

생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성 검색

최수임 · 이윤미 · †허태련
인하대학교 생물공학과
(접수 : 2003. 4. 19. 게재승인 : 2003. 8. 18.)

Screening of Hyaluronidase Inhibitory and Free Radical Scavenging Activity *in vitro* of Traditional Herbal Medicine Extracts

Soo-Im Choi, Yun-Mi Lee, and Tae-Ryeon Heo†
Department of Biological Engineering and Institute of Industrial Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2003. 4. 19. Accepted : 2003. 8. 18.)

For the screening of anti-inflammation and antioxidative activities, ethanolic extract of 40 species of traditional herbal medicines were examined their hyaluronidase inhibitory effect and radical scavenging activity *in vitro*. From the result of the hyaluronidase inhibitory activity using a Morgan-Elson assay, *Astragali Radix*, *Eucommia Cortex*, *Schizandrae Fructus*, *Scutellaria Radix*, *Acanthopanax Cortex*, *Chaenomelis Fructus*, *Amomum xanthioides Wallich* and *Moutan Radicis Cortex* showed more than 50% hyaluronidase inhibitory effects at the concentration of 10 mg/mL. In the various solvent fractions (n-hexane, chloroform, ethyl acetate, water) prepared from ethanolic extracts, the ethyl acetate fraction of all extracts tested showed strong activity. Antioxidative activity was evaluated by assaying electron-donating ability to DPPH free radical and scavenging of hydroxyl radical (\cdot OH) generated through Fenton reaction, respectively. *Rubus coreanus* Miq, *Moutan Radicis Cortex*, *Paeoniae Radix Alba*, *Plantaginis Semen* and *Sorbus commixta Hedl.* showed high activity more than 90%, yet similar activity to α -tocopherol and BHA at the concentration of 1 mg/mL in electron donating activity. The scavenging effects of ethanolic extracts on hydroxyl radical were investigated using a 2-deoxyribose oxidation method and tested all extracts showed significant radical scavenging activity. The experiment was also performed to examine whether herbal medicines having significant lipid peroxidation inhibitory activity, *Schizandrae-Fructus* is the strongest inhibitory activity in both linoleic acid and liposome peroxidation.

Key Words : Herbal medicines, hyaluronidase inhibition, radical scavenging, lipid peroxidation

서론

고분자 다당인 히아루론산 (hyaluronic acid; HA)은 진피층의 섬유아세포로부터 산출되어, 표피, 진피에 있어서 주요한 세포외 매트릭스로서 존재하는 glucuronic acid와 glucosamine이 반복해서 연결된 점액성 mucopolysaccharide로서 이론상으로는 자신의 무게의 약 100배의 수분을 지탱하는 성질을 가지며 수분을 많이 포함하는 젤리상의 물질로 세포 간에 존재한다. 특히 염증 반응에 관여하여 상처 치유 및 조절에 중

요한 역할을 하고 있다. 고분자 HA는 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 한편, HA 분해 산물 혹은 저분자 HA는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis, collagen deposition을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 류마티즘 관절염 등의 염증 환자에게서 특히 높은 농도로 관찰되고 있다(1, 2). Hyaluronidase (HAase)는 mucopolysaccharide-splitting enzyme의 하나로서 모세혈관 투과성에 관여하고, 간염, 치주염 등의 염증부위에서 활성이 증가하고 급성 부종을 일으키며, chemical mediator의 유리에도 관여하는 등 염증발현과 관련이 있는 효소로 dermis (connective tissue)의 기본물질인 HA와 같은 산성다당류 (acidic mucopolysaccharides)에서 N-acetyl-glucosamic 결합을 끊는 것을 촉진하며, 이들의 분해물질은 생물학적 시스템을 조절하는데 매우 중요하다(3-5).

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 화학반응,

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Yonghyun-dong 253, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7511 Fax : +82-32-872-4046

E-mail : theo@inha.ac.kr

대사 과정, 과도한 스트레스 등 체내의 다양한 생화학적 자극에 의하여 생성되는데 이러한 자극인자들은 서로 상호작용할 수 있으며 지질의 불포화 지방산 사슬이나 단백질의 아미노아실 사슬 혹은 뉴클레오티드와 핵산내의 염기 및 당 잔기와 반응할 수 있는 라디칼종의 생성을 야기시킨다. 결국, 지질 과산화, 효소 불활성화, DNA 및 세포막에 손상을 유발하여 암, 염증, 동맥경화 등 광범위한 질환의 원인을 제공하며 결과적으로 노화를 촉진(6)할 뿐 아니라 식품의 품질을 저하시키는 원인으로 알려져 있다. 특히, 이들 ROS는 염증발현 및 여러 가지 퇴행성 질환의 발생에 깊이 관여한다는 사실이 보고되고 있으며(7-9), cyclooxygenase와 lipoxygenase의 작용을 경유한 효소적 경로 또는 라디칼 기작을 경유한 비효소적 경로들이 포함될 수 있다. 최근에는 일산화질소 (nitric oxide, NO)의 과도한 생성이 염증 반응의 악화와 관련이 있는 것으로 알려져 NO 생성에 관여하는 iNOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 활성 억제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(10-12).

따라서 본 연구에서는 천연 식물 자원으로부터 항염증, 항산화 및 관절염에 활성을 갖는 유용한 물질을 검색하기 위해서 문헌조사를 통해 항염증 효과를 갖는 40여 가지의 국내산 약용 생약재를 선정하였고 이들에 대하여 HAase 활성 저해 효과와 DPPH와 hydroxyl 라디칼에 대한 소거활성을 측정하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 기기

본 실험에서 사용한 40여종의 한약재는 서울 경동시장 약재구매상가에서 구입하였으며, 모든 원료는 건조 및 마쇄하여 -20°C에서 보관하며 시료로 사용하였다. 시약으로는 DMAB 시약 (p-dimethylaminobenzaldehyde), hyaluronic acid (sodium salt, from human umbilical cord), hyaluronidase (type I-S, from bovine testis), potassium tetraborate, p-dimethylaminobenzaldehyde, DPPH (1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), 2-deoxy-D-ribose, thiobarbituric acid (TBA), α -tocopherol, BHA 등으로 Sigma사 (St. Louis, USA) 제품을 구입하여 사용하였고 그 외에 시료 추출에 사용한 시약은 일급 또는 특급을 사용하였다.

시료 추출물의 조제 및 용매분획

각각의 시료 50 g에 95% 에탄올 (시약용 1급)을 가하여 침지하였다. 24시간 방치한 후 여과하고 잔사에 다시 에탄올을 가하여 방치하고 여과하는 과정을 3회 반복 실행하였다. 얻은 여액을 합쳐 45°C 수욕상에서 진공회전농축기 (EYELA, Japan)로 농축한 후 건조하여 냉장보관하면서 에탄올 추출물 시료로 사용하였다. 이 에탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후, n-hexane, chloroform, ethyl acetate, water 순으로 분획을 실시하였고, 얻어진 각각의 분획은 감압농축하여 시료로 사용하였다.

DPPH 자유라디칼에 대한 전자공여능 측정

0.1 mM DPPH (in ethanol) 1 mL에 시료 100 μ L를 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후, 잔존하는 DPPH 라디칼을 517

nm에서의 흡광도를 UV Spectrophotometer로 측정하여 계산하였다. 전자공여능(%)은 $[(A_c - A_s)/A_c] \times 100$ 으로 산출하였다. 여기서 A_s 와 A_c 는 각각 실험구와 대조구에서의 흡광도를 나타내며 시료대신 시료를 녹인 에탄올을 대조구로 첨가하였다(13).

HAase 저해활성

HAase 억제효과는 sodium-HA로부터 형성된 N-acetyl-glucosamine을 glucoxazoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethylaminobenzaldehyde로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소활성을 정량화하였다(14, 15). 즉, 1% DMSO에 각 시료를 일정 농도가 되도록 조제하여 100 μ L (10 mg/mL)씩 시험관에 취하고 0.1 M acetate buffer 용액 (pH 3.5)에 녹인 HAase 용액 (7,900 units/mL) 50 μ L를 가하여 잘 혼합한 후 37°C water bath에서 20분간 배양한 다음 HAase activator로서 12.5 mM $CaCl_2$ 0.1 mL를 가하고 잘 혼합한 다음 다시 20분간 배양하였다. 기질로서 HAase 용액에 0.1 M acetate buffer에 녹인 HA (12 mg/mL) 250 μ L를 첨가하여 다시 40분간 배양하고 0.4 N NaOH 0.1 mL 및 0.4 M potassium tetraborate 용액을 0.1 mL 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕상에서 가열하였다. 가열한 반응액을 완전히 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 발색제로서 DMAB 시약 (p-dimethylaminobenzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 mL 및 10 N HCl 용액 50 mL 혼합액) 3.0 mL을 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출하였다. 저해 비율 계산은 $[(A_c - A_s)/A_c] \times 100$ 식으로 하였으며, A_c 와 A_s 는 각각 시료를 첨가한 대조구와 실험구에서의 흡광도를 나타낸다. 대조군은 시료 대신 1% DMSO를 첨가하여 처리하였다.

Hydroxyl radical(OH·) 소거능 측정

Hydroxyl 라디칼 소거능은 Chung 등(16)의 deoxyribose 산화법을 약간 변형하여 실시하였다. Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼은 2-deoxyribose를 산화시켜 malondialdehyde로 분해된다. 즉, 시험관에 미리 준비한 10 mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mM EDTA, 10 mM 2-deoxyribose를 함유한 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 0.2 mL에 1% DMSO에 녹인 시료 0.1 mL를 넣어 총 반응액을 1.8 mL로 하였다. 다시 여기에 10 mM의 H_2O_2 를 0.2 mL을 넣어서 잘 섞은 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 후, 2.8%의 trichloroacetic acid (TCA)와 1%의 thiobarbituric acid (TBA)를 반응혼합액에 가하여 10분간 끓인 다음, 반응액이 완전히 식으면 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 hydroxyl 라디칼 소거능 (%)은 $[1 - (A_s - A_0)/(A_c - A_0)] \times 100$ 의 식으로 구하여 비교하였다. 여기서 A_s 와 A_c 는 각각 시료를 첨가한 실험구와 대조구에서의 흡광도를 나타내며, A_c 는 시료를 녹인 1% DMSO, A_0 는 37°C에서의 반응이 생략된 시약 혼합액의 흡광도를 나타낸다.

β -Carotene / Linoleic acid system에서의 항산화 작용

각각의 에탄올 추출물의 지질과산화억제 작용은 Tage 등(17)의 β -Carotene/Linoleic acid system을 약간 변형하여 측정

하였다. β -Carotene/linoleic acid emulsion은 산화되면 탈색반응이 발생하며, 항산화 물질 존재시 본래 색을 유지하게 된다. 즉, 반응액 β -carotene 용액 (2 mg/20 mL in chloroform) 3 mL에 linoleic acid 40 mg, Tween40 400 mg을 첨가하고 chloroform을 N_2 gas를 이용하여 완전히 제거하였다. 잔사에 증류수 100 mL을 천천히 넣으면서 격렬하게 잘 섞어준 후 0.2 mL 시료가 들어있는 시험관에 용액 (emulsion) 5 mL을 첨가하였다. 시험관을 $40^\circ C$ water bath에 넣고 30분간 incubation한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 지질과산화 억제활성 (%)은 $[1-(A_c-A_s)/A_c] \times 100$ 의 식으로 구하여 비교하였다. 여기서 A_s 와 A_c 는 각각 시료를 첨가한 실험구와 대조구에서의 흡광도를 나타낸다. 대조구는 시료를 녹인 1% DMSO 용액으로 하였다.

리포솜 지질 과산화 억제 활성

생체 내에서의 지질 과산화 억제 활성은 egg yolk liposome 모델 반응계(18)를 이용하여 실시하였다. 즉, 시험관에 phosphatidylcholine liposome 기질 (0.1 g/20 mL chloroform) 1 mL에 시료액을 가한 후 chloroform은 N_2 gas로 제거하고, 0.01 M Tris-HCl-0.175 M KCl buffer 2 mL과 2 mM $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 10 μ L, 2 mM ascorbic acid 100 μ L을 첨가하여 반응 총 부피를 2 mL로 하였다. 이 액을 $37^\circ C$ 에서 30분간 incubation시킨 후 식히고, 5 mM EDTA 0.5 mL, 1% phosphoric acid 3 mL, 0.7% TBA용액 1 mL을 첨가하여 반응을 종결시킨 후 water bath에서 $100^\circ C$ 로 45분간 가열하였다. 여기에 n-butanol 4 mL을 가해 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출하였다. 저해 비율 계산은 $[(A_c-A_s)/A_c] \times 100$ 의 식으로 구하여 비교하였다. 여기서 A_s 와 A_c 는 각각 시료를 첨가한 실험구와 대조구에서의 흡광도를 나타낸다. 대조구는 시료를 녹인 1% DMSO 용액으로 하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물의 수율

에탄올 추출로 건조하여 얻은 각각의 추출물은 중량을 측정하여 가용성 물질의 수율을 구하였다(Table 1). 강활 (*Angelicae koreanae Radix*)과 초용담 (*Gentiana scabra Bunge.*)이 각각 43, 44%로 가장 높았으며, 황금 (*Scutellaria Radix*), 천궁 (*Cnidii Rhizoma*), 산수유 (*Corni Fructus*), 오미자 (*Schizandrae Fructus*), 산사 (*Amomum xanthioides Wallich*) 등도 20% 이상의 높은 수율을 보였다.

HAase 저해 활성

40 여종의 생약재 에탄올추출물의 항염효과를 확인하기 위하여 HAase에 대한 시료의 저해활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 황기, 두충, 오미자, 황금, 오가피가 60% 이상의 높은 활성을 나타내었으며 목단피와 산사, 목과가 50% 이상, 인삼과 백작약이 각각 46%와 35%로 활성을 나타내었다 (10 mg/mL). 김 등(19)은 염증 반응을 진행하는 효소인 COX-2의 활성을 억제하는 물질로서 황기로부터 isoflavonone glycoside 물질을 분리하였음을 보고한 바 있다. 높은 활성을 나타낸

오가피, 황기, 목과, 목단피, 오미자, 황금에 대하여 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, water 순으로 용매분획하여 HAase 저해 활성을 조사한 결과(Table 3), 6가지 모두 ethyl acetate와 water 분획물 (1 mg/mL)에서 높은 활성을 보였으며, 특히 황기와 목단피의 ethyl acetate 분획물에서 64% 이상의 활성을 나타내었다. 위의 결과로부터 HAase 저해 활성물질은 매우 극성이 높은 물질일 것으로 추측된다. HAase 활성을 억제하는 기능을 갖는 물질들에는 flavonoids, tannins, spice의 curcumines, 감초의 glycyrrhizin 등이 알려져 있고, 이들 성분들과 일부 식물 추출물들이 항염증제로서 사용되고 있다(20). 또한 정 등(21)은 조구동의 ethyl acetate 분획물로부터 활성물질인 화합물을 분리하여 ursolic acid로 동정하였으며, 목단피로부터 2종의 monoterpene 배당체를 분리하여 paeoniflorin과 oxypaeoniflorin으로 동정하여 보고한 바 있다.

DPPH 자유라디칼에 대한 전자공여능

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 라디칼로 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정화된 구조의 화합물로서 항산화 물질 존재하에서 환원되어 색깔을 띠지 않는 에탄올 용매가 된다(22). DPPH 라디칼에 대한 전자공여능을 측정한 결과, 목단피, 백작약, 차전자, 마가목, 복분자 에탄올 추출물이 1 mg/mL 농도에서 90% 이상의 높은 활성을 나타내었으며, 대조군으로 이용한 BHA와 α -tocopherol과 유사한 활성을 나타내었다(Table 2). 오미자, 황금, 감초, 황기, 두충도 50% 이상의 활성을 보였다. 에탄올 추출물에서 비교적 높은 활성을 나타낸 두충, 목단피, 백작약, 복분자를 n-hexane, chloroform, ethyl acetate 용매로 분획하여 라디칼 저해 활성을 조사한 결과(Table 4), 4가지 모두 ethyl acetate 분획물 (1 mg/mL)에서 높은 활성을 보였으며, 목단피와 백작약의 ethyl acetate 분획물은 95% 이상으로 대조군인 α -tocopherol과 BHA와 유사한 활성을 나타내었다. 목단피와 백작약은 n-hexane 분획물에서 각각 68%, 50%의 활성을 보였으나 물층에서도 각각 68%, 73%의 활성을 나타내었다. 복분자의 경우 chloroform 분획물에서도 ethyl acetate 분획물과 유사한 90%의 높은 활성을 나타내었다. 전자공여능은 라디칼에 수소를 공여함으로써 지질 과산화를 억제할 뿐만 아니라 체내에서 라디칼에 의한 노화의 억제에 이용된다. 따라서 이들 ethanol 추출물의 DPPH 라디칼에 대한 전자 공여능의 작용은 수소 공여체로서 또한 지질 라디칼과 반응하는 primary 항산화제로서 매우 효과적임을 보여주었다.

Hydroxyl(\cdot OH) 라디칼 소거 활성

Hydroxyl 라디칼은 활성 산소 라디칼 중에서 화학적으로 가장 반응성이 크며 기질을 산화시킬 수 있는 라디칼로, 특히 superoxide anion 라디칼 ($O_2^{\cdot -}$)을 생성하는 원인으로 작용하여 인접한 분자에 매우 심각한 손상을 초래한다. 생약재 추출물의 hydroxyl 라디칼에 대한 소거능은 Fenton 반응계를 이용하였다. 실험결과, 1 mg/mL 농도에서 위령선, 초용담, 통초, 구절초, 차조기잎 등이 DPPH 라디칼에 대한 소거능은 상대적으로 매우 낮았으나 hydroxyl 라디칼에 대하여 90% 정도의 소거능을 나타내어 실제로 체내에서 생성된 hydroxyl 라디칼에 대해서 매우 유용할 것으로 사료된다(Table 2). 이

외에 대부분의 추출물이 80%의 높은 활성을 나타내어 생약재 성분 자체가 hydroxyl 라디칼에 비교적 안정하며 매우 효과적인 소거제로서 작용함을 보여주었다. 남 등(23)은 석곡(*Dendrobium moniliforme* L.)의 열수추출물의 90%의 높은 활성을 보고한 바 있다. 두충, 목단피, 백작약, 복분자의 용매분획에 따른 활성은 각각의 용매분획층에서 유사한 활성도를 보였으나, 물층에서의 활성은 비교적 낮았다(Table 4). 이는 소거능을 나타내는 활성 성분이 모든 용매분획에 분산되어 있고, 이러한 물질들은 비극성 또는 중간 극성에 가까운 물질일 것으로 사료된다.

지질과산화 억제 활성

HAase 저해 활성과 라디칼에 대한 높은 소거능을 갖는 산사, 황기, 두충, 목단피, 백작약, 오미자, 황금, 마가목 에탄올 추출물에 대하여 지질과산화 억제 활성을 측정하였다. 지질과산화 억제 활성은 linoleic acid 기질과 phosphatidylcholine (난황레시틴) 리포솜 기질에 대한 과산화억제 활성으로 측정하였다. β -carotene/linoleic acid에 대한 과산화 억제능은 마가목이 82%로 가장 높았으며, 리포솜에 대한 과산화 억제능은 오미자가 78%로 가장 높았다(Table 5). 오미자는 두 기질에 대하여 모두 가장 높은 활성을 나타내었다. 특히, 오미자는 두 기질에 대하여 모두 가장 높은 활성을 나타내었다. Liposome을 이용한 생체 내 지질 과산화의 반응모델에 산화를 촉진하는 Fe를 첨가하여 실시하였다.

Table 1. List of traditional herbal medicines investigated and their yield of ethanolic extracts

| Name of traditional herbal medicines | | Family | Used part | Yield (%) |
|---------------------------------------|-------------|-------------------|-----------|-----------|
| Botanical name | Korean name | | | |
| <i>Acanthopanax Cortex</i> | 오가피 | Araliaceae | Rhizome | 4.1 |
| <i>Achyranthis Radix</i> | 우슬 | Amaranthaceae | Radix | 7.5 |
| <i>Aconitum koreanum</i> Raym. | 백부자 | Ranunculaceae | Tuber | 1.1 |
| <i>Amomum xanthioides</i> Wallich | 산사 | Rosaceae | Fruit | 28.6 |
| <i>Angelicae gigantis Radix</i> | 당귀 | Angelicagigas | Radix | 14.9 |
| <i>Angelicae koreanae Radix</i> | 강활 | Umbelliferae | Root | 43.0 |
| <i>Astragali Radix</i> | 황기 | Leguminosae | Root | 4.6 |
| <i>Chaenomelis Fructus</i> | 모과 | Rosaceae | Fruit | 15.4 |
| <i>Chinae Rhizoma</i> | 도복령 | Liliaceae | Root | 2.4 |
| <i>Chrysanthemi sibirici Herba</i> | 구절초 | Compositae | Leaf | 4.6 |
| <i>Citri Pericarpium</i> | 진피 | Rutaceae | Cortex | 10.0 |
| <i>Clematidis Radix</i> | 위령선 | Ranunculaceae | Root | 18.4 |
| <i>Cleosia argentea</i> | 청상자 | Amaranthaceae | Seed | 6.6 |
| <i>Cnidii Rhizoma</i> | 천궁 | Umbelliferae | Rhizome | 27.0 |
| <i>Corni Fructus</i> | 산수유 | Cornaceae | Fruit | 28.9 |
| <i>Dictamnus albus</i> L. | 백선피 | Rutaceae | Radix | 16.9 |
| <i>Dioscorea Rhizoma</i> | 산약 | Dioscoreaceae | Rhizoma | 0.5 |
| <i>Eucommia Cortex</i> | 두충 | Eucommia ulmoides | Cortex | 4.5 |
| <i>Gentiana scabra</i> Bunge. | 초용담 | Gentianaceae | Root | 44.0 |
| <i>Ginseng Radix</i> | 인삼 | Araliaceae | Root | 3.3 |
| <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 감초 | Leuaminosae | Radix | 10.3 |
| <i>Hocquartia manshuriensis</i> Nakai | 통초 | Araliaceae | Stem | 6.3 |
| <i>Kalopanax pictum</i> Nakai | 해동피 | Leguminosae | Cortex | 3.3 |
| <i>Loranthi Ramulus</i> | 상기생 | Loranthaceae | Ramulus | 15.1 |
| <i>Lycii Fructus</i> | 구기자 | Solanaceae | Fruit | 8.7 |
| <i>Mori Cortex Radicis</i> | 상백피 | Moraceae | Radix | 7.4 |
| <i>Moutan Radicis Cortex</i> | 목단피 | Paeoniaceae | Cortex | 4.8 |
| <i>Paeoniae Radix Alba</i> | 백작약 | Paeoniaceae | Radix | 4.0 |
| <i>Perillae Folium</i> | 차조기잎 | Labiatae | Leaf | 4.6 |
| <i>Plantaginis Semen</i> | 차전자 | Plantaginaceae | Seed | 2.8 |
| <i>Platycodi Radix</i> | 길경 | Campanulaceae | Radix | 1.5 |
| <i>Polygoni multiflori Radix</i> | 하수오 | Polygonaceae | Radix | 17.0 |
| <i>Poria cocos</i> wolf | 백복령 | Polyporaceae | Wolf | 6.3 |
| <i>Puerariae Radix</i> | 갈근 | Leuaminosae | Radix | 12.9 |
| <i>Rubus coreanus</i> Miq. | 복분자 | Rosaceae | Fruit | 10.4 |
| <i>Schizandrae Fructus</i> | 오미자 | Schizandraceae | Seed | 27.4 |
| <i>Scutellaria Radix</i> | 황금 | Labiatae | Radix | 33.1 |
| <i>Siegesbeckiae Herba</i> | 희철 | Compositae | Leaf | 26.8 |
| <i>Sophorae Radix</i> | 고삼 | Leuaminosae | Radix | 1.04 |
| <i>Sorbus commixta</i> Hedl. | 마가목 | Rosaceae | Cortex | 5.5 |
| <i>Trichosanthis Radix</i> | 천화분 | Cucurbitaceae | Root | 1.0 |

Table 2. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activities for the ethanolic extracts of traditional herbal medicines

| Name of traditional herbal medicines | Hyaluronidase inhibitory activities | Electron donating effect on DPPH | Hydroxyl radical(\cdot OH) scavenging activity (%) |
|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---|
| Botanical name | (%) | radical (%) | |
| <i>Acanthopanax Cortex</i> | 60.2 ± 2.90 ^a | - | 66.6 ± 0.35 |
| <i>Achyranthis Radix</i> | 22.8 ± 2.92 | 25.5 ± 0.37 | 88.7 ± 0.21 |
| <i>Aconitum koreanum Raym.</i> | - ^b | - | 88.8 ± 0.03 |
| <i>Amomum xanthioides Wallich</i> | 50.0 ± 3.52 | 10.7 ± 0.27 | 88.6 ± 0.19 |
| <i>Angelicae gigantis Radix</i> | 20.4 ± 0.83 | - | 88.1 ± 0.19 |
| <i>Angelicae koreanae Radix</i> | - | 29.0 ± 0.06 | 88.5 ± 0.24 |
| <i>Astragali Radix</i> | 61.2 ± 2.59 | 50.3 ± .024 | 88.5 ± 0.19 |
| <i>Chaenomeles Fructus</i> | 57.4 ± 0.40 | 36.3 ± 0.07 | 69.3 ± 0.24 |
| <i>Chinae Rhizoma</i> | - | 14.7 ± 0.09 | 65.0 ± 0.21 |
| <i>Chrysanthemi sibirici Herba</i> | - | 24.9 ± 0.65 | 89.8 ± 0.52 |
| <i>Citri Pericarpium</i> | - | 10.8 ± 0.09 | 88.8 ± 0.03 |
| <i>Clematidis Radix</i> | - | 18.5 ± 0.87 | 89.1 ± 0.11 |
| <i>Cleosia argentea</i> | 4.8 ± 1.09 | 14.7 ± 0.13 | 87.2 ± 0.10 |
| <i>Cnidii Rhizoma</i> | - | 22.9 ± 0.05 | 88.0 ± 0.17 |
| <i>Corni Fructus</i> | 11.0 ± 1.09 | 27.6 ± 0.42 | 71.1 ± 0.28 |
| <i>Dictamnus albus L.</i> | - | - | 88.5 ± 0.28 |
| <i>Dioscorea Rhizoma</i> | - | - | 68.6 ± 0.27 |
| <i>Eucommia Cortex</i> | 63.1 ± 1.46 | 72.2 ± 0.18 | 61.8 ± 0.25 |
| <i>Gentiana scabra Bunge.</i> | - | 12.4 ± 0.29 | 89.1 ± 0.03 |
| <i>Ginseng Radix</i> | 46.6 ± 2.74 | - | 69.0 ± 0.31 |
| <i>Glycyrrhizae Radix</i> | - | 62.4 ± 0.75 | 70.7 ± 0.07 |
| <i>Hocquartia manshuriensis Nakai</i> | - | 29.9 ± 0.20 | 89.4 ± 0.07 |
| <i>Kalopanax pictum Nakai</i> | 20.6 ± 0.44 | 17.9 ± 0.29 | 70.4 ± 0.30 |
| <i>Loranthi Ramulus</i> | - | - | 62.5 ± 0.23 |
| <i>Lycii Fructus</i> | - | - | 70.9 ± 0.20 |
| <i>Mori Cortex Radicis</i> | - | 26.3 ± 0.69 | 66.8 ± 0.17 |
| <i>Moutan Radicis Cortex</i> | 55.4 ± 2.53 | 95.6 ± 0.05 | 88.6 ± 0.15 |
| <i>Paeoniae Radix Alba</i> | 35.0 ± 1.09 | 93.9 ± 0.15 | 88.7 ± 0.17 |
| <i>Perillae Folium</i> | 1.3 ± 0.91 | 37.9 ± 0.27 | 89.5 ± 0.03 |
| <i>Plantaginis Semen</i> | 16.1 ± 3.24 | 94.8 ± 0.05 | 66.4 ± 0.17 |
| <i>Platycodi Radix</i> | - | 27.5 ± 0.18 | 67.1 ± 0.31 |
| <i>Polygoni multiflori Radix</i> | - | - | 66.1 ± 0.03 |
| <i>Poria cocos wolf</i> | 25.7 ± 2.77 | 13.8 ± 1.18 | 64.3 ± 0.27 |
| <i>Puerariae Radix</i> | - | 53.0 ± 0.22 | 88.8 ± 0.37 |
| <i>Rubus coreanus Miq.</i> | 20.3 ± .078 | 94.4 ± 0.05 | 70.8 ± 0.45 |
| <i>Schizandrae Fructus</i> | 62.6 ± 0.71 | 66.3 ± 0.23 | 70.8 ± 0.34 |
| <i>Scutellaria Radix</i> | 64.7 ± 1.43 | 66.2 ± 0.47 | 69.3 ± 0.19 |
| <i>Siegesbeckiae Herba</i> | - | - | 88.2 ± 0.07 |
| <i>Sophorae Radix</i> | - | - | 67.2 ± 0.43 |
| <i>Sorbus commixta Hedl.</i> | 24.0 ± 1.46 | 94.0 ± 0.10 | 89.6 ± 0.33 |
| <i>Trichosanthis Radix</i> | - | - | 61.1 ± 0.45 |

To test hyaluronidase inhibitory and radical scavenging activity of herbal medicine, concentration of each ethanol extract was treated at 10 mg/mL and 1mg/mL, respectively.

^a Result was expressed as the mean ± S.D of three parallel measurements

^b - : No effect

Table 3. Hyaluronidase inhibitory activities of each organic solvent extracts fractionated from ethanolic extracts of herbal medicines

| Sample | Inhibition (%) | | | |
|------------------------------|-------------------------|-------------|---------------|-------------|
| | Hexane | Chloroform | Ethyl acetate | Water |
| <i>Acanthopanax Cortex</i> | 3.0 ± 3.03 ^a | 16.8 ± 0.03 | 54.8 ± 1.23 | 69.6 ± 2.44 |
| <i>Astragali Radix</i> | - | 20.5 ± 0.90 | 64.9 ± 0.68 | 65.3 ± 1.38 |
| <i>Chaenomeles Fructus</i> | - | - | 48.9 ± 2.07 | 58.2 ± 4.36 |
| <i>Moutan Radicis Cortex</i> | 8.6 ± 2.01 | - | 64.6 ± 1.39 | 67.3 ± 1.23 |
| <i>Schizandrae Fructus</i> | 10 ± 0.28 | 2.6 ± 0.07 | 59.0 ± 2.79 | 67.1 ± 2.11 |
| <i>Scutellaria Radix</i> | 9.2 ± 0.92 | 20.0 ± 1.12 | 43.8 ± 0.72 | 55.2 ± 0.78 |

Concentration of each extract was 10 mg/mL.

^a Result was expressed as the mean ± S.D of three parallel measurements

Table 4. DPPH and hydroxyl radical scavenging activities of each organic solvent extracts fractionated from ethanolic extracts of herbal medicines

| Sample | Solvent | DPPH radical scavenging activity | | Hydroxyl radical scavenging activity | |
|------------------------------|---------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------|
| | | O.D at 517nm | Inhibition(%) | O.D at 520nm | Inhibition(%) |
| <i>Eucommia Cortex</i> | Hexane | 0.519 ± 0.008 | 50.1 ± 0.82 ^a | 0.248 ± 0.005 | 85.5 ± 0.33 |
| | Chloroform | 0.751 ± 0.003 | 27.8 ± 0.25 | 0.214 ± 0.004 | 87.6 ± 0.27 |
| | Ethyl acetate | 0.046 ± 0.004 | 95.6 ± 0.36 | 0.545 ± 0.003 | 67.3 ± 0.21 |
| | Water | 0.620 ± 0.032 | 40.4 ± 0.24 | 1.118 ± 0.001 | 35.0 ± 0.56 |
| <i>Moutan Radicis Cortex</i> | Hexane | 0.329 ± 0.011 | 68.3 ± 0.98 | 0.222 ± 0.003 | 87.1 ± 0.18 |
| | Chloroform | 0.771 ± 0.002 | 25.9 ± 0.17 | 0.220 ± 0.003 | 87.2 ± 0.17 |
| | Ethyl acetate | 0.050 ± 0.020 | 95.2 ± 0.21 | 0.316 ± 0.001 | 81.4 ± 0.07 |
| | Water | 0.325 ± 0.003 | 68.75 ± 0.83 | 1.084 ± 0.029 | 25.5 ± 0.43 |
| <i>Paeoniae Radix Alba</i> | Hexane | 0.519 ± 0.008 | 50.1 ± 0.82 | 0.219 ± 0.006 | 87.3 ± 0.37 |
| | Chloroform | 0.751 ± 0.003 | 27.8 ± 0.25 | 0.209 ± 0.001 | 87.8 ± 0.07 |
| | Ethyl acetate | 0.046 ± 0.004 | 95.6 ± 0.36 | 0.236 ± 0.003 | 86.2 ± 0.19 |
| | Water | 0.281 ± 0.024 | 72.98 ± 0.30 | 1.118 ± 0.001 | 23.2 ± 0.069 |
| <i>Rubus coreanus</i> Miq. | Hexane | 0.974 ± 0.001 | 6.3 ± 0.06 | 0.471 ± 0.002 | 71.9 ± 0.127 |
| | Chloroform | 0.088 ± 0.001 | 91.5 ± 0.10 | 0.248 ± 0.002 | 85.5 ± 0.153 |
| | Ethyl acetate | 0.085 ± 0.001 | 91.8 ± 0.10 | 0.241 ± 0.004 | 85.9 ± 0.288 |
| | Water | 0.720 ± 0.037 | 30.8 ± 0.20 | 0.959 ± 0.005 | 34.2 ± 0.360 |
| α-tocopherol | | 0.043 ± 0.001 | 95.9 ± 0.10 | | |
| BHA | | 0.048 ± 0.002 | 95.4 ± 0.17 | | |
| Quercetin | | 0.045 ± 0.001 | 95.7 ± 0.10 | | |
| Control | | 1.04 ± 0.001 | | A ₀ 0.010 | |

Concentration of each extract was 1 mg/mL.

^aResult was expressed as the mean ± S.D of three parallel measurements

Table 5. Lipid peroxidation inhibitory effect of each organic solvent extracts fractionated from ethanolic extracts of herbal medicines

| Name of traditional herbal medicines | β-carotene/linoleic acid | Liposome model system |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Botanical name | lipid peroxidation inhibition (%) | TBARS inhibition (%) |
| <i>Amomum xanthioides</i> Wallich | 75.6 ± 0.53 ^a | 63.9 ± 1.31 |
| <i>Astragali Radix</i> | 66.3 ± 0.43 | 66.2 ± 2.05 |
| <i>Eucommia Cortex</i> | 72.1 ± 1.10 | 46.8 ± 0.87 |
| <i>Moutan Radicis Cortex</i> | 76.1 ± 0.49 | 60.9 ± 2.30 |
| <i>Paeoniae Radix Alba</i> | 57.4 ± 0.20 | 68.8 ± 1.22 |
| <i>Schizandrae Fructus</i> | 73.1 ± 0.28 | 78.3 ± 1.10 |
| <i>Scutellaria Radix</i> | 66.9 ± 0.17 | 59.1 ± 0.09 |
| <i>Sorbus commixta</i> Hedl. | 82.0 ± 0.80 | 61.2 ± 1.40 |

Concentration of each extract was 1 mg/mL.

^aResult was expressed as the mean ± S.D of three parallel measurements

실제로 금속물질은 여러 경로를 통해서 형성된 과산화수소와 즉시 반응하고 hydroxyl 라디칼을 형성하며 이들은 불포화지방산과 탈수소반응을 통해 유리라디칼을 형성하는 secondary 산화가 진행된다. 특히, 세포막 지질과산화 반응이 라디칼에 의해 촉진되며 생체 DNA의 초기손상까지 일으키므로(24) 위의 결과 높은 활성을 나타낸 추출물은 primary와 secondary 항산화제로서의 이용가능성이 충분할 것이다.

따라서 항염증 작용으로서 HAase 활성을 저해시키는 물질로서 황기, 목단피, 오미자 등이 또한 오미자, 목단피, 백작약, 복분자 등은 활성산소종에 의한 조직 손상 및 염증 질환에 매우 유효한 소재로서 이용될 수 있으리라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 항염증 및 항산화 활성을 갖는 유용한 물질을 검색하기 위해 40여 가지 생약재를 에탄올 추출하여 HAase 억제 및 라디칼 소거 활성을 측정하였다. HAase 억제 활성을 측정한 결과, 1 mg/mL의 농도에서 황기, 두충, 오미자, 황금, 오가피, 목과, 목단피, 산사가 50% 이상의 저해활성을 나타내었고, 이들에 대하여 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, water로 순차적으로 용매분획하여 활성을 측정한 결과, 모든 시료의 ethyl acetate와 water 분획에서 높은 활성을 보였다. 항산화 활성은 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능과 Fenton 반응에 의해 발생한 hydroxyl radical에 대한 소거능으로 평가하였다. DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 복분자, 목단피, 백작약, 차전자, 마가목 에탄올 추출물이 1 mg/mL 농도에서 90% 이상으로 대조군으로 이용한 BHA와 α -tocopherol과 유사한 활성을 나타내었다. 2-deoxyribose 산화법에 따른 hydroxyl 라디칼 소거활성에서 대부분의 에탄올 추출물 시료에서 모두 높은 활성을 나타내었다. 활성을 갖는 시료에 대하여 지질과산화 억제 활성을 측정한 결과 linoleic acid와 phosphatidylcholine liposome 기질 모두에 대하여 오미자 추출물은 가장 높은 억제 활성을 나타내었다.

감 사

본 연구는 보건복지부 보건과학기술진흥사업의 지원 (과제번호 : 01-PJ1-PG3-22000-0033)에 의하여 이루어진 연구결과의 일부이며, 이에 저자는 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee, N. H., S. J. Lee, D. S. Jung, H. J. Bu, H. C. Yang, and K. Z. Riu (2001), Screening of the Tyrosinase Inhibition and Hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju, *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 175-180.
- Ghosh, P. (1994), The role of hyaluronic acid in health and disease : interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid, *Clin. Exp. Rheumatol.* **12**, 82-85.
- Meyer, K. (1947), The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase, *Physiol. Rev.* **27**, 335-359.
- Golberg, R. L., J. P. Huff, M. E. Lenz, P. Glickman, R. Katz, and E. J. M. A. Thonar (1991), Elevated plasma levels of hyaluronate in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Arth. Rheum.* **34**, 799-807.
- Stern, M. and R. Stern (1992), An Elisa-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors, *Matrix* **12**, 397-403.
- Cerutti, P. A. (1994), Oxygen-radicals and cancer, *Lancet* **344**, 862-863.
- Fisher-Nielsen, A., I. B. Jeding, and S. Loft (1994), Radiation induced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and its prevention by scavengers, *Carcinogenesis* **15**, 1609-1612.
- Cerutti, P. A. and B. F. Trump (1991), Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis, *Cancer Cells* **3**, 1-7.
- Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge and C. E. Cross (1992), Free radicals, antioxidants, and human disease : Where are we now?, *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 598-620.
- Ohima, H. and H. Bartsch (1994), Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis, *Mutat. Res.* **305**, 253-264.
- Yun, H. Y., V. L. Dawson, and T. M. Dawson (1996), Neurobiology of nitric oxide, *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 291-316.
- Hur, S. K., S. S. Kim, Y. H. Heo, S. M. Ahn, B. G. Lee, and S. K. Lee (2001), Effects of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw 264.7 macrophages, *J. Appl. Pharmacol.* **9**, 188-193.
- Blois, M. S. (1958), Antioxidative determination by the use of a stable free radical, *Nature* **181**, 1199-1200.
- Kim, Y. S., Y. K. Noh, G. I. Lee, and Y. K. Kim (1995), Inhibitory effects of Herbal Medicines on hyaluronidase activity, *Kor. J. Pharmacogn.* **26**, 265-272.
- Lee, J., S. H. Lee, K. R. Min, K. S. Lee, J. S. Ro, J. C. Ryu, and Y. Kim (1993), Inhibitory effects of hydrolyzable tannins on Ca²⁺-activated hyaluronidase, *Planta Media*, in press.
- Chung, S. K., T. Osawa, and S. Kawakishi (1997), Hydroxyl radical scavenging effects of spices from Brown mustard (*Brassica nigra*), *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 118-121.
- Taga, M. S., E. E. Miller, and D. E. Pratt (1984), Chia seeds as a source of natural lipid antioxidant, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **61**, 928-931.
- Fukazawa, K., H. Chida, A. Tokomura, and H. Tsukatani (1981), Antioxidant effect of alpha-tocopherol in incorporation into lecithin liposome on ascorbic acid-iron(2+)- induced lipid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 173-178.
- Kim, E. J., O. J. Oh, S. K. Lee, and K. S. Yang (2001), Inhibitory effect of Astragali Radix on COX-2 activity, *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 311-315.
- Kushwah, A., M. K. Amma, K. N. Sareen (1978), Effect of some anti-inflammatory agents on lysosomal and testicular hyaluronidases, *Indian J. Exp. Biol.* **16**, 222-224.
- Jeong, S. J., Y. S. Ko, N. H. Ahn, and Y. C. Kim (1998), Hyaluronidase inhibitor from *Uncariae Ramulus et Uncus*, *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 169-172.
- Luciana L., F. S. Mensor, G. G. Menezes, A. S. Leitao, T. C. Reis, D. Santos, S. C. Cintia, and G. L. Suzana (2001), Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.* **15**, 127-130.
- Nam, S. H. and M. Y. Kang (2000), Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants, *Kor. J. Soc. Agric. Chem, Biotechnol.* **43**, 141-147.
- Ueda, K., S. Kobayashi, J. Morita, and T. Komano (1985), Site-specific DNA mutation caused by lipid peroxidation products, *Biochem. Biophys. Acta.* **824**, 341-348.