

화살나무 잎 열수추출물의 생리활성

권구중 · 최대성¹ · 왕명현*

강원대학교 생명공학부, ¹정선군 농업기술센터

Biological Activities of Hot Water Extracts from *Euonymus alatus* Leaf

Gu-Joong Kwon, Dae-Sung Choi¹, and Myeong-Hyeon Wang*

School of Biotechnology, Kangwon National University

¹Jeongseon Agricultural Technology & Extension Center

Abstract This study was performed to investigate the biological activities of roasted (RE) and non-roasted (NRE) hot water extract samples from *Euonymus alatus* leaf by measuring DPPH radical scavenging, total polyphenol content, hydroxyl radical scavenging, superoxide dismutase (SOD)-like activity, anti-inflammatory activity, and inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase *in vitro*. The IC₅₀ values for DPPH free radical scavenging activity of the NRE and RE hot water extracts were 19.1 μ g/mL and 21.9 μ g/mL, respectively, and their total polyphenol contents were estimated as 9.6 mg/g for NRE and 10.6 mg/g for RE. Both NRE and RE scavenged the hydroxyl radical in a concentration-dependent manner, but their activities were lower than that of BHA. It was also shown that SOD-like activity was dependent on NRE and RE concentration, and the SOD-like activity of NRE was slightly higher than that of RE. The highest SOD-like activity obtained from NRE was 20% at a concentration of 3 mg/mL. Neither NRE nor RE seemed to have an effect on α -amylase and α -glucosidase inhibition. Finally, the hot water extracts of NRE and RE significantly decreased the concentration of LPS-induced NO in RAW 264.7 cells, indicating anti-inflammatory activity.

Key words: *Euonymus alatus*, antioxidant activity, nitric oxide, superoxide dismutase, α -amylase

서 론

최근 생활환경과 식생활 패턴의 변화 등으로 현대인들은 노화를 포함한 각종 성인병 발생의 원인이 되고 있는 활성산소가 주목받고 있다. 이들 활성산소는 강한 산화력으로 동맥경화 및 당뇨병 등 각종 질병과 생체 대사과정에서 생성되어 세포막 지방질을 과산화시키고 세포막투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발시킨다(1-4). 현재 식품분야에서도 이러한 활성산소의 반응성을 감소 또는 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 관한 연구가 커다란 관심이 되고 있다(5,6). 또한, 국민들의 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강 지향적인 식품개발이 활발히 진행되고 있으며, 기호식품에 있어서도 건강유지를 위한 기능성 제품이 상품화되고 있다(7).

화살나무[*Euonymus alatus*(Thumb.) Sieb.]는 우리나라 및 일본, 중국에 분포되어 있으며, 노박덩굴과에 속하는 낙엽관목이다. 높이는 약 3m에 달하고 줄기에 2-4개의 날개처럼 코르크질이 붙어 있는 것이 특징이다. 줄기에 붙어있는 이 날개의 생김새가 특이하여 귀신을 쫓는 화살이란 뜻의 귀전우(鬼剪羽)라고도 불리운다. 잎은 마주달리고 짧은 잎자루가 있으며, 타원형 또는 달걀을

거꾸로 세운 모양으로 가장자리에 잔 톱니가 있다. 화살나무는 한방에서 수피와 가지를 월경불순, 무월경, 산후지혈과 자궁암 등에 이용하였으며, 민간에서는 열매를 연고로 피부병에 이용하였다. 화살나무잎은 홉잎이라고도 불리우는데, 예로부터 이른 봄에 어리고 부드러운 잎을 요리재료로 이용하였다(8). 또한 고흥압, 동맥경화, 천식에 치료효과가 있다고 알려지고 있다(9). 현재까지 화살나무잎으로 제외한 다른 부위(가지, 줄기, 날개)에 대해서 성분 및 기능성에 대한 연구로 화살나무 추출물이 염증성 싸이토카인의 분비 억제 및 세포의 안정화 작용을 가지고 있음을 규명하였다(10-12). 그러나 화살나무 잎에 대한 생리활성 규명은 상대적으로 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 화살나무잎을 이용하여 열수추출물에 대한 항산화활성 및 생리활성과 화살나무잎을 고온에서 볶음처리 시 가열처리가 화살나무잎의 생리활성 물질에 미치는 영향을 검토하여 천연물소재로서 기능성제품 개발을 위한 기초자료로 제시하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구의 시료는 정선군 농업기술센터에서 분양받은 화살나무[*Euonymus alatus*(Thumb.) Sieb.] 잎으로 2007년 5월에 채취한 것을 사용하였다. 시료는 230°C로 유지된 솥에 넣고 10분간 볶음처리하고 볶음처리 온도는 3 단계(230-150-80°C)로 실시하였다. 이것을 10배의 증류수로 가하여 중탕추출기로 100°C에서 2시간 동안 가열추출하여, 동결건조한 후 시료로 이용하였다.

*Corresponding author: Myeong-Hyeon Wang, School of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

Tel: 82-33-250-6486

Fax: 82-33-241-6480

E-mail: mhwang@kangwon.ac.kr

Received July 16, 2007; accepted August 28, 2007

총폴리페놀 함량 측정

화살나무잎 열수추출물의 총폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis법(13)으로 측정하였다. 즉 시료 1 mg에 Folin reagent 2 mL을 넣은 후 3분간 정치하고 10% sodium carbonate (10% Na₂CO₃) 2 mL을 첨가하여 혼합한 후 30°C에서 40분 정치한 뒤 분광광도계를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 이 검량곡선으로부터 시료중의 총폴리페놀 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

화살나무잎 열수추출물을 각 농도별(50, 100, 200, 500 µg/mL)로 제조한 시료 0.4 mL에 0.2 mM DPPH 0.4 mL를 가하고 vortex mixing 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소율을 조사하였다. 무처리구와 처리구의 값을 비교하여 free radical 소거활성을 결정하였다. 이 때 IC₅₀(µg/mL)은 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 추출물의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인 α -tocopherol, ascorbic acid 및 BHT(butylated hydroxytoluene)를 대조구로 사용하여 비교하였다.

Hydroxyl 라디칼 소거능 측정

Fenton반응으로 생성된 hydroxyl 라디칼에 의한 2-deoxyribose의 산화정도를 Gutteridge의 방법에 따라 측정하였다(14). 시험관에 0.1 mM FeSO₄ · 7H₂O 0.2 mL, EDTA용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL 에 시료 0.2 mL, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 mL, 10 mM H₂O₂ 0.2 mL을 가하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 2.8% TCA (trichloroacetic acid) 용액 1 mL를 가하여 95°C에서 10분간 증탕한 후 냉각한 다음 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료의 hydroxyl 라디칼 소거활성은 아래 식에 따라 계산하였다.

Hydroxyl 라디칼소거활성(%) = (1 - 시료첨가구 흡광도/대조구 흡광도) × 100

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund(15)의 방법에 따라 시료 0.2 mL에 Tris · HCl buffer 3.0 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL을 가하고 25°C에서 10분간 방치한 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구에는 시험용액 대신 탈이온수를 첨가하였다. SOD 유사활성 측정은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

SOD 유사활성(%) = {1 - (시료첨가구 흡광도/대조구 흡광도)} × 100

α -Amylase 저해 활성

화살나무잎 열수추출물 50 µL를 1.2 U/mL pancreatin기원의 α -amylase 효소액 250 µL와 혼합하여 37°C에서 10분간 preincubation 한 후 0.5% starch 500 µL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 48 mM DNS(3,5-dinitrosalicylic acid and 30% sodium potassium tartrate in 0.5 M NaOH) 발색시약 500 µL를 넣고, 100°C에서 15분간 끓여 발색시킨 후 충분히 냉각시켰다. 이 반응액에 3배의 물을 가하고 잘 교반한 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율을 계산하였다. α -Amylase의 활성을 50% 저해하는 저해제의 농도를 IC₅₀으로 계산하였다.

α -Glucosidase 저해 활성

화살나무 잎 열수추출물 50 µL를 0.15 U/mL α -glucosidase 효소액 50 µL, 200 mM KPB(pH 7.0) 50 µL와 혼합하여 37°C에서 15분간 preincubation 한 후 3 mM pNPG(4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) 100 µL를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.1 M Na₂CO₃ 750 µL로 반응을 정지시킨 후, 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 α -glucosidase의 IC₅₀을 계산하였다.

Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 소거활성은 마우스의 대식세포 세포주인 Raw 264.7세포를 지시세포로 이용하여 Murakami 등의 방법에 의해 측정하였다(16). Raw 264.7세포는 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 media에서 배양하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 Raw 264.7세포를 96 well에 well당 1 × 10⁵ cells을 분주한 다음 시료를 10 µg/mL 및 100 µg/mL의 농도가 되도록 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 48시간 동안 5% CO₂의 공기조건에서 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 10 µg/mL의 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하여 활성화 유도한 세포를 사용하였다. 배양 후, 상정액 100 µL를 회수하고 여기에 동량의 Griess solution을 첨가하여 15분간 방치한 다음 상정액의 발색도를 microplate reader를 사용하여 520 nm 및 550 nm의 흡광도로 측정하였다. 세포가 생산한 NO를 정량하기 위하여 sodium nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

MTT assay에 의한 세포독성 검정

Mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다(17). Raw 264.7 세포를 microplate에 NO 측정과 같은 조건으로 분주하여 24시간 배양한 후, 10 µg/mL 및 100 µg/mL의 농도가 되도록 시료를 첨가하였다. 배양이 끝나면 배양액의 5 mg/mL의 MTT용액(Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) 100 µL를 첨가하고 37°C에서 3시간 처리한 다음 DMSO 150 µL를 첨가한 상태에서 10분간 진탕시켜 세포내에 들어간 색소를 충분히 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm 및 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성실험은 LPS 무처리군에 대한 처리군의 비율로 계산하여 세포 생존율을 나타내었다.

결과 및 고찰

화살나무 잎 열수추출물의 수율

화살나무잎 덩음처리는 녹차를 녹차잎에 들어있는 산화효소를 파괴하기 위해 술에 녹차잎을 넣고 열을 가해 덩음 식혀서 비비는 과정을 몇 번 반복하여 수분을 제거하여 만들어 생산하는 전통적인 방법을 이용하였다. 일반적으로 전통적으로 손에 의해 이루어지는 제다법은 차 품질에 큰 영향을 미치기 때문에 이를 균일화시키기 위해 덩음차 제조 공정 중 덩음회수가 녹차의 품질에 미치는 영향을 검토한 결과, 5회 덩음처리를 한 것이 최적의 조건이었음을 밝혔다(18). 본 연구에서는 덩음처리 전 시료의 수분함량이 25% 정도로 낮은 수분함량과 화살나무잎의 색이 과도한 열처리로 인한 변색으로 화살나무 잎의 덩음처리는 3단계로 실시하였다. 3단계 덩음처리 후 수분함량은 2.0%였다. 화살나무잎에 대한 덩음처리와 덩음처리하지 않은 시료의 열수추출물 수율은 Table 1에 나타난 것처럼 덩음처리한 시료 17.8%, 덩음처리하지 않은 시료 16.8%로 덩음처리한 경우가 다소 높게 나타났다.

Table 1. Extraction yield and total polyphenol content of hot water extract from *E. alatus* leaf

Sample	Yield (%)	Total polyphenol content (mg TAE/g) ¹⁾
No roasted <i>E. alatus</i>	16.8	10.6 ± 0.8 ²⁾
Roasted <i>E. alatus</i>	17.8	9.6 ± 0.7

¹⁾TAE standards for tannic acid equivalents.
²⁾Values are means ± S.D.

Table 2. DPPH free radical scavenging activities of hot water extract obtained from *E. alatus* leaf

Sample	IC ₅₀ (µg/mL)
No roasted <i>E. alatus</i>	19.1 ± 0.8
Roasted <i>E. alatus</i>	21.9 ± 1.0
Ascorbic acid	3.5 ± 0.1
α-Tocopherol	15.9 ± 2.3
BHA	6.1 ± 0.6

All values are means ± S.D.

뒤음처리한 시료의 열수추출물 수율이 다소 높은 것은 뒤음처리한 시료와 뒤음처리하지 않은 시료의 수분함량의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

총폴리페놀 함량

페놀성 물질은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl을 가지기 때문에 단백질 및 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화효과 등의 생리활성 기능도 가진다(19,20). 화살나무잎 열수추출물에 대한 총페놀물의 함량은 Table 1에 나타난 것처럼, 뒤음처리 하지 않은 시료 10.6 mg/g, 뒤음처리한 시료 9.6 mg/g 로 뒤음처리하지 않은 시료가 다소 높게 나타났다. 뒤음차에서 탄닌함량이 14.1%로 보고하였으며, 탄닌의 98%가 카테킨류인 것으로 보고하였다(21). 또한 녹차의 폴리페놀 함량은 14.38-19.36%로 보고하였다(22). 본 실험에 얻어진 화살나무잎 열수추출물에 대한 총폴리페놀 함량은 녹차보다는 낮은 수치를 보여주었다.

DPPH에 의한 항산화 활성

인체 내의 free radical은 지질, 단백질 등과 결합하여 생체의 노화를 일으키는 물질이며, free radical을 제거할 수 있는 천연물에 대한 연구가 끊임없이 이루어지고 있다. 특히 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거법은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색이 탈색에 의해 나타내는 정도를 지표로 하여 항산화능을 측정하는 방법이다(23). 화살나무잎 뒤음처리와 하지 않은 열수추출물에 대한 DPPH에 의한 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 뒤음처리하지 않은 시료의 항산화 활성(19.1 µg/mL)이 뒤음처리한 시료(21.9 µg/mL)보다도 좋은 활성을 보여주었다. 전자공여능은 phenolic acid와 flavonoid 및 기타 phenolic 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다(24). 또한 항산화성의 정도는 식물의 종류 및 이들에 함유되어 있는 항산화 유효성분의 종류와 추출방법에 따라 현저한 차이가 난다고 보고하였다(25). 화살나무잎 열수추출물들에서 뒤음처리하지 않은 시료가 전자공여능이 높은 것은 뒤음처리한 시료에 비해 다소 높은 페놀물질이 함유하고 있기 때문인 것으로 생각된다.

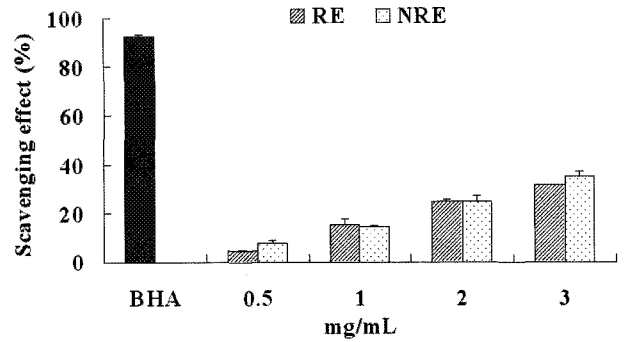


Fig. 1. The hydroxyl radical scavenging activities of hot water extracts in *Euonymus alatus* leaf. BHA at the concentration of 100 µg/mL was used as the positive control. NRE: No roasted *E. alatus* leaf, RE: Roasted *E. alatus* leaf. All values are means ± S.D.

Hydroxyl 라디칼 소거능

Hydroxyl 라디칼은 활성산소 라디칼 중에서 화학적으로 가장 반응성이 크며, 기질을 산화시킬 수 있는 라디칼로, 특히 superoxide anion(O₂⁻)을 생성하는 원천으로 작용하여 인접한 분자에 매우 심각한 손상을 초래한다. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 Fenton reaction에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼을 deoxyribose를 분해하고 이 때 생성된 MDA(malondialdehyde)양을 측정함으로써 화합물의 hydroxyl 라디칼 소거능을 측정하였다. Fig. 1은 화살나무잎 열수추출물에 대한 hydroxyl 라디칼 소거능을 나타낸 것이다. 대조구인 BHA는 100 µg/mL에서 93% 정도의 높은 hydroxyl 라디칼 소거능을 보여주었다. 화살나무잎 열수추출물에 대한 hydroxyl 라디칼 소거능은 뒤음처리한 시료와 뒤음처리하지 않은 시료, 모두 농도의 증가에 따라 hydroxyl radical이 감소하는 경향을 보여 주어 농도의존적인 저해효과를 나타냈다. 3 mg/mL의 농도에서 뒤음처리하지 않은 시료가 hydroxyl 라디칼 소거능이 가장 높은 35%를 보여주었다. 대조구인 BHA에 비해 낮은 hydroxyl 라디칼 소거능을 보여준 화살나무잎 열수추출물은 산화방지제인 BHA와는 달리 순수한 화합물이 아닌 조추출물이기 때문에 낮은 것으로 생각된다.

SOD 유사활성 측정

SOD는 superoxide(O₂⁻)를 정상상태의 산소로 환원시킴으로써 superoxide가 관여하는 각종 질병이나 노화를 억제할 수 있는 효소이며, SOD 유사활성물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하며, superoxide의 반응성을 억제하고 superoxide로부터 생체를 보호하는 것으로 보고되고 있으며, 이를 제거함으로써 산화적 장애를 방어하고 노화억제의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보고 있다(26). 화살나무잎 열수추출물에 대한 SOD 유사활성 결과는 Fig. 2에 나타났다. 전체적으로 SOD 유사활성은 농도에 의존하는 경향을 보여주었다. 화살나무잎 열수추출물에 대한 대조구인 ascorbic acid의 경우, 3 mg/mL에서 52%의 SOD 유사활성을 보인 반면, 뒤음처리하지 않은 시료가 20%, 뒤음처리한 시료가 18%로 뒤음처리하지 않은 시료가 다소 높은 SOD 유사활성효과를 보여주었다.

α-Amylase와 α-glucosidase 저해 활성

화살나무잎의 열수추출물들에 대한 α-amylase와 α-glucosidase에 대한 저해효과를 대조구인 acarbose와 함께 측정하여 Fig. 3과 4에 나타났다. Acarbose는 α-amylase와 α-glucosidase에 대한 저해

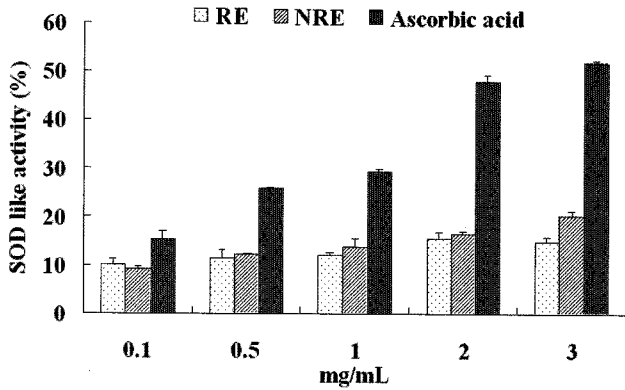


Fig. 2. Pyrogallol antioxidation activity of hot water extracts in *E. alatus* leaf. NR: No roasted *E. alatus* leaf, RE: Roasted *E. alatus* leaf. All values are means \pm S.D.

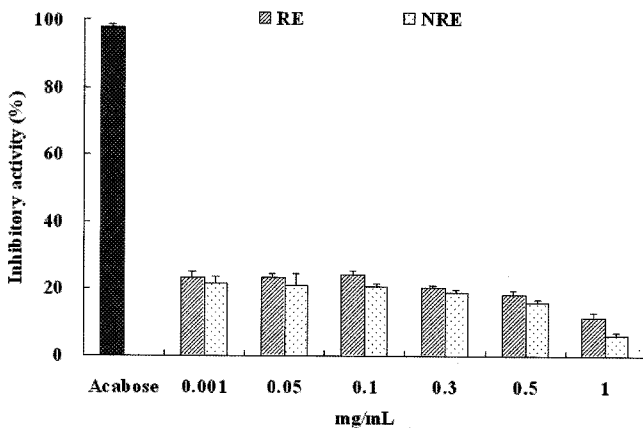


Fig. 3. Inhibitory effects of *E. alatus* leaf on α -amylase. Acabose at the concentration of 0.1 μ g/mL was used as the positive control. NR: No roasted *E. alatus* leaf, RE: Roasted *E. alatus* leaf. All values are means \pm S.D.

제로서 시판되고 있는 의약품으로서 주로 소장 세포의 점막에 존재하는 maltase의 활성을 억제시키는 것으로 알려지고 있다(27,28). 대조구인 acabose는 0.1 μ g/mL의 농도에서 98% 정도의 저해 효과를 보여주었다. 0.001-0.1 mg/mL 사이의 농도에서 덩음처리한 시료가 23-24%, 덩음처리하지 않은 시료가 21-22% 정도의 유사한 α -amylase 저해 활성을 보여주었다. 그러나 0.1 mg/mL 이상의 고농도에서는 오히려 α -amylase에 대한 저해활성이 감소됨을 확인하였다. 이것으로 화살나무 열수추출물이 저농도에서는 α -amylase를 저해하여 포도당과 같은 단당류의 분해를 지연시키나 고농도일 때는 단당류로 분해를 촉진시킴을 알 수 있었다. α -Amylase 저해는 모두 덩음처리한 시료가 덩음처리하지 않은 것에 비해 다소 좋은 효과를 보여주었다. 덩음처리한 시료가 0.1 mg/mL의 농도에서 α -amylase는 25% 정도였다. 그러나 α -glucosidase에 대한 저해활성은 다소 미약한 결과를 보여주고 있어 이에 대한 활성이 거의 없는 것으로 생각된다.

Nitric oxide(NO) 생성량 측정 및 MTT assay에 의한 세포 독성 검정

Nitric oxide는 생체 내에서 NO Synthase(NOS)라는 효소의 촉매작용을 통해 L-arginine로부터 생성되는 반응성이 강한 자유라디칼이다. NO는 생리적인 현상인 혈압조절과 신경전달 매개체로

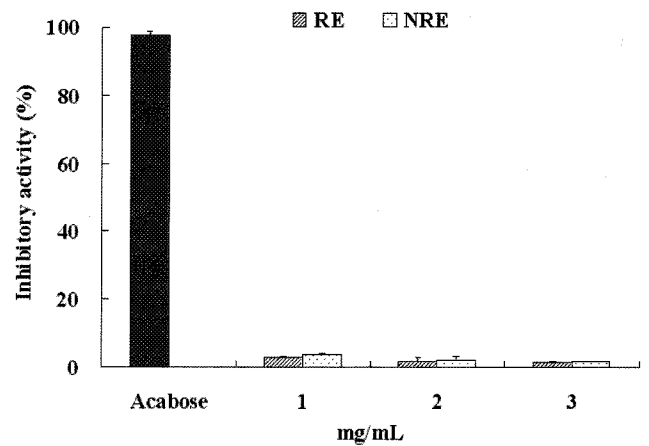


Fig. 4. Inhibitory effects of *E. alatus* leaf on α -glucosidase. Acabose at the concentration of 0.1 μ g/mL was used as the positive control. NRE: No roasted *E. alatus* leaf, RE: Roasted *E. alatus* leaf. All values are means \pm S.D.

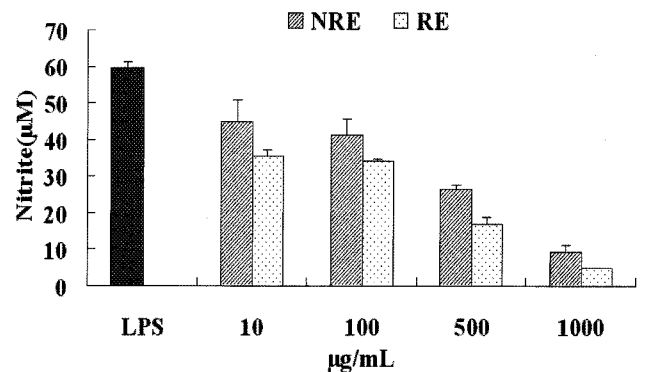


Fig. 5. Inhibition of nitrite production by *E. alatus* leaf extracts. NRE: No roasted *E. alatus* leaf, RE: Roasted *E. alatus* leaf. All values are means \pm S.D.

작용하며, 면역반응에 중추적인 역할을 하고 있으며, 뼈를 형성하는 chondrocyte와 synoviocyte같은 세포에서도 발현되고 있다(29). 그러나 최근에 과량의 NO 생성이 염증반응을 일으키고, 조직의 파괴 및 면역체계의 이상을 일으킨다고 보고되고 있다(30). 본 연구에서는 Raw 264.7세포를 LPS로 활성화시킴과 동시에 화살나무 열수추출물을 첨가하고 18시간 경과한 후 생성된 NO의 양을 측정하였다(Fig. 5). LPS로 활성화된 Raw 264.7세포는 약 60 μ M 정도의 NO를 생성하였으나, 화살나무 열수추출물을 처리하였을 때 NO 생성이 현저히 억제됨을 확인하였다. NO 생성억제 효과는 화살나무 열수추출물 농도에 의존적이었으며, 두 시료 모두 1000 μ g/mL의 농도에서 가장 좋은 결과를 보여주었다.

MTT를 이용하여 화살나무 열수추출물의 Raw 264.7세포에 대한 세포독성을 확인하였다(Fig. 6). 세포독성측정은 LPS 무처리군에 대한 처리군의 비율로 계산하여 세포생존율을 나타내었다. 덩음처리하지 않은 시료는 열수추출물의 첨가량이 증가하여도 세포생존율이 일정하게 나타났지만, 덩음처리한 시료는 열수추출물의 첨가량 증가와 함께 세포생존율이 감소하였다.

화살나무 열수추출물에 대한 NO 생성 억제효과는 덩음처리하지 않은 시료와 덩음처리한 시료, 모두 농도의존적인 효과를 보여주고 있어 농도의 증가와 함께 항염증활성효과가 향상되었

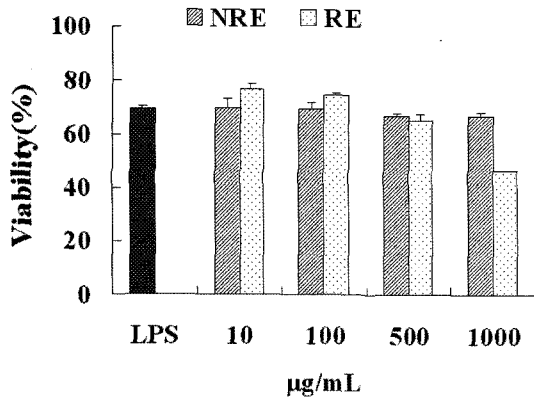


Fig. 6. Cell viability was measured by MTT assay. NRE: No roasted *E. alatus* leaf, RE: Roasted *E. alatus* leaf. All values are means \pm S.D.

다. 그러나 MTT를 이용한 세포 생존율을 측정할 결과, 볶음처리하지 않은 시료의 열수추출물 첨가량이 증가하여도 일정하게 나타난 반면, 볶음처리한 시료의 열수추출물 첨가량이 증가함에 따라 세포 생존율은 현저하게 감소하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 볶음처리하지 않은 시료가 볶음처리한 시료에 비해 좋은 염증 저해 효과를 보여주고 있으며, 특히 볶음처리하지 않은 시료의 1,000 µg/mL의 농도에서 가장 좋은 항염증효과를 나타냈다.

이상의 결과에서 화살나무잎 열수추출물에 대한 생리활성은 볶음처리하지 않은 시료가 볶음처리한 시료에 비해 다소 좋은 항산화 및 α -amylase 저해, 항염증효과를 보여주었다. 일반적으로 녹차는 기호성이 우수하고 페놀성 화합물, 비타민C, 탄닌, 카페인 등과 같은 성분이 함유하고 있고, 여러 성인병 예방 등의 뛰어난 약리적 특성을 가지고 있다. 이러한 녹차의 성분들은 볶음처리에 따라 큰 차이를 나타낸 것으로 알려지고 있다(31). 또한 볶음처리한 옷나무 열수추출물이 암세포 성장억제효과가 있는 것으로 보고하고 있다(32). 이러한 것들을 근거로 하여 본 연구에서 식용으로 이용되어지고 있는 화살나무잎을 보다 기능성 소재로서 활용하기 위해 볶음처리를 실시하였으나, 볶음처리가 화살나무잎이 가지고 있는 생리활성기능을 오히려 저해시키는 요인으로 작용하는 것으로 사료된다.

요 약

화살나무잎을 이용하여 열수추출물에 대한 항산화활성 및 생리활성과 화살나무잎을 고온에서 볶음처리시 가열처리가 화살나무잎의 생리활성 물질에 미치는 영향을 검토하기 위해 볶음처리한 것과 볶음처리하지 않은 시료에 대한 항산화 활성, α -amylase, α -glucosidase 및 염증억제효과를 분석하였다. 화살나무잎 열수추출물에 대한 총폴리페놀 함량은 볶음처리하지 않은 시료 10.6 mg/g, 볶음 처리한 시료 9.6 mg/g 로 볶음처리하지 않은 시료가 다소 높게 나타났다. DPPH 라디칼 소거능은 볶음처리하지 않은 시료의 항산화 활성(19.1 µg/mL)이 볶음처리한 시료(21.9 µg/mL)보다도 좋은 활성을 보여주었다. Hydroxyl 라디칼 소거능은 볶음처리한 시료와 볶음처리하지 않은 시료, 모두 농도의 증가에 따라 hydroxyl radical이 감소하는 경향을 보여주어 농도의 의존적인 저해효과를 나타냈다. SOD 유사활성은 농도에 의존하는 경향을 보여주었고, 화살나무 잎의 열수추출물에 대한 대조구인 ascorbic acid의 경우, 3 mg/mL에서 52%의 SOD 유사활성을

보인 반면, 볶음처리하지 않은 시료가 20%, 볶음처리한 시료가 18%로 볶음처리하지 않은 시료가 다소 높은 SOD 유사활성도를 나타내었다. α -Amylase 저해효과는 화살나무 잎의 열수추출물은 농도의 증가에 따라 효과가 낮아졌고, 볶음처리한 시료가 볶음처리하지 않은 것에 비해 다소 좋은 효과를 보여주었다. 그러나 α -glucosidase 저해효과에 대한 활성은 거의 없었다. 대식세포 Raw 264.7세포를 이용한 화살나무잎 열수추출물의 항염증활성 효과는 LPS로 활성화시킴과 동시에 화살나무잎 열수추출물을 첨가하고 18시간 경과한 후 생성된 NO의 양을 측정하여, 볶음처리한 시료와 볶음처리하지 않은 시료 모두에서 농도의존적인 NO 생성억제효과가 확인되었다. MTT를 이용한 화살나무잎 열수추출물의 세포생존율은 볶음처리하지 않은 시료의 경우, 열수추출물의 첨가량이 증가하여도 세포생존율이 일정하게 나타났지만, 볶음처리한 시료는 열수추출물의 첨가량 증가와 함께 세포생존율이 감소하였다.

문 헌

1. Fridorich I. The biological activity of oxygen radicals. Science 201: 875-881 (1978)
2. Imalay IA, Limm S. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 240: 1302-1309 (1989)
3. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants antioxidants and the degenerative disease of aging. P. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7915-7922 (1993)
4. Mccord JM. Oxygen derived radicals: A link between reperfusion injury and inflammation. Fed. Proc. 46: 2402-2406 (1987)
5. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. Crit. Rev. Food Sci. 35: 7-20 (1995)
6. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do you know that they are working? Crit. Rev. Food Sci. 35: 21-39 (1995)
7. Lee JR, Jung JD, Lee JI, Song YM, Jin SK, Kim IS, Kim HY, Lee JH. The effects of emulsion type sausages containing mulberry leaf and persimmon leaf powder on lipid oxidation, nitrite, VBN, and fatty acid composition. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 23: 1-8 (2003)
8. Han YB. Hankuk Yasaeng Sikyong Sikmul Jawon II (Wild Edible Plant Resources in Korea II). Korea University Press, Seoul, Korea. pp. 347-351 (2003)
9. Huang KC. The Pharmacology of Chinese Herb. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA. pp. 93-94 (1993)
10. Lee JH, Shin SJ, Moon Y, Lee DK. Reduction of doxorubicin induced tissue damage by *Euonymus alatus* extract. Korean J. Immunol. 18: 253-263 (1996)
11. Chung HS, Jeong HJ, Kim JS, Jeong SI, Kim KS, Kim KS, Kang BK, Ahn JW, Back SH, Kim HH. Activation of inducible nitric oxide synthase by *Euonymus alatus* in mouse peritoneal macrophages. Clin. Chim. Acta 318: 113-120 (2002)
12. Kim JM, Yang HH, Choi MS. 1994. Effect of *Euonymus alatus* on the tumorigenesis and immune response. Korean J. Vet. Public Health 18: 79-85 (1994)
13. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. Am. J. Enol. Viticult. 16: 144-158 (1965)
14. Gutteridge JM. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid reactive material from deoxy sugars, nucleosides, and benzoate. Biochem. J. 224: 761-767 (1984)
15. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47: 468-474 (1974)
16. Murakami A, Gao G, Kim OK, Omura M, Yano M, Ito I, Furukawa H, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H. Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitor of nitric oxide generation in mouse macrophage Raw 264.7

- cells. J. Agr. Food Chem. 47: 333-339 (1999)
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. J. Immunol. Methods 65: 55-63 (1993)
 18. Park JH, Kim YO, Jung JM, Seo JB. Effect on quality of pan-fried green tea at different pan-frying conditions. J. Bio. Environ. Control 15: 90-95 (2006)
 19. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1127-1132 (2000)
 20. Whang HJ, Han WS, Yoon KR. Quantitative analysis of total phenolic content in apple. Anal. Sci. Technol. 14: 377-383 (2001)
 21. Jeon JR, Park GS. Korean green tea by *Ku Jeong Ku Po's* 1. Analysis of general compositions and chemical composition. Korean J. Soc. Food Sci. 15: 95-101 (1999)
 22. Choi SH, Lee BH, Choi HD. Analysis of catechin contents in commercial green tea by HPLC. J. Korean Food Sci. Nutr. 21: 386-389 (1992)
 23. Choi CH, Song ES, Kim JS, Kang MH. Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1216-1220 (2003)
 24. Kand YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 626-632 (1996)
 25. Kim JG, Kang YM, Eum GS, Ko YM, Kim TY. Antioxidative activity and anti-microbial activity of extracts from medicinal plants (*Akebia quinata* Decaisn, *Scirus fluvialis* A. Gray, *Gardenia jasminoides* for. Grandiflora Makino). J. Agr. Life Sci. 37: 69-75 (2003)
 26. Kuramoto T. Development and application of food materials from extract such as SOD. Up-to-date Food Process. 27: 22-23 (1992)
 27. Carrascosa JM, Moleto JC, Fermin Y, Martinez C, Andes A, Satrustegui J. Effect of chronic treatment with acarbose on glucose and lipid metabolism in obese diabetic Wistar rats. Diabetes Obes. Metab. 3: 240-248 (2001)
 28. Scheen AJ. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus, a critical review of controlled trials. Diabetes Metab. 24: 311-320 (1998)
 29. Ding AH, Nathan CF, Stuhr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. J. Immunol. 141: 2407-2412 (1988)
 30. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophage. Carcinogenesis 20: 1945-1952 (1999)
 31. Ko YS, Lee IS. Quantitative analysis of free amino: Acids and free sugars in steamed and roasted green tea by HPLC. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 14: 301-304 (1985)
 32. Kwak EJ, Jo IJ, Sung KS, Ha TY. Effect of hot water extracts of roasted *Rhus verniciflua* Stokes on antioxidant activity and cytotoxicity. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 784-789 (2005)