

염주괴불주머니 (*Corydalis heterocarpa*)의 항산화 활성

김유아 · 이정임 · 이진혁 · 공창숙¹ · 남택정² · 서영완*

한국해양대학교 해양환경 · 생명과학부, ¹부경대학교 해양바이오프로세스연구단, ²부경대학교 식품생명공학부

Antioxidant Activity of the Salt Marsh Plant *Corydalis heterocarpa*

You Ah Kim, Jung Im Lee, Jinhyeok Lee, Chang-Suk Kong¹, Taek Jeong Nam², and Youngwan Seo*

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

¹Marine Bioprocess Research Center, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract The antioxidant activities of two crude extracts (CH₂Cl₂ and MeOH) and their solvent fractions (*n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, and H₂O fractions) from *Corydalis heterocarpa* were determined by evaluating authentic ONOO⁻ and ONOO⁻ generated from SIN-1 (3-morpholinsydnonimine) *in vitro* as well as by measuring the degree of occurrence of intracellular reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO). Scavenging activities of solvent fractions on authentic ONOO⁻ increased in the order of *n*-BuOH > 85% aq. MeOH > H₂O > *n*-hexane fractions, while those on ONOO⁻ generated from SIN-1 increased in the order of *n*-BuOH > 85% aq. MeOH > H₂O > *n*-hexane fractions. In addition, all solvent fractions effectively inhibited the intracellular ROS and NO levels. The *n*-BuOH fraction especially exhibited the strongest ROS scavenging effect. Further purification of *n*-BuOH fraction led to the isolation of cnidimoside A, which presented the potent ROS scavenging effect at 10 μM. From these results, extracts of *C. heterocarpa* and its component, cnidimoside A, were predicted to be potentially useful as ingredients for protecting against oxidation.

Keywords: *Corydalis heterocarpa*, cnidimoside A, nitric oxide, reactive oxygen species, peroxyntirite

서 론

인체의 정상적인 대사과정 중 산소가 유입되어 세포 내에서 이용될 때, superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl (HO·), alkoxyl (RO·), hydroperoxyl radical (HOO·) 등과 같은 활성 산소종 (reactive oxygen species)과 nitric oxide (NO·)와 peroxyntirite (ONOO⁻)와 같은 활성 질소종 (reactive nitrogen species)이 생산된다 [1]. NO는 항암, 항미생물작용, 그리고 혈관 확장에 의한 혈액순환 개선 및 성기능 장애개선 [2] 등의 기능을 가진다고 알려져 있다. 하지만 과도한 양의 NO가 생성되면 poly (ADP-ribose) synthetase가 활성화되어 세포 내 NAD가 고갈 되게 함으로서 세포를 죽게 할 뿐만 아니라 [3], ribonucleotide reductase의 tyrosyl radical과 반응하

여 핵산의 염기를 deamination 시켜 DNA 합성을 억제하거나 파괴하여 돌연변이를 유발한다 [4,5]. 뿐만 아니라 O₂⁻과 반응하여 강력한 산화제인 ONOO⁻를 생성하게 되는데 [6] 이는 sulfhydryl, 지질, 아미노산, nucleotide와 같은 세포 구성성분에 대해 여러 가지 심각한 손상을 야기시킨다. 또한 ONOO⁻는 퇴행성 질환 즉, 암, 노화, 동맥경화, 류마티스 관절염 등과 같은 여러 질환과 직접적인 관련이 있는 것으로 보고 된다 [7-10]. 이러한 이유에서 인체 내 활성 산소종과 활성 질소종의 생성을 억제하고 제거하기 위한 항산화 물질의 탐색이 오래전부터 행해져 왔으며, 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)과 butylated hydroxytoluene (BHT)이 개발되어 널리 사용되었다. 그러나 이들은 과량 섭취 시 심각한 질병을 유발하는 것으로 알려져 기존 합성 항산화제를 대체 할 수 있는 안전한 천연 항산화제에 대한 연구가 많이 이루어졌다. 그 결과, 허브와 같은 식물로부터 분리된 carotenoid, polyphenol, flavonoid 계열의 화합물이 높은 항산화 효과를 가지는 것으로 보고되었다 [11,12]. 최근에 들어

*Corresponding author

Tel: +82-51-410-4328, Fax: +82-51-404-3538

e-mail: ywseo@hhu.ac.kr

서는 육상 생물뿐만 아니라 해양생물 유래의 생리활성 물질의 개발에 관심이 증대되고 있으며 [13], 그 중에서도 일반적으로 호숫가와 암염과 같이 토양의 염분농도가 높은 지역에서 잘 자라는 식물인 염생식물이 새로운 소재로 각광을 받고 있다. 이는 염생식물이 육상생태계와 매우 다른 환경에서 생육하기 때문에 육상 생물에서 발견되지 않은 유용한 유전자원이나 생리활성물질의 개발 가능성이 매우 높을 것으로 평가되기 때문이라 여겨진다 [14-17].

염주괴불주머니 (*Corydalis heterocarpa*)는 양귀비목 양귀비과의 두해살이 풀로써 [18] 우리나라와 일본 등지에 많이 분포하고 있는 염생식물이다. 오래전부터 뿌리 및 줄기가 산모의 진통이나 경련의 치료제로 사용되어 왔으며, 최근에 이들의 추출물 및 화합물을 이용한 암세포 증식억제 효과 및 항면역 연구가 보고된 바 있으나 [19,20], 여전히 이에 대한 생리활성이나 화학성분에 관한 천연물 화학적 연구가 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 염주괴불주머니의 추출물 및 분획물을 제조하고 1종의 chromone 계열의 화합물을 분리하여 이들의 분리과정 및 항산화 활성 검색 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 염주괴불주머니 (*C. heterocarpa*)는 2003년 7월 전라남도 무안군 현경면에서 직접 채집하여 웅달에서 자연 건조한 후 추출하기 전까지 -25°C에서 냉동 보관하였다.

기기 및 시약

화합물은 high performance liquid chromatography (HPLC)으로 Dionex P580 pump (USA)와 Varian 350 refractive index detector (USA)를 사용하여 분리·정제하였다. 단일 분리된 화합물의 구조 결정을 위해 Perkin elmer polarimeter 341 (USA)를 사용하여 비선광도를 측정하였으며, NMR 스펙트럼은 Varian Mercury 300 (¹H-NMR 300 MHz와 ¹³C-NMR 75 MHz)에서 CD₃OD (Merck, deuterium degree 99.95%) 용액을 사용하여 기록하였다. Mass 스펙트럼 데이터는 한국기초과학연구소에서 의뢰하여 분석하였다. 사용된 모든 유기 용매는 사용하기 전 정제하여 실험에 사용하였으며, L-ascorbic acid, DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid (DL-penicillamine), dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 3-morpholinolysynonimine (SIN-1)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 peroxynitrite (ONOO⁻)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

시료의 추출 및 제조

냉동보관 되었던 염주괴불주머니 (300 g)는 해빙하여 잘게 자른 후, dichloromethane (CH₂Cl₂)을 사용하여 24시간 동안 추출한 후, 여과하는 과정을 2번 반복하여 얻어진 추출액을 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator로 농축함으로써 CH₂Cl₂ 추출물을 얻었다. 여과하고 남은 잔사에 동량의 methanol (MeOH)용매를 사용하여 CH₂Cl₂와 동일한 과정을 통해 MeOH 추출물을 얻었다. 두 추출물을 혼합 (41.1 g)한 후 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (7.3 g), 85% aq. MeOH (12.0 g), *n*-BuOH (4.3 g) 그리고 H₂O (20.0 g) 분획층을 얻었다. 얻어진 추출물과 용매 분획층은 dimethylsulfoxide (DMSO)로 희석하여 실험에 사용하였다.

활성성분의 분리

n-BuOH 분획층에 대해 MeOH과 물의 혼합용매를 사용하여 RP flash column chromatography를 실시하였으며 50% (Rfc 1), 60% (Rfc 2), 70% (Rfc 3), 80% (Rfc 4), 90% aq. MeOH (Rfc 5)과 100% MeOH (Rfc 6), 그리고 100% EtOAc (Rfc 7) 용매 분획을 얻었다. Rfc 1 용매 분획물은 MeOH과 chloroform을 혼합 (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, and 100% MeOH in CHCl₃)하여 silica gel column chromatography를 통해 9개의 subfractions (Fr. 1-1 – Fr. 1-9)으로 분획하였다. Fr. 1-4 (20% MeOH in CHCl₃)은 silica prep. TLC (EtOAc : MeOH : H₂O = 23 : 4 : 3)를 사용하여 분리·정제하였으며, 이는 다시 역상 HPLC (YMC ODS-A, 43% aq. MeOH, 1 cm x 25 cm, S-5 μm, 2 mL/min)를 실시하여 순수한 화합물 **1** (4.5 mg)을 얻었다.

화합물 **1** (cnidimoside A) : Amorphous white solid; [α]_D²⁰ -3.16 (*c* 0.32, MeOH); FABMS *m/z* 439 [M+H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 6.29 (1H, s, H-8), 5.98 (1H, s, H-3), 5.46 (1H, t, *J*=7.0 Hz, H-2'), 4.65 (1H, d, *J*=12.1 Hz, H-5'a), 4.32 (1H, d, *J*=12.1 Hz, H-5'b), 4.31 (1H, br. s, H-1"), 3.89 (1H, dd, *J*=1.9, 11.6 Hz, H-6"a), 3.72 (1H, dd, *J*=4.5, 11.6 Hz, H-6"b), 3.37 (1H, m, H-4"), 3.35 (2H, d, *J*=7.0 Hz, H-1'), 3.34 (1H, m, H-5"), 3.32 (1H, m, H-3"), 3.21 (1H, m, H-2"), 2.31 (3H, s, 2-Me), 1.76 (3H, s, H-4"); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ: 183.6 (C, C-4), 168.6 (C, C-2), 164.0 (C, C-7), 159.6 (C, C-5), 157.6 (C, C-9), 132.3 (C, C-3'), 128.7 (CH, C-2'), 112.1 (C, C-6), 108.6 (CH, C-3), 104.5 (C, C-10), 102.3 (CH, C-1"), 94.3 (CH, C-8), 78.6 (CH, C-5"), 77.7 (CH, C-3"), 75.0 (CH, C-2"), 71.6 (CH, C-4"), 68.1 (CH₂, C-5'), 62.7 (CH₂, C-6'), 22.0 (CH₂, C-1'), 21.8 (CH₃, C-4'), 20.3 (CH₃, 2-Me).

Peroxyntirite (ONOO⁻) 소거 활성 측정

ONOO⁻소거 활성은 Kooy 등 [21]의 방법에 따라

dihydrorhodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다. DHR 123은 최종 농도가 5 μM 이 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였으며, buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride 그리고 100 μM (final concentration)의 diethyltriaminepenta acetic acid (DTPA)를 혼합하여 조제하였다. Buffer 용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 authentic ONOO⁻를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하여 측정하였으며, 3-morpholinonydnimine (SIN-1)을 첨가할 경우, SIN-1이 DHR 123과 점진적인 산화를 일으키는 것을 고려하여 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. DHR 123 fluorescence intensity는 multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 $\lambda_{\text{excitation}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 530 nm에서 측정하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율 (%)로 계산하였다.

세포 배양

마우스 대식세포 Raw 264.7와 섬유 육종 세포 HT1080은 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Utah, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, Utah, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma Scientific, Japan)에서 배양하였다. 세포 배양은 2일 간격으로 배지를 교환하였으며, 6-7일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

NO (nitric oxide) 생성 억제능 측정

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에 100 μL 씩 분주하여 (5×10^3 cells/well) 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 Modified Eagle medium (MEM)으로 교체한 후 준비된 sample을 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 lipopolysaccharide (LPS, final concentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 이 후 생성된 NO의 양은 griess 시약 (0.1% N-(1-naphtyl)ethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1 : 1)과 배양액을 1 : 1로 혼합하여 15분 동안 실온에 방치한 후, multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 [22]. 이 반응은 1-naphthylenediamine, sulfanilamide 그리고 NO₂⁻가 반응하여 azo coupling을 이루는데, 이 두 개의 고리 형태가 550 nm의 파장에서 최대의 흡광도 값을 나타내며 이 값을 측정하여 간접적으로 NO의 생성량을 측정할 수 있다 [23].

세포 생존율 측정

염주괴불주머니의 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다 [24]. 배양된 세포는 5×10^3 cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 새로운 배지에 일정 농도의 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 1 mg/mL의 MTT가 포함된 배지를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 이때 생성된 formazan crystal은 DMSO에 녹여서 multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율 (%)을 구하였다.

ROS (reactive oxygen species) 소거능 측정

세포 내 자유라디칼 생성 정도는 DCF-DA assay로 측정하였다 [25]. 섬유 육종 세포 HT1080은 96 well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 희석한 20 μM 의 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, fluorescence probe)를 첨가하여 20분간 배양하였다. DCF-DA 처리 후 일정한 농도의 시료를 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. PBS로 3회 씻은 후, 2시간 동안 500 μM 의 H₂O₂를 처리하여 세포 내 자유라디칼 생성 정도는 multidetection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 $\lambda_{\text{excitation}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 528 nm에서 DCF fluorescence intensity를 측정하였다.

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균 (mean) \pm 표준오차 (standard error of mean, SEM)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 statistic analysis system v9.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

추출물 및 화합물의 항산화 활성

Peroxynitrite (ONOO⁻) 소거 활성

염주괴불주머니 추출물이 가지는 authentic ONOO⁻와 SIN-1의 소거 효과를 Kooy 등 [21]의 방법을 이용하여 검색

하였다. SIN-1은 NO·와 O₂^{·-}을 동시에 발생시켜서 신속하게 ONOO⁻를 생성시키는 화합물로서 흔히 사용된다. ONOO⁻ 소거 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율 (%)로 나타내었다. 염주괴불주머니의 CH₂Cl₂와 MeOH 추출물에 대한 authentic ONOO⁻의 소거 효과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이, 25 µg/mL의 농도에서 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid (100%)와 penicillamine (96%)의 소거 효과보다는 다소 떨어지지만 각각 70%와 76%의 높은 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 그리고 SIN-1에서 유도된 ONOO⁻에 대한 소거 효과는 50 µg/mL의 농도에서 CH₂Cl₂와 MeOH 추출물이 각각 71%와 102%의 소거효과를 보였으며, 특히 MeOH 추출물이 대조군에 상응하는 우수한 ONOO⁻ 소거 효과가 있음이 확인되었다. 위의 결과를 바탕으로 ONOO⁻의 소거에 작용을 하는 생리활성성분이 추출 용매의 극성도에 영향을 받을 수 있을 것이며, 이러한 성향은 Lee 등 [26]에서 보고된 다수의 염생식물 추출물의 결과와 유사하다.

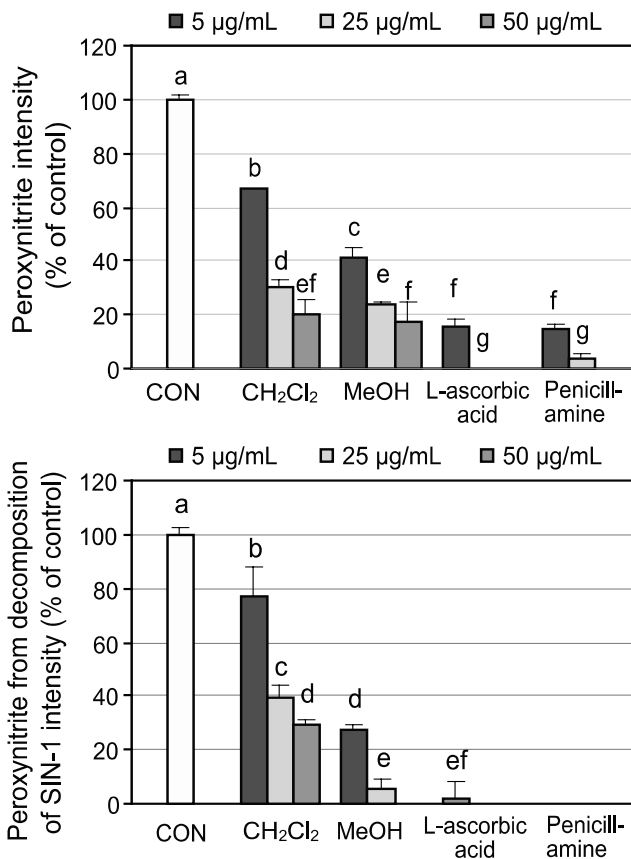


Fig. 1. Peroxynitrite scavenging activity of crude extracts from *Corydalis heterocarpa*. ^{a-g}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple rangetest.

위의 실험 결과를 바탕으로 염주괴불주머니 추출물에 대한 순차적인 용매분획을 통해 4개의 분획층 *n*-hexane, 85%

aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 H₂O 분획층을 얻었으며, 이들 에 대한 ONOO⁻ 소거 효과를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. *n*-Hexane 분획층을 제외한 모든 분획층에서 농도의존적으로 authentic ONOO⁻를 소거하는 효과가 나타났으며, 그 중 *n*-BuOH 분획층은 12.5 µg/mL의 농도에서도 76% 이상의 높은 소거율을 나타내었다. SIN-1에 의해 유도된 ONOO⁻의 효과는 authentic ONOO⁻와 유사한 경향으로 *n*-BuOH 분획층이 가장 높게 나타났으며, 85% aq. MeOH과 H₂O 분획층 또한 높은 소거 활성을 보였다. 50 µg/mL의 농도에서 *n*-BuOH과 85% aq. MeOH 분획층이 각각 96%와 95%의 높은 소거 효과를 나타내었으며, *n*-BuOH 분획층은 12.5 µg/mL의 농도에서도 ONOO⁻를 81% 가량 소거하는 것으로 나타났다. Seo 등 [27]의 연구에서 해조류 지충이 (*Sargassum thunbergii*)의 ONOO⁻ 소거 활성을 바탕으로 분획층으로부터 순수한 화합물을 분리한 바 있으며, 본 연구에서도 유사하게 분획 용매의 극성도에 따른 물질의 이동도를 뚜렷이 관찰 할 수 있었다.

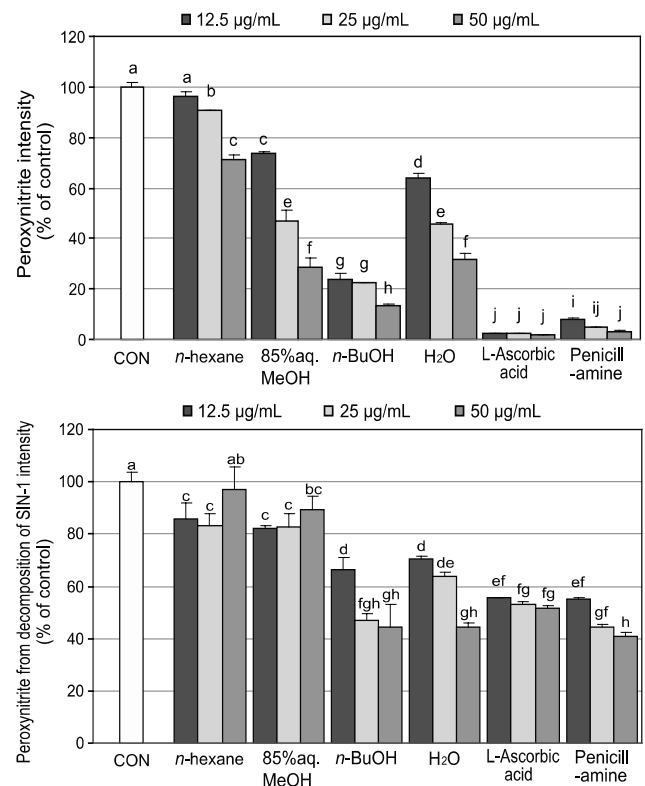


Fig. 2. Peroxynitrite scavenging activity of solvent fractions from *Corydalis heterocarpa*. ^{a-j}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple rangetest.

NO (nitric oxide) 생성 억제능

염주괴불주머니에 대한 세포 내 NO 생성 억제 효과에 대한 측정은 마우스 대식세포 Raw 264.7을 사용하였다.

시료 처리 후 LPS를 48시간 동안 처리하여 NO의 생성을 유도하였으며 시료를 처리하지 않고 LPS만 처리한 것을 대조군으로 하여 백분율 (%)로 비교하여 나타내었다. Fig. 3에서와 같이 추출물의 NO 함량을 측정된 결과, CH₂Cl₂와 MeOH 추출물의 모든 농도에서 NO의 함량이 낮게 나타났으며, 가장 낮은 농도인 50 µg/mL의 농도에서 CH₂Cl₂와 MeOH 추출물이 각각 71%와 54%로 NO의 생성을 억제시키는 것으로 나타났다.

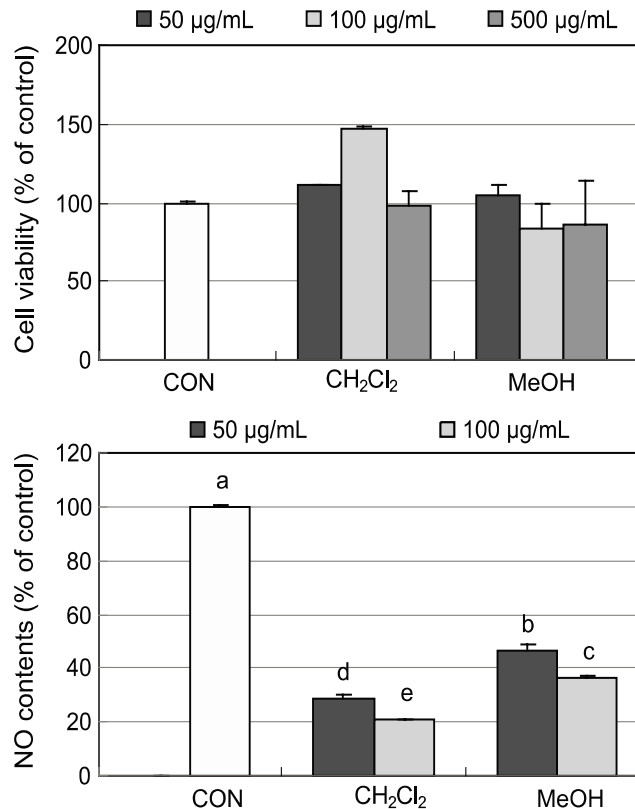


Fig. 3. Effect of *Corydalís heterocarpa* crude extracts on intracellular NO level induced by LPS. Raw264.7 macrophages were pretreated with 50 µg/mL concentration of seaweed extracts for 1 h before stimulation with LPS (1 µg/mL) for another 48 h. The nitrite content of culture media was analyzed. ^{a-e}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

Fig. 4는 순차적으로 얻은 4개의 분획층의 NO 함량을 측정된 결과로 모든 분획층에서 NO의 생성을 억제시키는 것으로 확인되었으며, 그 가운데 85% aq. MeOH과 n-hexane 분획층이 높은 NO 생성 억제능을 나타냈다. 100 µg/mL의 농도에서 차례로 85% aq. MeOH (77%) > n-hexane (62%) > n-BuOH (42%) > H₂O (33%) 분획층 순으로 NO 생성 억제 효과를 나타내었으며, 50 µg/mL 농도에서 85% aq. MeOH (70%) > n-hexane (62%) > H₂O (36%) > n-BuOH (27%) 분획층의 순으로 효과를 나타내었다.

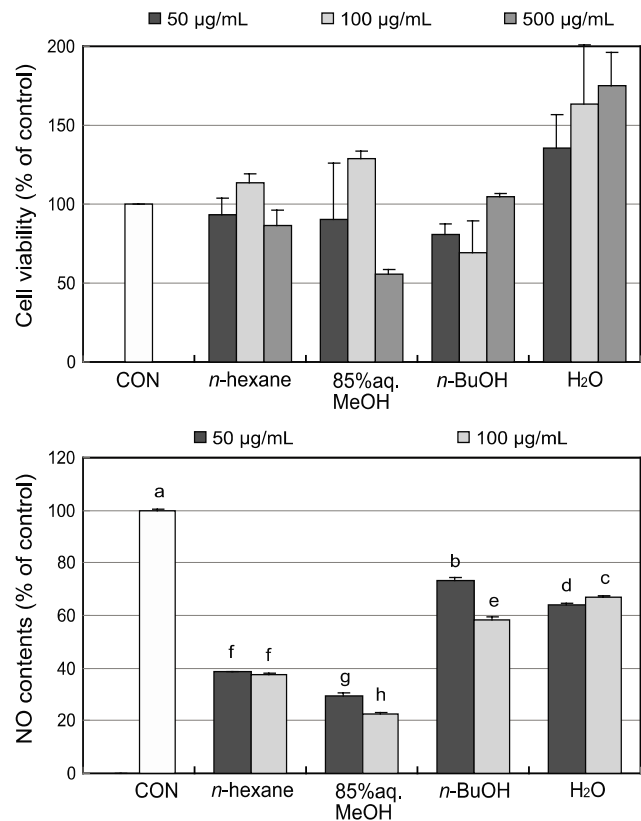


Fig. 4. Effect of *Corydalís heterocarpa* solvent fractions on intracellular NO level induced by LPS. Raw264.7 macrophages were pretreated with 50 µg/mL concentration of seaweed extracts for 1 h before stimulation with LPS (1 µg/mL) for another 48 h. The nitrite content of culture media was analyzed. ^{a-h}Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

NO 생성 억제 효과의 경우에는 n-BuOH 분획층에서 높은 활성을 나타낸 ONOO⁻ 소거 효과와는 달리 85% aq. MeOH 분획층에서 더 높게 나타났다. 이러한 결과는 Yoon 등 [28]의 연구에서 보고된 염생식물 큰비쭉의 추출물 및 분획물의 NO 생성 억제 결과와 유사한 결과로 그 효과가 비극성 용매 분획층에서 더 높게 나타났으며, 이는 ONOO⁻ 소거에 영향을 미치는 물질 이외의 활성성분이 비극성 분획층으로 이동하여 NO의 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

ROS (reactive oxygen species) 소거능

염주괴불주머니의 세포 내 활성산소종 소거 효과는 섬유육종 세포인 HT1080을 사용하였으며, 형광염료인 DCF-DA가 세포 내 생성된 자유 라디칼과 반응하여 형광물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 측정하였다. 세포 내 자유라디칼 생성은 H₂O₂를 이용하여 유도하였으며, 30분 간격으로 120분 동안 형광 정도를 측정하여 나타내었다. Fig. 5와 같이 두 용매 추출물의 ROS 소거능은 시료를 처리하지 않고

H₂O₂만을 처리한 control과 비교하여 모두 농도 의존적으로 ROS를 효과적으로 소거하는 것으로 확인되었다. 특히, 100과 50 µg/mL의 농도에서 모두 80% 이상의 ROS 소거능을 보여주었으며, 이는 H₂O₂로 ROS를 유도하지 않은 blank보다 더 뛰어난 효과였다.

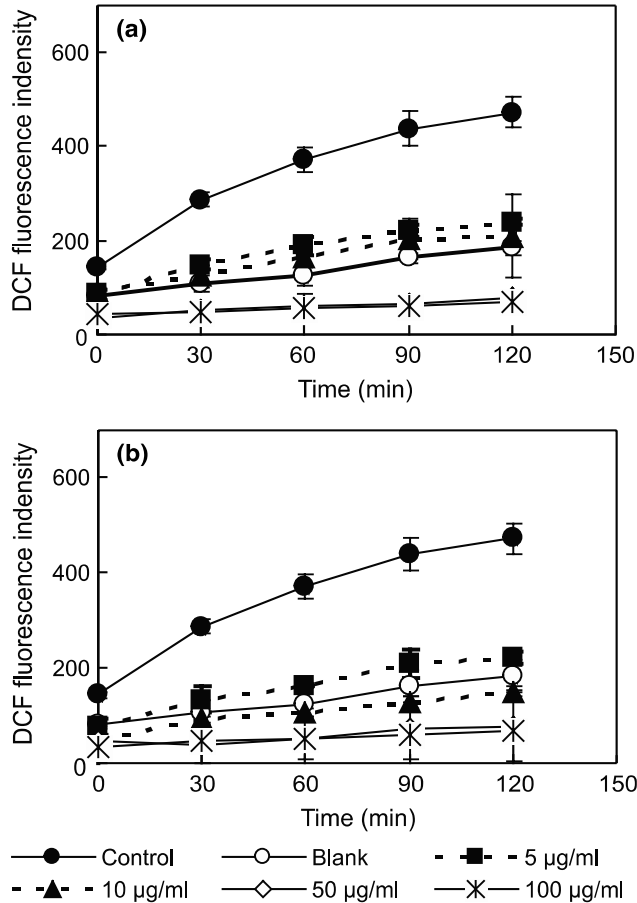


Fig. 5. Effect of *Corydalis heterocarpa* crude extracts on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide. After preincubation of the HT1080 cells in 20 µM DCF-DA, cells were treated with *Corydalis heterocarpa* crude extracts for 2 h. DCF fluorescence was measured following addition of 500 µM H₂O₂ at $\lambda_{\text{excitation}} = 485$ nm and $\lambda_{\text{emission}} = 528$ nm. (a)CH₂Cl₂ ext, (b)MeOH ext.

Fig. 6은 염주괴불주머니의 4개의 분획층에 대한 ROS 소거활성을 측정된 결과로써 H₂O 분획층을 제외한 모든 분획층에서 ROS를 효과적으로 소거하는 것으로 확인되었다. 그 가운데 *n*-BuOH 분획층은 50과 100 µg/mL의 농도에서 90% 정도의 ROS 소거능을 보여주었으며, 10과 5 µg/mL의 낮은 농도에서도 50% 이상의 가장 높은 소거율을 나타내어 ONOO⁻ 소거 활성과 유사한 성향을 보여주었다. 85% aq. MeOH과 *n*-hexane 분획층 또한 *n*-BuOH 분획층 보다는 다소 낮지만 ROS를 매우 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서 염주괴불주머니의 추출물의 항산화 활성

물질이 극성에 따라 용매 분획에 의해 이동함을 확인 할 수 있었으며, 특히 *n*-BuOH 분획층이 ONOO⁻와 ROS를 뛰어난 억제시키는 것을 볼 수 있었다. Kim 등 [29]의 연구에서 함초 (*Salicornia herbacea*)의 항산화 활성을 바탕으로 *n*-BuOH 분획층으로부터 flavonoid 계열의 순수한 화합물을 분리한 바 있으며, 본 연구에서도 이와 유사하게 *n*-BuOH 분획층으로부터 높은 항산화 활성을 가지는 순수한 화합물을 분리할 수 있을 것으로 여겨졌다.

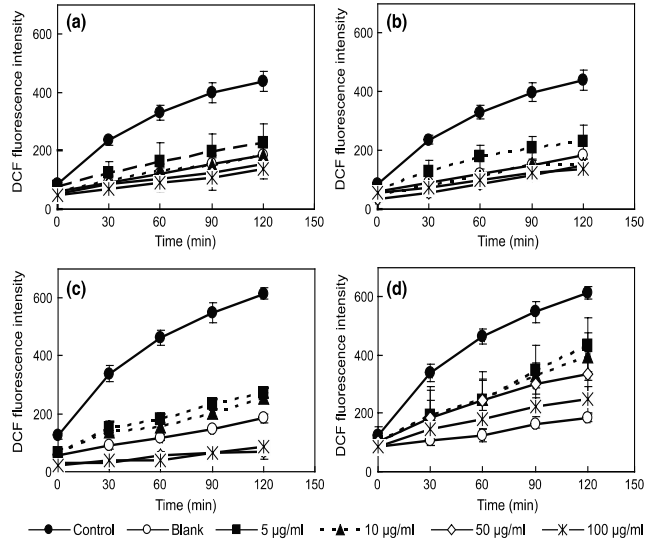


Fig. 6. Effect of *Corydalis heterocarpa* solvent fractions on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide. After preincubation of the HT1080 cells in 20 µM DCF-DA, cells were treated with *Corydalis heterocarpa* crude extracts for 2 h. DCF fluorescence was measured following addition of 500 µM H₂O₂ at $\lambda_{\text{excitation}} = 485$ nm and $\lambda_{\text{emission}} = 528$ nm. (a) *n*-Hexane fr. (b) 85% aq. MeOH fr. (c) *n*-BuOH fr. (d) H₂O fr.

Cnidimoside A의 항산화 활성

염주괴불주머니의 분획층 중 가장 높은 ROS 소거 효과를 보이는 *n*-BuOH 분획층으로부터 1종의 순수한 화합물 (화합물 1)을 분리하였다. 화합물 1의 구조는 NMR, IR, UV 등의 분광학적 분석과 문헌치 [30]와의 비교 분석을 통해 chromone glucosides 계열인 cnidimoside A임을 확인하였으며, 그 구조를 Fig. 7에 나타내었다. Cnidimoside A는 벌사상자 (*Cnidium monnieri*)로부터 분리된바 있으며 높은 항암 활성을 가지는 것으로 보고되었다 [31].

분리된 화합물 1의 항산화 활성은 세포성장에도 영향을 미치지 않은 10 µM 농도에서 세포 내 ROS 소거능과 NO 생성 억제효과로 확인하였다. 그 결과 화합물 1은 세포내 NO 생성 억제에는 큰 효과를 보이지 않았지만, ROS는 43.3% 이상을 소거시켜 높은 항산화 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 *n*-BuOH 분획층이 NO 생성 억제효과보다 ROS 소거에 더 뛰어난 효과를 보인 것과 부합하는 것으로서 화합

물 1이 *n*-BuOH 분획층의 ROS 소거 활성에 높은 기여를 하는 것으로 판단된다.

이상의 결과들로부터 염주괴불주머니는 생체 내 산화스트레스로 인해 생성된 라디칼의 활발한 소거를 통해서 세포의 산화적 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히, 앞서 보고된 cnidimoside A는 항암효과 뿐만 아니라 세포 내에 생성된 활성산소종을 효과적으로 제거하는 항산화효과를 가지는 것으로 나타났으며, 추후 지속적인 연구를 통하여 유사한 계열의 화합물을 추가로 분리할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 염주괴불주머니의 추출물 및 화합물을 이용한 유전자 단계 혹은 *in vivo* 단계의 생리활성 검증을 통해 항산화 및 항암 활성을 가진 새로운 건강기능성 식품 및 의약품으로서의 개발이 기대되어 진다.

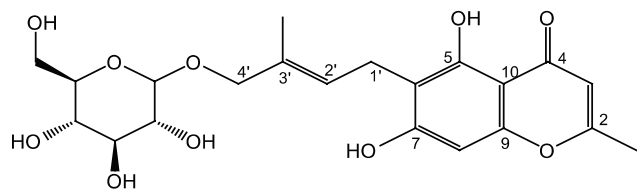


Fig. 7. The structure of cnidimoside A.

감 사

본 연구는 국토해양부 해양생명공학사업의 해양바이오 프로세스연구단 연구비 지원에 의해 수행 되었습니다.

접수 : 2009년 9월 3일, 게재승인 : 2009년 10월 22일

REFERENCES

- Fang, Y. Z., S. Yang, and G. Wu (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutr.* 18: 872-879.
- Lee, B. H., D. S. Baik, S. U. Yun, J. M. Shin, J. H. Kim, S. Y. Yun, B. H. Kim, S. B. Kim, J. E. Shin, and I. H. Song (2007) Peripheral nitric oxide activity in patients with liver cirrhosis. *Korean J. Med.* 73: 251-257.
- Zhang, J., V. L. Dawson, T. M. Dawson, and S. H. Snyder (1994) Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263: 687-689.
- Kwon, N. S., D. J. Stuehr, and C. F. Nathan (1991) Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.* 174: 761-767.
- Nguyen, T., D. Brunson, C. L. Crespi, B. W. Penman, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3030-3034.
- Moncada, S. and A. Higgs (1993) The L-arginine nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002-2012.
- Nakagawa, T. and T. Yokozawa (2002) Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1745-1750.
- Tsuda, T., Y. Kato, and T. Osawa (2000) Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett.* 484: 207-210.
- Virag, L., E. Szabo, P. Gergely, and C. Szbo (2003) Peroxynitrite induced cytotoxicity : mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.* 140: 113-124.
- Balavoine, G. G. A. and Y. V. Geletii (1999) Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. Part 1: Convenient assay. *Nitric Oxide* 3: 40-54.
- Choi, U., D.-H. shin, Y-S Chang, and J. I Shin (1992) Screening of natura antioxidant from plant and their antioxidative effect. *Korea J. Food Sci. Technol.* 24: 142-148.
- Yanishlieva, N. V., E. Marinova, and J. Pokorný (2006) Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 776-793.
- Park, J. C. and J. W. Choi (1996) Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Korean J. Pharmacogn.* 27: 117-122.
- Lee, H.-J., J. W. Ahn, B.-J. Lee, S. G. Moon, and Y. Seo (2004) Antioxidant activity of *Rosa rugosa*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 67-71.
- Seo, Y., H. J. Lee, Y. A. Kim, and K. E. Park (2004) Antioxidative effect of glasswort (*Salicornia herbacea*) extract from Daebudo. *Proc. Curr. Biotech. Bioeng.* 10: 1-7.
- Ng, T. B., F. Liu, and H. X. Wang (2004) The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of *Panax quinquefolium*, *Panax notoginseng*, *Codonopsis pilosula*, *Pseudostellaria heterophylla* and *Glehnia littoralis*. *J. Ethnopharmacol.* 93: 285-288.
- Kong, C.-S., Y. A. Kim, M. M. Kim, J. S. Park, S. K. Kim, B. J. Lee, T. J. Nam, and Y. Seo (2008) Antioxidant activity and inhibition of MMP-9 by isorhamnetin and quercetin 3-O-β-D-glucopyranosides isolated from *Salicornia herbacea* in HT1080 Cells. *Food Sci. Biotechnol.* 17: 983-989.
- Lee, Y. N. (2002) *Flora of Korea*. 4: p. 241. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Seoul, Korea.
- Kim, Y. A., J. I. Lee, C.-S. Kong, S. S. Yea, and Y. Seo (2009) Antiproliferative effect of extracts from *Corydalis heterocarpa* on human cancer cells. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 24: 201-208.

20. Kang, K.-H., C.-S. Kong, Y. Seo, M.-M. Kim, and S.-K. Kim (2009) Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa*, in HT-29 human colon carcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2129-2134.
21. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 149-156.
22. Green, L. C., D. A. Wagner, G. J. logowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analyt. Biochem.* 126: 131-138.
23. Nataliya, B. and N. Andrei (2005) A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide* 13: 93-97.
24. Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* 119: 203-210.
25. Okimoto, Y., A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita, and N. Noguchi (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 474: 137-140.
26. Lee, H.-J., Y. A. Kim, J. W. Ahn, B.-J. Lee, S. G. Moon, and Y. Seo (2004) Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 57-61.
27. Seo, Y., H.-J. Lee, K. E. Park, Y. A. Kim, J. W. Ahn, J. S. Yoo, and B.-J. Lee (2004) Peroxynitrite-scavenging constituents from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 212-216.
28. Yoon, W.-J., J.-A. Jung, K.-N. Kim, J.-Y. Kim, and S.-Y. Park (2007) *In vitro* anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extracts in murine macrophage Raw 264.7 cell. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 464-469.
29. Kim, Y. A., C.-S. Kong, Y. R. Um, S.-Y. Lim, S. S. Yea, and Y. Seo (2009) Evaluation of *Salicornia herbacea* as a potential antioxidant and anti-inflammatory agent. *J. Med. Food* 12: 661-668.
30. Baba, K., H. Kawanishi, M. Taniguchi, and M. Kozawa (1994) Chromone glucosides from *Cnidium japonicum*. *Phytochemistry* 35: 221-225.
31. Kimura, Y., M. Sumiyoshi, M. Taniguchi, and K. Baba (2008) Antitumor actions of a chromone glucoside cnidimoside A isolated from *Cnidium japonicum*. *J. Nat. Med.* 62: 308-313.