



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2022년 8월

교육학석사(영양교육) 학위논문

# 추출방법에 따른 오리나무 잎의 이화학적 성분 및 항산화 활성 비교

조선대학교 교육대학원

영양교육전공

장 희 영

# 추출방법에 따른 오리나무 잎의 이화학적 성분 및 항산화 활성 비교

Comparison of the Physicochemical Composition  
and Antioxidant Activities of *Alnus japonica*  
leaves according to Various Extraction Methods

2022년 8월

조선대학교 교육대학원

영양교육전공

장 희 영

# 추출방법에 따른 오리나무 잎의 이화학적 성분 및 항산화 활성 비교

지도교수 이 주 민

이 논문을 교육학석사(영양교육)학위  
청구논문으로 제출함.

2022년 4월

조선대학교 교육대학원

영양교육전공

장 희 영

# 장희영의 교육학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장

조선대학교 교수

이재준



심사위원

조선대학교 교수

이주민



심사위원

조선대학교 교수

최지영



2022년 6월

조선대학교 교육대학원

## 〈 목 차 〉

제 1장. 서론 .....	1
제 2장. 연구방법 .....	3
1. 실험재료 .....	3
2. 시료추출 .....	3
3. 일반성분 분석 .....	4
4. 구성 아미노산 분석 .....	4
5. 유기산 분석 .....	4
6. 지방산 분석 .....	5
7. 무기질 분석 .....	5
8. 총 Polyphenol 함량 측정 .....	6
9. 총 Flavonoid 함량 측정 .....	6
10. ABTS <sup>+</sup> radical 소거능 .....	7
11. DPPH radical 소거능 .....	7
12. FRAP .....	8
13. 통계처리 .....	8

제 3장. 연구결과 및 고찰 .....	9
1. 일반성분 분석 .....	9
2. 구성 아미노산 분석 .....	11
3. 유기산 분석 .....	13
4. 지방산 분석 .....	15
5. 무기질 분석 .....	17
6. 총 Polyphenol 총 Flavonoid 함량 .....	19
7. ABTS <sup>+</sup> radical 소거능 .....	21
8. DPPH radical 소거능 .....	23
9. FRAP(환원력) 분석 .....	25
제 4장. 요약 및 결론 .....	27
참고문헌 .....	29

# LIST OF TABLES

Table 1. Proximate compositions of <i>Alnus japonica</i> (Thunb.) steudel leaves .....	10
Table 2. Contents of free amino acids of <i>Alnus japonica</i> (Thunb.) steudel leaves.....	12
Table 3. Contents of organic acids of <i>Alnus japonica</i> (Thunb.) steudel leaves.....	14
Table 4. Contents of fatty acids of <i>Alnus japonica</i> (Thunb.)steudel leaves.....	16
Table 5. Contents of minerals of <i>Alnus japonica</i> (Thunb.) steudel leaves.....	18
Table 6. Total polyphenol and total contents of <i>Alnus japonica</i> (Thunb.) steudel leaves.....	20
Table 7. Ferric reducing antioxidant power of <i>Alnus japonica</i> (Thunb.) steudel leaves .....	26

# LIST OF FIGURES

Figure 1. ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging activity of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves ..... 22

Figure 2. DPPH radical-scavenging activity of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves ..... 24

## ABSTRACT

### 추출방법에 따른 오리나무 잎의 이화학적 성분 및 항산화 활성 비교

#### Comparison of the Physicochemical Composition and Antioxidant Activities of *Alnus japonica* leaves according to Various Extraction Methods

by. Jang Hee-Young

Advisor : Prof. Joomin Lee, Ph.D.

Major in Nutrition Education

Graduate School of Chosun University

Along with the extension of human life expectancy, modern people's interest in health after COVID-19 is gradually increasing, and accordingly, research on antioxidant health functional foods related to health promotion and aging prevention is being actively conducted. Antioxidants are a series of systems that control oxidation or remove oxides generated by oxidative stress during the process of producing energy in vivo, and are attracting attention as a defense mechanism that restores and inhibits the generation of active oxygen species excessively generated in this process. Active oxygen, which contains

superoxide anion radicals, hydroxy radicals, singlet oxygen, hydrogen peroxide, etc. generated by the presence of environmental stress and pre-hydrogenic acid in the biological tissue, is produced by the pre-hydrogenic element. In a continuous stable state, it acts on proteins and lipids to oxidize components, as well as to function as a prooxidant, causing mutation generation and cancer of DNA and RNA. In other words, it not only increases the permeability of the cell membrane, but also causes overall cytotoxicity, leading to causes of various diseases such as aging. Antioxidants are used to minimize loss of vitamins and essential amino acids by reacting with free radicals and to slow or prevent production according to several studies. Vegetable foods such as nuts, grains, and tea have excellent antioxidant effects, so it has been reported that they help chronic diseases such as aging delay and hyperlipidemia, arteriosclerosis, cancer, respiratory diseases, and diabetes through proper intake. *Alnus japonica* is a deciduous tree of the birch family, and is a deciduous tree that usually grows naturally in mountains and streams, and grows up to 20m in height. The name *Alnus japonica* originated from the fact that *Alnus japonica* were planted every 5 ri using them as indicators of distance and direction along the road. It grows naturally in the area of 200-900m above sea level in the north of the central part of Korea, and the flowers are chrysanthemum, the shape of the leaves is oval, and the edge is in the shape of fine teeth. In spring, female and male flowers bloom separately, and female flowers bloom in a long egg shape, and male flowers form an unknown flower sequence similar to the shape of a cat's tail. The fruit is in the shape of a pine cone and contains seeds, and when the seeds are scattered around, the color turns black and hangs on the branches. On the root side, root lump bacteria coexist, growing well even in barren soil and making rough soil greasy. *Alnus japonica* has a hard and dense wood grain, and when the

wood is first cut, the cross section is white, but when exposed to air, it gradually discolors to red. The *Alnus japonica* used as a material in this experiment is also called the bark of the *Alnus japonica* in oriental medicine. *Alnus japonica* are known to have effects such as fever and hemostasis and have been used by the private sector such as diarrhea, toothache, hangover relief, and anticancer. In addition to triterpenoid of various ingredients such as luphenone, beta-amylin, glutenol, degradation serol, and betulinic acid, the effects of it-sitosterol, heptacoic acid, aliphatic compound alkanol, pyrocatechol tannin, piliin, salivine, and anti-hypochlorine are reported. The purpose of this study is to investigate the physicochemical properties and antioxidant activity of *Alnus japonica* leaves according to the extraction method.

**Key words:** *Alnus japonica* leaves, extraction method, physicochemical composition, antioxidant activity

## 제 1장. 서 론

인간의 평균 수명 연장과 더불어 코로나 바이러스(COVID-19) 이후 건강에 대한 현대인들의 관심은 점차 높아지며 이에 따라 건강증진 및 노화 방지와 관련된 항산화 건강기능식품의 연구가 활발히 이루어지고 있다(1,2). 항산화란(Antioxidation) 전자전달 체계가 생체 내 에너지를 생산하는 과정 중 산화적 스트레스로 생성된 산화를 조절하거나 산화물을 제거하는 일련의 체계로, 이러한 과정에서 과하게 발생된 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 상태를 정상(正常)으로 회복 및 생성을 억제하는 방어기전으로 주목 받고 있다(3). 산소에서 발생하는 초과산화물 음이온기, 히드록시 라디칼, 일중항산소 및 과산화수소 등을 가지고 있는 활성산소는 생체조직 내에서 산화를 촉진하는데(4) 환경적인 스트레스 및 유전적인 요인에 의해 발생이 이루어지는 활성산소종은 미토콘드리아(Mitochondria)의 호흡단계 중 생성되는 불완전한 전자를 주변 분자로부터 전자를 가져와 일정한 상태가 유지되는 과정에서 생성된다(5). 연속적으로 안정한 상태가 되면 단백질과 지질에 작용을 가해 구성성분을 산화시키는 것은 물론 prooxidant로 기능하여 DNA 및 RNA의 돌연변이 생성 및 암화과정을 생성하는 원인으로 작용한다(6). 즉, 세포막의 투과성을 높일 뿐만 아니라 전반적인 cytotoxicity을 초래하여 노화현상 등 여러 가지 질환의 원인을 유도한다(7). 항산화제는 산소를 제거하거나 흡수하는 것이 아니며 유리기(free radical)와 반응함으로써 비타민과 필수 아미노산 등의 손실 최소화 및 유지 제품의 산패를 늦추거나 방지하는 목적으로 이용되고 있으며(8) 여러 연구결과에 따르면 열매채소류, 견과류, 곡류, 차류 등 식물성 식품(Vegetable foods)은 항산화 효과가 뛰어나 적절한 섭취를 통해 노화 지연 및 고지혈증, 동맥경화, 암, 호흡계질환, 당뇨병 등 만성질환에 도움이 되는 것으로 보고됐다(15,16). 오리나무(*Alnus japonica*)는 자작 나무과인 낙엽 교목으로 산과 개울가에서 보통 자생하는 낙엽교목으로 높이는 20m까지 자란다. 오리나무라는 이름은 오리나무를 길가에 거리 및 방향을 알려주는 지표로 삼아 5리(五里)마다 오리나무를 심었던 데서 유래되었다. 우리나라 중부 이북의 해발고도 200~900m 지역에 자생하고 있으며 꽃은 취산화서이며 잎사귀 모양은 타원형이며 가장자리는 잔 톱니 모양으로 이루어져 있다. 봄에 암꽃과 수꽃이 각각 따로 개화하는데 암꽃은 긴 달걀 모양으

로 개화하고, 수꽃은 마치 고양이 꼬리 모양과 비슷하게 미상꽃차례를 이루고 있다. 열매는 솔방울 모양이며 씨가 들어 있고 씨가 주변으로 흩날리면 색이 까맣게 변색하여 가지에 달려 있다. 뿌리 쪽에는 뿌리혹박테리아가 공생하여 척박한 토양에서도 무리 없이 잘 자라고 거친 토양을 기름지게 한다. 오리나무 목재는 나뭇결이 단단하고 촘촘하며 처음에 목재를 절단하면 단면이 흰색이지만 공기 중으로 노출되면 점차 붉은색으로 변색한다. 본 실험에 재료로 사용된 오리나무는 한방에서 오리나무 나무껍질을 적양(赤楊)이라고도 부른다. 오리나무는 해열(解熱), 지혈(止血) 등의 효능을 가지고 있고(9) 설사, 치통, 숙취 해소, 향암 등 민간에서 사용되어 온 것으로 알려졌다(10). 오리나무(*Alnus japonica*)에는 루페논, 베타아밀린, 글루테놀, 타락세롤, 베틀린산 등 여러 가지 성분의 triterpenoid 외에  $\beta$ -sitosterol, 헵타코산, 지방족(Aliphatic compound)인 alcohol, pyrocatechol 계열 탄닌과 pillioin, 살비제닌 및 5-hydroxy-4', 7-dimethoxyflavone 등의 플라보노이드 화합물이 함유되어 있으며(11, 12, 13, 14, 15, 16) 오리나무의 향암효과(17), 항산화효과(18, 19), 항염효과(20), 간 보호 효과(21), 오리나무 줄기의 항균 활성 효과(22) 등에 관한 연구가 보고되었지만 현재까지 오리나무잎(*Alnus japonica leaves*)의 항산화 성분에 관한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 추출방법에 따른 오리나무잎의 이화학적 성분 및 항산화 활성을 알아보고자 한다.

## 제 2장. 연구 방법

### 1. 실험재료

본 연구를 위해 사용된 자작나무과 식물인 오리나무 잎(*Alnus japonica leaves*)은 2021년 7월 충청북도 괴산에서 구매하여 사용하였다. 오리나무 잎은 세척 한 후 실온에서 대략 24시간 1차 건조시켰고 시료는 60℃에서 40시간 동안 hot air drier(열풍 건조기, GNCO, Jangseong, Korea)를 이용하여 2차 건조시켰다. 건조한 오리나무잎을 freeze drying을 위해 -70℃에서 deep freezer에 냉동 후 72시간동안 freeze drying 시켰다. 동결건조된 시료는 분쇄기를 사용하여 100mesh로 분쇄하여 -70℃ 초저온냉장고에 보관하여 사용하였다.

### 2. 시료 추출

오리나무 잎 분말 시료 일정량에 20배 부피의 80% 에탄올 및 증류수를 flask에 붓고 환류냉각관이 부착된 환류 냉각관을 장착한 65℃의 히팅맨틀(Mtops ms-265, Seoul, Korea)을 통해 3시간씩 총 3회 반복 추출한다. 이후 오리나무 잎 추출액을 whatman filterpapier(Whatman No.2)를 사용하여 걸러냈다. 추출된 여액은 40℃ 수욕 상에서 진공회전농축기를 이용하여 용매 제거 후 감압·농축하여 freeze-drying 시켰다. 시료는 -70℃에 냉동 보관하여 산화 방지하였다.

### 3. 일반성분 분석

오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 일반성분은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists)법(23)을 이용하여 실험하였다. 회분은 550℃ ash법, 조지방은 Soxhlet법, 수분함량은 105℃ 건조법으로 측정하였고 조단백질은 원소분석기를 통해 전질소량을 일정한 양으로 나누고 정량한 값에 질소계수 6.25를 곱셈하여 조단백질로 하였다. 탄수화물은 100에서 조단백질, 수분, 회분, 조지방의 값을 제한값으로 표시하였다.

### 4. 구성 아미노산 분석

분해관에 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물 0.5g에 3 mL의 6N HCl를 혼합하여 탈기 후 121℃에서 24시간 동안 가수분해한다. 그 후 glassfilter로 여액을 여과하고 회전 진공농축기(EYELA VACUUM NVC-1100, Tokyo, Japan)로 감압하고 농축한 뒤에 sodium phosphate buffer (pH 7.0) 10mL로 정용하였다. 용액 1 mL를 취하여 멤브레인 필터(0.2 μm)로 걸러낸 후에 Amino acid autoanalyze를 이용해 분석하였다.

### 5. 유기산 분석

오리나무 잎 80% 에탄올 추출물 0.5 g에 증류수 20 mL을 넣은 후, 80℃ 이상의 water bath에서 4시간 동안 가열시켜 추출한 용액을 Whatman 멤브레인 여과지(1μm)를 이용하여 여과시켰다. 그 후 30 mL로 정용하여 이를 Whatman membrane filter(0.45 μm)로 여과한 후 Prominence HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용해 분석하였다.

## 6. 지방산 분석

오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 지방산 조성 분석은 Wungaarden의 방법(24)에 따라 분석하였다. 시료 2 g을 chloroform-methanol로 추출 후 여과한다. 그 후에 감압 농축한 지방질을 약 100 mg을 취하여 4 mL의 1N-KOH.ethanol 용액에 섞은 후 유지 방울이 존재하지 않을 때 까지 교반한다. 5 mL의 14% BF<sub>3</sub>-Methanol을 혼합하여 환류냉각기를 부착하여 5분간 80°C에서 heating하여 메틸에스테르화하고 용액에 NaCl 포화용액 3 mL와 헥산 1 mL를 넣어 흔들여 교반 후 시험관에 옮겨 두고 상층을 분리해서 취한 뒤 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 혼합하여 수분을 없앤 후 0.5 mL를 유리병에 취한 후 가스 크로마토그래피(gas chromatography)로 분석하였다.

## 7. 무기질 분석

오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 구성 무기질 분석은 A.O.A.C. 방법(23) 실시하였다. 시료 0.5 g에 10 mL의 20% HNO<sub>3</sub>, 3 mL의 60% HClO<sub>4</sub>를 취하여 색이 투명해질 때 까지 heating한 후 0.5 M HNO<sub>3</sub>로 50 mL를 정용시켰다. 각각의 항목별 표준용액을 혼합 후 유리병에 8 mL씩 정용하여 표준용액으로 한 다음 0.5 M HNO<sub>3</sub>를 대조군으로 하여 유도결합플라즈마 spectrum analyzer로 분석하였다.

## 8. 총 Polyphenol 함량 측정

오리나무 잎 80% 에탄올 추출물과 오리나무 잎 증류수 추출물의 총 폴리페놀 (polyphenol) 함량은 Folin-Denis의 방법(25)을 응용하여 측정하였다. 1.5 mL Eppendorf tube에 시료 및 농도별 standard 용액 200  $\mu$ l와 Folin reagent 200  $\mu$ l을 넣은 후 실온에서 3분간 반응시켰다. 10% Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 400  $\mu$ l을 첨가하여 vortex한 후 암소에서 40분간 반응시켰다. 96 well plate에 200  $\mu$ l 씩 넣은 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 tannic acid를 이용하여 표준곡선을 그리고 추출물의 총 polyphenol 함량을 산출하였다.

## 9. 총 Flavonoid 함량 측정

오리나무 잎 80% 에탄올 추출물과 오리나무 잎 증류수 추출물의 총 flavonoid 함량 측정은 Davis법을 변형한 Chae 등의 방법(26)에 따라 측정하였다. 1.5 mL Eppendorf tube에 시료 및 농도별 standard 용액 500  $\mu$ l에 diethylene glycol 500  $\mu$ l를 첨가한후 1N NaOH 10  $\mu$ L을 넣고 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켰다. 그 후 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 취한 후 UV-spectrophotometer를 이용해 415 nm로 흡광도 측정하였다. Rutin을 이용하여 표준곡선을 그리고 추출물의 총 flavonoid 값을 계산하였다.

## 10. ABTS<sup>+</sup> radical 소거능

Re의 방법(27)을 변형하여 분석하였다. 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 1:1 비율로 섞어 암실에서 24시간 동안 방치하여 radical 생성을 유도하였다. 그 후 7 mM ABTS 용액에 2.4 mM potassium persulfate 10 mL를 주입하였다. UV-spectrophotometer로 750 nm에서 흡광도 값이  $0.7 \sim 1 \pm 0.02$ 가 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. ABTS 라디칼 용액 450  $\mu$ L와 각 농도별로 제조된 시료를 각 50 $\mu$ L 혼합하여 히팅블록(heating block) 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계로 750 nm에서 흡광도 측정하여 시료의 농도별 소거능 값으로 표준곡선 그려서 IC<sub>50</sub> 값 산출을 산출하였다.

## 11. DPPH radical 소거능

시료추출액 50  $\mu$ L에 0.2 mM DPPH 450  $\mu$ L 첨가한 후 vortexing하였다. 그 후 시료 무첨가군은 ethanol 50  $\mu$ L에 0.2 mM DPPH 450 $\mu$ L 첨가하였다. 이 시료는 heating block 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. UV-spectrophotometer 를 사용하여 595 nm에서 흡광도 측정하고 시료의 농도별 소거능 값으로 표준곡선 그려서 IC<sub>50</sub> 값 산출하였다. 대조군으로는 1,000 ppm BHA와 Ascorbic acid이다.

## 12. FRAP

Benzie&Strain(28)의 방법을 변형하여 FRAP assay를 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent (300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6)(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA) 10 mL, 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ)(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA) 1mL, 20 mM ferric chloride(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA))를 1mL를 혼합하여 사용하였다. 각각의 시료 10  $\mu$ L와 증류수 90  $\mu$ L를 FRAP reagent 200  $\mu$ L와 혼합하여 UV-spectrophotometer를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준곡선을 그리고 FRAP 값을 계산하였다.

## 13. 통계처리

본 연구에서 실행한 모든 실험은 독립적으로 3회 걸쳐 반복 시행하였으며 측정결과는 평균(mean)과 표준편차(SD)로 하였고, GraphPad Prism 6 program(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하여 각 실험군 간의 유의성 검사 및 증명하였다.  $p < 0.05$  수준으로 Student *t*-test와 분산분석(one-way ANOVA)을 통해 사용한 각 시료 간의 통계적 유의성을 조사하였다.

## 제 3장. 연구 결과 및 고찰

### 1. 일반성분 분석

Table 1은 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 일반성분을 분석한 결과이다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물에서 가장 많은 일반성분은 탄수화물이었으며 77.84%를 차지하였다. 또한, 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 일반성분 함량은 수분 5.05%, 조회분 4.9%, 조단백질 9.16%, 조지방 3.05%로 나타났다.

Table 1. Proximate compositions of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

(Dry Matter Basis, %)

Composition	AJ-EE <sup>1)</sup>
Moisture	5.05 ± 0.11
Crude ash	4.90 ± 0.10
Crude protein	9.16 ± 0.24
Crude fat	3.05 ± 0.5
Carbohydrate	77.84 ± 0.85

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

## 2. 구성 아미노산 분석

Table 2는 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 구성 아미노산 함량을 측정한 결과이다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물 구성 아미노산은 필수아미노산 9종 및 비필수아미노산 7종이 검출되었으며 총 16종이 검출되었다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 필수아미노산은 leucine이 698.730 mg/100g으로 가장 높은 함량을 보였고 phenylalanine, valine, arginine, threonine, lysine, isoleucine, histidine, methionine 순으로 높게 나타났다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 필수아미노산은 총 함량은 3481.309 mg/100g이었다. 비필수 아미노산은 glutamic acid가 868.788 mg/100g로 가장 높게 나타났으며 aspartic acid, proline, alanine, glycine, serine, tyrosine 순으로 높은 함량을 보였다. 총 비필수 아미노산은 3729.083 mg/100g로 나타났다.

Table 2. Contents of free amino acids of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves (mg/100g)

Amino acid	AJ-EE <sup>1)</sup>
Essential	
Threonine	393.030 ± 1.47
Valine	450.757 ± 2.33
Methionine	68.464 ± 5.03
Isoleucine	354.263 ± 1.15
Leucine	698.730 ± 2.98
Phenylalanine	467.037 ± 3.68
Histidine	264.228 ± 1.80
Lysine	378.937 ± 3.58
Arginine	405.863 ± 2.48
Total EAA <sup>2)</sup>	3481.309
Non-essential	
Aspartic acid	650.196 ± 7.57
Serine	449.393 ± 4.01
Glutamic acid	868.788 ± 5.02
Proline	534.688 ± 4.25
Glycine	450.888 ± 5.21
Alanine	487.084 ± 1.52
Tyrosine	288.046 ± 3.25
Total AA <sup>3)</sup>	3729.083
EAA/AA(%)	93.35

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

<sup>2)</sup>Total EAA: Total essential amino acids.

<sup>3)</sup>Total AA: Total amino acids.

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

### 3. 유기산 분석

Table 3는 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 유기산 함량을 나타냈다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물에서 검출된 유기산은 총 5가지이다. 유기산의 종류 citric acid, malic acid, succinic acid, formic acid, acetic acid이며 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물 유기산의 함량은 15994.32 ppm이다. citric acid가 7329.694 ppm으로 가장 많이 검출되었으며 그다음으로는 malic acid, succinic acid, acetic acid, formic acid 순으로 높게 나타났다. 가장 높게 나타난 citric acid는 구연산 또는 시트르산이라고 하며 감귤류의 과일에 있는 산 화합물로서 시트르산은 향료, 킬레이트제, 산성화제로 널리 사용돼 자연적인 보존제로서 식품에 산성 또는 신맛을 첨가 및 환경친화적인 청소제 이용, 굳은 석회질을 녹이는데 사용된다. 또한, 두 번째로 높게 검출된 succinic acid는 격리제, 완충액 및 중화제로서 식품에 사용돼어 왔고 호박산이라고도 부르며 당의 발효로 발생한 석신산은 발효주에 짠맛, 쓴맛, 신맛의 조합을 만들어내기도 한다 (29). 본 연구에 따라 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 유기산 중 citric acid가 주된 유기산이라는 점을 나타낸다.

Table 3. Contents of organic acids of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

(ppm)

Organic acids	AJ-EE <sup>1)</sup>
Citric acid	7329.694 ± 2.04
Malic acid	4984.716 ± 4.20
Succinic acid	1830.131 ± 0.77
Formic acid	200.873 ± 4.55
Acetic acid	1648.908 ± 1.56
Total	15994.32

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

#### 4. 지방산 분석

Table 4은 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 지방산 분석한 결과이다. 오리나무 잎에는 포화지방산은 5종, 단일불포화지방산은 3종, 다가불포화지방산은 1종이 검출되었다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 지방산은 palmitic acid가 42.84% 그다음으로는 tricosanoic acid, heneicosanoic acid, stearic acid, lignoceric acid 순으로 포화지방산이 나타났다. 단일불포화지방산은 oleic acid의 함량이 6.97%로 가장 높게 나타났으며 그다음으로는 cis-10-Heptadecenoic acid는 6.58%, elaidic acid는 1.68% 순으로 검출되었다. 또한, 다가불포화지방산은 linolenic acid가 8.89% 나타났다. 따라서 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 주요 지방산은 포화지방산 중 palmitic acid, oleic acid, linolenic acid로 나타났다.

Table 4. Contents of fatty acids of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

Fatty acids	AJ-EE <sup>1)</sup>
Palmitic acid (C16:0)	42.84 ± 1.07
Stearic acid (C18:0)	4.68 ± 0.48
Heneicosanoic acid (C21:0)	6.02 ± 1.52
Tricosanoic acid (C23:0)	20.95 ± 0.11
Lignoceric acid (C24:0)	1.38 ± 0.15
<b>Saturated</b>	<b>75.88</b>
cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1)	6.58 ± 0.20
Elaidic acid (C18:1n9t)	1.68 ± 0.15
Oleic acid (C18:1n9c)	6.97 ± 0.05
<b>Monounsaturated</b>	<b>15.23</b>
Linolenic acid (C18:3n3)	8.89 ± 0.48
<b>Polyunsaturated</b>	<b>8.89</b>
<b>Total</b>	<b>100.00</b>

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

## 5. 무기질 분석

Table 5는 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 무기질 함량을 분석한 것이다. 오리나무 잎의 총 무기질은 19,908.03 ppm으로 총 8종의 무기질이 검출되었고 Ca(칼슘) 함량이 11,720.369 ppm으로 가장 높게 나왔고 K(칼륨), Mg(마그네슘), Mn(망간), Fe(철), Zn(아연), Na(나트륨), Cu(구리) 순으로 검출되었다. 무기질은 신진대사, 성장 등 생명유지에 필수영양소로서 미량영양소로 일정량의 섭취가 반드시 필요한 영양소로서 섭취가 부족하면 결핍증이 나타난다(30). 과거 식량부족 및 영양공급의 부족으로 대부분의 사람이 무기질이 결핍증으로 이에 관한 연구가 활발히 이루어졌고 영양권장량 기준을 설정하여 적절한 섭취를 권고해 왔다(31, 32, 33). 오리나무잎에서 가장 많이 검출된 Ca는 체내 무기질 중 39%차지 하며 골격 및 치아를 구성하는 성분이며 체내 칼슘 함량 약 99% 이상이 골격과 치아에 존재한다. 또한, 근육, 신경 등의 정상적인 기능을 유지하며 칼슘 결핍 시 골격량의 감소, 골다공증 등의 골격 관련 질병 원인이 되기도 하며 과잉섭취 시 신석증, 비정상적인 혈청 칼인산효소 수치 등을 나타낸다(34, 35). K는 칼륨은 체내에서 체액을 조절 및 pH의 균형을 이루는 역할을 하고 신경전달 자극, 근육의 수축 작용하는 기능을 한다. 또한, 심장기능에서 혈압저하 등 심박동과 맥박을 정상으로 유지하는 역할도 한다(36).

Table 5. Contents of minerals of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

(ppm)

Minerals	AJ-EE <sup>1)</sup>
Ca	11720.369 ± 2.06
K	5772.520 ± 3.25
Mg	1674.249 ± 1.54
Fe	258.334 ± 1.52
Na	24.595 ± 6.32
Mn	401.527 ± 2.01
Cu	7.665 ± 0.15
Zn	48.774 ± 1.52
Total	19908.03

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves  
All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

## 6. 총 Polyphenol 및 총 Flavonoid 함량

Polyphenol 화합물은 식물계에 분포하며 분자 안에 두 개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가진 방향족 화합물(37)로서 시력증진, 항산화, 항암 등의 다양한 효능을 가지고 있다(38, 39). 다양한 천연물로부터 분리된 천연 항산화제로는 ascorbic acid, tocopherols, carotenoids, maillardreaction products, aminoacids, peptides, phospholipids 및 폴리페놀과 플라보노이드 등이 있다(40). 항산화 활성은 대부분 페놀성 화합물에 의한 것이며 식물체로는 열매, 줄기 등에 존재한다(41). 최근 Linus Pauling institute의 연구에 의하면 과채류의 플라보노이드는 항염증 및 면역증진 작용을 하는 항산화 효과가 있다고 보고하였다(42).

플라보노이드는 모든 식물 영양소에서 발견되며 카로티노이드와 함께 과채류의 색을 나타내기도 한다. 플라보노이드는 식물 영양소 중 가장 큰 집단에 속하며 quercetin과 kaempferol이 가장 잘 알려졌다. 플라보노이드는 대표 항산화 물질로 flavonols, anthocyanidins, flavones, flavanones, catechins 등으로 구성되어 있다. 물질에 따라 신체 활성산소를 제거 및 생체보호하고는 기능을 한다. 플라보노이드 식품을 섭취시 활성산소에 관한 생체보호 시스템을 유지하여 항산, 항균 효과가 있다고 보고되었다(43). 또 항산화, 항염, 항알러지, 항균, 항바이러스, 면역 증강, 순환기 질환 예방, 모세혈관 강화 등의 효능이 있는 것으로도 알려져있다(44).

추출법에 따른 오리나무 잎의 총 polyphenol 및 총 flavonoid 함량은 Table 6에 나온 바와 같이 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 총 polyphenol 함량은 104.02 mg/g이며 총 flavonoid 함량은 76.71 mg/g이다. 또한, 오리나무 잎 증류수 추출물의 총 polyphenol 함량은 70.95 mg/g이며 총 flavonoid 함량은 32.57 mg/g이다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물이 증류수 추출물 보다 총 polyphenol 및 flavonoid 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 특히 80% 오리나무 잎 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 1.4배 이상, 총 플라보노이드 함량은 2배 이상 월등히 높은 것을 알 수 있었다. 그 결과 총 flavonoid 함량이 가장 높은 80% 에탄올 오리나무 잎 추출물에서 항산화제로서 응용이 가능할 것으로 사료된다.

Table 6. Total polyphenol and total contents of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

	AJ-EE <sup>1)</sup>	AJ-WE <sup>2)</sup>
Total polyphenol (mg TAE/g)	104.02 ± 0.67	70.95 ± 3.69*
Total flavonoid (mg RE/g)	76.71 ± 2.95	32.57 ± 0.65*

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

<sup>2)</sup>AJ-WE, water extract of *Alnus japonica* leaves

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

\* $p < 0.05$ ; Significantly different for AJ-EE and AJ-WE by the Student's t-test

## 7. ABTS<sup>+</sup> radical 소거능

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 항산화 측정은 potassium persulfate와 반응시켜 생성된 ABTS<sup>+</sup> 라디칼의 소거능을 이용한 측정법이다. ABTS<sup>+</sup> 라디칼의 청녹색이 734 nm에서 시료의 항산화능이 높아질수록 흡광도가 낮아지는 것을 확인할 수 있다(45).

추출법에 따른 오리나무 잎의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 Figure 1와 같다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 0.125 mg/mL 농도에서 48.15%, 0.25 mg/mL 농도에서 61.42%, 0.5 mg/mL 농도에서 89.12%로 나타났다. 또 오리나무 잎 증류수 추출물은 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 0.125 mg/mL 농도에서는 16.67%, 0.25 mg/mL 농도에서 34.39%, 0.5 mg/mL 농도에서 66.74%로 나타났다. 50% radical 소거능 값 IC<sub>50</sub>을 구한 결과, 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물 ABTS<sup>+</sup>의 IC<sub>50</sub>은 0.18 mg/mL로 나타났으며 오리나무 잎 증류수 추출물 ABTS<sup>+</sup>의 IC<sub>50</sub>은 0.37 mg/mL로 나타났다. 따라서 오리나무 잎의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 80% 에탄올 추출에서 유의적으로 높게 나타났다. 본 실험의 결과, 오리나무 잎 80% 에탄올 추출과 오리나무 잎 증류수 추출물 모두 항산화 물질에 의해 ABTS<sup>+</sup> free 라디칼이 소거됨으로써 농도 의존적으로 항산화의 활성이 높아짐을 알 수 있다.

Figure 1. ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging activity of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

	Concentration (mg/mL)	ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activity (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
AJ-EE <sup>1)</sup>	0.125	48.15 ± 2.65 <sup>c</sup>	0.18
	0.25	61.42 ± 3.37 <sup>d</sup>	
	0.5	89.12 ± 0.34 <sup>e</sup>	
AJ-WE <sup>2)</sup>	0.125	16.67 ± 3.28 <sup>a</sup>	0.37
	0.25	34.39 ± 0.15 <sup>b</sup>	
	0.5	66.74 ± 2.11 <sup>d</sup>	

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

<sup>2)</sup>AJ-WE, water extract of *Alnus japonica* leaves

Data are the mean ± SD of triplicate experiments (n=3). Means with the different letters (a-e) within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

## 8. DPPH radical 소거능

DPPH는 안정된 유리라디칼을 가지고 있으며 토코페롤, 아스코르브산, 폴리하이드록시 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 보라색으로 탈색 된다(16). 따라서 식물이나 식품추출물 또는 특정 혼합물의 freeradical 소거활성을 평가하기 위해서 DPPH 실험이 주로 이용된다(47, 48). DPPH 라디칼은 체내 생성되는 라디칼은 아니지만 홀수 전자가 있어 산화방지제로부터 전자 혹은 수소를 받아 라디칼이 제거되며 보라색을 나타내어 517 nm에서 UV spectrum을 나타낸다. 라디칼의 색은 라디칼이 환원 및 제거된 후 노란색이 되어 흡광도가 낮아진다. DPPH는 흡광도를 이용한 항산화능 분석 실험 방법이다.(45)

Figure 2은 추출법에 따른 오리나무 잎의 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 값을 나타내고 있다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 값은 0.125 mg/mL농도에서 40.16%, 0.25 mg/mL에서 68.15%, 0.5 mg/mL농도에서 69.73%로 나타났고 50% 라디칼 소거능인 IC<sub>50</sub> 값은 DPPH의 IC<sub>50</sub>은 0.26 mg/mL로 나타났다. 또한, 오리나무 잎 증류수 추출물에서는 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL 농도에서 각각 19.85%, 39.06%, 66.42%, 로 나타났으며 50% 라디칼 소거능인 IC<sub>50</sub> 값은 DPPH의 IC<sub>50</sub>은 0.36 mg/mL 나타났다. 본 연구의 결과로 오리나무 잎의 DPPH radical 소거능은 오리나무 잎 증류수 추출물보다 오리나무 잎 80% 에탄올 추출에서 유의적으로 높게 나타났다. 대조군인 BHA와 Ascorbic acid의 값은 각각 88.25%, 91.52%로 나타나므로 오리나무 잎과 비교하였을 때 차이를 보였다.

Figure 2. DPPH radical-scavenging activity of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

	Concentration (mg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
AJ-EE <sup>1)</sup>	0.125	40.16 ± 1.52 <sup>b</sup>	0.26
	0.25	68.15 ± 3.63 <sup>c</sup>	
	0.5	69.73 ± 3.14 <sup>c</sup>	
AJ-WE <sup>2)</sup>	0.125	19.85 ± 3.90 <sup>a</sup>	0.36
	0.25	39.06 ± 2.60 <sup>b</sup>	
	0.5	66.42 ± 0.37 <sup>c</sup>	
Ascorbic acid	1.000	91.52	
BHA	1.000	88.25	

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

<sup>2)</sup>AJ-WE, water extract of *Alnus japonica* leaves

Data are the mean ± SD of triplicate experiments (n=3). Means with the different letters (a-c) within the same row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

## 9. FRAP(환원력) 분석

FRAP측정법은 철 이온을 환원능을 측정하는 것으로 낮은 pH에서 reducing agent에 의해 ferric tripyridyltriazine ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) 집합체가 ferrous tripyridyltriazine ( $Fe^{2+}$ -TPTZ)으로 되돌아가는 원리를 이용한 총 항산화능 측정법이다(45, 49).

추출법에 따른 오리나무 잎의 FRAP활성은 Table 7과 같다. 추출법에 따른 FRAP활성을 측정한 결과 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물은  $14.72 \mu\text{M}$ 며 증류수 추출물은  $18.56 \mu\text{M}$ 으로 증류수 오리나무 잎 추출물에서 FRAP활성이 유의미하게 높은 것을 알 수 있다.

Table 7. Ferric reducing antioxidant power of *Alnus japonica* (Thunb.) steudel leaves

(FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O eq uM)

Ferric reducing antioxidant power	
AJ-EE <sup>1)</sup>	14.72 ± 0.05*
AJ-WE <sup>2)</sup>	18.56 ± 0.04

<sup>1)</sup>AJ-EE, 80% ethanol extract of *Alnus japonica* leaves

<sup>2)</sup>AJ-WE, water extract of *Alnus japonica* leaves

Data are the mean ± SD of triplicate experiments (n=3)

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

\**p*<0.05; Significantly different for AJ-EE and AJ-WE by the Student's t-test

## 제 4장. 요약 및 결론

본 연구는 오리나무 잎을 이용하여 80% 에탄올 추출법의 일반성분 분석과 추출법을 달리하여 항산화 활성 비교를 위한 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능, FRAP 분석을 이용한 free radical(유리기) 소거능 측정, 항산화 물질함량을 측정하였다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 일반성분 분석 결과, 탄수화물이 가장 높은 비중을 차지하였고 수분, 조회분, 조단백질, 조지방 순으로 높은 것으로 나타났다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물 구성아미노산은 필수아미노산 9종, 비필수아미노산 7종이 검출되었으며 총 16종이 검출되었다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 필수아미노산은 leucine 가장 높은 함량을 보였고 phenylalanine, valine, arginine, threonine, lysine, isoleucine, histidine, methionine 순으로 높게 나타났다. 비필수 아미노산은 glutamic acid가 가장 높게 나타났으며 aspartic acid, proline, alanine, glycine, serine, tyrosine 순으로 높은 함량을 보였다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물에서 검출된 유기산은 총 5가지로 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물에서 citric acid가 가장 많이 검출되었으며 그 다음으로는 malic acid, succinic acid, acetic acid, formic acid 순으로 높게 나타났다. 오리나무 잎의 주요 지방산은 포화지방산은 5종, 단일불포화지방산은 3종, 다가불포화지방산은 1종이 검출되었다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 지방산은 palmitic acid이 가장 높게 검출되었고 그다음으로는 tricosanoic acid, heneicosanoic acid, stearic acid, lignoceric acid순으로 포화지방산이 나타났다. 단일불포화지방산은 oleic acid의 함량이 가장 높게 나타났으며 그 다음으로는 cis-10-Heptadecenoic acid, elaidic acid 순으로 검출되었다. 또한, 다가불포화지방산은 linolenic acid이 나타났다. 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 무기질은 총 8종의 무기질이 검출되었고 Ca 함량이 가장 높게 나왔고 K(칼륨), Mg(마그네슘), Mn(망간), Fe(철), Zn(아연), Na(나트륨), Cu(구리) 순으로 검출되었다. 총 polyphenol 함량은 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물이 증류수 추출물보다 유의적으로 높게 나타났다. 50% radical 소거능 값 IC<sub>50</sub>을 구한 결과, 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물 ABTS<sup>+</sup>의 IC<sub>50</sub>은 0.18 mg/mL로 나타났으며 오리나무 잎 증류수 추출물 ABTS<sup>+</sup>의 IC<sub>50</sub>은 0.37 mg/mL로 나타났다. 따라서 오리나무 잎의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물에서 항산화능이 우수한 것으로 사료 된다. 추출법에 따른 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 DPPH의 IC<sub>50</sub>은 0.26 mg/mL로 나타났다. 또한, 오리나무 잎 증류수 추출물의 IC<sub>50</sub>을 구한 결과 DPPH의 IC<sub>50</sub>은 0.36 mg/mL

나타났다. 오리나무 잎의 DPPH radical 소거능은 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물의 항산화 효과가 높다는 것을 나타내었다. 오리나무잎의 FRAP 활성을 분석한 결과 오리나무 잎 80% 에탄올 추출물은  $14.72 \mu\text{M}$ 이며 증류수 추출물은  $18.56 \mu\text{M}$ 로 나타났으며 증류수 오리나무 잎 추출물에서 FRAP활성이 유의미하게 높은 것을 알 수 있었다. 본 연구의 결과로 오리나무잎은 필수아미노산 및 필수지방산을 비롯한 무기질, 항산화제를 함유하고 있어 항산화제 등 건강기능식품으로 개발 가능성이 있다고 사료된다.

## 참고문헌

1. Goldberg I. 1994. Functional Foods. Chapman & Hall Press, NewYork, NY, USA. p 3-550.
2. Sadaki O. 1996. The development of functional foods and materials. Bioindustry 13: 44-50.
3. Lee MY, Seo CS, Ha H, Jung D, Lee H, Lee NH, Lee JA, Kim JH, Lee YK, Son JK, Shin HK. 2010. Protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* against OVA-induced murineasthma model via up-regulation of heme oxygenase-1. J Ethnopharmacol 130: 61-69.
4. Comporti, M. 1993. Lipid peroxidation : An overview. pp.65-79. In: Free Radicals : From Basic Science to Medicine: Molecular and cell biology updates. In Poli, G., Albano,E., and Dianzani, M. U. (eds.), Birkhauser Verlag. Basel,Switzerland.
5. Day BJ. 2014. Antioxidant therapeutics: Pandora's box. Free Radic Biol Med 66: 58-64.
6. Eigner D, Scholz D. 1999. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. J Ethnopharmacol 67: 1-6.
7. Meneghini, R., Martins, E. A. L. and Calderaro, M. 1993. DNA damage by

- reactive oxygen species : The role of metal. pp. 102-112, In: Free Radicals : From Basic Science to Medicine : Molecular and cell biology updates. In Poli, G., Albano, E. and Dianzani, M. U. (eds.), Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland.
8. Jun, Dong Ha, Kim, Hui-Yeong, Han, Sang-Ik, Kim, Young Hun, Kim, Se Gie, and Lee, Jin-Tae, "Studies on Antioxidant Effect of Mushroom Complex," Journal of Life Science, vol. 23, no. 3, pp. 377-382, Mar. 2013.
  9. An, S. W., Kim, Y. G., Kim, M. H., Lee, B. I., Lee, S. H., Kwon, H. I., Hwang, B. and Lee, H. Y. 1999. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* Thunb and *Alnus japonica* Steud. Kor. J. Med. Crop Sci. 7, 263-268.
  10. Lee, S.J. 1966. Korea Folk Medicine. Seoul National University Publishing Center Press, Seoul, Korea. p. 40.
  11. Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 16: 33-49
  12. Kim, H. J., Yeom, S. H., Kim, M. K., Shim, J. G., Paek, I. N. and Lee, M. W. 2005. Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* Steudel. Arch. Pharm. Res. 28, 177-179.
  13. Kuroyanagi, M., Shimomae, M., Nagashima, Y., Muto, N., Okuda, T., Kawahara, N., Nakane, T. and Sano, T. 2005. New diarylheptanoids from *Alnus japonica* and their antioxidative.

14. Lee, M. W., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. 1992. Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*. *Phytochemistry* 31, 2835-2839.
  
15. Na, C. S., Lee, S. B., Kim, J. B., Chung, H. S. and Dong, M. S. 2012. Effect of hot water extract of *Alnus japonica* Steud on the experimentally-induced acute gastritis and peptic ulcers in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 43, 72-78.
  
16. Wada, H., Tachibana, H., Fuchino, H. and Tanaka, N. 1998. Three new diarylheptanoid glycosides from *Alnus japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1054-1055.
  
17. Stevic, T., Savikin, K., Zdunic, G., Stanojkovic, T., Juranic, Z., Jankovic, T. and Menkovic, N. 2010. Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* extracts. *J. Med. Food* 13, 700-704.
  
18. Kim, S. T., Kim, J. D., Ahn, S. H., Ahn, G. S., Lee, Y. I. and Jeong, Y. S. 2004. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Alnus japonica* extracts on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 18, 971-975.
  
19. Lee, Y. A., Kim, K. H., Kim, J. S., Cho, S. M., Kim, S. W. and Lee, M. W. 2000. Antioxidative effects of diarylheptanoids from *Alnus hirsuta*. *Arch. Pharm. Res.* 44, 193-196.
  
20. Lee, M. W., Kim, J. H., Jeong, D. W., Ahn, K. H., Toh, S. H. and Surh, Y. J. 2000. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *Sibirica*. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 517-518.

21. Lee, J. Y. and Lee, M. O. 2016. Influential factors for the knowledge and awareness of adults on periodontal diseases and their belief. J. Kor. Cont. Associ. 16, 295-307.
  
22. Kim, H. S., & Cho, S. J. (2019). Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Alnus japonica* Stem Extract against *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Life Science, 29(12), 1386-1392.
  
23. AOAC. 2005. Official methods of analysis. 18th ed. Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA
  
24. Wungaarden DV. 1967. Modified rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal Chem 39(7):848-849. doi:10.1016/0021-9673(85)80015-7.
  
25. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12(2): 239-249.
  
26. Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH. 2002. Standard good analysis. 381-382.
  
27. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C.1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26(9-10): 1231-1237. doi:10.1016/S0891-5879(98)00315-3.
  
28. Benzie IF, 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. doi: 10.1006/abio.1996.0292.

29. Apleblat, Alexander (2014). 《Citric acid》. Springer. ISBN 978-3-319-11232-9.
  
30. Kim, M.-G. et al. (2014) “A Study on the Content of Minerals in Fortified Food,” Journal of Food Hygiene and Safety. The Korean Society of Food Hygiene and Safety. doi: 10.13103/jfhs.2014.29.2.099.
  
31. Gray, G. E., Paganin-Hill, A. and Ross, R. K.: Diet intake and nutrient supplement use in a southern California retirement community. Am. J. Clin. Nutr. 38, 122 (1983).
  
32. Raab, C. A., Bock, M. A., Carpenter, K., Medeiros, D., Ortiz, M., Read, M., Shutz, H. G., Sheehan, E.T. and Williams, D. K.: Targeting messages to supplement users. J. Am. Diet. Assoc. 89, 545 (1989).
  
33. Young Shin, Sung Dan Kim, Bog Soon Kim, Eun Sun Yun, Min Su Chang, Sun Ok Jung, Yong Choel Lee, Jung Hun Kim, and Young Zoo Chae. : The Content of Minerals and Vitamins in Commercial Beverages and Liquid Teas. J. Fd Hyg. Safety. 26(4), 322-329 (2011).
  
34. Expert Group on Vitamin and Minerals. Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals. (2003).
  
35. Kim, Myeong-Gil, et al. “A Study on the Content of Minerals in Fortified Food.” Journal of Food Hygiene and Safety, vol. 29, no. 2, The Korean Society of Food Hygiene and Safety, 30 June 2014, pp. 99-104. Crossref, doi:10.13103/jfhs.2014.29.2.099.
  
36. AhnKY, Kim BY, LeeSW (1999). Renal adaptive responses of HKa 2 gene (HKa

- 2a, HKa 2b) to the changes of potassium(K) die. Korean J Nephrol 18:672-682
37. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zyzyphus jujuba* var. *inermis* rehder. Kor. J. Food. Sci. Technol. 2006;38:128-34.
38. Kang MH, Cho CS, Kim ZS, et al. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. Kor. J. Food. Sci. Technol. 2002;34:1098-102.
39. Lee SY, Shin YJ, Park JH, Kim SM, Park CS. An analysis of the Gyungokgo's ingredients and a comparison study on anti-oxidation effects according to the kinds of extract. Kor. J. Herbology. 2008;23(2):123-36.
40. Hahm, T S, King, DL, Min DB. Food antioxidants. 『J. Food Biotechnol』, 2: 1-8, 1993.
41. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MPM. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. 『J. Med. Res. Reviews』, 22: 747-766, 2006.
42. Vicenti MP, White LA, Schron DJ, Benbow U. Regulation expression of the gene for matrix metallo proteinase-1(collagenase): Mechanism that control enzyme activity, transcription and mRNA stability. 『J. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp』, 6: 391-411, 1996.
43. Nam HS. Studies on Physicochemical Properties and Functionality of *Zyzyphus jujube* Miller by Maturation and Dried. 『Ph.D Thesis, Deagu Hanny University, Deagu』, 2014.

44. Daker M, Abdullah N, Vikineswary S, Coh PC, Kuppusamy UR. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmielles* sp. as stabiliser of lipid rich foods. 『Food Chem』 , 107: 1092-1098, 2008.
45. Ji-Woo Yoon, Hana Kim, Tae-Jun Ha, Su-Hee Park, Sae-Me Lee, Sung-Il Ahn, Jhoo Jin Woo, Kim Gur Yoo. "Antioxidant Activity of Greek-style Yogurt with Stevia Leaf Extracts" Journal of Dairy Science and Biotechnology 34, no.4 (2016) : 263-270.
46. Alsereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Ros-marinus officinalis* Linn) and its therapeutic potentials. Indian J. Exp. Biol. , 37: 124- 130, 1999.
47. Choi CH, Song ES, Kim JS, Kang H. Antioxidative activities of *castanea crenata* flos methanol extracts. 『Kor J. Food Sci. Technol』 , 35: 1216-1220, 2003.
48. Ammara RB, Wissem B, Mohamed BS, Jihed B, Ines S, Aicha N, Ines B, Bouhl S B, Anne-Marie M, Chekir-Ghedira L, Marie-Genevieve DF, Kamel G. Antioxidant and free radical-scavenging properties of- 77-three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L(Rhamnaceae): a structure-activity relationship. 『J. Food Chem』 , 116: 258-264, 2009.
49. Benzie I. F. F. , Strain J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay , Anal Biochem, Vol.239; pp.70-76