

## 천연 색소 고정화 기술을 활용한 오미자와 자소엽 추출물 함유 음료의 항산화 활성 연구

신인순<sup>1,2</sup>, 황수정<sup>1,2</sup>, 김성옥<sup>1,2</sup>, 허담<sup>3</sup>, 김미려<sup>1,2\*</sup>

1 : 대구한의대학교 BK21 한방신약개발연구팀, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실  
3 : (주)옵니허브

### Antioxidative Activities of Mixture of Schisandrae Fructus (SF) and Perilae Folium (PF) using Natural Color fixation technic

Insoon Shin<sup>1,2</sup>, Su Jung Hwang<sup>1,2</sup>, Sung Ok Kim<sup>1,2</sup>, Dam Heo<sup>3</sup>, Mi Ryeo Kim<sup>1,2\*</sup>

1 : R&D Team for the New Drug of Oriental Medicine (BK 21),  
2 : Department of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea  
3 : Omniherb Co. Ltd., Daegu, Korea.

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study focused on Schisandrae Fructus (SF) and Perilae Folium (PF), traditional medicine herbs and health functional food in Korea, Japan and China. We investigated various pharmacological activities that include a potential source of free radical scavenging, anti-viral, anti-microbial, anti-allergy and anti-inflammatory activities.

**Methods :** We conducted an investigation of total contents of phenolic and flavonoid compounds in these single herbal extraction with/without combined to mixture. We also measured antioxidant activities such as DPPH free radical scavenging, SOD-like scavenging, nitrite scavenging and hydroxyl radical scavenging activities, xanthine oxidase inhibition, linoleic acid peroxidation inhibition, and reducing power.

**Results :** As the results, contents of total phenolic compounds and flavonoids were higher in those of PF than those of SF. Those of SF+PF mixture showed the synergy effects compared with those of SF and PF single extractions. Activities of DPPH free radical and SOD-like scavenging in 1 mg/mL concentration increased in dose dependent manners. That of SF increased compared with that of PF. That of SF and PF mixture also increased compared with that of BHA as a positive control. The other antioxidant activities also showed similar to pattern of activity of DPPH free radical scavenging. When combined to SF and PF extractions, there was showed synergic effect compared with those of BHA, excepted activities of xanthine oxidase inhibition and reducing power. Taken together, SF and PF have high phenolic and flavonoid compounds content furthermore, antioxidant activities in SF and PF mixture showed more synergy effect compared with those of BHA.

**Conclusions :** Therefore, these findings suggest that SF and PF mixture may offer functional materials potential for development of functional beverage. But further studies are needed for the identification of the active compounds.

**Key words :** Schisandrae Fructus, Perilae Folium, phenolic, flavonoid, antioxidant activity.

\*교신저자 : 김미려. 대구 수성구 상동 165번지 대구한의대학교.  
· Tel : 053-770-2241, · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr.  
· 접수 : 2011년 8월 15일 · 수정 : 2011년 9월 4일 · 채택 : 2011년 9월 17일

## 서론

현대 의학과 문명의 발달로 노화나 암 유발 뿐만 아니라 동맥경화증 및 각종 질병의 인자로서 생체 내에서 생기는 free radical에 많은 관심이 집중되고 있다. 특히 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)의 형성은 산소를 사용하는 과정에서 불가피하게 발생하게 되는데<sup>1,2)</sup>, superoxide, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical과 같은 free radical은 분자 구조적으로 불안정하며, 매우 큰 반응성을 지니고 있으므로 단백질 핵산(DNA, RNA)을 파괴시켜 지질의 과산화 반응으로 인해, 지질 산화, 세포막 분해, 세포의 노화 및 세포의 괴사 등에 의해 나타난다<sup>3,4)</sup>.

최근 현대인들은 산소에 의한 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있으며, 이러한 산화적 스트레스는 정상적인 경우 생체 내 항산화계에 의해 제거되지만 산화적 스트레스가 제거되지 못하면 생체막이 손상되어 DNA의 파괴 및 고분자 단백질의 기능 상실로 인한 다양한 퇴행성 질환이 유발된다<sup>5,6)</sup>. 그러므로 인체내 활성산소 생성을 억제하고 건강 문제를 해결할 수 있는 천연 항산화제 개발에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

항산화제는 공기 중의 산소에 의한 유지의 산화로 인한 필수 아미노산과 특정 비타민류 등의 손실을 최소화하거나 유지식품의 변질 및 유지식품의 산패를 방지 할 목적으로 첨가하는 물질이다. 지금까지 활성산소와 free radical 생성을 방지하기 위한 페놀계 항산화제의 대표적인 것으로 BHA (butylated hydroxy anisole), BHT (butylated hydroxy toluene), TBHQ (tertiarybutyl hydroxy-quinone) 및 PG (propyl gallate), ascorbic acid<sup>7,8)</sup> 등과 같은 합성 항산화제와  $\alpha$ -토코페롤과 같은 천연 항산화제가 이용되고 있다. BHA, BHT가 그중에서 인체에 대한 독성이 약하다고 되어 있어 현재 널리 사용되고 있는 합성 항산화제로 인정받고 있으나<sup>9)</sup> 독성 및 발암성 등의 안전성이 문제시되면서 그 사용을 기피하고 있으며,  $\alpha$ -토코페롤은 가격이 높은 단점을 가지고 있어 이들을 대체할 수 있는 효과적이고도 안전한 천연 항산화제의 개발이 시급하다<sup>10)</sup>. 항산화 물질은 다양한 분야에서 이용될 수 있기 때문에 국가 경제 산업적인 측면에서 매우 큰 파급 효과를 기대할 수 있다. 따라서 적은 양으로도 항산화 효과를 나타내고 천연으로부터 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 신규 천연 항산화제의 개발이 요구된다.

본 연구에서는 收斂固澁, 滋補肺腎, 生津止渴하는 효능이 있으며 이미 우수한 항산화 활성을 가지고 있는 오미자<sup>11)</sup>와 한방제품으로 가공할 때 보관, 유통과정 중에 생기는 오미자 고유의 변색을 방지하여 肺, 脾經에 작용하여 解表散寒, 行氣和胃하는 작용을 갖고 있는 자소엽<sup>11)</sup>의 추출액을 혼합하여 음료를 제조하였다. 각각의 시료 추출물과 동량 혼합물에서 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량을 측정하고 합성 항산화제로 널리 알려진 BHA와의 비교 측정하여 동량 혼합물에서 자소엽 추출액의 첨가가 천연 색소 고정화를 유도하여 변색이 방지되며, 항산화력 또한 유의하게 증가하는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 제조

실험에 사용한 혼합 시료인 오미자+자소엽(SF+PF, 언제나 젊은 피부)과 각각의 단일 시료 오미자(SF), 자소엽(PF)은 (주)동우당 제약에서 제공받은 것을 사용하였다. 혼합시료는 오미자 25g, 자소엽 2.8g, 해양심층소금(울릉미네랄)에 증류수 1L를 넣고 추출기에 투입하여 냉수 추출한 다음 5시간 후 자소엽을 제거하고, 8시간 후 오미자를 제거하여 식물성 혼합원료 추출액을 제조하였다. 식물성 혼합원료 추출액에 액상과당(신동방CP), 레몬 농축 과즙액을 배합비율에 의거 배합하여 50℃에서 30분 교반하고 배합액을 95℃에서 20분간 살균 후 1마이크로 여과기를 통과시켜 여과시켰다. 단일시료인 오미자 추출액(정제수 1L, 액상과당 120g, 오미자 25g, 해양심층소금 1g), 자소엽 추출액(정제수 1L, 액상과당 120g, 자소엽 2.8g, 해양심층소금 1g)을 넣고 제조하여 실험에 사용하였다.

### 2. 안정성 측정

추출액의 저장기간 중 변화를 관찰하기 위하여 대조군인 오미자추출액과 자소엽 추출액, 실험군인 오미자자소엽 추출액을 실내, 실외로 나누어 0, 1, 3, 7, 15, 50, 70일째 흡광도(520nm에서 분광광도계를 이용), 당도(시료에 용해된 설탕의 질량을 굴절당도계를 이용하여 백분율로 나타냄), 산도(pH meter기를 이용)를 측정하였다.

### 3. 총 페놀성 화합물 함량 측정

총 페놀화합물의 함량은 Foiln-Denis법<sup>12)</sup>을 응용하여 측정하였다. 시료 추출물 0.5ml에 Foline-Ciocalteau's phenol reagent 0.5ml를 넣고 3분간 방치하여 10% Sodium Carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0.5ml를 혼합하고 1시간 방치 후 Spectrophotometer (UVD 3200, Labomed, Culver, USA)를 이용하여 760nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tannic acid를 0~500 $\mu$ g/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선 으로부터 총 페놀 함량을 계산하였다.

### 4. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량<sup>13)</sup>은 시료 추출물 1ml에 diethylene glycol 2ml을 첨가하여 충분히 시료가 용해되도록 하고, 0.1N NaOH 0.2ml 을 첨가한다. 1시간동안 37℃ 수조에서 반응시키고, Spectrophotometer (UVD 3200, Labomed, Culver, USA)를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 rutin을 0~500 $\mu$ g/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선 으로부터 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

## 5. 항산화 활성의 검정

### 1) DPPH radical 소거활성 측정

Blois의 방법<sup>14)</sup>을 변형하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거능을 측정하였다. 시료 추출물 2ml에 DPPH용액 1ml를 혼합하여 실온에서 2시간 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 추출물에 대한 DPPH radical 소거활성의 양성대조군으로 BHA를 이용하여 측정하였으며 시료용액의 첨가군과 무첨가군간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 2) Superoxide radical(SOD) 소거능 측정

Marklund와 Marklund의 방법<sup>15)</sup>을 응용하여 측정하였으며, 시료 추출물 0.2ml에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer 2.6ml와 7.2mM pyrogallol 0.2ml를 가하고 25℃에서 10분간 방치한 후 1N HCl 1ml로 반응을 정지시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 추출물에 대한 SOD 유사 활성의 양성대조군으로 BHA를 이용하여 측정하였으며 시료용액의 첨가군과 무첨가군간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 3) ·OH 소거활성 측정

Fenton 반응으로 ·OH를 생성시키고, 생성된 ·OH에 의해 핵산의 구성당인 deoxyribose가 분해되는 정도를 TBA발색법<sup>16)</sup>에 의하여 측정하였다. 10mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10mM EDTA, 10mM 2-D-deoxyribose 용액 각각 0.2ml과 시료 추출물 0.2ml, 0.1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2ml를 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 2.8% TCA 용액 1ml를 가하고 반응을 중지시킨 다음 1% TBA 용액 1ml를 첨가하여 다시 반응을 중지시키고, 1% TBA 용액 1ml를 첨가하여 100℃의 수욕 상에서 10분간 가열시킨 후 급냉한 것을 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 추출물에 대한 ·OH 소거활성의 양성대조군으로 BHA를 이용하여 측정하였으며, 시료용액의 첨가군과 무첨가군간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 4) Xanthine oxidase (XO)에 대한 저해효과

Stripe와 Della Corte의 방법<sup>17)</sup>에 따라 시료 추출물 0.1ml에 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6ml와 xanthine 2mM을 녹인 기질액 0.2ml를 첨가하였다. 여기에 0.2U/ml(Sigma, USA) 농도의 xanthine oxidase 0.1mlx를 가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 1N HCL 1ml를 가하여 반응을 정지시켜 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하였다. 시료 추출물에 대한 xanthine oxidase 저해 활성의 양성대조군으로 BHA를 이용하여 측정하였으며 시료용액의 첨가군과 무첨가군간의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

### 5) Linoleic acid 자동산화에 대한 저해효과

Linoleic acid의 항산화 효과 검정은 Haraguchi등<sup>18)</sup>의 방법을 응용하여 시행하였다. 에탄올에 녹인 2.51% linoleic acid 0.4ml, 0.04M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.8ml, 증류수 0.77ml 그리고 각 농도의 추출물 0.03ml로 반응액을 조성하여 40℃의 암소에서 incubation하였다. 24시간

후 이 반응액 0.1ml을 취해 75% ethanol 2.7ml, 30% ammonium thiocyanate 용액 0.1ml, 3.5% HCl에 녹인 0.02M ferrous chloride 0.1ml와 혼합한 후 500nm에서 흡광도를 측정하여 산화정도를 관찰하였다. 시료 추출물에 대한 linoleic acid 저해 효과를 비교하기 위해 양성대조군으로 BHA를 이용하여 측정하였으며 시료용액의 첨가군과 무첨가군간의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

### 6) 아질산염 소거능

Kato 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 1mM NaNO<sub>2</sub> 용액 1ml에 시료 용액 1ml를 첨가하고 0.2M 구연산 완충용액(pH 3.0)을 사용하여 반응용액의 pH가 3.0이 되도록 총량을 10ml로 조정하였다. 이를 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음 1ml를 취하여 여기에 초산 용액을 5ml 첨가하고 Griess 시약(30% 초산으로 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 각각 조제하여 1:1의 비율로 사용 직전 혼합) 0.4ml를 가하여 실온에서 15분간 방치한 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 추출물에 대한 아질산염 소거능은 양성대조군으로 BHA를 이용하여 측정하였으며 시료용액의 첨가군과 무첨가군간의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

### 7) 환원력의 측정

Elmastas등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 농도별로 제조한 시료 0.1ml에 0.2M 인산 완충액 (pH 6.8) 0.25ml과 1% potassium ferricyanide K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0.25ml을 넣은 다음, 50℃에서 20분간 반응시킨다. 반응시킨 후 0.25ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가하고 1000rpm에서 10분간의 원심분리를 통하여 얻어진 상층액에 0.1% FeCl<sub>3</sub> 0.05ml을 넣어 발색반응을 유도시킨 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 추출물에 대한 환원력의 측정은 양성대조군으로 BHA를 이용하여 측정하였다.

## 5. 통계처리

본 실험의 결과는 3회 반복 측정 후 SPSS 18 프로그램을 사용하여 Mean±SD로 나타내었으며,  $p < 0.05$  수준에서 LSD를 실시하여 대조군에 대한 유의성을 ANOVA 분석하였다.

## 결 과

### 1. 안정성 측정

#### 1) 흡광도

오미자(SF)군에서 0일째 흡광도가 0.20에서 70일 경과 후 0.10~0.15사이의 흡광도가 나타나 70일 경과 후에는 오미자의 붉은 색을 거의 잃었고, 자소엽 추출액(PF)은 0일에서 70일 사이 0.100의 흡광도로 일정하게 유지되었으나 붉은색을 띠지 않는 매우 낮은 흡광도를 나타냈다. 또한 두 재료의 동량 혼합군인 오미자+자소엽 추출액(SF+PF)의 경우 0일 0.40의 높은 흡광도를 나타내다가 약 70일 경과 후에는 0.30~0.35로 흡광도가 낮아졌지만, 육안상으로는 오미자 단독 추출군과 같은 붉은 색이 처음과 같이 유지되는 것으로 보였다(Fig. 1).

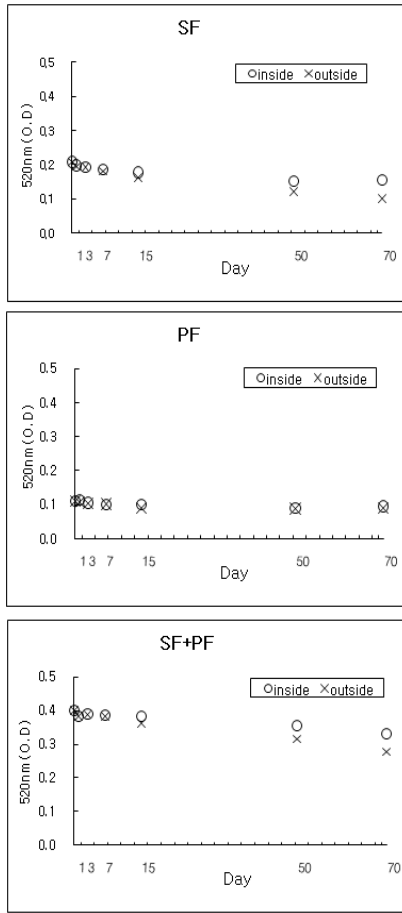


Fig.1. Change of color (absorbance) in herbal extracts.

2) 당도

단독 추출군과 혼합 추출군의 경우 시간이 지남에 따른 당도의 변화는 약 0.5% 증가 후 일정하게 유지됨을 알 수 있다. 자소엽 추출액(PF)이 오미자추출군(SF)과 혼합추출액군(SF+PF)에 비해 당도가 낮게 나타난 이유는 오미자 추출액의 당도가 0.5%, 자소엽 추출액의 당도가 0% 이기 때문이다 (Fig. 2).

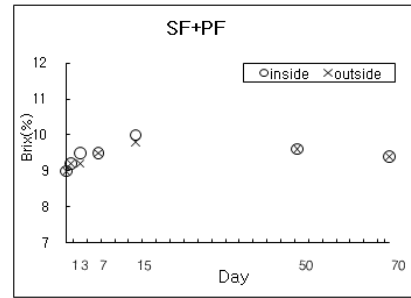


Fig. 2. Change of sugar contents (brix degree) in herbal extracts

3) 산도

자소엽 추출액 pH의 경우 0일 중성에 가까운 pH를 나타냈으나 15일 이후 pH 5 정도의 약산성으로 변화하였음을 알 수 있다. 하지만, 오미자 추출액, 오미자-자소엽추출액의 pH는 두 군 모두 0~70일 동안 pH 3 전후로 일정하므로 오미자 추출액에 자소엽을 가하여도 pH는 큰 변화가 없음을 알 수 있었다(Fig. 3).

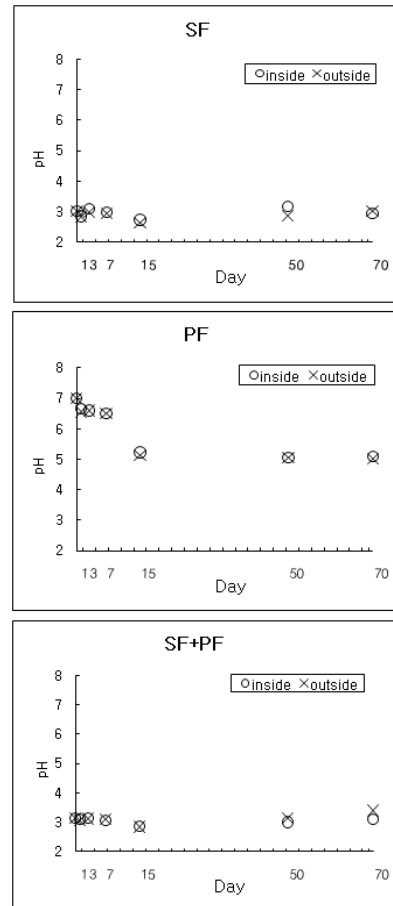
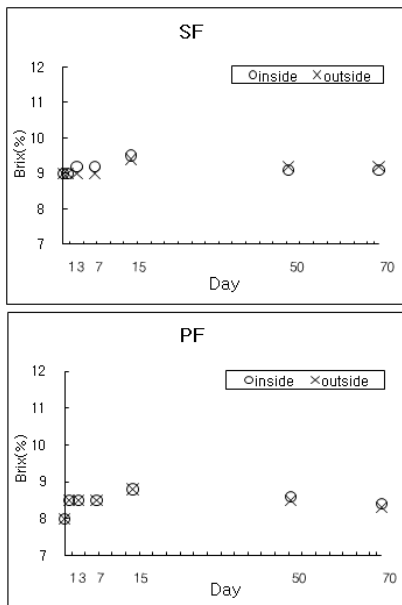


Fig.3. Change of acidity (pH) in herbal extracts.

2. 총 페놀성 화합물 함량 측정

총 페놀성 화합물의 함량을 측정 한 결과 오미자(SF)와 자소엽(PF) 단독 추출물에서 각각 7557.85 mg/mL, 8790.97 mg/mL로 오미자보다 자소엽(PF)에서 높은 함량을 나타냈다. 그리고 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서 총 페놀성 화합물의 함량을 측정한 결과 10412.65 mg/mL로 각각의 단일 추출물 내 함량보다 월등히 높게 측정되었다(Fig. 4).

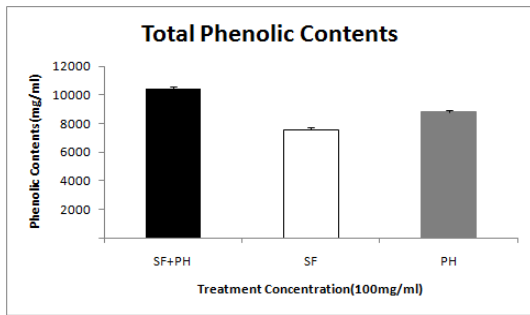


Fig. 4. Contents of total phenolics in herbal extracts. All value are means±SD in triplicate measurement.

### 3. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 오미자(SF), 자소엽(PF)에서 각각 153.26 mg/mL, 93.73 mg/mL로 자소엽(PF)이 오미자추출물(SF)보다 높은 함량을 나타냈고, 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서는 196.84 mg/mL로 각각 단일 추출물에서보다 플라보노이드 함량이 높게 측정되었다(Fig. 5).

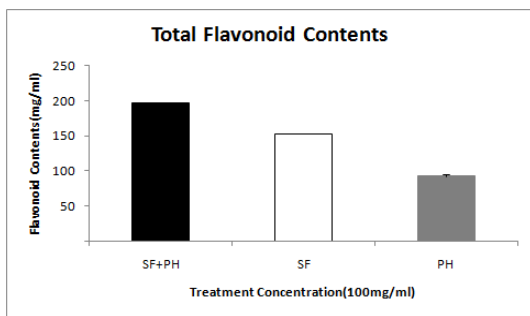


Fig. 5. Contents of total flavonoids in herbal extracts. All value are means±SD in triplicate measurement.

### 4. 항산화 활성의 검정

#### 1) DPPH radical 소거활성 측정

각각 추출물의 0.1~1 mg/mL 처리 농도 범위 내에서 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 모든 시료에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자공여 작용이 증가하였으며, 1 mg/mL의 농도에서 자소엽(PF)이 28.65±2.00%, 오미자(SF)가 38.32±1.88%의 소거능을 보였고 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서는 92.46±1.51%의 소거능을 나타냈다. 한편, 양성대조군인 0.1 mg/mL의 BHA는 81.11±1.05%의 소거능을 보여, 동량 혼합물(SF+PF)이 합성 항산화제인 BHA보다 우수한 소거 활성능이 있음을 알 수 있었다(Fig. 6).

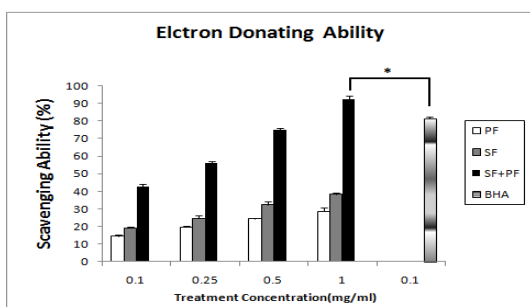


Fig. 6. DPPH free radical scavenging activity of herbal extracts. All value are means±SD in triplicate measurement. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD test as post-hoc analysis for the multiple comparison>(\* ,  $\rho$ 0.05 vs BHA)

#### 2) Superoxide radical(SOD) 소거능 측정

Superoxide의 소거활성능을 0.1~1 mg/mL 농도에서 확인한 결과 자소엽(PF)은 1 mg/mL농도에서 23.98±1.13%, 오미자(SF)는 45.38±0.10%로 나타났고, 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서는 81.10±1.16%의 소거능을 보임으로써, 0.1 mg/mL 농도로 BHA를 처리한 군의 51.67±0.69% 보다 우수한 SOD 소거활성을 나타냈다(Fig. 7).

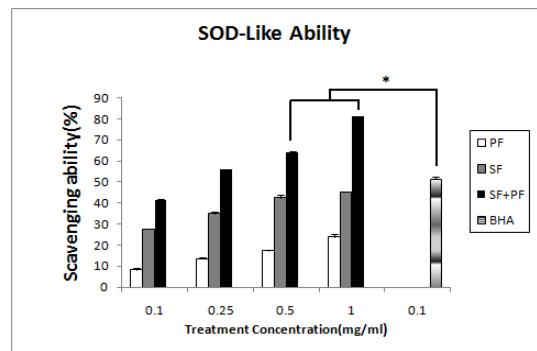


Fig. 7. SOD-like scavenging ability of herbal extracts. All value are means±SD in triplicate measurement. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD test as post-hoc analysis for the multiple comparison>(\* ,  $\rho$ 0.05 vs BHA)

#### 3) ·OH 소거활성 측정

추출물의 농도가 증가함에 따라 hydroxyl radical에 대한 소거 작용도 유의적으로 상승하였다. 1mg/mL 농도에서 자소엽(PF)과 오미자(SF)의 hydroxyl radical 소거 작용은 각각 55.32±0.63%, 80.25±1.03% 이었으며 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서는 95.55±0.54%를 보임으로써 합성항산화제인 BHA가 0.1mg/mL농도에서 나타낸 76.52±0.25% 보다 우수한 효과를 보였다(Fig. 8).

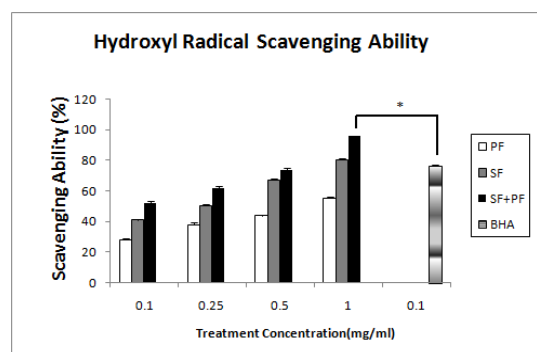


Fig. 8. Hydroxyl radical scavenging activity of herbal extracts. All value are means±SD in triplicate measurement. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD test as post-hoc analysis for the multiple comparison>(\* ,  $\rho$ 0.05 vs BHA)

#### 4) Xanthine oxidase(XO)에 대한 저해효과

Xanthine oxidase활성 억제에 대해 측정된 결과 모든 시료의 농도가 증가함에 따라 XO 저해 활성이 증가하였다. 즉, 1mg/mL 농도에서 자소엽(PF), 오미자(SF)가 각각 49.88

$\pm 2.09\%$ ,  $61.76 \pm 1.95\%$ 로 나타났고, 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서  $73.88 \pm 2.98\%$ 의 소거능을 나타냈다. 합성 항산화제인  $0.1\text{mg/mL}$  농도의 BHA는  $78.92 \pm 4.52\%$ 로 동량 혼합물과 비슷한 활성을 나타냈다(Fig. 9).

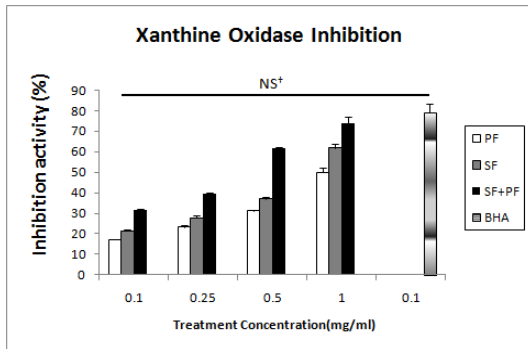


Fig. 9. Effect of Xanthine oxidase inhibition on herbal extracts. All value are means  $\pm$  SD in triplicate measurement. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD test as post-hoc analysis for the multiple comparison.(† : non-significant vs BHA)

#### 5) Linoleic acid 자동산화에 대한 저해효과

세포막 구성 지방산인 linoleic acid의 산화에 대한 추출물의 저해효과를 분석한 결과 모든 추출물의 농도가 증가할수록 저해효과도 커졌다.  $1\text{ mg/mL}$  농도에서 자소엽(PF)과 오미자(SF) 각각  $65.65 \pm 0.77\%$ ,  $79.04 \pm 0.67\%$ 를 나타냈고, 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서는  $93.59 \pm 0.36\%$ 의 산화 저해 활성을 나타내었다. 합성 항산화제인  $0.1\text{ mg/mL}$  농도의 BHA에서는  $80.81 \pm 0.47\%$ 의 결과로 동량 혼합물(SF+PF)과 유사한 소거 작용을 나타냈다(Fig. 10).

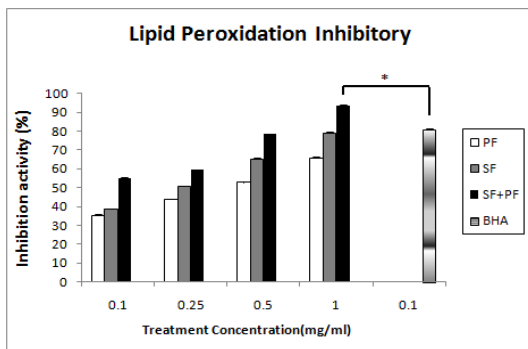


Fig. 10. Effect of Linoleic acid lipid peroxidation inhibition on herbal extracts. All value are means  $\pm$  SD in triplicate measurement. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD test as post-hoc analysis for the multiple comparison(\*,  $p < 0.05$  vs BHA).

#### 6) 아질산염 소거능

발암성 물질인 nitrosamine을 쉽게 생성하는 아질산염 제거 효과를 알아본 결과  $1\text{ mg/mL}$  농도에서 자소엽(PF)과 오미자(SF) 각각  $63.71 \pm 0.14\%$ ,  $72.78 \pm 1.17\%$ 의 저해 효과를 나타냈고, 이들의 동량 혼합물(SF+PF)은  $90.43 \pm 0.71\%$ 로 높은 저해율을 나타냈다. 합성 항산화제인  $0.1\text{ mg/mL}$ 의 BHA에서  $91.09 \pm 0.07\%$ 의 결과로 동량혼합물(SF+PF)과 유사한 소거 작용을 나타냈다(Fig. 11).

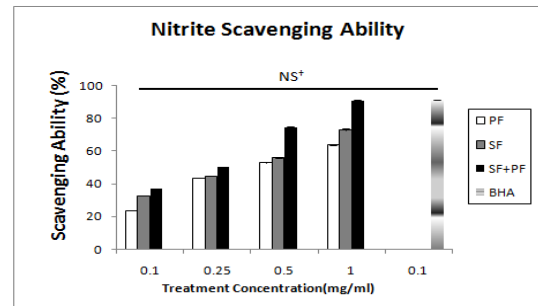


Fig. 11. Nitrite scavenging ability of herbal extracts. All value are means  $\pm$  SD in triplicate measurement. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD test as post-hoc analysis for the multiple comparison.(† : non-significant vs BHA)

#### 7) 환원력 측정

추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적인 환원력을 확인 할 수 있었다.  $1\text{ mg/mL}$  농도에서 자소엽(PF)과 오미자(SF) 처리군에서 각각  $1.56 \pm 0.50\%$ ,  $1.82 \pm 0.37\%$ 의 환원력을 나타냈고, 이들의 동량 혼합물(SF+PF)에서는  $2.16 \pm 0.49\%$ 의 환원력이 관찰됨으로써, 합성항산화제인  $0.1\text{ mg/mL}$  농도의 BHA에서 보인  $2.48 \pm 0.00\%$ 와 유사한 환원력을 보였다(Fig. 12).

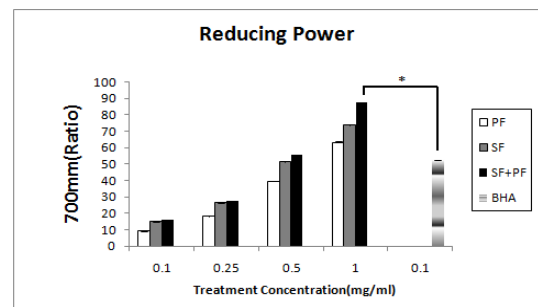


Fig. 12. Reducing power of herbal extracts. All value are means  $\pm$  SD in triplicate measurement. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD test as post-hoc analysis for the multiple comparison(\*,  $p < 0.05$  vs BHA).

## 고 찰

현대 의학 기술의 발달과 경제수준의 향상으로 건강과 장수에 대한 관심이 높아짐에 따라 항암<sup>21)</sup>, 항노화<sup>22)</sup>, 항염증<sup>23)</sup> 등의 생리 활성을 갖는 다양한 천연물에 대한 연구에 관심이 높아지고 있다. 또한, 각종 천연식품의 가공기술 발달과 더불어 복용이 간편하고, 효능이 뛰어난 천연 식품 원료에 대한 다양한 연구들<sup>24,25)</sup>도 활발히 진행되고 있다.

흔히 유해산소라 불리는 활성산소는 현대인들의 과도한 알코올 섭취, 흡연, 약물, 스트레스, 식습관, 환경오염물질 등 외적요인과 화학물의 방사능, 물리 화학적 요인<sup>26,27)</sup>에 의해 발생한다. 이러한 결과로 인해 세포내 단백질, DNA 또는 세포 생체막을 공격하여 기능적 손상을 받게 되는데 궁극적으로 세포가 산화적 스트레스를 받으면 노화, 당뇨병, 심장병 그리고 각종 암의 원인이 되는 것으로 잘 알려져 있다<sup>28)</sup>. 이러한 각종 질병들의 치료가 다양한 요법으로 시술되어 왔으나 이에 따른 부작용도 간과할 수 없는 것이 사실이다.

오미자(*Schisandrae Fructus*; SF)는 목련과(Magnoliaceae)에 속하는 낙엽성 木本인 五味子(*Schisandra chinensis*)의 과실이다. 이 약물은 오미(酸·苦·甘·辛·鹹·澀)를 가지고 있으며, 주로 腎經에 작용하여 위로는 肺氣를 收斂하고, 아래로는 腎陰을 滋養하며 아울러 澀精止瀉, 生津, 止汗 등의 작용을 한다. 肺虛喘咳를 收斂하여 止咳平喘하고, 腎虛로 인한 遺精滑精을 收斂하여 固澀止遺의 효능이 있다. 오미자는 lignan 화합물이 18.1~19.2% 함유되어있으며 shizandrin, deoxyschizandrin,  $\gamma$ -schizandrin, schizandol, pseudo- $\gamma$ -schizandrin, gomisins A-G, F~H 등을 함유한다고 보고되고 있다. 자소엽(*Perillae Folium*; PF)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 일년생 草本인 蘇葉(*Perilla frutescens*)의 잎이다. 이 약물은 주로 肺, 脾經에 작용하여 風寒의 邪氣를 發散시킬 뿐만 아니라 行氣寬中하며, 安胎 작용도 한다. 外感風寒으로 인한 惡寒發熱, 無汗의 表實證과 脾, 肺氣滯로 인한 咳嗽 胸悶, 惡心嘔吐 등에 적용한다. 그러므로 風寒表證에 胸悶嘔惡 등의 증후를 겪었을 경우 이 약물을 사용한다. 종자, 잎 및 가지에 모두 정유성분이 함유되어 있는데, 정유 성분 중 perillaldehyde가 약 50~60%, 1-limonene,  $\alpha$ ,  $\beta$ -pinene 등의 정유성분을 함유하고 있다<sup>11)</sup>.

한편, 식물에서 얻어지는 천연색소는 클로로필, 카로티노이드, 안토시아닌, 플라보노이드, 퀴논(벤조퀴논, 나프토클리논, 안트라퀴논), 쿠마린 유도체 등이 있으며, 한약재에도 오미자, 자소엽, 홍화, 울금, 치자, 강황 등 색소 성분을 함유하는 것이 많다. 그러나 천연색소는 섭취방법, 추출방법에 따라 함유율, 색도, 약효 및 안정성에 변동이 있으므로 한방제품으로 가공시 색조가 선명하지 못하고 유통과정 중에 탈색이 빠르게 나타나는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 항산화활성이 있는 자소엽<sup>29)</sup>을 이용한 천연 색소 고정 기술을 오미자에 적용하여, 고유의 함유 색소성분의 색도, 안정성을 개선, 향상시켰으며, 약리 효능 또한 최대화하고자 하였다.

페놀 화합물과 플라보노이드 화합물은 다양한 식물계에 널리 분포되어 있는 대표적 항산화 물질이며<sup>30)</sup>, 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있어서 단백질 및 거대분자와 쉽게 결합하여 항암 및 항산화 활성과 같은 다양한 생리활성을 나타낸다<sup>31)</sup>. 총 페놀성 화합물의 함량을 측정할 결과 오미자(SF)와 자소엽(PF) 보다 동량 혼합물(SF+PF)의 함량이 10412.65 mg/mL로 높게 측정되었으며 총 플라보노이드 함량 또한 동량 혼합물(SF+PF)에서 196.84 mg/mL로 페놀화합물과 같은 양상을 나타냈다.

Free radical은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키는 것으로 페놀성 화합물인 경우 자유라디칼을 상쇄시키는 능력이 강하므로 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제하는데 이용되고 있다<sup>32)</sup>. DPPH는 추출물들의 생리활성 물질이 환원되어 자색으로 탈색되는 정도에 따라 항산화 활성 정도를 측정하는데, 0.1~1 mg/mL 범위에서 농도에서 높아질수록 자소엽(PF), 오미자(SF), 동량 혼합물(SF+PF) 순으로 DPPH 소거능이 증가하는 것을 확인 할 수 있었는데, 1 mg/mL의 동량 혼합물(SF+PF)이 92.46±1.51%의 소거능을 보여 81.11±1.05%의 소거능을 보인 0.1 mg/mL BHA 보다 우수한 소거능을 나타냈음을 알 수 있었다.

항산화 효소중의 하나인 SOD (superoxide dismutase)는

생체 내에서 superoxide radical( $O_2^-$ )을 산소로 산화시켜주는 천연 항산화제이다. superoxide 산화 억제 작용을 알아보기 위해 superoxide와 반응하여 갈변물질을 나타내는 pyrogallol<sup>15)</sup> 자동산화반응을 측정하기 위하여 0.1~1 mg/mL 농도의 추출물과 반응시킨 결과 자소엽(PF), 오미자(SF), 동량 혼합물(SF+PF) 순으로 농도 의존적으로 증가하는 SOD 유사활성을 보였다. 즉, 1mg/mL 동량 혼합물(SF+PF)에서 81.10±1.16%의 결과를 보여, 0.1 mg/mL 농도 BHA 처리군에서의 51.67±0.69%보다 비교적 높은 소거능을 확인할 수 있었다.

·OH은 구리, 철 이온과 같은 금속이온과 반응하여 독성이 강한 free radical을 생성하여 DNA에 손상을 주거나 돌연변이를 유발하여 생체나 식품에 문제시 되고 있다<sup>16)</sup>. 0.1~1 mg/mL의 추출물 농도에 따라 ·OH 소거능을 측정할 결과, 자소엽(PF), 0.1 mg/mL BHA, 오미자(SF), 동량 혼합물(SF+PF)순으로, 농도 의존적으로 ·OH 소거능이 증가하였다. 0.1 mg/mL에서 BHA가 76.52±0.25%의 ·OH 소거활성을 보인 반면에 1 mg/mL에서 동량 혼합물(SF+PF)이 95.55±0.54%의 소거 활성을 나타내어 합성 항산화제인 BHA보다 우수한 항산화능을 보였다.

Xanthine Oxidase는 생체 내에서 purine 대사에 관여하여 uric acid를 형성하는 효소로써 혈장 내에 활성이 증가하면 통풍과 신장질환을 유발한다<sup>33)</sup>. XO를 0.1~1 mg/mL 범위에서 시료 처리 농도에 따라 저해 활성을 측정할 결과 농도가 높아질수록, 자소엽(PF), 오미자(SF), 동량 혼합물(SF+PF)순으로 XO 저해 활성이 증가하였다. 0.1 mg/mL에서 BHA가 78.92±4.52%의 우수한 XO 저해 활성을 보였으며, 1 mg/mL에서 동량 혼합물(SF+PF)이 73.88±2.98%를 보여 합성 항산화제인 BHA 만큼 XO의 저해에 대한 활성을 나타냈다.

생체를 구성하고 있는 지질은 라디칼에 의해 지방산으로부터 수소원자가 이탈됨으로써 산화되기 시작하여 반응성이 높은 유리 라디칼이 형성되어 노화나 암 발생의 주요원인이기도 하다<sup>34)</sup>. Linoleic acid 기질에 0.1~1 mg/mL 농도의 시료를 처리하고 저해 활성을 측정할 결과 농도가 높아질수록 자소엽(PF), 오미자(SF), 동량 혼합물(SF+PF)순으로 linoleic acid 저해 활성이 증가하였다. 0.1 mg/mL BHA가 80.81±0.47%의 linoleic acid 자동산화를 저해하였으며, 1 mg/mL 농도에서 동량 혼합물(SC+PH)이 93.59±0.36%의 저해를 보여 합성항산화제인 BHA 보다 우수한 산화억제 효과를 나타냈다.

발암물질로 알려진 nitrosamine의 전구물질로 알려진 amine류 함유 식품을 섭취했을 때, nitrosamine이 생성될 가능성이 매우 크다<sup>35)</sup>. Jung 등<sup>36)</sup>과 Kim 등<sup>37)</sup>은 nitrosamine 생성은 pH에 의존적이며 아질산염 소거능은 강산성일 때 가장 높으며, pH가 상승할수록 감소한다고 보고하였다. 0.1~1 mg/mL 농도로 추출물을 처리하고 아질산염 소거능을 측정할 결과 농도가 높아질수록, 자소엽(PF), 오미자(SF), 동량 혼합물(SF+PF)순으로 아질산염 소거능이 증가하였다. 0.1 mg/mL BHA에서 91.09±0.07%로 우수한 아질산염 소거능을 보였으며, 1 mg/mL의 동량 혼합물(SF+PF) 처리군에서 90.43±0.07%를 보여 합성 항산화제인 BHA와 유사한 소거작용을 나타냈다.

환원력은 시료 자체의 흡광도 수치로써 발색정도가 높을수록 높은 환원력을 나타내는데 0.1~1 mg/mL 농도범위에서 환원력을 측정할 결과 자소엽(PF), 오미자(SF), 동량 혼합물(SF+PF)순으로 항산화력이 높게 나타났으며, 합성 항산화제인 0.1 mg/mL BHA에서  $2.48 \pm 0.00$ 의 환원력과 유사하게 1 mg/mL 동량 혼합물(SF+PF) 처리군에서도  $2.16 \pm 0.49$ 의 유사한 항산화력을 나타냈다. 본 연구에서는 Sung 등<sup>38)</sup>의 흑미늘에 관한 연구 보고처럼 농도의존적으로 환원력이 증가하였으며, Holasova 등<sup>39)</sup>의 연구에서처럼 페놀 함량이 높을수록 환원력이 증가한다는 보고와도 일치하였다.

본 연구를 종합한 결과 오미자(SF), 자소엽(PF) 단일추출물보다 동량 혼합물(SF+PF)에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량의 증가를 보였으며, 동량 혼합물(SF+PF)의 항산화능을 합성 항산화제로 널리 알려진 BHA와 비교 분석한 결과 BHA와 유사한 항산화 효과를 얻었다. 따라서 오미자에 자소엽을 첨가함으로써 합성 항산화제가 아닌 천연 한약 소재를 이용하여 색소 고정화를 확립하고, 우수한 항산화 활성을 확인함으로써, 오미자를 이용하여 기능성 액상제품을 개발할 때 본 연구 결과를 기초자료 활용할 수 있으며, 우수한 항산화 효과로 인해 활성산소 관련 질환 및 노화의 예방 및 치료에 보조제로 이용될 수 있으리라 사료된다.

## 결 과

본 연구에서는 오미자(SF), 자소엽(PF), 동량 혼합물(SF+PF)의 항산화 활성을 측정할 결과, 동량혼합물(SF+PF)에서 양성대조군인 BHA에 비견하는 안정성과 강력한 항산화력을 확인하였을 뿐만 아니라 자소엽을 통한 천연색소 고정화 기술과 효능의 시너지 효과 또한 입증되었다. 따라서 오미자를 이용한 기능성 제품 개발 시 자소엽의 적용 뿐만 아니라 이를 활용한 색소 음료 개발시 천연 색소 고정화 기술의 활용도가 적용될 수 있을 것으로 기대된다. 한편 오미자와 자소엽의 동량 혼합물(SF+PF) 음료는 항산화 기능이 뛰어나므로 현대인의 산화적 스트레스 관련 질환 및 활성 산소로 인한 노화관련 질환의 제 증상 예방 및 개선용으로 응용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2009년도 산학 공동기술개발지원사업(과제번호 : 00037352-3)의 일환으로 수행된 것입니다.

## 참고문헌

1. Knight JA. The process and theories of aging. *Ann Clin Lab Sci*, 1995 ; 25 : 1-12.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J Biochem*, 1984 ; 219 : 1-14.

3. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem*, 1997 ; 174 : 305-19.
4. Cha BC, Lee EH, Noh MA. Antioxidant activity of *Smilacis Chinae Radix*. *Korean J. Pharmacogn*, 2005 ; 36 : 195-200.
5. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. A study of antioxidative and hypoglycemic activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Korean J Food & Nutr*, 2009 ; 22 : 41-47.
6. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000 ; 279 : 1005-1029.
7. Haumann BF. Antioxidants : firms seeking products they can label as natural. *Inform*, 1990 ; 1 : 1002-1013.
8. Dziezak JD. Antioxidants. *Food Technol*, 1986 ; 40 : 94-102.
9. Kim DH. *Food Chemistry*. Seoul : Tamgudang, 1983 : 482.
10. Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxy toluene (BHT), and butylated hydroxy anisole (BHA). *Kor J Food Sci Tecchnol*, 1982 ; 14 : 83-288.
11. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kowm DR, Bu YM. *Boncho-Hak*. Seoul : Young-Lim Press, 2006 : 129-131, 933-935.
12. Gutfinger T. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc*, 1958 ; 58 : 966-968.
13. Chang CC, Yang MH, Wen HM and Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food, Drug, Anal*, 2002 ; 10 : 178-182.
14. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958 ; 181 : 1199-1200.
15. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide amino radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1975 ; 47 : 468-474.
16. Bu HJ, Lee HJ, Yoo ES, Jung DS, Riu KZ, and Lee S. Antioxndnat effects and inhibitory effect on NO synthesis by extracts of *cansvalia lineate*. *Kor J Phar*, 2004 ; 35 : 338-345.
17. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 1969 ; 244 : 3855-3861.
18. Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidative substances in leaves of *polygonum hydropiper*. *J. Agric. Food Chem*, 1992 ; 40 : 1349-1351.
19. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibitory of nitrosamine formation by



- nondialyzable melanodins. *Agric Biol Chem*, 1987 ; 51 : 1333-1338.
20. Elmastas M, Isildak O, Turkedul I, and Temur N. Determination of antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J Food Compost Anal*, 2007 ; 20 : 337-345.
  21. Rho SN, Oh HS. Effect of omija (*Schizandra Chinensis Baillin*) extracts on the growth of liver cancer cell line SUN-398. *Nutrition Society*, 2002 ; 35 : 201-206.
  22. Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Jung HJ, Kang HY, Ha HJ. Supercritical extraction of oriental herb : anti-aging and anti-wrinkle effects. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 2008 ; 23 : 529-534.
  23. Choi SI, Lee YM, Heo TR. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 2003 ; 18 : 282-288.
  24. Kwak EJ, Lee YS. Effect of the extracts of various foods and medicinal herbs on the antioxidant activity and sensory characteristics of jujube-omija herbal sauce. *Korean J SOC Food Cookry SCI*, 2002 ; 18 : 433-440.
  25. Ha HC, Kim HS, Ryu BH. Antioxidative Effects of ethanol extract obtained from Rooibos Tea(*Aspalathus linearis*) and It's application of food. *Kor J Food & Nutr*, 2000 ; 13 : 13-20.
  26. Halliwell B. Antioxidant in human health and disease. *Annual Reviews in Nutrition*, 1996 ; 16 : 33-49.
  27. Morrissey PA, O'Brien NM. Dietary antioxidants in health and disease. *Internal Diary Journal*, 1998 ; 8 : 463-472.
  28. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007 ; 39 : 44-84.
  29. Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in korea. *Korean J Soc Appl Biol Chem*, 2006 ; 49 : 328-333.
  30. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 1999 ; 47 : 3954-3962.
  31. Lee JH, Lee SR. Analysis of phenolic substances content in korean plants food. *Korean J Food Sci*, 1994 ; 26 : 310-316.
  32. An BJ, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee J Y, Son JH. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korea snaguisorbae officinalis L. *J. Korean Soc Apple Biol Chem*, 2004 ; 47 : 244-250.
  33. Kramer HM, Curhan G. The association between gout and nephrolithiasis. *Am J Kid Diseases*, 2002 ; 40 : 37-42.
  34. Farag RS, Badei A, Hewdi FM, Baroty GS. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic and oxidation in aqueous media. *J Am Oil Chem Soc*, 1989 ; 66 : 792-799.
  35. Gray JI, Dugan JR. Inhibition of n-nitrosamine formation in model food systems. *J Food Sci*, 1975 ; 40 : 981-984.
  36. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT(Omija) seed. *Korean J Food SCI*, 2000 ; 32 : 928-935.
  37. Kim JS, Choi SY. Physicochemical Properties and antioxidative activities of Omija(*Schizandra chinensis* Bailon). *Korea J Food & Nutr*, 2008 ; 21 : 35-42.
  38. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *Korean J SOC Food Sci Nutr*, 2008 ; 37 : 965-971.
  39. Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S. Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Research International*, 2002 ; 35 : 207-211.