J. Soc. Cosmet. Scientists Korea ISSN 1226-2587
Vol. 39, No. 4, December 2013, 337-345

아로니아 베리 열매 및 잎 추출물의 항산화 활성

이 혜 미·공 봉 주·권 순 식·김 경 진·김 해 수·전 소 하·하 지 훈·김 진 숙*·박 수 남†

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, 나노바이오화장품연구실, *(주)케이엔케이
(2013년 7월 25일 접수, 2013년 7월 30일 수정, 2013년 8월 14일 채택)

Antioxidative Activities of *Aronia melanocarpa* Fruit and Leaf Extracts

Hye Mi Lee, Bong Ju Kong, Soon Sik Kwon, Kyeong Jin Kim, Hae Soo Kim, So Ha Jeon, Ji Hoon Ha, Jin-Sook Kim*, and Soo Nam Park†

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Nanobiocosmetic Lab.,
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
*KNK Co., Ltd, Naeson-dong, Uiwang-si, Gyeonggi-do 437-835, Korea
(Received July 25, 2013; Revised July 30, 2013; Accepted August 14, 2013)

요 약: 본 연구에서는 아로니아 베리 열매 및 잎 추출물의 항산화 활성을 비교 연구하였다. 아로니아 베리 열매의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 free radical 소거 활성(FSC_{50})은 각각 16.29 μg/mL 및 12.29 μg/mL이었으며, 열매추출물의 free radical 소거활성은 잎 추출물 경우보다 높게 나타났다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 아로니아 베리 열매 추출물의 총 항산화능(OSC_{50})은 에틸아세테이트 분획의 경우 2.86 μg/mL, 아글리콘 분획은 1.80 μg/mL로, 아글리콘 분획의 총항산화능은 ascorbic acid (1.50 μg/mL)와 비슷한 활성을 나타내었다. 총항산화능에서도 열매 추출물이 잎 추출물 보다 활성이 높은 것으로 나타났다. 사람 적혈구의 $^1O_2$로 유도된 세포손상에 대한 보호 효과 실험에서 열매의 아글리콘 분획은 농도의존적(5 ~ 50 μg/mL)으로 세포보호 효과를 나타내었다. 열매 아글리콘분획의 τ_{50}은 10 μg/mL에서 72.3 min으로 지용성 항산화제로 알려진 (+)-α-tocopherol (38.0 min)보다 1.9 배 더 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 이상의 결과들은 아로니아 베리의 열매 추출물이 잎 추출물보다 높은 항산화능을 나타내며, 태양 자외선에 노출된 피부에서 발생되는 $^1O_2$를 포함하는 ROS에 대항하여 세포를 보호함으로써 기능성 항산화 화장품 소재로서의 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidative effects of *Aronia melanocarpa* fruit and leaf extracts were investigated. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC_{50}) of the ethylacetate and aglycone fractions of fruit extracts were 16.29 μg/mL, and 12.29 μg/mL, respectively. The free radical scavenging activity of fruit extract was higher than that of leaf extracts. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC_{50}) of the ethylacetate and aglycone fractions of fruit extracts on ROS generated in Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 system using the luminol-dependent chemiluminescence assay showed 2.86 μg/mL, and 1.80 μg/mL, respectively. ROS scavenging activity of the aglycone fraction of fruit extracts was similar to that of L-ascorbic acid (1.50 μg/mL). The ROS scavenging activity of fruit extracts was higher than that of leaf extracts. The cellular protective effects of aglycone fraction of fruit extracts (τ_{50} = 72.3 min) on the $^1O_2$-induced cellular damage of human erythrocytes especially were increased in a concentration dependent manner (5 ~ 50 μg/mL). τ_{50} (72.3 min) of the aglycone fraction showed 1.9 times higher than (+)-α-tocopherol (38 min), known as lipophilic antioxidant at 10 μg/mL. These results incidicate that *A. melanocarpa* fruit extracts have higher antioxidant effects than leaf extracts and could be applicable to functional cosmetics materials for antioxidants by protecting skin exposed to solar UV radiation against ROS including $^1O_2$.

† 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

Keywords: *Aronia melanocarpa, antioxidative activity, photoaging, cellular protective effect*

1. 서 론

광노화는 특히 태양광선에 노출되는 신체 부위에서 자외선의 작용으로 나타난다. 피부가 자외선에 지속적으로 노출되면 피부에는 많은 양의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. ROS란 $^1O_2$나 H_2O_2와 같은 비 라디칼종과 $O_2^{\cdot -}$나 ·OH과 같은 산소중심의 라디칼들 그리고 생체 분자와 ROS와의 반응에서 유래된 ROO·, RO·, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 피부에서 과잉의 활성산소가 생성되면 염증, 면역억제, 돌연변이, 광발암 및 피부노화 등 피부의 광산화적 손상 위험을 실질적으로 증가시킨다[1-3].

피부에는 ROS의 산화적 스트레스에 대항하기 위해 ROS를 소거할 수 있는 효소 및 비효소적 항산화제들이 존재한다. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 효소적 항산화제와 비타민 E 및 C, 유비퀴놀, 카로티노이드, 글루타치온과 같은 비효소적 항산화제들은 항산화 방어망을 구축하여 ROS로부터 세포 및 조직을 보호한다. 하지만 계속된 ROS의 공격은 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어계를 붕괴시키고, 이어서 지질, 단백질, DNA와 같은 세포 구성 성분들을 손상시켜서 피부노화를 가속화시킨다[4-6].

ROS 중에서 $^1O_2$는 수명이 짧고 반응성이 매우 큰 분자이며, 주로 광증감반응을 통해서 피부에서 생성되는 활성산소로 광노화에 있어서 핵심적인 역할을 한다. 또한 $^1O_2$와 함께 ·OH도 반응성이 가장 큰 ROS로서 생체 내에는 이들 활성산소를 제거할 수 있는 효소가 존재하지 않는다. 사람 피부 세포에 있어서 지질과산화, 단백질 산화 및 DNA 손상뿐만 아니라 UV-A (320 ~ 380 nm) 의존성 세포 사멸이나 사람 피부 섬유아세포에서의 matrix metalloproteinases (MMPs, 예 collagenase 등)의 발현 및 합성에 $^1O_2$가 포함되는 것으로 보고되고 있다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다[7-9].

따라서 광노화를 방어하고 자외선으로부터 피부 보호제를 개발하는데 있어서 $^1O_2$ 및 ·OH는 매우 중요한 ROS임을 나타낸다. 이들 ROS가 광노화에 포함되기 때문에, 항산화제의 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소는 피부 광노화를 예방하고 최소화시키기 위해 촉망되는 전략으로 평가받고 있다. 이와 함께 최근에 피부 항산화 방어망을 구축하기 위해 새로운 천연 항산화제의 개발 및 항산화제의 피부전달시스템에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다[10-13].

아로니아 베리(*Aronia melanocarpa*)는 장미과의 낙엽 관목으로 북아메리카에서 자생하며, black chokeberry로도 불린다. 최근에는 한국에서도 재배되고 있다. 아로니아 베리는 주로 안토시아닌과 같은 폴리페놀류, 플라보노이드 및 탄닌 등을 함유하고 있으며, 천연 항산화제 함량이 많은 기능성 식품으로 언급되고 있다. 안토시아닌류는 특유의 색 때문에 천연 색소로도 이용되고 있다. 아로니아 베리는 항산화 이외에도 위보호, 항염증, 면역조절 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다[14-19]. 하지만 아로니아 열매 및 잎 추출물의 활성분획인 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획에 대한 다양한 ROS (H_2O_2, ·OH, $O_2^{\cdot -}$)에 대한 총항산화능이나 피부 광노화에 있어서 중요한 $^1O_2$에 의한 세포손상에 있어서의 세포보호 효과에 대한 비교 연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 주로 식품 분야에서 이용되는 아로니아 베리의 열매와 잎을 이용하여 추출물 및 분획을 제조한 후 이들 추출물 및 분획에 대하여 DPPH로 유도된 free radical 소거 활성, Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 계에서 생성되는 다양한 ROS (H_2O_2, ·OH, $O_2^{\cdot -}$)에 대한 소거활성 그리고 $^1O_2$로 유도된 세포손상에 대한 보호 활성을 평가함으로써 열매와 잎의 항산화 활성을 비교 평가하고, 아로니아 베리 추출물의 항산화 화장품(또는 두발용품)으로서의 응용 가능성이 있는지를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사

의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였고, pH 미터는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였다. EDTA, luminol, heparin, 광증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, H_2SO_4 그리고 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 아로니아 베리 열매와 잎은 2013년 경상북도 칠곡군 북삼읍 보손3길 32-3 K아로니아 농장에서 재배된 것을 ㈜케이엔케이로부터 제공받아 사용하였다.

2.2. 아로니아 베리 열매, 잎의 분획 및 추출

건조된 아로니아 베리 열매와 잎 각각의 100 g에 50% 에탄올 1 L 및 2 L를 넣고 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 evaporator를 이용하여 감압 건조시킨 후 파우더를 얻고, 이 파우더 양으로부터 50% 에탄올 추출물의 수율을 구하였다. 이렇게 얻어진 50% 에탄올 추출물 파우더의 일부를 물과 n-헥산을 처리하여 비극성 성분을 제거하고 이어서 에틸아세테이트로 분획한 후 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 에틸아세테이트 분획물 일부를 산으로 가수분해하여 당을 제거시킨 후 감압 농축하여 아글리콘 분획물을 제조하였다. 아글리콘 분획물의 제조 방법은 에틸아세테이트 일정량에 H_2SO_4 및 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류・냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정하고 증류수로 세척하여 산, 염기 및 당 등을 모두 제거한 후에 다시 에틸아세테이트로 추출하고 이를 감압・농축한 후 얻어진 아글리콘 분획물을 실험에 사용하였다.

2.3. 아로니아 베리 열매 및 잎 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 높은 반응성을 가진 홀 전자를 갖는 원자단으로 매우 불안정하다. 이러한 특징으로 피부 조직에 손상을 입혀 피부 노화를 가속화시킨다. 아로니아 베리 열매 및 잎 추출물에 대한 free radical 소거 활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL을 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. Free radical 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC_{50}, μg/mL)로서 표기하였다.

$$Inhibition\,(\%) = \left\{1 - \left[\frac{(A_{\mathrm{Experiment}} - A_{Blank})}{A_{Control}}\right]\right\} \times 100$$

2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+}–EDTA/H_2O_2계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계는 각종 ROS ($O_2^{\cdot -}$, ・OH, H_2O_2)를 생성시키며 철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical (・OH) 발생에 있어서 중요한 역할을 한다. 이 계를 이용하여 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 총항산화능을 측정할 수 있다.

실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물과 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 μL를 가한 후 35 mM luminol 80 μL를 넣은 다음 흔들어 섞어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣는다. 5 min 동안 37 ℃ 항온시킨 후 150 mM H_2O_2 40 μL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H_2O_2와 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없

도록 하였다. 화학발광으로 측정한 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC_{50}, μg/mL)로 표기하였다.

$$Inhibition\,(\%) = \frac{(Control\text{의}\ cpm - Sample\text{의}\ cpm)}{(Control\text{의}\ cpm - Blank\text{의}\ cpm)} \times 100$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀 3명으로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5 × 10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 아로니아 베리 열매, 잎 추출물의 광용혈 억제 효과

1.5 × 10^7 cells/mL 적혈구 현탄액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물 용액을 농도별로 각각 50 μL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min간 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose bengal (12 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 간 광을 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응 (post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 파장에서 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 ℃ 항온실에서 행하였다.

아로니아 베리 열매 및 잎 추출물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50}을 구하여 비교하였다. 대조군은 τ_{50}이 31 min으로 오차 범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

$$Relative\ protective\ effects = \frac{Sample\ \tau_{50}}{Control\ \tau_{50}}$$

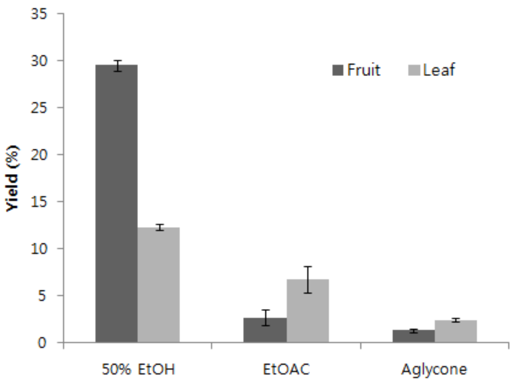

Figure 1. Yields of *A. melanocarpa* fruit and leaf extract/fractions.

2.5. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 아로니아 베리 열매, 잎 추출물의 수율

건조된 아로니아 베리 열매 및 잎을 50% 에탄올로 추출하고 건조시킨 후 얻어진 50% 에탄올 추출물의 수율은 건조된 아로니아 베리 열매 및 잎의 건조 중량당 각각 29.46% 및 12.26%였다. 50% 에탄올 추출물로부터 얻어진 에틸아세테이트 분획의 수율은 건조된 아로니아 베리 열매 및 잎의 건조 중량 당 각각 2.67% 및 6.71%였다. 아로니아 베리 열매 및 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 산가수분해반응을 통해 얻어진 아글리콘 분획물의 수율은 건조된 아로니아 베리 열매 잎의 건조 중량 당 열매가 1.33%, 잎이 2.42%로 얻어졌다(Figure 1).

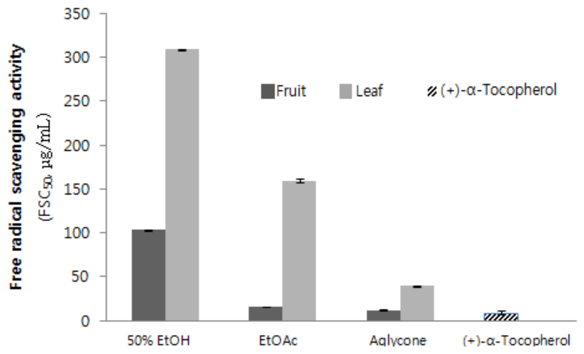

Figure 2. Free radical scavenging activities of *A. melanocarpa* fruit and leaf extract/fractions and (+)-α-tocopherol.

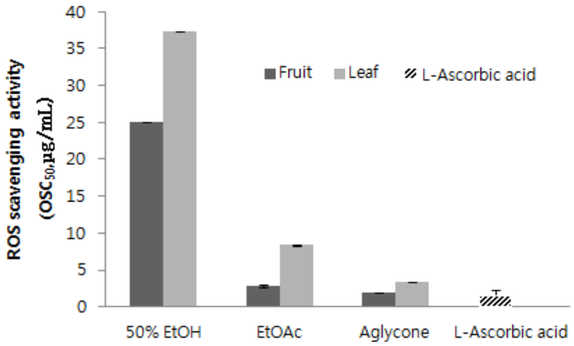

Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activities of *A. melanocarpa* fruit and leaf extract/fractions and L-ascorbic acid in Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 system by luminol-dependent chemiluminescene assay.

3.2. 아로니아 베리 열매, 잎 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

자외선 노출에 의해 생성되는 ROS에는 ·OH와 같은 홀 전자를 갖는 라디칼 종이 포함되어 있다. 이러한 라디칼 종은 반응성이 매우 높아 피부의 여러 구성물질을 산화시키고 파괴시켜 피부 노화를 야기한다. 피부 내 존재하는 비타민 E 등의 항산화제는 ROS로 유도되는 세포막의 지질과산화 연쇄 반응에서 생성되는 지질 라디칼에 전자를 제공함으로써 라디칼 연쇄 반응을 종결시킨다. 따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH를 이용하여 아로니아 베리 추출물의 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 아로니아 베리 열매 및 잎으로부터 얻어진 추출물과 분획에 대하여 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol의 free radical 소거 활성과 비교하였다(Figure 2). 아로니아 베리 열매와 잎의 50% 에탄올 추출물의 라디칼 소거 활성(FSC_{50})은 각각 103.95 μg/mL 및 300.96 μg/mL, 에틸아세테이트 분획물은 각각 16.29 μg/mL 및 159.12 μg/mL, 아글리콘 분획의 경우에는 각각 12.29 μg/mL 및 40.12 μg/mL를 나타내었다.

열매 추출물은 잎 추출물보다 50% 에탄올 추출물에서는 약 2 배, 에틸아세테이트 분획에서 9.8 배, 아글리콘 분획에서 3.3 배의 더 큰 free radical 소거 활성을 나타내었다. 비교물질로 사용된 (+)-α-tocopherol (FSC_{50} = 9.00 ± 2.90 μg/mL)과 비교하였을 때 아로니아 베리 열매의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 (+)-α-tocopherol과 유사한 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}–EDTA/H_2O_2계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

본 실험에 사용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서는 Fe^{3+} 및 H_2O_2로부터 Fenton 반응을 경유하여 다양한 종류의 ROS가 생성된다. ROS는 반응액 중의 luminol과 반응하여 들뜬 상태의 아미노프탈산이 되고 이어서 빛을 내는 화학발광이 나타난다. 이 계에 항산화제가 첨가되면 ROS를 소거하고 화학발광은 감소한다. Figure 3는 아로니아 열매 및 잎의 추출물 또는 분획의 ROS 소거 활성(총항산화능)을 보여주고 있다. 아로니아 베리 열매와 잎 추출물의 경우, 50% 에탄올 추출물의 활성산소 소거 활성은 각각 25.00 μg/mL 및 37.27 μg/mL, 에틸아세테이트 분획은 각각 2.86 μg/mL 및 8.38 μg/mL, 아글리콘 분획은 각각 1.80 μg/mL 및 3.38 μg/mL로 나타났다.

아로니아 베리 열매와 잎의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 우수한 활성산소 소거 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 DPPH법으로 측정한 free radical 소거 활성에서와 같은 결과를 보여주었다. 아로니아 베리 열매가 잎보다 에틸아세테이트 분획에서 4.5 배, 아글리콘 분획에서는 1.8 배, 50% 에탄올 추출물에서는 1.4 배 더 큰 총 항산화능을 나타냈다. 또한 열매의 아글리콘 분획은 비교물질로 사용된 L-ascorbic acid (OSC_{50} = 1.50 μg/mL)와 유사한 활성산소 소거 활성을 나타냈다.

3.3. $^1O_2$로 유도된 사람 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상

Table 1. Cellular Protective Effects of *A. melanocarpa* Fruit Extract/Fractions and (+)-α-Tocopherol on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

	τ_{50} (Half time of hemolysis[1)])			
Concentration (μg/mL)	5	10	25	50
50% EtOH extract	43.9 (± 4.9)	33.9 (± 0.4)	58.2 (± 1.2)	93.3 (± 5.1)
EtOAc fraction	47.9 (3.4)	41.5 (± 0.3)	87.9 (± 2.2)	137.0 (± 12.0)
Aglycone fraction	50.9 (± 0.9)	72.3 (± 5.4)	125.7 (± 0.1)	150.9 (± 6.1)
(+)-α-Tocopherol	-	38.0 (± 1.8)	-	74.3 (± 6.4)

[1)] Control, τ_{50} = 29.0 ± 1.1 min

Table 2. Cellular Protective Effects of *A. melanocarpa* Leaf Extract/Fractions and (+)-α-Tocopherol on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

	τ_{50} (Half time of hemolysis[1)])			
Concentration (μg/mL)	5	10	25	50
50% EtOH extract	25.7 (± 0.2)	28.2 (± 7.4)	33.5 (± 4.5)	50.8 (± 2.7)
EtOAc fraction	26.6 (± 3.0)	31.7 (± 3.4)	32.3 (± 4.3)	37.6 (± 4.7)
Aglycone fraction	43.7 (± 4.2)	58.9 (± 0.8)	99.4 (± 3.3)	113.7 (± 1.5)
(+)-α-Tocopherol	-	38.00 (± 1.80)	-	74.33 (± 6.35)

[1)] Control, τ_{50} = 33 ± 1.1 min

및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험법을 이용하여 천연물 추출물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다. 사람 적혈구 세포를 이용하여 광증감제로 유도된 활성산소 생성과 세포손상에 있어서 아로니아 베리 추출물의 세포보호 효과를 측정하였다. 피부에는 porphyrin이나 riboflavin과 같은 다양한 광증감제들이 존재하며 이들은 자외선에 노출될 때 광증감 반응을 통해 $^1O_2$를 비롯한 다양한 활성산소종을 생성시킨다. 특히 광증감반응의 주 생성물인 $^1O_2$는 반응성이 매우 큰 ROS로 피부 항산화제를 고갈시킴으로써 항산화 방어망을 붕괴시키고, 세포막에서 라디칼 반응을 개시시킴으로써 연쇄 반응을 일으켜서 세포막을 파괴하는 세포 손상을 야기시킨다. 따라서 적혈구의 광용혈 실험법은 피부 광노화 모델로서 활성산소로부터 세포보호 효과를 측정하는데 매우 효과적이다. 본 실험을 통해 광증감제로 사용되는 rose-bengal로 유도된 $^1O_2$에 의한 세포 손상에 있어서 아로니아 베리의 열매와 잎 추출물/분획의 세포보호 효과를 측정하여 아로니아 베리 추출물의 항산화제로서의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

아로니아 베리 열매 및 잎의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획물에 대하여 5, 10, 25 및 50 μg/mL의 농도에서 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})을 측정함으로써 세포보호 효과를 비교하였다(Table 1, 2). 이 값(τ_{50})은 시료의

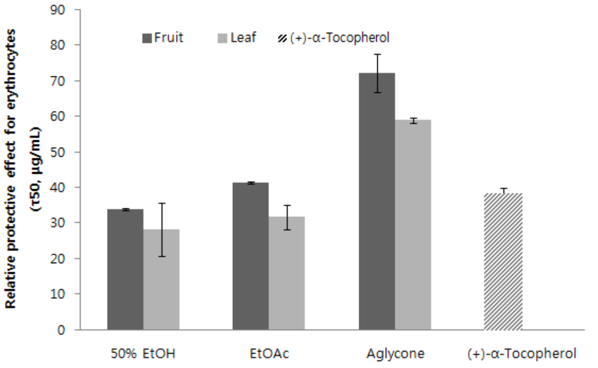

Figure 4. The cellular protective effects of *A. melanocarpa* fruit and leaf extract/fractions and (+)-α-tocopherol at 10 μg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocyes. (Control = 31 ± 1 min)

세포보호 활성이 클수록 높게 나타난다. 시료를 넣지 않은 대조군의 경우, 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간은 31 ± 1 min으로 재현성이 양호하게 나타났다. 아로니아 베리 열매의 모든 분획은 잎보다 우수한 세포보호 효과를 나타냈다. 아로니아 베리 열매의 50% 에탄올 추출물은 5, 10, 25 및 50 μg/mL의 농도에서 τ_{50}이 43.9, 33.9, 58.2 및 93.3 min으로, 에틸아세테이트 분획은 47.9, 41.5, 87.9 및 137.0 min으로 10 μg/mL를 제외한 농도에서 농도 의존적인 세포보호 효과를 나타냈다. 아글리콘 분획의 경우는, 5 ~ 50 μg/mL의 농도 범위에서 τ_{50}이 50.9, 72.3, 125.7 및 150.9 min으로 세포보호 활성이 에탄올, 에틸아세테이트 분획보다 높게 나타났으며, 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol보다 우수한 보호 활성을 보였다(Table 1). 잎의 경우, 모든 분획의 5 ~ 50 μg/mL 농도에서 농도 의존적인 보호 효과를 보였다. 하지만 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 비교 물질인 (+)-α-tocopherol에 비해 큰 효과는 보이지 않았다(Table 2). 이는 추출용매에 따른 각 분획의 성분 차이로 인해 세포막에서의 보호 효과의 차이가 나타난 것으로 사료된다.

아로니아 베리의 열매와 잎의 아글리콘 분획은 10 μg/mL에서 (+)-α-tocopherol보다 각각 1.9 배, 1.5 배의 우수한 세포보호 효과를 나타냈으며, 열매는 잎보다 1.2 배의 효과를 보였다(Figure 4). 아로니아 베리 열매와 잎 추출물/분획 중 아글리콘 분획이 활성산소에 대한 세포보호 활성이 우수하며 항산화제로서 응용 가능성이 있음을 나타낸다.

4. 결 론

1) 아로니아 베리의 열매, 잎 추출물의 free radical 소거 활성(FSC_{50})을 비교한 결과, 열매의 경우는 아글리콘 분획(12.29 μg/mL) > 에틸아세테이트 분획(16.29 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(103.95 μg/mL) 순서로, 잎은 아글리콘 분획(40.12 μg/mL) > 에틸아세테이트 분획 (159.12 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(300.96 μg/mL) 순서로 나타났다. 따라서 잎의 세 분획 모두 비교 물질인 (+)-α-tocopherol보다 낮은 free radical 소거 활성을 보였으며, 열매의 아글리콘 분획이 (+)-α-tocopherol과 유사한 소거 활성을 갖는 것을 확인하였다.

2) 아로니아 베리의 열매, 잎 추출물의 활성산소 소거 활성(총항산화능, OSC_{50})을 확인한 결과, 열매는 아글리콘 분획(1.80 μg/mL) > 에틸아세테이트 분획(2.86 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(25.00 μg/mL) 순서로 나타났으며, 잎의 경우는 아글리콘 분획(3.38 μg/mL) > 에틸아세테이트 분획(8.38 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(37.27 μg/mL) 순서이다. 따라서 열매의 아글리콘 분획만이 강력한 항산화제인 L-ascorbic acid와 유사한 활성산소 소거 활성이 있음을 확인하였다.

3) 아로니아 베리의 열매, 잎 추출물의 $^1O_2$로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과(적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간, τ_{50})를 확인한 결과, 열매는 아글리콘 분획의 경우에만, 잎은 모든 분획에서 5 ~ 50 μg/mL까지 농도의존적으로 세포보호 효과를 나타내었다. 10 μg/mL를 기준으로 세포보호 효과는 열매의 아글리콘 분획(72.3 min) > 잎의 아글리콘 분획(58.9 min) > (+)-α-tocopherol (38.0 min) 순서로 나타났으며, 비교 물질로 사용된 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol보다 열매의 아글리콘은 1.9 배, 잎은 1.5 배의 우수한 세포보호 효과를 보였다.

본 연구에서는 아로니아 베리의 열매, 잎 추출물의 항산화 효과를 확인, 비교 평가하였다. 진행된 모든 실험에서 열매 추출물이 잎보다 높은 항산화 활성을 보였으며, 특히 아글리콘 분획이 $^1O_2$에 의한 세포 손상에 대한 우수한 보호 효과가 있음을 나타내었다. 이상의 결과를 통해 아로니아 베리의 열매와 잎의 아글리콘 분획은 항산화 기능성 화장품의 천연 소재로서

응용이 가능하다고 사료된다.

감사의 글

본 과제(결과물)는 2013년도 교육과학기술부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력선도대학(LINC) 육성 사업의 연구 결과입니다.

Reference

1. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(3), 75 (1997).
2. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
3. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin : Antiaging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**, 85 (2010).
4. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, In *Free Radical Damage and Its Control*, eds. C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, 239 Elsevier Science B. (1994).
5. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
6. O. ten Berge, S. G. A. van Veisen, B. Glovannone, C. A.F.M. Bruljnzeel-Koomen, E. F. Knol, K. Guikers, and H. van Weelden, Assessment of cyclobutane pyrimidine dimers by digital photography in human skin, *J. Immun. Methods*, **373**(1-2), 240 (2011).
7. H. M. Chiang, H. C. Chen, H. H. Chiu, C. W. Chen, S. M. Wang, and K. C. Wen, *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after UVB exposure via ROS scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, 9 (2013).
8. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
9. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of intestitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
10. J. E. Kim, H. J. Lee, M. S. Lim, M. A. Park, and S. N. Park, Cellular protective effect and liposome formulation for enhanced transdermal delivery of *Persicaria hydropiper* L. extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**(1), 15 (2012).
11. S. N. Park, H. J. Lee, H. S. Kim, M. A. Park, and H. A. Gu, Enhanced transdermal deposition and characterization of quercetin-loaded ethosomes, *Korean J. Chem. Eng.*, **30**(3), 688 (2013).
12. M. H. Lee, S. J. Kim, and S. N. Park, Development of porous cellulose-hydrogel system for enhanced transdermal delivery of quercetin and rutin, *Polymer (Korea)*, **37**(3), 347 (2013).
13. S. N. Park, M. H. Lee, S. J. Kim, and E. R. Yu, Preparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposome-in-hydrogel complex system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **435**, 361 (2013).
14. T. Tanaka and A. Tanaka, Chemical components and characteristics of black chokeberry*, J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.,* **48**, 606 (2001).
15. J. Hudec, D. Bakosy, D. Mravec, L. Kobida, M. Burdovaa, I. Turianica, and J. Hlusyek, Content of phenolic compounds and free polyamines in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) after application of polyamine biosynthesis regulators, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3625 (2006).
16. L. Sueiro, G. G. Yousef, D. Seigler, E. G. DE Mejia, M. H. Grace, and M. A. Lila, Chemopreventive potential of flavonoid extracts from plantation-bred and wild *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) fruits, *J. Food Sci.*, **71**(8), C480 (2006).
17. A. Kokotkiewicz, Z. Jaremicz, and M. Luczkiewicz, Aronia plants: A review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine, *J. Med. Food*, **13**(2), 255 (2010).
18. J. Niedworok, B Jankowska, E. Kowalczyk, K.

Charyk, and Z. Kubat, Antiulcer activity of anthocyanin from *Aronia melanocarpa* Elliot, *Herba Polonica,* **43**, 222 (1997).
19. K. Ohgami, I. Ilieva, K. Shiratori, Y. Koyoma, X. Jin, K. Yoshida, S. Kase, N. Kitaichi, Y. Suzuki, T. Tanaka, and S. Ohno, Anti-inflammatory effect of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.,* **46**, 275 (2005).