

비파 잎 추출물의 항산화 및 항균활성

이경인 · 김선민[†]

동신대학교 한약재산업학과

Antioxidative and Antimicrobial Activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. Leaf Extracts

Kyoung-In Lee and Sun-Min Kim[†]

Dept. of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Jeonnam 520-714, Korea

Abstract

Antioxidative, antimicrobial activities and Raw 264.7 cell viability as cytotoxicity of various solvent extracts from leaf of *Eriobotrya japonica* Lindl. dried by different methods were investigated for processing as functional ingredient. In DPPH radical scavenging activity, RLE (80% EtOH extract of raw leaf) and FLE (80% EtOH extract of freeze-dried leaf) exhibited strong scavenging effect on 300 μ M DPPH radical solution (1.71 mg/mL and 2.11 mg/mL for RLE SC₅₀ and FLE SC₅₀). Also in nitric oxide scavenging activity, RLE and FLE showed strong activities (83.9% and 82.2% in 5 mg/mL sample concentration). Total phenolic compound contents of each extracts were found to be 73.7~215.4 mg/g and RLE was showed the highest phenolic compound content. Also, total flavonoid contents were found to be 24.85~110.3 mg/g and RLE was showed the highest flavonoid content. In antimicrobial activity, RLE was showed higher growth inhibition effect against all microbial strains. RLE, RLW (hot water extract of raw leaf), and FLW (hot water extract of freeze-dried leaf) exhibited strong antimicrobial activities against MRSA and *S. aureus*. In measurement of cytotoxicity by MTT assay, Raw 264.7 cell viabilities of 80% EtOH extracts showed better effect than water extracts. Especially viability of RLE was found be over 100% in every tested sample concentration.

Key words: *Eriobotrya japonica*, antioxidative, antimicrobial, cytotoxicity

서 론

비파(*Eriobotrya japonica* Lindl.)나무는 장미과(Rosaceae)의 상록소교목으로서 겨울철에 개화하여 이듬해 6월에 수확하는 과실수이다. 중국이 원산지로서 최대 생산국이며, 일본이나 스페인 등에서도 비파재배가 활발할 뿐만 아니라 비파 가공 산업이 발달되어 있다. 한방 관련 의서나 민간요법에서는 비파 과실이나 잎이 진해, 거담, 구토, 토혈 등에 효과가 있으며, 호흡진정과 갈증해소에 효능이 뛰어난 것으로 전하고 있다. 특히 비파 잎은 청폐(淸肺), 지해(止咳), 화위(和胃), 지구(止嘔), 소담(消痰), 해서독(解暑毒) 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다(1-3).

일본과 중국 등의 최근 연구에 따르면 비파 종자 추출물이 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)을 제거하거나 산화적 스트레스를 억제하며(4,5), LDL oxidation을 방지하는 효과가 있음이 확인되었다(6). 비파 잎에서는 항당뇨 효과(7)와 항염증 및 항암효과를 나타내는 물질의 존재를 확인하기도 하였다(8).

국내에서는 비파 과실의 성분분석(9-11)이나 비파 부위별 용매추출물의 항산화 및 항균활성에 관한 연구(12,13), 비파 잎의 특정성분을 이용한 peroxy-nitrite 소거능에 대한 연구(14), nitrite 소거능 및 항돌연변이 효과에 관한 연구(15) 등이 진행되었다.

비파는 잎이나 종자에 amygdalin을 비롯한 생리활성 성분이 다량 함유되어 있어서 새로운 기능성 소재로의 개발 잠재성이 높으나 국내외적으로 비파의 기능성에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 그러나 우리나라 남해안 지역의 지리적, 기후적 특성이 비파재배에 적합한 것으로 판단되면서 몇몇 지자체에서는 비파를 지역특화작목으로 육성하고 있어 그 재배면적이 증가하고 있는 추세이므로 제품화에 응용할 수 있는 다양한 기초 연구 자료가 필요하다. 특히 비파의 특성상 연중 대량 수확이 가능한 잎의 기능성 및 활용방안에 대한 연구가 시급히 요구되고 있다.

한편 천연물의 항산화 활성, 항균 활성은 재료의 처리 조건 및 추출방법 등에 따라 유효물질의 함량이나 생리적 활성도 다르게 나타난다(16). 따라서 본 연구에서는 다양한 조건

[†]Corresponding author. E-mail: eppiksm@naver.com
Phone: 82-61-330-3226, Fax: 82-61-336-3118

으로 건조한 비파 잎을 재료로 하여 추출용매별 항산화 및 항균활성과 세포독성의 차이에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

비파 잎은 2007년 10월 전남농업기술원 과수연구시험장에서 채취한 것을 4°C 이하로 냉장보관하면서 사용하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), sodium nitroferri-cyanide(III) dihydrate, sulfanilamide, N-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, ascorbic acid, ascorbic acid 6-palmitate, tannic acid, rutin은 Sigma(USA)제품을 사용하였고, diethyleneglycol과 Folin-Denis reagent는 Fluka (Belgium)제품을 사용하였다. 항균활성에 사용된 배지는 Becton, Dickinson and Company(USA) 제품을 사용하였으며, 세포독성 시험에 사용된 MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)와 DMSO (dimethyl sulfoxide)는 Sigma(USA), DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)은 GIBCO(USA)제품을 사용하였다.

균주 및 세포주

항균활성 실험에 사용된 미생물 균주 중 MRSA(methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, CCARM3696)는 서울여자대학교 항생제 내성균주은행에서 분양받았으며, *Bacillus cereus*(KCTC1012), *Bacillus subtilis*(KCTC1021), *Staphylococcus aureus*(KCTC3881), *Vibrio vulnificus*(KCTC2959), *Staphylococcus epidermidis*(KCTC1917)와 세포독성 시험에 사용된 동물세포주인 Raw 264.7은 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양 받은 것을 실험에 사용하였다.

기기

항산화 활성 및 세포독성 시험은 microplate-reader(BIO-TEK, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

시료의 조제

비파의 신선한 잎을 수세하여 음건한 것을 생잎(RL, raw leaf), 수세 후 음건한 잎을 dry oven에서 90°C로 5시간 동안 건조한 것을 가열건조 잎(DL, dried leaf), -80°C의 deep freezer로 동결시켜 진공건조기로 건조한 것을 동결건조 잎(FL, freeze-dried leaf)으로 구분하여 추출에 사용하였다. 추출은 환류식 추출장치를 이용하여 열수와 80% ethanol을 추출용매로 하여 2시간씩 2회 반복하여 실시하였다. 추출액은 감압식 농축기를 사용하여 농축 후 다시 동결건조 하여 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였으며, 각각의 추출물은 Table 1과 같이 표현하였다.

일반성분 분석

일반성분은 AOAC의 방법(17)을 기준으로 수분은 105°C

Table 1. Abbreviation of each extract

Mark	Signification
RLW	hot water extract of raw leaf
RLE	80% EtOH extract of raw leaf
DLW	hot water extract of oven dried leaf at 90°C
DLE	80% EtOH extract of oven dried leaf at 90°C
FLW	hot water extract of freeze-dried leaf
FLE	80% EtOH extract of freeze-dried leaf

상압가열건조법, 조단백은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 건식법으로 분석하였으며, 탄수화물은 이들 성분을 제외한 나머지 값으로 결정하였다.

DPPH radical 소거능 측정

비파 잎 추출물의 항산화 활성은 DPPH를 이용하여 radical 소거능을 측정하였다(18). 각 추출물을 methanol에 0.1~20 mg/mL의 다양한 농도로 용해시킨 시료액 10 µL와 300 µM로 용해시킨 DPPH 용액 190 µL를 혼합하여 15분간 암실에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 바탕으로 50%의 DPPH radical을 소거하는데 필요한 농도(SC₅₀)를 계산하였다. 대조군으로 ascorbic acid (vitamin C)를 사용하였다.

Nitric oxide 소거능 측정

Nitric oxide 소거능은 Marcocci 등의 방법(19)을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 10 mM sodium nitroferri-cyanide(III) dihydrate 50 µL와 증류수에 일정농도로 용해시킨 시료액 30 µL를 혼합한 후 25°C에서 150분 동안 반응시켰다. 1% sulfanilamide(in 30% acetic acid) 60 µL를 혼합하고 5분 후 다시 0.1% N-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride(in 60% acetic acid) 60 µL를 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 ascorbic acid(vitamin C)를 사용하였으며, 시료액 대신 증류수를 사용한 대조군의 결과를 기준으로 소거능을 계산하였다.

Total phenolic compound 함량 측정

Folin-Denis 법을 이용하여 각 추출물의 total phenolic compound 함량을 측정하였다(20). 1 mg/mL 농도로 methanol에 용해시킨 시료액 80 µL와 Folin-Denis reagent 80 µL를 혼합하여 3분간 반응시킨 뒤, 10% Na₂CO₃를 80 µL를 혼합하여 암실에서 60분간 반응시킨 후 상등액 120 µL를 취하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 tannic acid를 이용하여 검량선을 작성하고 phenolic compound 함량을 mg/g tannic acid로 나타내었다.

Total flavonoid 함량 측정

페놀성 화합물중 특히 여러 가지 기능성을 나타내는 것으로 알려진 flavonoid 함량을 알아보기 위해 Lee 등의 방법(21)을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 1 mg/mL 농도로

methanol에 용해시킨 시료액 10 μ L와 1 N-NaOH 10 μ L, diethyleneglycol 200 μ L를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin을 이용하여 검량선을 작성하고 total flavonoid 함량을 mg/g rutin으로 나타내었다.

Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

각 추출물의 항균활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였다(22). 항균시험용 평판배지는 계대 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 200 μ L씩 도말하여 준비하였고, 50 mg/mL 농도로 조제한 시료를 disc당 1, 5 mg이 되도록 paper disc(8 mm)에 천천히 흡수시킨 뒤 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 후 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다. 대조군으로 ampicillin(10 μ g/disc)을 사용하였다.

MTT assay에 의한 세포생존율 측정

비파 잎 추출물의 세포보호 및 독성유무를 확인하기 위해 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정하였다(23). Raw 264.7 세포주를 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 100 μ L씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 incubator에서 배양한 후 250~2,000 μ g/mL 농도의 각 추출물을 10 μ L씩 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. MTT시약을 10 μ L를 가하여 다시 4시간 동안 반응시킨 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO를 100 μ L 가하여 30분 방치한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 넣지 않은 대조구의 흡광도를 100%로 하여 상대적 생존율을 구하였다.

통계처리

모든 측정값은 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS 12.0을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하였으며, 유의성은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

결과 및 고찰

일반성분

비파 잎의 일반성분을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 비파 잎에는 수분이 59.13%로 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며, 조회분이 3.43%, 조단백이 3.37%, 그리고 조지방이

Table 2. Proximate composition of *Eriobotrya japonica* leaf (unit: %, wet basis)

Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Carbo-hydrate
59.13 \pm 0.35 ¹⁾	3.37 \pm 0.30	0.26 \pm 0.06	3.43 \pm 0.01	33.81 \pm 0.15

¹⁾Values are mean \pm SD (n=3).

0.26%로 가장 낮은 함량을 보였다. 이들 성분을 제외한 나머지 33.81%가 탄수화물에 해당하는 것으로 조사되었으며, 이는 대부분이 섬유질이고 미량(1~2%)의 당 성분이 존재하는 것으로 알려져 있다(11).

Bae와 Shim(11)의 연구에 따르면 비파 잎의 일반성분은 수분 48.7%, 조회분 5.71%, 조단백 5.23%, 조지방 3.25%로 나타나 본 연구 결과와 다소 차이가 있으나, 이는 비파 품종, 재배조건, 비파 잎 채취 시기나 건조 상태에 따른 차이로 여겨진다. 다만 조지방 함량의 경우는 품종이나 지역적인 재배 환경의 차이와 더불어 세척 과정에서 제거된 표면성분에 의한 영향이 크게 작용한 것으로 판단된다.

건조 및 추출조건별 수율

각 조건별 추출수율을 측정된 결과 Table 3에서와 같이 FLE가 27.75%의 가장 높은 수율을 보였다. DL의 경우 열수 추출물이나 에탄올 추출물 모두 RL의 추출수율보다는 높았지만 FL의 추출수율보다는 현저하게 낮게 나타났다.

한편, 건조 조건에 관계없이 80% ethanol 추출물이 열수 추출물보다 추출수율이 높게 나타났으며 그 가운데 가열 건조 잎의 추출수율이 가장 큰 차이를 보였다.

Total phenolic compound 및 total flavonoid 함량

Phenolic compound는 식물의 대표적인 2차 대사산물로 hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물로서 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 항산화 활성은 페놀성 화합물의 종류나 함량이 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있어(24-26) tannic acid를 표준물질로 하여 각 추출물의 총 페놀성 화합물 함량을 측정하였다. 한편, flavonoid는 전형적인 페놀성 화합물로서 C₆-C₃-C₆의 기본구조를 가지며, flavonoid의 polyphenolic한 성질은 superoxide, hydroxy radical과 같은 세포손상을 초래하는 free radical을 없애주는 항산화 활성을 나타내므로(27) rutin을 표준물질로 하여 flavonoid 함량을 측정, 항산화 활성 측정지표로서의 활용 가능성을 확인하였다.

총 페놀성 화합물은 Table 4에서 보는 바와 같이 RLE에서 215.4 mg/g으로 가장 높은 함량을 보였다. 건조 조건별로는 RL, FL, DL 순으로 높은 함량을 보였으며, 추출 방법은

Table 3. Yield of extracts from *Eriobotrya japonica* leaf in various conditions (unit: %)

RLW	RLE	FLW	FLE	DLW	DLE
12.77 \pm 0.62 ¹⁾	14.80 \pm 1.22 ^{de}	25.48 \pm 0.93 ^{ab}	27.75 \pm 1.29 ^a	19.10 \pm 0.81 ^{cd}	22.80 \pm 1.85 ^{bc}

¹⁾Values are mean \pm SD (n=2). Different superscript letters in the same line show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

Table 4. Total phenolic compound and flavonoid contents of extracts from *Eriobotrya japonica* leaf (unit: mg/g)

	RLW	RLE	FLW	FLE	DLW	DLE
Phenolic compound	125.7±5.01 ^{c1)}	215.4±6.59 ^a	116.2±6.52 ^c	170.6±8.35 ^b	73.7±5.09 ^d	84.1±4.82 ^d
Flavonoid	69.1±5.45 ^c	110.3±6.88 ^a	41.8±9.62 ^d	90.9±7.27 ^{ab}	24.9±4.58 ^d	76.4±9.09 ^{bc}
Relative ratio (%) ²⁾	54.9	51.2	36.0	53.3	33.8	90.8

¹⁾Values are mean±SD (n=3) without relative ratio. Different superscript letters in the same line show significant differences at p<0.05 by one-way ANOVA.

²⁾Relative ratio: a ratio of flavonoid content compared to phenolic compound.

Table 5. DPPH radical scavenging activities of extracts from *Eriobotrya japonica* leaf

	RLW	RLE	FLW	FLE	DLW	DLE	VC ²⁾
SC ₅₀ (mg/mL)	3.10±0.44 ^{c1)}	1.71±0.16 ^a	2.61±0.19 ^{bc}	2.11±0.17 ^{ab}	4.71±0.24 ^d	3.02±0.11 ^c	0.48±0.09
Relative activity (%) ³⁾	15.42	27.92	18.31	22.66	10.15	15.83	100.00

¹⁾Values are mean±SD (n=3) without relative activity. Different superscript letters in the same line show significant differences at p<0.05 by one-way ANOVA.

²⁾VC: ascorbic acid (vitamin C).

³⁾Relative activity: a ratio of SC₅₀ value compared to positive control (VC).

80% ethanol 추출이 열수 추출보다 더 유리한 결과를 보였다.

Flavonoid는 페놀성 화합물의 일종이므로 각 시료의 총 flavonoid 함량은 총 페놀성 화합물과 동일한 경향을 보여 RLE가 110.3 mg/g 으로 가장 높았으며, 이는 DLW보다 약 3배 많은 함량을 보인 것이다. Table 4에서 보는 바와 같이 총 페놀성 화합물 가운데 flavonoid가 차지하는 비율은 열수 추출물은 RLW가 54.9%로 가장 높고 DLW가 33.8%로 가장 낮아 거의 절반 수준에 그친 반면, 80% ethanol 추출물의 경우 DLE가 90.8%로 총 페놀성 화합물의 대부분이 flavonoid로 구성되어 있는 것으로 나타났으며, RLE에서도 51.2%로 나타나 ethanol 추출물의 flavonoid의 비율이 상대적으로 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 오디 추출물의 항산화 활성과 페놀성 화합물의 구성에 관한 연구(28)에서 오디 ethanol 추출물이 열수 추출물보다 페놀성 화합물의 함량이 높다는 보고와 일치한 것으로, 항산화성 페놀화합물은 ethanol 추출이 열수 추출보다 효과적인 방법임을 시사하고 있다.

DPPH radical 소거능

천연물의 항산화 활성은 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력, 즉 DPPH의 전자공여능을 측정하는 방법이 가장 많이 이용되고 있는데 최근 양마, 소태나무, 배암차즈기, 오디 등의 약용식물에서 매우 높은 전자공여능이 확인되었다(26,28-30).

비파 잎 추출물의 DPPH 전자공여능은 Table 5에서 보는 바와 같이 건조 조건에 관계없이 80% ethanol 추출물이 열수 추출물보다 더 높은 radical 소거활성을 보였는데, 이러한 결과는 Koba 등(6)의 비파 종자, 과피, 과실 등을 대상으로 실시한 추출용매별 DPPH 소거활성 평가에서 ethanol 추출물이 열수 추출물보다 효과적이었다는 결과와 일치한다.

특히 RLE의 SC₅₀이 1.71 mg/mL로 가장 높은 활성을 보였는데 이는 대조군인 vitamin C의 약 1/3에 해당하는 활성으로 평가되었다. 또한 열수 추출물의 경우 FLW의 SC₅₀이

2.61 mg/mL로 RLW나 DLW보다 높은 활성을 보여 열수 추출물을 응용해야 하는 경우에는 FL을 이용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

Nitric oxide 소거능

Nitric oxide(NO)는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역기능 등이 있지만, 과량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다(31). 또한 superoxide 음이온(O₂⁻)과 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite(ONOO⁻)를 생성한다(32). Peroxynitrite는 단백질 및 지질의 과산화를 유도하고 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있고 반응 속도는 H₂O₂의 수천 배에 이르며 신경세포에서 짧은 시간 동안 급속한 손상을 유발하는 것으로 보고되고 있다(33).

비파 잎 추출물의 nitric oxide 소거능을 측정한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 RL, FL, DL 순으로 높은 활성을 보였으며, RLE가 모든 농도에서 가장 높은 nitric oxide 소거능을 보였다. 추출용매별로는 80% ethanol 추출물이 열수추출물보다 높은 소거능을 나타냈는데, 이는 Bae 등(15)의 비파 부위별 용매추출물의 아질산염 소거능에서 methanol 추출물이 열수추출물보다 높은 소거능을 보였다는 결과와 맥락을 같이한다. 모든 추출물에서 농도 의존적인 소거능을 보였으나, 모든 조건의 열수 추출물들은 농도 차이에 따른 소거능의 변화폭이 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 또한 RLW, RLE, FLW, FLE를 0.5 mg/mL로 처리했을 때 대조군인 vitamin C보다도 높은 소거능을 보여 비파 잎 추출물의 nitric oxide 소거활성은 저농도로도 효과를 발휘할 수 있는 것으로 판단되었다. 이는 Song 등(14)의 비파 유래 flavonoid인 afzelin, quercitrin과 chlorogenic acid 등의 peroxynitrite 소거활성에서 방향성의 ortho-dihydroxyl 기와 carboxylic acid의 methyl 기를 가진 화합물이 높은 저해 및

Table 6. Nitric oxide scavenging activities of extracts from *Eriobotrya japonica* leaf (unit: %)

Sample concentration	RLW	RLE	FLW	FLE	DLW	DLE	VC ²⁾
0.5 mg/mL	45.4±0.54 ^{a1)}	47.1±0.88 ^a	41.1±2.26 ^a	44.7±0.42 ^a	20.9±2.29 ^b	14.6±1.84 ^b	31.8±1.36
1.0 mg/mL	49.7±0.07 ^{bc}	54.9±0.72 ^a	47.4±0.70 ^c	51.9±1.01 ^{ab}	35.3±1.02 ^d	35.0±1.26 ^d	74.2±0.42
2.5 mg/mL	58.6±0.36 ^b	71.6±1.81 ^a	58.6±0.62 ^b	69.4±1.12 ^a	47.5±0.31 ^c	59.2±0.75 ^b	84.2±0.52
5.0 mg/mL	68.3±0.35 ^c	83.9±0.29 ^a	69.0±0.34 ^c	82.2±0.87 ^a	58.3±0.78 ^d	77.2±0.15 ^b	89.6±0.15

¹⁾Values are mean±SD (n=3). Different superscript letters in the same line show significant differences at p<0.05 by one-way ANOVA.

²⁾VC: ascorbic acid (vitamin C).

소거능을 보였다는 결과와 관련지어 볼 때, 비교적 저분자이며 간단한 구조를 가진 vitamin C의 소거능보다 상대적으로 고분자이며 polyhydroxyl기를 포함한 phenolic compound 나 flavonoid 등 식물체가 가지고 있는 대사산물들이 조건에 따라서는 더 효과적인 항산화제로서 작용할 수 있음을 보여주는 결과라고 판단된다. 반면 DL은 가열에 의한 활성물질의 변성 및 손실로 nitric oxide 소거활성이 다소 낮게 나타났다.

Nitric oxide 소거능도 DPPH radical 소거능과 마찬가지로 80% ethanol 추출물이 열수 추출물보다 높은 활성을 보였으나, 예외적으로 DL의 경우 0.5 mg/mL의 농도에서 열수 추출물이 80% ethanol 추출물보다 다소 높은 활성을 나타내었고, 1.0 mg/mL의 농도에서는 거의 동일한 활성을 보였다.

Disc diffusion assay에 의한 항균활성

Table 7에 비파 잎 추출물의 균주별 항균활성을 나타냈다. *S. aureus*의 경우 1 mg/disc 농도에서는 RLE가 가장 높은 항균활성을 보였으나, 전반적으로 열수 추출물의 항균활성이 80% ethanol 추출물보다 높은 경향을 보였다. *S. epidermidis*, *B. cereus*, *B. subtilis* 균주에 대해서는 RLE가 모든 농도에서 가장 강한 항균활성을 보였으며, RLW와 FLW 및 DLW의 경우 저농도에서는 활성을 나타내지 못하고 고농도에서 약간의 항균활성을 보였다. 전체적으로 3종

의 균주에 대한 항균활성은 80% ethanol 추출물이 열수 추출물보다 효과적이었다. 또한 *V. vulnificus* 균주는 모든 시료에서 5 mg/disc의 고농도에서만 활성을 확인할 수 있었으며, RLE가 가장 높은 활성을 보였으나 다른 균주에 대한 활성에 비해서는 상대적으로 낮았다.

반면 Fig. 1과 같이 항생제 내성을 가지는 MRSA에 대해서 비파 잎 추출물이 강한 항균활성을 보였다. 비파 잎 추출물 가운데 RLE가 MRSA에 대해 가장 강한 항균활성을 보였

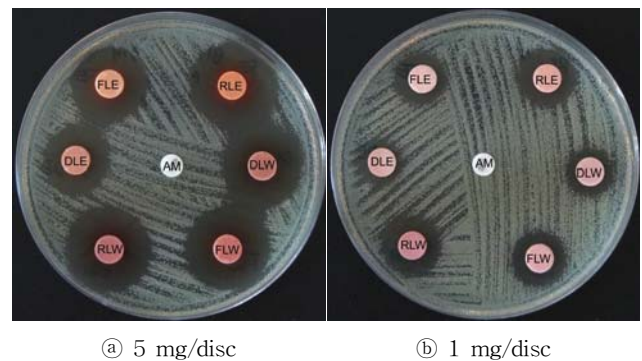


Fig. 1. Antimicrobial activities of extracts from *Eriobotrya japonica* leaf against MRSA. AM: ampicillin (antibiotic, 10 µg/disc).

Table 7. Antimicrobial activities of extracts from *Eriobotrya japonica* leaf (unit: mm)

Samples	mg/disc	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>V. vulnificus</i>	MRSA
RLE	1	13.5±0.5 ^{a1)}	8.0±0.0	9.5±0.5	8.0±0.0	— ²⁾	16.5±0.5 ^a
	5	18.5±0.5 ^a	14.0±1.0 ^a	13.0±0.5 ^a	12.0±0.5	10.5±0.5 ^a	24.0±0.0 ^a
RLW	1	12.0±0.9 ^{ab}	—	—	—	—	15.0±1.0 ^{ab}
	5	18.5±0.5 ^a	10.5±0.5 ^b	8.0±0.0 ^b	—	10.0±0.0 ^{ab}	24.0±1.0 ^a
FLE	1	11.0±0.5 ^b	—	8.0±0.0	8.0±0.0	—	14.0±0.5 ^b
	5	16.0±0.9 ^b	12.0±1.0 ^{ab}	12.0±0.9 ^a	11.0±0.5	9.0±0.5 ^b	22.0±0.5 ^b
FLW	1	13.0±0.5 ^a	—	—	—	—	14.0±0.0 ^b
	5	19.0±1.0 ^a	10.5±1.3 ^b	8.0±0.0 ^b	8.0±0.0	9.0±0.0 ^b	23.5±0.5 ^{ab}
DLE	1	8.5±0.5 ^c	—	9.0±0.5	8.0±0.0	—	9.0±0.5 ^d
	5	13.0±0.5 ^c	11.0±0.0 ^b	12.5±0.5 ^a	11.0±1.0	9.0±0.9 ^b	18.0±1.0 ^c
DLW	1	11.0±0.9 ^b	—	—	—	—	12.0±0.9 ^c
	5	17.0±1.0 ^b	10.0±0.5 ^b	8.0±0.0 ^b	8.0±0.0	9.5±0.5 ^{ab}	22.5±0.5 ^{ab}
AM (10 µg/disc) ³⁾		41.0±0.5	30.0±1.0	16.5±0.5	17.0±0.5	18.0±1.0	—

¹⁾Values are mean±SD (n=3). Different superscript letters in the same column and concentration (mg/disc) show significant differences at p<0.05 by one-way ANOVA. Diameter of clear zone including disc diameter of 8 mm.

²⁾No inhibition.

³⁾AM: ampicillin (antibiotic).

Table 8. The Raw 264.7 cell viabilities of extracts from *Eriobotrya japonica* leaf (unit: %)

Sample concentration	RLW	RLE	FLW	FLE	DLW	DLE
0.25 mg/mL	92.2±8.13 ^{c1)}	120.7±12.98 ^{ab}	95.3±5.42 ^c	113.3±8.79 ^b	84.2±7.08 ^c	131.2±3.80 ^a
0.50 mg/mL	97.8±6.17 ^b	117.4±9.57 ^a	89.7±6.94 ^b	112.6±6.23 ^a	76.6±3.47 ^c	110.9±3.47 ^a
1.00 mg/mL	87.3±5.29 ^d	106.7±16.21 ^{ab}	91.1±3.91 ^{cd}	114.4±4.51 ^a	80.9±6.51 ^d	102.6±3.35 ^{bc}
2.00 mg/mL	80.2±4.49 ^b	108.2±1.70 ^a	78.5±4.78 ^b	84.7±4.77 ^b	70.6±2.15 ^c	69.9±8.02 ^c

¹⁾Values are mean±SD (n=8). Different superscript letters in the same line show significant differences at p<0.05 by one-way ANOVA.

으며, RL이나 FL은 추출 용매에 의한 활성의 차이가 거의 없었으나, DL의 경우 열수 추출물이 80% ethanol 추출물보다 모든 농도에서 훨씬 높은 활성을 보였다. 건조 조건별로는 RL, FL, DL 순으로 활성이 높았다. 이와 같은 결과는 수종 한약재 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균활성에 대한 Park 등(34)의 연구결과와 비파 부위별 용매추출물의 항균 활성에 대한 Bae 등(12)의 연구결과와 연관지어볼 때 비파 잎을 천연 항생제로 개발할 수 있는 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

MTT assay에 의한 세포생존율

비파 잎 추출물의 정상세포 보호 및 독성의 정도를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포주를 대상으로 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정하였다. 추출물별로 0.25~2.00 mg/mL의 단계별 농도에 대한 측정 결과를 Table 8에 나타내었다.

모든 추출물의 세포생존율이 69.9~131.2%의 범위로 측정됨에 따라 독성이 아주 약하거나 오히려 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 추출용매별로는 80% ethanol 추출물의 생존율이 69.9~131.2%로 열수 추출물의 생존율 70.6~97.8%보다 높았고, 건조 조건별로는 RL, FL, DL 순으로 높은 생존율을 보였으며, 그 가운데 RLE가 모든 농도에서 100% 이상의 양호한 생존율을 보였다. FLE와 DLE의 경우 0.25~1.00 mg/mL 농도 구간에서는 RLE와 유사한 높은 세포생존율을 보였으나 2.00 mg/mL 농도에서 급격히 감소되는 것으로 나타났다.

요 약

전처리와 추출용매에 따른 비파 잎의 항산화활성 비교에서, 열수 추출물보다 80% ethanol 추출물에서 상대적으로 높은 활성을 보였다. 특히, RLE에서 DPPH radical 소거능은 SC₅₀이 1.71 mg/mL로 가장 강한 효과를 보였으며, nitric oxide 소거능에서도 높은 활성을 보였다. 이는 total phenolic compound와 total flavonoid 함량 측정에서 각각 215.4 mg/g, 110.3 mg/g으로 가장 높은 함량을 보인 결과와 상당한 관계성이 있는 것으로 판단된다. 건조 조건별로는 건조를 실시하지 않은 RL이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며, FL과 DL 순으로 나타났다. 다만 열수 추출물 가운데서 FLW가 DPPH radical 소거능 측정 결과 다른 열수 추출

물(RLW, DLW)보다 높은 소거능을 보였다. 또한 가열건조와 동결건조 한 시료를 비교하면 FL이 DL보다 상대적으로 더 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 비파 잎을 기능성 소재로서 이용할 경우 생잎을 바로 이용하는 것이 가장 높은 활성을 기대할 수 있지만 불가피하게 건조를 해야 할 경우 가열건조보다는 동결건조를 선택하는 것이 생리활성물질의 보존에 도움을 줄 수 있음을 시사한다. 한편 FL의 추출수율을 함께 고려할 경우 항산화 활성은 RL보다 다소 낮지만 추출수율은 RL에 비해 약 2배 정도 높으므로 동결건조가 유리할 수도 있음을 보여주는 결과이기도 하다. 이와 함께 항균활성 실험에서는 RLE가 거의 모든 균주에 대해서 가장 강한 생육저해 활성을 보였다. 다만 건조를 실시한 시료의 경우 MRSA와 *S. aureus* 균주에 대해서 FL이나 DL 모두 열수 추출물이 상대적으로 높은 항균효과를 가지는 것으로 관찰되었다. 이와 함께 비파 잎 추출물이 항생제에 내성을 가진 MRSA에 대해서 강한 항균효과를 나타낸 것은 비파 잎을 활용한 천연 항균물질 개발 가능성을 밝게 하는 결과라고 판단된다. 각 추출물의 세포독성의 정도를 알아보기 위해 MTT assay 이용한 Raw 264.7의 세포생존율을 측정한 결과, RLE가 가장 양호한 세포보호 효과를 보였으며, 80% ethanol 추출물의 세포독성이 열수 추출물보다 낮아 세포 보호효과가 높은 것으로 측정되었다. 이상의 결과로 볼 때 비파 잎을 항산화 및 항균성 소재로 활용하고자 할 경우 RLE가 가장 유용한 방법이 될 수 있다. 다만 건조의 과정을 필수적으로 거쳐야 하는 경우에는 가열건조보다는 동결건조를 이용하는 것이 생리활성 측면에서 바람직한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 동신대학교 학술연구비에 의하여 연구된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. 한방약리학 교재편찬위원회. 2005. 한방약리학. 도서출판 신일상사, 서울. p 290-292.
2. 정보섭, 신민교. 2003. 도해 향약(생약)대사전(圖解 鄉藥(生藥)大事典). 영림사, 서울. p 610-612.
3. Park MY. 2006. Germplasm evaluation and breeding of

- Eriobotrya japonica* Lindl. *PhD Dissertation*. Chonnam National University, Kwangju. p 4-6.
4. Hamada A, Yoshioka S, Takuma D, Yokota J, Cui T, Kusunose M, Miyamura M, Kyotani S, Nishioka Y. 2004. The effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on oxidative stress in adriamycin-induced nephropathy in rats. *Biol Pharm Bull* 27: 1961-1964.
 5. Yokota J, Takuma D, Hamada A, Onogawa M, Yoshioka S, Kusunose M, Miyamura M, Kyotani S, Nishioka Y. 2006. Scavenging of reactive oxygen species by *Eriobotrya japonica* seed extract. *Biol Pharm Bull* 29: 467-471.
 6. Koba K, Matsuoka A, Osada K, Huang YS. 2007. Effect of loquat (*Eriobotrya japonica*) extracts on LDL oxidation. *Food Chem* 104: 308-316.
 7. Chen J, Li WL, Wu JL, Ren BR, Zhang HQ. 2008. Hypoglycemic effects of a sesquiterpene glycoside isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Phytomedicine* 15: 98-102.
 8. Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Taguchi Y, Akazawa H, Ukiya M, Kimura Y, Suzuki T, Nishino H. 2005. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effect of the triterpene acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biol Pharm Bull* 28: 1995-1999.
 9. Cho YS, Park SK, Lee HY. 1991. Composition of free sugars, organic acids and free amino acids in loquat flesh. *J Korean Soc Food Nutr* 20: 89-93.
 10. Lee BY, Park EM, Kim EJ, Choi HD, Kim IH, Hwang JB. 1996. Analysis of chemical components of Korean loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. *Korean J Food Sci Technol* 28: 428-432.
 11. Bae YI, Shim KH. 1998. Nutrition components in different parts of Korean loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Korean J Postharv Sci Technol* 5: 57-63.
 12. Bae YI, Chung YC, Shim KH. 2002. Antimicrobial and antioxidant activities of various solvent extract from different parts of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Korean J Food Preserv* 9: 97-101.
 13. Bae YI, Jeong CH, Shim KH. 2005. Antioxidative and antimicrobial activity of epicatechin isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica*). *J Food Sci Nutr* 10: 118-121.
 14. Soung DY, Kim JS, Chung HY, Jung HA, Park JC, Choi JS. 1999. Flavonoids and chlorogenic acid from *Eriobotrya japonica* scavenge peroxynitrite. *Nat Prod Sci* 5: 80-84.
 15. Bae YI, Jeong CH, Shim KH. 2002. Nitrite-scavenging and antimutagenic effects of various solvent extract from different parts of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Korean J Food Preserv* 9: 92-96.
 16. Chung HS. 2001. Isolation of new bioactive phytochemicals from natural products. *Food Industry and Nutrition* 6: 53-59.
 17. AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg. p 1-25.
 18. Ku KM, Kim KU, Lee SC, Kang YH. 2006. Screening of cancer preventive activities from medicinal plants. *Korean J Med Crop Sci* 14: 590-591.
 19. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaux MT, Packer L. 1994. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 748-755.
 20. Amerine MA, Ough CS. 1980. *Method for analysis of musts and wine*. Wiley & Sons, Chichester. p 176-180.
 21. Lee YC, Hwang KH, Han DH. 1997. Composition of *Opuntia ficus-india*. *Korean J Food Sci Technol* 29: 847-853.
 22. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. 1995. *Collins and Lyne's microbiological methods*. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. p 178-205.
 23. Shin KM, Park YM, Kim IT, Hong SP, Hong JP, Lee KT. 2003. *In vitro* antiinflammatory activity of amygdalin in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Korean J Pharmacognosy* 34: 223-227.
 24. Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 134: 3479S-3485S.
 25. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *Am J Clin Nutr* 81: 230S-242S.
 26. Ryu SW, Jin CW, Lee HS, Lee JY, Sapkota K, Lee BG, Yu CY, Lee MK, Kim MJ, Cho DH. 2006. Changes in total polyphenol, total flavonoid contents and antioxidant activities of *Hibiscus cannabinus* L. *Korean J Med Crop Sci* 14: 307-310.
 27. Dewick PM. 2002. *Medicinal natural products*. Wiley & Sons, Chichester. p 149-151.
 28. Bang IS, Park HY, Yuh CS, Kim AJ, Yu CY, Ghimire B, Lee HS, Park JG, Choung MG, Lim JD. 2007. Antioxidant activities and phenolic compounds composition of extracts from mulberry (*Morus alba* L.) fruit. *Korean J Med Crop Sci* 15: 120-127.
 29. Yin Y, Wang MH. 2007. Antioxidant and anticancer activity of fractions from *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. methanolic extract. *Korean J Med Crop Sci* 15: 329-334.
 30. Lim JA, Yun BW, Baek SH. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. *Korean J Med Crop Sci* 15: 183-188.
 31. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 1075-1079.
 32. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls, the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266: 4244-4250.
 33. Haenen GR, Paquay JB, Korthhouwer RE, Bast A. 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 591-593.
 34. Park CG, Bang KH, Lee SE, Cha MS, Sung JS, Park HW, Seong NS. 2001. Antibacterial activity from medicinal plant extracts on the *Staphylococcus aureus*. *Korean J Med Crop Sci* 9: 251-258.

(2009년 1월 5일 접수; 2009년 1월 21일 채택)