



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

붓순나무 추출물의  
세포독성 및 항산화 효과

Cytotoxicity on cell and Antioxidant Activity  
of *Illicium anisatum* L. extract

濟州大學校 大學院

農學科

崔 固 峰

2017年 8月

붓순나무 추출물의  
세포독성 및 항산화 효과

指導教授 宋 昌 吉

崔 固 峰

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

2017年 6月

崔固峰의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 (印)

---

委 員 (印)

---

委 員 (印)

---

濟州大學校 大學院

2017年 6月

# 목 차

LIST OF TABLE .....	i
LIST OF FIGURE .....	ii
ABSTRACT .....	iv
I. 서언 .....	1
II. 연구사 .....	3
III. 재료 및 방법 .....	5
1. 실험재료 .....	5
2. 항균실험 .....	7
3. Phenol 함량 분석 .....	7
4. Flavonoid 함량 분석 .....	8
5. ABTS radical 소거능 .....	8
6. DPPH radical 소거능 .....	9
7. MTT assay .....	9
IV. 결과 .....	10
1. 붓순나무 추출물 및 분획물의 수율 .....	10
2. Phenol 검량 분석 .....	11
3. Flavonoid 검량 분석 .....	12
4. 항미생물 평가 .....	13
5. 세포독성 평가 .....	15
1) Raw 264.7 cell 평가 .....	15
2) HaCat cell 평가 .....	17
6. ABTS radical 소거능 .....	19
7. DPPH radical 소거능 .....	23
V. 고찰 .....	27
VI. 적요 .....	31
인용문헌 .....	32

# LIST OF TABLES

Table 1. Yield extract and Fraction from <i>Illicium anisatum</i> L. ....	10
Table 2. The result of ABTS radical scavenging in <i>Illicium anisatum</i> L. leaf .....	20
Table 3. The result of ABTS radical scavenging in <i>Illicium anisatum</i> L. trunk .....	22
Table 4. The result of DPPH radical scavenging in <i>Illicium anisatum</i> L. leaf .....	24
Table 5. The result of DPPH radical scavenging in <i>Illicium anisatum</i> L. trunk .....	25

# LIST OF FIGURES

Fig. 1. <i>Illicium anisatum</i> L. ....	5
Fig. 2. Solvent fractionation of <i>Illicium anisatum</i> L. ....	6
Fig. 3. Total phenolic compounds of <i>Illicium anisatum</i> L. ....	11
Fig. 4. Total phenolic compounds of <i>Illicium anisatum</i> L. ....	12
Fig. 5. Colony diameter of fungi taxa grown in PDA medium with various concentrations Of <i>Illicium anisatum</i> L. extracts .....	14
Fig. 6. Effects of <i>Illicium anisatum</i> L. leaf extracts on of RAW264.7 cell .....	16
Fig. 7. Effects of <i>Illicium anisatum</i> L. trunk extracts on of RAW264.7 cell .....	16
Fig. 8. Effects of <i>Illicium anisatum</i> L. leaf extracts on of HaCat cell .....	18
Fig. 9. Effects of <i>Illicium anisatum</i> L. trunk extracts on of HaCat cell .....	18
Fig. 10. The result of ABTS radical scavenging in <i>Illicium anisatum</i> L. leaf according to different concentration of Organic solvent extract and Fraction .....	20

Fig. 11. The result of ABTS radical scavenging in *Illicium anisatum*  
L. trunk according to different concentration of Organic  
solvent extract and Fraction ..... 22

Fig. 12. The result of DPPH radical scavenging in *Illicium anisatum*  
L. leaf according to different concentration of Organic solvent  
extract and Fraction ..... 24

Fig. 13. The result of DPPH radical scavenging in *Illicium anisatum*  
L. trunk according to different concentration of Organic  
solvent extract and Fraction ..... 25

## ABSTRACT

This study was implemented to investigate the cytotoxicity and antioxidant functionality of *Illicium anisatum* L natural product. The purpose of this study is to provide the basic data for developing how to utilize *Illicium anisatum* L native to Jeju Island, South Korea and natural product-derived antioxidant.

As a result of mycete hyphal growth experience, it was found that the higher the concentration of *Illicium anisatum* L hot water extract, the more the hyphal growth was inhibited. With regards to ABTS radical scavenging ability, it was found that the leaves showed over 50% antioxidative effect in n-butanol fraction at 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration; and branches, antioxidative effect higher than BHT in 70% ethanol, chloroform, ethyl acetate, n-butanol fractions. In regards to DPPH radical scavenging ability, the leaves were found to have over 50% antioxidative effect in ethyl acetate fraction at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration; and branches, oxidative effect higher than BHT in n-butanol, and ethyl acetate fractions at 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration.

As a result of phenol examination, the leaves showed the highest amount of chloroform, followed by 70% ethanol, and ethyl acetate in order. In the branch extract, n-butanol and ethyl acetate fractions were found in large amount each. Both leaves and branches showed high amounts of flavonoids in n-butanol and ethyl acetate fractions.

Cytotoxicity examination found no cytotoxicity in HaCat cell of leaf and branch hot water extracts at 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. The 70% ethanol extract was found to have no cytotoxicity in leaves at 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration and branch at 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In raw 267.7 cell, the leaf and branch hot water extracts showed no toxicity at 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The 70% ethanol extract had no cytotoxicity in leaves at 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and branches at 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



Based on the findings above, it seems that some specific ingredients of phenol and flavonoids contained in *Illicium anisatum* L ethyl acetate fraction help affect mycete growth and antioxidative ability. Moreover, *Illicium anisatum* L cytotoxicity was not found in HaCat cell and Raw 267.7 cell under a certain concentration level, indicating the possibility to be utilized as a natural antioxidant to replace the synthesized antioxidant, BHT.

## I. 서 언

붓순나무(*Illicium anisatum* L.)는 진도, 완도 및 제주도에서 자생하는 상록활엽 소교목으로 해발 700m 이하의 산지에서 자라며 내한성이 약한 수종으로 연평균 기온이 12℃ 이상인 전라도와 경상도 남부지역에서만 생육이 가능하다. 바위틈이나 다소 습기가 적은 곳에서 잘 자라며 햇빛이 강한 곳 보다는 약간 그늘진 곳에서 잘 자라는 수종이다(손 등, 2007). 제주도에서는 동쪽지역에 있는 채오름, 까끄레기오름 주변의 하천(천미천의 상류), 서검은오름에 자생하고 있다(송 등, 2005). 붓순나무는 관상, 약용 및 향료로 쓰이고 사계절 푸른 잎을 갖는 상록수이며 꽃의 향기가 좋아 남부지방에서는 정원수나 공원수로 적합한 나무이다. 나무껍질은 혈액응고 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 향료로도 사용하고 있다(신, 2009). 중국의학에서는 오랫동안 유독 약물로 알려져 왔으며 내부적으로 복용하거나 결막에 바르지 않도록 지시하고 있다(Chen, 1912).

화장품과 생활용품 시장에서도 천연물 소재에 대한 요구가 높아져 약초를 소재로 한 화장품, 목욕용품 등의 제품이 증가하고 있는데 우리 고유의 약초를 이용한 기능성 화장품, 생활용품 시장은 서양의 허브와 달리 약리작용이 강하여 새로운 틈새시장 창출이 가능하다(정, 2012). 천연물의약품 시장은 국제보건기구(WHO)에 따르면 600억 달러 이상의 가치를 가진 다고 밝혔으며, 실제로 현재의약시장에서의 천연물 의약품의 연간 판매액은 400억 달러에 매년 평균 15% 이상의 성장률로 발전하고 있으며, 국내 천연물 시장을 살펴보면 천연물의약품 약 4,000억원, 천연물공산품 5,000억원 등을 포함하여 건강과 관련된 천연물 소재 시장은 10조원을 상회할 것이라고 한다(최, 2007).

민간에서 오랫동안 약재로 사용해 오던 식물들의 생리활성들이 피부과학적으로 입증되면서 그 식물들로부터 유효성분을 농축하거나 분리하여 화장품 등에 이용되고 있다. 또한 기능성 화장품의 출현으로 소비자들의 인식도 높아져 피부의 생리활성을 향상시켜 주는 천연원료를 첨가하여 미백, 주름개선 등의 효과를 나타내는 제품들도 많이 개발되어 왔다. 하지만, 전 세계 39여만 종의 식물 가운데

연구가 진행되어 온 것은 5% 정도에 불과하다. 이것을 고려하면 앞으로도 이를 이용한 생리활성물질의 연구 및 개발이 더 필요함은 물론, 매우 높은 부가가치를 생산하는 산업으로 자리매김 할 것으로 예상된다(김, 2004).

오늘날 세계 의학계는 인류의 질병 중 90%정도는 활성산소와 관련돼 있는 것으로 보고 있다. 각종 암은 물론 심근경색, 동맥경화, 뇌졸중, 고혈압, 당뇨병, 감염 등 다양한 질병에 활성산소가 직·간접적으로 영향을 미친다(황, 2007).

‘좋은 산소’로 알려진 triplet oxygen( $^3\text{O}_2$ )이 어떤 환경적 요인(대사, 또는 외부의 도전)에 의해서 singlelet hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )로 변화되며, 이것이 다시 전자 ( $e^-$ )를 받아 hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ) 등의 생체에 유해한 ‘나쁜 산소’라고 하는 활성산소가 생성된다(최, 1998). 이들 활성산소를 Oxygen radical, free radical, oxygen free radical 또는 reactive oxygen species(ROS)이라고 부르고 있다(최, 1998).

활성산소 발생 정도에 대한 항산화능의 유도가 미치지 못한다면, 체내의 활성산소 및 그 생산물에 의해 노화, 동맥경화가 진행될 것이다.(정, 1991) SOD(superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase 등과 천연 항산화제인 tocopherol, vitamins, carotenoids, catechin 및 합성 항산화제인 BHA, BHT, Trolox를 필두로 한 많은 항산화제가 개발되어 있다(오, 2002). 그러나 합성 항산화제에 대한 소비자의 기피성향과 합성 항산화제가 대량으로 투여된 동물실험에서 발암성이 보고되고 있어 합성 항산화제의 사용이 점차 제한되고 있다. 따라서 효력이 우수하고 안전한 천연물 유래의 항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다(오, 2002).

본 연구는 붓순나무 천연물의 세포독성 및 항산화 기능성에 관한 연구를 진행하여, 제주 자생식물인 붓순나무의 그 활용방안과 기초자료로 제공하기 위하여 실시하였다.

## II. 연구사

Quercetin, naringenin 및 Ginkgo ext. 는 활성 산소종에 대한 소거작용과 활성 산소 생성 효소의 활성을 저해함으로써 항산화 및 항염증 효과를 통하여 활성 산소종에 의해 유도된 paraquat 독성을 경감시키는 것으로 이들 flavonoid류는 앞으로 paraquat의 독성 경감제 개발에 유용하리라고 사료되고 있다(김, 1997).

항산화에 관련한 연구는 구지뽕나무 근피로부터 분리된 플라보노이드의 항산화 작용(이 등, 2002), 선복화의 항산화 플라보노이드 및 세포독성 세스퀴테르페노이드(류 등, 2002), 진달래꽃으로부터 분리된 플라보노이드 화합물의 항산화성에 관한 연구(김 등, 1996), 항산화 활성이 높은 구기엽 추출물 제조(김 등, 2008), 이팝나무의 항산화 및 항균활성(이 등, 2003), 국내 시판되는 일부 다류 제품의 항산화 효과(최 등, 2003) 등이 진행되어 있다.

반면 붓순나무는 국내에서 삼목 시기와 생장호르몬이 붓순나무의 발근에 미치는 영향(서, 2007), 상록활엽수 활용을 위한 환경내성평가와 증식방법에 관한 연구(최, 2013), 붓순나무 묘목을 대상으로 광도변화에 따른 생육환경 조사(손, 2006), 다른 광도에서 생육한 먼나무 붓순나무의 생리적 차이(손, 2006), 비음처리에 따른 붓순나무의 광합성, 엽록소 함량 및 엽 특성(손, 2007), 낮은 광도에서 붓순나무(*Illicium anisatum* Sieb. et Zucc.)의 생리적 특성(손, 2006) 등으로 생육에 관련한 연구에 집중되어 있다.

붓순나무는 독성이 있어 프랑스에서 유아의 떨림 또는 경련, 고장, 크리링을 가진 과다홍분성, 눈떨림 그리고 구토가 관찰되었으며(Minodier, 2003), 쥐에 붓순나무 잎 추출물을 투여하면 구토, 걸음걸이 장애 등과 같은 신경 발달과 같은 신경학적 징후가 나타나며, 2000년 3월 일본의 목장에서는 붓순나무의 표준 물질인 anisatin에 의해서 소 5마리가 신경 증상을 나타냈으며, 그중 3마리가 60시간 안에 사망하기도 하였으며(Kobayashi, 2003), *Illicium religiosum*과의 중독으로 인한 독성 경련의 발생(Caldwell, 1957)과 붓순나무의 독성 효과에 관한 연구(Langgaard, 1881) 등으로 식용이 금지되어있다.

대표적인 다른 독성이 있는 식물은 협죽도의 잎 에탄올 추출물의 Caki-1 인체 신세포암 apoptosis 유발에 관한 연구(장, 2011), NF- $\kappa$ B 활성 저해를 통한 협죽도 에탄올 추출물의 항염증 효능(김, 2010)과 천남성에서 C57BL/6N 생쥐에서 천남성 추출물과 분획물의 발모효과에 대한 실험적 연구(권 등, 2009), 천남성(天南星)이 HeLa Cell의 증식억제(增殖抑制)와 apoptosis에 미치는 영향(影響)(조 등, 2006) 및 반하의 염증성 동물 모델에서 반하 추출물의 억제효과(정, 2011), 반하 추출물이 비만쥐의 지방조직에 미치는 항비만 효과(김, 2006) 등 많은 생리활성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

붓순나무의 정유성분은 2008년 35종의 정유성분들을 확인하였으며  $\alpha$ -pinene(4.23%), methylbutenol(5.23%), 1,8-cineol(45.32%), linalool(5.23%), isopulegol(5.82%), 1methyl-3-(1-methyl-ethyl) cyclohexene(5.32%) 등의 함량이 높은 것으로 밝혀졌다(임 등, 2008).

2009년에는 붓순나무의 정유는 52개 성분이 확인되었고, 주요성분은 eucalyptol (21.8%)로 확인되었으며, 붓순나무의 정유성분은 DPPH와 anti-elastase 활성을 나타냈으며, *I. anisatum* 에센셜 오일 (IAE) IAE가 RAW 264.7 세포에서 LPS-유발 NO 및 PGE2 생산의 효과적인 억제제임을 나타내는 것으로 보고되어 있다(김, 2009).

### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 시료는 제주시 천미천 일대 자생지에서 채집하여 2주간 음건한 뒤 분쇄한 붓순나무 목질부 300g, 잎부 300g을 각각 EtoH-D.W. (7 : 3, v/v) 혼합용액에 침지하여 교반기에 72시간, 3회 추출하였다.

추출액은 각각 여과지(No.2, Whatman, Maidstone, England)가 깔려있는 Buchner funnel을 이용하여 감압여과하여 침전물을 분리하였으며, 추출액은 Everporater를 사용하여 40°C에서 감압 농축하였다.

농축한 추출액은 각각 분획깔대기에서 헥산(n-hexane), 디클로로메탄(dichloromethane), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol), 수분층(Aqueous layer)으로 순차 분획하였으며, 각각의 분획물은 동결건조하여 사용하였다.



Fig. 1. *Illicium anisatum* L.

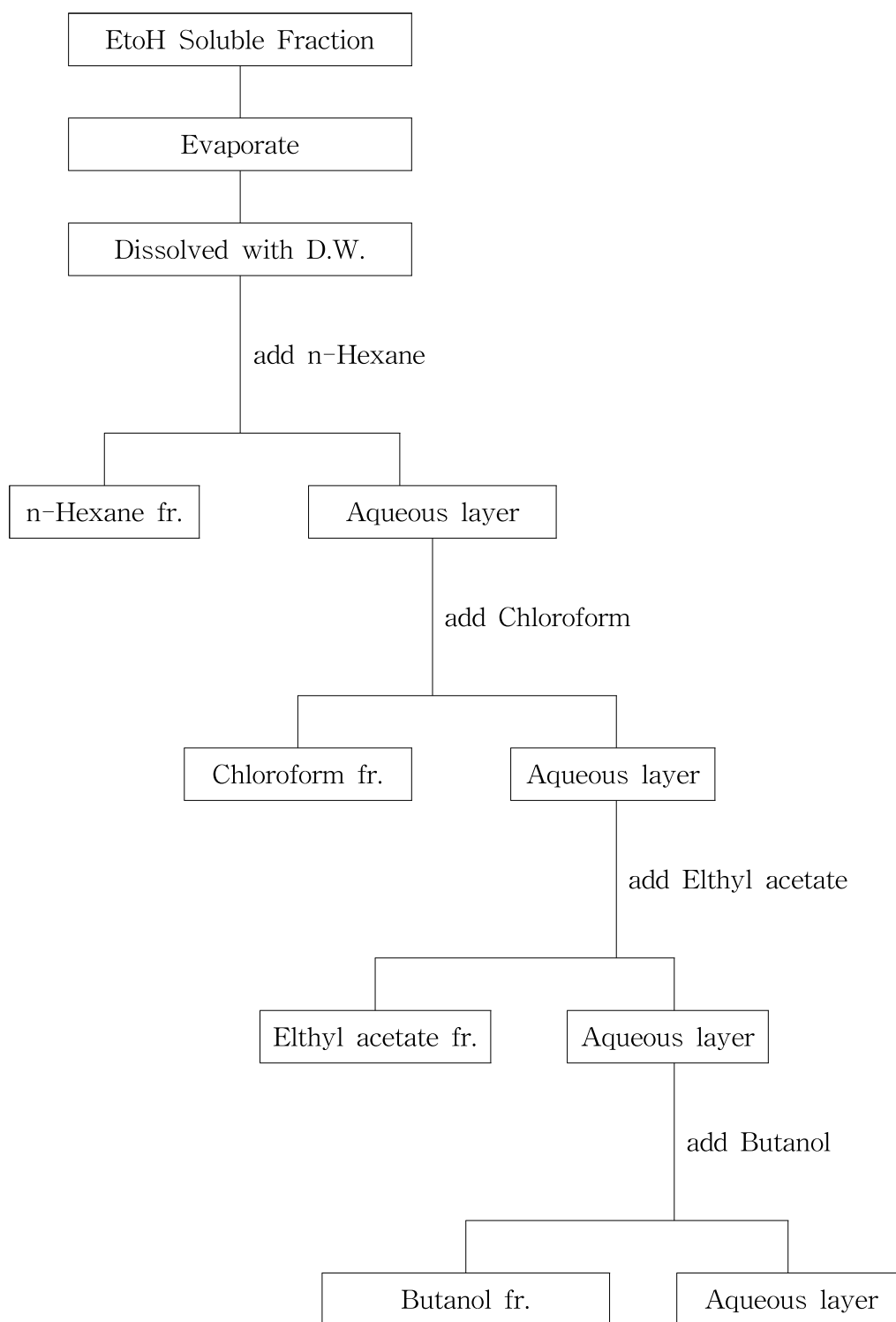


Fig. 2. Solvent fractionation of *Illicium anisatum* L.

## 2. 항균 실험

미생물인 *Pythium graminicola*, *Pythium vanterpoolii*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani* AG-1 1b는 제주대학교 작물보호학실험실에서 분양 받아 실험에 사용하였다.

실험재료 건조량 100g당 1000ml의 증류수를 넣어 auto clave를 사용하여 121℃에서 15분간 고압 멸균하여 열탕처리를 하였고 1차 증류수로 75%, 50%, 25%으로 희석하여 실험구로 사용, 대조구는 24시간 전에 받아둔 증류수를 사용하였다.

대조구는 증류수 900ml에 Potato dextrose agar 39g과 Agar 5g을 넣고 실험구는 증류수 대신 수용성 추출액을 농도별로 넣고 고압멸균하여 Petri dish(∅ 90mm)당 25ml 정도의 배지를 제조하였다.

각 균주를 1주일 동안 배양하여 동일한 사이즈를 얻기 위해 Corkborer(지름 ∅8mm)를 이용하여 접종하였으며, 배지가 식은 후 배양된 균주를 배지의 가운데에 접합한 후 5일 동안 colony diameter를 측정하였고 데이터는 대조구에 대해 상대성장률(Relative growth ratio, RGR)을 환산하였다(Costilow, 1981).

## 3. Phenol 함량 분석

총 페놀 함량은 Prussian blue법을 사용하였다. 농도별 시료용액 100ul에 0.01M FeCl<sub>3</sub>과 0.1N HCl 1ml를 혼합한 용액을 가한뒤 0.016M K<sub>3</sub>FE(CN)<sub>5</sub> 용액 1ml를 혼합하여 진탕한 후 실온에 15분간 방치한 후 H<sub>2</sub>O와 gum arabic, phosphoric acid를 혼합한 stabilizer 5ml를 첨가한 뒤 LISA reader (VERSA, USA)를 이용하여 700nm에서 흡광도를 측정하였다. gallic acid를 표준물질로 하여 얻은 검량선으로부터 총 페놀 함량을 산출하였다.



#### 4. Flabonoid함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Davis법을 일부 변형한 Davis변법을 사용하였다. 90% diethylene glycol 10ml에 시료용액 0.2ml를 가하여 혼합하고, 4-NaOH용액 0.2ml를 가하여 30°C에서 5분간 유지한 후, 그의 등황색을 LISA reader (VERSA, USA)를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준 물질로 하여 얻은 검량선으로부터 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

#### 5. ABTS radical 소거능

붓순나무로부터 추출 및 분리한 각각의 분획물에 대해 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS+) radical 소거능을 Re(1927) 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다.

7mM ABTS와 2.45mM K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> 동량을 혼합 후 실온, 암소에서 24시간 방치하여 ABTS+ 라디칼 생성으로 유도 후 ABTS+용액을 희석하여 734nm에서 흡광도값이 1.2~1.3nm정도가 되도록 희석하여 사용하였다. 희석한 ABTS+ 용액 80 $\mu$ l에 추출액 및 분획물을 각각 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 25 $\mu$ g/ml, 12.5 $\mu$ g/ml의 농도로 20 $\mu$ l을 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 734nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 6. DPPH radical 소거능

붓순나무로부터 추출 및 분리한 각각의 분획물에 대해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능을 Bios 등(1958)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다.

각각의 농도별 시료 100 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 25 $\mu$ g/ml, 12.5 $\mu$ g/ml의 추출물 100 $\mu$ l에 1mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 100 $\mu$ l을 가한 뒤, 혼합물을 교반하여 상온에서 20분간 반응시키고 UV/VISspectrophotometer로 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7. MTT assay

붓순나무 잎과 가지의 열수추출물과 70% Ethanol 추출물에 대한 세포독성을 측정하였다.

RAW 264.7 및 HaCaT 세포를 5x10<sup>5</sup> cells/ml로 96well plate에 분주하고 24시간 동안 안정화 시킨 후 시료를 농도별로 처리하고 24시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 배양액을 제거한 후 MTT 시약(0.1  $\mu$ g/ml)을 처리하고 4시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에 방치하였다. 그 후 MTT 시약을 버리고 DMSO를 처리한 뒤 30분 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 뒤 540nm 파장에서 micro spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

## IV. 결 과

### 1. 붓순나무 추출물 및 분획물의 수율

채취한 붓순나무 시료를 2주 이상 음건한뒤 잎과 가지로 분리하여 3cm 크기 이하로 세잘하여 3일 동안 70% Ethanol로 3회 반복 추출하였다. Ethanol 추출액은 filter paper로 감압 여과시킨 후 evaporator을 사용하여 감압 농축하여 잎 7.5mg, 가지 17.09mg 의 분말을 얻어 잎 7.50%, 가지 17.09%의 수율을 나타내었다. 붓순나무 추출물을 증류수와 혼합하여 분별 깔대기를 사용하여 *n*-Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, *n*-Butanol, Aqueous로 순서대로 분획하였다. 각각의 분획은 3회 반복 실시하였으며, 각각의 용매 분획량은 잎 분획물에서 *n*-Hexane 5.98mg, Chloroform 18.52mg, Ethyl acetate 0.36mg, *n*-Butanol 2.04mg, Aqueous 2.79mg을 얻었으며 가지 분획물에서 *n*-Hexane 12.45mg, Chloroform 18.27mg, Ethyl acetate 0.68mg, *n*-Butanol 5.85mg, Aqueous 2.15mg을 얻었다(Table 1).

Table 1. Yield extract and fraction from *Illicium anisatum* L.

Extract and fraction	Leaf		Trunk	
	Weight(mg)	Yield(%)	Weight(mg)	Yield(%)
70% Etanol	17.09	17.09%	7.50	7.50%
<i>n</i> -Hexane	12.45	12.45%	5.98	5.98%
Chloroform	4.79	4.79%	4.99	4.99%
Ethyl acetate	0.68	0.68%	0.36	0.36%
<i>n</i> -Butanol	5.85	5.85%	2.04	2.04%
Aqueous	2.15	2.15%	2.79	2.79%

## 2. Phenol 검량 분석

본 연구에서 붓순나무의 잎과 가지의 유기용매 추출물 및 분획물을 각각 725nm의 분광광도계로 측정하였으며, 검량선은 gallic acid를 사용하였다.

붓순나무 가지와 잎의 순차적 분획물 중 잎 분획물 70% Ethanol 1973.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *n*-Hexane 1667.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Chloroform 1799.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Ethyl acetate 2476.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *n*-Butanol 2717.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Aquarius 1631.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 측정되었으며, 가지 분획물 70% Ethanol 1403.80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *n*-Hexane 276.38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Chloroform 2371.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Ethyl acetate 1129.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *n*-Butanol 314.99 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Aquarius 105.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$  으로 측정되었다.

Chloroform 분획물에서는 잎이 1799.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2371.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 잎의 페놀함량이 높게 나타났으나, 70% Ethanol, *n*-Hexane, Ethyl acetate, *n*-Butanol, Aquarius은 가지가 잎보다 페놀 함량이 높은 것으로 나타났다(Fig. 3).

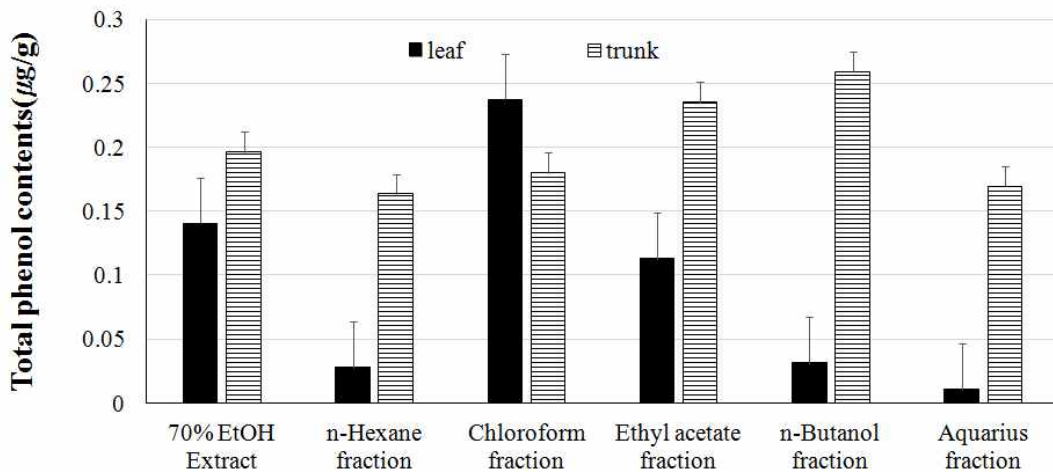


Fig. 3. Total phenolic compounds of *Illicium anisatum* L.

### 3. Flavonoid 검량 분석

본 연구에서 붓순나무의 잎과 가지의 분획물을 각각 415nm의 분광광도계로 측정하였으며, 검량선은 Quercetin를 사용하였다.

붓순나무 가지와 잎의 순차적 분획물 중 잎 분획물의 *n*-Hexane 1297.96 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Chloroform 848.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Ethyl acetate 2036.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *n*-Butanol 1987.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 가지 분획물의 *n*-Hexane 680.30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Chloroform 624.73 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Ethyl acetate 890.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , *n*-Butanol 890.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 잎의 플라보노이드 함량이 높게 나타났으나 잎 분획물의 70% Ethanol 1117.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Aquarius 245.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 가지 분획물의 70% Ethanol 711.685 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Aquarius 472.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 70% Ethanol, Aquarius는 잎의 플라보노이드 함량이 더 높게 나타났다(Fig. 4).

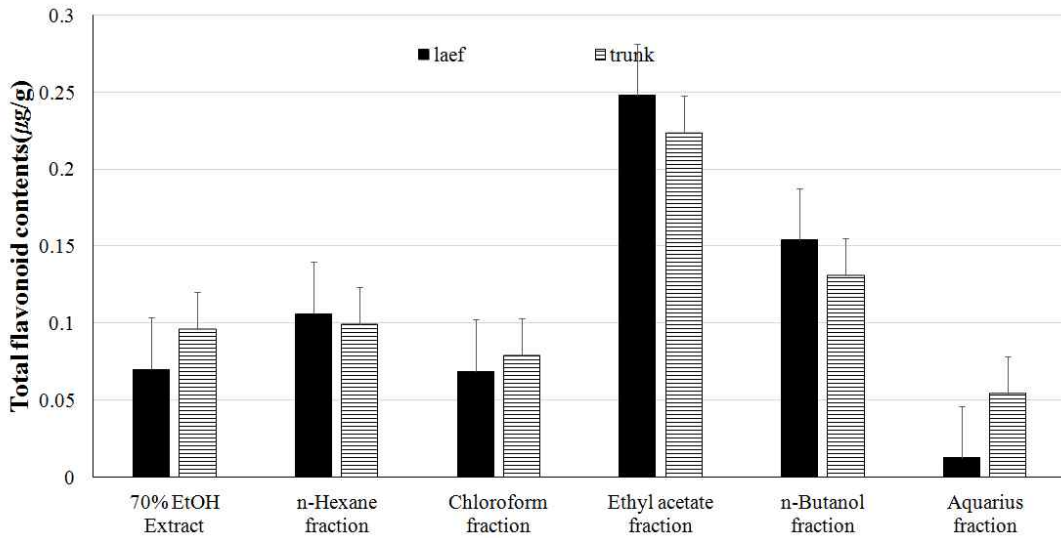


Fig. 4. Total flavonoid compounds of *Illicium anisatum* L.

#### 4. 항 미생물 평가

Allelopathy는 어떤 식물이 분비하는 화학 물질이 직·간접적으로 주위 다른 식물에 영향을 끼쳐 발아와 생장을 억제하는 식물 상호 간섭작용을 말한다(조, 2004). 알레로화학물질(allelochemicals)은 수많은 종류가 있으나, 중요한 몇가지만 예시하면 phenolic compound, flavonoids, alkaloids, terpenoids 등이 있다. 이러한 알레로화학물질은 식물이 수용성, 휘발성 물질로 주위 환경으로 방산한다(길, 2005). 이러한 allelochemicals는 식물 주변의 미생물과도 상호작용하여 식물 구성을 형성하고 서식지 생물다양성 통제에 관여하고 있다(Fernandez, 2013).

붓순나무 추출액이 식물 병원균에 미치는 영향을 조사한 결과 추출액의 농도가 높아질수록 식물병원균의 생장이 억제되는 경향을 나타냈다. *Pythium graminicola*, *Pythium vanterpoolii*는 대조구에 비해 거의 성장하지 못하였으며, *Pythium ultimum*은 25% 용액 처리구에서 61.48%, 50% 용액 처리구에서 15.55%의 성장률을 보이고 75% 이상의 처리구에서는 거의 성장하지 못하였다. *Rhizoctonia solani* AG-1 1b는 25% 용액 처리구에서 43.61%, 50% 용액 처리구에서 8.04%의 성장률을 보이고 75% 처리구에서부터 3.72%, 100% 처리구에서 2.84%로 성장하였다. *Rhizoctonia cerealis*는 25%용액 처리구에서 70.93%, 50%용액 처리구에서 51.72%의 성장률을 보이고 75%처리구에서 41.87%, 100% 처리구에서 32.01%로 성장하였다(Fig. 5).

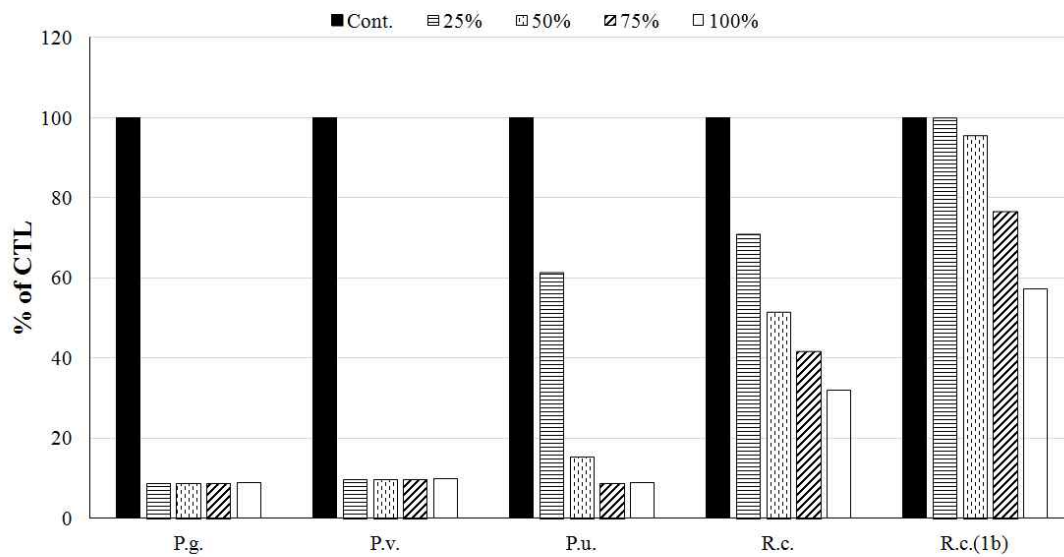


Fig. 5. Colony diameter of fungi taxa grown in PDA medium with various concentrations of *Illicium anisatum* L. extracts

P.g. *Pythium graminicola*; P.v. *Pythium vanterpooli*; P.u. *Pythium ultimum*; R.c. *Rhizoctonia cerealis*; R.s.(1b), *Rhizoctonia solani* AG-1(1b).

## 5. 세포독성 평가

### 1) Raw 264.7 평가

MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 검정은 세포 독성 항암제를 스크리닝하기 위한 전형적인 방법이다. MTT 분석은 대상 추출물 및 용액에 대하여 생체 내 모델을 사용하여 약물의 효율을 시험하고 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설 및 독성을 평가한다(Li, 2012).

MTT assay는 cell line에 대해 사용하는 실험으로, 세포가 얼마나 자랐는지 세포독성을 확인하는 용도로 주로 사용한다. LPS 자극에 의한 NO의 발현 억제 능력을 평가하였다. LPS를 Raw264.7 cell에 treat 하여 열수추출물과 70% Ethanol 의 농도별 6개 sample에 의해 NO의 발현이 저해되는지 확인하였다.

Raw 264.7 cell에 대한 영향을 측정하기 위하여 붓순나무 잎과 가지의 열수추출물과 70% Ethanol 추출물에 대해서 500 $\mu$ g/ml, 250 $\mu$ g/ml, 125 $\mu$ g/ml, 62.5 $\mu$ g/ml, 31.25 $\mu$ g/ml 농도 로 측정하였다.

Raw 264.7 cell에 대한 세포독성을 확인한 결과 붓순나무 잎의 열수추출물에서는 500 $\mu$ g/ml의 농도에서도 독성이 나타나지 않았으며, 70% Ethanol 추출물에서는 125 $\mu$ g/ml이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았다(Fig. 6).

Raw 264.7 cell에 대한 세포독성을 확인한 결과 붓순나무 가지의 열수추출물에서는 500 $\mu$ g/ml의 농도에서도 독성이 나타나지 않았으며, 70% Ethanol 추출물에서는 100 $\mu$ g/ml이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았다(Fig. 7).



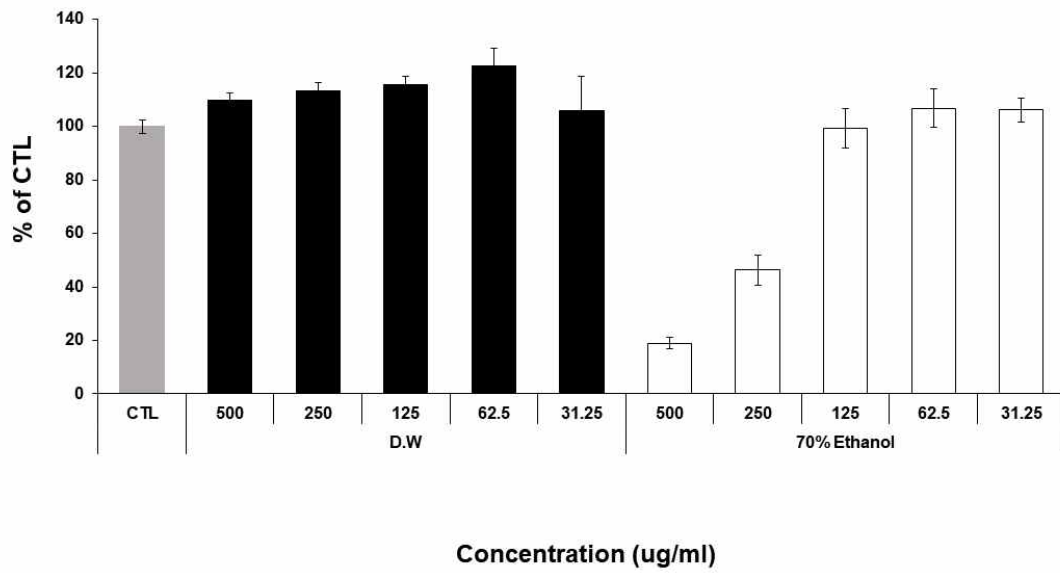


Fig. 6. Effects of *Illicium anisatum* L. leaf extracts on of RAW264.7 cell.

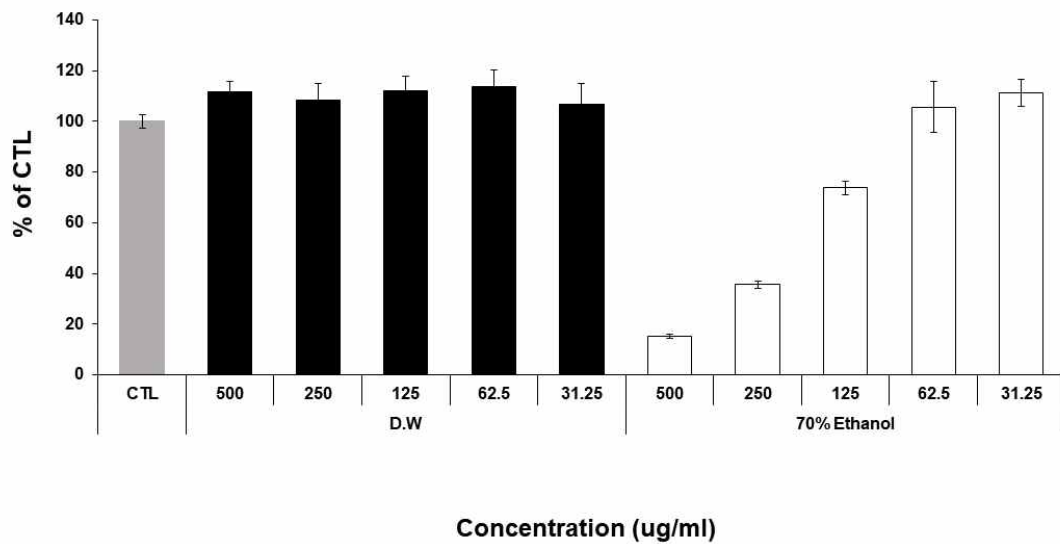


Fig. 7. Effects of *Illicium anisatum* L. trunk extracts on of RAW264.7 cell.

## 2) HaCat cell 평가

HaCat cell에 대한 영향을 측정하기 위하여 붓순나무 잎과 가지의 열수추출물과 70% Ethanol 추출물에 대해서  $500\mu\text{g/ml}$ ,  $250\mu\text{g/ml}$ ,  $125\mu\text{g/ml}$ ,  $62.5\mu\text{g/ml}$ ,  $31.25\mu\text{g/ml}$  농도로 측정하였다.

HaCat cell에 대한 세포독성을 확인한 결과 붓순나무 잎의 열수추출물에서는  $500\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 독성이 나타나지 않았으며, 70% Ethanol 추출물에서는  $250\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았다(Fig. 8).

붓순나무 가지의 열수추출물에서는  $500\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 독성이 나타나지 않았으며, 70% Ethanol 추출물에서는  $31.25\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았다(Fig. 9).

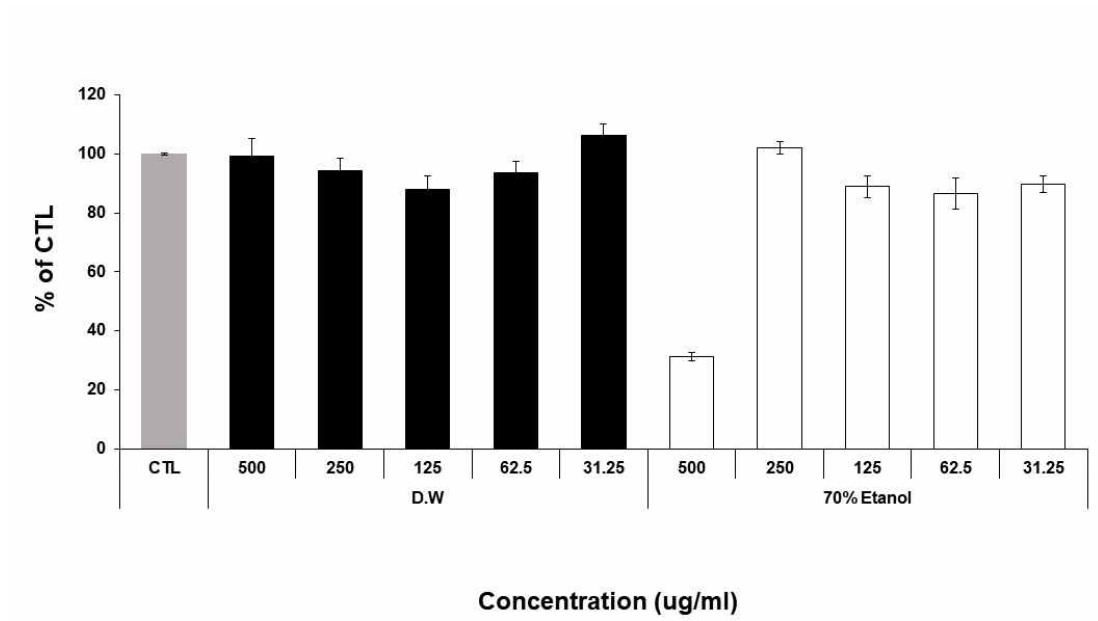


Fig. 9. Effects of *Illicium anisatum* L. leaf extracts on of HaCat cell.

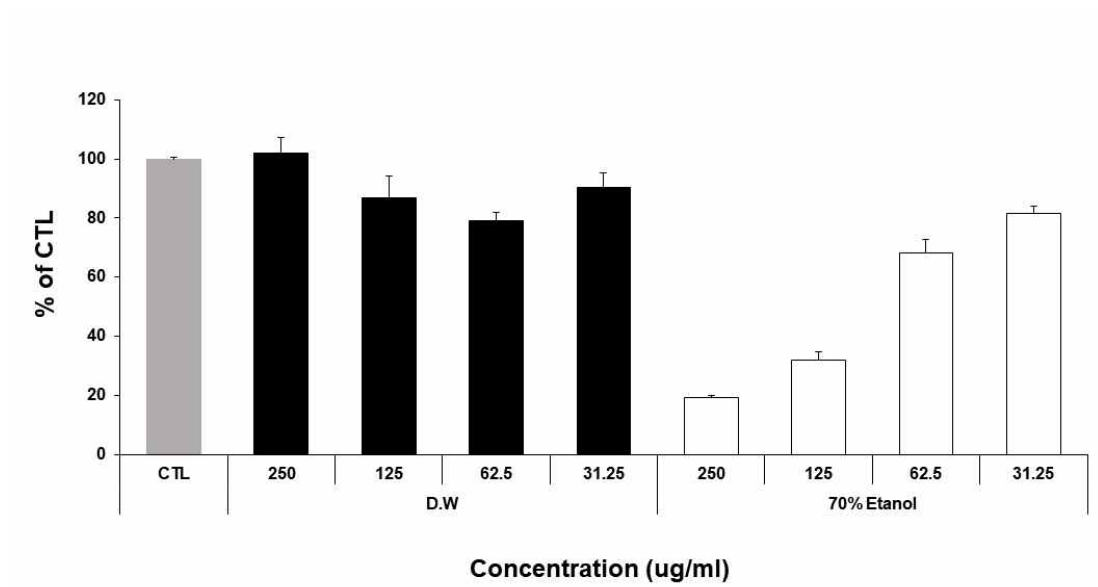


Fig. 8. Effects of *Illicium anisatum* L. trunk extracts on of HaCat cell.

## 6. ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거 활성방법은 ABTS의 양이온 radical 의 흡광도가 항산화제에 의해 감소되는 원리에 기초한 방법으로 potassium persulfate와 ABTS의 산화에 의해 radical을 형성시킨 후 각각의 시료에 의한 radical 소거활성을 측정함으로써 각 시료의 항산화능을 확인할 수 있다(김, 2009).

붓순나무의 잎과 가지의 분획물을 각각 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 제조하여 ABTS 소거 활성을 측정한 결과를 얻은 Fig. 7과 Table 2에 가지는 Fig. 8과 Table 3에 나타내었다.

Fig. 7에서 붓순나무 잎 추출물의 분획별 ABTS radical 소거활성능력은 Ethyl acetate 분획물과 *n*-Butanol 분획물에서는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 70% 이상의 활성을 나타냈으며, 70% Etanol 추출물, *n*-Hexane 분획물, Chloroform 분획물, Ethyl acetate 분획물, *n*-Butanol 분획물에서 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 50% 이상의 ABTS radical 소거 활성능력을 보였다(Fig. 10).

Table 2에서 보는 바와 같이 잎의 추출물, 분획물 별 ABTS radical 소거능의 반 농도값은 Ethyl acetate, Chloroform, *n*-Butanol, *n*-Hexane, EtoH 70%, Aquarius 순으로 나타났으며 Ethyl acetate 분획물에서 33.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 반 농도를 나타내고 있다(Table 2).

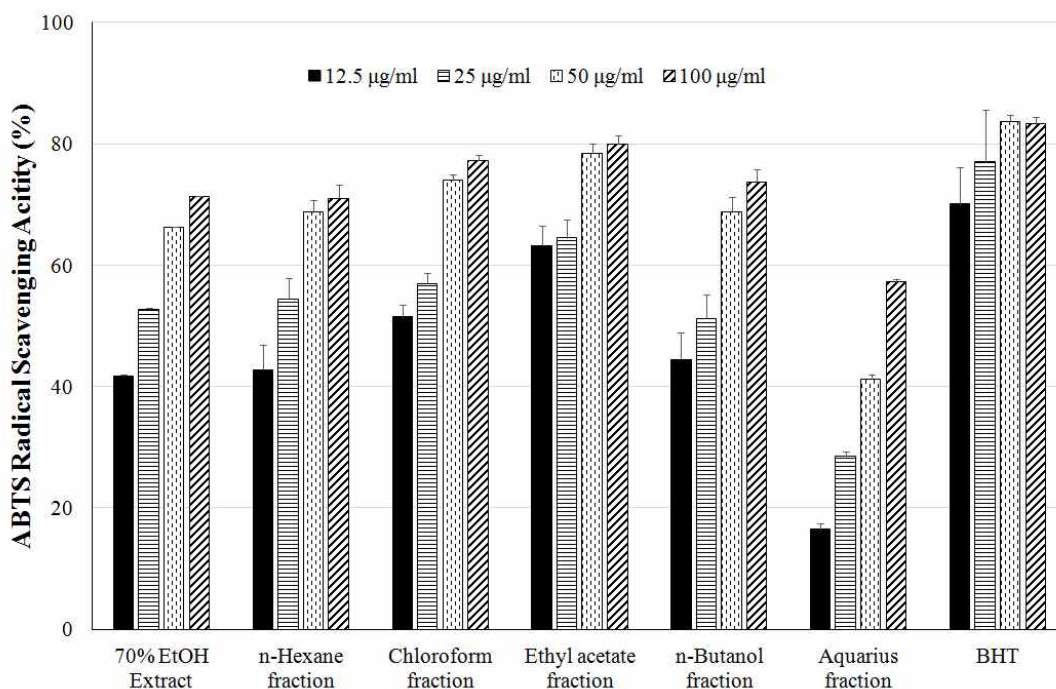


Fig. 10. The result of ABTS radical scavenging in *Illicium anisatum* L. leaf according to different concentration of organic solvent extract and fraction.

Table 2. The result of ABTS radical scavenging in *Illicium anisatum* L. leaf(mean±SD)

Extract	RC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1)</sup>
70%EtOH Extract	66.12±7.89
n-Hexane fraction	57.54±9.32
Chloroform fraction	46.50±8.73
Ethylacetate fraction	33.37±11.38
n-Butanol fraction	48.30±10.35
Aquarius fraction	101.44±5.00
BHT <sup>2)</sup>	10.29±1.90

1) RC50: Amount required for a 50% reduction of ABTS free radicals after 15 min

2) BHT, butylated hydroxytoluene.

Fig. 8에서 붓순나무 가지 추출물의 분획별 ABTS radical 소거활성능력은 70% Etanol 추출물, Chloroform 분획물, Ethyl acetate 분획물, *n*-Butanol 분획물에서 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 70% 이상의 ABTS radical 소거 활성능력을 보였다(Fig. 11).

Table 3에서 보는 바와 같이 가지의 추출물, 분획 별 ABTS radical 소거능의 반 농도값은 *n*-Butanol, Ethyl acetate, Chloroform, EtoH 70%, Aquarius, *n*-Hexane 순으로 나타났으며 *n*-Butanol 분획물에서 -42.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Ethyl acetate 분획물에서 -27.53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 반 농도값을 나타내고 있어 낮은 농도에서의 추가적인 ABTS radical 소거능 측정이 필요해 보인다. 그 중 *n*-Butanol 분획물과 Ethyl acetate 분획물은 각각 합성항산화제 양성대조군인 BHT보다 높은 항산화활성을 나타내고 있다(Table 3).

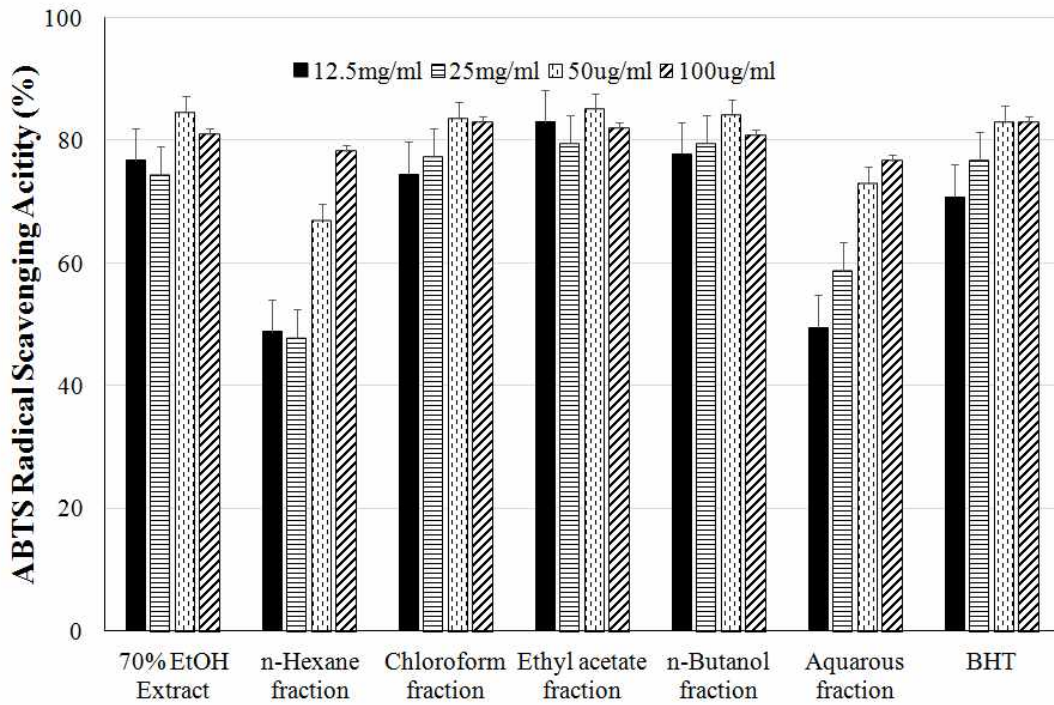


Fig. 11. The result of ABTS radical scavenging in *Illicium anisatum* L. trunk according to different concentration of Organic solvent extract and Fraction.

Table 3. The result of ABTS radical scavenging in *Illicium anisatum* L. trunk(mean±SD)

Extract	RC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1)</sup>
70%EtOH Extract	15.6±5.60
n-Hexane fraction	45.44±1.48
Chloroform fraction	2.14±1.16
Ethylacetate fraction	-
n-Butanol fraction	-
Aquarius fraction	42.65±8.97
BHT <sup>2)</sup>	12.59±3.26

1) RC50: Amount required for a 50% reduction of ABTS free radicals after 15 min

2) BHT, butylated hydroxytoluene.

## 7. DPPH radical 소거능

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로 항산화 물질에 의한 전자 공여에 의해 지질과산화 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical의 억제 정도를 간접적으로 측정할 수 있다(김, 2009).

붓순나무의 잎과 가지의 분획물을 각각 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 제조하여 DPPH 소거 활성을 측정한 결과를 얻은 Fig. 9과 Table 4에 가지는 Fig. 10과 Table 5에 나타내었다.

Fig. 9에서 붓순나무 잎 추출물의 분획별 DPPH radical 소거활성능력은 Ethyl acetate 분획물에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 50% 이상의 DPPH radical 소거 활성능력을 보였다.

Table 4에서 보는 바와 같이 잎의 추출물, 분획물 별 DPPH radical 소거능의 반 농도값은 Ethyl acetate, EtoH 70%, *n*-Hexane, *n*-Butanol, Chloroform, Aquarius 순으로 나타났으며 Ethyl acetate 분획물에서 146.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 반 농도를 나타내고 있다.



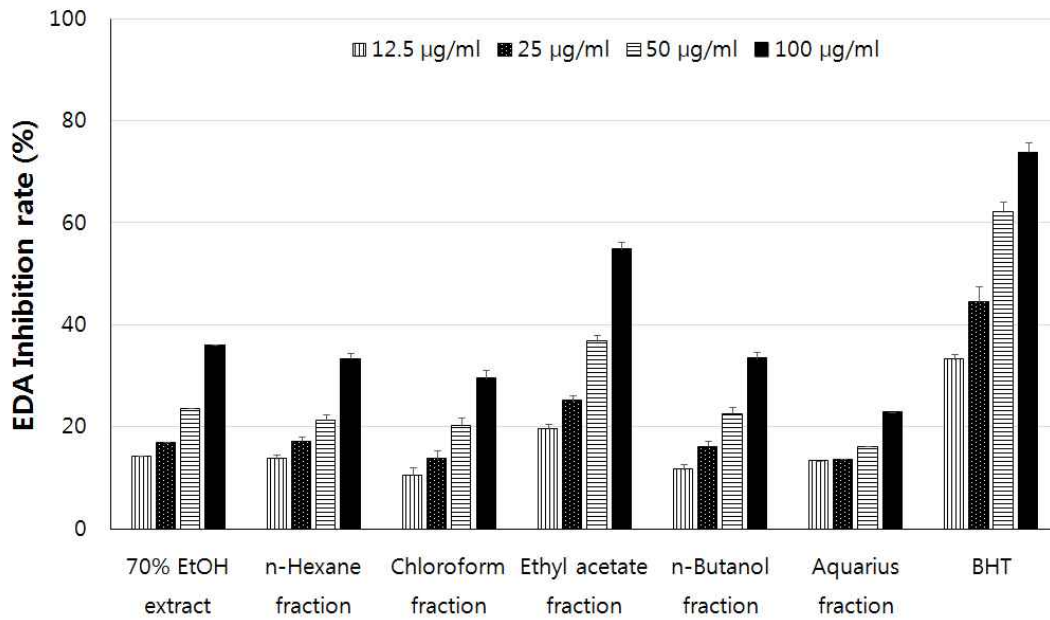


Fig. 12. The result of DPPH radical scavenging in *Illicium anisatum* L. leaf according to different concentration of Organic solvent extract and Fraction.

Table 4. The result of DPPH radical scavenging in *Illicium anisatum* L. leaf(mean±SD)

Extract	RC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1)</sup>
70%EtOH Extract	227.75±6.13
n-Hexane fraction	262.13±6.29
Chloroform fraction	335.97±29.81
Ethylacetate fraction	146.47±25.71
n-Butanol fraction	297.52±5.72
Aquarius fraction	531.58±0.38
BHT <sup>2)</sup>	185.65±5.84

1) RC50: Amount required for a 50% reduction of DPPH free radicals after 20 min

2) BHT, butylated hydroxytoluene.

Fig. 10에서 붓순나무 가지 추출물의 분획별 DPPH radical 소거활성능력은 EtoH 70%, Ethyl acetate, *n*-Butanol 분획물에서 50 $\mu$ g/ml의 농도에서도 50% 이상의 DPPH radical 소거 활성능력을 보였다.

Table 5에서 보는 바와 같이 가지의 추출물, 분획물 별 DPPH radical 소거능의 반 농도값은 Ethyl acetate, *n*-Butanol, EtoH 70%, Aquarous, Chloroform, *n*-Hexane 순으로 나타났으며 Ethyl acetate 분획물에서 57.76 $\mu$ g/ml의 반 농도를 나타내고 있다.

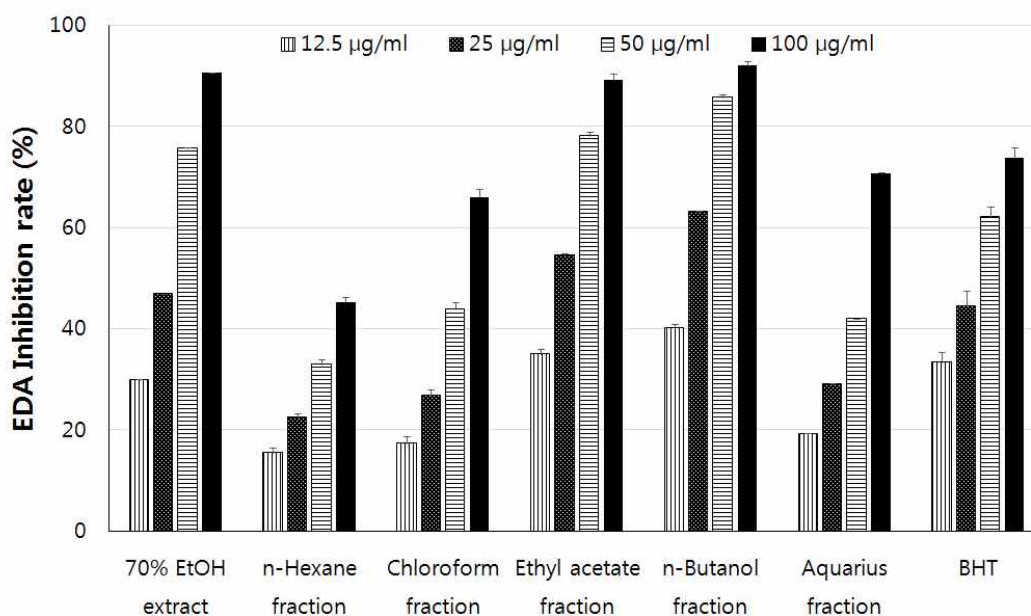


Fig. 13. The result of DPPH radical scavenging in *Illicium anisatum* L. trunk according to different concentration of organic solvent extract and fraction.

Table 5. The result of DPPH radical scavenging in *Illicium anisatum* L. trunk(mean±SD)

Extract	RC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1)</sup>
70%EtOH Extract	85.94±0.29
n-Hexane fraction	198.91±3.83
Chloroform fraction	147.74±4.70
Ethylacetate fraction	57.76±3.92
n-Butanol fraction	58.47±2.97
Aquarius fraction	135.47±0.17
BHT <sup>2)</sup>	70.64±2.45

1) RC50: Amount required for a 50% reduction of DPPH free radicals after 20 min

2) BHT, butylated hydroxytoluene.

## V. 고 찰

본 연구는 붓순나무 천연물의 세포독성 및 항산화 기능성에 관한 연구를 진행하여, 제주 자생식물인 붓순나무의 그 활용방안과 천연물 유래의 항산화제 개발에 대한 기초자료로 제공하기 위하여 실시하였다.

붓순나무는 잎과 가지에 각각 70% Ethanol용액으로 침지하여 동결건조한 뒤 분획깔대기를 사용하여 *n*-Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, *n*-Butanol, Aquarius로 각각 분획하여 동결건조하였으며, 용매 분획수율은 잎 분획물 *n*-Hexane 5.98%, Chloroform 18.52%, Ethyl acetate 0.36%, *n*-Butanol 2.04%, Aqueous 2.79%을 얻었으며 가지 분획물에서 *n*-Hexane 12.45%, Chloroform 18.27%, Ethyl acetate 0.68%, *n*-Butanol 5.85%, Aqueous 2.15%이었다.

또한 열수추출액을 사용한 *Pythium graminicola*, *Pythium vanterpoolii*, *Pythium ultimum*과 *Rhizotonia cerealis*, *Rhizoctonia solani* AG-1 1b에 대한 항균실험 결과 *pythium* 계열의 *Pythium graminicola*, *Pythium vanterpoolii*는 25% 이하의 농도에도 전혀 성장하지 못하였으며 *Pythium ultimum*은 75% 이상의 농도에서 성장하지 못하였다. *Rhizotonia cerealis*와 *Rhizoctonia solani* AG-1 1b 또한 붓순나무 열수추출액의 농도가 높아질수록 생장이 저해되는 효과를 나타내었다.

식물 성분 중 하나 또는 둘 이상의 수산기로 치환된 방향족 환을 가지고 있는 phenolic compound는 진균, 세균 또는 virus 등 병균의 침입에 대한 방어 작용으로서 항균효과를 나타내는 물질이 많은데(Snook et al., 191; Miles, 1991), 이는 2차 대사산물 중 phytoncide 및 phytoalexin 물질이 유도되어 촉진되기 때문이라고 알려져 있다(Barz, 1990). 일반적으로 페놀성 화합물은 phenolic acid 및 comarin류, flavonoid류 그리고 탄닌류의 세 그룹으로 나뉘며, 그 구조에 따라 이화학적인 성질 및 생리적 기능이 달리 나타난다(Lee and Lee, 1994; Kubo et al., 1995; Park et al., 1991; sakanaka et al., 2000)라는 보고가 있다.

70% Ethanol 추출액 및 분획물별 Phenol함량, Flavonoid, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능을 측정하였다.

ABTS radical 소거능에 대한 결과는 앞에서는 *n*-Butanol 분획물에서 12.5µg/ml의 농도에서도 50%이상의 항산화 활성효과를 나타냈으며, 가지에서는 70% Ethanol, Chloroform, Ethyl acetate, *n*-Butanol 분획물에서 모두 합성항산화제인 BHT보다 높은 수치의 항산화 활성 효과를 나타내었다.

DPPH radical 소거능에 대한 결과, 앞에서는 Ethyl acetate 분획물에서 100µg/ml의 농도에서 50%이상의 항산화 활성효과를 나타내었으며, 가지추출물에서는 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물에서 12.5µg/ml의 농도에서도 합성항산화제인 BHT보다 높은 수치의 항산화 활성 효과를 나타내었다.

페놀분석 결과 앞에서는 Chloroform 분획물에서 가장 높은 수치로 관측되었으며, 70% Ethanol, Ethyl acetate 순으로 나타났다. 가지추출물에서는 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물에서 각각 높은 수치로 관측되었다. 플라보노이드 분석 결과 앞과 가지 모두 *n*-Butanol 분획물과 Ethyl acetate 분획물에서 각각 높은 수치로 나타났다.

이들 결과를 종합하면 붓순나무 잎 추출물 및 분획물의 ABTS radical 소거능 및 DPPH 소거능은 양성대조군인 BHT보다 높은 효과를 나타내지 않았으나, 각각 Ethyl acetate 분획물과 *n*-Butanol 분획물에서 유효한 항산화 활성능력을 나타내었으며, 붓순나무 가지 추출물 및 분획물의 ABTS radical 소거능 및 DPPH 소거능은 가지에서는 70% Etanol, Chloroform, Ethyl acetate, *n*-Butanol 분획물에서 모두 합성항산화제인 BHT보다 높은 수치의 항산화 활성 효과를 나타내었으며, 특히 Ethyl acetate 분획물과 *n*-Butanol 분획물에서 높은 항산화 활성수치를 나타내었다.

DPPH와 ABTS는 자연상태의 플라보노이드의 항산화활성을 확인하는데 사용되며(Pandey, 2013), 폴리페놀성 화합물 이외에 기타 미지의 성분 및 이들 성분 상호 간의 작용에 의해서도 항산화능이 증가한다고(Zheng and Wang, 1946) 보고하였고, 폴리페놀 및 비타민 C 이외의 다른 항산화 물질들의 작용 기작이 연쇄반응의 개시의 방지, 전이금속 이온과 결합, 과산화물의 분해 등으로 다양하다고(Diplock, 1947) 보고되었다.

붓순나무 잎과 가지에 포함된 페놀과 플라보노이드의 함량을 분석한 결과 잎의 추출물과 분획물에서는 페놀은 Chloroform 분획물에서 가장 높은 수치로 관측

되었으며, 70% Ethanol, Ethyl acetate 순으로 나타났으며, 플라보노이드는 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물에서 높은 수치를 나타내었다. 가지추출물에서는 페놀과 플라보노이드 모두 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물에서 각각 높은 수치로 관측되었다.

이는 ABTS radical 소거능 및 DPPH radical 소거능 활성화에 잎과 가지 모두 Ethyl acetate 분획물과 *n*-Butanol 분획물에서 높은 항산화 활성 능력을 나타내는 경향과 유사하여 붓순나무의 페놀과 플라보노이드의 특정 성분이 항산화 능력 발현에 영향을 주는 것으로 파악된다.

페놀과 플라보노이드의 특정성분이 항산화능력 발현에 영향을 준다는 연구는 김정콩(김, 2002), 돌단풍(임, 2010), 민들레(한, 2011), 부평초(송, 2016) 등의 연구와도 상통한다.

Raw 264.7 대식세포는 초기 염증성 cytokine 분비 및 nitric oxide(NO)를 생성하는 염증성 세포로서 염증매개질환 연구에 주로 사용 되고 있다(최, 2015). Raw 264.7 cell과 HaCat cell에 대한 세포독성을 확인한 결과 Raw 264.7 cell에서는 붓순나무 잎과 가지의 열수추출물에서는 500 $\mu$ g/ml의 농도에서도 독성이 나타나지 않았으며, 70% Ethanol 추출물에서 잎은 125 $\mu$ g/ml이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았으며. 가지에서는 100 $\mu$ g/ml이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았다.

HaCaT 각질형성세포는 다양한 염증성 cytokine과 chemokine을 생성하여 피부의 면역반응실험에 주로 사용되고 있다(최, 2015). HaCat cell 에 대한 세포 독성을 확인한 결과 붓순나무 잎과 가지의 열수추출물에서는 500 $\mu$ g/ml의 농도에서도 독성이 나타나지 않았으며, 70% Ethanol 추출물은 잎에서는 250 $\mu$ g/ml이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았으며, 가지에서는 31.25 $\mu$ g/ml이하의 농도에서 독성이 나타나지 않았다.

본 실험들의 결과를 종합했을 때, 붓순나무 부위별 추출물 및 분획물의 특정 농도에 따라 항산화능력이 발현되었으며 잎보다 가지 추출물 및 분획물에서 더 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 또한 페놀 및 플라보노이드 분석에서 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물이 높게 관찰되어 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물의 특정성분이 항산화 활성 효과에 영향을 주는 것으로 판단되었다. 또한 프랑스에서 유아의 떨림 또는 경련, 고장, 크리링을 가진 과다홍분성, 눈떨림

그리고 구토가 관찰되었으며(Minodier, 2003), 쥐에 붓순나무 잎 추출물을 투여하면 구토, 걸음걸이 장애 등과 같은 신경 발달과 같은 신경 학적 징후가 나타나며, 2000년 3월 일본의 목장에서는 붓순나무의 표준물질인 anisatin에 의해서 소 5마리가 신경 증상을 나타냈으며, 그중 3마리가 60시간 안에 사망하기도 하였으며(Kobayashi, 2003), *Illicium religiosum*과의 중독으로 인한 독성 경련의 발생(Caldwell, 1957)과 붓순나무의 독성 효과에 관한 연구(Langgaard, 1881) 등의 기존의 붓순나무 독성에 관한 연구와 결과를 나타내었다.는 기존의 연구가 있었지만, 붓순나무 추출물의 세포독성을 관측한 결과 붓순나무 열수추출물에서 Raw 264.7cell과 HaCat cell에 세포독성이 없는 것으로 관찰되었으며, 70% Ethanol 추출물에서 Raw 264.7cell은  $125\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도, 가지  $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 독성이 관찰되지 않았으며, HaCat cell에 대한 결과 잎  $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도, 가지  $31.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 붓순나무를 추출물을 일정농도 이하로 사용한다면 천연 생리활성제로의 이용이 가능할 것으로 사료된다.

## VI. 적 요

본 연구는 붓순나무 천연물의 세포독성 및 항산화 기능성에 관한 연구를 진행하여, 제주 자생식물인 붓순나무의 그 활용방안과 천연물 유래의 항산화제 개발에 대한 기초자료로 제공하기 위하여 실시하였다.

진균의 균사생장 실험에 대한 결과 붓순나무 열수추출물의 농도가 증가함에 따라 균사생장이 억제되는 경향을 보였다. ABTS radical 소거능에 대한 결과는 앞에서는 *n*-Butanol 분획물에서 12.5 $\mu$ g/ml의 농도에서 50%이상의 항산화 효과를 나타냈으며, 가지에서는 70% Etanol, Chloroform, Ethyl acetate, *n*-Butanol 분획물에서 BHT보다 높은 수치의 항산화 효과를 나타내었다. DPPH radical 소거능에 대한 결과, 앞에서는 Ethyl acetate 분획물에서 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 50%이상의 항산화 효과를 나타내었으며, 가지추출물에서는 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물에서 12.5 $\mu$ g/ml의 농도에서 BHT보다 높은 수치의 항산화 효과를 나타내었다.

페놀분석 결과 앞에서는 Chloroform, 70% Ethanol, Ethyl acetate 순으로 높은 수치로 관측되었으며, 가지추출물에서는 *n*-Butanol, Ethyl acetate 분획물에서 각각 높은 수치로 관측되었다. 플라보노이드 분석 결과 앞과 가지 모두 *n*-Butanol과 Ethyl acetate 분획물에서 각각 높은 수치로 나타났다.

세포독성을 확인한 결과 HaCat세포에서의 앞과 가지 열수추출물은 250 $\mu$ g/ml의 농도에서 독성이 나타나지 않았으며, 70% Etanol 추출물은 앞에서는 250 $\mu$ g/ml, 가지에서는 31.25 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포독성을 가지지 않는 것으로 나타났다. Raw 267.7 세포에서 앞과 가지 열수추출물은 250 $\mu$ g/ml의 농도에서 독성이 나타나지 않았으며, 70% Etanol 추출물은 앞에서는 125 $\mu$ g/ml, 가지에서는 62.5 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포독성을 가지지 않는 것으로 나타났다.

이들 결과를 종합하면 붓순나무의 Ethyl acetate 분획물에 함유된 페놀과 플라보노이드의 특정 성분에 의하여 진균의 생장과 항산화능력에 영향을 주는 것으로 판단된다. 또한 세포독성을 확인한 결과 HaCat 세포와 Raw 267.7 세포에서 일정 농도 이하에서 붓순나무의 세포독성이 관찰되지 않아 합성 항산화제인 BHT를 대체할 천연항산화제로의 이용가능성이 사료된다.



## 인 용 문 헌

- Bulir. J. 1912. Zusammensetzung der fetten ole der samen von *Illicium verum* Hook. und *Illicium religiosum* Sieb. Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel sowie der Gebrauchsgegenstände. 24 : 309 - 319.
- Caldwell, A. F., J. Barnes. 1957. An occurrence of toxic convulsions due to poisoning with *Illicium religiosum*. Journal of the Royal Army Medical Corps. 103 : 91 - 94.
- Cha, W. S., J. H. Kim, K. H. Lee, H. J. Kwon, S. J. Yoon, W. K. Choi and Y. J. Cho. 2006. Antioxidative and inhibition activities on helicobacter pylori of Spice extracts. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 35 : 315 - 320.
- Cho, J. H., J. B. Jang, K. S. Lee and W. J. Bea. 2006. Inhibitory effects of *Arisaematis rhizoma*(天南星) on cell proliferation in HeLa cell. The Journal of oriental obstetrics & gynecology. 19 : 25 - 40.
- Choi, G. H., H. S. Yoon and J. S. Kim. 1989. Antioxidative effectiveness of methanol extract in mustard. Agricultural research bulletin of Kyungpook National University. 7 : 165 - 174.
- Choi, H. Y. 2009. Antimicrobial activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract and its effects on quality characteristics in sulgidduk, The Korean journal of food and nutrition. 22 : 321 - 331.
- Choi, J. E., B. K. Pack and M. R. Jin. 2015. Anti-inflammatory and antioxidant effects of water extracts of sasangja-tang(SSJ) and gami-sasangja-tang(GSJ). Korean medicine laboratory center of Daejeon University. 23 : 5 - 13. (Translation).

- Choi, J. H. 1998. The role of oxygen radicals in aging process. korean journal of Zoology Conference The 19th Biological Science Symposium 1998. 7 - 14. (Translation).
- Choi, T. W., B. T. Kang, J. H. Kang and M. P. Yang. 2015. Effect of trans-10, cis-12 Conjugated Linoleic Acid on Calcium-Dependent Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Production and Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells. Journal of veterinary clinics. 32 : 135 - 140.
- Cuerin, H. P. 1964. A New anatomical characteristic in differentiation between the fruit of *Illicium Verum* Hook. F. and *Illicium Religiosum* Sieb. Annales pharmaceutiques françaises. 22 : 27 - 33.
- Eijkmann, J. F. 1888., Als giftigen bestandtheil des *Illicium religiosum* Sieb. Zeitschrift für analytische Chemie. 27 : 128 - 129.
- Ghil, B. S. 2005. Basic and prospective aspects on allelopathic research. korean journal of Environment and Ecology Conference. 3 - 14. (Translation).
- Go, Y. J., D. S. Cha, H. D. Choi, Y. G. Pack and I. O. Choi. 2008. Hot Water Extraction Optimization of Dandelion Leavesto Increase Antioxidant Activity. Korean j. food sci. technol. 40: 283 - 289.
- Gwon. G. S., M. W. Lee, I. G. Jung, H. S. Jung, B. Y. Song, J. M. Song and C. H. Lee. 2009. Experimental studies on the hair growth activity of fractions and extract of arisaematis *Rhizoma* in C57B/6N mice. Journal of physiology & pathology in Korean Medicine. 23 : 619 - 630.
- Hipler, U. C., T. W. Fischer and P. Elsner. 2003. HaCaT Cell Proliferation Influenced by Melatonin. Skin pharmacology and applied skin physiology. 16 : 379 - 385.
- Hwang, N. S. 2007. Active oxygen. Journal of the KSME 47(10). 89-91. (Translation).

- Hwang, H. S., J. M. Kim, Y. J. Jeon, Y. A. Song and H. S. Pack. 2003. Flavonoids and antimicrobial activity of the ethanol extract of korean cherry (*Prunus tomentosa* Thunberg). Journal of the Korean society of food science and nutrition. 32 : 833 - 839.
- Jeon, G. S., W. R. Seo and S. I. Pack. 2015. Antioxidant activity of chinese mung bean. The Korean journal of culinary research. 21 : 41 - 51.
- Jeong, H. Y. 1991. Aging, free radical, arteriosclerosis. life science. 1 : 2 - 14.
- Jeong, Y. H. 2010. Potential Value of Jeju Resource Plants. korean journal of Plant Resources and Plant Science. 2010. 4 - 4. (Translation).
- Ji, N., J. L. Song, J. H. Kil and K. Y. Park. 2013. Protective Effects of *Perilla frutescens* Britt var. japonica Extracts from Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. J Korean soc food sci nut. 42 : 161 - 167.
- Ju, S. Y. 2013. Antioxidant activities of medicinal plant extracts. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 42 : 512 - 519.
- Jung, I. C and H. Y. Sohn. 2014. Antioxidation, Antimicrobial and Antithrombosis Activities of Aged Black Garlic(*Allium sativum* L.) Korean J. Microbiol. Biotechnol. 42 : 285 - 292.
- Jung, I. Y. 2005. Antioxidant activity and radioprotection of two flavonoids from propolis. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 34 : 162 - 166.
- Kang, G. J., N. J. Kang, S. C. Han, D. H. Koo, Y. S. Kim, J. H. Lee, S. C. Kim, D. H. Park, J. S. Lee, H. K. Kang and E. S. Yoo. 2012. Inhibitory Effect of Artemisininic Acid Isolated from *Artemisia Annua* L on the MDC in HaCaT Keratinocytes. Kor. J. Pharmacogn. 43 : 217 - 223.
- Kang, S. H., K. J. Kim. 2013. Effects of *Lithospermum erythrorhizon* on the cytokine gene expression in human keratinocytes. The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 26 : 50 - 62.

- Kim, E. H and D. K. Rhee. 2009. Anti-oxidative properties of ginseng. J. Ginseng Res. 33 : 1 - 7.
- Kim, H. S., M. J. Hong, I. Y. Kang, J. Y. Jung, H. G. Kim, Y. S. Shin, H. J. Jeon, J. G. Seo and Y. H. Kang. 2009. Radical scavenging activities and antioxidant constituents of oriental melon extract. Journal of bio-environment control. 18 : 442 - 447.
- Kim, H. Y and M. H. Kang, 2005. Screening of korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. Phytotherapy research : PTR, 19 : 359 - 361.
- Kim, H. Y and J. H. Oh, 1999. Screening of korean forest Plants for rat lens aldose reductase inhibition. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 63 : 184 - 188.
- Kim, H. Y., W. D. Seo<sup>1</sup>, K. H. Seo, M. J. Lee, S. W. Choi, K. S. Lee, S. L. Kim and H. J. Kang. 2016. Antioxidative and Protective Effects of Corn Silk (*Zea mays* L.) Extract on Human HaCaT Keratinocyte. Korean J. Crop Sci. 61 : 184 - 190.
- Kim, S. Y., S. H. Jung and D. H. Jung. 1993. Screening of zearalenone-producing strains by ELISA method. Journal of the Korean society of Agricultural Chemistry and Biotechnology. 36 : 7 - 10.
- Kim, T. S., W. J. Pack, S. B. Ko and M. H. Kang. 2008. Development of Extracts of *Lycii folium* Having High Antioxidant Activity. J Korean Soc Food Sci Nutr. 37 : 1318 - 1322.
- Kobayashi, H. 2003. *Illicium religiosum* poisoning in fapanese black cattle. Journal of the Japan Veterinary Medical Association. 56 : 15 - 22.
- Langgaard, A. 1881. Ueber die giftwirkung von japanischem sternanis (*Illicium religiosum* Sieb). Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin.s 86 : 222 - 239.
- Lee, H. J and S. N. Park. 2011. Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Quercus salicina* Blume Extracts. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 37 : 143 - 152.

- Lee, H. J., G. N. Im, M. A. Pack and S. N. Pack. 2011. Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. don extracts. Korean journal of microbiology and biotechnology. 39 : 63 - 69.
- Lee, H. J., J. W. Ahn, B. J. Lee, S. G. Moon and Y. W. Seo. 2004. Antioxidant activity of rosa rugosa. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 19 : 67- 71.
- Lee, H. J., G. J. Kang, W. J. Yoon, H. G. Kang, Y. S. Kim, S. M. Kim and E. S. Yu. 2006. Anti-inflammatory effect of unripe fruit of *Citrus grandis* osbeck in RAW 264.7 and HaCaT cells. the korean society of pharmacognosy. 37 : 74 - 80. (Translation).
- Lee, H. J., Y. O. Kim and N. G. Jang. 1997. Allelopathic effects on seed germination and fungus growth from the secreting substances of some plants. The Korean journal of ecology. 20 : 181 - 189.
- Lee, M. Y., M. S. Yu, Y. J. Hwang, Y. J. Jin, M. H. Hong and Y. H. Pyo. 2012. Vitamin C, Total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. korean journal of Food Science Society. 44 : 540 - 544. (Translation).
- Lee, S. G., E. J. Lee, W. D. Park, J. B. Kim and S. W. Choi. 2011. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from Korean Traditional Medicinal Prescriptions. Korean J. food SCI. technol. 43 : 624 - 632.
- Lee, S. H and M. S. Lee. 2017. The research on antioxidative effect of *Sasa quelpaertensis* extractum and assessment of cytotoxicity. Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society. 18 : 687 - 693.
- Lee, S. J., J. H. Shin, H. J. Lee, H. M. Tak, M. J. Kang and N. J. Sung. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Functional Plant Material. Journal of Life Science. 7 : 869 - 878.
- Lee, Y. N., B. R. Song and J. H. Ju. 2014. Anti-inflammatory Activity of Perilla frutescens Britton Seed in RAW 264.7 Macrophages and an

- Ulcerative Colitis Mouse Model. Korean J. food SCI. technol. 46 : 61 - 67.
- Li, J. I., T. Tong, D. O. Ko, D. O. Chung, W. C. Jeong, J. E. Kim and S. G. Kang. 2012. Anti-oxidant and Anti-skin-aging Effects of Abalone Viscera Extracts in Human Dermal Fibroblasts. Korean J Food Preserv. 19 : 463 - 469.
- Lim, E. G., G. T. Kim, B. M. Kim, E. J. Kim, S. Y. Kim, N. K. Han, J. S. Ha and Y. M. Kim. 2017. Study of Anti-microbial Activities and Anti-inflammatory Effects of Chamomile (*Matricaria chamomilla*) Extracts in HaCaT cells. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal. 32 : 9 - 15.
- Minodier, P., P. Pommier, ne. E. Moulè, K. Retornaz, N. Prost and L. Deharo. 2003. Intoxication aiguë par la badiane chez le nourrisson Star anise poisoning in infants. Archives de pédiatrie : organe officiel de la Société française de pédiatrie. 10 : 619 - 621.
- Pandey, R. P., N. Koirala, J. H. Lee, H. C. Lee and J. K. Sohng. 2013. Comparative study of the antioxidative potential of common natural flavonoids and isoflavonoids. Korean journal of microbiology and biotechnology. 41 : 367 - 371.
- Shin, S. W. H. L. Jeong and B. K. Soo. 2012. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Xanthium sibiricum*. Korean J. Plant Res. 25 : 372 - 378.
- Suh, J. H., O. J. Paek, Y. W. Kang, J. E. Ahn, J. S. Yun, K. S. Oh, Y. S. An, S. H. Pack and S. J. Lee. 2013. Study on the Antioxidant Activity in the Various Vegetables. Journal of Food Hygiene and Safety. 28 : 337-341.
- TakaHashi, M. 1994. Exine development in *Illicium Religiosum* Sieb. et Zucc. (*Illiciaceae*). Grana. 33 : 309 - 312.

## 感 謝 文

부족한 저를 학부생부터 대학원까지 항상 지켜봐주시고 지도해주신 송창길 교수님께 진심으로 감사의 말씀드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 논문심사를 맡아주시고 논문이 완성되기까지 좋은 지적과 조언을 해주신 현해남 교수님, 김동순 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 학부와 대학원 과정까지 많은 가르침을 주신 강영길 명예교수님, 전용철 교수님, 김주성 교수님께도 감사의 말씀드립니다.

제가 학부부터 대학원까지 식물에 관심을 가지게 하고 물심양면 도와주신 김현철 박사님, 송진영 박사님, 김태근 선배님, 강정환 선배님께도 감사의 말씀을 드립니다. 실험을 생활을 함께했던 현도경 선배님, 차진우 선배님, 현명선 누나, 노수방 형님, 오동은, 이희선, 신용하, 권난희에게도 감사의 말씀을 드립니다.

제가 논문을 쓰기까지 많은 관심을 가져주신 김찬우 박사님, 송상철 박사님, 장용석 선배님, 김용근 선배님, 김경범 선배님, 이영돈 선배님, 이종훈 조교선생님을 비롯한 대학 및 대학원 선�후배님들께 감사드립니다.

논문이 완성될 때 까지 많은 배려를 해주신 제주메밀영농조합법인 조병학대표님, 김주미 대리님, 제주메밀사업단 현성울 단장님, 이현서 사무국장님, 나은지 사무장님께도 감사의 말씀 드립니다.

지금까지 함께 뒤에서 지켜봐준 김성민, 김재현, 좌동석, 김주미, 김지예, 김지선을 비롯한 많은 친구들에게도 감사드립니다.

마지막으로 저를 늘 응원해준 저희 부모님과 누나, 여동생, 매형에게도 감사드립니다.

이 외에도 저에게 많은 도움을 주시고 배려해주신 많은 분들께 감사의 인사드립니다.