

국내 9종 산림식물 추출물의 항산화 효능

심완섭 · 이종석¹ · 이사라¹ · 최선일 · 조봉연 · 최승현 · 한응호 · 장길웅 · 권희연
최예은 · 김종예 · 김종대 · 이옥환*
강원대학교 식품생명공학과, ¹국립생물자원관

Antioxidant Effect of Extracts from 9 Species of Forest Plants in Korea

Wan-Sup Sim, Jong Seok Lee¹, Sarah Lee¹, Sun-Il Choi, Bong-Yeon Cho, Seung-Hyun Choi, Han Xionggao, Gill-Woong Jang, Hee-Yeon Kwon, Ye-Eun Choi, Jong-Yea Kim, Jong-Dai Kim, Ok-Hwan Lee*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

¹Biological and Genetic Resources Assessment Division, National Institute of Biological Resources, Incheon, Korea

(Received June 3, 2019/Revised July 8, 2019/Accepted July 27, 2019)

ABSTRACT - This study was carried out to investigate the antioxidant effects of extracts from 9 species of forest plants in Korea. DPPH, ABTS, NaNO₂, hydrogen peroxide radical scavenging activity and reducing power activity were evaluated to measure the antioxidant activities of plant extracts. As a result, *Geranium thunbergii* has been identified as the most effective antioxidant resource. Also, total phenolic content was highest in *Geranium thunbergii* (303.94±0.63 mg GAE/g) among 9 species extracts. Total flavonoid content was highest in *Rosa multiflora* (24.32±0.22 mg QE/g) and proanthocyanidin content was highest in *Vitis ficifolia* (279.00±4.58 mg CE/g) among 9 species extracts. In addition, the protective effect of plant extracts in H₂O₂-induced human dermal fibroblast (HDF) cell systems were also assessed. Significant protective effects in H₂O₂-induced human dermal fibroblast (HDF) cell systems were found in all plant extracts, especially in *Geranium thunbergii*. These results suggest that *Geranium thunbergii* could be a potential natural resource for antioxidant activity.

Key words : Korean native forest plants, Antioxidant effect, Human dermal fibroblasts, *Geranium thunbergii*, Natural resource

최근 무분별한 화학물질 배출, 자외선을 포함한 환경오염 및 다양한 원천에서 오는 스트레스 등으로 인해 암, 동맥경화, 노화 등 현대 질병의 발병률이 증가하고 여러 합병증을 유발하는 것으로 보고 되어지고 있다¹⁾. 이러한 성인병을 유발하는 원인 중 하나는 활성산소종이라 불리는 ROS (reactive oxygen species)가 과발현된 결과이다²⁾. 활성산소종의 종류로는 hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide ion (O₂⁻), hydroxyl radical (·OH) 등이 대표적이며, 이는 인체 대사과정에서 자연스럽게 발생하여 세균이나 이물질로부터 신체를 보호해주지만, 과잉 생산시 생체내 정상적인 세포의 세포막, 단백질, DNA 손상 등을 일으켜 각종 질병을 유발하게 된다³⁾. 따라서 이러한 ROS를 제거

하기 위하여 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 및 propyl gallate (PG) 등의 합성 항산화제를 사용하여 왔으나, 많은 연구에서 이들의 장기 섭취는 암, 세포 내 독성 등의 부작용을 유발한다고 보고된 바 있다⁴⁾. 따라서 합성 항산화제를 효과적으로 대체할 천연 항산화제를 민간요법이나 한방에서 효능이 입증된 천연물을 중심으로 연구되어질 필요가 있다⁵⁾.

국가 간에 생물자원을 활용하여 생기는 이익을 공유하기 위한 나고야의정서 협약을 체결한 이후, 국내 유전자원의 보호를 위해 국내 산림자원 중 식품원재료 데이터베이스에 등재된 원료에 대한 효능을 평가하는 것은 매우 시의적절한 연구로 사료된다⁶⁾. 따라서 많은 연구자들이 국내 자생 식물에 대한 기능성 연구를 수행하고 있는데, Hyun 등⁷⁾은 제주지역에 자생하는 식물자원 54종을 대상으로 항산화 활성과 미백효과 및 주름개선효과를 조사한 바 있고, 그 중 자금우, 산딸나무, 소귀나무 등이 우수한 항산화 활성을 지닌다고 보고하였으며, Rim 등⁸⁾과 Kang

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Phone: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

등⁹⁾은 각각 국내 식물자원 86종 메탄올 추출물과 40종 고압용매 추출물의 항산화 및 항균 활성을 검증하였다. 그러나 국내 산림지역에서 자생하는 식물의 잎, 줄기 및 잔가지를 이용한 항산화 활성에 관한 연구가 많지 않고, 이를 이용하여 식품가공 원료로 적용한 연구도 초기단계에 불과하다. 따라서 본 연구진은 국립생물자원관으로부터 국내 자생식물 9종을 제공받아 항산화 활성 및 성분을 분석하여 고부가가치 생물산업에 활용 될 수 있는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium persulfate, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, Iron(III) chloride, aluminum nitrate, potassium acetate, quercetin, folin-ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, gallic acid 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 시약으로 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), bovine serum (BS), phosphate-buffered saline (PBS) 및 trypsin-EDTA 등은 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였으며 그 외, 실험에 사용한 시약은 분석용으로 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

국내 산림자생 식물 추출물 제조

본 연구에서 사용된 9종의 산림식물(머위, 뱀딸기, 찔레나무, 까치밥나무, 말오줌때, 가중나무, 까마귀머루, 이질풀, 다래)은 2016, 2017년에 채집한 것으로 국립생물자원관으로부터 제공받았다. 본 연구에 사용된 각 산림자생 식물의 학명 및 부위는 Table 1에 제시하였다. 산림자생 식물 내 수용성 화합물과 지용성 화합물을 함께 추출하기

위하여 70% 에탄올을 사용하였으며, 각 시료 100 g을 70% 에탄올 1000 mL에 침지시켜 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 상기 추출 과정을 3회 반복하고 얻어진 추출액은 모두 합하여 filter paper (Whatman, No.3, Maidstone, Kent, UK)로 여과한 뒤, 회전진공농축기(EYELA, N-3000, Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축한 후, 동결건조(Ilshinbiobase Co., Ltd, Yangju, Korea)하여 실험에 사용하였다.

피부 섬유아세포 배양 및 분화

피부 섬유아세포(Human dermal fibroblast)는 American Type Culture Collection (ATCC, PCS-201-012, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 피부 섬유아세포는 실험목적에 따라 12-well 및 96-well plate에 각각 1×10^6 cells/well을 seeding 한 후, FBS (10%) 및 P/S (1%)를 함유한 low glucose DMEM (89%)에서 24시간 배양하였다. 이 때, 산림 식물 추출물의 효과를 관찰하기 위해 각각 50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였으며, 양성 대조군으로는 ascorbic acid 50 μM 로 처리하여 효능을 비교하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Cho 등¹⁰⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 70% 에탄올을 사용하여 용해시킨 시료 0.1 mL와 0.4 mM DPPH 용액 0.1 mL를 혼합한 뒤, 30분 동안 암소에서 반응시켰다. 흡광도 값은 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)의 515 nm에서 측정하였으며, DPPH 라디칼 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \frac{[Ac - As]}{Ac} \times 100$$

Ac : 공시료 흡광도, As : 시료군 흡광도

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Cho 등¹¹⁾의 방법으로 측정하였다

Table 1. The information of Korean native forest plants

No.	Family	Scientific name	Parts
1	Asteraceae	<i>Petasites japonicus</i> (Siebold & Zucc.) Maxim.	Stem, Leaf
2	Rosaceae	<i>Duchesnea chrysantha</i> (Zoll. & Moritz) Miq.	Fruit
3	Rosaceae	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Fruit, Leaf, Petal, Sprout
4	Grossulariaceae	<i>Ribes mandshuricum</i> (Maxim.) Kom.	Fruit
5	Staphyleaceae	<i>Euscaphis japonica</i> (Thunb.) Kanitz	Sprout
6	Simaroubaceae	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle f. <i>erythrocarpa</i> (Carriere) Rehder	Leaf
7	Vitaceae	<i>Vitis ficifolia</i> Bunge var. <i>sinuata</i> (Regel) H. Hara	Fruit
8	Geraniaceae	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold ex Lindl. & Paxton	Leaf
9	Actinidiaceae	<i>Actinidia arguta</i> (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.	Stem, Fruit, Sap, Sprout

다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 빛을 차단한 상태로 16시간 동안 상온에서 반응시켜 ABTS 양이온을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.72 ± 0.02 가 되도록 무수에탄올을 이용하여 조절하였다. 시료 50 μ L에 ABTS 용액 150 μ L를 첨가하여 20분 동안 상온에서 반응시켜 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Ac : 공시료 흡광도, As : 시료군 흡광도

Reducing power activity 측정

Reducing power activity는 Lim 등¹²⁾의 방법을 수정하여 실험하였다. 시료 0.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer 0.5 mL, 1% potassium ferricyanide 0.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 0.5 mL를 첨가한 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액 1.0 mL에 0.1% iron(III) chloride 0.2 mL를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 통해 reducing power를 비교하였다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Lee 등¹³⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 1 mM NaNO₂ 용액 0.5 mL를 첨가하고 0.1 N HCl로 반응용액의 pH를 1.2로 보정한 후 반응용액의 최종부피는 증류수를 첨가하여 5 mL로 하였다. 그 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 반응액을 1 mL씩 취하여 2% acetic acid 5 mL와 Griess reagent 0.4 mL를 혼합시킨 뒤 상온에서 15분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{아질산염 소거능} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Ac : 공시료 흡광도, As : 시료군 흡광도

Hydrogen peroxide 소거능 측정

과산화수소 소거능은 Hyon 등¹⁴⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 각 시료 30 μ L에 pH 7.4인 0.1 M sodium phosphate buffer 100 μ L를 첨가한 후 2 mM hydrogen peroxide 15 μ L를 첨가하여 35°C에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 1.25 mM ABTS 25 μ L과 peroxidase (1 U/mL) 25 μ L를 첨가하고 재차 35°C에서 20분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화수소 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{과산화수소 라디칼 소거능(\%)} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Ac : 공시료 흡광도, As : 시료군 흡광도

총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Jo 등¹⁵⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 각 시료 500 μ L에 12.5% sodium carbonate reagent 1.25 mL와 1 M folin-ciocalteu's reagent 250 μ L를 혼합하여 암소에서 40분간 반응 후 microplate reader를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하여 총 폴리페놀 함량을 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Shin 등¹⁶⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 2% aluminum chloride 0.5 mL를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin를 사용하여 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

총 프로안토시아닌 함량 분석

총 프로안토시아닌 함량은 vanillin-sulfuric acid법을 이용하였으며 Hwang 등¹⁷⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mg을 methanol 5 mL에 용해시킨 후, 4% vanillin reagent 3 mL를 첨가하여 진탕 혼합하였다. 다음 hydrochloric acid 1.5 mL를 반응용액에 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 catechin을 사용하여 총 프로안토시아닌 함량을 나타내었다.

XTT assay를 이용한 세포독성 평가

HDF (human dermal fibroblast) 세포에 대한 식물 추출물의 독성평가는 XTT {2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilideinnersalt} assay kit를 이용하여 측정하였다. HDF cell을 1×10^6 cells/well로 96-well plate에 seeding하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 식물 추출물의 농도는 각각 50, 100 및 200 μ g/mL의 농도로 처리한 후 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. XTT 1 mL, PMS (N-methylphenazonium methylsulfate) reagent 20 μ L의 비율로 XTT working solution을 제조하여 media volume의 20%만큼 첨가하여 incubator에서 4시간 반응시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포 독성을 측정하였다¹⁸⁾.

산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호효과 측정

산화적 스트레스에 의한 세포손상 보호효과는 XTT assay를 변형하여 측정하였다. HDF cell을 12-well plate에 seeding 한 뒤 24시간 동안 배양하여 부착시킨 뒤, 식물

추출물을 각각 50, 100 및 200 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 산화적 스트레스를 유발하기 위해 1 mM hydrogen peroxide를 2시간 동안 세포에 처리하였다. 다음으로, 배지를 제거하고 각 well에 XTT working solution이 20% 포함된 배지를 첨가한 뒤, 빛을 차단하고 incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포손상 보호효과를 측정하였다¹⁹⁾.

H₂-DCFDA assay를 이용한 산화적 스트레스 측정

HDF cell에 대한 ROS 생성억제 효능평가는 H₂-DCFDA (2'-7'-Dichloro-dihydrofluorescein diacetate) assay를 이용하여 측정하였다. HDF는 12-well plate에 1×10⁶ cells/well 농도로 seeding하고 24시간 동안 배양하여 부착시킨 뒤, 식물 추출물을 각각 50, 100 및 200 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS buffer로 2회 washing한 후 hydrogen peroxide 1 mM을 3시간 동안 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 뒤, media를 제거하고 3.7% paraformaldehyde를 1 mL씩 첨가하여 상온에서 15분간 고정시켰다. 5 µM DCFDA solution을 1 mL씩 처리한 후 빛이 들어가지 않도록 주의하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 fluorescent microplate reader를 이용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다²⁰⁾.

통계처리

모든 실험들의 통계처리는 SAS version 9.4 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 one-way ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

DPPH, ABTS, 아질산염, Hydrogen peroxide 소거능 및 reducing power 활성

국내 산림식물 9종의 70% 에탄올 추출물의 항산화 활성은 Table 2에 나타내었다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 대표적인 항산화 활성 측정 방법으로, 항산화 물질에 의한 양이온 라디칼 소거로 인해 화합물이 탈색되는 원리를 이용한다²¹⁾. DPPH 라디칼 소거능은 이질풀이 60 µg/mL 이하의 낮은 IC₅₀ 값을 보이면서 가장 높은 활성을 보였고, 까치밥나무가 160 µg/mL 이상의 높은 IC₅₀ 값을 보이면서 가장 낮은 활성을 보였다. ABTS 라디칼 소거능의 경우, 짚레나무와 이질풀이 각각 51.72±1.36, 46.99±3.23 µg/mL의 IC₅₀ 값으로 가장 높은 활성을 보였고, DPPH 라디칼 소거능에서 가장 낮은 활성을 보인 까치밥나무가 123.12±1.11 µg/mL의 IC₅₀ 값으로 ABTS 라디칼 소거능 역시 가장 낮은 활성을 보였다. 이상의 결과는 Sung 등²²⁾이 연구한 이질풀 열수추출물의 DPPH (25 µg/mL, 52.8%) 및 ABTS (25 µg/mL, 65.2%) 라디칼 소거능보다는 비교적 낮은 활성을 지닌 것으로 확인되었으며 이는 추출 용매 및 온도에 따른 차이에 기인된 것으로 사료된다.

Nitric oxide는 생체 내에서 NO synthase (NOS)의 촉매 작용에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 활성질소종 중 하나로서 일반적으로 면역반응에 중요한 역할을 하지만, 과량의 NO 생성은 염증 반응을 유발하고 세포의 돌연변이 및 조직의 파괴를 야기시킨다고 알려져 있다²³⁾. 또한 과량의 hydrogen peroxide는 과산화지질의 생성을 촉진하여 동맥경화 및 뇌졸중 등의 성인병의 원인이 되고 세포 기능 저하를 통해 염증 반응을 유발시킨다고 보고되어 진다²⁴⁾. 아질산염 소거능 결과, 짚레나무, 뱀딸기, 머위는 각각 119.87±1.62, 122.58±2.17, 139.01±3.88 µg/mL의 IC₅₀

Table 2. IC₅₀ values of DPPH, ABTS, NaNO₂, hydrogen peroxide radical scavenging activity and O.D. value (700 nm) of reducing power activity of Korean native forest plants

No.	DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)	NaNO ₂ (µg/mL)	Hydrogen peroxide (µg/mL)	Reducing power		
					50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
1	95.02±3.95 ^{de1)}	70.38±0.86 ^d	139.01±3.88 ^d	125.90±6.54 ^d	0.22±0.01 ^{kl}	0.33±0.00 ^{hi}	0.76±0.07 ^b
2	104.64±1.88 ^d	73.47±4.32 ^d	122.58±2.17 ^d	431.67±20.35 ^a	0.18±0.00 ^{mn}	0.31±0.00 ⁱ	0.53±0.00 ^e
3	99.73±4.71 ^{de}	51.72±1.36 ^e	119.87±1.62 ^d	232.11±10.44 ^b	0.25±0.00 ^j	0.41±0.01 ^f	0.74±0.03 ^b
4	160.79±4.38 ^a	123.12±1.11 ^a	171.87±1.46 ^e	194.10±4.13 ^c	0.15±0.00 ^o	0.24±0.01 ^{jk}	0.41±0.01 ^f
5	91.35±4.34 ^e	113.57±10.32 ^{ab}	375.36±12.12 ^b	125.11±2.04 ^d	0.17±0.00 ^{no}	0.37±0.00 ^e	0.70±0.00 ^c
6	103.21±9.66 ^d	105.67±7.20 ^{bc}	363.48±5.98 ^b	80.02±3.25 ^f	0.26±0.01 ⁱ	0.57±0.00 ^d	1.16±0.00 ^a
7	132.46±4.67 ^b	105.99±3.80 ^{bc}	392.13±17.18 ^b	105.16±4.69 ^e	0.11±0.00 ^p	0.19±0.00 ^{mn}	0.35±0.02 ^{gh}
8	53.24±2.42 ^f	46.99±3.23 ^e	366.70±28.58 ^b	65.73±4.48 ^f	0.20±0.00 ^{lm}	0.41±0.00 ^f	0.71±0.01 ^c
9	119.98±5.11 ^c	100.81±1.96 ^c	545.13±13.55 ^a	128.70±5.92 ^d	0.10±0.00 ^p	0.18±0.00 ^{mn}	0.34±0.00 ^h

¹⁾Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

값으로 가장 높은 활성을 나타내었고, 다래는 545.13±13.55 µg/mL의 IC₅₀ 값으로 가장 낮은 활성을 나타내었다. 이는 Yeo 등²⁵⁾이 연구한 쥘레나무의 열수 및 에탄올 추출물의 10 µg/mL 농도에서 47.09%, 48.02%의 NO 소거능보다 낮은 활성임을 확인하였다. Hydrogen peroxide 소거능 측정 결과, 이질풀, 가중나무가 각각 65.73±4.48, 80.02±3.25 µg/mL의 IC₅₀ 값으로 가장 높은 활성을 나타내었고, 뱀딸기가 431.67±20.35 µg/mL의 IC₅₀ 값으로 가장 낮은 활성을 나타내었다. Ferric-ferricyanide (Fe³⁺)의 ferrous (Fe²⁺)로 환원능을 시험하는 reducing power activity는 700 nm의 흡광도 값으로 결과 값을 제시하였다. 9종 추출물에서 모두 농도 의존적으로 환원력이 증가되었으며, 가중나무, 머위 및 쥘레나무, 이질풀 및 말오줌때 순으로 우수한 환원력을 지닌 것을 확인하였다. 따라서 상기의 항산화 실험들의 결과를 종합해 보았을 때, 아질산염 소거능 측정 실험을 제외한 모든 실험에서 이질풀이 9종의 식물 자원 중 항산화 활성이 가장 뛰어난 자원임을 확인하였다. 또한 모든 항산화 실험은 하나의 메커니즘으로 작용되지 않기 때문에 실험 별 샘플의 다양한 경향이 나타난 것으로 사료된다²⁶⁾.

총 폴리페놀, 플라보노이드 및 프로안토시아닌 함량 측정

다양한 생리활성을 지닌 식물 자원 9종의 phytochemical 항산화 성분을 분석하기 위해 총 폴리페놀, 플라보노이드, 프로안토시아닌 함량을 측정하여 Table 3에 나타내었다. 총 9종의 식물 추출물 중에서 이질풀이 303.94±0.63 mg GAE/g으로 가장 높은 총 폴리페놀 함량을 지닌 것을 확인하였다. 또한 이질풀의 폴리페놀 성분 분석을 실시한 선행연구에 따르면 이질풀은 폴리페놀 중 탄닌 성분이 주로 함유되어 있음이 확인되었고, 그 중 풍부한 geraniin 화합물의 우수한 항산화력은 여러 연구에 의해 널리 입증되

어졌다^{27,28)}. 따라서 이는 본 연구에서 실시한 국내 식물 자원 9종 중 이질풀의 DPPH, ABTS, hydrogen peroxide 라디칼의 우수한 소거능의 결과로 귀결된다고 사료된다. 이질풀에 이어서 가중나무(245.78±2.51 mg GAE/g), 쥘레나무(183.01±1.96 mg GAE/g), 까마귀머루(175.04±2.07 mg GAE/g) 역시 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내었으며, 까치밥나무는 40.59±0.32 mg GAE/g으로 총 폴리페놀 함량이 가장 낮은 것을 확인하였다. 그 외 나머지 식물 추출물에서는 123.95-163.21 mg GAE/g로 유사한 총 폴리페놀 함량을 나타내었다. 이는 제주 자생식물 54종의 항산화 성분을 분석한 Hyun 등⁷⁾의 연구 결과(36.4-287.9 mg GAE/g)와 유사한 것을 확인하였다. 한편, 플라보노이드의 함량 측정 결과, 쥘레나무가 24.32±0.22 mg QE/g으로 가장 높은 총 플라보노이드를 함유한 것을 나타내었다. LC-MS를 통해 쥘레나무의 생리활성 성분을 분석한 Pang 등²⁹⁾의 연구에 따르면, 쥘레나무에 함유되어 있는 플라보노이드 성분은 대표적으로 rutin, quercetin, kaempferol, lysionotin, oleanolic acid 등으로 분석되었으며, 이들은 항산화, 항염증 등의 효능으로 널리 알려져 있다. 또한 까마귀머루, 까치밥나무, 머위가 이어서 각각 20.88±0.96 mg QE/g, 19.01±0.86 mg QE/g, 13.13±0.77 mg QE/g으로 다른 식물 추출물에 비해 높은 총 플라보노이드 함량을 지닌 것으로 나타내었다. 프로안토시아닌 함량을 측정한 결과, 까마귀머루가 279.00±4.58 mg CE/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 다래(156.33±6.33 mg CE/g), 까치밥나무(127.78±8.88 mg CE/g), 쥘레나무(85.67±4.91 mg CE/g)가 다른 식물 추출물에 비해 높은 총 프로안토시아닌 함량을 지닌 것으로 나타내었다. 머루는 다른 산림자원 보다 프로안토시아닌이 풍부한 자원으로 널리 알려져 있으며, Lee 등³⁰⁾의 머루 분획물의 카테킨 성분을 분석한 연구 결

Table 3. Total phenolic, total flavonoid and total proanthocyanidin contents of Korean native forest plants

No.	TP (mg GAE/g) ¹⁾	TF (mg QE/g)	TA (mg CE/g)
1	138.45±7.92 ²⁾	13.13±0.77 ^d	43.33±7.51 ^e
2	123.95±2.85 ^g	11.44±0.42 ^e	24.56±4.02 ^f
3	183.01±1.96 ^c	24.32±0.22 ^a	85.67±4.91 ^d
4	40.59±0.32 ^h	19.01±0.86 ^c	127.78±8.88 ^c
5	163.21±1.05 ^e	8.67±0.28 ^f	N.D. ³⁾
6	245.78±2.51 ^b	12.74±1.51 ^{de}	2.44±1.26 ^g
7	175.04±2.07 ^d	20.88±0.96 ^b	279.00±4.58 ^a
8	303.94±0.63 ^a	9.40±0.58 ^f	4.11±2.41 ^g
9	135.73±1.69 ^f	12.27±0.37 ^{de}	156.33±6.33 ^b

¹⁾TP; total phenolic contents, TF; total flavonoid contents, TA; total proanthocyanidin contents, GAE; gallic acid equivalent, QE; quercetin equivalent, CE; catechin equivalent.

²⁾Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

³⁾N.D. not detected.

과에 따르면, 머루는 86.00±6.74 g CE/100 g의 높은 함량과 우수한 DPPH 라디칼 소거능 및 높은 FRAP value을 지닌 것을 확인하였다. 반면, 말오줌때는 총 프로안토시아니딘이 검출되지 않았다. 이상의 결과를 종합해 보았을 때, 식물의 종에 따라 항산화 성분이 상이한 것으로 나타났으며 또한 자생환경(일조량, 강수량 등)에서도 영향을 받는 것으로 사료된다³¹⁾.

9종 산림 식물 추출물의 세포독성 평가

국내 산림식물 9종 추출물이 피부 섬유아세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 XTT assay를 이용하였다. XTT assay는 살아있는 세포 내 mitochondrial dehydrogenase 효소에 의한 XTT의 분열로 짙은 붉은색을 띠는 formazan이 생성되는 원리를 이용한 방법이다³²⁾. 피부 섬유아세포에 대한 국내 산림식물 9종 추출물의 세포독성 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 9종 식물 추출물은 50, 100 및 200 µg/mL의 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, 현미경 상의 어떠한 morphology의 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에서는, 국내 산림식물 9종 추출물의 피부 섬유아세포에 대한 항산화 활성을 측정하기 위하여 세포독성이 나타나지 않은 50, 100 및 200 µg/mL 농도로 실험을 진행하였다.

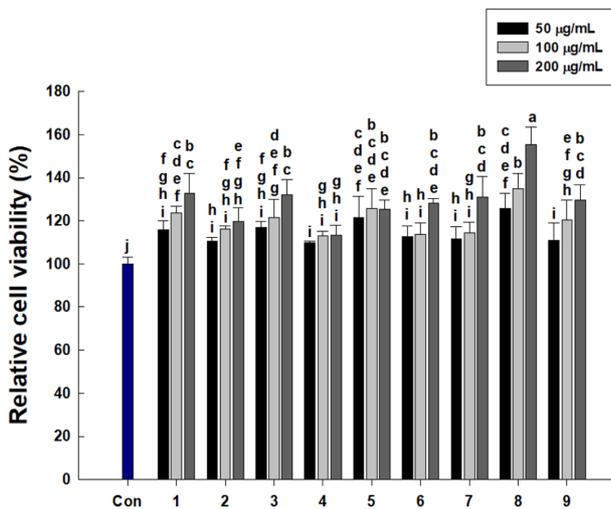


Fig. 1. Effects of Korean native forest plants on cell viability. Cell viability was measured by XTT assay. The exponentially growing cells were plated into 96-well plates at a density of 1×10^6 cells/well in DMEM/FBS medium and incubated for 24 h prior to treatment at 37°C in 5% CO₂. Cells were divided into a control group and treatment groups. Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p<0.05$ by Duncan’s multiple range test.

Hydrogen peroxide로 유도된 세포손상에 대한 추출물의 세포 보호효과

Hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유도한 피부 섬유아세포에 국내 산림식물 9종 추출물이 미치는 세포 보호효과는 XTT assay로 측정하였고, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 피부 섬유아세포에 1 mM hydrogen peroxide로 세포손상을 유도하였을 때, 음성대조군은 control에 비해 71% 정도로 세포 생존율이 감소한 반면, 9종 식물 추출물을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 농도 의존적으로 다시 증가되는 경향을 나타내었다. 머위, 뱀딸기, 짚레나무, 까치밥나무, 가중나무, 이질풀 추출물 200 µg/mL 농도에서 양성대조군으로 사용한 50 µM ascorbic acid의 96.02% 세포 생존율을 뛰어넘는 효능을 보였으며, 특히 이질풀, 가중나무에서 가장 우수한 세포 보호효과를 지닌 것으로 나타내었다. 이는 페놀성 화합물이 세포 보호효과에 영향을 미친다는 것과 유사한 결과로, 높은 함량의 페놀 화합물을 지닌 이질풀과 가중나무에서 보다 우수한 세포 보호효과를 나타낸 것으로 사료된다³³⁾.

H₂-DCFDA 염색을 통한 추출물의 세포내 항산화 효과

국내 산림식물 9종 추출물의 피부 섬유아세포 내 ROS 생성 억제 효과를 알아보기 위하여 H₂-DCFDA 염색을 통해 항산화력을 평가하였고, 그 결과는 Fig. 3과 같다. Hydrogen peroxide를 처리한 음성 대조군에서는 control에 비해 세포 내 ROS 발생량이 약 344% 증가한 반면, 9종

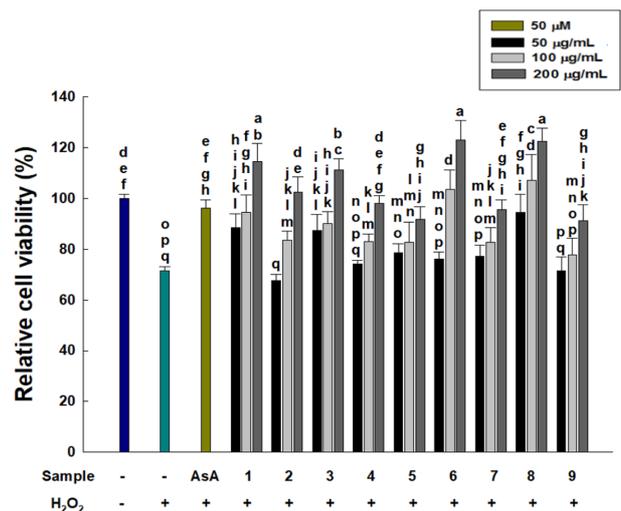


Fig. 2. Effects of Korean native forest plants on cell viability on H₂O₂-induced cell damage in human dermal fibroblasts (HDFs) cell system. HDFs were treated with 1 mM H₂O₂ and stained with XTT to show survival cells compared to non-treated group. Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p<0.05$ by Duncan’s multiple range test.

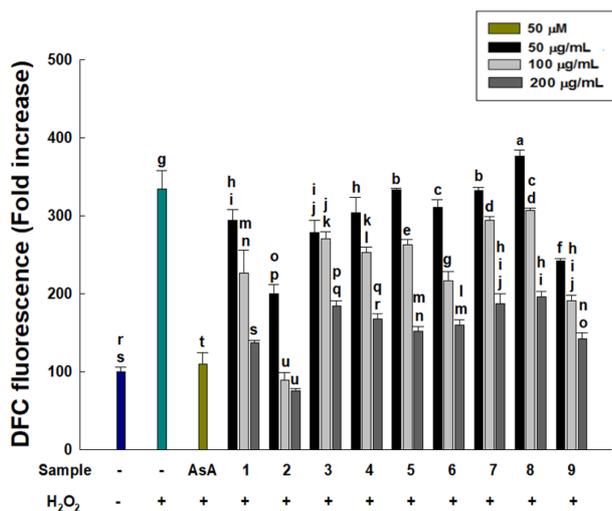


Fig. 3. Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in human dermal fibroblasts (HDFs) treated with Korean native forest plants or H₂O₂. The relative fold increase of detected ROS was measured. Intracellular ROS generation was measured using the H₂DCFDA method. Cells were exposed to plant extracts for 24 h, then 1 mM H₂O₂ for 2 h. Results are presented as the mean±SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

식물 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 세포 내 ROS 발생이 감소함을 나타내었다. 특히 뱀딸기 추출물의 경우, 100 및 200 μg/mL 농도에서 양성대조군으로 사용한 50 μM ascorbic acid 보다 더 높은 ROS 억제능을 지닌 것을 확인하였다.

Acknowledgement

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였으며(NIBR201628101, NIBR201726101), 2017년도 한국연구재단 지원(NRF-2017R1D1A3B06028469), 2018년 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(한국연구재단-2018-미래기초과학핵심 리더양성사업/글로벌박사양성사업).

국문요약

본 연구의 목적은 예부터 약재로 사용되며 식품원재료 데이터베이스에 등재되어 있는 국내 산림 자생식물 9종의 항산화 효능을 평가하여 기능성 식품원료로서의 기초자료를 제공하고자 하였다. 식물 9종의 잎, 줄기 및 잔가지 부위를 70% 에탄올을 사용하여 추출한 후, 항산화 활성(DPPH, ABTS, 아질산염, hydrogen peroxide 라디칼 소거능, reducing power activity)을 측정하였으며, 그 결과 이

질풀이 그 외 다른 식물 추출물보다 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였다. 또한 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 프로안토시아닌 분석을 통해 이들의 항산화 성분의 함량을 측정하고자 하였다. 폴리페놀 함량은 이질풀에 이어서 가중나무, 쫄레나무, 까마귀머루 순으로 많았으며, 플라보노이드 함량은 쫄레나무, 까마귀머루, 까치밥나무, 머위가 많이 함유하고 있음을 확인하였다. 프로안토시아닌 함량은 까마귀머루, 다래, 까치밥나무, 쫄레나무가 다른 식물 추출물에 비해 많은 함유량을 나타내어, 식물의 종에 따라 항산화 성분이 상이하게 존재하는 것을 확인하였다. 피부 섬유아세포를 이용하여 세포 독성을 평가한 결과, 9종의 식물 추출물 모두 50, 100 및 200 μg/mL 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 또한 hydrogen peroxide로 피부 섬유아세포에 산화적 스트레스를 유도한 상태에서 XTT assay와 H₂-DCFDA 염색을 통해 식물 추출물의 세포 생장을 및 세포 내 ROS 발생률을 측정된 결과, 이질풀을 포함한 9종의 식물 추출물에서 농도 의존적인 세포 보호 효과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 9종의 산림식물(머위, 뱀딸기, 쫄레나무, 까치밥나무, 말오줌때, 가중나무, 까마귀머루, 이질풀, 다래)은 추후 항산화에 도움을 주는 건강기능식품으로의 적용 및 항미백 효과로 인한 천연 화장품 소재로서 그 활용도가 넓을 것으로 예상된다. 특히 이질풀의 경우 본 연구를 바탕으로 하여 해당 작용기전 등을 탐구하는 심화 연구가 필요하다고 사료된다.

References

- Jang, Y.S., Jeong, J.M.: Effects of phyto-extract mixture on adiposity and serum lipid levels in obese mice induced by high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**, 1439-1445 (2010).
- Park, S.M., Choi, Y.M., Kim, Y.H., Ham, H.M., Jeong, H.S., Lee, J.S.: Antioxidant content and activity in methanolic extracts from colored barley. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**, 1043-1047 (2011).
- Kim, E.J., Choi, J.Y., Yu, M., Kim, M.Y., Lee, S., Lee, B.H.: Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**, 337-342 (2012).
- Cho, S.H., Choi, Y.J., Rho, C.W., Choi, C.Y., Kim, D.S., Cho, S.H.: Reactive oxygen species and cytotoxicity of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) Sap. *Korean J. Food Preserv.*, **15**, 105-110 (2008).
- Cha, B.C., Lee, E.H.: Antioxidant and antiinflammation activities of *Prunus persica* tree extracts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **12**, 289-294 (2004).
- Choi, S.I., Lee, S., Lee, H.J., Kim, B.J., Yeo, J., Jung, T.D., Cho, B.Y., Choi, S.H., Han, X., Sim, W.S., Lee, J.H., Lee, O.H., Lee, J.S.: Antioxidant and anti-aging effects of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. in human dermal

- fibroblast. *J. Agri. Life Environ. Sci.*, **29**, 185-192 (2017).
7. Hyun, S.H., Jung, S.K., Jwa, M.K., Song, C.K., Kim, J.H., Lim, S.: Screening of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in jeju island. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**, 200-208 (2007).
 8. Rim, Y.S., Park, Y.M., Park, M.S., Kim, K.Y., Kim, M.J., Choi, Y.H.: Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **8**, 342-350 (2000).
 9. Kang, M.A., Kim, M.B., Kim, J.H., Ko, Y.H., Lim, S.B.: Integral antioxidative capacity and antimicrobial activity of pressurized liquid extracts from 40 selected plant species. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**, 1249-1256 (2010).
 10. Cho, M.L., Lee, H.S., Kang, I.J., Won, M.H., You, S.G.: Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chem.*, **127**, 999-1006 (2011).
 11. Cho, M.L., Yoon, S.J., Kim, Y.B.: The nutritional composition and antioxidant activity from *Undariopsis peterseniana*. *Ocean Polar Res.*, **35**, 273-280 (2013).
 12. Lim, J.D., Cha, H., Choung, M., Choi, R., Choi, D., Youn, A.R.: Antioxidant activities of acidic ethanol extract and the anthocyanin rich fraction from *Aronia melanocarpa*. *Korean J. Food Cook. Sci.*, **30**, 573-578 (2014).
 13. Lee, S.J., Shin, J.H., Kang, M.J., Jung, W.J., Ryu, J.H., Kim, R.J., Sung, N.J.: Antioxidants activity of aged red garlic. *J. Life Sci.*, **20**, 775-781 (2010).
 14. Hyon, J.S., Kang, S.M., Han, S.W., Kang, M.C., Oh, M.C., Oh, C.K., Kim, D.W., Jeon, Y.J., Kim, S.H.: Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus grandis* Osbeck peel. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**, 1310-1316 (2009).
 15. Jo, Y.H., Park, J.W., Lee, J.M., Ahn, G.H., Park, H.R., Lee, S.C.: Antioxidant and anticancer activities of methanol extracts prepared from different parts of Jangseong daebong persimmon (*Diospyros kaki* cv. Hachiya). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**, 500-505 (2010).
 16. Shin, J.H., Choi, D.J., Lee, S.J., Cha, J.Y., Sung, N.J.: Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 965-971 (2008).
 17. Hwang, I.W., Lee, H.R., Kim, S.K., Zheng, H.Z., Choi, J.U., Lee, S.H., Lee, S.H., Chung, S.K.: Proanthocyanidin content and antioxidant characteristics of grape seeds. *Korean J. Food Preserv.*, **15**, 859-863 (2008).
 18. Choi, S.I., Lee, J.S., Lee, S., Lee, H.J., Kim, B.H., Yeo, J., Jung, T.D., Cho, B.Y., Choi, S.H., Lee, J.H., Kim, J.Y., Lee, O.H.: Antioxidant and anti-aging effects of extracts from leaves of *Castanea crenata* Siebold & Zucc. in human dermal fibroblast. *J. Food Hyg. Saf.*, **32**, 243-248 (2017).
 19. Kim, O.K., Ho, J.B., Nam, D.E., Jun, W., Hwang, K.T., Kang, J.E., Chae, O.S., Lee, J.: Hepatoprotective effect of *Curdrania tricuspidata* extracts against oxidative damage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 7-13 (2012).
 20. Choi, S.I., Lee, J.S., Lee, S., Yeo, J., Jung, T.D., Cho, B.Y., Choi, S.H., Sim, W.S., Han, X., Lee, J.H., Kim, J.D., Lee, O.H.: Antioxidant and anti-aging effects of extracts from leaves of the *Quercus aliena blume* on human dermal fibroblast. *J. Food Hyg. Saf.*, **33**, 140-145 (2018).
 21. Sim, W.S., Choi, S.I., Jung, T.D., Cho, B.Y., Choi, S.H., Han, X., Lee, J.H., Seo, Y.R., Kim, H.B., Lim, K.T., Lee, O.H.: β -glucan content and antioxidant activity of mixed extract from *Sarcodon aspratus* and rice bran. *J. Food Hyg. Saf.*, **33**, 200-206 (2018).
 22. Sung, H.M., Seo, Y.S., Yang, E.J.: Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract obtained from *Geranium thunbergii* using different extraction temperatures and times. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **47**, 1006-1013 (2018).
 23. Jee, S.O.: Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Korea J. Plant Res.*, **22**, 145-151 (2009).
 24. Lee, J.W., Do, J.H., Shin, K.H.: Antioxidant activity of the water soluble browning reaction products isolated from korean red ginseng 1. DPPH radical and hydrogen peroxide scavenging. *J. Ginseng Res.*, **23**, 176-181 (1999).
 25. Yeo, J.S., Chun, S.S., Choi, J.H.: Antioxidant activities of solvent extracts from *Rosa multiflora*. *J. Life Sci.*, **24**, 1217-1223 (2014).
 26. Choi, J.I., Kim, Y.J., Kim, J.H., Song, B.S., Yoon, Y., Byun, M.W., Kwon, J.H., Chun, S.S., Lee, J.W.: Antioxidant activities of the extract fractions from *Suaeda japonica*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**, 131-135 (2009).
 27. Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Ikeda, Y., Shingu, T., Inoue, T.: Constituents of *Geranium thunbergii* SIEB. et ZUCC. XIII. isolation of water-soluble tannins by centrifugal partition chromatography, and biomimetic synthesis of elaeocarpusin., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4075-4082 (1986).
 28. Lin, S.Y., Wang, C.C., Lu, Y.L., Wu, W.C., Hou, W.C.: Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 2485-2492 (2008).
 29. Pang, N., Malike, D., Liu, H.: Simultaneous determination of main bioactive components in *Rosa multiflora* Thunb. and their fragmentation study by LC-MS. *Chromatographia.*, **70**, 1253-1257 (2009).
 30. Lee, H.R., Bak, M.J., Jeong, W.S., Kim, Y.C., Chung, S.K.: Antioxidant properties of proanthocyanidin fraction isolated from wild grape (*Vitis amurensis*) seed. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **52**, 539-544 (2009).
 31. Cho, M.L., Lee, J.S., Lee, S., Son, Y.K., Bae, C.H., Yeo, J., Lee, H.S., Ma, J.G., Lee, O.H., Kim, J.Y.: Antioxidant activity of 11 species in korean native forest plants. *Korean J. Food Nutr.*, **28**, 1098-1106 (2015).
 32. Shin, H.J., Jin, J.H., Lee, K.G., Lee, C.H., Lee, S.R., Ha, K.T., Joo, M., Jeong, H.S.: Nrf-2 mediated antioxidative effect of korean and chinese safflower seeds. *Korean J. Orient Physiol Pathol.*, **27**, 745-751 (2013).
 33. Kim, D.B., Oh, J.W., Lee, J.S., Park, I.J., Cho, J.H., Lee, O.H.: Antioxidant activities of green and purple kohlrabi juices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **46**, 601-608 (2014).