

와송과 한약재 복합물의 *in vitro* 생리활성 평가

이수정¹ · 신정혜² · 강재란¹ · 황초롱¹ · 성낙주^{1*}

¹경상대학교 식품영양학과 · 농업생명과학연구원

²(재)남해마늘연구소

In vitro Evaluation of Biological Activities of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) and Korean Traditional Plants Mixture

Soo-Jung Lee¹, Jung-Hye Shin², Jae-Ran Kang¹, Cho-Rong Hwang¹, and Nak-Ju Sung^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Institute of Agriculture and Life Sciences,
Gyeongsang National University, Gyeongnam 660-701, Korea

²Namhae Garlic Research Institute, Gyeongnam 668-812, Korea

Abstract

This study was carried out to determine the biological activities of Wa-song (*Orostachys japonicus*) hot water extracts. Four types of extract samples were prepared, including Wa-song, traditional plants mixture [PM; mixture of Baekbokryung (*Poria cocos*), Changchul (*Atractylodis rhizoma*), and Sa-in (*Amomum xanthoides*)], and two different ratio composites of these (mixture of PM and Wa-song extract, 1:1 (v/v); PMO-1 and 1:3 (v/v); PMO-3). Their biological activities were measured using various *in vitro* assays. Total phenolic and flavonoid contents of PM were higher compared to those of Wa-song, and those of PMO-1 were higher than those of PMO-3. Further, PMO-1 contained higher ABTS and DPPH radical scavenging, reducing power, and nitrite scavenging activities than PMO-3. On the contrary, PMO-3 contained higher tyrosinase and inhibitory activities of MCF-7 and HT-29 cancer cells than PMO-1. According to the results, biological activities of PMOs were significantly higher than those of Wa-song extract and PM in *in vitro* assays. Therefore, we expect that PMOs could show higher biological activities than Wa-song extract alone *in vivo*.

Key words: Wa-song (*Orostachys japonicus*), plants mixture, antioxidant, anticancer activity

서 론

생체 내 정상적인 호흡과정에서 산소대사의 부산물로써 약 2% 정도의 활성산소종이 발생되는데, 이들은 노화나 생활 습관병 등의 다양한 만성질환의 발병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(1). 생체는 이러한 활성산소종의 생성을 차단하기 위한 자체 방어능력을 가지나, 이를 능가한 활성산소 및 유리 라디칼의 제거는 외부로부터 방어 물질을 섭취함으로써 가능해진다(2). 대표적인 페놀계 합성 항산화제인 BHA나 BHT의 경우 그 항산화능은 높으나 과량 섭취 시 독성과 발암성의 위험으로(3) 식물 유래의 안전한 항산화제에 대한 요구가 증대되고 있다. 현재, 우리나라에서 천연 항산화제, 기능성식품 및 신약 개발을 위한 phytochemicals에 관한 연구는 동양의학에서 기원된 생약 식물류와 이들 식물체내에 천연적으로 함유되어 있는 물질 및 다양한 측면에서의 생리활성 규명을 중심으로 진행되고 있다(4-7).

민간과 한의학에서 이용되는 천연식물 소재인 와송(Wa-song, *Orostachys japonicus* A. Berger)은 민간요법에서 오

래전부터 면역작용이나 암치료에 이용되어져 왔으며, 항산화(8,9), 항궤양(10) 등의 효능이 알려져 있다. 백복령(Baekbokryung, *Poria cocos* Wolf)은 내부가 백색인 복령으로 항암, 위궤양 개선, 혈당 강하(11,12) 및 항산화 활성(13)이 있으며, 창출(Changchul, *Atractylodis rhizoma*)은 지방세포의 분화 억제에 효과적이며, 민간요법에서는 위장관 계통의 질환에 사용되기도 한다(14). 사인(Sa-in, *Amomum xanthoides*)은 alloxan으로 유발된 당뇨쥐에서 혈당 및 인슐린 분비의 정상화에 효과적인 것으로 보고된 바 있다(15,16). 이들 천연식물류는 각각 만성질환의 치료나 예방에 효과가 있음이 보고되고 있으며, 최근에는 이러한 식물의 단독 이용보다는 유사한 효능을 가진 식물류가 혼합된 복합물의 이용으로 관심이 전향되고 있다. Cho 등(17)은 7종의 한약재를 동량씩 혼합한 조성물에서 *in vitro* 항산화 활성이 증가되어 각 구성 물질의 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량에 의존적으로 활성 차이를 보인다고 하였다. 또한 이들 조성물을 동물 양념으로 사용할 경우 조성물 중의 항산화성 물질에 기인하여 저장기간의 증가에 따른 불포화지방산의 감소를 줄일

*Corresponding author. E-mail: snakju@gnu.ac.kr
Phone: 82-55-772-1431, Fax: 82-55-772-1439

수 있다는 보고도 있다(18). Park 등(19)은 전호, 구기자나무 및 사삼의 단독 추출물보다 이들을 혼합하여 추출한 복합물이 당뇨쥐의 혈당 강하에 더욱 효과적인 것으로 보고한 바 있다.

이와 같이 여러 식물류의 혼합 처방은 각 재료에 함유된 유효 물질간의 상호작용으로 첨가 효과뿐만 아니라 생리활성의 시너지 효과도 발휘할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 다양한 약리작용이 있어 과거로부터 고급 약재로 사용되어온 와송의 생리활성 연구의 일환으로 와송 추출물의 항산화 및 항암 활성을 측정하였으며, 와송과 유사한 활성을 지니는 한약재로 백복령, 창출 및 사인 등의 한약재를 선별하여 이들의 복합물에 대한 *in vitro*에서 와송과의 시너지 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 추출물의 제조

와송은 경남 산청지역의 산에 자생된 것을 동정 후 구입하여 지상부를 수세한 후 열풍건조 시켰으며(20), 한약재는 문헌을 통하여 와송과 유사한 생리활성을 지니는 식물류를 선정하였으며, 경남 진주시 소재 약재상에서 시판되는 건조품인 백복령, 창출 및 사인을 구입하였다. 와송과 3종의 한약재는 건조시료 중량에 대해 10배의 물을 가하여 95°C의 수욕상에서 3시간 동안 2회 반복 추출하여 추출물을 얻었다.

한약재 혼합물(PM)은 각각 추출된 3종의 한약재 추출물을 동량으로(1:1:1, w/w/w) 혼합하였으며, 와송 복합물(PMO)은 한약재 혼합물(PM)에 와송 추출물을 첨가하여 PMO-1(한약재 혼합물 : 와송 추출물 = 1:1, w/w)과 PMO-3(한약재 혼합물 : 와송 추출물 = 1:3, w/w)으로 각각 제조하여 즉시 실험에 사용하였다.

총 페놀 및 플라보노이드 정량

총 페놀 함량은 시료액, Foline-Ciocalteu 시약 및 10% Na_2CO_3 용액을 각각 동량씩 가하여 혼합한 다음 실온의 암실에서 1시간 동안 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, caffeic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 얻은 표준검량선으로부터 총 페놀 함량을 산출하였다(21). 플라보노이드 함량은 시료액 1 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합한 다음 실온의 암실에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin(Sigma Chemical Co.)을 사용하여 얻은 표준검량선으로 플라보노이드 함량을 계산하였다(22).

ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능 측정

와송 복합물의 ABTS[2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate)] 라디칼 소거능은 7 mM의 ABTS 수용액에 potassium persulfate를 2.4 mM 농도가 되도록 용해

시킨 후 암실에서 12시간 이상 반응시켰다. 이를 415 nm에서 1.5의 흡광도가 되도록 증류수로 조정된 ABTS 시약 3 mL와 시료액 1 mL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하였다(23). DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 일정 농도별 시료액 1 mL에 DPPH 시약(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methanol) 2 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(24). 라디칼 소거능은 시료액 무첨가구에 대한 시료액 첨가구의 흡광도 비(%)로 계산하였다.

환원력 측정

와송 복합물의 환원력은 Oyaizu(25)의 방법에 따라 시료액, 200 mM의 인산 완충액(pH 6.6) 및 1%의 potassium ferricyanide 용액을 동량으로 혼합하여 50°C의 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액을 가하여 반응을 정지시키고 5000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액에 증류수 및 0.1% ferric chloride 용액을 동량으로 혼합한 후 700 nm에서 측정한 흡광도를 시료액의 환원력으로 나타내었다.

아질산염 소거능 측정

와송 복합물에 1 mM 아질산나트륨 용액 1 mL를 가하고 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충액(pH 2.5)을 가하여 반응용액의 총 부피를 10 mL로 한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액 1 mL를 취하여 2% 초산용액과 Griess 시약을 차례로 가하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 아질산염 소거능을 계산하였다(26).

Tyrosinase 활성 저해능 측정

Tyrosinase 활성 저해능은 효소의 반응으로 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 따라 측정하였다(27). 0.2 M potassium phosphate 완충액(pH 6.5) 2.3 mL에 2 mM L-tyrosine 용액 0.4 mL, 시료액 0.2 mL 및 tyrosinase(220 unit/mL, Sigma Chemical Co.) 0.1 mL를 차례로 가하여 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 470 nm에서 흡광도(S_{OD})를 측정하였다. 효소액 대신에 증류수를 사용하여 측정한 흡광도(B_{OD}) 및 시료액 대신에 증류수를 첨가하여 측정한 흡광도(C_{OD})를 이용하여 다음의 식에 따라 tyrosinase 활성 저해능을 산출하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = \left(1 - \frac{S_{OD} - B_{OD}}{C_{OD}}\right) \times 100$$

암세포 성장 저해능 측정

인체 위암 세포주(AGS), 유방암 세포주(MCF-7) 및 결장암 세포주(HT-29)는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 10% FBS, 5000 unit/mL의 penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지로 37°C 및 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 시료액에 의한 암세포의 성장 저해능은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol)-

2,5-diphenyl tetrazolium bromide[법(28)으로 측정하였으며, 세포 배양용 96 well plate에 4×10^4 cells/mL을 100 μ L씩 분주하여 37°C 및 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 농도를 달리한 시료액을 100 μ L씩 접종하였다. 이를 다시 24시간 배양한 후 5 mg/mL의 MTT 용액 10 μ L를 첨가하여 37°C에서 3시간 배양하였으며, 이때 생존 세포와 MTT 시약과의 반응으로 생성된 formazan 결정을 100 μ L의 dimethyl sulfoxide에 녹여 plate shaker(MX2, FINEPCR, Seoul, Korea)에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader(UVM 340, ASYS Hitech, Eugendorf, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포 성장 저해능(%)으로 계산하였다.

통계처리

모든 결과는 5회 이상 반복하여 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시험구에 대한 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

와송 복합물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

와송 복합물의 생리활성을 증대시키기 위해 선정된 한약재의 혼합물(PM)과 와송 복합물(PMO-1, PMO-3)의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 와송 열수추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 9.21 mg/g 및 6.22 mg/g이었으며, PM은 85.76 mg/g 및 12.88 mg/g이었다. 와송 추출물과 와송 복합물(PMO-1, PMO-3)의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 한약재가 함유된 와송 복합물에서 더 많았는데, PM의 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 와송 추출물에 비해 약 9.3배 및 2.1배 정도 높았기 때문이라 판단된다. 더욱이 한약재의 구성성분인 사인 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 192.12 mg/g 및 19.59 mg/g으로 백복령 및 창출에 비해 월등히 높아 한약재 혼합물의 생리활성에 주된 역할을 할 것으로 생각되며, 와송 추

출물과 한약재를 동량으로 혼합한 PMO-1은 PMO-3에 비해 시료 중의 총 페놀 및 플라보노이드 함량에 기인된 생리활성의 향상을 위한 효과적인 조성 비율인 것으로 사료된다.

식물류의 생리활성은 유리 라디칼의 소거를 특징으로 하는 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물의 함유량에 의존적이므로, 대부분의 식물류는 이들 물질의 함량에 따라 항산화 활성이 증가하는 경향을 보인다(29). 또한 와송의 항산화능도 시료 중의 페놀 화합물 함량에 기인된 것으로 보고된 바 있다(20,30). 한약재나 약용식물류를 이용한 항산화 활성의 검정 결과, 대부분의 식물류에서 항산화능이 확인되었으며(7,29), 활성은 시료 중의 총 페놀 및 플라보노이드류에 의존적이거나 그 양이나 성분이 식물의 종류에 따라 매우 상이한 것으로 보고되어 있다(6). 하지만 한약재의 유효 성분은 식품 중의 다른 성분과 공존할 경우 시너지 효과를 나타내어 생체 방어 시스템의 보강 및 생체 내 항상성 유지에도 유효한 것으로 알려지고 있다(31). 따라서 이러한 식물류 혼합물은 여러 활성 물질이 공존되어지므로 반응조건 내의 상호작용에 의해 항산화 활성의 상승이 가능하리라 판단된다(6).

반면에, 항산화 활성을 가지는 각각의 순수 페놀성 물질을 일정량씩 혼합하여 항산화 활성을 측정할 결과, 혼합물의 항산화능은 단일품의 항산화능에 대한 합과 유사하여 시너지 효과보다는 오히려 첨가 효과라는 보고도 있다(32). 그러나 대부분의 천연 식물류 혼합물의 높은 생리활성은 식물체 간의 상호작용에 의한 시너지효과가 주 요인인 것으로 알려져 있다(6,17). 더욱이 8종의 한약재 복합물에서 금은화의 첨가 유무에 따라 항산화 활성에 차이를 보인다는 보고(33)로 볼 때, 본 연구에서와 같이 사인과 같은 총 페놀 화합물의 함량이 많은 시료의 사용은 주 성분의 활성 증가를 위한 보조제로써의 이용 가능성이 높을 것으로 예상된다.

와송 복합물의 라디칼 소거능

생약재 및 와송 복합물의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능은 Table 2 및 3에 나타난 바와 같이, 100~1000 μ g/mL의 농도 범위에서 시료의 농도가 증가됨에 따라 유의적으로 상승하였다. 와송 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 100~500 μ g/mL 농도에서 20%미만이었으나, 1000 μ g/mL 농도에서는 70%의 소거능을 보였다. PM은 500 μ g/mL 농도에서 38.46%, 1000 μ g/mL 농도에서는 85.23%의 소거능을 보여 와송 추출물에 비해 모든 농도에서 유의적으로 높았다. 와송 복합물은 100~250 μ g/mL 농도에서 PMO-3가 PMO-1보다 유의적으로 높은 소거능을 보였으나, 500 μ g/mL 농도에서는 오히려 PMO-1이 51.52%로 PMO-3(38.37%)에 비해 유의적으로 높은 소거능을 보였고 1000 μ g/mL 농도에서는 90% 이상으로 비슷한 활성이었다. 즉, 와송 복합물은 500 μ g/mL 이상의 농도에서 PM이나 와송 추출물보다 소거능이 유의적으로 높아 이들 각 한약재의 혼합에 따른 ABTS 라디칼 소거능에 시너지 효과를 보이는 것으로 판단된다.

DPPH 라디칼 소거능은 1000 μ g/mL 농도에서 PM이

Table 1. Total phenol compounds and flavonoids contents of the Wa-song and its composite

Samples	Total phenol compounds	Flavonoids
	(mg/g dried extract)	
Wa-song extract	9.21±0.51	6.22±0.77
PM ¹⁾	85.76±1.21	12.88±0.02
PMO-1 ²⁾	58.48±0.44	13.97±0.42
PMO-3 ³⁾	39.25±0.61	9.10±0.19
Baekbokryung extract	13.53±0.36	5.03±0.06
Changchul extract	23.23±0.65	6.27±0.10
Sa-in extract	192.12±1.25	19.59±0.92

¹⁾Plants mixture (PM): Baekbokryung, Changchul and Sa-in extracts were mixed with same ratio (v/v).

²⁾PMO-1: PM and Wa-song extract were mixed with 1:1 (v/v) ratio.

³⁾PMO-3: PM and Wa-song extract were mixed with 1:3 (v/v) ratio.

Table 2. ABTS radical scavenging activity of the Wa-song and its composite (%)

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Wa-song extract	0.68 \pm 0.17 ^{aA}	7.15 \pm 0.08 ^{bA}	18.79 \pm 1.08 ^{cA}	70.64 \pm 0.29 ^{dA}
PM	7.44 \pm 0.81 ^{aB}	21.12 \pm 0.26 ^{bC}	38.46 \pm 0.55 ^{cB}	85.23 \pm 1.67 ^{dB}
PMO-1	6.81 \pm 0.69 ^{aB}	17.75 \pm 0.25 ^{bB}	51.52 \pm 1.89 ^{cC}	92.17 \pm 0.05 ^{dC}
PMO-3	12.04 \pm 0.612 ^{aC}	26.71 \pm 0.96 ^{bD}	38.37 \pm 1.11 ^{cB}	94.92 \pm 0.11 ^{dD}

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-D) are significantly different.

Table 3. DPPH radical scavenging activity of the Wa-song composite (%)

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Wa-song extract	9.88 \pm 1.44 ^{aA}	16.79 \pm 0.94 ^{bA}	30.21 \pm 0.94 ^{cA}	75.34 \pm 2.68 ^{dB}
PM	15.30 \pm 0.38 ^{aB}	35.88 \pm 0.25 ^{bC}	57.67 \pm 0.69 ^{cC}	84.71 \pm 0.36 ^{dC}
PMO-1	19.92 \pm 0.95 ^{aC}	37.21 \pm 0.07 ^{bD}	64.46 \pm 1.51 ^{dD}	73.59 \pm 1.19 ^{dB}
PMO-3	18.50 \pm 1.80 ^{aC}	27.04 \pm 0.48 ^{bB}	47.79 \pm 0.44 ^{cB}	69.13 \pm 1.41 ^{dA}

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-D) are significantly different.

84.71%로 와송 추출물이나 와송 복합물에 비해 유의적으로 활성이 높았다. 250~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 PMO-1이 다른 실험구에 비해 유의적으로 소거능이 높았으며, 더욱이 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 PMO-1은 PMO-3보다 유의적으로 소거능이 높아 ABTS 라디칼 소거능과 유사한 경향성을 보였다.

항산화 활성이 우수한 다수의 한약재 추출물의 혼합물에 대한 DPPH 라디칼 소거능이 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 74.2~81.9%, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 89.2~91.8%로 보고된 바 있는데(34), 이는 본 연구 결과와도 유사하며, 혼합물의 경우 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도는 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도보다 혼합물의 활성 차이를 비교할 수 있는 적정 농도인 것으로 생각된다. 또한 사인의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 IC_{50} 값은 162.5 $\mu\text{g/mL}$ 이나 백복령 및 창출은 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이상이었으므로 (결과 미제시), PM의 첨가비율이 높은 PMO-1의 라디칼 소거능은 사인에 의존적인 것으로 추정된다.

마늘과 홍삼의 혼합물에 대한 라디칼 소거능은 혼합 전에 비해 큰 폭으로 상승되었는데, 각 시료에 함유된 유효물질의 상대적인 양이 증가되었기 때문이라고 Shin 등(35)이 보고한 바 있다. 또, 약용식물류 추출물을 각각 2종씩 동량으로 혼합하여 항산화 활성을 측정된 결과, 혼합 전과 비교해 보아 대차를 보이지 않아 약용식물류 추출물의 혼합 시 생리활성의 안정화가 가능하다는 보고도 있다(36). 본 연구에서도 한약재의 혼합물이 와송 추출물에 첨가되었을 때 라디칼 소거능이 상승되는 것으로 보아, 상대적 유효물질의 함량

증가와 더불어 생리활성의 안정화를 유지함으로써 시너지 효과를 내는 것으로 추정된다.

와송 복합물의 환원력

한약재 및 와송 복합물의 환원력은 Table 4와 같다. 700 nm에서 측정된 시료액의 흡광도 값이 클수록 환원력이 높은 것으로 판단할 수 있는데, 와송 추출물의 환원력은 100~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 PM보다 유의적으로 낮았지만, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 비슷하였다. PMO-1의 환원력은 PMO-3에 비해 모든 농도에서 유의적으로 높았으며, 와송 복합물은 와송 추출물이나 PM에 비해 약 2배 정도 활성이 높았다. 더욱이 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 환원력은 라디칼 소거능과도 유사한 경향성을 보여 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 와송 복합물은 와송의 생리활성 증가를 위한 적정 농도인 것으로 사료된다.

환원력을 발휘하는 물질은 전자 공여체로 작용하며, 지질 과산화 과정에서 중간 생성물의 형성을 감소시켜 2차적인 항산화제 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(34). 월계수잎 추출물의 환원력은 수소공여능을 가지는 방향족 환화합물에 hydroxy기의 치환 정도에 의존적이며(37), 20여종의 약용식물류 물 추출물의 항산화능이 폴리페놀 화합물과 관련성이 높은 것으로 보고되어 있다(6). 와송 추출물의 환원력 또한 시료 중 총 페놀 화합물의 함량에 기인한다고 보고되어 있으나(20), 상기의 플라보노이드 및 총 페놀화합물의 상대적 함량은 한약재 복합물이 더 높았으므로 와송 복합물의 환원력은 한약재의 환원력에 더 의존적인 것으로 생각된다.

Table 4. Reducing power of the Wa-song and its composite (O.D. value, 700 nm)

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Wa-song extract	0.10 \pm 0.01 ^{aA}	0.14 \pm 0.01 ^{bA}	0.22 \pm 0.00 ^{cA}	0.70 \pm 0.02 ^{dA}
PM	0.15 \pm 0.00 ^{aB}	0.27 \pm 0.01 ^{bC}	0.41 \pm 0.00 ^{cC}	0.73 \pm 0.10 ^{dA}
PMO-1	0.19 \pm 0.00 ^{aC}	0.28 \pm 0.01 ^{bD}	0.48 \pm 0.01 ^{dD}	1.85 \pm 0.04 ^{dC}
PMO-3	0.15 \pm 0.00 ^{aB}	0.21 \pm 0.00 ^{bB}	0.34 \pm 0.01 ^{cB}	1.34 \pm 0.03 ^{dB}

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-D) are significantly different.

Table 5. Nitrite scavenging activity of the Wa-song and its composite

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Wa-song extract	2.68 \pm 1.02 ^{aA}	4.18 \pm 0.33 ^{bA}	11.32 \pm 0.69 ^{cA}	28.17 \pm 0.71 ^{dA}
PM	2.86 \pm 0.64 ^{aA}	7.18 \pm 0.65 ^{bB}	15.40 \pm 0.29 ^{cB}	35.02 \pm 0.43 ^{dB}
PMO-1	3.52 \pm 0.42 ^{aA}	10.57 \pm 0.86 ^{bC}	13.15 \pm 3.40 ^{bAB}	57.89 \pm 0.61 ^{cD}
PMO-3	5.07 \pm 0.49 ^{ab}	6.48 \pm 1.85 ^{ab}	9.81 \pm 1.42 ^{bA}	47.04 \pm 0.73 ^{cC}

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-D) are significantly different.

와송 복합물의 아질산염 소거능

PM 및 와송 복합물의 아질산염 소거능을 pH 2.5의 반응 조건에서 측정 한 결과는 Table 5와 같다. 250 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 PM은 와송 추출물에 비해 아질산염 소거능이 유의적으로 높았으며, 모든 농도에서 PMO-1이 PMO-3보다 유의적으로 높은 활성이었으나 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 그 차이가 적었다.

수중의 약용식물류가 혼합된 한약탕제의 아질산염 소거능은 pH 3.0 이하의 조건에서 약 70%인데 그 활성은 시료 중의 페놀 화합물에 기인된다고 보고된 바 있다(38). 또한 혈당저하와 관련된 천연물 복합제에 대한 아질산염 소거능도 pH 1.2의 조건에서 44.4~84.3%로 페놀 화합물이나 플라보노이드 함량이 높은 복합제에서 소거능이 높은 것으로 확인되었으며, 특히 플라보노이드 함량이 높은 복합제는 DPPH 라디칼 소거능도 우수하여 천연물 복합제의 아질산염 소거능이 총 페놀보다는 오히려 플라보노이드류의 함량에 대한 의존도가 높다고 보고되어 있다(39). 본 연구 결과 와송 복합물 중 PMO-1의 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 PMO-3보다 높은 것으로 볼 때 아질산염 소거능도 이들 물질과 관련된 것으로 사료된다. 따라서 아질산염이 생체 내 위장의 pH 조건에서 발암성 nitrosamine을 생성하는 전구물질로 작용하는 것을 고려해 본다면 와송 복합물은 아질산염 소거제로써의 생체 방어기능에도 유효할 것으로 생각된다.

와송 복합물의 tyrosinase 활성 저해능

와송 복합물의 tyrosinase 활성 저해능은 Table 6에 나타난 바와 같이, 와송 추출물의 tyrosinase 활성 저해능은 500 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 농도에서는 PM과 유의차가 없었으나 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 유의적으로 높았다. 와송 복합물은 PMO-3가 PMO-1에 비해 유의적으로 높은 저해능을 보여 와송의 함유량에 기인된 것으로 생각된다.

멜라닌 색소를 형성하는 효소인 tyrosinase는 생체 내 생화학적 산화에 의해 생성된 활성산소에 의해 피부 면역기능

을 억제시켜 피부 염증이거나 기미를 초래하게 되는데, tyrosinase 활성 저해능을 가진 식물에 의해 피부에서의 항산화능을 기대해 볼 수 있는 것으로 간주된다. 꿀꿀과의 허브류 식물은 총 페놀 및 플라보노이드 함량과 비례적으로 항산화능이 높았으며, 항산화능과 tyrosinase 활성 저해능 간에는 정(+)의 상관관계($r=0.863$)인 것으로 보고되어 있다(40). 약용식물류 중 와송의 tyrosinase 활성 저해능은 73.56%로 항산화능과도 비례적이었으며, 특히 모과는 항산화능 및 tyrosinase 활성 저해능이 모두 우수한데 그 유효물질 중 (-)-epicatechin이 주된 성분이라는 보고도 있다(41). 또한 여뀌과의 일년생 풀인 쪽꽃 추출물로부터 tyrosinase 활성 저해능에 유효한 플라보노이드 성분으로 quercetin 3-O-rhamnoside가 동정된 바 있다(42). 와송 중의 플라보노이드류로는 epigallocatechin-3-gallate, quercetin 3-O-rhamnosyl-7-O-glucoside 및 kaempferol이 동정된 바 있는데 (9), 와송 복합물의 tyrosinase 활성 저해능도 시료 중의 총 페놀 및 플라보노이드류에 기인된 결과라 사료된다.

와송 복합물의 암세포 생육 저해능

와송 추출물, PM 및 와송 복합물의 AGS, MCF-7 및 HT-29 세포에 대한 생육 저해능을 MTT assay로 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 PM에 대한 AGS 세포의 생육 저해능은 53.64%였으며, 그 외 실험구에서는 모두 50% 미만이었다. 와송 추출물은 각각 46.49%, 27.80% 및 24.50% (AGS, MCF-7 및 HT-29 세포)의 생육 저해능을 보여 PM이 와송 추출물보다 유의적으로 높은 활성이었다.

AGS 세포에 대한 생육 저해능은 와송 복합물과 와송 추출물간에 비슷하였다. MCF-7 세포의 생육 저해능은 와송 추출물에 비해 PM이 유의적으로 높았으나, 와송 복합물의 경우 와송의 함유량이 많은 PMO-3가 PMO-1에 비해 유의적으로 활성이 높아 와송 복합물의 암세포 생육 저해능이 와송에 기인된 것으로 추정된다. HT-29 세포의 생육 저해능은 와송 복합물이 와송 추출물이나 PM에 비해 유의적으로

Table 6. Inhibitory effect of tyrosinase activity in the Wa-song and its composite

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	250	500	1000
Wa-song extract	17.37 \pm 0.69 ^{aA}	20.28 \pm 0.59 ^{bA}	26.12 \pm 1.69 ^{cB}	37.21 \pm 1.16 ^{dBC}
PM	18.53 \pm 0.96 ^{aAB}	21.48 \pm 1.75 ^{bA}	23.64 \pm 1.49 ^{bA}	30.46 \pm 1.40 ^{cA}
PMO-1	18.97 \pm 0.49 ^{ab}	21.19 \pm 2.64 ^{aA}	27.17 \pm 0.47 ^{bB}	35.30 \pm 1.16 ^{cB}
PMO-3	19.21 \pm 0.96 ^{ab}	26.13 \pm 1.00 ^{bB}	30.82 \pm 0.94 ^{cC}	39.49 \pm 1.55 ^{dC}

Means with different superscripts in the same row (a-d) and column (A-C) are significantly different.

(%)

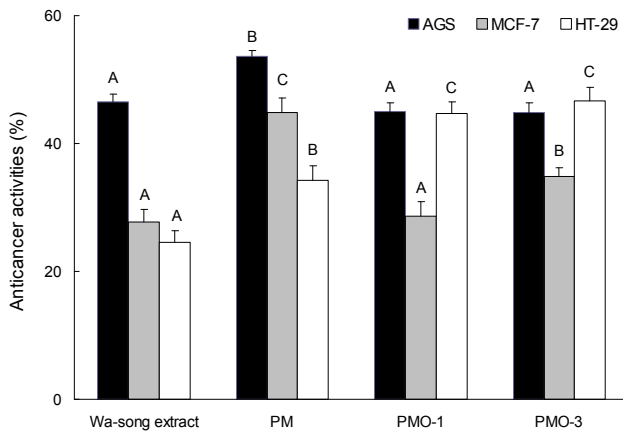


Fig. 1. Inhibitory activity of the Wa-song and its composite in human cancer cell growth. ^{A-C}Means with different superscripts in the different sample from the same cancer cell are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

높았으며, 와송 함유량에 따른 유의차는 보이지 않았다.

사인의 메탄올 추출물로부터 terpenoids, sesquiterpenes, 페놀 화합물 및 플라보노이드가 분리·동정된 바 있으며, 이들 물질은 인체 암세포에 대한 생육 저해능이 보고된 바 있다(43). 복령의 triterpenoids 성분도 폐암, 피부암 및 직장암 등의 암세포에 대한 생육 저해능이 높다고 보고되어 있다(44). 더욱이 항산화능을 지니는 폴리페놀 성분은 hydroxy기가 발암성을 갖는 유리기와 결합함으로써 발암성 물질을 불활성화시키기 때문에 항암활성에도 효과적인 것으로 보고되고 있다(45).

본 연구 결과 와송 복합물의 항산화 활성은 와송 추출물에 비해 유의적으로 높았으나, AGS 및 MCF 세포에 대해 생육 저해능은 오히려 와송 복합물의 활성이 다소 낮았다. 이러한 현상은 각 시료 추출물에는 여러 가지의 활성물질이 함께 존재하므로 이들의 상호작용과 반응기질에 대한 복합물의 반응 차이(6)인 것으로 추정된다. 이와 같이 여러 종류의 식물체가 혼합되었을 때 항산화능에 대한 결과의 해석에 한계점이 있으나(14) 우리 식생활의 대부분이 혼합 식품의 형태이며, 특히 한약재는 단일 재료의 사용보다는 복합처방이 많기 때문에 복합 처방 시 재료의 종류나 배합비율은 그 의미가 크다고 볼 수 있다. 그러나 *in vitro* 상의 생리활성 효과는 체내 생리활성의 상승으로 이어질 가능성이 높으므로 이들 복합물은 생체 방어시스템의 보강에 도움이 될 것으로 기대되어진다.

요 약

와송의 생리활성을 증대시킬 수 있는 복합물을 제조하기 위하여 와송 추출물, 한약재(백복령, 창출 및 사인)의 혼합물 및 한약재와 와송의 복합물(1:1, PMO-1; 1:3, PMO-3)의 항산화 및 암세포 생육 저해능을 비교하였다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 한약재 혼합물이 와송 추출물보다 많았

며, 와송 복합물에서는 PMO-1이 PMO-3보다 더 높았다. 라디칼 소거능, 환원력 및 아질산염 소거능은 PMO-1이 PMO-3보다 활성이 높았으며, tyrosinase 활성 저해능 및 MCF-7 및 HT-29 세포의 생육 저해능은 와송의 함유량이 많은 PMO-3의 활성이 더 높았다. 따라서 모든 생리활성 시험에서 와송 복합물이 와송 추출물이나 한약재 혼합물에 비해 유의적으로 활성이 높았으며, 와송 복합물은 와송 추출물의 생리활성의 상승에 효과적일 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업(106012-03-SB010)의 연구과제로 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kirkinezos IG, Moraes CT. 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial disease. *Semin Cell Dev Biol* 12: 449-457.
- Oh SI, Lee MS. 2003. Screening for antioxidative and antimutagenic capacities in seven common vegetables taken by Korean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1344-1350.
- Choe SY, Yang KH. 1982. Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J Food Sci Technol* 14: 283-288.
- Larson RA. 1988. The antioxidant of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969-978.
- Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7-14.
- 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.
- Nam SH, Kang MY. 2000. Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 141-147.
- Lee SJ, Cha JY, Shin JH, Chung MJ, Sung NJ. 2008. Antioxidant effect of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) extracts on edible oil and fat. *J Life Sci* 18: 1106-1114.
- Lee JH, Lee SJ, Park S, Kim HK, Jeong WY, Choi JY, Sung NJ, Lee WS, Lim CS, Kim GS, Shin SC. 2011. Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicus* A. Berger using HPLC-MS/MS: contribution to the overall antioxidant effect. *Food Chem* 124: 1627-1633.
- Jung HJ, Choi J, Nam JH, Park HJ. 2007. Antitumor effects of the flavonoid-rich fraction from the extract of *Orostachys japonicus* in mice. *J Med Food* 10: 702-706.
- Kang AS, Kang TS, Shon SM, Kang MS, Kim GP, Lee JS. 1999. Studies on improvement of artificial cultivation and antioxidative activity of *Poria cocos*. *Korean J Mycol* 27: 378-380.
- Kwon MS, Chung SK, Choi JU, Song KS, Lee IS. 1999. Antimicrobial and antitumor activity of triterpenoids fraction from *Poria cocos* Wolf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1029-1033.
- Kim DG, Son DH, Choi UK, Cho YS, Kim SM. 2002. The

- antioxidant ability and nitrite scavenging ability of *Poria cocos*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1097-1101.
14. Kwak CS, Kim MY, Lee MS. 2005. Antioxidative effect of plant food mixtures in rat fed on high fat-high cholesterol diet. *Korean J Nutr* 38: 352-363.
 15. Park BH, Park JW. 2001. The protective effect of *Amomum xanthoides* extract against alloxan-induced diabetes through the suppression of NF kappa B activation. *Exp Mol Med* 33: 64-68.
 16. Rho HW, Lee JN, Koo BS, Zhao ZL, Park JW, Kim HR. 2002. Therapeutic effect of *Amomum xanthoides* extract on experimental diabetes induced by alloxan. *Korean Diabetes J* 26: 126-133.
 17. Cho HS, Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Cho HS, Lee HJ, Sung NJ. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging effect of the composites containing medicinal plant extract. *J Life Sci* 17: 1135-1140.
 18. Cho HS, Shin JH, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ. 2007. Lipid compositions changes of seasoned pork prepared with medicinal plant extracts during storage. *J Life Sci* 17: 1675-1681.
 19. Park KJ, Jin HS, Park SH, Kim EH, Kim JK. 2008. Antihyperglycemia effect of medicinal plants mixture in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1554-1559.
 20. Lee SJ, Seo JK, Shin JH, Lee HJ, Sung NJ. 2008. Antioxidant activity of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) according to drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 605-611.
 21. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
 22. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
 23. Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26: 1231-1237.
 24. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 25. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr* 44: 307-315.
 26. Kim DS, Ahn BW, Yeum DM, Lee DW, Kim ST, Park YH. 1987. Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. *Bull Korean Fish Soc* 20: 463-468.
 27. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med* 3981: 517-519.
 28. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65: 55-63.
 29. 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.
 30. Lee SJ, Song EJ, Lee SY, Kim KBWR, Kim SJ, Yoon SY, Lee CJ, Ahn DH. 2009. Antioxidant activity of leaf, stem and root extracts from *Orostachys japonicus* and their heat and pH stabilities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1571-1579.
 31. Wasser SP, Ewis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* 19: 65-96.
 32. Heo HJ, Kim YJ, Chung D, Kim DO. 2007. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chem* 104: 87-92.
 33. Kim JP, Chon IJ, Cho HK, Ham IH, Whang WK. 2004. The antioxidant and the antidiabetic effects of ethanol extract from biofunctional foods prescriptions. *Kor J Pharmacogn* 35: 98-103.
 34. Yen GC, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 43: 27-32.
 35. Shin JH, Kang MJ, Lee SJ, Yang SM, Rue GH, Sung NJ. 2009. Biological activities of dried garlic, red ginseng and their mixture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1633-1639.
 36. Kim KD. 2007. Research of efficacy & stability about mixed medicinal plants extracts. *J Kor Soc Cosm* 13: 601-608.
 37. Devi SL, Kannappan S, Anuradha CV. 2007. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of Indian bay leaf, *Cinnamomum tamala* (Buch.-Ham) T. Nees & Eberm using rat brain synaptosomes as model system. *Indian J Exp Biol* 45: 778-784.
 38. Lee KA, Chung HY. 2004. Biological activities a Korean traditional prescription, *Nogyongdaebotang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 28-33.
 39. Kim JO, Kim JB, Kim HY. 2009. Anti-oxidative activity of the herb mixture prescribed to induce blood glucose level and effect on the differentiation of 3T3-L1 fibroblast. *Korean J Food Preserv* 16: 115-121.
 40. Jang KH, Park HW, Lee DJ. 2011. Evaluation of antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities in Labiate herb plants. *Korean J Intl Agri* 23: 81-88.
 41. Cha BC. 2011. Tyrosinase, hyaluronidase inhibitory effect and antioxidant activity of medicinal plants. *Kor J Pharmacogn* 42: 89-97.
 42. Woo YM, Kim AJ, Kim J, Lee CH. 2011. Tyrosinase inhibitory compounds isolated from *Persicaria tinctoria* flower. *J Appl Biol Chem* 54: 47-50.
 43. Choi JW, Kim KH, Lee IK, Choi SU, Lee KR. 2009. Phytochemical constituents of *Amomum xanthioides*. *Nat Prod Sci* 15: 44-49.
 44. Kwon MS, Chung SK, Choi JU, Song KS, Lee IS. 1999. Antimicrobial and antitumor activity of triterpenoids fraction from *Poria cocos* Wolf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1029-1033.
 45. Ryu BH, Park CO. 1997. Antioxidant effect of green tea extracts on enzymatic activities of hairless mice skin induced by ultraviolet B light. *Korean J Food Sci Technol* 29: 355-361.

(2011년 12월 2일 접수; 2012년 1월 16일 채택)