

## 좁은잎산사나무 열매 추출물의 효능에 관한 연구

†이 광 수 · 박 경 숙

장안대학교 건강과학부 식품영양과 부교수

### A Study of Effects of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* Extracts

†Kwang-Soo Lee and Kyung-Sook Park

Associate Professor, Dept. of Food & Nutrition, Jangan University, Hwaseong 18331, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to investigate effects of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* extracts obtained from 95% methanol and water. Methylene chloride, ethyl acetate, and methanol were used to fractionate the 95% methanol extract and each fraction was testified total polyphenol contents, electron donating abilities, the scavenging abilities of superoxide anion radical, as well as hydrogen peroxide. Extraction yields of 95% methanol and water from *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* were 25.40%, 23.12% respectively. Total polyphenol contents were 28,708.0±1,755.05 µg GAE/mL in 95% methanol, revealing the highest among them, 12,726.67±479.33 µg GAE/mL in water extract, 15,854.67±498.38 µg GAE/mL in methanol fraction, 11,810.67±584.48 µg GAE/mL in ethyl acetate fraction, and 5294.67±190.36 µg GAE/mL in methylene chloride fraction. Total polyphenol contents revealed significant differences ( $p<0.05$ ) between the solvents. In the experiment of the electron donating ability, water extract revealed 84.33±0.1% scavenging ability, the highest. Other extracts and fractions were 81.8±1.11% for water, 79.73±1.32% for ethyl acetate fraction, 75.73±2.17% for methylene chloride fraction, and 42.1±5.01% for methanol fraction, the lowest electron donating ability. Electron donating abilities revealed significant difference ( $p<0.05$ ) between the solvents. In the experiment of superoxide anion radical scavenging ability, ethyl acetate fraction(0.0026±0.0002) had the highest scavenging ability, and the others revealed slight increase rather than decrease in scavenging ability. Hydrogen peroxide scavenging ability revealed the highest in methanol fraction (-0.00206±0.00165) and the others were as follow; water extract (0.00157±0.00249), 95.0% methanol extract (0.005±0.0036), methylene chloride fraction (0.0039±0.00364), and ethyl acetate fraction (0.0002±0.00059).

Key words: *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa*, total polyphenol contents, electron donating ability, superoxide anion radical

#### 서 론

생활수준의 향상으로 평균수명이 늘어나면서 급속한 고령 사회로의 진입은 건강한 삶에 대한 요구와 관심을 갖게 한다. 특히 생활의 단순화와 급속한 전자산업의 급속한 변화로 인한 사회생활의 복잡성은 스트레스를 만들고, 이러한 스트레스는 심박변이에 영향을 주는(Jang 등 2018) 등 현대인의 건강에 많은 영향을 주고 있다. 스트레스로 인하여 다양하게 표

출되는 건강 문제를 해결하는 방안의 하나로 우리나라 성인 남성들은 금연과 절주 등의 바람직한 생활태도를 갖기보다는 임의의 약물복용이나 건강보조식품에 의존하는 것으로 나타났다(Bae 등 1995), 건강보조식품에 사용되는 첨가물은 합성물질보다는 천연물을 선호함으로써 천연물 추출물의 활성산소종(ROS)을 저해하는 생리 활성에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 산소를 사용하는 생명체의 대사과정에서 산소로부터 생성되는 활성산소를 억제하거나, 지연시키는 작

† Corresponding author: Kwang-Soo Lee, Associate Professor, Dept. of Food & Nutrition, Jangan University, Hwaseong 18331, Korea. Tel: +82-31-299-3068, Fax: +82-31-299-3609, E-mail: lkss2920@jangan.ac.kr

용을 항산화라고 하며, 이러한 기능을 갖는 물질을 항산화제(antioxidant)라고 한다. 이러한 항산화제는 항산화제의 역할이 어느 기작에서 작용하느냐에 따라서 1차 항산화제와 2차 항산화제로 나뉘지는데, 1차 항산화제는 새로운 활성산소가 체내에 생성되는 것을 방지하는 물질로 활성산소를 포집하여 연쇄반응을 방지하는 2차 항산화제와 구별된다. Cerutti PA(1985)는 미토콘드리아에서 활성산소종들이 생성되는데, 그 이유는 에너지를 생성하기 위해서 산소가 소비될 때 생성되며, 활성산소의 생성은 세포막 분해 혹은 DNA 합성 억제 등의 생리적 장애를 일으킨다고 했다. 심할 경우에는 세포가 사멸할 수 있다(Inze & Van 1995). 인체에 심각한 영향을 줄 수 있는 활성산소를 제거하기 위한 항산화성 물질과 관련한 연구는 지속적으로 진행되고 있는데, 환경적 요인에 의한 스트레스와 다량의 자외선 노출에 따른 활성산소종의 생성으로 인한 피부 노화방지(Black 등 1991), 여드름과 아토피 등과 관련한 피부질환(Cho 등 2008), 항장소재 개발과 연계한 항산화성 물질 개발(Jeong 등 2011), 피부노화와 연계한 주름 억제 등을 목적으로 한 연구(Zhoh 등 2002; Kang 등 2009), tyrosinase의 활성 저해 기능으로 인한 미백제 개선(Van Gelder 등 1997) 등 활성산소종의 억제제와 관련한 연구는 지속적으로 연구되고 있다.

산사나무(*Crataegus pinnatifida*)는 장미과에 속하는 소교목으로 '산에서 자라는 아침의 나무'라는 뜻을 가지고 있으며, 우리나라에는 좁은잎산사나무(*Crataegus pinnatifida* var. *psilosa*)를 비롯하여 털산사나무(*C. pinnatifida* var. *pubescens*), 가새잎산사나무(*C. pinnatifida* var. *partita*), 자작잎산사나무(*C. pinnatifida* for. *partita*), 넓은잎산사나무(*C. pinnatifida* var. *major*), 야광나무(*C. maximowiczii*), 자작잎산사나무(*C. pinnatifida* for. *benlifolia*) 등 7종류가 야생하고 있다. 본 연구에 사용한 좁은잎산사나무(*Crataegus pinnatifida* var. *psilosa*)는 장미과에 속하는 소교목으로 꽃은 4-5월에 피는 백색 또는 담홍색이고, 열매는 9-10월에 작고 등글면서 붉게 혹은 노랗게 달려서 꽃 못지않게 예쁘다. Zhang 등(2013)은 넓은잎산사나무 열매에서 70% ethanol로 추출하여 얻은 sugar-free aqueous extract를 쥐에 투여한 실험에서 total cholesterol, triglyceride 그리고 low-density lipoprotein-cholesterol은 감소시키나, high-density lipoprotein-cholesterol은 증가시키는 것으로 발표하였다. Wen 등(2015)은 procyanidin B2가 페놀성 화합물 중에서는 가장 많이 함유되어 있고, 이 외에도 epicatechin, chlorogenic acid, hyperoxide 그리고 isoquercitrin 등이 함유되어 있어서 산사나무열매는 건강식품으로 개발 가치가 있는 것으로 보고하였다. 산사나무의 화학적 조성에 대한 분석에서 총페놀류의 함량은 나뭇잎과 꽃이 열매보다 더 많이 함유하고 있고, 열매에서는 procyanidins 그리고 잎에서는 flavonol glycosides

and C-glycosyl flavones가 많으며, 주요한 페놀류의 화합물로는 epicatechin, aglycons and glycosides of B-type oligomeric procyanidins, phenolic acids and C-glycosyl flavones 등이 있는 것으로 발표했다(Yang & Liu 2012). 최근 산사나무와 관련한 약리적 작용과 효능에 대한 연구는 산사나무 켈러스 추출물에서의 페놀류 성분 분석과 항산화제로서의 가능성 연구(Baharun 등 2003), 산사나무에서 분리한 화합물들의 흑색종에 대한 천연 치료제로의 활용 가능성(Mustapha 등 2016), Zebrafish 형태를 활용한 멜라닌 합성의 저해제로서의 효능(Aqalou 등 2018), 심장작용의 개선과 경색부위의 감소효능(Nasa 등 1993; Veveris 등 2004; Tassell 등 2010; Koch & Malek 2011), 산사나무에서 얻은 페놀 추출물의 ultraviolet B에 노출된 감광설피부노화에 대한 저해작용(Liu 등 2018), 산사열매의 ethanol 추출물의 알코올 비의존성 지방간 질환에 대한 효능 연구(Saeedi 등 2018), 산사나무에서 분리한 pectin pentaoligosaccharide의 간에서 지방산 산화와 관련한 효소의 mRNA level에 미치는 영향(Li 등 2013) 등 간과 심장 그리고 피부질환과 관련한 분야에서 활발하게 이루어지고 있다.

본 연구는 좁은잎산사나무 열매를 건조한 후에 각각 메탄올과 물로 추출하였고, 메탄올 추출물과 물 추출물 모두 생리적 활성에 영향을 주는 성분이 있음을 확인하였으며, 메탄올 추출물은 성질을 달리하는 유기용매로 분획한 다음 각 분획물을 감압 하에 농축하여 농축된 분획들을 폴리페놀 함량 측정과 전자공여능 측정 그리고 superoxide 제거능 측정과 hydrogen peroxide 제거능 측정을 통하여 생리적 활성에 영향을 주는 물질을 확인함으로써 분획물에 따른 산사나무 열매의 활용에 대한 기초자료로의 제공뿐만 아니라, 향후 생리적 활성에 영향을 주는 성분들의 분리와 구조를 규명하는데 그 목적을 두고 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료, 시약 및 기구

본 연구에 사용된 좁은잎 산사나무 열매는 경기도 성남지역에 있는 가천대학교 인근 지역에서 채취한 열매를 물로 씻은 후에 건조기에서 50°C로 72시간 건조한 다음에 저온(-20°C)에서 냉동 보관하였고, 실험 직전에 이를 분쇄하여 실험에 사용하였다.

Folin-Ciocalteu법에 사용된 Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 전자공여능 측정에 사용된 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl(DPPH)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 추출 용매로 사용된 methylene chloride, ethyl acetate, methanol 등은 Daejung(Incheon, Korea) 제품을 사용하였다. Superoxide anion radical 제거에 사용된 cyto-

chrome C, xanthine, sodium deoxycholate와 xanthine oxidase는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 명시되지 않은 시약은 1급(95% 이상) 시약을 사용하여 실험하였다. Vortex Mixer는 Thermolyne(Iowa, USA)사의 Type 37600 Mixer를 이용하였다. TECAN사(Salzburg, Austria) Infinite 200 PRO NanoQuant UV/VIS Spectrophotometer로 전자공여능 측정, 폴리페놀 함량 측정, superoxide anion radical 제거능 측정 그리고 hydrogen peroxide 제거능 측정을 하였다. 냉장 혹은 냉동이 필요한 시료와 시약은 Infobiotech사(Daejeon, Korea) IBK-1200RF에 보관하였고, 항온조는 LAB PARTNER사(Seoul, Korea) PSHWB-30을 사용하였다.

### 2. 좁은잎 산사나무 열매의 추출 및 분리

50°C에서 72시간 건조하여 냉동 보관한 좁은잎 산사나무 열매를 분쇄하였고, 분쇄한 70.5 g을 상온에서 물과 95.0% methanol(MeOH)에 각각 48시간 정치하여 추출하는 방법으로 3회 추출하였고, 각각의 추출액은 여과 후 감압상태에서 농축한 다음 총 폴리페놀류 측정, 항산화성 측정, superoxide 제거능 측정 그리고 hydrogen peroxide 제거능에 대하여 측정을 하였다. Methanol로 추출한 농축액은 극성을 달리하는 용매로 분획하여 용매에 따른 분획물들의 효능을 검증하였다. 먼저 methanol로 추출한 농축액에 농축액의 5배에 해당하는 부피의 methylene chloride(MC)를 넣고 충분히 저어 준 후에 상등액을 포집하는 방법으로 2회 추출하였고, 마지막은 여과를 하여 여과액은 포집한 상등액과 합쳐서 농축하여 실험에 사용하였다. Ethyl acetate 분획물은 여과 후에 남은 침전물을 methylene chloride와 동량의 ethyl acetate를 침전물에 넣고 충분한 교반 후에 여과하는 방법으로 3회 실시하였으며, 여과액들은 감압 하에 농축하는 방법으로 얻어서 실험에 사용하였다. Methanol의 분획은 ethyl acetate 분획과 동일한 방법으로 하였다. 각 분획물에 대한 정량적인 분석보다는 효능의 차이점에 대한 정성적인 부분에 중점을 두고 분석하였다.

### 3. 총 폴리페놀 함량 측정

Folin-Ciocalteu법(Singleton & Rossi 1965)에 따라서 총 폴리페놀 함량 측정을 측정하였다. 좁은잎 산사나무 열매를 95.0% methanol과 물로 추출하여 농축한 용액들은 각각 1,000배로 희석하였고, ethyl acetate, methanol로 분획한 분획분은 각각 200배, methylene chloride로 분획한 분획분은 100배로 각각의 분획 용매로 희석하여 실험에 사용하였다. 먼저 희석한 시료액 400 µL를 취하여 물 3.0 mL와 혼합한 후에 Folin-Ciocalteu reagent 200 µL를 넣었고, 이 용액에 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 400 µL를 넣은 후, vortex mixer에서 강하게 저어준 다음 상온에서 1시간 정치시켰다. 총 폴리페놀 함량의 측정은 UV

spectrophotometer(Infinite 200 PRO NanoQuant UV/VIS Spectrophotometer, TACAN, Salzburg, Australia)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량 산출은 표준물질로 사용한 gallic acid로 표준 검량선을 구하였고, 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalents(GAE µg/mL extract)로 환산하였다.

### 4. 전자공여능 측정

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)의 free radical 제거능 측정은 좁은잎 산사나무 열매를 95.0% methanol과 물의 추출물 그리고 methylene chloride, ethyl acetate, methanol로 95.0% methanol 추출물을 분액한 분획물을 희석하지 않고, Lee & Park(2015)의 방법에 준하여 전체 부피를 조정하는 방법으로 실험을 하였다. 즉, 95% 에탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 800 µL에 시료 20 µL를 첨가하였고, 혼합 후 vortex mixer에서 강하게 저어준 다음 1시간 동안 37°C의 항온조에서 반응시킨 후에 UV spectrophotometer를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(EDA%)은 다음 식에 의하여 구하였다.

Electron donating ability(EDA%)=

$$\left(1 - \frac{A_{\text{experiment}}}{A_{\text{blank}}}\right) \times 100$$

A<sub>experiment</sub>: 시료가 첨가된 반응물의 흡광도

A<sub>blank</sub>: 시료가 첨가되지 않은 대조군

### 5. Superoxide anion radical 제거능 측정

Superoxide 제거 능력 측정은 활성산소종의 하나인 superoxide anion radical에 의해 cytochrome c가 환원되는 양을 측정하는 방법으로(McCord & Fridovich 1968) 95.0% methanol과 물의 추출물 그리고 95.0% methanol 추출물을 methylene chloride, ethyl acetate, methanol로 분액한 분획물을 각 분획물의 용매로 90% 용액을 만들어서 측정하였다. 즉, 0.1 mM EDTA를 함유하는 50 mM 인산염 완충액(pH 7.8) 2.1 mL와 50 µM KCN 0.1 mL, 0.5 mM xanthine 0.3 mL, 1% sodium deoxycholate 0.1 mL에 xanthine oxidase 0.1 mL(시료를 넣지 않은 상태에서 흡광도가 0.02 되게 조절한 것), 0.1 mM cytochrome c 0.3 mL와 시료액 10 µL를 넣고 550 nm에서 흡광도의 증가를 2분 동안 측정하였다.

### 6. Hydrogen peroxide 제거능 측정

Hydrogen peroxide 제거 능력 실험은 Aebi H(1974)의 방법에 의하여 95.0% methanol과 물의 추출물 그리고 95.0% methanol 추출물을 methylene chloride, ethyl acetate, methanol로 분액한 분획물을 각 분획물의 용매로 90% 용액을 만들어서 측

정하였다. 즉, 50 mM 인산염 완충액(pH 7.0) 2.0 mL에 시료 10  $\mu$ L와 기질 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액 1.0 mL를 가하여 240 nm에서 흡광도 변화를 관찰하고, 1분 동안에 1  $\mu$ M의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해하는 능력을 1 unit로 하였다.

## 7. 자료의 통계처리

모든 실험결과는 3회 이상 반복 실행하여 얻었고, 평균±표준편차로 산출하였다. 모든 자료의 통계처리는 Statistical Package for the Social Science Program(SPSS, version 21)을 사용하여 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 실험군 간의 유의성은 Duncan multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 좁은잎 산사나무 열매의 추출

건조 후 분쇄한 70.5 g의 좁은잎 산사나무 열매에서 95% methanol의 추출에서는 17.84 g을 얻어 25.40%의 수득률을 나타냈고, 물로 추출한 것은 16.30 g으로 23.12%의 수득률을 나타냈다. Nam 등(2015)은 산사 추출물 실험에서 100% ethanol에서 19.03% 그리고 물에서 21.71%의 수득률과 유사한 결과를 나타내었다. Methanol에서의 수득률이 ethanol에서의 수득률보다 약간 높게 나타난 것은 추출에 사용된 분쇄 입자의 크기와의 관련이 있고, methanol 용출 능력이 ethanol보다 더 높은 것으로 사료되며, 95% methanol의 추출물의 용매별 분획에 대한 수득률은 분획물의 효능 차이에 대한 검증에 중점을 두어서 생략하였다.

### 2. 총 폴리페놀 함량

Table 1에서 보는 바와 같이 95% methanol 추출물의 총 폴리페놀 함량은 28,708.0 $\pm$ 1,755.05  $\mu$ g GAE/mL로 나타났고, 물 추출물은 12,726.67 $\pm$ 479.33  $\mu$ g GAE/mL, 극성을 달리하여 95% methanol 추출물에서 분획한 분획물에서는 methanol로 분획한 분획물이 15,854.67 $\pm$ 498.38  $\mu$ g GAE/mL로 가장 높은 함량을 보였으며, ethyl acetate로 추출한 분획물은 11,810.67 $\pm$ 584.48  $\mu$ g GAE/mL, methylene chloride의 분획물은 5,294.67 $\pm$ 190.36  $\mu$ g GAE/mL로 나타나 methylene chloride 분획물이 가장 낮게 나타났다. Lee & Park(2016)은 낙상홍에서의 70% methanol 추출물에는 2,007.30 $\pm$ 109.28  $\mu$ g GAE/mL가 함유된 것으로 발표하여 좁은잎 산사나무 열매가 낙상홍보다 더 많은 페놀류들이 함유되어 있는 것으로 나타났고, 건강기능성 식품으로의 연구가 더 필요할 것으로 사료된다. Methanol 추출물의 용매별로의 분획에서는 methanol 분획분에서의 총 페놀함량이 가장 높게 나타났고, 이는 피라칸타의 70%

**Table 1. The total polyphenol contents obtained from *C. pinnatifida* var. *psilosa* extracts using different solvents**

Extraction solvents	Total polyphenols ( $\mu$ g/mL) <sup>1)</sup>
95% MeOH	28,708.0 $\pm$ 1,755.05 <sup>a</sup>
MC fraction	5,294.67 $\pm$ 190.36 <sup>b</sup>
EA fraction	11,810.67 $\pm$ 584.48 <sup>c</sup>
MeOH fraction	15,854.67 $\pm$ 498.38 <sup>d</sup>
Water	12,726.67 $\pm$ 479.33 <sup>e</sup>
F-value	671.183(0.000)*

<sup>1)</sup> Total polyphenol content was expressed as  $\mu$ g/mL gallic acid equivalents (GAE).

The data are displayed with mean $\pm$ standard deviation (n=3).

\* Means with different letters (<sup>a-e</sup>) within a column are significantly different at  $p < 0.05$ .

MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, MeOH: methanol.

methanol 추출물의 분획실험에서 methanol은 880.53 $\pm$ 803.31  $\mu$ g GAE/mL, methylene chloride는 273.39 $\pm$ 10.19  $\mu$ g GAE/mL, ethyl acetate는 80.57 $\pm$ 0.64  $\mu$ g GAE/mL로 나타난 것(Lee KS 2017)의 비교에서 methanol 분획은 동일한 결과를 나타내고 있으나, methylene chloride와 ethyl acetate에서 차이가 보임은 원시료의 추출용액의 농도 서로 상이하고, 구성물질의 조성이 다름 등 다각적인 연구가 필요하다. 목초액에서의 총 페놀화합물은 ethyl acetate에서 488.3 mg/g으로 가장 높게 나타났고(Kim 등 2005), 평의 비름 추출물에는 238.5 $\pm$ 18.9 mg/g gallic acid equivalent(Kim 등 2017), 탈지미세조류로부터 40% 에탄올 열수추출에서는 3.35 mg/g gallic acid equivalent(Choi 등 2016), 흑미강의 추출물에서는 35.06 $\pm$ 1.28 mg/g quercetin equivalent(Cheigh 등 2010), 금은화에서는 127.9 mg/g gallic acid equivalent(Song 등 2018), 고려영경귀로부터 염기 열수추출조건으로 최적화한 조건에서는 5.18 mg/g gallic acid equivalent(Jung 등 2018)이 있는 것으로 조사되었고, 조사된 자료와의 비교에서도 좁은잎산사나무 열매의 추출물에는 상당량의 폴리페놀성화합물이 존재하는 것으로 나타나, 이의 활용에 대한 연구가 필요한 것으로 사료된다. 용매에 따른 총 폴리페놀 함량은 유의적인 관계가 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

### 3. 전자공여능 측정(Electron donating ability measurement)

Table 2에서 보는 바와 같이 95% methanol 추출물의 전자공여능은 81.8 $\pm$ 1.11%로 나타났고, 물 추출물은 84.33 $\pm$ 0.1%의 전자공여능을 나타내 두 추출물 모두 전자공여능이 있는 것으로 나타났다. Methanol 추출물을 극성을 달리하는 용매로 분획한 실험에서는 ethyl acetate 분획과 methylene chloride 분

**Table 2. Electron donating ability of *C. pinnatifida* var. *psilosa* extracts obtained from different solvents**

Extraction solvents	Electron donating ability (EDA) <sup>1)</sup>
95% MeOH	81.8±1.11 <sup>c</sup>
MC fraction	75.73±2.17 <sup>b</sup>
EA fraction	79.73±1.32 <sup>bc</sup>
MeOH fraction	42.1±5.01 <sup>a</sup>
Water	84.33±0.1 <sup>c</sup>
<i>F</i> -value	671.183(0.000)*

<sup>1)</sup> Electron donating ability (EDA) content was %.

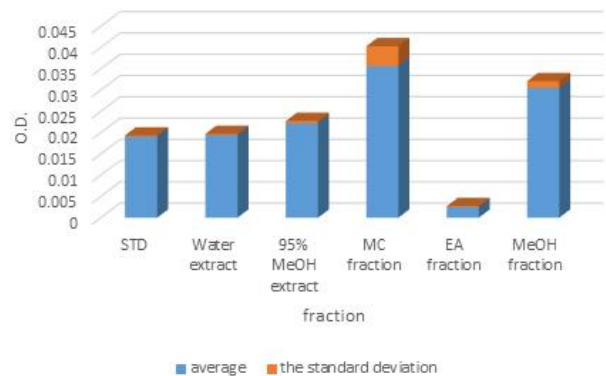
The data are displayed with mean±standard deviation (n=3).

\* Means with different letters (<sup>a-c</sup>) within a column are significantly different at  $p < 0.05$ .

MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, MeOH: methanol. 획물이 각각 79.73±1.32%, 75.73±2.17%로 비슷한 효능이 있는 것으로 나타났고, methanol 분획에서는 42.1±5.01%로 가장 낮은 전자공여능을 보였다. 이는 95% methanol 추출물이 갖는 전자공여능은 대부분 ethyl acetate나 methylene chloride에 용해되는 성분인 것으로 사료된다. Jang JS(2018)는 맥문동 추출물의 전자공여능 측정 실험에서 70% methanol 추출물에서 69.17±12.61%로 나타났고, Lee KS(2017)의 피라칸타 70% methanol 추출물에서는 79.09±7.30% 전자공여능이 있는 것으로 보고하여 본 실험과 유사한 전자공여능이 있는 것으로 나타났다. Ahn 등(2011)은 이대를 butanol, ethyl acetate, methanol, ethanol, water, hexane ether 등의 용매로 추출한 DPPH 전자공여능 실험에서 52.6~11.8%의 전자공여능이 나타난 것으로 보고하였고, Mo 등(2013)은 노근 에탄올 추출물의 10.0 mg/mL 농도에서 75.17% 전자공여성이 있는 것으로 보고하였다. Kwon 등(2011)은 산겨릅나무 목질부에서 분리한 페놀성 화합물의 DPPH 라디칼 소거 활성 연구에서 항산화 효능을 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 라디칼 소거능(IC<sub>50</sub>)으로 간주한 것을 참고로 했을 때 좁은잎 산사나무 열매의 95% methanol 추출물과 물 추출물, 그리고 ethyl acetate와 methylene 분획물이 항산화 효능을 갖는 것으로 사료되고, 분획물들을 보다 세분된 분리에 의한 전자공여능을 나타내는 물질의 분리 및 구조 규명과 이를 활용한 건강식품 개발 활용에 대한 연구가 필요한 것으로 사료된다. 각 용매에 따른 전자공여능은 유의적인 관계가 있는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

#### 4. Superoxide radical anion 제거능 측정

Fig 1에서 보는 바와 같이 95% methanol 추출물의 superoxide radical anion 제거능은 0.0222±0.0005, 물 추출물은 0.0197±0.0003, methylene chloride 분획물은 0.0356±0.0047, ethyl acetate 분획물에서는 0.0026±0.0002, 그리고 methanol 분획물은

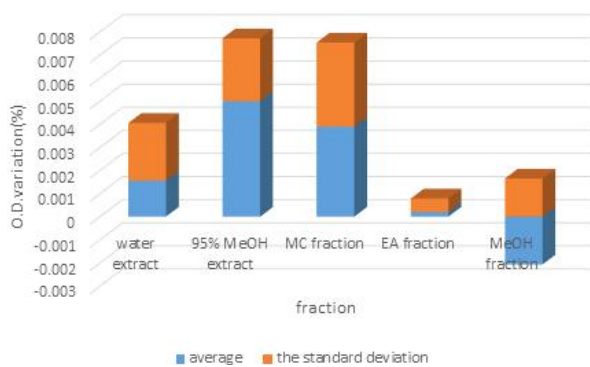


**Fig. 1. The measurement of superoxide anion radical depending on fractions.** MeOH: methanol, EA: ethyl acetate, MC: methylene chloride, STD: standard.

0.0305±0.0016을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물에서 감소함을 나타내는 것으로 보이나, 그 차이는 유의적이지 않은 것으로 나타났다. 낙상홍의 용매에 따른 추출물의 실험에서 ethyl acetate 분획물이 superoxide radical anion을 감소시키는 것으로 나타났고(Lee & Park 2016), Lee KS(2017)의 피라칸타 실험에서도 ethyl acetate 분획물에서만 superoxide radical anion이 감소하는 것으로 보고하여 본 실험과 같은 결과를 나타냈다. 좁은잎산사나무 열매의 superoxide radical anion 제거능이 낮은 값을 보인 것은 추출물의 용해성이 낮은 것도 한 원인으로 추정할 수 있고, 분획에 따른 유효성분의 희석이나 물질 상호간의 작용 감소 등 다각적인 관점에서 연구할 필요가 있다고 사료된다. Methylene chloride로 분획한 실험에서는 모두 superoxide radical anion이 증가하는 것으로 나타나, 기능성 식품으로 활용 시에 유해성 물질을 제거하는 하나의 방법으로 접근할 수는 있으나, 이에 대한 명확한 규명이 선행되어야 한다.

#### 5. Hydrogen peroxide 제거능 측정

Fig 2에서 보는 바와 같이 hydrogen peroxide 제거능은 95.0% methanol 추출물은 0.005±0.0036, 물 추출물에서는 0.00157±0.00249, methylene chloride 분획물은 0.0039±0.00364, ethyl acetate 분획물은 0.0002±0.00059, 그리고 methanol 분획물은 -0.00206±0.00165로 나타났고, 전체적으로 hydrogen peroxide 제거능이 아주 미약한 것으로 나타났다. 식물에서 hydrogen peroxide의 제거는 엽록체에 있는 ascorbate peroxidase가 관여하는 것으로 알려져 있다(Asada K 1992). 파파야 잎의 추출물에서 생물 활성적으로 유효하게 활성산소종을 감소시키는 성분에 대한 연구(Okoko & Ere 2012)에서는 100 μm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하여 추출물의 저해능 실험을 하였다. Hydrogen peroxide의 제거능이 아주 미약하게 나타난 것은 실험에 사용



**Fig. 2.** The measurement of hydrogen peroxide decomposition depending on fractions. MeOH: methanol, EA: ethyl acetate, MC: methylene chloride.

된 hydrogen peroxide의 농도(mM unit)가 다른 연구(Okoko & Ere 2012)와의 상이함( $\mu\text{m}$  unit)에 따른 영향이 큰 것으로 사료되나, 이에 대한 규명이 필요하다.

## 요약 및 결론

좁은잎 산사나무 열매를  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 건조하였고, 이를 분쇄한 후에 95.0% methanol과 물로 각각 72 hr 정치한 다음 여과한 여액을 감압·농축한 추출물에 대하여 총 폴리페놀 함량 측정, DPPH에 대한 전자공여능 실험, superoxide anion radical의 제거능 실험 그리고 hydrogen peroxide 제거능 측정을 하였고, methanol로 추출한 농축액은 다시 성질을 달리하는 유기용매(methylene chloride, ethyl acetate, methanol)로 분획하여 감압 하에 농축한 분획물들에 대하여 총 폴리페놀 함량 측정, DPPH에 대한 전자공여능 실험, superoxide anion radical의 제거능 실험 그리고 hydrogen peroxide 제거능 측정을 한 결과는 다음과 같다.

- $50^{\circ}\text{C}$ 에서 건조한 좁은잎 산사나무 열매를 분쇄하여 95% methanol과 물로 추출한 수득율은 각각 25.40%와 23.12%였다.
- 총 폴리페놀 함량은 95% methanol에서는  $28,708.0 \pm 1,755.05 \mu\text{g GAE/mL}$ , 물에서는  $12,726.67 \pm 479.33 \mu\text{g GAE/mL}$ 로 95% methanol에 더 많이 용해되는 폴리페놀류들이 존재하는 것으로 나타났고, 극성을 달리한 용매로 95% methanol 추출물의 분획에서는 methanol로 분획한 분획물이  $15,854.67 \pm 498.38 \mu\text{g GAE/mL}$ 로 가장 높은 함량을 보였으며, ethyl acetate로 추출한 분획물은  $11,810.67 \pm 584.48 \mu\text{g GAE/mL}$ , methylene chloride의 분획물은  $5,294.67 \pm 190.36 \mu\text{g GAE/mL}$ 로 나타나 methylene chloride 분획물이 가장 낮게 나타났다. 용매에 따른 총 폴리페놀 함량은  $p < 0.05$ 에서 유의적인 관계가 있음을 보였다.
- DPPH에 대한 전자공여능 측정에서 95% methanol 추출

물의 전자공여능은  $81.8 \pm 1.11\%$ , 물 추출물은  $84.33 \pm 0.1\%$ 의 전자공여능을 나타내 두 추출물 모두 전자공여능이 있는 것으로 나타났다. Methanol 추출물을 극성을 달리하는 용매로 분획한 실험에서는 ethyl acetate 분획과 methylene chloride 분획물이 각각  $79.73 \pm 1.32\%$ ,  $75.73 \pm 2.17\%$ 로 비슷한 효능이 있는 것으로 나타났고, methanol 분획이  $42.1 \pm 5.01\%$ 로 가장 낮은 전자공여능을 보였다. 분획용매에 따른 전자공여능은 유의적인 관계가 있음을 보였다( $p < 0.05$ ).

4. Superoxide anion radical 제거능 측정에서는 95% methanol 추출물이  $0.0222 \pm 0.0005$ , 물 추출물은  $0.0197 \pm 0.0003$ , methylene chloride 분획물은  $0.0356 \pm 0.0047$ , ethyl acetate 분획물에서는  $0.0026 \pm 0.0002$ , 그리고 methanol 분획물은  $0.0305 \pm 0.0016$ 을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물에서만 감소함을 나타내는 것으로 보이나, 그 차이는 유의적이지 않는 것으로 나타났다.

5. Hydrogen peroxide 제거능은 95.0% methanol 추출물은  $0.005 \pm 0.0036$ , 물 추출물에서는  $0.00157 \pm 0.00249$ , methylene chloride 분획물은  $0.0039 \pm 0.00364$ , ethyl acetate 분획물은  $0.0002 \pm 0.00059$ , 그리고 methanol 분획물은  $-0.00206 \pm 0.00165$ 로 나타나 제거능이 있는 것으로 사료되나, 전체적으로 hydrogen peroxide 제거능이 아주 미약한 것으로 나타났다. Hydrogen peroxide의 제거능이 아주 미약하게 나타난 것은 hydrogen peroxide의 농도에 따른 영향이 클 것으로 사료되어 이에 대한 규명이 필요한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 장안대학교 2018년도 자체연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Aebi H. 1974. Catalase. In Bergmyer HU (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis. 2<sup>nd</sup> ed. pp.673-684. Academic Press
- Ahn BK, Seo GY, Moon YS, Choi DB. 2011. DPPH radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities of *Pseudosasa japonica* var. *purpurascens* shoot extract. *J Adv Eng Tech* 4:261-264
- Aqalou A, Thrapsianiotis M, Anqelis A, Papakyriakou A, Skaltsounis AL, Aliqiannis N, Beis D. 2018. Identification of novel melanin synthesis inhibitors from *Crataegus pycnoloba* using an *in vivo* zebrafish phenotypic assay. *Front Pharmacol* 9:265-284
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase - A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85:235-

241

- Bae JM, Lee MS, Kim DH, Shin MH, Noh JY, Ahn YO, Park BJ. 1995. Sociodemographic factors related to the self-medication on Korean adult men. *J Korean Soc Clin Pharmacol Ther* 3:80-90
- Bahorun T, Aumjaud E, Ramphul H, Rycha M, Luximon-Ramma A, Trotin F, Aruoma OI. 2003. Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung* 47:191-198
- Black DL, Chatterjee R, Hannon DP. 1991. Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem Photobiol* 54:215-223
- Cerutti PA. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227:375-381
- Cheng CI, Chung EY, Ko MJ, Cho SW, Chang PS, Hong SI, Chung MS. 2010. Effect of subcritical water for the enhanced extraction efficiency of polyphenols and flavonoids from black rice bran. *Food Eng Prog* 14:335-341
- Cho SH, Choi YJ, Rho CW, Choi CY, Kim DS, Cho SH. 2008. Reactive oxygen species and cytotoxicity of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) sap. *Korean J Food Preserv* 15:105-110
- Choi K, Lee J, Jo J, Shin S, Kim JW. 2016. Optimization of hot-water extraction conditions of polyphenolic compounds from lipid extracted microalgae. *Korean Chem Eng Res* 54:310-314
- Inze D, Van Montagu M. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* 6:153-158
- Jang EH, Kin AY, Yu HY. 2018. Relationships of psychological factors to stress and heart rate variability as stress responses induced by cognitive stressors. *Sci Emot Sensib* 21:71-82
- Jang JS. 2018. Antioxidant activities of *Liriope platyphylla* L. extracts obtained from different solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31:543-548
- Jeong HR, Kim JH, Jo YN, Jeong JH, Heo HJ. 2011. Characterization as cosmetic substances of chestnut inner skin extracts with antioxidant activity. *J Agric Life Sci* 45:183-191
- Jung HJ, Han YJ, Lee DK, Gam DH, Kim JW. 2018. Optimization of alkaline hot-water extraction conditions for production of polyphenolic compounds and flavonoids from Korean thistle (*Cirsium japonicum*). *J Adv Eng Tech* 11:95-99
- Kang DY, Shin MO, Son JH, Hae SJ. 2009. The antioxidative and antimicrobial effects of *Celastrus orbiculatus*. *J Life Sci* 19:52-57
- Kim JS, Park SW, Ham YS, Jung SK, Lee SH, Chung SK. 2005. Antimicrobial activities and phenolic compounds of pyroligneous liquor. *Korean J Food Preserv* 12:470-475
- Kim SS, Park KJ, Lee SE, Lee JH, Choi YH. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory effects of phenolic rich *Hylotelephium erythrostictum* extracts. *Korean J Food Preserv* 24:842-848
- Koch E, Malek FA. 2011. Standardized extracts from hawthorn leaves and flowers in the treatment of cardiovascular disorders-preclinical and clinical studies. *Planta Med* 77:1123-1128
- Kwon DJ, Kim JK, Bae YS. 2011. DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds isolated from the stem wood of *Acer tegmentosum*. *J Korean Wood Sci Tech* 39:104-112
- Lee KS, Park KS. 2015. A study of effects of coffee waste extracts obtained from solvents. *Korean J Food Nutr* 28:866-870
- Lee KS, Park KS. 2016. A study of effects of *Ilex serrata* Thumb extracts. *Korean J Food Nutr* 29:946-951
- Lee KS. 2017. A study of antioxidant effects of *Pyracantha angustifolia* (Franch.) C. K. Schneid extract. *Korean J Food Nutr* 30:1286-1291
- Li TP, Zhu RG, Dong YP, Liu YH, Li SH, Chen G. 2013. Effects of pectin pentaoligosaccharide from Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. *major*) on the activity and mRNA levels of enzymes involved in fatty acid oxidation in the liver of mice fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem* 61:7599-7605
- Liu S, You L, Zhao Y, Chang X. 2018. Hawthorn polyphenol extract inhibits UVB-induced skin photoaging by regulating MMP expression and type I procollagen production in mice. *J Agric Food Chem* 66:8537-8546
- McCord JM, Fridovich I. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243:5753-5760
- Mo JH, Oh SJ, Kim KR. 2013. Comparison on the antioxidative activity of ethanol and hot water extracts of *Phragmites rhizoma*. *J Kor Soc Cosm* 19:809-814
- Mustapha N, Mokdad-Bzeouich I, Maatouk M, Ghedira K, Hennebelle T, Chekir-Ghedira L. 2016. Antitumoral, antioxidant, and antimelanogenesis potencies of Hawthorn, a potential natural agent in the treatment of melanoma. *Melanoma Res* 26:211-222
- Nam SM, Kang IJ, Shin MH. 2015. Anti-diabetic and anti-oxidative activities of extracts from *Crataegus pinnatifida*. *J East Asian Soc Diet Life* 25:270-277

- Nasa Y, Hashizume H, Hoque AN, Abiko Y. 1993. Protective effect of crataegus extract on the cardiac mechanical dysfunction in isolated perfused working rat heart. *Arzneimittelforschung* 43:945-949
- Okoko T, Ere D. 2012. Reduction of hydrogen peroxide-induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 2:449-453
- Saeedi G, Jeivad F, Goharbari M, Gheshlaghi GH, Sabzevari O. 2018. Ethanol extract of *Crataegus oxyacantha* L. ameliorate dietary non-alcoholic fatty liver disease in rat. *Drug Res* 68:553-559
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Song SY, Kim MK, Ha HY. 2018. Optimal extraction conditions of phenolic compounds, flavonoids and chlorogenic acid of *Lonicera japonica* Flos. *J Adv Eng Tech* 11:1-5
- Tassell MC, Kingston R, Gilroy D, Lehane M, Furey A. 2010. Hawthorn (*Crataegus* spp.) in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacogn Rev* 4:32-41
- Van Gelder CWG, Flurkey WH, Wichers HJ. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45:1309-1323
- Veveris M, Koch E, Chatterjee SS. 2004. Crataegus special extract WS 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life Sci* 74:1945-1955
- Wen L, Guo X, Liu RH, You L, Abbasi AM, Fu X. 2015. Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*". *Food Chem* 186: 54-62
- Yang B, Liu P. 2012. Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. *J Sci Food Agric* 92:1578-1590
- Zhang J, Liang R, Wang L, Yan R, Hou R, Gao S, Yang B. 2013. Effects of an aqueous extract of *Crataegus pinnatifida* Bge. var *major* N.E.Br. fruit on experimental atherosclerosis in rats. *J Ethnopharmacol* 148:563-569
- Zhoh CK, Kim BN, Hong SH, Han CG. 2002. The antimicrobial effects of natural aromas for substitution of parabens. *J Soc Cosme Scientists Korea* 28:166-185

---

Received 01 October, 2018

Revised 14 October, 2018

Accepted 25 October, 2018