

## 미세분쇄에 의한 감국(*Chrysanthemum indicum* Linne) 추출물의 생리활성

조 영 제

경북대학교 식품공학부/식품생물산업연구소

### Biological Activity of Extracts from *Chrysanthemum indicum* Linne by Ultrafine Grinding

Young-Je Cho

School of Food science and Biotechnology/Food and Bio-Industry Research Institute,  
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

**ABSTRACT** In this study, the biological activity of water and ethanol extracts from *Chrysanthemum indicum* Linne by ultrafine grinding for functional food source are examined. The content of phenolic compounds from *Chrysanthemum indicum* Linne were the highest when extracted for 6 hr with 70% ethanol. The extraction yield of water and ethanol extracts were  $7.12 \pm 1.61$  mg/g and  $7.51 \pm 2.14$  mg/g, respectively. With ultrafine grinding, water and ethanol extracts were  $8.63 \pm 1.15$  mg/g and  $9.33 \pm 1.35$  mg/g, respectively. In determining anti-oxidative activity of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts, DPPH of normal grinding extracts was 83.52% and ultrafine grinding was 92.37%. In ABTS radical cation decolorization, normal grinding, fine grinding, and ultrafine grinding extracts were 90% or higher. In antioxidant protection factor (PF), water and ethanol extracts of ultrafine grinding showed relatively high anti-oxidative activities of each 1.82 PF and 2.16 PF, respectively. The TBARS value of ultrafine grinding extracts were lower than normal grinding and fine grinding extracts. The inhibition activity on xanthin oxidase of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts was 67.53% in ultrafine grinded water extracts and 83.45% in ultrafine grinded ethanol extracts. Inhibition on xanthin oxidase of ethanol extracts showed a higher inhibition effect than water extracts, and ultrafine grinding was higher than normal grinding. In angiotensin converting enzyme inhibition activity, ultrafine grinding water extract was 24% or higher, and ethanol extract was 34% or higher. The elastase inhibition activity of ultrafine grinding extract was 25.56%, which was higher than 20.34% of fine grinding extracts. Water extracts did not show hyaluronidase inhibition activity but ethanol extracts showed 35% of hyaluronidase inhibition activity. The determining expression inhibition of iNOS and COX-2 protein in macrophage by *Chrysanthemum indicum* Linne extracts with a Western blot analysis, iNOS and COX-2 protein expression inhibition by *Chrysanthemum indicum* Linne ethanol extracts were 40% and 15%, respectively at 100  $\mu$ g/mL concentration. The inhibitory patterns of iNOS and COX-2 protein expression was concentration dependent. The result suggests that *Chrysanthemum indicum* Linne extracts by ultrafine grinding may be more useful than normal grinding as potential sources due to anti-oxidation, angiotensin converting enzyme and xanthine oxidase inhibition, anti-inflammation effect.

**Key words:** biological activity, *Chrysanthemum indicum*, antioxidant, anti-inflammation, angiotensin converting enzyme inhibition

## 서 론

감국(*Chrysanthemum indicum* Linne)은 관속식물의 국화과(Compositae) 국화속(*Chrysanthemum*)에 속하는 한반도 자생의 다년생 초본으로, 키는 30~60 cm이고 잎은 긴 타원형-난형이며 깃털 모양으로 다섯 갈래로 갈라지고 9~10월에 노란 꽃이 피며 이 꽃을 건조한 것이 감국으로 일컬어지고 있다(1,2). 주요 성분으로는 플라보노이드 화합물인 luteolin, apigenin, apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucoside 및

luteolin 7-O- $\beta$ -D-glucoside 등과 sesquiterpene lactone 화합물인 cumambrin A, cumambrin B, arteglinin A 및 angeloyljadin 등이 알려져 있다(3). 감국은 예로부터 민간의 약용이나 전통식품 등 식용으로 널리 이용되어 왔는데 해열 및 제독 작용이 있어 폐렴, 기관지염 치료에 도움을 주고 중추신경 억제 및 두통과 현기증 완화, 습진을 비롯한 피부질환, 동맥경화, 고혈압에 효과적이며 위염과 안질환에도 좋은 효능을 가지는 것으로 알려져 있다(4,5). 또한 감국에서 분리한 성분이 항암효과, aldose reductase 저해효과 및 nitric oxide 생성 저해효과 등이 있음이 보고되어 있다(6-9). 감국은 식품으로 국화차 및 국화주가 주를 이루어 소비되고 있고 약용으로는 감국을 그대로 사용하는 것뿐 별

다른 가공 제품이나 산업화에 의한 생산품이 없어서 산업화를 위한 다양한 개발과 연구가 필요한 실정이다. 최근 고도의 산업화와 경제 발전이 이루어지면서 사람들은 식품을 통하여 질병을 예방하고 수명을 연장하기 위해서 기능성 식품 소재나 천연 자원을 활용하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그 결과 건강증진 및 질병 예방 효과가 밝혀진 많은 식품 소재들이 발굴되었고 더 나아가 이들을 이용하여 생체 방어와 생체리듬에 영향을 주는, 즉 생리조절 기능을 가진 기능성 식품의 탐색과 이들을 응용한 여러 가지 산업 제품 개발 및 생산에 관심을 가지고 있다(10,11).

따라서 본 연구에서는 천연물 생리활성 탐색 및 기능성 연구의 일환으로써 분쇄에 따른 감국 추출물의 항산화, 고혈압억제, 통풍억제 및 항염증 등의 생리활성을 검토하여 기능성 식품 등의 산업에 적용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 미세분쇄와 초미세분쇄 감국 시료의 제조

본 실험에서 사용된 시료는 대구광역시 시중 한약방에서 판매하는 감국을 구입하여 mixer를 사용하여 분쇄하여 40 mesh를 통과한 분말을 일반분쇄 시료로 하였다. Fine grinding(미세분쇄) 및 ultrafine grinding(초미세분쇄) 시료는 감국을 10 L 용량의 초미세분쇄 장치(KMA-200, Koreamedi Co., Daegu, Korea)를 이용하여 시간당 20 kg의 grinding 속도로 fine grinding(125 µm ISO mesh size, ASTM 140 mesh: 미통과 사이즈)과 ultrafine grinding(125 µm ISO mesh size, ASTM 140 mesh: 통과 사이즈)으로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

### 감국 추출물의 제조

Water extracts는 시료 1 g에 증류수 200 mL를 넣고 액이 100 mL가 될 때까지 가열한 후 24시간 동안 상온에서 교반 추출하였다. Ethanol extracts는 시료에 100 mL의 70% ethanol을 가하고 homogenizer로 20,000 rpm에서 1분간 균질화 시킨 후 24시간 동안 교반 추출하였으며, 추출액들은 Whatman No. 1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator(N-11, Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하였다.

### Phenol성 화합물 정량

추출물 1 mL에 95 % ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 잘 섞어 5분간 방치한 후 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다(12).

### 전자공여능 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법(13)에 준

하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 60 µM DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

### ABTS radical cation decolorization의 측정

ABTS radical cation decolorization의 측정은 Fellegrini 등(14)의 방법에 의해 측정하였다. 7 mM ABTS와 140 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>을 5 mL:88 µL로 섞어 어두운 곳에 12~16시간 방치시킨 후, 이를 absolute ethanol과 1:88의 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.002가 되도록 조절된 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 50 µL와 ABTS solution 1 mL를 30초 동안 섞은 후 2.5분간 incubation하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

### Antioxidant protection factor(PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법(15)으로 측정하였다. 10 mg의 β-carotene을 50 mL의 chloroform에 녹인 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40°C water bath에서 chloroform을 증류시킨 후 20 µL linoleic acid, 184 µL Tween 40과 50 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL의 emulsion에 시료용액 100 µL를 혼합하여 vortex로 잘 섞어준 뒤 50°C에서 30분간 반응시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{PF} = \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}$$

### Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

TBARS는 Buege와 Aust의 방법(16)에 따라 측정하였다. 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 mL와 시료 0.2 mL를 섞은 후 50°C water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 mL에 TBA reagent 2 mL를 가하고 15분간 boiling한 다음 10분간 냉각시킨 후 15분간 1,000 rpm(VS-5500N, Vision, Bucheon, Korea)으로 원심분리 하여 실온에서 10분간 방치 후 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TBARS값은 흡광도 수치×0.0154로 1 mL 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3-tetraethoxy propane(TEP)의 µM로 표시하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 TBARS } \mu\text{M}}{\text{대조구의 TBARS } \mu\text{M}}\right) \times 100$$

### Angiotensin converting enzyme(ACE) 활성억제 측정

ACE 활성억제 측정은 Cushman 등의 방법(17)으로 0.3

M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 2.5 mM hippuryl-histidyl-leucine(HHL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 녹인 기질액 0.15 mL에 ACE(0.125 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 0.1 mL와 시료액 0.1 mL를 가하고 대조구에는 시료액 대신 증류수를 0.1 mL 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1 N-HCl 0.35 mL를 가하여 반응을 종료시킨 뒤 ethyl acetate 3 mL를 가하고 ethyl acetate 층만을 취하여 evaporating한 뒤 그 잔사에 증류수 2 mL를 가하여 효소에 의해 기질로부터 분리되어 추출된 hippuric acid를 녹여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 구한 뒤 표준곡선에서 양을 환산하여 아래의 식에 의해 저해율(%)을 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{반응구의 hippuric acid 생성량}(\mu\text{g})}{\text{대조구의 hippuric acid 생성량}(\mu\text{g})}\right) \times 100$$

#### Xanthine oxidase(XOase) 활성억제 측정

XOase 활성억제 측정은 Stirpe와 Corte의 방법(18)에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 1 mL에 xanthine oxidase(0.25 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 0.1 mL와 감국 추출물 0.1 mL를 가하고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.1 mL 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid(TCA) 1 mL를 가하여 반응을 종료시키고 3,500 rpm에서 15분간 원심 분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 292 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 uric acid 양을 표준곡선에 의해 양을 환산하여 아래의 식에 의해 저해율(%)을 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}(\mu\text{g})}{\text{대조구의 uric acid 생성량}(\mu\text{g})}\right) \times 100$$

#### Elastase 활성 억제 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법(19,20)에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 20분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase(2.5 U/mL) 용액 0.5 mL를 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide(0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### Hyaluronidase(HAase) 활성 억제 측정

HAase 저해활성 측정은 sodium-hyaluronic acid(HA)

로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucoxazoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethylamino benzaldehyde(DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다(21,22). 즉 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase(7,900 U/mL) 0.05 mL와 시료용액 0.1 mL를 혼합하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 12.5 mM CaCl<sub>2</sub> 0.1 mL를 가하고 혼합 후 다시 20분간 배양하였다. 기질로서 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 HA(12 mg/mL)를 첨가하여 다시 40분간 배양하여 0.4 N potassium tetraborate 0.1 mL 및 0.4 N NaOH 용액을 0.1 mL 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕상에서 가열한 후 완전히 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 발색제로 dimethylamine borane(DMAB) 시약 3 mL를 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 항염증 효과 측정을 위한 세포배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cells은 한국세포주은행(Korean Cell Line Research Foundation, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 fetal bovine serum(FBS)을 10%, 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양하였다. Cell 배양 dish에 cell의 밀도가 2~3×10<sup>6</sup>/mL 정도가 되게 계대 배양하여 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 cell 상태를 유지하였다. 실험을 할 때는 80%의 confluency와 20회 이하 passages 조건을 준수하여 실험하였고, 실험 전 12시간은 FBS를 제거한 배지로 cell을 배양시켰다(23).

#### Western blot을 이용한 inducible NO synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2) 단백질 발현 측정

iNOS protein 발현을 측정하기 위하여 대식세포주인 RAW264.7 세포를 100 π tissue culture dish에 각 well당 2×10<sup>4</sup> cells/mL cell로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별(10, 50, 100 µg/mL)로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 또 다시 배지를 제거하고 phosphate buffer saline(PBS)으로 2번 세척해 준 후, lysis buffer(Radio Immuno Precipitation Assay(RIPA) buffer 10 mL에 complete mini 1 tablet을 가함) 100 mL로 용해해서 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액을 모아 새 튜브로 옮겨 단백질 정량을 하거나 또는 차후 사용하기 위하여 -20°C에 보관하였다. 원심분리 하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 20 µL의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semidry transfer cell 기기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여

polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 동안 blocking buffer(5% skim milk in tris-Buffered Saline Tween-20(TBST))에서 배양시켰다. 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 iNOS(1:1,000, BD Bioscience, Sanjose, CA, USA), COX-2(1:1,000, Cayman, Ann Arbor, MI, USA), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)(1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 mouse anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP), bovine anti-goat IgG HRP(1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)의 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 3회 세척한 뒤 암실에서 ECL(Millipore, Bedford, MA, USA) 용액으로 반응시키고 X-ray film에 노출시켜 각각의 band를 Molecular Imager(Bio-Rad)를 이용하여 band를 정량화 하였다(24).

**통계처리**

실험결과와 통계분석은 SAS(Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 통계처리 하였고 Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**용매 농도 및 용출 시간이 phenolic 화합물의 용출에 미치는 영향**

시료의 유효성분을 보다 효율적으로 추출할 방안을 확립하기 위하여 인체에 유해하지 않은 용매로 물과 에탄올을 선택하여 추출시간 및 용매의 농도에 따라 추출되는 phenolic 화합물의 함량을 측정하였다. 감국으로부터 phenolic compound의 용출은 Fig. 1(A)와 같이 10% EtOH에서 3.63 mg/g, 30% EtOH에서 5.78 mg/g, 60% EtOH에서 7.14 mg/g으로, 첨가되는 EtOH 농도의 증가에 따라 지속적으로 증가하였으며, 70% EtOH에서 7.54 mg/g으로 가장 높은

추출함량을 나타내었다. 감국의 70% EtOH 추출물을 추출 시간별 phenolic 성분 용출량을 측정한 결과 Fig. 1(B)와 같이 6시간 경과까지 지속적으로 증가하여 6.8 mg/g까지 증가하다가 6시간 이후는 변화가 거의 없었다. 따라서 감국으로부터 phenolic compound의 용출을 위한 최적조건은 70% ethanol로 6시간 추출이었다.

**초미세분쇄에 의한 phenolic 화합물의 용출량 변화**

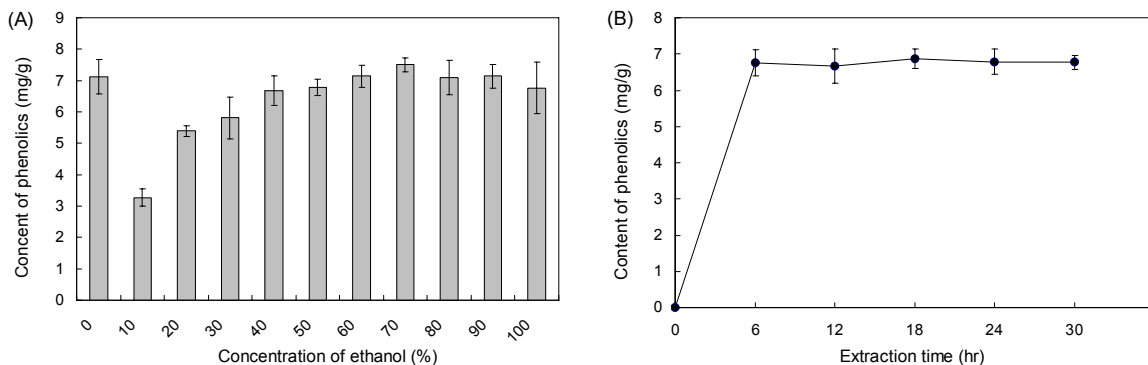
초미세분쇄 기술은 해당 물질의 표면적을 극대화시킴으로 분해가 어려운 물질들의 용해도를 높이는 장점이 있다. 또한 상대적으로 유용성 물질인 phenolic 화합물의 추출을 용이하게 하고 그 수율 또한 높여준다. 이러한 초미세분쇄 기술은 1차 가공처리 기술을 넘어서 기존 한약재의 용해도를 증진시킴으로써 유용성분의 용출을 증가시켜 기능성 식품 소재나 식의약 소재 등 고부가 가치소재로의 전환을 기대할 수 있다.

본 연구에서는 초미세분쇄 가공기술을 이용하여 감국을 각각 미세와 초미세 분쇄를 하여 각각의 phenolic 화합물의 추출 수율을 비교하였다. 그 결과 Table 1과 같이 물보다 에탄올을 용매로 이용하는 것이 효과적이며, 일반적 분쇄보다 초미세분쇄를 하였을 때 추출 수율이 증가하는 것을 알 수 있었다. Cho 등(25)이 보고한 홍삼의 입자 크기에 대한 추출 수율이 원형삼에 비해 10~40 mesh로 분쇄하였을 때, 1.56배 높아진다는 보고와 같이 입자가 작아질수록 추출 수율이 높아짐을 확인할 수 있었다.

**Table 1.** Contents of phenolic compound in water and ethanol extracts from *Chrysanthemum indicum* L. in relation to grinding techniques

Grinding technique	Phenolic content (mg/g)	
	Water extracts	70% ethanol extracts
Normal grinding	7.12±1.61 <sup>b1)</sup>	7.51±2.14 <sup>b</sup>
Fine grinding	7.24±1.10 <sup>b</sup>	7.65±1.55 <sup>b</sup>
Ultrafine grinding	8.63±1.15 <sup>a</sup>	9.33±1.35 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means separation within columns by 5% DMRT.



**Fig. 1.** Effects of various ethanol concentration (A) and extraction time with 70% ethanol (B) on extraction of phenolic compounds from *Chrysanthemum indicum* L.

**Table 2.** Antioxidant activities of water and ethanol extracts from *Chrysanthemum indicum* L. in relation to grinding techniques

Grinding technique	Antioxidant activity (%)							
	Water extracts				70% ethanol extracts			
	DPPH (%)	ABTS (%)	PF <sup>1)</sup>	TBARS (μM)	DPPH (%)	ABTS (%)	PF	TBARS (μM)
Normal grinding	83.52±1.62 <sup>b2)</sup>	97.46±1.71 <sup>a</sup>	1.31±0.12 <sup>b</sup>	0.25±0.03 <sup>a</sup>	82.42±2.42 <sup>b</sup>	99.46±1.11 <sup>a</sup>	1.11±0.06 <sup>b</sup>	0.60±0.02 <sup>a</sup>
Fine grinding	83.14±0.98 <sup>b</sup>	97.66±2.10 <sup>a</sup>	1.33±0.11 <sup>b</sup>	0.24±0.05 <sup>a</sup>	86.07±1.68 <sup>ab</sup>	98.77±1.17 <sup>a</sup>	1.21±0.02 <sup>b</sup>	0.59±0.01 <sup>a</sup>
Ultrafine grinding	92.37±2.11 <sup>a</sup>	98.70±1.16 <sup>a</sup>	1.82±0.11 <sup>a</sup>	0.12±0.03 <sup>b</sup>	90.16±1.17 <sup>a</sup>	99.74±1.01 <sup>a</sup>	2.16±0.11 <sup>a</sup>	0.37±0.08 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>PF: antioxidant protection factor. <sup>2)</sup>Means separation within columns by 5% DMRT.

### 항산화 효과

감국 물 추출물의 oxidative free radical 반응을 이용한 환원성 물질의 분석인 DPPH법으로 전자공여능을 측정된 결과 Table 2에서와 같이 일반분쇄 추출물의 83.52%보다 초미세 추출물의 항산화력이 92.37%로 더 우수하였으며, ABTS radical cation decolorization의 경우 미세와 초미세 분쇄한 감국 추출물 모두 90% 이상의 높은 항산화력을 보여 수용성 물질에 대한 높은 항산화력을 나타내었으며, 분쇄 가공 방법에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다. β-Carotene을 linoleic acid emulsion에 첨가하여 감국 추출물들의 지용성 물질에 대한 antioxidant protection factor(PF)를 측정된 결과 Table 2에서와 같이 일반분쇄 추출물과 미세분쇄 추출물이 물 추출물에서 각각 1.31 PF와 1.33 PF, ethanol 추출물에서 각각 1.11 PF와 1.21 PF를 나타낸 반면 초미세분쇄 한 감국 추출물에서는 물과 에탄올 추출물에서 1.82 PF와 2.16 PF의 높은 항산화력을 나타내어 분쇄한 입자의 크기가 작아질수록 지용성 물질에 대한 항산화 물질이 많이 용출되어 항산화력이 높아지는 것으로 판단하였다. 추출물들의 TBARS를 측정된 결과 일반분쇄 및 미세분쇄에 비해 초미세분쇄 한 감국 추출물에서 더 낮은 TBARS 값을 나타내어 앞의 PF 결과와 같은 pattern을 나타내었으며, 분쇄한 입자의 크기가 작아질수록 지용성 물질에 대한 항산화 물질이 많이 용출되어 TBARS 값이 낮아지는 것으로 판단하였다. 따라서 감국추출물 제조 시 초미세분쇄를 사용하여 추출물을 제조하는 것이 항산화효과를 높일 수 있는 방법으로 활용할 수 있을 것이라 판단되었다(Table 2).

### Xanthine oxidase(XOase) 저해 효과

XOase는 생체 내 purine 대사과정에서 urate를 형성하고 혈장 내 urate를 증가시켜 골절에 축적되게 함으로써 통증을 유발하는 통풍(gout)을 일으키는 효소이다. 따라서

**Table 3.** Xanthine oxidase inhibitory effects of water and ethanol extracts from *Chrysanthemum indicum* L. in relation to grinding techniques

Grinding technique	Xanthine oxidase inhibition (%)	
	Water extracts	70% ethanol extracts
Normal grinding	43.45±1.32 <sup>c1)</sup>	51.12±1.18 <sup>c</sup>
Fine grinding	53.03±2.71 <sup>b</sup>	63.42±2.16 <sup>b</sup>
Ultrafine grinding	67.53±1.56 <sup>a</sup>	83.45±2.10 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means separation within columns by 5% DMRT.

purine 대사과정에서 작용하는 XOase를 억제시킴으로 인하여 통풍 예방 또는 치료의 효과를 기대할 수 있다(18). 감국 추출물의 XOase 저해효과를 측정된 결과 Table 3과 같이 물 추출물의 경우 일반분쇄가 43.45%의 억제효과를 나타낸 반면 미세분쇄나 초미세분쇄의 경우 XOase에 대한 억제효과가 53.05, 67.53%로 더 높게 나타남을 알 수 있었다. Ethanol 추출물의 경우도 같은 양상을 나타내었으며 물 추출물보다는 ethanol 추출물의 효소억제효과가 더 우수한 결과를 나타내었다. 이는 표면적이 극대화됨으로써 감국으로부터 생리활성 성분의 용출이 함께 증가하여, 효소저해 능력이 상승한 것으로 판단되었다.

### Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 효과

ACE는 불활성형인 angiotensin I의 C 말단 his-leu를 절단하여 angiotensin II를 생성시킬 뿐만 아니라 혈압을 감소하는 bradykinin을 불활성화 시키는 효소이므로, 이 효소의 작용을 저해함으로써 고혈압의 치료가 가능할 것으로 판단된다(17). 고혈압은 뇌혈관 질환, 심혈관 질환 등을 일으키는 대표적인 원인으로 식생활의 서구화와 노령화 사회가 가속화됨에 따라 급속도로 증가하고 있다. 고혈압에 대한 치료는 혈관확장제, 칼슘차단제 등 치료제가 다양한 용도로 이용되고 있지만, 신장 기능 장애, 두통 등의 부작용이 있어서 천연 치료제의 개발이 다각적으로 이루어지고 있다. Cho 등(26)은 여러 연구를 통하여 angiotensin converting enzyme 저해활성을 테스트함으로써 천연치료제로서의 가능성을 보고하였다. 감국의 물 추출물 경우, Table 4에서와 같이 미세 분쇄 추출물이 3.7%로 높지 않았으나, 초미세분쇄 추출물의 경우 24% 이상의 억제효과를 나타내었다. Ethanol 추출물은 물 추출물에 비해 상대적으로 더 높은 저해 활성을 나타내어 초미세분쇄 추출물의 경우 약 34%의

**Table 4.** Angiotensin converting enzyme inhibitory activities of water and ethanol extracts from *Chrysanthemum indicum* L. in relation to grinding techniques

Grinding technique	Angiotensin converting enzyme inhibition (%)	
	Water extracts	70% ethanol extracts
Normal grinding	3.31±0.47 <sup>b1)</sup>	6.74±0.72 <sup>b</sup>
Fine grinding	3.72±0.24 <sup>b</sup>	8.35±0.67 <sup>b</sup>
Ultrafine grinding	24.23±1.18 <sup>a</sup>	33.94±2.16 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means separation within columns by 5% DMRT.

**Table 5.** Elastase inhibitory effects of water and ethanol extracts from *Chrysanthemum indicum* L. in relation to grinding techniques

Grinding technique	Elastase inhibition (%)	
	Water extracts	70% ethanol extracts
Normal grinding	20.15±1.15 <sup>ab1)</sup>	17.93±1.28 <sup>b</sup>
Fine grinding	20.34±1.54 <sup>ab</sup>	18.01±0.92 <sup>b</sup>
Ultrafine grinding	25.56±1.13 <sup>a</sup>	22.35±2.07 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means separation within columns by 5% DMRT.

ACE 저해능을 보여 처리 농도를 높인다면 더 우수한 고혈압 억제 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단하였다.

**Elastase 저해 효과**

피부는 주름 증가와 탄력감소, 색소 침착 등이 노화의 대표적인 형태로 그중 가장 대표적인 노화의 현상은 바로 주름이다. Oh 등(20)은 이러한 주름을 생성하는 가장 대표적인 두가지 요인은 자외선, 공해 등 외적인 환경요인과 나이가 들면서 발생하는 피부 조직의 내적 요인이라고 하였다. Elastase는 피부조직 내의 엘라스틴을 분해함으로써 피부의 탄력성이나 싱싱함을 잃게 하고 주름과 거칠어짐이 발생하여 피부의 노화를 촉진한다. 따라서 elastase의 활성을 억제함으로써 피부노화를 지연시킬 수 있을 것이다. 감국 추출물의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 elastase 억제 효과를 측정 한 결과 Table 5에서와 같이 감국의 물 추출물은 미세 분쇄 추출물의 억제율 20.34%보다 초미세분쇄 추출물의 억제율이 25.56%로 더 우수한 기능성을 나타내었으며, 물 추출물이 ethanol 추출물에 비해 상대적으로 elastase에 대하여 더 높은 저해 효과를 나타내었다. 이는 phenolic compound의 용출량과 관계없이 물 추출물과 ethanol 추출물 속에 존재하는 phenolic profile의 차이에 기인한 것으로 추정하며 이에 대한 연구는 향후 진행되어야 할 것으로 생각되었다.

**Table 6.** Hyaluronidase inhibitory activities of water and ethanol extracts from *Chrysanthemum indicum* L. in relation to grinding techniques

Grinding technique	Hyaluronidase inhibition (%)	
	Water extracts	70% ethanol extracts
Normal grinding	0	24.5±1.35 <sup>b1)</sup>
Fine grinding	0	30.2±1.17 <sup>ab</sup>
Ultrafine grinding	0	35.1±1.31 <sup>a</sup>

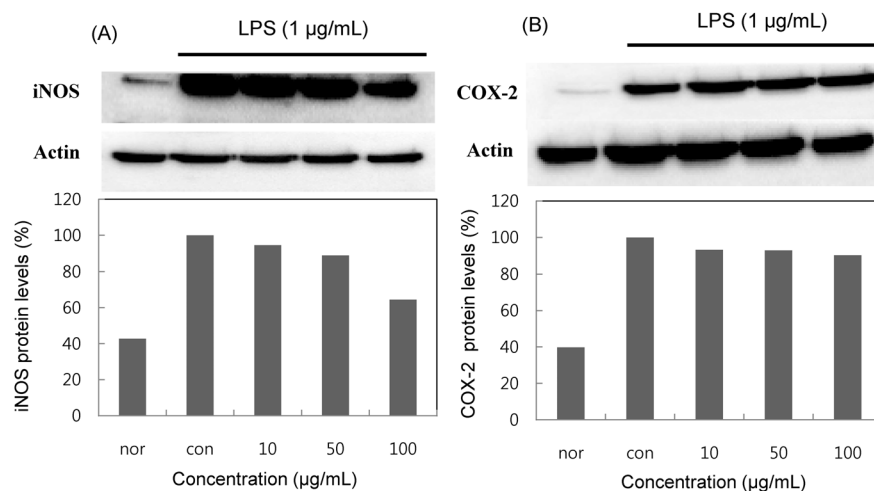
<sup>1)</sup>Means separation within columns by 5% DMRT.

**Hyaluronidase(HAase) 억제 효과**

고분자 hyalurinic acid(HA)는 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하지만 HA 분해 산물이나 저분자 HA는 inflammation, fibrosis collagen deposition을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 HA 분해효소인 HAase의 활성을 억제하여 HA의 고분자 형태를 유지시킴으로써 항염증 효과를 기대할 수 있다(23). 미세 분쇄 및 초미세분쇄 한 감국의 물 추출물과 70% ethanol 추출물의 HAase 억제효과를 비교한 결과 Table 6에서와 같이 일반분쇄 추출물보다 초미세분쇄 추출물에서 11% 더 우수한 효소 저해능을 나타내었다. 물 추출물에서는 억제효과가 관찰되지 않았으나 ethanol 추출물에서 35% 정도의 염증억제효과를 보여주었다. 또한 분쇄된 입자의 크기가 작을수록 HAase에 대한 억제효과는 높아짐을 확인하였다. Heo 등(27)은 감잎의 항알레르기 효과가 분쇄한 입자의 크기가 작을 때 효과가 우수하였다고 보고한 것과 비교할 때 본 연구에서도 초미세분쇄에 의해 감국 입자가 작아질수록 생리활성은 증가하는 것을 알 수 있었다.

**감국 에탄올 추출물에 의한 iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 효과**

NO의 생성에는 NO synthase(NOS)가 작용하게 되는데, constitutive NO synthase(cNOS)와 iNOS 중 자극에 유도된 iNOS의 경우 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하고,



**Fig. 2.** Inhibitory effects of *Chrysanthemum indicum* L. extracts on the production of iNOS and COX-2 in LPS stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 10, 50, and 100 µg/mL concentrations of *Chrysanthemum indicum* L. extracts dissolved in distilled water for 1 hr prior to the addition of LPS (1 µg/mL), and the cells were further incubated for 24 hr. Control cells were incubated with vehicle alone.

생성된 NO는 guanyl cyclase의 활성화와 동시에 세포독성을 나타내게 된다. 따라서 LPS로 유도되어진 RAW264.7 cell에서 iNOS의 protein level의 감소를 확인함으로써 항염증 효과를 기대할 수 있으며, 세포와 같은 macrophage 또한 monocyte에서 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), IL-6와 같은 proinflammatory cytokine을 증가시키는 요인 중 하나인 COX-2의 protein level의 감소를 이끌어냄으로써 항염증 효과를 기대할 수 있다(28,29). 또 monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 phosphatidic acid, fibroblast growth factor 등에 의해서 증식하고 glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증 치료 target molecule이 되고 있다. 감국 에탄올 추출물에 의한 NO 생성저해 기전을 확인하기 위해 Western blot으로 iNOS의 단백질 발현을 측정할 결과 Fig. 2(A)에서와 같이 감국 에탄올 추출물의 경우 대조군에 비해 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 40% 정도의 억제효과를 나타내었고, 농도 의존적으로 감소하는 효과를 관찰할 수 있었다. 또 다른 염증인자인 COX-2의 단백질 발현을 측정할 결과 Fig. 2(B)에서와 같이 감국 에탄올 추출물의 처리에 의해 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 15%의 억제효과를 나타내었다. Byun(30)은 약용작물인 산 더덕과 현 삼 추출물에 의해 대식세포에서 iNOS와 COX-2 발현이 저해되었다고 보고하였으며, 본 연구에서도 약용작물의 일종인 감국의 에탄올 추출물에 의해 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 농도 의존적으로 억제됨이 확인되어 NO와 상호 작용을 가진 iNOS 및 COX-2 발현억제에 의해 LPS로 유도되어진 대식세포주인 RAW264.7 세포에서의 염증 억제 효과를 기대할 수 있었다.

## 요 약

감국 phenolic compound의 추출을 위한 최적 추출조건은 70% ethanol로 6시간 추출이 최적이었다. 그때 추출수율은 물 추출물이 7.12 $\pm$ 1.61 mg/g, ethanol 추출물이 7.51 $\pm$ 2.14 mg/g이었고 초미세분쇄 했을 경우 물 추출물이 8.63 $\pm$ 1.15 mg/g, ethanol 추출물이 9.33 $\pm$ 1.35 mg/g이었다. 감국 추출물의 항산화력 측정에서 DPPH는 일반분쇄 추출물이 83.52%, 초미세분쇄 추출물이 92.37%이었다. ABTS radical cation decolorization의 경우 일반분쇄, 미세분쇄 및 초미세분쇄 추출물 모두 90% 이상이었다. Antioxidant protection factor(PF)의 경우 초미세분쇄 한 감국의 물과 에탄올 추출물에서 1.82 PF와 2.16 PF의 높은 항산화력을 나타내었다. TBARS도 일반분쇄 및 미세분쇄에 비해 초미세분쇄 한 감국 추출물에서 더 낮은 TBARS값을 나타내었다. 감국 추출물의 xanthin oxidase 저해효과는 초미세분쇄 물 추출물이 67.53%, ethanol 추출물이 83.45%이었다. Xanthin oxidase 저해는 물 추출물보다는 ethanol 추출물이, 초미세분쇄 추출물이 일반 추출물에 비해 효소억제효과가

더 우수한 결과를 나타내었다. Angiotensin converting enzyme 저해효과는 초미세분쇄 추출물의 경우 물 추출물에서 24% 이상의 억제효과를 나타내었고, ethanol 추출물은 34%의 억제효과를 나타내었다. 감국 추출물의 elastase 억제효과는 미세분쇄 추출물의 저해율 20.34%에 비하여 초미세분쇄 추출물의 억제율이 25.56%로 더 우수한 기능성을 나타내었다. Hyaluronidase의 경우 감국 물 추출물에서는 억제효과가 관찰되지 않았으며, ethanol 추출물에서만 35% 정도의 염증억제효과를 보여주었다. 감국 추출물에 의해 대식세포에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현억제 효과를 Western blot analysis로 측정할 결과 감국 에탄올 추출물에 의해 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 각각 40%와 15%의 발현억제를 나타내었고, 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 본 연구결과 초미세분쇄에 의한 감국 추출물은 일반분쇄 추출물에 비해 고혈압과 동맥 억제 효과가 확연히 높아짐을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 지식경제부에서 시행한 지역산업전략기획기술개발사업의 결과이며, 연구개발비 지원에 감사드립니다. 이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

1. Yoon OH, Cho JS. 2007. Optimization of extraction conditions for hat water extracts from *Chrysanthemum indicum* L. by response surface methodology. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 1-8.
2. Park JH, Lee JK. 2000. *The encyclopedia of medicinal plants*. Shinilbooks Pub., Seoul, Korea. p 8.
3. Woo KS, Yu JS, Hwang IH, Lee YR, Yoon HS, Lee J, Jeong HS. 2008. Antioxidative activity of volatile compounds in flower of *Chrysanthemum indicum*, *C. morifolium*, and *C. zawadskii*. *J Korean Soc Food Sci Nur* 37: 805-809.
4. Hong UC. 2002. Essential oil compositions *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45: 108-113.
5. Jang DS, Park KH, Lee JR, Ha TJ, Park YB, Nam SH, Yang MS. 1999. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 176-179.
6. Nam SH, Choi SD, Choi JS, Jang DS, Choi SU, Yang MS. 1997. Effects of sesquiterpene lactones isolated from *Chrysanthemum boreale* M. against Sarcoma 180 implanted in ICR mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 144-147.
7. Shin KH, Kang SS, Seo EA, Shin SW. 1995. Isolation of aldose reductase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum boreale*. *Arch Pharm Res* 18: 65-68.
8. Yoshikawa M, Morikawa T, Murakami T, Toguchida I, Harima S, Matsuda H. 1999. Medicinal flowers. I. Aldose reductase inhibitors and three new eudesmane-type sesquiterpenes, kikanols A, B and C, from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47: 340-

- 345.
9. Yoshikawa M, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Matsuda H. 2000. Medicinal flowers. II. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germane-type sesquiterpenes, kikanols D, D monoacetate, E, F and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 48: 651-656.
  10. Park SH, Hwang HS, Han JH. 2004. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function. *Korean J Nutr* 37: 364-372.
  11. Park SY, Kim JW. 1992. Screening and isolation of the anti-tumor agents from medicinal plants ( I ). *Kor J Pharmacogn* 23: 264-267.
  12. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-249.
  13. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
  14. Fellegrini N, Ka R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol* 299: 379-389.
  15. Andarwulan N, Shetty K. 1999. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem* 47: 1776-1780.
  16. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310.
  17. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
  18. Stripe F, Corte ED. 1969. The regulation of rat liver xanthin oxidase: Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3862.
  19. Cannell RJ, Kellam SJ, Owsianka AM, Walker JM. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med* 54: 10-14.
  20. Oh MH, Lee JE, Kim SY, Kim SY, Park KC, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, Kim DS. 2009. Screening system establishment for potential anti-wrinkle agents using human fibroblast elastase. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 35: 19-25.
  21. Moon TC, Park JO, Chung KW, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW, Chang KC. 1999. Anti-inflammatory activity of the flavonoid components of *Lonicera japonica*. *Yakhak Hoeji* 43: 117-123.
  22. Reissig JL, Stominger JL, Leloir LF. 1995. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J Biol Chem* 270: 959-966.
  23. Cho YJ, An BJ. 2008. Anti-inflammatory effect of extracts from *Cheongmoksang* (*Morus alba* L.) in lipopolysaccharide-stimulated Raw cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 44-48.
  24. Cho YJ. 2011. Anti-inflammatory effect of *Jatropha* from *Phellodendron amurense* in lipopolysaccharide-stimulated Raw264.7 cells. *J Appl Biol Chem* 54: 114-119.
  25. Cho CW, Kim SW, Rho JH, Rhee YK, Kim KT. 2008. Extraction characteristics of saponin and acidic polysaccharide based on the red ginseng particle size. *J Ginseng Res* 32: 179-186.
  26. Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Lee KH, An BJ, Choo JW. 2006. Inhibitory effects of water and 80% ethanol extracts from mulberry leaves (*Morus alba* L.) on angiotensin converting enzyme and xanthin oxidase. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 114-124.
  27. Heo JC, Lee KY, Lee BG, Choi SY, Lee SH, Lee SH. 2010. Anti-allergic activities of ultra-fine powder from persimmon. *Korea J Food Preserv* 17: 145-150.
  28. Kim NK, Kim MH, Yoon CS, Choi SW. 2006. Studies on the anti-inflammatory activity of *Paulownia coreana* Uyekii leaf extract. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 32: 241-247.
  29. Kanda N, Koike S, Watanabe S. 2005. IL-17 suppresses TNF- $\alpha$ -induced CCL27 production through induction of COX-2 in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 116: 1144-1150.
  30. Byun BY. 2005. Effects of *Inonotus obliquus* ethanol extract on cytokine expression in Raw 264.7 cell. *Kor J Herbology* 20: 55-60.