



Original Article / 원저

## 황련 추출물의 LC-MS/MS 분석 및 항염증 효과

김민정<sup>1#</sup>, 양예진<sup>1#</sup>, 김광연<sup>2#</sup>, 김훈환<sup>1</sup>, 손재동<sup>1</sup>, 양주혜<sup>2</sup>, 이동빈<sup>1</sup>, 김우현<sup>1</sup>, 이후장<sup>1</sup>, 박선빈<sup>3\*</sup>,  
박광일<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경상국립대학교 수의과대학

<sup>2</sup>한국한의학연구원 한의기술응용센터

<sup>3</sup>동국대학교 한의과대학 방제학교실

## LC-MS/MS analysis and anti-inflammatory effects of crude extract from *Coptidis Rhizoma*

Min-Jung Kim<sup>1#</sup>, Ye-Jin Yang<sup>1#</sup>, Kwang-Youn Kim<sup>2#</sup>, Hun Hwan Kim<sup>1</sup>, Jae Dong Son<sup>1</sup>,  
Ju-Hye Yang<sup>2</sup>, Dong bin Lee<sup>1</sup>, Woo Hyun Kim<sup>1</sup>, Hu-Jang Lee<sup>1</sup>, Seon Been Bak<sup>3\*</sup> and  
Kwang-Il Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

<sup>2</sup>Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental  
Medicine

<sup>3</sup>School of Korean Medicine, Dongguk University

### ABSTRACT

**Objectives** : The main aim of this study was to examine the LC-MS/MS used to identify phenolic compounds of CRE(*Coptidis Rhizoma* 70% EtOH Extract). Also, we investigated antioxidative activities and Anti-inflammatory activities.

**Methods** : LC-MS/MS Analysis HPLC and LC-MS/MS were performed on a 1260 series HPLC system (Agilent Technologies, Inc., California, USA) and 3200 QTrap tandem mass system (Sciex LLC) operated in positive ion mode (spray voltage set at -4.5 kV). The solvent used was DW and Acetonitrile containing 0.1% formic acid, a gradient system was used at a flow rate of 0.5 mL/min for analysis, and a Prontosil C18 column (length, 250 mm; inner diameter, 4.6 mm; particle size, 5 μm; Phenomenex Co., Ltd., California, USA, Biochoff Chromatography) was used. The solvent conditions used in the mobile phases were 0-10 min at 10-15% B, 10-20 min at 20% B, 20-30 min at

25%, 30-40 min at 40%, 40-50 min at 70%, 50-60 min at 95%, and 60-70 min at 95%. The analysis was performed at a wavelength of 284 nm and a temperature of 35°C. The cell viability was measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. We examined the effects of CRE on the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide (NO) in a RAW 264.7 cells

**Results :** The chemical analysis CRE by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) confirmed that Rosmarinic acid, Ferrulic acid, 3-O-feruloylquinic acid, and 5-O-feruloylquinic acid as phenolic components. DPPH radical scavenging activity was the inhibitory activity of CRE showed at 200 µg/mL a statistically significant level. MTT assay demonstrated that the CRE did not have a cytotoxic effect in RAW 264.7 and LPS-induced RAW264.7 cells. Also, CRE reduced NO production in RAW 264.7 cells stimulated with LPS.

**Conclusions :** Based on these findings, The chemical analysis 4 major components CRE such as Rosmarinic acid, Ferrulic acid, 3-O-feruloylquinic acid, and 5-O-feruloylquinic acid. Moreover, we confirmed that CRE has effects antioxidant and anti-inflammatory. The results demonstrate that CRE can be used as an antioxidant and a powerful chemopreventive ingredient against inflammatory diseases.

**Key words :** LC-MS/MS, Anti-inflammatory, Antioxidant, *Coptidis Rhizoma*.

## I. 서론

황련은 중국어로 Huanglian이라고도 알려진 *Coptidis rhizome*(CR)은 *Coptis chinensis* Franch의 뿌리 줄기이다. 현대 약리학 연구에서 황련은 신경 보호<sup>1)</sup>, 항염증<sup>2), 3), 4)</sup>, 항비만<sup>3)</sup>, 항산화<sup>5), 6)</sup>, 항암<sup>7)</sup>, 항죽상경화증<sup>8)</sup> 및 항당뇨<sup>9)</sup> 등의 효능을 가지고 있음이 입증되었다. 이 뿐만 아니라 황련의 주성분은 isoquinoline계 alkaloid인 berberine으로 그람 음성균에 대한 광범위한 항균 작용과<sup>10)</sup> 함께 항염증 및 항암 작용<sup>11)</sup>, 항산화 작용<sup>12)</sup>, 피부염증<sup>13)</sup>에도 큰 효과를 나타낸다. 다양한 효능을 가진 황련은 한약재로서의 활용도 높으며, 천연물 신약 개발 분야에서도 많이 응용된다<sup>14)</sup>.

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포벽에서 유도된 화합물로 염증성 사이토카인의 강력한 유도제로 알려져 있다. LPS는 RAW 264.7에서 nitric oxide(NO), cyclooxygenase-2(COX-2), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6(Interleukin-6) 등과 같은 많은 염증 매개체를 상향 조절할 수 있다<sup>15)</sup>. LPS와 LPS로 유도된 염증성 사이토카인은 혈관 투과성을 증가시

키고, 암세포의 혈관 외 유출을 유도하는 암세포 및 내피 세포에 부착 분자의 발현을 향상시키는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>.

일중항 산소(1O<sub>2</sub>)은 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 같은 라디칼 유도체로, 자유라디칼(Free radical)의 한 종류이다. 자유라디칼은 짝을 이루지 않은 전자를 운반하고 독립적인 존재의 원자 또는 분자로서 수명이 짧고 반응성이 높으며 불안정하기에 결과적으로 전자를 잡으려는 다른 물질과의 빠르게 반응한다<sup>17), 18)</sup>. 정상적인 세포의 대사는 ROS를 생성하며 이들은 세포 내 및 세포 외 대사를 변경하는 동물 및 식물 세포의 신호 경로 활성화에 중요한 역할을 한다. 거의 대부분의 ROS는 미토콘드리아의 호흡 통해 세포에서 생성된다<sup>17), 19)</sup>. 내인성 대사 반응 동안 호기성 세포는 분자 산소의 생물학적 감소의 일반적인 생성물로서 슈퍼옥사이드 음이온(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 하이드록실 라디칼(OH·) 및 유기 과산화물을 생성한다. 이뿐만 아니라, 저산소 상태에서의 미토콘드리아 호흡 사슬은 Reactive nitrogen species(RNS)을 생성할 수 있는 NO를 생성한다<sup>17)</sup>. RNS는 과도한 지질 과산화를 유도하여 추가 반응성 중, 예를 들어 반응

#These authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: Seon Been Bak. School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.

E-mail: sbpark@dongguk.ac.kr

\*Corresponding author: Kwang Il Park. College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501, Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3877, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : kipark@gnu.ac.kr

•Received : January 9, 2023 / Revised : January 9, 2023 / Accepted : January 12, 2023

성 aldehyde-malondialdehyde 및 4-hydroxynonenal을 생성하게 되는데 이것은 지질과 단백질은 산화 공격의 중요한 표적이며 이것은 돌연변이 유발 과정을 향상시킬 수 있다<sup>20), 21)</sup>. 최근 몇 년 동안 염증은 다양한 세포 과정을 포함하는 생물 의학 연구자들의 주요 목표 연구 분야 중 하나이다. 일반적으로 염증은 NO와 전 염증성 사이토카인 분비에 의한 자연적인 보호 반응이지만 장기기간의 만성 염증은 해로울 수 있으며, 이는 발열, 천식, 죽상 동맥 경화증, 관절염, 신경 퇴행성 질환 및 심지어 암과 같은 질병의 발병으로 이어진다<sup>12)</sup>. 염증 반응에서 백혈구와 비만 세포는 손상 부위에 존재하며 이는 산소 흡수 증가로 인해 "호흡 폭발"을 일으켜 손상된 부위에서 ROS의 생성 및 방출을 향상시킨다<sup>21), 21)</sup>. 그러나 염증 세포의 경우에는 사이토카인과 같은 더 많은 용해성 염증 매개체를 생성한다. 염증의 경우, 염증 원인을 치료하는 것이 가장 중요하기에 염증의 원인인 염증 매개체의 억제는 염증성 질환의 치료에 사용될 수 있다<sup>13), 16), 22)</sup>.

따라서 본 연구에서는 한약재로 널리 쓰이고 있는 CRE 유효성분 확인하고 CRE에 대하여 약리효과 중 항산화 및 항염증 활성에 대해 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 추출물 제조

황련(*Coptidis Rhizoma*)은 영천 한방 약초시장(영천, 한국)에서 구입하여 건조된 *Coptidis Rhizoma*(CR) 30g를 미세한 분말로 분쇄하고 300 mL의 70% 에탄올을 첨가한 후 40에서 100 rpm으로 진탕기에서 24시간 동안 추출하였다. 그런 다음 추출물을 150  $\mu$ m Sieve (Retsch, Haan, Germany)를 통해 여과하고 증발시키고 동결건조를 통해 농축한 다음 -20에서 보관하였다(수율 15.56%). 실험을 위해 분말(10mg)을 1 mL의 증류수(v/v)에 녹이고 0.22  $\mu$ m 여과하여 CRE(*Coptidis Rhizoma* 70% EtOH Extract)로 명명하고 사용하였다.

### 2. LC-MS/MS 분석 조건

LC-MS/MS는 1260 series HPLC system(Agilent Technologies, Inc.) 및 3200 QTrap tandem mass system(Sciex LLC)에서 negative ion mode(spray voltage set at -4.5 kV)에서 수행하였다. ProntoSil C18 컬럼(길이, 250 mm; 내경, 4.6 mm; 입자 크기, 5  $\mu$ m, Phenomenex

Co., Ltd., Biochoff Chromatography)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 증류수와 B 용매 0.1% formic acid 포함하는 Acetonitrile이고, 이동상에 사용된 용매 조건은 (10-15)% B에서 (0-10)분, 20% B에서 (10-20)분, 25% B에서 (20-30)분, 40% B에서 (30-40)분, 70% B에서 (40-50)분, 95% B에서 (50-70)분 분석을 수행하였다. 분석을 위해 0.5 ml/min의 유속으로 gradient system을 사용하였고 컬럼 오븐 온도는 35°C, 분석파장은 284 nm 수행하였다.

### 3. 세포 생존률 측정 (MTT assay)

RAW 264.7 세포를 24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 24시간 배양하여 0, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL의 CRE와 1  $\mu$ g/mL LPS를 12 시간 처리한 후, 그리고 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 처리하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 살아있는 세포가 시약과 반응하여 생성된 formazan crystal을 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해시키고, microplate 측정기(Tecan Infinite® M200 PRO, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. DPPH 측정방법

Free radical 소거활성 측정 DPPH(1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 항산화 활성은 화합물이 DPPH radical에 전자를 공여함으로써 자유기를 소거하는 활성을 측정하는 것으로 DPPH를 메탄올에 희석하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 0.96~0.97이 되는 농도를 선택하였다. Free radical 활성측정은 96-well microplate spectrophotometer를 사용하여 CRE 100% 증류수에 처리한 후 동량의 1 mM DPPH를 가한 후 암실에서 30분을 두었다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>23)</sup>. DPPH Remaining은 시료첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였다.

DPPH Remaining (%) = (시료첨가구 OD \* 100) / 비첨가구 OD

### 5. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

세포배양액 내의 NO 농도는 Griess 반응법을 이용하여 측정하였다<sup>36)</sup>. 세포는  $5 \times 10^4$  cells/well

96-well plate에 24시간 배양 후 1  $\mu$ g/mL의 LPS를 1시간 동안 처리한 다음, CRE를 농도별(25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL)로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의

상층액을 얻은 후 동량의 Griess 시 (1% sulfanilamide : 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride = 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite(Wako Chemical Co.)를 표준물질로 하여 얻은 표준곡선에 대입하여 산출하였다.

### 6. 통계 처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 유의성 검정은 ANOVA(one-way analysis of variance) 및 student's t-test를 이용하여 P<0.05 수준에서 검증하였다.

## III. 결과

### 1. 황련(Coptidis Rhizoma)의 HPLC-MS/MS 분석

CRE에 함유된 화합물의 정성적 분석은 HPLC-MS/MS

를 통해 얻었다. HPLC 머무름 시간과 UV-vis 스펙트럼을 기반으로 총 4개의 peak가 식별되었다(Fig. 1). 284nm 파장에서 HPLC 크로마토그래프로 얻은 peak에 따라 4종의 페놀화합물이 확인되었다. 4종의 페놀화합물은 Rosmarinic acid(1), Ferulic acid(2), 3-O-feruloylquinic acid(3), 5-O-feruloylquinic acid(4)으로 확인되었다. Table 1에서는 4.74분(1), 5.42분(2), 5.93분(3) 및 7.62분(4)의 머무름 시간에 표시하였고 공개된 출처의 참조 화합물을 기반으로 한 질량 분석 정량 데이터에 대해 설명을 하였다. 본 연구에서는 검출된 페놀화합물의 특성을 규명하는 데 초점을 두었으며, LC-MS/MS로 얻은 분자 이온 peak 및 질량 패턴을 기반으로 검출된 페놀화합물 관한 문헌 데이터와 비교하여 확인하였다. 그 후 표준물질과의 머무름 시간과 스펙트럼 UV max 값을 비교하여 다시 한번 확인하였다. Fig. 2에서는 LC-MS/MS 데이터를 기반으로 화합물의 절단을 예측한 결과이다.

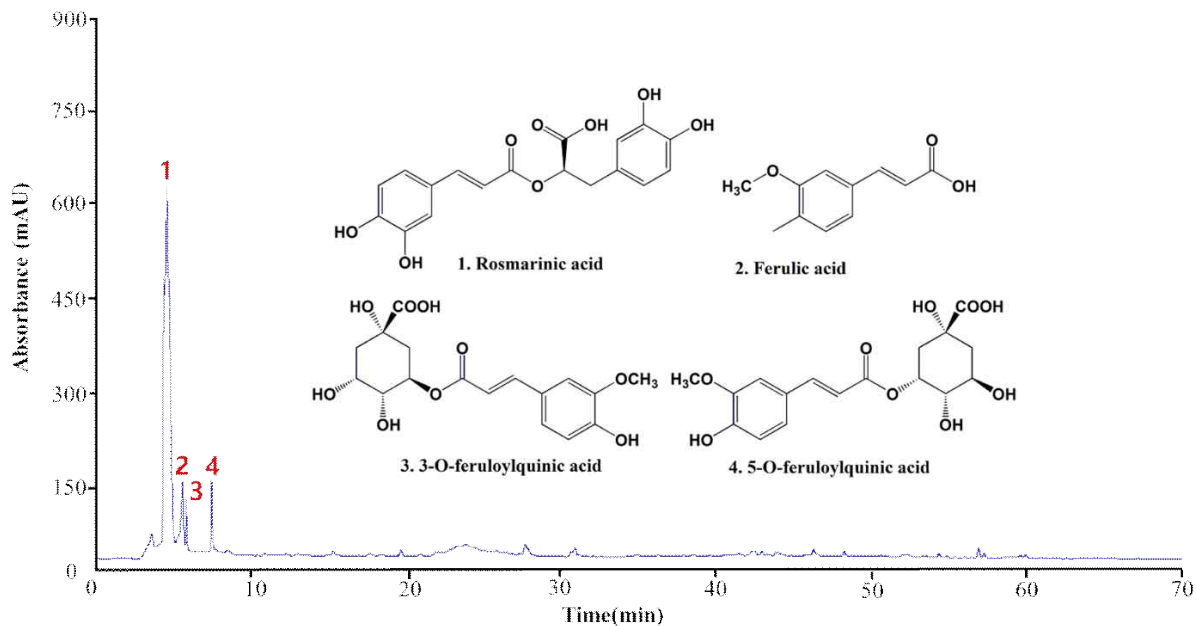


Fig. 1. The HPLC chromatogram and Structure of the polyphenolic compounds in CRE. The detected compounds at the 284nm wavelength are Rosmarinic acid(1), Ferulic acid(2), 3-O-feruloylquinic acid(3), 5-O-feruloylquinic acid(4).

Table 1. The HPLC-MS/MS data of the polyphenolic compounds in *CRE*.

Peak No.	Rt(min)	Formula	Compound	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	Reference
1	4.74	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	Rosmarinic acid	359	197, 179, 161, 135	Desta KT <i>et al.</i> , 2015. <sup>25)</sup>
2	5.42	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Ferulic acid	193	178, 149, 134	Li W <i>et al.</i> , 2003. <sup>26)</sup>
3	5.93	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	3-O-feruloylquinic acid	367	193, 191, 173, 134	Kose YB <i>et al.</i> , 2016. <sup>27)</sup>
4	7.62	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	5-O-feruloylquinic acid	367	191, 173	Kose YB <i>et al.</i> , 2016. <sup>28)</sup>

Rt: retention time.

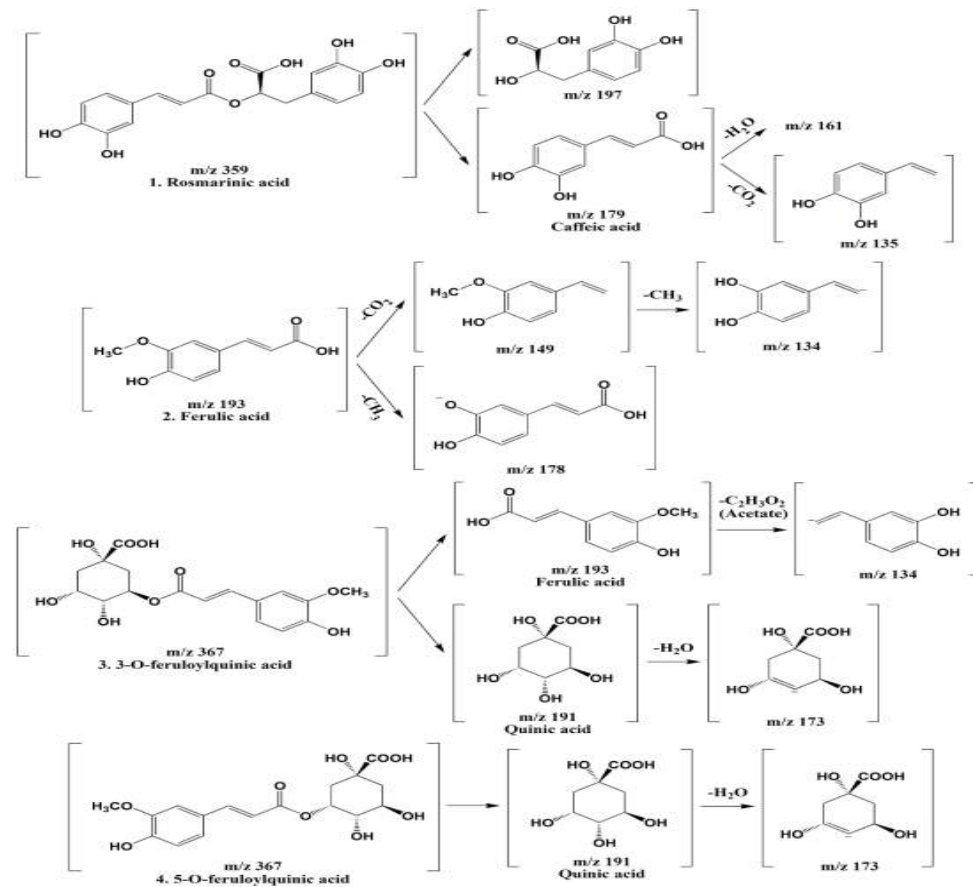


Fig. 2. Fragmentation scheme of polyphenols contained in *CRE*. Proposed fragmentation patterns for Rosmarinic acid(m/z 359), Ferulic acid(m/z 193), 3-O-feruloylquinic acid(m/z 367), 5-O-feruloylquinic acid(m/z 367).

## 2. DPPH radical 양 측정

CRE의 항산화 효능을 측정하기 위한 방법으로 DPPH radical 남아있는 양을 측정하였으며 결과는 Fig.

5에 나타났다. CRE는 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  항산화 효과가 나타났다. 양성 대조군인 Ascorbic acid (AA) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  보다는 낮은 효과가 나타났다(Fig. 3).

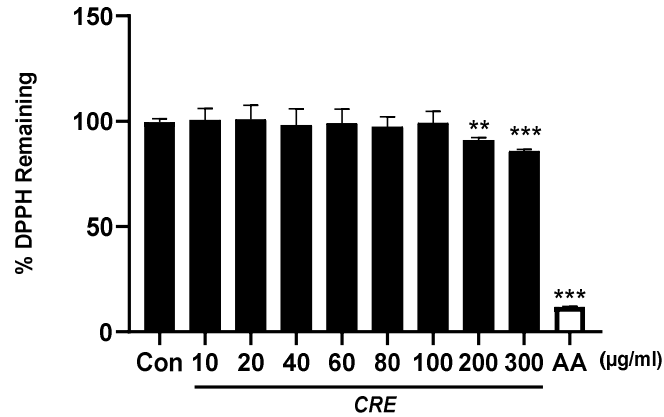


Fig. 3. Effect of CRE on DPPH free radical scavenging activity. The data represent three experiments and are expressed as mean  $\pm$  SE; differences were considered statistically as follows, \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . DPPH free radical scavenging activity for test sample was determined with 1 mM DPPH methanolic solution. Concentration of the CRE was 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 and 300( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). AA: Ascorbic acid.

## 3. 세포 생존율 확인

CRE의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT 분석을 시행하였고, 그 결과를 Fig. 3에 나타났다. DMSO에 용해한 CRE를 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 측정한 결과, 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였고 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의

농도에서도 세포에 대한 독성을 보이지 않았다. 또한 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리한 CRE를 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 세포에 대한 독성을 보이지 않았으므로 이후 세포배양 실험에서는 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 가장 높은 농도로 정하여 실험을 진행하였다.

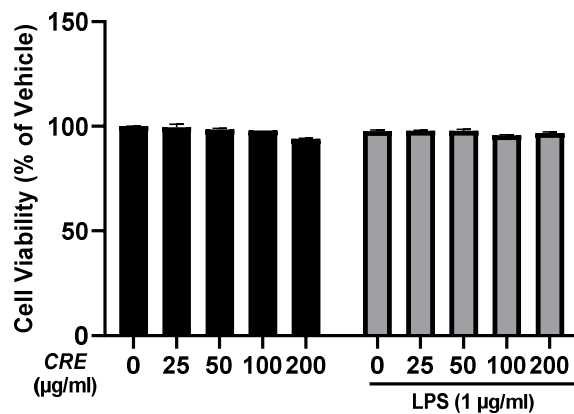


Fig. 3. Effect of CRE on cell viability in RAW264.7 cells and cell viability of the LPS-induced RAW 264.7 cells pretreated with CRE. Values represent mean  $\pm$  SE of three measurements.

#### 4. LPS 로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 Nitric Oxide (NO) 대한 CRE 억제효과

CRE의 항염증 활성을 확인하기 위하여 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하는 효과를 측정하였고, 그 결과를 Fig. 4에 나타냈다. LPS만 처리한 군과 CRE 군

비교하였을 때, NO의 생성량을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 확인하였다. CRE은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 염증물질 NO의 생성을 유의성 있게 감소하였다.

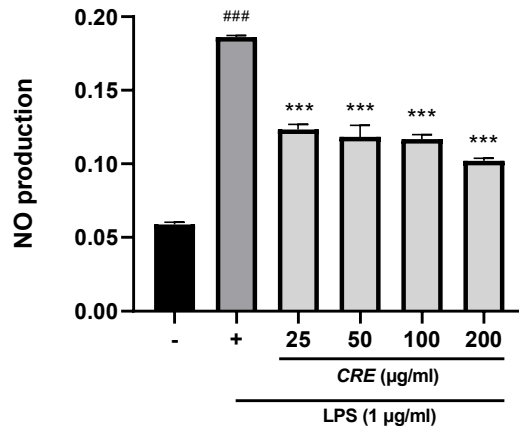


Fig. 4. Effects of the CRE on LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. The data represent three experiments and are expressed as mean  $\pm$  SE; of three independent experiments. ### $p < 0.001$  versus the non-treated control group. \*\*\* $p < 0.001$  versus the control group treated with LPS alone.

#### IV. 고찰

천연물에 존재하는 생리 활성물질인 페놀화합물은 hydroxylation(-OH), O-methylation(-OCH<sub>3</sub>), O-glycosylation 등의 결합 패턴에 따라 다양한 형태를 가지며<sup>28)</sup> 항산화, 항염증 등의 다양한 생리활성 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>29), 30)</sup>. 페놀 화합물은 탄소 수에 따라 hydroxybenzoic acid류(C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>)와 hydroxycinnamic acid류(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)로 구분되며, 이 중 non-flavonoids 물질인 hydroxycinnamic acid류가 더 큰 비중을 차지한다<sup>31)</sup>. Hydroxycinnamic acid 유도체는 caffeic acid와 quinic acid가 ester 결합한 형태의 화합물이다<sup>32), 33)</sup>. Hydroxycinnamic acid는 p-coumaroylquinic acid류, caffeylquinic acid류, feruloylquinic acid류 등을 포함한다<sup>34)</sup>. CRE에서 분리 및 동정된 활성물질 중 Rosmarinic acid는 잘 알려진 hydroxycinnamic acid 한 종류이고 Ferulic acid, 3-O-feruloylquinic acid, 5-O-feruloylquinic acid 또한 hydroxycinnamic acid에 포함된다(Fig. 1, Table 1). CRE의 페놀화합물 성분

(Rosmarinic acid, Ferulic acid, 3-O-feruloylquinic acid, 5-O-feruloylquinic acid)과 생리 활성과의 상관관계를 확인하기 위하여 항산화 및 항염증 활성을 측정하였다.

페놀성 항산화제들은 연쇄반응 과정에서 alkylperoxy radical이나 alkyl radical에 수소를 공여하여 radical을 소거함으로써 산화를 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>35)</sup>. 이러한 환원력은 페놀화합물에 수소 또는 전자를 얻는 것을 말한다. 즉, 페놀이 수소 원자를 radical에 제공하여 안정한 non-radical을 만들고, peroxy radical은 resonance hybrid를 형성할 수 있으므로 산소와 반응이 어려워서 free radical이 안정화가 된다<sup>36)</sup>. CRE에서 확인된 페놀화합물의 특성을 이용한 DPPH 실험 결과에서는 CRE의 200 µg/mL부터 높은 항산화 활성을 나타내었다(Fig. 3). 폴리페놀, 플라보노이드와 DPPH 소거능이 일관되게 비례하는 경향성 있다. 이러한 결과로부터 CRE의 폴리페놀 성분이 free radical을 제거함으로써, 항산화효과가 있는 것으로 보인다. 이러한 항산화효과는 다양한 활성산소로 유발되는 질환을 예방 및 치료

할 수 있으며, CRE는 중요한 항산화제로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

염증(inflammation)반응은 이러한 free radical에 의하여 생체 내의 조직손상을 유발하고 그 외 바이러스와 같은 병원체에 염증매개 물질의해 발생하게 된다. macrophage는 감염초기 생체방어에 중요한 역할을 하며 대표적인 염증 매개물인 NO와 사이토카인 생성에 관여한다<sup>37), 38)</sup>. NO는 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 부산물로 생성된다. 또한 LPS와 같은 세균의 내독소나 여러 가지 사이토카인에 의해 유도되어 생성되기도 한다. NO는 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 물질로 다양한 자극으로 여러 종류의 세포에서 합성된다<sup>39)</sup>. 정상적으로 혈관 확장, 신경 전달 체제, 항균 물질, 면역조절 등의 생체 내에서 긍정적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>40)</sup>. 하지만 병원체 등에 의해 과도하게 증가한 NO는 세포 파괴, 조직 손상, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시켜 다양한 질병 유발하는 요인으로 관여한다<sup>41)</sup>. RAW 264.7 macrophage에서 염증 반응으로 생성되는 NO 측정된 결과에서는 CRE의 200 µg/mL에서 NO의 생성이 가장 많이 억제되었다 (Fig. 4). CRE 추출물의 처리로 LPS에 의해 진행되는 염증과정에서 중요한 매개체인 NO의 생성이 감소시켰으며, 이러한 결과로 CRE가 다양한 염증질환의 치료에 잠재적인 소재로 사용 될 수 있음을 보여준다.

따라서, CRE에서는 4종(Rosmarinic acid, Ferulic acid, 3-O-feruloylquinic acid, 5-O-feruloylquinic acid)의 페놀 화합물 확인할 수 있었고, free radical이 소거됨을 통해 CRE 항산화 효능과 LPS로 유도된 대식 세포에서의 NO억제를 통해 항염증 효과를 확인하였다.

## V. 결론

본 연구에서는 CRE의 LC-MS/MS 이용하여 활성 성분을 확인하였다. 그리고 항산화 및 항염증 효능 확인을 위해 Free radical의 소거 활성과 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CRE는 페놀화합물 성분 중 Rosmarinic acid, Ferulic acid, 3-O-feruloylquinic acid, 5-O-feruloylquinic acid 가진다.

2. CRE는 free radical을 소거함으로써 항산화 효과를 가진다.

3. CRE는 Nitric oxide(NO) 억제함으로써 항염증 효과를 가진다.

이러한 결과에 따라 CRE에서 확인된 Rosmarinic acid, Ferulic acid, 3-O-feruloylquinic acid, 5-O-feruloylquinic acid는 다양한 생리활성을 가진 페놀 화합물로서 향후 천연 항산화제 및 항염증제 소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation (NRF) grant funded by the Korean government (No. 2022R111A3053818), the “Leaders in Industry–university Cooperation 3.0” Project, and supported by the Ministry of Education and National Research Foundation of Korea and by grant (No. 20190055) funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Republic of Korea.

## References

1. Hsu YY, et al. Berberine activates Nrf2 nuclear translocation and protects against oxidative damage via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism in NSC34 motor neuron-like cells. *Eur J Pharm Sci.* 2012 ; 46(5) : 415–25.
2. Yan B, et al. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF-kappaB pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells. *Int Immunopharmacol.* 2017 ; 45 : 194–200.
3. Zou ZY, et al. Coptisine attenuates obesity-related inflammation through LPS/TLR-4-mediated signaling pathway in Syrian golden hamsters. *Fitoterapia.* 2015 ; 105 : 139–46.
4. Gao MY, et al. Berberine inhibits LPS-induced TF procoagulant activity and expression through NF-kappaB/p65, Akt and MAPK pathway in THP-1 cells. *Pharmacol Rep.* 2014; 66(3) : 480–4.





5. Zhao H, et al. Berberine suppresses gero-conversion from cell cycle arrest to senescence. *Aging*. 2013 ; 5(8) :623–36.
6. Yokozawa T, et al. Protective role of *Coptidis Rhizoma* alkaloids against peroxy-nitrite-induced damage to renal tubular epithelial cells. *J Pharm Pharmacol*. 2005 ; 57(3) : 367–74.
7. Zhang Y, Liang Y, He C. Anticancer activities and mechanisms of heat-clearing and detoxicating traditional Chinese herbal medicine. *Chin Med*. 2017 ; 12(1) : 20.
8. Feng M, et al. Comparative effect of berberine and its derivative 8-cetylberberine on attenuating atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *Int Immunopharmacol*. 2017 ; 43:195–202.
9. Zhang DS, et al. Effect of berberine on the insulin resistance and TLR4/IKKbeta/NF-kappaB signaling pathways in skeletal muscle of obese rats with insulin resistance. *J Sichuan Univ Med Sci Ed*. 2015 ; 46(6) : 827–31.
10. Shin HS, You HK, Song KB. Effects of *Rhizoma Coptidis* on Cellular Activity and IL-6 Production of LPS-treated Periodontal Ligament Cells. *Journal of Wonkwang dental Research institute*. 1997 ; 7(1) : 177–91.
11. Tang J, Feng Y, Tsao S, Wang N, Curtain R, Wang Y. Berberine and *Coptidis rhizoma* as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations. *J Ethnopharmacol*. 2009 ; 126(1) : 5–17
12. Liu F, Ng T. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci*. 2000 ; 66(8) : 725–35.
13. Hou C, Chen L, Yang L, Ji X. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides. *Int J Biol Macromol*. 2020 ; 153 : 248–255.
14. Kim KB, Lee HT, Ku KH, Hong JW, Cho SI. Review of Pharmacological Effects of *Coptidis Rhizoma* and its Bioactive Compounds. *Journal of Korean Traditional Medicine*. 2012 ; 33(3) : 160–183.
15. Han S, Gao H, Chen S, Wang Q, Li X, Du LJ, Li J, Luo YY, Li JX, Zhao LC, Feng J, Yang S. Procyanidin A1 Alleviates Inflammatory Response induced by LPS through NF- $\kappa$ B, MAPK, and Nrf2/HO-1 Pathways in RAW264.7 cells. *Sci Rep*. 2019 ; 9(1) : 15087.
16. Jain S, Dash P, Minz AP, Satpathi S, Samal AG, Behera PK, Satpathi PS, Senapati S. Lipopolysaccharide (LPS) enhances prostate cancer metastasis potentially through NF- $\kappa$ B activation and recurrent dexamethasone administration fails to suppress it in vivo. *Prostate*. 2019 ; 79(2) : 168–182.
17. Lee MH, Chao CH, Hsu YC, Lu MK. Production, characterization, and functions of sulfated polysaccharides from zinc sulfate enriched cultivation of *Antrodia cinnamomea*. *Int J Biol Macromol*. 2020 ; 159 : 1013–1021.
18. Arulsevan P, Fard MT, Tan WS, et al. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 ; 2016 : 5276130.
19. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic Biol Med*. 2010 ; 49(11) : 1603–1616.
20. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019 ; 18(3) :121–126.
21. L. M. Coussens and Z. Werb, Inflammation and cancer. *Nature*, 2002 ; 420(6917) : 860–867.
22. S. P. Hussain, L. J. Hofseth, and C. C. Harris, “Radical causes of cancer,” *Nature Reviews Cancer*. 2003 ; 3(4) : 276–285.
23. Harmey JH, Bucana CD, Lu W, Byrne AM, McDonnell S, Lynch C, Bouchier-Hayes D, Dong Z. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer*. 2002 ; 101(5) : 415–22.
24. Lim JP, Song YC, Kim JW, Ku CH, Eun JS, Leem KH, Kim DK. Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*. *Arch Pharm Res* 2022; 25: 449–452.
25. Desta KT, Kim GS, Kim, YH, Lee WS, Lee SJ,

- Jin JS, Shin SC, The polyphenolic profiles and antioxidant effects of *Agastache rugose* Kuntze (Banga) flower, leaf, stem and root. *Biomedical Chromatography*. 2015 ; 30(2), 225–231.
26. Li W, Sun Y, Liang W, Fitzloff JF, van Breemen, R. B. Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003 ; 17(9) : 978–982.
27. Köse, Y. B., İscan, G., Göger, F., Akalın, G., Demirci, B., & Başer, K. H. C. Chemical Composition and Biological Activity of *Centaurea baseri*: New Species from Turkey. *Chemistry & Biodiversity*, 2016 ; 13(10) ; 1369–1379.
28. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.
29. Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 1997 ; 26(8) : 1001–1043.
30. Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, Kang H, Kim DW, Moon WK, Lee KH. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- $\kappa$ B and IFN- $\gamma$ /STAT1 pathways in RAW 264.7 cells. *Nitric Oxide* 2010 ; 23(3) : 241–219.
31. Thomas, M.J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 2000 ; 16(7–8) : 716–718.
32. Mattila P, Hellstrom J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007 ; 20(3–4) : 152–160.
33. Heleno SA, Martins A, Queiroz MJR, Ferreira IC. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*. 2015 ; 173 : 501–513.
34. Clifford MN, Jaganath IB, Ludwig IA, Crozier A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*, 2017 ; 34(12) : 1391–1421.
35. K. Azuma M, Nakayama M, Koshika K, Lppoushi Y, Yamaguchi K, Kohata Y, Yamaguchi H Ito , Higashio H. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem*, 1999 ; 47 : 3963–3966.
36. Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J. Plant Res*, 2012 ; 25 : 299–307.
37. Lee CB. Anti-inflammation activity of water extracts from *Hericium erinacium* among medicinal mushrooms. *Culinary science and hospitality research*. 2012 ; 18(4) : 233–242
38. LEE DH., SOHN DS., CHO DY., KIM, BJ, LIM YY, KIM YH. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Sophora flavescens* root extraction in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Korean Journal of Medical Mycology*, 2010 ; 15(2) : 39–50.
39. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol*. 1996 ; 10(3–4) : 291–316.
40. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. 1996 ; 316 : 209–215.
41. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. 2000 ; 47(1) : 6–9.