

冬葵子와 茄麻子의 抗酸化 效能 研究

최정운[#], 成洛戌¹, 이영종^{*}

曉園大學校 韓醫科大學 本草學教室, 1: 농촌진흥청 작물과학원

Effects of Malvae Semen and Abutili Semen on Anti-oxidation Activities

Jung-Woon Choi[#], Nak-Sull Seong¹, Young-Jong Lee^{*}

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

1: National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

Objectives : Anti-oxidation activities of Malvae Semen and Abutili Semen were compared and evaluated.

Methods : We tested the anti-oxidant effect through in vitro experiment and in vivo experiment that induced oxidative stress using ethanol.

Results : 1. In the anti-oxidative activities of Malvae Semen and Abutili Semen they had high effects in case of the scavenging activitie of DPPH and superoxide anion radical, and inhibitory effect of linoleic acid oxidation.

2. Malvae Semen had large quantities of phenolic compound than Abutili Semen, but the anti-oxidative activity of Malvae Semen was weaker than that of Abutili Semen.

3. The anti-oxidative effect of Abutili Semen was more strong than that of Malvae Semen in the rat stressed by ethanol.

Conclusion : Anti-oxidation activities of Abutili Semen were stronger than those of Malvae Semen. Therefore, the complementary usage of Malvae Semen and Abutili Semen can be considered.

Key words : Malvae Semen, Abutili Semen, anti-oxidation activities.

*교신저자: 이영종, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 031-750-5415 · E-mail: garak@kyungwon.ac.kr

#제1저자: 최정운, 경원대학교 한의과대학 본초학교실

· 접수 : 2006년 11월 27일 · 수정 : 2006년 12월 11일 · 채택 : 2006년 12월 20일

서 론

冬葵子는 神農本草經¹⁾ 上品에 “冬葵子, 味甘寒, 主五臟六腑, 寒熱羸瘦, 五癃利小便, 久服堅骨長肌肉, 輕身延年”이라고 처음 수재된 이후, 임상에서 利水通淋, 潤腸通便, 下乳의 효능으로淋病, 水腫, 大便不通, 乳汁不行을 치료하는데 사용되고 있으며²⁾, 尚麻子는 新修本草³⁾에 “尚實, 味苦, 平, 無毒, 主亦白冷熱癆, 散服飲之, 吞一枚破癆腫”이라고 처음 수록된 이후, 임상에서 清熱利濕, 解毒, 退翳의 효능이 있어 赤白痢疾,淋病濕痛, 癰腫, 二翳를 치료하는데 사용되고 있다⁴⁾.

冬葵子의 기원으로 대한약전외한약규격집⁵⁾에 아욱과(Malvaceae)의 아욱 *Malva verticillata* Linne의 씨라고 되어 있고, 중국약전⁶⁾에는 冬葵果라고 하여 같은 식물의 성숙한 과실을 여름과 가을에 채취하여 잡질을 제거하고 險乾한 것이라고 하였으며, 북한약전⁷⁾에는 같은 식물의 여문 씨를 가을에 모아서 햇볕에 말려 사용한다고 하였다. 尚麻子는 우리나라 공정서에는 수재되지 않았으며, 중국약전⁶⁾에 尚麻子라고 하여 아욱과(錦葵科; Malvaceae)에 속하는 尚麻(어저귀) *Abutilon theophrasti* Medicus의 성숙한 과일을 가을에 채취하여 햇볕에 말린 후 종자만을 취하여 사용한다고 하였다.

冬葵子의 효능으로 高 등⁸⁾은 冬葵子를 水濕障碍로 인한 諸般 症狀, 大便의 煙結症狀, 乳房脹痛, 乳汁不下 등에 응용할 수 있고, 消化機能은 정상이나 水道不利하여 몸이 뭉거나 小便障碍가 있는 등의 증상, 脂肪過剩으로 肥滿이면서 便秘를 同伴하는 증상 등의 치료약물로 사용할 수 있다고 하였다. 또한, 최근의 연구에 의하면 冬葵子 또는 冬葵葉에는 항염성분이 있으며^{9,10)}, 면역기능증강 효능 및 저혈당증 해소 등에 대한 효과도 보고된 바 있다^{11,12)}.

이처럼 冬葵子는 二便不通, 肥滿 등에 효능이 있어 한약으로 뿐만 아니라 식품으로도 많이 사용되는데, 시중 유통 冬葵子에는 尚麻子가 혼용되어 있는 경우가 많다.

이에 저자는 冬葵子와 尚麻子의 효능을 검증하여, 冬葵子와 尚麻子를 적절히 사용하는데 지침을 마련하고자 하였으며, 항산화에 대한 효능을 검사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 冬葵子(*Malva verticillata* Linne)는 국내산을 경동시장 종묘시장에서, 尚麻子(*Abutilon theophrasti* Medicus)는 중국산을 중국 安國市場에서 구입하여 경원대학교 본초학교실에서 감정한 후 사용하였다.

2) 동물

동물로는 Sprague-Dawley 계의 수컷 흰쥐를 구매하여 2 주일 이상 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명설비에 의하여 조명시간을 오전 7:00부터 오후 7:00까지 12시간으로 조절하며, 실내온도는 $22\pm1^{\circ}\text{C}$, 습도는 60% 내외로 유지하였고, 급수는 일반 상수도를 사용하였고 사료와 급수는 제한하지 않았다. 정상사료를 食餌하면서 사육한 후에 체중이 $250\pm10\text{g}$ 인 개체를 실험에 사용하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

ammonium thiocyanate, acetaldehyde, formaldehyde, formamide, glutamine, hydrogen peroxide, silymarin group, tannic acid 등은 Aldrich 제품, DMSO(dimethyl sulfoxide), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), glutathione, linoleic acid, methyl pyrazole, DPN(diphosphopyridine nucleotide), NBT(nitro blue tetrazolium chloride monohydrate), sodium nitrite, sodium azide, sodium pyrophosphate, dithiobis, trypan blue, pyrophosphate, ferrous-chloride, magnesium chloride, phosphoric acid, PMS(phenazine methosulfate), rotenone, semicarbazide-HCl 등은 SIGMA 제품, cholic acid, cholesterol, glutathione reductase, superoxide dismutase, xanthine monosod salt 등은 WAKO 제품, Folin-Ciocalteu' phenol Reagent, KCN 등은 Fluka 제품, DMEM(Dulbecco's modified eagle medium), BCS (bovine calf serum), Trypsin-EDTA 등은 JBI(Join Bio-Innovation, Korea) 제품, penicillin-streptomycin은 Cambrex 제품, ethanol은 J.T.Baker 제품, xanthine oxidase는 Calbio 제품, isofurane은 중외제약 제품을 사용하였다.

(2) 기기

원심분리기는 high speed centrifuge(Kontron, Model

T-324, Italy), ultra centrifuge(Kontron, Model T-2000, Italy), 조직마쇄용으로 homogenizer(B·Braun, Model Potter S, Germany), 용액시료의 냉동건조에는 freeze-dryer(Labconco, Model LYPH·LOCK 12, USA)와 centra-vac system(Vision, Model VS-802F, Korea), 흡광 치측정용으로 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu, Model Mini-1240, Japan), 진조시료의 분쇄에는 pulverizer(RONG-TSONG Iron workers, Taiwan), 용액시료의 농축에는 rotary evaporator(TOKYO RIKAKIKAI Co., Model Eyela, Japan), 세포배양에는 CO₂ incubator(Nuaire, USA) 및 clean bench(Hansol SM, Korea), 마취기로는 MDS Matrix VMC anesthesia Machine (Matrix Medical Inc, Model Vip 3000, England)를 사용하였고, 혈액성분 분석에는 ADVIA1650(Bayer, Japan), HITACHI 7180(HITACHI, Japan)를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

in vivo 실험에는 전탕액을, 그리고 *in vitro* 실험에는 전탕 액스 분말을 사용하였다. 약제를 냉각기가 부착된 둥근 플라스크에 넣은 후, 10-15 배량의 증류수를 첨가한 다음, 플라스크 탕액이 끓는 시점으로부터 2시간 동안 煎湯하였다. 전탕이 끝난 용액을 4겹의 거어즈로 여과한 후 여과액을 비이커에 옮겨 넣고 가열하여 농축하였고, 농축된 전탕액을 적당량으로 분주하여 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다. 조제된 농축 冬葵子 전탕액의 농도는 1.25g/ml, 농축 尚麻子 전탕액의 농도는 0.41g/ml이었다. *in vitro* 실험을 위한 시료로는 준비된 전탕액을 동결건조기로 완전 건조한 분말을 사용하였다. 冬葵子 전탕액으로부터 얻은 분말의 수율($100 \times$ 최종분말의 중량 / 전탕에 사용된 약재의 중량)은 12.6%이었으며, 尚麻子 전탕액으로부터 얻은 분말의 수율은 13.4%이었다.

2) 산화반응 억제효과 측정

(1) DPPH 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Lee 등¹³⁾의 방법에 따라 실시하였다. 1.5×10^{-4} M의 농도로 에탄올에 녹여 조제한 DPPH 반응액과 일정 농도의 시료를 30㎕를 첨가해 최종 부피가 3㎖가 되게 혼합하고 3분 후에 517㎚에서 흡광도를 측정하여 소거능(%)을 산출하였다.

(2) Superoxide anion radical 소거능

Superoxide anion radical 소거능은 Nishikimi 등¹⁴⁾의 방법에 따라 실시하였다. 시료 500㎕, 0.1M Tris-HCl 완충액 (pH 8.5) 100㎕, 100µM PMS 200㎕, 500µM NBT 200㎕ 및 500µM NADH 400㎕를 가해 560㎚에서 흡광도 측정하고 시료를 함유하지 않은 용매에 대한 소거율(%)로 결과를 나타내었다.

(3) Linoleic acid 과산화저해

Linoleic acid 과산화저해율은 Haraguchi 등¹⁵⁾의 방법에 따라 실시하였다. 25mg/ml 농도의 시료용액 30㎕, linoleic acid 400㎕, phosphate buffer 800㎕, 종류 수 770㎕를 가해 반응 혼합물을 만들어 40℃에서 자동산화를 유발하였다. 이 반응액 0.1㎖을 24시간 후 취해 0.1㎖의 30% NH₄SCN 및 75% 에탄올 2.7㎖와 혼합한 액에 2.45mg/ml 농도의 ferrous chloride 0.1㎖을 가해 혼합하고 3분 후 500㎚에서 흡광도 측정하여 용매를 사용한 대조군의 흡광도에 대한 저해율(%)로서 항산화 효과를 나타내었다.

(4) 총페놀 함량

페놀 함량은 Kim 등¹⁶⁾의 방법에 따라 실시하였다. 시료액 100㎕와 2% Na₂CO₃ 2㎖ 및 50% Folin-Ciocalteau 시약 100㎕를 혼합하고 30분 후 흡광도를 750㎚에서 측정한 후 얻어진 흡광도를 tannic acid를 표준물질로 사용한 검량선에 근거하여 산출하였다.

3) 산화 동물모델에서의 항산화 효과 측정

(1) 산화적 스트레스 유발 및 약재투여

Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 2주일간 예비 사육한 후, 에탄올 단독투여군인 대조군(control), 강력한 항산화제인 실리마린(silymarin; 1g/kg body weight/day)투여군, 그리고 검액투여군 등으로 실험군을 나누어, 모든 실험군에 2주일 동안 매일 마리당 30% 에탄올 3.0㎖를 경구투여 하여 산화적 스트레스를 유발하였다(Table 1).

산화적 스트레스 유발과 동시에 실험군에는 冬葵子 전탕액(1.25g/ml)과 尚麻子 전탕액(0.41g/ml)을 2주일 동안 매일 1회에 걸쳐 17:00에서 18:00까지 개체

당 0.5㎖씩 경구투여 하였고, 대조군에는 전탕액 대신에 생리식염수(0.85% NaCl)를, 실리마린 투여군에는 실리마린(1g/kg body weight/day)을 투여하였다.

Table 1. Experimental Design for *in vivo* Test for 2 Weeks

Groups	Ethanol	Administrations		
Control	Yes	Saline		
Silymarin	Yes	Silymarin weight/day)	(1g/kg body weight/day)	
Experimental group	Yes	Malvae Semen Ext. weight/day)	(2.5g/kg body weight/day)	
		Abutili Seme Ext.	(0.82g/kg body weight/day)	

(2) 간장 적출 및 효소액 조제

간장은 0.9%의 식염수로 관류한 후 적출하여 세척하고 여과지로 수분을 제거한 다음 -70°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였으며, 조직 균질액 및 효소액 준비과정은 Fig. 1과 같다. 간장 1g에 10.0㎖의 0.1M phosphate buffer를 가한 다음 빙냉상태에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 600×g로 15분간 원심분리하였으며, 상등액 1.0㎖를 취하여 GSH(glutathione) 함량측정에 사용하였다. 나머지 9.0㎖를 8,000×g로 10분동안 재원심분리하여 얻은 침전물에 1.0㎖의 50mM PBS(phosphate buffered saline, pH7.0)을 가하여 catalase 및 ALDH(acetaldehyde dehydrogenase) 활성측정에 사용하였다. 상등액은 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리한 다음 그 상등액을 SOD(superoxide dismutase), GSH-peroxidase 및 ADH(alcohol dehydrogenase) 측정용 시료로 사용하였다(Fig. 1).

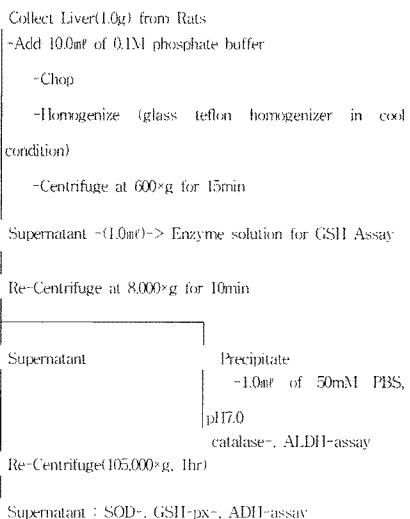


Fig. 1. Preparation of tissue homogenate and enzyme solution from rat liver.

(3) GSH(glutathione) 함량 측정

GSH의 함량은 Ellman 등¹⁷⁾의 방법에 따라 간 조직의 분쇄액을 준비하여 측정하였다. 균질화한 액을 20분간 원심분리(1,000×g, 40C)하여 상등액을 취하였다. 마쇄하여 얻은 homogenate액에 0.1% picric acid를 침가한 다음, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 그 상등액을 취하여 0.2 mM NADPH, 0.6 mM DTNB, 5 mM EDTA 및 glutathione reductase가 포함된 0.1M potassium, phosphate buffer(pH 7.5)를 침가하여 412 nm에서 30초 간격으로 3분간 흡광치 변화를 측정하였다.

(4) GSH-px(glutathione peroxidase) 활성 측정

GSH-px 활성은 Flohe¹⁸⁾의 방법에 따라 측정하였다. 1×10^{-3} M sodium azide와 1 mM EDTA를 함유하는 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 500 μl , 효소액 100 μl , glutathione reductase (2.768 U/mL) 100 μl , 1×10^{-2} M glutathione 100 μl 을 혼합, 37°C에서 10분 동안 예비 배양한 후 이 반응액에 0.1% NaHCO₃에 녹인 1.5×10^{-3} M NADPH 100 μl 를 가해 1분간 그리고 1.5×10^{-3} M H₂O₂ 100 μl 을 가한 후 다시 1분간 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 흡광도와 NADPH의 molecular extinction coefficient ($E=6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2$)로부터 효소액과 blank의 1분간의 NADPH 농도의 변화 ($\Delta[\text{NADPH}]/\text{min.}$)를 산출하고 이 효소액의 수치에서 blank의 수치와 GSH-px와 관련없는 인자에 의해 나타나는 $\Delta[\text{NADPH}]/\text{min.}$ 를 빼

준 값을 다음의 식에 대입하여 GSH-px의 활성 ($U/k/mg\ protein$)을 산출하였다.

$$Uk = 0.868 \times (\Delta[NADPH]/[GSH_0] \times t) \times (V_i/V_s)$$

V_i/V_s : 희석배수,

V_i : incubation volume,

V_s : initial sample volume,

GSH₀ : glutathione의 초기 농도

(5) SOD(superoxide dismutase) 활성 측정

SOD 활성은 Ptichis 등¹⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 15mM sodium xanthine(in 0.1M NaOH) 1.0 mL와 10mM hydroxylamine hydrochloride 0.1 mL, 원심 분리한 조직 상등액 10 μL 그리고 1/15M phosphate buffer(pH7.8) 1.49 mL를 혼합한 후 37°C에서 10분간 예열하였다. 여기에 xanthine oxidase (0.1U/mL) 200 μL를 가하고 다시 37°C에서 20분간 배양후, 0.05% sulfanilamide 0.1 mL, 0.02% N-(1-naphthyl)ethylenediamine 0.1 mL를 가한 후 실온에서 20분간 방치한 후 595nm에서의 흡광차변화를 측정하였다. 이와 함께 표준 SOD를 사용하여 동일한 과정을 행하여 표준검량선을 얻었으며, 시료의 단백질함량을 반영하여 활성(unit/mg protein)을 나타내었다.

(6) Catalase 활성 측정

Catalase 활성은 Abei²⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다. 0.1 mL의 원심분리한 상등액, 기질인 10.5 mM H₂O₂ 그리고 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 혼합하여 3mL이 되게 한 후 25°C에서 30초 동안 반응시켰으며, 이 반응액을 240nm에서 H₂O₂의 흡광도 변화로 효소 활성을 측정하였고, 효소활성(k/mg protein)은 1분간 1μM H₂O₂를 분해시키는 데 요구되는 효소량으로 나타내었다.

(7) ADH(alcohol dehydrogenase) 활성 측정

Tottmar 등²¹⁾의 방법에 따라 측정하였다 0.2 M ethanol 0.1 mL, 0.5 M semicarbazide 0.02 mL, 0.1 M NAD (in 0.01M HCl) 0.02 mL 및 0.1 M Tris buffer (pH 8.5) 2.0 mL를 혼합한 다음, 30°C로 온도를 조정하였다. 이 혼합액에 미리 준비된 효소액 0.1 mL를 가하여 파장 340nm에서 1 분간의 흡광도변화를 측정하였으며, 생성된 NADH의 양을 활성으로 환산하였으며,

계산식은 다음과 같았다.

$$\text{units/mL} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min}) \times (\text{reaction vol}) \times (\text{dilution factor})}{(\text{sample vol}) \times 6.22}$$

$$\text{units/mg protein} = \frac{\text{Activity (units/mL)}}{\text{mg protein / mL of sample}}$$

(Note) 6.22 : millimolar extinction coefficient of NAD⁺ at 340nm

(8) 단백질 함량 정량

단백질함량은 Bradford²²⁾의 방법에 따라 실시하였고, 검량표준곡선 작성을 위한 표준단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다.

4) 통계처리

in vivo 실험으로부터 얻은 결과들의 실험군별 상호비교를 위한 평균치는 평균 ± 표준오차 (Mean±S.E.)로써 산출하였다. 실험군 간의 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였으며 p-value가 0.05 미만인 경우에 그 유의성을 인정하였다.

in vitro 실험으로부터 얻은 결과들의 평균치는 평균±표준편차(Mean±SD)로써 산출하였다.

성 적

1. 산화반응 억제 효과

1) DPPH 소거 효과

冬葵子 전탕액 및 尚麻子 전탕액을 냉동건조하여 얻은 분말의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거능을 측정하여, 항산화제로 널리 활용되고 있는 BHT(butylated hydroxy toluene)의 DPPH 소거활성과 비교하였다. 125, 250, 500, 1000 μg/mL (=mg/kg)의 시료를 사용하였을 때, 冬葵子의 DPPH 소거능은 각각 2.6%, 4.8%, 7.7% 및 10.4%였다. 시료의 양이 증가함에 따라 DPPH 소거능 또한 증가하였으나, 시료의 양이 500 μg/mL 이상인 경우에는 소거활성이 다소 둔화되는 경향을 보였다. 尚麻子의 DPPH 소거능은 각각 1.9%, 3.1%, 6.6% 및 13.5%로, 시료의 양이 증가함에 비례

하여 DPPH 소거능 또한 증가하였으며, 시료의 양이 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하인 경우에는 소거활성이 多葵子에 다소 낮았으나, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우에는 多葵子의 경우보다도 DPPH 소거활성이 더 강하였다. BHT의 DPPH 소거활성은 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 6.2%, 12.6%, 18.6% 및 22.3%로 역시 BHT농도가 증가함에 따라 소거활성이 증가하였다. BHT 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 투여된 경우와 비교하였을 때, 多葵子는 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우에도 BHT 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우보다 소거활성이 낮았으나, 尚麻子는 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우에도 BHT 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 투여된 경우보다 더 DPPH 소거활성이 강였다. 이러한 소거활성과 尚麻子의 경우는 투여된 농도에 거의 정비례하여 소거활성이 증가하는 점으로 미루어 보아, 多葵子보다는 尚麻子의 DPPH 소거능이 더 강하다고 생각되었다. 본 연구에서 사용한 BHT는 고순도 (99.8%)이며, 多葵子 및 尚麻子는 전탕액을 냉동건조하여 얻은 분말임을 고려할 때, 多葵子와 尚麻子의 DPPH 소거활성은 매우 강한 편이라고 생각되었다 (Fig. 2).

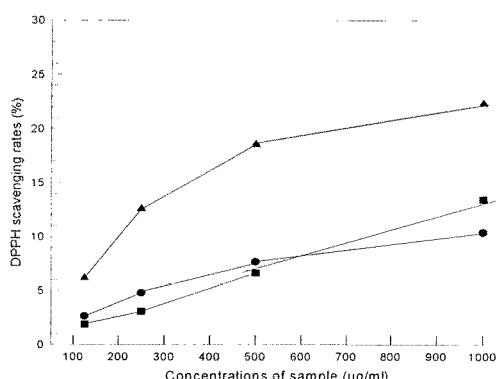


Fig. 2. DPPH-scavenging activities of Malvae Semen(-●-), Abutili Semen(-■-) and BIIT(-▲-).

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

MV: Extract powder prepared from Malvae Semen

AT: Extract powder prepared from Abutili Semen

BHT: Butylated hydroxy toluene

2) Superoxide anion radical 소거 효과

多葵子 전탕액 및 尚麻子 전탕액을 냉동건조하여 얻은 분말의 superoxide anion radical($\cdot\text{O}_2^-$) 소거능(scavenging activity)을 측정하였다. 100, 300, 500, 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (=mg/kg)의 시료를 사용하였을 때, 多葵子의 superoxide anion radical 소거능은 각각 0%,

0%, 10.2% 및 17.5%로, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로는 소거능이 없었으나, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 경우에는 시료의 양에 비례하여 소거능이 증가하였다. 尚麻子의 경우에는 100, 300, 500, 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (=mg/kg)의 시료를 사용하였을 때 superoxide anion radical 소거능이 각각 0.0%, 10.5%, 19.3% 및 24.2%로, 역시 시료의 양이 증가함에 따라 소거능 또한 증가하였다.

多葵子와 尚麻子 모두 시료의 양이 증가함에 따라 소거능 또한 증가하였고, 多葵子를 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 첨가하였을 때의 superoxide anion radical 소거활성(17.5%)보다 尚麻子 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 경우의 소거활성(19.3%)이 더 강한 점으로 미루어 보아, 多葵子보다는 尚麻子의 superoxide anion radical 소거능이 더 강하다고 생각되었다 (Fig. 3).

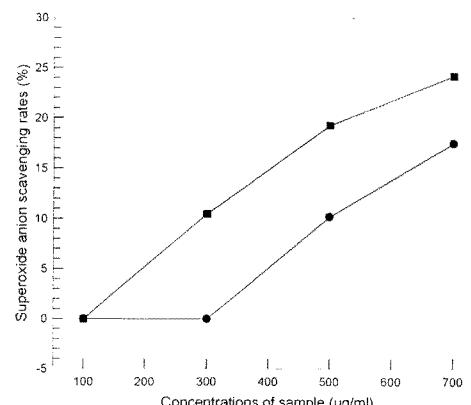


Fig. 3. Superoxide anion radical scavenging effects of Malvae Semen(-●-) and Abutili Semen(-■-).

MV: Extract powder prepared from Malvae Semen

AT: Extract powder prepared from Abutili Semen

3) Linoleic acid 과산화 저해 효과

多葵子 전탕액 및 尚麻子 전탕액을 냉동건조하여 얻은 분말이 linoleic acid의 산화를 억제하는 활성(oxidation inhibition)을 측정하였으며, 항산화제로 널리 활용되고 있는 BHT(butylated hydroxy toluene)와 ascorbic acid(AA; Vitamin C)의 산화억제활성과 비교한 결과, 전반적으로 多葵子, 尚麻子 및 BHT는 거의 유사한 양상으로 linoleic acid의 산화를 억제하였고, ascorbic acid는 초기에는 산화억제율이 54.4%로 11.3%, 23.4% 및 28.2%인 다른 세 경우보다 훨씬 높은 억제효율을 보였으나 50시간 이후에는 산화억제

율이 저하되어 오히려 다른 세 경우보다 상대적으로 낮은 억제율을 보였다. 10시간까지의 초기 산화억제율은 ascorbic acid가 탁월하였고, 冬葵子와 尚麻子는 ascorbic acid보다는 낮았으나, BHT보다는 높은 억제활성을 보였으며, 尚麻子가 冬葵子보다 다소 강한 산화억제활성을 보였다. 20시간 이후에는 冬葵子와 尚麻子가 거의 대등한 산화억제능을 보였으며, 그 산화억제능은 90시간까지도 유지되었다 (Fig. 4).

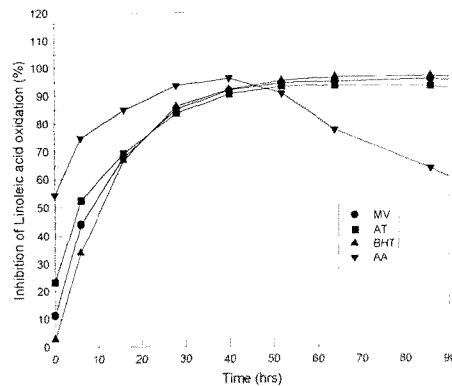


Fig. 4. Inhibitory effects of Malvae Semen and Abutili Semen on the oxidation of linoleic acid.

MV: Extract powder prepared from Malvac Semen

AT: Extract powder prepared from Abutili Semen

BHT: Butylated hydroxy toluene

AA: Ascorbic acid

4) 폐놀성 성분의 함량

폐놀성 물질(phenolic compounds)은 여러 산화반응을 억제하는 영향을 미치기 때문에, 冬葵子 및 尚麻子 전탕액 분말에 포함되어 있는 폐놀성 물질의 함량을 조사하였다. 冬葵子 전탕액 분말(MV)에는 폐놀성 성분이 $27.5\% (27.52 \pm 0.01 \text{ mg of phenolic compound/mg of sample})$, 그리고 尚麻子 전탕액 분말(AT)에는 $25.5\% (25.52 \pm 0.01 \text{ mg of phenolic compound/mg of sample})$ 의 폐놀성 성분이 함유되어 있었으며, 그 차이는 2.0% 정도로 큰 차이는 아니라 고 생각되었다 (Table 2).

Table 2. The Contents of Phenolic Compound in Malvae Semen and Abutili Semen

Groups	Contents	Contents of phenolic compound($M \pm SD; n=4$)
	MV	
	AT	$25.52 \pm 0.01 \text{ (mg/mg of sample)}$
		$27.52 \pm 0.01 \text{ (mg/mg of sample)}$

MV: Extract powder prepared from Malvae Semen

AT: Extract powder of the decoction prepared from Abutili Semen

2. 흰쥐 간에서의 항산화 효능

1) GSH(glutathione) 함량

흰쥐에 에탄올을 투여하여 산화적 스트레스를 유발하는 한편, 각 실험군에 冬葵子 전탕액, 尚麻子 전탕액 및 강력한 항산화제인 실리마린을 각각 투여하여, 스트레스만 유발한 대조군과 비교하였다. 흰쥐의 간(liver)을 절취하여 간에서의 산화적 스트레스의 지표가 되는 성분의 함량 또는 활성을 검사하였다.

에탄올만 투여한 대조군의 GSH 함량은 $5.5 \mu\text{g/g tissue}$ 였으며, 실리마린 군은 $15.0 \mu\text{g/g tissue}$ 로 대조군의 272.7%에 달하는 높은 수준이었다. 冬葵子 투여군의 GSH 함량은 $8.0 \mu\text{g/g tissue}$ 로 대조군의 145.5%로 유의하게 높은 수준이었고($p<0.05$), 尚麻子 투여군의 GSH 함량은 $185.5 \mu\text{g/g tissue}$ 로 대조군의 185.5%에 달하여 현저하게 높았다($p<0.01$) (Fig. 5).

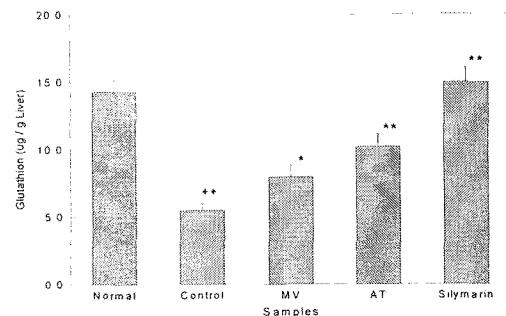


Fig. 5. The effects of the decoction prepared from Malvac Semen and Abutili Semen on the contents of glutathione after chronic ethanol intake in rat tissue.

Normal: Not administrated with ethanol or drug

Control: Administrated with ethanol(3.0ml of 30% ethanol)

MV: Administrated with Malvac Semen-decoction(0.0625g/0.5ml/day)

AT: Administrated with Abutili Semen-decoction(0.205g/0.5ml/day)

Silymarin: Administrated with silymarin(1g/kg body weight/day)

+*: compared with normal group, *: compared with control group

(++, **: $p<0.01$, *: $p<0.05$)

2) GSH-peroxidase(glutathione peroxidase) 활성

에탄올만 투여한 대조군의 GSH-peroxidase 활성은 3.1 ± 0.2 U/mg protein이었고, 항산화제인 실리마린을 투여한 실험군의 활성은 4.3 ± 0.1 U/mg protein으로 대조군의 138.7%에 달하는 수준으로 현저하게 상승되었다($p < 0.01$). 에탄올과 함께 冬葵子 전탕액을 투여한 실험군(MV)의 GSH-px 활성은 3.8 ± 0.2 U/mg protein으로 대조군에 비하여 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), 尚麻子 투여군(AT)의 GSH-peroxidase 활성은 4.2 ± 0.2 U/mg protein으로 현저하게 높은 수준이었다($p < 0.01$) (Fig. 6).

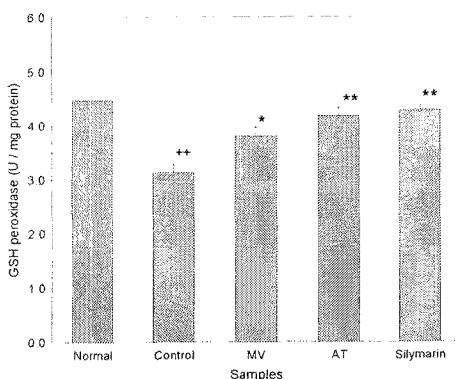


Fig. 6. The effects of the decoction prepared from Malvae Semen and Abutili Semen on the activities of GSH-peroxidase after chronic ethanol intake during 14 days in rat tissue.

Normal: Not administrated with ethanol or drug

Control: Administrated with ethanol(3.0 ml of 30% ethanol)

MV: Administrated with Malvac Semen-decoction(0.0625g/0.5ml/day)

AT: Administrated with Abutili Semen-decoction(0.205g/0.5ml/day)

Silymarin : Administrated with silymarin(1g/kg body weight/day)

+: compared with normal group, *: compared with control group

(++, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$)

3) Soluble SOD(superoxide dismutase) 활성

SOD의 활성에 따른 흡광치의 변화를 검사한 SOD 표준곡선(Fig. 12), 검사에 사용한 간장(liver)추출 용액의 SOD 활성 및 단백질정량치를 근거로 사용하여 soluble superoxide dismutase (Cu · Zn-SOD) 활성을 검사하였다.

정상군의 활성은 0.45 ± 0.03 U/mg protein이었고, 에탄올이 투여된 대조군의 활성은 0.72 ± 0.06 U/mg protein으로 정상군에 비하여 현저하게 상승하였다

($p < 0.01$). 冬葵子 투여군(MV)의 SOD 활성은 0.51 ± 0.04 , 尚麻子 투여군(AT)의 활성은 0.34 ± 0.03 , 그리고 실리마린 투여군의 SOD 활성은 0.60 ± 0.06 U/mg protein의 활성을 보였다. 대조군과 비교하였을 때, 冬葵子 투여군(MV)은 SOD 활성이 대조군의 70.8%로 유의하게 저하되었으며($p < 0.05$), 尚麻子 투여군(AT)은 대조군의 47.2%로 현저하게 저하되었으며($p < 0.01$), 실리마린 투여군은 대조군의 83.3%로 저하되는 경향성을 보였으나 유의수준은 아니었다. 이와 같이, 冬葵子 전탕액과 尚麻子 전탕액은 모두 알콜성 스트레스가 유발된 흰쥐의 soluble SOD 활성을 저하시켰으며, 尚麻子 전탕액에 의한 SOD 활성저하효과가 훨씬 더 강하였다. (Fig. 8).

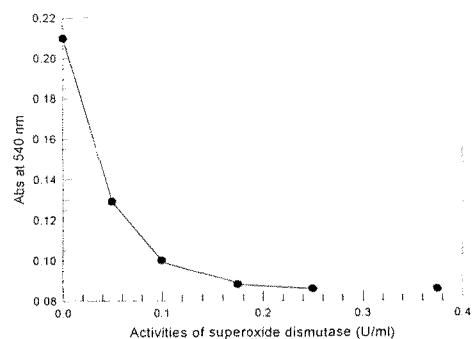


Fig. 7. Standard curve of superoxide dismutase

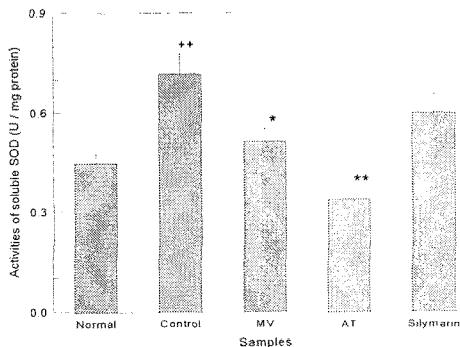


Fig. 8. The effects of the decoction prepared from Malvae Semen and Abutili Semen on the activities of soluble superoxide dismutase (SOD) after chronic ethanol intake during 14 days in rat tissue.

Normal: Not administrated with ethanol or drug

Control: Administrated with ethanol(3.0 ml of 30% ethanol)

MV: Administrated with Malvae Semen-decoction(0.0625g/0.5ml/day)

AT: Administrated with Abutili Semen-decoction(0.205g/0.5ml/day)

Silymarin: Administrated with silymarin(1g/kg body weight/day)

+: compared with normal group, *: compared with control group

(++, **: p<0.01, *: p<0.05)

4) Catalase 활성

Catalase 활성은 과산화수소(H₂O₂)를 분해시키는 활성으로 측정하였으며, 이를 위하여 작성한 과산화수소의 표준곡선은 그림 14와 같았다 (Fig. 14).

정상군의 catalase 활성은 150.3±6.8kU/mg protein이었고, 에탄올이 투여된 대조군의 활성은 120.0±4.2U/mg protein으로 정상군에 비하여 현저하게 저하되었다(p<0.01). 冬葵子 투여군(MV)의 catalase 활성은 131.0±6.0, 尚麻子 투여군(AT)의 활성은 134.6±3.4, 그리고 실리마린 투여군의 catalase 활성은 146.3±6.8 kU/mg protein의 활성을 보였다. 대조군과 비교하였을 때, 冬葵子 투여군(MV)은 catalase 활성이 대조군의 104.5%로 유의한 차이가 없었으나, 尚麻子 투여군(AT)은 대조군의 112.2%로 유의하게 상승하였고(p<0.05), 실리마린 투여군의 활성은 대조군의 121.9%로 현저하게 상승하였다. 이와 같이, 尚麻子 전탕액은 알콜성 스트레스가 유발된 흰쥐 간의 catalase 활성을 상승시켰으나, 冬葵子 전탕액은 유의한 영향이 없었다 (Fig. 10).

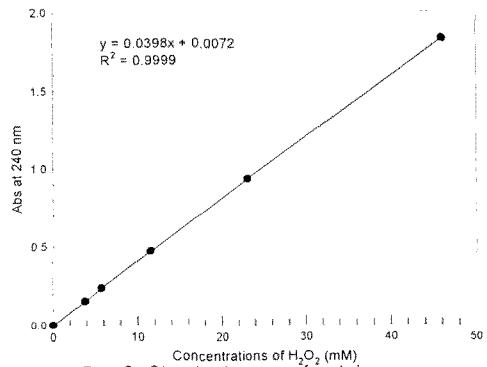


Fig. 9. Standard curve of catalase

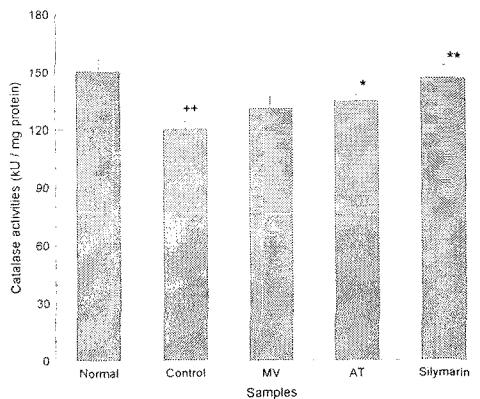


Fig. 10. The effects of the decoction prepared from Malvae Semen and Abutili Semen on the activities of catalase after chronic ethanol intake during 14 days in rat tissue.

Normal: Not administrated with ethanol or drug

Control: Administrated with ethanol(3.0 ml of 30% ethanol)

MV: Administrated with Malvae Semen-decoction(0.0625g/0.5ml/day)

AT: Administrated with Abutili Semen-decoction(0.205g/0.5ml/day)

Silymarin: Administrated with silymarin(1g/kg body weight/day)

+: compared with normal group, *: compared with control group

(++, **: p<0.01, *: p<0.05)

5) ADH(alcohol dehydrogenase) 활성

알콜성 스트레스를 유발시킨 흰쥐 간(liver)의 ADH 활성을 검사한 결과, 정상군의 ADH 활성은 1.83±0.11mU/mg protein이었고, 에탄올이 투여된 대조군의 ADH 활성은 2.30±0.13mU/mg protein으로 정상군에 비하여 유의하게 상승하였다(p<0.05).

冬葵子 투여군(MV)의 ADH 활성은 1.85±0.14, 尚

麻子 투여군(AT)의 활성은 2.15 ± 0.08 , 그리고 실리마린 투여군은 3.03 ± 0.16 mU/mg protein의 ADH활성을 보였다. 대조군과 비교하였을 때, 冬葵子 투여군(MV)은 ADH 활성이 대조군의 80.4%로 유의하게 저하되었다($p < 0.05$). 尚麻子 투여군(AT)은 ADH 활성이 대조군의 93.5%로 다소 낮았으나 유의한 차이는 아니었다. 실리마린 투여군의 ADH활성은 대조군의 131.7%로 현저하게 상승하였다. 이와 같이, 冬葵子 전탕액은 알콜성 스트레스가 유발된 흰쥐 간의 ADH 활성을 오히려 저하시켰으며, 尚麻子 전탕액은 유의한 영향이 없었다 (Fig. 11).

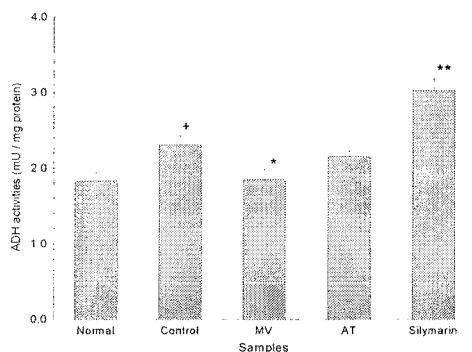


Fig. 11. The effects of the decoction prepared from Malvae Semen and Abutili Semen on the activities of alcohol dehydrogenase after chronic ethanol intake during 14 days in rat tissue.

Normal: Not administrated with ethanol or drug

Control: Administrated with ethanol(3.0 ml of 30% ethanol)

MV: Administrated with Malvae Semen-decoction(0.0625g/0.5ml/day)

AT: Administrated with Abutili Semen-decoction(0.205g/0.5ml/day)

Silymarin : Administrated with silymarin(1g/kg body weight/day)

+: compared with normal group, *: compared with control group

(++, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$)

고찰

冬葵子의 기원으로 대한약전외한약규격집⁵⁾에 아욱과(Malvaceae)의 아욱 *Malva verticillata* Linne의 씨라고 되어 있고, 중국약전⁶⁾에는 冬葵果라고 하여 같은 식물의 성숙한 과실을 여름과 가을에 채취하여 잡질을 제거하고陰乾한 것이라고 하였다.

尚麻子는 우리나라 공정서에는 수재되지 않았으며, 중국약전⁶⁾에 尚麻子라고 하여 아욱과(錦葵科; Malvaceae)에 속하는 尚麻(어저귀) *Abutilon theophrasti* Medicus의 성숙한 과일을 가을에 채취하여 햇볕에 말린 후 종자만을 취하여 사용한다고 하

였다. 어저귀의 학명이 대한식물도감²³⁾에는 *Abutilon avicennae* Gaertn.으로 되어 있는데, (24)에 의하면 *Abutilon theophrasti* Medicus와 *Abutilon avicennae* Gaertn.는 같은 식물이다.

한편 市中에서는 한때 尚麻子가 冬葵子와 함께 혼용된 경우가 있었다. 尚麻子에는 pentose, pentosan, methyl pentosan, uron 酸 등이 함유되어 있고, 다양한 linoleic acid, 油脂와 함께 센나도 함유하고 있다²⁵⁾. 冬葵子는 식품으로도 사용할 수 있지만, 尚麻子는 식품으로는 사용할 수 없는 약재이기 때문에 冬葵子와 尚麻子의 효능을 명확히 할 필요가 있다고 사료된다. 이에 본 연구에서는 冬葵子 및 尚麻子의 고지혈증에 대한 영향 및 항산화효능을 비교함으로서 임상에서 보다 유용하게 활용할 수 있는 기초를 마련하고자 하였다.

冬葵子와 尚麻子 전탕액을 냉동건조하여 얻은 분말을 사용하여, 두 약재의 항산화 효과를 측정하였다. DPPH는 비교적 안정한 radical이며 free radical 상태에서는 적색을, 그리고 radical이 모두 소모되면 황색을 띠게 된다. DPPH를 사용하여 冬葵子와 尚麻子 전탕 액스 분말의 항산화 효능을 검사한 결과, 이들 두 분말의 항산화능은 거의 유사하였으며, 강력한 항산화제인 순수정제 BHT(butylated hydroxy toluene)의 50%정도에 달하는 항산화능을 보였다. Superoxide anion radical([·O₂⁻]) 소거능은 尚麻子 전탕 액스 분말이 冬葵子 전탕 액스 분말보다 1.5배 이상 강하였고, linoleic acid의 산화를 방지하는 효과는 비슷하였다.

항산화제로 작용하는 화합물로는 퀴논, 아민, 폐놀류 등이 있는데, 두 전탕 액스 분말의 폐놀성 성분 함량을 분석한 결과, 폐놀성 성분(phenolic compound)은 冬葵子 추출분말이 약 8% 더 높은 수준이었다. 앞에서 尚麻子 전탕 액스 분말에는 폴리페놀류 이외에 항산화 효능을 나타내는 하이드로퀴논류 또는 아민류가 冬葵子보다 더 많은 양이 존재하거나, 아니면 상대적으로 보다 강력한 항산화물질이 함유되어 있음을 시사하는데, 이에 대해서는 보다 심도있는 연구가 필요하다고 사료된다.

한편, 흰쥐에 에탄올을 투여하여 산화적 스트레스를 유발하는 동시에 冬葵子 전탕액과 尚麻子 전탕액을 투여하여 항산화 효능을 검사한 결과, 항산화 효능의 한 지표가 되는 간장(liver)의 glutathione 함량은, 冬葵子 및 尚麻子 투여군 모두 상승하였으나 尚麻子 투여군의 함량이 월씬 더 높았다.

GSH-peroxidase 활성 또한 尚麻子 투여군이 더욱 강하였으며, soluble superoxide dismutase 및 catalase의 경우에도 尚麻子 투여군의 항산화 효과가 더 강하였다. 그러나, 간장(liver)에서의 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성은 冬葵子 투여군이 대조군에 비하여 유의하게 저하되어 정상군과 거의 유사한 활성을 보였으나, 尚麻子 투여군은 대조군과 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 *in vivo*에서의 결과들은 尚麻子에 의한 항산화 효능이 冬葵子의 항산화 효능보다 강함을 시사하고 있지만, 이러한 평가는 冬葵子의 ADH 활성저하의 기전을 구명한 연후에 확실히 검증될 수 있을 것이므로 이에 대한 심도있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 실험결과를 종합할 때, 尚麻子는 冬葵子에 비하여 항산화 효능이 더 강하였다. 그러므로 尚麻子의 유통을 금지할 것이 아니라 利尿, 通乳, 潤腸의 효능이 유사한 尚麻子를 冬葵子와 함께 사용하는 방안을 강구할 필요가 있다고 사료된다.

결 론

利尿, 通乳, 潤腸 효능이 유사한 점이 많은 冬葵子 및 尚麻子의 항산화 효능을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *in vitro* 항산화 활성은 다음과 같았다.

1) 冬葵子와 尚麻子 모두, DPPH 소거능, superoxide anion radical 소거능, linoleic acid의 산화방지 효과가 강하였다.

2) 冬葵子 煎湯 엑스 분말은 尚麻子 전탕 엑스 분말보다 더 높은 농도의 폐놀성 성분을 함유하고 있었으나, 항산화 효능은 尚麻子가 오히려 더 강하였다.

2. 에탄올로 산화적 스트레스를 유발한 흰쥐 간에서의 항산화 효능은 다음과 같았다.

1) 尚麻子가 冬葵子보다 glutathione 함량, GSH-peroxidase 활성, soluble superoxide dismutase 및 catalase 활성 등에서 더 높은 항산화 효과를 보였다.

2) Alcohol dehydrogenase 활성은 冬葵子 투여군은 정상치에 가깝게 저하되었으나, 尚麻子 투여군은 영향이 없었다.

이상의 결과에서 尚麻子는 冬葵子에 비하여 항산화 효능이 더 강하였다. 그러므로 尚麻子를 冬葵子와

함께 사용하는 방안을 강구할 필요가 있다고 사료된다.

참고문헌

- 黃爽 輯. 神農本草經. 北京:中醫書籍出版社. 1982:143.
- 全國韓醫科大學共同教材編纂委員會 編. 本草學. 서울:영림사. 2004:369.
- 尚志鈞 輯校. 新修本草. 安徽科技出版社. 1981:293,457.
- 中華人民共和國衛生部藥典委員會 編. 中華人民共和國 藥典. 北京:化學工業出版社. 2000:142,162-163.
- 지형준, 이상인, 안덕균, 이경순, 이숙연, 이영종 편. 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해 제2개정. 서울:한국메디칼인텍스사. 1998:188.
- 中華人民共和國衛生部藥典委員會 編. 中華人民共和國 藥典. 北京:化學工業出版社. 2000:162-163.
- 조선민주주의 인민공화국 보건부 약전위원회. 조선민주주의 인민공화국 약전 제5판. 평양:의학과학출판사. 1996:296.
- 高光帝, 宋勇善. 冬葵子에 대한 文獻的 考察. 한방재활의학회지 1996;6(1):489-495.
- Tomoda M, Asahara H, Gonda R, Takada K. Constituents of the seed of *Malva verticillata*. VIII. Smith degradation of MVS-VI, the major acidic polysaccharide, and anti-complementary activity of products. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992;40(8):2219-21.
- Shimizu N, Asahara H, Tomoda M, Gonda R, Ohara N. Constituents of seed of *Malva verticillata*. VII. Structural features and reticuloendothelial system-potentiating activity of MVS-I, the major neutral polysaccharide. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1991;39(10):2630-2.
- Tomoda M, Shimizu N, Gonda R, Kanari M, Yamada H, Hikino H. Anti-complementary and hypoglycemic activities of the glycans from the seeds of *Malva verticillata*. *Planta Med*. 1990;56(2):168-70.
- Gonda R, Tomoda M, Shimizu N, Kanari M. Characterization of an acidic polysaccharide from the seeds of *Malva verticillata* stimulating the phagocytic activity of cells of the RES. *Planta*

- Med. 1990;56(1):73-6.
13. Lee SE, NS Seong, CG Park, and JS Seong. Screening for antioxidative activity of oriental medicinal plant materials. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2002;10:171-176.
14. Nishikimi N, NA Rao, and K Yagi. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972;46:849.
15. H, K Hashimoto, and A Yagi. Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J. Agric. Food Chem.* 1992;40:1349-1351.
16. Kim NM, HS Sung, and WJ Kim. Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 1993;25:204-209.
17. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 1950;82:79.
18. Flohe L, Miguel J, A T Quintanilha, H Weber (eds.). Determination of glutathione peroxidase. In *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol. III. CRC Press. 1989:283-284.
19. Pritchard K, LL Louca, and V Glover. Quantitation of soluble Superoxide dismutase in rat, based on the inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride. *Anal. Biochem.* 1994;221:428-31.
20. Abe H, L Packer(ed). Catalase in vitro, In "Methods in enzymology(vol. 5)". Academic Press. 1984:121-126.
21. S.O.C. Tottmar, H.Pettersson, K.H.Kiessling. The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem.J.* 1973;135:577-586.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
23. 이창복. 대한식물도감. 서울:향문사. 1982:537-538.
24. 李愚喆. 韓國植物名考. 서울:아카데미서적. 1996:705.
25. Kojima T, Kishi M, Sekita S, Satake M. Origin of sennosides in health teas including Malva leaves. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2001;42(3):202-5.