

## 단일 생약재 및 생약복합제 에탄올추출물의 항산화 및 항염증 활성

이성규\* · 정현진 · 이은주 · 김종부 · 최상원<sup>1</sup>

(주)엔유씨전자 바이오연구소, <sup>1</sup>대구가톨릭대학교 식품영양학과

### Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Medicinal Herb Mixtures

Sung Gyu Lee\*, Hyun-Jin Jeong, Eun-Ju Lee, Jong-Boo Kim, and Sang-Won Choi<sup>1</sup>

Bio Research Institute, NUC Electronics Co. Ltd.

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu

**Abstract** In this study, antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from medicinal herb mixtures were investigated *in vitro*. Contents of total polyphenols in ethanol extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. (HC), *Carthamus tinctorius* L. (CT), and MIX-2 (*Houttuynia cordata* Thunb., *Acanthopanax gracilistylus* Smith, *Carthamus tinctorius* L., *Kalopanax pictus*) were 58.98, 60.79 and 57.74 mg/g respectively. Radical scavenging activities of the ethanol extracts were examined using  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radicals and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) assay. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts from medicinal herbs composites were examined using 5-lipoxygenase (5-LO), cyclooxygenase-2 (COX-2) and nitric oxide (NO) inhibition assays. The ethanol extracts from medicinal herb mixtures showed higher 5-LO and COX-2 inhibition activities than those from single medicinal herbs. The ethanol extracts from medicinal herb mixtures also showed strong anti-inflammatory activity through inhibition of NO production.

**Keywords:** antioxidant, anti-inflammatory, medicinal herb, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase-2

## 서 론

최근 생활환경과 식생활 패턴의 변화로 노화를 지연시키거나, 심장 질환을 억제하는 효능을 보이는 기능성 생리활성물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 특히 단백질 분해, DNA의 손상, 돌연변이를 유발하는 프리라디칼(2)을 제거하는 작용을 하는 항산화제는 발암(3), 심장병(4), 노화(5), 염증반응(6) 등의 문제들을 억제한다. 일반적으로 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 butylated hydroxytoluen(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl galate(PG)는 우수한 항산화성과 경제성으로 널리 사용되어 왔지만, 장기간 섭취 시 간, 폐, 신장, 위장, 순환계 등에 심각한 독성을 일으키는 것으로 알려져 그 사용량이 규제되어 있어(7,8) 천연으로부터 안전한 식이성 대체 항산화제의 개발이 요구되고 있다. 특히 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 것으로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있으며(9), 특히 플라보노이드는 기질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어 식품, 의약품, 화장품 등 여러 분야에 이용되고 있다(10).

한편 염증반응은 체내에서 발생한 산화스트레스에 의해 촉진

되는데, 산화스트레스는 세포사멸뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증 반응을 개시하거나 악화시킨다. 유해한 자극 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발현되면 세포막 인지질로부터 arachidonic acid(AA)가 유리된 후 lipoxygenase(LO) 혹은 cyclooxygenase(COX)의 작용을 거쳐 leukotriene, thromboxane, prostaglandin 등 다양한 염증반응의 매개체들을 생성한다(11). 강한 항산화 활성을 가지는 폴리페놀 화합물은 염증반응을 매개하는 COX와 LO의 활성을 저해한다고 보고되었다(12).

생약재들은 낮은 독성과 부작용으로 인하여 우리나라와 동양권에서 민간요법으로 오랫동안 이용되어 왔고(13), 통증완화, 항염증, 방부, 해열, 해독, 수렴 등의 다양한 생리활성 효능이 있어 치료와 예방의 목적으로 활용되고 있다(14). 두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.)의 약리학적 연구로는 항노화작용, 단백질 합성 및 지질대사 촉진작용, 골다공증 억제 작용 등이 보고되고 있다(15). 삼백초(Saururaceae)는 항산화, 항균, 과산화지질 생성억제, 항알러지, 면역력 증진 등의 효과가 우수한 것으로 알려져 있다(16-18). 오가피(*Acanthopanax gracilistylus* Smith)는 항염증, 항히스타민, 항알러지, 항산화, 항암 등의 기능이 보고되고 있다(19). 우슬(*Achyranthes japonica* Nakai)의 약리작용으로는 관절염, 항암, 항알러지, 친식, 항염증 등의 효과에 관한 연구들이 보고가 되어 있다(20). 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)는 홍화씨에 함유되어 있는 리그난과 플라보노이드 및 세로토닌유도체 등의 폴리페놀화합물이 항염증(21), 항산화(22), 항암(23) 등의 효능이 있는 것으로 보고되었다. 해동피(*Kalopanax pictus* Nakai)의 생리활성 효과에 관한 연구는 항산화(24), 항지질 과산화효과(25), 항염증(26), 항균활성(27), 항당뇨(28) 등의 연구가 보고되었다. 한편 전통적으로 생

\*Corresponding author: Sung Gyu Lee, Bio Research Institute, NUC Electronics Co. Ltd., Daegu 702-503, Korea  
Tel: 82-53-665-5064  
Fax: 82-53-332-7018  
E-mail: ks20823@nate.com  
Received October 19, 2010; revised December 21, 2010;  
accepted December 28, 2010

**Table 1. List and yield of six different medicinal herbs used in this study**

Name	Scientific name	Part	Source	Yield (%, w/w of 100 g dry sample)
Eucommiae Crotex	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv. (EU)	bark	Korea	9.3
Houttuyniae Herba	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb. (HC)	leaves	Korea	7.9
Acanthopanax Root Bark	<i>Acanthopanax gracilistylus</i> Smith (AG)	bark	China	5.3
Achyranthis Radix	<i>Achyranthis japonica</i> Nakai (AJ)	root	Korea	3.4
Carthami Flos	<i>Carthamus tinctorius</i> L. (CT)	seed	Korea	6.3
Kalopanax Cortex	<i>Kalopanax pictus</i> (KP)	bark	China	4.6

약재를 질병의 치유에 사용함에 있어 그들의 효능을 증진시키고 독성이나 부작용을 줄이기 위하여 복합물의 형태로 많이 사용되고 있으며(29), 최근에는 생약 복합제가 건강기능식품의 기능성 원료로 인정된바 있다. 이와 같이 생약 복합제가 약물간의 상호작용을 통해 더욱 유효한 효과를 발휘하고 있다는 점에서, 생약재들을 배합하여 상승효과를 나타내는 복합제의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 6종의 단일 생약재와 단일 생약재를 혼합하여 제조한 3종의 생약복합제의 항산화 및 항염증 활성에 대해 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시료의 추출

본 실험에 사용된 생약재는 현재 한방 및 민간처방에서 약리적으로 항산화나 항염증작용이 있는 시료를 선정하였으며, 경동시장에서 구입하였고, 공시된 시료 및 이용부분은 Table 1과 같다. 생약복합제 MIX-1, MIX-2, MIX-3는 6종의 생약재중 오가피를 각 조성물에 공통적으로 포함되도록 하였고, 그 외의 생약재는 무작위로 선별하여 총 3종의 MIX-1, MIX-2, MIX-3 생약복합제를 본 실험에 사용하였다(Table 2).

단일 생약재들은 적당한 크기로 마쇄한 후 추출에 이용하였다. 마쇄시료 100 g에 대해 10배의 80% 에탄올을 넣어 40°C 초음파 추출기(JAC-4020, KODO Technical Research Co., Ltd., Hwaseong, Korea)에서 3시간 동안 2회 반복 추출한 후, 여과(Whatman No 2, Maidstone, England)하였다. 여과한 에탄올 추출액을 감압농축(N-1000S-WD, Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 얻은 에탄올 추출물에 80% 에탄올 100 mL로 용해시켜 4°C에 하루 방치한 후 상층액을 다시 감압농축 후 동결건조(FDU-1100, Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 에탄올추출물을 제조하였다. 생약복합제 추출물의 경우 각 조성에 들어가는 단일 생약재들을 동량의 비율로 섞어 단일 생약재 에탄올추출물 제조 방법과 동일하게 제조하였다. 추출수율은 추출 전 생약재 건조물에 대한 추출물의 완전건조 후 무게백분율로 계산하였고 각 단일 생약재의 추출수율은 Table 1과 같이 나타났고 생약복합제의 추출수율은 Table 2와 같이 나타났다.

### 총 폴리페놀함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(30)을 응용하였다. 각 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 다시 증류수로 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석된 Folin 시약(Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 2 mL을 첨가하여 잘 혼합하였다. 혼합액을 3분간 방치한 다음 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Sigma Co.) 2 mL을 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontran Co., Milan, Italy) 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 tannic acid(Sigma Co.)를 이용한 표준곡

**Table 2. List and yield of three different medicinal herb mixtures used in this study**

Name	Composition drug	Yield (%, w/w of 100 g dry sample)
MIX-1	AG+KP+AJ (1:1:1, w/w)	6.2
MIX-2	AG+KP+CT+HC (1:1:1:1, w/w)	4.5
MIX-3	AG+AJ+EU+CR <sup>1)</sup> (1:1:1:1, w/w)	7.3

<sup>1)</sup>*Chinemys reevesii* Gray (CR)

선은 tannic acid의 최종농도가 0, 5, 25, 50, 75 µg/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다.

### 총 플라보노이드 함량 측정

시료의 총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(31)의 방법을 응용하여 측정하였다. 각 샘플 0.1 mL와 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate(Sigma Co.)와 1 M potassium acetate(Sigma Co.) 0.1 mL 그리고 80% 에탄올 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 quercetin(Sigma Co.)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

### 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) radical 소거활성 측정

시료의 free radical 소거활성은 stable radical인 DPPH(Sigma Co.)에 대한 환원력을 측정한 것으로 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800 µL와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 200 µL를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 합성 항산화제인 *t*-butylatedhydroxyanisole(BHA, Sigma Co.)와 천연 항산화제인 L-ascorbic acid(Sigma Co.)를 사용하였다.

### 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) radical 소거활성

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS<sup>+</sup> cation decolorization assay방법(32)에 의하여 시행하였다. 7 mM ABTS(Sigma Co.)와 2.45 mM potassium persulfate(Sigma Co.)를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup>을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되게 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 990 µL에 sample 10 µL를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. ABTS radical의 소거활성은 IC<sub>50</sub> 값으로 표시하였다.

### 5-LO 저해 활성 측정

5-LO 저해 활성 측정은 LO inhibitor screening assay kit(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 실험하였다. 샘플 10  $\mu$ L에 5-LO(220 units/mL) 90  $\mu$ L와 1 mM 아라키돈산 10  $\mu$ L를 첨가하여 5분간 상온에서 반응시킨 후, 색원체(chromogen) 100  $\mu$ L를 가하여 상온에서 5분 동안 반응시키고 ELISA autoreader(UVM340, Biochrom Ltd., Holliston, MA, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성대조군으로 nordihydroguaiaretic acid(NDGA, Sigma Co.)을 사용하였으며, 다음 식에 따라 저해율을 계산하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = \frac{(C - S)}{C}$$

S:  $\Delta$ absorbance of sample C:  $\Delta$ absorbance of control

### COX-2 저해 활성 측정

COX-2 저해 활성 측정은 COX inhibitor screening assay kit(Cayman Chemical Co.)를 이용하여 실험하였다. 시료 20  $\mu$ L에 hematin 10  $\mu$ L, 효소 5  $\mu$ L, buffer 950  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 반응 후 10  $\mu$ L의 아라키돈산을 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 COX-2를 활성화시킨 후 이를 50  $\mu$ L를 취하여 200  $\mu$ L의 색원체를 넣은 후 25°C에서 90분간 반응시킨 후 ELISA autoreader(Biochrom Ltd.)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성대조군으로 비스테로이드성 소염제 중의 하나인 indomethacin(Sigma Co.)을 사용하였으며, 다음 식에 따라 저해율을 산출하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = \frac{(C - S)}{C}$$

S:  $\Delta$ absorbance of sample C:  $\Delta$ absorbance of control

### 세포주 배양

본 실험에 사용된 murine macrophage cell line RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA), 100  $\mu$ g/mL penicillin(Gibco-BRL) 그리고 100  $\mu$ g/mL streptomycin(Gibco-BRL)을 첨가한 DMEM 배지(Gibco-BRL)를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C 배양기에서 2-3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

### 세포 생존율 측정

세포 생존율은 Carmichael 등(33)의 방법에 따라 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 즉 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well 농도로 분주하여, 24시간 배양 후 배지를 제거하고, lipopolysaccharide(LPS, 100 ng/mL)가 첨가된 DMEM 배지 200  $\mu$ L에 녹인 농도별 시료를 각 well에 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 여기에 PBS(pH 7.4)로 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT(Sigma Co.) 용액 20  $\mu$ L를 첨가하고 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 상등액을 제거하고 각 well 당 DMSO 100  $\mu$ L를 가하여 10분간 교반한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Nitric oxide(NO) 함량 측정

NO 함량은 Green 등(34)의 방법으로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL 농도로 96 well

plate에 분주한 후, 시험시료와 LPS(100 ng/mL, Sigma Co.)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu$ L와 Griess시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100  $\mu$ L를 혼합하여 96 well plate에서 10분간 반응시킨 후 ELISA autoreader(Biochrom Ltd.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrate(Sigma Co.)로 표준곡선을 작성하여 NO의 함량을 산출하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 mean $\pm$ SD로 나타내었으며, 실험결과의 통계분석은 SAS version 6.12(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 평균화 표준오차, Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )를 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

6종의 단일 생약제인 두충(EU), 어성초(HC), 오가피(AG), 우슬(AJ), 홍화(CT), 해동피(KP)와 생약복합제인 MIX-1(AG, KP, AJ), MIX-2(AG, KP, CT, HC), MIX-3(AG, AJ, EU, CR)의 에탄올추출물에 존재하는 총 폴리페놀의 함량은 tannic acid를 기준물질로, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준물질로 하여 각각 측정된 결과는 Table 3과 같다. 총 폴리페놀 함량은 어성초, 홍화, MIX-2 에탄올추출물이 각각 58.98, 60.79, 57.74 mg/g의 함량으로 다른 시료들 보다 높게 측정되었다. 또한 플라보노이드 함량도 어성초, 홍화, MIX-2 에탄올추출물이 각각 36.86, 19.42, 14.74 mg/g으로 높게 측정되었다. 어성초의 경우 총 폴리페놀 함량은 홍화와 비슷한 함량을 보였으나 플라보노이드 함량은 홍화보다 약 2배정도 높은 함량을 보였다. 생약복합제의 경우 MIX-2가 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높게 측정되었다. Lee 등(35)의 결과에서 천연물 복합제의 경우 비교적 많은 양의 페놀 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났고, 복합제를 구성하고 있는 생약제의 대부분이 페놀을 다량 함유하는 식물에 기인한다는 결과와 같이 본 연구에서도 MIX-2의 경우 단일 생약제 중 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 가장 많이 함유된 어성초와 홍화가 첨가되어 있어 높은 함량을 보인 것으로 생각된다.

**Table 3. Total polyphenol and flavonoid contents of ethanol extracts from six medicinal herbs and three their mixtures**

Sample	Total polyphenol <sup>1)</sup> (mg/g)	Total flavonoid <sup>2)</sup> (mg/g)
EU	42.18 $\pm$ 5.63 <sup>3)</sup>	2.54 $\pm$ 3.05
HC	58.98 $\pm$ 7.83	36.86 $\pm$ 8.79
AG	23.25 $\pm$ 9.35	4.96 $\pm$ 0.48
AJ	5.97 $\pm$ 1.25	-
CT	60.79 $\pm$ 10.90	19.42 $\pm$ 1.00
KP	31.60 $\pm$ 4.22	1.88 $\pm$ 0.34
MIX-1	31.32 $\pm$ 4.28	4.98 $\pm$ 1.00
MIX-2	57.74 $\pm$ 4.92	14.74 $\pm$ 3.81
MIX-3	28.13 $\pm$ 2.94	1.75 $\pm$ 0.21

<sup>1)</sup>Total polyphenol content (mg/g) was equivalent as tannic acid as standard.

<sup>2)</sup>Total flavonoid content (mg/g) was equivalent as quercetin as standard.

<sup>3)</sup>Each value is mean $\pm$ SD (n $\geq$ 3).

**Table 4. Scavenging effects of the ethanol extracts from six medicinal herbs and three of their mixtures on DPPH and ABTS radicals**

Sample	RC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>1)</sup>	
	DPPH	ABTS
EU	123.99±10.98 <sup>2)</sup>	44.35±8.49
HC	69.64±1.41	24.06±1.10
AG	91.56±6.49	80.56±0.34
AJ	1000	1000
CT	50.70±0.35	18.91±1.85
KP	118.20±6.68	70.77±0.56
MIX-1	122.16±6.62	104.94±5.51
MIX-2	63.49±2.07	41.61±1.31
MIX-3	150.76±18.11	123.98±0.56
BHA	2.43±0.84	3.56±1.09
L-AsA	3.90±1.12	3.48±0.07

<sup>1)</sup>Concentration required for 50% reduction of each radical.

<sup>2)</sup>Each value is mean±SD (n≥3).

BHA and L-ascorbic acid (L-AsA) were used as positive references.

식품에 존재하는 많은 phytochemical 중 폴리페놀계 물질들은 여러 가지 식품에 널리 분포되어 있으며 이들은 천연항산화제로서 작용할 수 있다(36). 특히, 주된 식물계 폴리페놀 물질인 플라보노이드는 항산화, 항암, 고혈압 억제, 충치예방, 항염증 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다(37).

**라디칼 소거활성**

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 라디칼 소거 작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다(38). 단일 생약재 및 생약복합제 에탄올추출물들의 라디칼 소거활성 측정에는 DPPH와 ABTS 라디칼을 이용하여 측정하였다. DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 활성 라디칼로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화물질을 검색하고, ABTS는 2-azino-bis의 색을 띠는 양이온 라디칼의 감소에 근거하여 항산화능을 측정하는 방법으로 추출물의 항산화력에 의해 ABTS 라디칼이 소거되어 청록색으로 탈색된 활성 라디칼의 제거 정도를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS 소거활성능을 측정할 수 있고 탈색 반응이 1분 안에 종료되어 단시간에 측정 가능하다(39). 따라서 단일 생약재 및 생약복합제 에탄올추출물들과 인공천연 항산화제로 알려진 BHA, L-ascorbic acid의 항산화효과를 DPPH와 ABTS 라디칼의 소거활성을 측정하여 라디칼을 1/2로 소거하는데 필요한 시료의 농도인 RC<sub>50</sub> 값으로 나타내어 비교하였다(Table 4). 그 결과, DPPH 라디칼의 RC<sub>50</sub> 값은 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 결과와 유사하게 어성초(HC), 홍화(CT), MIX-2 에탄올추출물에서 각각 69.64, 50.70, 63.49 µg/mL로 추출물 가운데 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 보였고, ABTS 라디칼의 RC<sub>50</sub> 값은 각각 24.06, 18.91, 41.61 µg/mL로 DPPH 라디칼 소거능과 유사한 경향을 보였다. 양성대조군으로 사용된 BHA와 ascorbic acid는 2.43-3.90 µg/mL로 RC<sub>50</sub> 값이 낮게 측정되었다. 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenolic 물질에 대한 항산화작용의 지표라는 보고(40)와 유사하게 본 연구의 추출물들의 경우 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 결과와 대부분 비례적으로 일치하는 것으로 나타났다.

**Table 5. 5-LO and COX-2 inhibitory effects of the ethanol extracts from six medicinal herbs and three of their mixtures**

Sample (25 µg/mL)	5-LO inhibition (%)	COX-2 inhibition (%)
EU	21.53±0.04 <sup>1)</sup>	87.82±1.10
HC	0.93±0.91	92.88±1.82
AG	36.23±0.35	72.70±0.21
AJ	22.11±0.30	75.69±0.00
CT	2.31±2.05	92.11±1.69
KP	15.97±1.88	88.87±3.39
MIX-1	45.60±0.12	80.65±0.00
MIX-2	32.64±0.28	90.43±0.00
MIX-3	52.43±1.01	85.93±1.65
NDGA <sup>2)</sup>	86.11±0.64	-
Indomethacin	-	95.89±1.05

<sup>1)</sup>Each value is mean±SD (n≥3).

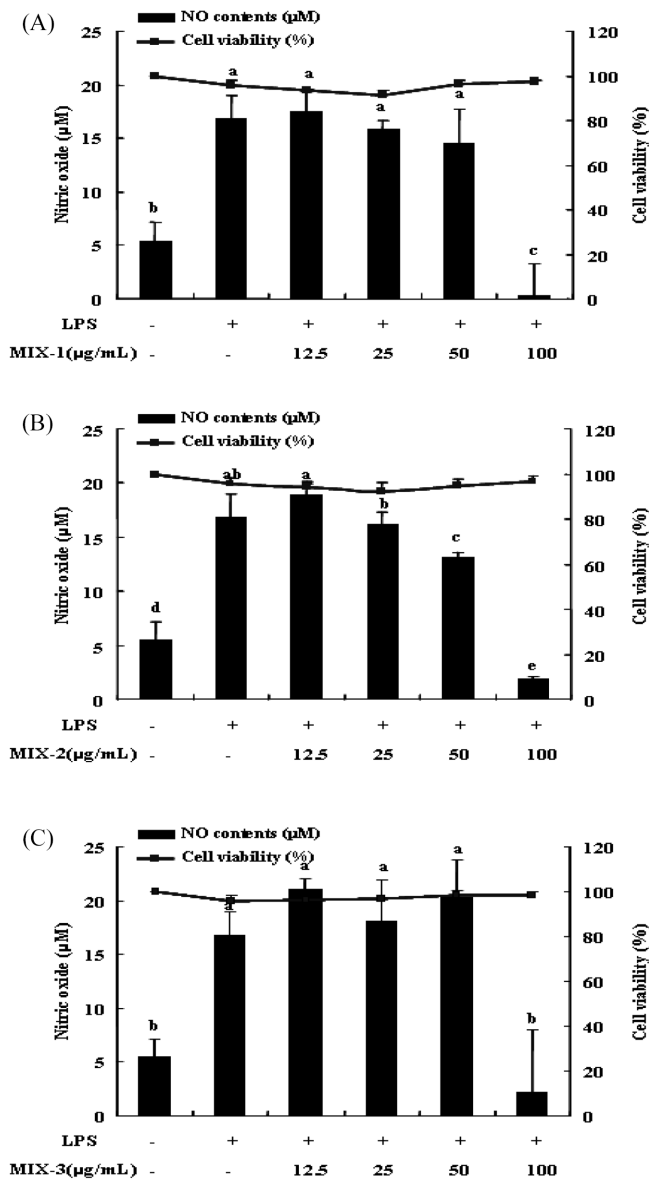
<sup>2)</sup>NDGA and indomethacin (each 1 µg/mL) were used as positive control.

**5-LO와 COX-2의 저해활성**

단일 생약재 및 생약복합제 에탄올추출물의 5-LO 및 COX-2 저해활성을 측정한 결과는 Table 5와 같이 나타났다. NDGA와 indomethacin을 각각 5-LO와 COX-2의 양성대조군으로 사용하여 1 µg/mL의 농도로 효소 저해활성을 측정하였고 단일 생약재와 생약복합제 에탄올추출물의 농도는 25 µg/mL로 동일하게 처리하였다. 5-LO의 저해활성의 경우 단일 생약재 에탄올추출물에서 오가피(AG)만이 약 36.23%로 30% 이상의 저해활성을 보인 반면 생약복합제 에탄올추출물의 경우 3가지 생약복합제 에탄올추출물 모두 30% 이상의 저해활성을 보였고 특히 MIX-3의 경우 약 52.43%의 높은 저해활성을 나타냈다. 양성대조군으로 사용된 NDGA는 1 µg/mL의 낮은 농도에서도 약 86.11%의 저해활성을 보였다. Kim(41)은 5-LO 효소를 50%의 저해활성을 나타내는 농도(IC<sub>50</sub>)가 대추와 자근이 각각 195.11, 206.89 µg/mL로 보고되었던 것과 비교해 NDGA 보다는 낮은 저해활성을 나타냈지만 25 µg/mL의 농도에서 50% 이상의 저해활성을 보인 MIX-3는 5-LO를 효과적으로 저해한다고 볼 수 있다. COX-2의 저해활성은 모든 시료에서 70% 이상의 높은 저해활성을 보였으며 어성초(HC), 홍화(CT), MIX-2 에탄올추출물의 경우 90% 이상의 저해활성을 보였다. 양성대조군인 indomethacin의 경우 1 µg/mL의 농도에서 약 95.89%의 우수한 COX-2 저해활성을 나타냈다. 본 연구에서 단일 생약재 및 생약복합제 에탄올추출물의 COX-2 저해활성은 70% 이상의 높은 저해활성을 나타내었고, 5-LO의 경우 단일 생약재 에탄올추출물보다 생약복합제 에탄올추출물이 더 높은 저해활성을 보였다. Lee와 Jang(42)은 COX-2와 염증성 cytokine들이 금은화와 황금 단일 추출물보다 금은화와 황금 복합 추출물에서 보다 더 우수한 저해 효과를 보인 것과 같이 본 연구에서도 생약복합제 에탄올추출물이 단일 생약재 에탄올추출물보다 5-LO와 COX-2 효소를 동시에 효과적으로 저해할 수 있는 것으로 나타났다.

**세포독성과 NO 생성 저해 효과**

LPS는 그람 음성 세균의 세포벽 물질이다. 단구세포 또는 대식세포는 미량의 LPS에 의해 활성화되고 다양한 사이토카인, 아라키돈산 대사산물, 활성산소, NO 등을 생산, 방출한다(43,44). NO는 정상적인 생리 상태에서 혈관의 항상성, apoptosis 유도 작용 등 중요한 생리적인 기능을 매개하지만 다량의 NO는 정상세



**Fig. 1.** Effects of ethanol extracts from three different medicinal herb mixtures on viability and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells (A: MIX-1 B: MIX-2 C: MIX-3). RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of each sample and LPS (100 ng/mL) for 24 h. And the NO contents in supernatant was measured using Griess reagent. Each value is mean±SD (n≥3).

포를 죽이고 염증을 유도하여 급성 또는 만성 염증질환의 원인이 되는 물질로 작용하게 된다(45). 따라서, 효과적인 NO 분비 조절은 급성 또는 만성 염증질환의 치료방법으로 알려져 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 염증 형성에 중요한 역할을 하는 효소인 5-LO와 COX-2를 동시에 효과적으로 억제하는 생약복합제 MIX-1(AG, KP, AJ), MIX-2(AG, KP, CT, HC), MIX-3(AG, AJ, EU, CR)의 에탄올추출물이 NO의 생성을 저해할 수 있는지를 알아본 결과 Fig. 1과 같이 나타났다. NO 생성 저해 효과를 측정하기 전에 생약복합제 에탄올추출물이 세포에 독성을 나타내는지 MTT assay를 이용하여 측정하였을 때, 3가지의 생약복합제 모두 90% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 독성은 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이에 3가지 생약복합제

에탄올추출물의 농도를 각각 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 세포에 처리하였다. 그 결과, LPS만 처리한 군에서는 NO가 약 18.9 µM로 처리하지 않은 군보다 약 2배 이상의 NO를 생성하였고 여기에 MIX-1과 MIX-3 에탄올추출물을 처리한 군의 경우 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 유의적으로 NO의 생성을 저해한 것에 비해 MIX-2 에탄올추출물의 경우 50 µg/mL의 농도에서부터 유의적으로 NO의 생성을 저해하는 것을 확인하였다. 이는 생약복합제 에탄올추출물 중 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 라디칼 소거능이 MIX-2 에탄올추출물이 가장 우수하게 나타난 결과와 일치한 것을 보였다.

본 연구에서 사용된 단일 생약제 에탄올추출물 보다는 생약복합제 에탄올추출물이 생약복합제 조성물 중에 함유되어 있는 성분들이 서로 혼합되면서 시너지 효과를 나타내는 것으로 생각되며 이러한 생약복합제들은 염증성 질환의 예방 및 치료용 기능성 소재로 활용될 수 있으리라 본다.

## 요 약

본 연구에서는 문헌을 통하여 항산화 혹은 항염증 활성을 가지는 6종의 생약제와 이들 생약제를 혼합하여 제조한 생약복합제의 항산화 및 항염증 활성을 측정하였다.

총 폴리페놀 함량은 어성초, 홍화, MIX-2 에탄올추출물이 각각 58.98, 60.79, 57.74 mg/g의 함량으로 다른 시료들 보다 높게 측정되었다. 또한 플라보노이드 함량도 어성초(HC), 홍화(CT), MIX-2 에탄올추출물이 각각 36.86, 19.42, 14.74 mg/g으로 높게 측정되었다. 단일 생약제와 생약복합제 에탄올추출물의 라디칼 소거능을 측정된 결과 DPPH 라디칼의  $RC_{50}$  값은 어성초, 홍화, MIX-2 에탄올추출물에서 각각 69.64, 50.70, 63.49 µg/mL로 추출물 가운데 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 보였고, ABTS 라디칼의  $RC_{50}$  값도 어성초, 홍화, MIX-2가 각각 24.06, 18.91, 41.61 µg/mL로 DPPH 라디칼 소거능과 유사한 경향을 보였다. 시료들의 항염증 효능을 측정하기 위해 5-LO 및 COX-2 효소 저해활성을 측정된 결과 단일 생약제 에탄올추출물보다 생약복합제 에탄올추출물이 5-LO와 COX-2 효소를 동시에 저해하는 효과가 증가되는 것으로 나타났다. 염증유발 효소 저해활성이 우수했던 생약복합제 에탄올추출물들의 NO 소거활성을 비교한 결과, MIX-2 에탄올추출물이 50 µg/mL의 농도에서부터 유의적으로 NO의 생성을 저해하는 것을 확인하였다. 따라서 단일 생약제 보다는 생약복합제가 서로 혼합되면서 시너지 효과가 나타나는 것으로 생각되며 앞으로 명확한 기전에 대한 연구들이 지속된다면 기능성 식품 소재로서의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 지역산업선도기술개발사업 연구과제(과제번호-70004130)의 일환으로 수행된 결과의 일부로서 연구비를 지원해 준 관계자에 감사드립니다.

## 문 헌

- Sadaki O. The development of functional and materials. *Bioindustry* 13: 44-50 (1996)
- Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Bio. Med.* 29: 222-230 (2000)
- Moini G, Parker L, Saris NL. Antioxidant and prooxidant activities of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl.*

- Pharm. 182: 84-90 (2002)
4. Giles GI, Tasker KM, Jacob C. Hypothesis: The role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radical Bio. Med.* 31: 1279-1283 (2001)
  5. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutr. Res.* 18: 872-879 (2002)
  6. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Bio. Med.* 34: 1507-1516 (2003)
  7. Barene AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63 (1975)
  8. Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxy anisol (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* 14: 283-288 (1982)
  9. Pratt DE, Huang MT, Ho ST, Lee CY. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health (II). antioxidants and cancer prevention, Washington DC, USA. pp. 54-71 (1992)
  10. Kim EC, Ahn SY, Hong ES, Li GH, Kim EK, Row KH. Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 16: 348-353 (2005)
  11. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes; advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875 (2001)
  12. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schimidit H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187: 1-17 (2006)
  13. Yang MS, Ha YL, Nam SH, Choi SU, Jang DS. Screening of domestic plants with antibacterial activity. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 38: 584-589 (1995)
  14. Kim KD. Research of oriental medicine plant on antioxidation and ultraviolet rays absorption. *J. Korean Soc. Cosm.* 10: 145-153 (2004)
  15. Li Y, Metori K, Koike K, Che QM, Takahashi S. Improvement in the turnover rate of the stratum comeum in false aged model rats by the administration of geniposide acid in *Eucommia ulmoides* olive leaf. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 582-585 (1999)
  16. Chen YY, Liu JF, Chen CM, Chao PY, Chang TJ. A study of antioxidative and antimutagenic effects of *Houttuynia cordata thumb* using an oxidized frying oil-fed model. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 49: 327-333 (2003)
  17. Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 1053-1058 (2003)
  18. Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim HY, Shibahara N, Park JC. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component on lipid peroxidation. *Am. J. Chinese Med.* 31: 907-917 (2003)
  19. Lee KH, Nam JO, Yoon WH. Effect of protein-bond polysaccharide isolated from *Acanthopanax senthapanax* in reducing the toxic effect of cisplatin. *Korean J. Pharmacogn.* 38: 1-17 (2007)
  20. Singh RK, Pandey BL. Further study of anti-inflammatory effects of *Abies pindrow*. *Phytother. Res.* 11: 535-537 (1997)
  21. Kawashima S, Hayashi M, Takii T, Kimura H, Zhang HL, Nagatsu A, Sakakibara J, Murata K, Oomoto Y, Onozaki K. Serotonin derivative, *N*-(*p*-coumaroyl) serotonin, inhibits the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 by endotoxin-stimulated human blood monocytes. *J. Interf. Cytok. Res.* 18: 423-428 (1998)
  22. Zhang HL, Nagatsu A, Watanabe T, Sakakibara J, Okutama H. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* 45: 1910-1914 (1997)
  23. Bae SJ, Shim SM, Park YJ, Lee JY, Chang EJ, Choi SW. Cytotoxicity of phenolic compounds isolated from seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) on cancer cell lines. *Food Sci. Biotechnol.* 11: 140-146 (2002)
  24. Choi JW, Huh K, Kim SH, Lee KT, Lee HK, Park HJ. Kalopanaxsaponin A from *kalopanax pictus*, a potent antioxidant in the rheumatoid rat treated with Freund's complete adjuvant reagent. *J. Ethnopharmacol.* 79: 113-118 (2002)
  25. Choi L, Han YN, Lee KT, Park KY, Kwak TS, Kwon SH, Park HL. Anti-lipid peroxidative principles from the stem bark of *Kalopanax pictus* Nakai. *Arch. Pharm. Res.* 24: 536-540 (2001)
  26. Lee EB, Li DW, Hyun JE, Kim IH, Whang WK. Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Kalopanax pictus* bark and its fractions. *J. Ethnopharmacol.* 77: 197-201 (2001)
  27. Lee MW, Kim SU, Hahn DR. Antifungal activity of modified hederagenin glycosides from the leaves of *Kalopanax pictum* var. chinense. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 718-719 (2001)
  28. Kim DH, YU KW, Bae EA, Park HJ, Choi JW. Metabolism of kalopanax B and H by human intestinal bacteria and antidiabetic activity of their metabolites. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 360-365 (1998)
  29. Bansky D, Barolet R. Chinese Herbal Medicine Formulas and Strategies. Eastland Press, Seattle, WA, USA. pp. 7-8 (1990)
  30. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249 (1912)
  31. Nieva, Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114 (2000)
  32. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
  33. Charmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Michell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-941 (1987)
  34. Green LC, Wagner DA, Glogowski J. Analysis of nitrate, and nitrite in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138 (1982)
  35. Lee MH, Jo DJ, Yoon SR, Lee GD. Physicochemical properties of functional herb mixtures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1571-1577 (2007)
  36. Cho SY, Han YB, Shin KH. Screening for antioxidant activity of edible plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 133-137 (2001)
  37. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 128-134 (2006)
  38. Ahn SI, Heuing BJ, Son JY. Antioxidative activity and nitrite-scavenging abilities of some phenolic compounds. *Korean J. Food Cookery Sci.* 23: 19-24 (2007)
  39. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 269-275 (2008)
  40. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 978-984 (1995)
  41. Kim KM. Screening of anti-allergic agents using lipoxygenase assay and degranulation marker. *J. Drug Res.* 5: 45-48 (1996)
  42. Lee YS, Jang SI. Study on the anti-inflammatory effects of the remedy prescribed with *Lonicerae Flos* and *Scutellariae Radix* in U937 cells. *Korean J. Oriental Med. Prescription* 18: 121-132 (2010)
  43. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 737-769 (1995)
  44. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochem. Biophys. Acta* 1411: 271-230 (1999)
  45. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-1623 (1992)