

병풍쌈의 에탄올 추출물의 항산화 기능 및 DNA의 산화적 손상 억제작용

이진하^{1*} · 이봉경^{1†} · 박애리¹ · 이계재^{1‡} · 최대운¹ · 한상화² · 최근표³ · 김종대¹ · 김진철¹ · 안주희¹ · 이현용¹ · 신인철^{2§} · 박희준⁴

¹강원대학교 바이오산업공학부, ²강원대학교 자연과학대학 생화학과, ³강원도립대학 식품가공제과제빵학과, ⁴상지대학교 보건과학대학, 제약공학과

In vitro Antioxidant Potential and Oxidative DNA Damage Protecting Activity of the Ethanol Extracts of *Cacalia firma* Komar

Jin Ha Lee^{1*}, Bong Gyeong Lee^{1†}, Ae Ri Park¹, Kye Jhae Lee^{1‡}, Dae Woon Choi¹, Sang Hwa Han², Geun Pyo Choi³, Jong Dai Kim¹, Jin Chul Kim¹, Ju Hee Ahn¹, Hyeon Yong Lee¹, In Chul Shin^{2§}, and Hee Juhn Park⁴

¹School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

²Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

³Gangwon Provincial College, Gangneung, Kangwon, Republic of Korea

⁴Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 220-702, Republic of Korea

Received March 3, 2011; Accepted August 26, 2011

The Korean edible mountainous vegetable, byeongpungssam, *Cacalia firma* Komar. (CFK) is a wild plant found in the intermountain areas in Korea. The aim of this study was to investigate its free radical scavenging activity using 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ferric reducing/antioxidant power assays, an electron spin resonance spectroscopy. We also examined its protective effect against oxidative DNA damage using agarose electrophoresis of ethanol extract of CFK. The protective activity of the extract against the DNA damage induced by HO· radicals was compared to epicatechin, ascorbic acid and trolox as reference antioxidant compounds. Total phenolic content in the extract was determined spectrometrically according to the Folin-Ciocalteu procedure and calculated as gallic acid equivalents. Total polyphenolic content of the extract was measured in the leaves (161.53±1.07 µg/g) and shoot (142.45±0.56 µg/g). The antioxidant potential of the extracts against some radicals and DNA damage by HO· radicals showed over 60%, respectively.

Key words: antioxidation, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, *Cacalia firma* Komar, DNA damage, electron spin resonance spectroscopy, ferric reducing/antioxidant power, Sannamul, superoxide

[†]Present Address: Graduate School of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Republic of Korea

[‡]Present Address: Research Institute of Ottogi co. Inc., Anyang, Gyeonggi-do, 431-070, Republic of Korea

[§]Present Address: Gangweon Institute of Health and Environment, Chuncheon 200-822, Republic of Korea

*Corresponding author
Phone: +82-33-251-6430; Fax: +82-33-253-6560
E-mail: jinhalee@kangwon.ac.kr

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.042>

서 론

식품의 재료중 오래전부터 고전적으로 사용되어온 산촌의 식용자원중 주로 잎 부분을 이용하는 자원을 산나물 이라 불려왔고, 참취나 곰취 처럼 이름의 끝이 취로 끝나는 식용자원을 취나물이라 불려 왔다. 취나물은 이름 그대로 취로 끝나는 엽채류로 참취, 곰취, 수리취등의 식물학적으로 국화과에 속하는 식물이 대부분이고 산나물의 경우는 취나물을 포함하여 나무의 잎에서 얻어지는 식용자원 즉 두릅, 화살나무와 같은 식용자원을 포함한 이름으로 산촌에서 포괄적으로 불려왔다. 근래에는

사회의 복잡한 생활중에서 건강에 관심이 높아지고 있어서 야생 식용자원에 대한 관심이 점차 증대되어 오고 있는 중에 산나물 혹은 취나물이 매우 관심의 대상에서 높은 위치를 차지하고 있다. 예로부터 동양에서는 식의동원(食醫同源) 혹은 의식동원(醫食同源) 및 약식동원(藥食同原)이라 하여 좋은 식품이 의약 기능을 가지고 있다고 알려지고 있다. 이러한 용어는 대체로 동양의약적인 사고에 바탕을 둔 것으로 약용 혹은 식용으로 혼용할 수 있는 자원을 포함하는 의미로 볼 수 있다. 식용자원의 생리활성 기능은 다양하지만 생체의 일부의 기능중 산화환원반응에 기반을 둔 것으로 환원 또는 산화억제 기능이 중요한 역할을 하고 있음 알려진 후 식용자원의 항산화력에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[Kim와 Kim, 1999]. 이러한 의미의 대상이 근래 산나물 혹은 취나물들로서 한국, 중국 및 일본등지에서 그들의 성분 및 생리활성과 관련된 많은 연구 결과들이 발표되고 있다. 그 중 본 연구와 관련 있는 참취의 성분[Kim와 Yang, 1986; Shin 등, 1998], 생리활성[Park 등, 1997; Kim와 Kim, 1999] 및 곰취의 성분[Surh 등, 2009] 과 생리활성[Wang 등, 2006; Bae 등, 2009]등이 있고 입수하기 어렵거나 이용도가 적은 자원류는 그 결과를 찾기 어렵다. 병풍취의 성분분석 과 성분 분석 및 부분적인 항산화 작용 등의 기능에 대하여 적은 수의 보고가 있다[Park 등, 2009; Lee 등, 2011]. 본 연구는 같은 강원도 지역내에서 생산된 희귀한 산나물 자원인 병풍쌈의 생리활성작용의 구명을 목적으로 항산화 및 DNA damage에 대한 작용을 여러 가지 방법으로 비교 연구한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료조제. 본 실험에 사용된 자원들은 강원도 홍천 지역의 2009년 5월과 6월에 전통시장 및 산촌 지역등에서 구입한 것으로 판매인의 수확내용에 의하면 표고 700 미터이상의 지역의 것으로 신선한 것을 수세하여 실내에서 물기를 제거하고 초저온 냉동고(-80°C)에 보존하며 사용하였다.

시료제조는 에틸알콜(EtOH)에 추출한 다음 알콜을 진공 농축하여 제거하고 동결건조 한 것을 사용하였다. 대체로 산나물류나 취나물류는 잎과 엽경을 모두 식용으로 함으로 폴리페놀 함량 분석은 잎과 엽경을 구분하여 분석하고 그 외 항산화 분석에서는 잎과 엽경을 포함한 전체 부분을 혼합하여 사용하였다.

시약 및 기기. ABTS, ascorbic acid (AsA), potassium persulfate, (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methy-chroman-2-carboxylic acid (Trolox), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), (-)epicatechin, potassium peroxodisulfate, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), 5,5-di-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), diethylenetriaminepenta-acetic acid (DTPA), hypoxanthine (HX), xanthine oxidase (XOD), ferrous sulfate heptahydrate (FeSO₄·7H₂O), calf thymus DNA는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)사 제품을, 기타 시약은 Wako (Osaka, Japan)사 제품을 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 UV-vis spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Co., Echung, Germany), microplate reader (Vmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), microplate reader (A-

5002, Sunrice, Leeton, Australia), ESR spectrometer (JES-TM200, JEOL, Tokyo, Japan) 등을 사용하였다.

병풍쌈 추출물의 페놀 화합물 측정. 병풍쌈 분획물의 총 페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법[Singleton와 Rossi, 1965]을 이용하여 측정하였다. 1 mg/mL의 농도로 녹인 시료 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 5 mL로 만든 후 Foline-Ciocalaus' phenol reagent 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 다음 3분간 실온에서 반응시켰다. 10% Na₂CO₃ 포화용액 1 mL을 가하여 혼합한 다음 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 상등액을 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 이용하여 시료와 동일한 방법 실행하여 얻은 표준검량곡선으로부터 추출물의 총 페놀 함량을 구하였다.

수소전자공여능에 의한 항산화 활성 측정. 병풍쌈 분획물에 대한 DPPH radical 소거활성은 Lee 등[2003]의 방법을 응용하여 실행하였다. 0.1 mM DPPH-EtOH 용액 0.1 mL와 여러가지 농도로 조제한 각각의 시료를 같은 양으로 첨가하여, mixing하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 반응용액을 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화제의 표준물질로 ascorbic acid (AsA)와 trolox를 사용하여 비교하였다.

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

ABTS assay에 대한 항산화 활성 측정. 병풍쌈 분획물에 대한 ABTS의 측정은 Re 등[1999]의 방법으로 측정하였다. 7 mM ABTS 용액 5 mL에 140 mM K₂S₂O₈ 88 μL를 혼합한 후 실온·암실에서 12시간 동안 반응시킨다. 반응용액 1 mL을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.03이 되도록 5 mM phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 희석하여 ABTS 시약으로 사용하였다. 다양한 농도로 조제한 각각의 시료와 희석된 ABTS 시약을 첨가하여 암실에서 6분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

FRAP assay에 대한 항산화 활성 측정. 산화형 철 이온에 대한 시료의 환원작용을 측정하는 방법에 의한 항산화력을 Benzie와 Strain[1996] 방법에 의하여 측정하였다. FRAP 시약은 매번 사용시 마다 다음과 같이 새로 조제하였다. 300 mM acetate buffer (pH 3.6) 500 mL에 20 mM FeCl₃·H₂O 50 mL와 10 mM TPTZ-40 mM HCl 용액 50 mL를 혼합하여 조제하여 냉장고(4°C) 중에 보관하며 당일 실험에 사용하였다. 반응용액은 증류수 90 μL, 각각의 농도로 조제한 시료 용액 30 μL를 시료의 최종농도가 1/34이 되도록 혼합하여 37°C에서 30분간 보존한 후, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank test 로는 시료 용액 대신에 증류수를 사용하였다.

ESR에 의한 Hydroxyl radical의 억제작용 측정. Hydroxyl radical은 생체내에서 발생하며 유해한 대사를 유발하여 건강과 질병에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 유해성 유리기로서 *in vitro*에서는 Fenton 반응에 의하여 ·OH radical을 유도한다. ·OH radical에 대한 시료가 그 유해성 유리기를 억제하는 기능을 조사하기 위하여 ESR spectrometry를 이용하였다[Noda 등, 1997]. Microtube에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 9 M DMPO, 20 mM FeSO₄를 첨가한 후 각 농도의 시료

와 20 mM H₂O₂를 넣고 잘 혼합한 후, ESR용 석영셀에 옮긴 후 즉시 ESR spectrometer를 이용하여 반응액의 DMPO-OH adducts를 측정하였다. ESR spectroscopy는 magnetic center field 341.000 mT (Width 5.0×1 mT), modulation frequency 9.415260 GHz, time constant 0.03 s, microwave power 2.00 mW, sweep time 10 s (ACCUM 1), MOD 100 kHz (Width 2.0×0.1 mT), amplitude 1.63×10의 조건에서 측정된 다음 제조사의 사용법 중의 계산식을 이용하여 억제기능을 구하였다.

Scavenging activity (%)

$$=100 \times \left(\frac{\text{Control signal intensity} - \text{Sample signal intensity}}{\text{Control signal intensity}} \right)$$

ESR에 의한 Superoxide (SO) radical 측정. Microtube에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 5 mM DTPA, 9 M DMPO, 50 mM hypoxanthine와 각 농도의 시료를 혼합하여 198 μL를 microtube에 넣고, 25 U xanthine oxidase 시료와 2 μL를 가하여 총량을 200 μL로 맞추고 잘 혼합한 후, ESR 용 석영셀에 옮기고 즉시 DMPO-SO adduct의 signal을 측정하였다[Guo 등, 1998]. Positive control의 adduct는 시료 대신에 buffer 용액을 사용하여 측정된 후 비교하였다. ESR spectroscopy는 magnetic center field 341.000 mT (Width 5.0×1 mT), modulation frequency 9.415260 GHz, time constant 0.03 s, microwave power 2.00 mW, sweep time 10 s (ACCUM 1), MOD 100 kHz (Width 2.0×0.1 mT), amplitude 1.63×10의 조건하에서 측정하였다. ESR에 의하여 얻어진 spectra의 peak로부터 상기의 hydroxyl radical 억제능 계산법과 같은 방법으로 SO의 억제능을 계산하였다.

Hydroxyl radical에 의한 DNA damage 보호효과. DNA 손상은 여러가지 원인으로 손상되지만 본 실험에서는 산화적인 손상을 유도하여 조사하였다. Calf thymus DNA에 대한 Fenton 반응으로 발생하는 ·OH radical의 산화적 손상도와 각 시료에 의한 DNA 보호효과는 horizontal agarose gel electrophoresis에 의하여 측정하였다[Lee 등, 1989]. 45 mM tris base-borate, 1 mM EDTA (1×TBE buffer)에 녹인 1%의 agarose gel에

0.05% ethidium bromide 10 μL를 첨가하여 사용하였다. 5×HMP buffer (25 mM NaHPO₄, 12.5 mM Na₂HPO₄, pH 6.6)에 녹인 calf thymus DNA에 1 mM FeSO₄와 10 mM H₂O₂와 시료를 처리하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, loading buffer로 1% agarose gel에 loading하여 2.5 v/cm의 전압으로 2시간 동안 전기이동 하였다. 대조군으로는, trolox, AsA 및 (-)epicatechin을 사용하여 시료와 동일한 방법으로 DNA damage 방어작용을 비교하였다.

결과 및 고찰

병풍삼 추출물의 페놀 화합물. 페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물로서 항산화, 항균활성 등의 다양한 생리활성 기능을 나타내며, 일반적으로 식물류에서 항산화 활성을 나타내는 물질은 페놀 화합물이 작용하는 것으로 알려져 있다[Tapas 등, 2008]. 페놀 함량은 대조군으로 사용한 gallic acid의 표준 검량선으로 부터 구하였으며, Table 1에 나타내었다. 식물의 폴리페놀류는 여러 가지 생리적 기능성 작용이 기대되는 것으로 많은 자원들에 대하여 분석과 그 활용도에 대한 관심을 가지게 되었다[Tapas 등, 2008].

병풍삼의 총 페놀 함량은 줄기와 잎을 구분하여 분석한 결과는 Table 1과 같으며 3회 반복 실험의 평균값을 gallic acid의 양(GAE)으로 표시하였다. 취나물 중 total polyphenol contents는 곰취가 2.43%[Kwon 등, 2002], 참취가 2.1%[Kim 등, 2004], 동결 건조한 참취가 28,880 μg[Ahn 등, 2000], 수리취의 물 추출물이 3.4%[Jung 등, 2008]등의 보고가 있으나 수확 시기 및 시료의 처리 등이 상이하여 본 연구와 비교하는 것은 쉽지 않았다.

DPPH 의한 전자공여성. DPPH는 proton donor들에 의하여 환원되고 본래의 청자색이 환원되어 황색에 가까운 색전환하여 생체내에서 화학적 산화환원 기작에 근거하여 proton donor 물질들이 산화된 효소등 생리활성 관련 물질을 활성화 하는데 기여한다. 이러한 원리에 근거하여 많은 화학물질 및 식용 재료

Table 1. Contents of the major compounds of Sannamul and other edible plants by harvesting time

Plants	Major compounds and contents (% or weight) in the part of plants			Harvesting Time	References
	Leaves	Shoots	Others		
CFK	Polyphenol/161.53 μg	Polyphenol/142.45 μg		May 25	
SEK			Polyphenol/19.6 g	May	Lee et al. [2010]
SPK			Polyphenol/21.6 g	May	Lee et al. [2010]
DZL			Polyphenol/8.0 g	May 9	Woo et al. [2008]
			Polyphenol/7.2 g	July 17	Woo et al. [2008]
			Polyphenol/6.5 g	Sept. 3	Woo et al. [2008]
GT			Catechins/12.02%	May 8	Park et al. [2008]
			Catechins/12.83%	July 9	Park et al. [2008]
			Catechins/13.90%	Aug. 30	Park et al. [2008]
AP			Polyphenol/77.1 g	April	Jang et al. [2008]
			Polyphenol/153.9 g	July	Jang et al. [2008]

Plant Name: *Cacalia firma* Komar (CFK), *Synurus excelsus* Kitamura (SEK), Green Tea (GT), *Synurus plamatopimatifidus* Kitamura var. *plamatopimatifidus* (SPK), *Agrimonia pilosa* (AP), *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum* (Maxim.) Kitam. (DZL)

Table 2. Electron Donating Activity on the DPPH of the *C. firma* Komar EtOH extract¹⁾

Sample	($\mu\text{g/mL}$)	10	20	30	40	50
EtOH Ex.		32.7 \pm 1.4	43.9 \pm 1.1	54.8 \pm 1.5	65.4 \pm 1.4	65.4 \pm 1.4
Control	($\mu\text{g/mL}$)	10	15	20	25	30
AsA		25.2 \pm 1.7	48.5 \pm 1.3	67.5 \pm 1.7	90.2 \pm 2.3	97.1 \pm 1.5
Trolox		12.4 \pm 0.3	33.0 \pm 1.8	50.1 \pm 1.0	78.0 \pm 0.9	92.2 \pm 0.8

¹⁾All values (inhibition ratio, %) are mean \pm SD of triplicate determinations.

Table 3. Scavenging activity on the ABTS of the *C. firma* Komar EtOH extract¹⁾

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	2	4	6	8	10
EtOH Ex.	10.8 \pm 1.3	17 \pm 0.8	25.9 \pm 1.5	42.4 \pm 1.2	67.1 \pm 0.9
AsA	17.1 \pm 0.8	30.8 \pm 0.2	51.8 \pm 1.1	69.8 \pm 0.8	90.1 \pm 0.9
Trolox	9.2 \pm 2.1	29.9 \pm 0.9	49.1 \pm 0.7	74.2 \pm 1.3	95.1 \pm 0.8

¹⁾All values (inhibition ratio, %) are mean \pm SD of triplicate determinations.

Table 4. Antioxidant Activity of *C. firma* Komar EtOH Ex. by FRAP Assay¹⁾

Sample	($\mu\text{g/mL}$)	20	40	60	80	100
EtOH Ex.		13.6 \pm 1.2	25.4 \pm 0.9	51.2 \pm 1.0	62.3 \pm 1.5	78.9 \pm 0.9
Control	($\mu\text{g/mL}$)	10	15	20	25	30
AsA		32.1 \pm 0.8	49.5 \pm 1.1	61.6 \pm 0.6	78.0 \pm 1.4	95.1 \pm 0.8
Trolox		17.9 \pm 0.9	34.8 \pm 0.6	52.7 \pm 1.2	74.9 \pm 0.9	89.4 \pm 0.8

¹⁾All values (inhibition ratio, %) are mean \pm SD of triplicate determinations.

들에 대한 항산화 작용을 DPPH의 환원작용을 조사하여 항산화 기능으로 표시하여 왔다. 산나물류의 DPPH에 대한 항산화 작용은 곶취와 참취의 99% EtOH 추출물이 가장 강하였고 [Kwon 등, 2002; Kim 등 2004], 수리취 잎의 물 추출물은 DPPH에 대하여 50% 저해능력 value (IC_{50})가 83.6 μg , 줄기가 64.9 μg [Jung 등, 2008]의 연구 보고가 있다. 병풍쌈의 전자공여능은 항산화작용 대조군으로 AsA와 trolox를 사용하였으며 병풍쌈 추출물의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 사전 실험에서 많은 연구에서 사용되어 온 negative control의 AsA와 trolox는 DPPH에 대한 시료와의 항산화 억제 기능의 농도가 차이가 많았기 때문에 시료의 농도와 다른 농도로 처리하여 비교하였다. 병풍쌈 추출물의 농도가 높아질수록 전자공여능력 증가하는 경향을 나타내었다. 대조군으로 AsA, trolox 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 90.2, 78%의 소거활성을 보였으며, 병풍쌈의 EtOH 추출물의 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 양이 AsA의 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 거의 비슷한 항산화 작용을 보였다.

ABTS radical에 의한 항산화 활성. ABTS⁺ cation decolorization assay는 라디칼 용액에 의해 생성되는 peroxide radical의 성질을 가진 ABTS⁺가 항산화 물질에 의해 제거되어 청록색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화능을 확인하는 방법이다 [Re 등, 1999]. ABTS⁺에 대한 병풍쌈 시료의 항산화 활성은 Table 3에 나타내었다. 항산화 작용의 대조군인 AsA와 trolox는 처리량은 시료와 동일한 양을 처리하였으며, 대조군 AsA 및 trolox는 최고 농도인 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 90.1, 95.2%의 높은 소거활성을 보였으나 시료의 경우는 동일 농도에서 양성 대조군 보다 약한 항산화성을 보였다.

FRAP assay를 이용한 항산화력. 항산화력 측정 방법에는 여러 가지가 있는데 그중 산화형 철 이온의 환원력으로부터 항산화력을 평가하는 방법으로 근래 많이 활용되는 FRAP assay를 이용하여 항산화력을 조사하였다 [Benzie와 Strain, 1996; Benzie와 Szeto 1999; Ou 등, 2000]. 시료의 FRAP assay 결과는 Table 4에 나타내었다. 사전 실험에서 양성 대조군으로 사용한 AsA 및 trolox는 시료와 동일한 농도 조건하에서는 그 값들을 비교하는데 차이가 너무 커서 시료의 농도와 양성 대조군의 농도를 달리하여 흡광도상에서 유사한 저해능을 보이는 값으로부터 항산화 작용의 결과를 얻었다. 시료의 농도를 100 $\mu\text{g/mL}$ 첨가했을 때 양성 대조군의 최고값에는 미치지 못하고 양성 대조군의 80 $\mu\text{g/mL}$ 정도의 값과 비교되는 산화철 이온의 환원력을 가지고 있었다.

ESR에 의한 Hydroxyl radical 소거활성. 강력한 활성 산소종으로 알려진 $\cdot\text{OH}$ radical은 반응성이 매우 강하고 반응속도도 매우 빠른 유해성 유리기로 분류 되고있다.

이와 같은 유해성 유리기는 생체내에서 직접적인 DNA 손상을 비롯한 생체 물질중에서 DNA가 관련된 성분에 관여하여 돌연변이, 암등의 발생과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다 [Masarwa 등, 2005]. 따라서 radical을 소거하는 효과는 항산화제로서 생체의 질병예방 및 방어 차원에서 매우 중요한 역할을 수행할 수 있다. $\cdot\text{OH}$ radical은 Fenton's reaction에 의하여 유도하여 시료와 잘 혼합하여 반응시킨 후 즉시 ESR에서 측정하였다 (Fig. 1). 그림에서와 같이 병풍쌈의 EtOH 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$ 은 $\cdot\text{OH}$ ESR signal에 생성에 대하여 강한 억제력을 보였다. $\cdot\text{OH}$ 생성반응은 생체의 여러 조직이나 세포 중에서 대사

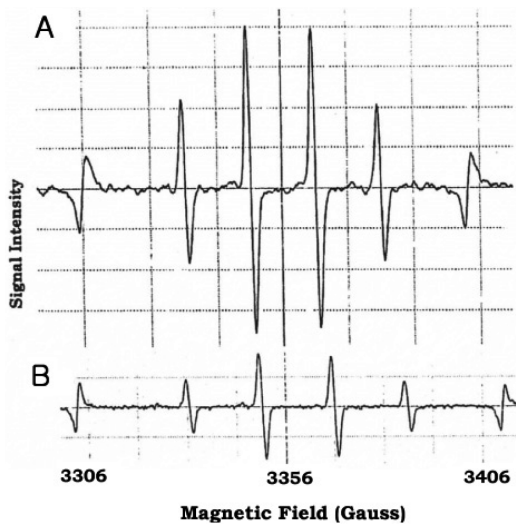


Fig. 1. ESR spectra of DMPO-OH Adducts from the Reaction Mixture of *C. firma* Komar EtOH Ex. with Hydroxyl Radical Solution. (A) Hydroxyl radical solution without sample (Control). (B) Reaction mixture with CFK EtOH extract 50 µg/mL of OH radical solution.

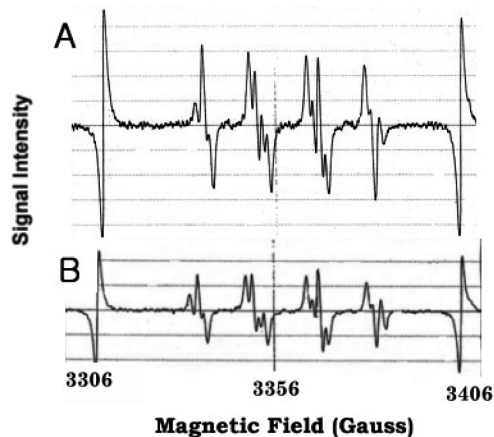


Fig. 2. ESR Spectra of DMPO-SO Adducts from the Reaction Mixture of *C. firma* Komar EtOH Ex. with Superoxide Radical Solution. (A) Superoxide radical solution without sample (Control). (B) Reaction mixture with CFK EtOH Ex 50 µg/mL of SO radical solution.

과정중에 발생하여 각종 질병을 유발하므로 의학학적 입장에서 항산화 작용에 의하여 예방하거나 방지하는 것이 매우 중요하다고 강조하고 있다[Nunoshiba 등, 1999].

ESR에 의한 Superoxide radical 소거활성. SO는 생체내에서 superoxide dismutase가 존재하는 것이 알려지면서[Imlay와 Fridovich, 1990] 급속한 연구의 관심이 증가되어 근래에 와서는 Roubaud 등[1997]의 방법으로 정량 분석도 가능하게 되었다. SO는 생체내에서의 생성과 과산화 반응의 연쇄반응 과정에서도 생성되며 강력한 반응성이 있는 유해성 유리기로서 분류되어 있다.

ESR spectrometry를 이용해 병풍쌈 추출물의 SO· 소거활성을 측정된 결과 ·OH 결과와 마찬가지로 시료를 50 µg/mL 첨가했을 때와 시료를 첨가하지 않은 control의 DMPO-adduct의 signal을 비교한 것을 Fig. 2에 나타냈다. 시료의 50 µg/mL 농

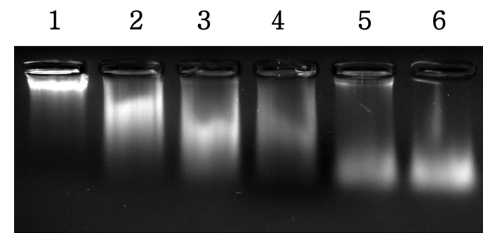


Fig. 3. Electrophoregram of the reaction mixture of DNA damage by induced various concentrations of Fenton's solution on an agarose gel electrophoresis. Lane 1. Control(DNA Only); 2. 50 µM FeSO₄ and 2.5 mM H₂O₂; 3. 100 µM FeSO₄ and 2.5 mM H₂O₂; 4. 150 µM FeSO₄ and 2.5 mM H₂O₂; 5. 200 µM FeSO₄ and 2.5 mM H₂O₂; 6. 250 µM FeSO₄ and 2.5 mM H₂O₂.

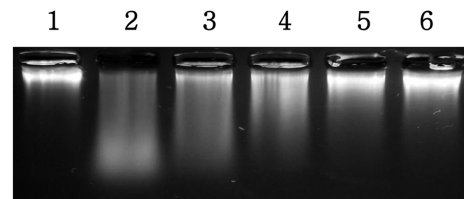


Fig. 4. Electrophoregram of the reaction mixtures of various concentrations of (-)epicatechin on OH-induced DNA damage. Lane 1. DNA Only; 2. Fenton's Solution; 3. 20 µg/mL (-)Epicatechin; 4. 15 µg/mL (-)Epicatechin; 5. 10 µg/mL (-)Epicatechin; 6. 5 µg/mL (-)Epicatechin.

도는 SO· signal 생성에 대한 억제력은 ·OH signal에서와 유사한 결과로 강한 유리기 생성을 억제하고 있었고, 시료 농도의 의존적으로 소거 기능이 증가함을 확인하였다.

Hydroxyl radical 유발에 의한 DNA damage 보호효과.

DNA damage에 대한 유해성 유리기, 중금속 및 환경오염물질 등의 여러가지 유해물질의 작용에 의하여 DNA가 손상을 입는다는 보고가 많다[Bruskov 등, 2002]. 이러한 유해성 유리기에 의한 DNA 손상을 방어하거나 예방적인 기능을 조사하는 몇가지 방법이 있지만, 본 연구에서는 horizontal agarose gel electrophoresis를 이용하여 조사하였다[Lee, 1983]. 유해산소종을 포함한 유리기에 의한 DNA 손상을 일반적으로 oxidative DNA damage라고 부르며, 유해성 유리기에 의하여 DNA의 손상이 *in vivo*는 물론 *in vitro*에서도 유발된다고 많이 보고되고 있다. 이러한 유해성 작용을 억제하기 위하여 항산화 기능이 있는 식용자원중 식물의 폴리페놀계 화합물을 함유하고 있는 자원에 대하여 많은 관심을 보이고 있다. Fenton reaction에 사용하는 반응 화합물은 초기에는 H₂O₂와 FeSO 농도비를 1:1 하였으나 그 이후 많은 연구과정중에서 상대 화합물의 농도의 변화가 있어도 ·OH radical을 유발하는 것이 확인되어 본 실험에서도 알맞은 두 화합물의 농도를 연구 대상인 calf thymus DNA에 대하여 조사하였다. Calf thymus DNA에 대하여 2.5 mM H₂O₂와 여러 가지 농도의 FeSO₄ 변화시키며 조제한 Fenton solution과의 반응용액을 agarose gel electrophoresis를 행하여 DNA damage를 보인 결과는 Fig. 3과 같다. 이 실험에서 DNA fragmentation이 가장 강하게 나타나는 Fenton reaction의 적절한 반응농도는 2.5 mM H₂O₂와 250 µM FeSO₄로 혼합한 반응액이 확인되어, 이 후 DNA damage 연구에서는 ·OH를 유도하는 실험에서 반응액은 이 농도로 조제하여 사용하였

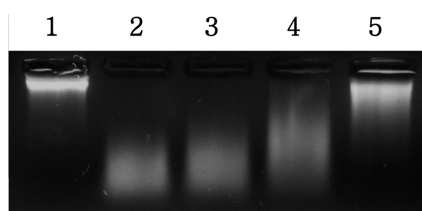


Fig. 5. Electrophoregram of the reaction mixtures of some antioxidants and EtOH extract of *C. firma* Komar and OH-induced DNA damage, respectively. Lane 1. DNA Only; 2. 25 µg/mL trolox; 3. 25 µg/mL AsA; 4. 20 µg/mL (-)Epicatechin; 5. 25 µg/mL EtOH extract.

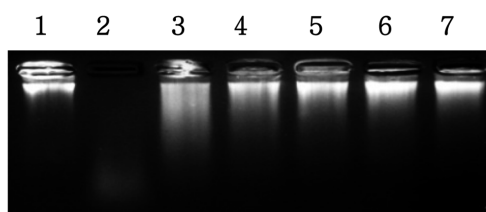


Fig. 6. Electrophoregram of the reaction mixtures of various concentrations of the EtOH extract of *C. firma* Komar on OH-induced DNA Damage. Lane 1. DNA Only; 2. Fenton's ·OH Solution; 3. 50 µg/mL EtOH Ex.; 4. 40 µg/mL EtOH Ex.; 5. 30 µg/mL EtOH Ex.; 6. 20 µg/mL EtOH Ex.; 7. 10 µg/mL EtOH extract

다. Free radical 등에 의한 DNA damage 는 electrophoregram 상에서 DNA fragment의 생성과 억제를 비교하여 fragmentation 이 억제되어 negative control인 DNA 단독의 그림과 비슷할 결과가 관찰될 경우는 억제 기능을 보인 것이고 fragmentation 이나 tail이 관찰될 경우는 그 길이나 크기 혹은 DNA 형광 발 색도의 강약등에 따라 억제 기능의 강약을 이해할 수 있다.

Fig. 4는 calf thymus DNA의 산화적 손상에 대한 항산화의 대조용으로 식물류 중에 광범위 하게 존재하는 (-)epicatechin을 다양한 농도 조건으로 hydroxyl radical의 DNA damage에 대한 보호효과를 보인 것이다. 이 그림에서 알 수 있듯이 epicatechin 은 ·OH radical에 의한 DNA damage를 보호하는 효과가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인 하였다. 본 연구에서 사용된 양성 대조군 항산화물질들의 DNA damage에 대한 보호효과에 대한 결과는 Fig. 5에 보였다. DNA damage에 대한 항산화제들은 모두 같은 농도로 처리하여 비교한 결과 trolox 와 AsA가 강한 protective effect를 보였고 epicatechin과 시료는 그보다 약한 작용을 나타냈음이 확인되었다. 시료의 각 농도별 DNA damage에 대한 방어효과도 상기 언급된 유리기에 대한 항산화 작용의 결과와 같이 농도 의존적으로 점차 증가하는 것이 확인 되었다(Fig. 6). 많은 식물류 중에는 항산화 작용을 하는 기능이 확인된 것과 같이, 본 연구에 사용된 병풍쌈도 항산화 작용 및 DNA damage에 대한 방어 작용이 확인 되었다. 이번 연구에서 병풍쌈의 유효성 유리기의 작용을 억제하는 항산화 작용은 DNA damage에 대한 억제 기능도 보이고 있으므로 항산화 력과 DNA damage에 대한 protection effect가 밀접한 관계가 있음이 확인 되었다. 본 연구에서 사용된 시료는 첫 단계의 알콜 추출물 형태의 것을 사용하여 위와 같이 양성 대조군 항산화제와 비교하여 약한 결과를 얻었지만 각종 유리기들에 대한

항산화 기능 및 DNA damage에 대한 억제 기능이 확인된 것은 사실이므로, 더욱 분리 정제단계를 진행하여 유효 성분의 함량이 많도록 조제하면 더욱 강한 작용이 기대되고 중요한 식물 화학적, 식품학적 의의 및 의약학적 소재로의 활용도 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

초 록

산나물의 일종인 병풍쌈[*Cacalia firma* Komar. (CFK)]은 산지에서는 인기 있는 자생식품 자원이다. 본 연구의 목적은 CFK의 ethanol (EtOH) 추출물의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ferric reducing/antioxidant power 분석법 및 electron spin resonance spectroscopy에 의한 유리기의 억제작용과 agarose electrophoresis법에 의한 산화적 DNA damage에 대한 보호효과를 조사하는 것이다. HO· 유리기에 의한 CFK EtOH 추출물의 DNA damage 보호효과는 항산화 참고 물질로 epicatechin, ascorbic acid 및 trolox등과 비교하였다. CFK EtOH 추출물 중의 총 페놀물질 분석은 Folin-Ciocalteu의 방법으로 행하고 표준물질로 gallic acid equivalents를 사용하여 함량을 표시하였다. CFK EtOH 추출물 중의 총 페놀 함량은 잎 과 줄기 부분에서 각각 161.53±1.07 µg/g, 142.45±0.56 µg/g이 확인 되었다. CFK EtOH 추출물 중의 유리기들에 대한 항산화 기능과 HO·기에 의한 DNA 손상에 대한 보호효과는 각각 약 60% 이상의 기능을 보였다.

Key words: antioxidation, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, *Cacalia firma* Komar, DNA damage, electron spin resonance spectroscopy, ferric reducing/antioxidant power, Sannamul, superoxide

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업[IPET 2009 (109086-03-1-CG0000)]과 2011년 교육과학기술부의 지역거점연구단 육성사업(의료바이오 신소재융복합연구사업단)의 지원에 의하여 이루어진 것임. 본 연구는 강원대학교 공동실험실습관에서 제공하는 기기들로 수행되었음에 감사드리며, 본 연구에 사용되는 자원을 입수하는데 적극 협조하여 주신 홍천군의 이우준씨와 횡성군의 서성구씨에 대하여 깊이 감사드립니다.

참고문헌

Ahn HJ, Cho MJ, and Cho YO (2000) Evaluation of the antioxidant contents of Korean wild leaf vegetables. *Nutrition Sciences* 3, 98-102.
 Bae JH, Yu SO, Kim YM, Chon SU, Kim BW, and Heo BG (2009) Physiological activity of methanol extracts from *Ligularia fischeri* and their hyperplasia inhibition activity of cancer cell. *J Bio-Environ Control* 18, 67-73.
 Benzie IFF and Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma

- (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70–76.
- Benzie IFF and Szeto YT (1999) Total Antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* **47**, 633–636.
- Bruskov VI, Malakhova LV, Masalimov ZK, and Chernikov AV (2002) Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage of DNA. *Neucleic Acid Res* **30**, 1354–1363.
- Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, and Xin W (1998) ESR study on the structure antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta* **1427**, 13–23.
- Imlay JA and Fridovich I (1990) Assay of Metabolic Superoxide Production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 6957–6965.
- Jung MJ, Heo SI, and Wang MH (2008) Antioxidant activities of different parts of *Synurus deltoideus* NAKAI extracts *in vitro*. *Food Sci Biotechnol* **17**, 1156–1159.
- Kim YD and Yang WM (1986) Studies on the components of wild vegetable in Korea. *J Korean Soc Food Nutr* **15**, 10–16.
- Kim JH and Kim MK (1999) Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of *Perilla frutescens*, *Artemisia princeps* var. *orientalis* and *Aster scaber* on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* **32**, 540–551.
- Kim KH, Kwon YJ, Kim YE, and Nahmgung B (2004) Changes of total phenol content and antioxidant activity of *Aster scaber* Thumb. extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J Food Presev* **11**, 88–93.
- Kwon YJ, Kim KH, and Kim HK (2002) Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of *Ligularia fischeri* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J Food Preserv* **9**, 332–337.
- Lee JH (1983) DNA-breaking action of guanine analogs modified by triose reductone. *Korean Biochem J* **16**, 240–245.
- Lee JH, Choi JM, and Kim GS (1989) Effect of pH and metal ionic strengths on the DNA breaking action of some guanine analogs. *Korean Biochem J* **22**, 105–109.
- Lee JH, Park AR, Choi DW, Kim JD, Kim JC, Ahn JH, Lee HY, Choe M, Choi KP, Shin IC, and Park HJ (2011) Compositions and Electron-Donating Ability of 4 Korean Wild Sannamuls. *Korean J Medicinal Corp Sci* **19**, 111–116.
- Lee SJ, Lee MK, Choi GP, Kim NY, Roh SK, Heo MY, Kim JD, Lee HY, and Lee JH (2003) Inhibitory effect of Korean mistletoes on the oxidative DNA Damage. *Korean J Medicinal Corp Sci* **11**, 89–96.
- Masarwa A, Rachmilovich-Calis S, Meyerstein N, and Meyerstein D (2005) Oxidation of organic substrates in aerated aqueous solutions by the Fenton reagent. *Coord Chem Rev* **249**, 1937–1943.
- Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shimmei M, and Packer L (1997) Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem Mol Biol Int* **42**, 35–44.
- Nunoshiba T, Obata F, Boss AC, Oikawa S, Mori T, Kawanishi S, and Yamamoto K (1999) Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **49**, 34832–34837.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, and Deemer EK (2000) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J Agric Food Chem* **50**, 3122–3128.
- Park HJ, Nugroho A, Lee JH, Kim JD, Kim WB, Lee KR, and Choi JS (2009) HPLC analysis of caffeoylquinic acids in the extract of *Cacalia firma* and peroxynitrite scavenging effect. *Korean J Pharmacogn* **40**, 365–369.
- Park JR, Park JC, and Choi SH (1997) Screening and characterization of anticholesterol substances from edible plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **26**, 236–241.
- Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* **26**, 1231–1237.
- Roubaud V, Sankarapandi S, Kuppusamy P, Tordo P, and Zweier JL (1997) Quantitative measurement of superoxide generation using the spin trap 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide. *Anal Biochem* **247**, 404–411.
- Shin KH, Lee, SH, Cho DH, and Park CH (1998) Analysis of vitamins and general component in the leaves of chwinamul. *Korean J Plant Res* **11**, 163–167.
- Singleton VL and Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144–158.
- Surh JH, Kim JO, Kim MH, Lee, JC, Lee BY, Kim MY, Yang HW, Yun SJ, and Jeong HR (2009) Nutritional properties as food resources for menu development of cubed snailfish, shaggy sea raven, and two kinds of wild vegetables that are stable products in Samcheok. *Korean J Food Cookery Sci* **25**, 690–702.
- Tapas AR, Sakarkar DM, and Kakde RB (2008) Flavonoids as nutraceuticals: A review. *Tropical J Pharmaceutical Research* **7**, 1089–1099.
- Wang J, Wang N, Y6ao XS, Ishii R, and Kitanaka S (2006) Inhibitory activity of chinese herbal medicines toward histamine release from mast cells and nitric oxide production by macrophage-like cell line, RAW 264.7. *J Nat Med* **60**, 73–77.