

그리스산 올리브 잎 분획물의 이화학적 특성 및 생리활성

최남영 · 신한승
동국대학교 식품공학과

Physicochemical Properties and Physiological Activities of Olive Leaf (*Olea europaea* L. var. Kalamata) Fractions

NamYoung Choi and Han-Seung Shin

Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Korea

Abstract

Antioxidant activity and nitrite scavenging ability of olive leaf fractions cultivated in Greece(*Olea europaea* L. var. Kalamata) was evaluated. Oleuropein in olive leaf was found as the major phenolic compound and showed a high contents in butanol fractions. Superoxide dismutase(SOD)-like activity, 1,1-diphenyl-2-picryl hydroxyl (DPPH) radical scavenging activity and inhibitory activity on the auto-oxidation rate of the linoleic acid were investigated for antioxidant activity of olive leaf. SOD-like activity of olive leaf extract was ranged from 0 to 24.71%. DPPH radical scavenging activity was increased with ethanol extract of olive leaf cultivated in Greece. Inhibitory activity on auto-oxidation rate of linoleic acid and nitrite scavenging ability were also observed from acetate fraction of olive leaf extracts.

Key words: olive leaf, oleuropein, antioxidant, sod, dpph, linoleic acid, nitrite scavenging ability

서 론

올리브란 하나의 식물계와 그에 대한 대표적인 속(屬)에 대해서 뿐만 아니라, 올리브 나무에 열리는 나무에도 공통적으로 사용하는 명칭으로 24개의 속(屬)에 약 900여 종(種)이 존재하며 스페인, 이태리, 그리스 등이 주요 올리브 생산 국가이다. 현재 올리브가 미치는 건강상의 이점에 대한 관심이 높아짐으로 인해 세계의 여러 국가 및 지역(미국, 캐나다, 일본 등)에서도 재배하고 있으며 열매는 생과 그대로 사용하거나 올리브유의 원료로, 잎은 이태리 요리의 향신료나 약용식품으로 현재까지 이용되어 왔다.

약용식품으로써 올리브 잎은 말라리아 고열 등을 치료하는 목적으로 민간 의약품으로 사용되었고 또

한 고혈압, 아테롬성 동맥경화증, 결장암, 염증, 식중독 등의 증상에 효능이 있고 특히 올리브 잎 추출물은 혈압을 낮추거나 관상동맥의 혈류 속도를 증가, 부정맥을 완화, 소장 근육의 경련을 예방하는 등의 능력이 있는 것으로 알려져 있으며 최근에는 AIDS(Acquired Immune Deficiency Syndrome)에도 효능이 있는 것으로 알려져 있다 (Campeol et al., 2003; Flamini et al., 2003; Garcia-Gomez et al., 2003; Ryan et al., 2003).

올리브 잎의 주요 생리활성 물질은 페놀성 화합물들로 hydroxytyrosol, tyrosol, catechin, caffeic acid, vanillic acid, p-coumaric acid, diosmetin, vanillin, rutin, oleuropein, demethyloleuropein, oleuroside, verbascoside, ligstroside, flavonoid glycosides including luteolin 7-rutinoside, luteolin 4-glucoside, apigenin 7-glucoside, apigenin 7-rutinoside 등이 있다. 특히 이들 성분 중 oleuropein 은 올리브 잎에 가장 많이 함유되어 있는 페놀성 물질로 최근에는 oleuropein의 생리활성에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데 생리활성물질은 매우

Corresponding author: Han-Seung Shin, Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul, 100-715, Korea
Phone: +82-2-2260-8590, Fax: +82-2-2260-8590
E-mail: spartan@dongguk.edu

적은 양으로도 인체 내에서 현저한 활성을 나타내는 고부가가치 물질로 많은 종류가 유용하게 쓰이고 있다(Bianco et al., 2000; Ryan et al., 2002).

Oleuropein은 올리브 열매와 잎에 함유된 주요 페놀화합물로서 세균, 바이러스, 진균 등과 같이 인체에 해로운 미생물에 대한 저항력을 향상, 고혈압 완화, 산화 방지 효과, 혈당 조절 기능 등 다양한 질병의 치료·보조 기능이 있는 물질로 밝혀지고 있어 올리브 잎으로부터 추출한 페놀성 성분들로부터 이러한 질병에 대한 연구로 이어지고 있으며(Raffaella & Patumi, 2002).

여러 연구에서 보여 지듯이 기능성 물질로서의 올리브 잎과 그 추출물에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있고 인체에 미치는 그들의 영향이 밝혀지고 있으나 국내에서는 아직 그 연구가 활발하게 이루어지지 않고 있다. 또한 그 동안은 주로 올리브의 열매에서 짜낸 기름만 이용하였지만 최근에는 올리브 잎에서 추출한 기능성 물질에 포커스가 맞춰지고 있다.

따라서 본 연구에서는 기능성 식품의 소재로써 그리스산 올리브 잎의 항산화기능과 아질산염 소거능력을 평가해 올리브 잎의 식품가공과 건강기능식품 제조 시 활용될 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

그리스(*Olea europaea* L. var. Kalamata) 산 올리브 잎을 준비하여 잘 씻어 이물질을 제거하고 자연 건조 시킨 후 30 mesh 전후로 조분쇄하여 시료로 사용하였다.

올리브 잎 80%에탄올 추출물 & 유기용매 분획물의 제조

30 mesh 전후로 조분쇄 된 올리브 잎 25 g에 10 배의 80% 에탄올을 첨가하고 soxhlet 장치를 이용하여 환류냉각하며 3시간동안 80°C 수욕상에서 3회 반복 추출하였다. 이를 여과한 후 24시간 동안 4°C에서 정치시키고 재 여과하였다. 이 용액을 70°C에서 rotary vacuum evaporator(R-124, BUCHI, Switzerland)를 이용하여 감압농축한 후 동결 건조하여 올리브 잎 에탄올 추출물을 제조하였고 이 올리브 잎 에탄올 추출물을 극성의 차를 이용해 서로 다른 용매를 첨가하여 단계적으로 분획하였다. 올리브 잎 에탄

올 추출물을 물에 녹여 분획깔때기에 넣고 hexan을 첨가하여 hexan층과 물층을 분획하였고 이를 다시 감압 농축하여 hexan 분획물을 얻었다. 동일한 과정을 통해 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었고 최종 남은 용액은 물분획물이라 칭하였다. 이들 분획물들을 감압, 농축하였고 동결 건조하여 용매를 제거한 후 실험에 사용하였다.

총 플라보이드 & 총 페놀 함량 분석

총 flavonoid 함량은 올리브 잎 80%에탄올 추출물 및 용매 분획물을 일정량 취해 50% methanol 용액 5 mL로 mass-up한 후 이 시료 용액 1 mL와 diethylene glycol 10 mL, 1N-NaOH용액 1 mL 가하여 혼합시킨 후, 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 표준검량곡선은 naringin (Sigma, Saint Louis, USA,)을 이용하여 작성하였다.

시료의 페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 것을 이용한 Folin-Dennis법(Teresa et al., 1995)을 이용하여 측정하였다.

일정량의 Dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹인 시료 1 mL, 증류수 7 mL, Folin-Dennis 시약 0.5 mL를 첨가하고 정확히 3분 후에 sodium carbonate anhydrous 포화용액 1 mL, 증류수 0.5 mL를 넣은 후 725 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 tannic acid(Fluka, Buchs, Switzerland)를 이용하여 작성하였다. Folin-Dennis시약은 sodium tungstate 10 g, phosphomolybdic acid 2 g, phosphoric acid 5 mL에 증류수를 가한 후(시료가 녹을 만큼 충분히) 80°C 수욕상에서 환류냉각하여 사용하였다.

HPLC에 의한 페놀성 화합물 분석

페놀성 화합물 분석은 HPLC(UVD340U, DIONEX, Munich, Germany)를 이용하여 분석을 하였다. 80% 올리브 잎 추출물과 각각의 용매 분획물을 메탄올에 녹인 후 0.45 µL membrane filter로 여과하여 사용하였다.

이 때 사용한 컬럼은 µ-Bondapak C₁₈(300× 3.9 mm, Waters, USA), 용매는 0.2% KH₂PO₄(pH3) / acetonitrile (85:15), 이동 속도는 1.5 mL/min, 검출기는 UV detector(검출파장 280 nm), 시료 주입량

은 20 μL 이었다. 표준 시료는 Catechin(Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan), Caffeic acid (Sigma, Saint Louis, USA), Vanillin(Junsei, Tokyo, Japan), Rutin(Across, New Jersey, USA), Oleuropein (Chromadex, California, USA)을 사용하였다. 단, Oleuropein의 분석 조건은 위와 다르게 하였는데 용매는 water(pH2.5, H_3PO_4) / acetonitrile(77.5:22.5), 검출기는 UV detector(검출파장 240 nm), 이동속도와 시료 주입량은 위의 조건과 동일하였다.

SOD 유사활성 (Superoxide dismutase-like activity) 측정

Marklund *et al.*(1975)의 방법으로 측정하였다. 일정농도의 시료 0.2 mL, Tris-HCl buffer(50 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane + 10 mM EDTA (pH8.5로 보정) 3 mL, 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL)을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키고 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨다. 반응액 중 산화된 pyrogallo의 양은 420 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성능 (%) = $(1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도}) \times 100$

DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 제거능

Chu *et al.*(2000)의 방법에 따라 일정농도의 추출물 0.2 mL에 4×10^{-4} M DPPH용액 0.8 mL를 가하고 10초간 혼합한 뒤 상온에서 10분간 방치 후 525 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 제거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

DPPH radicals scavenging activity(%) = $(1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도}) \times 100$

Linoleic acid 자동산화 억제활성

Kiharu *et al.*(1990)의 방법을 변형하여 측정하였다. 처리 농도별로 일정량의 시료에 99.5% 에탄올 2 mL, 에탄올로 희석한 2.5% linoleic acid 2.05 mL, 1시간 이상 aeration 시킨 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0) 4 mL를 가한 후 증류수를 첨가하여 총량이 10 mL가 되도록 조정한 후, 이 용액을 70°C 압소에서 24시간 동안 반응 시키면서 3시간 간격으

로 반응액 0.1 mL를 취하여 75% 에탄올 9.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL, 3.5% HCl과 0.02 M ferrous chloride의 혼합용액 0.1 mL를 차례로 첨가하여 상온에서 3분간 반응 시킨 후 UV/VIS spectrophotometer를 사용해서 500 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

Nitrite 분해능

Gray & Dungan(1975) 방법에 따라 일정 농도의 시료 1 mL에 1 mM NaNO_2 용액 1 mL를 가한 뒤 0.1 N HCl로 반응 용액의 pH가 1.2가 되게 조절한 후 총량이 10 mL가 되도록 하였다. 1시간동안 37°C에서 반응 시킨 이 용액을 1 mL 취해 2% acetic acid 5 mL, Griess시약(30% acetic acid 로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine의 1:1 비율 혼합액으로 사용 직전에 조제함.) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 상온에서 15분간 반응시키고 UV/VIS spectrophotometer를 사용해서 520 nm에서 흡광도를 측정하여 남아있는 아질산량을 구하였다. 대조구는 Griess 시약대신 동량의 증류수를 가하여 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

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

N: nitrite scavenging ability, A: 시료첨가구 흡광도
B: 1 mM NaNO_2 의 흡광도, C: 대조구의 흡광도

통계처리

모든 측정값은 평균값 \pm 표준편차(Mean \pm S.D.)로 표시하였고 각 실험군간의 통계학적 분석은 Windows 용 Sigma-Stat 2.0(Jandel Corp. San Rafael, CA, USA)를 이용하였다. 각 군간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하였으며 유의성은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 판단하였다.

결과 및 고찰

총 플라보이드 & 총 페놀 함량 분석

올리브 잎 80% 에탄올 추출물과 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물에 대한 총 플라보노이드와 총 페놀 함량을 비교한 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

총 플라보이드 함량은 에틸아세테이트 분획물이 24.7%로 가장 높은 함량을 나타냈고 핵산과 물 분획물에서는 그 함량이 낮았다. 총 페놀 함량의 경우도 에틸아세테이트 분획물이 17.6%로 가장 높았으며 핵산과 물 분획물에서 상대적으로 페놀함량이

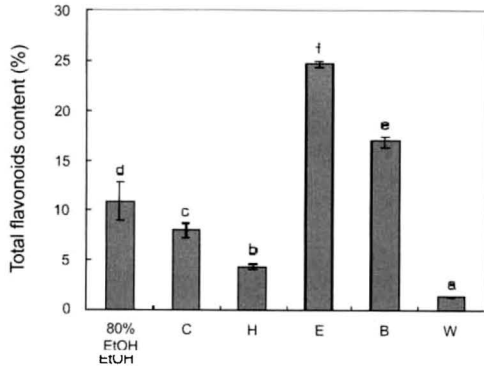


Fig. 1. Total flavonoid contents of olive leaf fractions raised in Greece.

80% EtOH : 80% ethanol extract, C : Chloroform fraction, H: Hexane fraction, E : Ethyl acetate fraction, B : Butanol fraction, W : Water fraction

^{a-f}Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$) by Student-Newman-Keuls Method.

All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

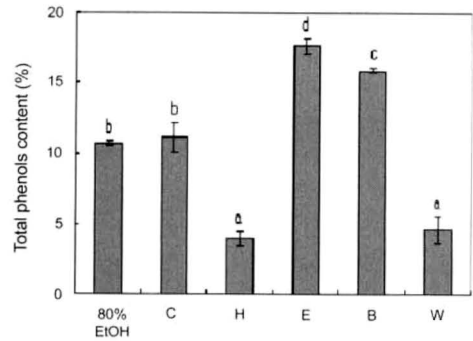


Fig. 2. Total phenol contents of olive leaf fractions raised in Greece.

80% EtOH : 80% ethanol extract, C : Chloroform fraction, H: Hexane fraction, E : Ethyl acetate fraction, B : Butanol fraction, W : Water fraction

^{a-d}Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$) by Student-Newman-Keuls Method.

All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

낮아 플라보노이드와 비슷한 양상을 나타냈다.

동일 조건에서 올리브 잎 분획물의 플라보노이드와 페놀 함량을 분석한 결과에서 플라보노이드의 함량은 1.5~7.13%, 페놀함량은 3.4~17.5%의 수준으로 나타나 본 실험에서 보다 낮은 함량을 보였다. 하지만 부탄올 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 올리브 잎 80%에탄올 추출물의 플라보노이드와 페놀 함량이 상대적으로 높은 값을 나타내며 물, 헥산 분획물의 함량이 상대적으로 낮은 값을 나타냈다는 점에서는 유사한 결과를 나타냈다.

HPLC에 의한 용매별 분획물의 페놀성 화합물 함량 올리브 잎 80% 에탄올 추출물과 분획물에 대한

페놀성 화합물의 함량을 비교한 결과를 Table 1에 나타냈고 HPLC에 의한 oleuropein의 chromatogram을 Fig. 3에 나타냈다. 올리브 잎 분획물의 주요 페놀성 물질은 oleuropein이었고 부탄올 분획물에서 그 함량이 유의적으로 높았으며 물 분획물에서는 페놀성 화합물이 거의 검출되지 않았다. Oleuropein은 세균이나 바이러스, 진균 등과 같이 인체에 해로운 미생물에 대한 저항력을 향상 시켜 고혈압 완화, 산화 방지 효과, 혈당 조절 기능 등 다양한 질병의 치료·보조 기능이 있는 물질로 밝혀지고 있는데 올리브 잎의 페놀성 화합물을 측정 한 논문에서 올리브 잎의 주요 페놀성 물질을 oleuropein이라고 보고 하여 본 실험과 비슷한 결과를 나타냈다 (Ryan et al., 2002; Silva et al., 2006).

Table 1. Phenolic compound contents of olive leaf fractions raised in Greece

(mg/100g)^{2),3)}

Samples	Catechin	Caffeic acid	Vanillin	Rutin	Oleuropein
80% EtOH	0.07±0.02 ^a	ND	0.002±0.0006 ^b	0.13±0.03 ^d	4.21±0.57 ^b
Hexane fr.	ND ¹⁾	0.03±0.04 ^a	0.003±0.002 ^b	0.02±0.004 ^{ab}	3.92±0.43 ^b
Chloroform fr.	ND	0.03±0.04 ^a	0.003±0.002 ^b	0.06±0.007 ^c	0.32±0.03 ^a
Ethyl acetate fr.	ND	0.10±0.001 ^a	0.002±0.001 ^b	0.17±0.009 ^c	5.76±0.32 ^c
Butanol fr.	0.14±0.01 ^b	0.02±0.01 ^a	0.02±0.0 ^a	0.008±0.005 ^a	32.47±0.25 ^d
Water fr.	ND	ND	0.002±0.0008 ^b	0.04±0.02 ^{bc}	ND

¹⁾ND=Not detected

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determined.

³⁾Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$) by Student-Newman-Keuls Method.

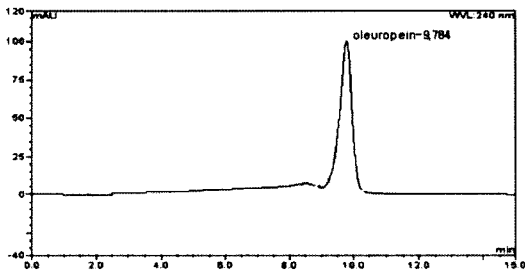


Fig. 3. HPLC chromatogram of Oleuropein standard (300 µg/mL).

올리브 잎 분획물의 SOD 유사활성

올리브 잎 분획물의 SOD 유사활성은 0~24.71%의 범위이었으며 올리브 잎80% 에탄올 추출물에서 가장 높은 활성을 나타냈고 농도 의존적으로 증가하였다(Table 2). 본 실험 결과를 오가피(13.5%), 구기자 (21.27%), 천문동(11.7%), 복분자(13.2%), 갈근 (17.13%), 생강(9.03%), 싸리추출물(20~44.08%) 등 한국산 약용식물 82종의 SOD 유사활성을 알아본 연구(37)의 결과와 비교해보면 3-4종의 약용식물을 제외하고는 1,000 ppm 농도에서 SOD 유사활성이 더 높거나 비슷한 결과를 나타냈다. SOD는 사람과 동물의 장기와 혈액 내에 존재하는 생리활성 효소로 유해 산소를 제거하는 역할을 하게 되며 SOD 유사활성물질은 phytochemical에 속하는 물질이 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide radical의 반응성을 억제하여 생체를 보호한다고 보고되어 있다 (Murakami et al., 2003).

올리브 잎 분획물에서 페놀성 화합물에 의한

phytochemical 성분들의 영향으로 SOD 유사활성이 있음이 확인되었고 이러한 SOD 유사활성을 갖는 물질을 섭취하는 것은 생체내의 superoxide를 제거 시킴으로써 노화억제와 산화를 예방할 수 있는 방법이라 할 수 있겠다.

올리브 잎 분획물의 DPPH radical 제거능

올리브 잎 80%에탄올 추출물과 클로로포름 분획물에서 비교적 높은 활성을 나타냈으며, 처리농도가 증가함에 따라 올리브 잎 분획물의 DPPH radical 제거활성이 5.90~56.86%로 증가함을 확인할 수 있었다(Table 3).

올리브 잎 분획물의 DPPH radical 제거활성은 약용식물인 국내산 참당귀 43%, 연명초 60.0%의 radical 제거활성과 유사하게 나타났고, catechin류에 의해 대표적인 항산화 물질로 알려진 녹차의 DPPH radical 제거활성이 50.56%로 보고되어 올리브 잎 분획물의 항산화 효과가 우리에게 잘 알려진 약용식물에 비하여 뒤지지 않는다는 것을 확인할 수 있었다 (Hassan & Fan, 2005; Sanchez et al., 2007).

세포가 성장하고 자라면서 발생하는 free radical에 의해 세포가 산화되어 손상되는데 페놀성 화합물은 환원성이 강해서 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 항산화 능력이 있다고 알려져 있다. DPPH는 자체가 안정한 free radical을 지니고 있는 화합물로 항산화물질에 의해 환원되어 항산화능력을 확인하는데 널리 사용되는 물질이다. 위와 같은 결과로 올리브 잎 분획물에서도 free radical에

Table 2. Superoxide dismutase-like activity (SOD like activity)of olive leaf fractions raised in Greece

Samples	SOD like activity (%) ^(2,3)		
	100 ppm	500 ppm	1,000 ppm
Chloroform fr.	2.25±0.61 ^a	2.83±0.83 ^b	4.99±0.88 ^b
Butanol fr.	1.96±0.17 ^a	3.24±0.29 ^b	4.31±0.61 ^b
Ethyl acetate fr.	ND ¹⁾	0.88±0.00 ^a	3.33±0.17 ^b
80% EtOH	8.73±0.74 ^c	16.86±0.61 ^c	24.71±0.59 ^c
Hexane fr.	3.33±0.17 ^b	ND	ND
Water fr.	ND	ND	0.78±0.17 ^a

¹⁾ND=Not detected

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determined.

³⁾Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p<0.05$) by Student-Newman-Keuls Method.

Table 3. DPPH radical scavenging activity of olive leaf fractions raised in Greece

Samples	DPPH radical scavenging activity (%) ^(1,2)		
	100 ppm	500 ppm	1,000 ppm
Chloroform fr.	18.11±0.07 ^f	27.45±0.10 ^c	51.48±0.10 ^c
Butanol fr.	8.64±0.06 ^b	16.4±0.03 ^b	27.08±0.10 ^b
Ethyl acetate fr.	5.90±0.42 ^a	15.11±0.06 ^a	29.55±0.39 ^c
80% EtOH	13.38±0.00 ^d	38.91±0.07 ^e	56.86±0.08 ^f
Hexane fr.	15.93±0.12 ^c	31.51±0.08 ^d	41.36±0.11 ^d
Water fr.	10.05±0.03 ^c	16.38±0.00 ^b	21.31±0.56 ^a
Vit. C	26.05±0.10 ^e	50.43±0.10 ^h	71.50±0.60 ⁱ
Vit. E	27.26±0.07 ^b	45.84±0.07 ^e	67.04±0.10 ^h
BHT	25.90±0.16 ^e	41.86±0.07 ^f	66.60±0.13 ^e

¹⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determined.

²⁾Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p<0.05$) by Student-Newman-Keuls Method.

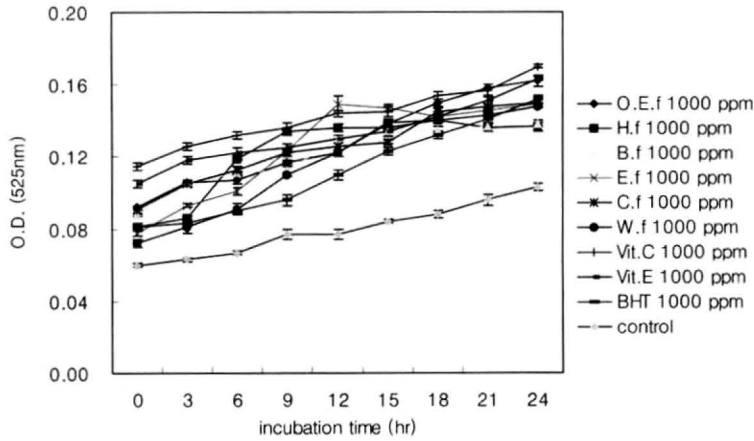


Fig. 4. Antioxidant effects of olive leaf fractions (concentration of 1,000 ppm) raised in Greece on the autoxidation rate of the linoleic acid store at 70°C.
 Mean±SD are significantly different ($p<0.05$) by Student-Newman-Keuls Method. All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력이 있음이 확인되었으며 이는 올리브 잎의 페놀성 화합물의 작용으로 판단된다.

Linoleic acid 자동산화억제활성

자동산화 과정은 두 개의 radical이 안정한 화합물을 생성함으로써 반응이 종결되는 것인데 이 과정에서 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하게 하는 환원성이 강한 물질을 필요로 하게 된다. 항산화제는 이러한 free radical을 제거하는 역할을 하게 되는데 주로 페놀성 화합물이 이러한 기능을 갖고 있으며 올리브 잎의 주요 페놀성 화합물인 oleuropein과 hydroxytyrosol이 linoleic acid 자동산화를 억제하는 능력이 있다고 보고되었다 (Park, 2005).

Linoleic acid와 함께 시료를 처리하여 지질과산화물을 억제하는 정도는 Fig. 4와 같다. 시간 경과에 따라 농도 의존적으로 비교적 일정하게 산화억제활성을 나타냈다. 올리브 잎 80%에탄올 추출물의 경우 시간 경과에 따라 Vit. C, Vit. E, BHT와 동일한 수준으로 항산화력을 나타냈으며 클로로포름 분획물, 물 분획물의 순으로 산화억제활성을 확인할 수 있었고 이것 역시 추출물 내에 존재하는 phenol류의 작용으로 linoleic acid의 자동산화 억제활성을 보인 것이라 생각된다.

아질산염 소거능력 평가

발암물질인 Nitrosamine 생성의 원인물질인 nitrite 제거활성을 확인한 결과를 Table 4에 나타냈다. 헥산과 물 분획물을 제외하고는 올리브 잎 분획물의 아질산염 소거능력은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며 1,000 ppm 농도 기준으로 높은 활성을 나타냈다. 한약재로 쓰이는 약용식물 추출물의 아질산염 소거능을 살펴본 연구에 따르면 동일 조건에서 당귀35%, 목통42%, 골담초33%, 쥘레 영

Table 4. Nitrite scavenging activity of olive leaf fractions raised in Greece

Samples	Nitrite scavenging activity(%) ^(2,3)		
	100 ppm	500 ppm	1,000 ppm
Chloroform fr.	ND ¹⁾	9.80±0.87 ^a	70.60±0.00 ^a
Butanol fr.	ND	26.50±0.00 ^b	74.00±0.87 ^b
Ethyl acetate fr.	28.90±0.87 ^b	65.70±0.87 ^f	83.80±0.00 ^d
80% EtOH	ND	9.33±1.67 ^a	75.00±1.50 ^b
Hexane fr.	ND	ND	ND
Water fr.	ND	ND	ND
Vit. C	34.5±0.49 ^b	63.2±0.45 ^c	91.5±0.62 ^e
Vit. E	28.7±0.46 ^c	55.4±0.97 ^d	83.8±0.90 ^d
BHT	26.6±0.70 ^a	47.8±0.40 ^c	79.5±0.87 ^c

¹⁾ND=Not detected

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determined.

³⁾Means in the same column not sharing a common letter are significantly different ($p<0.05$) by Student-Newman-Keuls Method.

지버섯 64%의 제거능을 나타냈다. 또한 노화질환을 예방하고 항산화능력이 있다고 알려진 솔잎 추출물과 쑥 추출물 등은 각각 77.85%, 37%의 아질산염 소거능을 나타내 본 실험에서 사용한 올리브 잎 분획물의 제거활성은 높은 수준의 활성을 보인 것이라 생각된다 (Song *et al.*, 2003).

식품 중에 함유되어 있는 nitrate 자체는 해롭지 않지만 nitrate reductase에 의해 아질산염으로 환원되면 독성을 가지게 된다. 식품의 뿌리나 잎에서 만 들어지는 모든 화학물질을 통틀어 일컫는 개념으로 식물 중에 존재하는 성분들 중 인체에 유익한 생리활성을 가진 성분들을 phytochemical이라 한다. 이러한 phytochemical 중 플라보노이드나 페놀성 화합물은 radical acceptor으로써 좋은 conjugated double bond 구조로 환원성이 강해 free radical에 전자를 공여하여 nitrite scavenger 역할을 하게 된다.

위와 같은 결과로 올리브 잎 분획물에서도 oleuropein과 같은 phytochemical 성분들의 영향으로 free radical에 전자를 공여하여 발암물질인 nitrosamine을 억제하는 능력이 있음이 확인되었다.

요 약

용매별 그리스산 올리브 잎 분획물의 총 플라보노이드 및 페놀 함량에서는 에틸아세테이트 분획물, 올리브 잎 80%에탄올 추출물, 부탄올 분획물 등이 다른 분획물보다 높은 함량을 나타냈으나 헥산과 물 분획물은 상대적으로 낮은 함량을 보였다. 올리브 잎 80% 에탄올 추출물과 분획물에 대한 페놀성 화합물의 함량을 비교한 결과 올리브 잎의 주요 페놀성 물질은 oleuropein이었고 다른 분획물들에 비해 부탄올 분획물에서 그 함량이 높게 나타났으며 물 분획물에서는 페놀성 화합물이 검출되지 않거나 혹은 그 함량이 매우 낮았다.

SOD 유사활성능은 0~24.71%의 범위로 분석되었으며 올리브 잎 80% 에탄올 추출물에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 처리농도가 증가함에 따라 올리브 잎 분획물의 DPPH radical 제거활성은 5.90~56.86%로 증가하였으며 이중 1,000 ppm 기준 올리브 잎 80%에탄올 추출물이 비교적 높은 활성을 나타내 올리브 잎 분획물에서도 phenolic 물질에 의한 작용으로 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 효과가 있음이 확인되었다. Linoleic acid와 함께 시료를 처리하여 지질과산화물을 억제하는 정도를 측정 한 결과 시간 경과에 따라 농도 의존적

으로 비교적 일정하게 산화억제활성을 나타냈고 올리브 잎 80%에탄올 추출물의 경우 시간 경과에 따라 Vit. C, Vit. E, BHT와 동일한 수준으로 항산화력을 나타냈다.

발암물질인 Nitrosamine 생성의 원인물질인 nitrite 제거활성을 확인한 결과 헥산과 물 분획물을 제외하고는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈으며 에틸아세테이트는 83.80%의 높은 아질산염 소거능을 나타냈다.

참고문헌

- Bianco A and Uccella N. 2000. Biophenolic components of olives. *Food Res. Int.* **33**: 475-485
- Campeol E, Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Cremonini R and Ceccarni L. 2003. Volatile fractions from three cultivars of *Olea europea* L. collected in two different seasons. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 1994-1999
- Chu Y.H, Chang CL and Hsu H.F. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 561-566
- Flamini G, Cioni PL and Morelli I. 2003. Volatiles from leaves, fruit, and virgin oil from *Olea europea*. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 1382-1386
- Garcia-Gomez A, Roig A and Bernal MP. 2003. Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource. Technol.* **86**: 59-64
- Gray JI and Dugan JRL. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J. Food Sci.* **40**: 981-985
- Hassan O and Fan LS. 2005. The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM). *LWT* **38**: 315-321
- Kiharu I, Miho I. and Toshimi H. 1990. Major antioxidative substances in leaves of Satsumi-kabu. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1053-1055
- Marklund S and Marklund G. 1975. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 468-474
- Murakami A, Takahashi D, Koshimizu K and Ohigashi H. 2003. Synergistic suppression of superoxide and nitric oxide generation from inflammatory cells by combined food factors. *Mutat. Res.* **523**: 151-161
- Park CS. 2005. Antioxidative and Nitrite Scavenging Abilities of Medicinal Plant Extracts. *Korean J. Food Preser.* **12**: 631-636
- Raffaella B and Patumi M. 2002. *Olea europea* L. Leaf Extract and Derivatives: Antioxidant Properties. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4934-4940

- Ryan D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K and Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Hort.* **92**: 147-176
- Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M and Robards K. 2003. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive *Olea europaea* cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 2532-2538
- Sanchez CS, Gonzalez AMT, Garcia-Parrilla M.C, Granados J.J.Q, Serrana H.L.G and Martinez M.C.L. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta.* **593**: 103-107
- Silva S, Gomes L, Leitao F, Coelho AV and Vilas Boas L. 2006. Phenolic compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Sci. Technol. Inter.* **12**: 385-395
- Song JH, Lee HS, Hwang JK, Chung TY, Honh SR and Park KM. 2003. Physiological Activities of *Phellinus ribis* Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 690-695
- Teresa-Sartue M, Huang SW and Frankel EN. 1995. Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached and deodorized olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**: 1131-1137