J Plant Biotechnol (2019) 46:338-345
DOI:https://doi.org/10.5010/JPB.2019.46.4.338

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

추출 용매에 따른 개똥쑥 차 추출물의 페놀 성분과 항산화 활성

김경철 · 김주성

Phenolic content and antioxidant activity of sweet wormwood tea extracts using different solvents

Kyeoung Cheol Kim · Ju-Sung Kim

Received: 10 December 2019 / Revised: 25 December 2019 / Accepted: 25 December 2019
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The selection of a suitable solvent is very important when preparing an extract. However, the effect of ethanol solvent concentration in the extraction of sweet wormwood tea has not been reported. Thus, extracts were prepared from sweet wormwood tea using water and various ethanol concentrations, and the phenolic compounds, antioxidants and anti-enzyme activities of the extracts were analyzed. The phenolic acid and flavonoid components differed according to extraction solvent, which also resulted in different antioxidant and antienzyme activities. In particular, flavonoid rhamnetin was not extracted using 80% and 99.5% ethanol and was highest when 60% ethanol was used for extraction. In the case of chlorogenic acid, the highest extraction efficiency was obtained with 80% ethanol. These results suggest the need for research to increase specific extraction efficiency by targeting major compounds that affect physiological activity.

Keywords Polyphenol, Rhamnetin, Solvent extraction, Sweet wormwood tea

서 언

항산화 활성이 있는 2차 대사산물을 함유한 식품은 암, 당뇨, 심혈관계 질환 등에 대한 보호 효과가 보고되었다(Ames et al. 1993). 이에 따라 식물성 식품의 섭취는 질병 감소와 관계가 있는 것으로 나타났다(Xing et al. 2001). 이러한 생리활성 효과는 식품에 함유되어 있는 ascorbic acid, tocopherol 및 폴리페놀 화합물이 중요하게 작용한다. 따라서 다양한 질병 위험을 방지하기 위해 식물성 식품 섭취를 제안하고 있으며 소비가 증가하고 있다.

국내 자생하고 있는 개똥쑥은 국화과에 속하는 일년생 약용작물이다. 원산지는 온난한 아시아 지역으로 알려졌고 중국과 베트남에 주로 분포하고 있지만 질병 방지를 위한 중요한 식물성 원료이므로 유럽, 미국, 아프리카, 러시아 등 여러 국가에 귀화 및 재배되고 있다(Charles et al. 1990; Willcox et al. 2004). 개똥쑥에 들어있는 성분은 현재까지 200여종 이상 분리되었다(Bhakuni et al. 2001; Li et al. 2006; Tan et al. 1998; Willcox et al. 2004). 주로 sesquiterpenoids의 그룹에 속하는 물질로 구성되어 있다(Li et al. 2006). 특히 artemisinin은 말라리아를 억제하는 효과가 매우 높고 약리학적 이용가능성이 높기 때문에 주요 화합물로 연구가 집중되었다(Li et al. 2006). 하지만 Bhakuni et al. (2001)은 개똥쑥에는 다양한 이차대사산물이 있으며 테르페노이드, 쿠마린, 플라보노이드, 스테롤, 스테로이드 등이 다양한 활성을 담당할 것으로 보고하였다.

한국에서 개똥쑥의 기능성을 탐색하기 위해 항산화와 항암 성분(Ryu et al. 2011), 아토피 피부염(Kang et al. 2012), 항암(Kim et al. 2016) 등 생리활성이 연구되었고 개똥쑥을 활용한 식품 개발이 이루어져 김치(Lee and Kwon 2015), 전병(Moon et al. 2015a), 절편(Moon et al. 2015b) 등 다양하게 이용이 가능한 것으로 확인되었다. 차는 개똥쑥을 섭취하기 편리한 방법으로 van der Kooy and Verpoorte (2011)는 개똥쑥 잎을 차로 제조할 때 artemisinin 수용성에 관해 보고하였지만 Weathers and Towler (2012)의 연구에서 열수로 추출되는 개똥쑥 차에서는 artemisinin은 추출되지만 플라보노이드에 속하는 artemetin

K. C. Kim · J.-S. Kim (✉)
제주대학교 식물자원환경전공
(Major in Plant Resource and Environment, SARI, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)
e-mail: aha2011@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과casticin는 잘 추출되지 않는 것으로 나타나 다양한 성분의 상승효과를 기대하기 어렵다고 판단하였다. 이처럼 개똥쑥에 관한 연구는 건조된 식물체에서 주로 이루어졌고, 개똥쑥 차를 활용한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 개똥쑥 차를 이용한 가공식품 및 천연소재를 개발하고자 물과 다양한 농도의 에탄올을 이용하여 추출하였고 페놀 및 플라보노이드 성분, 항산화 활성, 항효소 활성을 비교하여 이용 목적에 따른 용매를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 시료는 제주시 노형동에서 채취하여 덖음 공정(1차 덖음; 160°C 7분, 30분 실온 숙성, 2차 덖음; 180°C 12분, 30분 실온 숙성, 3차 덖음; 180°C 7분, 30분 실온 숙성) 방법으로 제조한 개똥쑥 잎 차를 사용하였다. 개똥쑥 잎 차는 분말화한 뒤 증류수부터 99.5% 에탄올까지 20% 단위로 제조된 용매를 사용하였다. 추출 조건은 시료 대비 20배에 해당하는 용매를 가하고 환류냉각기를 이용하여 80°C 온도에서 3시간 추출하였다. 추출액은 여과한 뒤 감압회전 농축하여 실험에 사용하였다.

총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent로 측정하였다. 추출물 20 μL에 증류수 700 μL, 50%(v/v) Folin-Ciocalteu reagent 100 μL를 가하였다. 2시간 방치한 후 20% sodium carbonate 100 μL를 혼합하여 발색시켜 i-Mark microplate reader (168-1135, Bio-Rad, Hercules. CA, USA)로 750 nm 흡광도를 확인하였다. 표준물질로 사용된 gallic acid의 흡광도 값으로 회귀분석을 실시하였고 추출물에 함유된 총 페놀 함량을 추정하여 gallic acid 당량으로 계산하였다.

총 플라보노이드 함량을 측정하기 위해 우선적으로 추출물 0.1 mL에 에탄올 0.3 mL를 가하였다. 반응 시약으로 10% (w/v) aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 20 μL씩 넣고 최종 부피가 1 mL로 되도록 증류수로 희석하였다. 1시간 방치한 후 415 nm 흡광도를 확인하였다. 표준물질로 사용된 quercetin의 흡광도 값으로 회귀분석을 실시하였고 추출물에 함유된 총 플라보노이드 함량을 추정하여 quercetin 당량으로 계산하였다.

HPLC를 이용한 페놀산 및 플라보노이드 정량

페놀산 정량 분석은 2가지 용매 펌프 시스템을 가진 high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD, Shimadzu, Japan)를 이용하였다. 컬럼은 YMC-Triart C18 column (250×4.6 mm I.D. 5 μM hybrid silica-based ODS, YMC Co Korea)을 장착하고 40°C 온도를 유지하였다. 각 펌프의 용매는 증류수와 아세토니트릴이며 1% (v/v) trifluoroacetic acid로 조성되었다. 분당 1 mL의 흐름속도로 용매 구배 조건을 조성하였으며 10% 아세토니트릴로 시작하여 10분에 20%, 20분에 25%, 30분에 27.5%, 45분에 40%, 50분에 60%, 55분에 100%로 아세토니트릴의 농도를 높였고 62분에 10%로 분석하였다. 용매 구배 조건에 따른 각 피크는 PDA 검출기와 함께 페놀산은 260 nm, 플라보노이드는 280 nm의 검출 파장을 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 분석

DPPH 라디칼 소거능은 Blois (1958)에 의해 제안된 방법으로 측정하였다. 각 추출물 40 μL에 0.15 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 160 μL를 가하고 암실에서 30분 반응하였다. 이어서 490 nm의 흡광도를 측정하여 저해율을 산출하였다. 추출물의 다양한 농도의 DPPH 라디칼 저해율을 통하여 실험에 사용된 DPPH 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 추출물의 농도로 나타내어 평가하였다.

Superoxide 라디칼 소거능 분석

Superoxide anion 라디칼 소거능은 NBT/PMS/NADH 시스템에 의해 측정되었다(Li et al. 1992). 각 추출물 50 μL, 150 μM nitroblue tetrazolium (NBT) 50 μL, 60 μM phenazine methosulfate 50 μL와 468 μM β-nicotinamide adenine dinucleotide 50 μL를 혼합하였다. 5분 반응 후 560 nm의 흡광도를 측정하여 저해율을 산출하고 생성된 superoxide anion 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 추출물의 농도로 나타내어 평가하였다.

Nitric oxide 라디칼 소거능 분석

Nitric oxide 라디칼 소거능의 측정은 Patel and Patel (2011)의 방법을 이용하여 수행하였다. 추출물 50 μL와 10 mM sodium nitroprusside dihydrate (SNP) 50 μL를 혼합하여 150분 방치한 후 griess 시약 100 μL와 10분간 반응하였다. 이어서 560 nm 흡광도를 측정한 뒤 저해율을 계산하였다. 계산된 저해율은 nitric oxide 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 추출물의 농도로 나타내어 평가하였다.

Hydroxyl 라디칼 소거능 분석

Hydroxyl 라디칼 소거능은 DCFH-DA 방법으로 측정하였다 (Aranda et al. 2013). 우선적으로 dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)에 esterase를 처리하여 2 μM esterase

treated DCFH-DA를 제조하였다. 제조된 형광 용액 50 μL를 추출물 50 μL와 혼합하고 0.2 mM $FeSO_4$ 50 μL, 1 mM H_2O_2 50 μL를 가하여 30분 반응하였다. 이어서 excitation 460 nm, emission 530 nm 형광도를 측정한 뒤 저해율을 계산하였다. 계산된 저해율은 hydroxyl 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 추출물의 농도로 나타내어 평가하였다.

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) 분석

Konczak et al. (2010)의 방법을 변형하여 추출물에 대한 TEAC를 분석하였다. 7 mM 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid)를 2.45 mM potassium persulfate와 반응하여 734 nm의 흡광도 값을 0.70 ± 0.02가 되도록 제조하였다. 제조된 ABTS 용액 1 mL와 추출물 50 μL를 혼합하고 5분간 반응하였다. 이어서 734 nm 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 사용된 trolox의 흡광도 값으로 회귀분석을 실시하였고 추출물의 TEAC 값을 추정하여 trolox 당량으로 계산하였다.

Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) 분석

Prior et al. (2003)의 방법을 변형하여 추출물에 대한 ORAC를 분석하였다. 추출물 50 μL를 78 nM fluorescein 150 μL로 희석한 뒤 37°C에서 10분 배양하였다. 그리고 221 mM 2,2'azobis (2-amino-propane) dihydrochloride 50 μL를 반응시켜 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광도 감소 정도를 1시간 동안 1분 간격으로 측정하였다. 측정된 형광도를 이용하여 area under the curve (AUC)를 산출하였고, trolox를 이용하여 산출된 AUC에 대비 추출물의 ORAC 값을 추정하여 trolox 당량으로 계산하였다.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 분석

Konczak et al. (2010)의 방법을 변형하여 추출물에 대한 FRAP을 분석하였다. 10 mM 2,4,6-tripyridyls-triazine (TPTZ), 20 mM $FeCl_3$를 0.3 M sodium acetate buffer (pH 3.6)로 희석하여 FRAP 반응용액을 제조하였다. 제조된 FRAP 반응용액 150 μL에 추출물 5 μL를 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 배양하였다. 이어서 반응액은 microplate reader를 이용해 595 nm의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 사용된 $FeSO_4$의 흡광도 값으로 회귀분석을 실시하였고 추출물의 FRAP 값을 추정하여 $FeSO_4$ 당량으로 계산하였다.

α-Glucosidase 저해활성 측정

α-Glucosidase 저해활성은 Kim and Kim (2019)의 방법으로 수행하였다. 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)로 희석된 추출물 140 μL와 α-glucosidase (0.3 U/mL) 50 μL를 가하고 37°C로 조절된 배양기에서 10분 방치하였다. 이어서 2 mM *p*-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (*p*NPG) 10 μL를 섞어 37°C 30분 동안 발색시켰다. 반응액은 100 mM sodium carbonate를 100 μL 넣어 반응을 정지시킨 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성은 Ko et al. (2018)의 방법으로 측정하였다. 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 희석된 추출물 140 μL에 elastase (1 U/mL) 10 μL, 1 mM N-succinyl-(Ala)3-*p*-nitroanilide 50 μL를 가하고 37°C에서 20분 반응하였다. 이어서 415 nm의 흡광도를 측정한 뒤 저해율을 계산하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성은 Ko et al. (2018)의 방법으로 측정하였다. 추출물 10 μL에 1 KU/mL tyrosinase from mushroom 20 μL와 tyrosinase 기질 용액(50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 1 mM L-tyrosine, 증류수를 10:10:9 비율로 제조) 170 μL를 혼합하고 37°C로 조절된 배양기에서 15분 반응하였다. 이어서 490 nm의 흡광도를 측정한 뒤 저해율을 계산하였다.

통계분석

통계처리는 statistical package for the social sciences (SPSS, ver. 18.0) 소프트웨어를 사용하였다. 데이터 간의 유의적인 차이를 분석하기 위해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)의 Tukey multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 및 플라보노이드 함량

식물 유래 페놀성 화합물은 생리활성을 나타내는 주요 2차 대사산물이다. 종류에는 페놀산과 플라보노이드로 크게 구분되며 과량의 활성산소종에 의해 야기되는 산화스트레스를 효과적으로 방어한다(Tsao 2010). 이러한 페놀성 화합물은 구조적으로 전자 또는 수소를 공여하여 라디칼을 소거하므로 그 함량에 따라 활성이 높아진다고 보고되었다(Gramza et al. 2006). 이에 따라 용매별 개똥쑥 차 추출물의 항산화 활성에도 영향이 나타날 것으로 판단된다. 용매별로 추출된 개똥쑥 차 추출물의 총 페놀 함량은 111.79 ± 0.79 ~ 129.59 ± 0.16 mg GAE/g으로 추출물간의 큰 함량 차이는 보이지 않았지만 40, 60, 80% 에탄올 추출물의 경우 유의적으로 높은 함량이 확인되었다(Table 1). Jeong et al. (2007)의 연구에서 머

Table 1 Total phenolic and flavonoid content in extracts of the sweet wormwood tea

Solvent used	Total phenolic content (mg GAE[x]/g of dry extract)	Total flavonoid content (mg QE[y]/g of dry extract)
Distilled water	111.79±0.79 d	11.12±0.44 d
20% Ethanol	121.34±0.87 b	18.65±0.26 a
40% Ethanol	129.17±0.42 a	16.62±0.15 b
60% Ethanol	129.59±0.16 a	15.10±0.26 c
80% Ethanol	127.99±0.50 a	16.29±0.54 b
99.5% Ethanol	115.44±0.54 c	14.41±0.64 c

Values are expressed as mean±SD (n=3) Means with a column with the different letters (a-d) are significantly different (Tukey, $p>0.05$).
[x]GAE: gallic acid equivalent.
[y]QE: quercentin equivalent.

루 추출에 사용된 물과 에탄올에 비해 50% 에탄올로 추출하였을 때 폴리페놀 함량이 더 높다고 보고하였다. 이처럼 중간 에탄올 농도의 추출 용매는 페놀 화합물 추출에 효과적이었고 본 실험결과와 유사하였다. 반면 총 플라보노이드 함량은 총 페놀 함량과 다른 경향으로 20% 에탄올 추출물(18.65 ± 0.26 mg QE/g)이 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 개똥쑥 차의 총 페놀 함량에 비 플라보노이드 그룹에 속하는 화합물이 측정되어 나타난 결과로 생각된다.

페놀산 및 플라보노이드 정량

페놀산은 비 플라보노이드 폴리페놀 화합물에 속하며 C1-C6 또는 C3-C6 구조를 가진다. 크게 벤조익산과 시나믹산 그룹으로 나눌 수 있고 과일과 채소에는 유리 페놀산의 형태로 존재하지만 곡물과 같은 경우 결합되어 있기 때문에 산, 염기 또는 효소 처리를 통해 유리 형태를 얻을 수 있다(Tsao 2010). HPLC를 이용하여 페놀산 총 12종에 대한 정량 분석 결과는 Table 2와 같다. 벤조익산 그룹에서는 syringic acid와 gallic acid의 피크는 검출되지 않았으며 benzoic acid, protocatecuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid 4개의 페놀산이 미량 확인되었다. 또한 추출에 사용된 용매의 에탄올 농도가 높을수록 페놀산이 더 추출되는 경향이 나타났다. 시나믹산 그룹에서 cinamic acid는 검출되지 않았으나 caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferullic acid, sinapinic acid, chlorogenic acid 5종의 페놀산이 확인되었다. 특히 chlorogenic acid의 경우 4.557 ~ 14.243 mg/g 범위로 분석된 페놀산 표준물질 중에서 가장 높은 함량이었다. 특히 80% 에탄올 추출물이 함량이 가장 높았다. 플라보노이드는 식물체에서 주로 배당체로 존재하며 C6-C3-C3의 기본 구조를 갖는다. 또한 수산기와 링 C에 따라 안토시아닌, 플라바논, 플라본, 플라보놀 등의 다양한 하위 그룹이 존재한다(Tsao 2010). Gramza et al. (2006)의 연구에서는 지질에서 차 추출물의 항산화 활성이 폴리페놀 화합물인 플라보노이드 함량이 중요하게 작용하였으며 단일 성분마다 항산화에 미치는 영향력이 다르다는 결과를 보여 주었다. 이에 따라 개똥쑥 차 추출물에 대한 플라보노이드 정량 분석을 진행하였다. HPLC를 이용한 플라보노이드 총 10종에 대한 정량 분석 결과는 Table 2와 같다. 개똥쑥 차 추출물에서 10종의 표준물질과 동일한 피크가 확인되었다. 주요 플라보노이드로 rutin, hesperidin, myricetin, rhamnetin, nobiletin 5종으로 나타났다. 개별 분석된 플라보노이드의 함량은 전체적으로 Gramza et al. (2006)의 연구결과와 마찬가지로 높은 에탄올 추출 용매를 사용하였을 때 플라보노이드 추출에 유리하였다. 특이적으로 rhamnetin의 추출은 80%, 99.5% 에탄올에서는 이뤄지지 않았다. 개별 분석된 플라보노이드의 총 함량은 60% 에탄올이 39.88 mg/g으로 가장 높았다. 일반적으로 플라보노이드 유도체는 수용성 용매보다 에탄올, 아세톤과 같은 유기용매에서 쉽게 용해되고 식물의 페놀성 물질 추출 및 분리에 이용된다(Lee et al. 2004). 이에 따라 본 실험결과에서 대부분의 플라보노이드가 에탄올에서 유의적으로 높다고 확인되었다. 하지만 hesperidin, naringenin, rhamnetin의 경우 중간 에탄올 농도에서 높은 함량이 나타났다. 이러한 결과는 식물에서 추출할 때 목적으로 하는 플라보노이드 화합물에 따라 에탄올 농도 조절이 필요하다는 점을 시사한다.

라디칼 소거능

용매별로 추출된 개똥쑥 차 추출물의 라디칼 소거능은 4가지 각기 다른 라디칼을 이용하여 분석되었다. DPPH는 그 자체 안정한 화합물로 라디칼 소거활성이 있는 항산화제와 반응하여 정량적으로 탈색되는 성질이 있다. 이를 이용하여 항산화제 검색에서 쉽게 측정할 수 있어 널리 이용된다(Blois 1958). DPPH 라디칼 소거활성은 20% 에탄올로 추출하였을 때 IC_{50}이 46.50±0.05 μg/mL으로 다른 추출물보다 유의적으로 높은 활성이 나타났다(Table 3). Nitric oxide는 다양한 염증 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 생

Table 2 Phenolic compound content in extracts of sweet wormwood tea

Phenolic compound	Sample[x] (mg/g)					
	0EE	20EE	40EE	60EE	80EE	99.5EE
Benzoic acid group						
Benzoic acid	ND[y]	ND	ND	ND	ND	0.290 a
Protocatecuic acid	0.036 b	ND	0.031 b	ND	0.054 a	0.159 a
Syringic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p-Hydroxybenzoicacid	0.779 d	0.541 f	0.791 c	0.739 e	1.101 b	1.683 a
Vanillic acid	ND	ND	ND	ND	0.101 a	ND
Gallic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	0.815	0.541	0.822	0.739	1.256	2.132
Cinamic acid group						
Cinnamic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Caffeic acid	ND	ND	ND	ND	0.085 a	0.092 a
p-Coumaric acid	0.086 e	0.010 f	0.124 d	0.149 c	0.380 b	0.705 a
Ferullic acid	ND	ND	0.076 d	0.100 c	0.305 b	0.391 a
Sinapinic acid	0.593 e	0.477 f	0.765 d	0.928 c	1.407 a	1.069 b
Chlorogenic acid	4.557 f	5.585 e	8.279 d	10.276 b	14.243 a	10.030 c
Total	5.236	6.072	9.244	11.453	16.420	12.287
Flavonoid group						
Rutin	6.446 d	5.807 e	5.153 f	6.791 c	8.163 b	8.619 a
Taxifolin	1.009 f	1.259 e	1.138 d	1.576 c	1.983 b	2.577 a
Narirutin	1.485 ab	0.631 d	0.715 d	0.889 c	1.389 b	1.582 a
Hesperidin	2.480 e	1.811 f	2.800 d	5.234 c	7.360 a	6.603 b
Neohesperidin	0.098 e	0.200 b	0.139 c	0.109 d	0.206 b	0.433 a
Myricetin	2.853 f	3.383 e	4.071 d	4.518 c	5.386 b	6.845 a
Naringenin	0.015 d	0.495 c	0.542 c	0.735 b	0.910 a	0.580 c
Rhamnetin	4.215 d	10.350 c	11.993 b	14.332 a	ND	ND
Nobiletin	1.111 f	3.468 e	4.784 d	5.421 c	7.183 b	8.714 a
Tangeretin	ND	0.080 e	0.202 d	0.272 c	0.408 b	0.489 a
Total	19.71	27.48	31.54	39.88	32.99	36.44

Values are expressed as mean (n=3) Means with a row with the different letters (a-f) are significantly different (Tukey, $p>0.05$)
[x]Sample abbreviation: 0EE, distilled water extract; 20EE, 20% ethanol extract; 40EE, 40% ethanol extract; 60EE, 60% ethanol extract; 80EE, 80% ethanol extract; 99.5EE, 99.5% ethanol extract.
[y]ND: not detected.

Table 3 IC_{50} values for radical scavenging activities of extract of sweet wormwood tea

Solvent used	Radical scavenging IC_{50}[x] (μg/mL)			
	DPPH	Superoxide	Nitric oxide	Hydroxyl
Distilled water	48.47±0.16 b	29.21±0.57 a	202.71±3.55 c	68.68±0.85 c
20% Ethanol	46.50±0.05 a	28.33±0.24 a	175.07±4.38 b	52.97±2.90 a
40% Ethanol	57.78±1.24 d	28.16±0.66 a	155.78±3.78 a	64.79±2.19 b
60% Ethanol	52.32±0.26 c	28.35±0.65 a	178.11±4.66 b	68.99±0.69 c
80% Ethanol	59.05±0.29 d	31.15±0.41 b	176.80±6.98 b	68.81±1.48 c
99.5% Ethanol	77.83±0.23 e	28.69±0.41 a	212.34±9.46 c	119.37±4.30 d

Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with a column with the different letters (a-e) are significantly different (Tukey, $p>0.05$).
[x]IC_{50} (μg/mL): Inhibition concentration at which 50% of radicals are scavenged.

성된 라디칼은 조직에 직접적으로 독성이 있으며 nitic oxide 라디칼의 만성적인 체내 잔류에 의해 당뇨병, 관절염을 포함하여 다양한 암과 염증 상태와 관련이 깊다(Tylor et al. 1997). 또한 nitric oxide의 독성은 superoxide와 반응할 때 증가하고 반응성이 높은 peroxynitrite를 형성한다(Huie and Padmaja 1993). Superoxide anion은 자체적으로 세포 독성을 나타낸다. 이를 억제하기 위한 항산화제로 플라보노이드가 효과적이라고 보고하였다(Robak and Gryglewski 1988). PMS-NADH에

Table 4 Antioxidant values for extract of sweet wormwood tea

Solvent used	TEAC (mM TE[x]/g)	ORAC (mM TE/g)	FRAP (mM FE[y]/g)
Distilled water	445.42±10.61 b	2532.86±268.71 c	900.87±3.93 d
20% Ethanol	498.33±11.29 a	4093.42±374.56 ab	1038.80±8.55 c
40% Ethanol	503.18±11.02 a	4638.20±699.85 a	1103.04±4.28 b
60% Ethanol	499.55±12.02 a	3268.62±224.34 bc	1103.00±2.63 b
80% Ethanol	440.51±07.87 b	2853.15±549.22 bc	1168.08±9.80 a
99.5% Ethanol	385.78±08.56 c	3421.34±624.12 bc	906.52±7.53 d

Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with a column with the different letters (a-d) are significantly different (Tukey, $p>0.05$).
[x]TE: trolox equivalent.
[y]FE: $FeSO_4$ equivalent.

의해 생성된 superoxide 라디칼은 NBT를 감소시키므로 추출물의 라디칼 소거능을 측정할 수 있다. Superoxide 실험에서 추출물간 활성의 차이는 크게 나타나지 않았다. 예외적으로 80% 에탄올 추출물의 활성이 조금 낮았다(Table 3). Nitric oxide 소거능은 IC_{50}이 155.78 ~ 212.34 μg/mL로 다른 라디칼 소거능에 비해 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 샘플의 농도가 높은 것으로 확인되었다(Table 3). Hydroxyl 라디칼은 지질 과산화 및 생물학적 손상을 일으키는 주요 활성산소종이다(Aurand et al. 1977). 추출용매에 따른 활성은 60% 에탄올 추출물이 가장 높았다. Hydroxyl 라디칼 소거능에서는 DPPH와 마찬가지로 20% 에탄올 추출물(52.97 ± 2.90 μg/mL)에서 활성이 높은 것으로 확인되었다 용매별로 추출된 개똥쑥 차 추출물의 라디칼 소거능은 4가지 각기 다른 라디칼을 이용하여 분석되었다(Table 3). 실험 결과 라디칼의 종류에 따라 추출물의 항산화 화합물과 반응 정도는 경향성이 다르게 나타났다. 일반적으로 DPPH 라디칼 소거능을 이용하여 항산화 활성을 분석하지만 각기 다른 라디칼을 이용한다면 시료에 들어있는 항산화 화합물 특성에 따른 라디칼 소거 활성을 비교할 수 있을 것으로 생각된다.

항산화 지수

용매별로 추출된 개똥쑥 차 추출물의 항산화 지수는 TEAC, ORAC 및 FRAP으로 측정하였다. TEAC에서 potassium persulfate에 의해 라디칼이 형성된 ABTS는 짙은 청록색을 보이지만 수소를 공여 받아 환원되면 무색에 가까워진다. 탈색 원리에 따라 측정된 $ABTS^{\bullet+}$ 라디칼을 소거하는 정도를 trolox에 대비하여 상대적인 항산화력으로 나타낸다(Konczak et al. 2010). TEAC 비교 결과 20%, 40%, 60% 에탄올로 추출한 경우 500 mM TE/g에 근접한 값으로 유의적으로 높은 것으로 나타났다(Table 4). ORAC는 peroxy radical에 의해 형광도가 감소되는 원리를 이용하여 첨가된 항산화 물질이 가진 수소전달 능력에 따라 소거된 라디칼을 측정할 수 있는 방법이다(Prior et al. 2003). ORAC는 20%, 40% 에탄올 추출물에서 가장 높은 값이 확인되었다(Table 4). FRAP 측정은 낮은 pH에서 추출물에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ)로 환원되는 정도를 흡광도 변화를 통해 항산화력을 확인할 수 있다(Konczak et al. 2010). FRAP의 결과는 앞선 TEAC와 ORAC와 다른 경향이 나타났다. TEAC와 ORAC에서 높았던 20%, 40%, 60% 에탄올 추출물의 FRAP 값보다 80% 에탄올 추출물이 1168.08 ± 9.80 mM FE/g으로 가장 높은 활성을 보였다(Table 4). Proteggente et al. (2002)의 연구에서 채소와 과일의 TEAC, ORAC 및 FRAP은 유의한 상관관계를 보인다고 보고하였다. 하지만 본 실험에서는 에탄올 농도별 개똥쑥 차 추출물의 항산화 지수 경향성은 달랐다.

효소 저해활성

당뇨병은 인슐린 분비 또는 작용에 대한 내분비 시스템의 대사 장애로 고혈당증을 유발한다. 특히 식후 고혈당 감소를 목적으로 glucosidase와 같은 탄수화물 가수분해 효소의 억제를 통해 포도당의 흡수를 지연시키는 치료 방법이 있다. α-Glucosidase 억제제로는 acarbose가 있지만 다양한 플라보노이드에서 저혈당과 항고혈당의 작용을 보이는 플라보노이드가 보고되고 있다(Pereira et al. 2011). 개똥쑥 차 추출물에 들어있는 플라보노이드 성분에 의해 활성이 기대되며 α-glucosidase 저해활성은 125 ~ 1000 μg/mL까지 실험농도를 설정하여 양성대조구로 혈당강하제로 사용되는 acarbose와 비교하였다(Table 5). 각 추출물은 농도의존적으로 활성이 증가하는 경향을 보였다. 125, 250 μg/mL 저농도의 α-glucosidase 저해활성은 물과 20%, 40%, 60% 에탄올 용매로 사용한 4개의 추출물에서 acarbose보다 2배 정도 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 또한 추출용매에 따른 비교 결과 80%, 99.5% 에탄올 추출물의 경우 α-glucosidase를 저해하는 성분이 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다. Milella et al. (2016)의 연구에서는 추출물의 rhamnetin은 α-amylase와 α-glucosidase에 대한 활성이 높다고 보고하였다. 이에 따라 개똥쑥 차 추출물에서 α-glucosidase 활성을 보인 주요 플라보노이드는 rhamnetin로

Table 5 α-Glucosidase inhibition activities in extracts of sweet wormwood tea

Solvent used	α-Glucosidase inhibition activity (%)			
	125 μg/mL	250 μg/mL	500 μg/mL	1000 μg/mL
Distilled water	52.36±0.56 d	68.15±0.92 c	81.56±0.34 c	84.18±0.31 b
20% Ethanol	65.65±0.48 b	77.04±0.73 b	85.47±0.28 b	82.60±0.53 c
40% Ethanol	69.59±0.39 a	81.26±0.49 a	89.27±0.26 a	92.45±0.35 a
60% Ethanol	54.48±0.62 c	76.63±0.66 bc	88.50±0.24 a	92.87±0.28 a
80% Ethanol	7.90±1.19 f	27.11±2.14 g	62.15±0.61 f	83.77±0.48 c
99.5% Ethanol	8.15±1.04 f	33.69±1.91 f	69.70±0.45 d	84.99±0.25 b
Acarbose	24.45±0.96 e	46.40±1.70 e	64.32±0.44 e	82.81±0.24 c

Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with a column with the different letters (a-g) are significantly different (Tukey, $p>0.05$).

Table 6 Elastase and tyrosinase inhibition activities in extracts of sweet wormwood tea

Solvent used	Elastase inhibition (%)	Tyrosinase inhibition (%)
Distilled water (1000 μg/mL)	29.69±0.07 c	16.48±1.73 f
20% Ethanol (1000 μg/mL)	34.24±3.55 bc	24.44±2.44 e
40% Ethanol (1000 μg/mL)	34.64±5.15 bc	31.90±1.36 d
60% Ethanol (1000 μg/mL)	40.19±1.87 b	37.24±0.77 c
80% Ethanol (1000 μg/mL)	52.17±5.37 a	44.58±0.80 b
99.5% Ethanol (1000 μg/mL)	26.61±1.00 d	47.85±1.21 a
Urosolic acid (200 μg/mL)	51.51±2.51 a	-
Arbutin (100 μg/mL)	-	44.72±3.99 ab

Values are expressed as mean±SD (n=3). Means with a column with the different letters (a-f) are significantly different (Tukey, $p>0.05$).

예상되며 HPLC 분석에서 함량이 확인되지 않은 80%, 99.5% 에탄올 추출물은 이에 따른 결과로 낮은 활성을 보인 것으로 사료된다(Table 2). Elastase 저해활성에서 개똥쑥 차 추출물 중 80% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 보였으나 양성대조구로 사용된 ursolic acid보다 약 10배 정도 낮은 활성을 보였다(Table 6). Tyrosinase 저해능은 추출 용매로 사용한 에탄올의 농도가 높을수록 활성이 증가하는 것으로 확인되었다(Table 6). 이를 통해 tyrosinase를 저해하는 개똥쑥 차의 주요 성분은 극성이 높을 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는 개똥쑥 차를 이용한 가공식품 및 천연소재를 개발하고자 물과 다양한 농도의 에탄올로 추출하여 페놀 및 플라보노이드 성분을 분석하였고 항산화 및 항효소 활성을 비교하였다. 개똥쑥 차 추출물은 용매에 따라 총 페놀과 플라보노이드 함량에 유의적인 차이를 보였고 이를 통해 추출 요인으로서 에탄올 농도가 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 또한 HPLC로 분석된 페놀산과 플라보노이드 정량분석 결과 구성 성분의 차이가 있었으며 이에 따라 항산화 및 항효소 활성에도 영향을 주었다. 개똥쑥 차 이용 측면에서 에탄올 농도 조절을 통해 목적에 맞는 용매 선택을 제안하는 바이다.

사 사

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 지역특화산업 육성사업(R0003895)으로 수행된 연구결과입니다.

References

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. PNAS 90(17): 7915-7922

Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell JV, Gombau L (2013) Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. Toxicol in Vitro 27(2):954-963

Aurand LW, Boone NH, Giddings GG (1977) Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. J Dairy Sci

60(3):363-369

Bhakuni RS, Jain DC, Sharma RP, Kumar S (2001) Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. Curr Sci 80(1):35-48

Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181(4617):1199

Charles DJ, Simon JE, Wood KV, Heinstein P (1990) Germplasm variation in artemisinin content of *Artemism annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. J Nat Prod 53(1):157-160

Gramza A, Khokhar S, Yoko S, Gliszczynska-Swiglo A, Hes M, Korczak J (2006) Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. Eur J Lipid Sci Tech 108(4):35

Huie RE, Padmaja S (1993) The reaction of NO with superoxide. Free Radical Res 18(4):195-199

Jeong HJ, Park SB, Kim SA, Kim HK (2007) Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. Korean J Food Nutr 36(12):1491-1496

Kang GJ, Kang NJ, Han SC, Koo DH, Kim YS, Lee JH, Kim SC, Park DH, Lee JS, Kang HK, Yoo ES (2012) Inhibitory effect of artemisinic acid isolated from *Artemisia Annua* L on the MDC in HaCaT keratinocytes. Korean J of Pharmacogn 43(3):217-223

Kim BM, Kim GT, Kim EJ, Lim EG, Kim SY, Kim YM (2016) Extract from *Artemisia annua* Linné induces apoptosis through the mitochondrial signaling pathway in HepG2 Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 45(12):1708-1716

Kim KC, Kim JS (2019) Physiological activity of the extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea by different ethanol concentrations. J Plant Biotechnol 46(1): 37-44

Ko HM, Eom TK, Kim KC, Yoo JH, Lim JD, Yoo CY, Kim JS (2018) Biological activity investigation of supercritical fluid extract of fermented mountain ginseng adventitious root. J Adv Eng and Tech 11(2):115-121

Konczak I, Zabaras D, Dunstan M, Aguas P (2010) Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. Food Chem 122(1): 260-266

Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, Jang YS (2004) Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. Food Chem Toxicol 42(9):1383-1388

Lee SS, Kwon DJ (2015) Quality characteristics of kimchi with *Artemisia annua* extracts. Korean J Food Preserv 22(5): 666-673

Li J, Zheng RL, Liu ZM, Jia ZJ (1992) Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides on superoxide and its antioxidation effect. Zhongguo Yao Li Xue Bao 13(5):427-430

Li Y, Huang H, Wu YL (2006) Qinghaosu (artemisinin) - a fantastic antimalarial drug from a traditional Chinese medicine, p.183-256. Medicinal chemistry of bioactive natural products. Wiley-Interscience

Milella L, Milazzo S, De Leo M, Vera Saltos MB, Faraone I, Tuccinardi T, Lapillo M, De Tommasi N, Braca A (2016) α -Glucosidase and α-amylase inhibitors from *Arcytophyllum thymifolium*. J Nat Prod 79(8):2104-2112

Moon EW, Park HJ, Park JS (2015b) Properties of Jeonbyeong prepared with *Artemisia annua* L. powder. J Korean Soc Food Cult 30(5):644-649

Moon EW, Park HJ, Park JS, Lee MK, Na HS (2015a) Quality properties of rice cake containing *Artemisia annua* L. powder. Korean J Food Preserv 22(6):811-816

Patel R, Patel N (2011) *In vitro* antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. JAPER 1:52-68

Pereira DF, Cazarolli LH, Lavado C, Mengatto V, Figueiredo MSRB, Guedes A, Pizzolatti MG, Silva FRMB (2011) Effects of flavonoids on α-glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. Nutrition 27(11-12): 1161-1167

Prior RL, Hoang HA, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC (FL))) of plasma and other biological and food samples. J Agric Food Chem 51(11): 3273-3279

Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Buren LV, Wagner E, Wiseman S, Frans van de P, Dacombe C, Rice-Evans CA (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Radic Res 36(2):217-233

Robak J, Gryglewski RJ (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. Biocheem Pharmacol 37(5):837-841

Ryu JH, Lee SJ, Kim MJ, Shin JH, Kang SK, Cho KM, Sung NJ (2011) Antioxidant and anticancer activities of *Artemisia annua* L. and determination of functional compounds. Koean J Food and Nut 40(4):509-516

Tan RX, Zheng WF, Tang HQ (1998) Biologically active substances from the genus *Artemisia*. Planta medica 64(04):295-302

Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients 2(12):1231-1246

Tylor BS, Kion YM, Wang QI, Sharpio RA, Billiar TR (1997) Nitric oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. Arch Sur 132(11):1177-1183

van der Kooy F, Verpoorte R (2011) The content of artemisinin in the *Artemisia annua* tea infusion. Planta medica 77(15): 1754-1756

Weathers PJ, Towler MJ (2012) The flavonoids casticin and artemetin are poorly extracted and are unstable in an *Artemisia annua* tea infusion. Planta medica 78(10):1024-1026

Willcox M, Bodeker G, Bourdy G, Dhingra V, Falquet J, Ferreira JF, Graz B, Hirt HM, Hsu E, Magalhães PM, Provendier D, Wright C (2004) *Artemisia annua* as a traditional herbal antimalarial, p. 43-59. Traditional medicinal plants and malaria. CRC press

Xing N, Chen Y, Mitchell SH, Young CY (2001) Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. Carcinogenesis 22(3):409-414