

느릅나무 초임계 추출박 60% 주정추출물의 생리활성

문명재^{1,2}, 박광현³, 최선은^{4*}

¹(제)전남생물산업진흥원 나노바이오연구센터 책임연구원, ²조선대학교 생명화학고분자공학과 대학원생(박사수료),
³남부대학교 한방제약개발학과 교수, ⁴남부대학교 향장미용학과 교수

Biological activity of supercritical extraction residue 60% ethanolic extracts from *Ulmus davidiana*

Myung-Jae Mun^{1,2}, Kwang-Hyun Park³, Sun Eun Choi^{4*}

¹Principal Researcher, Nano Bio Research Center JBF,

²Doctor course completion, Department of Biochemical & Polymer Engineering, Chosun University,

³Professor, Department of Oriental Pharmaceutical Development Nambu University,

⁴Professor, Department of Cosmetology Science Nambu University

요 약 초임계 추출 기술을 활용하여 느릅나무 가지 추출물을 연구하는 과정에서 발생하는 초임계 추출박의 자원 재활용에 대한 검증을 하기 위해서 초임계 추출박의 주정추출물(USCFR)과 에틸아세테이트 용매분획물(USCFREA)의 항산화, 항알러지, 총 페놀 정량 실험을 각각 수행 하였다. 항산화 활성은 양성대조군인 비타민C와 비교한 결과 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS라디칼 소거능의 IC₅₀값(ppm)이 비타민C는 7.42±0.09, 7.50±0.05, USCFR은 22.94±0.09, 6.43±0.10, USCFREA은 17.80±0.14, 5.34±0.06 으로 각각 확인되어 양성 대조군과 비교하였을 때 매우 우수한 항산화 활성이 확인 되었다. 그리고 항알러지 활성 연구에서는 USCFR과 USCFREA 모두 농도 의존적으로 항알러지 활성이 확인이 되었고, 특히, USCFREA은 매우 적은 농도에서도 강력한 항알러지 활성이 확인 되었다. 끝으로, 총 페놀 함량(ugEG, ugGA;ppm)에서 USCFR은 134.17±0.13, 132.02±0.24, USCFREA은 154.77±1.05, 153.18±1.10으로 각각 확인이 되어 기존의 초임계 추출물과 비교하면 매우 높은 총 페놀 함량을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 USCFR과 USCFREA은 강력한 항산화 활성을 기반으로 한 만성 염증성 피부면역 질환 개선 및 치료 보조제 관련 의약품 또는 기능성 화장품 개발을 위한 기초 연구 자료가 될 것으로 기대된다.

주제어 : 느릅나무, 초임계 추출박, 항산화, 항알러지, 폴리페놀

Abstract *Ulmus davidiana* supercritical fluid residue EtOH extracts(USCFR) and ethyl acetate solvent fraction (USCFREA) of supercritical extraction foil were investigated in order to examine the recycling of supercritical extraction foil in the process of studying *Ulmus davidiana* branch supercritical extract. Experiments were performed for the determination of total phenol content. The IC₅₀ value(ppm) of DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scavenging activity was 7.42±0.09, 7.50±0.05, 22.94±0.09, 6.43±0.10, and USCFREA, respectively, as compared with the positive control (vitamin C) with values 17.80±0.14 and 5.34±0.06, respectively. The antioxidative activities of USCFR and USCFREA were confirmed to be superior to the positive control group. In anti-allergic activity studies, both USCFR and USCFREA showed concentration-dependent anti-allergic activity, and USCFREA showed strong anti-allergic activity even at very low concentrations. The total phenolic contents (ugEG, ugGA; ppm) of USCFR were 134.17 ± 0.13, 132.02±0.24 and USCFREA were 154.77±1.05 and 153.18±1.10, respectively. Based on the above results and strong antioxidant activity, USCFR and USCFREA hold the potential to be considered as basic research materials for the development of therapeutic supplements based medicines or functional cosmetics related to chronic inflammatory skin immunity diseases.

Key Words : *Ulmus davidiana*, supercritical extraction residue, anti-oxidative, anti-allergic, poly-phenol

*This study was carried out with the support of 'R&D Program for Forest Science Technology (Project No. "2017031B10-1819-BA01")' provided by Korea Forest Service(Korea Forestry Promotion Institute).

*Corresponding Author : Sun-Eun Choi (sechoi@nambu.ac.kr)

Received September 5, 2018

Revised September 18, 2018

Accepted October 20, 2018

Published October 31, 2018

1. 서론

인간의 생명유지를 위해서 산소가 반드시 필요하지만 에너지 생산 과정에서 활성산소종과 자유라디칼이 생성되어 산화적 스트레스를 주어 노화를 비롯하여 면역질환, 성인병, 난치성피부면역질환, 심혈관질환, 암 등과 같은 여러 질환을 불러일으키는 것으로 알려져 있다[1,2]. 현대인의 건강하지 못한 불규칙한 생활 및 식습관을 포함하여 일상생활 및 직장생활의 스트레스 환경에서 활성 산소종의 위협에 노출이 많아짐에 따라서 현대인들은 산화적 스트레스를 줄일 수 있는 생리활성 소재 즉, 항산화제의 필요성에 대해서 긍정적으로 평가하는 전문가들의 의견이 많은 현실이다[3]. 이러한 이유로 항산화제 도입에 있어서 우선 고려했던 점은 우수한 항산화 활성과 경제성이라고 할 수 있다. 그에 따라서 인공합성항산화제가 많이 이용되었으나, 최근 들어서는 인체의 안전성과 가습기 살균제 합성 화합물의 인체 유해성 논란 등의 사회적 이슈로 인해서 국내는 물론이고 전 세계적으로 부작용이 없으면서 효능이 보장되는 즉, 천연물 유래 항산화제 개발 연구가 꾸준히 이뤄지고 있다[4,5].

또한, 산화적스트레스는 알러지 질환과도 연관성이 있는데, 알러지 관련 질환의 대표적인 질환들로는 알러지성 아토피피부염, 알러지성 결막염, 알러지성 비염 및 천식 등이 있는데 이들 알러지성 질환들과 체내 비만세포가 유발하는 것으로 잘 알려져 있다. 비만세포는 탈과립화를 통해서 히스타민, β -hexosaminidase, 대사산물, 염증성 사이토카인, immunoglobulin E (IgE) 등의 방출과 연관성이 매우 높다. 알러지성 치료는 원인제거는 현실적으로 어렵고, 증상을 완화하는 방향으로 연구가 진행되고 있고, 기존 약물들이 내성 및 부작용의 보고들로 인해서 수많은 연구자들은 천연물로부터 부작용 및 내성이 없는 항히스타민제 등의 알러지 및 피부면역질환 치료제 또는 개선제를 개발하고자 많은 연구자들이 노력하고 있다[6-10].

한편, 항산화 활성과 항알러지 효능이 우수한 천연소재를 활용할 때는 생물제조 최적의 공정에 대한 검토와 고민이 필요하다. 비용, 공간, 시설 및 인프라 등을 고려함과 동시에 동일한 양의 천연 원물에서 다량의 유효물질을 생산할 수 있도록 최적의 추출공정이 개발되어야 한다. 그에 따라서 천연물 유래 추출물을 생산할 때 학계, 산업계 등에서 가장 많이 활용되는 추출방법은 열수추출, 에탄올추출, 초음파추출, 가압추출, 초임계추출 등 여러

가지 방법들이 시도 되고 있다. 각 추출방법마다 장점과 단점이 분명히 존재하기에 이는 연구자들이 실험실 수준과 향후 상업화 수준에서 면밀하게 장점과 단점을 다방면으로 고려해야 할 것이다.

여러 가지 추출방법 중 특히 초임계추출 기술은 환경친화적인 측면과 유기용매의 인체 안전성, 환경오염 등의 문제를 해결하기 위한 방법으로 알려져 있다[11-14]. 그에 따라서 최근 본연구팀도 느릅나무를 초임계 추출 기술을 활용하여 느릅나무 초임계 추출물을 대상으로 다양한 생리활성 연구를 수행한 바 있다[15]. 이번 연구에서는 초임계 추출후에 남은 자원 즉, 초임계 추출박의 자원 재활용의 가치를 검증하기 위해서 느릅나무 초임계 추출박을 60%주정 추출하여 항산화, 항알러지 활성 연구를 수행하였다.

또한, 느릅나무 초임계 추출물의 부가 가치를 높이기 위해서 폴리페놀 증대 생산방법의 일환으로 에틸아세테이트 용매 분획을 추가로 실시하여 생리활성을 검증 및 비교 연구를 통해서 느릅나무 초임계 추출박 추출물의 천연물 유래 신소재로서의 가능성을 확인하기 위해 본 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료 및 추출방법

본 연구에서는 느릅나무 가지 추출은 초임계유체 추출 연구용 장비(ISA-SEFE-0500-0700-080, Ilsin Autoclave, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 사용한 느릅나무 가지를 서울약령시장에서 구입하여 이물질을 제거하고 세척한 후, 음건하여 실험재료로 사용하였다. 건조된 시료 96 kg을 200 mesh의 분쇄망을 통과하도록 분쇄하고, 분쇄된 느릅나무 가지를 추출조의 온도를 50°C 로 조절하여 온도를 유지시킨다. 온도가 안정화되면 느릅나무 가지 시료를 넣고 CO₂ 가스를 등압으로 유지시킨 후, 고압펌프를 이용하여 line을 통해 실험압력 조건인 400 bar에 도달할 때까지 Control valve를 조절하여 주입하였다. 설정 압력에 도달 후 추출조 하부로 에탄올 (HPLC grade)을 분당 3 mL씩 60분 동안 총 180 mL를 투입하여 추출을 진행하였으며, 시료에 남아있는 잔존 에탄올을 제거하기 위해 설정된 압력과 온도로 30min 동안 고압펌프를 이용하여 CO₂를 흘려보내며 추출을 완료 하였다.

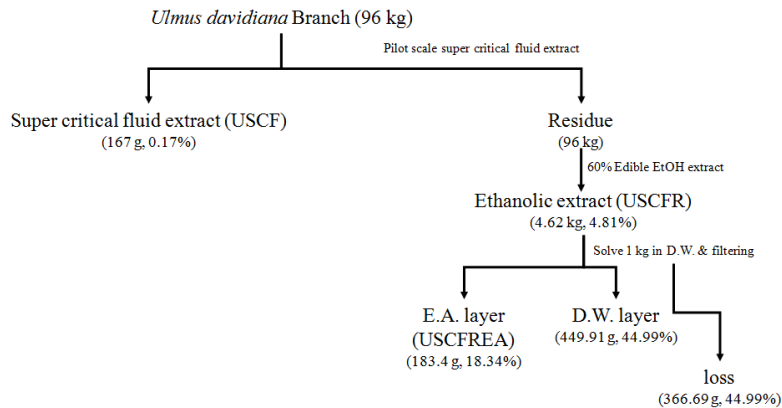


Fig. 1. Schematic diagram of the USCFR and USCFRE

이상과 같이 느릅나무 가지를 초임계 추출을 하고 난 후의 느릅나무 초임계 추출박 시료 96 kg을 음건하여 60% 주정으로 실온에서 1회 추출하여 여과하였다. 그 추출액을 감압농축 및 동결건조를 실시해 최종 4.62 kg을 Fig.1과 같이 확보한 후 실험에 사용 하였다.

확보된 느릅나무 초임계 추출박 60% 주정추출물을 1 kg 정량하여 분별깔때기를 이용하여 에틸아세테이트 용매분획을 실시하여 에틸아세테이트 용매 분획물 183.4 g을 Fig.1과 같이 확보하여 실험에 사용 하였다.

2.1 DPPH 라디칼 소거작용의 측정

Hatano 등[16]의 방법을 참조하여 DPPH 프리 라디칼 소거작용의 측정을 실시하였다.

2.2 ABTS 라디칼 소거작용의 측정

ABTS 라디칼 소거 활성은 Re 등[17]의 방법을 수정하여 측정하였다.

2.3 RBL-2H3세포 배양

RBL-2H3세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구매하였으며, 15% Fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)과 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin(Gibco, USA)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, USA)에 2 mM L-glutamine(Gibco,USA)를 첨가한 배지에서 배양하였다. 성장배지는 2-3일 마다 교환해 주었으며, 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다.

2.4 MTT assay

본 실험에서 RBL-2H3 cells에 대한 느릅나무 가지 초임계 추출박 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매분획층의 세포 독성 및 실험 시 처리 농도를 결정하기 위해 MTT assay를 실행하였다[18].

2.5 β-hexosaminidase assay

Cell seeding은 RBL-2H3 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 24 well plate에 2×10⁵ cells/mL의 세포수가 되도록 분주하였다. Cell sensitization은 세포 분주후 500ng/mL 농도의 anti-DNP(dinitrophenol) Ig E로 감작하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 배양하였다. Cell activation은 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH7.2)로 2번 세척한 다음 각 well당 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1 % BSA가 포함된 Siraganian buffer에 추출물을 농도별로 첨가한 후 30분 동안 37 °C, 5%, CO₂ incubator에서 배양하고, dinitrophenol-conjugated human serum albumin (DNP-HSA)-specific IgE의 농도가 100 ng/mL이 되도록 처리하여 10분 동안 반응시킨 후, ICE bath에 10분 동안 방치하여 반응을 종결시켰다. 얻어진 상등액은 3분간 3000rpm에서 원심분리 시킨 후, 상등액 30 μL를 96 well plate에 옮기고 동량의 substrate buffer (1 mM 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 0.1 M citrate buffer pH 4.5)를 넣어 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨 0.1M carbonate buffer 200 μL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader(TECAN, Salzburg, Austria)를 사용하

여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[19].

2.6 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 표준물질로 gallic acid와 ethyl gallate를 사용하여 Folin-Denis법[20]에 따라서 수행하여 총 페놀 함량을 산출하였다.

2.7 통계 처리

본 연구의 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균값±표준편차로 나타내었으며, 각 실험 농도 별 표준차이를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며, 유의성이 발견된 경우 Tukey's HSD test[21]에 의해 농도 간의 유의성을 분석하였다. 모든 자료의 통계처리는 SPSS(Statistical Package for Science, version 24.0 SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였고, 유의수준 α=0.05로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 DPPH 라디칼 소거능 활성

느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 양성대조군인 비타민 C와 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물 2.5-100 ppm 까지 측정된 결과 모든 실험 농도에서 농도 의존적으로 통계적으로 유의적인 DPPH 라디칼 소거능이 관찰 되었다. IC₅₀ 값을 비교해 보면 양성대조군인 비타민 C는 7.42±0.09 ppm, 느릅나무

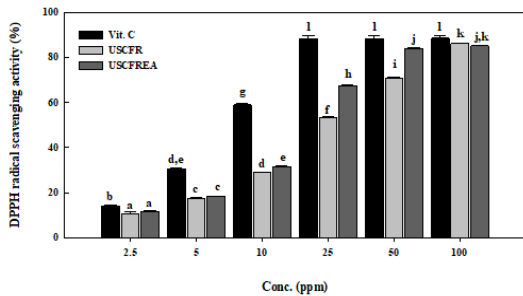


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of USCFR and USCFREA

Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences (p<0.05).

초임계 추출박 60% 주정 추출물은 22.94±0.19 ppm, 느릅나무 초임계 추출박 60% 주정 추출물의 에틸아세테이트 용매 분획물은 17.80±0.14 ppm으로 확인이 되었다. 이는 기존 천연물 유래 초임계 추출물에서는 확인되기 어려운 강력한 항산화 활성으로 확인이 되었다. 그에 따라서 비타민 C를 대체 또는 병용할 수 있는 강력한 천연 항산화제로서의 자원적 가치가 충분히 있음을 알 수 있었다.

3.2 ABTS 라디칼 소거능 활성

느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물의 ABTS radical 소거능을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물을 각각 2.5-100 ppm 까지 측정된 결과 모든 실험 농도에서 농도 의존적으로 유의적인 ABTS 라디칼 소거능이 관찰 되었다. 특히, 실험 최고 농도인 100 ppm 에서는 양성 대조군인 비타민 C 항산화 활성과 동등한 것으로 확인되었다. 또한 IC₅₀ 값을 비교해 보면 양성대조군인 비타민 C는 7.50±0.05 ppm, 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물은 6.43±0.10 ppm, 느릅나무 초임계 추출박 60% 주정 추출물의 에틸아세테이트 용매 분획물은 5.34±0.06 ppm으로 확인이 되어 양성대조군인 비타민 C에 비해서 매우 강력한 항산화 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로서 느릅나무 가지 초임계 추출박 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매분획물이 산화적 스트레스로 인해 유발하는 면역질환, 노화질환, 만성 염증성 알러지성 질환군을 포함한 난치성 피부면역질환을 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있는 신규 천연항산화제로 개발이 가능할 것으로 판단된다.

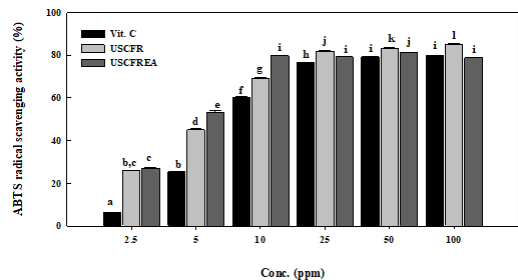


Fig. 3. ABTS radical scavenging activities of USCFR and USCFREA

Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences (p<0.05).

3.3 MTT assay 세포독성 평가

느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물의 항알리지 효능 검정을 위해서 RBL-2H3 세포를 대상으로 최소농도 50 ug/mL부터 최고농도 500 ug/mL까지 세포독성을 MTT assay를 통하여 검정한 결과는 Fig. 4,5와 같이 확인이 되었다. 그에 따라서 β -hexosaminidase assay를 수행한 각각의 실험 농도에서는 RBL-2H3 세포에 어떠한 독성도 없었음을 확인할 수 있었다.

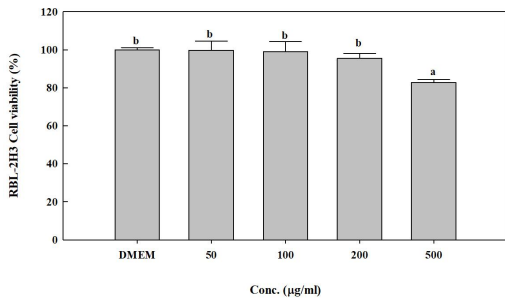


Fig. 4. Effects of supercritical extraction of USCFR on the viability of mouse RBL-2H3 cells. The cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance. Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

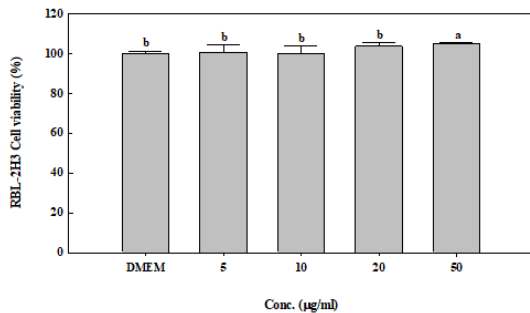


Fig. 5. Effects of supercritical extraction of USCFA on the viability of mouse RBL-2H3 cells. The cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance. Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.4 β -hexosaminidase 탈과립 억제에 의한 항알리지 효능 평가

느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에

틸아세테이트 용매 분획물의 항알리지 효능을 평가하기 위해서 RBL-2H3 세포로부터 β -hexosaminidase assay를 수행한 결과는 Fig. 6과 같이 확인이 되었다. 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물은 세포 독성이 없는 농도 250, 500 ug/mL 두 농도에서 normal control군과 negative control군 두 개 군과 비교 하였을 때, 통계적으로 유의성 있게 β -hexosaminidase 분비를 억제하는 것이 확인이 되었다. 특히, 실험최고 농도인 500 ug/mL에서는 normal control군과 동등한 β -hexosaminidase 분비능이 확인이 되어 강력한 β -hexosaminidase 분비 억제가 되었음을 알 수 있었다.

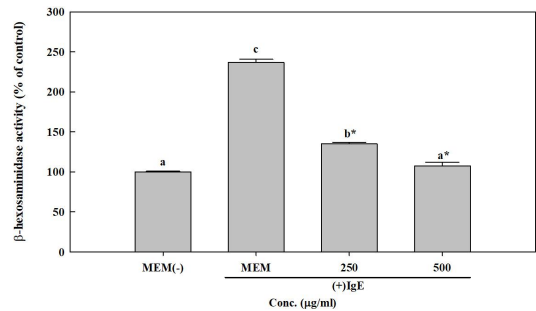


Fig. 6. Effects of USCFA extracts on β -hexosaminidase release. Values are means±SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

또한, 느릅나무 초임계 추출박 60% 주정 추출물의 에틸아세테이트 용매 분획물의 실험 결과를 살펴보면, 세포 독성이 없는 농도 10, 20 ug/mL 두 농도에서 normal control군과 negative control군 두 개 군과 비교 하였을 때, 통계적으로 유의성 있게 β -hexosaminidase 분비를 억제하는 것이 확인이 되었다. 실험최고 농도인 20 ug/mL에서는 normal control군과 동등한 β -hexosaminidase 분비능이 확인이 되어 강력한 β -hexosaminidase 분비 억제가 되었음을 알 수 있었다. 에틸아세테이트 용매분획물의 실험결과에서 더욱 의미 있다고 할 수 있는 부분은 초임계 추출박 주정 추출물에 비해서 훨씬 적은 농도인 25배 이상의 적은 농도에서도 통계적으로 유의성 있는 β -hexosaminidase 분비 억제능이 Fig.7과 같이 확인이 되었다는 점이다.

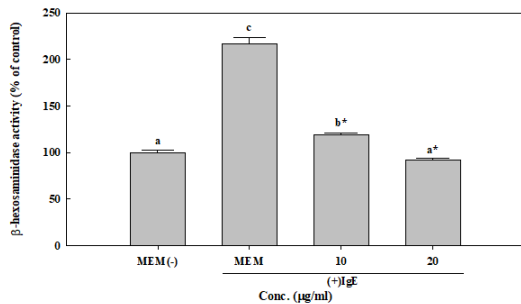


Fig. 7. Effects of USCFREA extracts on β -hexosaminidase release.

Values are means \pm SD of triplicate determinations. Different superscripts within a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

이상의 결과를 보아 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물은 강력한 β -hexosaminidase 분비 억제능이 확인이 되어 향후 알러지성 면역질환과 관련된 천연물 유래 신기능성 소재로 개발 가능성 소재로 유망하다는 것을 알 수 있다.

3.6 총 페놀 함량

천연물 유래 다양한 기능성 소재 발굴에 있어서 중요한 역할을 하는 것은 poly-phenol 화합물로부터 기인하는 것으로 잘 알려져 있다. 그에 따라서 많은 연구자들이 천연물 유래 신소재 발굴에 있어서 다양한 생리활성과 더불어서 추가로 검정하는 실험이 바로 총 페놀 함량 분석이다. 총 페놀 함량을 분석함으로써 신규 천연 소재가 향후 기능성 소재로 활용될 가치에 대해서 평가 및 판단하는 중요한 요소로 받아들여 지고 있다. 이는 poly-phenol 화합물이 프리라디칼 소거능을 기반으로 한 항산화 활성을 기본으로 한 항염증, 항균, 면역치료 등 다양한 생리활성을 나타내기 때문이라고 사료된다. 이번 연구에 있어서는 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물의 총 페놀 함량을 측정하기 위해서 페놀 화합물의 표준물질로 가장 보편적으로 잘 활용되고 있는 gallic acid와 ethyl gallate를 각각 사용하여 Folin-Denis법[20]에 의해 구해진 검량선 으로부터 총 페놀 함량을 Table 1.과 같이 확인이 되었다. 이 결과에서 특히 주목할 점은 기존 연구에서 확인된 느릅나무 가지 초임계 추출물의 총 페놀 함량과 비교하였을 때 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물은 ethyl gallate 기준 총 페놀 함량은 262.36 % 가 더 높았고, gallic acid 기준 총 페놀 함량은 282.76 % 더 높은 함량을

확인 할 수 있었다. 그리고 느릅나무 가지 초임계 추출박 60% 주정 추출물의 에틸아세테이트 용매 분획물은 ethyl gallate 기준 총 페놀 함량은 302.64 % 가 더 높았고, gallic acid 기준 총 페놀 함량은 328.08 % 더 높은 함량을 각각 확인 할 수 있었다.

Table 1. Total phenolic contents of USCFR and USCFREA. (mg/g)

Groups ¹⁾	USCFR	USCFREA
TPCEG	134.17 \pm 0.13 ²⁾	154.77 \pm 1.05
TPCGA	132.02 \pm 0.24 ²⁾	153.18 \pm 1.10

1)TPCEG, Total Polyphenol Contents Ethyl Gallate; TPCGA, Total Polyphenol Contents Gallic acid.

2)All values in Table are mean \pm SD.

이와 같은 결과로서 이번 실험에서 수행한 강력한 항산화 활성과 항알러지 효능의 근거는 높은 페놀 화합물 함량으로부터 기인한 것으로 추정 할 수 있다. 향후 지속적인 성분 분석 연구를 통하여 느릅나무 가지 초임계 추출박 주정물과 에틸아세테이트 용매분획물의 강력한 생리활성을 나타낸 단일 화합물을 밝혀나가야 할 것으로 사료된다. 또한, 높은 함량의 페놀함량과 강력한 생리활성 등을 고려하였을 때 느릅나무 초임계 추출박 주정추출물과 에틸아세테이트 용매분획물은 우수한 기능성 소재로서의 가능성이 높을 것으로 생각된다.

4. 결론

친환경적인 추출방법으로 대두되고 있는 초임계 추출 공법으로부터 발생하는 추출박의 자원 활용의 가치성과 유용성을 검증하기 위해서 느릅나무 초임계 추출박을 60% 주정 추출을 실시하였고, 주정 추출물을 대상으로 에틸아세테이트 용매 분획을 실시하여 천연물 유래 신기능성 소재로서의 가능성을 항산화 활성, 항알러지 활성, 총 페놀 함량 분석을 각각 실시하였다.

DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능 실험으로서 확인한 항산화 활성 검증에서는 기존에 연구 보고 했던 느릅나무 초임계 추출물과 양성대조군인 비타민 C 와 비교하였을 때 매우 강력한 항산화 활성을 각각 나타났음을 확인할 수 있었다.

또한, RBL-2H3 세포를 대상으로 β -hexosaminidase 분비 억제능으로서 항알러지 효능을 실험한 결과 실험에

사용한 모든 시료는 매우 강력한 항알러지 효능이 기대 되었으며, 특히 에틸아세테이트 용매분획물은 적은 농도에서도 강력하고 유의성 있는 항알러지 효능이 확인 되었다.

끝으로, 총 페놀 함량을 분석한 결과 기존 초임계 추출물과 비교하였을 때 약 3배가량 높은 폴리페놀 함량이 확인이 되어 이번 생리활성에서 검증한 항산화 활성과 항알러지 활성이 매우 강력하고 우수한 근거가 확인이 되었다.

이상의 실험 결과를 종합하여 보면 느릅나무 가지 초임계 추출 후에 발생하는 추출막의 주정추출물과 에틸아세테이트 용매 분획물은 강력한 항산화 활성과 항알러지 효능을 기반으로 하여 산화적 스트레스 관련 질환과 알러지성 질환 중 특히 난치성 피부면역 질환에 적용이 가능한 천연물 유래 신소재로서 적용이 충분히 가능한 소재로 기대된다.

REFERENCES

[1] J. Zhao, M. Lahiri-Chatterjee, Y. Sharma, & R. Agarwal. (2000). Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis*, 21, 811-816.

[2] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, & J. Telser. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.

[3] M. J. Kim, W. M. Chu, & E. J. Park. (2012). Antioxidant and antigenotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying methods. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41, 1041-1048.

[4] J. W. Kim, J. K. Kim, I. S. Song, E. S. Kwon, & K. S. Youn. (2013). Comparison of antioxidant and physiological properties of Jerusalem artichoke leaves with different extraction processes. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42, 68-75.

[5] Y. J. Cho, S. K. Lee, Y. H. Ahn, & J. H. Pyee. (2003). Development of ultrasonication-assisted extraction process for manufacturing extracts with high content of pinosylvin from pine leaves. *Journal of the Korean Society for Agricultural Machinery*, 28, 325-334.

[6] A. J. Nauta, F. Engels, L. M. Knippels, J. Garssen, F. P.

Nijkamp, & F. A. Redegeld. (2008). Mechanisms of allergy and asthma. *European Journal of Pharmacology*, 585, 354-360.

[7] S. J. Galli. (1993). New concepts about the mast cell. *The New England Journal of Medicine*, 328, 257-265.

[8] T. Mainardi, S. Kapoor, & L. Bielory. (2009). Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, 283-294.

[9] J. M. Kim, D.J. Kim, T. H. Kim, J. M. Baek, H. S. Kim, & M. Cho. (2010). Effects of water extract of glycyrrhiza uralensis on β -hexosaminidase release and expression of the cytokines of RBL-2H3 mast cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 18, 231-237.

[10] M. Fu, S. Fu, S. Ni, L. Zou, Y. Liu, & T. Hong. (2017). Anti-inflammatory effect of epigallocatechin gallate in a mouse model of ovalbumin-induced allergic rhinitis. *International Immunopharmacology*, 49, 102-108.

[11] M. McHugh, V. Krukonis & H. Brenner. (1994). *Supercritical fluid extraction: Principles and practice, 2nd ed*, United States of America : Butterworth-Heinemann, 1-16.

[12] G. G. Hoyer. (1985). Extraction with supercritical fluids: why, how and so what, *Chemtech*, 15, 440-448.

[13] E. Stahl, K. W. Quirin & D. Gerard. (1988). Dense gases for extraction and refining. Springer Verlag, Berlin, Germany, 173.

[14] Y. H. Choi, E. J. Park, Y. L. Kim, Y. W. Chin, J. W. Kim, S. H. Jeon, S. N. Joung & K. P. Yoo. (1999). Selective extraction of cytotoxic substances from medicinal plants using supercritical carbon dioxide. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 30, 59-64.

[15] J. H. Seo, Y. J. Lee, Y. I. Jo, J. Y. Ko, M. J. Mun, K. H. Park & S. E. Choi. (2018) Anti-fungal, anti-oxidant, and anti-inflammatory effects of supercritical fluid extracts from *Ulmus davidiana*. *Journal of the Korea Convergence Society*, 9, 225-233.

[16] T. Hatano, R. Edamatsu, M. Hiramatsu, A. Mori, Y. Fujita, T. Yasuhara, T. Yoshida & T. Okuda. (1989). Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 2016-2021.

[17] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, & C. Rice-Evans. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.

Free Radical Biology & Medicine, 26, 1231-1237.

- [18] T. Mosmann. (1983). Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- [19] M. Matsubara, S. Masaki, K. Ohmori, A. Karasawa, & K. Hasegawa. (2004). Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochemical Pharmacology*, 67, 1315-1326.
- [20] O. Folin & W. Denis. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 12, 239-243.
- [21] R. G. D. Steel, & J. H. Torrie. (1980). *Principle and procedures of statistics. 1st ed.* Kogakusha, Tokyo, Japan : McGraw-Hill 187- 221.

최 선 은(Choi, Sun Eun)

[정회원]



- 2010년 8월 : 중앙대학교 약학과 (약학박사)
- 2010년 9월 ~ 2011년 8월 : 중앙대학교 생명약연구원 전임연구원 (Post. Doc.)
- 2012년 3월 ~ 현재 : 남부대학교 향장미용학과 교수
- 2018년 9월 ~ 현재 : 남부대학교 산학협력단 중소기업 산학협력센터장
- 관심분야 : 천연물신약, 천연물의약품, 기능성화장품
- E-Mail : sechoi@nambu.ac.kr

문 명 재(Mun, Myung Jae)

[정회원]



- 2001년 2월 : 조선대학교 고분자공학과(공학사)
- 2003년 2월 : 조선대학교 고분자공학과(공학석사)
- 2013년 8월 : 조선대학교 생화학학교분자공학과(공학박사 수료)
- 2007년 3월 ~ 현재 : (재) 전남생물산업진흥원 나노바이오연구센터 책임연구원
- 관심분야 : 나노융합 및 화장품 소재, 약물전달 기술
- E-Mail : mmj7689@hanmail.net

박 광 현(Park, Kwang-Hyun)

[정회원]



- 2004년 8월 : 전북대학교 의학과 (의학박사, 생화학 전공)
- 1999년 3월 ~ 2001년 6월 : (주)에이비아이 부설연구소 번역화학연구부장
- 2006년 11월 ~ 2007년 7월 : 원광대학교 의약자원연구센터 연구교수
- 2007년 8월 ~ 2012년 2월 : 전북대학교부설 심혈관연구소/의과학연구소 연구원
- 2012년 3월 ~ 현재 : 남부대학교 한방 제약개발학과 교수
- 관심분야 : 신규타깃기반의약소재 발굴, 세포신호전달
- E-Mail : khpark@nambu.ac.kr