

<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.3.311>

JCCT 2019-8-39

## 붓순나무 잎과 가지의 추출물에 대한 생리활성 평가

### Biological Activity on Extracts of Japanese Anise(*Illicium Anisatum* L.) Leaves and Twigs

신성환\*

Seong-Whan Shinn\*

**요약** 붓순나무의 잎과 가지를 50 % 아세톤 수용액으로 추출하고, 추출된 각각의 조추출물(crude)을 *n*-hexane, chloroform, EtOAc와 물(H<sub>2</sub>O)로 분획한 후, 각각의 분획물에 대하여 항산화 활성과 항바이러스 활성 시험을 실시하였다. 항산화 활성은 붓순나무 잎의 경우 EtOAc용성 분획물에서 가지의 경우 EtOAc용성 분획물과 수용성 분획물에서 가장 좋은 활성을 보였고, 대조군으로 사용된 BHT 및  $\alpha$ -tocopherol에 비하여 우수한 항산화 활성이 있는 것으로 나타났다. 항바이러스 활성의 경우, HRV 1B와 EV 71에서는 항바이러스 활성이 미흡한 것으로 나타났으나, Influenza PR8에서는 어느 정도 항바이러스 활성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 특히 EtOAc용성 분획물과 수용성 분획물에서 80% 이상의 세포 생존율이 나타난 것으로 보아 붓순나무의 극성 분획물에는 항바이러스 효과를 가지고 있는 활성 물질이 존재하고 있다는 사실을 알 수 있었다. 이상의 결과를 통하여 우리는 붓순나무로 부터 얻어진 추출물이 항산화제 및 항바이러스제의 원료로 사용 될 수 있는 천연 바이오매스 자원으로써의 가능성이 있음을 제시하였다.

**주요어** : 붓순나무, 추출물, 분획물, 항산화 활성, 항바이러스 활성

**Abstract** Japanese anise (*Illicium anisatum* L.) leaves and twigs were extracted with 50 % aqueous acetone three times. After filtration, the extracts were fractionated with *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and H<sub>2</sub>O, and then freeze dried after condensation. Then antioxidation and antiviral activity were evaluated on each fractions. In the antioxidative activities, the results indicated high activity in the EtOAc soluble fraction of the leaves and the EtOAc and H<sub>2</sub>O soluble fractions of the twigs. It showed much higher antioxidative value compare to the controls, BHT and  $\alpha$ -tocopherol. In the antiviral activities, the all fractions were negative effects in HRV 1B and EV 71, but good in Influenza PR8. The activities of the crude extracts of the leaves and twigs showed more than 80% activity at the concentration of 10 $\mu$ g/mL and 50  $\mu$ g/mL, respectively, and the activities of the EtOAc and H<sub>2</sub>O soluble fractions were close to 80%.

Based on the above results, the extracts of Japanese anise may be applied for one of the natural biomass sources that can be used as an antioxidant and an antiviral substance.

**Key words** : Japanese anise, EtOAc soluble fraction, H<sub>2</sub>O soluble fraction, Antioxidative activity, Antiviral activity

\*정회원, 한라대학교 신소재화학공학과  
접수일: 2019년 4월 12일, 수정완료일: 2019년 5월 14일  
게재확정일: 2019년 6월 8일

Received: April 12, 2019 / Revised: May 14, 2019

Accepted: June 8, 2019

\*Corresponding Author: swshinn@halla.ac.kr

Dept. of Advanced Materials & Chemical Engineering, Halla Univ, Korea

## 1. 서론

인체의 노화를 유발하는 질병 중 90%는 활성산소와 관련이 있다고 알려져 있다. 활성산소는 우리 몸의 세포와 DNA를 공격하여 각종 만성 질환과 노화를 불러오는 유해 물질로 두통, 만성피로, 만성위장병 뿐 만 아니라 동맥경화증, 신장질환, 알레르기성 피부염 등의 원인이 된다고 알려져 있으며, 페놀 화합물, 비타민, 테르페노이드, 카르토노이드 등 식품 섭취를 통해 어느 정도 제거 할 수 있다고 발표된 바 있다 [1, 2]. 일반적으로 황산화제는 천연 황산화제와 합성 황산화제로 구분되어 진다. 천연 황산화제는 주로 추출물이나 농축물의 형태로 단일 물질인 합성 황산화제에 비하여 낮은 활성을 나타내지만, 인체의 흡수량이 높아 합성 황산화제보다 상대적으로 효율이 뛰어나다고 알려져 있다 [3]. 대표적인 합성 황산화제로는 BHT (butylated hydroxytoluence), BHA (butylated hydroxyanisole) 등이 있으나 과량 섭취시 심각한 병을 유발 할 수 있는 것으로 알려져 있어 인체에 무해하면서 황산화 효과가 상대적으로 우수한 천연 황산화제의 개발이 절실히 요구되고 있는 형편이다 [4, 5, 6]. 또한 최근에 SARS, AI 등 신종바이러스의 출현은 인간과 가축의 생명을 심각하게 위협하고 있으며, 이와 같은 각종 바이러스 질환의 예방과 새로운 치료제에 대한 사회적 관심이 더욱 고조되고 있는 형편이다. 현재 사용 중인 IDU (iododeoxyuridine), ACV (acyclovir), IFN (interferon) 등 대부분의 항바이러스제는 세포 독성과 신경정신학적 증상 등 여러 가지 부작용이 있는 것으로 보고되었고 [7, 8], 따라서 부작용이 적고 안전한 새로운 항바이러스제의 개발 역시 지속적으로 요구되고 있다.

이와 같은 관점에서 최근에는 상대적으로 부작용이 적고, 안전성이 높은 천연 바이오매스를 이용한 생약제제에 대한 연구가 다양한 분야에서 수행되고 있으며, 특히 목재의 추출성분을 이용한 천연물 의약품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 목재자원 중 붓순나무 (*Illicium anisatum* L)는 붓순나무과에 속하는 상록수종으로 신종인플루엔자 치료제인 타미플루(Tamiflu)의 원료로 사용된 중국의 팔각(학명 : *Illicium verum* Hook.f.)과 같은 속에 속하는 수종으로 한국과 중국 그리고 일본 등지에 분포하고 있으며, 우리나라에는 남부 지방과 제주도에 자생하는 제주도의 특산 수종으로

알려져 있다. 수피는 혈액 응고제로 사용되기도 하고, 잎과 가지는 약용과 향료로 사용되기도 하지만, 열매에는 독성이 있어 주의해야 한다고 보고 된 바 있다 [9]. 그러나 신경계 독성이 있는 것으로 알려진 붓순나무와는 달리 팔각에는 독성이 없어 열매는 향신료와 식품 등에 이용되고, 향진균, 향균 및 항산화 활성을 가지고 있다고 연구되었다 [10, 11, 12]. 따라서 팔각과 동일한 속인 붓순나무에도 인체에 유용한 여러 가지 생리활성을 가지고 있을 것으로 예측되지만, 현재까지 붓순나무 추출성분에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 붓순나무 잎과 가지로 부터 추출물을 추출하고, 그 추출물에 대한 항산화 활성과 항바이러스 활성의 기초적인 생리활성 시험을 실시하여 붓순나무 추출성분의 기능적 응용을 위한 기초 자료를 얻고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 추출물의 분획

본 실험에서 사용한 붓순나무는 2017년에 제주도 제주난대아열대립연구소로부터 전달받아 약 2주간 실험실에서 천연 건조 시킨 후 분쇄하여 분말로 제조한 후 추출용 시료로 사용하였다. 극성 분획물을 얻기 위하여

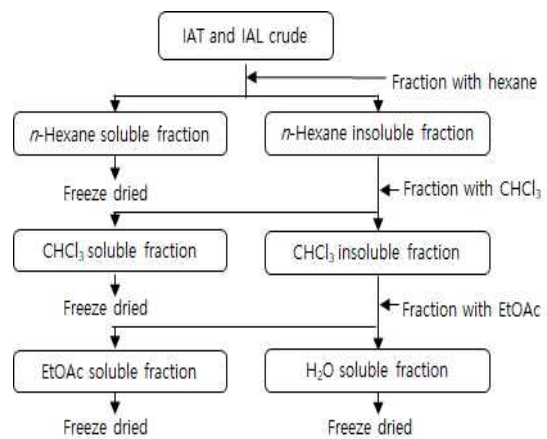


그림 1. 붓순나무 잎과 가지의 분획도.

IAL: *Illicium anisatum* leaves;

IAT: *Illicium anisatum* twigs.

Figure 1. Fractionation scheme of Japanese Anise leaves and twigs.

벗순나무 잎과 가지의 추출용 시료를 각각 상온에서 3 일 동안 50 % 아세톤 수용액에 침지하여 추출하는 작업을 3회 반복하여 추출액을 얻었고, 이렇게 얻어진 추출액을 40 °C에서 감압농축기로 농축하여 조추출물을 얻었다. 농축된 조추출물은 분획깔때기를 사용하여 그림 1과 같이 극성에 따라 *n*-hexane, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc) 그리고 수용성 순으로 순차적으로 분획하였고, 각각의 분획물은 농축한 후 동결건조 하여 분말상태로 조제하였다.

## 2. 항산화 활성 시험

항산화 활성 실험은 DPPH 라디칼(radical) 소거법을 사용하였다. DPPH 라디칼 소거법은 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 사용하여 자유 라디칼 소거능 활성을 검정하는 방법으로 Blois [13]의 방법을 변형하여 수행하였다. 96 well microplate에 희석된 시료를 100 μl씩 넣은 후 0.2 mM DPPH 용액을 100 μl 넣고 실온에서 30분간 반응 시킨 후 microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무첨가 대조군은 시료대신 에탄올을 첨가하여 같은 방법으로 측정하였고, 시료의 색을 보정하기 위하여 0.2 mM DPPH 용액 대신 에탄올을 넣어 실험 하였으며, 저해율은 식 (1)을 이용하여

구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{무첨가대조구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (1)$$

또한 각 시료의 항산화 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도 (μl)를 검체의 농도 (IC<sub>50</sub>)로 나타내어 비교하였다.

## 3. 항바이러스 활성 시험

항바이러스 활성과 세포독성의 측정은 바이러스 감염에 의해 유도되는 세포 변성 효과(cytopathic effect, CPE)를 이용한 SRB(sulforhodamine) 분석법(assay)으로 측정하였다. SRB 분석법은 단백질 염색 시약인 sulforhodamine를 이용하여 세포의 생존력을 측정하는 방법으로 현재 항암제 스크리닝에 사용하는 분석법이다. 시험에 사용한 바이러스로는 Influenza virus A/PR/8 (Influenza PR8), rhinovirus 1B (HRV 1B)와 enterovirus 71 (EV 71)의 세 가지 바이러스를 ATCC에서 구입하여 사용하였다.

우선 96-well culture plate의 각각의 well에 세포를

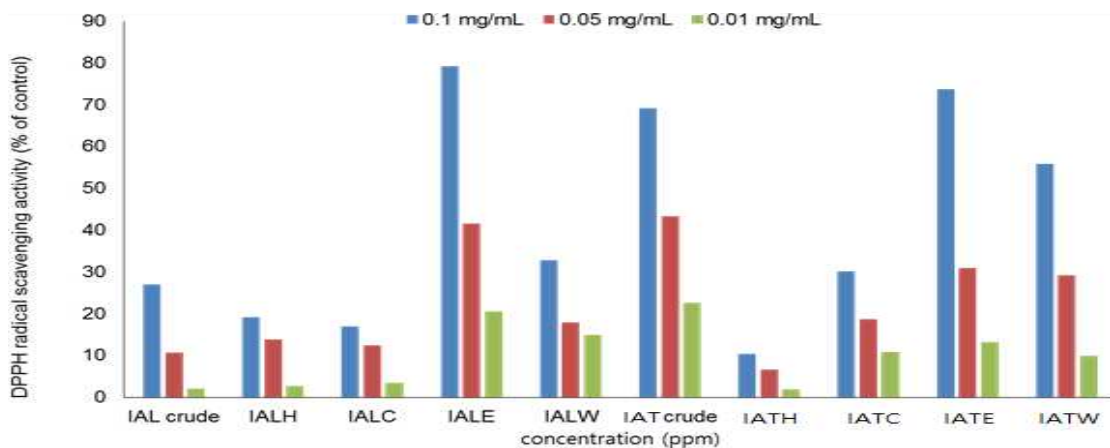


그림 2. 벗순나무 잎과 가지 분획물의 radical 소거능

Figure 2. DPPH radical scavenging activities on the fractions of *Illicium anisatum* leaves and twigs.

IAL : *Illicium anisatum* leaves IAT : *Illicium anisatum* twigs ;  
 IALH : *n*-hexane soluble fraction of leaves ; IALC : CHCl<sub>3</sub> soluble fraction of leaves ;  
 IALE : EtOAc soluble fraction of leaves ; IALW : H<sub>2</sub>O soluble fraction of leaves ;  
 IATH : *n*-hexane soluble fraction of twigs ; IATC : CHCl<sub>3</sub> soluble fraction of twigs ;  
 IATE : EtOAc soluble fraction of twigs ; IATW : H<sub>2</sub>O soluble fraction of twigs

2 X 10<sup>4</sup>의 수로 준비하여 90 % 정도 자랐을 때 실험에 이용하였다. 24시간 후, 1% FBS와 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infection dose 50)의 농도로 희석된 각각의 바이러스를 90 µL첨가하였으며, 적정 농도의 항바이러스제 10 µL를 첨가하였다. 각 항바이러스제는 0.4 µg/mL, 2 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL 4개의 농도범위로 결정하였다. 3개의 well은 항바이러스제를 처리하지 않고 바이러스만 처리하여 세포대조구로 사용하였고, 또 다른 3개의 well은 바이러스와 항바이러스제를 모두 처리하지 않은 세포 대조구로 사용하였다. CO<sub>2</sub> incubator에서 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>의 조건으로 2일 동안 배양한 후 세포의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 650nm에서 기준 흡광도를 갖는 SpectraMax i3 microplate reader (Molecular Devices, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 562 nm에서 측정하였고, 세포 생존률은 측정된 광학 밀도에 기초하여 비교를 위해 계산되었다.

### III. 결과 및 고찰

붓순나무 잎과 가지를 각각 50 % 아세톤 수용액에 침지하여 조추출물을 추출하였고, 추출된 조추출물을 극성에 따라 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 수용성 순으로 순차적으로 분획한 후, 동결 건조하였다. 이렇게 얻어진 각각의 조추출물과 분획물로부터 붓순나무 잎과 가지의 추출성분에 대한 기능적 응용을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 항산화 활성 시험과 항바이러스 활성 시험을 실시하였다.

표 1. 붓순나무 분획물의 IC<sub>50</sub> 값

Table 1. IC<sub>50</sub> values of antioxidative activities of the fractions

	Fraction	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Leaves	Crude extractive	0.18
	<i>n</i> -hexane soluble fraction	0.26
	CHCl <sub>3</sub> soluble fraction	0.32
	EtOAc soluble fraction	0.06
	H <sub>2</sub> O soluble fraction	0.19
Twigs	Crude extractive	0.06
	<i>n</i> -hexane soluble fraction	0.51
	CHCl <sub>3</sub> soluble fraction	0.19
	EtOAc soluble fraction	0.07
	H <sub>2</sub> O soluble fraction	0.09
Control	BHT	14
	α-tocopherol	12

#### 1. 항산화 활성 시험 결과

붓순나무 잎과 가지의 각각의 분획물에 대하여 DPPH 라디칼 소거법을 사용하여 항산화 활성을 실험하였다. 항산화 활성 실험 결과는 표 1에서 보는 바와 같이 붓순나무 잎의 조추출물과 분획물에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.18, 0.26, 0.32, 0.06, 0.19 µg/ml이었고, 붓순나무 가지의 조추출물과 분획물의 경우에는 각각 0.06, 0.51, 0.19, 0.07, 0.09 µg/ml로, 붓순나무 잎과 가지의 조추출물과 분획물 모두 기준물질인 BHT와 α-tocopherol 보다 현저히 낮은 IC<sub>50</sub>값을 나타내어 매우 우수한 항산화 활성을 보이는 것으로 판명되었다. 특히 붓순나무 잎의 EtOAc용성 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 0.06 µg/ml, 가지의 EtOAc용성 분획물과 수용성 분획물의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.07, 0.09 µg/ml로 다른 분획물 보다 매우 우수한 활성을

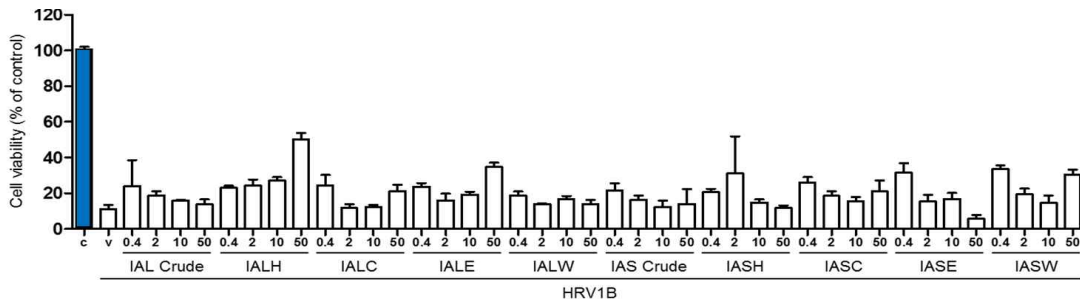


그림 3. rhinovirus 1B 바이러스에 대한 붓순나무 추출물의 세포생존률.

Figure 3. The effect of *Illicium anisatum* extracts on rhinovirus 1B.

보이는 것을 알 수 있었다.

또한 그림 2에 나타난 대로 각 시료의 농도별 항산화 활성을 보면, 붓순나무 잎과 가지의 조추출물과 분획물 모두 농도 의존적인 활성을 보였고, 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거능도 증가하는 경향이 있는 것을 알 수 있었다.

## 2. 항바이러스 활성 시험 결과

붓순나무 잎과 가지의 분획물에 대한 항바이러스 활성 측정을 위하여 SRB(sulforhodamine) 분석법을 수행하였다. 분석을 위하여 Influenza virus A/PR/8 (Influenza PR8), rhinovirus 1B (HRV 1B), enterovirus

71 (EV 71)의 세 가지 바이러스를 사용하였고, 각 추출물의 농도를 0.4, 2, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 으로 조절하여 실험하였다. 실험 결과에 의하면, HRV 1B와 EV 71의 경우에는 그림 3과 그림 4에서 보는 바와 같이 붓순나무 잎과 가지의 조추출물과 분획물 모두 항바이러스 효과가 미비한 것으로 나타난 반면에 Influenza PR8의 경우에는 그림 5에서 보는 바와 같이 어느 정도 항바이러스 활성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 특히 붓순나무 잎과 가지의 조추출물의 경우에는 농도 10  $\mu\text{g/ml}$ 와 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 80%이상의 세포 생존율을 보였고, 또한 각각의 EtOAc 용성 분획물과 수용성 분획물에서도 80%에 가까운 세포 생존율을 보이는 것으로 나타났다. 결과적으로 붓순나무 잎과 가지의 극성 분획물에는 항바이러스 효과를

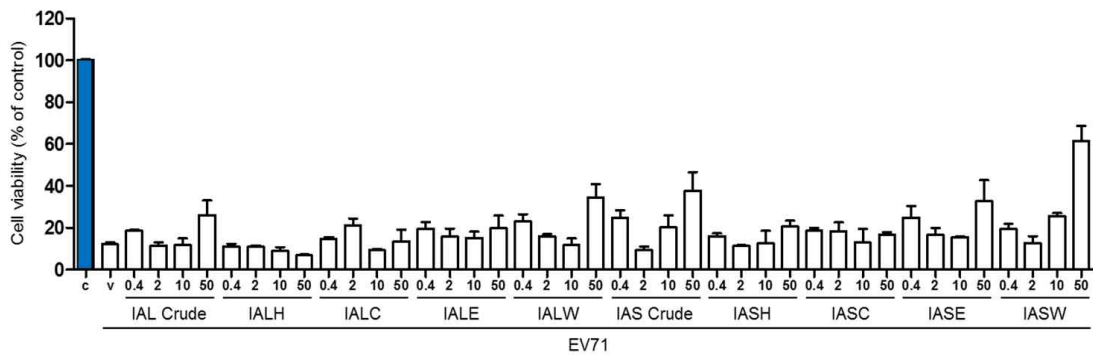


그림 4. enterovirus 71 바이러스에 대한 붓순나무 추출물의 세포생존률.

Figure 4. The effect of *Illicium anisatum* tree extracts on enterovirus 71.

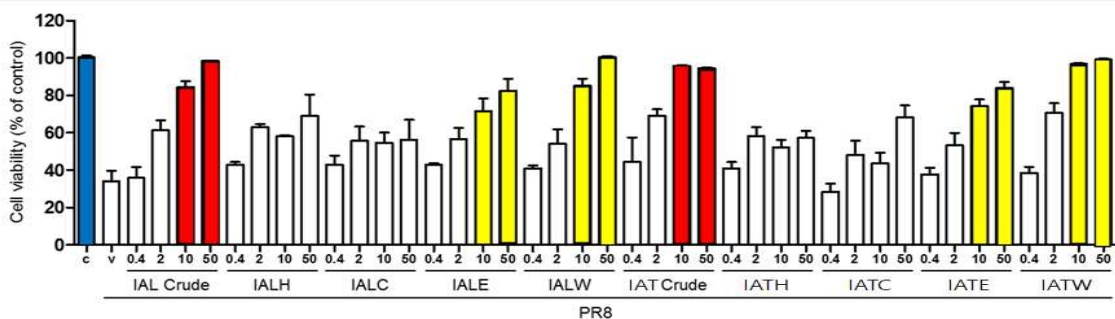


그림 5. influenza A 바이러스에 대한 붓순나무 추출물의 세포생존률.

Figure 5. The effect of *Illicium anisatum* tree extracts on influenza A virus.

갖고 있는 활성물질이 존재함을 예견 할 수 있었다.

#### IV. 결 론

붓순나무 잎과 가지 추출성분에 대한 기능적 응용 가능성에 대한 기초 자료를 얻기 위하여 각각의 조추출물과 분획물에 대하여 항산화 활성과 항바이러스 활성 시험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 항산화 활성 실험 결과에 의하면, 항산화 활성은 농도 의존적으로 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거능이 증가하는 경향이 있음을 알 수 있었고, 붓순나무 잎과 가지의 조추출물과 분획물에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 기준 물질에 비하여 매우 낮은 IC<sub>50</sub> 값이 나타나 우수한 항산화 활성 물질이 존재함을 알 수 있었다. 항바이러스 실험 결과에 의하면, 조추출물의 경우 농도 10 µg/mL와 50 µg/mL에서 80 %이상의 세포 생존률을 보였고, 각각의 EtOAc용성 분획물과 수용성 분획물에서도 80 %에 가까운 세포 생존률이 나타났다. 결과적으로 붓순나무 잎과 가지의 추출물 중 극성 분획물에는 항바이러스 효과를 갖고 있는 활성 물질이 존재함을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과를 통하여 본 논문은 붓순나무 잎과 가지로 부터 얻어진 추출물이 향후 합성 항산화제 및 항바이러스제를 대체할 수 있는 천연 자원으로써의 활용 가능성이 있음을 보였다.

#### References

- [1] Z. Hossain, A. K. A. Mandal, S. K. Datta and A. K. Biswas, "Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line", *Journal of Biotechnology*, Vol. 129, No. 4, pp. 658-667, 2007.
- [2] J. W. Kim, M. Um and J. W. Lee, "Antioxidant activities of hot water extracts from different parts of rugosa rose(*rosa rugosa* thunb.)", *J. Korean Wood Sci. Technol*, Vol. 46, No. 1, pp. 38-47, 2018.
- [3] C. H. Lee and S. L. Shin, "Merit and application of plant resources as functional bio-materials for human life and health", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol. 5, pp. 5-24, 2009.
- [4] H. K. Kim, Y. E. Kim, J. R. Do, Y. C. Lee and B. Y. Lee, "Antioxidatives activity and physiological activity of some Korean Medicinal Plants", *Korean J. Food Sci. Thchnol*, Vol. 27, No. 1, pp. 80-85, 1995.
- [5] D. K. Lim, U. Choi and D. H. Shin, "Antioxidant activity of ethanol from Korean Medicinal Plants", *Korean J. Food Sci. Thchnol*, Vol. 28, No. 1, pp. 83-89, 1996.
- [6] G. M. Williams, M. J. Iatropoulos and J. Whysner, "Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives", *Food and chemical Toxicology*, Vol. 37, pp. 1027-1038, 1999.
- [7] A. K. Ong and F. G. Hayden, "John F. Enders Lecture 2006: Antivirals for influenza", *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 196, pp. 181-190, 2007.
- [8] M. Tisdale, "Monitoring of viral susceptibility: new challenges with the development of influenza NA inhibitors", *Rev. Med. Virol*, Vol. 10, pp. 45-55, 2000.
- [9] K. Yamada, K., S. Takada, S. Nakamura and H. Yoshimasa, "The Structure of Anisatin", *Tetrahedron Letters*, Vol. 52, pp. 4797-4801, 1965.
- [10] H. Y. Kim and J. H. Oh, "Screening of Korean forest plants for rat lens aldose reductase inhibition", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 63, pp. 184-188, 1999.
- [11] H. Y. Kim and K. Kim, "Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, pp. 1586-1591, 2003.
- [12] H. Y. Kim and M. H. Kang, "Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity", *Phytotherapy Research*, Vol. 19, pp. 359-361, 2005.
- [13] M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol. 181, pp. 1199-1200, 1958.