



## 쥐오줌풀의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 활성

박재호 · 장태원 · 이승현<sup>†</sup>

중원대학교 산학협력단

### Antioxidative Activities and Inhibition Effects on Oxidative DNA Damage of *Valeriana fauriei*

Jae Ho Park, Tae Won Jang and Seung Hyun Lee<sup>†</sup>

Industry-Academic Cooperation Foundation, Jungwon University, Goesan 28024, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** *Valeriana fauriei* (Valerianaceae) has been used to as a traditional medicine to treat a variety of symptoms, including headache, insomnia, hypertension, and menstrual irregularity. However, the present study investigates the species' antioxidant activity and its inhibition of oxidative DNA damage, which have yet to be studied.

**Methods and Results:** The antioxidant activity was assessed using radical scavenging assays with 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) and, 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and a reducing power assay. The total phenol content was also analyzed, and phenolic compounds were detected using HPLC/UV, whereas the inhibitory effect of *Valeriana fauriei* on oxidative DNA damage was measured using  $\phi$ -174 RF I plasmid DNA cleavage assay. The DPPH and ABTS radical scavenging activity were  $75.17 \pm 3.55\%$  and  $95.83 \pm 0.63\%$ , respectively, and the reducing power was  $93.14 \pm 1.74$  at  $200 \mu\text{g/ml}$ . The total phenol content was  $10.24 \pm 0.04 \text{ mg/g}$ , whereas chlorogenic acid, catechin, caffeic acid and epicatechin were identified using HPLC/UV, and the  $\phi$ -174 RF I plasmid DNA cleavage assay indicated that *V. fauriei* provided protection against oxidative damage.

**Conclusions:** The results of the present study suggest that *V. fauriei* has powerful antioxidant activity that can provide protective effects against the oxidative DNA damage caused by free radicals. The species, therefore, provides a valuable resource for the development of natural pharmaceutical to treat aging, cancer, and degenerative diseases.

**Key Words:** *Valeriana fauriei*, Antioxidant, DNA Damage, High Performance Liquid Chromatography

## 서 언

최근 합성 항산화제의 부작용인 독성 작용을 대체하기 위하여 천연 항산화제로 사용될 수 있는 식물의 항산화물질에 대해 다양한 연구가 이루어지고 있다 (Jung *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2012). 식물이 함유하고 있는 항산화 물질은 phenolics 및 flavonoid 계통의 화합물로 알려져 있으며 (Choe and Yang, 1982), 이 물질들은 화학적인 연쇄반응을 통해 alkyl radical 또는 alkylperoxy radical에 수소를 공여하고, 이 결과

radical을 안정화시켜 제거함으로써 산화를 억제하는 효능을 보인다 (Lee *et al.*, 2006). 활성산소종인 radical은 세포대사과정에서 끊임없이 생성되고, 체내에서 생성되는 활성산소종과 항산화효소와의 항상성이 깨어지게 되면 산화적 스트레스로 인한 노화, 당뇨, 비만과 같은 각종 질병들을 야기하게 된다 (Halliwell, 1995). 이러한 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA까지도 비가역적인 변형과 파괴를 유래하여 여러 가지 질병을 유발 하는 것으로 알려져 있다 (Seifried *et al.*, 2007).

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-43-830-8823 (E-mail) zhangfu@jwu.ac.kr

Received 2016 December 6 / 1st Revised 2016 December 15 / 2nd Revised 2016 December 20 / 3rd Revised 2016 December 23 / Accepted 2016 December 23

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.

DNA 손상을 일으키는 4가지의 중요한 과정으로는 oxidation, methylation, deamination, depurination 등이 있으며, 이 중에서 oxidation이 가장 크게 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Ames, 1985). 정상세포에서 종양 세포로 진행되는 과정은 개시 (initiation), 촉진 (promotion), 진행 (progression)의 과정을 거쳐 발생하며, 개시 (initiation)는 전자 친화성 발암인자 (initiator)가 생체 내 대사에서 활성화되어, 유전자의 핵산에 비가역적으로 결합하여 정상세포의 DNA를 손상시키고, 신생물 전구세포 (preneoplastic cell)를 형성하는 돌연변이 현상이다. 암의 개시 (initiation) 단계에서 발생하는 DNA 손상은 암발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로, 개시 (initiation) 단계에서의 DNA 손상 억제제는 항암활성에 있어서 중요한 역할을 한다 (Surh, 1999; Johnson *et al.*, 1996).

본 연구에서 사용된 쥐오줌풀 (*Valeriana fauriei*)은 마타리과 (Valerianaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 뿌리 및 뿌리 줄기는 약용 또는 정유 채취를 위한 소재로서 이용되고 있다 (Houghton, 1988; Lawrence, 1985). 쥐오줌풀의 식물명은 식물의 뿌리에서 쥐오줌 냄새 같은 독특한 향이 나기 때문에 붙여진 이름으로서 성분으로는 valeric acid, isovalerianic acid, bornylvalerianate, valerianone, bornylacetate, camphene,  $\alpha$ - $\beta$ -pinene, limonene, kessane, kassanol, kanokonol 등을 함유하고 있다 (Cho *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1995).

쥐오줌풀의 건조뿌리를 사용하여 진정, 불면, 신경성 불안정, 두통 등에 전통적으로 사용되었으며 동양 의학에서는 산통, 월경불순, 피어, 금창치료, 고혈압, 위통 등에 응용하고 있으며 서양에서도 항히스테리 치료에 사용되어져왔다 (Becker *et al.*, 1983). 쥐오줌풀에 대한 연구는 뿌리의 정유 성분 (Jin *et al.*, 2007)이나 생리 활성 성분 (Wills and Shohet, 2009)등 주로 성분이나 식물분류에 대한 연구가 주를 이루고 있다.

본 연구는 쥐오줌풀의 페놀류 화합물의 분석과 에틸아세테이트 분획물의 항산화 활성 및 산화적 DNA 손상에 대한 억제효과를 평가하여, 기능성 천연 소재로의 활용가치를 높이고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 사용된 쥐오줌풀 (*Valeriana fauriei*)는 충청북도 괴산군 칠성면 쌍곡리 85에서 채집하여 중원대학교 생약자원 개발학과에서 동정하였으며 (voucher number: JWU-LSH-001), 전초를 사용하였다. HPLC 분석에 사용된 HPLC grade의 acetonitrile, dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol, ethyl acetate, methanol, petroleum ether는 Merck (Frankfurter, Darmstadt, Germany)제품을 사용하였다. 기타 용매는 SK chemicals (Seoul, Korea)제품을 사용 하였다. 1,1-diphenyl-2-

picryl hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, potassium persulfate, potassium phosphate buffer, potassium hexacyanoferrate (III), trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride, folin, sodium carbonate, tannic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다.  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약 및 기기는 별도 표기하였다.

### 2. 방법

#### 1) 추출 및 분획

쥐오줌풀의 에틸아세테이트 분획물은 건조시료 100 g을 분쇄한 후, 80% 메탄올 3 l로 3일간 침지한 후 Whatman filter paper (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England)로 여과하였다. 메탄올 추출물을 40°C이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치 (N-1110S, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 농축한 후 분별 깔대기를 이용하여 페트롤리움 에테르, 에틸아세테이트 순으로 3회 용매분획 하였다. 이 중 에틸아세테이트 분획물을 감압 환류 냉각장치로 농축하여 실험 전까지 -27°C에 보관하였고, DMSO에 4,000 ppm으로 용해하여 시료로 사용하였다. 항산화 활성을 나타내는 성분들은 주로 페놀성 화합물로, 에탄올이나 에틸아세테이트 등의 유기 용매 또는 수용성 에탄올 용액 등에 잘 녹는다. 본 실험에서는 메탄올 추출물 및 페트롤리움 에테르 그리고 에틸아세테이트 분획물을 비교한 결과, 에틸아세테이트 분획물에서 항산화 활성 및 추출 수율이 효율적으로 나타나 이 분획물을 추출 용매로 사용하였다 (Table 1).

#### 2) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet 방법 (Bondet *et al.*, 1997)을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300  $\mu$ M 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 를 515 nm에서 흡광도 값이 1.00이 되도록 에탄올을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물 (0.32, 1.6, 8, 40, 200  $\mu$ g/ml) 40  $\mu$ l에 DPPH solution 760  $\mu$ l를 첨가한 후 37°C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer (Human Co., Xma-3000PC, Korea)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\left[ 1 - \frac{\text{추출물 첨가구의 흡광도}}{\text{추출물 무첨가구의 흡광도}} \right] \times 100$$

#### 3) ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg의 방법 (Van den Berg *et al.*, 1999)을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7.4 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt와 2.6 mM potassium persulfate

를 혼합하여 24시간 ABTS radical을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70이 되도록 희석하였다. 각 농도별 추출물 40  $\mu$ l에 ABTS solution 760  $\mu$ l를 첨가한 후 37 °C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\left[1 - \frac{\text{추출물 첨가구의 흡광도}}{\text{추출물 무첨가구의 흡광도}}\right] \times 100$$

#### 4) 환원력

환원력 측정은 Oyaizu (1986)의 방법을 사용하였다. 각 농도별 추출물 100  $\mu$ l에 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.6) 250  $\mu$ l과 1% potassium hexacyanoferrate (III) 250  $\mu$ l을 혼합한 후, 50°C에서 20분 반응시킨 후 찬물로 냉각하여, trichloroacetic acid (TCA) 250  $\mu$ l를 첨가하였다. 위 반응액을 2,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상등액 400  $\mu$ l에 증류수 400  $\mu$ l와 0.10% ferric chloride 16  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) 총 페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법 (AOAC, 1984)을 참고하여 측정하였다. 추출물 50  $\mu$ l와 증류수 950  $\mu$ l, folin 500  $\mu$ l를 혼합한 후, 20% sodium carbonate 2.5 ml를 넣어 40분간 실온에서 반응시켰다. 반응물을 흔들지 않고 맑은 액체를 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tannic acid를 사용하였고, 정량 직선방정식을 사용하였다.

#### 6) Phenolic compounds에 대한 HPLC 분석

페놀류 화합물의 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석은 Waters 2695 system (Waters, Milford, MA, USA)과 Waters 2487 Dual  $\lambda$  absorbance detector (Waters, Milford, MA, USA)를 통해 분석하였다. 실험에 사용된 시료 및 표준품은 1 mg을 취하여 1 ml의 메탄올에 용해하여 0.45  $\mu$ m membrane filter (Waters, Milford, MA, USA)를 이용해 여과하였고, 시료 10  $\mu$ l를 메탄올 및 1% acetic acid/H<sub>2</sub>O을 이동상으로 Waters XBridge™ C-18 column (4.6 mm  $\times$  250 mm) packed with 5.0  $\mu$ m diameter particles (Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 흡광도 280 nm에서 분석하였다. 추출물의 각 페놀성 화합물은 각각의 표준품과 비교하여 동정 및 정량하였다. 표준품은 Sigma-Aldrich사의 chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, epicatechin (St. Louis, MO, USA)을 이용하였으며, 각 표준품의 정량 직선방정식을 사용하여 정량하였다.

#### 7) $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성

$\phi$ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성은 Jung과 Surh (2001)의 방법을 참고하여 측정하였다.

Ferric chloride (FeCl<sub>2</sub>)에 의한 산화적 스트레스 손상 억제 활성 검정을 위해 각 농도별 추출물 40  $\mu$ l와 6 mM FeCl<sub>2</sub> 60  $\mu$ l와 증류수 700  $\mu$ l를 넣은 후, 37°C에서 15분 반응하였다. 반응물 20  $\mu$ l와  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA 5  $\mu$ l를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

Ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>) 의한 산화적 스트레스 손상 억제 활성 검정을 위해 각 농도별 추출물 40  $\mu$ l와 0.4 mM FeSO<sub>4</sub>와 0.4 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 1:1로 혼합한 용액을 760  $\mu$ l를 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응하였다. 반응물 20  $\mu$ l와  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA 5  $\mu$ l를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

#### 8) 통계학적 분석

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 SPSS 18.0 (statistical package for the social sciences Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, ANOVA를 통한  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 사후 검정하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. 항산화 활성

쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 항산화 활성을 비교하기 위해서 강력한 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid (Padayatty *et al.*, 2003)와 함께 측정하여 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 그리고 환원력을 비교 분석하여 나타냈다.

쥐오줌풀의 메탄올 추출물 및 페트롤리움 에테르 분획물, 에틸아세테이트 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성을 비교 측정 한 결과 (Table 1), 소거활성이 뛰어난 에틸아세테이트 분획물을 시료로 선택하였으며, 쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 각 추출물의 농도가 높을수록 DPPH 소거 활성이 높았으나 8  $\mu$ g/ml 이하의 저농도에서도 낮은 활성을 나타내었다. 추출물의 농도 200  $\mu$ g/ml에서 75.17  $\pm$  3.55%의 소거 활성으로 L-ascorbic acid에 비해 낮은 활성을 나타내었다. 하지만 쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 ABTS 라디칼 소거활성을 평가한 결과 (Table 2), 분획물 농도 200  $\mu$ g/ml에서 95.83  $\pm$  0.63%의 소거 활성을 나타내었으며 15.97  $\mu$ g/ml의 높은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 또한 통계적으로 40  $\mu$ g/ml를 제외한 모든 농도에서

**Table 1.** DPPH radical scavenging activity (%) of methanol extract and its solvent fractions from *Valeriana fauriei*.

Sample	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	DPPH radical scavenging activity (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
ME	0.32	2.85 ± 1.46*	29888.43
	1.6	3.56 ± 1.45*	
	8	3.87 ± 1.45*	
	40	7.44 ± 1.40*	
	200	38.77 ± 0.92*	
EAVF	0.32	1.78 ± 1.08*	119.50
	1.6	2.94 ± 1.67*	
	8	6.93 ± 1.39*	
	40	23.02 ± 2.81*	
	200	75.17 ± 3.55*	
PEVF	0.32	1.88 ± 1.52*	15470 × 10 <sup>5</sup>
	1.6	2.73 ± 1.91*	
	8	3.75 ± 1.89*	
	40	6.22 ± 1.84*	
	200	18.44 ± 1.60*	
AA	0.32	5.32 ± 0.49	5.08
	1.6	20.88 ± 0.05	
	8	76.51 ± 0.11	
	40	88.23 ± 0.05	
	200	93.47 ± 0.06	

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively (\**p* < 0.05). ME; Methanol extracts of *Valeriana fauriei*, EAVF; Ethyl acetate fraction from methanol extracts of *Valeriana fauriei*, PEVF; Petroleum ether fraction from methanol extracts of *Valeriana fauriei*, AA; L-ascorbic acid.

L-ascorbic acid와 유의성 없는 뛰어난 활성을 보였다. 쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 환원력은 분획물 농도 0.32, 1.6, 8, 40, 200  $\mu\text{g/ml}$  에서 L-ascorbic acid와 비교하여 53.40 ± 1.06, 59.55 ± 1.49, 68.65 ± 1.73, 82.88 ± 1.07, 93.14 ± 1.74로 높은 환원력을 보였다 (Table 3).

**2. 총 페놀 화합물 함량 및 HPLC를 통한 페놀류 화합물 동정**

쥐오줌풀 메탄올 추출물, 페트롤리움 에테르 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 총 페놀 화합물 함량을 분석한 결과

**Table 2.** ABTS radical scavenging activity of ethyl acetate fractions from methanol extract of *Valeriana fauriei*.

Sample	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABTS radical scavenging activity (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
EAVF	0.32	1.56 ± 0.77	15.97
	1.6	4.97 ± 0.30	
	8	21.23 ± 1.74	
	40	71.59 ± 1.13*	
	200	95.83 ± 0.63	
L-ascorbic acid	0.32	5.14 ± 2.74	10.49
	1.6	9.28 ± 3.20	
	8	23.85 ± 1.93	
	40	93.04 ± 1.29	
	200	96.32 ± 2.89	

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively (\**p* < 0.05). EAVF; Ethyl acetate fraction from methanol extracts of *Valeriana fauriei*, AA; L-ascorbic acid

(Table 4), 총 페놀 함량은 농도별로 희석한 tannic acid의 표준곡선 (TAE)을 통해 함량을 계산하였으며, 각각 2.70 ± 0.11, 1.83 ± 0.06, 10.24 ± 0.04 mg/g · TAE로 나타났다. 메탄올 추출물 및 페트롤리움 에테르 분획물은 에틸아세테이트 분획물에 비해 비교적 낮은 총 페놀 함량을 나타냈으며, 이 결과를 통해 메탄올 추출물과 페트롤리움 에테르 분획물보다 높은 페놀류 화합물이 포함된 에틸아세테이트 분획물을 HPLC 분석시료로 사용하였다.

HPLC를 통해 가장 높은 총 페놀 함량을 나타낸 쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 페놀류 화합물을 분석 및 동정한 결과 (Table 4), chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, epicatechin을 동정하였으며, 각 표준품에 의한 정량직선방정식을 통해 함량을 분석한 결과, 각각 2.61 ± 0.05, 0.21 ± 0.01, 1.79 ± 0.03, 0.57 ± 0.03  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다.

**3. 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 활성**

쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물은 FeCl<sub>2</sub> (ferric chloride)의 산화적 스트레스와 FeSO<sub>4</sub> (ferrous sulfate)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 fenton 반응을 이용한 산화적 스트레스를 이용하여 DNA 손상 억제

**Table 3.** Reducing power of ethyl acetate fractions from methanol extract of *Valeriana fauriei*.

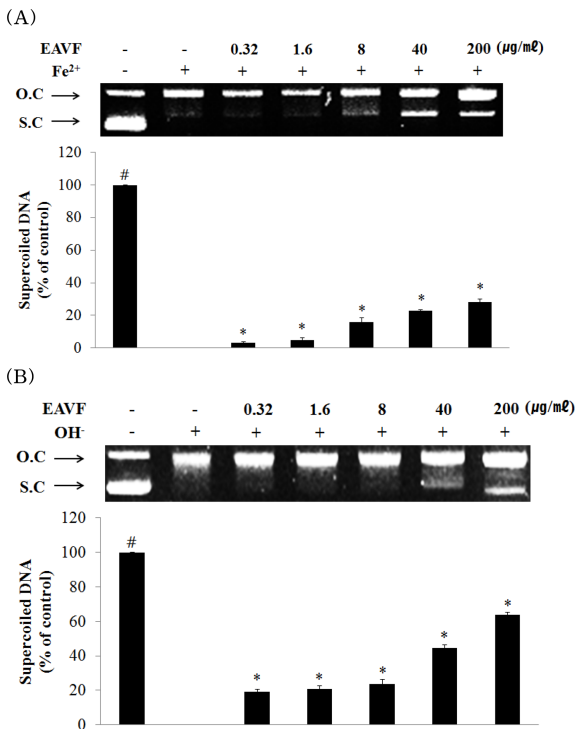
Sample	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	200	40	8	1.6	0.32
EAVF	93.14 ± 1.74*	82.88 ± 1.07*	68.65 ± 1.73*	59.55 ± 1.49*	53.40 ± 1.06*

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Relative value represent comparing with 200  $\mu\text{g/ml}$  of L-ascorbic acid (AA 200) (\**p* < 0.05). EAVF; Ethyl acetate fraction from *Valeriana fauriei*.

**Table 4.** Amount of total phenol content and phenolic compounds in methanol extract and its solvent fractions from *Valeriana fauriei*.

Sample	Total phenol content (mg/g · TAE)	Phenolic compounds (μg/g)			
		Chlorogenic acid	Catechin	Caffeic acid	Epicatechin
ME	2.70 ± 0.11	-	-	-	-
PEVF	1.83 ± 0.06	-	-	-	-
EAVF	10.24 ± 0.04	2.61 ± 0.05	0.21 ± 0.01	1.79 ± 0.03	0.57 ± 0.03

Mean values ±SD from triplicate separated experiments are shown. ME; Methanol extracts of *Valeriana fauriei*, -; not detected, EAVF; Ethyl acetate fraction from methanol extracts of *Valeriana fauriei*, PEVF; Petroleum ether fraction from methanol extracts of *Valeriana fauriei*.



**Fig. 1.** Protective effects of ethyl acetate fractions from *Valeriana fauriei* (EAVF) on oxidative DNA damage by  $\phi$  X-174 RF I plasmid DNA.  $\phi$  X-174 RF I plasmid DNA was treated with various concentrations (0, 0.32, 1.6, 8, 40 and 200 μg/ml) of EAVF and oxidative damage by Fe<sup>2+</sup> ion (A) and hydroxyl radical (B). Fe<sup>2+</sup>; 6 mM FeCl<sub>2</sub>, hydroxyl radical (OH<sup>-</sup>); 0.4 mM FeSO<sub>4</sub> + 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O.C.; Open circular, S.C.; Super-coiled. Values are expressed as means ± SD of three independent experiments. #; non-treated group, was set as 100%. \**p* < 0.05 as compared with the non-treated control group. Remaining super-coiled form (%) was quantified using the software Un-SCAN-IT gel version 5.1 (Silk Scientific, Inc.).

활성을 평가하였으며,  $\phi$ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 이용한 비 세포적 시스템으로 평가하였다.

쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물 모두 대조군과 비교해서 모든 농도에서 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 억제하

는 활성을 보였다 (Fig. 1). 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 받은 plasmid DNA는 그 구조가 깨지면서 open-circular로 전환되며, 정상적인 plasmid DNA의 형태인 supercoiled는 대조군 및 추출물에 의한 방어효과에 의해 그 형태가 유지된다. Fe<sup>2+</sup>에 대한 억제효과는 분획물 농도 0.32, 1.6, 8, 40, 200 μg/ml 에서 각각 3.18 ± 0.72%, 4.84 ± 1.55%, 15.93 ± 2.46%, 22.69 ± 0.94, 28.25 ± 1.88%의 비교적 낮은 효과를 보인 반면, OH<sup>-</sup>에 대한 억제효과는 분획물 농도 0.32, 1.6, 8, 40, 200 μg/ml 에서 19.11 ± 1.65%, 20.97 ± 1.64%, 23.66 ± 2.50%, 44.53 ± 1.79%, 63.66 ± 1.54%의 높은 효과를 보였다. 농도 의존적으로 산화적 DNA 손상에 대한 억제효과를 보였으며, Fe<sup>2+</sup>에 대한 낮은 억제효과에 비해 OH<sup>-</sup>에 대한 강한 억제효과를 나타냈다.

## 고찰

항산화 활성의 기작은 유리기와 반응하는 것으로, 유리기 소거작용은 활성라디칼 (free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH와 ABTS는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로 DPPH 라디칼 소거 활성은 수소 공여체의 활성을 측정하는 방법으로 폐놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스코르빈산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색 되는 원리를 이용한 방법이며, 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다 (Que et al., 2006). ABTS 라디칼 소거활성은 라디칼을 생성하는 ABTS가 존재 시, hydrogen peroxide와 metmyoglobin의 빠른 항산화 반응에 의해 myoglobin radical을 감소시키는 기전으로 소거활성을 나타낸다.

쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성에서, 농도 의존적인 효과를 나타내었지만 L-ascorbic acid (5.08 μg/ml)와 비교하여 IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration) 값이 119.50 μg/ml로 현저히 낮은 소거활성을 보였다. 하지만 동속 근연식물인 *Valeriana officinalis*의 IC<sub>50</sub> 값 (38 mg/ml)에 비해 매우 높은 값을 보였다 (Dugaheh et al., 2013). ABTS 라디칼 소거활성에서, L-ascorbic acid (10.49 μg/ml)와 비교하여 IC<sub>50</sub> 값이 15.47 μg/ml로 상당히 높은 소거활성을 보였다.

ABTS와 DPPH는 같은 radical이지만 DPPH는 free radical이며 ABTS는 cation radical이다. 이에 따른 각 radical과 항산화물질 사이의 반응에 차이가 있다 (Meir *et al.*, 1995). 쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물은 DPPH에서 기인하는 free radical에 대한 소거활성에 비해 ABTS에서 유래하는 cation radical을 효과적으로 소거하였다. 환원력 평가는 시료의 환원력에 따라 노란색의 실험 용액이 청색 또는 녹색으로 전환되는 원리를 이용한 것이다. 항산화제와 같은 환원제는  $Fe^{3+}$ /ferricyanide complex를 환원시켜 ferrous 형태로 전환하고, 이 과정을 통해 형성된 Perl's Prussian blue의 흡광도를 700 nm에서 측정하는 원리이다 (Ferreira *et al.*, 2007).

쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 환원력은 L-ascorbic acid (100)와 상대적인 값으로 비교하여 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서  $93.14 \pm 1.74$ 의 환원력을 나타냈다. 강한 환원력을 가진 화합물은 전자 공여체로 작용하고 지질 과산화 과정에 의해 산화된 중간매개체들을 환원시킨다. 이러한 환원작용은 1차 및 2차 항산화제로 작용하게 되며, 노화 및 성인병을 포함하는 다양한 질병의 원인인 활성산소종의 산화를 억제한다 (Chanda and Dave, 2009; Marnett, 2000).

쥐오줌풀의 뿌리 및 근경에서 chlorogenic acid, lignans, flavonoids, valerenic acids and valpotrates의 HPLC 분석에 의한 동정 및 확인에 대한 연구 (Navarrete *et al.*, 2006)를 참고하여, HPLC 분석을 통한 페놀류 화합물을 동정한 결과, chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, epicatechin이 각각  $2.61 \pm 0.05$ ,  $0.21 \pm 0.01$ ,  $1.79 \pm 0.03$ ,  $0.57 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ 으로 확인되었다. 식물에서 확인되는 페놀류 화합물의 항산화 활성은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제, 활성산소의 소거제, 사슬전단 항산화제 (chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 페놀류 화합물 및 플라보노이드 화합물은 하이드록실 작용기의 치환 패턴과 그 구조적인 측면과 연관되어 있으며, 뛰어난 라디칼 소거 활성은 고리구조에 포함된 3',4'-orthodihydroxy 및 4-carbonyl 작용기와의 연관성이 크다. -OH 작용기는 고리구조에 카테콜 유사 구조를 부여하고 이 구조를 통해 항산화효과가 나타난다. 또한 C2-C3 이중결합은 고리구조로부터 발생하는 전자의 delocalization에 관련이 깊고 라디칼 소거활성을 증가시킨다고 알려져 있다 (Bors *et al.*, 1990). 또한 페놀류 화합물은 항산화 활성뿐만 아니라 항암 및 항균 작용을 포함하는 다양한 생리활성을 나타내는 물질로 알려져 있다 (Ferrerres *et al.*, 2009).

대부분의 천연 항산화제 등의 생리활성 물질은 식물에서 유래로 하는 페놀류 화합물인 것으로 알려져 있다 (Huang *et al.*, 1992). 쥐오줌풀의 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력은 상대적으로 높은 함량의 chlorogenic acid와 관련이 있다고 보인다. 2개의 -OH 작용기를 포함하는 chlorogenic acid

는 그 구조적인 특징 (Cuvelier *et al.*, 1992)에 의해 라디칼 소거활성 및 환원력을 강하게 나타내는 것으로 사료된다.

산화적 스트레스는 강한 반응성을 가진 라디칼을 형성하고 DNA를 비가역적으로 변형시키는데 (Seifried *et al.*, 2007), 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 있다 (Kawanishi *et al.*, 2001).

정상적인 plasmid DNA는 supercoiled (SC) 형태로 존재하나  $H_2O_2$ 와 철의 fenton 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼 또는 철 이온 존재 하에서는 산화적 스트레스에 의한 손상을 받아 open-circular (OC)형태로 전환된다. 쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물의 산화적 DNA 손상 억제 활성을 평가한 결과,  $FeCl_2$ 에서 기인한  $Fe^{2+}$  및  $FeSO_4$ 에서 기인한  $OH^-$  라디칼에 대한 산화적 손상에 대해 억제효과를 농도 의존적으로 나타냈다. 특히 강력한 라디칼로 알려져 있는  $OH^-$ 에 대한 강한 억제효과를 보였다. 이를 통해 금속 킬레이팅 작용에 비해 하이드록실 라디칼에 대한 소거활성이 상당히 효과적인 것을 확인할 수 있었다. 또한 높은 항산화 효과를 나타내는 미선나무 꽃 에틸아세테이트 분획물의 억제활성 (82%, 200  $\mu\text{g/ml}$ )과 비교할만한 높은 활성을 나타냈다 (Ahn and Park, 2013).

따라서 쥐오줌풀 에틸아세테이트 분획물은 메탄올 추출 및 페트롤리움 에테르 분획물에 비해 높은 페놀류 화합물을 포함하고 있는 것을 확인하였으며, 페놀류 화합물에 의해 높은 항산화 활성 및 환원력을 나타내었다. 이를 기반으로, 하이드록실 라디칼에 의한 산화적 DNA 손상에 대해 높은 억제 활성을 나타냈다.

## REFERENCES

- Ahn J and Park JH. (2013). Effects of *Abeliophyllum distichum* Nakai flower extracts on antioxidative activities and inhibition of DNA damage. Korean Journal of Plant Resources. 26:355-361.
- Ames BN. (1985). Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radical and degenerative diseases. Risk Analysis in the Private Sector. 220:297-321.
- Association of Official Analytical Chemists(AOAC). (1984). Official methods of analysis 14th(ed). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA. p.8-35.
- Becker H, Chavadej S and Weberling F. (1983). Valepotriates in Valeriana thalictroides. Planta medica. 49:64-64.
- Bondet V, Brand-Williams W and Berset C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. LWT-Food Science and Technology. 30:609-615.

- Bors W, Heller W, Michel C and Saran M.** (1990). Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 264:165-170.
- Chanda S and Dave R.** (2009). *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*. 3:981-996.
- Cho CH, Choi YH, Kim KS, Ahn TJ and Han OK.** (1996). Differences of major compounds in *Valeriana fauriei* var. *dasycarpa* HARA and *Valeriana officinalis* L. grown at different places in Korea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 4:109-113.
- Choe SY and Yang KH.** (1982). Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene(BHT) and butylated hydroxyanisole(BHA). *Korean Journal of Food Science and Technology*. 14:283-288.
- Choi YH, Kim YH, Lee JC, Cho CH and Kim CS.** (1995). Differences of essential oil content in *Valeriana fauriei* var. *dasycarpa* Hara, *V. officinalis* var. *lalfolia* Miq and *V. wallichii* DC. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 3:217-225.
- Cuvelier ME, Richard H and Berset C.** (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 56:324-325.
- Dugaheh MA, Meisami F, Torabian Z and Shariffar F.** (2013). Antioxidant effect and study of bioactive components of *Valeriana sisymbriifolia* and *Nardostachys jatamansii* in comparison to *Valeriana officinalis*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26:53-58.
- Ferreira IC, Baptista P, Vilas-Boas M and Barros L.** (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*. 100:1511-1516.
- Ferreres F, Gomes D, Valentão P, Goncalves R, Pio R, Chagas EA, Seabra RM and Andrade PB.** (2009). Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chemistry*. 114:1019-1027.
- Halliwell B.** (1995). Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 49:1341-1348.
- Houghton PJ.** (1988). The biological activity of valerian and related plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 22:121-142.
- Huang MT, Ho CT and Lee CY.** (1992). Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society. Washington DC, USA. p.54-71.
- Jin HS, Jin ML, Lee MY, Park HJ, Nam JH, Hwang B and Hwang SJ.** (2007). Effect of elicitors on the production of valepotriates and valerenic acid in the adventitious roots of *Valeriana fauriei* var. *dasycarpa* Hara. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:241-245.
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA and Finkel T.** (1996). Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:11848-11852.
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE and Baek NI.** (2004). Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *Applied Biological Chemistry*. 47:135-140.
- Jung YJ and Surh YJ.** (2001). Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radical Biology and Medicine*. 30:1407-1417.
- Kawanishi S, Hiraku Y and Oikawa S.** (2001). Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research*. 488:65-76.
- Lawrence BM.** (1985). A review of the world production of essential oils. *Perfumer and Flavorist*. 10:1-16.
- Lee YS, Joo EY and Kim NW.** (2006). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepista nuda*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 35:1309-1314.
- Marnett LJ.** (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 21:361-370.
- Meir S, Kanner J, Akiri B and Philosoph-Hadas S.** (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 43:1813-1819.
- Navarrete A, Avula B, Choi YW and Khan IA.** (2006). Chemical fingerprinting of *Valeriana* species: Simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of AOAC International*. 89:8-15.
- Oyaizu M.** (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44:307-315.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK and Levine M.** (2003). Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*. 22:18-35.
- Park EB, Kim HS, Shin SY, Ji IA, Kim JH, Kim SG, Yoo BH, Kim BW, Kwak IS, Kim MM and Chung KT.** (2012). Antioxidative activity of *Cornus officianalis* extracts obtained by four different extraction techniques. *Journal of Life Science*. 22:1507-1514.
- Que F, Mao L and Pan X.** (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*. 39:581-587.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI and Milner JA.** (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 18:567-579.
- Surh YJ.** (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research*. 428:305-327.
- Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H and Bast AALT.** (1999). Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*. 66:511-517.
- Wills RBH and Shohet D.** (2009). Changes in valerenic acids content of valerian root(*Valeriana officinalis* L.) during long-term storage. *Food Chemistry*. 115:250-253.