

## 음나무(*Kalopanax septemlobus* Koidz.) 잎 추출물의 폴리페놀 및 항산화효과

전동하<sup>1</sup>, 이진태<sup>1</sup>, 천순주<sup>1</sup>, 이창언<sup>1</sup>, 김태훈<sup>2</sup>, 이도형<sup>3</sup>, 한진규<sup>4</sup>, 김세현<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>2</sup>대구한의대학교 한약재약리학과, <sup>3</sup>영남대학교 산림자원학과, <sup>4</sup>국립산림과학원

### Polyphenol and Anti-oxidant Effects of *Kalopanax septemlobus* Koidz. Leaf Extracts

Dong-Ha Jun<sup>1</sup>, Jin-Tae Lee<sup>1</sup>, Soon-Ju Cheon<sup>1</sup>, Chang-Eon Lee<sup>1</sup>, Tae Hoon Kim<sup>2</sup>, Do-Hyung Lee<sup>3</sup>,  
Jingyu Han<sup>4</sup> and Sea-Hyun Kim<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyungsan 712-715, Korea

<sup>2</sup>Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyungsan 712-715, Korea

<sup>3</sup>Department of Forest Resources, Yeungnam University, Gyungsan 712-749, Korea

<sup>4</sup>Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea

**Abstract** - The aim of the study was to assess the cosmeceutical activity of *Kalopanax septemlobus* leaf and it is possible that can be used as a cosmetic ingredient for applicaiton of cosmetic industries. The concentration of total phenolic compound of hot water and 70% EtOH extracts of *K. septemlobus* leaf showed 104 mg/L and 125 mg/L respectively. In the result of DPPH(1,1- diphenyl-2-picryl -hydrazyl) scavenging radical activity, 70% EtOH extracts of *K. septemlobus* leaf showed 93.1% and it was similar to BHA(butylated hydroxyanisole) effect at 1,000ppm concentration. Xanthine oxidase inhibition of hot water extracts and 70% EtOH extracts of *K. septemlobus* leaf were 46.6% and 60.4% at 1,000ppm, respectively. In these results, *K. septemlobus* leaf has a great potential as a cosmeceutical ingredient with a natural anti-oxidant source.

**Key words** - *Kalopanax septemlobus*, Anti-oxidative activity, Cosmeceutical

## 서 언

우리 인체는 외부로부터 끊임없는 자극을 받아 활성산소(reactive oxygen species, ROS)와 유리기(free radicals)를 생성함으로써, 산화물질(pro-oxidants)을 축적한다. 또한 이에 대한 방어기전으로 산화 억제물질(anti-oxidants)을 형성하여 산화물과 균형을 이루어 건강을 유지하게 한다. 그러나 현대인들은 증가하는 스트레스, 환경오염, 약물, 유전적 요인 등에 의해 생성되는 산화물에 노출되어 있어 산화와 항산화물질간의 평형 상태를 유지하지 못하고 있다(Hwang *et al.*, 2006). 이러한 활성산소는 암이나 동맥경화증, 혹은 심혈관계 질환과 관련이 있으며 생

물분자를 공격하여 세포나 조직에 피해를 주고 이로 인해 노화에도 관여한다(Maxwell, 1995).

천연물에 대한 관심이 높아지면서 천연물로부터 기능성 물질을 탐색하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있으며, 수목의 목재, 잎 등의 추출성분 중 생리활성이 뛰어난 성분들을 이용해 기능성 물질로써의 활용방안도 활발히 연구되고 있다(Kong, 2004).

산림자원에서 수목의 이용은 주로 줄기의 목질 부분을 중심으로 이루어져 왔지만 최근, 수목의 목질부 이외 부분에서 우수한 활성성분들이 검색됨에 따라 수목의 전부위에 대한 연구를 통해 다양한 산업적 이용 가능성이 발표되고 있다.

음나무(*Kalopanax septemlobus* Koidz.)는 우리나라 전국에 자생하는 낙엽활엽 교목으로 수고 25 m, 직경 1 m

\*교신저자(E-mail) : goldtree@forest.go.kr

에 달하는 거목으로 군집성이 없으며, 수직적으로는 표고 100~1,800 m 에서 자라나, 표고 400~500 m 부근에 집중 분포하고 지리적으로는 우리나라와 중국, 일본 등 동북아시아 지역에 분포한다. 유묘시에는 내음성이 높아 수관하부에서도 생육하나 크면서부터 양광을 요구하며, 생장이 빠르고 단간으로 생장하여 어려서 달렸던 가지는 수령이 증가하면서 자연낙지 되고 토심이 깊고 비옥한 곳에서 잘 생장하나 토성은 별로 가리지 않는다(문흥규 등, 2007).

음나무는 예로부터 한방에서 그 껍질을 해동피(海桐皮 : *Kalopanax cortex*), 근피는 해동수근(海桐樹根)이라 하여 풍습제거, 경락소통, 살충, 살균, 항진균, 신경통 등으로 널리 사용되어 왔으며, 최근에는 면역활성, 항산화 활성 및 잎 추출물의 진통 및 소염효과에 대한 연구 결과가 보고되고 있다(Choi, 1997; 박희준 등, 2005; 김세현 등, 2007).

본 연구에서는 음나무 잎 추출물의 화장품 약리활성인 항산화활성을 검증하고, 화장품 및 의약품의 산업적 응용을 위하여 천연소재인 음나무 잎 추출물의 기능성 물질로써 적용 가능성을 확인하기 위하여 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료제조

본 실험에 사용된 공시 재료는 새순 생산량이 많은 음나무 다수확성 우량품종 육성을 위하여 국립산림과학원 산림유전자원부에서 1998년 전국 10개 지역으로부터 선발한 표본목에서 접수를 채취하여 접목 증식한 클론보존원의 20 클론에서 잎을 채취하였다. 채취된 잎은 물로 세척 음건 후 건조된 시료를 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다. 열수 추출물은 시료에 10배의 물을 넣어 3시간 동안 85°C에서 추출하고, 70% EtOH 추출물은 시료에 10배의 ethanol과 물을 7:3의 비율(v/v)로 넣은 다음 3일 동안 추출하였으며, 두가지 가용부를 감압 농축하여 동결건조 후 시료로 사용하였다.

### 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 분석은 널리 사용되고 있는 Folin-Denis법(Swain *et al.* 1959)으로 측정하였다. 열수 및 70% EtOH 추출물을 증류수에 녹여서 folin시약을 가하고 5분간 정치한 다음 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 가하였다. 이 혼합

액을 1시간 동안 정치한 후 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 구하였다.

### 전자공여능 측정(Electron donating ability, EDA)

전자공여능은 Blois의 방법(1958)으로 측정하였으며, 각 시료용액 100 µl에 2×10<sup>-4</sup> M의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 50 µl을 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$EDA(\%) = \left( 1 - \frac{C-D}{A-B} \right) \times 100$$

- A : Absorbance at 517 nm without test sample after incubation.
- B : Absorbance at 517 nm without test sample before incubation.
- C : Absorbance at 517 nm with test sample after incubation.
- D : Absorbance at 517 nm with test sample before incubation.

### Nitric oxide radical 저해활성 측정

Nitric oxide radical 저해활성은 Marcocci 등의 방법(1994)으로 측정하였다. Sodium nitroferricyanide(III) dihydrate solution에 20 mM phosphate buffer pH 7.4에 녹인 각 시료를 넣고 25°C에서 150분간 반응시켰다. 이 반응액에 griess reagent를 넣고 542 nm에서 흡광도를 측정하여 nitrite 저해활성을 확인하였다.

$$Nitric\ oxide\ radical\ inhibition\ rate\ (\%) = \left( 1 - \frac{C-D}{A-B} \right) \times 100$$

- A : Absorbance at 542 nm without test sample after incubation.
- B : Absorbance at 542 nm without test sample before incubation.
- C : Absorbance at 542 nm with test sample after incubation.
- D : Absorbance at 542 nm with test sample before incubation.

### Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte의 방법(1969)을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6ml를 넣은 후, 여기에 xanthine oxidase(0.2 U/ml) 10 µl과 1 mM의 xanthine(20 µl)을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응물에 1 N HCl 1ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Xanthine oxidase inhibition rate (\%)} = \left( 1 - \frac{C-D}{A-B} \right) \times 100$$

- A : Absorbance at 292 nm without test sample after incubation,
- B : Absorbance at 292 nm without test sample before incubation,
- C : Absorbance at 292 nm with test sample after incubation,
- D : Absorbance at 292 nm with test sample before incubation,

### ABTS radical cation decolorization 측정

ABTS radical cation decolorization은 Pellegrin 등의 방법(1998)에 의해 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS 5 ml와 140 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 88 μl를 ethanol과 약 1:88 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.002가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 50 μl와 ABTS solution 1 ml를 혼합하여 30초간 진탕한 후 7분간 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left( 1 - \frac{C-D}{A-B} \right) \times 100$$

- A : Absorbance at 734 nm without test sample after incubation,
- B : Absorbance at 734 nm without test sample before incubation,
- C : Absorbance at 734 nm with test sample after incubation,
- D : Absorbance at 734 nm with test sample before incubation,

## 결과 및 고찰

### 폴리페놀 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로써 다양한 분자구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl(OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하여, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(Jung *et al.*, 2004).

음나무 잎 추출물에 포함되어있는 폴리페놀의 함량을 조

Table 1. The contents of total polyphenol from *K. septemlobus* leaf extracts.

Extracts	Polyphenol contents (mg/L)
Hot water	104
70% EtOH	125

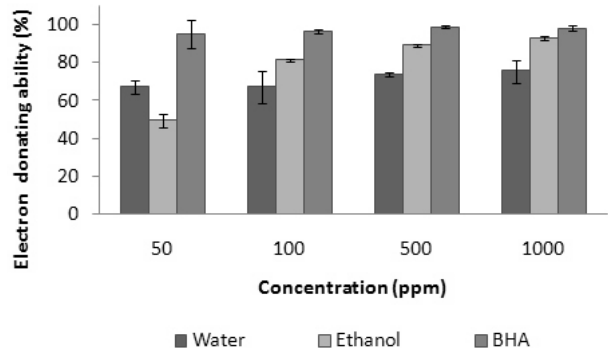


Fig. 1. Electron donating ability of *K. septemlobus* leaf extracts. Water : Hot water extracts of *K. septemlobus* leaf, Ethanol : 70% EtOH extracts of *K. septemlobus* leaf, BHA : butylated hydroxyanisole, Results are means ± S.D. of triplicate data.

사한 결과 열수추출물은 104 mg/L, 그리고 70% EtOH 추출물은 125 mg/L의 폴리페놀이 각각 함유되어 있어, 열수추출물 보다 70% EtOH 추출물의 폴리페놀 함량이 높음을 확인할 수 있었다(Table 1).

### 전자공여능 측정

DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 517 nm에서 강한 흡수 스펙트럼을 보이나 페놀성 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해 주는 전자공여체와 반응하게 되면 전자 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 되며 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다(Brand-Wiliams *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005). 음나무 잎 추출물의 50, 100, 500, 1,000 ppm시료를 사용하였을 때 농도 의존적으로 전자공여능이 증가하였으며, EtOH가용부의 경우 1,000 ppm이상인 경우에 93.1% 이상의 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었다. 이는 BHA의 DPPH radical 소거능과 유사함을 보였으며, 70% EtOH 추출물의 DPPH radical 소거능이 열수추출물의 전자공여능보다 높게 나타났다(Fig. 1).

### Nitric oxide radical 저해활성 측정

넓은 뜻으로 활성산소(reactive oxygen species)의 하나인 nitric oxide radical(NO) 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 500 ppm에서 음나무 잎의 70% EtOH 추출물은 49.2%, 열수추출물은 48.9%의 저해활성을 나타냈으며, 1,000 ppm에서는 각각의 추출물에서 49.5%, 49.6%로 BHA의 nitric oxide radical 저해활성보다 높은 저해활

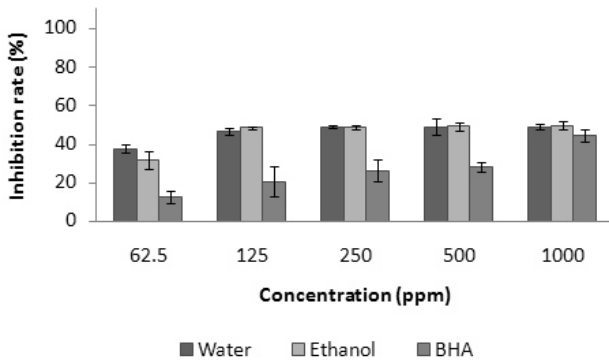


Fig. 2. Nitric oxide scavenging ability of *K. septemlobus* leaf extracts. Water : Hot water extracts of *K. septemlobus* leaf, Ethanol : 70% EtOH extracts of *K. septemlobus* leaf, BHA : butylated hydroxyanisole, Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

성을 보였다. 전자공여능 측정실험에서와 같이 70% EtOH 추출물의 활성이 더 높은 것으로 나타났다.

### Xanthine oxidase 저해활성측정

Xanthine oxidase는 생체내 퓨린대사에 관여하는 효소로 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요소(urea)를 형성하며 요소가 혈장 내에 증가되면 골절에 축적되므로 통증을 동반하는 통풍을 유발할 뿐만 아니라, 신장에 침착되어 신장질환을 일으키기도 한다(Kelley and Wyngaarden, 1974; Wyngaarden and Holmes, 1977; Storch and Ferber, 1988; Hatano *et al.*, 1989). 본 실험에서는 항산화능을 측정하는 방법의 하나로써 xanthine oxidase 저해활성 실험을 하였다. 음나무 잎 추출물의 xanthine oxidase의 저해활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 70% EtOH 추출물과 열수추출물 모두 농도 의존적으로 xanthine oxidase의 저해 효과가 증가하였으며, 70% EtOH 추출물은 1,000 ppm에서 60.4%, 열수추출물은 46.6%의 저해능 작용을 나타냈다.

### ABTS radical cation decolorization 측정

이 방법은 추출물들의 상대적인 항산화효과 측정인 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다. 또한 aqueous phase 모두에 적용이 가능하며, 표준물질의 사용으로 추출물의 상대비교가 가능하도록 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS+ free radical이 추출물속의 항산화

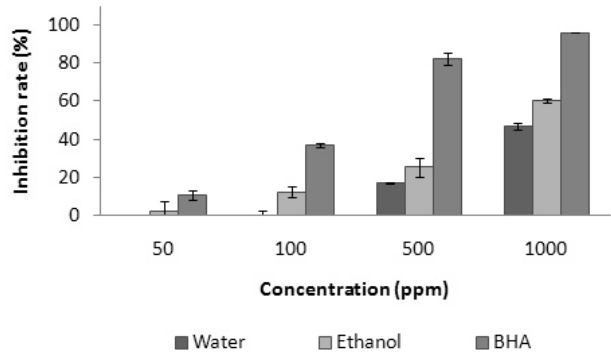


Fig. 3. Xanthine oxidase inhibition of *K. septemlobus* leaf extracts. Water : Hot water extracts of *K. septemlobus* leaf, Ethanol : 70% EtOH extracts of *K. septemlobus* leaf, BHA : butylated hydroxyanisole, Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

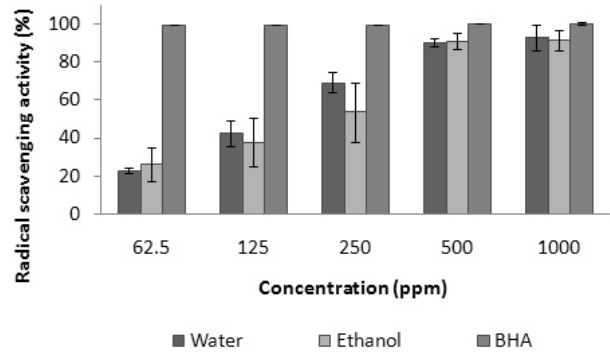


Fig. 4. ABTS Radical cation decolorization activity of *K. septemlobus* leaf extracts. Water : Hot water extracts of *K. septemlobus* leaf, Ethanol : 70% EtOH extracts of *K. septemlobus* leaf, BHA : butylated hydroxyanisole, Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용하였다. 열수추출물은 500 ppm 농도에서 90.4%, 1,000 ppm 농도에서 92.7%의 radical scavenging activity를 나타내었으며, 70% EtOH 추출물은 500 ppm 농도에서 91%, 1,000 ppm 농도에서 91.4%의 radical scavenging activity를 나타내어 열수추출물과 70% EtOH 추출물은 유사한 효과를 나타냈다(Fig. 4).

## 적 요

음나무 잎 추출물의 생리활성을 분석하기 위해 열수추출물과 70% EtOH 추출물의 폴리페놀의 함량을 측정하였으

며, 항산화활성 분석을 위해 전자공여능, nitric oxide radical 저해활성, xanthine oxidase 저해활성, ABTS radical cation decolorization을 측정하였다. 폴리페놀의 총 함량은 열수추출물과 70% EtOH 추출물에서 각각 104 mg/L, 125 mg/L으로 정량되어 70% EtOH 추출물이 열수추출물에 비해 높은 함량을 보였다. DPPH radical 소거능은 70% EtOH 추출물이 1,000 ppm에서 93.1%로 나타나 같은 농도의 BHA와 유사한 소거능을 보였다. nitric oxide radical 저해활성은 70% EtOH 추출물과 열수추출물이 1,000 ppm에서 49.6%, 49.5%로 나타나 같은 농도의 BHA보다 높은 nitric oxide radical 저해활성을 보였다. Xanthine oxidase 저해활성은 1,000 ppm농도에서 열수추출물과 70% EtOH 추출물에서 각각 46.6%, 60.4% 활성을 나타내었다. ABTS radical cation decolorization 활성은 1,000 ppm에서 열수추출물이 92.7%, 70% EtOH 추출물이 91.4%로 나타났다. 이상의 결과로 보아 음나무 잎의 70% EtOH 추출물과 열수추출물 모두 많은 폴리페놀이 함유되어 있으며, 70% EtOH 추출물과 열수추출물 모두 합성항산화제에 비해 항산화 활성이 다소 낮지만 천연 항산화제로 우수한 항산화활성을 나타내는 것으로 분석되었다. 이를 바탕으로 음나무 잎의 강한 항산화능을 피부노화 예방관련 미용식품 및 기능성 화장품 소재로 활용 가능한 유용한 수종으로 개발 될 수 있을 것이다.

## 인용문헌

- 김세현, 박영기, 장용석, 한진규, 정현관. 2007. 음나무 추출물의 세포 내 산화 스트레스와 항산화 활성. 한국목재공학회. 35(6): 126-134.
- 문홍규, 박소영, 김용욱, 손석규, 김지아. 2007. 산림자원의 기내대량증식. 국립산림과학원. pp. 39.
- 박희준, 남정환, 정현주, 김원배, 박광균, 정원운, 최종원. 2005. 음나무 잎 수피의 진통소염효과 및 아주반트로 유발된 산화적 스트레스에 대한 효과. 생약학회지. 36(4): 318-323.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181: 1199-1200.
- Brand-Williams, W., Cuvelier M. E. and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Technology. 28: 25-30.
- Choi, S. W. 1997. Antioxidative Properties of Methanolic Extracts in Leaves of *Kalopanax pictum* Nakai. Research Bulletin of the Catholic University of Taegu-Hyosung. 54(2): 131-139.
- Hatano, T., Yasuhara, T., Fukuda, T., Noro, T. and T. Okuda. 1989. Phenolic constituents of licorice II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 37: 3005-3009.
- Hwang, H. S., Lee, Y. K. and K. G. Lee. 2006. Fractionation of Banaba Leaves Extract (*Lagerstroemia speciosa* L. Pers) and its Antioxidant Activity. Food Engineering Progress. 10: 120-124.
- Jung, M. S., Lee G. S. and Chae H. J. 2004. *In vitro* biological activity assay of ethanol extract of Radish. Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry. 47(1): 67-71.
- Kelley, W. N. and J. B. Wyngaarden. 1974. Enzymology of gout. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. 41: 1-33.
- Kong, W. S. 2004. Species Composition and Distribution of Native Korean Conifers. Korean J. Geographical Society. 39: 528-543.
- Lee, S. Y., Hwang E. J., Kim G. H., Choi Y. B., Lim C. Y., S. M. Kim. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. Korea Journal of Food Science and Technology. 13(3): 93-100.
- Marcocci, L., Maguire J. J., Droylefaix M. T. and L. Packer. 1994. The Nitric Oxide Scavenging Properties of *Ginkgo biloba* Extract EGb 761. Biochemical and Biophysical Research Communications. 201, 15: 748-755.
- Maxwell, S. J. 1995. Prospects for the use of anti-oxidant therapies. Drugs. 49: 345-361.
- Pellegrin, N., Re, R., Yang, M and Rice-Evans, C. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Method Enzymol. 299: 379-389.
- Stirpe, F. and E. D. Corte. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Journal of Biochemistry. 244: 3855-3861.
- Storch, J. and E. Ferber. 1988. Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. Analytical Biochemistry. 169(2): 262-267.

Swain, T., Hillis, W.E. and Ortega, M. 1959. Phenolic constituents of *Psidium domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. Science of Food Agriculture. 10: 83-88.

Wyngaarden, J. B. and E. W. Jr. Holmes. 1977. Molecular nature of enzyme regulation in purine biosynthesis. Ciba Foundation Symposium. 48: 43-64.

(접수일 2009.6.15; 수락일 2009.7.28)