

참죽나무 잎 추출물의 생리활성

신 희 준 · ¹전 영 진 · † 신 현 재
조선대학교 공과대학 생명화학공학과, ¹조선대학교 의과대학 약리학교실
(접수 : 2007. 7. 28., 게재승인 : 2008. 3. 16.)

Physiological Activities of Extracts of *Cedrela sinensis* Leaves

Hee-June Shin, Young-Jin Jeon¹, and Hyun-Jae Shin[†]

Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

¹Department of Pharmacology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received : 2007. 7. 28., Accepted : 2008. 3. 16.)

The purpose of this study was to confirm the content of total polyphenol, antioxidative and immune activities of the extracts of *Cedrela sinensis* leaf. The content of total polyphenol of water extracts ranged from 46.5-59.6 mg/100 g, which was higher than other extracts using organic solvents such as EtOAc, CH₂Cl₂ and C₆H₁₄. The antioxidant activity of the water and organic solvents extracts showed 6-33% in terms of 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) scavenging activity. To analyze the immuno-stimulation activity of *C. sinensis* leaf extract, we investigated the effect of the extracts on NO synthesis which is important in host defense against bacterial infection. Hot water extracts significantly increased NO generation by RAW 264.7, macrophage cell line, while organic solvent extract has no significant effect on NO production. To further analyzed the anti-inflammatory effect of the extracts, we investigated the effects of the extracts on lipopolysaccharide (LPS)-induced NO generation. Organic solvent extracts of *C. sinensis* leaves showed strong inhibitory effect on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These results suggest that *C. sinensis* leaf extract may represent a useful immune stimulating agent and anti-inflammatory agent.

Key Words : *Cedrela sinensis*, 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), nitric oxide (NO), antioxidant, immune stimulating activity

서 론

최근 국민건강을 위한 건강기능식품의 활성화 및 기능성 화장품법의 시행 등으로 점차 새로운 기능성 물질 및 제품의 개발이 각 분야에서 앞 다투어 진행되고 있는 실정이다. 따라서 순수 국산 원료를 이용한 새로운 기능성 원료의 개발은 무척 시의적절하다고 할 수 있다.

야생하는 산채는 그 동안 영양적인 면이나 기호적인 면에서 중요성이 널리 인식되지 않았으나 일부 차 (tea)나 채소류에서 항산화성, 항암성, 항균성 등의 기능성이 알려짐에 따라 상용 하던 야생 산채의 기능성에 대해서 관심을 가지게 되었다(1). 이러한 산채 중에서 그 가능성이 주목 받고 있는 것으로

요즘 경남 함양군, 충북 영동군, 전북 남원 등의 농가에서 재배하고 있는 참죽나무가 있다. 참죽나무는 분류학적으로 쥐손이풀목 멸구술나무과에 속하는 낙엽교목으로서, 학명은 *Cedrela sinensis*이며, 독특한 향 때문에 향춘수라고도 불린다(2). 참죽나무의 잎에는 단백질, 당질, 지질, 섬유소, 철분, 인 등의 무기질과 그 밖의 특이 성분인 크웰시트린 (quercitrin) 외에도 비타민 C가 함유되어 있으며, 이 중 칼슘이 잎의 건조 중량 100 g당 946 mg을 함유하고 있어 일반적인 고칼슘 식품인 다시마와 견주어도 손색없는 높은 칼슘함량을 나타내고 있다(3). 한편 근피에는 탄닌 (tannin) 성분이 함유되어 있고 비타민 A, B, E 등도 상당량 함유되어 있다. 전통적으로 만성 위장질환, 지혈작용 등에도 효과가 좋다고 알려져 있는 참죽나무는 특유의 향으로 인해 병충해가 없는 것으로 알려져 있어 농약으로부터 자유로운 완전한 무공해 식품이다. 중국이 원산지인 참죽은 예로부터 주로 새순을 식품으로 이용해 왔으며 특히 사찰에서 차나 나물 등으로 즐겨먹던 고급 전통식품 중의 하나이다. 최근에는 여러 종류의 기능성 물질을 연구로

† Corresponding Author : Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Tel : +82-62-230-7518, Fax : +82-62-230-7226

E-mail : shinhj@chosun.ac.kr

참죽나무 잎의 조리 시 quercitrin의 함량 변화(4), 화학성분 및 생리활성(5), 항염증 및 진통효과(6), 참죽나무 잎에서 flavonoid 성분의 분리(7), 계절에 따른 flavonoid 화합물의 변화(8) 등이 진행되어 왔다. 그러나 실제 식품에 적용 가능한 추출물을 대상으로 항산화능과 면역증강능을 연구한 사례는 아직 없다.

본 연구에서는 참죽나무 잎의 유용물질을 식품화하기 위한 전단계로서 열수추출시료와 EtOH추출시료를 가지고 총 폴리페놀 함량을 비교하였으며 생리활성 중에서 항산화활성은 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여능 (electron donating ability)을 측정하는 방법으로 조사하였으며, nitric oxide (NO) 활성측정을 통하여 면역증강능을 확인하였다.

재료 및 방법

참죽나무 잎

본 실험에 사용된 참죽나무 잎은 경상남도 함양군에서 2006년 5월경 (전반기)에 재배한 것과 10월경 (후반기)에 재배한 것을 수집하여 수세 후 그늘에서 말려 분쇄하여 사용하였다.

시약 및 기기

추출물의 농축은 rotary evaporator (BUCHI Rotary R-205, Heating Bath B-490, Hanpae Low Temp-Circulator HB-205 WL-4, Germany)를 사용하였다. 총 폴리페놀 함량의 측정에는 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (SIGMA-Aldrich Korea)를 사용하였으며 항산화력의 측정에는 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH, SIGMA-Aldrich Korea)를 사용하였다. 세포배양에 사용된 시약은 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다.

세포배양

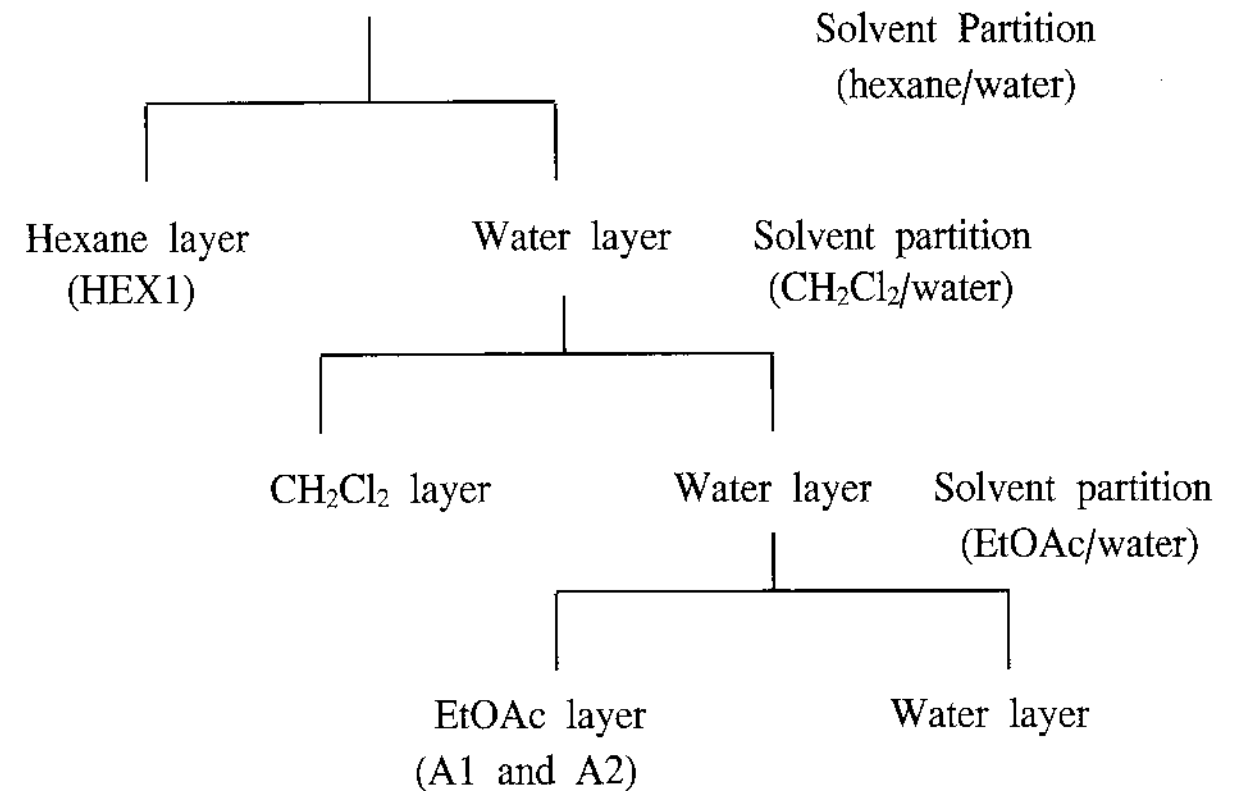
RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포들은 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum), 2 mM의 L-glutamine, 100 U/ml 페니실린과 100 µg/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포들은 37°C에서 5% CO₂ 존재 하에 배양하였다.

추출 방법

이 실험에서는 추출용매를 증류수와 EtOH 두 가지로 나누어 진행하였다. 우선 증류수를 이용하여 열수추출한 경우는, 분쇄한 참죽나무 잎 분말 100 g에 증류수 1 L를 가하여 "1 h 진탕한 것"과 "2 h 진탕한 것"으로 나누었다. 진탕 후 냉장 보관으로 침전시킨 후 원심분리 (12,000 rpm, 15 min)하여 여과액을 감압 농축하였다. EtOH을 이용하여 추출한 경우는, 잎 분말 35 g에 80% EtOH을 가하여 6 day 동안 침출한 것을 60°C 항온조에서 1 h 동안 진탕 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 15 min)하여 여과액을 감압 농축하였다. 이 여과액은 다시 water (H₂O) layer과 hexane (C₆H₁₄) layer로 분획하고, water layer는 다시 CH₂Cl₂ layer과 water layer로 분리하였다. 이 water layer는 또 다시 EtOAc layer과 water layer로 분획하여 최종 추출물을 얻었다(Scheme 1). 면역증

강활성의 측정을 위해서 열수추출 분획과 EtOH추출 분획 및 기타 분획은 필요에 따라 silica gel column chromatography를 이용하여 정제하였다. 열수추출 분획의 경우 H로, 주정추출 후 분리된 헥산 추출분획의 경우 HEX로, EtOAc 분획의 경우 A로 표시하였다.

The leaves of *Cedrela sinensis* 35 g and 80% ethanol 356 ml



Scheme 1. Extraction and isolation of natural compounds from *Cedrela sinensis*.

Total phenol함량

총 페놀의 함량측정은 Folin-Dennis법에 준하여 실시하였으며, 기준 물질은 chlorogenic acid, caffeic acid, catechin을 사용하였고 각각 1/100, 1/125, 1/200, 1/250, 1/400, 1/500로 희석한 대조군과 참죽나무 잎 추출물의 1/10 희석액을 사용하였다. Caffeic acid의 경우 물에 잘 녹지 않아 용해 시에 sonicator를 이용하여 분산시켰다. 희석액 4 ml에 Folin reagent 1 ml을 가하고 5 min간 vortexing 시킨 후 20% NaCO₃ 1 ml 용액을 가하였다. 이 혼합액을 1 h 동안 정치 후 분광광도계 (Shimadzu Mini 1240, Japan)를 사용하여 640 nm에서 흡광도를 측정하고 각 대조시료를 측정하여 표준곡선으로 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 추출단계 중 3번째 단계의 시료를 대상으로 총 폴리페놀 함량을 측정하여 나타내었다(9).

항산화능 측정

시료의 항산화 활성은 시료 첨가 후 시료의 환원력 평가를 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH)의 흡광도 감소에 대한 값을 구하여 산정하였다. DPPH의 농도는 MeOH에 희석하여 0.6 mM로 제조하여 대조군으로 사용한 butylated hydroxyanisole (BHA), 비타민 E, 비타민 C를 사용하였고 각각 1/10, 1/20, 1/100, 1/125, 1/165, 1/250, 1/500, 1/1000로 희석한 대조군과 참죽나무 잎 추출물을 1/10로 희석한 시료를 사용하였다(10). 제조된 0.6 mM DPPH 1 ml와 각각의 시료 4 ml를 가한 후 시간대 별로 (10, 12, 15, 20, 30 min) 517 nm에서 흡광도를 측정한 시료군 흡광도와 무 첨가군 흡광도를 활성계산법에 의해 산출하여 항산화 결과 값을 얻었다(11).

참죽의 면역기능 측정

자가면역기능 향상에 대한 부분을 확인하기 위하여 세포에서 분비되는 면역인자인 아질산염 (nitrite)을 다음과 같은 방법으로 측정하였다. RAW 264.7 cells을 96-well 배양접시를

이용하여 5×10^5 cells/ml 로 조절하여 0.1 ml씩 분주한 다음, 24 h 동안 37°C에서 lipopolysaccharide (LPS) 또는 참죽 추출물로 자극시켰다. 분리된 상층액과 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid)을 같은 부피로 섞고 실온에서 10분 동안 배양시켰다. 표준곡선을 만들기 위해 NaNO_2 를 사용하고, 아질산염 생산은 550 nm에서 흡광도로 판독해서 측정하였다.

결과 및 고찰

추출 결과

열수추출의 경우 증류수 1 L을 이용하여 진탕하였으며 진탕 후 원심분리 하여 추출액은 각각 550 ml (1 h 진탕)와 740 ml (2 h 진탕)가 남았으며, 80% 주정 추출의 경우 추출 후에 각 분획은 회전식 진공증발기로 분리 농축하였고 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

Table 1. Summary of solvent extraction condition of *Cedrela sinensis* leaves extracts*

Extraction solvents	H ₂ O	EtOAc	CH ₂ Cl ₂	C ₆ H ₁₄
bath temp (°C)	45-65	30-35	30-35	30-32
Rotary evaporator rotating speed (rpm)	45-60	45-60	45-60	45-60
condenser temp (°C)	-6.5~-14	-2.6~-10	-2.6~-10	-2.6~-10
Extracts of May leaf (ml)	57	26	21	42
Extracts of October leaf (ml)	46	31	18	42

*35 g dry leaves of *C. sinensis* and 365 ml of 80% ethanol were used.

Polyphenol 함량

참죽나무 잎을 상반기 (5월)와 하반기 (10월)에 채취하여 추출된 polyphenol 함량을 보면 상반기 채취한 추출물에서 폴리페놀의 함량이 나왔다. 특히 수용액층 (water layer)에서 59.6 mg/100 g으로 유기용매층보다 더 많은 폴리페놀의 함량이 나왔으며, 유기용매층의 경우 C₆H₁₄, EtOAc, CH₂Cl₂ 순의 양적 변화가 있었다. 상반기 채취 참죽나무 잎에서 총 폴리페놀 함량은 122.8 mg/100 g으로 나왔으며 하반기 채취한 참죽나무 잎에서는 총 93.5 mg/100 g으로 조금 낮게 나왔다(Table 2). Chlorogenic acid와 caffeic acid을 기준으로 하여 산출한 폴리페놀 함량 또한 상반기 채취한 참죽나무의 어린잎이 하반기 채취한 참죽나무 잎 보다 근소한 차이로 더욱 많은 함량이 검출되었다(data not shown). 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 표준물질을 caffeic acid, chlorogenic acid, catechin을 가지고 상대적인 값을 산출하였는데, 표준물질에 따라 근소한 차이로 서로 다른 값들이 도출되었다(data not shown).

Table 2. Polyphenol content in leaves of *Cedrela sinensis* based on catechin

Solvents	Leaf in May	Leaf in October
H ₂ O	59.6	46.5
EtOAc	22.8	28.8
CH ₂ Cl ₂	16.0	4.0
C ₆ H ₁₄	24.4	14.2
Total	122.8	93.5

항산화능

참죽나무 잎을 계절별로 채취하여 Scheme 1에 따라 추출하여 시료로 사용하였다. 일반적으로 플라보노이드의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH법을 사용하게 되는데, DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 그 자체가 질소 중심원력의 라디칼로 구성되어 있다. 시료의 항산화 활성은 시료 첨가 후 시료의 활성평가를 DPPH 흡광도 변화에 대한 값을 구하여 산정하였다.

대조군으로는 BHA, 비타민 E, 비타민 C를 40 μm/ml 농도로 사용하였다. 참죽나무 잎추출물의 DPPH 소거 활성도는 평균적으로 대조군의 20% 수준으로 나타났다. 그러나 추출물이 정제되지 않았다는 사실을 감안하면 참죽나무 잎 추출물의 항산화능력은 다른 항산화제에 비해 결코 뒤떨어지지 않는다고 판단할 수 있다(Fig. 1). 참죽나무 잎의 채취시기에 따른 차이는 거의 없는 것으로 나타났으며, 특이할 만한 사항으로는 총 폴리페놀 측정에서 극히 소량의 폴리페놀 함량이 측정된 hexane layer에서 가장 높은 DPPH소거 활성도가 나왔다. 최근 노화와 성인병 질환의 원인이 생체 내에서 발생하는데 활성산소종 (reactive oxygen species)에 의한 산화적 대사 부산물이 중요한 원인이 된다는 학설이 있으며, 이 활성산소종이 단백질, 생체막, DNA 등에 유해한 작용을 하게 됨에 따라 활성산소종을 조절할 수 있는 물질로 알려진 이와 같은 천연 항산화제에 개발이 절실히 필요하다 할 수 있다.

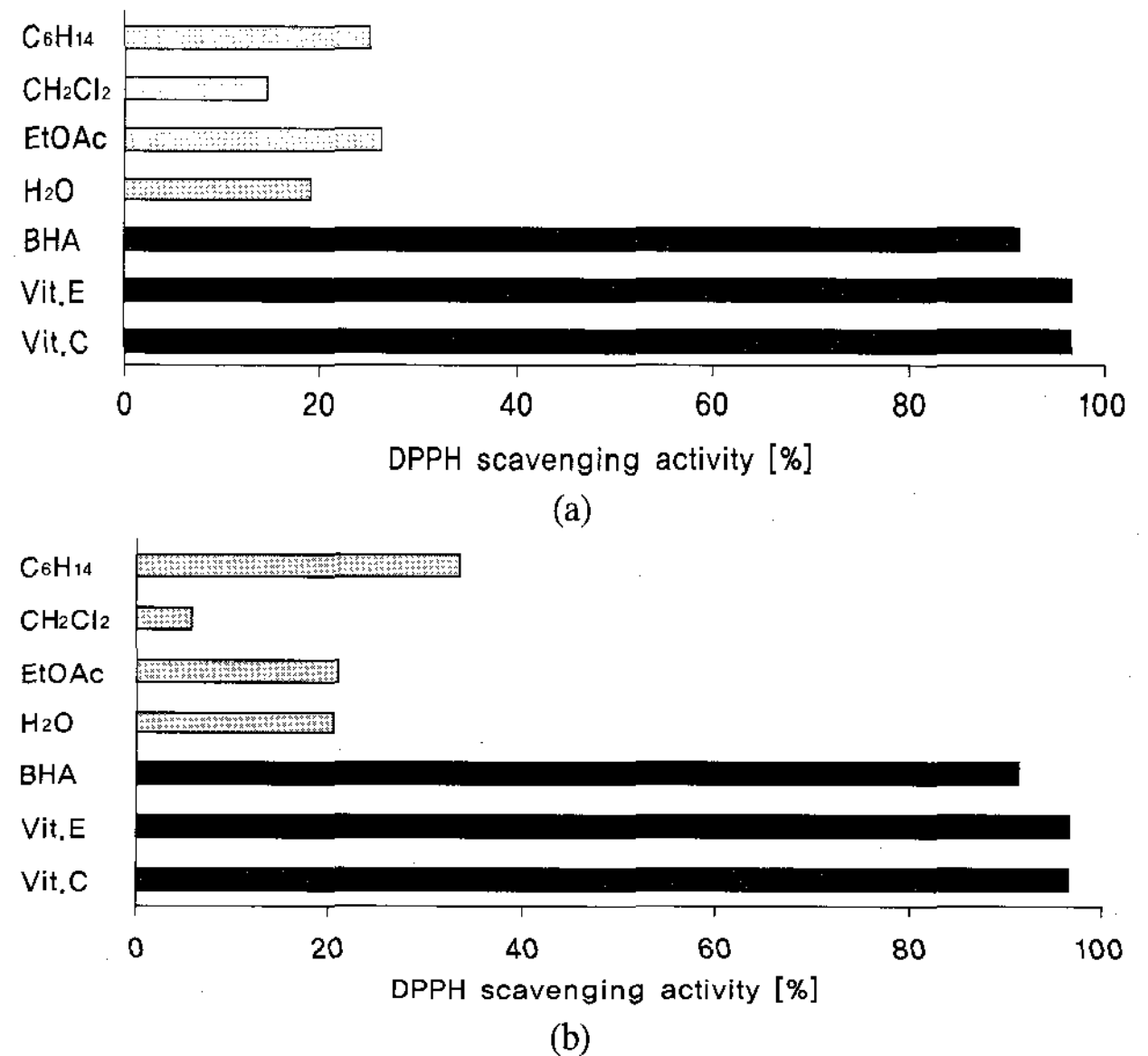


Figure 1. DPPH free radical elimination ability of the extracts of *Cedrela sinensis* leaves in (a) May and (b) October.

아질산염 (nitrite) 측정

추출단계별로 여러 가지 분획을 추출하여 대식세포에서의 NO 생성을 측정한 결과 참죽나무 잎으로부터 열수 추출한 분획에서(H1-H4) NO 생성의 증가를 관찰할 수 있었다. NO 생성 증가 정도는 양성대조군인 lipopolysaccharide (LPS)에 비해서도 상당히 크게 증가하였다(Fig. 2(a)). Fig. 2(b)에서 희석을 많이 한 시료에서도 NO 증가 활성이 나타나므로 열수 추출물에서 NO 증가 활성이 나타는 것을 증명할 수 있었다. 또한 채취한 시기에 따른 유의적 차이는 없었다. Fig. 3에서

참죽나무로부터 추출한 시료에서 NO의 생성을 억제하는 효능이 있는지 검증하기 위하여 각 분획을 LPS와 같이 생쥐대식세포주인 RAW 264.7에 처리하였다. 참죽나무로부터 열수추출한 분획에서 (H1-H4) NO 생성의 증가를 관찰할 수 있었으며 감소효능은 관찰되지 않았다. EtOAc (A1, A2)나 hexane (HEX1)으로 추출한 시료에서는 LPS에 의한 NO 증가 활성이 억제됨을 확인할 수 있었다. Fig. 4에서 참죽나무로부터 유기용매로 추출한 시료에서 NO의 생성을 억제하는 효능이 있는지 정확하게 검증하기 위하여 유기용매 분획을 좀 더 희석하여 LPS와 같이 생쥐대식세포주인 RAW 264.7에 처리하였다. EtOAc (A1, A2)와 hexane으로 추출한 시료에서는 LPS에 의한 NO 증가 활성이 억제됨을 확인할 수 있었다. 위의 결과를 보면 참죽나무의 열수추출 분획에는 대식세포의 활성을 증가시키는 성분이 포함되어 있고, 유기용매 추출 분획에는 대식세포의 활성을 감소시키는 성분이 포함되어 있는 것으로 판단되며, 따라서 추가연구를 통하여 각 분획을 좀 더 세분화 시켜서 면역증강물질과 염증억제물질을 순수 분리하고, 면역증강효능과 염증억제효능을 좀 더 심층적으로 분석할 필요가 있을 것으로 판단된다.

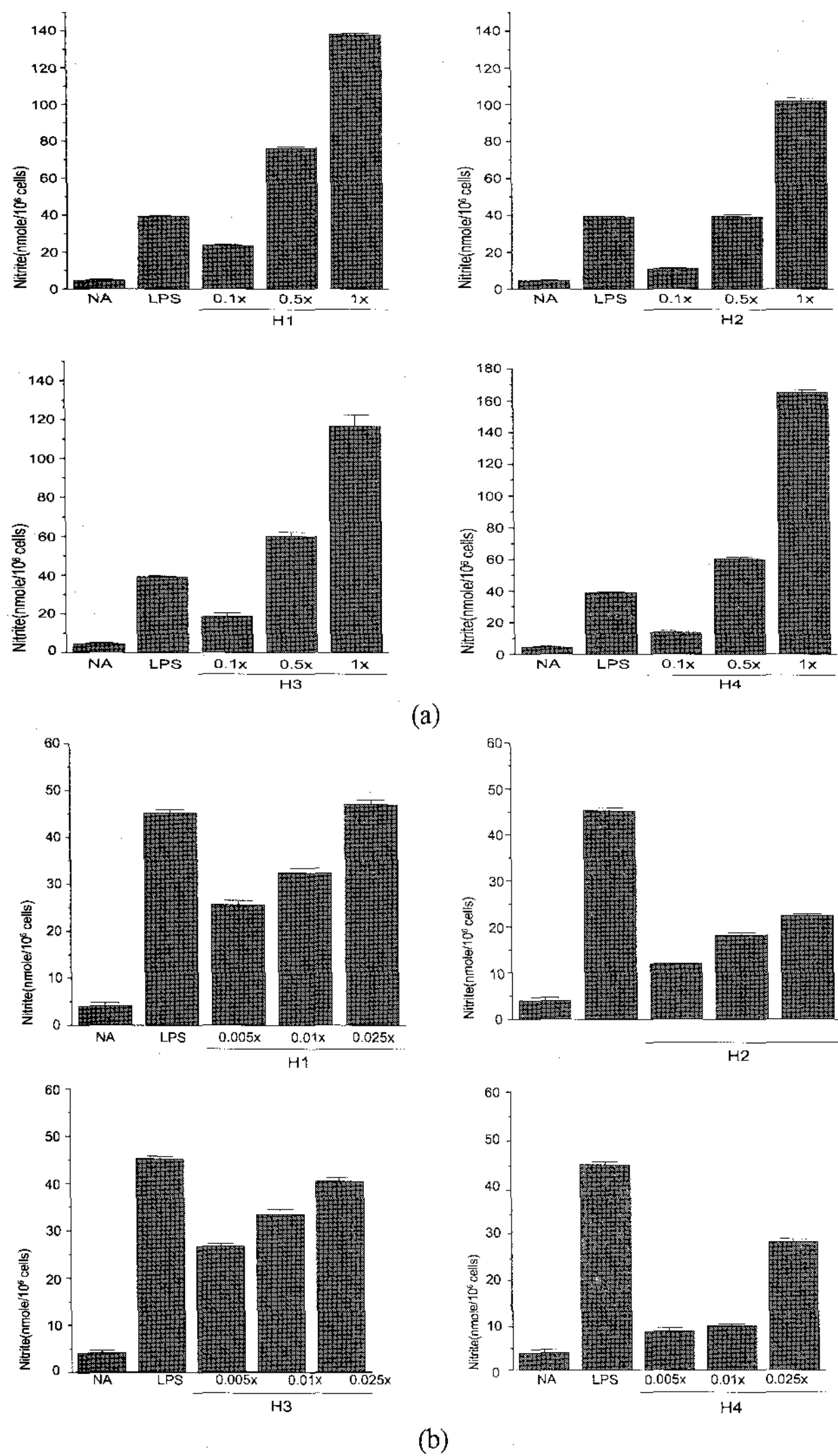


Figure 2. Effect of the water extracts of *Cedrela sinensis* leaves on NO production (a) higher concentration and (b) lower concentration.

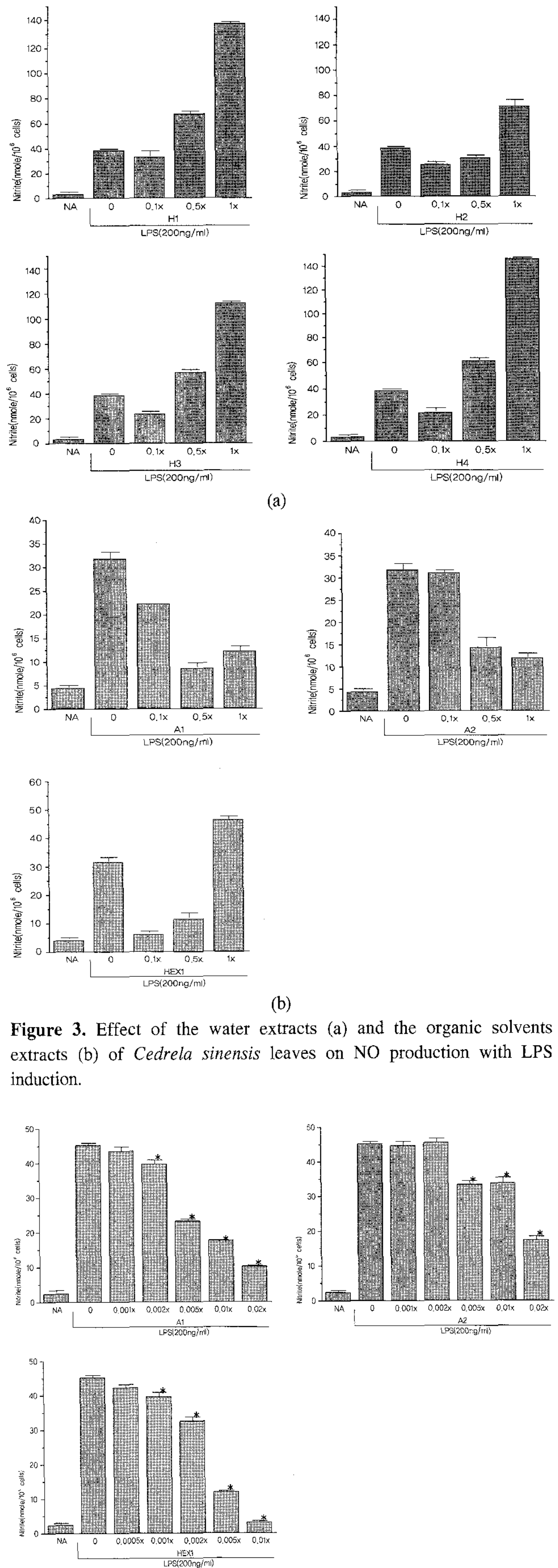


Figure 3. Effect of the water extracts (a) and the organic solvents extracts (b) of *Cedrela sinensis* leaves on NO production with LPS induction.

Figure 4. Effect of the organic solvents extracts with dilute state of *Cedrela sinensis* leaves on NO production.

참죽나무 열수추출액은 대식세포의 활성을 증가시켜 인체의 비특이적 면역반응을 증가시킴으로써 종양세포와 병원체의 성장을 억제할 가능성이 있기 때문에 참죽나무 잎을 물로 다려 먹게 되면 면역증강에 좋은 차로 상품화 가능할 것으로 판단되어진다. 한편, 대식세포의 활성이 너무 강해지는 경우 염증성 쇼크를 유발할 수도 있고, 자가면역반응을 일으킬 수도 있음을 유의하여야 한다. 참죽나무의 유기용매 추출물은 항염증성 성분이 포함되어 있을 것을 추정된다. 따라서 추가 연구를 통하여 소염물질을 개발할 수 있는 가능성도 열려 있다. 이상과 같은 결과를 미루어 볼 때, 참죽나무 잎이 한 가지 식물인데도 불구하고 유효 성분과 추출 방법에 따라 면역 증강 및 항균, 항염 작용을 하는 다양한 식품으로써 이용될 수 있다.

요 약

본 연구를 통하여 요즘 기능성 측면에서 관심을 끌고 있는 참죽나무 잎의 열수추출물과 유기용매 추출물을 이용하여 항산화능과 면역증강능을 확인하였다. 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량은 46.5-59.6 mg/100 g으로 유기용매 추출물보다 그 수치가 더 높았다. 열수 추출물과 유기용매 추출물의 항산화 활성은 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) radical 소거활성으로 6-33%로 기준물질보다 낮은 값을 나타내었다. 참죽나무 잎 추출물의 면역증강능을 확인하기 위하여 박테리아 감염에 대항하는 숙주방어체계에 필요한 NO 생성능을 확인하였다. 열수 추출물은 마크로파지 세포주인 RWA 264.7의 NO 생성을 증가시켰다. 그러나 유기용매추출물은 별다른 변화를 가져오지 않았다. 항염효과를 증명하기 위하여 인지질다당류 (LPS) 유발 NO생성에 미치는 영향을 조사하여, NO 생성을 억제하는 것을 증명하였다. 즉, 면역증강능의 확인 실험을 통하여 참죽나무 잎의 열수추출 분획에 대식세포의 활성을 증가시키는 성분이 포함되어 있고, 유기용매 추출 분획에서는 대식세포의 활성을 감소시키는 성분이 포함되어 있는 것으로 판단된다. 이상과 같은 결과를 미루어 보았을 때, 참죽이 한 가지 식물인데도 불구하고 유효 성분과 추출 방법에 따라 상이한 면역 증강 및 항균, 항염 작용을 보이는 것으로 나타났다.

REFERENCES

- Kim, H. Y., Y. J. Kwon, Y. E. Kim, and B. Nahmgung (2004), Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of *Aster scaber* thunb extracts with different microwave-assisted extraction conditions, *Korean J. Food Preservation* **11**, 88-93.
- Pack, Y. H., G. Y. Jea (2004), Tree Story of Our Nation, 1st ed., p277, Ebilac Press, Seoul.
- Han, Y. B. (2003), Korean Wild Edible Plant Resources II, 1st ed., p297, Korea University Press, Seoul.
- Park, J. C., S. S. Chun, and S. H. Kim (1995), Changes on the quercitrin content in the preparation for the leaves of *Cedrela sinensis*, *Korean J. Soc. Food. Sci.* **11**, 303-308.
- Park, J. C., S. S. Chun, H. S. Young, and S. H. Kim (1993), Studies on the chemical components and biological activities of edible plants in Korea (II), *J. Korean Soc. Food Nutr.* **22**, 581-585.
- Park, J. C., Y. B. Yu, J. H. Lee. and N. J. Kim (1994), Studies on the chemical components and biological activities of edible plants in Korea (VI), *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**, 116-119.
- Park, J. C. and S. H. Kim (1995), Seasonal variation of flavonoid contents in the leaves of *Cedrela sinensis*, *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 578-581.
- So, E. M., E. J. Jung, C. C. Shin, S. H. Kim, S. O. Beak, Y. M. Kim. and I. K. Kim (2006), Antioxidant activities of Pu-erh tea, *Anal. Sci. Technol.* **19**, 39-44.
- Chi, H. Y., K. H. Kim, W. S. Kong, S. L. Kim, J. A. Kim, I. M. Chung and J. T. Kim (2005), Antioxidant activity and total phenolic compounds of *P. eyngii* spp. extracts, *J. Crop Sci.* **50**, 216-219.
- An, B. J., M. J. Bae, H. J. Choi, Y. B. Zhang, T. S. Sung, and C. Choi (2002), Isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon(*Diospyrus kaki* L. Folinn), *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 212-217.
- An, B. J. (2002), An Industrial Application for Functional Materials and Polyphenols from the Korean Persimmon Leaves, Food Preservation and Processing Industry.