

만형자(*Vitex rotundifolia*) 추출물의 항산화 활성과 Tyrosinase 저해 활성

이양숙 · 최복동 · 주은영 · 신승렬¹ · 김남우[†]

대구한의대학교 한방생약자원학과, ¹대구한의대학교 한방식품조리영양학과

Antioxidative Activities and Tyrosinase Inhibition Ability in Various Extracts of the *Vitex rotundifolia* Seeds

Yang-Suk Lee, Bok-Dong Choi, Eun-Young Joo, Seung-Ryeul Shin
and Nam-Woo Kim[†]

Department of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea

¹Faculty of Cuisine and Nutrition, Daegu Haany University, Gyeongbuk 712-715, Korea

Abstract

The purpose of this study was to measure flavonoid and polyphenol contents, and physiological activities of various extracts from *Vitex rotundifolia* seeds (known as Man Hyung Ja). We obtained three extracts using water (WE), ethanol (EE) and hot water (HWE). The EE sample had the highest flavonoid content of 31.05 mg/g. Polyphenol contents of WE and HWE were 186.69 mg/g and 182.55 mg/g, respectively. HWE had the highest superoxide dismutase (SOD)-like activity, at 83.40%. The electron donating abilities (EDA) were 91.14~95.97% at the concentration of 1.0 mg/mL, and all of extracts showed more than 88% EDA even at a concentration of 0.1 mg/mL. The inhibitory rates of xanthine oxidase were 94.02~97.51% when 1.0 mg/mL extracts were used, and all extracts showed more than 90% inhibition at 0.5 mg/mL. The nitrite scavenging abilities were 59.27~86.61% at pH 1.2 and 1.0 mg/mL extract concentration; these abilities decreased as pH increased. Tyrosinase inhibition activities of HWE and WE were 48.58% and 46.67%, respectively. These results indicate that *Vitex rotundifolia* seeds extract might be an effective antioxidative activity.

Key words : *Vitex rotundifolia* seeds, superoxide dismutase, electron donating ability, xanthine oxidase, tyrosinase

서 론

만형자(蔓荊子)는 순비기나무(*Vitex rotundifolia* L.)의 성숙된 열매를 건조한 것으로 마편초과(Verbenaceae)에 속하는 한방 약용식물자원으로 경북 및 황해도 이남의 섬이나 해안가에 자생하며 중국과 일본에도 자생하는 것으로 알려져 있다(1,2). 만형자의 기원식물인 순비기나무는 독특하면서 강한 향기를 가지고 있어 예전부터 잎과 가지는 목욕용 재료나 실내의 습기를 제거하기 위한 흡습제 및 방매제로 사용하였으며, 종자인 만형자는 두통을 완화시키는 효과가 있다고 하여 민간에서는 배개속으로 사용하였다(2). 또한

우리나라를 포함한 중국과 일본 등 동양의학에서 만형자는 성질이 차고 맛은 쓰면서 맵고 독이 없어 강장, 진정, 진통, 소염작용이 있어 감기, 만성중이염, 이명, 난청, 시력장애, 두통, 신경통, 습진 및 다양한 염증과 알러지성 질환의 치료에 사용한다(3-5).

만형자에 관한 연구로는 monoterpene류를 포함한 약 76종의 정유성분(5)과 골수성 백혈병 저해 효과를 나타내는 flavonoids과 식물생장을 조절하는 phenol 화합물 등이 분리 동정된 바 있다(6,7). 또한 만형자는 혈압상승 억제(8), 항암(9), 항돌연변이(10), 항알러지(11), 진정(12), 방충작용(13) 등 다양한 생리학적 효능을 나타내는 것으로 알려져 있으며, Kim 등(14)은 만형자의 기원식물인 순비기나무의 재배 한계분포와 항염 활성에 대하여 보고한 바 있다. 그리고 Jung 등(15)과 Joo 등(16)은 순비기나무의 줄기와 잎 추출물

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

에 대한 항산화 활성을 연구한 바 있다.

활성산소(reactive oxygen)는 호기성 생물체에서 생명 유지에 절대적으로 필요한 산소가 전자수용체로써 에너지 공급을 위해 생화학적 반응이 지속적으로 일어나는 과정에서 발생한다. 이 활성산소들은 효소 불활성화, 지질산화, DNA 변성, 세포노화 등을 초래함으로써 암을 비롯한 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 염증, 자가면역질환 등의 심각한 생리적 장애를 일으키는 원인으로 지목되고 있다(17,18). Tocopherol, carotenoid, catechins, flavonoids 등의 천연물에서 활성산소를 제거시킬 수 있는 항산화제 개발 및 이용에 관한 다양한 연구가 이루어지면서 최근에는 천마, 복분자, 감초 등 다양한 한방 약용식물자원을 이용하여 음료, 육가공품 및 국수 등 다양한 기능성 식품의 신소재로 이용되고 있다(19,20).

우리나라에서는 한방 약용식물을 일상생활에서 다양한 방법으로 이용하는 민간요법이 있어 약용자원을 이용한 식품첨가제나 기능성 제품의 개발 및 상품화가 용이하다. 본 실험에서는 예로부터 한방생약재로 사용하며, 유용한 성분 및 효과를 나타내는 만형자를 항산화제나 기능성 소재로 이용하기 위하여 만형자 추출물에 함유된 플라보노이드와 폴리페놀 화합물의 함량을 측정하였으며, 각 추출물의 SOD 유사활성, 전자공여, xanthine oxidase 저해 및 아질산염 소거 작용 등 항산화 활성과 tyrosinase 저해효과를 측정하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시료의 추출

본 실험에 사용한 만형자(*Vitex rotundifolia* L.)는 2006년 11월에 대구 약령시장에서 국내에서 2006년에 생산된 만형자를 구입하여 증류수에 3회 세척하고 종피를 제거한 후 음건하여 추출시료로 사용하였다.

만형자의 물 추출물(Water extract: WE)과 에탄올 추출물(Ethanol extract: EE)은 환류 냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에 시료 당 10배에 해당되는 증류수 및 70% 에탄올을 넣고 80°C와 60°C의 수욕 상에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 열수 추출물(Hot water extract: HWE)은 시료의 30배 분량의 증류수를 넣고 압력추출기(KSNP B1130, Kyungseo, Korea)로 110°C, 1.5 기압 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 항산화 활성을 측정하기 위한 시료로 사용하였다.

플라보노이드 화합물 함량

만형자 추출물에 함유된 플라보노이드 총 화합물의 함량

은 동결건조하여 분말화 된 만형자 추출물을 10 mg/mL의 농도로 80% ethanol에 희석한 다음 Nieva Moreno 등(21)의 방법을 변형하여 측정하였다. 희석액 0.1 mL에 80% ethanol 0.4 mL를 첨가하여 혼합한 후 10% aluminum nitrate 0.1 mL와 1 M potassium acetate 0.1 mL 그리고 80% ethanol 4.3 mL를 가하여 25°C에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 정량은 quercetin (Sigma Chemical Co., USA)을 이용하여 최종농도가 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL가 되도록 취하여 위와 동일한 방법으로 측정한 표준곡선으로 만형자 추출물에 대한 플라보노이드 함량을 산출하였다.

폴리페놀 화합물 함량

만형자 추출물의 동결 건조된 시료는 10 mg/mL의 농도로 3차 증류수에 희석하여 Folin-Denis 법(22)으로 측정하였다. 일정 농도의 시료 0.2 mL에 증류수 1.8 mL를 희석한 다음, folin-ciocalteu's phenol reagent 0.2 mL를 첨가, 혼합하여 3분간 실온에서 반응시켰다. 여기에 sodium carbonate (Na₂CO₃) 포화용액 0.4 mL를 가하여 혼합한 후 증류수를 1.4 mL 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 폴리페놀 화합물은 tannic acid(Sigma Chemical Co. USA)를 이용하여 최종농도가 0, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL가 되도록 취하여 위와 동일한 방법으로 측정한 표준곡선으로 만형자 추출물에 함유된 폴리페놀 화합물 함량을 산출하였다.

SOD 유사활성능 측정

SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund(23)의 방법에 따라 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 일정 농도의 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응 후, 1 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하여 만형자 추출물의 첨가구와 무첨가구의 흡광도의 차이를 %로 나타내었다.

전자공여능 측정

추출방법을 달리한 만형자의 각 추출물에 대한 전자공여능은 Blois(24)의 방법에 따라 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 분말로 제조한 만형자 추출물을 일정 농도로 희석한 시료 2 mL를 absolute ethanol에 0.2 mM의 농도로 희석한 DPPH 용액

1 mL를 가하여 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 전자공여능은 시료 첨가 전, 후의 흡광도 차이를 %로 나타내었다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거 작용은 Kato 등(25)의 방법에 따라 1 mM의 NaNO_2 용액 2 mL에 일정 농도의 만형자 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 조정 한 후, 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 첨가, 혼합하여 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응시킨 시료를 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구는 griess reagent 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하여 만형자 추출물의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 %로 나타내었다.

Xanthine oxidase 저해활성

Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Della Corte(26)의 방법에 따라 측정하였다. 일정농도로 희석한 만형자 추출물 0.1 mL에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL와 xanthine(2 mM)을 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 정지시킨 다음 반응액에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. 만형자 각 추출물에 대한 xanthine oxidase 저해활성은 시료의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 %로 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 추출물 대신 동일한 농도로 첨가하여 위의 방법으로 측정하였다.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해 활성은 Yagi 등(27)의 방법에 따라 측정하였다. 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL와 일정 농도로 희석한 만형자 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 만형자 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 감소율을 %로 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 추출물 대신 동일한 농도로 첨가하여 위의 방법으로 측정하였다.

통계처리

본 실험결과는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험

결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 실험군간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS 14.0 for windows program을 이용하여 ANOVA test를 실시하여 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

플라보노이드 화합물 함량

추출용매와 방법이 상이한 만형자의 각 추출물에 함유된 플라보노이드 화합물의 함량을 측정한 결과 에탄올 추출물(EE)이 31.05 mg/g으로 가장 많은 플라보노이드 화합물을 함유하였으며, 열수 추출물(HWE)과 물 추출물(WE)은 각각 17.67 mg/g과 10.74 mg/g으로 용매로 에탄올을 사용한 것이 물로 추출한 것보다 약 1.7~3배 많은 플라보노이드 화합물을 함유하였다(Fig. 1).

일부 약용식물에 함유된 플라보노이드 함량을 측정한 결과 토사자에서는 19.77 mg/g이며, 사상자, 오미자, 부자, 그리고 산수유 등에서 2.94~8.09 mg/g의 플라보노이드를 함유하였다는 Kim 등(28)의 보고와 비교하면 만형자의 EE 추출물에 함유된 플라보노이드 함량이 더 높았으나 HWE와 WE는 토사자보다는 낮았으나 기존에 보고된 사상자나 부자보다는 많은 플라보노이드 화합물이 함유되어 있음을 알 수 있다.

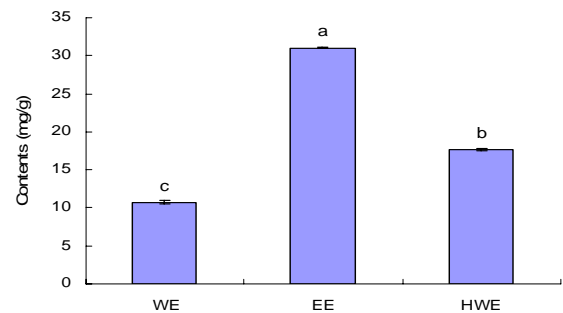


Fig. 1. Contents of flavonoid compounds in various extracts from *V. rotundifolia* seeds.

WE : Water extract, EE : Ethanol extract, HWE : Hot water extract. Bars within different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. All values are expressed as Means \pm SD of triplicate determinations.

폴리페놀 화합물 함량

만형자 추출물의 폴리페놀 화합물의 함량을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. WE에서 186.69 mg/g으로 가장 많은 폴리페놀을 함유하였으며 HWE는 182.55 mg/g, 그리고 EE는 100.80 mg/g으로 WE와 HWE가 에탄올 추출물인 EE보다 약 1.8배 많은 폴리페놀을 함유하였다

물을 용매로 추출한 산수유의 폴리페놀 함량은 32.25 mg/g이며 사상자 15.72 mg/g, 오미자 12.69 mg/g이라는 결

과(28)와 비교하면 만형자 추출물이 종자를 한방생약재로 사용하는 약용식물 추출물보다 폴리페놀 함량이 높으므로 분석되었다. 또한 Moon 등(29)의 정향(10.31 mg/g), 모과(3.55 mg/g), 흑두(0.55 mg/g) 등의 결과와 비교하여도 만형자 추출물에 함유된 폴리페놀이 약 10~18배 이상 많았다. 따라서 만형자는 항산화 활성을 나타내는 주요물질로 알려진 폴리페놀을 다량 함유하여 천연 항산화제로써 잠재적인 이용가치가 높은 것으로 생각되며, 특히 물을 이용하여 추출하는 것이 더욱 효과적으로 폴리페놀을 추출할 수 있을 것으로 판단된다.

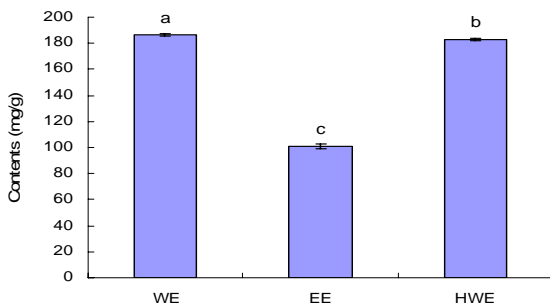


Fig. 2. Contents of polyphenol compounds in various extracts from *V. rotundifolia* seeds.

WE : Water extract, EE : Ethanol extract, HWE : Hot water extract. Bars within different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. All values are expressed as Means \pm SD of triplicate determinations.

SOD 유사활성능

만형자 종자 추출물의 SOD 유사활성을 측정된 결과 1.0 mg/mL의 농도에서 HWE(83.40%) > WE(56.50%) > EE(12.48%)의 순으로 고온, 고압에서 추출한 HWE는 WE와 EE보다 약 1.4~6배 높은 SOD 유사활성을 나타내었다 (Table 1). 그러나 0.5 mg/mL 이하의 농도에서 WE는 EE와 HWE보다 높았으며, 특히 0.1 mg/mL의 농도에서는 WE가 20.99%로 HWE(5.10%)보다는 약 4배, EE(0.67%)와 비교하여도 약 30배 높은 SOD 유사활성능을 나타내었다.

일부 약용식물의 SOD 유사활성능을 분석하여 백편두 47.87%, 결명자 17.73% 그리고 의이인에서는 5.53%라는 결과(30)와, 산사자의 물과 에탄올 추출물은 12% 미만의 SOD 유사활성능(31)을 나타내었다는 결과와 비교하면 만형자 추출물의 SOD 유사활성이 더 높았다. Kwon 등(32)과 Lee 등(33)은 폴리페놀의 함량이 높을수록 SOD 활성이 높다고 보고하여, 본 실험에서 폴리페놀의 함량이 높은 WE와 HWE가 에탄올을 용매로 추출한 EE보다 SOD 유사활성능이 우수하다는 결과와 일치하였다. 이는 폴리페놀이 항산화 효과를 나타낸다는 기존의 연구 결과(29,30,32) 등으로 미루어 보아 만형자 종자에는 SOD를 효과적으로 저해하는 천연 폴리페놀 성분을 다량 함유하며, 기존에 보고된 여러 종류의 천연물보다 우수한 SOD 유사활성능을 갖는다고

할 수 있다. 또한 물을 용매로 이용하여 높은 온도에서 추출한다면 더욱 효과적으로 SOD 유사활성능을 나타낼 수 있다고 판단된다.

전자공여능

상이한 조건으로 추출한 만형자 추출물의 DPPH에 대한

Table 1. Superoxide dismutase (SOD)-like activity of various extracts from *V. rotundifolia* seeds

Samples	SOD-like activity(%) ^{1,2)}			
	0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL
Water extract	20.99 \pm 0.23 ^a	30.15 \pm 2.26 ^a	46.48 \pm 0.89 ^a	56.50 \pm 0.42 ^b
Ethanol extract	0.67 \pm 0.12 ^c	5.45 \pm 0.60 ^c	11.02 \pm 1.66 ^c	12.48 \pm 0.61 ^c
Hot water extract	5.10 \pm 1.17 ^b	14.38 \pm 1.63 ^b	34.38 \pm 1.77 ^b	83.40 \pm 1.06 ^a

¹⁾All value are expressed as Mean \pm SD of triplicate determinations.

²⁾Different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

전자공여능을 0.1~1.0 mg/mL의 농도에서 측정된 결과 EE(90.32~95.97%) > WE(88.40~95.08%) > HWE(88.03~91.14%)의 순으로 전자공여효과를 나타내었으며, EE는 본 실험에서 가장 저농도인 0.1 mg/mL의 농도에서도 90% 이상의 활성을 나타내었으며, 물을 용매로 추출한 경우에서도 88%의 높은 활성을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Electron donating ability of various extracts from *V. rotundifolia* seeds

Samples	Electron donating ability(%) ^{1,2)}			
	0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL
Water extract	88.40 \pm 0.35 ^b	88.80 \pm 0.24 ^b	91.21 \pm 0.16 ^b	95.08 \pm 0.40 ^b
Ethanol extract	90.32 \pm 0.09 ^a	93.48 \pm 0.77 ^a	94.66 \pm 0.00 ^a	95.97 \pm 0.33 ^a
Hot water extract	88.03 \pm 1.11 ^b	89.45 \pm 0.51 ^b	90.35 \pm 0.28 ^c	91.14 \pm 0.42 ^c

¹⁾All value are expressed as Mean \pm SD of triplicate determinations.

²⁾Different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

메탄올을 용매로 추출한 일부 종자류 약용식물에 대한 전자공여 활성을 측정된 결과(15) 1.0 mg/mL의 농도에서 창이자에서는 19.1%이며, 행인, 결명자, 오매, 초과 등은 0~6.7%의 전자공여능을 나타낸다는 결과와 비교하여 만형자 추출물은 90% 이상으로 매우 높은 전자공여능을 나타내었다. 또한 만형자의 기원식물인 순비기나무의 줄기는 18.4%의 전자공여능을 나타낸다는 Joo 등(16)의 보고와 비교하여도 약 4.5배 높은 전자공여능을 나타내었다. 이는 기존에 보고된 다른 한방 약용식물보다 만형자가 우수한 전자공여 효과를 지닌 것으로 분석되며 이를 의약품 원료나 천연 항산화제 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

아질산염 소거능

낮은 산성조건에서 발암성 물질인 nitrosamine을 쉽게 생성하는 아질산염에 대하여 위장의 pH 조건과 유사한 pH 1.2, 3.0, 그리고 6.0의 조건으로 농도에 따른 만형자 종자 추출물의 아질산염 소거능을 측정하였다(Table 3). pH 1.2의 1.0 mg/mL의 조건에서 EE는 86.61%를 나타내어 WE(59.30%)와 HWE(59.27%)보다 높은 아질산염 소거율을 보였다. pH 3.0의 조건에서는 물을 용매로 추출한 WE(35.73%)와 HWE(34.30%)가 에탄올을 용매로 추출한 EE(26.53%)보다 높았으며, pH 6.0에서는 HWE가 약 20%의 아질산염 소거율을 나타내었다. 모든 추출물은 pH가 증가할수록, 만형자 추출물의 농도가 낮을수록 아질산염 소거능은 감소하였으며, pH 1.2의 조건에서는 EE가 가장 높은 소거효과를 나타내었으나 pH가 증가함에 따라 WE와 HWE가 좀더 높은 아질산염 소거율을 보였다.

본 실험결과를 일부 종자류 한방 생약재 추출물의 아질산염 소거능을 측정한 결과 pH 1.2의 조건에서 사인 87.00%, 백두구 73.23%, 그리고 흑두에서는 63.50%라는 Moon 등(29)의 결과와 비교하면 만형자의 EE는 Moon 등(29)의 결과보다 유사하거나 높은 아질산염 소거효과 보였으나, WE와 EE는 낮은 소거활성을 나타내었다. 그러나 하수오, 오미자, 행인 등에서 20% 이하의 아질산염 소거율을 나타내었다는 보고(34)보다는 만형자 추출물의 아질산염 소거율이 더 높았다. pH의 변화에 따라서는 pH가 높아질수록 아질산염 소거능이 감소한다는 기존의 결과(34,35)와도 일치하여 위장의 낮은 pH 조건하에서도 효과적으로 nitrosamine을 억제할 수 있음을 나타내었다. 그러므로 만형자를 아질산염 및 아민 함유제품과 같이 섭취 및 가공한다면 nitrosamine 생성 억제 및 항산화 효과도 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 3. Nitrite scavenging ability of various extracts from *V. rotundifolia* seeds at pH

Samples	pH	Nitrite scavenging ability(%) ^{1,2)}			
		0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL
Water extract	1.2	1.10 ± 0.23 ^c	19.77 ± 1.37 ^c	32.77 ± 1.59 ^{ab}	59.30 ± 0.71 ^b
Ethanol extract		27.21 ± 0.44 ^a	50.82 ± 0.67 ^a	70.01 ± 0.47 ^a	86.61 ± 0.58 ^a
Hot water extract		6.21 ± 0.67 ^b	24.10 ± 0.56 ^b	34.98 ± 1.35 ^c	59.27 ± 2.36 ^b
Water extract	3.0	8.00 ± 0.96 ^b	17.98 ± 0.17 ^c	24.46 ± 1.24 ^b	35.73 ± 0.82 ^a
Ethanol extract		12.88 ± 0.60 ^a	18.23 ± 0.34 ^b	21.41 ± 0.73 ^c	26.53 ± 0.59 ^c
Hot water extract		9.93 ± 0.78 ^b	21.24 ± 0.50 ^a	26.35 ± 1.01 ^a	34.30 ± 0.56 ^b
Water extract	6.0	0.63 ± 0.60 ^b	6.51 ± 0.46 ^b	10.79 ± 0.17 ^b	18.78 ± 0.60 ^b
Ethanol extract		2.29 ± 0.59 ^a	7.52 ± 0.49 ^a	10.52 ± 0.42 ^b	14.07 ± 0.36 ^c
Hot water extract		0.28 ± 0.48 ^b	7.12 ± 0.68	11.13 ± 0.43 ^a	19.55 ± 0.43 ^a

¹⁾All value are expressed as Mean ± SD of triplicate determinations.
²⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Xanthine oxidase 저해활성

생체내에서 purine 대사에 관여하여 통풍과 신장질환의 원인이 되는 xanthine oxidase(XO)를 0.1~1.0 mg/mL의 농도에서 만형자 추출물에 대한 저해활성을 측정한 결과는 Table 4에 나타내었다. WE에서는 69.55~94.42%의 저해율을 보였으며, EE는 47.21~97.51% 그리고 HWE에서는 37.50~94.02%로 모든 추출물은 시료의 농도가 증가함에 따라 XO 저해율도 증가하였으며, 0.5 mg/mL 이상의 농도에서는 만형자의 세가지 추출물 모두에서 90% 이상의 높은 저해활성을 나타내었다. 만형자의 각 추출물은 0.1 mg/mL의 저농도에서 WE가 약 70%의 XO 저해율을 나타내어 HWE(37.50%)보다 약 2배 높은 효과를 보였으나 1.0 mg/mL의 농도에서는 유사한 저해활성을 보였으며, EE는 97.51%로 가장 높은 XO 저해활성을 나타내었다. 또한 만형자 추출물은 대조군인 ascorbic acid와 비교하여 0.1 mg/mL의 낮은 농도에서는 만형자 추출물보다 높은 XO 저해율이 높았으나 농도가 증가함에 따라 만형자 추출물이 ascorbic acid보다 높은 저해효과를 나타내었다.

본 실험결과는 산사자의 물과 에탄올 추출물이 1.0 mg/mL의 농도에서 11% 미만의 XO 저해율을 나타내었다는 결과(31)와 비교하면 만형자 추출물이 약 8배 높은 XO 저해활성을 나타내었다. 따라서 진정, 진통, 소염 등의 치료 및 예방을 위해 한방약재로 사용되고 있는 만형자가 약리학 적 효능이 있음을 알 수 있으며 이를 이용한 기능성 식품 및 제품에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 4. Xanthine oxidase(XO) inhibition of various extracts from *V. rotundifolia* seeds

Samples	XO inhibition(%) ^{2,3)}			
	0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL
Water extract	69.55 ± 1.66 ^a	89.94 ± 1.68 ^a	92.74 ± 1.59 ^{ab}	94.42 ± 1.04 ^b
Ethanol extract	47.21 ± 1.08 ^b	86.65 ± 1.38 ^b	94.10 ± 1.38 ^a	97.51 ± 0.42 ^a
Hot water extract	37.50 ± 0.94 ^c	89.45 ± 0.56 ^a	90.76 ± 1.53 ^b	94.02 ± 0.65 ^b
AsA ¹⁾	84.40 ± 3.25	87.23 ± 2.69	88.65 ± 2.46	91.50 ± 2.26

¹⁾AsA=Ascorbic acid.
²⁾All value are expressed as Mean ± SD of triplicate determinations.
³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Tyrosinase 저해활성

Melanin 생성 및 식물의 갈변화를 촉진시키는 효소인 tyrosinase의 저해활성을 0.1~1.0 mg/mL의 농도에서 측정한 결과 만형자의 열수 추출물인 HWE가 7.53~48.58%로 가장 높았으며 WE에서는 6.40~46.67%, EE는 4.98~29.09%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다(Table 5). 모든 추출물은 시료의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해율도 증가하였으며, 물을 용매로 추출한 HWE와 WE가 EE보다 1.5배 이상 높은 tyrosinase 저해활성을 나타내었다.

만형자 추출물의 결과는 복분자와 개자에서 63%와 62%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다는 결과(36)보다는 낮은 저해율을 보였으나 열매, 종자류의 일부 한방 약용식물인 오미자 21%, 매실 20%, 산약 11% 등의 tyrosinase 저해효과와 비교하면 만형자 추출물의 tyrosinase에 대한 저해활성이 높았다. 이상의 결과 만형자는 한방 생약재로 많이 이용되는 약용식물보다 높은 tyrosinase 저해활성을 나타내어 melanine 생성 및 식물의 갈변화를 저해하는데 이용 가능한 한방 약용자원으로 판단된다.

Table 5. Tyrosinase inhibition of various extracts from *V. rotundifolia* seeds

Samples	Tyrosinase inhibition(%) ^{2,3)}			
	0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL
Water extract	6.40 ± 0.40 ^{ab}	23.27 ± 0.81 ^a	25.20 ± 0.40 ^b	46.67 ± 0.61 ^b
Ethanol extract	4.98 ± 0.68 ^b	14.16 ± 0.89 ^b	21.13 ± 1.01 ^c	29.09 ± 0.77 ^c
Hot water extract	7.53 ± 1.26 ^a	24.03 ± 1.07 ^a	29.04 ± 0.35 ^a	48.58 ± 1.07 ^a
AsA ¹⁾	96.68 ± 0.52	98.04 ± 0.52	98.04 ± 0.26	98.79 ± 0.69

¹⁾AsA=Ascorbic acid.

²⁾All value are expressed as Mean ± SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

요 약

한방 약용자원으로 이용되고 있는 순비기나무(*Vitex rotundifolia*)의 종자를 건조시킨 만형자를 새로운 항산화제나 생리활성 소재로 활용하기 위한 연구의 일환으로 물 추출물(WE)과 에탄올 추출물(EE) 그리고 열수 추출물(HWE)에 함유된 플라보노이드와 폴리페놀 화합물 함량을 분석하였고, 각 추출물을 0.1~1.0 mg/mL의 농도로 희석하여 항산화 활성 및 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 플라보노이드 화합물 함량은 만형자 추출물 중 EE에서 31.05 mg/g으로 가장 많이 함유하였으며, 폴리페놀 화합물은 물을 용매로 추출한 WE에서 186.69 mg/g, HWE는 182.55 mg/g을 함유하였다. SOD 유사활성능은 1.0 mg/mL의 농도에서 12.48~83.40%로 HWE가 EE보다 6배 이상 높은 유사활성을 나타내었다. 전자공여능은 1.0 mg/mL의 농도에서 91.14~95.08%로 0.1 mg/mL 농도에서도 세가지 추출물 모두 88% 이상의 전자공여능을 나타내었다. 통풍을 일으키는 원인으로 알려져 있는 xanthine oxidase 대한 저해활성을 측정된 결과 1.0 mg/mL의 농도에서 94.02~97.51%였으며, 0.5 mg/mL에서도 90% 이상의 저해활성 나타내어 대조군인 ascorbic acid 보다 높은 xanthine oxidase 저해활성을 보였다. 아질산염 소거능은 pH 1.2의 조건에서 59.27~86.61%로 EE에서 가장 높았으며, pH 3.0에서는 26.53~35.73%, pH 6.0에서는 14.07~19.55%의 소거율을 나타내었다.

Tyrosinase에 대한 저해활성을 측정한 결과에서는 29.09~48.58%로 HWE가 가장 높은 저해율을 보였으며 WE도 46.67%로 EE보다 약 1.5배 높은 저해활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 만형자 추출물은 플라보노이드 함량은 EE에서 가장 많이 함유하였으나 폴리페놀 화합물은 WE와 HWE가 EE보다 약 1.8배 많았고 SOD 유사활성과 tyrosinase 저해율 또한 높았으며, 전자공여능은 EE에서 더 높았으나 WE가 유사한 활성을 나타내었다. 또한 아질산염 소거능은 pH 1.2에서는 EE가 높았으나 pH 3.0의 조건에서는 WE와 HWE가 더 우수한 소거효과를 나타내었으므로 만형자는 물을 용매로 추출하는 것이 에탄올을 용매로 추출하는 것보다 더 효율적인 것으로 사료되며, 천연항산화제나 미백제 및 기능성 식품 그리고 의약품 등의 원료 및 첨가물로써 활용될 수 있는 유용한 한방 약용자원인 것으로 판단된다.

감사의 글

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

참고문헌

- Lee, T.B. (1993) In illustrated flora of Korea, 5th. Hyangmoonsa Seoul., p.644
- Yeeh, Y., Kang, S.S., Chung, H.G. and Chung, M.S. (1996) Genetic and clonal diversity in Korean populations of *Vitex rotundifolia*(Verbenaceae). J. Plant Research, 109, 161-168
- 구분홍. (1994) 동의보감 한글완역본(허준 저). 대중서관, p.293, 1445
- 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 6 p.604-608
- Jang, S.J., Kim, Y.H., Kim, M.K., Kim, K.W. and Yun, S.E. (2002) Essential oil composition from leaves, flowers, stems, and fruits of *Vitex rotundifolia* L. fil. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 45, 101-107
- Kang, S.S., Kim, J.S., Kim, H.J. and Jung, Y.R. (1994) Phytochemical analysis of *Vitex rotundifolia* Fructus. Kor. J. Pharmacogn., 25, 214-220
- Yoshioka, T., Inokuchi, T., Fujioka, S. and Kimura, Y. (2004) Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. Z. Naturforsch., 59, 510-514
- Choi, G.P., Cung, B.H., Lee, D.I., Lee, H.Y., Lee, J.H.

- and Kim, J.D. (2002) Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. Korean J. Medicinal Crop Sci., 10, 399-402
9. Jo, K.J., Yoon, M.Y., Lee, M.R., Cha, M.R. and Park, H.R. (2007) The anticancer effect of extracts from *Vitex rotundifolia* on human colon carcinoma cell lines. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 50, 228-232
 10. Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S. and Kameoka, H. (1995) Antimutagenic activity of (+)-polyalthic acid from *Vitex rotundifolia*. J. Agric. Food Chem., 43, 3012-3015
 11. Shin, T.Y., Kim, S.H., Lim, J.P., Suh, E.S., Jeong, H.J., Kim, B.D., Park, E.J., Hwang, W.J., Rye, D.G., Baek, S.H., An, N.H. and Kim, H.M. (2000) Effect of *Vitex rotundifolia* on immediate-type allergic reaction. J. Ethnopharmacol., 72, 443-450
 12. Okuyama, E., Fujimori, S., Yamazaki, M. and Deyama, T. (1998) Pharmacologically active components of *Vitis Fructus*(*Vitex rotundifolia*). II. The components having analgesic effects. Chem. Pharm. Bull., 46, 655-662
 13. Watanabe, K., Takata, Y., Matsuo, M. and Nishimura, H. (1995) Rotundial, a new natural mosquito repellent from the leaves of *Vitex rotundifolia*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 1979-1980
 14. Kim, J.H., Park, S.S. and Song, C.K. (2008) Cultivation limit of *Vitex rotundifolia*, *Tetragonia tetragonoides* and *Glehnia littoralis* at coastal area and physiological vitality of RAW 264.7 cell and HL-60 cell. Korean J. Medicinal Crop Sci., 16, 44-50
 15. Jung, S.J., Lee, J.H., Song, H.N., Seong, N.S., Lee, S.E. and Baek, N.I. (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 47, 135-140
 16. Joo, E.Y., Lee, Y.S. and Kim, N.W. (2007) Polyphenol compound contents and physiological activities in various extracts of the *Vitex rotundifolia* stems. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 36, 813-818
 17. Freeman, B.A. and Grapo, J.D. (1982) Biology of disease; free radicals and tissue injury. Lab. Invest., 47, 412-426
 18. McCord, J.M. (1987) Oxygen-derived radicals; a link between reperfusion injury and inflammation. Fed. Proc., 46, 2402-2406
 19. Nam, H.Y. and Cho, J.S. (2006) Quality characteristics of white pan bread with ingredients of sagonja-tang. Korean J. Food Cookery Sci., 22, 458-467
 20. Hong, S.P., Jeong, H.S., Jeong, E.J. and Shin, D.H. (2006) Quality characteristic of beverage with *Gastrodia elata* Blume extract. J. Fd. Hyg, Safety, 21, 31-35
 21. Moreno, M.I.N, Isla, M.I., Sampietro, A.R. and Vattuone, M.A. (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, D.C. USA., 45, 21-22
 23. Marklund, S. and 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
 24. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
 25. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agric. Biol. Chem., 51, 1333-1338
 26. Stirpe, F. and Corte, E.D. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. J. Biol. Chem., 244, 3855-3861
 27. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. (1987) Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. Planta Medica, 53, 517-519
 28. Kim, E.Y., Baik, I.H., Kim, J.H., Kim, S.R. and Rhyu, M.R. (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol., 36, 338-338
 29. Moon, J.S., Kim, S.J., Park, Y.M., Hwang, I.S., Kim, E.Y., Park, J.W., Park, I.B., Kim, S.W., Kang, W.G., Park, Y.K. and Jung, S.T. (2004) Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and content of phenolic compounds. Korean J. Food Preserv., 11, 207-213
 30. Lim, J.D., Yu, C.Y., Kim, M.J., Yun, S.J., Lee, S.J., Kim, N.Y. and Chung, I.M. (2004) Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. Korean J. Medicinal Crop Sci., 12, 91-202
 31. An, B.J. and Lee, J.T. (2002) Studies on biological activity from extract of *Crataegi fructus*. Kor. J. Herbology, 17, 29-38
 32. Kwon, T.D., Choi, S.W., Lee, S.J., Chung, K.W. and Lee, S.C. (2001) Effects of polyphenol or vitamin C ingestion on antioxidative activity during exercise in rats. Korean J. Physical Education, 3, 891-899
 33. Lee, Y.S., Joo, E.Y. and Kim, N.W. (2006) Polyphenol contents and physiological activity of the *Lespedeza*

- bicolor* extracts. Korean J. Food Preserv., 13, 616-622
34. Kim, S.M., Cho, Y.S. and Sung, S.L. (2001) The antioxidant ability and nitrate scavenging ability of plant extract. Korean J. Food Sci. Technol., 33, 623-632
35. Lee, Y.S., Joo, E.Y. and Kim, N.W. (2005) Antioxidant activity of extracts from the *Lespedeza bicolor*. Korean J. Food Preserv., 12, 75-79
36. Jung, S.W., Lee, N.K., Kim, S.J. and Han, D.W. (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 891-896

(접수 2008년 10월 6일, 채택 2009년 1월 30일)