

그라비올라(*Annona muricata*) 잎 추출물의 항산화 활성 Antioxidant Activity of Leaf Extract from *Annona muricata*

이계원, 조영호(건양대학교)

차 례

1. 서론
2. 실험방법
3. 결과 및 고찰
4. 결론

■ keyword : | 그라비올라 | 폴리페놀 | 항산화 활성 |

1. 서론

그라비올라(*Annona muricata* L.)는 브라질을 포함한 아마존 일대와 남미, 북미의 열대에 자생하고 있는 5~6m 정도의 작은 상록수이다. 단맛이 있는 타원형의 열매는 가시가 있으며 짙은 녹색 또는 황록색 껍질에 흰 과육이 있다. 그라비올라의 나무껍질, 잎, 뿌리, 씨앗 등은 예로부터 자생 지역에서 민간약재로 이용되어 왔으며, 각 부위에 따라 효능과 이용법이 다르다고 알려져 있다[1].

또한, 최근에는 항산화 물질 및 폴리페놀 등이 피부 세포내부의 산화적 손상을 최소화 하는 식물로서 혈압저하, 혈관확장, 심장작용억제 효과가 알려져 있다. 특히, 잎, 씨 및 줄기에 함유된 유효 성분들이 암세포에 대한 세포독성이 있는 것으로 알려지면서 항암치료제로 이용되고 있다[2].

피부는 다양한 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에 산화적 스트레스에 직접적으로 노출되어 있다. 이러한 원인은 다양하게 있지만, 주 요인인 태양 자외선의 노출로 인해 반응성이 매우 큰 활성산소종이 생성되며, 활성산소종으로부터 유도된 광산화적 손상을 받게 된다[3]. 이러한 활성산소종에 의한 손상을 억제하기 위하여 항산화 관련 제품들이 광범위하게 연구되고 소비자들로부터 많은 관심을 받고 있다.

또한 천연유래의 원료들은 효능과 안전성 면에서 기존 제품보다 뛰어난 장점을 지니고 있기 때문에 피부주름개선, 미백 등 각종 기능성 화장품 개발에 활발히 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 그라비올라의 화장품 소재로서의 가능성을 알아보기 위해서 그라비올라 잎을 에탄올로

추출하고 용매분획하여 항산화 활성을 비교 측정하였다.

2. 실험방법

2.1 시약 및 기기

사용한 기기로는 감압농축기(NVC-2100, Eyela, Japan), UV-VIS spectrophotometer (Gensys 10S, Thermo, USA), ELISA reader (Sunrise, Tecan, Switzerland), Incubator (SLI-700, Eyela, Japan), Shaker (Titramax 100, Heidolph, Germany) 등을 사용하였다.

사용한 시약은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, nitrotetrazolium blue chloride, xathine sodium salt, xanthine oxidase from bovine milk, tannic acid, Folin-Ciocalteu's reagent 등은 Sigma Aldrich (USA)사 제품을 사용하였으며 그 외 실험에 사용된 모든 시약은 일급 및 특급시약을 구입하여 사용하였다.

2.2 그라비올라 잎 추출물의 제조 및 분획

2.2.1 그라비올라 잎 에탄올 추출

건조된 그라비올라 잎을 곱게 간 가루 50 g을 70% (v/v) 에탄올 수용액으로 3시간씩 3회 환류추출 후 냉침하여 왓트만(Whatman) 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50°C 이하에서 감압농축 및 동결건조하여 그라비올라 잎 에탄올 추출물(19 g)을 제조하였다.

2.2.2 그라비올라 추출물 용매분획

제조된 에탄올 추출물의 유효성분을 확인하기 위하여

극성별 용매 분획을 실시하였다. 제조된 에탄올 추출물의 일부(5 g)를 물에 분산시킨 후 Hexane 500 ml로 분배 추출하여 hexane (Hx) 분획을 얻고, 포화 NaCl 용액으로 back washing하고, 무수 Na₂SO₄로 탈수한 후, 감압 농축하였다. 남은 물층에 대하여 dichloromethane (MC), ethylacetate (EtOAc), 수포화 부탄올(aq BuOH)을 이용하여 Hx 분획과 같은 방법으로 각각 탈수한 후, 감압농축하였다. 각각의 건조 분획을 DMSO에 녹여 농도를 조정하여 다음 시료로 사용하였다.

2.3 유효성분 확인

2.3.1 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법[4]으로 측정하였으며, 적당하게 희석된 시료 1 ml에 95% 에탄올 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu's reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어 주었다. 5분간 방치한 후, 10% Na₂CO₃ 1 ml를 가한 후, 725 nm에서 1시간 이내에 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 미리 작성된 검량선으로부터 양을 환산하였다. 이 때 검량선은 tannic acid 표준품 10 mg을 에탄올 5 ml에 용해시켜 표준 원액을 제조한 다음 적당히 희석시켜 사용하였다.

2.4 항산화 효과 측정

2.4.1 DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 소거활성 측정은 Blois의 방법[5]을 변형하여 실시하였다. 각 농도별로 조제한 시료 20 μ l와 0.1 mM DPPH 용액 180 μ l를 혼합한 후 20분 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 ELISA reader를 사용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 DPPH radical 소거활성을 백분율(%)로 나타내었다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH radical 소거활성(\%)} \\ &= \frac{(\text{대조군의 흡광도} - \text{반응군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \end{aligned}$$

2.4.2 Superoxide anion radical 소거활성 측정

그라비올라 에탄올 추출물 및 용매분획의 초과산화 음이온(superoxide anion) radical 소거활성을 통하여 활성산소에 의한 산화 스트레스로부터 피부를 보호하는 효

과를 알아보기 위하여 xanthine oxidase와 반응하여 uric acid로 전환될 때 생성되는 초과산화 음이온(O₂⁻)이 NBT와 반응하여 diformazan으로 전환되는 정도를 Nishikimi의 방법[6]을 변형하여 측정하였다. 즉, 3 mM xanthine과 0.6 mM NBT 용액, 15 mM Na₂-EDTA 용액, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 혼합하여 시료 30 μ l를 첨가하고 0.1 U xanthine oxidase를 50 μ l 가하여 5분간 교반한 후, 배양기에서 37°C로 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 ELISA reader를 사용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 초과산화 음이온 radical 소거 활성을 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{Superoxide anion radical 소거활성(\%)} = \frac{[\text{대조군의 흡광도} - \text{반응군의 흡광도}]}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1 추출수율 비교

그라비올라 잎 에탄올 추출물 및 용매별 분획물의 추출 수율은 표 1에 나타낸 바와 같다. 이는 각 추출물들의 추출액을 동결건조 시켜서 건물 중량을 구한 다음 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타낸 값이다. 추출 수율은 물 분획이 40%로 가장 높았으며, 그 외 수포화 부탄올 분획 > EtOAc 분획 > EtOH 추출물 > Hx 분획 > MC 분획 순으로 나타났다.

표 1. Extraction yields of 70% ethanol extracts and solvent fraction from *A. muricata*

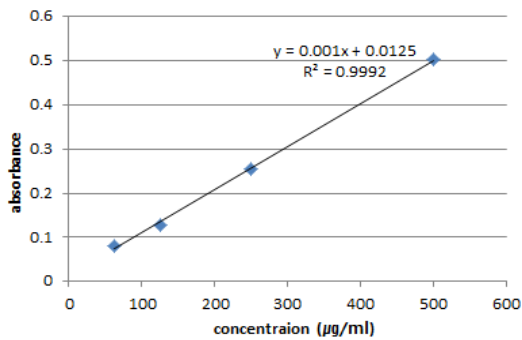
Fraction	Yield (%)
EtOH	38
Hx	3.6
MC	2.2
EtOAc	4.2
aq BuOH	21
DW	40

3.2 유효성분 확인

3.2.1 총 폴리페놀 함량 측정 결과

폴리페놀이란 녹색식물이 광합성 작용을 할 때 생성된 탄수화물의 일부가 변화한 2차 대사산물로 식물계에 8,000여 개의 구조를 가진 성분으로 존재하며 페놀성 화

합물이라고도 한다. 분자 내 페놀성 수산기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있기 때문에 항산화 작용, 항암 및 콜레스테롤 저하작용 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다[7]. 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 표준물질로서 tannic acid를 6.25 ~ 500 ppm 농도로 계열희석하여 검량선을 작성한 결과 그림 1과 같이 양호한 직선성($R^2 = 0.9992$)을 나타내었다.



▶▶ 그림 1. Calibration curve of tannic acid

그라비올라 에탄올 추출물과 용매별 분획내의 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 각 시료의 농도를 상기 검량선의 측정범위 안에 들어가도록 희석하여 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2. Total polyphenol contents of solvent fraction from *A. muricata*

Fraction	Total polyphenol ($\mu\text{g/ml}$)
EtOH	233.06 ± 11.37
Hx	118.51 ± 4.10
MC	151.24 ± 9.72
EtOAc	67.30 ± 4.48
aq BuOH	92.76 ± 2.78
DW	69.42 ± 3.67

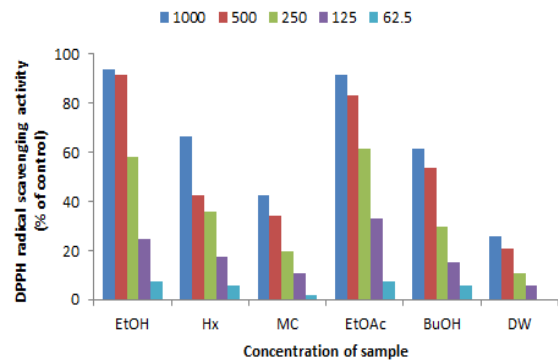
표 2에 나타난 바와 같이 EtOH 추출물에서 233.06 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 많은 폴리페놀이 함유된 것으로 나타났으며, 그 다음 MC 분획 > Hx 분획 > 수포화 부탄올 분획 > 물 분획 > EtOAc 분획 순으로 나타났다.

3.3 항산화 효과

3.3.1 DPPH radical 소거효과

DPPH는 자유 라디칼의 안정된 모델로서 반응 중

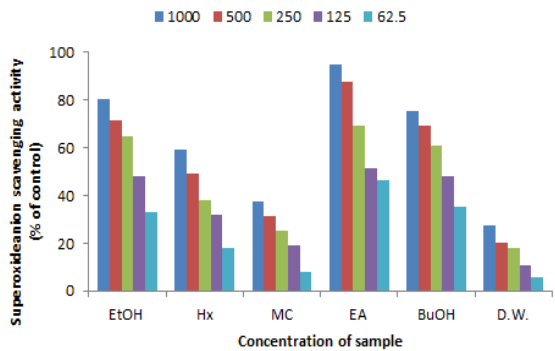
DPPH radical의 감소는 자유 라디칼의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고, 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있기 때문에 시료의 항산화 효과를 측정할 때 DPPH radical 소거능 측정법이 많이 이용된다[8]. 익모초 추출물 및 용매별 분획의 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타내었다(그림 2). 특히 EtOAc 분획의 경우 1000 ppm에서 91.59%, 500 ppm에서 83.49%, 250 ppm에서 61.23%의 저해활성을 나타내어 다른 시료들에 비해 월등히 높은 DPPH radical 소거활성을 보였다. 시료들의 DPPH radical 소거활성 정도는 EtOAc 분획 > EtOH 분획 > 수포화 부탄올 분획 > Hx 분획 > MC 분획 > 물 분획 순으로 나타났다.



▶▶ 그림 2. Effect of solvent fraction from *A. muricata* on DPPH radical scavenging activity

3.2.2 Superoxide anion radical 소거효과

초과산화 음이온 radical 저해작용은 xanthine oxidase에 의해 생성된 초과산화 음이온 radical이 사용된 시료에 의해 제거된 비율을 측정하여 항산화 효과를 평가하는 방법으로 알려져 있다[9]. 그라비올라 에탄올 추출물 및 용매별 분획의 초과산화 음이온 radical 소거활성을 측정된 결과 투여농도 의존적으로 초과산화 음이온 radical 소거작용을 나타내었다(그림 3). 특히, EtOAc 분획의 경우 1000 ppm에서 94.97%, 500 ppm에서 87.51%, 250 ppm에서 69.27%의 저해활성을 나타내어 모든 시료들 중에서 가장 높은 초과산화 음이온 radical 소거활성을 보였다. 시료들의 초과산화 음이온 radical 소거활성 정도는 EtOAc 분획 > 수포화 부탄올 분획 > EtOH 분획 > 물 분획 > Hx 분획, MC 분획 순으로 나타났다.



▶▶ 그림 3. Effect of solvent fraction from *A. muricata* on superoxide anion radical scavenging activity

4. 결론

본 연구에서는 그라비올라 잎을 70% 에탄올로 추출한 후 극성별 용매로 분획하여 유효성분 확인(총 폴리페놀 함량) 및 항산화 활성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

그라비올라 잎 에탄올 추출물 및 용매별 분획의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 에탄올 추출물이 233.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 가장 높게 나타났다.

DPPH radical과 초과산화 음이온 radical 소거 활성을 통해 항산화 효과를 측정한 결과 그라비올라 에탄올 추출물 및 용매별 분획 모두 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 특히, EtOAc 분획의 경우 500 ppm에서 DPPH radical과 초과산화 음이온 radical을 80% 이상 소거하는 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

이상의 결과로부터 그라비올라 잎 추출물의 경우 향후 용매별 분획에 대한 분리 및 정제, 기능성 활성 평가 등의 추가적인 연구를 통해 기능성 화장품 소재로 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- [1] Asare, G. A., Afriyie, D., Ngala, R. A., Abutiati, H., Doku, D., Mahmood, S. A., and Rahman, H., 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), 65-74, 2015
- [2] Baskar, R., Rajeswari, V., and Kumar, T. S., in vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian J. Exp. Biol.*, 45, 480-485, 2007

- [3] Lee, H. J., Lim, N. G., Antibacterial and antioxidative activity of *lespedeza cuneata* G. Don extracts, *Korean J. Microbiol.*, 7, 63-69, 2011
- [4] Folin, A. D., Denis, W., A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine, *J. Biol. Chem.*, 22, 305-308, 1915
- [5] Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampeietro, A. R., Vatuone, M. A., Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, *J. Ethnopharmacol.*, 71, 109-114, 2000
- [6] Blois M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 26, 1199-1203, 1958
- [7] Jeong, H. J., Park, S. B., Kim, S., Kim, H. K., Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 36, 1491-1496, 2007
- [8] Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S., The contribution of plant food antioxidants to human health trends, *Food Sci. Technol.*, 6, 75-82, 1995
- [9] Kuppasamy, P., Zweier, J. L., Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, 264, 9880-9884, 1989

저자소개

● 이 계 원(Gye-Won Lee)



- 1989년 2월 : 충남대학교 약학대학 약학사
- 1992년 2월 : 충남대학교 약학대학 약학석사 (약제학)
- 1995년 8월 : 충남대학교 약학대학 약학박사 (약제학)
- 2002년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 제약생명공학과 부교수

<관심분야> : 약물 전달 시스템(DDS), NLC 약물의 가용화 및 나노제제 기술 Method validation development

● 조 영 호(Yong-Ho Cho)



- 1991년 2월 : 대구대학교 공과대학 공학사 (생물공학)
- 1993년 2월 : 건국대학교 축산대학 농학석사 (생화학)
- 2004년 2월 : 대구대학교 공과대학 공학박사 (생물공학)
- 2007년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 제약생명공학과 부교수

<관심분야> : 기능성 화장품 소재 및 화장품 개발, 피부 면역 증진 소재 및 제형 개발, 난용성생리활성 물질의 가용화 기술 및 제제 개발