

우슬을 주원료로 한 복합조성물의 기능성 평가

권순성^{1,†} · 최선강^{2,†} · 주두권 · 이진원 · 신세철¹ · 최혜림¹ · 오영선¹ · 성은수*
수원여자대학교 약용식물과, ¹강원대학교 생물자원과학과, ²강원대학교 농생명산업학전공

Functional Assessment of Complex Composition Based on *Achyranthes japonica* Nakai

Soon Sung Kwon^{1,†}, Seon Kang Choi^{2,†}, Joo Doo Kuen, Jin Won Lee, Shin Se Cheol¹,
Hye Lim Choi¹, Yeong Seon Oh¹, and Eun Soo Seong*

Department of Medicinal Plant, Suwon Women's University, Suwon 16632, Republic of Korea

¹Department of Bio-Resource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²Department of Agricultural Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

Abstract

The antioxidant activity, total phenol content, and inhibitory effect of xanthine oxidase (XOase) for six different medicinal plant complexes such as *Achyranthes japonica*, *Acanthopanax sessiliflorus*, *Carthamus tinctorius*, *Eucommia ulmides*, *Viscum album*, and *Caragana koreana* were investigated in this study. The free radical scavenging activity values using DPPH(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS[2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation] analyses were found to be 532.03±86.60 µg/mL and 1376.50±35.01 µg/mL, respectively, in 95% of ethanol extracts among six medicinal plant mixed compositions (6MPMC). The total phenolic content in 70% ethanol extract of 6MPMC was 125.19±1.34 mg GAE/g. The inhibitory activity against XOase was highest at 33.20±0.17% in the 70% ethanol extract of 6MPMC. In the antimicrobial activity test of 6MPMC, the minimum inhibitory concentration (MIC) value showed activities against *V. litoralis* and *E. coli* in 70% and 95% ethanol extracts, and these two microorganisms were created in clear zones by method of paper disc diffusion. These results suggest that the 6MPMC, composed of *Achyranthes japonica*, *Acanthopanax sessiliflorus*, *Carthamus tinctorius*, *Eucommia ulmides*, *Viscum album*, and *Caragana koreana*, have both antioxidant and antimicrobial activities and, therefore, may serve as a functional health food product.

Key words: antioxidant activity, total phenol content, inhibitory effect of xanthine oxidase, six medicinal plant mixed composition, antimicrobial activity

서 론

우리나라에서 오래전부터 사용되어왔던 한약재는 질병치료와 예방을 목적으로 상당량 활용되어 왔으며, 합성 약물에 대한 부작용의 우려가 현대 사회 문제점으로 대두되어 한약재 가공 기술 발달에 따른 한약재 섭취 수요는 꾸준히 증가하고 있는 실정이다(Choi et al., 2016). 최근에는 통증 완화, 해열, 항염증, 해독과 같은 효능이 알려져 있는 한약 소재를 활용함에 있어서 단일 조성물로 사용하기보다는 한약재 복합 조성물을 건강기능식품으로 개발하고자 하는 연

구들이 많이 진행되고 있다. 홍마늘·녹차·식이섬유소 복합 조성물 섭취시 간조직 항산화 효소활성 증가 및 배설작용 촉진이 강화되는 것으로 나타났으며, 마늘·결명자·하수오·산사육·영지의 복합 조성물 섭취시 간조직내 항산화 활성 증가 및 혈청세포내 지질 축적의 억제 기능 관련 연구들이 보고되었다(Lee et al., 2009; Hwang et al., 2015). 여러 한약재들을 혼합하면서 더 기능성이 강화된 식품 형태로 제조하게 되는데, 각 한약재마다 전처리 방법 및 이용부위들이 상이하므로, 이와 관련된 기초연구 및 복합조성물에 대한 생리 활성 및 이화학적 특성 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

활성산소종(reactive oxygen species: ROS)의 과다한 생성은 세포내의 산화 스트레스를 유발시켜 단백질 및 DNA 손상을 입혀 정상적인 세포 활동 대사에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Cataldi, 2010). 산화적 스트레스는 산화와 환원의 불균형적 원인으로 발생되며, 이는 암,

[†]These authors are contributed to this work.

*Corresponding author: Eun Soo Seong, Department of Medicinal Plant, Suwon Women's University, 72 Onjung-ro, Kwonsun-ku, Suwon, Kyungkido 16632, Korea

Tel: +82-31-290-8384; Fax: +82-31-290-8248

E-mail: eunsooses@hanmail.net

Received April 27, 2019; revised May 16, 2019; accepted May 16, 2019

당뇨병, 면역체계 이상 질환, 노화로 인한 관절염 이상 및 신경 장애와 같은 질병을 유도하게 된다(Emerit et al., 2004). 이러한 질병을 일으키는 원인을 알고 병을 효과적으로 예방할 수 있는 항산화 활성이 높은 건강기능식품을 개발하여 노화로 인한 관절염 예방과 치료의 효율을 높이고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 118종 한약자원 식물의 항산화 활성을 측정하여 박하, 비파엽, 초과 등에서 80% 이상의 항산화 활성이 있음을 보고하였다(Jeong et al., 2004). 130 종 한약재의 항산화 효과 검증에서는 25종의 한약재에서 80% 전자공여능이 있다고 보고되었다(Nam & Kang, 2000). 복합 한약재 조성물을 이용한 항산화 활성 평가연구 사례에서는 동의보감에 5가지의 처방(십육미류기음, 단자청피탕, 지폐산 I, 지폐산 II, 청간해울탕)에 대한 총 페놀 함량, DPPH와 ABTS를 이용한 free radical 소거능, 산화 손상에 의한 genomic DNA의 손상 억제 활성과 같은 항산화능을 평가한 보고가 있다(Choi et al., 2016).

우슬(牛膝)은 비름과(Amaranthaceae)에 속하는 다년생 초본 식물로 우리나라, 중국, 일본에 주로 분포하며, 국내에서 오래전부터 약재로 사용해진 생약명은 쇠무릎이라 알려져 있다. 우슬(*Achyranthes japonica* Nakai)은 이뇨와 진통의 치료제, 항염증, 항산화 등의 생물학적 활성을 나타내는 약용식물로 알려져 있고, 우슬의 에탄올 추출물은 *C. difficile*에 대한 항미생물 작용을 하는 것으로 보고되었다(Jung et al., 2007; Kim et al., 2015). 오가피(*Acanthopanax sessiliflorus seeman*)는 한약재로 이용시 주로 줄기껍질을 이용하며, 강장, 신경통, 식욕부진, 고혈압 치료 및 예방에 사용되며, 오가피 메탄올 추출물은 *Staphylococcus aureus* 및 *staphylococcus epidermidis*에 대한 항균활성을 나타내는 것으로 나타났다(Ban et al., 2013). 두충나무(*Eucommia ulmides* Oliv) 추출물은 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*에 대해 우수한 항균활성을 보여주었다(Kim et al., 2013). 겨우살이(*Viscum album* var. *coloratum*) 추출물은 식중독 유발 세균에 대한 억제 활성이 있음을 보고하였다(Bae et al., 2005). 토사자(*Caragana koreana* Nakai)의 뿌리 추출물은 *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Typhymurium, *Escherchia coli*에 대한 항균활성이 보고되었다(Oh et al., 1998). 특히, 우슬을 원료로 한 제조 연고를 퇴행성 골관절염 유도 부위에 처방시 병리조직학적 세포고사 및 이에 관련된 단백질 발현 양상에 대한 연구도 보고되었다(Kim et al., 2008; Kim et al., 2009).

따라서 본 연구에서는 우슬을 주원료로 한 홍화, 오가피, 두충, 겨우살이, 토사자를 혼합한 복합 조성물의 항산화 활성, 총 페놀 함량 분석, XOase 활성 억제능 및 항균활성을 평가·분석함으로써 건강기능식품으로서의 가능성을 확인하는 기초 자료로 활용하고자 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

한방재료를 이용한 건강기능식품 제조 전문 회사인 (주) 와이케이컴퍼니(서울, 한국)로부터 우슬(뿌리) 단일 조성물과 우슬(뿌리), 오가피(줄기껍질), 두충(줄기껍질), 홍화(종자), 겨우살이(어린가지), 토사자(종자)를 이용하여 건강환 형태로 제조된 약용식물 복합 조성물을 분양받아 비교 실험하였다. 이 조성물중 법제가 필요한 한방재료인 홍화와 두충을 묶어서 사용하였고, 토사자는 주증으로 법제하였다. 이렇게 처리된 6종의 재료를 1:1:1:1:1로 혼합한 후, 40 mesh 이하로 곱게 분쇄하여 환 형태로 제조하였다. 혼합된 조성물은 사포닌, 시토스테롤, 세사민, 피토스테롤 등 골다공증 및 관절염에 효능 있는 약재들을 선별하여 제조하였다(Kim et al., 2008; Kim et al., 2015; Ban et al., 2013; Kim et al., 2013; Bae et al., 2005; Oh et al., 1998). 배합율에 대한 제조 근거는 한의학적으로 뼈관절에 도움을 주고 부작용을 줄이기 위해 상승배오에 맞게 한약재들을 선정 및 균일 배합하였다. 제조된 복합 조성물을 믹서로 곱게 갈은 후, 건강식품으로서의 기능성을 평가하기 위해 식품안정성 평가시 부적절할 것으로 여겨지는 유기용매를 제외한 순수한 물과 희석 에탄올만 이용하여 추출하여 평가에 이용하였다.

추출 및 농축

재료 50 g의 샘플을 믹서기로 분쇄한 후, 물, 70% 에탄올, 95% 에탄올을 이용하여 실온에서 24시간 추출하였다. 각 혼합물을 여과한 다음 Whatman No. 42 여과지(Tokyu Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)를 사용하여 잔해물을 제거하고 추출물을 회전 농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)를 사용하여 45°C에서 증발시켰다. 우슬 단일 조성물과 물, 70% 에탄올, 95% 에탄올을 이용한 추출물은 41.88%, 30.68%, 18.41%의 수율로 측정되었고, 6 MPMC의 각각 추출물의 수율은 41.42%, 31.77%, 19.92%로 나타났다. 각 시료의 농축물을 70% 에탄올에 용해시켜 생리 활성 분석을 위한 농도로 정량하였다.

DPPH를 이용한 free radical 소거능 활성 측정

준비된 추출물의 DPPH를 이용한 free radical 소거능 활성 측정은 Shimada 등의 연구에 따라 실험하였다(Shimada et al., 1992). 준비된 시료 100 µL에 0.15 M DPPH 용액 100 µL를 첨가하고 실온에서 30분간 암상태에서 반응 후, UV-VIS spectrophotometer (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 517 nm 흡광도에서 측정하였다. 측정값은 소거가 일어나는 농도 활성을 RC₅₀ (µg/mL)으로 나타내었다. 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

ABTS를 이용한 free radical 소거능 활성 측정

준비된 샘플의 ABTS를 이용한 free radical 소거 활성은 Re 등의 연구에 의해 실시된 방법을 응용하여 실험을 실시하였다(Re et al., 1999). 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium를 1:1로 믹스한 후 암상태인 실온에서 반응시키고, UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 732 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.03 이 되게 phosphate saline (PBS, pH 7.4)로 희석하여 준비하였다. 준비된 희석 용액 990 μ L에 샘플 10 μ L를 넣은 후 10분 동안 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 샘플의 free radical 소거 활성은 free radical을 50% 소거시키는 추출물의 최소 농도를 RC_{50} (μ g/mL)로 하여 나타내었고, 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

총 페놀함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 분석법을 응용하여 측정하였다(Kim et al., 2007). 50 μ L의 페놀 시약(1 M)에 100 μ L의 각 추출물(1 mg/mL)을 첨가한 후, 1.85 mL의 증류된 탈이온수를 넣어 혼합하여 3분간 방치하였다. 준비된 시료에 300 μ L Na_2CO_3 을 넣어 섞고, 1.7 mL의 탈이온수를 첨가하여 총부피를 4 mL로 정량하였다. 정량한 샘플을 혼합하여 암상태에서 반응시키고, UV-VIS spectrophotometer를 725 nm에 맞추고 흡광도를 측정하였다. 기준물질은 gallic acid를 사용하였고, 검량선 작성후 총 페놀 함량을 분석하였다.

Xanthine Oxidase (XOase) 활성 억제 측정

관절염 유발에 관련된 효소인 XOase의 억제 활성은 Stirpe와 Corte의 방법에 따라 측정하였다(Stirpe & Corte, 1969). 즉 처리군은 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 1 mL에 xanthine oxidase (0.25 unit/ml) 0.1 mL와 추출샘플 0.1 mL를 가하고 대조군에는 증류수를 0.1 mL 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 후, 20% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가하여 반응을 종료시키고 단백질을 제거를 위해 3,500 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid 양을 292 nm에서 측정하여 구한 뒤 표준곡선에서 양을 환산하여 다음과 같은 공식에 의해 저해율(%)을 계산하였다. 저해율(%)은 $1 - (\text{반응구의 uric acid 생성량} / \text{대조구의 uric acid 생성량}) \times 100$ 으로 구하였다.

미생물 배양 조건

국내 미생물자원센터에서 7종류 미생물을 분양받아 항산화능이 높았던 6 MPMC 시료추출물의 항미생물 활성도 검정하였다. 7종류 세균은 *S. aureus* (KCTC No. 1916: 황색포도상구균), *Vibrio littoralis* (KCTC No. 13228: 대장균 중비만유도균), *Bacillus subtilis* (KCTC No. 1021: 고초균),

Klebsiella pneumonia (KCTC No. 2208: 폐렴구균), *E. coli* (KCTC No. 1924: 대장균), *Sal. Typhimurium* (KCTC No. 1925: 위장염 유발), *P. aeruginosa* (KCTC No. 2742: 녹농균)을 실험에 이용하였다. 항미생물 활성 실험을 위해 LB액체배지(bacto-tryptone 10 g/L, bacto-yeast 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 5.8)를 이용하여 *B. subtilis*를 제외한 6가지 미생물을 37°C에서 배양하였고, *B. subtilis*는 30°C에서 배양하여 미생물 성장을 유도하였다.

미생물의 최소 저해 농도 활성

미생물 최소 저해 농도 활성 실험방법은 Kobayashi 등(1993)이 사용한 방법을 응용하여 절차대로 실험을 수행하였다. 배양한 미생물 농도를 7.8-1,000 μ g/mL가 되도록 희석 정량하여 샘플당 최종 볼륨은 200 μ L가 되도록 96 well micro plate에 분주하여 37°C 및 30°C에서 배양하면서 미생물 저해 활성을 체크하였다. 이 때 양성대조군은 tetracycline을 사용하였으며, 모든 실험은 3반복으로 실시해 활성 저해 농도를 결정하였다.

디스크 확산분석법에 의한 미생물의 저해 활성

MIC 분석에서 억제 활성 보인 2종류 미생물 *V. littoralis*와 *E. coli*에 대해 디스크 확산법을 이용한 미생물 저해 활성을 분석하였다(Seo et al., 2016). LB agar 배지를 제조하여 10^7 - 10^8 CFU/mL로 희석한 미생물 배양액을 100 μ L씩 도말한 후, paper disc를 배지 위에 놓고 100 mg/mL 농도의 각 샘플을 20 μ L씩 흡수되도록 접종하였다. 분양받은 균종류에 따른 적정 성장 온도인 37°C 또는 30°C에서 배양하면서 생성된 clear zone을 확인하여 측정하였다.

통계분석

통계처리는 IBM SPSS Statistics (SPSS v.23, International Business Machines Co., Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하여, 사후분석을 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)를 통해 통계적 유의성을 5% 수준에서 분석하였다.

결과 및 고찰

6종의 약용식물 복합 조성물의 free radical 소거능 측정을 통한 항산화능 분석

6종의 약용식물 혼합 조성물의 DPPH radical 과 ABTS radical 소거능은 추출물의 농도를 50, 100, 200, 1000 μ g/mL로 맞추어 RC_{50} 값으로 나타내어 비교하였으며, DPPH와 ABTS free radical 소거능에 대한 결과는 비슷한 경향으로 나타났다. DPPH를 이용한 free radical 소거능을 분석한 결과, 물 추출물에서 881.91 ± 46.32 μ g/mL, 95%에탄올 추출물은 532.03 ± 86.60 μ g/mL의 수치를 보였다. 70%에탄올 추출물에서는 572.02 ± 13.96 μ g/mL의 수치를 나타낸

것으로 보아, 95% 에탄올 추출물에서 가장 항산화 활성이 높은 것으로 나타났고, 70% 에탄올과 95% 에탄올 추출물 간의 비교는 통계적으로 큰 차이를 보이지는 않았다(Table 1). 특히, 물 추출물간의 활성을 비교하면, 우슬 단일 조성물에서는 1247.25±229.00 µg/mL, 6가지 복합조성물에서는 881.91±46.32 µg/mL로 나타나는 것으로 보아 6가지 약용식물 복합조성물을 이용한 시험구에서 free radical 소거능이 유의성 있게 높게 나타났다.

ABTS를 이용한 항산화 활성 측정을 통해 용매 추출물별 효과를 실험한 결과, DPPH를 이용한 항산화 소거능 측정 결과와 마찬가지로 단일조성물 시험구보다 6가지 복합조성물의 추출물에서 더 높은 항산화 활성을 나타내었다. 6가지 복합조성물의 95% 에탄올 추출물에서 1376.50±35.01 µg/mL 수치를 나타내어 모든 대조구와 처리구 대비 가장 높은 항산화활성을 나타내었다(Table 2). 목단피, 작약, 감초, 육계, 어성초의 5가지 한약원료 복합 조성물을 50% 에탄올로 추출하여 DPPH를 이용한 free radical 소거능 저해 활성 결과, 5 mg/mL의 농도에서는 95% 이상의 저해활성을 나타내어 항산화 작용이 높은 것으로 보고되었다(Hwang et al., 2011). 복합 한약재 추출물 11종에 대하여 항산화 효과를 탐색하고자 DPPH radical 소거능을 측정할 결과, 단천환가감방 27%, 사미강압탕 21%을 나타냈으나 나머지 복합 한약재들은 20% 미만으로 나타난 결과도 보고되었다(Kim et al., 2006). 이렇듯 요즘 약용식물을 활용한 건강기능식품 소재 탐색을 통한 원료 연구에서는 1가지 한약재가 아닌 여러가지 약용식물 복합 조성물을 이용한

제품화 연구가 상당히 많이 연구되고 있다.

페놀성 물질이 free radical을 얼마만큼 소거할 수 있는지는 DPPH나 ABTS 같은 분석을 통해 항산화능 예측이 가능하다. 거의 모든 페놀성 물질은 free radical을 효과적으로 소거할 수는 있으나, 기질에 따라 페놀성 물질이 선택적 작용을 하므로 두 가지 방법 모두를 측정하여 항산화능을 분석하는 것이 바람직하다(Lee et al., 2012). 우리의 실험결과는 두 방법 모두 유사 패턴의 항산화능을 보여주었으나, 기질특이성에 반응하는 페놀성 물질 작용으로 인해 ABTS radical은 소거하고, DPPH radical은 소거 못하는 결과도 초래될 수 있다(Youn et al., 2017).

6종의 약용식물 복합 조성물의 총 페놀 함량 분석

우슬, 오가피, 두충, 홍화자, 겨우살이, 토사자를 혼합한 조성물의 용매 추출 종류별 총 페놀 함량 측정 시료는 1,000 µg/mL의 농도로 정량하여 분석에 이용하였다. 물 추출물 13.76±0.22 mg GAE/g, 70% 에탄올 추출물 125.19±1.34 mg GAE/g, 95% 에탄올 추출물 7.24±0.19 mg GAE/g로 측정되었다. 총 페놀 함량의 경우 단일 조성물 대비 6가지 복합 조성물의 70% 에탄올 추출물에서 상당히 높은 총 페놀 함량을 지닌 것으로 측정되었다(Table 3). 총 페놀 함량이 많은 식물을 섭취할수록 체내의 활성산소를 제어하여 항암, 항산화 활성이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2005). 우리와 유사한 연구를 한 보고 중 7가지의 한약복합처방 추출물(황후산, 사간탕, 시호청간탕, 대황목단탕, 소청룡탕, 십육미류기음, 길경탕)의 총 페놀 함

Table 1. Comparison through free radical scavenging activity by DPPH analysis from extracts of medicinal plant mixed composition for one type or six types

Samples	Extracts	RC ₅₀ ⁶⁾ (µg/mL)
Single composition ¹⁾	W ³⁾	1247.25±229.00 ^a
	70E ⁴⁾	627.24±28.21 ^a
	95E ⁵⁾	620.62±37.36 ^a
6 MPMC ²⁾	W	881.91±46.32 ^b
	70E	572.02±13.96 ^a
	95E	532.03±86.60 ^a
Ascorbic acid		5.66±0.07

¹⁾Control: *Achyranthes japonica*
²⁾6 MPMC: 6 kinds of medicinal plant mixed composition: *Achyranthes japonica*, *Acanthopanax sessiliflorus*, *Carthamus tinctorius*, *Eucommia ulmides*, *Viscum album* and *Caragana koreana*.
³⁾W; Water.
⁴⁾70E; 70% Ethanol.
⁵⁾95E; 95% Ethanol.
⁶⁾RC₅₀: Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction. The concentrations of all samples were adjusted to 50, 100, 200 and 1000 µg/mL. All values of RC₅₀ are means±standard deviation for three replicate tests. The data were analyzed using SPSS statistic program and were represented as significant difference at 5% level of probability (*p*<0.05). Letters such as a-c represent as significantly different by statistical analysis.

Table 2. Comparison through free radical scavenging activity by ABTS analysis from extracts of medicinal plant mixed composition for one type or six types

Samples	Extracts	RC ₅₀ ⁶⁾ (µg/mL)
Single composition ¹⁾	W ³⁾	5007.92±989.47 ^b
	70E ⁴⁾	2235.31±285.86 ^a
	95E ⁵⁾	1750.46±50.68 ^a
6 MPMC ²⁾	W	4117.15±536.10 ^b
	70E	1723.54±42.33 ^a
	95E	1376.50±35.01 ^a
Ascorbic acid		5.57±0.05

¹⁾Control: *Achyranthes japonica*
²⁾6 MPMC: 6 kinds of medicinal plant mixed composition: *Achyranthes japonica*, *Acanthopanax sessiliflorus*, *Carthamus tinctorius*, *Eucommia ulmides*, *Viscum album* and *Caragana koreana*.
³⁾W; Water.
⁴⁾70E; 70% Ethanol.
⁵⁾95E; 95% Ethanol.
⁶⁾RC₅₀: Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction. The concentrations of all samples were adjusted to 50, 100, 200 and 1000 µg/mL. All values of RC₅₀ are means±standard deviation for three replicate tests. The data were analyzed using SPSS statistic program and were represented as significant difference at 5% level of probability (*p*<0.05). Letters such as a and b represent as significantly different by statistical analysis.

Table 3. Comparison of contents for total phenol from extracts of medicinal plant mixed composition for one type or six types

Samples	Extracts	Phenol content ⁽⁶⁾ (mg GAE/g sample)
Single composition ¹⁾	W ³⁾	9.24±0.22 ^d
	70E ⁴⁾	22.10±0.13 ^b
	95E ⁵⁾	13.49±0.33 ^c
6 MPC ²⁾	W	13.76±0.22 ^c
	70E	125.19±1.34 ^a
	95E	7.24±0.19 ^e

¹⁾Control: *Achyranthes japonica*

²⁾6 MPMC: 6 kinds of medicinal plant mixed composition: *Achyranthes japonica*, *Acanthopanax sessiliflorus*, *Carthamus tinctorius*, *Eucommia ulmides*, *Viscum album* and *Caragana koreana*.

³⁾W; Water.

⁴⁾70E; 70% Ethanol.

⁵⁾95E; 95% Ethanol.

⁶⁾Total phenol contents are represented as mg gallic acid equivalents (GAE)/g sample. All values of phenol content are means±standard deviation for three replicate tests. The data were analyzed using SPSS statistic program and were represented as significant difference at 5% level of probability ($p<0.05$). Letters such as a-e represent as significantly different by statistical analysis.

량은 50.351±3.122-1905.650±10.587 mg GAE/g D.W.의 범위로 측정된 연구 결과가 보고되었다(Lee et al., 2015). 유암 치료를 위해 동의보감에 기록된 처방 5가지(십육미류기음, 단자청피탕, 지폐산 I, 지폐산 II, 청간해울탕)를 물과 에탄올을 이용한 추출물로부터 총 페놀 함량 측정 결과, 30.16±0.29-06.95±0.60 mg GAE/g D.W.의 범위 수치로 나타났다(Choi et al., 2016). 이는 우리 결과와 마찬가지로 식물 성분의 총 페놀함량은 극성용매에서 용해도가 높으므로 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 총 페놀 함량이 더 높게 측정된 결과를 나타낸 것과 같다. 오가피, 삼백초, 어성초, 우슬, 감초를 혼합한 약선차 조성물의 생리활성연구에서는 총 페놀 함량은 138.72 mg/100 mL로 측정하여 보고되었다(Choi et al., 2012).

Xanthine oxidase (XOase) 억제 활성 분석

XOase는 xanthine을 기질로 이용하여 superoxide radical을 생성하는 관절염 중 통풍 유발효소이다. uric acid수치가 높아지면 통풍을 유발하는 것으로 알려져 있고, 통풍이 심한 경우 신장이나 심장 등에 합병증을 유발할 수도 있다(Duke et al., 1973). 따라서 XOase 저해제는 통풍 치료제로 사용되어왔다. 본 연구에서는 6종의 약용식물 복합 조성 추출물을 1000 µg/mL의 농도로 정량하여 XOase 저해 활성을 측정한 결과, 70% 에탄올 추출물에서 33.20±0.17%로 단일 추출물 및 다른 추출물과 비교했을 때 가장 높은 XOase 저해 활성을 나타냈다(Table 4). 이는 총 페놀 함량이 가장 높았던 6종 약용식물 복합 조성물의 70% 에탄올 시험구에서 XOase 저해 활성까지 높은 것으로 측정되어, XOase 저해 활성은 총 페놀 함량과 상관관계가 있을 것으

Table 4. Comparison of inhibitory activity against xanthine oxidase (XOase) from extracts of medicinal plant mixed composition for one type or six types

Samples	Extracts	Inhibitory activity ⁽⁶⁾ (%)
Single composition ¹⁾	W ³⁾	27.30±0.00 ^b
	70E ⁴⁾	27.50±0.10 ^b
	95E ⁵⁾	13.47±0.06 ^d
6 MPMC ²⁾	W	27.40±0.10 ^b
	70E	33.20±0.17 ^a
	95E	17.80±0.17 ^c
Positive control (allopurinol)		89.30±1.30

¹⁾Control: *Achyranthes japonica*

²⁾6 MPMC: 6 kinds of medicinal plant complex: *Achyranthes japonica*, *Acanthopanax sessiliflorus*, *Carthamus tinctorius*, *Eucommia ulmides*, *Viscum album* and *Caragana koreana*.

³⁾W; Water.

⁴⁾70E; 70% Ethanol.

⁵⁾95E; 95% Ethanol.

⁶⁾Inhibitory activity; Absorbance at 292nm was represented as inhibition rate (%). All values of inhibitory activity are means±standard deviation for three replicate tests. The data were analyzed using SPSS statistic program and were represented as significant difference at 5% level of probability ($p<0.05$). Letters such as a-d represent as significantly different by statistical analysis.

로 사료된다. 6종 약용식물 복합 조성물의 추출물을 이용한 통풍억제 효과는 현재 통풍 치료제로 이용되고 있는 allopurinol (1000 µg/mL, positive control)의 XOase 억제능인 89.30±1.30%와 비교하면 낮은 억제효과를 나타내었으나, 정제하여 순도를 높이면 통풍 치료제로의 활용 가능성도 기대할 수 있을 것이라 판단된다. XOase 활성이 높은 천연소재를 통풍 치료제로 개발하고자 하는 연구가 많이 집중된 가운데, 본 연구의 데이터는 통풍 치료제 개발을 위한 기초 데이터로 활용할 수 있을 것으로 보인다. 이와 비슷한 연구 결과 중, 카타네오 품종의 에탄올 추출물에서는 21.4±2.3% XOase의 저해율을 나타내었다(Chae et al., 2012). 정금나무의 열매 부위에서 XOase 저해 활성은 200 µg/mL 농도에서 43.3±0.8% 저해 수치가 조사되었다(Chae et al., 2012). 식물계에 존재하는 페놀성 물질의 생리활성에 따라 각종 효소의 저해 효과가 다르게 나타난다고 보고하였다(Hayashi et al., 1988). XOase 저해 기작에 관여하는 특정 페놀 화합물은 6종 약용식물 복합조성물의 70% 에탄올 추출물에 더 많이 용해되어 존재하기 때문에 XOase 저해 효과가 어느 정도 측정된 것으로 여겨진다.

6종의 약용식물 복합 조성물의 항미생물 활성 분석

우슬 단일 조성물보다 항산화능, 총 페놀 함량 및 XOase 저해능이 우수하다고 밝혀진 우슬, 오가피, 두충, 홍화자, 겨우살이, 토사자 혼합 조성물(6가지)의 추출물로부터 7종류 미생물에 대한 항미생물 활성을 MIC법을 이용하여 1차적으로 분석하였다. 물 추출물의 경우 7종류 미생물에 대한 활성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 70% 에

Table 5. Minimal inhibitory concentration (MIC) in extract of solvent types from six different medicinal plant mixed composition

Extraction	MIC ¹⁾ (µg/mL)						
	<i>S. aureus</i> (+)	<i>V. litoralis</i> (+)	<i>B. subtilis</i> (-)	<i>K. pneumonia</i> (-)	<i>E. coli</i> (-)	<i>Sal. Typhimurium</i> (-)	<i>P. aeruginosa</i> (-)
DW	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
70% EtOH	ND	<125	ND	ND	<125	ND	ND
95% EtOH	ND	<8	ND	ND	<125	ND	ND
Tetracycline	8	8	8	8	8	8	8

¹⁾The MIC values against bacteria were determined by the serial 2-fold dilution method.

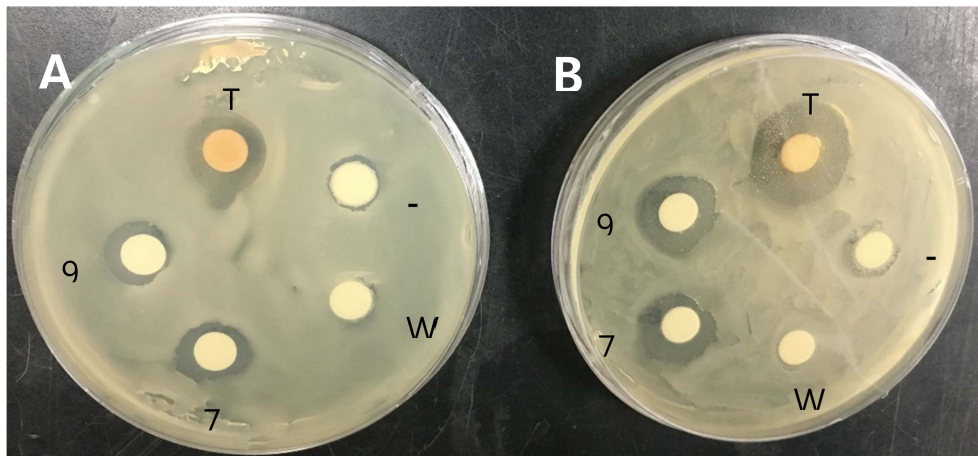


Fig. 1. Antimicrobial activity by method of paper disc diffusion using crude extracts depending on solvent types from six different medicinal plant mixed composition. A: *V. litoralis*, B: *E. coli*, T: Tetracycline (positive control), -: 70% EtOH (negative control), W: water extract, 70E: 70% EtOH extract, 95E: 95% EtOH extract.

탄을 추출물의 경우, *V. litoralis*와 *E. coli*에 대한 항미생물 활성이 모두 125 µg/mL 이하에서 미생물에 대한 최소 저해능이 있는 것으로 나타났다. 95% 에탄올 추출물의 경우, *V. litoralis*에 대해서는 8 µg/mL 이하, *E. coli*에 대해서는 125 µg/mL 농도 이하에서 최소 저해능이 있는 것으로 조사되었다(Table 5). 또한, 항미생물 활성이 1차적으로 나타난 이 2가지 미생물에 대해 paper disc를 이용한 clear zone 생성 정도를 측정하고, 육안으로 관찰하였다(Fig. 1). *V. litoralis*와 *E. coli*를 적용하여 추출물 접종 후 생성된 clear zone 측정 결과, *V. litoralis*에 대해서는 70%에탄올 추출물에서 21.70±0.10 mm, 95% 에탄올 추출물에서는 14.70±0.11 mm로 나타나 70% 에탄올 추출물에서 clear zone이 더 크게 생성되었음을 알 수 있었다. *E. coli*에 대한 항미생물 측정 결과에서는 95% 에탄올 추출물에서 13.00±0.05 mm로 나타나 70% 에탄올의 6.70±0.15 mm 보다 저해 활성이 더 높은 것으로 나타났다(Table 6). 또한 이 두가지 미생물에 대한 6종의 약용식물 복합 조성물의 추출물에 대한 항미생물 활성은 *E. coli*보다 *V. litoralis*의 활성이 더 높은 것으로 확인되어, 이 식품 섭취시 비만유도 억제 효과가 높을 것으로 사료된다.

복합 약용식물 조성물을 이용한 항미생물 활성 연구는

Table 6. Determination of clear zone generated from antimicrobial activity using crude extraction of six different medicinal plant mixed composition

Samples	Concentration (mg/mL)	Clear zone (mm)	
		<i>V. litoralis</i>	<i>E. coli</i>
DW		0.0±0.0	0.0±0.0
70% EtOH	100	21.70±0.10 ^a	6.70±0.15 ^b
95% EtOH		14.70±0.11 ^b	13.00±0.05 ^a
Tetracycline	10	40.00±0.10	60.00±0.05

All values of clear zone are means±standard deviation for three replicate tests. The data were analyzed using SPSS statistic program and were represented as significant difference at 5% level of probability ($p < 0.05$). Letters such as a and b represent as significantly different by statistical analysis.

승마갈근탕액과 발효된 승마갈근탕액의 *C. albicans*에 대한 항진균효과와 *S. mutans*, *S. epidermidis*, *S. aureus*에 대한 항세균 효과에서, 최고억제농도 800 µg/mL-3,200 µg/mL 로 항진균효과가 더 높게 나타났다고 보고하였다(In et al., 2014). 감초·마치현·생지유·고삼·황벽·사상자의 혼합 조성물에 대한 항균활성은 1% 농도 첨가시 *S. epidermidis*와 *P. acnes*의 2가지 균에 대해 10-11 mm, *S. aureus*에 대한 항균 활성은 10% 농도를 첨가해야 clear zone 크기가

11 mm로 나타난 것으로 보고하였다(Kim et al., 2006). 당귀 · 천궁 · 작약 · 지황 · 황금 복합조성물의 항균활성은 피부 상재균 *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. epidermidis*와 여드름 원인균 *P. acnes* 대한 clear zone 생성을 측정된 결과, 에탄올 추출물에서 2 mg/disc에서 15 mm, 4 mg/disc에서 19 mm로 관찰되어 물추출물에 비해 에탄올 추출물에서 항균 활성이 높게 나타났다(Lee et al., 2015). 이는 물추출물보다 에탄올 추출물의 항균활성이 높게 나타나는 우리 연구 결과와 일치하는 경향을 보여주었다.

이상의 연구결과로부터, 우슬 · 오가피 · 두충 · 홍화자 · 겨우살이 · 토사자를 혼합하여 제조한 약용식물 복합 한약재 조성물은 DPPH와 ABTS를 이용한 자유라디칼소거능 활성 분석에서 우슬 단일 조성물 대비 항산화 활성이 있는 것으로 나타났다. 또한 총 페놀 함량 분석과 XOase 억제능 측정결과, 페놀함량이 높은군에서 XOase 억제능도 높아지는 것으로 두 시험구간에 상관관계가 있음을 나타냈다. 항균활성 효과에서는 6종의 혼합 조성물이 비만유도 균(*V. littoralis*)과 대장균(*E. coli*)에 대한 억제 활성이 있는 것으로 확인되어, 건강기능식품 소재로서의 활용이 높을 것으로 사료된다. 우슬 단일조성물을 제조하여 건강기능식품으로 활용하는 것보다 본 연구결과에서 보듯 우슬을 포함한 6종의 약용식물 복합 조성물로 제조하여 식품으로 활용할 경우, 한층 더 기능성이 강화된 소재로 이용가치가 높아질 것으로 여겨진다. 또한 앞으로 6종의 약용식물 복합 조성물의 XOase 저해 활성을 통한 관절염 유발효소 억제 효과를 세포 수준으로 연구한다면, 통풍 치료를 위한 의약 소재로서의 가치도 고려해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

우슬 · 오가피 · 두충 · 홍화자 · 겨우살이 · 토사자의 6종 약용식물을 혼합한 조성물의 기능성을 알아보기 위해 우슬 단일 조성물과 비교하여 항산화활성, 총 페놀함량, xanthine oxidase 억제능 및 항균활성을 평가하였다. 추출 용매는 물, 70% 에탄올, 95% 에탄올 3가지를 사용하였다. DPPH와 ABTS를 이용하여 free radical 소거능을 측정된 결과, 6종 혼합 조성 추출물에서 95% 에탄올 조건일 때 $532.03 \pm 86.60 \mu\text{g/mL}$ and $1376.50 \pm 35.01 \mu\text{g/mL}$ 로 우슬 단일 추출물 대비 높은 소거능을 나타냈다. 총 페놀 함량과 xanthine oxidase 억제능에서는 70%에탄올 조건에서 각각 $125.19 \pm 1.34 \text{ mg GAE/g}$ 와 $33.20 \pm 0.17\%$ 로 가장 높은 함량과 XOase 억제능을 나타내었다. 우슬 단일 추출물 대비 6종의 혼합 추출물이 더 좋은 항산화능과 높은 페놀함량과 XOase억제능을 보여줌에 따라, 6종 혼합 추출물을 이용한 미생물에 대한 항균활성 분석도 실시하였다. MIC 억제 농도 측정 및 paper disc법을 이용한 clear zone 측정을 한 결과, 에탄올 추출물 조건에서 7종의 식품 안정성에 미치는 미생물

중 *V. littoralis*와 *E. coli*에 대해 가장 높은 항균활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 이 같은 결과로부터, 우슬 단일 조성물 보다는 우슬 · 오가피 · 두충 · 홍화자 · 겨우살이 · 토사자의 6종 혼합 조성로 제조하는 것이 건강기능식품로서의 가치를 훨씬 더 높일 것으로 생각된다.

감사의 글

실험재료를 제공해주신 (주)와이케이컴퍼니에 감사드리고, 이 연구는 2016년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(관리번호 520160503)로 연구하였습니다. 부분적으로, 강원대학교 한방바이오연구소 지원에 의하여 연구하였습니다.

References

- Bae JH, No SH, Park HJ. 2005. Antimicrobial effect of *Viscum album* var. *coloratum* extracts on food-borne pathogens. *J. East Asia Soc. Diet. Life.* 15: 182-187.
- Ban HJ, Kim MY, Ko KS. 2013. A study on the cosmeceutical ingredient of the methanol extract of *Acanthopanax sessiliflorum* seeman. *J. Korean Soc. Beauty Cult. Arts* 2: 36-42.
- Cataldi A. 2010. Cell responses to oxidative stressors. *Current Pharm. Des.* 16: 1387-1395.
- Chae JW, Park HJ, Kang SA, Cha WS, Ahn DH, Cho YJ. 2012. Inhibitory effects of various mulberry fruits (*Morus alba* L.) on related enzymes to adult disease. *J. Life Sci.* 22: 920-927.
- Chae JW, Jo BS, Joo SH, Ahn DH, Chun SS, Cho YJ. 2012. Biological and antimicrobial activity of *Vaccinium oldhami* fruit. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1-6.
- Choi EO, Son DH, Kim MY, Hwang-Bo H, Kim HJ, Jeong JW, Hong SH, Park C, Choi YH. 2016. Anti-oxidant and anti-microbial activities of herb-combined remedies used in traditional Korean medicine for treating breast cancer. *J. Life Sci.* 26: 680-688.
- Choi IS, Cha EJ, Lee YR, Kim JK. 2012. Antioxidant and anti-cancer activities of Yak-sun tea by oriental medicinal herb. *Korean J. Food Nutr.* 25: 447-453.
- Duke EJ, Joyce P, Ryan JP. 1973. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *J. Biochem.* 131: 187-193.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharm.* 58: 39-46.
- Hayashi T, Sawa K, Morita N. 1988. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Nat. Pro.* 51: 345-351.
- Hwang CR, Kang JR, Shim HJ, Kang MJ, Shin JH. 2015. Effect of garlic enzymatic hydrolysates and natural color resource composites on lipid metabolism in rat fed a high fat diet. *J. Life Sci.* 25: 663-672.
- Hwang J, Yun JK, Han KH, Do E, Lee JS, Lee EJ, Kim JB, Kim MR. 2011. Anti-oxidation and anti-aging effect of mixed extract from Korean medicinal herbs. *Korean J. Herb.* 26: 111-117.
- In JP, Shin JM, Hur SJ, Lee SK. 2014. Antioxidative, antimicrobial and anticarcinogenic activities of seungmagalgeuntang and fermented seungmagalgeuntang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 980-988.

- Jeong SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baeg NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 135-140.
- Jung SM, Choi SI, Park SM, Heo TR. 2007. Antimicrobial effect of *Achyranthes japonica* Nakai extracts against *Clostridium difficile*. Korean J. Food Sci. Tech. 39: 564-568.
- Kim DH, Ahn BJ, Ahn HJ, Ahn YS, Kim YG, Park CG, Park CB, Cha SW, Song BH. 2015. Studies on seed germination characteristics and patterns of protein expression of *Achyranthes japonica* by treating plant growth regulators and seed primings. Korean J. Med. Crop Sci. 23: 13-19.
- Kim EJ, Chung HW, Kim GY. 2008. Effect of *Achyranthes radix* and ultrasound in osteoarthritis rats articular cartilage. Kor. J. Orient. Physiol. Pathol. 22: 390-396.
- Kim HW, Shin HJ, Hwang DB, Lee JE, Bak MC, Kim JH, Kim DU. 2013. Antimicrobial activity and safety test of mixed plant extracts including *Phellodendron amurense* and *Eucommia ulmoides* Oliv. Korean Chem. Eng. Res. 51: 536-539.
- Kim JM, Oh H, Song S, Kim NK, Hwang CY. 2006. Study on the anti-microbacterial activity, anti-inflammatory and anti-allergic effects of several herb-extract. Korean J. Orient. Physiol. Pathol. 20:103-114.
- Kim KT, Yoo KM, Lee JW, Eom SH, Hwang IK, Lee CY. 2007. Protective effect of steamed american ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. J. Ethnopharmacol. 111:443-445.
- Kim YO, Lee SW, Lee SE. 2009. Effects of *Achyranthes japonica* on carrageenan-induced arthritis rat model. Korean J. Med. Crop Sci. 17: 470-474.
- Kobayashi A, Koguchi Y, Takahashi S, Kanzaki H, Kawazu K. 1993. ST-1, a novel radical scavenger from fungus F-124. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1034-1046.
- Lee IC and Kim MK. 2015. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory of mixed medicinal herb extract. Korean J. Herb. 30: 51-58.
- Lee MH, Lee J, Park C, Han MH, Hong SH, Choi YH. 2015. Antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of seven traditional herb-combined remedies. J. Life Sci. 25: 406-415.
- Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH. 2012. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 540-544.
- Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Yang SM, Ju JC, Sung NJ. 2009. Effect of garlic and medicinal plants composites on antioxidant activity and lipid levels of liver in hypercholesterolemic rats. J. Life Sci. 19: 1769-1776.
- Nam SH, Kang MY. 2000. screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plant. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 43: 141-147.
- Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. Korean J. Food Sci. Tech. 37: 233-240.
- Oh DH, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY. 1998. Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 957-963.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad. Biol. Med. 26: 1231-1237.
- Seo GE, Kim SM, Pyo BS, Yang SA. 2016. Antioxidant activity and antimicrobial effect for foodborne pathogens from extract and fractions of *Sanguisorba officinalis* L. Korean J. Med. Crop Sci. 24: 303-308.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the anti-oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agri. Food Chem. 40: 945-948.
- Stirpe F, Corte ED. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 244: 3855-3863.
- Youn SJ, Rhee JK, Lee H. 2017. Comparison of total phenolics, total flavonoids contents, and antioxidant capacities of an Apple Cultivar (*Malus domestica* cv. Fuji) peel powder prepared by different powdering methods. Food Eng. Prog. 21: 326-331.