

자생 산사(*Crataegus pinnatifida* BUNGE)씨의 추출 용매에 따른 항산화 활성

김민아 · Duan Yishan · 성중환 · 정현식 · 김한수[†]

부산대학교 식품공학과

Antioxidative Activity of Feral Haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) Seed Extracts Using Various Solvents

Min-A Kim · Yishan Duan · Jong-Hwan Seong · Hun-Sik Chung · Han-Soo Kim[†]

Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Abstract

The purpose of this study was to examine the antioxidative activity of feral haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) seed extracts using 70% methanol, 70% ethanol, chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), n-butanol and ethyl acetate (EA). The total phenol content of the five extracts ranged from 37.29 mg/g to 55.53 mg/g. Moreover, the content was high in the 70% methanol and, 70% ethanol extracts, but low in the n-butanol extract. On the contrary, the total flavonoid content decreased in the order of n-butanol (2.93 mg/g), EA (2.67 mg/g), 70% methanol (1.00 mg/g), 70% ethanol (0.88 mg/g) and CM (0.67 mg/g) extracts. The NO₂ radical scavenging activity, antioxidant activity by β -carotene bleaching assay and, superoxide dismutase (SOD) like ability decreased in the order of 70% methanol, 70% ethanol, CM, EA and, n-butanol extracts; further, a similar tendency was also observed in the total phenol contents. Overall, these results indicated that the antioxidative activity of feral haw seeds was closely related to the total phenol and flavonoid contents. Therefore, haw seeds might be usefully applied to natural antioxidants as well as functional foods.

Key words: *Crataegus pinnatifida* BUNGE, antioxidation, total phenol, flavonoid, superoxide dismutase

I. 서론

최근 생활수준의 향상으로 인한 식생활의 서구화 및 생활 양식의 변화로 운동 부족, 잦은 음주, 흡연으로 인한 비만, 고혈압, 당뇨, 암과 같은 생활습관병의 유병률이 증가하고 있다(Kim OH와 Park JK 2012, Park JK 등 2012, Seo YJ 등 2012). 이로 인해 건강에 대한 관심이 증가하게 되어 생식 등 야채, 채소, 과일 등의 섭취가 늘어나고 있으며 올바른 식습관에 대한 중요성이 강조되고 있다(Son SM 2004). 실제로 비만 아동은 정상 아동에 비하여 어육류군은 많이 섭취하였으나 녹황색 채소류 및 과일류는 적게 섭취하는 것으로 나타났으며 이러한 식습관의 차이로 인하여 비만 아동군에서 BMI, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤이 더 높게 측정되었다고 하였다(Han JS와 Rhee SH 1996). 또한, 꾸준히 생식을 섭취한 소비자는 일반 소비자에 비하여 낮은 체지방율과 혈청지질지표를 나타내었다

고 하며(Son SM 2004), 하루 360 mL 씩 혼합채소 주스를 섭취한 여대생의 중성지질은 22%나 감소하였으며, 혈청 SOD는 증가하는 것으로 나타나 채소의 보충은 고지혈증, 비만, 당뇨 등의 예방이 가능할 것이라고 하였다(Kang JY 등 2005). 식물 유래 생리활성물질인 phytochemical은 그 종류가 매우 다양한 것으로 알려져 있고 항암, 항염증, 항산화 등의 효과를 나타낸다고 하며, 대표적인 물질로는 polyphenol과 flavonoid가 있다(Dillard CJ와 German JB 2000, Liu RH 2003). Phenol 화합물은 구조에 phenolic hydroxyl기를 가지고 있으며 아질산염의 분해를 통해 nitrosamine 생성을 억제하고, quinone으로 산화되어 free radical 소거 등을 통해 항산화력을 나타낸다고 알려져 있고(Kang YH 등 1996), flavonoid 중 일부는 낮은 농도에서도 높은 전자 공여능을 나타내고, 구조에 따라 flavanol, flavone, flavonol, flavanone, isoflavone으로 나뉘는데 심혈관계 보호 효과, LDL 산화 저해 및 항산화 등의 효과가 있다고 한다(Kang YH 등 1996, Heim KE 등 2002).

산사(*Crataegus pinnatifida* BUNGE)는 특유의 향과 맛을 가지는 장미과(Rosaceae)의 열매로 아가위라고도 불리며 우리나라를 비롯한 중국 및 일본 등지에 분포하고 항비만, 소화기 질환, 고혈압 등의 약용 및 식용으로 널리

[†]Corresponding author: Han-Soo Kim, Dept. of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang Korea
Tel: +82-55-350-5351
Fax: +82-55-350-5359
E-mail: kimhs777@pusan.ac.kr

이용되고 있다(Bae MH와 Kim HH 2003, Park JK 등 2012). 한편, 칼륨과 칼슘의 함량이 높다고 알려져 있고 그 밖에 인, 망간, 아연, 철분, 포도당, 과당, 식이 섬유소 등을 함유한다고 알려져 있는데(Chon JW 등 2005), 산사의 효능에 대한 연구로는 항산화(Liu T 등 2010), 항균(Ryu HY 등 2010), 항혈전(Ryu HY 등 2007), 고지혈증 개선(Kwon SH와 Kim JB 2010), 위장 보호 효과(Tadic VM 등 2008), 지방 세포의 분화 억제(Won SH 등 2008), 체중 조절(Chon JW 등 2009), 간 손상 예방(Shin JH 등 2010), 체내 지질 농도 개선(Park SH 등 2005) 등의 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다. 약리 성분으로는 catechin, caffeic acid, cyanidin-3-galactoside, ursolic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, hyperoside, isoquercitrin, pyrogallol, corosolic acid, salicylic acid, ferulic acid, quercetin 등이 알려져 있고(Kim JS 등 1993, Oh IS와 Kim IH 1993, Park SW 등 1994, Lim JD 등 2004, Liu P 등 2010, Ryu HY 등 2010), 산사 추출물 1%를 돈육 양념에 첨가하였을 때 총 균수가 낮아졌으며 육색의 개선, 보수력 증진의 효과를 나타내었다고 한다(Lee SH 등 2009). 콜레스테롤 대사 조절에 관여하는 효소인 hydroxy-methyl-glutaryl CoA (HMG- CoA reductase)의 활성을 저해하여 콜레스테롤 저하작용이 있을 것이라고도 보고된 바 있다(Lee HJ와 Choi MS 1999). 또한, 고지방 식이에 산사 발효초를 6주간 섭취시킨 흰쥐는 체내 지질의 흡수 방해 작용이 일어나 분변에서 포화지방산 함량이 높게 검출되었으며 체중은 감소하는 것으로 나타났고(Chon JW 등 2009), 고콜레스테롤 식이에 2% 산사 분말을 첨가하여 4주간 섭취시킨 수컷 흰쥐는 체내 지질 개선 및 간 손상 예방 효과가 있어 심혈관계 질환에 효과가 있을 것이라고 보고되어 있다(Kwok CY 등 2010).

한편, 식품 가공 공정 중 부산물로 배출 되는 씨를 활용하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데(Kim NY 등 2006, Hwang IW 등 2008, Lee GY 등 2008), 산사 씨를 이용한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에, 본 실험에서는 산사 씨를 용매별로 추출하여 total phenol 및 flavonoid 함량을 비교 하고 NO₂ radical 소거 활성, β-carotene/linoleic acid 시스템에서의 항산화 활성 및 SOD 유사활성을 측정하여 산사씨의 기능성 식품 소재 및 새로운 천연 항산화제로 활용 가능성을 알아 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 시료는 강원도 정선군 남면에서 자생하는 야생 산사를 2011년 10월 하순에 채취하여 씨를 분리하고, 진공동결건조(EYELA, FDU-2000, Rikakikai Co.,

Tokyo, Japan)시킨 다음 분쇄기(DCM-5500, Dae-Chang, Seongnam, Korea)로 마쇄하여 -80°C의 deep freezer(SW-UF-400, Sam-Won Co., Pusan, Korea)에 보관하며 본 실험에 사용하였다.

2. 시료 추출

시료의 추출은 2 L 플라스크에 진공 동결 건조된 산사씨 분말 100 g을 넣고 70% methanol 및 70% ethanol, chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), n-butanol 및 ethyl acetate (EA) 용매를 각각 10배 가하여(1:10, w/v) 24시간씩 총 2회 추출하였다. 각 용매 추출물을 여과지(filter paper, Advantec, No.1)로 걸러내고 rotary vacuum evaporator (EYELA, N-N series, Tokyo, Japan)로 40°C에서 감압농축하여 용매를 완전히 제거한 후, -80°C(SW-UF-400, Sam-Won Co., Pusan, Korea)에서 냉동 저장하여 본 실험의 시료로 사용하였다. 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출 후 건조 중량 백분율로 나타내었다(Jang EH 등 1996).

3. Total phenol 측정

Total phenol 함량은 Folin-Denis' 방법에 따라 측정하였다(Gutfinger T 1981). 시료 농도는 1.0 mg/mL에서, 시료 0.4 mL 및 DW 4 mL, Folin-Denis' reagent 0.5 mL를 혼합하여 3분간 방치하였다. 여기에 10% Na₂CO₃ 0.5 mL를 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, caffeic acid를 표준물질로 하여 시료 1 g 당 caffeic acid mg으로 나타내었다.

4. Total flavonoid 측정

Total flavonoid 함량은 Mello BCBS 등(2010)의 방법에 준하여 측정하였다. 시료 농도는 1.0 mg/mL에서, 시료 1 mL에 10% aluminum nitrate 0.5 mL 및 1 M potassium acetate 0.5 mL, 80% ethanol 2 mL를 가하여 40분 동안 반응시켰다. 반응액을 UV/VIS-spectrophotometer (Specord 200, Analytik-Jena, Germany)로 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 quercetin을 사용하여 시료 1 g 당 quercetin mg으로 나타내었다.

5. NO₂ radical scavenging activity 측정

자생 산사씨 추출물의 아질산염 소거 활성은 Kato H 등(1987)과 Lee SC 등(2006)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 1 mL에 1 mM sodium nitrite 0.5 mL를 가하여 0.2 M citrate buffer (pH 2.5) 8.5 mL를 첨가한 후, water bath에서 37°C, 1시간 동안 반응시켰다. 반응액 1 mL와 2% acetic acid 3 mL 및 griess reagent (1% sulfanilic acid in 30% acetic acid:1% naphthylamine in 30% acetic acid = 1:1) 0.4 mL를 혼합하여 15분간 실온에 방치시켰다. 흡광도는 520 nm에서

측정하였으며 아래의 식을 이용하여 활성 정도를 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 나타내었다.

$$\text{Nitrite scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

- A : absorbance of sample
- B : absorbance of DW instead of sodium nitrite
- C : absorbance of DW instead of sample

6. β-carotene bleaching assay

β-carotene에서의 항산화 작용은 Jeong CH 등(2008)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, chloroform 10 mL에 β-carotene 1 mg을 용해하여 linoleic acid 20 mg 및 tween 40을 200 mg 가하여 잘 혼합하였다. 혼합액을 40°C에서 감압진공농축기로 chloroform을 제거한 후, DW 100 mL를 첨가하고 진탕하여 β-carotene emulsion을 조제하였다. 시료 0.3 mL에 β-carotene emulsion 3 mL를 가하여 50°C에서 2시간 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 나타내었다.

$$\beta\text{-carotene bleaching activity (\%)} = \left(1 - \frac{S_0 - S_{120}}{B_0 - B_{120}}\right) \times 100$$

- S₀ : absorbance of sample after 0 min
- S₁₂₀ : absorbance of sample after 120 min
- B₀ : absorbance of blank after 0 min
- B₁₂₀ : absorbance of blank after 120 min

7. Superoxide dismutase (SOD) like ability

산사 씨 추출물의 SOD 유사활성은 시료 0.2 mL에 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.5) 3 mL 및 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응 시킨 후, 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시켰다. 흡광도는 420 nm에서 측정하였으며, 다음의 식에 의하여 나타내었다(Marklund S와 Marklund G 1974). 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 나타내었다.

$$\text{SOD likes activity (\%)} = \left(1 - \frac{S-A}{B}\right) \times 100$$

- S : absorbance of sample
- A : absorbance of DW instead of pyrogallol
- B : absorbance of DW instead of sample

8. 통계처리

분석 결과의 통계처리는 평균값과 표준편차로 나타내었다. 군간의 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA, IBM SPSS statistics ver. 21)로 분석하였고, p<0.05 수준에서

Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수율

추출 용매별 산사 씨의 수율은 Table 1과 같이, 70% methanol 추출물이 10.38±0.30%로 추출 용매 중 가장 높은 수율을 나타내었으나, 70% ethanol 추출물(10.23±0.17%)과 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v) 추출물은 7.11±0.78%로 나타나 70% methanol 및 70% ethanol 추출물 다음으로 높은 수율을 보였으며, n-butanol 추출물은 2.77±0.55%, ethyl acetate (EA) 추출물은 0.76±0.06%로 추출 용매 중 유의적으로 가장 낮은 수율을 나타내었다.

2. Total phenol의 함량

산사 씨의 추출 용매별 total phenol 함량은 Fig. 1과 같이, 70% methanol 추출물이 55.53±0.73 mg/g으로 추출 용매 중 가장 높은 함량을 나타내었으며, 70% ethanol이 각각 51.54± 1.05 mg/g의 함량을 보여 70% methanol 다음으로 높게 나타났으나 두 용매 추출물간에 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었다. CM 및 EA 추출물은 각각 39.04±0.12 mg/g, 48.68±0.79 mg/g의 함량을 나타내어 EA 추출물이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 한편, n-butanol 추출물은 37.29±0.36 mg/g의 함량으로 추출 용매 중 유의적으로 가장 낮은 것으로 나타났다.

종류별 한약재의 열수 추출물 total phenol 함량에 있어서 꿀풀이 5.07 mg/100 g으로 높게 나타났고, 산사씨는 2.25 mg/100 g으로 꿀풀 보다 낮게 나타났지만 결명자의

Table 1. Yield of various solvent extracts from feral haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) seed

Solvent	Yield (%)
70% methanol	10.38±0.30 ^{d1)}
70% ethanol	10.23±0.17 ^d
CM ²⁾	7.11±0.78 ^c
n-butanol	2.77±0.55 ^b
EA ³⁾	0.76±0.06 ^a

¹⁾ The data are presented as means±SD of 3 times. Means with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

²⁾ CM; Chloroform:Methanol=2:1 (v/v).

³⁾ EA; Ethyl acetate.

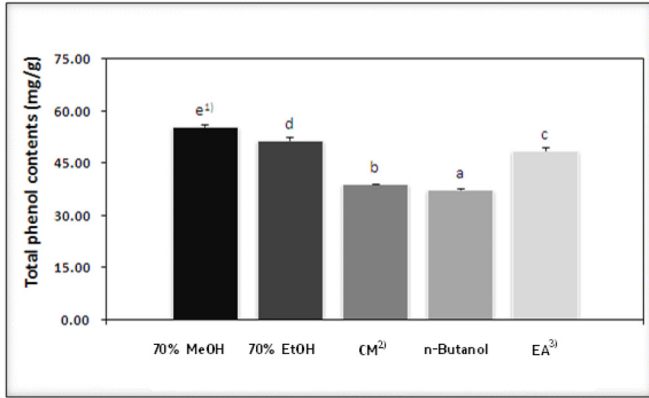


Fig. 1. Total phenol contents of various solvent extracts from feral haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) seed.

- 1) The data are presented as means±SD of 3 times. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
- 2) CM; Chloroform:Methanol=2:1 (v/v).
- 3) EA; Ethyl acetate.

2.15 mg/100 g 함량보다는 높은 것으로 나타났다(Ju JC 등 2006). 참외 종자 ethanol 추출물의 total phenol 함량은 109 mg/100 g 이라고 보고되어 있으며(Kim JH 등 2012), 포도 씨를 용매별로 추출하였을 때 열수 추출물은 14.3%, 70% acetone은 40.3%, 70% ethanol은 51.0%로 70% ethanol 추출물에서 가장 높은 것으로 나타났다고 보고된 바 있다(Jang JK와 Han JY 2002). 또한, 시판되는 녹차 및 홍차류의 항산화력은 대부분 polyphenol성 화합물에 의한 것이라는 보고가 있고(Choi YM 등 2003), phenol 화합물은 구조에 phenolic hydroxyl기를 가지고 있어 free radical의 수용체로 작용하여 항산화 활성을 나타낸다고 하며, 대표적으로 녹차의 catechin, 커피의 chlorogenic acid 등이 있다고 한다(Kim JS와 Choi SY 2008). 본 실험결과에서도 70% methanol 및 70% ethanol 추출물에서 높은 total phenol 함량이 높게 나타났다.

3. Total flavonoid의 함량

산사 씨의 total flavonoid 함량은 Fig. 2와 같다. n-butanol 추출물이 2.93±0.16 mg/g으로 추출 용매 중에서 가장 높게 나타났으며, EA 추출물이 2.67±0.18 mg/g으로 n-butanol 추출물 다음으로 높게 나타났으나 두 추출물간에 유의적인 차이는 없었다. 70% methanol이 1.00±0.00 mg/g으로 n-butanol 및 EA 추출물 다음으로 높은 함량을 보였고, 70% ethanol 용매 추출물이 0.88±0.04 mg/g으로 나타났으며, CM 추출물이 0.67±0.08 mg/g으로 추출 용매 중 유의적으로 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다. 대추 과육 및 씨의 total flavonoid 함량은 과육에서 35.56 μg/mg, 씨에서 131.48 μg/mg으로 나타나 씨에서 더 높게

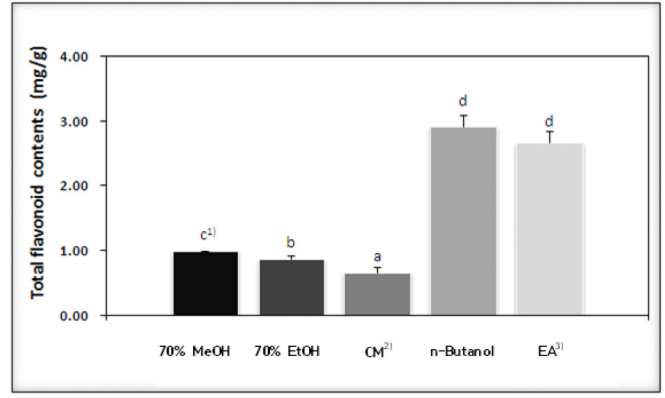


Fig. 2. Total flavonoid contents of various solvent extracts from feral haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) seed.

- 1) The data are presented as means±SD of 3 times. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
- 2) CM; Chloroform:Methanol=2:1 (v/v).
- 3) EA; Ethyl acetate.

나타났다고 하며(Yu MH 등 2006), 홍화씨 ethanol 추출물은 78.69 mg/g의 함유량을 보였다고 한다(Yu SY 등 2013). 산사는 90% ethanol, butanol, n-hexane, ethyl acetate 등 추출 용매에 따라 total flavonoid 함량이 다르다고 하였고(Ryu HY 등 2007, Ryu HY 등 2010, Song TH 등 2012), 이는 추출 용매에 따른 성분 조성 및 함량 등이 달라지기 때문인 것으로 보고되어 있다(Jayaprakasha GK 등 2001).

4. NO₂ radical scavenging activity

아질산염은 어류 및 식육의 저장, 가공시 부패 방지, 향미 증진, 발색 등의 목적으로 첨가되는데 hemoglobin을 methemoglobin으로 산화시키고, 아민과 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 형성하기 때문에 문제가 되고 있다(Jeong CH 등 2006). 산사 씨 용매별 추출물의 NO₂ radical 소거 활성은 Fig. 3과 같으며 모든 시료 농도에서 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 70% methanol 추출물은 농도별로 4.94±1.52%, 10.38±1.67%, 17.94±1.43%으로 높은 활성을 보였으나, 70% ethanol 추출물(3.73±0.46%, 9.78±1.94%, 16.53±1.21%)과 유의적인 차이는 없었다. CM 추출물은 농도별로 3.43±0.35%, 9.17±0.46%, 15.73±1.36%의 활성을 나타내었고, EA 추출물은 시료 농도별로 2.62±0.80%, 8.57±2.61%, 13.41±1.40%를 나타내었다. n-butanol 추출물은 농도별로 각각 1.92±0.35%, 5.44±1.85%, 7.36±1.94%로 용매 추출물 중 유의적으로 가장 낮은 활성을 나타내었다. 대조군인 ascorbic acid는 농도별로 27.22±0.46%, 45.16±0.17%, 58.27±0.80%의 유의적인 차이를 보였으며 용매별 추출물과도 유의적인 차이를 나타내었다.

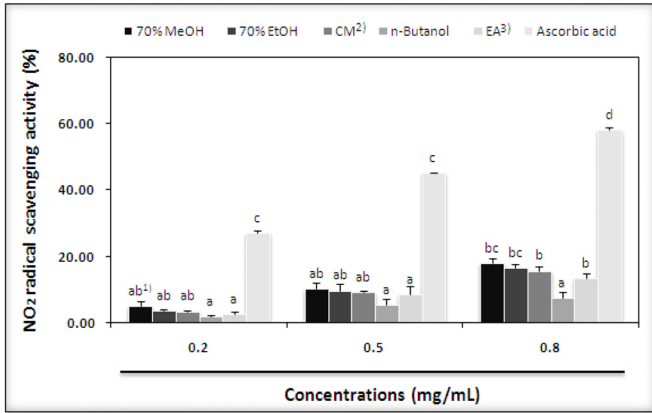


Fig. 3. NO₂ radical scavenging activity of various solvent extracts from feral haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) seed.

- 1) The data are presented as means±SD of 3 times. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
- 2) CM; Chloroform:Methanol=2:1 (v/v).
- 3) EA; Ethyl acetate.

한편, 오미자 종자의 추출 용매별 아질산염 소거 활성은 methanol에서 가장 높게 나타났고 ethanol, water, chloroform, ethyl acetate 순이었으며, 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Jung GT 등 2000). 산사 및 살구 씨, 산약, 지실 추출물의 아질산염 소거 활성은 열수 추출물보다 ethanol 추출물에서 더 높게 나타났으며 산사의 아질산염 소거능이 가장 높은 것으로 보고되어져 있다(Park CS 등 2006). 산사, 차조기, 현초, 하수오 ethanol 추출물 또한 산사의 아질산염 소거 활성이 유의적으로 가장 높은 것으로 나타났다고 하였다(Lee SH 등 2009). Phenolic acid는 아질산을 분해함으로 높은 아질산염 소거능을 나타내지만 flavonoid 중의 일부는 아질산염 소거율이 낮다고 보고된 바 있다(Kang YH 등 1996). 따라서 본 실험결과 70% methanol 및 70% ethanol 추출물에서 높은 아질산염 소거능을 보였으며 이는 산사 씨 중의 phenolic compound에 의한 것으로 사료된다.

5. β-carotene에 의한 항산화 활성

산화에 의하여 빠르게 탈색되는 β-carotene은 항산화 물질이 존재할 경우 free radical의 소거로 인해 탈색이 억제된다고 하며 이러한 원리를 이용하여 β-carotene에서의 항산화 작용을 측정한다고 알려져 있다(Jayaprakasha GK 등 2001). 산사 씨 추출 용매별 β-carotene에서의 항산화 작용은 Fig. 4와 같다. 70% methanol 추출물은 48.36±2.39%, 64.84±3.67%, 75.24±1.06%이며, 70% ethanol 추출물의 활성은 45.97±2.08%, 62.58±1.27%, 70.13±1.65%으로 시료 0.8 mg/mL 농도를 제외한 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL 농도에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. CM 추출물은 28.82±

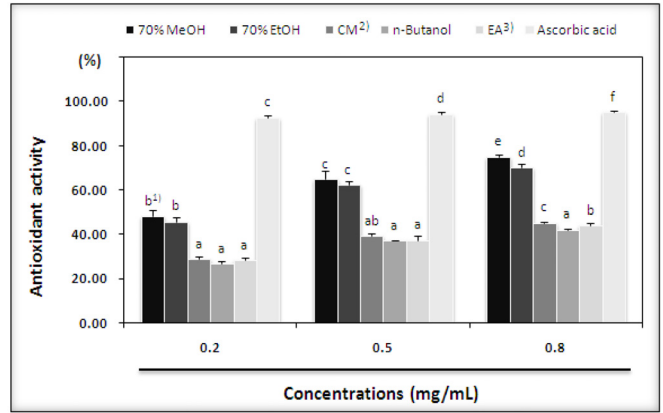


Fig. 4. β-carotene bleaching assay of various solvent extracts from feral haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) seed.

- 1) The data are presented as means±SD of 3 times. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
- 2) CM; Chloroform:Methanol=2:1 (v/v).
- 3) EA; Ethyl acetate.

1.12%, 39.44±1.06% 및 45.44±0.30%, EA 추출물은 농도별로 28.25±1.54%, 37.60±1.67%, 44.02±0.98%, n-butanol 추출물은 26.95±1.07%, 37.18±0.11%, 42.31±0.52%의 활성을 나타내었다. 대조군인 ascorbic acid는 농도별로 93.02±0.16%, 94.57±0.28%, 95.17±0.27%로 다른 용매 추출물에 비하여 높은 활성을 나타내었다.

여주의 항산화 활성을 측정한 결과 완숙과에서 79.9%, 잎 63.9%, 미숙과 59.0%, 줄기 36.2%를 나타내었으며, 산화율은 꽃열매에서 0.41로 가장 빠르게 나타났다고 보고되었다(Kubola J와 Siriamornpun S 2008). 라즈베리와 블루베리 추출물의 β-carotene에 대한 항산화 활성은 농도가 높아짐에 따라 증가하는 경향이라고 하였으며(Jeong CH 등 2008), 만다린과 오렌지 및 포도의 β-carotene 산화 억제 활성에서 항산화력은 total phenol, flavonoid 함량과 밀접한 관련이 있다고 보고되어 있다(Goulas V와 Manganaris GA 2012). 따라서 산사 씨의 β-carotene에서의 항산화 활성은 산사의 phenol 및 flavonoid 성분 때문인 것으로 추정된다.

6. Superoxide dismutase (SOD) like ability

Superoxide dismutase (SOD)는 지질과산화물을 생성하여 세포 손상을 일으킨다고 알려져 있는 superoxide radical를 소거함($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)으로써 항산화 효과를 나타낸다고 알려져 있는데 SOD 유사활성은 이와 비슷한 작용을 하는 저분자 물질로 자동산화 억제를 통하여 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다(McCord JM과 Fridovich I 1969, Lee EJ와 Bae JH 2011). 산사 씨의 용매별 추출물 SOD 유사활성은 Fig. 5와 같이, 70% methanol이 농도별로 9.76±

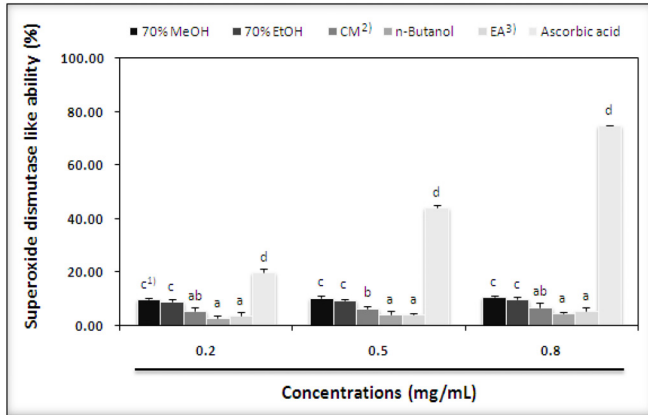


Fig. 5. Superoxide dismutase like ability of various solvent extracts from feral haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) seed.

1) The data are presented as means±SD of 3 times. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) CM; Chloroform:Methanol=2:1 (v/v).

3) EA; Ethyl acetate.

0.51%, 10.50±0.92%, 10.80±0.44%로 추출 용매 중 가장 높은 활성을 나타내었으며, 70% ethanol이 8.88±1.12%, 9.62±0.26%, 9.91±0.89%로 70% methanol 다음으로 높은 활성을 보였지만 70% methanol 및 70% ethanol 추출물간에 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. CM 추출물이 5.47±1.54%, 6.51±0.92%, 6.95±1.56%, EA 추출물이 3.85±1.43%, 4.14±0.44%, 5.33±1.68%, n-butanol 추출물이 각각 2.81±0.89%, 3.99±1.43%, 4.59 ±0.44%로 나타났으며 추출 용매 중 가장 낮은 활성을 나타내었다. 대조군인 ascorbic acid는 19.82±1.43%, 44.23±0.68%, 74.85±0.26%로 용매별 추출물보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

오미자 추출물의 SOD 유사활성은 1,000 ppm 농도에서 물과 ethanol 추출물이 각각 51.2%, 53.6%를 나타내었고 (Kwon HJ와 Park CS 2008), 유근피는 1,000 ppm 농도에서 물과 ethanol 추출물이 각각 53.3%, 38.3%를 나타내었으며(Jeong KY와 Kim ML 2012), 오디의 각 용매 추출물의 SOD 유사 활성은 H₂O 추출물(8.63%), ethanol 추출물(27.55%, 26.73%), methanol 추출물(29.50%, 25.58%)이 대조군인 BHT(78.42%)보다 낮은 활성을 나타내었다고 보고되었다(Lee EJ와 Bae JH 2011). 오미자 종자 추출물의 SOD 유사활성은 물 추출물 보다는 ethanol 추출물에서 더 높은 경향이였으며 시료 농도가 높을수록 유의적으로 증가하였다고 하였다(Choi HS 등 2012). SOD와 같은 항산화 효소는 지질과산화 억제와 등의 효과를 기대할 수 있다고 하였다(McCord JM과 Fridovich I 1969, Sung KS 등 2000). 따라서 산사 씨 추출물은 이러한 산화 억제 효과가 있을 것이라고 사료되며 이는 산사 씨에 함유되어 있는 phenol 및 flavonoid와 같은 항산화 성분

때문인 것으로 판단된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 산사씨의 추출 용매별 항산화 활성을 확인하고자 total phenol, flavonoid, NO₂ radical 소거 활성, β-carotene에서의 항산화 활성 및 SOD 유사 활성을 분석하였다. Total phenol 함량은 70% methanol (55.53 mg/g), 70% ethanol (51.54 mg/g), EA (48.68 mg/g), CM (39.04 mg/g), n-butanol (37.29 mg/g) 추출물 순으로 높게 측정되었고, total flavonoid 함량은 n-butanol (2.93 mg/g), EA (2.67 mg/g), 70% methanol (1.00 mg/g), 70% ethanol (0.88 mg/g), CM (0.67 mg/g) 추출물 순으로 높은 함량을 보였다. NO₂ radical 소거 활성은 70% methanol, 70% ethanol, CM, EA, n-butanol 추출물 순이었으며, β-carotene에서의 항산화 활성은 70% methanol, 70% ethanol, CM, EA, n-butanol 추출물 순으로 높게 나타났다. Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성은 70% methanol, 70% ethanol, CM, EA, n-butanol 추출물 순으로 높은 활성을 보였으며, 항산화 활성은 대부분 70% methanol 및 70% ethanol 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었고, CM, EA 및 n-butanol 추출물의 활성은 실험에 따라 차이가 있었으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 산사씨는 항산화 활성이 우수하여 다양한 기능성 식품 소재 및 천연 항산화제로 활용 가능할 것으로 생각된다.

References

- Aughsteeen AA, Mohammed FI. 2002. Insulin enhances amylase and lipase activity in the pancreas of streptozotocin-diabetic rats. *Saudi Med J* 23: 838-844
- Bae MH, Kim HH. 2003. Mechanism of *Crataegi fructus* extract induced endothelium-dependent vasorelaxation in rabbit carotid artery. *Korean J Herb* 18: 169-180
- Choi HS, Beik KY, Kim JB. 2012. Studies on antioxidative effects of *Schisandra chinensis* seed extract. *J Korean Soc Cosmet* 18: 908-915
- Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727
- Chon JW, Park JK, Lee MA, Jeong MR, Han JH, Park YK. 2009. Fermented *Crataegi fructus* vinegar improves lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1024-1031
- Chon JW, Park SJ, Han JH, Park SH. 2005. Study of *Crataegi fructus* for medicinal foods applications - nutrition composition and scheme for foods -. *Korean J Oriental Phys Path* 19: 1220-1224

- Dillard CJ, German JB. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci Food Agric* 80: 1744-1756
- Goulas V, Manganaris GA. 2012. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in cyprus. *Food Chem* 131: 39-47.
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 966-968
- Han JS, Rhee SH. 1996. The relationship between serum cholesterol level and dietary intake in obese children. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 433-440
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure - activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572- 584
- Hwang IW, Lee HR, Kim SK, Zheng HZ, Choi JU, Lee SH, Lee SH, Chung S K. 2008. Proanthocyanidin content and antioxidant characteristics of grape seeds. *Korean J Food Preserv* 15: 859-863
- Jang EH, Pyo YH, Ahn MS. 1996. Antioxidant effect of omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *Korean J Soc Food Sci* 12: 372-376
- Jang JK, Han JY. 2002. The antioxidant ability of grape seed extracts. *Korean J Food Sci Technol* 34: 524-528
- Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem* 73: 285-290
- Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. 2008. Analysis of nutritional compositions and antioxidative activities of Korean commercial blueberry and raspberry. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1375-1381
- Jeong CH, Nam EK, Shim KH. 2006. Antioxidative activities and nitrate scavenging activity in different parts of *Erigeron annuus*. *J Agric Life Sci* 40: 13-20
- Jeong KY, Kim ML. 2012. Physiological activities of *Ulmus pumila* L. extracts. *Korean J Food Preserv* 19: 104-109
- Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7-14
- Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935
- Kang JY, Kim SY, Lee MS, Ahn HS. 2005. Effects of vegetables juice supplementation on serum lipid profile and antioxidant activity in college women. *Korean J Comm Nutr* 10: 183-188
- Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *J Agric Biol Chem* 51: 1333-1338
- Kim JH, Suh JK, Kang YH. 2012. Anticancer effects of the extracts of oriental melon (*Cucumis melo* L. var *makuwa Makino*) seeds. *Korean J Plant Res* 25: 647-651
- Kim JS, Choi SY. 2008. Physicochemical properties and antioxidative activities of omija (*Schizandra chinensis* Bailon). *Korean J Food Nutr* 21: 35-42
- Kim NY, Choi JH, Kim YG, Jang MY, Moon JH, Park GH, Oh DH. 2006. Isolation and identification of an antioxidant substance from ethanol extract of wild grape (*Vitis coignetiea*) seed. *Korean J Food Sci Technol* 38: 109-113
- Kim OH, Park JK. 2012. The effects of participation in exercise and nutrition education program on physical fitness, dietary habits and nutrition intake status for adolescents. *Korean J Obesity* 21: 158-165
- Kim JS, Lee GD, Kwon JH, Yoon HS. 1993. Identification of phenolic antioxidative components in *Crataegus pinnatifida* Bunge. *J Korean Agric Chem Soc* 36, 154-157.
- Kubola J, Siriamornpun S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chem* 110: 881-890
- Kwok CY, Wong CNY, Yau MYC, Yu PHF, Au ALS, Poon CCW, Seto SW, Lam TY, Kwan YW, Chan SW. 2010. Consumption of dried fruit of *Crataegus pinnatifida* (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. *J Functional Foods* 2: 179-186
- Kwon HJ, Park CS. 2008. Biological activities of extracts from omija (*Schizandra chinensis* Baillon). *Korean J Food Preserv* 15: 587-592
- Kwon SH, Kim JB. 2010. Effects of *Crataegii Fructus* on the diet-induced hyperlipidemia in rats. *Korean J Oriental Phys Path* 24: 67-73
- Lee EJ, Bae JH. 2011. Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mulberry fruit. *Korean J Food Nutr* 24: 204-209
- Lee GY, Jang DS, Lee YM, Kim YS, Lim JS. 2008. Constituents of the seeds of *Cornus officinalis* with inhibitory activity on the formation of advanced glycation end products (AGEs). *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 316-320
- Lee HJ, Choi MS. 1999. Measurement of inhibitory activities on 3-hydroxy-3- methylglutaryl CoA reductase and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase by various plant extracts *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 958-962
- Lee SC, Kim SY, Heong SM, Park JH. 2006. Effect of far-infrared irradiation on catechins and nitrite scavenging activity of green tea. *J Agric Food Chem* 54: 399-403
- Lee SH, Jeong EJ, Jung TS, Park LY. 2009. Antioxidant activities of seasoning sauces prepared with *Geranium thunbergii* sieb. et Zucc. and *Crataegi fructus* and the quality changes of seasoned pork during storage. *Korean J Food Sci Technol* 41: 57-63
- Lee SH, Kang KM, Park HJ, Baek LM. 2009. Physiological characteristics of medicinal plant extracts for use as

- functional materials in seasoning sauce for pork meat. Korean J Food Sci Technol 41: 100-105
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. Korean J Medicinal Crop Sci 12: 191-202
- Liu P, Yang B, Kallio H. 2010. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography - lectrospray ionization mass spectrometry. Food Chem 121: 1188-1197
- Liu RH. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. Am J Clin Nutr 78: 517-520
- Liu T, Cao Y, Zhao M. 2010. Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. major) fruits. Food Chem 119: 1656-1662
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47: 469-474
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). J Biol Chem 244: 6049-6055
- Mello BCBS, Petrus JCC, Hubinger MD. 2010. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. J Food Engin 96: 533-539
- Oh IS, Kim IH. 1993. Pharmaco-constituents of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* leaves(I). Korean J Pharmacogn 37: 476-482
- Park CS, Yang KM, Kim ML. 2006. Functional properties of medicinal plant extracts. Korean J Food Cook Sci 23: 720-727
- Park JK, Kweon SH, Kim YH, Jang MJ, Oh KW. 2012. Dietary behaviors related to metabolic syndrome in Korean adults. Korean J Comm Nutr 17: 664-675
- Park SH, Kim YH, Chon JW, Song YJ, Han JH. 2005. Study of *Crataegi Fructus* for medicinal foods applications - functional evaluation of fermented liquid on the lipid profile improvement high fat diet -. Korean J Oriental Phys 19: 1272-1280
- Park SJ, Shin EH, Lee JH. 2012. Biological activities of solvent fractions from methanolic extract of *Crataegi fructus*. Korean J Food Nutr 25: 897-902
- Park SW, Yook CS, Lee HK. 1994. Chemical components from the fruits of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa*. Korean J Pharmacogn 25: 328-335
- Ryu HY, Ahn SM, Kim JS, Jung IC, Sohn HY. 2010. Antimicrobial activity of fruit of *Crataegus pinnatifida* Bunge against multidrug resistant pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* sp. Korean J Microbiol Biotechnol 38: 77-83
- Ryu HY, Kim YK, Kwon IS, Kwon CS, Jin IN, Sohn HY. 2007. Thrombin inhibition activity of fructus extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge. J Life Science 17: 535-539
- Seo YJ, Kim MH, Kim MH, Choi MK. 2012. Status and relationships among lifestyle, food habits, and stress scores of adults in chungnam. Korean J Community Nutr 17: 579-588
- Shin JH, Jo MJ, Park SM, Park SJ, Kim SC. 2010. Hepatoprotective activity of *Crataegii fructus* water extract against cadmium-induced toxicity in rats. Korean J Oriental Phys Path 24: 249-257
- Son SM. 2004. Nutrition and health of sunsik consumer. Korean J Food Nutr 17: 103-109
- Song TH, Choi HS, Kim YS, Woo IA. 2012. Study on sensory and mechanical characteristics of white bread containing different levels of Korean and Chinese sansa (*Crataegus pinnatifida* Bunge) powder. Korean J Food Culture 27: 391-399
- Sung KS, Chun C, Kwon YH, Kim KH, Chang CC. 2000. Effects of red ginseng component on the antioxidative enzymes activities and lipid peroxidation in the liver of mice. J Ginseng Res 24: 29-34
- Tadic VM, Dobric S, Markovic GM, Dordevic SM, Arsic IA, Menkovic NR, Stevic T. 2008. Anti-inflammatory, gastroprotective, free radical scavenging and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. J Agric Food Chem 56: 7700-7709
- Won SH, Kwon KR, Rhim TJ, Kim DH. 2008. The effect of *Crataegi Fructus* pharmacopuncture on adipocyte metabolism. J Pharmacopuncture 11: 63-73
- 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 jujuba* var. *inermis* rehder. Korean J Food Sci Technol 38: 128-134
- Yu SY, Lee YJ, Kang SN, Lee SK, Jang JY, Lee HK, Lim JH, Lee OH. 2013. Analysis of food components of *Carthamus Tinctorius* L. seed and its antimicrobial activity. Korean J Food Preserv 20: 227-233

Received on Jan. 22, 2014/ Revised on Feb. 3, 2014/ Accepted on Feb. 6, 2014