

울피 추출물 및 분획물의 항산화 활성

박찬휘 · 강현 · 이성규

Antioxidant activity of ethanol extracts and fractions from *Castanea crenata* inner shell

Chan-Hwi Park · Hyun Kang · Sung-Gyu Lee

Received: 27 June 2022 / Revised: 28 June 2022 / Accepted: 28 June 2022
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study examined the antioxidant activity of ethanol extract and fraction from *Castanea crenata* inner shell *in vitro*. Antioxidant activity was evaluated through total polyphenol and flavonoid contents and DPPH radical scavenging ability using electron spin resonance (ESR). The total polyphenol contents of the 70% ethanol extract and ethyl acetate fraction were 39.76 mg GAE/g and 323.92 mg GAE/g ($p < 0.05$). The total polyphenol contents of the ethyl acetate fraction were higher than other fractions. Furthermore, the total flavonoid contents of ethyl acetate were higher than other fractions at 13.12 mg QE/g ($p < 0.05$). In DPPH radical scavenging ability measurement, the RC_{50} value of ethyl acetate was lower than ascorbic acid at 2.27 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$). In conclusion, this result showed that the ethyl acetate fraction of *Castanea crenata* inner shell 70% ethanol extract has high antioxidant activity.

Keywords antioxidant activity, *Castanea crenata* inner shell, ethyl acetate fraction, polyphenol, DPPH

서론

활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 산소의 연소과정에서 생성되는 부산물로서 주로 미토콘드리아의 에너지 생성 과정에서 생성된다. 적절한 양의 활성산소는 세균으로부터

터 신체를 보호할 수 있고, 세포의 성장, 세포사멸 및 신호 전달을 조절한다. 하지만 체내에 높은 농도로 존재할 경우 세포 내의 단백질, 지질을 산화시켜(Brieger et al. 2012) 세포의 노화 및 사멸을 촉진시킴으로써 당뇨병, 암, 뇌졸중 등의 질병을 유발할 수 있다(Kim and Kim 2020). 체내 활성산소는 catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) 같은 체내 항산화 효소나 외부 항산화제에 의해 억제될 수 있으며, 이를 통해 활성산소에 의해 유발될 수 있는 질병을 예방할 수 있다. 항산화제는 free radical과의 반응을 통해 비타민류와 필수 아미노산의 손실을 최소화하기 위해 사용되며(Lee et al. 2005), free radical을 억제할 수 있는 외부의 천연 항산화제로는 α -tocopherol (Vitamin E), ascorbic acid (Vitamin C) 등이 있다(Frankel 1996). α -tocopherol보다는 ascorbic acid가 항산화제로서 더 선호되는데 α -tocopherol은 높은 안정성을 가지나 경제적으로 좋지 못하다는 단점이 있다(Lee et al. 2005). 합성 항산화제에는 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT) 등이 있고 경제적이고 효과가 우수하다는 장점이 있지만 생체 내 안정성에 대한 논란이 존재하고(Kim et al. 2018), 실험동물에 고농도로 투여했을 때 간비대 증 유발 및 발암성을 나타내어(Lee et al. 2005), 천연물 유래 항산화제에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다.

울피는 너도밤나무과 밤나무의 밤의 속 껍질로 tannic acid, catechin, gallic acid, coumarin 등 항산화 성분의 함유량이 많아(Gu et al. 2018; Lee and Surh 2021) 체내에서의 활성산소종을 저해할 수 있는 천연 항산화제로서 활용될 수 있다. 최근 연구 결과를 통해 울피가 주름개선, 미백(Jang et al. 2011), 보습(Gu et al. 2018), 항아토피 활성(Choi et al. 2013), 항염 등의 효과가 있으며, 멜라닌 색소의 과다 침착을 저해하여 피부 미용에도 사용되고 있다고 보고되고 있다(Gu et al. 2018). 또한 Kim 등(2022)은 울피가 알레르기 천식 모델에서도 유의한 효과를 보였다고 보고하였고, Noh 등(2011)의 연구결과에

C.-H. Park · H. Kang · S.-G. Lee (✉)
단국대학교 보건복지대학 임상병리학과
(Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University, Cheonan-si, Chungnam, 31116, Republic of Korea)
e-mail: sung-gyu@dankook.ac.kr

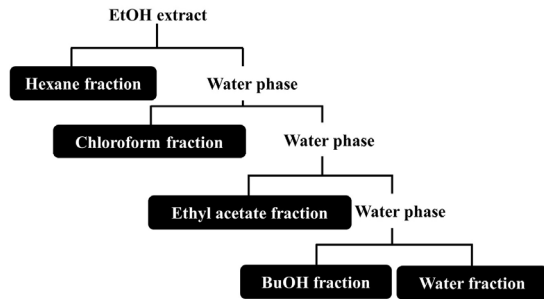


Fig 1 Diagram of *Castanea crenata* inner shell fraction preparation

따르면 율피는 간 보호 효과도 있는 것으로 보고되고 있다. 율피에 대한 다양한 연구가 진행되고 있지만 율피의 분획물에 대한 연구는 아직 부족한 상황이다. 이에 본 연구에서는 율피 추출물과 분획물의 기능성 소재로서의 가능성을 알아보고자 항산화 활성을 *in vitro* 시험을 통해 조사하였다.

재료 및 방법

추출물 및 분획물의 제조

율피를 분쇄기로 분말화한 후 율피 분말 100 g에 70% 에탄올을 10배수로 첨가하여 실온에서 72시간동안 추출하였다. 추출액은 Whatman No.3 filter paper (Whatman Ltd., Maidstone, Kent, UK)를 이용하여 여과한 후 55°C에서 감압농축하였다. 농축이 완료된 추출물은 동결건조해서 파우더화한 후 -70°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 율피 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, water층으로 분획한 후 동일한 과정을 거쳐 동결건조하였다(Fig. 1).

총 폴리페놀 함량 측정

시료용액 60 µL에 2배 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, USA) 60 µL를 넣고 실온에서 3분간 반응시킨 후 10% Na₂CO₃ (Sigma Co.)를 60 µL 넣고 실온에서 40분간 반응시킨 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid (Sigma Co.)를 사용하였고, 표준곡선을 작성하여 총 폴리페놀의 함량을 측정하였다

총 플라보노이드 함량 측정

시료용액 100 µL에 10% aluminium nitrate (Sigma Co.)와 1 M potassium acetate (Sigma Co.)를 20 µL씩 넣고 80% 에탄올을 860 µL을 가한 다음 실온에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin (Sigma Co.)을 사용하였고, 표준곡선을 작성하여 총 플라보노이드의 함량을 산출하였다.

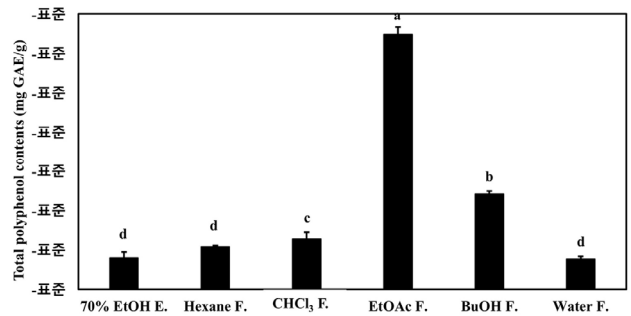


Fig 2 Total polyphenol contents in ethanol extracts and fractions from *Castanea crenata* inner shell. The total polyphenol content was analyzed as gallic acid equivalents (GAE) mg/g of extracts' fractions. Data were expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Different letters indicate significant differences at *p* < 0.05 using Duncan's multiple range test

Electron spin resonance (ESR)을 이용한 DPPH 라디칼 소거능 측정

메탄올에 용해시킨 60 µM DPPH와 농도별 시료용액을 동량 혼합하여 교반한 후 실온에서 2분간 방치하였다. 이후 capillary tube에 옮겨 ESR 분광광도계(Jeol Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 측정하였다. 측정조건은 center field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 5 mW, gain: 6.3 × 10⁵, temperature: 298 K이다. 시료는 음성 대조군의 활성을 절반으로 감소시키는 RC₅₀ 값을 산출하여 양성 대조군인 ascorbic acid과 비교 분석하였다.

통계처리

모든 실험의 데이터는 3회 분석의 평균값으로 산출하였다. 그룹 간 통계적 유의성 분석은 통계 프로그램 SPSS statistics (ver. 25, IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였고, 평균값의 통계적 유의성은 *p*<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결과

총 폴리페놀 함량 측정

율피에 존재하는 총 폴리페놀의 함량은 gallic acid를 기준물질로 측정하였고, 측정된 함량은 Figure 2에 나타내었다. 70% 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량은 39.76 mg GAE/g 이었고, 추출물의 분획물의 총 폴리페놀 함량은 ethyl acetate, butanol, chloroform, hexane, water순으로 각각 323.92, 120.35, 63.80, 53.84, 38.18 mg GAE/g이었다. 이를 통해 ethyl acetate 층의 총 폴리페놀 함량이 가장 높음을 확인하였다(*p* < 0.05).

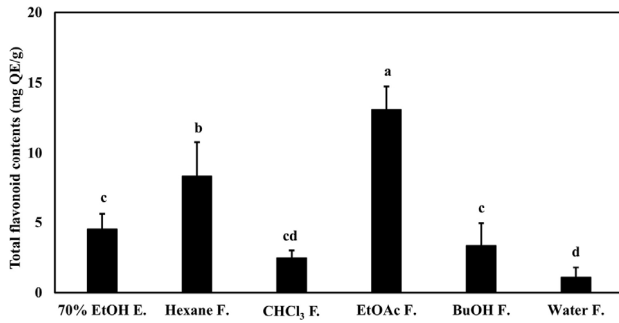


Fig 3 Total flavonoid contents in ethanol extracts and fractions from *Castanea crenata* inner shell. Total flavonoid content analyzed as quercetin equivalents (QE) mg/g of extracts fractions. Data were expressed as mean \pm standard deviation (n = 3). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

총 플라보노이드 함량 측정

울피에 존재하는 총 플라보노이드의 함량은 quercetin을 기준물질로 하여 측정되었으며, 측정된 함량은 Figure 3에 나타났다. 70% 에탄올 추출물에서 총 플라보노이드 함량은 4.54 mg QE/g이었고 추출물의 분획물의 총 플라보노이드 함량은 ethyl acetate, hexane, butanol, chloroform, water 순으로 각각 13.12, 8.31, 3.36, 2.50, 1.10 mg QE/g이었다. 이를 통해 ethyl acetate 층이 가장 많은 플라보노이드를 함유하고 있음을 확인하였고($p < 0.05$), 총 폴리페놀 함량의 측정 결과와 일치하였다.

DPPH 라디칼 소거능

ESR을 이용해 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Figure 4에 나타났다. 울피 추출물의 RC_{50} 값은 35.60 μ g/mL였고,

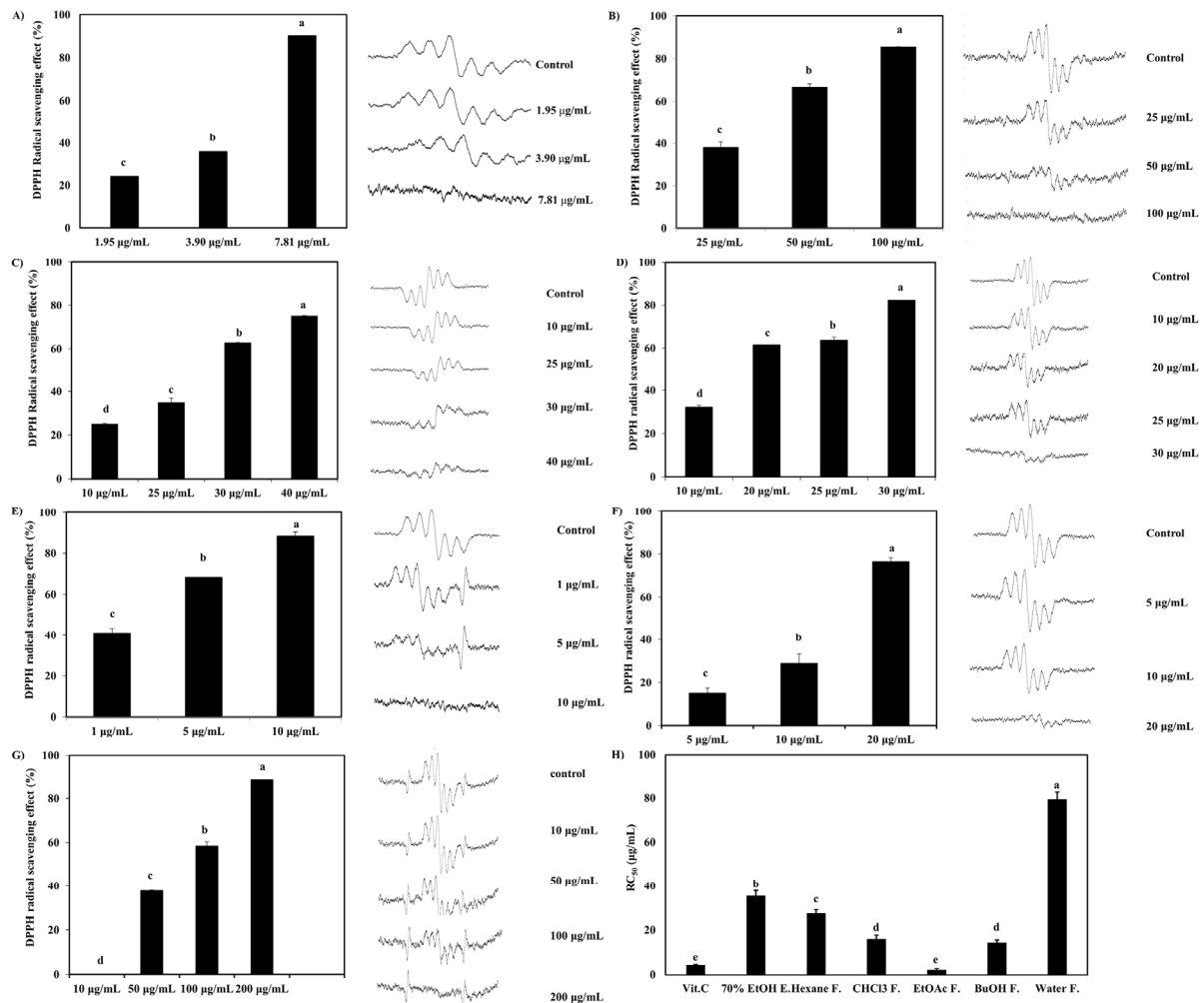


Fig 4 DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts and fractions from *Castanea crenata* inner shell. The DPPH radical scavenging activity was measured using an ESR spectrophotometer. Graph and ESR spectra indicate the DPPH radical scavenging effect of (A) ascorbic acid, (B) 70% ethanol extracts, (C) hexane fractions, (D) chloroform fractions, (E) ethyl acetate fractions, (F) butanol fractions, and (G) water fractions. Meanwhile, (H) indicates the RC_{50} value of DPPH radical scavenging activity. Data were expressed as mean \pm standard deviation (n = 3). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

분획물의 RC_{50} 값은 ethyl acetate, butanol, chloroform, hexane, water 순으로 각각 2.27, 14.44, 16.04, 27.69, 79.54 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과 ethyl acetate 층의 라디칼 소거 활성이 가장 좋았고, 양성 대조군인 ascorbic acid의 4.45 $\mu\text{g/mL}$ 보다 더 좋은 활성을 보였다($p < 0.05$).

고찰

폴리페놀은 식물에 널리 분포하고 있는 생물활성 화합물로 폴리페놀의 활성은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 연구가 진행되고 있다. 연구를 통해 폴리페놀은 항산화 활성 외에 심혈관 질환, 염증 등에 대해 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다(Garcia and Larrosa 2020).

폴리페놀은 플라보노이드 군과 비플라보노이드 군으로 나뉘어질 수 있다. 플라보노이드 군에는 flavone, catechin, anthocyanin 등이 포함되며, 비플라보노이드군에는 coumarin, lignan 등이 포함되어 있다(Ganesan and Xu 2017). 폴리페놀에 속하는 플라보노이드는 가장 많이 존재하는 식물의 천연물 중 하나로 C6-C3-C6의 구조를 가지고 있으며, flavanones, flavones, flavonols, flavanols, isoflavones, isoflavanones으로 분류된다. 플라보노이드는 항산화, 항암, 항균 등의 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 전립선, 폐암, 난소암 등에 대해 암세포의 발달 방지 및 발암물질의 작용 전 역제를 통해 항암 활성을 나타낸다(Sajid et al. 2021).

Kwon 등(2001)이 밤 귀피의 분획물에서 ethyl acetate 및 diethyl ether 층에서 항산화 활성이 가장 높다고 보고한 결과와 비교했을 때 본 연구에서도 율피의 분획물 중 ethyl acetate 층의 항산화 활성이 가장 높음을 확인하였다. Lee 등(2012)의 연구결과에 따르면 플라보노이드 함량이 항산화 활성과 연관이 있으므로 율피의 ethyl acetate 분획물은 항산화제로서 이용될 수 있다고 생각된다.

DPPH는 짙은 자주색을 띠며 안정적인 자유 라디칼로서, DPPH를 이용한 라디칼 소거능 측정은 빠르고 간단하여 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위해 널리 사용되는 방법이다. DPPH는 물질로부터 전자나 수소를 받게 되면 diphenylpicryl hydrazine으로 환원되며 보라색이 노란색으로 변화하는데 이를 이용하여 다양한 식물의 항산화능을 측정하는데 활용되고 있다(Le et al. 2019; Park et al. 2014). Electron spin resonance (ESR)은 홀전자를 가지는 자유 라디칼을 정량할 수 있는 직접적인 방법으로서 피크의 높이가 감소할수록 자유라디칼 소거 활성이 높아진다는 것을 의미한다(Cha et al. 2006; He et al. 2014).

Choi 등(2013)은 율피의 열수 추출물 및 발효물 1 mg/mL에서 DPPH 라디칼 소거능이 각각 73.74%, 67.17%라고 보고하였다. 본 연구에서의 율피 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 200 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 80% 이상의 라디칼 소거능을 보이므로 본 연구에 쓰인 율피 추출물 및 분획물이 우수한 라

디칼 소거능을 가지고 있다고 할 수 있다. Kim 등(2014)은 추출 조건을 달리 한 율피 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과 RC_{50} 값이 10-407 $\mu\text{g/mL}$ 라고 보고하였고, 이와 비교했을 때 본 연구에서의 율피 추출물 및 분획물의 RC_{50} 값이 2.27-79.54 $\mu\text{g/mL}$ 이므로 율피 추출물 및 분획물이 우수한 라디칼 소거능을 가진다는 것을 확인하였다.

용매를 이용한 분획물의 제조는 용매의 극성이 다르다는 점을 이용하여 분리하는 과정으로 ethyl acetate는 저극성의 용매로서 저분자이면서 저극성의 물질인 플라보노이드와 알칼로이드가 분리되게 된다(Kim et al. 2019). Nawaz 등(2020)의 연구에 따르면 용매의 극성도에 따른 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과 4-6 정도의 수준의 극성을 가지는 용매 추출물에서의 라디칼 소거능이 높게 측정되었고, ethyl acetate는 4-5 정도의 극성도를 가지므로 본 연구의 ethyl acetate 층의 항산화 활성이 높게 나온 결과와 일치하였다. Galanakis 등(2013)은 페놀 화합물들의 극성에 대해 조사하였고, hydroxycinnamic acid, hydroxybenzoic acid 등이 극성의 정도를 나타내는 log P가 1-2 수준으로 저극성을 나타낸다고 보고하였다. hydroxycinnamic acid와 hydroxybenzoic acid는 항산화 활성을 나타낼 수 있는 페놀 화합물로서(Cizmarova et al. 2021) 분획 과정에서 시료의 포함되어 있던 화합물이 ethyl acetate 층에 용해되면서 ethyl acetate 분획물이 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 사료된다.

적요

본 연구에서는 율피 추출물 및 분획물의 항산화 활성을 *in vitro* 실험을 통하여 조사하였다. 총 폴리페놀 함량은 율피의 70% 에탄올 추출물에서 39.76 $\mu\text{g/mL}$ 였고 분획물 중에서는 ethyl acetate 층의 함량이 323.92 $\mu\text{g/mL}$ 으로 가장 높았다($p < 0.05$). 총 플라보노이드 함량 측정 결과 폴리페놀 측정 결과와 유사하게 ethyl acetate 분획물의 함량이 13.12 $\mu\text{g/mL}$ 으로 가장 높았다($p < 0.05$). DPPH 라디칼 소거능 측정 결과 ethyl acetate 분획물의 RC_{50} 값이 2.27 $\mu\text{g/mL}$ 으로 양성 대조군인 ascorbic acid보다 낮은 RC_{50} 값을 나타내었다($p < 0.05$). 모든 결과를 종합해보았을 때, 율피의 70% 에탄올 추출물과 분획물 중 ethyl acetate 분획물의 항산화 활성이 가장 높게 나타났음을 확인하였다.

이에 본 연구의 결과는 율피를 기능성 소재로서 활용하는데 기초 자료로 쓰일 것으로 기대되며, ethyl acetate 분획물에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

사사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.2021R1F1A1063617).

References

- Brieger K, Schiavone S, Miller Jr FJ, Krause KH (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, 142:w13659
- Cha SH, Heo SJ, Jeon YJ (2006) Screening for DPPH Free Radical Scavenging Activities of Autogenous Seaweeds in Jeju Island Using a Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy. *Journal of Marine Bioscience and Biotechnology* 1:252-259
- Choi MO, Kim BJ, Jo SK, Jung HK, Lee JT, Kim HY, Kweon DJ (2013) Anti-allergic activities of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifementans*. *Korean Journal of Food Preservation* 20:583-591
- Cizmarova B, Birkova A, Hubkova B, Bolerazska B (2021) Pycnogenol - extract from French maritime pine bark (*Pinus pinaster*), as an effective antioxidant against superoxide radical. *Functional Food Science* 1:14-22
- Frankel EN (1996) Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food chemistry* 57:51-55
- Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V (2013) A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *International Journal of Food Properties* 16:382-396
- Ganesan K, Xu B (2017) Polyphenol-Rich Lentils and Their Health Promoting Effects. *International journal of molecular sciences* 18:2390
- Garcia-Conesa MT, Larrosa M (2020) Polyphenol-Rich Foods for Human Health and Disease. *Nutrients* 12:400
- Gu YR, Kim JH, Hong JH (2018) The anti-oxidant, whitening and anti-wrinkle effects of *Castanea crenata* inner shell extracts processed by enzyme treatment and pressurized extraction. *Korean Journal of Food Preservation* 25:79-89
- He W, Liu Y, Wamer WG, Yin JJ (2014) Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis* 22:49-63
- Jang MJ, Cheon SJ, Kim HY, Kwon DJ, Kim SH, Lee JT (2011) The Anti-Wrinkle and Whitening Effect of Extracts of *Castanea crenata* Inner Shell. *Journal of Life Science* 21:734-738
- Kim CY, Kim JW, Jeong JS, Lim JO, Ko JW, Kim TW (2022) Inner Shell of Chestnut (*Castanea crenata*) Suppresses Inflammatory Responses in Ovalbumin-Induced Allergic Asthma Mouse Model. *Nutrients* 14:2067
- Kim JY, Kim SY, Kwon HM, Kim CH, Lee SJ, Park SC, Kim KH (2014) Comparison of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity on Chestnut, Chestnut Shell and Leaves of *Castanea crenata* Extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science. The Korean Society of Medicinal Crop Science* 22:8-16
- Kim KC, Eom TK, Kim JS (2019) Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Fruit Extracts from *Daphniphyllum macropodum*. *Journal of Advanced Engineering and Technology* 12:149-155
- Kim SJ, Kim GH (2020) Plants from Ulleung island ameliorate lipid accumulation and oxidative stress in oleic acid-induced in HepG2 Cells. *Korean Journal of Food Preservation* 27:817-828
- Kim, YJ, Kim SY, Jeong MJ, Lee UT, Choo ST, Youn SN, Kim MR (2018) Antioxidant effect of ethanol extract from *Plantaginis Herba*. *The Korea Journal of Herbology* 33:37-43
- Kwon EJ, Kim YC, Kwon MS, Kim CS, Kang WW, Lee JB, Chung SK (2001) Antioxidative Activity of Solvent Fraction and Isolation of Antioxidative Compound from Chestnut Husk. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 30:726-731
- Le DD, Nguyen DH, Zhao BT, Min BS, Song SW, Woo MH (2019) Quantitation and Radical Scavenging Activity Evaluation of Iridoids and Phenylethanoids from the Roots of *Phlomis umbrosa* (Turcz.) using DPPH Free Radical and DPPH-HPLC Methods. and their Cytotoxicity. *Natural Product Sciences*. 25:122-129
- Lee JY, Surh JH (2021) Effect of the Addition of Chestnut Inner Shell Powder on the Physicochemical and Sensory Attributes of Yanggaeng. *Korean Journal of Food and Cookery Science* 37:31-40
- Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH (2012) Vitamin C, Total Polyphenol, Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of Several Fruit Peels. *Korean Journal of Food Science and Technology* 44:540-544
- Lee YS, Joo EY, Kim NW (2005) Antioxidant Activity of Extracts from the *Lespedeza bicolor*. *Korean Journal of Food Preservation* 12:75-79
- Nawaz H, Shad MA, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N (2020) Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 56: e17129
- Noh JR, Kim YJ, Gang GT, Hwang JH, Lee HS, Ly SY, Oh WK, Song KS, Lee CH (2011) Hepatoprotective effects of chestnut (*Castanea crenata*) inner shell extract against chronic ethanol-induced oxidative stress in C57BL/6 mice. *Food and Chemical Toxicology* 49:1537-1543
- Park CH, Kim KH, Yook HS (2014) Free Radical Scavenging Ability and Quality Characteristics of Yanggaeng Combined with Grape Juice. *The Korean Journal of Food And Nutrition* 27:596-602
- Sajid M, Channakesavula CN, Stone SR, Kaur P (2021) Synthetic Biology towards Improved Flavonoid Pharmacokinetics. *Biomolecules* 11:754