

췘뜨기의 항진균 및 항산화 효과

천현자 · 김용현 · 이 홍 · 이영행 · 채규윤*

원광대학교 자연과학대학 자연과학 기술학부

Antioxidative and Antifungal Activity of *Equisetum arvense* L.

Hyun Ja Chun, Young Hyun Kim, Hong Lee, Young Hang Lee, Kyu Yun Chai*

Department of Natural Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University

We investigated antifungal and antioxidant activity of *Equisetum arvense* L. The sterile stems of *Equisetum arvense* L. were extracted with methanol and then fractionated with n-hexane, ethyl acetate, butanol, and water. And their antifungal activities were determined by using paper disk diffusion method and (1, 3) β -glucan synthase inhibitory activity assay, and antioxidant activities were determined by using DPPH method. The ethyl acetate fraction showed antifungal activity on *Candida albicans* in both disk diffusion and enzyme assays. This also showed antioxidant activity in DPPH assay. Further fractionation with ethyl acetate fraction was performed to obtain effective fractions. 4, 5, 6 and 7 fractions showed the significant antifungal activities, and, 4 and 5 fractions showed the strongest antioxidative activity.

Key words : (1, 3) β -glucan synthase, antifungal and antioxidant activity

서 론

식물자원에서 항암, 항알러지, 항산화, 항균 등의 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들 유용성분을 식품이나 의약품에 첨가하거나 그 자체를 이용하려는 시도가 진행되고 있다. 항산화 물질은 생체 내에서 활성 산소종의 대사산물에 의해 생성되는 자유기(free radical)에 의한 지방질 산화 및 DNA의 손상을 억제시킴으로써 동맥경화, 심장병 예방, 노화억제 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁾.

진균감염에 의한 질병의 발생 빈도가 증가하는데 반하여 사용 가능한 효과적인 치료약물은 극히 제한되어 있고, 사용 가능한 치료제가 가지는 부작용이 있는 점에 비추어 새로운 형태의 효과적인 항진균 물질의 개발은 매우 중요하다고 인식된다²⁻⁴⁾. 효과적인 항진균 환성물질은 진균에 대해서는 특이적으로 작용하나 고등동물인 포유류에는 무해해야 하므로, (1, 3) β -glucan synthase는 포유류의 세포벽에는 없고 진균류의 세포벽에만 존재하는 효소이기 때문에 이 효소를 효과적으로 차단할 수 있는 물질이 인체에는 부작용이 없이 진균류에만 선택적으로 작용하

는 항진균 약물로의 개발 가능성이 크다고 판단된다⁵⁻⁶⁾. 특히 현재 임상에서 사용되는 항진균 치료제 중 이러한 작용기전에 근거한 약물은 아직 알려져 있지 않다. 따라서 진균세포벽의 형성 및 성장에 필수적인 (1, 3) β -glucan synthase의 차단효과를 확인할 수 있는 생리활성 측정방법에 근거하여 (1, 3) β -glucan synthase에 선택적으로 작용하는 항진균 효과를 지닌 천연물의 개발은 중요하다고 사료된다⁷⁻⁸⁾.

췘뜨기(*Equisetum arvense* L.)는 속새과(Equisetaceae)에 속하는 다년생 식물로 일명 접속초라고도 불리며, 우리나라 전역에 분포 한다⁹⁾. 한방에서는 이뇨, 해열, 자궁출혈의 지혈제로 사용되어 왔으며 민간약에서는 암, 당뇨 등 각종 성인병의 치료에 이용되고 있다¹⁰⁾. 그 성분으로는 flavonoid glycosides와 phenolic acid, sterol 및 brassino-steroid와 indanone, crystalline 등이 보고되어 있다¹¹⁻¹²⁾.

췘뜨기의 약리 효과에 관한 연구로는 Kreitmair¹³⁾ 등이 이뇨 작용에 대한 연구를 하였고, Lyubartseva¹⁴⁾ 등은 요로 결석증의 치료효과에 대하여 보고하였으며, Monpon¹⁵⁾ 등은 silanol complex가 창상에 효과가 있다고 보고하였다. 또한 정¹⁶⁾ 등은 항돌연변이원성에 췘뜨기 성분이 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 췘뜨기를 이용한 항진균 및 항산화에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

* 교신저자 : 채규윤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 자연과학대학

· E-mail : geuyoon@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6230

· 접수 : 2004/07/16 · 수정 : 2004/08/18 · 채택 : 2004/09/17

따라서 본 연구에서는 쐐뜨기의 항산화 효과 및 항진균 효과를 탐색하기 위한 기초 연구로서 쐐뜨기 추출물들과 분획물들의 항진균 및 항산화 효과를 측정하였기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료의 선정 및 분획, 정제

본 실험에서 사용한 쐐뜨기는 김제시 백구면에서 채취하여 음건한 것을 사용하였다. 쐐뜨기 1.2 kg을 메탄올 36 L에 담근 후 추출한 추출액을 여지로 여과하고 메탄올 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 연속적인 solvent partitioning 방법에 의하여 3개의 추출을 분획 추출하였다. 에틸아세테이트 추출물 4.423 mg을 메탄올에 녹인후 octadecyl-functionized silicagel 40,000 mg을 넣어 용매에 감압 증류시켜 octadecyl-functionized silicagel에 coating시키고 coating된 에틸아세테이트 추출물을 다시 octadecyl-functionized silicagel 200 g이 충전된 column chromatography에 넣어 250 ml의 메탄올과 물로 용리시켜 분획을 얻었다. 활성 정도에 근거하여 활성이 있는 것으로 확인된 추출물은 지속적인 분리 과정을 통하여 정제한다(Fig. 1).

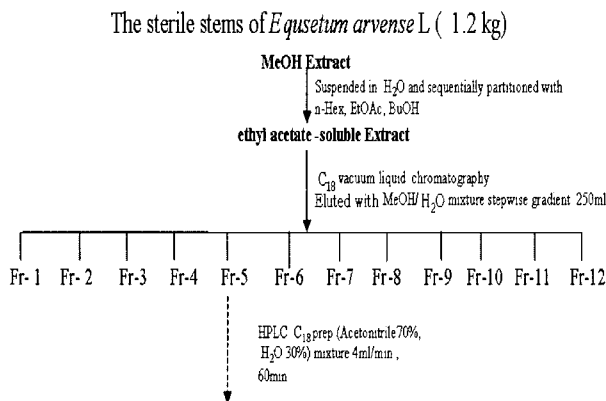


Fig. 1. Extraction and fractionation of *Equisetum arvense* L.

2. 사용균주 및 균주의 배양

항진균 실험용으로 사용된 균주로는 *Candida*, *Aspergillus*를 사용하였고, 항균 대조약으로는 Deoxynojirimycin을 사용하였다. 균주 배양에 사용된 배지는 PDB(Potato Dextrose Broth)를 사용하여 농도가 0.064 mg/mL가 되게 희석한 후 계열희석 방법에 의하여 화합물의 농도가 0.064~0.00078 mg/mL인 시료용액을 조제하고 1 mL당 포자수가 $0.5 \times 10^3 \sim 0.5 \times 10^3$ 되도록 균액 조제한 후 다양한 농도의 시료 0.1 mL와 0.1 mL의 균액을 혼합하고 96-well microplate를 이용하여 37°C에서 24 시간 배양하여 사용하였다.

3. 항진균성 활성효과의 측정

*Candida albicans*에 대한 초기단계의 항진균 활성을 측정하였다. 항진균 활성 측정법으로는 여지 디스크 확산법(paper disk diffusion)¹⁷⁾과 (1,3)- β -glucan synthase inhibition assay¹⁸⁾ 방법을 이용하였다.

4. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성 측정

각 시료의 DPPH(1,1-di-phenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 전자 공여능(electron donating ability)¹⁹⁾를 측정하였다. 각 시료는 methanol에 5 mg/ml의 농도로 녹인 후 희석하여 사용하였다. 각 추출물이 첨가된 methanol 용액 0.8 ml에 0.35 mM DPPH 시약 0.2 ml를 가하고 잘 섞은 후 암소에서 10 분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 dose-response 곡선으로부터 50 %의 자유라디칼 소거능(IC₅₀) 값을 구하였다. 대조군으로는 시료 대신 methanol을 넣고 측정하였으며 비교군으로는 Ascorbic acid와 BHA를 사용하였다.

5. 통계처리

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's T-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 수득율

쐐뜨기 1.2 kg을 메탄올 36 L에 담근 후 추출한 추출액을 여지로 여과하여 메탄올 추출물 77 g(6.42 %)을 얻었다. 메탄올 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 의 순서로 분획 추출하여 헥산추출물 13.662 g(18 %), 에틸아세테이트 추출물 4.423 g(6 %), 부탄올 추출물 40.379 g(52 %), 물 추출물 18.536 g(24 %)을 얻었다. 에틸아세테이트 추출물 4.423 g을 메탄올에 녹인 후 octadecyl-functionized silicagel 40,000 mg을 넣어 용매에 감압 증류시켜 octadecyl-functionized silicagel에 coating시키고 coating된 에틸아세테이트 추출물을 다시 octadecyl-functionized silicagel 200 g이 충전된 column chromatography에 넣어 250 ml의 메탄올과 물로 용리시켜 분획을 얻어 용매를 감압 농축시켜 12개 분획을 얻었으며 수득율은 Table. 1과 같다.

Table 1. Fraction yields of Ethyl acetate obtained from *Equisetum arvense* L.

Fractions	Equisetum arvense	
	Mass (mg)	Yield (%)
Fraction 1	753.6	17
Fraction 2	322.3	7
Fraction 3	209.3	5
Fraction 4	326.0	7
Fraction 5	92.5	2
Fraction 6	226.2	5
Fraction 7	158.6	3
Fraction 8	411.8	9
Fraction 9	93.2	2
Fraction 10	282.1	6
Fraction 11	562.2	13
Fraction 12	939.1	22

2. 종이 디스크 확산법에 의한 쐐뜨기의 항균효과

쐐뜨기의 용매 용매별 추출물을 대상으로 종이 디스크 확산법을 이용하여 약제의 항균효과를 조사한 본 결과는 Table 2와 같다. 용매 추출물 중에 n-hexane, ethyl acetate 추출물에

서 양성반응으로 활성을 보였으며, butanol 추출물에서는 음성 반응으로 활성을 나타내지 않았다. Table 2에서 양성으로 나오는 ethyl acetate 추출물을 대상으로 하여 다시 (1,3) β -glucan synthase inhibition assay 방법을 이용하여 항진균 활성을 측정하였다.

Table 2. Antifungal activities of *Equisetum arvense* L. in *Candida albican* by the paper disc diffusion method.

Solvent Extracts	Activity
n-hexane	++
Ethyl Acetate	++
Butanol	-

* sample concentration: 1mg/ ml, Positive control(+), Negative control(-): 0~5 mm +, 5~10 mm ++

3. (1,3) β -glucan synthase inhibition법에 의한 썰뜨기의 항균효과
일반적으로 UDP-[14C]glucose를 기질로 사용하는 radio activity assay 방법의 경우는 fluorescence reader를 이용하여 측정하는 방법에 비하여 그 비용이 많이 드는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 안전하고 경제적인 UDP-glucose를 기질로 사용하는 Fluorescence assay 방법을 토대로 하여 썰뜨기 유기용매 추출물의 항진균 작용의 생리활성을 검색하였다. 먼저, 글루칸 합성 저해제로 알려져 있는 Deoxynojirimycin이 500 μ g/ml 농도에서 (1,3) β -glucan synthase의 in vitro 활성을 62.69 % 저해하였고 2000 μ g/ml 농도에서 91.54 %의 저해율을 보였으므로 썰뜨기의 농도를 500 μ g/ml로 고정화 후 효소의 저해율을 측정하여 Deoxynojirimycin의 저해율과 비교하여 (1,3) β -glucan synthase의 활성 저해율을 측정하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 썰뜨기의 모든 추출물에서 좋은 저해율을 보였으며, 특히 EA 추출물에서 97.55 %로 가장 좋은 저해율을 보였다.

Table 3. Inhibitory effect on (1,3) β -glucan synthase activity of Solvent Extracts from *Equisetum arvense* L.

Sample	농도(μ g/ml)	inhibition(%)
썰뜨기 Hexane	500	80.27
EA	500	97.55
BuOH	500	72.69
Deoxynojirimycine	500	62.69

따라서 가장 좋은 저해율을 보이는 썰뜨기 EA 추출물을 다시 용매 분획하여 효소 활성 저해율을 다시 측정하였으며 그 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와 같이 썰뜨기 EA의 경우에는 4, 5, 6, 7 분획에서 90 %이상의 좋은 효소 저해율을 보였다. 따라서 썰뜨기 EA의 4, 5, 6, 7 분획에 항진균 효과를 나타내는 활성 물질이 존재하리라 예상되어진다. 현재까지 알려진 연구결과에 의하면 (1, 3) β -glucan synthase의 작용을 저해하는 물질은 진균 세포의 사멸(fungicidal)을 유발하며 이러한 특성은 삼투압 지지물질(sorbitol 등)의 존재 하에서는 나타나지 않는 것으로 보고되어 있다. 그러므로 (1, 3) β -glucan synthase 저해제로 확인된 물질에 대하여 화합물의 처리된 세포와 sorbitol의 존재 하에 화합물이 처리된 세포를 neutral red로 염색(세포벽이 파괴되면 검게 염색)하여 그 변화를 측정, 진균 세포벽의 존재 여부를

관찰하는 세포 수준에서 진균 세포벽의 활성저해여부를 확인해 볼 필요가 있다.

Table 4. Inhibitory effect on (1,3) β -glucan synthase of fractions of Ethyl acetate Extracts from *Equisetum arvense* L.

Fraction	inhibition(%)
EA.Fr.1	67.6
EA.Fr.2	75.4
EA.Fr.3	49.3
EA.Fr.4	92.1
EA.Fr.5	91.4
EA.Fr.6	90.9
EA.Fr.7	91.4
EA.Fr.8	-14.4
EA.Fr.9	85.1
EA.Fr.10	77.4
EA.Fr.11	58.7
EA.Fr.12	67.9
EA.Fr.13	46.3

4. DPPH법에 의한 썰뜨기의 항산화 활성

전자공여능(electron donating ability)은 지질과산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical에 전자를 제공하여 연쇄반응을 정지시킨다. 특히 DPPH법은 간단하면서도 대량으로 측정이 가능하여 이 물질은 라디칼을 갖는 물질 중에서 비교적 안정한 화합물로 항산화 물질의 전자 공여능으로 인하여 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 methanol 용액에서는 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성물질이 DPPH의 라디칼을 포획하기 때문에 보라색이 소실된다. 따라서 미지 시료의 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있으며 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높은 장점이 있다. 썰뜨기 추출물들의 항산화 작용을 DPPH법에 의해 측정할 결과 각 추출물과 분획물에 대한 IC₅₀ 값은 다음과 같다. Table 5에서 보는 바와 용매 추출물 중에서 EA 추출물의 IC₅₀ 값이 100.34 μ g/ml로 가장 높게 나타났다.

Table 5. IC₅₀ values of the solvent extracts obtained from *Equisetum arvense* L. in DPPH radical scavenging activity.

Fractions	IC ₅₀ (μ g/ml)
n-Hexane Fraction	749.34 \pm 97.14
Ethyl Acetate Fraction	100.34 \pm 15.41
Butanol Fraction	684.30 \pm 43.23

따라서 활성이 가장 높게 나타난 EA 추출물을 silicagel을 이용하여 용매 분획한 후 EA 분획물의 항산화 활성을 측정하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 9, 10, 11 분획물에서는 항산화 활성이 나타나지 않았으며, 1 분획물에서부터 7 분획물 사이에서 항산화 활성이 나타났다. 이 중에서 특히 4, 5 분획물에서 45.16과 49.82 μ g/ml 값으로 가장 높은 활성을 보였다. 표준 항산화제인 Ascorbic acid의 17.39 μ g/ml와 BHA의 18.48 μ g/ml의 값보다는 약간 높은 값을 보였으나 더욱 분획물을 추출 분리하면 좋은 항산화 성분을 발할 가능성을 보여주었다.

Table 6. IC₅₀ values of the fractions of Ethyl acetate obtained from *Equisetum arvense* L. in DPPH radical scavenging activity.

Fractions	IC ₅₀ (µg/ml)
EA.Fr.1	71.31 ± 16.82
EA.Fr.2	91.91 ± 37.41
EA.Fr.3	68.94 ± 15.13
EA.Fr.4	45.16 ± 12.57
EA.Fr.5	49.82 ± 4.97
EA.Fr.6	84.80 ± 30.27
EA.Fr.7	200.60 ± 47.07
EA.Fr.8	448.00 ± 26.31
EA.Fr.9	>1000
EA.Fr.10	>1000
EA.Fr.11	>1000
EA.Fr.12	344.03 ± 36.83
Ascorbic acid	17.39 ± 06.23
B-IA	18.48 ± 09.32

결 론

썰뜨기의 시료를 여지 확산법과 (1, 3)β-glucan synthase 차단효과를 중심으로 항진균 효과와 DPPH법에 의한 항산화 효과를 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

썰뜨기의 n-hexane와 ethyl acetate 추출물이 여지 확산법에서 양성반응을 보였다. 썰뜨기의 모든 추출물에서 (1, 3)β-glucan synthase 차단효과를 보여 진균에 대한 좋은 저해율을 나타내었다. 썰뜨기 EA 추출물을 다시 용매 분획하여 EA의 4, 5, 6, 7 분획에서 진균에 대한 좋은 저해율을 보였다. 썰뜨기의 EA 추출물에서 항산화 활성을 보였다. 썰뜨기 EA 추출물을 다시 용매 분획하여 EA의 4, 5 분획에서 높은 항산화 효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해보면 썰뜨기 EA의 3, 4, 5, 6, 7 분획, 특히 4, 5 분획 중에 항 진균 효과와 항산화 활성을 동시에 나타내는 활성물질이 존재하리라 예상되어진다.

감사의 글

본 연구는 2003년 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, H. K., Kim, J. S., Kim, N. Y., Kim, M. J., Park, S. U. and Yu, C. Y., Antioxidant, Antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA, Korean J. Medicinal Crop Sci, 11(1):53-61, 2003.
2. Rex, J. H., Rinaldi, M. G. and Pfaller, M. A., Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1-8, 1995.
3. Klepser, M. E., Ernst, E. J. and Pfaller, M. A., Update on antifungal resistance. *Trends in Microbiology*, 5, 372-375, 1997.
4. Georgopapadakou, N. H. and Tkacz, J. S., The fungal cell

5. wall as a drug target. *Trends in Microbiology*, 3, 98-104., 1995.
5. Debono, M. and Gordee, R. S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 471-497, 1994.
6. Frost, D. J., Brandt, K., Capobianco, J. and Goldman, R., Characterization of (1,3)-β-glucan synthase in *Candida albicans*: microsomal assay from the yeast or mycelial morphological forms and a permeabilized whole-cell assay. *Microbiology*, 140, 2239-2246, 1994.
7. Ohyama, T., Kurihara, Y., Ono, Y., Ishikawa, T., Miyakoshi, S., Hamano, K., Arai, M., Suzuki, T., Igari, H., Suzuki, Y. and Inukai, M., Arborcandins A, B, C, D, E and F, Novel (1, 3)β-glucan synthase inhibitors: production and biological activity. *J. Antibiot.* 53, 1108-1116, 2000.
8. 민지영, 김은미, 민태진, 버섯중 항균 활성물질의 개발-버섯 중의 식물병원성 곰팡이에 대한 항균활성 물질 검색, *The Korean Journal of Mycology*, 25, 354-361. 1997.
9. 이창복, 대한식물도감, 향문사, 서울, p. 221, 1979.
10. 중약대사전, 상해과학기술 출판사, 소학관 편, p. 2534, 1985.
11. Syrchina, A. I., Gorokhova, V. G., Tyukavkina, N. A., Bebkina, V. A. and Voronkov, M. G., Flavonoid glycosides from sporogenous stems of *Equisetum arvense*. *Khim. Prir. Soedin*, 3, pp. 334-7, 1980.
12. Syrchina, A. I., Zapesochaya, G. G., Tyukavkina, N. A. and Voronkov, M. G., 5-Glycoside of *Equisetum arvense* flavones. *Khim. Prir. Soedin*, 3, pp. 413-14, 1980.
13. Kreimair, H., Pharmacological tria with some domestic plants. *E. Merck's Johnesber*, 50, pp. 102-110, 1936.
14. Lyubartseva, A. A., Socolova, V. E., Kolesnikov, D. G. and Shengur, V. F., Agent for treatment of urolithiasis. U.S.S.R. SU 1,324,669(CLA-61K35/78), 23 Jul 1987, Appl.4,000,161,30 Dec 1985. from *Otkrytiya, Izobret.* (27), 15, 1987.
15. Mompon Bernard., Biogenic silanol complexes from *Equisetum arvense*. *Fr. Demande FR 0,523(CLA61K35/78)*, 12 Aug 1988, Appl. 87/1,445,06 p.3, 1987.
16. 정규찬, 김미정, 썰뜨기 성분의 항돌연변이원성에 관한 연구, 영남대학교 새마을지 역개발연구, 17, 155-168, 1995.
17. Hadacek, F. and Greger, H., Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.*, 11, 137-147, 2000.
18. Shedletzky, E., Unger, C. and Delmer, D. P., A microtiter-based fluorescence assay for (1,3)β-glucan synthases. *Anal. Biochem.*, 249, 88-93, 1997.
19. Xiong, Q., Kadota, S., Tadata, T. and Namba, T. : Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*, *Biol. Pharm. Bull.*, 19:1580-1585, 1996.