

Identification of Antioxidant Compound Derived from Methanolic Extract of *Houttuynia Cordata*

Hyeji Kim^{1†}, Heesung Hwang^{1†}, Sumin Park¹, Sungwook Kang¹, Hyejeong Kim¹, Sugyeong Hong², Moon-Moo Kim³ and Yunghee Oh^{3*}

¹Department of Chemistry, Dong-Eui University, 176, Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 47340, Korea

²Department of Chemistry & Biology, Dong-Eui University, 176, Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 47340, Korea

³Department of Applied Chemistry, Dong-Eui University, 176, Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 47340, Korea

Received April 11, 2016 / Revised May 24, 2016 / Accepted July 17, 2017

This study was carried out to evaluate the antioxidant effect of methanolic extract of *Houttuynia cordata* (HCME) and to identify a compound having antioxidant effect. The ethyl acetate fraction of HCME showed the highest antioxidant effect in organic solvent fractions. The fraction was then separated into 12 fractions by open column chromatography. Among these fractions, the fraction 10 (Fr. 10) with the highest antioxidant activity was isolated, and its antioxidant effect was evaluated by DPPH radical scavenging activity, reducing power, TBARS, cell viability, DNA oxidation and DCF fluorescence. The Fr. 10 at a 64 µg/ml showed 60% of inhibitory effect similar to that of vitamin C at 10 µg/ml, compared with blank group. The Fr. 10 at 64 µg/ml showed 264% of reducing power, compared with blank group. TBARS assay showed that the Fr. 10 at 64 µg/ml had 35.5% of inhibitory effect similar to that of vitamin E at 1,000 µg/ml, compared with blank group. The Fr. 10 above 32 µg/ml displayed cytotoxicity. However, it was observed that the Fr. 10, above 1 µg/ml reduced DNA damage. DCF fluorescence assay showed that the Fr. 10 inhibited oxidative stress by H₂O₂ in a dose dependent manner. The compound of Fr. 10 was identified to be rutin whose molecular weight is 610 by the IR and LC-MS analyses. Therefore, these results suggest that the rutin of Fr. 10 could use as a natural antioxidant for development of cosmetics and functional foods.

Key words : Antioxidant effect, DCF fluorescence, *Houttuynia cordata*, rutin

서론

인체는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 정상적인 세포기능의 일부로서 생성한다[12]. 그러나 내부적 요인과 외부적 요인으로 발생하는 ROS의 과잉생산은 산화적 손상을 유발시켜 모든 세포 성분의 구조를 변형시킨다. 이러한 ROS는 세포의 노화와 퇴행을 초래하여 각종 질병의 원인으로 밝혀지고 있다[19, 35, 41]. 각종 질병들의 원인이 될 수 있는 ROS의 문제점에 대한 해결책으로 항산화제 등과 같은 약제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[3, 22, 33]. 산화적 손상을 억제시키고 ROS를 소거하는 대표적인 항산화제로는 vitamin C (vit C), vitamin E (vit E), β-carotin 그리고 selenium 등이 있다. 그 외에도 합성 항산화제로 butylated hydroxyl

anisole (BHA)와 butylated hydroxyl toluene (BHT)가 주로 사용되고 있다. 합성 항산화제는 과다섭취 시 병을 유발하기도 하고, 생체 효소 및 지방의 변이원성 및 인체에 독성을 나타내기 때문에 안전성에 논란으로 사용규제를 받고 있다[14, 26]. 이러한 합성 항산화제의 문제로 인해 보다 안전한 천연 항산화제의 개발이 지속적으로 이루어져야 하는 실정이다. 그 예로 천연식물에 분포되어 있는 플라보노이드(flavonoid)는 페놀성 화합물로써, 항암이나 심장질환 예방효과에 탁월하며 체내 산화작용을 억제시키는 작용을 한다고 알려졌다[8, 42]. 이와 같이 최근 약제나 과일, 채소와 같은 천연물로부터 항산화제를 개발, 이용하려는 연구 및 부작용이 없는 생리활성물질을 찾는 연구 추세로 변화하고 있다[2, 11].

본 연구에서 발굴된 어성초(*Houttuynia cordata* Thunb)는 쌍떡잎식물의 여러해살이 약초로서 약모밀의 전초이다. 어성초는 약재로 여러 질병에 광범위한 치료효과가 보고된바 있으며[39], 현재까지 어성초에 관한 연구로는 어성초 뿌리의 항균활성[39], 항산화[28], 항종양[21], 항백혈병[4], 고지혈 억제효과[7], 카드뮴에 대한 독성억제효과 등이 보고되고 있으며[27], 어성초에 함유되어 있는 quercetin은 다양한 생리활성기능을 가지고 있다고 조사되었다[36]. 현재 진행된 연구로는 Kumar 등[24]의 보고에 따르면 streptozotocin (STZ)라는 약

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1517, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : yhoh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

물을 쥐에게 주사하였을 때 당뇨를 유도 시키는데 어성초의 메탄올 추출물이 이를 억제 하는데 있어 효능을 보인다고 보고하였다. Chen 등[5]은 어성초의 수용추출물을 사전 섭취 시 아세트 아미노펜에 의한 산화로부터 간을 보호 하는 간 보호제로서 사용될 수 있다고 보고하였다. Ng 등[31]의 보고에 따르면 어성초 추출물 중 Bleomycin이라는 성분이 폐 섬유증의 부분적산화 손상의 감소에 대한 보호에 효과를 나타낸다는 보고가 있다. 또 다른 연구에서는 Li 등[29]의 보고에 따라 어성초 추출물이 비만세포 활성화 및 아나필락시스 반응을 억제 시키는 모습이 확인 되었고 비만의 치료에 유용할 수 있다고 발표하였다. Kim 등[23]은 항산화 활성을 보이는 어성초의 효능을 더욱 증대 시키기 위해 유산균을 이용해 발효 시켜 항산화 활성을 비교하였고 발효하지 않은 어성초에 비해 항산화 활성이 높아진다는 것을 발표하였다. 다양한 방면의 연구가 진행되어 왔지만 현재 살아있는 세포를 이용한 항산화력의 연구는 부족한 실정이다.

그리하여 본 연구는 어성초의 메탄올 추출(Methanolic extract of *Houttuynia cordata*, HCME)에 의한 유기용매 별 분획 및 칼럼 크로마토그래피를 하여 각각의 분획물들을 자유라디칼의 소거 정도 분석, ROS 제거 정도 분석, 활성산소 억제능 분석을 통해 항산화 효과를 확인하고, DNA 산화억제에 대한 항산화 효과 분석, DCFH-DA 보호능력 효과 분석을 수행하여 살아있는 세포실험을 통해 기존의 보고된 연구들과의 차별성을 두어 항산화 효과를 나타내는 분획물의 성분을 분석하고 확인하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 어성초(*Houttuynia cordata*)는 진주에 위치한 남윤식품에서 제공되었으며, 건조시킨 후 실온 보관 하여 실험에 사용되었다. 추출 및 분획 용매로 methanol, n-hexane, ethyl acetate, n-butanol을 사용하였다. 세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin (10,000 U/ml) / strepto-mycin (10,000 µg/ml) / amphotericin (2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland, UK) 로 부터 구입하였다. B16F1 cell line은 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로 부터 구입 하였다. MTT reagent, agarose와 기타시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다. Fr. 10의 정성분석을 위해 IR (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FT-IR Spectrometer)은 Thermo Scientific(Waltham, MA,USA)제품을 사용하였고 정성분석을 위해 LC-MS(Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, LC-MS)는 isocratic pump(G1310), quaternary pump (G1311)와 UV-vis detector (G1314), 칼럼은 SB-C18 column(1.8 µm × 2.1 × 50 mm)로 구성된 Agilent (Santa Clara, CA, USA)의 제품을 사용하였다.

시료의 제조

HCME는 아래와 같은 방법으로 추출하였다. 5.9 kg의 어성초를 완전히 건조시킨 후 분쇄하였다. 분쇄된 어성초를 메탄올에 3일간 추출 및 여과하여 약 59.1 l의 여과 액을 감압농축 하였다. 농축된 어성초 메탄올 추출물을 각각의 유기 용매 별 분획물들의 항산화력을 비교한 결과, 뛰어난 항산화력을 나타낸 ethyl acetate 분획물로 크로마토그래피를 통해 fraction을 나누어 각각의 항산화력을 비교하였다. 총 12개의 fraction 중 양성대조군에 비해 가장 높은 항산화 효과를 보인 Fr. 10을

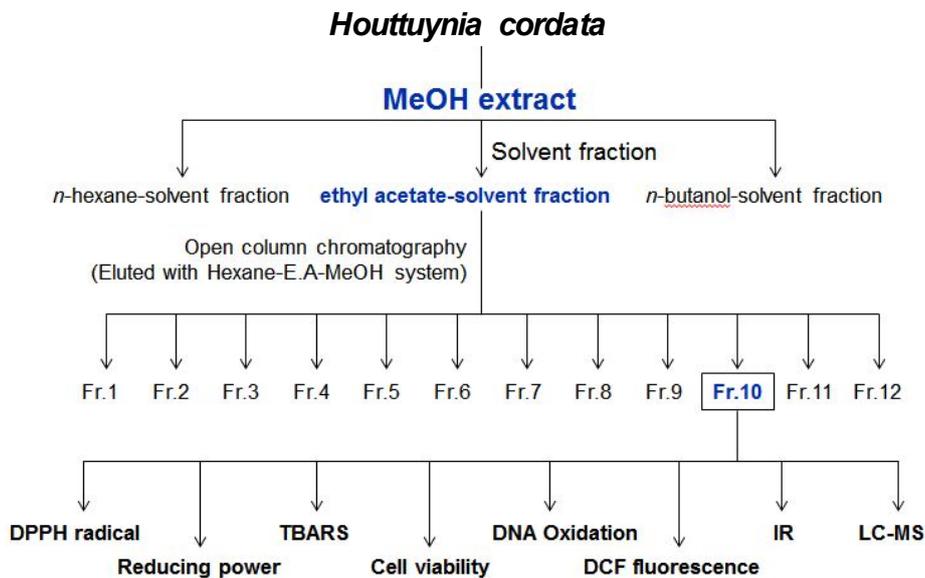


Fig. 1. Schematic diagram of extraction procedure and antioxidant activity test of *Houttuynia cordata*.

본 연구에 이용하였다.

MTT assay

Hansen [13]의 방법에 따라 B16F1 세포에 대한 Fr. 10의 세포독성을 MTT(3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

DPPH radical scavenging assay

Brand-Williams [16]의 방법을 변형시켜 DPPH radical에 대한 Fr. 10의 소거능력을 측정하였다. 최종 volume 500 μ l에서 농도가 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 μ g/ml가 되도록 하였고, 각 시료를 시험농도로 처리하고 잘 혼합한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화제로 잘 알려진 vit C 100 μ g/ml를 양성대조군으로 사용하여 비교하여 측정하였다.

Reducing power assay

Oyaizu [32] 6 μ l의 Fr. 10에 200 mM phosphate buffer (P.H 6.6) 200 μ l과 1% potassium ferricyanide 200 ml 순서로 넣고 교반을 하고 50°C에서 20분 방치한다. 여기에 10% TCA를 넣어 반응을 종결 시킨 뒤 3,000 RPM 10분 동안 원심분리를 한 후 얻은 상층 액 250 ml에 증류수 250 ml와 1% ferric chloride 넣고 교반을 한다. 이 과정을 거친 시료를 흡광도 620 nm으로 측정한다. 양성 대조군으로는 vit C 10 μ g/ml를 사용하여 비교하여 측정하였다.

In vitro 지질과산화에 대한 항산화 활성 측정

Fr. 10를 시험농도가 되게 linolenic acid emulsion과 30분 동안 혼합하여 방치한 후 3.2 mM FeSO₄ 및 6.6 mM H₂O₂를 혼합하여 60°C에서 1시간 동안 반응 시킨 후 10% TCA를 혼합하여 반응 종결을 시키고 상온에 원심분리 1200 xg 10분을 한 후 얻은 상등 액 200 μ l과 0.67% TBA 200 μ l을 넣고 100°C에서 10분 방치 후 540 nm으로 흡광도를 측정한다. 양성 대조군으로는 vit E 1,000 μ g/ml를 사용하여 비교하여 측정하였다.

DNA oxidation assay

Genomic DNA는 약간 변형된 표준과정에 따라 B16F1세포로부터 추출 하였다[37]. Fenton반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 노출된 DNA산화는 기존의 실험방법에 따라 수행하였다[30]. 먼저 4 μ l의 DNA 용액에 시험농도의 Fr. 10, 0.75 mM FeSO₄와 0.25 mM H₂O₂ 28 μ l, B16F1세포의 DNA 5 μ l를 첨가 하였다. 반응 혼합물을 10분 동안 상온에서 반응을 시킨 후 130 mM EDTA 4 μ l를 넣어 반응을 종결시킨다. 이후 16 μ l의 반응혼합물과 4 μ l loading buffer를 1% agarose gel에서 100 V로 30분 동안 전기영동을 하였다. 전기영동 한

것을 LAS3000[®] image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

DCF fluorescence assay

DMEM 배지에 DCFH-DA를 20 μ M 농도로 만들어준 다음 37°C에서 20분 방치를 해주면 DCFH-DA가 세포 내에 침투하게 된다. 여기에 Fr. 10를 처리 후 1시간 방치하였다. 그 후 H₂O₂ 500 μ M 농도로 만들어준 다음 HBSS 버퍼 100 μ l를 처리하였다. 세포 내에서 DCFH-DA와 반응 하여 H-DA가 떨어져 나가게 되며 DCF가 남게 된다. 이 DCF가 형광을 띄게 된다. 이를 한 시간마다 excitation: 488 nm, emission: 530 nm 조건으로 측정한 후 MTT처리하였다.

IR spectrum assay

Fr. 10의 정성분석을 위해 적외선분광기(FT-IR Spectrometer)는 분자에 적외선을 조사하여 진동과 회전 에너지를 흡수하는 같은 크기의 에너지가 흡수될 때 분자 spectrum을 이용하여 고체표면의 흡착물질을 감쇠 전반사(attenuated total reflection, ATR)측정법으로 분석하였다.

LC-MS spectrum assay

Fr. 10의 정성분석을 위해 액체 크로마토그래피 질량분석기(LC-MS)는 이온의 진행방향에 대한 변화를 이용해 Liquid Chromatography (LC)에서 분석된 시료를 연속해서 Mass Spectrometer (MS)로 보내어 각 peak의 물질에 대해 분석하였다. 이동상으로 acetonitrile과 1% formic 그리고 D.W를 사용하였고, instrument conditions으로 column temperature 30 °C, flow rate 1.000 ml/min, Pressure 441.7 bar, MSD instrument conditions으로 quad temperature 100 °C, gas temperature 300 °C, drying gas 13 l/min의 조건에서 7분간 측정하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료농도에 대한 유의 차 검정은 대조군과 비교하여 student's test 한 후 p<0.05 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

세포성장 미치는 Fr. 10의 효과

세포독성의 농도를 조사하기 위해 24시간 후에 MTT assay를 수행하였다. 시료의 세포독성을 측정된 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 양성대조군과 비교하였을 때 Fr. 10는 32 μ g/ml 이상에서 세포독성에 의해 생존율이 감소하였다.

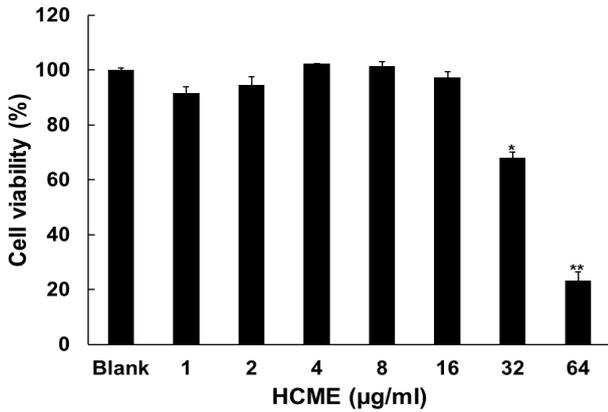


Fig. 2. Effect of Fr. 10 on viability of B16F1. The cells were treated with Fr. 10 at 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 µg/ml. Cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Reducing power에 의한 Fr. 10의 항산화 효과

Reducing power를 통해 Fr. 10의 ROS 제거 정도를 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 양성대조군으로 사용된 vit C (10 µg/ml)과 비교하였을 때 64 µg/ml의 농도에서 우수한 환원력을 나타냈다. 양성대조군은 138%의 환원력을 보였고, 32 µg/ml의 농도에서 140%로 양성대조군과 비슷한 결과를 보였고, 64 µg/ml의 농도에서는 264%로 양성대조군보다 뛰어난 환원력을 보였다.

DPPH radical 에 의한 Fr. 10의 항산화 효과

DPPH radical 소거법으로 항산화 물질에 의한 산화억제 정도를 예측해 자유라디칼의 소거 정도를 확인할 수 있다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 양성대조군과 비교하였을 때 1 µg/ml

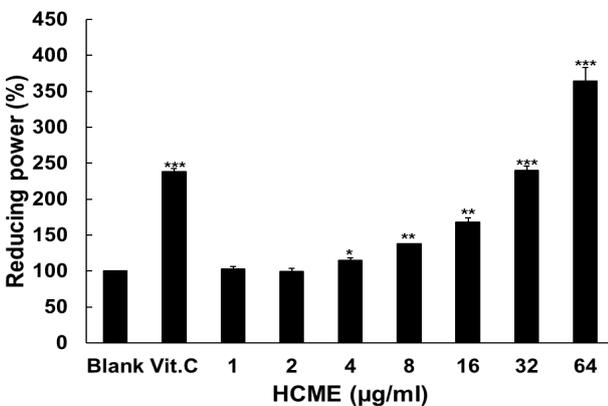


Fig. 3. Reducing power of Fr. 10. Vit C at 10 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

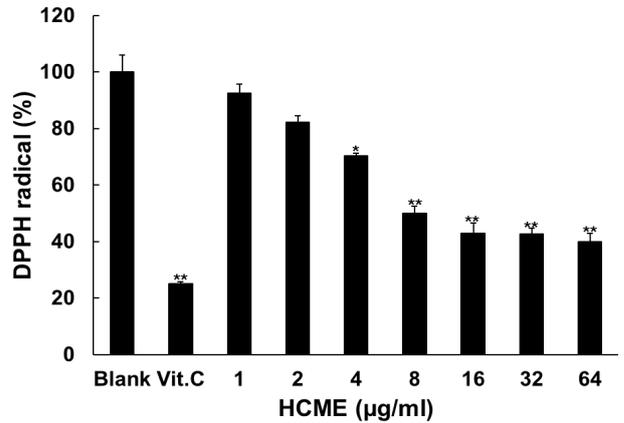


Fig. 4. Effect of Fr. 10 on scavenging activity of DPPH. Vit C was used as a positive control in this experiment. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments compared with control. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

부터 농도에 비례하여 DPPH radical에 대한 소거 능력이 나타났다. 양성대조군으로 사용된 vit C (100 µg/ml)이 75%의 억제능을 보였으며, 64 µg/ml 농도에서 양성대조군에 근접하는 60%의 억제능을 보였다.

Lipid peroxidation에 대한 Fr. 10의 항산화 효과

Fr. 10의 활성산소 억제능을 조사하기 위하여 TBARS 시험을 수행하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 양성대조군으로 사용된 vit E (1,000 µg/ml)는 약 30%의 억제능을 나타내고 1 µg/ml 이상의 농도에서 효능을 보였으며 32 µg/ml에서 양성대조군과 같은 값의 억제능이 나타난다.

DNA 산화억제에 대한 Fr. 10의 항산화 효과

Fenton reaction에 의해 생성되는 hydroxyl radical에 DNA

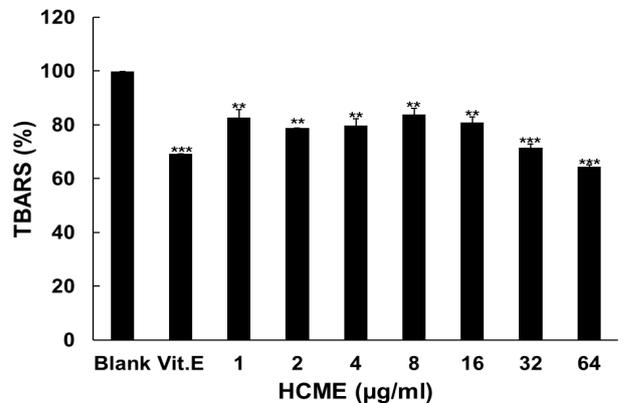


Fig. 5. Inhibitory effect of Fr. 10 on lipid peroxidation Vit E at 1,000 µg/ml was used as a positive control. Lipid peroxidation was determined by TBARS. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

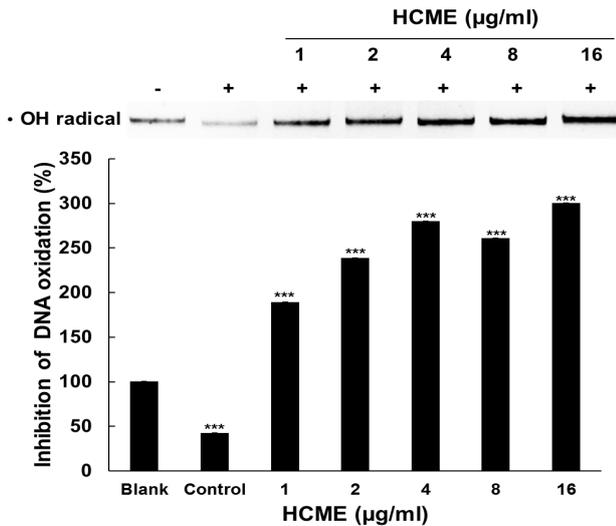


Fig. 6. Protective effect of Fr. 10 on DNA oxidative damage induced by hydroxyl radical. Genomic DNA purified from human dermal fibroblasts were pre-treated with Fr. 10 for 1 hr exposed to OH using Fenton reaction. (***, $p < 0.001$).

가 노출되면 분해가 일어나게 된다. Fr. 10의 DNA손상에 대한 항산화 효과를 조사하기 위해 B16F1 세포로부터 DNA를 분리하여 fenton reaction에 의하여 생성된 hydroxyl radical에 노출시켰다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 양성대조군과 비교하여 Fr. 10이 1 µg/ml 이상의 농도에서 DNA 분해가 억제되어 hydroxyl radical에 의한 DNA의 손상을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

DCF fluorescence에 대한 Fr. 10의 항산화 효과

DCFH-DA세포 내에서 H₂O₂와 반응하게 되면 DCF가 생성되면서 형광을 띄게 된다. Fr. 10이 H₂O₂를 얼마나 소거하는지를 확인해 보았다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 2 µg/ml 이상의 농도에서 산화 억제능이 나타났고, 64 µg/ml에서 약 74%의 산화 억제능이 나타났다. Fr. 10의 농도가 증가할수록 세포 내 과산화 수소를 억제하는 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

IR, LCMS spectrum에 대한 Fr. 10의 분석

항산화 효과가 가장 좋은 Fr. 10의 성분분석을 위해 IR과 LC-MS를 이용하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 IR을 이용하여 루틴(rutin)을 확인 할 수 있었고, Fig. 9에서 보는 바와 같이 LCMS를 이용하여 분자량이 610인 물질을 확인 할 수 있었다. rutin의 분자량이 610인 것으로 보아 항산화력이 가장 좋았던 Fr. 10의 성분은 rutin으로 판단할 수 있다.

고 찰

현대인들은 대사활동을 하는 산소와 다르게 매우 불안정한

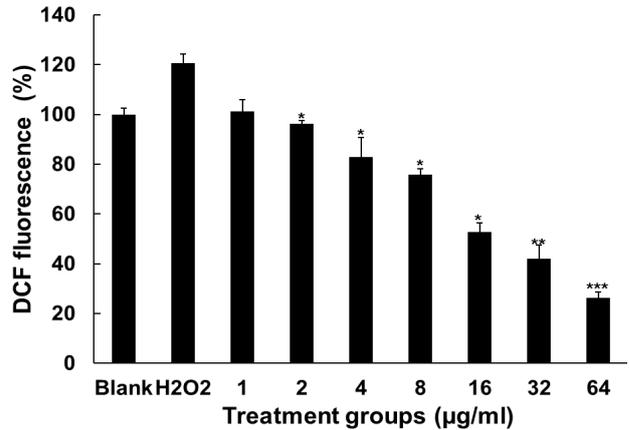
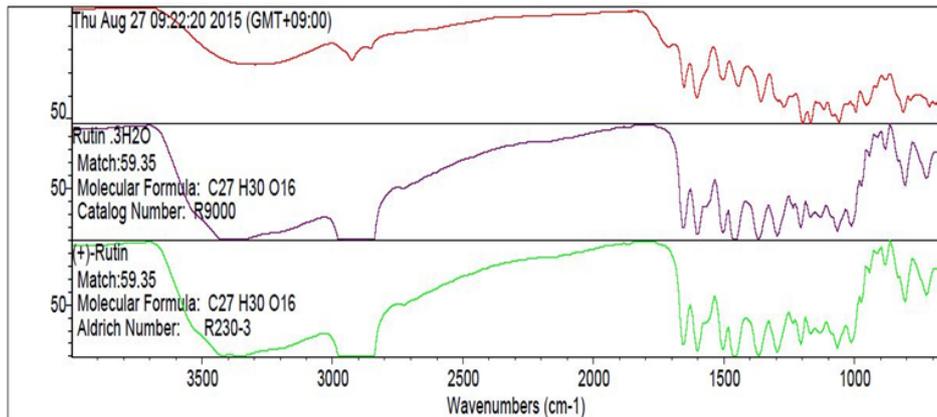


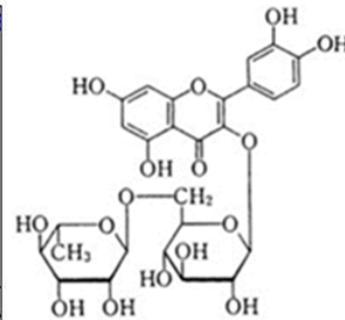
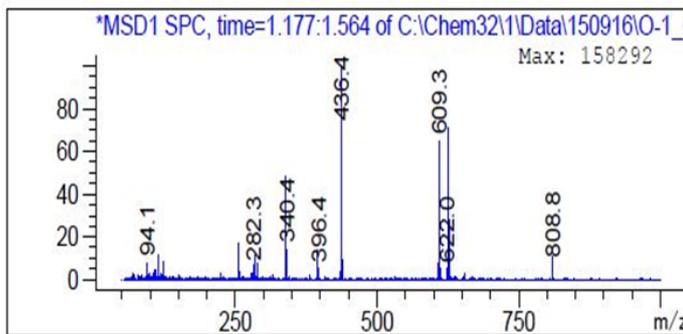
Fig. 7. Effect of Fr. 10 on the scavenging activity of intracellular hydrogen peroxide in B16F1 cells. After the cells were loaded with 500 µM DCFH-DA for 20 minutes, the cells were treated with Fr. 10 at 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 µg/ml, for 1 hr. Then, the cells were exposed to hydrogen peroxide at 500 µM. The fluorescence intensities were measured with 485 nm and 535 nm of excitation and emission frequencies, respectively. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

상태로 산화적 손상을 유발시키는 활성산소로부터 인체를 보호하기 위한 항산화력을 필요로 한다. 비정상적인 양의 ROS는 인체 내 세포들의 퇴화는 물론 각종 질병들의 요인이 되고 있다[1]. 많은 연구자들이 식품으로서 안전하고 항산화 물질이 풍부한 식품을 만들기 위한 천연식물을 다각적으로 발굴하고자 노력하고 있다. 따라서 본 연구에서는 어성초를 메탄을 추출하여 Fr. 10의 ROS에 대한 억제효과와 이러한 효과를 일으키는 생리활성물질에 관한 연구를 하였다. HCME에 대한 각각의 유기 용매 별 분획물들의 항산화력을 비교한 결과로 ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물의 결과 값이 비슷한 양상을 보였다. 이러한 양상은 Cho [6]의 어성초 추출물에 대한 DPPH의 자유라디칼 소거활성의 결과와 유사하였다. HCME의 항산화력을 나타내는 생리활성물질이 hexane 분획물에 비해 상대적으로 더 극성을 띄고 단일성분으로 볼 수 없다고 간주된다. ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물 중 더 뛰어난 항산화력을 나타낸 ethyl acetate 분획물로 칼럼 크로마토그래피를 통해 fraction을 나누어 각각의 항산화력을 비교하였다. 총 12개의 fraction 중 Fr. 9, 10, 11 그리고 12에서 양성대조군에 비해 항산화 효과가 크게 나타났다. Fr. 9의 전개용매는 ethyl acetate이고, Fr. 10, 11, 12는 ethyl acetate와 methanol의 10:1 비율이다. 따라서 항산화력을 나타내는 생리활성물질이 전개용매 hexane에 비해 상대적으로 더 극성을 띤다고 재차 확인할 수 있었다. fraction 중 가장 높은 항산화 효과를 보인 Fr. 10을 이용하여 자유라디칼의 소거 정도 분석, ROS 제거 정도 분석, 활성산소 억제능 분석, DNA손상에 대한 항산화 효과, DCFH-DA 보호능력 효과를 수행하였다. Fr. 10은 세포



Index	Match	Compound Name
1	4891	Rutin .3H2O
2	683	(+) -Rutin
3	352	Yacca / Accroides
4	9720	Protocatechuic aldehyde
5	774	3,4-Dihydroxybenzaldehyde, 97%
6	352	Yacca / Accroides
7	9692	Chrysin
8	8234	3,6-Bis(dimethylamino)-10-dodecylacridinium bromide
9	685	Troxeutin, 90+%
10	2034	11b,17a-Dihydroxy-6a-methyl-1,4-pregnadiene-3,20-dione

Fig. 8. IR spectrum of Fr. 10. IR spectrum was analyzed by the NICOLET iS10 of Thermo Scientific. Rutin was identify from the spectrum analysis.



Peak #2 at 1.334 min (1.179 to 1.564 min)

-> The analysis found 2 components, indicating an impure peak. <-

Component 1: Peak at Scan 81.2. Top ions are 625 626

Component 2: Peak at Scan 88.4. Top ions are 609 610

Fig. 9. LC-MS spectrum of Fr. 10. LC-MS spectrum was analyzed by the Agilent 6100 Series LC/MS of Agilent Technologies. Peak was confirmed that the molecular weight is 610.

독성이 있는 것으로 나타났다. Fr. 10에 대한 DPPH radical 소거 활성 결과로 Jeong 등[17]이 보고한 어성초 추출물의 항산화 및 신경세포 보호효과에 대한 결과에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical에 대한 소거능이 크게 증가하였다는 결과와 일치하였고, Kim 등[20]이 보고한 어성초의 추출물에 따른 항산화력 연구에서 추출에 사용되는 용매에 따라

DPPH radical 소거능이 다르다고 보고하였다. 앞서 연구된바 있는 reducing power에 대한 Fr. 10의 효과는 농도 의존적으로 나타났다. Jeong 등[17]이 보고한 어성초 추출물의 항산화 및 신경세포 보호효과에 대한 결과에서 FRAP (ferric reducing/antioxidant power) assay에 의해 평가된 환원력 또한 농도 의존적으로 효과가 나타났다고 보고되었다. Fr. 10에 대한 lip-

id peroxidation의 결과로 농도가 증가함에 따라 positive control인 vit E와 비슷한 활성산소 억제율이 나타남을 보였다. Kwon 등[25]이 보고한 바에 따르면 어성초 추출물이 ROS 생성을 억제해 과산화지질함량을 감소 시키는 것을 보아 간 기능 개선에 효과가 있을 것이라고 보고하였다. Jeong 등[17]은 지질과산화에 대한 항산화 활성 실험을 통해 신경세포 보호효과가 있다고 보고하였고, 퇴행성 신경질환 등을 예방하는 기능성 식품 소재로서의 가치가 높다고 보고하였다. 산화적 DNA손상 억제 능력에 대한 Fr. 10의 효과는 농도 의존적으로 나타났다. Hah 등[10]이 보고한 연구에서 농도가 증가할수록 산화적 DNA손상 억제 능력이 증가하였다는 결과와 일치하였고, TANG 등[40]의 어성초 추출물을 이용해 인체의 대장 선암 세포에서 산화적 DNA손상 억제 연구에서 또한 DNA손상 억제 능력이 높은 효과를 나타내고 항암효과에도 효능을 나타낸다고 보고하였다. DCFH-DA fluorescence에 대한 Fr. 10의 효과는 농도 의존적으로 나타났다. 또 다른 연구 결과로써, TANG 등[40]이 어성초 추출물을 이용해 인체의 대장 선암 세포에서 보고한 연구에서 시간의존적에 따라 활성산소 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소하게 된다는 결과를 보고하였다. Fr. 10의 항산화력을 나타내는 생리활성물질의 성분 분석을 위하여 FT-IR과 LC-MS를 이용하였다. IR을 이용한 성분 분석 결과 rutin이라는 물질을 발견했으며, LC-MS를 이용하여 분자량 610인 물질을 확인하였다. rutin의 분자량이 610인 것으로 보아 Fr. 10의 항산화력을 나타내는 생리활성 물질은 rutin으로 판단할 수 있다. 향후에는 기술적인 측면을 더 보완하여 Fr. 10과 비슷한 수치로 항산화 효능을 나타낸 Fr. 9, 11, 12의 생리활성 분석이 필요하다고 사료된다. rutin은 뛰어난 자유라디칼 소거능력과 세포 보호 효과 등이 있다고 보고되어 지고 있으며[34, 38], 출혈을 예방하는 작용이 있어 출혈성 질병 예방에 효과가 있고 항암 항균 물질의 비타민 P라는 것을 확인할 수 있었다[9, 15, 18]. 그러므로 HCME의 rutin 성분을 이용하여 ROS를 억제할 수 있고 뿐만 아니라 각종 화장품 및 기능성 식품 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2017학년도 동의대학교 교내연구비(2017028 50001)에 의해 연구되었음.

References

1. Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
2. Aruoma, O., Halliwell, B., Aeschbach, R. and Löliger, J. 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* **22**, 257-268.
3. Bull, C., Niederhoffer, E. C., Yoshida, T. and Fee, J. A. 1991. Kinetic studies of superoxide dismutases: properties of the manganese-containing protein from *Thermus thermophilus*. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4069-4076.
4. Chang, J. S., Chiang, L. C., Chen, C. C., Liu, L. T., Wang, K. C. and Lin, C. C. 2001. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *Am. J. Chin. Med.* **29**, 303-312.
5. Chen, W. T., Yang, C. L. and Yin, M. C. 2014. Protective effects from *Houttuynia cordata* aqueous extract against acetaminophen-induced liver injury. *Biomedicine* **4**, 24-28.
6. Cho, W. J. 2014. Study on physiological activities of *Houttuynia cordata* Thunb extract. Hoseo University.
7. Chung, C. K., Ham, S. S., Lee, S. Y., Oh, D. H., Choi, S. Y., Kang, I. J. and Nam, S. M. 1999. Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 205-211.
8. Cushnie, T. T. and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**, 343-356.
9. Frosch, P. J. and Kligman, A. M. 1979. The soap chamber test: a new method for assessing the irritancy of soaps. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1**, 35-41.
10. Hah, D. S., Kim, C. H., Ryu, J. D., Kim, E. K. and Kim, J. S. 2007. Evaluation of protective effects of *Houttuynia cordata* on H₂ O₂ -induced oxidative DNA damage using an alkaline comet assay in human HepG2 cells. *Toxicol. Res.* **23**, 25-31.
11. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1-8.
12. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1999. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford university press Oxford.
13. Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
14. Haumann, F. 1990. Antioxidants: Firms seeking products they can label as 'natural'. *International news on fats, oils and related materials (USA)*.
15. Im, J. H., Lee, Y. k. and Huh, K. M. 2008. Preparation and characterization of PEG-PLA (PLGA) micelles for solubilization of pioglitazone. *Polym. Kor.* **32**, 143-149.
16. Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* **60**, 417-420.
17. Jeong, H. R., Kwak, J. H., Kim, J. H., Choi, G. N., Jeong, C. H. and Heo, H. J. 2010. Antioxidant and neuronal cell protective effects of an extract of *Houttuynia cordata* Thunb (a culinary herb). *Kor. J. Food Preserv.* **17**, 720-726.
18. Jeong, K. H. and Kim, Y. J. 2006. Polymeric micelle using poly ((R)-3-hydroxybutyric acid)/poly (ethylene glycol) amphiphilic block copolymer for drug delivery system. *Polym. Kor.* **30**, 512-518.
19. Kennedy, C. H., Church, D. F., Winston, G. W. and Pryor, W. A. 1991. Antioxidant activity of flavonoids. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4069-4076.

- W. A. 1992. tert-Butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **12**, 381-387.
20. Kim, H. S., Kim, M. J., Cheong, C. and Kang, S. A. 2013. Antioxidant properties in water and 70% ethanol extracts of *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Kor. Acad. Industr. Coop. Soc.* **14**, 5091-5096.
 21. Kim, S. K., Ryu, S. Y., No, J., Choi, S. U. and Kim, Y. S. 2001. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharmacol. Res.* **24**, 518-521.
 22. Kim, Y. and Kim, S. U. 1991. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J. Neurosci. Res.* **29**, 100-106.
 23. Kim, Y. M., Jeong, H. J., Chung, H. S., Seong, J. H., Kim, H. S., Kim, D. S. and Lee, Y. G. 2016. Anti-oxidative activity of the extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. Fermented by lactic acid bacteria. *J. Life Sci.* **26**, 468-474.
 24. Kumar, M., Prasad, S. K., Krishnamurthy, S. and Hemalatha, S. 2014. Antihyperglycemic activity of *Houttuynia cordata* Thunb. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2014**.
 25. Kwon, R. H., Na, B. J., Park, S. J., Woo, W. H., Mun, Y. J. and Lee, M. S. 2007. Effect of *Houttuynia cordata* Thunb and herbs mixture extract on the antioxidation in the LPS-induced hepatotoxicity. *J. Kor. Orient. Med.* **21**, 1520-1524.
 26. Kyrtopoulos, S. 1988. N-nitroso compound formation in human gastric juice. *Cancer Surv.* **8**, 423-442.
 27. Lee, J., Jeong, S., You, I., Kim, S., Lee, K., Han, D. and Baek, S. 2001. The inhibitory effects of the methanol extract of *Houttuynia cordata* Thunb against cadmium induced cytotoxicity (V). *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 61-67.
 28. Lee, Y. J., Shin, D. H., Chang, Y. S. and Shin, J. I. 1993. Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **25**, 683-688.
 29. Li, G. Z., Chai, O. H., Lee, M. S., Han, E. H., Kim, H. T. and Song, C. H. 2005. Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1864-1868.
 30. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405-410.
 31. Ng, L. T., Yen, F. L., Liao, C. W. and Lin, C. C. 2007. Protective effect of *Houttuynia cordata* extract on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. Chin. Med.* **35**, 465-475.
 32. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr. Dia.* **44**, 307-315.
 33. Przyklenk, K. and Kloner, R. A. 1986. Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium". *Circul. Res.* **58**, 148-156.
 34. Rice Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.
 35. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P. and Deng, H.-X. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
 36. Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S. and Russo, G. L. 2012. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 6-15.
 37. Salo, T., Mäkelä, M., Kylmäniemi, M., Autio Harmainen, H. and Larjava, H. 1994. Expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 during early human wound healing. *Lab. Invest.* **70**, 176-182.
 38. Skibola, C. F. and Smith, M. T. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 375-383.
 39. Song, J. H., Kim, M. J., Park, I. H. and Kwon, H. D. 2003. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1053-1058.
 40. Tang, Y. J., Yang, J. S., Lin, C. F., Shyu, W. C., Tsuzuki, M., Lu, C. C., Chen, Y. F. and Lai, K. C. 2009. *Houttuynia cordata* Thunb extract induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Oncol. Rep.* **22**, 1051-1056.
 41. Warner, B. B. and Wispe, J. R. 1992. Free radical-mediated diseases in pediatrics. *Semin. Perinatol.* **16**, 47-57.
 42. Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **107**, 135.

초록 : 어성초 메탄올 추출물로부터 항산화 효능을 가진 활성물질의 확인김혜지^{1*} · 황희성^{1*} · 박수민¹ · 강성욱¹ · 김혜정¹ · 홍수경² · 김문무³ · 오영희^{3*}(¹동의대학교 화학과, ²동의대학교 화학생물학과, ³동의대학교 응용화학과)

본 연구는 어성초의 메탄올 추출물을 이용하여 항산화 효능이 가장 좋은 fraction을 찾고, 항산화 효능을 나타내는 성분을 분석하였다. 메탄올 추출에 의한 유기 용매 별 분획에서 항산화 효과가 가장 좋은 ethyl acetate 분획물을 칼럼 크로마토그래피하여 12가지의 fraction 중 가장 높은 항산화 효과를 보인 Fr. 10을 이용하여 DPPH 라디칼의 소거활성, 환원력, 지질과산화, 세포독성, DNA 산화 및 DCFH-DA를 이용한 세포내 과산화수소 제거효과를 조사하였다. DPPH radical scavenging activity, reducing power, TBARS, cell viability, DNA oxidation and DCF fluorescence 12가지의 fraction들 중 항산화 효능이 가장 좋은 Fr. 10의 DPPH radical 소거 활성 결과로 64 µg/ml 농도에서 양성대조군에 근접하는 60%의 억제능을 보였다. Reducing power 결과로 32 µg/ml의 농도에서 140%로 양성대조군과 비슷한 결과 값을 보였다. TBARS 결과로 2 µg/ml에서 양성대조군과 같은 값의 활성산소 억제능이 나타난다. 또한 cell viability 결과로 32 µg/ml 이상의 농도에서 세포 독성에 의해 생존율이 감소하였고, DCF fluorescence 결과로 농도의존적으로 H₂O₂에 의한 산화적 손상을 억제하는 것으로 나타났다. DNA oxidation 실험결과 1 µg/ml 이상의 농도에서 DNA의 손상을 감소시킴을 확인할 수 있었다. IR 및 LC-MS를 이용하여 Fr. 10의 유효성분을 조사한 결과 rutin (분자량, 610)으로 확인 되었다. 결론적으로 어성초의 메탄올 추출물로부터 분리한 Fr. 10은 농도 의존적으로 항산화 효능이 우수하게 나타났고, 어성초는 화장품 및 기능성 식품의 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.