

추출조건에 따른 유근피 추출물의 항산화 활성

김재민¹ · 조명래¹ · 서규은¹ · 김예슬¹ · 정태동¹ · 김영현¹ · 김단비¹ · 신기해¹
오지원¹ · 이종석² · 이진하¹ · 김종예¹ · 이대원³ · 이옥환¹

¹강원대학교 식품생명공학과

²국립생물자원관

³정선약초백화점

Effect of Extraction Conditions on *in vitro* Antioxidant Activities of Root Bark Extract from *Ulmus pumila* L.

Jae-Min Kim¹, Myoung-Lae Cho¹, Kyu-Eun Seo¹, Ye-Seul Kim¹, Tae-Dong Jung¹,
Young-Hyun Kim¹, Dan-Bi Kim¹, Gi-Hae Shin¹, Ji-Won Oh¹, Jong Seok Lee²,
Jin-Ha Lee¹, Jong-Yae Kim¹, Dae-Won Lee³, and Ok-Hwan Lee¹

¹Department of Food science and Biotechnology, Kangwon National University

²National Institute of Biological Resources

³Department of Jeongseon Yaccho

ABSTRACT This study investigated optimal extraction conditions for application of *Ulmus pumila* L. as a natural antioxidant. *U. pumila* L. was extracted using ethanol (EtOH) at various concentrations (0, 40, and 80%) and extraction times (1, 2, and 3 h) at 70°C and then evaluated for extraction yield, total phenolic contents, total flavonoid contents, as well as antioxidant activities [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, reducing power, and oxygen radical absorbing capacity (ORAC)]. Antioxidant activities were correlated with total phenolic and flavonoid contents. Of the solvent conditions, 80% EtOH extracts for 3 h at 70°C showed the highest total phenolic and flavonoid contents with strong antioxidant activities, although there were no significant time effects on DPPH and ABTS radical scavenging activities and reducing power. However, ORAC values of all EtOH extracts remarkably increased in a time-dependent manner. In addition, 80% EtOH extract for 3 h exhibited strong antioxidant effects on HDF and 3T3-L1 cells. Therefore, the antioxidant capacity of *U. pumila* L., may due to phenolic and flavonoid contents, and extraction conditions were 80% EtOH for 3 h at 70°C. This extract could be a good source for natural antioxidants.

Key words: *Ulmus pumila* L., DPPH, ABTS, ORAC, total phenolic content

서 론

인체의 산화적 스트레스로 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 생체 내의 세포막, 단백질, DNA 손상 등을 유발시켜 암, 당뇨, 고혈압, 비만 등 각종 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(1-3). 활성산소종에는 superoxide anion(O²⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl 라디칼(OH) 등이 있는데, 기능성 식품 및 의약품 산업에서는 활성산소종들을 제거하기 위하여 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl gallate(PG) 등을 사용하여 왔다.

그러나 많은 연구 결과들에서 이들 합성 항산화제가 암을 유발하거나 세포 내 독성을 나타낸다고 보고하였다(4). 따라서 보다 안전하고 효과적인 천연 항산화제를 찾고자 하는 연구가 꾸준히 수행되고 있으며, 최근에는 민간요법이나 한방에서 효능이 입증된 육상 식물을 활용한 기능성 식품, 화장품 및 의약품 소재에 관한 연구가 많이 수행되고 있다(5,6).

느릅나무(*Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai)는 전국 각지에 자생하고 일본, 중국 등지에도 분포하는 것으로 알려져 있으며, 느릅나무의 껍질은 유백피(bark of *Ulmus pumila* L.)이고, 뿌리껍질은 유근피(root bark of *U. pumila* L.)이다. 유근피는 예부터 염증, 항부종, 항균 작용 등의 생리활성으로 민간요법에서 많이 사용하여 왔으며(7), 최근 연구 결과에 의하면 유근피의 수용성 추출물에서 분리된 단백질은 mouse의 생체 내 면역력을 증가시켜 항암 활성을 유도한다고 보고되었다(8). 한편 유근피를 100% 메탄올로

Received 27 March 2015; Accepted 30 April 2015

Corresponding author: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea

E-mail: loh99@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-6454

추출하여 분리한 flavonoid 성분의 화합물은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), OH 라디칼 소거능과 높은 환원력을 보였으며(9), 80% 메탄올로 추출 후 분리된 phenolic 화합물들은 글루탐산에 의한 신경세포 독성으로부터 뇌신경 보호 효과를 갖는다고 보고되었다(10). 또한 80% 에탄올로 추출된 유근피 추출물은 다른 농도의 에탄올 추출물보다 높은 항산화, 항고혈압, 항염증 효과를 보였다(8). 이러한 연구 결과들에서 보듯이 유근피는 추출용매 및 추출조건에 따라 다양한 기능성을 갖는 성분들을 분리할 수 있다. 하지만 유근피를 기능성 항산화 소재로 활용하기 위한 최적 추출조건 확립에 관한 연구는 거의 수행되지 않았으며, 유근피의 추출용매 및 추출시간에 따른 항산화 활성에 대한 체계적인 연구는 수행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 유근피 추출물을 기능성 식품 및 의약품 산업의 소재로 활용할 기초 자료를 제공하고자 유근피를 추출용매(0, 40, 80% 에탄올)와 추출시간(1, 2, 3시간)을 달리하여 추출조건에 따른 폴리페놀, 플라보노이드 함량을 연구하였고 다양한 방법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였으며, 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 항산화 활성과의 연관성을 분석하였다. 또한 *in vitro* 항산화 활성에서 가장 우수한 유근피 추출물을 이용하여 피부 섬유아세포에서 hydrogen peroxide에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 관찰하였고, 3T3-L1 전지방세포에서 ROS 생성 저감 활성을 연구하였다.

재료 및 방법

유근피 추출물 제조

본 연구에 사용한 유근피(*Ulmus pumila* L.)는 정선약초 백화점에서 구입하여 20 mesh 이하로 분쇄 후 4°C에 보관하였다. 유근피 추출물은 1 g의 시료에 200 mL의 용액(0, 40, 80% 에탄올)을 첨가하였으며, 70°C에서 1, 2, 3시간 동안 환류냉각 추출하였다. 각각의 추출물은 filter paper(Whatman No. 3, Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 후, 회전 진공 농축기(Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Shanghai, China)를 사용하여 60°C에서 농축하였고, 동결건조(Ilshin-biobase Co., Ltd., Yangju, Korea) 하였다. 각 추출물의 수율은 건조중량을 기준으로 환산하여 계산하였다.

실험시약

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, sodium carbonate, aluminium nitrate, potassium acetate, sodium hydroxide, DPPH, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(Trolox), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), acetic acid, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH), potassium persulfate, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), N-acetyl-L-cysteine(NAC) 등은 Sigma-

Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, fluorescein sodium salt는 Junsei Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast)는 강원대학교 생물공학과 Bioprocess Engineering 실험실로부터 분양받아 본 연구실에서 계대배양하여 사용하였고(11), 마우스 유래 지방세포 3T3-L1 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, CL-173, Manassas, VA, USA)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S), phosphate-buffered saline(PBS) 및 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Gibco(Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

유근피의 일반성분 분석

유근피의 일반성분은 AOAC법(12)에 따라 수분 함량은 상압건조법, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조단백질 함량은 semi micro-Kjeldahl법, 회분 함량은 회화법으로 분석하였고, 탄수화물 함량은 유근피 시료 100 g 중에서 수분, 회분, 조지방 및 조단백을 합한 값을 100에서 뺀 값으로 하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법을 변형하여 측정하였다(13). 각 시료 1 mL에 2% sodium carbonate 용액 1 mL와 10% Folin-Ciocalteu's reagent 1 mL를 혼합하여 암소에서 1시간 방치 후 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 표준물질의 표준곡선($y=16.47x+0.014$, $R^2=0.993$)으로부터 총 폴리페놀 함량(mg GAE/g sample)을 계산하였다.

총 플라보노이드 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등(14)의 방법에 따라 각 시료 0.5 mL에 95% EtOH 1.5 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL 및 1.0 M potassium acetate 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices)의 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 catechin를 이용하여 표준물질의 표준곡선($y=1.879x+0.035$, $R^2=0.995$)으로부터 총 플라보노이드 함량(mg CE/g sample)을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 시료 내의 항산화 물질과 자유라디칼인 DPPH 시약이 반응하여 자유라디칼이 소거되어 자색에서 노란색으로 탈색되는 원리를 이용한다. DPPH 라디칼 소거능은 Stagos 등(15)의 방법을 변형하여 측정하였다. Ethanol을 사용하여 용해시킨 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL

와 시료 0.2 mL를 혼합한 뒤 10분 동안 암소에서 반응시킨 후 microplate reader의 517 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

$A_{\text{Experiment}}$: 시료군 흡광도, A_{Blank} : 공시험 흡광도

A_{Control} : 대조군 흡광도

ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS 시약과 potassium persulfate의 반응에 의해 생성된 ABTS 자유라디칼이 시료의 항산화 성분에 의해 청록색으로 탈색되는 현상을 이용한 방법이다. ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(16)의 방법으로 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 빛을 차단한 상태로 16시간 동안 상온에서 반응시켜 ABTS 양이온을 형성시킨 후 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 무수에탄올을 이용하여 조절하였다. 시료 10 μL 와 900 μL 의 희석된 ABTS 용액을 첨가하고 6분 동안 반응시켜 microplate reader의 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

A_{Sample} : 시료군 흡광도, A_{Control} : 대조군 흡광도

환원력

환원력은 ferric-ferricyanide(Fe^{3+})가 항산화 활성 물질에 의하여 ferrous(Fe^{2+})로 환원되는 능력을 측정하는 방법으로 Oyaizu(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.1 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer 0.5 mL, 1% potassium ferricyanide 0.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 10% trichloroacetic acid 0.5 mL를 넣어준 다음 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하고, 상층액 0.5 mL와 증류수 0.5 mL 그리고 0.1% iron(III) chloride 0.1 mL를 첨가하여 상온에서 10분간 반응 후 microplate reader 655 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ORAC assay

Oxygen radical absorbing capacity(ORAC)는 항산화 활성 물질이 자유라디칼의 chain을 절단하여 항산화력을 나타내는 것을 측정하는 것으로(18), 유근피 추출물의 ORAC assay는 Ou 등(19)의 방법을 변형하여 실험하였다. 75 mM phosphate buffer에 유근피 추출물을 용해시키고, 53 mM의 fluorescein 150 μL 를 첨가 후, 37°C에서 15분간 가열한 다음 144 mM AAPH 25 μL 를 첨가하였다. 형광분광광도계

는 37°C로 조정 후, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 90분간 측정하였다. 표준물질로는 Trolox를 사용하였으며, 표준시약과 유근피 추출물의 under the curve(AUC)를 측정하고 $\mu\text{M TE/mg}$ 으로 표기하였다.

세포배양

피부 섬유아세포는 실험목적에 따라 96-well plate 및 6-well plate에 각각 1×10^6 cells/well 농도로 seeding 한 후, FBS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 저농도 포도당 DMEM(89%)에서 배양하였다. 이때 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물의 효과를 관찰하기 위하여 음성대조군에는 아무것도 처리하지 않았으며, 양성대조군으로는 NAC를 처리하였다.

3T3-L1 지방세포 분화 과정 중 유근피 추출물에 의해 세포 내 ROS 생성량의 변화를 관찰하였다. 3T3-L1 세포주는 ATCC로부터 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포는 24-well plate에 각각 1×10^6 seeding 한 후 BS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 고농도 포도당 DMEM(89%)에서 100% confluence 될 때까지 CO₂ incubator에서 배양하였다. 2일 후 지방세포 분화유도 물질(10 $\mu\text{g/mL}$ insulin, 1 μM DEX, 0.5 mM IBMX)과 FBS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다. 지방세포 분화(day 0) 시 DMEM에 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물을 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였고, 이때 유근피 추출물의 효과를 비교하기 위하여 음성대조군에는 아무것도 처리하지 않았으며, 양성대조군에는 항산화제인 NAC(5 mM)를 처리하여 비교하였다. 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후 2일마다 지속적으로 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지에 각각의 시료를 처리한 다음, 8일 동안 분화시키며 지방축적량 및 ROS의 생성량을 관찰하였다.

XTT assay를 이용한 세포 독성평가

피부 섬유아세포와 3T3-L1 전지방세포에 대한 유근피 추출물의 세포 독성평가는 XTT[2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt] assay kit을 이용하여 측정하였다. 세포는 실험 전날 1×10^6 cells 농도로 96-well plate에 seeding 하고 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. XTT reagent 1 mL와 PMS reagent 20 μL 를 혼합하여 working solution을 조제하고, CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양한 후 microplate reader를 이용하여 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포 독성을 계산하였다(20,21).

산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호 효과 측정

산화적 스트레스 요인에 의한 세포 손상 보호 효과는 XTT assay를 변형하여 측정하였다. 먼저 피부 섬유아세포를 96-well plate에 seeding 하고 유근피 80% 에탄올 3시

간 추출물을 100, 200 µg/mL 농도로 처리하고 24시간 동안 배양 후, 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 1 mM hydrogen peroxide를 3시간 동안 세포에 처리하였다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 각 well에 XTT working solution이 20% 포함된 배지를 200 µL씩 첨가하였다. XTT가 첨가된 96-well plate는 CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응한 후, microplate reader를 이용하여 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포 손상 보호 효과를 계산하였다.

NBT assay를 이용한 ROS 함량 측정

분화과정에 따른 지방세포의 ROS 생성량을 측정하기 위하여 먼저 24-well plate에 배양 및 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후 멸균된 PBS(pH 7.4)를 이용하여 2회 세척하고, 0.2% NBT reagent 0.2 mL를 첨가하여 CO₂ incubator 안에서 90분간 반응시킨 뒤 100% acetic acid를 이용하여 dark blue formazan을 모두 용출시켰다. 그 후 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

모든 실험은 3반복으로 측정한 값을 평균±표준편차로 나타내었다. 실험 결과의 통계적 유의성은 one-way ANOVA 분석을 하였으며, 최소 유의차 검정(LSD)에 의해 평균 간의 유의차를 $P < 0.05$ 유의 수준에서 Tukey's test로 유의성을 검정하였다. 실험의 통계분석은 SAS 9.3(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

유근피의 일반성분 분석

유근피의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 유근피 100 g(dry weight basis) 중에는 수분 12.7%, 조회분 9.0%, 조단백질 5.2%, 조지방 0.6%, 탄수화물 72.5%가 함유되어 있었다. 이러한 결과는 평창지역 유근피의 일반성분(수분 5.7%, 조회분 15.7%, 조단백질 5.7%, 조지방

Table 1. Proximate composition of *U. pumila* L. (%)

Proximate composition	<i>Ulmus pumila</i> L.
Moisture	12.7±0.1 ²⁾
Ash	9.0±0.8
Protein	5.2±0.0
Lipid	0.6±0.1
Carbohydrate ¹⁾	72.5

¹⁾100-sum of moisture, crude ash, crude protein, and crude fat contents.

²⁾All values are mean±SD of triple determinations.

0.5%, 탄수화물 72.4%) 및 홍천지역 유근피의 일반성분(수분 6.2%, 조회분 10.9%, 조단백질 6.7%, 조지방 0.7%, 탄수화물 75.5%)(22) 함량과 비교하였을 때 수분 및 조회분의 함량은 약간 차이를 보였으나 조단백질, 조지방, 탄수화물의 함량은 유사하였다. 이와 같은 결과는 유근피의 일반성분들은 느릅나무의 자생환경(토양환경, 기후조건, 채취시기 등)에 따라 다르게 함유되어 있는 것으로 보인다.

유근피의 추출조건에 따른 추출수율, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

유근피를 다양한 용매조건과 시간으로 추출하여 획득된 수율은 Table 2에 나타내었다. 유근피의 수율은 전체적으로 19.4~27.3%로 나타났으며, 80% 에탄올로 1시간 추출하였을 때 19.4%로 가장 낮았고, 0% 에탄올 3시간 추출에서 27.3%로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 100% 메탄올로 상온에서 추출한 유근피의 추출물(15.2%)(9), 70% 에탄올 60°C에서 3시간 추출한 추출물(12.0%) 및 0% 에탄올 80°C에서 3시간 추출한 유근피 추출물(12.7%) 수율보다 높게 나타났다(23). 이상의 결과에서 보듯이 유근피 추출물의 수율은 추출용매, 추출온도 및 추출시간에 따라 다르게 나타나는 것을 알 수 있다.

유근피 추출물의 총 폴리페놀 함량은 215.7~363.5 mg/g sample로 나타났으며, 0% 에탄올 추출물에서 가장 낮은 총 폴리페놀 함량(215.7~218.4 mg/g sample)을 보였고, 80% 에탄올 추출물에서 가장 높은 총 폴리페놀 함량(312.3~363.5 mg/g sample)을 보였다(Table 2). 이러한 결과는 Kim 등

Table 2. Extraction yield, total phenolic, and flavonoid contents of *U. pumila* L. extracts

EtOH Con. (%)	Time (h)	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoids content (mg CE ²⁾ /g)
0	1	26.3	218.4±11.1 ^{4b)}	174.3±13.8 ^d
	2	25.6	215.7±9.1 ^d	179.0±5.0 ^d
	3	27.3	217.6±18.8 ^d	184.3±12.6 ^d
40	1	24.3	259.5±5.9 ^c	254.0±8.4 ^c
	2	23.4	272.6±19.1 ^c	265.8±7.2 ^c
	3	27.2	270.4±17.7 ^c	268.8±5.1 ^c
80	1	19.4	312.3±10.6 ^b	306.6±6.3 ^b
	2	20.2	326.7±6.2 ^b	318.4±12.1 ^b
	3	20.1	363.5±6.9 ^a	363.3±27.6 ^a

¹⁾GAE: gallic acid equivalent. ²⁾CE: catechin equivalent. ³⁾Value are mean±SD (n=3). ^{a-d)}Significant differences among various samples.

(24)이 보고한 농도별 에탄올 추출물 중 70% 에탄올 추출물에서 최대의 총 폴리페놀 함량을 나타낸 것과 유사하였다. 그러나 Jeong과 Kim(23) 및 Kim 등(7)이 보고한 유근피 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량(각각 17.9, 7.1 mg/g sample)보다 높게 나타났다. 다른 식물과 비교를 하면 유근피 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Seo 등(24)이 보고한 더위지기의 총 폴리페놀 함량(548.0 mg/g sample)보다는 낮은 값을 보였다. 한편 유근피 추출물의 총 플라보노이드 함량은 174.3~363.3 mg/g sample로 나타났으며, 0% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량보다 낮은 174.3~184.3 mg/g sample을 보였다. 그러나 40%, 80% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량(각각 254.0~268.8, 306.6~363.3 mg/g sample)은 총 폴리페놀 함량과 유사하게 나타났다. 유근피 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Kim 등(25)이 보고한 오가피, 칩, 인삼의 총 플라보노이드 함량(44.0, 15.2, 5.9 mg/g sample)보다 높게 나타났다. 따라서 본 연구 결과 유근피 추출물에 함유되어 있는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 유근피의 추출방법 및 느릅나무의 자생환경(일조량, 강수량, 토양 영양분 등)에 큰 영향을 받는 것으로 예상되며, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 직접적인 연관성을 갖는 항산화 활성에 관하여 연구하였다.

유근피 추출물의 항산화 활성

유근피 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능,

ABTS 라디칼 소거능, 환원력, ORAC assay를 수행하였다. Fig. 1에서 보듯이 유근피 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 0% 에탄올 추출물이 34.7%로 가장 낮게 나타났으며, 80% 에탄올 추출물이 55.7%로 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 하지만 각 농도의 에탄올 추출물을 1, 2, 3시간 비교하였을 때 DPPH 라디칼 소거능은 큰 차이를 보이지 않았다. 다른 연구에 의하면 Kim 등(26)은 감초를 이용하여 용매 추출조건과 추출시간에 따른 항산화 활성을 연구하였는데, 본 연구 결과와 유사하게 에탄올 농도가 증가함에 따라 항산화 활성이 증가하였고 추출시간은 항산화 활성에 크게 영향을 미치지 않았다. 한편 유근피 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 0% 에탄올 추출물에서 27.8%의 낮은 라디칼 소거능을 보였으나 80% 에탄올 추출물에서는 76.3%의 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. 또한 ABTS 라디칼 소거능 역시 DPPH 라디칼 소거능과 유사하게 추출시간에 따른 라디칼 소거능의 변화는 보이지 않았다. 추출조건에 따른 유근피 추출물의 환원력은 0% 에탄올 추출물에서 가장 낮은 환원력(흡광도 0.49)을 보였으며, 80% 에탄올 추출물에서 가장 높은 환원력(흡광도 0.71)을 보였다. 또한 추출시간에 따른 항산화 활성의 차이는 크게 나타나지 않았다. 이러한 항산화 활성은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 비슷한 양상을 보였다. 유근피 추출물의 ORAC는 0% 에탄올 1시간 추출물에서 1,331 $\mu\text{M TE/mg}$ 을 보이다가 0% 에탄올 3시간 추출물에서는 2,557 $\mu\text{M TE/mg}$ 으로 증가하였다. 또한 80% 에탄올 1시간 추출물은 0% 에탄올 3시간 추출물 및 40%

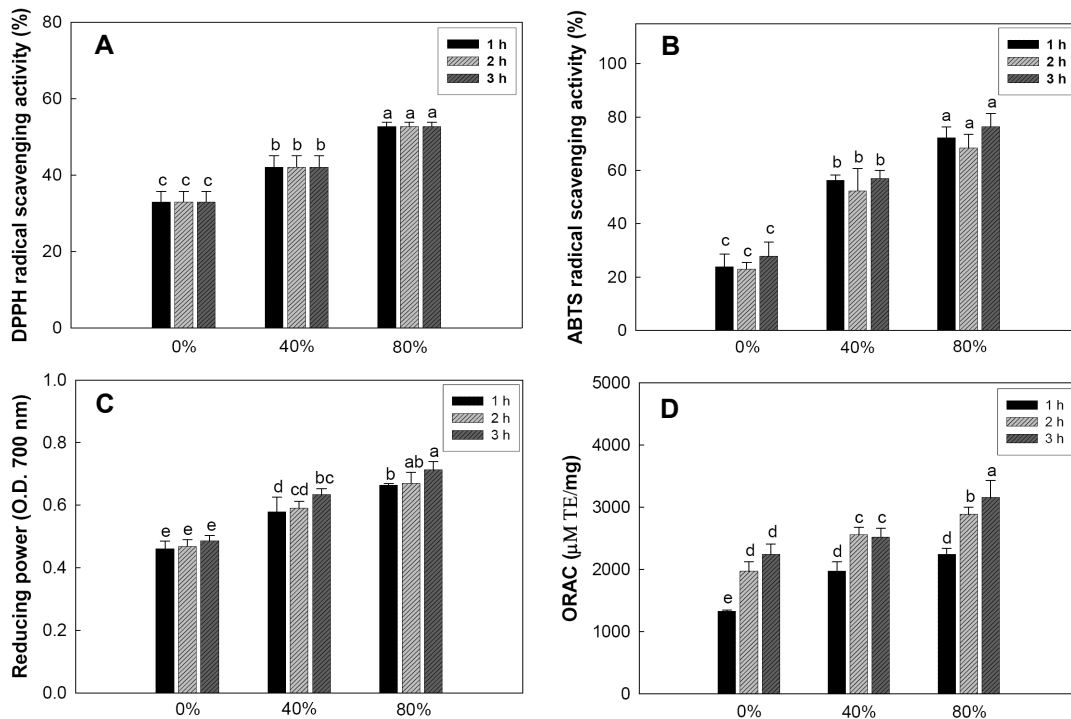


Fig. 1. Antioxidant activities of various extracts from *U. pumila* L. DPPH radical scavenging activity (A), ABTS radical scavenging activity (B), reducing power (C), and oxygen radical absorbing capacity (ORAC) (D). Each samples used at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. ^{a-c}Significant differences among different EtOH concentration and extraction times.

에탄올 1시간 추출물과 유사한 2,242 $\mu\text{M TE/mg}$ 의 ORAC를 보였으며, 80% 에탄올 3시간 추출물은 3,158 $\mu\text{M TE/mg}$ 으로 ORAC가 증가하였다. 본 연구에서 수행된 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물의 ORAC는 Feeney(27)의 논문에서 보고된 성인 하루 ORAC 권장량인 3,000~5,000 ORAC를 충족하였다. 따라서 이상의 결과는 유근피 추출물의 항산화 활성은 80% 에탄올로 추출하였을 때 가장 높은 DPPH, ABTS 라디칼 소거능과 환원력을 보였으며, 추출시간은 라디칼 소거능 및 환원력에 크게 영향을 미치지 않는 것을 보여준다. 그러나 ORAC assay에서는 유근피를 80%로 3시간 추출하였을 때 가장 높은 활성을 보였다. Jung 등(9)은 유근피를 70% 메탄올로 추출하였을 때 flavonoid 성분인 (-)-catechin과 (-)-catechin-7-O- β -D-apiofuranoside가 높은 DPPH 및 OH 라디칼 소거능을 보인다고 보고하였으며, Bong과 Park(28)은 유근피에서 추출한 phenolic 성분인 hederagenin 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside(HDL)가 ROS 생성과 관련된 산화 효소 및 항산화 효소에 대한 저해 효과를 보인다고 보고하였다. 따라서 유근피의 주요 항산화 활성은 flavonoid 및 phenolic 성분 때문인 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 항산화 활성의 주요 성분인 flavonoid 및 phenolic의 함량과 항산화 활성과의 연관성을 분석하였다.

상관관계 분석

유근피 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, 환원력 및 ORAC와의 연관성 분석은 Table 3에 나타내었다. 유근피 추출물의 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성과의 연관성은 전체적으로 $R^2=0.813\sim0.976$ 으로 높은 상관관계를 보였다. 특히 유근피 추출물의 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능과의 연관성은 $R^2=0.976$ 을 보이면서 가장 높은 연관성을 보였다. 그러나 ORAC는 총 폴리페놀 함량과의 연관성이 $R^2=0.813$ 으로 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 환원력

Table 3. Correlation analysis (R^2) between the content of antioxidant compounds and antioxidant activities (DPPH, ABTS, FRAP, reducing power, and ORAC) of *U. pumila* L.

Antioxidant compounds ¹⁾	DPPH	ABTS	Reducing power	ORAC
TP	0.976 ^{**2)}	0.946 ^{**}	0.961 ^{**}	0.813 ^{**}
TF	0.967 ^{**}	0.978 ^{**}	0.988 ^{**}	0.826 ^{**}

¹⁾TP, total phenol content; TF, total flavonoid content.

²⁾Significantly different at ^{**} $P < 0.01$.

에 비해서는 약간 낮은 연관성을 보였다. 한편 유근피 추출물의 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성과의 연관성 분석은 총 폴리페놀 함량과 유사하게 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능, 환원력에서 높은 연관성을 보였으며($R^2=0.967\sim0.988$), ORAC에서 조금 낮은 연관성($R^2=0.826$)을 보였다. ORAC가 다른 항산화 활성에 비해 약간 낮은 연관성을 보이는 이유는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 환원력은 phenolic 화합물에 특이적으로 반응하는데 반해, ORAC 분석법은 phenolic 화합물뿐만 아니라 non-phenolic 화합물에도 반응하기 때문인 것으로 예상된다(29,30).

산화적 스트레스에 의한 HDF 세포에 대한 세포 보호 효과

유근피 추출물이 피부 섬유아세포와 3T3-L1 전지방세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물을 농도별로 처리하고 XTT assay 방법으로 세포의 생존율을 측정한 결과(Fig. 2), 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서는 유근피 추출물의 피부 섬유아세포에 대한 세포 보호 효과 및 항산화 활성을 측정하기 위하여 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 이용하여 실험을 진행하였다.

유근피 추출물이 hydrogen peroxide로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 피부 섬유아세포의 생존율에 미치는 영향을 XTT assay로 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 피부 섬유아세포는 1 mM hydrogen peroxide를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 40% 정도로 생존율이 감소한

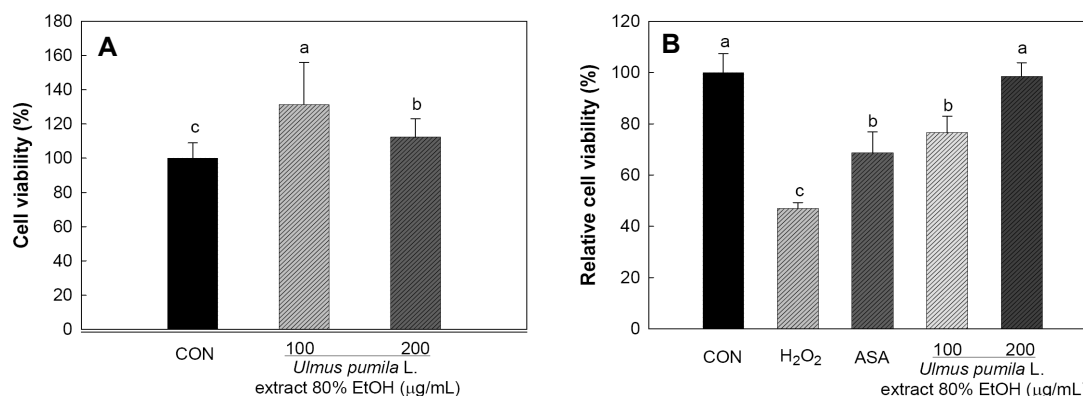


Fig. 2. Effect of *U. pumila* L. extracts on cell viability (A) and protective effects against oxidative stress-induced damage on human dermal fibroblast (B). ^{a-c}Significant differences among different concentration of 80% EtOH extracts.

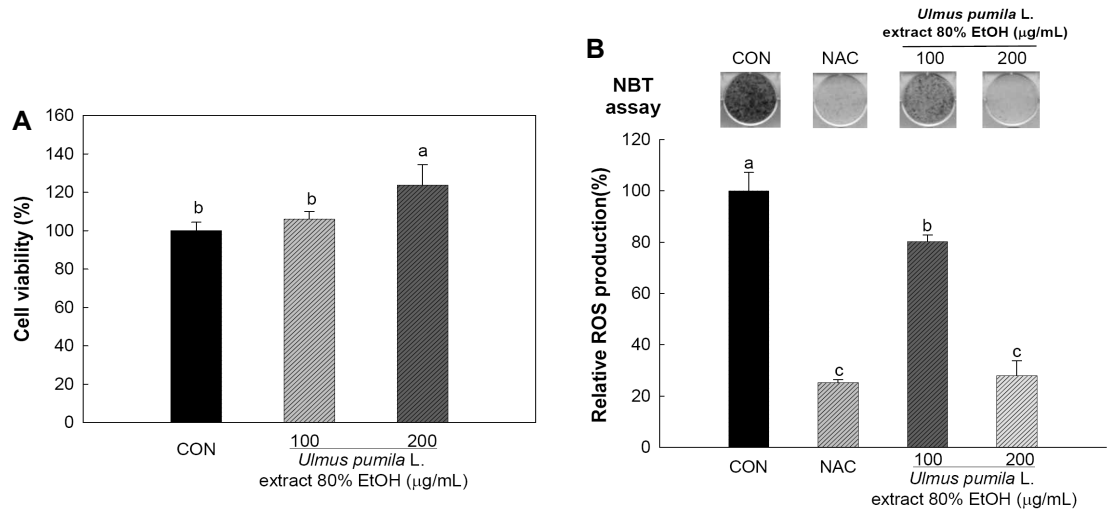


Fig. 3. Effect of *U. pumila* L. extracts on cell viability (A) and relative reactive oxygen species (ROS) production (B) in 3T3-L1 cells. ^{a-c}Significant differences among different concentration of 80% EtOH extracts.

반면, 유근피 추출물 전처리군에서는 산화적 스트레스 영향에 반하여 세포 생존율이 다시 증가함을 확인하였다.

NBT assay를 이용한 ROS 함량

NBT assay는 NBT 용액이 지방세포 내에 축적된 ROS와 반응하여 dark blue formazan을 생성하게 되며, 이를 용출하여 세포 내 ROS의 생성량을 알 수 있다. 이러한 산화적 스트레스는 지방세포의 분화 및 지방의 축적과 밀접한 관계를 갖는 것으로 알려져 있다(20,31). 3T3-L1 전지방세포에 분화 유도 물질을 처리하여 지방세포로 분화시킨 뒤 생성된 ROS 생성량을 측정하기 위하여 NBT assay를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 시료를 처리하지 않은 대조군과 유근피 추출물의 흡광도를 비교한 결과 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물을 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 ROS 생성량은 약 80%였으나 200 µg/mL 처리군에서는 27%로 양성대조군인 NAC와 유사한 수치를 나타냈다. 따라서 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물은 지방세포에서 분비되는 ROS를 효과적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

요 약

본 연구는 유근피를 항산화 소재로 사용하기 위한 기초 자료를 제공하고자 에탄올의 농도(0, 40, 80% 에탄올) 및 추출 시간(1, 2, 3시간)이 다른 조건에서 추출하였으며, 이들 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 또한 다양한 추출물의 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, 환원력, ORAC value 등의 항산화 활성을 측정하였으며, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성과의 연관성을 분석하였다. 그 결과 유근피 추출물은 80% 에탄올로 3시간 추출하였을 때 가장 높은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 항산화 활성을 보였다. 또한 DPPH 및 ABTS

라디칼 소거능, 환원력은 에탄올 함량에 따른 활성 차이는 보였으나 추출시간에 따른 항산화 활성 차이는 보이지 않았다. 하지만 ORAC는 유근피 추출물의 추출시간이 증가함에 따라 함께 증가하였다. 이상의 결과로 볼 때 유근피 추출물은 80% 에탄올을 이용하여 70°C에서 3시간 추출을 할 때 항산화 활성을 갖는 phenolic 및 flavonoid 계열의 유효성분이 가장 많이 추출되었다. 또한 유근피 80% 에탄올 3시간 추출물은 피부 섬유아세포와 3T3-L1 지방세포에서 세포독성을 나타내지 않았고 피부 섬유아세포에서 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 가졌으며, 3T3-L1 지방세포에서 활성산소종 생성량을 감소하였다. 따라서 높은 항산화력을 가진 유근피 추출물은 천연 항산화제로 충분히 사용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 식품 기능성평가 지원사업 위탁 연구 개발과제(과제번호: C1012013-01-01)로 수행한 연구의 일부로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
2. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 275-295.
3. Gardner PR, Fridovich I. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem* 266: 19328-19333.
4. Cho ML, Lee DJ, Lee HS, Lee YJ, You SG. 2013. LPS-induced NO inhibition and antioxidant activities of ethanol extracts and their solvent partitioned fractions from four brown seaweeds. *Ocean Sci J* 48: 349-359.

5. Jo HJ, Kim JW, Yoon JA, Kim KI, Chung KH, Song BC, An JH. 2014. Antioxidant activities of amaranth (*Amaranthus* spp. L.) flower extracts. *Korean J Food & Nutr* 27: 175-182.
6. Park JC, Yee ST. 2000. Functional food and bioactive constituents from oriental medicine resources. *Food Industry and Nutrition* 5(3): 27-37.
7. Kim KB, Jo BS, Park HJ, Park KT, An BJ, Ahn DH, Kim MU, Chae JW, Cho YJ. 2012. Healthy functional food properties of phenolic compounds isolated from *Ulmus pumila*. *Korean J Food Preserv* 19: 909-918.
8. Lee EH, Park CW, Jung YJ. 2013. Anti-inflammatory and immune-modulating effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai extract on a macrophage cell line and immune cells in the mouse small intestine. *J Ethnopharmacol* 146: 608-613.
9. Jung MJ, Heo SI, Wang MH. 2008. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chem* 108: 482-487.
10. Lee MK, Kim YC. 2001. Five novel neuroprotective triterpene esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *J Nat Prod* 64: 328-331.
11. Yun JS, Pahk JW, Lee JS, Shin WC, Lee SY, Hong EK. 2011. *Inonotus obliquus* protects against oxidative stress-induced apoptosis and premature senescence. *Mol Cells* 31: 423-429.
12. AOAC. 1995. *Official methods of analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 32-1-13.
13. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem* 44: 37-41.
14. 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.
15. Stagos D, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, Panagoulis C, Reri E, Skaltsounis L, Tsatsakis AM, Kouretas D. 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species. *Food Chem Toxicol* 50: 4115-4124.
16. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
17. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
18. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50: 4437-4444.
19. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
20. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
21. Blumberg JM, Tzamelis I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. 2006. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 28: 11205-11213.
22. Sa JH, Kim NS, Bae CM, Kim NY, Shim HY, Chun JM, Ko SH, Lee HH, Shin IC, Jeong KJ, Han KS. 2011. Survey for approximate composition and mineral content of medicinal plants marketed in Gangwon province. *Rep Inst Health & Environ* 22: 42-51.
23. Jeong KY, Kim ML. 2012. Physiological activities of *Ulmus pumila* L. extracts. *Korean J Food Preserv* 19: 104-109.
24. Seo EJ, Hong ES, Choi MH, Kim KS, Lee SJ. 2012. The antioxidant and skin whitening effect of *Artemisia iwayomogi* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 44: 89-93.
25. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
26. Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. 2006. Investigation of antioxidant activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J Food Sci Technol* 38: 584-588.
27. Feeney MJ. 2004. Fruits and the prevention of lifestyle-related diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31: S11-S13.
28. Bong JG, Park Y. 2010. Antioxidant effect of hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabino pyranoside (HDL) isolated from root bark of *Ulmus davidiana*. *J Life Sci* 20: 281-291.
29. Speisky H, López-Alarcón C, Gómez M, Fuentes J, Sandoval-Acuña C. 2012. First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south Andes region of South America. *J Agric Food Chem* 60: 8851-8859.
30. Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
31. Lee OH, Kwon YI, Hong HD, Park CS, Lee BY, Kim YC. 2009. Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52: 70-75.