

추출 방법에 따른 금화규 꽃 추출물의 항산화 활성 및 성분 함량 분석

김나인¹, 최문희¹, 박길수², 신현재^{1*}

Analysis of Antioxidant Activity and Component Contents of *Aurea Helianthus* Flower Extracts with Different Extraction Methods

Nain Kim¹, Moon-Hee Choi¹, Gil-Su Park², and Hyun-Jae Shin^{1*}

Received: 27 May 2021 / Revised: 24 June 2021 / Accepted: 25 June 2021

© 2021 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Aurea helianthus* (AH), one of representative warm-temperature plant in southern Korea, is traditionally used in China for various medicinal purposes. The bioactive constituents from aerial parts of the AH leaf and stem as well as flowers have been studied by several researchers showing anti-inflammation, immune-modulatory, antioxidant, and whitening effects. However, the effects of the AH flower on the biological activities for cosmetic application have not been thoroughly investigated. This study reported the possible utilization of AH flower extracts (AHF) with different extraction methods and validated antioxidant and analysis of the bioactive components. The AHF was treated with hot water, cold water, 70% ethanol respectively. Besides component analysis of the extract, the antioxidant activities were determined with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assay. The 70% ethanol extracts showed the highest antioxidant activities and active ingredient contents like the total phenolic, flavonoid and sugar and protein contents. Interestingly, collagen contents and free amino acids analysis were determined maximum in the cold-water extracts. Then the diversification and standardization of extraction methods were to be studied further in the future. In summary, AHF are useful plant resources

that can provides promising antioxidation and can be used as potential natural cosmetics ingredients and healthy foods.

Keywords: *Aurea helianthus*, extraction methods, antioxidant activity, cosmetics, polyphenol, flavonoids

1. INTRODUCTION

활성산소종의 과잉 생산은 건강한 세포에 산화를 일으켜 세포와 DNA를 손상시키며 염증, 암, 노화 관련 질환과 같은 퇴행성 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다 [1]. 폴리페놀은 superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$), alkoxy radical ($\text{RO}\cdot$) 등의 활성산소종을 제거하여 세포를 산화적 손상으로부터 보호할 수 있다. 현재 많은 연구에서 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있는 천연 소재는 높은 항산화 활성과 생분해성을 나타내며 낮은 독성의 장점을 가지고 있어 제약과 식품, 화장품 산업 등에 광범위하게 이용되고 있다 [2]. 금화규 (*Aurea helianthus*)는 아욱과 (Malvaceae)에 속하는 다년생 허브로서 중국이 원산지이며 예로부터 중국에서 전통적으로 약초로 사용되어 왔고 잎과 줄기는 유용한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 금화규는 노란색의 활짝 핀 꽃 모양으로 황금 해바라기라는 이름을 가지고 있으며, 같은 아욱과 식물인 닥풀 (*Abelmoschus manihot*) 및 열대에서 자생하는 오크라 (*Abelmoschus esculentus*)와 매우 유사한 꽃모양을 가지고 있다. 닥풀은 금화규와 마찬가지로 중국이 원산지인 중국의 전통적인 약초이며, 닥풀의 에탄올 추출물로 만들어진 Huangkui 캡슐은 현재 중국의 신장 질환 환자 치료에 사용된다 [3]. 금화규 추출물의 생리활성에는 종양 세포 억제, 항산화, 지질대사조절, 항염 및 멜라닌 생성 억제 등의 기능이 알려져 있다 [4]. 금화

¹조선대학교 대학원 화학공학과

¹Department of Chemical Engineering, Graduate School of Chosun University, Gwangju 61452, Korea

Tel: +82-62-230-7518, Fax: +82-62-230-7226

E-mail: shinhj@chosun.ac.kr

²(주)한라산 부설 고려산삼연구소

²Hanrasan, Inc., Jeju 63234, Korea

규의 어린 잎은 철분, 비타민 A 및 비타민 C 함량이 높아 차 또는 수프의 형태로 음용되고 있다 [5]. 금화규 추출물의 선행 연구결과를 살펴보면 주로 동남아시아에서 자생하는 금화규의 생리활성 등이 일부 보고되었으며, 금화규 꽃의 추출 방법에 따른 성분 함량 및 생리활성 등은 거의 보고가 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 물과 에탄올을 용매로 사용한 추출 방법에 따른 금화규 꽃 추출물 (AHF)을 제조하고, 항산화 활성 (DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능) 과 성분함량 (총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 총 당 및 단백질, collagen 함량과 유리아마노산 측정 등)을 비교 분석하여 화장품 및 식품소재로서의 활용 가능성에 대해서 검토하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 금화규 꽃 추출물 제조

본 연구에 사용된 금화규 꽃은 2020년도 7월경에 제주자치도 제주시 소재의 농장에서 채취되었으며, (주)한라산 백봉인 (Jeju, Korea)으로부터 제공받아 사용하였다. 금화규 꽃은 세척 후 건조 후 분쇄하여 시료로 사용하였다. 추출 방법에 따른 금화규 꽃의 활성을 확인하기 위해 열수, 냉수, 70% 에탄올을 사용하여 추출을 진행하였다 (Fig. 1). 열수 추출물은 건조된 금화규 꽃 시료 50 g을 증류수 1 L에 침지시킨 후 auto clave를 사용하여 121°C, 90 분 동안 추출하였다. 추출물은 여과지 (Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후에 감압농축기를 이용하여 농축하고, 동결 건조하여 시료로 사용하였다 (AHF1). 냉수 추출물은 건조된 금화규 꽃 시료 50 g을 증류수 1 L에 침지시킨 후 25°C, 8 시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과지 (Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후에 감압농축기를 이용하여 농축하고, 동결 건조하여 시료로 사용하였다 (AHF2). 70% 에탄올 추출물은 건조된 금화규 꽃 시료 50 g을 70% 에탄올 1 L에 침지시킨 후 80°C, 6 시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과지 (Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후에 감압농축기를 이용하여 농축하고, 동결 건조하여 시료로 사용하였다 (AHF3). 추출 수율은 아래의 식에 의해 계산하였다.

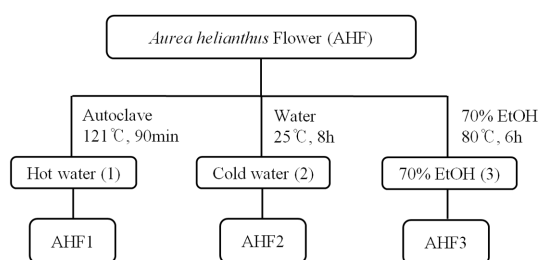


Fig. 1. Isolation diagram of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods.

$$\text{Extraction yield (\%)} = (W1 \times 100) / W2$$

W1 : the weight of dry extract

W2 : the weight of the plant powder

2.2. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다 [6]. 각 농도 별 금화규 꽃 추출물 200 μ L에 0.25 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약 800 μ L를 혼합하여 암실에서 30 분 동안 반응시켰다. 흡광도는 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 를 사용하여 517 nm 파장에서 측정하였다. gallic acid는 양성 대조군으로 사용하여 비교 실험하였다. 각 용액의 radical 소거능은 다음 식에 의해 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

2.3. ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능은 Re 등의 방법을 변형하여 측정하였다 [7]. 14 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 시약을 7 mM, potassium persulfate (4.9 mM) 시약을 2.45 mM 농도로 제조하여 1 : 1 비율로 혼합한 후에 암실에서 18 시간동안 ABTS radical을 형성하여 준비하였다. 이 용액은 730 nm에서 흡광도 값이 0.9 ± 0.02 가 될 수 있도록 증류수로 희석하여 사용하였다. 각 농도 별 금화규 꽃 추출물 200 μ L에 ABTS 용액 1,000 μ L를 혼합하여 암실에서 15 분 동안 반응시켰다. 흡광도는 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 를 사용하여 730 nm 파장에서 측정하였다. quercetin은 양성 대조군으로 사용하여 비교 실험하였다. 각 용액의 radical 소거능은 다음 식에 의해 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

2.4. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량 분석은 Folin-Ciocalteu 방법을 활용하여 측정하였다 [8]. 각 농도 별 금화규 꽃 추출물 500 μ L에 0.2 M Folin-Ciocalteu's phenol 시약 500 μ L, 2% sodium carbonate 수용액(w/v) 500 μ L를 추가로 혼합하고, 암실에서 30 분 동안 반응시켰다. 흡광도는 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader를 사용하여 750 nm 파장에서 측정하였다. 이때 추출물의 최종 농도는 500 μ g/mL로 하여 gallic acid (GAE)와 *p*-coumaric acid (COE) 를 표준물질로 사용한 검량 곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

2.5. 총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량 분석은 Kim등의 방법을 활용하여 측정하였다 [9]. 각 농도 별 금화규 꽃 추출물 500 μ L에 methanol

1.5 mL, 10% aluminium chloride 100 µL, 1 M potassium acetate 100 µL, 증류수 2.8 mL를 차례대로 첨가하여 상온에서 40 분 동안 반응시켰다. 흡광도는 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 를 사용하여 415 nm 파장에서 측정하였다. 이때 추출물의 최종 농도는 500 µg/mL로 하여 quercetin (QUE)과 rutin (RUE)을 표준물질로 사용한 검량곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

2.6. 총 당 함량 분석

총 당 함량 분석은 phenol-sulfuric acid 방법을 활용하여 측정하였다 [10]. 각 농도 별 금화규 꽃 추출물 500 µL에 5% phenol solution 500 µL, H₂SO₄ 2 mL를 차례대로 첨가하여 상온에서 15 분 동안 반응시켰다. 흡광도는 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 를 사용하여 490 nm 파장에서 측정하였다. 총 당 함량의 정량은 glucose를 이용하여 검량곡선을 작성하여 계산하였다.

2.7. 총 단백질 함량 분석

총 단백질 함량 분석은 Bradford 방법을 변형하여 측정하였다 [11]. 각 농도 별 금화규 꽃 추출물 10 µL에 증류수 390 µL, Bradford 시약 100 µL를 혼합하여 상온에서 5분 동안 반응시켰다. 흡광도는 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 를 사용하여 595 nm 파장에서 측정하였다. 총 단백질 함량의 정량은 albumin을 이용하여 검량곡선을 작성하여 계산하였다.

2.8. Collagen 함량 분석

Collagen 함량 분석은 Bergman 등의 방법을 활용하여 측정하였다 [12]. 각 추출방법 별 금화규 꽃 추출물은 1 g에 6N HCl을 10 mL 가하여 섞은 다음 100°C, 24 시간 동안 완전히 가수분해 시켰다. 표준용액인 trans-4-hydroxy-L-proline 으로 0~5 mg/mL의 범위의 stock solution을 만들어 표준용액과 가수분해가 끝난 추출물을 유리관에 각각 1.6 mL씩 분주한 후, 2N NaOH 용액 900 µL 와 900 µL chloramine-T을 순서대로 혼합하여 상온에서 30 분간 반응시켰다. 이때 추출물은 12,000 rpm, 7 분 동안 원심분리 하여 사용하였다. 700 µL Ehrlich reagent를 첨가한 다음 62.5°C에서 40 분 동안 반응시켜 상온에서 냉각하였다. 흡광도는 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 를 사용하여 550 nm 파장에서 측정하였다. collagen 중 hydroxyproline의 이론적 함량은 13.5% 이므로 아래 식에 따라 collagen 함량을 구한다.

$$\text{Collagen contents (mg/g)} = 100 / 13.5 \times \text{Hydroxyproline contents (mg/g)}$$

2.9. 유리 아미노산 분석

유리 아미노산 분석은 각 추출방법 별 금화규 꽃 추출물 0.1 g을 18 mL 유리관에 칭량 후 6 N HCl을 5 mL를 가하여 감압 밀봉한 후 110°C, 24 시간 동안 완전히 가수분해 시켰

다. 가수분해가 끝난 추출물은 50°C에서 rotary evaporator로 산을 제거한 후 Lithium dilution buffer로 10 mL 정용 하였다. 이 중 1 mL를 취하여 membrane filter 0.2 µm로 여과시켜 4.6 × 150 mm Cation separation column (LCA K07/Li)을 사용하여 아미노산 자동분석기 (S433, Sykam GmbH, Germany, Munich)로 정량분석 하였다.

2.10. HPLC를 이용한 폴리페놀 함량 분석

추출물에 함유된 폴리페놀류를 정량분석하기 위해 HPLC (SPD-20A, SHIMADZU CO., Japan)를 이용하여 분석을 진행하였다. 각 추출방법 별 금화규 꽃 추출물은 10 mg/mL 농도로 제조한 후 0.45 µm syringe filter 로 여과하여 사용하였다. column은 C₁₈ column (Shim-pack GIS-ODS, 4.6 × 250 mm, 5.0 µm, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였고, 이동상은 water (2% acetic acid) (A), acetonitrile (B)로 하여 280 nm에서 측정하였다. 분석 조건은 이동상의 구배 조건은 이동상(B)를 기준으로 0 min: B (10%), 0~10 min: B (10%), 10~70 min: B (40%), 70~80 min: B (100%), 80~85 min: B (100%), 85~95 min: B (10%), 95~105 min: B (10%)로 하였으며 샘플의 주입량은 20 µL였다. 표준물질로는 ascorbic acid, niacinamide, gallic acid, catechin hydrate, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, ethyl gallate, *p*-coumaric acid, rutin hydrate, ferulic acid, naringin, quercetin을 사용하였다.

2.11. 통계처리

본 실험에서 얻어진 모든 결과값은 3 회 이상의 반복 실험을 통하여 실험 결과값의 평균±표준오차로 나타내었다. 이에 대한 통계적 분석은 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 사용하여 Duncan 방법으로 one-way ANOVA 분석을 통하여 통계분석을 실시하였으며, $p < 0.05$ 이내가 되는 값을 선별하여 유의성이 있다고 판단하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 금화규 꽃 추출물의 수율

천연물로부터 유효성분의 추출은 추출되는 용매의 비율과 종류, 추출 방법 등에 따라 추출되는 성분들이 달라지기 때문에 추출 수율에 있어서도 차이를 보인다 [13]. 본 실험에서 금화규 꽃은 3 가지 방법으로 추출하였으며, 각 추출방법별 금화규 꽃의 수율은 Table 1에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 수율은 열수, 냉수, 70% 에탄올을 사용했을 때 각각

Table 1. Extract yield of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods

Sample	Weight (g)	Yield (%)
AHF1	24.28	48.56
AHF2	5.27	10.54
AHF3	16.39	21.78

48.56%, 10.54%, 21.78% 로 열수 추출물에서 수율이 가장 높은 것으로 확인되었다. Kim 등의 연구에서 금화규 잎의 80% 에탄올 추출물의 수율은 23.3%로 본 실험결과와 비슷하였다 [5]. 본 실험 결과에서는 점성이 있는 수용성 물질들이 열수 추출물에 추출되어 수율이 가장 높은 것으로 사료된다.

3.2. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical은 비교적 안정한 free radical로 이는 인체 내에서 세포의 노화와 각종 질병 등을 일으키므로 천연물에 항산화제로 작용할 수 있는 물질들의 항산화 활성을 평가하는데에 널리 사용되고 있다 [14]. 본 실험에서 금화규 꽃 추출물을 100 µg/mL~1000 µg/mL의 농도로 제조하여 농도 별 DPPH radical 소거능을 확인하고 IC₅₀ 값을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 Table 2에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 DPPH radical 소거능은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확

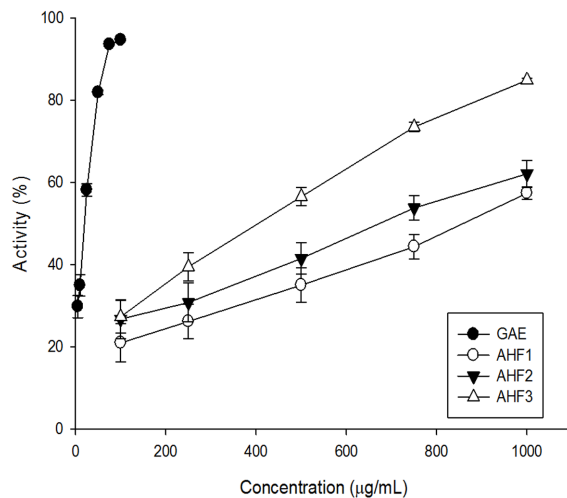


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods. The appropriate amount of gallic acid was used as a positive control (GAE). The results are the mean \pm SD from three independent experiments.

인 할 수 있었으며, 70% 에탄올 추출물에서의 IC₅₀ 값이 422.20 µg/mL로 가장 높은 활성을 보였다. 이는 Kim 등의 연구에서 보고한 금화규 잎의 80% 에탄올 추출물보다 더 높은 DPPH radical 소거능을 나타내며 금화규 꽃이 잎보다 더 높은 DPPH radical 소거능을 가지는 것으로 사료된다 [4]. 반면에 금화규 꽃의 열수 추출물과 냉수 추출물은 IC₅₀ 값이 각각 853.93 µg/mL, 692.54 µg/mL로 70% 에탄올 추출물에 비해 낮은 DPPH radical 소거능을 나타내었다. 본 실험 결과는 주로 지용성 물질의 항산화 능력을 측정하는 DPPH radical의 특징에 따라 열수 및 냉수 추출물이 70% 에탄올 추출물에 비해 비교적 낮은 DPPH radical 소거능을 나타내는 것으로 사료된다 [15].

3.3. ABTS radical 소거능 측정

금화규 꽃 추출물을 100 µg/mL~1000 µg/mL의 농도로 제조

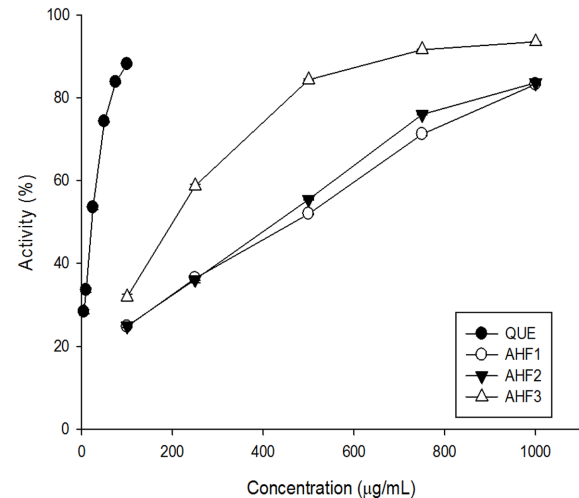


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods. The appropriate amount of quercetin was used as a positive control (QUE). The results are the mean \pm SD from three independent experiments.

Table 2. IC₅₀ values of DPPH and ABTS radical scavenging activities, total polyphenol and total flavonoid contents of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods. The results are the mean \pm SD from three independent experiments. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

Sample	DPPH IC ₅₀	ABTS IC ₅₀	TPC		TFC	
	(µg/mL)	(µg/mL)	(GAE ¹⁾ mg/g)	(COE ²⁾ mg/g)	(QUE ³⁾ mg/g)	(RUE ⁴⁾ mg/g)
AHF1	853.93 \pm 6.36 ^c	466.69 \pm 3.13 ^c	5.12 \pm 0.08 ^a	26.73 \pm 0.07 ^a	31.83 \pm 1.19 ^b	79.65 \pm 2.59 ^a
AHF2	692.54 \pm 8.86 ^b	443.02 \pm 4.65 ^b	5.39 \pm 0.12 ^b	29.27 \pm 0.23 ^b	27.09 \pm 2.03 ^a	98.83 \pm 1.54 ^b
AHF3	422.20 \pm 4.13 ^a	215.63 \pm 4.89 ^a	10.18 \pm 0.02 ^c	72.75 \pm 0.06 ^c	62.98 \pm 2.88 ^c	169.41 \pm 2.59 ^c
STD (Gallic Acid)	22.73 \pm 2.04	-	-	-	-	-
STD (Quercetin)	-	27.23 \pm 0.51	-	-	-	-

¹⁾Total polyphenol contents was expressed as equivalent of mg gallic acid per gram.

²⁾Total polyphenol contents was expressed as equivalent of mg p-coumaric acid per gram.

³⁾Total flavonoid contents was expressed as equivalent of mg quercetin per gram.

⁴⁾Total flavonoid contents was expressed as equivalent of mg rutin hydrate per gram.

하여 농도 별 ABTS radical 소거능을 확인하고 IC₅₀값을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 3와 Table 2에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 ABTS radical 소거능은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, DPPH radical 소거능 측정결과와 마찬가지로 70% 에탄올 추출물에서의 IC₅₀ 값이 215.63 µg/mL로 가장 높은 활성을 보였다. 또한 열수 추출물과 냉수 추출물은 IC₅₀ 값이 각각 466.69 µg/mL, 443.02 µg/mL로 비슷한 ABTS radical 소거능을 보여주었다. 본 실험결과는 ABTS는 cation radical이고, DPPH는 free radical이라는 점에서 추출방법 별 항산화물질의 종류가 다름에 따라 두 radical에 결합하는 능력이 달라 radical을 제거하는 능력이 차이나는 것에 있는 것으로 사료되며 또한 ABTS radical은 수용성 물질과 지용성 물질의 항산화 능을 측정할 수 있는 특징에 따라 DPPH radical에 비해 더 높은 IC₅₀ 값을 나타낸 것으로 사료된다 [16].

3.4. 총 폴리페놀 함량 분석

폴리페놀은 식물에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, 이들은 hydroxyl group을 가지고 있어 단백질과 여러 화합물들과 쉽게 결합하고, 대표적으로 항산화, 항염, 항암 등의 생리활성을 갖는다 [17,18]. 또한 폴리페놀의 함량이 증가함에 따라 다양한 생리활성이 증가하는 경향을 보이는 것으로 알려져 있다 [19]. 본 실험에서는 추출방법 별 금화규 꽃 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 폴리페놀 함량은 70% 에탄올 추출물에서 10.18 GAE mg/g, 72.75 COE mg/g으로 가장 높은 폴리페놀 함량을 보였으며, 열수 추출물과 냉수 추출물은 각각 5.12 GAE mg/g, 26.73 COE mg/g 그리고 5.39 GAE mg/g, 29.27 COE mg/g 이었다. 이는 금화규 꽃 추출물의 페놀성 화합물이 수용성 용매에서 용해도가 낮기 때문에 유기용매에서 더 많은 양의 폴리페놀이 측정된 것으로 사료되며, 금화규 꽃에 gallic acid 보다 *p*-coumaric acid 함량이 더 많은 것을 나타낸다. Mohite (2019) 등의 연구에서 금화규와 같은 아욱과에 속하는 *A. esculentus*, *A. manihot*, *A. ficulneus*, *A. esculentus* cv. Phule Utkarsha의 추출방법별 열매 추출물의 GAE mg/g의 함량은 *A. esculentus* cv. Phule Utkarsha의 물 추출물에서 최대 5.86 GAE mg/g을 나타냈다는 보고가 있다 [20]. 이는 본 연구 결과와 비교하였을 때 금화규 꽃 추출물의 폴리페놀 함량은 다른 아욱과 종과 비슷하지만, 70% 에탄올 추출물은 약 2 배 이상 함량이 높은 것으로 확인되었다.

3.5. 총 플라보노이드 함량 분석

플라보노이드는 폴리페놀 화합물의 일종으로 대표적으로 quercetin, naringin, rutin 등이 있으며, 식물의 다양한 부위에 함유되어 있다. 또한 폴리페놀과 마찬가지로 항산화 및 항염 등의 효과가 보고되고 있다 [21]. 본 실험에서는 추출방법 별 금화규 꽃 추출물의 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 플라보노

이드 함량은 70% 에탄올 추출물에서 62.98 QUE mg/g, 169.41 RUE mg/g으로 가장 높은 플라보노이드 함량을 보였으며, 열수 추출물과 냉수 추출물은 각각 31.83 QUE mg/g, 79.65 RUE mg/g 그리고 27.09 QUE mg/g, 98.83 RUE mg/g 이었다. 이는 금화규 꽃에 quercetin 보다 rutin 함량이 더 많은 것을 나타낸다. Ayushi (2016) 등의 연구에서 금화규와 같은 아욱과에 속하는 오크라 (*A. esculentus*) 잎의 물 추출물은 6.12 QUE mg/g을 나타냈다 [22]. 이는 본 연구 결과와 비교하였을 때 금화규 꽃 추출물의 플라보노이드 함량이 오크라 잎보다 약 5배에서 10배 가량 높은 함량을 나타내는 것으로 확인되었으며, 금화규 종과 재배지 토양에 함유된 질소 함량 등과 같은 환경적인 영향으로 판단된다.

3.6. 총 당 함량 분석

본 실험에서는 추출방법 별 금화규 꽃 추출물의 당 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 당 함량은 70% 에탄올 추출물에서 686.51 mg/g 으로 가장 높은 함량을 보였으며, 열수 추출물과 냉수 추출물은 각각 244.56 mg/g, 223.13 mg/g 이었다. Gemede (2016) 등의 연구에서 금화규와 같은 아욱과에 속하는 오크라 (*A. esculentus*) 꼬투리의 당 함량은 366.60 mg/g 에서 509.70 mg/g 사이의 값을 나타냈다는 보고가 있다 [23]. 이는 본 연구 결과와 비교하였을 때 크게 다르지 않았으며, 탄수화물 100 g 당 72~90 g을 함유 한 곡물과 같은 일부 기존 공급원의 함량과 비교할 때 잠재적인 탄수화물 공급원으로 간주될 수 있는 것으로 사료된다 [24].

3.7. 총 단백질 함량 분석

단백질의 주요 기능은 인체에서 손실된 조직의 성장과 교체이며, 그 중 Arbutin은 미백 독성 물질인 Hydroquinone의 부작용 대체 성분으로 사용되고 있다 [25]. 본 실험에서는 추출방법 별 금화규 꽃 추출물의 단백질 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 단백질 함량은 70% 에탄올 추출물에서 90.49 mg/g 으로 가장 높은 함량을 보였으며, 열수 추출물과 냉수 추출물은 각각 78.24 mg/g, 78.29 mg/g이었다. 금화규는 Nzikou (2006) 등의 연구에서 알려진 *Moringa oliefera* (4.2 g/100 g), *Amarantus* sp. (6.1 g/100 g), *Gnetum africanum* (1.5 g/100 g) 및 *Pterocarpus*

Table 3. Component contents of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods. The results are the mean ± SD from three independent experiments. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

Sample	Total carbohydrate contents	Total protein contents	Hydroxyproline contents
	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
AHF1	244.56 ± 2.01 ^b	78.24 ± 0.72 ^a	135.41 ± 0.10 ^b
AHF2	223.13 ± 3.47 ^a	78.29 ± 1.85 ^a	162.66 ± 0.07 ^c
AHF3	686.51 ± 3.78 ^c	90.49 ± 1.67 ^b	98.31 ± 0.04 ^a

sp. (2.0 g/100 g)와 비교하였을 때 유전적 요인으로 인한 차이가 존재하지만 좋은 단백질 공급원임을 의미한다 [26].

3.8. Collagen 함량 분석

피부의 구성 물질 중 하나인 collagen은 외부 스트레스나 내부의 산화적 손상에 의해 분해가 진행됨에 따라 주름이 깊어지고 탄력이 감소되어 피부 노화의 원인이 된다 [27]. 본 실험에서는 추출방법 별 금화규 꽃 추출물의 collagen 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 금화규 꽃 추출물의 collagen 함량은 냉수 추출물에서 162.66 mg/g로 가장 높은 함량을 보였으며, 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물은 각각 135.41 mg/g, 98.31 mg/g 이었다. 이는 표준물질로 쓰인 hydroxy proline이 수용성이기 때문에 유기용매가 들어가지 않은 추출물에서 collagen 사슬 간에 좀 더 강한 수소 결합에 의한 것으로 판단된다. 본 실험에서 HPLC 분석결과를 보면 금화규 꽃 추출물에는 collagen 생성에 필수인 비타민 C, 비타민 B 등이 다량으로 함유되어 높은 collagen 함량이 측정 된 것으로 판단된다. Kim (2017) 등의 연구에서 금화규는 collagen의 합성을 돕는 효과가 있는 것으로 보고하였는데 이는 본 연구결과와 일치하는 결과이며, 금화규가 피부에 자극을 주어 procollagen 합성 촉진에 영향을 미치는 것

로 사료된다 [5].

3.9. 유리 아미노산 분석

aspartic acid, glutamic acid, glycine 및 alanine 등의 유리 아미노산은 식품의 향기와 풍미를 부여한다고 알려져 있다 [28]. 본 실험에서는 추출방법 별 금화규 꽃 추출물의 식품소재로써의 가능성을 확인 하기 위해 유리 아미노산 분석을 진행하였으며, 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 유리 아미노산 함량은 꽃 분말에서 가장 높게 검출되었고, 추출물 중에서는 냉수 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었다. 유리 아미노산의 종류는 총 18 종류로, 꽃 분말과 모든 추출물에서 동일한 종류의 아미노산이 검출됨을 확인하였다. 유리 아미노산의 함량은 금화규 꽃 분말과 모든 추출물에서 glutamic acid의 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으며 aspartic acid, alanine, glycine도 다량으로 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 추후 초음파 처리 등 다양한 추출방법을 통해 아미노산 함량 변화를 분석하는 것도 의미가 있을 것으로 사료된다.

3.10. HPLC를 이용한 폴리페놀 함량 분석

금화규 꽃 추출물에 함유된 폴리페놀류를 확인하기 위해 HPLC 분석을 진행하였고, 그 결과는 Fig. 4와 Table 5에 나타

Table 4. Free amino acid contents of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods

Amino acids	AHF		AHF1		AHF2		AHF3	
	mg/100g	%	mg/100g	%	mg/100g	%	mg/100g	%
Aspartic acid	985.16	7.91	524.85	6.79	707.53	6.62	433.67	6.12
Threonine	577.78	4.64	266.76	3.45	405.29	3.79	244.23	3.44
Serine	672.28	5.40	427.01	5.52	351.11	3.28	384.08	5.42
Glutamic acid	2,389.23	19.17	2,117.06	27.38	3,248.05	30.39	2,595.29	36.60
Proline	763.62	6.13	402.77	5.21	634.38	5.94	417.33	5.89
Glycine	759.69	6.10	519.90	6.72	741.46	6.94	431.39	6.08
Alanine	917.67	7.36	657.60	8.50	1,077.30	10.08	741.44	10.46
α -aminobutyric acid	694.18	5.57	334.96	4.33	437.87	4.10	331.30	4.67
Methionine	184.60	1.48	121.40	1.57	197.80	1.85	43.98	0.62
Isoleucine	613.00	4.92	295.92	3.83	377.07	3.53	204.30	2.88
Leucine	1,004.54	8.06	298.49	3.86	396.05	3.71	209.26	2.95
Tyrosine	335.64	2.69	170.36	2.20	172.29	1.61	80.53	1.14
Phenylalanine	564.63	4.53	266.62	3.45	334.59	3.13	179.12	2.53
β -alanine	403.59	3.24	271.76	3.51	256.03	2.40	82.38	1.16
γ -amino-n-butyric acid	290.70	2.33	408.63	5.28	679.60	6.36	513.81	7.25
Histidine	247.96	1.99	121.03	1.57	177.00	1.66	53.16	0.75
Lysine	606.77	4.87	223.04	2.88	254.83	2.38	81.86	1.15
Arginine	450.00	3.61	304.43	3.94	240.20	2.25	64.24	0.91
Total	12,461.03		7,732.58		10,688.43		7,091.36	

AHF : *A. helianthus* flower

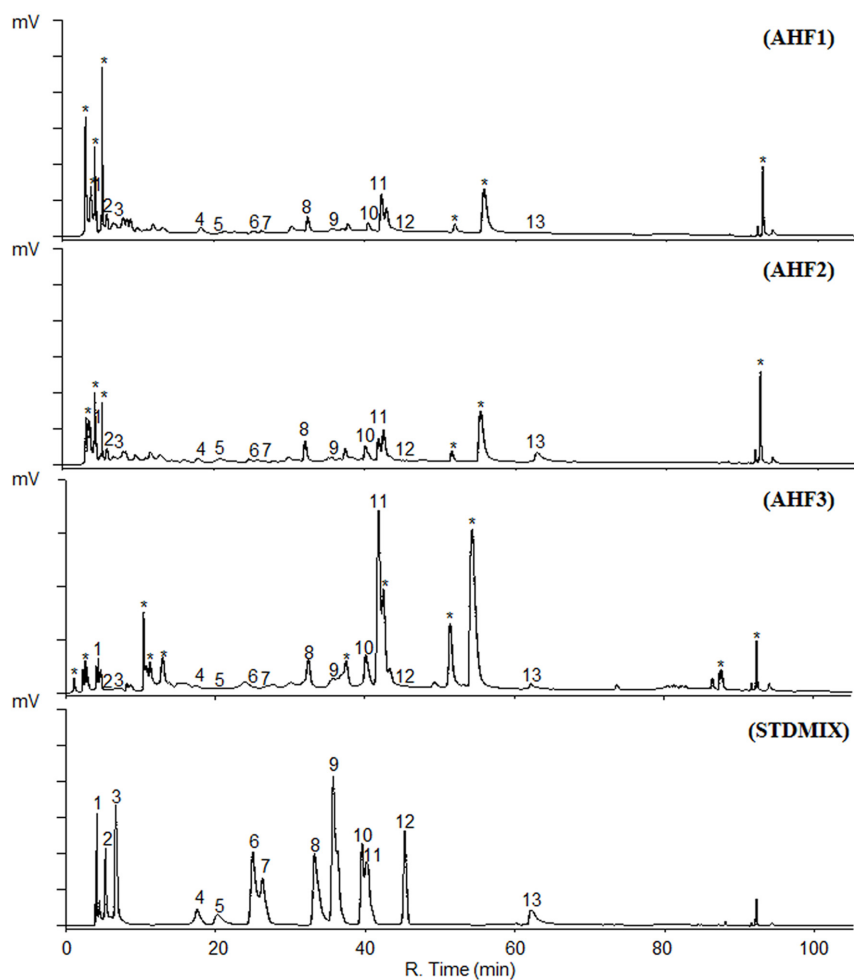
AHF1 : hot water extract of *A. helianthus* flower

AHF2 : cold water extract of *A. helianthus* flower

AHF3 : 70% ethanol extract of *A. helianthus* flower

Table 5. Phenolic compound contents of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods quantified by HPLC using diode array detection at 280 nm. The results are the mean \pm SD from three independent experiments (Unit : mg/g)

No.	Sample	AHF1	AHF2	AHF3
1	Ascorbic acid	17.13 \pm 0.11	13.33 \pm 0.09	6.65 \pm 0.88
2	Niacinamide	16.30 \pm 0.11	6.35 \pm 0.09	1.72 \pm 0.88
3	Gallic acid	5.35 \pm 0.03	3.31 \pm 0.02	3.69 \pm 0.02
4	Catechin hydrate	0.27 \pm 0.01	4.49 \pm 0.07	9.50 \pm 0.01
5	Chlorogenic acid	0.05 \pm 0.01	6.97 \pm 0.03	4.54 \pm 0.02
6	Caffeic acid	1.41 \pm 0.01	2.26 \pm 0.01	31.37 \pm 0.01
7	Epicatechin	0.46 \pm 0.01	2.20 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
8	Ethyl gallate	8.40 \pm 0.02	9.69 \pm 0.01	37.34 \pm 0.00
9	<i>p</i> -Coumaric acid	1.53 \pm 0.01	2.43 \pm 0.02	19.28 \pm 0.09
10	Rutin hydrate	0.98 \pm 0.03	5.52 \pm 0.08	47.29 \pm 0.02
11	Ferulic acid	5.81 \pm 0.01	8.92 \pm 0.01	112.45 \pm 0.01
12	Naringin	1.01 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	6.30 \pm 0.03
13	Quercetin	0.35 \pm 0.09	11.75 \pm 0.01	5.42 \pm 0.88
Total		59.04 \pm 0.04	77.44 \pm 0.04	285.54 \pm 0.22

**Fig. 4.** HPLC analysis results of *A. helianthus* flower (AHF) extracts with different extraction methods and standard mixture using diode array detection at 280 nm. Numbers indicate the following: (1) ascorbic acid; (2) niacinamide; (3) gallic acid; (4) catechin hydrate; (5) chlorogenic acid; (6) caffeic acid; (7) epi-catechin; (8) ethyl gallate; (9) *p*-coumaric acid; (10) rutin hydrate; (11) ferulic acid; (12) naringin; (13) quercetin.

내었다. 표준물질로는 ascorbic acid, niacinamide, gallic acid, catechin hydrate, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, ethyl gallate, *p*-coumaric acid, rutin hydrate, ferulic acid, naringin, quercetin을 사용하였다. HPLC 분석결과 70% 에탄올 추출물에서의 폴리페놀 표준물질 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 특히 ferulic acid의 함량이 가장 높았다. 열수 및 냉수 추출물에서는 ascorbic acid와 niacinamide 등의 비타민류 물질들이 70% 에탄올에 비해 약 2배 가량 더 많이 검출되었다. 폴리페놀 표준물질 외에 unknown peak들도 다량 검출되었는데, 이는 폴리페놀 표준물질에 포함되지 않은 다른 유효 화합물들이 금화규 꽃 추출물에 포함되어 있는 것으로 판단되며, 높은 peak area 값을 가지고 있어 이들 또한 항산화 활성에 관여하는 것으로 추정된다. 폴리페놀 함량 분석은 추후 본 실험에서 검출되지 않은 다양한 종류의 화합물 분석을 위해 C₁₈ column 이외에 silica column을 사용하여 검출할 필요가 있다 판단된다.

4. CONCLUSION

본 연구는 금화규 꽃잎을 열수, 냉수, 70% 에탄올을 사용해 3가지 방법으로 추출하여 추출 조건에 따른 항산화 활성 및 유효성분 함량을 확인하고 비교 분석하였다. 추출물의 수율은 열수를 사용한 추출물이 48.56%로 가장 높았으며, 점성이 있는 수용성 물질들이 포함되어 있었다. 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거능 측정 결과 추출 방법에 따라 차이를 보이지만 대체로 높은 radical 소거능을 보여주었으며, 70% 에탄올 추출물에서 가장 높은 radical 소거능을 나타내었다. 총 폴리페놀, 플라보노이드, 당 및 단백질 등의 유효성분 분석결과 또한 70% 에탄올 추출물에서 가장 높은 함량을 보였는데, 이는 금화규 꽃 추출물의 화합물이 수용성 용매에서 용해도가 낮기 때문으로 판단된다. Collagen 함량, 유리 아미노산 함량은 냉수 추출물에서 가장 높은 함량을 보여주었는데, 이는 천연 소재 추출물의 활용 방법에 따라 추출 방법 또한 선택이 가능할 것으로 사료된다. HPLC에 의한 폴리페놀 함량 분석을 통해 13가지 폴리페놀 화합물을 확인 하였으며, 추후 본 실험에서 검출되지 않은 다양한 종류의 화합물 분석을 위해 C₁₈ column 이외에 silica column을 사용하여 검출할 필요가 있다 판단된다. 본 연구는 금화규 꽃이 추후 기능성 화장품 및 식품 소재로서 활용이 가능한 유용한 식물자원임을 검증하였고, 활용 방법에 따른 추출법의 다변화 필요성과 추출법 표준화 가능성을 보여주었다. 추가로 금화규 꽃 추출물의 화장품 소재 활용을 위한 미백, 주름개선 등의 지속적인 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 산림청 (한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발

사업 (2020194B10-2022-BA01)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Korkina, L. G and I. B. Afanas' Ev (1996) Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 38: 151-163.
- Kim, H. S. and L. S. Seong (1999) Induction of erythromycin by virginiamycin inducing factor, Virginiae Butanolide C. *KSBB J.* 14: 682-687.
- Li, N., H. Tang, L. Wu, H. Ge, Y. Wang, H. Yu, and H. F. Gu (2021) Chemical constituents, clinical efficacy and molecular mechanisms of the ethanol extract of *Abelmoschus manihot* flowers in treatment of kidney diseases. *Phytother Res.* 35: 198-206.
- Dan, L. U. and B. J. I. A. Rui (2015) Research progress in Chinese medicinal material *Aurea Helianthus*. *Chin J Drug Eval.* 2: 2095-3593.
- Kim, H. J., C. G. Park, R. Varghese, J. Y. Lee, Y. Kim, and G. H. Sung (2017) In-vitro antioxidative, antiinflammatory properties of *Aurea helianthus* leaf extract a Korean traditional medicinal plant. *Saudi J. Biol. Sci.* 24: 1943-1947.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237.
- Ainsworth, E. A. and K. M. Gillespie (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2: 875-877.
- Kim, N. I., M. H. Choi, and H. J. Shin (2020) Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Machilus thunbergii* Leaves and Branch Extracts with Different Extraction Methods. *KSBB J.* 35: 310-318.
- A. O. A. C. (1980) Official Methods of Analysis. 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., pp.190-209
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bergman, I. and R. Loxley (1963) Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* 35: 1961-1965.
- Cha, J. Y., H. Y. Ahn, K. E. Eom, B. K. Park, B. S. Jun, and Y. S. Cho (2009) Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. *J. Life Sci.* 19: 652-658.
- Moreno, M. I. N., M. I. Isla, A. R. Sampietro, and M. A. Vattuone (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114.
- Baltrušaitytė, V., P. R. Venskutonis, and V. Čeksterytė (2007) Radical scavenging activity of different floral origin honey and bread phenolic extracts. *Food Chem.* 101: 502-514.
- Wang, M., J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E. J. LaVoie, T. C. Huang, and C. T. Ho (1998) Antioxidative phenolic compounds

- from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* 46: 4869-4873.
17. Mossa, A. T. H., A. A. Refaie, A. Ramadan, and J. Bouajila (2013) Antimutagenic effect of *Origanum majorana* L. essential oil against prallethrin-induced genotoxic damage in rat bone marrow cells. *J. Med. Food.* 16: 1101-1107.
 18. Cieslik, E., A. Greda, and W. Adamus (2006) Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chem.* 94: 135-142.
 19. Kaur, C. and H. C. Kapoor (2002) Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 153-161.
 20. Mohite, A. V. and R. V. Gurav (2019) Nutraceutical and antioxidant evaluation of *Abelmoschus taxa*. *Int. J. Veg. Sci.* 25: 610-618.
 21. Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572-584.
 22. Ayushi, T., D. Prachee, S. K. Gupta, and W. Geeta (2016) Screened Phytochemicals of *A. esculentus* Leaves and their Therapeutic Role as an Antioxidant. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 8: 1509-1515.
 23. Gemede, H. F., G. D. Haki, F. Beyene, A. Z. Woldegiorgis, and S. K. Rakshit (2016) Proximate, mineral, and antinutrient compositions of indigenous Okra (*Abelmoschus esculentus*) pod accessions: implications for mineral bioavailability. *Food Sci. Nutr.* 4: 223-233.
 24. Elinge, C. M., A. Muhammad, F. A. Atiku, A. U. Itodo, I. J. Peni, and O. M. Sanni (2012) Proximate, mineral and anti-nutrient composition of pumpkin (*Cucurbitapepo* L) seeds extract. *Int. J. Plant Res.* 2: 146-150.
 25. Parejo, I., F. Viladomat, J. Bastida, and C. Codina (2001) A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 12: 336-339.
 26. Nzikou, J. M., M. Mvoula-Tsieri, E. Matouba, J. M. Ouamba, C. Kapseu, M. Parmentier, and S. Desobry (2006) A study on gumbo seed grown in Congo Brazzaville for its food and industrial applications. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 2469-2475.
 27. Gheldof, N. and N. J. Engeseth (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3050-3055.
 28. Ruiz-Capillas, C. and A. Moral (2001) Changes in free amino acids during chilled storage of hake (*Merluccius merluccius* L.) in controlled atmospheres and their use as a quality control index. *Eur Food Res Technol.* 212: 302-307.