

## 복분자 에탄올 추출물의 항산화 및 항용혈 효능

장태수\* · 양재찬\*\* · 임선영\* · 김보애\*\*†

\*서울대학교 그린바이오과학기술연구원

\*\*목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부

(2014년 2월 27일 접수; 2014년 4월 1일 수정; 2014년 4월 3일 채택)

### Antioxidant and Antihemolytic Activity of Ethanol Extracts of *Rubus coreanus Miquel*

Tae-Su Jang · Jae-Chan Yang · Sun-Young Lim · Bo-Ae Kim†

*Institute of Green Bio Science & Technology Seoul National University,  
1200 Shinri, Daehwa-myeon, Pyeongchang-gun, Gangwon-do 232-916, Korea*

*College of Sciences & Technology, Division of Biomedical & Cosmetics, Mokwon University,  
Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 302-729, Korea*

(Received February 27, 2014; Revised April 1, 2014; Accepted April 3, 2014)

**요약** : 천연에서 유래한 항산화 및 항용혈 소재개발을 위해 복분자 에탄올 추출물의 생리활성 효능 평가를 실시하였다. 복분자를 에탄올 추출한 후, 획득한 추출물을 섬유아세포주인 HS68에 처리하여 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사 항산화 효능을 평가하였다. 또한 Sprague Dawley 랫트 적혈구 세포에 과산화수소로 산화를 유도한 후 추출물의 항용혈 효능을 살펴보았다. 그 결과 추출물은 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 랫트 적혈구를 이용한 항용혈 평가에서는 과산화수소를 단독으로 처리한 양성대조군보다 추출물을 처리한 군에서 항용혈율이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 이들 결과는 복분자 추출물이 항산화효능과 항용혈 약용 식물 소재로서의 가능성을 내는 것으로 사료된다.

주제어 : 복분자, 항산화, 항용혈 활성

**Abstract** : To develop a natural antioxidant and anti-hemolytic agents, we investigated the effects of ethanol extracts of *Rubus coreanus Miquel* (crude extracts). Crude extract was extracted with ethanol. Antioxidant activity of crude extracts was evaluated by employing two different assays, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and super oxide dismutase(SOD)-like activity. Also, anti-hemolytic activity of crude extract was determined using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced hemolysis in normal rat red blood cells (RBC) or plasma. The extracts obtained from crude extract dose-dependently increased the scavenging activity on DPPH-induced radicals

†Corresponding author  
(E-mail: kba@mokwon.ac.kr)

and SOD-like activity. RBC oxidative hemolysis induced by  $H_2O_2$  was significantly suppressed by the extracts of *Rubus coreanus Miquel* in a dose-dependent manner. These results suggest that crude extracts may have value as the potential antioxidant and anti-hemolytic medicinal plant.

*Keywords* : *Rubus coreanus Miquel*, antioxidant, antihemolytic activity

## 1. 서론

최근 천연 유래한 기능성 신소재에 대한 관심이 높아지고 있으며, 항산화(antioxidant) 효능을 가지는 노화 억제 천연물에 대한 연구 개발이 활발하게 진행되고 있다[1]. 기존의 생명공학을 이용한 의학적 소재 연구기술의 발전과 함께 천연 식물성 소재를 포함하는 여러 가지 한약재에서 산화적 손상을 억제하거나 노화를 효과적으로 제어하는 물질 등에 관한 많은 보고가 천연유래 소재에 대한 긍정적인 인식으로 작용하고 있다[2-3]. 인간의 수명이 연장되면서 노화 및 혈액순환 장애와 관련된 성인병이 증가하고 있는데, 그 원인은 생체 대사과정에서 발생하는 히드록시 라디칼, 슈퍼옥사이드 라디칼, 과산화수소와 같은 지질과산화물 초래하는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성과 관련되는 것으로 알려져 있다[4-5]. 활성 산소종은 세포의 구성성분인 당, 인지질, 단백질, DNA 등에 대하여 비가역적 파괴 작용을 함으로써[6-7], 노화현상은 물론 파킨슨 병, 뇌졸중 등의 뇌질환과 피부질환, 심장질환, 류마티스, 암, 염증반응 등 각종 질병의 주원인이 되고 있다[5-8]. 활성 산소종은 겸상 적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), glucose-6-phosphate dehydrogenase 결핍 및 이상 혈액소증(hemoglobinopathy)을 가진 환자에서 적혈구에 치명적인 손상을 유도한다[9-12]. 적혈구의 세포막에는 불포화 지방산이 다량 포함되어 있으며, 세포질에는 높은 농도의 산소와 헤모글로불린이 함유되어 있어 산화적 손상에 매우 민감하게 반응한다[12,13]. 세포막이 산화적 스트레스에 노출되게 되면 지질과산화(lipid peroxidation)가 생성되며 지질과산화의 최종 생성물로서 malondialdehyde (MDA)가 적혈구에 일시적으로 노출될 경우 세포 구성물과의 높은 반응성으로 적혈구의 세포사멸을 초래한다[13].

대사과정에서 생성된 유해활성산소는 생체 내에서 스스로 제거할 수 있는 항산화 물질을 갖고 있는데, 즉 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase와 같은 항산화 효소와 비타민 E 등과 같은 항산화물질이 존재하여 외부의 산화적 스트레스로부터 인체를 보호한다. 그러나 체내 염증반응과 관련된 질환의 경우 활성 산소류가 과다하게 생성되기 때문에 외부로부터 항산화 물질을 보충할 필요가 있다. 본 연구는 항산화물질이 다량 포함되어 있는 천연소재로서 복분자 추출물을 이용하여 항산화 효능과 적혈구 보호효능을 측정하였다.

복분자(*Rubus coreanus Miquel*)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 산딸기(Rubus)의 일종으로 검은 빛의 붉은색 열매를 맺는 다년생 식물이다[14]. 예로부터 약용으로 사용되고 있으며 동의보감(東醫寶鑑)에 의하면 신(身)과 간(肝)을 보호하고 눈을 밝게 하며, 강장, 당뇨, 지혈 등에서 사용된다고 알려져 있다[15]. 특히 복분자는 인, 철, 유기산, 비타민 C 등의 유효성분[16]과 생리활성물질의 종류로는 gallic acid, quercetin, ellagic acid 및 다양한 페놀산 등이 있어 인체의 항암작용, 항산화작용, 면역증진 효과가 있다고 알려져 있다[17-20]. 복분자는 1990년대부터 매년 11,000톤 이상이 생산되고 많은 농가의 주요 소득원이기는 하나 홍수출하로 인한 가격폭락이 문제시 되고 있다. 복분자의 주요제품인 과실주의 소비가 크게 감소하여 다양한 제품개발이 시도되고 있으나 단순 가공 수준의 제품만이 제시되고 있어 과다 생산되는 복분자의 효율적인 활용방안이 아직 미흡한 실정이다[21-23]. 따라서 본 연구에서는 복분자의 항산화 효능과 항용혈 효능을 함께 평가함으로써 적혈구 세포막보호 효능에 대하여 구체화하여 다양한 분야에서 적극적으로 활용될 수 있도록 항산화 기능성소재로서의 가능성을 검증하고자 한다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 실험 재료

복분자는 강원도 횡성에서 2013년 7월 생산된 것을 제공 받아 사용하였다. 수확 직후의 복분자를 상온에서 5일 동안 건조하여 분쇄한 뒤 열에 의한 손상으로부터 배제하기 위해 상온 25°C에서 99.5% 에탄올 용매로 하여 추출하였다. 추출물은 4일에 걸쳐 추출되었으며, 분쇄된 원료와 에탄올의 비율은 1:9로 설정한 후 추출하였고, 상층액을 100 $\mu$ m filter paper를 이용하여 감압 필터링하였다. 이 후 획득된 추출액을 농축기를 이용하여 45°C의 조건으로 농축하였으며, 최종 동결건조기로 용매 잔류를 최소화한 후 분말형태로 -75°C에 보관하면서 *in vitro* 실험에 사용하였다.

### 2.2. 생리활성 측정

#### 2.2.1. 항산화 효과(DPPH scavenging activity, SOD-like activity)

추출물의 DPPH 저해율 활성 측정(Electron donating abilities, EDA)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[24]. 각 시료용액 2.0 ml에 0.2 ml의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.5 ml를 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다. SOD 효소 활성은 SOD assay Kit-WST를 이용하여 지시대로 측정하였다. 96-well plate에 청각 분획물을 넣고 WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 후 37°C에서 20분간 incubation한 후 microplate reader에서 450 nm 파장을 측정하였다.

#### 2.2.2. 세포배양 (Cell culture)

인간 섬유아세포주인 HS68 (human skin fibroblast)은 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 분양 받아 사용하였으며, 세포배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 항생제 (penicillin/streptomycin)는 Gibco사 (Grand Island, NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하

였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건인 incubator에서 배양하였다. 세포배양 배지는 2일마다 새로운 배지로 갈아주었다.

#### 2.2.3. 세포독성 평가 (MTT assay)

시험 종료 후 배지를 제거하고 MTT solution (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide])을 넣고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양 후 MTT solution을 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이는 노란색의 tetrazolium이 살아있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 보라색의 formazan 변환되는 것을 측정하는 분석 방법이다.

#### 2.2.4. 적혈구 부유액의 제조 및 용혈 측정 (Antihaemolytic activity method)

7주령의 건강한 수컷 SD (Sprague Dawley) 랫트를 중앙실험동물(주)로부터 공급받아 사용하였으며, 제공받는 날로부터 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 휴식한 후 사용하였다. 랫트는 에테르로 마취시켜 헤파린이 처리된 주사기를 이용하여 심장으로부터 채혈하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 9.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 추출물을 농도별로 가하여 상층액 내의 혈색소(hemoglobin)양을 540 nm 파장에서 spectrophotometer를 이용해 측정하였다. 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 함유된 PBS로 반응시킨 것을 100% 용혈을 일으킨 양성대조군으로 하여 항용혈율을 백분율로 환산하였다.

### 2.3. 통계학적 분석

모든 결과는 3회 이상 반복 분석하였으며, 자료는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ SD)로 나타내었고, 통계학적 분석은 Student's t-test로 행하였으며, 유의성 검증은 대조군과 비교하여 결정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 항산화 결과

활성산소종에 의한 피부노화는 주름형성, 색소 침착, 피부건조와 같이 다양한 형태로 나타나며

자외선, 영양상태의 불균형, 환경오염 등 각종 산화적 스트레스가 그 원인이다. 활성산소종은 끊임없이 생성되지만 정상인의 경우 인체 내부에 항산화 방어 시스템을 갖추고 있어 유해한 산화적 스트레스로부터 대응하여 항상성을 끊임없이 유지한다. 항산화 방어 시스템 중에서도 효소에 의한 방어기전은 catalase와 superoxide dismutase 등을 대표적으로 들 수 있다[25]. 이에 본 연구에서는 복분자 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 효소 활성에 대하여 측정하였다. DPPH는 보라색을 띄며 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 전자를 받게 되면 흡광도가 감소하며, 환원력이 있는 물질과 만나 전자를 내어주면 DPPH 라디칼이 소멸되어 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변하는 것을 측정하게 된다. 그 결과 추출물을 처리한 경우 농도 의존적으로 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, SOD-like activity 또한 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 1).

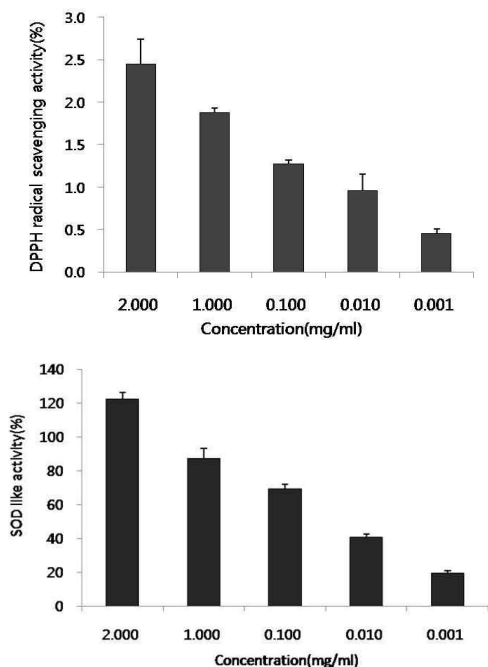


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity(%) and SOD-like activity of dependent on concentration from EtOH extracts of *Rubus coreanus Miquel*.

### 3.2. 세포생존을 평가 결과

추출물의 독성을 평가하기 위해 HS68 섬유아 세포에 복분자 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 다음 24시간 후에 ELISA microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 복분자 에탄올 추출물의 경우 2, 1 mg/ml 농도에서 각각  $77.8 \pm 4.26$ ,  $91.0 \pm 2.92\%$ 의 세포생존율을 나타내었으며 0.5mg/ml 이상의 농도에서 다소 낮은 세포생존율을 나타내었으나 그 이하의 농도에서는 독성을 나타내지 않아 높은 피부세포 안전성을 나타내는 것으로 평가된다.

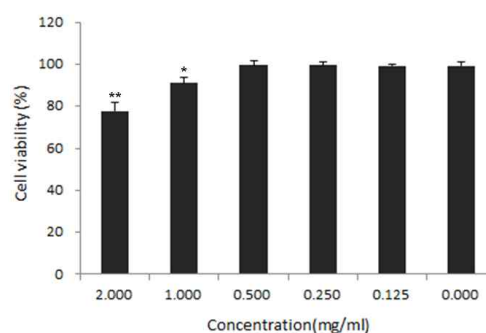


Fig. 2. Cell viability of dependent on concentration from EtOH extracts of *Rubus coreanus Miquel*. Data were presented as them  $\pm$  S.D., \*;  $P < 0.05$  compared with negative control \*\*;  $P < 0.01$  compared with negative control.

### 3.3. 항용혈 활성 (Antihaemolytic activity)

$H_2O_2$ 를 처리한 적혈구는 시간 의존적으로 용혈율이 증가하였으며, 1시간 이후에는 100% 용혈되었다. 복분자 추출물 처리에 의한 적혈구 용혈 억제 효과를 평가하기 위해  $H_2O_2$ 로 산화적 손상을 유도하는 동시에 농도별로 추출물을 포함하여 실험을 수행하였다. 그 결과 Table 1과 같이 복분자 에탄올 추출물을 처리한 군에서 용혈이 억제되는 것으로 나타났으며 농도 의존적으로 항용혈율이 증가하였다. 기존 연구 의하면 vitamin C와 Quercetin이 강력한 항용혈을 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[26]. 즉 항용혈 효능을 나타낸다는 것은 적혈구 세포막의 산화적 손상을 억제하는 것으로써 강력한 항산화 효능과 관련된다. 그러므로 이에 대한 결과를 바탕으로 vitamin C와 Quercetin을 양성대조군으로 설정하

여 추후 항용혈 효능에 대한 비교 실험을 하여 증명할 필요가 있다고 사료된다.

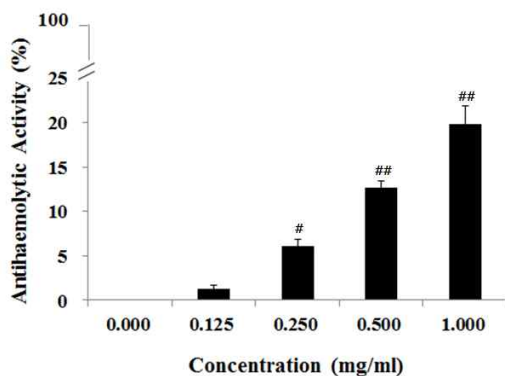


Fig. 3. Measurement of hemolytic inhibition (%) of EtOH extracts from *Rubus coreanus* Miquel using erythrocyte from SD rat. Data were presented as them  $\pm$  S.D., #; P<0.05 compared with positive control ##; P<0.01 compared with positive control.

#### 4. 결 론

본 연구는 복분자를 에탄올 추출한 후 세포생존율, 항산화 효능을 포함한 레드 적혈구 항용혈율을 평가하여 산화적 물질부터 세포를 보호할 수 있는 천연 기능성 소재로서의 가능성을 평가하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 복분자 에탄올 추출물의 세포생존율에 미치는 영향에 대하여 MTT 평가 결과 0.5mg/ml 이상의 농도에서 다소 낮은 세포 생존율을 나타내었다.
2. 복분자 에탄올 추출물을 처리한 경우 농도 의존적으로 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, SOD-like activity 또한 농도 의존적으로 증가하였다.
3. 복분자 에탄올 추출물을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 양성대조군과 비교해 용혈이 억제되는 것으로 나타났으며 농도 의존적으로 항용혈율이 증가하였다.

이상의 결과는 복분자 에탄올 추출물이 세포보호 효능을 나타내는 항산화 기능성 소재로서 식품, 화장품 등의 다양한 사업에 활용될 수 있는 가능성이 충분하다고 판단된다.

#### 감사의 글

이 논문은 강원권 광역경제권 선도산업 산업생태계지원 사업에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

#### References

1. W. G. Cho, Comparison of Drug Delivery using Hairless and Pig Skin, *J. of Korea Oil Chemists' Soc.*, 24(4), 410 (2007).
2. I. C. Kim, Antioxidative Property and Whitening Effect of the Polygoni Multiflori Radix, Polygonati Rhizoma and Ephedrae Herba, *J. of Korea Oil Chemists' Soc.*, 25(4), 533 (2008).
3. K. C. Sung, A study on the Antimicrobial Effect of Natural Artemisia Extract using Super Critical Carbon Dioxide, *J. of Korea Oil Chemists' Soc.*, 20(4), 309 (2004).
4. H. Wiseman, Dietary influences on membrane function; impotent in protection against oxidative damage and disease. *Nutr Biochem.*, 7(1), 2 (1996).
5. J. Bouayed, T. Bohn, Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev.*, 3(4), 228 (2010).
6. S. Kawashima, The possible role of lipoperoxide in aging. *Nagoya J. Med Sci.*, 32, 303 (1970).
7. E. A. Dicker, A. D. Crum, J. T. Calvert, Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric Food Chem.*, 40(5), 756 (1992).

8. B. H. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, **186**, 1 (1990).
9. S. M. Edgington, As we live and breathe: free radicals and aging. Correlative evidence from a number of fields suggests they may be key. *Bio Technology*, **12**(1), 37 (1994).
10. J. L. Vives Corrons, A. Miguel-Garcia, M. A. Pujades, A. Miguel-Sosa, S. Cambiazzo, M. Linares, M. T. Dibarrart, M. A. Calvo, Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *Eur J. Haematol.*, **55**(5), 327 (1995).
11. C. Rice-Evans, S. C. Omorphos, E. Baysal, Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J.* **237**(1), 265 (1986).
12. S. M. Sadrzadeh, E. Graf, S. S. Panter, P. E. Hallaway, J. W. Eaton, Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J Biol Chem.*, **259**(23), 14354 (1984).
13. M. R. Clemens, M. Ruess, Z. Bursa, H. D. Waller, The relationship between lipid composition of red blood cells and their susceptibility to lipid peroxidation. *Free Radical Res Commun.*, **3**(1-5), 265 (1987).
14. M. S. Kim, G. C. Pang, M. W. Lee, Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanum*. *J. Pharm Soc Korea*, **41**, 1 (1997).
15. J. Heo, Donguibogam 1-5. Yeogang Publishing Co., Seoul, Korea, 62 (1994).
16. Pang KC, Kim MS, Lee MW (1996) Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharm.*, **27**, 366 (1996).
17. Y. A. Lee, M. W. Lee, Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharm.*, **26**, 27 (1995).
18. M. W. Lee, Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *J. Pharm Soc Korea*, **39**, 200 (1995).
19. Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY, Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. *Korean J. Med Crop Sci.*, **14**(4), 206 (2006).
20. M. K. Lee, H. S. Lee, G. P. Choi, D. H. Oh, J. D. Kim, C. Y. Yu, H. Y. Lee, Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Med Crop Sci.*, **11**(1), 5 (2003).
21. K. H. Sung, J. H. Lee, A study on quality characteristics of Teriyaki sauce with added *Rubus coreanus* Miquel. *J. East Asian Soc. Diet Life*, **19**(6), 958 (2009).
22. Y. J. Song, A study to marketing strategies for the korean wild-berry wine industry. *Korean Bus. Edu. Assoc.*, **4**, 119 (2004).
23. S. M. Hong, M. J. Kang, J. H. Lee, J. H. Jeong, S. H. Kwon, K. I. S, Production of Vinegar using *Rubus coreanus* and Its Antioxidant Activities. *Korean J. Food Preserv.*, **19**(4), 594 (2012).
24. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199 (1958).
25. C. K. Sen, Oxidative and antioxidants in exercise. *J. Appl Physiol.* **79**(3), 675 (1995).
26. M. A. Ebrahimzadeh, S. F. Nabavi, S. M. Nabavi, B. Eslami, Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Central European J. Biology.* **5**(3), 338 (2010).