



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](#)

생활과학석사학위논문

Black Raspberry 씨와 포도 씨

탄닌 분획물의 항산화 및 항염증 효과

Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities of

Tannin Fraction

from Black Raspberry Seeds and Grape Seeds

2013년 1월

서울대학교 대학원

식품영양학과

박 미 영

Black Raspberry 씨와 포도 씨
탄닌 분획물의 항산화 및 항염증 효과

지도교수 황금택

이 논문을 생활과학석사 학위논문으로 제출함

2013년 1월

서울대학교 대학원

식품영양학과

박미영

박미영의 석사학위논문을 인준함

2013년 1월

위원장: 권 훈 정 (인)

부위원장: 황 인 경 (인)

위원: 황 금 택 (인)

국문 초록

Black Raspberry 씨와 포도 씨

탄닌 분획물의 항산화 및 항염증 효과

박미영

서울대학교 대학원 식품영양학과

Black raspberry (*Rubus occidentalis*)와 포도 (*Vitis labrusca*)는 한국에서 생과 또는 가공된 형태로 폭넓게 소비되고 있다. 현재까지 많은 연구에서 과육부분의 black raspberry와 포도의 생리 활성 기능이 보고되어 왔으며, 근래에는 과피, 씨, 줄기와 같은 부산물에도 이러한 잠재적인 가능성이 제시되고 있다. 따라서, 본 연구의 목적은 국내산 black raspberry 씨와 포도 씨로부터 총 추출물과 탄닌 분획물을 얻어 항산화 및 항염증 효과를 비교 평가하는 것이다.

Black raspberry 씨와 포도 씨의 총 추출물을 각각 BSTE (black raspberry seed total extract)와 GSTE (grape seed total extract)라 하고, black raspberry 씨와 포도 씨의 탄닌 분획물을 각각 BSTF (tannin

fraction from black raspberry seed)와 GSTF(tannin fraction from grape seed)라 명명하였다. 씨 추출물의 폴리페놀 함량, FRAP, DPPH, ABTS를 통한 항산화능 평가와 cell culture 실험에서의 세포 독성 및 NO 생성 억제 효과의 평가는 동결건조물의 건조 중량을 기준으로 나타냈다.

BSTE의 총 폴리페놀 함량은 271.0 mg GAE/g으로 GSTE(206.2 mg GAE/g)의 총 폴리페놀 함량보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$, t-test). BSTF의 총 폴리페놀 함량(787.8 mg GAE/g)은 GSTF(760.8 mg GAE/g)보다 높았지만 유의적인 차이는 없었다($p > 0.05$, t-test). BSTE의 FRAP 값은 GSTE($534.6 \mu\text{M TEAC/g}$)보다 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), BSTF의 FRAP 값($926.5 \mu\text{M TEAC/g}$)도 GSTF($2300.9 \mu\text{M TEAC/g}$)보다 유의적으로 높았다. GSTE의 DPPH IC_{50} ($56.7 \mu\text{g/mL}$ (freeze-dried extract/reaction solution)) 값이 BSTE($40.9 \mu\text{g/mL}$)에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$). BSTF의 DPPH IC_{50} ($11.7 \mu\text{g/mL}$) 값은 GSTF($14.8 \mu\text{g/mL}$)에 비해 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). BSTE와 GSTE의 DPPH IC_{50} 값은 ascorbic acid($17.9 \mu\text{g/mL}$)와 trolox($21.4 \mu\text{g/mL}$)에 비해 약 2배 정도 높았고, BSTF와 GSTF의 DPPH IC_{50} 값은 이와 비슷하거나 낮았다. BSTE의 ABTS IC_{50} 값($92.2 \mu\text{g/mL}$ (freeze-dried extract/reaction solution))이 GSTE($121.7 \mu\text{g/mL}$)에 비해 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). BSTF의 ABTS IC_{50} 값($25.27 \mu\text{g/mL}$)은 GSTF($40.39 \mu\text{g/mL}$)에 비해

II

유의적으로 낮았다($p < 0.01$). BSTE와 GSTE의 ABTS IC_{50} 값은 ascorbic acid($38.56 \mu\text{g/mL}$)에 비해 약 2~3배 정도 높았으나, BSTF와 GSTF의 ABTS IC_{50} 값은 비슷하거나 낮았다.

생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 RAW 264.7 세포를 4시간 동안 BSTE, GSTE, BSTF, GSTF로 처리하고 배양하여 염증을 유발한 후 NO 생성량을 확인한 결과, 씨 추출물들의 농도에 비례하여 NO 생성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, BSTE, BSTF가 각각 GSTE, GSTF에 비해 NO 생성 저해 효과가 유의적으로 더 높았다.

결론적으로, 국내산 black raspberry 씨 추출물(BSTE, BSTF)이 포도 씨 추출물(GSTE, GSTF)에 비해 항산화 활성 측정과 항염증 활성 측정에서 더 높은 효과를 보였다. 따라서, black raspberry 씨 총 추출물과 탄닌 분획물은 이미 효과가 알려진 포도 씨 총 추출물과 탄닌 분획물처럼 천연 항산화제 및 항염증제로서의 사용 가능성을 지닌 식물 자원인 것으로 판단된다.

주요어: Black raspberry 씨; 포도 씨; Ellagitannin; Proanthocyanidin; 항산화 효과; 항염증 효과

학번: 2011-21639

목 차

국문 초록	I
목차	IV
표 목차	VII
그림 목차.....	VIII

I. 서론

1. Black raspberry와 포도	1
2. Black raspberry 씨와 포도 씨	2
3. 탄닌.....	3
4. 연구 목적	7

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료	9
2. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물	
2.1. Black raspberry 씨와 포도 씨 총 추출물	10
2.2. Black raspberry 씨와 포도 씨 탄닌 분획물	12

3. Black raspberry 씨와 포도 씨 탄닌 분획물의 HPLC-ESI-MS 분석.	14
4. 일반 성분 분석	
4.1. 수분 함량 측정	15
4.2. 조회분 함량 측정.....	15
4.3. 조지방 함량 측정.....	16
5. Cyanide 함량 분석.....	17
6. Total polyphenol 함량 측정	18
7. 항산화능 측정	
7.1. Ferric reducing anti-oxidant power (FRAP)	19
7.2. DPPH radical scavenging activity.....	20
7.3. ABTS radical scavenging activity	20
8. 세포 배양	22
9. 세포 독성 측정.....	23
10. Nitric oxide (NO) assay	24
11. 통계처리.....	25

Ⅲ. 실험 결과 및 고찰

1. Black raspberry 씨와 포도 씨의 수분, 조회분 및 조지방 함량	26
2. Black raspberry 씨와 포도 씨의 cyanide 함량.....	28

3. Black raspberry 씨와 포도 씨와 탄닌 분획물의 조성.....	29
4. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 수율	37
5. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 총 폴리페놀 함량	38
6. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 항산화능	
6.1. FRAP.....	40
6.2. DPPH radical scavenging activity.....	42
6.3. ABTS radical scavenging activity	45
7. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물을 처리한 RAW 264.7 세포 독성 효과	48
8. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 NO 생성 저해 효과.....	51
참고 문헌.....	54
Abstract	62

표 목차

Table 1. Moisture, crude ash and crude oil contents in black raspberry seeds and grape seeds	27
Table 2. Identification of ellagitannins from black raspberry seeds determined by HPLC-ESI-MS.....	31
Table 3. Identification of proanthocyanidins from grape seeds determined by HPLC-ESI-MS.....	34

그림 목차

Fig. 1. Structures of gallic acid(A), ellagic acid(B), hexahydroxydiphenic acid(C), and the basic monomeric units for the larger molecular mass ellagitannins: galloyl-HHDP glucose(D), pedunculagin(E), castalagin/vescalagin isomers(F) and sanguin H10(G)	5
Fig. 2. Structure of proanthocyanidins	6
Fig. 3. Flowchart of extraction process.....	11
Fig. 4. HPLC-ESI-MS chromatogram of ellagitannins from black raspberry seeds	30
Fig. 5. HPLC-ESI-MS chromatogram of proanthocyanidins from grape seeds.....	33
Fig. 6. Polyphenol contents in black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions.....	39
Fig. 7. Ferric reducing anti-oxidant power of black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions	41

Fig. 8. DPPH radical scavenging activity of black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions43

Fig. 9. ABTS radical scavenging activity of black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions46

Fig. 10. Viability of RAW 264.7 cells treated with black raspberry seed and grape seed extracts (A) and tannin fractions (B)49

Fig. 11. Viability of RAW 264.7 cells treated with LPS and black raspberry seed and grape seed extracts (A) and tannin fractions (B) ..50

Fig. 12. NO production of RAW 264.7 cells treated with black raspberry seed and grape seed extracts (A) and tannin fractions (B) ..52

I. 서론

1. Black raspberry와 포도

Black raspberry는 *Rubus* 속 식물인 나무딸기류로서 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 낙엽 활엽 관목으로 주로 초여름에 열매를 맺으며 유럽 및 북미를 비롯하여 아시아 서부, 아프리카 등지에 분포되어 있다(Oh 등, 2008). Black raspberry 이외에도 raspberry, blackberry, boysenberry 등의 다양한 종류가 이에 속한다. Black raspberry는 polyphenols, flavonoids (anthocyanins, flavonols, flavanols), tannin (condensed와 hydrolysable tannins)의 함량이 풍부하여 항산화, 항염증, 항암작용의 속성을 가진 것으로 알려져 있다(Tulio 등, 2008; Seeram, 2008).

포도는 갈대나무목(Rhamnales) 포도과(Vitaceae)에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 포도과에는 11속, 700여종의 포도가 있으며(Hwang 등, 2008), 항산화(Kedage 등, 2007), 항염증(Castilla 등, 2006) 및 항암효과(Jang 등, 1997)를 가진 것으로 알려져 있다.

우리나라에서 주로 재배하여 판매하는 품종의 black raspberry (*Rubus occidentalis*)와 포도 (*Vitis labrusca*)는 생과 또는 주스, 과일주 제조 활용

등의 가공된 형태로 폭넓게 소비되고 있다. 최근 건강에 대한 사람들의 관심이 높아지면서 우리나라에서도 생리활성 기능을 가진 소재나 가공식품들이 개발되고 있으며(Shin 등, 2003), 익지 않은 어린 black raspberry 열매(미숙과) 추출분말을 이용하여 간 기능 개선에 도움을 주는 기능성을 인정받은 건강기능식품 음료가 판매되고 있다. Wang 등(2009)은 red raspberry의 과육이 숙성될수록 cyanidin-based anthocyanin은 증가하는 반면 ellagic acid, quercetin 3-glucoside, quercetin derivative와 같은 폴리페놀 함량은 유의적으로 감소한다고 보고하였다.

2. Black raspberry 씨와 포도 씨

현재까지 과육부분의 black raspberry와 포도의 생리 활성 기능에 대한 연구는 활발히 보고되어 왔으며, 최근에는 과피, 씨, 줄기와 같은 부산물의 생리 활성 기능과 질병 예방 효과에 대한 잠재적인 가능성이 제시되고 있다(Peleg 등, 1991). Furuuchi 등(2011)에 따르면, *Rubus* 중 하나인 boysenberry의 씨와 주스가 6가지 종류의 폴리페놀(flavanol monomers, proanthocyanidins, ellagitannins, anthocyanins, ellagic acid, and flavonol glycosides)을 함유하였으며, 그 중에서 ellagitannin이 가장 풍부하고 그 다음으로는 proanthocyanidin이라고 하였다. Ku와 Mun(2008)은 복분자 씨(*Rubus coreanus*)에 함유되어 있는 폴리페놀

화합물이 씨의 높은 항산화능과 연관이 있다고 보고하였다. Ross 등(2007)은 Sephadex LH-20을 이용하여 씨가 포함된 raspberry 추출물을 분획하였을 때, LH-20 bound fraction이 폴리페놀 화합물의 하나인 ellagitannin이 풍부하다는 것을 확인하였다. 또한, 이는 raspberry 추출물과 anthocyanin-rich fraction보다 더 높은 항산화능을 가진다고 보고하였으며, 대부분의 ellagitannin이 raspberry의 씨에서 추출되었을 가능성을 암시하였다. Hager 등(2008)은 ellagtiannin이 과일의 모든 부분(seeds, torus, flesh)에 존재하지만, 특히 씨에 가장 풍부하게 존재한다고 보고하였다.

3. 탄닌

탄닌은 식물계에 광범위하게 존재하는 특별한 페놀성 화합물이며 단백질 또는 다당류와 같은 다른 polymer와 결합하려는 특성에 의해 이름이 지어졌다(Damodaran 등, 2008). 탄닌은 오크 나무의 껍질과 다양한 과일에서 발견되고 있으며, 현재 서로 다른 과일에서 추출한 탄닌 분획물의 생리 활성 효과에 대한 논문이 발표되고 있다. 탄닌의 색 범위는 yellowish-white에서 light brown에 해당하며 식품의 짙은 맛에 관여한다. 탄닌의 구조는 매우 복잡하며, 일반적으로 가수분해형 탄닌(hydrolysable tannin)과 축합형 탄닌(condensed tannin)의 두 그룹으로 분류하고 있다(Damodaran 등,

2008).

가수분해형 탄닌에는 gallic acid가 당과 결합하여 이루어진 gallotannin이나 ellagic acid와 당이 결합한 hexahydroxydiphenic acid로 이루어진 ellagitannin이 있다(Fig. 1; Määttä-riihinen 등, 2004; Hager 등, 2008). 이 성분은 석류, black raspberry, raspberry, strawberry, walnut, almond 등에 풍부하게 함유되어 있다(Clifford and Scalbert, 2000). Lee 등(2010)은 석류로부터 추출한 가수분해형 탄닌이 RAW 264.7 세포에서 NO 생성과 iNOS 발현을 억제한다고 보고하였다. 더불어, 온전한 형태의 ellagitannin은 ellagic acid로 가수분해되어 혈류로 흡수되며, ellagitannin의 대사 물질인 ellagic acid도 항염증 효과를 가진 것으로 보고되고 있다(Umesalma and Sudhandiran, 2010). Ellagic acid는 RAW 264.7 세포에서의 NO, L929 세포에서의 TNF- α (Kassim 등, 2010), human monocyte에서의 PGE₂ (Karlsson 등, 2010) 등의 anti-inflammatory mediator를 억제한다고 보고되었다. Ellagitannin은 장의 박테리아에 의해 urolithin으로 변형되기도 하는데, 이 또한 잠재적인 항산화능을 가진다고 보고된 바 있다(Bialonska 등, 2009).

축합형 탄닌은 proanthocyanidin이라고도 불리며, 기본 구조는 polyhydroxyflavan-3-ol으로 carbon-carbon 결합으로 연결되어 구성되어 있다(Fig. 2; Passos 등, 2007; Damodaran 등, 2008). 이 화합물은 무

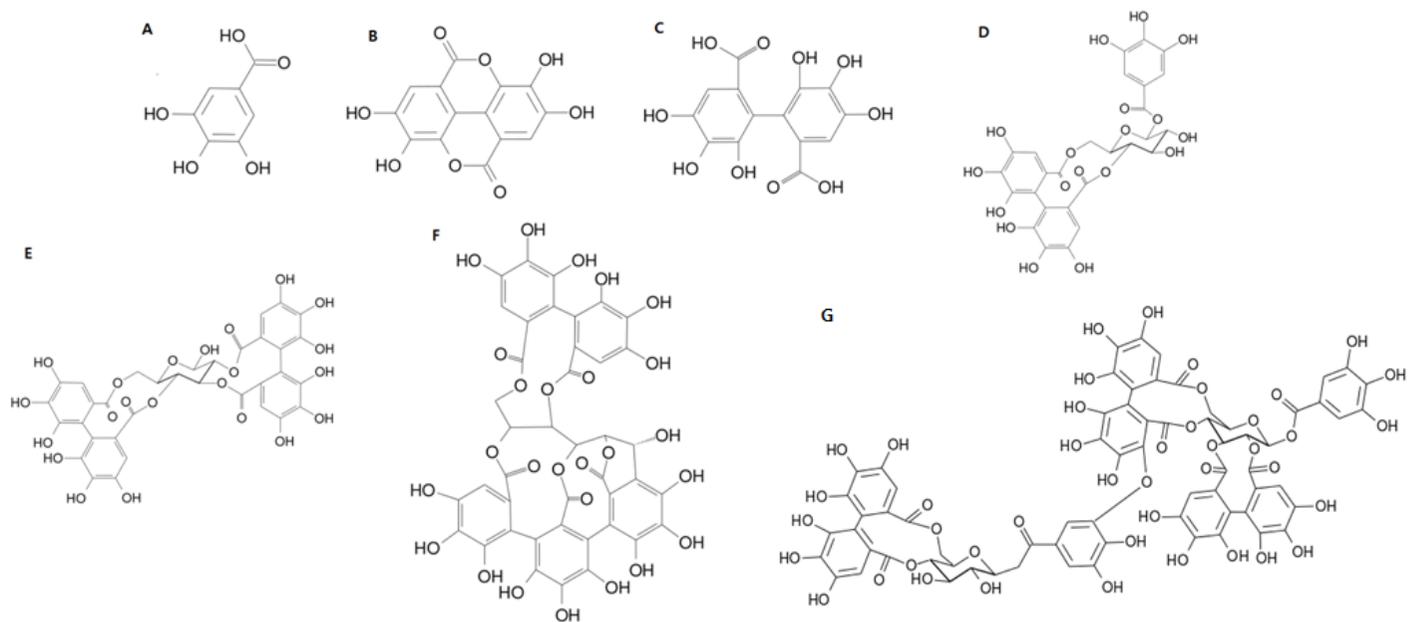


Fig. 1. Structures of gallic acid(A), ellagic acid(B), hexahydroxydiphenic acid(C), and the basic monomeric units for the larger molecular mass ellagitannins: galloyl-HHDP glucose (D), pedunculagin(E), castalagin/vescalagin isomers(F) and sanguin H10(G).

Structures were adapted from Hager et al.(2008) and Ross et al.(2007).

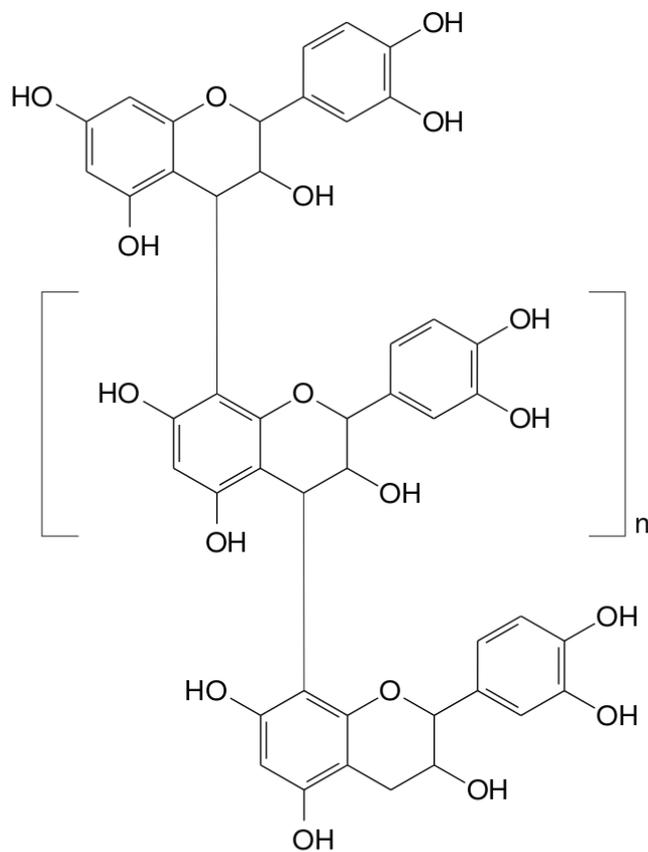


Fig. 2. Structure of proanthocyanidins

Structures were adapted from Damodaran et al.(2008).

색이지만 구조적으로 anthocyanidin과 비슷하고 식품 공정 동안에 색을 가진 물질로 바뀔 수 있다(Damodaran 등, 2008). Proanthocyanidin은 procyanidin, prodephinidin, propelargonidin이 있으며 이 중 procyanidin 형태로 가장 많이 존재하고 산성 상태에서 열을 가하면 cyanidin과 (-)-epicatechin으로 가수분해된다. Proanthocyanidin은 처음에 cocoa bean에서 발견되었으며 포도의 껍질, 씨, 줄기에 존재하는 것으로 알려져 있다(Gabetta 등, 2000). Dimeric proanthocyanidin은 사과, 배, kola nut에서 발견되며, 이 화합물은 공기 또는 빛이 존재하는 상태에서 red-brown의 stable derivatives로 분해되는 것으로 알려져 있다. Kris-Etherton 등(2004)은 proanthocyanidin이 항염증 cytokine의 형성을 억제하고 anti-lipid peroxidation의 생리활성 기능을 가진 것으로 보고하였다. Zhang 등(2006)은 human monocyte 세포인 THP-1에서 procyanidin dimer B2가 LPS에 의해 유도된 inflammatory mediator를 억제하는 것을 관찰하였다.

4. 연구 목적

포도 씨에 함유되어 있는 축합형 탄닌 또는 proanthocyanidin의 항산화 및 항염증 활성에 대한 많은 연구가 수행되어 왔지만(Chacón 등, 2009; Terra 등, 2007; Terra 등, 2009), black raspberry 씨의 가수분해형 탄닌 또는 ellagitannin에 대한 항산화 및 항염증 활성에 대한 연구는 부족한 실

정이다. 따라서, 본 연구에서는 와인 부산물인 국내산 black raspberry 씨와 포도 씨로부터 총 추출물과 탄닌 분획물을 얻고 항산화 및 항염증 효과를 비교 평가하였다. 이를 통하여 기능성 식품 소재의 발굴 및 제품 개발을 위한 기초적 자료를 제공하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구의 실험 재료인 black raspberry (*Rubus occidentalis*) 씨를 얻기 위하여 2010년과 2011년에 고창에서 수확한 것을 과일 상태로 구입하여 사용하였다. 과육으로부터 씨를 분리하는 과정은 Oh 등(2007)의 방법을 참고하여 수행하였다. 와인 공정 중 압착 과정에서 얻은 씨를 수돗물을 채운 컨테이너에 담고 손바닥을 이용하여 부드럽게 문질러 과육으로부터 씨를 분리하였다. 과육과 펄프는 물에 떠있는 반면 씨는 바닥에 가라앉으므로 씨가 가라앉도록 충분한 시간을 두었다. 과육과 물의 혼합물 부분은 버리고, 체를 이용하여 씨를 모았다. 이후, 씨에 묻은 색소가 물에 묻어 나오지 않을 때까지 수돗물을 이용해 씻어주었다. 마지막 씻김 작업이 끝나면, 씨를 약 24시간 동안 상온에서 먼 거즈 위에 펼쳐 건조하였다. 건조한 씨는 플라스틱 백에 담아, 사용 전까지 냉동(-20°C) 보관하였다.

포도 씨 (*Vitis labrusca*, Campbell Early)는 2011년 상주에서 수확한 것을 과일 상태로 구입하여 위와 같은 과정을 거쳐 과육으로부터 씨를 분리하였다.

2. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물

Black raspberry 씨와 포도 씨의 총 추출물과 탄닌 분획물은 Fig. 3과 같이 만들었다.

2.1. Black raspberry 씨와 포도 씨 총 추출물

Black raspberry 씨와 포도 씨를 믹서기(Hanil Electric Co., Bucheon, Korea)로 분쇄하여 35 mesh 체(Chunggye Sanggongsa, Seoul, Korea)에 통과시켰다. 이 씨 분말 20 g에 hexane(Samchun Chemical Co., Seoul, Korea) 100 mL를 첨가하여 1시간 동안 일정하게 교반하였다. 이후, hexane과 씨 분말의 혼합물을 Buchner 플라스크와 Whatman No. 2 filter paper(Whatman International Ltd., Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과하였다. 위의 과정을 2번 더 반복하여 oil을 제거하고 씨 분말을 모았다. 씨 분말에 60% methanol(Samchun Chemical Co.) 100 mL을 넣고 sonicator(Branson 5510, Branson Co., Danbury, CT, USA)를 이용하여 30분 동안 추출하였다. 이후, 30분 동안 4000 rpm에서 원심분리하고 상층액을 Whatman No. 2 filter paper로 여과하였다. 앞의 추출과정을 총 3번 반복하여, methanol 여과액을 모은 후, 45°C에서 감압농축기(A-10005; Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 methanol을 제거하였다. 이후, 이를 증류수 50 mL에 녹여 -72°C에서 얼린 후 동결 건조기(Labconco Co., Kansas City, MO, USA)를 이용하여 동결 건조하여 black raspberry 씨와

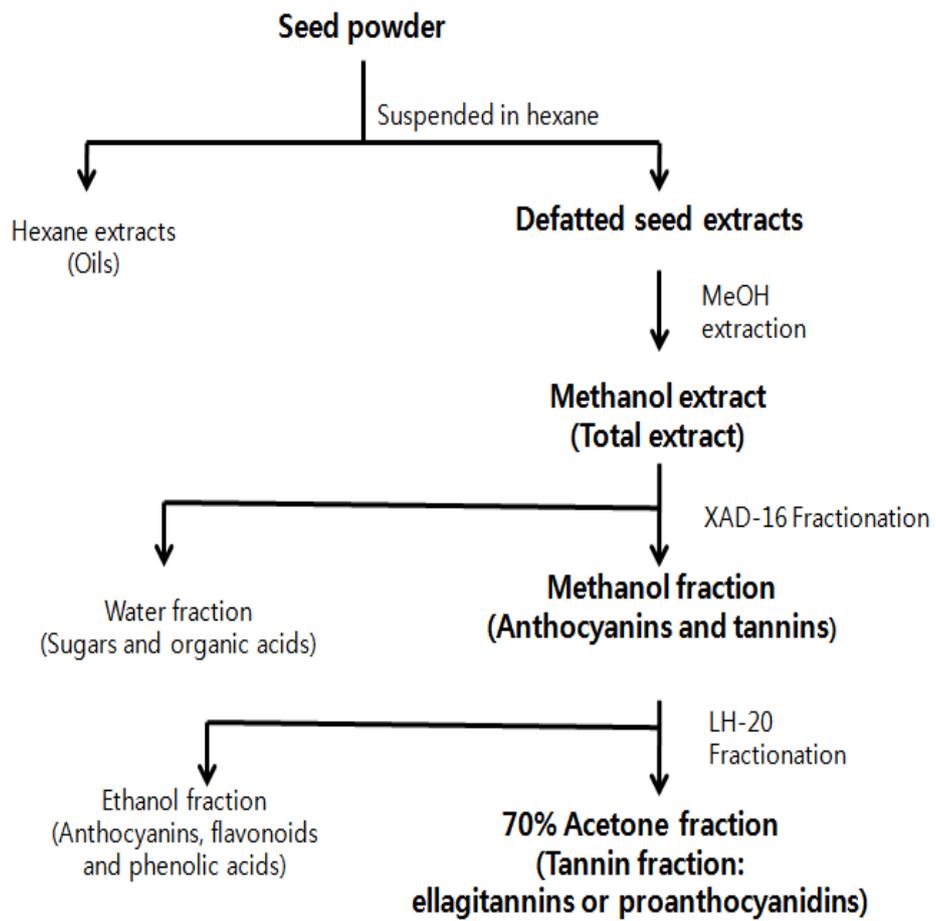


Fig. 3. Flowchart of extraction process

포도 씨의 총 추출물을 얻었고, 이를 각각 BSTE(black raspberry seed total extract), GSTE (grape seed total extract)라 명명하였다. 시료는 질소 충전한 뒤 사용 전까지 냉동(-20°C) 보관하였다.

2.2. Black raspberry 씨와 포도 씨 탄닌 분획물

Black raspberry 씨와 포도 씨로부터 탄닌 분획물을 얻기 위하여 Furuuchi 등(2011)의 방법을 변형하여 분획하였다. 먼저 Amberlite XAD-16(Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, USA)으로 충전한 column(25 × 500 mm inner diameter; Daihan Scientific, Seoul, Korea)을 methanol과 증류수로 차례로 씻어 안정화시킨 후, 앞의 과정으로 얻은 씨의 총 추출물을 주입하였다. 이후, 증류수 4 L로 씻어 free sugar와 organic acid를 제거하고 다시 methanol 500 mL로 용출시켜 얻은 polyphenol 분획물을 감압 농축하였다. 이를 다시 ethanol 50 mL에 녹인 후, Sephadex LH-20(GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden)로 충전하고 70% acetone과 ethanol으로 차례로 씻어 안정화시킨 column(22 × 250 mm inner diameter; Daihan Scientific)에 주입하였다. 이후, ethanol 300 mL로 씻어 anthocyanin과 flavonoid, phenolic acid를 제거하고 70% acetone 300 mL로 용출시켜 탄닌 분획물을 얻었다. 탄닌 분획물은 45°C에서 감압농축기(A-10005)를 이용하여 acetone을 제거하

였다. 이를 증류수 50 mL에 녹여 -72°C 에서 얼린 후 동결 건조기 (Labconco Co.)를 이용하여 동결 건조하여 black raspberry 씨와 포도 씨의 탄닌 분획물을 얻었고, 이를 각각 BSTF(tannin fraction from black raspberry seed), GSTF(tannin fraction from grape seed)라 하였다. 시료는 질소 충전한 뒤 사용 전까지 냉동(-20°C) 보관하였다.

3. Black raspberry 씨와 포도 씨 탄닌 분획물의 high performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry (HPLC–ESI–MS) 분석

Black raspberry 씨와 포도 씨로부터 얻은 탄닌 분획물의 탄닌 조성을 확인하기 위하여 HPLC–ESI–MS 분석을 수행하였다. 모든 시료는 methanol에 녹여 0.45- μ m filter에 통과시켜 준비하였다. Surveyor LC system(Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)과 Finnigan LCQ Deca XP plus mass spectrometer(Thermo Scientific)로 분석하였으며, 컬럼은 Zorbax Eclipse Plus C18(1.8 μ m, 2.1 mm \times 50mm; Agilent Technologies, Inc., New Castle, DE, USA)을 사용하였다. 이동상은 0.1% formic acid 수용액(용매 A)와 0.1% formic acid acetonitrile 용액(용매 B)이었다. 용매의 gradient는 0~5 min, 용매 A 99%; 5~20 min, 용매 A 99~40%; 20~23 min, 용매 A 40%; 23~25 min, 용매 A 40~99%; 25~30 min, 용매 A 99%로 하였다. 시료의 주입량은 10 μ L였으며, 유속은 150 μ L/min로 유지하였고, 검출 파장은 254 nm에서 측정하였다. 질량 분석은 positive와 negative mode를 사용하였으며, mass spectra는 50–2000 atomic mass unit에서 측정하였고, spray voltage는 5 kV, capillary temperature는 275°C, capillary voltage는 15 V였다.

4. 일반 성분 분석

4.1. 수분 함량 측정

수분은 AOAC 방법(AOAC, 1990)에 따라 상압 가열 건조법으로 분석하였다. 시료 1 g을 정확히 칭량하여 105°C dry oven에 넣어서 건조하고, 데시케이터에 넣어 뚜껑을 닫고 실온이 될 때까지 30분간 방냉하여 칭량하였다. 항량이 될 때까지 이와 같은 가열, 방냉, 칭량을 반복하여 수분 함량을 구하였다.

수분(%)

$$=100 \times (\text{건조 후 시료가 든 수기의 항량}-\text{수기의 항량}/\text{시료의 채취량})$$

4.2. 조회분 함량 측정

조회분은 직접회화법으로 분석하였다. 항량이 된 회화용기에 시료 1 g을 취하여, 200°C 전기곤로에서 예비회화하였다. 이후, 회화용기를 550°C 온도의 회화로에 옮겨 회분이 얻어질 때까지 가열하였다. 이후, 가열을 중지하고 데시케이터에 넣어 도가니의 방냉 후 전자저울로 칭량하였다. 항량이 될 때까지 가열, 방냉, 칭량을 반복하여 회분 함량을 구하였다.

조회분(%)

$$=100 \times (\text{회화 후 시료가 든 수기의 항량}-\text{수기의 항량}/\text{시료의 채취량})$$

4.3. 조지방 함량 측정

조지방은 Soxhlet 추출법을 이용하여 분석하였다. 시료 1 g을 원통여과지에 정밀히 달아 탈지면으로 윗부분을 가볍게 막은 뒤 Soxhlet 지방 추출장치에 넣고 petroleum ether(Sigma Chemical Co.)를 사용하여 9시간 동안 추출하였다. 추출이 끝나면 받는 용기에 남아있는 ether를 증발시키고 104°C dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 칭량하였다. 이와 같이 건조, 방냉, 칭량을 반복하여 지방 함량을 구하였다.

조지방(%)

=100 × (추출물이 들어있는 수기의 항량-수기의 항량/ 시료의 채취량)

5. Cyanide 함량 분석

총 시안이온의 분석은 기존에 수행된 여러 연구를 참고로 하여 수행하였다(Bradbury 등, 1991; Haque 등, 2001). 약 1 g의 시료에 0.1 M H_3PO_4 40 mL를 가하여 homogenizer를 이용하여 약 10초씩 2회 반복하여 분쇄하였다. 4°C로 설정된 원심분리기에서 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하고, 상층액 1 mL을 취하여 4 M의 H_2SO_4 1 mL와 100°C에서 50분간 반응시켰다. 반응이 끝난 용액을 충분히 식힌 후, 3 M의 NaOH 3 mL를 가하여 5분 동안 중화시켰다. 용액 중 100 μ L를 취하여 0.2 M phosphate buffer(pH 6.0) 700 μ L, 0.5%의 chloramine-T 40 μ L를 각각 넣어 5분간 반응시켰다. 마지막으로 barbituric/pyridine acid 160 μ L를 첨가한 후 60분간 반응시켜 spectrophotometer(Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이온 크로마토그래피용 시안 이온 표준품(Sigma Chemical Co.)을 0.2 M NaOH 용액으로 희석하여 검량선을 작성하였다.

6. Total polyphenol 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Singleton 등(1999)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu 시약이 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리로 분석하였다. Gallic acid(Sigma Chemical Co.)를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하였다. 시료의 농도는 검량선의 범위가 되도록 methanol로 희석하였다. 2 N Folin-Ciocalteu 시약(Sigma Chemical Co.) 100 μ L와 증류수 1.58 mL에 시료 20 μ L를 넣고 상온에서 3분간 반응시켰다. 이 반응액에 20% (w/v) Na_2CO_3 (Yakuri Pure Chemicals Co., Osaka, Japan) 용액 300 μ L를 첨가하고 40°C에서 30분 동안 반응시켰다. Spectrophotometer(Spectramax 190)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 1 g 씨에 대한 mg gallic acid equivalents(GAE)로 환산하여 표시하였다.

7. 항산화능 측정

7.1. Ferric reducing anti-oxidant power (FRAP)

FRAP의 측정은 Benzie와 Strain(1996)의 방법에 따라 측정하였다. FRAP 측정 시, Chelex(2g/L, Chelex 100 sodium form; Sigma Chemical Co.)를 이용하여 deionized water를 만들어 모든 시료의 희석과 용액의 제조에 사용하였다. 10 mM 2,4,6-tri(2-pyridil)-1,3,5-triazine(TPTZ; Sigma Chemical Co.)를 40 mM HCl(Samchun Chemical Co.)에 녹여서 TPTZ 용액을 만들었다. FRAP 용액은 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6; Sigma Chemical Co.), TPTZ 용액, 실험 직전에 만든 20 mM FeCl₃(Duksan Chemicals, Ansan, Korea) 용액을 각각 10:1:1의 비율로 혼합하여 만들고 이를 37°C에서 10분간 반응시켰다. 앞의 과정으로 만든 FRAP 용액 180 μ L와 희석한 시료 20 μ L를 다시 37°C에서 10분간 반응시킨 후, spectrophotometer(Spectramax 190)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로 1 mM (+/-)-6-hydroxy-2,5,6,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid(trolox; Sigma Chemical Co.)를 사용하여 검량선을 작성하고 FRAP 값은 trolox equivalent anti-oxidant capacity (TEAC)로 표현하였다.

7.2. DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity를 Brand-Williams 등(1995)의 방법에 따라 측정하였다. 2,2'-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH; Sigma Chemical Co.)을 methanol에 녹여 0.2 mM DPPH 용액을 제조하였다. 시료를 methanol로 희석하여 IC₅₀ 값을 산출할 수 있는 농도가 되도록 하였다. Ascorbic acid(Sigma Chemical Co.)와 trolox를 비교물질로 사용하였다. 다양한 농도의 시료와 비교물질 50 μ L에 DPPH 용액 100 μ L을 첨가하고 30분간 상온의 암소에서 방치한 후, spectrophotometer(Spectramax 190)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음의 식을 이용하여 DPPH free radical scavenging activity를 백분율로 나타내고, DPPH radical을 50% 소거하는 시료의 농도(DPPH IC₅₀)를 구하였다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH free radical scavenging activity (\%)} \\ & = 100 \times (\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}) / \text{absorbance} \\ & \text{of control} \end{aligned}$$

7.3. ABTS radical scavenging activity

ABTS radical scavenging activity는 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 증류수를 이용하여 7 mM 2,2'-azino-bis(3-

ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammounium salt (ABTS; Sigma Chemical Co.)와 2.45 mM potassium persulfate (Sigma Chemical Co.)를 만들어 혼합하였다(1:1, v/v). 이 용액을 30°C의 암소에서 15시간 동안 방치한 후에 734 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.05 가 되도록 methanol로 희석하였다. 시료를 methanol로 희석하여 IC_{50} 값을 산출할 수 있는 농도가 되도록 하였다. Ascorbic acid와 trolox를 비교물질로 사용하였다. 다양한 농도의 시료와 비교물질 20 μ L에 ABTS 용액 180 μ L을 첨가하고 5분간 반응시켰다. 이후, spectrophotometer (Spectramax 190)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음의 식을 이용하여 ABTS free radical scavenging activity를 백분율로 나타내고, ABTS radical을 50% 소거하는 시료의 농도 (ABTS IC_{50})를 구하였다.

ABTS free radical scavenging activity (%)

= $100 \times (\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}) / \text{absorbance of control}$

8. 세포 배양

본 연구에 사용한 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 본 연구실에서 계대배양하여 5와 20 사이의 passage를 사용하였다. Mouse macrophage인 RAW 264.7 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco), 2% HEPES(Gibco)와 1% penicillin/streptomycin(Gibco)을 첨가한 배지에서 배양하였다. 배양 환경은 5% CO₂와 37°C를 유지하였다.

9. 세포 독성 측정

세포 독성은 MTT assay 방법에 따라 Jeong 등(2010)의 방법을 참고하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96-well, flat-bottom plate에 1×10^4 cells/well 또는 1×10^5 cells/well 농도로 분주하고 5% CO₂와 37°C의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 배지를 제거하고 무혈청 배지로 희석한 다양한 농도의 시료를 100 μ L씩 넣어 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료가 포함된 배지를 제거하고 각각의 well에 10 μ L 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma Chemical Co.)와 100 μ L 무혈청 배지를 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. 다시 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Samchun Chemical Co.) 100 μ L을 첨가하여 20분 동안 상온에서 formazan을 용해하였다. Spectrophotometer(Spectramax 190)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하고 cell viability(%)를 산출하였다. 시료를 첨가한 군과 대조군의 cell viability를 비교하여 시료가 세포에 미치는 독성을 측정하였다.

Cell viability (%)

= $100 \times (\text{absorbance of treated cells} / \text{absorbance of control cells})$

10. Nitric oxide (NO) assay

NO는 Izumi 등(1997)의 방법으로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96-well, flat-bottom plate에 1×10^5 cells/well 농도로 분주하고 5% CO₂와 37°C의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 무혈청 배지로 희석한 다양한 농도의 시료 200 μ L를 넣고 4시간 동안 배양한 후 *Escherichia coli*에서 추출한 100 ng/mL의 lipopolysaccharides(LPS 0111:B4; Sigma Chemical Co.) 10 μ L를 첨가하였다. 20시간 후, 세포 배양액 100 μ L를 취하여 100 μ L의 Griess 시약(0.5% (w/v) sulphanilamide(Sigma Chemical Co.) 인산(2.5%) 용액과 0.05% (w/v) naphthylethylenediamine dihydrochloride의 1:1 혼합액)과 5분간 반응시켰다. Spectrophotometer(Spectramax 190)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 sodium nitrite(Sigma Chemical Co.) 검량선을 작성하여 구하였다.

11. 통계처리

통계처리는 IBM SPSS Statistics 20을 이용하여 t-test 또는 one-way ANOVA를 실시하였다. ANOVA 통계 분석 결과 유의성이 있을 경우, Duncan의 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)을 통해 통계적 유의성을 검토하였다($p < 0.05$).

Ⅲ. 실험 결과 및 고찰

1. Black raspberry 씨와 포도 씨의 수분, 조회분 및 조지방 함량

국내에서 생산된 black raspberry 씨와 포도 씨의 수분, 조회분 및 조지방 함량은 Table 1과 같다. Black raspberry와 포도 씨의 수분과 조지방 함량은 유의적인 차이를 보였다($p < 0.01$). Oh 등(2007)은 black raspberry 씨의 지방이 17.3~27.9%를 차지하고 있으며, linoleic acid와 linolenic acid가 각각 53%와 32.7%를 차지하여 불포화지방산이 95.8% 이상인 것으로 보고하였다. 또한, Bushman 등(2004)은 black raspberry 씨의 지방이 15%를 차지하고 있으며, linoleic acid와 linolenic acid가 각각 53.5%와 31.2%를 차지하고 있다고 보고하였다. Fernández 등(2010)은 다양한 용매(hexane, acetone, methanol, ethanol 등)를 이용하여 Soxhlet 추출한 포도 씨 oil의 수율이 12.2~20.8%인 것으로 보고하였다. 본 연구에서 black raspberry 씨와 포도씨의 조지방 함량은 각각 16.7%와 12.5%로서 다른 논문의 연구결과와 비슷하였다.

Table 1. Moisture, crude ash and crude oil contents in black raspberry seeds and grape seeds

Sample	Moisture (%, w/w)	Crude ash (%)	Crude oil (%, w/w)
Black raspberry seed	6.49±0.29	2.89±0.07	16.73±0.53
Grape seed	8.03±0.28	1.66±0.17	12.52±1.05

Each value represents the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

2. Black raspberry 씨와 포도 씨의 cyanide 함량

Cyanide는 많은 식물에서 자연적으로 발생하며 시안(청산) 배당체 자체는 유해하지 않으나, 효소에 의해 분해되어 시안화수소를 생성하여 청색증 등을 유발한다. Biller(2008)에 따르면 약 200 mg의 solid cyanide 또는 cyanide solution을 경구 섭취하였을 경우, 수분 안에 죽음에 이를 수 있다고 보고하였다. 또한, 현재 식품의약품안전청에서는 살구씨(행인)와 복숭아씨(도인)의 경우 한꺼번에 많은 양을 섭취하게 되면 시안화합물 중독으로 구토, 설사, 현기증과 심할 경우 산소결핍으로 혼수상태를 유발시킬 수 있는 특유의 독성 때문에 식품 원료로서의 사용을 금지하고 있다. 아마씨의 경우, 섭취량 및 섭취방법에 제한이 있는 씨로 분류하여 물에 장시간 침지하여 자가 소화시킨 후, 수 차례 세척하거나 또는 가열 후 섭취하고, 섭취량은 1회 4 g, 하루 16 g(약 2숟가락) 미만으로 권고하고 있다. 현재 국립독성연구원에서는 U.S. EPA에서 설정된 reference dose를 근거로 하여 하루 최대 노출 허용량으로 1.2 mg HCN/person/day로 설정하고 있다.

따라서, 비교물질로서 아마씨와 함께 black raspberry 씨와 포도 씨 내에 존재하는 cyanide의 함량을 측정한 결과, 아마씨($770.9 \pm 87 \mu\text{g/g}$ seed), 포도 씨($161.8 \pm 24.05 \mu\text{g/g}$ seed), black raspberry 씨($77.0 \pm 5.25 \mu\text{g/g}$ seed)의 순서로 많았다.

3. Black raspberry 씨와 포도 씨 탄닌 분획물의 조성

Black raspberry 씨로부터 얻은 탄닌 분획물(BSTF)의 조성을 HPLC-ESI-MS로 확인하였다. Positive와 negative ion mode의 결과를 비교하여 더 높은 이온강도를 보이는 크로마토그램을 Fig. 4와 Table 2에 제시하였다. Black raspberry 씨 탄닌 분획물(BSTF)의 HPLC-ESI-MS 자료(negative mode)는 이전 연구와 비교하여 확인하였다(Beekwilder 등, 2005; Godovac 등, 2009; Hager 등, 2008; Mullen 등, 2003; Ross 등, 2007). Peak A와 B에서는 m/z 783.1의 주요한 ion이 검출되어 pedunculagin isomer라고 추정하였다. Peak A(m/z 1566.9, 301.3)와 peak B(m/z 1566.9, 633.0, 301.3)의 fragment pattern을 바탕으로 sanguin H10 isomer가 존재할 것으로 예상하였다. Peak C의 m/z 865.1는 proanthocyanidin trimer로 확인하였다(Simonetti 등, 2002). 이외에도 m/z 1871.5, 1567.0, 935.1, 783.1, 633.2, 301.3의 fragment가 관찰되었는데, 이 중 m/z 935.1, 633.2에서 relative abundance가 높았다. 이전 연구들을 바탕으로 하여 galloyl-HHDP glucose(m/z 633.2), galloyl-bis-HHDP glucose isomer(m/z 935.1(783.1, 301.3)), sanguin H6 isomer(m/z 1871.5(1567.0, 935.1, 633.2, 301.3))가 존재할 가능성이 있다고 추정하였다. Peak D에서는 m/z 935.1에서 주요한 ion을 확인하였는데,

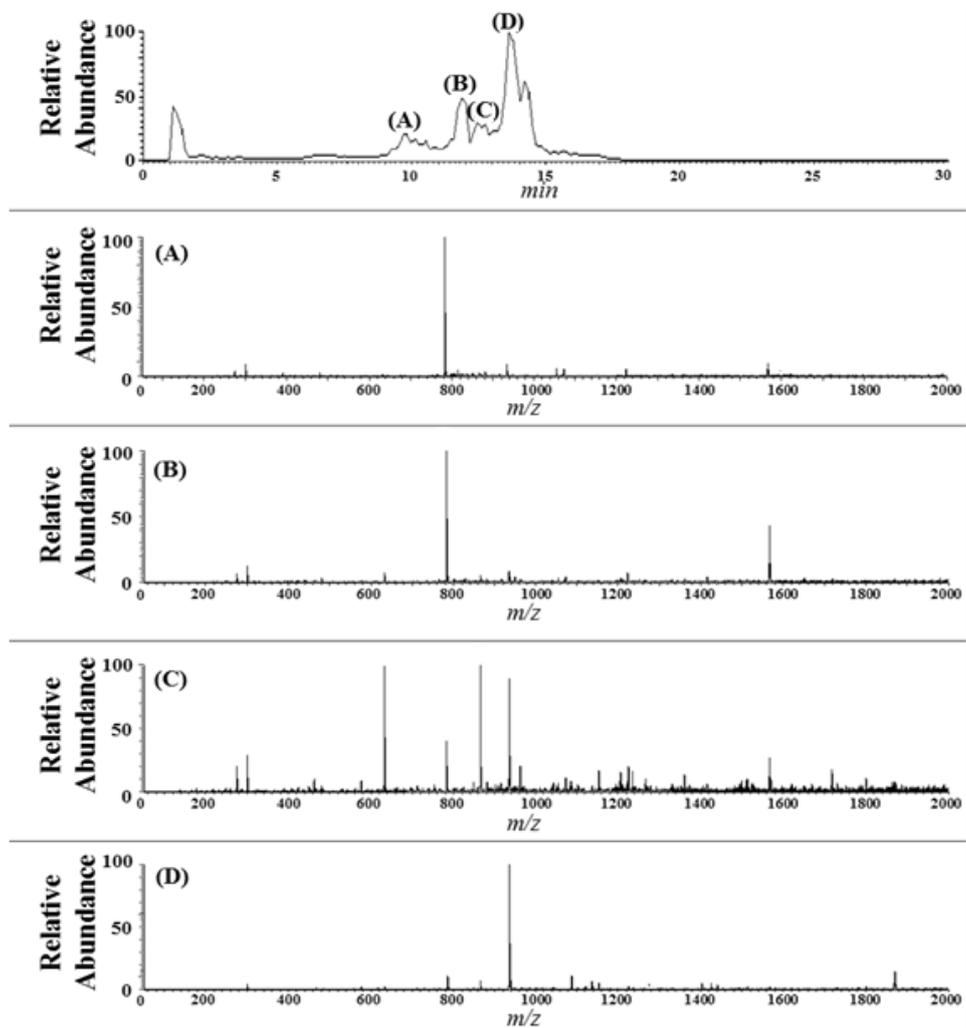


Fig. 4. HPLC–ESI–MS chromatogram of ellagitannins from black raspberry seeds

Retention time: (A), 9.11–10.86 min; (B), 11.44–12.02 min; (C), 12.16–12.89 min; and (D), 13.33–14.65 min

Molecular mass data refer to Table 2.

Table 2. Identification of ellagitannins from black raspberry seeds determined by HPLC–ESI–MS

Peak no.	MS data	Tentative structural assignment
	Negative ion mode (fragments)	
A	1567(301)	sanguiin H10 isomer
	783 (301)	pedunculagin isomer
B	1567(633, 301)	sanguiin H10 isomer
	783 (301)	pedunculagin isomer
C	1872(1567, 935, 633, 301)	sanguiin H6 isomer
	935 (783, 301)	galloyl–bis–HHDP glucose isomer
	865	proanthocyanidin trimer
	633	galloyl–HHDP glucose isomer
D	1871	sanguiin H6 isomer
	935	galloyl–bis–HHDP glucose isomer

The abundant ions are in bold.

Peak numbers and retention times refer to Fig. 4.

이는 galloyl-bis-HHDP glucose isomer으로 확인되며, m/z 1870.9에서 작은 peak을 형성하여 sanguin H6 isomer도 존재할 것으로 예상된다.

Nollet과 Toldra(2012)는 ellagitannin과 ellagic acid의 구조는 negative mode로 분석하는 것이 positive mode보다 더 많은 정보를 제공한다고 보고하였다. Hager 등(2008)은 *Rubus* 종의 과일과 잎에서 관찰한 대부분의 ellagitannin 구조는 galloyl-bis-HHDP의 중합된 형태이고 sanguin H-6, lambertianin C, 그리고 다양한 ellagic acid 유도체 등의 ellagitannin이 포함되어 있지만, 다양하고 복잡한 구조의 특성으로 인해 아직 밝혀지지 않은 ellagitannin이 있다고 보고하였다. 또한, blackberry 씨 추출물에서 대부분의 ellagitannin이 multiple isomer로 존재하는 것을 확인하였고, 이는 본 연구결과와 유사하다. 같은 *Rubus* fruit인 raspberry에 대한 연구에서 lambertianin A/sanguin H-6의 isomer가 한 개 존재하는 것으로 보고한 바 있으나(Mullen 등, 2003; Beekwilder 등, 2005), blackberry 씨에서 한 개 이상의 lambertianin A/sanguin H6 isomer를 관찰한 논문도 있다(Hager 등, 2008).

포도 씨로부터 얻은 탄닌 분획물(GSTF)의 조성을 HPLC-ESI-MS로 확인하였다. Positive와 negative ion mode의 결과를 비교하여 더 높은 이온강도를 보이는 크로마토그램을 Fig. 5와 Table 3에 제시하였다. 포도 씨 탄닌 분획물(GSTF)의 HPLC-ESI-MS 자료(positive mode)는 이전 연구

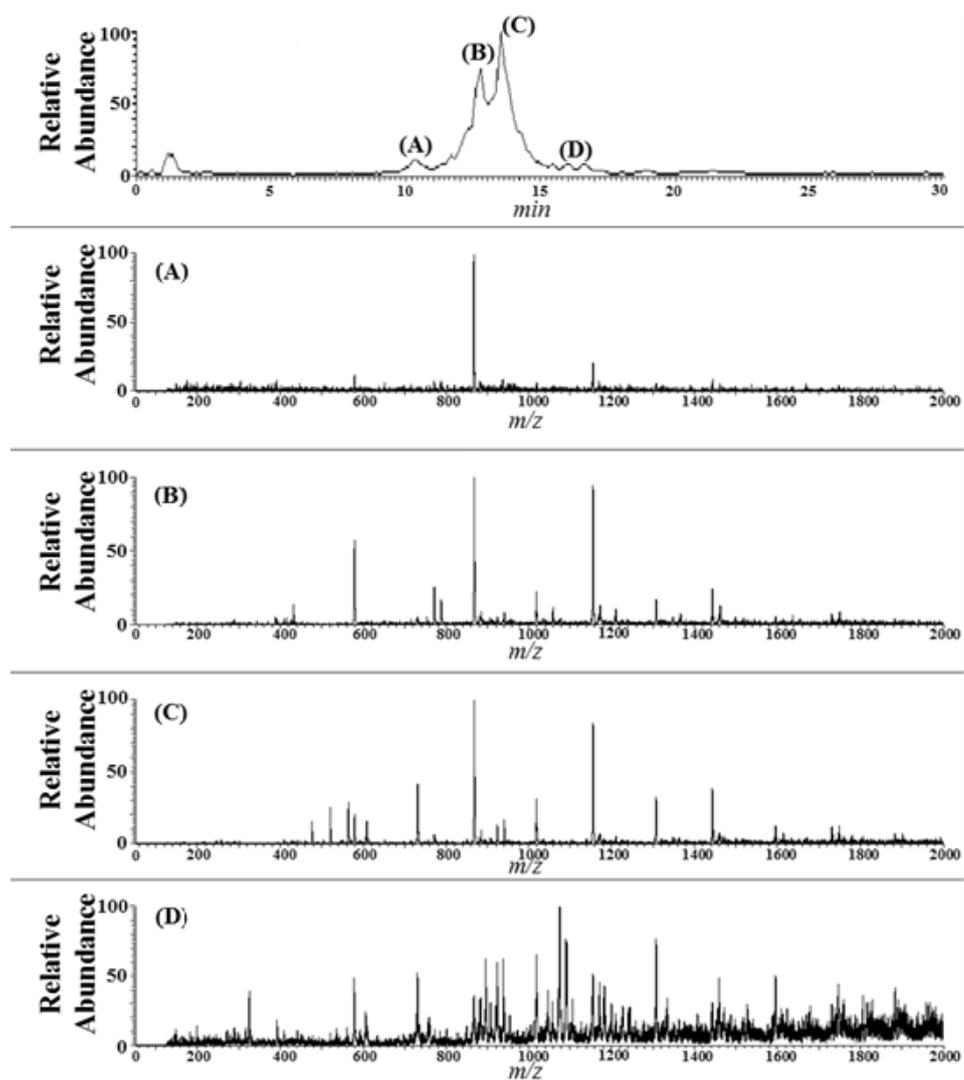


Fig. 5. HPLC-ESI-MS chromatogram of proanthocyanidins from grape seeds

Retention time: (A), 9.93–10.88 min; (B), 11.49–13.05 min; (C), 13.19–13.81 min; and (D), 14.79–17.19 min

Molecular mass data refer to Table 3.

Table 3. Identification of proanthocyanidins from grape seeds determined by HPLC–ESI–MS

Peak no.	MS data	Tentative structural assignment
	Positive ion mode	
A	1155, 867 , 579	trimer, tetramer
B	1443, 1307, 1155 , 1019, 867 , 579	tetramer, pentamer
C	1595, 1443, 1307, 1155 , 1019, 867 , 731 , 579	pentamer monogallate
D	1731, 1595, 1443, 1307 , 1155, 1019 , 867, 731	hexamer

The abundant ions are in bold.

Peak numbers and retention times refer to Fig. 5.

와 비교하여 확인하였다(Buendía 등, 2010; Gabetta 등, 2000; Godevac 등, 2009; Simonetti 등, 2002). 본 연구의 peak A~D에서 m/z 579, 867, 1155, 1443, 1731의 ion는 각각 proanthocyanidin dimers, trimers, tetramers, pentamers, hexamers에 상응하고, m/z 731, 1019, 1307, 1595는 각각 proanthocyanidin dimer monogallate, trimer monogallate, tetramer monogallate, pentamer monogallate에 상응한다. Peak A에서는 m/z 1155.0, 867.0, 579.1을 확인하였고 그 중 m/z 867.0의 relative abundance가 높았으며, 두 가지의 질량 단위인 proanthocyanidin trimer와 tetramer가 존재할 것으로 추정하였다. Peak B(m/z 1443.0, 1307.0, 1155.1, 1018.9, 867.3, 579.1), peak C(m/z 1595.0, 1443.2, 1307.1, 1155.0, 1019.0, 867.1, 731.1, 579.1), peak D(m/z 1731.2, 1594.9, 1442.9, 1307.1, 1155.2, 1019.1, 867.2, 731.0)에는 관찰한 ion을 토대로 proanthocyanidin tetramer, pentamer, pentamer monogallate, hexamer가 존재할 것으로 예상하였다. 그러나 본 연구에서 peak B~D의 분리가 분명하게 되지 않아 각각의 peak에 대한 정확한 identification을 하기에는 어려움이 있었다.

Black raspberry 씨와 포도 씨 탄닌 분획물의 positive와 negative ion mode의 HPLC-ESI-MS 결과를 모두 종합하여 볼 때, black raspberry 씨와 포도 씨 탄닌 분획물의 탄닌 조성이 서로 다르다는 것을 확인하였다.

Black raspberry 씨의 탄닌 분획물에는 proanthocyanidin trimer도 존재하였으나 대부분이 ellagitannin으로 구성되어 있었다. 반면, 포도 씨의 탄닌 분획물은 proanthocyanidin만으로 구성되어 있었으며 ellagitannin fragment pattern이 보이지 않았다. 그러나 탄닌 분획물 내 각각의 peak에 대한 정확한 identification과 isomer의 구조를 알아내려면 NMR을 이용한 추가 실험이 필요할 것으로 보인다.

4. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 수율

BSTE, GSTE의 수율은 각각 $4.78 \pm 0.72\%$ 와 $13.50 \pm 3.82\%$ 였고, BSTF와 GSTF의 수율은 각각 $0.84 \pm 0.07\%$ 와 $1.41 \pm 0.16\%$ 였다. Baydar 등(2007)의 연구에 따르면 acetone:water:acetic acid(90:9.5:0.5)와 acetate:methanol:water(60:30:10)로 추출한 포도 씨 추출물의 수율은 각각 $15.3 \pm 2.3\%$ 와 $16.2 \pm 2.8\%$ 였다. Hong 등(2001)은 상온에서 methanol 추출한 포도 씨 추출물의 수율은 $12.92 \pm 0.03\%$ 라고 보고하였다.

5. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 총 폴리페놀 함량

씨 추출물의 항산화 성분 함량은 동결건조물의 건조 중량을 기준으로 하여 Fig. 6에 나타냈다. BSTE의 총 폴리페놀 함량은 271.0 mg GAE/g으로 GSTE(206.2 mg GAE/g)의 총 폴리페놀 함량보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$, t -test). BSTF의 총 폴리페놀 함량(787.8 mg GAE/g)은 GSTF(760.8 mg GAE/g)보다 높았지만 유의적인 차이는 없었다($p > 0.05$, t -test). Carpenter 등(2007)의 연구에 따르면 포도 씨 추출물의 총 폴리페놀 함량은 865 mg GAE/g으로 본 실험결과와 유사하였다. 또한, Cuevas-Rodríguez 등(2010)의 연구에 따르면 proanthocyanidin이 풍부한 다양한 Mexican blackberry (*Rubus* spp.) 추출물의 총 폴리페놀 함량은 454.9–598.0 mg GAE/g of dry weight이라 보고하였다.

본 연구 결과를 씨 중량을 기준으로 환산하면, BSTE, GSTE, BSTF, GSTF의 총 폴리페놀 함량은 각각 13.0, 27.8, 6.6, 10.7 mg GAE/g seed으로 포도 씨의 총 추출물과 탄닌 분획물이 black raspberry 씨의 총 추출물과 탄닌 분획물보다 폴리페놀함량이 더 많았다. Luther 등(2007)과 Bushman 등(2004)의 연구에 따르면 black raspberry 씨의 총 폴리페놀 함량은 각각 11.8과 44.6 mg GAE/g seed였다.

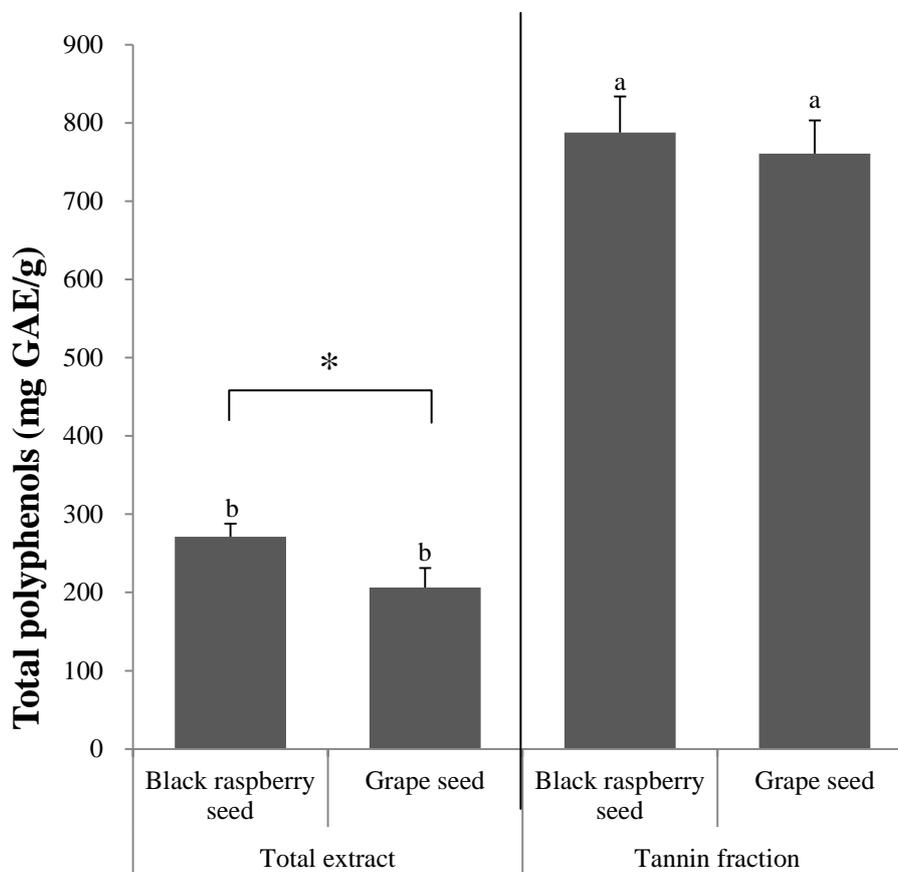


Fig. 6. Polyphenol contents in black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions

Based on the freeze-dried extract; Bars represent mean \pm standard deviation (n=3).

GAE: gallic acid equivalent.

* Significantly different within the same group (* <0.05 ; t-test).

^{a,b}Values with different superscripts represent significant differences ($p<0.05$; one-way repeated ANOVA and Duncan's multiple range test).

6. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 항산화능

6.1. FRAP

씨 추출물의 항산화 성분이 Fe^{3+} /tripirydyltriazine complex를 환원시키는 능력을 통해 FRAP을 측정하였다. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 FRAP(expressed as TEAC) 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 본 연구의 GSTE의 FRAP 값은 $534.6 \mu\text{M TEAC/g}$ 로 산출할 수 있는데, 이는 Xu 등(2010)의 연구에서 보고된 *V. vinifera* L. Cabernet Sauvignon($605.2 \mu\text{M TEAC/g}$)의 FRAP 값과 유사하다. BSTF($2926.5 \mu\text{M TEAC/g}$)의 FRAP 값은 GSTF($2300.9 \mu\text{M TEAC/g}$)보다 유의적으로 높았다.

본 연구 결과를 씨 중량을 기준으로 환산하면, BSTE, GSTE, BSTF, GSTF의 FRAP 값은 각각 49.8, 72.1, 12.3, 16.2 mM TEAC/g seed이었다.

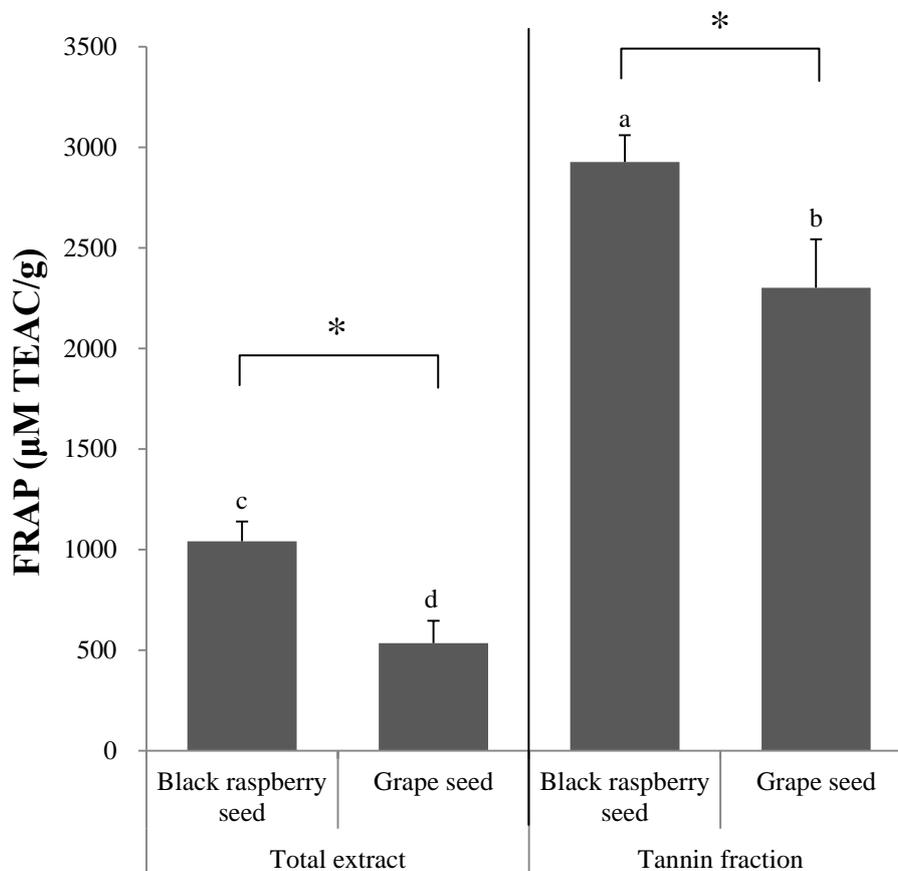


Fig. 7. Ferric reducing anti-oxidant power of black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions

Based on the freeze-dried extract; Bars represent mean \pm standard deviation (n=3).

TEAC: trolox equivalent anti-oxidant capacity

*,** Significantly different within the same group (*<0.05, **<0.01; t-test).

^{a,b,c,d}Values with different superscripts represent significant differences (p<0.05; one-way repeated ANOVA and Duncan's multiple range test).

6.2. DPPH radical scavenging activity

DPPH·는 517nm(보라색)에서 최대의 흡광도를 가진다. 항산화제로부터 수소를 흡수하여 DPPH를 형성하게 되고, 보라색에서 노란색으로 변하게 된다. 이를 UV spectrophotometer를 이용하여 흡광도가 감소하는 것을 통해 항산화력을 측정한다. 따라서, 씨 추출물의 항산화능을 DPPH radical scavenging activity를 통해 측정하였다.

씨 추출물의 항산화능을 ascorbic acid와 trolox의 DPPH radical scavenging activity와 비교하여 DPPH IC₅₀(DPPH radical을 50% 소거할 수 있는 추출물의 농도) 값을 Fig. 8에 나타내었다. GSTE의 DPPH IC₅₀(56.7 μ g/mL(freeze-dried extract/reaction solution) 값은 BSTE(40.9 μ g/mL)에 비해 유의적으로 높았으며(p<0.05), 이는 BSTE가 GSTE보다 높은 항산화능을 가지는 것을 의미한다. BSTF의 DPPH IC₅₀(11.7 μ g/mL) 값은 GSTF(14.8 μ g/mL)에 비해 유의적으로 낮았다(p<0.05). BSTE와 GSTE의 DPPH IC₅₀ 값은 ascorbic acid(17.9 μ g/mL)와 trolox(21.4 μ g/mL)에 비해 약 2배 정도 높았고 BSTF와 GSTF의 DPPH IC₅₀ 값은 비슷하거나 낮았다. Xu 등(2010)의 연구에 따르면 *V. vinifera* L. Cabernet Sauvignon 포도 씨의 DPPH 값은 422.2 μ M TEAC/g of dry defatted matter로서, 본 연구의 포도 씨 총 추출물인 GSTE의 값(438.5 μ M TEAC/g)과 유사하였다.

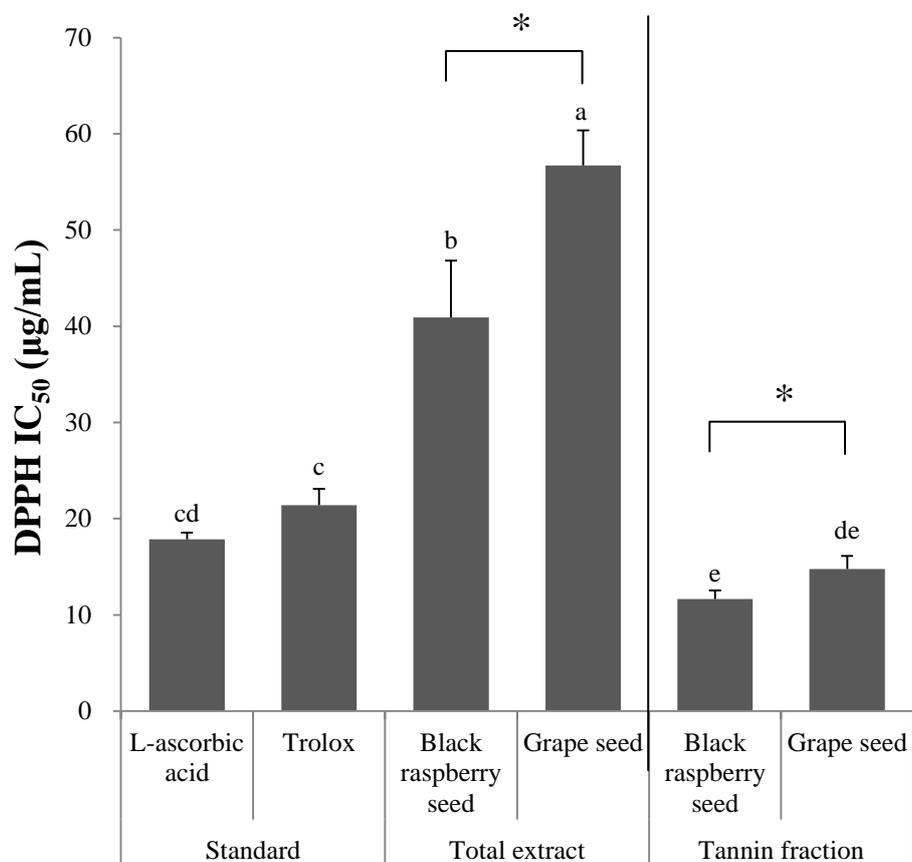


Fig. 8. DPPH radical scavenging activity of black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions

Bars represent mean \pm standard deviation (n=3).

μ g/mL: freeze-dried extract/reaction solution

DPPH IC₅₀: 50% DPPH radical scavenging activity

* Significantly different within the same group (*<0.05; t-test).

a,b,c,d,e Values with different superscripts represent significantly differences (p<0.05; one-way repeated ANOVA and Duncan's multiple range test).

씨 중량을 기준으로 DPPH radical scavenging activity를 trolox equivalent anti-oxidant capacity (TEAC; $\mu\text{M/g seed}$)로 나타내면, BSTE, GSTE, BSTF, GSTF는 각각 26.5, 59.2, 17.0, 23.8 mM TEAC/g seed이었으며, 포도 씨가 black raspberry 씨에 비해 항산화능이 높았다.

6.3. ABTS radical scavenging activity

ABTS radical scavenging activity를 통해 씨 추출물의 항산화능을 측정하였다. 씨 추출물의 항산화능을 ascorbic acid와 trolox의 ABTS radical scavenging activity와 비교하여 ABTS IC₅₀(ABTS radical을 50% 소거할 수 있는 추출물의 농도) 값을 Fig. 9에 나타내었다. BSTF의 ABTS IC₅₀ 값이 가장 낮았으며, 그 다음으로는 GSTF, BSTE, GSTE 순이었다. BSTE의 ABTS IC₅₀ 값(92.2 $\mu\text{g/mL}$ (freeze-dried extract/reaction solution))은 GSTE(121.7 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 유의적으로 낮았으며($p < 0.05$), 이는 BSTE가 GSTE보다 높은 항산화능을 가지는 것을 의미한다. BSTF의 ABTS IC₅₀ 값(25.27 $\mu\text{g/mL}$)은 GSTF(40.39 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 유의적으로 낮았으며($p < 0.01$), 이는 BSTF가 GSTF보다 높은 항산화능을 가지는 것을 의미한다. BSTE와 GSTE의 ABTS IC₅₀ 값은 ascorbic acid(38.56 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 약 2~3배 정도 높았으나, BSTF와 GSTF의 ABTS IC₅₀ 값은 비슷하거나 낮았다. Xu 등(2010)의 연구에 따르면, *V. vinifera* L. Cabernet Sauvignon 포도 씨 추출물의 ABTS 값은 649.9 $\mu\text{M TEAC/g}$ of dry defatted matter로 보고하였으며, 이는 본 실험의 포도 씨 총 추출물인 GSTE(607.8 $\mu\text{M TEAC/g}$)의 ABTS 값과 유사하다.

씨 중량을 기준으로 ABTS radical scavenging activity를 $\mu\text{M TEAC/g}$

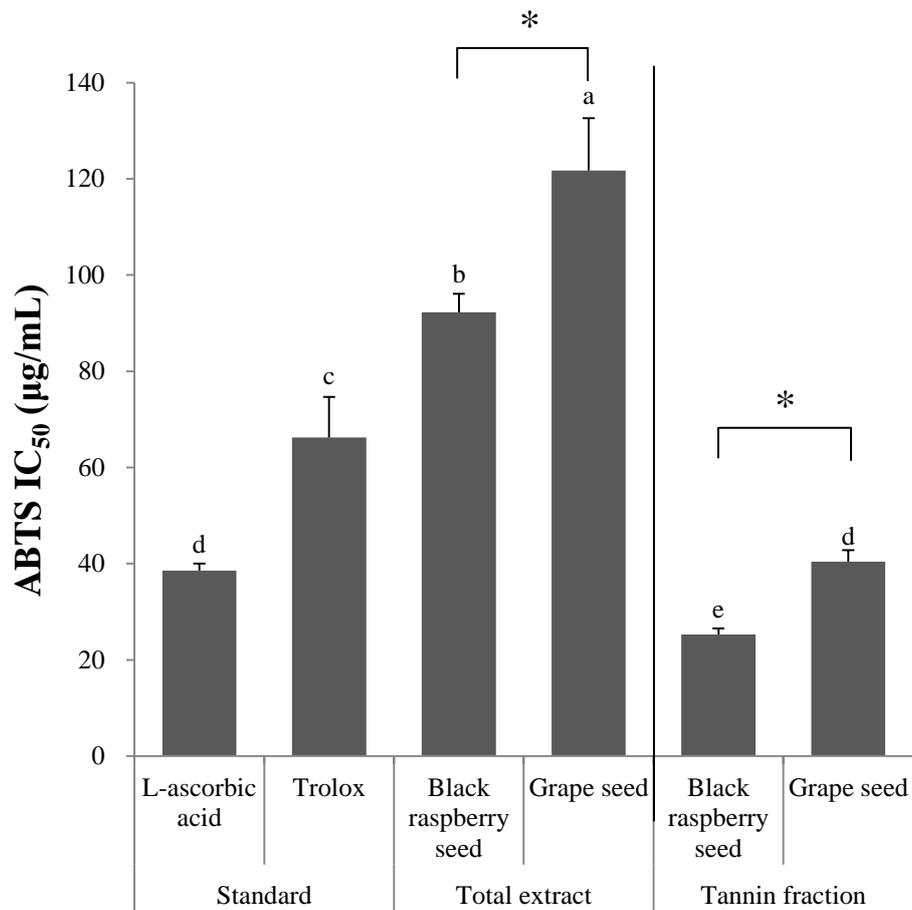


Fig. 9. ABTS radical scavenging activity of black raspberry seed and grape seed extracts and tannin fractions

Bars represent mean \pm standard deviation (n=3).

μ g/mL: freeze-dried extract/reaction solution

ABTS IC₅₀: 50% ABTS radical scavenging activity

*,** Significantly different within the same group (*<0.05, **<0.01; t-test).

^{a,b,c,d,e} Values with different superscripts represent significantly differences (p<0.05; one-way repeated ANOVA and Duncan's multiple range test).

seed로 나타내면, BSTE, GSTE, BSTF, GSTF는 각각 39.2, 82.0, 22.4, 22.1 mM TEAC/g seed이었으며, 포도 씨가 black raspberry 씨에 비해 항산화능이 높았다.

7. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물을 처리한 RAW

264.7 세포 독성 효과

설치류의 RAW 264.7 세포를 이용하여 씨 추출물이 세포에 독성을 미치는 농도를 조사하였다.

RAW 264.7 세포를 1×10^4 cells/well의 농도에서 BSTE, GSTE, BSTF, GSTF를 각각 200, 200, 40, 40 $\mu\text{g/mL}$ (freeze-dried extract/medium) 까지의 농도로 24시간 동안 처리하여 시료 비처리 대조군과 비교하였을 때, 세포 생존율이 80% 이상인 BSTE, GSTE, BSTF, GSTF 농도는 각각 20, 40, 2.5 and 5 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(Fig. 10).

RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well의 농도에서 LPS만 처리한 군과 LPS와 씨 추출물을 함께 처리한 군을 LPS 비처리 대조군과 비교하여 Fig. 11에 cell viability를 나타냈다. LPS 처리군은 LPS 비처리 대조군과 비교하였을 때, 세포 생존율에서 유의적인 차이를 보였으나 LPS 처리군과 LPS와 씨 추출물을 함께 처리한 군간(40 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 총 추출물과 10 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 탄닌 분획물의 농도)의 세포 생존율은 유의적인 차이가 없었다(Fig. 11).

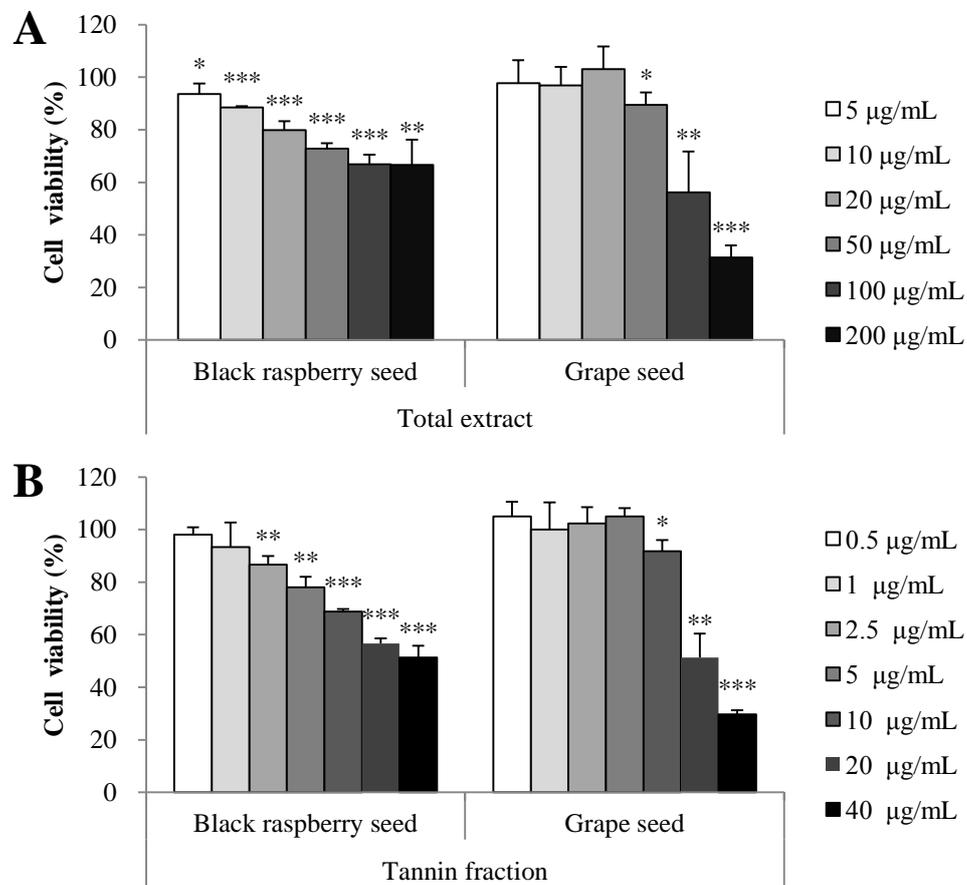


Fig. 10. Viability of RAW 264.7 cells treated with black raspberry seed and grape seed extracts (A) and tannin fractions (B)

Bars represent mean \pm standard deviation (n=3).

μ g/mL: freeze-dried extract/medium

Untreated control cells were set as 100%.

Statistical significance is based on the difference when compared with the cells without treating extracts (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

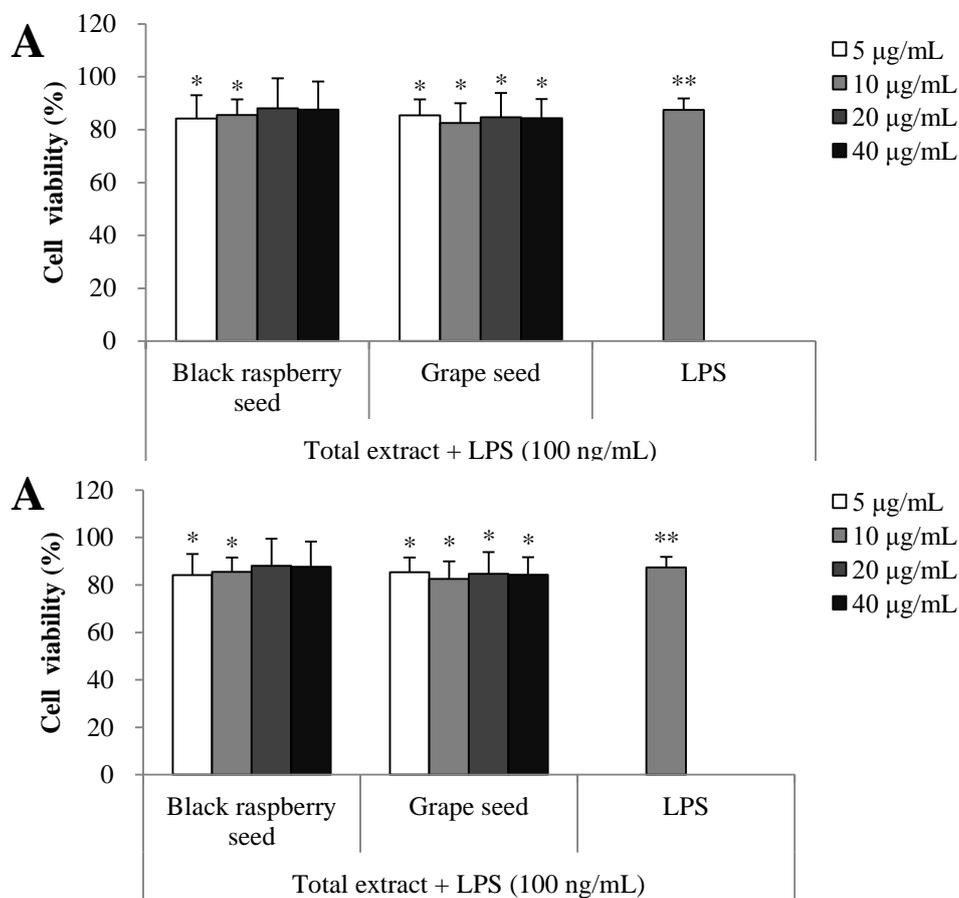


Fig. 11. Viability of RAW 264.7 cells treated with LPS and black raspberry seed and grape seed extracts (A) and tannin fractions (B) Bars represent mean \pm standard deviation (n=3).

μ g/mL: freeze-dried extract/medium

Untreated control cells were set as 100%.

Statistical significance is based on the difference when compared with the cells without treating extracts (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

LPS: treated lipopolysaccharides from *Escherichia coli*

8. Black raspberry 씨와 포도 씨 추출물의 NO 생성 저해 효과

NO는 염증의 발달과 관련이 있다(Mantovani 등, 2008). NO의 생성량은 LPS 자극으로 유도된 RAW 264.7 세포의 배양액을 취하여 측정하였다. 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 BSTE, GSTE, BSTF, GSTF를 처리하여 배양한 후 세포 배양액을 Griess 시약과 반응시켜 확인한 결과, LPS를 처리한 대조군은 NO의 생성량이 높았으며 LPS를 처리하지 않은 대조군은 NO의 생성량이 상대적으로 매우 낮았다. 또한, LPS와 씨 추출물을 함께 처리한 군에서는 씨 추출물의 농도와 비례하여 NO 생성 저해 효과가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. BSTE 추출물은 GSTE에 비해 5–40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의적으로 NO 생성 저해 효과가 높았다(Fig. 12A). BSTE 추출물은 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 35%의 NO 생성을 유의적으로 억제하였으며($p < 0.05$), GSTE 추출물은 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 14%의 NO 생성 저해 효과를 보였다(Fig. 12A). BSTF는 1–10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의적으로 NO 생성을 억제하였으며, GSTF에 비해 2.5–10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의적으로 NO 생성을 억제하였다(Fig. 12B). BSTF는 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 19%의 NO 생성을 억제한 반면, GSTF는 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 10%의 NO 생성을 억제하였다(Fig. 12B). Terra 등

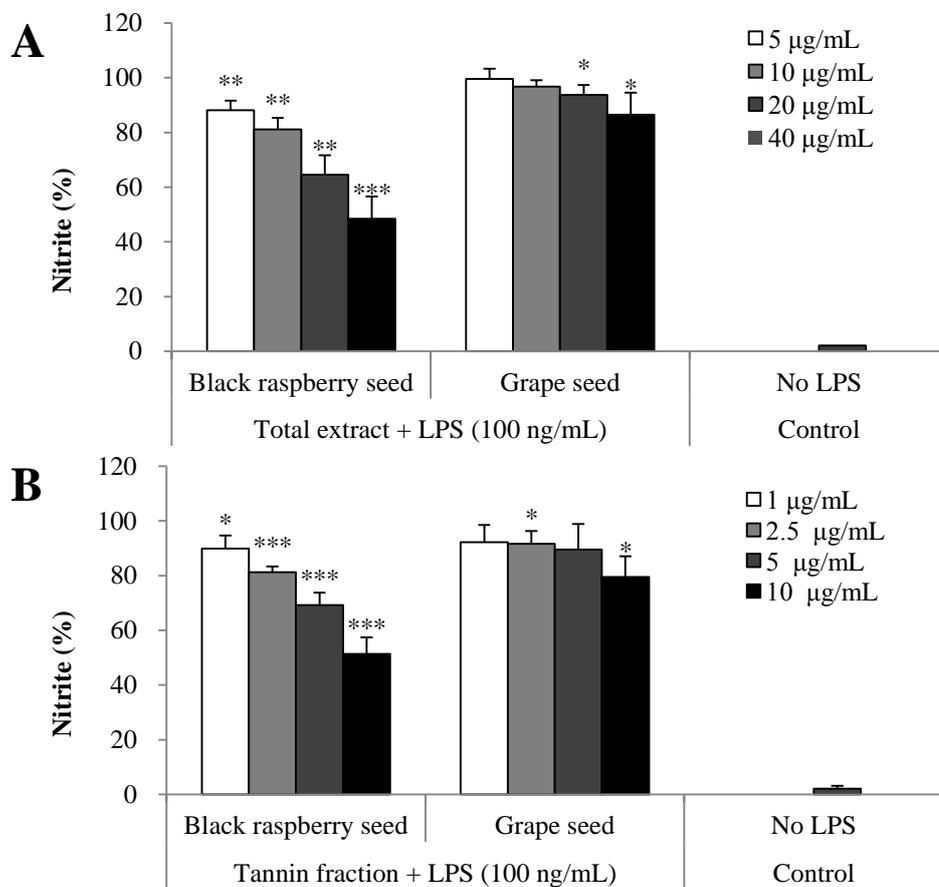


Fig. 12. NO production of RAW 264.7 cells treated with black raspberry seed and grape seed extracts (A) and tannin fractions (B) Bars represent mean \pm standard deviation (n=3).

μ g/mL: freeze-dried extract/medium

Statistical significance is based on the difference when compared with the cells without treating extracts (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

LPS: treated lipopolysaccharides from *Escherichia coli*

No LPS: Not treated with LPS and sample

(2007)은 4시간 동안 preincubation한 procyanidin 추출물이 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NO 생성을 20% 저해하는 것으로 보고하였다.

Cuevas-Rodríguez 등(2010)에 따르면, Mexican blackberry 추출물의 항산화능과 NO 생성 억제가 polyphenol과 유의적인 관련이 있다고 보고하였다. 이는 본 연구에서 항산화능이 높은 추출물일수록 NO 생성 억제 효과가 더 좋았다는 결과와 일치한다.

참고 문헌

- WILLIAM, H. 2000. Animal feed. In *Official methods of analysis of AOAC international 17th edition*. pp.1-2, Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, Washington.
- BAYDAR, N.G., ÖZKAN, G. and YAŞAR, S. 2007. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control* 18, 1131-1136.
- BEEKWILDER, J., JONKER, H., MEESTERS, P., HALL, R.D., VAN DER MEER, I.M. and DE VOS, C.H.R. 2005. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3313-3320.
- BENZIE, I.F.F. and STRAIN, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70-76.
- BIALONSKA, D., KASIMSETTY, S.G., KHAN, S.I. and FERREIRA, D. 2009. Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10181-10186.
- BILLER, J. 2008. Cyanide. In *The Interface of Neurology & Internal Medicine*. pp. 938-942, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- BRADBURY, J.H., EGAN, S.V. and LYNCH, M.J. 1991. Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. *J. Sci. Food Agric.* 55, 277-290.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. and BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci.*

Technol. 28, 25-30.

- BUENDÍA, B., GIL, M.I., TUDELA, J.A., GADY, A.L., MEDINA, J.J., SORIA, C., LÓPEZ, J.M. and TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 2010. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3916-3926.
- BUSHMAN, B.S., PHILLIPS, B., ISBELL, T., OU, B., CRANE, J.M. and KNAPP, S.J. 2004. Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7982-7987.
- CARPENTER, R., O'GRADY, M.N., O'CALLAGHAN, Y.C., O'BREIN, N.M. and KERRY, J.P. 2007. Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Sci.* 76, 604-610.
- CASTILLA, P., ECHARRI, R. DÁ VALOS, A., CERRATO, F., ORTEGA, H., TERUEL, J.L., LUCAS, M.F., GÓ MEZ-CORONADO, D., ORTUÑO, J. and LASUNCIÓN, M.A. 2006. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 252-262.
- CHACÓN, M.R., CEPERUELO-MALLAFRÉ, V., MAYMÓ-MASIP, E., MATEO-SANZ, J. M., AROLA, L., GUITIÉRREZ, C., FERNANDEZ-REAL, J.M., ARDÈVOL, A., SIMÓN, I. and VENDRELL, J. 2009. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine* 47, 137-142.
- CLIFFORD, M.N. and SCALBERT, A. 2000. Ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1118-1125.

- CUEVAS-RODRÍGUEZ, E.O., DIA, V.P., YOUSEF, G.G., GARCÍA-SAUCEDO, P.A., LÓPEZ-MEDINA, J., PAREDES-LÓPEZ, O., DE MEJIA, E.G. and LILA, M.A. 2010. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9542-9548.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K.L. and FENNEMA, O.R. 2008. Colorants. In *Fennema's Food Chemistry*. pp. 571-638, CRC Press, Florida.
- FERNÁNDEZ, C.M., RAMOS, M.J., PÉREZ, Á and RODRÍGUEZ, J.F. 2010. Production of biodiesel from winery waste: extraction, refining and transesterification of grape seed oil. *Bioresource Technol.* 101, 7019-7024.
- FURUUCHI, R., YOKOYAMA, T., WATANABE, Y. and HIRAYAMA, M. 2011. Identification and quantification of short oligomeric proanthocyanidins and other polyphenols in boysenberry seeds and juice. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3738-3746.
- GABETTA, B., FUZZATI, N., GRIFFINI, A., LOLLA, E., PACE, R., RUFFILLI, T. and PETERLONGO, F. 2000. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia* 71, 162-175.
- GOĐEVAC, D., TEŠEVIĆ, V., VAJS, V., MILOSAVLJEVIĆ, S. and STANKOVIĆ, M. 2009. Antioxidant properties of raspberry seed extracts on micronucleus distribution in peripheral blood lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2853-2859.
- HAGER, T.J., HOWARD, L.R., LIYANAGE, R., LAY, J.O. and PRIOR, R.L. 2008. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *J. Agric. Food Chem.* 56, 661-669.
- HAQUE, M.R. and BRADBURY, J.H. 2001. Total cyanide determination of

- plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chem.* *77*, 107-114.
- HONG, N., YAYLAYAN, V.A., RAGHAVAN, G.S.V., PARÉ, J.R.J. and BÉLANGER, J.M.R. 2001. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed. *Nat. Prod. Lett.* *15*, 197-204.
- HWANG, I., LEE, H., KIM, S., ZHENG, H., CHOI, J., LEE, S., LEE, S. and CHUNG, S. 2008. Proanthocyanidin content and antioxidant characteristics of grape seeds. *Korean J. Food Preserv.* *15*, 859-863.
- IZUMI, S., OHNO, N. and YADOMAE, T. 1997. Down-regulation of LPS-induced nitric oxide synthesis of murine macrophages by oral administration of Sho-saiko-to. *Drug Develop. Res.* *40*, 48-55.
- JANG, M. CAI, L., UDEANI, G.O., SLOWING, K.V., THOMAS, C.F., BEECHER, C.W.W., FONG, H.H.S., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D., MEHTA, R.G., MOON, R.C. and PEZZUTO, J.M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* *275*, 218-220.
- JEONG, J.H., JUNG, H., LEE, S.R., LEE, H.J., HWANG, K.T. and KIM, T.Y. 2010. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chem.* *123*, 338-344.
- KARLSSON, S., NÅNBERG, E., FJAERAA, C. and WIJKANDER, J. 2010. Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E₂ in human monocytes. *Brit. J. Nutr.* *103*, 1102.
- KASSIM, M., ACHOUI, M., MUSTAFA, M.R., MOHD, M.A. and YUSOFF, K.M. 2010. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian

- honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutr. res.* *30*, 650-659.
- KEDAGE, V.V., TILAK, J.C., DIXIT, G.B., DEVASAGAYAM, T.P.A. and MHATRE, M. 2007. A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera* L.). *Crit. Rev. Food Sci.* *47*, 175-185.
- KRIS-ETHERTON, P.M., LEFEVRE, M., BEECHER, G.R., GROSS, M.D., KEEN, C.L. and ETHERTON, T.D. 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.* *24*, 511-538.
- KU, C.S. and MUN, S.P. 2008. Antioxidant activities of ethanol extracts from seeds in fresh Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and wine processing waste. *Bioresource Technol.* *99*, 4503-4509.
- LEE, C.J., CHEN, L.G., LIANG, W.L., and WANG, C.C. 2010. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem.* *118*, 315-322.
- LUTHER, M., PARRY, J., MOORE, J., MENG, J., ZHANG, Y., CHENG, Z. and YU, L. 2007. Inhibitory effect of chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chem.* *104*, 1065-1073.
- MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K.R., KAMAL-ELDIN, A. and TÖRRÖNEN, A.R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *J. Agric. Food Chem.* *52*, 6178-6187.
- MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. and BALKWILL, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.

- MULLEN, W., YOKOTA, T., LEAN, M. E.J. and CROZIER, A. 2003. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry* 64, 617-624.
- NOLLET, L.M.L. and TOLDRA, F. 2012. Hydrolyzable tannins : gallotannins, ellagitannins, and ellagic acid. In *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*. pp. 435-460, CRC Press, Florida.
- OH, H.H., HWANG, K.T., SHIN, M.K., LEE, H.K. and KIM, S.Z. 2007. Oils in the seeds of caneberries produced in Korea. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 549-555.
- OH, H.H., HWANG, K.T., KIM, M., LEE, H.K. and KIM, S.Z. 2008. Chemical characteristics of raspberry and blackberry fruits produced in Korea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37, 738-743.
- PASSOS, C.P., CARDOSO, S.M., DOMINGUES, M.R., DOMINGUES, P., SILVA, C.M. and COIMBRA, M.A. 2007. Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. *Food Chem.* 105, 1457-1467.
- PELEG, H., NAIM, M., ROUSEFF, R.L. and ZEHAVI, U. 1991. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J. Sci. Food Agric.* 57, 417-426.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. and RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Bio. Med.* 26, 1231-1237.
- ROSS, H.A., MCDOUGALL, G.J. and STEWART, D. 2007. Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. *Phytochemistry* 68, 218-228.
- SEERAM, N.P. 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical

- activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 627-629.
- SHIN, K.S., PARK, P.J., BOO, H.O., KO, J.K. and HAN, S.S. 2003. Chemical components and comparison of biological activities on the fruit of natural bogbunja (*Rubus coreanus* Miquel). *Korean J. Plant Res.* *16*, 109-117.
- SIMONETTI, P., CIAPPELLANO, S., GARDANA, C., BRAMATI, L. and PIETTA, P. 2002. Procyanidins from vitis vinifera seeds: in vivo effects on oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* *202*, *50*, 6217-6221.
- SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R. and LAMUELA-RAVENTOS, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* *299*, 152-178.
- TERRA, X., MONTAGUT, G., BUSTOS, M., LLOPIZ, N., ARDÈVOL, A., BLADÉ, C., FERNÁNDEZ-LARREA, J., PUJADAS, G., SALVADÓ, J. and AROLA, L. 2009. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* *20*, 210-218.
- TERRA, X., VALLS, J., VITRAC, X., MÉRRILLON, J.M., AROLA, L., ARDÈVOL, A., BLADÉ, C., FERNÁNDEZ-LARREA, J., PUJADAS, G., SALVADÓ, J. and BLAY, M. 2007. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 4357-4365.
- TULIO, A.Z., REESE, R.N., WYZGOSKI, F.J., RINALDI, P.L., FU, R. and SCHEERENS, J.C. 2008. Cyanidin 3-rutinoside and cyaniding 3-

- xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 1880-1888.
- UMESALMA, S. and SUDHANDIRAN, G. 2010. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediator NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clin. Pharmacol.* *107*, 650-655.
- WANG, S.Y., CHEN, C. and WANG, C.Y. 2009. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chem.* *112*, 676-684.
- XU, C., ZHANG, Y., CAO, L. and LU, J. 2010. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chem.* *119*, 1557-1565.
- ZHANG, W., LIU, H., XIE, K., YIN, L., LI, Y., KWIK-URIBE, C.L. and ZHU, X. 2006. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 508-515.

Abstract

Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities of Tannin Fraction from Black Raspberry Seeds and Grape Seeds

Miyoung Park

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Black raspberry and grape have biological activities such as anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities. Black raspberry and grape are widely consumed in our diet in various ways including wine, juice and raw fruits. Many byproducts and waste materials, including seeds and wine pomace produced after the processing, are an attractive source of functional compounds.

Much research has been conducted on the anti-inflammatory activity of condensed tannins or proanthocyanidins from grape seeds. However, little is

known about the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysable tannins or ellagitannins from black raspberry seeds. Thus, the objective of this study was to evaluate anti-oxidant and anti-inflammatory activities of total extract and tannin fraction of black raspberry seeds compared with grape seed total extract and its tannin fraction.

The total extracts and the tannin fractions of black raspberry seeds and grape seeds were abbreviated as BSTE, GSTE, BSTF and GSTF, respectively. The equal weights of the freeze-dried extracts were used for anti-oxidant activities and cell culture experiments.

Total polyphenol content in BSTE was 271.0 mg GAE/g, significantly higher than that of GSTE (206.2 mg GAE/g) ($P < 0.05$ according to a t-test). Total polyphenol content of BSTF was 787.8 mg GAE/g, not significantly different from that of GSTF (760.8 mg GAE/g). The FRAP value of the GSTE (534.6 $\mu\text{M TEAC/g}$) was significantly higher than that of BSTE ($p < 0.01$). The BSTF showed significantly higher TEAC value (2926.5 $\mu\text{M TEAC/g}$) than that of GSTF (2300.9 $\mu\text{M TEAC/g}$). The DPPH IC_{50} value of the BSTE (40.9 $\mu\text{g/mL}$ (freeze-dried extract/reaction solution)) was significantly lower than that of the GSTE (56.7 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$), indicating the BSTE has a higher anti-oxidant activity than the GSTE. The BSTF also showed lower DPPH IC_{50} value (11.7 $\mu\text{g/mL}$) than that of the GSTF (14.8 $\mu\text{g/mL}$) ($P < 0.05$). The ABTS IC_{50} values of

the BSTF had the lowest ABTS IC₅₀ value (25.3 µg/mL), followed by the GSTF, BSTE and GSTE. In this study, the ABTS IC₅₀ value of BSTE was significantly lower than that of the GSTE (P<0.05), indicating the BSTE has a higher anti-oxidant activity than the GSTE. The ABTS IC₅₀ value of the BSTF was also significantly lower than that of GSTF (P<0.01).

When anti-inflammatory effect was determined by LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells treated with the BSTE, GSTE, BSTF and GSTF, seed extracts dose-dependently inhibited the production of NO. BSTE showed a significantly higher NO inhibition than GSTE at 5-40 µg/mL of tested concentrations. BSTF also showed a significantly higher NO inhibition than GSTF at 2.5-10 µg/mL of tested concentrations. Our study showed that extracts with the higher anti-oxidant activities tended to have higher NO inhibition.

Anti-oxidant activities and anti-inflammatory activity of the total extract and tannin fraction of black raspberry seeds were significantly higher than those of grape seeds. The results of the present study suggest that black raspberry seed total extract and its tannin fraction might be used as a source of natural anti-oxidant agents. Furthermore, it would be worthwhile to utilize the wastes from wine-making process as alternative natural anti-oxidants and anti-inflammatory agents in food, cosmetic or pharmaceutical industry.

Key Words: Black raspberry seed; Grape seed; Ellagitannin; Proanthocyanidin;
Anti-oxidant activity; Anti-inflammatory activity

Student Number: 2011-21639