

Antioxidant Effects of *Stewartia koreana* Nakai Leaves and Branch Extracts

Hye Soo Kim¹, Min Jeong Park¹, Soo Jeong Kim¹, Bu Kyung Kim¹, JunHo Park², DaeHyun Kim² and Soo Jeong Cho^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea

²Forest Research Department, Gyeongsangnam-do Forest Environment Research Institute, 386 Sumokwon-ro, Jinju 52615, Korea

Received November 28, 2020 / Revised December 18, 2020 / Accepted February 9, 2021

This study was carried out to evaluate the antioxidant properties of the dried leaves and branches of *Stewartia koreana* Nakai. The dried leaf and branch of *S. koreana* were extracted with 70% ethanol at 80°C. The antioxidant activities of ethanol extracts of *S. koreana* leaf (EESL) and *S. koreana* branch (EESB) were analyzed. The total polyphenol contents in EESL and EESB were 162.57±0.9 mg of GAEs/extract g and 59.1±0.9 mg of GAEs/extract g, respectively. The flavonoid contents in EESL and EESB were 59.1±0.9 mg of QEs/extract g and 4.7±0.1 mg of QEs/extract g, respectively. EESL showed a better scavenging ability with DPPH and ABTS than EESB, at 0.4 mg/ml. Moreover, EESL were more effective according to ORAC values than EESB. The toxicity of EESL was investigated using a WST-1 assay on the human skin fibroblast cell line CCD-986sk. Therefore, EESL can be used as a potential source of functional, naturally-sourced material in cosmetics as well as food.

Key words : Flavonoids content, ORAC value, radical scavenging ability, *Stewartia koreana* Nakai, total polyphenol content

서 론

‘항노화(anti-aging)’에 대한 관심이 증가하면서 화장품 시장은 단순한 미용 목적의 기능성 화장품에서 미용목적의 코스메틱(cosmetic)에 전문적인 치료 기능이 강조된 파마슈티컬(pharmaceutical)이 합쳐진 코스메슈티컬(cosmeceutical) 개념으로 빠르게 확장되고 있으며 이에 따라 항산화 및 항염증 효과가 있는 활성성분에 대한 관심도 증가하고 있다[37].

항노화는 나이가 들에 따라 나타나는 신체적, 정신적 기능의 퇴화적 변화인 노화를 방지하고 억제하여 노화를 최대한 지연시키는 것을 의미한다. 노화에는 주름살 증가, 탄력 감소, 피부 처짐 등의 현상이 동반되는데 이와같은 피부노화에는 내인성 인자에 의한 자연노화와 장기간의 자외선 노출로 인해 발생되는 광노화가 있다[20, 33]. 자외선은 세포 농도를 정상으로 유지하고 비타민 D 생성, 살균작용 등 인체에 유익한 작용을 하지만 자외선이 피부의 진피층에 도달하면 섬유아세포(fibroblast) 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 증가시켜 matrix-metalloproteinase (MMP)의 발현을 유도하고 결합조직인 collagen, elastin, glycosaminoglycan (GAG),

히알루론산 사슬을 절단하거나 비정상적인 교차결합을 유도하여 피부 주름을 유발하고 멜라닌 생성과정 등에 관여하여 피부노화를 가속화시킨다[13]. 또한 활성산소종에 의한 지질 과산화는 과산화된 라디칼이 혈액을 타고 이동하기 때문에 지질 과산화가 일어나는 부위뿐만 아니라 지질 과산화가 일어난 부위에서 멀리 떨어진 다른 부위의 지질 과산화도 유발할 수 있다. 이러한 산화반응은 고혈압, 동맥경화, 심부전, 류마티스관절염, 알레르기, 암, 뇌졸중, 파킨슨병, 치매 등과 같은 뇌 질환 및 골다공증의 원인이 되고 있다[30]. 이외에도 활성산소종은 아토피피부염, 여드름, 건선 등을 유발 또는 악화시키고 세포 내에서의 DNA 손상과 피부암 및 피부노화를 초래하는 염증(inflammatory)과 알러지 반응(allergic responses)에도 관여한다[14, 39]. 인체는 ascorbate peroxidase (APX), catalase, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) 등의 체내 항산화 효소를 이용하여 활성산소종과 자유라디칼의 연쇄반응을 제어하고 있지만 컨디션이나 나이에 따라 효소적 항산화 물질의 생성이 적어지거나 활성산소종이 과량으로 생성되면 항산화 방어체계가 불균형을 이루게 되어 각종 질환의 발생 및 노화가 촉진된다[1, 10, 11, 41]. 이와같은 활성산소종에 의한 손상을 억제하기 위해 사용되고 있는 항산화제에는 ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, tocopherol 등의 천연 항산화제와 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butyl hydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG) 등의 합성 항산화제가 있다[18]. 천연 항산화제는 인체에는 안전하지만 단독으로는 탁월한 효과를 나타내지 못한다는 단점이 있고 합성 항산화제는 뛰어난 항산화력과 저렴한 가격으로 경

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3397, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sjcho@gntech.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.

제성이 높아 널리 사용되고 있으나 다량 섭취 시 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 부작용이 나타날 수 있다[4, 18]. 최근 들어 이와같은 합성 항산화제의 부작용이 알려지면서 안정성이 확보된 천연물 유래 항산화제에 대한 관심과 수요가 증가하여 천연 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[8, 41].

노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)는 차나무과(Theaceae)의 낙엽교목으로 주로 지리산 권역에 자생하고 있는 우리나라 고유수종이다. 한방에서는 노각나무 수피와 근피를 모란이라고 부르며 서근활혈의 효능이 있어 타박상으로 인한 어혈, 근육 이완, 풍습성으로 인한 사지마비와 동통 등의 치료에 사용하였고 민간에서는 노각나무 열매를 곱판, 이노 약으로 사용하였다[2]. 노각나무의 가지과 잎에서는 dihydrochalcone, flavonoids, hyperin, lignin, phenolic compound, phenylpropanoid, spinasterol glycoside, sterols 등의 화합물이 분리되었으며[2], 노각나무의 피부미백[36], 항염증[17], 염증성 골 손실 방지[31], 과골세포 형성 및 분화 억제[31], 혈관 신생[25], 상처 치유[26] 등에 관한 생리활성 연구가 보고되었으나 노각나무 부위별 항산화 효과에 관한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 노각나무 잎과 가지의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), 세포독성 등을 비교분석하여 천연물 유래 기능성 화장품이나 식의약품 소재로서 노각나무의 부위별 이용 가능성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

노각나무 추출물의 제조

본 실험에 사용한 노각나무 잎과 가지는 (주) 농협회사법인 모리(경상남도 거창군 소재)에서 제공받아 사용하였다. 분쇄한 노각나무의 잎과 가지는 건조한 다음 분쇄하여 각각 5배 (v/v)의 70% 에탄올에 침지한 후 80°C에서 2시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출물은 whatman filter paper (No. 2)로 여과한 후 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 완전히 제거한 다음 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)에 용해하여 사용하였다. 노각나무 잎과 가지 조추출물의 추출수율은 18.9%, 10.6% 였다. 대조구로 사용한 녹차 잎 추출물도 노각나무와 동일한 조건으로 추출하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

노각나무 잎과 가지 추출물의 총 폴리페놀 함량은 folin-ciocalteu reagent가 추출물에 의해 환원되면 몰리브덴이 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Singleton 등[27]의 방법에 준하여 측정한다. 다음 gallic acid (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 작성한 검량선을 이용하여 구하였다. 노각나무 잎과 가지 추출물 100 µl에 2% sodium

carbonate (Na₂CO₃) 용액(Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 2 ml를 첨가한 다음 3분 동안 방치한 후 0.2 N folin-ciocalteu reagent (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 100 µl를 첨가하였다. 혼합액은 상온에서 30분 동안 반응시킨 다음 microplate reader (Molecular devices, SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조구로 사용된 녹차(하동 녹차) 잎은 화개농협에서 구입하여 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

노각나무 잎과 가지 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 짙은 보라색을 띠는 안정한 라디칼인 DPPH가 항산화물질의 전자공여능에 의해 수소 혹은 전자를 받아 탈색되는 원리를 이용한 Blois 등[3]의 방법에 준하여 확인하였다. 노각나무 잎과 가지 추출물 50 µl에 0.15 mM DPPH 용액(Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 µl를 첨가한 후 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 microplate reader (Molecular devices, SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조구로는 L(+)-ascorbic acid (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 DPPH 라디칼 소거 활성은 시료첨가구와 대조구의 흡광도 차이를 백분율로 환산하여 확인하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성(\%)} = (\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}) / \text{대조구 흡광도} \times 100$$

ABTS 라디칼 소거 활성

노각나무 잎과 가지 추출물의 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 라디칼 소거 활성은 청록색을 띠는 ABTS⁺ 라디칼이 항산화물질의 전자공여능에 의해 수소 혹은 전자를 받아 탈색되는 원리를 이용한 Re 등[35]의 방법에 준하여 확인하였다. 노각나무 잎과 가지 추출물 100 µl에 ABTS 용액(Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 900 µl를 첨가한 후 microplate reader (Molecular devices, SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조구로는 L(+)-ascorbic acid (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 ABTS 라디칼 소거 활성은 시료첨가구와 대조구의 흡광도 차이를 백분율로 환산하여 확인하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거 활성(\%)} = (\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}) / \text{대조구 흡광도} \times 100$$

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

노각나무 잎과 가지 추출물의 peroxy 라디칼 소거능을 나타내는 oxygen radical absorbance capacity (ORAC)는 per-

oxyl 라디칼의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율을 측정하는 Cao 등[5]의 방법에 준하여 확인하였고 ORAC 지수는 trolox (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 작성한 검량선을 이용하여 구하였다.

노각나무 잎과 가지 추출물 10 μ l에 300 mM 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH, Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 20 μ l와 250 nM fluorescein (Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 2.7 ml를 첨가한 다음 microplate reader (Molecular devices, SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 485 nm (excitation wavelength)와 535 nm (emission wavelength)에서 1시간 동안 2분마다 형광을 측정하였다.

WST-1 assay를 이용한 세포독성 측정

노각나무 잎과 가지 추출물의 세포 독성은 WST (water soluble tetrazolium salt)-1 assay를 이용하여 추출물이 섬유아 세포 CCD-986sk의 세포생존율에 미치는 영향으로 확인하였다[9]. 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB 10092)으로부터 분양받은 섬유아세포 CCD-986sk은 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Rockville, MD, USA)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco, Rockville, MD, USA)이 첨가된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, Rockville, Md, USA) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 2일 동안 배양하였다. 배양된 섬유아세포 CCD-986sk는 24-well plate에 10⁵-10⁶ cells/well로 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양한 후 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 다시 배양하였다. 각 well에 WST-1 용액(TAKARA Bio Inc., Shiga, Japan) 50 μ l를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 다음 microplate reader (Molecular devices, SpectraMax M5, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 5회 이상 반복실험을 수행하였으며 실험결과와 평균값과 표준오차는 SAS (Statistical analysis system, USA)로 구하였고 통계적 유의성은 Duncan's 다중검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

노각나무 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀 화합물은 식물에 존재하는 파이토케미칼(phytochemical) 중에서 식물의 광합성에 따라 생성되는 식물 내 페놀성 수산기(-OH)를 가진 화합물을 총칭한다. 폴리페놀 화합물은 식물이 광합성 과정 중 활성산소종, 상처, 초식 동물의 공격 등 스트레스를 받을 때 자신을 보호하기 위해 생산하는

2차 대사산물로서 다수의 수산기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 거대 분자들과 쉽게 결합하는 특징이 있다. 따라서 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀 화합물은 항균 활성, 항산화 활성, 항암 효과, 노화 지연, 성인병 예방 등 다양한 생리활성을 나타내며 폴리페놀 화합물의 함량은 항산화 활성의 간접적인 지표로 사용되고 있다[7, 40]. 폴리페놀 화합물은 일반적으로 플라보노이드(flavonoids)와 비플라보노이드(non-flavonoids) 화합물로 분류되며 대표적인 플라보노이드 화합물에는 안토시아닌, 카테킨, 플라보논, 플라본, 이소플라본 등이 있고 대표적인 비플라보노이드 화합물에는 포도, 딸기, 블루베리, 라즈베리, 체리, 석류 등에 존재하는 엘라그산(ellagic acid)이 있다. Flavone 구조를 기본 골격으로 가진 플라보노이드는 식물의 꽃, 잎, 줄기, 열매 등에 많이 함유되어 있으며 금속이온과 결합할 수 있고 superoxide anion, 산소원자, 지질과산화 라디칼 등을 제거하는 항산화 활성이 있다[16, 19].

노각나무 잎과 가지의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 gallic acid equivalents (GAEs)으로 나타내었으며 플라보노이드 함량은 quercetin를 표준물질로 하여 quercetin equivalents (QEs)로 나타내었다(Fig. 1). 노각나무 잎과 가지 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 162.57 \pm 0.9 mg GAEs/extract g과 53.18 \pm 0.2 mg GAEs/extract g으로 노각나무 가지에 비해 잎의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났고 노각나무 잎과 가지 추출물의 플라보노이드 함량도 노각나무 가지 (4.7 \pm 0.1 mg QEs/extract g)에 비해 잎(59.1 \pm 0.9 mg QEs/extract g)에서 높게 나타났다. 또한 대조구로 사용한 녹차 잎 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 170.22 \pm 0.5 mg GAEs/extract g과 70 \pm 0.31 mg GAEs/extract g이었다.

약용식물 추출물에 함유된 폴리페놀 함량을 측정된 Moon 등[28]의 보고에 의하면 애엽 및 측백 등에는 4.41-8.55 mg/g의 폴리페놀이 함유되어 있는데 노각나무 잎에는 59.1 \pm 0.9 mg GAEs/extract g의 폴리페놀이 함유되어 있으므로 애엽 및 측백 등의 약용식물 추출물에 비해 노각나무 잎 추출물에는 약 19-36배 정도 많은 폴리페놀이 함유되어 있다. 또한, 노각나무 잎 추출물의 플라보노이드 함량과 약용식물 및 기능성 식품 원료로 많이 사용되고 있는 당귀(11.06 GAEs/extract g), 상백피(10.30 GAEs/extract g), 홍삼(13.20 GAEs/extract g) 등의 플라보노이드 함량을 비교해보면 노각나무 잎 추출물에는 당귀, 상백피, 홍삼보다 약 4.5-5.7배 정도 많은 플라보노이드가 함유되어 있다[12].

노각나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

노각나무 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 확인하였으며 Fig. 2와 같다. DPPH 라디칼 소거 활성을 이용하여 항산화 활성은 측정하는 방법은 짙은 자색을 띠고 있는 비교적 안정한 화합물인 DPPH가 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등과 같은 항산화 물질로부터

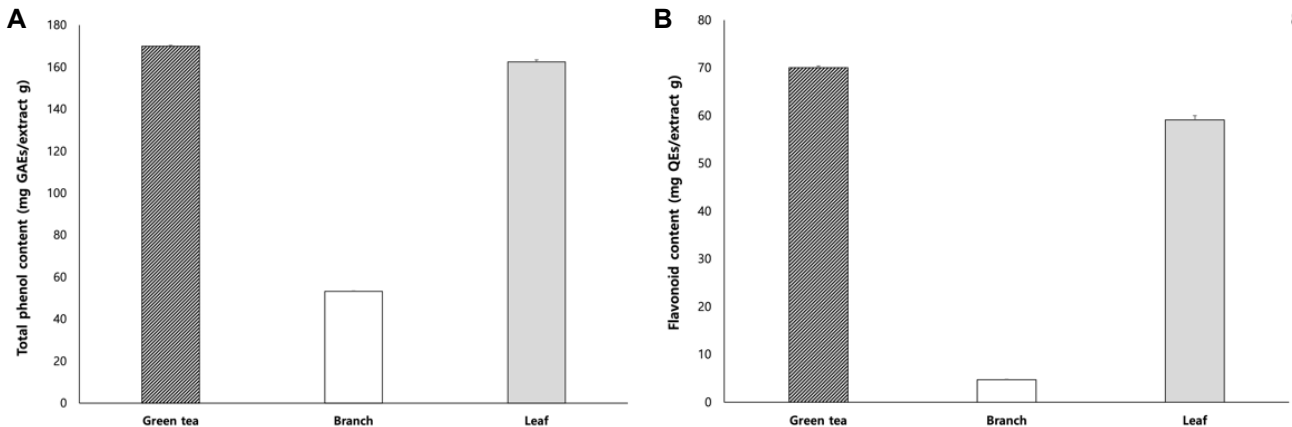


Fig. 1. Total contents of polyphenol (A) and flavonoid (B) of ethanol extracts from leaves and branch of *S. koreana*. Values are expressed as mean \pm SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

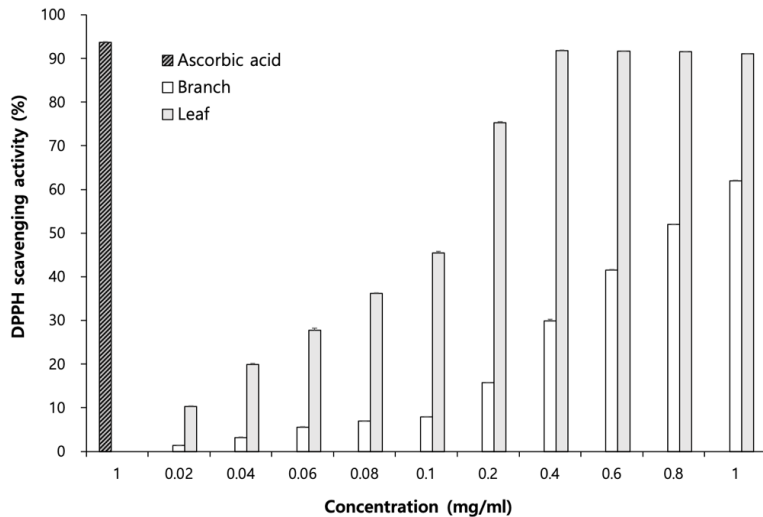


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from leaves and branch of *S. koreana*. Values are expressed as mean \pm SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

전자나 수소를 제공받아 환원되면 DPPH의 자색이 탈색되는 원리를 이용한 방법으로 환원력이 클수록 항산화 활성이 높다 [24]. 항산화 물질은 자유라디칼에 전자를 공여하여 라디칼의 공유결합을 증가시키는 전자공여능이 높을수록 인체 내에서 활성산소종에 의한 노화를 효과적으로 억제할 수 있다[6]. 노각나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 잎과 가지 모두 농도의존적으로 증가하였으며 가지보다는 잎의 DPPH 라디칼 소거능이 높게 나타났다. 노각나무 추출물 0.4 mg/ml의 농도에서 잎과 가지의 DPPH 라디칼 소거능은 각각 91.85 \pm 0.01%, 29.93 \pm 0.2%였으며 노각나무 잎 추출물은 양성대조구로 사용한 ascorbic acid (1 mg/ml, 93.71 \pm 0.1%) 보다 낮은 농도에서 ascorbic acid와 유사한 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다 (Fig. 2). Park 등[32]은 국내산 생약 추출물의 항산화활성에 관한 연구에서 작약의 DPPH 라디칼 소거능은 0.3 mg/ml의 농도에서 86.8%, 목단은 80.4%, 오미자는 85.7%였다고 보고하였으며 이 연구결과와 비교하면 노각나무 잎의 DPPH 라디칼

소거능은 작약, 목단, 오미자 등의 DPPH 라디칼 소거능과 비슷하거나 약간 높은 것으로 나타났다. Kang [15] 등의 보고에 의하면 전자공여능은 phenolic acid와 플라보노이드 및 기타 페놀성 화합물에 대한 항산화 작용의 지표이며 환원력이 클수록 전자공여능이 높다.

노각나무 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS 라디칼 소거 활성은 DPPH 라디칼 소거능과 함께 항산화 활성을 확인하기 위해 많이 이용되는 방법이지만 ABTS는 양이온 라디칼을, DPPH는 음이온 라디칼을 생성하는 차이가 있어서 이 두가지 방법은 기질과 반응물질의 결합 정도가 다르고 측정 결과가 상이할 수도 있다. ABTS는 비교적 안정한 free radical로써 ABTS 라디칼을 억제하거나 소거하는 것으로 항산화 활성을 평가하며 hydrogen donating antioxidants (수소공여 항산화제)와 chain breaking antioxidants (연쇄절단 항산화제)의 항산화 활성 측정이 가능하다[23]. 노각나무 추출물

의 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 노각나무 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 잎과 가지 모두 농도의존적으로 증가하였으며 가지보다는 잎의 ABTS 라디칼 소거능이 높게 나타났다. 0.4 mg/ml의 농도에서 노각나무 추출물 잎과 가지의 ABTS 라디칼 소거능은 각각 94.77±0.34%, 44.92±0.79%였다. 산양삼 추출물의 항산화 효과에 관한 Kim과 Son [21]의 연구에 의하면 산양삼 추출물은 1 mg/ml의 농도에서 86% 이상의 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내었으며 이 연구결과와 비교했을 때 노각나무 잎 추출물은 산양삼 추출물보다 ABTS 라디칼 소거 활성이 우수한 것으로 나타났다. 양성 대조구인 ascorbic acid는 1 mg/ml의 농도에서 90.09±0.01%의 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 일반적으로 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성은 친수성 물질과 소수성 물질 모두에 적용 가능하기 때문에 DPPH 음이온 라디칼 소거능보다는 높은 활성을 나타낸다[34].

노각나무 추출물의 oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

ORAC 지수는 항산화 물질의 total antioxidant capacity를 나타내는 지표로써 AAPH에 의한 peroxy radical의 생성과 소멸에 따른 형광물질의 감소율을 측정하여 평가한다. 또한, ORAC 지수는 radical chain reaction의 수소 전자 전달과 연관된 hydrophilic 성분과 hydrophobic 성분에 모두 반응하기 때문에 감도가 우수하며 응용범위가 넓다는 장점이 있다[29].

노각나무 잎과 가지의 ORAC 지수는 trolox equivalents (TEs)로 구하였으며 Fig. 4와 같다. 노각나무 잎과 가지의 ORAC 지수는 각각 104.13±0.48 µM TEs/extract g과 57.36±0.35 µM TEs/extract g이었고 가지보다는 잎의 ORAC 지수가 더 높게 나타났다. 클로렐라 추출물의 항산화 활성에 관한 Lee [22] 등의 보고에 의하면 클로렐라 물 추출물의 ORAC 지수는 62.39±7.15 µM TEs/extract g였다. 클로렐라 물 추출물의 ORAC 지수와 비교했을 때 노각나무 잎 추출물의 ORAC 지수는약 1.7

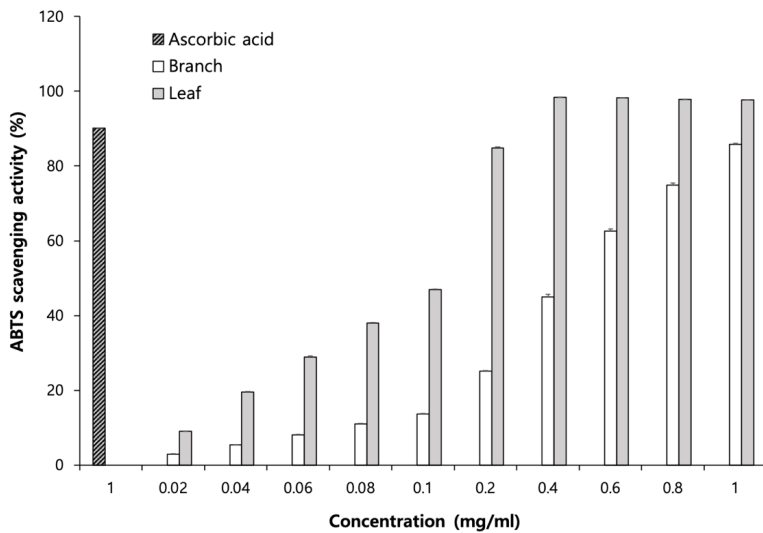


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of ethanol extracts from leaves and branch of *S. koreana*. Values are expressed as mean ± SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

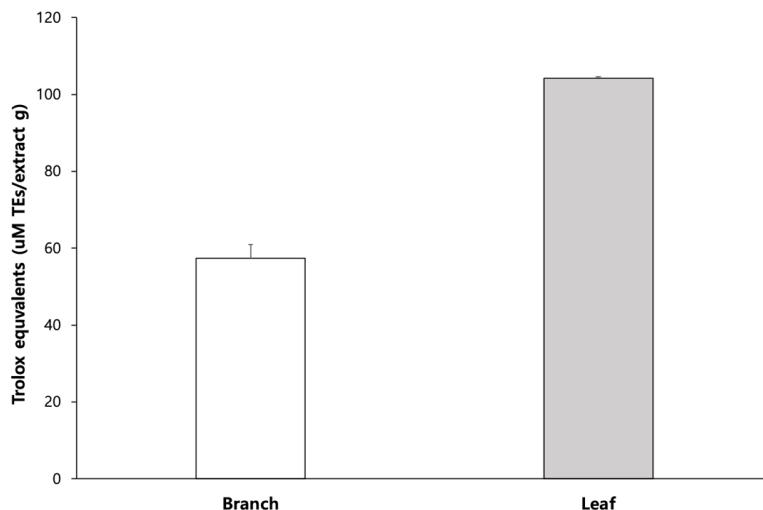


Fig. 4. Oxygen radical absorbance capacity of ethanol extracts from leaves and branch of *S. koreana*. Values are expressed as mean ± SD (n=5), values with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

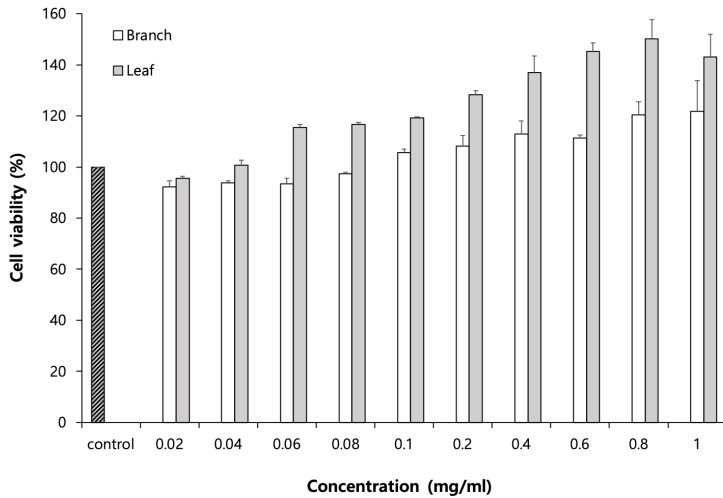


Fig. 5. Effects of ethanol extracts from leaves and branch of *S. koreana* on cell proliferation in human skin fibroblast cell line CCD- 986sk. The CCD-986sk cell was incubated for 24 hr in DMEM media with different concentration of ethanol extracts from leaf and branch of *S. koreana*. The cell proliferation was determined using WST-1 assay. Values are expressed as mean \pm SD (n=5), Values with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

배 정도 높게 나타났다. 노각나무 가지 추출물에 비해 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, ORAC 지수 등이 높은 이유는 노각나무 가지에 비해 잎의 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높기 때문으로 판단되며 항산화 활성의 지표인 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높고 환원력이 높은 노각나무 잎 추출물은 항산화 활성이 우수한 기능성 식의약품 소재나 화장품 소재로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

노각나무 추출물이 섬유아세포 CCD-986sk의 세포생존율에 미치는 영향

섬유아세포 CCD-986sk에 대한 노각나무 추출물의 세포 독성은 CCD-986sk에 추출물을 처리한 다음 WST-1 assay를 이용하여 확인하였다. 세포의 증식능력이나 세포생존력을 정량하는 대표적인 실험방법 중 하나인 WST-1 assay는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소 효소에 의해 엷은 붉은색의 수용성 기질인 water soluble tetrazolium salts가 짙은 붉은색의 formazan으로 변환되는 성질을 이용하는 검사법으로 흡광도는 살아있는 세포 수에 비례한다[38]. 섬유아세포 CCD-986sk에 노각나무 잎과 가지 추출물을 각각 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/ml의 농도로 처리한 다음 WST-1 assay에 의한 세포생존율을 조사한 결과, 노각나무 잎과 가지 추출물 처리구의 모든 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 노각나무 추출물은 세포독성은 나타나지 않는 것으로 판단되며 높은 농도의 노각나무 잎과 줄기 추출물 처리구에서는 세포생존율이 100% 이상을 나타내어 세포 증식이 촉진되는 것으로 판단된다. 노각나무 추출물에 의한 CCD-986sk세포의 증식 촉진효과에 관해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2020년 경상남도 노각나무 유래 식의약품소재

개발 및 산업화 연구 용역 사업 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Aitken, R. J., Buckingham, D. and Harkiss, D. 1993. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 441-450.
- Bae, J. J. and Kwak, J. H. 2015. Phenolic compounds from the twigs of *Stewartia pseudocamellia*. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**, 303-308.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63.
- Cao, G., Alessio, H. M. and Cutler, R. G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 303-311.
- Cha, J. Y. 2009. Functional components and biological activities of marketing black garlic. MS Thesis. Gyeongsang National University.
- Chen, H. Y., Lin, Y. C. and Yen, G. C. 2007. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chem.* **101**, 686-694.
- Duh, P. D., Tu, Y. Y. and Yen, G. C. 1999. Antioxidant activity of water extract of Hwang jyu (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT-Food Sci. Technol.* **32**, 269-277.
- Francoeur, A. M. and Assalian, A. 1996. Microcat: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1.

- Biochemica* **3**, 19-25.
10. Guk, M. H., Kim, D. H., Lee, C., Jeong, E. S., Choi, E. J., Lee, J. S. and Lee, T. S. 2013. Antioxidant and skin whitening effects of *Inonotus obliquus* methanol extract. *J. Mushroom Sci. Prod.* **11**, 99-106.
 11. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
 12. Jeong, H. J., Lee, S. G., Lee, E. J., Park, W. D., Kim, J. B. and Kim, H. J. 2010. Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbal extracts according to extraction methods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 571-577.
 13. Kammeyer, A. and Luiten, R. M. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**, 16-29.
 14. Kang, Y. H., Park, Y. K. and Lee, G. D. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenol compounds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 232-239.
 15. Khalid, O. A. 2009. Oxidant/antioxidant status in obese adolescent females with Acne vulgaris. *Indian J. Dermatol.* **54**, 36-40.
 16. Kim, D. J., Oh, S. K., Yoon, M. R., Chun, A. R., Hong, H. C., Lee, J. S. and Kim, Y. K. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the 70% ethanol extracts from brown and milled rice by cultivar. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 467-473.
 17. Kim, M. H., Jang, J. H., Oh, M. H., Heo, J. H. and Lee, M. W. 2014. The comparison of DPPH-scavenging capacity and anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the stems of *Stewartia koreana* Nakai. *Nat. Prod. Res.* **28**, 1409-1412.
 18. Kim, S. C., Kwon, H. S., Kim, C. H., Kim, H. S., Lee, C. Y. and Cho, S. J. 2016. Comparison of antioxidant activities of pileus and stipe from White Beech Mushroom (*Hypsizygos marmoratus*). *J. Life Sci.* **26**, 928-935.
 19. Kim, S. C., Ryu, H. M., Jung, S. M., Lee, Y. H., Kim, H. S., Kim, J. O., Cho, Y. U. and Cho, S. J. 2013. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of *Hypsizygos marmoratus* (brown cultivar) methanol extracts. *J. Mushroom Sci. Prod.* **11**, 254-260.
 20. Kim, Y. J., Lee, Y. R., Cheon, J. W. and Lee, H. S. 2010. Anti-aging effect of *Ligustrum japonicum* extract in the human fibroblast cells. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* **36**, 295-301.
 21. Kim, Y. J. and Son, D. Y. 2012. Antioxidant and inhibitory effects of Korean *Panax ginseng* extract on pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1371-1377.
 22. Lee, D. H. and Hong, J. H. 2015. Antioxidant activities of chlorella extracts and physicochemical characteristics of spray-dried chlorella powders. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 591-597.
 23. Lee, S., You, Y., Kim, K., Park, J., Jeong, C., Jhon, D. Y. and Jun, W. 2012. Antioxidant activities of native Gwangyang *Rubus coreanus* Miq. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 327-332.
 24. Lee, S. Y., Choi, H. D., Yu, S. N., Kim, S. H., Park, S. K. and Ahn, S. C. 2015. Biological activities of *Mesembryanthemum crystallinum* (Ice plant) extract. *J. Life Sci.* **25**, 638-645.
 25. Lee, T. H., Lee, G. W., Kim, C. W., Bang, M. H., Baek, N. I., Kim, S. H., Chung, D. K. and Kim, J. 2010. *Stewartia koreana* extract stimulates proliferation and migration of human endothelial cells and induces neovascularization *in vivo*. *Phytother. Res.* **24**, 20-25.
 26. Lee, T. H., Lee, G. W., Park, K. H., Mohamed, M. A., Bang, M. H., Baek, Y. S., Son, Y., Chung, D. K., Baek, N. I. and Kim, J. 2014. The stimulatory effects of *Stewartia koreana* extract on the proliferation and migration of fibroblasts and the wound healing activity of the extract in mice. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 145-152.
 27. Moon, J. S., Kim, S. J., Park, Y. M., Hwang, J. S., Kim, E. H., Park, J. W., Park, I. B., Kim, S. W., Kang, S. G., Park, Y. K. and Jung, S. T. 2004. Activities of antioxidation and alcohol dehydrogenase inhibition of methanol extracts from some medicinal herbs. *Kor. J. Food Preserv.* **11**, 201-206.
 28. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3122-3128.
 29. Ozer, A., Ergul, B. K. and Sezai, S. 2005. Oxidative stress in patients with acne vulgaris. *Mediators Inflamm.* **6**, 380-384.
 30. Park, C. K., Kim, H. J., Kwak, H. B., Lee, T. H., Bang, M. H., Kim, C. M., Lee, Y. K., Chung, D. K., Baek, N. I., Kim, J., Lee, Z. H. and Kim, H. H. 2007. Inhibitory effects of *Stewartia koreana* on osteoclast differentiation and bone resorption. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 1507-1516.
 31. Park, S. W., Kim, S. H. and Jung, S. K. 1995. Antimutagenic effects and isolation of flavonoids from *Humulus japonicus* extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 897-901.
 32. Parrado, J., Bougria, M., Ayala, A., Castano, A. and Machado, A. 1999. Effects of aging on the various steps of protein synthesis: fragmentation of elongation factors 2. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 362-370.
 33. Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. and Jacob, R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3273-3279.
 34. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
 35. Roh, H. J., Noh, H. J., Na, C. S., Kim, C. S., Kim, K. H., Hong, C. Y. and Lee, K. R. 2015. Phenolic compounds from the leaves of *Stewartia pseudocamellia* Maxim. and their whitening activities. *Biomol. Ther.* **23**, 283-289.
 36. Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
 37. Tomas, C., Tsai, B. S. and Basil, M. H. 2008. Cosmeceutical agents: A comprehensive review of the literature. *Clin. Med.*

- Dermatol.* **1**, 1-20.
38. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K. and Watanabe, M. 1999. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* **36**, 47-50.
39. Toshinori, B. and Chikako, N. 2012. Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. *J. Dermatol. Sci.* **68**, 3-8.
40. Yang, C. S., Landau, J. M., Hung, M. T. and Newmark, H. L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 381-406.
41. Yen, G. C. and Hsieh, C. L. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3952-3957.

초록 : 노각나무 잎과 가지 추출물의 항산화 효과

김혜수¹ · 박민정¹ · 김수정¹ · 김부경¹ · 박준호² · 김대현² · 조수정^{1*}

(¹경남과학기술대학교 제약공학과, ²경남산림환경연구원)

본 연구에서는 우리나라 고유 수종인 노각나무(*Stewartia koreana*)의 부위별 이용 가능성을 알아보기 위하여 노각나무 잎과 가지를 70% 에탄올에 침지한 다음 부위별 항산화 활성을 조사하였다. 노각나무 가지 추출물(53.18±0.2 mg GAEs/extract g)에 비해 잎 추출물(162.57±0.9 mg GAEs/extract g)의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났고 플라보노이드 함량도 가지(4.7±0.1 mg QEs/extract g)에 비해 잎(59.1±0.9 mg QEs/extract g)에서 높게 나타났다. 노각나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거 활성은 잎과 가지 모두 농도 의존적으로 증가하였으며 가지보다는 잎에서 높게 나타났다. 노각나무 추출물 0.4 mg/ml의 농도에서 잎과 가지의 DPPH 라디칼 소거능은 각각 91.85±0.01%, 29.93±0.2%였으며 노각나무 잎 추출물은 양성대조구로 사용한 ascorbic acid (1 mg/ml, 93.71±0.1%) 보다 낮은 농도에서 ascorbic acid와 유사한 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 노각나무 추출물 0.4 mg/ml의 농도에서 잎과 가지의 ABTS 라디칼 소거능은 각각 94.77±0.34%, 25.13±0.15%였다. 노각나무 잎과 가지의 ORAC 지수는 각각 104.13±0.48 μM TEs/ extract g과 57.36±0.35 μM TEs/extract g으로 가지보다는 잎의 ORAC 지수가 더 높게 나타났다. 노각나무 추출물의 세포 독성은 WST-1 assay를 이용하여 추출물이 섬유아 세포 CCD-986sk에 미치는 영향으로 평가하였다. 이상의 결과를 종합해보면, 노각나무 잎 추출물은 가지에 비해 항산화 활성 지표인 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높고 항산화 활성이 높기 때문에 노각나무 잎 추출물은 항산화 활성이 우수한 기능성 식의약품소재나 화장품 소재로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.