



Antioxidant activity of ten Lamiaceae plant seed extracts

JunHyeok Kim · Hee Ho Lee · Chung Youl Park · Hyun Min Kim · Young Ho Jung · Sae Hyun Kim · Chae Sun Na

10종 꿀풀과(Lamiaceae) 식물 종자 추출물의 항산화 활성

김준혁 · 이희호 · 박충열 · 김현민 · 정영호 · 김세현 · 나채선

Received: 23 April 2022 / Accepted: 14 June 2022 / Published Online: 30 September 2022
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract This study explored plant-derived natural antioxidants by evaluating the antioxidant activity of Lamiaceae plant seed extracts. Plants with the percentage of filled seeds at or above 90% and seed germination at or above 50% were selected. Of the ten species studied, the total phenolic content of the seeds was high in the species *Phlomis umbrosa* Turcz. (6.2 mg GAEs/g of seeds) and *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl. (4.5 mg GAEs/g of seeds). The total flavonoid content of the seeds was high in *E. ciliata* (1.0 mg QEs/g of seeds) and *P. umbrosa* (0.6 mg QEs/g of seeds). Based on the EC₅₀ value of the seed extracts, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity was high in the seeds of the plants *E. ciliata* (27.5 µg/mL), *Mosla dianthera* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Maxim. (29.2 µg/mL), and *Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai (33.3 µg/mL). In addition, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity was high in *P. vulgaris* var. *lilacina* (25.6 µg/mL), *E. ciliata* (25.9 µg/mL), and *M. dianthera* (27.6 µg/mL) seeds. The ferric reducing antioxidant power of the seed extracts was high in *P. vulgaris* var. *lilacina* (2910.4 µM Fe(II)/g of extract), *E. ciliata* (2836.2 µM Fe(II)/g of extract), and *M. dianthera* (2754.4 µM Fe(II)/g of extract). According to the cluster analysis based on antioxidant activity, the seeds of the ten species were classified

into three groups, from group 1 with low antioxidant activity to group 3 with high antioxidant activity; *E. ciliata*, *M. dianthera*, and *P. vulgaris* var. *lilacina* were classified as group 3.

Keywords Antioxidant · Conservation · Germination · Lamiaceae · Radical scavenging activity

서론

자유라디칼은 하나 이상의 짝을 이루지 않은 전자를 지니고 있으면서 독립적으로 존재하는 모든 화학종을 일컫으며, 체내에서 일어나는 여러 대사경로에서 생성되기도 한다. 생체내에서 발생하는 자유라디칼 및 이들의 후속 반응결과 생성되는 활성산소종들은 세포구성 성분들과 반응하여 세포의 산화적 손상을 일으켜 노화를 비롯하여 다양한 급성 및 만성 질환을 야기하는 것으로 보고되고 있다[1]. 항산화제는 활성산소종을 비롯하여 지질산화물 등 산화스트레스를 유발할 수 있는 물질들을 소거하거나 산화력이 낮은 화학종으로 변환함으로써 세포의 손상을 저감할 수 있는 것으로 알려져 있다. 항산화제 섭취에 따른 질병 예방에 대한 역학적 증거와 시험관 내에서 항산화제가 자유 라디칼과 반응한다는 화학적 증거가 있으며, 이들이 체내에서 어떻게 작용하는지에 대한 연구들이 진행되고 있다[1,2]. 식물 내 이차 대사산물로 많이 존재하는 페놀성 화합물들은 강한 항산화력을 가지고 있어 다양한 산화적 스트레스를 막는데 주요한 역할을 한다고 알려져 있다[3].

약용식물과 허브는 식물 중에서도 자연적 항산화제 공급원으로 기대 받기 때문에 다양한 종을 대상으로 이들의 항산화능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다[4]. 꿀풀과 식물은 전세계적으로 236속 6,000종이 있으며[5], 국내에서도 27속 118종이 자생

Chae Sun Na (✉)
E-mail: chaesun.na@koagi.or.kr
Baekdudaegan National Arboretum at 1501, Chunyang-ro, Chunyangmyeon, Bonghwa-gun, Gyeongsangbuk-do 36209, Republic of Korea

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.

하고 있다[6]. 한반도에서 다양한 용도로 활용되었던 민속식물 1,095분류군 중 29 분류군이 꿀풀과 식물이며, 특히 익모초는 약용식물 중 가장 많이 이용되었다[7]. 최근에도 익모초를 포함하는 꿀풀과 식물을 대상으로 항산화, 항염증, 항당뇨 등 다양한 활성들이 조사되고 있다[8-10].

식물은 잎, 줄기, 뿌리, 종자 등 다양한 부위로 이루어져 있으며, 부위에 따라 추출물의 항산화 활성이 다르게 나타난다 [11]. 예를 들어 국화과 식물인 썩새리는 DPPH 라디칼 소거능을 기준으로 부위에 따라 최대 6.7배 차이가 나며, 꿀풀은 최대 2.5배 차이가 난다[12,13]. 따라서 다양한 식물 부위에 따른 추출물별 항산화 활성 평가가 필요함에도 대부분의 연구는 종자를 제외한 전초, 잎 등에 집중되어 있다. 최근 낙지다리, 국화과 식물 등을 대상으로 종자에 대한 항산화 활성이 평가되고 있지만[14,15], 꿀풀과 식물관련 연구는 전초, 뿌리 등에 집중되어 있어 종자를 대상으로 한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 10종 꿀풀과 식물 종자 추출물을 대상으로 항산화 활성 평가와 비교를 통해 기능성 식품 및 약품 소재로서의 활용에 있어 기초자료로 사용하기 위함과 아울러 야생식물의 경쟁력을 높여 식물 다양성 보전에 기여하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 종자 활력 평가

본 실험은 국립백두대간수목원 종자은행에서 분양 받은 10종의 종자를 사용하였다(Table 1). 추출을 진행하기 전 종자의 상태를 평가하기 위해 충실률 및 발아검사를 진행하였다. 충실률 (Percent of filled seeds, PFS)은 X-ray (EMT-F70, Softex Co., Ltd., Kobe, Japan)를 이용하여 25립 4반복으로 조사하였다. 각 종들의 발아조건은 Seed Information Database와 국가생물종지식정보시스템을 참고하여 설정하였다[6,16]. 앞서 조사된 발아조건 및 충실률에 따른 발아능력을 평가하기 위하여 25립 4반복을 기준으로 over-sowing을 위한 종자량을 계산하여 성장상 (TGL-1S, ESPEC MIC Corp., Osaka, Japan)에서 최대 30일간 배양하였다[17]. 발아율은 매일 24시간 마다 유근이 종피를 뚫고 돌출된 종자를 기준으로 조사하였으며, 최종발아율(Percent of germination, %), T50 (Time to 50% germination, days), 평균발아소요일수(Mean germination time, MGT, days)을 계산하

였다. T50과 평균발아소요일수는 Dezfuli의 방법을 참고하여 계산하였다[18]. 또한, 50% 미만의 최종 발아율을 나타낸 종자는 100 ppm의 GA₃를 처리하여 추가적인 발아능력을 평가하였다.

종자 추출물 제조

종자를 액체 질소와 균질기(Bead Ruptor 24 Elite, Omni-International, Kennesaw, GA, USA)를 이용하여 곱게 갈아 건 중량 대비 20배(w/v)의 75% MeOH (Macron Fine Chemicals, Radnor, PA, USA)을 가하여 진탕배양기에서 상온에서 7일간 추출하였다. 제조된 종자 추출물은 여과지(0.45 μm, PVDF4525A, Hyundai Micro Co., Seoul, Korea)를 이용하여 여과한 후 감압 농축기로 감압 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 DMSO에 10 mg/mL의 농도로 녹여 -20 °C에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

총 페놀성 화합물 함량 측정

총 페놀성 화합물 함량은 Singleton의 연구[19]를 변형하여 측정하였다. 종자 추출물 20 μL에 증류수에 녹인 0.4 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Chemical Co.) 40 μL를 넣어준 후 5분간 방치한 후, 140 μL의 700 mM Na₂CO₃ (Daejung, Siheung-si, Korea)를 넣어주고 상온에서 2시간 반응 후 microplate reader (Multiskan go, Thermo Scientific, Vantaa, Finland)로 765 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid (Sigma Chemical Co.)를 희석하여 검량선을 만들어 종자 추출물 내 총 페놀성 화합물 함량을 gallic acid equivalent로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Christ와 Müller의 연구[20]를 변형하여 측정하였다. 100 μL 종자 추출물에 300 μL EtOH (Daejung, Siheung-si, Korea), 20 μL의 1 M potassium acetate (Junsei Chemical Co., Tykyo, Japan), 20 μL의 10% aluminum chloride (AlCl₃, Junsei Chemical Co., Tykyo, Japan), 560 μL의 증류수를 넣고 혼합한 후 상온에서 30분간 반응시킨 후 96-well plate에 200 μL씩 분주 후 microplate reader로 415 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 Quercetin (Sigma Chemical Co.)을 희석하여 검량선을 만들어, 종자 추출물 내 총 플라보노이드 함량을 분석하였다.

Table 1 The list of 10 Lamiaceae plant seeds used in this experiment

No.	Scientific name	Korean name	Collection time
1	<i>Clinopodium micranthum</i> (Regel) H.Hara	Du-me-cheung-cheung-i	2019.09.18.
2	<i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hyl.	Hyang-yu	2019.10.30.
3	<i>Isodon excisus</i> (Maxim.) Kudô	O-ri-bang-pul	2019.10.14.
4	<i>Isodon inflexus</i> (Thunb.) Kudô	San-bak-ha	2019.10.15.
5	<i>Isodon japonicus</i> (Burm.f.) H.Hara	Bang-a-pul	2019.10.16.
6	<i>Isodon serra</i> (Maxim.) Kudô	Ja-ju-bang-a-pul	2017.10.23.
7	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	Ik-mo-cho	2018.10.18.
8	<i>Mosla dianthera</i> (Buch.-Ham. ex Roxb.) Maxim.	Jwi-kkae-pul	2019.10.13.
9	<i>Phlomis umbrosa</i> Turcz.	Sok-dan	2019.09.24.
10	<i>Prunella vulgaris</i> L. subsp. asiatica (Nakai) H.Hara	Kkul-pul	2018.07.06.

DPPH 라디칼 소거활성 평가

DPPH radical 소거활성은 Blois의 연구[21]를 변형하여 평가하였다. 종자 추출물 50 µL에 150 µL의 0.1 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Alfa Aesar, MS, USA) radical 용액을 혼합하여 30분간 암소에서 반응시켰다. 그 후에 microplate reader로 517 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. Blank는 종자 추출물을 처리하지 않고 추출물 희석 용매인 DMSO를 첨가한 것으로 하여 반응액의 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 아래의 식에 따라 백분율로 나타낸 후 50%의 소거능을 나타내는 종자 추출물 농도인 EC₅₀ 값을 구하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid(Fujifilm Wako pure chemical co., Osaka, Japan)을 사용하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{추출물 첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거활성 평가

2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS radical 소거활성은 Miller 등의 연구[22]를 변형하여 평가하였다. 증류수 5 mL에 140 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈, Acros oragnics, Geel, Belgium) 88 µL를 가한 혼합 시약에 ABTS diammonium salt (Sigma Chemical Co.) 20 mg을 넣어 7.1 mM ABTS 수용액을 만들어 암실에 14-16시간 방치시킨 후, 이를 에탄올로 희석하여 734 nm에서 측정된 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 조절된 ABTS solution을 시약으로 사용하였다. 종자 추출물 10 µL와 ABTS solution 190 µL를 96-well plate에 분주한 후 2분 30초간 반응시킨 후 microplate reader로 734 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 무첨가구는 종자 추출물을 처리하지 않고 추출물 희석 용매인 DMSO를 첨가한 것으로 하여 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 아래의 식에 따라 백분율로 나타낸 후 50%의 소거능을 나타내는 종자 추출물 농도인 EC₅₀ 값을 구하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid (Fujifilm Wako pure chemical co., Osaka, Japan)을 사용하였다.

$$\text{APTS 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{추출물 첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Ferric Reducing Antioxidant power (FRAP) 평가

FRAP 평가는 Molina-Díaz 등의 연구[23]를 변형하여 평가하였다. FRAP solution은 pH 3.6의 300 mmol/L Acetate buffer (Samchun, Pyeongtaek-si, Korea)와 40 mmol/L HCl (Fujifilm Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan)에 녹인 10 mM/L 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ, Sigma Chemical Co.)와 20 mM/L ferric chloride (Sigma Chemical Co.)를 10:1:1 비율로 실험 직전에 만들어 사용하였다. 종자 추출물 10 µL와 FRAP solution 200 µL를 혼합한 후 37 °C에서 4분간 반응시킨 후 microplate reader로 593 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. FRAP value는 표준물질로 ferrous sulfate heptahydrate (Sigma Chemical Co.)을 희석하여 검량선을 만들어, Fe(II)의 용량으로 나타내었다.

통계분석

활력평가를 제외한 모든 실험은 3회 반복하였으며, 통계 분석은 SPSS v.23 (IBM, Armonk, NY, USA)을 이용하였다. 비슷한 항산화능력을 갖는 종끼리 분류하고 비교하기 위해 항산화능력 결과를 기반으로 계층적 군집분석을 실시하였다. 각 종별로 차이를 나타낸 항산화 지표인 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성, FRAP 데이터를 Z-score로 표준화하여 제곱 유클리디안 거리를 이용한 Ward's method의 계층적 군집 분석에 사용하였다.

결과 및 고찰

꿀풀과 식물 종자들의 활력 평가 결과

꿀풀과 식물 종자들의 활력을 평가하기 위해 충실물과 최대 30 일까지의 발아검정을 통해 최종 발아율, T50, 평균발아소요일수를 계산하였다(Table 2). 충실물의 경우, 익모초와 꿀풀을 제외

Table 2 Percent of filled seeds (PFS), germination condition, percent of germination (PG), time to 50% germinations (T50) and mean germination time (MGT) of 10 Lamiaceae plant seeds used

No.	Scientific name	PFS (%)	Condition (Day/Night)	PG (%)	T50 (day)	MGT (day)
1	<i>C. micranthum</i>	98.0±1.2 ¹⁾	25/15 °C (12h/12h)	99.0±1.0	2.7±0.1	4.5±0.2
2	<i>E. ciliata</i>	100.0±0.0	25/15 °C (12h/12h)	57.0±2.5	3.2±0.3	4.9±0.3
3	<i>I. excisus</i>	80.0±3.3	25/15 °C (12h/12h)	78.3±1.7	3.8±0.2	5.7±0.1
4	<i>I. inflexus</i>	91.0±5.0	25/15 °C (12h/12h)	77.2±5.2	2.3±0.2	4.5±0.2
5	<i>I. japonicus</i>	100.0±0.0	25/15 °C (12h/12h)	92.0±0.0	2.3±0.0	4.3±0.2
6	<i>I. serra</i>	100.0±0.0	25/15 °C (12h/12h)	92.0±0.0	1.9±0.1	3.9±0.2
7	<i>L. japonicus</i>	69.0±9.1	25/15 °C (12h/12h)	59.2±7.6	2.0±0.1	3.8±0.2
8	<i>M. dianthera</i>	96.0±1.6	25/15 °C (12h/12h)	83.0±8.3	5.6±0.2	8.2±0.5
9	<i>P. umbrosa</i>	98.0±2.0	25/15 °C (12h/12h)	43.9±13.1	19.3±0.2	21.1±0.3
10	<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>asiatica</i>	76.0±7.8	25/15 °C, GA ₃ 100 ppm (12h/12h)	81.0±4.4	2.6±0.1	4.3±0.2
			25/15 °C (12h/12h)	71.6±2.9	3.2±0.4	5.8±0.6

¹⁾Data are represented as the means±SE of quadruplicate determination

Table 3 Extraction yield, total phenolic and flavonoid contents of 10 Lamiaceae plant seed extracts as equivalent to gallic acid and quercetin

No.	Scientific name	Extraction Yield (%)	Total phenolic content (mg GAEs/g seed ²⁾)	Total flavonoid content (mg QEs/g seed ³⁾)
1	<i>C. micranthum</i>	4.5±0.0 ¹⁾	2.3±0.0	0.2±0.0
2	<i>E. ciliata</i>	5.4±0.0	4.5±0.0	1.0±0.0
3	<i>I. excisus</i>	6.1±0.0	2.4±0.0	0.1±0.0
4	<i>I. inflexus</i>	5.1±0.0	3.0±0.1	0.2±0.0
5	<i>I. japonicus</i>	4.5±0.0	2.1±0.0	0.2±0.0
6	<i>I. serra</i>	6.0±0.2	2.2±0.1	0.3±0.0
7	<i>L. japonicus</i>	6.9±0.1	3.4±0.0	0.4±0.0
8	<i>M. dianthera</i>	2.8±0.1	2.2±0.1	0.1±0.0
9	<i>P. umbrosa</i>	13.7±0.1	6.2±0.0	0.6±0.0
10	<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>asiatica</i>	3.2±0.1	2.6±0.1	0.4±0.0

¹⁾Data are represented as the means±SE of triplicate determination

²⁾Total phenolic contents are expressed as mg gallic acid equivalents (GAEs)/g seed

³⁾Total flavonoid contents are expressed as mg quercetin equivalents (QEs)/g seed

한 모든 종에서 80% 이상으로 충실한 것을 확인할 수 있었다. 일반적인 꿀풀과 종자들의 최적 발아조건인 25/15 °C에서의 최종 발아율의 경우, 향유, 익모초, 속단을 제외하면 70% 이상의 최종 발아율을 나타냈으며, 그 중 두메층층이가 99%의 가장 높은 발아율을 나타냈다. 43.9%의 낮은 발아율을 나타낸 속단의 경우, GA₃ 100 ppm을 처리하면 81.0%로 발아율이 높아졌다. 자주방아풀은 T50이 1.9일, 익모초는 MGT가 3.8일로 나타나 가장 빠른 발아속도를 나타냈다. 반면에 쥐깨풀의 경우, T50 5.6일, MGT 8.2일로 가장 느린 발아속도를 나타냈다. 낮은 발아율을 나타냈던 향유, 익모초 중 향유의 경우, GA₃ 처리를 통해 발아율이 증진될 수 있다는 연구보고가 있으며[24], 익모초는 충실한 종자의 비율이 낮아 낮은 발아율을 나타낸 것으로 판단된다. 또한, GA₃ 처리에 따른 발아율 향상이 확인된 향유와 속단의 경우, 추가적인 실험을 통해 종자 휴면유형 탐색이 필요할 것으로 생각된다. 본 실험에서는 최종 발아율이 50% 이상인 종들을 대상으로 항산화 능력을 평가하였다.

꿀풀과 식물 종자들의 추출수율, 총 페놀성 화합물 함량 결과

꿀풀과 식물 종자 10종의 75% MeOH 추출물을 대상으로 추출수율, 총 페놀성 화합물 함량 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였다(Table 3). 추출수율은 2.8-13.7%로 다양하였으며, 그 중 쥐깨풀, 꿀풀이 각각 2.8, 3.2%로 낮았으며 속단이 13.7%로 가장 높았다. 총 페놀성 화합물 함량의 경우, 2.1-6.2 mg GAEs/g seed로 다양하였으며, 향유와 속단이 4.5, 6.2 mg GAEs/g seed로 높게, 방아풀, 자주방아풀, 쥐깨풀이 2.1, 2.2, 2.2 mg GAEs/g seed로 낮게 나타났다. 총 플라보노이드 함량의 경우, 0.1-1.0 mg QEs/g seed로 다양하였으며, 향유와 속단이 1.0, 0.6 mg QEs/g seeds로 높게, 오리방풀, 쥐깨풀이 0.1 mg QEs/g seed로 낮게 나타났다. 현재 보고된 종자를 대상으로 한 총 페놀성 화합물 함량은 아마란스 종자 추출물(4.23 mg GAEs/g), 석류 종자(11.84 mg GAEs/g), 낙지다리 종자(19.8 mg GAEs/g), 쇠별꽃 종자 추출물(27.30 mg GAEs/g) 등이 있으며, 본 실험의 결과와 마찬가지로 종에 따라 매우 다양하게 나타났다[14,25-27]. 하지만 국화과 식물 종자들의 총 페놀성 화합물 함량에 비해 꿀풀과

식물 종자의 경우 전반적으로 낮은 함량을 가지고 있는 것으로 판단된다[15].

꿀풀과 종자들의 DPPH 라디칼 소거활성 평가 결과

꿀풀과 식물 종자들의 항산화 활성을 측정하기 위해 농도별 종자 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 통해 소거활성이 50% 일 때의 추출물 농도(EC₅₀)를 평가하였다(Table 4). 분석결과, EC₅₀ 농도 값은 27.5에서 173.6 µg/mL까지 다양하게 나타났다. 향유, 쥐깨풀, 꿀풀이 각각 27.5, 29.2, 33.3 µg/mL로 높은 활성을 나타냈으며, 반대로 오리방풀, 자주방아풀, 속단이 166.8, 173.6, 136.0 µg/mL로 낮은 활성을 나타냈다. 높은 활성을 나타낸 꿀풀과 종자들은 국화과 식물 종자들의 DPPH 라디칼 소거 활성(EC₅₀)인 구절초(65.0 µg/mL), 포천구절초(57.4 µg/mL), 서양민들레(59.1 µg/mL) 보다 높은 활성을 갖으며, 낙지다리 종자(27.6 µg/mL) 만큼의 높은 활성을 보였다[14,15]. 본 실험의 대조구인 ascorbic acid의 EC₅₀ 값은 3.8 µg/mL로 본 실험의 모든 종보다 높은 활성을 나타냈다.

꿀풀과 식물 종자들의 ABTS 라디칼 소거활성 평가 결과

꿀풀과 식물 종자들의 항산화 활성을 측정하기 위해 농도별 종자 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 통해 소거활성이 50% 일 때의 추출물 농도(EC₅₀)를 평가하였다(Table 5). 분석결과, EC₅₀ 값은 25.6에서 103.5까지 다양하게 나타났다. DPPH 라디칼 소거활성 평가 결과와 마찬가지로 향유, 쥐깨풀, 꿀풀에서 각각 25.9, 27.6, 25.6 µg/mL로 높은 활성이 나타났으며, 반대로 두메층층이, 자주방아풀에서 각각 103.5, 100.5 µg/mL로 낮은 활성이 나타났다. 낮은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 산박하, 속단이 ABTS 라디칼 소거활성에서는 높은 활성이 나타났다. 이러한 결과는 항산화 능력을 평가하기 위해 사용된 자유 라디칼 분자인 DPPH와 ABTS의 반응 특성에 따른 결과로 각 종자 추출물 내 존재하는 페놀성 화합물 조성 및 함량에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다[28]. 본 실험의 대조구인 ascorbic acid의 EC₅₀ 값은 6.0 µg/mL로 본 실험의 모든 종보다 높은 활성이 나타났다.

Table 4 The EC₅₀ values for the DPPH and ATBS radical scavenging activities of 10 Lamiaceae plant seed extracts

No.	Scientific name	DPPH radical Scavenging EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS radical Scavenging EC ₅₀ (µg/mL)
1	<i>C. micranthum</i>	83.4±0.8 ²⁾	103.5±1.7
2	<i>E. ciliata</i>	27.5±0.3	25.9±0.4
3	<i>I. excisus</i>	166.8±2.6	72.7±0.6
4	<i>I. inflexus</i>	130.5±2.9	38.4±0.7
5	<i>I. japonicus</i>	85.4±2.0	65.2±1.2
6	<i>I. serra</i>	173.6±1.1	100.5±2.4
7	<i>L. japonicus</i>	82.7±1.1	49.6±0.6
8	<i>M. dianthera</i>	29.2±0.6	27.6±0.4
9	<i>P. umbrosa</i>	136.0±0.8	40.3±1.4
10	<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>asiatica</i>	33.3±0.4	25.6±0.3
	Ascorbic acid ¹⁾	3.8±0.0	6.0±0.1

¹⁾The positive control is ascorbic acid

²⁾Data are represented as the means±SE of triplicate determination

Table 5 FRAP value of ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) of 10 Lamiaceae plant seed extracts

No.	Scientific name	FRAP value (µM Fe(II)/g extract)	FRAP value (µM Fe(II)/g seed)
1	<i>C. micranthum</i>	1366.8±4.8 ²⁾	61.4±0.8
2	<i>E. ciliata</i>	2836.2±15.5	155.2±0.5
3	<i>I. excisus</i>	996.7±9.6	61.1±0.6
4	<i>I. inflexus</i>	1430.2±49.4	73.1±2.3
5	<i>I. japonicus</i>	1167.2±3.6	52.4±0.6
6	<i>I. serra</i>	1013.0±30.2	60.5±3.0
7	<i>L. japonicus</i>	1150.9±14.8	79.3±0.8
8	<i>M. dianthera</i>	2754.4±62.9	75.9±3.0
9	<i>P. umbrosa</i>	889.7±4.8	121.8±1.7
10	<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>asiatica</i>	2910.4±25.7	93.1±2.1
	Ascorbic acid ¹⁾	8569.6±72.5	

¹⁾The positive control is ascorbic acid

²⁾Data are represented as the means±SE of triplicate determination

꿀풀과 식물 종자들의 FRAP 평가 결과

꿀풀과 식물 종자들의 항산화 활성을 측정하기 위해 종자 추출물의 FRAP를 평가하였다(Table 5). 분석결과, FRAP 값은 889.7에서 2910.4 µM Fe(II)/g extract로 다양하게 나타났으며, 향유, 쥐깨풀, 꿀풀에서 각각 2836.2, 2754.4, 2910.4 µM Fe(II)/g extract로 높게 나타났으며, 오리방풀, 자주방아풀, 속단에서 각각 996.7, 1013.0, 889.7 µM Fe(II)/g extract로 낮게 나타났다. 추출수율을 반영하여 종자 무게에 따른 FRAP 값을 계산하였을 경우, 향유, 속단, 꿀풀이 155.2, 121.8, 93.1 µM Fe(II)/g seed로 높게 나타났다. 쥐깨풀의 경우, 높은 항산화 활성을 가지고 있으나 낮은 추출수율(2.8%)로 인해 종자 무게에 따른 FRAP 값이 낮게 나타나 추출수율을 높일 수 있는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 또한, 본 실험의 대조구인 ascorbic acid의 FRAP 값은 8569.6 µM Fe(II)/g으로 본 실험의 모든 종보다 높은 활성이 나타났다.

현재까지 녹두(632.5 µM Fe(II)/g extract), 파파야(1116.7 µM Fe(II)/g), 타마린드(2486.0 µM Fe(II)/g), 아보카도(1484.0 µM Fe(II)/g) 등의 다양한 식물 종자를 대상으로 FRAP 값이 보고

되어있으나[29-31], 꿀풀과의 경우 이러한 연구가 부족하다. 결과적으로 본 연구를 통해서 꿀풀과 식물 종자들의 FRAP 값을 평가하였으며, 특히 높은 FRAP 값을 나타낸 향유, 쥐깨풀, 꿀풀의 경우 높은 항산화 능력을 가진 것으로 판단된다.

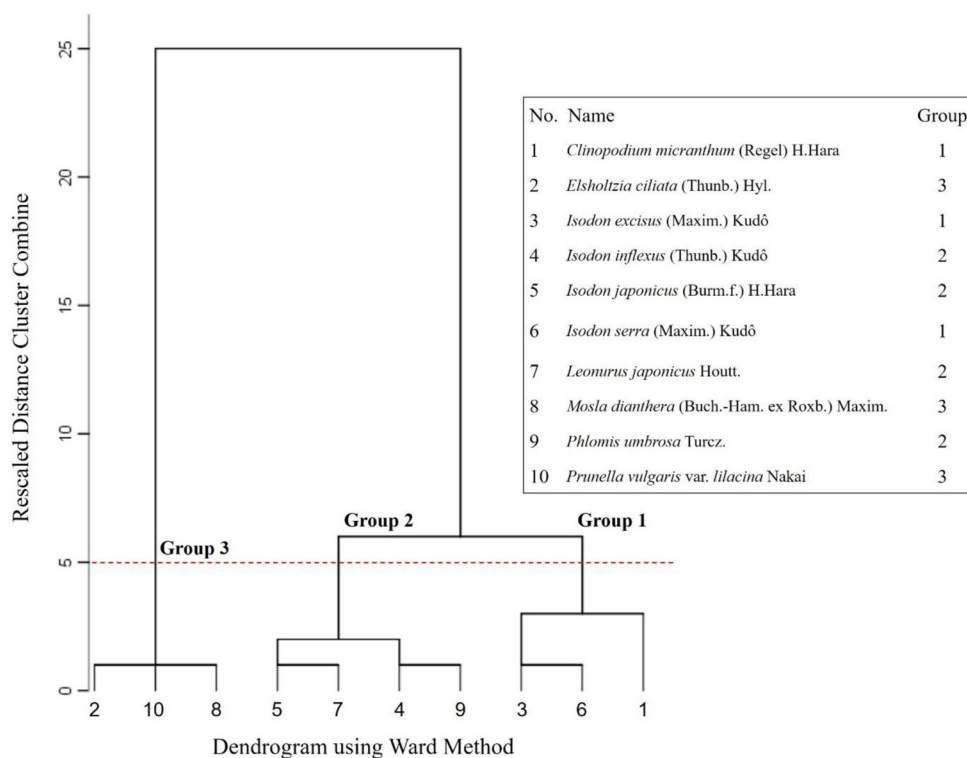
꿀풀과 식물 종자들의 계층적 군집분석 결과

꿀풀과 10종을 종자의 항산화능력이 비슷한 종들끼리 분류하고 비교하기 위해 앞서 조사된 항산화능력을 기반으로 군집분석을 수행하였다. DPPH 라디칼 소거활성(EC₅₀), ABTS 라디칼 소거활성(EC₅₀), FRAP (µM Fe(II)/g extract) 데이터를 이용하여 작성된 덴드로그램을 참고하여 3개의 그룹으로 분류하였다(Table 6, Fig. 1). 분석 결과, 낮은 항산화 활성을 가지는 group 1에서부터 높은 항산화 활성을 갖는 group 3로 분류되었다. 결과적으로 group 3로 분류된 향유, 쥐깨풀, 꿀풀 종자 추출물의 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다. 향유의 경우, 종자를 제외한 전초, 꽃, 잎, 줄기, 뿌리의 부위별 항산화 능력이 보고되었으나 [32-34], 쥐깨풀과 꿀풀은 전초를 대상으로 항산화 능력이 보고된 바 있다[35-39]. 이러한 결과를 토대로, 향유, 쥐깨풀, 꿀풀

Table 6 Comparison of antioxidant activity according to groups divided by hierarchical cluster analysis using DPPH·ABTS radical scavenging activity, FRAP data in 10 Lamiaceae plant seed extracts

Group	Scientific name	TPC (mg GAEs/g seed)	TFC (mg QEs/g seed)	DPPH radical scavenging EC ₅₀ (μg/mL)	ABTS radical scavenging EC ₅₀ (μg/mL)	FRAP (μM Fe(II)/g extract)	FRAP (μM Fe(II)/g seed)
<i>C. micranthum</i>							
1	<i>I. excisus</i>	2.3±0.0 ¹⁾	0.2±0.0	141.2±14.5	92.3±5.0	1125.5±61.1	61.0±0.9
	<i>I. serra</i>						
<i>I. inflexus</i>							
2	<i>I. japonicus</i>	3.7±0.5	0.3±0.0	108.7±7.5	48.3±3.2	1159.5±58.7	81.6±7.6
	<i>L. japonicus</i>						
	<i>P. umbrosa</i>						
<i>E. ciliate</i>							
3	<i>M. dianthera</i>	3.1±0.4	0.5±0.1	30.0±0.9	26.4±0.4	2842.6±30.6	108.1±12.1
	<i>P. vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>						

¹⁾Data included in each group are represented as the means±SE

**Fig. 1** Dendrogram showing classification of datasets by a hierarchical cluster analysis using ward's method. The datasets of DPPH radical scavenging activity (EC₅₀), ABTS radical scavenging activity (EC₅₀), FRAP (μM Fe(II)/g extract). The red dotted line means selection criteria for three clusters

종자가 식물 소재의 천연 항산화제로써 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 야생식물 자원의 항산화 능력을 평가하여 보전 및 활용가능성을 높이기 위해 꿀풀과 식물 10종의 종자를 대상으로 활력 및 항산화 능력을 평가하였다. 본 연구의 결과를 통해 꿀풀과를 포함하는 야생식물자원에 대한 관심과 이용이 높아져 생물다양성의 보전을 촉진하길 기대한다.

초 록

본 연구는 꿀풀과 식물 종자 추출물의 항산화 활성 평가를 통해 식물 유래 천연 항산화제를 탐색하기 위해 진행되었다. 총 싹률 90% 이상이고 발아율이 50% 이상인 종자를 대상으로 하였다. 총 페놀성 화합물 함량은 속단(6.2 mg GAEs/g seed), 향유(4.5 mg GAEs/g seed) 순으로 높게 나타났다. 총 플라보노이

드 함량은 향유(1.0 mg QEs/g seed), 속단(0.6 mg QEs/g seed) 순으로 높게 나타났다. DPPH 라디칼 소거활성은 종자 추출물의 EC₅₀ 값을 기준으로 향유(27.5 µg/mL), 쥐깨풀(29.2 µg/mL), 꿀풀(33.3 µg/mL) 순으로 높게 나타났다. ABTS 라디칼 소거활성은 꿀풀(25.6 µg/mL), 향유(25.9 µg/mL), 쥐깨풀(27.6 µg/mL) 순으로 높게 나타났다. FRAP 평가는 꿀풀(2910.4 µM Fe(II)/g extract), 향유(2836.2 µM Fe(II)/g extract), 쥐깨풀(2754.4 µM Fe(II)/g extract) 순으로 높게 나타났다. 항산화 활성을 기반으로 한 군집분석에 따라 10종은 항산화 활성이 낮은 group 1에서 활성이 높은 group 3까지 3개의 group으로 분류하였으며, 향유, 쥐깨풀, 꿀풀 종자는 group 3에 속하였다.

Keywords Antioxidant · Conservation · Germination · Lamiaceae · Radical scavenging activity

감사의 글 This study was carried out with the support of R&D Program for Forest Science Technology (Project No. 2021400B10-2225-CA02) provided by Korea Forest Service (Korea Forestry Promotion Institute).

References

- Kehrer JP, Klotz LO (2015) Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Crit Rev Toxicol* 45(9):765–798. doi: 10.3109/10408444.2015.1074159
- Forman HJ, Davies KJ, Ursini F (2014) How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Bio Med* 66:24–35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15(10):7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313
- Erdemoglu N, Turan NN, Caköcö I, Sener B, Aydoñ A (2006) Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts. *Phytotherapy Research. Phytother Res* 20(1): 9–13. doi: 10.1002/ptr.1816
- Carović-Stanko K, Petek, M, Grdiša M, Pintar J, Bedeković D, Herak Custic M, Satovic Z (2016) Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods—a review. *Czech J Food Sci* 34(5): 377–390. doi: 10.17221/504/2015-CJFS
- Korean National Arboretum (2022) Korea Biodiversity Information System. <http://www.nature.go.kr>. Assessed 25 January 2022
- Korean National Arboretum (2017) Ethnobotany in Korea: The traditional knowledge and use of indigenous plants. Korean National Arboretum Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea, pp 7
- Uritu CM, Mihai CT, Stanciu GD, Dodi G, Alexa-Stratulat T, Luca A, Leon-Constantin M, Stefanescu R, Bild V, Melnic S, Tamba BI (2018) Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Res Manag* 2018. doi: 10.1155/2018/7801543
- Kim JW, Hong JH (2021) Physicochemical properties and physiological activities of *Agastache rugosa* extracts. *Korean J Food Preserv* 28(1): 88–98. doi: 10.11002/kjfp.2021.28.1.88
- Lee JH, Yim DS, Choi SS (2021) Antibacterial Activity and Anti-inflammatory Effect of Methanol Extracts of *Salvia miltiorrhiza* Against Oral Pathogenic Bacteria. *Korean J Pharmacogn*, 52(1): 41–48. doi: 10.22889/KJP.2021.52.1.41
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*, 89(3): 217–233. doi: 10.1016/j.fbp.2010.04.008
- Song YJ, Chang JP, Yoo JH (2016) Antioxidant Activities of Water Extracts from Different Parts of *Lycopus lucidus* Turcz. *Ex Benth. Kor J Herbol* 31(6): 21–28. doi: 10.6116/kjh.2016.31.6.21
- Seo JK, Kang MJ, Shin JH, Lee SJ, Jeong HG, Sung NJ, Chung YC (2010) Antibacterial and Antioxidant Activities of Solvent Extracts from Different Parts of Hagocho (*Prunella vulgaris*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(10): 1425–1432. doi: 10.3746/jkfn.2010.39.10.1425
- Kim JH, Im JH, Park CY, Lee DH, Lee MH, Jung YH, Park CH, Na CS (2021) Antioxidant and α-glucosidase inhibitory effects of *Pethorum chinense* Purch seed extracts. *Korean J Food Preserv* 28(3): 384–390. doi: 10.11002/kjfp.2021.28.3.384
- Kim JH, Lee DH, Lee MH, Jung YH, Park CH, Lee HH, Na CS (2021) Antioxidant Activity of Asteraceae Plant Seed Extracts. *J Life Sci* 31(6): 543–549. doi: 10.5352/JLS.2021.31.6.543
- Royal Botanic Gardens, Kew (2017) Seed information database (SID), ver. 7.1. Assessed 25 January 2022
- Davies R, Di Sacco A, Newton R (2015) Germination testing: procedures and evaluation. Technical Information Sheet_13a. Royal Botanic Gardens, Kew/Dezfuli PM, Sharif-Zadeh F, Janmohammadi M (2008) Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). *ARPN J Agric Biol Sci* 3(3): 22–25
- Dezfuli PM, Sharif-Zadeh F, Janmohammadi M (2008) Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). *ARPN J Agric Biol Sci* 3(3): 22–25
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Method Enzymol* 299: 152–178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Christ B, Müller KH (1960) Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Archiv der Pharmazie*. 293(65): 1033–1042
- Blois MS (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617): 1199–1200
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84: 407–412
- Molina-Diaz A, Ortega-Carmona I, Pascual-Reguera MI (1998) Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta* 47: 531–536. doi: 10.1016/S0039-9140(98)00085-X
- Kim GT, Um TW (1995) A Study for the utilization of wild herbaceous species-effects of gibberelic acid treatment on seed germination. *Korean J Environ Ecol* 9: 56–61
- Jo HJ, Chung KH, Yoon JA, Song BC, An JH (2014) Free radical-scavenging activities of amaranth (*Amaranthus* spp. L.) seed extracts. *Food Eng Prog* 18(2): 116–123. doi: 10.13050/foodengprog.2014.18.2.116
- Elfalleh W, Hannachi H, Tlili N, Yahia Y, Nasri N, Ferchichi A (2012) Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *J Med Plants Res* 6(32): 4724–4730. doi: 10.5897/JMPR11.995
- Cho HD, Kang WS, Kim DH, Ku JJ, Seo KI (2019) Comparison of biological activity between *Stellaria aquatica* seed extracts. *Korean J Food Preserv* 26(2): 228–237. doi: 10.11002/kjfp.2019.26.2.228
- Arnao MB (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Tech* 11(11): 419–421. doi: 10.1016/S0924-2244(01)00027-9
- Orak H, KARAMAĆ M, ORAK A, AMAROWICZ R, JANIAC M (2018) Phenolics content and antioxidant capacity of mung bean (*Vigna radiata* L.) Seed. *YYU J Agric Sci* 28: 199–207
- Zhou K, Wang H, Mei W, Li X, Luo Y, Dai H (2011) Antioxidant activity of papaya seed extracts. *Molecules* 16(8): 6179–6192. doi: 10.3390/molecules16086179
- Soong YY, Barlow PJ (2004) Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food chem* 88(3): 411–417. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.02.003

32. Lee SE, Sung JS, Jang IB, Kim GS, Ahn TJ, Han HS, Kim JE, Kim YO, Park CB, Cha SW, Ahn YS, Park HK, Bang JK, Seong NS (2008) Investigation on antioxidant activity in plant resources. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16(5): 356–370
33. Ma J, Xu RR, Lu Y, Ren DF, Lu J (2018) Composition, antimicrobial and antioxidant activity of supercritical fluid extract of *Elsholtzia ciliata*. *J Essent Oil Bear Pl* 21(2): 556–562. doi: 10.1080/0972060X.2017.1409657
34. Pudziuvelyte L, Liaudanskas M, Jekabsone A, Sadauskiene I, Bernatoniene J (2020) *Elsholtzia ciliata* (thunb.) hyl. extracts from different plant parts: phenolic composition, antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Molecules* 25(5): 1153. doi: 10.3390/molecules25051153
35. Kanyal J, Prakash OM, Kumar R, Rawat DS, Pant AK (2019) *Mosla dianthera* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Maxim: Chemical compositions, biochemical assay, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of chloroform extract. *Int J Chem Stud* 7(4): 2807–2813
36. Lee EJ, Kwon YJ, Noh JE, Lee JE, Lee SH, Kim JK, Kim KS, Choi YH, Kwon JH (2005) Optimization of Microwave-Assisted Process for Extraction of Effective Components from *Mosla dianthera* M. *Korean J Food Preserv* 12(6): 617–623
37. Hwang YJ, Lee EJ, Kim HR, Hwang KA (2013) In vitro antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. *BMC Complem Altern M* 13(1): 1–9
38. Lee SA, Lee DH, Baek, JW, Jung EB, Baek JY, Lee IK, Jang TS, Kang KS, Kim KH (2017) In vitro assessment of selected Korean plants for antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Pharm Biol* 55(1): 2205–2210. doi: 10.1080/13880209.2017.1397179
39. Park DS, Park MY, Chon SM, Lee JY, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Kim JH (2011) Antioxidant Activity of Different Solvent Fractions from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 19(6): 484–490. doi: 10.7783/KJMCS.2011.19.6.484