

추출용매에 따른 다릅나무 수피 추출물의 항산화 활성

김경선[#], 장준복, 도은수, 길기정, 유지현^{*}

중부대학교 한방제약과학과

Stem bark of *Maackia amurensis* Extract according to extraction Solvent

Gyeong-Sun Kim[#], Jun-Pok Chang, Eun-Soo Doh, Ki-Jung Kil, Ji-Hyun Yoo^{*}

Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University Geumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : The objective of this research was to investigate the antioxidant activities of stem bark of *Maackia amurensis* extract.

Methods : Stem bark of *Maackia amurensis* extract were prepared using 70% methanol. Methanol extracts were fractionated to hexane, chloroform, ethyl acetate, butyl alcohol, water fractions and investigated. The antioxidant activities of fractions was evaluated by four different assays as total polyphenol contents, total flavonoid contents, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free-radical scavenging activity and ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) scavenging ability.

Results : The yield of methanolic extracts from stem bark of *Maackia amurensis* was 10.16%, whereas those of its solvent fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate, butyl alcohol, and water) were 5.45, 11.39, 13.88, 26.07, and 40.80%, respectively. The total polyphenol contents and electron donating ability of 70% methanol extracts from stem bark of *Maackia amurensis* were 15.44 mg/g and 194.15 µg/mL of its IC₅₀, respectively. The 70% methanol extracts showed the highest antioxidant activity. The total polyphenol content and total flavonoid content of chloroform fractions were higher in each of 201.98 mg/g and 13.55 mg/g. The chloroform fraction showed the lowest levels of DPPH(IC₅₀, 183.95 µg/mL) and ABTS scavenging activity(IC₅₀, 10.0 µg/mL). The antioxidant activity was detected in methanol extract, chloroform fractions.

Conclusions : These results indicate that 70% methanol extract and its fractions of stem bark of *Maackia amurensis*, especially chloroform fraction, have the properties of anti-oxidant suggesting stem bark of *Maackia amurensis* may be a candidate for natural and functional materials.

Key words : *Maackia amurensis*, Antioxidant, solvent fraction

I. 서 론

현대사회의 식습관과 서구화된 생활 방식에 따라 지나친 음주, 음식물의 과잉 섭취로 인하여 간 경화, 지방간, 간암, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화증, 심장병, 당뇨병 등의 만성질환이 점점 증가하는 추세이다. 이에 따라 건강과 장수에 대한 관심이 증가 되고 기능성 소재와 제품의 수요가 증가 하는 추세로 보다 안전한 자원을 찾음으로써 천연자원에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다¹⁾.

우리나라 주요 조림 수종 중 하나이며²⁾, 특용수로 많이 이용되고 있는 다릅나무(*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim)는 한국 전역과 중국 동북 지방, 아무르, 우수리에 분포하는 낙엽 교목으로 다릅나무 속, 콩과에 속하며 우리나라에는 솔비나무와 다릅나무 2종이 있다. 높이 15 m에 달하며 잎은 호생하며 기수 1회 우상 복엽이고 소엽은 9~11개이며 타원형 또는 장난형으로 길이 5~8 cm, 점첨두이며 원저이고 양면에 털이 없다. 화서는 총상화서 또는 원추화서로서 가지 끝에 달리며 길이 10~20 cm이고 흰색의 꽃이 7월에 핀다.

*Corresponding author : Ji-Hyun Yoo, Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University Geumsan 312-702
· Tel : +82-41-750-6962 · E-mail : jhyoo@joongbu.ac.kr

#First author : Gyeong-Sun Kim, Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University Geumsan 312-702

· Tel : +82-41-750-6394 · E-mail : rudtjdsdflk@naver.com

· Received : 28 April 2016 · Revised : 5 May 2016 · Accepted : 16 May 2016

열매는 핵과로서 넓은 선형이며 털이 없고 길이 5 cm 정도이다. 다른나무의 껍질, 가지, 잎 등은 약용으로 관절염, 진통제, 종양 치료, 위암, 항 궤양, 부인병 등에 사용하였다고 보고³⁾된 바 있으며, 다른나무의 주성분은 플라보노이드와 알칼로이드로 보고⁴⁾하였다. 다른나무의 잎과 줄기에서 formononetin, genisetin, retusin 등의 화합물이 분리⁵⁾되었고, 심재에서는 orodol, tectorigenin, (-)-medicarpin, (±)-vestitol 등의 isflavonoid 계 화합물들의 분리⁶⁾와, 목질부에서는 liquiritigenin, naringenin 등의 polyphenol계 화합물의 분리가 보고되어있다⁷⁾. 또한 다른나무의 줄기 껍질에서는 maackiaflavanone A'B, maackiapentone 등의 prenylated flavonoid에 대한 분리 및 항암작용 효과가 있음이 보고⁸⁾와 다른나무에서 분리된 화합물들이 합성 항산화제인 BHT와 비슷한 항산화력을 가진다고 보고되어 있다³⁾. 이와 같이 다른나무는 예로부터 약용으로 이용되어왔고, 과학적으로 다양한 생리활성(항산화, 항암, 부인병)등의 효과가 알려져 있는 것³⁾으로 사료되지만 관련 연구는 아직 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 항산화 활성을 중심으로 다른나무 수피를 음건 후 분쇄하여 hexane, chloroform, ethyl acetate 및 butyl alcohol 등의 용매를 이용하여 분획한 후 각 분획물에 대한 항산화 활성 확인하여 기초 자료로 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 다른나무(*Maackia amurensis* Rupr. et. Maxim)는 2014년 4월경에 경북 영천지역에서 채취한 것을 구입한 후 중부대학교 한방제약학과에서 감정하였다. 이용하기 전에 불순물을 제거하고, 코르크층을 분리한 수피를 음건한 후 분쇄하여 4℃에서 냉장 보관한 후 추출용 시료로 사용하였다.

2. 시료추출 조건검색

생리활성 검증을 위한 최적 추출 조건을 검색하기 위해 시료를 methanol을 사용하여 0%, 30%, 50%, 70%, 99% 의 농도별로 실온교반 추출하였다. 모든 추출은 충분한 시료확보를 위하여 각각 24시간씩 3회 추출하였다.

3. 추출물 및 분획 제조

조추출물 제조 : 건조된 다른나무의 수피 467.2 g를 70% 메탄올로 24시간 3회 교반 추출하여 얻은 추출액을 감압 여과한 후 여과액을 감압 농축 하여 46.98 g의 조추출물을 얻었다.

70% 메탄올 조추출물의 분획 제조 : 조추출물에 증류수를 가하여 현탁 시킨 후 동일한 부피의 hexane, chloroform, ethyl acetate, butyl alcohol로 3회씩 반복하여 Fig. 1과 같이 순차적으로 분획하고 남은 수용액 층(Water)을 감압 농축하여 분획물을 얻었다(Fig. 1).

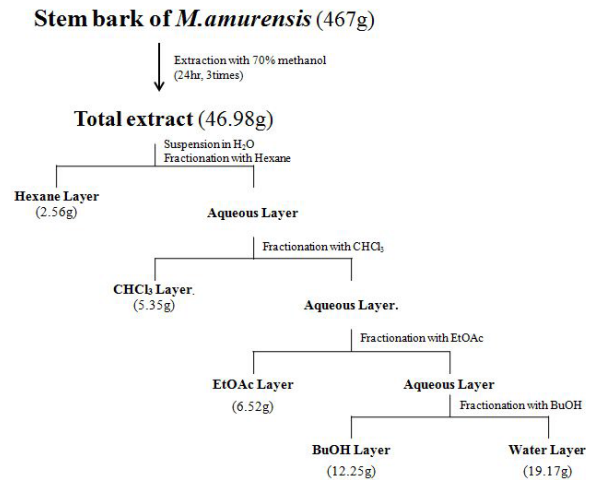


Fig. 1. A scheme of extraction and fractionation of stem bark *M. amurensis* methanol extract and its solvent fractions

4. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법⁹⁾을 응용하여 측정하였다. 즉, 시료 추출물 10 μL에 2% Na₂CO₃ 용액 180 μL를 첨가한 후 3분간 방치시키고 1 N Folin-Ciocalteu reagent 10 μL를 첨가하여 37℃ 암실에서 30분간 방치하였으며 Multimicroplate reader-SpectraMax M5(Molecular Devices, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하여 표준 검량선을 작성하였으며 추출물의 총 폴리페놀 함량은 시료 100 g당 mg의 gallic acid로 나타냈다.

5. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Dewanto 등¹⁰⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 추출액 25 μL를 증류수 100 μL에 희석한 다음 5% NaNO₂ 용액 7.5 μL를 첨가한 후 5분간 방치하였다. 10% Al₃·6H₂O 용액 15 μL를 첨가하고 다시 5분간 방치하였다. 그 후 1 M NaOH 100 μL를 첨가한 후 37℃ 암실에서 10분간 반응시킨 후 Multi microplate reader-SpectraMax M5(Molecular Devices, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 이때, (+)-catechin hydrate를 표준물질로 하여 표준 검량선을 작성하였으며 추출물의 총 플라보노이드 함량은 시료 100 g당 mg (+)-catechin hydrate로 나타냈다.

6. DPPH 라디칼 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free 라디칼 소거법 Blois¹¹⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 50 μL에 0.15 mM DPPH 용액 200 μL를 가한 후, 암소에서 30분간 반응시킨 후 Multimicroplate reader-SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 대조구로는 BHA와 ascorbic acid를 사용하였고, 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 라디칼 소

거능(IC₅₀)으로 표시하였으며, 분획물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도}/\text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

7. ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼을 이용한 항산화력 측정은 Re 등¹²⁾의 방법을 변형하여 측정하였다.

7 mM의 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diam-monium salt와 2.4 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 4시간 동안 방치하여 ABTS+를 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광 값이 0.7~0.8이 되도록 몰흡광계수($\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 225 μL 에 시료 25 μL 에 가한 후, Multimicroplate reader-SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 BHA와 ascorbic acid를 사용하였고, 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 라디칼 소거능 (IC₅₀)으로 표시하였으며, 분획물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도}/\text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

8. 통계처리

분석결과는 측정치의 평균±표준편차로 표시하였고, 통계 처리는 SAS package program(1996)의 General Linear Model(GLM) procedure에 따라 처리하였으며, 각 처리구간의 유의성 검증은 분산분석을 실시 후, Duncan's multiple range tests (Duncan, 1955)로 5% 수준($p < 0.05$)에서 실시하였다.

III. 결 과

1. 시료추출 조건검색

시료의 최적 추출조건 도출을 위해 다릅나무 수피를 Methanol의 농도를 0%, 30%, 50%, 70%, 99%로 구분하여 추출한 다음 총 폴리페놀 함량을 기초로 대표적으로 쓰이는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)을 기질로 이용하여 다릅나무 수피 추출조건을 검토하였다. 다릅나무 수피에 methanol 농도별 추출물의 폴리페놀 함량을 분석한 결과 0%는 14.91 ± 0.49 mg/g, 30%는 12.71 ± 0.18 mg/g, 50%는 13.61 ± 0.47 mg/g, 70%는 15.44 ± 0.44 mg/g, 99%는 14.98 ± 0.21 mg/g로 나타나 70% 농도로 추출한 경우가 함량이 높았으나 농도별 간의 유의성 검증 결과 0%, 70%, 99% 간에는 함량의 유의차가 나타나지 않았다. Methanol 농도별 다릅나무 수피 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 0%는 1013.05 ± 4.51 $\mu\text{g/mL}$, 30%는 798.73 ± 4.74 $\mu\text{g/mL}$, 50%는 473.04 ± 1.96 $\mu\text{g/mL}$, 70%는 194.15 ± 2.96 $\mu\text{g/mL}$, 99%는 554.07 ± 1.71 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC₅₀값을 나타냈고, 대조구인 ascorbic acid와 BHA는 각각 5.64 ± 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 6.57 ± 0.42 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC₅₀ 값을 나타냈다. 다섯가지의 추출

조건 중 모두 총 폴리페놀 및 DPPH 라디칼 소거 활성능에서 70% methanol 추출물이 가장 높은 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

Table 1. Total polyphenol content DPPH radical scavenging activity(IC₅₀) of stem bark of *M. amurensis* methanol by methanol concentrations

Solvent fractions	Total phenolic contents (mg GAE ¹⁾ /g)	Electron donating ability IC ₅₀ ²⁾ ($\mu\text{g/mL}$)
0%	$15.09 \pm 0.54^{3)5)}$	1013.05 ± 4.51^a
30%	12.49 ± 0.47^c	798.73 ± 4.74^b
Methanol	13.51 ± 0.44^b	473.04 ± 1.96^d
70%	15.16 ± 0.68^a	194.15 ± 2.96^e
90%	15.14 ± 0.36^a	554.07 ± 1.71^c
Ascorbic acid		5.64 ± 0.25^f
BHA ⁴⁾		6.57 ± 0.42^f

1) Total phenolic content was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE)

2) Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% IC (inhibitory concentration) of triplicate experiments

3) Each value is mean \pm SD (n=3)

4) BHA : Butylated hydroxy anisole

5) Mean with the same letters(a-d) are not significantly by Duncan's multiple range test($p < 0.05$)

2. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

다릅나무 수피에서 가장 우수한 70% methanol 추출물을 이용하여 극성별 유기용매를 이용한 분획물을 얻어 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다.

다릅나무 수피 70% 메탄올 추출물에 대한 용매별 분획물을 표준물질인 gallic acid를 기준물질로 하여 표준곡선을 그린 후 분리된 분획물의 폴리페놀 함량을 측정된 결과 hexane (71.96 ± 0.80 mg/g), CHCl₃ (201.98 ± 10.31 mg/g), EtOAc (185.23 ± 2.89 mg/g), BuOH (83.45 ± 0.9 mg/g) 및 water (37.45 ± 1.53 mg/g)로 CHCl₃ 분획물에서 가장 높은 폴리페놀이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 총 플라보노이드 함량은 (+)-catechin hydrate를 표준물질로 하여 측정된 결과 Hexane (6.48 ± 1.13 mg/g), CHCl₃ (13.55 ± 1.33 mg/g), EtOAc (12.71 ± 0.73 mg/g), BuOH (2.48 ± 0.74 mg/g) 및 Water (1.72 ± 0.45 mg/g)로 CHCl₃ 분획물에서 가장 높게 나타났지만, 유의성 검증 결과 EtOAc층과 유의한 차를 보이지 않았다.

Table 2. Total polyphenol and flavonoid content of solvent fractions from stem bark of *M. amurensis*

Solvent fractions	Total phenolic contents (mg GAE ¹⁾ /g)	Total flavonoid contents (mg CE ²⁾ /g)
Hexane	$71.96 \pm 0.81^{2)4)}$	6.49 ± 1.10^b
CHCl ₃	201.98 ± 10.82^a	13.56 ± 1.33^a
EtOAc	185.23 ± 2.90^b	12.71 ± 0.73^a
BuOH	83.46 ± 0.94^c	2.48 ± 0.75^c
Water	37.45 ± 1.53^c	1.72 ± 0.45^d

1) Total phenolic content was expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE)

2) Total flavonoid content was expressed as mg/g catechin equivalents (CE)

3) Each value is presented as mean \pm standard deviation (n=3)

4) Mean with the same letters(a-d) are not significantly by Duncan's multiple range test($p < 0.05$)

3. 다릅나무 용매 분획물의 항산화 활성

다릅나무 수피 용매 분획물의 항산화활성을 평가하기 위해 유리 라디칼 소거능을 평가하는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였고, 라디칼 소거능을 IC₅₀ 값으로 나타냈다. DPPH 라디칼 소거능을 평가한 결과 분획물 IC₅₀값은 각각 hexane(447.88±5.70 µg/mL), CHCl₃(183.95±2.67 µg/mL), EtOAc(287.18±1.45 µg/mL), BuOH(2030.59±776.63 µg/mL) 및 water(480.90±9.30 µg/mL)이며, 대조구인 ascorbic acid와 BHA는 각각 5.64±0.25 µg/mL, 6.57±0.42 µg/mL로 분획물 중에는 CHCl₃ 분획물이 가장 낮은 농도에서 50%의 라디칼 소거능을 보였지만 ascorbic acid와 합성 항산화제인 BHA보다는 높은 농도에서 50%의 라디칼 소거능을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거능을 평가한 결과 분획물들의 IC₅₀값은 각각 hexane(55.51±4.39 µg/mL), CHCl₃(10.00±0.33 µg/mL), EtOAc(12.36±0.64 µg/mL), BuOH(69.36±0.52 µg/mL) 및 water(73.83 ±5.07 µg/mL)이며, 대조구인 ascorbic acid와 BHA는 각각 3.52±0.02 µg/mL, 3.33±0.20 µg/mL로 CHCl₃ 분획물이 가장 낮은 농도에서 50%의 라디칼 소거능을 보였지만 유의성 검증 결과 EtOAc 분획물과 유의차는 없었다. ABTS 및 DPPH 라디칼 소거활성 결과에서 모두 CHCl₃ 분획물에서 항산화활성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 3. DPPH radical scavenging activity(IC₅₀) and ABTS radical scavenging activity(IC₅₀) of solvent fractions from stem bark of *M. amurensis*

Solvent fractions	Electron donating ability	ABTS radical scavenging activity
	IC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Hexane	447.88 ± 5.70 ^{2)c}	55.51 ± 4.39 ^b
CHCl ₃	183.95 ± 2.67 ^e	10.00 ± 0.33 ^c
EtOAc	287.18 ± 1.45 ^d	12.36 ± 0.64 ^c
BuOH	2030.59 ± 776.63 ^a	69.36 ± 0.52 ^a
Water	480.90 ± 9.30 ^b	73.83 ± 5.07 ^a
Ascorbic acid	5.64 ± 0.25 ^f	3.52 ± 0.02 ^d
BHA ³⁾	6.57 ± 0.42 ^f	3.33 ± 0.20 ^d

¹⁾ Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% IC (Inhibitory concentration) of triplicate experiments

²⁾ Each value is mean ± SD (n=3)

³⁾ BHA : Butylated hydroxy anisole

⁴⁾ Mean with the same letters(a-d) are not significantly by Duncan's multiple range test(p<0.05)

IV. 고찰

최근 식물자원이 가지고 있는 다양한 기능성 성분의 개발과 그 효능에 대한 연구가 주목받기 시작하면서 우리가 예로부터 이용해 왔거나 혹은 그 이용가능성을 아직 검증하지 못한 다양한 식물에 대한 관심도가 증가되고 있는 실정이다¹³⁾. 지구 상에는 약 20만종의 식물이 존재하고 있으며, 이 중 우리나라에 발생하는 종류는 약 5,000종의 식물이 발생하고 있는 것으로 추정되고 있다. 다양한 식물은 이에 수반되는 다양한 기능성 물질을 가지고 있음이 알려지면서 이를 이용하고자 자원식물을 중심으로 다양한 연구가 진행되고 있다¹⁴⁾.

항산화제란 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질의

산화 억제 기능을 하는 물질 또는 효소로서 free radical의 생성 억제 및 소거를 촉진할 뿐만 아니라 산화속도를 억제하여 주는 물질들이나 인자들을 일컫는다. 항산화제로는 합성물질인 BHA(butylated hydroxy anisole), BHT(butylated hydroxy toluene), PG(propyl gallate) 등이 있으며 천연 항산화제에는 vitamin E 및 carotenoid 등이 있다. 또한 항산화 효소로는 SOD(superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase 등이 생체 내에 존재한다. 현재 상용되고 있는 합성 항산화제인 BHT와 BHA는 단용 혹은 혼용으로 일정수준 이상 섭취 시 심각한 여러 질병을 유발 시킬 수 있다^{15,16)}. 또한 합성 항산화제는 이취(異臭)가 있고 고온에서 불안정하며¹⁷⁾, 기형 발생인자 발암물질이 될 수 있고¹⁸⁾, 특히 천연 항산화제보다 합성 항산화제는 항산화력이 우수하지만 과용 시간, 위장점 막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 발생시킨다. 따라서 생체 부작용이 없고 활성 산소를 제거하여 질병예방 및 노화 억제에 효과가 있으며, 항산화력이 강한 천연 항산화제를 동·식물로부터 찾으려는 연구가 활발히 이루어지고 있다^{1,19)}. 본 연구에서는 다릅나무 수피의 Methanol 농도별 조건을 탐색 한 후 hexane, CHCl₃, EtOAc, BuOH, water로 분획하여 각 분획물 중에 어떤 분획물의 항산화 효능이 가장 뛰어난지를 검증하였다.

식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중 하나인 폴리페놀류 화합물은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 결합하려는 성질을 가지고 있으므로 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 가진다²⁰⁾. 총 폴리페놀 함량은 폴리페놀의 산화 환원반응을 응용한 것으로 페놀성 물질인 phospho molybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용하였다²¹⁾. 다릅나무 수피 용매별 분획물의 폴리페놀 함량을 조사한 결과, 각 용매 분획물의 총 폴리페놀 함량은 CHCl₃ > EtOAc > BuOH > Hexane > Water 순으로 CHCl₃ 분획물에서 가장 높게 나타내었다. 이 등²²⁾은 콩과에 속하는 싸리나무 수피의 CHCl₃ 분획물(206.27 mg/mL)에서 폴리페놀 함량이 높다고 보고하였으며, 본 실험 결과와 유사한 수준을 나타냈다. 또한 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능의 결과를 미루어보아 다릅나무 수피 부위에 함유되어 있는 페놀성 화합물이 항산화 활성에 영향을 미치는 것으로 유추할 수 있다.

Flavonoid는 주로 anthocyanidin, flavonol, flavone, catechin 및 flavanone 등으로 구성되어 있으며 그 구조에 따라 특정 flavonoid는 항산화 및 항균성 등 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다²³⁾. 다릅나무 70% 메탄올 추출물에 대한 용매별 분획물의 총 플라보노이드 함량은 다릅나무의 용매 분획별 플라보노이드 함량은 CHCl₃ > EtOAc > Hexane > BuOH > Water 순으로 CHCl₃ 분획물에서 가장 높은 함량을 나타냈다. 또한 Lee 등²⁴⁾은 천년초 줄기의 분획별 플라보노이드 함량이 EtOAc (118.52±7.05 µg/mg), CHCl₃(114.00±10.03 µg/mg)임을 보고하였는데, 본 결과와 비교하면 천년초 줄기의 CHCl₃ 분획물보다 다릅나무 수피 CHCl₃ 분획물의 플라보노이드 함량이 매우 높음을 알 수 있다. 한편 Kim 등²⁵⁾은 작약이나 목단 등 20여종의 약용 식물의 메탄올 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 대부분의 식물에서 폴리페놀이 플라보노이드 보다 높으며, 폴리페놀 함량이 플라보노이드 함량보다 월등히 많은

시료의 경우 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 보아 플라보노이드 외에 다른 폴리페놀 화합물들도 항산화 활성에 기여한다고 보고하였다. 본 실험에서의 폴리페놀에서는 BuOH > Hexane 순으로 나타내었지만, 플라보노이드에서는 Hexane > BuOH 순으로 다른 양상을 나타내었다. 이러한 차이 용매별로 용출되는 성분과 양이 달라서 나타나는 결과라고 사료된다.

항산화 효과를 측정하는 실험 중 DPPH는 실제 항산화 효과와 연관성이 있으며 α -tocopherol, ascorbic acid, polyhydroxy 방향족 화합물 등의 항산화제에 의해 환원되어 짙은 자색이 노란색으로 탈색되는 정도를 측정하는 것으로 항산화 물질의 수소공여능으로 알려져 있다²⁶⁾. 님나무 70% 메탄올 추출물을 각 용매로 분획한 분획물의 전자공여능을 조사한 결과 IC₅₀값은 각각 CHCl₃ > EtOAc > Hexane > Water > BuOH 순으로 CHCl₃층이 가장 낮은 농도에서 50%의 라디칼 소거능을 보였다. 대조구인 ascorbic acid와 합성 항산화제인 BHA보다는 높은 농도에서 50%의 라디칼 소거능을 나타냈다. 이 등²²⁾은 같은 콩과인 싸리나무의 CHCl₃ (96.11±0.71 μ g/mL) 분획물보다도 낮은 농도에서 IC₅₀값을 나타냈고, 천연초 줄기의 CHCl₃ 분획물은 님나무 수피 보다 약 2.5배 높은 농도인 500 μ g/mL에서 약 50%의 라디칼 소거능을 나타냈다. 그러나 이러한 각 소재에 따른 전자공여능의 차이는 소재에 따라 용매별 분획의 전자공여능에 차이가 있을 수 있음을 알려주는데, 이는 앞서 폴리페놀 또는 플라보노이드함량이나 성분에서 언급한 바대로, 소재에 따라 이들 성분의 함량이 다르기 때문이라 생각된다. 또한 Kim 등²⁵⁾은 작약이나 목단 등 20여종의 약용식물의 메탄올 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드함량을 측정된 결과, 대부분의 식물에서 폴리페놀 함량이 플라보노이드 보다 높으며, 폴리페놀 함량이 플라보노이드 보다 월등히 높은 시료에서 높은 것으로 보아 플라보노이드 이외에 phenolic acids나 hydroxycinnamic acids 등에 속하는 다른 폴리페놀 화합물들이 전자공여능에 상당히 기여한다고 한 바 있다. 본 연구결과는 전자공여능이 플라보노이드 성분보다는 폴리페놀성분에 의해 발휘되는 것이 아닌가 하는 점을 시사한다.

ABTS 라디칼 소거능은 항산화제의 유무를 확인하는 것으로 라디칼을 생성하는 ABTS 존재 시 hydrogen peroxide와 metmyoglobin의 활성을 토대로 보다 빠른 항산화반응을 일으켜 myoglobin 라디칼을 감소시키는 기전이라고 할 수 있다¹²⁾. 님나무 수피 70% 메탄올 추출물에 대한 분획물의 따른 ABTS 라디칼을 50% 억제하는데 요구되는 농도(IC₅₀)로써 비교한 결과 CHCl₃ > EtOAc > Hexane > BuOH > Water 순으로 CHCl₃ 분획물에서 가장 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다. 대조구인 Ascorbic acid와 BHA과 비교하였을 때 분획물 중에는 CHCl₃ 분획물이 가장 낮은 농도에서 50%의 라디칼 소거능을 보였지만 유의성 검증 결과 EtOAc 층과 유의차는 없었다. 이는 같은 콩과인 싸리나무의 CHCl₃층보다도 낮은 농도에서 IC₅₀값을 나타냈고²²⁾, 천연초 줄기의 CHCl₃층에서는 님나무 수피보다 약 75배 높은 농도인 750 μ g/mL에서 약 50%의 라디칼 소거능²⁴⁾으로 님나무 수피 CHCl₃ 분획물에서 비교적 우수한 항산화능을 가지는 것을 확인하였다. 페놀화합물과 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거활성과 높은 연관성을 보고한 연구²⁷⁾에서와 같이 본 연구에서 또한 많은 양의 페놀화합물이 존재하는 CHCl₃ 분획물에서 높은 활성을 보였다.

따라서, 본 결과를 바탕으로 님나무 수피의 CHCl₃ 분획물을 이용하여 항산화 및 관련 분야에 대한 지속적인 연구의 필요성이 요구되는 바이다.

V. 결 론

님나무(*Maackia amurensis*) 수피의 70% methanol 추출물과 순차적 용매 분획물에 대한 천연항산화제로서의 효과 탐색을 위해 다음과 같은 항산화 활성 결과를 나타내었다.

1. 님나무 수피의 70% methanol 추출물에서 폴리페놀 15.44 mg/g로 가장 높은 함량을 나타내었고, DPPH 라디칼 소거능은 194.15 μ g/mL로 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다.
2. 님나무 수피의 70% methanol 추출물로부터 hexane, CHCl₃, EtOAc, BuOH, water로 분획하여 생리활성 검증을 실시한 결과, 총 폴리페놀 함량(201.98 mg/g) 및 총 플라보노이드 함량(13.55 mg/g)은 CHCl₃ 분획물에서 가장 높은 함량을 나타내었다.
3. 님나무 수피의 70% methanol 추출물로부터 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 활성결과 CHCl₃ 분획물에서 각각 183.95 μ g/mL와 10.00 μ g/mL로 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다.

이상의 *in vitro* 항산화능 결과(폴리페놀, 플라보노이드, DPPH와 ABTS 소거능)에서는 강력한 항산화제로 알려진 BHA 이나 ascorbic acid의 항산화능에는 미치지 못했지만 님나무 수피 CHCl₃ 분획물에서 큰 항산화능을 나타내었다. 앞으로 항산화 효능을 갖는 분리 및 확인을 이루어질 경우 항산화 소재로서 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Lee MH, Kim JM, Park EJ. Antioxidant and Antigenotoxic Effects of Sansuyu Fruit (*Cornus fructus*) Extracted with Water at Different Temperatures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2011 ; 40 : 149-155.
2. Han SH, Kim DH, Kim GN, Lee JC. Changes on Growth, Photosynthesis and Pigment contents of the *Maackia amurensis* and *Viburnum opulus* var. *calvescens* under Enhanced Temperature and CO₂ Concentration. *Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology.* 2011 ; 13 : 115-122.
3. Kim WJ, Lee HJ, Lee SK, Kang HY, Choi DH, Choi TH. Studies on Biological Activity of Wood Extractives(XVIII)-Isolation and Antioxidant Activity of Chemical Constituents From *Maackia amurensis* *Mokchae Konghak.* 2007 ; 35 : 135-144.
4. Li X, Wang D, Xia MY, Wang ZH, Wang WN, Cui Z. Cytotoxic Prenylated Flavonoids from the stem Bark of *Maackia amurensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 2009 ;

- 57 : 302–306.
5. Komissarenko AN, Kovalev VN, Komissarenko NF. Isoflavonoids of the Bark and Leaves of *Maackia amurensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1994 ; 30 : 288–290.
 6. Kulesh NI, Maksimov OB, Denisenko VA, Glazunov VP. Isoflavonoids from Heartwood of *Maackia amurensis* RUPR, ET MAXIM. *Chemistry of Natural Compounds*. 2001 ; 37 : 26–28.
 7. Kulesh NI, Vasilevskaya NA, Veselova MV, Denisenko VA, Fedoreev SA. Minor Polyphenols from *Maackia amurensis* wood. *Chemistry of Natural Compounds*. 2008 ; 44 : 575–577.
 8. Li X, Wang D, Xia MY, Wang ZH, Wang WN, Cui Z. Cytotoxic Prenylated Flavonoids from the stem Bark of *Maackia amurensis*. *Chem. Pharm. Bull*. 2009 ; 57 : 302–306.
 9. Folin O, Denis W. A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem*. 1915 ; 22 : 305–308.
 10. Dewant V, Xianzhong W, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*. 2002 ; 50 : 4959–4964.
 11. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 26 : 1199–1120.
 12. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice–Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med*. 1999 ; 26 : 1231–1237.
 13. Cho IS, Han YH, Lee GY, Park KY. Search for medicinal plants on improvable effect of intestinal microflora. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2007 ; 15 : 26–29.
 14. Kang BH. Superintendence of Korean resource plant. Seoul : Richvanilla. 2014 : 12–16.
 15. Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and Butylated hydroxyanisole(BHA). *Koreaen J. Food Sci, Technol*. 1982 ; 14 : 283–288.
 16. Kang IH, Cha JH, Lee SW, Kim HJ, Kwon SH, Ham IH, Hwang BS, Whang WK. Isolation of Anti–Oxidant from Domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge Leaves. *Kor. J. Phamacogn*. 2005 ; 36 : 121–128.
 17. Chang SS, Matatijasevic BO, Hsieh OAL, Hwang CH. Natural antioxidants rosemary and sage. *J. Food Sci*. 1977 ; 42 : 1102.
 18. Schafer E, Arnrich L. Effects of dietary vitamin E on serum and pulmonary fatty acid as prostaglandins in rats fed excess linoleic acid. *J. Nutr*. 1984 ; 144 : 1130.
 19. Doh ES, Chang JP, Kil KJ, Choi MS, Yang JK, Yun CW, Jeong SM, Jung YH, Lee GH. Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. *Korea J. Plant Res*. 2011 ; 2 : 30–39.
 20. Kim HY, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative by extracts from seed sprout and flower of safflower(*Carthamus tinctorius* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 2000 ; 29 : 1127–1132.
 21. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc*. 2007 ; 2 : 875–877.
 22. Lee JH, Jhoo JW. Antioxidant Activity of Different Parts of *Lespedeza bicolor* and Isolation of Antioxidant Compound. *Korean J. Food Sci, Technol*. 2012 ; 44 : 763–771.
 23. Middleton E, Kandaswami C. Potential health–romoting properties of citrus flavonoids. *Food Techonl*. 1994 ; 48 : 115–119.
 24. Lee JN, Kim HE, Kim YS. Anti–diabetic and Anti–oxidative Effects of *Opuntia Humifusa* Cladodes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 2014 ; 45 : 661.
 25. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 1995 ; 27: 80–85.
 26. Cherdshewasart W, Sutjit W. Correlation of antioxidant activity and major iso– flavonoid contents of the phytoestrogen–rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine*. 2008 ; 15 : 38–43.
 27. Choi Y, Jeong HS, Lee J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem*. 2007 ; 103 : 130–138.