KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 53, No. 4, pp. 416~422 (2021)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2021.53.4.416

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

주정 농도별 감국 추출물의 항산화 및 항염증 활성

강 현[1] · 박찬휘[1] · 권상오[2] · 이성규[1,*]
[1]단국대학교 임상병리학과, [2](주)에스앤디 기업부설연구소

Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts at different ethanol ratios

Hyun Kang[1], Chan-Hwi Park[1], Sang-Oh Kwon[2], and Sung-Gyu Lee[1,*]
[1]*Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University*
[2]*R&D Center, S&D Co., Ltd.*

Abstract In the present study, antioxidant and anti-inflammatory activities were measured in *Chrysanthemum indicum* Linne extracted with different ethanol concentrations. The 50% ethanol extract demonstrated the highest yield of 33.6%, while the 30% and 70% ethanol extracts showed the highest total polyphenol contents of 59.70 and 61.35 mg GAE/g, respectively. The antioxidant activity of 70% ethanol extract was highest in the DPPH radical scavenging activity (RC_{50} 14.95 μg/mL) and $ABTS^+$ radical scavenging activity (RC_{50} 42.28 μg/mL). FRAP activity was significantly higher in the 30% ethanol extract than the other extracts. The anti-inflammatory effects of *Chrysanthemum indicum* Linne extracted with different ethanol concentrations were examined using nitric oxide (NO) inhibition assays. In LPS-induced RAW 264.7 cells, the 30% ethanol extract showed the highest inhibition of NO production with 11.16 μM at a concentration of 200 μg/mL. The results of this study suggest that *Chrysanthemum indicum* extracted 30% or 70% ethanol concentrations as potential functional raw material.

Keywords: *Chrysanthemum indicum* Linne, extraction condition, antioxidant, anti-inflammatory, radical scavenging activity

서 론

현대사회에서는 과도한 스트레스, 불균형한 식사, 흡연, 과음, 피로 등으로 인간의 수명과 삶을 위협하는 만성질환들이 증대되고 있고, 이를 예방하고 치료할 수 있는 천연소재를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 주요 만성질환들의 유발 기전은 산화적 스트레스와 만성 염증과 관련이 깊다(Lodovici 등, 2001). 지속적으로 과도하게 산화적 스트레스가 상승하면 그 부산물로 인하여 hydrogen peroxide, superoxide radical, peroxyl radical, hydroxyl radical 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생되는데(Valko 등, 2007), 활성산소종의 과생성은 정상세포의 손상을 초래할 뿐 아니라 손상된 세포로 인하여 염증반응이 발생되고 염증반응이 지속되면 전신적 만성 염증을 유도함으로써 노화, 암, 치매, 심혈관계 및 퇴행성 질환들을 초래하는 것으로 알려져 있다(Halliwell, 1996).

염증반응은 광범위한 외부 자극에 대하여 신체가 손상될 때 그 부위를 재생하려는 기전이지만(Lee, 2009), 그 정도가 장기화되면 암과 같은 여러 가지 질환을 유발하게 된다(Willoughby, 1971). 염증상태에서는 대식세포가 활성화되어 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현이 촉진되고 이로 인하여 과도하게 nitric oxide (NO)가 분비되면 만성염증으로 발전하게 된다(Monacada 등, 1991). 따라서, 염증반응을 조절하여 만성염증으로의 발전을 억제 및 예방하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

감국(*Chrysanthemum incidicum* Linne)은 관속식물의 국화과(Compositae) 국화속(*Chrysanthenum*)에 속하는 국내에 자생하는 다년생 초본식물로 9-10월에 노란 꽃이 피며 꽃 부분에 감미(甘味)가 있어 감국(甘菊)이라 일컬어지고 있다(Park과 Lee, 2000; Yoon과 Cho, 2007). 감국은 국화차나 국화주의 형태로 주로 소비되고 있고(Shin 등, 2004) 약용으로는 별다른 가공 제품이나 산업화에 의한 제품이 없어서 감국의 제품화를 위한 다양한 개발과 연구가 필요한 실정이다. 한의학에서 감국은 소염, 혈압강하, 두통 해소, 해열 등을 목적으로 이용되고 있으며(Hong, 2002; Jang 등, 1999) 여러 연구들을 통해 항암(Li 등, 2009), 항균(Shunying 등, 2005), 면역강화(Ren 등, 1999), 항염(Cheon 등, 2009), 항산화(Yoshikawa 등, 2002) 활성 등이 있음이 보고되고 있다. 감국에 존재하는 주요 성분으로는 플라보노이드 화합물 계통이 다량 함유되어 있으며 대표적으로 apigenin, luteolin, acacetin 및 그 외 flavonoid 배당체들이 주로 함유되어 있고(Ryu 등, 1994), 그 중 luteolin의 경우 항암(Heinrich 등, 1988) 및 항염(Cheon 등, 2009) 활성에 대한 효능이 보고되었다. 현재까지의 감국에 대한 연구들은 주로 단일용매 추출물이나 분획물에 관한 연구들이 대부분이며, 용매 농도별로 추출한 감국 관련 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 감국을 주정 농도별(0, 10, 30, 50, 70% 주정) 추출물을 제조한 후 항산화 활성 및 항염증 활성을 측정

*Corresponding author: Sung-Gyu Lee, Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University, Cheonan, Chungnam, 31116, Republic of Korea
Tel: +82-41-550-1465
Fax: +82-41-559-7934
E-mail: sung-gyu@dankook.ac.kr
Received April 19, 2021; revised June 9, 2021; accepted June 17, 2021

하여 최적 추출조건을 확인함과 동시에 천연 기능성 신소재로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료 제조

본 연구에서 사용된 감국추출물은 ㈜보국약품(원산지: 경북 의성)에서 구매한 감국의 꽃 부위를 ㈜에스앤디(Osong, Korea)에서 제조하여 시료로 사용하였다. 항산화 활성 및 항염증 활성에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

감국 분말 100 g에 농도별(0, 10, 30, 50, 70%) 주정을 원료 대비 20배수를 첨가하여 50°C, 6시간 교반 1차 추출하여 여과한 후, 10배수를 첨가하여 50°C, 6시간 2차 교반 추출을 진행하였다. 모든 추출액은 여과(Whatman No. 1, Whatman Ltd., Maidstone, Kent, UK)한 후 55°C에서 감압농축(Rotavapor R-100, Buchi, Flawil, Switzerland) 하였다. 농축한 추출물은 진공건조(vacuum drying oven, Vision, Daejeon, Korea)한 후 분말화하여 –70°C 초저온 냉동고(DF9010, Ilshin Bio base Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에 보관하면서 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin과 Denis, 1912)을 응용하여 1 mg/mL 각 시료용액 1 mL와 2배 희석한 Folin-Ciocalteau's phenol reagent (Sigma Co.) 1 mL를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 여기에 10% Na_2CO_3 (Sigma Co.) 용액 1 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 700 nm (UVIKON 922, Kontran Co., Milan, Italy)에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid (Sigma Co.)를 이용하여 농도별 표준곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(2000)의 방법을 변형하여 시 0.1 mL와 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate (Sigma Co.)와 1 M potassium acetate (Sigma Co.) 0.1 mL 그리고 80% 에탄올 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin (Sigma Co.)을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거능

시료용액의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois (1958)의 방법에 따라 시료용액 800 μL에 0.15 mM DPPH 용액 200 μL를 가하여 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 절반으로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50}과 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용해 표준곡선을 구한 후, Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) mg/g로 환산하여 나타내었다.

$ABTS^+$ 라디칼 소거능

시료 용액의 ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate (Sigma Co.)를 최종농도로 혼합(v/v)하여 실온의 어두운 곳에 24시간 동안 방치하였다. 그 후 증류수를 가하여 732 nm에서의 흡광도 값이 0.70 (±0.02)이 되도록 희석한 후 990 μL를 취하여 시료용액 10 μL를 가하고 실온에서 1분간 방치한 다음 732 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 RC_{50}과 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용해 표준곡선을 구한 후, VCEAC mg/g로 환산하여 나타내었다.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

FRAP은 Benzie와 Strain의 방법(1996)을 응용하여 측정하였다. FRAP reagent는 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6)와 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 용액, 20 mM $FeCl_3$ 용액을 제조하여 10:1:1의 비율로 실험 직전에 혼합하여 사용하였다. 농도별 감국시료 10 μL와 FRAP 시약 200 μL를 혼합하여 섞고, 37°C에서 5분간 반응시킨 후 Miroplate Spectrophotometer (xMark™, BIO-RAD, Hercules, UA, USA) 장비를 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 FRAP 수치는 0-5 mM $FeSO_4.H_2O$로 작성한 표준 검량 곡선에 흡광도 수치를 적용하여 구하였으며, 결과는 $FeSO_4$ eq mM/mg으로 나타내었다.

세포 배양

마우스 유래 RAW 264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, 배양은 DMEM (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)배지에 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL)를 첨가하고, 100 μg/mL penicillin (Gibco-BRL) 그리고 100 μg/mL streptomycin (Gibco-BRL)을 첨가한 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO_2 조건에서 2-3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

세포독성

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well 농도로 분주하여, 24시간 배양 후 배지를 제거하고, lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/mL)가 첨가된 DMEM 배지 200 μL에 녹인 각 시료를 최종 농도 0, 25, 50, 100 그리고 200 μg/mL가 되도록 well에 첨가하여 5% CO_2가 존재하는 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 MTT 용액(5.0 mg/mL)을 첨가하고 동 배양조건에서 4시간 더 배양한 후 상등액을 제거하고 각 well 당 DMSO 100 μL를 가하여 10분간 교반한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 측정

LPS에 의해 생성된 NO함량은 Green 등(1982)의 방법을 응용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well 농도로 96 well plate에 분주하여, 24시간 배양 후 배지를 제거하고, LPS (100 ng/mL, Sigma Co.)가 첨가된 배지에 각 시료를 최종 농도 0, 25, 50, 100 그리고 200 μg/mL가 되도록 well에 첨가하여 5% CO_2가 존재하는 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액과 Griess시약(Sigma Co.)을 동량 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선은 sodium nitrate (Sigma Co.)로 작성하여 NO의 함량을 산출하였다.

Western blot

iNOS 단백질 발현을 측정하기 위해 western blotting을 실시하였다. RAW 264.7 세포를 6 well plate에 5×10^5 cells/mL로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 제거 후 LPS를 100 ng/mL 농도로 처리한 배지에 시료를 100 μg/mL 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 세척해준 뒤, lysis buffer를 첨가하여 30분간 4°C에서 방치 후 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 후 상등액의 단백질을 회수하였다. 단백질을 8%의

sodium dedecyl sulfate polyacrylamide fel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전기영동 후, nitrocellulose membrane에 단백질을 transfer 시켰다. Membrane을 실온에서 1시간 동안 5% skim milk 용액에서 blocking 시킨 후 1차 항체를 4°C에서 overnight 하였다. 다음 날 Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST)로 세척 후, 2차 항체를 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 TBST로 세척한 뒤, ECL kit를 이용하여 반응시키고 X-ray film에서 단백질 band를 현상하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균과 표준편차로 표기했고 통계 프로그램 SPSS statistics (ver. 25, IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 유의성 검증을 위하여 ANOVA를 실시하였다. 평균값의 통계적 유의성은 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

주정 농도별 추출 수율, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

감국 추출물의 주정 농도에 따른 추출 수율은 Table 1에서와 같이 주정 농도 0-70%에 따라 각각 23.5, 26.1, 26.7, 33.6, 27.4%로 주정 농도가 50%일 때 가장 높았으며, 주정을 첨가하지 않았을 때 가장 낮은 수율을 보였다. 이는 Nakamura 등(2019)의 보고와 같이 당유자 잎을 에탄올 농도별로 추출한 수율이 물 추출물보다 높은 수율을 나타낸 결과와 유사하게 비교적 에탄올과 물의 혼합 추출에서 높은 추출 수율이 확인되었다. 용매를 사용한 추출은 원료의 생리활성 물질을 얻는데 주로 사용되는 추출 방법으로 원료의 종류, 추출용매의 극성, 추출온도 및 시간에 따라 다르며 동일 조건에서 추출물의 수율은 용매와 밀접하게 관계가 있어 효율적인 추출을 위해서는 추출용매의 선정이 중요하다(Fatiha 등, 2012).

식물 유래 페놀 화합물은 산화 환원 특성을 가지고 있어 항산화 물질로 작용한다(Soobrattee 등, 2005). 폴리페놀 화합물의 자유 라디칼 소거 능력이 hydroxyl group에 의해 촉진되기 때문에, 총 폴리페놀 화합물의 함량은 항산화 활성의 스크리닝을 위한 기초로 사용될 수 있다. 또한 플라보노이드류는 식물의 2차 대사산물이며, 플라보노이드의 항산화 활성은 유리 OH group, 특히 3-OH의 존재에 따라 달라진다. 식물 유래 플라보노이드는 *in vitro* 및 *in vivo* 시험에서 항산화 효능이 있음이 보고되고 있다(Geetha 등, 2003). 주정농도별 감국 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 1에 제시하였다.

주정 농도별 감국 추출물의 폴리페놀 함량은 36.80-61.35 mg GAE/g으로 측정되었다. 30%와 70% 주정 추출물이 각각 59.70, 61.35 mg GAE/g으로 높은 함량을 보였으며 0%의 추출용매에서는 36.80 mg GAE/g으로 가장 낮은 함량을 보였다. Nam 등(2015)의 연구에서는 산사나무를 이용하여 물과 에탄올을 혼합한 용매에서 침투 용이성이 증가하여 단독 용매보다 폴리페놀의 용해도가 증가한다는 보고와 같이 본 연구에서도 0%의 추출용매 보다 30%와 70% 농도의 주정을 사용하였을 때 높은 폴리페놀 함량을 보였다. 또한 Cho (2014)의 연구에서 70% 주정 감국 추출물의 폴리페놀 함량이 7.51 mg/g을 나타낸 것과 비교했을 때, 본 연구의 70% 주정 추출물에서 폴리페놀 함량이 더 높다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 감국의 재배지역 및 추출방법에 따라 성분 및 효능에 차이가 있는 것으로 사료된다.

주정 농도별 감국 추출물의 플라보노이드 함량은 20.27-57.94 mg QE/g으로 측정되었다. 30% 주정 추출물에서 57.94 mg QE/g으로 가장 높았으며, 폴리페놀 함량과 유사하게 0% 주정 추출물에서 20.27 mg QE/g으로 가장 낮은 함량을 보였다. 플라보노이드는 화학구조에 따라 용매에 따른 용해도에 차이가 있다고 보고되었으며(Middleton과 Kandaswami, 1992), 본 연구에 사용된 감국의 경우 30% 주정을 사용하였을 때, 가장 높은 플라보노이드 용해도를 가지는 것으로 확인되었다.

주정 농도별 감국 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

라디칼 소거 활성은 암을 포함한 다양한 질병에서 활성 산소의 유해한 역할을 예방하는데 매우 중요하다. DPPH 라디칼 소거는 식물유래 추출물의 항산화 활성을 스크리닝 하는데 주로 활용되는 분석이며, 보라색의 DPPH 용액에 여러 농도의 항산화 추출물을 첨가하여 diphenylpicryl hydrazine으로 환원되는 원리를 이용한 실험이다. 이 방법은 분석에 필요한 시간이 상대적으로 짧기 때문에 항산화 활성을 시험하는 데에 광범위하게 사용되고 있다(Blois, 1958).

주정 농도별 감국 추출물과 양성대조군인 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 RC_{50}값으로 산출한 결과와 VCEAC mg/g로 환산한 결과는 Table 2에 나타내었다. 70% 주정 추출물에서 RC_{50}값은 14.95 μg/mL로 가장 높은 활성을 나타냈고, 30% 주정 추출물(21.60 μg/mL)이 다음으로 나타났으며, 10, 50% 주정 추출물은 각각 27.56, 27.84 μg/mL로 유사한 소거활성을 보였다. 반면, 0% 주정 추출물의 경우 폴리페놀과 플라보노이드 함량 결과와 유사하게 가장 낮은 활성을 나타냈다. 이는 Huang 등(2005)의 연구에서 폴리페놀 함량과 라디칼 소거 활성은 높은 상관관계가 있다는 보고와 유사하게 70% 주정 추출물에서 다량 추출

Table 1. Extraction yields, total polyphenol, and total flavonoid content of the *Chrysanthemum indicum* obtained according to different ethanol concentrations

Extracts	Yield (%)[1)]	TPC (mg GAE/g)[2)]	TFC (mg QE/g)[3)]
0% EtOH	23.5	36.80±1.08[c4)5)]	20.27±0.57[d]
10% EtOH	26.1	49.37±0.92[b]	40.72±0.10[c]
30% EtOH	26.7	59.70±3.06[a]	57.94±2.64[a]
50% EtOH	33.6	50.23±3.88[b]	39.74±1.41[c]
70% EtOH	27.4	61.35±3.32[a]	48.55±3.32[b]

[1)]Percentage yield from the dried plant material.
[2)]Total polyphenol content analyzed as gallic acid equivalent (GAE) ma/g of extract.
[3)]Total flavonoid content analyzed as quercetin equivalent (QE) ma/g of extract.
[4)]Data are mean±standard deviation (n=3).
[5)]Different superscripts in a column indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2. DPPH radical and ABTS$^+$ radicl scavenging activity of *Chrysanthemum indicum* extracted by different ethanol concentrations

Extracts	Antioxidant activities (RC_{50} [1)], μg/mL)		VCEAC (mg VCE /g)[2)]	
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
0% EtOH	50.38±3.07[a 3,4)]	126.20±7.59[a]	20.84±3.79	40.31±3.55
10% EtOH	27.56±1.33[b]	86.84±1.91[b]	34.77±2.86	62.62±1.9
30% EtOH	21.60±1.37[c]	64.03±0.14[c]	49.01±1.75	92.89±16.83
50% EtOH	27.84±0.42[b]	51.67±4.53[d]	63.67±8.27	82.49±9.49
70% EtOH	14.95±0.71[d]	42.28±1.67[e]	104.64±13.02	98.74±8.22
Ascorbic acid	1.17±0.02[e]	5.34±0.06[f]	-	

[1)]Amount required for 50% reduction of scavenging activity.
[2)]Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) mg/g
[3)]Data are mean±standard deviation (n=3).
[4)]Different superscripts in a column indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Reducing power of *Chrysanthemum indicum* extracted by different ethanol concentrations

Extracts	FRAP value (mM $FeSO_4$E/mg)[1)]			
	62.5 μg/mL	125 μg/mL	250 μg/mL	500 μg/mL
0% EtOH	0.04±0.00[d2)3)]	0.05±0.00[d]	0.08±0.00[e]	0.12±0.00[d]
10% EtOH	0.05±0.00[c]	0.08±0.00[c]	0.12±0.00[d]	0.23±0.00[c]
30% EtOH	0.06±0.00[b]	0.09±0.00[b]	0.16±0.00[b]	0.28±0.00[b]
50% EtOH	0.05±0.00[c]	0.08±0.00[c]	0.13±0.00[c]	0.23±0.00[c]
70% EtOH	0.05±0.00[c]	0.08±0.00[c]	0.13±0.00[c]	0.23±0.00[c]
Ascorbic acid	0.41±0.00[a]	0.81±0.01[a]	1.58±0.01[a]	3.11±0.00[a]

[1)]FRAP value analyzed as $FeSO_4$ equivalent ($FeSO_4$E) mM/mg of extract.
[2)]Data are mean±standard deviation (n=3).
[3)]Different superscripts in a column indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

된 폴리페놀 및 플라보노이드 물질이 DPPH 라디칼 소거능에 높게 기여하고 있을 것으로 사료된다.

주정 농도별 감국 추출물의 ABTS$^+$ 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS와 potassium persulfate의 반응을 통해 청록색의 ABTS$^+$ 라디칼을 생성하는 방법으로 ABTS 라디칼 양이온과 potassium persulfate로 ABTS의 산화에 의해 생성되며, 수소 공여능을 가지는 항산화제를 첨가하게 되면 라디칼이 소거되어 탈색된 색의 흡광도를 측정하는 원리로 실험에 사용된다(Re 등, 1999).

주정 농도별 감국 추출물과 양성대조군인 ascorbic acid의 ABTS$^+$ 라디칼 소거능을 측정하여 RC_{50}값으로 산출한 결과와 VCEAC mg/g로 환산한 결과는 Table 2에 나타내었다. 70% 주정 추출물에서 RC_{50}값은 42.28 μg/mL로 가장 높은 활성을 나타냈고 0%의 추출용매에서는 126.20 μg/mL로 가장 낮은 활성을 보여 DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 경향을 나타내었다. 이는 Hyun 등(Hyun 등, 2019)의 감국 70% 에탄올 추출물의 ABTS$^+$ 라디칼 RC_{50}값이 98.70 μg/mL를 나타낸 결과와 비교해 볼 때 본 연구의 70% 주정 추출물에서 ABTS radical 소거능이 우수한 것을 알 수 있었다.

주정 농도별 감국 추출물의 FRAP 활성

FRAP은 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 항산화제에 의해 착색된 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ)로 환원 정도를 측정하는 방법이다(Benzie와 Strain, 1996). 항산화제의 환원 원리는 수소 원자를 공여함으로써 자유 라디칼의 연쇄 반응을 억제시켜 항산화 활성을 나타낸다(Duh 등, 1999). 주정 농도별 감국 추출물의 FRAP 활성은 Table 3에 나타내었다. 환원력은 추출물의 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 특히 30% 주정 추출물은 모든 농도에서 유의적으로 가장 높은 FRAP 활성을 보였다. 반면 0% 주정 추출물의 경우 모든 농도에서 가장 낮은 FRAP 활성을 보였다. 항산화능 테스트시 실험마다 측정 원리와 반응 메커니즘이 다르고 특정 성분에 대한 반응 정도가 다르기 때문에 항산화 효능을 검정할 때는 여러 가지 방법으로 평가하기를 권고하고 있다(Patthamakanokporn 등, 2008). 이러한 결과를 통해 FRAP 활성에서는 30% 주정 추출물이 70% 주정 추출물에 비해 환원능이 더 우수한 것으로 사료된다.

주정 농도별 감국 추출물의 세포독성

대식세포 염증 반응에 NO와 같은 활성산소종 및 염증성 사이토카인을 생성하여 감염초기 생체방어에 중요한 역할을 담당함으로 항염증 효과를 측정하는 모델로 많이 사용된다(Higuchi 등, 1990). 주정 농도별 감국 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT 방법을 이용하였다. 그 결과, 세포 생존율이 모든 처리군에서 90% 이상으로 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). 이는 감국 추출물이 보여주는 항염 효과가 세포 생존율의 감소가 아닌 감국 자체의 약리활성으로 사료된다.

주정 농도별 감국 추출물의 NO 저해능

NO는 박테리아, 바이러스, 진균 및 기생충과 같은 다양한 병

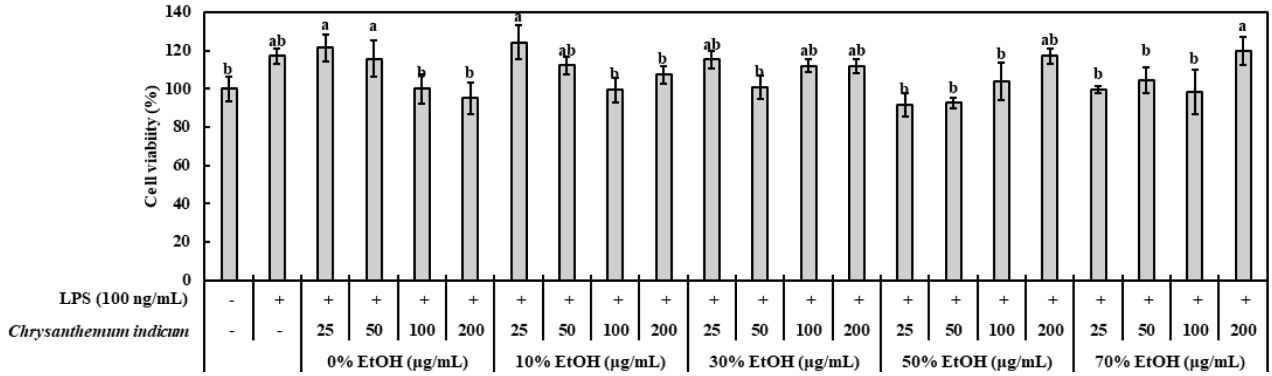

Fig. 1. Effect of *Chrysanthemum indicum* extracted by different ethanol concentrations on RAW 264.7 cells viability. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of extract solutions for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay. Data are mean±standard deviation (n=3). Different superscripts in a column indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

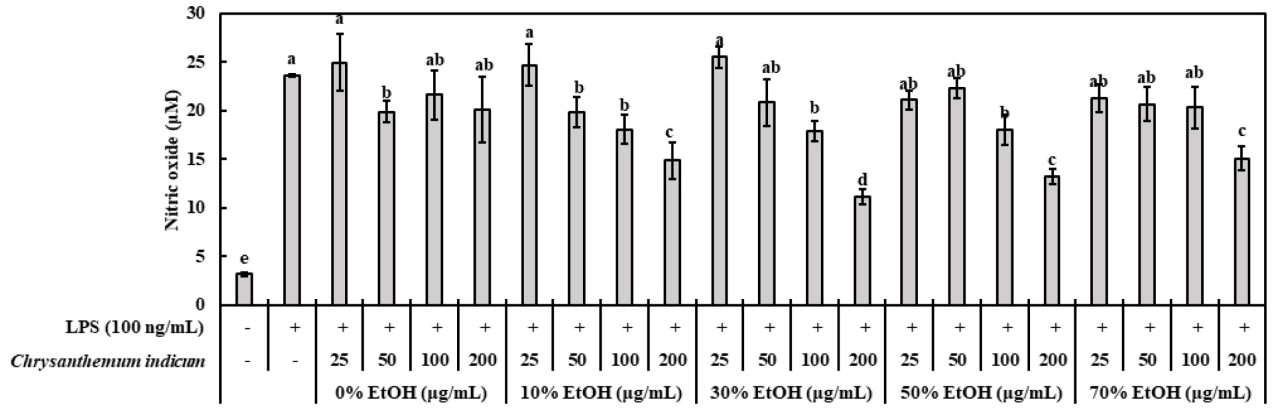

Fig. 2. Effect of *Chrysanthemum indicum* extracted by different ethanol concentrations on LPS-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of each sample and LPS (100 ng/mL) for 24 h. And the NO contents in supernatant was measured using Griess reagent. Data are mean±standard deviation (n=3). Different superscripts in a column indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

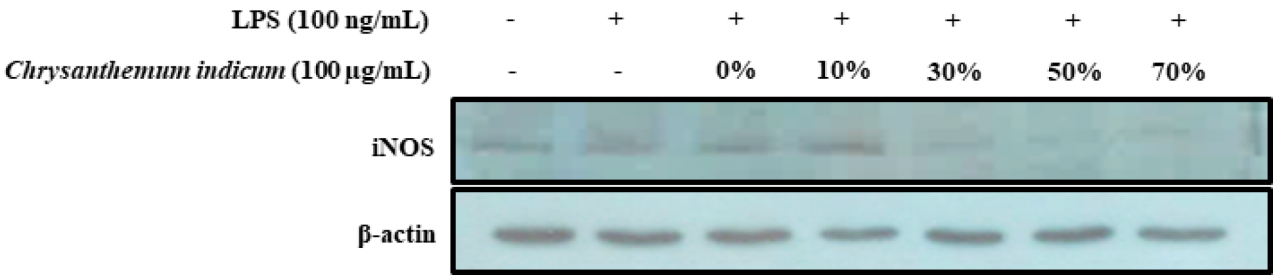

Fig. 3. Effect of *Chrysanthemum indicum* extracted by different ethanol concentrations on LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with each sample and LPS (100 ng/mL) for 24 h. Whole cell lysates were analyzed by western blot analysis using β-actin as a loading control.

원체에 대한 방어 반응을 위한 중요한 분자이다. 정상적인 생리적 조건에서 NO는 신경 전달, 혈관 확장 및 신경독성과 같은 다양한 병태 생리학적 과정의 조절에 중요한 역할을 하지만 NO의 과생산은 급성 및 만성 염증과 관련된 조직 손상을 유발한다(Monacada 등, 1991). 그람음성 박테리아의 세포벽에서 추출되는 성분인 LPS는 대식세포의 강력한 활성제 중 하나이며 전 염증성 사이토카인의 생성을 유도한다. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 NO 생성을 억제하는 것은 다양한 항염증제를 선별할 수 있는 방법 중 하나이다(Moncada 등, 1991).

주정 농도별 감국 추출물의 NO 생성능을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. RAW 264.7 cell에 LPS 무처리군의 경우 3.16 μM의 NO 함량이 나타난 반면, LPS를 처리하였을 때 23.59 μM로 NO의 생성이 과도하게 발생되어 염증이 유도되었음을 확인하였다. LPS처리군과 비교시 감국 추출물을 처리하였을 경우, 모든 추출물 군에서 50 μg/mL 농도에서부터 NO 생성이 감소되는 경향을 보였다. 특히, 30% 주정 추출물의 경우 200 μg/mL 농도에서 11.16 μM로 가장 우수한 NO 생성 억제를 보였다. 감국의 경우 quercetin, luteolin과 같은 플라보노이드 계통의 성분을 다량 함유하고 있고, 이들 성분들은 항염증 효과가 보고된 바 있다(Park과 Song, 2013). 특히 감국 30% 주정 추출물은 다른 추출물

보다 플라보노이드 성분이 많이 추출되어 염증반응에 가장 높은 활성을 주는 것으로 생각된다.

주정 농도별 감국 추출물의 iNOS 단백질 발현 억제 효과

LPS로 염증이 유발된 RAW 264.7 cell 세포에서 주정농도별 감국 추출물에 의한 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과는 western blotting을 통하여 확인하였다. 그 결과, iNOS 발현은 30-70% 감국 추출물을 처리하였을 경우 LPS 처리한 대조군에 비해 단백질 발현양이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). Cho(2014)의 연구에서 70% 주정 감국 추출물이 동일한 농도에서 40% 억제 효과를 보인 것과 비교했을 때, 본 연구의 70% 주정 추출물에서도 iNOS 발현 억제 효과가 높다는 것을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 주정 농도별로 추출된 감국에 대한 항산화 및 항염증 활성을 측정하였다. 추출 수율의 경우 50% 주정 추출물에서 33.6%로 가장 높은 수율을 보였다. 총 폴리페놀 함량의 경우 30%와 70% 주정 추출물이 각각 59.70, 61.35 mg GAE/g으로 다른 추출물에 비해 유의적으로 높은 함량을 보였고, 플라보노이드 함량은 30% 주정 추출물에서 57.94 mg QE/g으로 가장 높은 함량을 보였다. 항산화 활성은 70% 주정 추출물이 DPPH 라디칼 소거능(RC_{50} 14.95 μg/mL), $ABTS^{+}$ 라디칼 소거능(RC_{50} 42.28 μg/mL)에서 가장 활성이 높았다. FRAP 활성은 30% 주정 추출물에서 다른 추출물과 비교해 유의적으로 높은 활성을 보였다. 주정 농도별 추출물의 항염 효과는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증 매개인자인 NO 생성 억제를 측정한 결과, 세포독성 없이 30% 주정 추출물 200 μg/mL 농도에서 11.16 μM로 가장 우수한 NO 생성 억제를 보였다. 또한, iNOS 발현을 측정한 결과 30-70% 주정 추출물이 높은 iNOS 발현 저해 효과를 보였다. 따라서 감국 추출물 제조 시 항산화 효과를 위해서는 30% 주정 및 70% 주정 으로 추출하는 것이 효과적이며 항염 효과를 위해서는 30-70% 주정으로 추출하는 것이 가장 효과적일 것으로 사료된다. 본 연구의 결과는 감국을 기능성 신소재 개발 원료로 활용하는데 기초 자료가 될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성+(R&D), 과제번호 S3005009” 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

Referecnes

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)

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200 (1958)

Cheon MS, Yoon TS, Lee DY, Choi GY, Moon BC, Lee AY, Choo BK, Kim HK. *Chrysanthemum indicum* Linné extract inhibits the inflammatory response by suppressing NF-B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. J. Ethnopharmacol. 122: 473-477 (2009)

Cho YJ. Biological Activity of Extracts from *Chrysanthemum Incidicum* Linne by Ultrafine Grinding. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43: 110-117 (2014)

Duh PD, Du PC, Yen GC. Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. Food Chem. Toxicol. 37(11): 1055-1061 (1999)

Fatiha B, Khodir M, Farid D, Tiziri R, Karima B, Sonia O, Mohamed C. Optimization of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.). Phcog. Commn. 2: 72-86 (2012)

Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12: 239-249 (1912)

Geetha S, Sai-Ram M, Mongia SS, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. J. Ethnopharmacol. 87: 247-251 (2003)

Green LC, Wagner DA, Glogowski J. Analysis of nitrate, and nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 126: 131-138 (1982)

Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annu. Rev. Nutr. 16: 33-50 (1996)

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem. J. 334: 297-314 (1988)

Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J. Immunol. 144: 1425-1431 (1990)

Hong UC. Essential oil compositions *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum.* J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 45: 108-113 (2002)

Huang D, Ou B, Prior RI. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 53: 1841-1856 (2005)

Hyun JM, Jo YJ. Kim YB, Park SM, Yoon KS, Lee NH. Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of flavonoids extracted from *Dendranthema indicum* flowers in Jeju island. Korean J. Food Sci. Technol. 36(4): 1259-1267 (2019)

Jang DS, Park KH, Lee JR, Ha TJ, Park YB, Nam SH, Yang MS. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii*, and *Chrysanthemum boreale*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 44: 137-142 (1999)

Lee JY. Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Malus micromalus* Makino in Jeju Island. KSBB J. 24: 327-333 (2009)

Li ZF, Wang ZD, Ji YY, Zhang S, Huang C, Li J, Xia XM. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human HCC MHCC97H cells with *Chrysanthemum indicum* extract. World J. Gastroentero. 15: 4538-4546 (2009)

Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. Food Chem. Toxicol. 39: 1205-1210 (2001)

Middleton JrE, Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochem. Pharmacol. 43: 1167-1179 (1992)

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43: 109-142 (1991)

Nakamura M, Ra JH, Kim JS. Evaluation of biological activity for Dangyuja (*Citrus grandis*) leaves and investigation of optimal concentrations extracted by alternative ethanol concentrations. J. Plant Biotechnol. 46: 45-55 (2019)

Nam SM, Kang IJ, Shin MH. Anti-diabetic and anti-oxidative activities of extracts from *Crataegus pinnatifida*. J. East Asian Soc. Diet Life 25: 270-277 (2015)

Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000)

Park CM, Song YS. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF-κB/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. Nutr. Res. Pract. 7: 423-429 (2013)

Park JH, Lee JK. The encyclopedia of medicinal plants. Shinilbooks Pub., Seoul, Korea. pp. 8 (2000)

Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwa PP.

Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. J. Food Compos. Anal. 21: 241-248 (2008)
Ren, AN, Wang, ZG, Lu ZC, Wang, LW, Wu YL. Study on bacteriostasis and antivirotic of flowers *Chrysanthemum indicum*. Pharm. Biotechnol. 6: 241-244 (1999)
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)
Ryu SY, Choi SU, Lee CO, Lee SH, Ahn JW, Zee OP. Antitumor activity of some phenolic components in plants. Arch. Pharm. Res. 17: 42-44 (1994)
Shin YJ, Jeon JR, Park GS. Physicochemical properties of gamgug (*Chrysanthemun indicum* L.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 146-151 (2004)
Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. Chemicalcomposition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. J. Ethnopharmacol. 96: 151-158 (2005)
Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun OT. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions Mutat. Res. Fundam. Mol. 579: 200-213 (2005)
Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39: 44-48 (2007)
Willoughby DA. Human arthritis applied to animal models towards a better therapy. Ann. Rheum. Dis. 34: 471-478 (1971)
Yoon OH, Cho JS. Optimization of extraction conditions for hat water extracts from *Chrysanthemum indicum* L. by response surface methodology. Korean J. Food Cook. Sci. 23: 1-8 (2007)
Yoshikawa M, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Matsuda H. Medicinal flowers. II. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type sesquiterpe sesquiterpenes, kikkanols D, D monoacetate, E, F, and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. Chem. Pharm. Bull. 48: 651-656 (2002)