

ORIGINAL ARTICLE

와송(*Orostachys japonicus* A. Berger) 추출물의 총 페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 비교

진동혁 · 김한수* · 성종환 · 정헌식
부산대학교 식품공학과

Comparison of Total Phenol, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of *Orostachys japonicus* A. Berger Extracts

Dong-Hyeok Jin, Han-Soo Kim*, Jong-Hwan Seong, Hun-Sik Chung

Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Abstract

The purpose of this study was to measure the bioactivity and antioxidant activity of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Orostachys japonicus* A. Berger have been known to contain functional materials such as kaempferol, hydroquinone, methyl gallate, quercetin, gallic acid etc. To identify the main functional materials of *Orostachys japonicus* A. Berger, the contents of flavonoid and phenol were measured. We extracted *Orostachys japonicus* A. Berger powder from four solvents such as chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), distilled water (DW), 70% methanol, 70% ethanol. After that, this study determined tannin, total phenol, flavonoid content, DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power and reducing power of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts and as results of comparing each extract, respectively. From the above results shows that antioxidant activity and bioactivity of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts was higher in the order of 70% ethanol, 70% methanol, DW and CM ($p < 0.05$). The results showed that antioxidant activity of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts supposed to affect by the total phenol and flavonoid contents.

Key words : *Orostachys japonicus* A. Berger, Antioxidant activity, Tannin, Total phenol, Flavonoid

1. 서론

인체 내의 호흡과정 중 발생하는 산화 생성물인 reactive oxygen species (ROS)는 singlet oxygen (1O_2), superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH $^-$) 등으로 다양하게 존재하며(Dröge, 2002; Halliwell et al., 1992), 지질 과산화, 세포막 파괴, 단백질 변성, DNA 손상 등과 함께 생

체에서 생리적 장애를 일으킨다고 알려져 있다(Hwang et al., 2016; Jiang, 2005). 하지만 현대 사회에서 인간은 식품을 저장하거나 유통 중 발생하는 지질 산화, 스트레스, 환경오염, 생활습관 등으로 인하여 ROS에 노출되기 쉽다(Bokov et al., 2004). 이러한 산화적 스트레스를 억제하기 위해 천연물로부터 유래한 천연항산화물질 개발에 대한 관심은 끊임없이 높아지고 있으며(Kim et al., 2014), 그 중 flavonoid 및 polyphenol과 같은

Received 4 March, 2016; Revised 21 March, 2016;

Accepted 23 March, 2016

*Corresponding author : Han-Soo Kim, Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 50463, Korea
Phone: +82-55-350-5351
E-mail: kimhs777@pusan.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© 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.

phytochemical은 과일이거나 야채와 같은 식물체에 많이 함유되어 있으며 생체 내 산화 생성물 제거, 유전자 조절, 면역체계 자극과 같은 효과가 있어 그 효과가 주목 받고 있다(Luthria et al., 2015).

와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 바위솔, 와화(瓦花), 와련화(瓦蓮花) 등으로 불리는 돌나물과의 다년생 초본 식물로서 백 여년 이상 된 기와지붕이나 산 그리고 바닷가의 바위 위에 자란다(Lee et al., 2009). 한국, 중국 및 일본 등지에 분포하고 있으며 kaempfero, quercetin과 같은 flavonoid, friedelin, *epi*-friedelinol, glutinone, glutinol과 같은 triterpenoid, sterol 계열의 β -sitosterol, campesterol 등의 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Choi et al., 2008). 또한 항당뇨(Lee et al., 2013), 항암(Won et al., 2014), 항산화(Kim et al., 2009; Lee et al., 2011) 등의 연구결과가 보고되고 있어 점차 그 관심이 높아지고 있다. 반면에 와송을 용매별로 추출한 후 항산화 활성과 생리활성물질의 성분 함량을 측정하여 비교한 연구는 미비한 실정이다.

이에 따라 본 연구에서는 와송의 chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), DW (distilled water), 70% methanol, 70% ethanol의 용매별로 추출하여 tannin, total phenol, flavonoid 함량을 측정하고, 항산화 능력(DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity) 및 환원력(ferric reducing antioxidant power, reducing power)을 측정하여 와송의 추출 용매에 따른 항산화능력을 비교하여 여러 질병 예방과 건강기능식품 개발의 목적으로 기능성 및 고부가 천연항산화제로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에 사용된 시료는 전북 무주군에서 2014년 10월에 채취한 와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)을 55°C 이하에서 열풍건조시켜 분쇄하여 deep freezer (DF-8514, Il-Shin BioBase Co., Daegu, Korea)에서 -80°C로 보관하며 사용하였다.

2.2. 시료의 추출

시료의 추출은 동결 저장된 와송 분말 100 g을 취해

chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), 70% methanol, 70% ethanol 용매를 각 10배 가하여(1:10, w/v) 상온에서 24시간씩 2회 추출한 뒤 여과(filter paper, Advantec, No.2, Tokyo, Japan)하였고, 물 추출물은 70°C에서 2시간씩 2회 추출하여 여과하였다. 추출물들은 rotary evaporator (Hei-VAP Advantage, Heidolph, Germany)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 회수한 고형의 시료를 희석(0.2, 0.4, 0.6, 1.0 mg/mL)하여 실험에 사용하였다 실험에 사용하였다. 시료의 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출 후 건조 중량 백분율(%)로 나타내었다.

2.3. Tannin 함량 측정

와송의 tannin 함량은 Prussian blue assay(Graham, 1992; Schofield et al., 2001)를 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.06 g에 methanol 6.0 mL를 넣고 30분간 방치하고 여과한 뒤, 여과액 2.0 mL에 distilled water 50.0 mL을 가하여 실험에 사용할 extract solution을 조제하였다. 조제한 extract solution 2.0 mL에 0.1 M ferric chloride 1.0 mL와 8.0 mM potassium ferricyanide 1.0 mL를 가하여 충분히 섞은 뒤 실온에서 1시간 30분 방치한 후, UV/Vis spectrophotometer (SP-200, Analytik Jena Co., Jena, Germany)를 사용하여 720 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 표준물질로는 catechin을 사용하여 시료 1 g당 mg CE (mg of catechin equivalents)로 나타내었다.

2.4. Total phenol 함량 측정

Total phenol 함량은 Folin-Denis` 방법을 변형하여 실험하였다(Kim et al., 2013). 시료 추출액 0.5 mL에 증류수 3.0 mL을 넣고, Folin-Denis reagent 0.5 mL를 가한 후, 혼합하여 3분간 실온에 방치한 뒤 10% Na₂CO₃ solution 0.5 mL을 첨가하여 실온에 1시간 방치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 caffeic acid를 사용하여 시료 1 g당 mg CAE (mg of caffeic acid equivalents)로 나타내었다.

2.5. Flavonoid 함량 측정

Total flavonoid 함량은 시료 추출액 0.5 mL에 10% aluminium nitrate 0.5 mL와 1 M potassium acetate 0.5 mL를 가한 뒤, 80% ethanol 2.0 mL를 첨가하여 잘

혼합한 후 40분간 실온에 방치하여 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였다(Jing et al., 2015). 이 때 표준물질인 quercetin을 사용해 검량선을 작성하여 시료 1 g당 mg QE (mg of quercetin equivalents)로 계산하였다.

2.6. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity는 각 용매 별 시료 추출물 0.2 mL와 0.1 mM DPPH 2.8 mL를 혼합하고 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다. 각 시료 추출물의 free radical scavenging activity는 IC₅₀ (50% inhibitory concentration)으로 결과를 표시하였다(Duan et al., 2014; Blois, 1958). 이 때 활성 비교를 위하여 control로 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)을 사용하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= \left(1 - \frac{Abs_{Sample}}{Abs_{Blank}}\right) \times 100$$

2.7. ABTS radical scavenging activity 측정

ABTS cation decolorization assay에 의한 방법(Floegel et al., 2011)을 변형하여 ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical을 이용한 항산화 활성을 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1 (v/v)의 비율로 섞어 16시간 동안 암소에 방치하여 ABTS radical을 형성시킨 후, ethanol로 희석하여 735 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되도록 하였다. 희석된 용액 2.9 mL에 시료 추출액 0.1 mL를 넣은 후 10분 뒤 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control은 BHA를 사용하였고 ABTS radical scavenging activity는 다음 식에 의하여 계산하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \left(1 - \frac{Abs_{Sample}}{Abs_{Blank}}\right) \times 100$$

2.8. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

FRAP 측정은 환원력을 이용하여 항산화능을 측정하는 방법(Ortuño et al., 2016; Raudonis et al., 2012)으로 0.3 M sodium acetate buffer (pH 3.6)과 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) solution, 20 mM ferric chloride를 10:1:1 (v/v/v)로 혼합하여 실험 직전에 조제하여 사용하였다. 시료 추출액 0.2 mL에 FRAP reagent 3.0 mL를 가하여 30분간 water bath에 방치한 뒤 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며 ferrous sulfate를 이용하여 검량선을 작성한 후 환원력을 표시하였다. Control은 ascorbic acid를 사용하였고 이를 통해 EC₅₀ (half maximal effective concentration)을 구하였다.

2.9. Reducing power 측정

와송의 용매별 추출물에 따른 reducing power의 측정은 각 시료 추출 용액 1.0 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1.5 mL와 1% potassium ferricyanide 1.0 mL를 넣고 50 °C의 water bath에서 20분간 반응 시켰다. 반응시킨 혼합액에 10% trichloroacetic acid 1.5 mL를 가하여 섞은 후 3,000 rpm에 10분간 원심분리하여 분리된 상등액 1.0 mL를 증류수 3.0 mL 그리고 0.1% ferric chloride solution 0.2 mL와 잘 혼합시켜 10분 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다(Singhal et al., 2014). 또한 EC₅₀은 control로 사용한 BHA를 통하여 계산하였다.

2.10. 통계 처리

실험 데이터는 3회 반복 측정하였으며, mean±SD (n=3)으로 표현하였다. 또한 실험 군간의 유의적인 차이는 one-way ANOVA (analysis of variance)로 분석한 뒤 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 농도 간의 유의성을 검증하였다. 통계처리에 대한 프로그램은 IBM SPSS statistic ver. 22를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 수율

와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)의 chloroform :methanol (CM, 2:1, v/v)과 distilled water (DW), 70% methanol 및 70% ethanol의 추출 수율은 Table 1에

Table 1. Contents of tannin, total phenol, flavonoid, and IC₅₀ & EC₅₀ values in the antioxidant activity evaluation assays of *Orostachys japonicus* A. Berger

Assays	<i>Orostachys japonicus</i> A. Berger powder			
	CM ²⁾	DW ³⁾	70% methanol	70% ethanol
Tannin content (mg CE ¹⁾ /g)	3.97±0.49			
Extraction yields (%)	10.56	34.86	16.80	17.72
Total phenol content (mg CAE ⁴⁾ /g)	8.17±0.08 ^{a7)}	15.42±0.14 ^b	23.77±0.08 ^c	24.14±0.21 ^d
Total flavonoid content (mg QE ⁵⁾ /g)	12.68±0.23 ^b	11.52±0.15 ^a	15.82±0.18 ^c	16.02±0.18 ^c
DPPH ⁶⁾ (IC ₅₀ , mg/mL)	8.680±0.831 ^d	1.942±0.078 ^c	0.615±0.005 ^b	0.585±0.009 ^a
ABTS (IC ₅₀ , mg/mL)	4.528±0.471 ^d	2.638±0.120 ^c	1.313±0.050 ^b	1.135±0.081 ^a
FRAP (EC ₅₀ , mg/mL)	11.496±0.522 ^b	11.432±0.205 ^b	3.788±0.071 ^a	3.758±0.154 ^a
Reducing power (EC ₅₀ , mg/mL)	6.053±0.563 ^c	4.197±0.522 ^b	1.841±0.155 ^a	1.696±0.165 ^a

¹⁾ CE: catechin equivalents

²⁾ CM: chloroform:methanol mixture (2:1, v/v)

³⁾ DW: distilled water

⁴⁾ CAE: caffeic acid equivalents

⁵⁾ QE: quercetin equivalents

⁶⁾ DPPH radical scavenging activity (DPPH), ABTS radical scavenging activity (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP)

⁷⁾ The values are means±SD (n=3). Values with the different letters in the same row are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests

나타내었다. 각 용매별 추출 수율은 DW에서 34.86%로 가장 높게 나타났고, 70% ethanol에서 17.72%, 70% methanol에서 16.80%, CM에서 10.56% 순으로 나타났다.

3.2. Tannin 함량

외송 분말의 tannin 함량은 Table 1에서와 같이 3.97±0.49 mg CE/g으로 나타났다. 탄닌은 과일, 콩 등에 함유되어 있는 polyphenol 성분으로 섭취 시 떫은맛과 함께 인체에서 항산화, 항균, 항암작용을 하는 것으로 알려져 있다(Schofield et al., 2001). 산수유 1.50 mg/g (Jang et al., 2009), 녹차잎 2.35±0.31 mg/mL (Lee and Park, 2007), 산머루 와인 1.88 mg/mL(Kim et al., 2007)로 보고되어 있으며, 이에 따라 외송의 tannin 함량은 높은 수준인 것으로 확인하였다.

3.3. Total phenol 함량

외송의 용매별 추출물에서의 total phenol 함량은 Table 1에 나타내었으며 70% ethanol 추출물에서 24.14±0.21 mg CAE/g으로 가장 높게 나왔고, 70%

methanol에서 23.77±0.08 mg CAE/g, DW에서 15.42±0.14 mg CAE/g, CM에서 8.17±0.08 mg CAE/g 순으로 CM에서 가장 낮은 값으로 관찰되었다. 외송에 대한 연구 중 Lee et al.(2012)은 외송 95℃ 물 추출물의 total phenol 함량은 9.21±0.51 mg/g로 보고하였으며 이는 추출 온도 차이에 의해 본 실험의 결과보다 낮게 나온 것으로 추측된다. 또한 Ahn et al.(2015)은 외송의 DW, 95% ethanol, 95% methanol 추출물에서 각각 35.42±0.26, 122.27±8.37, 87.75±1.55 mg/100 g의 phenol 함량을 보고하였고 사용한 표준물질이 달라 본 실험과 함량의 차이는 비교하기 어려우나, phenol 함량이 ethanol, methanol, DW 순으로 관찰된 것은 본 실험의 결과와 유사하다. 페놀성 화합물은 단백질과 같은 고분자 물질과 결합하기도 하여 인체 내에서 다양한 생리활성을 가지는 2차 대사산물의 하나로 함량이 증가함에 따라 항산화 활성이 증가하는 경향을 보인다고 보고되어있다(Bravo, 1998; Wang et al., 1998).

3.4. Flavonoid 함량

외송의 각 용매 추출물에서 flavonoid 함량은 Table 1

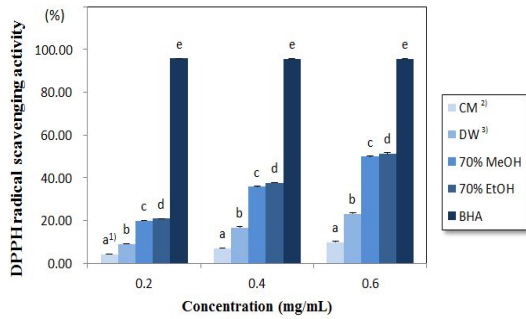


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of various extracts from *Orostachys japonicus* A. Berger.

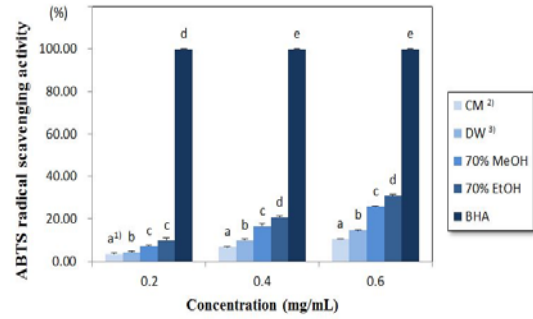


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of various extracts from *Orostachys japonicus* A. Berger.

¹⁾ The values are means±SD (n=3). Bars with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

²⁾ CM: chloroform:methanol mixture (2:1, v/v) extract.

³⁾ DW: distilled water.

에 나타내었으며, 70% ethanol 추출물에서 16.02 ± 0.18 mg QE/g, 70% methanol 추출물 15.82 ± 0.18 mg QE/g, CM 추출물이 12.68 ± 0.23 mg QE/g, DW 추출물 11.52 ± 0.15 mg QE/g 순으로 70% ethanol 추출물과 70% methanol 추출물은 유의적 차이가 없었다 ($p<0.05$). Total phenol 함량의 경우 DW 추출물의 함량이 CM 추출물 보다 높게 관찰되었지만, flavonoid 함량의 경우 CM 추출물이 더 높게 나타나는 경향을 보였다. Flavonoid는 flavonol (quercetin, fisetin, kaempferol), flavone, isoflavone (daidzein, biochanin A), flavanol (epicatechin 3-gallate) 등 여러 생리활성물질이 있어 용매에 따라 추출되는 정도가 다르다고 알려져 있다(Seo et al., 2016). Kim et al.(2012)의 국내의 자생식물과 생약 자원 methanol 추출물에 대한 flavonoid 함량 연구에서 울금 14.31 ± 0.00 mg/g, 범부채 12.02 ± 1.44 mg/g, 뽕나무 6.19 ± 3.25 mg/g, 민들레 13.69 ± 0.00 mg/g으로 보고 하였으며 외송의 함량이 이보다 높은 것으로 확인되어 생약자원으로서 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

3.5. DPPH radical scavenging activity

외송의 각 용매별 추출물과 control인 BHA의 DPPH radical 소거능을 각 농도별로 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었고, IC₅₀값을 구하여 Table 1에 나타내었다. 각 용매별 추출물을 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL의 농도로 측정된 결과 농도가 증가함에 따라 radical 소거활성이 유의적으로

증가하였다($p<0.05$). 70% ethanol 추출물에서 농도별로 각각 $20.92\pm 0.12\%$, $37.69\pm 0.19\%$, $51.22\pm 0.55\%$ 로 추출물 중에 가장 높은 소거활성을 보였으며, 70% methanol 추출물이 $19.90\pm 0.25\%$, $35.78\pm 0.21\%$, $49.88\pm 0.25\%$ 로 나타났으며, DW 추출물 $8.98\pm 0.12\%$, $16.77\pm 0.32\%$, $23.19\pm 0.49\%$, CM 추출물이 $4.26\pm 0.07\%$, $7.15\pm 0.12\%$, $9.95\pm 0.32\%$ 로 각 용매 추출물 중 가장 낮은 소거능을 보였다. IC₅₀은 70% ethanol 추출물이 0.585 ± 0.009 mg/mL, 70% methanol 추출물에서 0.615 ± 0.005 mg/mL, DW 추출물 1.942 ± 0.078 mg/mL로 관찰되었으나 CM 추출물의 경우 8.680 ± 0.831 mg/mL로 다른 추출물들과는 다소 차이가 있는 결과를 보였다. 70% ethanol과 70% methanol의 0.6 mg/mL 농도에서의 항산화능은 50% 정도의 소거능을 보였으나 CM 추출물의 경우 10% 미만의 소거능을 가지고 있는 것으로 관찰되었다. Rice-Evans et al.(1997)은 polyphenol 함량이 증가함에 따라 free radical 소거능이 증가된다고 보고하였으며, 본 연구에서 용매별 total phenol 함량과 DPPH의 항산화능에 대한 결과가 CM < DW < 70% MeOH < 70% EtOH 용매 순으로 나타난 것으로, 이들 보고와 유사한 것으로 확인되었다.

3.6. ABTS radical scavenging activity

외송의 용매 추출물의 농도별 ABTS radical 소거능은 Fig. 2에 나타내었으며, 그 결과에 의한 IC₅₀값은

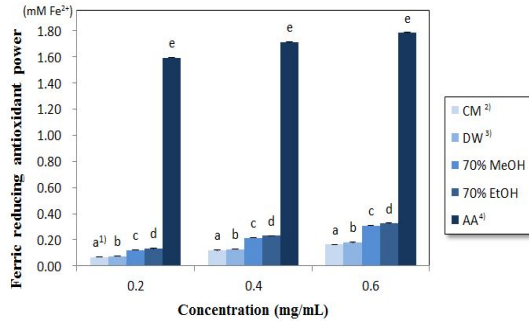


Fig. 3. Ferric reducing antioxidant power of various extracts from *Orostachys japonicus* A. Berger.

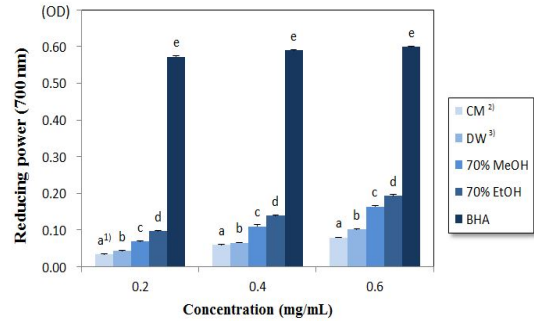


Fig. 4. Reducing power of various extracts from *Orostachys japonicus* A. Berger.

¹⁾ The values are means \pm SD (n=3). Bars with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

²⁾ CM: chloroform:methanol mixture (2:1, v/v) extract.

³⁾ DW: distilled water.

⁴⁾ AA: ascorbic acid.

Table 1에 표시하였다. ABTS radical 소거능은 각 농도가 높아짐에 따라 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 70% ethanol 추출물에서 $9.97 \pm 1.12\%$, $20.649 \pm 0.94\%$, $31.00 \pm 0.51\%$, 70% methanol 추출물 $7.24 \pm 0.57\%$, $16.60 \pm 1.29\%$, $25.73 \pm 0.36\%$, DW 추출물이 농도별로 $4.37 \pm 0.43\%$, $9.93 \pm 0.71\%$, $14.53 \pm 0.50\%$, CM 추출물은 $3.57 \pm 0.32\%$, $6.82 \pm 0.16\%$, $10.58 \pm 0.36\%$ 로 다른 추출물 중 낮은 소거능을 보였다. 또한 IC_{50} 값은 70% ethanol 추출물이 1.135 ± 0.081 mg/mL로 높은 소거능을 보였고, 70% methanol 추출물이 1.313 ± 0.050 mg/mL, DW 추출물 2.638 ± 0.120 mg/mL, CM 추출물 4.528 ± 0.471 mg/mL의 순으로 나타났다. 항산화 능력의 평가 지표로 사용되는 ABTS radical 소거능과 DPPH radical 소거능의 활성은 두 실험 결과의 차이는 있지만 서로 비례적 상관관계를 가지는 것으로 보고되고 있으며(Lou et al., 2012; Wootton et al., 2007), 본 실험의 결과 또한 이와 유사한 것으로 나타났다. 또한 외송물 추출물 0.5, 1.0 mg/mL 농도에서 ABTS radical 소거능이 각 $18.79 \pm 1.08\%$ 와 $70.64 \pm 0.29\%$ 으로 보고되었는데(Lee et al., 2012) 이러한 차이는 추출 조건과 농도의 차이에 기인하는 것으로 사료되며, 본 연구의 결과 또한 농도 의존적으로 소거능이 증가하는 경향을 보였다.

3.7. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

외송의 각 추출물에 따른 FRAP 결과는 Fig. 3에 나타내었고, EC_{50} 값은 Table 1에 나타내었다. Ferrous sulfate를 표준물질로 사용하여 측정된 흡광도를 검량선을 작성하여 계산한 결과 70% ethanol 추출물에서 각 농도별로 0.133 ± 0.001 , 0.231 ± 0.001 , 0.326 ± 0.003 mM Fe^{2+} , 70% methanol 추출물에서 0.120 ± 0.000 , 0.215 ± 0.002 , 0.309 ± 0.002 mM Fe^{2+} , DW 추출물은 0.075 ± 0.000 , 0.127 ± 0.001 , 0.180 ± 0.001 mM Fe^{2+} , CM 추출물은 0.066 ± 0.001 , 0.119 ± 0.001 , 0.164 ± 0.002 mM Fe^{2+} 로 나타났으며, EC_{50} 은 70% ethanol 추출물에서 3.758 ± 0.154 mg/mL, 70% methanol 추출물에서 3.788 ± 0.071 mg/mL로 유의적 차이가 없었으며($p < 0.05$), DW 추출물에서 11.432 ± 0.205 mg/mL, CM 추출물에서 11.496 ± 0.522 순으로 관찰되었다. DW 추출물과 CM 추출물 또한 유의적 차이가 없었으나 다른 추출물과는 큰 차이가 있었다($p < 0.05$). Carlsen et al.(2010)의 연구에서 견과류 0.333 mM Fe^{2+} /g, 향신료 0.290 mM Fe^{2+} /g, 매자(red sour berry) 0.273 mM Fe^{2+} /g, 월계수 잎 0.278 mM Fe^{2+} /g으로 보고된 것을 미루어보아 DW 추출물과 CM 추출물에서는 강한 활성을 보이지 않았으나 70% ethanol과 70% methanol 추출물의 경우는 우수한 항산화능을 가지고있는 것으로 사료된다.

3.8. Reducing power

외송 각 추출물의 reducing power의 결과는 Fig. 4에 나타내었고, EC₅₀ 값은 Table 1에 나타내었다. 각 용매별 추출물과 BHA의 농도가 증가함에 따라 유의적으로($p < 0.05$) 흡광도가 증가하였고, 70% ethanol 추출물에서 각 농도별로 0.097±0.002, 0.139±0.003, 0.193±0.003으로 나타났으며, 70% methanol 추출물이 0.069±0.001, 0.110±0.004, 0.164±0.003, DW 추출물 0.043±0.002, 0.065±0.001, 0.102±0.001, CM 추출물은 0.033±0.002, 0.059±0.002, 0.079±0.001의 흡광도가 관찰되었다. 또한 EC₅₀은 70% ethanol 추출물이 1.696±0.165 mg/mL, 70% methanol 추출물 1.841±0.115 mg/mL로 두 추출물간의 유의적인 차이는 없었으며($p < 0.05$), DW 추출물 4.197±0.522 mg/mL, CM 추출물 6.053±0.563 mg/mL의 순으로 나타났다. 이와 같이 외송의 모든 용매별 추출물에서 농도 의존적으로 환원력이 증가하는 경향을 보였으나 control인 BHA와 비교해 보았을 때 FRAP의 결과와 마찬가지로 높지 않은 것으로 확인되어 Lee et al.(2009)의 연구와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 EC₅₀의 결과를 비교해 보았을 때 다른 항산화 결과와 마찬가지로 비슷한 양상의 용매별 활성이 관찰되었다. Reducing power는 시료가 제공하는 수소원자가 ROS chain을 분해하여 항산화 활성을 나타내 항산화활성과 관련 있는 것으로 알려져 있다(Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007).

4. 결론

본 연구에서는 외송(*Orostachys japonicus* A. Berger)의 chloroform:methanol (CM, 2:1, v/v), DW (distilled water), 70% methanol, 70% ethanol 용매 추출물에서 항산화 활성 및 생리활성을 알아보고 외송의 기능성 소재 및 건강식품으로서의 가치를 검토하기 위하여 본 실험을 수행한 결과, 외송 분말에서 tannin 성분은 3.97±0.49 mg CE/g으로 높은 함량을 가지고 있었고, 각 용매별 추출물에 대하여 total phenol, flavonoid 함량, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, ferric reducing antioxidant power 및 reducing power를 측정 비교한 결과 70% ethanol ≥ 70% methanol > DW ≥ CM 추출물 순으로 70% ethanol 추출물과 70% methanol

추출물에서 DW 추출물과 CM 추출물 보다 높은 항산화 능이 나타났다. 일부 실험에서는 70% ethanol과 70% methanol 추출물 그리고 DW와 CM 추출물에서 유의적인 차이 없이 비슷한 활성을 보였으나 농도에 따라 점진적으로 활성이 증가하는 경향이 관찰되었다. 또한 외송의 용매별 phenolic compound, flavonoids와 같이 생리활성물질의 함량에 따라 항산화활성이 증가되는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구 결과 외송의 70% ethanol과 70% methanol 추출물은 우수한 항산화 활성과 생리활성물질을 가지고 있었으며 생약자원 및 천연항산화제로서 응용할 가능성이 높은 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Ahn, H. Y., Choe, D. J., Cho, Y. S., 2015, Antioxidant activity and chemical characteristics of *Orostachys malacophyllus* and fermented *Orostachys malacophyllus*, *J. Life Sci.*, 25, 577-584.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., 2007, Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves, *Food Chem.*, 102, 1233-1240.
- Blois, M. S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A., 2004, The Role of oxidative damage and stress in aging, *Mech. Ageing Dev.*, 125, 811-826.
- Bravo, L., 1998, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.*, 56, 317-333.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bohn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs, D. R., Blomhoff, R., 2010, The Total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide, *Nutrition Journal*, 9, 1.
- Choi, S. Y., Kim, J. G., Jung, N. J., 2008, Studies on the

- physicochemical characteristics and NDMA formation of *Orostachys japonicus* A. Berger, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 21, 148-156.
- Dröge, W. 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.*, 82, 47-95.
- Duan, Y., Kim, M. A., Kim, H. S., Seong, J. H., Lee, Y. G., Kim, D. S., Chung, H. S., 2014, Effects of feral haw (*Crataegus pinnatifida* Bunge) seed extracts on the antioxidant activities, *J. Life Sci.*, 24, 386-392.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., Chun, O. K., 2011, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *J. Food Compos. Anal.*, 24, 1043-1048.
- Graham, H. D., 1992, Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 801-805.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., Cross, C. E., 1992, Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?, *J. Lab. Clin. Med.*, 119, 598-620.
- Hwang, K. A., Kim, G. R., Hwang, Y. J., Hwang, I. G., Song, J., 2016, Oxidative stress inhibitory effects of low temperature-aged garlic (*Allium stivum* L.) extracts through free radical scavenging activity, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 45, 27-34.
- Jang, M., Kim, Y. J., Min, J. W., Yang, D. C., 2009, Optimization of extraction method for the quantitative analysis of gallic acid from *Cornus officinalis*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 41, 498-502.
- Jiang, W. Y., 2005, Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: A Perspective from modern science, *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, 558-563.
- Jing, E. L., Song, T. F., Zeng, H. Q., Chang, L., Shao, P. N., 2015, Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru, *LWT-Food Sci. Technol.*, 64, 1022-1027.
- Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M., Kim, M. Y., Lee, S., Lee, B. H., 2012, Total polyphenols, Total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 44, 337-342.
- Kim, E. J., Kim, Y. H., Kim, J. W., Lee, H. H., Ko, Y. J., Park, M. H., Lee, J. O., Kim, Y. S., Ha, Y. L., Ryu, C. H., 2007, Optimization of fermentation process and quality properties of wild grape wine, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 36, 366-370.
- Kim, H. J., Lee, J. Y., Kim, S. M., Park, D. A., Jin, C., Hong, S. P., Lee, Y. S., 2009, A New epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *Orostachys japonicus*, *Fitoterapia*, 80, 73-76.
- Kim, H. S., Duan, Y., Kim, M. A., Jang, S. H., 2014, Contents of antioxidative components from pulpy and seed in wild haw (*Crataegus pinnatifida* BUNGE), *J. Environ. Sci. Int.*, 23, 1791-1799.
- Kim, J. G., Kim, H. L., Kim, S. J., Park, K. S., 2013, Fruit quality, anthocyanin and total phenolic contents, and antioxidant activities of 45 blueberry cultivars grown in Suwon, Korea, *J. Zhejiang University-Sci. B (Biomedicine & Biotechnology)*, 14, 793-799.
- Lee, J. H., Lee, S. J., Park, S., Kim, H. K., Jeong, W. Y., Choi, J. Y., Sung, N. J., Lee, W. S., Lim, C. S., Kim, G. S., Shin, S. C., 2011, Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicus* A. Berger using HPLC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant effect, *Food Chem.*, 124, 1627-1633.
- Lee, M. K., Park, Y. S., 2007, Changes of taste quality and catechins content in tea extracts according to elapsed time an ambient temperature, *Hort. Environ. Biotechnol.*, 48, 298-302.
- Lee, S. J., Shin, J. H., Ju, J. C., Kang, S. K., Sung, N. J., 2013, Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Orostachys japonicus* with medicinal herbs in streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 42, 587-594.
- Lee, S. J., Shin, J. H., Kang, J. R., Hwang, C. R., Sung, N. J., 2012, *In vitro* evaluation of biological activities of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) and Korean traditional plants mixture, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 41, 295-301.
- Lee, S. J., Song, E. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Kim, S. J., Yoon, S. Y., Lee, C. J., Ahn, D. H., 2009, Antioxidant activity of leaf, stem and root extracts from *Orostachys japonicus* and their heat and pH stabilities, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 38, 1571-1579.
- Lou, H., Hu, Y., Zhang, L., Sun, P., Lu, H., 2012, Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical

- scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruits development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values, *Food Sci. Technol.*, 47, 19-24.
- Luthria, D. L., Lu, Y., Maria John, K. M., 2015, Bioactive phytochemicals in wheat: Extraction, analysis, processing, and functional properties, *J. Func. Food*, 18, 910-925.
- Ortuño, J., Serrano, R., Jordán, M. J., Bañón, S., 2016, Relationship between antioxidant status and oxidative stability in lamb meat reinforced with dietary rosemary diterpenes, *Food Chem.*, 190, 1056-1063.
- Raudonis, R., Raudone, L., Jakstas, V., Janulis, V., 2012, Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries, *J. Chromatogr. A*, 1233, 8-15.
- Rice-Evans C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.*, 2, 152-159.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N., 2001, Analysis of condensed tannins: A Review, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, 21-40.
- Seo, D. J., Jeon, S. B., Oh, H., Lee, B. H., Lee, S. Y., Oh, S. H., Jung, J. Y., Choi, C., 2016, Comparison of the antiviral activity of flavonoids against murine norovirus and feline calicivirus, *Food Control*, 60, 25-30.
- Singhal, M., Paul, A., Singh, H. P., 2014, Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives, *J. Saudi Chem. Soc.*, 18, 121-127.
- Wang, M. F., Shao, Y., Li, J. G., Zhu, N. Q., Ho, C. T., 1998, Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4869-4873.
- Won, Y. S., Lee, J. H., Kwon, S. J., Ahn, D. U., Shin, D. Y., Seo, K. I., 2014, Anticancer effects of cultivated *Orostachys japonicus* on human prostate cancer cells, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 43, 67-73.
- Wootton, P. C., Moran, A., Ryan, L., 2011, Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods, *Food Res. Int.*, 44, 217-224.