



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2021년 08월  
석사학위논문

폴리페놀이 함유된 스위트  
체리 추출물의 항산화 및  
항염 활성

조선대학교 대학원

화학공학과

김 성 주

폴리페놀이 함유된 스위트  
체리 추출물의 항산화 및  
항염 활성

**Antioxidant and anti-inflammatory activity  
of sweet cherry (*Prunus avium L.*) extract  
containing polyphenols**

2021년 08월 27일

조선대학교 대학원

화학공학과

김 성 주

폴리페놀이 함유된 스위트  
체리 추출물의 항산화 및  
항염 활성

지도교수 신 현 재

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2 0 2 1 년 0 4 월

조선대학교 대학원

화학공학과

김 성 주

## 김성주의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이중현 (인) 

위 원 조선대학교 교수 이재욱 (인) 

위 원 조선대학교 교수 신현재 (인) 

2 0 2 1 년 0 5 월

조선대학교 대학원

# 목 차

<b>List of Tables</b> .....	<b>I</b>
<b>List of Figures</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>제 1 장 서론</b> .....	<b>1</b>
제 1 절 연구의 배경 .....	1
1. 스위트 체리 (sweet cherry, <i>Prunus avium</i> ) .....	1
2. 폴리페놀 (Polyphenols) .....	3
3. 항산화 (Antioxidation) .....	7
4. 염증 (inflammation) .....	15
제 2 절 연구 동향 및 구성 .....	19
1. 연구 동향 .....	19
2. 연구의 구성 .....	21
<b>제 2 장 재료 및 방법</b> .....	<b>23</b>
제 1 절 실험 재료 및 시약 .....	23

제 2 절 추출 및 분리 .....	24
제 3 절 총 폴리페놀화합물 함량 측정 .....	26
제 4 절 총 플라보노이드 함량 측정 .....	27
제 5 절 산지별 원물의 플라보놀 배당체 함량 분석 .....	28
1. High performance liquid chromatography (HPLC) .....	28
2. HPLC/Mass spectrometry (HPLC/MS) .....	30
제 6 절 항산화 활성 측정 .....	32
1. ABTS radical scavenging assay .....	32
2. DPPH radical scavenging assay .....	33
제 7 절 항염증 효능 측정 .....	34
1. 세포 배양 및 처리 .....	34
2. MTT assay .....	34
3. Nitric oxide (NO) assay .....	34
4. Western blot analysis .....	35
제 3 장 결과 및 고찰 .....	36
제 1 절 추출 조건 최적화 .....	36
1. 추출 수율 .....	36
제 2 절 총 페놀화합물 함량 측정 .....	38
제 3 절 총 플라보노이드 함량 측정 .....	40

제 4 절 산지별 원물의 플라보놀 배당체 함량 분석 .....	42
1. HPLC 분석결과 .....	42
2. HPLC/Mass 분석결과 .....	44
제 5 절 항산화 활성 측정 .....	49
1. ABTS radical scavenging activity .....	49
2. DPPH radical scavenging activity .....	51
제 6 절 항염증 효능 측정 .....	53
제 4 장 결론 .....	59
참고문헌 .....	61



## List of Tables

Table 1. Abbreviations of sweet cherry extract .....	25
Table 2. Analysis conditions of high performance liquid chromatography for flavonol glycosides analysis .....	30
Table 3. Analysis conditions of ultra high performance liquid chromatography for Flavonol glycosides analysis .....	32
Table 4. Extraction yields of <i>Prunus avium</i> L. extracts from domestic (Imsil region) (IW, IE, IEH, IEE, IEW), Poland (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and Chile (CW, CE, CEH, CEE, CEW) .....	38
Table 5. Flavonol glycosides contents of <i>P. avium</i> L. extract from domestic (IW, IE), Poland (PW, PE), and Chile (CW, CE) .....	44

## List of Figures

Figure 1. Various types of polyphenols. ....	4
Figure 2. Structural formula of flavonoids. ....	6
Figure 3. Antioxidant activities of antioxidant enzymes and antioxidants. ....	9
Figure 4. Mechanism of cell death and proliferation according to the concentration of active oxygen in the human body Nimism ....	10
Figure 5. From oxidation and reduction of alpha-tocopherol, L-ascorbic acid The antioxidant mechanism that comes ....	13
Figure 6. Representative formulas of carotenoids ....	14
Figure 7. Toll-like receptor 4 (TLR4) pathways. These pathways induce the transcription of pro-inflammatory mediators such as iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL-6.;lipopolysaccharide-binding protein (LBP), Myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88), nuclear factor kappa B (NF-kB), mitogen activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) ....	18
Figure 8. Isolation diagram of <i>Prunus avium</i> L. extracts from domestic (Imsil region) (IW, IE, IEH, IEE, IEW), Poland (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and Chile (CW, CE, CEH, CEE, CEW). ....	22
Figure 9. Total polyphenol contents of (A) <i>P. avium</i> L. extract (CW, CE, CEH, CEE, CEW), (B) <i>P. avium</i> L. (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and (C) <i>P. avium</i> L. extract (IW, IE, IEH, IEE, IEW). ....	40
Figure 10. Total flavonoid contents of (A) <i>P. avium</i> L. extract (CW, CE, CEH, CEE, CEW), (B) <i>P. avium</i> L. (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and (C) <i>P. avium</i> L. extract (IW, IE, IEH, IEE, IEW). ....	42
Figure 11. HPLC/MS profile of <i>P. avium</i> L. extracts from domestic (Imsil) (IW, IE),	

Poland (PW, PE), and Chile (CW, CE) and standard mixture using diode array detection at 370 nm. Numbers indicate the following: (1) quercetin dihydrate, (2) kaempferol, and (3) isorhamnetin. (A:IW, B:IE, C:CW, D:CE, E:PW, F:PE, G(G:Standard). ..... 46

Figure 12. Quercetin standard curve for HPLC. .... 47

Figure 13. Kaempferol standard curve for HPLC. .... 48

Figure 14. Isorhamnetin standard curve for HPLC. .... 49

Figure 15. ABTS antioxidant activity of (A) *P. avium* L. extract (CW, CE, CEH, CEE, CEW), (B) *P. avium* L. (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and (C) *P. avium* L. extract (IW, IE, IEH, IEE, IEW). The appropriate amount of vitamin C was used as a positive control. The results are the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. .... 51

Figure 16. DPPH free radical scavenging activity of (A) *P. avium* L. extract (CW, CE, CEH, CEE, CEW), (B) *P. avium* L. (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and (C) *P. avium* L. extract (IW, IE, IEH, IEE, IEW). The appropriate amount of vitamin C was used as a positive control. The results are the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. .... 53

Figure 17. Cell viability of RAW 264.7 cells with the extracts(A) CW, (B) PW, (C) IW, (D) CE, (E) PE, (F) IE. RAW 264.7 cells were treated with the extracts (50-800  $\mu$ g/mL) for 48 h. The results are the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). .... 55

Figure 18. Nitric oxide production of (A) CW, (B) PW, (C) IW (D) CE, (E) PE, (F) IE extracts. RAW 264.7 cells were treated with LPS alone (1  $\mu$ g/mL), or with LPS (1  $\mu$ g/mL) and (A) CW, (B) PW, (C) IW extracts (12.5-25  $\mu$ g/mL) for 48 h. The results are the mean  $\pm$  SD from three independent

experiments. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). ..... 57

Figure 19. Inhibition of iNOS expression and MAP kinase phosphorylation by IE in LPS-activated RAW 264.7 cells. (A) Effect of varying concentrations of IE on LPS-induced iNOS and COX-2 inhibition. (B) Immunoblotting for  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . Cells were pretreated with IE for 1 h before LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) stimulation for 15 min. .... 59

## ABSTRACT

### **Antioxidant and anti-inflammatory activity of sweet cherry (*Prunus avium L.*) extract containing polyphenols**

Seong Joo Kim.

Advisor: Prof. Hyun-Jae Shin, Ph.D.

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

The fruit of sweet cherry is highly popular by Korean consumers for its precociousness and quality such as sweet, color, and sour taste. Besides palatability, there is huge needs for the nutritional and functional information about sweet cheery nowadays. In this study, sequential solvent fractions of hot water extract and 70% ethanol extract were prepared from domestic (Imsil region) and foreign (Chile and Poland) sweet cherries (*Prunus avium L.*) to investigate their antioxidant and anti-inflammatory activities. The yield of the hot water extract from Chile one was 29.28%, and the solvent fraction yields of 70% ethanol, hexane, ethyl acetate (EA), and water residue were 28.49%, 0.6%, 1.14%, and 84.37%, respectively. The yield hot water extract from Poland was 30.39%, and the solvent fraction yields for 70% ethanol, hexane, ethyl acetate (EA), and water residue were 36.01%, 0.64%, 2.68%, and 84.57%, respectively. The yield of hot water extract from Imsil region was 22.66%, and the solvent fraction yields for 70% ethanol, hexane, ethyl acetate (EA), and water residue were 21.46%, 0.87%, 1.58%, and 90.58%, respectively. Water extract of Chilean cherry is CW, 70% alcohol extract CE, hexane extract CEH, ethyl acetate extract CEE, residue is CEW. And the water extract of Polish cherry is PW, 70% alcohol extract PE, hexane extract PEH, ethyl acetate extract PEE, and the residue is PEW. And the water extract of Imsil cherry

is IW, 70% alcohol extract IE, hexane extract IEH, ethyl acetate extract IEE, and the residue is IEW. The total polyphenols content of the fraction was high in CEE, PEE, and IEE, and the total flavonoid content was high in PEE and IEE. The total flavonoid content in CE was low. Analysis of flavonol glycosides using HPLC showed a high content in PW and PE, and flavonol glycosides were identified as a result of HPLC/MS in all of CW, CE, PW, PE, IW, and IE. ABTS radical scavenging showed high content in CEE ( $133.53 \pm 13.26$ ), PEE ( $62.27 \pm 3.08$ ), IEE ( $136.77 \pm 3.77$ ), and DPPH radical scavenging showed high content in CE ( $701.62 \pm 28.68$ ), PE ( $6084.10 \pm 39.65$ ), IE ( $133.53 \pm 39.93$ ) showed high antioxidant activity. To measure anti-inflammatory activity, cell viability was measured using RAW 264.7 cells for hot water extracts and 70% EtOH extracts from overseas (Chile, Poland) and domestic (Imsil). None of them showed any toxicity compared to the control group. After simultaneous administration of CW, CE, PW, PE, IW, and IE to RAW 264.7 cell treated with LPS, the concentration-dependent inhibitory ability of NO production was confirmed as a result of Nitric Oxide (NO) measurement. As a result of Western Blot measurement after administration of IE to LPS-treated RAW 264.7 cells, the expression of iNOS and COX-2 proteins was significantly suppressed, and the expression level of I $\kappa$ B $\alpha$  affecting NF- $\kappa$ B activity was reviewed. It was confirmed that the sample (IE) significantly increased I $\kappa$ B $\alpha$ , and is expected to decrease the amount of NF- $\kappa$ B expression. The research results suggest that the sweet cherry fruit from domestic (Imsil) has high potential in antioxidant and anti-inflammation activity, so it could be used as a valuable ingredient in functional foods and cosmetic products.

# 제1장 서론

## 제 1 절 연구의 배경

### 1. 스위트 체리(sweet cherry, *Prunus avium* L.)

스위트 체리(*Prunus avium* L.)는 장미과(Rosaceae)로서 달고 짙으며 쓴맛이 특징이며 유럽, 서부아시아 및 아프리카 서북부를 원산지로 온대 작물로 전 세계 40개국 이상의 나라에서 재배되고 있다. 또한, 체리는 질병을 예방하는 물질로 알려진 폴리페놀 성 화합물이 다량으로 함유한 원료이며, 미국에서는 대중적으로 알려진 과일이다. 신맛이 느껴지는 체리에 비하여 스위트 체리의 생산량이 높을 뿐만 아니라 생산가치 또한 우수하여 전세계적으로 각광 받는 대표적인 컬러푸드이다[1]. 체리는 색깔, 단맛과 신맛 등으로 품질을 결정되고 붉은색에 가까움으로 숙성의 진행됨을 육안으로 확인한다. 또한 체리는 녹색에서 붉은색으로 점차적으로 변하는 대표적인 천연물이며, 숙성될수록 클로로필은 점차 사라지고 안토시아닌이 증가함에 따라 색이 변하게 된다. 붉은색의 정도로 스위트 체리의 숙성을 평가하는 지표이며, 안토시아닌의 종류와 함량을 결정하는데 있어 체리의 색은 중요한 요소이다[2]. 보편적으로 체리는 단 맛을 가지고 있는 스위트 체리, 신맛을 가지고 있는 타트 체리(*Prunus cerasus* L.)으로 크게 두 가지 품종으로 나뉜다. 스위트 체리는 단 맛을 내는 열매로 단맛은 주로 glucose, fructose에 의해 표현되며, 타트 체리의 신맛은 organic acid (malic acid)에 의해 표현된다. 스위트 체리 100 g 당 13 g, 타트 체리는 100 g당 8 g으로 단당의 함량이 더 높은 것이 특징이며, 체리에는 수용성 비타민 C, B, 지용성 비타민 A, E, K 와 카로티노이드 및 베타-카로틴이 포함되어 있으며 [3], cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin- 3-Orutinoside, cyanidin-3-O-sophoroside, pelargonidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-rutinoside, peonidin-3-O-glucoside 및 peonidin-3-Orutinoside 등의 성분도 함유되어 있다고 보고되어 있다[4,5]. 스위트 체리는 vitamin C를 많이 함유하고 있어 항산화제의 역할로도 우수하며, β-carotene을 포함하고 있어 체내에서 vitamin A로 전환되어 건강한 시력 유지에 도움을 주고, 타트 체리보다 3배 더 많은 안토시아닌 함량으로 돌연변이 세포의 세포 주기 정지 및 세포 사멸을 촉진하여 암 예방에 도움을 줄 수도 있다. 또한, 세포 분화를 촉진하기로 알려진 cyanidin은 건강한 세포를 계속해서 촉진시킴으로서 암세포로 변이되는 위험을 줄이는데 도움을 주고 ellagic acid을 함유하고 있어 발암물질이 DNA에

결합하는 것을 막아 결합 조직을 강화시키고 암세포의 확산을 예방한다고 알려져 있다. 이처럼 식품이나 의약품으로 많이 쓰일 수 있는 재료이며, 암과 심장 및 혈관 질병 예방에 효능을 갖고 있다고 보고 되고 있으며, 골관절염과 통풍에도 효과를 보인다고 알려져 있다. 천연 적색 색소로 활용하기 위해 소재개발 연구가 진행 중이며[4,6], 여러 종류의 가공식품으로 개발 연구가 진행되고 있다[7].



## 2. 폴리페놀(Polyphenols)

과일과 야채는 다량의 폴리페놀이 함유되어 있으며, 사람이나 동물에게 건강 기능을 강화시키는 효과가 있음이 밝혀져 있다. 또한, 폴리페놀은 과산화 물질을 제거하는 작용과 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 폴리페놀은 산화스트레스와 같이 체내 활성산소가 많아져 생체 산화 균형이 무너진 상태에서 세포나 조직을 보호하고 손실을 방지한다고 알려져 있다[8]. 폴리페놀은 Fig. 1과 같이 phenolic acids, lignans, flavonoids, stilbenes으로 분류 된다. 폴리페놀은 분자 내에 전자가 풍부하고 이로 인해 탈 수소화가 일어나도 안정한 분자 구조를 이루고 있으며 대부분의 폴리페놀은 항산화 활성을 띤다고 알려져있다. 항산화 물질로 작용하는 폴리페놀은 radical 소거 후 분자 내의 수소결합이 안정해야 한다. 반응성이 높은 활성산소가 지속적으로 생성되어 농도가 증가하여 항산화계의 방어한도가 넘어가게 되면 산화적 스트레스(oxidative stress) 현상이 나타나게 되는데 이를 방지하는 것이 폴리페놀의 주된 능력이다[9-11]. Polyphenol은 화학적으로 벤젠고리에 hydroxyl group을 가진 화합물이다. 대략 8,000개 이상의 구조를 갖고 있다고 polyphenol은 알려져 있으며, 이런 flavonoid가 모여 tannin이라고 불리고 proanthocyanidins 또는 procyanidins으로 불린다[12].

대표적인 폴리페놀의 하나인 안토시아닌은 꽃, 열매, 줄기, 잎 등 식물의 각 부위에 폭넓게 함유되어 있으며 적색, 자주색 및 청색을 나타내는 수용성 플라보노이드 색소로 각 부위별 특성에 따라 서로 다르게 존재한다[13]. 이런 폴리페놀은 플라보노이드와 논플라보노이드로 구분되며, 하나 이상의 hydroxyl group이 존재하면서 하나 이상의 aromatic ring을 갖는다. 플라보노이드는 15개의 탄소 골격에 구조식 중앙의 산소 고리(Ring A)의 산화에 따라 flavone, flavonol, flavonone, flavannone, flavan-3-ol, isoflavone, anthocyanidin으로 나뉜다. 논플라보노이드는 기본 구조인 페놀산을 중심으로 phenolic acids, lignans, stilbene로 나뉜다[14]. 최근 연구 결과에 따르면 polyphenol 다수의 hydroxyl group은 다른 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 갖고 있어 항산화, 항염증, 항암, 지질 과산화 저해 작용 등 다양한 생리활성 효과가 인정되었다[1,15]. 또한, 유전자 발현을 조절하고 장내 미생물 균형 조절에 도움을 주는 것으로 알려져 여러 연구가 진행되고 있는 물질이다[16].

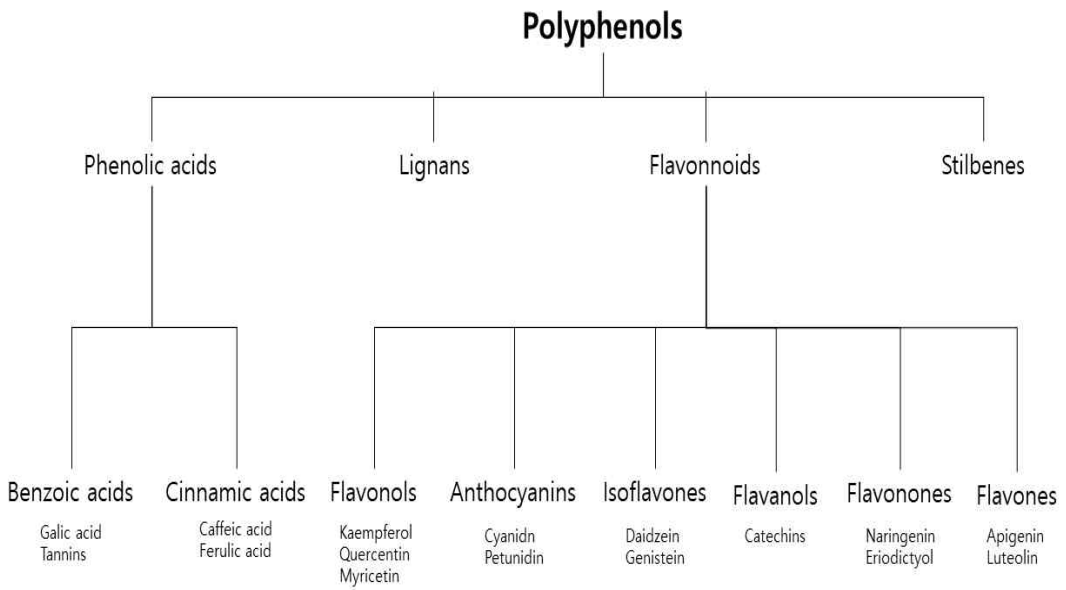


Figure 1. Various types of polyphenols.

Phenolic acids는 주로 caffeic acid나 ferulic acid로 존재한다. 특히, lignin은 식물의 세포벽을 형성하는 전구체로서 대부분 hemicellulose에 결합된 형태로 식물의 여러 세포에 분포되어있다. 이런 phenolic acids는 benzoic acids (galic acid, tannins)와 cinnamic acids (caffeic acid,  $\rho$ -coumaric acid, ferulic acid) 두 종류로 구분할 수 있으며, cinnamic acids가 더 많이 분포되어 있다고 알려져 있다. Phenolic acids 중 galic acid는 과일, 야채를 비롯한 견과류 등에 다량으로 존재하며, 분자 구조에 3개의 hydroxyl group을 가지고 있어 매우 강한 항산화이면서 항독소 및 항돌연변이성, 신경 보호, 항암효과가 있다고 알려져 있다. Cinnamic acids 중  $\rho$ -coumaric acid는 항염증, 항산화, 항알러지 작용과 더불어 혈당을 낮추는 효과도 있다고 보고되었다[17].

Lignan은 곡류, 과일, 채소류 등 다양한 식물들에 폭넓게 존재한다. Lignan의 성분으로 sesamin, sesaminol glucose, sesamol인 등이 있으며, sesamin이 가장 많이 존재한다[18].

Flavonoid는 두 개의 벤젠 고리를 포함하여 15개의 탄소골격으로 이루어져 있으며, 3개의 선형 탄소사슬이 결합된 형태이다. 보통 식물에 함유 되어 있을 때 노란색을 띠며 태양의 자외선으로부터 보호하기 위해 자연적으로 만들어진 천연물질이다. Flavonoid는 대부분 수용성이며, phenolic 화합물로 당과 결합하여 각기 다른 배당체로 존재한다. 산화 정도에 따라 6종류인 flavonol, flavone, flavanone, isoflavones, anthocyanidin, flavonol로 분류된다[18]. Flavonols의 섭취는 강한 항산화능과 혈관 질환 위험을 줄여준다. 대표적으로 kaempferol과 quercetin이 존재하고 flavonols은 비교적 낮은 농도로 존재하지만, quercetin가 같은 경우 활성산소 제거에 탁월한 효능을 갖고 있다. Quercetin과 apigenin은 항균 활성으로 가장 많이 연구된 플라보노이드 중 하나이다[19]. Flavanone은 오렌지, 레몬과 같은 감귤류에 많이 존재하며, 그 종류로는 Hesperitin, naringenin이 존재한다. 자유라디칼 제거 특성으로 인해 항산화뿐만 아니라 항염증, 혈중 지질 저하, 콜레스테롤 긍정적인 효능이 있다[20]. Isoflavonoids는 식물계에서 콩과식물에 주로 발견되며, 일부는 미생물에 존재한다고 알려져 있다[21].

Stilbene는 식품에 흔히 존재하지 않지만, 견과류나 적포도주에 존재하는 방향족 탄화수소인 resveratrol과 같은 페놀화합물이 이에 속한다. Coumaroyl-Co A와 malonyl-Co A가 stilbene synthase라는 효소에 의해 합성되어 trans-form, cis-form, piceid의 3가지 형태로 알려져 있으며, 항암, 항산화 활성을 갖고 있다[18].

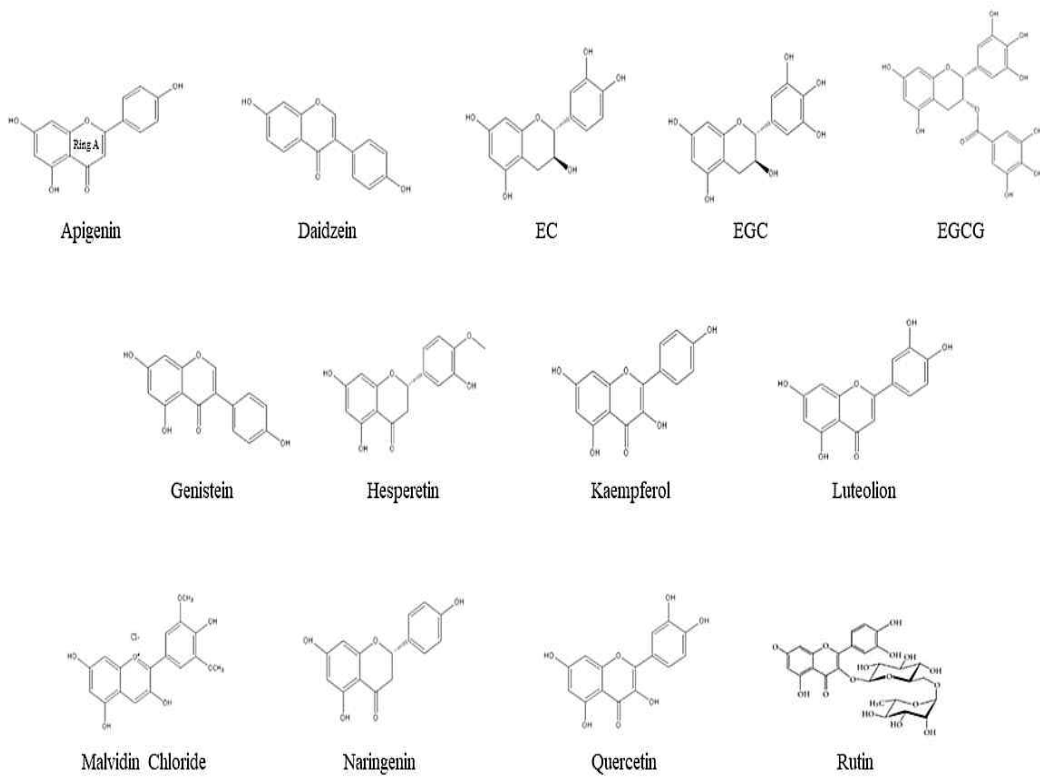


Figure 2. Structural formula of flavonoids.

### 3. 항산화(Antioxidation)

호흡 과정 중에 체내로 들어오는 산소를 이용하여 신체에서는 다양한 대사활동을 하며, 이 대사과정 중에 산소가 완전하게 환원되지 못하면 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)가 생성되게 된다[17]. 활성산소종에 대한 많은 연구가 진행되었으며, 여러 연구 중 자유라디칼(free radical) 이론에 대한 연구가 가장 설득력 있는 연구로 알려져 있다[22]. 자유라디칼 이론은 superoxid dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT)의 분비량이 적어져 활성산소가 다량으로 생성되고 신체 내의 조직과 구성 세포에 손상을 일으켜 각종 질병을 유발 시키는 이론이다[23]. 체내에서 과량의 활성산소가 생성되면 세포 내의 지질 과산화, DNA 손상이 일어나게 되고 지속적 문제가 야기 되어 세포 손상 및 세포 변이의 원인이 되어 암세포를 비롯하여 골다공증, 심장질환과 같은 문제를 발생시킨다고 알려져 있다[24,25]. 활성산소로부터 세포 손상을 방어하기 위해 세포에는 자체적으로 내재성(endogenous) 항산화 물질이 분비되며 활성산소의 축적을 억제하고 산화적 스트레스로 인하여 발생 되는 문제를 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다[26,27].

세포에서 자체적으로 분비되는 항산화 효소로는 SOD, CAT, glutathione reductase (GRD), glutathione peroxidase (GPX), uric acid, bilirubin 등으로 알려져 있다[28]. 또한, vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenium, polyphenol, arginine, glutathione 등과 같은 항산화제를 섭취하면 세포에서 자체적으로 분비되는 항산화 효소에 의해 세포를 보호하고 손상을 지연시킬 수 있다(Fig. 3)[29,30]. 활성산소의 낮은 적정 농도에서는 세포 증식(proliferation)에 관여하지만, 높은 농도에서는 세포의 손상을 포함한 여러 영향을 미친다. 체내에서 일어나는 활성산소는 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)의 과정을 통하여 활성화된다. Extracellular signal-regulated Kinases (ERKS)와 c-Jun N-terminal Kinases (JNKs)가 모두 MAPK 신호전달 과정을 통하여 활성화 된다. 적절한 농도의 활성화 산소는 신호 조절 키나아제 ERKs를 활성화 시키고 세포 증식에 도움을 준다. 높은 농도의 활성산소는 JNKs라는 신호전달 단백질을 활성화하여 세포를 사멸(apoptosis)시킨다[31]. 이렇게 활성화된 JNKs는 콜라겐을 분해시키는 대표적인 효소인 Matriix MetallorProteinase (MMPs)의 발현을 활성화시킨다(Fig. 4). 활성산소로 인하여 유발되는 지질과산화(Lipid peroxidation)는 체내의 혈관을 통해 발생부위를 포함하여 다른 부위까지도 이동하여 체내 조직세포의 산화를 유발시키고 세포의 DNA, 지질, 단백질등을 손상시킴으로써 세포사멸을 일으

킨다[32]. 이와 같은 과정이 지속적으로 진행되면서 암, 심혈관계 질환, 류마티스 관절염, 당뇨병 치매질환 등의 다양한 질병을 일으킨다. 고령화 시대가 지속되면서 신체는 노쇠해지게 되고 신체를 보호하기 위하여 활성산소를 제거에 도움을 주는 항산화 효소와 항산화 물질에 관심이 집중되기 시작했다. 항산화 물질은 비타민, 카로티노이드, 폴리페놀류 3가지 상태로 존재한다. 이런 환원 물질은 conjugated double bond를 가지거나 aromatic ring을 가지는 electron donor의 역할을 한다[33].

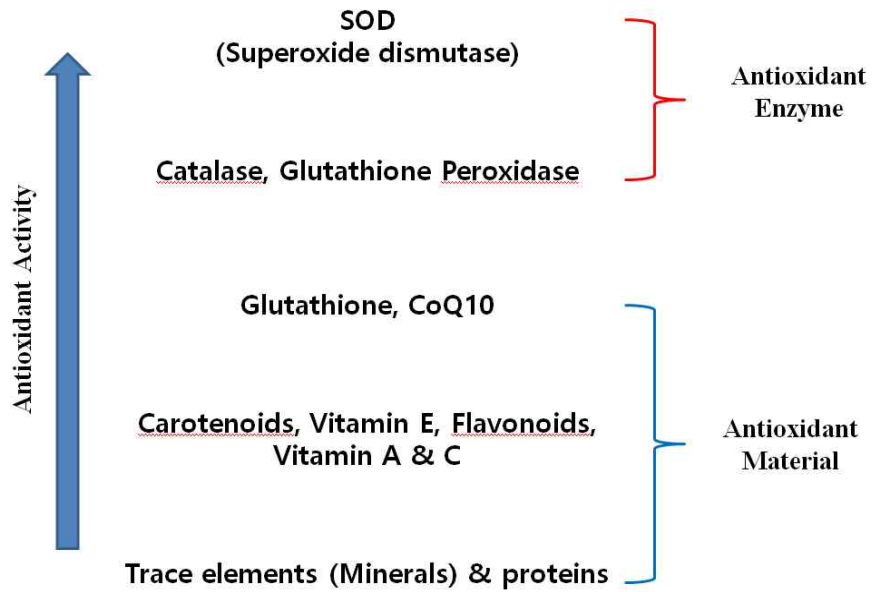


Figure 3. Antioxidant Activities of Antioxidant Enzymes and Antioxidants.

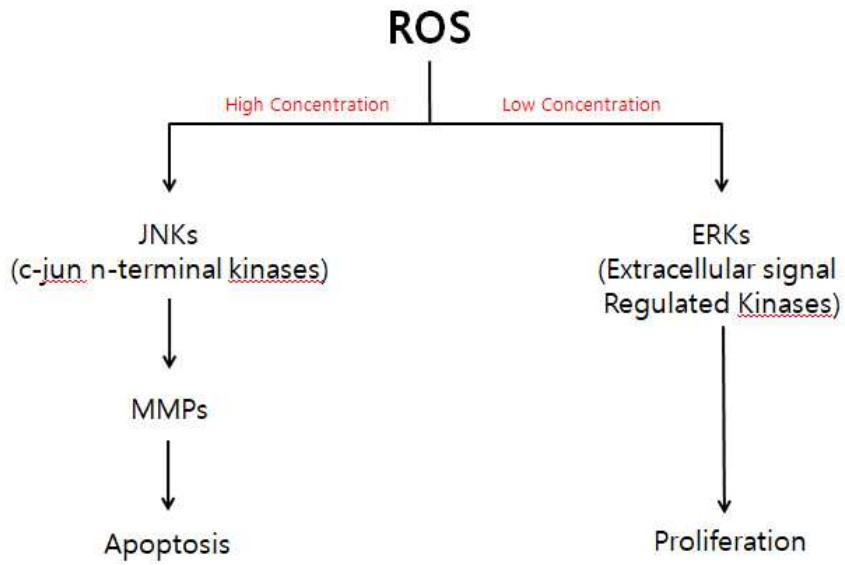


Figure 4. Mechanism of cell death and proliferation according to the concentration of active oxygen in the human body.



첫 번째, 비타민류의 항산화 물질인 L-ascorbic acid (vitamin C),  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E), vitamin A 등이 있다. 수용성인 L-ascorbic acid는 과산화수소를 제거하는 항산화 활성을 갖고 있고,  $\alpha$ -tocopherol은 세포막 산화를 억제한다. 이 물질들은 세포 내의 glutathoin과 함께 유기적으로 항산화 작용을 한다[34].  $\alpha$ -Tocopherol은 세포내 산화물을 환원시키고 산화된  $\alpha$ -tocopherol은 L-ascorbic acid이 환원시킨다. 이후 산화된 L-ascorbic acid은 glutathione에 의해 환원되고 산화된 glutathion은 glutathione 환원효소에 의해 환원된다(Fig. 5)[35].

두 번째, 카로티노이드류의 항산화 물질은 약 600여 종으로 광산화 과정에서 과산화 라디칼을 제거하며, 항산화에 중요한 역할을 하는 색소이다. 카로티노이드는 수많은 conjugated double bond를 갖고 있는 독특한 구조이며, 광산화 과정에서 생성되는 활성산소를 제거하고 세포들을 보호한다. 또한, 카로티노이드류의 항산화 물질들은 산화된 다른 항산화제의 환원을 도와 항산화 활성을 증강시키는데 도움을 준다[36]. 대표적인 카로티노이드류 항산화 물질로는  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, Lutein, Zeaxanthin 등이 존재한다(Fig. 6).

마지막으로, 식물에서 아주 흔한 페놀류 화합물인 폴리페놀이다. 현재 약 10,000만 종류 이상의 구조가 밝혀졌고, 과산화수소 형성의 감소에 도움을 줄뿐만 아니라 자유라디칼을 제거함으로써 항산화 효과에 널리 연구되어왔다[37]. 하이드록실기 (hydroxyl group)를 갖고 있는 폴리페놀은 다른 물질과 쉽게 결합하여 산화적 스트레스를 막고 항산화 활성 및 항염 활성 등에 효과가 있다고 알려져 있다[38]. 폴리페놀의 종류는 크게 phenolic acid, lignans, flavonoids, stilbenes로 나뉜다.

이러한 항산화 물질의 작용은 자유라디칼의 생성을 막고 피부의 노화와 암을 예방할 수 있다[39]. 여러 연구자들은 안토시아닌을 함유한 소재개발 연구를 진행 중이며, 안토시아닌을 이용한 질병을 예방하거나 건강기능성식품으로 개발을 진행하고 있다. 안토시아닌이 포함된 폴리페놀성 화합물은 잠재적 건강 기능성 능력과 안정성을 가지고 있다[40]. 항산화 물질의 활성을 확인하기 위한 분석으로는 인위적으로 라디칼을 발생시켜 항산화 실험을 확인할 수 있다. 라디칼 소거능은 UV 파장을 이용한 비색법과 금속 chelation 같은 실험으로 활성을 측정한다. 라디칼은 크게 자유라디칼과 산소라디칼로 분류할 수 있으며, 금속 chelation은  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 등과 같은 2가 금속이온을 지진산화반응에서 촉매 작용을 이용하여 산화 반응을 발생시키고 이 과정에서 라디칼의 생성으로 세포의 손상을 막는다. 자유라디칼의 원리를 사용

하는 항산화 활성 실험으로는 DPPH radical scavenging activity와 Trolox equivalent antioxidant capacity 실험이 알려져 있다. DPPH radical scavenging activity는 분자 내 남은 전자가 delocalization된 상태로 존재하여 안정한 자유라디칼이라고 알려져있다 [41]. 517 nm에서 최대 흡광값을 갖으며, 분자내에 자유라디칼이 존재하면 보라색을 나타내며, 이 자유라디칼이 항산화 물질을 만나면서 전자를 얻게 되면 노란색으로 색 변이가 일어난다. 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzethiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼을 사용하는 Trolox equivalent antioxidant capacity 실험은 매우 안정한 자유라디칼로서 푸른색을 나타내다 항산화 물질로부터 전자를 얻게 되면 투명한 색으로 색 변이가 일어나는 원리이다[42].

산소라디칼을 이용한 항산화 활성 확인 실험으로는 Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) scavenging activity, superoxide radical scavenging activity, Peroxynitrite radical ( $ONOO\cdot$ ) scavenging activity가 있다.  $H_2O_2$ 를 이용한 실험은 체내로 들어오는  $H_2O_2$ 로 인하여 hydroxyl radical이 생성되어 지질과산화물을 촉진 시켜 체내 세포를 손상을 입히는 원리이며[41], Superoxide radical은 nitroblue tetrazolium 용액과 체내의 세포에서 조효소로 작용하는 nicotinamide adenine dinucleotide 용액을 혼합하여 phenazine methosulfate를 첨가하면 hydroxyl radical을 생성되는 원리를 이용한 실험이다[42]. 금속 chelating을 이용한 항산화 활성 확인 실험으로는 대표적으로 ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay, Potassium ferricyanide reduction (PFRAP), Hydroxyl radical scavenging activity 등이 있다. FRAP assay는  $Fe^{3+}$  이온이 환원되는 정도를 측정하여[43], PFRAP assay는 potassium ferricyanide는 항산화 물질과 반응하여 환원되는 정도를 측정하여[44], hydroxyl radical scavenging activity은  $Fe^{2+}$ 가 과산화 수소에 의해  $Fe^{3+}$ 로 산화 되는데 그 과정에서 hydroxyl radical과 hydroxide ion을 형성하는 fenton reaction을 이용하여 ROS 중 하나인 hydroxyl radical을 생성하여 deoxyribose와 반응시켜 항산화 활성을 확인하는 원리이다[45].

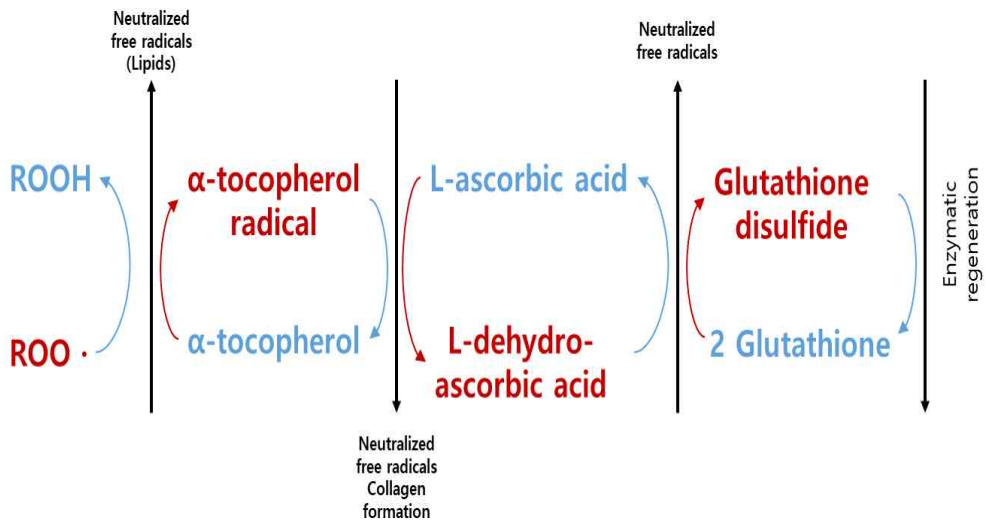


Figure 5. From oxidation and reduction of alpha-tocopherol, L-ascorbic acid The antioxidant mechanism that comes.

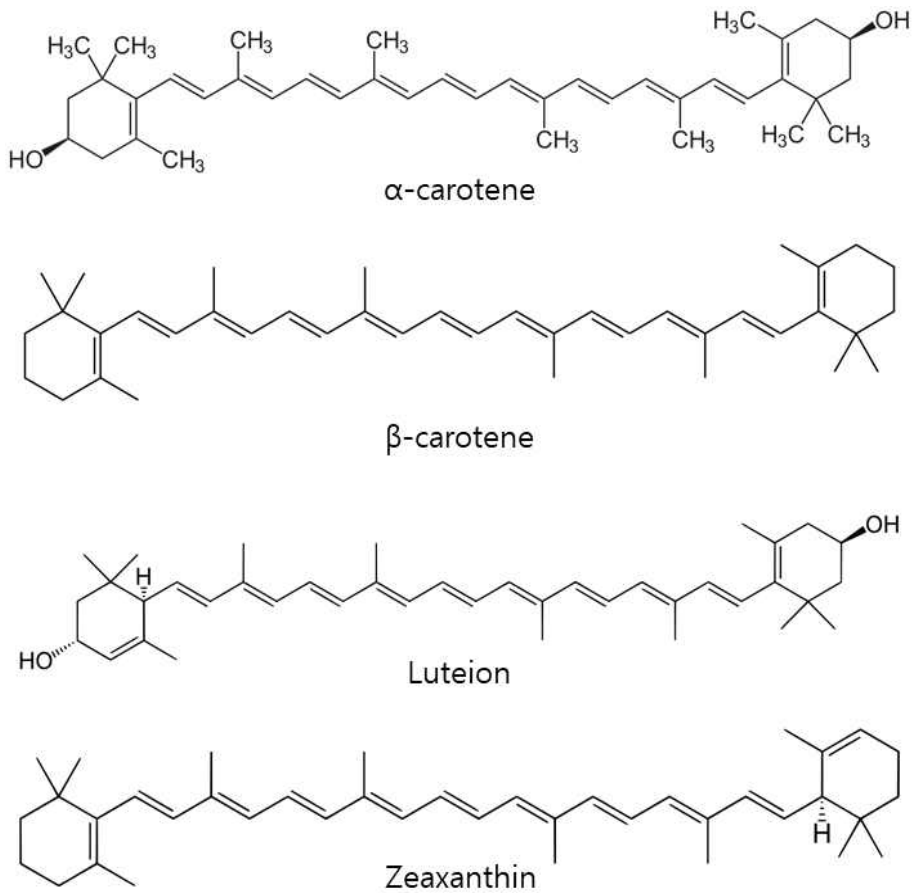


Figure 6. Representative formulas of carotenoids.

## 4. 염증(inflammation)

염증이란 바이러스 감염 혹은 박테리아 같은 외부 물질이 체내에 유입 되었을 때에 일어나는 방어반응으로 수많은 면역세포와 조직 세포가 외부 물질을 공격하기 위해 다량의 활성산소종과 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)을 생성하고 체내에서 중요한 역할을 한다[46]. 감염과 같은 외부 자극 또는 손상에 대한 정상적인 신체의 방어반응으로 체내에서 받아들여지는 염증 한도 내에서 손상된 조직을 회복시키고 복원되지만, 비정상적인 과한 염증반응이 이 지속되는 경우 염증 관련 세포에서 염증을 일으키는 물질이 과도하게 생성되어 세포 혹은 조직에 손상을 일으켜 다양한 질환들을 나타나게 된다. 이러한 질환들은 만성 염증 질환이라고 하며, 각종 암, 자가면역질환 등을 일으킨다[47].

만성 염증이나 급성 염증에 있어서 ROS와 RNS, cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 같은 효소는 염증반응에서 중요한 역할을 담당한다. 또한, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)와 같은 효소는 세포 내 항산화 방어체계 균형에 관여하는 반응으로서 염증성 효소의 발현을 조절한다[46,48]. 염증반응을 유도하는 lipopolysaccharids (LPS)로 인하여 대식세포 및 면역세포의 활성화로부터 시작되며, 자극되어진 대식세포는 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 및 NF- $\kappa$ B 전사인자를 활성화시켜 iNOS, COX-2, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1beta(IL-1 $\beta$ )와 같은 염증 매개체 발현을 촉진시킨다. iNOS와 COX-2는 각각 nitric oxide (NO)과 prostaglandin E<sup>1</sup> (PGE<sup>1</sup>)와 같은 염증 반응물질을 다량으로 발생시키면서 만성적인 염증반응을 유도하여 면역 반응과 염증반응을 악화시킨다[49]. 염증성 물질등 ROS를 과잉생산하는 대식세포는 LPS로 활성화되어 염증반응으로 인해 산화적 스트레스를 증가시킨다. 이런 산화적 스트레스의 증가는 항산화 방어체계를 불균형화를 초래하여 단백질, 지질, DNA 등을 산화적으로 손상시키고 염증성 질환을 일으키는 요인으로 알려져 있다[50]. 포유류의 대식세포에는 현재 13 종류의 Toll like receptors (TLRs)가 알려져있다. TLRs는 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)를 인지하는 수용체이면서 바이러스, 세균, 박테리아 등의 병원균들이 갖는 독특한 구조이다[51]. 내독소로 작용하는 Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균이 갖고 있는 세포막의 구성 물질로서, LPS binding protein (LBP)와 복합체를 이루고 TLR4에 의해 인지 된다[52,53]. LBP의 작용으로 LPS를 인지하고 TLR4는

인산화를 통해 활성화되고 신호전달을 통하여 일련의 염증 과정이 진행되게 된다. 대식세포에서는 2 가지 경로가 있으며, LPS를 매개로 신호전달을 하고 있다. 의존적인 경로인 Myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88)과 비의존적인 경로가 있다고 알려져 있다[54]. 하지만 두 가지 경로 모두 NF- $\kappa$ B pathway와 MAP kinase pathway를 경유 하며, 이 두 경로를 통해 활성화된 대식세포는 산화질소를 생성하게 된다[55]. 산화 질소는 Nitric oxide synthase (NOS) 효소에 의해 생성되는데 3가지 종류로 알려져 있다. NOS 중 endothelial NOS (eNOS)와 neuronal NOS (nNOS)는 세포에서 발현되는 효소로 알려져 있다. 반면에 inducible NOS (iNOS)는 대식세포에서 LPS 자극에 급격하게 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다[56]. 급격하게 증가한 iNOS는 산화질소의 농도를 급격하게 증가시키고 과도한 양의 산화질소는 세포에 직접적인 산화스트레스를 가하여 DNA, 단백질 등에 악영향을 주게 되고 패혈증, 천식, 만성염증, 알츠하이머, 파킨슨병 등의 다양한 질병을 일으킨다고 알려져 있다[57]. NF- $\kappa$ B는 염증을 일으키는 염증성 유전자의 발현을 조절하고, 급성 염증과 면역반응이 일어나면 세포의 생존 혹은 자기 사멸을 조절한다. 이런 NF- $\kappa$ B는 inhibitory kappa B (I $\kappa$ B)에 의해 불활성화 상태가 되는데, I $\kappa$ B kinase가 활성화되어 I $\kappa$ B가 분해되면 서로다른 단백질의 소단위체 두 개가 연결된 이중체인 p65와 p50의 heterodimer 형태로 핵으로 이동되고 염증반응을 유도하는 cytokine, iNOS, COX-2 등의 유전자 발현을 일으키고 그 결과 IL-1 $\beta$ , IL-6등의 유전자의 전사를 조절한다고 알려져 있다[58]. 염증성 질환으로 인한 붓기, 통증과 같은 증상을 완화하기 위하여 일상생활에서 소염제를 사용하고 있다. 가장 많이 처방되는 약물 중 하나인 비스테로이드계 소염제(non steroidal antiinflammatory drugs, NSAID)는 진통제, 해열제 및 항염증 특성을 갖는다[59]. 비스테로이드계 소염제는 소화기관, 심혈관등에 다양한 부작용이 보고되어 사용이 금지되고 있다. 스테로이드계 소염제 또한 항염증 효과가 우수하지만 장기간 복용할 경우 체내에 약물에 대한 내성이 생기며 소장염증이 생기고 심혈관계 질환, 면역 교란의 발생이 보고되고 있다 [60-61].

이러한 스테로이드계와 비스테로이드계 소염제의 잠재적 위험성을 줄이고 안전성이 보장된 천연물을 이용한 치료와 부작용이 적은 천연물 유래 기능성 소재 개발에 주목하고 있다[62]. 식물성 천연물질에 함유한 폴리페놀과 플라보노이드와 같은 항산화제는 산화적 스트레스를 감소시켜주며 생성된 ROS를 제거하고 발생을

조절하여 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 수 있다고 알려져 있다[63]. 그러므로 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하면 광범위한 염증 질환을 예방할 것이라고 사료 된다.

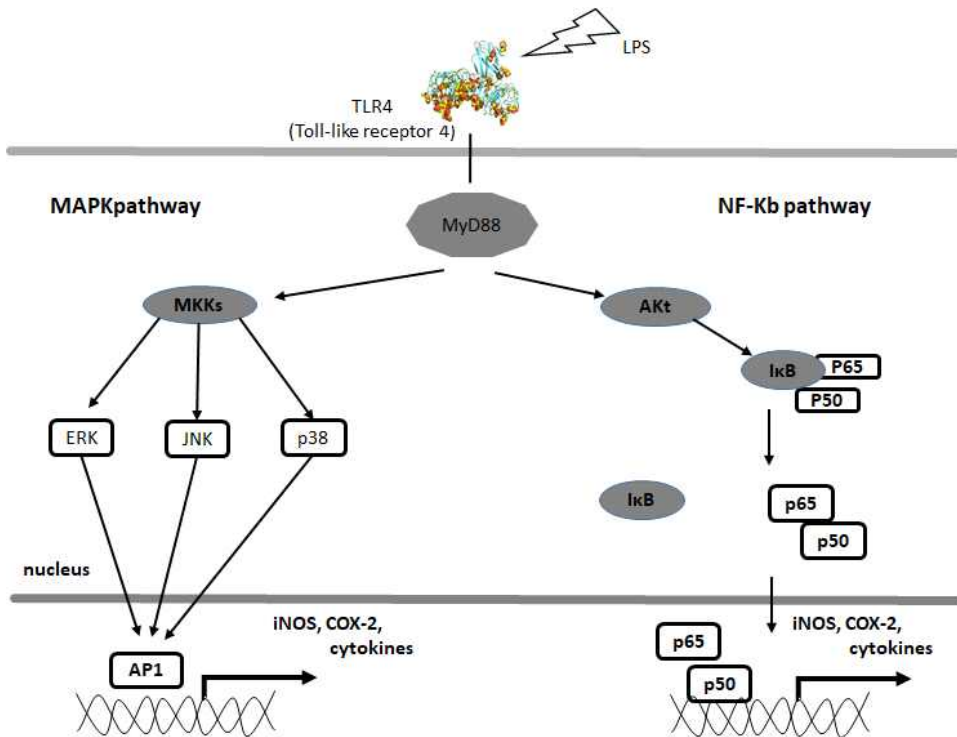


Figure 7. Toll-like receptor 4 (TLR4) pathways. These pathways induce the transcription of pro-inflammatory mediators such as iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL-6. ;lipopolysaccharide-binding protein (LBP), Myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88), nuclear factor kappa B (NF-kB), mitogen activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt).



## 제 2 절 연구 동향 및 구성

### 1. 연구 동향

식물은 재배되는 환경과 조건에 따라 성분 및 함량의 차이가 발생하게 되기에 성분의 종류에 따라 항산화 활성을 갖는 작용기전이 각기 다르기에 다양한 측정 방법으로 항산화 활성에 대하여 접근하는 것이 옳다고 생각한다. 현재까지 연구자들에 의한 스위트 체리 연구는 주로 생리 활성과 관련된 연구가 진행되었으며, high-performance liquid chromatography (HPLC)를 활용하여 sugar, organic acid, polyphenol 및 anthocyanin에 대하여 정량화하였다.

B. Girard 등은 품종별 스위트 체리의 이화학적 특성에 대하여 연구를 하였으며, 비휘발성 성분과 휘발성 성분을 HPLC와 gas chromatography (GC)로 결과를 분석하였다. 실험결과 비휘발성 성분 중 sugar component는 glucose (5.2–8.8 g/100 g fresh weight (FW)), fructose (4.4–6.4 g/100 g of FW), sorbitol, mannitol (2.2–8.0 g/100 g FW)을 확인하였고, acid component 성분으로 malic acid (502.7–948.3 mg/100 g FW), ascorbic (8.4-15.9 g/100 g FW) 등을 확인하였으며, 휘발성 성분으로 (E)-2-hexenol, benzaldehyde, hexanal와 (E)-2-hexenal 등을 확인하였고, 이러한 성분 분석으로 인하여 스위트 체리를 이용한 상업적 가능성에 대하여 보고하였다[64].

Maria Serrano 등은 스위트 체리의 숙성 과정에 따라 크기 및 색상으로 14가지의 group으로 나누어 연구를 진행하였으며, 실험결과 항산화 활성 실험을 비롯하여 sugar, organic acid, polyphenol 등을 분석하였다. sugar 성분은 크기가 커지며 연화되는 시점에서 증가 되는 것으로 확인되며, 항산화 활성 및 페놀 화합물은 색이 짙어지는 단계의 group 8에서부터 기하급수적으로 증가함을 확인하였다고 보고하였다 [1]. 이에 연장된 연구로 Valentina Usenik 등은 형태 학적 특성과 서로 다른 숙성시기를 가진 스위트 체리에 대해 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성에 대해 평가하고, 스위트 체리에 포함된 sugar, organic acid, polyphenol 등을 HPLC를 활용하여 정량화하였다. 실험 결과 sugar 성분 (glucose, ructose, sucrose, sorbitol)의 합 125-265 g/kg, organic acid (malic acid, citric acid, fumaric acid)은 3.67–8.66 g/kg, total polyphenol은 44.3-87.9 mg을 확인하였다. Total polyphenol 과 organic acid contents의 상관관계는 품종에 따라 다르다고 보고하였다[65].

Seeram 등은 스위트 체리의 추출물에서의 HPLC를 이용하여 성분 분석을 하였고,

성분 분석을 한 결과 cyanidin-3-glucosylrutinoside와 cyanidin-3-rutinoside의 존재를 확인하고 정량화 하였다[2]. 또한, 상업용 항산화제로 알려진 tert-butylhydroquinone, butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), 비타민 E보다 체리 추출물의 125 µg/mL의 농도에서 더 우수하였다고 밝혔으며, cyclooxygenase-I에서 45% cyclooxygenase-II에서 47% 억제 활성을 확인하였다고 보고하였다[2].

Goncalves 등은 스위트 체리를 메탄올 추출을 통한 동결건조 분말화 하였고, HPLC를 활용하여 성분 프로파일링을 하였으며, 성분은 neochlorogenic, chlorogenic, hydroxycinnamates, *p*-coumaroylquinic acid, Cy-3-glucoside, Cy-3-rutinoside, catechin, epicatechin, rutin, cyanidin-3-rutinoside을 확인하였고, 항산화 활성은 cyanidin-3-rutinoside보다는 *p*-coumaroylquinic acid의 함량에 더 유의적으로 우수한 활성을 나타낸다고 보고하였다[66].

Kim 등은 여러 품종에서 스위트 체리의 페놀릭 성분이 체내의 신경 세포 보호 효과에 대해 비교 평가를 연구하였으며, 신경 세포는 PC12 cell을 사용하였다[68]. HPLC 분석 결과 4 가지 품종의 스위트 체리에서 phenolics은 각각 92.1-146.8 mg, gallic acid 146.1-312.4 mg, anthocyanins은 30.2-76.6 mg, cyanidin 3-glucoside은 49.1-109.2 mg으로 보고 하였으며, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, kaempferol, isorhamnetin도 확인이 되었다. anthocyanins의 함량이 높을수록 세포 손상을 보호하고 산화스트레스로부터 신경 세포 PC12 cell을 보호함을 확인하였으며, 안토시아닌이 풍부할수록 antineurodegenerative activity이 있다고 보고 하였다[67].

Ahn 등은 경북지역에서 수확한 스위트 체리 열수 추출물을 유기용매 분획 추출하고 항균 및 항산화에 대한 생리활성을 연구하였으며, hexane, ethyl acetate, butanol, distilled water 잔류물에 대한 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 비교한 결과 분획 중 ethyl acetate 분획에서 5.24%, 3.76%로 가장 높은 농도를 확인하였고, 항균 활성으로서 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*을 사용하여 최소 억제 농도에 대한 유의성 높은 항균 활성을 갖는다고 보고하였다[68].

## 2. 연구의 구성

최근 경제가 성장하면서 사람들의 소득이 증대함에 따라 헬스케어에 관한 관심이 더욱 증대되고 있다. 천연물에서의 생리활성을 갖는 물질 탐색에 연구가 각광받고 있으며, 항균, 항산화, 항염증 활성을 갖는 천연물 소재 개발 연구를 지속적으로 진행되고 있다[69]. 스위트 체리는 장미과로서 열매는 달고 뚫으며 쓰다. 유럽, 아프리카 서북부, 서부 아시아가 원산지이며 주로 이 지역에서 재배된다. 최근 대한민국에서도 임실, 경주 등을 비롯한 국내산 스위트 체리 품종 재배에 노력하고 있으며 일부 지역에서 재배되고 있다[70]. 주위 환경에 따라 모든 식물들은 폴리페놀성 화합물의 성분과 비율에 차이가 생기기에 본 연구에서는 대한민국 임실에서 재배된 스위트 체리와 국외 폴란드 및 칠레산 스위트 체리의 폴리페놀성 화합물의 분석과 항산화, 항염증 효능을 비교하였다. 100세 시대를 바라보며 현대인의 건강에 대한 관심이 증가하면서 천연물에 존재하는 생리활성물질의 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에 사용된 스위트 체리는 국내에서 유통되고 있는 국내산(전라북도 임실), 국외산(폴란드, 칠레) 열매를 씨를 제거하고 과육을 건조하여 열수 추출과 70% ethanol을 이용한 주정 추출을 진행하였고 70% 주정 추출물에 대하여 *n*-hexane, ethyl acetate를 이용하여 분획 추출하였다(Fig. 8). 각 추출물을 회전감압농축기(N-1200B, EYELA, Japan)를 사용하여 농축하고 동결건조를 하여 실험용 시료 샘플을 만들어 본 연구에 사용하였다. 추출물의 폴리페놀성 화합물을 분석하고, 항산화 및 항염증 활성을 free radical scavenging, 효소 저해 활성 및 세포 실험으로 확인하고자 하였다. 각 추출물의 폴리페놀성 화합물의 분석은 플라보놀 배당체(kaempferol, quercetin, isorhamnetin)를 HPLC를 이용하여 함량 분석하였고 HPLC/MS를 이용하여 확인하였다. 항산화 효능은 ABTS, DPPH radical scavenging을 실험하였으며, 항염증 효능을 측정하기 위하여 효소 저해 활성과 대식세포인 Raw 264.7 세포주를 사용하여 실험을 진행하였다.

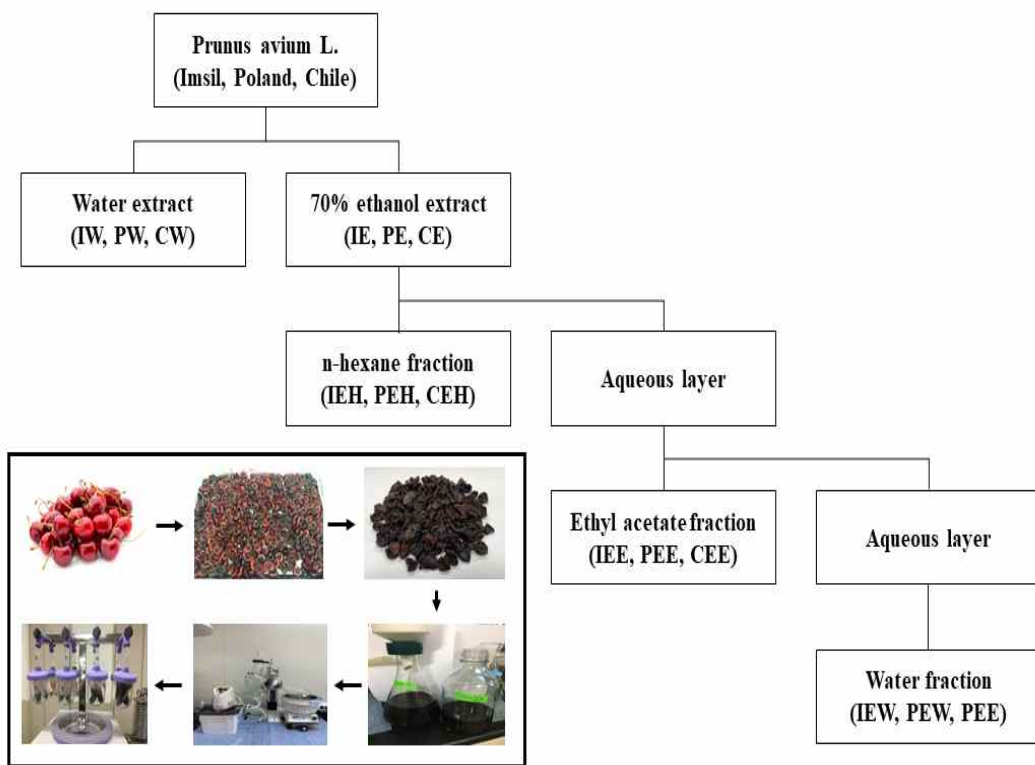


Figure 8. Isolation diagram of *Prunus avium L.* extracts from domestic (Imsil region) (IW, IE, IEH, IEE, IEW), Poland (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and Chile (CW, CE, CEH, CEE, CEW).

## 제 2 장 재료 및 방법

### 제 1 절 실험 재료 및 시약

#### 1. 실험 재료

본 연구에 사용된 스위트 체리는 임실, 폴란드, 칠레 3종으로 2020년 5월에 수확된 것이며, 국내산 판매품의 경우에는 다양한 종류가 뒤섞여 판매되므로 동일 품종의 실험 재료를 확보하기 위해 임실 소재의 한 농가로부터 수확한 것을 5 kg을 공급받아 사용하였다. 각 재료는 세척 후 씨를 제거하고 남은 과육을 60℃에서 24 h 열풍 건조하여 보관한 후 연구에 필요한 추출물 조제에 사용하였다.

#### 2. 실험 시약

본 연구에서 추출에 사용된 시약은 ethanol (DUKSAN), methanol (DUKSAN), ethyl acetate (DUKSAN)을 사용하였으며, 각종 생리활성 실험을 위하여 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, SIGMA), L-ascorbic acid (SIGMA), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS, SIGMA), folin-ciocalteus phenol reagent (SIGMA), potassium persulfate (SIGMA), KCl (DUKSAN), NaCl (DUKSAN), NaCO<sub>3</sub> (DUKSAN), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (DUKSAN), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (DUKSAN), gallic acid (SIGMA), aluminum chloride (SIGMA), potassium acetate (SIGMA), quercetin (SIGMA), kaempferol (SIGMA), isorhamnetin (SIGMA), quercetin dihydrate (WAKO), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-carboxylic acid (trolox, SIGMA), HCl (DUKSAN), methanol (THERMO FISHER SCIENTIFIC), phosphoric acid (DUKSAN), ethanol (THERMO FISHER SCIENTIFIC)을 사용하였다. HPLC 분석에 사용된 모든 시약은 HPLC grade 시약을 사용하였다.

## 제 2 절 추출 및 분리

### 1. 스위트 체리 분리 및 건조

스위트 체리는 6-8월에 수확한 것을 사용하였으며, 국내산(전라북도 임실), 국외산(폴란드, 칠레)을 각 2 kg씩 구입하여 씨앗을 제거 후 50℃에서 24 h 동안 열풍 건조하여 사용하였다.

### 2. 열수추출(Aqueous extract)

씨앗을 제거 후 열풍 건조가 완료된 각 스위트 체리와 증류수를 1:10 (w/w)의 비율로 침지 한 후 가압추출법으로서 autoclave 100 ℃에서 90 min동안 추출하였다. 추출 후 얻어진 추출물은 Whatman No.4를 이용하여 여과한 후 감압농축기를 이용하여 농축 후 항산화 활성 및 플라보놀 함량 등을 위한 분석용 시료로 사용하였다.

### 3. 주정추출 및 층 분리(Ethanolic extract and fractionation)

씨앗을 제거 후 열풍 건조가 완료된 각 스위트 체리와 70% ethanol을 1:10 (w/w)의 비율로 침지한 후 상온(25±3℃)에서 72 h 동안 추출하였다. 추출 후 얻어진 추출물은 Whatman No.4를 이용하여 여과한 후 감압농축기를 이용하여 농축 후 사용하였으며, hexane, ethyl acetate를 이용하여 층 분리를 하였다. 각 층분리 된 용액은 농축 후 사용하였다. 열수 및 70% 주정 추출물의 약자는 Table. 1과 같이 표시하였다. 추출 분획 과정은 Fig. 8과 같이 진행하였다.

Table 1. Abbreviations of sweet cherry extract

Sample	Abbreviation
Domestic(Imsil, Jeonbuk) Prunus avium L. aqueous extracts	IW
Domestic(Imsil, Jeonbuk) Prunus avium L. ethanolic extracts	IE
Domestic(Imsil, Jeonbuk) Prunus avium L. ethanolic extracts - Hexane fraction	IEH
Domestic(Imsil, Jeonbuk) Prunus avium L. ethanolic extracts - EtOAc fraction	IEE
Domestic(Imsil, Jeonbuk) Prunus avium L. ethanolic extracts - Water fraction	IEW
Oversea(Poland) Prunus avium L. aqueous extracts	PW
Oversea(Poland) Prunus avium L. ethanolic extracts	PE
Oversea(Poland) Prunus avium L. ethanolic extracts - Hexane fraction	PEH
Oversea(Poland) Prunus avium L. ethanolic extracts - EtOAc fraction	PEE
Oversea(Poland) Prunus avium L. ethanolic extracts - Water fraction	PEW
Oversea(Chile) Prunus avium L. aqueous extracts	CW
Oversea(Chile) Prunus avium L. ethanolic extracts	CE
Oversea(Chile) Prunus avium L. ethanolic extracts - Hexane fraction	CEH
Oversea(Chile) Prunus avium L. ethanolic extracts - EtOAc fraction	CEE
Oversea(Chile) Prunus avium L. ethanolic extracts - Water fraction	CEW

## 제 3 절 총 폴리페놀화합물 함량 측정

### 1. 총 폴리페놀 함량(Total Polyphenol Contents)

본 연구에서는 Total Polyphenol Contents (TPC)를 진행하기 위하여 Folin-Denis법을 수정하여 실험하였다[38]. TPC를 측정하는데 있어 gallic acid를 standard로 하여 추출물내의 gallic acid의 함량을 비색법으로 측정하였다. 농축한 각 추출물을 500  $\mu$ g/mL 농도로 희석하여 실험하였다. 각 추출물 0.3 mL와 0.2 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent 0.3 mL, 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.3 mL를 잘 혼합한 후 실온에서 30 min동안 반응시켰다. 흡광도는 ELISA microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc, USA)을 사용하여 750 nm 파장에서 분석하였다.



## 제 4 절 총 플라보노이드 함량 측정

### 1. 총 플라보노이드 함량(Total Flavonoid Contents)

총 플라보노이드 함량을 Moreno 등의 방법을 수정하여 측정하였다[39]. 농축한 각 추출물을 500 µg/mL 농도로 희석하여 실험하였다. 각 추출물 0.5 mL와 10 % aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40 min 동안 반응시켰다. 흡광도는 ELISA microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., USA)을 사용하여 415 nm 파장에서 흡광도를 분석하였다.

## 제 5 절 산지별 원물의 플라보놀 배당체 함량 분석

### 1. High performance liquid chromatography (HPLC)

#### (1) 희석용액 조제

칠레, 폴란드, 입실 스위트 체리 추출물의 성분 분석을 위해 HPLC 장비를 사용하였다. 각 샘플의 희석 용액은 에탄올, 정제수, 0.1M 염산을 50:20:8 부피의 비율로 제조하여 사용하였다.

#### (2) 플라보놀 배당체(Flavonol glycosides) 표준용액 조제

퀘르세틴 이수화물 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL부피 플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용하였다. 캄페롤 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용하였다. 이소람네틴 25 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용하였다. 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

#### (3) 시료 전처리

각 샘플의 동결 건조된 시료를 분쇄하여 사용하였고, 분쇄된 powder를 모아 4℃에 보관하며 다음 분석에 사용하였다. 분쇄된 powder에 100 mg을 정밀하게 칭량하여 가수분해용 삼각플라스크에 취한 후 10 mL 희석용액을 가하고 90℃의 수욕상에서 1 h 동안 가수분해하였다. 위의 시험용액은 0.45 μm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 하였다.

#### (4) HPLC 분석

플라보놀 배당체 분석은 HPLC를 이용하여 분석하였으며 Chu Chen의 방법과 Yuangang Zu의 방법을 변형하여 진행하였다[71,72]. HPLC는 Shimadzu LC-20 series (Degassor : DGU-405, pump ; LC-40D, Auto Sampler : SIL-40C, Photo Diodie Array Detector : SPD-M40, Column Oven : CTO-40C, Japan)로 구성되었으며 분석 조건은 Table. 2와 같다. 분석에 사용한 모든 용액은 0.45 μm filter로 여과하여 분석하였다.

Table 2. Analysis conditions of high performance liquid chromatography for flavonol glycosides analysis

<b>Analysis condition</b>	<b>Explanation</b>
HPLC equipment	Shimadzu LC-20 series
Mobile phase	0.1% phosphoric acid in ACN : 0.1% phosphoric acid = 40 : 60
Flow rate	1.0 mL/min
Column	Capcellpak C18 UG120 (250×4.6 mm, 5.0 $\mu$ m particle size)
Oven temperature	35°C
UV wavelength	370 nm
Injection volume	10 $\mu$ L
Total run time	20 min

## 2. HPLC/Mass spectrometry (HPLC/MS)

분석용 시료는 HPLC 분석 시 같은 전처리로 처리하여 분석에 사용하였다. 플라보놀 배당체 분석은 LC/Q-TOF/MS를 이용하여 분석하였다. UHPLC는 Agilent 1290 Infinity(MS Q-TOF : G6550A, Ion Source ; Sual AJS ESI)로 구성되었으며 분석 조건은 Table. 3과 같다. 분석에 사용한 모든 용액은 0.45  $\mu\text{m}$  filter로 여과하여 분석하였다.

Table 3. Analysis conditions of ultra high performance liquid chromatography for Flavonol glycosides analysis

<b>Analysis condition</b>	<b>Explanation</b>
	UHPLC / 1290 Infinity (Agilent)
HPLC equipment	MS Q-TOF / G6550A (Agilent)
	Dual AJS ESI
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid in Water B : 0.1% Formic acid in ACN
Flow rate	0.3 mL/min
Column	Agilent EclipsePlus C18, RRHD column. (50 × 2.1 mm, 1.8 μm, particle size)
Oven temperature	35°C
UV wavelength	370 nm
Injection volume	1.00 μL
Total run time	20 min

## 제 6 절 항산화 활성 측정

### 1. ABTS radical scavenging assay

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Re 등의 방법을 수정하여 측정하였다[73]. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1 비율로 혼합하고 실온암실에서 24 h 방치한다. 730 nm에서 흡광도가  $0.700 \pm 0.02$ 이 되도록 PBS (pH 7.4)로 희석하여 ABTS stock solution을 제조하였다. 농축한 추출물을 5-1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험하였다. ABTS stock solution과 희석한 추출물을 5:1의 비율로 혼합하여 암실에서  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 으로 15 min동안 반응시킨 후 흡광도는 ELISA microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., USA)을 사용하여 730 nm에서 측정하였으며 positive control로 trolox를 사용하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 시료 미첨가한 대조군의 흡광도를 50% 소거하는데 상응하는 농도로 각 각의 추출물의  $\text{IC}_{50}$  값을 계산하였다.

## 2. DPPH radical scavenging assay

DPPH에 의한 라디칼 소거능은 Blois의 방법을 수정하여 측정하였다[74]. DPPH를 MeOH에 용해하여 0.1 mM DPPH stock solution을 제조하여 사용하였다. MeOH을 사용하여 농축한 추출물을 10-10,000 µg/mL으로 희석하여 사용하였다. 0.1 mM DPPH 용액을 500 µL와 농도별로 제조한 추출물 500 µL를 혼합하여 15 min동안 암실에서 반응 후 흡광도는 ELISA microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., USA)을 사용하여 517 nm 파장에서 측정하였다. Positive control로 L-Ascorbic acid를 사용하였다. DPPH radical에 의한 소거능 IC<sub>50</sub>는 용매만을 사용한 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도로 나타내었다.

$$Antioxidant\ activity(\%) = \frac{absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample}{absorbance\ of\ control} \times 100$$

## 제 7 절 항염증 효능 측정

### 1. 세포 배양 및 처리

RAW 264.7 macrophage cell은 한국세포주은행에서 구매하여 실험하였으며, 세포 배양을 위해 10 % Fetal Bovin Serum (FBS, HyClone<sup>®</sup>, USA), 100 units/mL penicillin 및 100 µg/mL Stereptomycin (Welgene, KOREA)이 함유된 Dulbecco's modified of Eagle's medium (DMEM, HyClone<sup>®</sup>, USA) 배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 존재 하의 incubator에서 배양 하였다.

### 2. MTT assay

각 시료의 독성 농도를 확인하고자 MTT assay를 사용하여 측정하였다. MTT assay는 세포내 mitorondria의 dehydrogenase에 의해서 MTS가 formazan으로 변화하는 것을 이용하는 원리로 생성된 formazan의 농도를 측정하는 방법이다. 세포를 24 well plate에 배양하고 나서 시료들을 농도별로 24 h 동안 처리한 후, 생존해 있는 세포를 MTT (0.2 mg/mL)시약에 1 h 동안 반응 시켰다. 상층액을 제거하고 well 당 200 µL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣어 생성된 formazan crystals을 녹여내었다. 마지막으로 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 vehicle 처리군과 비교하였다.

### 3. Nitric oxide (NO) assay

Nitric Oxide (NO)의 농도는 N-(1-naphtyl)-ethylenediamine, sulfanilamide, NO<sub>2</sub>가 반응하여 azo coupling을 이루게 되는데, 이 두 링의 형태가 540 nm 의 파장에서 최대의 흡광도 값을 갖게 된다. 이를 용한 방법으로 griess reaction (0.1 % N-(1-naphtyl)-ethylenediamine in dH<sub>2</sub>O, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid = 1:1) 을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 6 well plate에 2.5×10<sup>5</sup> cells/well로 RAW 264.7 cell을 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator, 24 h 배양하였다. RAW 264.7 cell에 LPS 3 µg/mL를 처리하고 시료들을 농도별로 처리해 24 h 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양 상층액 100 µL를 96 well plate에 취하고 griess reagent 100 µL를



넣어 암실에서 10 min간 반응 한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO농도는 sodium nitrite (0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ M의  $\text{NaNO}_2$ )를 사용하여 표준 곡선을 취하고 이를 비교하여 결과 값을 산출하였다. 항염증 활성 평가는 LPS만 처리한 control과 비교하여 NO의 생성량이 줄어든 정도로 판단하였다.

#### 4. Western blot analysis

RAW 264.7 macrophage 세포에서 발현되는 염증관련 분자지표인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 및 signaling 대사과정에서 후보 시료들이 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot analysis를 수행하였다. 실험은 배양이 끝난 세포를 2-3회 PBS로 세척 한 후 lysis buffer를 첨가하고 cell을 lysis 시킨다. 그 후, 12,000 rpm에서 20 min 동안 원심분리하였다. Bradford법을 이용하여 protein의 정량 측정하였으며, 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE)로 변성 분리하였고, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer 하였다. Membrane을 blocking 시킨 후, 2.5% nonfat dry milk가 함유된 Tris-buffered saline에 0.2 % Tween-20 (TBST)에 1차 항체를 넣고 상온에서 4 h 동안 반응시켰다. 1차 항체와 반응시킨 membrane을 PBST로 3 회 세척하고 2차 항체와 상온에서 2 h 동안 반응시킨 뒤에 TBST로 3 회 세척하여 ECL advance detection system으로 각 band의 발현 양상을 확인하였다. Western blot 으로 단백질 발현 측정하기 위해  $\beta$ -actin, iNOS, COX-2, I  $\kappa$ B $\alpha$ 의 일차항체와 anti-goat, anti-rabbit, anti-mouse등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 제 1 절 추출 조건 최적화

#### 1. 추출 수율

폴란드, 칠레, 임실 스위트체리 추출물의 수율은 다음과 같은 식으로 구하였으며, Table. 4에 각각의 추출물의 수율을 정리하였다.

$$Yield(\%) = \frac{Weight\ of\ concentrated\ sample\ after\ extraction\ (g)}{Weight\ of\ dried\ sweet\ cherry} \times 100$$

칠레 스위트 체리 추출물에서 CW가 29.28%, CE가 28.49%, 폴란드 스위트 체리 추출물에서 PW 30.39%, PE가 36.01%, 임실 스위트 체리 추출물에서 IW가 22.66%, IE가 21.46%임을 확인하였으며, 칠레 스위트 체리 추출물과 임실 스위트 체리 추출물에서 열수추출물의 수율이 조금 더 높았는데, 이는 극성을 가진 생리활성 물질의 함유량이 조금 더 높은 것으로 판단된다. 하지만, 폴란드 스위트 체리 추출물에서는 70% 주정 추출에서 더 높은 수율을 확인할 수 있었다. 이는 폴란드 스위트 체리 추출물에 칠레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물보다 분자 내 비극성인 생리활성 물질을 더 많이 함유하는 것으로 판단된다.

Table 4. Extraction yields of *Prunus avium* L. extracts from domestic (Imsil region) (IW, IE, IEH, IEE, IEW), Poland (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and Chile (CW, CE, CEH, CEE, CEW)

Sample	Weight (g)	Yield (%)
IW	45.31	22.66
IE	42.92	21.46
IEH	0.38	0.87
IEE	0.68	1.58
IEW	38.88	90.58
PW	60.77	30.39
PE	72.02	36.01
PEH	0.46	0.64
PEE	1.93	2.68
PEW	60.91	84.57
CW	58.55	29.28
CE	56.98	28.49
CEH	0.34	0.6
CEE	0.65	1.14
CEW	48.08	84.37

## 제 2 절 총 페놀화합물 함량 측정

### 1. Total polyphenol contents (TPC)

TPC 측정 결과는 Fig. 9와 같으며, 칠레 스위트 체리 추출물, 폴란드 스위트 체리 추출물 TPC 분석 결과를 확인해 보면 CEE, PEE의 값이 가장 높게 측정되었다. 이는 칠레 스위트 체리 추출물, 폴란드 스위트 체리 추출물에는 비극성 polyphenol 물질이 많은 것으로 판단되며, 그에 반해 임실 스위트 체리 추출물 TPC에서는 IW, IE, IEE, IEW에서 비슷한 양의 polyphenol 물질을 함유할 것으로 사료된다.

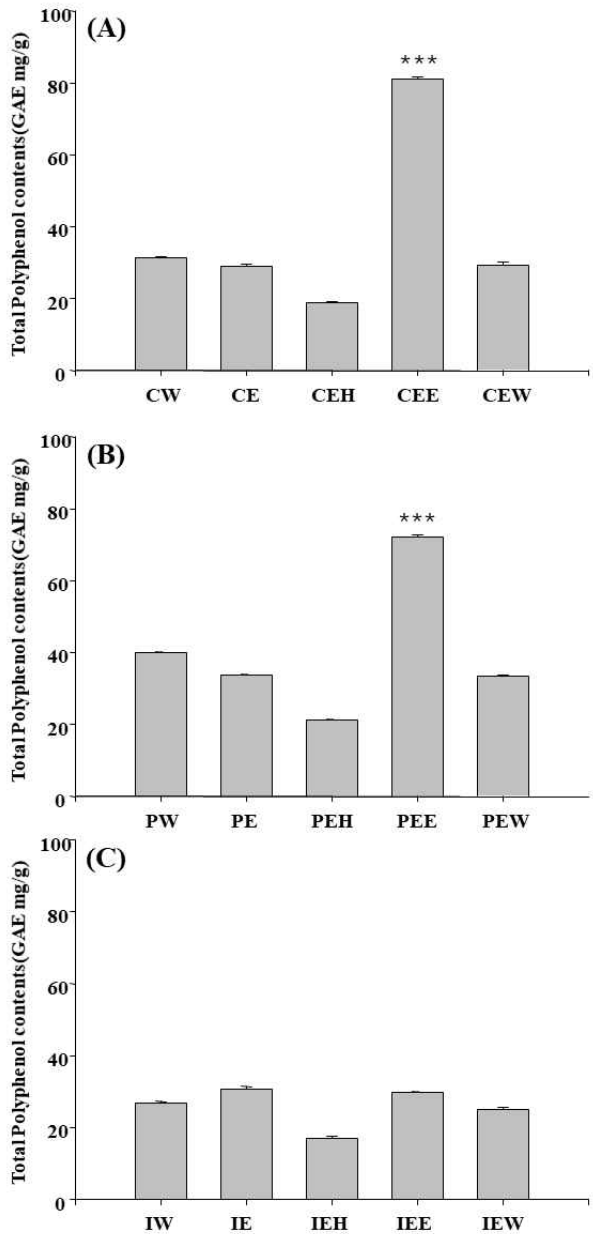


Figure. 9 Total polyphenol contents of (A) *P. avium L.* extract (CW, CE, CEH, CEE, CEW), (B) *P. avium L.* (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and (C) *P. avium L.* extract (IW, IE, IEH, IEE, IEW). The data are represented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. GAE Gallic acid equivalents, \*\*\*  $P < 0.001$  versus.

### 제 3 절 총 플라보노이드 함량 측정

#### 2. Total flavonoid contents (TFC)

TFC 측정 결과는 Fig. 10와 같으며, 폴란드 스위트 체리 추출물, 임신 스위트 체리 추출물 TFC 분석 결과를 확인해보면 PEE, IEE의 값이 높게 측정 되었다. 이는 폴란드 스위트 체리 추출물, 임신 스위트 체리 추출물에는 비극성 flavonoid 물질이 많은 것으로 판단되며, 그에 반해 칠레 스위트 체리 추출물에는 CE, CEE, CEW에 비슷한 양의 flavonoid 물질이 있는 것으로 사료 된다.

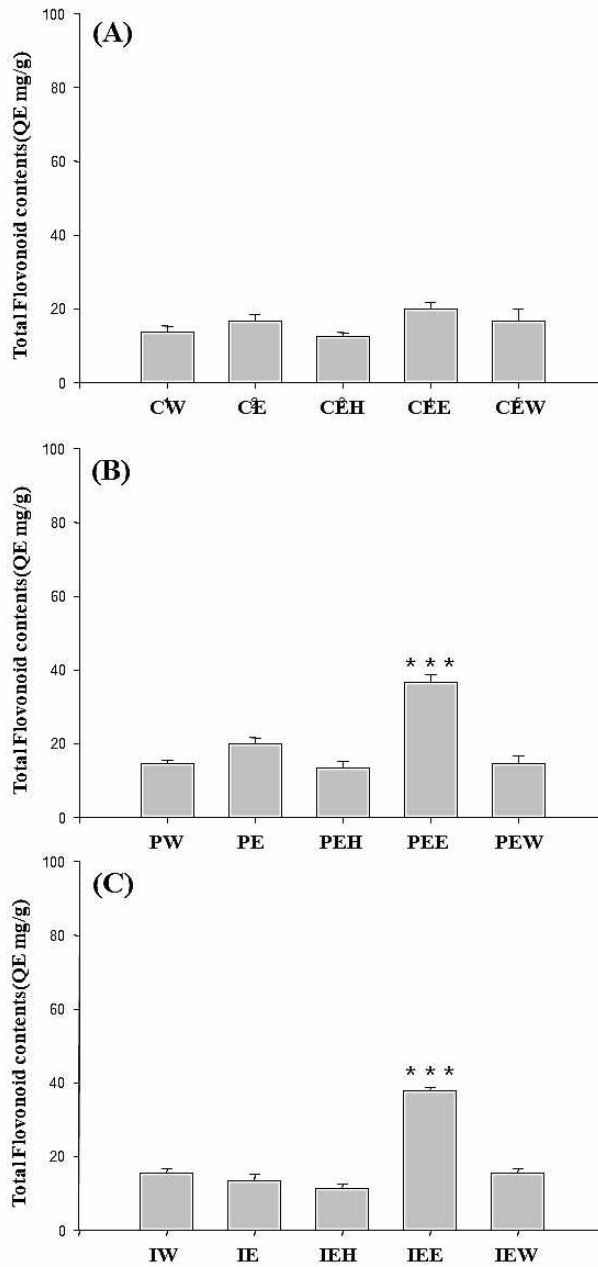


Figure. 10 Total flavonoid contents of (A) *P. avium L.* extract (CW, CE, CEH, CEE, CEW), (B) *P. avium L.* (PW, PE, PEH, PEE, PEW), and (C) *P. avium L.* extract (IW, IE, IEH, IEE, IEW). The data are represented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. GE Quercetin equivalents, \*\*\*  $P < 0.001$  versus.

## 제 4 절 산지별 원물의 플라보놀 배당체 함량 분석

### 1. HPLC 분석 결과

폴란드 스위트 체리 추출물의 PW (quercetin  $1.88 \pm 0.08$  mg/g, kaemferol  $0.43 \pm 0.01$  mg/g, isorhamnetin  $0.38 \pm 0.02$  mg/g), PE (quercetin  $2.11 \pm 0.09$  mg/g, kaemferol  $0.48 \pm 0.01$  mg/g, isorhamnetin  $0.45 \pm 0.01$  mg/g)에서 높은 quercetin, kaemferol, isorhamnetin의 함량을 확인할 수 있었으며, 칠레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물의 CW (quercetin  $0.43 \pm 0.01$  mg/g, kaemferol  $0.26 \pm 0.01$  mg/g, isorhamnetin  $0.042 \pm 0.01$  mg/g), CE (quercetin  $0.89 \pm 0.02$  mg/g, kaemferol  $0.41 \pm 0.01$  mg/g, isorhamnetin  $0.042 \pm 0.01$  mg/g), IW (quercetin  $0.44 \pm 0.04$  mg/g, kaemferol  $0.17 \pm 0.02$  mg/g, isorhamnetin  $0.038 \pm 0.03$  mg/g), IE (quercetin  $0.72 \pm 0.01$  mg/g, kaemferol  $0.24 \pm 0.01$  mg/g, isorhamnetin  $0.058 \pm 0.01$  mg/g)에서는 다소 낮은 함량을 확인하였다(Table. 5).



Table 5. Flavonol glycosides contents of *P. avium L.* extract from domestic (IW, IE), Poland (PW, PE), and Chile (CW, CE)

NO.	Sample	IW	IE	PW	PE	CW	CE
1	Quercetin	0.44 ±	0.72 ±	0.43 ±	0.89 ±	1.88 ±	2.11 ±
	Dihydrate	0.04	0.01	0.01	0.02	0.08	0.09
2	Kaempferol	0.17 ±	0.24 ±	0.26 ±	0.41 ±	0.43±	0.48 ±
		0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
3	Isorhamnetin	0.038 ±	0.058 ±	0.042 ±	0.042 ±	0.38 ±	0.45 ±
		0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
Total		0.648	1.018	0.732	1.342	2.69	3.04

## 2. HPLC/Mass 분석 결과

질량분석기는 분자의 질량을 재는 기기로 1912년에 Thompson에 의해 첫 질량분석기가 만들어졌다. 질량분석기는 물질의 질량을 질량 대 전하의 비로 측정하여, 이온은 여러 가지 이온화 방법에 의해서 형성된다. 본 연구에서는 폴란드 스위트 체리, 추출물, 칠레 스위트 체리 추출물의 플라보노이드 함량을 비교 분석하였다. 실험결과 폴란드 스위트 체리 추출물, 칠레 스위트 체리 추출물의 CW, CE, PW, PE와 임실 스위트 체리 추출물의 IW, IE에서 negative 영역에서 kaemferol, quercetin, isorhamnetin의 정성 분석을 확인하였다(Fig. 11).

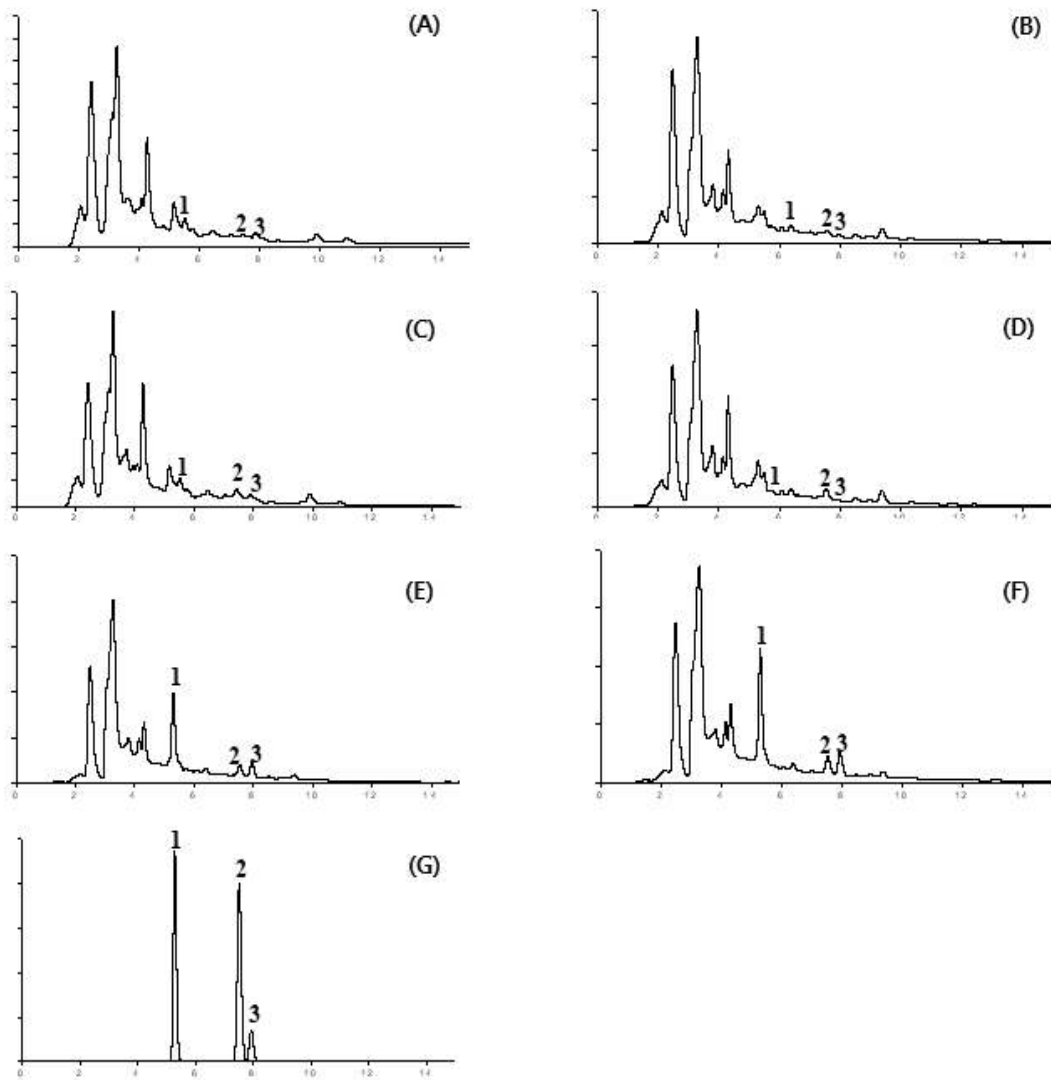


Figure 11. HPLC/MS profile of *P. avium* L. extracts from domestic (Imsil) (IW, IE), Poland (PW, PE), and Chile (CW, CE) and standard mixture using diode array detection at 370 nm. Numbers indicate the following: (1) quercetin dihydrate, (2) kaempferol, and (3) isorhamnetin. (A:IW, B:IE, C:CW, D:CE, E:PW, F:PE, G(G:Standard)).

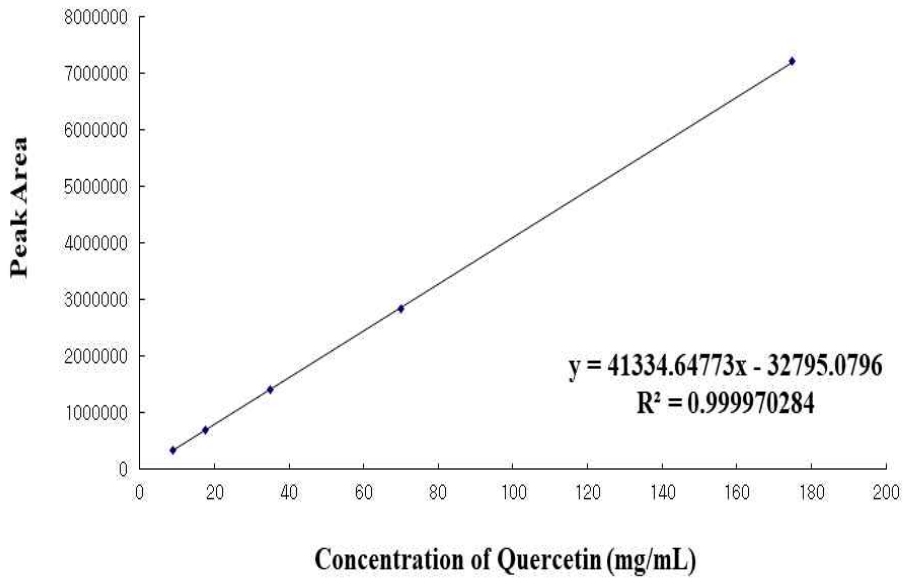


Figure 12. Quercetin standard curve for HPLC.

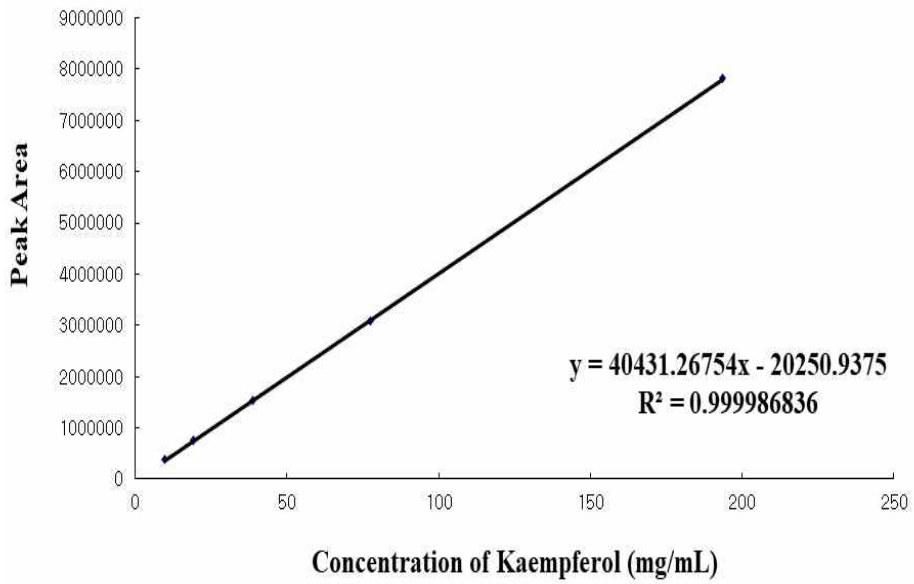


Figure 13. Kaempferol standard curve for HPLC.

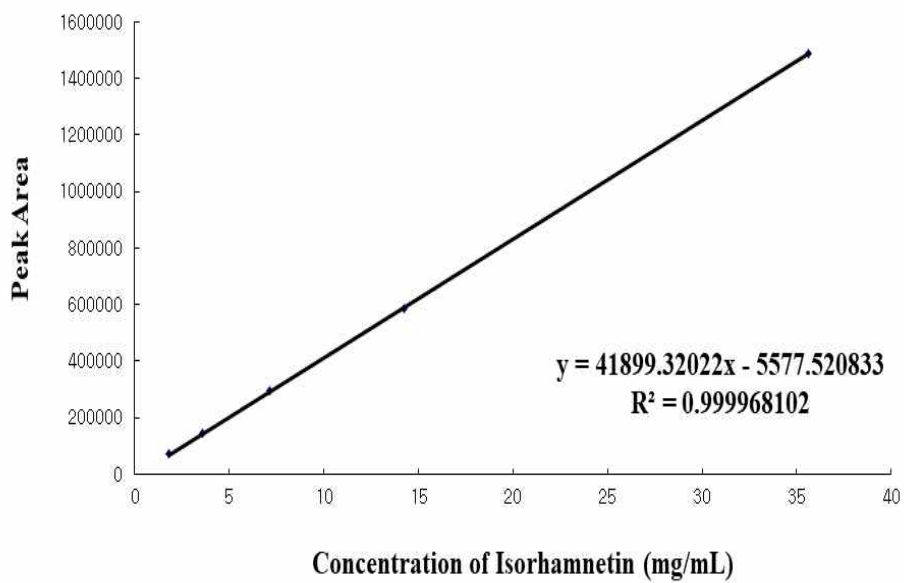


Figure 14. Isorhamnetin standard curve for HPLC.

## 제 5 절 항산화 활성 측정

### 1. ABTS radical scavenging activity

항산화 활성을 radical scavenging으로 측정하는 ABTS radical scavenging 방법은 극성을 띠는 물질에서 소거활성이 높은 것으로 알려져 있으며, 단시간에 측정할 수 있고 소수성, 친수성 모두 적용가능한 실험법이다[75]. ABTS 용액과 산화제인 potassium persulfate를 혼합하여 ABTS radical이 생성되며, 청색으로 변하게 되는 비색법을 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다. 항산화제에 의해 ABTS radical이 환원되면 청색에서 투명색으로 변화가 일어난다. 비색법을 이용한 항산화능 측정중 ABTS radical은 양이온 radical의 변화에 따른 측정 방법이다.

ABTS radical scavenging을 측정한 결과, IC<sub>50</sub>값은 폴란드 스위트 체리 추출물, 칠레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물의 추출용매의 분획에 따른 비교에서는 CEE에서 152.20 µg/mL, PEE에서 98.30 µg/mL, IEE에서 142.30 µg/mL에서 가장 높은 항산화 활성이 확인되었으며, 폴란드 스위트 체리 추출물 PEW는 측정농도에서 IC<sub>50</sub>값을 찾을 수 없었다. 그 외 모든 용매 추출물 시료에서 다소 활성이 높음을 확인하였으며(Fig. 15), 주정 추출물에서의 항염증 효과가 있을 것이라 사료된다.

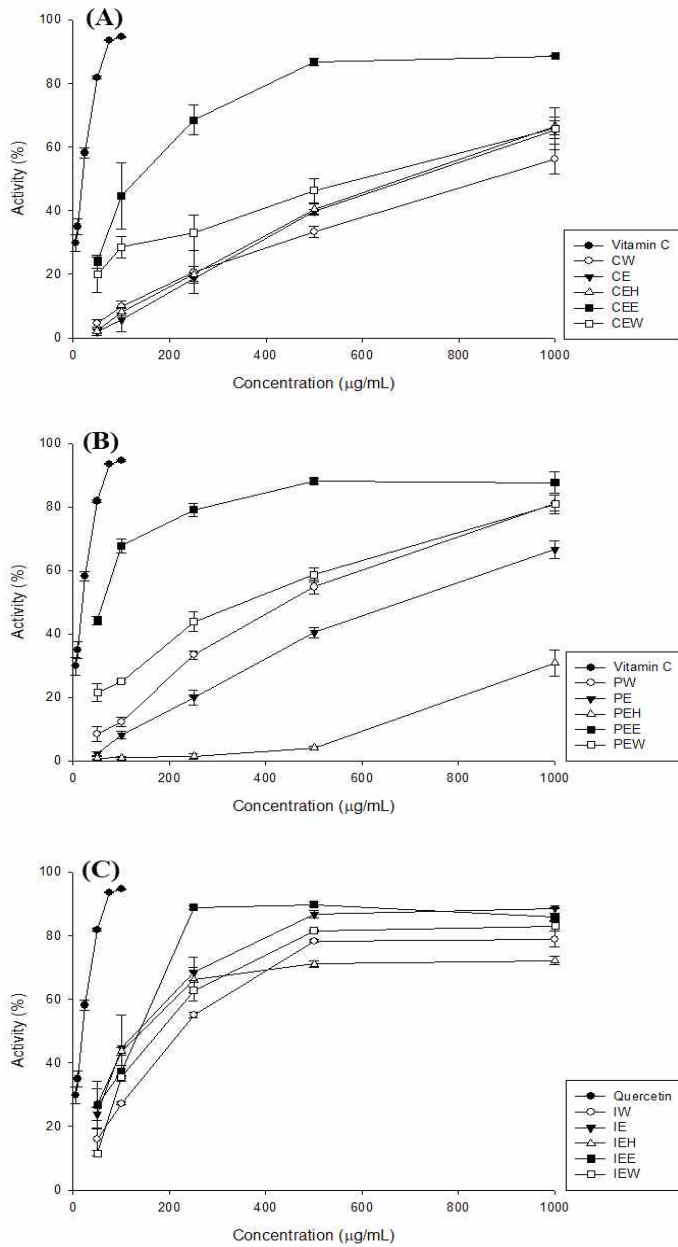


Figure 15. ABTS activity of (A) extracts of *Prunus avium L.* (CW, CE, CEH, CEE, CEW) and (B) extracts of *Prunus avium L.* (PW, PE, PEH, PEE, PEW) and (C) extracts of *Prunus avium L.* (IW, IE, IEH, IEE, IEW). The appropriate amount of Vitamin C was used as a positive control. The results are the mean  $\pm$  SD from three independent experiments.



## 2. DPPH radical scavenging activity

비교적 안정한 자유라디칼을 갖는 DPPH radical scavenging은 색이 변화하면서 항산화 물질이 환원되어 자유라디칼 소거능을 평가하며, 천연물의 항산화 활성을 측정하는 비색법으로 많이 활용되는 실험이다[76]. 환원력이 높을수록 라디칼 소거능은 상승하게 되는데 이러한 물질의 환원력이 높을수록 Kang 등은 DPPH radical scavenging이 polyphenol과 flavonoid 물질에 대한 항산화 활성의 지표로 활용할 수 있다고 하였다[77]. DPPH radical은 인위적으로 만들어진 radical로서 일반적으로 체내에서 확인되는 항산화 메카니즘과 다른 메카니즘으로 다른 항산화 활성을 나타낸다. 인위적으로 만들어진 DPPH radical은 안정한 radical이며 비색법으로 식물에 존재하는 간단하게 평가하기 쉬운 항산화제의 평가방법으로 많이 사용되고 있다. DPPH radical scavenging을 측정한 결과 칠레 스위트 체리 추출물의 CE에서 115.16  $\mu\text{g/mL}$  가장 높은 항산화 활성이 확인되었으며, 폴란드 스위트 체리 추출물의 PE에서 55.12  $\mu\text{g/mL}$ , PEH 56.24  $\mu\text{g/mL}$ , PEE에서 48.64  $\mu\text{g/mL}$ 로 높은 항산화능 활성이 확인되었다. 임실 스위트 체리 추출물의 IE에서 65.31  $\mu\text{g/mL}$ , IEH에서 71.59  $\mu\text{g/mL}$ , IEE 79.61  $\mu\text{g/mL}$ 로 높은 항산화 활성을 확인이 확인되었다(Fig. 16). 각 추출물에 대한 DPPH radical 소거 활성은 비교적 주정 추출물의 분획물에 대하여 우수한 효과를 보였으며, 칠레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물의 주정 추출의 시료에서 높은 활성을 나타내 항염증에 대해 효과가 있을 것이라 사료된다.

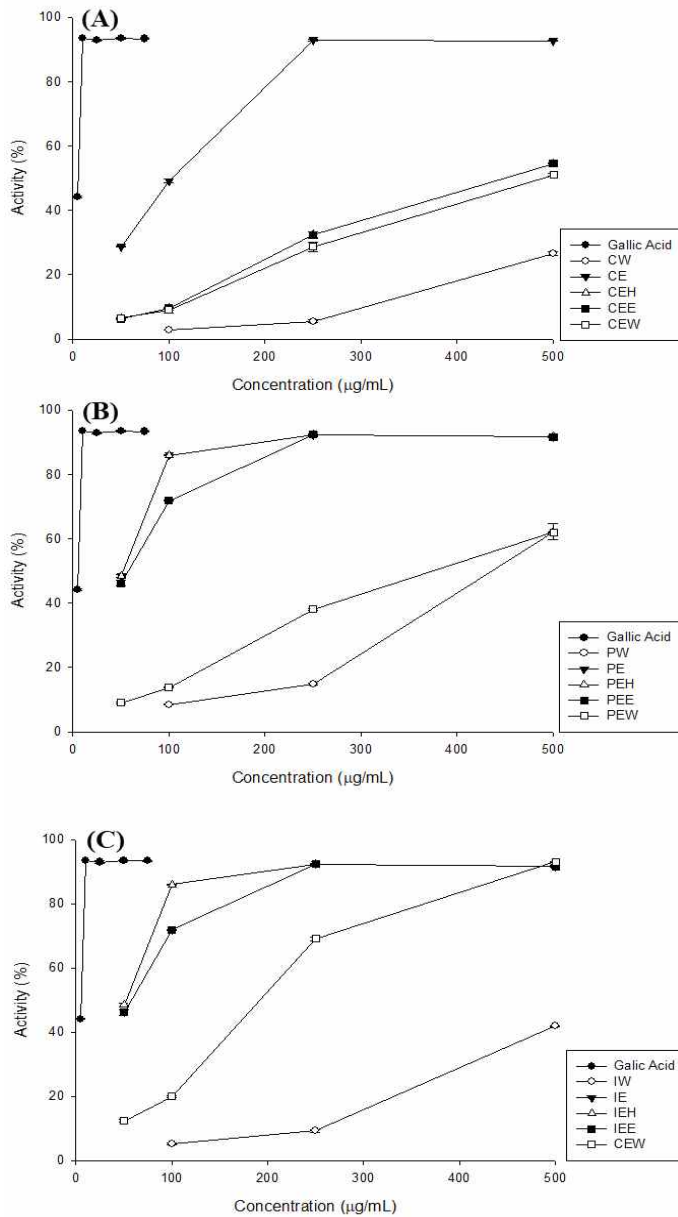


Figure 16. DPPH free radical scavenging activity of (A) extracts of *Prunus avium L.* (CW, CE, CEH, CEE, CEW) and (B) extracts of *Prunus avium L.* (PW, PE, PEH, PEE, PEW) and (C) extracts of *Prunus avium L.* (IW, IE, IEH, IEE, IEW). The appropriate amount of gallic acid was used as a positive control. The results are the mean  $\pm$  SD from three independent experiments.

## 제 6 절 항염증 효능 측정

### 1. MTT assay

RAW264.7 cell의 생존율과 항염증 활성 실험에서 후보 시료(IE)의 투여 농도를 결정하기 위하여 후보 시료를 농도별(50-800  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 뒤 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 각 후보 시료(CW, PW, IW, CE, PE, IE)를 농도별로 24 h 처리한 RAW 246.74 cell에 세포 생존율을 확인한 결과, 무처리군인 control을 백퍼센트 기준으로 잡았을 때, CW 처리군의 경우 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 CW, CE, PW, PE, IW, IE에서 모두 유의적으로 세포 생존율을 확인하였으며, 시료를 투여하지 않은 대조군에 비해 모두 아무런 독성이 나타나지 않았다(Fig. 17). 이 결과에 따라 Nitric Oxide (NO) 생성 억제를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

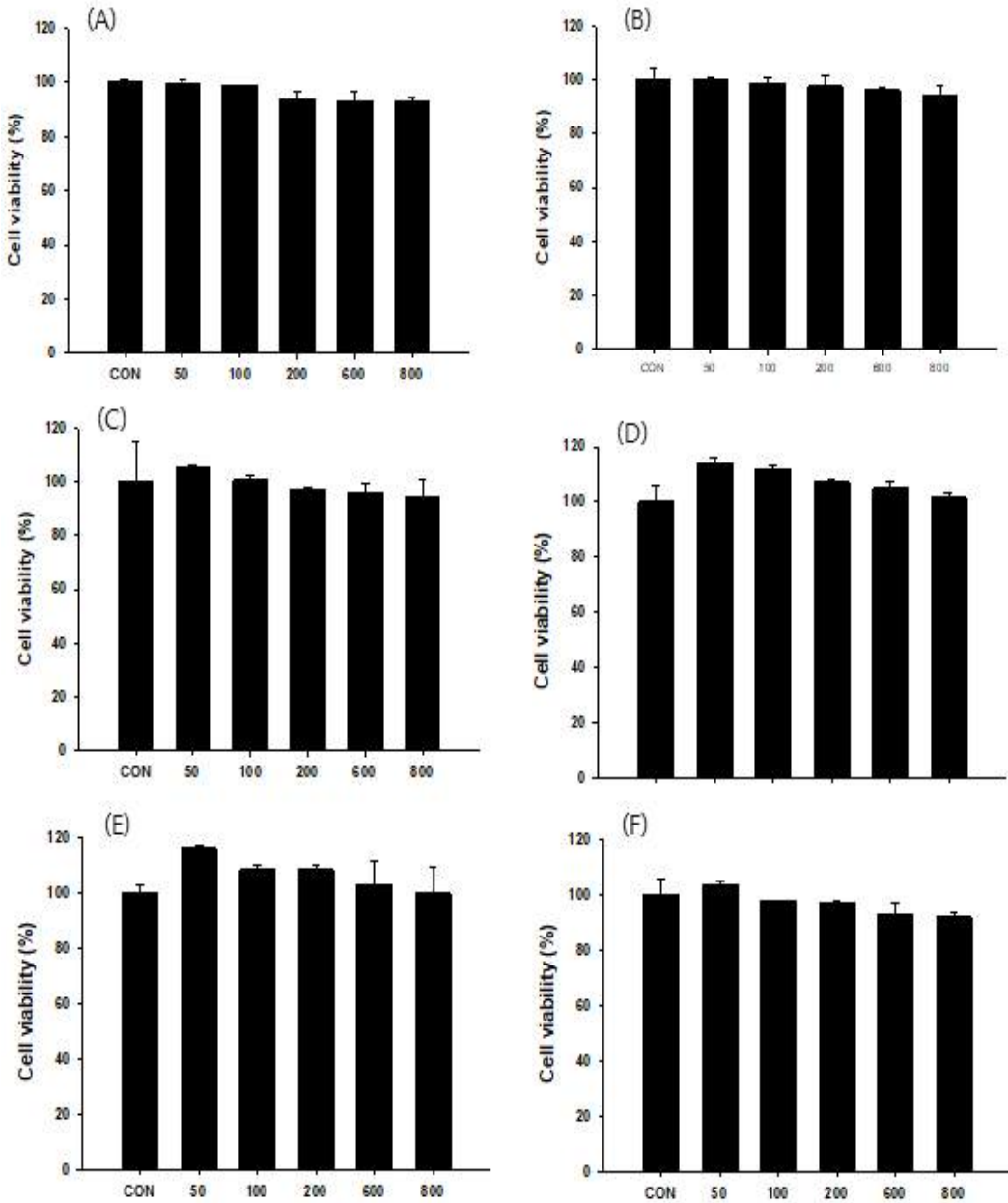


Figure 17. Cell viability of RAW 264.7 cells with the extracts. (A) CW, (B) PW, (C) IW, (D) CE, (E) PE, (F) IE. RAW 264.7 cells were treated with the extracts (50-800 µg/mL) for 24 h. The results are the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## 2. Nitric Oxide (NO) Analysis

Nitric Oxide (NO)는 ROS중에서 염증을 유발시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이런 NO가 많이 생성되면 통증, 열 등을 동반하는 염증 반응을 일으켜 과도하게 생성되는 염증은 패혈성 쇼크를 유발시키고 지속적으로 활성이 이어지면 만성염증 및 자가 면역질환으로 진행될 수 있다.

RAW 264.7 cell에 염증 유발물질인 LPS를 처리하여 염증을 유도하고 후보 시료 (IE)를 동시 투여하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 18과 같으며, LPS를 처리한 군에서는 염증을 유발시켜 무처리군 대비  $214 \pm 7.17$  %를 생성하였으며, CW는  $50 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서  $173.53 \pm 6.35\%$  감소하였고,  $100 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서는  $163.24 \pm 6.73\%$ 로 농도 의존적으로 감소함을 보였다. CE는  $50 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서  $166.31 \pm 5.87\%$  감소하였고,  $100 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서는  $153.63 \pm 1.11$  %로 농도 의존적으로 감소함을 보였다. PW는  $50 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서  $183.92 \pm 4.35\%$  감소하였고,  $100 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서는  $169.94 \pm 8.28\%$ 로 농도 의존적으로 감소함을 보였다. PE는  $50 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서  $144.79 \pm 8.55\%$  감소하였고,  $100 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서는  $120.08 \pm 5.60\%$ 로 농도 의존적으로 감소함을 보였다. IW는  $50 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서  $198.19 \pm 3.35$  % 감소하였고,  $100 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서는  $178.48 \pm 5.81\%$ 로 농도 의존적으로 감소함을 보였다. IE는  $50 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서  $153.23 \pm 4.89\%$  감소하였고,  $100 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 시료에서는  $144.44 \pm 2.07\%$ 로 농도 의존적으로 감소함을 보였다. 열수 추출물과 70 % 주정 추출물 중에서  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 가장 우수한 활성을 확인하였다.

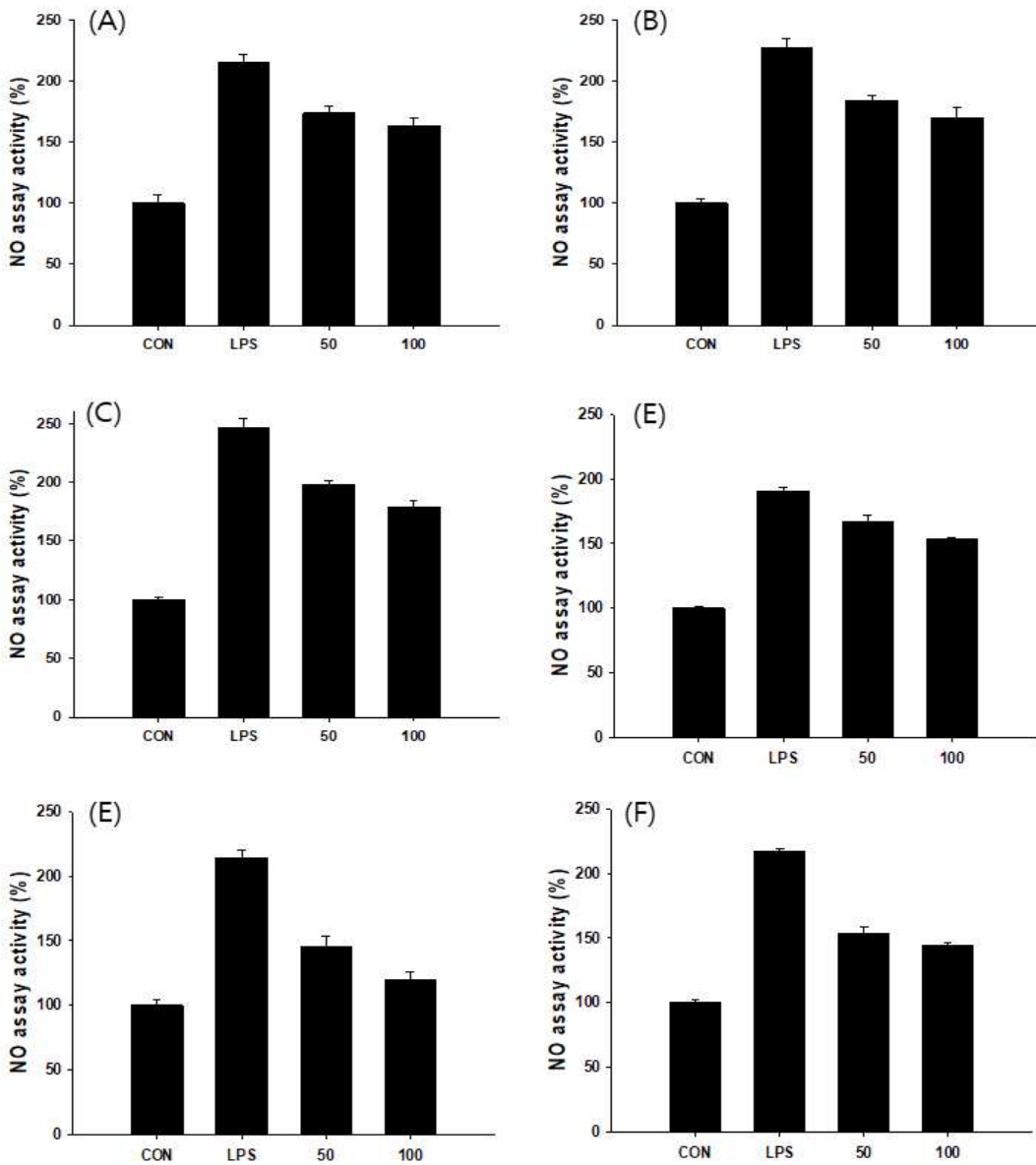


Figure 18. Nitric oxide production of (A) CW, (B) PW, (C) IW (D) CE, (E) PE, (F) IE extracts. RAW 264.7 cells were treated with LPS alone (1 µg/mL), or with LPS (1 µg/mL) and extracts (50-100 µg/mL). The results are the mean ± SD from three independent experiments. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 3. Western Blot Analysis

RAW 264.7 cell에서 iNOS와 COX-2는 신체의 방어체계를 자극하는 신호 물질인 염증성 cytokine과 NO를 분비시키는 단백질이며, NF- $\kappa$ B pathway에 조절된다. 후보 시료(IE)는 LPS를 처리한 RAW 264.7 cell에서 발견되는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 유의적으로 억제시켰다. 또한, 후보 시료(IE)가 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell의 NF- $\kappa$ B 활성화에 영향을 주는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현 정도를 검토한 결과, 후보 시료(IE) I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현양이 유의적으로 증가됨을 확인하였다(Fig. 19). 향후 NF- $\kappa$ B 활성을 확인하기 위해 추가 실험을 진행할 필요가 있다.

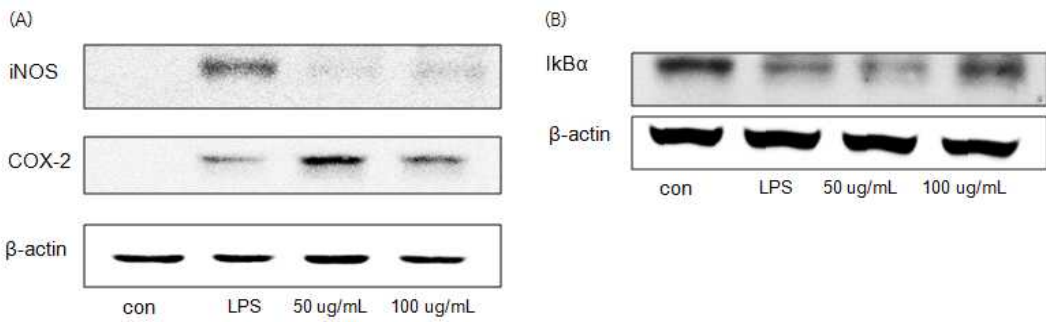


Figure 19. Inhibition of iNOS expression and MAP kinase phosphorylation by IE in LPS-activated RAW 264.7 cells. (A) Effect of varying concentrations of IE on LPS-induced iNOS and COX-2 inhibition. (B) Immunoblotting for I $\kappa$ B $\alpha$ . Cells were pretreated with IE for 1 h before LPS (1  $\mu$ g/mL) stimulation for 15 min.



## 제 4 장 결론

스위트 체리는 전세계적으로 수요가 늘어나고 있으며, 많은 연구를 통하여 항산화, 항염, 항암 등 다양한 분야에서 약리작용을 가지고 있음을 확인하였다. 모든 천연물은 재배되는 지역과 환경에 따라 유용 생리활성 물질이 변하게 된다. 앞선 스위트 체리의 연구는 국외산의 기준을 감안하여 임실 스위트 체리의 항산화 활성, 항염 효과에 대한 비교를 하고자 하였다. 본 연구에서는 폴란드 스위트 체리 추출물, 칠레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물의 항산화 활성, 효소 저해 활성 및 Raw 264.7 cell 실험을 통하여 항염증 활성을 확인 하였다. 실험에 사용한 스위트 체리는 가압추출 공정을 적용하여 일반 열수 조건보다 추출 수율을 증가시켰다. 또한 스위트 체리 70 % 주정 추출 후 층 분리하여 유용 생리활성 물질을 각 층마다 분획하여 실험을 진행하였다. 총 폴리페놀 함유량 측정을 위해 TPC를 측정 한 결과 폴란드 스위트 체리 추출물, 칠레 스위트 체리 추출물의 함유량이 임실 스위트 체리 추출물보다 더 높게 측정되었으며, 폴란드 스위트 체리 추출물, 칠레 스위트 체리 추출물에는 비극성 polyphenol 물질이 많이 있을 것으로 판단된다. 플라보노이드 함유량을 측정하기 위해 TFC를 측정한 결과 폴란드 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물의 함유량이 칠레 스위트 체리 추출물보다 더 높게 측정되었으며, 폴란드 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물에는 비극성 flavonoid 물질이 많이 있을 것으로 판단된다. 스위트 체리 추출물에 함유된 플라보놀 배당체를 정량분석하기 위하여 HPLC를 사용하였으며, 검증 절차를 위하여 HPLC/MS를 사용하여 플라보노이드 배당체의 해당 물질을 정성 분석하였다. 플라보놀 배당체로서 standard 물질로 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 사용하였다. 정성 분석 결과 플라보노이드 배당체가 폴란드 스위트 체리 추출물, 칠레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물에서 확인이 되었으며, 폴란드 스위트 체리 추출물에서 플라보놀 배당체의 높은 함량을 확인할 수 있었다. 칠레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물에서는 폴란드 스위트 체리 추출물보다 낮은 함량이 확인되었다. 추출 용매와 원산지에 따라 함유된 성분의 차이로 인하여 폴리페놀, 플라보노이드 함량, 항산화 활성 및 항염증 활성의 차이가 존재하는 것으로 판단된다. 항산화 활성은 ABTS radical scavenging 및 DPPH radical scavenging 활성을 통하여 확인하였으며, 열수추출물 보다 70 % 주정추출물의 항산화 활성이 더 높은 것으로 확인되었다. 항염증 활성을 측정하기 위해 폴란드 스위트 체리 추출물, 칠

레 스위트 체리 추출물, 임실 스위트 체리 추출물에서의 열수 추출물과 70 % 주정 추출물에 대해 RAW 264.7 cell을 사용하여 세포 생존율을 측정하였고, 그 결과 시료를 투여하지 않은 대조군에 비해 모두 아무런 독성이 나타나지 않았다. LPS를 처리한 RAW 264.7 cell에 CW, CE, PW, PE, IW, IE 동시 투여 후 NO 측정 결과 농도 의존적인 NO 생성 억제 능력을 확인하였다. LPS를 처리한 RAW 264.7 cell에 IE를 투여 후 western blot 분석 결과, iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 유의적으로 억제시켰고, NF- $\kappa$ B 활성화에 영향을 주는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현 정도를 검토한 결과, IE는 I $\kappa$ B $\alpha$ 를 유의적으로 증가 됨을 확인하였으며, NF- $\kappa$ B의 발현양을 감소시킬 것으로 예상된다.

결론적으로 아직까지는 외국산 스위트 체리의 효능이 국내산 스위트 체리보다 더 효과가 좋은 것으로 확인이 되었지만, 임실 스위트 체리의 다량의 phytochemical을 함유하고 있고, 항산화 및 항염증 활성 또한 효능이 있음을 확인되었으므로 추후 임실 스위트 체리의 지속적인 연구를 통해 항염증 치료제로서 활용 가능할 것으로 사료 된다.

## References

- [1] Rashidkhani, B., P. Lindblad, and A. Wolk (2005) Fruits, vegetables and risk of renal cell carcinoma: a perspective study of Swedish women. *Int J Cancer*. 113(3): 451-5.
- [2] Serrano, M., F. Guillén, D. Martínez-Romero, S. Castillo, and D. Valero (2005) Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J Agric Food Chem*. 53; .2741-2745.
- [3] Burkhardt, S., D. X. Tan, L. C. Manchester, R. Hardeland, and R. J. Reiter (2001) Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *J Agric Food Chem*. 49: 4898-4902
- [4] Ferretti, G., T. Bacchetti, A. Belleggia, and D. Neri (2010) Cherry Antioxidants: From Farm to Table. *Molecules* 15(10): 6993-7005.
- [5] Gao, L., and G. Mazza (1995) Characterization, quantification, and distribution of anthocyanins and color less phenolics in sweet cherries. *J Agric Food Chem*. 43: 343-346.
- [6] Kim, K. H., S. Y. Lee, and H. S. Yook (2009) Quality characteristics of muffins prepared with flowering cherry (*Prunus serrulata* L. var. *spontanea* Max. wils.) fruit powder. *J Kor Soc Food Sci Nutr*. 38: 750-756
- [7] Kim, Y. H (1999) The characterization of anthocyanin pigments prepared from cherry (*Prunus serrulata* L. var. *spontanea* Max. wils) for the potential sources of red colorant. *J Kor Soc Agric Chem Biotech*. 42: 134-139.
- [8] Rimbach, G., J. Fuchs, and I. Packer (2005) Application of nutrigenomics tools to analyze the role of oxidation and antioxidant in gene expression. Taylor & Francis group., pp. 1-12. Christian Albrechts University, JKiel, Germany.
- [9] Seyoum, A., K. Asres, and F. K. El-Fiky (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67(18): 2058-2070.
- [10] Slater T. F (1989) Disturbances of free radical reactions: Acause or consequence

of cell injury: Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam. pp. 1-9

- [11] Cross, C. E., B. Halliwell, E. T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, J. M. McCord, D. Harman (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 107: 526-545.
- [12] Campanella, L., A. Bonanni, E. Finotti, M. Tomassetti (2004) Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosensors and Bioelectronic.* 19(7): 641-651.
- [13] Choung, M. G (2004) Analysis of anthocyanins. *Korean J Crop Sci*, 49: 55-67.
- [14] Del Rio, D., A. Rodriguez-Mateos, J. P. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, and A. Crozier (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 18(14): 1818-1892.
- [15] Rossi, A., I. Serraino, and P. Dugo (2003) Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radic Res.* 37: 891-900.
- [16] Lau, F. C., B. Shukitt-Hale, and J. A. Joseph (2006) Beneficial Effects of Berry Fruit Polyphenols on Neuronal and Behavioral Aging. *J Sci Food Agric.* 86: 2251-2255.
- [17] Lee, J., H. J. Kim, G. Y. Jang, K. H. Seo, M. R. Kim, Y. H. Choi, and J. W. Jung (2020) Effect of *Leonurus japonicus* Houtt on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice. *J Physiol Pathol Korean Med.* 34: 81-87.
- [18] Kim, B. S (2014) The effects of *Phragmites rhizoma* herbal-acupuncture solution on inflammation in human mast cells and human alveolar epithelial cell lines *Phragmites rhizoma's* effects. *The Journal of Korean Medicine.* 35(4): 1-9.
- [19] Miranda, C. L., J. F. Stevens, V. Ivanov, M. McCall, B. Frei, M. L. Deinzer, and D. R. Buhler (2000) Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *Agricultural and food chemistry.*

48(9): 3876-84.

- [20] Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79: 727-747.
- [21] Iwashina, T (2013) Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales (Review). *Bull Natl Mus Nat Sci.* 39: 25-51.
- [22] Menvielle-Bourg, F. J (2005), Superoxide dismutase (SOD), a powerful antioxidant, is now available orally. *Phytothérapie*, 3 (3), 118-121
- [23] Smirnoff, N., and Q. J. Cumbes (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4): 1057-1060.
- [24] Beckman, K. B.; Ames, B. N. (1998), The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78 (2), 547-81.
- [25] Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5:9-19.
- [26] Kato Y, A. Nagao, J. Terao, and T, Osawa (2003) Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67(5): 1136-1139.
- [27] Scott B. C., J. Butler, B. Halliwell, and O. I. Aruoma (1993) Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radic Research Commun.* 19(4): 241-253.
- [28] Li, S., H. Y. Tan, N. Wang, Z. J. Zhang, L. Lao, C. W. Wong, and Y. Feng (2015) The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 16(11): 26087-26124.
- [29] Ashock, B. T., and R. Ali (1999) The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology.* 34: 293-303.
- [30] Fang, Y. Z., S. Yang, and G. Wu (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18: 872-879.
- [31] Lee, H. S., C. Y. Hwang, S. Y. Shin, K. S. Kwon, and K. H. Cho (2014),

MLK3 is part of a feedback mechanism that regulates different cellular responses to reactive oxygen species. *Sci signal.* 7: (328), ra52.

- [32] Briganti, S., and M. Picardo (2003) Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 17(6): 663-669.
- [33] Lee, J. N. Koo, and D. B. Min (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY.* 3(1): 21-33.
- [34] Niki, E., N. Noguchi, H. Tsuchihashi, N. Gotoh (1995) *The American journal of clinical nutrition.* 62(6): 1322S-1326S.
- [35] Chan, A. C (1993) Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 71(9): 725-731.
- [36] Stahl. W., and H. Sies (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine.* 24(6): 345-351.
- [37] Sato, M., N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, and H. Ochi (1996) Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44(1): 37-41.
- [38] Lu, Y., and L. Y. Foo (2000) Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food chemistry.* 68(1): 81-85.
- [39] Areias, F. M., A. C. Rego. C. R. Oliverira, and R. M. Seabra (2001) Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe<sup>2+</sup>-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem Pharmacol.* 62(1): 111-118.
- [40] Hollman P. C (2001) Evidence for health benefits of plant phenol: local or systemic effects?. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 81; 842-852
- [41] Allison, M. C., A. G. Howatson, C. J. Torrance, F. D. Lee, and R. I. Russell (1992) Gastrointestinal Damage Associated with the Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *N Engl J Med.* 327: 1882-1883.

- [42] Ahn, G. Y., and S. H. Bae (2018) Strategies for the safe use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Korean Med Assoc.* 61(6): 367-75.
- [43] Nakano, Y., and K. Asada (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology.* 22(5): 867-880.
- [44] Choi, H. R., J. S. Choi, Y. N. Han, S. J. Bae, and H. Y. Chung (2002) Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytotherapy Research*, 16(4): 364-367.
- [45] Benzie, I. F., and J. J. Strain (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- [46] Tonomura, B. I., H. Nakatani, M. Ohnishi, J. Yamaguchi-Ito, and K. Hiromi (1978) Test reactions for a stopped-flow apparatus: Reduction of 2, 6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid. *Analytical Biochemistry*, 84(2): 370-383.
- [47] Tak, P. P., and G. S. Firestein (2001) NF-kappa B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 107: 7-11
- [48] Bodet, C., F. Chandad and D. Grenier (2006) Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *Journal of Dental Research*, 85: 235-239.
- [49] Fujihara, M., M. Muroi, K. Tanamoto, T. Suzuki, H. Azuma, and H. Ikeda (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*, 100: 171-194.
- [50] Yu, X., and T. Kensler (2005) Nrf2 as a target for cancer chemoprevention.

- Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 591: 93-102.
- [51] Dinarello, C. A (2010) Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 140: 935-950.
- [52] Moon, E. Y., and S. Pyo (2007) Lipopolysaccharide stimulates Epacl-mediated Rap1/NF-kappaB pathway in Raw 264.7 murine macrophages. *Immunol Lett*. 110: 121-125.
- [53] Lee, A. K., S. H. Sung, Y. C, Kim, and S. G. Kim (2003) Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol*. 139(1): 11-20.
- [54] Chen, T. L., C. C. Chang, Y. L. Lin, Y. F. Ueng, R. M. Chen (2009) Signal-transducing mechanisms of ketamine-caused inhibition of interleukin-1 beta gene expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage-like Raw 264.7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 240: 15-25.
- [55] Takeda, K., and S. Akira (2004) TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 16: 3-9.
- [56] Hiransai, P, S, Ratanachaiyavong, A, Itharat, P, Graidist, P, Ruengrairatanaroj, and J. Purintrapiban (2010) Dioscorealide B suppresses LPS-induced nitric oxide production and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages: The inhibition of NF-kappaB and ERK1/2 activation. *J Cell Biochem*. 109: 1057-1063.
- [57] Jacobs, A. T., and L. J. Ignarro (2001) Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*. 276: 47950-47957.
- [58] Reddy, D. B., and P. Reddanna (2009) Chebulagic acid (CA) attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-kappaB and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 381: 112-117.
- [59] Carter, A. B., K. L Knudtson, M. M. Monick, and G. W. Hunninghake (1999)



The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem.* 274: 30858-30863.

- [60] Cheng, P., T. Wang, W. Li, I. Muhammad, H. Wang, X. Sun, Y. Yang, J. Li, T. Xiao, and X. Zhang (2017) Baicalin alleviates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in chicken by suppressing TLR4-mediated NF-κB pathway. *Front Pharmacol.* 8: 547.
- [61] Chan, F. K. L., and D. Y. Graham (2004) Prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug gastrointestinal complications-review and recommendations based on risk assessment. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 19(10):1051-1061
- [62] Rodan, G. A., and T. J. Martin (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 289: 1508-1514.
- [63] Akdis, C. A (2012) Therapies for allergic inflammation: Refining strategies to induce tolerance, *Nature Medicine*, 18(5): 736-749.
- [64] Girard. B., and T. G. Kopp (1998) Physicochemical Characteristics of Selected Sweet Cherry Cultivars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2): 471-476.
- [65] Usenik, V., J. Fabčič, and F. Štampar (2007) Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Food Chemistry*, 107(1), 185-192.
- [66] Goncalves, B., A. K. Landbo, M. Let, A. P. Silva, E. Rosa and A. S. Meyer (2004) Storage affects the phenolic profiles and antioxidant activities of cherries (*Prunus avium* L.) on human low-density lipoproteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 84: 1013-1020.
- [67] Kim D. O., H. J. Heo, Y. J. Kim, H. S. Yang and C. Y. Lee (2005) Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells, *Journal of the*

Science of Food and Agriculture. 53: 9921-9927.

- [68] Ahn, S. M., H. Y. Ryu, D. K. Kang, I. C. Jung, and H. Y. Sohn (2009) Antimicrobial and Antioxidant activity of the Fruit of *Prunus avium* L., *Microbiology and Biotechnology Letters*, 37(4): 371-376.
- [69] Chaovanalikit, A. and R. E. Wrolstad (2004) Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties, *Journal of food scienc.* 69: 67-72.
- [70] Kang J. K., and G. R., Cho (2007) Production situation and demand estimates of cherry (*Prunus avium* L.) in Korea. *Korean Society of International Agriculture.* 19: 214-223.
- [71] Chen, C., H. Zhang, W. Xiao, Z. P. Yong, and N. Bai (2007) High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *Chromatography A*, 1154(2007): 250-259
- [72] Zu. Y., C. Li, Y. Fu, and C. Zhao (2005) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(2006), 714-719
- [73] Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* 26: 1231-1237.
- [74] Blois, M. S (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200.
- [75] Wang, M., J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E. J. LaVoie, T. C. Huang, and C. T. Ho (1998) Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12): 4869-4873.
- [76] Sharma, O. P., and T. K. Bhat (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4): 1202-1205.
- [77] Kang, Y. H., Y. K. Park, S. R. Oh, and K. D. Moon (1995) Studies on the

physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. Korean Journal of Food Science and Technology, 27(6): 978-984.

## 감사의 글

대학원에 진학하여 석사 과정을 공부하고 본 논문이 완성되기까지 많은 도움을 주신 모든 분들께 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

먼저, ‘똑똑하다는 것은 여러번 읽고 눈으로 새겨 머릿속에 기억하는 것이 많다는 것이다’ 라고 가르침을 주신 지도교수 신현재 교수님께 고개 숙여 진심으로 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 부족한 저에게 많은 기회를 주시고, 연구자로서의 인성과 지성이 발전할 수 있도록 지도해주셔서 감사합니다. 항상 격려해주신 이중현 교수님, 이재욱 교수님, 이정수 교수님 모두 진심으로 감사드립니다.

타지에서 직장을 다녀 바쁘다는 핑계로 연락도 자주 못드리지만 한결같이 저를 믿어주시고 응원해주시며 언제나 아들이 하는 선택엔 동참해주시고 응원해주시는 아버지, 어머니, 귀엽고 하나밖에 없는 여동생 모두 감사하고 사랑합니다. 가족이라는 단어는 저에게 정말 큰 힘이 되고 안정감을 얻습니다.

아무것도 모르고 직장을 다니며 대학원 석사과정을 접하며 처음부터 끝까지 도움과 가르침을 주신 최문희 박사님 너무 감사합니다. 항상 신경 써주는 동갑내기 친구 분위기 메이커 승화, 물어보면 친절하게 알려주는 지적인 다송이, 귀찮은 부탁 해도 항상 웃으면서 도와주는 나인이 모두에게 감사드립니다. 짧은 2년 동안 대학원 석사과정을 마치고 힘들게 논문을 마무리하게 되었습니다. 열심히 한다고 했지만 되돌아보니 항상 아쉬움이 많이 남는 것 같습니다. 지금까지 제가 받았던 사랑과 관심 그리고 많은 조언은 앞으로 제 앞 길에 있어 값진 재산이 될 것 같습니다. 제 삶에 있어 모든 분들께 너무 나도 감사드립니다.

21년 05월 28일

김 성 주