

## 그라비올라(*Annona muricata*) 잎 추출물 및 분획물의 항산화 활성과 성분 분석

박 소 현·김 지 민\*·김 진 환\*·오 윤 수\*·주 동 휘\*·이 은 영\*·신 혁 수·김 아 랑·이 상 래·박 수 남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 정밀화학과 화장품종합기술연구소, 코스메틱 융·복합산업 지원 센터,  
\*한성과학고등학교

(2017년 10월 26일 접수, 2017년 11월 20일 수정, 2017년 11월 26일 채택)

### Antioxidative Effects and Component Analysis of Graviola (*Annona muricata*) Leaf Extract/Fractions

So Hyun Park, Ji Min Kim\*, Jin Hwan Kim\*, Yoon Soo Oh\*, Dong Hee Joo\*,  
Eun Young Lee\*, Hyuk Soo Shin, A Rang Kim, Sang Lae Lee, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center,  
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

\*Hansung Science High School, Seoul 03732, Korea

(Received October 26, 2017; Revised November 20, 2017; Accepted November 26, 2017)

**요약:** 본 연구에서는 그라비올라(*Annona muricata*) 잎으로부터 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획을 제조하였고 이들 추출물/분획에 대하여 항산화 활성을 평가하였다. 1,1-Phenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 시험법을 이용한 자유라디칼 소거 활성, 루미놀 발광법을 이용한 총 항산화능 및 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소광 효과를 평가하였다. 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성 (FSC<sub>50</sub>)은 각각 45.6, 29.8 및 18.0 µg/mL이었고, 총 항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 4.4, 1.1 및 2.8 µg/mL이었다. 에틸아세테이트 분획의 총 항산화능은 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid (1.5 µg/mL)보다 높은 항산화능을 나타내었다. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소광 상수 실험 결과, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획은 비교물질로 사용된 L-ascorbic acid와 유사한 활성을 보여주었다. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구 세포 손상에 있어서, 그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물은 농도 의존적(5-50 µg/mL)으로 세포보호 활성을 나타내었다. 실험에 사용된 그라비올라 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획에 대하여 TLC 및 HPLC를 이용한 성분 분석을 수행하였다. 에틸아세테이트 분획에서는 rutin (quercetin-3-O-rutinoside), kaempferol-3-O-neohesperidoside, nicotiflorin (kaempferol-3-O-rutinoside), p-coumaric acid을 확인하였다. 아글리콘 분획에서는 kaempferol이 존재함을 확인하였다. 이상의 결과들은 그라비올라 잎 추출물이 항산화 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative effects and component analysis of 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction obtained from *Annona muricata* leaf were investigated. Free radical scavenging activities were performed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay, total antioxidant capacities were estimated using luminol-dependent chemiluminescence assay and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenching effects were estimated. Free radical scavenging activities (FSC<sub>50</sub>) of 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction were 45.6, 29.8 and 18.0 µg/mL, and total antioxidant capacities (OSC<sub>50</sub>) were 4.4, 1.1 and 2.8 µg/mL, respectively. As a result of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenching experiment, ethyl acetate and aglycone fraction showed similar activities to L-ascorbic acid used as a comparative control. The cellular

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)  
call: 02)970-6451

protective effects of 50% ethanol extract on the  $^1\text{O}_2$ -induced cellular damage of human erythrocytes were exhibited at concentration-dependent (5-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). TLC and HPLC were used to analyse components in the ethyl acetate fraction and aglycone fraction of *Annona muricata* leaf. In ethyl acetate fraction, rutin (quercetin-3-O-rutinoside), kaempferol-3-O-neohesperidoside, nicotiflorin (kaempferol-3-O-rutinoside), *p*-coumaric acid were identified. In aglycone fraction, kaempferol was identified. These results suggest that the extracts of *Annona muricata* leaf have the applicability as antioxidant cosmeceutical ingredients.

**Keywords:** *Annona muricata*, antioxidative activity, cellular protective effect, component analysis, reactive oxygen species

## 1. 서 론

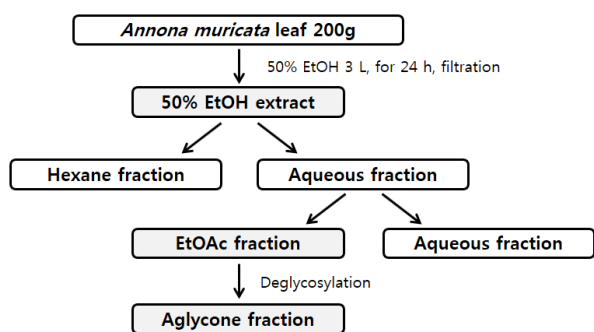
최근 소비자들의 기능성 화장품에 대한 관심이 증가함에 따라 국내뿐만 아니라 국외까지도 항산화 및 항노화 소재에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 노화는 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 구분지을 수 있다. 내인적 노화는 시간이 지남에 따라 진행되는 자연적인 노화를 말하고, 외인적 노화는 자외선, 담배 연기, 미세먼지 등과 같은 환경인자들에 의해 진행되는 노화를 말한다. 특히 자외선 노출은 외인적 노화의 주요 원인이며 광노화라고도 한다. 광노화는 피부 노화의 80%를 차지하며 광노화 된 피부는 주름, 탄력 손실, 건조, 거친 외관 및 색소 침착 등의 특징을 보인다. 피부가 자외선에 노출되면 라디칼 또는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성시킴으로써 주요 조직을 손상시키고 노화가 진행된다. ROS는 유해한 산소종으로, 종류에는 singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), alkoxy radical ( $\cdot\text{OR}$ ) 및 hydroperoxy radical ( $\cdot\text{OOR}$ ) 등이 있다. 이들 ROS는 DNA, 지질 막 및 단백질과 같은 세포 구성 요소를 변형시킬 수 있다. 이는 비정상적인 세포 기능을 유발할 수 있으며 비정상적인 단백질 생성, 결합 조직의 분해 및 발암 등을 유발한다. 지속적인 자외선 노출은 진피의 세포외기질(ECM)이라고 하는 결합 조직에서 가장 눈에 띄는 손상을 발생시킨다. 세포외기질의 가장 중요한 구조는 콜라겐, 엘라스틴 및 글리코사미노글리칸이며 이들은 피부의 탄력 및 수분을 유지하는 기능을 갖는다. 광노화 된 피부에서는 콜라겐이 손상되고 감소되며 비정상적인 엘라스틴 섬유와 글리코사미노글리칸이 축적되는 특징이 있다[1-4].

또한 사람 피부 섬유아세포에서  $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1의 합성을  $^1\text{O}_2$ 이 매개할

수 있다는 보고도 있다. MMPs는 주로 결합 조직 분자와 기저막 단백질을 표적으로 한다. MMPs는 피부 노화를 비롯한 여러 생리학적 및 병리학적 과정에서 깊숙이 연관이 있다고 볼 수 있다[5-7]. 따라서 이러한 활성산소들의 생성을 억제하는 항산화제의 개발은 필수적인 과제이다.

피부에는 활성산소에 의한 손상을 예방하거나 회복하기 위해 다양한 항산화 네트워크가 구축되어 있다. 항산화제는 유해한 활성산소를 무력화시키고 산소 항상성을 유지시킨다. 활성산소를 제거하는 가장 중요한 효소적 항산화제는 glutathione peroxidase이다. 이 항산화제는 glutathione의 thiol 그룹이 전자를 공여함으로써 다양한 ROS를 제거할 수 있다. 또 다른 효소적 항산화제에는 각각 superoxide radical과 hydrogen peroxide를 제거하는 superoxide dismutase (SOD)와 catalase가 있다. 비효소적 항산화제에는 ubiquinol, vitamin C (L-ascorbic acid), vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), carotenoid 및 flavonoid가 포함된다[8,9]. 이러한 보호 작용에도 불구하고 지속적인 외부요인에 의해 활성산소가 과잉 생성됨으로써 항산화 네트워크가 붕괴되면 피부의 세포, 조직 및 구성성분들은 산화적 손상을 입기 시작하고 피부 노화가 가속화될 수 있다[10-12]. 따라서 항산화 네트워크를 회복시키고 세포 및 조직을 보호하기 위해 항산화제를 보충해주는 것이 중요하다. 또한 합성 원료의 유해성이 사회적으로 이슈가 되면서 천연 원료에 대한 소비자의 관심이 지속적으로 증가하고 있다. 따라서 천연 항산화제를 개발하여 화장품에 응용하려는 시도가 계속되고 있다.

그라비올라(*Annona muricata* Linn.)는 남미·북미·필리핀·인도네시아 등 열대지방에서 재배되는 목련목 포도나무과로, 잎은 타원형이며 7-20 cm의 길이, 2-5 cm의 폭을 갖는다. 주요 성분으로는 flavonoids, isoquinoline alkaloids, annonaceous acetogenins 등이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다[13-19].



**Figure 1.** Scheme for preparation of extract/fractions from *A. muricata* leaf.

염증, 류마티즘, 당뇨병, 고혈압, 불면증 및 기생충 감염 등을 포함한 질병의 치료에 광범위하게 사용되어 왔으며, 특히 주성분인 annonaceous acetogenins은 암 세포의 사멸을 성공적으로 유도시키는 것으로 주목 받고 있다[20-24]. 그라비올라 잎 추출물에 관한 연구에서 다양한 항산화 활성 평가가 보고되고 있으나  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에서 각종 활성산소에 대한 총 항산화능이나 광증감 반응으로 유도된  $^1O_2$ 의 소거 활성,  $^1O_2$ 로 유도된 적혈구 세포손상에서 보호 효과에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

본 연구에서는 그라비올라 잎의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획을 제조하고, 다양한 항산화 활성 평가(자유라디칼 소거 활성,  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에서 생성된 다양한 활성산소에 대한 총 항산화능,  $^1O_2$  소거 활성,  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성)를 진행하고 활성 성분에 대한 분석을 진행함으로써 그라비올라 잎 추출물의 기능성 항산화 화장품 소재로서의 응용 가능성을 조사하고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 시약 및 기기

라디칼 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical과 화학발광 실험에 사용한 luminol과 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA),  $H_2O_2$ , 그리고 세포보호 효과 측정에 사용한 heparin 및 rose-bengal은 Sigma-Aldrich (Korea)에서 구입하였다. 그 외  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서

구입하였고, 완충용액 제조에 사용된  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , NaCl, trizma base, HCl 그리고  $H_2SO_4$ , 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)- $\alpha$ -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, kaempferol, rutin, nicotiflorin, kaempferol-3-O-neohesperidoside, p-coumaric acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다.

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA)사 제품을, pH 미터는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였으며, HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 Shim-pack VP-ODS C18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) 제품을 사용하였으며, LC/ESI-MS (Applied Biosystems, USA)는 서울대학교 NICEM (농생명과학공동기기원)에 분석 의뢰를 하였다. 성분 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet gel 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다.

### 2.2. 그라비올라 잎 추출물 및 분획 제조

그라비올라 잎은 인도네시아산을 2017년 5월 경동 시장에서 구입하였다. 그라비올라 잎 200 g을 50% 에탄올 3 L에 24 h 동안 침적시켜 추출하였다. 50% 에탄올 추출물 100 mL를 40  $^{\circ}C$ 에서 감압 증류하여 추출물(수율 14.9%)을 얻었다. 남은 50% 에탄올 추출물 1 L를 감압 증류하여 수증만 남긴 후, n-헥산을 처리하여 클로로필 등의 비극성 성분을 제거하였다. 이후 에틸아세테이트와 1:1 비율로 3번 분획하였다. 망초산( $Na_2SO_4$ )을 이용하여 물을 제거하고 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획(수율 0.7%)을 얻었다.

또한 에틸아세테이트 분획 일부를 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시키고자 하였다. 에틸아세테이트 분획 0.2 g에 증류수 9 mL, 아세톤 10 mL 및  $H_2SO_4$  1 mL를 순서대로 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 시킨 후, 다시 에틸아세테이트를 이용하여 분획하고 이를 감압 증류하여 아글리콘(수율 0.3%)을 제조하였다(Figure 1).

## 2.3. 그라비올라 잎 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.3.1. DPPH 자유라디칼 소거 활성

메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 혼합하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 UV/Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 DPPH 시약을 넣지 않은 것을 공시험(blank), 시료를 넣지 않은 것을 대조군(control), 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 계산하였다. 자유라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>, µg/mL)로서 표기하였으며, 자유라디칼(DPPH) 소거 활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

#### Radical Scavenging (%)

$$= \left\{ 1 - \left( \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100$$

### 2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 그라비올라 잎 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 통한 활성산소 종 생성을 위해 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 값은 다음 식으로 활성산소 소거율(%)을 계산하였고, 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>)로 표기하였다.

#### ROS Scavenging (%)

$$= \left( \frac{Cpm_{\text{control}} - Cpm_{\text{experiment}}}{Cpm_{\text{control}} - Cpm_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

### 2.3.3. Singlet Oxygen 소광 속도 상수

Singlet oxygen 소광 속도 상수 실험법은 이전 연구에 명시된 방법을 참조 및 응용하여 진행하였다[25]. 광증감제로 rose-bengal을 사용하였으며, 광증감 반응으로 발생된 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 양의 측정은 DPBF를 이용해 측정하였다. DPBF는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>에 대하여 물리적 소광 작용을 하지 않고 화학적 소광만을 한다고 알려져 있다. 따라서 DPBF는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>과 정량적으로 반응하기 때문에 DPBF의 감소량을 측정함으로써 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>의 양을 측정할 수 있다.

메탄올을 용매로 사용하여 rose-bengal 24 µM, DPBF 15, 30, 60, 90 µM을 준비하였다. 시험관에 rose-bengal 1 mL, DPBF 1 mL를 넣고, 메탄올로 제조한 다양한 농도의 시료 1 mL를 첨가한 후 1 min간 조사하였다. 조사전과 후에 DPBF의 λ<sub>max</sub>인 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같은 과정을 이용하여 DPBF의 4개의 농도에 대해 각각의 흡광도 감소를 측정하였다. 또한 시료에 대해서도 최소 4개의 농도에 대해 위와 같은 과정을 반복한 뒤, steady-state approximation, Stern-Volmer식을 이용하여 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소광 속도 상수인 K<sub>q</sub> 값을 구할 수 있었다[25]. 공시험(blank)으로 DPBF를 제외한 rose-bengal 1 mL, 메탄올 1 mL, 시료 1 mL를 시험관에 넣고 410 nm에서 흡광도를 측정하여 rose-bengal과 시료의 영향을 보정하였다. 모든 과정은 암실에서 진행하였다.

## 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

### 2.4.1. 적혈구 분산액 제조

실험에 사용된 적혈구는 heparin이 첨가된 시험관에서 4 °C의 냉장고에 보관되었고 12 h 이내에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 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 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이 되도록 제조되었으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5 × 10<sup>7</sup>

**Table 1.** HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *A. muricata* Leaf

Condition of HPLC analysis																									
Column	Shim-pack VP-ODS C18 column																								
Detector	UVD 170s DIONEX																								
UV length	254-400 nm																								
Flow rate	1.0 mL/min																								
Injection volume	15 $\mu$ L																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Program order</th> <th>Time (min)</th> <th>2% AA<sup>1)</sup> in water (%)</th> <th>0.5% AA<sup>1)</sup> in 50% ACN<sup>2)</sup> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>35</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>50</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>55</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>60</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	Program order	Time (min)	2% AA <sup>1)</sup> in water (%)	0.5% AA <sup>1)</sup> in 50% ACN <sup>2)</sup> (%)	1	0	80	20	2	35	40	60	3	50	40	60	4	55	80	20	5	60	80	20
Program order	Time (min)	2% AA <sup>1)</sup> in water (%)	0.5% AA <sup>1)</sup> in 50% ACN <sup>2)</sup> (%)																						
1	0	80	20																						
2	35	40	60																						
3	50	40	60																						
4	55	80	20																						
5	60	80	20																						
Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution																									

<sup>1)</sup> AA : Acetic acid, <sup>2)</sup> ACN : Acetonitrile

cells/mL로 계산된다.

#### 2.4.2. 그라비올라 잎 추출물의 광용혈 억제 효과

$1.5 \times 10^7$  cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료를 농도별로 각각 50  $\mu$ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 간 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose-bengal (13  $\mu$ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광 조사하였다. 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 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)를 통해 평가하였다. 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20  $^{\circ}$ C 항온실에서 진행되었다.

적혈구의 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여 비교하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은  $\tau_{50}$ 이 25.0 min으로 오차범위  $\pm$  1.0 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

#### 2.5. 그라비올라 잎 추출물의 성분 분석

##### 2.5.1. TLC 및 HPLC를 이용한 성분 분석

그라비올라 잎 추출물의 성분 분석은 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45  $\mu$ m)를 이용하여 여과시킨 분획 용액을 TLC 및 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 전개용매는 ethyl acetate : chloroform : formic acid : distilled water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v) 및 hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v)를 사용하였다. TLC에서 성분 분석을 위해 표준물질의 R<sub>f</sub> 값, 자외선 그리고 2-aminoethyl diphenylbroinate (NP) 발색법을 이용하였고 이미 보고된 분광학적 자료를 참고하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 및 0.5% acetic acid의 50% acetonitrile 용매를 이용하여 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때, HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

그라비올라 잎 추출물의 성분 분석을 위해 TLC로부터 각각의 띠를 긁어 70% 에탄올로 추출한 후 농축하여 얻었다. 얻어진 파우더를 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milipore 0.45  $\mu$ m)를 이용하여 여과하고 그 여액을 HPLC 및 LC/ESI-MS 분석에 이용하였다.

##### 2.5.2. LC/ESI-MS를 이용한 성분 분석

분석 기기로 LC기기는 Thermo-Finnigan surveyor instrument (Thermo scientific, USA)(column spec. U-VDSpher Pur C18-E 1.8  $\mu$ m, 50  $\times$  2.0 mm Cat.-No.

N0520E181UVC), autosampler, PDA-UV detector를 사용하였으며, 질량분석(Mass spectrometric analysis)기기는 Thermo Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer, with ESI interface (Thermo scientific, USA)를 사용하였다. Injection volume은 5  $\mu$ L, flow rate는 200  $\mu$ L/min이며 전개용매 조건으로는 0.1% formic acid (in D.W) (A 용매) : 0.1% formic acid (in acetonitrile) (B용매) = 75 : 25를 사용하였다.

## 2.6. 통계처리

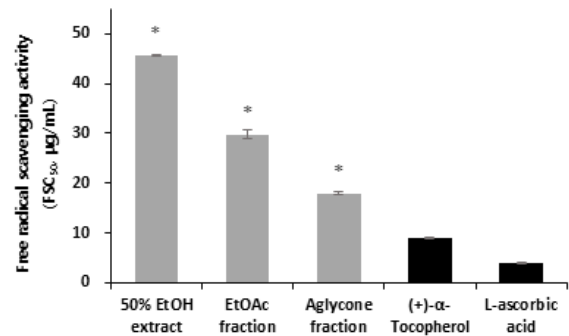
본 연구의 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였고 통계자료의 값은 mean  $\pm$  S.D.로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA)프로그램을 이용하였으며, one-way ANOVA 검정을 적용하여  $p < 0.05$  유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. DPPH 자유라디칼 소거 활성

활성산소에는  $\cdot$ OH와  $O_2^{\cdot-}$ 와 같은 라디칼이 있으며, 이들은 홀수 전자를 가지고 있어 반응성이 매우 높아 생체 내에서 지질과산화 연쇄반응을 일으켜 인체 내 다양한 손상 반응을 일으킨다. 라디칼은 전자를 받아 환원됨으로써 높은 반응성이 소멸될 수 있다. (+)- $\alpha$ -tocopherol, L-ascorbic acid 등은 강력한 항산화제로 잘 알려져 있으며 라디칼에 전자주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이와 같이 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통해서 시료의 자유라디칼 소거 활성  $FSC_{50}$ 을 측정할 수 있다.

그라비올라 잎의 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성( $FSC_{50}$ )은 각각 45.6, 29.8 및 18.0  $\mu$ g/mL로 나타났다(Figure 2). 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성이 50% 에탄올 추출물의 활성보다 각각 34.6%, 60.5% 증가했으며, 특히 아글리콘 분획의 라디칼 소거 활성이 가장 높게 나타났다. 비교물질로 사용된 (+)- $\alpha$ -tocopherol (9.0  $\mu$ g/mL) 및 L-ascorbic acid (4.0  $\mu$ g/mL)보다는 낮은 활성을 보였으나, 최근 저자들이 보고한 돌외[26], 라벤더[27] 및 카렌둘라[28] 추출물보다 우수한 활성 결과를 보여주었다.



**Figure 2.** Free radical scavenging activities of extract/fractions from *A. muricata* leaf and reference. Data are indicated as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$  compared with (+)- $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid.

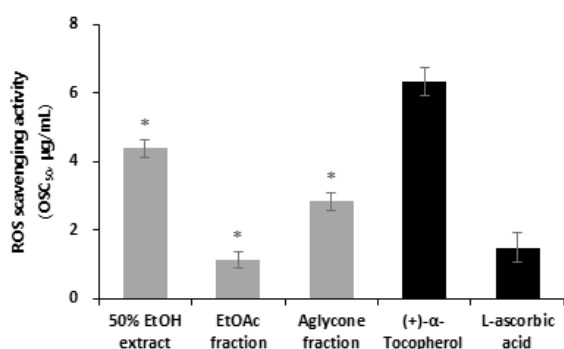
### 3.2. Luminol 발광법을 이용한 $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

본 연구에 이용된  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에서는  $H_2O_2$ 와  $Fe^{2+}$ 에 의해 여러 가지 활성산소가 발생된다. 생체 내에도 철(Fe)과 구리(Cu) 같은 전이금속 이온들이 존재하며 자외선에 의해 생성된  $H_2O_2$ 와 Fenton 반응을 일으켜 여러가지 활성산소가 생성된다. 활성산소에 의해 루미놀은 들뜬 상태인 아미노프탈산으로 되고 이어 바닥상태로 떨어지면서 420-450 nm에서 발광하는 특성을 가진다. 이 계에 항산화제를 첨가하여 화학발광이 감소하는 정도에 따라 활성산소 소거 활성을 측정할 수 있으며, 이를 이용하여 총 항산화능  $OSC_{50}$ 을 평가하였다.

그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 활성산소 소거 활성( $OSC_{50}$ )은 각각 4.4, 1.1 및 2.8  $\mu$ g/mL로 나타났으며, 비교물질로 사용된 L-ascorbic acid는 1.5  $\mu$ g/mL, (+)- $\alpha$ -tocopherol은 6.3  $\mu$ g/mL로 나타났다(Figure 3). 모든 추출물 및 분획은 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 높은 활성을 나타냈으며, 에틸아세테이트 분획은 강력한 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid보다도 큰 소거능을 보였다. 또한, 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 돌외 [26], 라벤더[27] 및 카렌둘라[28] 추출물보다 뛰어난 활성 결과를 보여주었다.

### 3.3. Singlet Oxygen 소광 속도 상수

그라비올라 추출물 및 그 분획이 광증감 반응의 주 생성물인 singlet oxygen을 효과적으로 소광시키는지



**Figure 3.** ROS scavenging activities of extract/fractions from *A. muricata* leaf and reference. Data are indicated as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$  compared with (+)- $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid.

알아보고자 하였다. 광증감제인 rose-bengal에 빛이 조사되면 singlet oxygen ( $^1O_2$ )이 생성되는데,  $^1O_2$ 은 매우 높은 반응성을 갖는 활성산소종 중 하나로서 세포를 포함하는 체내 여러 물질에 손상을 입힌다. 따라서 강력한 반응성을 갖는  $^1O_2$ 을 소광할 수 있다면 산화적 환경으로부터 방어능을 갖는데 핵심 요소로 작용할 수 있다.

결과는 Stern-Volmer 식을 이용해 계산된 소광상수  $K_q$  값으로 나타내었다(Table 2). 이번 실험에서 설정한 조건의 적합성을 확인하기 위해 강력한  $^1O_2$  소광 물질인  $\beta$ -carotene로 예비실험을 통해 기존 문헌 값과 비교하였으며, 비교물질로 항산화제 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 L-ascorbic acid를 사용하였다. 계산된  $\beta$ -carotene의 소광 상수 값은 문헌 값( $2.6 \times 10^{10} M^{-1}S^{-1}$ )과 유사한  $K_q$  값( $2.1 \times 10^{10} M^{-1}S^{-1}$ )을 얻을 수 있었다[25]. L-ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol의  $K_q$  값은 각각  $1.1 \times 10^8 M^{-1}S^{-1}$ ,  $1.7 \times 10^8 M^{-1}S^{-1}$ 이 얻어졌다. 반면 그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의  $K_q$  값은 각각  $1.0 \times 10^8 M^{-1}S^{-1}$ ,  $1.1 \times 10^8 M^{-1}S^{-1}$ ,  $1.1 \times 10^8 M^{-1}S^{-1}$ 로 계산되었다. 50% 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획에서  $^1O_2$ 을 더욱 효과적으로 소광시켰으며, 이들은 비교물질 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다는 소광능이 떨어졌으나 L-ascorbic acid와 유사한  $^1O_2$  소광 효과를 보여주었다.

**3.4.  $^1O_2$ 으로 유도된 적혈구의 파기에 대한 세포보호 효과**  
피부 세포막은 지질 이중층 구조를 이루고 있다. 2개의 인지질 꼬리부분이 서로 cis 형태를 이루으로써

**Table 2.** Singlet Oxygen Quenching Rate Constant of Extract/Fractions from *A. muricata* Leaf and Reference

Compounds	$K_q (M^{-1}S^{-1})$
50% EtOH extract	$1.0 \times 10^8$
EtOAc fraction	$1.1 \times 10^8$
Aglycone fraction	$1.1 \times 10^8$
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	$1.7 \times 10^8$
L-Ascorbic acid	$1.1 \times 10^8$

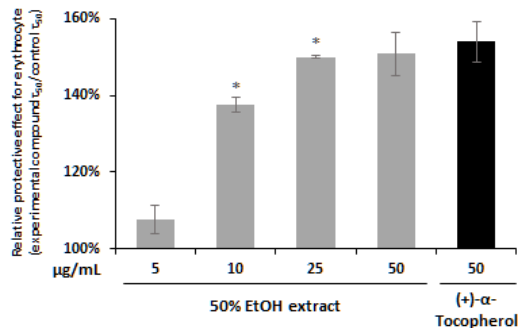
자외선에 의해 쉽게 손상될 수 있다. 자외선이 조사되면 생체 내에 존재하는 광증감제는 singlet oxygen ( $^1O_2$ )과 같은 활성산소의 발생을 야기한다. 이는 지질과산화, 단백질 산화 등 자동산화반응에 의해 세포 손상을 야기한다. 본 연구에서는 광증감제로 알려진 rose-bengal 및 피부막 지질 이중층 구조와 유사한 적혈구 세포를 이용하여  $^1O_2$ 으로 유도된 산화적 세포 손상 시스템을 구축하였다. 활성산소로 인해 적혈구 세포가 50% 감소하는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )으로 세포보호 효과를 평가하였다.

그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획에 대하여 5, 10, 25 및 50  $\mu g/mL$ 의 농도에서 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )을 측정함으로써 세포보호 효과를 비교하였다(Table 3). 이 값( $\tau_{50}$ )은 시료의 세포보호 활성이 클수록 높게 나타난다. 시료를 넣지 않은 대조군의 경우, 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간은  $25.0 \pm 1.0$  min으로 재현성이 양호하게 나타났다. 그라비올라 잎의 50% 에탄올 추출물은 5, 10, 25 및 50  $\mu g/mL$ 의 농도에서 각각  $\tau_{50}$ 이 26.9, 34.4, 37.5 및 37.7 min으로 농도 의존적인 세포보호 활성을 나타냈다. 그러나 에틸아세테이트 분획은 22.4, 11.9, 6.8 및 6.7 min으로 농도 의존적으로 세포 용해를 촉진시키는 현상을 나타냈다. 아글리콘 분획은 33.1, 32.0, 26.7 및 13.8 min으로 5-25  $\mu g/mL$ 에서는 세포보호 효과가 있는 것으로 나타나지만 농도 의존적으로 활성이 떨어졌으며, 50  $\mu g/mL$ 에서는 오히려 세포 용해를 촉진시켰다. 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획에서 이러한 현상이 나타나는 이유는 녹색식물 잎 추출물에서 흔히 나타나는 클로로필 및 그 유도체들 때문으로 사료된다. 클로로필 및 그 유도체로 알려진 포르피린류는 광증감제로 알려져 있다. 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획이 고농도일 경우 이

**Table 3.** Cellular Protective Effects of Extract/Fractions from *A. muricata* Leaf and (+)- $\alpha$ -Tocopherol on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Erythrocytes

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\tau_{50}$ (half time of hemolysis)*			
	5	10	25	50
50% EtOH extract	26.9 ( $\pm$ 0.9)	34.4 ( $\pm$ 0.5)	37.5 ( $\pm$ 0.1)	37.7 ( $\pm$ 1.4)
EtOAc fraction	22.4 ( $\pm$ 0.2)	11.9 ( $\pm$ 3.5)	6.8 ( $\pm$ 0.1)	6.7 ( $\pm$ 0.1)
Aglycone fraction	33.1 ( $\pm$ 2.4)	32.0 ( $\pm$ 2.0)	26.7 ( $\pm$ 2.4)	13.8 ( $\pm$ 1.7)
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	31.1 ( $\pm$ 1.6)	36.6 ( $\pm$ 1.5)	37.5 ( $\pm$ 1.3)	38.7 ( $\pm$ 1.6)

\*Control,  $\tau_{50} = 25.0 \pm 1.0$  min



**Figure 4.** The cellular protective effects 50% ethanol extracts obtained from *A. muricata* leaf and reference on the rose-bengal sensitized photohemolysis of erythrocytes (control = 100%). Data are indicated as mean  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$  compared with concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$  in 50% ethanol extract dose-treated groups.

들의 광증감 작용으로 세포보호 작용을 상쇄하고 오히려 세포막 용해를 촉진시키는 작용이 있음을 알 수 있다. 클로로필 및 포르피린 유도체들은 그 농도가 낮아도  $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 활성산소를 생성시키는 광증감 작용을 일으킬 수 있다. 앞으로 추가 연구를 통해 클로로필 및 그 유도체를 완전히 제거한 후 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획을 대상으로 실험을 하면 농도 의존적으로 세포보호 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

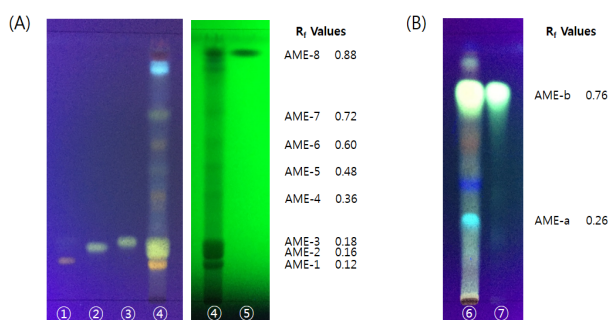
한편, 그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물과 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol의 세포보호 활성을 비교하였다(Figure 4). 50% 에탄올 추출물은 5-50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군(100%) 대비 각각 108, 138, 150, 151%로 농도 의존적인 세포보호 효과를 나타내었다. 50  $\mu\text{g/mL}$ 에

서 비교 물질인 (+)- $\alpha$ -tocopherol와 유사한 세포보호 효과를 나타내었다.

### 3.5. 그라비올라 잎 분획의 성분 분석

그라비올라 잎의 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획의 성분을 분석하기 위해 TLC 및 HPLC를 이용하고 LC/ESI-MS 및 UV 스펙트럼으로 확인하였다. 순상 TLC로 성분을 분리할 수 있는 이동상 조건(ethyl acetate : chloroform : formic acid : distilled water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v)) 하에서 그라비올라 잎 에틸아세테이트 분획은 8개의 띠(AME-1-AME-8)로 분리되었고, 이를 끊어 추출·농축한 각각의 성분들을 HPLC로 비교하였다. 분리된 띠를 끊어 HPLC로 분석한 결과, Figure 5(A)의 TLC (normal phase)에서 AME-1은 Figure 6(A)의 HPLC (reverse phase) peak 2, AME-2는 peak 3, AME-3은 peak 4, AME-8은 peak 1과 일치함을 확인하였다. HPLC 상에서 주성분으로 확인된 네 개의 띠(AME-1, 2, 3, 8)를 중점적으로 분석하였다. 먼저 UV 스펙트럼 및 LC/ESI-MS를 통하여 분석한 결과로 peak 1은 *p*-coumaric acid, peak 2는 rutin, peak 3은 kaempferol-3-*O*-neohesperidoside, peak 4는 nicotiflorin로 추정되었다(Table 4). Peak 3과 4의 경우 UV 스펙트럼 및 LC/ESI-MS 결과가 같았으나 문헌을 통해 이성질체인 kaempferol-3-*O*-neohesperidoside와 nicotiflorin이라는 것을 알 수 있었다. 이들은 *m/z* 및  $\lambda_{\text{max}}$  값이 같은 것을 참고문헌을 통해 확인하였다. 따라서 HPLC로 표준물질과 retention time을 비교하여 확인하였다(Table 4). 또한 TLC로 표준물질과 비교하여  $R_f$  값이 0.12인 AME-1



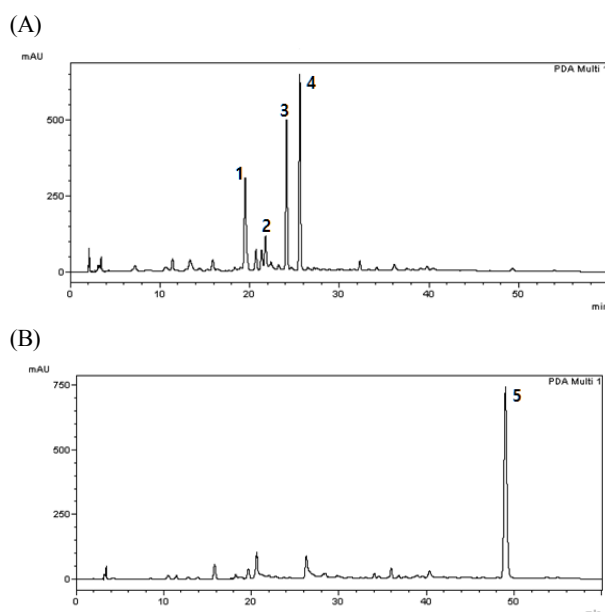


**Figure 5.** TLC chromatogram of ethyl acetate fraction and aglycone fraction from *A. muricata* leaf and references (NP reagents-UV 365 nm and UV 254 nm). (A) Eluent system: ethyl acetate : chloroform : formic acid : DW = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), ① rutin, ② kaempferol-3-*O*-neohesperidoside, ③ nicotiflorin, ④ ethyl acetate fraction, ⑤ *p*-coumaric acid. (B) Eluent system: hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v), ⑥ aglycone fraction, ⑦ kaempferol.

은 rutin,  $R_f$  값이 0.16인 AME-2는 kaempferol-3-*O*-neohesperidoside,  $R_f$  값이 0.18인 AME-3는 nicotiflorin,  $R_f$  값이 0.88인 AME-8은 *p*-coumaric acid임을 확인하였다 (Figure 5(A)).

그라비올라 잎 추출물의 아글리콘 분획은 플라보노이드 배당체를 비배당체로 전환시켰기 때문에 순상 TLC에서 상대적으로 비극성 용매조건(hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v))을 이용하여 분리하였다. 그중 주성분으로 확인되는 AME-b는  $R_f$  값이 0.76으로 표준물질과 비교하여 kaempferol로 추정되었다(Figure 5(B)). 또한 HPLC로 retention time을 표준물질과 비교하고, UV 스펙트럼 및 LC/ESI-MS를 통해 peak 5는 kaempferol임을 확인하였다(Table 4).

TLC 및 HPLC를 통하여 에틸아세테이트 분획의 주 성분인 nicotiflorin 및 kaempferol-3-*O*-neohesperidoside가 아글리콘 분획에서 가수분해에 의해 kaempferol로 성분 변화함을 확인하였으며, 배당체인 peak 3, 4번이 두드러지게 사라졌고, peak 5 (kaempferol)의 함량이 증가함을 보였다. 한편 에틸아세테이트 분획의 rutin은 아글리콘 분획에서 quercetin으로 성분 변화가 일어나야 한다. 그러나 아글리콘 분획의 TLC 및 HPLC 결과에서 quercetin의 피크가 관찰되지 않았다. 이는 에틸아세테이트 분획에서 kaempferol 배당체가 대부분을 차지하고 있고, 아글리콘 분획 시 모두 kaempferol로 변화되기 때문에, 상대적으로 매우 극소량인 quercetin은 육



**Figure 6.** The HPLC chromatograms of ethyl acetate fraction (A) and aglycone fraction (B) from *A. muricata* leaf at 254-400 nm absorbance. 1: *p*-coumaric acid, 2: rutin, 3: kaempferol-3-*O*-neohesperidoside, 4: nicotiflorin, 5: kaempferol.

안으로 관찰될 수 있는 범위에 들지 않는 것으로 사료된다. 결론적으로 그라비올라 잎 에틸아세테이트 분획보다 아글리콘 분획에서 당이 제거된 아글리콘 구조의 플라보노이드가 증가함을 확인할 수 있으며, 이러한 성분 변화가 그들의 활성에 차이를 나타낼 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물과 분획들의 항산화 및 세포보호 효과를 평가하고 성분 분석을 진행하였다.

1) 그라비올라 잎 추출물의 자유라디칼 소거 활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과, 아글리콘 분획(18.0 μg/mL) > 에틸아세테이트 분획(29.8 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(45.6 μg/mL) 순서로 나타났으며, 비교물질인 (+)-α-tocopherol (9.0 μg/mL) 및 L-ascorbic acid (4.0 μg/mL) 보다는 낮은 활성을 나타내었다.

2) 그라비올라 잎 추출물의 총 항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 에틸아세테이트 분획(1.1 μg/mL) > 아글리콘 분획(2.8 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(4.4 μg/mL) 순서로 나타

**Table 4.** LC/ESI-MS and UV Spectrum Characteristics of Ethyl Acetate Fraction and Aglycone Fraction from *A. muricata* Leaf

TLC band	HPLC peak No.	Identified compound	Measurement				Reference
			Retention time (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Negative ions (m/z) [M-H] <sup>-</sup>	Positive ions (m/z) [M+H] <sup>+</sup>	
AME-1	2	Rutin C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	21.726	254.7, 352.0	609.8	611.3	[29]
AME-2	3	Kaempferol-3-O-neohesperidoside C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	24.109	264.0, 348.0	593.8	-	[29]
AME-3	4	Nicotiflorin C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	25.586	264.0, 348.0	593.8	595.2	[29]
AME-8	1	<i>p</i> -Coumaric acid C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	19.595	308.0	163.0	-	[30]
AME-b	5	Kaempferol C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	52.846	264.0, 368.0	285.3	287.3	[31]

났으며, 모두 비교물질 (+)- $\alpha$ -tocopherol (9.0  $\mu$ g/mL)보다 활성이 뛰어났다. 특히 가장 소거능이 큰 에틸아세테이트 분획은 강력한 수용성 항산화제 L-ascorbic acid (1.5  $\mu$ g/mL)보다도 높은 활성을 나타내었다.

3) <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소광 속도 상수 실험에서 그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획의 K<sub>s</sub>값은 각각 1.0 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>, 1.1 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>, 1.1 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>로 계산되었다. 비교물질인 (+)- $\alpha$ -tocopherol (1.7 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)보다는 낮은 활성을 나타내었지만, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획은 L-ascorbic acid (1.1 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)와 유사한 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 소광 효과를 나타내었다.

4) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구 세포 파괴에 대한 세포보호 효과( $\tau_{50}$ )는 그라비올라 잎 50% 에탄올 추출물이 5-50  $\mu$ g/mL에서 농도 의존적으로 용혈을 억제하였다. 50  $\mu$ g/mL 농도에서 항산화제 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비교한 결과, 50% 에탄올 추출물 및 (+)- $\alpha$ -tocopherol의  $\tau_{50}$  값은 각각 37.7 min 및 38.7 min로 유사한 세포보호 효과를 나타내었다. 단, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획에서 세포보호 활성이 나타나지 않은 것은 분획 중에 함유되어 있는 클로로필 및 그 유도체에 의한 광증감작용으로 보호 작용을 상쇄시킨 것으로 간주된다.

5) TLC와 HPLC를 이용한 성분 분석을 통해 그라비올라 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획에서는 rutin (quercetin-3-O-rutinoside), kaempferol-3-O-neohesperidoside, nicotiflorin (kaempferol-3-O-rutinoside), *p*-coumaric

acid를 확인하였고 아글리콘 분획에서는 kaempferol을 확인하였다.

이상의 결과들로부터 그라비올라 잎 추출물은 항산화 활성이 뛰어남을 알 수 있었고, 분획을 함으로써 항산화 활성에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 성분 분석을 통해 이러한 항산화 효과가 다양한 플라보노이드에 기인된 것으로 확인하였다. 다만, 그라비올라 잎 추출물 또는 분획을 화장품에 적용할 경우는 추출물 중에 클로로필 또는 포르피린류가 함유되지 않도록 제조해야 활성산소로부터 세포보호능을 향상시키는 기능성 소재로서 응용가능성이 있음을 시사하였다.

## Reference

1. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
2. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
3. H. J. Yang, E. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Psidium guajava* leaf extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**(3), 233 (2008).
4. H. U. Simon, A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer,

- Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, **5**(5), 415 (2000).
5. S. N. Park, Skin aging, and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
  6. Y. Al-Nuaimi, M. J. Sherratt, and C. E. M. Griffiths, Skin health in older age, *Maturitas*, **79**(3), 256 (2014).
  7. J. Wohlrab, K. Hilpert, and L. Wolff, Epidermal aging and anti-aging strategies, *Hautarzt*, **67**(2), 107 (2016).
  8. S. A. Kyrtopoulos, N-nitroso compound formation in human gastric juice, *Cancer Surv.*, **8**(2), 423 (1989).
  9. R. S. Sohala and W. C. Orr, The redox stress hypothesis of aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**(3), 539 (2012).
  10. 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).
  11. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota, Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Pig. Cell Res.*, **16**(6), 629 (2003).
  12. M. L. Circu and T. Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox system, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**(6), 749 (2010).
  13. Y. Gavamukulya, F. Abou-Elella, F. Wamunyokoli, and H. AEl-Shemy, Phytochemical screening, anti-oxidant activity and *in vitro* anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola), *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **7S1**, S355 (2014).
  14. J. Paul, R. Gnanam, R. M. Jayadeepa, and L. Arul, Anti cancer activity on Graviola, an exciting medicinal plant extract vs various cancer cell lines and a detailed computational study on its potent anti-cancerous leads, *Curr. Top. Med. Chem.*, **13**(14), 1666 (2013).
  15. S. Sun, J. Liu, H. Kadouh, X. Sun, and K. Zhou, Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**(12), 2773 (2014).
  16. T. D. Thang, D. N. Dai, T. M. Hoi, and I. A. Ogunwande, Study on the volatile oil contents of *Annona glabra* L., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L., from Vietnam, *Nat. Prod. Res.*, **27**(13), 1232 (2013).
  17. M. Nawwar, N. Ayoub, S. Hussein, A. Hashim, R. El-Sharawy, K. Wende, M. Harms, and U. Lindequist, A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn., *Arch. Pharm. Res.*, **35**(5), 761 (2012).
  18. A. Matsushige, Y. Kotake, K. Matsunami, H. Otsuka, S. Ohta, and Y. Takeda, Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **60**(2), 257 (2012).
  19. A. Matsushige, K. Matsunami, Y. Kotake, H. Otsuka, and S. Ohta, Three new megastigmanes from the leaves of *Annona muricata*, *J. Nat. Med.*, **66**(2), 284 (2012).
  20. S. Adewole and J. Ojewole, Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **6**(1), 30 (2009).
  21. G. A. Asare, D. Afriyie, R. A. Ngala, H. Abutiati, D. Doku, S. A. Mahmood, and H. Rahman, Antiproliferative activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. on the prostate, BPH-1 cells, and some target genes, *Integr. Cancer Ther.*, **14**(1), 65 (2015).
  22. I. O. Ishola, O. Awodele, A. M. Olusayero, and C. O. Ochieng, Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents, *J. Med. Food*, **17**(12), 1375 (2014).
  23. S. Z. Moghadamtousi, H. Karimian, E. Rouhollahi, M. Paydar, M. Fadaeinasab, and H. A. Kadir, *Annona*

- muricata* leaves induce G<sub>1</sub> cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells, *J. Ethnopharmacol.*, **156**, 277 (2014).
24. M. P. Torres, S. Rachagani, V. Purohit, P. Pandey, S. Joshi, E. D. Moore, S. L. Johansson, P. K. Singh, A. K. Ganti, and S. K. Batra, Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism, *Cancer Lett.*, **323**(1), 29 (2012).
  25. S. N. Park, Quenching effect of carotenoids on singlet oxygen, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **10**(1), 75-89 (1984).
  26. K. M. Kim, A. R. Kim, A. Y. Kim, J. H. Ha, S. H. Xuan, Y. J. Jeong, Y. M. Park, H. J. Jeong, I. G. Hong, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) extracts against oxidative stress, *Kor. J. Pharmacogn.*, **48**(2), 125 (2017).
  27. A. Y. Kim, J. H. Ha, A. R. Kim, H. J. Jeong, K. M. Kim, and S. N. Park, Cellular protective effect and active component analysis of Lavender (*Lavandula angustifolia*) extract/fraction, *Appl. Chem. Eng.*, **28**(4), 479 (2017).
  28. S. H. Xuan, G. Y. Kim, J. Y. Yu, J. W. Kim, Y. R. Yang, Y. H. Jeon, Y. J. Jeong, A. R. Kim, and S. N. Park, Antioxidant and cellular protective effects against oxidative stress of *Calendula officinalis* flowers extracts in human skin cells, *Appl. Chem. Eng.*, **27**(6), 620 (2016).
  29. R. J. Grayer, G. C. Kite, M. Abou-Zaid, and L. J. Archer, The application of atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography-mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: characterisation of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*, *Phytochem. Anal.*, **11**, 257 (2000).
  30. A. Plazonić, F. Bucar, Ž. Maleš, A. Mornar, B. Nigović, and N. Kujundžić, Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry, *Molecules*, **14**(7), 2466 (2009).
  31. T. Iwashina and G. Kokubugata, Flavone and flavonol glycosides from the leaves of *Triumfetta procumbens* in Ryukyu islands, *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.*, **38**(2), 63 (2012).