

## 고로쇠와 우산고로쇠 저온고압 수용성 추출물의 유용생리활성 비교

정명훈\* · 하지혜\* · 오성호\* · 김승섭\* · 이학주\*\* · 강하영\*\* · 이현웅\*\*\*\*†

\*강원대학교 BT특성화학부(대학) 생물소재공학과, \*\*국립산림과학원, \*\*\*강원대학교 생명공학연구소

### Comparison of Biological Activities of *Acer mono* and *A. okamotoanum* Extracts by Water Extracton and Low Temperature High Pressure Extraction

Myoung Hoon Jeong\*, Ji Hye Ha\*, Sung Ho Oh\*, Seung Seop Kim\*, Hak Ju Lee\*\*, Ha Young Kang\*\*, and Hyeon Yong Lee\*\*\*\*†

\*Department of Biomaterials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

\*\*Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea.

\*\*\*Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

**ABSTRACT:** Hepatoprotective and antioxidant activities of *Acer mono* and *A. okamotoanum* were compared after being extracted by low temperature and high pressure (LTHP) at 20 MPa and 60 °C for 15 minutes. Extraction yield of both *A. mono* and *A. okamotoanum* was increased about 40~43% by this extraction process. On scavenging activities, the bark of *A. okamotoanum* from this extraction process showed the highest activity as about 97%. This value was higher than that from conventional water extraction and *A. mono* extracts. Both of *A. mono* and *A. okamotoanum* showed high ability on nitrite scavenging, but decreasing tendency according to increasing of pH. On SOD-like test, *A. okamotoanum* had the highest activity as 46.28% at 1.0 mg/ml concentration. *A. okamotoanum* extracted by LTHP also showed the highest activity as 197.38% in adding 1.0 mg/ml concentration. Generally, the extracts from low temperature and high pressure extraction process are higher hepatoprotective and antioxidant activities than that from conventional water extraction. It can conclude that the bark of *A. okamotoanum* has better biological activities than other parts of *A. mono*.

**Key Words :** *Acer mono*, *Acer okamotoanum*, Low temperature high pressure extraction, Antioxidant, Hepatoprotective

## 서 언

고로쇠나무 (*Acer mono*)는 표고 100~1,800 m에 자생하며, 한국, 일본, 중국, 만주에까지 분포하는 단풍나무과에 속하는 낙엽교목이다. 우리나라에는 고로쇠나무 (*Acer mono*), 붉은고로쇠나무 (*A. mono* for. *rubripes*), 우산고로쇠나무 (*A. okamotoanum*), 만주고로쇠나무 (*A. truncatum*), 긴고로쇠나무 (*A. mono* for. *dissectum*), 왕고로쇠나무 (*A. mono* var. *savatiери*), 산고로쇠나무 (*A. mono* var. *horizontale*), 집게고로쇠나무 (*A. mono* for. *connivens*), 털고로쇠나무 (*A. mono* var. *ambiguum*) 등 9종의 품종과 변종이 생육하고 있는 것으로 알려져 있다 (Lee, 1982). 현재 고로쇠나무에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않으며, 수액에 관한 연구로 국내에서는 무기물과 당류분석 (Kim et al., 1991), 자작나무 수액 중에 갈슘, 마그네슘 분석 (Yoon et al., 1992), 수액 성분분석과

효능 (Ahn, 1975) 등이 보고되어 있으며, 일본의 경우는 국내에 비해 비교적 폭넓은 연구가 이루어지고 있으나 우리나라와 마찬가지로 약리적 효과보다는 수액의 성분분석에 관한 것으로 자작나무의 성분에 관한 연구 (Terazawa et al., 1984) 등이 보고되고 있다. 또한 대부분의 연구가 고로쇠 수액에 관한 것으로, 고로쇠나무 자체의 활성 연구는 분획을 통한 항산화물질 분리 (Kwon et al., 1997), 고로쇠와 우산고로쇠 나무의 항산화능 및 glutathione S-transferase활성비교 (Jin et al., 2008) 등이 있다.

고로쇠나무와 같은 초목류의 추출에 있어서, 초고압 추출을 이용하면 다양한 식물 원료의 유기화합물의 추출을 크게 증가시킬 수 있고, 용매의 손실과 에너지, 공정시간을 줄이면서 높은 추출수율을 얻을 수 있다. 게다가 초고압 추출공정은 낮은 온도에서 공정을 수행하여, 추출에서의 온도에 의한 피해를 피할 수 있고 휘발성분의 손실을 줄일 수 있다. 식물 원료의 용

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received 2009 September 22 / 1st Revised 2009 October 23 / 2nd Revised 2009 November 17 / Accepted 2009 December 8

매 추출에 있어서 초고압추출공정을 이용하면 갑작스런 압력의 변화로 용매의 식물 원료로의 침투와 세포벽의 파괴로 인한 세포내 물질의 방출의 효과가 증가 된다 (Chen *et al.*, 2007).

산화작용은 생체에서 끊임없이 일어나는데 호흡에 산소를 이용하는 생물체로서 산화적 스트레스에 대한 노출은 불가피하다. 산업화와 더불어 증가되는 환경 오염물질들과 흡연, 알콜, 방사선 등은 반응성이 높은 활성 산소를 발생시키는 원인이 되며, SOD, catalase, peroxidase, glutathion reductase 등과 같은 체내 항산화계의 역할만으로는 한계를 넘어서 산화적 스트레스에 의한 세포막과 단백질의 분해, DNA 합성 억제 등의 손상이 유발된다 (Cao *et al.*, 2006). 인간을 비롯한 모든 호기성 생물체들은 공기 중의 산소를 이용하여 생명 유지에 필요한 에너지를 생성하는 과정에서 활성산소종 ( $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ , OH) 이 발생하며, 이들에 대한 자기 방어 기구를 가지고 있다. 그러나 생체 방어 기구에 이상이 초래되거나 각종 물리, 화학적 요인들에 의해 활성 산소종의 생성이 증가되면 산화적 손상을 입게 되어 직접 또는 간접적으로 생체에 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Gutteridge and Halliwell, 1994). 간에서 일어나는 생체 내 약물대사는 주로 체내로 흡수된 약물이 약물자체 또는 약물대사효소에 의한 대사과정을 통해 활성 대사체로 변환되어 약효를 발현하고, glutathione S-transferase (GST) 등의 효소에 의해 포합반응을 거쳐 무독화되고 동시에 보다 높은 수용성을 획득하여 신장이나 담즙을 통하여 각각 뇨와 변으로 체외로 쉽게 배출되도록 한다 (Wrighton and Stevens, 1992; Hartley *et al.*, 1995). 광 등 (1999)의 연구에서 한국 재래종 벼 종자가 항산화 활성에 기인하여 간보호작용 또한 나타내고 있다는 연구에 근거하여 GST 활성을 통한 간보호 작용을 탐색하였다.

본 연구에서는 최근 채취 및 그 이용성이 증대되고 있는 고로쇠 및 우산고로쇠나무의 목부와 수피를 대상으로 초고압 추출 공정을 통하여 항산화 활성 및 간보호 활성을 측정하고, 이를 통해 고로쇠 및 우산고로쇠나무가 가지는 기능성 식품소재로서의 가능성을 평가하고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

고로쇠나무와 우산고로쇠나무는 2009년 5월에 강원도 인제군과 울릉도에서 채취한 것으로, 수피를 분리하여 사용하였다. 재료를 실온에서 음건시킨 후 분쇄기로 분말화 한 뒤 실험에 사용하였다. 고로쇠 및 우산고로쇠나무 추출물을 약자로 표시하였다. 고로쇠, 우산고로쇠나무의 학명인 *Acer mono* 와 *A. okamotoanum* 의 M과 O를 각각 가장 앞에 표시하였고, 수피 (bark)의 B를 가운데에 위치 시키고, 열수 추출공정 (water extraction)의 W, 저온 고압 추출 (low temperature high

pressure)의 H를 가장 마지막에 표시하였다. 즉, 고로쇠 수피 열수 추출물은 MBW, 고로쇠 수피 저온 고압 추출물은 MBH, 우산고로쇠 열수 추출물은 OBW, 우산고로쇠 저온 고압 추출물은 OBH의 약자로 표시하였다.

### 2. 초고압 추출조건

초고압 추출은 고로쇠 및 우산고로쇠나무 수피 100 g을 초고압 추출 장치 (FOOD CIP-70-350-80, Ilshin autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 20 MPa의 압력으로 15분간 초고압 추출을 시행하였다. 초고압 추출이 끝난 고로쇠 및 우산고로쇠 수피를 수직환류냉각기가 부착된 추출 flask에 10배의 증류수를 사용하여 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압여과한 후 여액을 회전증발기 (rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압농축하고 다시 농축액을 동결건조하여 고로쇠 및 우산고로쇠 분말을 제조하여 실험에 사용하였다.

### 3. DPPH radical에 대한 전자공여능 측정

추출물의 전자공여작용 (electron donating abilities, EDA)은 각각의 추출물에 대한 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)의 전자공여효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 에탄올 1 ml, 시료 10  $\mu$ l, 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) 990  $\mu$ l를 분주한 시험관에 0.5 mM DPPH 용액 (Abs. EtOH soln.) 0.5 ml를 넣어 교반하고, 암실에서 5분간 반응을 유도한 후, 잔존 radical의 농도를 UV spectrometer를 이용하여 517 nm에서 측정하였다 (Lee and Lee, 2008). 전자공여능 (%)은  $[(1 - As / Ac) \times 100]$ 으로 나타내었고, As와 Ac에 실험군과 대조군의 흡광도 값을 각각 대입하여 계산하였다. 그리고 항산화제인 butylated hydroxy anisole (BHA)의 활성을 조사하여 본 실험의 추출물과의 비교를 실시하였다.

$$EDA (\%) = (1 - \frac{As}{Ac}) \times 100$$

As: 추출물 첨가구의 흡광도

Ac: 추출물 무첨가구의 흡광도

### 4. SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법 (1974)에 따라 과산화수소 ( $H_2O_2$ )로 전환 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 즉, 일정 농도의 시료 0.2 ml에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl] amino-methane + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 첨가하고 25°C에서 10분간 반응 후 1 N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 spectropho-

tometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가 및 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율 (%)로 나타내었다.

$$SOD \text{ 유사활성 (\%)} = \left(1 - \frac{As}{Ac}\right) \times 100$$

As: 추출물 첨가구의 흡광도

Ac: 추출물 무첨가구의 흡광도

단 As와 Ac는 대조구의 흡광도를 제외한 수치

### 5. 아질산염 소거능

아질산염 소거작용은 Gray와 Dugan (1975)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 1 ml에 일정 농도의 시료 1 ml를 가하고 0.1 N HCl (pH 1.2)을 사용하여 pH를 1.2로 조정된 반응용액을 가해 총량을 10 ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 ml씩 취하여 2% 초산용액 5 ml, Griess 시약 0.4 ml를 가하여 잘 혼합시킨 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 UV-spectrophotometer를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 공시험은 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 ml를 가하여 동일하게 행하였다. 아질산염 소거작용은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율로써 나타냈으며, 이 값이 큰 것일수록 아질산염 소거작용이 크다는 것을 의미한다.

N: 아연산염 소거율

$$N(\%) = \left(1 - \frac{A-c}{B}\right) \times 100$$

A: 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

C: 시료 추출물 자체의 흡광도

### 6. Glutathione S-transferase 활성 분석

간의 중요 해독 기전 중의 하나인 GST (glutathione S-transferase)의 활성을 측정하였다. Habig 등 (1974)의 방법과 같이 조제된 반응시약에 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 기질로서 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 첨가한 후 다시 37°C에서 2분간 반응시켰다. 반응 후 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심 분리한 후 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정한 뒤 다음과 같이 GST의 활성도를 계산하였다(Lee et al., 2003).

### 7. Scanning Electron Microscope 관찰

초고압 공정을 거친 후 세포조직의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 저진공주사현미경 (Low Vacuum-Scanning Electron, ×400)은 일본의 Hitachi Science systems의 S-3500N으로 촬영하여 고로쇠 수피의 표면을 관찰하였다. SEM (scanning electron microscope)을 통한 고로쇠나무 추출물의 표면 관찰을 위해 금, 백금, 금합금, 백금합금 등 작은 크기의 입자를 3~4 mm 정도 얇게 증착하여 전도성을 획득하고 2차 전자 방출 유도 및 전자선으로부터 시료를 보호하여야 하는 전처리 과정을 거친 후 촬영을 하였다 (Chae, 1996).

### 8. HPLC 분석을 통한 추출물의 물질 비교

시료 내 유용성분들의 비교를 위해 HPLC 분석용 water에 녹여 0.45 μm syringe filter로 여과하고 물 추출물과 물 추출 후 초음파 병행 추출물, 5분의 초고압 추출물 그리고 15분의 초고압 추출물을 각각 1 mg/ml의 농도로 조제하여 injection volume 20 μl로 측정하였다. HPLC 기기는 BIO-TEK instrument (Italy)사의 HPLC 500 series를 사용하여 Pump : BIO-TEK 522 controller, Column: Alltech Prevail C18 5 μm이고 이동상은 물과 acetonitrile을 사용하였는데 처음 10분간은 acetonitrile과 물의 비율을 20 : 80, 그 후 매 10분간 40 : 60, 60 : 40, 80 : 20으로 하였고 마지막 10분간은 20 : 80의 비율로 흘러보내 주었고, 유속은 1.0 ml/min으로 흘러주었다.

### 9. 통계처리

Microsoft excel의 student t-test에 의해 유의성을 검정하였다. 또한 각 활성 실험 등에 대한 각 실험결과는 triplicate determinations에 의한 Mean ± standard deviation (SD)로 표시했으며 각 평균치 간의 차이는 student t-test에 의해 P < 0.001, P < 0.005, P < 0.01 수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 추출수율 비교

Table 1은 고로쇠와 우산고로쇠나무의 추출수율을 나타낸 것이다. 우산고로쇠 저온 고압 추출물이 11.38%로 가장 높은 추출 수율을 나타내었고, 고로쇠 열수 추출물이 5.64%로 가장 낮은 추출수율을 나타내었다. 고로쇠와 우산고로쇠나무 전체의 수율을 살펴보면 고로쇠 보다 우산고로쇠나무의 수율이 조금 더 높은 것을 확인할 수 있다. 저온 고압 추출공정을 통해 일반 열수 추출물보다 추출 수율이 약 40% 증가한 것을 알 수 있다. 고로쇠나 우산고로쇠 나무처럼 그 표면이 단단한 초목류의 경우 일반 열수 추출을 할 경우 높은 온도와 오랜 시간이 걸린다는 단점이 있다. 그리고 본 연구의 결과에서처럼 추출수율 또한 저온 고압 추출공정에 비해 현저히 낮은 결과

**Table 1.** Extraction yields of *Acer mono* and *A. okamotoanum* by water extraction and low high pressure extraction process.

Sample	Extraction condition	Yields (% w/w)
<i>A. mono</i>	MBW <sup>1)</sup>	5.64 ± 0.21
	MBH <sup>2)</sup>	9.87 ± 0.56**
<i>A. okamotoanum</i>	OBW <sup>3)</sup>	6.89 ± 0.33**
	OBH <sup>4)</sup>	11.38 ± 0.71***

Each value were compared with control at <sup>a</sup> $P < 0.001$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.005$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.01$  by student *t*-test. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

<sup>1)</sup>MBW : water extraction of bark of *A. mono*.

<sup>2)</sup>MBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. mono*.

<sup>3)</sup>OBW : water extraction of bark of *A. okamotoanum*.

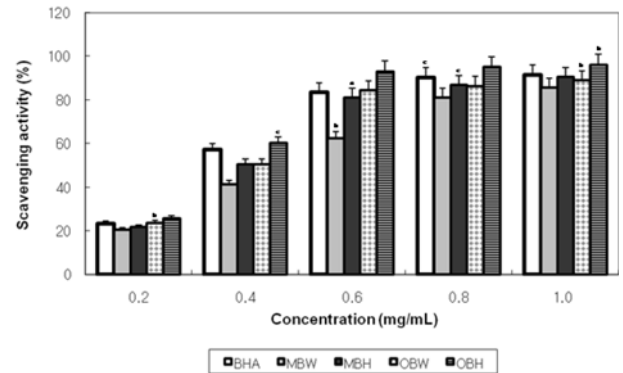
<sup>4)</sup>OBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. okamotoanum*.

를 확인할 수 있다. 이것은 기존의 추출 방법으로는 용출되지 않았던 활성 성분들이 저온 고압에 의한 높은 압력의 영향으로 조직과 세포막의 변형으로 인해 용매의 세포 내부로의 침투가 용이해져 기존 물질들의 용출량 증가와 새로운 물질의 용출이 가능해져 나타난 결과라 사료된다. 따라서 초목류의 추출에 있어 본 연구에서 사용한 저온 고압 추출 공정을 이용하면 용매의 손실과 에너지, 공정시간을 줄이면서 높은 추출수율 또한 얻을 수 있으며, 낮은 온도에서 추출이 진행되기 때문에 높은 온도에 의한 활성성분의 파괴 및 변성의 피해를 피할 수 있다.

## 2. DPPH radical에 대한 전자공여능 측정

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH radical 소거 활성법은 비교적 간단하면서도 대량으로 측정이 가능한 방법이다. 이 물질은 radical을 갖는 물질 중에서 비교적 안정한 화합물로 EtOH 용액에서는 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성 물질이 DPPH의 radical을 소거시켜 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있고, 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높은 장점이 있는 방법이다. 전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로도 이용되고 있다 (Choi and Oh, 1985).

Fig. 1은 고로쇠 및 우산고로쇠나무의 각 부위별 DPPH radical에 대한 전자 공여능을 나타낸 그림이다. 전체적으로 처리한 시료의 농도가 높아질수록 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 저온 고압 처리한 우산고로쇠 수피 추출물이 1.0 mg/mL의 농도에서 96.21%의 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 0.2, 0.4 mg/mL의 낮은 농도에서는 대조군으로 처리한 butylated hydroxy anisole (BHA)보다 비슷하거나 낮은



**Fig. 1.** DPPH scavenging activity of the extracts from *Acer mono* and *A. okamotoanum* by water extraction and low temperature high pressure extraction process. Each value were compared with control at <sup>a</sup> $P < 0.001$ , <sup>b</sup> $P < 0.005$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$  by student *t*-test. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. (BHA : Butylated hydroxy anisole, MBW : water extraction of bark of *A. mono*, MBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. mono*, OBW : water extraction of bark of *A. okamotoanum*, OBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. okamotoanum*).

경향을 보이다가 시료의 처리 농도가 높아질수록 BHA보다 그 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 이는, 약용 식물 추출물의 항산화 활성 검색에 관한 연구 (Jung *et al.*, 2004)에서 보고된 괴화 (76.9%), 녹차 (64.6%), 작약 (57.1%) 등의 결과를 훨씬 상회하는 결과로 저온 고압 처리한 추출물의 항산화 활성이 매우 높은 것으로 나타났다. 고로쇠와 우산고로쇠 추출물 모두 저온 고압 처리한 추출물의 활성이 일반 열수 추출물 보다 약 6% 정도 더 높은 것을 확인할 수 있다.

## 3. SOD 유사활성 측정

생체내 활성 산소종은 산소에서 유래된 것들로서 안정한 분자 상태인 triplet oxygen ( $^3O_2$ )이 자외선, 방사선, 화학반응, 대사과정을 통하여 생성되며 (Trush *et al.*, 1982; Aust *et al.*, 1985) superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), hydroxy radical ( $OH \cdot$ ), peroxy radical ( $HO_2 \cdot$ ), nitricoxide radical ( $NO \cdot$ )과 같은 자유 라디칼들과 라디칼의 형태가 아닌 singlet oxygen ( $^1O_2$ ), 오존 ( $O_3$ ), hypochlorous acid (HOCl) 그리고 과산화수소 ( $H_2O_2$ )등이 있다 (Aruoma, 1994; Davies and Goldberg, 1987). 이들 활성 산소에 의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러 체내 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기하며 (Miquel *et al.*, 1989), 활성 산소종이 정상적으로 소거되지 않았을 때 잔존하는 자유 라디칼에 의해 산화적 스트레스를 받게 됨으로써 다른 질병의 원인이 되기도 하고, 식품에서도 부패와 독성물질 생성 등으로 유해한 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Harman, 1982).

**Table 2.** SOD-like activities of the extracts from *Acer mono* and *A. okamotoanum* by water extraction and low temperature high pressure extraction process.

Sample	Concentration (mg/ml)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
<sup>1</sup> BHA	7.30 ± 0.24*	15.74 ± 0.24	21.59 ± 0.28***	29.47 ± 1.02	34.51 ± 1.46*
<sup>2</sup> MBW	5.84 ± 1.11**	12.47 ± 0.32*	16.59 ± 0.62	21.42 ± 0.74	25.47 ± 0.74
<sup>3</sup> MBH	8.46 ± 0.15	19.73 ± 1.22	24.68 ± 0.48***	31.31 ± 1.22**	39.14 ± 0.22***
<sup>4</sup> OBW	9.78 ± 0.65**	16.21 ± 0.95***	23.41 ± 0.44*	28.74 ± 0.81	33.56 ± 0.12*
<sup>5</sup> OBH	11.93 ± 0.38**	22.93 ± 0.54	29.74 ± 0.95**	32.89 ± 0.46	46.28 ± 0.39

Each value were compared with control at \*P < 0.001, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.01 by student t-test. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

<sup>1</sup>BHA : Butylated hydroxy anisole.

<sup>2</sup>MBW : water extraction of bark of *A. mono*.

<sup>3</sup>MBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. mono*.

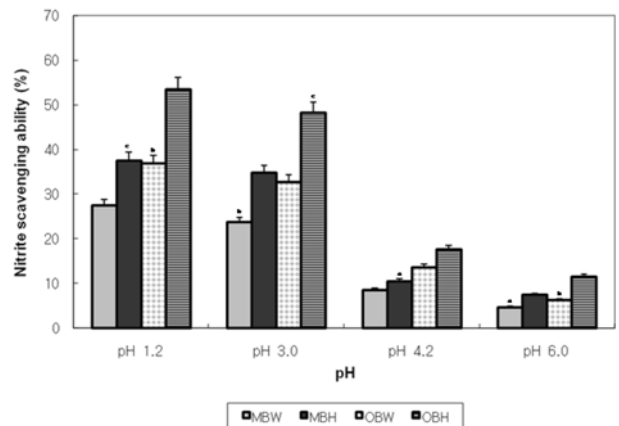
<sup>4</sup>OBW : water extraction of bark of *A. okamotoanum*.

<sup>5</sup>OBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. okamotoanum*.

고로쇠 및 우산고로쇠나무 추출물의 superoxide anion radical 소거능을 측정한 결과 (Table 2) 0.2~1.0 mg/ml의 시료 처리 농도 범위에서 대부분의 추출물이 대조군으로 처리한 BHA보다 최대 약 20% 가량 높은 활성을 보였다. 특히 우산고로쇠 저온 초고압 추출물이 1.0 mg/ml의 농도에서 가장 높은 46.28%의 활성을 나타내었다. 또한 우산고로쇠 추출물이 고로쇠 추출물보다 약 7% 가량 높은 활성을 나타내었다. 이는 헛개나무 추출물의 항산화 활성에 관한 연구 (Lee et al., 2004)에서 보고된 200 µg/ml에서의 99.5%보다는 현저히 낮은 수치이나 산겨릅나무 추출물의 항산화 (Kwon et al., 2008)연구에서 보고된 1000 µg/ml의 농도에서 각 분획별 활성의 평균 수치인 약 40%보다 높은 수치이다. 또한 저온 초고압 처리에 의해 약 10% 이상의 활성 증진 효과를 확인할 수 있었다.

**4. 아질산염 소거능 측정**

실험에 사용한 추출물의 농도는 1.0 mg/ml의 시료를 사용하였다. Fig. 2는 고로쇠 및 우산고로쇠나무 추출물의 아질산염 소거능을 나타낸 것으로 전체적으로 pH 1.2에서 27~53%의 소거율을 나타내었으며, pH 3.0에서 23~48%, pH 4.2에서 8~17%, pH 6.0에서 4~11%의 소거율을 나타내었다. 결과적으로 강한 산성에서는 어느 정도 활성을 나타내었으나 pH 4.2 이상에서는 소거율이 급격히 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 우산고로쇠 추출물의 소거율은 고로쇠 추출물 보다 높았다. 특히 우산고로쇠 수피 추출물의 활성을 살펴보면 일반 열수 추출물의 활성이 고로쇠의 저온 고압 추출물의 활성 보다 높은 것으로 미루어 보아 우산고로쇠 추출물이 아질산염소거에 특별한 효능이 있는 활성물질을 가지고 있는 것으로 사료된다. 또한 이는, 대나무 에탄올 추출물의 항산화 효과에 관한 연구 (Lim et al., 2004)에서 보고된 0.2 mg/ml의 농도로 처리한 시료의 경우 pH 1.2, pH 3.0, pH 6.0에서 각각 43.02%,



**Fig. 2.** Nitrite scavenging ability of the extracts from *Acer mono* and *A. okamotoanum* by water extraction and low temperature high pressure extraction process. Each value were compared with control at <sup>a</sup>P < 0.001, <sup>b</sup>P < 0.005, <sup>c</sup>P < 0.01 by student t-test. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (MBW : water extraction of bark of *A. mono*, MBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. mono*, OBW : water extraction of bark of *A. okamotoanum*, OBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. okamotoanum*).

35.46%, 9.86%의 결과 처럼 pH가 높아짐에 따라 pH 의존적인 비슷한 결과를 얻었다. 또한 이와 비슷한 결과로 Kang 등 (Kang et al., 1996)은 각종 phenolic 화합물의 농도를 0.1~6 mM 수용액으로 조제한 후, 아질산염 소거율을 여러 pH조건에서 측정한 결과 pH 1.2에서 가장 높게 나타났으나, pH 6.0에서는 10% 정도로 대부분 상실되었다고 보고한 결과와 유사하였다. 실험결과 인체 내의 위내 pH 조건과 비슷한 pH 1.2에서 가장 높은 활성을 나타낸 것으로 미루어 고로쇠 및 우산고로쇠 추출물이 효과적인 아질산염소거작용을 통해 nitrosamine의 생성을 억제할 것으로 사료된다.

5. Glutathione S-transferase 활성 측정

Fig. 3은 고로쇠와 우산고로쇠 추출물의 GST활성을 나타낸 것이다. 모든 시료에 있어서 처리 농도가 증가함에 따라 활성 역시 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 우산 고로쇠 수피 저온 고압 추출물이 1.0 mg/ml의 농도에서 197.38%의 가장 높은 활성을 나타내었다. 나머지 시료의 경우도 1.0 mg/ml의 농도에서 약 140% 이상의 활성을 나타내 대체적으로 높은 활성을 나타내었다. 이는 Shon 등이 보고한 연구 (Shon *et al.*, 2006)에서 3~30 mg/ml의 첨가를 통해 대조군 대비 약 2배의 GST 활성도를 나타낸 결과와 유사한 결과로 고로쇠 및 우산 고로쇠 추출물이 항산화 활성에 영향을 줄 수 있음을 확인할 수 있는 결과이다.

6. Scanning Electron Microscope 관찰

고로쇠 및 우산고로쇠나무 조직의 관찰을 위해 저진공주사 현미경을 이용하여 시료의 표면을 400배로 확대하여 관찰하였다 (Fig. 4). (A)와 (C)는 각각 고로쇠와 우산고로쇠나무의 열수 추출물의 표면을 관찰한 것이다. 그리고 (B)와 (D)는 (A)와 (C)에서 사용된 부위를 저온 고압 처리 후 변형된 조직의 모습을 담아낸 사진이다. 옆의 그림과 비교하여 각각 겉표면

의 조직 변화라든지 깨알 같은 조직이 생성된 것으로 미루어 초고압 처리에 의해 표면 조직의 파괴와 변형을 통해 생리활

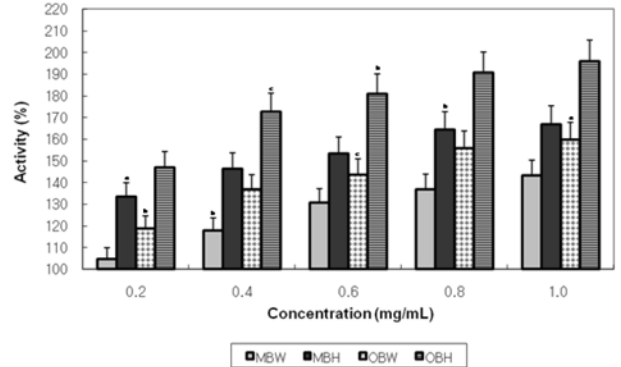


Fig 3. Effect of glutathione S-transferase activity in adding the extracts from *Acer mono* and *A. okamotoanum* by water extraction and low temperature high pressure extraction process. Each value were compared with control at <sup>a</sup> $P < 0.001$ , <sup>b</sup> $P < 0.005$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$  by student *t*-test. Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown (MBW : water extraction of bark of *A. mono*, MBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. mono*, OBW : water extraction of bark of *A. okamotoanum*, OBH : low temperature high pressure extraction of bark of *A. okamotoanum*).

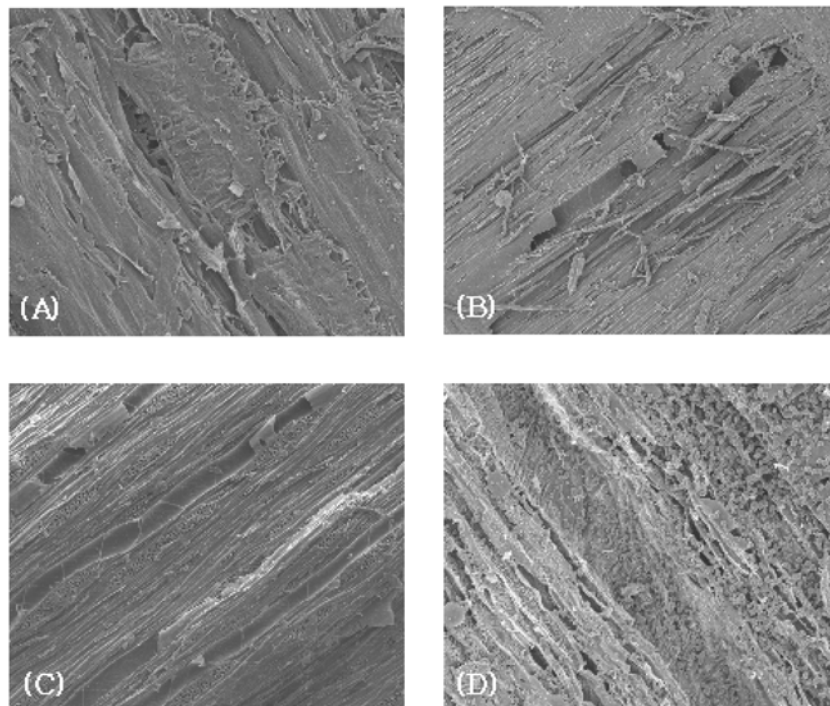
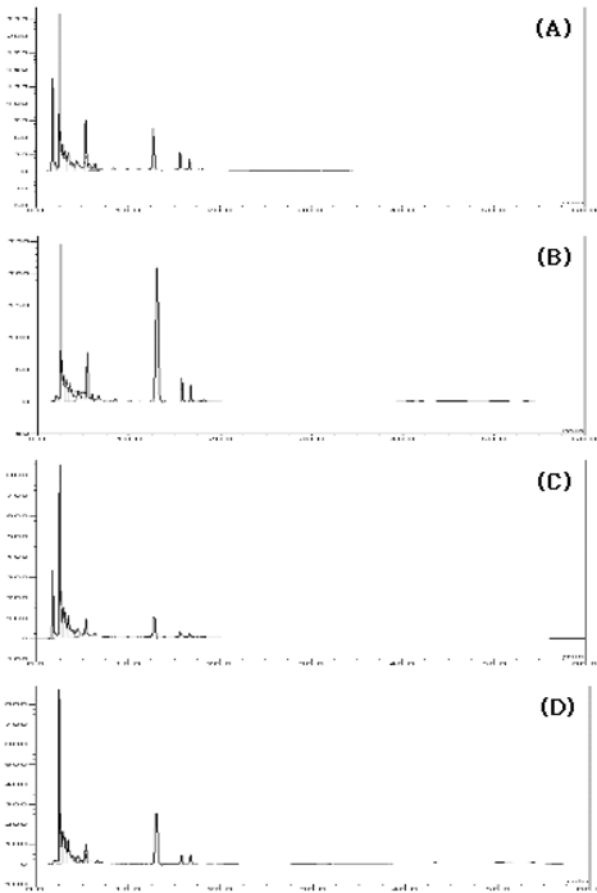


Fig. 4. Comparison of the bark and wood structures of *Acer mono* and *A. okamotoanum* after treated low temperature high pressure extraction for 15 min by scanning electron microphotographs (SEM)

- A: Structure of bark of *A. mono*.
- B: Structure of bark of *A. mono* after treated low temperature high pressure process for 15 minutes.
- C: Structure of bark of *A. okamotoanum*.
- D: Structure of bark of *A. okamotoanum* after treated low temperature high pressure process for 15 minutes.



**Fig. 5.** Comparison of HPLC chromatogram of *Acer mono* and *A. okamotoanum* according to water extraction and low temperature high pressure extraction process.  
 A: Extracts by water extraction of *A. mono*.  
 B: Extracts by low temperature high pressure extraction of *A. mono*.  
 C: Extracts by water extraction of *A. okamotoanum*.  
 D: Extracts by low temperature high pressure extraction of *A. okamotoanum*.

성물질의 용출이 더 용이할 것으로 사료되고, 우산고로쇠의 경우 고로쇠의 표면 형태보다 더 많이 변형이 일어난 것을 관찰할 수 있는데 이러한 표면 형태의 변화를 통해 고로쇠에 비해 우산고로쇠 추출물의 활성이 더 높은 것에 대한 증거가 될 수 있겠다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 초고압에 의한 새로운 물질의 분리 및 정제에 관한 연구가 더 수반되어야 할 것이다.

**7. HPLC 분석을 통한 추출물의 물질 비교 분석 결과**

Fig. 5는 고로쇠와 우산고로쇠나무의 HPLC 분석결과를 나타낸 그림이다. 분석 결과를 살펴보면 고로쇠와 우산고로쇠 시료 모두 12~13분 사이에 큰 peak를 볼 수 있고, 15분, 16분에 작은 peak들이 나타난 것을 확인할 수 있다. (A)는 고로쇠

의 일반 열수 추출물의 peak를 나타낸 것이고, (B)는 저온 고압 추출을 통한 고로쇠 추출물의 peak를 나타낸 것이다. 두 그림의 peak를 살펴보면 저온 고압 추출을 통한 추출물의 peak의 크기가 일반 열수 추출 공정에 의한 것보다 훨씬 큰 것을 알 수 있는데, 이는 저온 고압 추출 공정을 통해 고로쇠가 가지고 있던 성분들의 용출이 더 많았기 때문인 것으로 사료된다. 또한 우산고로쇠 추출물의 peak를 나타낸 (C)와 (D)의 결과에서도 열수 추출물의 peak에 비해 저온 고압 추출물의 peak의 크기가 훨씬 큰 것을 알 수 있다. 이 또한 저온 고압 추출 공정을 통해 우산고로쇠가 가지고 있던 성분의 용출이 더 많이 이루어진 결과라 할 수 있겠다. 앞의 SEM관찰 결과에서 봤듯이 저온 고압 공정을 통한 표면 조직의 변화로 인해 성분의 용출이 더 많이 이루어져 추출수율 향상 및 활성 증진의 결과를 HPLC 분석결과를 통해 확인할 수 있었다.

본 연구에서 확인한 실험결과를 바탕으로 하여 고로쇠와 우산고로쇠나무와 같은 단단한 구조로 이루어진 목질계 시료에 있어 기존 열수 추출 공정으로는 한계가 있었던 생리활성 성분의 추출이 저온 고압 추출 공정을 통한 획득이 용이하여 지고, 이로 인한 추출 수율의 증진 및 활성 증진의 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과를 통해 고로쇠와 우산고로쇠 뿐만 아니라, 그 이외의 목질계 시료에 있어서도 추출 수율의 증진과 효과적인 향산화 소재로서의 가능성을 확인할 수 있는 의미 있는 결과라 사료된다.

**감사의 글**

본 연구는 국립산림과학원의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

**LITERATURE CITED**

Ahn WY. (1975). Color index and coloring substances in Korean sugar maple, *Acer mono* Max. syrub. Journal of Korean Forest Society. 26:7-12.  
 Aruoma OI. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food and Chemical Toxicology. 32:671-683.  
 Aust SD, Morehouse LA and Thomas CE. (1985). Role of metals in oxygen radical reaction. Journal of Free Radicals in Biology & Medicine. 1:3-25.  
 Cao LH, Lee JK, Cho KH, Kang DG, Kwon TO, Kwon JW, Kim JS, Sohn EJ and Lee HS. (2006). Mechanism for the vascular relaxation induced by butanol extract of *Agrimonia pilosa*. Korean Journal of Pharmacognosy. 37:67-73.  
 Chae JM. (1996). Maceration methods for SEM observation. Keimyung Medical Journal. 15:75-85.  
 Chen RZ, Zhang SQ and Liu ZQ. (2007). Application of ultrahigh pressure technology in extracting active component from Chinese material medica. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 38:1905-1908.

- Choi JH and Oh SK.** (1985). Studies on the anti-aging of Korean ginseng. *Journal of Food Science and Nutrition*. 17:506-515.
- Davies KJ and Goldberg AL.** (1987). Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 262:8227-8234.
- Gray JI and Dugan LR Jr.** (1975). Inhibition of n-nitrosamine formation in model food system. *Journal of Food Science*. 40:981-984.
- Gutteridge JMC and Halliwell B.** (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press, Oxford, UK. p. 1-62.
- Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB.** (1974). Glutathione S-transferase : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249:7130-7139.
- Harman D.** (1982). In free radicals in biology. V. Academic Press, New York. pp. 255-275.
- Hartley DP, Ruth JA and Petersen DR.** (1995). The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 316:197-205.
- Jin L, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Kwon MC, Jeong MH, Lee HJ, Kang HY, Choi DH and Lee HY.** (2008). Comparison of antioxidant and glutathione S-transferase activities of extracts from *Acer mono* and *A. okamotoanum*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:427-433.
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE and Baek NI.** (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 47:135-140.
- Kang YH, Park YK and Lee GD.** (1996). The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compound. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 28:232-239.
- Kim CM, Jung DL and Shoe HJ.** (1991). A study on the ingredients in the sap of *Acer mono* Max. and *Betula costata* T. in Mt. Jiri area. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 20:479-482.
- Kwak TS, Park HJ, Jung WT and Choi JW.** (1999). Antioxidative and Hepatoprotective activity of coloured-, scented and Korean Native rice varieties based on different layers. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 28:191-198
- Kwon HN, Park JR and Jeon JR.** (2008). Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 37:1389-1394.
- Kwon YS, Kim MJ, Choi YH and Kwak SS.** (1997). Activity of antioxidative compounds from the stem of *Acer mono* Max. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 5:302-306.
- Lee HH and Lee SY.** (2008). Cytotoxic and antioxidant effects of *Taraxacum coreanum* Nakai. and *T. officinale* WEB. extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:79-85.
- Lee SE, Bang JK and Seong NS.** (2004). Inhibitory activity on angiotensin converting enzyme and antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb. cortex extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 12:79-84.
- Lee SE, Seong NS, Bang JK and Park CG.** (2003). Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 11:127-134.
- Lee TB.** (1982). Illustrated flora of Korea. Hyangmunsa. p. 522-524.
- Lim JA, Na YS and Baek SH.** (2004). Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Phyllostachys bambusoides*. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 36:306-310.
- Marklund S and Marklund G.** (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47:469-474.
- Miquel J, Quintanilha AT and Weber H.** (1989). In handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press, I p. 223.
- Shon YH, Cho HJ, Chang HW, Son KH and Nam KS.** (2006). Chemopreventive potential of *Salvia miltiorrhiza* fraction extracts. *Journal of Science*. 16:369-374.
- Terazawa M, Koga T, Okuyama H and Miyake M.** (1984). Phenolic compounds in living tissues of woods III. Platyphylloside, a new diarylheptanoid glucoside from the green bark of shirakamba (*Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* Hara). *Mokuzai Gakkaishi*. 30:391-403.
- Trush MA, Mimnaugh EG and Gram TE.** (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochemical Pharmacology*. 31:3335-3346.
- Wrighton SA and Stevens JC.** (1992). The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*. 22:1-21.
- Yoon SL, Jo JS and Kim TO.** (1992). Utilization and tapping of the sap from birches and maples. *Mokchae Konghak*. 20:15-20.