

에탄올 농도 조건이 개똥쑥 추출 및 생리활성에 미치는 영향

김경철¹ · 김주성^{1,*}

¹제주대학교 식물자원환경전공

Effect of varying ethanol concentrations on the extraction properties and physiological activity of *Artemisia annua* L.

Kyeongcheol Kim¹ and Ju-Sung Kim^{1,*}

¹Major in Plant Resource and Environment, SARI, Jeju National University

Abstract The present study was undertaken to compare the effects exerted by different extraction solvents on the extraction of active components, such as polyphenols and flavonoids, from the dried leaves of *Artemisia annua* L. Different extracts were prepared using a heating mantle. The extraction solvents used were distilled water, and 20, 40, 60, 80, and 99.5% ethanol solution. It was observed that the 40% ethanol solution yielded the most significant results in the extraction of various phytochemicals with phenol concentration of 154.8±0.28 mg of gallic acid equivalent/g and flavonoid content of 25.28±0.01 mg quercetin equivalent/g. However, based on the extraction solvent used, varying trends were observed in the antioxidant, enzyme inhibition, and bacterial inhibition analyses. It was concluded that the extraction solvent should be selected based on the purpose of use of the dried leaves of *A. annua* L.

Keywords: *Artemisia annua*, antioxidant, bacterial inhibition, enzyme inhibition, flavonoids

서 론

쑥속에 속하는 식물들은 아시아, 유럽 및 아메리카 지역 등 전 세계적으로 널리 분포하고 높은 생명력과 번식력이 강한 특징이 있다(Lodari 등, 1989). 한국의 경우 쑥속 식물을 건조하여 경련, 마비 등의 신경계 질환 치료와 위장염, 호흡기 등 다양한 민간요법 재료로 이용되는 것으로 알려져 있다(Lee, 2000). 또한 엽록체, 효소, 섬유질, 단백질과 비타민이 많이 함유되어 있어 영양적으로 우수한 식물이다. 쑥속 식물 중 전 세계적으로 분포하는 개똥쑥의 경우 아시아가 원산지이며 국내에서는 들관과 길에 자생하고 있다(Ryu 등, 2011). 약재명으로 ‘청호’라고 불리며 개똥쑥의 지상부는 지혈제, 살충제와 피부 처방에 쓰이고 있다. 개똥쑥은 terpenoids, flavonoids, stereroids, coumarins 등 다양한 2차 대사산물을 함유하고 있다(Bhakuni 등, 2001). Artemisinin, cadinene, cineol 등의 성분은 항암 효능이 뛰어나다고 알려져 있으며(Xie 등, 2000), 특히 artemisinin은 강력한 항말라리아 효능을 지니고 있어 현재 의약품으로 이용되고 있다(Tu, 2011). 개똥쑥과 관련된 연구에서 Ryu 등(2011)의 부위에 따른 활성 비교 결과 개똥쑥 잎이 줄기에 비해 총 phenol과 flavonoid 함량이 2배 높았고 그에 따라 항산화 활성이 유의적으로 높다고 하였다. 현재까지 개똥쑥의 생리활성 보고는 에센셜 오일에서의 항균과 항산화 활성(Juteau 등, 2002; Romero 등, 2006), 항종양(Zheng, 1994) 등 다양하게

확인되었다. 이러한 연구에 기반하여 Cai 등(2004)은 주요 페놀성 화합물을 분리, 동정하여 chlorogenic acid, ρ -coumaric acid, coumarin, 6,7-dimethoxycoumarin, luteolin-7-glucoside, rutin, quercitrin, quercetin, luteolin 및 kaempferol 등의 10가지 성분을 보고 하였다.

에탄올과 물의 경우 메탄올, 헥산 및 아세톤과 같은 고독성의 유기용매에 비해 취급이 안전하여 추출 용매로 주로 사용되었다. 이러한 용매를 이용할 때 단일 용매로 추출하기 보다 혼합된 용매로 추출한 경우 식물로부터 페놀성 화합물 추출에 더 적합하다고 알려졌다(Goli 등, 2005; Turkmen 등, 2006). 또한 “like dissolve like” 원리에 따르면 용매와 화합물의 극성이 유사할수록 추출에 용이한 것으로 알려져 있다(Yang과 Zhang, 2008; Zhang, 2007).

다양한 페놀성 성분이 있으며 생리활성이 뛰어난 개똥쑥 잎을 에탄올과 물로 조성된 농도별 용매를 이용할 경우 추출된 성분의 차이와 그에 따른 생리활성에 변화가 나타날 것으로 판단된다. 본 연구에서는 개똥쑥 잎의 생리활성에 따른 추출 용매 선택을 위하여 에탄올의 농도를 다르게 한 6종류의 용매로 시료를 각각 추출한 뒤 추출물의 총 phenol 및 flavonoid 함량, 항산화 활성, 항미생물 활성, 항효소 활성을 조사하여 개똥쑥 잎의 기능성 성분 최적 추출 방법에 대한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 개똥쑥은 제주도 노형동 소재 개똥쑥 자생지에서 형태학적 특성을 검토하여 선별한 뒤 채취하였다. 채취한 식물체는 잎을 분리한 뒤 건조 및 분쇄과정을 거쳐 0.5 mm 크기 미만의 개똥쑥 잎 분쇄시료를 사용하였다.

*Corresponding author: Ju-Sung Kim, College of Applied Life Sciences, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Korea
Tel: +82-64-754-3314
Fax: +82-64-725-2351
E-mail: aha2011@jejunu.ac.kr
Received October 8, 2019; revised December 2, 2019;
accepted December 10, 2019

추출물의 제조

개똥쑥 잎 분쇄시료 5g에 20배의 증류수 또는 20, 40, 60, 80, 99.5% (v/v) 에탄올을 각각 가한 후 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀로 80°C에서 3시간 추출하였다. 각 추출물은 여과하여 회전 증발 농축기로 농축한 후 동결건조하여 분석용 시료로 실험에 이용하였다.

총 phenol 함량 측정

총 phenol 함량 실험은 Folin과 Denis 방법(1912)을 변형하여 수행하였다. 추출물에 증류수 700 µL를 첨가하고 50% Folin-Ciocalteu 시약 100 µL를 넣어 2시간 반응한 후 20% Na₂CO₃ 용액을 100 µL씩 가하고 1시간 후 i-Mark microplate reader (168-1135, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀성 성분의 양은 gallic acid 표준곡선에 대입하여 산출된 당량으로 환산하여 나타내었다.

총 flavonoid 함량 측정

총 flavonoid 함량은 질산 알루미늄 분석법으로 수행하였다 (Zhang 등, 2010). 알칼리 조건에서 시료의 flavonoid와 알루미늄이 킬레이트 작용을 기반으로 다음과 같이 측정하였다. 추출물 100 µL, 에탄올 300 µL, 10% (w/v) aluminum nitrate 20 µL와 1 M potassium acetate 20 µL를 혼합하고 증류수를 이용하여 1 mL가 되도록 만들었다. 1시간 방치한 후 415 nm 흡광도에서 발색 정도를 확인하였다. 추출물의 총 flavonoid 함량은 quercetin 표준곡선에 대입하여 산출된 당량으로 환산하여 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 분석

안정한 DPPH에 대한 추출물의 라디칼 소거 활성은 분광광도계를 이용한 비색법으로 수행하였다. 메탄올로 희석한 0.15 mM DPPH 용액 160 µL와 추출물 40 µL를 암실에서 30분간 반응한 후 490 nm의 흡광도를 측정하였다. 개똥쑥 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 추출물을 처리하지 않은 무처리구 흡광도와 비교해서 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 추출물의 농도(radical scavenging concentration, RC₅₀, µg/mL)를 산출하여 나타내었다.

Superoxide 라디칼 소거능 분석

Superoxide 라디칼 소거능의 측정은 Nishikimi 등(1972)에 의해 기술된 방법에 기초하여 수행하였다. 추출물 50 µL, 150 µM nitroblue tetrazolium (NBT) 50 µL, 60 µM phenazine methosulfate (PMS) 50 µL를 혼합하고 468 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 50 µL 가한 후 5분 반응하여 560 nm의 흡광도 감소 정도를 측정하였다. 추출물의 superoxide 라디칼 소거능은 무처리구와 비교하여 NBT에 대한 흡광도 변화를 저해율로 계산하고 50% 소거하는데 필요한 추출물의 농도(RC₅₀, µg/mL)를 산출하여 나타내었다.

Nitric oxide 라디칼 소거능 분석

Nitric oxide 라디칼 소거능의 측정은 griess 시약을 이용하여 분석하였다(Patel과 Patel, 2011). 추출물과 10 mM sodium nitroprusside dihydrate (SNP)를 1:1 비율로 혼합하여 1시간 30분 반응한 후 반응액 100 µL와 griess 시약을 100 µL을 10분간 반응하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 nitric oxide 라디칼 소거능은 생성된 라디칼이 50% 소거하는데 필요한 추출물의 농도(RC₅₀, µg/mL)로 나타내었다.

Hydroxyl 라디칼 소거능 분석

Hydroxyl 라디칼 소거능의 측정은 Aranda 등(2013)의 방법을 응용하여 수행하였다. 1 mM dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) 20 µL에 0.1 unit/mL esterase 10 mL를 가하여 형광을 생성시켰고 만들어진 2 µM esterase treated DCFH-DA 50 µL와 추출물 50 µL, 0.2 mM FeSO₄ 50 µL를 혼합하였다. 혼합액에는 1 mM의 H₂O₂ 50 µL를 처리하여 hydroxyl radical을 생성하였다. 30분 후 excitation 460 nm, emission 530 nm에서 형광도를 측정하였다. 추출물의 hydroxyl 라디칼 소거능은 무처리구와 비교하여 라디칼에 의해 감소되지 않은 형광도 정도를 저해율로 계산하고 50% 소거하는데 필요한 시료의 농도(RC₅₀, µg/mL)로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거능 분석

2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphnate) 라디칼 소거능은 다양한 물질의 항산화 평가에 사용되는 분광광도계를 이용한 분석법이다. Re 등(1999)은 ABTS 라디칼 소거능에서 trolox를 응용하여 개선된 방법을 고안하였고 본 실험에서는 이를 참고하여 수행하였다. 2.45 mM potassium persulfate으로 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid)를 산화시켜 ABTS⁺를 생성한 뒤 추출물과 20:1 비율로 5분간 반응하여 탈색 정도를 734 nm 흡광도로 확인하였다. 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 농도의존적으로 ABTS 라디칼을 제거하는 항산화제인 trolox 대비 활성(trolox equivalent antioxidant capacity)으로 나타내었다.

Ferric reducing antioxidant power 분석

FRAP은 항산화 효과가 있는 물질에 대한 철의 환원 능력을 측정하여 항산화력을 평가하기 위해 고안된 방법이다(Benzie와 Strain, 1996). 이를 응용하여 추출물의 환원력을 평가하기 위해 수행하였다. 추출물 5 µL에 10 mM 2,4,6-tripirydyls-triazine (TPTZ)와 20 mM FeCl₃를 0.3 M sodium acetate buffer (pH 3.6)로 희석하여 제조된 FRAP working solution을 150 µL 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 환원에 따른 발색 정도를 595 nm의 흡광도로 확인하였다. 추출물의 FRAP 값은 FRAP working solution과 반응하여 선형의 표준곡선을 나타내는 FeSO₄ 당량으로 산출하여 나타내었다.

Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) 분석

ORAC는 친수성 및 친유성 물질에 대한 항산화 활성 분석을 위한 방법으로 Prior 등(2003)의 방법을 변형하여 분석하였다. 78 nM fluorescein 용액으로 희석한 추출물 200 mL를 37°C에서 10분 방치한 후 221 mM 2,2'-azobis(2-amino-propane) dihydrochloride 50 µL를 처리하였을 때 excitation 485 nm, emission 535 nm 조건에서 감소되는 형광도를 1시간 동안 1분 간격으로 측정하였다. 계산된 area under the curve (AUC)를 trolox 당량으로 산출하여 나타내었다.

HPLC 분석

추출물의 flavonoid는 high-performance liquid chromatography (HPLC-Diode array detector (DAD), Shimadzu, Japan)로 분석하였다. 컬럼은 YMC-Triart C18 column (250×4.6 mm I.D. 5 µM Hybrid silica-based ODS, YMC, Seongnam, Korea)를 사용하였고 용매 조성을 A: 1% (v/v) trifluoroacetic acid/distilled water, B: 1% trifluoroacetic acid/methanol 2개의 펌프를 포함하는 시스템으로 A: 90%, B: 10%로 시작하여 10 min에 A: 80%, B: 20%, 20

min에 A: 75%, B: 25%, 30 min에 A: 72.5%, B: 27.5%, 45 min에 A: 60%, B: 40%, 50 min에 A: 40%, B: 60%, 55 min에 A: 0%, B: 100%, 62 min에 A: 90%, B: 10%로 용매 구배를 실시하였고, 용매 흐름속도를 1 mL/min, 컬럼 온도는 40°C로 고정하였다. 용리된 성분은 photodiode array (PDA) 검출기를 포함하여 280 nm에서 피크를 확인하였다.

미생물 저해활성 분석

본 실험에서 사용된 7종의 균주는 그람양성균 *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Micrococcus luteus* (KCTC 1056), *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 1917), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (KCTC 1927)와 그람음성균 *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1750), *Escherichia coli* (KCTC 1924), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (KCTC 2208)로 한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 분양받았다. 계대배양을 통해 제조된 미생물 배양액으로 추출물의 농도를 1 mg/mL가 되도록 혼합한 후 적정 조건에서 배양하며 24시간 동안 4시간 간격으로 595 nm의 흡광도 변화를 측정하였다. 추출물의 미생물 저해활성은 무처리구와 비교하여 분석하였고 항균제로 사용되는 tetracycline과 streptomycin을 동일 농도에서 비교하여 나타내었다.

효소 저해활성 분석

α -Glucosidase 저해활성은 Kim과 Kim(2019)의 방법에 따라 분석하였다. 추출물 20 μ L, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 120 μ L와 α -glucosidase (0.3 U/mL) 50 μ L를 혼합하고 37°C에서 10분 배양하였다. 혼합액에 2 mM *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (*p*NPG) 10 μ L를 가하고 37°C 30분 배양한 후 100 mM sodium carbonate를 100 μ L를 넣고 415 nm의 흡광도를 측정하였다.

Elastase와 tyrosinase 저해활성은 Ko 등(2018)의 방법에 따라 분석하였다. Elastase 저해활성의 경우 추출물 20 μ L를 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 120 μ L로 희석하고 elastase (1 U/mL) 10 μ L와 elastase 기질 1 mM N-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide 50 μ L를 가하였다. 혼합액은 37°C에서 20분 반응이 끝난 후 415 nm의 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 1 mM L-tyrosine, 증류수를 10:10:9 비율로 제조된 working solution 170 μ L, 추출물 10 μ L, 1 KU/mL tyrosinase from mushroom 20 μ L를 혼합하였다. 혼합액은 37°C에서 15분 반응이 끝난 후 490 nm의 흡광도를 측정하였다.

통계분석

측정된 데이터는 3회 반복하여 statistical package for the social sciences (SPSS, ver. 18.0)로 각 추출물 간의 유의적인 차이를 분석하였다. 검정 방법으로 일원분산분석(ANOVA)과 Tukey의 다중범위검정(Tukey multiple range test)으로 $p < 0.05$ 수준의 유의성을 확인하였다.

결과 및 고찰

총 phenol 및 총 flavonoid 함량

총 phenol 및 총 flavonoid 함량은 Table 1과 같다. 총 phenol 함량의 범위는 평균 95.55-154.80 mg GAE/g으로 물 추출물(122.02±0.28 mg GAE/g)에서 용매로 사용한 에탄올의 함량이 높아지면서 총 phenol 함량이 증가하였고 40% 에탄올 추출물은 154.80±0.28 mg GAE/g으로 가장 높은 함량이 확인되었다. 하지만 60% 에탄올 추출물(146.40±0.59 mg GAE/g)에서 다시 감소하

Table 1. Total phenol and flavonoid contents of various solvent extracts from *Artemisia annua* L.

Extract	Total phenol (mg GAE/g ¹⁾)	Total flavonoid (mg QE/g ²⁾)
Distilled water	122.02±0.28 ^{c3)}	14.60±0.13 ^c
20% Ethanol	144.55±0.69 ^e	21.70±0.12 ^c
40% Ethanol	154.80±0.28 ^e	25.28±0.01 ^a
60% Ethanol	146.40±0.59 ^b	21.22±0.06 ^c
80% Ethanol	135.05±0.71 ^d	24.62±0.18 ^b
99.5% Ethanol	95.55±0.37 ^f	20.11±0.51 ^d

¹⁾mg GAE/g: gallic acid equivalents of extract.

²⁾mg QE/g: quercetin equivalents of extract.

³⁾Values are means of triplicate determination±standard deviation. Within each column, different letters (a-f) are significantly different at $p < 0.05$ (Tukey).

여 99.5% 에탄올 추출물은 평균 95.55 mg GAE/g의 함량을 나타내었다. 총 flavonoid 함량은 14.60-25.28 mg QE/g의 범위로 나타났다. phenol 함량과 마찬가지로 40% 에탄올 추출물(25.28±0.01 mg QE/g)에서 유의적으로 높은 함량이 확인되었다. 그러나 추출 용매에 따라 총 flavonoid 함량은 크게 차이가 나타나지 않았다. 개똥쑥 잎의 총 phenol 및 flavonoid 함량은 물과 에탄올로 단일 용매 추출하였을 때보다 혼합 용매에서 더 높은 함량을 보였다. Ryu 등(2011)은 개똥쑥 열수 및 80% 에탄올 추출물의 총 phenol 함량은 88.19, 99.98 mg/g으로 80% 에탄올 추출물이 유의적으로 높았으며 총 flavonoid 함량 또한 총 phenol 함량과 유사하여 80% 에탄올을 이용하였을 때 기능성 성분 추출에 유리하다고 보고하였다. 이러한 결과와 마찬가지로 본 실험에서도 물과 에탄올로 단일 용매 추출하였을 때보다 물-에탄올 혼합 용매에서 더 높은 총 phenol 및 flavonoid 함량 결과가 확인되었다. 이는 개똥쑥 잎에 비극성-극성인 넓은 범위의 페놀성 성분이 분포한다는 것을 나타내며 두 가지 용매로 조합된 용매가 추출에 유의적 영향을 준 것으로 생각된다(Turkmen 등, 2006). 유기용매가 추출되는 특성은 삼투압 또는 모세관 현상 등으로 식물체에 흡수되어 용매 농도에 따라 성분이 침출되어 가용성화 시킨다. 그리고 식물체에서 용매로 확산되기 때문에 농도별 에탄올이 추출 효율에 나타난 결과로 보인다. 또한 총 phenol 함량에서 40% 에탄올로 추출한 경우 최대에 도달하였고, 99.5% 에탄올 추출물이 가장 높은 phenol 함량을 보이지 않는 결과를 볼 때 개똥쑥 잎의 페놀성 성분은 낮은 극성이나 비극성 성분 이외에도 중간 극성 특성을 가진 다수의 페놀성 화합물의 존재가 예상된다.

라디칼 소거능

개똥쑥 추출물의 라디칼 소거능은 용매로 사용한 에탄올의 농도와 유의적인 차이가 있는 것으로 확인되었다(Table 2). DPPH의 경우 물 추출물(40.23±0.15 μ g/mL)에서 40% 에탄올 추출물(39.76±0.47 μ g/mL)까지 유의적으로 높은 활성이 나타났고, superoxide는 20% 에탄올 추출물(9.70±1.07 μ g/mL)과 40% 에탄올 추출물(9.40±0.70 μ g/mL)이 높은 활성을 보였다. Nitric oxide에서 40% 에탄올 추출물이 50% 소거하는데 필요한 농도가 354.95±2.96 μ g/mL로 가장 높은 소거능을 가진 것으로 확인되었다. Hydroxyl 라디칼 소거능 분석 결과 40% 에탄올 추출물(42.03±1.01 μ g/mL)에서 높은 활성이 나타났다. 개똥쑥 추출물의 라디칼 소거능은 그 종류에 따라 추출 용매에 따른 활성의 경향이 완전히 일치하지는 않았지만 20%, 40% 에탄올 범위에서 추출하였을 때 라디칼 소거 활성이 높게 작용하는 것으로 보인다. Paixao 등(2007)의

Table 2. RC₅₀ for radical scavenging activity of various solvent extracts from *Artemisia annua* L.

Extract	Radical scavenging activity (RC ₅₀ ¹⁾), µg/mL			
	DPPH	Superoxide	Nitric oxide	Hydroxyl
Distilled water	40.23±0.15 ^{a2)}	14.61±0.64 ^b	458.01±05.12 ^d	50.69±1.64 ^b
20% Ethanol	40.55±0.18 ^a	9.70±1.07 ^a	420.70±14.26 ^d	42.03±1.01 ^a
40% Ethanol	39.76±0.47 ^a	9.40±0.70 ^a	354.95±02.96 ^a	52.08±1.30 ^b
60% Ethanol	48.30±0.57 ^b	21.59±3.76 ^c	370.33±02.40 ^e	53.10±1.69 ^c
80% Ethanol	48.02±0.10 ^b	>100 ^d	366.88±02.56 ^b	61.29±0.82 ^d
99.5% Ethanol	88.64±0.60 ^c	>100 ^d	538.70±38.14 ^e	134.74±6.38 ^e

¹⁾ RC₅₀: means is the concentration of extract required for scavenging radical by 50%.

²⁾ Values are means of triplicate determination±standard deviation. Within each column, different letters (a-e) are significantly different at $p<0.05$ (Tukey).

Table 3. Values of TEAC, FRAP and ORAC of various solvent extracts from *Artemisia annua* L.

Extract	TEAC ¹⁾ mM TE/g	FRAP ²⁾ mM FE/g	ORAC ³⁾ mM TE/g
Distilled water	394.27±9.26 ^{c4)}	765.81±3.32 ^d	2,994.85±674.85 ^c
20% Ethanol	590.76±8.93 ^a	1,367.50±18.32 ^c	6,502.67±315.65 ^{bc}
40% Ethanol	584.04±8.72 ^a	1,421.05±15.33 ^b	6,621.74±22.59 ^b
60% Ethanol	581.67±10.86 ^a	1,540.94±11.60 ^a	7,235.39±4.54 ^a
80% Ethanol	498.69±14.67 ^b	1,344.67±21.18 ^c	6,411.64±168.87 ^{bc}
99.5% Ethanol	277.00±9.59 ^d	779.45±7.61 ^d	3,965.72±253.03 ^d

¹⁾ TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity values are expressed as mM trolox/g of extract.

²⁾ FRAP: ferric reducing antioxidant power values are expressed as mM FeSO₄/g of extract.

³⁾ ORAC: oxygen radical absorbance capacity values are expressed as mM trolox/g of extract.

⁴⁾ Values are means of triplicate determination±standard deviation. Within each column, different letters (a-e) are significantly different at $p<0.05$ (Tukey).

Table 4. Flavonoid composition of various solvent extracts from *Artemisia annua* L.

Standard	Extract					
	Distilled water	20% Ethanol	40% Ethanol	60% Ethanol	80% Ethanol	99.5% Ethanol
Rutin	0.783 ¹⁾	1.117	5.452	7.882	0.079	0.113
Taxifolin	0.108	0.142	1.275	3.22	0.011	0.015
Narirutin	1.551	3.427	2.395	1.869	0.157	0.361
Hesperidin	5.235	13.125	15.514	6.824	0.527	1.387
Neohesperidin	0.163	0.717	N.D ²⁾	N.D	0.017	0.075
Myricetin	0.331	0.936	7.335	11.972	0.035	0.098
Quercetin	0.006	0.027	0.105	0.162	0.001	0.002
Luteolin	N.D	0.094	N.D	N.D	N.D	0.012
Naringenin	N.D	0.039	0.789	0.381	N.D	0.004
Kaempferol	N.D	N.D	N.D	0.202	N.D	N.D
Isorhamnetin	N.D	0.108	1.247	0.579	N.D	0.009
Nobiletin	1.214	4.619	6.551	17.552	0.121	0.499
Tangeretin	N.D	0.184	0.351	0.035	N.D	0.022

¹⁾ Values are means of triplicate determination.

²⁾ N.D: not detected.

보고에 따르면 DPPH 항산화 실험에서 DPPH 분자와의 반응은 저분자 페놀성 화합물이 더 유리하게 작용하였다. 따라서 총 phenol과 flavonoid에서 차이가 크지 않은 60-80% 에탄올 추출물의 라디칼 소거능 실험결과는 반응에 영향을 주는 저분자 페놀성 화합물의 추출 차이로 생각된다. 그러므로 개똥쑥 잎의 추출에서 60% 이상의 에탄올 용매 사용은 저분자 phenol을 추출하는데 불리할 것으로 판단된다.

총 항산화력

추출물의 항산화 활성을 표준물질로 계산하여 산출된 값은

Table 3과 같다. TEAC 값의 경우 277.00-590.76 mM TE/g의 범위로 측정되었고 20-60% 에탄올로 추출하였을 때 유의적으로 높은 값이 확인되었다. FRAP의 경우 60% 에탄올 추출물에서 1540.94±11.60 mM FE/g으로 가장 높은 FRAP값을 보였다. ORAC 결과는 60% 에탄올 추출물(7235.39±4.54 mM TE/g)이 가장 높았으며 FRAP의 결과와 비슷한 경향이었다. 총 항산화력의 결과를 종합하였을 때 공통적으로 60% 에탄올로 추출하였을 경우 높은 값이 측정되었다. Turkmen 등(2006)은 용매의 농도가 추출에 영향을 준다고 보고하였다. 이에 따라 개똥쑥 추출물에도 항산화 효과에 주요한 요인으로 작용하는 총 phenol 및 총 flavonoid 함

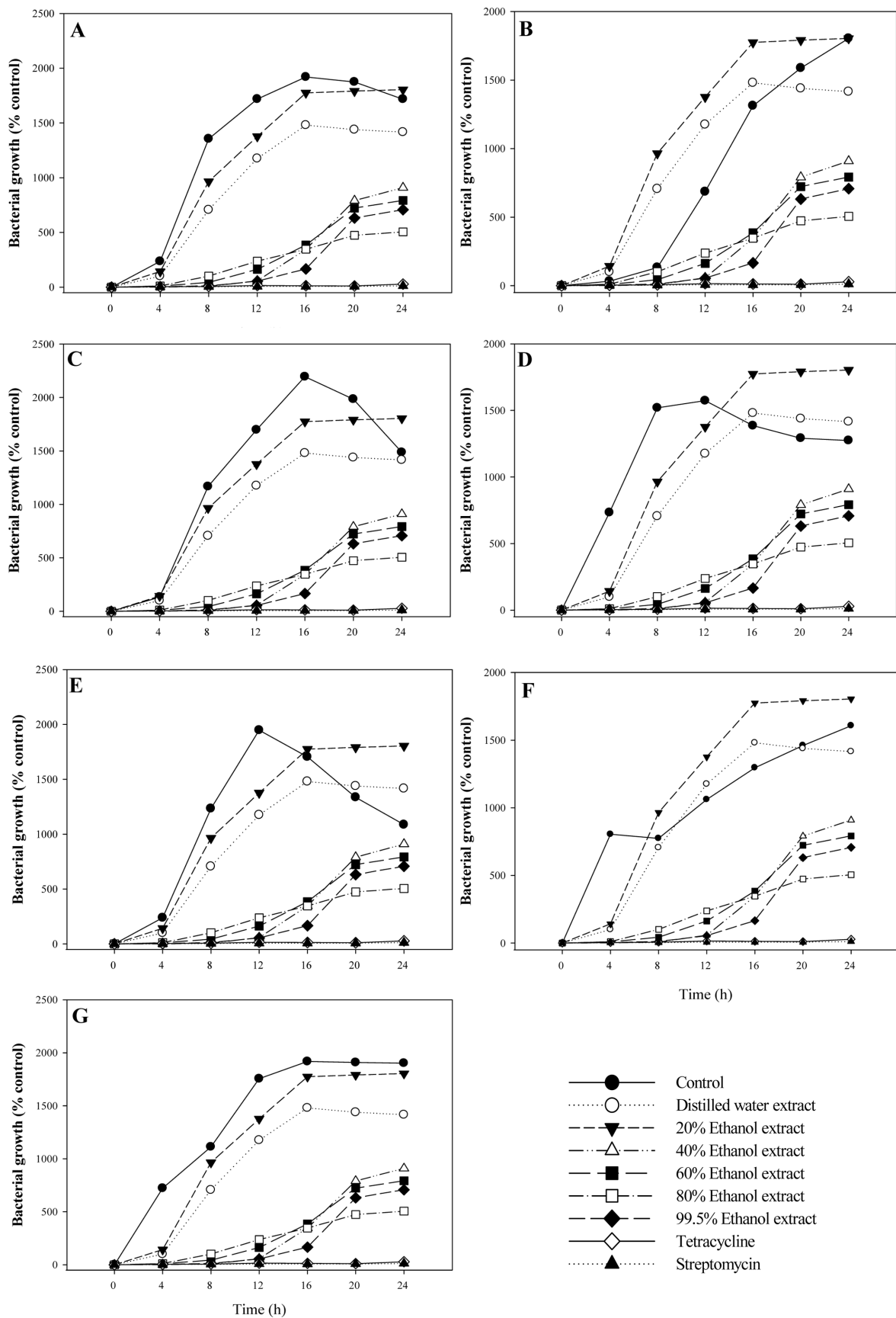


Fig. 1. Bacterial growth inhibition activities of various solvent extracts from *Artemisia annua* L. The growth curve (A) *Bacillus cereus*, (B) *Micrococcus luteus*, (C) *Staphylococcus epidemidis*, (D) *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, (E) *Pseudomonas aeruginosa*, (F) *Escherichia coli* and (G) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. The values are indicated as means of three independent experiments.

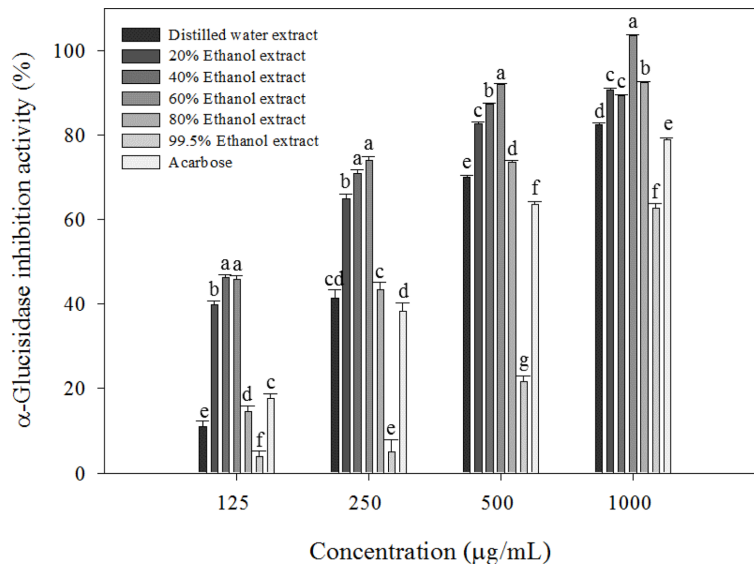


Fig. 2. α-Glucosidase inhibition activities of various solvent extracts from *Artemisia annua* L. with acarbose as positive control. The values are indicated as means±standard deviation of three independent experiments. Means with different letters (a-f) are significantly different ($p < 0.05$).

량에도 영향을 미쳤으며 물과 에탄올로 추출한 경우보다 물-에탄올 혼합 용매에서 높은 항산화력이 확인되었다. 하지만 총 항산화력 실험별로 유의적 경향은 다르게 나타났다. 이는 실험 종류에 따라 측정할 수 있는 항산화 기작과 범위가 달라서 나타난 것으로 생각된다. 또한 Kang 등(2010)이 보고한 화합물의 분자 구조 차이로 항산화 활성에 영향을 준다는 결과처럼 개똥쑥에서 용매 농도에 따라 추출된 성분의 차이로 기인한 것으로 보인다.

Flavonoid 정량

13종의 flavonoid 조성을 HPLC를 이용하여 분석한 결과는 Table 4와 같다. 개똥쑥 잎에서 검출된 주요 flavonoid는 rutin, hesperidin, myricetin, nobiletin이었다. Rutin의 함량은 40, 60% 에탄올 추출물에서 높았으며 hesperidin은 20, 40% 에탄올 추출물에서 높은 함량을 보였다. Myricetin과 nobiletin의 경우 60% 에탄올이 다른 추출물에 비해 함량이 높았다.

미생물 저해활성

추출물 처리에 따른 균주 생장에 미치는 효과는 Fig. 1과 같다. 그람 양성균 4종과 그람 음성균 3종의 24시간 생육기간 동안 모든 균주에서 물 추출물과 20% 에탄올 추출물의 미생물 성장 억제에 대한 효과가 확인되지 않아 무처리구와 비슷한 성장곡선을 보였다. 반면 40% 에탄올 이상의 용매로 추출한 경우 약 12시간까지 성장 억제 효과가 나타났다. 그 이후에는 효과가 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 항균제로 사용되는 tetracycline과 streptomycin은 24시간까지 미생물 저해활성이 유지되었다. Hayouni 등(2007)은 디스크 확산 분석법으로 항균 활성을 측정하였고 극성이 높은 용매로 추출한 경우 더 높은 저해활성이 나타났으며 총 phenol 함량과 관련성이 있다고 보고하였다. 그러나 개똥쑥 잎의 항균 활성은 총 phenol 함량과 유사한 경향을 보이지 않았다. Majorie(1999)의 보고에서 식물의 항균활성에 미치는 화합물 종류는 polyphenols과 더불어 quinones, flavonoids, tannins, coumarins, terpenoids 및 alkaloids 등 다양한 화합물이 존재한다고 하였다. 그 중 Juteau 등(2002)의 보고에서 개똥쑥에 들어있는 오일 성분이 항균활성을 나타내었으며, 총 phenol 함량 이외에도 항균

활성에 요인으로 작용하는 다양한 성분이 개똥쑥 잎에 존재할 수 있음을 시사한다. 본 실험에서는 에탄올에 높은 효율로 추출되는 항균 화합물의 함량 차이에 의한 것으로 판단된다.

효소 저해활성

추출물에 대한 α-glucosidase 저해활성은 125-1000 µg/mL 농도에서 비교 분석하였다(Fig. 2). 모든 추출물이 농도 의존적으로 활성이 증가하였지만 20-60% 에탄올 추출물이 상대적으로 더 높은 활성을 보였고 혈당강하제로 사용되는 acarbose보다 α-glucosidase를 효과적으로 저해하였다. Sharma 등(2008)은 α-glucosidase 저해능과 같은 항당뇨 활성은 phenol 및 flavonoid 구조적 특징으로 달라질 수 있다고 하였다. 이는 함유되어 있는 성분의 함량에 따라 추출물의 활성에도 영향이 나타날 수 있다고 판단된다. Wang 등(2010)이 구아바 잎에서 분리한 각 flavonoid 성분별 α-glucosidase 억제활성을 측정 한 결과 myricetin>quercetin>kampferol>guaijaverin>avicularin>hyperin>apigenin 순으로 명백히 높은 활성이 나타났다. 개똥쑥 잎의 flavonoid 분석 결과 60% 에탄올 추출물은 myricetin, quercetin 및 kampferol의 함량이 다른 추출물보다 높았고 각 성분의 활성으로 나타난 결과로 판단된다.

Elastase에 대한 추출물 효과는 1 mg/mL 농도에서 비교 분석하였다(Fig. 3A). 추출물에서는 40, 60% 에탄올 추출물이 40% 이상의 높은 활성을 보였지만 대조구로 사용된 ursolic acid (200 µg/mL) 보다는 낮은 수준으로 확인되었다.

Tyrosinase에 대한 추출물 효과는 1 mg/mL 농도에서 비교 분석하였다(Fig. 3B). 추출에 사용된 용매의 에탄올 농도가 높을수록 활성이 상승하였고 99.5% 에탄올 추출물은 약 50% 저해하였다. 대조구로 사용된 arbutin (250 µg/mL)보다는 다소 낮은 활성이었다. 개똥쑥 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 Ryu 등(2011)의 보고에서 에탄올과 물로 각각 추출하였을 때 에탄올 추출물이 유의적으로 저해활성이 높다는 결과와 일치하였다. 이는 쑥의 핵산과 클로로포름 분획물에서 높은 tyrosinase 저해능을 보인다는 결과(Kwak 등, 2001)를 바탕으로 물과 비교하여 비극성 성분의 용출이 쉬운 에탄올로 추출하여 나타난 결과로 판단된다.

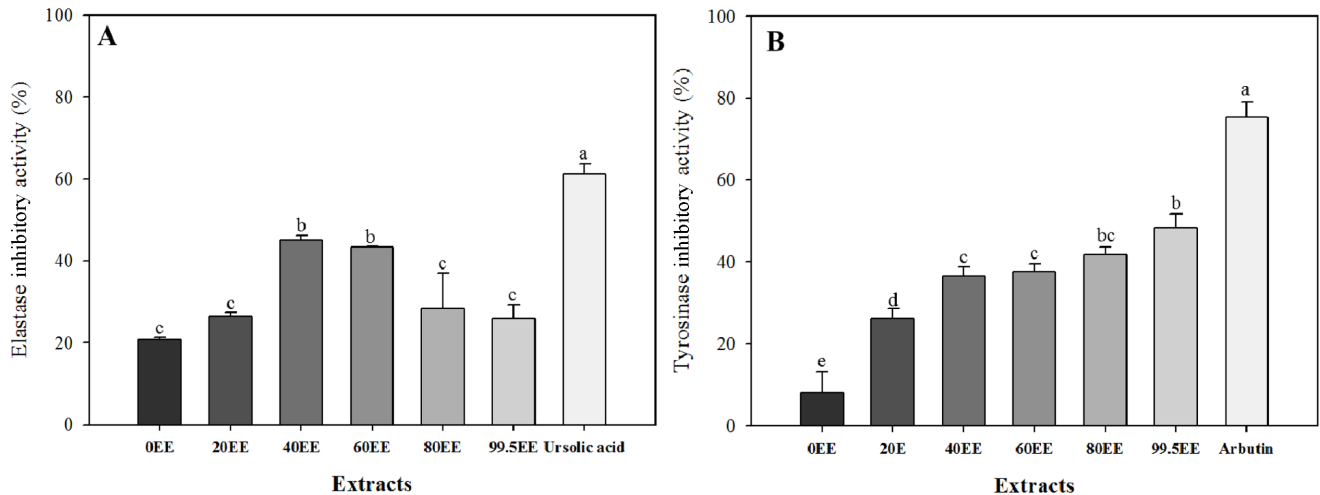


Fig. 3. Inhibitory effect of elastase (A) and tyrosinase (B) activity of various solvent extracts from *Artemisia annua* L. at 1 mg/mL. As a positive control, the concentrations of ursolic acid and arbutin are 200 μ g/mL and 250 μ g/mL, respectively. The values are indicated as means \pm standard deviation of three independent experiments. Means with different letters (a-e) are significantly different ($p < 0.05$). 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.

요 약

본 연구는 물과 다양한 에탄올 농도로 추출한 개똥쭉 잎 추출물의 페놀성 성분과 다양한 생리활성을 비교하여 효과적인 용매 조건을 조사하기 위해 수행하였다. 총 phenol과 flavonoid 함량에서 40% 에탄올로 추출하였을 때 효율이 극대화되는 효과가 확인되었다. 이후 에탄올의 농도를 높여도 총 phenol 및 flavonoid 함량에 대한 긍정적 효과는 기대할 수 없었다. 인위적으로 생성시킨 DPPH, superoxide, nitric oxide 및 hydroxyl 라디칼 소거능 실험 결과는 20, 40% 에탄올 추출물에서 높은 소거 활성이 나타났다. 반면 TEAC, FRAP 및 ORAC 분석을 통해 얻어진 총 항산화력은 60% 에탄올 추출물이 가장 높은 값을 보였다. 개똥쭉 잎 추출물의 항균활성은 물과 20% 에탄올 추출물에서는 생장저해효과가 없었지만, 40%에서 99.5% 에탄올 추출물은 활성이 관찰되었다. 효소 저해 활성의 경우 항당뇨와 관련이 있는 α -glucosidase 실험에서 99.5% 에탄올 추출물을 제외한 나머지 추출물은 양성대조구로 사용된 acarbose보다 비슷하거나 높은 저해능을 가진 것으로 확인되었다. 특히 60% 에탄올이 가장 높은 활성을 보였다. Elastase 실험은 40%와 60% 에탄올에서 높은 활성을 보였고 tyrosinase는 용매로 사용된 에탄올 농도 의존적으로 저해능이 증가하는 경향이 있었다. 각 추출물에 대한 flavonoid 함량을 HPLC로 분석하였을 때 주요 flavonoid는 rutin, hesperidin, myricetin, nobiletin이었다. 또한 추출 용매에 따라 구성하고 있는 flavonoid의 성분이 달랐다. 결과를 종합하여 볼 때 개똥쭉 잎의 페놀성 성분은 극성-비극성의 넓은 범위를 가지며 중간 극성의 페놀성 물질의 함량이 높을 것으로 보인다. 그리고 개똥쭉 추출물의 생리활성은 강력한 활성을 가진 특정 flavonoid에 의해 나타났다. 이러한 연구 결과를 토대로 개똥쭉의 flavonoid 성분 추출 시 사용되는 용매 농도 설정에서 기초 자료로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

References

Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell JV,

- Gombau L. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. In Vitro*. 27: 954-963 (2013)
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 239: 70-76 (1996)
- Bhakuni RS, Jain DC, Sharma RP, Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Curr. Sci*. 80: 35-48 (2001)
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*. 74: 2157-2184 (2004)
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem*. 12: 239-243 (1912)
- Goli AH, Barzegar M, Sahari MA. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem*. 92: 521-525 (2005)
- Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem*. 105: 1126-1134 (2007)
- Juteau F, Masotti V, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia* 73: 532-535 (2002)
- Kang J, Li Z, Wu T, Jensen GS, Schauss AG, Wu X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chem*. 122: 610-617 (2010)
- Kim KC, Kim JS. Physiological activity of the extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea by different ethanol concentrations. *J. Plant Biotechnol*. 46: 37-44 (2019)
- Ko HM, Eom TK, Kim KC, Yoo JH, Lim JD, Yoo CY, Kim JS. Biological activity investigation of supercritical fluid extract of fermented mountain ginseng adventitious root. *J. Adv. Eng. and Tech*. 11: 115-121 (2018)
- Kwak JH, Seo UK, Han YH. Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*. 16: 220-223 (2001)
- Lee SD. Bioactive constituents and utilities of *Artemisia* sp. as medicinal herb and foodstuff. *Korean J. Food Nutr*. 13: 490-505 (2000)
- Lodari C, Hattori K, Futsuhara Y. Morphological difference on leaf surface and pollen grains in genus *Artemisia*. *Jpn. J. Breed*. 39: 9-12 (1989)

- Majorie MC. Plant products as antimicrobial agents. *Cli. Microbiol. Rev.* 12: 564-582 (1999)
- Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 849-854 (1972)
- Paixao N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* 105: 204-214 (2007)
- Patel R, Patel N. *In vitro* antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* 1: 52-68 (2011)
- Prior RL, Hoang HA, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. 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: 3273-3279 (2003)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Romero MR, Serrano MA, Vallejo M, Efferth T, Alvarez M, Marin JJ. Antiviral effect of artemisinin from *Artemisia annua* against a model member of the Flaviviridae family, the bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Planta Med.* 72: 1169-1174 (2006)
- Ryu JH, Kim RJ, Lee SJ, Kim IS, Lee HJ, Sung NJ. Nutritional properties and biological activities of *Artemisia annua* L. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 163-170 (2011)
- Sharma B, Balomajumder C, Roy P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 46: 2376-2383 (2008)
- Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* 17: 17 (2011)
- Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem.* 99: 835-841 (2006)
- Wang H, Du YJ, Song HC. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chem.* 123: 6-13 (2010)
- Xie D, Wang L, Ye H, Li G. Isolation and production of artemisinin and stigmaterol in hairy root cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 63: 161-166 (2000).
- Yang Y, Zhang F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrason. Sonochem.* 15: 308-313 (2008)
- Zhang M, Chen H, Li J, Pei Y, Liang, Y. Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 181-185 (2010)
- Zhang ZS, Li D, Wang LJ, Ozkan N, Chen XD, Mao ZH, Yang HZ. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Sep. Purif. Technol.* 57: 17-24 (2007)
- Zheng GQ. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 60: 54-57 (1994)