

소리쟁이 추출물의 항산화 효능

임태진*, 최무영¹, 박희준²

상지대학교 동물생명자원학부 동물생명공학전공, ¹식품영양학과, ²제약공학과

Antioxidative Activity of *Rumex crispus* L. Extract

Tae-Jin Rhim*, Moo-Young Choi¹ and Hee-Juhn Park²

Department of Animal Biotechnology in Division of Animal and Life Resources,

¹Department of Food and Nutrition, ²Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract - The objective of this study was to investigate the antioxidative capacity of ethanol extracts from *Rumex crispus* L. The concentration of *R. crispus* L. extract at which DPPH radical scavenging activity was inhibited by 50% was 2.15 mg/mL, which was lower than that of α -tocopherol (0.43 mg/mL), as compared to 100% by pyrogallol as a reference. Total antioxidant status was examined by total antioxidant capacity against ABTS radical reactions. Total antioxidant capacities of *R. crispus* L. extract at concentrations of 0.1 and 1 mg/mL were 0.47 and 2.33 mM Trolox equivalents, respectively, which were higher than those of α -tocopherol. Superoxide scavenging activities of *R. crispus* L. extract at concentrations of 0.1 and 1 mg/mL were 21.5 and 78.9%, respectively, which were not significantly ($p > 0.05$) different from those of catechin. Oxygen radical absorbance capacities of *R. crispus* L. extract at concentrations of 20 and 100 μ g/mL were 62.5 and 156.4 μ M Trolox equivalents, respectively, which were lower than those of ascorbic acid. Cupric reducing antioxidant capacities of *R. crispus* L. extract at concentrations of 0.1 and 1 mg/mL were 0.28 and 1.88 mM Trolox equivalents, which were similar or significantly ($p < 0.05$) higher than those of α -tocopherol, respectively. *R. crispus* L. extract prevented supercoiled DNA strand breakage induced by hydroxyl radical and peroxy radical. Total phenolic contents of *R. crispus* L. extract at concentrations of 0.5 and 5 mg/mL were 0.58 and 3.85 mM gallic acid equivalents, respectively. *R. crispus* L. extract at concentration of 0.1 and 0.5 mg/mL inhibited 0.2 mM *tert*-butyl hydroperoxide-induced cytotoxicity by 38.5 and 63.5%, respectively, in HepG2 cell culture system. Thus, strong antioxidant and cytotoxicity-inhibiting effects of *R. crispus* L. extract seem to be due to, at least in part, the prevention from free radicals-induced oxidation as well as high levels in total phenolic contents.

Key words - *Rumex crispus* L., DPPH radical, ABTS radical, Superoxide, ORAC, CUPRAC, Supercoiled DNA breakage, Total phenolic content, Cytotoxicity

서 언

활성산소라고도 불리우는 반응산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡과정에서 체내에 유입된 산소가 산화과정에 이용되면서 여러 대사과정에서 생성되어 생체조직을 공격하고 세포를 손상시키며, 암, 동맥경화증, 당뇨병 등 많은 질병들이 ROS와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Halliwell *et al.*, 1992; Thannickal and Fanburg, 2000). 항산화제는 이러한 ROS를 제거시킴으로써 생체내

산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질을 방어하는 작용을 한다. 최근에는 페놀화합물과 같이 식물계에 널리 분포되어 있는 천연 항산화제의 중요성과 이에 관한 연구가 증대되고 있다.

소리쟁이(*Rumex crispus* L.)는 마디풀목 마디풀과에 속하는 여러해살이풀로써, 들 습지에서 잘 자라며, 급성간염, 기관지염, 창독 등에 효능이 있다고 알려져 있다(Bae, 2000). 소리쟁이의 유용성분으로는 사포닌, 탄닌, 플라보노이드, anthraquinone 등이 알려져 있고(Kim *et al.*, 1998; Günaydin *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2004),

*교신저자(E-mail) : tjrhim@sangji.ac.kr

항균(Yildirim *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2006), 항진균(Kim *et al.*, 2004), 항염증(Lee *et al.*, 2007) 활성 등이 보고된 바 있다. 소리쟁이 뿌리, 종자 또는 지상부 추출물은 butylated hydroxyanisole(BHA)이나 ascorbic acid와 유사한 DPPH 라디칼 소거활성(Jeong *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Maksimović *et al.*, 2011; Suh *et al.*, 2011)과 singlet oxygen 소거활성(Suh *et al.*, 2011)을 나타내었다고 보고된 바 있다. 또한, 소리쟁이 열매추출물의 지질과산화 억제 효과도 보고된 바 있다(Maksimović *et al.*, 2011).

이와 같이, 소리쟁이 추출물의 항균, 항염증 및 항산화 효과에 관해 보고된 바는 있으나, 다양한 자유라디칼에 대한 소거활성과 세포독성 억제효과에 관한 연구 결과는 거의 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 소리쟁이 추출물의 자유라디칼 소거, 총페놀 함량 및 세포독성 억제 등 항산화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Fetal bovine serum(FBS)은 Lonza(Walkersville, MD, USA)로부터 구입하였고, pBR322 DNA는 KOSCHEM(Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, GelRed nucleic acid gel stain은 Biotium(Hayward, CA, USA)으로부터 구입하였다. 항산화 활성 분석과 세포배양에 사용한 다른 모든 시약들은 분석급 이상으로 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, HPLC 분석에 사용한 CH₃CN, methanol, trifluoroacetic acid는 모두 HPLC급으로 Avantor Performance Materials(Center Valley, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

소리쟁이 추출물

소리쟁이는 경상북도 경산시에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 건조된 시료 500 g을 마쇄하여, 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 round flask에 넣고 450 mL의 95% 에탄올을 첨가하여 혼합한 후, heating mantal(E105, Minsung Scientific Co., Seoul, Korea)로 80°C에서 4시간 강열 환류 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 추출액을 Whatman No.2 여과지로 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 용액은 감압농축기(Eyela N-1 NW, Tokyo

Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 45°C에서 감압 농축시켰으며, 동결건조 후 72.5 g의 추출물을 회수하였다. 소리쟁이 추출물은 분석시까지 -80°C에서 보관하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 Malterud *et al.*(1993)의 방법에 따라 측정하였다. DPPH 용액(45 µg/mL methanol)을 추출물과 혼합한 다음 515 nm에서 흡광도의 감소를 30초 간격으로 5분간 측정하였다. 흡광도는 GENESYS 10S spectrophotometer(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. DPPH 소거활성은 pyrogallol 용액(125 µg/mL DMSO)의 흡광도 감소를 100%로 기준하여 표기하였다. 또한, 양성 대조군으로 α-tocopherol을 사용하여 DPPH 소거활성을 비교 조사하였다.

Total antioxidant capacity(TAC) 측정

총항산화능(total antioxidant status)은 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) 방법을 수정한 Erel(2004)의 방법에 따라 TAC를 측정하였다. 추출물에 0.35 M acetate 완충용액과 0.89 mM 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS) 용액 및 0.44 mM H₂O₂ 용액 등을 첨가하고 혼합한 뒤 5분 후에 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였고, TAC 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다. 또한, 양성 대조군으로 α-tocopherol을 사용하여 TAC를 비교 조사하였다.

Superoxide 소거활성 측정

Superoxide 소거활성은 Liu *et al.*(1997)의 방법에 따라 측정하였다. 추출물에 62 µM nitro blue tetrazolium (NBT)과 98 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0)을 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액과 33 µM phenazine methosulfate (PMS)를 각각 첨가하였다. 즉, 비효소적으로 PMS/NADH로 유발된 superoxide는 NBT를 자주색의 formazan으로 환원시키며, 생성된 formazan을 측정하기 위해 560 nm에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 추출물의 superoxide 소거활성(%)은 $[(\text{흡광도}_{\text{추출물무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{추출물}}) / \text{흡광도}_{\text{추출물무첨가}}] \times 100$ 의 공식으로 계산하였다. 또한, 양성

대조군으로 catechin을 사용하여 superoxide 소거활성을 비교 조사하였다.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

ORAC는 Huang *et al.*(2002)의 방법에 따라 추출물에 6×10^{-5} mM fluorescein 용액을 첨가하고 37°C에서 10분간 가열한 다음, 19 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH) 용액을 첨가한 뒤, GEMINI XS fluorescence microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 2분 간격으로 60분간 형광도를 측정하였다. 표준시약으로 Trolox를 사용하였으며, 표준시약과 추출물의 area under the curve(AUC)를 측정하였다. ORAC는 표준시약 농도와 AUC 간의 회귀곡선을 이용하여 μM Trolox equivalent로 표기하였다. 또한, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하여 ORAC를 비교 조사하였다.

Cupric reducing antioxidant capacity(CUPRAC) 측정

CUPRAC는 Apak *et al.*(2004)의 방법에 따라 측정하였다. 추출물에 2.44 mM cupric chloride 용액과 1.83 mM neocuproine 및 0.24 M ammonium acetate 완충용액(pH 7.0) 등을 첨가하고 혼합한 뒤, 실온에서 1시간 방치한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였고, CUPRAC 활성은 mM Trolox equivalent로 표기하였다. 또한, 양성 대조군으로 α -tocopherol을 사용하여 CUPRAC를 비교 조사하였다.

Supercoiled DNA Strand 절단

- ① Hydroxyl radical에 의한 DNA strand 절단은 Hiramoto *et al.*(1996)의 방법에 따라 측정하였다. Supercoiled pBR322 DNA 0.2 μg 에 추출물을 넣고 0.1 mM H_2O_2 용액과 0.1 mM FeSO_4 용액을 함께 37°C에서 1시간 배양하였다. 양성 대조군으로 sesamol을 사용하였다.
- ② Peroxyl radical에 의한 DNA strand 절단은 Hu *et al.*(2000)의 방법에 따라 측정하였다. Supercoiled pBR322 DNA 0.2 μg 에 추출물을 넣고 5 mM AAPH와 함께 37°C에서 2시간 배양하였다. 양성 대조군으로

Trolox를 사용하였다.

배양이 끝난 다음, gel loading buffer를 첨가하고, 0.01% GelRed nucleic acid stain이 포함된 0.8% agarose에서 전기영동을 실시하였다. 자외선 하에서 사진을 촬영한 후, DNA band의 density는 Image J 1.44 program(NIH, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 측정하였으며, 소리쟁이 추출물의 supercoiled DNA strand 절단 억제효과는 supercoiled DNA strand의 retention percent를 측정함으로써 조사하였다. Retention percent는 $(A_{\text{sample}}/A_{\text{native}}) \times 100$ 의 공식으로 계산하였으며, A_{sample} 은 라디칼과 추출물 처리시의 supercoiled DNA strand의 amount를 나타내며, A_{native} 는 라디칼과 추출물 무처리시의 supercoiled DNA strand의 amount를 나타낸다.

총페놀 함량(total phenolic content) 측정

추출물내 총페놀 함량은 Singleton and Orthofer(1999)의 방법에 따라 추출물에 0.08 N Folin-Ciocalteu 시약을 첨가하고 실온에서 6분간 방치한 다음, 3% Na_2CO_3 용액을 첨가하고 90분간 방치한 뒤, 760 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 표준시약으로 gallic acid를 사용하여 표준곡선을 작성하였고, 총페놀 함량은 mM gallic acid equivalent로 표기하였다.

세포독성 억제효과 측정

소리쟁이 추출물의 세포독성 억제 효과를 조사하기 위해, *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP)로 유도된 HepG2 세포배양실험에서 추출물 첨가에 의한 세포 생존율을 측정하였다. HepG2 세포(KCLB No. 88065)는 한국세포주은행으로부터 구입하였다. HepG2 세포를 10% FBS와 100 U/mL penicillin 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하여 5×10^4 cells/well이 되도록 24-well plate(SPL, Pocheon, Korea)에 분주하고 37°C, 5% CO_2 incubator(NAPCO 6001, Precision Scientific Inc., Chicago, IL, USA)에서 배양하였다. 100% confluent에 도달한 후 *t*-BHP(0.2 mM) 또는 소리쟁이 추출물이 포함된 배지로 교체하고 5시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 세포 단층에 Mosmann(1983)의 방법에 따라 thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT) 시약(5 mg/mL)을 첨가하고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 3시간 배양한 후 0.04 M HCl 용액을 첨가한 뒤 570 nm에서 흡광도를

측정함으로써 MTT 값을 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 MTT 값을 100%로 기준하여 처리군의 MTT 값으로 표기하였다.

HPLC 분석

표준 화합물과 추출물을 각각 메탄올에 녹이고, 0.50 µm syringe filter로 여과한 후, Prostar 210 solvent delivery module, Prostar 325 UV-Vis detector로 구성된 HPLC system(Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA)에 주입하였다. HPLC용 컬럼은 Shiseido(Tokyo, Japan) Capcell Pak C18 컬럼(5 µm, 250 mm×4.6 mm i.d.)이었다. 이동상 용매로 A 용매는 0.05% trifluoroacetic acid(TFA) 용액을 사용하였고, B 용매는 MeOH-CH₃CN(60:40)을 포함한 0.05% TFA 용액을 사용하였으며, 이동상의 흐름속도는 1.0 mL/min이었고, 용리구배 조건은 다음과 같다(0 min, 85% A:15% B; 0-35 min, 35% A:65% B; 35-42 min, 0% A:100% B; 42-49 min, 85% A:15% B). 자외선 흡광도는 고정 파장 254 nm에서 40분 동안 측정하였다. 표준액으로부터 각각의 peak 면적을 얻어 표준 검량선의 회귀방정식을 작성하였다. 추출물(1 mg/mL)을 주입하여 chromatogram의 peak를 얻고, 각 표준 화합물의 회귀방정식을 이용하여 농도를 측정함으로써, 추출물중 표준 화합물의 함량을 측정하였다.

통계 분석

추출물 농도별 항산화 활성은 일원 분산분석을 사용하여 조사하였고, 농도별 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test(Steel and Torrie, 1980)를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다. 또한, 추출물과 양성대조군의 항산화 효능 비교는 대응표본 T-검정을 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거활성

소리쟁이 추출물의 농도별 DPPH 라디칼 소거활성은 Fig. 1에 나타나 있다. Pyrogallol의 억제율을 100%로 기준하였을 때 소리쟁이 추출물의 0.01 mg/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거활성은 2.2%이었고, 추출물 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여, 0.1, 0.5, 1, 2.5 및 5

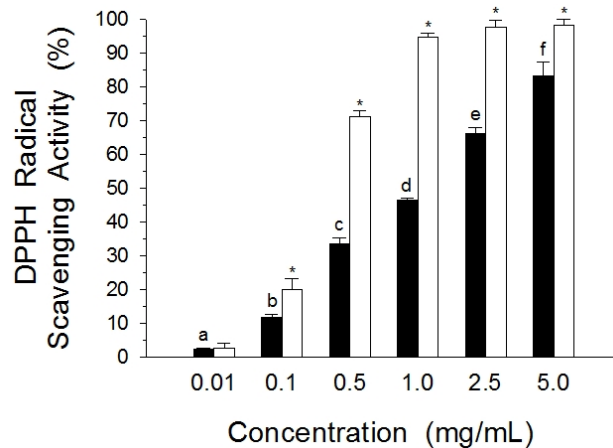


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of *R. crispus* L. extracts. Data results were expressed as % radical scavenging activity relative to 100% radical scavenging activity of pyrogallol solution as a reference. Each bar represents the mean ± SD of quadruplicate determinations. ■: extract, □: α-tocopherol (positive control).^{abcdef} Values with different letters are significantly different at p<0.05. *p<0.05 when compared with the extract within same group.

mg/mL 농도의 추출물은 각각 11.9, 33.4, 46.5, 66.3 및 83.3%의 소거활성을 나타내었다. 반면에, 양성대조군으로 사용한 α-tocopherol의 DPPH 라디칼 소거활성은 0.1, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서 각각 20.0, 71.1 및 94.6%로 나타나, 소리쟁이 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성이 α-tocopherol의 약 절반임을 알 수 있었다. 또한, 추출물 농도와 DPPH 라디칼 소거활성 간의 회귀분석 결과, 50%의 라디칼 소거활성에 필요한 소리쟁이 추출물의 농도(IC₅₀)는 2.15 mg/mL로 나타난 반면, α-tocopherol의 DPPH IC₅₀는 0.43 mg/mL로 나타나, 소리쟁이 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성이 α-tocopherol에 비해 낮음을 알 수 있었다. 소리쟁이의 DPPH 라디칼 소거활성은 부위 및 추출 용매별로 상이하게 보고되고 있다. 소리쟁이 뿌리 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 BHA 활성의 1/3이라고 보고된 바 있으나(Kim *et al.*, 2010), 종자 또는 지상부 에틸아세테이트추출물 및 열매 메탄올추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 BHA와 유사하게 나타났다고 보고된 바 있다(Jeong *et al.*, 2006; Maksimović *et al.*, 2011; Suh *et al.*, 2011).

TAC

총항산화능은 Trolox를 표준물질로 사용하여 ABTS 라디칼에 대한 소거활성을 흡광도로 측정하였으며, 소리쟁이 추출물의 농도별 TAC는 Fig. 2에 나타나 있다. 소리쟁이 추출물 0.01 mg/mL 농도의 TAC는 0.14 mM Trolox equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 TAC도 비례적으로 증가하여, 0.1, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서는 각각 0.47, 1.33 및 2.33 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 반면에, 양성대조군으로 사용한 α -tocopherol의 TAC는 0.01, 0.1, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서 각각 0.11, 0.29, 0.83 및 1.49 mM Trolox equivalent로 측정되었다. 모든 농도에서 소리쟁이 추출물의 총항산화능이 α -tocopherol에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높게 관찰되어, 소리쟁이 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성이 α -tocopherol에 비해 탁월함을 알 수 있었다.

Superoxide 소거활성

Superoxide 소거활성은 추출물 무침가군의 흡광도 변화를 100%로 기준하여, 추출물 첨가군의 흡광도 변화를 superoxide 생성 억제율로 표시하였다. 소리쟁이 추출물의 농도별 superoxide 소거활성은 Fig. 3에 나타나 있다. 소리쟁이 추출물 0.01 mg/mL 농도의 superoxide 소거활성은 3.1%

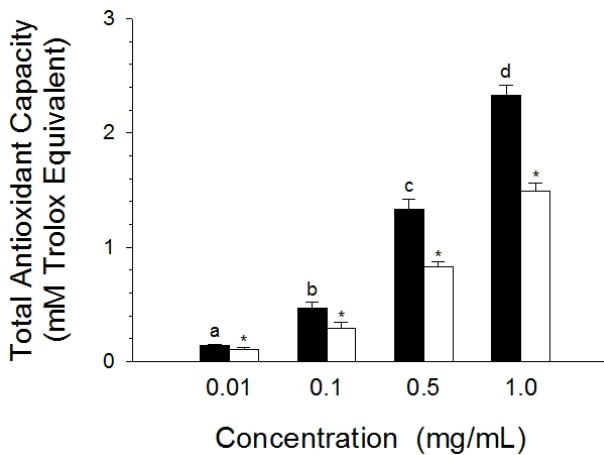


Fig. 2. Total antioxidant capacity of *R. crispus* L. extracts. Data results were expressed as in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean \pm SD of quadruplicate determinations. ■: extract, □: α -tocopherol (positive control). ^{abcd}Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. * $p < 0.05$ when compared with the extract within same group.

이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 소거활성도 증가하여, 0.1, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서 superoxide 소거활성은 각각 21.5, 61.1 및 78.9%로 나타났다. 반면에, 양성대조군으로 사용한 catechin의 superoxide 소거활성은 0.01, 0.1, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서 각각 1.8, 22.3, 60.8 및 80.4%로 측정되었다. 모든 농도에서 소리쟁이 추출물과 catechin 간의 superoxide 소거활성에는 유의적인($p > 0.05$) 차이가 관찰되지 않아, 소리쟁이 추출물의 superoxide 소거활성이 catechin의 활성과 유사함을 알 수 있었다.

ORAC

ORAC는 자유라디칼 손상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 항산화능으로, Trolox를 표준물질로 사용하여 AAPH에 의해 생성된 peroxy 라디칼에 대한 소거활성을 나타낸다. 소리쟁이 추출물의 농도별 ORAC는 Fig. 4에 나타나 있다. 10 μ g/mL 농도에서 소리쟁이 추출물의 ORAC는 38.2 μ M Trolox equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 ORAC도 증가하여, 20, 50 및 100 μ g/mL 농도의 소리쟁이 추출물의 ORAC는 각각 62.5, 112.2 및 156.4 μ M Trolox equivalent로 나타났다. 반면에, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid의 ORAC는 10, 20, 50 및 100 μ g/mL 농도에서 각각 39.9, 87.8, 151.1 및 160.6 μ M Trolox equivalent로 측정되었다. 10 μ g/mL 농도를 제외

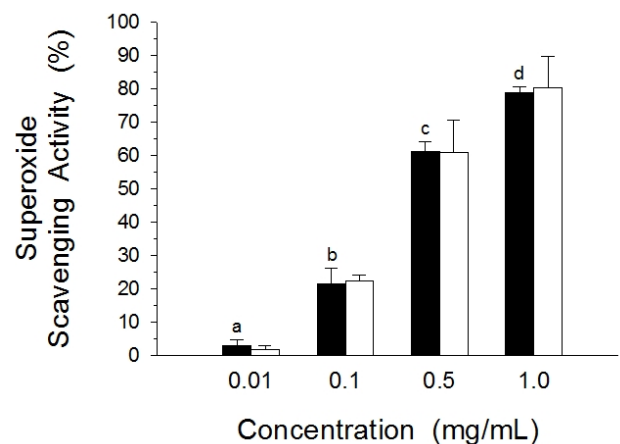


Fig. 3. Superoxide radical scavenging activities of *R. crispus* L. extracts. Data results were expressed as % inhibition of the activity. Each bar represents the mean \pm SD of quadruplicate determinations. ■: extract, □: catechin (positive control). ^{abcd}Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

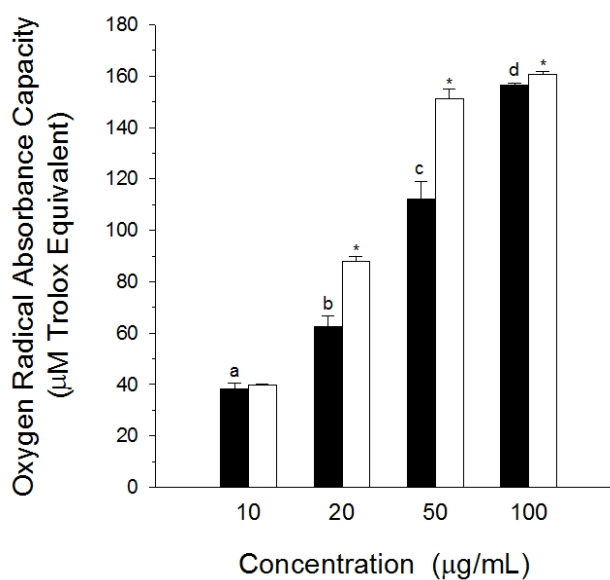


Fig. 4. Oxygen radical absorbance capacity of *R. crispus* L. extracts. Data results were expressed as in terms of μ M Trolox equivalent. Each bar represents the mean \pm SD of triplicate determinations. ■: extract, □: ascorbic acid (positive control). ^{abcd}Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. * $p < 0.05$ when compared with the extract within same group.

한 모든 농도에서 소리쟁이 추출물의 ORAC가 ascorbic acid에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 낮게 관찰되어, 소리쟁이 추출물의 peroxy 라디칼 소거활성이 ascorbic acid에 비해 낮음을 알 수 있었다.

CUPRAC

CUPRAC는 Trolox를 표준물질로 사용하여 구리이온 환원력의 활성을 흡광도로 측정하였으며, 소리쟁이 추출물의 농도별 CUPRAC는 Fig. 5에 나타나 있다. 소리쟁이 추출물 0.05 mg/mL 농도의 CUPRAC는 0.12 mM Trolox equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 CUPRAC도 비례적으로 증가하여, 0.1, 0.2, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서는 각각 0.28, 0.51, 1.24 및 1.88 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 반면에, 양성대조군으로 사용한 α -tocopherol의 CUPRAC는 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서 각각 0.13, 0.25, 0.48, 1.08 및 1.67 mM Trolox equivalent로 측정되었다. 저농도에서는 유의적 차이가 관찰되지 않았지만, 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 소리쟁이 추출물의 CUPRAC가 α -tocopherol에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 약간 높게 관찰되어, 소리쟁이 추출물의 구리이온 환원력이

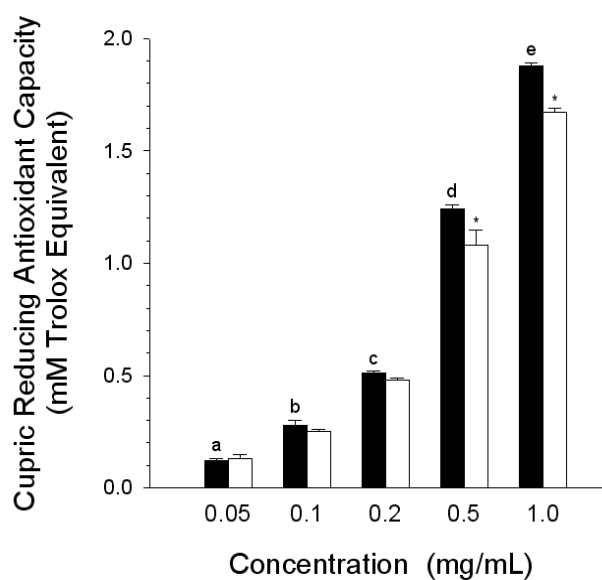


Fig. 5. Cupric reducing antioxidant capacity of *R. crispus* L. extracts. Data results were expressed as in terms of mM Trolox equivalent. Each bar represents the mean \pm SD of triplicate determinations. ■: extract, □: α -tocopherol (positive control). ^{abcde}Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. * $p < 0.05$ when compared with the extract within same group.

우수함을 알 수 있었다.

Supercoiled DNA Strand 절단 억제효과

DNA 전기영동을 이용하여 소리쟁이 추출물 농도별 hydroxyl 라디칼 및 peroxy 라디칼에 의해 유도된 DNA strand 절단에 미치는 효과는 Fig. 6과 Table 1에 나타나 있다. Fenton 시약인 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 처리에 의해 생성되는 hydroxyl 라디칼 존재하에, pBR322 DNA의 supercoiled form은 nicked open circular form 및 linear form으로 전환되었다(lane 1 vs 2, Fig. 6A). Hydroxyl 라디칼 존재하에 plasmid DNA를 소리쟁이 추출물과 함께 배양하였을 때, 0.001 mg/mL 농도의 추출물 첨가는 supercoiled DNA strand 절단에 영향을 주지 않았다(lane 2 vs 3, Fig. 6A). 그러나, 추출물 농도가 증가함에 따라 nicked open circular form은 감소한 반면 supercoiled form은 증가하여, 0.01 및 0.05 mg/mL 농도에서 supercoiled DNA strand의 retention percent는 각각 29.2 및 39.5%로 나타났다. 특히, 0.1 mg/mL 농도의 소리쟁이 추출물과 양성대조군으로 사용한 동일한 농도의 sesamol 간에 hydroxyl 라디칼에 대한 supercoiled DNA strand의 retention percent(82.9 vs

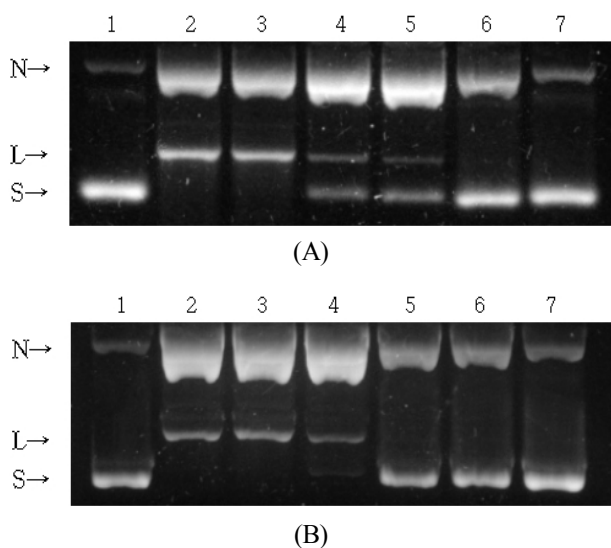


Fig. 6. Electrophoresis of pBR322 DNA treated with hydroxyl radical and peroxy radical in the presence of *R. crispus* L. extracts. (A) hydroxyl radical was generated by 0.1 mM H₂O₂ and 0.1 mM FeSO₄; (B) peroxy radical was generated by 5 mM AAPH. Lane 1, DNA alone; Lane 2, DNA+radical; Lane 3, DNA+radical+0.001 mg/mL extracts; Lane 4, DNA+radical+0.01 mg/mL extracts; Lane 5, DNA+radical+0.05 mg/mL extracts; Lane 6, DNA+radical+0.1 mg/mL extracts; Lane 7, DNA+radical+0.1 mg/mL sesamol (A) or 0.01 mg/mL Trolox (B). N, nicked open circular form; L, linear form; S, supercoiled form.

Table 1. Retention percent of supercoiled DNA strand with the addition of *R. crispus* L. extracts in hydroxyl radical- and peroxy radical-induced pBR322 plasmid DNA breakage

Extract (mg/mL)	Retention percent	
	Hydroxyl radical	Peroxy radical
0.01	29.2 ± 5.7 ^a	9.9 ± 0.4 ^a
0.05	39.5 ± 14.0 ^a	66.0 ± 11.1 ^b
0.1	82.9 ± 2.9 ^b	82.4 ± 6.1 ^c
Positive Control ^Z	94.2 ± 1.9 ^b	96.5 ± 0.7 ^d

Supercoiled pBR322 DNA were treated with hydroxyl radical and peroxy radical in the presence of *R. crispus* L. extracts. Retention percent of supercoiled DNA strand was calculated as described in Materials and Methods. The values are means±SD of triplicate determinations.

^Z0.1 mg/mL sesamol for hydroxyl radical- and 0.01 mg/mL Trolox for peroxy radical-induced supercoiled DNA strand breakage. ^{abcd}Values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

94.2%)에는 유의적(p>0.05) 차이가 발견되지 않았다(lane 6 vs 7, Fig. 6A). AAPH 처리에 의해 생성되는 peroxy 라디칼 존재하에, pBR322 DNA의 supercoiled form은 nicked open circular form 및 linear form으로 전환되었다 (lane 1 vs 2, Fig. 6B). Peroxy 라디칼 존재하에 plasmid DNA를 소리쟁이 추출물과 함께 배양하였을 때, 0.001 mg/mL 농도의 추출물 첨가는 supercoiled DNA strand 절단에 영향을 주지 않았으며(lane 2 vs 3, Fig. 6A), 0.01 mg/mL 농도에서도 supercoiled DNA strand의 retention percent는 9.9%에 지나지 않았다. 그러나, hydroxyl 라디칼의 경우와는 달리, peroxy 라디칼 존재하에 0.05 mg/mL 농도의 추출물 첨가시 peroxy 라디칼에 의한 supercoiled DNA strand의 retention percent는 66.0%(vs 39.5%)로 높게 나타났다(lane 5, Fig. 6A vs lane 5, Fig. 6B). 추출물 농도가 증가함에 따라 nicked open circular form은 감소한 반면 supercoiled form은 증가하여, 0.1 mg/mL 농도의 추출물 첨가시 supercoiled DNA strand의 retention percent는 82.4%로 나타났지만, 양성대조군으로 사용된 0.01 mg/mL 농도의 Trolox(96.5%)에 비해서는 supercoiled DNA 절단 효과가 낮게 관찰되었다(lane 6 vs 7, Fig. 6B).

총페놀 함량

소리쟁이 추출물의 농도별 총페놀 함량은 Fig. 7에 나타

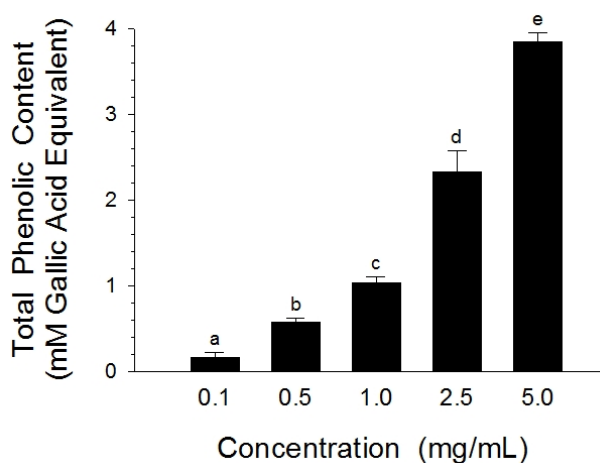


Fig. 7. Total phenolic content of *R. crispus* L. extracts. Data results were expressed as in terms of mM gallic acid equivalent. Each bar represents the mean ± SD of quadruplicate determinations. ^{abcde}Values with different letters are significantly different at p<0.05.

나 있다. 소리쟁이 추출물 0.1 mg/mL 농도의 총페놀 함량은 0.17 mM gallic acid equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총페놀 함량도 비례적으로 증가하여, 0.5, 1, 2.5 및 5 mg/mL 농도에서 각각 0.58, 1.04, 2.33 및 3.85 mM gallic acid equivalent로 나타났다. 항산화 활성이 높다고 알려진 개머루덩굴과 만병초의 1 mg/mL 농도에서 총페놀 함량이 각각 1.12와 1.25 mM gallic acid equivalent로 보고된 바 있어(Rhim and Choi, 2010, 2011), 소리쟁이 추출물의 총페놀 함량이 높음을 알 수 있었다.

세포독성 억제 효과

소리쟁이 추출물의 농도별 세포독성 억제 효과는 Fig. 8에 나타나 있다. 세포 생존율은 대조군(t-BHP 무첨가군)

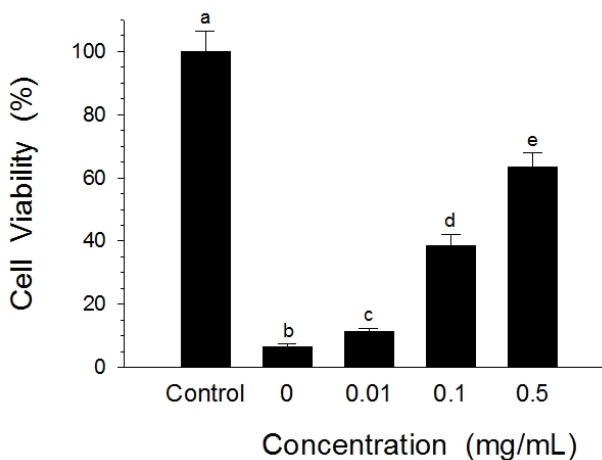


Fig. 8. The effect of *R. crispus* L. extracts on HepG2 cell viability. HepG2 cells were cultured for 5 h in the presence of 0.2 mM t-BHP and *R. crispus* L. extracts. Cell viability was determined using MTT method. Each bar represents the mean±SD of triplicate determinations. ^{abcde}Values with different letters are significantly different at p<0.05.

의 MTT값을 100%로 기준하여 표기하였다. HepG2 세포에 0.2 mM 농도의 t-BHP를 첨가한 뒤 5시간 배양한 결과, 세포 생존율은 6.6%로 나타나, t-BHP가 HepG2 세포 독성을 유발하였음을 알 수 있었다. HepG2 세포배양에서 0.2 mM 농도의 t-BHP 존재하에 소리쟁이 추출물 0.01 mg/mL 농도의 첨가는 11.2%의 생존율을 나타내었다. 추출물 농도가 증가함에 따라 세포 생존율도 유의적으로 (p<0.05) 증가하여, 0.1 및 0.5 mg/mL 농도에서 각각 38.5 및 63.5%로 나타났다. 본 연구에서 관찰된 소리쟁이의 간세포 독성 억제 효과는 생쥐에 소리쟁이 종자 메탄을 추출물 투여시 간독성이 억제되었다는 기존 연구결과(Lee et al., 2007)와도 일치하고 있다.

HPLC 분석

분석에 사용된 5종의 표준 화합물의 retention time, 표준 검량선의 회귀방정식 및 R² value는 Table 2에 나타나 있다. Gallic acid, catechin, quercitrin, quercetin 및 kaempferol의 linear range는 각각 3.13~100, 6.88~220, 1.56~50, 1.88~60 및 1.56~50 µg/mL이었고, detection limit은 각각 0.24, 1.51, 0.12, 0.08 및 0.13 µg/mL이었다(data not shown). 소리쟁이 추출물의 HPLC 분석 결과는 Table 3에 나타나 있다. Catechin의 함량이 32.1 mg/g으로 가장 높게 나타난 반면, gallic acid, kaempferol, quercitrin, quercetin 등은 1 mg/g 이하로 측정되어, 이들의 함량이 낮은 것으로 나타났다.

따라서, 본 연구 결과들은 소리쟁이 추출물의 강력한 항산화 효과와 세포독성 억제 효과를 나타내 보이고 있으며, 이러한 효능들은 적어도 자유라디칼의 산화 억제와 높은 총페놀 함량에 기인하는 것으로 사료된다. 또한, 향후 소리쟁이 추출물의 항산화 성분 분석과 동정 및 항산화 기전

Table 2. Retention time and calibration equation of standard phenolic compounds used for HPLC analysis

Compound	Retention time (min)	Calibration equation (linear model) ^Z	R ^{2Y}
Gallic acid	4.01	Y=243.27X+46.54	0.9997
Catechin	7.68	Y=28.78X+61.55	0.9995
Quercitrin	19.27	Y=458.11X+62.59	0.9998
Quercetin	24.63	Y=659.28X+87.33	0.9999
Kaempferol	28.70	Y=456.72X+56.83	0.9998

^ZY, peak area at 254 nm; X, concentration of the standard (µg/mL).

^YR², correlation coefficient for 6 data points in the calibration curves (n=3).

Table 3. Content of poly phenolic compounds in *R. crispus* L. extracts

Compound	Content (mg/g extract) ^z
Gallic acid	0.86 ± 0.023
Catechin	32.10 ± 0.189
Quercitrin	0.22 ± 0.007
Quercetin	0.10 ± 0.004
Kaempferol	0.31 ± 0.007

^zThe values are means±SD of triplicate determinations.

연구와 더불어 소리쟁이 추출물의 천연 항산화제로의 개발 가능성을 시사하고 있다.

적 요

본 연구에서는 소리쟁이 에탄올추출물의 항산화 효과를 조사하였다. Pyrogallol의 억제율을 100%로 기준하였을 때, DPPH 라디칼을 50% 억제시키는데 필요한 소리쟁이 추출물의 농도는 2.15 mg/mL으로 α-tocopherol의 IC₅₀(0.43 mg/mL)에 비해 높게 나타났다. 총항산화능은 ABTS 라디칼에 대한 소거활성으로 측정하였다. 소리쟁이 추출물 0.1 및 1 mg/mL의 총항산화능은 각각 0.47 및 2.33 mM Trolox와 동등한 수준이었으며, α-tocopherol에 비해 높게 나타났다. 소리쟁이 추출물 0.1 및 1 mg/mL의 superoxide 소거활성은 각각 21.5 및 78.9%이었으며, catechin에 비해 차이가 없었다. 소리쟁이 추출물 20 및 100 µg/mL의 peroxy 라디칼 소거활성은 각각 62.5 및 156.4 µM Trolox와 동등한 수준이었으며, ascorbic acid에 비해 낮게 나타났다. 소리쟁이 추출물 0.1 및 1 mg/mL의 구리이온 환원력은 각각 0.28 및 1.88 mM Trolox와 동등한 수준이었으며, α-tocopherol에 비해 유사하거나 높게 나타났다. 소리쟁이 추출물은 hydroxyl 라디칼 및 peroxy 라디칼로 유발된 supercoiled DNA strand 절단을 억제시켰다. 소리쟁이 추출물 0.5 및 5 mg/mL의 총페놀 함량은 각각 0.58 및 3.85 mM gallic acid와 동등한 수준으로 높게 나타났다. 또한, HepG2 세포주를 이용한 세포배양에서 소리쟁이 추출물 0.1 및 0.5 mg/mL 농도의 첨가는 0.2 mM tert-butyl hydroperoxide로 유도된 세포독성을 각각 38.5 및 63.5% 감소시켰다. 따라서, 본 연구 결과들은 소리쟁이 추출물의 강력한 항산화 효과와 세포독성 억제 효과를 나

타내며, 이러한 효능은 적어도 자유라디칼의 산화 억제와 높은 총페놀 함량에 기인하는 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2011년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

인용문헌

- Apak, R., K. Güçlü, M. Özyürek and S.E. Karademir. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 52:7970-7981.
- Bae, K. 2000. *The Medical Plants of Korea*. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, Korea. p. 92 (in Korean).
- Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37:277-285.
- Günaydin, K., G. Topçu and R.M. Ion. 2002. 1,5-Dihydroxyanthraquinones and an anthrone from roots of *Rumex crispus*. *Nat. Prod. Lett.* 16:65-70.
- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge and C.E. Cross. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J. Lab Clin. Med.* 119:598-620.
- Hiramoto, K., N. Ojima, K.I. Sako and K. Kikugawa. 1996. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol. Pharm. Bull.* 19:558-563.
- Hu, C., Y. Zhang and D.D. Kitts. 2000. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *Henonis* leaf extract *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 48:3170-3176.
- Hwang, S.W., T.J. Ha, J.R. Lee, J. Lee, S.H. Nam, K.H. Park and M.S. Yang. 2004. Isolation of anthraquinone derivatives from the root of *Rumex japonicus* H. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47:274-278 (in Korean).
- Huang, D., B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and R. L. Prior. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 50:4437-4444.
- Jeong, G.T., K.M. Lee and D.H. Park. 2006. Study of

- antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. Korean Chem. Eng. Res. 44:81-86 (in Korean).
- Kim, D.K., S.U. Choi, S.Y. Ryu, K.R. Lee and O.P. Zee. 1998. Cytotoxic constituents of *Rumex japonicus*. Yakhak Hoeji 42:233-237.
- Kim, H.J., E.Y. Hwang, N.K. Im, S.K. Park and I.S. Lee. 2010. Antioxidant activities of *Rumex crispus* extracts and effects on quality characteristics of seasoned pork. Korean J. Food Sci. Technol. 42:445-451 (in Korean).
- Kim, J.C., G.J. Choi, S.W. Lee, J.S. Kim, K.Y. Chung and K.Y. Cho. 2004. Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew. Pest Manag. Sci. 60:803-808.
- Lee, S., D. Kim, D. Yim and S. Lee. 2007. Anti-inflammatory, analgesic and hepatoprotective effect of semen of *Rumex crispus*. Kor. J. Pharmacogn. 38:334-338 (in Korean).
- Liu, F., V.E.C. Ooi and S.T. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sci. 60:763-771.
- Maksimović, Z., N. Kovačević, B. Lakušić and T. Čebović. 2011. Antioxidant activity of yellow dock (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) fruit extract. Phytother. Res. 25:101-105.
- Malterud, K.E., T.L. Farbot, A.E. Huse and R.B. Sund. 1993. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. Pharmacology 47:77-85.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65:55-63.
- Rhim, T.J. and M.Y. Choi. 2010. The antioxidative effects of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts. Korean J. Plant Res. 23:445-450 (in Korean).
- Rhim, T.J. and M.Y. Choi. 2011. The antioxidative effects of *Rhododendron brachycarpum* extracts. Korean J. Plant Res. 24:456-460 (in Korean).
- Singleton, V.L. and R. Orthofer. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299:152-178.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics, 2nd ed, McGraw-Hill, New York, USA. pp. 186-187.
- Suh, H.J., K.S. Lee, S.R. Kim, M.H. Shin, S. Park and S. Park. 2011. Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. J. Photochem. Photobiol. B 102:102-107.
- Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. American J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279:L1005-L1029.
- Yildirim, A., A. Mavi and A.A. Kara. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. J. Agric. Food Chem. 49:4083-4089.

(Received 15 June 2012 ; Revised 20 September 2012 ; Accepted 18 October 2012)