

## 국내산과 중국산 자화지정(*Viola mandshurica*) 추출물의 생리활성

최복동<sup>1</sup> · 박창수<sup>2</sup> · 주은영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 한방생약자원학과  
<sup>2</sup>상주시청

## Physiological Activities of Korean and Chinese *Viola mandshurica* Extracts

Bok-Dong Choi<sup>1</sup>, Chang-Soo Park<sup>2</sup>, and Eun-Young Joo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea

<sup>2</sup>Sangju-City Hall, Gyeongbuk 742-706, Korea

### Abstract

This study was carried out to compare the physiological activities of the extracts from Korean and Chinese *Viola mandshurica* W. Baker. The water extract from leaves of Chinese *V. mandshurica* exhibited the highest extraction yields of 30.45 g/100 g and the highest content of total flavonoids as 102.30 mg/g. Also, its ethanol extract showed the best content of polyphenol compounds as 136.16 mg/g. The leaf extract of Korean *V. mandshurica* produced higher electron donating abilities (EDA) of 92.69% (KLW) and 93.61% (KLE) than the other fractions. The strongest SOD-like activity was shown in the ethanol extract from Korean leaves of 17.28% at the concentration of 1.0 mg/mL. The nitrite scavenging abilities (NSA) of the leaf extracts of *V. mandshurica* from China were intense over 50% at pH 1.2 and 3.0. In the results of inhibitory rates of xanthine oxidase (XO), both ethanol extracts from Korean and Chinese leaves were higher than the other fractions as 98.67% and 93.80% respectively. Effect of tyrosinase inhibition was the highest in the water extract (45.04%) of Chinese leaves, followed by its ethanol extract (31.36%). The results of EDA, SOD-like activity and XO inhibition of the leaf extracts from Korean *V. mandshurica* were higher than those of Chinese, on the other hand, determinations on total polyphenol contents, NSA and tyrosinase inhibition were higher in those of Chinese.

**Key words:** *Viola mandshurica*, electron donating ability, SOD, nitrite scavenging ability, xanthine oxidase

### 서 론

최근 천연물에 함유되어 산화방지 작용을 나타내는 페놀 성분을 포함한 2차대사 생리활성 물질은 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가가치 물질로써 천연 식물성 소재를 대상으로 새로운 항산화 물질에 대한 질병 치료 가능성과 유용한 생리활성 물질의 탐색 및 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(1-3). 각종 식물에 다량으로 존재하는 phenol 화합물과 flavonoid류 등이 항산화, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성 기능을 갖는 것으로 보고되어 있다(3,4). 2005년도 특허청 통계자료에서는 국내 천연물 신약의 특허출원에서 사용된 원료의 70%가 식물에서 유래되어 있음을 제시하고 있어 다양한 식물자원이 개발 가능성이 높은 기능성 식·의약품 소재임을 나타내고 있다(5). 최근에는 천마, 복분자, 감초 등 다양한 한방생약재를 이용하여 음료, 육가공품 및 국수, 제과제빵 등 다양한 기능성 식품의 신소재로 이용되고 있다(6,7).

자화지정(紫花地丁)은 제비꽃과(Violaceae)에 속한 다년생 초본인 제비꽃(*Viola mandshurica* W. Baker) 및 동속 근연식물의 대근전초(帶根全草)를 건조한 것이다(8). 본초강목에는 자화지정의 약성은 차고(寒) 독이 없으며(無毒), 맛은 쓰고(苦) 매우며(辛), 청열해독(淸熱解毒), 양혈소종(涼血消腫) 등의 효능이 있다고 기록되어 있다(9-13). 그리고 자화지정은 자지정(紫地丁), 지정초(地丁草), 근근채(董董菜), 동북근채(東北董菜), 전두초(箭頭草), 독행호(獨行虎), 양각자(羊角子), 미포대(米布袋) 등의 이명으로도 불리어지고 있다(11,12,14). 우리나라에서는 한약재로 많이 사용되지는 않으나, 주로 민간에서 화농성 염증 질환에 매우 좋은 효능을 나타내는 것으로 알려져 있어 지혈, 부스럼, 종기, 난치성 종양, 임파선 결핵, 피부 염증 등 살균, 해열, 소염 등의 치료제로 이용한다. 또한 소화기 질환인 장염, 설사, 이질, 복통 및 눈 다래끼나 독사 등에 의한 교상 등에도 활용한다(15).

대한약전외생약규격집(KHP)(8)에는 자화지정의 기원식

\*Corresponding author. E-mail: jey@dhu.ac.kr  
Phone: 82-53-819-1437, Fax: 82-53-819-1272

물로 4~5월에 자주색의 꽃이 개화하며 우리나라 전역에서 쉽게 관찰할 수 있는 다년생 초본인 제비꽃(*Viola mandshurica* Baker)과 호제비꽃(*Viola yedoensis* Makino)이 자화지정으로 사용되거나 제비꽃을 주로 수재한다(8,9)고 되어 있다. 그러나 현재 약재시장에서 한약재로 유통, 사용되고 있는 자화지정의 대부분은 중국산이며, 중국에서는 호제비꽃을 자화지정으로 주로 수재하며 제비꽃은 동북근채(東北葶菜)라 부르나 자화지정과 동일하게 사용하고 있다(13).

자화지정으로 수재하는 제비꽃은 살리실산, 메틸배당체, 알칼로이드 및 다양한 종류의 사포닌을 함유하며(16), 생리학적 활성과 관련하여 포도당 구균과 녹농균(17), 폐렴구균 및 피부진균 등 다양한 병원 미생물에 대한 항균작용(12)을 나타내며, 진통 억제, 소염작용(18,19) 등에 효과적인 것으로 보고되어 있다. 또한 Yun 등(20)은 혈압조절과 관련이 있는 angiotensin converting enzyme(ACE)의 저해율이 37%를 나타낸다고 보고한 바 있다. 이외에 제비꽃속 중 삼색제비꽃(*Viola tricolor*)의 항균활성(21), 아욱제비꽃(*Viola hondoensis*)에서 추출한 flavonol glycoside의 피부보호 효과(22) 및 aldose reductase 저해 작용(23) 등에 대해 연구된 바 있으며, Moon과 Yook(24)은 *V. japonica*와 *V. lactiflora*의 flavonol 성분에 대하여 분리 동정하였다.

이와 같이 다양한 유용성분을 함유하며, 항균, 소염작용 등 약리학적 효과를 갖는 것으로 알려진 자화지정(제비꽃)의 생리활성에 대한 기초연구는 이루어진 바 없다. 더욱이 국내산 자화지정은 거의 없으며 중국산이 한약 재료로 유통, 이용되고 있는 상황에서 원산지에 따른 활성차이에 관한 연구 또한 전혀 된 바 없다. 따라서 본 연구는 기능성식품 소재로 자화지정의 이용가능성을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 국내에서 채집된 자화지정의 기원식물인 제비꽃과 국내에서 유통되고 있는 중국산 자화지정을 각각 추출하여 이에 대한 생리활성을 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 국내산 자화지정은 2007년 5월경에 경북 경산 일대에서 제비꽃(*Viola mandshurica*)을 동정 후 채집하여 지상부(잎)와 지하부(뿌리)를 따로 분리하고 흐르는 물에 세척하여 흙과 이물질을 제거한 후 40°C의 열풍건조기에서 24시간 건조하였다. 중국산은 대구 약령시장에서 한약 재료로 판매되고 있는 자화지정을 구입하여 이물질을 제거한 지상부(잎)만을 중국산 자화지정의 추출 시료로 사용하였다.

### 추출물의 제조

추출물은 환류냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에 국내산은 채집된 제비꽃의 잎과 뿌리 그리고 중국산 자화지정

잎을 각각 10배에 해당되는 증류수와 70% 에탄올을 넣고 80°C와 60°C의 수욕 상에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 각 추출물은 여과한 다음 rotatory vacuum evaporator (Eyela 400 series, Japan)로 감압농축한 후에 동결건조 하여 분말로 제조하여 물과 에탄올 추출물로 하였으며 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 폴리페놀 화합물 함량

자화지정 추출물을 1 mg/mL의 농도로 증류수에 희석하여 Folin-Denis(25)법으로 측정하였다. 추출물 0.2 mL에 증류수 1.8 mL를 가한 후 Folin-ciocalteu's phenol reagent 0.2 mL를 첨가, 혼합하여 3분간 실온에서 반응시켰다. 여기에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 0.4 mL를 가하여 혼합한 후 증류수 1.4 mL를 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 최종농도가 0, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL가 되도록 취하여 위와 같은 방법으로 측정된 검량선으로 자화지정 각 추출물의 폴리페놀 화합물 함량을 구하였다.

### 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 정량은 Nieva Moreno 등의 방법(26)을 변형하여 각 농도별 추출액 0.1 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL와 1 M potassium acetate 0.1 mL 그리고 80% ethanol 4.7 mL를 가하여 25°C에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량은 quercetin(Sigma Chemical Co.)을 이용하여 최종농도가 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL가 되도록 취하여 위와 동일한 방법으로 측정된 검량선으로 자화지정 추출물의 플라보노이드 함량을 구하였다.

### 전자공여능 측정

자화지정 각 추출물에 대한 전자공여능은 Blois의 방법(27)에 따라 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 일정 농도의 시료 2 mL에 absolute ethanol에 0.2 mM의 농도로 DPPH를 희석한 용액 1 mL 가하고 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 전자공여능은 시료 첨가 전·후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### SOD 유사활성능 측정

국내산과 중국산 자화지정의 SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법(28)에 따라 hydrogen peroxide로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 일정 농도의 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응 후, 1 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된

pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하여 추출물의 첨가구와 무첨가구의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

**아질산염 소거능 측정**

아질산염( $\text{NaNO}_2$ ) 소거 작용은 Kato 등의 방법(29)에 따라 측정하였다. 1 mM의  $\text{NaNO}_2$  용액 2 mL에 일정 농도의 자화지정 추출물을 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.2 M citrate buffer를 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 6.0으로 조정하여 반응용액의 부피를 10 mL로 하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 각각 1 mL씩 취하였다. 여기에 2% acetic acid를 5 mL를 첨가하고, Griess reagent (A:B=1:1, A: 1% sulfanilic acid in 30% acetic acid, B: 1% naphthylamine in 30% acetic acid) 0.4 mL 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응시킨 시료를 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구는 Griess reagent 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하여 자화지정 추출물의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

**Xanthine oxidase 저해 활성**

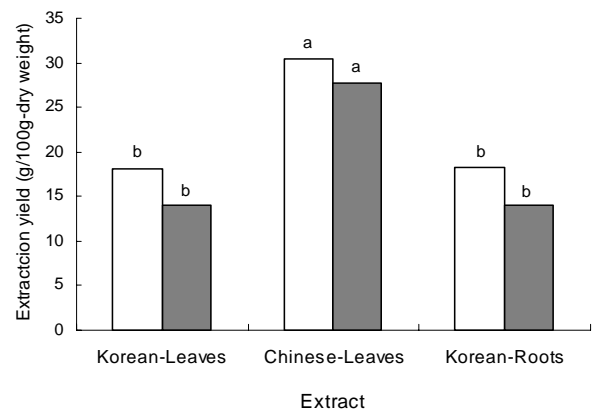
Xanthine oxidase 저해 활성 측정은 Stirpe와 Corte의 방법(30)에 따라 실시하였다. 일정 농도로 희석한 자화지정 추출물 0.1 mL에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL와 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 0.2 mL를 첨가하였다. 여기에 xanthine oxidase(0.2 U/mL) 0.1 mL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자화지정 추출물에 대한 xanthine oxidase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

**Tyrosinase 저해 활성**

Tyrosinase 저해 활성은 Yagi 등의 방법(31)에 따라 측정하였다. 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL와 일정농도로 희석한 자화지정 추출물 0.1 mL를 혼합한 용액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시킨 후, 생성된 DOPA chrome을 흡광도 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

**통계처리**

본 실험결과는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험 결과를 평균±표준편차로 나타내었다. 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS 14.0 for windows program을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후 유의성이 있는 경우,  $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.



**Fig. 1. Extraction yields of the extracts from Korean and Chinese *V. mandshurica* leaves and roots.**

□: water extract, ■: ethanol extract. The figure bar within different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

**결과 및 고찰**

**추출수율**

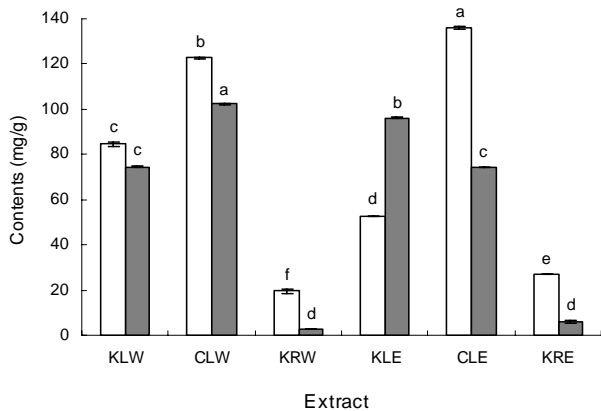
자화지정의 부위별 물 추출물과 에탄올 추출물의 수율은 Fig. 1과 같다. 자화지정 건체 시료 100 g당 중국산 물 추출물과 에탄올 추출물이 각각 30.45 g과 27.70 g으로 가장 높은 수율을 나타내었다. 국내산 자화지정 잎은 각각 18.17 g과 14.09 g이었으며, 뿌리에서는 18.29 g과 14.07 g의 수율을 나타내었다. 국내산보다는 중국산의 수율이 높았으며, 에탄올보다는 물을 용매로 추출한 경우가 더 높은 수율을 나타내었다.

**폴리페놀 화합물 및 플라보노이드 함량**

자화지정의 물과 에탄올 추출물에 존재하는 폴리페놀 화합물 함량을 측정한 결과 중국산 잎 에탄올 추출물(136.16 mg/g) > 중국산 잎 물 추출물(122.63 mg/g) > 국내산 잎 물 추출물(84.54 mg/g) > 국내산 잎 에탄올 추출물(52.73 mg/g) > 뿌리 에탄올 추출물(26.70 mg/g) > 뿌리 물 추출물(19.39 mg/g)의 순으로 폴리페놀을 함유하였다(Fig. 2). 중국산 자화지정 추출물이 국내산 잎 추출물보다 약 1.5~2.5배 많은 폴리페놀 화합물을 함유하였으며, 뿌리보다 잎 추출물의 폴리페놀 함유량이 더 높았다.

플라보노이드 함량은 중국산 잎 물 추출물(102.30 mg/g) > 국내산 잎 에탄올 추출물(96.12 mg/g) > 국내산 잎 물 추출물(74.37 mg/g) > 중국산 잎 에탄올 추출물(74.06 mg/g) > 국내산 뿌리 에탄올 추출물(5.86 mg/g) > 국내산 뿌리 물 추출물(2.71 mg/g)의 순으로 뿌리보다는 잎 추출물이, 국산보다는 중국산의 플라보노이드 함량이 높았다(Fig. 2).

본 실험결과는 약용식물 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 Moon 등(32)은 녹차, 곱향, 애엽 등이 4.41~10.98 mg/g이며, 갈근, 감초, 작약에서는 2.67~4.69 mg/g의 폴리페놀을 함유한다고 하였으며, 향료성 약용식물인 라벤

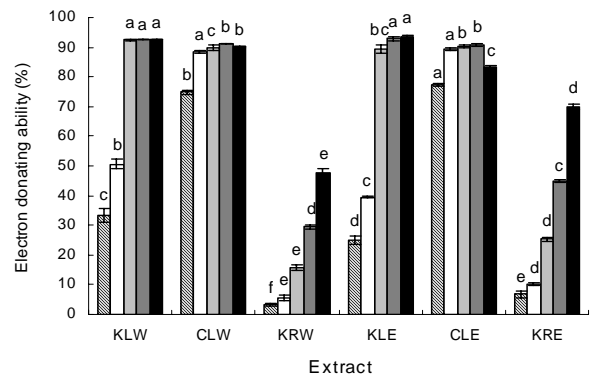


**Fig. 2. Contents of total polyphenol and flavonoid compounds of various extracts from Korean and Chinese *V. mandshurica* leaves and roots.**  
 □: polyphenols, ■: flavonoids. K LW: Korean *V. mandshurica* leaves water extract, KL E: Korean *V. mandshurica* leaves ethanol extract, CL W: Chinese *V. mandshurica* leaves water extract, CL E: Chinese *V. mandshurica* leaves ethanol extract, KR W: Korean *V. mandshurica* roots water extract, KR E: Korean *V. mandshurica* roots ethanol extract. All value presents the mean ±SD of triplicate determinations, bar within different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

더에는 5.4 mg/g, 카모마일 7.5 mg/g, 제라늄 25.9 mg/g 그리고 물싸리에는 37.9 mg/g의 폴리페놀 화합물을 함유한다는 Miliuskas 등(33)의 결과와 비교하면 자화지정의 잎과 뿌리 추출물이 더 많은 폴리페놀 화합물을 함유하였다. 또한 Lee 등(34)은 울릉도 산채류 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과 섬고사리의 잎과 뿌리는 16.75 mg/g과 2.32 mg/g의 플라보노이드를 함유하며, 눈개승마는 각각 16.47 mg/g과 14.63 mg/g을 함유하였다는 보고와 비교하여도 자화지정 잎 추출물의 플라보노이드 함량은 섬고사리나 눈개승마보다 4배 이상 높았으나 자화지정 뿌리 추출물은 Lee 등(34)의 섬고사리보다는 약간 높았으나 눈개승마보다는 매우 낮은 함량을 나타내었다. 또한 Miliuskas 등(33)의 라벤더, 칼렌둘라, 카모마일, 제라늄 등의 추출물에서 0.3~13.8 mg/g의 플라보노이드를 함유하였다는 결과와 비교하여도 자화지정 잎 추출물들의 플라보노이드 함량이 높았다. 따라서 자화지정을 이용한 기능성식품 개발 가능성은 높다고 할 수 있다.

**전자공여능**

국내산과 중국산 자화지정 추출물의 DPPH를 이용한 전자공여 효과를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 추출시료를 0.05 mg/mL에서 1.0 mg/mL의 농도로 측정된 결과 자화지정의 국내산 잎의 물 추출물은 33.41%~92.69%로 0.3 mg/mL 이상의 농도에서 90%이상의 전자공여효과를 보였으며, 에탄올 추출물은 24.84%~93.61%로 0.5 mg/mL의 농도에서 90% 이상의 효과를 나타내었다. 중국산 잎의 물 추출물과 에탄올 추출물은 74.77%~91.03%와 74.44%~90.84%로 0.5 mg/mL의 농도에서 가장 높은 전자공여효과



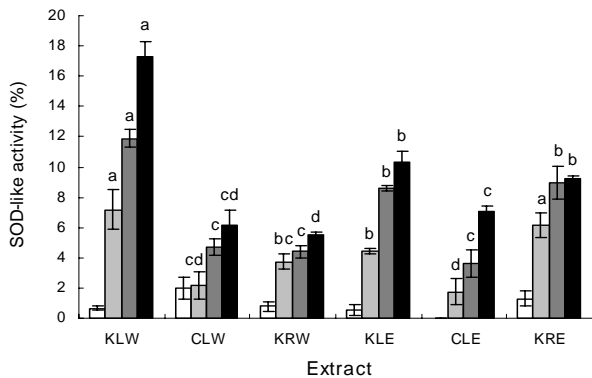
**Fig. 3. Electron donating abilities of various extracts from Korean and Chinese *V. mandshurica* leaves and roots.**  
 ▨: 0.05 mg/mL, □: 0.1 mg/mL, ◻: 0.3 mg/mL, ◼: 0.5 mg/mL, ◼: 1.0 mg/mL. The abbreviation of introductory remarks are the same as in Fig. 2. All value presents the mean ±SD of triplicate determinations, bar within different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

를 나타내었으며, 1.0 mg/mL에서는 오히려 전자공여능이 낮아졌다. 그러나 중국산 잎 추출물은 0.05 mg/mL의 농도에서도 약 75%의 전자공여능을 나타내어 국내산보다 약 2~3 배 이상 높았으며, 0.1~0.5 mg/mL의 농도에서는 88~91%로 유사한 활성을 나타내었다. 자화지정 뿌리의 물 추출물은 3.31~47.56%였으며 에탄올 추출물은 6.78%~69.83%로 잎 추출물보다 낮은 전자공여능을 나타내었다.

약용식물 물 추출물의 항산화 활성을 측정된 Kim 등(35)은 1.0 mg/mL의 농도에서 음양곽 69.5%, 당귀 15.8%, 감초 13.3%, 그리고 옥죽은 5.4%의 전자공여능을 나타내었다는 결과와 비교하면 본 실험의 자화지정의 잎과 뿌리의 전자공여능이 매우 높았다. 또한 Jung 등(36)은 약용식물의 메탄올 추출물이 0.1 mg/mL의 농도에서 체비꽃 전초가 9.7%의 전자공여효과를 나타내며, 녹차 64.6%, 개망초 24.5%, 작약 12.9% 그리고 도꼬마리의 잎과 뿌리가 각각 12.7%와 12.0%이며, 방풍의 잎과 뿌리는 8.6%와 1.0%라는 결과와 비교하여도 0.1 mg/mL 농도의 자화지정 추출물은 녹차보다는 낮은 전자공여능을 보였으나 다른 약용식물보다는 높았다. 이러한 결과로 미루어보아 자화지정이 기능성식품의 소재로 활용될 수 있는 우수한 약용식물이라고 할 수 있다.

**SOD 유사활성능**

자화지정의 잎과 뿌리 추출물에 대한 SOD 유사활성능을 산화효소인 pyrogallol을 농도에 따라 반응시킨 결과는 Fig. 4와 같다. 1.0 mg/mL의 농도에서 국내산 잎의 물 추출물이 17.28%로 가장 높은 SOD 유사활성능을 보였으며, 0.5 mg/mL에서도 11.90%의 활성을 나타내었으며, 국내산 잎 에탄올 추출물은 10.35%의 SOD 유사활성 효과를 보였다. 중국산 잎의 물과 에탄올 추출물은 6.11%와 7.04%였으며, 뿌리에서는 각각 5.48%와 9.21%의 SOD 유사활성능을 나타내어 뿌리보다는 잎의 SOD 유사활성 효과가 높았다. 특히 자화지정의 국내산 잎의 물 추출물은 뿌리와 중국산 잎 추출



**Fig. 4.** Superoxide dismutase (SOD) like activities of various extracts from Korean and Chinese *V. mandshurica* leaves and roots.

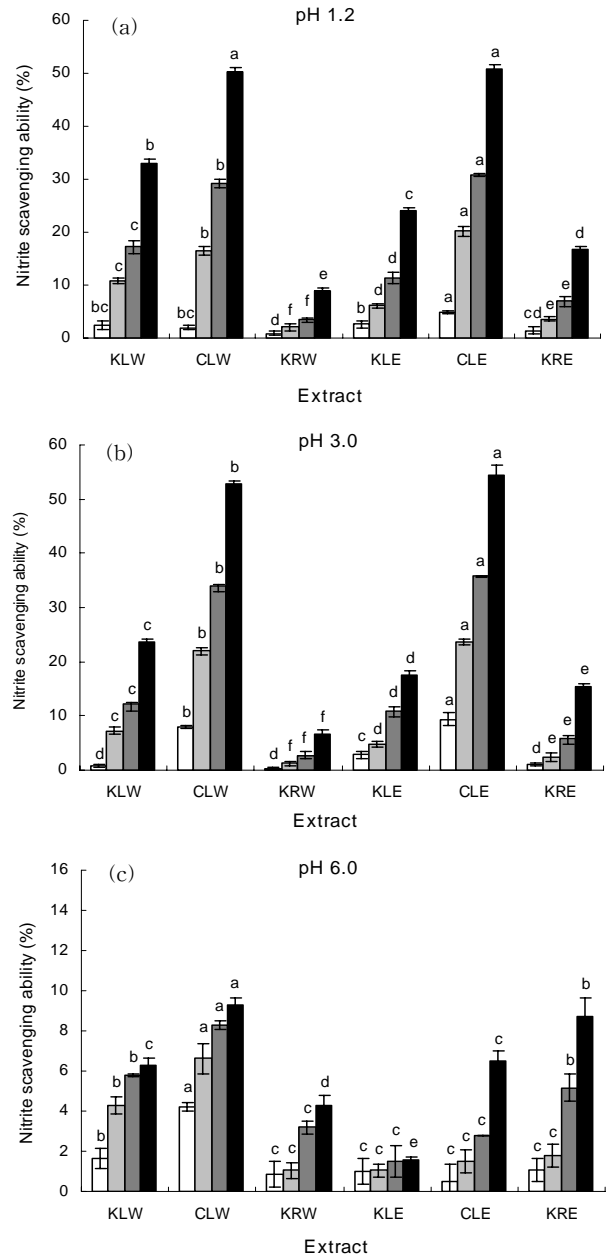
□: 0.1 mg/mL □: 0.3 mg/mL, ■: 0.5 mg/mL, ■: 1.0 mg/mL. The abbreviation of introductory remarks are the same as in Fig. 2. All value presents the mean ±SD of triplicate determinations, bar within different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

물보다 약 2.5배 높은 활성을 나타내었으나 국내산 잎의 에탄올 추출물은 중국산 잎의 에탄올 추출물보다는 높았으나 뿌리의 에탄올 추출물과는 유의적 차이가 없었다.

본 실험 결과를 Lim 등(37)의 잎을 한약재로 사용하는 약용식물의 SOD 유사활성이 곽향 16.5%, 박하 15.0%, 익모초 7.53% 그리고 소엽에서는 3.67%이며, 뿌리를 한약재로 사용하는 약용식물인 감초 35.63%, 황기 23.13%, 작약 6.27% 그리고 마황에서는 5.83%의 SOD 유사활성을 나타내었다는 결과와 비교하면 자화지정 잎은 Lim 등(37)의 잎류 약용식물보다 높거나 유사한 SOD 유사활성 효과를 나타내었으며, 자화지정 뿌리는 황기나 감초보다는 낮았으나 작약과 마황과는 유사한 SOD 유사활성 효과를 나타내었다.

**아질산염 소거능**

자화지정의 잎과 뿌리 추출물을 상이한 pH 조건과 농도에 따라 아질산염 소거 효과를 측정하였다. pH 1.2의 1.0 mg/mL의 농도에서 중국산 잎 에탄올 추출물(50.74%) > 중국산 잎 물 추출물(50.14%) > 국내산 잎 물 추출물(32.86%) > 국내산 잎 에탄올 추출물(23.97%) > 뿌리 에탄올 추출물(16.76%) > 뿌리 물 추출물(8.96%)의 순으로 중국산 잎의 에탄올과 물 추출물이 가장 높은 아질산염 소거효과를 나타내었으며 추출용매에 따른 유의적 차이는 없었다(Fig. 5a) ( $p < 0.05$ ). pH 3.0의 조건에서는 국내산 잎의 물과 에탄올 추출물에서 각각 23.62%와 17.56%, 뿌리에서는 6.73%와 15.41%였으며, 중국산 잎의 물 추출물은 52.94%, 에탄올 추출물은 54.38%로 가장 높은 아질산염 소거효과를 나타내었으며, 국내산 잎보다 약 2배 이상 높은 소거효과를 보였다(Fig. 5b). pH 6.0에서도 1.56%~9.27%로 중국산 잎 추출물이 국내산 잎과 뿌리보다 아질산염 소거효과가 높았다(Fig. 5c). pH 조건에 따라서는 국내산 자화지정의 잎과 뿌리 추출



**Fig. 5.** Nitrite scavenging abilities of various extracts from Korean and Chinese *V. mandshurica* leaves and roots according to pH.

□: 0.1 mg/mL □: 0.3 mg/mL, ■: 0.5 mg/mL, ■: 1.0 mg/mL. The abbreviation of introductory remarks are the same as in Fig. 2. All value presents the mean ±SD of triplicate determinations, bar within different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

물은 pH 1.2에서 가장 높은 소거효과를 나타내었으며, pH가 증가함에 따라 소거능이 감소하였으나 중국산 잎 추출물은 pH 3.0에서 가장 높은 아질산염 소거효과를 나타내었다. 모든 추출조건에서 자화지정의 국내산 잎은 물 추출물이 더 높은 아질산염 소거효과를 나타내었으나, 뿌리에서는 에탄올 추출물이 물 추출물보다 약 2배 높은 소거효과를 나타내었으며, 중국산 잎 추출물은 pH 1.2에서는 물과 에탄올 추출

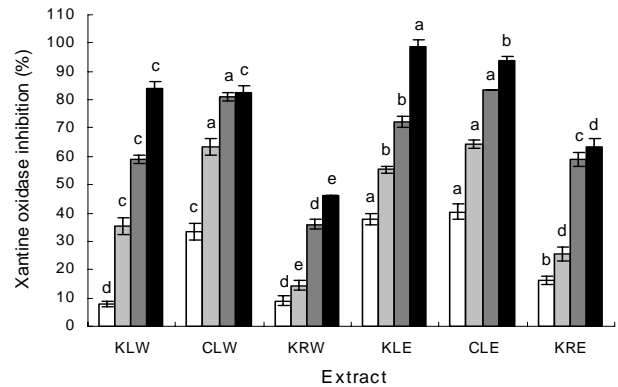
물 모두 50%의 유사한 아질산염 소거효과를 보였으나 pH 3.0에서는 에탄올 추출물이, pH 6.0에서는 물 추출물이 더 높은 아질산염 소거능을 나타내었다.

자화지정 추출물의 아질산염 소거효과는 Moon 등(38)의 pH 1.2의 조건에서 박하(93.98%), 곽향(77.49%), 감초(68.52%), 당귀(57.72%) 등의 결과와 비교하여 자화지정의 잎과 뿌리 추출물의 아질산염 소거능은 낮았다. 그러나 국내산 생약 추출물의 아질산염 소거효과를 측정한 Kim 등(39)의 황금 11.5%, 두충 6.9%, 작약 6.6%, 그리고 시호에서 5.5%의 소거능을 나타내었다는 보고와 본 실험 결과와 비교하면 자화지정 추출물의 아질산염 소거능이 더 높았다. Kytopoulos (40)는 nitrosamine 생성의 최적 pH가 2.5~3.0으로서, pH에 매우 의존적이며 아질산염 소거능 역시 강산성에서는 높고 pH가 높아질수록 감소하는 것으로 보고하였으며, Moon 등(38)과 Kim 등(39)의 보고와 본 실험의 pH 1.2와 3.0에서 가장 높은 아질산염 소거효과를 나타내었다는 결과와도 일치하였다. 또한 본 결과에서 폴리페놀이 가장 많이 함유된 것으로 분석된 중국산 자화지정 잎의 에탄올 추출물과 물 추출물이 pH 3.0의 조건에서 가장 높은 아질산염 소거율을 나타내었다는 결과는 polyphenol 화합물이 아질산염을 효과적으로 분해하여 nitrosamine의 생성을 억제한다고 보고한 Takashi 등(41)의 결과와 각종 phenolic 화합물은 산성조건에서 nitroso화 반응을 강력하게 억제한다는 Cooney와 Ross(42)의 결과와도 일치하였다. 따라서 자화지정을 아질산염 및 아민이 함유된 식품과 함께 섭취하거나 가공한다면 nitrosamine 생성 억제 및 효과적인 항산화 활성도 기대할 수 있을 것이다.

#### Xanthine oxidase 저해 활성

자화지정의 잎과 뿌리 추출물을 농도에 따라 xanthine oxidase(XO) 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 1.0 mg/mL의 농도에서 국내산 잎 > 중국산 잎 > 뿌리의 순으로 국내산 잎의 물 추출물이 98.67%로 가장 높은 XO 저해효과를 보였으며, 용매에 따른 부위별 추출물은 물보다는 에탄올 추출물이 더 높은 XO 저해율을 나타내었다. 0.1~0.5 mg/mL의 농도에서는 자화지정의 중국산 잎 추출물이 국내산 잎 추출물보다 높은 XO 저해효과를 보였으며, 중국산 잎의 물 추출물은 0.5 mg/mL의 농도에서 80.83%로 1.0 mg/mL의 82.50%와 유사한 활성을 나타내었다.

Yeo 등(43)은 홍차의 XO 저해율이 78.7%라는 결과와, 녹차에서는 89.2%~93.2%라는 보고와 비교하면 본 실험의 자화지정 잎 추출물은 높거나 유사한 XO 저해율을 보였으며, Kim 등(44)의 차조기 잎 물 추출물이 46.9%라는 결과와 비교하여도 자화지정 추출물의 XO 저해활성이 높았다. 그러므로 민간에서 염증 질환 치료제로 사용되고 있는 자화지정이 효과가 있음을 알 수 있으며, 이를 기능성식품의 개발에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.



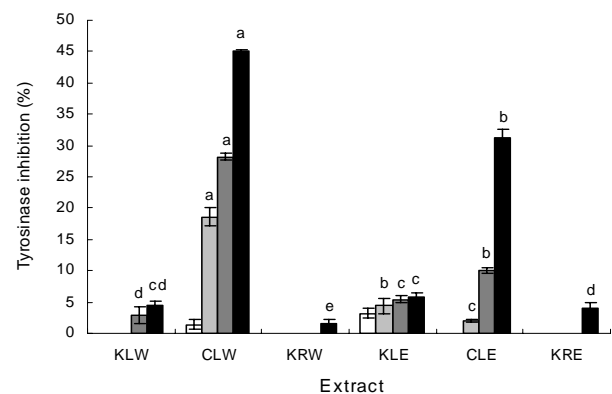
**Fig. 6. Xanthine oxidase inhibition of various extracts from Korean and Chinese *V. mandshurica* leaves and roots according to pH.**

□: 0.1 mg/mL □: 0.3 mg/mL, ■: 0.5 mg/mL, ■: 1.0 mg/mL. The abbreviation of introductory remarks are the same as in Fig. 2. All value presents the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations, bar within different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### Tyrosinase 저해 활성

국내산과 중국산 자화지정 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 1.0 mg/mL의 농도에서 중국산 잎의 물과 에탄올 추출물이 45.04%와 31.36%로 국내산 잎 추출물의 4.37%와 5.72%보다 약 5배~10배 높은 tyrosinase 저해율을 나타내었다. 뿌리 추출물은 저농도에서는 tyrosinase 저해효과가 없었으며, 1.0 mg/mL에서 1.60%~4.12%의 낮은 저해율을 보였다.

본 결과를 Kim 등(45)의 0.3 mg/mL의 농도에서 곱취 39%, 참취 25% 그리고 꼭두서니의 전초와 뿌리에서 각각 5%와 1%의 tyrosinase 저해율을 나타낸다는 결과와 비교하면 중국산 자화지정 잎의 물 추출물이 18.62%로 꼭두서니



**Fig. 7. Tyrosinase inhibition of various extracts from Korean and Chinese *V. mandshurica* leaves and roots according to pH.**

□: 0.1 mg/mL □: 0.3 mg/mL, ■: 0.5 mg/mL, ■: 1.0 mg/mL. The abbreviation of introductory remarks are the same as in Fig. 2. All value presents the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations, bar within different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

추출물보다는 높았으나 국내산 자화지정의 잎과 뿌리 추출물은 Kim 등(45)의 결과보다 낮았다. 또한 1.0 mg/mL의 농도에서 지모(4%), 텍사(5%), 두충(17%), 갈근(25%), 인삼(27%) 등의 저해율을 나타내었다는 Choi 등(46)의 결과와 비교하여도 중국산 자화지정 추출물은 높았으나 국내산 잎과 뿌리는 매우 낮은 tyrosinase 저해효과를 나타내었다.

## 요 약

국내에서 채집된 자화지정(*V. mandshurica*)의 잎과 뿌리 그리고 한방생약재로 유통, 판매되고 있는 중국산 자화지정의 생리활성을 측정 비교하였다. 중국산 자화지정의 물 추출물의 수율이 30.45 g/100 g으로 가장 높은 추출수율을 나타내었으며, 플라보노이드 함량도 102.30 mg/g으로 가장 많이 함유하였다. 추출물의 폴리페놀 함량은 중국산 자화지정의 에탄올 추출물에서 136.16 mg/g으로 가장 많이 함유된 것으로 분석되었다. 전자공여능은 국내에서 채집된 자화지정 잎의 물과 에탄올 추출물이 각각 92.69%와 93.61%를 나타내었다. SOD 유사활성능은 1.0 mg/mL의 농도에서 국내산 잎의 에탄올 추출물이 17.28%를 나타내었다. 아질산염 소거능은 중국산 잎 추출물이 pH 1.2와 pH 3.0의 조건에서 50% 이상의 소거율을 보였으며, xanthine oxidase 저해율은 국내산과 중국산 모두 잎의 에탄올 추출물에서 98.67%와 93.80%로 가장 높은 저해효과를 나타내었다. Tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과에서는 중국산 잎의 물과 에탄올 추출물이 45.04%와 31.36%로 국내산 자화지정 잎과 뿌리보다 tyrosinase 저해율이 매우 높았다. 이상의 결과 추출물의 수율, 폴리페놀과 플라보노이드 화합물 함량 및 아질산염 소거능 그리고 tyrosinase 저해 활성은 중국산 자화지정이 국내산 자화지정보다 높은 함량과 활성을 나타내었으며, 전자공여능과 SOD 유사활성능 그리고 xanthine oxidase 저해 효과는 국내산이 중국산보다 높은 활성을 나타내었다. 그리고 자화지정의 뿌리 추출물은 국내산과 중국산의 자화지정 잎 추출물보다 낮은 생리활성 효과를 나타내었다. 이상의 생리활성 결과는 자화지정이 훌륭한 기능성식품 소재임을 나타낸다고 할 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 대구한의대학교 기린연구비의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 문 헌

- Halliwell B, Hoult RJ, Blake DR. 1988. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 2: 2867-2870.
- Kitahara K, Matsumoto Y, Ueda H, Ueoka R. 1992. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of irradiated methyl linoleate. *Chem Pharm Bull* 40: 2208-2209.
- Hatano T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effect on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Nat Med* 49: 357-363.
- Pratt DE. 1992. Natural antioxidants from plant materials. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health (II)*. Huang MT, Hi ST, Lee CY, eds. Am Chem Soc, Washington DC. p 54-60.
- 특허청. 2005. 지식재산 통계연보. 특허청.
- Nam HY, Cho JS. 2006. Quality characteristics of white pan bread with ingredients of Sagoonja-Tang. *Korean J Food Cookery Sci* 22: 458-467.
- Hong SP, Jeong HS, Jeong EJ, Shin DH. 2006. Quality characteristic of beverage with *Gastrodia elata* Blume extract. *J Fd Hyg Safety* 21: 31-35.
- KHP. 2007. The Korean Herbal Pharmacopoeia. 식품의약품안전청. p 294.
- 成都中醫學院主編. 1982. 中象學. 上海科學技術出版社, 上海. p 78.
- 中醫大辭典編輯委員會編. 1982. 中醫大辭典(中象分冊). 人民衛生出版社, 北京. p 362.
- 李時珍. 1983. 本草綱目. 고문사, 서울. p 647.
- 江蘇新醫學院. 1999. 中藥大辭典. 上海科學技術出版社, 上海. p 800-802.
- 國家中醫藥管理局編委會. 1999 中華本草. 上海科學技術出版社, 上海. Vol 5, p 463-468.
- 신민교. 1986. 원색임상본초학. 남산당, 서울. p 340.
- Yook CS, Lee WC, Moon CK. 1989. Studies on flavonoid glycoside of the leaves of *Viola diamantica*. *Yakhak Hoeji* 33: 124-128.
- 문관섭. 1984. 약초의 성분과 이용. 일월서각, 서울. p 481-482.
- 박성규, 안덕균. 1991. 자화지정 종류의 효능에 관한 비교 연구. 본초분과학회지 6: 77-83.
- Ko WC, Shin MK. 1987. Experimental studies on the analgesic and antiphlogistic effects of *Viola herba*. *Kor J Pharmacogn* 18: 210-215.
- Lee BW, Kim DH. 2003. Inhibitory effect of *Viola herba* extract on inflammatory cytokine production by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in cultured human synovial cells. *Kor J Herbology* 18: 89-96.
- Yun JS, Chung BH, Kim NY, Seong NS, Lee HY, Lee JH, Kim JD. 2003. Screening of 94 plant species showing ACE inhibitory activity. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 246-251.
- Witkowska-Banaszczak E, Bylka W, Matlawska I, Goślińska O, Muszyński Z. 2005. Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. *Fitoterapia* 76: 458-461.
- Moon HI, Lee J, Zee OP, Chung JH. 2005. The effect of flavonol glycoside on the expression of matrix metalloproteinase-1 in ultraviolet-irradiated cultured human skin fibroblasts. *J Ethnopharma* 101: 176-179.
- Moon HI, Jung JC, Lee J. 2006. Aldose reductase inhibitory effect by tectorigenin derivatives from *Viola hondoensis*. *Bioorg Med Chem* 14: 7592-7594.
- Moon CK, Yook CS. 1981. Ein flavonol-triglykosid aus herba *Viola japonica*. *Kor J Pharmacog* 12: 146.
- AOAC. 2005. *Official Method of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA. Vol 45, p 21-22.
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.

27. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
28. Marklund S, Marklund G. 1975. Involvement of superoxide amino radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 468-474.
29. Kato H, Lee IE, Chuyen, NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
30. Stirpe F, Corte ED. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244: 3855-3861.
31. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Medica* 53: 517-519.
32. Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, Kim EY, Park JW, Park IB, Kim SW, Kang WG, Park YK, Jung ST. 2004. Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and content of phenolic compounds. *Korean J Food Preserv* 11: 207-213.
33. Miliauskas G, Venskutonis PR, Been TAV. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 85: 231-237.
34. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J Food Sci Technol* 37: 233-240.
35. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 338-338.
36. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 135-140.
37. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 191-202.
38. Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, Kim EH, Park JW. 2004. Activities of antioxidation and alcohol dehydrogenase inhibition of methanol extracts from some medicinal herbs. *Korean J Food Preserv* 11: 201-206.
39. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 80-85.
40. Kytopoulos SA. 1987. Ascorbic acid and formation of N-nitroso compounds; possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 45: 1344-1350.
41. Takashi Y, Yamamoto M, Tamura A. 1978. Studies on the formation of nitrosamines; The effects of some polyphenols on nitrosation of diethylamine. *J Food Hyg Soc* 19: 224-229.
42. Cooney RW, Ross PD. 1987. N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution: effect of vanillin and related phenols. *J Agric Food Chem* 35: 789-793.
43. Yeo SG, Park YB, Kim IS, Kim SB, Park YH. 1995. Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 154-159.
44. Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kwoen DJ, Choi UK. 2007. antioxidant activities of extract with water and ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta kudo* leaf. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 327-333.
45. Kim SJ, Heo MY, Kang SS, Kim HP. 2003. Tyrosinase inhibitory activity of plant extracts (III): Fifty Korean indigenous plants. *J Appl Pharmacol* 11: 245-248.
46. Choi BW, Kee BH, Kang JH. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor J Pharmacogn* 29: 237-242.

(2008년 7월 1일 접수; 2008년 9월 10일 채택)