

Antioxidant Activity Analysis of Useful Compounds from *Artemisiae Annuae Herba* Using On-line Screening HPLC-ABTS⁺ Assay

Kwang Jin Lee · Jin Yeul Ma*

On-line Screening HPLC-ABTS⁺ assay를 이용한 청호로부터 유용성분의 항산화 활성 분석

이광진 · 마진열*

Received: 17 March 2014 / Accepted: 13 May 2014 / Published Online: 31 December 2014
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

Abstract The Antioxidant activity screening identification of five kind compounds in *Artemisiae annuae herba* with the on-line screening high performance liquid chromatography (HPLC) ABTS⁺ assay. The various experimental variables such as the extraction time (h) and extraction solvent composition (%) of dipping method were investigated efficiently extraction at the room temperature 25°C. The results, the highest yield of total extract amount (0.458 g, 15.250%) was obtained by dipping method with 100% water and extraction time to 3 h. And the on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay method was rapid and efficient to search for bioactivity from natural products.

Keywords analysis · annuae herba · artemisiae · identification · on-line screening high performance liquid chromatography

청호(*Artemisiae Annuae Herba* 이하 AAH)는 널리 한국, 일본, 중국 등에 널리 분포되어 있으며 향이 강하고 독특하며 대부분

약재로 사용되고 있다(Kim, 등 2003). 국화과의 식물로서 일명 황화호(黃花蒿)의 전초를 말하며 1년생 또는 2년생 초본으로 높이는 30–150 cm, 줄기는 원통형이며 어릴적에는 청록색이다(Kim, 등 1999). 청호의 성분으로는 abrotamine, vitamin A, β -bourbonene, caryophyllene, α -pinene, β -pinene, 1,8-cineole, α -thujone 등이 함유되어있다(Kim, 등 1994). 약리작용으로서는 해열, 이담, 구충 및 피부진균, 황달, 악창, 탈모의 치료 등에 쓰여지고 있다(Kim, 등 1999; 2002). 본 연구는 상용공정의 기초 데이터를 제시하기 위한 방법으로 청호의 추출액 포함된 chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, aremisinin, vitexin의 성분을(Jung 등, 2011), On-line screening high performance liquid chromatography (HPLC)-ABTS⁺ assay를 이용하여 항산화 활성을 온라인스크리닝 하였고, 각 추출물의 추출 효율을 확인 하였다(Lee 등, 2009).

시료 및 용매. 본 연구에 사용된 청호(*Artemisiae Annuae Herba*) 시료는 영천 현대약업사(한국)에서 구매하여 한국한의학연구원 한의신약개발그룹에서 엄선된 시료를 사용하였다. 표준 시료인 chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin, aremisinin은 Sigma-Aldrich (USA)에서 vitexin은 Fluka (USA)에서 구입하였다. 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기(desiccator)에 보관하여 사용하였고 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 μ m, Waters Co., USA)를 이용하여 여과를 하였다. 용매는 HPLC급(99.9%)으로 메탄올, 아세트나이트릴은 J.T. Baker Inc (USA)과 TFA은 Sigma-Aldrich용액을 사용하였으며 그리고 물은 초순수 제조장치 Waters (Milipore, USA)를 이용하여 제조한 3차 증류수를 0.2 μ m mbrane filter (Advantec, Japan)로 여과 처리하여 사용하였다.

Radical scavenging 항산화 활성 분석을 위하여 ABTS⁺ 시험법을 사용했으며 사용된 시약은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺, C₁₈H₂₄N₆S₄)와 potassium persulfate를

K. J. Lee · J. Y. Ma
Korean Institute of Oriental Medicine (KIOM), KM-Based Herbal Drug Development Group, 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Republic of Korea

*Corresponding author (J. Y. Ma: jyma@kiom.re.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/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

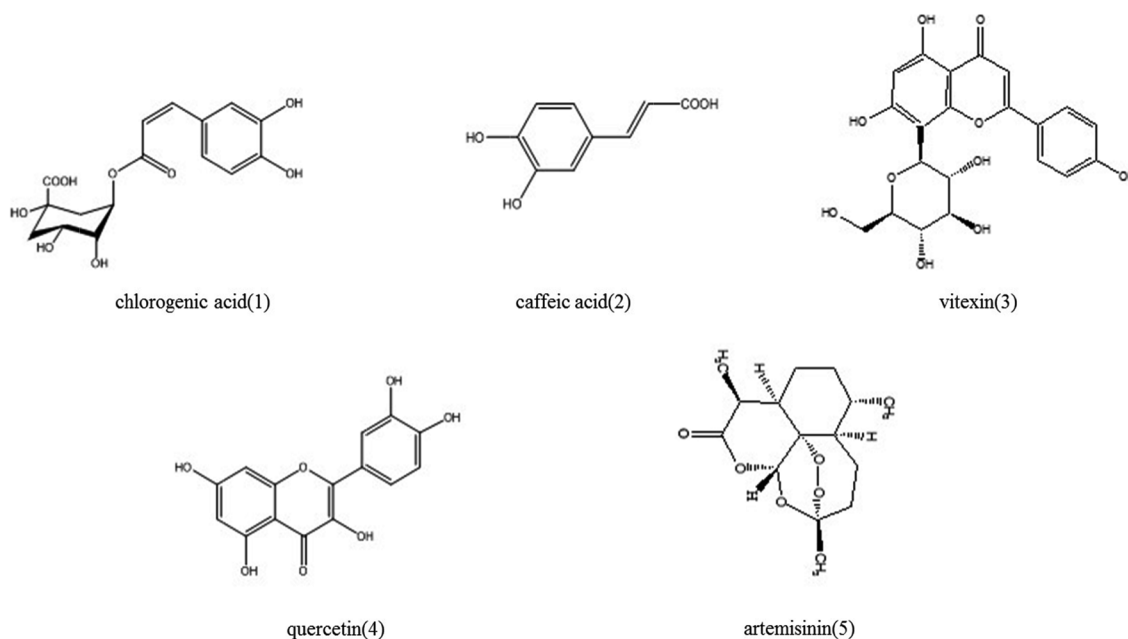


Fig. 1 Chemical structures of five kind compounds in *Artemisiae annuae herba*.

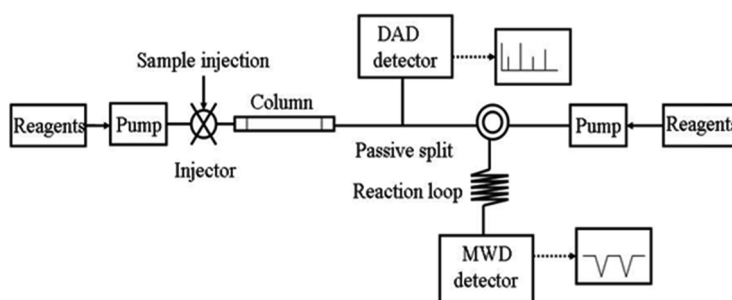


Fig. 2 Schematic of on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay system.

사용하여 완전히 녹인 후, ABTS⁺ 시약과 충분히 교반 후 차광시켰다. 제조된 용액은 1 L 갈색병에 넣고 하루 정도 라디칼의 안정성을 위해 어두운 곳에서 보관한 뒤 사용하였다(Lee 등, 2012). 표준시료는 2 mg을 고순도 메탄올 10 mL를 취하여 200 ppm의 표준원액을 제조하였다. Fig 1에서는 각각의 표준시료 구조식을 나타내었다.

추출 및 전처리(I). 일정한 상온(25°C)에서 수행 하였으며 건조 분쇄된 시료는 푸두믹스(220 W, 1.3 A person Hannil Mixer FM)에서 2 min 동안 분쇄 후 입자를 체 거름(30 μm)으로 분별하여 시료로 사용하였다. 이후, 청호 건조분말로부터 추출 효율을 확인하기 위하여 추출시간 변화는 시료 1 g을, 다양한 용매 조성변화는 시료 3 g을, 각각 적용하였다. 각 시료는 200 mL 비이커에 추출용매 50% 수용성 메탄올, 100% 메탄올, 100% 물을 각각 100 mL를 첨가하여 침적방법(dipping)을 적용하여 추출시간 1–6 h 동안 2회 반복 실험을 시행하여 물질의 변화를 확인하였다. 추출물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매추출 후 여지필터(pore size: 5 μm)에서 감압 여과하여 시료 잔유물과 분리시켰고 이후 감압 농축 후 동결건조(refrigerated vapor trap)를 하여 전체 추출 수율 계산과 시험용액으로 사용 하였다.

추출 및 전처리(II). 청호 건조시료 50 g을 샘플의 10배 부피로 물에 1 h 동안 침적한 다음 3 h 동안 100°C에서 열탕 추출(Gyeongseo, Cosmos-660, Korea) 하였다. 추출된 추출물은 standard testing sieve (150 μm, Rs-tech, Germany)로 여과 후 동결 건조 하였다. 제조된 시료는 4°C에 냉장 보관하여 실험에 사용하였다. 이후 소량의 시료를 0.2 μm PVDF Membrane filter로 여과하여 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 분석에 사용하였다.

On-line system 기기. on-line HPLC시스템으로는 Dionex Co. (USA)의 3000 pump와 injector는 10 μL sample loop (Dionex Co, ID×0.18 L×550 mm Viper 550 mm, USA)가 연결되었고, 데이터 처리는 Dionex Co.의 PC에 설치된 Chromeleon data acquisition system (Dionex version 7)과 HPLC-DAD를 사용하여 분석을 하였다. Fig 2에서는 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 시스템을 나타내었다. 분석에 사용된 컬럼은(RS-Tech 4.6×250 mm, 5 μm, C₁₈, Korea)와 유속은 1.0 mL/min, 주입부피는 10 μL, 컬럼오븐 온도 40°C로 고정하였다. UV 검출기(DAD; diode array detector)의 파장범위를 200–450 nm로 적용하여 210, 254, 280, 320 nm로 검출하였고, 항산화 활성은(MWD; multiple wavelength detector)의 734 nm로 나타내었다.

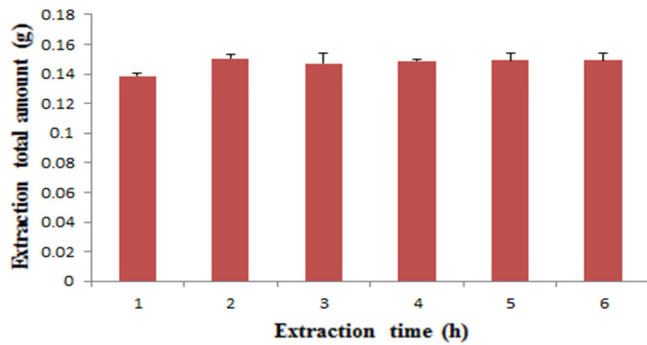


Fig. 3 Total extraction amount with various extraction time (extraction solvent: 100% water, room temperature: 25°C, extraction method: dipping, loading amount: 1 g).

이동상은 이성분계 A: H₂O/TFA (99.9/0.1 v/v%), B: Acetonitrile (100 v/v%)을 사용하여 (A:B 90-30:10-70 v/v%)으로 60 min 동안 일정용매조성법으로 실험하였다. 본 연구는 청호의 지표성분인 chlorogenic acid, caffeic acid, vitexin, quercetin, artemisinin

를 선정하였고 추출 거동을 확인하기 위하여 침적추출(dipping)을 적용한 추출용매 50% 수용성 메탄올, 100% 메탄올, 100% 물의 조건을 설정하였다. 이것의 각 추출물에서 얻은 지표성분(표준물질; 순도: 98%>)과 추출물의 빠른 항산화 활성이 확인되었고 각 추출물의 함량과 수율을 분석하여 기능성소재로 사용이 가능한 기초 자료를 제시하였다. Fig. 3에서는 청호 시료 1 g에서 최적의 추출조건을 확립하기 위하여 침적방법(dipping)을 적용한 상온(25°C)에서 추출용매 100% 물, 추출시간 1–6 h 동안 수행하였다. 이때 수분(10.3%)이 함유되었다. 이 결과 최적의 추출 시간은 3 h으로 선정하였고 4 h 이후부터는 완만한 추출 거동 및 미미한 수율(%) 변화를 보였다. 일반적으로 천연물 및 한약재에서의 추출은 물질이 가지고 있는 조직적 특성 및 성상에 따라 재배 특성에 따라 추출 시스템에 따라 추출 효율의 차이가 클 것으로 보인다(Hazra, 등 2004). Table 1에서는 청호 시료 3 g에서 추출용매 선정에 따른 추출 효율을 확인하였다. 용매조성 변화에 따라 추출수율(yield)의 변화는 50% 수용성 메탄올 추출물에서 14.883%, 100% 메탄올 추출물에서 7.430%, 100% 물 추출물에서 15.250%의 추출 거동을 확인 할 수 있었다(선행 실험 Fig. 3). 또한 추출물 함량은 50% 수용성

Table 1 Extraction amount and yield in *Artemisiae annuae herba* with extraction time (3 h) and dipping method (25)

No	Extraction solvent (%)	Total extract amount (g)	Dry sample weight (g)	Yield (%)
1	50% MeOH (1)	0.459	3	14.883
2	50% MeOH (2)	0.434		
3	100% MeOH (1)	0.227	3	7.430
4	100% MeOH (2)	0.219		
5	100% Water (1)	0.460	3	15.250
6	100% Water (2)	0.455		

Table 2 Antioxidant activity identification of each extract and standard sample in *Artemisiae annuae herba*

No	Dissolve solvent (%)	Standard compounds name	<i>t_R</i> (min)	Positive peak area (mAU)	Negative peak area (mAU)	UV (nm)
1	50% MeOH	chlorogenic acid	9.670	71.818	23.769	320
		quercetin	-	-	-	254
		caffeic acid	11.837	28.126	13.550	320
		artemisinin	-	-	-	254
		vitexin	15.153	5.305	-	210
2	100% MeOH	chlorogenic acid	9.677	23.927	9.581	320
		quercetin	-	-	-	254
		caffeic acid	11.813	24.530	11.827	320
		artemisinin	-	-	-	254
		vitexin	15.017	9.931	-	210
3	100% Water	chlorogenic acid	9.670	115.736	32.780	320
		quercetin	-	-	-	254
		caffeic acid	11.853	29.708	12.911	320
		artemisinin	-	-	-	254
		vitexin	15.170	5.507	-	210
4	100% MeOH (standard compounds)	chlorogenic acid	9.757	56.705	25.070	320
		quercetin	24.757	122.167	77.333	254
		caffeic acid	11.760	172.290	65.355	320
		artemisinin	44.463	1.437	-	254
		vitexin	15.180	120.676	-	210

N.D. (-): not detected, chlorogenic acid (1), caffeic acid (2), vitexin (3), quercetin (4), artemisinin (5).

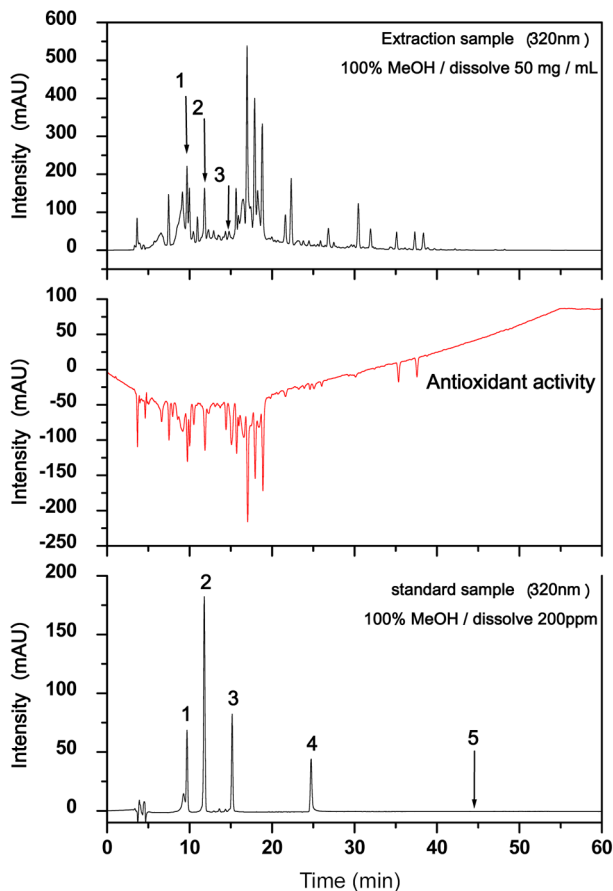


Fig. 4 Analysis of five kind compound in *Artemisiae annuae herba* using on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay(chlorogenic acid (1), caffeic acid (2), vitexin (3), quercetin (4), aremisinin (5), injection volume: 10 μ L, positive UV wavelength: 320 nm, negative wavelength: 734 nm, mobile phase A: 0.1% TFA in water 90-30%, B: acetonitrile 10-70%, run time 60 min, positive-flow rate: 1 mL/min, negative-flow rate: 0.5 mL/min).

메탄을 추출물에서 0.459–0.434 g과 평균 0.4465 g, 100% 메탄을 추출물에서 0.227–0.210 g과 평균 0.218 g, 100% 물 추출물에서 0.460–0.455 g과 평균 0.4575 g을 얻을 수 있었다. 따라서 100% 물 추출물의 추출효율이 가장 좋았고 100% 메탄을 추출물의 추출효율이 가장 낮았다. Table 2에서는 5가지 지표성분에 대하여 각각 200 ppm으로 제조한 뒤 빠른 항산화 활성 능력을 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 시스템으로 살펴보았다.

이 결과 chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid에서 항산화 활성을 확인하였고 aremisinin, vitexin에서는 항산화 활성을 확인하지 못했다. 이때 quercetin (Negative peak area (mAU) 77.333) > caffeic acid (Negative peak area (mAU) 65.355) > chlorogenic acid (Negative peak area (mAU) 25.070) 순으로 활성도가 높았다. 또한 추출 시료의 양이 증가된 50 g을 100% 물 추출(수율: 8.34%)에서 확보된 시료를 50 mg/mL로 제조하여 분석하였다. 결과적으로 각 지표성분의 항산화 활성은 50% 수용성 메탄올에서는 chlorogenic acid (1, Negative peak area (mAU) 23.769) > caffeic acid (2, Negative peak area (mAU) 13.550)의 활성을 보였고, 100% 메탄올에서는 caffeic acid (2, Negative peak area (mAU) 11.827) > chlorogenic acid (1,

Negative peak area (mAU) 9.581)의 활성을 보였으며, 100% 물에서는 chlorogenic acid (1, Negative peak area (mAU) 32.780) > caffeic acid (2, Negative peak area (mAU) 12.911)의 활성을 나타내었다. 하지만, vitexin은 소량 함유 되었을 것으로 사료되며 매우 미미한 활성을 예측 할 수 있었다(본 연구에서는 제시 하지 않았다). 또한 quercetin과 aremisinin은 청호 추출물에서 확인 할 수 없었다. 특히 artemisinin은 UV를 흡수하는 chromophore가 없어서 254 및 320 nm 파장에서 검출 하기가 힘들다. 이때 물질 사이의 각 체류시간(t_R)은 chlorogenic acid 9.757 min, caffeic acid 11.760 min, vitexin 15.180 min, quercetin 24.757 min, aremisinin 44.463 min이었다. 이 결과를 기초로 하여 항산화 활성 screening 시스템을 이용한 동시분석과 항산화 활성 확인이 탁월한 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay를 적용한 크로마토그램 결과를 Fig. 4에서 보여주고 있다. 특히 선행연구(Lee 등, 2012)를 기초로 한 빠른 항산화 활성 능력을 screening 할 수 있었다. 따라서 추출 효율 및 항산화 활성은 추출 방법에 따라 다양한 각도에서 확인되어 빛, 열에 불안정 성분을 얻기 위한 안정한 추출 방법을 찾아야 할 것이다 (Lee, 등 2008; Inoue, 등 2011; Song, 등, 2013). 또한 활성산소(free radical oxygen radical)에 기인하여 추출 과정 중 유용성분이 소멸되거나 유용성분의 함유되는 정도는 매우 큰 차이가 있을 것으로 사료된다(Ridder, 등 2008). 이 결과 산업적 경제성을 고려한 고효율 고비용의 추출조건이 제조공정 특성에 맞게 제시 되어야 할 것이며 나아가 기초 데이터의 사용은 공학적 기반을 기초로 한 수학적 모델링을 통해 산업적 적용을 예측해야 될 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 전 처리한 추출액에 포함된 청호로부터 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay를 이용한 항산화 활성을 빠르게 screening하여 탐색하고 최적의 추출조건을 실험적으로 모색 할 수 있었다.

초 록

On-line screening high performance liquid chromatography (HPLC)-ABTS⁺ assay를 이용한 청호로부터 chlorogenic acid, caffeic acid, vitexin, quercetin, aremisinin의 항산화 활성을 온라인스크리닝 하였다. 이때 침적방법을 적용한 추출시간과 추출용매 조성으로부터 추출효율을 확인하였다. 이 결과 100% 물 추출물에서 수율이 가장 좋았고 chlorogenic acid의 항산화 활성이 가장 높았다. 또한 on-line screening HPLC-ABTS⁺ assay 분석은 천연물에서 항산화 활성을 신속하게 탐색하는데 효율적이다.

Keywords 분석 · 온라인스크리닝 HPLC · 청호 · 추출

감사의 글 본 연구는 한국한의학연구원 연구지원(K14050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

References

- Hazra B, Sarma MD, and Sanyal U (2004) Separation methods of quinonoid constituents of plants used in Oriental traditional medicines. *J of Chroma B* **812**, 259–75.
- Inoue K, Kitade M, Hino T, and Oka H (2011) Screening assay of angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from complex natural colourants and foods using high-throughput LC-MS/MS. *F Chemistry* **126**, 1909–15.

- Jung HA, Nurul Islam MD, Kwon YS, Jin SE, Son YK, Park JJ et al. (2011) Extraction and identification of three major aldose reductase inhibitors from *Artemisia montana*. *F and Chemical Toxicol* **49**, 376–84.
- Kim KS, Lee SH, Lee YS, Jung SH, Park YM, Shin KH et al. (2003) Antioxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *J of Ethnoph* **85**, 69–72.
- Kim KS, Lee SH, Shin JS, Shim SH, and Kim BK (2002) Arteminin, a new coumarin from *Artemisia apiacea*. *Fitoterapia* **73**, 266–8.
- Kim KS, Shim SH, Jang JM, Cheong JH, and Kim BK (1999) A Study on Hair-growth Activity of *Artemisia apiacea* Hance. *Yakhak Hoeji* **43**, 798–01.
- Kim OC and Jang HJ (1994) Volatile components of *Artemisia apiacea* Herba. *Agr Chemistry and Biot* **37**, 37–42.
- Lee KJ and Um BH (2008) Extraction of Useful component from Natural plants using Ultrasound system. *Korean J Biotechnol Bioeng* **23**, 101–8.
- Lee KJ, Liang C, Yang HJ, and Ma JY (2012) Rapid Identification of Homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* Leaves by HPLC Online ABTS⁺ Screening Method. *Yakhak Hoeji* **56**, 217–21.
- Lee KJ, Shin YK, and Kim YS (2009) Enhanced effect extraction of Antioxidant substance Homoorientin from *Pseudosasa japonica* and *Phyllostachys bambusoides* leaves using Ultrasonic wave system. *Korean J Biotechnol Bioeng* **24**, 189–94.
- Ridder SD, Kooy FVD, and Verpoorte R (2008) *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries- Review. *J of Ethnopharmacology* **120**, 302–14.
- Song XY, Li YD, Shi YP, Ling J, and Chen J (2013) Quality control of traditional Chinese medicines: a review. *Chinese J of Nat Medi* **11**, 596–607.