

## 비자(*Torreya nucifera*) 추출물의 생리활성

전호성<sup>1</sup> · 이양숙<sup>2</sup> · 김남우<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(주)정문 한방생명자원연구소

<sup>2</sup>대구의대학교 한방생약자원학과

## The Antioxidative Activities of *Torreya nucifera* Seed Extracts

Ho-Sung Jeon<sup>1</sup>, Yang-Suk Lee<sup>2</sup>, and Nam-Woo Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Biomedical Resources, JungMon, Gyeongbuk 712-715, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea

### Abstract

This study was investigated to analyze the contents of flavonoid and polyphenol compounds, and inhibitory activities of tyrosinase and antioxidation to measure physiological effect of reflux water extraction (WE), reflux ethanol extraction (EE) and hot water extract under high pressure (HWE) of *Torreya nucifera* seed. HWE yields the highest contents of flavonoid compounds (176.34 mg/g) and polyphenol compounds (112.95 mg/g). The tyrosinase inhibitory rates were 5.62~28.71% at 2.0 mg/mL and HWE showed the highest inhibition rate. The nitrite scavenging abilities of all extracts were over 90% at pH 1.2 and 3.0 at the concentration of 2.0 mg/mL. The superoxide dismutase (SOD)-like activities of HWE was the highest value of 33.58%. The electron donating abilities (EDA) were 66.46~89.72% and HWE was the highest when the extracts were tested at 0.1 mg/mL. The EDA of all extracts were decreased with an increment of the extracts concentrations. The xanthine oxidase inhibitory rate of HWE was the highest value of 89.29% at the concentration of 2.0 mg/mL and the WE and HWE were over 75% rate of xanthine oxidase inhibition at 0.5 mg/mL.

**Key words:** *Torreya nucifera* seed, flavonoid, polyphenol, tyrosinase, nitrite scavenging, SOD, electron donating, xanthine oxidase

## 서 론

현대인들은 과다한 스트레스와 운동부족 그리고 불균형한 영양섭취 및 생활리듬의 변화 등으로 고혈압과 심장병 같은 각종 성인병과 만성질환의 발병률이 증가하고 있다. 노화를 포함한 각종 성인병의 발병 원인으로 알려져 있는 활성산소는 강한 산화력으로 생명체에 치명적인 산소 독성을 일으켜 효소 불활성화, 지질산화, DNA 변성 등을 초래하여 암을 비롯한 뇌질환과 심장질환, 염증, 자가면역질환 등을 일으킨다(1,2). 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제는 phenol류, flavonoid류, tocopherol류, ascorbic acid, carotenoids 등의 천연 항산화제와 BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole), PG(propyl galate) 등의 합성산화제가 있다. 이중 합성산화제는 우수한 항산화성과 경제성으로 널리 사용되어 왔지만, 안전성에 논란이 있어 사용량이 규제되고 있다(3,4). 따라서 최근에는 기능성식품이라는 개념이 도입되어 이러한 활성산소를 감소시킬 수 있는 천연 생리활성 물질에 대한 관심이 증가하고

있다(5,6). 특히 동양의학에서 주로 이용되던 약용식물을 포함한 다양한 천연물에서 각종 질병의 예방과 치료에 효과적인 유용물질을 동정, 분리하여 이를 이용한 기능성 제품 개발이 활발히 추진되고 있으며, 일부 천연물 성분들은 이미 제품화되어 있다(7,8).

우리나라의 남부지방과 일본에 자생하는 비자나무(*Torreya nucifera* Siebold et Zuccarini)는 주목과(Taxaceae)의 상록고목으로 비자나무의 성숙된 종자에서 종피(種皮)를 제거하고 건조한 것을 비자(榧子)라 하며, 식육증진, 소화촉진, 변비 및 치질 치료 등의 약리작용을 나타내며, 십이지장충 및 구충제로 이용한다(9-11). 또한 비자에서 추출한 기름은 식용하며, 머릿기름이나 연료로도 사용되어 왔다(12).

비자나무에 관한 선행연구로는 비자에 함유된 지방질(13)과 sterol 성분(10), desmethylsterol 조성(14) 및 비자유의 지질대사와 이와 관련된 효소발현(12) 등에 대하여 연구된 바 있으며, 비자의 살충효과(15) 및 항균성(16)에 대해 보고된 바 있다. 한편, 중의학에서 생약재로 사용되는 비자(榧子)는 *Torreya grandis* Fort.로 우리나라에서 한약첨가제로 사

\*Corresponding author. E-mail: tree@dhu.ac.kr  
Phone: 82-53-819-1438, Fax: 82-53-819-1272

용하고 있는 비자와는 동일한 속(屬)에 속하는 식물이나 서로 다른 종이나(17,18), 중국에서 비자로 사용하는 *T. grandis*에서 항산화성 및 항염증 활성(19)을 나타내며, 방충효과(20)도 나타내는 것으로 보고되어 있다.

그러나 국내에서 식용 및 한방재료로 사용되고 있는 비자나무(*T. nucifera*) 종자의 지방 성분 및 지질대사에 관한 연구는 보고되어 있으나 비자 추출물의 항산화적 생리활성에 관한 연구는 이루어진 바 없다. 이에 물과 에탄올을 용매로 추출한 비자 추출물의 플라보노이드와 폴리페놀 화합물 함량을 측정하고 tyrosinase 저해 및 아질산염 소거능 등 항산화적 생리활성을 측정하여 천연 항산화제로서의 개발 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

비자는 2006년 7월에 대구 약령시장에서 한약 재료로 판매되고 있는 국내산 비자(檉子)를 구입하여 증류수에 3회 세척 후 물기를 제거하고 음건하여 추출시료로 사용하였다.

비자의 물 추출물(reflex water extract: WE)과 에탄올 추출물(reflex ethanol extract: EE)은 환류냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에 시료 당 10배에 해당되는 증류수 및 70% 에탄올을 넣고 각각 80°C와 60°C의 수욕 상에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 열수 추출물(hot water extract under high pressure: HWE)은 시료의 30배 분량의 증류수를 넣고 압력추출기(KSNP B1130, Kyungseo, Korea)로 110°C, 1.5기압 하에서 3시간 동안 추출하였다. 모아진 추출액은 filter paper로 여과한 다음, rotatory vacuum evaporator (Eyela 400 series, Japan)로 감압농축한 후에 동결건조(FD 5510 SPT, Ilshin, Korea)하여 분말로 제조하였으며, 일정 농도로 희석하여 본 실험의 추출시료로 사용하였다.

### 플라보노이드 화합물 함량 측정

비자 추출물에 함유된 플라보노이드는 Nieva Moreno 등의 방법(21)을 변형하여 1.0 g/mL의 농도로 희석한 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 spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량은 quercetin(Sigma, USA)을 이용하여 최종농도가 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL가 되도록 취하여 위와 동일한 방법으로 측정된 표준곡선으로 비자 각 추출물의 플라보노이드 총 함량을 구하였다.

### 폴리페놀 화합물 측정

비자의 추출물을 1.0 mg/mL 농도로 증류수에 희석하여 Folin-Denis법(22)으로 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 mL와 증류수 1.4 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 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 흡광도의 표준곡선으로 비자 각 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량을 구하였다.

### Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 Yagi 등의 방법(23)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 비자 추출물 0.1 mL를 혼합한 용액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시킨 후, 생성된 L-DOPA chrome을 흡광도 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었으며, 대조군으로 추출물 대신 ascorbic acid(Sigma, USA)를 추출물과 동일한 농도로 첨가하여 위와 동일한 방법으로 tyrosinase 저해활성을 측정하였다.

### 아질산염 소거능 측정

아질산염(NaNO<sub>2</sub>) 소거능은 Kato 등의 방법(24)에 따라 1.0 mM의 NaNO<sub>2</sub> 용액 2.0 mL에 일정 농도의 비자 추출물 1.0 mL를 첨가하였다. 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 1.0 mL씩 취하였다. 여기에 2% acetic acid를 5.0 mL를 첨가하고, Griess reagent 0.4 mL 첨가하여 혼합한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응시킨 시료를 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군은 Griess reagent 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하여 비자 추출물의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 추출물과 동일한 농도로 첨가하여 위와 동일한 방법으로 pH와 농도에 따른 아질산염 소거능을 측정하였다.

### SOD 유사활성능 측정

비자 추출물의 SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법(25)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 나타내었으며, 대조군은 ascorbic acid를 이용하여 SOD 유사활성 효과를 측정하

였다.

#### 전자공여능 측정

비자 각 추출물에 대한 전자공여능은 Blois의 방법(26)에 준하여 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 일정 농도의 시료 2.0 mL에 absolute ethanol에 0.2 mM 농도의 DPPH 용액 1.0 mL 가하고 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었으며, 대조군은 ascorbic acid를 이용하여 추출물의 전자공여능을 비교하였다.

#### Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stirpe와 Corte의 방법(27)에 따라 실시하였다. 일정 농도로 희석한 비자 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 정지하여 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비자 추출물에 대한 xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 추출물 대신 동일한 농도로 첨가하여 위의 방법으로 측정하였다.

#### 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 하여 유의성이 있는 경우,  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

#### 비자 추출물의 수율과 플라보노이드 및 폴리페놀 화합물 함량

비자나무 종자의 추출방법과 용매에 따른 추출물 수율은 100 g 당 열수 추출물(HWE) 7.08 g > 에탄올 추출물(EE) 6.00 g > 물 추출물(WE) 5.09 g으로 HWE가 WE와 EE보다 약 1.2~1.4배 높은 수율을 나타내었다(Table 1). 비자 각 추출물의 플라보노이드와 폴리페놀 화합물의 함량을 측정할 결과에서는 HWE > WE > EE의 순이었으며, 플라보노이드는 0.83~35.47 mg/g, 폴리페놀은 85.58~112.95 mg/g으로 플라보노이드와 폴리페놀 화합물 모두 HWE에서 가장 많이 함유하는 것으로 분석되었다(Table 1). 특히 플라보노이드는 에탄올을 용매로 추출한 EE보다 물을 용매로 추출한 WE는 약 30배 이상, HWE는 EE보다 40배 이상 많은 플라보노이드를 함유하였으며, 비자를 80°C에서 추출한 WE보다는

Table 1. Extraction yields, flavonoid and polyphenol compound contents in various extracts from *T. nucifera* seed

Extracts <sup>1)</sup>	Yields (g/100 g)	Flavonoids (mg/g)	Polyphenols (mg/g)
WE	5.09	24.52±0.45 <sup>2)bc3)</sup>	109.97±1.19 <sup>b</sup>
EE	6.00	0.83±0.10 <sup>c</sup>	85.58±1.15 <sup>c</sup>
HWE	7.08	35.47±1.81 <sup>a</sup>	112.95±1.39 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>WE: reflux water extraction, EE: reflux ethanol extraction, HWE: hot water extract under high pressure.

<sup>2)</sup>Flavonoid and polyphenol compounds are mean±SD of triplicate determinations.

<sup>3)</sup>Value with different superscripts within the column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

100°C 이상의 고온·고압에서 추출한 HWE에서 더 많은 플라보노이드와 폴리페놀 화합물이 함유된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 고온과 고압으로 각 식물 조직체의 결합이 파괴되어 유용성분의 추출은 더 잘 이루어지며(28), 고분자의 폴리페놀 화합물은 저분자 화합물로 전환되어 총 폴리페놀 함량이 증가하는 것(29,30)으로 보고되어 있으므로 본 실험에서도 비자의 수율과 비자 종자에 함유된 플라보노이드 및 폴리페놀 화합물 역시 100°C 이상의 고온과 고압의 추출 조건에서 더 많이 추출된 것으로 생각된다.

항산화 활성을 나타내는 일부 약용식물 추출물의 플라보노이드와 폴리페놀 함량을 측정한 결과 산수유는 5.15 mg/g의 플라보노이드와 32.25 mg/g의 폴리페놀을 함유하며, 오미자에서는 2.94 mg/g과 12.67 mg/g 그리고 토사자는 19.77 mg/g과 28.22 mg/g를 함유한다는 결과(31)와 비교하면 비자의 EE에 함유된 플라보노이드 함량은 낮았으나 폴리페놀 화합물(85.58 mg/g)은 더 많았으며, WE와 HWE 모두 Kim 등(31)의 결과보다 폴리페놀의 함량은 높았다. 또한 Moon 등(32)은 과실류와 종자류 생약제(모과, 사인, 백두구, 팔각향, 흑두)에서 0.55~3.81 mg/g의 폴리페놀을 함유한다는 결과와 비교하여 볼 때 비자나무 추출물에는 다량의 폴리페놀을 함유하는 것으로 나타났다. 식물에 함유된 플라보노이드나 폴리페놀 화합물은 천연항산화제로써 작용할 수 있으며 항산화 작용에 영향을 나타낸다는 기존의 연구(31,33)에 근거하여 비자에 다량의 플라보노이드와 폴리페놀을 함유하므로 천연항산화제로써 이용 가치가 있을 것으로 판단된다.

#### Tyrosinase 저해활성

비자 추출물의 melanine 색소 생성에 관여하는 tyrosinase 저해활성을 0.1~2.0 mg/mL의 농도에서 측정한 결과 2.73~28.71%로 물 추출물인 WE는 가장 높은 tyrosinase 저해율을 나타내었으며, EE와 HWE보다 2.4~5.1배 높았다. EE는 2.82~11.94 mg/mL로 0.1 mg/mL의 농도에서는 저해활성이 없었으며, HWE는 2.73~5.62 mg/mL로 추출물의 농도가 증가에 따른 tyrosinase 저해율의 유의적 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Tyrosinase inhibition of various extracts from the *T. nucifera* seed

Concentration (mg/mL)	Extracts <sup>1)</sup>			Control
	WE	EE	HWE	Ascorbic acid
0.1	2.84±0.82 <sup>2)Ad3)</sup>	NA <sup>4)</sup>	2.73±1.15 <sup>A</sup>	96.68±0.52
0.5	11.16±0.60 <sup>Ac</sup>	2.82±0.99 <sup>Bb</sup>	3.75±3.34 <sup>B</sup>	98.04±0.26
1.0	21.32±1.00 <sup>Ab</sup>	3.38±0.71 <sup>Bb</sup>	4.09±1.70 <sup>B</sup>	98.79±0.69
2.0	28.71±1.05 <sup>Aa</sup>	11.94±1.07 <sup>Ba</sup>	5.62±1.03 <sup>C</sup>	99.25±0.69

<sup>1)</sup>The abbreviation of introductory remarks are the same as in Table 1.

<sup>2)</sup>All values are mean±SD of triplicate determinations.

<sup>3)</sup>Value with different capital and small letters in superscripts within the same row and column are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>4)</sup>Not activated.

본 실험 결과는 연교에서 54%의 tyrosinase 저해효과를 나타내며, 치자 36%, 행인 33%, 그리고 지실에서 15%의 저해효과를 나타낸다는 Choi 등(34)의 결과와 비교하면 비자의 HWE는 연교와 치자, 행인보다는 낮았으나 지실보다는 높은 tyrosinase 저해를 나타내었다. Tyrosinase에 대한 저해활성은 폴리페놀의 종류 및 구조와 상관관계가 있으며(35), 폴리페놀의 함량이 높을수록 우수한 것으로 알려져 있다(36). 그러나 본 실험에서 비자를 80°C에서 추출한 WE가 100°C 이상의 고온과 고압에서 추출한 HWE보다 약 5배 높은 tyrosinase 저해효과를 나타내어, 물을 용매로 추출한 경우 추출시간과 온도가 낮을수록 tyrosinase 저해활성이 높다는 Lee 등(37)의 결과와 일치하였다. 따라서 비자에 함유된 tyrosinase의 저해를 나타내는 생리활성 물질은 온도에 의해 영향을 받는 것으로 판단되며, 이에 대한 활성물질의 종류 및 구조에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

#### 아질산염 소거능

비자의 세 가지 추출물을 pH와 농도에 따라 아질산염 소거효과를 측정된 결과, 농도 2.0 mg/mL의 pH 1.2의 조건에

서 89.56~94.30%로 HWE가 가장 높은 아질산염 소거효과를 보였으며, 0.5 mg/mL에서도 세 가지 추출물 모두 50% 이상의 소거율을 나타내었다(Table 3). pH 3.0에서는 91.77~92.56%로 EE에서 가장 높았으며, WE와 HWE는 유사한 아질산염 소거효과를 나타내었으며, pH 6.0의 조건에서는 4.94~5.66%로 HWE에서는 아질산염 소거효과가 없었다. pH 1.2와 3.0에서 비자의 모든 추출물은 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거율이 유의적으로 증가하였으나( $p<0.05$ ), pH 6.0에서는 추출물의 농도 증가에 따른 유의적 차이가 없었다. 그리고 물을 용매로 추출한 WE와 HWE는 pH가 증가함에 따라 아질산염 소거능이 감소하였으나 에탄올을 용매로 추출한 EE는 0.1과 2.0 mg/mL의 농도에서 pH 1.2보다 3.0에서 더 높은 아질산염 소거효과를 나타내었다.

육두구의 물과 에탄올 추출물이 pH 1.2의 1.0 mg/mL 농도에서 4.5%와 28.8%의 아질산염 소거 효과를 나타내었다는 Son 등(38)의 결과와, 일부 종자류 한약재의 아질산염 소거능을 측정한 결과 모과, 사인, 백두구 등의 종자류 한방생약재에서 73.23~87.00%의 소거효과를 나타내었다는 결과(39)와 비교하여도 비자의 아질산염 소거작용이 매우 우수

Table 3. Nitrite scavenging abilities of various extracts from the *T. nucifera* seed at pH respectively

Concentration (mg/mL)	Extracts <sup>1)</sup>			Control	
	WE	EE	HWE	Ascorbic acid	
pH 1.2	0.1	12.46±0.12 <sup>2)Bd3)</sup>	5.57±0.23 <sup>Cd</sup>	15.26±0.43 <sup>Ad</sup>	87.41±0.21 <sup>b</sup>
	0.5	59.64±0.43 <sup>Ac</sup>	51.20±0.35 <sup>Cc</sup>	58.09±0.89 <sup>Bc</sup>	97.97±0.14 <sup>a</sup>
	1.0	89.28±0.12 <sup>Ab</sup>	83.76±0.23 <sup>Cb</sup>	86.24±0.26 <sup>Bb</sup>	98.38±0.21 <sup>a</sup>
	2.0	93.25±0.12 <sup>Ba</sup>	89.56±0.00 <sup>Ca</sup>	94.30±0.17 <sup>Aa</sup>	98.66±0.35 <sup>a</sup>
pH 3.0	0.1	10.53±0.12 <sup>Bd</sup>	10.82±0.84 <sup>Bd</sup>	12.73±0.92 <sup>Ad</sup>	71.01±0.54 <sup>c</sup>
	0.5	50.07±0.12 <sup>Ac</sup>	46.69±0.23 <sup>Bc</sup>	45.89±0.58 <sup>Bc</sup>	93.41±0.71 <sup>b</sup>
	1.0	78.33±0.42 <sup>Ab</sup>	76.47±0.54 <sup>Bb</sup>	73.69±0.65 <sup>Cb</sup>	96.95±0.34 <sup>a</sup>
	2.0	91.80±0.20 <sup>Ba</sup>	92.56±0.12 <sup>Aa</sup>	91.77±0.38 <sup>Ba</sup>	97.27±0.21 <sup>a</sup>
pH 6.0	0.1	4.94±0.37	2.83±1.40	NA <sup>4)</sup>	21.21±0.55 <sup>c</sup>
	0.5	6.27±0.84	4.15±1.10	NA	60.69±0.48 <sup>b</sup>
	1.0	6.37±0.53	5.42±0.91	NA	78.44±0.33 <sup>a</sup>
	2.0	4.94±0.31	5.66±0.58	NA	79.50±0.54 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>The abbreviation of introductory remarks are the same as in Table 1.

<sup>2)</sup>All values are mean±SD of triplicate determinations.

<sup>3)</sup>Value with different capital and small letters in superscripts within the same row and column are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>4)</sup>Not activated.

하다고 할 수 있다. Kytopoulos(40)는 nitrosamine의 생성 최적 pH는 2.5~3.0으로 pH에 의존적이라고 하였으며, Shenoy와 Choughuley(41)는 각종 phenol류가 amine의 nitrosamine 저해제로 작용하며 이중 catechol은 산성조건에서 amine보다 nitrite와 더욱 쉽게 반응한다고 보고하였다. 또한 caffeic acid와 ferulic acid와 같은 phenolic acid도 nitrosamine의 생성을 억제한다는 보고(42)로 미루어보아 비자에는 위장의 낮은 pH 조건에서 nitrosamine 생성을 효과적으로 억제하는 phenol 성분이 다량 함유된 것으로 판단되며, 이를 아질산염이나 아민이 함유된 제품과 함께 섭취 및 가공한다면 더욱 효과적으로 nitrosamine의 생성 억제 및 산화방지 효과도 기대할 수 있을 것이다.

**SOD 유사활성능**

비자 추출물을 0.1~2.0 mg/mL의 농도로 SOD 유사활성을 측정한 결과 HWE(10.72~33.58%) > EE(5.34~24.16%) > WE(9.12~17.70%)의 순으로 나타났다(Table 4). WE는 0.5 mg/mL 이하의 농도에서 HWE와 SOD 유사활성효과가 유의적으로 차이가 없었으나(p<0.05) 추출물의 농도가 증가함에 따라 EE보다 낮은 활성을 나타내었으며, 2.0 mg/mL의 농도에서는 HWE가 EE보다 약 2배 높은 활성을 나타내었다.

일부 과실류 약용식물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 구기자 21.27%, 오매 15.63%, 목과 14.17%, 복분자 13.20% 그리고 산사에서는 6.70%라는 보고(43)와 비교하면 비자의 WE는 구기자보다는 낮았으나 EE와 HWE는 Lim 등(43)의 결과보다 높은 SOD 유사활성능을 나타내었다. 폴리페놀 화합물은 superoxide radical을 소거하는 것으로 알려져 있으며, 폴리페놀의 함량이 많을수록 SOD 유사활성이 높은 것으

로 보고되어 있으며(44), 이는 가장 많은 폴리페놀을 함유하는 HWE에의 SOD 유사활성이 가장 높다는 결과와 일치하였다. 그러나 본 실험에서 EE는 플라보노이드와 폴리페놀의 함량이 WE보다 낮았으나 1.0 mg/mL 이상의 농도에서는 WE보다 더 높은 SOD 유사활성능을 나타내었다. 이는 폴리페놀의 종류와 구조에 따라 생리활성에 차이가 있다는 보고(36,45)로 미루어 볼 때 추출용매와 추출방법의 차이에 의한 것으로 판단되며, 폴리페놀 이외의 항산화 효과를 나타내는 생리활성 물질이 비자에 함유된 것으로 생각된다.

**전자공여능**

비자의 WE와 EE 그리고 HWE를 0.1~2.0 mg/mL의 농도에서 DPPH free radical을 이용하여 전자공여효과를 측정 한 결과를 Table 5에 나타내었다. WE에서는 60.65~89.72%, EE는 53.84~66.46% 그리고 HWE에서는 47.42~67.97%로 WE에서 가장 높은 전자공여능을 보였다. 비자의 모든 추출물은 0.1 mg/mL에서 가장 높은 전자공여효과를 나타내었으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자공여능은 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 일반적으로 전자공여능은 시료의 함량이 증가할수록 전자공여효과가 증가하나(46) 본 실험결과에서는 상반된 결과를 나타내어 이는 비자에 함유된 다른 화합물이 전자공여효과를 억제하는 것으로 사료된다. Kang 등(47)은 폴리페놀 함량에 비례하여 전자공여능도 증가한다고 보고하였으나 비자 추출물을 대상으로 한 실험에서는 폴리페놀의 함량과 상관관계가 없었다.

본 실험 결과를 Chen 등(19)이 중국에서 비자로 사용되는 동속의 *T. grandis*의 에탄올 추출물이 1.0 mg/mL의 농도에서 100%의 전자공여능을 나타낸다는 결과와 비교하면 본

**Table 4. Superoxide dismutase (SOD) like activities of various extracts from the *T. nucifera* seed**

Concentration (mg/mL)	Extracts <sup>1)</sup>			Control
	WE	EE	HWE	Ascorbic acid
0.1	9.12±0.87 <sup>2)Ac3)</sup>	5.34±1.59 <sup>Bd</sup>	10.72±1.38 <sup>Ac</sup>	94.74±0.00
0.5	14.79±1.82 <sup>Ab</sup>	9.49±0.97 <sup>Bc</sup>	12.23±1.05 <sup>ABc</sup>	94.74±0.00
1.0	14.10±1.76 <sup>Bb</sup>	17.78±1.94 <sup>ABb</sup>	18.93±1.90 <sup>Ab</sup>	94.74±0.00
2.0	17.70±1.15 <sup>Ca</sup>	24.16±1.67 <sup>Ba</sup>	33.58±1.63 <sup>Aa</sup>	99.12±1.52

<sup>1)</sup>The abbreviation of introductory remarks are the same as in Table 1.

<sup>2)</sup>All values are mean±SD of triplicate determinations.

<sup>3)</sup>Value with different capital and small letters in superscripts within the same row and column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

**Table 5. Electron donating abilities of various extracts from the *T. nucifera* seed**

Concentration (mg/mL)	Extracts <sup>1)</sup>			Control
	WE	EE	HWE	Ascorbic acid
0.1	89.72±0.26 <sup>2)Aa3)</sup>	66.46±0.80 <sup>Ba</sup>	67.97±1.02 <sup>Ba</sup>	57.54±0.52
0.5	71.78±0.60 <sup>Ab</sup>	59.35±0.78 <sup>Bb</sup>	58.49±1.55 <sup>Bb</sup>	65.01±0.80
1.0	65.81±1.45 <sup>Ac</sup>	54.16±0.55 <sup>Bc</sup>	53.66±1.70 <sup>Bc</sup>	67.00±1.09
2.0	60.65±0.34 <sup>Ad</sup>	53.84±1.41 <sup>Bc</sup>	47.42±0.71 <sup>Cd</sup>	67.33±0.30

<sup>1)</sup>The abbreviation of introductory remarks are the same as in Table 1.

<sup>2)</sup>All values are mean±SD of triplicate determinations.

<sup>3)</sup>Value with different capital and small letters in superscripts within the same row and column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 6. Xanthine oxidase inhibition of various extracts from the *T. nucifera* seed

Concentration (mg/mL)	Extracts <sup>1)</sup>			Control
	WE	EE	HWE	Ascorbic acid
0.1	36.26 ± 1.01 <sup>1)Ac2)</sup>	16.67 ± 3.32 <sup>Cc</sup>	26.79 ± 0.00 <sup>Bd</sup>	84.40 ± 1.23
0.5	77.78 ± 1.01 <sup>Ab</sup>	56.52 ± 2.17 <sup>Bb</sup>	76.19 ± 1.03 <sup>Ac</sup>	87.94 ± 1.23
1.0	83.63 ± 2.68 <sup>Aa</sup>	60.14 ± 1.26 <sup>Bb</sup>	85.74 ± 0.00 <sup>Ab</sup>	90.78 ± 2.46
2.0	85.96 ± 0.75 <sup>Ba</sup>	66.67 ± 1.26 <sup>Ca</sup>	89.29 ± 1.79 <sup>Aa</sup>	93.62 ± 0.00

<sup>1)</sup>The abbreviation of introductory remarks are the same as in Fig. 2.

<sup>2)</sup>All values are mean ± SD of triplicate determinations.

<sup>3)</sup>Value with different capital and small letters in superscripts within the same row and column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

실험의 비자(*T. nucifera*)의 전자공여능이 약 50% 정도 낮았다. 그러나 Moon 등(39)은 일부 종자류 추출물을 1.0 mg/mL의 농도에서 측정하여 사인(42.12%), 백두구(42.27%), 팔각향(26.45%), 흑두(12.75%) 등의 결과와 비교하면 비자 추출물이 좀 더 높은 전자공여효과를 나타내었다. 또한 초과(34.9%), 진피(10.2%), 결명자(6.7%), 오매(5.6%) 등의 결과(48)와 비교하여도 비자가 2~2.5배 높은 활성을 나타내어 기존에 보고된 열매 및 종자류 식물보다 높은 전자공여능을 나타내었다.

#### Xanthine oxidase 저해활성

Xanthine oxidase는 생체 내 purine 대사에 관여하는 효소로써 xanthine 또는 hypoxanthine에서 요산을 형성하여 통풍을 일으키는 효소로 요산이 과도하게 생성되어 혈액 내에 증가하면 관절이나 관절주위조직 및 신장 등에 침착되어 염증을 일으키고, 이로 인하여 통증 및 신장 질환을 일으킨다(49). 비자 추출물을 uric acid를 생성하는 xanthine oxidase의 저해활성을 측정한 결과 2.0 mg/mL의 농도에서 66.67~89.29%로 HWE에서 가장 높은 저해효과를 나타내었다(Table 6). 물을 용매로 추출한 WE와 HWE는 0.5 mg/mL의 농도에서도 75% 이상의 xanthine oxidase 저해효과를 보였으며, EE에서도 55% 이상의 저해율을 나타내었으며, 모든 추출물은 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ).

본 실험결과는 팔배나무 종자의 에탄올 추출물에서 77.0%의 xanthine oxidase 저해효과를 나타내며 산뽕나무 종자 추출물은 41.2%의 저해율을 나타낸다는 Hyun 등(50)의 결과와 비교하면 비자 추출물의 저해활성이 높았다. 중국에서 비자로 사용되는 *T. grandis*는 항산화 및 항염 작용이 있다고 하였으며(19), 우리나라와 일본에서 비자로 사용되고 있는 *T. nucifera* 또한 우수한 xanthine oxidase 저해효과를 나타내는 것으로 보아 비자속 식물은 우수한 항산화 및 항염 작용을 나타낸다고 할 수 있으며, 유용식물로서 이용가치가 높다고 할 수 있다.

#### 요 약

식용 및 한방생약재로 사용되고 있는 비자나무(*T. nuci-*

*fera*) 종자인 비자(榲子)를 천연 항산화 소재로 활용하기 위한 연구의 일환으로 물 추출물(WE)과 에탄올 추출물(EE) 그리고 열수 추출물(HWE)에 함유된 플라보노이드와 폴리페놀 화합물의 함량과 tyrosinase 저해, 아질산염 소거, 전자공여, xanthine oxidase 저해활성 등 항산화적 생리활성을 측정하였다. 추출방법과 용매를 달리한 비자의 수율은 100°C 이상의 고온과 압력이 가해진 HWE가 7.08 g/100 g으로 가장 높은 수율을 나타내었다. 또한 비자의 HWE는 35.47 mg/g의 플라보노이드와 112.95 mg/g의 폴리페놀 화합물을 함유하였다. 비자의 각 추출물에 대한 tyrosinase 저해율은 2.0 mg/mL의 농도에서 5.62~28.71%로 WE에서 가장 높은 저해효과를 나타내었다. 아질산염의 소거능을 측정한 결과에서는 pH 1.2의 2.0 mg/mL의 조건에서 HWE가 94.30 %로 가장 높은 소거효과를 보였으며, pH 1.2와 3.0에서 비자의 세 가지 추출물 모두 약 90% 이상의 아질산염 소거능을 나타내었다. SOD 유사활성능은 HWE에서 33.58%로 WE(17.70%)와 EE(24.16%)보다 약 1.4~2배 높은 활성을 보였다. 전자공여능은 0.1 mg/mL의 농도에서 66.46~89.72%로 WE에서 높았으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 전자공여능이 감소하였다( $p < 0.05$ ). Xanthine oxidase 저해는 HWE에서 89.29%로 가장 높은 저해효과를 나타내었으며, 0.5 mg/mL의 농도에서도 WE와 HWE는 75% 이상의 저해율을 나타내었다. 이상의 실험 결과 비자는 물을 용매로 추출하는 것이 다량의 플라보노이드와 폴리페놀 화합물 추출에 효과적인 것으로 판단되며 또한 우수한 생리활성 효과를 나타내므로 이를 이용하여 기능성식품이나 제품의 첨가물 또는 의약품 재료로 개발, 활용할 수 있는 유용한 한방생약자원인 것으로 판단된다.

#### 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

#### 문 헌

1. Freeman BA, Grapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.

2. McCord JM. 1987. Oxygen-derived radicals; a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 46: 2402-2406.
3. Barene AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.
4. Choe SY, Yang KH. 1982. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J Food Sci Technol* 14: 283-288.
5. Thomas MJ. 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do you know that they are working? *Crit Rev Food Sci* 35: 21-39.
6. Hara C, Kumazawa Y, Inagaki K, Kaneko M, Kiho T, Ukai S. 1986. Mitogenic and colony-stimulating factor-inducing activity of polysaccharide fractions from the fruit bodies of *Dictyohora indusiata*. *Fisch Chem Pharm Bull* 39: 1615-1616.
7. Nam HY, Cho JS. 2006. Quality characteristics of white pan bread with ingredients of Sagoonja-Tang. *Korean J Food Cookery Sci* 22: 458-467.
8. 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.
9. Lee SJ. 1966. *Korean folk medicine*. Seoul National Univ, Seoul, Korea. p 6.
10. Chung BS, Ko YS. 1978. Studies on the sterol components of Torreya nut of Korea. *Yakhak Hoeji* 22: 87-90.
11. Lee TB. 1993. *Illustrated flora of Korea*. 5th ed. Hyangmoonsa, Seoul, Korea. p 56.
12. Endo Y, Osada Y, Kimura F, Fujimoto K. 2006. Effects of Japanese torreyia (*Torreya nucifera*) seed oil on lipid metabolism in rats. *Nutrition* 22: 553-558.
13. Im HS, Yoon KR, Chung DH. 1980. Studies on the lipid components of *Torreya nucifera* seed. *Korean J Food Sic Technol* 12: 324-327.
14. Joh YG, Kim KJ, Bark KS, Jeong TM. 1981. Studies on the composition and chemical structure of desmethylsterols from *Torreya nucifera* seeds. *Korean J Food Sci Technol* 13: 127-132.
15. Kim ND. 1996. Study on the anthelmintic principle of *Torreya nucifera*. *J Pharmaceu Soc Kor* 10: 30-32.
16. Oh HJ, Ann HM, So KH, Kim SS, Yun PY, Jeon GL, Riu KZ. 2007. Chemical and antimicrobial properties of essential oils from three coniferous trees *Abies koreana*, *Cryptomeria japonica*, and *Torreya nucifera*. *J Appl Biol Chem* 50: 164-169.
17. 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 2, p 364-348.
18. 南京藥學院編寫組. 1978. 中草藥學(中冊). 江蘇人民出版社, 南京. Vol 1, p 86.
19. Chen BQ, Cui XY, Zhao X, Zhang YH, Piao HS, Kim JH, Lee BC, Pyo HB, Yun YP. 2006. Antioxidative and acute antiinflammatory effects of *Torreya grandis*. *Fitoterapia* 77: 262-267.
20. Lui ZL, Goh SH, Ho SH. 2007. Screening of chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J Sto Pro Res* 43: 290-296.
21. 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.
22. AOAC. 2005. *Official Method of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. Vol 45, p 21-22.
23. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Medica* 53: 517-519.
24. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
25. 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.
26. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
27. Stirpe F, Corte ED. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244: 3855-3861.
28. Woo KS, Jang KI, Kim KY, Lee HB, Jeong HS. 2006. Antioxidative activity of heat treated licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts. *Korean J Food Sci Technol* 38: 355-360.
29. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. 2005. The effect of cooking methods total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem* 93: 713-718.
30. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidative activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
31. 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: 333-338.
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. Bors W, Saran M. 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Comm* 2: 289-294.
34. Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor J Pharmacogn* 29: 237-242.
35. Kim JK, Cha WS, Park JH, Oh SL, Cho YJ, Chum SS, Choi C. 1997. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from Korean green tea. *Korean J Food Sci Technol* 29: 173-177.
36. Lee SJ, Park DW, Jang HG, Kim CY, Park YS, Kim TC, Heo BG. 2006. Total phenol content, electron donating ability, and tyrosinase inhibition activity of pear cut branch extract. *Korean J Hort Sci Technol* 24: 338-341.
37. Lee YS, Joo EY, Kim NW. 2006. Polyphenol contents and physiological activity of the *Lespedeza bicolor* extracts. *Korean J Food Preserv* 13: 616-622.
38. Son JY, Heuing BJ, Takeda Y, Ando K. 2007. Functional properties of nutmeg. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 33-40.
39. 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.
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. Shenoy NR, Choughuley ASU. 1989. Effect of certain phenolic on nitrosamine formation. *J Agric Food Chem* 37: 721-726.
42. Kuenzing W, Chau J, Norkus E, Conney AH. 1984. Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* 5: 309-312.

43. 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.
44. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem* 44: 37-41.
45. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. 1988. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* 51: 345-348.
46. Kim SA, Oh SI, Lee MS. 2007. Antioxidative and cytotoxic effects of solvent fractions from *Elaeagnus multiflora*. *Korean J Food and Nutr* 20: 134-142.
47. Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239.
48. 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.
49. Wyngaarden JB, Holmes EW Jr. 1977. Molecular nature of enzyme regulation in purine biosynthesis. *Ciba Found Symp* 48: 43-64.
50. Hyun SH, Jung SK, Jwa MK, Song CK, Kim JH, Lim SB. 2007. Screen of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in Jeju island. *Korean J Food Sci Technol* 39: 200-208.

(2008년 10월 9일 접수; 2008년 11월 20일 채택)