

건조방법에 따른 총주산 병풀의 영양성분과 생리활성

엄현주 · 신현영* · 지영미** · 권누리*** · 윤향식 · 김인재**** · 송용섭***** · 유광원*****

충청북도농업기술원 지방농업연구소, *고려대학교 의생명융합과학과 석사과정,
충주시농업기술센터 지방농촌지도사, *충청북도농업기술원 연구원, ****충청북도농업기술원 지방농업연구소,
*****충청북도농업기술원 농촌지도관, *****한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Nutritional Components and Physiological Activity of *Centella asiatica* Cultured in Chungju by Drying Method

Hyun-Ju Eom, Hyun-Young Shin*, Yeong Mi Ji**, Nu Ri Kwon***, Hyang-Sik Yoon,
In Jae Kim****, Yong-sup Song***** and †Kwang-Won Yu*****

Associate Researcher, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea

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

**Rural Extension Worker, Chungju Agricultural Technology and Extension Center, Chungju 27442, Korea

***Researcher, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea

****Senior Researcher, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea

*****Senior Extension Specialist, Chungcheongbukdo Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Korea

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

Abstract

Centella asiatica (CA) has been used as a nutritional plant as well as a traditional herbal medicine around the world. This study, quality component (proximate composition, total polyphenol, and triterpenoid compound), and antioxidant and anti-inflammatory activities of CA dried using various methods were investigated. Proximate compositions of CA with different drying methods included a large amount of carbohydrates, crude protein, crude ash, and crude fiber. Among the drying methods, cold drying provided the highest total polyphenol content and antioxidant activity, while hot-air drying at 75°C provided the lowest total polyphenol content and antioxidant activity. In addition, when the major triterpenoid compounds of CA were analyzed, the highest content of asiaticoside of triterpenoid glycoside was obtained with all drying methods. With respect to the total triterpenoid, the highest content was obtained with cold drying (68.8 mg/g) whereas natural drying (31.4 mg/g) provided the lowest content. In anti-inflammatory activity of LPS-stimulated RAW 264.7 cells, EtOH extract of cold drying showed a significantly higher inhibitory activity in comparison to the other drying methods. In conclusion, it is considered that the cold drying method is suitable for industrial preparation of functional materials with high physiological ingredients, and antioxidant and anti-inflammatory activities from CA.

Key words: *Centella asiatica*, drying method, nutritional components, triterpenoid, physiological activity

서론

병을 치료하는 풀이라는 뜻을 가진 병풀(*Centella asiatica* L. Urban)은 미나리과(Apiaceae)의 다년생 초본식물로, 주로

고온 다습한 인도, 네팔, 파키스탄, 마다가스카르 등을 비롯하여, 중국, 말레이시아, 인도네시아를 포함한 아시아에서 자생하고 있다(Bylka 등 2013; Mohd Razali 등 2019). 또한, 병풀은 Gotu kola 및 Indian pennywort로도 불리고, 현재

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

국내에서 꽃과 줄기는 식품원재료로 등록되어 있지 않고 잎만 식품원재료로 등록되어 있다(MFDS 1998). 우리나라의 경우에는 제주도와 일부 남부지역에 자생하고 있는데, 최근에는 충주, 합천 등지에서 재배하기 시작하여 국내산 병풀을 상업적으로 이용하고자 하는 노력이 지속되고 있다(Lee 등 2020; Shin 등 2020).

수천년 동안 여러 나라에서 전통적인 방법을 통해 약용 허브로 널리 사용되어 왔으며 최근 연구된 바로는, 항산화 활성(Kil 등 2018), 면역 활성(Ha 등 2009), 심혈관 보호(Mohd Razali 등 2019), 항염증 활성(Kwon 등 2008), 콜라겐 합성 촉진(Bylka 등 2013) 및 피부 재생(Bylka 등 2014) 등이 보고되고 있으며, 식품으로 이용되기 보다 피부손상, 상처치료 등의 피부관련 의약품 및 화장품 원료로서 각광받고 있다.

주요 지표성분은 triterpenoid 에 속하는 asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid 및 madecassoside 이며, 특히 asiaticoside 는 항균 및 항진균 활성의 특성을 가지고 있기 때문에 다양한 피부질환, 상처 치유 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim 등 2002; Kil 등 2018). 현재, 병풀의 성분과 관련된 국내 연구로는 병풀 지상부 조직에서 시기별 triterpene glycoside 함량에 관한 연구(Kil 등 2018) 및 충주산 병풀을 용매추출에 따른 triterpene 의 함량 평가(Shin 등 2020) 등이 보고되고 있으며 본 연구진은 건조방법에 따른 일반성분, 생리활성 및 지표성분의 함량에 초점을 맞추어 진행하였다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 충주산 병풀을 이용하여 다양한 건조조건에 따른 일반성분, 항산화 및 항염증 활성을 검토하고 이에 따른 지표성분의 함량을 평가하여 충주산 병풀의 최적 건조조건을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 건조방법

본 연구에 사용된 병풀은 2020년 충북 충주에서 재배한 것을 구입하여 사용하였다. 잎자루를 포함하여 병풀의 잎만을 세척하여 사용하였으며 건조방법은 자연(상온)건조의 경우 24시간 동안 25~30°C에서 건조, 냉풍건조(SM-7000T, COOLTOP, Cheonan, Korea)는 24시간 동안 35°C에서 건조하였으며, 열풍건조(HDG-230A, Hyundai Enertec, Hwaseong, Korea)는 60°C, 75°C 조건에서 각각 6시간씩 건조하였다. 마지막으로 동결건조는 동결건조기(FDFA-4508, OPERON, Gimpo, Korea)를 이용하여 건조하였다. 건조된 병풀의 일반성분은 건조된 시료를 분쇄하여 분석하였고, 총 폴리페놀 및 항산화능 분석은 분말을 60% ethanol로 3시간 동안 진탕 추출하였고, 원심분리(8,000 g, 20 min)하여 감압여과(Adventec

No.2, Adventec, Tokyo, Japan) 후 분석하였으며, 항염증 활성은 선행연구(Shin 등 2020)에서 최적조건으로 설정한 70% 에탄올 추출을 참고하여 사용하였다.

2. 일반성분 분석

건조방법을 달리한 병풀의 일반성분 분석은 AOAC방법(1990)에 따라 측정하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열건조법, 조단백질은 Micro-Kjeldahl, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분의 함량은 550°C 직접회화법을 사용하였고, 조섬유는 Fibertec system M(Tecator Co., Hoganas, Sweden)을 이용하여 Henneberg-Stohmann 개량법으로 분석하였다. 탄수화물의 함량은 100%에 수분, 조단백질, 조지방, 조회분 및 조섬유의 함량을 뺀 값으로 정의하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

건조방법을 달리한 병풀의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과, 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리를 이용하여 측정하였다(Amerine & Ough 1980). 추출물 50 µL에 2% Na₂CO₃ 1 mL를 혼합하여 3분 방치하고, 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 50 µL를 혼합하여 1시간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 표준물질 gallic acid(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 검량선을 작성하였고, mg gallic acid equivalent(GAE)/g(dry basis)로 나타내었다.

4. 자유라디칼 소거능

건조방법을 달리한 병풀의 자유라디칼 소거능은 DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능으로 측정하였다. 먼저, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능은 0.4 mM DPPH(Sigma-Aldrich, USA) 용액을 흡광도 값이 1.3~1.4가 되도록 희석한 후 추출물 0.2 mL에 DPPH용액 0.8 mL를 가한 후 실온에서 30분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 전자공여능은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다(Choi 등 2003). 2,2'-azino-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) 라디칼 소거능은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 하룻동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 물 흡광계수($\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 시료추출물 50 µL를 가하여 30분간 반응시켜 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼의 소거능은 시료 첨가구와 시료를 첨가하지 않은 경우의 흡광도를 백분율로 나타내었다(Roberty 등 1999).

5. RP-HPLC를 이용한 triterpenoid의 정량 분석

건조방법을 달리한 병풀 추출물 5종에 존재하는 triterpenoid 성분인 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid의 함량을 평가하기 위해 RP-HPLC system (Agilent 1200 series; Agilent Technologies)을 이용하였다. 칼럼은 YMC-Triart C18(250×4.6 mm, 5 μm; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)를 사용하였으며 Diode Array Detector (DAD; Agilent Technologies, Palo Alto, CA., USA)를 이용하여 205 nm에서 측정하였다. 칼럼 온도는 30℃를 유지하였으며, 이동상은 acetonitrile 및 H₂O를 이용하였으며, Shin 등(2020)의 방법을 이용하여 기울기 조건으로 분석하였다. Injection volume은 20 μL, 유속은 1 mL/min으로 분석을 진행하였으며 표준물질은 Sigma-Aldrich에서 구입한 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid를 메탄올에 용해하여 농도별로 측정하여 검량선을 작성하고 시료에 존재하는 성분 함량을 mg/g으로 나타내었다.

6. 세포주 및 배양조건

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, 세포주는 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. 세포주는 37℃, 5% CO₂ 조건이 유지되는 배양기(Sanyo, Sakata, Japan)에서 2~3일 동안 번식 계대배양하여 실험에 이용하였다.

7. 항염증 활성 평가

건조방법을 달리한 병풀 주정 추출물의 항염증 활성 평가는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포를 이용하여 평가하였다. 3×10⁵ cells/mL로 조정된 후 96 well plate에 200 μL씩 도포하고 배양기에서 약 70~80% confluent될 때까지 배양하여 세포를 안정화시켰다. 이후, 상등액을 모두 제거하고 FBS가 함유되지 않은 serum-free DMEM 160 μL와 시료 20 μL를 첨가하고 배양하였으며, 30분 후 염증 유발 물질로 1 μg/mL의 lipopolysaccharide from *Escherichia coli*(LPS; Sigma-Aldrich) 20 μL를 첨가하여 24시간 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 30분간 배양하여 550 nm의 흡광도에서 측정하였으며, 시료처리군의 세포생존율은 LPS 대조군에 대한 세포생존율(cell viability, %)로 나타내었다. 한편, 배양 상등액에 존재하는 tumor necro-

sis factor-α(TNF-α), interleukin-6(IL-6), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 및 산화질소(nitric oxide; NO)의 함량은 Invitrogen 및 BD bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구입한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 및 griess assay를 통해 측정되었으며, 제공된 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(ng/mL)으로 계산되었으며, 산화질소 함량은 NaNO₂를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(μM)으로 계산되었다.

8. 통계처리

모든 시험은 3번 반복 진행하였으며 결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타난 후 통계분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)를 이용하였다. 일반성분 분석 및 항산화 활성은 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시한 후, 동질성을 갖는 경우 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다. 한편, 항염증 활성의 경우에는 Student's *t*-test를 이용하여 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 대조군과의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 건조방법별 병풀의 일반성분

건조방법을 달리한 병풀의 일반성분은 Table 1에 나타내었다. 분석에 사용한 병풀은 서로 다른 방법으로 건조한 뒤 마쇄하여 분말형태로 사용하였으며, 함량은 모두 % 단위로 나타내었다. 먼저, 건조하지 않는 병풀은 수분함량 89.94%, 탄수화물 4.86%, 조섬유 4.59%, 조단백 2.73%, 조회분 2.38% 및 조지방 0.09% 순으로 검출되었다. 건조를 진행할 경우, 탄수화물 함량이 가장 많았고, 그 다음으로 조단백, 조회분, 조섬유, 수분 및 조지방 순으로 나타났다. 건조 병풀의 수분함량의 경우 5.33~7.21%로 나타났으며, 그 중 열풍건조(5.97%)가 유의적으로 낮았으며, 냉풍건조(7.21%)로 가장 높은 것으로 확인되었다. 조회분의 경우는 14.24~16.45%로 동결건조(14.24%)가 가장 낮았으며, 75℃ 열풍건조(16.45%)가 가장 높게 검출되었다. 조단백은 20.10~22.81%로 60℃ 열풍건조(20.10%)가 가장 낮게 나타났으며, 자연건조(22.81%)가 가장 높은 것으로 나타났다. 조지방의 경우는 2.50~4.82%로 자연건조(2.50%)가 가장 낮은 값을 나타냈으며, 60℃ 열풍건조(4.82%)가 가장 높은 것으로 나타났다. 조섬유는 10.98~11.70%로 건조방법간 유의적인 차이가 없었으며, 마지막으로 탄수화물의 경우는 40.44~43.38%로 75℃ 열풍건조(40.44%)가 가장 낮게 나타났으며, 동결건조(10.98%)가 가장 높은 것

Table 1. Proximate composition of *C. asiatica* with different dry methods

(Unit: %)

Dry method	Moisture	Crude ash	Crude lipid	Crude protein	Crude fiber	Carbohydrate
Natural drying	5.97±0.11 ^(c1)	15.44±0.08 ^c	2.50±0.03 ^c	22.81±0.13 ^a	11.66±0.03	41.63 ^c
Cold drying	7.21±0.04 ^a	16.03±0.04 ^b	2.56±0.08 ^d	21.81±0.07 ^c	11.31±0.18	41.08 ^d
Freezing drying	6.23±0.12 ^b	14.24±0.04 ^d	4.73±0.10 ^b	20.46±0.25 ^d	10.98±0.05	43.38 ^a
Hot-air drying 60°C	5.42±0.14 ^d	15.25±0.13 ^c	4.82±0.28 ^a	20.10±0.03 ^c	11.70±0.42	42.74 ^b
Hot-air drying 75°C	5.33±0.05 ^d	16.45±0.03 ^a	4.16±0.03 ^c	21.92±0.14 ^b	11.70±0.14	40.44 ^e

¹⁾ All values represent mean±S.D.^{a-e}Values with different small letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

으로 확인되었다. 조섬유를 제외한 건조방법에 따른 수분함량, 조회분, 조단백질, 조지방 및 탄수화물의 함량이 유의적으로 차이가 있었으며, 건조방법별 연관성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 삼채임(Lee JM 2006)과 모시임(Kim 등 2014)을 건조한 다른 연구에서도 탄수화물을 포함한 조섬유가 가장 높게 나타났다고 보고되고 있으며, 다음으로 조단백이 많이 검출되어 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 Ogunka-Nnoka 등(2020)의 연구에서는 상온에서 14일 건조한 병풀의 경우, 수분 13.1%, 조회분 16.55%, 조단백 8.55%, 조지방 1.2%, 조섬유 17% 및 탄수화물 43.81%로 확인되었는데, 본 연구진의 결과와 비교할 경우 수분함량은 다소 많이 검출되어 충분히 건조가 되지 않은 것으로 판단된다. 또한, 조회분과 조지방 함량은 본 연구결과와 유사한 값을 나타냈으나, 조단백 함량은 약 2.5배가량 적게 나타났고, 조섬유는 약 1.5배가량 높게 나타나, 지역, 품종 및 재배방법에 따라 일반성분의 함량이 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 일반성분 분석의 결과를 종합해 보면, 병풀은 탄수화물, 조단백 및 조회분을 다량 함유하고 있어 좋은 식품 소재가 될 것으로 사료된다.

2. 건조방법별 병풀의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성
건조방법을 달리한 병풀 추출물 5종의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성은 Table 2에 나타내었다. 페놀성 화합물은

flavonoids, anthocyanins 등을 총칭하며 식물체에 널리 존재하는 2차 대사산물로, 분자 내 다수의 phenolic hydroxyl기를 가지고 있어 효소 단백질 등의 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성으로 항산화 효과 및 항암, 항염증 효과를 갖는 인체에 대한 유용한 생리활성 물질로 널리 보고되고 있다(Cha 등 1999). 본 실험에서 건조방법별 병풀 추출물의 총 폴리페놀 함량은 냉풍건조가 16.36 GAE mg/g으로 유의적으로 가장 높았으며, 75°C에서 열풍건조는 7.75 GAE mg/g으로 가장 낮게 나타났다. Ariffin 등(2011)의 연구에서 병풀을 100°C에서 수분함량이 6.5%되게 건조하였을 때, 총 폴리페놀 함량이 7.3 GAE mg/g 검출되었다고 보고하였으며, 발효하거나 부분 발효한 병풀은 5.3~6.8 GAE mg/g으로 총 폴리페놀 함량이 다소 감소하였다고 보고되고 있으며, 건조 및 발효에 따라 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. Pittella 등(2009)의 연구에서 병풀을 물로 추출하였을 때 28.6 GAE mg/g 검출되었다고 보고하여 본 연구결과와는 다소 차이가 났으며, 이렇듯 총 폴리페놀 함량이 높게 검출된 것은 병풀이 가지고 있는 다양한 폴리페놀 중 gallic acid, catechin, chlorogenic acid, rutin, rosmarinic acid, quercetin, kaempferol, luteolin 및 naringin 등을 함유하기 때문이다(Ariffin 등 2011).

서로 다른 방법으로 건조한 병풀을 100배 물로 희석한 후 DPPH 라디칼 소거능 확인하였을 때, 냉풍건조가 55.07%로 유의적으로 가장 높았고, 자연건조(45.80%), 60°C 열풍건조

Table 2. Analysis of physiological activity of *C. asiatica* with different dry methods

Dry method	Total polyphenol (mg GAE/g DM)	DPPH radical scavenging activity (%)	ABTS radical scavenging activity (%)
Natural drying	10.63±0.05 ^(c1)	45.80±0.17 ^b	40.98±0.82 ^b
Cold drying	16.36±0.31 ^a	55.07±0.41 ^a	61.49±0.43 ^a
Freezing drying	9.11±0.17 ^d	27.28±0.06 ^d	38.74±0.08 ^c
Hot-air drying 60°C	11.65±0.19 ^b	35.49±0.08 ^c	38.92±0.28 ^c
Hot-air drying 75°C	7.75±0.18 ^c	21.06±0.10 ^e	31.22±0.43 ^d

¹⁾ All values represent mean±S.D.^{a-e}Values with different small letters within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

(35.49%), 동결건조(27.28%), 75°C 열풍건조(21.06%) 순으로 라디칼 소거능이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 50배 물로 희석한 병풀 추출액을 ABTS 라디칼 소거능을 분석한 결과도 유사하게 나타나 냉풍건조가 61.49%로 유의적으로 가장 높은 소거능을 나타냈고, 자연건조(40.98%), 60°C 열풍건조(38.92%), 동결건조(38.71%), 75°C 열풍건조(31.22%) 순으로 라디칼 소거능이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. Ariffin 등(2011)의 연구에서 발효시키지 않은 병풀보다 발효기간을 거친 병풀이 유의적으로 항산화능이 감소하는 경향을 보인다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 총 폴리페놀 함량 및 라디칼 소거능의 결과를 종합해 보면, 총 폴리페놀 함량과 항산화활성은 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, Zainol 등(2003)과 Shin 등(2020)의 연구에서 총 폴리페놀과 항산화능은 높은 상관관계가 있다고 보고하였으며 본 연구결과와 일치하는 것으로 보인다. 항산화 활성에 따른 건조방법은 냉풍건조가 가장 적합한 것으로 사료되며, 고온에서는 총 폴리페놀 함량 및 라디칼 소거능이 낮아지는 것으로 보아 열에 의해 활성성분이 소실되는 것으로 추정된다. 추후 추출물에 존재하는 폴리페놀 화합물을 mass spectrometry 및 HPLC를 이용하여 정성 및 정량분석을 통해 항산화활성에 따른 폴리페놀 함량의 상관관계를 밝히는 것이 필요할 것으로 사료된다.

3. 건조방법별 병풀의 triterpenoid 화합물 함량

병풀에 존재하는 주로 보고된 생리활성물질은 asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid, madecassoside 등의 terpenoid와 thankunside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid가 존재한다고 보고되고 있다(Chandrika & Prasad Kumarab 2005). 선행 연구를 통해서 asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid, madecassoside를 정량하였으며, 용매추출을 이용하여 70% 에탄올 추출하였을 때 유효성분들이 많이 검출되는 것을 확인하였으며(Shin 등 2020), 이에 따라 동일 분석조건 하에서 분

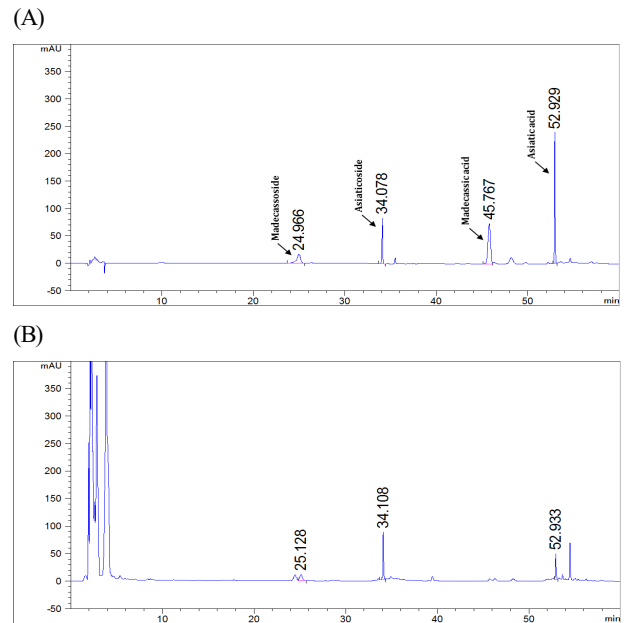


Fig. 1. HPLC chromatogram of (A) standard mixture, and (B) freezing drying extract prepared from *Centella asiatica*. Standard mixture and freezing drying extract were applied to the HPLC system at doses of 125 µg/mL and 5 mg/mL, respectively.

석을 진행하였다. Madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid를 혼합한 standard mixture의 크로마토그램은 Fig. 1A에 나타내었다. 동일 분석조건 하에서 추출물의 크로마토그램은 Fig. 1B와 같이 확인되었으며, 건조방법을 달리 한 병풀의 triterpenoid 화합물을 분석한 결과는 Table 3에 나타내었다. 5종의 병풀 추출물에 존재하는 triterpenoid 4종의 함량을 종합적으로 비교한 결과, 모든 추출물에서 asiaticoside의 함량(16.4~43.4 mg/g)이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 다음으로는 madecassoside (10.4~24.8 mg/g), asiatic acid (0.4~1.0 mg/g) 순으로 검출되었으며, madecassic acid는 검출

Table 3. Determination of major pentacyclic triterpenoids of *C. asiatica* with different dry methods

Dry method	Madecassoside (mg/g)	Asiaticoside (mg/g)	Madecassic acid (mg/g)	Asiatic acid (mg/g)	Sum (mg/g)
Natural drying	10.4	21.0	ND ¹⁾	ND	31.4
Cold drying	24.8	43.4	ND	0.7	68.8
Freezing drying	20.4	35.3	ND	0.4	56.0
Hot-air drying 60°C	18.8	20.1	ND	1.0	40.0
Hot-air drying 75°C	15.1	16.4	ND	0.7	32.3

¹⁾ Not determined.

되지 않는 것으로 확인되었다. Asiaticoside는 항균, 항진균, 피부질병, 세포보호 등 다양한 기능이 알려져 있으며 (Kwon 등 2008; Kil 등 2018) 건조 방법에 따라 가장 높게 검출되며 다양한 기능성 효과가 나타날 것으로 추정된다. 건조 방법별로 살펴보면, 4가지의 triterpenoid 총 함량은 냉풍건조(68.8 mg/g)일 때 가장 높은 것으로 나타났고, 동결건조(56.0 mg/g), 60°C 열풍건조(40.0 mg/g), 75°C 열풍건조(32.3 mg/g) 및 자연건조(31.4 mg/g) 순으로 나타났다. Rafamantanana 등 (2009)의 연구와 비교해 볼 때, 병풀의 산지에 따라 유효성분의 함량에 따른 차이가 나타나는 것으로 확인할 수 있었으며, Shin 등 (2020)의 연구에서 동결건조 70% 에탄올 추출을 이용하였을 때 4종의 triterpenoid 함량이 52.3 mg/g을 나타냈으며, 본 연구의 동결건조(56.0 mg/g)의 함량과 유사한 수준이었다. 또한, 유효성분을 추출하기 위해 다른 건조방법보다 냉풍건조가 더 적합한 것으로 나타났다. 특히 asiaticoside의 함량이 가장 높았던 냉풍건조와 75°C 열풍건조와 비교했을 때 약 3배 정도 차이가 나타났으며, asiaticoside 성분은 열에 의해 소실되는 것으로 확인되었다. Madecassoside는 다소 다른 경향이 나타났는데, 냉풍건조일때 가장 높은 함량인 24.8 mg/g이 검출되었으며, 다음으로 동결건조(20.4 mg/g), 60°C 열풍건조(18.8 mg/g), 75°C 열풍건조(15.1 mg/g) 및 자연건조(10.4 mg/g)의 순으로 나타나, asiaticoside보다 다소 열에 안정적인 것으로 나타났다. 종합적으로, asiaticoside 및 madecassoside는 병풀 추출물의 주된 활성 성분으로 기대되며 산업적으로 지표물질로 적합할 것으로 나타내었다. 추후 분석법 검증을 통해 보다 정확한 함량을 제시하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

4. 건조방법별 병풀의 항염증 활성

그람 음성균의 세포벽 성분인 LPS로 염증 모델을 형성한 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 염증 유발 물질인 TNF- α , IL-6, MCP-1 및 NO의 생성에 건조방법을 달리한 병풀 추출물 5종의 미치는 영향을 확인하고 이에 따른 항염증 소재로의 활용가능성을 평가하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성이 없는 농도범위를 확인한 결과, 건조방법을 달리한 병풀 추출물 5종은 1~100 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 105% 이상의 세포 생존율을 보였다(Fig. 2A). 특히, 냉풍건조 한 시료의 1~100 μ g/mL의 농도에서 LPS 대조군 대비 통계학적으로 유의한 15.8~91.6%의 세포 증식활성이 나타났다. Ha 등(2009)의 연구에서 인간 정상 섬유아세포인 CCD-986sk에 대한 세포독성을 확인하였을 때 최대 투여농도인 1.0 mg/mL의 농도에서 추출물이 정상세포의 생존율을 68% 이상임을 확인하였으며, Shin 등 (2020)의 연구에서 다양한 용매추출을 이용하였을 때 70% 에탄올 추출물이 12.5~100 μ g/mL의 농도범위

에서 LPS 대조군 대비 15.9~92.9%의 세포 증식활성을 보고 하였으며 이는 본 연구와 유사한 것으로 나타났다.

한편, TNF- α , IL-6 및 MCP-1 등은 선천적 면역반응에서 나타나는 가장 중요한 염증 매개물질로 과도하게 생성되면 전신적인 염증질환을 초래할 수 있다고 알려져 있으며(Shan 등 2009), 본 연구에서는 LPS로 염증 모델을 형성한 RAW 264.7 세포에서 각기 다른 방법으로 건조한 병풀 추출물 처리에 따른 TNF- α , IL-6, MCP-1 및 NO 억제 활성을 평가하였다. TNF- α 억제 활성은 Fig. 2B에 나타내었다. Jeon 등 (2000)의 연구에서 IL-1 β 및 염증 억제 효과로 보고된 dexamethasone(50 μ g/mL)을 양성 대조군(positive control, PC)으로 이용하였으며, LPS 대조군은 22.0 ng/mL의 TNF- α 생성능을 보였으며, PC 대조군은 LPS 대조군 대비 1.9 ng/mL(92.7%)의 억제활성을 나타내었다. 병풀 추출물 5종은 100 μ g/mL의 농도에서 7.1~18.7 ng/mL(14.9~69.0%)의 통계적으로 유의한 억제 활성이 나타났으며 냉풍건조, 자연건조 및 열풍건조 75°C는 1~100 μ g/mL의 농도범위에서 농도-의존적으로 유의한 억제활성이 나타났다. 특히, 냉풍건조는 1~100 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 7.7~18.9 ng/mL(14.2~69.0%)의 통계적으로 유의한 억제 활성이 나타났으며, 건조 방법에 달리한 추출물 중 가장 억제활성 효과가 우수한 것으로 나타났다. IL-6의 억제 활성은 Fig. 2C에 나타내었다. 양성대조군인 PC는 50 μ g/mL의 농도 범위에서 LPS 대조군(21.7 ng/mL) 대비 2.6 ng/mL(91.5%)의 유의한 억제활성을 나타내었다. 동결건조를 제외한 추출물 4종은 100 μ g/mL의 농도에서 LPS 대조군 대비 4.8~9.8 ng/mL(56.9~80.9%)의 통계적으로 유의한 억제활성이 나타났다. 자연건조 및 냉풍건조는 1~100 μ g/mL의 농도범위에서 농도-의존적인 유의한 억제활성이 나타났으며, 특히 냉풍건조는 1~100 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 4.8~18.1 ng/mL(16.8~80.9%)의 우수한 억제활성 효과를 나타내었다. 케모카인의 일종인 MCP-1의 억제활성은 Fig. 2D에 나타내었으며, 양성대조군은 PC는 50 μ g/mL의 농도에서 LPS 대조군(17.7 ng/mL)대비 2.2 ng/mL(91.4%)의 억제활성을 나타내었다. 자연건조, 냉풍건조 및 열풍건조 75°C는 100 μ g/mL의 농도에서 LPS 대조군 대비 8.1~10.9 ng/mL(40.0~56.5%)의 억제 활성을 나타내었다. 특히, 냉풍건조는 10~100 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 농도-의존적으로 유의한 8.2~14.2 ng/mL(20.4~56.1%)의 우수한 억제 활성을 나타내었다. 마지막으로 산화질소(nitric oxide, NO) 억제활성은 Fig. 2E에 나타내었다. Jeon 등(2008) 및 Lee & Kang(2020)은 NO의 발생기전은 다양하게 나타나며 염증성 cytokine과 관련이 있고 산화질소는 세포손상을 유도하여 염증과 관련되어 있다고 보고되고 있어 주요한 염증지표로 나타나고 있다.

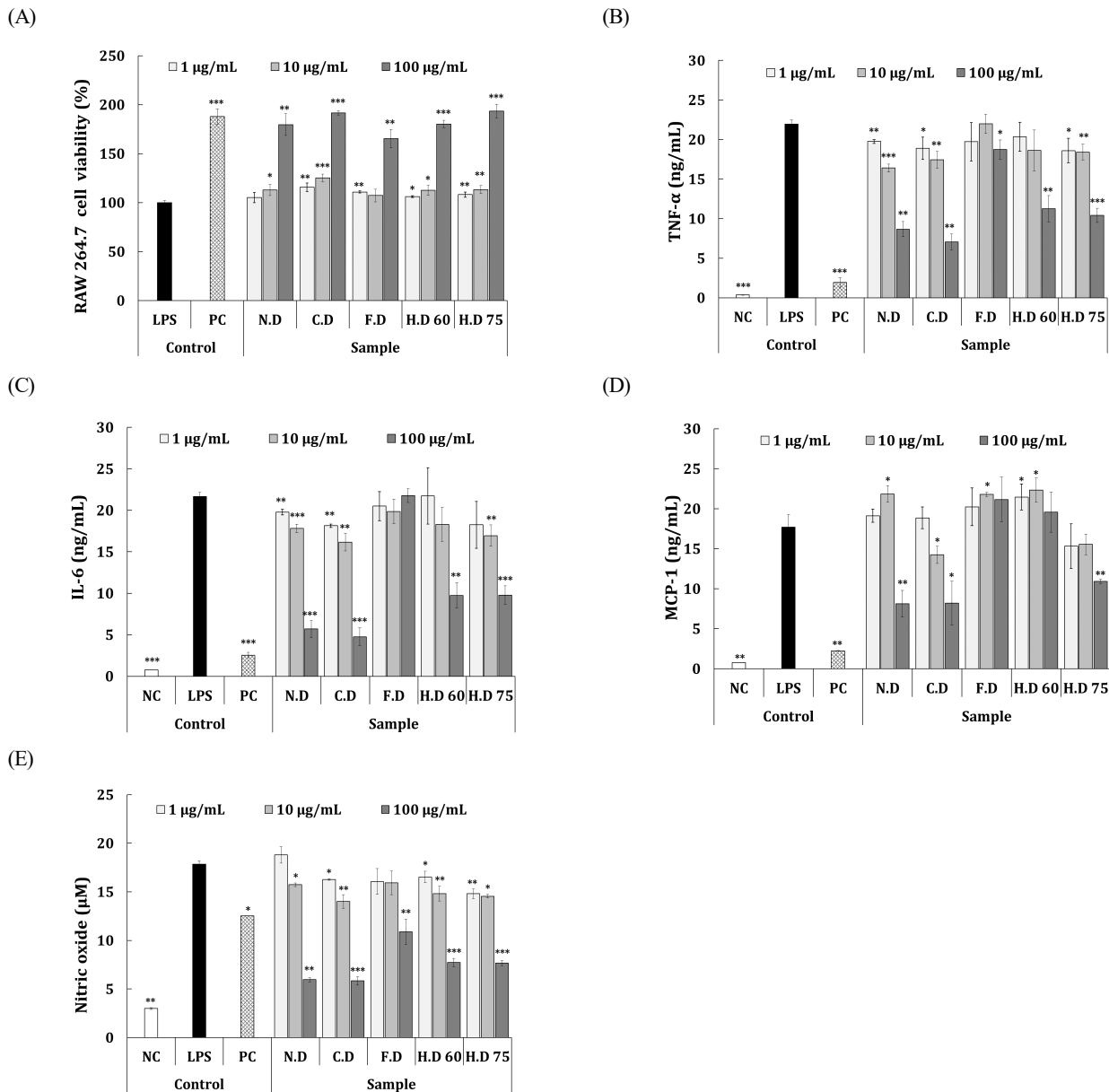


Fig. 2. Anti-Inflammatory activities of *Centella asiatica* with different dry methods. RAW 264.7 macrophage cells were treated with each sample followed by LPS treatment for 24 hr, and the viability (A) and production of TNF-α (B), IL-6 (C), MCP-1 (D) and nitric oxide (E) were estimated. Only medium was used as negative control (NC). A dexamethasone (50 µg/mL) for TNF-α, IL-6, MCP-1 and N-nitroarginine methyl ester (L-NAME; 50 µg/mL) for NO experiments were used as positive control (PC), respectively. Asterisks mean a significant difference between LPS-treated group (LPS) treated with only LPS (1 µg/mL) and each group by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

양성대조군인 PC인 N-nitroarginine methyl ester(L-NAME)는 50 µg/mL의 농도에서 LPS 대조군(17.8 µM) 대비 12.5 µM (35.7%)의 통계적으로 유의한 억제활성을 나타내었다. 추출물 5종은 100 µg/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 5.8~10.9 µM(46.8~80.9%)의 통계적으로 유의한 억제활성을

나타냈다. 냉풍건조, 열풍건조 60°C 및 75°C는 1~100 µg/mL의 농도 범위에서 LPS 대조군 대비 농도-의존적인 유의한 억제활성이 나타났으며, 특히 냉풍건조는 1~100 µg/mL의 농도 범위에서 5.8~16.3 µM(10.5~80.9%)의 통계적으로 유의한 억제 활성을 나타내었다. RAW 264.7 세포의 항염증 활성을

종합했을 때, 건조방법을 달리한 병풀 추출물 중 냉풍건조가 다양한 마커에서 가장 억제 활성이 우수한 것으로 나타났고, 동결건조 경우는 다소 낮은 억제활성을 보였다. Goo 등(2018) 및 Shin 등(2020)의 연구에 의하면 추출물의 항염증 활성을 조사한 결과, 염증 유발한 대식세포의 염증성 cytokine(TNF- α , IL-6) 뿐만 아니라 NO 생성이 억제되었다고 보고되고 있으며 본 연구와 유사한 것으로 나타났다. 본 연구를 통해 냉풍건조가 최적의 건조방법을 설정하였으며, 최적 건조 방법을 통해 용매추출을 이용하여 항염증 활성을 평가하는 것이 필요로 할 것으로 판단된다.

결과적으로 건조 방법을 달리한 병풀은 항산화 및 항염증 활성소재로서 이용 가능성을 확인할 수 있었으며, 특히 냉풍건조가 항산화 및 항염증 활성에 적합할 것으로 사료된다. 원료 표준화를 위한 병풀 추출물의 지표성분은 asiaticoside 및 madecassoside가 적합할 것으로 나타났으며, 본 연구를 통해 건조방법에 따른 생리활성 및 활성성분이 미치는 영향을 파악하였으며, 수입산 병풀을 대체하고 지역농산물 이용 확대에 기여하고자 하였다. 기능성 효과가 뛰어나 사용이 증가하고 있는 병풀을 건조방법별로 활성 및 성분을 분석하였을 때, 냉풍건조가 다른 건조방법에 비해 항산화 및 항염증 활성이 우수하고 성분의 함량이 높은 것으로 나타나 산업적으로 활용가능성이 높은 것으로 나타났다. 기존에 생리활성 유지가 가장 우수하다고 알려진 동결건조에 비해 냉풍건조를 하였을 때 우수한 것으로 나타났으며, 고비용의 동결건조보다 저비용의 냉풍건조로 건조 시 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요약 및 결론

최근 피부재생효과가 뛰어나 의학 및 화장품 원료로 주목을 받고 있는 병풀의 식품 소재화 활용하기 각기 다른 방법으로 건조한 병풀의 일반성분, 항산화 효과 및 70% 에탄올 병풀 추출물로부터 지표성분의 함량과 항염증 활성을 알아 보았다. 건조방법을 달리한 병풀의 일반성분은 탄수화물, 조단백 및 조회분, 조섬유를 다량 함유하고 있었고, 조섬유의 경우는 건조방법별 유의적인 차이는 없었다. 건조방법별 병풀의 총 폴리페놀 및 항산화 활성은 냉풍건조가 가장 우수한 것으로 나타났으며, LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 대한 항염증 활성의 결과를 종합했을 때, 냉풍건조가 다양한 바이오 마커에서 다른 추출물에 비해 가장 억제 활성 효과가 우수한 것으로 나타났다. 또한, 병풀에 존재하는 주요 생리활성 물질로 알려진 triterpenoid 화합물을 분석한 결과, 모든 건조방법에서 asiaticoside가 가장 높은 함량을 가진 것으로 나타났으며, 4가지 지표성분의 총 함량은 냉풍건조가

68.8 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타냈다. 결과적으로 냉풍건조가 병풀 시료에서 가장 높은 triterpenoid 함량을 보였으며 유의적으로 우수한 항산화 및 항염증 활성을 나타내어 최적의 건조방법임을 확인할 수 있었다. 또한, 이는 비용적인 측면에서 경제적이며 산업적으로도 활용 가능성이 높은 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01528507)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Amerine MA, Ough CS. 1980. Methods for Analysis of Musts and Wine, Wiley Sons, pp. 176-180
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. p.342. Association of Official Analytical Chemists
- Ariffin F, Chew SH, Bhupinder K, Karim AA Huda N. 2011. Antioxidant capacity and phenolic composition of fermented *Centella asiatica* herbal teas. *J Sci Food Agric* 91:2731-2739
- Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. 2013. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatol Alergol* 1:46-49
- Bylka W, Znajdek-Awizeń P, Studzińska-Sroka E, Dańczak-Pazdrowsk A, Brzezińska M. 2014. *Centella asiatica* in dermatology: An overview. *Phytother Res* 28:1117-1124
- Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. 1999. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28:1310-1315
- Chandrika UG, Prasad Kumarab PAAS. 2015. Gotu Kola (*Centella asiatica*): Nutritional properties and plausible health benefits. *Adv Food Nutr Res* 76:125-157
- Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:723-727
- Goo YM, Kil YS, Sin SM, Lee DY, Jeong WM, Ko K, Yang K, Kim YH, Lee SW. 2018. Analysis of antibacterial, antiinflammatory, and skin-whitening effect of *Centella asiatica* (L.) Urban. *J Plant Biotechnol* 45: 117-124
- 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
- Jeon HJ, Kang HJ, Jung HJ, Kang YS, Lim CJ, Kim YM, Park EH. 2008. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J Ethnopharmacol* 115:82-88
- 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. *Immunopharmacology* 48: 173-183
- 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 AR, Lee HJ, Jung HO, Lee JJ. 2014. Physicochemical composition of ramie leaf according to drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:118-127
- Kim OT, Kim MY, Park YJ, Hong MH, Ahn JC, Oh MH, Hwang B. 2002. Production of triterpene glycosides from whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Korean J Plant Biotechnol* 29:281-285
- Kwon MC, Han JG, Ha JH, Oh SH, Jin L, Jeong HS, Choi GP, Hwang B, Lee HY. 2008. Immuno-regulatory effect on *Centella asiatica* L. Urban extraction solvent associated with ultrasonification process. *Korean J Med Crop Sci* 16:294-300
- Lee JM. 2016. Physicochemical and antioxidant properties in *Allium hookeri* by hot air- and freeze-drying methods. *Korean J Food Preserv* 23:57-62
- Lee YH, 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
- Ministry of Food and Drug Safety. 1998. List of food ingredients. Available from <http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/foodMaterial/foodMaterialDB.do> [cited 8 February 2021]
- Mohd Razali NN, Ng CT, Fong LY. 2019. Cardiovascular protective effects of *Centella asiatica* and its triterpenes: A review. *Planta Med* 85:1203-1215
- Ogunka-Nnoka CU, Igwe FU, Agwu J, Peter OJ, Wolugbom PH. 2020. Nutrient and phytochemical composition of *Centella asiatica* leaves. *Med Aromat Plants* 9:1-7
- 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, Raoelison GE, Cheuk K, Ratsimammanga 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
- Roberty R, Anna P, Anna P, Catherine RE, Min P, Icoletta P. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26:1231-1237
- Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9:1042-1048
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim JE, Lee KH, Bae YJ, Yu KW. 2020. Bioactive compounds, anti-oxidant activities and anti-inflammatory activities of solvent extracts from *Centella asiatica* cultured in Chungju. *Korean J Food Nutr* 33:692-701
- 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 19 February, 2021

Revised 04 March, 2021

Accepted 15 March, 2021