

연구논문

# 사과꽃잎 추출물의 용매 분획으로부터 기능성 소재의 탐색

최선주<sup>1</sup>, 조은아<sup>1</sup>, 조은혜<sup>1</sup>, 정윤주<sup>2</sup>, 구창섭<sup>2</sup>, 하병집<sup>2</sup>, 채희정<sup>1\*</sup>

## Screening of Functional Materials from Solvent Fractions of Apple Flower Leaf Extract

Sun Ju Choi<sup>1</sup>, Eun-ah Cho<sup>1</sup>, Eunhye Cho<sup>1</sup>, Yoonjoo Jeong<sup>2</sup>, Chang Sub Ku<sup>2</sup>, Byungjhip Ha<sup>2</sup>, and Hee Jeong Chae<sup>1\*</sup>

접수: 2011년 3월 10일 / 게재승인: 2011년 4월 25일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Fractional solvent extraction by organic solvents such as hexane, chloroform, ethylacetate, and butanol was carried out using 70% ethanol extract of apple flower leaves. Biological activities including antioxidant, whitening, antimicrobial and anti-wrinkle activities were investigated and bio-active materials of the extracts were identified using GC/MSD. Among the tested solvent fractions, ethylacetate fraction showed the highest total polyphenol content (1218.94 µg/mL), and flavonoid (140 µg/mL). The DPPH radical scavenging activities was over 80% at a dry matter-based concentration of 200 µg/µL and SOD-like activity was over 90% at 50 µg/mL concentration in ethylacetate fraction that was slightly lower than of ascorbic acid. Tyrosinase inhibition activity related to skin-whitening was over 60% by ethylacetate fraction of 100 µg/mL. As an anti-aging effect, elastase inhibitory activity was about 45% in ethylacetate fraction. Also, it showed a significantly antimicrobial activity against *P. acenes*. From GC/MSD analysis, a characteristic peak of high content in ethylacetate fraction was identified as kaempferol, which has been reported as a bioactive compound.

**Keywords:** apple flower leaf, kaempferol, polyphenol,

solvent fraction, antioxidant

### 1. 서론

생활수준이 급속하게 발전함에 따라 건강과 웰빙에 대한 인식이 갈수록 고조되면서 질병 방지와 노화 억제 등 생리적 효능에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 항산화 효과와 항균활성 등 기능성 성분에 대한 관심이 집중되고 있다.

산화적 스트레스의 주 원인은 태양 자외선이며 특히, 자외선에 의한 광산화적 피부 손상은 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의해서 매개되고 [1-3], 우리가 매일 호흡을 통해 받아들이는 산소는 생명 유지를 위해 반드시 필요한 물질이나 흡수된 산소의 약 2~3% 정도는 체내에서 매우 불안정한 물질이다. 산소로부터 파생된 자유기인 활성 산소종 (ROS)은 세포의 주요 성분인 단백질, 핵산 등의 손상을 유발해 세포 기능에 결정적이 영향을 미치게 되는데 [4] 이러한 산화적 스트레스는 간 염증 및 노화, 암 등의 다양한 질병 과정에서 관련된 것으로 밝혀지고 있으며 [5-6] 이를 극복하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

폴리페놀은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 갖는다. 폴리페놀 계열의 플라보노이드 (flavonoid)는 2개의 방향족 고리와 3개의 탄소로 이루어진 일련의 기본 링 구조 (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)를 갖는 화합물이다. 플라보노이드와 카테킨 (catechin)등 질병 예방에 유효하는 것이 증명되었다 [7]. 이것은 플라보노이드가 항산화제나 자유라디칼 소거제, 양이온의 킬레이트로 작용하기 때문이다 [8-9]. 항산화 및 항균 효과 등의 활성 성분을 가지는 기존의 합성물질은 반성독성, 발암 및 돌연변이 유발

<sup>1</sup>호서대학교 식품생물공학과 및 식품기능안전연구센터  
<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, and Center for Food Function and Safety, Hoseo University, Asan 336-795, Korea  
Tel: +82-41-540-5642, Fax: +82-41-532-5640  
e-mail: hjchae@hoseo.edu

<sup>2</sup>(주)롯데 기업부설연구소  
<sup>2</sup>R&D Center, Cotde Co., Ltd, Cheonan 330-858, Korea

등의 이유로 사용이 제한적이기 때문에 [10], 안정성을 갖추면서 효과가 뛰어난 천연 물질에 대한 관심이 집중되고 있다.

장미과 식물은 항산화 [11], 항염증 [12], tyrosinase의 저해제 [13]와 항암성 [14]을 증진시키는 효과를 가진다고 보고되고 있다. 장미과에 속하는 사과꽃은 4~5월에 피고 흰색 꽃이 잎과 함께 가지 끝 잎겨드랑이에서 나와 산형으로 달려 있다. 현재 사과꽃에 관한 효능으로는 항산화 효과 [15]가 밝혀져 있을 뿐 다른 효능에 관한 연구는 미비한 실정이다.

사과꽃 열매인 사과에 많이 함유된 대표적인 플라보노이드 물질은 kaempferol과 quercetin으로 밝혀져 있어 [16] 사과꽃 또한 사과와 유사한 기능성을 기대해 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 사과꽃의 활성 성분을 추출하여 성분을 확인하고 생리활성 검증을 통해 화장품 산업 및 기능성 식품 소재로서의 응용가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료 및 기기

본 연구에 사용된 사과꽃잎은 2010년 5월경 충남 예산에서 재배된 사과꽃잎을 수확하여 실험재료로 사용하였다. 시료 추출에 사용된 용매들은 Burdick & Jackson (MI, USA)사의 제품을 사용하였으며, 사용 시약은 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), pyrogallol, mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA), kojic acid, ursolic acid 등은 Sigma사 (MO, USA)에서 구입하였다. 세포독성에 사용된 시약은 RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin은 Gibco (NY, USA)에서 구입하였으며 그 밖의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 2.2. 사과꽃잎 용매 분획별 추출

열풍건조한 사과꽃잎은  $\pm 0.117$  mm 크기로 분쇄하였다. 시료 100 g을 20배 중량의 증류수에 현탁하여 60°C에서 6시간 동안 추출한 후 원심분리 (3200 rpm, 20min)한 후 재 여과 (filter paper: Whatman No. 1)하고 상등액은 rotary evaporator (SB-1000, EYELA, Japan)로 농축하여 동결건조 (ED 8518,

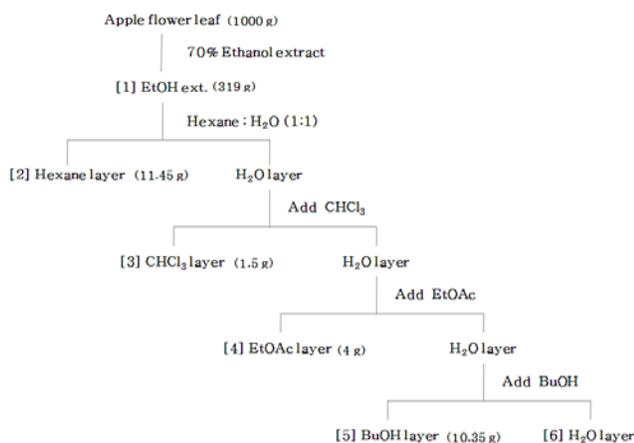


Fig. 1. Extraction and fraction procedure of apple flower.

IIShin, Seoul, Korea)시켰다. 에탄올 추출물의 경우 건조 시료 1 kg에 20배 중량의 70% 에탄올을 첨가하여 위와 동일한 과정으로 추출물을 제조하여 얻은 사과꽃잎 추출물을 극성의 차를 이용해서 서로 다른 용매를 첨가하여 단계적으로 분획하였다. 70% 에탄올 추출물에 물과 hexane 혼합액으로 분획하여 물에 가용성인 분획과 hexane에 가용성인 분획으로 분리하였으며, chloroform, ethylacetate, butanol을 순차적으로 가하여 각각의 분획물을 얻었다 (Fig. 1). 이들 분획물은 감압농축하였고 동결 건조하여 용매를 제거한 후 실험에 사용하였다.

### 2.3. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Cho 등 [17]의 방법인 Folin-Denis법을 응용하여 분석하였다. 추출액 0.1 mL에 Folin-Ciocalteu phenol reagent 0.05 mL를 혼합하고 4분 후, 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.5 mL를 가하여 혼합하고 상온에서 2분간 방치한 후, 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질을 이용하여 검량선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

### 2.4. 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등 [18]의 방법을 응용하여 분석하였다. 추출액 0.1 mL에 10% aluminium nitrate nonahydrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 95% 에탄올 4.7 mL을 순차적으로 가하여 25°C water bath (SWB-10, Jeio Tech, Korea)에서 40분 동안 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 표준물질을 이용하여 함량을 계산하였다.

### 2.5. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 메탄올에 0.4 mM의 농도로 용해한 DPPH 용액 160  $\mu$ L와 시료 40  $\mu$ L를 첨가하여 암소에서 30분간 방치한 다음 microplate reader (VERSAmax, Molecular Device, CA, USA)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같이 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \left[ 1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{Blank}}} \right] \times 100$$

### 2.6. SOD (superoxide dismutase) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 유해 환원 산소종을 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하였다. Tris-HCl 완충용액 (pH 8.5) 120  $\mu$ L에 40  $\mu$ L의 시료와 7.2 mM pyrogallol 40  $\mu$ L를 가하여 25°C에서 10분간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{SOD-like activity}(\%) = \left[ 1 - \frac{A_{\text{Experiment}}}{A_{\text{Blank}}} \right] \times 100$$

### 2.7. 티백활성 (Tyrosinase inhibition assay)

Tyrosinase 저해활성은 L-tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에 tyrosinase 효소 작용에 의해 생성되는 DOPA 생성물을

측정하는 방법으로 측정하였다 [19]. Tyrosinase 저해활성은 0.5 M 인산완충용액 (pH 6.5) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 dopachrome을 475 nm에서 측정하였다.

### 2.8. Elastase 저해활성

Elastase 저해활성 측정은 0.25 M Tris-HCl (pH 8)에 elastase 기질인 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 2 mM이 용해된 buffer 20 µL에 측정시료용액 20 µL와 buffer 140 µL를 첨가하여 25°C에서 10분 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 20 µL 첨가 (농도 0.18 U/mL)하여 37°C에서 10 min 동안 반응하여 410 nm에서 흡광도로 측정하였다.

### 2.9. 항균활성

그램 음성균인 *Escheichia coli* (ATCC 9633)와 그람 양성균인 *Bacillus subtilis* (ATCC 51189)는 nutrient broth (Difco, USA)를 사용하였으며, 여드름균인 *Propionibacterium acenes* (KCTC 5012)은 gifu anaerobic medium (GAM)을 사용하였다. *P. acenes*균은 CO2 incubator에서 37°C로 배양하였고, 그 외의 균주는 37°C 배양기에서 배양하였다.

항균력 측정은 paper disk를 이용하여 측정하였으며 실험에 사용한 filter paper disk (Ø8 mm, Whatman, Japan)와 고체배지, 피펫 등은 모두 멸균처리 하여 사용하였다. 평판 배지에 24시간 배양된 균주 100 µL를 취하여 spreader로 균일하게 도말한 후 제조한 추출물과 대조군을 filter paper disk위에 주입하여 24시간 동안 배양한 후 clear zone size를 측정하였다.

### 2.10. GC/MSDD 분석

동결건조한 시료를 methanol에 녹인 후 0.2 µm filter로 여과한 후 시료 1 µL를 gas chromatography/mass selective detector (GC/MSDD)에 의하여 분석하였다. GC는 HP 6890 (Agilent CA, USA)를 column은 DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm, Agilent CA, USA)를 사용하였다. 주입구와 검출기의 온도는 250°C이며, carrier gas는 helium을 사용하여 유속은 1.0 mL/min로 하고 시료는 splitless mode로 1 µL를 주입하였다. 화합물 동정에 사용한 ion source temperature는 280°C, electron multiplier (EM) voltage 1905.9 V이며, 분석할 분자량의 범위 (m/z)는 50~650 a.m.u로 하여 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 분획별 사과꽃잎의 추출 수율

건조한 사과꽃잎 추출물은 여과·농축하여 파우더를 얻었으며, 이 때 수득율은 29%이었다. 그리고 같은 실험조건하에 사과꽃잎 1 kg을 70% ethanol에 추출하고 여과·농축하여 31.9%를 수득하였으며, hexane 분획물 3.8%, chloroform 분획물 0.5%, ethylacetate 분획물 1.4%, butanol 분획물 3.5%

를 수득하였다 (Fig. 1). 본 연구에서는 각각의 사과꽃잎 용매 분획물을 생리활성 평가 및 유효성분 분석에 사용하였다.

### 3.2. 총 폴리페놀 함량

본 연구에서는 분획별 사과꽃잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 chlorogenic acid를 기준물질로 측정하였다.

사과꽃잎 DW 추출물은 513.13 mg/g이며, 70% ethanol 추출물에서는 542.5 mg/g, hexane 분획물은 602.64 mg/g, chloroform 분획물은 721.9 mg/g, ethylacetate 분획물은 809.9 mg/g, butanol 분획물은 564.8 mg/g, DW 분획물은 627.64 mg/g의 폴리페놀 화합물이 함유된 것으로 분석되었으며 (Fig. 2), 사과꽃잎의 극성보다는 비극성 용매에서 주성분인 페놀성 화합물이 많이 추출되는 것을 확인할 수 있었다. 식물체에 널리 분포되어 있는 폴리페놀성 화합물은 식물의 고유한 색을 부여하고, phenolic hydroxyl기를 갖고 있기 때문에 단백질 등과 결합하는 성질을 가지며 [20], 연쇄반응에서 alkyl radical이나 alkylperoxy radical에 수소를 공여하여 그 radical을 제거함으로써 산화를 억제하는 작용을 나타낸다 [21]. 또한 페놀 화합물 함량과 항산화 활성간의 상호작용에 대한 많은 연구들에서 알 수 있듯이 식물체가 지니고 있는 페놀 화합물의 함량을 조사함으로써 식물유래 천연 추출물들의 항산화 활성을 탐색하는 일차적인 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다 [22].

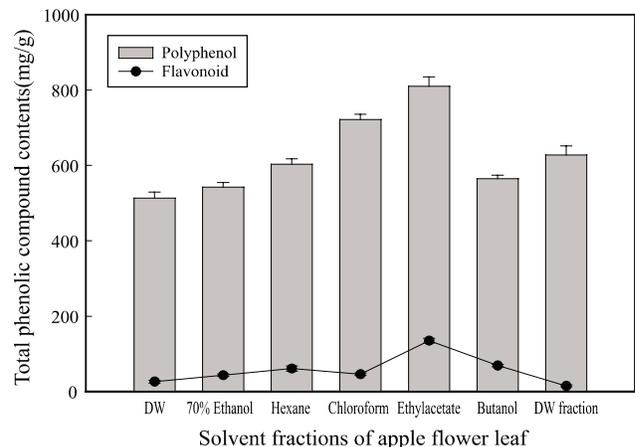


Fig. 2. Contents of total phenolic compounds in apple flower extract.

### 3.3. 총 플라보노이드 함량

용매 분획별 사과꽃잎의 페놀성 화합물 성분 중의 하나인 플라보노이드류 함량을 측정하기 위해 quercetin을 표준물질로 하여 실험을 하였다. 측정된 결과는 Fig. 2와 같이 사과꽃잎 물 추출물, 70% ethanol 추출물, hexane 분획물, chloroform 분획물, ethylacetate 분획물, butanol 분획물, 물 분획물은 각각 26.33 mg/g, 43.39 mg/g, 60.89 mg/g, 45.94 mg/g, 135 mg/g, 68.89 mg/g, 및 14.83 mg/g의 플라보노이드 화합물을 함유하였다. 이는 모든 추출물의 총 폴리페놀의 함량 중 약 1~20%의 플라보노이드를 함유하고 있으며 폴리페놀 함량 결과와 유사하게 ethylacetate 분획물

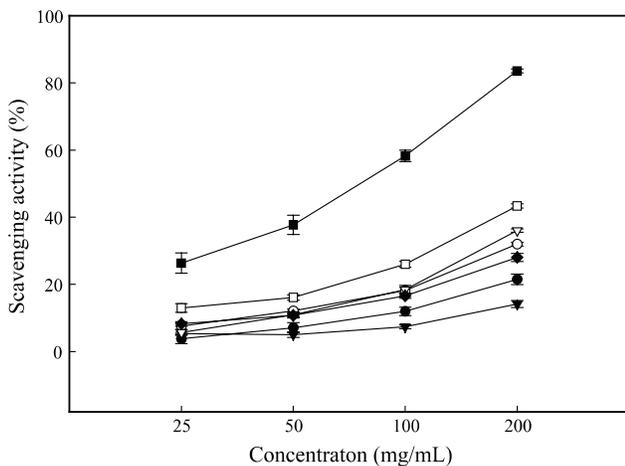
에 가장 많은 플라보노이드가 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 일부 약용식물의 플라보노이드 화합물의 함량을 측정 한 Chung 등 [23]은 엉겅퀴 줄기 및 허수오가 각각 0.47 mg/g 및 1.02 mg/g의 플라보노이드를 함유하고 있었으며, 사과꽃잎 분획물은 10~50배 많은 플라보노이드 화합물이 함유된 것으로 분석되었다.

**3.4. DPPH radical 소거능 측정**

DPPH 자유라디칼 소거능은 항산화 활성을 측정하는데 가장 보편적으로 사용되고 있는 방법으로서 DPPH는 분자내 라디칼을 함유하고 있으며 토코페롤, ascorbic acid, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되면서 radical이 소거되어 짙은 자색이 탈색되는데 이 정도를 항산화물질의 수소공여능으로 측정하는 방법으로 인체내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다.

본 연구에서는 사과꽃잎의 용매 분획에 따른 항산화 활성을 알아보기 위해서 농도별로 DPPH 자유라디칼 소거능을 측정하였다 (Fig. 3). 그 결과 ethylacetate 분획 > butanol 분획 > chloroform 분획 > 70% ethanol 분획 순으로 높은 항산화 활성을 보였으며, 그 중 ethylacetate 분획물이 200 µL/mL에서 가장 높은 80% 이상의 항산화 활성을 나타내었다. 각각의 분획물에서 농도 의존적으로 항산화 활성을 나타내었고, 이는 농도 증가에 따라 환원력이 증가된 것으로 추측되며 ethylacetate 분획물에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 그러나 같은 장미과 식물인 산벚나무 [24]와 비교한 결과 산벚나무의 수피 열수추출물은 50 ppm의 농도에서 59% 이상의 항산화 효과를 나타내었고, 에탄올추출물의 경우 92% 이상의 높은 항산화 효과를 나타낸 결과보다는 낮음을 확인할 수 있었다.

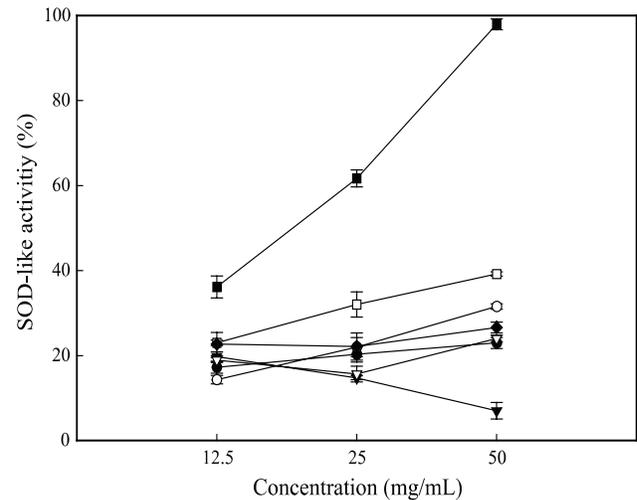
최근에는 활성산소의 산화적 손상을 제거하는 방법으로 천연물에서 항산화 효과가 높은 약리활성물질을 추출·정제하여 이용되고 있기 때문에 사과꽃잎 추출물은 항산화 자원 식물로의 이용이 가능할 것으로 생각된다.



**Fig. 3.** DPPH free radical scavenging activities of solvent fractions of apple flower (●, dw extract; ○, 70% ethanol fraction; ▼, hexane fraction; ▽, chloroform fraction; ■, ethylacetate fraction; □, butnaol fraction; ◆, dw fraction).

**3.5. SOD (superoxide dismutase) 유사활성 측정**

본 실험은 pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 Fig. 4와 같이 SOD 유사활성을 측정한 결과 사과꽃잎 ethylacetate 분획 50 ppm 농도에서 97%의 효능을 나타내었으며, butanol 분획, 70% ethanol 분획 순으로 50 ppm 농도에서 30% 이상의 SOD 유사활성을 나타내었다. 장미과 식물 중의 하나인 산돌베나무의 SOD 유사활성 결과 500 µg/mL의 농도에서 열수 추과 에탄올 추출물에서 각각 31%와 37%의 활성 [25]과 비교하여 사과꽃잎 추출물의 유사활성이 보다 높음을 확인할 수 있었다. 이처럼 비교적 우수한 superoxide 소거 활성을 보인 것은 DPPH radical 소거활성 실험과 같은 결과로 보여지며 용매 분획별 사과꽃잎 추출물이 항산화 작용에 효과적인 것으로 사료된다. 또한 Kwon 등 [26]은 폴리페놀의 함량이 높을수록 SOD 유사활성이 우수하다고 보고 하였으며, 본 실험의 결과에서도 폴리페놀의 함량이 높은 사과꽃잎 ethylacetate 분획물이 가장 높은 SOD 유사활성을 나타내었다.



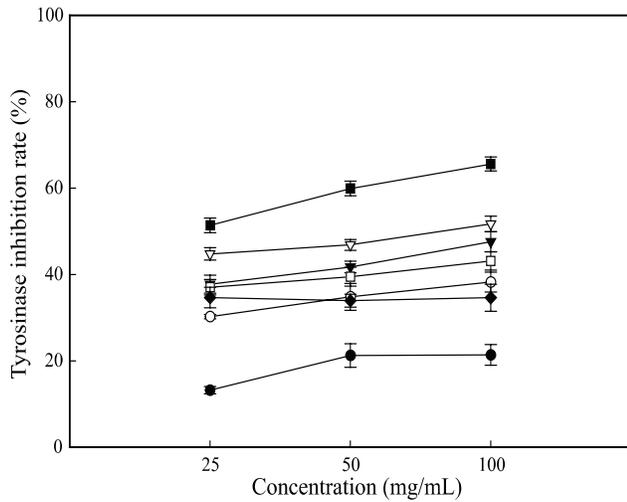
**Fig. 4.** SOD-like activity of solvent fractions of apple flower (●, dw extract; ○, 70% ethanol fraction; ▼, hexane fraction; ▽, chloroform fraction; ■, ethylacetate fraction; □, butnaol fraction; ◆, dw fraction).

**3.6. 미백활성 (Tyrosinase inhibition assay)**

피부가 자외선에 노출되면 멜라닌 세포내의 tyrosine이 tyrosinase의 생합성 작용으로 산화 반응을 일으켜 멜라닌을 생성하며 과잉 생산된 멜라닌은 피부에 기미, 주근깨 등의 색소 침착을 일으키게 된다 [27].

사과꽃잎 추출물이 멜라닌 색소의 중요한 단계를 촉매하는 효소인 tyrosinase 활성의 저해효과를 조사하기 위해 기존의 피부 미백제인 kojic acid와 용매 분획별 사과꽃잎 추출물의 각 농도에 따른 tyrosinase 저해효과를 비교하였다. Fig. 5에서와 같이 ethylacetate 분획물 100 ppm 농도에서 60% 이상의 효능을 보였으며, DW 추출물에서는 현저하게 낮은 20%의 tyrosinase 저해능을 보였다. 이는 추출물에 비하여 용매별 분획 추출시 미백효능이 더 증가됨을 알 수 있었으며, 이세이지 또는 로즈마리 등의 잎에서 추출된 페놀

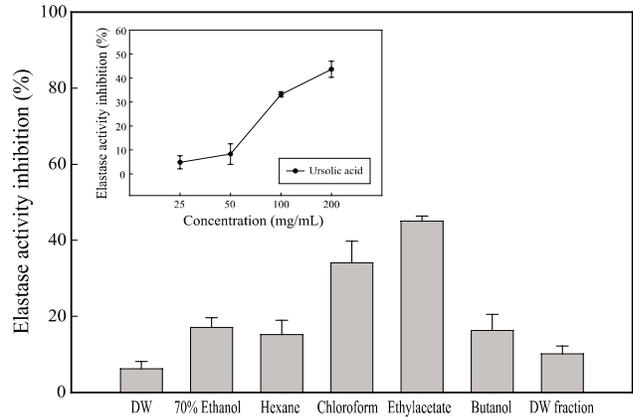
화합물 성분이 효소활성을 저해한다는 결과와 유사한 결과이다 [28]. 또한 Ra 등 [29]이 총 페놀함량 및 항산화효과와 tyrosinase 활성의 저해는 상관관계가 있다고 보고한 결과와도 일치한다. 이는 tyrosinase 저해활성 부위의 구리이온과 착화합물을 형성하는 것에 의한 것으로 추정되며 이상의 결과로 용매별 사과꽃잎 추출물의 tyrosinase 저해능은 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성 결과에서와 같이 ethylacetate 분획물에서 가장 높은 결과를 나타내었다. 특히 arbutin이나 kojic acid에 비해 사과꽃잎 추출물은 천연물로서 독성이 낮기 때문에 화장품의 미백제로서의 활용이 매우 기대된다.



**Fig. 5.** Inhibition rate of solvent fractions of apple flower leaf extract on tyrosinase (●, dw extract; ○, 70% ethanol fraction; ▲, hexane fraction; ▽, chloroform fraction; ■, ethylacetate fraction; □, butanol fraction; ◆, dw fraction).

**3.7. Elastase 저해활성**

용매 분획별 사과꽃잎 추출물이 피부 주름과 탄력에 관여하고 있는 elastin을 가수분해하는 효소인 elastase 활성에 미치는 영향을 알아보았다. Ethylacetate 분획과 chloroform 분획 500 μL/mL 농도에서 각각 45%와 34%의 elastase 활성을 저해하는 효과를 보였으며 다른 분획물은 20% 이하의 낮은 저해활성을 나타내었다 (Fig. 6). 또한 대조군 ursolic acid와 비교시 같은 농도의 ethylacetate 분획물에서 유사한 활성을 나타냄을 확인하였다. elastase는 피부 진피층에 존재하는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 주요 성분으로 주름 생성에 밀접한 관계가 있는 물질로서 [30] 실험 결과 분획별 사과꽃 elastase 저해효과를 확인 할 수 있었다. 또한 Kwak 등 [31]의 각종 약용 식물로부터 elastase 저해물 탐색에 대한 보고에서 총 64종의 식물체를 채집해 피부노화 억제와 관련된 elastase 저해 물질의 탐색한 결과, 메탄올 추출물의 경우 elastase 저해활성이 높았으며, 1 μg/mL의 농도에서 인동덩굴과 천궁이 40% 정도의 효과로 사과꽃잎 ethylacetate 분획층의 elastase 저해활성이 높은 것으로 판단되었다. 또한 Kwak 등 [31]과 같이 사과꽃잎의 추출 용매 및 추출 시간을 최적화하면 더 높은 elastase 저해활성을 나타낼 것으로 기대된다.



**Fig. 6.** Elastase inhibition activity of solvent fraction of apple flower leaf.

**3.8. 항균 활성**

식물 추출물의 항균활성은 페놀성 물질과 상관관계가 있으며 [32], 플라보노이드 함량이 높을수록 항균 효과가 높다

**Table 1.** Antimicrobial activity of solvent fractions from apple flower leaf extracts on several microorganisms (a: grapefruit seed extract, b: penicillin, c: blank (70% ethanol), d: sample)

Sample	<i>E-coli</i>	<i>B. Subtilis</i>	<i>P. acnes</i>
DW extraction			
70% Ethanol fraction [1]			
Hexane fraction [2]			
Chloroform fraction [3]			
Ethylacetate fraction [4]			
Butanol fraction [5]			
DW fraction [6]			

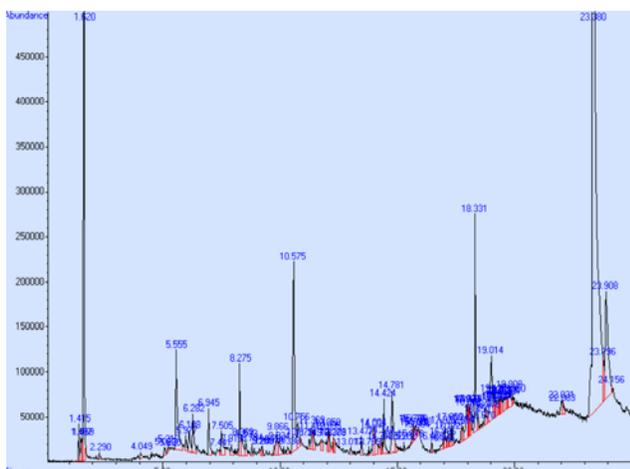
**Table 2.** Phenolic compounds identified from ethylacetate fraction

Compounds	Retention time (min)	Identified ions (m/z)	Area (%)
Benzoic acid	6.102	51, 77, 105, 122	0.54
Xanthosine	7.507	43, 57, 73, 86	0.67
2-Methoxy-4-vinylphenol	8.272	77, 107, 135, 150	1.11
p-Hydroxybenzoic acid	10.759	93, 121, 138	0.84
3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid	11.365	97, 153, 168	0.41
2-Propenoic acid	13.996	65, 91, 107, 147, 164	0.57
3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)	14.775	51, 63, 77, 89, 133, 194	1.66
Kaempferol	23.379	51, 69, 93, 121, 143, 161, 184, 229, 286	47.88

는 [30] 보고되고 있다. 다량의 페놀성 화합물을 함유하는 용매 분획별 사과꽃잎 추출물의 항균 활성을 검토하기 위하여, 피부 상재균인 *E. coli*, *P. acenes*와 *B. subtilis*에 대한 항균효과를 관찰한 결과 Table 1과 같이 나타내었다. 실험 결과 *E. coli*와 *B. subtilis*의 경우 대조군으로 사용한 penicillin과 자몽종자 추출물에서 clear zone을 확인 할 수 있었으며, 용매 분획별 사과꽃잎 추출물에서는 항균 활성을 나타내지 않았다. 그러나 여드름균으로 알려진 *P. caenes*에 대하여 용매 분획별 사과꽃잎의 경우 1% 농도에서 ethylacetate 분획물에서 15 mm의 생육 저해환을 형성하였으며 다른 분획 추출물에서도 10 mm의 생육 저해환을 확인할 수 있었다. 이와 같이 사과꽃잎 추출물의 경우 여드름에 유용한 소재 및 화장품 개발에 응용가능성을 기대해 볼 수 있다.

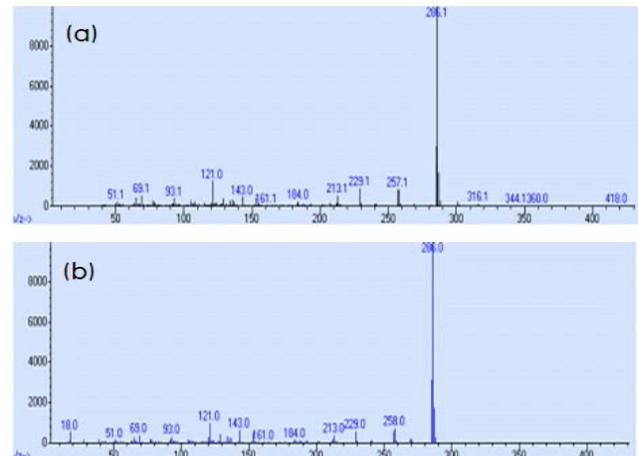
### 3.9. GC/MSD 분석

다량의 페놀성 화합물이 함유되어 있으며 생리활성이 뛰어난 사과꽃잎 ethylacetate 분획물의 주요성분을 알아보기 위하여 GC/MSD를 이용하여 분석하였다. Fig 7은 GC/MSD에 주입하여 얻은 총이온 크로마토그램이며, 크로마토그램 상에 나타난 피크의 질량분석 스펙트럼을 확인하여 페놀성 화합물을 확인하였다 (Fig. 9). 90%이상 일치하는 성분들을 각각의 상대함량 % (총 피크 면적에 대한 면적 %)과 각 성분별로 질량분석 스펙트럼에 나타난 각 토막이온의 상대체기를 Table 2에 나타내었다. 사과꽃잎 ethylacetate 분획물에

**Fig. 7.** GC chromatogram of ethylacetate fraction of apple flower leaf.

는 kaempferol의 함량은 47.78%이었으며, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)은 1.66%, 2-Methoxy-4-vinylphenol은 1.11% 순으로 Fig. 8과 같이 표준물질인 kaempferol과 사과꽃잎 ethylacetate 분획물의 mass spectrum이 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

Kaempferol은 수산기가 공유결합하면서 항산화 작용, 중금속 해독작용, 항암작용 및 항염증작용 등 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있는 기능성 물질이다 [33-35]. 본 연구로부터 사과꽃잎에 함유된 대표적인 주요 폴리페놀 물질로서 kaempferol이 확인되었으며, 사과꽃잎의 kaempferol 함량 분석 등의 추가 연구를 통하여 기능성 소재로서의 개발 가능성을 검토할 필요가 있다고 판단된다.

**Fig. 8.** Mass spectral fragmentation pattern of kaempferol (a) and peak at the same retention time from ethylacetate fraction of apple flower leaf (b).

### 감사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역 혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과이며, 이에 깊이 감사드립니다.

### References

1. Fantone, J. C. and P. A. Ward (1982) Role of oxygen-derived free

- radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction. *Ann. J. Path.* 107: 395-418.
2. Davies, K. J. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radical. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
  3. Foote, C. S. (1976) Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. Ed. W. A. Pryor. 2, 85, Academic Press, New York.
  4. Temple, N. J. (2000) Antioxidants and diseases: more question than answers. *Nutr. Research.* 20: 449-459.
  5. Lee, S. E., D. W. Son, Y. P., Yoon, S. Y., Lee, B. J. Lee, and S. H. Lee (2006) Protective effects of the methanol extracts of *Acanthopanax koreanum* against oxidative stress. *Kor. J. Pharm.* 37: 16-20.
  6. Nordmann, R. (1993) Free radicals, oxidative stress and antioxidant vitamins. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 187: 277-285.
  7. Kenkt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T and A. Aromaa (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 560-568.
  8. Cha, J. Y. and Y. S. Cho (1999) Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 1131-1136.
  9. Zhoh, C. K. and T. I. Kim (2002) The extracting methods of the seeds of yew (*taxus cusoidata sieb*) by solvent extraction and its efficacy. *Kor. J.* 33: 364-371.
  10. Thayer, D. W., G. Boyd, A. Kim, J. B. Fox, and H. M. Farrell (1998) Fate of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage on rqw of cooked turkey breast meat. *J. Food Prot.* 61: 979-987.
  11. Cho, E. J., T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara, and J. C. Park (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phyromedicin.* 10: 544-551.
  12. Oku, H., Y. Ueda, and K. Ishifruo (2003) Anti-pruritic effects of the fruits of *chaenomeles sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1031-1034.
  13. Gao, H., L. Wu, M. Kuroyanagi, K. Harada, N. Kawahar, T. Nakane, K. Umehara, A. Kirasawa, and Y. Nakamura (2003) Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* K. and their activities in B16 mouse epidermal cells. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 1318-1321.
  14. Kim, Y. M., J. Yun, C. K. Lee, H. Lee, K. R. Min, and Y. Kim (2002) Oxyresveratrol and hydroxystibene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 277: 16340-16344.
  15. Abassi, N. A., M. N. Kushad, and A. G. Endress (1998) Active oxygen scavenging enzyme activities in developing apple flowers and fruits. *Sci. Hort.* 74: 183-194.
  16. Park, S. Y. (2008) Protective effects of kaempferol and quercetin on oxidative stress in CPAE cell. *Kor. J. Plant Res.* 24: 395-401.
  17. Cho, C. H., G. J. Yoo, M. H. Son, K. H. Park, B. L. Lim, D. C. Kim, and H. J. Chae (2008) Resveratrol extraction from grape fruit stem and its antioxidant activity. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51: 11-16.
  18. Nivea, M. M., A. R. Sampoetr, and M. A. Vattuone (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114.
  19. Jeong, M. S., G. S. Lee, and H. J. Chae (2004) *In vitro* biological activity assay of ethanol extract of radish. *J. Kor. Soc.* 47: 67-71.
  20. Lee, S. O., H. J. Lee, M. H. Yu, H. K. Im, and I. S. Lee (2005) Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. *J. Kor. Food Sci. Technol.* 37: 233-240.
  21. Labuza, T. P. (1973) Kinetic of lipid oxidation in foods. *CRS Crit. Rev. Food Technol.* p. 335.
  22. Boo, H. O., H. H. Lee, J. W. Lee, S. J. Hwang, and S. U. Park (2009) Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J. Med. Crop Sci.* 17: 15-20.
  23. Chung, M. S., H. J. Um, C. K. Kim, and G. H. Kim (2007) Development of functional tea product using *Cirsium japonicum*. *Kor. J. Food Culture* 22: 261-265.
  24. Park, J. M. J. Y. Lee, T. S. Park, S. J. Hyun, H. H. Kim, Y. J. Cho, O. J. Kwon, A. R. Son, D. S. Kim, and B. J. An (2008) A study on the cosmeceutical activities of *Prunus sargentii* R. J. *Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 51: 70-78.
  25. Lee, C. E., Y. H. Kim, B. G. Lee, and D. H. Lee (2010) Study on anti-oxidant effect of extracts from *Pyroussuriensis* leaves. *J. Kor. For. Soc.* 4: 546-552.
  26. Kwon, T. D., S. W. Choi, S. J. Lee, K. W. Chung, and S. C. Lee (2001) Effects of polyphenol or vitamin C ingestion on antioxidative activity during exercise in rats. *Kor. J. Phys. Edu.* 3: 891-899.
  27. Sung, K. C. and K. J. Kim (2005) Tyrosinase activated inhibition effect and analysis of pine-needles extract. *Kor. Oil Chem. Soc.* 22: 71-76.
  28. Curelier, M. E., Richahae, H, and C. Breset (1996) Antioxidative activity of phenolic composition of pilot plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 73: 645-652.
  29. Ra, K. S., H. J. Suh, S. H. Chung, and J. Y. Son (1997) Antioxidant activity of solvent extract from onion skin. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29: 595-6001.
  30. Lee, S. Y., J. H. An, and H. Y. Cho (2003) Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *crataegus pinnatifida* bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Kir. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46: 60-65.
  31. Kwak, Y. J., D. H. Lee, N. M. Kim, and J. S. Lee (2005) Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Kor. J. Medicinal Crop. Sic.* 13: 213-216.
  32. Park, C. S. (2005) Component and quality characteristics of powdered green tea cultivated in Hwagae area. *Kor. J. Food Preserv.* 12: 36-42.
  33. Kajiya, K., M. Ichiba, M. Kuwabara, S. Kumazawa, and T. Nakayama (2001) Role of lipophilicity and hydrogen peroxide formation in the cytotoxicity of flavonols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1227-1229.
  34. Nakayama, T., M. Tamada, T. Osawa, and S. Kawakishi (1993) Pression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 45: 265-267.
  35. Kaneko, T. and N. Baba (1999) Protective effect of flavonoids on endothelial cells against linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity. *Biosci. Biochnol. Biochem.* 63: 323-328.