

## In Vitro Antioxidant Activity of *Alnus firma* Extracts

Hye Jung Choi and Woo Hong Joo\*

Department of Biology and Chemistry, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received December 12, 2018 / Revised December 27, 2018 / Accepted January 14, 2019

This study evaluated the antioxidant activity of the extract and fractions of *Alnus firma*. *Alnus firma* had the highest total phenolic content ( $452.80 \pm 7.01$   $\mu\text{g}$  gallic acid equivalents/mg) in a methanol (MeOH) fraction and the highest total flavonoid content ( $112.29 \pm 11.14$   $\mu\text{g}$  rutin equivalents/mg) and antioxidant capacity ( $936.23 \pm 0.07$   $\mu\text{g}$   $\alpha$ -tocopherol equivalents/mg) in an ethylacetate (EA) fraction. The antioxidant activities of various solvent extract fractions of *Alnus firma* were evaluated using various antioxidant assays, including  $\beta$ -carotene - linoleate assay, reducing power assay, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, metal chelating activity assay, superoxide anion radical scavenging assay, and lipid peroxidation inhibition assay using the ferric thiocyanate method. These activities were compared with those of ascorbic acid, butylated hydroxyanisole (BHA), gallic acid (GA), butylated hydroxytoluene (BHT), and  $\alpha$ -tocopherol. First, at a 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration, the EA and MeOH fractions of *A. firma* showed 92.43% and 89.20% DPPH radical scavenging activity, respectively. Second, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the EA fraction exhibited 72.49% superoxide anion radical scavenging activity, a little greater than the same dose of GA (60.88%). Finally, 0.5 and 1 mg/ml of the EA fraction showed 73.45% and 73.29% inhibition of peroxidation in the  $\beta$ -carotene - linoleic acid system, respectively. The decreasing order of reducing power was EA fraction > *n*-butanol (BuOH) fraction > dichloromethane (DCM) fraction > *n*-hexane (HX) fraction. The results obtained in the present study indicated that *Alnus firma* can be used as an easily accessible potential source of natural antioxidants.

**Key words** : *Alnus firma*, antioxidant, antioxidant capacity, flavonoids, reducing power

### 서 론

우리나라에서는 항산화제로서 비타민 C 와 비타민 E 그리고 소수의 합성 항산화제가 식품의 산화 방지제로서 사용되고 있다. 현재 강한 항산화 효과와 경제성이 뛰어난 합성 항산화제가 개발되어 의약품과 식품분야에서 이용되고 있으나 폐놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)와 butylated hydroxyanisole (BHA)가 인체에 대한 유해성을 보임[2, 12]에 따라 보다 안전하고 항산화 효능이 높은 천연 항산화제에 대한 탐색 연구가 절실히 요구되고 있다. 자연 식물은 생육에 필수적인 1차 대사산물 뿐만 아니라 생육에 필수적이지 않은 다양한 2차 대사산물을 생산하고 있다. 2차 대사산물에는 alkaloid, glycoside, terpenoid 등이 있으며, 이들 대사산물은 항산화활성 뿐만 아니라 다양한 기능을 가지고 있으며, 현재 알려져 있는 천연 항산화제로는 ascorbic acid, tocopherols, carotenoids, phospholipids 및 flavonoid 등이 있다.

식물기원의 항산화 활성을 가지는 생리활성 물질은 잎, 꽃, 열매, 줄기, 뿌리 및 수피 등의 모든 부분에 존재하며, 천연물 중에는 생약재를 포함한 herb류가 가장 많이 연구에 이용되어 왔다. 오리나무 속(*Alnus* sp.)식물은 자작나무과(Betulaceae)에 속하며 북반부 및 남아메리카에 30여종이 서식하고 있으며, 우리나라에는 오리나무(*Alnus japonica*), 물오리나무(*Alnus hirsuta*), 사방오리나무(*Alnus firma* Sieb. et Zucc), 물갸나무(*Alnus hirsuta* var. *sibirica*) 등 9종 이상이 자생하는 것으로 알려져 있다[10]. 오리나무 속 식물을 대상으로 한 천연물연구로 항암과 세포독성 연구가 진행되고 있다[1, 21]. 한편 *Alnus* 속 식물에는 diarylheptanoid 계열을 비롯한 flavonoid, tannin 그리고 triterpenoid 등 폐놀성 화합물이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[8, 23]. 그러나 오리나무 속 식물에 대한 연구는 일부 종 즉 오리나무와 물갸나무에 집중되어 있어 오리나무 속 다른 종에 대한 연구는 미흡한 수준이다. 특히 사방사업으로 일환으로 대량 식재되어 있는 사방오리나무를 대상으로 한 연구는 미진한 실정이다. 제주 자생식물들을 이용한 항산화 및 화장품 기능성 소재 연구에서 사방오리에 대한 총 폐놀화합물 함량과 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성이 조사 보고되고 있을 뿐이다[7, 9].

그러므로 본 연구에서는 천연 식의약품으로 개발할 가치가 있는 중요한 자원 식물인 사방오리나무 종에 대하여 천연물 화학적인 연구를 시도하여 사방오리나무 종의 항당뇨 효과를

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

보고한 바 있으며[3], 본 연구에서는 항산화 효능에 대하여 종합적으로 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 사방오리(*Alnus firma*)는 경남 고성지방에서 자생하는 것을 채취하여 음건 후 세절한 뒤 -20℃ 냉동고에 보관하며 사용하였다. 표준시약은 gallic acid (Chem service, USA), rutin (Sigma-Aldrich, USA), L-ascorbic acid (Shinyo Pure Chemical, Japan) 그리고 비타민 E ( $\alpha$ -tocopherol, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

### 추출

사방오리나무 가지, 잎, 열매를 포함하여 100 g을 세절하여 상온에서 99.5% methanol (MeOH) 1.5 리터로 3회 반복 추출하였으며, MeOH 추출물을 증류수 1리터에 현탁시켜 용매의 극성차를 이용하여 *n*-hexane (HX), dichloromethane (DCM), ethylacetate (EA) and *n*-butanol (BuOH) 층으로 순차적으로 분획하여 여과지로 여과하고 36℃에서 감압 농축하여 -20℃ 냉동고에 보관하며 사용하였다.

### 총 페놀성 화합물 함량 측정

총 페놀함량은 Slinkard과 Singleton 방법[22]에 준하여 Folin-Ciocalteu를 사용하여 측정하였다. 각 용매별 분획물을 1 mg/ml 농도로 하여 45 ml의 증류수와 1 ml의 Folin-Ciocalteu reagent를 혼합하고 3분 뒤, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 첨가하였다. 전체 혼합물이 잘 반응하도록 간헐적으로 섞어주면서 실온에서 2시간 반응시킨 다음 760 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. 각 분획물의 phenolic compounds의 함량은 표준물질인 gallic acid (GA)를 사용하여 산정하였다.

### 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드 함량은 Woisky과 Salatino의 방법[24]에 준하여 각 용매별 분획물을 1 mg/ml 농도로 하여 사용하였다. 0.5 ml의 분획물과 2% aluminium chloride solution 첨가하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 표준물질인 rutin을 사용하여 산정하였다.

### 총 항산화 활성 측정

총 항산화능은 Prieto 등의 방법에 준하여 실험하였다[18]. 1 mg/ml 농도의 각 용매 분획물 0.1 ml에 반응용액(0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, 4 mM ammonium molybdate) 1 ml을 가한 후, 반응액은 phosphomolybdenum 착물의 생성과 molybdenum으로 환원시킬 수 있는 최적 조건

인 90℃에서 90분간 반응시킨 뒤에 생성물질이 안정화되도록 실온까지 식힌 후 695 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 산화 생성물질의 생성 억제 정도와 표준물질( $\alpha$ -tocopherol)에 의한 산화 생성물질의 생성 억제 정도와 비교하여 시료의 총 항산화 활성을 산정하였다.

### 총 환원력 측정

총 환원력은 Prieto 등의 방법[18]에 준하여 1 mg/ml 농도의 각 용매 분획물 0.1 ml에 반응용액(0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, 4 mM ammonium molybdate) 1 ml을 가하여 35℃에서 90분간 반응시킨 뒤 측정하였다. 표준물질인 비타민 E ( $\alpha$ -tocopherol)의 농도를 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu$ g/ml로 제조 비교하여, 시료의 비타민 E 함량을 측정함으로써 비타민 E ( $\alpha$ -tocopherol)의 equivalents로써 총 환원력을 산출하였다.

### 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성

각 추출분획물의 자유 라디칼 소거능은 DPPH를 이용하여 Hatano 등의 방법[5]에 준하여 측정하였다. 다양한 농도로 조제한 각 분획물 0.1 ml에 0.1 mM DPPH (in 99.5% ethanol) 용액 1.9 ml을 첨가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37℃에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid, BHA 그리고 BHT를 각각 사용하였고, 추출분획물을 제외시킨 반응액을 음성대조군으로 사용하였다. 각 분획물의 항산화작용은 IC<sub>50</sub> 치(DPPH 라디칼 형성을 50%로 억제하는 데 필요한  $\mu$ g/ml 농도)로 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = \frac{[(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100}{\text{OD}_{\text{control}}}$$

OD<sub>control</sub>: 추출물을 제외시킨 반응액의 흡광도, OD<sub>sample</sub>: 추출물 포함 반응액의 흡광도

### 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거활성

슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거활성은 blue tetrazolium (NBT) 기질을 첨가한 후 자유 라디칼의 감소를 흡광도로 측정하여 산출하였다[14]. 1 ml의 반응액은 0.7 ml의 분획물(10-50  $\mu$ g/ml), 1 mM의 NADH, 1 mM의 NBT (in 1 M phosphate buffer, pH 7.8) 0.1 ml 그리고 120  $\mu$ M의 phenazine methosulphate (PMS) 0.1 ml을 첨가하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 GA를 사용하였다.

### $\beta$ -carotene linoleate 모델 시스템을 이용한 항산화 활성 측정

$\beta$ -carotene linoleate model system에 의한 항산화 활성을 Miller의 방법에 준하여 측정하였다[13]. 2 mg의  $\beta$ -carotene을

10 ml chloroform에 녹여서 2 ml를 덜어낸 뒤 50°C에서 진공 농축하여 chloroform을 제거한 후, 40 mg의 linoleic acid, 400 mg의 Tween 40과 100 ml의 증류수를 가하여 충분히 진탕하여  $\beta$ -carotene emulsion을 제조하였다. 여러 농도로 조제한 분획물 0.2 ml에  $\beta$ -carotene emulsion 3 ml에 가하고 잘 섞은 후 즉시 470 nm에서 흡광도를 측정하고 50°C의 water bath에서 정치시켰다.  $\beta$ -carotene emulsion의 산화는 20분 간격으로 100분 동안 흡광도를 측정하여 확인하였다. 양성 대조군으로 L-ascorbic acid와 BHA를 사용하였고, 실험은 3회 반복 수행하였다.

#### 환원능력 측정

$\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ 에서  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ 로의 환원을 측정함으로써 환원능을 측정하였다[17]. 다양한 농도로 조제한 분획물에 2.5 ml phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6)와 2.5 ml 1% potassium ferri-cyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]를 첨가하여 50°C에서 20분 반응 후에 25°C에서 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액 2.5 ml, 증류수 2.5 ml에 1% ferric chloride [ $\text{FeCl}_3$ ] 0.5 ml을 가하여 진탕한 뒤 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid 및 BHA를 사용하였다.

#### Ferric thiocyanate (FTC)에 의한 지질과산화 억제 활성 측정

지질과산화 억제활성 측정은 Osawa 와 Namiki 방법에 준하여 실험하였다[16]. 1 mg/ml의 분획물 120  $\mu\text{l}$ 에 2.51% linoleic acid 2.88 ml을 가한 뒤 40 mM phosphate buffer (pH 7.0) 9 ml를 첨가하여, 빛을 차단시키고 40°C에서 96시간 반응하였다. 24시간 간격으로 반응액에서 0.1 ml를 꺼내어 75% ethanol 9.7 ml을 가한 뒤 30% ammonium thiocyanate [ $\text{NH}_4\text{SCN}$ ] 0.1 ml을 첨가하였다. 정확히 3분 뒤에 20 mM ferrous chloride (in 3.5% hydrochloric acid) 0.1 ml을 가하여 잘 섞은 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid, BHA 그리고 BHT를 각각 사용하였고, 음성대조군으로

추출물을 제외시킨 반응액을 사용하였다.

#### 금속이온( $\text{Fe}^{2+}$ )의 킬레이트 효과

금속이온 킬레이팅 활성은 분획물과 반응액을 전배양시킨 후에 형성된  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozine 착물을 측정하여 산출하였다[4]. 다양한 농도(50-250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 조제한 각 분획물 0.5 ml과 0.6 mM  $\text{FeCl}_2$  0.1 ml 그리고 MeOH 0.9 ml을 가한 뒤 실온에서 10분간 반응시켰다. 5 mM ferrozine을 첨가하고 실온에서 다시 5분 동안 반응시켰다.  $\text{Fe}^{2+}$ -chelating 효과는 562 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며 양성대조군으로 EDTA를 사용하였다.

## 결 과

#### 총 페놀성 화합물 함량

사방오리를 100 g 추출하여 MeOH 추출물 16.65 g을 얻었고, HX, DCM, EA 그리고 BuOH 분획은 각각 3.6 g, 0.96 g, 3.71 g 그리고 4.71 g을 얻었다. Folin-Ciocalteu reagent를 사용하여 표준물질인 GA를 10-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제조하여 작성한 검정곡선에 기초하여 총 페놀성 화합물 함량을 측정하였다. 사방오리나무 1 mg의 MeOH 분획물과 EA 분획물은 각각 452.80  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 435.28  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 페놀성 화합물의 함량이 아주 높았고, BuOH 분획물이 190.89  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , HX 분획물과 DCM 분획물의 페놀성 화합물 함량이 각각 78.33  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 23.14  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났다(Table 1).

#### 플라보노이드 함량

사방오리 유기용매 추출물의 플라보노이드 함량은 표준물질인 rutin을 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 제조하여 작성한 검정곡선으로부터 비교 정량하였다. 1 mg/ml 농도의 MeOH, HX 그리고 DCM 분획물은 각각 67.70, 57.08, 50.71  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 플라보노이드 함량이 비슷하였고, EA 분획물은 112.29  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 다른 분획물에 비해 2-3배 이상 플라보노이드

Table 1. Extraction yields, total phenolic contents, total flavonoid contents, total antioxidant contents and total reducing power in crude *Alnus firma* extracts

	Yield (g/100g) <sup>a</sup>	Total phenolic contents ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>b</sup>	Total flavonoid contents ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>c</sup>	Total antioxidant capacity ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>d</sup>	Total reducing power ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>e</sup>
MeOH	16.65	452.80±7.01	67.70±0.22	814.92±0.07	242.86±0.02
HX	3.6	23.14±2.19	57.08±4.14	155.97±0.03	217.24±0.03
DCM	0.96	8.33±8.32	50.71±0.45	373.23±0.08	269.94±0.03
EA	3.71	435.28±5.26	112.29±11.14	936.23±0.07	211.05±0.01
BuOH	4.71	190.89±7.01	15.25±0.38	65.54±0.02	46.17±0.01

<sup>a</sup>g extracts / 100 g *Alnus firma*.

<sup>b</sup>gallic acid equivalents ( $R^2 = 0.9984$ ; mean  $\pm$  S.D.; n=3).

<sup>c</sup>rutin equivalents ( $R^2 = 0.9986$ ; mean  $\pm$  S.D.; n=3).

<sup>d</sup> $\alpha$ -tocopherol equivalents ( $R^2 = 0.9923$ ; mean  $\pm$  S.D.; n=3).

<sup>e</sup> $\alpha$ -tocopherol equivalents ( $R^2 = 0.9998$ ; mean  $\pm$  S.D.; n=3).

함량이 많은 것으로 나타났으며, BuOH 분획물은 15.25 µg/mg로 플라보노이드 함량이 상대적으로 적었다(Table 1).

**총 항산화 활성**

α-tocopherol의 검정곡선에 기초하여 사방오리 각 유기용매 분획의 농도를 1 mg/ml로 하여 항산화 활성을 측정된 결과, EA 분획물이 936.23 µg/ml로 항산화 활성이 가장 좋았고, MeOH, DCM 분획이 각각 814.92, 373.23 µg/ml, 그리고 HX 그리고 BuOH 분획이 각각 155.97, 65.54 µg/ml 으로 나타났다 (Table 1).

**총 환원력**

1 mg/ml 농도의 사방오리 유기용매 분획물에 들어있는 총 환원력을 비타민 E (α-tocopherol)-equivalents로써 측정된 결과, HX과 EA 분획물이 각각 217.24, 211.05 µg/ml으로 유의하게 높게 나타났으며, BuOH 분획물이 46.17 µg/ml로 상대적으로 낮은 함량을 나타냈다. 그리고 MeOH과 DCM 분획물이 각각 242.86, 269.94 µg/ml로 높은 함량을 나타냄으로써 이 분획이 가장 높은 총환원력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Table 1).

**DPPH 라디칼 소거활성**

분획물의 DPPH 라디칼 소거능은 L-ascorbic acid, BHA, BHT를 각각 표준물질로 사용하여 분획물과 같은 농도로 제조하여 비교 측정하였으며 결과는 Fig. 1에 정리하여 놓았다. 250 µg/ml 농도에서 사방오리 EA 분획물과 L-ascorbic acid는 각각 92.43, 97.88%로 유의하게 높은 자유 라디칼 소거율을 보였고, MeOH 분획물과 BHA가 각각 89.20%, 87.44%로 역시 높은 소거율을 나타냈다. HX과 DCM 분획물은 각 6.91, 15.53%의 낮은 자유 라디칼 소거율을 나타냄으로써 DPPH 라디칼 소거능이 거의 없음을 확인할 수 있었다. 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 MeOH,

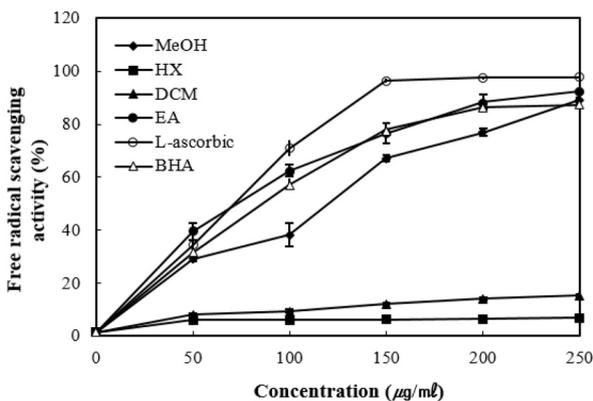


Fig. 1. Free radical scavenging activity of MeOH, HX, DCM and EA fractions of *Alnus firma* by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The results are mean ± S.D. of triplication.

HX, DCM, EA 순으로 87.5, 2150, 1625, 65.83 µg/ml로 나타났다.

**슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거활성**

50 µg/ml 농도에서 사방오리 각 유기용매 분획물의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거율은 MeOH, HX, DCM 및 EA 분획물이 각각 52.37%, 9.86%, 14.78%, 72.49%로 나타났고, 표준물질인 GA는 60.88%로 나타났다(Fig. 2). 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 HX과 DCM 분획물이 각각 6031.3, 327.56 µg/ml로 높게 나타났고, MeOH과 EA 분획물은 각각 40.22, 14.53 µg/ml로 나타났다.

**β-carotene linoleate 모델 시스템을 이용한 항산화 활성 측정**

β-carotene과 linoleate 시스템으로 각종 농도 사방오리의 유기용매 분획물과 표준물질인 L-ascorbic acid와 BHA를 사용하여 β-carotene과 linoleic acid의 항산화 활성을 비교 측정하였다(Fig. 3). 0.5 및 1 mg/ml의 EA 분획물과 BHA는 100분 경과 시까지 각각 73.45%, 73.29%, 83.63%, 90.70%의 높은 산화 저해율을 보여주었고, 0.5 및 1 mg/ml의 DCM 분획물도 57.93%, 69.23%의 저해율을 나타냄으로써 항산화 활성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 0.1 mg/ml의 EA 분획물과 DCM 분획물, 각종 농도의 HX 분획물 그리고 0.5 및 1 mg/ml의 L-ascorbic acid는 시간이 지남에 따라 흡광도가 급격하게 감소함으로써 50% 이하의 낮은 항산화 활성을 나타내었다.

**환원능 측정 결과**

표준 환원물질로써 L-ascorbic acid와 BHA를 사용하여, 분획물과 같은 농도로 제조하여 환원력을 비교하였다. 250 µg/ml 농도에서 사방오리 유기용매 분획물은 HX, DCM, EA, BuOH 순으로 환원능이 0.042, 0.165, 1.441, 0.662로 나타났다 (Fig. 4).

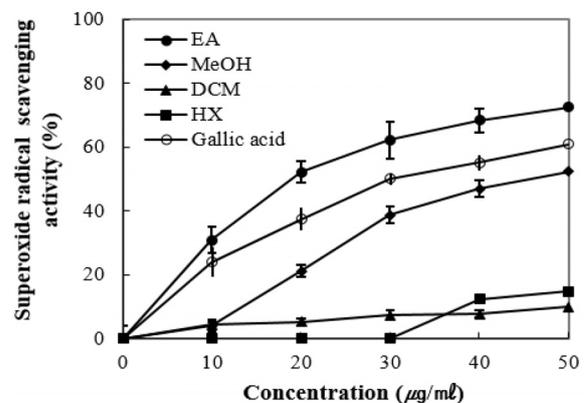


Fig. 2. Superoxide anion radical scavenging activity of MeOH, HX, DCM and EA fractions of *Alnus firma* by PMS/NADH-NBT method. The results are mean ± S.D. of triplication.

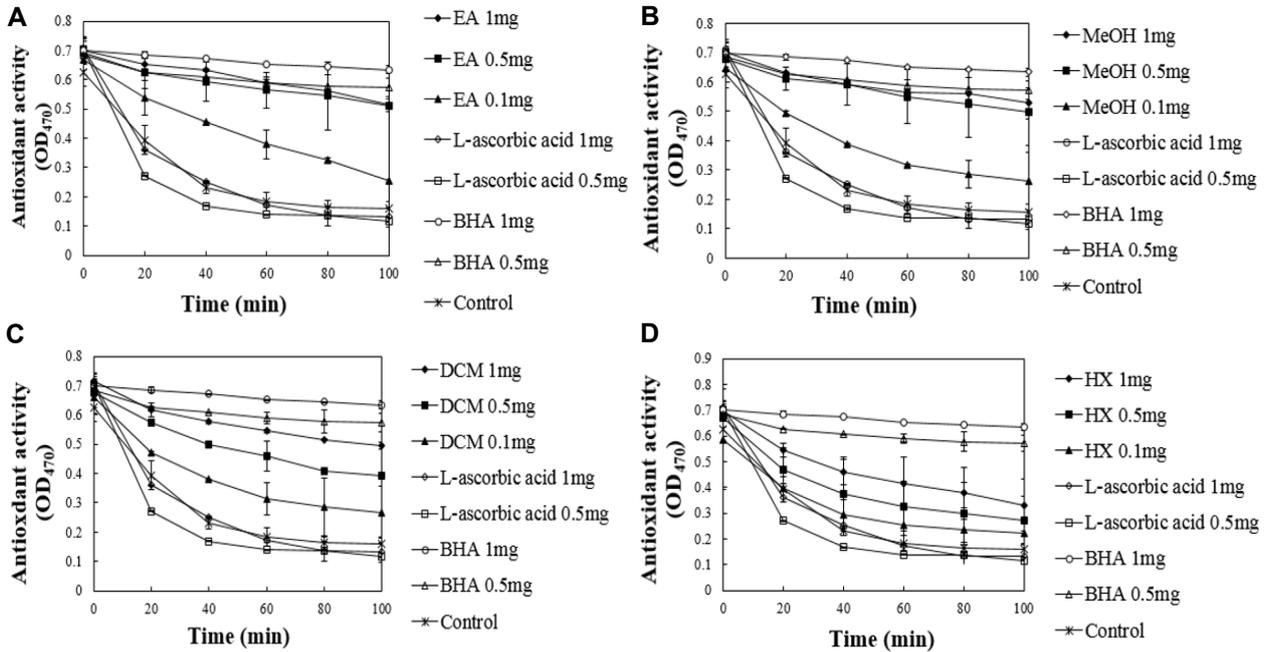


Fig. 3. Antioxidant activities of *Alnus firma* extracts using the  $\beta$ -carotene linoleate model system. L-ascorbic acid and BHA were used as positive controls. (a) EA fraction; (b) MeOH fraction; (c) DCM fraction; (d) HX fraction.

**Ferric thiocyanate (FTC)에 의한 지질과산화 억제 활성 측정**

1 mg/ml 농도의 사방오리 유기용매 분획물의 지질과산화 억제효능 측정은 표준물질인 L-ascorbic acid, BHA 및 BHT를 같은 농도로 하여 40°C에서 4일 동안 반응시키면서 측정하였다. 반응 72시간 까지는 control과 비교했을 때 상당한 지질과산화 억제능력을 보였으나, 그 이후로 반응시간이 증가함에 따라 더 이상 지질과산화 억제 능력이 나타나지 않았다. 실험 결과, ferric thiocyanate 방법에 의한 지질과산화 억제능 측정에서 사방오리의 MeOH, DCM 그리고 EA 분획물은 폐쇄계 합성 항산화제인 BHT와 유의한 억제능을 나타내었으나, HX

과 BuOH 분획물에서는 지질과산화 억제능을 확인할 수 없었다(Fig. 5).

**금속이온의 킬레이트 효과**

추출물에 의한  $Fe^{2+}$  이온의 킬레이트 효과는 지질과산화 억제능력의 한 척도로서 ferrozine과  $Fe^{2+}$  이온의 정량적인 착물 형성 정도를 측정함으로써 결정하였다(Fig. 5). 추출물과 표준물질의 킬레이트 효과로 농도가 높아짐에 따라 비례적으로  $Fe^{2+}$ -ferrozine 착물이 감소되었다. 250  $\mu$ g/ml에서 MeOH 분획물은 52.7%, HX과 EA가 각각 47.77%, 45.71%로 비슷하게

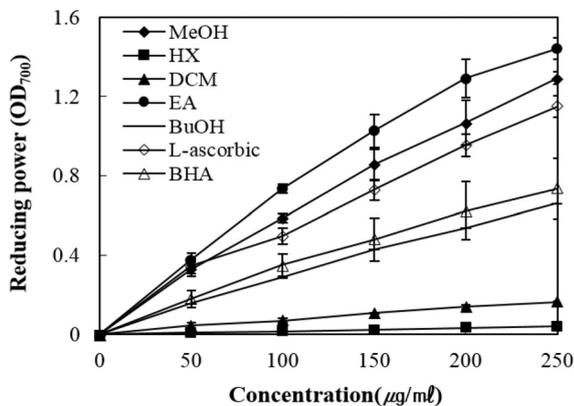


Fig. 4. Reducing power of MeOH, HX, DCM, EA and BuOH fractions of *Alnus firma*. The results are mean  $\pm$  S.D. of triplication.

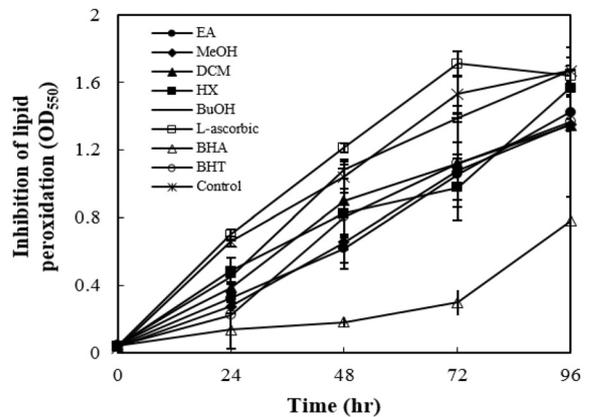


Fig. 5. Inhibition of lipid peroxidation of *Alnus firma* extracts. Ferric thiocyanate (FTC) method was used for determination of lipid peroxidation. The results are mean  $\pm$  S.D. of triplication.

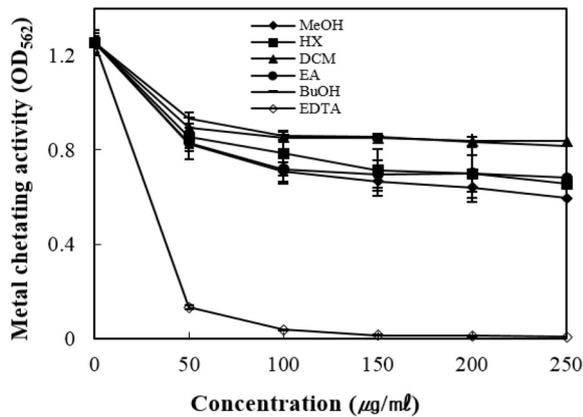


Fig. 6. Metal chelating effect of organic solvent-fractions of *Alnus firma*. Each value is expressed as mean  $\pm$  S.D. of triplication.

나타났고, DCM과 BuOH 분획물이 각각 33.47%, 33.55%로 나타났다(Fig. 6).

### 고찰

오리 나무 속 나무의 항산화 효능 검증에서 비교가능한 데이터가 부족하며 일부는 오리나무 속에서 분리된 물질에 대한 항산화 효능이므로 종합적인 평가가 불가능하다. 그러나 일부 자료에 기초하여 살펴보면 제주 자생 사방오리 메탄올 추출액의 총 페놀화합물이 188.7 mg/g임이 밝혀져 있으나[7], 본 연구 결과에서는 452.8 µg/mg으로 2배 이상 함량이 높은 것으로 밝혀졌다. 또한 Kim 등[9]에 의한 고압액체 추출장치로 추출한 사방오리 추출물에서의 총 페놀화합물 함량 75.8 mg/g 보다 본 연구에 사용한 사방오리 시료에 보다 많은 페놀 화합물이 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 이는 사방오리 자생지의 환경 조건에서 기인하는 것으로 기능성 물질의 함량이 매우 중요한 기능성 소재 개발시에는 자생지에 대한 보다 면밀한 조사가 선행되어야 한다는 것이 본 연구에서도 확인되었다.

한편 파키스탄 자생 *Alnus nitida*의 총 페놀 화합물과 총 플라보노이드 함량보다 사방오리나무의 함량은 낮았으나 총 항산화능은 모든 분획에서 높으며, 총 환원력도 매우 높은 것으로 밝혀졌다[19]. 사방오리 나무 EA추출 분획의 DPPH 라디칼 소거능은 합성항산화제인 BHA, BHT 보다 높게 나타났으며, 천연 항산화제인 L-ascorbic acid와 비슷한 항산화 활성을 보였다. 사방오리 EA 분획물을 IC<sub>50</sub> 값으로 비교해보면, *Alnus hirsuta*에서 분리된 oregonin의 95.0µg/ml와 1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-β-D-xylopyranoside의 92.0 µg/ml 보다 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었으나, hirsutanonol의 65.2 µg/ml 와 비슷한 값으로 사방오리 EA 분획물에는 매우 강력한 라디칼 소거물질이 함유되어 있음을 알 수 있었다[11]. 슈퍼

옥사이드 음이온 라디칼 소거 활성에서 GA가 36.22 µg/ml로 나타남으로써 사방오리 EA분획물이 표준물질인 GA 보다 더 효율적으로 superoxide 음이온 발생을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 사방오리 EA 분획물은 *Hyphaene thebaica* 열수 추출물의 superoxide radical 소거율 IC<sub>50</sub> 7316 µg/ml보다 훨씬 뛰어났고, black tea의 열수 추출물의 소거율 IC<sub>50</sub> 100 µg/ml 보다 6배 이상 뛰어난 것으로 확인되었다[6]. β-carotene linoleate 모델 시스템을 이용한 항산화 활성 측정에서는 1 mg/ml 농도에서 사방오리의 EA, MeOH 및 DCM 분획물은 일본 감잎차의 열수 추출물보다 뛰어났으나, MeOH 추출물보다는 항산화 활성이 다소 낮음을 확인할 수 있었다[20]. 사방오리 HX 분획물과 DCM 분획물은 상대적으로 낮은 흡광도 값을 나타냄으로써 환원 능력이 적음을 알 수 있었으나, EA 분획물은 표준물질인 BHA 보다 약 2배 높고, L-ascorbic acid 보다도 높은 흡광도 값을 나타냄으로써 환원능력이 뛰어남을 확인할 수 있었다. 또한 BuOH 분획물도 표준물질인 BHA와 유의하게 높게 나타남으로써 그 유효성을 검증할 수 있었다. 소화불량 개선, 호흡기 질환 치유, 비만 및 주름개선 등에 효과적이라고 알려져 있는 허브인 *Foeniculum vulgare*의 환원능과 비교하면 *Foeniculum vulgare*의 물과 에탄올 추출물의 환원능이 표준 물질인 BHA와 BHT보다 낮게 보고되어 있는데 비해 사방오리 EA 추출 분획물의 환원능은 매우 좋은 것으로 확인되었다[15]. 한편 250 µg/ml 농도에서 *Hyphaene thebaica*의 열수 추출물과 black tea의 열수추출물의 금속이온 킬레이트 효과는 40% 이하로 사방오리 MeOH, HX 그리고 EA 분획물이 이들 보다 높았으나, 사방오리 DCM과 BuOH 분획물은 비슷하거나 이들 보다 다소 낮았다[6].

이상의 결과에서 사방오리는 현재 바이오 매스면에서 풍부하며, 척박한 토양에서도 생육이 가능하며 생육속도가 빠르므로, 현재는 미이용 자원이나 미래가치가 높은 자원으로 항산화 및 식의약품 개발 등에서 매우 유용하게 활용이 가능할 것으로 판단된다. 그러므로 사방오리 자생지에 대한 자세한 기초조사가 필요하며 이를 기초로 하여 식의약품 개발, 천연 항산화제 개발 나아가 기능성 화장품 개발 등의 응용연구가 진행되어야 할 필요성이 높다.

### References

- Bae, C. I., Gong, J. M., Oh, J. W., Kim H. J., Oh, G. J., Park, S. K., Chung, S. G. and Cho, E. H. 1997. Studies on the cytotoxic constituent of *Alnus hirsuta*. *J. Pharmaceut. Soc. Korea* **41**, 559-564.
- Branen, A. S. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated dihydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63.
- Choi, H. J., Jeong, Y. K., Kang, D. O. and Joo, W. H. 2008. Inhibitory effects of four solvent fractions of *Alnus firma* on α-amylase and α-glucosidase. *J. Life Sci.* **18**, 1005-1010.

4. Decker, E. A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agr. Food Chem.* **38**, 674-677.
5. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. 1989. Effect of the interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenol on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016-2021.
6. Hsu, B., Coupar, I. M. and Ng, K. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.* **98**, 317-328.
7. Hyun, S. H., Jung, S. K., Jwa, M. K., Song, C. K., Kim, J. H. and Lim, S. B. 2007. Screening of antioxidants and cosmetics from natural plant resources in Jeju island. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 200-208.
8. Karchesy, J. J., Laver, M. L., Barofsky, D. F. and Barofsky, E. 1974. Structure of oregonin, a natural diarylheptanoid xyloside. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **16**, 649-650.
9. Kim, M. B., Park, J. S. and Lim, S. B. 2010. Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. *Food Chem.* **122**, 546-552.
10. Lee, C. B. 1980. Plant flora of Korea. *Hyangmoonsa*.
11. Lee, Y. A., Kim, K. H., Kim, J. S., Cho, S. M., Kim, S. W. and Lee, M. W. 2000. Antioxidative effects of diarylheptanoids from *Alnus frsutata*. *J. Pharmaceut. Soc. Korea* **44**, 193-196.
12. Maeura, Y., Weisburger, J. H. and Williams, G. 1984. Dose-dependent reduction of N-2-fluorenylacetylamide-induced liver cancer and enhancement of bladder cancer in rats by butylated hydroxytoluene. *Cancer Res.* **44**, 1604-1610.
13. Miller, H. E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **48**, 91-91.
14. Nishikimi, M., Rao, N. A. and Yagi, K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **46**, 849-854.
15. Oktay, M., Gülçin, İ. and Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* **36**, 263-271.
16. Osawa, T. and Namiki, M. 1981. A Novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agr. Biol. Chem.* **45**, 735-739.
17. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucoamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **44**, 307-315.
18. Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* **269**, 337-341.
19. Sajid, M., Khan, M. R., Shah, N. A., Shah, S. A., Ismail, H., Younis, T. and Zahra, Z. 2016. Phytochemical, antioxidant and hepatoprotective effects of *Alnus nitida* bark in carbon tetrachloride challenged Sprague Dawley rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 268.
20. Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chem.* **89**, 569-575.
21. Sheth, K., Bianchi, E., Wiedhopf, R. and Cole, J. R. 1973. Antitumor agents from *Alnus oregona*. (Betulaceae). *J. Pharmaceut. Sci.* **62**, 139-140.
22. Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1997. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* **28**, 49-55.
23. Suga, T., Iwata, N. and Asakawa, Y. 1972. Chemical constituents of male flower of *Alnus pendula* (Betulaceae). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **45**, 2058-2060.
24. Woisky, R. G. and Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.* **37**, 99-105.

**초록 : 사방오리(*Alnus firma*) 추출물의 *in vitro* 항산화 활성**

최혜정 · 주우홍\*

(창원대학교 생물학화학융합학부)

본 연구는 사방오리 추출 분획물의 항산화 활성을 검증하기 위하여 시행되었다. 사방오리는 메탄올(MeOH) 분획에 가장 높은 총 페놀화합물( $452.80 \pm 7.01 \mu\text{g gallic acid equivalents/mg}$ )을 그리고 에틸에세테이트(EA) 분획에 가장 높은 총 플라보노이드 함량( $112.29 \pm 11.14 \mu\text{g rutin equivalents/mg}$ )과 가장 높은 총 항산화 활성( $936.23 \pm 0.07 \mu\text{g } \alpha\text{-tocopherol equivalents/mg}$ )을 가지고 있었다. 사방오리의 용매 추출분획물에 대한 항산화 활성은 아스코빅산 등 표준 물질과 비교하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정, 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능 측정,  $\beta$ -carotene - linoleate 에세이, 환원력 측정, ferric thiocyanate법으로 지질과산화 억제력 측정 그리고 금속 킬레이팅능 측정 등 다양한 항산화 활성을 측정하였다. 250  $\mu\text{g/ml}$  농도의 사방오리 EA와 MeOH 분획은 DPPH 라디칼 소거능 측정에서 각각 92.43와 89.20% 항산화 활성을 가지고 있었다. 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 EA분획은 72.49% 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능을 보였으며 이는 gallic acid의 소거능(60.88%)보다 조금 높았다. 또한  $\beta$ -carotene-linoleic acid 시스템에 의한 과산화 억제능 조사에서 0.5과 1  $\text{mg/ml}$  농도의 EA 분획이 각각 73.45와 73.29% 억제능을 보였다. 항산화 활성은 EA 분획 > BuOH 분획 > DCM분획 > HX분획 순 이었다. 이상의 본 연구 결과에서 사방오리는 천연 항산화제제 개발을 위한 용이하게 접근 가능한 잠재적인 자원으로 판단된다.