

## ***n*-Hexane 및 Ethyl Acetate를 이용한 Willamette 품종 라즈베리추출물의 페놀 화합물 함량 및 항산화 효능 연구**

박 규 근<sup>†</sup> · 윤 여 필

그린코스 주식회사 기업부설연구소

(2020년 8월 13일 접수, 2020년 11월 9일 수정, 2020년 12월 11일 채택)

### **Studies on the Phenolic Compound Content and Antioxidant Efficacy of *Rubus idaeus* (Raspberry) Cultivar ‘Willamette’ Fruit Extract Using *n*-Hexane and Ethyl Acetate**

Kyu Kun Park<sup>†</sup> and Year Pill Yoon

R&D Center, Greencos Inc., 15, Hwagok-ro 68-gil, Gangseo-gu, Seoul 07548, Korea

(Received August 13, 2020; Revised November 9, 2020; Accepted December 11, 2020)

**요약:** 본 연구는 willamette 품종의 동결건조라즈베리분말, *n*-hexane 및 ethyl acetate를 이용하여 라즈베리 추출물(*Rubus idaeus* (Raspberry) fruit extract, RIFE)을 제조한 다음 페놀 화합물 함량, 철 이온 환원능력, 그리고 라디칼 소거 능력의 측정을 수행하였다. Willamette 품종 라즈베리추출물은 10% 농도까지 세포독성을 보이지 않았다. 해당 농도로 실험을 수행한 결과 총 페놀 화합물 함량은 375.3 ppm, 총 플라보노이드 함량은 43.46 ppm이 포함된 것을 확인하였고, ferric reducing antioxidant power (FRAP) reagent를 이용한 철 이온 환원능력은  $\text{FeSO}_4$  0.532 mM에 해당하는 환원능력을 가졌음을 확인하였다. 이를 바탕으로 항산화 소재의 대표적 원료인 L-ascorbic acid와 비교하는 라디칼 소거능 실험을 실시하였다. 그 결과 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능력은  $94.5 \pm 0.7\%$ 를 나타냈고, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 라디칼 소거능은  $99.4 \pm 2.82\%$ 를 나타냈으며, nitric oxide (NO) 라디칼 소거능은  $88.5 \pm 0.4\%$ 를 나타냈다. 표준인 L-ascorbic acid 용액과 비교할 때 25 - 50 ppm 사이의 효능을 지닌 DPPH 라디칼 소거능 / 100 ppm에 근접한 효능을 지닌 ABTS 라디칼 소거능 / 1,000 ppm 이상의 효능을 지닌 NO 라디칼 소거능을 가졌음을 확인하였다. 이러한 결과들은 willamette 품종 라즈베리추출물이 항산화 활성을 가지는 효과적인 화장품 소재로 적용 가능하다는 것을 시사한다.

**Abstract:** In this study, *Rubus idaeus* (Raspberry) cultivar ‘Willamette’ fruit extract(RIFE) was prepared from the freeze-dried raspberry powder, *n*-hexane and ethyl acetate, and then the phenolic compound content, ferric reducing ability, and radical scavenging ability were measured. The raspberry cultivar ‘willamette’, ‘polka’, and ‘polana’ compound fruit extract did not show cytotoxicity up to the concentration of 10%. As a result of conducting an experiment at the concentration, it was confirmed that the total phenolic compound content was 375.3 ppm, and the total flavonoid content was 43.46 ppm, and the ferric reducing ability by ferric reducing antioxidant power (FRAP) reagent was equivalent to  $\text{FeSO}_4$  0.532 mM. It was confirmed that 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability was  $94.5 \pm 0.7\%$ , and the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging ability was  $99.4 \pm 2.82\%$ , and the nitric oxide (NO) radical scavenging activity was  $88.5 \pm 0.4\%$ . When compared with the L-ascorbic acid ‘standard’ solution, DPPH radical scavenging ability was between 25 - 50 ppm / ABTS radical scavenging

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: shattrath@green-cos.com)  
call: 070-4892-4812

ability was close to 100 ppm / NO radical scavenging ability was more than 1,000 ppm. These results suggest that the raspberry cultivar 'willamette' fruit extract could be applied as an effective cosmetic material with antioxidant activity.

**Keywords:** *Rubus idaeus* (Raspberry) fruit extract, willamette cultivar, phenolic compounds, anti-oxidant, radical scavenging ability

## 1. 서 론

산소를 이용하여 에너지를 생산하는 생물은 대사 부산물로서 활성 산소를 생산한다. 이러한 활성 산소는 세포의 신호 전달에 중요한 역할을 하기 때문에 적당한량의 활성 산소는 생명체의 기능 유지에 꼭 필요하다. 이 중 피부의 활성 산소는 환경에서 유래하여 생성된 외인성 산화물이나 호흡으로 인하여 생성된 내인성 산화물들에 의하여 발생한다. 이렇게 발생하는 활성 산소가 과다해지면 피부를 비롯한 장기의 과사, 노화 및 염증 반응을 일으킨다고 알려져 있다. 더불어 피부의 노화가 진행될수록 피부에서 생성된 활성 산소를 제거하는 능력이 점점 감소하고 염증 반응이 증가한다[1]. 이 때문에 어린 피부와는 달리 노화된 피부는 활성 산소에 대한 반응이 매우 취약하며, 결론적으로 노화된 피부에서 활성 산소를 제거하는 것은 피부의 노화 및 염증 반응을 줄이는데 매우 중요하다.

대한민국은 2017년에 노인 인구가 전체의 14% 이상인 고령사회로 진입하면서 피부미백, 주름개선과 같은 항산화 화장품에 대해 소비자들의 관심도가 높아지고 있으며, 젊은 층에서도 항산화 기능성 화장품 소비가 증가하고 있다. 2011년 세계 화장품 시장규모는 2,428 억 달러로 전년 대비 3.9% 증가하였는데, 이중 2010년 항산화 화장품의 세계 시장규모는 463 억 달러로 전년 대비 4.4% 증가하였다. 즉 전체 화장품 시장 성장률보다 항산화 화장품 시장 성장률이 더 높고, 시장 전망이 밝다는 것을 알 수 있다. 현재 항산화 원료는 레티놀 및 유도체를 비롯한 비타민 A 관련 소재, 아데노신 등의 DNA 관련 소재 그리고 아세틸헥사 펩타이드-8, 팔미토일올리고펩타이드, 팔미토일테트라펩타이드-7 등의 펩타이드류 등을 들 수 있다. 하지만, 이러한 소재의 대부분은 차광이 필요하거나 저온 보관이 요구되는 등 특수한 보관 조건을 요구하고 있는 상황이며, 이에 따라 천연소재를 기반으로 한 항산화 원료의 개발이 활발히 수행되고 있다.

라즈베리는 낙엽관목으로 잔가시가 있으며 줄기는 대개 곧게 선다. 잎은 어긋나고, 꽃은 봄에 흰색으로 피며, 꽃잎과 꽃받침은 5 개이다. 열매는 집합과로 여름에 익으며, 익

은 열매는 꽃 턱에서 잘 떨어진다. 유럽산과 북아메리카산 등 여러 종이 있으며 열매를 먹기 위하여 재배한다. 라즈베리에는 페놀 화합물 50 종류 이상과[2-4], 페놀 화합물의 한 종류인 플라보노이드 류가[2] 포함되어 있으며 안토시아닌을 포함하고 있어 항산화 활성능력을 가지고 있다[5-7]. 선행 연구결과에 따르면 이런 여러 종들의 라즈베리 중 특히 Willamette 품종의 라즈베리가 안토시아닌의 함량과 철 이온 환원능력이 제일 우수한 것으로 알려져 있다[8]. 따라서 본 연구에서는 Willamette 품종의 동결건조라즈베리분말로부터 라즈베리추출물을 제조한 다음 페놀 화합물 함량 분석, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 분석, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 라디칼 소거능 분석, nitric oxide (NO) 라디칼 소거능 분석, ferric reducing antioxidant power (FRAP) reagent를 이용한 철 이온 환원능력 분석을 통해 항산화 활성을 가지는 효과적인 화장품 소재로의 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 라즈베리추출물 제조

라즈베리추출물의 제조는 선행 연구결과[8]의 방법에서 추출용매로 화장품 내 금지성분인 methanol 대신 *n*-hexane과 ethyl acetate로 변경하여 제조하였다. Willamette 품종의 동결건조 라즈베리(*Rubus idaeus* (Raspberry) fruit)분말은 숨인터내셔널(주)(Korea)에서 구입하였고 동결건조 라즈베리파우더를 10 배당량의 ethanol (Daejung, Korea)에 용해시켰다. 용해시킨 라즈베리파우더를 45 °C에 4 h 동안 중탕기(JSWB-11T, JSR, Korea)로 추출해 라즈베리추출액을 얻었다. 얻은 라즈베리추출액을 1.2 µm filter를 이용하여 여과한 다음, 1 µm, 0.8 µm, 0.45 µm filter에 대해서도 반복하여 라즈베리여과물을 만들었다. 여과한 라즈베리여과물을 45 °C에서 40 mBar가 될 때까지 회전증발농축기(Rotavapor R200, BUCHI, Switzerland)로 농축하여 라즈베리농축액을 얻었다. 얻은 라즈베리농축액을 20 배당량의 가운수와 동량의 *n*-hexane (Samchun Chemical, Korea)을 추가한 다음

혼합하고 n-hexane 층을 얻는 과정을 3 회 반복하였다. n-Hexane 층들을 얻고 남은 액에 동량의 가온수와 ethyl acetate (Samchun Chemical, Korea)를 추가한 다음 ethyl acetate 층을 얻는 과정을 3 회 반복하였다. 얻은 ethyl acetate 층들을 45 °C에서 180 mBar가 될 때까지 회전증발농축기로 농축하여 라즈베리추출원액을 얻었다. 마지막으로 라즈베리추출원액에 가온수와 방부제를 추가하여 라즈베리추출물 (*Rubus idaeus* (Raspberry) fruit extract, RIFE)을 얻었다.

## 2.2. 라즈베리추출물의 세포독성 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) 시약을 이용한 세포 생존율로 측정하였다. 96 well plate에  $10^5$  cells / well의 농도로 세포 (L929, fibroblast cell line)를 분주한 다음, 라즈베리추출원액을 농도별(1 - 20%)로 각 well에 첨가하였다. 그 후 시험 물질이 충분히 노출될 수 있도록 plate를 37 °C, 5%, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 24 h 동안 배양하였다. 배양한 plate에 2 - 5 mg / mL MTT 용액을 첨가한 다음, 37 °C, 5%, CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 추가로 4 h 방치하였다. 방치한 plate에 Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)를 분주한 다음, 차광상태에서 plate를 20 min 동안 충분히 흔들어 준 후, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reader (ELISA reader, SpectraMax<sup>®</sup> ABS plus, Molecular devices, USA)를 사용하여 570 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 측정 후 가로축 값을 시료의 종류, 세로축 값을 가로축에 해당하는 시료의 흡광도 ÷ 라즈베리추출원액을 첨가하지 않은 시료의 흡광도 × 100 으로 하는 막대그래프를 그렸다.

## 2.3. 라즈베리추출물의 페놀 화합물 함량 측정

페놀 화합물 함량은 Folin-Denis법[9]을 변경하여 측정하였다. Galic acid (Sigma, USA)를 정제수에 용해시켜 1,000 / 500 / 250 / 125 / 62.5 ppm galic acid 용액을 제조하였다. 정제수와 folin-ciocalteu's phenol reagent 2 N (Sigma, USA)을 1 : 1로 혼합하여 1 N folin-ciocalteu's phenol reagent를 제조하였다. 96 well plate에 10% 라즈베리추출원액 10  $\mu$ L와 1 N folin-ciocalteu's phenol reagent 10  $\mu$ L를 혼합하였다. 96 well plate에 각기 다른 농도의 galic acid 용액 10  $\mu$ L와 1 N folin-ciocalteu's phenol reagent 10  $\mu$ L를 혼합하여 standard 시료들을 제조하였다. 96 well plate에 정제수 10  $\mu$ L와 1 N folin-ciocalteu's phenol reagent 10  $\mu$ L를 혼합하여

blank시료를 제조한 다음, 암실에서 3 min 동안 방치하였다. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydrous (Daejung, Korea)를 정제수에 용해시켜 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 제조하였다. 96 well plate에 있는 시료들에 정제수 130  $\mu$ L와 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 20  $\mu$ L를 추가로 혼합하였다. 96 well plate를 암실에서 1 h 방치한 다음, ELISA reader를 사용하여 765 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 가로축 값을 galic acid 용액의 농도, 세로축 값을 galic acid 용액들의 흡광도(농도에 따라 변동) - blank의 흡광도(농도 상관없이 고정)으로 하는 꺾은선형 그래프를 그린 다음, 네 점의 standard를 잇는 선형 추세선을 그렸다. 10% 라즈베리추출원액의 혼합물의 흡광도 - blank의 흡광도 값을 계산한 다음 선형 추세선에 대입하고 galic acid 값을 읽어 10% 라즈베리추출원액에 포함된 페놀 화합물의 양을 산출하였다.

## 2.4. 라즈베리추출물의 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드 함량은 Lamaison 등의 방법[10]을 변경하여 측정하였다. Quercetin (Sigma, USA)을 ethanol에 용해시켜 1,000 / 500 / 250 / 125 / 62.5 ppm quercetin 용액을 제조하였다. Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O (Duksan, Korea) 7.15 g을 50 mL 정제수에 용해시켜 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 용액을 제조하였다. CH<sub>3</sub>COOK (Duksan, Korea) 4.907 g을 50 mL 정제수에 용해시켜 1 M CH<sub>3</sub>COOK 용액을 제조하였다. 96 well plate에 10% 라즈베리추출원액 20  $\mu$ L와 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 4  $\mu$ L, 1 M CH<sub>3</sub>COOK 4  $\mu$ L을 투입 후 혼합하였다. 96 well plate에 각기 다른 농도의 quercetin 용액 20  $\mu$ L와 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 4  $\mu$ L, 1 M CH<sub>3</sub>COOK 4  $\mu$ L을 투입 후 혼합하여 standard 시료들을 제조하였다. 96 well plate에 정제수 20  $\mu$ L와 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 4  $\mu$ L, 1 M CH<sub>3</sub>COOK 4  $\mu$ L을 투입 후 혼합하여 Blank 시료를 제조하였다. 96 Well Plate에 있는 시료들에 ethanol 172  $\mu$ L를 추가로 혼합하고 실온에서 40 min 방치한 다음 ELISA reader를 사용하여 415 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 가로축 값을 quercetin 용액의 농도, 세로축 값을 quercetin 용액들의 흡광도(농도에 따라 변동) - blank의 흡광도(농도 상관없이 고정)으로 하는 꺾은선형 그래프를 그린 다음 네 점의 standard를 잇는 선형 추세선을 그렸다. 10% 라즈베리추출원액 혼합물의 흡광도 - blank의 흡광도 값을 계산한 다음 선형 추세선에 대입하고 quercetin 값을 읽어 10% 라즈베리추출원액에 포함된 플라보노이드 화합물의 양을 산출하였다.

## 2.5. 라즈베리추출물의 철 이온 환원능력 측정

Acetate buffer, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 용액,  $\text{FeCl}_3$  용액을 혼합하여 제조하는 ferric reducing antioxidant power (FRAP) reagent를 이용한 철 이온 환원능력 측정은 Benzie 등의 방법[11]을 변경하여 측정하였다. 0.1 N HCl (Daejung, Korea)과 정제수를 2 : 3 비율로 혼합하여 40 mM HCl 용액을 제조하였다. 2.4609 g의  $\text{CH}_3\text{COONa}$ 를 100 mL의 정제수에 용해시켜 300 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  용액을 제조하였다. 1.8015 g의  $\text{CH}_3\text{COOH}$ 를 100 mL의 정제수에 용해시켜 300 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  용액을 제조하였다. 0.3123 g의 TPTZ (Supelco, Germany)를 10 mL의 HCl 용액에 용해시켜 10 mM TPTZ 용액을 제조하였다. 0.0324 g의  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, USA)를 10 mL의 정제수에 용해시켜 20 mM  $\text{FeCl}_3$  용액을 제조하였다. 제조한 300 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  용액과 300 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  용액을 혼합하여 pH를 3.6으로 조정된 acetate buffer를 제조하였다. 제조한 acetate buffer : TPTZ 용액 :  $\text{FeCl}_3$  용액을 10 : 1 : 1로 혼합하여 FRAP reagent를 제조한 다음, 37 °C incubator 안에 방치하여 가온시켰다. 0.0278 g의  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, USA) 100 mL의 정제수에 용해시켜 1 mM  $\text{FeSO}_4$  용액을 제조한 다음, 정제수에 희석하여 0.5 / 0.25 / 0.125 mM  $\text{FeSO}_4$  용액을 제조하였다. 96 well plate에 10% 라즈베리추출원액 50  $\mu\text{L}$ 와 FRAP Reagent 100  $\mu\text{L}$ 를 투입 후 혼합하여 Standard 시료를 제조하였다. 96 well plate에 각기 다른 농도의  $\text{FeSO}_4$  용액 50  $\mu\text{L}$ 와 FRAP reagent 100  $\mu\text{L}$ 를 투입 후 혼합하여 control 시료들을 제조하였다. 96 well plate에 10% 라즈베리추출원액 50  $\mu\text{L}$ 와 정제수 100  $\mu\text{L}$ 를 투입 후 혼합하여 blank 시료를 제조하였다. 96 well plate에 각기 다른 농도의  $\text{FeSO}_4$  용액 50  $\mu\text{L}$ 와 정제수 100  $\mu\text{L}$ 를 투입 후 혼합하여 추가 blank 시료들을 제조하였다. 제조한 시료들이 담긴 96 well plate를 37 °C에서 1 h 동안 방치한 다음 ELISA reader를 사용하여 593 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 가로축 값을  $\text{FeSO}_4$  용액의 농도, 세로축 값을  $\text{FeSO}_4$  용액들의 흡광도(농도에 따라 변동) - blank의 흡광도(농도 상관없이 고정)으로 하는 꺾은선형 그래프를 그린 다음, 네 점의 standard를 잇는 선형 추세선을 그렸다. 10% 라즈베리추출원액 혼합물의 흡광도 - blank의 흡광도 값을 계산한 다음 선형 추세선에 대입하고  $\text{FeSO}_4$  값을 읽어 10% 라즈베리추출원액이 몇 농도의  $\text{FeSO}_4$ 에 해당하는 철 이온 환원효과를 가지는지 한 산하였다.

## 2.6. 라즈베리추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능은 Blois의 방법[12]을 변경하여 측정하였다. L-ascorbic acid (Daejung, Korea)를 ethanol에 용해시켜 100 / 50 / 25 ppm L-ascorbic acid 용액을 제조하였다. DPPH (Sigma, USA) 1.5772 mg을 10 mL 정제수에 용해시켜 DPPH 시약을 제조하였다. 96 well plate에 10% 라즈베리추출원액 100  $\mu\text{L}$ 와 DPPH 시약 100  $\mu\text{L}$ 을 투입 후 혼합하여 sample 시료를 제조하였다. 96 well plate에 각기 다른 농도의 L-ascorbic acid 용액 100  $\mu\text{L}$ 와 DPPH 시약 100  $\mu\text{L}$ 을 투입 후 혼합하여 standard 시료들을 제조하였다. 96 well plate에 정제수 100  $\mu\text{L}$ 와 DPPH 시약 100  $\mu\text{L}$ 을 투입 후 혼합하여 control 시료를 제조하였다. 96 well plate에 정제수를 투입하여 blank 시료를 제조하였다. 제조한 시료들이 담긴 96 well plate를 실온에서 30 min 방치하였다. 방치한 96 well plate를 ELISA reader를 사용하여 520 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 측정 후 가로축 값을 시료의 종류, 세로축 값을 (control의 흡광도 - 가로축에 해당하는 시료의 흡광도) ÷ control × 100의 흡광도로 하는 막대그래프를 그렸다.

## 2.7. 라즈베리추출물의 ABTS 라디칼 소거능 측정

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 라디칼 소거능 측정은 Re 등의 방법[13]을 변경하여 측정하였다. L-ascorbic acid를 ethanol에 용해시켜 200 / 100 / 50 / 10 ppm L-ascorbic acid 용액을 제조하였다. 0.038 g의 ABTS (Sigma, USA)를 10 mL의 정제수에 용해시켜 7 mM ABTS 용액을 제조하였다. 0.013 g의  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Sigma, USA)를 20 mL의 정제수에 용해시켜 2.4 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  용액을 제조하였다. ABTS 용액과  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  용액을 1 : 1 비율로 혼합한 다음 16 - 24 h 동안 실온, 암실조건에 방치하였다. 방치한 용액을 734 nm에서 0.7의 흡광도를 나타내는 만큼 정제수로 희석하여 ABTS+ 용액을 제조하였다. 96 well plate에 ABTS+ 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 정제수 100  $\mu\text{L}$ 와 혼합하여 control 시료를 제조하였다. 96 well plate에 ABTS+ 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 각기 다른 농도의 L-ascorbic acid 용액 100  $\mu\text{L}$ 와 혼합하여 Sample 1 시료들을 제조하였다. 96 well plate에 정제수 100  $\mu\text{L}$ 와 각기 다른 농도의 L-ascorbic acid 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 sample 1 blank 시료들을 제조하였다. 96 well plate에 ABTS+ 용액 100  $\mu\text{L}$ 와 10% 라즈베리추출원액 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 Sample 2 시료를 제조하였다. 96 well plate에 정제수 100  $\mu\text{L}$ 와 10% 라즈



베리추출원액 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 sample 2 blank 시료를 제조하였다. 제조한 시료가 담긴 96 well plate를 ELISA reader를 사용하여 734 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을  $(1 - (\text{sample의 흡광도} - \text{sample blank의 흡광도}) / \text{control의 흡광도}) \times 100$  식에 대입하여 ABTS scavenging ability 값을 구하였다.

## 2.8. 라즈베리추출물의 Nitric Oxide(NO) 라디칼 소거능 측정

Nitric oxide (NO) 라디칼 소거능 측정은 Song 등의 방법 [14]을 변형하여 측정하였다. 0.0069 g의  $\text{NaNO}_2$  (Sigma, USA)를 100 mL의 정제수에 용해시켜 1 mM  $\text{NaNO}_2$  용액을 제조하였다. 2.4609 g의  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Daejung, Korea)를 100 mL의 정제수에 용해시켜 300 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  용액을 제조하였다. 1.8015 g의  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Daejung, Korea)를 100 mL의 정제수에 용해시켜 300 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  용액을 제조하였다. 1-Naphthylamine (Sigma, USA)을 30%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  용액에 용해시켜 1% 1-naphthylamine 용액을 제조하였다. Sulfanilic acid (Sigma, USA)를 30%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  용액에 용해시켜 1% sulfanilic acid 용액을 제조하였다. 제조한 1% 1-naphthylamine 용액과 1% sulfanilic acid 용액을 1 : 1로 혼합하여 griess reagent를 제조하였다. 제조한 300 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  용액과 300 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  용액을 혼합하여 pH를 4.0으로 조정된 acetate buffer를 제조하였다. 96 well plate에 10% 라즈베리추출원액 30  $\mu\text{L}$ 와 acetate buffer 140  $\mu\text{L}$ 를 투입 후 혼합하여 standard 시료를 제조하였다. 96 well plate에 1 mM  $\text{NaNO}_2$  용액 30  $\mu\text{L}$ 와 acetate buffer 140  $\mu\text{L}$ 를 투입 후 혼합하여 control 시료를 제조하였다. 제조한 시료들이 담긴 96 well plate를 37  $^\circ\text{C}$ 에서 1 h 동안 방치한 다음, 해당 시료들에 추가로 griess reagent 70  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 sample 시료를 제조하였다. 추가로 해당 시료들에 griess reagent 대신 정제수 70  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 blank 시료를 제조하였다. 혼합한 96 well plate를 추가로 실온에서 15 min 동안 방치한 다음, ELISA reader를 사용하여 520 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을  $(1 - (\text{sample의 흡광도} - \text{sample blank의 흡광도}) / (\text{control의 흡광도} - \text{control blank의 흡광도})) \times 100$  식에 대입하여  $\text{NO}_2^-$  radical scavenging ability 값을 구하였다. 추가로 L-ascorbic acid를 ethanol에 용해시켜 1,000 / 500 ppm L-ascorbic acid 용액을 제조한 다음, 10% 라즈베리추출물 대신 혼합하여 위의 과정을 반복하였고, 5% / 2% 라즈베리추출물에도 위의 과정을 반복하였다.

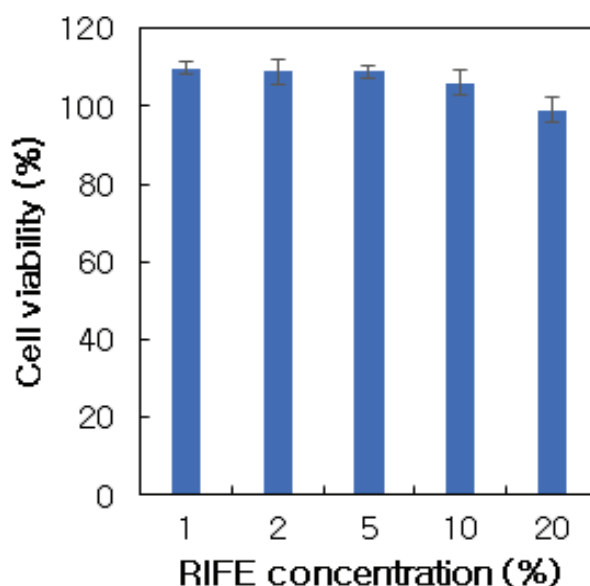
## 2.9. 통계처리

모든 측정값은 3 회 분석하여 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 일원 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA) 및 tukey test를 적용하여  $p < 0.05$ 를 만족하는 유의성 검정을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. *Rubus idaeus* (Raspberry) Fruit Extract(RIFE)의 세포독성 측정

설정된 여러 농도의 라즈베리추출원액을 세포에 첨가하여 배양한 결과, 10% 이하 모든 농도의 라즈베리추출원액에서 L929 세포에 대해 100% 이상의 세포생존율을 나타내다가 20% 농도에서  $99 \pm 3.1\%$ 의 세포생존율을 나타내었다 (Figure 1). 이러한 결과는 먼저 추출물을 제조할 때 n-hexane과 ethyl acetate를 용매로 사용할 경우 세포독성에 영향을 거의 미치지 않는다는 것을 알 수 있으며, 또한 라즈베리추출원액의 농도가 10%를 초과하면 항산화 효능의 과다로 활성 산소가 필요 이상으로 감소하여, 생명 현상을 둔화시킨 것으로 인해 측정할 수 있는 생존율 또한 낮아진다고

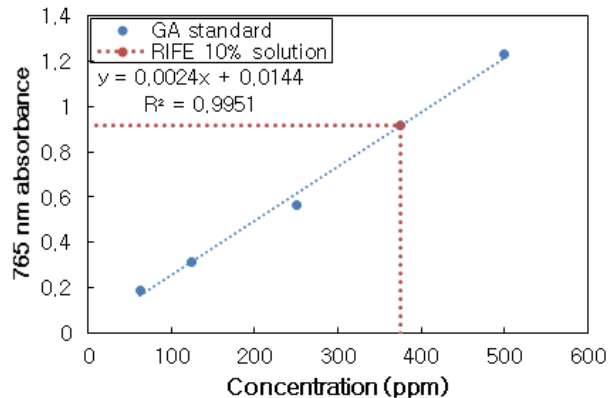


**Figure 1.** Cell viability of various concentration of RIFE solution on L929 cells by MTT assay. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistically significant from the control ( $p < 0.05$ ). RIFE, *Rubus idaeus* (raspberry) cultivar 'willamette' fruit extract; MTT, 3-(4,5-dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide.

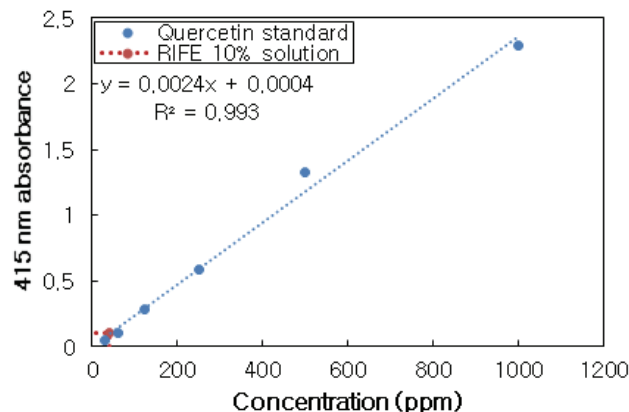
유추할 수 있다. 해당 결과를 바탕으로 추가 실험은 세포 독성이 나타나지 않은 최대 농도인 라즈베리추출원액 10% 용액에 대해 진행하였다.

### 3.2. RIFE의 페놀 화합물 함량 측정

여러 농도의 galic acid 용액들의 흡광도를 측정한 결과를 바탕으로 도출한 galic acid 농도에 따른 흡광도와 standard curve, 이를 바탕으로 역산한 라즈베리추출원액 10% 용액의 페놀 화합물 함량은 다음과 같다(Figure 2). Standard



**Figure 2.** 765 nm absorbance of GA standard solutions and phenolic compound concentration equivalent of RIFE 10% solution. 765 nm absorbance of RIFE 10% solution was 0.915. Calculating with GA standard curve, phenolic compound concentration of RIFE 10% solution was equal to 375.3 ppm of GA. GA, galic acid.



**Figure 3.** 415 nm absorbance of quercetin standard solutions and flavonoid concentration equivalent of RIFE 10% solution. 415 nm absorbance of RIFE 10% solution was 0.1047. Calculating with quercetin standard curve, flavonoid concentration of RIFE 10% solution was equal to 43.46 ppm of quercetin.

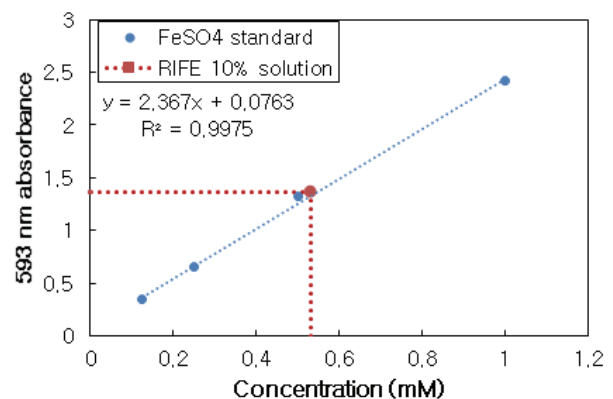
curve를 바탕으로 추세선 식( $y = 0.0024x + 0.0144$ )을 도출한 다음, 라즈베리추출원액 10% 용액의 765 nm에 대한 흡광도를 측정한 결과 0.9150으로 나타났다. 해당 흡광도 식을 y값에 대입한 다음, 추세선 식을 바탕으로 x값을 계산한 결과 라즈베리추출원액 10% 용액은 375.3 ppm의 페놀 화합물을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

### 3.3. RIFE의 플라보노이드 함량 측정

여러 농도의 quercetin 용액들의 흡광도를 측정한 결과를 바탕으로 도출한 quercetin 농도에 따른 흡광도와 standard curve, 이를 바탕으로 역산한 라즈베리추출원액 10% 용액의 플라보노이드 함량은 다음과 같다(Figure 3). Standard curve를 바탕으로 추세선 식( $y = 0.0024x + 0.0004$ )을 도출한 다음, 라즈베리추출원액 10% 용액의 415 nm에 대한 흡광도를 측정한 결과 0.1047로 나타났다. 해당 흡광도 식을 y값에 대입한 다음, 추세선 식을 바탕으로 x값을 계산한 결과 라즈베리추출원액 10% 용액은 43.46 ppm의 플라보노이드를 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

### 3.4. RIFE의 철 이온 환원능력 측정

여러 농도의  $\text{FeSO}_4$  용액들의 흡광도를 측정한 결과를 바탕으로 도출한  $\text{FeSO}_4$  농도에 따른 흡광도와 standard curve, 이를 바탕으로 역산한 라즈베리추출원액 10% 용액의 철 이온 환원능력은 다음과 같다(Figure 4). Standard curve를 바탕으로 추세선 식( $y = 2.367x + 0.0763$ )을 도출한



**Figure 4.** 593 nm absorbance of  $\text{FeSO}_4$  standard solutions and FRAP equivalent of RIFE 10% solution. 593 nm absorbance of RIFE 10% solution was 1.3708. Calculating with  $\text{FeSO}_4$  standard curve, FRAP of RIFE 10% solution was equal to 0.532 mM of  $\text{FeSO}_4$ . FRAP, ferric reducing antioxidant power.

다음, 라즈베리추출원액 10% 용액의 593 nm에 대한 흡광도를 측정된 결과 1.3708로 나타났다. 해당 흡광도 식을  $y$  값에 대입한 다음, 추세선 식을 바탕으로  $x$ 값을 계산한 결과 라즈베리추출원액 10% 용액은  $\text{FeSO}_4$  0.532 mM에 해당하는 철 이온 환원능력을 가지고 있음을 보였다.

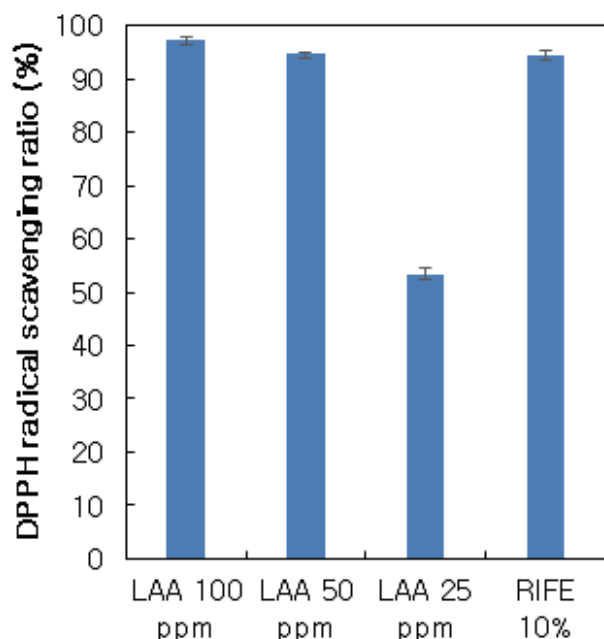
### 3.5. RIFE의 DPPH 라디칼 소거능 측정

세 농도의(100 / 50 / 25 ppm) L-ascorbic acid와 라즈베리추출원액 10%의 흡광도를 측정된 결과를 바탕으로 계산한 DPPH 라디칼 소거율은 다음과 같다(Figure 5). L-ascorbic acid 용액의 경우 100 ppm에서  $97.3 \pm 0.5\%$ 의 매우 높은 소거 활성을 보였고, 50 ppm에서도  $94.8 \pm 0.1\%$ 로 100 ppm과 유사한 높은 소거 활성을 보였다. 그러나 25 ppm에서는  $53.3 \pm 1.4\%$ 의 소거 활성을 보여 라디칼 소거율이 급격히 떨어지는 모습을 보였다. 라즈베리추출원액 10% 용액의 경우,  $94.5 \pm 0.7\%$ 의 소거 활성을 보였다. 선행연구[8]에서 나타난 소거율인 40.68 - 47.96%보다 높은 결과값을 나타냈는데, 선행연구의 라즈베리추출물은 동결건조 라즈베리 0.5 g에 80% methanol 용액 20 mL를 추가하여 균질 혼합 후 원심분리를 통과한 것을 여과하여 제조하였기 때

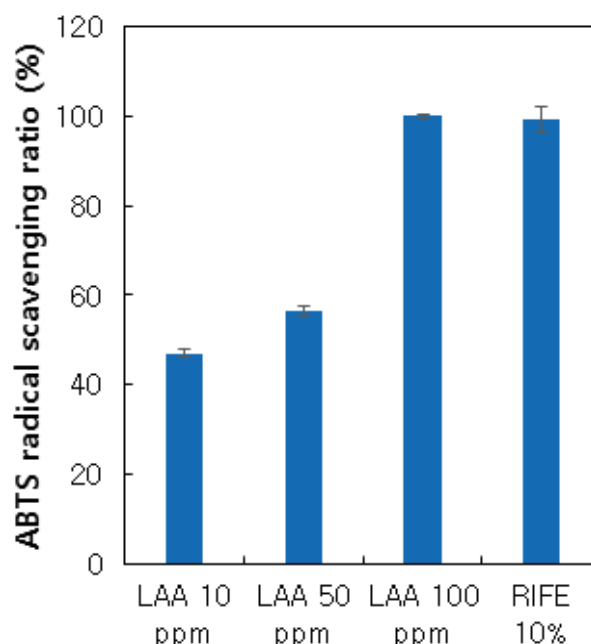
문에 고형분 대비 용액농도로 환산 시 약 3%의 농도를 나타내어 본 연구에서 제조한 농도보다 낮다. 정량적인 데이터의 비교는 추가 실험을 할 필요가 있으나, 정성적으로 *n*-hexane과 ethyl acetate를 이용한 추출물도 라디칼 소거능을 유지하는 것을 알 수 있다. 라즈베리추출원액 10% 용액의 DPPH 라디칼 소거율은 항산화 능력이 우수하다고 알려진 L-ascorbic acid 50 ppm에 비해 통계적으로 유의하다고 할 만큼 비교우위에 있다고 할 수는 없으나, L-ascorbic acid의 경우 특유의 높은 항산화 활성으로 인한 불안정성 때문에 범용적인 화장품 소재로 쓰이기 어려운 만큼 라즈베리추출물은 항산화 활성을 가지는 효과적인 화장품 소재로 사용될 가능성이 충분하다고 할 수 있다.

### 3.6. RIFE의 ABTS 라디칼 소거능 측정

250 ppm L-ascorbic acid와 라즈베리추출원액 10%의 흡광도를 측정된 결과를 바탕으로 계산한 ABTS 라디칼 소거율은 다음과 같다(Figure 6). 100 ppm L-ascorbic acid의 경우  $99.95 \pm 0.34\%$ 의 매우 높은 소거 활성을 보였으나 50 ppm에서는  $56.6 \pm 1.18\%$ 의 소거 활성을 보여 라디칼 소거율이 급격히 떨어지는 모습을 보였다. 한편 라즈베리추출



**Figure 5.** DPPH radical scavenging ratio of LAA and RIFE solution. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistically significant from the control( $p < 0.05$ ). DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; LAA, L-Ascorbic Acid.



**Figure 6.** ABTS radical scavenging ratio of LAA and RIFE solution. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistically significant from the control( $p < 0.05$ ). ABTS, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt.

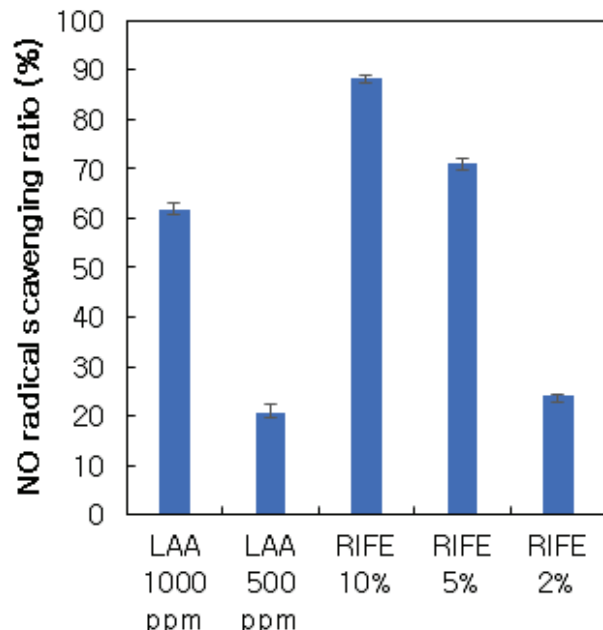
원액 10% 용액의 경우  $99.4 \pm 2.82\%$ 의 소거 활성을 보였으며, L-ascorbic acid 50 ppm보다 통계적으로 유의하게 비교우위에 있어 DPPH 라디칼 소거보다 더 효율적인 결과를 나타냈다.

### 3.7. RIFE의 Nitric Oxide(NO) 라디칼 소거능 측정

라즈베리추출원액 10%의 흡광도를 측정한 결과를 바탕으로 계산한 NO 라디칼 소거율은 다음과 같다(Figure 7). L-ascorbic acid 용액의 경우 1,000 ppm에서  $61.7 \pm 1.3\%$ 의 소거 활성을 보였고, 500 ppm에서  $20.6 \pm 1.1\%$ 의 소거 활성을 보여 다른 라디칼 소거능 측정에 비해 낮은 결과 값을 보였다. 라즈베리추출원액 10% 용액은  $88.5 \pm 0.4\%$ 의 소거 활성을 보여 추가로 희석하여 실험을 진행하였다. 그 결과 라즈베리추출원액 5% 용액은  $70.9 \pm 1.09\%$ 의 소거 활성을 보였고, 라즈베리추출원액 2% 용액은  $24 \pm 0.4\%$ 의 소거 활성을 보여 5% 용액도 L-ascorbic acid 1,000 ppm 용액보다 높은 NO라디칼 소거율을 보여주는 것을 확인하였다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 항산화 활성을 지니는 화장품 소재로서



**Figure 7.** NO radical scavenging ratio of LAA and RIFE solution. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistically significant from the control( $p < 0.05$ ). NO, nitric oxide.

Willamette 품종의 라즈베리(*Rubus idaeus*)를 발굴하였다. Willamette 품종의 동결건조라즈베리분말, *n*-hexane과 ethyl acetate로 제조한 라즈베리추출물은 페놀 화합물의 경우 375.3 ppm, 플라보노이드의 경우 43.46 ppm의 함유량을 보였으며, FeSO<sub>4</sub> 0.532 mM에 해당하는 철 이온 환원능력을 가지고 있었음을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 항산화 소재의 대표적 원료인 L-ascorbic acid와 비교하는 라디칼 소거능 실험을 실시하였다. 실험 결과 라즈베리추출원액 10% 용액은 L-ascorbic acid 25 - 50 ppm 사이의 효능을 지닌 DPPH 라디칼 소거능 / 100 ppm에 근접한 효능을 지닌 ABTS 라디칼 소거능 / 1,000 ppm 이상의 효능을 지닌 NO 라디칼 소거능을 가졌음을 확인하였다. 이상의 결과에서 Willamette 품종의 라즈베리추출물은 항산화 소재로서 그 효능을 제시하였고, 천연 항산화 화장품 성분으로서 개발 가치가 충분하다고 사료된다.

## Acknowledgement

본 연구는 2018년도 중소벤처기업부의 기술개발사업 지원에 의한 연구임 [S2582425]

## Reference

1. H. Y. Chung and Y. K. Kim, Age-associated alteration in the hepatic superoxide generation and antioxidant activities in the senescence-accelerated mice, *Yakhak Hoeji*, **36**(5), 460 (1992).
2. E. Carvalho, P. Franceschi, A. Feller, L. Palmieri, R. Wehrens, and S. Martens, A targeted metabolomics approach to understand differences in flavonoid biosynthesis in red and yellow raspberries, *Plant Physiol. Biochem.*, **72**(11), 80 (2013).
3. U. Szymanowska, B. Baraniak, and A. Bogucka-Kocka, Antioxidant, anti-inflammatory, and postulated cytotoxic activity of phenolic acid and anthocyanin-rich fractions from polana raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit and juice - *in vitro* study, *Molecules*, **23**(7), 4 (2018).
4. S. P. Mazur, A. Nes, A. Wold, S. F. Remberg, and K. Aaby, Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during



- three harvest seasons, *Food Chem.*, **160**(19), 237 (2014).
5. H. H. Kang, Ph. D. Dissertation, Gyeongsang National Univ., Jinju, Korea (2009).
  6. H. J. Chang, E. H. Choi, and H. S. Chun, Quantitative structure-activity relationship (QSAR) of antioxidative anthocyanidins and their glycosides, *Food Sci. Biotechnol.*, **17**(3), 501 (2008)
  7. R. A. Moyer, K. E. Hummer, C. E. Finn, B. Frei, and R. E. Wrolstad, Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(3), 519 (2002)
  8. A. Kostecka-Gugała, I. Ledwożyw-Smoleń, J. Augustynowicz, G. Wyżgolik, M. Kruczek, and P. Kaszycki, Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe, *Open Chem.*, **13**(1), 1313 (2015)
  9. V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Meth. Enzymol.*, **299**(2), 152 (1999)
  10. J. L. Lamaison, and A. Carnet, Content of main flavonoids in flowers and leaves of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. in relation with development stages, *Pharm. Acta Helv.*, **25**(1), 12 (1991)
  11. I. F. F. Benzie and J. J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal. Biochem.*, **239**(1), 70 (1996).
  12. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958).
  13. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9-10), 1231 (1999).
  14. H. S. Song and K. Y. Moon, *In vitro* antioxidant activity profiles of B-glucans isolated from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2, *Food Sci. Biotechnol.*, **15**(3), 437 (2006).
  15. J. I. Hong, H. J. Kim, and J. Y. Kim, Factors affecting reactivity of various phenolic compounds with the Folin-Ciocalteu reagent, *Korean J. Food & Nutr.*, **40**(2), 205 (2011).