

추출 온도에 따른 산수유의 항산화 활성 및 항유전독성 효과 비교

이민희 · 김정미 · 박은주[†]

경남대학교 식품영양학과

Antioxidant and Antigenotoxic Effects of Sansuyu Fruit (*Corni fructus*) Extracted with Water at Different Temperatures

Minhee Lee, Jungmi Kim, and Eunju Park[†]

Dept. of Food and Nutritional Science, Kyungnam University, Gyeongsan 631-701, Korea

Abstract

The objective of this study was to evaluate the antioxidant and antigenotoxic activities of sansuyu fruit (*Corni fructus*, CF) at temperatures of 25°C, 50°C, and 90°C using a water extraction method. Total phenolic content (TPC), DPPH radical-scavenging activity (RSA), and superoxide dismutase (SOD)-like activity, and ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) values were determined. Also the antigenotoxicity of CF was determined by measuring inhibitory effects of H₂O₂ induced DNA damage in human leukocytes using the comet assay. The TPC in the CF extracts was 4.2, 4.6, and 5.5 g/100 g GAE in 25°C, 50°C, and 90°C, respectively. The DPPH RSA of the CF extracts increased in a dose-dependent manner over the range of 50~1000 µg/mL in all temperatures and the SC₅₀ of DPPH RSA of the CF extracts were not significantly different at different extraction temperatures. The SC₅₀ of SOD-like was the highest in CF extracted at 25°C (1.1 mg/mL) followed by 90°C (1.2 mg/mL) and 50°C (1.3 mg/mL). The ORAC values of the CF extracts were not significantly different in low concentration (10 µM/mL) and was in order of 25°C (5.7 µM TE) < 90°C (6.2 µM TE) < 50°C (8.5 µM TE) in high concentration (50 µM/mL). 200 µM H₂O₂ induced DNA damages in human leukocytes were significantly reduced by the pretreatment with the CF extracts. These results suggest that sansuyu fruit (*Corni fructus*) can be used as a natural source for antioxidant activities and as antigenotoxic agents regardless of the water extraction temperature.

Key words: *Corni fructus*, antioxidant, antigenotoxic, extraction temperature

서 론

Superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide, hydroxyl, peroxy nitrite 등과 같은 활성 산소종(ROS)들은 호기 호흡을 하는 모든 생명체의 정상적인 대사과정 중에 끊임없이 발생된다(1,2). 이와 같은 ROS는 불안정하고 반응성이 매우 강하여 세포의 구성 성분들인 지질, 단백질, 유전자(DNA) 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 산화반응을 유발하여 노화뿐만 아니라 암, 동맥경화, 후천성 면역결핍증, 심장질환, 당뇨병, 신경계 질환, 염증, 류마티스 등에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(3-5). 이러한 ROS의 작용은 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 및 glutathione-peroxidase(GSH-px)와 같은 항산화 효소와 vitamin C, vitamin E 등의 항산화 물질에 의해서 최소화될 수 있으나, 산업화와 더불어 각종 환경요인에 의하여 ROS가 과도하게 생성되어 인체 내의 방어체계가 불균형을 초래한 결과 산화적 스트레스에 의한 각종 질병과 노화, 세포막과 단백질 분

해, DNA합성 억제 등의 손상이 유발된다(6-10). 이러한 산화적 스트레스를 억제하기 위하여 천연 항산화제와 함께 butylated hydroxy anisol(BHA) 및 butylated hydroxy toluene(BHT) 등의 합성 항산화제가 개발되었다. 합성 항산화제는 천연 항산화제보다 항산화력이 우수하지만 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가 등 변이원성 및 독성이 지적되면서 비교적 독성이 적고 안전성 및 관능상의 문제가 되지 않는 천연 항산화제 개발을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다(11-13).

산수유(*Corni Fructus*)는 층층나무과에 속하는 산수유나무(*Cornus officianlis*)에서 붉은색 열매의 씨를 제거한 것으로, 산수유의 길이는 1.5 cm 내외인 장추원형의 모양으로 생김새가 측나라 대추 같고 신맛이 두드러지기 때문에 측산 초라고도 불린다(14). 산수유는 그 맛이 시고 성질은 약간 따뜻하며(15), 산수유 추출물에는 항당뇨병 활성이 있는 지용성 물질의 ursolic acid, 주석산, 사과산 외에 morroniside, loganin, sweroside 및 methylmorroniside인 4개의 글루코

[†]Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-505-999-2139

사이드 등이 함유되어 있다(16,17). 이러한 산수유는 예로부터 다뇨, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔다. 그리고 자양, 강장, 음위, 이조에 약효가 있으며, 간경, 신경에 좋고, 이노작용, 혈압강하작용, 단백질의 소화를 돕는 작용, 항암 및 항균 작용 등이 있다고 알려져 있다(18).

산수유에 관한 연구로는 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육 분리특성(19), 산수유와 구기자를 이용한 국산 전통차 개발에 관한 연구(20), 항균 및 항산화성(21-27), 산수유에 함유된 항암물질의 정제 및 특성(28), 산수유 종자의 독성과 렙틴 성분(29), 산수유 에탄올 추출물의 생리활성(30), 산수유의 영양성분 분석(31), 산수유로부터 gallic acid 추출 및 HPLC에 의한 정량분석(32) 등이 보고되었다. 산수유는 주로 약용으로 이용하기 때문에 고온에서 달여서 따뜻하게 먹는 방법이 일찍부터 이용되어 왔다. 시중에는 저온에서 추출한 산수유 제품이 판매되고 있으나, 추출온도에 따른 효능에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 다양한 온도에서 추출한 산수유 물 추출물의 항산화 활성과 항유전독성 활성을 측정하여 산수유의 천연 항산화제로서 개발 가능성을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 산수유는 전남 구례에서 재배한 것으로 마산 어시장 한약재 판매점에서 구매하여 사용하였다. 항산화력 측정에 사용된 Folin-Ciocalteu 시약은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하였고, 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl(DPPH), gallic acid, pyrogallol은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Trizma hydrochloride(Tris-HCl), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate(EDTA), dimethyl sulfoxide(DMSO) 등을 비롯한 기타 시약 및 용매는 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

시료의 추출

산수유 5 g에 100 mL의 증류수를 가하고 항온수조를 이용하여 25°C에서 24시간, 50°C, 90°C에서 각각 3시간 동안 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후, 이것을 회전진공농축기(Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 37°C에서 농축하였다. 각 농축물은 50 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹여 4°C에서 보관하면서 각 농도별로 희석해서 실험에 사용하였다.

총 페놀 함량

총 페놀 함량은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis 방법(33)으로 측정하였다. 즉, 시료 1 mL를 취하여 증류수 1 mL를 가하여 희석하고 1 N Folin-Ciocalteu 시약 2 mL를 가하여 실온에서 3분간 방치한 후, 10% Na₂CO₃용액

2 mL를 가하여 이 혼합액을 1시간 동안 상온에서 방치하였다. 이 혼합물에서 200 µL를 취하여 ELISA reader(Sunrise, Tecan Co. Ltd., Gröodig, Austria)을 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 mg/100 g gallic acid equivalents (GAE) 단위로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 80 µL의 0.2 mM DPPH 에탄올 용액을 농도별(50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL) 시료 20 µL에 가한 후 10초 동안 잘 혼합해 주고 상온에서 10분간 반응시켜 ELISA reader를 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리구에는 20 µL의 DMSO로 처리하여 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 계산하여 나타내었으며, 각 용매별로 DPPH 라디칼을 50% 저해하는 농도인 SC₅₀을 구하였다.

Radical scavenging activity(RSA, %)=(1 - A/B)×100
A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 무처리구의 흡광도

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성은 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL로 희석한 산수유 추출물 50 µL에 50 µL Tris-HCl buffer(pH 8.5)와 7.2 mM pyrogallol 50 µL을 가하여 25°C에서 45분간 반응시킨 후, ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리구에는 50 µL의 DMSO로 처리하여 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 SOD 유사활성은 아래의 식에 의해 계산하여 나타내었으며, 각 용매별로 pyrogallol을 50% 저해하는 농도인 SC₅₀을 구하였다.

SOD-like activity(%)=(1 - A/B)×100

A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 무처리구의 흡광도

ORAC(oxygen radical absorbance capacity) assay

Peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 형광의 감소를 변화에 대한 산수유 추출물(10, 50 µg/mL)의 항산화 활성은 peroxy radical scavenging capacity(ORAC_{ROO·}) 분석법(34)을 이용하여 측정하였다. 과산화 라디칼의 생성을 위해 5 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였고, 형광표준 용액은 Ou 등(35)의 방법에 따라 40 nM fluorescent를 제조하여 GENios fluorescence plate reader(Tecan, Salzburg, Austria)로 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 측정하였다. 결과는 vitamin E 수용성 유도체인 Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonyl acid) 1 µM에 의해 보호된 curve area와 비교하여 검체 1 g당 µM Trolox equivalent로 나타내었다(µM TE/g).

혈액 내 백혈구 세포 분리

건강한 성인 남성으로부터 채혈한 신선한 전혈 5 mL을 Histopaque 1077을 이용해 백혈구만을 분리해 낸 후 본 실험

에 사용하였다.

시료의 처리 및 산화적 스트레스 유발

준비된 백혈구 세포에 각 추출물 시료를 1, 50, 10, 50 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 백혈구를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 µM H₂O₂를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하였다. Positive control을 위해 산수유 대신 용매인 DMSO를 처리한 후 200 µM H₂O₂를 처리하였고, negative control의 경우에는 H₂O₂를 처리하지 않았다.

DNA 손상 측정(Comet assay)

Comet assay를 위해 반응을 끝낸 백혈구를 75 µL의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 다음, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 미리 덮여진 슬라이드 위에 백혈구와 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 유리 덮개로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. 젤이 굳으면 유리 덮개를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µL로 한 겹 더 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 알칼리 분해 완충용액(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 슬라이드를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 백혈구를 용해시켰다. 분해가 끝난 후, 슬라이드를 전기영동수조에 배열하고 4°C의 차가운 전기영동 완충용액(300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH>13)을 채워 20분 동안 방치하여 DNA의 알칼리 민감 부위가 노출되도록 한 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동수조를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 슬라이드를 건조시켰다. 20 µL/mL 농도의 EtBr로 핵을 염색하여 유리 덮개로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD 카메라(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 이미지는 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터상에서 분석하였다. 백혈구의 H₂O₂에 의한 DNA 손상 및 산수유 추출물에 의한 손상 보호 효과는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA 함량(Tail Intensity)을 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 슬라이드를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

통계처리

모든 데이터의 통계처리는 각 항목에 따라 SPSS for Windows(ver. 14.0)를 이용하여 분석하였고 평균과 표준오차를 구하여 신뢰수준 95%(p<0.05)에서 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다. 각 항목은 one-way 분산분석(ANOVA)

Table 1. Total phenol contents (TPC) of *Corni fructus* water extraction at different temperatures

TPC	g/100 g GAE ¹⁾	Temperature		
		25°C	50°C	90°C
		4.2±0.0 ^a	4.6±0.0 ^b	5.5±0.0 ^c

Values are mean with standard error. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

¹⁾GAE: gallic acid equivalents.

을 시행하여 F값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량

산수유 추출물의 총 페놀 함량 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 90°C의 추출물이 5.5±0.0 g/100 g GAE으로 가장 함량이 높았고, 그 다음으로 50°C(4.6±0.0 g/100 g GAE), 25°C(4.2±0.0 g/100 g GAE) 추출물 순으로 페놀 함량이 많았다. 이는 추출 온도가 높아질수록 총 페놀 함량이 증가하는 것을 보여준다. 한편, Kim 등(36)에 의한 연구에 따르면 40°C에서 추출한 산수유의 총 페놀 함량은 32.3±0.1 mg/g이었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

라디칼은 불안정하여 세포 구성 성분들과 쉽게 반응하여 비선택적이고 비가역적인 손상을 일으킨다. 보라 빛을 나타내는 DPPH 라디칼은 비교적 안정한 화합물로 항산화제와의 반응에 의해 라디칼이 소거되어 노란색으로 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 검증하는데 사용된다(37). 산수유 추출물의 DPPH 라디칼 소거능과 라디칼을 50% 저해하는 농도인 SC₅₀값은 Table 2에 나타냈다. 각 시료의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거능이 유의하게 증가하였다. 산수유 추출물의 SC₅₀은 25°C, 50°C, 90°C에서 각각 557.0 µg/mL, 575.0 µg/mL, 542.1 µg/mL를 나타내었다. 본 연구에서는 추출온도에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 SC₅₀은 유의한 차이가 없었으나, Koh 등(38)과 Choi 등(39)의 연구에서는 민들레 잎과 노루궁뎅이 버섯의 열수 추출 시 추출 온도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하며 최적온도 이후는 감소하는 경향을 보였다.

SOD 유사활성 측정

생체 내 항산화 효소 중의 하나이며 세포질, 엽록체, 미토콘드리아에 존재하는 SOD는 O₂·에 대항하는 첫 번째 효소로서 O₂·을 H₂O₂와 O₂로 전환함으로써 살아있는 세포를 보호하는 생물학적 기능을 수행한다. SOD 유사활성은 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide로부터 생체를 보호한다(40).

산수유 추출물의 SOD 유사활성 측정결과와 라디칼을 50% 저해하는 농도인 SC₅₀값은 Table 2에 나타냈다. 각 시

Table 2. DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity of *Corni fructus* water extraction at different temperatures

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH RSA ¹⁾ (%)			SOD-like activity (%)		
	25°C	50°C	90°C	25°C	50°C	90°C
50	10.0 \pm 1.0 ^a	8.5 \pm 0.6 ^a	10.4 \pm 0.8 ^a	0.9 \pm 0.7 ^a	2.7 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.4 ^a
100	18.8 \pm 0.1 ^b	16.0 \pm 0.2 ^b	20.2 \pm 0.7 ^b	3.6 \pm 0.3 ^b	6.8 \pm 0.4 ^b	2.2 \pm 0.2 ^a
250	34.3 \pm 0.4 ^c	34.9 \pm 1.1 ^c	33.7 \pm 0.2 ^c	9.9 \pm 1.0 ^c	11.2 \pm 0.5 ^c	12.9 \pm 1.3 ^b
500	58.7 \pm 0.3 ^d	58.4 \pm 0.8 ^d	58.1 \pm 0.4 ^d	24.3 \pm 0.4 ^d	24.1 \pm 1.7 ^d	24.4 \pm 0.5 ^c
1000	73.9 \pm 1.0 ^e	74.1 \pm 0.8 ^e	76.3 \pm 0.4 ^e	44.4 \pm 0.3 ^e	38.8 \pm 1.7 ^e	39.0 \pm 0.7 ^d
SC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ²⁾	557.0 \pm 4.4	575.0 \pm 4.0	542.1 \pm 7.0	1107.3 \pm 7.1 ^a	1251.4 \pm 32.5 ^b	1239.9 \pm 23.9 ^b

Values are mean with standard error. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾RSA: radical scavenging activity.

²⁾SC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$): concentration for scavenging 50% of radicals.

료의 농도가 증가할수록 SOD 유사활성이 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 라디칼을 50% 저해하는 농도인 SC₅₀ 값은 25°C, 50°C, 90°C에서 각각 1107.3 \pm 7.1 $\mu\text{g/mL}$, 1251.4 \pm 32.3 $\mu\text{g/mL}$, 1239.9 \pm 23.9 $\mu\text{g/mL}$ 로 25°C에서 유의하게 낮았다. 이는 25°C에서 추출한 시료가 SOD 유사활성이 유의하게 높음을 나타낸다. 본 연구와 같이 다양한 온도에 따른 산수유 추출물에 관한 직접적인 문헌보고가 거의 없어 비교가 어렵지만, Park 등(41)의 연구는 본 연구에서 추출한 온도와 비슷한 80°C에서 산수유를 추출하였고, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 측정된 SOD 유사활성을 비교해 보면 39.0%로 비슷한 활성을 보였다.

ORAC assay

ORAC assay는 2004년 항산화 작용의 표준화를 위한 세계학술대회에서 선정된 방법 중 하나로서 식품이나 음료의 total antioxidant capacity(TAC)를 양적으로 측정하여 항산화 활성을 평가하기 위한 도구로 널리 활용되는 방법이다. ORAC assay는 hydroxyl기나 peroxy기와 같이 짧은 시간 존재하는 radical에 대한 항산화 반응을 검정할 수 있다(34,42).

ORAC assay system을 이용하여 peroxy 라디칼에 대한 산수유 추출물의 제거활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. AAPH를 peroxy 라디칼 개시제로 사용하였을 때 산수유 추출물의 저농도(10 $\mu\text{g/mL}$)에서는 온도에 따른 peroxy 라디칼 제거 활성의 차이가 없었으나, 고농도(50 $\mu\text{g/mL}$)에서는 25°C에서 5.7 \pm 0.3 $\mu\text{M TE/g}$, 50°C에서 8.5 \pm 0.2 $\mu\text{M TE/g}$, 그리고 90°C에서는 6.3 \pm 0.2 $\mu\text{M TE/g}$ 으로 각 온도에 따른 peroxy 라디칼 제거 활성의 유의한 차이를 보였다. 본 연구와 같이 ORAC assay를 이용한 실험이 국내에서는 드물게 이루어지고 있으며, 산수유를 이용한 연구는 아직 보고된 바가 없어 타 연구와의 비교가 불가능 하였으나, Lee 등(43)의 연구에서 홍삼 추출물의 농도 0, 0.5, 1, 2%에서 각각 1.9, 2.0, 2.2, 2.4 TE μM 으로 ORAC value는 홍삼 추출물 처리 농도가 높아질수록 증가한 것으로 보고하였다. Kang과 Choung(44)의 연구에서 유색감자 홍영 및 자영 추출물을 저농도에서 측정한 결과, ORAC value는 2 $\mu\text{g/mL}$ 이하 수준에서는 홍영과 자영의 차이가 없었으며, 10 $\mu\text{g/mL}$

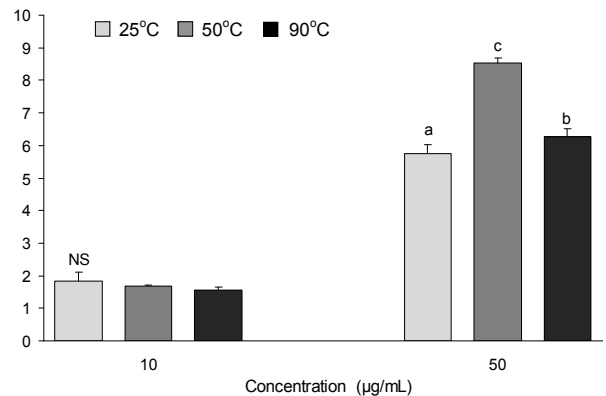


Fig. 1. Peroxyl radical-scavenging capacities of *Corni fructus* water extraction at different temperatures. ORAC values expressed as Trolox equivalents (μM) according to the concentration of *Corni fructus* extracted at different temperature. Values are mean with standard error. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. NS: no significantly different in each extraction temperature at 10 $\mu\text{g/mL}$.

를 처리한 경우 trolox(대조 표준액)의 value를 1로 보았을 때 홍영의 value는 0.25, 자영의 value는 0.40으로 차이를 보였다.

산수유 추출물이 DNA 손상에 미치는 영향

Single-cell gel electrophoresis라고도 불리는 comet assay는 세포내 DNA 손상을 측정할 수 있는 방법이다. Comet assay는 세포의 분열주기에 관계없이 대부분의 세포에 적용시킬 수 있고, 다른 방법들보다 간편하고 민감하여 *in vitro* 연구 및 *in vivo* 연구에서 널리 사용되고 있다(45).

H₂O₂로 유도된 산화적 DNA 손상에 대한 산수유 추출물의 보호효과 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 제시하였다. 온도에 따른 산수유 추출물을 1, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 백혈구에 처리한 후 H₂O₂를 200 μM 농도로 처리하여 유도된 DNA tail 부분의 DNA 함량을 측정한 결과, 각 시료의 모든 농도에서 H₂O₂ 양성 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 산수유 추출물의 DNA 손상 억제율을 H₂O₂ 양성 대조군과 비교한 결과, 25°C에서 28.5%, 50°C에서 37.5%, 그리고 90°C에서는 38.5%로 나타났다. 활성 비교를 위해 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 ascorbic acid의 DNA 손상

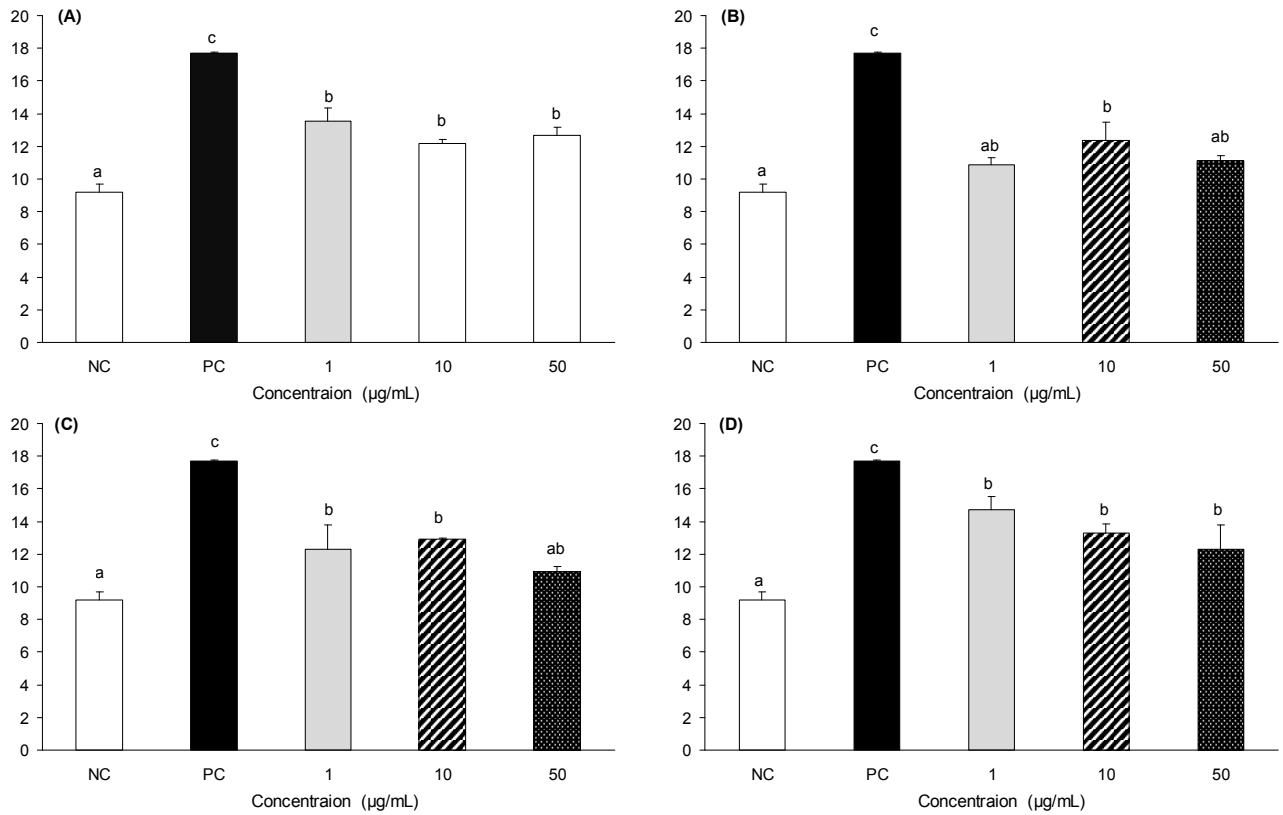


Fig. 2. Antigenotoxic effect of *Corni fructus* water extraction at different temperatures. Values are mean with standard error. NC, DMSO-treated normal control; PC, 200 µM H₂O₂-treated positive control. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test. A: *Corni fructus* water extraction at 25°C, B: *Corni fructus* water extraction at 50°C, C: *Corni fructus* water extraction at 90°C, D: vitamin C.

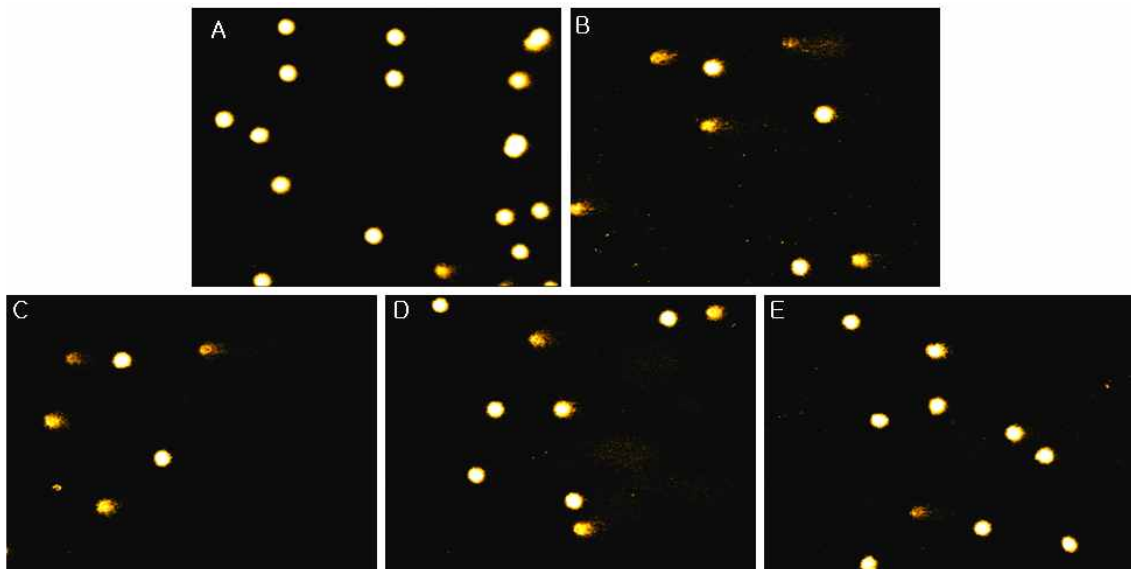


Fig. 3. Comet images of human leukocytes treated with *Corni fructus* water extraction at 90°C. A: negative control, B: positive control, C: *Corni fructus* 1 µg/mL + 200 µM H₂O₂, D: *Corni fructus* 10 µg/mL + 200 µM H₂O₂, *Corni fructus* E: CF 50 µg/mL + 200 µM H₂O₂.

억제율은 30.5%로 산수유 추출물의 산화적 DNA 손상 억제 효과가 ascorbic acid와 비슷한 수준임을 보였다. 이는 산수유 성분인 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF)이 H₂O₂에 의

해 손상된 human hepatocyte LO2을 보호하는 효과를 지닌다는 Ding 등(46)의 연구에 의해 뒷받침 될 수 있을 것으로 보인다. 최근 몇몇 연구에서 다양한 약용 식물 내 함유되어

있는 polyphenol 성분이 hydrogen peroxide에 의해 유도된 백혈구 DNA 손상을 억제한다는 결과가 comet assay를 통해 입증된 바 있다(47,48). 산수유의 이러한 DNA 손상 억제 효과 또한 cornusiiin A, B 및 C, dimeric monomeric 및 trimeric hydrolyzable tannins와 같은 polyphenol 성분에서 비롯된 것으로 사료된다. 이는 산수유의 tannin 성분 중 7-O-galloyl-D-sedoheptulose가 db/db mice에서 간과 신장의 산화적 스트레스에 유익한 효과를 지닌다는 Park 등 (49)의 연구에 의해 뒷받침 될 수 있을 것으로 보인다. 산수유의 polyphenol 뿐만 아니라 hypoglycemic 효과와 항염증 효과가 있는 iridoid glycoside(50,51) 등과 같은 성분 또한 DNA 손상 억제효과에 기여할 것으로 사료된다. 이상의 결과에서 다양한 온도에서 추출한 산수유 추출물은 추출온도와 상관없이 H₂O₂로 유도된 산화적 DNA 손상을 효과적으로 보호함을 알 수 있었다.

요 약

산수유 5 g에 100 mL의 증류수를 가하고 항온수조를 이용하여 25°C, 50°C, 90°C에서 추출한 다음 농축하여 각각 온도별 추출물을 얻었다. 각 온도별 추출물을 이용하여 산수유의 항산화 활성 조사 결과, 총 페놀함량은 가장 높은 온도(90°C)에서 추출한 추출물이 5.5 g/100 g GAE으로 가장 높았고, 그 다음으로 50°C, 25°C 추출물 순으로 페놀 함량이 많았다. DPPH 라디칼 소거능 측정에서는 각 시료의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거능이 유의하게 증가하였다. 그러나 라디칼의 50%를 저해하는 농도인 SC₅₀은 추출 온도에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다. SOD 유사활성에서도 역시 각 시료의 농도가 증가할수록 활성이 높았으며, SC₅₀은 다른 온도에 비해 25°C에서 유의하게 낮았는데 이는 25°C에서 SOD 유사활성이 가장 좋음을 나타낸다. 또한 ORAC assay를 이용한 peroxy 라디칼 소거능은 저농도에서는 각 온도에 따라 유의적 차이를 보이지 않았으나, 고농도에서는 50°C에서 유의하게 높았다. 한편 산수유 추출물의 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 효과를 보기 위해 1, 10, 50 µg/mL의 농도로 백혈구에 처리한 후 200 µM H₂O₂로 DNA 손상을 유도한 결과, 50 µg/mL 농도에서 손상된 DNA tail 부분의 DNA 함량을 측정한 % tail DNA inhibition이 25°C에서 28.5%, 50°C에서 37.5% 그리고 90°C에서는 38.5%로 나타났다. 이상의 결과에서 산수유를 물로 추출할 경우 추출 온도가 높을수록 총 페놀함량은 증가한 것으로 나타났지만 항산화 활성과 항유전독성 효과는 추출 온도와는 상관없이 우수한 것으로 나타났다. 이는 산수유가 일반적으로 고온에서 열수 추출하는 한약재로서 뿐만 아니라 비교적 낮은 온도에서 우려내는 식용 음료로서도 사용이 가능하다는 것을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Ahotupa M, Saxelin M, Korpela R. 1996. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutr Today* 31(Suppl.): 51S-52S.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1994. *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford University Press, Oxford, UK. p 1-62.
- Wickens AP. 2001. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol* 128: 379-391.
- Lopaczynski W, Zeissel SH. 2001. Antioxidant, programmed cell death, and cancer. *Nutr Res* 21: 295-307.
- Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Teler J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-48.
- Cerutti PA. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381.
- Frei B. 1994. *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic press, New York, USA. p 25-55.
- Jung DS. 2003. Player's training of physical strength and reactive oxygen. *J Sports Sci* 86: 32-29.
- Bergsten P, Amitai G, Kehrl J, Levine M. 1990. Ascorbic acid content of human B and T lymphocytes and monocytes. *Ann NY Acad Sci* 587: 275-277.
- Kelly FJ. 1998. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. *J Int Fed Clin Chem* 10: 21-23.
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J Oil Chem Soc* 52: 59-62.
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. 1995. Active-oxygen scavenging activity of plants extracts. *Biol Pharm Bull* 18: 162-166.
- Namiki M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29: 273-300.
- Yoon GB, Jang JK. 1989. *Wild grass for body*. Seok O publishing company, Seoul, Korea. p 459.
- Seo KI, Lee SW, Yang KH. 1999. Antimicrobial and antioxidative activities of *Corni fructus* extracts. *Korean J Postharvest Sci Technol* 6: 99-103.
- Yang TH, Liu SH, Sun MH. 1971. Constituents of the fruits of *Cornus officinalis*. *Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih* 22: 22-26.
- Toheu E, Chiro TH. 1973. Constituents of *Cornus officinalis*. *Yakugaku Zasshi* 93: 30-34.
- Kim CS, Park JH, Do SH. 1979. The study for the use of the wild plant resources in Korea. KIST BS E463(1): 1410-1416.
- Lee YC, Kim YE, Lee BY, Kim CJ. 1992. Chemical compositions of *Corni Frucus* and separating properties of its flesh by drying. *Korean J Food Sci Technol* 24: 447-450.
- Joo HK. 1988. Study on development of tea by utilizing *Lycium chinense* and *Cornus officinalis*. *Korean J Dietary Culture* 3: 377-383.
- Seo KI, Lee SW, Yang KH. 1999. Antimicrobial and antioxidative activities of *Corni Fructus* extracts. *Korean J Postharvest Sci Technol* 6: 99-103.

22. Lee SO, Han SM, Kim HM, Jeung SK, Choi JY, Kang IJ. 2006. Chemical components and antimicrobial effects of *Corni fructus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 891-896.
23. Jeon YH, Kim MH, Kim MR. 2008. Antioxidative, anti-mutagenic, and cytotoxic activities of ethanol extracts from *Cornus officinalis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1-7.
24. Chun HJ, Choi WH, Lee JH, Yang HO, Baek SH. 2003. Screening of cytotoxicity and antimicrobial effects of hexane extracts from *Cornis fructus*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 17: 476-480.
25. Lee JK, Hong GY, Park YJ, Park ST. 2008. Effect of *Cornis fructus* extract on the cell adhesion ability and oxidative stress in cultured NIH3T3 fibroblasts injured by hydrogen peroxide. *J Kor Soc People Plants Environ* 11: 49-57.
26. Kim YD, Kim HK, Kim KJ. 2003. Antimicrobial activity of solvent fraction from *Cornus officinalis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 829-832.
27. Kim OK. 2005. Antidiabetic and antioxidative effects of *Corni fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Oil Chem Soc* 22: 157-167.
28. Kim BH, Park KW, Kim JY, Jeong HY, Yang GH, Cho YS, Yee ST, Seo KI. 2004. Purification and characterization of anticarcinogenic compound from *Corni fructus*. *Korean J Food Sci Technol* 36: 1001-1007.
29. Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. 1993. Toxicity and lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. *Korean J Pharmacogn* 24: 177-182.
30. Kwon SH, Yang HS, Kim JY, Park KW, Shon MY, Kang KS, Shim KH, Seo KI. 2009. Biological activities of ethanol extract from *Corni fructus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 287-291.
31. Kim YD, Kim HK, Kim KJ. 2003. Analysis of nutritional components of *Cornus officinalis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 785-789.
32. Jang M, Kim YJ, Min JW, Yang DC. 2009. Optimization of extraction method for the quantitative analysis of gallic acid from *Cornus officinalis*. *Korean J Food Sci Technol* 41: 498-502.
33. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-249.
34. Kurihara H, Fukama H, Asami S, Totoda Y, Nakai M, Shibata H, Yao XS. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biol Pharm Bull* 27: 1093-1098.
35. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
36. Kim EY, Bail IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
37. Bondet V, Brand-Williams W, Bereset C. 1997. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *Lebensm Wiss Technol* 30: 609-615.
38. Koh YJ, Cha DS, Choi HD, Park YK, Choi IW. 2008. Hot water extraction optimization of dandelion leaves to increase antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 40: 283-289.
39. Choi MA, Park NY, Jeong YJ. 2004. Optimization of hot water extraction conditions from *Hericum erinaceus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1068-1073.
40. Kang MH, Choi CS, Kim ZS, Chung HK, Min KS, Park CG, Park HW. 2002. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1098-1102.
41. Park CS, Kim DH, Kim ML. 2008. Biological activities of extracts from *Corni fructus*, *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza uralensis*. *Kor J Herbology* 23: 93-101.
42. Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized method for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and biological and food samples. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
43. Lee JS, Kim GN, Jang HD. 2008. Effect of red ginseng extract on storage and antioxidant activity of tofu. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1492-1506.
44. Kang SC, Choung MG. 2008. Comparative study on biological activities of colored potatoes, Hongyoung and Jayoung cultivar. *Korean J Crop Sci* 53: 233-239.
45. Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
46. Ding X, Wang MY, Yao YX, Li GY, Cai BC. 2010. Protective effect of 5-hydroxymethylfurfural derived from processed *Fructus Corni* on human hepatocyte LO2 injured by hydrogen peroxide and its mechanism. *J Ethnopharmacol* 128: 373-376.
47. Soltani F, Mosaffa F, Iranshahi M, Karimi G, Malekaneh M, Haghghi F, Behravan J. 2009. Evaluation of anti-genotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell Biol Toxicol* 25: 291-296.
48. Yen GC, Hung YL, Hsieh CL. 2000. Protective effect of extracts of *Mesona procumbens* Hemsl. on DNA damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide and UV irradiation. *Food Chem Toxicol* 38: 747-754.
49. Park CH, Noh JS, Yamabe N, Kang KS, Tanaka T, Yokozawa T. 2010. Beneficial effect of 7-O-galloyl-D-se-doheptulose on oxidative stress and hepatic and renal changes in type 2 diabetic db/db mice. *Eur J Pharmacol* 640: 233-242.
50. Park CH, Yamabe N, Noh JS, Kang KS, Tanaka T, Yokozawa T. 2009. The beneficial effects of morroniside on the inflammatory response and lipid metabolism in the liver of db/db mice. *Biol Pharm Bull* 32: 1734-1740.
51. Yamabe N, Noh JS, Park CH, Kang KS, Shibahara N, Tanaka T, Yokozawa T. 2010. Evaluation of loganin, iridoid glycoside from *Corni Fructus*, on hepatic and renal glucolipotoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. *Eur J Pharmacol* 648(1-3): 179-187.

(2010년 10월 14일 접수; 2011년 1월 20일 채택)