



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

에탄올 농도에 따른 산딸나무
열매 추출물의 항산화 활성

**Antioxidant activity of *Cornus kousa* fruit extracted
in different ethanol concentrations**

濟州大學校 大學院

農學科

高 鉉 民

2019年 2月

에탄올 농도에 따른 산딸나무 열매 추출물의 항산화 활성

指導教授 金 柱 成

高 鉉 民

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

2018年 12月

高鉉民의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

濟州大學校 大學院

2018年 12月

목 차

LIST OF TABLE	iii
LIST OF FIGURE	IV
ABSTRACT	V
I. 서론	1
II. 연구사	3
III. 연구목적	10
IV. 재료 및 방법	11
1. 시료 및 추출물의 제조	11
2. 추출물의 성분 분석	11
1) 총 당 및 환원당 함량 분석	11
2) 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석	12
3) HPLC를 이용한 추출물의 폴리페놀 성분 분석	12
4) 총 안토시아닌 함량 분석	14
3. 추출물의 항산화 활성 측정	14
1) DPPH radical 소거능 측정	14
2) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)	15
3) Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	15
4) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	15
4. HepG2 세포 모델에서 추출물의 항산화 활성 측정	16
1) HepG2 세포 배양	16
2) 세포 생존율 및 산화스트레스로부터 세포 보호 효과	16
3) 세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제능	16
5. 통계분석	17
V. 연구결과 및 고찰	18
1. 산딸나무 열매 추출물의 추출수율	18

2. 산딸나무 열매 추출물의 성분 분석	19
1) 총 당 및 환원당 함량	19
2) 총 페놀 및 플라보노이드 함량	21
3) HPLC를 이용한 추출물의 폴리페놀 성분 분석	23
4) 총 안토시아닌 함량	28
3. 산딸나무 열매 추출물의 항산화 활성	30
1) DPPH radical 소거능	30
2) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)	32
3) Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	34
4) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	35
4. HepG2 세포 모델에서 산딸나무 열매 추출물의 항산화 활성	36
1) 세포 생존율 및 산화스트레스로부터 세포 보호 효과	36
2) 세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제능	39
5. 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성의 상관관계 분석	41
VI. 결론	43
VII. 적요	45
인용문헌	46

LIST OF TABLES

Table 1.	Analysis conditions of polyphenol compounds using HPLC	13
Table 2.	Retention time of polyphenol compound standards	13
Table 3.	Extraction yield of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	18
Table 4.	Total sugar and reducing sugar content of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	20
Table 5.	Total phenol and flavonoid content of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	22
Table 6.	Polyphenol compounds content of the <i>Conrus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	24
Table 7.	Total anthocyanin content of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	29
Table 8.	DPPH radical scavenging activity of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	31
Table 9.	Trox equivalent antioxidant capacity of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	33
Table 10.	Ferric reducing antioxidant power of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	34
Table 11.	Oxygen radical absorbance capacity of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	35
Table 12.	Hepatoprotective effect on TBHP-induced cytotoxicity of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	38
Table 13.	Intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging activity of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	40
Table 14.	Correlation analysis between total phenol and flavonoid content and antioxidant activity of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	42

LIST OF FIGURES

Fig. 1.	Fruit of <i>Cornus kousa</i>	2
Fig. 2.	Basic structure of flavonoid	8
Fig. 3.	Classification of polyphenols	8
Fig. 4.	HPLC Chromatogram of the <i>Cornus kousa</i> fruit extract analyzed at 245 nm	25
Fig. 5.	HPLC Chromatogram of the <i>Cornus kousa</i> fruit extract analyzed at 260 nm	26
Fig. 6.	HPLC Chromatogram of the <i>Cornus kousa</i> fruit extract analyzed at 320 nm	27
Fig. 7.	HepG2 cell viability of the <i>Cornus kousa</i> fruit extracted in different ethanol concentrations	37

ABSTRACT

In this study, for the purpose of using *Cornus kousa* fruit as a material for health functional foods, the total sugar and reducing sugar content, total phenol and flavonoid content, total anthocyanin content and individual component analysis of polyphenol compounds were performed by extracts of ethanol concentration (distilled water, 20, 40, 60, 80, 100%). Antioxidant activity was also measured by measuring DPPH radical scavenging ability, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), HepG2 cytoprotective effect and ROS production inhibitory activity.

Total sugar content of extracts was 834.89 mg glucose/g in 100% ethanol extract and 559.49 and 561.44 mg glucose/g in 80% ethanol extract and 100% ethanol extract, respectively. The contents of total phenol, flavonoid and anthocyanin were 20.08 mg GAE/g, 0.86 mg QE/g and 23.37 mg C3GE/100 g, respectively, in the 60% ethanol extract.

Catechin was identified as a major polyphenol compound of the *C. kousa* fruit. The protocatechuic acid, syringic acid, gallic acid and chlorogenic acid were detected. The total content of polyphenol compounds detected was also the highest at 358.47 $\mu\text{g/g}$ in 60% ethanol extract.

The results of analysis of DPPH radical scavenging ability, TEAC, FRAP and ORAC of extracts showed that 60% ethanol extract had the highest antioxidant activity. In addition, the protective effect of extracts for HepG2 cells induced oxidative stress by TBHP showed a concentration-dependent protection effect at 5~20 $\mu\text{g/mL}$, and was best in 60% ethanol extract. The intracellular ROS production inhibitory activity of the extracts increased in a concentration dependent manner at 5~20 $\mu\text{g/mL}$ and showed the highest activity in 60% ethanol extract. Therefore, in this study, it was confirmed that the 60% ethanol extract of *C. kousa* fruit had the highest total phenol and flavonoid content, antioxidant activity, protective effect of

HepG2 cells induced by oxidative stress and inhibition of intracellular ROS production, and suggested that it could be used as a health functional food material.

I. 서론

활성산소는 호기성 생물이 호흡하면서 체내로 유입된 산소가 대사 과정 중 생성된 불안정한 유리 라디칼로서 생체에 감염을 일으키는 물질을 차단하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Jeong, 1991; Lee, 2007; Kang and Kim, 2015). 하지만 스트레스, 대기오염, 대사율 증가 등으로 인해 활성산소가 체내에 과다 생성되는 경우에는 DNA를 손상시키며 세포 괴사, 노화, 암, 성인병 등 인체에 악영향을 일으키는 것으로 보고되었다(Koksal et al., 2017). 체내에서 과다 생성되는 활성산소종을 억제해주는 방어체계에는 효소계 항산화제 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST)가 있으며 비효소적 항산화제로는 천연 항산화제인 vitamin A, vitamin C, phenolic acid, flavonoid 등과 합성 항산화제 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT) 등이 있다(Lee and Lee, 2016). 하지만 합성 항산화제는 인체에 암을 비롯한 각종 질병 등 악영향을 주는 것으로 보고되면서 비교적 안전한 천연물에서 유래한 항산화제의 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

산딸나무(*Cornus kousa*)는 층층나무과 식물로 산여지 또는 산딸이라 불리며 우리나라 중부이남 또는 제주 한라산에서 자생한다(Fig. 1). 산딸나무의 높이는 7~12 m 정도이다. 잎은 달걀형으로 가장자리가 물결 모양이며 꽃의 길이는 3~8 cm로 백색의 꽃턱있는 네 장씩 십자 모양을 이루고 있는 것이 특징이다. 나무의 열매는 딸기 모양으로 10월 경 적색으로 성숙되고 지름 2.5 cm 안팎이다. 건조에 약하나 양지에서 잘 성장하며 꽃과 열매는 미관상 효과가 뛰어나다. 또한 공해에 강한 성질을 갖고 있어 가정이나 거리, 공원 등의 조경수로 많이 심기도 한다(조 등, 2012). 산딸나무는 예로부터 꽃과 열매를 약재로 사용하였으며 소창, 지사효과가 있다고 알려져 있다(So, 1994). 또한 예로부터 소화불량, 설사, 배탈 등에 효과가 있어 열매를 달여서 복용하였다.

따라서 본 연구에서는 산딸나무 열매를 에탄올 농도별로 추출하여 페놀성 화합물의 함량과 개별성분, 프리라디칼 소거능 및 세포 내에서의 항산화 활성을 비교·분석하였다.



Fig. 1. Fruit of *Cornus kousa*.

II. 연구사

1. 산딸나무

산딸나무의 주요 성분으로 잎에서 tannin과 gallic acid, isoquercetin 등의 페놀성 물질 등이 분리되었다(Ryu and Yook, 1971). Kim et al. (2008)은 산딸나무의 가지, 잎, 꽃, 열매를 각각 80% 에탄올로 환류냉각 추출하여 총 페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화활성, tyrosinase 억제활성을 분석하였다. 그 결과 꽃이 모든 부위를 통틀어 가장 우수한 활성을 지니고 있었으며 특히 tyrosinase 억제활성은 꽃에서 유일하게 나타났음을 보고하였다. 또한 활성이 비교적 높았던 꽃과 잎의 에탄올 추출물은 용매의 극성 순으로 분획하고 위와 동일한 실험을 진행하여 분획물의 활성을 보고한 바 있다. Kim et al. (2010)은 GC/MS를 사용하여 산딸나무 잎, 가지, 열매 혼합추출물에 대한 페놀화합물을 정량분석하였다. 그 결과 페놀 성분으로 quercetin, chlorogenic acid, caffeic acid, gallic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, catechin, protocatechuic acid가 검출되었으며 그 중 quercetin이 산딸나무의 주요 성분임을 보고하였다.

Kim et al. (2002)은 산딸나무 열매의 메탄올 추출물을 mouse와 백혈병 세포주 L210 및 HL60에 처리하여 면역조절기능을 검정한 결과, 세포 및 체액성 면역능력을 증가시키고 각 암세포의 세포사멸을 촉진시켜 다양한 면역조절기능을 가지고 있음을 보고하였다. 또한 Lee et al. (2006)은 산딸나무 열매를 메탄올로 추출하고 에틸아세테이트, 부탄올, 물로 분배 추출하여 에틸아세테이트 분획으로부터 sterol 화합물인 β -sitosterol, stigmast-4-en-6 β -ol-3-one, daucosterol 3종을 산딸나무 열매에서 최초로 분리하였다. 이 중 stigmast-4-en-6 β -ol-3-one는 지상식물에서 매우 드물게 존재하는 것으로 주로 해양식물에서 분리된 물질로 알려져 있음을 보고하였다. 열매에서 분리된 β -sitosterol은 지방암세포의 사멸을 유도하고 항염증과 해열작용 등의 기능이 보고된 바 있으며(Gupta et al., 1980; Awad et al., 2003), daucosterol은 암세포에 세포 사멸을 유도하고 증식을 억제하는 효과가 보고되었다(Zhao et al., 2015; Wang et al., 2016).

층층나무과 식물 6종의 안토시아닌 함량을 보고한 Vareed et al. (2006)에 의해

산딸나무 열매의 안토시아닌은 처음 보고되었다. 안토시아닌 cyanidin 3-O-galactoside, cyanidin 3-O-glucoside가 sample g당 각각 0.02, 0.16 mg 검출되었는데 cyanidin 3-O-galactoside와 cyanidin 3-O-glucoside는 산화적 스트레스에 강하고 항산화 효과가 우수하다고 보고된바 있다(Lee et al., 2009). 다른 안토시아닌 delphinidin 3-O-glucoside, delphinidin 3-O-rutinoside, delphinidin 3-O-galactoside, pelargonidin3-O-galactoside는 검출되지 않았으며 산딸나무 열매의 안토시아닌 함량은 6종의 층층나무과 식물 중에서 가장 적은 안토시아닌 함량이 확인되었다. Vareed et al. (2007)은 산딸나무 열매의 메탄올, 에틸아세테이트 분획에서 생물학적 분리 및 구명을 통해 myricetin 3-O-rhamnoside, kaempferol 3-O-glucoside, cornin, stenophyllin, ursolic acid, β -sitosterol을 분리하였으며 분리된 물질의 지질 과산화와 종양세포주의 억제활성을 보고하였다. 이 등(2010)은 산딸나무 열매에서 2차 대사산물 22종(lignans, triterpenoids, flavonoids, sterols)을 분리하였으며 분리된 lignan과 triterpenoid는 종양세포종인 HCT-116, HeLa, MCF-7에 세포 독성을 나타내었고 항암, 항고혈압, 항고콜레스테롤혈증의 활성이 있음을 보고하였다. 또한 산딸나무 열매의 열수 추출물과 40% 에탄올 교반 추출물은 xanthine oxidase와 α -glucosidase, tyrosinase, collagenase 그리고 HAase의 저해활성을 나타내 항산화, 항당뇨, 기능성 화장품 소재, 통풍억제 등의 기능이 있음을 보고하였다(Lee et al., 2015).

2. 활성산소

1) 활성산소의 생성

분자나 원자의 최외각 전자궤도에 짝을 이루지 못한 전자를 가지고 있는 활성산소는 호기성 생물이 생명을 유지하기 위한 호흡과정에서 꾸준히 생산되는 부산물이며, 체내로 유입된 산소가 미토콘드리아와 세포질에서 대사 과정 중 생성된 불안정한 유리 라디칼이다(Kang and Kim, 2015).

2) 활성산소의 생성 요인

활성산소는 생체 내부 및 외부 요인에 의해 생성된다. 생체 내부요인으로는 주로 세포 대사 및 산화효소·박테리아 작용이 있으며, 외부 요인으로는 대기오염,

흡연, 자외선 등이 있다(Ko et al., 2010).

3) 활성산소의 종류

활성산소의 종류로는 과산화수소(hydrogen peroxide), 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 일중항산소(singlet oxygen), 삼중항산소(triplet oxygen) 등이 있으며 불안정한 구조로 인하여 반응성이 크기 때문에 생체물질과 반응하게 되어 여러 종류의 피해를 유발시킨다.

4) 활성산소가 인체에 유발하는 피해

활성산소는 감염을 유발하는 이물질의 침입을 차단하여 생체를 방어하는 능력을 갖추고 있는 것으로 알려져 있다(Jeong, 1991; Lee, 2007). 하지만 생체 방어기전에 이상이 생기거나 물리, 화학적 요인이 작용하는 경우, 세포 내의 항상성에 불균형이 나타나 과량의 활성산소가 존재하게 되고 산화 스트레스를 유발한다(Yeon et al., 2013). 활성산소는 인체를 구성하는 기본물질인 일부 아미노산과 빠르게 반응함으로써 단백질 구조를 파괴하거나 변형을 일으켜 세포의 apoptosis를 유도하고 기능적 활성 소실, 유전자 조절 및 발현에 있어 기능을 상실시킨다. 또한 DNA를 직접적으로 손상시켜 돌연변이를 유발하고 핵산의 변형을 초래한다. 그 이외에도 노화, 암, 동맥경화, 염증, 중추신경장애, 허혈성 심장질환, 당뇨 등 인체에 악영향을 유발하는 것으로 알려져 있다(Koksal et al., 2017). 또한 활성산소는 인체의 기관에도 피해를 유발하는 것으로 알려져 있으며 그 예로 간세포가 있다. 간세포의 미토콘드리아는 주로 에너지 생성을 수행하고 있으며 비정상적인 세포를 분해하는 역할을 한다. 미토콘드리아는 아세틸 CoA 산화와 전자전달계를 통한 산화적 인산화에 관여하게 되는데 대사가 일어나는 내막에서 활성산소가 주로 생성된다고 알려져 있다. 활성산소가 과다 생성된 경우 세포막의 불포화지방산과 결합하여 지질과산화물을 유발하며 간세포의 산화적 손상을 일으킨다. 미토콘드리아의 주 기능인 호흡 연쇄 활성이 손상되는 경우에는 활성산소가 더 많이 발생하게 되고 따라서 산화적 스트레스가 나타나 염증, 섬유화, 간경화, 암 등에도 관여하는 것으로 보고되었다(건강기능식품 기능성 평가 가이드, 2015; Jang et al., 2016).

3. 항산화제

1) 효소계 항산화제

항산화효소는 체내에서 활성산소종에 의한 피해를 억제해주는 역할을 하며, 그 종류에는 SOD, CAT, GPx, GR, GST 등이 있다. SOD는 초과산화이온을 과산화수소와 산소로 변환하여 세포에 나타나는 독성을 완화시켜주는 효소로, 그 종류에는 시토질의 Cu/Zn을 가지는 SOD, 미토콘드리아 막의 Mn을 가지는 SOD 등이 존재한다. CAT는 SOD에 의해 환원된 과산화수소 이외에도 포유동물 세포의 peroxisome의 효소, xanthine oxidase와 미토콘드리아 전자전달계에서 생성된 과산화수소를 독성이 없는 물과 산소로 분해하여 활성산소로부터 세포를 보호하는 역할을 한다(Choe et al., 2003; Boo et al., 2011). GPx는 여러 조직 내에 존재하며, 활성부위에 셀레늄을 함유하고 환원형 glutathione (GSH)를 산화형 glutathione (GSSG)로, 과산화수소를 물로 환원시키는 촉매역할을 한다. GR은 포유동물 조직 내의 존재하는 flavoprotein으로 시토질에 위치하고, NADPH 존재하에 GSSG를 GSH로 환원시켜 간접적으로 세포를 보호함으로써 항상성 유지에 기여한다(Kim and Han, 2018). GST는 내·외재적으로 electrophilic compounds의 해독에 관여하며, GPx에 의해 프리라디칼을 제거함으로써 산화스트레스로부터 보호작용을 하는 phase II 효소이다(Kim et al., 2017).

2) 비효소계 항산화제

비효소계 항산화제에는 합성 항산화제와 천연 항산화제가 있다. 합성 항산화제는 아민계, 설파이드계, 페놀계 등으로 구분되며 그 중 페놀계 합성 항산화제 BHA, BHT, *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) 등이 식품 산업에서 다방면으로 사용되어왔다. 천연 항산화제는 식물로부터 유래된 물질인 glutathione, thioredoxin, carotenoid와 다양한 방향족 화합물, vitamin A, B, C, E 등이 있다(Lee and Lee, 2016).

합성 항산화제는 천연 항산화제에 비하여 항산화력이 우수하고 비용이 저렴한 장점이 있으나 열에 불안정하고 과량섭취 시 생체효소 및 지방의 변이로 암을 비롯한 병을 유발하며 간 비대, 간장 중 microsomal enzyme activity의 증가 등 부

작용이 있는 것으로 알려져 있다(Park et al., 1991; Choi et al., 1992; Jeong et al., 2006).

4. 폴리페놀

Pytochemical은 식물체의 생육단계에서 생산되는 물질로 항산화 활성과 다양한 생리활성 기능들을 가지고 있어 섭취 시 인간이 건강하게 살아가는데 도움을 제공한다(Lim et al., 2004). 그 중 식물체의 과실과 영양체에 주로 존재하는 폴리페놀은 식물 조직을 지지하고 보호하며 화분 매개충을 식물체로 유인하고 다른 식물의 생육을 억제하는 알레로패시의 기능을 가진다(Park et al., 2011). 최근에는 항산화, 항암 및 항염 등의 약리학적 기능을 가지고 있는 것으로 보고되어 오늘날 제약 및 건강기능식품 산업계에서 많은 연구가 이루어지고 있다.

폴리페놀은 분자 하나에 2개 이상의 하이드록실 그룹을 가지는 방향족 화합물로, 페놀성 고리 및 구조에 따라 플라보노이드류와 비플라보노이드류로 구분된다. 플라보노이드류는 15개의 탄소 골격을 기본으로 A링, B링, C링에 선형 탄소 사슬이 결합되어 있는 형태이다(Fig. 2). C링의 산화 상태에 따라 Fig. 3과 같이 flavanol, flavone, isoflavone, anthocyanidin, flavanone, flavanol로 분류되며 비플라보노이드류는 phenolic acid, stilbene, lignan 등으로 구분된다(Del Rio et al., 2013).

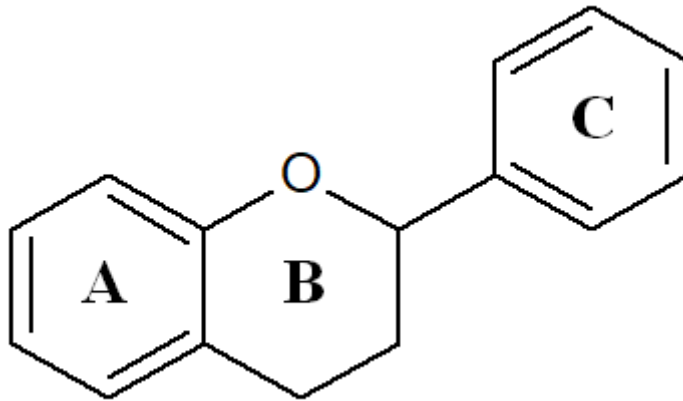


Fig. 2. Basic structure of flavonoid.

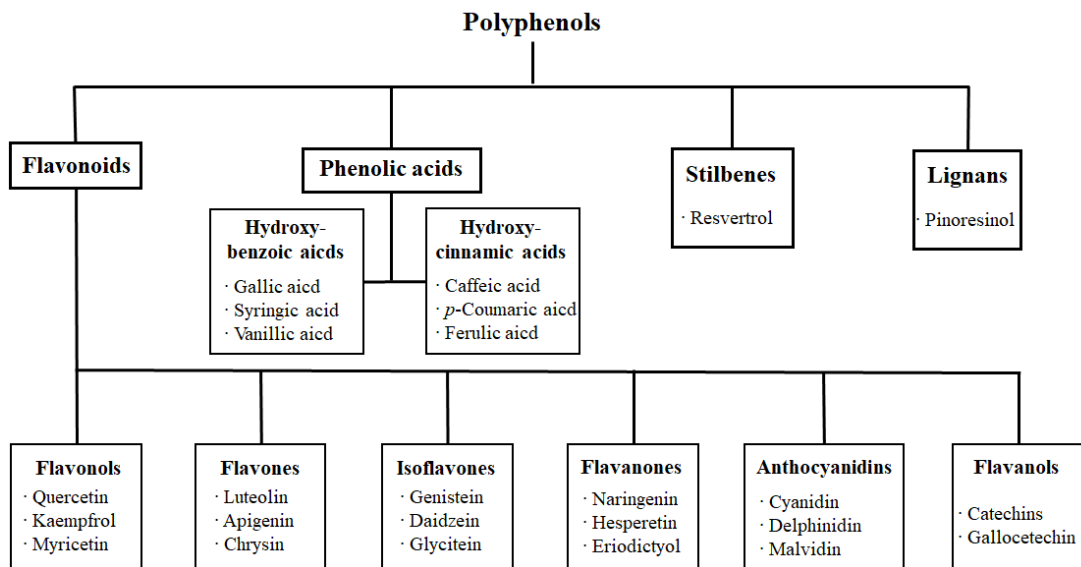


Fig. 3. Classification of polyphenols.

5. 용매 추출

용매추출은 식물에서 기능성 물질을 추출하는 방법 중 하나로, 식물체에 삼투압과 모세관 현상 등에 의하여 용매가 흡수되면 용매 농도에 의해 식물체 조직이 손상됨으로써 유용물질이 침출되고 용해되지 않던 물질들까지 가용화시켜 세포 내부에서 바깥으로 확산되는 현상을 이용하는 추출방법이다(Kim and Hong, 2012).

기존에는 식물의 기능성 성분을 추출하기 위해 열수 추출 방법을 사용하였으나 점차 추출 효율 증대 및 추출 시간을 단축하기 위하여 유기용매 추출법을 사용하는 연구사례가 증대되고 있다. 추출용매는 추출하고자 하는 물질을 잘 용해하고 농축이 쉬운 용매를 사용하는 것이 일반적이며 추출에 사용되는 유기용매에는 ethanol, methanol, hexane, isopropyl alcohol, ethyl acetate, acetone 등이 있다.

Lapornik et al. (2005)은 식물체의 안토시아닌과 폴리페놀은 용매에 따라 추출함량이 달라지며 70% 에탄올을 용매로 하는 추출물은 물 추출물에 비하여 폴리페놀과 안토시아닌 함량이 2배 이상 더 높게 측정되었다고 보고한 바 있다. 또한 Kim et al. (2006)은 극성이 높은 유기용매에서 높은 항산화 활성이 나타난다고 보고한 바 있다.

유기용매 추출은 다양한 성분들을 용도에 맞게 추출할 수 있는 장점이 있지만 용매 제거가 어렵기 때문에 용매잔류로 인한 독성이 존재한다(건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정, 2018). 또한 장시간 추출에 의하여 성분이 파괴되는 문제가 존재함에 따라 건강기능식품 기능성 원료로서의 기능성뿐만 아니라 안정성을 고려하였을 때 기본적으로 사용할 수 있는 물과 에탄올을 본 연구에서 산딸나무 열매 추출물의 용매로 사용하였다.

Ⅲ. 연구 목적

현대사회가 급속도로 발전함에 따라 사람들의 생활수준이 높아지고 의학이 발달함으로써 우리나라는 전 세계에서 고령 사회로 접어드는 수준이 가장 빠른 나라가 되었다. 또한 사람들의 식습관이 점차 서구적으로 변화함에 따라 성인병 및 각종 질병 등의 문제가 발생하고 있으며 이를 극복하고 건강한 삶을 살아가고자 하는 사람들이 증가하고 있다. 사람들의 건강에 대한 관심이 증가하면서 질병을 예방하고 건강을 증진하기 위하여 사람들은 건강과 관련해 많은 지출을 하고 있다(Suh, 2006). 그 중 건강기능식품의 소비는 꾸준히 증가하고 있는 추세로 과거에는 중장년층이 주 소비자층이던 것에 비해 최근에는 셀프 메디케이션(self-medication) 트렌드가 확산되면서 젊은 세대층 또한 많은 소비를 하고 있다. 따라서 건강기능 식품 개발을 목적으로 하는 연구가 국내·외에서 다양하게 수행되고 있으며 그 중 천연물의 기능성에 대한 관심이 높아져 식물 소재로부터 유래한 성분의 연구와 가공 및 식품 개발 등이 활발하게 이루어지고 있다(Won et al., 2015).

선행연구로부터 산딸나무 열매에는 여러 기능성 물질이 함유되어 있으며 우수한 생리활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 하지만 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성을 최대화 할 수 있는 추출조건에 관한 보고는 제한적인 것으로 판단되었다. 식물을 에탄올로 추출할 때 에탄올 농도에 따라 페놀 화합물의 함량 및 항산화 활성은 달라지는 것으로 보고되어 있으며 용매의 적절한 에탄올 농도를 탐색하는 것은 산딸나무 열매 추출물의 부가가치를 높이는데 유용할 것으로 보인다. 따라서 본 연구는 산딸나무 열매를 건강기능식품 소재로 활용하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 산딸나무 열매의 추출 공정에서 용매의 에탄올 농도(증류수, 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올)를 추출 요인으로 설정하여 용매의 에탄올 조성이 산딸나무 열매의 총 페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화 활성, 산화스트레스가 유도된 HepG2세포의 보호효과와 세포 내 활성산소종 억제능에 미치는 영향을 조사하였다.

IV. 재료 및 방법

1. 시료 및 추출물의 제조

본 연구에 사용된 산딸나무 열매는 2017년 10월경 제주대학교 내에서 성숙된 붉은 열매만을 선별하여 수확하였다. 열매는 세척한 후에 -80°C 에서 보관 후 일주일 동안 동결건조를 실시하였다. 건조된 시료는 분쇄기를 사용하여 분말로 제조하였고 시료와 에탄올 농도별 용매(증류수, 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올)를 1:20 비율로 혼합하여 80°C 에서 90분씩 3회 반복하여 환류냉각 추출하고 여과하였다. 이후 감압농축기(Hel-VAP Precision, Heidolph, Germany)를 사용하여 추출한 시료를 농축하고 동결건조하여 건조된 시료를 본 실험에 사용하였다.

2. 추출물의 성분 분석

1) 총 당 및 환원당 함량 분석

각 추출물의 총 당 함량은 phenol-sulfuric acid 방법을 변형하여 분석하였다. 각 추출물 100 μL 에 5% phenol 100 μL 를 혼합한 후 95% H_2SO_4 500 μL 를 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. 이후 UV-spectrometer (UV-1800, Shimadzu, Japan)를 사용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 작성한 검량선으로 환산하였다.

각 추출물의 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS)법을 변형하여 분석하였다. 각 추출물 100 μL 와 DNS 시약을 1.2 mL를 혼합한 후 90°C 에서 10분간 반응시켰다. 이후 반응을 중지하기 위해 얼음을 사용하여 10분간 냉각시키고 UV-spectrometer를 사용하여 575 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 작성한 검량선으로 환산하였다.

2) 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

총 페놀 함량 분석은 Ko et al. (2017)의 방법을 사용하여 분석하였다. 각 추출물 20 μL 에 증류수 700 μL 를 혼합한 후 Folin-Ciocalteu 시약 100 μL 를 가하고 혼합하여 2시간 반응시켰다. 이후 20% Na_2CO_3 를 100 μL 씩 가하였다. 반응액은 1시간 정치하고 microplate reader (i-Mark 168-1135, Bio-Rad, USA)를 사용하여 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 작성한 검량선으로 환산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Ko et al. (2017)의 방법을 사용하여 분석하였다. 각 추출물 100 μL 에 에탄올 300 μL , 10% aluminum nitrate 20 μL , 1 M CH_3COOK 20 μL 를 혼합하였으며 이후 혼합액에 증류수 560 μL 를 가하여 1시간 방치시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 사용하여 작성한 검량선으로 환산하였다.

3) HPLC를 이용한 추출물의 폴리페놀 성분 분석

각 추출물의 폴리페놀 화합물은 high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD, Shimadzu, Japan)를 사용하여 분석하였다(Table 1). 본 연구에서 사용한 폴리페놀 화합물의 표준물질은 다음과 같다(Table 2). Column은 YMC-Triart C18 column (250 \times 4.6 mm, YMC, Korea)를 사용하였으며 column의 온도는 40 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하여 분석하였다. 이동상은 A: 0.1% trifluoroacetic acid가 함유된 증류수, B: 0.1% trifluoroacetic acid가 함유된 아세토니트릴을 사용하였으며 이동상의 유속은 1 mL/min, 검출파장은 245, 260, 320 nm 조건 하에 분석을 수행하였다.

Table 1. Analysis conditions of polyphenol compounds using HPLC.

Content	Condition																																				
Column	YMC-Triart C18 (250×4.6 mm, YMC, Korea)																																				
Column temperature	40 °C																																				
Wavelength	245, 260, 320 nm																																				
Mobile phase	A: 0.1% trifluoroacetic acid in water B: 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile																																				
Flow rate	1 mL/min																																				
Gradient conditions	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.01</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>5.00</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>20.00</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>25.00</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>35.00</td><td>75</td><td>25</td></tr> <tr><td>50.00</td><td>75</td><td>25</td></tr> <tr><td>55.00</td><td>40</td><td>60</td></tr> <tr><td>57.00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>62.00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>65.00</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr><td>70.00</td><td>90</td><td>10</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0.01	90	10	5.00	80	20	20.00	80	20	25.00	80	20	35.00	75	25	50.00	75	25	55.00	40	60	57.00	20	80	62.00	20	80	65.00	90	10	70.00	90	10
Time (min)	A (%)	B (%)																																			
0.01	90	10																																			
5.00	80	20																																			
20.00	80	20																																			
25.00	80	20																																			
35.00	75	25																																			
50.00	75	25																																			
55.00	40	60																																			
57.00	20	80																																			
62.00	20	80																																			
65.00	90	10																																			
70.00	90	10																																			
Injection volume	20 µL																																				

Table 2. Retention time of polyphenol compound standards.

Label	Standard	Retention time (min)	Wavelength (nm)
a	Gallic acid	5.033	245
b	Catechin	10.144	320
c	Chlorogenic acid	10.456	260
d	Caffeic acid	11.866	260
e	Syringic acid	12.438	320
f	<i>p</i> -Coumaric acid	16.115	260
g	Protocatechuic acid	26.019	320
h	Myricetin	30.962	260
i	Quercetin	47.477	260

4) 총 안토시아닌 함량 분석

총 안토시아닌 함량 분석은 Li and Jeong (2015)의 방법을 변형하여 분석하였다. 각 추출물의 동결 건조된 시료 0.1 g에 25 mM KCl buffer (pH 1.0)와 400 mM CH₃COONa buffer (pH 4.5)를 각각 혼합한 이후 원심분리하여 상층액을 분석 시료로 이용하였으며 UV-spectrometer를 사용하여 520 nm와 700 nm에서 각각의 흡광도를 측정하였다. 추출물의 총 안토시아닌 색소함량은 cyanidin 3-O-glucoside를 기준으로 계산하였다.

$$\text{Total anthocyanin content (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times 1000 \times \text{DF}) / \varepsilon \times L$$

A (absorbance) = (A₅₁₀ - A₇₀₀) pH_{1.0} - (A₅₁₀ - A₇₀₀) pH_{4.5}, MW = Molecular weight of cyanidin 3-O-glucoside (449.2 g/mol), DF = Dilution factor, ε = Molar absorbance of cyanidin 3-O-glucoside (26,900 M⁻¹cm⁻¹), L = Cell pathlength (1 cm)

3. 추출물의 항산화 활성 측정

1) DPPH radical 소거능

각 추출물의 DPPH radical 소거활성은 Shin and Song (2017)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 추출물 20 μ L와 150 μ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 180 μ L를 가하여 혼합한 뒤 암소에 30분간 정치하였다. 이후 microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같은 계산식을 사용하였으며 DPPH radical을 50% 소거하는데 요구되는 시료의 양을 RC₅₀으로 표기하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging rate (\%)} = [1 - (\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of sample blank}) / \text{absorbance of control}] \times 100$$

2) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

TEAC는 Zulueta et al. (2009)의 방법을 변형하여 측정하였다. ABTS radical을 생성시키기 위해 7 mM ABTS, 2.45 mM potassium persulfate를 암소에 24시간 방치시켰으며 실험에 사용하기 직전에 ABTS radical 용액을 734 nm 파장에서 흡광도 값이 0.70이 되도록 증류수로 희석하였다. 이후 각 추출물 50 μ L에 ABTS radical 용액 1 mL를 혼합하여 3분간 방치 후 UV-spectrometer를 사용해 734 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 표준물질로 trolox를 사용하였으며 작성된 검량선으로 건조 시료 1 g당 trolox 농도(mM TE/g)로 나타내었다.

3) Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP은 Guo et al. (2003)의 방법을 변형하여 측정하였다. FRAP 시약은 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6)와 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine, 20 mM FeCl₃를 10:1:1의 비율로 혼합하여 제조하였다. 각 추출물 50 μ L와 37°C에서 30분간 반응시킨 FRAP 시약을 150 μ L 가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 FeSO₄를 사용하였으며 작성된 검량선으로 건조 시료 1 g당 FeSO₄ 환원력(mM FE/g)으로 나타내었다.

4) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

ORAC 분석은 Cao et al. (1993)의 방법을 변형하여 측정하였다. 추출물 50 μ L에 78 nM fluorescein 150 μ L를 혼합하여 37°C에서 10분간 방치하였다. 이후 221 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)를 가하였다. 형광도는 microplate reader를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 60분간 1분간격으로 측정하였다. Trolox를 표준시약으로 사용한 검량선으로 건조 시료 1 g당 trolox 농도(mM TE/g)로 나타내었다.

4. HepG2 세포 모델에서 추출물의 항산화 활성 측정

1) HepG2 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 human hepatoma로부터 유래된 HepG2 세포로 배지는 5% FBS와 penicillin 100 unit/mL, streptomycin 50 µg/mL가 함유된 DMEM을 사용하였으며 5% CO₂가 공급되는 incubator (HERAcell 150i, Thermo Scientific, USA)에서 37°C를 유지시켜 T자형 flask에서 배양하였다. 또한 모든 실험에 사용된 세포는 약 80% confluent 되었을 때 사용하였다.

2) 세포 생존율 및 산화스트레스로부터 세포 보호 효과

HepG2 세포는 24-well plate에 5×10⁴ cells/well의 농도로 각 well에 분주하였다. 24시간 후에 기존의 배지를 제거하고 FBS를 첨가하지 않은 배지로 교환하였으며 산딸나무 열매 에탄올 농도별 추출물을 5, 10, 20 µg/mL 농도로 각각 처리하였다. 12시간 후 산화스트레스를 유도하기 위하여 100 µM *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)를 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 이후 각 well에 1 mg/mL 농도의 MTT 시약을 넣어 2시간 반응시키고 제거하였으며 DMSO를 넣어 formazan crystal을 녹인 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 보호 효과는 다음과 같은 계산식을 사용하여 세포 생존율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{[(\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of blank}) / (\text{absorbance of control} - \text{absorbance of blank})] \times 100}$$

3) 세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제능

ROS 생성 억제능은 다음의 방법을 사용하여 측정하였다. HepG2 세포를 96-well plate에 1×10⁵ cells/well의 농도로 각 well에 분주하였다. 24시간 이후 기존의 배지를 제거하고 FBS를 첨가하지 않은 배지로 교환하였으며 산딸나무 열매 에탄올 농도별 추출물을 5, 10, 20 µg/mL 농도로 각각 처리하였다. 12시간 후 50 µM DCFH-DA를 각 well에 30분간 처리하고 제거하였다. 이후 100 µM TBHP를

가하여 90분 간 반응시켰으며 생성된 DCF의 형광도를 excitation 485nm, emission 530 nm에서 microplate reader를 사용하여 측정하였다. ROS 억제능은 control의 형광도 값을 기준으로 하여 ROS 생성량을 control 값의 배수로 나타내었다.

5. 통계분석

본 연구의 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 실험군은 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, ver 18.0)를 사용하여 Duncan의 다중범위 검정(Duncan Multiple Range Test, DMRT)을 실시함으로써 통계학적으로 유의성을 분석하였다($p < 0.05$). 또한 각 실험의 연관성을 확인하고자 Pearson's correlation analysis를 이용하여 상관관계를 분석하였으며 각 측정값에 해당되는 유의성은 NS (Not significant), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)로 표기하였다.

V. 연구결과 및 고찰

1. 산딸나무 열매 추출물의 추출수율

산딸나무 열매 추출물의 추출수율은 35.70~41.90% 범위로 나타났다(Table 3). 추출물 중 40% 에탄올 추출물의 수율은 41.90%로 가장 높았으며 80% 에탄올 추출물의 수율은 35.70%로 가장 낮았다. 또한 단일 용매의 추출물의 수율은 물 추출물에서 38.90%로 100% 에탄올 추출물의 37.63% 보다 더 높은 수율을 보였다. 본 연구의 추출수율 결과는 Oh et al. (1998)이 보고한 미역과 다시마를 에탄올 농도별로 추출하였을 때 나타난 추출수율과 유사한 경향을 보였으며, 이는 용매의 극성에 따라 추출되는 성분이 다르며 함량 또한 달라지기 때문에 다음과 같은 추출수율을 보인 것으로 생각된다.

Table 3. Extraction yield of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	Extraction yield (%)
Distilled water	38.90 ± 0.62 bc
20% EtOH	38.23 ± 0.58 cd
40% EtOH	41.90 ± 0.70 a
60% EtOH	39.30 ± 0.17 b
80% EtOH	35.70 ± 0.20 e
100% EtOH	37.63 ± 0.21 d

Means with varying letters (a-e) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

2. 산딸나무 열매 추출물의 성분 분석

1) 총 당 및 환원당 함량

식품에 존재하는 당 성분은 환원당과 비환원당으로 구분되며 이를 총칭하여 총 당으로 정의한다. 환원당은 반응성을 나타내는 알데히드기와 케톤기를 가지며 금속염 알칼리성 용액을 환원시키는 glucose, galactose, fructose, mannose 등의 단당류와 lactose, maltose 등의 이당류를 의미하며 설탕을 제외한 과당, 포도당, 맥아당이 포함된다(Ji and Chang, 2013). 산딸나무 열매 추출물의 총 당 및 환원당 함량은 Table 4와 같다. 추출물의 총 당 함량은 684.25~834.89 mg glucose/g 범위로 용매의 에탄올 농도가 증가할수록 총 당 함량은 높게 나타나는 경향을 보였다. 추출물의 환원당 함량은 483.42~561.44 mg glucose/g 범위로 나타났으며 80, 100% 에탄올 추출물 > 40, 60% 에탄올 추출물 > 20% 에탄올 추출물, 증류수 추출물 순으로 높은 함량을 보였다. 이는 총 당 함량과 유사한 경향으로 나타났다. 남(2014)은 미성숙 건여주의 열수 및 에탄올 추출물의 총 당 및 환원당 함량은 에탄올 추출물에서 유의적으로 높게 나타났다고 보고한 바 있다. 또한 Kim et al. (2010)은 뽕나무 품종별 오디의 총 당 및 환원당 함량이 각각 32.46~77.14%, 16.86~65.67%로 나타났다고 보고하였으며, 산딸나무 열매도 비교적 당 함량이 높아 주스 등의 음료로 가공하여 식품으로서 활용할 수 있는 가능성이 있을 것으로 기대된다.

Table 4. Total sugar and reducing sugar content of the *Conrus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	Total sugar (mg glucose/g) ¹⁾	Reducing sugar (mg glucose/g)
Distilled water	684.25 ± 8.17 e	483.47 ± 12.43 c
20% EtOH	757.40 ± 3.12 d	483.42 ± 16.78 c
40% EtOH	786.92 ± 3.79 c	512.97 ± 21.85 b
60% EtOH	783.39 ± 4.09 c	524.60 ± 11.67 b
80% EtOH	823.29 ± 9.60 b	559.49 ± 21.01 a
100% EtOH	834.89 ± 2.71 a	561.44 ± 21.85 a

Means with varying letters (a–e) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

¹⁾mg glucose/g: mg glucose equivalent per sample 1 g.

2) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀은 식품 속에 함유되어있는 식물체의 2차 대사물질로 높은 항산화능을 가지며 phenolic acid, flavonoid, stilbene, lignan으로 분류된다. 플라보노이드는 C₆-C₃-C₆의 탄소골격을 가지며 flavonol, flavone, isoflavone, anthocyanidin, flavanone, flavanol로 분류된다. 플라보노이드의 화합물에는 quercetin, luteolin, myricetin 등이 있으며 구조적 특징으로 인해 높은 항산화능을 가지는 물질이다 (Del Rio et al., 2013). 산딸나무 열매 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 5와 같다. 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 11.93~20.08 mg GAE/g, 0.09~0.86 mg QE/g 범위로 용매의 에탄올 농도가 증가할수록 함량은 증대되어 60% 에탄올 추출물에서 각각 20.08 mg GAE/g, 0.86 mg QE/g으로 가장 높은 함량이 검출되었으나 80, 100% 에탄올 추출물에서는 다소 낮은 함량을 보였다. 또한 물과 에탄올 혼합용매 추출물에서 물과 100% 에탄올을 단독용매로 사용한 추출물보다 더 높은 페놀 및 플라보노이드 함량을 보였는데 이는 식물에 수용성 및 지용성 성분으로 존재하는 생리활성 물질이 함께 추출된 것으로 보인다 (Hwang et al., 2007). 이 결과는 오디 에탄올 농도별 추출물 중 60% 에탄올 추출물에서 가장 높은 페놀함량을 보고한 Cha et al. (2004)의 연구결과와 Cho et al. (2007)이 보고한 오미자 에탄올 농도별 추출물의 페놀함량과 유사한 경향을 보였다.

Table 5. Total phenol and flavonoid content of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	(mg GAE/g) ¹⁾	(mg QE/g) ²⁾
Distilled water	11.93 ± 0.13 f	0.09 ± 0.01 f
20% EtOH	15.80 ± 0.18 d	0.50 ± 0.01 c
40% EtOH	19.22 ± 0.07 b	0.72 ± 0.02 b
60% EtOH	20.08 ± 0.20 a	0.86 ± 0.02 a
80% EtOH	16.08 ± 0.20 c	0.44 ± 0.02 d
100% EtOH	12.49 ± 0.12 e	0.40 ± 0.01 e

Means with varying letters (a-f) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

¹⁾mg GAE/g: mg gallic acid equivalent per sample 1 g.

²⁾mg QE/g: mg quercetin equivalent per sample 1 g.

3) HPLC를 이용한 추출물의 폴리페놀 성분 분석

HPLC를 이용한 산딸나무 열매 추출물의 폴리페놀 화합물 분석 결과는 다음과 같다. 앞서 보고된 Kim et al. (2010)의 연구결과를 참고하여 총 9종의 폴리페놀 화합물을 표준물질로 선정하였으며 분석 결과 5종이 확인되었다(Table 6; Fig. 4-6). 검출된 폴리페놀 화합물에는 gallic acid, catechin, chlorogenic acid, syringic acid, protocatechuic acid가 있으며 다음의 화합물들은 높은 항산화능을 가지는 물질로 알려져 있다(Papadopoulos and Boskou, 1991; Kono et al., 1997; Yilmaz and Toled, 2004). 검출된 화합물 중 모든 추출물에서 gallic acid와 catechin, syringic acid가 공통적으로 검출되었으나 chlorogenic acid는 100% 에탄올 추출물에서 peak가 나타나지 않았으며 protocatechuic acid는 증류수와 100% 에탄올 추출물에서 peak가 확인되지 않았다. 또한 catechin의 함량은 145.64~287.01 $\mu\text{g/g}$ 의 범위로 모든 추출물에서 가장 높은 함량을 보여 산딸나무 열매의 주요 폴리페놀 성분임을 확인할 수 있었다. Catechin은 폴리페놀의 플라보놀이 속하는 화합물로 녹차의 주 성분으로 보고된바 있으며 인간의 건강에 도움을 주는 물질이다.

폴리페놀 화합물의 총 함량은 60% 에탄올 추출물에서 358.47 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았으며 가장 낮은 페놀 함량이 검출된 증류수 추출물(168.43 $\mu\text{g/g}$)보다 약 2.13배 더 높은 함량을 보였다. 특히 60% 에탄올 추출물은 다른 추출물들에 비하여 산딸나무 열매의 주요 폴리페놀 화합물로 확인된 catechin을 비롯한 chlorogenic acid, syringic acid의 함량이 각각 4.70, 24.03 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았다.

Table 6. Polyphenol compounds content of the *Conrus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Polyphenol compounds	Contents of polyphenol compounds ($\mu\text{g/g}$)					
	Distilled water	20% EtOH	40% EtOH	60% EtOH	80% EtOH	100% EtOH
Gallic acid	12.01 \pm 6.50	14.65 \pm 0.02	10.92 \pm 0.28	11.20 \pm 0.37	12.25 \pm 0.27	1.08 \pm 0.09
Catechin	145.64 \pm 1.52	207.14 \pm 2.92	242.55 \pm 3.00	287.01 \pm 4.39	276.04 \pm 1.46	181.48 \pm 0.32
Chlorogenic acid	0.02 \pm 0.10	1.32 \pm 0.08	1.03 \pm 0.02	4.70 \pm 0.01	1.71 \pm 0.02	N.D.
Caffeic acid	N.D. ¹⁾	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Syringic acid	10.76 \pm 0.33	16.37 \pm 0.07	16.03 \pm 0.24	24.03 \pm 0.51	17.98 \pm 0.24	10.07 \pm 0.24
<i>p</i> -Coumaric acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Protocatechuic acid	N.D.	19.79 \pm 0.12	33.41 \pm 0.85	31.53 \pm 0.16	37.53 \pm 4.12	N.D.
Myricetin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Quercetin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	168.43	259.27	303.94	358.47	345.51	192.63

Data represent the means (n = 2).

¹⁾N.D.: Not detected

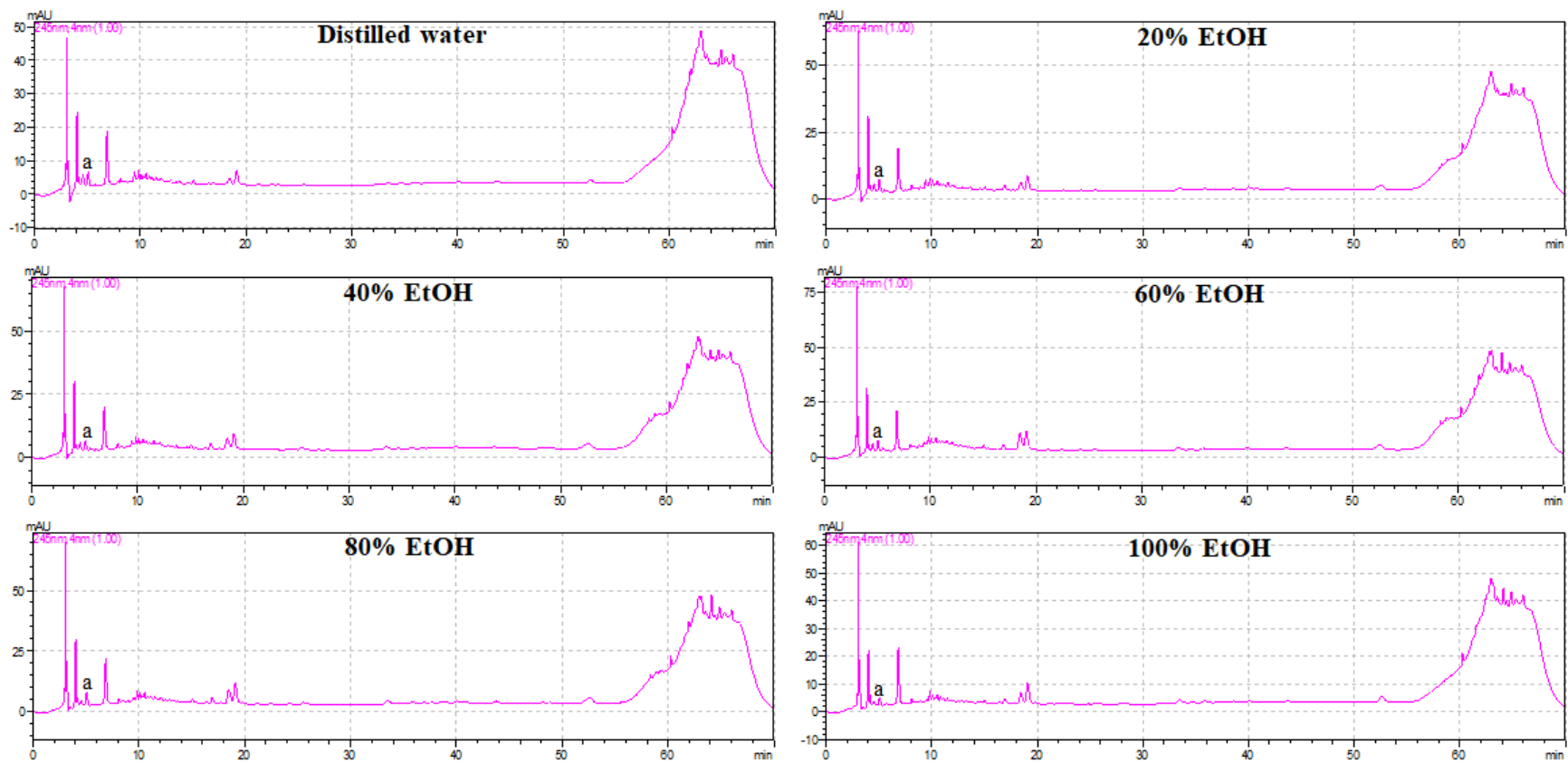


Fig. 4. HPLC Chromatogram of the *Cornus kousa* fruit extract analyzed at 245 nm.

(a): gallic acid

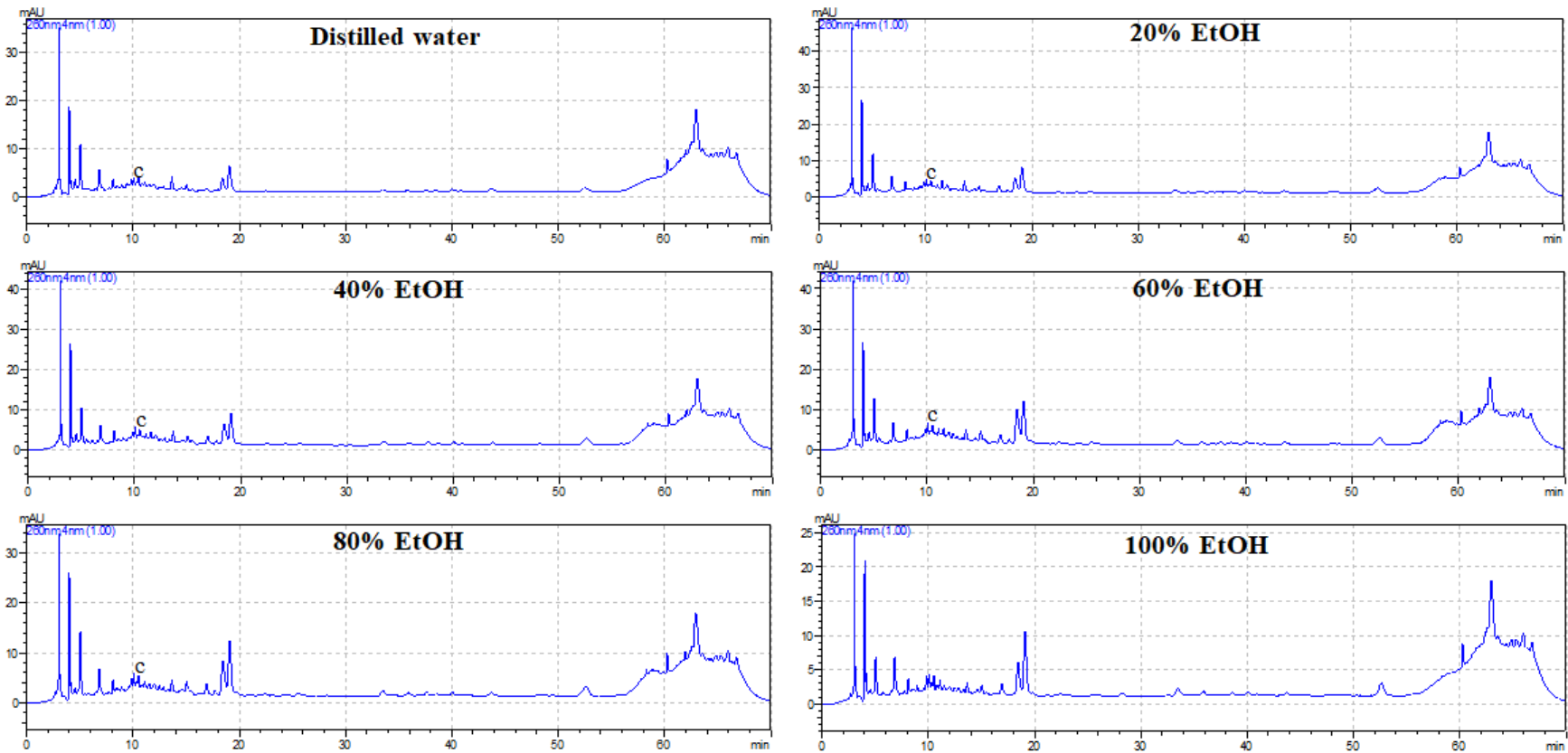


Fig. 5. HPLC Chromatogram of the *Cornus kousa* fruit extract analyzed at 260 nm.

(c): chlorogenic acid

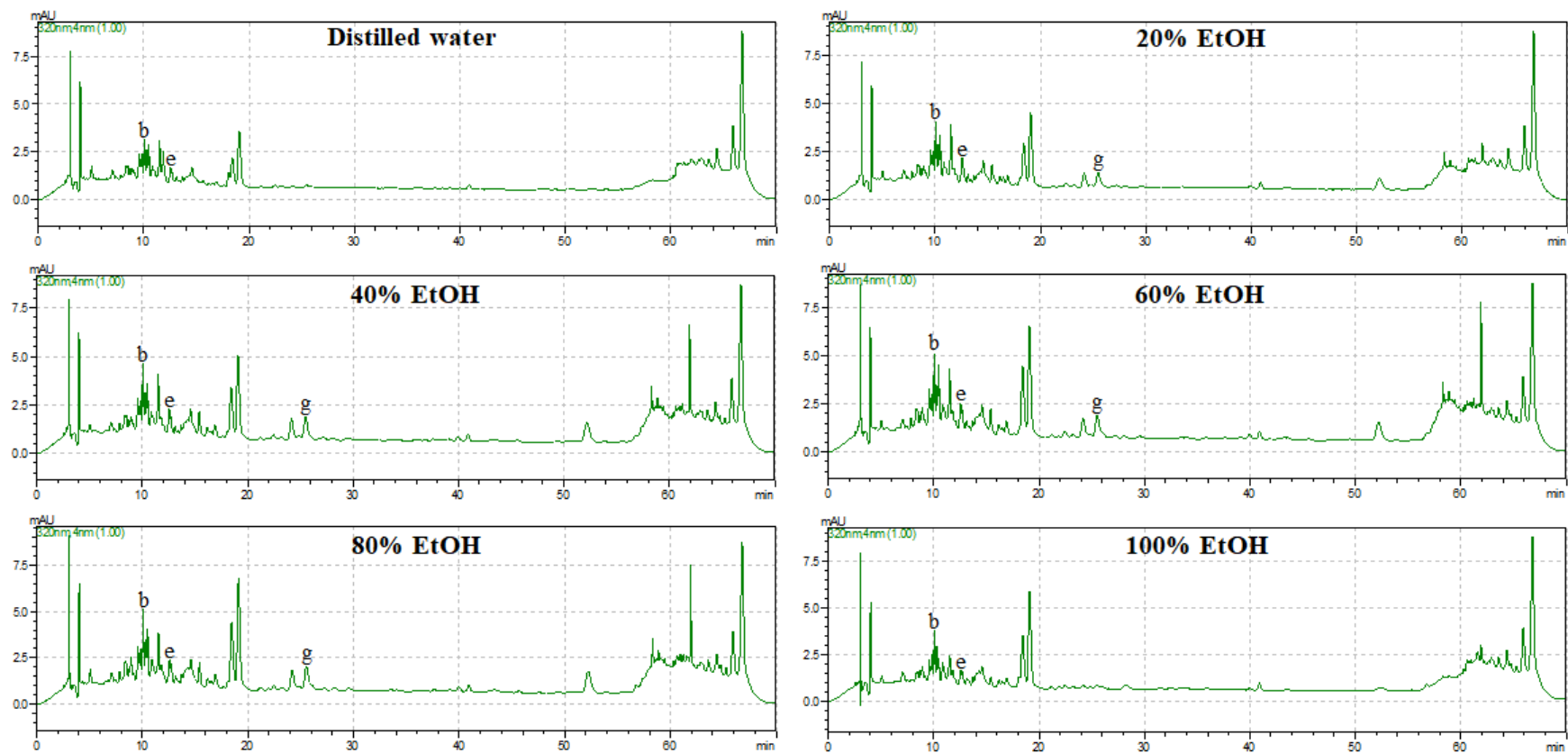


Fig. 6. HPLC Chromatogram of the *Cornus kousa* fruit extract analyzed at 320 nm.

(b): catechin, (e): syringic acid, (g): protocatechuic acid

4) 총 안토시아닌 함량

안토시아닌 색소는 식물의 꽃과 과실에 주로 함유되어 있으며 수소 이온의 농도에 의해 다양한 색을 나타내는 플라보노이드계 폴리페놀 물질로 식품의 천연 첨가제 등으로 사용된다. 대표적으로 cyanidin 3-O-galactoside, cyanidin 3-O-glucoside 등이 있으며 산화스트레스에 강하고 항산화성이 높은 것으로 보고된 바 있다(Lee et al., 2009).

총 안토시아닌 함량은 안토시아닌이 pH에 의해 가역적인 구조적 변형이 일어나 유색의 oxonium 형태가 pH 1.0에서, 무색의 hemiketal 형태가 pH 4.5에서 우세한 점을 기반으로 pH differential method에 따라 측정하였다(Hong et al., 2012). 산딸나무 열매 추출물의 총 안토시아닌 함량은 Table 7과 같다. 추출물의 총 안토시아닌 함량은 4.15~23.37 mg C3GE/100 g 범위로 측정되었으며 용매의 에탄올 농도가 증가할수록 함량은 증대되어 60% 에탄올 추출물에서 23.37 mg C3GE/100 g으로 가장 높은 함량이 검출되었으나 80, 100% 에탄올 추출물에서는 60% 에탄올 추출물과 비교하여 다소 낮은 함량을 보였다. 유사한 연구결과로 Kim et al. (2014)은 복분자박의 안토시아닌 최적정제과정에서 60~75% 농도의 에탄올을 용매로 사용할 때 가장 높은 안토시아닌 함량을 용출할 수 있었다. 또한 김(2015)이 보고한 초음파 추출, 환류냉각 추출, 교반 추출 등 각각의 추출방법을 다르게 한 양하 추출물에서 에탄올을 용매로 사용한 추출물이 물 추출물보다 더 높은 안토시아닌 함량을 보였다.

Table 7. Total anthocyanin content of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extraction solvent	(mg C3GE/100 g) ¹⁾
Distilled water	4.15 ± 0.04 f
20% EtOH	14.83 ± 0.03 e
40% EtOH	20.41 ± 0.03 d
60% EtOH	23.37 ± 0.05 a
80% EtOH	23.01 ± 0.07 b
100% EtOH	21.19 ± 0.02 c

Means with varying letters (a-f) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

¹⁾mg C3GE/100 g: mg cyanidin 3-O-glucoside equivalent per sample 100 g.

3. 산딸나무 열매 추출물의 항산화 활성

1) DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능 측정법은 전자가 부족하여 짙은 보라색을 가지는 DPPH가 방향족 화합물 및 아민류 물질 등의 전자공여능으로 인해 환원되어 탈색하게 되는 원리를 기반으로 한 항산화 실험법이다(Kang et al., 2002). 산딸나무 열매 추출물의 DPPH radical 소거활성은 Table 8과 같다. 에탄올 농도별 추출물의 DPPH RC_{50} 값 범위는 283.64~1190.30 $\mu\text{g/mL}$ 로 각 추출물 간의 유의적인 활성이 나타났으며 0~60% 에탄올 농도 범위에서는 농도 의존적으로 활성이 증가하였으나 이후 고농도에서는 다소 감소하였다. 60% 에탄올 추출물의 DPPH RC_{50} 값은 283.64 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 소거활성을 보였는데 이는 60% 에탄올 추출물의 많은 phenolic hydroxyl (OH) group들이 DPPH radical 소거능에 영향을 준 것으로 보인다.

본 연구에서 DPPH radical 소거능은 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 유사한 경향을 보였다. Son and Ryu (2009)의 연구에 의하면 총 페놀성 화합물이 가장 높게 나타난 시료에서 DPPH의 라디칼 소거활성이 가장 우수하였으며 이는 높은 상관관계가 있다고 보고하였다. 따라서 60% 에탄올 추출물에서 가장 높은 페놀 함량을 보였기에 DPPH 소거능이 가장 높게 측정된 것으로 사료되며 60% 에탄올 추출물은 표준물질로 사용한 BHT의 DPPH RC_{50} (38.81 $\mu\text{g/mL}$)과 비교하였을 때 약 1/7의 활성을 보였다.

Table 8. DPPH radical scavenging activity of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	RC ₅₀ ¹⁾
Distilled water	783.22 ± 5.19 f
20% EtOH	550.05 ± 6.64 d
40% EtOH	410.84 ± 12.26 c
60% EtOH	283.64 ± 25.60 b
80% EtOH	596.71 ± 10.76 e
100% EtOH	1190.30 ± 19.27 g
BHT	38.81 ± 2.44 a

Means with varying letters (a-g) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

¹⁾RC₅₀: Concentration required to reduce 50% of DPPH at 30 minutes once reaction starts (µg/mL)

2) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

ABTS radical은 potassium persulfate와 ABTS에 의해 생성된 free radical로 청록색을 띠며, 항산화능을 가진 성분에 의해 제거되어 탈색되는 것을 이용하는 항산화 효과 측정 방법이다. TEAC 값으로 나타낸 산딸나무 열매 추출물의 ABTS radical 소거능은 Table 9와 같다. 에탄올 농도별 추출물의 TEAC 값 범위는 42.20~119.40 mM TE/g로 에탄올 농도에 따라 TEAC 값은 점차 증가하여 40, 60% 에탄올 추출물에서 가장 높은 값을 보였으나 80, 100% 에탄올 추출물에서는 감소하는 경향을 보였다.

DPPH assay는 free radical의 소거능을 측정하는 것으로 알려져 있으며 ABTS assay는 cation radical의 소거능을 측정하는 것으로 보고된 바 있다. 하지만 각 실험은 유사한 경향을 보여주었다. 이는 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 각 소거능에 영향을 준 것으로 사료되며, 앞서 보고된 Choi et al. (2007)의 연구에 따르면 페놀 함량은 ABTS radical 소거 활성에 주요인으로 작용한다는 결과와 유사하였다. 또한 Min and Jhoo (2013)의 보고에 따르면, 에탄올 농도별 추출물의 ABTS radical 소거능은 증류수 추출물과 100% 에탄올 추출물보다 에탄올과 증류수를 혼합한 추출물에서 ABTS 소거활성이 더 높은 결과를 보였으며 본 연구 또한 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 9. Trolox equivalent antioxidant capacity of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	TEAC (mM TE/g) ¹⁾
Distilled water	67.31 ± 1.35 c
20% EtOH	91.93 ± 1.67 b
40% EtOH	117.13 ± 1.03 a
60% EtOH	119.40 ± 0.96 a
80% EtOH	90.88 ± 1.50 b
100% EtOH	42.20 ± 1.06 d

Means with varying letters (a-d) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

¹⁾mM TE/g: mM trolox equivalent per sample 1 g.

3) Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP법은 ferric tripyridyltriazine [Fe(III)-TPTZ] 복합체가 낮은 pH에서 항산화 물질에 의해 ferrous tripyridyltriazine [Fe(II)-TPTZ]로 환원되는 원리를 이용한 항산화 활성 측정방법으로 항산화능을 가지는 물질 대부분이 환원력을 보유한다는 원리에 의해 고안되었다. 산딸나무 열매 추출물의 FRAP 값은 Table 10과 같다. 에탄올 농도별 추출물의 FRAP 값 범위는 10.98~187.81 mM FE/g으로 0~60% 에탄올 농도 범위에서는 농도 의존적으로 활성이 증가하여 60% 에탄올 추출물에서 187.81 mM FE/g로 가장 높은 FRAP 값을 보였다. 하지만 고농도 에탄올 추출물에서는 감소하는 경향을 나타내었다. Pulido et al. (2000)의 연구에 따르면 식물체에서 추출된 페놀 화합물은 항산화 활성을 가지며 주요인으로 산화환원력이 작용한다고 보고하였다. 따라서 60% 에탄올 추출물의 FRAP 값이 높게 측정된 것은 페놀 화합물의 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

Table 10. Ferric reducing antioxidant power of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	FRAP (mM FE/g) ¹⁾
Distilled water	46.00 ± 2.34 e
20% EtOH	108.67 ± 1.92 d
40% EtOH	173.79 ± 4.16 b
60% EtOH	187.81 ± 4.75 a
80% EtOH	124.78 ± 2.48 c
100% EtOH	10.98 ± 0.86 f

Means with varying letters (a-f) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

¹⁾mM FE/g: mM ferrous sulfate equivalent per sample 1 g.

4) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

ORAC법은 미국 농무성과 국립노화연구소에 의해 고안된 식품과 음료의 총 항산화력 측정방법으로 체내에서 각종 질병을 일으키는 활성산소로부터 동결 건조된 시료에 의한 보호능력을 평가할 수 있다. ORAC법은 항산화 *in vitro* 실험 중에서 임상시험과 가장 상관성이 높다고 보고된 바 있으며 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)에 의해 생성된 peroxy radical이 항산화능을 띠는 물질에 의해 소거됨으로써 프리라디칼의 억제활성을 형광도로 측정할 수 있는 실험법이다 (Rhim and Choi, 2010). 산딸나무 열매 추출물의 ORAC 값은 Table 11과 같다. ORAC 값은 0~60% 에탄올 농도 범위에서 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하여 60% 에탄올 추출물에서 721.55 mM TE/g로 가장 우수한 활성을 보였다. 반면 80~100% 농도에서는 활성이 감소되었다.

Table 11. Oxygen radical absorbance capacity of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	ORAC (mM TE/g) ¹⁾
Distilled water	169.57 ± 12.18 e
20% EtOH	455.62 ± 1.48 d
40% EtOH	666.90 ± 15.63 b
60% EtOH	721.55 ± 21.90 a
80% EtOH	522.94 ± 3.74 c
100% EtOH	118.49 ± 19.78 f

Means with varying letters (a-f) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

¹⁾mM TE/g: mM trolox equivalent per sample 1 g.

4. HepG2 세포 모델에서 산딸나무 열매 추출물의 항산화 활성

1) 세포 생존율 및 산화스트레스로부터 세포 보호 효과

산딸나무 열매 추출물을 HepG2 세포에 단독으로 처리하였을 때 생존율에 미치는 영향은 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 모든 추출물 처리군이 85% 이상의 생존율을 보였다(Fig. 7). 따라서 TBHP에 의하여 산화스트레스가 유도된 HepG2 세포의 보호 효과를 확인하기 위해서 추출물은 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이하로 처리하였다(Table 12). 100 μM TBHP를 단독으로 처리하였을 때 세포 생존율은 20.90%로 무처리군에 비하여 유의적인 세포독성을 나타내었다. 산딸나무 열매 에탄올 농도별 추출물은 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 범위 내에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 증대하였다. 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 40, 60% 에탄올 추출물 처리군을 제외한 다른 추출물 처리군은 TBHP 단독 처리군과 비교하였을 때 세포 생존율의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 따라서 40, 60% 에탄올 추출물 처리군에서 단독으로 세포 보호 효과를 보였다. 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 모든 추출물에서 세포 보호효과를 나타냈으며 그 중 40, 60% 에탄올 추출물에서의 세포 생존율은 각각 63.97, 68.20%로 가장 높은 보호 효과를 보였다. 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 60% 에탄올 추출물의 세포 생존율은 84.60%로 모든 추출물 중 가장 높은 보호 효과를 나타내었다. 따라서 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 농도범위에서 세포 생존율이 가장 높은 60% 에탄올 추출물이 TBHP에 의해 유도된 산화 스트레스로부터 가장 우수한 세포 보호 효과를 가지는 것으로 사료된다.

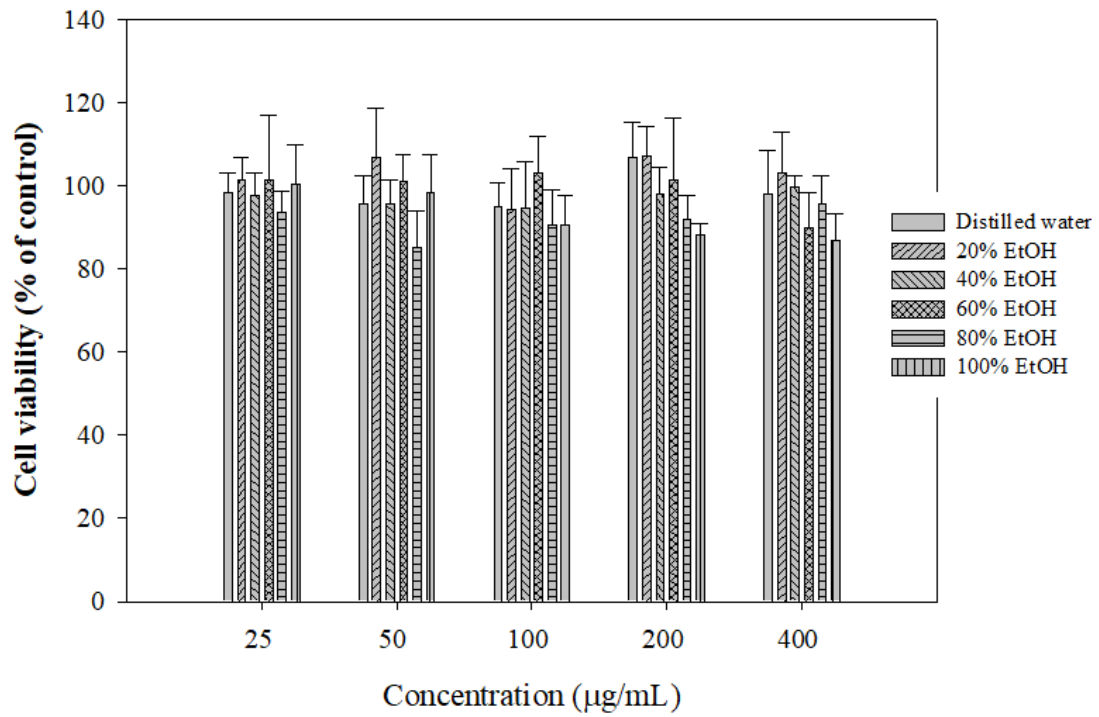


Fig. 7. HepG2 cell viability of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Table 12. Hepatoprotective effect on TBHP-induced cytotoxicity of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	Concentration($\mu\text{g/mL}$)				
	Control	TBHP	5	10	20
Distilled water		20.90 \pm 0.70 d	16.96 \pm 3.34 dC	44.41 \pm 4.67 cD	59.44 \pm 2.02 bD
20% EtOH		20.90 \pm 0.70 d	24.97 \pm 1.74 dB	55.45 \pm 1.52 cBC	78.36 \pm 2.78 bB
40% EtOH		20.90 \pm 0.70 e	33.00 \pm 4.88 dA	63.97 \pm 2.77 cAB	70.07 \pm 3.27 bC
60% EtOH	100.62 \pm 3.65 a	20.90 \pm 0.70 e	31.34 \pm 3.55 dA	68.20 \pm 5.21 cA	84.60 \pm 3.08 bA
80% EtOH		20.90 \pm 0.70 d	17.06 \pm 1.13 dC	41.25 \pm 4.32 cD	69.53 \pm 1.53 bC
100% EtOH		20.90 \pm 0.70 d	22.31 \pm 1.74 dBC	46.24 \pm 9.18 cCD	73.98 \pm 4.28 bBC

Means with varying letters (a-e) in the same row are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

Means with varying letters (A-D) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

2) 세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제능

체내에서 ROS가 증가하게 되면 세포와 조직에 산화스트레스를 유발하여 손상을 가한다. 따라서 ROS가 노화, 염증, 당뇨 등의 만성질환에 직접적으로 영향을 미치기 때문에 세포내 대사에서 ROS의 조절작용이 필요하다(Tak et al., 2014). 비극성인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 세포막을 통과하여 세포내로 들어가게 되면 세포 내 존재하는 esterase 효소가 작용하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 분해되며 DCFH는 TBHP에 의해 생성된 ROS와 반응함으로써 형광을 띄는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 전환된다(Jeong et al., 2016). 따라서 ROS 생성량이 많은 경우에 형광값이 증가하게 되므로 ROS를 억제하는 물질과 반응할 때 감소하는 형광값을 토대로 ROS 생성 억제능을 측정하였다. 무처리군의 ROS량을 1로 설정하였을 때 TBHP 단독 처리군의 ROS량은 4.83배 증가하였다(Table 13). 산딸나무 열매 추출물은 모든 추출물에서 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 ROS 생성 억제능은 60% 에탄올 추출물이 다른 추출물들에 비해 가장 우수한 활성을 보였으며 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 40~80% 에탄올 추출물이 가장 우수한 활성을 보였다. 결론적으로 산딸나무 열매 추출물은 HepG2 세포내에서 TBHP 처리에 의한 ROS 생성량을 효과적으로 억제하는 것이 확인되었다.

Table 13. Intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging activity of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

Extracts	Concentration($\mu\text{g/mL}$)				
	Control	TBHP	5	10	20
Distilled water			3.79 ± 0.36 dC	3.44 ± 0.16 cE	2.41 ± 0.04 bB
20% EtOH			3.62 ± 0.39 dBC	3.08 ± 0.03 cD	2.26 ± 0.36 bB
40% EtOH			3.10 ± 0.13 dAB	2.51 ± 0.08 cB	1.89 ± 0.13 bA
60% EtOH	1.00 ± 0.02 a	4.83 ± 0.03 e	2.96 ± 0.18 dA	2.23 ± 0.04 cA	1.66 ± 0.07 bA
80% EtOH			3.54 ± 0.17 dBC	2.48 ± 0.01 cB	1.73 ± 0.08 bA
100% EtOH			3.53 ± 0.38 dBC	2.91 ± 0.04 cC	2.52 ± 0.15 bB

Means with varying letters (a-e) in the same row are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

Means with varying letters (A-E) in the same column are significantly different by Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

5. 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성의 상관관계 분석

산딸나무 에탄올 농도별 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성의 상관관계는 Table 14와 같다. 총 페놀 함량은 총 플라보노이드 함량($r = 0.935, p < 0.001$)과 높은 정의 상관관계를 나타내었으며 이는 에탄올 농도에 따라 산딸나무 열매를 추출할 때 용출되는 함량이 유사한 것으로 생각된다. 총 페놀 함량은 DRC_{50} ($r = -0.875, p < 0.001$), ROS ($r = -0.832, p < 0.001$)와 부의 상관관계를 갖고 있으며 TEAC ($r = 0.940, p < 0.001$), FRAP ($r = 0.971, p < 0.001$), ORAC ($r = 0.979, p < 0.001$), CPE ($r = 0.592, p < 0.01$)와는 정의 상관관계를 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 DRC_{50} ($r = -0.678, p < 0.01$), ROS ($r = -0.857, p < 0.001$)와 부의 상관관계를 TEAC ($r = 0.774, p < 0.001$), FRAP ($r = 0.831, p < 0.001$), ORAC ($r = 0.861 < 0.001$), CPE ($r = 0.756, p < 0.001$)와는 정의 상관관계를 나타내었다. 이는 총 페놀 함량과 항산화 활성은 정의 상관관계($r = 0.8$)를 나타내어 페놀 화합물이 항산화 활성과 밀접한 관련이 있다는 Kim et al. (2004)의 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각 실험별 항산화 활성과 모두 높은 상관관계가 있음을 보여주었다.

Table 14. Correlation analysis between total phenol and flavonoid and antioxidant activities of the *Cornus kousa* fruit extracted in different ethanol concentrations.

	TP ¹⁾	TF ²⁾	DRC ₅₀ ³⁾	TEAC ⁴⁾	FRAP ⁵⁾	ORAC ⁶⁾	CPE ⁷⁾	ROS ⁸⁾
TP	1	0.935***	-0.875***	0.940***	0.971***	0.979***	0.592**	-0.832***
TF		1	-0.678**	0.774***	0.831***	0.861***	0.756***	-0.857***
DRC ₅₀			1	-0.979***	-0.955***	-0.927***	-0.353 ^{N.S}	0.560*
TEAC				1	0.988***	0.969***	0.391 ^{N.S}	-0.658**
FRAP					1	0.992***	0.449 ^{N.S}	-0.756***
ORAC						1	0.512*	-0.800***
CPE							1	-0.579*
ROS								1

Data represent the means (n = 3). N.S: Not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

¹⁾TP: Total phenol content, ²⁾TF: Total flavonoid content, ³⁾DRC₅₀: Concentration required to reduce 50% of DPPH at 30 minutes once reaction starts (µg/mL),

⁴⁾TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity, ⁵⁾FRAP: Ferric reducing antioxidant power, ⁶⁾ORAC: Oxygen radical absorbance capacity, ⁷⁾CPE: Cell protective effect,

⁸⁾ROS: Reactive oxygen species.

VI. 결 론

본 연구에서는 산딸나무 열매를 건강기능식품의 소재로 활용하기 위하여 에탄올 농도별(증류수, 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올) 추출물의 성분 함량, 항산화 활성, 간세포 보호효과를 검정하였다. 산딸나무 열매 에탄올 추출물의 연구결과는 다음과 같다.

1. 산딸나무 열매 에탄올 농도별 추출물의 총 당 및 환원당 함량을 분석한 결과 총 당 함량은 100% 에탄올 추출물에서 834.89 mg glucose/g으로 가장 높은 함량이 확인되었으며 환원당 함량은 80% 에탄올 추출물과 100% 에탄올 추출물에서 각각 559.49, 561.44 mg glucose/g으로 유의적인 차이가 없는 수준에서 가장 높은 함량이 확인되었다.

2. 산딸나무 열매 에탄올 농도별 추출물의 총 페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량을 분석한 결과 60% 에탄올 추출물에서 총 페놀 함량은 20.08 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량은 0.86 mg/ QE/g, 총 안토시아닌 함량은 23.37 mg C3GE/100g으로 다른 농도의 추출물과 비교하여 가장 높은 함량이 확인되었다.

3. Catechin은 산딸나무 열매의 주요 폴리페놀 화합물로 확인되었으며, protocatechuic acid, syringic acid, gallic acid, chlorogenic acid 순으로 높은 함량이 검출되었다. 또한 검출된 폴리페놀 화합물의 총 함량은 60% 에탄올 추출물에서 358.47 µg/g으로 가장 높았다.

4. 산딸나무 열매 에탄올 농도별 추출물의 DPPH radical 소거능, TEAC, FRAP, ORAC를 측정하여 항산화 검정을 분석한 결과 각 실험에서 60% 에탄올 추출물이 가장 높은 항산화 활성을 갖고 있음을 확인하였다.

5. TBHP를 처리하여 산화스트레스가 유도된 HepG2 세포의 생존율은 약 20.90%로 control과 비교하였을 때 유의적인 세포 독성이 나타났다. 따라서 산화스트레스에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 위해 산딸나무 에탄올 농도별 추출물을 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 결과, 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리시 강한 활성은 보이지 않았으나 40%, 60% 에탄올 추출물에서 세포 보호 효과가 확인되었다. 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 모든 추출물이 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 보였으며, 특히 60% 에탄올 추출물을 20 $\mu\text{g/mL}$ 처리하였을 때 세포 생존율은 84.60%로 가장 우수한 세포 보호 효과가 나타났다.

6. 세포내 활성산소종(ROS)은 control에 비해 TBHP 처리군에서 약 4.83배가 생성되었다. 따라서 ROS 생성 억제능을 확인하기 위해 산딸나무 에탄올 농도별 추출물을 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였다. 모든 추출물은 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다. 그 중 60% 에탄올 추출물이 가장 우수한 활성을 보여 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 ROS를 control 기준 약 1.66배까지 억제하였다.

다음의 연구결과를 종합해보면, 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 항산화 활성 및 산화스트레스가 유도된 HepG2세포의 보호 효과와 높은 상관관계를 가지고 있는 것으로 나타났으며 페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높았던 60% 에탄올 추출물에서 총 항산화 활성 및 HepG2 세포의 보호 효과가 가장 우수한 활성을 보였다. 따라서 산딸나무 열매를 건강기능식품 소재로의 활용을 극대화하기 위해서는 60% 에탄올로 추출할 때 가장 적합한 것으로 생각된다. 또한 추출용매 이외에도 추출시간, 추출온도, 용매비 등을 요인으로 설정하여 기능성 물질의 최적화 추출방법에 대한 연구와 인체의 특정 기관을 타겟으로 하는 연구 등 추가적인 연구가 진행된다면 건강기능식품의 원료로써 산딸나무 열매의 이용가능성이 높아질 것으로 생각된다.

VII. 적 요

본 연구에서는 산딸나무 열매를 건강기능식품의 소재로 활용하기 위하여 각 에탄올 농도별(증류수, 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올) 추출물의 총 당 및 환원당 함량, 총 페놀 및 플라보노이드 함량, 총 안토시아닌 함량과 폴리페놀 화합물 개별 성분 분석을 수행하였으며 DPPH radical 소거능, TEAC, FRAP, ORAC, HepG2 세포 보호 효과, ROS 생성 억제능을 측정하여 항산화 활성을 확인하였다.

추출물의 총 당 함량은 100% 에탄올 추출물에서 834.89 mg glucose/g, 환원당 함량은 80% 에탄올 추출물과 100% 에탄올 추출물에서 각각 559.49, 561.44 mg glucose/g으로 가장 높은 함량을 보였다. 총 페놀, 플라보노이드 및 안토시아닌 함량은 60% 에탄올 추출물에서 각각 20.08 mg GAE/g, 0.86 mg QE/g, 23.37 mg C3GE/100 g으로 다른 농도의 추출물과 비교하여 가장 높은 함량을 보였다.

Catechin은 산딸나무 열매의 주요 폴리페놀 화합물로 확인되었으며, protocatechuic acid, syringic acid, gallic acid, chlorogenic acid가 검출되었다. 또한 검출된 폴리페놀 화합물의 총 함량은 60% 에탄올 추출물에서 358.47 µg/g으로 가장 높았다.

추출물의 DPPH radical 소거능, TEAC, FRAP, ORAC를 분석한 결과 각 실험에서 60% 에탄올 추출물이 가장 높은 항산화 활성을 갖고 있음을 확인하였다. 또한 TBHP에 의해 산화스트레스가 유도된 HepG2 세포에 추출물의 보호 효과는 5~20 µg/mL에서 농도 의존적으로 나타났으며 60% 에탄올 추출물에서 가장 우수하였다. 추출물의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제능은 5~20 µg/mL에서 농도 의존적으로 증가하였으며 60% 에탄올 추출물에서 가장 높은 활성을 나타냈다.

따라서 본 연구에서는 산딸나무 열매 60% 에탄올 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화 활성, 산화스트레스가 유도된 HepG2 세포의 보호 효과 및 세포내 활성산소종 생성 억제능이 가장 우수함을 확인하였으며 건강기능식품 소재로서 활용 가능성을 시사하였다.

인 용 문 헌

- Awad, A.B., Roy, R., Fink, C.S. 2003. β -Sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 10(2): 497-500.
- Boo, H.O., Hwang, S.J., Bae, C.S., Park, S.H., Song, W.S. 2011. Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Korean Journal of Plant Resources*, 24(1): 105-112.
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3): 303-311.
- Cha, W.S., Shin, H.R., Park, J.H., Oh, S.L., Lee, W.Y., Chun, S.S., Choo J.W., Cho, Y.J. 2004. Antioxidant activity of phenol compounds from mulberry fruits. *Korean Journal of Food Preservation*, 11(3): 383-387.
- Cho, Y.J., Ju, I.S., Kim, B.C., Lee, W.S., Kim, M.J., Lee, B.G., An, B.J., Kim, J.H., Kwon, O.J. 2007. Biological activity of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *Applied Biological Chemistry*, 50(3): 198-203.
- Choe, M., Shin, G.J., Choi, G.P., Do, J.H., Kim, J.D. 2003. Synergistic effects of extracts from Korean red ginseng, *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. and *Rubus coreanus* Miq. on antioxidative activities in rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 11(2); 148-154.
- Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S., Shin, J.I. 1992. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 24(2): 142-148.
- Choi, Y., Jeong, H.S., Lee, J. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chemistry*, 103(1): 130-138.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. 2013. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14): 1818-1892.

- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23(12): 1719-1726.
- Gupta, M.B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava, K.P. 1980. Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol. *Planta Medica*, 39(6): 157-163.
- Hong, S.M., Kang M.J., Lee, J.H., Jeong, J.H., Kwon, S.H., Seo, K.I. 2012. Production of vinegar using *Rubus coreanus* and its antioxidant activities. *Korean Journal of Food Preservation*, 19(4): 594-603.
- Hwang, J.S., Lee, B.H. An, X., Jeong, H.R., Kim, Y.E., Lee, I., Lee, H. Kim, D.O. 2015. Total phenolics, total flavonoids and antioxidant capacity in the leaves, bulbs, and roots of *Allium hooker*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 47(2): 261-266.
- Jang, M., Seo, H.L., Kim, S.C., Kim Y.W. 2016. Effect of *Prunellae Spica* on oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the hepatocyte. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, 30(1): 20-26.
- Jeong, G.T., Lee, K.M., Park, D.H. 2006. Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chemical Engineering Research*, 44(1): 81-86.
- Jeong, H., Kim, H., Ju, E., Kong, C.S., Seo, Y. 2016. Antioxidant effect of the halophyte *Atriplex gmelinii*. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 31(4): 200-207.
- Jeong, H.Y. 1991. Aging-free radical-arteriosclerosis. *Life Science*, 1(1): 2-14.
- Ji, Y.S., Chang, J.P. 2013. Antioxidative activity of the durian (*Durio zibethinus*) extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 21(4): 255-261.
- Kang, D.H., Kim, M.Y. 2015. Comparative phenolic composition and antioxidant properties of honey and honeycomb extracts. *Journal of Life Science*, 25(10): 1169-1175.
- Kang, M.H., Choi, C.S., Kim, Z.S., Chung, H.K., Min, K.S., Park, C.G., Park, H.W.

2002. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. Korean Journal of Food Science and Technology, 34(6): 1098-1102.
- Kim, D.I., Hong, J.H. 2012. Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. Korean Journal of Food and Cookery Science, 28(3): 275-283.
- Kim, E.O., Lee, Y.J., Leem, H.H., Seo, I.H., Yu, M.H., Kang, D.H., Choi, S.W. 2010. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberries from seven different *Morus alba* L. cultivars. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 39(10): 1467-1475.
- Kim, E.Y., Baik, I.H., Kim, J.H., Kim, S.R., Rhyu, M.R. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean Journal of Food Science and Technology, 36(2): 333-338.
- Kim, H.A., Lee, M.Y., Kang, M.H. 2017. Effects of lymphocyte DNA damage levels in Korean plant food groups and Korean diet regarding to glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms. Journal of Nutrition and Health, 50(1): 10-24.
- Kim, H.S., Kang, E.J., Kim, W.S., Kim, M.H. 2014. Study to find the optimal purification processing conditions of anthocyanin from Bokbunja byproducts. Food Engineering Progress, 18(1): 25-31.
- Kim, H.W., Han, H.K. 2018. Effects of dietary supplementation with *Allium hookeri* root on the antioxidant enzyme activities in streptozotocin-Induced diabetic rats. Journal of the East Asian Society of Dietary, 28(3): 179-187.
- Kim, J.S., Oh, C.H., Jeon, H., Lee, K.S., Ma, S.Y. 2002. Immuno-regulatory property of fruit-extracts of *Cornus kousa* Burg. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 10(5): 327-332.
- Kim, S.J., Kweon, D.H., Lee, J.H. 2006. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). Korean Journal of Food Science and Technology, 38(4): 584-588.

- Kim, Y.J., Jeong, J.A., Kwon, S.H., Lee, C.H. 2008. Comparison of biological activities of extracts from different parts and solvent fractions in *Cornus kousa* Bueg. Korean Journal of Plant Resources, 21(1): 28-35.
- Ko, H.M., Eom, T.K., Song, S.K., Jo, G.Y., Kim, J.S. 2017. Tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities and antioxidant effects of extracts from different parts of *Hypochaeris radicata*. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 25(3): 139-145.
- Ko, S.C., Kang, S.M., Ahn, G.N., Yang, H.P., Kim, K.N., Jeon, Y.J. 2010. Antioxidant activity of enzymatic extracts from *Sargassum coreanum*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 39(4): 494-499.
- Koksal, E., Bursal, E., Gulcin, İ., Korkmaz, M., Caglayan, C., Goren, A.C., Alwasel, S.H. 2017. Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. International Journal of Food Properties, 20(3): 514-525.
- Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H. 1997. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1335(3): 335-342.
- Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. Journal of Food Engineering, 71(2): 214-222.
- Lee, D.Y., Song, M.C., Yoo, J.S., Kim, S.H., Chung, I.S., Kim, D.K., Park, M.H., Kwon, B.M., Kim, S.Y., Baek, N.I. 2006. Development of biologically active compounds from edible plant sources-XVII. isolation of sterols from the fruits of *Cornus kousa* Burg. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 49(1): 82-85.
- Lee, E.H., Lee, S.H., Cho, Y.J. 2015. Biological activities of extracts from *Cornus kousa* fruit. Journal of Applied Biological Chemistry, 58(4): 317-323.
- Lee, H.J., Choi, E.Y., Sim, Y.J., Kim, O.S., Yoo, H.J., Do, W.N., Kim, Y.H. 2009.

- Anthocyanin-contents and pigment stability of black soybean by different extract condition and stabilizer. *The Korean Journal of Food and Nutrition*, 22(1): 150-157.
- Lee, S.H., Lee, S.O. 2016. Polyphenol contents and antioxidant activities of lentil extracts from different cultivars. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45(7): 973-979.
- Lee, Y.S. 2007. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. *Korean Journal of Food Preservation*, 14(1): 78-86.
- Li, H., Jeong, J.M. 2015. Antioxidant activities of various berries ethanolic extract. *Korean Journal of Medical Crop Science*, 23(1): 49-56.
- Lim, J.D., Yu, C.Y., Kim, M.J., Yun, S.J., Lee, S.J., Kim, N.Y., Chung, I.M. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 12(3): 191-202.
- Min, K.C., Jhoo, J.W. 2013. Antioxidant activity and inhibitory effect of *Taraxacum officinale* extracts on nitric oxide production. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45(2): 206-212.
- Nam, S.W., Kim, M. 2015. A study on inhibitory activities on carbohydrase and anti-inflammatory activities of hot-water and ethanol extracts from immature dried bitter melon (*Momordica charantia* L.). *The East Asian Society of Dietary Life*, 25(6): 999-1006.
- Oh, C.K., Oh, M.C., Kim, S.H., Lim, S.B., Kim, S.H. 1998. Antimutagenic and antimicrobial effect of ethanol extracts from sea-mustard and sea-tangle. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 31(1): 90-94.
- Papadopoulos, G., Boskou, D. 1991. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(9): 669-671.
- Park, H., Choi, K.H., Park, Y.D., Park, C.S., Cha, J. 2011. Enzymatic synthesis of polyphenol glycosides by amylosucrase. *Journal of Life Science*, 21(11): 1631-1635.
- Park, J.H., Kang, K.C., Baek, S.B., Lee, Y.H., Rhee, K.S. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean Journal of Food Science*

- and Technology, 23(3): 256-261.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8): 3396-3402.
- Rhim, T.J., Choi, M.Y. 2010. The antioxidative effects of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts. Korean Journal of Plant Resources, 23(5): 445-450.
- Ryu, K.S., Yook, C.S. 1971. On the constituents of leaves of *Cornus kousa* Burg. Korean Journal of Pharmacognosy, 2: 41-42.
- Shin, Y.H., Song, C.K. 2017. Antioxidant and metalloproteinase inhibitory activities of ethanol extracts from *Lespedeza cuneata* G. Don. Korean Journal of Environmental Agriculture, 36(4): 263-268.
- So, B.K. 1994. The pictorial book of chinese medicinal herbs. Yeo-Gang Press, Seoul, Korea.
- Son, H.J., Ryu, G.H. 2009. Chemical compositions and antioxidant activity of extract from a extruded white ginseng. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 38(7): 946-950.
- Suh, K.H. 2006. Health and quality of life for Korean people in ageing society. Korean Journal of Clinical Psychology, 12(5): 133-147.
- Tak, H.M., Kim, G.M., Kim, J.S., Hwang, C.R., Kang, M.J., Shin, J.H. 2014. Quality characteristics and biological activity of fermented blank garlic with probiotics. Journal of Life Science, 24(5): 549-557.
- Vareed, S.K., Reddy, M.K., Schutzki, R.E., Nair, M.G. 2006. Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. Life Sciences, 78(7): 777-784.
- Vareed, S.K., Schutzki, R.E., Nair, M.G. 2007. Lipid peroxidation, cyclooxygenase enzyme and tumor cell proliferation inhibitory compounds in *Cornus kousa* fruits. Phytomedicine, 14(10): 706-709.
- Wang, G.Q., Gu, J.F., Gao, Y.C., Dai, Y.J. 2016. Daucosterol inhibits colon cancer growth by inducing apoptosis, inhibiting cell migration and invasion and targeting

- caspase signalling pathway. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(2): 395-401.
- Won, B.Y., Shin, K.Y., Ha, H.J., Yun, Y.S., Kim, Y.R., Lee, H.G. 2015. Changes in nutritional composition of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(6): 882-887.
- Yeon, S.H., Ham, H., Sung, J., Kim, Y., Namkoong, S., Jeong, H.S., Lee, J. 2013. Antioxidant activities of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(10): 1525-1532.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2): 255-260.
- Zhao, C., She, T., Wang, L., Su, Y., Qu, L., Gao, Y., Shou, C. 2015. Daucosterol inhibits cancer cell proliferation by inducing autophagy through reactive oxygen species-dependent manner. *Life Sciences*, 137: 37-43.
- Zulueta, A., Esteve, M.J., Frigola, A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1): 310-316.
- 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정, 2018, 식품의약품안전처.
- 건강기능식품 기능성 평가 가이드. 2015. 식품의약품안전평가원.
- 김명협. 2015. 양하의 생리활성 분석 및 양하피클의 품질특성. 숙명여자대학교 대학원 학위논문.
- 남승우. 2014. 미성숙 건여주(*Momordica charantia* L.) 열수 및 에탄올 추출물의 생리활성에 관한 연구. 경북대학교 대학원 학위논문.
- 이대영, 정낙훈, 정태석, 정인식, 노영덕, 백남인. 2010. Constituents of *Cornus kousa* fruits and evaluation for their biological activity. 한국약용작물학회: 학술대회논문집, 140-141.
- 조경진, 김현숙, 박관수, 이상명, 이찬희. 2012. Vegetation characteristics and soil analysis of the *Cornus kousa* habitat. 산림과학 공동학술발표논문집, 2012, 1119-1121.