



### 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#)

이학석사 학위논문

**Feline calicivirus**에 항바이러스  
활성을 가지는 천연식물자원  
물질의 탐색



2010년 2월

부경대학교 대학원

미생물학과

김경란

이학석사 학위논문

**Feline calicivirus에 항바이러스  
활성을 가지는 천연 식물자원  
물질의 탐색**

지도교수 이명숙

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2010년 2월

부경대학교 대학원

미생물학과

김경란

김경란의 이학석사 학위논문으로 인준함.

2010年 2月



주 심 박 사 최 태 진 (인)

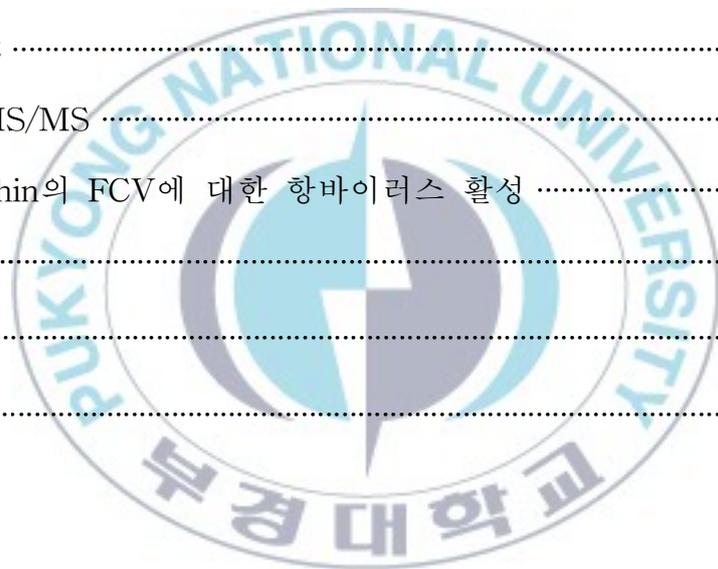
위 원 박 사 김 영 목 (인)

위 원 박 사 이 명 속 (인)

# 목 차

Abstract .....	1
서론 .....	3
재료 및 방법 .....	6
1. 실험재료 .....	6
1.1. 숙주세포와 바이러스 .....	6
1.2. 천연식물자원 및 추출물 준비 .....	6
1.3. 시약 .....	8
2. 실험방법 .....	9
2.1. 세포배양 .....	9
2.2. 바이러스 감염 및 증식 .....	9
2.3. 바이러스 정량 .....	12
2.4. 세포 독성검사(MTT assay) .....	13
2.5. 항바이러스 활성평가 .....	14
2.5.1. Plaque reduction assay .....	14
2.5.2. Virucidal effect .....	15
2.6. 녹차추출물로부터 Anti-FCV 성분의 분리 및 정제 .....	16
2.6.1. 녹차추출물의 용매분획 .....	16
2.6.2. HPLC에 의한 항바이러스 활성물질 분리 .....	18

2.6.3. LC-MS/MS에 의한 항바이러스 활성물질 분리 .....	18
<b>결과 및 고찰</b> .....	21
1. CrFK cell에 대한 천연물질의 세포독성시험 .....	21
2. 천연물질의 FCV에 대한 항바이러스 활성 .....	23
2.1. Plaque reduction assay에 따른 항바이러스 효과 .....	23
2.2. 천연물질의 FCV에 대한 virucidal activity .....	29
2.3. 녹차 및 홍화씨 추출물의 virucidal activity .....	33
3. 녹차의 용매분획에 대한 항바이러스 활성 .....	35
4. 녹차의 항바이러스 물질분리 및 정제 .....	37
4.1. HPLC .....	37
4.2. LC-MS/MS .....	41
4.3. Catechin의 FCV에 대한 항바이러스 활성 .....	44
<b>요 약</b> .....	46
<b>감사의 글</b> .....	48
<b>참고문헌</b> .....	50



## List of Tables

Table 1. Natural medicinal plants used in this study .....	7
Table 2. The gradient mobile phase of LC-MS/MS for analysis of catechins .....	20
Table 3. Cytotoxicity effects of various methanolic extracts on CrKF cell by MTT assay .....	22
Table 4. Antiviral activity of methanolic extracts from national plants against feline calicivirus by plaque reduction assay .....	24
Table 5. Virucidal activity of various methanolic extracts from medicinal plants against feline calicivirus .....	31
Table 6. Virucidal activity of methanolic extracts of <i>Camellia sinensis</i> L. and <i>Carthamus tinctorius</i> L. against feline calicivirus .....	34
Table 7. Virucidal activity of the solvent soluble fractions from <i>Camellia sinensis</i> L. against feline calicivirus .....	36
Table 8. Antiviral activity of catechins from <i>Camellia sinensis</i> L. against feline calicivirus by plaque reduction assay .....	45

## List of Figures

- Fig. 1. Inverted microscopic photograph of normal Crandell-reese feline kidney (CrFK) CCL-94 cells and CrFK cells infected by feline calicivirus after 24 hr ..... 10
- Fig. 2. Scheme of extraction and liquid-liquid solvent fraction from *Camellia sinensis* L. .... 17
- Fig. 3. Antiviral activity of spices on plaque formation. Six-well plates containing monolayers of CrFK cells were washed and infected with equal volume of virus suspension (200 pfu/mL) · ..... 25
- Fig. 4. Antiviral activity of herb teas on plaque formation. Six-well plates containing monolayers of CrFK cells were washed and infected with equal volume of virus suspension (200 pfu/mL) · ..... 26
- Fig. 5. Antiviral activity of medical plants on plaque formation. Six-well plates containing monolayers of CrFK cells were washed and infected with equal volume of virus suspension (200 pfu/mL) ..... 28

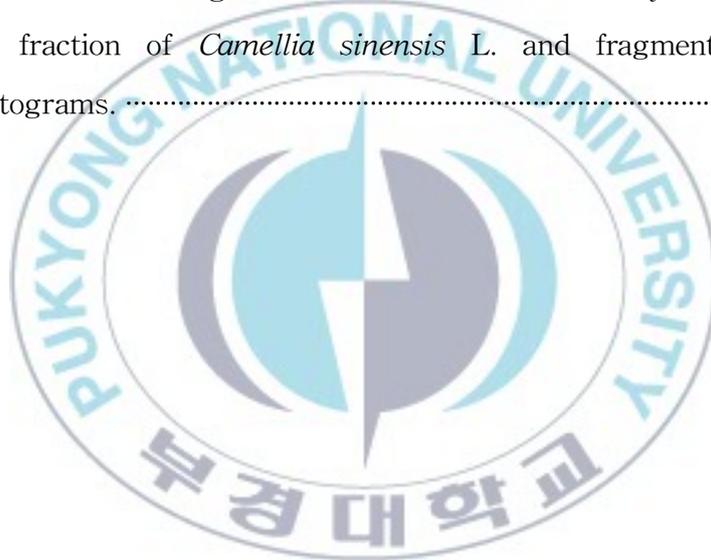
Fig. 6. Structures of catechins isolated from *Camellia sinensis* L. ... 38

Fig. 7. HPLC elution profile of standard catechins ..... 39

Fig. 8. HPLC elution profile of the ethyl acetate soluble fraction of  
*Camellia sinensis* L. .... 40

Fig. 9. LC-MS/MS chromatograms (total ion current) of a mixture of  
standard catechins and fragment ion chromatograms ..... 42

Fig. 10. LC-MS/MS chromatograms (total ion current) of ethyl acetate  
soluble fraction of *Camellia sinensis* L. and fragment ion  
chromatograms. .... 43



Screening of Antiviral Substance from Natural Plants Resources  
against Feline Calicivirus

Kyoung Lan Kim

Department of Microbiology, The Graduate School,  
Pukyong National University

**Abstract**

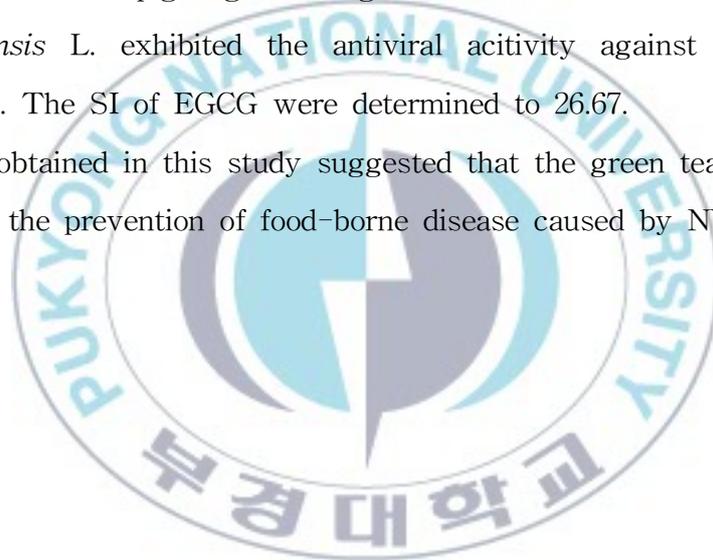
Noroviruses, which are cause gastroenteritis illness in people, is one of important food-borne pathogens of noroviruses over world-wide. Nevertheless, there are not many commercial disinfectants effective against norovirus because which cannot be grown in tissue culture. Therefore disinfection efficacy and inactivation studies have been performed using closely related viruses such as feline calicivirus (FCV).

In an effort to discover an antiviral substance against norovirus, extracts from several plants including spices and herbs were evaluated for its antiviral activity against FCV as a surrogate for norovirus. Among them, the methanolic extract of green tea (*Camellia sinensis* L.) exhibited significant antiviral activity against FCV, that was 0.13 mg/mL of 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) and 2.47 mg/mL of 50% cytotoxicity concentration ( $CC_{50}$ ). Its selectivity index (SI)

was 18.57. After the treatment of *Camellia sinensis* L. extract (3.13 mg/mL) for 1 hr, FCV was completely inactivated. The antiviral activity of *Camellia sinensis* L. extracts against FCV was determined to be dose- and time- dependent.

To perform more detailed investigation on antiviral activity, the *Camellia sinensis* L. extract was further fractioned with organic solvents. Among them, the ethyl acetate fraction showed the strongest anti-FCV activity. In order to identify an anti-FCV substance from the ethyl acetate fractions of *Camellia sinensis* L., a high performance liquid chromatography (HPLC) and LC-MS/MS were performed. The epigallocatechin gallate (EGCG) isolated from *Camellia sinensis* L. exhibited the antiviral activity against FCV surrogated NV. The SI of EGCG were determined to 26.67.

The results obtained in this study suggested that the green tea will be effective in the prevention of food-borne disease caused by NV.



## 서 론

노로바이러스는 분류학상 Caliciviridae family에 속하며 단일가닥의 RNA를 갖는 virus로, 생김새로 인하여 소형구형 바이러스(small round structured virus, SRSV)로 불리기도 하다가 최근 노로바이러스로 공식 명명 된 식중독 바이러스이다. 최근 전세계적으로 노로바이러스 식중독에 대한 사례가 많이 보고되고 있으며 미국 질병관리 본부(Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 조사에 의하면 수인성으로 인한 장염환자의 70% 이상이 노로바이러스에 의한 것으로 보고되고 있다 (Bull *et al.*, 2006; Fankhauser *et al.*, 2002; Lopman *et al.*, 2004; Widdowson *et al.*, 2005).

국내에는 노로바이러스 식중독이 1999년 처음 보고되었으며, 단체급식과 외식의 생활화로 2003-2004년 대형식중독을 일으키며 주목받기 시작하여 2007년 1~5월까지 발생한 식중독 사고 중 40% 이상이 노로바이러스가 원인체로 밝혀지는 등(Lee, 2007), 매년 노로바이러스에 의한 식중독발생이 증가하고 있어 집단식중독 유발 병원체의 효과적인 관리를 위해 2006년 질병관리본부는 신고대상 병원체로 지정하여 감시를 강화하고 있다(Jee, 2006).

노로바이러스 식중독은 감염된 환자의 토사물, 분변 및 신체접촉에 의한 것이며 식수 및 어패류, 과일, 채소 등 즉석 섭취가 가능한 식품이 오염된 경우 10~100개의 작은 입자로도 질병을 일으킬 수 있으며, 입자가 매우 작아 공기중에 에어로졸 형태로 부유하기 때문에 집단감염이 급속도로 발생하여 메스꺼움, 구토, 설사 복통 등의 급성위장염의 증상을 나타낸다(Blackburn *et al.*, 2004). 노로바이러스 식중독은 5세 이하의 유

아에게 가장 많이 발생 하지만 청장년층까지 폭넓은 연령층에 감수성을 나타내며, 겨울에 유행하는 계절적인 특징을 보이거나 최근에는 여름철까지 지속적으로 발생하여 공중 보건학상 큰 위협을 받고 있다(Lopman *et al.*, 2004).

노로바이러스는 60℃의 가열, 냉장·냉동 온도에서도 생존하며, ether, 낮은 pH, 알코올계의 소독제에도 제어효과가 크지 않고 염소농도 1000~5000 ppm에서도 생존하는 것으로 알려져 있다(Doultree *et al.*, 1999; Duizer *et al.*, 2004b; Malik *et al.*, 2006; Jimenez and Chiang, 2006). 본 바이러스를 제어시키기 위한 화학적인 소독제는 과다 사용할 경우 열, 가려움 등 인체에 부작용을 가져올 수 있으며 식생활 수준의 향상과 더불어 식품의 안전성에 대한 소비자 의식이 증가되고 있어 최근에는 화학 합성품인 소독제를 천연물질로 대체하려는 경향이 높아지고 있다.

이에 부합하여 최근 여러 DNA 또는 RNA 바이러스의 복제를 억제하기 위하여 다양한 화학적 성분을 가지고 있는 천연물질을 이용하여 항균 및 항바이러스 활성에 대하여 보고가 되고 있으나(Park and Lee, 2005), 항노로바이러스 활성을 가지는 천연물질에 대한 연구는 전무한 상태이다. 그 이유는 노로바이러스는 인간의 장세포를 숙주로 하기 때문에 동물실험이나 세포배양의 방법으로 증식 시킬 수 없어(Duizer *et al.*, 2004a), 바이러스 증식을 선택적으로 억제하는 약제를 찾기란 쉽지 않고, 현재 각종 virus에 대한 증식작용 억제 및 그 작용 방식에 대한 체계적인 연구를 할 수 없기 때문이다. 따라서, 노로바이러스와 같은 *Caliciviridae* family 에 속하면서 단일가닥의 RNA를 지니고 유전학적, 생화학적, 물리화학적인 특성이 유사한 feline calicivirus를 노로바이러스의 대체모델로 이용하여 연구하고 있다(Gehrke *et al.*, 2004; Kampf,

2005; Steinmann, 2004)

본 연구에서는 노로바이러스를 효과적으로 제어시킬 수 있는 천연자원을 탐색하기 위하여 다양한 생리활성 작용이 있다고 알려진 여러 향신료, 차(茶), 식물성 한약재를 대상으로 노로바이러스의 대체모델인 feline calicivirus에 대한 항바이러스 활성을 조사하였다.



## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1.1. 숙주세포와 Virus

본 연구에 사용한 feline calicivirus (FCV, ATCC VR-782)와 FCV의 숙주세포인 Crandell-reese Feiline Kidney cell (CrFK, ATCC CCL-94)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였다.

#### 1.2. 천연식물자원 및 추출물 준비

FCV에 대한 항바이러스 시험에 사용된 천연식물자원은 향신료 3종(마늘, 생강, 고춧가루), 차(茶) 2종(로즈마리, 녹차) 그리고 식물성 한약재 6종(천궁, 홍화씨, 헛개, 팽자, 당귀, 진피)등 총 11종의 물질을 시험에 사용하였다(Table 1). 그 중 향신료와 녹차는 국내에서 일반적으로 시판되고 있는 것을 사용하였으며, 그 외의 식물자원은 2008년 4월 부산 부전시장에서 구입하였다.

각 천연물질들은 건조중량 10배량의 95% methanol로 45℃ 에서 3시간 동안 3회 반복하여 교반 추출하였고, 이를 여과한 후 60℃ 수욕상에서 rotary evaporator로 감압·농축하였다. 각 추출물을 250 mg/mL의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO; Kanto, Japan)에 녹인 다음 0.45 µm millipore filter로 여과한 것을 실험에 사용하였다.

Table 1. Natural medicinal plants used in this study

Scientific name	Commercial name	Materials	Utilization
<i>Allium scorodorpasum</i> var. <i>viviparum</i> Regel	garlic	root	
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	ginger	root	spice
<i>Capsicum annuum</i> L.	red pepper	fruit	
<i>Rosemary officinalis</i> L.	rosemary	leaf	herb
<i>Camellia sinensis</i> L.	green tea	leaf	tea
<i>Cnidium officinale</i> Makino	cnidii rhizoma	root	
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	safflower	seed	
<i>Hovenia dulcis</i> var. <i>koreana</i>	raisin tree	stem	medical
<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.	trifoliolate orange	rind of fruit	plant
<i>Angelica gigas</i> Nakai	danggwi	root	
<i>Citrus aurantium</i> L. subsp	tangerine peel	rind of fruit	

### 1.3. 시약

세포 및 바이러스 배양에 사용된 배지인 Dulbecco modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 와 0.05% trypsin EDTA, 100 U/mL penicillin - 100 µg/mL streptomycin은 Gibco-Invitrogen Co. (Grand Island, N.Y., USA) 제품을 사용하였다.

세포독성 시험에 사용한 3-(4, 5-dimethyl-thiazol)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)와 카테킨의 표준시약인 (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) 등은 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA) 제품을 사용 하였으며, 그 외 추출 및 정제를 위한 유기용매는 HPLC용 특급 grade 시약을 사용하였다.



## 2. 실험방법

### 2.1. 세포배양

CrKF 세포는 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (TC flask, Corning, USA)에서 10% FBS, 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin이 포함된 growth medium (DMEM + 10% FBS)를 사용하였다. CrFK 세포를 계대 배양하기 위해서는 75 cm<sup>2</sup> TC flask에 monolayer로 형성한 세포를 1x PBS (pH 7.4)으로 세척한 다음 0.05% trypsin EDTA를 첨가하였다. 이를 2분 동안 반응시킨 뒤, 세포를 flask 바닥으로부터 분리시켜 1,500x g에서 3분 원심분리 한 다음, 1:7 의 비율로 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 세포가 80-90% 이상 monolayer을 형성하면 2일에 한번 씩 계대 배양하여 사용하였다(Fig. 1, Bidawid *et al.*, 2003).

### 2.2. 바이러스 감염 및 증식

바이러스 현탁액을 얻기 위해 노로바이러스의 대체모델로 사용된 FCV는 monolayer로 형성된 CrFK 세포의 growth medium을 제거한 뒤, FCV 배양액을 0.1 M.O.I (multiplication of infection)가 되도록 접종 한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에 90분 동안 배양하여 바이러스가 세포에 흡착 되도록 하였다. 흡착시킨 뒤, maintenance medium (DMEM + 2% FBS)을 10 mL 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였으며, 16~24 시간 후 세포병변효과(cytopathic effects; CPE, Fig. 1)가 일어나 부착된 세포

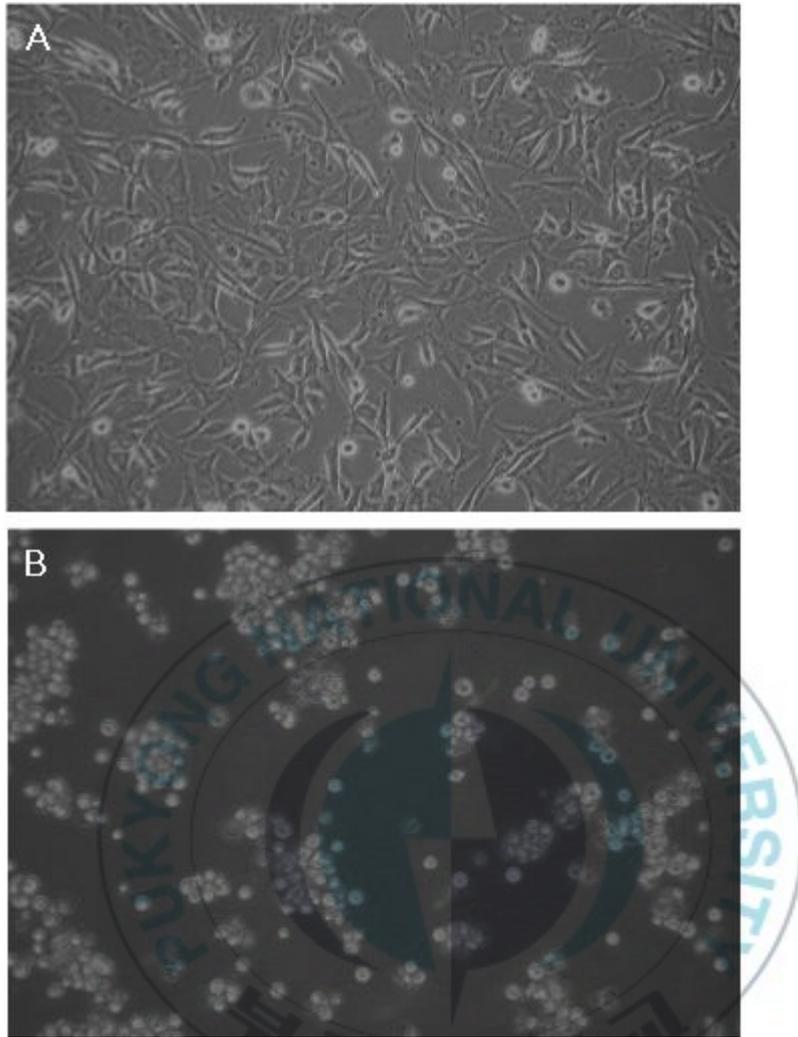


Fig. 1. Inverted microscopic photograph of normal Crandell-reese feline kidney (CrFK) CCL-94 cells (A) and CrFK cells infected by feline calicivirus after 24 hr (B).

들이 떨어지면 FCV가 감염된 flask를 freezing-thawing을 2번 반복한 후, 1,800x g에서 15분 원심분리 하였다. Cell-debris는 제거하고 세포를 파쇄시킨 후, 바이러스를 함유하고 있는 상등액을 cryogenic vial (Nalgene, USA)에 0.5 mL 분주하여 사용할 때 까지 -70℃에 보관하였다 (Bidawid *et al.*, 2003).



### 2.3. 바이러스 정량

바이러스를 정량하기 위한 방법으로 end point dilution assay 방법인 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>)으로 바이러스 감염가를 측정하였다. 이는 일정량의 세포배양액에 50%를 감염시키는데 필요한 바이러스 회석배수를 나타내는 것이다.

먼저 96 well plate에 CrFK cell을  $1.0 \times 10^4$  cells/well 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양하여 monolayer을 얻었다. 숙주 세포가 monolayer로 형성된 96 well plate에 growth medium을 aspirate를 이용하여 제거한 후, 바이러스 현탁액을 maintenance medium에 10진법으로 연속 희석하였다. 희석된 바이러스를 25 µl씩 4개의 well에 접종하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator 90분 동안 방치하여 FCV를 각 well에 형성된 cell에 흡착시키고, 이를 다시 회수한 뒤 각 well에 100 µl의 maintenance medium을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에 배양하였다. 바이러스 감염 후 3-4일간 매일 현미경을 통하여 CPE 형성 유무를 관찰하였으며, 바이러스에 의해 lysis된 세포를 3.4% formaldehyde용액으로 세포를 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 5분 염색하여 가시화하였다. 바이러스 감염가는 50% 이상 CPE가 나타난 well의 희석단계를 Reed-Muench method로 산정하고 log TCID<sub>50</sub>/mL로 표시하였다 (Mahy and Kangro., 1996; G. Kampf *et. al.*, 2005).

## 2.4. 세포독성검사(MTT assay)

각 추출물의 CrFK cell에 대한 세포독성은 생존 세포내의 효소작용에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)의 환원으로 형성되는 formazan crystal 양을 흡광도로 측정하는 MTT assay에 따라 시험하였다. 먼저 CrFK cell ( $1.0 \times 10^4$  cells/well)을 96well plate에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양하여 monolayer을 얻은 후, growth medium을 제거하였다. 최고농도 2.50 mg/mL의 각 추출물을 2.50, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.08 mg/mL의 농도가 되도록 6단계로 배수 희석하여 100 µL씩 분주하고 24시간 더 배양하였다. 세포의 병변도를 확인한 후, 추출물을 제거하고 2 mg/mL의 MTT용액을 100 µL씩 첨가하였다. 이를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양하고, 과량의 MTT 용액을 제거한 다음 세포내에 형성된 formazan crystal을 DMSO로 용해한 뒤, ELISA reader (Molecular Decives, Co., Sunnyvale, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 추출물 대신 maintenance medium만 첨가시킨 것으로 하였고 대조군과 비교하여 흡광도가 50% 감소되는 농도를 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>)으로 정하였다.

## 2.5. 항바이러스 활성평가

### 2.5.1. Plaque reduction assay

노로바이러스를 대체한 feline calicivirus에 대한 항바이러스 효과는 plaque reduction assay에 따라 시험하였다. CrFK cell( $4.0 \times 10^5$  cells/mL)를 6 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양하여 monolayer을 얻었다. 세포단층을 PBS로 세척하고 약 20-200 pfu/well로 희석한 바이러스 용액을 접종한 후 90분 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 90분 방치하여 FCV가 CrFK cell에 흡착할 수 있도록 하였다. 바이러스가 흡착되는 동안 1000, 500, 250, 125, 12.5, 6.25 3.13 µg/mL의 농도로 조제한 각 추출물을 2x MEM에 첨가한 다음, 1.5% agar와 1:1로 혼합하여 agar가 굳지 않도록 45°C water bath에 보관하였다. 바이러스 흡착이 완료되면, 다시 바이러스를 회수하고 미리 제조해둔 추출물을 첨가한 2x MEM-1.5% agar를 각 well에 4 mL 씩 분주하였다. 바이러스 감염에 의하여 plaque가 형성될 때까지 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양하여, plaque가 형성되면 agar overlay medium을 떼어내고 3.4% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 염색하여 plaque수를 대조군과 비교하였다. 바이러스 증식을 50% 억제시키는 추출물의 농도를 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>)로 정하였고, 추출물이 세포에 끼치는 독성 값(CC<sub>50</sub>)을 항바이러스 약효 값(EC<sub>50</sub>)으로 나누어 준 selectivity index (SI)를 산출하여 항바이러스 효과를 판정하였다.

$$SI \text{ (selectivity index)} = \frac{CC_{50} \text{ (50\% cytotoxic concentration)}}{EC_{50} \text{ (50\% effective concentration)}}$$

## 2.5.2. Virucidal effect

천연식물자원에 대하여 FCV의 사멸정도를 확인하기 위한 살바이러스 시험은 FCV 회석액을 일정시간 추출물과 반응시킨 후 CrFK cell에서 측정된 TCID<sub>50</sub> 방법으로 바이러스 감염가를 측정하여 효과를 판정하였다 (Doultree *et al.*, 1999; Gehrke *et al.*, 2004).

먼저 96 well plate에 CrFK cell이  $6.3 \times 10^3$  cell/well 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양하여 monolayer을 얻는다. 각 추출물의 항바이러스 활성은 약 5.0 TCID<sub>50</sub>/mL로 회석된 FCV를 각 추출물과 농도별로 1:1로 혼합하여 실온에서 1, 3, 24 시간별로 실온에서 반응시켰다. 반응 종료 후, 즉시 virus를 maintenance medium에 10 진법으로 희석하고 CrFK cell이 monolayer로 형성된 96 well plate에 growth medium을 aspirate를 이용하여 제거하였다. 다음으로 희석된 바이러스를 25  $\mu$ l씩 4개의 well에 접종하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator 90 분 동안 방치하여 FCV를 CrFK cell에 감염시키고, 각 well에 100  $\mu$ l의 maintenance medium을 첨가하였다. 바이러스에 감염 3-4일 후 CPE 유무를 확인하고, 0.1% crystal violet 으로 가시화 시킨 후 바이러스 감염가를 측정하였으며, 대조군으로는 추출물 대신 maintenance medium을 희석된 바이러스와 혼합한 것으로 하였다.

## 2.6. 녹차추출물로부터 Anti-FCV 성분의 분리 및 정제

### 2.6.1. 녹차추출물의 용매분획

항바이러스 활성에 효과가 있는 천연물질인 녹차추출물을 이용하여 용매 분획을 실시하였다. 메탄올 추출물에 일정량의 증류수를 가하여 현탁시킨 후, 분획 깔때기를 이용하여 비극성 용매인 *n*-hexane ( $C_6H_{14}$ )부터, dichloromethane ( $CH_2Cl_2$ ), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), and water ( $H_2O$ ) 순서로 순차적으로 이용하여 용매 분획을 하였다. 먼저 녹차 메탄올 추출물에 *n*-hexane을 증류수와 동량으로 넣고, 잘 혼합한 후 추출용매와 수층이 나뉘도록 방치하였다. *n*-hexane층을 분액깔때기를 이용하여 분리하고 남은 여액에 같은 방법으로 동량의 dichloromethane을 첨가한 뒤 충분히 흔들어 방치시킨 후 dichloromethane 층을 분리하였으며, 이후 ethyl acetate, *n*-butanol과 water을 남은 여액과 동량으로 첨가하여 차례대로 분획하였다(Fig. 2, Eom *et al.*, 2008). 얻어진 추출 여액들은 60°C 수욕상에서 rotary evaporator로 감압·농축하였으며, 각 추출물을 250 mg/mL의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO; Kanto, Japan)에 녹인 다음 0.45  $\mu$ m millipore filter로 여과한 것을 실험에 사용하였다.

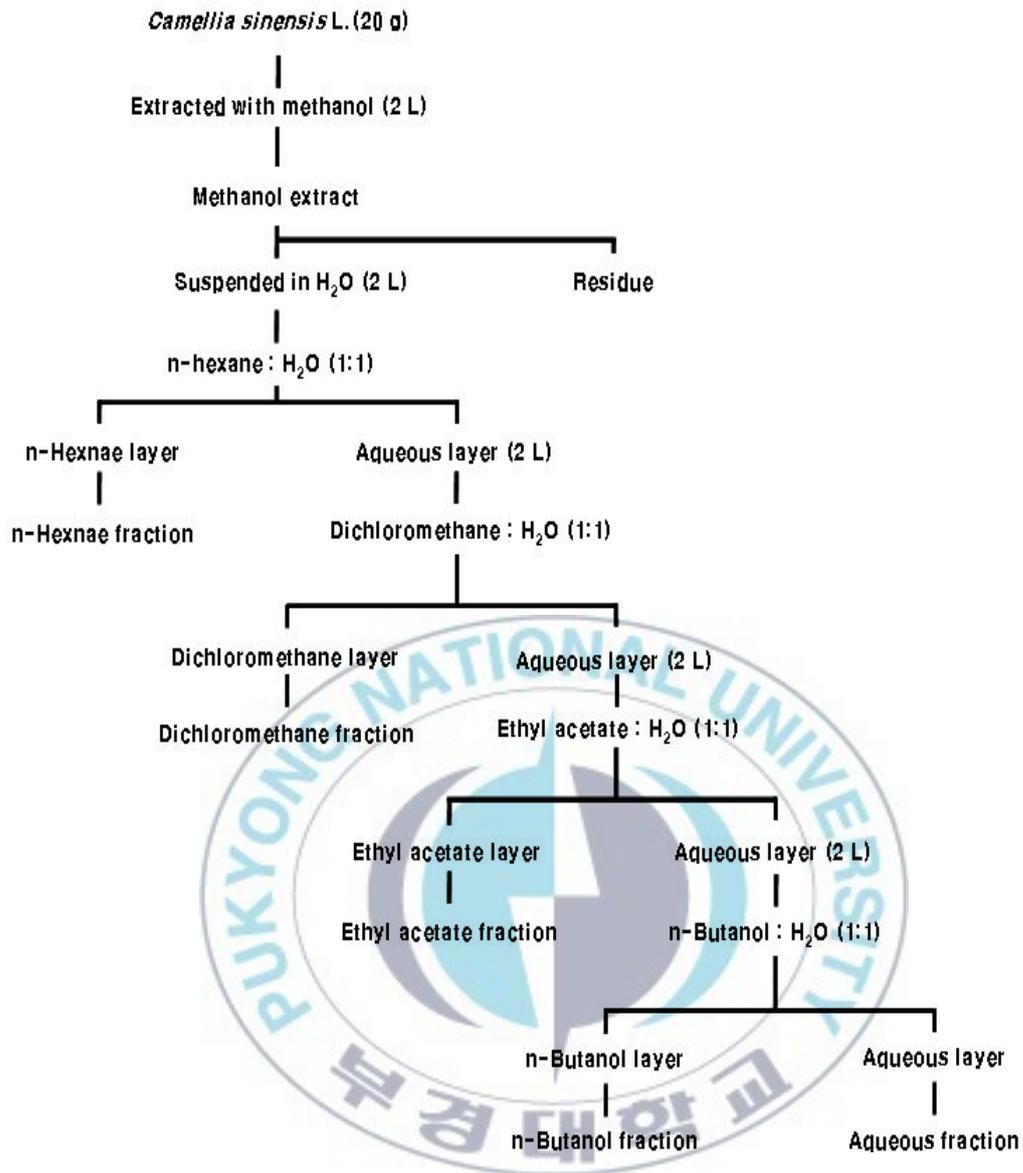


Fig. 2. Scheme of extraction and liquid-liquid solvent fraction from *Camellia sinensis* L..

## 2.6.2. HPLC에 의한 항바이러스 활성물질 분리

녹차 추출물의 ethylacetate 용매 분획물로 부터 항바이러스 활성을 나타내는 물질을 분리하기 위하여 high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Tech, USA)로 분석하였다. 분석용 컬럼은 정지상으로 크기가 5  $\mu\text{m}$ 인 C<sub>18</sub> reverse-phase colum (Eclipse XDB, 4.6 x 150 mm, Agilent Tech, USA)를 사용하였다. 각 시료의 주입량은 20 $\mu\text{l}$  이고, 이동상으로는 0.1% acetic acid 가 포함된 water, acetonitrile, ethylacetate를 87:10:3 (v/v)의 비율로 하여, 유량은 0.8 mL/min, UV detector의 검출과장은 280 nm로 고정하였다(Row and Yinzhe, 2006).

## 2.6.3. LC-MS/MS에 의한 항바이러스 활성물질 분리

녹차 용매 추출 분획의 FCV에 대한 항바이러스 활성을 가지는 물질을 알아보기 위하여 LC-MS/MS를 이용하여 분석을 실시하였다. Mass spectrometer는 Thermo Finnigan TSQ Quantum discovery triple-quadrupole mass spectrometer (San Jose, CA, USA)와 분리를 위한 HPLC는 Thermo Finnigan MS Pump plus system (San Jose, CA, USA)을 사용하였다. 분석용 column은 Luna C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 50 x 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA)을 사용하였다. MS의 spray voltage는 3.5 kV, capillary temperature는 250 $^{\circ}\text{C}$ 였고, negative ion electrospray mode로 분석하였다. 시료의 주입량은 20  $\mu\text{l}$ 였고, 이동상으로는 A용액은 water (0.1% formic acid)와 B용액은 acetonitrile (0.1% formic acid)을

사용하여 acetonitrile의 비율이 점진적으로 높아지는 gradient program을 사용하였다. A 용액과 B 용액을 95.5:0.5의 비율로 시작하여 6분 만에 B 용액을 100% 까지 올린 후, 9분 까지 유지하고 다시 비율을 낮추어 5분 간 column의 평형화 시간을 가지도록 설정하였다(Table 2). 유속은 0.6 mL/min였으며, 각각의 고유한 fragment ion들을 확인하기 위하여 100-600 m/z을 full scan하였다(Mata-Bilbao. *et al.*, 2007).



Table 2. The gradient mobile phase of LC-MS/MS for analysis of catechins

Time (min)	A : water (0.1% formic acid)	B : acetonitrile (0.1% formic acid)
0	95.5	0.5
3	75	15
6	0	100
9	0	100
10	95.5	0.5
15	95.5	0.5



## 결과 및 고찰

### 1. CrFK cell에 대한 천연물질의 세포독성시험

각 천연식물자원 추출물의 CrFK cell에 대한 세포독성은 MTT assay에 따라 시험하였다. 식물 추출물을 2.5 mg/mL의 농도부터 2배로 6단계 희석하여 추출물을 가한 세포의 효소작용에 의해 형성되는 formazan crystal 양을 추출물을 가하지 않은 세포와 비교하였다. 대조군에 비하여 흡광도가 50% 감소되는 농도를  $CC_{50}$ 으로 나타내었으며, 세포독성을 측정한 결과 각 추출물들은 CrFK cell에 대해 서로 다른 세포독성을 나타내었다.

천연식물추출물 중 향신료의 경우 다른 식물 자원보다 세포독성이 비교적 약하게 나타났다. 그 중 고춧가루 추출물은  $CC_{50}$ 값이 11.75 mg/mL로써 CrFK cell에 대하여 독성이 매우 약하게 나타났으며, 생강추출물의  $CC_{50}$  값은 3.97 mg/mL로 향신료 중에서 비교적 세포 독성이 높게 나타났다. 차(茶)의 경우 로즈마리와 녹차 추출물의 세포독성은 각각 2.14 mg/mL, 2.47 mg/mL의 농도로 나타났으며, 식물성 한약재로 사용되는 추출물의 경우 탕자와 당귀 추출물이 각각 0.80 mg/mL, 0.75 mg/mL의 농도로 CrFK 세포에 대하여 독성이 높게 나타났다. 이상의 결과를 조합하여 보면, 식물성 한약재가 향신료와 차(茶)에 비하여 세포독성이 높은 것으로 조사되었다.

Table 3. Cytotoxicity effects of various methanolic extracts on CrKF cell by MTT assay

Natural plants	Scientific name	CC <sub>50</sub> * (mg/mL)
	<i>Allium scorodorpasum</i> var. viviparum Regel	11.75
Spice	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	3.97
	<i>Capsicum annuum</i> L.	11.62
Tea	<i>Rosemary officinalis</i> L.	2.14
	<i>Camellia sinensis</i> L.	2.47
Medical plant	<i>Cnidium officinale</i> Makino	2.98
	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	0.95
	<i>Hovenia dulcis</i> var. koreana	2.34
	<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.	0.80
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	0.75
	<i>Citrus aurantium</i> L. subsp	1.27

\* CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

## 2. 천연물질의 FCV에 대한 항바이러스 활성

### 2.1. Plaque reduction assay에 따른 항바이러스 효과

천연식물자원 메탄올 추출물의 FCV에 대한 항바이러스 효과를 측정하기 위하여 plaque reduction assay에 따라 시험하여 50% 바이러스 증식을 억제 시키는 농도인  $EC_{50}$ 을 조사하였고, 이에 대한 항바이러스 효과는  $CC_{50}$ 과  $EC_{50}$ 으로부터 계산된 selectivity index (SI)값으로 나타내었다.

김치 부재료로 많이 사용되고 있으며 항균작용을 가지는 것으로 알려진 마늘, 생강 및 고춧가루 추출물(Kim *et al.*, 2000)의 FCV에 대한 항바이러스 활성을 조사한 결과를 Fig. 3와 Table 4에 나타내었다. 향신료 추출물을 포함하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 마늘의  $CC_{50}$ 와  $EC_{50}$ 이 각각 11.75 mg/mL, 4.67 mg/mL로 높은 농도에서 plaque를 50% 억제시킬 수 있으므로 SI값이 2.52로 비교적 낮게 나타났다. 생강과 고춧가루는 SI 값이 각각 0.53, 1.97로 향신료의 항바이러스 효과는 매우 미약한 것으로 나타났다.

일반적으로 흔히 음용되고 있는 녹차와 로즈마리의 FCV에 대한 항바이러스 활성을 Fig. 4와 Table 4에 나타내었다. 녹차의 경우 0.13 mg/mL의 농도에서 plaque를 50% 감소할 수 있었으므로  $EC_{50}$ 가 0.13 mg/mL로 나타났으며, SI값은 18.5로 천연식물자원 중 가장 높은 값으로 조사되었다. 로즈마리의  $EC_{50}$ 와  $CC_{50}$ 는 각각 0.34 mg/mL, 2.14 mg/mL의 농도로 SI값이 6.29로 녹차보다는 항바이러스 효과가 낮게 나타났다.

Table 4. Antiviral activity of methanolic extracts from national plants against feline calicivirus by plaque reduction assay

Natural plants	Scientific name	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mg/mL)	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (mg/mL)	SI <sup>c</sup>
	<i>Allium scorodorpasum</i> var. viviparum Regel	11.75	4.67	2.52
Spice	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	3.97	7.52	0.53
	<i>Capsicum annuum</i> L.	11.62	5.91	1.97
Herb	<i>Rosemary officinalis</i> L.	2.14	0.34	6.29
tea	<i>Camellia sinensis</i> L.	2.47	0.13	18.57
	<i>Cnidium officinale</i> Makino	2.98	2.51	1.19
	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	0.95	0.27	3.52
Medical plants	<i>Hovenia dulcis</i> var. koreana	2.34	1.92	1.22
	<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.	0.80	0.49	1.63
	<i>Angelica gigas</i> Nakai	0.75	0.26	2.88
	<i>Citrus aurantium</i> L. subsp	1.27	0.54	2.35

<sup>a</sup> 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

<sup>b</sup> 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) is the concentration of the sample required to reduce plaque formation of virus by 50%.

<sup>c</sup> Selectivity Index (SI) = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.

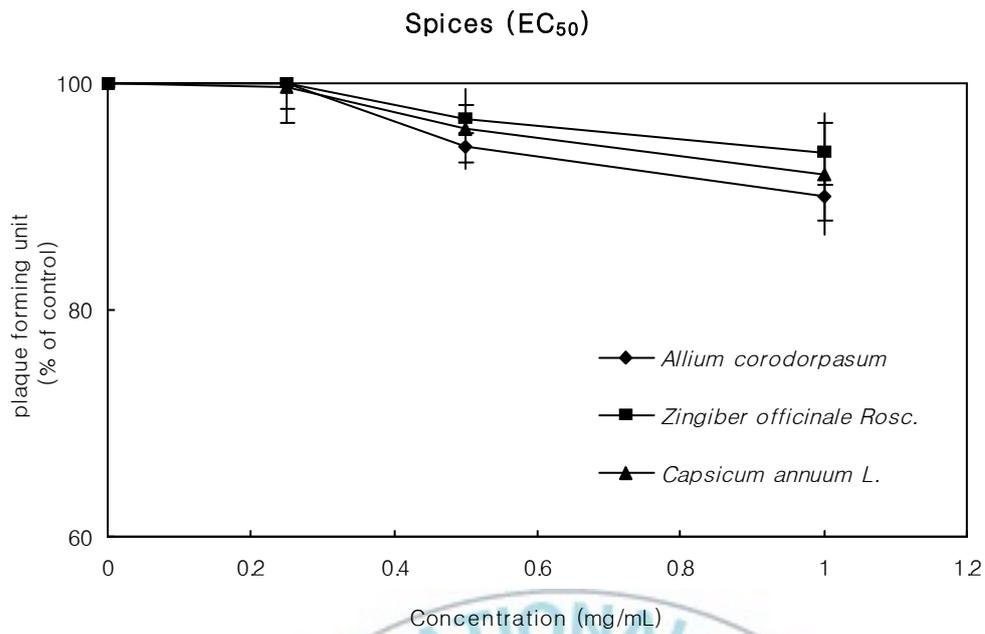


Fig. 3. Antiviral activity of spices on plaque formation. Six-well plates containing monolayers of CrFK cells were washed and infected with equal volume of virus suspension (200 pfu/mL). The overlay medium, mixed with 1.5% agar and 2x MEM, containing each on 0.2 mg/mL to 1 mg/mL with each spice. Results are expressed as percent with respect to virus control with out spices. This experiment was performed as triplicate. Each value is the result of mean  $\pm$  S.E.

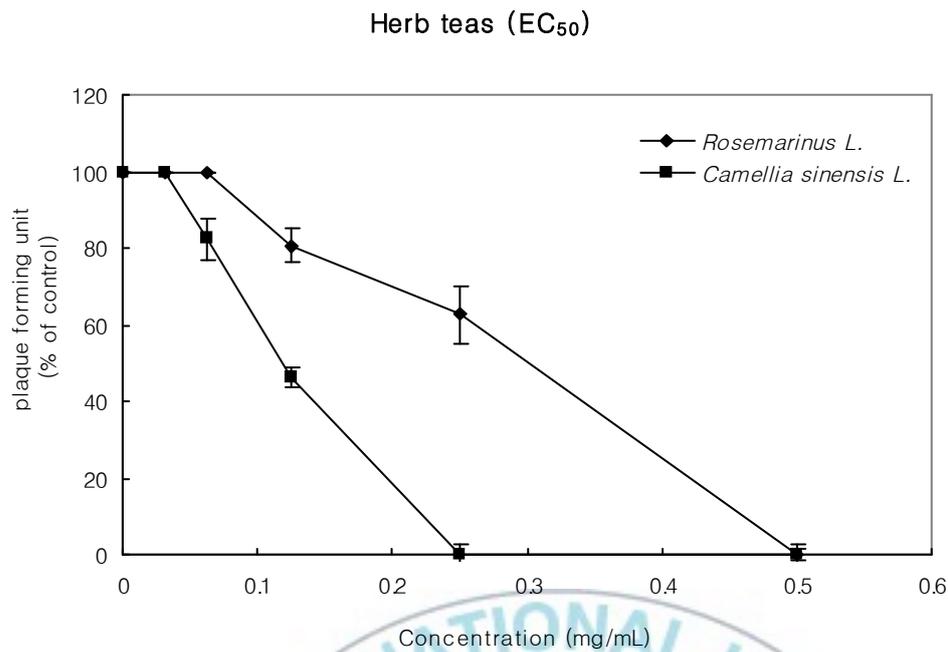


Fig. 4. Antiviral activity of herb teas on plaque formation. Six-well plates containing monolayers of CrFK cells were washed and infected with equal volume of virus suspension (200 pfu/mL). The overlay medium, mixed with 1.5% agar and 2x MEM, containing each on 0.1 mg/mL to 0.5 mg/mL with each herb tea. This experiment was performed as triplicate. Each value is the result of mean  $\pm$  S.E.

약용식물로 사용되는 식물성 한약재의 FCV에 대한 항바이러스 활성은 Fig. 5와 Table 4에 나타나었다. 식물성 한약재 중에서는 진피의 SI값이 3.74로 가장 높게 나타났으며, 홍화씨의 경우 0.27 mg/mL의 낮은 농도에서 plaque를 강하게 억제 하였으나, CC<sub>50</sub>값이 0.95 mg/mL로 세포에 대해서는 높은 독성을 나타내어 SI값이 3.52로 비교적 낮게 측정되었다. 나머지 추출물질은 SI값이 3이하로 FCV에 대한 항바이러스 활성이 낮게 나타났다.

이상의 결과로 보아 천연식물자원 중에서 녹차의 SI값이 18.57로 가장 우수한 효과를 나타내었으며 허브차로 응용되는 녹차와 로즈마리 추출물이 FCV의 plaque형성을 억제시키는데 효과적으로 작용하는 것으로 판단된다.



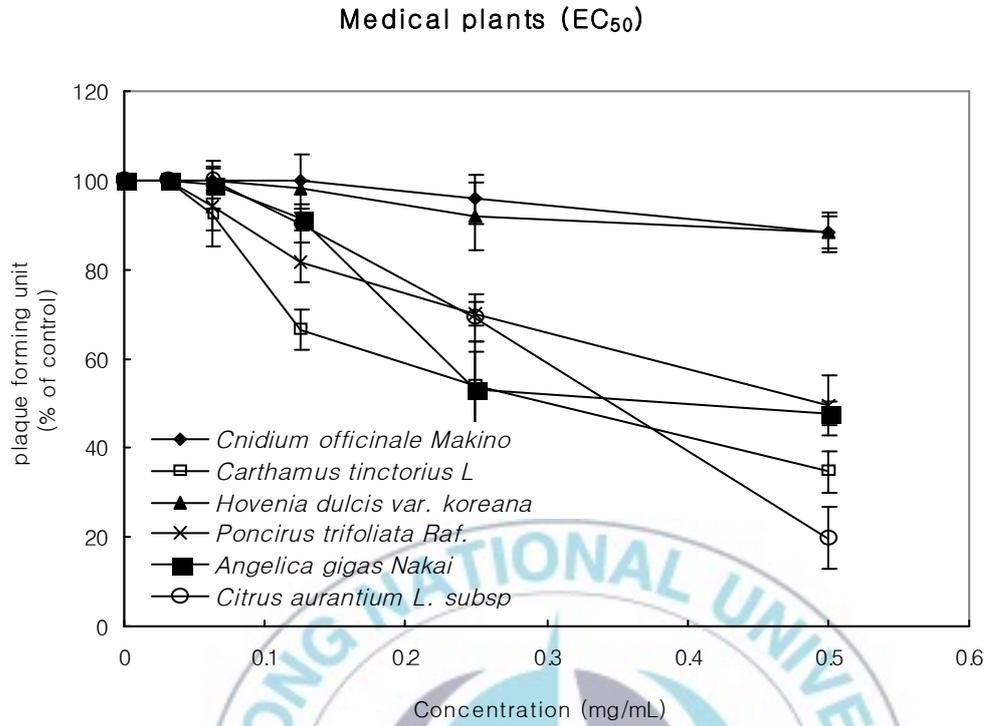


Fig. 5. Antiviral activity of medical plants on plaque formation. Six-well plates containing monolayers of CrFK cells were washed and infected with equal volume of virus suspension (200 pfu/mL). The overlay medium, mixed with 1.5% agar and 2x MEM, containing each on 0.1 mg/mL to 0.5 mg/mL with each medical plants. This experiment was performed as triplicate. Each value is the result of mean  $\pm$  S.E.

## 2.2. 천연물질의 FCV에 대한 virucidal activity

각 추출물에 대하여 직접적으로 바이러스를 불활성화 시킬 수 있는 농도를 측정하기 위하여 virucidal activity를 TCID<sub>50</sub>/mL의 방법으로 바이러스 감염가를 측정하였다.

CrFK cell이 FCV에 감염될 경우 세포병변효과(CPE)가 일어나 부착된 세포들이 떨어지게 된다. 이를 이용하여 바이러스 감염가는 FCV를 감염시킨 세포의 5일 배양 후, 50% 이상 CPE가 나타난 well의 희석단계를 log TCID<sub>50</sub>/mL 값으로 표시하였다.

향신료의 FCV에 대한 virucidal activity를 알아보기 위하여, 각 추출물을 농도별로 FCV 희석액과 반응시키고 CrFK cell에 감염시킨 후 FCV에 대한 추출물의 virucidal activity를 Table 5에 나타내었다. 향신료 추출물질을 함유하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 마늘의 경우 25 mg/mL의 농도에서도 TCID<sub>50</sub>값이 거의 감소하지 않아 항바이러스 활성이 나타나지 않았으며, 생강과 고춧가루 추출물의 경우도 마늘 추출물과 마찬가지로 항바이러스 활성은 나타나지 않았다.

로즈마리와 녹차의 FCV에 대한 virucidal activity를 측정한 결과, 로즈마리 추출물의 경우 6.25 mg/mL에서 3시간 반응 후 1 log가 감소하였으나, 그 이하의 농도에서는 항바이러스 활성이 나타내지 않았다. 로즈마리는 그람 양성균에 대하여 항균활성이 있다고 보고되고 있으나(Chung *et al.*, 2001), FCV에 대한 virucidal activity는 미약한 것으로 나타났다. 녹차 추출물의 경우 3.13 mg/mL의 농도에서 3시간 이상 FCV와 반응시킨 경우 CrFK cell에서 바이러스 감염이 나타나지 않았으며, 1.56 mg/mL의 농도에서는 24시간 반응 시킨 경우 바이러스 감염이 나타내지

않아 바이러스가 완전히 불활성화 되었으므로 다른 추출물에 비해 상대적으로 뛰어난 virucidal activity을 나타내었다(Table 5).

Bellamy(1995)에 따르면 바이러스 log TCID<sub>50</sub>/mL값이 4 log 이상 감소하였을 경우 항바이러스 효과가 있는 것으로 판단한다. 녹차추출물의 경우 3.13 mg/mL에서 TCID<sub>50</sub>값이 5 log 이상 감소하였으므로 뛰어난 항바이러스 활성을 가지고 있음을 알 수 있다.

약리작용 및 항균활성이 있다고 알려진 그 밖의 식물성 한약재 6종을 FCV에 대한 virucidal activity을 조사하였다. 그 결과, 천궁, 헛개, 탕자, 당귀 및 진피의 경우 log TCID<sub>50</sub>/mL값이 감소하는 경향을 나타내지 않아 항바이러스 작용은 매우 미약한 것으로 관찰되었다(Table 5). 그러나 홍화씨의 경우 12.5 mg/mL에서 대조군과 비교하였을 때 3시간이상 반응 시켰을 경우 TCID<sub>50</sub>값이 4 log 이상 감소하였고, 6.25 mg/mL의 농도에서는 5시간 이상 반응시킨 경우에 4 log 이상 감소하여 다른 식물성 한약재보다 뛰어난 virucidal activity을 가지고 있는 것으로 나타났다 (Table 5). 그러나, 1.56 mg/mL의 저농도에서는 3시간 반응시킨 경우 1 log 정도 감소하였고 그 이후로는 반응시간을 연장하여도 지속적인 항바이러스 활성이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 홍화씨 추출물의 경우 농도 의존적인 항바이러스 활성을 가지고 있다는 것을 의미한다.

Table 5. Virucidal activity of various methanolic extracts from natural plants against feline calicivirus

Natural plants	Conc. (mg/mL)	log TCID <sub>50</sub> /mL			
		0 time	3 hr	5 hr	24 hr
<i>Allium corodorpasum</i> var. viviparum Regel	25.00	5.00	4.67	4.17	4.17
	12.50	5.00	4.53	4.58	3.87
	6.25	5.00	4.67	4.67	4.00
	3.13	5.00	4.67	4.17	4.00
	1.56	5.00	4.73	4.50	4.00
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	6.25	5.00	5.00	4.50	4.17
	3.13	5.00	5.00	4.34	4.17
	1.56	5.00	4.83	4.17	3.00
<i>Capsicum annuum</i> L.	25.00	5.00	5.45	5.00	4.83
	12.50	5.00	4.56	4.24	4.17
	6.25	5.00	4.00	4.00	4.17
	3.13	5.00	4.83	4.67	4.34
	1.56	5.00	5.00	4.33	4.17
<i>Rosemarinus</i> L.	6.25	5.00	4.00	4.00	3.50
	3.13	5.00	4.17	4.17	4.00
	1.56	5.00	4.34	4.17	4.00
<i>Camellia sinensis</i> L.	6.25	5.00	neg*	neg	neg
	3.13	5.00	neg	neg	neg
	1.56	5.00	3.50	3.00	neg
<i>Cnidium officinale</i> Makino	12.5	5.00	5.00	5.00	3.00
	6.25	5.00	5.17	4.83	3.73
	3.13	5.00	5.17	5.50	4.00
	1.56	5.00	4.83	4.83	4.33
Control	-	5.00	5.00	5.00	4.00

Table 5. Continued

Medicinal plants	Conc. (mg/mL)	log TCID <sub>50</sub> /mL			
		0 time	3 hr	5 hr	24 hr
	12.50	5.00	neg	neg	neg
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	6.25	5.00	2.17	neg	neg
	3.13	5.00	3.50	2.17	neg
	1.56	5.00	4.50	4.00	3.33
	6.25	5.00	5.00	4.67	neg
<i>Hovenia dulcis</i> var. koreana	3.13	5.00	4.67	4.33	neg
	1.56	5.00	5.00	5.00	3.00
	6.25	5.00	4.34	4.33	3.00
<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.	3.13	5.00	4.67	3.50	3.17
	1.56	5.00	4.83	4.50	3.17
	6.25	5.00	5.50	5.17	4.00
<i>Angelica gigas</i> Nakai	3.13	5.00	5.00	5.34	4.00
	1.56	5.00	4.83	4.50	4.50
	25.00	5.00	4.50	4.00	3.00
<i>Citrus aurantium</i> L. sub sp	12.50	5.00	4.49	3.71	3.00
	6.25	5.00	4.83	4.67	3.56
	3.13	5.00	4.50	4.34	3.83
	1.56	5.00	5.17	4.90	4.33
Control	-	5.00	5.00	5.00	4.00

### 2.3. 녹차 및 홍화씨 추출물의 virucidal activity

천연 식물자원 11종의 virucidal activity에 대하여 탐색한 결과, 녹차 추출물과 홍화씨 추출물이 FCV에 대한 virucidal activity가 뛰어난 것으로 조사되었다(Table 5). 녹차추출물의 경우 6.25 mg/mL에서 3시간 이상 반응 시킨 경우 FCV가 완전히 불활성화 되었으며, 홍화씨 추출물위 경우 6.25 mg/mL에서 5시간 이상 반응시킨 경우 FCV가 완전히 불활성화 되는 것으로 나타나 반응시간을 단축하여 반응 시간대에 따른 항바이러스 활성을 조사하였다(Table 6).

녹차 추출물의 경우, 3.13 mg/mL의 농도에서 30분 만에 TCID<sub>50</sub> 값이 1.5 log 감소되었으며, 반응 1시간 안에 바이러스가 불활성화 되는 것으로 나타났다. 그러나 1.56 mg/mL의 농도에서는 반응 시간이 경과하여도 약 1 log 정도 감소하여 낮은 농도에서는 virucidal activity가 미약한 것으로 나타났다.

홍화씨 추출물의 경우, 6.25 mg/mL의 농도에서 반응 5시간 만에 바이러스 감염을 나타내지 않았으나(Table 5), 시간을 단축한 결과 12.5 mg/mL의 농도에서는 30분 만에 2 log 정도가 감소하였고, 반응시간이 경과함에 virucidal activity가 점차 증가하여 3시간 이상 경과한 경우 FCV가 불활성화 되는 것으로 조사되었다. 6.25 mg/mL의 농도에서는 3시간이 지나야 2 log 이상이 감소하는 것으로 나타나 녹차보다는 항바이러스 활성이 약하지만 농도 및 반응시간에 유의적으로 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 관찰되었다(Table 6).

Table 6. Virucidal activity of methanolic extracts of *Camellia sinensis* L. and *Carthamus tinctorius* L. against feline calicivirus

Medicinal plants	Concentration (mg/mL)	log TCID <sub>50</sub> /mL			
		0 time	30 min	1 hr	3 hr
<i>C. sinensis</i> L.	6.25	5.00	2.17	neg*	neg
	3.13	5.00	3.50	neg	neg
	1.56	5.00	4.00	4.00	3.50
<i>C. tinctorius</i> L.	12.5	5.00	3.17	4.00	neg
	6.25	5.00	4.50	4.00	2.17
	3.13	5.00	4.50	4.17	3.50
	1.56	5.00	4.50	4.17	4.50
Control	-	5.00	5.00	5.00	5.00

TCID<sub>50</sub>, 50% tissue culture infectious dose; \* neg, feline calicivirus are inactivated.



### 3. 녹차의 용매분획에 대한 항바이러스 활성

이상 천연식물자원의 항바이러스 활성을 조사한 결과, 녹차추출물이 FCV에 대하여 항바이러스 효과가 가장 뛰어난 것으로 조사되었다. Manning (2003)에 의해 보고된 바에 의하면 녹차는 항균, 항산화, 항암 효과뿐만 아니라 혈압 강하작용, 멜라닌 생성 억제작용 등 인체 내 약리적 특성이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 녹차 중의 FCV에 대한 항바이러스 활성을 나타내는 성분을 추적하기 위하여 녹차추출물을 극성에 따른 용해도 차이를 이용하여 n-hexane ( $C_6H_{14}$ ), dichloromethane ( $CH_2Cl_2$ ), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (n-BuOH) 그리고 water ( $H_2O$ ) 순서로 순차적으로 용매 분획하였다. 용매분획에 따른 FCV의 virucidal activity를 측정한 결과를 Table 7에 나타내었다.

그 결과, EtOAc fraction에서 3.13 mg/mL의 농도에서는 1시간, 1.56 mg/mL의 농도에서는 3시간 만에 FCV를 완전히 불활성화 시키는 것으로 나타났다. n-BuOH fraction에서는 3.13 mg/mL의 농도에서 EtOAc fraction과 마찬가지로 1시간 만에 불활성화 시켰으나, 1.56 mg/mL의 농도에서는 5시간이 경과되어야 FCV를 불활성화 시킬 수 있었으므로 EtOAc fraction에서 가장 우수한 활성을 가지는 것으로 나타나, 이에 대한 용매 분획을 이용하여 HPLC와 LC-MS/MS로 분석하여 항바이러스 활성을 가지는 물질을 분리하였다.

Table 7. Virucidal activity of the solvent soluble fractions from *Camellia sinensis* L. against feline calicivirus

<i>Camellias sinensis</i> L. fraction	Conc. (mg/mL)	log TCID <sub>50</sub> /mL			
		0hr	1hr	3hr	5hr
n-Hexane	6.25	5.50	neg*	neg	neg
	3.13	5.50	2.83	neg	neg
	1.56	5.50	3.50	2.83	2.17
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6.25	5.50	neg	neg	neg
	3.13	5.50	2.00	neg	neg
	1.56	5.50	5.00	4.83	3.17
EtOAc	6.25	5.50	neg	neg	neg
	3.13	5.50	neg	neg	neg
	1.56	5.50	2.50	neg	neg
n-BuOH	6.25	5.50	neg	neg	neg
	3.13	5.50	neg	neg	neg
	1.56	5.50	3.83	2.83	neg
Water	6.25	5.50	4.00	2.17	neg
	3.13	5.50	4.50	3.17	neg
	1.56	5.50	4.50	3.50	2.17

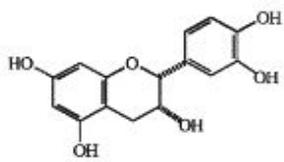
TCID<sub>50</sub>, 50% tissue culture infectious dose; \*neg, feline calicivirus are inactivated.

## 4. 녹차의 항바이러스 물질분리 및 정제

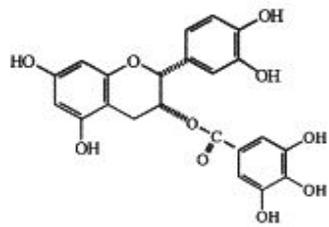
### 4.1. HPLC

녹차를 용매분획 한 결과 EtOAc fraction에서 가장 우수한 활성을 가지는 것으로 나타나, 이를 HPLC로 분석하여 항바이러스 활성을 가지는 물질을 분리하였다.

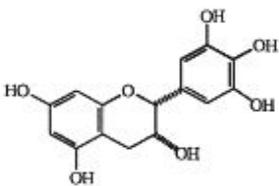
녹차는 최근 생리활성에 관하여 많은 주목을 받고 있는 건강식품 중 하나로 많은 특히, 녹차에 포함된 대표적인 카테킨 화합물인 epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG) 등은(Fig. 6), 항산화 및 항암 효과 이외에 면역체계 강화, 콜레스테롤 효과 등을 가지고 있다고 보고가 되고 있다(Kim and Row, 2001). 따라서 이러한 카테킨 화합물들이 항바이러스 활성을 가지는 물질로 판단되어 0.1% acetic acid가 포함된 water, acetonitrile, ethylacetate를 87:10:3 (v/v)의 비율로 이동상 용매를 결정한다. 먼저 순수하게 정제된 카테킨 화합물의 표준을 HPLC로 분리하였으며(Fig. 7), EtOAc fraction을 HPLC로 분리한 결과와 비교하였다. 그 결과, EtOAc fraction의 경우 약 6 개의 pick로 분리 되었으며, EGC의 retention time은 약 2.1분으로 나타났고, EC, EGCG, ECG은 각각 3.5, 5.1, 10.1분의 같은 retention time으로 분리되어 4가지 카테킨 화합물이 모두 포함되어 있었으며, 그중에서도 EGCG가 가장 많이 함유되어 있는 것으로 조사되었다(Fig. 8).



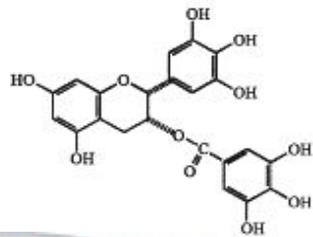
(-)-Epicatechin (EC)



(-)-Epicatechin gallate (ECG)



(-)-Epigallocatechin (EGC)



(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)

Fig. 6. Structures of catechins isolated from *Camellia sinensis* L.



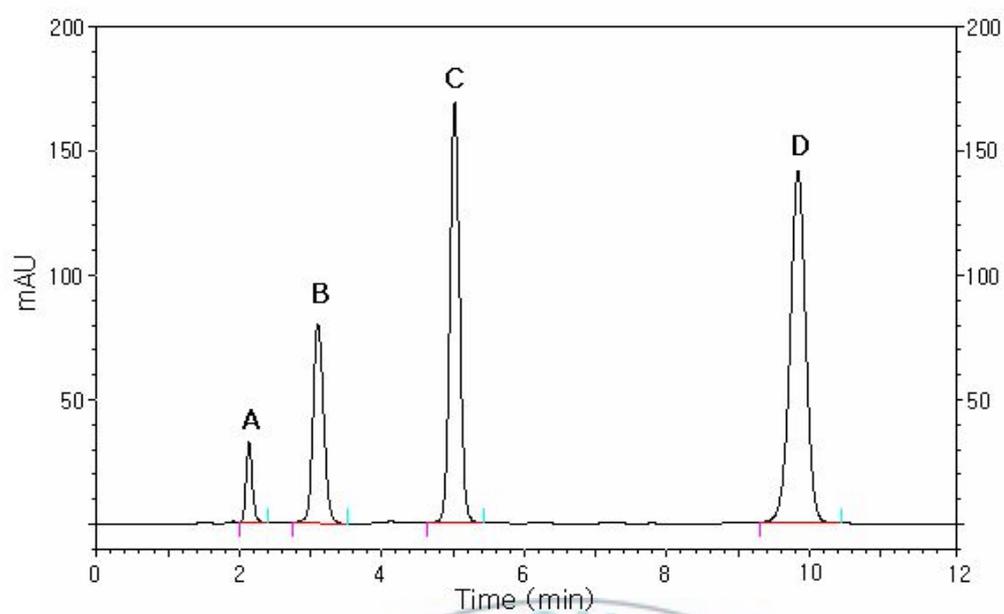


Fig. 7. HPLC elution profile of standard catechins. Catechins were isolated and analyzed by HPLC as described in Materials and Methods. A, epigallocatechin; B, epicatechin; C, epigallocatechin gallate; D, epicatechin gallate.

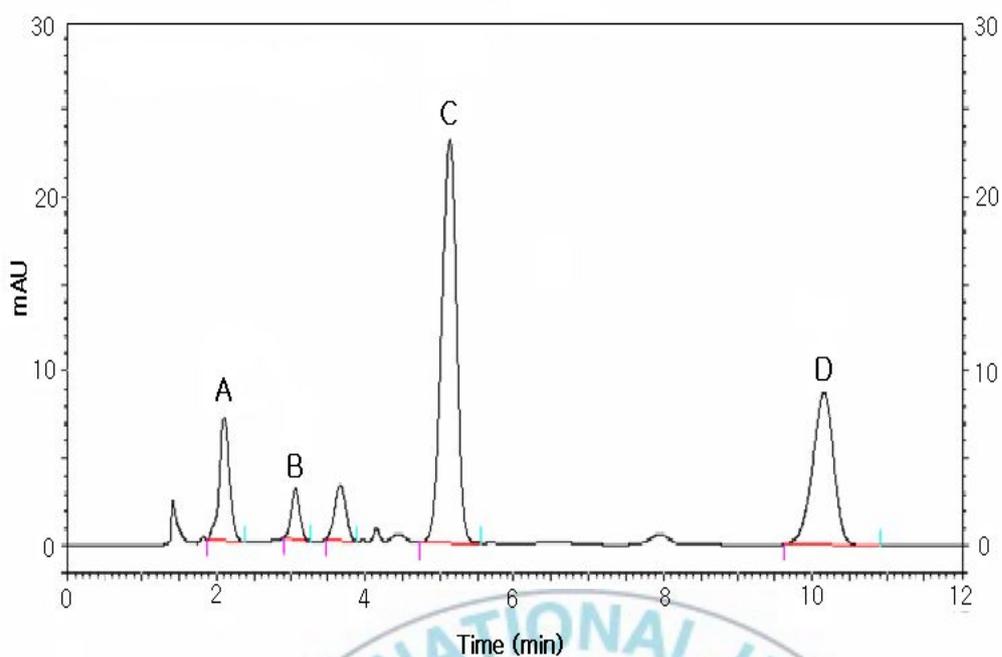


Fig. 8. HPLC elution profile of the ethyl acetate soluble fraction of *Camellia sinensis* L. That was isolated and analyzed by HPLC as described in Materials and Methods. A, epigallocatechin; B, epicatechin; C, epigallocatechin gallate; D, epicatechin gallate.

## 4.2. LC-MS/MS

녹차 EtOAc분획의 FCV에 대한 항바이러스 활성을 가지는 물질들의 물질 동정을 위하여 LC-MS/MS를 이용한 분석을 실시하였다. 이동상 용매로는 0.1% formic acid가 포함된 water와 acetonitrile을 이용하여 Luna C<sub>18</sub> column으로 분석하였으며, Quadrupole type의 mass spectrometer에서 m/z 100-600를 full scan 분석하여 고유한 fragment ion들을 확인하였다. 그 결과, ECG는 5.2분, EGCG는 4.7분, EGC는 7.11분대에 peak를 확인할 수 있었고(Fig. 9), EtOAc 분획물을 표준물질과 마찬가지로 full scan분석하였을 때, ECG와 EGCG는 표준물질과 동일한 spectra를 얻을 수 있었으나, EGC의 spectra는 확인 할 수 없었다(Fig. 10).



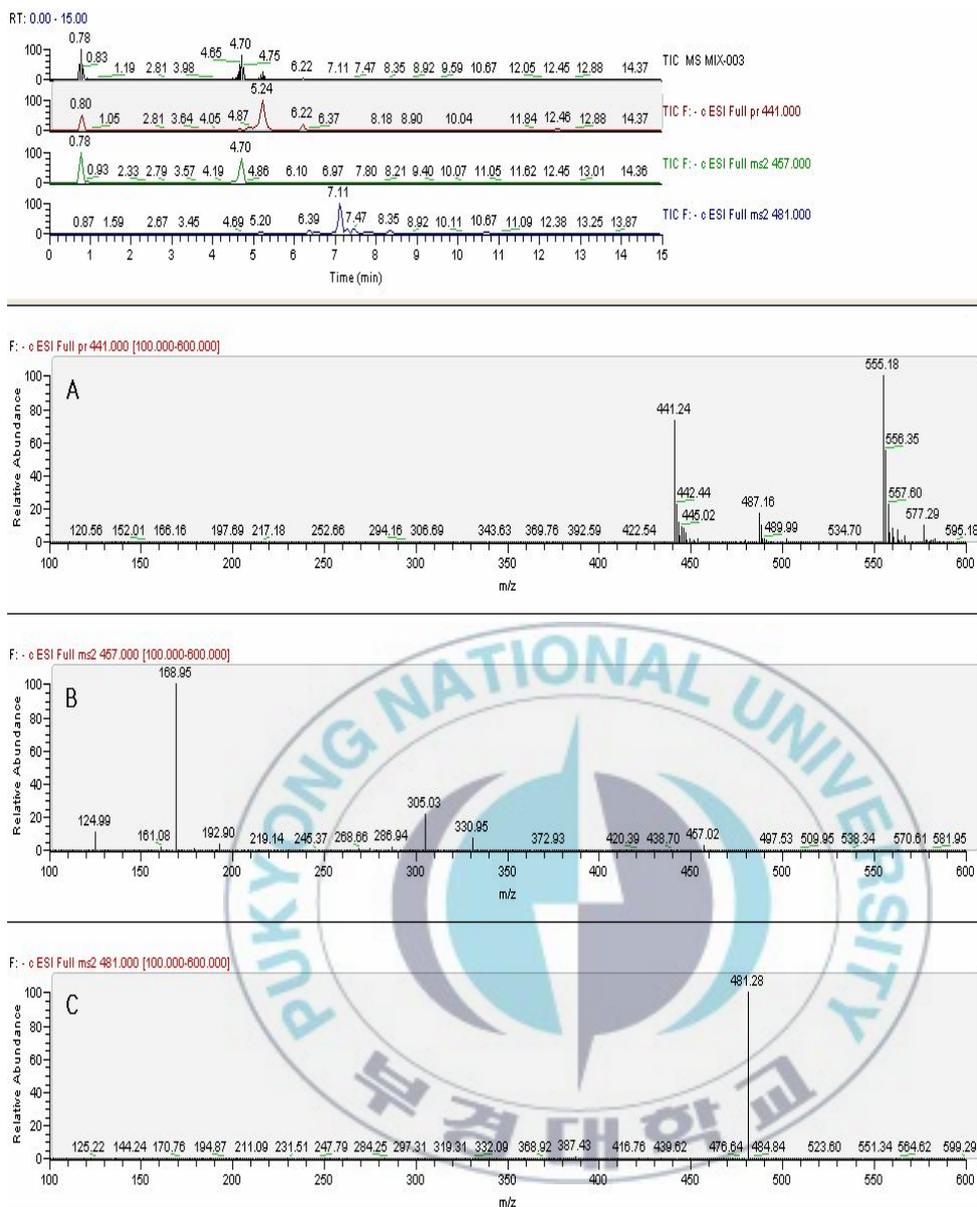


Fig. 9. LC-MS/MS chromatograms (total ion current) of a mixture of standard catechins and fragment ion chromatograms. A, epicaechin gallate; B, epigallocatechin gallate; C, epigallocatechin.

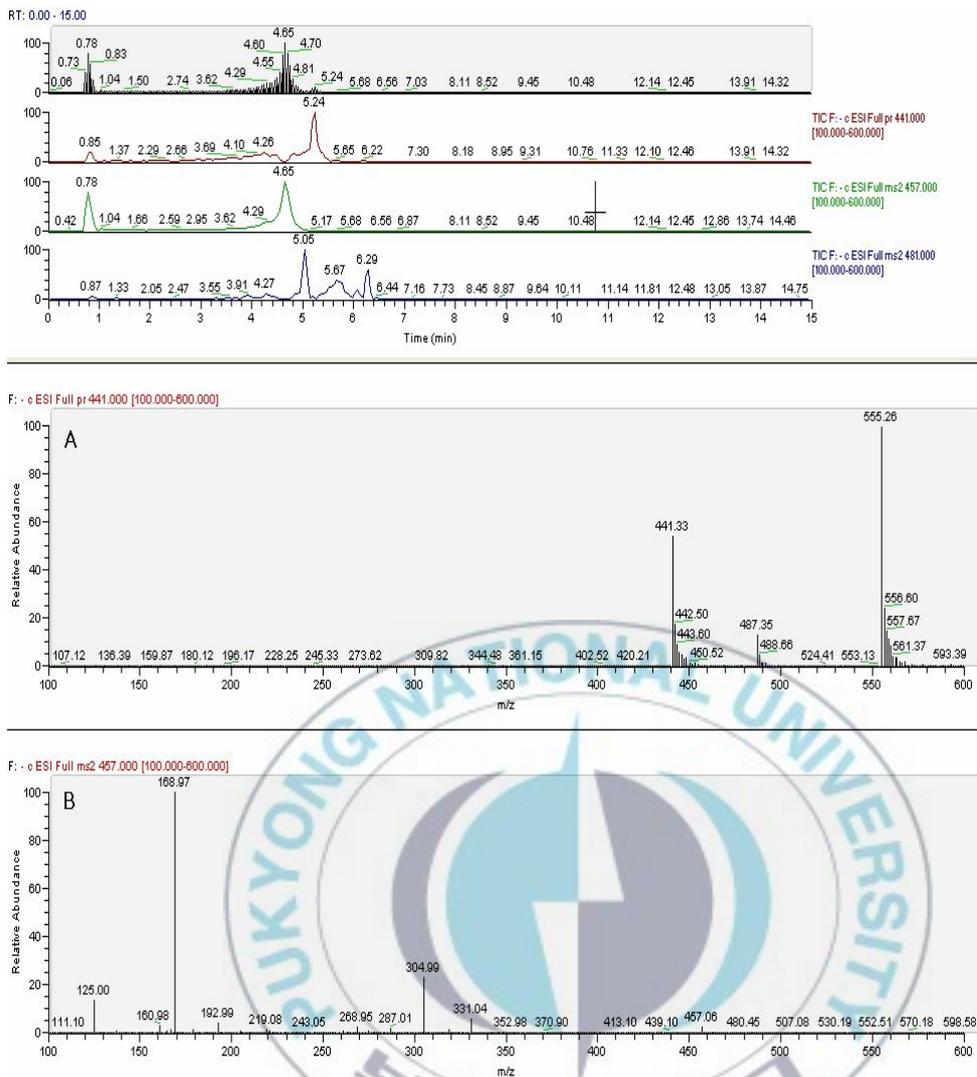


Fig. 10. LC-MS/MS chromatograms (total ion current) of ethyl acetate soluble fraction of *Camellia sinensis* L. and fragment ion chromatograms. A, epicaechin gallate; B, epigallocatechin gallate.

### 4.3. Catechin의 FCV에 대한 항바이러스 활성

녹차 EtOAc 분획물을 HPLC로 분리한 것 중 대표적인 catechin 화합물로 알려진 EGC, EC, EGCG, EGC를 회수하여, plaque reduction assay 방법으로 항바이러스 활성을 평가한 결과를 Table 8에 나타내었다. 그 중, EGCG의  $CC_{50}$ 값이  $320 \mu\text{g/mL}$ ,  $EC_{50}$ 값이  $12 \mu\text{g/mL}$ 로 SI가 26.67로써 FCV에 대하여 가장 높은 항바이러스 활성을 나타내었으며, EGC의  $EC_{50}$ 와  $CC_{50}$ 는 각각  $357 \mu\text{g/mL}$ ,  $18 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 SI값이 19.83으로 효과적인 바이러스 작용을 나타내는 것으로 조사되었다.

녹차의 연구 동향을 보면 녹차의 카테킨 화합물 중 가장 강력한 효능을 가지는 물질은 EGCG로써 항산화제로 널리 이용되고 있는 비타민 E보다 25배, 비타민 C보다 100배 더 효능이 있다고 알려져 있으며, 항암 효과 뿐만 아니라 항균효과, 항바이러스, 혈당상승 억제작용 등 많은 기능성 효과가 있다. 있다고 보고되고 있다(Kang *et al.*, 1999; Park, 2000). 이전의 문헌에 보고된 바와 같이 EGCG가 다른 catechin 화합물보다 FCV에 대하여 항바이러스 활성에 뛰어난 효과를 나타내었으며, 따라서 EGCG를 이용한다면 이러한 생리활성 효과뿐만 아니라, 천연물질로서 노로바이러스를 저감화 시켜 식중독 사고에 대한 피해와 혼란을 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

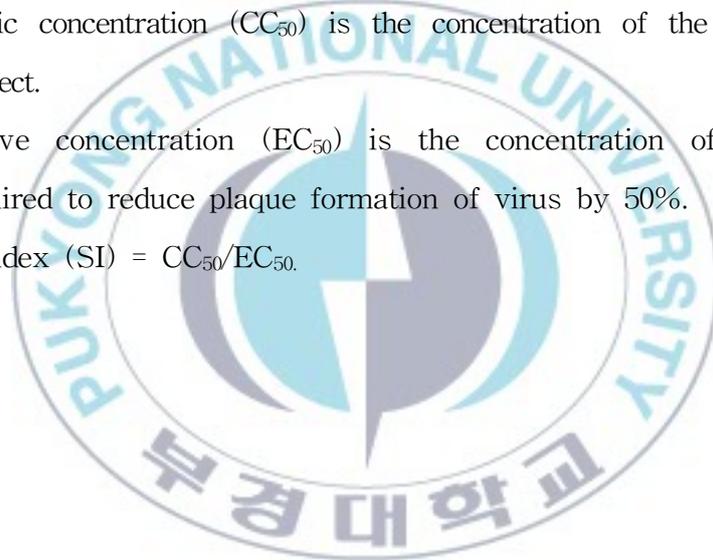
Table 8. Antiviral activity of catechins from *Camellia sinensis* L. against feline calicivirus by plaque reduction assay

Catechins	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	SI <sup>c</sup>
Epigallocatechin	237	153	1.55
Epicatechin	857	124	6.91
Epigallocatechin gallate	320	12	26.67
Epicatechin gallate	357	18	19.83

<sup>a</sup> 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

<sup>b</sup> 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) is the concentration of the sample required to reduce plaque formation of virus by 50%.

<sup>c</sup> Selectivity Index (SI) = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.



## 요 약

노로바이러스는 사람에게 급성 위장염을 일으키는 식중독 바이러스로 최근 전 세계적으로 노로바이러스 식중독에 대한 사례가 많이 보고되고 있으며 중요성이 부각되고 있다.

최근 효과적이고 친환경적인 소독제의 개발과 평가에 대한 필요성이 강조되며 허브제제와 약용식물에서 분리한 활성 성분에 대한 보고가 많이 보고되고 있으나, 노로바이러스는 인간의 장을 숙주로 하기 때문에 동물실험이나 세포배양의 방법으로 증식 시킬 수 없어 연구가 미비한 실정이며, 항 노로바이러스 활성을 가지는 천연물질에 대한 연구는 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 노로바이러스를 효과적으로 제어 시킬 수 있는 방안을 찾고자 norovirus의 대체 모델인 FCV를 이용하여 가장 흔하게 접할 수 있는 향신료 3종, 차(茶) 2종 그리고 식물성 한약재 6종으로 총 11종의 여러 가지 천연식물에 대하여 FCV의 plaque 형성 억제 효과 및 농도 및 시간별로 FCV를 효과적으로 불활성화 시킬 수 있는 물질을 탐색하였다.

총 11종의 천연식물 검색 결과, 향신료 3종은 모두 FCV에 대한 항바이러스 효과가 매우 미약하게 나타났으며, 2종의 차(茶) 중에서 녹차추출물의 SI값이 18.57으로 뛰어난 항바이러스 활성을 나타내었으며, 3.13 mg/mL의 농도에서 1시간 만에 FCV가 완전히 불활성화 되었다. 그리고 6종의 식물성 한약재 중 항바이러스 활성이 있었던 홍화씨 추출물의 SI값은 3.52으로 조사되었으며, 6.25 mg/mL의 농도에서 5시간 만에 FCV가 불활성화 되었다. 따라서 녹차 추출물이 FCV에 대하여 가장 효과적인 항바이러스 활성을 나타내었기 때문에, 녹차추출물 중 항바이러스 활

성을 가지는 물질을 분리하기 위하여 용매 분획(n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, water)을 실시하였다. 이 중 ethyl acetate fraction 에서 가장 효과적인 항바이러스 활성을 나타내었고, 이를 HPLC와 LC-MS/MS를 이용하여 분석한 결과, catechin 화합물을 4가지(epigallocatechin, epicatechin, epigallocatechin-gallate, epicatechin-gallate) 물질로 분리 할 수 있었다. 녹차추출물의 catechin 함량은 epigallocatechin-gallate, epicatechin-gallate, epicatechin, epigallocatechin 순으로 나타났다. HPLC로 분리한 catechin을 이용하여 항바이러스 활성을 조사한 결과 epigallocatechin-gallate의 SI값이 26.67 이고 epicatechin-gallate의 SI값은 19.83 으로, 분리된 catechin화합물 중 epigallocatechin-gallate가 FCV에 대하여 가장 효과적으로 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 조사되었다.



## 감사의 글

어느덧 2년이라는 시간이 흘러 석사과정의 종지부를 찍으려 합니다. 힘들고 어려웠던 시간도 있었지만 저의 인생에서 가장 중요하고 소중한 시간으로 기억 될 것입니다. 본 논문이 완성되기 까지 언제나 옆에서 용기와 힘을 주신 분들 덕분에 무사히 마칠 수 있었기에 고마운 마음을 전하고자 합니다.

부족한 제자를 부모님과 같은 마음으로 아낌없는 사랑과 관심을 가져주시고 여기까지 올수 있도록 방향을 제시해 주신 이명숙 교수님 정말 감사드리며, 교수님의 은혜 평생 간직하겠습니다. 또한 끊임없는 관심과 적극적인 지원으로 지도를 해주신 김영목 교수님과 바쁘신 일정 속에서도 논문수정을 위해 많은 도움을 주신 최태진 교수님 진심으로 감사드립니다. 학부시절부터 항상 지켜봐 주시고 많은 가르침을 베풀어 주신 이원재 교수님, 학문의 바른길을 제시해주신 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 김영태 교수님, 웃는 얼굴로 격려와 조언을 해주며 세포배양실 사용을 허락해주신 김군도 교수님 감사드립니다.

한 가족 같은 우리 일반미생물실험실의 귀염둥이 미진이, 모델 가영이, 해맑은 정배, 의젓한 한성이, 깜찍한 유리, 서로 기대고 의지할 수 있었던 미선이, 여린 현아, 예뻐진 옥주, 예은이, 지금 각자의 위치에서 열심히 노력하는 보람이, 지선이, 혜영이 부족한 언니 때문에 힘든 일도 많았을 텐데 불평 없이 많이 도와주고 잘 따라주어서 항상 미안하고 고맙습니다. 바쁘면 있을 때 오셔서 도와주시고 격려해 주셨던 구효영 선생님, 귀찮다 양으시고 멀리서도 많이 도와주고 격려도 많이 해주었던 영주언니, 지혜언니 감사드리고 앞으로 잘 부탁드립니다.

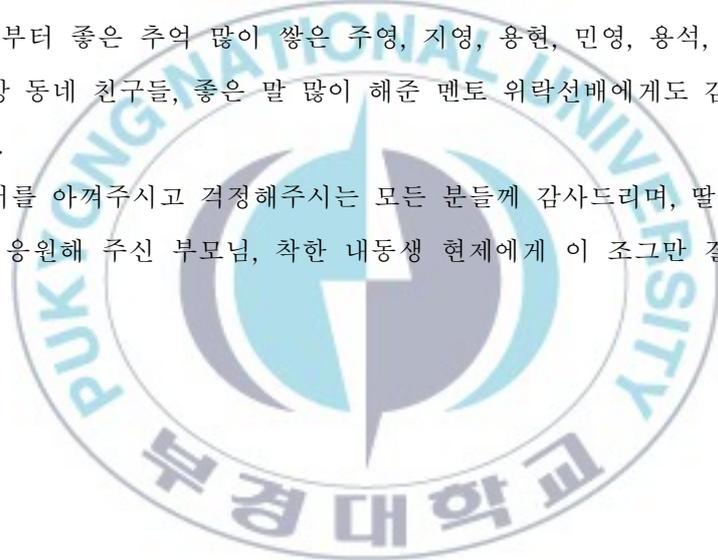
항상 옆에서 챙겨주시고 저의 든든한 버팀목이 되어주셨던 대성선배, 용배선배 감사드립니다. 그리고 착한 치송언니, 곧 아기엄마가 될 지혜언니 많이 못 도와 드려서 죄송하고 졸업 축하드립니다. 함께 의지할 수 있었던 대학원의 유일한 동기 명랑쾌활한 지원이 언니, 귀찮을 만도 한데 학교에서 집까지 저의 출

퇴근을 책임져 주었던 베스트 드라이버 태혁선배 정말 고맙습니다. 생화학방 근호선배, 희주선배, 바이러스방 연정이, 술친구 은정언니, 유전방 인영선배, 영식선배, 학과사무실 혜진언니 그리고 제가 이 논문을 쓸 수 있도록 세포배양 하는데 많은 도움을 준 진수선배, 지영이를 비롯한 각 실험실의 선후배님들 앞으로 좋은 결과 있으시길 바랍니다.

같이 프로젝트 진행하며 궂은일 마다않고 많은 도움을 준 식품공학과 성환선배, 송원선배, 근식선배, 현아언니, 태영선배, 혜진언니 이하 식품미생물실험실 식구들 따뜻하게 대해 주셔서 감사드립니다. 또한 물질분리하는데 있어 많은 도움을 주신 이가정 박사님, 짧은 시간이었지만 마우스 실험과 바이러스 실험을 할 수 있도록 도와주신 식품안전연구단의 미생물팀, 어패류 독소팀 감사드립니다.

또한 15년 동안 변함없이 옆에 있어준 앤돌핀 현미, 해피메이커 평생지기 친구 형주, 대학와서 알게 된 나의 보물 안미, 지애, 은영이 지금은 자주 보지 못하지만 1학년 때부터 좋은 추억 많이 쌓은 주영, 지영, 용현, 민영, 용석, 희원, 기현 그리고 사상 동네 친구들, 좋은 말 많이 해준 멘토 위락선배에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 저를 아껴주시고 걱정해주시는 모든 분들께 감사드리며, 딸을 믿고 옆에서 항상 응원해 주신 부모님, 착한 내동생 현제에게 이 조그만 결실을 바칩니다.



## 참고문헌

- Blackburn, B.G., G.F. Craun, J.S. Yoder, V. Hill, R.L. Calderon, N. Chen, S.H. Lee, D.A. Levy and M.J. Beach. 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water-United States, 2001-2002. *MMWR Surveillance Summaries*. 53, 23-45.
- Bidawid, S., N. Malik, O. Adegbinrin, S.A. Sattar and J.M. Farber. 2003. A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. *J. Virol. Methods*. 107, 163-167.
- Bellamy, K., 1995. A review of the test methods used to establish virucidal activity. *J. Hosp. Infect.* 30, 389-396.
- Bull, R.A., E.T.V. Tu, C.J. McIver, W.D. Rawlinson and P.A. White. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II. 4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 327-333.
- Chung, D.O., I.D. Park and H.O. Jung. 2001. Evaluation of functional properties of onion, rosemary, and thyme extracts in Onion Kimchi. *Kor. J. Soc. Food Cookery Sci.* 17, 24-29.
- Duizer, E., K.J. Schwab, F.H. Neill, R.L. Atmar, M.P.G. Koopman and

- M.K. Estes. 2004a. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* 85, 79–87.
- Duizer, E., P. Bijkerk, B. Rockx, A. Groot, F. Twisk and M. Koopmans. 2004b. Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4538–4543.
- Doultree, J.C., J.D. Druce, C.J. Birch, D.S. Bowden and J.A. Marshall. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.* 41, 51–57.
- Eom, S. H., M.S. Kang., and Y.M. Kim. 2008. Antibacterial activity of the Phaeophyta *Ecklonia stolonifera* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Fish. Sci. Technol.* 11, 1–6.
- Fankhauser, R. L., Monroe, S.S., Noel, J.S., Humphrey, C.D., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Ando, T. and Glass, R.I. 2002. Epidemiologic and molecular trends of ‘Norwalk-like viruses’ associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 186, 1 - 7.
- Gehrke, C., J. Steinmann and P. Goroncy-Bermes. 2004. Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol in vitro and in vivo. *J. Hosp. Infect.* 56, 49–55.
- Hierholzer, J.C. and R.A. Killington. 1996. Virus isolation and

quantitation. In: *Virology Methods Manual*. Mahy B.W.J and H.O. Kangro, eds., Academy Press, San Diego, 35-37.

Jee, Y.M. 2006. Norovirus food poisoning and laboratory surveillance for viral gastroenteritis in Korea. *Korea Institute for Health and Social Affairs*. 118, 26-34.

Jimenez, L. and M. Chiang. 2006. Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus : A surrogate for norovirus. *Am. J. Infect. Control*. 34, 269-273.

Kampf, G., D. Grotheer, and J. Steinmann. 2005. Efficacy of three ethanolbased hand rubs against feline calicivirus, a surrogate virus for norovirus. *J. Hosp. Infect.* 60. 144-149.

Kang, J.H., Y.K Park,, S.T. Chung,, K.H. Row., 1999. Extraction and purification of EGCG(Epigallocatechin Gallate) from green tea. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 14. 517-522.

Kim. J.I., K.H. Row., 2001. Recovery of catechin compound from Korean green tea by solvent extraction and partition. *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* 16. 442-445.

Kim, M.L., K.H. Choi and C.S. Park. 2000. Growth Inhibition of Food-borne Bacteria by Juice and Extract of Ginger and Garlic. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 10, 160-169.

- Lee, N.R. 2007. Norovirus and foodborne disease. *J. Food Hyg. Saf.* 2, 20-29.
- Lopman, B., H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez, A. Negrodo, J. Buesa, E. Schreier, M. Reacher, D. Brown, J. Gray, M. Iturriza, C. Gallimore, B. Bottiger, K.O. Hedlund, M. Torven, C.H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Poljsak-Prijatelj, J. Zimsek, G. Reuter, G. Szucs, B. Melegh, L. Svennson, Y. van Duynhoven and M. Koopmans. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet.* 363, 682 - 688.
- Malik, Y.S., S. Maherchandani and S.M. Goyal. 2006. Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Am. J. Infect. Contro.* 34, 31-35.
- Manning J., Roberts J.C., 2003. Analysis of Catechin Content of Commercial Green Tea Products. *J. Herbal Pharmacother.* 3, 19-32.
- Mata-Bilbao Mde L, Andrés-Lacueva C, Roura E, Jáuregui O, Torre C, Lamuela-Raventós RM., 2007. A new LC/MS/MS rapid and sensitive method for the determination of green tea catechins and their metabolites in biological samples. *J Agric Food Chem.* 55, 8857-8863.
- Park, C.S. 2000. Effect of pine needle and green tea extracts on the

survival of pathogenic bacteria. *J. Food Sci. Nutr.* 16. 40–46.

Park, K.J and H.H. Lee. 2005. In vitro antiviral activity of aqueous extracts from korean medicinal plants against influenza virus type A. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 924–929.

Row K.H., and J. Yinzhe, 2006. Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. *Bioresour. Technol.* 97, 790–793.

Steinmann, J. 2004. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants. *J. Hosp. Infect.* 56, 49–54.

Widdowson, M.A., A. Sulka, S.N. Bulens, S.R. Beard and S.S. Chaves. 2005. Norovirus and foodborne disease, United States. 1991–2000. *Emerging Infect. Dis.* 11, 95 - 102.

