

벌나무 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 알코올 분해능

최준혁¹ · 이소희¹ · 박윤희¹ · 이성규¹ · 정영태¹ · 이인선¹ · 박준홍² · 김현정^{1,3*}

¹계명대학교 식품가공학과

²주식회사 정문

³계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터

Antioxidant and Alcohol Degradation Activities of Extracts from *Acer tegmentosum* Maxim.

Jun-Hyeok Choi¹, So-Hee Lee¹, Yun-Hee Park¹, Sung-Gyu Lee¹, Yung-Tae Jung¹,
In-Seon Lee¹, Jun-Hong Park², and Hyun-Jeong Kim^{1,3*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²JUNG MUN, Gyeongbuk 712-881, Korea

³The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

The purpose of this study is to evaluate the antioxidant activities of extracts from *Acer tegmentosum* Maxim. (AT) and the ability of these extracts to reduce the serum alcohol concentration in rats administered alcohol. The total amount of polyphenols in hot water and ethanol extracts from AT were $71.93 \pm 2.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ and $152.69 \pm 1.25 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectively, while the total amount of flavonoids in hot water and ethanol extracts from AT were $7.51 \pm 1.34 \mu\text{g}/\text{mg}$ and $5.01 \pm 0.83 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. FRAP values in AT extracts were 1.67~1.75 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$. AT extracts were capable of directly scavenging DPPH and ABTS free radicals, with higher inhibitory activities for TBA. The hepatoprotective effect of hot water extracts from AT against ethanol-induced oxidative damage was investigated. Ethanol-induced damage on HepG2 liver cells were protected by hot water extracts from AT. Administration of hot water extracts from AT (200 mg/kg) had reduced serum alcohol levels in acute alcohol-treated rats. These results indicate that AT extracts can be protective against alcohol-induced toxicity, potentially through its antioxidant properties.

Key words: *Acer tegmentosum* Maxim., antioxidant, alcohol, HepG2, liver

서 론

한국인은 서양인에 비하여 알코올 분해 효율이 낮음에도 불구하고 현대사회의 복잡성과 지속적인 스트레스, 한국의 음주 문화적 특성으로 잦은 음주와 과음, 폭음의 형태로 알코올을 섭취하며 이로 인해 많은 사람들이 숙취를 경험한다. 숙취는 알코올 섭취 후 두통이나 속쓰림 등으로 나타나고, 이를 감소시킬 수 있는 약물을 찾는 연구들이 많이 이루어지고 있지만 현저한 효과를 나타내는 것은 많지 않다(1-3). 숙취 유발 물질로는 술의 알코올 성분과 1차 대사산물인 acetaldehyde가 알려져 있는데 체내로 흡수된 알코올은 alcohol dehydrogenase(ADH)에 의해 간에서 NAD^+ 가 NADH 로 환원되면서 acetaldehyde를 생산하며, acetaldehyde는 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 산화되어 acetone으로 대사되는데 이때 대사 장애가 일어나면 acetaldehyde가 축적되고 이는 변이원성, 발암성을 나타낸다(4). 이

러한 알코올 대사물질들은 간에서 면역반응을 일으키는데, 면역계에 radical로 인한 지질과산화 물질이 생성되면 단백질 변성을 가져오며, 알코올성 간질환은 알코올 섭취로 인해 생성되는 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA)에 의한 산화적 손상이 주요 요인으로 알려져 있다(5). 또한 알코올은 생체 내에서 산소를 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen과 같은 활성산소(active oxygen)로 과량 전환시켜 생체에 독성을 일으키며 심장질환, 암 등의 만성질환을 야기할 수 있다(6).

한편 벌나무(*Acer tegmentosum* Maxim.)는 단풍나무과에 속하며 국내의 고산지대에 분포하고 있으며, 산겨릅나무, 산저릅나무, 봉목, 산청목으로 불린다. 벌나무는 민간에서 간질환 치료에 효과가 있으며 특히 간에 쌓인 독을 해독하여 간세포를 살리는 효능이 있고, 이노작용 또한 강하여 신장염 치료에도 효과가 있다고 알려져 왔다(7). 또한 벌나무에는 (+)-catechin 등의 페놀성 화합물, methyl gallate 4-O- β

*Corresponding author. E-mail: sarikhj@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5906, Fax: 82-53-580-5538

-D-glucoopyranoside, β -sitosterol 등의 페놀성 글루코사이드 및 이소프렌계 화합물이 분리되었고(8), 암세포 성장저해 효과, 항산화 활성이 있으며, 벌나무 주정추출물은 CCl_4 , d(+)-galactosamine, DL-ethionine으로 유발한 간 손상에 대한 억제 효과와 벌나무 부탄올분획물이 lipopolysaccharide로 유도된 급성 간 손상에 대한 보호효과 등이 있음이 보고되기도 하였다(9,10). 그러나 벌나무 추출물의 알코올 투여에 의한 간 기능 보호효과에 대한 연구 보고는 아직 없다.

이에 본 연구는 벌나무의 에탄올 및 열수 추출물을 각각 제조하여 추출물별 항산화 활성을 비교하고, 추출물의 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 알코올 분해능을 검토하여 벌나무의 숙취해소 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 제조

본 실험에 사용한 벌나무는 대구시 약령시장에서 목질부가 절단되고 건조 상태의 것을 구입하여 사용하였다. 벌나무 에탄올 추출은 시료 무게의 10배량(w/v)의 70% 에탄올을 가하여 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복추출 하였고, 벌나무 열수추출은 시료 무게의 10배량(w/v)의 증류수를 가하여 1시간동안 끓여 추출하였다. 추출액은 각각 여과지(Whatman No. 3, Shatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator(Rotavapor R-205, BUCHI, Postfach, Switzerland)로 55°C에서 농축한 후 동결 건조하여 사용하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(11)을 응용하여 측정하였다. 각 시료 추출물 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고, 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 Folin 시약 2 mL를 첨가하고 3분간 방치한 후 10% Na_2CO_3 2 mL를 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron, Milan, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정 후 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(12)의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 추출물 0.1 mL와 80% ethanol 0.9 mL를 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate 0.1 mL, 그리고 80% ethanol 4.3 mL를 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 quercetin 검량선과 비교하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였다.

Ferric reducing/antioxidant power(FRAP) 측정

FRAP assay는 Benzie와 Strain 방법(13)을 96-well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. 반응액은 300 mM acetate buffer(pH 3.6) : 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine)

: 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10:1:1의 비율로 실험 직전에 만들어 사용하였다. 반응액과 시료를 혼합하여 4분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 표준곡선을 작성하여 추출물 1 μg 당 Fe^{2+} μmole 로 표시하였다.

α - α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical 및 ABTS radical 소거활성

DPPH radical에 대한 각 시료의 환원력을 측정하기 위해 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800 μL 와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 200 μL 를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(14). 이때 활성비교를 위하여 ascorbic acid를 사용하였다. 또한 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되게 phosphate buffered saline(PBS, pH 4)으로 희석하였다. 희석된 용액 180 μL 에 시료 20 μL 를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다.

Thiobarbituric acid(TBA) 방법에 의한 지질과산화 억제 활성

지질과산화 측정은 Kikuzaki와 Nakatani(15)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 추출물 1 mL에 2.52% linoleic acid 1 mL, 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0) 2 mL, 증류수 1 mL를 첨가하여 용액을 잘 혼합한 후 40°C 어두운 곳에 항온 처리하여 일정 간격으로 측정하였다. 먼저 20% trichloroacetic acid(TCA) 500 μL , 0.8% TBA 500 μL , 각 시료 용액 250 μL 를 가하여 혼합한 후 열탕조에서 20분간 가열처리하여 냉각시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하고 그 상층액을 523 nm에서 측정하여 TBA값을 측정하였다.

세포주 배양 및 세포독성 측정

본 실험에 사용한 인간 유래 간암 세포주 HepG2 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 세포주의 세포독성을 측정하기 위하여 Carmichael 등(16)의 방법에 따라 MTT assay로 측정하였다. 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 5% CO_2 가 존재하는 37°C incubator에서 2~3회 계대배양한 후 사용하였다. HepG2 세포를 1×10^5 cells/well로 96-well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 다음 5% 에탄올과 농도별 시료를 처리하여 24시간 배양한 후 5 mg/mL의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 10 μL 를 각 well에 넣고 배양기

에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

실험동물 및 혈중 알코올 분석

동물은 생후 6주령 된 체중 200 g 내외의 웅성 Sprague Dawley rat를 (주)오리엔트(Daegu, Korea)로부터 구입하여 일정한 조건(온도, $22 \pm 2^\circ\text{C}$; 습도, $50 \pm 5\%$; 명암, 12시간 light/dark cycle)으로 일주일간 적응시킨 후, 각 5마리씩 정상군(Normal), 알코올 투여군(Alcohol), 알코올+시료 투여군(ATW)으로 나누어 실험하였다. Rat는 실험 전 18시간 동안 절식시켰으며, 이때 물은 제한 없이 공급하였다. 알코올+시료 투여군은 알코올 투여 30분전에 200 mg/kg의 시료를 경구투여 하였으며, 이때 정상군 및 알코올 투여군은 시료 대신 증류수를 경구투여 하였다. 알코올 투여는 30% 주정을 체중 kg당 3 g 수준으로 1회 경구투여 하였고, 대조군은 알코올 대신 증류수를 경구투여 하였다.

알코올 농도 측정을 위해 알코올 투여 후 0분, 30분, 2시간 후에 꼬리정맥으로 채혈하였다. 채취한 혈액은 4°C , $2,500 \times g$ 에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 얻고, 즉시 -80°C 의 초저온냉동고에 넣어 급속동결 시켜 보관하였다. 혈중 알코올 농도 측정을 하기 위해 ethanol assay kit(BioVision Inc, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

통계처리

실험결과는 SPSS 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 일원배치분산분석으로 비교하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간에 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

벌나무 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 FRAP능

먼저 벌나무 열수 및 에탄올 추출물을 제조한 후 각 추출물의 수율은 Table 1과 같이 각각의 건물당 6.4%, 5.3%로 열수추출물이 에탄올추출물보다 더 높은 수율을 나타내었다.

폴리페놀계 물질들은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물을 가리키며, 플라보

Table 1. Yields of extracts from *Acer tegmentosum* Maxim.

Sample ¹⁾	Yields (g/100 g dry basis)
ATW	6.40
ATE	5.30

¹⁾ATW, hot water extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.; ATE, ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.

Table 2. Contents of total polyphenols and flavonoids in extracts from *Acer tegmentosum* Maxim.

Sample ¹⁾	Total polyphenol ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Total flavonoid ³⁾ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	FRAP values (Fe^{2+} $\mu\text{M}/\mu\text{g}$)
ATW	171.93 ± 2.20	7.51 ± 1.34	1.75 ± 0.32
ATE	152.69 ± 1.25	5.01 ± 0.83	1.67 ± 0.28

¹⁾ATW, hot water extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.; ATE, ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.

²⁾Micrograms of total polyphenol content/mg of plants based on tannic acid as standard.

³⁾Micrograms of total flavonoid content/mg of plants based on quercetin as standard.

노이드와 탄닌이 주성분으로 총치예방, 항고혈압, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(17).

벌나무 에탄올추출물 및 열수추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 tannic acid, quercetin을 기준 물질로 하여 측정하였다(Table 2). 그 결과 벌나무 열수추출물의 총 폴리페놀 함량은 171.93 ± 2.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 벌나무 에탄올추출물은 152.69 ± 1.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 열수추출물에서 좀 더 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 총 플라보노이드 함량 또한 벌나무 열수추출물과 에탄올추출물이 각각 7.51 ± 1.34 , 5.01 ± 0.83 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 벌나무 열수추출물에서 높게 나타났다.

항산화 효과가 우수하다고 알려진 편백나무의 총 폴리페놀 함량은 138.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었고, 플라보노이드 함량은 8.12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 보고되었다(18). 이 결과와 비교했을 때 벌나무 열수 및 에탄올추출물은 편백나무와 유사한 양의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있으며, 특히 벌나무 열수추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 더 높음을 알 수 있었다.

또한 총 항산화능을 측정하는 FRAP 방법은 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것으로, 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안된 방법이다(17). 벌나무 열수추출물 및 에탄올추출물의 FRAP값이 각각 1.75 ± 0.32 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$, 1.67 ± 0.28 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ 으로 벌나무 열수추출물의 FRAP의 함량이 에탄올추출물보다 비교적 높음을 확인할 수 있었다. Sánchez-González 등(19)은 총 폴리페놀 함량과 FRAP value는 높은 상관관계가 있다고 보고하였는데 본 연구의 결과에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

벌나무 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거활성

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 함황 아미노산과 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로, 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 페놀성 화합물의 경우 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 free radical에 의한 산화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다(20).

벌나무 열수 및 에탄올추출물과 BHA의 DPPH 소거활성

Table 3. Scavenging effects of BHA and *Acer tegmentosum* Maxim. extracts on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot)

Sample ¹⁾	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Scavenging effect (%)	RC ₅₀ ²⁾ ($\mu\text{g/mL}$)
ATW	5	18.86 \pm 0.75 ³⁾	14.02 \pm 0.14 ^b
	10	37.65 \pm 10.58	
	25	76.37 \pm 6.17	
ATE	5	9.24 \pm 0.98	17.23 \pm 0.62 ^a
	10	30.69 \pm 1.90	
	25	73.55 \pm 2.30	
BHA	1	24.38 \pm 1.75	2.48 \pm 0.01 ^c
	2.5	56.87 \pm 0.66	
	5	81.94 \pm 2.00	

¹⁾ATW, hot water extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.; ATE, ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.

²⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH \cdot at 30 min after starting the reaction.

³⁾Each value is mean \pm SD (n \geq 3).

^{a-c}Means with different letters are significantly different (p<0.05).

을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 벌나무 열수추출물은 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 76.37%의 소거능을 보였고, 벌나무 에탄올추출물은 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 73.55%, BHA(5 $\mu\text{g/mL}$)에서 81.94% 정도의 항산화능을 나타내어 벌나무 열수 및 에탄올추출물이 우수한 DPPH 소거활성능이 있음을 알 수 있었다. 그리고 벌나무 열수 및 에탄올추출물의 RC₅₀값은 각각 14.02 \pm 0.14, 17.23 \pm 0.62 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. Lee 등(21)에 의하면 고로쇠나무 잎, 모과나무 잎, 산수유 잎, 배롱나무 꽃, 오동나무 열매의 RC₅₀값이 각각 39.4, 46.0, 44.4, 29.6, 27.2 $\mu\text{g/mL}$ 이고, Jung 등(22)은 오미자 종자의 메탄올추출물의 RC₅₀값을 33.2 $\mu\text{g/mL}$ 로, Li 등(23)은 해양균류의 RC₅₀값을 29~200 $\mu\text{g/mL}$ 로 보고하였다. 이러한 결과는 벌나무 추출물이 DPPH 라디칼 소거활성이 우수하다고 보고된 수종의 다른 식물들에 비해서도 탁월한 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

혈장에서 ABTS의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 ABTS 라디칼 소거활성법은 표준물질인 trolox값과 비교하여 나타낼 수 있으며, *in vivo*에서의 항산화능 측정뿐만 아니라 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있다(24-26). 벌나무 열수 및 에탄올추출물의 ABTS 소거활성을 positive control로 사용되는 trolox와 비교 측정된 결과, ABTS 소거활성 측정법에서 trolox는 30 μM 에서 55.64% 정도의 소거활성을 보였고, 벌나무 열수추출물은 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 82.15%, 벌나무 에탄올추출물은 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 79.96%를 나타내었다(Table 4). 특히 벌나무 열수 및 에탄올추출물의 RC₅₀값은 각각 10.38, 10.58 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 특히 ABTS radical 저해 활성이 DPPH radical 저해 활성보다 높게 나온 경향이었는데, 이는 ABTS radical 측정방법이 hydrogen-donating antioxidants와 chain breaking antioxidants 모두를 측정할 수 있고, aqueous phase와 organic phase 모두에

Table 4. Scavenging effects of trolox and *Acer tegmentosum* Maxim. extracts on 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radical (ABTS \cdot)

Sample	Concentration	Scavenging effect (%)	RC ₅₀ ³⁾ ($\mu\text{g/mL}$)
ATW ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)	1	9.85 \pm 3.59 ⁴⁾	10.38 \pm 1.26 ^b
	5	30.09 \pm 0.28	
	10	57.14 \pm 13.12	
ATE ($\mu\text{g/mL}$)	20	82.15 \pm 1.92	10.58 \pm 1.73 ^b
	1	10.28 \pm 2.71	
	5	29.71 \pm 2.38	
Trolox ²⁾ (μM)	10	57.97 \pm 13.68	28.17 \pm 0.91 ^a
	20	79.96 \pm 5.20	
	15	29.08 \pm 1.71	
	30	55.64 \pm 1.39	
	60	94.62 \pm 0.08	

¹⁾ATW, hot water extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.; ATE, ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim.

²⁾The concentration unit of trolox was $\mu\text{M/mL}$.

³⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS \cdot at 1 min after starting the reaction.

⁴⁾Each value is mean \pm SD (n \geq 3).

^{a,b}Means with different letters are significantly different (p<0.05).

적용이 가능한 결과로 여겨지며(27), 벌나무 추출물의 활성 성분으로 수용성 및 지용성 성분이 함께 구성되어 있을 것으로 사료된다.

벌나무 추출물의 지질과산화 억제 활성

벌나무 추출물을 첨가하여 TBA 방법으로 지질과산화 억제활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 벌나무 추출물을 첨가하지 않는 대조군에서는 시간이 지남에 따라 과산화지질이 생성되어 보관 4일째에도 과산화지질 함량이 큰 폭으로 증가하는 경향을 나타내었으나, 벌나무 열수 및 에탄올추출물을 첨가한 처리구에서는 대조군에 비하여 과산화지질 증가 폭이 낮게 나타났고 열수추출물과 에탄올추출물 간에서는 열수추출물의 과산화 증가 폭이 더 낮게 나타났다. 이는 벌나무 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이

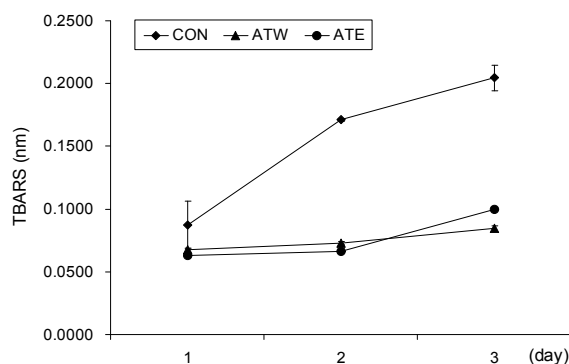


Fig. 1. Antioxidant activities of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts at 0.2 mg/mL in linoleic acid autooxidation system measured by the thiobarbituric acid method. ATW: hot water extracts of *Acer tegmentosum* Maxim. ATE: ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim. ^{a-c}Means with different letters are significantly different (p<0.05).

다량 존재하여 높은 항산화 활성을 가지기 때문에 지질과산화가 억제된 것으로 여겨진다. 따라서 벌나무 열수 및 에탄올추출물은 항산화능이 우수한 소재로 사용 가능할 것으로 사료된다.

벌나무 열수추출물의 간세포 보호효과

벌나무 추출물의 항산화 실험을 바탕으로 하여 벌나무 에탄올추출물보다 벌나무 열수추출물이 효과가 우수하여 벌나무 열수추출물만을 이용하여 간세포 보호효과를 확인하였다. 인간 유래의 간암세포주인 HepG2는 많은 실질(parenchymal) 세포 기능을 유지하여, 주로 독성의 대사에 관련된 독성 평가에 유용하게 이용되고 있다(28).

이에 알코올에 대한 *in vitro*에서의 간세포 보호효과를 확인하고자, 먼저 벌나무 열수추출물의 HepG2 세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 그 결과 시료를 처리하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 보았을 때, 벌나무 열수추출물 10~100 µg/mL의 농도로 처리하면 100% 이상의 높은 생존율을 보여 시료의 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 벌나무 열수추출물의 알코올에 대한 *in vitro*에서의 간세포 보호 효과를 확인하기 위하여 5%의 에탄올만 단독으로 처리하였을 때 세포생존율이 약 55%를 나타냈다. 하지만 5% 에탄올 처리 후 벌나무 열수추출물을 농도별로 처리한 결과, 시료처리 농도가 높아질수록 세포 생존율이 유의적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 벌나무 열수추출물이

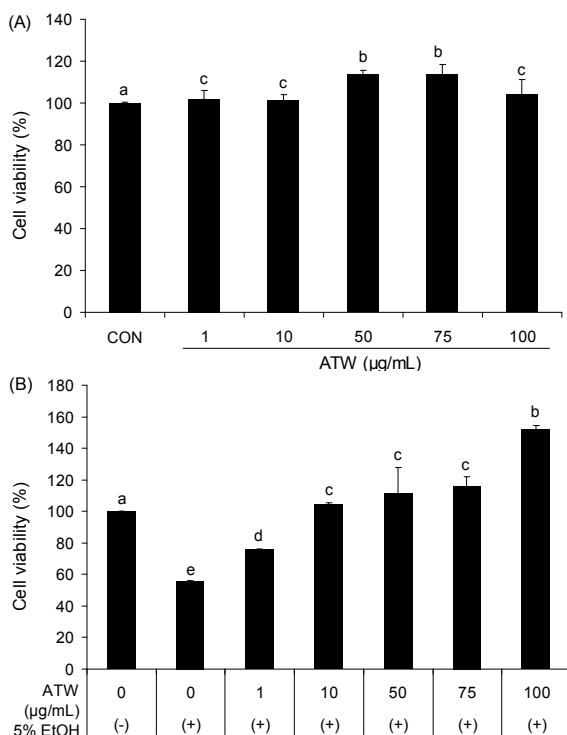


Fig. 2. Effects of *Acer tegmentosum* Maxim. hot water extracts on viability of HepG2 cells treated with 5% EtOH. Cells were incubated with EtOH and/or ATW for 24 hr. Results are represented as mean \pm SD. CON: Not treated with EtOH. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

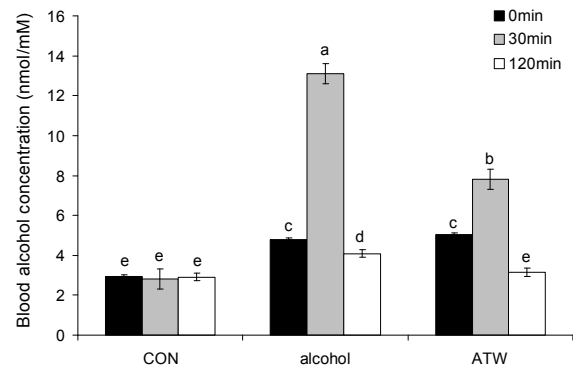


Fig. 3. Effects of *Acer tegmentosum* Maxim. hot water extracts (ATW, 200 mg/kg) against blood alcohol concentration on ethanol-treated rats. ^{a-c}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

에탄올로부터 간세포 손상을 억제하는데 효과가 있을 것으로 생각된다.

벌나무 열수추출물의 혈중 알코올 함량에 미치는 영향

벌나무 열수추출물이 혈중 알코올 함량에 미치는 영향은 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 대조군은 처리 시간에 따른 차이 없이 혈중 알코올 농도가 일정한 값을 나타냈다. 알코올 투여군(alcohol)에서는 알코올 투여 후 0분에서 혈중 알코올 농도가 대조군과 큰 차이가 없었으나, 30분에 가장 높은 혈중 알코올 농도를 나타냈다. 그리고 2시간 이후에는 대사과정에 의해 알코올 함량이 다시 낮아지는 결과를 보였다. 벌나무 투여군(ATW)에서는 알코올 투여 후 0분에서 혈중 알코올 함량이 대조군과 큰 차이가 없었으나 30분 후 알코올 투여군보다 혈중 알코올 함량이 유의적으로 낮은 결과를 나타냈고, 2시간 이후에는 대조군과 같은 수준으로 혈중 알코올 함량이 감소되는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

에탄올에 의한 조직손상의 원인으로 에탄올 자체, 아세트알데히드의 독성, 에탄올 산화과정에 따른 세포내 NADH/NAD⁺ 증가에 의한 대사 불균형, 활성산소 증가 등이 관여한다고 알려져 있다(29). 벌나무 열수추출물은 높은 항산화능을 가져 급성 에탄올 섭취로 증가된 활성산소를 감소시키고 효과적으로 혈중 에탄올을 제거하는 것으로 여겨진다. 따라서 벌나무 열수추출물은 급성 에탄올 섭취 시 효과적으로 혈중 에탄올을 제거하는 것으로 생각되어, 알코올의 독성으로부터 간 조직을 보호하는 숙취해소용 소재로의 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

요 약

벌나무의 에탄올 및 열수 추출물을 각각 제조하여 추출물별 항산화 활성을 비교하고, *in vitro* 및 *in vivo*에서의 알코올 분해능을 검토하였다. 벌나무 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 171.93 \pm 2.2 µg/mg, 152.69 \pm 1.25 µg/mg, 총 플라보노이드 함량은 각각 7.51 \pm 1.34 µg/mg,

5.01±0.83 µg/mg이었고, FRAP값은 각각 1.75±0.32 µM/µg, 1.67±0.28 µM/µg으로 나타났다. 벌나무 열수 및 에탄올 추출물은 DPPH 및 ABTS에 대해 높은 소거활성을 보였고, 지질과산화 억제활성이 높음을 알 수 있었다. 벌나무 열수 추출물은 HepG2 세포에서 알코올에 대한 *in vitro*에서의 간 세포 보호 효과가 있었고, 또한 알코올을 투여한 rat에서 벌나무 추출물을 투여하면 알코올 투여 30분이 경과한 후 알코올 투여군보다 혈중 알코올 함량이 유의적으로 저하되었다. 따라서 벌나무 추출물은 높은 항산화 작용을 하며, 알코올 분해 작용 및 알코올에 대한 간 보호 효과가 높은 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Choi GH, Kim JG, Kwon ST. 2011. Protective effects of food including *Hovenia dulcis* on acute alcohol intoxication. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1107-1112.
2. Cha JY, Jeong HJ, Jeong JJ, Yang HJ, Kim YT, Lee YS. 2009. Effects of amino acids on the activities of alcohol metabolizing enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH). *J Life Sci* 19: 1321-1327.
3. Park SM, Kang BK, Chung TH. 1998. The effect of mildronate on serum alcohol concentration and hangover syndrome. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 168-174.
4. Lieber CS. 1994. Alcohol and the liver. *Gastroenterology* 106: 1085-1105.
5. Palinski W, Witztum JL. 2000. Immune response to oxidative neopeptides on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 247: 371-380.
6. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 275-295.
7. Hong BK, Eom SH, Lee CO, Lee JW, Jeong JH, Kim JK, Cho DH, Yu CY, Kwon YS, Kim MJ. 2007. Biological activities and bioactive compounds in the extract of *Acer tegmentosum* Maxim. stem. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 296-303.
8. Hur JM, Jun M, Yang EJ, Choi SH, Park JC, Song KS. 2007. Isolation of isoprenoidal compounds from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *Kor J Pharmacogn* 38: 67-70.
9. Kwon HN, Park JR, Jeon JR. 2008. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1389-1394.
10. Shin IC, Sa JH, Shim TH, Lee JH. 2006. The physical and chemical properties and cytotoxic effects of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 322-327.
11. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-

- 243.
12. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
13. Benzie IF, Stain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 230: 70-76.
14. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujube* var. *intermis* Rehder. *Korean J Food Sci Technol* 38: 128-134.
15. Kikuzaki H, Nakatani N. 1993. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci Technol* 58: 1407-1410.
16. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Michell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
17. Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yoshida T, Okuda T, Sugimura T. 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of "tannin" in green tea. *Phytother Res* 1: 44-47.
18. Jung YT, Lee IS, Whang K, Yu MH. 2012. Antioxidant effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts. *J Life Sci* 22: 354-359.
19. Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. 2005. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem* 90: 133-139.
20. An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH. 2004. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorbae officinalis* L. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 244-250.
21. Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG, Sung JS, Song J. 2003. Antioxidants activities of Korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 127-134.
22. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidant, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
23. Li XF, Li Y, Nam KW, Kim DS, Chio HD, Son BW. 2002. Screening of radical scavenging activity from the marine-derived fungus. *Kor J Pharmacogn* 33: 219-223.
24. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 84: 407-412.
25. Rice-Evans C, Miller NJ. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 234: 279-293.
26. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956.
27. Chae JW, Kim JS, Jo BS, Kang SA, Park HJ, Joo SH, Chun SS, Cho YJ. 2011. Biological activity of ethanol extracts from *Amelanchier asiatica* fruits. *J Appl Biol Chem* 54: 238-243.
28. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615-616.
29. Lieber CS. 1991. Perspectives: do alcohol calories count? *Am J Clin Nutr* 54: 976-982.