

길경, 황기와 오미자 혼합추출물의 NO 억제활성과 Hyaluronidase 억제활성 효과

강창호 · 곽대영 · 소재성[†]
인하대학교 생물공학과

Inhibition of Nitric Oxide Production and Hyaluronidase Activities from the Combined Extracts of *Platycodon grandiflorum*, *Astragalus membranaceus*, and *Schisandra chinensis*

Chang-Ho Kang, Dae Young Kwak, and Jae-Seong So[†]

Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Abstract

In this study, the optimal extraction conditions for three medicinal herbs as functional sources against inflammatory and arthritic diseases were developed. Traditional medicinal herbs were screened for their inhibition of hyaluronidase (HAse) activity and nitric oxide (NO) synthesis. For the screening of anti-inflammatory properties, ethanolic extracts of 53 species of traditional medicinal herb were examined. We confirmed that *Astragalus membranaceus* (A.R.), *Schisandra chinensis* (S.F.), and *Platycodon grandiflorum* (P.G.) inhibit NO production. For extraction from all three herbs simultaneously, an ethanol concentration of 95%, a 1:2:1 mixture ratio, and at 50 rpm mixing speed, for over 12 h and at 30°C was the best condition for optimal extract yield and NO inhibition effects. HAse inhibition from the three herb extraction was three fold higher than single samples. The ethanol extracts were fractionated with various solvents (*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, and water). The ethyl acetate-soluble fraction of the herb mixture showed the highest extract yield (13%) and NO inhibition effects (73%). In conclusion, this study provides experimental evidence that a mixture of P.G., A.R., and S.F. could be used as a source of antioxidant ingredients in the food industry.

Key words: inflammation, hyaluronidase, nitric oxide, traditional herb

서 론

염증반응(inflammation)은 외부의 물리적인 상해 또는 미생물의 체내 감염으로부터 신체를 보호하기 위한 비 특이적인 방어작용이다. 이원자 자유 라디칼인 nitric oxide(NO)는 염증반응의 대표적인 매개체이다. NO는 생체 내에서 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유라디칼이다(1). NO는 생리적인 현상인 혈압조절과 신경전달 매개체로 작용하며, 혈액응고 및 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(2-4). 그러나 NO가 필요 이상으로 생성이 되면 염증 반응을 일으키고 조직의 파괴 및 면역 체계의 이상을 나타낸다. NO는 염증반응의 매개체로 시간이 지나면 nitrite(NO₂), nitrate(NO₃) 등의 안정한 화합물로 존재하게 되며, 이 과정에서 형성되는 peroxynitrite anion(ONOO⁻)이 염증을 일으키게 되며 세포 내 독소작용을 야기하여 조직의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(5,6).

Hyaluronic acid(HA)는 D-glucuronic acid와 N-acetyl-D-glucosamine이 반복해서 연결된 직선상의 고분자 다

당류로서 태반, 피부, 눈의 유리체, 활막액, 연골 등에 존재하며, 특히 세포의 분화와 성장에 관여하는 extracellular matrix의 주요한 구성 성분으로 세포의 분화 및 증식에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(7). Hyaluronidase(HAse)는 일반적으로 불활성 형태로 체내 리소좀 등에 존재하지만, 신체적 상해를 입었거나 류마티즘과 같은 염증 질환이 발생하였을 경우 활성화 되어 혈관계 투과성 및 염증반응에 관여하기 때문에 염증 유발 물질로 알려져 있으며, 알레르기 반응과 암세포 전이에도 관한다는 보고가 있다(8,9). 항염증 약물로 이용되고 있는 indomethacin, aspirin 등은 HAse에 대하여 강한 저해 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(10-12). 따라서 NO와 HAse 저해 활성 물질을 탐색하는 것은 항알레르기 및 항염증 약물의 개발 방법 중 하나로 이용되고 있다.

본 연구는 천연 식물 자원으로부터 항염증, 항산화 및 항관절염에 활성을 갖는 유용한 물질을 검색하기 위해 53가지의 국내산 약용 생약재를 선정하여 NO 억제활성을 조사하였으며, 단독으로 사용하기보다 유효성분의 상승효과를 알아보기 위하여 NO 억제활성이 뛰어난 생약재들의 혼합 추출조건을 최적화하고, 이에 대한 HAse의 억제활성 여부를

[†]Corresponding author. E-mail: sjaeseon@inha.ac.kr
Phone: 82-32-860-8666, Fax: 82-32-872-4046

비교해보았다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에 사용한 53가지의 생약재는 서울경동시장 약재도매 상가에서 원산지를 확인한 후 구입하였으며, 모든 원료는 건조 및 마쇄한 시료 3 g에 발효주정(95% EtOH, 진로주정, Ansan, Korea) 100 mL를 가하여 실온에서 24시간 동안 방치한 후 여과하고, 다시 잔사에 발효주정을 가하여 침지한 후 여과하는 과정을 3회 반복하여 실행하였다. 얻은 추출액은 45°C 수욕상에서 감압 농축한 후 건조하여 냉장 보관하며 본 실험에 사용하였다(Table 1). 사용된 시약으로 fetal bovine serum(FBS)은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 Gibco(Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 사용 기기로는 마쇄한 생약재를 입자의 크기 별로 나누기 위하여 standard sieve(CHUNG GYE, Seoul)를 사용하였고, 추출된 시료의 농축에는 rotary vacuum evaporator(EYELA Ltd., Kyoto, Japan)를 사용하였다. 흡광도 측정에는 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

세포배양

Macrophage RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% FBS, penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

NO 생성 저해 효과 측정

시료의 NO 생성 저해 활성은 nitrite assay(13)를 사용하여 측정하였다. NO 합성의 indicator로 사용되는 NO₂ 농도는 griess reagent(1% sulfonic acid, 0.1% N-1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)를 이용하여 배양배지에서 측정하였다. 세포배양액 100 µL를 동량의 griess reagent와 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 546 nm에서 microplate reader로 측정하였다. 모든 실험에서 fresh culture medium을 blank로 사용하였다.

Hyaluronidase 저해 활성 측정

HAse 저해 활성은 Elson-Morgan법(14)을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. HA가 HAse에 의해 분해되어 생성되는 N-acetylglucosamine의 양을 0.1 M acetate buffer 시약으로 발색시킨 후 microplate reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군과 비교하여 저해율을 계산하였다. 우선 microplate에 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 HAse 3 µL(in 23 units)와 0.1 M acetate buffer(pH 3.5, 5% DMSO)에 녹인 생약 시료 용액 6 µL를 각각의 well에 넣고 37°C에서 20분간 배양하였다. 배양한 후 각 well에

HAse activator로 12.5 mM calcium chloride 6 µL를 가한 후 다시 37°C에서 20분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 각각의 혼합용액에 기질로서 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 HA(12 mg/mL) 15 µL를 넣고 37°C에서 40분간 배양한 후, 효소반응을 중지시키기 위해 0.4 N NaOH 6 µL 및 0.4 M potassium tetraborate 6 µL를 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕상에서 가열하여 완전히 냉각시켰다. 반응물에 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl(DMAB, p-dimethyl-aminobenzaldehyde 0.4 g, acetic acid 35 mL 및 10 N HCl 용액 5 mL 혼합액) 180 µL를 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, HAse 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

Ac: A₅₉₅ of the control

As: A₅₉₅ of the sample

Ac와 As는 각각 대조군과 실험군의 흡광도를 나타내며, 시료 대신 0.1 M acetate buffer(pH 3.5, 5% DMSO)를 첨가하여 처리한 것을 대조군으로 하였다.

추출조건

단일생약재: 각각의 단일 생약재에 대한 수율과 NO 억제 활성의 효과를 확인하기 위해 다음의 실험조건을 바탕으로 추출조건 최적화 실험을 실시하였다. 최초의 추출조건인 not grinded, 95% EtOH, 24시간, 실온의 조건을 기준으로 용매의 농도, 추출 온도, 추출 시간, 입자의 크기 4가지 각각의 조건에 대해서 수율과 NO 억제활성 효과를 확인하였다. 추출용매인 주정의 농도는 5가지 조건(0, 12.5, 25, 50, 95%)으로, 추출 온도는 20~60°C까지 10°C 간격으로 5구간으로 각각 분리하여 수율과 NO 억제활성을 측정하였다. 추출 시간은 6~36시간까지 6시간 간격으로 6구간으로 분리하고, 입자의 크기는 standard sieve를 사용하여 not grinded, <0.85, 0.85~2, 2~3.36, >3.36 mm로 5구간으로 분리하여 수율과 NO 억제활성을 각각 측정하여 단일 생약재 별 각각의 최적화된 추출조건을 확인하였다.

혼합생약재: 단일 생약재의 혼합비율을(황기: 오미자: 길경) 각각 1:1:1, 1:2:1, 1:1:2, 2:1:1, 2:2:1 비율의 5구간으로 혼합하여 분석한 후, 최적의 혼합비율인 1:2:1로 혼합된 생약재를 실험재료로 사용하였다. 1:2:1로 혼합된 생약재는 용매의 농도, 추출 온도, 추출 시간, 입자의 크기 4가지 조건에 대해서는 각각의 조건별로 단일생약재의 추출조건과 동일하게 실시하였으며, 수율과 NO 억제활성 효과를 확인하였다. 또한 혼합 속도는 0, 50, 100, 150, 200 rpm의 5구간으로, 용매 분획별로는 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol 순으로 분리하여 각각의 조건별로 수율과 NO 억제활성을 측정하여 비교하였다.

통계처리
모든 실험은 3반복으로 측정하여 측정치를 평균값±표준
편차로 나타내었으며, 실험결과의 통계적 유의성은 Minitab

program(Minitab 16, Minitab Inc., State College, PA,
USA) one-way 분산분석(ANOVA)의 Turkey HSD test에
의해 시료간의 유의적 차이(p<0.05)를 검정하였다.

Table 1. List of medicinal herb with anti-inflammatory and/or anti-allergic effect

Scientific name	Used part	Yield (%)	NO inhibition ¹⁾	HAse inhibition ²⁾
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i> Seem.	Rhizome	4.1	42.3	19.6±1.7
<i>Achyranthes japonica</i> Nakai	Radix	7.5	25.1	18.2±0.4
<i>Angelica gigas</i> Nakai	Radix	14.9	— ³⁾	18.0±1.5
<i>Angelica koreana</i> Max.	Root	43.0	27.6	—
<i>Aralia cordata</i> Thunberg	Radix	6.4	86.0	—
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	Root	4.6	40.2	67.2±0.7
<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.	Rhizome	7.7	34.7	—
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	Fruit	10.0	33.0	—
<i>Celosia argentea</i> L.	Seed	6.6	17.7	—
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	Fruit	15.4	57.0	37.6±1.5
<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>latilobum</i>	Leaf	4.6	89.4	—
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	Root	3.1	40.7	—
<i>Clematis mandshurica</i> Rupr	Root	18.4	28.6	—
<i>Cornus officinalis</i> Sieb.et Zucc	Fruit	28.9	26.8	—
<i>Coix lacryma-jobi</i> L. var. <i>ma-yuen</i> Stapf	Seed	2.5	39.9	—
<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	Fruit	28.6	4.5	—
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Seed	20.0	28.4	—
<i>Dendrobium moniliforme</i>	Stem	5.0	24.1	—
<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz	Radix	16.9	38.1	—
<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne	Radix	0.5	—	—
<i>Solanum melongena</i> L.	Fruit	3.0	21.5	—
<i>Erycibe obtusifolia</i> Benth	Cortex	5.5	35.5	—
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Cortex	4.5	54.3	—
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis var. <i>grandiflora</i> Nakai	Fruit	35.9	21.9	—
<i>Gentiana scabra</i> Bunge var. <i>burgeri</i>	Root	44.0	50.4	—
<i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.	Root	10.3	9.6	33.3±1.5
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	Radix	10.3	45.1	—
<i>Poria cocos</i> Wolf	Wolf	6.3	2.6	—
<i>Kalopanax pictus</i> Nakai	Cortex	3.3	-19.3	16.9±1.2
<i>Ledebouriella seseloides</i> Wolff.	Root	3.3	43.9	—
<i>Ligustrum lucidum</i> Aiton	Fruit	39.3	35.1	—
<i>Perilla frutescens</i>	Leaf	4.6	73.4	—
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	Flower	58.4	—	—
<i>Loranthus parasiticus</i> Merr.	Cortex	15.1	34.8	—
<i>Lycium chinense</i> Mill	Fruit	8.7	23.4	—
<i>Taraxacum platycarpum</i>	Radix	12.1	—	—
<i>Morus alba</i> L.	Stem	7.4	39.9	—
<i>Paeonia obovata</i> Maxim.	Leaf	15.9	—	35.7
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	Radix	4.0	17.3	42.4±3.1
<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	Cortex	13.6	14.5	—
<i>Pinellia ternata</i> Thunb. Breit	Tuber	6.3	43.3	8.9±2.4
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	Radix	17.0	14.5	—
<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.	Radix	1.5	84.7	—
<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth.	Root	12.9	-13.0	15.7±0.8
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov	Cortex	9.9	52.8	—
<i>Rehmannia glutinosa</i> var. <i>purpurea</i>	Radix	4.3	6.5	—
<i>Schisandra chinensis</i> Baill.	Fruit	27.4	15.1	50.6±2.2
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Radix	3.3	36.2	64.7±0.7
<i>Siegesbeckia glabrescens</i> Makino	Leaf	26.8	39.0	—
<i>Smilax glabra</i> Roxb.	Rhizome	2.4	39.2	—
<i>Sophora flavescens</i> Ait.	Radix	1.0	29.8	—
<i>Tetrapanax papyriferus</i> K. Koch	Stem	6.3	34.0	—
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Radix	6.3	29.9	—

¹⁾NO inhibition was represented as % against control 0.1 M acetate buffer (pH 3.5, 5% DMSO): Inhibition effect (%)={ (Ac - As) / Ac } × 100 ± SD.

²⁾Hyaluronidase inhibition was represented as % against control 0.1 M acetate buffer (pH 3.5, 5% DMSO): Inhibition effect (%) = { (Ac - As) / Ac } × 100 ± SD.

³⁾No effect.

결과 및 고찰

발효주정 추출물의 수율

발효주정은 인체 유해성이 낮고 수용성과 지용성 물질을 용해시킬 수 있어, 에탄올을 사용했던 기존(15,16)의 결과가 발효주정의 사용 시에도 유효한가를 알아보기 위하여 생약재에 대해서 에탄올과 발효주정을 사용한 추출물의 수율과 NO 억제 활성을 비교하였다. 그 결과 각각의 수율과 NO 억제 활성이 0.5% 이내의 차이를 보여서 이후의 실험에서는 추출용매를 발효주정으로 하였다(data not shown). 발효주정 추출물의 중량을 측정하기 위하여 동결건조 후 각 시료의 수율을 구하였다(Table 1). 강활, 초용담, 금은화 등은 각각 43.0%, 44.0%, 58.4%로 가장 높았으며, 산수유, 산사, 향부자, 여정자, 황금, 희침 등도 20% 이상의 높은 수율을 보였다.

NO 억제 활성과 hyaluronidase 저해 활성 탐색

53가지의 한약재 추출물에 대하여 NO 억제 활성을 검색한 결과 구절초, 독활, 길경, 차즈기잎 등이 각각 89.4%, 86.0%, 84.7%, 73.4%로 높은 활성을 나타내었다(Table 1). 본 실험결과와 Kim(7)의 연구결과에서도 NO 억제 활성이 명확하다고 알려진 길경(P.G.)을 실험 대상으로 1차 선정하였다. HAse 억제 활성을 검색한 결과 황기, 오미자, 황금 등이 각각 67.2%, 50.6%, 64.7%로 높은 활성을 나타내었으며, 모

과, 인삼, 백작약 등은 30% 이상의 활성을 보였고, 오가피, 우슬, 석창포, 당귀, 해동피, 갈근, 복분자 등도 10% 이상의 활성을 나타내었다(Table 1). 이들 중 수율과 HAse 저해 활성을 고려하여 황기(15)와 오미자를 실험 대상으로 2차 선정하였다. Kim 등(17)의 연구결과에 따르면, 황기의 MeOH 및 EtOAc의 분획에서 염증이거나 산화적 스트레스와 관련된 COX-2에 대해서 억제효과가 있다고 알려져 있다. Choi 등(16)의 연구결과에 따르면, 오미자의 ethanol 추출이 HAse에 대해서 50% 이상의 저해활성을 나타내었다.

단일 생약재의 추출조건에 따른 NO 억제활성 효과

각각의 추출조건에 따른 NO 억제활성 결과는 Table 2와 같다. 최적조건을 보면 입자 크기에서는 황기는 <0.85~2 mm, 오미자는 <2 mm에서 NO 억제활성이 가장 효과적이었으며, 길경은 입자크기의 영향을 받지 않았다. 주정 농도는 황기가 0%, 오미자와 길경은 95%에서 추출한 시료가 NO 억제활성이 가장 효과적이었다. 추출 시간은 황기는 6~30 시간, 오미자는 6시간, 길경은 24~36시간에서 추출한 시료가 가장 효과적인 결과를 보였다. 추출온도는 황기는 30°C, 오미자는 20~30°C에서 추출한 시료가 가장 효과적이었으며, 길경은 추출온도의 영향을 받지 않았다. NO 억제활성 효과에 대한 각각의 최적 조건을 보면, 황기는 <0.85~2 mm, 0%, 6~30시간, 30°C, 오미자는 <2 mm, 95%, 6시간, 20~30

Table 2. Extraction yields and inhibition activities on NO synthesis in LPS-induced Raw 264.7 cell of each *Astragalus membranaceus* (A.R.), *Schisandra chinensis* (S.F.), and *Platycodon grandiflorum* (P.G.) ethanol extracts according to the various reaction conditions (%)

		Yield			NO inhibition activity		
		A.R.	S.F.	P.G.	A.R.	S.F.	P.G.
Particle size (mm)	Not grinded	7.53±0.45 ^{1)a}	18.87±0.32 ^c	1.17±0.25 ^a	56.83±0.38 ^c	88.30±0.26 ^a	87.70±1.82 ^a
	<0.85	8.23±0.23 ^a	37.9±0.35 ^b	1.43±0.16 ^a	74.30±0.26 ^a	87.00±0.46 ^a	89.87±0.32 ^a
	0.85~2	8.13±0.32 ^a	37.3±0.26 ^b	1.40±0.00 ^a	74.10±0.53 ^a	86.50±0.50 ^a	88.97±0.50 ^a
	2~3.36	7.67±0.30 ^a	36.77±0.32 ^b	1.00±0.20 ^{ab}	63.07±0.49 ^b	79.93±0.51 ^b	89.33±0.31 ^a
	>3.36	7.57±0.06 ^a	43.3±1.74 ^a	0.53±0.15 ^b	62.80±0.26 ^b	66.23±3.27 ^c	89.07±0.81 ^a
Ethanol concentration (%)	0	26.63±0.21 ^a	56.80±0.61 ^{ab}	42.03±0.57 ^b	58.47±1.40 ^a	21.00±0.20 ^b	56.83±1.76 ^b
	12.5	28.77±1.16 ^a	54.97±0.84 ^{bc}	41.37±1.12 ^b	55.00±0.26 ^b	20.40±0.36 ^b	55.53±0.90 ^b
	25	27.63±0.25 ^a	54.63±0.55 ^c	45.83±1.16 ^a	49.27±1.19 ^c	18.37±0.76 ^c	18.03±0.21 ^d
	50	23.30±0.70 ^b	57.57±0.38 ^a	39.27±0.32 ^b	7.90±0.26 ^c	20.93±0.38 ^b	46.87±0.23 ^c
	95	6.27±0.61 ^c	42.63±0.32 ^d	4.40±0.61 ^c	42.03±0.55 ^d	61.00±0.44 ^a	64.03±0.21 ^a
Extraction temperature (°C)	20	20.60±0.66 ^a	42.50±0.56 ^b	39.90±0.17 ^b	57.73±0.42 ^{ab}	41.93±0.15 ^a	57.67±0.31 ^a
	30	23.83±0.32 ^a	43.20±0.26 ^{ab}	40.83±0.23 ^{ab}	60.10±0.35 ^a	41.93±0.12 ^a	60.17±0.31 ^a
	40	23.80±0.17 ^a	43.77±0.21 ^a	41.10±0.10 ^{ab}	56.73±1.88 ^b	40.50±0.70 ^{ab}	58.97±1.71 ^a
	50	23.73±0.32 ^a	42.83±0.06 ^{ab}	41.20±0.30 ^a	57.70±0.26 ^{ab}	40.20±0.46 ^b	58.30±0.70 ^a
	60	23.83±0.38 ^a	42.83±0.38 ^{ab}	40.56±0.67 ^{ab}	56.70±0.17 ^b	40.60±0.62 ^{ab}	58.67±0.42 ^a
Extraction time (h)	6	22.47±0.55 ^a	24.43±0.49 ^c	48.33±0.21 ^b	57.33±2.04 ^a	54.30±1.06 ^a	11.43±0.90 ^d
	12	22.07±1.42 ^a	29.83±1.52 ^d	49.27±1.19 ^b	58.57±1.19 ^a	47.30±1.39 ^b	50.80±0.95 ^{bc}
	18	20.87±0.21 ^a	36.93±0.55 ^{bc}	56.80±0.89 ^a	59.33±0.98 ^a	43.57±0.51 ^{bc}	56.43±1.55 ^{ab}
	24	21.83±1.67 ^a	38.50±0.46 ^b	49.93±0.15 ^b	56.73±1.88 ^a	42.37±1.31 ^c	58.17±3.00 ^a
	30	21.70±1.59 ^a	42.97±1.33 ^a	50.60±0.46 ^b	58.57±1.19 ^a	9.03±1.50 ^d	60.77±2.05 ^a
	36	21.90±1.57 ^a	33.97±0.32 ^c	50.93±1.03 ^b	49.27±1.19 ^b	9.77±0.85 ^d	58.43±1.20 ^a
	42	22.80±1.30 ^a	35.47±0.12 ^c	43.20±0.46 ^c	45.83±1.16 ^b	- ²⁾	46.93±2.31 ^c
	48	20.90±0.26 ^a	36.13±0.93 ^{bc}	42.47±1.46 ^c	23.80±0.17 ^c	-	58.23±0.67 ^a

¹⁾Values are expressed as mean±SD (n=3).

²⁾No effect.

^{a-d}Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Turkey HSD test.

Table 3. Extraction yields and inhibition activities against nitric oxide synthesis on RAW 264.7 cell of the herb medicine mixture extracts according to the various reaction conditions (%)

		Mixture	
		Yield	NO inhibition activity
Mixture ratio (A.R. : S.F. : P.G.)	1:1:1	41.60 ± 0.56 ^{1) b}	47.43 ± 0.49 ^a
	1:2:1	42.90 ± 0.35 ^{ab}	47.33 ± 0.86 ^a
	1:1:2	43.93 ± 0.06 ^a	39.83 ± 0.15 ^d
	2:1:1	38.47 ± 0.65 ^c	45.53 ± 0.45 ^{ab}
	2:2:1	41.53 ± 0.47 ^b	43.00 ± 0.35 ^c
Ethanol concentration (%)	0	28.13 ± 0.55 ^c	39.70 ± 0.20 ^d
	12.5	38.07 ± 1.22 ^a	51.93 ± 0.21 ^b
	25	33.83 ± 0.38 ^b	46.17 ± 0.21 ^c
	50	24.40 ± 0.26 ^d	37.87 ± 0.15 ^e
	95	3.93 ± 0.21 ^e	71.63 ± 0.47 ^a
Extraction time (h)	3	29.40 ± 0.44 ^f	28.50 ± 0.44 ^d
	6	32.70 ± 0.36 ^e	39.83 ± 0.31 ^{bc}
	9	38.00 ± 0.10 ^d	40.87 ± 0.21 ^{ab}
	12	41.00 ± 0.20 ^{bc}	41.87 ± 0.21 ^a
	15	41.87 ± 0.12 ^{ab}	39.60 ± 0.36 ^{bc}
	18	40.50 ± 0.50 ^c	40.37 ± 0.32 ^{bc}
	21	42.10 ± 0.20 ^a	39.23 ± 0.67 ^c
	24	41.87 ± 0.06 ^{ab}	40.03 ± 0.50 ^{bc}
Extraction temperature (°C)	20	42.07 ± 0.31 ^c	47.97 ± 0.15 ^b
	30	45.17 ± 0.31 ^{ab}	50.90 ± 0.36 ^a
	40	45.07 ± 0.38 ^{ab}	48.43 ± 1.40 ^{ab}
	50	45.97 ± 0.15 ^a	49.57 ± 0.68 ^{ab}
	60	45.00 ± 0.10 ^b	42.93 ± 0.15 ^c
Shaking speed (rpm)	0	42.00 ± 0.10 ^b	47.93 ± 0.86 ^a
	50	44.07 ± 1.12 ^{ab}	50.03 ± 0.60 ^a
	100	43.93 ± 0.15 ^{ab}	49.07 ± 0.15 ^a
	150	44.97 ± 0.15 ^a	49.67 ± 0.67 ^a
	200	45.27 ± 0.72 ^a	44.80 ± 0.44 ^b
Solvent fraction	Hexane	8.27 ± 0.23 ^c	34.97 ± 0.90 ^d
	Chloroform	2.00 ± 0.10 ^e	27.00 ± 0.10 ^e
	Ethyl acetate	13.23 ± 0.23 ^a	72.90 ± 2.69 ^a
	<i>n</i> -Butanol	3.93 ± 0.06 ^d	55.03 ± 0.38 ^b
	Water	9.73 ± 0.46 ^b	47.93 ± 0.12 ^c

¹⁾ Values are expressed as means ± SD (n=3).

^{a-e} Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Turkey HSD test.

°C, 길경은 95%, 24~36시간에서 추출한 시료가 가장 효과적이었다. 길경의 함유성분으로는 platycodigenin, polygalactic acid 등 oleanane계 triterpene을 aglycone으로 한 20여 종의 사포닌 1~4% 정도 함유되어 있으며 이들 사포닌 성분들은 길경 추출물이 보여주는 다양한 약리작용을 나타내는 활성성분으로 보고되어져 있다(18-21).

혼합 생약재의 추출조건에 따른 NO 억제활성과 hyaluronidase 저해활성 효과

혼합 생약재의 각각의 조건에 따른 수율과 NO 억제 활성을 실험한 결과는 Table 3과 같다. 수율과 NO 억제 활성의 효과를 보면, 황기, 오미자, 길경을 각각 1:2:1로 혼합하여 추출한 시료가 가장 효과적인 것으로 확인되었다. 1:2:1 비율로 혼합한 생약재를 각각의 조건을 실험한 결과, 주정 농도는 95%, 추출 시간은 12시간, 추출 온도는 30°C, 혼합속도는 50 rpm, 추출 용매는 ethyl acetate에서 가장 효과적인 결과

를 보였다. 각각의 생약재와 혼합한 생약재의 발효주정 추출물에 대하여 HAse 저해 활성을 실험한 결과 1 g의 생약재로부터 최초의 추출조건(not grinded, 95% EtOH, 24시간, 실

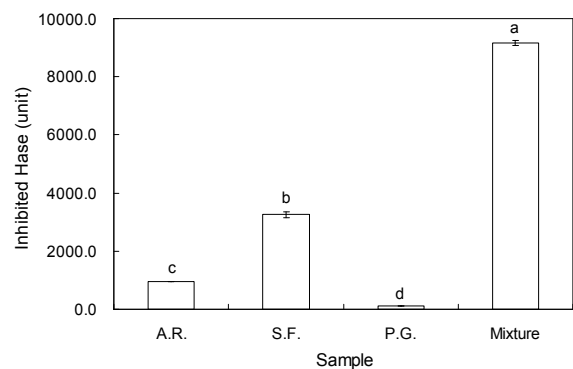


Fig. 1. Hyaluronidase inhibitory effect of ethanol extracts from 1 g of *Astragalus membranaceus* (A.R.), *Schisandra chinensis* (S.F.), *Platycodon grandiflorum* (P.G.) and mixture.

은, 0 rpm)으로 얻어진 시료에서 황기는 719.1 unit, 오미자는 3,503.0 unit, 길경은 143.3 unit의 HAse 억제 활성을 보였고 최적 추출조건(1:2:1, 12시간, 30°C, 50 rpm, ethyl acetate)으로 얻어진 혼합 추출물의 경우 9,305.8 unit의 HAse 저해 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

요 약

본 연구에서는 천연식물자원으로부터 항염증, 항산화 및 항관절염에 활성을 갖는 유용한 물질을 검색하기 위해 문헌 조사 및 기존의 연구결과를 통하여 선정된 53가지의 생약제로부터 NO와 HAse(hyaluronidase)의 억제활성 여부를 측정하였다. 측정 결과 억제효과가 우수하다고 확인된 황기(*Astragalus membranaceus*)와 오미자(*Schisandra chinensis*), 길경(*Platycodon grandiflorum*)을 최종 시료로 선정하였고, 이를 단독으로 사용하기보다는 유효성분의 항염증 및 항산화 효능에 대한 상승효과를 알아보기 위하여 혼합추출물의 최적조건을 확인하였다. 각 소재들을 1:2:1로 혼합한 혼합추출물에서 다양한 추출조건에 따라 단일 생약제 추출물에 비해 2배에서 4배까지의 수율 증가를 보였으며, NO 억제활성 효과도 증가한 것을 확인할 수 있었다. 수율과 NO 억제활성을 고려할 경우 혼합추출물의 최적 추출 조건은 황기, 오미자, 길경의 혼합비율 1:2:1, 추출시간 12시간, 추출온도 30°C, 혼합 속도 50 rpm, 추출용매로 ethyl acetate이었다. 위의 최적 조건을 적용한 혼합추출물은 HAse 저해 활성 실험에서 최초 추출물(not grinded, 95% EtOH, 24시간, 실온, 0 rpm)보다 약 16% 정도의 저해 상승효과가 나타났다. 이는 길경과 황기, 오미자의 상승작용 때문으로 사료된다. 이를 통해 황기와 오미자, 길경의 혼합추출물이 항염증, 항산화 및 항관절염에 활성을 갖는 유용한 물질로 사용 가능할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 인하대학교의 지원에 의해 이루어진 연구이며 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee HJ, Kim NY, Jang MK, Son HJ, Kim KM, Sohn DH, Lee SH, Ryu JH. 1999. A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF-α in LPS-activated macrophages. *Planta Med* 65: 104-108.
2. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. 2000. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two β-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406: 301-309.
3. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. 2001. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages.

- Life Sci* 69: 625-635.
4. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. 2001. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 76: 119-123.
5. deRoja-Walker T, Tamir S, Ji H, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1995. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8: 473-477.
6. Szabó C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. 1996. DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1753-1758.
7. Kim SW. 2009. The effects of *Lactobacillus plantarum* cultured in *Platycodi Radix* decoction on the expression of NO and TNF-α in mouse macrophage RAW 264.7 cell line. *MS Thesis*. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
8. Anderson AJ. 1968. The effect of anti-inflammatory drugs on the enzymic activity of a rat liver granular fraction which increases vascular permeability. *Biochem Pharmacol* 17: 2253-2264.
9. Cameron E, Pauling L, Leibovitz B. 1979. Ascorbic acid and cancer: a review. *Cancer Res* 39: 663-681.
10. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. 1985. Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33: 642-646.
11. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. 1992. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 40: 1439-1442.
12. Fujitani N, Sakaki S, Yamaguchi Y, Takenaka H. 2001. Inhibitory effects of microalgae on the activation hyaluronidase. *J Appl Phycol* 13: 489-492.
13. Reissig JL, Storminger JL, Leloir LF. 1995. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem* 270: 959-966.
14. Elson LA, Morgan W. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem J* 27: 1824-1828.
15. Lee YM, Choi SI, Lee JW, Jung SM, Park SM, Heo TR. 2005. Isolation of hyaluronidase inhibitory component from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (*Astragalus Radix*). *Food Sci Biotechnol* 14: 263-267.
16. Choi SI, Lee YM, Heo TR. 2003. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 282-288.
17. Kim EJ, Oh OJ, Lee SK, Yang KS. 2001. Inhibitory effect of *Astragalus Radix* on COX-2 activity. *Kor J Pharmacogn* 32: 311-315.
18. Kim YP, Lee EB, Kim SY, Li D, Ban HS, Lim SS, Shin KH, Ohuchi K. 2001. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med* 67: 362-364.
19. Lee KJ, You HJ, Park SJ, Kim YS, Chung YC, Jeong TC, Jeong HG. 2001. Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Cancer Lett* 174: 73-81.
20. Choi CY, Kim JY, Kim YS, Chung YC, Seo JK, Jeong HG. 2001. Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor-α from murine macrophages. *Int Immunopharm* 1:

- 1141-1151.
21. Kim HK, Choi JS, Yoo DS, Choi YH, Yon GH, Hong KS, Lee BH, Kim HJ, Kim EJ, Park BK, Jeong YC, Kim YS, Ryu SY. 2007. HPLC analysis of saponins in Platycodi Radix. *Kor J Pharmacogn* 38: 192-196.

(2013년 2월 18일 접수; 2013년 4월 1일 채택)