과제구분	기관고유	수행시기		전반기	
연구과제 및 세부과제		연구분야	수행기간	연구실	책임자
천연물을 이용한 기능성 소재 탐색 및 개발		농식품자원	'12~'14	농업기술원 환경농업연구과	원 선 이
다육식물의 기능성분 탐색 및 소재화		농식품자원	'13	농업기술원 환경농업연구과	소 호 섭
색인용어	천연물, 다육식물, 기능성				

ABSTRACT

This study was examined to investigate the anti-inflammatory and antioxidant effects of Opuntia ficus-indica P.Miller(OF), Sedum sarmentosum Bunge(SS). Sedum kantschaticum Fischer(SK), Sedum orbiculatum Linne(SO) extract to make a natural wound treatment.

The in vitro antioxidant activity, the half maximal inhibitory concentration of SK extract having high level of polyphenolic compound and vitamin C was the highest(0.6mg/ml) of them. But the total flavonoid contents was the highest in SO extract.

For the simple evaluation of anti-inflammatory activity, the half maximal inhibitory concentration of SK and SO extract in 50% EtOH on the production of NO by RAW264.7 cells in the presence of LPS was 9.2ug/ml and 24.1ug/ml, respectively. But SO ethanol extract showed the cytotoxic activity in 200ug/ml concentration.

Key words : Natural substance, Succulents, Functionality

1. 연구목표

다육식물은 식물체의 줄기나 잎이 수분을 많이 함유하고 있는 저수(貯水)조직이 발달된 식물로써 항염효과, 항산화활성이 높고 부종 및 화상치료제에 효과가 있는 식물로 알려져 있어 기능성에 대한 유효성분을 이용한 식의약 소재 개발이 요구되어진다.

특히 보검(Opuntia ficus-indica P.Miller)은 폴리페놀(polyphenol), 플라보노이드(flavonoid) 함량이 높고 사포닌, 다당체가 있어 항균 및 항산화 활성이 높으며, 돌나물(Sedum sarmentosum Bunge)은 섬유질이 적고, 비타민 C와 인산이 풍부하여 식욕촉진, 담석증 및 고혈압 예방, 간염 치료에 효과적으로 알려져 있으며, 기린초(Sedum kantschaticum Fischer)와 꿩의비름(Sedum orbiculatum Linne)은 폴리페놀과 플라보노이드 성분 함량이 높다고 알려져 있다.

따라서 본 연구는 보검, 돌나물, 기린초 및 꿩의비름등 다육식물의 항염 및 항산화 활성을 조사하고 기능성 성분을 구명하여 피부재생 효과가 있는 피부외용제를 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료 조제 및 일반성분 분석

보검은 경기도 고양시 선인장연구회에서, 돌나물, 기린초 및 꿩의비름은 경기도 소재 농원에서 구입하여 본원 연구온실에서 삽목증식하여 시험재료로 사용하였다. 일반성분은 시료 일정량을 500℃ 회화로에 회화시켜 얻은 회분에 염산용액($HCl:H_2O$=1:1)으로 50ml가 되게 정량한 후 발광플라즈마 분석기(Optima 8300, Perkinelmer)를 사용하여 무기성분을 측정하였다. 생시료 1kg을 동결건조한 후 분쇄기로 분말화한 다음 아미노산 자동분석기(Hitachi, L-8900)에 의한 시료의 가수분해 과정을 통하여 아미노산 함량을 분석하였다.

나. 총폴리페놀 함량

동결 건조한 분쇄시료 0.5g을 70% EtOH 용매 15ml를 넣고 30분간 진탕 후 10분간 원심분리하여 종이여과지(No.2)로 3회 추출한 다음 최종부피를 50ml로 정용한다. EtOH 추출물 100ul에 2% Na_2CO_3 2ml를 가하고 vortex한 후 2분간 방치한다. 50% Folin-Ciocalteau's phenol reagent 100ul를 첨가하고 vortex하여 30분간 방치한 다음 750nm에서 흡광도를 측정한다. 표준물질로 tannic acid 0.5g/100ml을 정용하고 10배 희석한 용액(0, 50, 100, 200, 300, 500mg/L)을 standard stock으로 사용하였다. 시료 중 총 폴리페놀 함량 계산식은 다음과 같다. 검량선 Y= aX + b (X : 분광법으로 측정한 흡광도, Y : 분광광도계로 주입된 표준용액의 농도(ppm, ug/ml))이며, 시료 중 총 폴리페놀 함량(ug/g) = Y' × V/S (Y' : 표준물질로 구한 검량선에 대립하여 얻은 Y값(ppm), V : 추출용매(70% EtOH)의 총 부피(ml), S : 추출시료의 무게(g))로 계산하였다.

다. 총플라보노이드 함량

동결 건조한 분쇄시료 0.5g을 취해 70% EtOH 용매 15ml를 넣고 30분간 진탕 후 10분간 원심분리 하여 종이여과지(No.2)로 3회 추출한 다음 최종부피를 50ml로 정용한다. 시험관에 Diethylene Glycol 2ml와 시액 1ml를 취해 잘 혼합한다. 혼합액에 1N NaOH 20ul를 가하고 다시 잘 혼합한다. 혼합액을 37℃ 항온수조에서 1시간 방치한 후 420nm에서 흡광도를 측정하였고 standard calibration curve는 naringin의 농도가 0~0.5mg% 범위가 되도록 제조한 표준용액으로 검량선을 구하여 성분함량을 산출하였다.

라. 항산화활성

항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl- 2-picryl hadrazyl) free radical 소거능으로 분석하였다. EtOH 추출물 350μl에 시료 75ul를 처리한 후 0.15mM DPPH in EtOH 용액 325μl를 넣고 섞는다. 반응물을 호일로 빛을 차단하여 4℃에서 30분 동안 반응한 후 520nm에서 흡광도를 측정하고, blank는 시료용매를 사용하였다. 대조구로는 ascorbic acid를 사용하여 비교하였으며 전자공여 효과는 시료 첨가구와 첨가하지 않은 경우의 흡광도를 백분율로 나타내었다. Electron donating ability(%) = [1−(A/B)] × 100 (A: Absorbance of sample, B: Absorbance of blank).

마. 항염활성

항염활성은 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원방법에 의한 superoxide anion radical 소거능으로 분석하였다. 시료 10g을 삼각플라스크에 넣고 증류수 100㎖를 첨가후 100℃에서 3시간 환류냉각하여 물 추출물을 조제하였고, 80% EtOH 100㎖를 첨가후 80℃에서 3시간 환류냉각하여 알콜 추출물을 조제하였다. 0.6mM hypoxanthin, 1mM EDTA, 0.2mM NBT를 함유하는 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 160μl에 각각의 추출물을 20μl를 첨가하고, xanthine oxidase(100mU/ml)을 20μl씩 가하여 반응시킨 후, 반응 혼합액을 37℃에서 약 20분간 반응 이후 612nm의 흡광도에서 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 자유라디칼 소거활성은 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(IC_{50})값을 계산하였다.

바. 동물 세포배양 및 NO활성

한국세포주은행에서 구입한 마우스 유래 macrophage cell line인 Raw 264.7 cell은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% FBS, 100U/ml penicillin 및 100 ug/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배양후 염증을 유발하는 LPS(lipopolysaccharide) 1ug/ml와 시료를 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200ug/ml 처리하여 24시간 배양한 다음 96 well plate에 100ul 씩 분주하였다. Nitric Oxide detection kit의 substrate solution N1 buffer 50ul를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응한 다음 coloring solution N2 buffer 50ul를 다시 처리하고 10분 반응후 540nm에서 흡광도를 측정하여 NO(Nitric Oxide) 생성 정도를 계산하였다.

사. 세포독성

식물 추출물을 24시간 처리한 Raw 264.7 cell에 20ul(500ug/ml) MTT(tetrazolium salt) 시약을 배지에 넣어준 다음 37℃, 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양하였다. Suction 및 washing후 200ul의 DMSO를 첨가하여 세포를 용해한 다음 37℃ CO_2 incubator에서 20분 반응후 560nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

항염효과 및 항산화 활성이 있는 다육식물에 대하여 기능성 유효성분을 이용한 피부 외용제를 개발하고자 식물 재료별 일반성분과 미량성분을 분석한 결과 보검은 회분, Ca, Mg이, 돌나물은 K, Fe, Zn, Mn이, 기린초는 N, Na, Cu가, 꿩의비름은 P, B 성분이 많이 함유되었다(표 1).

표 1. 식물재료별 일반성분 및 미량성분 분석

식물재료	회분 (%)	N (g/kg)	P (g/kg)	K (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	Na (g/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	B (mg/kg)
보 검	26.8	10.5	2.0	43.2	48.5	18.6	0.1	33.9	70.5	98.4	4.8	13.8
돌 나 물	22.1	32.0	3.9	58.2	36.3	7.6	0.3	117.9	135.0	176.6	11.3	10.2
기 린 초	18.8	35.6	3.8	39.3	37.8	5.6	5.2	57.9	30.5	77.4	12.8	19.1
꿩의비름	14.2	17.5	4.6	32.7	28.0	4.3	1.6	38.6	25.4	76.2	4.0	34.7

식물 재료의 아미노산 함량은 기린초가 aspartic acid, threonine, serine, cysteine, methionine, tyrosine, lysine이, 꿩의비름은 glutamic acid, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine, arginine이 가장 많이 함유되었다(표 2). 정 등(2004)은 보검 등 Opuntia속 다육식물은 glutamic acid와 lysine 함량이 많다고 보고하였지만 기린초와 꿩의비름이 보검과 돌나물보다 아미노산 함량이 많았다.

표 2. 아미노산 분석 (단위 : mg/kg)

식물재료	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	NH3	His	Arg	Total
보 검	178	172	104	232	141	142	8	104	20	66	119	25	55	102	470	26	58	2,021
돌 나 물	316	306	132	483	329	317	8	245	15	155	317	5	119	210	1,493	54	138	4,643
기 린 초	475	461	257	634	447	431	9	317	60	193	408	56	192	332	1,227	77	199	5,775
꿩의비름	440	426	211	662	489	484	8	365	39	218	479	15	201	328	1,506	82	221	6,174

식물체 생리활성과 항산화 활성을 분석한 결과 기린초는 폴리페놀 27.8mg/g, 비타민 C 1.56mg/100g으로 함량이 매우 높았고 DPPH 라디칼 50% 소거능이 0.6mg/ml으로 가장 우수하였다. 꿩의비름은 플라보노이드 함량이 19.7mg/g으로 처리구에서 가장 높았다(표 3).

표 3. 생리활성 및 항산화활성

식물재료	수분함량 (%)	총폴리페놀 (mg/g)	총플라보노이드 (mg/g)	DPPH IC_{50} (mg/ml)	비타민 C (mg/100g)
보검	94.5	13.3 c	4.3 d	18.2	1.06
돌나물	96.7	18.5 b	16.9 b	3.0	1.29
기린초	88.1	27.8 a	13.7 c	0.6	1.56
꿩의 비름	90.1	17.5 b	19.7 a	4.6	1.23

※ IC_{50}(The half maximal Inhibitory Concentration) : DPPH 라디칼 50% 소거농도

용매별 추출수율 및 추출물별 항염활성은 표 4와 같다. 보검은 물에서, 돌나물과 기린초 및 꿩의비름은 MeOH에서 추출수율이 각각 53.0%, 26.0%, 17.5%, 23.5%로 높았으며, NBT 활성은 보검과 돌나물이 물에서 각각 11.0, 1.9mg/ml, 기린초는 EtOH과 MeOH 추출에서 각각 0.05mg/ml, 꿩의비름은 EtOH 추출에서 IC_{50}이 0.36mg/ml으로 낮아 항염활성이 우수하였다. 보검과 돌나물은 윤 등(2012)이 손바닥 선인장 줄기를 연구한 결과와 같이 물 추출이 에탄올 추출보다 항염활성이 높게 나타났다.

표 4. 추출 용매별 수율 및 항염활성

식물재료	용매	추출수율 (%)	NBT IC_{50} (mg/ml)
보검	물	53.0	11.0
	EtOH	23.5	14.1
	MeOH	19.5	12.0
돌나물	물	16.5	1.9
	EtOH	24.5	7.1
	MeOH	26.0	8.2
기린초	물	17.0	0.62
	EtOH	14.5	0.05
	MeOH	17.5	0.05
꿩의비름	물	20.0	2.1
	EtOH	21.5	0.36
	MeOH	23.5	0.95

※ NBT(Nitroblue tetrazolium) 활성 : 50% 환원 저해농도

표 5. 동물세포에 의한 용매별 항염활성 검정

식물 재료	처리농도 (ug/ml)	Nitrite 농도(uM)			식물 재료	처리농도 (ug/ml)	Nitrite 농도(uM)		
		80℃물	100℃물	70%EtOH			50%EtOH	70%EtOH	100%EtOH
무처리		3.0	1.9	2.7	무처리		4.3	3.1	3.1
LPS	1	11.9	12.0	12.5	LPS	1	12.5	13.1	12.8
보검	2	11.9	12.1	12.4	기린초	2	9.5	10.7	10.1
“	5	11.6	11.3	11.7	“	5	8.8	9.9	7.2
“	10	11.2	11.0	11.1	“	10	5.9	9.6	6.6
“	20	9.7	11.3	10.9	“	20	2.9	7.4	6.4
“	50	10.6	10.7	10.1	“	50	2.0	5.8	5.8
“	100	10.1	10.9	10.4	“	100	2.9	6.2	4.5
“	200	10.0	10.3	10.5	“	200	2.6	5.6	4.1
무처리		4.0	3.7	3.5	무처리		3.9	4.3	3.8
LPS	1	11.2	12.8	11.8	LPS	1	12.1	11.1	11.4
돌나물	2	10.4	11.2	11.6	꿩의비름	2	10.0	9.4	9.5
“	5	9.5	11.4	11.5	“	5	9.4	9.0	8.1
“	10	9.3	11.3	10.8	“	10	7.3	7.9	8.1
“	20	8.6	10.7	10.7	“	20	6.6	8.4	7.5
“	50	8.7	10.7	10.4	“	50	5.7	7.0	8.3
“	100	8.8	10.0	9.6	“	100	5.6	5.8	8.1
“	200	8.7	10.4	9.3	“	200	5.9	6.1	7.7

동물세포에 대한 추출 방법 및 농도별 nitrite 농도 변화를 분석한 결과 보검과 돌나물은 80℃, 100℃ 물과 70% EtOH 추출물 2~200ug/ml 처리에서 LPS를 첨가한 처리에 비해 nitrite 농도가 0~2.2uM로 농도 변화가 작았다. 기린초는 50% EtOH 추출물 50ug/ml 처리에서 nitrite가 2.0uM, 꿩의비름도 50% EtOH 추출물 100ug/ml 처리에서 nitrite 5.6uM로 항염활성이 우수하였다(표 5). 또한 추출물 농도에 따라 IC_{50}을 산출한 결과 기린초는 9.2ug/ml, 꿩의비름은 24.1ug/ml으로 환산되었다.

동물 세포배양시 추출방법에 따라 세포 생존율이 다르게 나타났다(표 6). 보검과 돌나물은 100℃ 물 추출에서, 기린초와 꿩의비름은 50% EtOH 추출에서 생존율이 높았으나, 기린초 50% EtOH 추출물 200ug/ml 처리시 세포 생존율이 35.8%로 가장 낮아 기린초 추출물은 고농도에서 세포독성이 있음을 알수 있었다.

표 6. 용매별 세포독성

식물재료	처리농도 (ug/ml)	세포생존율(%)			식물재료	처리농도 (ug/ml)	세포생존율(%)		
		80℃물	100℃물	70%EtOH			50%EtOH	70%EtOH	100%EtOH
무처리		100	100	100	무처리		100	100	100
LPS	1	79.4	87.8	82.4	LPS	1	84.2	79.7	85.2
보검	20	77.3	76.3	69.8	기린초	20	86.5	68.4	62.9
“	100	75.4	77.0	55.8	“	100	58.8	44.4	49.7
“	200	69.9	79.4	53.5	“	200	35.8	45.7	44.4
LPS	1	80.0	87.1	86.5	LPS	1	86.0	83.4	85.9
돌나물	20	75.1	87.3	81.5	꿩의비름	20	85.6	75.2	82.7
“	100	74.5	73.5	81.6	“	100	83.3	76.1	85.8
“	200	66.6	72.1	70.4	“	200	83.3	74.2	71.2

김 등(2002)은 돌나물이 혈중 콜레스테롤 함량을 감소시켜 순환계질환의 위험도를 낮출수 있다고 보고하였으나 항염활성은 기린초와 꿩의비름보다 낮았다. 기린초는 항혈전 활성(손 등, 2004)뿐만 아니라 항염활성도 우수하지만 세포독성이 있는 단점이 있다. 그래서 세포독성이 없으며 항염활성이 우수한 피부외용제를 개발하기 위해서는 50% EtOH로 추출한 꿩의비름이 양호하다고 사료된다.

4. 적 요

항염효과 및 항산화 활성이 있는 다육식물에 대하여 기능성 유효성분을 이용한 피부외용제를 개발하고자 시험한 결과는 다음과 같다.

가. 식물체 분석결과 보검은 회분, Ca, Mg이, 돌나물은 K, Fe, Zn, Mn이, 기린초는 N, Na, Cu가, 꿩의비름은 P, B 성분이 많이 함유되었으며, 아미노산은 기린초가 Asp, Thr, Ser, Cys, Met, Tyr, Lys이, 꿩의비름은 Glu, Gly, Ala, Val, Ile,

Leu, Phe, His, Arg이 가장 많이 함유되었다.

나. 생리활성 및 항산화활성은 기린초가 총폴리페놀과 비타민 C 함량이 높아 항산화활성이 높았으며, 꿩의비름은 총플라보노이드 함량이 가장 높았다.

다. 보검은 물에서, 돌나물과 기린초 및 꿩의비름은 MeOH에서 추출수율이 높았으며, 보검과 돌나물은 물에서, 기린초는 EtOH과 MeOH 추출에서, 꿩의비름은 EtOH 추출에서 항염활성이 높았다.

라. 보검과 돌나물은 200ug/ml까지 동물세포에 대한 항염활성은 없었으며, 50% EtOH 추출물에서 기린초와 꿩의비름의 IC_{50}이 각각 9.2, 24.1ug/ml으로 항염활성이 가장 높았다.

마. 동물 세포배양시 보검, 돌나물과 꿩의비름은 200ug/ml까지 세포독성이 없었으며, 기린초 50% EtOH 추출물에서 세포 생존율이 낮아 세포독성이 있었다.

5. 인용문헌

김원희. 배송자. 김미향. 2002. 돌나물이 난소 절제한 흰쥐의 혈중 지질 함량에 미치는 영향. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(2):290-294.

선인장연구회. 2008. 선인장 추출물을 함유하는 비독성, 항산화 및 항비만 활성을 가지는 건강식품 조성물과 이의 제조방법. 출원번호 10-2008-0130097

손호용. 권윤숙, 김영숙, 권하영, 권기석, 김경재, 권정숙, 손건호. 2004. 약용 및 야생식물로 부터 트롬빈 저해물질 탐색. 생약학회지. 35(1):52-61

윤민선, 유재수, 이근광, 김명곤. 2012. A study on biological activities of Opuntia humifuca cladode extraacts. J Appl Biol Chem. 55(2):117-121

정재운. 조창휘. 홍승민. 이정진. 김순재. 서동빈. 박인태. 2004. 선인장 다육식물 유용물질 탐색. 2003년도 시험연구보고서. 785-792

6. 연구원 편성

세부과제	구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도 '13
다육식물의 기능성분 탐색 및 소재화	**책임자**	**환경농업 연구과**	**농업연구사**	**소호섭**	**세부과제 총괄**	**○**
	공동연구자	농업기술원	농업연구사	김대균	분석조사	○
		〃	〃	김정한	자료조사	○
		〃	농업연구관	원선이	방향설정	○
		〃	〃	주영철	연구자문	○