

碩士學位論文

새우나무 분획물의 통합적 항산화 능력

The background features a large, faint watermark of the Jeju National University logo. The logo is circular, containing a stylized flame or leaf design in blue, green, and purple. The text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' is written around the top half of the circle, and '제주대학교' is written around the bottom half. In the center of the logo, there is a smaller emblem with 'JEJU 1952' and a book icon.

濟州大學校 大學院

食品工學科

朴宰成

2010年 2月

새우나무 분획물의 통합적 향산화 능력

指導教授 任 尙 彬

朴 宰 成

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2010年 2月

朴宰成의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 河 璉 桓 印

委 員 _____ 高 榮 煥 印

委 員 _____ 任 尙 彬 印

濟州大學校 大學院

2010年 2月

Integral Antioxidant Capacity of Fractions
from *Ostrya Japonica*

Jae-Sung Park

(Supervised by professor Sang-Bin Lim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of master of engineering

2010. 2.

This thesis has been examined and approved.

Jin-Hwan Ha, Thesis director, Prof. of Food Science and Engineering

Young-Hwan Ko, Prof. of Food Science and Engineering

Sang-Bin Lim, Prof. of Food Science and Engineering

February 2010

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Summary	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
2. 실험방법	5
1) 고압용매 추출	5
2) Sephadex LH-20 column에 의한 분획	6
3) 총페놀 함량 측정	6
4) 통합적 항산화 능력 측정	7
5) GC-MS에 의한 정성 및 정량 분석	8
III. 결과 및 고찰	10
1. Sephadex LH-20 column에 의한 분획	10
2. 총페놀 함량	12
3. 통합적 항산화능력	14
4. GC-MS에 의한 폴리페놀 성분 정성 및 정량 분석	19
IV. 요약	28
참고문헌	29

Summary

Ostrya japonica, a natural plant in Jeju, was extracted by a pressurized liquid (40% EtOH, 50°C, 13.6 MPa, 10 min), and the extract was fractionated on Sephadex LH-20 column chromatography, and their total phenolics (TP), integral antioxidative capacity(IAC), individual phenolic compounds were evaluated. Eight fractions(F1~F8) were obtained, and relative contents of ethanol fraction(F1~F6) and methanol fraction(F7, F8) were 65.9% and 34.1%, and those of F2, F7, and F8 were high as 32.9%, 18.9%, and 15.2%, respectively. TP of methanol fractions was high as 672.8 and 613.3 mg catechin/g in F8 and F7, respectively, compared with those of ethanol fractions as F4(438.4), F5(411.1), and F6(372.9). High integral antioxidative capacity in F5 and F4 was found as 7.71 and 6.41 μmol ascorbic acid equivalents/g in water-soluble substances, and as 1.78 and 1.53 μmol trolox equivalents/g in lipid-soluble substances. Identification and quantification of fractions was performed by GC-MS. F1~F3 fractions contained several nonphenolic compounds such as hexadecanoic acid, di-(2-ethylhexyl) phthalate, and sugars, whereas F4~F8 had a predominant content of phenolic compounds. Catechin was present in all five fractions(F4~F8) and high in F7 and F8 as 61.0 and 38.0 mg/g, respectively. High content of protocatechuic acid was found in F8 and F7 as 70.6 and 53.8 mg/g, respectively. F6, F5, and F4 fractions had a high content of quercetin as 123.8, 35.9, and 23.5 mg/100g, respectively.

I. 서론

인체는 생명유지에 필요한 에너지를 만드는 과정에서 호흡을 통해 끊임없이 산소를 공급받는다. 그런데 호흡과정에서 흡입한 산소 중 일부(약 2~3%)는 활성산소라는 유독한 물질로 전환되어 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있는데(1), 이러한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에는 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxy radical($\cdot\text{OH}$), 과산화수소(H_2O_2) 등이 있다. 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의 세포성분을 쉽게 공격하여 산화적 손상들을 유발시킨다(2).

따라서 활성산소를 제거하므로써 산화적 스트레스에 의해 야기되는 노화와 각종 질환의 억제 및 치료를 위한 항산화제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이러한 항산화제에는 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl gallate(PG)와 천연항산화제인 tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등이 있다. 그런데 페놀계 합성항산화제인 BHT와 BHA는 항산화 효과와 경제성이 뛰어나지만, 단용 또는 혼용으로 일정수준 이상 섭취시 여러가지 질병을 유발시킬 수 있다는 보고가 있다(3,4). 또한 합성항산화제는 이취가 있고 고온에서 불안정하며(5,6) 기형발생인자 및 발암물질이 될 수 있고(7), 특히 과도한 복용은 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 일으키는 것으로도 알려져 있다(8). 따라서 합성항산화제를 대체할 수 있으면서 생체에 부작용이 없고 항산화력이 강한 천연항산화제를 천연물로부터 분리하여 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

식물체의 생육단계에서 생성되는 이차대사물질인 phytochemical은 항산화활성뿐만 아니라 인간의 건강과 영양학적 측면에 연관된 많은 생리활성이 밝혀지고 있다. 특히 폴리페놀은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 화학구조와 분자량을 가지며 하나 이상의 phenolic hydroxyl group을 가지기 때문에 단백질 또는 효소단백질, 기타 2가 금속이온 및 기타 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며 이런 종류의 화합물은 항산화 및 항암효과 등 여러 생리활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(9~12).

지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물 유래로서 주로 폴리페놀 화합

물인 것으로 알려져 있는데(13), 특히 flavonoid는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에 활용되고 있다(14). 또한 최근 각종 천연물로부터 항산화성 생리활성 물질을 검색하고 분리하여 그 성분이 flavonoid 화합물임을 규명한 연구들이 많이 보고되어 있다(15,16).

천연물로부터 생리활성 물질을 추출하는데 있어서 가장 우선적으로 고려해야 할 것은 추출수율 및 생리활성 물질의 활성도이다. 폴리페놀 화합물은 다양한 구조와 극성을 가지고 있고 빛과 산소에 민감하므로 추출하는데 어려움이 있다. 고압용매 추출법은 높은 온도와 압력을 이용한 추출방법으로서, 높은 온도는 용매점성을 감소시켜 목적성분에 대한 용매의 용해도를 향상시키고 analyte-matrix bond를 파괴시키며, 높은 압력은 추출용매와 시료간의 접촉을 증가시켜 목적성분의 추출을 용이하게 한다(17). 그런데 추출물 중에는 매트릭스가 복잡한 lipid, pigment, resin과 같은 고분자 물질이 존재하며 폴리페놀 화합물은 이들과 혼재하여 화학적으로 복잡성을 나타내어 정성, 정량 분석하는데 어려움이 있고(17,18) 생리활성 및 영양학적 가치를 감소시킨다(19,20). 따라서 추출 후 clean-up 과정은 필수적인데 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하여 폴리페놀 성분을 분리, 정제하고 있다(21~23).

새우나무(*Ostrya japonica*)는 우리나라 남부 산 중턱 이하의 산골짜기에 나는 낙엽 교목으로 키 20 m, 지름 70 cm이며 수피는 갈색 또는 회갈색을 띠고 있다. 잎은 호생하며 난형 또는 난상 타원형으로 길이가 5~13 cm이고 폭은 3~5 cm이다. 측맥이 9~13쌍이며 가장자리에 겹톱니가 있고 양면에 곧게 선 잔 털이 있다(24). Hyun 등(25)은 제주지역에 자생하는 식물 54종을 대상으로 하여 메탄올 추출물의 총페놀 함량과 생리활성을 측정된 결과 새우나무 추출물의 총페놀 함량이 가장 높았으며 DPPH 소거활성 및 tyrosinase 저해활성도 높은 수준을 나타내었다. Kim(26)은 새우나무의 폴리페놀 성분으로 catechin, quercetin, chlorogenic acid, caffeic acid, protocatechuic acid 등이 존재하는 것으로 보고하였으며, 특히 catechin은 건조시료 100 g당 2,455 mg로 가장 높은 함량을 나타내어 새우나무의 주요 폴리페놀 성분이라고 보고하였다.

녹차의 주요성분으로 알려진 catechin은 구조상 많은 hydroxyl radical (-OH)

을 가지고 있어 유지의 free radical 반응을 막아주고 항암효과 및 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있으며(27,28), 중금속류 제거 작용(29), 중추신경계 활성화(30), 항돌연변이 및 항알레르기 작용(31) 등 여러 약리 작용이 보고되고 있다. 또한 새우나무 추출물에는 catechin 외에도 quercetin, chlorogenic acid, caffeic acid, protocatechuic acid 등 다른 폴리페놀 성분들이 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(32~36). 따라서 본 연구에서는 제주도에 자생하는 새우나무를 고압용매 추출하고 column chromatography로 분획한 후 분획물의 통합적 항산화 활성을 측정하고 폴리페놀 성분을 정성, 정량하여, 새우나무 추출물이 천연 항산화제와 기능성 식품 첨가제로 활용 가능성을 검토하였다.



II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 재료는 제주도에 자생하고 있는 새우나무(*Ostrya japonica*)의 가지와 잎을 채집하여 세척, 음건하고 분쇄기(MF 10.1, Ika Work, Inc., USA)로 분쇄한 후 30 mesh를 통과하는 입자를 취하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 고압용매 추출

본 실험에 사용한 고압용매 추출장치(SFX 3560, Isco Inc., USA)는 syringe pump(260D, 100DX, Isco Inc, USA), 두 pump를 통제하는 controller와 유속조절을 위한 restrictor, sample cartridge가 장착되는 고압 chamber 및 추출물의 수집부로 구성되어있다. 추출시 추출용매의 흐름을 용이하게 하기 위하여 sample cartridge 밑부분에 sea sand(15~20 mesh, Junsei Chemical Co., Ltd.) 2 g을 충전하고 시료 1 g을 충전한 후, 다시 cartridge 윗부분에 sea sand 5.2 g을 충전하여 고압 chamber에 장착하였다. Syringe pump에서 가압된 추출용매는 supply valve를 통하여 고압 chamber 내의 cartridge에 주입된 후 일정온도에서 일정시간 동안 정지 추출하였다. 정지 추출이 완료된 후 추출용매는 시료가 충전된 cartridge를 흐르면서 추출을 행하였고 추출물은 restrictor를 통하여 collection vial에 포집되었다. 포집된 추출물은 진공회전증발농축기로 농축하였고 추출용매로 10 mL 정용한 후 $0.45\ \mu\text{m}$ cellulose acetate filter(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)로 여과하여 -20°C 에 저장하였다. 추출조건은 Kim(20)이 최적화한 고압용매 추출조건을 사용하였는데, 추출용매는 EtOH:H₂O(40:60, v/v), 추출온도는 50°C , 추출압력은 13.6 MPa, 추출시간 및 횟수는 10분씩 2회, 추출용매 유속은 1 mL/min, 정지 추출시간은 3분이었다.

2) Sephadex LH-20 column에 의한 분획

고압용매 추출법을 이용하여 얻은 새우나무 추출물을 Sephadex LH-20 column을 이용하여 분획하였다. 먼저 분획 컬럼은 Sephadex LH-20(particle size 25~100 μm , Sigma, USA) 100 g을 100% 에탄올로 24시간 동안 팽윤시킨 다음, 동일용매를 이용하여 glass column(600 \times 30 mm O.D.)에 충전시켜 제조하였다. 추출물의 분획은 추출물 6 mL를 컬럼에 로딩시킨 후 에탄올 1,000 mL와 메탄올 1,000 mL을 전개용매로 하여 컬럼에 흡착된 시료를 용출하였고 fraction collector(KMC-2000, Vision Scientific Co. LTD, Korea)를 이용하여 test tube 당 7 mL 씩 분획물을 포집하였다. 포집된 분획물은 UV/Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, NY, USA)를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 분획물은 진공회전증발농축기로 농축하였고 100% 에탄올로 20 mL 정용한 후 -20°C 에서 저장하면서 분석용 시료로 사용하였다. 가용성 고형분의 함량은 분획물 1 mL를 취하여 105°C 에서 항량이 될 때까지 건조한 후 증발잔사의 양으로 나타내었다.

3) 총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 Peschel 등(37)의 방법에 의하여 측정하였다. 시료 0.1 mL에 증류수 7.9 mL와 Folin-Ciocaltaeu reagent(Fluka, Switzerland) 0.5 mL를 가하고 2분후 20% sodium carbonate anhydrous solution 1.5 mL를 혼합하였다. 상온, 암소에서 2시간 반응시킨 후 흡광도를 ELISA reader(Multiskan EX, Thermo Electron Co., Vantaa, Finland)를 이용하여 750 nm에서 측정하였다. 총페놀 함량은 (+)-catechin(Fluka, Germany)을 표준품으로 200~1000 mg/L 농도로 검량선을 작성한 후 (+)-catechin equivalents(mg/g)로 나타내었다.

4) 통합적 항산화 능력 측정

새우나무의 고압용매 추출물과 분획물의 통합적 항산화 능력은 Besco 등(38)의 방법에 따라 PCL(photochemiluminescence)법에 의해서 분석하였다. 수용성 항산화력은 친수성 kit(ACW, Integral antioxidative capacity of water soluble substances)를, 지용성 항산화력은 소수성 kit(ACL, Integral antioxidative capacity of lipid soluble substances)를 Analytik Jena AG(Jena, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, Photochem system(Berlin, Germany)으로 측정하였다.

수용성 항산화력(ACW protocol)은 다음과 같이 시약을 제조한 후 측정하였다. Ascorbic acid standard solution중 Reagent 3 working solution(R③-WS)은 Reagent 3(photosensitizer, R③) vial에 Reagent 2(buffer solution, R②)를 750 μL 가하여 제조하였고, Reagent 4 working solution(R④-WS)은 490 μL Reagent 1(R①)과 10 μL H_2SO_4 를 Reagent 4(ascorbic acid, R④)에 혼합하여 R④ stock solution을 제조한 후 이 용액을 R①로 100배 희석하여 제조하였다. R④-WS 10 μL 에는 1 nmol의 ascorbic acid (표준용액)가 함유되어 있다. 수용성 항산화능력 측정은 R① 1,500 μL 와 R② 1,000 μL 가 들어있는 sampling tube에 R③-WS 25 μL 와 R④-WS를 10~50 μL 를 가하여 측정한 후 검량선을 작성하였고, 시료는 R① 1,500 μL , R② 1,000 μL , R③-WS 25 μL 에 시료 10 μL 를 가하여 측정곡선의 경사면을 측정한 후 공시료 및 시료의 lag phase값의 차이를 산출하였다.

지용성 항산화력(ACL protocol)은 다음과 같이 시약을 제조한 후 측정하였다. Trolox standard solution은 다음과 같이 제조하였다. R③ vial에 R②를 750 μL 가하여 R③-WS를 제조하였고, R④-WS는 R① 500 μL 를 R④(trolox) vial에 혼합하여 R④ stock solution을 제조한 후 이 용액을 R①로 100배 희석하여 제조하였다. 이 용액 10 μL 에는 1 nmol의 trolox(표준용액)이 함유되어 있다. 지용성 통합적 항산화능력은 R① 2,300 μL 와 R② 200 μL 가 들어있는 sampling tube에 R③-WS 25 μL 와 R④-WS 10~50 μL 를 가하여 측정한 후 검량선을 작성하였고, 시료는 R① 2,300 μL , R② 200 μL , R③-WS 25 μL 에 시료 10 μL 를 가하여 측정곡선 아래의 면적을 적분하여 검출한 후 공시료 적분 값과의 차이를 산출하였다.

수용성 통합적 항산화능력은 건조시료 g당 μmol ascorbic acid equivalents로, 지용성 통합적 항산화능력은 건조시료 g당 μmol trolox equivalents로 나타내었다.

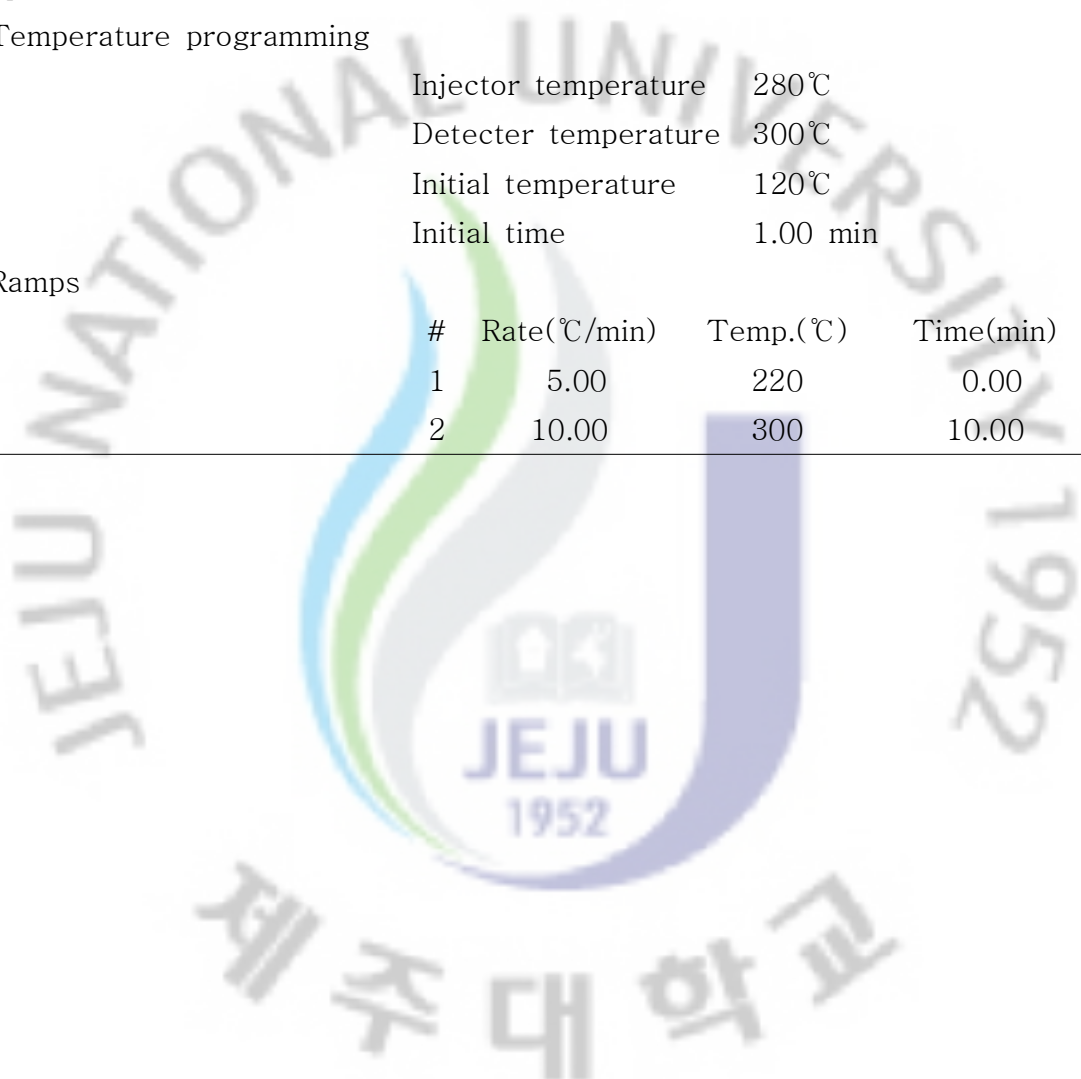
5) GC-MS에 의한 정성 및 정량 분석

새우나무 고압용매 추출물의 분획물별 정성 및 정량분석은 Chiou 등(39)의 방법에 의해 수행하였다. Sample 0.5 mL에 3 M HCl 0.25 mL을 가하여 80°C에서 1 시간 동안 산 가수분해 시키고 암소에서 냉각한 후 1 M KH_2PO_4 0.5 mL를 가하였다. Sep-pak C8(WAT036780, Waters, USA)을 ethyl acetate 3 mL, methanol 3 mL, bi-distilled water 6 mL로 활성화 시킨 후 상압 하에서 산 가수분해된 시료 0.5 mL를 로딩한 후 SPE vacuum manifold(Supelco, PA, USA)로 감압하여 용매와 수분을 완전히 제거하였다. Sep-pak에 흡착되어 있는 폴리페놀 성분을 ethyl acetate 3 mL로 용출시키고 35°C에서 용매를 진공회전증발농축기로 제거한 후 잔사를 methanol 0.5 mL에 용해시키고 internal standard(3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol, 995 mg/L, 10 μL)와 혼합하였다. 진공회전증발농축기로 다시 용매를 제거하고 BSTFA(Supelco, PA, USA) 250 μL 를 가하여 75°C에서 20분간 유도체화 시킨 후 1 μL 를 GC-MS에 주입하여 분석하였다.

GC-MS는 Hewlett-Packard사의 HP 6890 series GC system과 Agilent Technologies사의 5973 Network series mass selective detector가 capillary direct inlet으로 연결되어 있다. Sample injection은 Agilent Technologies사의 7683B series autosampler를 사용하였으며 기기분석조건은 Table 1과 같았다. 분획물별 정성분석은 reference compound와의 머무름 시간(retention time, RT) 비교 및 total ion chromatogram(TIC)을 Wiley library search하여 fragment ion을 비교하여 확인하였고, 폴리페놀 성분의 함량은 각 peak의 면적을 internal standard인 3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol의 peak 면적과 비교하여 정량 하였다. 새우나무 추출물의 폴리페놀 성분의 target ion과 qualifier ion은 다음과 같았다; protocatechuic acid 193, 370, 355, caffeic acid 396, 219, 381, catechin 368, 355, 179, chlorogenic acid 207, 345, 307, quercetin 647, 559, 575.

Table 1. GC-MS conditions for the qualitative and quantitative analysis of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*

Parameter	Condition			
Column	HP-5MS 5%-Phenyl Methyl Siloxane			
Carrier gas	Helium			
Split ratio	5 : 1			
Temperature programming	Injector temperature 280°C Detector temperature 300°C Initial temperature 120°C Initial time 1.00 min			
Ramps	#	Rate(°C/min)	Temp.(°C)	Time(min)
	1	5.00	220	0.00
	2	10.00	300	10.00



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Sephadex LH-20 column에 의한 분획

고압용매 추출물에 함유된 항산화물질을 분획하기 위해 에탄올과 메탄올을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography를 행하였다. Sephadex LH-20 column은 식물 추출물에 함유된 여러 성분을 단일물질로 분리하는데 널리 이용되고 있으며(22,23,40), 천연물 중에 함유된 항산화물질인 catechin을 분리하는데 효과적으로 이용되고 있다(23,41,42). Sephadex LH-20 column chromatography는 그물구조를 가진 gel을 이용하여 분자의 크기가 그물보다 작을수록 gel의 입자에 들어가기 쉽게 되어 column을 통과하는 속도가 늦어지게 되는 점을 이용하여 물질을 크기에 따라 분리, 정제하는 방법이다. 이 방법은 시료의 이동상에 대한 흡착성이 높지 않으므로 회수율이 높으며 이동상과의 접촉에 의한 분해의 위험성을 줄일 수 있는 장점이 있다(43).

새우나무 고압용매 추출물의 column chromatography profile은 Fig. 1과 같았다. 이동상의 용리에 의해 포집된 분획물은 280 nm에서의 흡광도에 따라 에탄올 분획은 6개 분획(F1~F6)으로, 메탄올 분획은 2개 분획(F7, F8)으로 총 8개 분획으로 분리되었다. 전개용매로 메탄올만을 사용하였을 때(Fig. 2)는 컬럼에 로딩된 새우나무 추출물이 극성이 높은 메탄올의 전개에 의해 동시에 용리되는 양상을 나타내어 분리능이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 극성이 다른 두 이동상인 에탄올과 메탄올의 순차적인 분획이 gel permeation chromatography상에서 새우나무 추출물 중 유효성분의 분리에 효과적임을 알 수 있었다.

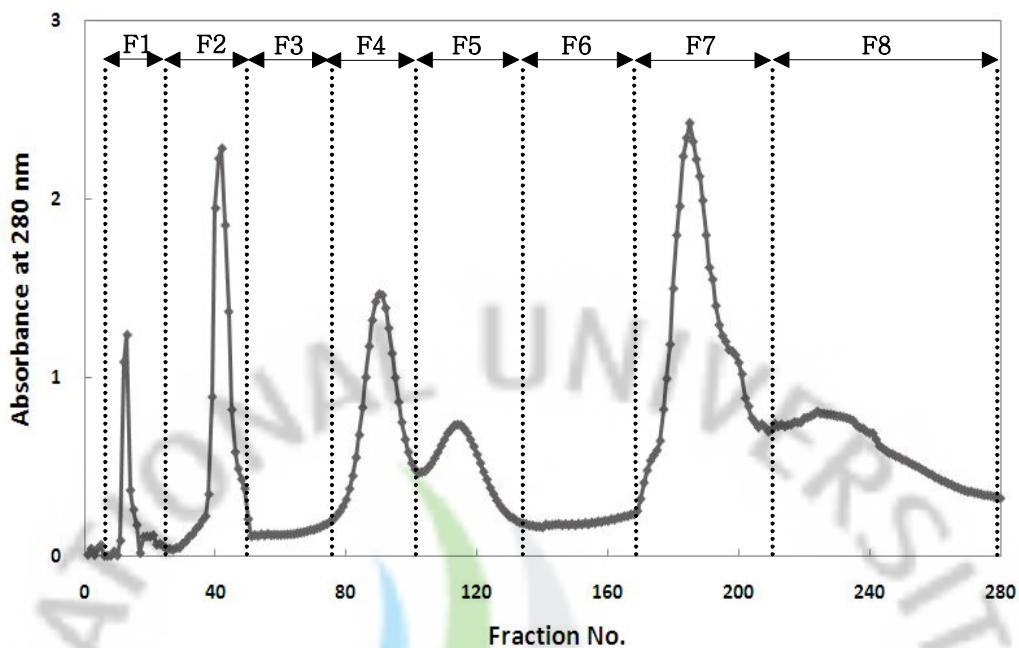


Fig. 1. Sephadex LH-20 column chromatogram of fractions eluted sequentially with ethanol and methanol from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*

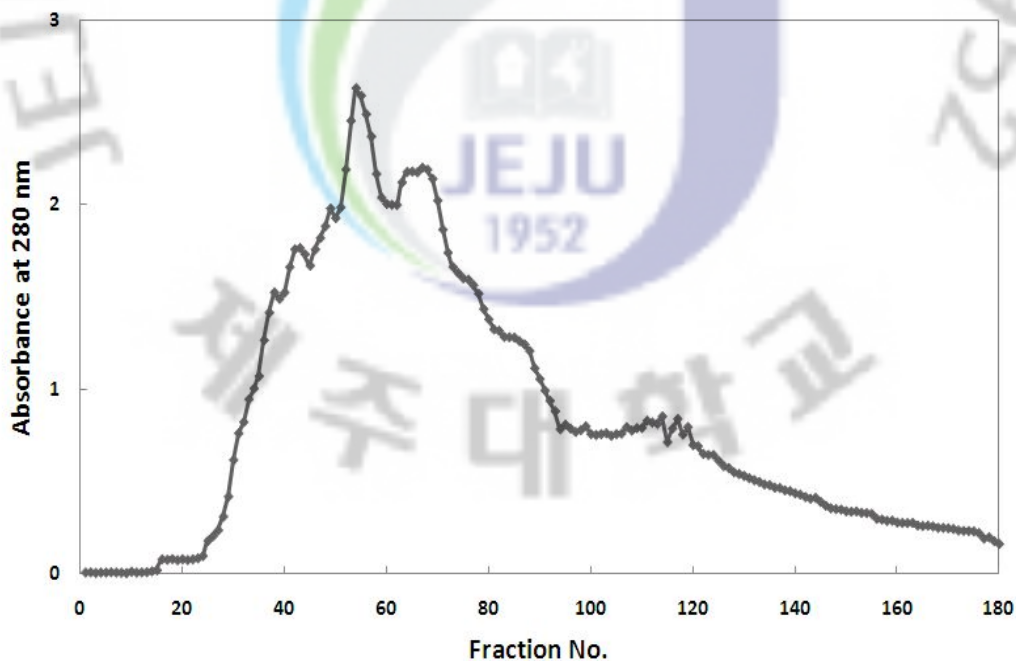


Fig. 2. Sephadex LH-20 column chromatogram of fractions eluted with only methanol from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*

2. 총페놀 함량

새우나무 추출물의 각 분획물별 분획수율과 총페놀 농도를 측정하였다(Table 2). 분획수율은 에탄올 분획물이 65.9%이었고 메탄올 분획물이 34.1%이었다. 각 분획별 분획수율은 F2가 32.9%로 가장 높았으며, 그 다음이 F7 18.9%, F8 15.2%, F4 10.8%, F5 8.7% 순이었다.

총페놀 함량은 메탄올 분획물인 F8과 F7이 672.8, 613.3 mg catechin/g으로 가장 높았고, 에탄올 분획물 중에서는 F4와 F5가 438.4, 411.1 mg catechin/g으로 가장 높았다. 8개의 fraction 중 분획수율이 가장 높았던 F2(32.9%)는 총페놀 함량이 95.7 mg catechin/g으로 낮은 함량을 나타내었다. 이로 보아 분획 초반인 F1~F3에서는 극성인 당 성분이 주로 용출되었고 F4 이상에서 폴리페놀 성분이 용리되는 것으로 추정되었다.

식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나인 폴리페놀 화합물은 hydroxyl group을 포함하는 다양한 구조와 분자량을 나타내며 이를 포함한 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 free radical에 수소를 공여하여 그 radical을 제거함으로써 산화를 억제한다(44). 이러한 폴리페놀은 항균, 항알러지, 항암, 충치예방, 심장질환 및 당뇨병 예방 등에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(45).

Table 2. Relative content and total phenolics of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*

Fraction	Elution solvent	Relative content (% w/w)	Total phenolics (mg catechin/g)
Before fractionation ^a	-	-	473.8±10.5
F1	Ethanol	3.8±0.0	27.4±1.6
F2	Ethanol	32.9±0.1	95.7±3.5
F3	Ethanol	4.7±0.2	101.3±2.0
F4	Ethanol	10.8±0.5	438.4±23.8
F5	Ethanol	8.7±0.2	411.1±15.6
F6	Ethanol	5.0±0.1	372.9±15.6
F7	Methanol	18.9±0.5	613.3±27.6
F8	Methanol	15.2±0.2	672.8±8.0

^a Pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*

3. 통합적 항산화 능력

대부분의 기존 항산화능 분석법(DPPH, TEAC, TRAP, ORAC)은 μmol 범위의 농도에서 분석시간이 수분 또는 수시간이 소요되며 특정 시스템에 제한적으로 적용되고 있다. 그러나 광화학 발광법(photochemiluminescence, PCL)은 인체에서 생성, 존재하는 가장 해로운 ROS의 하나인 superoxide radical의 소거능을 측정하는데 있어서 간편 신속한 방법으로, 래디칼을 생성하는데 고온이 요구되지 않으며 nmol 범위에서도 감도가 좋고 분석하는데 몇 분 밖에 걸리지 않는 장점이 있다. 또한 PCL은 인간이 음식을 섭취하였을 때 혈액 중에서 항산화 능력을 발휘하는 정도를 간접적으로 측정하는 방법으로 ACW, ACL 두 가지의 서로 다른 protocol을 사용하여 수용성과 지용성 시스템에서 통합적 항산화 능력을 측정할 수 있다(38,46).

새우나무 추출물 및 분획물의 통합적 항산화능력은 Table 3과 같았다. 분획전 새우나무 추출물의 수용성 항산화 능력은 $3.41 \mu\text{mol ascorbic acid equivalents/g}$ 인 반면, 분획물 F4, F5, F6는 각각 $6.41, 7.71, 3.65 \mu\text{mol ascorbic acid equivalents/g}$ 으로 추출물보다 강한 항산화활성을 나타내는 것으로 보아 수용성 항산화능력이 높은 성분들이 분획되고 있음을 알 수 있었다.

지용성 항산화 능력도 분획전 추출물에서는 $1.06 \mu\text{mol trolox equivalents/g}$ 인 반면, 분획물 F4, F5, F6는 각각 $1.53, 1.78, 1.06 \mu\text{mol trolox equivalents/g}$ 으로 분획 전 보다 항산화활성이 높은 것으로 보아 지용성 항산화능력이 높은 성분들이 분획되고 있음을 알 수 있었다. 수용성 및 지용성 항산화 능력이 가장 높은 에탄올 분획물 F4, F5, F6는 전체 분획물의 24.5%를 차지하였는데, 이 분획만을 포집하여 항산화 기능성 소재로 활용할 가능성이 있을 것으로 추정된다.

한편 Table 2에서 총페놀 함량이 가장 높았던 메탄올 분획물인 F7과 F8은 에탄올 분획물인 F4, F5, F6에 비하여 수용성 및 지용성 항산화능력이 모두 낮게 나타났다는데, 이들 분획물은 단일물질이 아닌 복합물질이며, 총페놀 함량보다 phenolic compound의 구조가 항산화능력 분석에 있어서 중요한 factor로 작용하는 것으로 추정된다(22). 또한 페놀화합물 외에 nitrogen compound(alkaloid, chlorophyll derivative, amino acid, amine), carotenoid, lignan, terpene 등도 항산화 능력을 나타내며(47) 총페놀 함량 분석시 phenolic compound 외에 protein compound 들이 Folin-Ciocalteu reagent와 반응하여 총페놀 함량에 영향을 미치는 것으로 알려

져 있어(48) 총페놀 함량이 항산화 능력분석에 절대적인 요소로서 작용하지 않는 것으로 추정된다.

Arfan 등(49)은 *Mallotus philippinensis* bark 추출물의 분획물 중(I~VI) 총페놀 함량이 가장 높은 VI(927 mg/g)의 항산화능력(6.01 mmol trolox/g)과 비교하여 IV(856 mg/g), V(794 mg/g)가 각각 6.82, 6.63 mmol trolox/g로 높은 항산화 능력을 나타내었으며, Zin 등(50)은 노니(*Morinda citrifolia* L.)의 잎, 열매, 뿌리 추출물의 분획물별 항산화 능력이 총페놀 함량과 일치하지 않았으며, 분획물에 존재하는 물질간의 서로 다른 메카니즘과 phenolic compound의 구조 등에 기인하는 것으로 보고하였다. Kim(26)에 의하면 제주 자생식물 20종의 통합적 항산화 능력 분석 결과 총페놀 함량과 높은 상관관계를 나타내었으나 지용성 항산화 능력이 가장 높았던 백량금(9.45 mmol trolox equivalents/g)의 총 고형분 중 총페놀 함량은 28%로 낮은 함량을 나타내었으며, Amarowicz(51)등도 rape seed 분획물의 래디칼 소거활성 능력이 총페놀 함량과 상관관계가 낮았다고 보고하였다.

총페놀 함량과 통합적 항산화 능력 사이의 상관관계를 보면 TPC와 ACW(Fig. 3), ACL(Fig. 4) 간의 linear correlation coefficient(R^2)는 각각 0.4214, 0.4531로 낮았으나, ACW과 ACL 사이(Fig. 5)의 R^2 는 0.9585로 높은 상관관계를 보여 수용성 항산화 효과가 높은 분획은 지용성 항산화 효과도 높음을 알 수 있었다.

Table 3. Integral antioxidative capacity (IAC) of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*

Fraction	Elution solvent	IAC of water-soluble substances (ascorbic acid, $\mu\text{mol/g}$)	IAC of lipid-soluble substances (trolox, $\mu\text{mol/g}$)
Before fractionation ^a	-	3.41±0.21	1.06±0.13
F1	Ethanol	0.35±0.00	0.10±0.00
F2	Ethanol	0.31±0.02	0.20±0.02
F3	Ethanol	1.88±0.05	0.55±0.03
F4	Ethanol	6.41±0.41	1.53±0.11
F5	Ethanol	7.71±0.65	1.78±0.07
F6	Ethanol	3.65±0.26	1.06±0.08
F7	Methanol	2.70±0.23	1.01±0.10
F8	Methanol	ND ^b	0.95±0.03

^a Pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*

^b Not detected

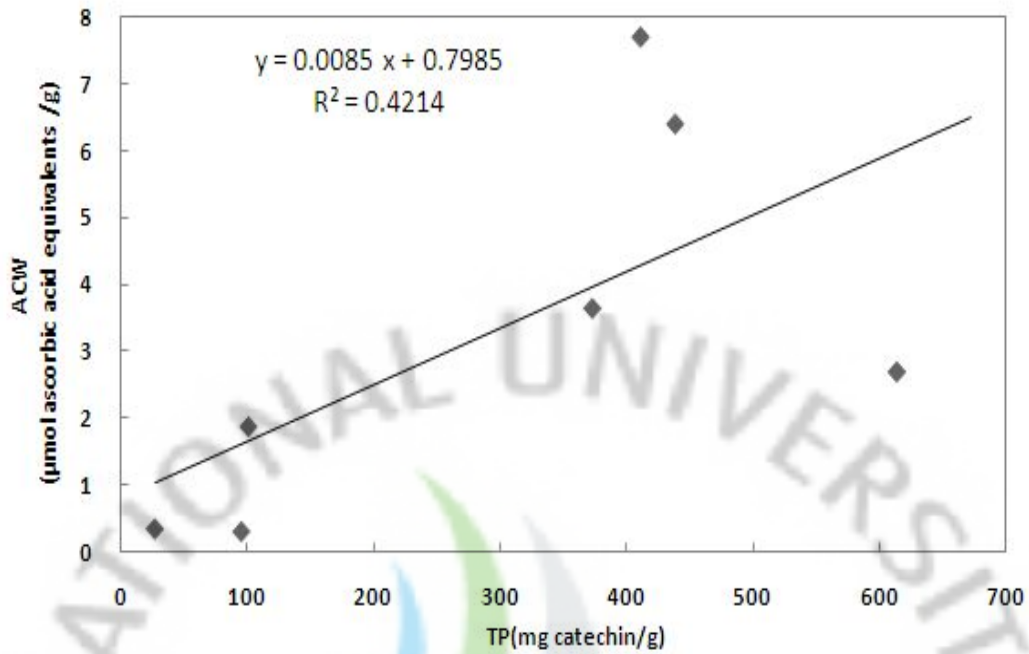


Fig. 3. Correlation between total phenolics(TP) and integral antioxidative capacity of water soluble substances(ACW) of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*.

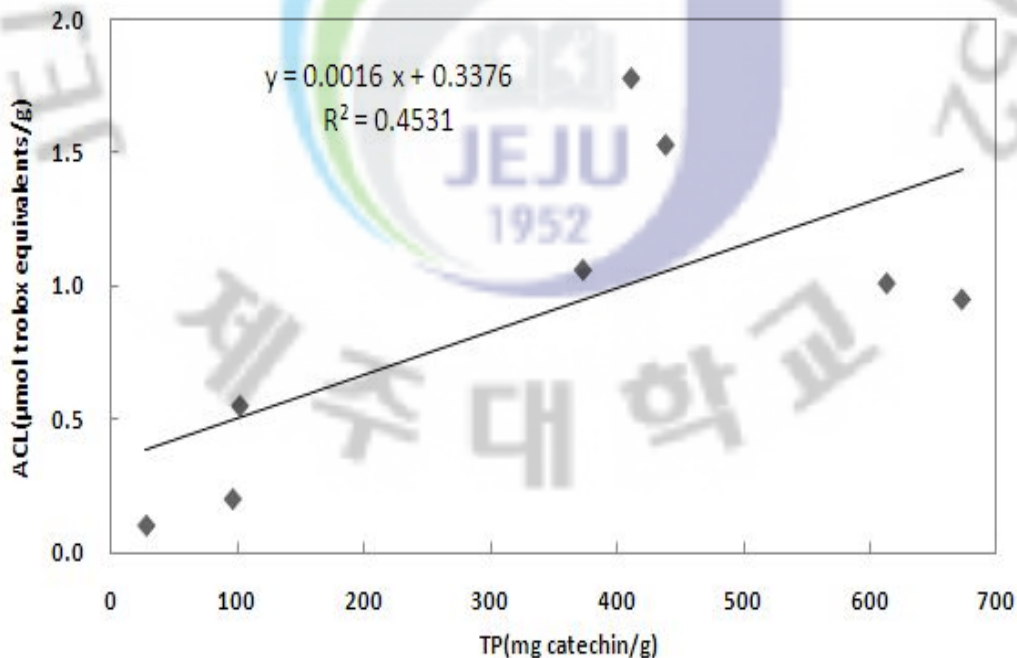


Fig. 4. Correlation between total phenolics(TP) and integral antioxidative capacity of lipid soluble substances(ACL) of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*.

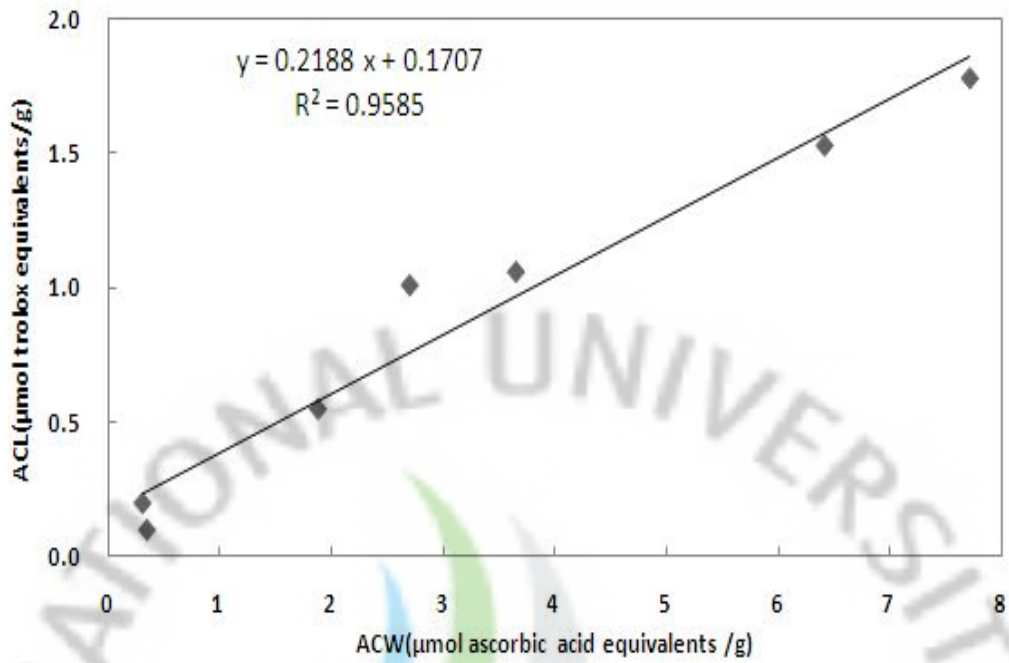


Fig. 5. Correlation of integral antioxidative capacity between water soluble substances (ACW) and lipid soluble substances (ACL) of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*.

4. GC-MS에 의한 폴리페놀 성분 정성 및 정량분석

새우나무 추출물의 분획물별 주요성분과 개별 폴리페놀 성분을 정성, 정량하기 위하여 시료를 산가수분해한 후 trimethylsilyl(TMS) 유도체화 하여 GC-MS로 분석하였다. TMS 유도체화를 통한 silylation 과정은 GC-MS 분석에서 널리 사용되는 방법으로(52,53), phenolic compound의 활성화된 hydrogen을 trimethylsilyl group(-Si(CH₃)₃)으로 유도체화 함으로서 모분자에 비해 휘발성이 높고 온도에 안정하여 보다 효율적인 GC-MS 분석을 수행할 수 있다(54).

새우나무 고압용매 추출물의 분획물을 GC-MS로 분석하여 Library (WILEY07) 검색을 통하여 각 크로마토그램의 질량스펙트럼과 비교한 결과 다양한 종류의 유기 화합물이 확인되었다. 분획물별 주요성분을 보면(Table 4) F1에서는 유기산인 citric acid, 지방족 화합물인 hexadecanoic acid, 방향족 화합물인 di-(2-ethylhexyl) phthalate가 확인되었으며, F2와 F3에서는 D-mannopyranose, glucopyranose, galactopyranose, glucose와 같은 다수의 당 성분만이 확인되었으나, 분획물 F4~F8에서는 새우나무 고압용매 추출물에 함유되어 있던 폴리페놀 성분인 protocatechuic acid, caffeic acid, catechin, quercetin이 확인되었다.

Table 4. Identification of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica* by GC-MS

Fraction	RT(min)	Identified ions (m/z)	Compound
F1	16.3	147, 273, 229, 319	citric acid
	20.0	88, 101, 157, 241	hexadecanoic acid
	27.2	149, 167, 57, 71	di-(2-ethylhexyl) phthalate
F2	18.5	204, 147, 217, 191	D-mannopyranose
	20.4	204, 191, 147, 217	glucose
F3	18.5	204, 147, 217, 129	glucopyranose
	19.5	204, 147, 217, 103	galactopyranose
F4	30.2	368, 355, 267, 179	catechin
	33.6	647, 559, 575, 207	quercetin
F5	22.7	396, 219, 381, 191	caffeic acid
	30.2	368, 355, 267, 179	catechin
	33.6	647, 559, 575, 207	quercetin
F6	16.9	193, 370, 355, 311	protocatechuic acid
	30.2	368, 355, 267, 179	catechin
	33.6	647, 559, 575, 207	quercetin
F7	16.9	193, 370, 355, 311	protocatechuic acid
	22.7	396, 219, 381, 191	caffeic acid
	30.2	368, 355, 267, 179	catechin
	33.6	647, 559, 575, 207	quercetin
F8	16.9	193, 370, 355, 311	protocatechuic acid
	30.2	368, 355, 267, 179	catechin

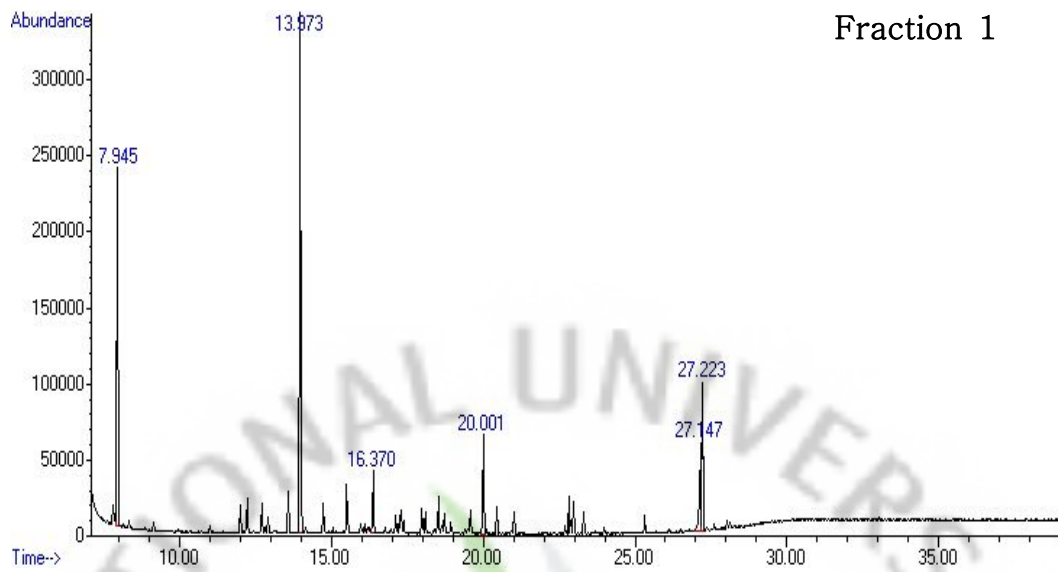


Fig. 6. GC-MS total ion chromatogram of fractions from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica*. Each peaks refer to individual compounds listed in Table 4.

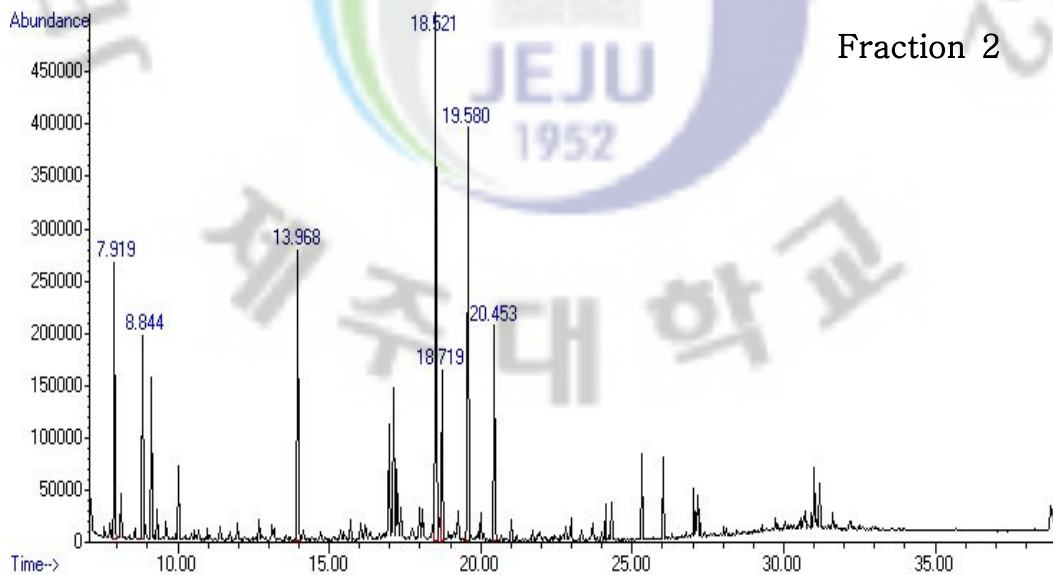


Fig. 6. Continued.

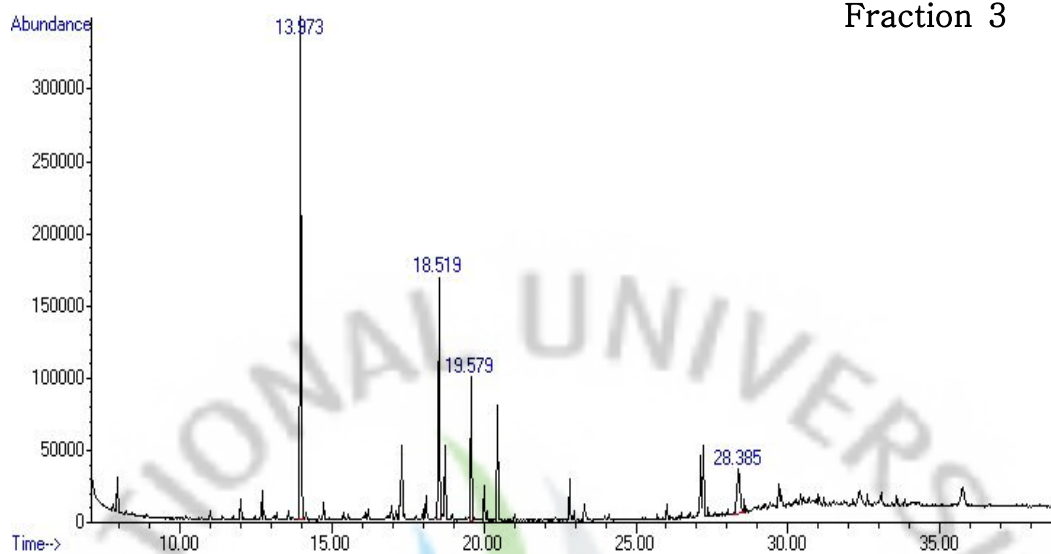


Fig. 6. Continued

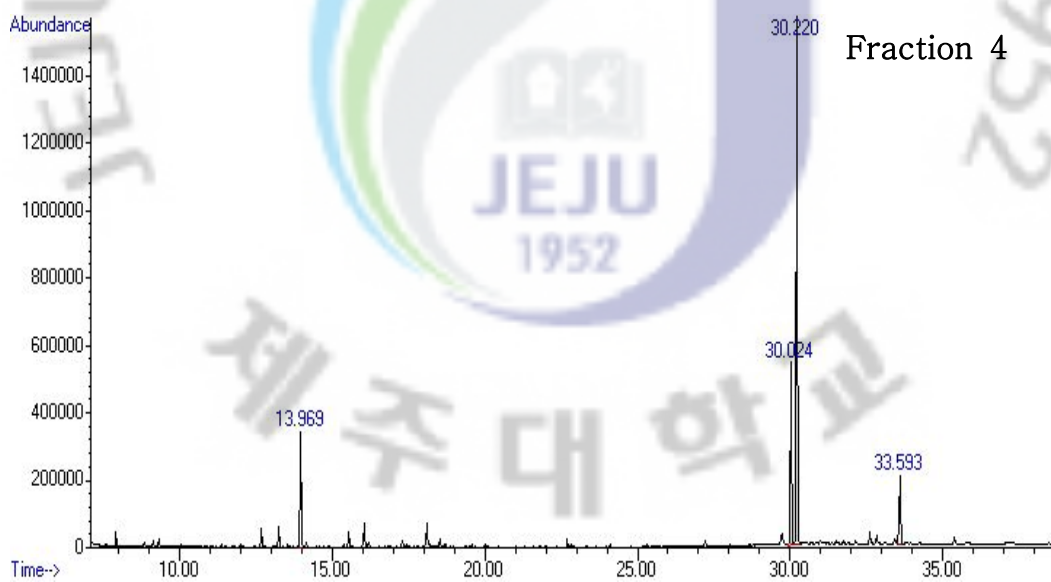


Fig. 6. Continued

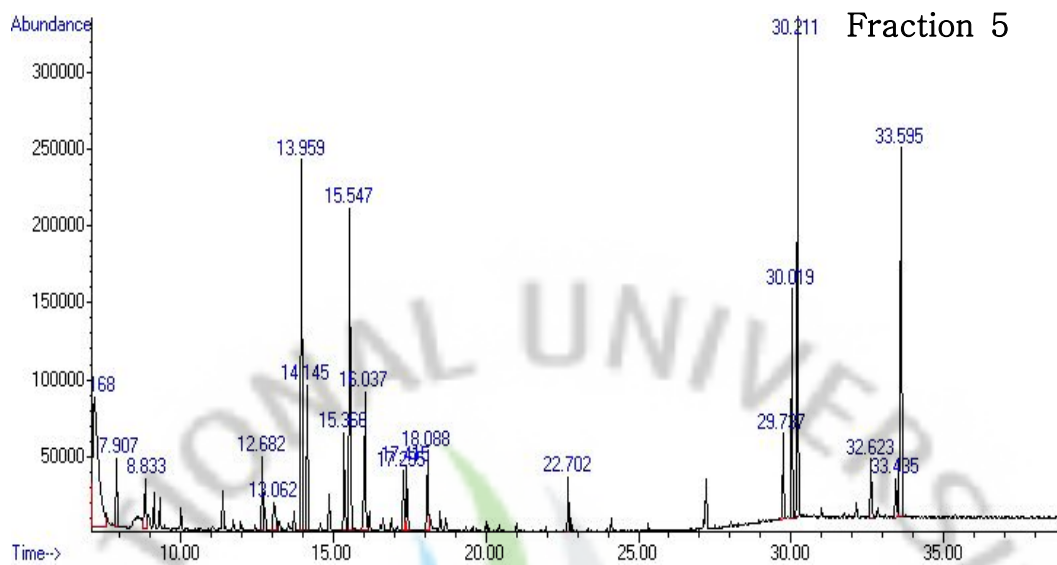


Fig. 6. Continued

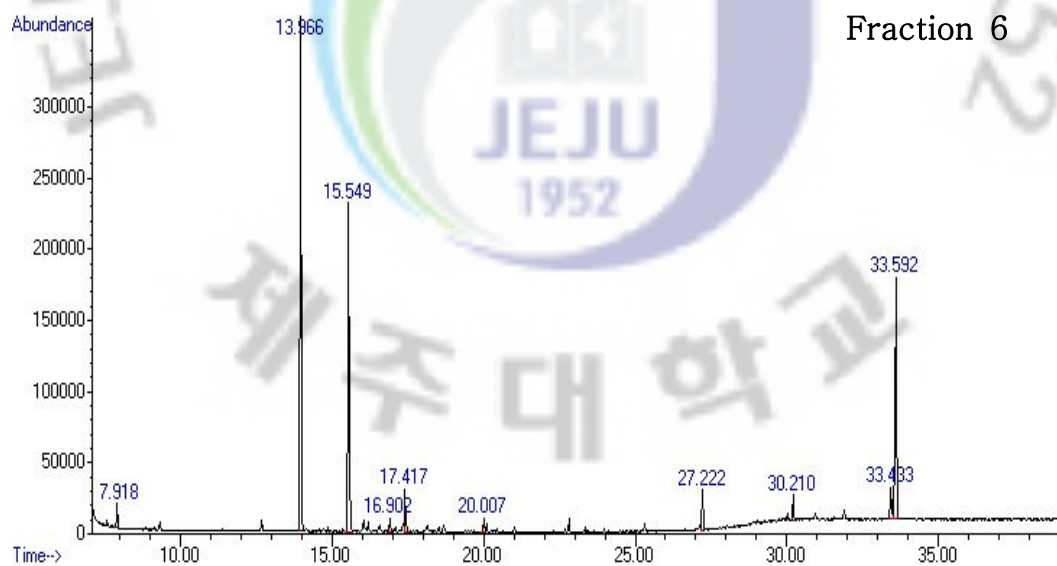


Fig. 6. Continued

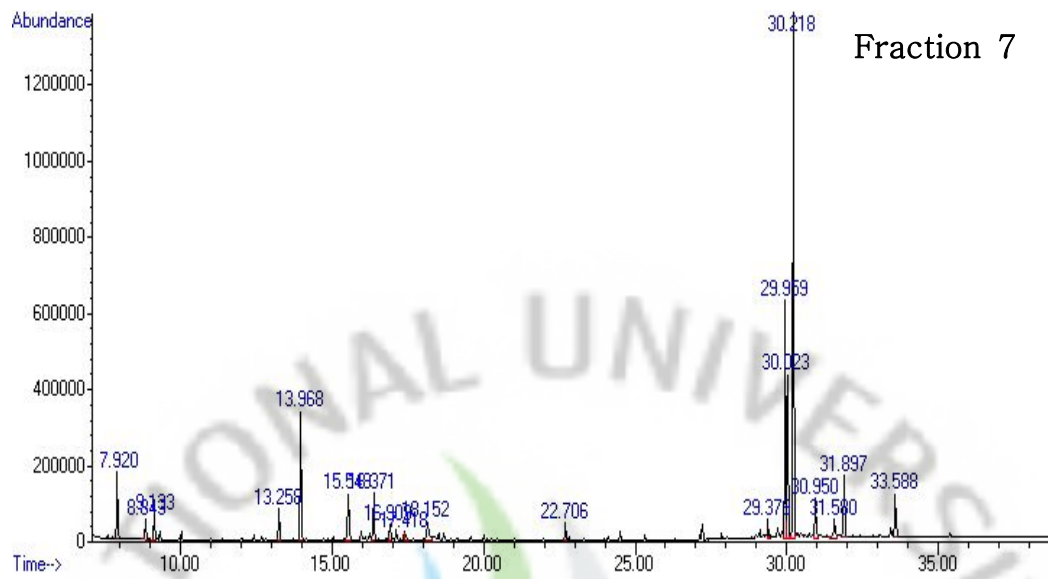


Fig. 6. Continued

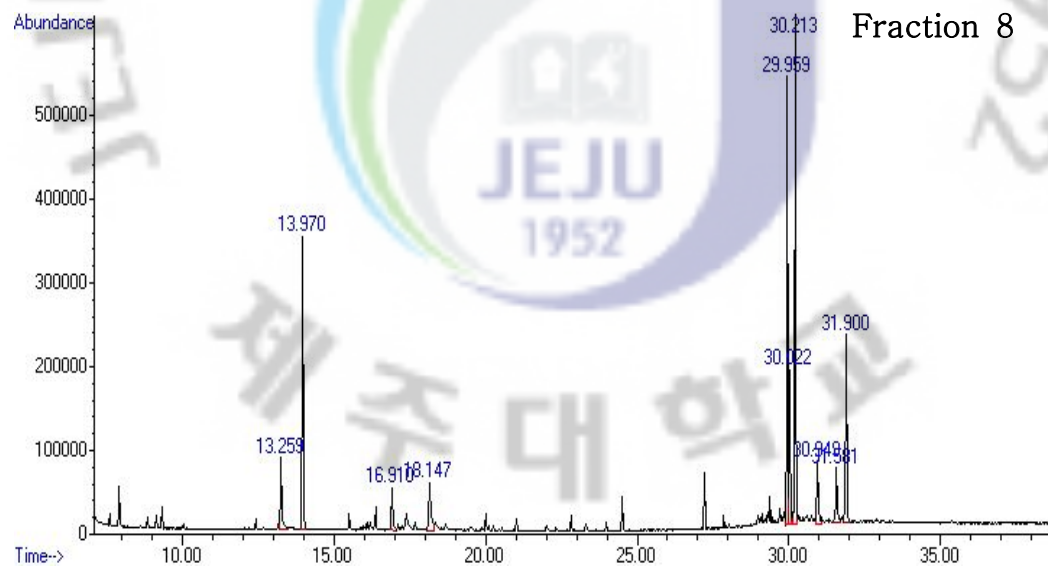


Fig. 6. Continued

새우나무 고압용매 추출물의 분획물에서 개별 폴리페놀 함량을 GC-MS로 정량한 결과는 Table 5와 같았다. Protocatechuic acid와 catechin은 주로 F7, F8 분획에, quercetin은 주로 F4~F6 분획에 농축되었는데, 이로부터 분자량 크기에 따른 분리보다 전개용매와의 친화력에 의해 분리되는 것으로 추정되었다. 한편 catechin은 F4~F8의 모든 분획물에서 확인되었는데 에탄올 분획물에서 그 함량이 점차 감소되다가 메탄올 분획물인 F7과 F8에서 61.0, 38.0 mg/g로 높은 함량을 나타내었다. RT 16.9분에서 확인된 protocatechuic acid는 메탄올 분획인 F7과 F8에서 53.8, 70.6 mg/g으로 높은 함량을 나타내었고 RT 33.6분에 확인된 quercetin은 에탄올 분획물인 F4~F6에서 높은 함량을 나타내었다. 그러나 개별 폴리페놀 성분이 특정 분획에서 분리되지 않았는데, 이는 동일 성분일지라도 구조 이성질체 등 다양한 구조를 가지고 있기 때문인 것으로 추정된다(55). 전체적으로 GC-MS에 의한 개별 폴리페놀 정량 데이터는 분획 후 회수율이 높지 않았으며, 표준편차가 높았는데, 앞으로 이에 대한 연구가 더 필요한 것으로 추정된다.

분획물별 통합적 항산화 능력과 개별적 폴리페놀 함량을 비교하여 보면 통합적 항산화 능력이 높은 F4~F7 분획에는 catechin과, 정성된 4종의 폴리페놀 성분 중 항산화 능력이 가장 높은 것(56)으로 알려진 quercetin이 다량 함유되어 있었으나, 통합적 항산화 능력이 낮은 F8 분획에는 quercetin이 함유되어 있지 않았다.

Shahidi 등(57)과 Meyer 등(58)은 다양한 메커니즘에 의해 폴리페놀의 항산화 능력이 변화하며 혼재하는 성분에 따라 항산화 능력을 상승 또는 감소시킨다고 보고하고 있으며, Lien 등(59)과 Moran 등(60)도 각 phenolic compound 간 또는 다른 성분과의 antagonistic, synergistic effect가 존재하여 항산화 능력에 있어 차이를 나타낸다고 보고하고 있다. 이로 보아 새우나무의 고압용매 추출물의 각 분획물에 포함된 폴리페놀 성분 간의 상호작용 및 확인되지 않은 물질 또는 그 물질과의 상호작용에 의해 분획물 F4와 F5가 높은 통합적 항산화 능력을 나타내는 것으로 추정된다. Wanasundara 등(51)은 총페놀 함량이 낮은 canola meal의 분획물이 높은 항산화 능력을 나타내었는데 이는 폴리페놀 화합물 간의 시너지 효과에 의한 것이라고 보고하였다.

한편 Yang 등(61)은 혼합물에 존재하는 성분들의 극성 및 분배계수, 분자량이 비슷할 경우 Sephadex LH-20 컬럼상에서 물질의 분리도가 감소되며 단일분획으로는 특정물질의 분리가 어렵다고 보고하였는데, 본 연구에서는 극성이 높은 메탄

을 분획으로 새우나무에 존재하는 모든 폴리페놀 물질들이 F7에 용리되어 동정되었으며, 에탄올 분획물인 F4~F6 분획에서도 폴리페놀 성분이 혼재됨에 따라 개별적으로 폴리페놀을 분리하기 위하여 에탄올 보다 비극성인 용매와의 농도구배에 의한 전개용매의 적절한 선택 및 추가적인 분리, 정제 과정이 필요할 것으로 추정된다.

새우나무의 주요 폴리페놀 성분의 생리활성을 살펴보면 protocatechuic acid는 phenylpropanoid 골격을 가지고 있는 hydroxycinnamic acid에 속하는 simple phenolic compound로서 파킨슨씨병과 같은 산화적 스트레스에 의해 야기되는 질병에 대해 신경보호작용을 나타내며(34,35), 항종양, 항산화작용 등 광범위한 기능이 알려져 있다(36).

Caffeic acid는 항암작용(32), 항염증 작용 및 정균작용(62)이 있고, 분자구조가 중금속과 결합이 용이하게 되어 있어 카드뮴 독성에 의한 세포손상을 억제하는 것으로 알려져 있다(63).

Catechin은 식물과 녹차의 성분으로 자연계에 광범위하게 존재하는 플라보이드계 flavan-3-ol 화합물로서 코코아, 차, 와인 그리고 포도껍질과 같은 다양한 식품 원료 속에 존재하며 항균, 항산화, 항염효과(64,65) 외에도 DNA복제와 회복을 조절하고 암의 촉진과 진행, 분자간 반응을 억제하는 차단제와 억제제로 작용하는 것으로 알려져 있다(66).

Quercetin은 *Allium* 속 채소류에 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라 단독으로 또는 glycoside 형태인 isoquercetin, rutin, quercimetrin 등으로 천연에 널리 분포되어 있으며 발암성 물질의 활성감소, 혈압강하, 모세혈관 강화작용, 항산화, 항염작용 등 다양한 약리작용이 알려져 있다(33).

본 연구에서 새우나무는 광범위한 생리활성을 나타내는 폴리페놀 물질을 함유하고 있으며 지용성 및 수용성 항산화 능력에서 높은 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 새우나무 추출물로부터 얻은 분획물은 항산화 관련 기능성 식품소재로서 활용 할 수 있을 것으로 기대되며 식품에 적용하기 위해 보다 많은 연구가 필요할 것이라 사료된다.

Table 5. Quantification of individual phenolic compounds(mg/g of dried fraction) of fractions (F4~F8) from pressurized liquid extract of *Ostrya japonica* by GC/MS

Polyphenols	Protocatechuic acid	Caffeic acid	Catechin	Quercetin	Total
RT(min)	16.9	22.7	30.2	33.6	-
Molecular weight(g/mol)	154.1	180.1	290.2	302.2	-
Before fractionation ^a	37.3±8.3	3.7±1.0	83.5±15.2	27.7±7.7	152.2
F4	-	-	34.4±5.4	23.5±11.1	57.9
F5	-	3.0±1.0	23.3±7.4	35.9±2.7	62.2
F6	46.1±19.9	-	6.8±6.2	123.8±22.1	176.7
F7	53.8±5.3	2.5±0.2	61.0±13.4	11.7±1.8	129.0
F8	70.6±17.3	-	38.0±10.2	-	108.6

^a Pressurized liquid extract of *Ostrya japonica* (mg/g of dried extract)

IV. 요약

제주에 자생하는 새우나무(*Ostrya japonica*)를 고압용매 추출(추출용매 40% EtOH, 추출온도 50℃, 추출압력 13.6 MPa, 추출시간 10분)하여 column chromatography법으로 분획을 실시한 후 각 분획물의 총페놀 함량, 통합적 항산화 능력 및 주요 성분을 정성, 정량 분석하였다. 고압용매 추출물은 F1에서 F8까지 총 8개의 분획으로 분리되었는데, 에탄올 분획물(F1~F6)의 분획수율은 65.9%, 메탄올 분획물(F7, F8)의 분획수율은 34.1%이었고, 8개의 분획물 중에는 F2, F7, F8이 각각 32.9%, 18.9%, 15.2%로 높은 분획수율을 나타내었다. 총페놀 함량은 메탄올 분획물인 F8과 F7이 672.8, 613.3 mg catechin/g으로 가장 높았고, 에탄올 분획물 중에서는 F4와 F5가 438.4, 411.1 mg catechin/g으로 가장 높았다. 통합적 항산화 능력은 F5와 F4가 각각 7.71, 6.41 $\mu\text{mol ascorbic acid equivalents/g}$ 로 가장 높은 수용성 항산화 능력을 나타내었으며 지용성 항산화 능력도 1.78, 1.53 $\mu\text{mol trolox equivalents/g}$ 로 가장 높았다. GC-MS를 이용하여 각 분획물을 정성, 정량 분석한 결과 F1~F3에서는 유기산, 지방족 화합물, 당 성분만이 확인되었으나, F4~F8에서는 폴리페놀 성분인 protocatechuic acid, caffeic acid, catechin, quercetin이 확인되었다. Catechin은 분획물 F4~F8에서 확인되었는데 메탄올 분획물인 F7과 F8에서 61.0, 38.0 mg/g로 높은 함량을 나타내었다. Protocatechuic acid는 메탄올 분획물인 F7과 F8에서 각각 53.8, 70.6 mg/g으로 높은 함량을 나타내었고, quercetin은 에탄올 분획물인 F4~F6에서 각각 23.6, 35.9, 123.8 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다.

참고문헌

1. Lee SO, Kim MJ, Kim DK, Choi HJ. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. Korean J. Soc. Food Sci. Nutr. 34: 139-147 (2005)
2. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Moll. Cell. Biochem. 174: 305-319 (1997)
3. Maeura Y, Weisburger JH, Williams G. Dose-dependent reduction of N-2-fluorenylacetamide-induced liver cancer and enhancement of bladder cancer in rats by butylated hydroxytoluen. Cancer Res. 44: 1604-1610 (1984)
4. Branen AS. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated dihydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59-63 (1975)
5. Chang SS, Matijasevic BO, Hsieh O, Huang CL. Natural antioxidants from rosemary and sage. J. Food Sci. 42: 1102-1106 (1977)
6. Rhee JS. Effect of methyl silicone, TBHQ and BHA/BHT on frying and storage stabilities of the vegetable salad oil in high density polyethylene bottles. Korean J. Food Sci. Technol. 10: 250-257 (1978)
7. Schafer E, Arnrich L. Effects of dietary vitamin E on serum and pulmonary fatty acids and prostaglandins in rats fed excess linoleic acid. J. Nutr. 114: 1130-1136 (1984)

8. Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene(BHT) and butylated hydroxy anisole(BHA). Korean J. Food Sci. Technol. 14: 283-28 (1982)
9. Lee JH, Lee SR, Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 317-323 (1994)
10. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food Chem. Toxicol. 32: 671-683 (1994)
11. Whang J, Han WS, Yoon KR. Quantitative analysis of total phenolic content in apple. Anal. Sci. Technol. 14: 377-383 (2001)
12. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower(*Carthamus tinctorius* L.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1127-1132 (2000)
13. Pratt DE, Huang MT, Ho ST, Lee CY. Phenolic compounds in food and their effects on health(II), antioxidants and cancer prevention, Washington DC. pp. 54-71 (1992)
14. Kim SK, Ban SY, Kim JS, Chung SK. Change of antioxidant activity and antioxidant compounds in *Saururus chinensis* by extraction conditions. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem 48: 89-92 (2005)
15. Lim DK, Choi U, Shin DH. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 83-89 (1996)

16. Park SS, Yu KH, Min TJ. Antioxidants activities of extracts from fruiting bodies of mushrooms. Korean J. Mycol. 26: 69-77 (1998)
17. Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernandez-Mendez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. J. Chromatogr. A. 1089: 1-17 (2005)
18. Svedstrom U, Vuorela H, Kostianen R, Laakso I, Hiltunen R. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. J. Chromatogr. A. 1112: 103-111 (2006)
19. Naczk M, Amarowicz R, Sullivan A, Shahidi F. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. Food Chem. 62: 489-502 (1998)
20. Shahidi F, Naczk M. An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. J. Am. Oil Chem. Soc. 69: 917-924 (1992)
21. Watanabe M, Ohshita Y, Tsushida T. Antioxidant compounds from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls. J. Agric. Food Chem. 45: 1039-1044 (1997)
22. Wanasundara UN, Amarowicz R, Shahidi F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. J. Agric. Food Chem. 42: 1285-1290 (1994)
23. Amarowicz R, Shahidi F. A rapid chromatographic method for separation

- of individual catechins from green tea. *Food Res. Int.* 29: 71-76 (1996)
24. Lee YN. *New flora of Korea Vol. I.* Kyohak Publishing Co. Seoul. Korea. pp. 218 (2007)
25. Hyun SH, Jung SK, Jwa MK, Song CK, Kim JH, Lim SB. Screening of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in Jeju island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 200-208 (2007)
26. Kim MB. Characteristics of pressurized liquid extracts from natural plants in Jeju. MS thesis. Cheju National University. Jeju (2008)
27. Cheng SJ. The preliminary study of inhibitory effects of green tea antioxidant on mutation. *Acta Exp. Biol.* 9: 328-334 (1986)
28. Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32: 613-622 (1986)
29. Kim MJ, Rhee SJ. Effects of Korean green tea, oolong tea, black tea beverage on the removal of cadmium in rat. *J. Korean Food Nutr.* 23: 784-791 (1994)
30. Hayashi E, Hayashi M, Yamazoe H. Pharmacological action of tea extract on the central nervous system in mice. *Oyo Yakuri.* 40: 351-356 (1990)
31. Kada T, Kaneko K, Matsuzaki S, Matsuzaki T, Hara Y. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens. *Mutat. Res.* 150: 127-131 (1985)

32. Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-*O*-tertradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 48: 5941-5946 (1988)
33. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585: 325-337 (2008)
34. An LJ, Guan S, Shi GF, Bao Ym, Duan YL, Jiang B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem. Toxicol.* 44: 436-443 (2006)
35. Guan S, Bao YM, Jiang B, An LJ. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Eur. J. Pharmacol.* 538: 72-79 (2006)
36. Tseng TH, Kao TW, Chu CY, Chou FP, Lin WL, Wang CJ. Induction of apoptosis by *Hibiscus* protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biol. Chem.* 274: 2232-2242 (2000)
37. Peschel W, Sanchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzia I, Jimenez D, Lamuela-Raventos R, Buxaderas S, Codina C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* 97: 137-150 (2006)
38. Besco E, Braccioli E, Vertuani S, Ziosi P, Brazzo F, Bruni R, Sacchetti G, Manfredini S. The use of photochemiluminescence for the measurement of the integral antioxidant capacity of baobab products. *Food Chem.* 102: 1352-1356 (2007)

39. Chiou A, Karathanos VT, Mylona A, Salta FN, Preventi F, Andrikopoulos NK. Currants(*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chem. 102: 516-522 (2007)
40. Mahinda W, Shahidi F. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. Food Chem. 70: 17-26 (2000)
41. Watanabe M. Catechins as antioxidants from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. J. Agric. Food Chem. 46: 839-845 (1998)
42. Santos-Buelga C, Williamson G. Methods in polyphenol analysis. Cambridge: Royal society of chemistry. pp. 229-266 (2003)
43. Cardellina JH. Step gradient elution in gel permeation chromatography. A new approach to natural products separations. J. Nat. Prod. 46: 196-199 (1983)
44. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medical plants. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 12: 191-202 (2004)
45. Lee YS, Joo EY, Kim NW. Polyphenol contents and physiological activity of the *Lsepedeza bicolor* extracts. Korean J. Food Preserv. 13: 616-622 (2006)
46. Vertuani S, Bosco E, Braccioli E, Manfredini S. Water soluble antioxidant capacity of different teas determination by photochemiluminescence. Nutrafoods. 3: 5-11 (2004)

47. Aruoma OI, Cuppett SL. Antioxidant methodology in vivo and in vitro Concepts, AOCS Press, Champaign, Illinois. pp. 41-172 (1997)
48. Shahidi F, Naczk M. Food phenolics sources, chemistry, effects, and applications. Lancaster basel: Technomic publishing Co. pp. 128 (1995)
49. Arfan M, Amin H, Karamac M, Kosinska A, Wiczowski W, Amarowicz R. Antioxidant activity of phenolic fractions of *Mallotus philippinensis* bark extract. Czech. J. Food Sci. 27: 109-117 (2009)
50. Zin ZM, Hamid AA, Osman A, Saari N. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu(*Morinda citrifolia* L.). Food Chem. 94: 169-178 (2006)
51. Wanasundara UN, Amarowicz R, Shahidi F. Partial characterization of natural antioxidants in canola meal. Food Res. Int. 28: 525-530 (1996)
52. Soleas GJ, Diamandis EP, Karumanchiri A, Goldberg DM. A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection. Anal. Chem. 69: 4405-4409 (1997)
53. Blau K, Halket J. Handbook of derivatives for chromatography(2nd ed.). John Wiley & Sons. New york (1993)
54. Proestos C, Boziaris IS, Nychas GJE, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chem. 95: 664-671 (2006)

55. Kim JS, Park JM, Yi JH, Kim WS. Molecular separation of dibromobenzene isomers by using selective guest inclusion of G₂NDS host framework. *Korean Chem. Eng. Res.* 45: 487-492 (2007)
56. Cai Y, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 78: 2872-2888 (2006)
57. Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung.* 44: 158-163 (2000)
58. Meyer A, Heinonen M, Frankel E. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.* 61: 71-75 (1998)
59. Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 285-294 (1999)
60. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 861-870 (1997)
61. Yang C, Li D, Wan X. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods an approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea. *J. Chromatogr. B.* 861: 140-144 (2008)

62. Chinthalapally VR, Dhimant D, Blpin K, Shantu A, Bandara SR. Effect of caffeic acid ester on carcinogen induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem. Biol. Int.* 84: 277-290 (1992)
63. Baek SH, Lee H, Pae HO, Ki YO, Kwak JS, Yoo HG, Han DS. Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 5. Antitoxic effects of binding of caffeic acid and cadmium on cultured rat neuroglial cells. *Korean J. Toxicol.* 11: 241-246 (1995)
64. Toda M, Okubo S, Ikigai H, Suzuki T, Suzuki Y, Shimamura T. The protective activity of tea against infection by *Vibrio colerae* 01. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 109-112 (1991)
65. Lee MK, Yi SY, Ahn HS, Ahn RM. Lipid peroxidation and antioxidase activities on hairless mouse induced by UVB irradiation and effects of tannic acid. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* 22: 102-108 (1996)
66. De Flora S, Ramel C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Res.* 202: 285-306 (1988)

감사의 글

2년의 대학원 시절을 무사히 마침에 많은 분들께 감사의 말씀을 전합니다.

먼저 너무나도 부족한 저에게 배움에 대해 생각하게 해주시고 조언과 지도를 아끼지 않으신 임상빈 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 밝은 웃음으로 너무나 많은 격려와 도움을 주신 송대진 교수님, 김수현 교수님, 소중한 충고와 함께 학문의 견해를 넓혀주신 강영주 교수님, 하진환 교수님, 세심하게 열정을 다해 지도해 주시고 조언해 주신 고영환 교수님, 김광표 교수님께도 한없이 감사드립니다.

대학원 생활을 하면서 배운 지식 못지 않게 더욱 값진 것은 선·후배들과 서로 도우며 함께 했다는 것입니다. 바쁘신 와중에도 따뜻하고 변함없는 지도를 주신 좌미경 선생님, 큰 뜻을 갖게 해준 성근이형, 든든한 조언자 태현이형, 친누나 같은 선희누나, 플타임으로 함께한 미보에게 감사의 마음을 전합니다.

늘 용기를 북돋아주신 김지훈 선생님, 친구같은 우석이형, 그리고 석사과정 동안 함께 공부해온 대학원 동기, 선·후배님들께도 고마움을 전하며 언제나 웃음짓게 해주고 평생 함께할 우리 친구들에게도 감사를 드립니다.

끝으로 지금의 모든 것이 이루어 질 때까지 언제나 저를 믿어주시고 무한한 사랑 베풀어 주신 할머니, 우리 가족들, 그리고 저를 위해 많은 것을 희생하는 너무나도 사랑하는 부모님, 누나에게도 감사를 드립니다.