



정향 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 및 항염 효과

오 희 경*

장안대학교 건강과학부 식품영양과

Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Extracts from *Eugenia caryophyllata* Thunb.

Hee-Kyung Oh*

Department of Food and Nutrition, Jangan University

Abstract

The objective of this study was to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Eugenia caryophyllata* Thunb. water and 70% ethanol extracts. The content of total polyphenol was significantly higher in water extract than in 70% ethanol extract. The DPPH radical scavenging activity of water extract was similar to that of Vit. C at a concentration of 1,000 µg/mL. The ABTS radical scavenging activities of water and 70% ethanol extract were similar to that of Vit. C at a concentration of 1,000 µg/mL. SOD-like activity of water extract was higher than that of 70% ethanol extract at a concentration of 1,000 µg/mL but lower than that of Vit. C. The DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and SOD-like activity increased as concentrations of water and 70% ethanol extracts increased. Cell cytotoxicity was not observed at all concentrations except at 100 µg/mL concentration of water extract. Inhibitory activity on NO production effect of water extract was significantly higher than that of 70% ethanol extract. These results show that *E. caryophyllata* Thunb. has potent biological activities, and their activities were different depending on extraction solvent.

Key Words: *Eugenia caryophyllata* Thunb., ABTS radical scavenging, Superoxide dismutase-like activity, anti-inflammation

1. 서 론

최근 경제 성장과 국민 소득의 향상으로 인한 운동부족, 영양과다, 흡연 및 음주 등과 같이 건강을 위협하는 요인들에 노출되기 쉬우며 이로 인해 발생되기 쉬운 질병 예방 및 회복, 노화억제 등을 위한 건강기능성 식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 질병 및 노화는 대사과정 중 발생하는 산화반응에 기인하며, 이러한 과정 중에 생성되는 활성산소는 불안정하고 산화력이 높아 생체 내 물질과 쉽게 반응하기 때문에 산화적 스트레스를 유발한다. 이러한 산화적 스트레스는 지질, 단백질, 탄수화물 및 DNA와 반응하여 여러 조직의 세포를 손상시켜 비만, 당뇨병, 동맥경화, 치매 등 다양한 질병을 유발할 수 있다(Velioglu et al. 1998; Lemberkovic et al. 2002). 항산화물질은 체내에서 생성되는 각종 활성산소에 의한 암, 동맥경화증 및 염증을 예방과 감소에 크게 기여하는 것으로 보고되고 있다. 이에 활성산소를 조절하거나 제거하는 능력을 지닌 생리활성물질에 대한 연구의 필요성

이 대두되면서 천연물을 이용한 소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있다(Seo et al. 2011; Lee et al. 2005).

현대 사회에서 여러 가지 원인들에 의해 질병이 유발함에도 불구하고 대부분 염증성 질환의 성격을 가지고 있다. 염증은 세균 감염, 화학물질, 체내 조직에 물리적 충격 등에 대해 생체가 재생이나 회복 등을 하기 위한 방어적 반응으로 나타내는 증세이다(Kawamata et al. 2000). 이 과정에서 활성산소종의 일종인 nitric oxide(NO)는 cytokines이나 감염 등에 의해 대식세포와 같은 면역세포에 의해 생성되어 각종 생리 및 병리적 과정에 있어 중요한 역할을 한다(Aktan 2004; Yoon et al. 2009; Farlik et al. 2010). 하지만 과도하게 생성된 NO는 부작용을 일으켜 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 지속적인 염증 반응은 조직의 손상 및 유전자 변이 등을 촉진시켜 관절염, 동맥경화 및 암 등을 일으킨다고 보고되고 있다(Liao et al. 2011). 최근에 개발된 염증성 질환을 치료하는 항염증제로 사용되는 약제는 위염, 신장염 및 심장질환 등을 초래함으로써 인체 안전성면에서 문제점을 안

*Corresponding author: Hee-Kyung Oh, Dept. of Food and Nutrition, Jangan University, Gyeonggi-do 445-756, Korea
Tel: 82-31-299-3063 Fax: 82-31-299-5633 E-mail: hkoh01@hanmail.net

고 있어 보다 안전한 항염증 치료제의 소재를 천연물에서 찾는 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Makins et al. 2003; Dogne et al. 2006).

정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb.)은 특유의 강한 향과 매운 맛을 가지고 있는 도금양과(Myrtaceae)에 속한 상록 소교목의 꽃으로 향신료의 일종으로 사용되고 있다(Singh et al. 2009). 예로부터 정향은 서양요리에서 육류와 야채요리를 위한 소스로 사용하고 있으며 최근 서구화로 인한 식생활의 변화로 정향의 사용은 계속 증가하고 있는 추세이다. 정향의 효과에 대한 연구결과로는 항산화, 항균, 항바이러스, 항스트레스 등 다양한 작용을 지니고 있어 천연 기능성 소재로 보고되고 있다(Kang et al. 1999; Dong et al. 2004; Lee et al. 2004; Singh et al. 2009). 정향의 주된 향기성분으로 정유성분인 eugenol이 알려져 있으며 eugenol의 생리활성 연구로는 항산화효과(Ito et al. 2005), 항염증효과(Ozturk et al. 2005), 항암효과(Kaur et al. 2010), 항균작용(Wang et al. 2010) 등 다양한 연구들이 보고되고 있다. 한편, 정향의 항산화 효과에 대한 연구결과에서는 정향의 휘발성 및 비휘발성 정유성분의 추출방법과 추출조건 등의 조건에 따라 항산화 결과들이 다소 다르게 보고되었다(Lee & Yoon. 1993; Ahn et al. 2000; Dong et al. 2004). 서양요리에서는 대부분이 정향 열수 추출물을 이용해 추출된 것을 사용하고 있으므로 정향의 열수 추출물과 식물의 추출효율을 높이기 위해 주로 사용하고 있는 유기용매인 70% 에탄올로 추출한 정향 추출물과 비교하여 정향을 유용하게 사용하기 위한 추출조건 및 효능에 대한 과학적인 근거 제시가 필요하다(Dong et al. 2004; Han et al. 2013). 따라서 본 연구에서는 정향의 이용 가치를 높이기 위하여 농도별 열수 및 에탄올 추출물의 free radical 소거능 및 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell을 이용한 NO 생성 저해를 분석하고 평가하여 건강 기능성에 적합한 정향 추출조건을 탐색하고 향후 항산화 및 항염증 소재 개발을 위한 기초 연구용 자료를 제공하고자 한다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 실험 재료 및 추출물의 제조

본 실험에서 사용한 정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb.)은 인도네시아산으로 2015년 수입상가에서 구입하여 실험 전까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다. 시료의 물 추출물은 건조시료 100 g 당 증류수 1,000 mL을 가하고, 90°C 에서 12시간 동안 3회 침치시킨 후 추출하였다. 시료의 에탄올 추출물은 건조시료 100 g당 70% ethanol 1,000 mL을 첨가하여 실온에서 12시간 동안 3회 침치시킨 후 추출하였다. 열수 및 에탄올 추출물은 각각 No. 2. filter paper (Advance Co., Tokyo, Japan)로 여과한 후 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (N-1000S-W, EYELA, Tokyo, Japan)로 용매를 제거하고 감압농축한 후 동결건조(Bondiro Vacuum Freeze-

Dryer, Ilshin Lab Co., Ltd, Seoul, Korea)하고 -70°C 에 냉동 보관하여 시료로 사용하였다.

2. 총 polyphenol 함량

총 polyphenol 함량은 Folin-Denis 방법(1912)에 따라 측정하였다. Test tube에 시료 1 mL과 Folin reagent 2 mL을 넣은 후 실온에서 3분간 정치한 다음 10% Na_2CO_3 2 mL을 첨가하였고, 이를 혼합한 후 30°C 에서 40분간 정치하였으며, UV-visible spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tannic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)의 검량선에 의하여 함량을 검출하였다.

3. DPPH radical 소거능

정향 열수 및 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 Blois의 방법(1958)을 변형하여 측정하였다. 시료 추출물 1 mL와 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 1 mL을 test tube에 취하고 잘 혼합한 다음 암소에서 30분간 반응시킨 후, UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 농도에 따른 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 이때, 활성의 비교를 위하여 합성 항산화제인 Vit. C를 이용하여 동일한 방법으로 측정하였다. 전자공여능은 (1-시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도) $\times 100$ 에 의하여 계산하여 나타냈다.

4. ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능은 Roberta et al.(1999)을 변형하여 측정하였다. 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid; ABTS)와 2.6 mM potassium persulphate를 하루 동안 암소에서 12시간 반응시킨 후 735 nm에서 흡광도 값이 1 ± 0.1 이 되도록 희석하였다. 희석한 ABTS 용액 0.5 mL에 각 농도별 시료 0.5 mL를 가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 활성의 비교를 위하여 합성 항산화제인 Vit. C를 이용하여 동일한 방법으로 측정하였다. ABTS radical 소거능은 (1-시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도) $\times 100$ 에 의하여 계산하여 나타냈다.

5. SOD 유사활성(Superoxide dismutase-like activity)

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법(1974)을 변형하여 측정하였다. 활성 산소종을 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매 하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 일정 농도별 시료 40 μL 에 pH 8.0으로 보정한 Tris-HCl buffer (50 mM tris amino-methane, 10 mM EDTA, pH 8.0) 120 μL 와 7.2 mM pyrogallol 20 μL 을 첨가하여 20°C 10분간 반응시키고,

1 N HCl 20 µL를 가하여 반응을 정시킨 후 UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 활성의 비교를 위하여 합성 항산화제인 Vit. C를 이용하여 동일한 방법으로 측정하였다. SOD 유사활성은 (1-시료침가구의 흡광도/무침가구의 흡광도)×100에 의하여 계산하여 나타냈다.

6. 세포독성 측정

실험에 사용한 mouse 대식세포 Raw 264.7 세포는 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco)와 1% penicillin와 streptomycin 이 첨가된 DMEM (Cellgro Mediatech, Manassas, VA, USA)배지를 이용하여 37°C에서 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포독성은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 96 well plate에 Raw 264.7 세포를 5.0×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 상층액을 제거하고 각 농도별로 희석한 시료(µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well에 CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Japan) 10 µL을 처리하여 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 발생정도를 microplate reader (Molecular Devices, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. NO 생성 저해 효과 측정

24 well plate에 2×10⁵ cells/mL의 Raw 264.7 세포를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 1시간 전 처리한 다음 염증 반응 유도 인자인 lipopolysaccharide (LPS)를 1 µg/mL의 농도로 처리 한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양 상층액에 Griess reagent (Nitric Oxide detection kit, iNtRON, Korea)을 1:1 비율로 반응 시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 통계처리

모든 통계자료는 SPSS Win. 20.0을 사용해 분석하였다. 각 시료에 대한 값은 평균±표준편차로 나타내었으며 처리간의 차이 유무를 ANOVA(One way analysis of variance)를 한 후 Duncan's multiple range test와 t-test를 이용하여 p<0.05 수준에서 각 처리간의 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 총 polyphenol 함량

정향 열수 및 70% 에탄올 추출물의 수율과 총 polyphenol 함량을 측정한 결과는 <Table 1>과 같다. 추출수율은 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물에서 각각 32.04% 및 31.09%으로 나타내었다. 총 polyphenol 함량은 열수 추출물이 239.26 mg/g, 70% 에탄올 추출물이 185.21 mg/g으로 열수

<Table 1> Total polyphenol content of *E. caryophyllata* Thunb. extract by water and 70% ethanol

Extract solvent	Yield(%)	Total polyphenol (mg/g DW)
Water	32.04	239.26±11.05 ^{1)a2)}
70% ethanol	31.09	185.21±8.68 ^{b)}

¹⁾Mean±SD

²⁾Values represent an average of three determinations.

³⁾Means in the column with different superscripts are significantly different by Student's t-test at p<0.05.

추출물은 70% 에탄올 추출물에 비하여 총 polyphenol 함량이 유의적으로 높게 나타났다고 보고하였다(p<0.05).

Koh et al.(2005)과 Kim et al.(2001)의 연구결과에 의하면 식물성 추출물은 추출 부위, 방법, 조건 및 추출용매 등에 따라 유효물질의 함량 및 양상이 다르며, 추출 성분들이 달라지기 때문에 추출 수율에 있어서도 많은 차이를 보인다고 보고하였으나 본 연구에서는 용매간의 추출 수율이 크게 차이하지 않았다. Ahn et al.(2000)과 Dong et al.(2004)의 연구에서 용매별 정향의 추출수율은 물, 메탄올 순으로 높게 나타났다고 보고하였고 그 결과를 용매의 극성이 높아질수록 수율이 증가되었고, 이는 수용성 폴리페놀 화합물과 아민류 등의 수용성 물질이 비극성용매보다 용이하게 용출되기 때문인 것으로 보았다. 한편, Kwon과 Park(2008)의 연구에서 오미자추출물의 phenolic 화합물 함량이 물 추출물보다 70% 에탄올추출물에서 높게 나타났다고 보고 하여 본 연구에서는 정향의 추출 용매로 극성용매인 물과 70% 에탄올 용매에 추출하여 기능성 효과를 비교하였다.

식품 중에서 널리 분포되어 있는 성분인 phenol 화합물은 하나 이상의 수산기로 치환된 방향족 환을 함유하고 있는 식물성분을 말하며, phenolics hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 free radical 소거 기능, 활성산소 및 질소종의 반응 억제 기능이 우수하여 다양한 생리활성을 갖는다(Kim et al. 2003; Choi et al. 2005). 일반적으로 phenol 화합물은 당이나 단백질과 결합하여 배당체로서 존재하는 경우가 많아 극성용매에 잘 녹는다고 보고하여 본 연구결과에서 정향의 총 polyphenol 함량이 70% 에탄올보다 물 용매에서 더 높게 나타난 결과를 뒷받침 해주고 있다(Woo 1995).

2. DPPH radical 소거능

정향 열수 및 70% 에탄올 추출물의 농도를 달리하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 <Table 2>와 같다. 모든 시료에서 추출물 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능은 유의적으로 증가하였으며 농도의존적인 경향을 보였다(p<0.05). 100~500 µg/mL의 농도에서 정향 물 추출물의 경우 24.62~88.07%의 소거능을 보여 대조군으로 사용한 Vit. C보다 높게 나타났고, 1,000 µg/mL의 농도에서 92.00%의 소

<Table 2> DPPH radical scavenging of *E. caryophyllata* Thunb. extract by water and 70% ethanol (%)

Extract solvent	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Water	24.62 \pm 0.35 ^{1)dA2)}	53.37 \pm 0.58 ^{cA}	88.07 \pm 1.34 ^{bA}	92.00 \pm 0.09 ^{aA}
70% ethanol	23.29 \pm 0.26 ^{dA}	48.70 \pm 0.36 ^{cB}	73.88 \pm 0.18 ^{bB}	88.67 \pm 0.17 ^{aB}
Vit. C	11.37 \pm 0.19 ^{dB}	26.56 \pm 1.87 ^C	51.23 \pm 0.63 ^{bC}	92.93 \pm 0.68 ^{aA}

¹⁾Mean \pm SD²⁾Values represent an average of three determinations.³⁾Means in the column (A-C) and row (a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.<Table 3> ABTS radical scavenging of *E. caryophyllata* Thunb. extract by water and 70% ethanol (%)

Extract solvent	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Water	35.07 \pm 0.01 ^{1)xB2)}	67.07 \pm 0.34 ^{bB}	93.05 \pm 0.41 ^{aB}	93.87 \pm 1.19 ^{aA}
70% ethanol	44.26 \pm 0.15 ^{dA}	79.15 \pm 0.08 ^{cA}	93.36 \pm 0.10 ^{bB}	94.01 \pm 0.25 ^{aA}
Vit. C	25.11 \pm 0.40 ^C	62.97 \pm 0.05 ^{bC}	94.01 \pm 0.20 ^{aA}	94.17 \pm 0.30 ^{aA}

¹⁾Mean \pm SD²⁾Values represent an average of three determinations.³⁾Means in the column (A-C) and row (a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

거능을 보여 대조군으로 사용한 Vit. C와 유의적인 차가 없어 유사한 항산화 활성을 나타내었다($p < 0.05$). 동일한 농도의 70% 에탄올 추출물에 비하여 물 추출물에서 높은 활성을 나타내었다. Dong et al.(2004)의 연구에서는 정향의 물, 메탄올 및 에테르 추출물에서 DPPH radical 소거능이 각각 36.1, 30.9, 29.7%로 물 추출물에서 radical 소거능이 가장 우수하게 나타난 것으로 보고하였으며, 이는 본 연구에서의 정향 물 추출물에서 DPPH radical 소거능이 70% 에탄올 추출물보다 우수하게 나타난 결과와 유사한 경향을 보였다.

인체 내 노화 촉진과 관련이 있는 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있다. 항산화 활성을 측정하는 방법의 일종인 DPPH radical 소거능 측정은 비교적 간단하여 가장 널리 사용되는 방법으로 항산화 물질에 의한 전자공여에 의해 지질과산화 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical의 억제 정도를 간접적으로 측정하는 방법이다(Kim et al. 2009). 또한, Kang et al. (1996)은 DPPH radical 소거능은 phenol 물질에 대한 항산화작용의 지표로서 추출물의 phenol 물질 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 증가한다고 보고하였다. 이러한 결과는 정향 물 추출물에서 polyphenol 함량 증가로 인해 DPPH radical 소거능이 우수하게 나타난 본 연구결과와 유사하였다.

3. ABTS radical 소거능

정향 열수 및 70% 에탄올 추출물의 농도를 달리하여 ABTS radical 소거능을 측정한 결과는 <Table 3>과 같다. 열수 및 70% 에탄올 추출물 농도가 증가함에 따라 ABTS

radical 소거능은 유의적으로 증가하였으며, DPPH radical 소거능과 같이 농도의존적인 경향을 보였다($p < 0.05$). 열수 및 70% 에탄올 추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 93.87%, 94.01%의 높은 소거능을 나타내었으며, 대조군인 Vit. C와 유사한 활성을 보였다($p < 0.05$). 농도 100과 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 70% 에탄올 추출물은 물 추출물에 비해 ABTS radical 소거능이 높게 나타났으며, 대조군인 Vit. C보다 높은 소거능을 나타냈다($p < 0.05$). 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 열수 및 70% 에탄올 추출물에 비해 대조군인 Vit. C에서 ABTS radical 소거능이 가장 높게 나타났다($p < 0.05$).

ABTS radical 소거능은 DPPH radical 소거능과 달리 극성과 비극성 시료의 소거활성을 모두 확인할 수 있으므로 적용 범위가 넓다. 이 방법은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 양이온(ABTS^+)을 항산화성을 가진 물질에 의해 제거하여 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 측정 방법이다(Van et al. 1999). Choi et al.(2003)은 ABTS radical 소거능이 우수한 차 열수 추출물에서 DPPH radical 소거능도 높게 나타났고 두 방법 간에 높은 상관관계가 존재함을 보고하였는데, 이러한 결과는 ABTS radical 소거능이 우수한 정향 물 추출물 1,000 ppm에서 DPPH radical 소거능도 높게 나타난 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

4. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성

정향 열수 및 70% 에탄올 추출물의 농도를 달리하여 SOD 유사활성을 측정한 결과는 <Table 4>와 같다. 열수 및 70% 에탄올 추출물 농도가 증가함에 따라 SOD 유사활성은 유의적으로 증가하였으며 농도의존적인 경향을 보였다

<Table 4> SOD-like activity of *E. caryophyllata* Thunb. extract by water and 70% ethanol (%)

Extract solvent	Concentration (µg/mL)			
	100	250	500	1000
Water	29.70±0.09 ^{1)dA2)}	35.63±1.12 ^{cB}	46.30±2.90 ^{bB}	62.24±1.72 ^{aB}
70% ethanol	22.73±1.97 ^{dB}	32.14±1.67 ^{cB}	39.27±2.71 ^{bB}	48.38±1.59 ^{aC}
Vit. C	27.06±0.69 ^{dA}	56.41±0.38 ^{cA}	72.93±0.32 ^{bA}	75.83±0.43 ^{aA}

¹⁾Mean±SD

²⁾Values represent an average of three determinations.

³⁾Means in the column (A-C) and row (a-d) with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

(p<0.05). 250~500 µg/mL에서 물과 70% 에탄올 추출물간에 SOD 유사활성은 유의적인 차이가 보이지 않았으며, 대조군인 Vit. C에 비해 낮은 항산화성을 나타내었다(p<0.05). 1,000 µg/mL의 농도에서 물 추출물의 SOD 유사활성은 62.24%로 70% 에탄올 추출물에 비해 높게 나타났으나, 대조군인 Vit. C에 비해 낮은 항산화성을 나타내었다(p<0.05).

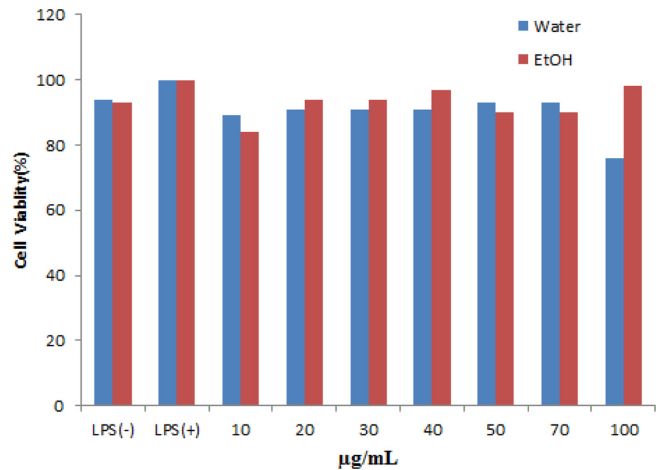
Superoxide dismutase(SOD)는 체내에 유해한 superoxide anion radical과 반응하여 과산화수소를 생성하는 항산화 효소로 알려져 있다(Ling et al. 2011). 생성된 과산화수소는 다시 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 세포를 방어하게 되므로 인체를 보호하는 데 없어서는 안 될 중요한 효소이다. SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로 열이나 알칼리에 약하므로 이러한 단점을 보완할 수 있는 SOD 유사활성에 대한 연구가 진행되고 있다. SOD 유사활성은 활성산소 중을 hydrogen peroxide (H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매 하는 pyrogallol의 생성량을 측정함으로써 superoxide의 산화 억제 작용을 알아볼 수 있는 방법이다(Benzie et al. 1996). Jeon et al.(2012)의 보고에 의하면 15.625~1,000 µg/mL 농도에서 참취 70% 에탄올 추출물과 aqueous 분획물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 각각 1.2±2.2~36.2±1.3%, 1.4±0.3~42.1±7.7%으로 본 연구결과와 같이 추출물 농도가 증가할수록 SOD 유사활성이 높아지는 농도의존적인 경향을 보였다.

5. 세포생존율

정향 물과 70% 에탄올 추출물의 세포독성을 RAW267.7 세포에서 확인 한 결과는 <Figure 1>과 같다. 100 µg/mL 농도의 물 추출물을 제외하고는 열수 및 70% 에탄올 추출물 모든 농도에서 세포 생존율에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

6. NO 생성 억제 효과

정향 열수 및 70% 에탄올 추출물의 nitric oxide (NO) 생성 억제를 알아보기 위해 LPS를 처리한 RAW264.7 세포를 대상으로 측정한 결과는 <Figure 2>와 같다. LPS를 처리한 RAW264.7 세포는 대조군보다 NO의 생성이 증가하였으나, 정향 열수 및 70% 에탄올 추출물은 10~100 µg/mL 농도에



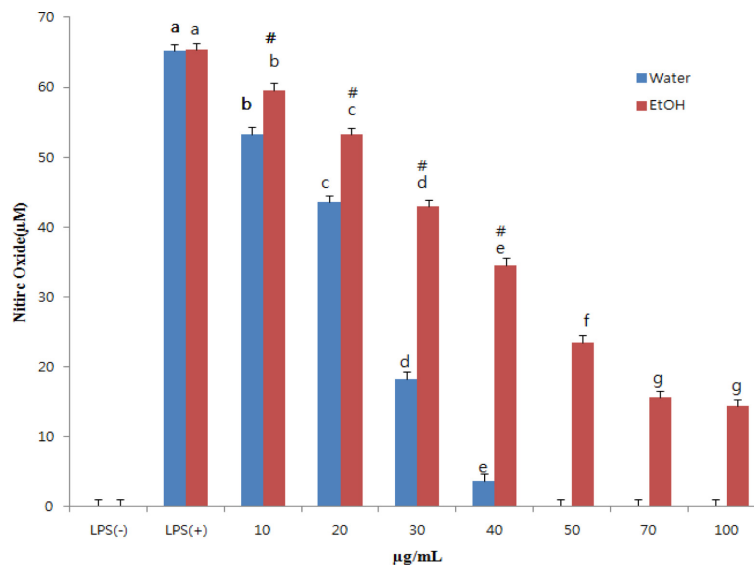
<Figure 1> Cytotoxicity of *E. caryophyllata* Thunb extract by water and 70% ethanol in RAW264.7

¹⁾Values are means±SE.

²⁾Values represent an average of three determinations.

서 NO 생성량이 유의적으로 감소하는 경향을 보였다(p<0.05). 추출물별에 따른 NO 생성 억제효과를 비교해 보면, 10~40 µg/mL 농도에서 70% 에탄올 추출물에 비하여 물 추출물에서 NO 생성 억제 효과가 유의적으로 낮게 나타내었다 (p<0.05). 특히 물 추출물의 경우 10~70 µg/mL에서 농도별 처리에서 독성이 관찰되지 않았으며, 이는 정향 물 추출물의 NO 생성억제가 독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하지 않는다는 것을 확인 하는 결과라고 사료된다.

체내 세포 조직에 어떠한 기질적인 변화를 가져오는 침습이 일어날 때, 다양한 염증 유도인자 중 nitric oxide (NO)는 대식세포, 간세포, 근육세포 등에서 생성되어 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 기능을 한다. NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되며 대식세포의 경우 LPS에 의해 iNOS가 발현된다(Aktan et al. 2004; Farlik et al. 2010). 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 점막손상을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다 (Oztuurk et al. 2005; Yoon et al. 2009). 천연물 추출용매에 따라 추출물의 NO 생성 억제 효과에 차이를 보여준 연구결과에 의하면, 다양한 용매로 추출한 비과엽 추출물들 중



<Figure 2> Inhibitory activity of *E. caryophyllata* Thunb extract by water and 70% ethanol on NO production

¹⁾ Values are means±SE.

²⁾ Values represent an average of three determinations.

^{3)a-c} Values with different superscripts indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's test.

^{4)#} Significant differences in comparison to *Eugenia caryophyllata* Thunb extracts at $p < 0.01$ by Student's t-test.

70% 에탄올 추출물은 열수추출물에 비해 NO 생성 억제 활성이 높게 나타났으나, 추출물의 5% 농도에서 세포독성을 나타냈다고 보고하였다(Park et al. 2015). 본 연구결과에서는 정향 물 추출물은 70% 에탄올 추출물에 비해 NO 생성 억제 활성이 높게 나타났으며, 이는 천연물의 추출 용매에 따라 NO 생성 억제 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 정향을 열수 및 70% 에탄올로 추출하여 추출물의 농도별에 따른 항산화 활성 및 항염 효과를 비교함으로써 추출용매에 따른 정향의 항산화 활성 및 항염 효과에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다. 정향 열수 및 70% 에탄올 추출물 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능은 유의적으로 증가하였으며, 특히 1,000 µg/mL에서 정향 물 추출물은 92.00%으로 Vit.C와 비슷한 소거능력을 보였다. ABTS radical 소거능과 SOD 유사활성도 정향 열수 및 70% 에탄올의 농도가 증가할수록 항산화 활성이 높게 나타났다. 열수 및 70% 에탄올 추출물 1,000 µg/mL에서 ABTS radical 소거능은 Vit. C와 유사한 활성을 보였다. 1,000 µg/mL의 농도에서 물 추출물의 SOD 유사활성은 70% 에탄올 추출물에 비해 높게 나타났으나, Vit. C에 비해 낮은 항산화성을 나타내었다. 100 µg/mL 농도의 물 추출물을 제외하고는 열수 및 70% 에탄올 추출물 10~70 µg/mL농도에서 세포 생존을 변화는 관찰되지 않았다. 정향 열수 및 70% 에탄올 추출물은 10~100 µg/mL 농도에서 NO 생성량이 유의적으로 감소하는 경향을 보였다 추출물별에 따른 NO 생성 억제효

과를 비교해 보면, 10~40 µg/mL 농도에서 70% 에탄올 추출물에 비하여 물 추출물에서 NO 생성 억제 효과가 유의적으로 낮게 나타내었다. 이상의 결과를 통하여 정향 열수 추출물은 70% 에탄올 추출물에 비해 항산화 작용 및 항염 효과에 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 천연소재로서 건강식품 개발에서 유용한 재료로 이용이 가능할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2016년 장안대학교 연구비로 이루어진 연구로 이에 감사를 표합니다.

References

Ahn CK, Lee YC, Yeom CA. 2000. Antioxidant and mixture effects of curry spices extracts obtained by solvent extraction. Korean J. Food Sci. Technol., 32(4): 491-499

Aktan F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci., 75(6):639-653

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem., 239(1):70-76

Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181: 1199-1203

Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of some commercial test. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 32(5):723-727

- Choi BB, Lee HJ, Bang SK. 2005. Studies on the volatile flavor components and biochemical characterization of *Artemisia princeps* and *A. argyi*. Korean J. Food & Nutr., 18(4):334-340
- Dogne JM, Hanson J, Supuran C, Pratico D. 2006. Coxibs and cardiovascular side-effects: from light to shadow. Curr. Pharm Des., 12(8):917-975
- Dong S, Moon JS, Rhee SK, Son JY. 2004. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 33(4):609-613 23
- Farlik M., Reutterer B, Schindler C, Greten F, Vogl C, Müller M, Decker T. 2010. Conventional initiation complex assembly by STAT and NF- κ B transcription factors regulates nitric oxide synthase expression, Immunity., 33(1):25-34
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic phosphomolybdc compounds as color regents. J. Biological Chem., 12(1):239-249
- Han JH, Moon HK, Chung SK, Kang WW. 2013. Comparison of Antioxidant Activities of Radish Bud (*Raphanus sativus* L.) According to Extraction Solvents and Sprouting Period. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 42(11):1767-1775
- Ito M, Murakami K, Yoshino M. 2005. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. Food Chem. Toxicol., 43(3):461-466
- Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Kim HR, Park DS. 2012. Antioxidant activity of extracts and fractions from *Aster scaber*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 41(9):1197-1204
- Kang SY, Kim TG, Park MS, Han HM, Jung KK, Kang JH, Moon AR, Kim SH. 1999. Inhibitory effects of *Eugenia caryophyllate*, *Ephedra sinica* and *Cinnamomum cassia* on the replication of HBV in HepG2 cells. J. Appl. Pharmacol., 7(2):133-137
- Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic ability of phenol compounds. Korean J. Food Sci. Technol., 28(2): 232-239
- Kaur G, Athar M, Alam M. 2010. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. Mol. Carcinog., 49(3):290-301
- Kawamata, H, Ochiai, N, Mantani, and K. Terasawa. 2000. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by *Juzen-taiho-to* in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage celline. Am. J. Chia. Med., 28(1):217-225
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. Korean J. Food Technol., 33(5):626-632
- Kim HB, Kim SK, Moon JY, Chang SJ. 2003. Quantification and varietal variation of free sugars in mulberry fruits. Korean J. Sericultural Sci., 45(1):80-84
- Kim HS, Hong MJ, Kang IY, Jung JY, Kim HK, Shin YS, Jun HJ, Suh JK, Kang YH. 2009. Radical scavenging activities and antioxidant constituents of oriental melon extract. J. Bio-Environment Control., 18(4):442-447
- Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY 2005. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. Korean J. Food Cookery Sci., 21(2):171-179
- Kwon HJ, Park CG. 2008. Biological activities of extracts from Omija (*Schizandra chinensis* Baillon). Korean J. Food Preserv., 15(4):587-592
- Lee OH, Jung SH, Son JY. 2004. Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 33(3):494-499
- Lee YC, Yoon JH. 1993. Antioxidative effects of volatile oil and oleoresin extracted from rosemary, sage, clove and nutmeg. Korean J. Food Sci. Technol., 25(4):351-354
- Lee YS, Joo EY, Kim NW. 2005. Antioxidant activity of extracts from the *Lespedeza bicolor*. Korean J. Food Preserv., 12(1):75-79
- Lemberkovics E, Czinner E, Szentmihalyi K, Balazs A, Sze E. 2002. Comparative evaluation of *Helichrysi flos* herbal extracts as dietary source of plant polyphenols, and macro-and microelements. Food Chem., 78(1):119-127
- Liao JF, Chiou WF, Shen YC, Wang GJ, Chen CF. 2011. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (Wuzhuyu) and its major bioactive components. Chinese Med., 6(1):1-8
- Ling J, Ha JH, Choi YY, Seo YC, Kim JS, Kim YO, Cha SW, Kim JC, Lee HY. 2011. Enhancement of cosmeceutical activities of Berberis koreana bark by high pressure ultrasonification extraction processes. Korean J. Medicinal Crop Sci., 19(1): 54-65.
- Makins R, Ballinger A. 2003. Gastrointestinal side effects of drugs. Expert Opin Drug Saf., 2(4):421-429
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47:469-474
- Oztuirk A, Ozbek H. 2005. The anti-inflammatory activity of eugenia caryophyllata essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. Eur. J. Gen. Med., 2(1):159-163
- Oztuirk A, Ozbek H. 2005. The anti-inflammatory activity of eugenia caryophyllata essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. Eur. J. Gen. Med., 2(4):159-163
- Park JO, Park JO, Joo CG. 2015. A Study on Whitening and Anti-

- inflammatory Effects of *Eriobotrya Japonica* Leaf Extracts with Different Extraction Methods. *J. Soc. Cosmet. Sci.*, 41(2):151-157
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Anath P, Min Y, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 26(9):1231-1237
- Seo SJ, Shim KB, Kim NW. 2011. Antioxidant effects of solvent fraction from *Nandina domestica* fruits. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 40(10):1371-1377
- Singh AK, Dhamanigi SS, Asad M. 2009. Anti-stress activity of hydroalcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). *Indian J. Pharmacol.*, 41(1):28-31
- Van DBR, Haenen GRMM, Van DBH, Bast A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.*, 66(4): 511-517.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46(10):4113-4117
- Wang C, Zhang J, Chen J, Fan Y, Shi Z. 2010. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Trop Plant Pathol.*, 35(3):137-143
- Woo WS. 1995. Olenolic compound. In *Natural product chemistry method*. 2nd ed. Seoul National University, Seoul, Korea, pp 61-157
- Yoon, WJ, Ham, YM, Kim, SS, Yoo BS, Moon JY, Baik JS, Lee NH, Hyun CG. 2009. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsia J. Biosci.*, 3(1):130-143

Received September 1, 2016; revised October 10, 2016; revised October 13, 2016; accepted October 13, 2016