

Note

염생식물 갯질경이의 Peroxynitrite 소거 활성

이정임¹ · 공창숙² · 정명은¹ · 홍주완¹ · 노 일¹ · 서영완^{1*}

¹한국해양대학교 해양과학기술대학 해양환경·생명과학부
(606-791) 부산광역시 영도구 동삼동 1
²신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과
(617-736) 부산광역시 사상구 괘법동 산 1-1

Peroxynitrite-scavenging Activity of the Halophyte *Limonium tetragonum*

Jung Im Lee¹, Chang-Suk Kong², Myoung Eun Jung¹, Joo Wan Hong¹,
Il Noh¹, and Youngwan Seo^{1*}

¹Division of Marine Environment & Bioscience, College of Ocean Science and Technology
Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

²Department of Food and Nutrition, College of Medical and Life Sciences
Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract : Crude extracts of *Limonium tetragonum* and their solvent-partitioned fractions were evaluated for their potential to scavenge authentic ONOO⁻, and ONOO⁻ derived from 3-morpholinopyridone (SIN-1). Four flavonol glycosides (1-4) were isolated by activity-guided separation. Their chemical structures were elucidated by extensive 2 D NMR experiments and by comparison with published spectral data. These compounds were also estimated for their peroxynitrite scavenging effects. The scavenging ratios of compounds 1-4 on authentic ONOO⁻ were 56, 37, 56, and 54%, respectively, at a concentration of 1 μM. On the other hand, the inhibition ratios of compounds 1-4 against ONOO⁻ generation from SIN-1 were 59, 39, 44, and 54% at the same concentration, respectively.

Key words : *Limonium tetragonum*, scavenging effect, reactive nitrogen species (RNS)

1. 서 론

인체 조직은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 계속적으로 노출될 때 손상을 입으며 이러한 활성산소종에 대한 방어기작은 superoxide dismutases(SODs), glutathione peroxidases 같은 효소나 그리고 비타민 C, 비타민 D, glutathione과 같은 항산화제를 필요로 한다. 산소호흡이 유지되는 한 산소는 세포내에서 계속적으로 이용되어 superoxide anion radical, hydrogen peroxide,

hydroxy radical 등이 끊임없이 생성되어 지며 산화적인 스트레스는 이러한 활성산소종의 생산이 항산화 방어체계를 압도할 때 발생된다(Fridorich 1978; Dreher and Junod 1996).

또한 생체내에서는 nitric oxide synthase에 의해서 arginine, 산소, 그리고 NADPH로부터 nitric oxide(NO·)가 생성되는데 이는 병원균을 죽이거나 신경회로전달 및 혈류조절을 하는 역할을 한다(Klotz et al. 2002). NO는 O₂⁻와 빠르게 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite를 형성하는데 이 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 자유라디칼은 아니지만 생존기간이 매우 짧고

*Corresponding author. E-mail : ywseo@hhu.ac.kr

NO나 O₂⁻보다 훨씬 반응성이 강하여 thiols, lipids, proteins, 그리고 nucleic acids 등과 같은 많은 중요한 생체물질에 ·OH보다 더 강한 산화적 손상을 야기시켜, 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부염증 등 여러 질환과 관련이 되는 것으로 보고되고 있다(Virlag et al. 2003; Patcher et al. 2005; Drel et al. 2007; Korda et al. 2008).

염분은 식물의 성장과 생산성에 큰 영향을 미치는 주요한 환경인자로서 식물조직에 산화 스트레스를 발생시키며 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical과 같은 여러 가지 활성산소종을 유도한다. 염생식물은 간석지나 해안사구 등과 같이 토양의 염분농도가 높은 지역에서 자라는 식물을 말하는데 이러한 식물들은 염분에 의한 산화적 스트레스를 견디거나 제거할 수 있는 항산화 방어 체계를 잘 발달시켜 왔다는 것이 보고되고 있다(Jithesh et al. 2006; Hamed et al. 2007; Ksouri et al. 2008; Ksouri et al. 2009).

갯질경이 [*Limonium tetragomum* (Thunb.) A. A. Bullock] 는 두해살이풀로서 높이는 30-60 cm 정도이며 뿌리 윗부분에서 10-30 cm의 길쭉한 주걱모양의 잎들이 사방으로 돌려 나며 8-10월에 황색의 꽃이 피고 10-11월에 종자가 결실된다. 주로 바닷가 소금기가 많은 갯벌의 윗부분이나 모래땅에서 자라며, 연한 잎은 나물로 해서 먹고, 뿌리도 식용으로 사용된다. 최근에 갯질경이의 추출물을 이용한 암세포 증식억제 효과에 대해 보고된 바 있으나 여전히 이에 대한 생리활성이나 이차 대사물질에 관한 연구는 거의 보고되지 않았다(Kong et al. 2008). 따라서 본 연구에서는 갯질경이의 추출물 및 분획물을 제조하고 4종의 플라보노이드 계열의 화합물을 분리하여 이들의 peroxynitrite에 대한 소거효과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

시료의 추출, 용매분획 및 화합물의 분리

실험에 사용한 갯질경이 (*L. tetragomum*)는 2003년 5월 전라남도 여수시 울촌면에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25°C에서 냉동 보관하였다.

냉동보관된 갯질경이는 해빙하여 추출에 적합한 크기로 세절한 후 CH₂Cl₂(3 l)를 가하여 24시간 동안 방치한 후 여과하고 남은 잔사에 다시 CH₂Cl₂(3 l)를 가하여 동일한 과정을 반복하여 용매 추출액을 얻었다. MeOH 용매에 대해서도 CH₂Cl₂와 동일한 방법으로 MeOH 용매 추출액을 얻었으며, 이렇게 얻어진 두 종류의 용매 추출물을 각각 진공증발기로 농축하여 조추출물을 얻었다. 두 종류의 조추출물을 혼합한 조추출물(24.41 g)을 용매극성에 따라 *n*-hexane(1.70 g), 85% aq. MeOH(0.34 g), *n*-BuOH(3.08 g), 그리고 H₂O(18.92 g) 분획으로 나누었으며, 그 중 *n*-

BuOH 분획(3.08 g)은 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography를 실시하여 7개의 fraction(50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq. MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc)으로 나누었다. 그 중 첫 번째 fraction(2.55 g)을 HP-20 (Diaion™ HP-20, Supelco)와 LH-20 Sephadex(bead size 25-100 mm, Sigma) column chromatograph를 실시하여 순수한 화합물 **1**(153.5 mg)과 subfraction(128.2 mg)을 얻었으며, subfraction은 reversed-phase HPLC(YMC ODS-A, 40% aq. MeOH)를 통해 순수한 화합물인 **2**(16.2 mg)와 2개의 화합물이 섞인 혼합물을 얻을 수 있었다. 이 혼합물은 다시 reversed-phase HPLC(YMC ODS-A, 20% aq. MeCN)를 실시하여 순수한 두 화합물인 **3**(14.2 mg)과 **4**(4.6 mg)를 분리하였다.

Myricetin-3-O-β-D-galactopyranoside(**1**): yellow powder; m.p. 191-195°C; [α]₂₅^D-8.08(c 0.37, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.36(1H, s, H-2'), 7.36(1H, s, H-6'), 6.38(1H, d, J=1.9 Hz, H-8), 6.18(1H, d, J=1.9 Hz, H-6), 5.18(1H, d, J=7.7 Hz, H-1"), 3.86(1H, d, J=2.2 Hz, H-4"), 3.82(1H, dd, J=7.7, 9.6 Hz, H-2"), 3.65(1H, m, Ha-6"), 3.58(1H, m, H-3"), 3.56(1H, m, Hb-6"), 3.49(1H, m, H-5"); ¹³C NMR(75 MHz, CD₃OD) δ 179.1(C-4), 165.9(C-7), 162.8(C-5), 158.4(C-2), 158.1(C-9), 146.2(C-3'), 146.2(C-5'), 138.0(C-4'), δ 135.8(C-3), 121.5(C-1'), 109.8(C-2'), 109.8(C-6'), 105.5(C-10), 105.4(C-1"), 99.8(C-6), 94.6(C-8), 77.1(C-5"), 75.0(C-3"), 73.2(C-2"), 70.0(C-4"), 61.9(C-6")

Myricetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside(**2**): yellow powder; m.p. 170-174°C; [α]₂₅^D-135.3(c 0.06, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.93(1H, s, H-2'), 6.93(1H, s, H-6'), 6.35(1H, d, J=1.9 Hz, H-8), 6.19(1H, d, J=1.9 Hz, H-6), 5.30(1H, brd, J=1.4 Hz, H-1"), 4.21(1H, brd, J=1.4 Hz, H-2"), 3.78(1H, dd, J=9.4, 3.3 Hz, H-3"), 3.51(1H, dq, J=9.4, 6.1 Hz, H-5"), 3.35(1H, t, J=9.4 Hz, H-4"), 0.96(3H, d, J=6.3 Hz, H-6"); ¹³C NMR(75 MHz, CD₃OD) δ 179.1(C-4), 165.6(C-7), 163.0(C-5), 159.3(C-2), 158.3(C-9), 146.7(C-3'), 146.7(C-5'), 137.7(C-4'), 135.1(C-3), 121.8(C-1'), 109.5(C-2'), 109.5(C-6'), 105.8(C-10), 103.5(C-1"), 99.7(C-6), 94.6(C-8), 73.3(C-4"), 72.1(C-3"), 72.0(C-5"), 71.8(C-2"), 17.7(C-6")

Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside(**3**): yellow powder; m.p. 212-216°C; [α]₂₅^D-12.9(c 1.0, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.68(1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.57(1H, dd, J=2.0, 8.5 Hz, H-6'), 6.84(1H, d, J=8.5 Hz, H-5'), 6.38(1H, brs, H-8), 6.19(1H, d, J=1.9 Hz, H-6), 5.22(1H, d, J=7.4 Hz, H-1"), 3.70(1H, dd, J=11.8, 2.2 Hz, Ha-6"), 3.56(1H, dd J=11.8, 5.0 Hz, Hb-6"), 3.46(1H, dd,

$J=7.7, 9.6$ Hz, H-2"), 3.40(1H, m, H-3"), 3.34(1H, m, H-4"), 3.21(1H, m, H-5"); ^{13}C NMR(75 MHz, CD_3OD) δ 179.3 (C-4), 165.9(C-7), 162.9(C-5), 158.8(C-2), 158.3(C-9), 149.7 (C-4'), 145.8(C-3'), 135.5(C-3), 123.1(C-6'), 122.9(C-1'), 117.4(C-2'), 115.9(C-5'), 105.6(C-10), 104.2(C-1"), 99.8 (C-6), 94.7(C-8), 78.7(C-5"), 78.1(C-3"), 75.7(C-2"), 71.2 (C-4"), 62.5(C-6")

Quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside(4): yellow powder; m.p. 224-228°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -12.5(c 0.9, MeOH); ^1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ 7.82(1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2'), 7.57(1H, dd, $J=1.9, 8.5$ Hz, H-6'), 6.84(1H, d, $J=8.53$ Hz, H-5'), 6.18(1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6), 6.38(1H, d, $J=1.9$ Hz, H-8), 5.16(1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1"), 3.84(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-4"), 3.81(1H, dd, $J=7.7, 9.6$ Hz, H-2"), 3.64(1H, m, H-6"), 3.56(1H, m, H-3"), 3.54(1H, m, H-6"), 3.46(1H, m, H-5"); ^{13}C NMR(75 MHz, CD_3OD) δ 179.3(C-4), 166.0 (C-7), 162.8(C-5), 158.5(C-2), 158.2(C-9), 149.8(C-4'), 145.6(C-3'), 135.6(C-3), 122.7(C-1'), 122.7(C-6'), 117.6 (C-2'), 115.9(C-5'), 105.5(C-10), 105.2(C-1"), 99.8(C-6), 94.6(C-8), 77.1(C-5"), 75.0(C-3"), 73.1(C-2"), 70.0(C-4"), 61.9(C-6")

DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, Sigma, MO, USA) 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 1 ml ethanol에 녹인 DPPH 원액 1.2 ml와 3 ml ethanol 그리고 0.5 ml DMSO 를 동일 비율로 혼합하여 DPPH radical solution을 준비한다. 900 μl 의 DPPH radical solution과 준비된 100 μl 시료를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)를 사용하여 518 nm에서 흡광도를 측정하였다(Blois 1958). 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며, 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94-0.97이 되도록 조정하였다.

Peroxynitrite 소거 활성 측정

갯질경 조추출물이 authentic ONOO⁻와 SIN-1에서 유래된 ONOO⁻에 대해 가지는 소거 효과를 Kooy 등(Kooy et al. 1994)의 방법을 이용하여 측정하였으며, ONOO⁻ 소거율은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrohodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다. Dimethylformamide로 녹인 DHR 123(5 mM) stock 용액은 질소로 purge하여 -80°C에 보관하였고, 50 mM sodium

phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합한 buffer(pH 7.4)와 100 μM DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid)를 혼합한 용액으로 DHR 123을 5 μM 로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR 123 buffer 용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 뒤, Victor3 multilabel plate reader를 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 실온에서 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. SIN-1은 NO와 O₂⁻를 동시에 발생시켜 ONOO⁻를 생성시키는 화합물로서 authentic peroxynitrite의 급속한 DHR 123의 산화와는 달리 점진적으로 산화가 일어나게 한다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

세포 배양

사람의 섬유육종 세포인 HT-1080은 한국 세포주 은행(Korean cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받아 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Utah, USA)이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Hyclone, Utah, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Forma Scientific, Japan)에서 배양하였다. 세포 배양은 2일 간격으로 배지를 교환하였으며, 6-7일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

세포내 SIN-1 유도 ONOO⁻ 측정

Kooy 등 (1994)의 방법을 변형하여 세포내 SIN-1 유도에 의한 peroxynitrite level을 측정하였다. HT-1080 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. PBS로 희석한 20 μM SIN-1을 처리한 후, 일정한 농도의 시료를 첨가하고 6시간 동안 배양하였다. PBS로 3회 씻은 후, 20 μM DHR 123(dihydrohodamine 123)로 처리하고 2시간 후, ex. 485 nm, em. 530 nm에서 peroxynitrite의 변화를 Victor3 multilabel plate reader로 측정하였다.

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(Mean)±표준편차(Standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System v9.1(SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

3. 결과 및 고찰

조추출물 및 용매 분획층의 ONOO⁻ 소거 활성

갯길경의 조추출물과 분획물에 대한 authentic ONOO⁻의 소거 효과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이, 실험에 사용된 모든 시료에서 authentic ONOO⁻를 유의적으로 소거하는 것으로 나타났다. 100 µg/ml의 농도에서 *n*-BuOH 분획은 100%에 달하는 높은 ONOO⁻ 소거율을 보였으며, 차순으로는 85% aq. MeOH, H₂O, *n*-hexane 분획의 순서로 각각 68%, 53%, 23%의 소거율을 보였다. 그리고 *n*-BuOH 분획과 85% aq. MeOH 분획의 경우 각각 10과 50 µg/ml 이상의 농도에서 50% 이상 authentic ONOO⁻를 소거하는 것으로 나타났다. 특히, *n*-BuOH 분획의 경우, 10 µg/ml 농도에서 85% 가량의 소거율을 보였으며, 이는 positive 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid(비타민 C)의 81% 소거율보다 더 높은 효과이다.

SIN-1에서 유래된 ONOO⁻에 대해 처리한 결과(Fig. 2), positive 대조군인 비타민 C와 penicillamine보다는 낮은 소거율을 보이지만 대부분의 추출물 및 분획층이 SIN-1에

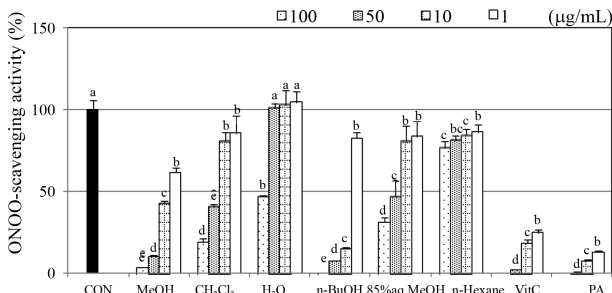


Fig. 1. Effects of crude extracts and solvent fractions from *L. tetragonum* on authentic peroxynitrite. ^{a-e}Means with different letters in each fraction are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

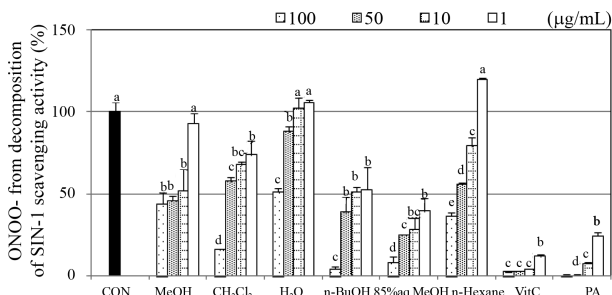


Fig. 2. Effects of crude extracts and solvent fractions from *L. tetragonum* on peroxynitrite from decomposition of SIN-1. ^{a-d}Means with different letters at the same concentrations are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

의해 생성된 ONOO⁻를 효과적으로 소거하는 것으로 나타났다. 100 µg/ml의 농도에서 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane, H₂O 분획의 순서로, 각각 96%, 92%, 63%, 49%의 소거율을 보였다. 특히, 85% aq. MeOH과 *n*-BuOH 분획은 1 µg/ml의 농도에서도 SIN-1에 의해 생성된 ONOO⁻를 50% 정도 소거하였다.

HT-1080 세포내에서 유도된 ONOO⁻에 대한 조추출물 및 용매 분획층의 소거 활성

in vitro 활성검색에서 뛰어난 ONOO⁻ 소거 활성을 보여준 조추출물 및 용매 분획층을 이용하여, 세포내에서 생성된 ONOO⁻에 대한 소거활성을 측정하였다. HT-1080 세포를 이용하여 실험하였으며, ONOO⁻소거 활성을 검색하기 전에 시료의 세포 생존에 영향을 미치는 농도를 검색하여 세포 독성이 없는 50 µg/ml의 농도 이하에서 실험하였다. 세포내 ONOO⁻에 대한 소거 활성 측정 결과, Fig. 3에 보여진 것처럼, H₂O 층을 제외한 모든 조추출물 및 분획물이 세포내 ONOO⁻를 유의적으로 소거하는 것으로 나타났다. 특히 *n*-BuOH 층과 85% aq. MeOH 층의 경우에는, 50 µM 농도에서 각각 32%, 43%의 ONOO⁻ 소거율을 나타내어, SIN-1을 처리하지 않은 blank의 35%와 유사하거나 더 높은 활성을 보여 주었다.

Flavonol 유도체들의 분리와 구조결정

갯길경의 용매 분획층에서 가장 우수한 ONOO⁻ 소거 활성을 나타낸 *n*-BuOH 분획으로부터 여러 종류의 크로마토그래피를 이용하여 flavonol glycosides를 분리하였다. 분리된 4개의 화합물은 NMR 스펙트럼 분석(Varian NMR 300 spectrometer, USA)을 통해 구조를 결정하였다. 이들은 이미 보고된 바 있는 myricetin-3-O-β-D-galactopyranoside(1), myricetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside(2), quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside(3), quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside(4)로서 분광학적인 데이터가 문헌에

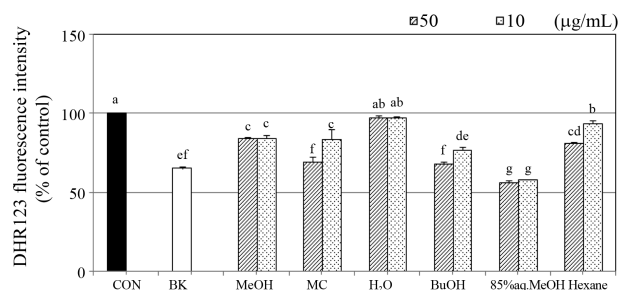


Fig. 3. Effects of crude extracts and solvent fractions from *L. tetragonum* on intracellular peroxynitrite from decomposition of SIN-1 in HT-1080 cells. ^{a-g}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

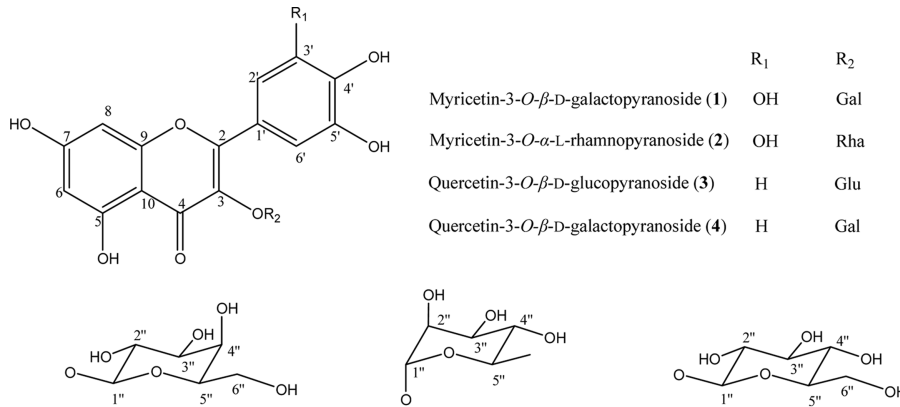


Fig. 4. Chemical structures of flavonol glycosides (1-4) isolated from *L. tetragonum*

보고된 값과 잘 일치하였다(Foo et al. 2000; Chung et al. 2004; Kong et al. 2008; Lee et al. 2007).

Yamazaki et al. 2007; Yoshimura et al. 2008; Hossein et al. 2010).

Flavonol 유도체들의 DPPH radical 소거 활성

분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성을 대조군을 기준으로 백분율로 나타내었으며, positive control로서 비타민 C를 사용하여 비교하였다. 분리된 4개의 화합물은 Fig. 5에서 보여진 것처럼 DPPH radical를 효과적으로 소거하였다. 50 μM의 농도에서 비타민 C의 DPPH radical 소거 활성(86%)보다는 다소 떨어지지만 모든 화합물이 80% 이상의 소거율을 나타냈으며, 25 μM 농도에서는 1 > 3 = 4 > 2의 순서로 각각 82%, 79%, 79%, 77%의 소거율을 나타내었는데, 이는 58%의 소거율을 가지는 비타민 C보다 훨씬 높은 소거율을 보여 주었다. 1과 3번 화합물의 경우에는, 10 μM의 농도에서도 50% 이상 DPPH radical를 소거하는 것으로 나타났다. 이 화합물들의 DPPH 라디칼 소거효과에 대해서는 이미 여러 문헌에서 각각의 화합물에 대해 보고되었으나 여기서는 이 화합물들의 상대적인 라디칼 소거효과를 비교하기 위하여 측정이 이루어 졌다(Conforti et al. 2002; Cho et al. 2003;

Flavonol 유도체들의 ONOO⁻ 소거 활성

분리된 4가지 화합물의 ONOO⁻에 대한 소거 활성검색 결과, Fig. 6에 보여진 것과 같이 분리된 모든 화합물이 ONOO⁻를 유의적으로 소거함을 확인할 수 있었다. 50 μM 이상의 농도에서 분리된 화합물 모두가 ONOO⁻를 90% 이상 소거하는 높은 활성을 나타냈으며, 1 μM 농도에서는 화합물 1-4는 각각 56, 37, 56, 54%의 소거율을 나타내었다. 이와 같이 1, 3, 4번 화합물은 1 μM 농도에서도 positive 대조군으로 사용된 비타민 C(54%)와 비교될 만큼 높은 소거활성을 보였다.

SIN-1 분해에 의해 생성되는 ONOO⁻의 소거 활성 측정 결과(Fig. 7), positive 대조군인 vitamine C와 penicillamine 보다 낮은 소거효과를 가지지만 대조군과 비교시 모든 화합물에서 SIN-1에 의해 생성된 ONOO⁻를 효과적으로 소거함을 확인하였다. 50 μM 이상의 농도에서 3 > 2 > 1 > 4 이 각각 90%, 87%, 86%, 84%로 80% 이상의 ONOO⁻ 소거율을 나타냈으며, 10 μM 농도에서는 화합물 1-4가 여

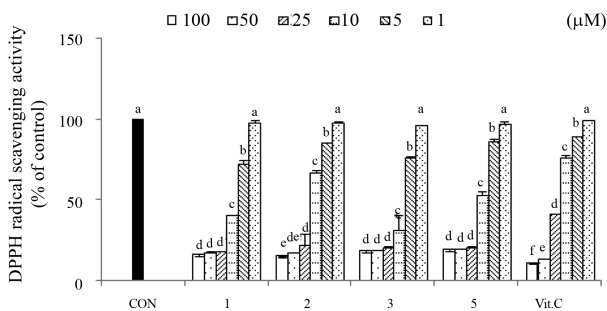


Fig. 5. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 1-4 from *L. tetragonum*. a-f Means with different letters in each compound are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test

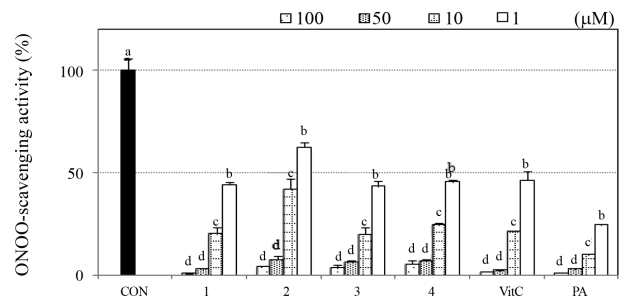


Fig. 6. Effects of isolated compounds 1-4 from *L. tetragonum* on authentic peroxynitrite. a-d Means with different letters in each compound are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test

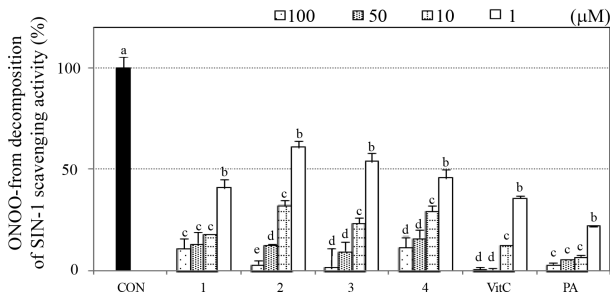


Fig. 7. Effects of isolated compounds 1-4 from *L. tetragonum* on peroxynitrite from decomposition of SIN-1. ^{a-e}Means with different letters in each compound are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test

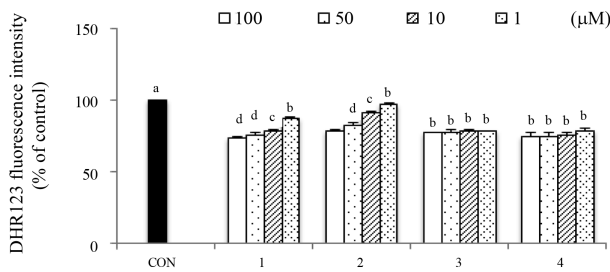


Fig. 8. Effects of isolated compounds 1-4 from *L. tetragonum* on intracellular peroxynitrite from decomposition of SIN-1 in HT-1080 cells. ^{a-e}Means with different letters in each compound are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test

전히 각각 82, 68, 76, 70%의 좋은 소거율을 나타내었다. 1 μM 농도에서도 화합물 1-4가 59, 39, 44, 54%의 소거율을 나타내어 1과 4번 화합물이 50% 이상의 소거효과가 있음을 보여주었다.

HT-1080 세포내에서 유도된 ONOO⁻에 대한 flavonol 유도체들의 소거 활성

먼저 분리된 화합물의 HT-1080 세포에 대한 세포 독성을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과, 100 μM의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 나타났으므로, 이 농도 이하에서 HT-1080 세포에 SIN-1을 처리할 때 생성되는 ONOO⁻의 소거 활성을 검색하였다(Fig. 8). 세포내 ONOO⁻의 소거 활성 측정 결과, 모든 화합물들이 대조군과 비교할 때 세포내 생성된 ONOO⁻를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났으며, 100 μM의 농도에서 모든 화합물이 20% 이상의 ONOO⁻ 소거 효과를 나타내었다. 1, 3, 4의 경우에는 10 μM 농도에서도 각각 21%, 21%, 24%로 20% 이상의 소거율을 보여주었다.

4. 결 론

염생식물 갯질경이의 질소활성종인 peroxynitrite에 대한 소거효과를 검토하기 위하여 갯질경이 추출물과 용매 분획물에 대한 활성검색을 실시하였다. 조추출물에 대한 검색결과 100 μg/ml의 시료처리 농도에서 좋은 peroxynitrite 소거효과를 보여주었다. 또한 극성에 따른 항산화 활성을 관찰하기 위하여 조추출물을 순차적으로 용매분획하여 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 및 H₂O의 4가지 분획물을 얻었으며 이들에 대한 항산화 활성을 검토한 결과 authentic peroxynitrite에 대한 *n*-hexane 층의 소거효과를 제외하고 모든 용매분획이 authentic peroxynitrite 및 SIN-1으로부터 유도된 peroxynitrite에 대해 좋은 소거효과를 보여주었다. 특히 *n*-BuOH 분획은 100 μg/ml의 농도에서 positive control인 비타민 C와 penicillamine 보다 더 좋거나 거의 필적하는 소거효과를 보여주었다.

따라서 peroxynitrite에 대해 가장 소거활성이 높은 *n*-BuOH 분획으로부터 활성성분들의 분리를 시도하였으며 모두 4개의 flavonol 유도체들이 얻어졌다. 이 화합물들의 peroxynitrite에 대한 소거효과는 이미 상기 결과에서 보여진 바와 같이 매우 우수하여 *n*-BuOH 분획의 주된 활성성분임을 확인할 수 있었다. 특히 화합물 1, 3, 4는 authentic peroxynitrite에 대해서 1 μM의 농도에서 50% 이상 그리고 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite에 대해서는 1 μM의 농도에서 1과 4가 50% 이상의 높은 소거효과를 나타내었다. 또한 생체 시스템에 보다 더 유사하다고 여겨지는 HT-1080 세포내에서 유도되어 생성된 peroxynitrite 소거 활성검색에서도 10 μM의 농도에서 20% 이상의 유의적인 소거효과를 보여 주었다.

이 flavonol 유도체들은 지금까지 갯질경이에서는 한 번도 분리된 적이 없으며 peroxynitrite 소거효과에 대해서도 단지 화합물 4만 유일하게 authentic peroxynitrite에 대한 소거효과가 보고되었다(Park et al. 2010). 이상의 결과로부터 해양생물 중 염생식물의 한 종류인 갯질경이가 높은 항산화효과를 가진 새로운 기능성 소재로서의 개발 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. *n*-BuOH 분획 다음으로 peroxynitrite 소거효과가 좋았던 85% aq. MeOH 분획으로부터 항산화 활성성분을 분리하기 위한 추가적인 연구가 현재 진행중에 있다.

사 사

본 연구는 2010년 농림수산식품부 수산기술개발사업 (No. 20100293) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 국토해양부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력 양성사업의 연구결과입니다.

참고문헌

- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**:1199-1200
- Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine* **10**:544-551
- Chung SK, Kim YC, Yoshiaki T, Kenji T, Masatake N (2004) Novel flavonol glycoside, 7-O-methyl meansitrin, from *Sageretia theezans* and its antioxidant effect. *J Agric Food Chem* **52**:4664-4668
- Conforti F, Statti GA, Tundis R (2002) Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia* **73**:479-483
- Dreher D, Junod F (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* **32**:30-38
- Drel VR, Patcher P, Vareniuk I, Pavlov I, Lyzogulbov VV, Grovez JT, Obrosova IG (2007) A peroxyxynitrite decomposition catalyst counteracts sensory neuropathy in streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol* **569**:45-48
- Foo LY, Lu Y, Molan AL, Woodfield DR, McNabb WC (2000) The phenols and prodelfinidins of white clover flowers. *Phytochemistry* **54**:539-548
- Fridorich L (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**:875-881
- Hamed KB, Castagna A, Salem E, Ranieri A, Abdelly C (2007) Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regul* **53**:185-194
- Hansen MB, Nielsen SE, 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
- Hossein N, Mohajjel KE, Khadijeh Z (2010) Free radical scavengers from the aerial parts of *Euphorbia petiolata*. *J Nat Med* **64**:187-190
- Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KP, Parida AK (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *J Genet* **85**:237-254
- Klotz LO, Schroeder P, Sies H (2002) Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stressresponsive pathways. *Free Radic Biol Med* **33**:737-743
- Kong CS, Kim YA, Kim MM, Park JS, Kim JA, Kim SK, Lee BJ, Nam TJ, Seo Y (2008) Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. *Toxicol In Vitro* **22**:1742-1748
- Kong CS, Um YR, Lee JI, Kim YA, Lee JS, Seo Y (2008) Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells. *Korean J Biotechnol Bioeng* **23**:177-182
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology Medicine* **16**:149-156
- Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T (2008) Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**:1514-1521
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magne C, Abdelly C (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol* **47**:2083-2209
- Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C (2008) Influence of biological, environmental and technical factorson phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comp Ren Biol* **331**:865-873
- Lee DY, Lyu HN, Kwak HY, Jung L, Lee YH, Kim DK, Chung IS, Kim SH, Baek NI (2007) Isolation of Flavonoids from the Fruits of *Cornus kousa* Burg. *J Appl Biol Chem* **50**:144-147
- Park HJ, Nugroho A, Jung B, Won YH, Jung YJ, Kim WB, Choi JS (2010) Isolation and quantitative analysis of flavonoids with peroxyxynitrite-scavenging effect from the young leaves of *Heracleum moellendorffii*. *Korean J Plant Res* **23**:393-398
- Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Ko DO, Wang ZH, You HJ, Kim HS, Kim JS, Kang SS, Hyun JW (2008) Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochim Biophys Acta* **178**:1448-1457
- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* **140-141**:113-124
- Yamazaki E, Inagaki M, Kurita O (2007) Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit. *Food Chem* **100**:171-177
- Yoshimura M, Akamura Y, Mie T, Yoshida T (2008) Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *J Nat Med* **62**:366-368

Received May 15, 2011

Revised May 24, 2011

Accepted May 30, 2011