

괴화와 괴각 에틸아세테이트 분획물의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 활성

장태원^{1#}, 김예랑¹, 이승현¹, 김도완², 박재호^{1*}

1 : 중원대학교 생약자원개발학과, 2 : 중원대학교 한방 식품바이오학과

Antioxidative Activities and Inhibition of DNA Damage of Ethylacetate Fraction from *Sophorae Flos* and *Sophorae fructus*

Tae Won Jang^{1#} Ye Rang Kim¹, Sung Hyeon Lee¹, Do-Wan Kim², Jae Ho Park^{1*}

1. Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

2. Department of Food Science and Industry, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

ABSTRACT

Objectives : In this study, we demonstrated the antioxidant activities and the inhibitory effect on oxidative DNA damage of ethyl acetate fractions extracted from *Sophorae Flos* and *Sophorae fructus*.

Methods : *Sophorae Flos* and *Sophorae fructus* were extracted with methanol(MeOH) and divided to Petroleum ether, Ethyl acetate(EtOAc) and Water fraction. The antioxidant activities were conducted by the 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) radical, 2, 2'-Azine-bis(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) diammonium salt(ABTS) radical scavenging assay, Fe²⁺ chelating assay and Reducing power assay. The inhibitory effect of DNA damage were characterized on ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay. In addition, we analyzed the Total phenol contents and the Vitamin C contents of *Sophorae Flos* and *Sophorae fructus*.

Results : The results of DPPH were 92.71% and 94.72%, ABTS were 87.16% and 62.44%, and Fe²⁺ chelating were 95.81% and 85.11% at 200 μ g/ml of *Sophorae Flos* and *Sophorae fructus* respectively. The *Sophorae Flos* showed stronger effect than *Sophorae fructus* in Reducing Power assay. Total phenol content was 111.77 mg/g and 122.54 mg/g, and Vitamin C content was 2.59 mg/g and 3.03 mg/g. Also both *Sophorae Flos* and *Sophorae fructus* have inhibitory antioxidant effect on ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay.

Conclusions : Over all, this study suggests that *Sophorae Flos* and *Sophorae fructus* can be used as not only effective antioxidant but also natural medicine.

Key words : *Sophorae Flos*, *Sophorae fructus*, DPPH, Reducing power, DNA damage, Fe²⁺ chelating

서 론

현대 사회의 경제와 사회 성장이 급격하게 이루어지는 동시에 인류의 건강에 대한 우려가 동시에 증가하고 있다. 이와 동시에 우수한 천연물질을 개발하는 연구와 천연생리활성물질의 기능성에 대해 연구가 활발하게 진행되고 있다¹⁾. 특히 환경오염, 장기 지속적인 흡연과 음주, 환경 호르몬 등은 인체 내의 산화적 스트레스를 일으키는 것으로 밝혀지고 있으며, 이러한 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체

내의 당, 지질, 단백질과 DNA까지도 비가역적인 변형과 파괴를 유래한다고 알려져 있다²⁾. 이러한 활성산소종이 암, 동맥경화, 심혈관계질환 뿐만 아니라 다양한 질병에 관련이 있다고 인식되며, 생물분자 자체를 공격하여 세포, 조직, 기관에 이르는 피해를 준다고 보고되고, 활성산소는 세균을 죽이는 살균의 생체 방어 작용을 하기도 하지만 일반적으로 생체 내에서 산화를 일으켜 질병을 초래하는 작용을 하며³⁾, 활성산소종에 의한 산화는 곧 노화에 직접적인 영향을 미치고 노화는 성인병 질환에 관여하게 되며 그 결과 여러 질병에 원인이

*Corresponding author : Jae Ho Park, Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805
· Tel : +82-43-830-8614 · E-mail : parkjih@jwu.ac.kr

#First author : Tae Won Jang, Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805

· Tel : +82-43-830-8614 · E-mail : jtw2111@hanmail.net

· Received : 24 February 2015 · Revised : 19 March 2015 · Accepted : 20 March 2015

된다는 보고도 있다⁴⁾.

최근, 활성산소종에 의한 인체 내 손상을 보호하는 항산화 물질에 대하여 다양한 연구가 진행되고 있는데, 합성 항산화제의 부작용인 독성 작용을 대체하기 위하여 천연 항산화제로 사용될 수 있는 식물의 항산화물질에 대해 다양한 연구가 이루어지고 있다^{5,6)}. 천연에서 얻을 수 있는 항산화 물질은 phenolics 및 flavonoid 계통의 화합물로 알려져 있는데 대부분의 식물에 phenolic 성분이 함유되어 있다⁷⁾. 이 물질들은 화학반응 중 연쇄반응을 통해 alkyl radical 또는 alkylperoxy radical에 수소를 공여하는 반응을 하고 이 결과 radical을 안정화시켜 제거함으로써 산화를 억제하는 효능을 보인다⁸⁾.

槐花(*Sophorae Flos*)와 槐角(*Sophorae fructus*)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 낙엽 교목인 회화나무 (*Sophora japonica* L.)의 꽃과 열매를 각각 지칭 하는 것으로, 槐花는 여름에 꽃이 피었을 때 채취한 꽃과 꽃봉오리를 사용하고, 槐角은 겨울철에 채취하여 건조한 성숙한 과실을 약용으로 사용한다. 槐花의 성미는 고(苦)하고, 미한(微寒)이며, 간(肝)과 대장경(大腸經)에 작용한다. 또한, 지혈작용을 하는 루틴을 함유하고 있어서 양혈지혈(涼血止血)에 효능이 있다고 알려졌다. 槐角의 성미는 고(苦)하고, 한(寒)하며, 간(肝)과 대장경(大腸經)에 작용한다. 또한, 피하와 피각은 동일하게 flavonoids류가 함유되어 있어 혈중 콜레스테롤의 저하효과 및 소염작용등 비슷한 작용을 한다⁹⁾. 그러나 槐角은 槐花보다 지혈작용이 약하지만 청열하강(淸熱下降) 작용을 하여 변혈(便血)의 증상이 나타날 경우 사용된다.

따라서 본 연구에서는 식물성 phenolic 화합물이 다수 함유된 槐花와 槐角의 항산화 활성을 비교 하고, 항산화 효과에 의한 산화적 DNA 손상 억제활성을 평가함으로써, 槐花와 槐角의 기능성 소재로서의 다양한 산업적 응용 분야에 이용 가능성을 높이고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 槐花 및 槐角은 제인병원(주)의 한방약재관에서 건조 동정된 시료를 제공받아 사용하였다.

2. 방법

1) Ethyl acetate 분획

실험에 사용된 槐花(*Sophora Flos*)는 건조시료 667.2 g을 분쇄한 후, 80% Methanol 3L로 3일간 침지한 후 여과하였고, 槐角(*Sophorae fructus*)은 건조시료 960.9g을 분쇄한 후, 80% Methanol 3L로 3일간 침지한 후 여과하였다. Methanol 추출물을 40°C이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치(rotary evaporator)로 농축한 후 분별깔대기에 Petroleum ether, Ethyl acetate 순으로 3회 반복으로 용매분획 하였다. Ethyl acetate 분획물을 감압 환류 냉각장치로 농축하여 실험 전까지 -27°C에 보관하였고, dimethylsulfoxide(DMSO)에 4000 ppm으로 용해하여 실험에 사용하였다.

2) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet¹⁰⁾ 방법을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300 μ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 515 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 Ethanol을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물 40 μ l에 DPPH solution 760 μ l를 첨가한 후 20분 간 37°C에서 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

3) ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg¹¹⁾ 등의 방법을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7 mM 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid(2,2' azino-bis)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간동안 ABTS + \cdot 을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.7이 되게 희석하였다. 각 농도별 추출물 40 μ l에 ABTS solution을 760 μ l씩 각각 첨가한 후 20분간 37°C에서 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

4) Fe²⁺ 킬레이팅 활성

Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 Hus¹²⁾ 방법을 참고하여 실험하였다. 槐花 및 槐角의 농도별 추출물 40 μ l에 1mM FeCl₂ 40 μ l와 증류수 700 μ l를 혼합하여 약 30초간 실온에서 반응하였다.

이 혼합물에 5mM ferrozine 40 μ l를 첨가하여 Fe²⁺-ferrozine complex를 유도하고 10분 뒤 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fe²⁺ 킬레이팅의 활성(%)은 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 킬레이팅 활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

5) 환원력

환원력은 Oyaizu¹³⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 각 농도별 추출액 100 μ l에 0.2 M Potassium Phosphate buffer (pH 6.6) 250 μ l과 1% Potassium Hexacyanoferrate(III) 250 μ l을 혼합한 후, 50°C에서 20분간 반응시킨 후 찬물로 냉각한 후, trichloroacetic acid(TCA) 250 μ l를 첨가하였다. 위 반응액을 2000 g에서 5분간 원심 분리하여 상등액

400 μ l에 증류수 400 μ l와 0.1% ferric chloride 16 μ l를 첨가하여 혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값이 높을수록 환원력이 강한 것으로 평가된다.

6) 총 페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis¹⁴⁾ 방법을 참고하여 측정하였다. 건조시료 1 g에 1% Acetic acid/diethyl ether 100 ml를 혼합하여 5분간 추출 후 상등액을 제거하였다. 잔여물과 70% Acetone을 혼합하여 50 ml를 만든 후 2시간 동안 교반 추출하였다. 상등액을 filter paper로 걸러낸 후, 70% Acetone으로 50ml 정용하였다. 추출물 50 μ l와 증류수 950 μ l, Folin 500 μ l를 혼합한 후, 20% Sodium carbonate 2.5 ml 넣고 40분간 실온에서 반응시켰다. 반응물을 흔들지 않고 맑은 액체를 UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 Tannic acid으로 정량 직선방정식을 사용하였다.

7) 비타민C 함량 분석

비타민C 함량은 Jagot and Dani¹⁵⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 건조시료 0.5 g에 증류수 10 ml 넣은 후, 4500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 추출하였다. 추출물을 filter paper(No.2)로 걸러낸 후, 200 μ l와 trichloroacetic acid(TCA) 800 μ l를 넣고 3000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상등액 500 μ l와 증류수 1.5 ml, Folin 200 μ l를 넣고 혼합한 후 10분간 상온에서 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 Ascorbic acid로 정량 직선방정식을 사용하였다.

8) ϕ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성

ϕ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성은 Jung¹⁶⁾방법을 참고하여 측정하였다.

- Ferric Chloride($FeCl_2$)을 통한 산화적 스트레스
 각 농도별 추출액 40 μ l와 $FeCl_2$ 60 μ l와 증류수 700 μ l를 넣은 후, 37°C에서 15분 반응하였다. 반응액 20 μ l와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 μ l를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X Loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.
- Ferrous sulfate($FeSO_4$)을 통한 산화적 스트레스
 각 농도별 추출액 40 μ l와 1.5mM $FeSO_4$ 와 1.5mM hydrogen peroxide(H_2O_2)를 1:1로 혼합한 용액 760 μ l을 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응하였다. 반응액 20 μ l와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 μ l를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X Loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

3. 통계학적 분석

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, $P < 0,05$ 수준에서 Duncan 다중검정법 (duncan's multiple range test)를 이용하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 항산화 활성

槐花와 槐角의 Ethyl acetate 분획물의 항산화 활성을 비교하기 위해서 대표적인 수용성 비타민 및 강력한 항산화제로 알려진 Ascorbic acid¹⁷⁾와 함께 측정하여 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성과 Fe^{2+} 킬레이팅 활성 그리고 환원력을 비교 분석하여 나타냈다.

槐花와 槐角의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 (Table 1), 각 추출물의 농도가 높을수록 DPPH 소거 활성이 높았으며, 槐花는 槐角에 비해 저농도에서도 높은 활성을 나타내었다. 추출물의 농도 200 μ g/ml에서 槐花와 槐角은 각각 92,71%, 94,72%의 소거 활성을 나타내어 L-ascorbic acid와 유사한 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 (Table 2) 槐花와 槐角 추출물 공히 저농도에서부터 활성이 급격히 높아져 추출물 농도 8 μ g/ml에서 부터는 활성 증가 폭이 낮았다. 추출물 농도 200 μ g/ml에서 槐花와 槐角은 각각 95,08%, 96,24%의 소거 활성을 나타내었다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from Sophorae Flos and Sophorae fructus.

Sample	Extracts (μ g/mL)					IC ₅₀ (μ g/mL)
	200	40	8	1,6	0,32	
Sophorae Flos	92,7±2,2a	84,2±2,4b	70,4±2,4a	12,8±1,9a	5,0±0,2a [*]	6,6
Sophorae fructus	94,7±0,3a	67,3±0,2c	18,3±0,3c	1,3±0,3b	1,0±0,3c	18,8
L-Ascorbic acid	93,5±0,2a	92,9±0,3a	64,8±0,2b	14,2±0,4a	3,0±0,2b	6,4

^{*} Each value is expressed as mean \pm SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p<0,05).

Table 2. ABTS radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from Sophorae Flos and Sophorae fructus.

Sample	Extracts (μ g/mL)					IC ₅₀ (μ g/mL)
	200	40	8	1,6	0,32	
Sophorae Flos	95,1±2,7a	89,0±0,8b	87,2±1,2b	61,0±1,0a	17,0±1,1a [*]	1,4
Sophorae fructus	96,2±0,8a	82,6±0,8c	79,9±1,3c	33,2±0,7b	7,4±0,3c	4,0
L-Ascorbic acid	99,4±0,9a	99,4±0,6a	93,0±2,1a	27,8±2,0c	11,8±1,2b	2,8

^{*} Each value is expressed as mean \pm SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p<0,05).

槐花와 槐角의 Fe^{2+} 킬레이팅 활성을 측정한 결과(Table 3), 각 추출물의 농도가 높을수록 킬레이팅 활성이 높았으며, 추출물 농도 200 μ g/ml에서 槐花와 槐角은 각각 95,81%와 85,11%으로 槐角에 비해 槐花의 킬레이팅 능력이 다소 높았다. 또한 槐花와 槐角의 환원력은 L-ascorbic acid와 비교를 통해 700 nm에서의 흡광도가 추출물 농도 200 μ g/ml에서 槐花가 우수한 효능을 보였으며 槐花와 槐角 모두 L-ascorbic

acid보다 좋은 활성을 나타내었다. (Table 4).

Table 3. Fe²⁺ Chelating activity (%) of ethyl acetate fractions from Sophorae Flos and Sophorae fructus.

Sample	Extracts (μg/mL)					IC ₅₀ (μg/mL)
	200	40	8	1,6	0,32	
Sophorae Flos	95,8±1,5a	78,7±1,5a	31,2±0,7a	9,6±0,8a	4,0±0,2a*	11,8
Sophorae fructus	85,1±2,1b	56,9±1,3b	16,5±0,6b	4,9±0,5b	2,6±0,5b	27,8
L-Ascorbic acid	47,5±1,5c	21,3±1,6c	12,9±0,9c	8,0±0,8a	2,8±0,4b	1115,5

* Each value is expressed as mean ± SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p<0,05).

Table 4. Reducing Power O.D of ethyl acetate fractions from Sophorae Flos and Sophorae fructus.

Sample	Extracts (μg/mL)				
	200	40	8	1,6	0,32
Sophorae Flos	1,12±0,05a	1,09±0,04a	0,37±0,06a	0,03±0,01b	0,01±0,00b*
Sophorae fructus	1,10±0,03a	0,78±0,03b	0,08±0,00b	0,01±0,00c	0,01±0,00b
L-Ascorbic acid	0,85±0,03b	0,81±0,03b	0,37±0,02a	0,14±0,01a	0,08±0,01a

* Each value is expressed as mean ± SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p<0,05).

2. 총 페놀 화합물 함량 분석 및 비타민 C 함량 분석

槐花와 槐角의 총 페놀 화합물 함량을 분석한 결과(Fig. 1A), 槐花는 111,77 mg/g, 槐角은 122,54 mg/g 으로 槐角의 총 페놀 화합물의 함량이 다소 높았다. 총 페놀 함량은 농도 별로 희석한 Tannic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다.

槐花와 槐角의 비타민 C 함량은 槐花는 2,59 mg/g, 槐角은 3,03 mg/g으로 槐角의 비타민 C 함량이 높았으며 농도 별로 희석한 Ascorbic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다(Fig. 1B).

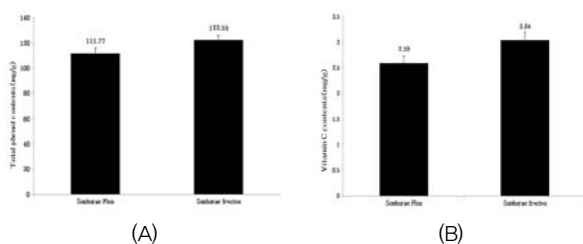


Fig. 1. Compared to (A) total phenolic compounds contents and (B) vitamin C contents of ethyl acetate fractions from Sophorae Flos and Sophorae fructus.

3. 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 활성

槐花와 槐角의 Ethyl acetate 분획물은 FeCl₂(ferric chloride)의 산화적 스트레스와 FeSO₄ (ferrous sulfate)와 H₂O₂의 fenton 반응을 이용한 산화적 스트레스를 이용하여 DNA 손상 억제 활성을 평가하였으며, ϕX-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 이용한 비 세포적 시스템으로 평가하였다.

槐花 및 槐角 Ethyl acetate 분획물 모두 대조구와 비교해서 모든 농도에서 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 억제하는 활성을 보였다(Fig. 2, 3). 정상적인 plasmid DNA는 supercoiled (SC) 형태로 존재하나 H₂O₂와 철의 fenton 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼 또는 철 이온 존재 하에서는 산화적 스트레스에 의한 손상을 받아 open-circular(OC) 형태로 전환된다.

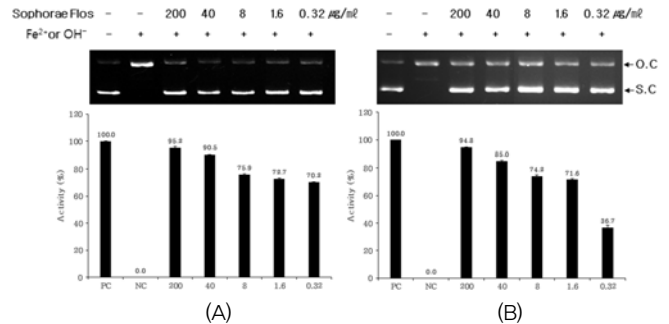


Fig. 2. Inhibition effect of Sophorae Flos against oxidative DNA damage by Fe²⁺ ion (A) and hydroxyl radical (B).

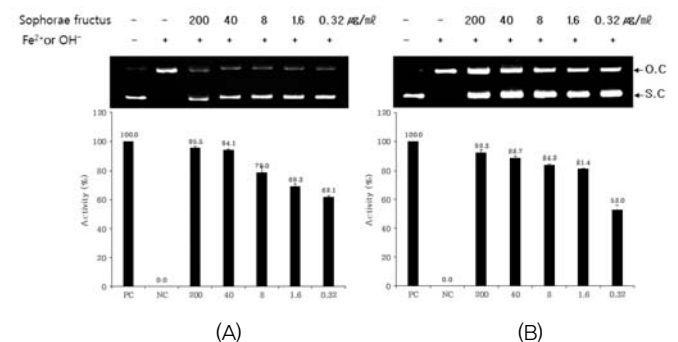


Fig. 3. Inhibition effect of Sophorae fructus against DNA cleavage induced by Fe²⁺ ion (A) and hydroxyl radical (B).

고찰

ROS는 체내 각종 세포 등의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되고, 체내에서 생성되는 ROS와 항산화효소와의 항상성이 깨어지게 되면 산화적 스트레스로 인한 노화, 당뇨, 비만과 같은 각종 질병들을 야기하게 된다¹⁸⁾. 이러한 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA까지도 비가역적인 변형과 파괴를 유래하여 여러 가지 질병을 유발 하는 것으로 알려져 있다²⁾. 이를 해결할 수 있는 항산화제에 관한 관심이 집중되었으나, 기존의 식품에 널리 사용되던 합성 항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene) 및 BHA(butylated hydroxyanisole) 등의 인체에 대한 독성이 보고된 이후로 점점 기피되고 있다¹⁹⁾. 따라서 최근에는 천연물에서 추출한 천연 항산화제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며²⁰⁻²²⁾, 천연 항산화제는 대부분 식물 기원의 페놀 화합물로서 유리 라디칼의 생성을 지연시키거나 활성을 저해하여 항산화 물질로서의 역할을 한다고 알려져 있다²³⁾.

따라서 본 연구에서는 槐花와 槐角의 총 페놀성 화합물과 비타민 C 함량을 비교 분석하고, 항산화 활성 및 DNA 손상 억제력을 평가하여 다양한 기능성 응용소재로서의 이용 가능성을 높이고자 한다.

槐花와 槐角의 항산화 활성은 추출물 농도별 처리에서 대조구인 L-ascorbic acid와 유사한 활성을 나타내었다. 특히 槐花의 DPPH와 ABTS 소거에 대한 IC₅₀(Inhibitor concentration 50%) 값은 각각 6.57과 1.41 µg/ml로 L-ascorbic acid의 6.36과 2.76 µg/ml로 활성이 유사하거나 높았다. 또한 槐花와 槐角의 Fe²⁺ 킬레이팅 활성과 환원력도 매우 높은 활성을 나타내었으며, 槐角에 비해 槐花의 활성이 다소 높게 나타났다. Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 생체 내의 철(iron, Fe)이온의 과잉으로 야기될 수 있는 hydrogen peroxide와의 fenton reaction에 의한 단백질 발현에 대한 직접적인 손상과 DNA 산화적 스트레스, 세포의 노화와 손상을 야기하는 강력한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 중 hydroxyl radical의 억제를 위한 Fe²⁺ 킬레이팅 반응을 이용한 것이다^{24,25}. 또한 환원력은 일반적으로 전자나 수소, 산소 등의 전자의 이동이나 공여가 가능한 물질들이 산화를 통해 활성산소를 발생하는 것에 대한 억제능력을 뜻한다.

槐花와 槐角은 flavonoid와 isoflavonoid 화합물이 함유되어 있는데, 특히 槐角의 루틴의 함량은 매우 높아 어린 열매 속의 루틴의 함량은 46%에 달한다. 槐角은 치질출혈, 대변출혈, 자궁출혈, 소변출혈 등에 지혈효과가 있으며 약리작용으로 혈당상승, 포도당 구균 및 대장균 성장 억제작용이 보고된 바 있다²⁶. 페놀류 화합물은 킬레이팅을 통해 금속이온들을 비활성화 시키고 추가적으로 superoxide-driven fenton reaction과 같은 활성산소종의 기원으로 중요하게 인식되고 있는 반응들을 억제한다²⁷⁻⁹. 槐花의 항산화 활성은 槐角에 비해 다소 높았으나, 槐角의 총 페놀성 화합물 함량과 비타민 C의 함량은 槐花에 비해 높게 나타났다.

산화물 일으키는 여러 원인 중 산화적 스트레스는 강한 반응성을 가진 라디칼을 형성하고 DNA를 비가역적으로 변형시키는데², 세포는 활성산소종을 방어하기 위한 여러 항산화 체계를 유지하고 있지만, 활성산소의 총량이 세포가 평형을 유지하는 항산화 보호 체계를 뛰어넘어 산화 및 환원 균형을 붕괴할 때 세포는 산화적 스트레스에 노출 수밖에 없다. 산화로 인한 변이는 단백질과 지질을 분해되고 재합성하는 것을 근거로 하였을 때 DNA의 손상에 의한 발암은 산화적 스트레스에 의해 매우 큰 영향을 받는다고 할 수 있다²⁹. DNA 손상에 대한 억제 능력을 평가하기 위해서, FeCl₂ 및 FeSO₄와 H₂O₂의 fenton 반응을 이용하였다. 이렇게 발생된 산화적 스트레스를 통해 DNA 손상을 일으키고 그 손상에 대한 추출물의 농도별 억제 능력을 평가한 결과 槐花, 槐角 모든 농도별 추출물 처리구에서 강한 억제능력을 보였다. 특히 낮은 농도 (0.32µg/ml)에서도 매우 높은 억제활성을 나타내었다.

결론

본 연구에서는 槐花와 槐角의 Ethyl acetate 분획물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH, ABTS, 환원력 그리고 Fe²⁺ 킬레이팅 활성을 측정하였다. 또한 총페놀성 화합물과

비타민 C 함량을 분석하여 비교하였으며, ϕX-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 통해 槐花와 槐角의 산화적 DNA 손상억제 효과를 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 槐花와 槐角의 농도별 DPPH, ABTS, Fe²⁺ 킬레이팅 활성 그리고 환원력은 강력한 항산화제인 L-ascorbic acid와 비교하여 매우 높은 항산화 활성을 나타내었다. 특히, 槐角에 비해 槐花의 활성이 다소 높게 나타났다
2. 槐角은 槐花에 비해 총 페놀성 화합물의 함량과 비타민 C 함량이 각각 9.6%, 17.4% 높게 분석되었다
3. 槐花와 槐角은 산화적 스트레스에 의한 ϕX-174 RF I plasmid DNA 손상을 효과적으로 억제하였다.

따라서 槐花와 槐角은 산화적 DNA 손상을 항산화 효과에 의해 매우 효과적으로 억제시키는 천연항산화 소재 및 암예방적 소재로서의 가치가 매우 높을 것으로 판단된다.

References

1. Konyahoglu S, Saglam H, Kivcak B. α -tocopherol, flavonoid, and phenol contents and antioxidant activity of *Ficus carica* leaves. *Pharm Biol*. 2005 ; 43(8) : 683-6.
2. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007 ; 18(9) : 567-79.
3. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995 ; 49(3) : 345-61.
4. Marnett LJ. Oxiradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000 ; 21(3) : 361-70.
5. Jeong SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baeg NI. Natural Products, Organic Chemistry ; Screening for Antioxidant Activity of Plant Medicinal Extracts. *J Korean Soc App Biol Chem*. 2004 ; 41 : 135-40.
6. Park EB, Kim HS, Shin SY, Ji IA, Kim JH, Kim SG, Yoo BH, Kim BW, KI, Kim MM, Chung KT. Antioxidative Activity of *Cornus officinalis* Extracts Obtained by Four Different Extraction Techniques. *J Life Sci*. 2012 ; 22(11) : 1507-14.
7. Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J Food Sci Technol*. 1982 ; 14(3) : 283-8.
8. Lee, YS, Joo EJ, Kim NW. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepistanuda*. *J Kor Soc Food Sci Nutr*. 2006 ; 35(10): 1309-14.
9. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DR, Boo YM. *Herbologycal Study on herbal medicine*. Seoul :

- Youngrim, 2008 : 543–6.
10. Bondet V, Brand Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm. Wiss U-Technol*, 1997 ; 30(6) : 609–15.
 11. Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 1999 ; 66(4) : 511–7.
 12. Hus B, Coupard IM, Ng K. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem*, 2006 ; 98(2) : 317–28.
 13. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 1986 ; 44(6) : 307–15.
 14. AOAC. Official Methods of Analysis, 14th ed. Washington DC. : Association of Official Analytical Chemists, 1995 : 8–35.
 15. Jagota SK, Dani HM. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Anal Biochem*, 1982 ; 127(1) : 178–82.
 16. Jung Y, Surh Y. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic Biol Med*, 2001 ; 30(12) : 1407–17.
 17. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*, 2003 ; 22(1) : 18–35.
 18. Halliwell B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, 1995 ; 49(10) : 1341–8.
 19. Sun B, Fukuhara M. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology*, 1997 ; 122(1–2) : 61–72.
 20. Caillet S, Yu H, Lessard S, Lamoureux G, Ajdukovic D, Lacroix M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chem*, 2007 ; 100(2) : 542–552
 21. Jang IC, Park JH, Park E, Park HR, Lee SC. Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from cosmos (*Cosmos bipinnatus*) flowers. *Plant Foods Hum Nutr*, 2008 ; 63(4) : 205–10.
 22. Jeon GI, Yoon MY, Park HR, Lee SC, Park E. Neuroprotective activity of *Viola mandshurica* extracts on hydrogen peroxide-induced DNA damage and cell death in PC12 cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2009 ; 1171 : 576–82.
 23. Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2005 ; 13(3) : 93–100.
 24. Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chem*, 2005 ; 89(4) : 569–75.
 25. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, 1995 ; 18(2) : 321–36.
 26. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. Activeoxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol Pharm Bull*, 1995 ; 18(1) : 162–6.
 27. Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med*, 1998 ; 24(9) : 1355–63.
 28. Rice-evans CA, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 1997 ; 2(4) : 152–9.
 29. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res*, 2001 ; 488(1) : 65–76.