

왕대, 조릿대, 오죽의 추출 용매에 따른 항산화, 신경염증제어 활성 및 지표성분 caffeic acid, *p*-coumaric acid, tricinin의 함량 비교

김연숙¹ · 조덕연² · 김미경³ · 최동국^{1,2,*}

¹건국대학교 생명공학과, ²건국대학교 대학원 응용생명과학과, ³태웅식품

Comparative study of antioxidant and anti-neuroinflammatory activity of leaf extracts of three different species of Bamboos in different extraction solvents containing caffeic acid, *p*-coumaric acid and tricinin

Yon-Suk Kim¹, Duk-Yeon Cho², Mikyung Kim³, and Dong-Kug Choi^{1,2,*}

¹Department of Biotechnology, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University

²Department of Applied Life Sciences, Graduate School, BK21 Program, Konkuk University

³Taewoong Food

Abstract The antioxidant and anti-neuroinflammatory activities of water, 30, 70, and 100% ethanol extracts of leaves of three different species of bamboo (*Phyllostachys nigra*, *P. bambusoides*, and *Sasa borealis*) were investigated. The levels of total polyphenol and flavonoid were measured, and antioxidant activity was evaluated using various antioxidant assays (DPPH, ABTS, and FRAP). Lipopolysaccharide (LPS)-induced BV2 microglial cell activation was used to evaluate the anti-neuroinflammatory properties of the bamboo leaf extracts. Treatment with both aqueous and ethanolic extracts showed no cytotoxicity in BV-2 microglial cells. Pre-treatment of BV-2 cells with bamboo leaf extracts significantly inhibited LPS-induced excessive production of nitric oxide in a dose-dependent manner. Moreover, phytochemical analysis based on the extraction solvent showed that caffeic acid, *p*-coumaric acid, and tricinin are the principal constituents of all three bamboo leaf extracts. Therefore, our findings suggest that bamboo leaf extract contains potent antioxidants and anti-neuroinflammatory compounds that can be used as potential therapeutic agents for the treat neuroinflammatory diseases.

Keywords: bamboo leaf extract, caffeic acid, *p*-coumaric acid, tricinin

서 론

대나무는 벼과의 아과인 대나무아과(Bambusoideae)에 속하는 식물로 열대지역이나 산악지방 등 넓은 지역에 걸쳐 분포되어 있다. 한국에서 자생 및 재배되고 있는 대나무는 5속에 11종, 4변종이 있는 것으로 알려져 있으며, 자생하고 있는 대표적인 종류로는 왕대, 조릿대, 오죽, 솜대, 맹종죽, 신의대 등이 있다(Ju 등, 2005). 대나무는 여러해살이 식물로 매년 재생산이 가능하고, 성장 속도가 빠른 특징 때문에 자원으로 활용이 우수한 장점을 가지고 있다. 대나무의 짙은 죽순이라고 하며 식품으로 사용되고 있으며, 앞은 죽엽이라고 불리며 대잎 차로 제조하여 차로 마시기도 하며 대줄기 및 대가지는 목재에 비해 탄력성이 우수하여 가공이 쉽다는 특징이 있으며 대나무 부위별로도 다양하게 활용하고 있다. 특히, 한의학에서 대나무 죽엽은 열 내림, 출혈방지, 이뇨, 소갈 방지 등에 사용하고, 죽순은 소담, 상위, 이격, 하기, 화열, 지갈, 해독에 사

용하고, 열매는 원기를 북돋는 데 사용하였다(Encyclopedia of orient medical, 1998; Kim 등, 2010).

대나무의 생리활성에 관한 연구로는 대나무의 지방 대사에 미치는 효과(Shin과 Han, 2002), 대나무(이대)의 생리활성 및 항균성 효과(Kim 등, 1996), 항산화 효과 및 아질산염 소거작용(Lim 등, 2004)이 등이 보고되었으며 특히 대나무의 항균 및 항산화 효과가 우수하다고 보고하고 있다. 대나무 잎이 혈중 콜레스테롤과 중성지방을 감소시키며 여러 항산화지표를 개선시켜 시중에 제품이 판매 및 개별인정을 받았으며, 대나무 잎이 혼합된 추출물에서 혈행개선 및 혈관확장의 기능(Choi 등, 2013)과 대나무 잎 추출물에서 항염증 효능 및 지방생성 억제에 대한 분석이 보고되었으나(Yang 등, 2017), 대나무 잎의 추출방법에 따른 항염증 활성이나 항염증 활성의 지표성분에 대한 비교 연구는 아직 부족한 실정이다.

본 연구에 사용된 3종의 대나무(왕대, 조릿대, 오죽) 중 오죽(*Phyllostachys nigra*)은 검정대, 흑죽이라고도 불리며 오죽 잎으로부터 분리된 성분으로는 orientin, vitexin, isoorientin, tricinin, luteolin-6-C-(6"-Otrans-caffeoylglucoside), vattarilflavone, trans-coniferyl alcohol, *p*-coumaric acid, n-feruloyl serotonin, caffeic acid ethyl ether, coumaryl alcohol, coumaric acid ethyl ether 및 ferulic acid ethyl ether가 있다(Kim 등, 2009; Kim 등, 2012; Shang 등, 2014). 왕대(*Phyllostachys bambusoides*)는 강죽, 참대 또는 고죽이라고도 불리며 왕대잎에서 항산화

*Corresponding author: Dong-Kug Choi, Department of Applied Life Sciences, Graduate School, BK21 Program, Konkuk University, Chungju 27478, Korea
Fax: +82-43-852-3616
E-mail: choidek@kku.ac.kr
Received March 8, 2021; revised April 14, 2021;
accepted April 14, 2021

활성이 우수한 homoorientin을 추출하였으며(Lee와 Um, 2008), ferulic acid, vanillin, coniferaldehyde, coniferyl alcohol, coniferaldehyde, 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone, *p*-methoxycinnamic acid, (±)-balanophonin, 6-methoxychromanone을 분리하였다(Kim 등, 2011). 우리나라에서 가장 흔한 대나무 종류 중 하나인 조릿대(*Sasa borealis*)는 다른 이름으로는 산죽, 지죽, 조죽, 입죽 등으로 부르며 조릿대의 줄기와 잎에는 acetic acid, citric acid, succinic acid, oxalic acid, tartaric acid, formic acid, malic acid 및 fumaric acid 등이 검출되었으며, 줄기보다 잎에 유기산이 많이 함유되어 있으며(Ko, 2008) syringaresinol과 tricetin, tricetin 7-*o*-β-D-glucopyranoside, luteolin 6-C-α-L-arabinopyranoside (isoorientin), isoorientin 2-*O*-α-L-rhamnoside, apigenin 6-C-β-D-xylopyranosyl-8-C-D-glucopyranoside 등이 함유되어 있음이 보고되었다(Jeong 등, 2007; Park 등, 2007; Yoon 등, 2000). 본 연구는 죽엽의 종류와 추출방법에 따라 항산화 활성 및 신경염증의 효능을 비교하여 시료의 추출 최적 조건을 확인하고자 하였으며, 또한 죽엽에 포함된 함량이 많고 기존 연구를 통하여 항염증효능이 우수하다고 알려진 물질인 caffeic acid, *p*-coumaric acid 와 tricetin을 지표성분으로 하여 품종 및 추출방법에 따른 함량의 차이가 있는지 확인하고자 하였다.

따라서 본 연구는 우리나라 대나무 종류 중 가장 일반적인 3종의 대나무(왕대, 조릿대, 오죽)를 이용하여 추출 용매에 따른 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 항산화 활성의 비교 및 BV2 세포를 이용하여 LPS로 유도된 과도한 신경염증에 대한 억제 효과를 평가하였으며, 항염증 활성의 주요 지표 성분인 caffeic acid, *p*-coumaric acid 와 tricetin의 함량을 확인하였다. 본 연구는 대나무잎 추출물을 신경염증질환에 사용할 수 있는 소재로 활용하는데 있어 기초 자료로 삼고자 수행하였다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용한 대나무잎 3종은 2020년 8월 백옥산업(Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, Folin-Ciocalteu's reagent, lipopolysaccharide (LPS), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), catechin, ferric chloride (FeCl₃), 4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), caffeic acid, *p*-coumaric acid 및 tricetin 시약은 Sigma-Aldrich Ltd. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 그 외에 사용된 시약은 모두 특급을 사용하였다.

시료의 추출

본 실험에 사용된 대나무잎 3종(왕대, 조릿대, 오죽)의 시료는 열수 추출과 30, 70, 100% 주정 추출 네 가지 방법으로 추출하였다. 열수 추출은 왕대(106.5 g), 조릿대(90 g), 오죽(52 g)에 정제수 각 2.0 L를 추가하여 60°C에서 16시간 동안 환류 추출하여 여과한 후 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 -80°C에 얼린 후 동결건조하였다. 주정 추출은 열수 추출과 같은 양의 시료에 각각 30% 에탄올, 70% 에탄올 및 100% 에탄올 2.0 L를 넣은 후 60°C에서 16시간 동안 환류 추출하여 여과한 후 감압 농축하고 동결건조하여 30% 주정추출물, 50% 주정추출물, 100% 주정추출물을 제조하였다. 이와 같이 제조한 12개의 시료는 냉동보관 하면서 실험에 사용하였다.

총폴리페놀 함량 측정

총폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Gutfinger, 1981)을 약간 변형하여 측정하였으며, 시료 200 μL에 1.0 N Folin-Ciocalteu 시약 및 20% Na₂CO₃ 용액을 각 1.0 mL씩 차례로 넣은 다음 실온에서 30분 반응시킨 후 분광광도계(Thermo Scientific Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 대나무 추출물의 총폴리페놀 함량을 산출하였고 gallic acid equivalents (mg GAE/g extract)로 나타내었다.

총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량은 Jia 등(1999)의 방법을 약간 변형하여 측정하였으며, 시료 0.25 mL에 증류수 1.25 mL를 혼합하고 5% sodium nitrite 75 μL 추가한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 10% aluminum chloride 0.15 mL를 추가한 후 실온에서 6분간 반응시킨 다음 1.0 M sodium hydroxide 0.5 mL와 증류수 275 μL를 차례로 추가하여 혼합한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 표준물질로 사용하여 표준검량선을 작성하였으며, 표준검량선으로부터 대나무 추출물의 총플라보노이드 함량을 계산하였고 결과는 catechin equivalents (mg CE/g extract)로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 Blois의 방법(1958)을 조금 변형하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다. Blank는 에탄올 100 μL, control은 에탄올 50 μL와 2 mM DPPH 용액 50 μL, DPPH와 시료 반응군은 에탄올 40 μL, DPPH 용액 50 μL와 시료 10 μL를 넣고, 시료 자체의 흡광도군은 에탄올 90 μL와 시료 10 μL를 넣은 후 상온에서 30분간 반응시킨 다음 515 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였으며 활성은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (1 - (C - D) / (B - A)) \times 100$$

A: Blank 흡광도

B: Control 흡광도

C: DPPH와 시료 반응액의 흡광도

D: 시료 자체의 흡광도

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)을 이용한 총항산화력 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(1999)의 방법에 따라 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 시료 0.15 mL과 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며 총 항산화력은 FeSO₄를 표준물질로 사용하여 mM FeSO₄ equivalent/mg extract로 나타내었다.

ABTS 라디칼을 이용한 총항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 총항산화력의 측정은 Re 등(1999)의 방법을 조금 변형하여 사용하였다. 7.4 mM ABTS 용액과 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 어두운 곳에서 12~16시간 동안 반응시켜 ABTS 라디칼을 생성하였다. 생성된 ABTS 라디칼의 흡광도가 734 nm에서 1.5가 되도록 증류수로 희석

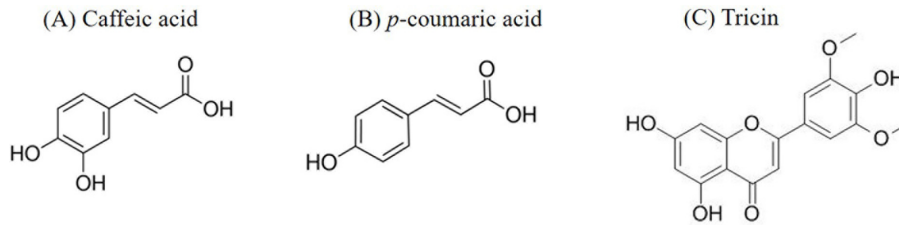


Fig. 1. The structure of caffeic acid, *p*-coumaric acid and triclin.

한 후 3.0 mL를 취하고 시료 1.0 mL를 넣은 후 실온에서 10 분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 Trolox 를 표준물질로 사용하여 mM Trolox equivalent/mg extract로 나타내었다.

Nitric oxide (NO) 및 세포 생존율 측정

Mouse microglia 세포인 BV2 세포를 5% fetal bovine serum 과 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지를 사용하여 5% CO₂와 37°C 조건에서 배양하였다. BV2 세포는 1×10⁵/well의 농도로 24-well plate에 분 주하고 다음날 시료를 1시간 전처리한 후, LPS (200 ng/mL) 를 처리하여 20시간 동안 신경염증 반응을 유도하였다. 세포 배양액의 상등액 100 μL를 취하여 Griess 시약과 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성량을 측정하였다. 결과는 표준물질인 sodium nitrate (NaNO₃) 용액을 사용하여 NO의 생성량을 표시하였다. 세포의 생존율은 MTT 방법을 이 용하여 측정하였다. NO 측정할 때와 같은 조건으로 BV2 세 포에 시료 및 LPS를 처리 후 24시간 후 MTT 용액을 넣고 2 시간 더 배양하였다. 배지를 버리고 DMSO를 넣어 MTT로 형성된 formazan을 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였 다. 무처리군인 control을 100% 기준으로 세포의 생존율을 계 산하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

HPLC 분석에 사용한 용매 및 이동상은 모두 HPLC급으로 Duksan Pure chemical (Ansan, Gyeonggi, Korea)사 제품을 사 용하였다. 본 실험에 사용된 표준물질인 caffeic acid, *p*- coumaric acid 및 triclin (Fig. 1)은 에탄올에 녹여 표준용액으 로 사용하였다. HPLC를 이용한 caffeic acid, triclin 및 *p*- coumaric acid의 정량 분석은 C18 칼럼을 이용하였으며, 0.1% 초산 용액과 acetonitrile을 이동상으로 사용하였다. 0.8 mL/min 의 유속으로 기울기 용출(gradient elution) 방법을 이용하여 측 정하였으며, 320 nm 파장에서 검출한 피크 면적을 이용하여 검량곡선을 작성하여 분석하였다. 분석에 사용한 시료 중 물 추출물은 10 mg/mL의 농도로 물에 녹여 0.45 μm로 필터 후 시료로 사용하였고, 에탄올 추출물은 10 mg/mL의 농도로 에 탄올에 녹여 필터 후 시료로 사용하였다. HPLC는 Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 제품을 사용하였고, 칼럼은 Thermo scientific사 제품인 Synchronis C18 (250×4.6 mm) 사용하였으며 Table 2와 같은 조건으로 caffeic acid, triclin 및 *p*-coumaric acid 함량을 측정하였다.

통계분석

실험 결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차(SD)를 구하 였으며, 각 구간 유의성의 검증은 GraphPad Prism 5.0 version

Table 1. Extraction yields, total polyphenol, flavonoid contents, FRAP and TEAC values of the various bamboo leaf extracts

Sample	Extraction solvent	Extraction yield (% w/w)	Total polyphenol content (mg GAE/g extract)	Total flavonoid content (mg CE/g extract)	FRAP (mM FeSO ₄ eq./mg extract)	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)
<i>P.bambusoides</i>	Water	5.91	31.969±0.206 ^b	3.593±1.697 ^a	0.337±0.010 ^{b,c}	0.379±0.037 ^b
	30% ethanol	6.24	34.546±1.148 ^c	8.037±0.641 ^c	0.399±0.005 ^{c,d}	0.476±0.030 ^d
	70% ethanol	6.21	31.419±1.194 ^b	8.407±1.697 ^c	0.402±0.007 ^{c,d}	0.426±0.025 ^{c,d}
	100% ethanol	4.96	30.491±0.297 ^b	13.963±0.641 ^d	0.394±0.008 ^{c,d}	0.386±0.009 ^b
<i>P.nigra</i>	Water	6.69	64.993±0.833 ^e	27.296±0.641 ^e	0.978±0.024 ^e	0.655±0.021 ^{e,f}
	30% ethanol	7.23	69.736±2.282 ^f	37.296±3.394 ^f	1.110±0.020 ^{e,f}	0.692±0.021 ^f
	70% ethanol	7.39	68.911±1.491 ^f	37.296±1.283 ^f	1.152±0.020 ^f	0.688±0.013 ^f
	100% ethanol	6.21	60.113±0.676 ^d	37.667±1.111 ^f	1.042±0.011 ^e	0.609±0.007 ^c
<i>S.borealis</i>	Water	6.92	25.852±0.297 ^a	2.852±0.641 ^a	0.266±0.004 ^a	0.347±0.014 ^{a,b}
	30% ethanol	7.28	31.213±0.586 ^b	3.593±0.641 ^a	0.367±0.014 ^c	0.408±0.025 ^c
	70% ethanol	7.47	31.797±1.229 ^b	6.185±1.283 ^b	0.378±0.009 ^c	0.403±0.027 ^c
	100% ethanol	6.44	24.718±0.487 ^a	6.926±1.697 ^b	0.266±0.005 ^a	0.301±0.021 ^a
BHT	-	-	-	-	0.456±0.011 ^d	0.791±0.013 ^e

GAE (gallic acid equivalents), CE (catechin equivalents), FRAP (Ferric reducing antioxidant power), TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Values represent means±SD (n=3). Different letters (a-g) represent statistically significant differences (p<0.05).

Table 2. Analytical conditions of HPLC for various bamboo leaf extracts

Description	Condition																									
HPLC model	Thermo scientific (Ultimate 3000)																									
Column	Synchronis C18 (250×4.6 mm, 5 μm) A: water (0.1% Acetic acid) B: 100% Acetonitrile																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Time (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td rowspan="5">Mobile phase</td> <td>5</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">Gradient</td> <td>15</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>		Time (min)	%A	%B		0	100	0	Mobile phase	5	80	20	Gradient	15	65	35	20	40	60	30	25	75	35	0	100
	Time (min)	%A	%B																							
	0	100	0																							
Mobile phase	5	80	20																							
	Gradient	15	65	35																						
		20	40	60																						
		30	25	75																						
		35	0	100																						
Flow rate	0.8 mL/min																									
Detection	UV detector 320 nm																									
Inject volume	20 μL																									

(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 로 검증하여 p 값이 0.05 미만을 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

죽엽 추출물의 추출 수율 및 총폴리페놀, 총플라보노이드 함량

대나무 3종(왕대, 조릿대, 오죽)의 죽엽 추출 용매별 수율을 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 왕대의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 추출물, 100% 주정추출물의 수율은 각각 5.91, 6.24, 6.21, 4.96%이었으며 조릿대의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물, 100% 주정추출물의 수율은 각각 6.92, 7.28, 7.47, 6.44%이었다. 오죽의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물, 100% 주정추출물의 수율은 각각 6.69, 7.23, 7.39, 6.21%로 대나무 3종 중 조릿대의 추출수율이 약간 높게 나타났으나 큰 차이는 나타나지 않았다. 또한, 대나무 3종 모두 100% 주정으로 추출한 추출물의 수율이 각각 4.96, 6.44, 6.21%로 다른 용매로 추출했을 때보다 약간 낮았으나 큰 차이는 나타나지 않았다.

페놀성 물질인 폴리페놀과 플라보노이드는 다양한 식물들에서 발견되고 있으며, 항산화, 항염, 항균 등 다양한 생리활성을 나타낸다는 많은 연구 결과들이 알려져 있다(Oh와 Yoon, 2017). 대나무 3종을 용매별로 추출하여 얻은 12종의 시료의 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량을 측정 결과를 Table 1에 나타내었다. 왕대의 열수추출물의 총폴리페놀 함량은 31.969 ± 0.206 mg GAE/g extract이고, 30% 주정추출물은 34.546 ± 1.148 mg GAE/g extract, 70% 주정추출물은 31.419 ± 1.194 mg GAE/g extract, 100% 주정추출물은 30.491 ± 0.297 mg GAE/g extract를 나타내었다. 이러한 결과는 김 등(2018)의 연구에서 측정된 왕대 죽엽의 폴리페놀 함량 결과와도 유사함을 확인하였다. 조릿대 추출물의 총폴리페놀 함량을 측정한 결과, 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물, 100% 주정추출물이 각각 25.852 ± 0.297 , 31.213 ± 0.586 , 31.797 ± 1.129 , 24.718 ± 0.487 mg GAE/g extract를 나타내었다. 오죽의 열수추출물의 총폴리

페놀 함량은 64.993 ± 0.833 mg GAE/g extract이고, 30% 주정추출물은 69.736 ± 2.282 mg GAE/g extract, 70% 주정추출물은 68.911 ± 1.491 mg GAE/g extract, 100% 주정추출물은 60.113 ± 0.676 mg GAE/g extract를 나타내었으며 오죽추출물이 왕대나 조릿대보다 총폴리페놀 함량이 높았다.

왕대의 총플라보노이드 함량은 열수 추출물이 3.593 ± 1.697 mg CE/g extract이고, 30% 주정추출물은 8.037 ± 0.641 mg CE/g extract, 70% 주정추출물은 8.407 ± 1.697 mg CE/g extract, 100% 주정추출물은 13.963 ± 0.641 mg CE/g extract을 나타내었다. 조릿대의 총 플라보노이드 함량은 열수 추출물이 2.852 ± 0.641 mg CE/g extract이고, 30% 주정추출물은 3.593 ± 0.641 mg CE/g extract, 70% 주정추출물은 6.185 ± 1.283 mg CE/g extract, 100% 주정추출물은 6.926 ± 1.697 mg CE/g extract을 나타내었다. 오죽의 총플라보노이드 함량은 열수 추출물이 27.296 ± 0.641 mg CE/g extract이고, 30% 주정추출물은 37.296 ± 3.394 mg CE/g extract, 70% 주정추출물은 37.296 ± 1.283 mg CE/g extract, 100% 주정추출물은 37.667 ± 1.111 mg CE/g extract를 나타내었다. 오죽의 총플라보노이드 함량 또한 총폴리페놀 함량의 결과와 유사하게 왕대나 조릿대 보다 높은 것을 확인하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

3종의 대나무잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Fig. 2에 나타내었다. 각각 농도별 시료가 DPPH 라디칼 소거 효과가 있는지 확인하기 위하여, 100-1,000 μg/mL의 농도 범위에서 측정하였으며 시료의 농도와 용매별 활성 차이를 비교하였다. 왕대의 추출물별 시료를 농도별로 처리하였을 때 DPPH 라디칼 소거 활성은 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 그러나 왕대의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물, 100% 주정추출물은 1,000 μg/mL의 농도에서 각각 15.05 ± 1.55 , 20.54 ± 2.63 , 20.89 ± 2.41 , $24.10 \pm 1.54\%$ 로 DPPH 라디칼 소거 활성이 낮았다. 또한, 조릿대 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물, 100% 주정추출물 1,000 μg/mL의 농도에서 각각 11.10 ± 1.95 , 18.09 ± 2.26 , 22.10 ± 1.00 , $16.26 \pm 1.94\%$ 의 DPPH 라디칼을 소거하여, 왕대 추출물과 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 오죽 추출물의 추출물별 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물, 100% 주정추출물은 1,000 μg/mL의 농도에서 각각 50.71 ± 1.24 , 53.47 ± 1.22 , 58.25 ± 1.56 , $53.00 \pm 3.25\%$ 로 3종의 대나무 추출물 중 오죽 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 우수하였다. 이는 오죽의 총폴리페놀 함량 및 총플라보노이드 함량이 3종의 대나무잎 추출물 중 가장 많았던 결과와 유사하였으나, 용매별 추출물의 총폴리페놀 함량 및 총플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거활성과 정확히 일치하지는 않았다.

FRAP (Ferric reducing antioxidant power)법을 이용한 총항산화력

FRAP 방법을 사용하여 대나무잎 추출물의 항산화력을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 왕대의 물추출물은 0.337 ± 0.010 mM FeSO₄ eq./mg extract, 30% 주정추출물은 0.399 ± 0.005 mM FeSO₄ eq./mg extract, 70% 주정추출물은 0.402 ± 0.007 mM FeSO₄ eq./mg extract, 100% 주정추출물은 0.394 ± 0.008 mM FeSO₄ eq./mg extract를 나타내었으며 주정추출물이 물추출물 보다 약간 높은 항산화력을 나타내었지만 큰 차이는 없었다. 오죽의 물추출물은 0.978 ± 0.024 mM FeSO₄ eq./

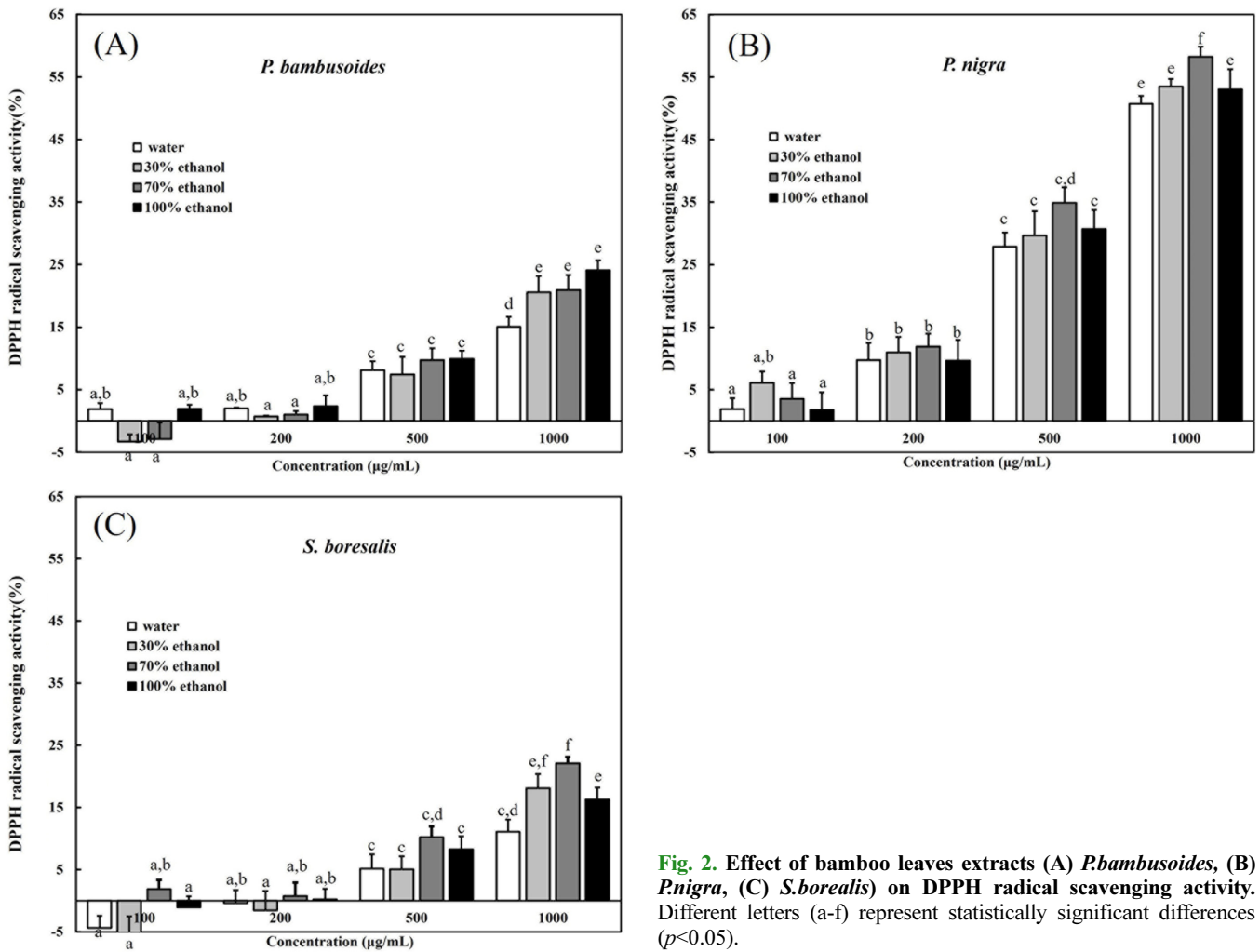


Fig. 2. Effect of bamboo leaves extracts (A) *Pbambusoides*, (B) *Pnigra*, (C) *Sboresalis* on DPPH radical scavenging activity. Different letters (a-f) represent statistically significant differences ($p < 0.05$).

mg extract, 30% 주정추출물은 1.110 ± 0.020 mM FeSO₄ eq./mg extract, 70% 주정추출물은 1.152 ± 0.020 mM FeSO₄ eq./mg extract, 100% 주정추출물은 1.042 ± 0.011 mM FeSO₄ eq./mg extract를 나타내었다. 조릿대의 물추출물은 0.266 ± 0.004 mM FeSO₄ eq./mg extract, 30% 주정추출물은 0.367 ± 0.014 mM FeSO₄ eq./mg extract, 70% 주정추출물은 0.378 ± 0.009 mM FeSO₄ eq./mg extract, 100% 주정추출물은 0.266 ± 0.005 mM FeSO₄ eq./mg extract를 나타내었다. 오죽 추출물이 DPPH 라디칼 소거활성 결과와 마찬가지로 왕대나 조릿대 추출물 보다 훨씬 강한 항산화력을 나타내었다(Table 1). 또한, 양성 대조군인 BHT의 경우 0.456 ± 0.011 mM FeSO₄ eq./mg extract값을 나타내었고, 이는 오죽 추출물이 항산화제인 BHT보다 더 우수한 전자공여 능력을 통한 항산화력이 있음을 나타냄을 의미한다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력

ABTS 라디칼 소거능을 이용하여 항산화력을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었으며, Trolox를 표준물질로 사용하여 총 항산화력을 TEAC (mM Trolox eq./mg extract) 값으로 나타내었다. 왕대의 물추출물의 항산화력은 0.379 ± 0.037 mM Trolox eq./mg extract, 30% 주정추출물은 0.476 ± 0.037 mM Trolox eq./mg extract, 70% 주정추출물은 0.426 ± 0.025 mM Trolox

eq./mg extract, 100% 주정추출물은 0.386 ± 0.009 mM Trolox eq./mg extract로 주정추출물이 물추출물 보다 총항산화력이 약간 높았으나 큰 차이는 없었다. 오죽의 물추출물의 항산화력은 0.655 ± 0.021 mM Trolox eq./mg extract, 30% 주정추출물은 0.692 ± 0.021 mM Trolox eq./mg extract, 70% 주정추출물은 0.688 ± 0.013 mM Trolox eq./mg extract를 나타내었으며, 양성대조군으로 사용한 BHT (0.791 ± 0.013 mM Trolox eq./mg extract)의 TEAC 값보다는 낮았지만 오죽추출물의 총항산화력이 우수함을 확인하였다. 조릿대 추출물의 총항산화력을 측정할 결과, 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물이 각각 0.347 ± 0.014 , 0.408 ± 0.025 , 0.403 ± 0.027 , 0.301 ± 0.021 mM Trolox eq./mg extract를 나타내었다. FRAP 결과와 마찬가지로 오죽추출물이 왕대나 조릿대추출물 보다 총항산화력이 우수한 것을 확인할 수 있었다.

죽엽 추출물의 NO 생성 억제 효과 및 세포 생존율 확인

과도한 NO의 생성은 산화적 손상이나 뇌혈관장벽(blood-brain-barrier) 붕괴와 같은 다양한 과정을 통해 뇌신경 질환에 연관되어있기 때문에 NO의 생성을 효과적으로 조절하는 것이 신경염증의 치료와 예방을 위한 일반적인 접근방법으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 항산화 활성이 가장 우수하였던 70% 주정추출물을 이용하여, LPS에 의해 활성화된 BV2

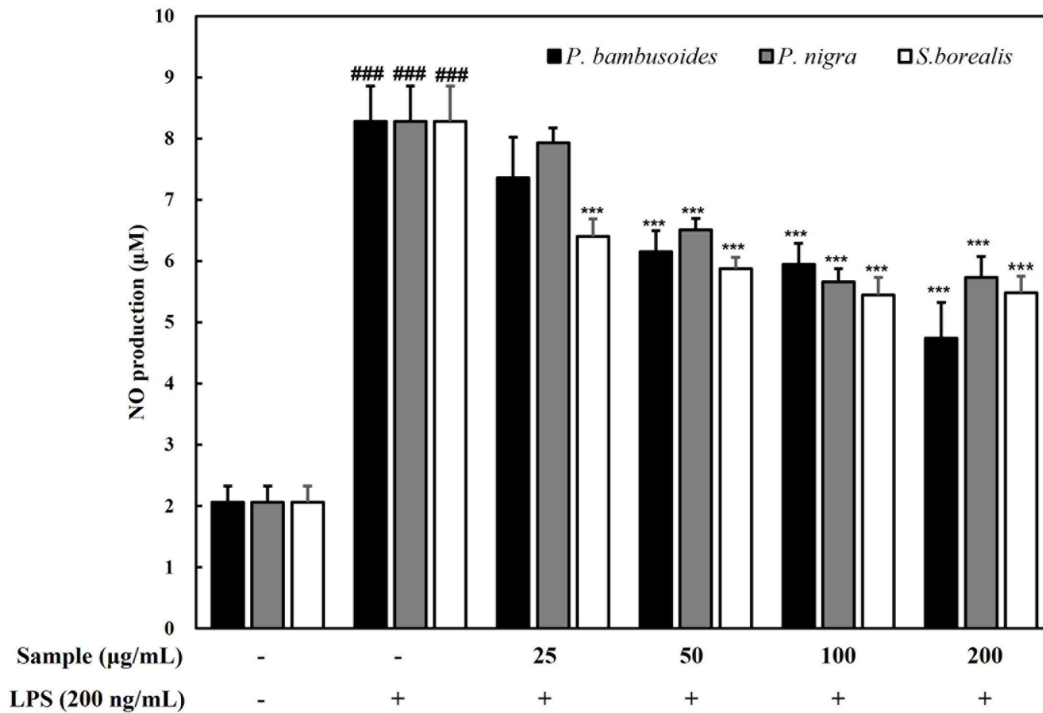


Fig. 3. Effect of bamboo leaves extracts on NO production in LPS-stimulated BV2 cells. The BV2 cells were treated with samples at various concentrations (25, 50, 100, and 200 µg/mL) with or without LPS (200 ng/mL) for 20 h. The nitrite in the culture supernatant was evaluated using Griess reagent. Data are presented as the mean±SD ($n=3$) for three independent experiments. ### $p<0.001$ versus control, *** $p<0.001$ versus LPS are significantly different as analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

세포의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, LPS 처리에 의해 증가된 NO의 생성량이 3종의 죽엽 추출물(70% 주정추출물)이 모두 농도 의존적으로 감소시키고 있음을 확인할 수 있었으며, 50-200 µg/mL의 농도에서 3종의 추출물 모두 유의적인 NO 생성억제를 나타내었다(Fig. 3). 특히, 저농도에서는 조릿대 추출물이 고농도에서는 왕대 추출물이 NO의 생성량을 효과적으로 억제하고 있음을 확인하였다. 이러한 NO의 감소가 세포독성에 의한 것인지 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포의 생존율을 측정된 결과 3종의 추출물 모두 최고 농도인 200 µg/mL에서 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다(Data not shown). 따라서, 3종의 죽엽추출물은 LPS로 과도하게 유도된 신경염증반응을 억제하였으며 이는 항신경염증 효과를 나타내는 것으로 판단되며 이후 신경염증 억제 효과에 관한 신호전달에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Caffeic acid, Tricin 및 *p*-coumarin 함량 비교

Caffeic acid, tricin 및 *p*-coumarin은 기존 연구를 통하여 항염증 활성의 우수함이 많이 알려져 있기 때문에(Kang 등, 2016; Yang 등 2013; Zhao 등, 2016; Zhu 등, 2018), 본 연구에서는 죽엽추출물의 항염증 지표물질로 caffeic acid, tricin 및 *p*-coumarin을 설정하고 HPLC를 이용하여 대나무 3종의 추출용매별 추출물(총 12종)에서 함량 차이가 있는지 비교하고자 하였다. Caffeic acid의 함량을 측정된 결과, 왕대와 조릿대의 물추출물에서는 caffeic acid의 함량이 측정되지 않았으며 왕대의 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물의 caffeic acid 함량은 각각 0.077±0.060, 0.084±0.001, 0.232±0.007 µg/mg으로 100% 주정추출물에서 함량이 가장 높

게 나타났다(Table 3). 조릿대의 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물의 caffeic acid 함량을 측정된 결과 각각 0.092±0.073, 0.113±0.011, 0.118±0.023 µg/mg로 추출물별 함량차이는 나타나지 않았다. 오죽의 물추출물 및 30% 주정추출물, 70% 주정추출물, 100% 주정추출물의 caffeic acid 함량은 각각 6.247±0.049, 0.889±0.064, 1.481±0.162, 2.586±0.036 µg/mg로 물추출물에서 caffeic acid 함량이 가장 높았으며, 오죽추출물이 왕대나 조릿대 추출물보다 caffeic acid 함량이 높았다.

왕대 추출물의 *p*-coumaric acid 함량 분석 결과, 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물의 *p*-coumaric acid 함량은 각각 1.557±0.340, 6.799±0.392, 7.345±0.502 및 9.168±1.480 µg/mg으로 100% 주정추출물에서 함량이 가장 높았다. 조릿대의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물의 *p*-coumaric acid 함량은 1.371±0.067, 6.502±0.232, 6.774±0.865, 6.496±0.949 µg/mg으로 왕대추출물의 결과와 마찬가지로 물추출물 보다 주정추출물의 *p*-coumaric acid 함량이 높았다. 오죽의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물의 *p*-coumaric acid 함량은 1.968±0.340, 6.944±1.054, 10.931±1.467, 9.374±1.140 µg/mg으로 70% 주정추출물에 포함된 *p*-coumaric acid 함량이 가장 높았으며 물추출물보다 주정추출물의 *p*-coumaric acid 함량이 높게 나타났다.

왕대 추출물의 tricin 함량 분석 결과, 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물은 각각 0.325±0.034, 2.627±1.423, 3.094±0.578, 4.856±1.426 µg/mg의 함량을 나타내었다. 조릿대의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물의 tricin 함량은 각각 0.298±0.031,

Table 3. Tricin, *p*-coumaric acid and caffeic acid contents of various bamboo leaf extracts

Sample	Extraction solvent	Caffeic acid (µg/mg)	<i>p</i> -coumaric acid (µg/mg)	Tricin (µg/mg)
<i>P.bambusoides</i>	Water	-	1.557±0.340 ^a	0.325±0.034 ^a
	30% ethanol	0.077±0.060 ^a	6.799±0.392 ^b	2.627±1.423 ^c
	70% ethanol	0.084±0.001 ^a	7.345±0.502 ^c	3.094±0.578 ^d
	100% ethanol	0.232±0.007 ^c	9.168±1.480 ^d	4.856±1.426 ^f
<i>P.nigra</i>	Water	6.247±0.049	1.968±0.340 ^a	0.412±0.019 ^a
	30% ethanol	0.889±0.064 ^d	6.944±1.054 ^{b,c}	1.149±0.087 ^b
	70% ethanol	1.481±0.162 ^c	10.931±1.467 ^e	5.233±2.698 ^g
	100% ethanol	2.586±0.036 ^f	9.374±1.140 ^d	3.094±0.875 ^d
<i>S.borealis</i>	Water	-	1.371±0.067 ^a	0.298±0.031 ^a
	30% ethanol	0.092±0.073 ^{a,b}	6.502±0.232 ^b	2.538±0.177 ^c
	70% ethanol	0.113±0.011 ^b	6.774±0.865 ^b	4.458±1.511 ^e
	100% ethanol	0.118±0.023 ^b	6.496±0.949 ^b	4.276±1.488 ^e

Different letters (a-g) represent statistically significant differences ($p < 0.05$).

2.538±0.177, 4.458±1.511 및 4.276±1.488 µg/mg을 나타내었으며 70% 주정추출물에서 triclin 함량이 가장 높았다. 오죽의 물추출물, 30% 주정추출물, 70% 주정추출물 및 100% 주정추출물의 triclin 함량은 0.412±0.019, 1.149±0.087, 5.233±2.698 및 3.094±0.875 µg/mg을 나타내었으며 조릿대 추출물과 마찬가지로 70% 주정추출물에서 triclin 함량이 가장 높았다. 본 연구에서 죽엽추출물의 항염증 지표물질로 설정한 caffeic acid, triclin 및 *p*-coumarin을 비교한 결과, 처음 연구의 가설처럼 지표물질의 함량과 NO 생성 억제효과가 일치하지는 않았으나 모두 NO 생성을 효과적으로 억제하였다. 따라서, 이는 천연물의 특징상 다양한 성분으로 인한 다중의 기능에 영향을 미치는 것으로 판단되며 이후 활성물질을 규명하는 연구를 진행하고자 한다.

요 약

본 연구에서는 국내에 자생하는 대나무 중 3종(왕대, 조릿대, 오죽)의 죽엽을 4종의 추출용매(물, 30% 주정, 70% 주정, 100% 주정)를 이용하여 추출 후 추출물별 항산화 활성 탐색, 신경염증 억제 효과 및 HPLC-UV 분석 방법에 의한 3가지 지표성분(caffeic acid, *p*-coumaric acid 및 Tricin)의 함량을 측정하였다. FRAP 방법과 DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거능 측정방법을 이용하여 항산화 활성을 탐색하였으며, 3종의 대나무 중에서는 오죽 추출물이 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량이 가장 높았다. FRAP 방법, DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거능 방법을 이용하여 항산화 활성을 측정된 결과 또한 오죽 추출물이 가장 우수하였다. Caffeic acid의 함량은 오죽의 물추출물이 6.247±0.049 µg/mg으로 가장 높았으며, *p*-coumaric acid의 함량은 오죽의 70% 주정추출물이 10.931±1.467 µg/mg으로 가장 높았으며 다음으로는 오죽의 100% 주정추출물이 9.374±1.140 µg/mg으로 높게 나타났으며 3종 죽엽의 물추출물을 제외한 주정추출물은 모두 *p*-coumaric acid 함량이 높음을 확인하였다. Tricin의 함량을 측정된 결과 또한 물추출물에서는 함량이 낮았으나, 70% 주정추출물이나 100% 주정추출물은 3종의 죽엽추출물 모두에서 3.094±0.875-5.233±2.698 µg/mg로 비슷한 함량을 나타내었다. LPS를 사용

하여 미세아교세포의 활성화를 유도하여 신경염증반응의 지표인 NO의 생성량을 측정한 결과 3종의 죽엽추출물(70% 주정추출물) 모두 농도 의존적으로 NO의 생성량을 억제하였다. 따라서 본 연구의 결과는 죽엽추출물이 미세아교세포의 과도한 신경염증 활성화로 인해 발생하는 뇌 신경질환의 치료 소재로서 활용 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성(R&D, S2912607)”사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

References

- Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299: 15-27 (1999)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1181: 1199-1200 (1958)
- Choi S, Park MS, Lee YR, Lee YC, Kim TW, Do SG, Kim DS, Jeon BH. A standardized bamboo leaf extract inhibits monocyte adhesion to endothelial cells by modulating vascular cell adhesion protein-1. *Nutr. Res. Pract.* 7: 9-14 (2013)
- Encyclopedia of orient medical, Jeungdam press, Seoul, Korea, 5026 (1998)
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 966-968 (1981)
- Jeong YH, Chung SY, Han AR, Sung MK, Jang DS, Lee J, Kwon YJ, Lee HJ, Seo EK. P-glycoprotein inhibitory activity of two phenolic compounds, (-)-syringaresinol and triclin from *Sasa borealis*. *Chem. Biodivers.* 4: 12-16 (2007)
- Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559 (1999)
- Ju IO, Jung GT, Ryu J, Choi JS, Choi YG. Chemical components and physiological activities of bamboo (*Phyllostachys bambusoides* Starf) extracts prepared with different methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 542-548 (2005)
- Kang BM, An BK, Jung WS, Jung HK, Cho JH, Cho HW, Jang SJ,

- Yun YB, Kuk YI. Anti-inflammatory effect of tricrin isolated from *Alopecurus aequalis* Sobol. on the LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Int. J. Mol. Med.* 38: 1614-1620 (2016)
- Kim MJ, Byun MW, Jang MS. Physiological and antibacterial activity of bamboo(*Sasa coreana* Nakai) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 135-142 (1996)
- Kim YS, Cho KA, Choi DB. Effect of solvents of extraction on the biological activities of *Phyllostachys Nigra* Munro. *Appl. Chem. Eng.* 21: 6-10 (2010)
- Kim DS, Choi MH, Shin HJ. Polyphenol contents and antioxidant activities of domestic bamboo leaves with different extraction solvents. *J. Adv. Eng. Tech.* 11: 7-13 (2018)
- Kim SM, Jeon JS, Kang SW, Kim WR, Lee KD, Um BH. Composition analysis and antioxidant activity of ojuk (*Phyllostachys nigra* Munro) leaf tea and shoot tea. *J. Appl. Biol. Chem.* 55: 95-101 (2012)
- Kim HJ, Kang MA, Kim SH, Yim SH, Lee IS. Bioactive phenolic constituents from the culms of *Phyllostachys bambusoides*. *Nat. Prod. Sci.* 17: 267-272 (2011)
- Kim CY, Lee HJ, Jung SH, Lee EH, Cha KH, Kang SW, Pan CH, Um BH. Rapid identification of radical scavenging phenolic compounds from black bamboo leaves using high-performance liquid chromatography coupled to an online ABTS+ -based assay. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52: 613-619 (2009)
- Ko MS. Chemical components in stalks and leaves of *Sasa borealis* Makino and antioxidative and antimicrobial activities of extracts. *Korean J. Food Preserv.* 15: 125-132 (2008)
- Lee KJ, Um BH. Extraction and Antioxidant activity analysis of homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* S. leaves. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51: 245-246 (2008)
- Lim AJ, Na YS, Beak SH. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Phyllostachys bambusoides*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 306-310 (2004)
- Oh MH, Yoon KY. Biological activity of crude polyphenol fractions of *Cedrela sinensis* isolated using different extraction methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 438-443 (2017)
- Park HS, Lim JH, Kim HJ, Choi HJ, Lee IS. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. *Arch. Pharm. Res.* 30: 161-166 (2007)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Shang YF, Kim SM, Um BH. Optimisation of pressurised liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. *Food Chem.* 154: 164-170 (2014)
- Shin MK, Han SH. Effects of methanol extracts from bamboo (*Pseudosasa japonica* Makino) leaves extracts on lipid metabolism in rats fed high fat and high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Cult.* 17: 30-36 (2002)
- Yang JH, Choi MH, Yang SH, Cho SS, Park SJ, Shin HJ, Ki SH. Potent anti-inflammatory and antiadipogenic properties of bamboo (*Sasa coreana* Nakai) leaves extract and its major constituent flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 65: 6665-6673 (2017)
- Yang WS, Jeong D, Yi YS, Park JG, Seo HH, Moh SH, Hong SY, Cho JY. IRAK1/4-targeted anti-inflammatory action of caffeic acid. *Mediators Inflamm.* DOI: 10.1155/2013/518183 (2013)
- Yoon KD, Kim CY, Huh H. The flavone glycosides of *Sasa borealis*. *Kor. J. Pharmacogn.* 31: 224-227 (2000)
- Zhao Y, Liu JX, Liu C, Zeng X, Li X, Zhao J. Anti-inflammatory effects of *p*-coumaric acid in LPS-stimulated RAW264.7 cells: Involvement of NF- κ B and MAPKs pathways. *Med. Chem.* 6: 327-330 DOI: 10.4172/2161-0444.1000365 (2016)
- Zhu H, Liang QH, Xiong XG, Wang Y, Zhang ZH, Sun MJ, Lu X, Wu D. Anti-inflammatory effects of *p*-coumaric acid, a natural compound of *Oldenlandia diffusa*, on arthritis model rats. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* DOI: 10.1155/2018/5198594 (2018)