

## 미성숙 복분자 과실의 항산화 효능 및 타이로시네이즈 저해 활성 평가

한 셋 별·권순식·공봉주·김경진·박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 에너지바이오대학 정밀화학과, 화장품종합기술연구소  
(2013년 7월 20일 접수, 2013년 7월 24일 수정, 2013년 8월 8일 채택)

### Antioxidative Effect and Tyrosinase Inhibitory Activity of the Unripened Fruit Extract of *Rubus coreanus* Miquel

Saet Byeol Han, Soon Sik Kwon, Bong Ju Kong, Kyeong Jin Kim, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, College of Energy and Biotechnology,  
Seoul National University of Science and Technology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea  
(Received July 20, 2013; Revised July 24, 2013; Accepted August 8, 2013)

**요약:** 본 연구에서는 미성숙 복분자 추출물의 항산화 효능과 타이로시네이즈 저해 활성을 평가하고 이들의 기능성 화장품 원료로서의 응용 가능성을 확인하였다. 모든 실험은 미성숙 복분자의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 이용하여 진행하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성(FSC<sub>50</sub>)은 에탄올 추출물(6.56  $\mu\text{g/mL}$ )과 에틸아세테이트 분획(6.14  $\mu\text{g/mL}$ )이 대표적인 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol (8.98  $\mu\text{g/mL}$ )보다 높은 것으로 나타났다. Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 활성산소종에 대한 소거 활성(OSC<sub>50</sub>)은 에탄올 추출물(0.83  $\mu\text{g/mL}$ ), 에틸아세테이트 분획(0.84  $\mu\text{g/mL}$ ), 아글리콘 분획(1.13  $\mu\text{g/mL}$ ) 세 분획 모두 대표적인 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid (1.5  $\mu\text{g/mL}$ )보다 높은 것으로 나타났다. Rose bengal로 광증감된 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>에 의한 적혈구 파괴에 대하여, 세 분획 모두 농도 의존적(1 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$ )인 세포보호 활성을 나타내었다. 또한 50  $\mu\text{g/mL}$  농도를 기준으로 비교하였을 때, 50% 에탄올 추출물의  $\tau_{50}$ 은 296.3 min으로 가장 높은 세포보호 활성을 나타내었다. 타이로시네이즈 저해 활성에서 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 알부틴보다 높은 저해 효과를 나타내었다. 이상의 결과들로부터 미성숙 복분자 추출물은 라디칼을 포함한 활성산소종을 소거하는 항산화제로서, 알부틴을 대체하는 미백 기능성 원료로서 응용될 수 있음을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative effects and inhibitory activities of unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel (*R. coreanus* Miquel) on tyrosinase were investigated and the potential applicability as a cosmeceutical ingredients was evaluated. All experiments were performed with 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction of unripened fruit extract of *R. coreanus* Miquel. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activities (FSC<sub>50</sub>) of 50% ethanol extract (6.56  $\mu\text{g/mL}$ ) and ethyl acetate fraction (6.14  $\mu\text{g/mL}$ ) of unripened fruit extract of *R. coreanus* Miquel were higher than (+)- $\alpha$ -tocopherol (8.98  $\mu\text{g/mL}$ ), which is known as a typical hydrophobic antioxidant. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of 50% ethanol extract (0.83  $\mu\text{g/mL}$ ), ethyl acetate fraction (0.84  $\mu\text{g/mL}$ ) and aglycone fraction (1.13  $\mu\text{g/mL}$ ) of *R. coreanus* Miquel on ROS generated in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system were higher than L-ascorbic acid (1.5  $\mu\text{g/mL}$ ), which is known as a typical hydrophilic antioxidant. The cellular protective effect of extract and fraction of unripened fruit extract of *R. coreanus* Miquel on the rose bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes was increased in a concentration dependent manner (1 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$ ). And 50% ethanol extract in 50  $\mu\text{g/mL}$  showed the most protective effect among extracts ( $\tau_{50}$  =

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

296.3 min). The inhibitory effects on tyrosinase of ethyl acetate and agylcone fractions were higher than arbutin. These results indicate that unripened fruit extracts of *R. coreanus* Miquel can be applied to antioxidant scavenging ROS including radical as an alternative whitening agent to replace arbutin.

**Keywords:** *Rubus coreanus* Miquel, antioxidative activity, tyrosinase, photoaging, cosmetics

## 1. 서 론

피부는 항시 산소와 접촉하고 있고, 자외선과 같은 유해 환경요소에 직접적으로 노출되어 있다. 특히 자외선으로부터 유도되어 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 피부의 광산화적 손상을 유발할 수 있다. ROS는 큰 산화력을 갖는 산소종으로 superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )과 같은 산소 중심의 라디칼뿐만 아니라 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ )과 같은 비라디칼 종을 포함한다. ROS는 대사과정에서도 생성될 수 있지만 지속적인 자외선 노출이나 스트레스는 과잉의 ROS 생성을 유발시킨다[1-3]. 이들 ROS는 생체 내 항산화 방어망을 붕괴시키고 이어서 세포를 구성하는 지질, 단백질 및 DNA의 산화뿐만 아니라 피부 진피 내 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) 등 단백질 가수분해효소의 발현을 증가시켜 세포외 매트릭스 구성 성분들인 콜라겐과 엘라스틴의 절단 및 비정상적인 교차결합을 유발시킴으로서 피부 노화를 가속화시키는 것으로 알려져 있다[4-8].

피부에는 활성산소종으로 유도되는 산화적 스트레스에 대항하기 위하여 항산화 방어망이 구축되어 있다. 효소적 항산화제인 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (GSHPx) 등은  $O_2^{\cdot-}$  및  $H_2O_2$  (또는 과산화물)와 같은 활성산소를 처리하며, 비효소적 항산화제인 비타민 E, 비타민 C, 카로티노이드 및 플라보노이드 등은 ROS를 제거하는데 참여한 다.  $^1O_2$  및  $\cdot OH$ 은 반응성이 매우 큰 활성산소로 생체 내에 이들 활성산소를 처리할 수 있는 항산화 효소가 없기 때문에 상기의 비효소적 항산화제들은  $^1O_2$  및  $\cdot OH$ 을 제거하는데 매우 효율적인 항산화제들이며 피부노화 억제에서도 매우 중요하다. 따라서 피부 항산화 방어망을 튼튼하게 구축함으로써 피부 노화를 지연시키기 위해서는 외부로부터 추가적인 항산화제의 보충이 이루어져야 한다[9-12].

본 연구에서 사용한 복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과에 속하는 야생 딸기나무의 생약명으로, 동남아시아의 한국, 중국 및 일본에만 자생하는 식물이다[13]. 복분자는 여드름 원인균에 대한 항균 활성 및 지루성 피부염에 대한 항염 효과, B16 세포주를 이용한 미백효능 등에 관한 연구들이 있다[14-17]. 또한 함유 성분으로는 페놀성 화합물, 트리테르페노이드, 플라보노이드 및 탄닌 등이 보고되고 있다[18,19]. 이외에도 복분자 열매, 뿌리 및 잎에 대한 항산화 연구와 성숙시기별 열매의 생리활성 비교 연구 등을 통해 식품으로의 이용 가능성에 관한 연구가 일부 진행된 상태이다. 하지만 성숙시기별 복분자 열매 추출물에 대한 ROS 소거활성이나 피부노화에 중요한  $^1O_2$ 와 같은 활성산소로 유도된 세포 손상에 있어서 보호효과 등 화장품의 항산화 소재로서의 연구는 진행되어 있지 않다[20-23].

따라서 본 연구에서는 미성숙 복분자를 이용하여 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 제조하였으며, 이들 분획의 항산화 활성 및  $^1O_2$ 로 유도된 세포 손상에 대한 보호 작용과 멜라닌 형성에 직접적으로 관여하는 타이로시네이즈의 저해 활성을 평가하였다. 이와 같은 미성숙 복분자의 분획별 비교 연구를 통해 미성숙 복분자 추출물의 항산화 및 항노화 화장품 소재로서의 이용 가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광 실험에 사용된 6-channel LB9505 LT는 Berthold (Germany)사의 제품, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose ben-

gal, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, trizma base, HCl 그리고 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. HPLC 용매 제조에 사용된 Acetonitrile은 J. T. Baker사와 B&J사의 HPLC grade 제품을 사용하였다. L-타이로신과 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide와 타이로시네이즈(11.9 mg solid, 4,276 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)- $\alpha$ -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, 알부틴은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 본 실험에 사용한 미성숙 복분자는 2013년 5월 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

## 2.2. 미성숙 복분자의 분획 및 추출

건조된 미성숙 복분자 100 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 50% 에탄올 파우더를 얻었다. 또한 에틸아세테이트 분획을 얻기 위해, 50% 에탄올 추출물을 감압 농축한 후 물과 n-헥산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이를 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

또한 에틸아세테이트 분획 파우더 일부를 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시켜 아글리콘 분획을 제조하였다. 실험 방법은 에틸아세테이트 가용분 일정량에  $\text{H}_2\text{SO}_4$  및 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

## 2.3. 미성숙 복분자 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

DPPH법은 시료의 라디칼 소거능을 평가할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자공여능을 통하여 시료의 환원력을 측정한다. 실험

방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 미성숙 복분자 추출물 1 mL를 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 하였다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로서 표기하였으며, 자유 라디칼(DPPH) 소거 활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

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

### 2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

$\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계는 다양한 ROS ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot\text{OH}$  그리고  $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있으며, 이 총항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 루미놀과 ROS와의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 확인할 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 미성숙 복분자 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu\text{L}$  및 5 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu\text{L}$ 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  40  $\mu\text{L}$ 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와  $\text{H}_2\text{O}_2$  대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로서 표기하였다.

## 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀 2명으로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  9.6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였으며 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는  $1.5 \times 10^7$  cells/mL이었다.

### 2.4.2. 미성숙 복분자 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12  $\mu\text{M}$ ) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm  $\times$  20 cm  $\times$  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 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 미성숙 복분자 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여 비교하였다.

## 2.5. 타이로시네이즈 저해 활성 측정

L-타이로신으로부터 멜라닌 생성과정에서 전체 반

응 속도를 결정하는데 작용하는 핵심효소는 타이로시네이즈다. 따라서 타이로시네이즈의 저해 활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-타이로신(0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응 혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 타이로시네이즈의 활성을 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )로 표기하였다.

## 2.6. 통계처리

결과는 각 실험그룹별 평균 표준편차(S.D)로 표기하였고 실험데이터는 대조군과 샘플처리 그룹간 Student's *t*-test법을 이용하여 처리하였다. 통계적 유의성은 *p* value가 0.05 미만인 것으로 판정하였다.

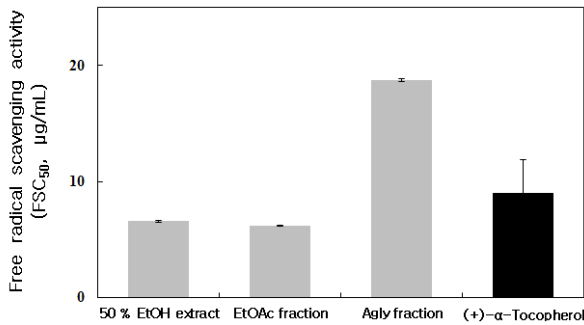
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 미성숙 복분자 추출물의 항산화 활성

#### 3.1.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

라디칼은 짝을 이루지 않은 홀전자를 가지고 있기 때문에 에너지가 높고 반응성이 높아 세포막에서 지질과산화반응의 자동산화반응을 개시시킬 수 있다. 이때 세포막에 생성된 라디칼에 전자를 하나 제공하게 되면 개시반응은 차단시킬 수 있다. 이와 같이 전자 하나를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력, 즉 환원력을 통해서 그 물질에 대한 항산화능을 측정할 수 있다. 항산화제의 능력은 안정화된 구조의 자유 라디칼인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

미성숙 복분자 추출물의 자유 라디칼 소거 활성( $\text{FSC}_{50}$ ) 결과를 Figure 1에 나타내었다. 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의  $\text{FSC}_{50}$ 은 각각  $6.56 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ ,  $6.14 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ 로 지용성 항산화제로 알려진 (+)- $\alpha$ -tocopherol ( $\text{FSC}_{50}$ ,  $8.98 \pm 2.93 \mu\text{g/mL}$ )과 비교해보았을 때, 각각 1.36 배, 1.46 배 높은 자유 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 한편 아글리콘 분획의 자유 라디칼 소거 활성은  $18.75 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ 로 비교 물질로 사용된 (+)- $\alpha$ -tocopherol 보다 다소 낮은 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 위의 결과를 통해 미성숙 복



**Figure 1.** Free radical scavenging activities of extract/fractions of *R. coreanus* Miquel extract and reference.

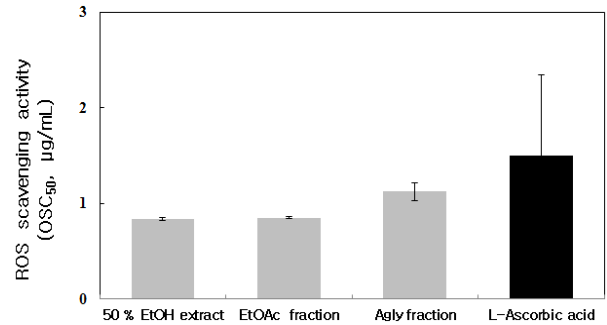
분자의 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획은 (+)-α-tocopherol을 대체하는 라디칼 소거제로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

3.1.2. Luminol 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성 (총항산화능)

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서는 Fe<sup>2+</sup>과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 Fenton 반응이 일어난다. 이러한 Fenton 반응에서는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>을 제외한 대부분의 ROS (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, ·OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 생성되며, 철과 같은 전이금속은 반응성이 큰 ·OH를 생성시키는데 중요한 역할을 한다.

본 실험에서는 루미놀 발광법을 이용하여 여러 가지 ROS에 대한 총항산화능을 측정하였다. 루미놀은 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되고 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된다. 아미노프탈산은 다시 바닥상태로 떨어지면서 발광(420 ~ 450 nm)을 하기 때문에 이를 이용하여 ROS의 소거능을 측정할 수 있다.

미성숙 복분자 추출물의 총항산화능 실험 결과를 Figure 2에 나타내었다. 미성숙 복분자의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 OSC<sub>50</sub>은 각각 0.84 ± 0.02 µg/mL, 0.85 ± 0.01 µg/mL로 나타났으며, 아글리콘 분획은 1.12 ± 0.09 µg/mL로 측정되었다. 이러한 결과를 체내에 존재하는 대표적인 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid (OSC<sub>50</sub> = 1.50 ± 0.85 µg/mL)와 비교하였다. 미성숙 복분자 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 각각 L-ascorbic acid보다 약 1.78, 1.76 및 1.34 배 더 큰 활성산소 소거 활성을 나타내었다.



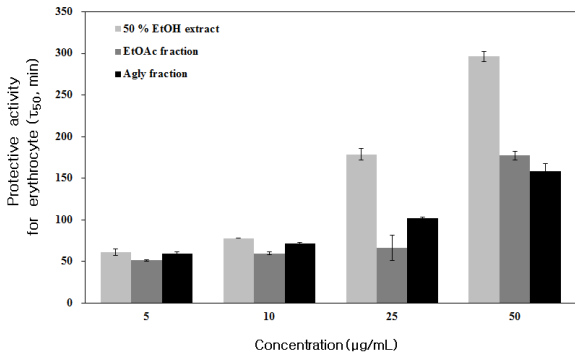
**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activities of *R. coreanus* Miquel extract/fractions and reference in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

3.1.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과  
 자외선이 조사되면 피부 내에서는 포르피린과 같은 광증감제에 의한 광증감 반응이 일어나 빠르게 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>와 여러 ROS들을 생성한다. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>는 반응성이 매우 큰 ROS로서 세포 막 구성성분인 인지질을 산화시켜 지질과 산화반응의 자동산화반응을 개시시킨다. 이어서 이러한 반응은 세포막의 붕괴를 일으켜 세포를 손상시킬 뿐만 아니라 용혈을 야기한다. 따라서 사람 적혈구 세포를 이용한 광용혈 실험법은 활성산소에 의한 항산화제의 고갈, 지질과산화반응, 단백질 산화, 세포막의 파괴 용혈 현상 등을 알아볼 수 있다. 상기 실험을 통하여 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)으로 세포보호 효과를 비교해 볼 수 있다. 이 값은 시료의 세포보호 활성이 클수록 높게 나타난다.

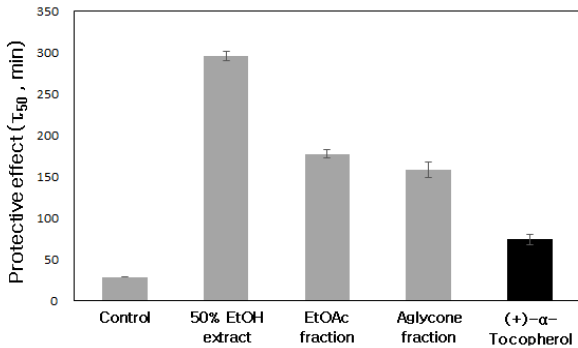
대조군으로 시료를 넣어주지 않고 혈구만 존재할 때의 τ<sub>50</sub>을 확인하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ<sub>50</sub>이 29.30 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다. Rose bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다.

미성숙 복분자 50% 에탄올 추출물의 경우 τ<sub>50</sub>이 5, 10, 25, 50 µg/mL의 농도에서 각각 61.2, 77.9, 178.8, 296.3 min, 에틸아세테이트 분획의 경우 51.5, 59.9, 66.4, 177.5 min, 아글리콘 분획의 경우 59.3, 71.7, 101.8, 158.8 min로 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었다(Figure 3).

가장 우수한 세포보호 효과를 나타내었던 50 µg/mL



**Figure 3.** Cell protective effects of *R. coreanus* Miquel extract/fractions against <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced photohemolysis of human erythrocytes (Control = 29.30 ± 1 min).

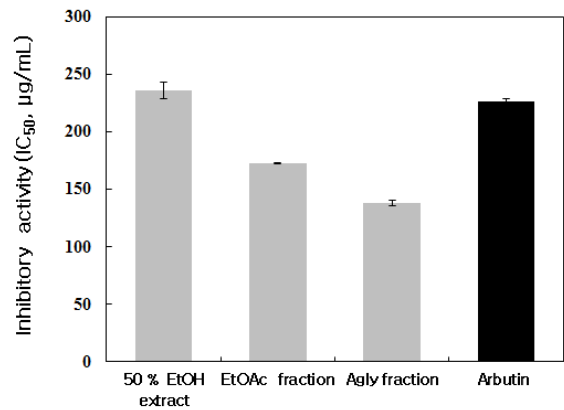


**Figure 4.** The effects of extract and fractions from *R. coreanus* Miquel and reference at 50 μg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (Control = 29.30 ± 1 min).

를 기준으로 미성숙 복분자의 세 분획과 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (74.3 ± 6.4 min)의 τ<sub>50</sub>을 비교하였다(Figure 4). 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획의 τ<sub>50</sub>은 각각 296.3 ± 5.9, 177.5 ± 5.1, 158.8 ± 9.2 min으로 나타났다. 이는 비교 물질인 (+)-α-tocopherol보다 각각 4.0, 2.4, 2.1 배 높은 세포보호 효과로서, 이러한 결과를 통해 미성숙 복분자의 세 분획 모두 높은 세포보호 효과를 통해 항산화제로서의 높은 응용 가능성을 확인하였다.

3.2. 미성숙 복분자 추출물의 tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성과정은 여러 경로를 거쳐서 형성되는 것으로 알려져 있지만, 핵심적인 효소는 타이로시네이스이다. 이 효소는 L-타이로신으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중에서, L-타이로신에서 3,4-dihy-



**Figure 5.** The inhibitory activities of *R. coreanus* Miquel extract/fractions and reference on tyrosinase.

droxy-L-phenylalanine (DOPA)로, 그리고 DOPA에서 dopaquinone으로 산화되는 과정에 촉매로 작용한다. 이 두 번의 산화 반응 후의 후속 반응은 자발적으로 일어나기 때문에, 타이로시네이스가 관여하는 반응이 전체 반응 속도를 결정하게 된다. 이러한 이유로 타이로시네이스 저해 활성은 미백 활성을 평가하는데 매우 중요한 요소이다. 본 실험에서는 미성숙 복분자 추출물 및 분획과 대표적인 미백제로 알려져 있는 알부틴을 비교 물질로 하여 타이로시네이스 저해 활성을 비교하였다(Figure 5).

미성숙 복분자의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 IC<sub>50</sub>은 각각 235.9 ± 7.4, 173.0 ± 0.7 μg/mL 로 나타났다. 또한 아글리콘 분획의 IC<sub>50</sub>은 137.9 ± 2.3 μg/mL로 세 분획 중 가장 높은 타이로시네이스 저해 활성을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물은 비교 물질로 사용한 알부틴 (226.9 ± 1.6 μg/mL)과 유사한 타이로시네이스 저해 활성을 나타내었다. 반면 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 알부틴에 비해 각각 1.3, 1.6 배 높은 타이로시네이스 저해 활성을 나타내었다. 따라서 미성숙 복분자 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 미백 기능성 원료로서 화장품에 응용 가능성이 있다고 여겨진다.

4. 결 론

1) 미성숙 복분자 추출물의 자유 라디칼 소거 활성 (FSC<sub>50</sub>) 측정 결과, 에틸아세테이트 분획(6.14 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(6.56 μg/mL) > (+)-α-tocopherol

(8.98  $\mu\text{g/mL}$ ) > 아글리콘 분획(18.75  $\mu\text{g/mL}$ ) 순서로 나타났다. 따라서 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 높은 라디칼 소거 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

2) 미성숙 복분자 추출물의 활성산소 소거 활성(총 항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 50% 에탄올 추출물(0.85  $\mu\text{g/mL}$ ) > 에틸아세테이트 분획(0.84  $\mu\text{g/mL}$ ) > 아글리콘 분획(1.12  $\mu\text{g/mL}$ ) > L-ascorbic acid (1.50  $\mu\text{g/mL}$ ) 순서로 나타났다. 세 분획 모두 비교 물질인 L-ascorbic acid보다 높은 활성산소 소거 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

3) 미성숙 복분자 추출물의 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 유도된 적혈구 파괴에 대한 효과 실험에서 세 분획 모두 농도 의존적인 세포보호 효과를 나타내었다. 또한 50  $\mu\text{g/mL}$  농도를 기준으로 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의  $\tau_{50}$ 은 각각 296.3, 177.5, 158.8 min으로 비교 물질인 (+)- $\alpha$ -tocopherol (74.3 min)보다 매우 높은 세포보호 활성을 나타내었다.

4) 자유 라디칼 소거 활성, 활성산소 소거 활성 및 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 유도된 적혈구 파괴에 대한 효과에 대하여 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 당을 제거시킨 아글리콘 분획보다 우수한 활성을 나타내었다. 이를 통해 미성숙 복분자 추출물 중 수상 추출 조건과 에틸아세테이트를 이용한 유효성분을 정제한 분획이 우수한 항산화 활성 및 세포보호 효과를 나타내는 유효성분 추출에 적합한 조건으로 사료된다.

5) 미성숙 복분자 추출물의 타이로시네이즈 저해 활성(IC<sub>50</sub>)은 아글리콘 분획(137.9  $\mu\text{g/mL}$ ) > 에틸아세테이트 분획(173.0  $\mu\text{g/mL}$ ) > 알부틴(226.9  $\mu\text{g/mL}$ ) > 50% 에탄올 추출물(235.9  $\mu\text{g/mL}$ ) 순서로 확인되었다. 특히 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 비교물질인 알부틴보다 약 1.3, 1.6 배 높은 저해 활성을 나타내었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 미성숙 복분자 추출물은 항산화 및 미백 기능성 원료로서 응용 가능성이 있다고 사료되며, 추가적으로 이러한 활성을 갖는 유효성분의 분리·정제 및 구조분석에 관한 연구와 성숙 시기별 복분자에 대한 항산화 및 타이로시네이즈 활성 비교 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 감사의 글

이 연구는 2013년도 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

## Reference

1. S. N. Park, Effect of natural products on skin cells: action and suppression of reactive oxygen species, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**(2), 77 (1999).
2. J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, and S. J. Weiss, Singlet oxygen production by human eosinophils, *J. Biol. Chem.*, **263**, 9692 (1988).
3. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
4. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph.D. Thesis, Seoul National University (1989).
5. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases : Role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**, 324 (2007).
6. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Amer. Heart J.*, **23**, 2382 (1998).
7. D. Bagchi, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129 (1995).
8. S. B. Berman and T. G. Hastings, Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species, *J. Neurochem.*, **69**(3), 1185 (1997).
9. H. R. Andersen, J. B. Nielsen, F. Nielsen, and P. Grandjean, Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes, *Clinical Chemistry*, **43**(4), 562 (1997).
10. M. Bilicia, H. Efe, M. A. Koroglu, H. A. Uydu, M.

- Bekaroglu, and O. Deger, Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments, *J. Affective Disorders*, **64**, 43 (2001).
11. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**(1), 44 (2007).
  12. H. J. Lee and S. N. Park, Antioxidative effect and active component analysis of *Quercus salicina* blume extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **37**(2), 143 (2011).
  13. H. S. Choi, M. K. Kim, H. S. Park, Y. S. Kim, D. H. Shin, Alcoholic fermentation of Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq) wine, *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **38**, 543 (2006).
  14. K. I. Lee, S. M. Kim, S. M. Kim, and B. S. Pyo, Comparison of fatty acids and antibacterial activity against pathogen of acne in different parts of ripened black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(3), 466 (2011).
  15. C. M. Park, M. S. Joung, D. O. Yang, and J. W. Choi, The study on the effect of *Rubus coreanus* Miquel extract as a cosmetic ingredient, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(1), 41 (2007).
  16. S. M. Oh, Y. J. Mun, W. H. Woo, Effects of *Rubus coreanus* Miquel on the expressions of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 melanoma cells, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **21**(6), 1456 (2007).
  17. T. Y. Shin, S. H. Kim, E. S. Lee, D. O. Eom, and H. M. Kim, Action of *Rubus coreanus* extract on systemic and local anaphylaxis, *Phytother. Res.*, **16**, 508 (2002).
  18. I. Yoon, J. Y. Cho, J. H. Kuk, J. H. Wee, M. Y. Jang, T. H. Ahn, and K. H. Park, Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanus* fruit, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **34**, 898 (2002).
  19. I. Yoon, J. H. Wee, J. H. Moon, T. H. Ahn, and K. H. Park, Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**, 499 (2003).
  20. J. W. Lee and J. H. Do, Determination of total phenolic compound from the fruit of *Rubus coreanus* and antioxidative activity, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**(5), 943 (2000).
  21. M. W. Lee, Phenolic Compounds from the leaves of *Rubus coreanus*, *J. Pharm. Soc. Korea*, **39**(2), 200 (1995).
  22. Y. Y. Lim, W. S. Jang, H. M. Kim, M. Y. Kim, S. A. Oh, J. O. Park, Y. T. Kim, J. H. Park, Y. J. Chun, J. W. Li, K. K. Moon, B. J. Kim, M. N. Kim, Y. M. Park, and H. Kang, A study of potential application of *Rubus coreanus* Miquel extract for seborrheic dermatitis treatment, *Korean J. Med. Mycol.*, **16**(1), 1 (2011).
  23. H. S. Cha, A. R. Youn, P. J. Park, H. R. Choi, and B. S. Kim, Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel during maturation, *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, **36**(3), 683 (2007).