

## 초음파 병행 추출이 마황과 복분자 열수 추출물의 면역활성 증진에 미치는 효과

박진홍 · 이현수 · 문형철 · 김대호 · <sup>1</sup>성낙술 · <sup>1</sup>정해곤 · <sup>1</sup>방진기 · †이현용  
강원대학교 바이오산업공학부, <sup>1</sup>농촌진흥청 작물시험장  
(접수 : 2003. 11. 6., 게재승인 : 2004. 4. 25.)

## Effect of Ultrasonification Process on Enhancement of Immuno-stimulatory Activity of *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq.

Jin Hong Park, Hyun Soo Lee, Hyoung Chul Mun, Dae Ho Kim,  
Nak Sul Seong<sup>1</sup>, Hae Gon Jung<sup>1</sup>, Jin Ki Bang<sup>1</sup>, and Hyeon Yong Lee†  
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea  
<sup>1</sup>National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea  
(Received : 2003. 11. 6., Accepted : 2004. 4. 25.)

The effect of ultrasonification on immuno-stimulatory activities of the extracts from *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. was observed by the growth of human immune cells. The extraction yields from water extracts and water extract with ultrasonification at 40°C, 60°C and 100°C were compared. The highest yield was observed enhancement ratio 2.34% in the extract at 40°C with ultrasonification. The growth of human T-cell was increased up to  $13.8 \times 10^4$  viable cells/ml in adding 1.0 g/L of the ultrasonification extracts. The treated extracts increased the specific secretion of TNF- $\alpha$  up to  $10.5 \times 10^4$  pg/cell. It was suggested that of the extracts on water the extraction yield with ultrasonification compared improved the extraction with ultrasonification of low than.

**Key Words :** *Ephedra sinica*, *Rubus coreanus*, ultrasonification, immuno-stimulatory, IL-6, TNF- $\alpha$

### 서론

초음파를 이용한 연구는 80년대 이후부터 분쇄, 혼합 및 추출공정 등에서 빠른 반응시간에 좋은 효율을 얻기 위해 많이 사용되어져 왔다. 초음파만을 단일 사용하게 될 때 드러나는 문제점은 초음파 조사시간이 길어질수록 온도가 상승한다는 것과 초음파가 pH에 굉장히 민감하다는 것이다. 이로 인해 초음파 단일 추출 시 조사시간이 길어짐으로 인해 온도가 자동 상승하게 되어 일정한 온도 수준을 이루어 낼 수 없으며, pH 변화로 인해 성분의 변화나 추출물의 유용 성분 및 활성 물질 등의 추출이 미처 다 일어나지 않을

수 있다는 것이다. 기존의 전통적인 추출 방법은 추출효율이 낮고 에너지 소비가 많으며 열로 인한 많은 유용성분의 파괴, 단백질의 변이, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출, 열에 대하여 불안정한 것 등의 단점을 드러내고 있다. 이에 반해 초음파 추출의 병행 방법은 추출공정의 효율을 높이고 식물로부터의 초음파를 이용한 추출이 생물 활성물과 식물 성분의 용매 추출동안 초음파를 이용하는 것이 효과가 있다고 보고된 바 있다(1, 2).

마황 (*Ephedra sinica* Stapf)은 마황과에 속하는 다년생 초본 혹은 초본성목으로 한방에서는 발한, 해열, 진해, 항염증의 목적으로 이용되어온 생약으로 ephedrine, pseudoephedrine, ephedroxane, norephedrine 등을 함유하고 있으며 많은 약리 작용이 보고되어 있다(3, 4). 마황은 알카로이드 성분인 ephedrine과 pseudoephedrine의 약리 작용으로 인해 세포성 및 체액성 면역반응에 대해 억제적으로 작용하는 것으로 보고 되어졌다(5).

복분자 (*Rubus coreanus* Miq.)는 중국, 일본, 우리나라 중남

† Corresponding Author : School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea  
Tel : +82-33-250-6455, Fax : +82-33-256-4819  
E-mail : hyeonl@kangwon.ac.kr

부 지방의 해발 50-1000 m 지역 산기슭 양지에 자생하는 미성숙 열매를 건조시킨 것이다(6).

복분자 딸기의 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin을 분리하였고, 또한 복분자 잎으로부터 4종의 flavonoids 그리고 ellagic acid 및 1종의 ellagitannin인 sanguin H-5를 분리하여 그 구조를 밝혔다(7, 8). 복분자 추출물은 인간 면역체계에서 항체 생성에 중요한 역할을 하는 인간 B세포와 T세포주의 생육을 촉진한다고 알려져 있다(9).

따라서 이들 생약재에 대한 활성 연구를 바탕으로 이에 덧붙여 최근 많은 이용 가치를 창출하고 있는 비열처리 방법 중 대표적이라 할 수 있는 초음파를 이용하여 저온 추출로 더 높은 생리활성 효과와 이들에 대한 이용 및 부가가치를 높이고자 하는 것이 본 연구의 목적이다.

## 재료 및 방법

### 초음파 추출

재료인 마황과 복분자는 2000년 경동시장에서 구입하여 상온에서 보관하였다. 각 시료를 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료중량에 대하여 각각 10배의 증류수를 추출 용매로 사용하여 40°C, 60°C, 100°C에서 추출하였으며, 100°C의 경우 12시간 동안, 40°C 및 60°C의 경우 6시간 동안 추출을 한 후 다시 Fig. 1의 초음파 추출기 (Asia industry, Kor.)를 통하여 각각의 온도인 40, 60, 100°C에서 40 KHz의 초음파로 30분간 초음파 추출을 병행하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조한 뒤에 각각의 수율을 계산하였다.

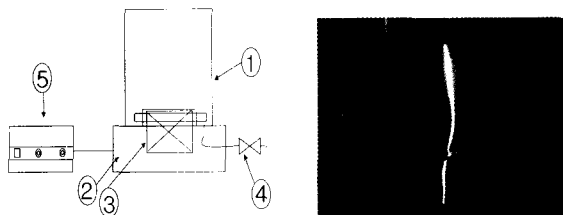


Figure 1. A schematic diagram of ultrasonic extraction system.

- |               |                         |
|---------------|-------------------------|
| 1. Water bath | 4. Ball valve           |
| 2. Base       | 5. Ultrasonic generator |
| 3. Transducer |                         |

### HPLC 분석을 통한 추출물의 물질 비교

시료의 분석을 위해 시료를 HPLC 분석용 water에 녹여 0.45  $\mu\text{m}$  여과막으로 여과하여 물 추출물과 물 추출 후 초음파를 병행한 추출물을 100 ppm의 농도로 조제하여 Injection volume 20  $\mu\text{l}$ 로 측정하였다. HPLC 기기는 BIO-TEK instrument (Italy)사의 HPLC 500 series를 사용하여 Pump : BIO-TEK 522 controller, Column : Alltech Prevail C18 5 $\mu$ , Mobile phase (water : acetonitril = 80 : 20), 유속은 0.5 ml/min, Detector: BIO-TEK HPLC 535 Detector (254 nm), Co 0.05 AUFS 감도 등으로 하였다.

### 면역세포 생육활성 측정

면역세포 생육활성 실험은 인간 면역 세포인 Raji (Human B cell)과 Jurkat (Human CD4<sup>+</sup> T cell)을 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 실시하였다. 세포의 생육은 RPMI 1640 (GIBCO, USA) 배지에서 10% FBS를 사용하여 37.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 면역 세포 생육활성 측정은 24 well plate에 세포를 900  $\mu\text{l}$ 씩 4.0  $\times 10^4$  cells/ml의 농도로 첨가하여 배양한 후 각 온도별 추출물들 (1.0 mg/ml)을 24시간이 지난 각각의 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, 100  $\mu\text{l}$ 의 MTT (50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 녹인 후, 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 취하여 96 well plate에 옮긴 후 540 nm에서 흡광도를 총 8일에 걸쳐 측정하여 세포의 생육활성을 관찰하였다. 배양을 통한 cell을 hemocytometer로 세포수를 측정하여 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 세포의 생육과 세포수에 따라 면역활성을 측정하였다.

### 인간 면역세포로부터 Cytokine 분비량 측정

면역세포들이 배지 내에 분비하는 cytokine인 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 Interleukine-6 (IL-6)의 양은 ELISA kit (Genzyme, USA)를 이용하여 측정하였다. 우선 인간 면역 세포인 B cell (Raji)과 T cell (Jurkat)을 이용하여 RPMI 1640 (GIBCO, USA) 배지에서 10% FBS를 사용하여 세포의 농도를 4.0  $\times 10^4$  cells/ml의 농도 정도로 배양시킨 후 이 배양배지를 원심 분리하여 상등액을 취한 다음 다양한 농도의 표준물질로서 TNF- $\alpha$  (1,000 pg/ml, 250 pg/ml, 62.5 pg/ml, 15.6 pg/ml, 0.0 pg/ml), IL-6 (500 pg/ml, 125 pg/ml, 31.25 pg/ml, 7.81 pg/ml, 0.0 pg/ml)들과 함께 37°C에서 30분간 배양 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하고 이 표준곡선 값을 이용하여 분비량을 측정하였는데, ELISA kit를 이용 인간 면역세포인 B cell (Raji)과 T cell (Jurkat)에 시료 투여 후 얻어진 O.D. 값을 비교하여 표준곡선에서 얻어진 값을 이용 cytokine의 양을 측정하였다(10).

## 결과 및 고찰

### 시료의 온도별 추출 수율 결과

마황 (*Ephedra sinica* Stapf)과 복분자 (*Rubus coreanus* Miq.)의 추출 수율은 Table 1과 같다. 수율 면에서는 마황 40°C 초음파 (40 KHz) 병행 추출물이 7.90%로 물 추출물 3.03%에 비해 2.34배 증가한 것으로 나타나 초음파 병행 추출을 통해 가장 높은 추출 수율 증가를 나타내었다. Table 1에서 확인할 수 있듯이 100°C 복분자 추출물은 물 추출물에 비해 초음파 병행 추출물이 1.27배 증가한 것으로 나타나 100°C 복분자 추출물을 제외한 모든 추출물들에서 초음파 병행 추출물이 물 추출물에 비하여 1.6배 이상 증가한 것으로 나타났다. 기존의 물 추출에 비하여 초음파 병행추출물의 수율이 높게 나타나는 것은 초음파 조사시 용존산소나 기포를 액외로 방출시키는 탈기현상을 일으켜 이들이 서로 용매와 상호작용하면서 상승작용을 일으키기 때문이다. 이런 상승작용으로 인하여 기존의 물 추출보다 낮은 온도에서 더 효율적

인 추출이 이루어져 초음파 병행 추출물의 수율이 높게 나타나는 것으로 보여진다.

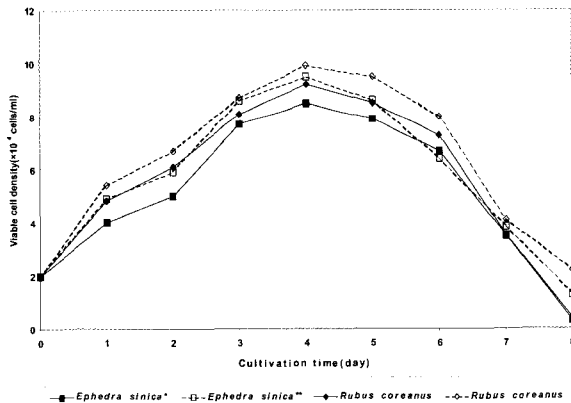
**Table 1.** The extraction yields of water extracts with or without ultrasonification on at 40°C, 60°C and 100°C from *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq.

Sample	Extraction temperature(°C)	Yield(% v/w)		
		I	II	Enhancementratio
<i>E. sinica</i>	40	7.90	3.03	2.34±0.3*
	60	10.14	5.35	1.9±0.5*
	100	12.7	7.31	1.74±0.6*
<i>R. coreanus</i>	40	10.75	6.09	1.77±0.1*
	60	16.56	10.32	1.6±0.8*
	100	20.50	16.16	1.27±0.3*

I : water extracts with ultrasonification II : simple water extract  
\* : Data represents mean±S.E. of three independent experiment

**면역세포의 생육활성 측정결과**

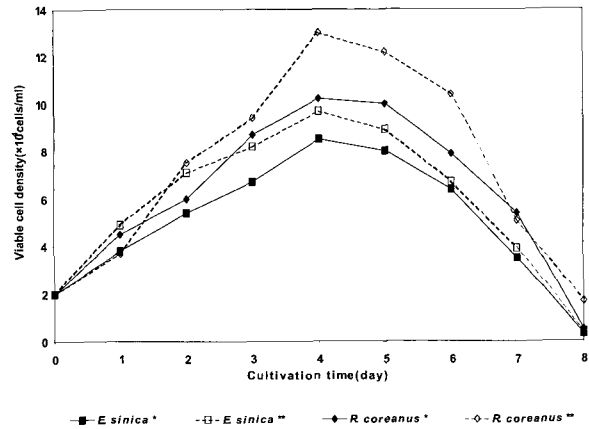
Fig. 2와 Fig. 3은 각각 B 세포와 T 세포의 생육 활성도를 배양 시간별로 8일 동안 생세포수를 측정하여 나타낸 것이다. Fig. 2의 B 세포의 활성도 측정시 배양 4일째 복분자 60°C 초음파 병행 추출물이  $9.9 \times 10^4$  cells/ml의 최대 활성도를 나타내었다.



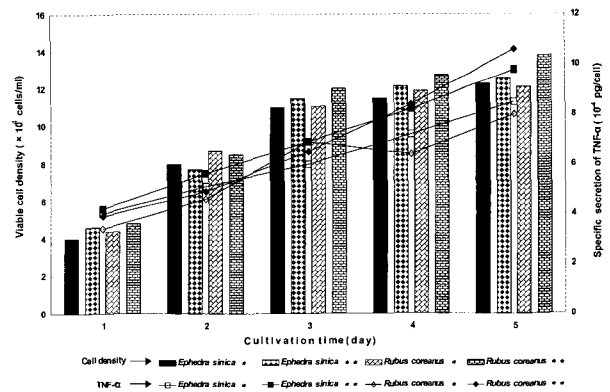
**Figure 2.** The growth of human B (Raji) cell in adding \*water extracts and \*\*water extracts with ultrasonification on extracts at 60°C according to the cultivation time. Each value is presented as the mean±S.E. of three independent experiments. \*, \*\*, p<0.01: significantly different from the control value.

또한 Fig. 3의 T 세포의 생육 활성도를 관찰한 결과 배양 5일째  $12.2 \times 10^4$  cells/ml로 최대의 생육 활성을 나타내었다. T 세포와 B 세포 모두 물 추출물에 비해 초음파 병행 추출물이 20~25%의 활성 촉진을 나타내었고, T 세포가 B 세포에 비해 전반적으로 더 높은 활성도를 보였다. 전체적인 온도별로 살펴보면 40°C, 100°C 추출물들보다는 60°C 추출물이 더 높은 활성을 보였고, 물 추출물보다는 초음파를 병행한 추출물이 더욱 생육을 증진시키는 것으로 나타났다. 모든 추출물중 복분자 60°C 초음파 병행 추출물이 가장 높은 활성 증진을 나타내었다. 이와 같은 결과는 너무 높거나 낮은 온도가 아닌 적정 온도 수준에 초음파를 병행하였을 때 그 증진 효과가 더 높아진다는 것을 알려주는 것이다. 이 초음파

병행 효과는 추출시 용매 내에서의 공동화 현상으로 인한 기포의 액외배출로 인한 액체들 간의 상호 상승작용으로 추출의 효율 뿐만 아니라 활성 성분들이 더 증진되는 효과를 가져온 것으로 사료된다.



**Figure 3.** The growth of human T (Jurkat) cell in adding \*water extracts and \*\*water extracts with ultrasonification on extracts at 60°C according to the cultivation time. Each value is presented as the mean±S.E. of three independent experiments. \*, \*\*, p<0.01: significantly different from the control value.

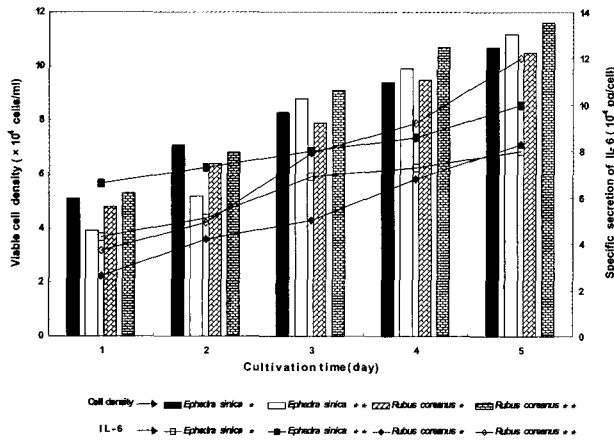


**Figure 4.** Kinetics of secretion TNF-α (curve line) from human B-cell cultured (bar chart) in adding \*water extracts and \*\*water extracts with ultrasonification at 60°C from *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. Each value is presented as the mean±S.E. of three independent experiments. \*, \*\*, p<0.01: significantly different from the control value (\*: simple water extract, \*\*: water extracts with ultrasonification).

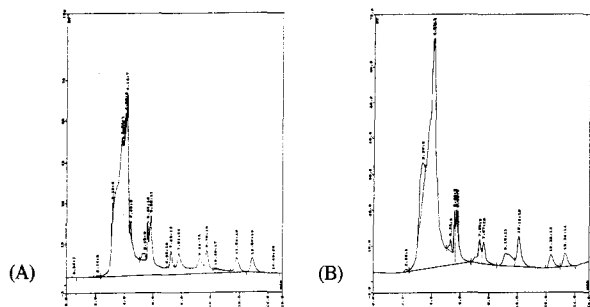
**인간 면역세포로부터 cytokine 분비량 측정 결과**

Fig. 4와 Fig. 5에서는 각종 생리학적, 병리학적인 과정에 관여하며 특히, 면역반응, 염증, tissue remodelling, 그리고 배발생과정에 중요한 역할을 담당하고 있는 cytokine의 분비를 측정하였다. Fig. 4에서는 TNF-α의 T 세포에서의 분비량을 관찰하였는데, 배양 5일째 복분자 (*Rubus coreanus* Miq) 60°C 초음파 병행 추출물이 1.0 g/L의 농도에서  $13.8 \times 10^4$  pg/cell의 분비량을 나타내어 Cytokine 최대의 분비량을 나타내었으며, 물 추출물은 배양 5일째 마찬가지로 1.0 g/L의 농도에서  $12.1 \times 10^4$  pg/cell의 분비량만을 나타내어 초음파 병

행 추출물에 비해 낮은 분비량을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 5에서 관찰한 IL-6은 T세포의 경우, 60°C 초음파 병행 복분자 (*Rubus coreanus* Miq)추출물이 1.0 g/L에서  $12 \times 10^4$  pg/cell로 가장 증진 효과가 크게 나타났으며 마황 (*Ephedra sinica* Stapf) 60°C 초음파 병행 추출물은  $10 \times 10^4$  pg/cell의 증진효과를 가져왔다. 그 반면에 초음파를 병행하지 않은 복분자 물 추출물은  $8.3 \times 10^4$  pg/cell의 비교적 낮은 증진 효과를 보였고, 마황 60°C 물 추출물은  $8 \times 10^4$  pg/cell의 낮은 증진 효과를 보여 물 추출물에 비해 초음파 병행 추출물의 증진효과가 더 높은 것으로 확인되었다. 총 5일 동안 IL-6과 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 측정된 결과 복분자 (*Rubus coreanus* Miq) 60°C 초음파 병행 추출물이 cytokien 분비량 증진효과가 가장 좋은 것으로 나타났다.



**Figure 5.** Kinetics of secretion IL-6 (curve line) from human T-cell cultured (bar chart) in adding \*water extracts and \*\*water extracts with ultrasonification at 60°C from *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. Each value is presented as the mean±S.E. of three independent experiments. \*, \*\*, p<0.01: significantly different from the control value (\*: simple water extract, \*\*: water extracts with ultrasonification).

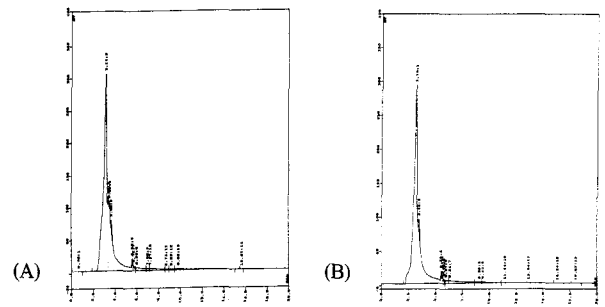


**Figure 6.** The result of HPLC analysis of water extracts(A) and water extracts with ultrasonification(B) at 60°C from *Ephedra sinica* Stapf.

**HPLC 분석을 통한 추출물의 물질 비교 분석 결과**

Fig. 6과 7에 마황과 복분자를 HPLC로 측정된 결과를 나타내었다. 대부분의 추출물들 간에 온도차나 물 추출물과 병행 추출물간에 큰 차이는 보이지 않았으나 작은 peak들이 다

양하게 나타났으며, peak의 크기나 면적 면에서 차이가 적게나마 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이 peak들의 작은 차이가 바로 초음파 병행 추출물과 물 추출물간 다른 생리활성도의 결과를 낳는 것으로 예측할 수 있다. Fig. 6의 마황 60°C 추출물의 peak 차이를 보면 물 추출물과 초음파 병행 추출물간의 확연한 차이를 확인 할 수 있다. major peak의 값으로 확인한 결과 물 추출물에 비해 초음파 병행 추출물이 더 많은 추출량과 더 다양한 간 peak를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 7의 복분자 60°C 추출물의 peak를 보면, major peak의 값이 더 크게 또한 더 다양하게 함유된 peak를 가지고 있어 물 추출물에 비해 초음파 병행 추출물에서 더 다양한 성분의 검출이 이루어진 것을 확인 할 수 있다. 이 peak들의 면적이나 분포의 차이가 면역세포의 생육증진이 물 추출물보다는 초음파 병행 추출물에서 더 나은 생리활성도를 보였다는 것들을 증명할 수 있는 결과들로 사료되어진다.



**Figure 7.** The result of HPLC analysis of water extracts(A) and water extracts with ultrasonification(B) at 60°C from *Rubus coreanus* Miq.

**요약**

본 연구에서는 한국산 생약재인 마황과 복분자를 이용하여 추출과정 중 40°C, 60°C, 100°C로 온도를 달리 하여 기존의 열수 추출방법과 초음파를 병행한 추출을 통하여 면역활성 증진에 다르게 나타나는 효과를 비교 실험하였다.

추출시 모든 열수 추출물들에 비해 초음파 병행 추출물의 추출 수율이 높게 나타났고, 마황 40°C 초음파 병행 추출물이 물 추출물에 비해 2.34배로 가장 높은 추출 수율이 나타났으며, 100°C 복분자 추출물은 물 추출물에 비해 초음파 병행 추출물이 1.27배 증가한 것으로 나타나 100°C 복분자 추출물을 제외한 모든 추출물들에서 초음파 병행 추출물이 물 추출물에 비하여 1.6배 이상 증가한 것으로 나타났다. 이는 추출시 추출되지 않았던 여러 활성 물질이 초음파 처리에 의해 액체간의 상호 탈기 작용에 의해 추출 수율의 상승 효과를 가져온 것으로 사료된다.

또한, 면역세포의 생육활성 측정결과 모든 조건에서 초음파 병행 추출물이 열수 추출만을 가한 추출물에 비해 생육도가 20~25% 가량 더 높게 관찰되었다. 더불어 인간 면역세포인 B, T cell을 이용한 cytokine 분비량 측정실험에서도 마찬가지로, 열수 추출물에 비해 초음파를 병행한 추출물에서 그 분비량이 1.5배 정도 더 높게 나타났다. 그 중에서도 복분

자 60°C, 40 KHz 초음파 병행 추출물이 가장 높은 cytokine 분비량 증가 효과를 나타내었다.

이러한 결과를 비추어 보면, 앞으로 더 많은 실험을 통하여 초음파의 병행 효과와 이를 통한 기능성 소재 및 기능성 식품으로의 고부가가치 창출을 위해 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

### 감 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업에 의해 수행된 결과로 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Toma, M., M. Vinatoru, L. Paniwnyk, and T. J. Mason (2001), Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrasonics Sonochem.* **8**, 137-142.
2. Vinatoru, M. (2001), An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochem.* **8**, 303-313.
3. Duncan, P. E., J. P. Griffin, and S. S. Solomon (1957), Bronchodilator drug efficacy via cyclic AMP, *Thorax.* **30**(2), 192-196.
4. Dulloo, A. G., J. Seydoux, and L. Girardier (1991), Periphdral mechanism of thermo-genesis induced by ephedrine and caffeine in brown adipose tissue, *Int. J. Obes.* **15**(5), 317-326.
5. Kim, T. H., K. S. Yang, E. Z. Hwang, and S. B. Park (1991), Effect of *Ephedrae Herb* on the Immune Response in Mice, *Kor. J. Pharmacogn.* **22**(3), 183-191.
6. Pang, K. C., M. S. Kim, and M. W. Lee (1996), Hydrolyzable Tannins from the Fruits of *Rubus coreanum*, *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(4), 366-370
7. Lee, M. W. (1995), Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*, *Kor. J. Pharmacogn.* **39**, 200-204
8. Lee, Y. A. and M. W. Lee (1995), Tannins from *Rubus coreanum*, *Kor. J. Pharmacogn.* **6**, 27-30.
9. Lee, M. K., H. S. Lee, G. P. Choi, D. H. Oh, J. D. Kim, C. Y. Yu, and H. Y. Lee (2003), Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq, *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **11**(1), 5-12.
10. Han, B. H., M. H. Park, J. Y. Cho, J. S. Park, E. S. Yoo, and K. U. Baik (1998), Effect of Ginsenosides from *Panax Ginseng* on TNF- $\alpha$  production and T cell proliferation, *Yakhak Hoeji*, **42**(3), 296~301.