

질경이 추출물의 DPPH 라디칼 소거효과 및 항균활성

정창호¹ · 배영일¹ · 심기환² · 최진상^{1†}

¹진주산업대학교 식품과학과

²경상대학교 응용생명과학부

DPPH Radical Scavenging Effect and Antimicrobial Activities of Plantain (*Plantago asiatica* L.) Extracts

Chang-Ho Jeong¹, Young-Il Bae¹, Ki-Hwan Shim² and Jine-Shang Choi^{1†}

¹Dept. of Food Science and Technology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

²Div. of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

To develop the functional food, methanol extracts of dried plantain (*Plantago asiatica* L.) was fractionated in hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and aqueous fraction. DPPH radical scavenging effect, reducing power, nitrite scavenging effect and antimicrobial activities of these fractions were investigated. Ethyl acetate fraction among these fractions showed the highest effect of all experiments. Ethyl acetate fraction showed about 60% scavenging effect on the DPPH radicals at 400 µg/5 mL. Nitrite scavenging effect of ethyl acetate and butanol fraction was more than 70~80% at concentration above of 500 µg. Among various solvent fractions from methanol extracts of plantain, ethyl acetate fraction showed the highest inhibitory effect on the microorganism such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Vibrio parahaemolyticus* at 5 mg/disc.

Key words: plantain, DPPH radical scavenging effect, antimicrobial activities, reducing power, nitrite scavenging effect

서 론

질경이(*Plantago asiatica* L.)는 질경이과(Plantaginaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 잎은 타원형 또는 난형이고, 6~8월에 꽃이 백색으로 피며, 10월에 6~8개의 흑색종자(黑色種子) 열매를 맺는다. 우리나라 전국의 산야, 도로 및 건물주변 등에 자생하는 귀화식물(歸化植物)로서 마차(馬車)가 다니는 차바퀴 자리에 흔히 자란다 하여 차전초(車前草)라고도 하며, 한방에서는 차전, 대차전, 차피초, 야지채, 하마초, 길장구, 배합조개, 배부쟁이 및 질갱이 등으로 불리고 있고, 예로부터 잎과 줄기는 나물 또는 육류와 섞어 고추장에 무쳐서 먹었다.

우리나라 야산에서 자생하는 구황식물인 질경이를 한방에서 차전초(車前草)와 차전자(車前子)로 구분하고 있는데 특히, 차전초(車前草)는 요혈(尿血), 강심(強心), 임질(淋疾), 태독(胎毒), 난산(難產), 심장염 및 열독에 의한 옹종(擁腫)의 해독제와 부인병, 늑막염 및 변비에 효과가 있는 것으로 보고(1)되어 있고, 질경이 종자인 차전자(車前子)는 소염 및 이뇨작용 등에 효과가 있어 민간요법으로 사용되어 왔다고 한다(2,3). 또한 질경이의 전초에는 iridoid 배당체인 ge-

nipiosidic acid, aucubin, flavone 배당체인 acetoside, plantagoside, plantaginin, honoplatagin, ursolic acid 등의 성분과 그 외 β-sitosterol, choline, palmitic acid, stigmasterol, vitamin B₁₃ 및 vitamin C 등의 성분이 함유되어 각종 항염증, 항균 및 항종양 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (4,5). 최근에는 질경이로부터 약리학적 연구(6), iridoid glycoside인 aucubin의 분리(7), 간독성에 대한 해독작용(8), 각종 만성 퇴행성 질환에 대한 예방 및 치료효과 등(4,9,10)에 관한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다.

유용 식용식물 및 생약 등의 천연물로부터 특정성분을 추출하여 천연식품보존제 등을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있는 상황에서 본 연구에서는 예로부터 약용식물로 이용되어 온 질경이를 새로운 기능성 식품소재로 활용하기 위한 일환으로 각종 용매로 추출하여 항산화, 아질산염 소거효과 및 항균활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 질경이(*Plantago asiatica* L.)는 2003년

*Corresponding author. E-mail: jschoi@jinju.ac.kr
Phone: 82-55-751-3275, Fax: 82-55-751-3279

9월 진주산업대학교 농장에서 채취하여 수세 후 음건한 것을 분쇄하여 실험재료로 사용하였다. 시료 100 g에 대하여 메탄올 300 mL로 3시간 환류냉각을 3회 반복 추출하여 여과하고 그 여액을 농축하여 Fig. 1과 같이 n-hexane fr., chloroform fr., ethyl acetate fr., n-butanol fr. 및 residual fr.으로 계통분획·분리하여 각 분획을 45°C 수육상에서 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 실험에 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거

질경이 추출물의 항산화효과는 Blois 방법(11)에 따라 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여 효과(electron donating ability)로 추출물에 대한 환원력을 측정하였다. 즉, 시료액 0.2 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액 0.8 mL, pH 6.5로 조정한 phosphate buffer 2 mL과 에탄올 2 mL을 가하여 10초간 혼합한 후 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan)로 흡광도를 측정하였다. 그리고 질경이 추출물에 대한 금속이온의 환원력 측정은 Oyaizu의 방법(12)에 따라 측정하였다. 즉, 각 농도별로 추출물을 조제한 후 여기에 sodium phosphate buffer(2.5 mL 200 mM, pH 6.6)와 potassium ferricyanide(2.5 mL, Sigma)를 혼합하였다. 그리고 혼합물을 50°C에서 20분 동안 정치시킨 후 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하고 10분 동안 650×g로 원심분리하였다. 원심분리한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride(1 mL, Sigma)를 첨가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아질산염 소거

질경이 추출물의 아질산염 소거효과는 Gray와 Dugan(13)의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL에 추출액을 농도별로 첨가하고, 0.1 N HCl 용액으로 반응용액의 pH를 1.2로 조정한 후 최종 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 mL를 취하여 2% 초산용액 5 mL, 30% 초산용액으로 용해한 Griess 시약(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 mL를 가하여 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치한 후

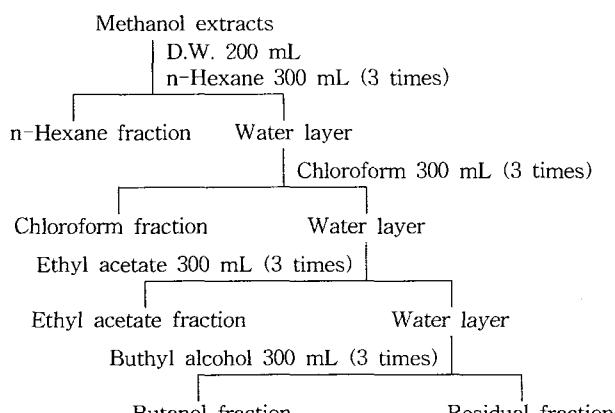


Fig. 1. Procedure of various solvent fractions from plantain.

UV/Vis-spectrophotometer로 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 Griess 시약 대신 종류수를 첨가하여 측정한 흡광도 차이를 백분율(%)로 환산하여 아질산염 소거효과를 측정하였다.

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 식품의 부패와 변질에 관여하는 미생물로 Gram positive bacteria(*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*) 5종과 Gram negative bacteria(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*) 4종 및 Brain heart infusion agar, tryptic soy broth agar 등을 균주용 배지로 사용하였다.

항균활성

질경이 추출물에 대한 항균활성 측정은 한천배지 확산법(agar diffusion method)으로 측정하였다(14). 즉, 각 균주용 agar 배지를 petri dish에 분주하여 평판 고형화시키고, 24시간 배양한 균 0.1 mL씩 petri dish에 접종한 후 미생물 종류에 따라 한천배지 10 mL를 평판배지로 사용하였다. 여기에 시료 20 μL를 멸균 paper disc(Φ8 mm)에 흡수시킨 후 배지에 접착시켜 37°C에서 12~24시간 동안 배양 후 형성된 clear zone 크기(mm)를 측정하였다.

분획물의 농도별 미생물 생육저해도 측정

질경이의 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 조제하여 본 실험에 사용한 균주 중 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli* 균주를 선택하고 각 미생물 배지에 첨가하여 미생물 생육저해도를 Lee와 Shin의 방법(15)에 준하여 측정하였다. 즉, membrane filter(0.45 μm)로 제균시킨 질경이 에틸아세테이트 분획물을 TSB(trypic soy broth) 배지에 1 mL당 각 농도별로 첨가한 후 각 공시균주(log 5.7 CFU/mL)를 0.1 mL 접종한 후 37°C에서 48시간 배양한 후 6시간 간격으로 미생물 생육정도를 UV/Vis-spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시간에 따른 흡광도의 변화로 미생물 생육 정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거효과

질경이 차전초의 메탄을 추출물을 각종 용매로 계통·분획하여 DPPH 라디칼 소거효과를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉, 질경이의 계통·분획물의 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거효과는 증가하는 경향이었다. 특히, 에틸아세테이트 분획물은 600 μg/5 mL 첨가시 80%의 가장 높은 DPPH 라디칼 소거효과를 나타내었으며, 다음은 부탄을 분획물로서 70%의 소거효과를 나타낸 반면, 물, 클로로포름 및 헥산 분획물은 20% 이하의 낮은 소거효과를 나타내었다. 또한,

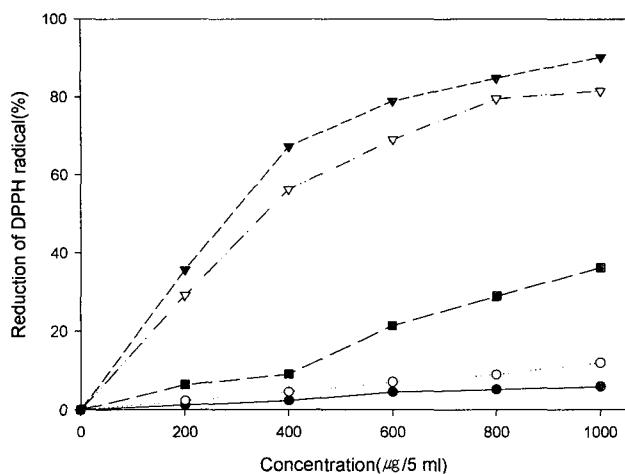


Fig. 2. DPPH radical scavenging effects for various solvent fractions of methanol extract from plantain.

●: Hexane fr., ○: Chloroform fr., ▼: Ethyl acetate fr., ▽: Butanol fr., ■: Residual fr.

질경이 차전초의 메탄을 추출물에 대한 각종 분획물의 환원력을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 특히, 질경이의 계통·분획물 중 시료를 첨가하지 않은 대조구($OD=0.05$)와 비교하여 분획물의 농도가 증가함에 따라 높은 환원력을 나타내었으며, DPPH 라디칼 소거효과와 같이 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 환원력을 나타낸 반면, 헥산과 물 분획물에서 가장 낮은 환원력을 나타내었다. 한편, Won 등(16)은 차전초의 메탄을 추출물을 계통·분획하여 Rancimat법으로 항산화력을 측정하였는데 에틸아세테이트, 헥산, 부탄을 분획물 순으로 항산화력을 나타내었다고 보고하였다. 특히, 에틸아세테이트 분획물에서 다량의 항산화 물질이 존재하고 있다는 보고와 일치하였다. 위의 항산화 실험결과를 바탕으로 실제 지방함유식품이나 육제품 등의 산화를 억제하기 위한 새로운 항산화 소재로서 사용 가능성이 높을 것으로 생각된다.

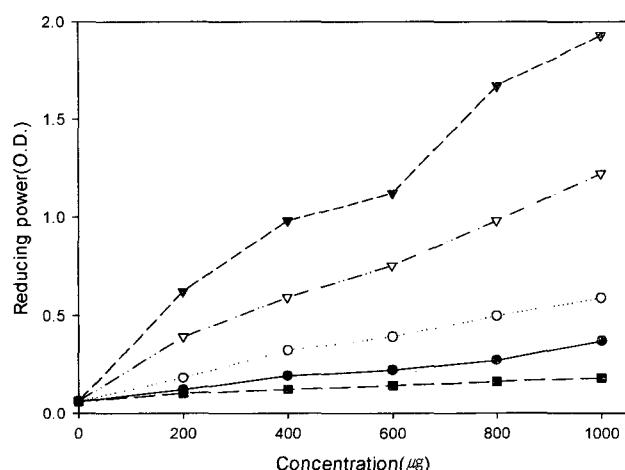


Fig. 3. Reducing powers for various solvent fractions of methanol extract from plantain.

●: Hexane fr., ○: Chloroform fr., ▼: Ethyl acetate fr., ▽: Butanol fr., ■: Residual fr.

아질산염 소거효과

질경이 차전초의 메탄을 추출물을 각종 용매로 계통·분획하여 pH 1.2에서 아질산염 소거효과를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, 질경이의 각 분획물을 농도별로 첨가하여 아질산염 소거효과를 측정한 결과 에틸아세테이트와 부탄을 분획물(300 μg)에서 50% 이상 높은 아질산염 소거효과를 나타내었다. 한편, Kim과 Park(17)은 식용버섯류의 메탄을 추출물을 각종 용매로 계통·분획하여 pH 1.2에서 아질산염 소거효과를 측정한 결과, 에틸아세테이트 분획물에서 약 40%, 나머지 분획물은 20% 미만의 아질산염 소거효과를 나타내었다고 보고하여 질경이 추출물이 식용버섯 추출물보다 다소 높은 아질산염 소거효과를 나타내는 것으로 추정된다.

항균활성

질경이 차전초의 메탄을 추출물을 각종 용매로 계통·분획하여 항균활성을 확인한 결과는 Table 1 및 Fig. 5와 같다. 즉, 항균활성은 에틸아세테이트, 클로로포름 및 부탄을 분획물 순으로 높게 나타난 반면, 헥산과 물 분획물의 경우 그람 양성과 음성균 모두 항균활성이 거의 나타나지 않았다. 특히, 항균활성이 높은 분획물 중 에틸아세테이트와 클로로포름 분획물(5.0 mg/disc)의 경우 *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* 및 *Bacillus cereus* 균에서 13~18 mm의 강한 항균활성을 나타내었다. 한편, 야생 식용식물의 활성성분에 관한 연구에서 Choi 등(18)은 부추의 분획별 활성성분을 비교한 결과, 에틸아세테이트 분획물이 다른 분획물에 비해 활성성분이 높았다고 보고하였다. Song 등(19)은 어성초의 에탄을 추출물을 용매극성에 따라 얻은 분획물 중 에틸아세테이트와 부탄을 분획물의 경우 다른 분획물에 비해 항균활성이 높게 나타났다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한, Kim 등(20)은 질경이의 메탄을 추출물을 계통·분획한 에틸아세테이트와 클로로포름 분

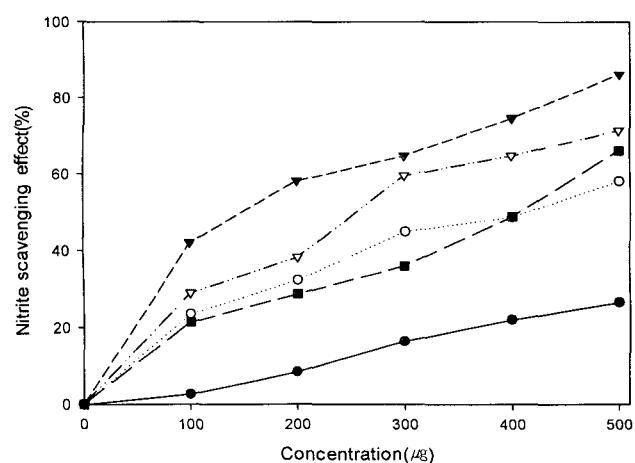


Fig. 4. Nitrite-scavenging effects for various solvent fraction of methanol extract from plantain.

●: Hexane fr., ○: Chloroform fr., ▼: Ethyl acetate fr., ▽: Butanol fr., ■: Residual fr.

Table 1. Antimicrobial activities for various solvent fractions of methanol extract from plantain against pathogenic bacteria

Strain ¹⁾	Clear zone on plate (mm) ²⁾ (5.0 mg/disc)				
	Hexane fr.	Chloroform fr.	Ethyl acetate fr.	Butanol fr.	Residual fr.
Gram positive bacteria					
<i>Bacillus subtilis</i>	- ³⁾	9	14	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	13	16	11	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	14	18	10	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	-	12	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	13	-	-
Gram negative bacteria					
<i>Escherichia coli</i>	-	9	13	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	12	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	9	14	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	17	-	-

¹⁾Strains were incubated on each medium at 37°C for 24 hr. ²⁾Diameter. ³⁾Not detected.

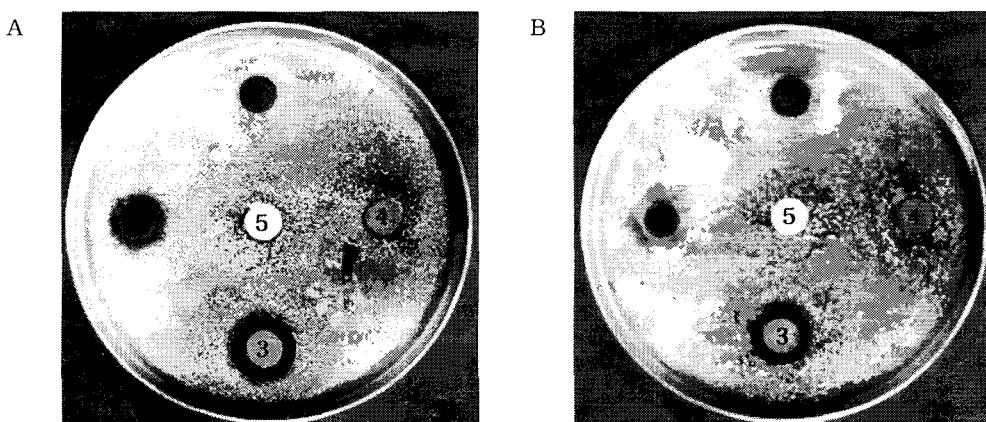


Fig. 5. Antimicrobial activities for various solvent fractions of the methanol extract from plantain against *Staphylococcus aureus* (A) and *Vibrio parahaemolyticus* (B).

1: Hexane fr., 2: Chloroform fr., 3: Ethyl acetate fr., 4: Butanol fr., 5: Residual fr.

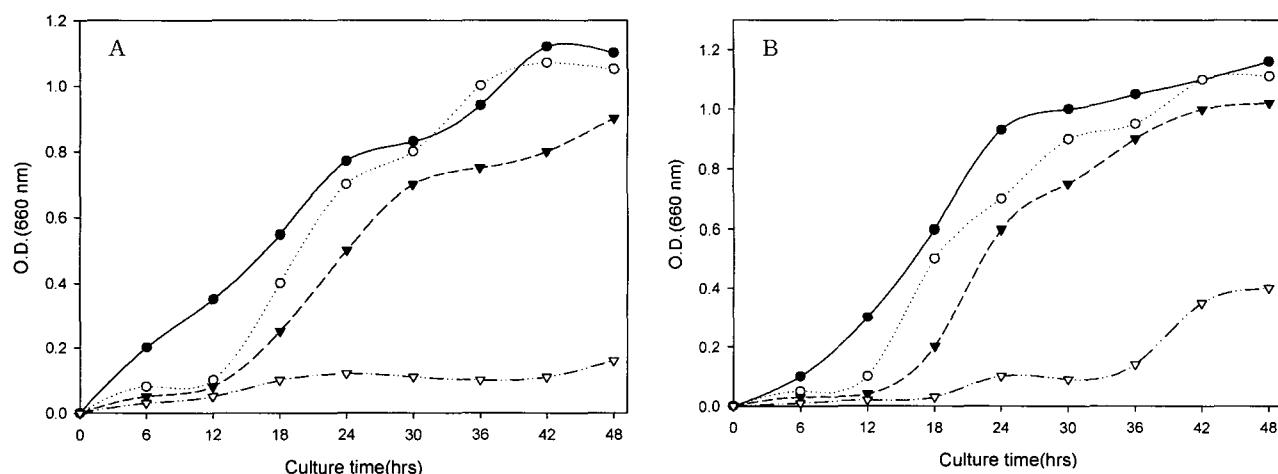


Fig. 6. Inhibitory effect for ethyl acetate fractions of methanol extract from plantain against *Staphylococcus aureus* (A) and *Escherichia coli* (B).

●: Control, ○: 0.5 mg/mL, ▼: 2.5 mg/mL, ▽: 5 mg/mL.

획물(2.0 mg/disc)에서 *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis* 및 *Staphylococcus aureus* 등에 강한 항균력이 나타났다고 보고하였고, 특히, 에틸아세테이

트 분획물의 항균활성에 hexadecanoic acid 성분이 관여하는 것으로 보고하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 항균성 물질은 특정 용매에만 용해되지 않고, 일부 다른 용매에도 용해되

는 성분으로 추출된다.

미생물 생육저해효과

식품냉동·냉장식품의 오염원인이 되는 그람 양성의 *Staphylococcus aureus*균과 음성균으로 오염지표균이면서 부페세균인 *Escherichia coli*균을 대상으로 항균활성이 높은 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 첨가하여 미생물 생육저해효과를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. *Staphylococcus aureus*의 경우 에틸아세테이트 분획물 0.5 및 2.5 mg/mL 첨가시 12시간, 5 mg/mL 첨가시 48시간까지 균의 증식을 저해하는 것으로 나타났다. *Escherichia coli*의 경우 *Staphylococcus aureus*보다 균 증식 저해효과는 낮았으나 5.0 mg/mL을 첨가할 경우 36시간까지 균 증식을 저해하는 것으로 나타났다. 한편, Lee 등(21)은 향신료 일종인 정향의 물추출물 0.20~0.25% 첨가시 *Staphylococcus aureus*균의 경우 12시간, 메탄을 추출물은 *Bacillus subtilis*균 약 72시간 이상 생육저해효과를 나타내었다고 보고하여 그람 양성균에 생육저해효과가 가장 높게 나타난 결과였다. Yun 등(22)은 갈참나무의 에탄올 추출물 농도별로 첨가한 결과 *Bacillus cereus*균은 500 µg/mL, *Listeria monocytogenes*와 *Escherichia coli* (O157:H7)균은 1 mg/mL 이상의 농도에서 24시간 동안 생육저해효과를 나타냈으며, *Salmonella typhimurium*균은 2 mg/mL 농도에서 16시간 동안 생육을 저해하였다고 보고하여 추출물의 농도가 높을수록 더 강한 항균활성을 나타내었다. 따라서 질경이에 함유되어 있는 항균물질을 분리하기 위한 연구가 더 필요한 것으로 판단된다.

요약

질경이를 새로운 기능성 식품소재로 활용하기 위한 일환으로 차전초의 메탄을 추출물을 각종 용매를 이용하여 계통·분획한 후 DPPH 라디칼 소거효과, 환원력, 아질산염 소거효과 및 항균활성에 대하여 조사하였다. DPPH 라디칼 소거효과는 분획물 중 에틸아세테이트와 부탄을 분획물(400 µg/5 mL)에서 60% 이상 높은 라디칼 소거율과 금속에 대한 강한 환원력을 나타낸 반면, 물, 클로로포름 및 헥산 분획물은 낮은 소거효과를 나타내었다. 질경이의 각 분획물을 농도별로 첨가한 아질산염 소거효과는 에틸아세테이트와 부탄을 분획물 500 µg 첨가시 70~80% 이상 높은 아질산염 소거효과를 나타내었다. 항균활성은 에틸아세테이트, 클로로포름 및 부탄을 분획물 순으로 높게 나타났으며, 에틸아세테이트 분획물의 경우 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* 및 *Vibrio parahaemolyticus* 등의 그람양성 및 음성균 모두 강한 항균효과를 나타내었다.

감사의 글

본 논문은 2003년 전주산업대학교 연구비지원에 의해 수행되었습니다.

문헌

- Lee SJ. 1966. *Korean folk medicine*. Publishing center of Seoul National University, Seoul. p 130.
- 이선우, 이용주. 1971. 생약학. 동명사, 서울. p 267.
- 신길구. 1973. 신씨본초학각론. 수문사, 서울. p 347.
- Park CH. 1996. A taxonomic and systematic study of genus *plantago* in Korea. *MS Thesis*. Korea University.
- 장상물, 최정, 김종완, 박병윤, 박선동. 1996. *한약자원식물학*. 학문출판, 서울. p 374~376.
- Ko ST, Lim DY. 1977. Pharmacological studies of *Plantago aginensis* Semen. *J Korean Pharm Sci* 7: 28~37.
- Yun HS, Chang IM, Choi HJ, Lee SY. 1980. Plants with liver protective activities (IV); Chemistry and pharmacology of *Plantaginis Semen et Folium*. *Kor J Pharmacog* 11: 57~60.
- Chang IM. 1998. Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 102: 189~204.
- Davidson MH, Maki KC, Kong JC, Dugan LD, Torri SA, Hall HA, Drennan KB, Aderson SM, Fulgoni VL, Saldanha LG, Olson BH. 1998. Long-term effects of consuming foods containing psyllium seed husk on serum lipids in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 67: 367~376.
- Anderson JW, Allgood LD, Turner J, Oeltgen PR, Daggi BP. 1999. Effects of psyllium on glucose and serum lipid responses in men with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 71: 1433~1438.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 25: 1199~1202.
- Oyaizu M. 1986. Studies of products of browning reactions : Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr* 44: 307~315.
- Gray J, Dugan Jr LR. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci* 40: 981~985.
- Farag RS, Daw ZY, Hewedii FM, El-Baroty GSA. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Prot* 52: 665~670.
- Lee BW, Shin DH. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism. *Korean J Food Sci Technol* 23: 200~204.
- Won YJ, Na MS, Lee MY. 2004. Effect of ethyl acetate fraction of plantain (*Plantago asiatica* L.) on experimentally-induced gastric mucosal damage and gastric ulcers in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 659~667.
- Kim SH, Park CS. 2001. Antibacterial and antioxidative activities of various extracts from *Basidiomycetes*. *Korean J Postharvest Sci Technol* 8: 118~124.
- Choi JS, Park SH, Kim IS. 1989. Studies on the active principles of wild vegetables on biotransformation of drug. *Kor J Phamacogn* 20: 117~122.
- Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. 2003. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1053~1058.
- Kim KH, Kim SI, Han YS. 1999. Isolation and identification of antimicrobial compound from plantain (*Plantago asiatica* L.). *Korean J Soc Food Sci* 15: 410~417.
- Lee OH, Jung SH, Son JY. 2004. Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 494~499.
- Yun JW, Yoo MY, Park BK, Lee MK, Oh DH. 2004. Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Quercus* spp. against foodborne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 463~468.

(2004년 10월 1일 접수; 2004년 12월 3일 채택)