

인동덩굴 추출물과 분획물의 항산화 활성 및 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과

이예슬, 윤민음, 이윤주, 박영민, 이상래, 박수남*
서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소

Received: November 29, 2017 / Revised: January 24, 2018 / Accepted: March 8, 2018

Antioxidant Activities and Cytoprotective Effects of *Lonicera japonica* Thunb. Extract and Fraction against Oxidative Stress

Ye Seul Lee, Mid Eum Yun, Yun Ju Lee, Young Min Park, Sang Lae Lee, and Soo Nam Park*

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea

In this study, the antioxidant activities and cytoprotective effects against oxidative stress of *Lonicera japonica* Thunb. 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction were investigated. Using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay, the free radical scavenging activity (FSC50) of *L. japonica* Thunb. 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction was determined as 152.00 and 77.25 $\mu\text{g/ml}$, respectively. To measure the reactive oxygen species (ROS) scavenging activity, the total antioxidant capacity (OSC50) was determined by using a luminol-dependent chemiluminescence assay. The antioxidant activity of the ethyl acetate fraction (0.33 $\mu\text{g/ml}$) was approximately four times stronger than that of the 50% ethanol extract (1.12 $\mu\text{g/ml}$). The protective effect against $^1\text{O}_2$ -induced cellular damage of human erythrocytes (τ_{50}) was 46.0 min at 10 $\mu\text{g/ml}$ of the 50% ethanol extract and 52.3 min at 1 $\mu\text{g/ml}$ of the ethyl acetate fraction. We also investigated the cytoprotective effects against oxidative stress induced by H_2O_2 and the intracellular ROS scavenging activity in response to UVB irradiation and found that the extract and fraction protected human skin cells from damage and reduced ROS. These results confirmed that *L. japonica* Thunb. was a valuable plant-derived natural antioxidant with potential for development as an antioxidative functional ingredient.

Keywords: *Lonicera japonica* Thunb., reactive oxygen species, antioxidative activity, cytoprotective effect, oxidative stress

서 론

피부 노화는 주요 발생 원인에 따라 내인성 노화와 외인성 노화로 구분할 수 있다. 내인성 노화는 생리적 요인의 기능 감소에 의해 발생하는 노화이며 외인성 노화는 자외선과 같은 외부 환경의 산화적 스트레스에 의해 발생하는 노화이다. 외인성 노화를 대표하는 인자에는 자외선이 있는데, 자외선에 의해 발생하는 노화를 광노화라고 한다. 이는 피부 노화의 상당한 부분을 차지한다. 피부 조직학적인 관점에서

관찰된 광노화에 의한 피부 변화에는 두꺼워진 표피, 깊은 주름 생성 등이 있다. 특히 자외선에 많이 노출된 목덜미 등에 특징적인 능선형의 주름이 생성된다[1–3].

피부의 광노화에 대한 가설 중 자유 라디칼(free radical) 설에 의하면, 피부가 자외선에 노출되었을 때 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 이것이 피부 조직이나 세포에 직·간접적으로 영향을 주어 피부 노화를 유발하거나 촉진시킨다[4]. 즉, ROS는 광노화의 가장 주된 원인이다. ROS란 반응성이 매우 높은 산소 종으로 하이드록실 라디칼($\cdot\text{OH}$), 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼($\text{O}_2^{\cdot-}$), 과산화 라디칼($\text{ROO}\cdot$) 등의 산소 중심 라디칼과 일중항 산소($^1\text{O}_2$), 과산화수소(H_2O_2), 하이드로과산화물(ROOH) 등의 비라디칼 종이 있다[5].

*Corresponding author

Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

앞서 언급한 활성산소의 공격으로부터 신체를 보호하기 위해 우리 몸은 다양한 항산화 네트워크를 구축하고 있다. 대표적인 항산화제로는 superoxide dismutase (SOD)와 같은 효소적 항산화제와 비타민 C, 비타민 E와 같은 비효소적 항산화제가 있다. 하지만, 자외선 조사에 의해 ROS가 과잉 생성되면 피부에 존재하던 항산화제가 감소하여 항산화 네트워크가 무너지게 되고 피부 노화가 촉진된다[7, 8]. 따라서 노화로부터 피부를 보호하고 항산화 네트워크를 유지하기 위해 항산화 물질을 보충해줘야 한다. 항산화제는 크게 합성과 천연 항산화제로 나뉘어져 있는데, 뛰어난 항산화 효능을 지닌 식물유래 천연 항산화제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[9].

본 연구에서 사용한 인동덩굴(*Lonicera japonica* Thunb.)은 우리나라 전역의 산에서 자라는 반상록활엽 덩굴성 관목으로, 한약재명으로는 “금은화”라고 한다. 예로부터 인동덩굴의 줄기, 꽃, 열매 등은 고열, 급성 간염, 염증 등에 약용으로 사용되어왔지만 약간 독성이 있어 오래 먹으면 좋지 않다고 알려져 있다. 인동덩굴 추출물의 효능으로 항균[10], 항염증[11], 항당뇨[12]에 대한 연구가 일부 보고되었다. 인동덩굴의 항산화 효능은 라디칼 소거능으로 확인된 바 있으나[13], 피부에서 생성되는 ROS와 이에 따른 손상에 대한 연구로는 진행되지 않았다. 다시 말해, 실제로 피부 세포 및 조직에서 나타나는 다양한 종류의 활성산소종 생성 시스템인 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총 항산화능 평가나 광노화의 중요한 실험 모델 중 하나인 광증감 반응으로 생성되는 1O_2 등의 활성산소에 의해 개시되는 세포막 파괴와 세포 손상에 대한 세포 보호 효과에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 상기에 제시된 항산화능 평가와 함께 피부 각질 형성 세포인 HaCaT 세포에서 과산화수소 및 자외선으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 인동덩굴 추출물 및 분획물에 대한 세포 보호 효과를 조사하였다.

본 연구는 피부 광노화에서 중요한 항산화 평가법을 이용하여 식물유래 천연 항산화제로서 인동덩굴의 각종 ROS에 대한 항산화능을 재평가함으로써 화장품에서 꼭 필요한 항산화 기능성 화장품 소재로서 개발 가능성이 있는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Cary 50 (Varian, Australia), 화학발광기는 6-channel LB9505 LT (Berthold, Germany)를 사용하였다. HPLC는 Shim-pack VP-ODS C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (Shimadzu, Japan) 제품을 사용하였다. Free radical 소거 활성에 사용한 1,1-

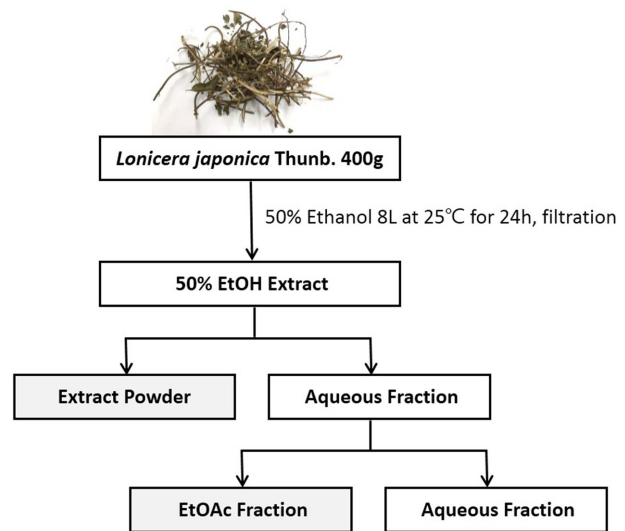


Fig. 1. Preparation procedure of extract and fractions of dried *L. japonica* Thunb.

diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, luminol, Folin-ciocalteu's phenol reagent은 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 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 acid, apigenin, caffeic acid, coumaric acid, luteolin은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 인동덩굴은 2017년 4월 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

인동덩굴의 추출/분획 및 수율

실험에 사용한 인동덩굴은 Fig. 1과 같은 방법으로 추출 및 분획을 실시하였다. 건조된 인동덩굴 400 g을 잘게 분쇄하여 50% 에탄올 8 L에 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 분말을 얻었다. 항산화 효능을 나타내는 활성 물질을 효과적으로 추출하기 위해 50% 에탄올 추출물을 중간 정도의 극성을 갖는 에틸아세테이트로 3회 분획하였다. 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 수율은 건조된 인동덩굴(400 g)을 기준으로 계산하였다. 건조된 인동덩굴의 50% 에탄올 추출물은 4.85%, 에틸아세테이트 분획은 0.41%로 나타났다.

인동덩굴 추출물의 항산화 효과 측정

DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성. DPPH법은 시료의 라디칼 소거능을 평가할 수 있는 실험법으로서, 비교적

안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자주게능을 통하여 시료의 환원력을 측정하는 실험법이다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 ml에 에탄올 1 ml를 첨가하고 여러 농도의 인동덩굴 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 소거활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도 (free radical scavenging activity, FSC₅₀, µg/ml)로서 표기하였으며, 자유 라디칼(DPPH) 소거활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

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

Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능). Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 다양한 ROS (O₂⁻, ·OH 및 H₂O₂)를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있으며, 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 루미놀과 ROS와의 반응을 통한 화학 발광을 측정함으로써 확인할 수 있다. 화학 발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 ml를 넣고 여러 농도의 인동덩굴 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µl 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 µl를 가한 후 35 mM luminol 80 µl를 넣고 흔들어 섞어주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µl를 넣고 화학 발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학 발광으로 측정된 저해율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학 발광의 세기(counts per minute, cpm)가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀)로서 표기하였다.

$$\text{ROS Scavenging (\%)} = \left\{ \frac{(\text{Cpm}_{\text{control}} - \text{Cpm}_{\text{experiment}})}{(\text{Cpm}_{\text{control}} - \text{Cpm}_{\text{blank}})} \right\} \times 100$$

광용혈(Photohemolysis)법을 이용한 세포 보호 효과 측정
적혈구 현탁액 제조. 적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 1,518 ×g으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하

고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심 분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 이를 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였으며 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다 [6]. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10⁷ cells/ml이었다.

인동덩굴 추출물 및 분획물의 광용혈 억제 효과. 적혈구 현탁액 3.5 ml를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료 용액을 첨가하였다. 시료를 농도별로 각각 50 µl씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (13 µM) 0.5 ml를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다. 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 동안 광조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20℃ 항온실에서 행하였다. 인동덩굴 추출물 및 분획물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ₅₀을 구하여 비교하였다.

HaCaT 세포 보호 효과 측정

HaCaT 세포 배양. 각질 형성 세포인 HaCaT 세포주는 CLS Cell Line Service GmbH (Eppelheim, Germany)에서 얻어 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (P/S)을 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다.

인동덩굴 추출물 및 분획물의 HaCaT 세포 독성 평가. 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물이 각질 형성 세포인 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay를 이용하여 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하여 60–80%까지 배양하였다. 무혈청 배지에 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 희석하여 24 h 동안 처리한 후, 배지를 모두 제거하고 0.5 mg/ml MTT 용액을 각 well에 첨가하여 2 h

Table 1. TLC mobile phase for separation of EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb.

Eluent System	
EtOAc Fraction	Hexane : Ethyl Acetate : Acetic Acid = 21 : 14 : 5 (v/v)

동안 37°C에 반응시켰다. 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹이고 ELISA reader (Tecan, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과. HaCaT 세포를 1×10^4 cells/well로 96-well plate에 분주하고 24 h 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 배양하였다. 24 h incubation 후, 배지를 모두 제거하고 무혈청 배지에 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 희석하여 24 h 동안 배양하였다. PBS 100 µl로 1회 세척한 후, 과산화수소 2 mM 농도(in PBS)로 30 min 처리하였다. 과산화수소를 모두 제거 후, PBS 100 µl로 2회 세척하였다. 세척 후, 무혈청 배지로 바꿔 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 24 h incubation 후, MTT assay로 세포 생존율을 확인하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 인동덩굴 50% 에탄올 추출물과 분획물의 세포 보호 효과를 확인하였다.

세포 내 ROS 소거활성 평가. 세포 내 ROS 소거활성 평가는 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate H₂DCF-DA)를 사용하여 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로

분주하여 24 h 동안 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 20 µM H₂DCF-DA로 30 min 동안 37°C에서 처리한 후, CL-1000 ultraviolet crosslinker를 이용하여 DPBS 상태에서 200 mJ/cm² UVB를 조사하여 세포 내 ROS를 생성시킨 직후, fluorescence ELISA reader (excitation, 490 nm emission, 530 nm) 기기를 통하여 형광의 세기를 측정하였다.

TLC 및 HPLC를 이용한 인동덩굴 추출물의 성분 분석

인동덩굴 추출물 중 에틸아세테이트 분획물을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Millipore 0.45 µm)를 이용하여 여과한 후 여과된 추출물 용액을 이용하여 극성 TLC (normal phase) 및 비극성 HPLC (C18) 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 1에 나타내었다. 성분은 이미 보고된 분광학적 자료, 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 NP-PEG (natural products-polyethylene glycol, 2-aminoethyl diphenylborinate) 발색법을 이용한 띠의 색상 등을 통해 확인하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 수용액과 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 수용액을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였고, HPLC 분리조건은 Table 2에 나타내었다.

총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량 측정

인동덩굴 추출물의 총 페놀성 화합물 함량 측정은 Alves 등의 방법을 이용하였다[23]. 추출물 80 µl에 Folin-Ciocalteu 시약(50% v/v)을 20 µl를 첨가한 다음, 25°C에서 5 min 동안 반응시켰다. 그 후 포화 Na₂CO₃ 용액(2% w/v) 200 µl를 첨

Table 2. HPLC condition for the separation of EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb.

Condition of HPLC Analysis				
Column	Shim-pack VP-ODS C18 Column (L : 250 mm, LD : 4.6 mm, 5 µm)			
Detector	UVD 170s DIONEX			
Detection Wavelength	254–400 nm			
Flow Rate	1.0 ml/min			
Injection Volume	20 µl			
	Program Order	Time (min)	2% AA ¹⁾ in Water (%)	0.5% AA ¹⁾ in 50% ACN ²⁾ (%)
	1	0	100	0
	2	10	100	0
	3	150	50	50
	4	200	0	70
	5	210	0	70
	6	215	100	0
	7	220	100	0

¹⁾AA: Acetic acid, ²⁾ACN: Acetonitrile.

가하여 혼합하고 25°C에서 30 min 반응시킨 후 ELISA reader (Tecan, Australia)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid를 표준 물질로 하여 농도별 표준 곡선을 작성한 후, 총 페놀성 화합물 함량을 측정하였다.

인동덩굴 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등의 방법을 이용하였다[24]. 추출물 30 µl에 증류수 120 µl를 첨가한 다음, NaNO₂ (25% w/v) 9 µl를 넣고 25°C에서 5 min 동안 반응시켰다. 이 용액에 AlCl₃ (10% w/v) 9 µl를 넣고, 1 min 후 NaOH (1 M) 60 µl와 증류수 72 µl를 첨가한 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로 luteolin을 이용하여 표준 곡선을 작성한 후, 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계자료의 값은 mean ± SD로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.0 (USA) 프로그램을 이용하였으며, Student's *t*-test 및 one-way ANOVA 검정을 적용하여 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

인동덩굴 추출물의 항산화 활성

DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성. 자외선 조사로 인해 생성되는 활성산소 중 라디칼을 보유하고 있는 것은 반응성이 높기 때문에 세포막과 결합하여 지질과산화반응을 개시할 수 있다. 이 때 라디칼에 전자를 제공하여 라디칼을 소거할 수 있는데 이러한 환원력을 이용하여 시료의 자유 라디칼 소거활성(free radical scavenging concentration, FSC₅₀)을 측정하였다[6].

본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼인 DPPH를 이용하

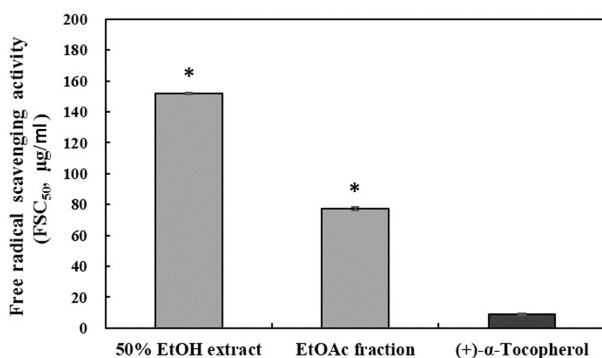


Fig. 2. Free radical scavenging activities of 50% EtOH extract and EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb., and (+)- α -tocopherol. Data are presented as the mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared with (+)- α -tocopherol.

여 인동덩굴의 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol을 대조군으로 라디칼 소거능을 비교했을 때, 자유 라디칼이 50% 소거되는 농도인 FSC₅₀은 인동덩굴 50% 에탄올 추출물에서 152.00 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물에서는 77.25 µg/ml로 나타났다(Fig. 2). 따라서 인동덩굴 추출물의 자유 라디칼 소거활성은 (+)- α -tocopherol (FSC₅₀, 8.98 µg/ml)보다 높지 않았으며, 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 통계적으로 유의하게 약 2배 높은 자유 라디칼 소거능을 나타냄을 확인하였다.

Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능). 본 실험법은 다양한 ROS를 생성하는 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 Fenton 반응을 이용한 항산화능 평가법이다. 본 실험에서는 Fenton 반응에 의해 생성된 H₂O₂, O₂⁻, ·OH와 같은 활성산소 소거능과 활성산소 생성 억제 등의 중요 수단인 킬레이팅 효과를 동시에 평가하여 총체적인 활성산소 소거능을 확인할 수 있다. 총 항산화능(ROS scavenging concentration, OSC₅₀)은 활성산소로부터 전자를 받은 luminol이 에너지를 방출하면서 내뿜는 420–450 nm의 빛을 측정하여 평가하였다[4].

활성산소가 50% 감소하는 농도인 OSC₅₀은 인동덩굴 50% 에탄올 추출물에서 1.12 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물에서는 0.33 µg/ml로 나타났다(Fig. 3). 두 가지 조건 모두 강력한 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid (4.95 µg/ml)와 비교하여도 높은 항산화능을 가지고 있음을 알 수 있다. 특히, 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물은 50% 에탄올 추출물과 비교하여 약 4배 높은 항산화 효능을 나타내었으며, L-ascorbic acid보다 월등히 높은 항산화 효능을 가지고 있음을 확인하였다. L-Ascorbic acid와 비교하여 인동덩굴 50% 에탄올 추

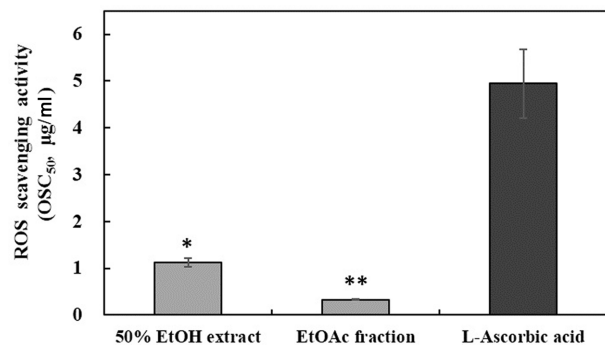


Fig. 3. ROS scavenging activities of 50% EtOH extract and EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb., and L-ascorbic acid in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data are presented as the mean \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with L-ascorbic acid.

출물과 에틸아세테이트 분획물은 모두 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. Fig. 2와 비교하여 본 실험 결과에서 나타난 높은 항산화능을 통해 인동덩굴 추출물 및 분획물이 효과적인 킬레이트제라는 것을 확인하였다.

¹O₂으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과. 피부가 자외선에 노출되면 porphyrin 혹은 riboflavin과 같은 다양한 광증감제의 반응에 의해 ¹O₂과 각종 ROS를 생성하게 된다. 이 때 생성되는 ¹O₂은 반응성이 매우 강한 활성산소로 피부에 존재하는 항산화제를 빠르게 고갈시켜 항산화 네트워크를 붕괴시킨다. 또한 세포막의 지질과산화반응을 개시하여 세포 손상을 촉진시킨다[14]. 따라서 본 실험법에서는 광증감제인 rose-bengal과 적혈구 세포를 이용하여 인동덩굴의 피부 광노화에서의 항산화능 및 세포 보호 효과를 평가하였다. 특히, 적혈구는 철을 함유하고 있어 암반응 상태에서도 Fenton 반응에 의한 다양한 ROS를 생성하고 세포막 및 구성 성분을 파괴시키기 때문에 천연물의 항산화 활성을 평가하는데 적합하였다. 본 실험에서는 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50} , min)을 측정하여 세포 보호 효과를 평가하였으며 세포 보호 효과가 클수록 값이 크게 나타났다.

인동덩굴 50% 에탄올 추출물은 1, 5, 10 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 24.8, 36.2, 46.0, 31.8 min을 나타내었고 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물은 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 26.2, 39.0, 52.3, 47.1, 16.9 min을 나타내었다(Table 3). 인동덩굴 50% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 세포 보호 효과가 증가하는 경향을 나타내었지만 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 세포 보호 효과가 약간 감소하였다. 인동덩굴 50% 에탄올 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 높은 세포 보호 효과를 나타내었으며 동일한 농도에서 비교 물질로 사용한 지질과산화 연쇄 반응의 차단제인 지용성 항산화제 (+)- α -tocopherol (37.5 min)보다도 높은 세포 보호 효과를 가지고 있음을 확인하였다. 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물 또한 농도 의존적으로 세포 보호 효과가 나타났으나, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 보호 효과가 약간 감소하였고 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 세포 보호 효과가 현저히 감소하

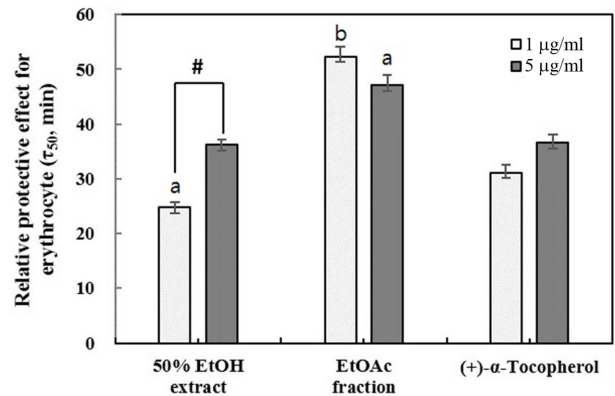


Fig. 4. Cellular protective effects of 50% EtOH extract and EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb., and (+)- α -tocopherol at 1 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$ on rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Data are presented as the mean \pm SD. ^a $p < 0.05$ and ^b $p < 0.01$ compared with (+)- α -tocopherol by one-way ANOVA. [#] $p < 0.05$ 1 $\mu\text{g/ml}$ versus 5 $\mu\text{g/ml}$ of 50% EtOH extract by Student's *t*-test.

였다. 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 높은 세포 보호 효과를 나타내었으며, 동일한 농도의 (+)- α -tocopherol (31.1 min)과 비교하였을 때 매우 높은 세포 보호 효과를 나타내었다. 또한, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 인동덩굴 에틸아세테이트 분획은 50% 에탄올 추출물보다 약 2배 높은 세포 보호 효과를 나타내었으며 이는 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(Fig. 4).

고농도에서의 인동덩굴 추출물 및 분획물의 세포 보호 효과 감소를 통해, 고농도의 추출물 및 분획물에 세포막 교란 혹은 세포 독성을 나타내는 물질의 존재 가능성을 확인하였다. 게다가 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물에서 대조군(30.8 min)보다 용혈이 빠르게 나타나는 것으로 미루어보아 이 물질이 에틸아세테이트 분획에 더 많이 함유되어 있을 것으로 예상된다.

HaCaT 세포 보호 효과

인동덩굴 추출물 및 분획물의 HaCaT 세포 독성 평가.MTT

Table 3. Cellular protective effects of 50% EtOH Extract and EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb., and (+)- α -Tocopherol on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

Concentration (μg/ml)	τ_{50} (Half time of hemolysis)						
	Control	0.1	0.5	1	5	10	25
50% EtOH extract	28.5 (± 0.8)	-	-	24.8 (± 0.5)	36.2 (± 0.9)	46.0 (± 0.3)	31.8 (± 1.4)
EtOAc fraction	30.8 (± 1.2)	26.2 (± 0.4)	39.0 (± 0.6)	52.3 (± 0.5)	47.1 (± 1.8)	16.9 (± 0.4)	-
(+)- α -tocopherol	30.3 (± 1.3)	-	-	31.1 (± 1.6)	36.6 (± 1.5)	37.5 (± 1.3)	38.7 (± 1.6)

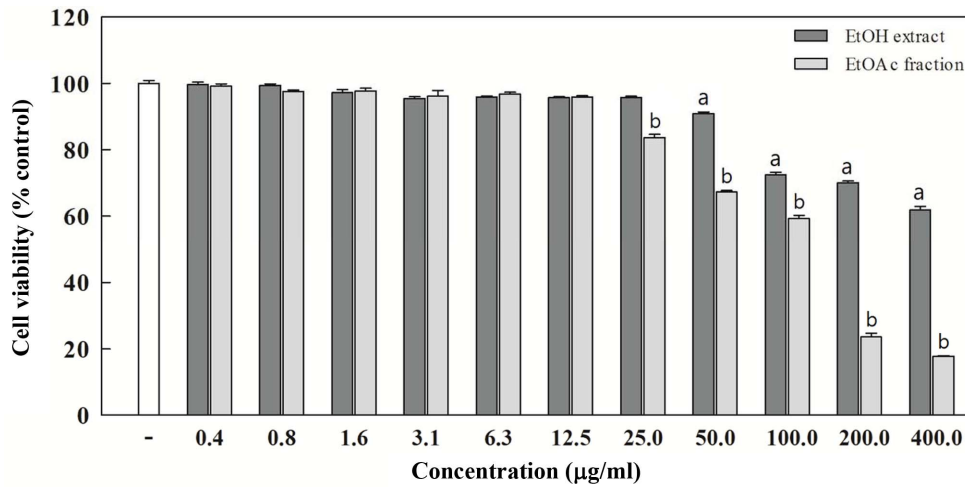


Fig. 5. Effect of *L. japonica* Thunb. 50% EtOH extract and EtOAc fraction treatment on HaCaT cell viability. HaCaT cells were treated with various concentrations of samples for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay. Data are presented as the mean \pm SD. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.05$ compared with untreated control by one-way ANOVA.

assay를 통해 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 각질 형성 세포인 HaCaT 세포에 대한 독성을 확인함으로써 앞으로의 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 0.4–400.0 µg/ml 농도의 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 HaCaT 세포에 24 h 처리 후 세포 생존율을 확인하였다. 실험 결과, 아무 처리하지 않은 군에 비해 인동덩굴 50% 에탄올 추출물은 25 µg/ml, 에틸아세테이트 분획물은 12.5 µg/ml의 농도까지는 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 5). 이를 바탕으로 본 실험에서는 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 최고 농도를 12.5 µg/ml로 설정하였다.

과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과. 과산화수소는 세포 내에서 $O_2^{\cdot-}$ 이 SOD로 촉매되어 생성되거나 자외선 조사에 의해서 과잉 생산되면 산화적 손상을 일으키게 된다. 활성산소인 과산화수소는 세포막을 통과하여 생체 내 미량으로 존재하는 금속 이온과 반응하여 다른 ROS를 생성시켜 세포 손상을 야기시킨다[19]. 따라서 인동덩굴 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포의 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다.

실험 결과, 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 군에 비하여 약 65%의 생존율을 나타내었다(Fig. 6A). 0.4–

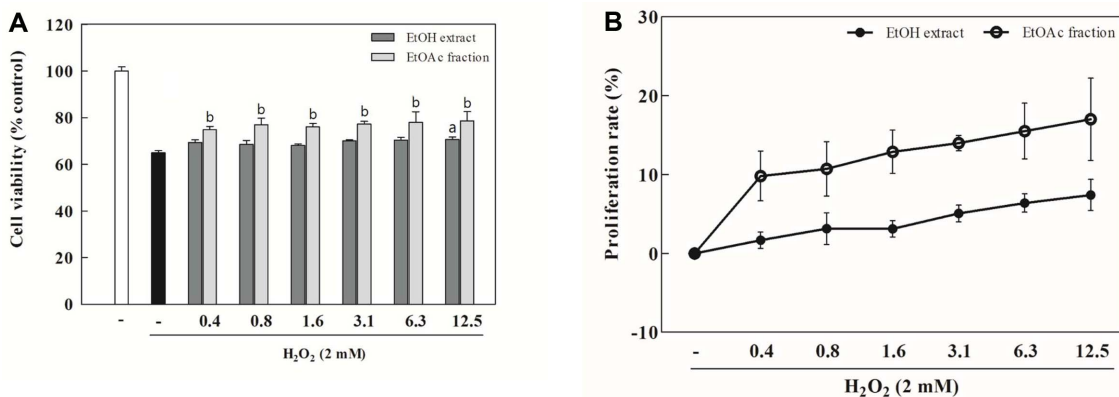


Fig. 6. (A) Cell protective effects of 50% EtOH extract and EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb. on H_2O_2 -induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. (B) Rate of increase in proliferation of cell protective effects. Data are presented as the mean \pm SD. ^a $p < 0.05$ compared with H_2O_2 treated control in 50% EtOH extract dose-treated groups by one-way ANOVA, ^b $p < 0.05$ compared with H_2O_2 treated control in EtOAc fraction dose-treated groups by one-way ANOVA.

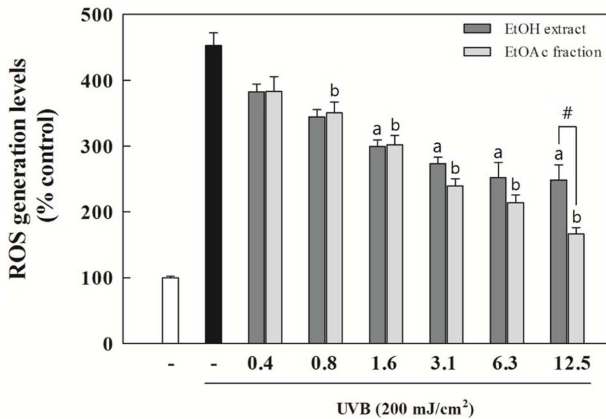


Fig. 7. Effects of *L. japonica* Thunb. 50% EtOH extract and EtOAc fraction on UVB-induced oxidative stress in HaCaT. *L. japonica* Thunb. 50% EtOH extract and EtOAc fraction scavenged UVB-induced upregulation of intracellular ROS production. The 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) probe was used to investigate intracellular ROS levels. Data are presented as the mean ± SD. ^a*p* < 0.05 compared with UVB treated control in 50% EtOH extract dose-treated groups by one-way ANOVA, ^b*p* < 0.05 compared with UVB treated control in EtOAc fraction dose-treated groups by one-way ANOVA. [#]*p* < 0.05 50% EtOH extract versus EtOAc fraction by Student's *t*-test.

12.5 µg/ml 농도 범위에서 50% 에탄올 추출물을 처리한 군은 최고 농도 12.5 µg/ml에서만 70.0%의 세포 생존율을 나타내 유의적 차이를 나타냈다. 그러나 0.4–12.5 µg/ml 농도 범위에서 에틸아세테이트 분획물을 처리한 군은 모든 농도에서 세포 생존율을 현저히 증가시켰으며 최대 78.6%까지 증가시켰다(각각 73.2, 74.8, 76.9, 76.0, 78.0%). 세포 증식율은 Fig. 6B에 나타내었다. 실험 결과, 인동덩굴 50% 에탄올

추출물과 에틸아세테이트 분획물 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 최고 농도에서 50% 에탄올 추출물이 약 4.5%의 증가율을 나타낸 것과 비교하여 에틸아세테이트 분획물은 약 14.6%의 증가율을 나타냄으로써 인동덩굴 50% 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 분획물이 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효능이 뛰어난 것을 확인하였다.

세포 내 ROS 소거 활성. 피부의 최외각 방어망인 표피에 자외선을 처리하면 세포 내 생성된 ROS가 세포의 구성 성분인 단백질, DNA 및 지질을 손상시키고 콜라겐, 엘라스틴과 같은 세포외기질을 분해시키는 MMPs의 발현을 촉진시켜 피부 노화를 가속화시킨다. 그러므로 세포 내 ROS 억제 작용이 있는 항산화 물질은 피부 노화를 억제할 수 있다. 따라서 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 각질 형성 세포 내 UVB로 유도된 ROS 소거 활성을 H₂DCF-DA를 이용하여 측정하였다.

실험 결과, UVB를 조사한 실험군은 조사하지 않은 군(100%)에 비해 ROS가 453.6%로 증가하였다. 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 HaCaT 세포에 0.4–12.5 µg/ml 농도 범위로 24 h 처리하였을 때, 모두 농도 의존적으로 ROS 감소를 나타내었다(Fig. 7). 50% 에탄올 추출물의 경우 UVB 처리군에 비해 1.56 µg/ml 이상에서 유의적 감소를 나타냈으며, 각각 33.9, 39.7, 44.3, 45.2% 감소율을 나타내었다. 그에 반해, 에틸아세테이트 분획물의 경우 0.78 µg/ml 이상에서 유의적 감소를 나타냈으며, 각각 22.7, 33.3, 47.2, 52.9, 63.3%의 감소율을 나타내었다. 게다가 인동덩굴 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 비교했을 때, 최고 농도 12.5 µg/ml에서 유의적 차이가 있음을

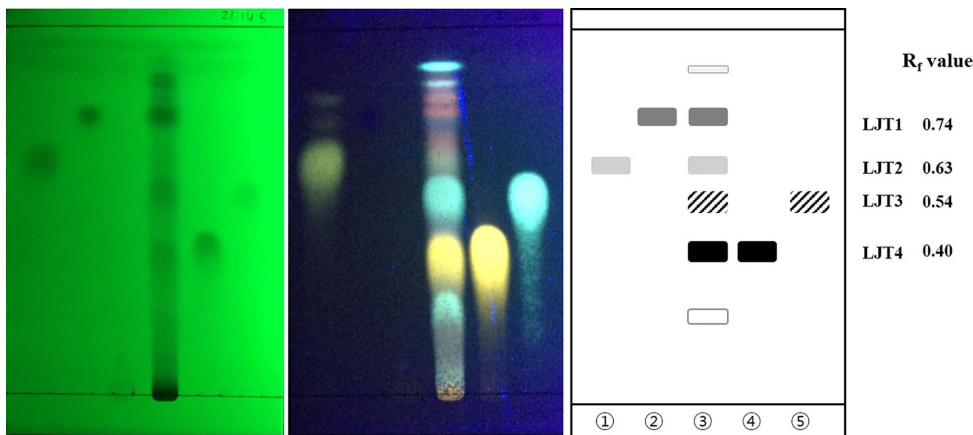


Fig. 8. TLC chromatogram of EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb. and references (UV 254 nm, NP-PEG reagents; UV 365 nm). Eluent system : hexane : ethyl acetate : acetic acid = 24 : 14 : 5 (v/v), ① apigenin, ② coumaric acid, ③ ethyl acetate fraction, ④ luteolin, ⑤ caffeic acid.

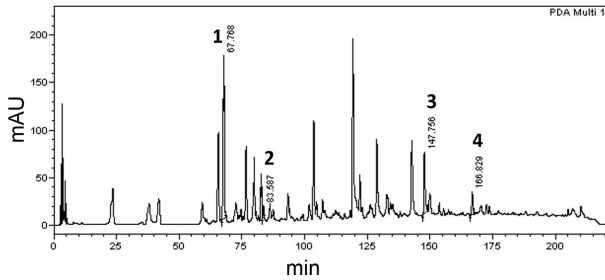


Fig. 9. The HPLC chromatogram of EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb. 1: LJT3, 2: LJT1, 3: LJT4, 4: LJT2.

통계적으로 관찰함으로써 세포 내 ROS 억제 효능이 인동덩굴 50% 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 분획물에서 더욱 뛰어남을 확인하였다.

인동덩굴 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석. 인동덩굴 추출물의 TLC 크로마토그램은 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8은 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물의 TLC 크로마토그램이며, 크게 6개의 띠로 분리되었다. 이 중 4개의 띠를 UV 및 NP-PEG 발색법을 이용해 확인하였다. 실험 결과, R_f 값이 0.74인 LJT1은 coumaric acid로 나타났고 R_f 값이 0.63인 LJT2는 apigenin, R_f 값이 0.54인 LJT3는 caffeic acid, R_f 값이 0.40인 LJT4는 luteolin으로 확인되었다. 확인된 성분 중에 caffeic acid와 luteolin이 가장 진한 색의 띠를 나타내었다.

인동덩굴 에틸아세테이트 분획물의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 9에 나타내었다. HPLC 크로마토그램의 peak를 동정하기 위해 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 긁어서 추출 및 여과하고 용매를 감압 건조시켜 파우더를 얻은 뒤, 에탄올로 녹여서 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. HPLC 분석 결과, 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물의 TLC 크로마토그램에서의 LJT1 (R_f 0.74)은 Fig. 9의 HPLC peak 2 (coumaric acid), LJT2 (R_f 0.63)는 peak 4 (apigenin), LJT3 (R_f 0.54)는 peak 1 (caffeic acid), LJT4 (R_f 0.40)는 peak 3 (luteolin)과 일치함을 확인하였다.

성분 분석을 통해 확인한 인동덩굴 주성분인 Caffeic acid와 luteolin의 항산화 효능은 여러 연구를 통해 알려져 있다 [15–18]. 페놀성 화합물인 caffeic acid는 주로 커피콩, 과일, 백리향과 같은 허브 등에서 발견되며, 항산화 효능뿐만 아니라 항암 효과[20]를 가지고 있다. 플라본 화합물인 luteolin은 인동덩굴 이외에 땅콩 껍질, 목서초, 국화, 파슬리, 샐러리 등에 존재하며, 항산화, 항염증, 세포 보호 효과[22] 등을 가지고 있다. Luteolin의 항산화 효능은 높은 환원력과 플라보노이드 B 고리의 금속 이온 킬레이팅 작용에 기인하며, 상호작용할 수 있는 다른 항산화제가 존재하는 생물학적 시스템

Table 4. Bioactive compounds contents of 50% EtOH extract and EtOAc fraction of *L. japonica* Thunb.

	Total phenolic (caffeic acid, mg/g)	Total flavonoid (luteolin, mg/g)
50% EtOH extract	35.7	145.5
EtOAc fraction	159.2	635.4

에서 항산화 시너지 효과를 나타낸다고 알려져 있다[21]. TLC 및 HPLC 성분 분석을 통해 인동덩굴 추출물의 주성분인 caffeic acid와 luteolin이 인동덩굴 추출물의 높은 항산화 활성과 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과에 기여함을 확인하였다.

인동덩굴 추출물의 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량 측정. 페놀성 화합물 및 플라보노이드는 뛰어난 항산화 효능을 나타내는 물질로, 천연물의 항산화능에 매우 중요한 역할을 하는 성분 중 하나이다. 앞서 TLC와 HPLC를 통해 확인한 caffeic acid, luteolin을 포함한 페놀성 화합물 및 플라보노이드의 함량을 확인하기 위해 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 측정 결과는 Table 4에 나타내었다.

인동덩굴 50% 에탄올 추출물과 분획물에 함유된 총 페놀성 화합물의 함량을 caffeic acid의 양으로 환산한 결과, 에틸아세테이트 분획물(159.2 mg/g)이 50% 에탄올 추출물(35.7 mg/g)보다 약 4.5배 높은 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량을 luteolin의 양으로 환산하여 나타낸 결과, 인동덩굴 추출물과 분획물에 각각 145.5, 635.4 mg/g의 총 플라보노이드 함량을 나타내었다. 실험 결과를 통해 인동덩굴 추출물의 뛰어난 항산화 활성 및 세포 보호 효과가 다량의 페놀성 화합물과 플라보노이드의 함유에 의한 결과임을 확인하였으며, 특히 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물은 50% 에탄올 추출물보다 약 4.5배 높은 페놀성 화합물 및 플라보노이드를 함유하고 있어 더욱 우수한 항산화 활성을 나타냄을 확인하였다.

요 약

DPPH를 이용한 인동덩굴 추출물의 자유라디칼 소거활성 (FSC₅₀) 측정 결과, 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물 (77.25 µg/ml)이 50% 에탄올 추출물(152.00 µg/ml)보다 약 2배 높은 활성을 나타내었다. Luminol 발광법을 이용한 인동덩굴 추출물의 활성산소 소거활성(총 항산화능, OSC₅₀) 측정 결과, 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물(0.33 µg/ml) > 인동덩굴 50% 에탄올 추출물(1.12 µg/ml) > L-ascorbic acid (4.95 µg/ml) 순서로 높게 나타났다. ¹O₂으로 유도된 적혈구 파괴

에 대한 세포 보호 효과(τ_{50}) 측정 결과, 인동덩굴 추출물의 농도에 의존적으로 세포 보호 효과가 나타났으나, 고농도에 서는 세포 보호 효과가 감소하는 경향을 나타내었다. 인동덩굴 50% 에탄올 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도(46.0 min)에서, 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도(52.3 min)에서 가장 높은 세포 보호 효과를 나타내었다. 인동덩굴 추출물 및 분획물의 세포 독성 평가 결과, 본 실험에서는 0.4–12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위를 설정하여 세포 보호 효과를 평가하였다. 과산화수소로 유도된 각질 형성 세포인 HaCaT 세포 보호 효과는 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 70.0, 78.6%의 세포 생존율을 나타냈으며, 대조군(65%)과 비교하여 유의한 세포 보호 효과를 가지고 있음을 확인하였다. UVB를 조사한 HaCaT 세포의 세포 내 ROS 소거 활성에서 인동덩굴 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물 모두 농도 의존적으로 ROS를 소거하였으며, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 45.2, 63.3%의 ROS 소거율을 나타내었다. 이를 통해 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 높은 세포 내 ROS 억제능이 있음을 확인하였다. TLC와 HPLC 크로마토그램을 이용한 인동덩굴의 에틸아세테이트 분획물의 성분 분석을 통해 caffeic acid, luteolin, apigenin, coumaric acid를 확인하였다. Caffeic acid와 luteolin의 뛰어난 환원력과 킬레이팅 작용이 인동덩굴 추출물의 활성산소 소거활성과 세포 보호 효과에 크게 기인했을 것으로 사료된다. 인동덩굴 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량 측정 결과를 통해, 인동덩굴 에틸아세테이트 분획물이 50% 에탄올 추출물보다 많은 페놀성 화합물, 플라보노이드를 함유하고 있기 때문에 더욱 우수한 항산화 활성을 나타내었음을 확인하였다.

본 연구에서는 자외선에 의해 생성되는 다양한 ROS에 대한 인동덩굴 추출물 및 분획물의 항산화 활성을 평가하였고 이상의 결과를 통해 인동덩굴 추출물이 식물유래 천연 항산화제로서 가치가 있음을 시사하였다. 뿐만 아니라, 인동덩굴의 항산화 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Mitsui T. 1997. *New Cosmetic Science*. Elsevier, Netherlands.
- Kammeyer A, Luiten RM. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**: 16-29.
- Lee DS, Lim MS, Kwan SS, Kim SY, Park SN. 2012. Antioxidative activity and componential analysis of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract. *Appl. Chem. Eng.* **23**: 93-99.
- Won DH, Han SB, Hwang JP, Kim SJ, Park J, Park SN. 2012. Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of *Lindera obtusiloba* blume extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* **38**: 297-304.
- Gordon MH. 1996. Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat. Prod. Rep.* **13**: 265-273.
- Park SN. 1997. Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* **23**: 75-132.
- Slater TF. 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* **222**: 1-15.
- Park SN, Kim SI, Ahn YJ, Kim EH. 2009. Antibacterial and antioxidative activities of *Quercus acutissima* Carruth leaf extracts and isolation of active ingredients. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **35**: 159-169.
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. 1995. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 162-166.
- Xiong J, Li S, Wang W, Hong Y, Tang K, Luo Q. 2013. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves. *Food Chem.* **138**: 327-333.
- Yoo HJ, Kang HJ, Song YS, Park EH, Lim CJ. 2008. Anti-angiogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* extract. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 779-786.
- Han JM, Kim MH, Choi YY, Lee H, Hong J, Yang WM. 2015. Effects of *Lonicera japonica* Thunb. on type 2 diabetes via PPAR- γ activation in Rats. *Phytother. Res.* **29**: 1616-1621.
- Hwang GS, Lee DH, Lee HJ. 2014. Antioxidant activity and components of *Lonicera japonica* Thunb. *Plant Resources Soc. Korea* **173**-173.
- Kong BJ, Han SS, Ha JH, Park SN. 2014. Antioxidant activities of *Ipomoea batatas* L. Lam.(purple sweet potato) extracts cultured in Korea. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **40**: 423-430.
- Gulcin I. 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* **217**: 213-220.
- Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, et al. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* **403**: 136-138.
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**: 1035-1042.
- Torel J, Cillard J, Cillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* **25**: 383-385.
- Kammeyer A, Luiten RM. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**: 16-29.
- Prasad NR, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. 2011. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol. Cell Biochem.* **349**: 11-19.
- Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. 2008. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med.* **74**: 1667-1677.
- Seibert H, Maser E, Schweda K, Seibert S, Gülden M. 2011. Cytoprotective activity against peroxide-induced oxidative damage

- and cytotoxicity of flavonoids in C6 rat glioma cells. *Food Chem. Toxicol.* **49**: 2398-2407.
23. Alves RC, Costa ASG, Jerez M, Casal S, Sineiro J, Nunez MJ, *et al.* 2010. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 12221-12229.
24. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**: 555-559.