

일일초 품종 및 부위별 메탄올 추출물 활성 비교

이희경 · 김주성 · 김명조 · 허권 · 이현용* · 유창연†

강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, * 강원대학교 바이오산업공학부

Comparison of biological activities of MeOH extracts in different cultivars and organs of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Hui Kyoung Lee, Ju Sung Kim, Myong Jo Kim, Kwon Heo, Hyeon Yong Lee* and Chang Yeon Yu†

Division of Applied Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University Chunchon, Korea

*School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National Uni. Chunchon, Korea

ABSTRACT : *Catharanthus roseus* was extracted with methanol and its Vinblastine contents and antioxidant and antimicrobial activities in each methanol extracts were determined. Vinblastine contents of leaves were much higher than those in other plant parts. The highest DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activities in plant parts showed in leaves of Stardust Orchid and Cooler Rose and the value was $RC_{50}=17$ and $18 \mu g/ml$ respectively. Leaves of Cooler Rose and Cooler Strawberry showed strong antimicrobial activities. Particularly, Cooler Rose showed strong antimicrobial activities except to *Penicillium oxalicum*.

Key words : DPPH radical scavenging activity, *Catharanthus roseus*, Vinblastine, antimicrobial activities

서 론

일일초(*Catharanthus roseus*)는 협죽과에 속하는 식물로 봄에 파종하는 1년초로 꽃 하나 하나는 단명 하지만, 계속해서 꽃을 피운다. 더운 여름에도 짙은 홍색, 백색, 분홍색으로 꽃이 피기 때문에 화단용, 분화용으로 많이 이용이 되고 있다. 일일초(*Catharanthus roseus*)에는 약 200여종의 indole alkaloid을 함유하고 있다. 특히 상업적으로 중요한 것은 급성백혈병과 악성임파종양 등의 치료에 사용되는 vinblastine과 vincristine은 현재 식물체에서 대량추출하여 공급되어지고 있으나 식물체내의 농도가 건물중의 0.0003%로 매우 낮고 추출물중의 구성이 매우 다양하여 이들을 식물체로부터 직접 추출하는 공정은 간단하지 않을 뿐 아니라 비용도 많이 든다. 식물조직배양에 의한 생산 방법도 많이 연구되고 있으나 아직 경제적으로 대량생산하는 단계에는 이르지 못하고 있다

(Kwak et al, 1993).

항암물질인 vinblastine은 식물체에 극소량으로 존재하는 단량체인 vindoline과 catharanthine의 결합에 의해 생성된다. Vindoline은 식물체내에 잎과 줄기에 제한적이지만 비교적 다량으로 존재하고, catharanthine는 식물 전체에 분포되어 있지만 농도가 매우 낮기 때문에 식물체내에서의 vinblastine함량은 대략 0.0003%로 극소량이 존재한다.

본 실험은 일일초의 품종별과 부위별로 vinblastine의 함량 조사와 부위별 항산화 활성, 항미생물 활성을 검정에 관한 기초 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

(주)실험식물센터에서 구입한 일일초(*Catharanthus*

† Corresponding author (Phone) : 033-250-6411, E-mail : cyyu@kangwon.ac.kr

Received 25 July 2002 / Accepted 22 August 2002

roseus)의 9품종의 종자(Cooler Strawberry, Cooler Rose, Cooler Grape, Cooler Raspberry Red, Cooler coconut, Stardust Pink, Stardust orchid, Blue pearl, Cascade Appleblossom)를 16cm×8cm tray에 파종하여 발아시킨 후 포장에 정식 후 채집한 일일초의 각 품종별 잎, 줄기, 꽃, 뿌리로 각각 나누어 음건을 한후 MeOH에 침적시켜 실온에서 1주일간 3회 반복 냉침 추출하였다. Vinblastine은 Sigma Chem. Co.에서 구입하였고 기타 추출용 용매와 시약은 특급을 구입하여 사용하였다.

1. 각 부위별 vinblastine 함량 비교

9개 품종 각 부위별로 vinblastine 함량을 비교하기 위해서 ODS (3.9 300mm, -Bondapack C18, Waters) column을 사용한 HPLC로 정량분석하였다. 용출액 (MeOH : Acetonitrile : 5mM diammonium hydrogen phosphate, pH 7.3, 3 : 4 : 3)의 유속은 1ml/min 였으며 UV 298nm에서 각 화합물을 검출하였다. 이 조건에서 vinblastine 용출시간은 9.4분이었다.

2. 분획물의 항산화활성 실험

일일초로부터 유용활성물질을 탐색하기 위해 일일초의 잎, 꽃, 줄기, 뿌리 추출물의 항산화 활성을 검정하였다.

자유 라디칼 (Free radical)인 1,1-디페닐-2-피크릴하이드라질(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH)을 사용한 항산화활성 측정방법 (Xing et al, 1996; Choi et al, 1993)을 이용하였다. 유리 시험관에 4ml의 메탄올을 넣고 시료 화합물을 농도별 (1.5~30µl)로 첨가한 다음 상기 DPPH (0.15mM) 용액을 1ml 첨가하여 실온에서 30분간 반응시키고 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 RC50(µg/ml)은 화합물을 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 화합물의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인 -tocopherol와 비교하였다.

3. 분획물의 항미생물 활성 실험

항미생물 활성을 조사하기 위하여 고바야시 (Kobayashi et al, 1994)등의 방법에 따라 조사하였다. 곰팡이 균주로는 *Aspergillus awamori*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium oxalicum*, *Trichoderma virens*, *Aspergillus niger*, *Hypocrea nigricans*을 사용하였고, 이들 곰팡이 배양용 PDB 슬란트에 곰팡이 포자발아 저해 시험용 배지 2ml를 첨가하여 유리병으로 상기 곰팡이 포자를 분리시키고 이를 다시 가제로 여과하였다. 그 여과액을 얻어 96 well plate에 100µl씩 분주하고 현미경으로 관찰하면서 시야에 50개의 포자가 관찰될 때까지 희석하였다. 상기의 시료를 8~1000ppm 농도까지 제조하

여 상기 well에 가하고 27 에서 24시간 동안 암배양한 후 현미경으로 포자발아가 저해되는 활성을 측정하였다.

또한, 세균균주로는 *Bacillus subtilis*와 *Candida lypolytica*를 사용하였고, 이들 세균주들을 NB배지 (Bactotryptone 10g + Yeast extract 5g + NaCl 10g) 10ml에 이식하여 27 에서 12시간 동안 진탕배양한 후 현탁액을 NB배지에 200배로 희석하여 항박테리아 시험에 사용하였다. 그 다음 96 well plate에 100µl씩 분주하고 상기의 시료를 8~1000ppm 농도까지 제조하여 상기 well에 가하고 27 에서 24시간 동안 암배양 후 현탁도를 기준으로 세균 성장저해 활성(MIC50)을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Vinblastine 함량 비교 결과

9개의 품종을 대상으로 항암물질인 vinblastine의 함량 정도를 알아보았는데 이 항암물질은 식물체내에 극소량이 존재함을 알 수 있었다. MeOH 추출물을 HPLC로 vinblastine의 함량 측정 결과 vinblastine은 9개 품종의 잎에서 모두 검출이 되었다. Vinblastine의 검출량이 가장 많은 품종은 Cooler Coconut의 잎에서 검출이 되었는데 검출량은 134.08(µg/ml)로 다른 분획물에서 검출된 양 보다 많게는 10배 가량 많이 검출되었음을 알 수 있었다. Vinblastine은 거의 잎에서만 검출이 되었는데 Cooler Grape, Cooler Strawberry 의 품종에서는 꽃과 줄기에서도 검출이 되었다(Table 1).

Table 1. Comparison of vinblastine contents of various parts of *Catharanthus roseus*

Cultivar	Leaves (µg/ml)	Flowers	Stems	Roots
Blue pearl	17.11			
Cooler Grape	53.35	6.89	2.64	
Stardust Orchid	24.18			
Cooler Raspberry	6.23			
Cooler Rose	10.93			
Stardust Pink	19.45			
Cooler Strawberry	22.15	5.29		
Cooler Coconut	134.08			
Cascade AppleBlossom	92.36			

2. 분획물의 항산화활성 실험

일일초의 유용활성물질을 탐색하기 위한 기초 자료의 하나로 일일초의 항산화 활성을 검정하였다. 일일초의

Table 2. Comparison of DPPH free radical scavenging activities of various parts of *Catharanthus roseus*

Cultivar	Plant parts	Antioxidative activity (RC ₅₀ [†] : $\mu\text{g/ml}$)
Stardust Orchid	leaves	17
	flowers	40
	stems	90
	roots	65
Cooler Raspberry red	leaves	35
	flowers	35
	stems	75
	roots	100
Cooler Rose	leaves	18
	flowers	35
	stems	80
	roots	60
Stardust Pink	leaves	30
	flowers	25
	stems	70
	roots	70
Cooler strawberry	leaves	30
	flowers	35
	stems	95
	roots	60
Cooler Coconut	leaves	48
	flowers	75
	stems	100
	roots	85
Cascade Appleblossome	leaves	30
	flowers	60
	stems	100
	roots	90
Blue Pearl	leaves	30
	flowers	75
	stems	85
	roots	85
Cooler Grape	leaves	40
	flowers	70
	stems	110
	roots	55
α -tocopherol		12

[†] Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min

잎, 꽃, 줄기, 뿌리의 분획물을 가지고 DPPH 자유 라디칼 포착활성을 비교하여본 결과 모든 품종의 잎이 꽃이나 줄기, 뿌리보다 활성이 높다는 것을 확인할 수 있었다. 품종별로는 Stardust Orchid의 잎과, Cooler Rose의 잎에서 각각 RC50 값이 $17\mu\text{g/ml}$, $18\mu\text{g/ml}$ 로 대조구인 - tocopherol($12\mu\text{g/ml}$)과 비슷한 결과를 보였다(Table 2).

3. 분획물 항미생물 활성 실험

일일초의 각 분획물별 항미생물활성 실험결과 모든 품종의 잎이 꽃보다 좋은 활성을 나타내었으며(MIC=8~ $250\mu\text{g/ml}$), 특히 Cooler Rose와 Cooler Strawberry의 품종에서는 fungi와 bacteria에 대해 좋은 항미생물 활성을 보였다. Cooler Rose의 잎은 *Penicillium oxalicum*에 MIC= $8\mu\text{g/ml}$ 정도로 가장 좋은 활성을 보였다.

특히, 항산화 활성 검증에서 좋은 검증 결과를 보였던 Cooler Rose가 항미생물 활성에서도 좋은 결과를 나타내었다(Table 3, 4).

적 요

일일초의 vinblastine 함량과 항산화 및 항미생물 의 품종별, 부위별 활성을 조사하였다. Vinblastine은 식물 체내에 극소량 존재하며 9개품종의 잎에서 대부분 검출이 되었다. 특히 Cooler Coconut의 잎에서의 검출량이 $134.08(\mu\text{g/ml})$ 로 다른 분획물에 비해 10배 가량 높은 수치를 보였다. 항산화 활성 검증에서는 Stardust Orchid의 잎과 Cooler Rose의 잎의 추출물이 각각 (RC 50= $17\mu\text{g/ml}$, $18\mu\text{g/ml}$)로 항산화 효과가 높음을 알 수 있었다. 부위별로는 대체적으로 잎, 꽃, 뿌리의 순으로 나타났다. 항미생물 활성 검증에서는 모든 품종의 잎이 꽃보다 높은 활성을 보였으며, 특히 Cooler Rose와 Cooler Strawberry가 활성이 좋게 나타났다. 이상의 시험 결과 항산화 활성이 높은 품종이 항미생물 활성에서도 좋은 결과를 보여주었다. 항산화 활성과 항미생물 활성이 높은 품종을 이용하여 앞으로 이를 이용한 여러 약품이나 식품의 개발이 기대된다.

사 사

본 과제는 과기처의 지역개발용역사업 [강원도 농산자원의 고부가가치 창출을 위한 핵심기술개발, 과제번호 0101029-1-2(2002 325)]의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

Table 3. Antimicrobial activity of flowers extracts in *Catharanthus roseus*

Extracts (Flowers)	Antimicrobial activity (MIC [†] : $\mu\text{g/ml}$)							
	Fungi strain						Bacteria strain	
	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>trichoderma virens</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Hypocrea nigricans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida</i>
Blue pearl	250	63	250	250	125	250	250	32
Cooler Grape	250	125	250	250	125	250	250	125
Stardust Orchid	250	125	250	125	125	125	1000	32
Cooler Raspberry	250	63	125	250	125	125	250	63
Cooler Rose	250	63	250	125	250	125	250	250
tardust Pink	125	63	250	63	250	125	250	250
Cooler Strawberry	250	125	250	125	250	125	250	250
Cooler Coconut	250	125	125	63	250	125	250	250
Cascade Apple Blossom	250	125	125	125	250	125	250	250
Cycloheximide	32	63	250	250	32	125		
Tetracycline							8	125

[†] The MIC values against bacteria and fungi were determined by the serial 2-fold dilution method. The growth of the bacteria was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye, and the spore germination of fungi was examined under a microscope.

Table 4. Antimicrobial activity of leaves extracts in *Catharanthus roseus*

Extracts (Flowers)	Antimicrobial activity (MIC [†] : $\mu\text{g/ml}$)							
	Fungi strain						Bacteria strain	
	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>trichoderma virens</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Hypocrea nigricans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida</i>
Blue pearl	250	125	250	250	250	125	125	125
Cooler Grape	125	63	250	125	250	125	125	125
Stardust Orchid	250	63	250	125	250	125	125	125
Cooler Raspberry	250	125	250	63	250	125	125	125
Cooler Rose	250	125	8	125	125	125	125	63
tardust Pink	250	125	125	63	500	125	125	125
Cooler Strawberry	63	63	125	63	250	125	250	63
Cooler Coconut	125	32	250	125	250	125	250	32
Cascade Apple Blossom	250	63	250	63	250	250	250	250
Cycloheximide	32	63	250	250	32	125		
Tetracycline							8	125

[†] The MIC values against bacteria and fungi were determined by the serial 2-fold dilution method. The growth of the bacteria was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye, and the spore germination of fungi was examined under a microscope.

LITERATURE CITED

- Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, and Mun SI** (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor J Pharm.* 24 : 299-303.
- Constabel F, Gaudet-LaPrairie P, Kurz GW, and Kutney JP** (1982) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots. *Plant Cell Rep.* 1 : 139-142.
- Deconti FC, and WA Creasey** (1975) Clinical aspects of the dimeric catharanthus alkaloids. In the catharanthus alkaloids. Edited by W. I. Taylor and N.R. Farnsworth. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 237-279.
- Deus-Neumann B, J Stockigt, and MH Zenk** (1987) Radioimmunoassay for the quantitative determination of catharanthine. *Planta Med.* 53 : 479-482.
- Jung KH, Kwak SS, Kim SW, Choi CY, and Liu JR** (1991) Improvement of Indole Alkaloid Productivity by Optimization of Medium Concentration and Cell Inoculum Size in Suspension Cultures of *Vinca*. *Kor.J. Plant Tissue Culture* Vol. 18.No.4 : 263-269.
- Kobayashi A, Kim MJ and Kawaz K** (1996) Uptake and exudation of phenolic compounds by wheat and antimicrobial components of the root exudate. *Z. Naturforsch.* 51c : 527-533.
- Kwak SS, Jung KH, Liu JR, Park SW, Lee H** (1993) Production of Vinblastine by Chemical Coupling of Vindoline extracted from cultivated plants and catharanthine from hairy root cultures in *Vinca (Catharanthus roseus)*. *Kor.J. Biotechnol. Bioeng.* Vol.8.No2 : 110-114.
- Westekemper P, Wiczorek U, Gueritte F, Langlois N, Langlois Y, Potier P, and Zenk MH** (1980) Radioimmunoassay for the determination of the indole alkaloid vindoline in *Catharanthus*. *Planta Med.* 39 : 24-37. Xiong, Q., S. Kadota, T. Tadota and T. Namba. 1996. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19 : 1580-1585.