

충주산 병풀 용매추출물의 활성성분과 항산화 및 항염증 활성

신현영 · 김 훈* · 정은진** · 김정은** · 이경행*** · 배운정*** · †유광원***

고려대학교 의생명융합과학과 석사과정, *경희대학교 피부생명공학센터 연구교수,
한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Bioactive Compounds, Anti-Oxidant Activities and Anti-Inflammatory Activities of Solvent Extracts from *Centella asiatica* Cultured in Chungju

Hyun-Young Shin, Hoon Kim*, Eun-Jin Jeong**, Jeung-Eun Kim**,
Kyeong-Haeng Lee***, Yun-Jeong Bae*** and †Kwang-Won Yu***

Master's Student, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

*Research Professor, Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University, Suwon 16229, Korea

**Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

***Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

Centella asiatica (CA) has been widely used as herbal plants. It is a valuable resources. The aim of the present study was to evaluate physiological activities of solvent extracts from CA cultivated in Chungju, Korea (Good tiger care). After preparing water (cold-water, CA-WE; hot-water, CA-HWE) and EtOH extracts (50% EtOH, CA-50E; 70% EtOH, CA-70E), their total polyphenol, flavonoid, and triterpenoid contents, and anti-oxidant activities, and anti-inflammatory activities were examined and compared. CA-70E showed the most potent anti-oxidant activity based on ABTS radical scavenging activity and reducing ability assays, while CA-50E and CA-70E showed the highest DPPH radical scavenging activity. Among major triterpenoid glycosides present in CA, madecassoside and asiaticoside contents were found to be the highest in CA-70E, and madecassic acid and asiatic acid were the highest in CA-50E. In LPS-stimulated RAW 264.7 cells, CA-70E showed the highest TNF- α inhibitory activity, although CA-50E and CA-70E similarly inhibited nitric oxide production. Ethanol extracts significantly inhibited IL-6 and IL-8 production more than water extracts using TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells, indicating its better inhibitory against skin inflammation. Therefore, Chungju-CA EtOH extract, especially 70% EtOH extract, has high physiologically active ingredients and potent anti-oxidant and anti-inflammatory activities, suggesting its industrial application as a functional material.

Key words: *Centella asiatica*, solvent extract, anti-oxidant, anti-inflammation, pentacyclic terpenoid

서 론

미나리아과(Apiaceae) 병풀속(*Centella*)에 속하는 다년생 포복성 초본인 병풀(*Centella asiatica*, CA)은 병을 고치는 풀이란 의미로 붙여진 이름으로, 아프리카의 마다가스카르 섬이 원산지라고 알려져 있으나 인도, 스리랑카 등의 남아시아와 인도네시아, 말레이시아와 함께 우리나라 제주도 및 남부 도서

지방의 고온 다습한 환경에서도 자생하는 것으로 알려져 있다(Jamil 등 2007). 병풀은 오래전부터 아시아 등지에서 전통 요법을 통해 약용으로 이용되어 왔으며, 과학적인 연구를 통해 신경세포 보호효과(Orhan IE 2012), 면역(Ha 등 2009), 항산화(Pittella 등 2009; Tatmiya 등 2014), 항균(Zaidan 등 2005), 항염증(Jo 등 2014), 주름개선(Bylka 등 2013), 보습(Lee 등 2019), 두피 흥반개선(Jo 등 2014), 미백 및 자외선 차단(Ha

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

등 2010), 피부각질 개선(Kwon 등 2012) 및 피부재생(Tenni 등 1988; Suguna 등 1996) 등의 다양한 생리활성 증진 효능이 밝혀져 있다. 이러한 병풀은 피부기능 개선용 소재로서 최근 기능성 화장품 및 의약품 소재로 광범위하게 활용되고 있는 상황이며, 국내 수요가 급격하게 증가되고 있는 실정이다(Ha 등 2010, Bylka 등 2013; Goo 등 2018). 일부 국내 자생 원료 또는 제주도 등지에서의 재배를 통해 국내산 병풀을 활용하고자 하는 노력이 보고되고는 있으나, 병풀 원료의 대부분은 인도, 스리랑카, 마다가스카르 등지를 통해 수입에 의존하고 있는 실정으로, 국내산 병풀을 활용한 제품은 극히 미진한 수준으로 확인되고 있다(Kim 등 2002). 1993년 생물다양성협약(Convention of Biological Diversity, CBD)이 발효된 이후, 유전자원의 접근 및 이용으로부터 발생하는 이익의 공정하고 공평한 이익공유(Access to genetic resources and Benefit-Sharing, ABS)를 위해 채택된 '나고야의정서'를 이행해야 하는 상황에서 국내 바이오산업의 경쟁력 강화와 수출 상품으로서의 육성을 위해 국내 자원 개발 및 국내 재배를 통한 수입 원료의 대체 필요성이 강하게 요구되고 있는 실정이다(Kim 등 2002). 한편, 최근 증가하고 있는 병풀의 수요를 대체하기 위해 국내에서는 병풀 재배를 통해 안정적인 원료공급을 시도하고 있는 중이며, Goo 등(2018)은 경남 합천지방에서 재배되고 있는 병풀의 항균, 항염증, 미백 및 주름개선 효능을 평가한 바 있다. 하지만 증가하고 있는 병풀의 수요에 비해 국내 재배 병풀을 이용한 생리활성 및 성분분석 등의 과학적인 결과는 매우 부족한 수준으로 파악되고 있다.

따라서 본 연구에서는 충북 충주지역에서 재배되고 있는 병풀(Good tiger care 품종)로부터 4종의 용매(냉수, 열수, 50%와 70% 주정) 추출물을 조제한 후 병풀에서 주요한 생리활성 성분으로 보고된 폴리페놀, 플라보노이드와 pentacyclic triterpenoid 화합물을 분석하고 항산화 및 항염증 활성을 검토하여 국내산 병풀의 산업적 활용 가능성을 타진함과 함께 지역농산물 활용증진에 따른 농가의 소득증대를 꾀할 수 있는 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출방법

본 실험에서 사용된 병풀(*Centella asiatica*, CA)은 Good tiger care 품종으로 충청북도 충주시의 농업회사법인 (주)병풀농원에서 재배하여 2020년 4-6월경에 채취된 것으로서, 입수된 즉시 품질 유지를 위해 -70°C 의 급속냉동기(Ilshin Biobase, Seoul, Korea)에 냉동시킨 후 동결건조(Ilshin Biobase, Seoul, Korea)를 진행한 후 건조물 형태로 냉장보관하며 실험에 사용하였다. 건조물의 냉수 추출, 50% 및 70% 주정 추출을 진

행하기 위하여 각각 건조 중량의 20배(w/v)에 해당하는 용매를 가하고 48시간 상온에서 침지하여 추출하였다. 열수 추출의 경우에는 건조 중량의 20배(w/v)의 해당하는 물을 가하고 decoction 방법으로 추출하였다. 각각의 추출물은 이후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리(Gyrogen Co., Ltd., Daejeon, Korea)한 다음 상등액을 다시 여과지(Whatman filter grade 1, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)로 여과하여 불용성 침전물을 제거하였다. 여과물은 감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)를 통해 40°C 에서 농축한 다음, 동결건조를 진행하여 병풀의 냉수 추출물(cold-water extract of *Centella asiatica*, CA-WE), 열수추출물(hot water extract of *Centella asiatica*, CA-HWE), 50% 주정추출물(50% ethanol extract of *Centella asiatica*, CA-50E) 및 70% 주정추출물(70% ethanol extract of *Centella asiatica*, CA-70E)로 조제하였으며, 이후 냉장보관하며 실험에 사용하였다.

2. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 평가

추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 비색법을 이용하여 측정하였다. 총 폴리페놀 함량 측정을 위해 추출물 10 μL 에 2% Na_2CO_3 10 μL 와 50% Folin-Ciocalteu 시약 200 μL 를 가한 후 30분간 암소에서 반응을 진행하였으며, microplate reader(Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 통해 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(Marinova 등 2005). 농도별 gallic acid를 통해 작성된 검량선을 이용하여 시료에 존재하는 총 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalent(GAE)/g sample로 계산하였다. 총 플라보노이드 함량은 Stanković MS(2011)의 방법을 약간 변형하여 추출물 20 μL 에 80% 에탄올 40 μL 를 가한 후 10% aluminium nitrate 20 μL , 1 M potassium acetate 20 μL 및 80% 에탄올 150 μL 를 순차적으로 넣고 암소에서 10분 반응시킨 후 415 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 농도별 quercetin을 통해 작성된 검량선을 이용하여 시료에 존재하는 총 플라보노이드 함량은 mg quercetin equivalent(QE)/g sample로 계산하였다.

3. 자유라디칼 소거활성 및 환원력 평가

추출물의 항산화 평가를 위한 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid/ABTS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich)의 라디칼 소거활성과 ferric reducing antioxidant power(FRAP) 활성은 모두 Ryu 등(2017)의 방법을 이용하여 평가하였다. 시료의 항산화력을 상대적으로 비교하기 위해 표준물질로 L-ascorbic acid(Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, 시료의 항산화력은 모두 mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)/g sample로 나타내었다.

4. 세포주 및 배양조건

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7과 인체 유래 각질 형성세포주인 HaCaT 세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 입수하였으며, 세포주는 모두 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, Massachusetts, USA)과 1% penicillin-streptomycin(P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; HyClone, San Angelo, TX, USA) 배지에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건이 유지되는 배양기(Sanyo, Sakata, Japan)에서 2~3일에 한 번씩 계대배양하여 실험에 이용하였다.

5. 항염증 활성 평가

추출물의 항염증 활성 평가를 위해 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/mL로 조정된 후 96 well plate에 200 μ L씩 도포하고 배양기에서 약 70% confluent될 때까지 배양하여 세포를 안정화시켰다. 이후 배양 상등액을 모두 제거하고 새로운 배양배지 160 μ L와 시료 20 μ L를 첨가하고 배양하였으며, 30분 후 염증 유발 물질로 10 μ g/mL의 lipopolysaccharide from *Escherichia coli*(LPS; Sigma-Aldrich) 20 μ L를 첨가한 다음 24 시간 동안 재배양하였다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 시료에 의한 독성평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Invitrogen, Eugene, OR, USA)법을 통해 550 nm의 흡광도에서 측정하였으며, LPS 대조군에 대한 세포생존율(cell viability, %)로 나타내었다. 한편, 배양 상등액에 존재하는 염증매개 물질인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 산화질소(nitric oxide; NO)의 함량은 Invitrogen에서 구입한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 및 Griess assay를 통해 측정되었으며, 각각의 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량으로 계산되었다. 한편 추출물의 피부염 억제 활성을 평가하기 위해 TNF- α (Invitrogen) 및 interferon-gamma(IFN- γ ; Invitrogen)로 염증을 유발한 HaCaT keratinocyte 세포에서 분비되는 interleukin-6(IL-6) 및 interleukin-8(IL-8)의 함량을 평가하였다. HaCaT 세포는 1×10^5 cells/mL로 조정된 후 96 well plate에 200 μ L씩 도포하고 배양기에서 약 80% confluent될 때까지 배양하여 세포를 안정화시켰다. 이후 배양 상등액을 모두 제거하고 새로운 배양배지 160 μ L와 시료 20 μ L를 첨가하고 배양하였으며, 1시간 후 염증 유발 물질로 각각 10 ng/mL의 TNF- α 와 IFN- γ (T+I)가 혼합된 용액 20 μ L를 첨가한 다음 24 시간 동안 재배양하였다. T+I로 자극된 HaCaT 세포에서 시료에 의한 독성평가는 상기 언급된 MTT법으로 측정하였으며, 배양 상등액에 존재하는 염증성 사이토카인인 IL-6 및 IL-8의 함량은 BD Biosciences(San Diego, CA, USA)에서 구입한 ELISA kit를 이용하여 측정되었다. IL-6 및 IL-8의 생성량

은 제조사에서 제공하는 recombinant protein을 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량으로 계산되었다.

6. HPLC-DAD를 이용한 triterpenoid의 정량 분석

병풀 추출물 4종에 존재하는 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid의 함량을 평가하기 위해 YMC-Triart C18(250 \times 4.6 mm, 5 μ m; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan) 및 Diode Array Detector(DAD; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)가 장착된 HPLC system(Agilent 1200 series; Agilent Technologies)를 사용하였다. 칼럼 온도는 30°C를 유지하였으며, 이동상으로는 acetonitrile(A)와 H₂O(B)를 다음과 같은 기울기 조건으로 진행하였다. 0 \rightarrow 15분(22% A), 15 \rightarrow 20분(22 \rightarrow 24% A), 20 \rightarrow 28분(24% A), 28 \rightarrow 32분(24 \rightarrow 40% A), 32 \rightarrow 45분(40% A), 45 \rightarrow 48분(40 \rightarrow 46% A), 48 \rightarrow 50분(46 \rightarrow 70% A), 50 \rightarrow 55분(70% A) 및 55 \rightarrow 60분(70 \rightarrow 22% A). Post time은 15분으로 설정하였으며, injection volume은 20 μ L, 유속은 1 mL/min, 검출 파장은 205 nm에서 분석을 진행하였다. 표준물질로는 Sigma-Aldrich에서 구입한 madecassoside(CAS No. 34540-22-2), asiaticoside(CAS No. 16830-15-2), madecassic acid(CAS NO. 18449-41-7) 및 asiatic acid(CAS No. 464-92-6)를 농도별로 측정하여 검량선을 이용하여 시료에 존재하는 성분 함량을 mg/g으로 나타내었다.

7. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하여 실시하였으며 결과를 평균 \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타낸 후 통계분석은 Statistical Package for the Social Science(SPSS V12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's t-test로 계산하여 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 대조군과의 유의성을 검증하였다. 한편 항산화 활성의 경우, 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시한 후, 동질성을 갖는 경우 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다. 분석인자들 간의 상관성 분석을 위해 각각의 측정값의 그래프를 linear regression을 통해 Pearson 상관계수(Pearson's correlation coefficient)로 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 병풀추출물의 수율과 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

본 연구에서는 국내에서 재배된 병풀의 산업적 활용 가능성을 증진시키기 위하여 다양한 추출용매 하에서 병풀의 주요한 활성성분으로 보고된 화합물의 함량과 함께 항산화 및 항염증활성의 변화를 확인하고자 하였다. 최근 병풀은 화장

품 또는 의약품 원료로 광범위하게 이용되고 있는 실정이지만, 본 연구에서는 식품 및 건강기능식품으로의 활용가능성도 고려하여 추출용매는 식품용으로 사용이 허가된 물과 주정만을 사용하기로 하였다. 즉, 충북 충주지역에서 재배중인 병풍 품종(*Centella asiatica*; Good tiger care)을 입수하여 각각 냉수 추출물(CA-WE), 열수 추출물(CA-HWE), 50%(CA-50E) 및 70% 주정 추출물(CA-70E)로 조제하였다. 추출수율의 경우 4종의 추출물에서 건조중량 대비 37.9~34.7%로 큰 차이를 보이지 않았으나, 물 추출물(37.0~37.7%)에서 주정 추출물(34.7~34.9%)에 비해 약간 높은 수율을 보였다. 비록 추출시간이 달랐음에도 불구하고 CA-WE와 CA-HWE만을 비교해 봤을 때, 열에 따른 수율의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 이는 병풍추출물 제조 시에 열을 가하지 않아도 유효성분이 충분히 추출될 수 있다는 것으로 해석될 수 있으며, 추후 이를 활용하여 산업적인 생산 시 큰 이점이 될 수 있을 것으로 보인다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었는데, 두 성분 모두 CA-70E에서 다른 추출물들에 비해 유의적으로 높은 함량(28.0 mg GAE/g 및 19.1 mg QE/g)을 보였으며, CA-WE에서는 가장 낮은 함량(9.0 mg GAE/g 및 2.3 mg QE/g)으로 확인되었다. 일반적으로 식물체 유래 폴리페놀과 플라보노이드와 같은 저분자 물질은 70% 에탄올 또는 메탄올 추출물에서 가장 잘 추출된다고 알려져 있는 반면, 물 추출물의 경우에는 탄수화물과 단백질 등의 고분자 성분이 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 추후 활성의 유무에 따라 CA-WE 및 CA-HWE의 주요 성분에 대한 분석이 필요할 것으로 판단되었다. 병풍에 존재하는 폴리페놀 또는 플라보노이드 함량을 평가한 최근 연구로는 Pittella 등(2009)이 보고한 브라질산 병풍 잎으로부터 분리한 수용성 추출물(aqueous extract, AE)의 페놀화합물의 함량(2.86 g/100 g)과 Zainol 등(2003)이 보고한 말레이시아산 병풍

부위별 추출물의 페놀화합물 함량(3.23~11.7 g/100 g) 등이 있다. 또한 Kil 등(2018)은 최근 국내 합천지방에서 재배되는 병풍의 생육부위별 유효성분을 비교하였는데, 폴리페놀과 플라보노이드의 경우 정확한 수치를 제시하지는 않았지만 잎자루(petiole) 또는 잎+잎자루(leaf+petiole)과 비교하여 잎(leaf)의 메탄올 추출물에서 가장 높은 함량을 제시한 바 있다. 본 연구에서는 병풍의 전초를 활용하기 위하여 건초에 대한 용매 추출물을 조제한 것으로 폴리페놀 함량(9.0~28.0 mg/g)이 다소 적은 함량을 나타내고 있으므로 향후 잎만의 용매추출물을 조제하여 건초의 용매추출물과 비교하고자 한다.

2. 병풍추출물 4종의 항산화 활성

ABTS 및 DPPH를 이용한 자유라디칼 소거활성 평가 결과는 Table 2에 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성의 경우에는 주정 추출물인 CA-70E(33.0 mg AEAC/g)와 CA-50E(31.0 mg AEAC/g)에서 우수하게 나타났으며, 물 추출물인 CA-WE(13.4 mg AEAC/g) 및 CA-HWE(21.8 mg AEAC/g)에서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다. 이러한 경향은 DPPH 라디칼 소거활성 결과에서도 유사하게 나타났는데, 활성은 CA-70E(29.8 mg AEAC/g), CA-50E(29.3 mg AEAC/g), CA-HWE(17.4 mg AEAC/g), CA-WE(9.2 mg AEAC/g) 순으로 확인되었다. Ferric ion(Fe^{3+})이 ferrous ion(Fe^{2+})으로 환원되는 원리를 이용하여 환원력을 평가하는 FRAP 활성(Benzie & Strain 1996)의 결과는 Table 2에 나타내었다. 앞서 측정된 자유라디칼 소거활성의 결과와 마찬가지로 환원력은 CA-70E(28.5 mg AE/g), CA-50E(23.9 mg AE/g), CA-HWE(16.8 mg AE/g), WE(8.5 mg AE/g) 순으로 높게 나타났다. Table 1에서 확인된 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 고려했을 때, 병풍추출물에서 발현되는 항산화 활성은 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물과 크게 관련되어 있는 것으로 확인되었다. 병풍의 부

Table 1. Extraction yields and total polyphenol and flavonoid contents of solvent extracts from *C. asiatica*

Extract	Yield (w/w%) ¹⁾	Polyphenol (mg GAE ²⁾ /g)	Flavonoid (mg QE ³⁾ /g)
CA-WE	37.7	9.0±0.8 ^c	2.3±0.3 ^d
CA-HWE	37.0	11.2±2.0 ^c	8.5±0.2 ^c
CA-50E	34.7	23.2±0.9 ^b	16.7±0.1 ^b
CA-70E	34.9	28.0±3.0 ^a	19.1±0.6 ^a

Different letters within the column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾ Yield(%) was calculated against the dried *C. asiatica*.

²⁾ Gallic acid equivalent.

³⁾ Quercetin equivalent.

Table 2. Anti-oxidant capacities of solvent extracts from *C. asiatica*

Extraction	ABTS (mg AEAC ¹⁾ /g)	DPPH (mg AEAC/g)	FRAP ²⁾ (mg AE ³⁾ /g)
CA-WE	13.4±0.1 ^d	9.2±1.0 ^c	8.5±0.5 ^d
CA-HWE	21.8±0.2 ^c	17.4±0.8 ^b	16.8±0.4 ^c
CA-50E	31.0±0.4 ^b	29.3±1.1 ^a	23.9±0.8 ^b
CA-70E	33.0±0.3 ^a	29.8±2.6 ^a	28.5±1.9 ^a

Different letters within the column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾ Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity.

²⁾ Ferric reducing antioxidant power.

³⁾ Ascorbic acid equivalent.

위별 페놀화합물의 함량을 측정한 Zainol 등(2003)의 연구에 따르면, 병풀의 페놀화합물의 함량은 항산화 활성과 밀접한 상관관계($r^2=9014$)를 갖는다는 보고하였는데, 이는 본 연구에서 도출된 결과와도 일치하는 것으로 보인다.

3. 병풀추출물의 pentacyclic triterpenoid 화합물 함량 비교

병풀에는 다양한 종류의 phytochemical이 존재하는 것으로 알려져 있지만, 현재까지 보고되어 있는 병풀의 주요한 활성 성분은 pentacyclic triterpenoid 화합물이다(Schaneberg 등 2003; Rafamantanana 등 2009; Singh 등 2015; Mahmood 등 2016). Kim 등(2002)은 병풀 지상부로부터 madecassoside와 asiaticoside의 시기별 함량변화를 보고하였으며, Kil 등(2018)은 최근 계절적 생육조건의 변화에 따른 국내산 재배 병풀의 다양한 지방부 조직에서 triterpene glycoside의 함량을 조사한 바 있다. 본 연구에서는 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 표준품을 입수하여 등량혼합물로 조제하고 분석한 결과는 Fig. 1A에 나타내었으며, 이들의 농도-피크면적 간의 상관관계를 통해 각각의 표준품에 대한 검량선을 작성하였다(data not shown). 동일 분석조건 하에서 시료의 크로마토그램은 Fig. 1B과 같이 확인되었으며, 표준품과의 retention time 비교를 통해 4종 물질은 모두 우수한 분리능으로 확인

되었다. 병풀추출물에 존재하는 triterpenoid 4종의 함량은 Table 3에 나타내었는데, triterpenoid 4종의 함량을 종합적으로 비교한 결과 모든 병풀추출물들에서 asiaticoside의 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 다음으로는 madecassoside, asiatic acid 및 madecassic acid 순으로 나타났다. 주정 추출물인 CA-50E와 CA-70E에서는 4종의 성분이 모두 검출된 반면, 물 추출물인 CA-WE에서는 모든 성분이 검출되지 않았고, CA-HWE에서는 madecassoside와 asiaticoside만 소량 검출되는 것으로 확인되었다. 4종 triterpenoid 화합물의 총합은 CA-70E(52.3 mg/g), CA-50E(46.7 mg/g), CA-HWE(7.4 mg/g), CA-WE(n.d.) 순으로 나타났다. 흥미롭게도, triterpene saponin 구조인 madecassic acid와 asiatic acid의 함량은 CA-50E에서 각각 1.6 및 4.1 mg/g으로 가장 높게 검출된 반면, 상기 triterpene saponin에 3당류(glucose 2분자와 rhamnose 1분자)가 결합된 triterpenoid triglycoside 형태인 madecassoside와 asiaticoside의 함량의 경우에는 CA-70E에서 각각 14.9 및 32.2 mg/g으로 가장 높게 확인되었다. 이러한 결과로부터 총주지역 병풀 추출물을 기능성 소재로서 산업적으로 활용하기 위한 지표성분으로서 함량이 높은 madecassoside 또는 asiaticoside가 이용될 수 있을 것으로 사료되었으며, Table 2에 나타난 항산화 활성 결과와의 상관관계로부터 이러한 triterpenoid 화합물들이 활성에 주요하게 작용하거나 연관되어 있는 활성물질로서의 가능성을 기대하게 한다고 추정되어진다.

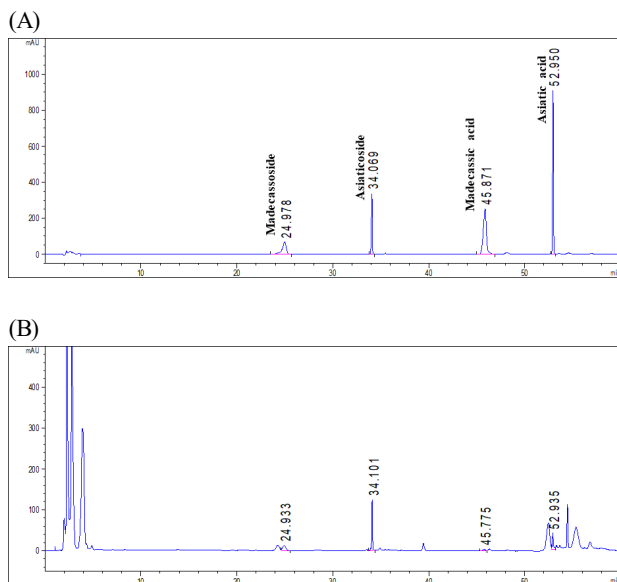


Fig. 1. HPLC chromatogram of (A) standard mixture comprising of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid, and (B) solvent extract (CA-70E) prepared from *C. asiatica*. Standard mixture and CA-70E were applied to the HPLC system at doses of 0.5 mg/mL and 5 mg/mL, respectively.

4. 병풀추출물 4종의 항염증 활성

마кро파지 세포는 체내 염증 반응에 관여하는 주된 세포로(Chen 등 2001; Lee와 Kang 2020), 본 연구에서는 그람 음성균의 세포벽 성분인 LPS로 염증이 유도된 마우스 유래 RAW 264.7 대식세포주에서 염증 유발 물질인 TNF- α 와 NO 생성에 병풀추출물이 미치는 영향을 확인하고 항염증 소재로서 활용가능성을 평가하고자 하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성이 없는 농도범위를 확인한 결과, 병풀 추출물 4종은 모두 12.5~100 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 95% 이상의 세포 생존율을 보였다(Fig. 2A). 더욱이, 주정 추출물인 CA-50E와 CA-70E에서는 LPS 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식 활성을 나타내었다. 즉, CA-50E는 50 및 100 μ g/mL의 농도에서 각각 LPS 대조군 대비 통계학적으로 유의한 20.8% 및 39.3%의 세포 증식 활성이 나타났으며, CA-70E의 경우에는 모든 농도범위인 12.5~100 μ g/mL에서 LPS 대조군 대비 15.9~92.9%의 세포 증식 활성이 확인되었다. 한편, LPS로 염증이 유발된 RAW 264.7 세포에서 병풀 추출물 처리에 의한 TNF- α 억제 활성을 평가한 결과는 Fig. 2B에 나타내었다. 본 연구에서는 양성대조군(positive control, PC)으로서 항염증 활성이 이미 보고된

Table 3. Determination of major pentacyclic triterpenoids from solvent extracts of *C. asiatica* by HPLC-DAD

Sample	Madecassoside (mg/g)	Asiaticoside (mg/g)	Madecassic acid (mg/g)	Asiatic acid (mg/g)	Sum (mg/g)
CA-WE	n.d. ¹⁾	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CA-HWE	3.1	4.3	n.d.	n.d.	7.4
CA-50E	13.8	27.2	1.6	4.1	46.7
CA-70E	14.9	32.2	1.5	3.7	52.3

¹⁾ Not determined.

바 있는 dexamethasone(20 µg/mL)을 사용하여 시료의 TNF-α 억제활성과 비교하고자 하였다(Jeon 등 2000). PC 대조군에서는 106.8 ng/mL의 TNF-α 생성량을 보여 LPS 대조군(121.4 ng/mL) 대비 통계학적으로 유의한 12.1%의 억제활성을 나타내었다. CA-WE와 CA-HWE의 경우, LPS 대조군 대비 0~7.5%의 약한 수준의 TNF-α 억제활성을 보인 반면, CA-50E와 CA-70E는 LPS 대조군과 비교하여 각각 8.2~19.1%와 7.9~33.8%의 TNF-α 억제활성을 나타내었다. 특히, 이들 추출물은 모든 농도범위에서 LPS 대조군 대비 통계학적으로 유의한 억제활성으로 나타났는데, CA-70E는 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 TNF-α 생성 억제에 가장 효과적으로 작용할 수 있는 추출물로 확인되었다. 또 다른 염증관련인자로서 산화질소(NO)의 억제활성 결과는 Fig. 2B에 나타내었다. NO 억제활성에서는 PC 대조군으로 *N*-nitroarginine methyl ester(50 µg/mL)를 사용하였다(Chen 등 2001). LPS 대조군은 10.5 µM의 NO 생성을 보였으며, PC 대조군은 3.4 µM로 LPS 대조군 대비 통계학적으로 유의한 87.4%의 억제활성을 나타내었다. 병풍추출물 4종은 모두 농도-의존적인 경향으로 NO 생성을 억제했는데, 물 추출물인 CA-WE와 CA-HWE는 모두 50~100 µg/mL의 농도에서만 LPS 대조군 대비 통계학적으로 유의한 NO 억제활성(각각 15.8~19.4% 및 18.6~26.9% 억제)을 나타내는 것으로 확인되었다. 반면 주정 추출물인 CA-50E와 CA-70E의 경우에는 시험한 모든 농도범위에서 LPS 대조군 대비 통계학적으로 유의한 NO 억제활성을 확인할 수 있었다. 12.5~25 µg/mL의 저농도 범위에서는 CA-50E(LPS 대조군 대비 35.6~47.8% 억제)가 CA-70E(23.7~33.6% 억제)보다 우수한 것으로 판단되었으나, 50~100 µg/mL의 높은 농도범위에서는 CA-50E(57.7~77.5% 억제)와 CA-70E(57.3~73.5% 억제)의 NO 억제활성이 유사하게 나타나 전반적으로 CA-50E와 CA-70E의 NO 억제활성은 유사한 수준을 갖는 것으로 확인되었다.

한편, 병풍은 화장품 원료로 다양하게 활용되고 있는데, 염증반응과 관련된 피부진정효과가 우수한 것으로 알려져 있다. 최근 본 연구에서 사용된 동일원료(Good tiger care)의 주정 추출물은 TNF-α와 IFN-γ(T+I) 유도에 의해 염증이 유발된 HaCaT 세포가 분비하는 염증매개 물질인 cyclooxy-

genase-2와 IL-6를 억제하는 항아토피 활성이 우수한 것으로 보고된 바 있다(Lee 등 2020). 본 연구에서는 이를 활용하여 HaCaT 세포를 이용한 피부염 억제효능을 확인하고자 하였다. TNF-α와 IFN-γ(T+I)와 같은 염증성 사이토카인은 피부세포에 작용하여 IL-6와 IL-8과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 조직의 염증을 유발하는 것으로 알려져 있기 때문에(Kim 등 2002; Yang 등 2015), 본 연구에서는 이를 활용하여 다양한 병풍 추출물 처리가 IL-6와 IL-8 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 먼저 HaCaT 세포에 대해 병풍 추출물의 세포독성을 MTT법으로 확인한 결과, 병풍 추출물 4종은 모두 12.5~100 µg/mL의 농도범위에서 T+I 대조군 대비 100% 이상의 세포 생존율을 보여 세포독성이 없는 것으로 사료되었다(Fig. 3A). 오히려 주정 추출물인 CA-50E와 CA-70E에서는 T+I 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식활성을 나타내었는데, 특히 CA-70E에서는 모든 농도범위에서 T+I 대조군 대비 통계학적으로 유의한 9.6~24.0%의 세포증식활성을 나타내었다. T+I 처리를 통해 염증이 유발된 HaCaT 세포에서 병풍 추출물 처리에 의한 IL-6 및 IL-8 억제활성을 평가한 결과는 Fig. 3B 및 Fig. 3C에 나타내었다. PC 대조군으로는 20 µg/mL의 dexamethasone을 처리하여 시료의 활성과 비교하고자 하였다. IL-6 억제활성의 경우(Fig. 3B), PC 대조군은 275.2 pg/mL의 IL-6 생성량을 보여 T+I 대조군(1,205.1 pg/mL)과 비교하여 80.3%의 통계학적으로 유의한 억제활성을 확인하였다. 병풍추출물 4종은 모두 12.5~100 µg/mL의 농도범위에서 농도-의존적이면서 통계학적으로 유의한 IL-6 억제활성을 보였다. T+I 대조군과 비교하여 IL-6 억제활성은 물 추출물인 CA-WE에서 6.6~50.5%, CA-HWE에서 16.8~44.6%로 나타났으며, 주정 추출물인 CA-50E에서 20.7~66.7%, CA-70E에서 27.3~58.4%로 확인되었다. 결과적으로 주정 추출물의 IL-6 억제활성이 동일 농도범위에서 물 추출물보다 더 우수한 것으로 사료되었다. T+I 처리를 통해 증가된 IL-8의 억제활성 평가 결과는 Fig. 3C에 나타내었다. PC 대조군은 276.0 pg/mL의 IL-8 생성량을 나타내었으며, 이는 T+I 대조군(631.7 pg/mL)과 비교하여 66.2%의 통계학적으로 유의한 IL-8 억제활성으로 확인되었다. 물 추출물인 CA-WE와 CA-HWE의 경우, T+I 유도군 대비 모든 시험농도범위에

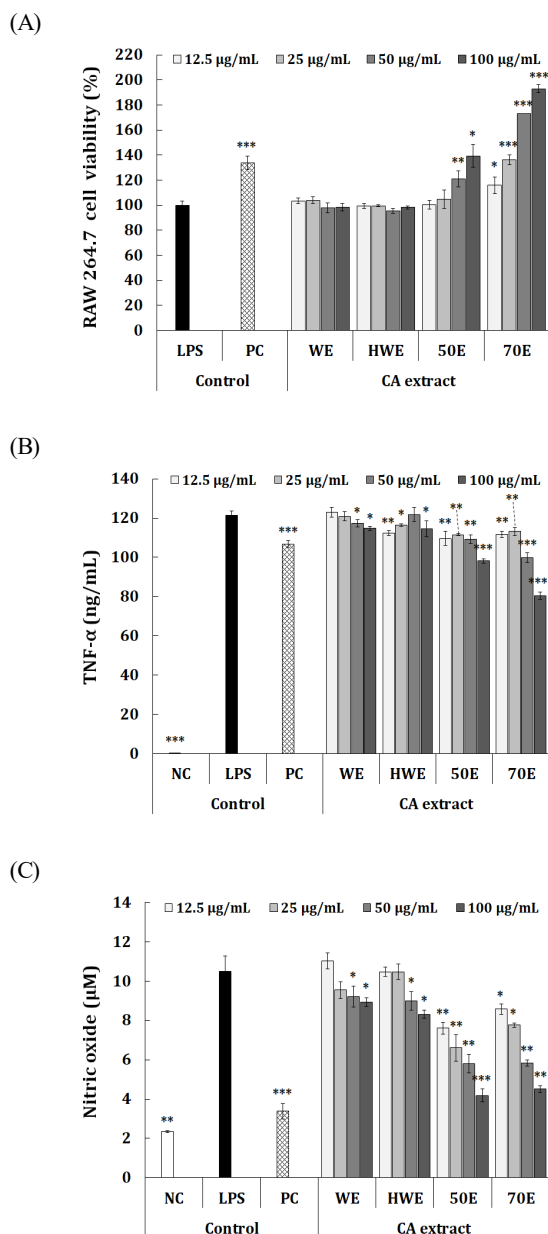


Fig. 2. Anti-inflammatory activity of solvent extracts from *C. asiatica*. RAW 264.7 macrophage cells were treated with each sample followed by LPS treatment for 24 hr, and the (A) viability and production of (B) TNF- α and (C) nitric oxide (NO) were estimated. Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Only medium was used as negative control (NC). A dexamethasone (20 μ g/mL) and N-nitroarginine methyl ester (L-NAME; 50 μ g/mL) were used as positive control (PC) in TNF- α and NO experiments, respectively. Asterisks mean a significant difference between LPS-treated group (LPS) treated with only LPS (1 μ g/mL) and each group by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

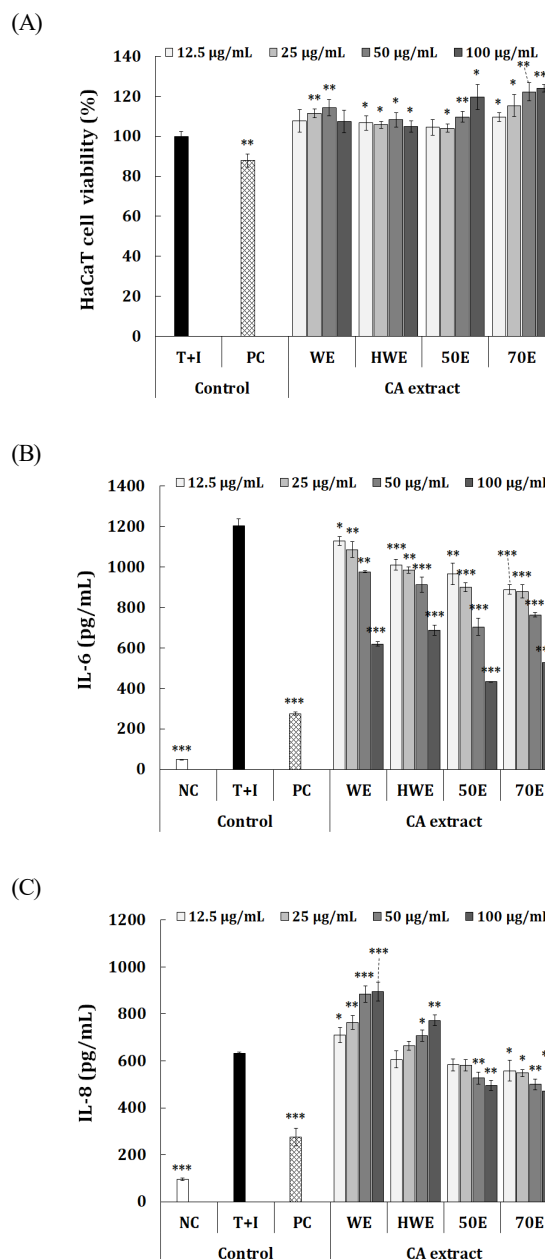


Fig. 3. Anti-inflammatory activity on the skin of solvent extracts from *C. asiatica*. HaCaT keratinocytes were treated with each sample followed by TNF- α +IFN- γ (T+I; 10 ng/mL each) treatment for 24 hr, and the (A) viability and production of (B) IL-6 and (C) IL-8 were estimated. Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Only medium was used as negative control (NC). A dexamethasone (20 μ g/mL) was used as positive control (PC). Asterisks mean a significant difference between LPS-treated group (LPS) treated with only LPS (1 μ g/mL) and each group by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Table 4. Correlation coefficients between total polyphenol, flavonoid and triterpenoids in *C. asiatica* and the various physiological activities

	ABTS	DPPH	FRAP	TNF- α	NO	IL-6	IL-8
Polyphenol	0.951*	0.953*	0.946	-0.966*	-0.965*	-0.776	-0.976*
Flavonoid	0.998**	0.994**	0.992**	-0.896	-0.956*	-0.716	-0.992**
Triterpenoid	0.962*	0.972*	0.942	-0.926	-0.991**	-0.833	-0.991**

Asterisks mean a significant difference between each phytochemical ingredient (polyphenol, flavonoid, and triterpenoid) and individual activity by Pearson's correlation analysis.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

서 IL-8 생성을 감소시키지 않았는데, T+I에 의해 유도된 IL-8 생성을 오히려 농도-의존적인 경향으로 증가시키는 것으로 나타나 IL-8 억제활성은 없는 것으로 판단되었다. 주정 추출물인 CA-50E와 CA-70E에서는 T+I 대조군 대비 각각 9.1~25.4% 및 13.7~29.6%의 농도-의존적인 IL-8 억제활성을 보였다. 특히, CA-70E의 경우 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 모든 시험농도범위에서 T+I 대조군 대비 통계학적으로 유의한 IL-8 억제활성을 나타내어 가장 우수한 활성을 나타내는 추출물로 판단되었다.

본 연구에서 분석한 병풀추출물의 생리활성 성분(폴리페놀, 플라보노이드 및 triterpenoid)과 생리활성(항산화 및 항염증)과의 상관성을 분석한 결과는 Table 4에 나타내었다. 병풀의 총 폴리페놀 함량은 FRAP 활성 및 IL-6 억제활성과 통계학적으로 유의한 상관성($p > 0.05$)이 확인되지 않았으나, ABTS ($R=0.951$), DPPH($R=0.953$), TNF- α ($R=-0.966$), NO($R=-0.965$) 및 IL-8($R=-0.976$) 활성과 통계학적으로 유의한 상관성($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$)이 확인되었다. 병풀의 총 플라보노이드 함량과 TNF- α 또는 IL-6 억제활성과의 상관성은 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나($p > 0.05$), ABTS ($R=0.998$), DPPH($R=0.994$), FRAP($R=0.992$), NO($R=-0.956$) 및 IL-8($R=-0.992$) 활성과는 통계학적으로 유의한 상관성($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$)을 갖는 것으로 나타났다. 마지막으로, 병풀의 총 triterpenoid 함량은 FRAP 활성, TNF- α 및 IL-6 억제활성과 통계학적으로 유의한 상관성($p > 0.05$)이 나타나지 않았으나, ABTS($R=0.962$), DPPH($R=0.972$), NO($R=-0.991$) 및 IL-8($R=-0.991$) 활성과 통계학적으로 유의한 상관성($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$)이 확인되었다.

결과적으로 충주지역에서 재배된 병풀은 항산화 및 항염증 활성 소재로서 산업적으로 활용가능성이 높은 소재로 판단되며, 특히 70% 주정 추출물이 항산화 및 항염증 활성에 유의하게 작용할 것으로 판단되었다. 이러한 충주지역 병풀 추출물의 원료표준화를 위한 지표성분으로는 triterpenoid인 asiaticoside 또는 madecassoside가 적합한 것으로 보인다. 본 연구진은 향후 병풀의 다양한 품종 및 건조조건에 따른 생리

활성 성분함량과 생리활성이 미치는 영향을 검토하여 충주 지역 병풀의 장점을 부각시킴으로써 수입산 병풀을 대체하고 지역농산물 확대에 기여하고자 한다.

요약 및 결론

기능성 화장품 및 의약품 원료로 폭넓게 활용되고 있는 병풀(*Centella asiatica*, CA)은 주로 남아시아 및 아프리카 등으로부터 수입되는 자원이며, 최근 들어 수요가 더욱 증가하고 있는 원료 자원이다. 본 연구는 충북 충주지역에서 재배되고 있는 Good tiger care 품종의 병풀을 이용하여 다양한 용매 추출물을 조제하고 이들의 주요한 활성성분 함량과 함께 항산화와 항염증활성을 평가하여 지역농산물로서 병풀의 산업적 활용가능성과 농가소득 확대를 목표로 진행되었다. 병풀로부터 물(냉수, CA-WE; 열수 추출물, CA-HWE)과 주정 추출물(50%, CA-50E; 70%, CA-70E)을 조제하여 총 폴리페놀과 플라보노이드 및 주요 triterpenoid 함량분석과 함께 항산화 및 항염증 활성을 평가하였다. 4종 용매 추출물은 건조 대비 34.7~37.7(w/w%)로 유사한 추출수율을 나타냈으며, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 CA-70E에서 가장 높게 확인되었다. ABTS 라디칼 소거활성과 환원력 평가를 통한 항산화 활성에서는 CA-70E에서 가장 우수한 활성을 나타냈으며, DPPH 라디칼 소거활성에서는 CA-50E와 CA-70E가 유사한 활성으로 확인되었다. 병풀에 함유되어 있는 주요 triterpenoid glycoside인 madecassoside와 asiaticoside의 함량은 CA-70E에서 가장 높게 확인된 반면, madecassic acid와 asiatic acid의 경우에는 CA-50E에서 가장 우수한 함량으로 나타났다. Lipopolysaccharide(LPS)로 자극된 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성을 평가한 결과, CA-70E는 가장 우수한 TNF- α 억제활성을 나타냈으며, 산화질소 억제활성에서는 CA-50E와 CA-70E가 유사하게 높은 활성을 나타냈다. 한편, TNF- α 와 INF- γ 로 염증이 유도된 HaCaT 세포에서 피부염 억제활성을 평가한 결과, 물 추출물에 비해 주정 추출물인 CA-50E와 CA-70E가 유의적으로 높은 IL-6 및 IL-8 억제활성을 나타내

었다. 결과적으로 충주지역 재배 병풀의 70% 추정 추출물은 물 추출물보다 주요한 활성성분이 높게 함유되어 있을 뿐만 아니라 항산화와 항염증 등의 생리활성이 우수한 것으로 확인되어, 산업적으로 기능성소재로서의 활용가능성이 높은 소재임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2020년 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ015285042020)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. 2013. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatol Alergol* 30:46-49
- Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hou WC, Yang LL, Lee TJF. 2001. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 82:537-548
- Goo YM, Kil YS, Sin SM, Lee DY, Jeong WM, Ko K, Yang K, Kim YH, Lee SW. 2018. Analysis of antibacterial, anti-inflammatory, and skin-whitening effect of *Centella asiatica* (L.) Urban. *J Plant Biotechnol* 45:117-124
- Ha JH, Kwon MC, Kim SS, Jeong MH, Hwang B, Lee HY. 2010. Enhancement of skin-whitening and UV-protective effects of *Centella asiatica* L. Urban by ultrasonification process. *Korean J Med Crop Sci* 18:79-85
- Ha JH, Kwon MC, Kim Y, Jeong SS, Jeong MH, Hwang B, Lee HY. 2009. Enhancement of immuno-modulatory of *Centella asiatica* L. Urban with edible polymer through nano-encapsulation process. *Korean J Med Crop Sci* 17:257-265
- Jamil SS, Nizami Q, Salam M. 2007. *Centella asiatica* (Linn.) Urban: A review. *Indian J Nat Prod Resour* 6:158-170
- Jeon YJ, Han SH, Lee YW, Lee M, Yang KH, Kim HM. 2000. Dexamethasone inhibits IL-1 β gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF- κ B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacol* 48:173-183
- Jo CH, Kim SY, An IS. 2014. The improving effect of *Centella asiatica* extracts on erythema on scalp of aged 20~50's women. *Korean J Aesthet Cosmetol* 12:921-927
- Kil YS, Sin SM, Lee DY, Min JW, Yang KJ, Lee SW, Kim YH, Goo YM. 2018. Analysis triterpene glycoside levels and antioxidant activity in the different shoot tissues of *Centella asiatica* (L.) Urban. *J Life Sci* 28:917-922
- Kim OT, Kim MY, Kim SJ, Kim YJ, Kim KS, Ahn JC, Kim SW, Hwang B. 2002. Seasonal variations of triterpene glycosides contents in the leaf of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Korean J Med Crop Sci* 10:375-378
- Kwon KJ, Choi SJ, Yoon YM. 2012. Improving effects of the cleanser containing *Centella asiatica* extracts and charcoal and pearl powder on the facial skin. *Asian J Beauty Cosmetol* 10:581-586
- Lee J, Myung CH, Lee JE, Jo MR, Kim HS, Lee NY, Woo H, You J, Jo H, Hwang JS. 2019. Anti-inflammatory and moisturizing effect of *Centella* extracts fermented in Jeju lava water. *J Soc Cosmet Sci Korea* 45:363-372
- Lee Y, Choi HK, N'deh KPU, Choi YJ, Fan M, Kim EK, Chung KH, An JH. 2020. Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *Nutrients* 12:411
- Lee YY, Kang SA. 2020. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* R. Br extracts. *Korean J Food Nutr* 33:483-492
- Mahmood A, Tiwari AK, Şahin K, Küçük Ö, Ali S. 2016. Triterpenoid saponin-rich fraction of *Centella asiatica* decreases IL-1 β and NF- κ B, and augments tissue regeneration and excision wound repair. *Turk J Biol* 40:399-409
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Technol Metall* 40:255-260
- Orhan IE. 2012. *Centella asiatica* (L.) Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evid Based Complementary Alternat Med* 2012:946259
- Pittella F, Dutra RC, Junior DD, Lopes MTP, Barbosa NR. 2009. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L.) Urb. *Int J Mol Sci* 10:3713-3721
- Rafamantanana MH, Rozet E, Raolison GE, Cheuk K, Ratsimamanga SU, Hubert P, Quetin-Leclercq J. 2009. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycone in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (Apiaceae). *J Chromatogr B* 877:2396-2402

- Ryu BS, Choi HE, Choi WS, Lee NH, Choi UK. 2017. Antioxidant activities of extracts from different parts of the pine tree. *Korean J Food Nutr* 30:1133-1139
- Schaneberg BT, Mikell JR, Bedir E, Khan IA. 2003. An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. *Pharmazie* 58:381-384
- Singh J, Sabir F, Sangwan RS, Narnoliya LK, Saxena S, Sangwan NS. 2015. Enhanced secondary metabolite production and pathway gene expression by leaf explants-induced direct root morphotypes are regulated by combination of growth regulators and culture conditions in *Centella asiatica* (L.) urban. *Plant Growth Regul* 75:55-66
- Stanković MS. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci* 33:63-72
- Suguna L, Sivakumar P, Chandrakasan G. 1996. Effects of *Centella asiatica* extract on dermal wound healing in rats. *Indian J Exp Biol* 34:1208-1211
- Tatmiya RN, Chundasama KS, Jhala VM, Thaker VS. 2014. Screening of proper leaf size in *Centella asiatica* for antioxidant potential and separation of phenolics using RP-HPLC. *J Appl Pharm Sci* 4:043-047
- Tenni R, Zanaboni G, De Agostini MP, Rossi A, Bendotti C, Cetta G. 1988. Effect of the triterpenoid fraction of *Centella asiatica* on macromolecules of the connective matrix in human skin fibroblast cultures. *Ital J Biochem* 37:69-77
- Yang JH, Hwang YH, Gu MJ, Cho WK, Ma JY. 2015. Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- α /IFN- γ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells. *Phytomedicine* 22:1262-1268
- Zaidan MR, Noor Rain A, Badrul AR, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. 2005. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop Biomed* 22:165-170
- Zainol MK, Abd-Hamid A, Yusof S, Muse R. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chem* 81:575-581

Received 06 November, 2020

Revised 22 November, 2020

Accepted 30 November, 2020