

# 국내산 개똥쑥 소수성 분획물의 항산화 활성 및 항주름 효과 탐색

김수민<sup>†</sup>

<sup>†</sup> 초당대학교 뷰티디자인학과

## Exploration of Antioxidant Activity and Anti-wrinkle Effect of Hydrophobic Fractions of Domestic *Artemisia annua* L.

Su-Min Kim <sup>†</sup>

<sup>†</sup>Department of beautydesign, Chodang University, Muan-gun, Jeollanam-do Korea

(Received : Jul. 31, 2020, Revised : Aug. 31, 2020, Accepted : Sep. 20, 2020)

**Abstract :** *Artemisia annua* belongs to the plant family of Asteraceae and is an annual short-day plant. This plant is known for its various effects such as its anti-cancer, anti-oxidant, anti-inflammatory, and cardiovascular disease therapies. However, the anti-wrinkle effect of the hydrophobic fraction extract has not been reported yet. In this study, the antioxidant activity and anti-wrinkle activity of the number of hydrophobic fractions of domestic *Artemisia annua* L is investigated. Three solvent extracts (hot water, 70% ethanol, and 100% methanol) of *Artemisia annua* L are prepared. In the evaluation results of *Artemisia annua* L. leaf, antioxidant and anti-wrinkle activities are uncovered. The 100% methanol extract shows the highest antioxidant activities and total phenolic and total flavonoid contents among them. Collagenase inhibition, ellstase inhibition, and hyaluronidase inhibition IC<sub>50</sub> rate are 124, 200, and 324 ug/mL, respectively. Therefore, this plant would be a useful anti-wrinkle cosmetic material.

**Keyword :** *Artemisia annua*, Anti-oxidant, Anti-wrinkle, Hydrophobic faction, Cosmetic material.

### 1. 서론

개똥쑥(*Artemisia annua* L.)은 예로부터 동의 보감에 경련, 안면마비등의 신경계 질환 치료와 위장염, 호흡기에 민간 요법에 쓰이는 약용식물로 알려져 있다. 잔잎쑥, 개똥쑥으로도 불리며 길가나 빈터, 강가 등에서 잘 자란다[1, 2]. 생명력과 번식력이 강한 다년생 초본으로 중국, 한국, 일본 등 아시아 지역과 유럽 및 아메리카 지역의 입야에 분포가 되어 있으며, 전 세계적으로 약 400여종의 자생하고 있다[3]. 개똥쑥은 높이가 약 1 m정도에 이르고 6~8월에 녹색의 꽃이 피며 우리나라의 경기, 제주, 평북, 함남 지방이나 아

시아 및 유럽 등지에 널리 분포되어 있다[4]. 중국에서는 예로부터 말라리아 치료를 위한 약초로 사용되어 왔는데, sesquiterpene의 주성분인 artemisinin이 강력한 항말라리아 효능을 지니므로 현재 의약품으로도 이용되고 있다[5]. 개똥쑥의 정유성분으로는 linalol, 1,8-cineol, *p*-cymene, thujone, camphor 등이 있는 것으로 알려져 있다[6]. 국내에서 개똥쑥에 관한 연구로는 전초주의 총 페놀 화합물 함량에 기인하여 DPPH 라디칼 소거능 및 SOD 유사활성이 높았다는 보고가 있으며, 수용성 추출물이 항곰팡이 활성을 가진다는 보고가 되어있다[7]. 이와 같이 개똥쑥의 대한 연구는 주로 수용성 물질에 국한되어 있으며, 소수성 분획물의 항산화 및 항주름 효과에 대한 연구는 진행된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 국내산 개똥쑥 추출물의 소수성 분획물을 사용하여 항산화 및 항주름 효과에 대한 연구를 진행하고 화장품 소재로서의 가능성에 대해서 탐색을 하였다.

<sup>†</sup>Corresponding Author

성명 : 김수민

소속 : 초당대학교 뷰티디자인학과

주소 : 전남 무안군 무안읍 무안로 380

전화 : 061-450-1905

E-mail :kles225@naver.com

## 2. 재료 및 방법

본 실험에서 사용한 개똥썩은(*Artemisia annua*) 2019년 7월경 강원도 태백시에서 자생하는 것을 채취하여 사용하였으며, 15~20일간 자연 건조 한 후 실험에 사용하였다. 추출용매는 OCI社(Seoul, Korea)의 공업용 Ethanol에 증류수를 혼합하여 70% Ethanol로 제조하여 사용하였으며, 공업용 Methanol 100%를 사용하였다. 각종 시약 및 용매는 Sigma aldrich社(St. Louis, USA), 삼전약품社(Seoul, Korea), 덕산약품(Seoul, Korea)의 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

### 2.1 추출물 제조 및 수율

개똥썩의 추출 방법별 활성을 확인하기 위해 열수, 주정, 유기용매를 사용하여 추출을 진행하였다. 개똥썩 잎을 파쇄기를 이용하여 분말 형태로 제조하여 추출을 진행하였다. 열수 추출물은 원물분말 20 g에 증류수 200 mL를 가하고, auto clave를 사용하여 100℃에서 1시간 동안 열수 추출을 진행하고 추출된 용액은 필터 후 동결건조 하였다. 주정 추출물은 원물분말 20 g에 70% 에탄올 200 mL를 가하고, 5일 동안 침지하여 추출을 진행하였고 추출된 추출물은 필터하여 감압농축하였다. 유기용매 추출물은 개똥썩 원물분말 20 g에 100% 메탄올 200 mL를 가하고, 7일 동안 침지하여 추출을 진행하였다. 개똥썩잎의 추출 수율은 주정 추출물, 유기용매 추출물, 열수 추출물로 구분하여 실험을 하였다.

### 2.2 항산화 활성

#### 2.2.1 DPPH radical 소거능 측정

DPPH free 라디칼 소거능은 Blois의 방법을 변형 실험하였다[8]. 개똥썩잎 추출물을 100-1000 µg/mL의 농도가 되도록 제조한 뒤 농도별 샘플 200 µL에 0.25 mM DPPH 시약을 800 µL를 혼합하고, 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 흡광도를 ELISA(FREEDOM EVO100, USA)장비를 활용하여 517 nm 파장에서 측정하였다. 양성대조군으로 gallic acid 를 사용하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 1 - \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

#### 2.2.2 ABTS radical 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Lee의 방법을 변형하여 진행하였다[9]. ABTS 시약을 7 mM 농도로 제조하고, potassium persulfate 시약을 2.45 mM 농도로 제조하여 1:1 비율로 혼합한 후 12시간동안 암실반응시켜 ABTS 라디칼을 생성하고 실험을 진행하였다. 개똥썩 추출물의 농도별 시료 200 µL에 ABTS 라디칼 시약을 1,000 µL를 혼합하고, 암실에서 30분 동안 반응하였다. 반응 후 흡광도를 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하

여 730 nm 파장에서 측정하였다. 양성대조군으로 gallic acid를 사용하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

### 2.3 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 실험을 진행하였다[10]. 개똥썩잎 추출물 시료 500 µL에 0.2 M Folin-Ciocalteu phenol 시약 500 µL, 2% sodium carbonate 수용액(w/v) 500 µL를 추가로 혼합하고 30분 동안 암실에서 반응을 시켰다. 반응 후 혼합물의 흡광도를 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 750 nm 파장에서 측정하였다. 추출물의 최종 농도는 500 µg/mL로 하였고, 총 페놀 함량은 검정곡선에 기초하여 gallic acid (GAE) mg/g 당량으로 표현하였다.

### 2.4 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Eom 등의 방법을 응용하여 실험을 진행하였다[11]. 생달나무 잎, 가지 추출물 시료 500 µL에 methanol 1.5 mL를 혼합하고, 10% aluminium chloride 100 µL, 1 M potassium acetate 100 µL 순서대로 혼합을 하고 증류수 2.8 mL를 첨가하고 상온에서 40분간 반응을 하였다. 반응 후 혼합물의 흡광도를 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader를 활용하여 415 nm 파장에서 측정하였다. 추출물의 최종 농도는 500 µg/mL로 하였고, 총 플라보노이드 함량은 검정곡선에 기초하여 quercetin (QUE) mg/g 당량으로 표현하였다

### 2.5 Collagenase 저해활성

개똥썩잎 추출 용매별 피부 주름 억제 효과를 확인하기 위해 collagenase 저해 활성을 측정하였다[12]. Collagenase 저해활성은 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-DArg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.5 mL 및 시료용액 0.2 mL의 혼합액에 200 units/mL의 농도로 제조한 collagenase type I 효소 (C0130, Sigma, USA) 용액 0.3 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 5% citric acid 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨 뒤, ethyl acetate 1 mL을 첨가하여 320 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Collagenase inhibition rate (\%)} = \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

2.6 Elastase 저해활성

개똥썩임 용매별 추출물의 피부 주름 개선 효과를 확인하기 위해 Kwak 등[12,13]의 방법을 변형하여 실험을 진행하였으며, 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 30분간 p-nitroanilide의 생성량을 측정하였다. 각 시험용액을 100 µg/mL씩 시험관에 취하고 pancreatic solution (Type I: from porcine pancreas 유래, 0.6 unit/mL, Sigma Aldrich, USA)용액 50 µg/mL을 가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide(1mg/mL)을 100 µg/mL을 첨가하여 30분간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.7 통계처리

실험결과의 통계처리는 SPSS 26 (IBM, USA) software에서 Turkey의 방법으로 one-way ANOVA 분석을 통하여 통계분석하였고, p < 0.05 이내가 되는 값을 선별하여 군간 비교 분석을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 개똥썩임 추출물 수율 결과

개똥썩임을 3가지 방법(열수, 주정, 유기용매)으로 각각 추출하였고, 추출결과는 Table 1에 나타내었다. 열수 추출물의 경우 13.5 %, 주정 추출물의 경우는 10.65 %, 유기용매 추출의 경우는 9.75 %로 확인되었으며, 주정추출(70% EtOH)을 사용한 추출 방법의 수율이 가장 높은 것으로 확인되었다.

Table 1. Yield results of *Artemisia annua* L. leaf extracts

Sample	Weight (g)	Yield (%)
AAW*	2.45	12.25
AAE	2.37	11.85
AAM	2.58	12.90

\*AAW; *Artemisia annua* L.leaf of water extraction, AAE; *Artemisia annua* L.leaf of ethanol 70% extraction and AAM; *Artemisia annua* L.leaf of methanol 100% extraction

3.3 DPPH radical 소거능 측정 결과

개똥썩임 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인하고 IC<sub>50</sub>값을 측정하였다(Figure 2, Table 2). DPPH activity 측정 결과 3가지 추출 용매별 항산화 활성이 다르게 측정되었으며, AAW의 IC<sub>50</sub> 값은 922 µg/mL, AAE의 IC<sub>50</sub> 값은 732 µg/mL, AAM의 IC<sub>50</sub> 값은 524 µg/mL,으로 확인되었다. 양성대조군인 gallic acid의 85 µg/mL이었으며,

개똥썩임 추출물보다 높은 활성을 나타내었으나 개똥썩 추출물이 천연물임을 감안했을 때 매우 높은 항산화 활성이 있음을 확인할 수 있다. 기존의 연구에서는 개똥썩 에탄올 추출물의 잎과 줄기 추출물의 항산화 활성을 비교하였는데 줄기보다는 잎의 항산화 활성이 높은 것으로 확인되었다[14]. 또한 맑은대썩의 ethyl acetate 및 분획물 및 butanol 분획물의 항산화능이 양성대조군인 BHT 보다 높다고 보고가 되었다[15]. 이와 같은 실험결과는 본 실험결과와 비슷한 결과이며, crude 상태의 추출물보다 분획물 상태의 샘플이 더 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있다. 추출물을 여러 단계에 걸쳐 분획하면 보다 순수한 물질을 얻을 수 있으며, 불순물을 감소시킬 수 있으므로 항산화 활성 또한 높게 측정된다. 추후 개똥썩 유기용매 추출물을 여러 단계에 걸쳐 분획하여 항산화 활성을 비교할 필요가 있다.

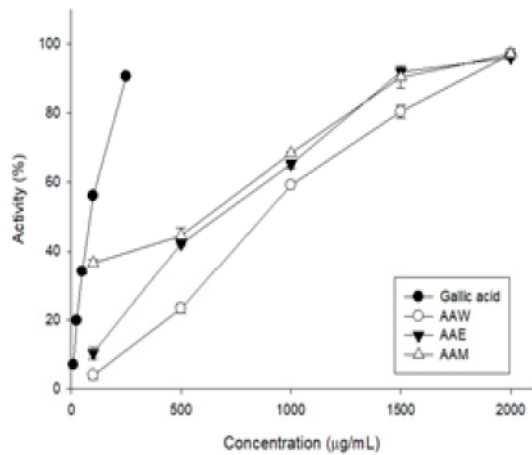


Figure 1. DPPH free radical activity results of *Artemisia annua* L. leaf extracts.

3.4 ABTS radical 소거능 측정 결과

개똥썩임 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 확인하고 IC<sub>50</sub>값을 측정하였다(Figure 3., Table 2). ABTS activity 측정 결과 개똥썩 잎 열수 추출물 및 주정 추출물보다 유기용매 추출물의 항산화 활성이 높은 것으로 확인되었다. 각각의 가지 추출물에서 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보이는 것으로 확인되었다. AAW의 IC<sub>50</sub> 값은 499 µg/mL, AAE의 IC<sub>50</sub> 값은 322 µg/mL, AAM의 IC<sub>50</sub> 값은 244 µg/mL으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 DPPH radical 소거능과 비슷한 결과이며, DPPH radical 소거능 보다 높은 항산화 활성을 갖는 이유는 ABTS radical 소거능 실험은 천연물의 친수성 및 친유성 성분 모두를 측정할 수 있기 때문이다. 기존의 연구에서는 개똥썩 추출물의 radical 소거능이 그 종류에 따라 추출 용매에 따른 활성의 경향이 달라지는 것을 확인하였으며, 20~40 %의 에탄올을 사용하여 추출한 샘플의 radical 소거능이 높다고

보고 하였다. 본 실험결과에서는 메탄올 추출물의 항산화 활성이 높게 측정되었으며, 이와 같은 결과는 메탄올을 사용하여 추출시 친유성 및 친수성 성분이 다량으로 검출되어 항산화 활성이 높게 측정된 것으로 판단된다 (Fig. 2).

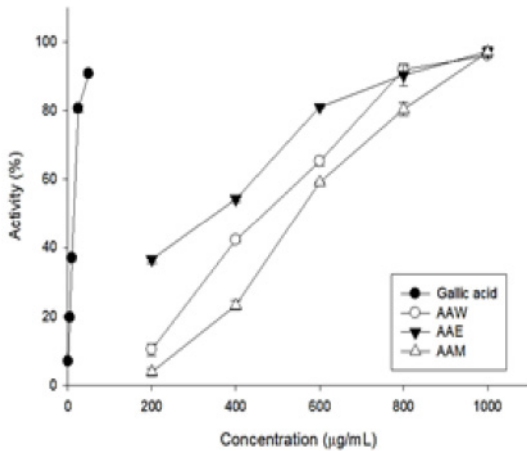


Figure 2. ABTS radical activity results of *Artemisia annua* L. leaf extracts.

3.4 총 폴리페놀 함량 측정 결과

다양한 방법으로 추출한 개똥쑥잎의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다(Table 2). 3가지 방법(열수, 주정, 유기용매)으로 추출한 샘플 모두 높은 폴리페놀 함량을 알 수 있었고, quercetin 보다 gallic acid 함량이 높은 것으로 확인 되었다. 총 폴리페놀 함량은 AAW, AAE, AAM 각각 83.62 GAE mg/g, 108.07 GAE mg/g, 129.87 GAE mg/g 으로 확인되었다. 기존의 연구 결과에 의하면 총 폴리페놀 함량은 평균 95.55-154.80 mg GAE/g으로 본 실험의 결과와 매우 비슷하며 에탄올의 용매 사용량이 40 % 정도에서 가장 높은 함량을 나타내며, 60% 에탄올 사용시 총 폴리페놀 함량이 감소한다고 보고하였다[16]. 본 실험에서는 100% 에탄올을 사용하여 추출을 진행하였으며, 열수나 주정 추출(70% 에탄올 추출)보다는 100% 메탄올 추출물의 폴리페놀 함량이 높은 것을 확인하였다.

3.5 총 플라보노이드 함량 측정 결과

플라보노이드는 폴리페놀 화합물에 속하며 대표적인 성분으로는 catechin, anthocyanin, quercetin 등이 있다[11]. 3가지 다른 용매 추출 방법으로 추출한 개똥쑥잎의 플라보노이드 함량은 유기용매 추출 방법의 플라보노이드 함량이 가장 높은 것으로 확인되었다(Table 2).

Table 2. Total polyphenol (TPC) and total flavonoid contents (TFC) of *Artemisia annua* L. leaf extracts

Sample	TPC	TFC
	GAE mg/g	QUE mg/g
AAW	83.62 ± 0.24	3.15 ± 0.08
AAE	107.07 ± 0.75	5.38 ± 0.05
AAM	129.87 ± 1.10	21.40 ± 0.08

3.6 Collagenase 저해활성 측정 Elastase 저해활성 측정 결과

주름개선 효과는 콜라겐을 분해하는 collagenase 및 elastase의 작용을 억제하는 것을 기본으로 한다[17]. Collagen은 피부의 fibroblast에서 합성되며, 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등의 기능이 알려져있다[18]. 본 연구의 결과 개똥쑥잎 추출물의 3가지 용매 추출방법중에서 유기용매 추출방법의 collagenase 및 elastase 저해활성이 가장 높게 측정되었으며, IC<sub>50</sub> 값은 152.60 µg/mL, 187.14 µg/mL 이었다. 또한 양성대조군으로 사용한 adenosine의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 49.43 µg/mL로 측정되었다(Fig. 3, Fig. 4). 이와 같은 결과로 보았을 때 개똥쑥 유기용매 추출물의 collagenase 저해 활성 및 elastase 저해활성은 천연물 기준으로 매우 높은 저해활성이 있음을 확인할 수 있다.

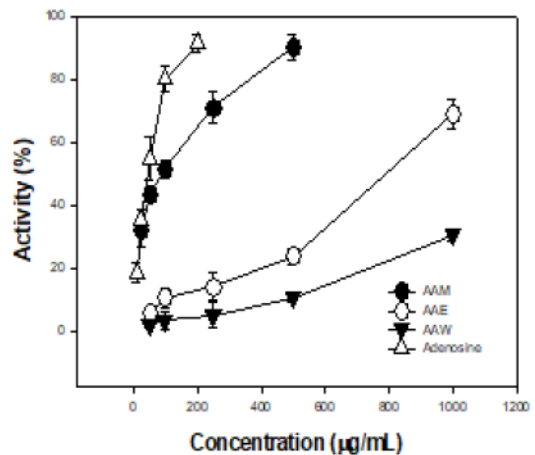


Figure 3. Collagenase inhibition activity of *Artemisia annua* L. leaf extracts.

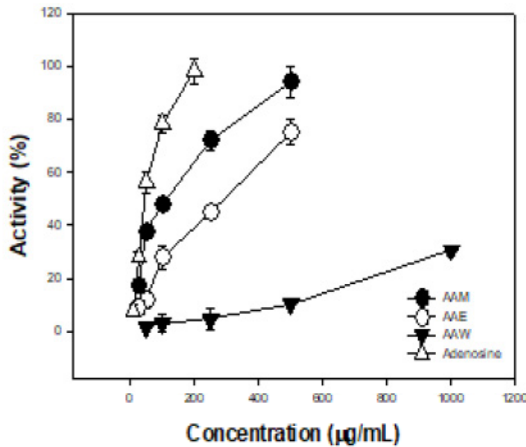


Figure 4. Elastase inhibition activity of *Artemisia annua* L. leaf extracts.

## 5. 결론

본 연구에서는 개똥쑥을 3가지 용매로 추출하여 항산화 활성 및 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량을 비교하였다. 항산화 실험결과 열수 추출, 주정추출, 유기용매 추출 방법중에서 유기용매 추출방법의 항산화 활성 및 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량이 높게 측정되었다. 또한 주름개선 효과에 대한 검증을 하고자 collagenase 및 elastase 저해 활성을 조사하였는데 3가지 추출 방법중에서 유기용매 추출 방법의 저해활성이 가장 높으로 나타났다. 이와 같은 결과로 보았을 때 개똥쑥잎은 추출 용매와 추출 방법에 따라 항산화 활성 및 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량이 달라지는 것을 알 수 있다. 또한 추출물의 함량이 증가할수록 항산화 활성, collagenase 및 elastase 저해 활성도 높아지는 것으로 판단된다. 따라서 개똥쑥 잎 유기용매 추출물은 항산화 및 항주름 개선 화장품 소재로써 잠재적 가능성이 있다고 사료된다.

## 참고문헌

- Lodari, C., K. Hattori, and Y. Futsuhara. *Jpn. J. Breed.* 39: 9-12 (1989).
- Li, L., B. A. Josef, B. Liu, S. Zheng, L. Huang, and S. Chen. *Front. Plant Sci.* 8: 1-10 (2017).
- Ryu, J. H., R. J. Kim, S. J. Lee, I. S. Kim, H. J. Lee, and N. J. Sung. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 163-170 (2011).
- Tu, Y. *Nat. Med.* 17: 17 (2011).
- Charles, D. J., E. Cebert, and J. E. J. Simon. *Essent. Oil Res.* 3: 33-39 (1991).
- Kim, K. B., K. H. Yoo, H. Y. Park, and J. M. Jeong. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 328-333 (2006).
- Park, E. J. and D. Y. Jhon. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 655-659 (2010).
- Lee, S. O., H. J. Lee, M. H. Yu, H. G. Im, and I. S. Lee. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 233-24 (2005).
- Choi, S. Y., Y. C. Kim, and B. S. Chang. *Korean J. Microscopy* 41: 169-177 (2011).
- Choi, S. Y., Y. C. Kim, and B. S. Chang. *Korean J. Microscopy* 41: 169-177 (2011).
- Eom, S. H., H. J. Park, C. W. Jin, D. O. Kim, D. W. Seo, Y. H. Jeong, and D. H. Cho. *Food Sci. Biotech.* 17 : 408-412 (2008).
- Kwak, Y. J., D. H. Lee, N. M. Kim, and J. S. Lee. *Korean soc. Med. Crop. Sci.* 13: 213-216 (2005).
- Kornicka, K., D. Nawrocka, A. Lis-Bartos, M. Maredziak, and K. Marycz, *RSC Adv.* 7: 24070-24084 (2017).
- Jung IC. *J East Asian Soc Dietary Life* 16: 332-343 (2006).
- Choi, S. R, D. H. You, J. Y. Kim, C. B. Park, J. Ryu, D. H. Kim, and J. S. Eun *Korean J Medicinal Crop Sci* 16: 112-117 (2008).
- Kim, K. B., K. H. Yoo, H. Y. Park, and J. M. Jeong *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 328-333 (2006).
- Jeon, H. *Kor. J. Herbology* 18: 187-187 (2003).
- Sin, B. Y., and H. P. Kim *Arch. Pharm. Res.* 28: 1152-1155 (2005).