J Korean Soc Food Sci Nutr
43(3), 389~396(2014)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.3.389

추출방법에 따른 쇠비름의 항산화, 생리활성 및 Acetylcholinesterase 저해활성

권유리 · 조성묵 · 황승필 · 권기만 · 김재원 · 윤광섭†
대구가톨릭대학교 식품공학전공

Antioxidant, Physiological Activities, and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of *Portulaca oleracea* Extracts with Different Extraction Methods

Yu-Ri Kwon, Sung-Mook Cho, Seung-Pil Hwang, Gi-Man Kwon, Jae-Won Kim, and Kwang-Sup Youn†
Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

ABSTRACT The physiological properties of 70% ethanol extracts from *Portulaca oleracea* with different extraction methods (reflux extraction, RE; autoclave extraction, AE; low temperature high pressure extraction, LTPE) were investigated. The freeze-dried powder yields of RE, AE, and LTPE were 33.78%, 30.80%, and 11.05%, respectively. The color values of L and b were higher in LTPE, and the chroma values were higher in AE and LTPE compared to RE. The total polyphenolics and proanthocyanidin contents in LTPE were significantly higher than in other extracts. The amount of substances related to flavonoids contents was highest in RE (4.30 mg/g), followed by AE (4.06 mg/g), and LTPE (4.00 mg/g). DPPH radical scavenging ability with a concentration of 500 mg% (w/v) were in the following order; LTPE (88.87%)> RE (83.84%)> AE (80.67%). Further, the reducing power, ABTS radical scavenging ability, and nitrite scavenging activity was observed in the same tendency as seen with the DPPH radical scavenging ability. However, the ferrous ion chelating activity of RE (85.45%) and AE (83.88%) was significantly higher than that of LTPE (75.60%). α-Glucosidase inhibitory activities of RE and LTPE with a concentration of 100 mg% were significantly higher than AE. Xanthine oxidase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of LTPE were higher than the other extracts. These results suggest that the extracts from *Portulaca oleracea* have the potential to act as functional materials, and components of *Portulaca oleracea* could be effective in the prevention of Alzheimer's disease, and may be used to develop various functional food products.

Key words: *Portulaca oleracea*, extraction method, antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibitory activity

서 론

최근 생활수준의 향상으로 식생활 수준이 개선되고 있으며, 특히 성인병 예방에 대한 관심이 높아짐에 따라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 억제시킬 수 있는 약용식물에 대한 관심이 증대되고 있다. 또한 평균수명의 증가로 인한 고령화 현상이 문제됨에 따라 치매와 같은 퇴행성 질환에 대한 관심이 증대되고 있다. 이러한 퇴행성 질환은 활성산소에 기인된 것으로 알려지고 있는데 활성산소종은 정상 에너지 대사과정에서는 물론 그 외의 여러 기전에 의해 끊임없이 생성되며 동시에 각종 효소 및 비효소적 항산화 물질에 의해 제거되어 정상 생체에서는 이들의 생성과 소거가 균형을 이루고 있다. 그러나 생체가 과도한 스트레스를 받거나 과음, 흡연, 피로 또는 각종 질병상태에서는 활성산소 생성계와 소거계 사이의 불균형에 따른 과잉의 활성산소 생성으로 조직의 손상에 따른 노화의 촉진, 발암, 고혈압, 동맥경화 및 당뇨 등과 같은 각종 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다(1). 이러한 질병의 원인으로 superoxide anion radical(O_2), hydroxyl(OH), singlet oxygen($^1O_2$) 및 hydrogen peroxide(H_2O_2) 등과 같은 free radical과의 관련성이 대두됨에 따라 식의약적인 측면에서 활성산소를 감소시킬 수 있는 천연식물자원을 활용한 소재 개발이 요구되고 있는 실정이다. 한편 Alzheimer's disease(AD)의 주 증상인 기억력 장애는 주로 대뇌 기저부의 콜린성 신경의 손상에 기인된 것으로, 인체 내 전기적 신호를 전달하는 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 향상이 AD에서 인지기능 개선에 도움이 된다고 알려지면서 cholinergic agonist나 acetylcholinesterase(AChE) 저해제를 통한 ACh의 농도 증가에 대한 연구가 진행되고 있으나 독성과 부작용으로 논란의 여지로 인하여 천연소재로부터의 새로운 치매 치료제 개발을 위한 노력이 경주되고 있다(2).

쇠비름(*Portulaca oleracea* L.)은 쇠비름과(Portulaca)의 한해살이 식물로 돼지풀, 도둑풀, 말비름이라고 하며 생약명으로는 마치현(馬齒莧), 오행초(五行草고), 장명채(長命采), 마치채(馬齒採)라고 불린다. 우리나라 각지의 길가,

Received 8 November 2013; Accepted 4 December 2013
†Corresponding author.
E-mail: ksyoun@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3209

채소밭, 빈터 등지에서 자생하며, 줄기의 높이가 15~30 cm 내외로 털이 없고 줄기의 직경은 2~3 cm로 가지가 많이 갈라져 땅위로 비스듬히 퍼지면서 자라는 식물이다. 쇠비름은 양념 등으로 버무려서 먹기도 하고 약재로도 활용되어 왔으며 과거 선조들의 민간요법에서는 충독, 사독 등의 해독제로도 사용되었고(3), 아라비아 반도에서는 방부제, 항괴혈병제제, 진경제, 이뇨제, 구충제, 피부진정제로도 사용되어 왔다(4). 또한 오메가-3 지방산이나 norepinephrine, dopamine이 많이 들어 있으며, 펙틴질을 포함한 수용성 다당류나 비타민류 및 아미노산, 유기산, 배당체, 알칼로이드 성분 등이 다량 함유되어 있다(5). 이와 같은 다양한 유용성분들을 함유하고 있는 쇠비름은 강력한 항균력을 지닐 뿐만 아니라 최근에는 다양한 유기용매별로 추출 및 분획한 쇠비름 추출물에서 항산화 효과나 항암, 항염증(6), 담배의 nicotine 성분의 제거효능(7)이 보고되었으며, 또한 비만 및 고지혈증의 예방(8), 항균작용을 이용한 장내 세균 억제(9) 등의 연구가 보고되었다. 근래에는 쇠비름이 이질간균, 티푸스균, 대장균, 포도상균 등에 대한 억제작용이 현저하다고 새롭게 밝혀지고 있으며 더욱이 급성 장염의 완치율은 90%, 만성 장염 완치율은 60%인 것으로 알려져 '천연항생제'라고 평가된 바 있다(10).

이와 같이 기능성 소재활용에 관한 연구를 통해 쇠비름의 우수성이 밝혀져 왔으나 쇠비름의 소비 확대는 크게 진전되지 않고 있으며 추출방법에 따른 항산화 및 생리활성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 쇠비름의 이용가치를 향상시키기 위하여 추출방법에 따른 항산화 및 생리활성을 조사함으로써 효과적인 추출방법을 제시하고, 산업화에 적용할 방법을 모색 및 기능성 소재로서의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 쇠비름(*Portulaca oleracea*) 잎은 2012년 전북 남원시에서 수확한 것을 구입하였으며 세척한 후 동결건조(freeze dryer, FD SFDSM12, Samwon, Seoul, Korea) 한 다음 분쇄기(IKA® A11 basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)를 사용하여 40 mesh로 분쇄한 분말을 -50°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

시료의 추출 및 수율 측정

쇠비름의 추출방법은 분쇄시료 50 g에 10배의 70% 에탄올을 가한 후 환류냉각추출(reflux extraction, RE), 가압가열추출(autoclave extraction, AE), 저온고압추출(low temperature high pressure extraction, LTPE) 방법으로 추출물을 제조하였다. 환류냉각추출은 분쇄시료와 용매를 넣은 용기에 냉각관을 부착하여 80°C의 맨틀 상에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 가압가열추출은 autoclave(DF-100A, DOORI Scientific Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 121°C에서 15분 동안 추출하였으며 저온고압추출은 rapid extractor(FT110, Benchtop rapid extractor, Armfield Ltd., Hampshire, UK)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 8.0 bar의 압력 하에서 2회 반복 추출하였다. 각각의 추출물은 Whatman No. 1 여과지(Toyo Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator(rotary vacuum evaporator N-N series, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축한 후에 동결건조(freeze dryer, FD SFDSM12, Samwon) 하여 분말 시료를 제조하였으며 -50°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출물 각각의 수율은 추출액을 동결건조 시켜 건물 중량을 구한 다음 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

색도 측정

추출 분말의 색도는 표준백색판으로 보정된 chromameter(CR-300 Minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. Hunter scale에 의한 L(lightness), a(redness-greenness), b(yellowness-blueness), H°(hue angle) 및 chroma value를 측정하였다.

폴리페놀, 플라보노이드 및 프로안토시아니딘 함량 측정

폴리페놀 함량은 Dewanto 등(11)의 방법에 따라 추출물 100 μL에 2% sodium carbonate 2 mL와 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 μL를 가한 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며 gallic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다. 플라보노이드 함량은 Abdel-Hameed(12)의 방법에 따라 추출물 100 mL에 5% sodium nitrite 0.15 mL를 가한 후 25°C에서 6분간 방치한 다음 10% aluminium chloride 0.3 mL를 가하여 25°C에서 5분간 방치하였다. 다음 1 N NaOH 1 mL를 가하고 교반한 다음 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며 rutin hydrate(Sigma-Aldrich Co.)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다. Vanillin-sulfuric acid법(13)에 따라 시료 200 μL에 1.2% vanillin 용액 500 μL와 20% sulfuric acid 500 μL를 혼합하여 20분간 방치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며 (+)-catechin(Sigma-Aldrich Co.)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

DPPH radical 소거활성 측정

Blois(14)의 방법에 따라 시료 0.2 mL에 0.4 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 0.8 mL를 가하여 10분간 방치한 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, DPPH radical scavenging ability(%)=100-[(O.D of sample/ O.D of control)×100]에 의하여 활성도를 산출하였다.

ABTS radical 소거활성 측정

Re 등(15)의 방법에 따라 7.4 mM ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt]와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온·암소에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 732 nm에서 흡광도가 0.700±0.030이 되도록 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 950 μL에 추출물 50 μL를 가하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, ABTS radical scavenging ability(%)=100－[(O.D of sample/ O.D of control)×100]에 의하여 활성을 산출하였다.

환원력 측정

Saeedeh와 Asna(16)의 방법에 따라 시료 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL를 가한 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 다음 10% trichloroacetic acid(TCA) 용액 2.5 mL를 가한 후 1,650×*g*에서 10분간 원심분리 하였으며, 상징액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1% $FeCl_3$ 용액 0.5 mL를 가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아질산염 소거활성 측정

Kato 등(17)의 방법에 따라 1 mM $NaNO_2$ 용액 1 mL에 시료추출액 1 mL를 가하고 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer(pH 2.5)를 가하여 총 부피를 10 mL로 조정하였다. 다음에 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1 mL를 취하여 2% 초산용액 3 mL와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine=1:1) 0.4 mL를 순차적으로 가한 후 실온에서 15분간 방치, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신 증류수를 사용하였으며 계산식, nitrite scavenging activity (%)=100－[(O.D of sample/ O.D of control)×100]에 의하여 산출하였다.

철 이온(Fe^{2+})에 대한 chelating 효과 측정

Yen 등(18)의 방법에 따라 시료추출액 1 mL, 80% ethanol 0.8 mL, 2 mM $FeCl_2 \cdot 4H_2O$[iron(II) chloride tetrahydrate] 용액 0.1 mL, 5 mM ferrozine[3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid] 용액 0.1 mL를 첨가한 다음 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 대표적 chelating agent인 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 사용하였으며 계산식, ferrous ion chelating effect(%)=100－[(O.D of sample/ O.D of control)×100]에 의하여 산출하였다.

α-Glucosidase 저해활성 측정

Kim 등(19)의 방법에 따라 시료 50 μL, 1 uint/mL α-glucosidase 0.05 mL와 200 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 50 μL를 잘 혼합하여 37°C에서 10분간 전처리 하였다. 다음에 3 mM ρNPG(ρ-nitrophenyl α-D-glucopyranoside) 100 μL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.1 M Na_2CO_3 0.75 mL로 반응을 정지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 저해활성은 α-glucosidase inhibitory activity(%)=[1－(C_{Abs}－S_{Abs})/ (C_{Abs}－B_{Abs})]×100: "C_{Abs}: 대조구 흡광도, S_{Abs}: 시료 흡광도, B_{Abs}: 시료 무첨가구의 흡광도"에 의하여 산출하였다.

Xanthine oxidase 저해활성 측정

Stirpe 등(20)의 방법에 따라 추출물 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 2 mM xanthine 기질액 0.2 mL를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 uint/mL) 0.1 mL를 가하였다. 다음 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종결시킨 후, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, xanthine oxidase inhibitory activity(%)=100－[(O.D of sample/ O.D of control)×100]에 의하여 산출하였다.

Acetylcholinesterase 저해활성 측정

Ellman 등의 방법(21)과 Sandahl과 Jenkins 방법(22)을 변형하여 측정하였다. AChE와 acetylthocholine iodine (ATC)은 100 mM phosphate buffer(pH 8.0)에 녹여 각각 0.25 U/mL와 75 mM을 제조하였으며, 발색시약은 39.6 mg의 DTNB[5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]와 15 mg의 sodium bicarbonate를 100 mM phosphate buffer(pH 8.0) 10 mL에 녹여 제조하였다. 추출물 30 μL에 phosphate buffer(100 mM, pH 8.0) 2.8 mL, AChE(0.25 U/mL) 30 μL, DTNB 100 μL를 넣고 혼합한 후, 37°C에서 10분간 preincubation을 한 다음 기질 ATC 30 μL를 첨가하여 37°C에서 3분간 반응시킨 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로서는 추출물 대신 100 mM phosphate buffer(pH 8.0) 30 μL를 가하여 측정하였으며, 저해활성은 계산식, acetylcholinesterase inhibitory activity(%)=[1－(C_{Abs}－S_{Abs})/ (C_{Abs}－B_{Abs})]×100, "C_{Abs}: 대조구 흡광도, S_{Abs}: 시료 흡광도, B_{Abs}: 시료 무첨가구의 흡광도"에 의하여 산출하였다.

Thin layer chromatography(TLC)에 의한 정성분석

TLC에 의한 정성분석은 추출물 동결건조 분말을 80% 메탄올에 녹여 0.45 μm syringe filter(Whatman, Rockland, MA, USA)로 여과 후 TLC 분석을 위한 시료로 사용하였으며, 각각의 시료는 silica plate(aluminum sheet silica gel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany)에 점적한 후 tol-

uene/acetone/formic acid(6:6:1, v/v/v)의 혼합용매로 전개하였다. 표준품(chlorogenic acid, rutin, tannin, β-carotene; Sigma-Aldrich Co.)으로 정성분석 하였으며, 성분 확인은 각 성분들의 R_f값과 자외선(UV-254 nm, UV-366 nm)을 이용한 띠의 색상으로 확인하였다. TLC에 의한 AChE의 저해활성 효과는 Yang 등(23)의 방법을 참고하여 측정하였으며, 효소액은 acetylcholinesterase(E.C. 3.1.1.7, Sigma product No. C3389, Sigma-Aldrich Co.) 1,000 Unit을 50 mM tris-hydrochloric acid buffer(pH 7.8) 150 mL에 녹인 다음 효소의 안정화를 위해 150 mg bovine serum albumin을 첨가하여 4°C를 유지하도록 하였다. 각각의 시료는 silica plate에 점적한 후 toluene/acetone/formic acid(6:6:1, v/v/v)의 혼합용매로 전개하였으며 건조하여 용매를 충분히 날려준 다음 효소액을 균일하게 분사하여 충분히 말려주었다. 다음 1-naphthyl acetate(1.5 mg/mL)를 분사하고 37°C에서 20분간 반응시킨 후 0.05% Fast Blue B Salt를 분사하여 발색시키고 밴드를 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 유의성 검증은 version 12의 SPSS(12, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software를 이용하여 Duncan's multiple range test를 행하였다.

결과 및 고찰

수율 및 색도

추출방법을 달리한 쇠비름의 수율 및 색도는 Table 1과 같다. 수율은 RE(reflux extraction), AE(autoclave extraction) 및 LTPE(low temperature high pressure extraction)가 각각 33.78%, 30.80% 및 11.05%로 추출방법에 따라 유의적인 차이를 나타내었으며, RE>AE>LTPE 순으로 높은 수율을 나타내었다. 환류냉각추출과 가압가열추출에서 높은 수율을 나타내는 것은 열처리 공정에 의하여 불용성 세포벽의 수용화에 의해 수용성 식이섬유가 증가되는 현상과 더불어, 수용화 과정 중에 식물조직의 구조적인 변화에 따라 불용성 식물세포벽으로부터 식이섬유 성분의 용해가 용이해짐에 따른 결과로 사료된다(24). 한편 Kang과 Lee(25)와 Kim 등(26)의 연구에서 환류냉각추출 및 가압가열추출이 저온고압추출에 비해 높은 수율을 나타내는 결과와 일치하는 것으로 보아 본 연구에서도 높은 온도와 압력에 의하여 막 투과성이 증대되어 보다 많은 성분이 쉽게 용출되어지는 것으로 판단된다. 색도에서는 밝기를 나타내는 L값과 황색도를 나타내는 b값의 경우 LTPE에서 가장 높았으며, AE 및 LTPE에서 색상을 나타내는 H°값 및 채도를 나타내는 chroma value는 증가하였다.

폴리페놀, 플라보노이드 및 프로안토시아니딘 함량

추출방법을 달리한 쇠비름의 폴리페놀, 플라보노이드 및 프로안토시아니딘의 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. RE, AE 및 LTPE의 폴리페놀 함량은 g당 18.62 mg, 17.11 mg 및 22.16 mg으로 저온고압추출의 경우 환류냉각 및 가압가열추출에 비해 각각 19.01% 및 29.51% 높은 함량을 나타내었다. 이는 고압 하에서 막 투과성이 증가함에 따라 폴리페놀 화합물의 용출이 용이해짐에 따른 결과로 사료된다. 한편 열처리의 경우 결합형 페놀화합물을 유리형으로 전환시켜 용출을 쉽게 하거나 고분자 페놀화합물을 저분자로 분해해 시료에서 추출되는 페놀성 물질의 함량을 증가(27)시키는 것으로 보고된 바 있으나 열처리에 따른 유용성분과 항산화 활성은 식물체의 종류나 결합구조, 소재에 따른

Table 1. Yields, and Hunter's color value of *Portulaca oleracea* extracts with different extraction methods

Samples[1)]	Yields (%, DB[2)])	Hunter's color value				
		L (lightness)	a (redness)	b (yellowness)	H° (hue angle)	Chroma value
RE	33.78±1.21[3)a4)]	49.98±0.29[c]	0.73±0.01[a]	9.36±0.35[c]	85.63±0.06[b]	9.35±0.35[c]
AE	30.80±0.89[b]	55.28±0.81[b]	0.08±0.09[c]	12.42±0.23[b]	89.63±0.42[a]	12.42±0.23[b]
LTPE	11.05±.0.57[c]	58.29±0.83[a]	0.39±0.08[b]	16.52±1.79[a]	89.13±0.71[a]	16.52±1.79[a]

[1)]SE, stirrer extraction; RE, reflux extraction; AE, autoclave extraction; LTHP, low temperature high pressure extraction.
[2)]DB: dry basis.
[3)]Values are means±standard deviation of triplicate determinations.
[4)]Different superscripts within a column (a-c) indicate significant differences (P<0.05).

Table 2. Total polyphenol, flavonoid and proanthocyanidin contents of *Portulaca oleracea* extracts with different extraction methods

Measurement	RE[1)]	AE[2)]	LTPE[3)]
Polyphenols (mg GAE[4)]/g)	18.62±0.32[7)b8)]	17.11±0.30[c]	22.16±0.26[a]
Flavonoids (mg RHE[5)]/g)	4.30±0.02[a]	4.06±0.04[b]	4.00±0.07[b]
Proanthocyanidins (mg CHE[6)]/g)	3.38±0.07[b]	3.35±0.10[b]	3.70±0.12[a]

[1-3)]See Table 1.
[4-6)]GAE, gallic acid equivalents; RHE, rutin hydrate equivalents; CHE, catechin hydrate equivalents.
[7)]Values are means±standard deviation of triplicate determinations.
[8)]Different superscripts within a row (a-c) indicate significant differences (P<0.05).

성분의 변화 모두에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(28). Woo 등(29)은 톱풀(*Achillea alpina*)과 울릉미역취(*Solidago virgaurea*) 어린잎을 가압열처리(121°C, 15 min)하였을 때 폴리페놀 함량은 감소된다고 하였으며 본 연구에서도 가압가열추출의 경우 고온에 의한 성분의 손실이 있는 것으로 나타났다. 플라보노이드 함량은 g당 4.30 mg, 4.06 mg 및 4.00 mg으로 가압가열추출 및 저온고압추출의 경우 유사하였고 환류냉각추출에서는 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 프로안토시아니딘 함량에서는 RE, AE 및 LTPE가 g당 각각 3.38 mg, 3.35 mg 및 3.70 mg으로 저온고압추출이 환류냉각 및 가압가열추출에 비해 각각 9.47% 및 10.45% 높은 함량을 나타내었다. 이상의 결과 추출방법에 따른 페놀화합물 함량의 유의적인 차이를 나타내었으며 저온고압추출 시 페놀화합물 등의 유용성분의 추출함량 증대에 좋은 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다.

DPPH radical 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력

추출방법을 달리한 쇠비름의 전자공여능, 환원력 및 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 500 mg%에서의 RE, AE 및 LTPE의 전자공여 활성은 각각 83.84%, 80.67% 및 88.87%로 저온고압추출이 환류냉각 및 가압가열추출에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 한편 양성 대조군으로 합성 산화방지제인 BHT(butylated hydroxytoluene, 95.38%)보다는 전반적으로 낮은 활성을 나타내었으나 쇠비름 추출물의 농도가 증가함에 따라 그 활성 역시 증가(data not shown)하기 때문에 천연 기능성 소재로써의 활용도는 높을 것으로 사료된다. 한편 ABTS 라디칼 소거활성은 추출방법별로 LTPE(91.37%)> RE(86.70%)> AE(83.19%) 순으로 저온고압추출에서 높은 활성을 보였으나 농도대비 양성대조군에 비해 현저히 낮은 활성을 나타내었다. 환원력은 시료에 존재하는 reductones가 제공하는 수소 원자가 활성산소 사슬에 분해함으로써 항산화 활성을 나타내는 것으로 항산화 활성과 직접 연관된 것으로 알려졌으며(30), 전자공여능과 유사한 경향을 나타내었는데 LTPE(1.60)가 RE(1.39) 및 AE(1.33)에 비해 유의적으로 높게 수치를 나타내었다. Osawa(31)는 식물로부터 추출된 phenol 부류의 화합물은 항산화능을 포함한 다양한 생리적 효능을 나타내고 이 효능은 주로 산화·환원력에 의한 효과로 보고한 바 있으며, 페놀 함량이 높을수록 항산화능이 증가한다고 보고하였는데 이는 본 연구와 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 LTPE의 환원력이 높은 결과는 쇠비름 추출물에 함유된 페놀화합물에 의한 것이라고 사료된다.

아질산염 소거활성 및 철 이온(Fe^{2+})에 대한 chelating 효과 측정

추출방법을 달리한 쇠비름의 아질산염 소거능 및 체내에서 세포의 지질 및 단백질의 산화를 촉진하는 Fe^{2+}의 chelating 효과를 조사한 결과는 Table 4와 같다. RE, AE 및 LTPE의 아질산염 소거활성은 각각 35.67%, 33.48% 및 40.33%로 저온고압추출, 환류냉각추출, 가압가열추출 순으로 높은 활성을 나타내었으며, 모든 추출군이 대조군 BHT(32.12%)보다 높은 활성을 나타내어 향후 기능성 소재로서의 개발 가능성이 있을 것으로 여겨진다. Takashi 등(32)의 보고에 따르면 폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 종류에 따라 차이는 있으나 phenol계 유도체들이 nitroso화합물의 생성을 억제한다고 하여 본 연구에서 추출방법에 따른 소거활성의 차이는 페놀화합물의 함량 차이에 의한 결과라 판단되며, 저온고압추출의 경우 위장내의 낮은 pH 조건에서 nitrosamine 형성을 보다 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 여겨진다. 한편 ferrous ion chelating 효과에서는 RE

Table 3. DPPH and ABTS radical scavenging ability, reducing power of *Portulaca oleracea* extracts with different extraction methods

Measurement	RE[1)]	AE[2)]	LTPE[3)]	Positive control, BHT
DPPH radical scavenging ability (%)	83.84±0.11[4)b5)]	80.67±0.87[c]	88.87±1.01[a]	95.38±0.69
ABTS radical scavenging ability (%)	86.70±0.74[b]	83.19±1.13[c]	91.37±0.99[a]	98.15±0.25
Reducing power (OD_{700})	1.39±0.06[b]	1.33±0.03[b]	1.60±0.05[a]	2.13±0.12

[1-3)]See Table 1. The concentrations of positive control (BHT; butylated hydroxytoluene) solutions were measured at 50 mg%, and various extracts sample were measured at 500 mg%.
[4)]Values are means±standard deviation of triplicate determinations.
[5)]Different superscripts within a row (a-c) indicate significant differences (P<0.05).

Table 4. Nitrite scavenging activity (NAS), and ferrous ion chelating activity (FICA) of *Portulaca oleracea* extracts with different extraction methods

Measurement[1)]	RE[1)]	AE[2)]	LTPE[3)]	Positive control	
				BHT	EDTA
NSA (%)	35.67±0.72[4)b5)]	33.48±1.36[b]	40.33±0.71[a]	32.12±0.89	−
FICA (%)	85.45±0.27[a]	83.88±0.40[b]	75.60±0.42[c]	−	98.74±0.21

[1-3)]See Table 1. The concentrations of positive control (BHT: butylated hydroxytoluene, 50 mg%; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, 100 mg%), and various extract samples were measured at 100 mg%.
[4)]Values are means±standard deviation of triplicate determinations.
[5)]Different superscripts within a row (a-c) indicate significant differences (P<0.05).

(85.45%)> AE(83.88%)> LTPE(75.60%)의 순으로 환류냉각추출 및 가압가열추출에서 높은 활성을 나타낸 반면 항산화 활성의 경향과는 상반되는 결과를 보였는데, 이는 금속이온을 제거할 수 있는 물질과 radical을 제거할 수 있는 물질의 차이에 따른 결과라 사료된다. 대표적인 금속이온 agent인 EDTA(98.74%)의 수준에는 미치지는 못하였으나 높은 활성을 나타내어 소재로서의 이용 가능성이 예견되었으며, 특히 쇠비름 추출물의 경우 단일 성분이 아닌 추출물임을 고려해 볼 때 추후 분리 및 구조 동정을 통하여 체내에 생성된 ferrous ion을 효과적으로 제거시킬 수 있는 천연물로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

α-Glucosidase, xanthine oxidase 및 acetylcholinesterase 저해활성 측정

추출방법을 달리한 쇠비름 추출물들의 α-glucosidase, xanthine oxidase(XO) 및 acetylcholinesterase(AChE) 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 일반적으로 α-glucosidase는 소장 상피세포의 미세융모막(brush border membrane)에 존재하는 효소로서, 소장에서 음식물 중의 전분을 포도당과 같은 당으로 분해하여 흡수시킨다. α-Glucosidase 저해제는 이당류의 분해효소를 가역적으로 억제하여 탄수화물의 흡수를 지연시키는 역할을 하며, 소장 전체에 포도당이 흡수되어 식후 혈당 상승을 완만하게 한다(33). 5 mg/mL 농도에서 α-glucosidase 저해활성은 RE, AE 및 LTPE가 각각 48.90%, 18.23% 및 46.04%로 환류냉각 및 저온고압추출에서 가장 높은 반면 가압가열추출에서는 낮은 활성을 나타내었다. 한편 양성 대조군인 acarbose (78.57%)에 비해 낮은 저해활성을 보였으나 환류냉각 및 저온고압추출의 경우 혈당의 급격한 증가를 예방할 수 있는 기능성 소재로서의 개발 가능성이 높을 것으로 판단된다.

XO는 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 uric acid를 형성하여 혈장 내에 과량 존재하게 되면 골절에 축적되어 심한 통증을 동반하는 통풍과 신장에 침착되어 신장 질환을 유발하는 효소로 알려져 있다. 따라서 XO 저해활성은 free radical의 생성을 억제하므로 항산화, 항노화 및 항암 등의 효과를 기대할 수 있는 생물학적 중요한 효소라고 할 수 있다. 5 mg/mL 농도에서 XO 저해활성은 RE, AE 및 LTPE가 각각 71.81%, 77.87% 및 84.52%로 저온고압추출에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 저온고압의 경우 대조구(86.45%)에 근접하는 저해활성을 나타내었다.

체내 수많은 신경전달물질 중에서 대표적인 acetylcholine(ACh)은 시냅스(synapse)와 시냅스 사이의 신경전달에 관계하는 중요한 신경전달물질로 신경세포 안에 존재하던 choline과 acetyl CoA가 acetyltransferase(ChAT)라는 효소에 의해 생성된다. ACh은 신경 말단에서 분비되어 수용체에 결합함으로써 신경세포의 신호를 전달한 후 AChE에 의해 acetate와 choline으로 분해가 되고, 분해된 choline은 carrier에 의해 다시 신경계로 부분 흡수된다. 신경세포가 손상된 치매 환자의 경우 생성되는 ACh의 양은 적고 AChE의 작용은 계속되어 신경전달에 이상이 생기게 되면서 결국 치매 환자는 학습능력 및 기억력 감퇴와 인지력 저하 등의 같은 병리 현상이 발생한다(34). 쇠비름 추출물의 AChE 저해활성은 5 mg/mL 농도에서 RE, AE 및 LTPE가 각각 22.19%, 24.79% 및 31.03%로 저온고압추출에서 가장 높았고 다음으로 가압가열추출, 환류냉각추출 순의 저해활성을 나타내었으나 저해제인 tacrine(87.17%)에 비해서는 전반적으로 낮은 활성을 보였다. 반면 쇠비름 추출물의 경우 단일 성분이 아닌 추출물인 점으로 볼 때 치매 예방 및 개선제로서의 가능성도 기대된다.

TLC에 의한 정성분석 및 AChE 저해활성 확인

추출방법을 달리한 쇠비름 추출물 각각을 TLC에 10 μL씩 spotting하여 표준물질을 자외선으로 비교한 결과(I, II) 및 AChE 저해활성을 확인한 결과(III)는 Fig. 2와 같다. RE, AE 및 LTPE 각각의 추출물에서 수종의 미세한 spot이 확인되었으며 각각의 표준품 chlorogenic acid(R_f 0.07), rutin(R_f 0.04), tannin(R_f 0.02), β-carotene(R_f 0.88)과 비교하여 동일한 위치에서 band가 확인되었다. 한편 Fast Blue B Salt를 분사하여 보라색을 발색시킨 plate(III)의 경우 AChE 억제 효능을 나타내는 white band(R_f 0.47)를 확인하였으며, UV-365 nm에서 관찰하였을 때 동일한 위치에서 blue zone(35)을 나타내 이 물질로 인해 AChE 저해활성이

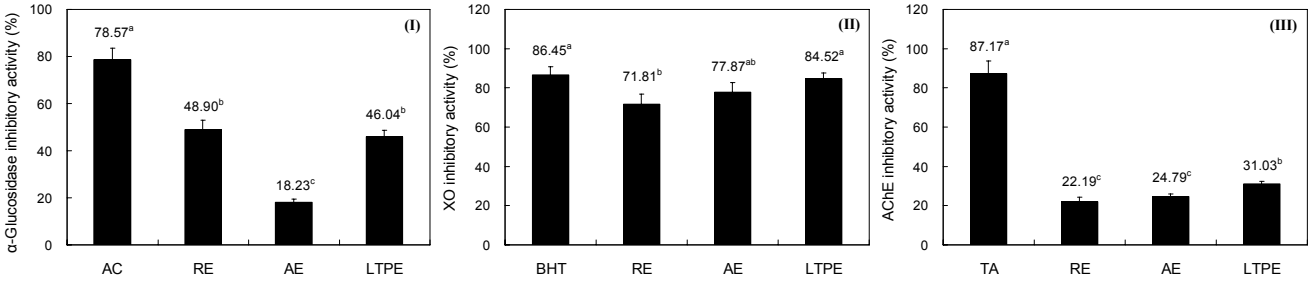

Fig. 1. α-Glucosidase, xanthine oxidase (XO), and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of *Portulaca oleracea* extracts with different extraction methods (100 mg%, dry basis). Values are means±standard deviation of triplicate determinations. Bars/mean values with different letters are significant differences (P<0.05). The concentrations of positive control (AC, acarbose; BHT, butylated hydroxytoluene; TA, tacrine) solutions were measured at 100 mg%.

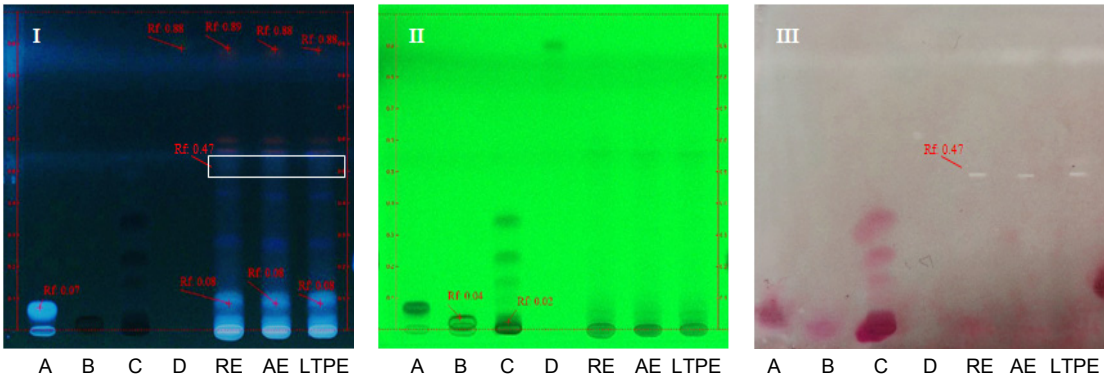

Fig. 2. Screening of 70% ethanol extracts of *Portulaca oleracea* with different extraction methods using TLC assay method. The concentrations of 10 mg/mL samples were loaded on the TLC plate, and developed in toluene/acetone/formic acid (6:6:1, v/v/v). A, chlorogenic acid; B, rutin; C, tannin; D, β-carotene. Ⅰ: UV-366 nm (without chemical treatment), Ⅱ: UV-254 nm (without chemical treatment), Ⅲ: white spots on the purple background represent the AChE inhibition when 1-naphthyl acetate (1.5 mg/mL) and Fast Blue B Salt (50 mg/100 mL) were sprayed, followed by 1,000 Unit/mL of AChE spray. Abbreviations: see Table 1.

나타나는 것을 확인하였다. TLC 방법에 의한 AChE의 저해활성은 naphthyl acetate가 AChE에 의해 α-naphthol로 전환되고, α-naphthol은 2개의 active site form을 가지고 있는 Fast Blue B Salt와 반응하여 azo dye가 생성되어 보라색이 나타나게 되는 원리로 AChE 저해를 할 수 있는 성분이 존재할 시 α-naphthol의 생산은 멈추게 되고 azo dye의 생산이 억제됨에 따라 활성성분은 white band를 띠게 된다(35). 한편 TLC 법에서 AChE 저해활성은 알칼로이드 성분의 존재로 나타나는 것으로 알려지고 있는데 현재 AChE 억제제로 잘 알려져 있는 galantamine의 경우 50% 이상이 알칼로이드 계열 화합물로 이루어져 있으며 또한 대부분의 천연물 AcheE 저해활성에 관한 성분 추적에서도 알칼로이드 성분의 함유에 따라 저해활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(36). 쇠비름의 경우 5가지 종류의 알칼로이드 성분인 oleracein A, B, C, D 및 E를 함유하는 것으로 알려진 바 있으며(5), 본 연구에서 쇠비름 추출물에서 AcheE 저해활성을 나타내는 것은 알칼로이드 성분에 따른 결과로 추정된다. 한편 쇠비름의 경우 퇴행성 질환의 하나인 치매의 예방 가능성을 보여주었으나 이에 대한 생리활성 성분 추적과 보다 구체적인 AChE 저해 메카니즘 연구와 효능검증이 수행되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

쇠비름의 활용 및 생리활성을 증가시킬 수 있는 적정 추출방법을 알아보고자 환류냉각, 가압가열 및 저온고압 추출법을 이용하여 추출한 쇠비름 70% 에탄올 추출물의 생리활성을 비교하였다. 추출수율은 환류냉각추출, 가압가열추출, 저온고압추출 순으로 높은 수율을 나타내었다. 색도에서는 저온고압추출에서 명도와 황색도가 높았고, 채도의 경우 가압가열 및 저온고압추출에서 높았다. 폴리페놀 및 프로안토시아니딘 함량은 저온고압추출이 환류냉각 및 가압가열추출에 비해 높은 함량을 나타내었으며, 플라보노이드 함량은 가압가열추출에서 높은 함량을 나타내었다. 항산화 활성은 저온고압추출이 환류냉각 및 가압가열 추출에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타낸 반면 철 이온에 대한 제거효과의 경우 환류냉각추출 및 가압가열추출에서 높은 활성을 나타내었다. α-Glucosidase 및 XO 저해활성은 저온고압추출에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편 AChE 저해활성에서는 저온고압추출, 가압가열추출, 환류냉각추출 순으로 높은 활성을 나타내었고, TLC bioassay를 통하여 살펴본 결과 특정 compound들에 의해 AChE 저해 활성이 나타났으며 퇴행성 질환의 하나인 치매의 예방 가능성을 확인하였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 저온고압추출물이 소재 활용가치가 높을 것으로 사료되며 천연항산화제 및 기능성 증진을 위한 소재로 이용 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 2013년도 대구가톨릭대학교 학부교육선진화 선도대학 지원 사업에 의한 것으로 감사드립니다.

REFERENCES

1. Danrong Z, Yuqiong C, Dejiang N. 2009. Effect of water quality on the nutritional components and antioxidant activity of green tea extracts. *Food Chem* 113: 110-114.
2. Hung TM, Thung PT, Nhan NT, Mai NTT, Quan TL, Choi JS, Woo MH, Min BS, Bae KH. 2011. Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from Corydalis tuber. *Nat Prod Sci* 17: 108-112.
3. Yook CS. 1989. *Coloured medicinal plants of Korea*. Academic Press, Seoul, Korea. p 164.
4. Habtemariam S, Harvey AL, Waterman PG. 1993. The muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* are associated with high concentrations of potassium ions. *J Ethnopharmacol* 40: 195-200.
5. Xiang L, Xing D, Wang W, Wang R, Ding Y, Du L. 2005. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry* 66: 2595-2601.

6. Park SH, Kim DK, Bae JH. 2011. The antioxidant effect of *Portulaca oleracea* extracts and its antimicrobial activity on *Helicobacter pylori*. *Korean J Food & Nutr* 24: 306-311.
7. Bea JH. 1999. Effect of *Portulaca oleracea* extract on removing nicotine component of tobacco. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 607-612.
8. Won HR, Kim SH. 2011. Antihyperlipidemic effect of diet containing *Portulaca oleracea* L. ethanol extract in high fat diet-induced obese mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 538-543.
9. Bae JH. 2012. The effect of *Portulaca oleracea* on the pathogens of gastroenteritis in infants. *Korean J Food & Nutr* 25: 233-238.
10. Rashed AN, Afifi FU, Disi AM. 2003. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. *J Ethnopharmacol* 88: 131-136.
11. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.
12. Abdel-Hameed ES. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem* 114: 1271-1277.
13. Baoshan S, Jorge MR, Isabel S. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 46: 4267-4274.
14. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radial cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
16. Saeedeh AD, Asna U. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem* 102: 1233-1240.
17. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
18. Yen GC, Duh PD, Tsai HL. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem* 79: 307-313.
19. Kim KY, Nam KA, Kurihara H, Kim SM. 2008. Potent α-glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* 69: 2820-2825.
20. Stirpe F, Della Corte E, Lorenzini E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
21. Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
22. Sandahl JF, Jenkins JJ. 2002. Pacific steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to chlorpyrifos: benchmark concentration estimates for acetylcholinesterase inhibition. *Environ Toxicol Chem* 21: 2452-2458.
23. Yang Z, Zhang X, Duan D, Song Z, Yang M, Li S. 2009. Modified TLC bioautographic method of screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *J Sep Sci* 32: 3257-3259.
24. Hwang JK, Kim CT, Hong SI, Kim CJ. 1994. Solubilization of plant cell walls by extrusion. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 358-370.
25. Kang KM, Lee SH 2013. Effects of extraction methods on the antioxidative activity of *Artemisia* sp. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1249-1254.
26. Kim JW, Kim JK, Song IS, Kwon ES, Youn KS. 2013. Comparison of antioxidant and physiological properties of Jerusalem artichoke leaves with different extraction processes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 68-75.
27. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. 2005. The effects of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem* 93: 713-718.
28. Jiratanan T, Liu RH. 2004. Antioxidant activity of processed table beets (*Beta vulgaris* var, *conditiva*) and green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 52: 2659-2670.
29. Woo JH, Shin SL, Jeong HS, Lee CH. 2010. Influence of applied pressure and heat treatment on antioxidant activities of young leaves from *Achillea alpina* and *Solidago virgaurea* subsp. *gigantea*. *Korean J Plant Res* 23: 123-130.
30. Gordon MH. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In *Food Antioxidant*. BJF Hudson, ed. Elsevier Applied Food Science Series, London, UK. p 1-18.
31. Osawa T. 1994. Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In *Postharvest Biochemistry of Plant Food Material in the Tropics*. Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM, eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. p 241-251.
32. Takashi Y, Yamamoto M, Tamura A. 1978. Studies on the formation of nitrosamines (Ⅶ); The effects of some polyphenols on nitrosation of diethylamine. *J Food Hyg Soc Jpn* 19: 224-229.
33. Kim HY, Lim SH, Park YH, Ham HJ, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim S. 2011. Screening of α-amylase, α-glucosidase and lipase inhibitory activity with Gangwon-do wild plants extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 308-315.
34. Vincenzo NT. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 122: 1961-1969.
35. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. p 51-90.
36. Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. 2008. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem Anal* 19: 411-419.