

## 꽃사과(*Malus prunifolia* Borkh.) 추출물의 생리활성 평가 및 활성 성분의 규명

신현영 · 김 훈\* · 정은진\*\* · 김현경\*\* · 이경행\*\*\* · 배윤정\*\*\* · 김우중\*\*\*\* · 이상현\*\*\*\*\* · †유광원\*\*\*  
고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템융합전공 대학원생, \*중앙대학교 생명공학대학 연구교수,  
\*\*한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, \*\*\*한국교통대학교 식품영양학전공 교수,  
\*\*\*\*경기도 경제과학진흥원 바이오센터 책임연구원, \*\*\*\*\*중앙대학교 식물생명공학과 교수

### Evaluation of the Physiological Activity and Identification of the Active Ingredients of Crab Apple (*Malus prunifolia* Borkh.) Extracts

Hyun Young Shin, Hoon Kim\*, Eun-Jin Jeong\*\*, Hyun-Gyeong Kim\*\*, Kyung-Haeng Lee\*\*\*,  
Yun-Jung Bae\*\*\*\*, Woo Jung Kim\*\*\*\*, Sanghyun Lee\*\*\*\*\* and †Kwang-Won Yu\*\*\*

Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Department of Integrated Biomedical and Life Science,  
Korea University, Seoul 02841, Korea

\*Research Professor, College of Biotechnology and Natural Resources, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

\*\*Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

\*\*\*Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

\*\*\*\*Senior Researcher, Biocenter, Gyeonggi Business and Science Accelerator, Suwon 16229, Korea

\*\*\*\*\*Professor, Dept. of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

### Abstract

To utilize *Malus prunifolia* Borkh. as a functional material, cold-water (CW), hot-water (HW), and 70% ethanol (EtOH) extracts were prepared, and their antioxidant and anti-inflammatory activities were compared. The antioxidant activity of the HW extract evaluated by ABTS and DPPH radical scavenging and FRAP activity was significantly effective. The total polyphenol content of the HW extract was also higher by  $15.5 \pm 0.7$  mg GAE/g extract compared to other extracts. The EtOH extract showed significantly decreased TNF- $\alpha$  (39.8%), IL-6 (65.5%), and NO (34.9%) levels in RAW 264.7 cells compared to the LPS-induced control group. The levels of IL-6 (21.1%) and IL-8 (19.3%) were significantly decreased by treatment of EtOH extract in HaCaT keratinocytes induced with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . The UHPLC-MS results indicated that the EtOH extract might have chlorogenic acid and phlorizin as the major compounds. This was validated using HPLC-DAD, which showed that the EtOH extract had higher levels of chlorogenic acid and phlorizin ( $1,185 \pm 58$  and  $470 \pm 10$   $\mu\text{g/g}$  extract, respectively). In conclusion, the present study suggested that the anti-inflammatory activity of the EtOH extract was more effective than the CW and HW extracts, and chlorogenic acid and phlorizin could be used as indicator compounds and functional substances.

Key words: *Malus prunifolia* Borkh., solvent extract, antioxidant, anti-inflammatory activity, indicator compound

### 서 론

국내 사과의 주요 품종으로 알려진 ‘후지(*Malus domestica*)’

는 안정적인 재배와 고품질 과실 생산을 위해 농가 및 연구 기관에서 많은 노력을 기울이고 있는 대표 품종이다(Son 등 2013). 사과는 대표적인 타카수정작물로서 수분수를 일정

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

비율 이상 혼식해주지 않으면 결실을 맺지 못한다(Kweon 등 2016). 장미과(Rosaceae) 사과나무속(Malus)에 속하는 소교목인 꽃사과(*Malus prunifolia* Borkh.)는 과실을 섭취하기보다 관상용 및 수분수용으로 이용되고 있으며, 사과 재배시 재배품종 사이에 수분수용 품종을 혼식해왔던 과거와 달리 현재는 꽃사과로 수분수의 역할을 대신하고 있다(Kang 등 2002). 꽃사과를 수분수로 이용할 경우, 대규모 농가에서는 재배특성이 다른 품종을 재배하여 제반관리에 효과적일 뿐만 아니라, 소규모 농가에서는 품종을 재식할 수 있다는 장점이 있다(Kang IK 2004). 또한, 발아력과 화분 생산량이 높으며 사과 재배 품종과 개화기가 유사하고 과실이 작으며 1년생 가지에서도 개화가 되기 때문에 효과적인 것으로 알려져 있다(Ha & Shim 1995). 이러한 이유로 외국에서는 일찍이 꽃사과를 수분수로서 이용해 왔으며, 국내에서도 ‘후지’ 품종 재배를 위해 꽃사과를 활용하고 있다(Williams & Church 1983).

최근, 코로나 19 사태로 인해 건강기능식품에 대한 관심이 증가하고 있고(Lee & Ryu 2020), 건강에 대한 인식이 높아짐에 따라 건강증진 및 질병 예방에 도움을 주는 기능성 물질에 관심이 증가하고 있다(Hsieh & Ofori 2007). 국내에서 진행된 사과 관련 연구로는 사과와 꽃사과 품종의 자가 불화합성 유전자형 동정(Cho 등 2014), 에탄올 추출물 유래의 색소 안전성(Kim YH 1999) 등이 보고되어 있으며, 기능성에 대한 연구로는 꽃사과 및 애사과를 이용한 염증억제활성(Kim 등 2021), 사과의 산지 및 저장기간에 따른 항산화 성분 및 활성(Jin 등 2014; Bang 등 2015) 등이 보고되어 있다. 꽃사과를 이용한 기능성 연구는 거의 찾아볼 수 없는 실정이며, 국외에서는 사과 품종별 페놀성 화합물 비교(Li 등 2014), 항산화 활성(Stojiljković 등 2016) 및 고콜레스테롤 혈증 개선(Li 등 2016) 등의 연구도 보고되고 있다. 따라서 용매추출에 따른 추출물간의 기능성 평가를 진행한 연구는 거의 보고되지 않아, 본 연구를 통해 기초자료로 활용할 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구진은 국내 충청북도 충주에서 ‘후지’ 품종 재배를 위해 수분수로 이용되는 꽃사과를 이용하여 물 및 주정을 이용하여 용매추출을 진행하여 추출물을 조제하였다. 조제한 용매추출물을 이용하여 항산화 활성, 총 폴리페놀 함량 및 면역세포주를 통한 염증 및 피부염 억제활성 등의 생리활성 평가를 진행하고자 하였다. 추출용매에 따른 생리활성의 차이를 비교함으로써 기능성 식품으로 꽃사과를 이용해 건강 기능성 식품 및 피부관리의 소재로서의 활용가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다. 뿐만 아니라, 유효성분의 정성 및 정량분석을 통해 생리활성 효과에 따른 유효성분의 함량을 평가하였으며 성분을 통해 지표물질로

서 활용하여 생산 및 제조의 산업화에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 추출방법

본 연구에서 사용된 꽃사과(*Malus prunifolia* Borkh.)는 충청북도 충주(Chungbuk, Korea)에서 재배한 것을 사용하였으며, 품질유지를 위해 제공받은 즉시  $-70^{\circ}\text{C}$  급속냉동기(Ilshin Biobase, Seoul, Korea)에 동결시킨 후 추출물 제조에 이용되었다. 동결된 과실은 추출하기 전 믹서기(Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 마쇄하였으며 각각 냉수 추출, 열수 추출 및 70% 주정 추출을 진행하였다. 냉수 추출 및 70% 주정 추출은 각각 중량의 20배(w/v)에 해당하는 용매를 가하고 48시간 상온에서 추출하였으며, 열수 추출의 경우에는 중량의 20배(w/v)의 해당하는 물을 가하고 decoction 방법으로 처리( $90\sim 95^{\circ}\text{C}$ )한 후 용매의 양이 절반으로 될 때까지 추출을 진행하였다. 이후, 추출물은 8,000 rpm에서 20분간 원심분리(Gyrogen Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 진행한 다음 상등액을 여과지(Whatman filter grade 1, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)로 여과하여 침전물을 제거하였다. 여과물은 감압 농축기(Eyela, Tokyo, Japan)를 통해 농축한 후, 동결건조를 진행하여 냉수추출물(cold-water extract, CW), 열수추출물(hot-water extract, HW) 및 70% 주정추출물(70% ethanol extract, EtOH)로 조제하였으며, 이후 분석에 이용하였다.

### 2. 항산화 활성 및 총 폴리페놀 함량

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid(ABTS, Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA) 및 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich)를 이용한 라디칼 소거 활성과 ferric reducing antioxidant power(FRAP) 활성은 Shin 등(2020)의 방법을 참고하여 진행하였다. 시료의 항산화력을 상대적으로 비교하기 위한 표준물질로 L-ascorbic acid(Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, 시료의 라디칼 소거능은 mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)/g ext.으로 나타냈으며, FRAP 활성은 mg ascorbic acid(AE)/g ext.으로 제시하였다. 총 폴리페놀 함량 측정은 Marinova 등(2005)의 방법을 약간 변형하여 진행하였다. 즉, 추출물 10  $\mu\text{L}$ 에 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  200  $\mu\text{L}$ 와 50% Folin-Ciocalteu 시약 10  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 30분간 암소에서 반응시킨 다음, 200  $\mu\text{L}$ 를 취하여 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 농도별 gallic acid(Sigma-Aldrich) 측정을 통해 작성된 검량선을 사용하여 시료에 존재하는 총 폴리페놀 함량을 mg gallic acid equivalent(GAE)/g ext.으로 계산하였다.

### 3. 세포주 및 배양조건

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7과 인체 유래 각질 형성 세포주인 HaCaT 세포주는 각각 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)과 CLS Cell Line Service(Eppelheim, Heidelberg, Germany)에서 구입하였으며, 두 세포는 모두 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, Massachusetts, USA)과 1% penicillin-streptomycin (P/S; GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 배양기(Sanyo, Sakata, Japan)에서 2~3일에 한 번씩 계대배양하여 연구에 이용되었다.

### 4. RAW 264.7 세포를 통한 염증 억제 활성

시료에 의한 염증 억제 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포를 3×10<sup>5</sup> cells/mL로 조정된 후 96 well plate에 200 µL씩 분주하고 배양기에서 약 18시간 배양하여 세포를 안정화시켰다. 이후 배양액을 제거하고 serum free-DMEM (이하 SFM) 160 µL와 시료 20 µL를 첨가하여 30분간 배양 후, 염증 유발물질인 lipopolysaccharide from *Escherichia coli*(LPS; Sigma-Aldrich) 20 µL를 첨가하여 24시간 동안 재배양하였다. LPS에 의해 염증이 유발된 RAW 264.7 세포에서 시료 처리군에 의한 독성평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Invitrogen, Eugene, OR, USA)법을 통해 550 nm의 파장의 흡광도에서 측정하였으며, LPS 대조군에 대한 세포 생존율(cell viability, %)로 나타났다. 한편, 배양된 상등액에 존재하는 염증매개 물질인 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-6(IL-6)은 각각 Invitrogen(Thermo Electron Co., Waltham, MA, USA) 및 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구입한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit로 측정되었으며, 각각의 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(pg/mL)으로 계산되었다. 또한 배양 상등액에 존재하는 산화질소(nitric oxide; NO)의 함량은 griess assay를 통해 측정되었으며, sodium nitrate(NaNO<sub>2</sub>)를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(µM)으로 계산되었다.

### 5. HaCaT 세포를 통한 피부염 억제 활성

시료에 의한 피부염 억제활성을 평가하기 위해 HaCaT 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 조정된 후 96 well plate에 200 µL씩 분주하고 배양기에서 약 24시간 배양하여 세포를 안정화시켰다. 이후 배양액을 제거하고 SFM 200 µL를 분주하여 24시간 동안 기아상태로 유지시켰다. 이후 SFM 160 µL와 시료 20 µL를 첨가하고 배양하였으며, 1시간 후 염증유발 물

질로 각각 10 ng/mL의 TNF-α와 IFN-γ(T+I)가 혼합된 용액 20 µL를 첨가한 다음 24시간 동안 재배양하였다. T+I로 자극된 HaCaT 세포의 시료에 의한 독성평가는 상기 언급된 MTT법으로 측정하였으며, T+I 대조군에 대한 세포 생존율(%)로 나타났다. 배양된 상등액에 존재하는 염증매개 물질인 IL-6 및 interleukin-8(IL-8)의 함량은 BD Biosciences에서 구입한 ELISA kit를 이용하여 측정되었으며 제조사에서 제공된 standard reference를 이용하여 작성된 표준곡선을 통해 함량(pg/mL)으로 계산되었다.

### 6. UHPLC-MS를 통한 정성 분석

시료에 존재하는 활성성분 또는 지표성분을 분석하기 위해 고분해능 질량분석기(High Resolution Mass Spectrometry, HRMS)를 사용하였다. Mass 장비는 LTQ Orbitrap XL (Thermo)을 이용하였고, 액체 크로마토그래피는 Accelar UHPLC system(Thermo Electron Co.)을 사용하였다. 컬럼은 ACQUITY UPLC® BEH C18 column(2.1×150 mm, 1.7 µm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)을 이용하였으며, 이동상은 0.1% formic acid가 함유된 water와 0.1% formic acid가 함유된 acetonitrile(B)를 사용하여 분석을 진행하였다. 이동상은 기울기 조건으로 진행하였으며 0→1 min(5% B), 1→20 min(5→70% B), 20→24 min(70→100% B), 24→27 min(100% B)으로 설정하였다. 유속은 400 µL/min, 주입량은 2 µL로 진행하였다. MS system의 이온화 소스는 electrospray ionization(ESI) mode를 사용하였으며, ESI는 5.0 kV의 전압으로 300°C에서 작동되었다. MS range는 100~1,000 m/z로 설정하였으며, MS data acquisition은 30,000이며, collision energy(CE)는 45%로 나타났으며 데이터는 Xcalibur system을 사용하여 분석하였다.

### 7. HPLC-DAD를 이용한 정량 분석

시료에 존재하는 chlorogenic acid 및 phlorizin을 분석하기 위한 장비는 Photodiode Array Detector(PDA; PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, USA) 검출기가 장착된 HPLC(PerkinElmer)를 이용하였다. 컬럼은 YMC Pack Pro C18 column(25 cm×4.6 mm, 5 µm; YMC Co., Ltd, Kyoto, Japan)을 장착하였으며 컬럼 온도는 25°C로 조정하여 진행하였다. 이동상으로는 0.2% acetic acid가 함유된 water와 acetonitrile(B)를 다음과 같은 기울기 조건으로 진행하였다: 0 min (5% B), 0→20 min (5→30% B), 20→30(30→50% B), 30→35 min (50→100% B), 35→40 min (100% B), 40→45 min(100→5% B) 및 45→55 min(5% B). 유속은 1 mL/min, 주입량은 10 µL로 설정하였으며 검출 파장은 280 nm에서 분석을 진행하였다. 표준물질로는 한국천연물과학기술연구소(Gyeonggi, Korea)에서

입수한 표준물질을 농도별로 분석하여 검량선을 작성한 후, 시료에 존재하는 성분 함량을  $\mu\text{g/g ext.}$ 로 나타냈다.

## 8. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하여 실시하였으며 결과를 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 나타낸 후 통계분석은 Statistical Package for the Social Science(SPSS V25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하였으며 각각  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  수준에서 대조군과의 유의성을 검증하였다. 한편 항산화 활성, 총 폴리페놀 함량 및 정량 분석 결과는 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시한 후, 동질성을 갖는 경우 분산 분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 항산화 활성 및 총 폴리페놀 함량

본 연구에서는 충주에서 재배된 꽃사과 과실의 상업적 활용 가능성을 재고하고자 각각 냉수추출물(CW), 열수추출물(HW) 및 주정추출물(EtOH)로 조제한 후 생리활성 평가를 비교하고자 하였다. ABTS, DPPH 자유라디칼 소거능 및 FRAP assay를 이용한 항산화 활성 평가는 Table 1에 제시하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 HW( $16.7 \pm 1.8$  mg AEAC/g ext.), EtOH( $11.5 \pm 1.2$  mg AEAC/g ext.) 및 CW( $6.1 \pm 0.3$  mg AEAC/g ext.) 순으로 나타났으며, 열수 추출물인 HW가 가장 우수한 것으로 확인되었다. 이러한 경향은 DPPH 라디칼 소거능 평가에서도 유사하게 나타났으며, HW( $8.7 \pm 0.4$  mg AEAC/g ext.), EtOH( $6.5 \pm 0.6$  mg AEAC/g ext.) 및 CW( $2.9 \pm 0.9$  mg

AEAC/g ext.)의 순으로 확인되었다. 한편, FRAP 활성 평가 결과는 Table 1에 나타냈다. 라디칼 소거활성 결과와 동일하게 FRAP 활성은 HW( $8.5 \pm 0.2$  mg AE/g ext.), EtOH( $5.5 \pm 0.1$  mg AE/g ext.) 및 CW( $3.2 \pm 0.1$  mg AE/g ext.) 순으로 확인되었으며, HW가 가장 우수한 활성으로 나타났다. 마지막으로 대체로 항산화 활성을 나타낸다고 잘 알려진 폴리페놀 함량을 분석해 본 결과, HW( $15.5 \pm 0.7$  mg GAE/g ext.), EtOH( $10.1 \pm 0.7$  mg GAE/g ext.) 및 CW( $6.1 \pm 0.3$  mg GAE/g ext.) 순으로 나타났다. 결과적으로 다양한 항산화 평가 결과와 항산화 성분인 폴리페놀 함량은 큰 연관이 있을 것으로 추정되었다. 본 연구결과를 통해 열수 추출물인 HW가 항산화 활성 및 총 폴리페놀 함량이 CW 및 EtOH보다 우수한 것으로 확인할 수 있었다. 본 연구결과는 Lee 등(2018)이 최근 자유 라디칼 소거능을 통한 항산화 활성과 총 폴리페놀 함량에 대한 상관성을 보고한 결과와 일맥상통하는 것으로 확인되었다. 현재까지 꽃사과에 대한 항산화 활성 연구는 거의 없는 실정이지만, 비교적 유사한 연구로 Hong 등(2021)은 미숙사과로부터 다양한 추출물을 제조하여 항산화 활성을 비교한 바 있다. 위 연구에서 미숙사과의 에탄올 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 물 추출물보다 유사하거나 높았는데, 본 연구결과와는 상이한 것으로 확인된다. 따라서, 추후 본 연구에서 사용된 꽃사과 추출물의 항산화 활성의 우수성을 입증하기 위해, 품종별 사과 추출물을 제조하여 항산화 활성을 비교 평가하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 2. 세포독성 평가

세포주를 이용한 염색 억제 활성은 염색인자 생산 억제를 측정하는 시험법으로 시료에 의해 세포독성을 나타내면 염

**Table 1. Antioxidant capacities and total polyphenol of solvent extracts from *Malus prunifolia* Borkh**

Sample	ABTS <sup>1)</sup> (mg AEAC <sup>4)</sup> /g ext. <sup>5)</sup>	DPPH <sup>2)</sup> (mg AEAC/g ext.)	FRAP <sup>3)</sup> (mg AE <sup>6)</sup> /g ext.)	Polyphenol (mg GAE <sup>7)</sup> /g ext.)
CW	$6.1 \pm 0.3^c$	$2.9 \pm 0.9^c$	$3.2 \pm 0.1^a$	$6.1 \pm 0.3^d$
HW	$16.7 \pm 1.8^a$	$8.7 \pm 0.4^a$	$8.5 \pm 0.2^a$	$15.5 \pm 0.7^a$
EtOH	$11.5 \pm 1.2^b$	$6.5 \pm 0.6^b$	$5.5 \pm 0.1^c$	$10.1 \pm 0.7^c$

All results are expressed as mean $\pm$ S.D. for three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. CW, cold water; HW, hot-water; EtOH, 70% ethanol.

<sup>1)</sup> ABTS radical scavenging activity.

<sup>2)</sup> DPPH radical scavenging activity.

<sup>3)</sup> Ferric reducing antioxidant power.

<sup>4)</sup> Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity.

<sup>5)</sup> Extract.

<sup>6)</sup> Ascorbic acid equivalent.

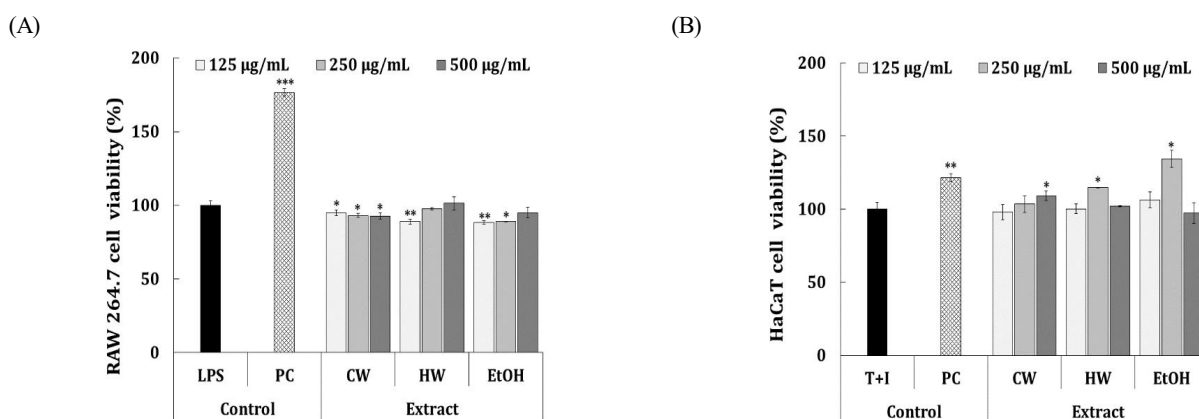
<sup>7)</sup> Gallic acid equivalent.

증 관련 인자들의 생산 감소를 통해 억제 활성이 나타나는 것으로 판단될 수 있기 때문에 먼저 시료에 의한 세포독성 평가를 진행하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성평가는 Fig. 1A에 나타났다. 추출물들은 125~500  $\mu\text{g/mL}$ 의 동일 농도범위에서 LPS 대조군 대비 88% 이상의 세포생존율을 보였는데, 일반적으로 비색법을 통한 세포독성 평가에서 시료에 대한 세포생존율이 대조군 대비 80% 이상이면 세포독성이 없는 것으로 간주되기 때문에 본 연구에서 CW, HW 및 EtOH 시료는 모두 세포독성이 없는 것으로 평가되었다. 또한, 인간유래 각질 형성세포인 HaCaT 세포를 통한 세포독성 평가는 Fig. 1B에 나타났다. 125~500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위에서 세포독성을 확인한 결과, 모든 추출물에서 T+I 대조군 대비 80% 이상의 세포 생존율을 보여 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. Lee 등(2020)의 연구에서 그린볼 사과는 RAW 264.7 세포에 100~500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군 대비 세포독성을 나타내지 않았는데, 이는 본 연구와 유사한 수준으로 확인되었다. 결론적으로, CW, HW 및 EtOH 시료는 모두 125~500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위에서 RAW 264.7 및 HaCaT 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 평가되었으며, 이후 동일농도 범위에서 염증 억제 활성을 평가하였다.

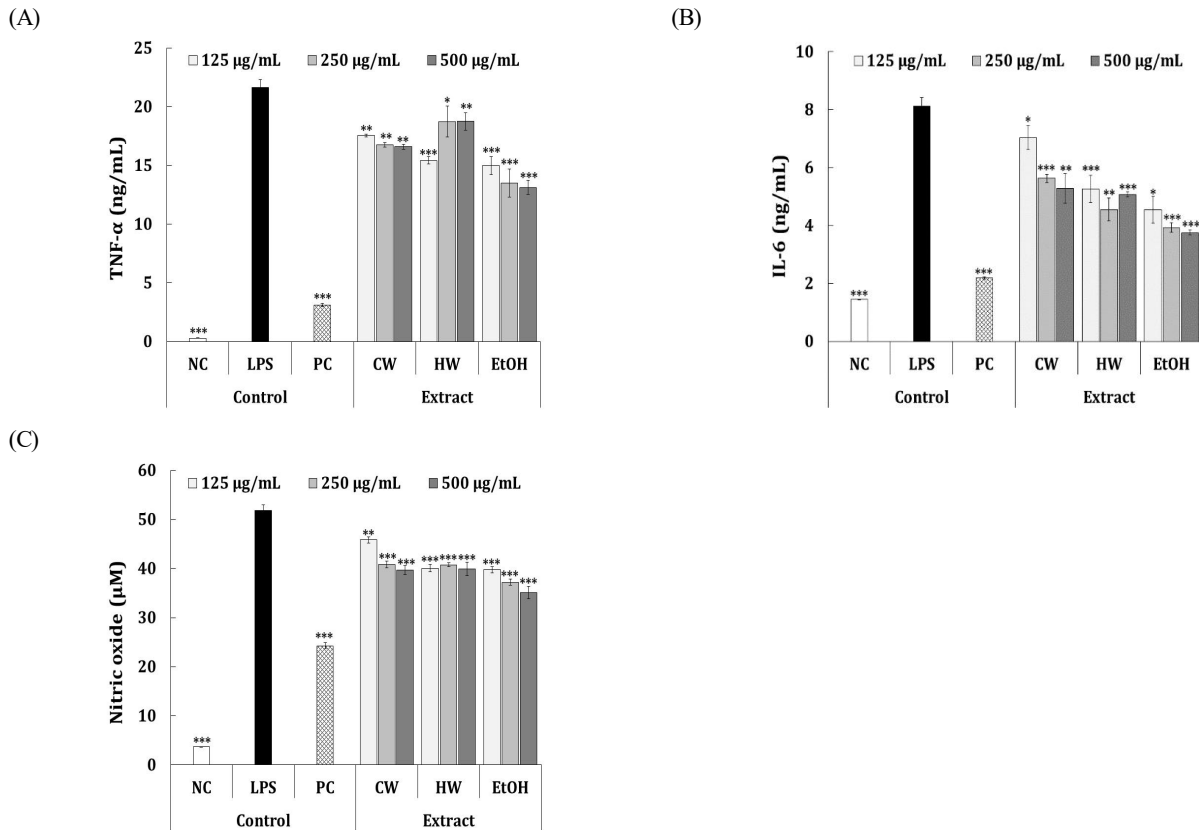
### 3. RAW 264.7 세포의 염증억제 활성

대식세포는 체내 염증 반응과 밀접한 세포로(Lee & Kang 2020), RAW 264.7 세포에서 분비하는 염증 매개 인자인 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 NO 생성에 꽃사과 추출물이 미치는 영향을 평가하였다. LPS를 통해 염증을 유발한 RAW 264.7 세포에

서 시료 처리에 의한 TNF- $\alpha$  및 IL-6 억제활성 평가에서는 양성대조군(positive control, PC)으로 Jeon 등(2000)의 연구에서 염증 억제활성이 보고된 dexamethasone(50  $\mu\text{g/mL}$ )을 사용하였다. TNF- $\alpha$  생성 억제활성 평가 결과는 Fig. 2A에 나타났다. PC 처리군은 3.1 ng/mL의 TNF- $\alpha$  생성량을 나타냈으며, LPS 대조군(21.6 ng/mL) 대비 통계적으로 유의한 86.8%의 억제활성으로 확인되었다. CW 처리군의 경우, 125~500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 16.6~17.4 ng/mL(19.7~23.6%)의 농도-의존적 통계적으로 유의한 TNF- $\alpha$  억제활성을 나타냈다. 동일 농도범위에서 HW 처리군은 LPS 대조군 대비 15.4~18.7 ng/mL(13.5~29.1%)의 유의한 TNF- $\alpha$  억제활성을 보였으며, EtOH 처리군은 13.1~15.0 ng/mL(31.1~39.8%)의 농도-의존적 유의한 TNF- $\alpha$  억제활성을 나타냈다. EtOH 추출물이 CW 및 HW 추출물에 비해 우수한 TNF- $\alpha$  억제활성으로 확인되었다. IL-6 억제 활성 평가 결과는 Fig. 2B에 제시했다. PC 처리군은 2.2 ng/mL의 IL-6 생성량을 나타냈으며, LPS 대조군(8.1 ng/mL) 대비 통계적으로 유의한 88.8%의 억제활성을 나타냈다. CW 처리군은 125~500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 5.3~7.0 ng/mL(16.3~42.5%)의 농도-의존적으로 유의한 IL-6 억제활성이 확인되었다. HW 처리군의 경우, 같은 농도범위에서 LPS 대조군 대비 4.5~5.3 ng/mL(42.8~53.5%)의 IL-6 억제활성이 확인되었으며, EtOH 처리군은 LPS 대조군 대비 3.8~4.5 ng/mL(53.7~65.5%)의 농도-의존적인 IL-6 억제활성으로 나타났다. EtOH 추출물이 CW 및 HW 추출물에 비해 우수한 IL-6 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 마



**Fig. 1. Cytotoxic effect of solvent extracts prepared from *Malus prunifolia* Borkh.** Using (A) RAW 264.7 macrophage and (B) HaCaT keratinocyte. Each sample were treated to RAW 264.7 or HaCaT cells, and inflammation inducer, such as lipopolysaccharide (LPS) or TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (T+I) were subsequently stimulated for 24 hr. A dexamethasone (50 and 20  $\mu\text{g/mL}$ , for RAW 264.7 and HaCaT, respectively) was used as positive controls. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between inflammation group (LPS or T+I) and each group by Student's *t*-test. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.



**Fig. 2. Anti-inflammatory activities of solvent extracts prepared from *Malus prunifolia* Borkh.** RAW 264.7 cells were treated with sample followed by LPS treatment for 24hr, and production of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6 and (C) nitric oxide (NO) were estimated. A dexamethasone (50  $\mu$ g/mL) or N-nitroarginine methyl ester (L-NAME; 50  $\mu$ g/mL) were used as positive control (PC) for TNF- $\alpha$  and IL-6, or NO experiments, respectively. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between LPS group and each group by Student's *t*-test. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

지막으로, NO 억제활성 평가 결과는 Fig. 2C에 나타냈으며, PC 대조군으로는 Reddy 등(2003)의 연구에 확인된 바 있는 N-nitroarginine methyl ester(50  $\mu$ g/mL)을 이용하였다. PC 처리군은 LPS 대조군(51.9  $\mu$ M) 대비 24.2  $\mu$ M(57.4%)의 유의한 NO 억제활성을 보였으며, CW 처리군은 125~500  $\mu$ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 39.6~45.8  $\mu$ M(12.5~25.4%)의 농도-의존적으로 유의한 NO 억제활성을 보였다. HW 처리군의 경우, 동일 농도범위에서 LPS 대조군 대비 39.9~40.8  $\mu$ M(23.0~24.8%)의 통계적으로 유의한 NO 억제활성이 확인되었다. EtOH 처리군에서는 LPS 대조군 대비 35.1~39.7  $\mu$ M(25.2~34.9%)의 유의적으로 우수한 NO 억제활성을 나타냈다. Kim 등(2021) 등의 연구에서 꽃사과와 유사한 꽃사과 및 애사과를 이용한 산화질소 억제활성 평가 결과에서는 농도-의존적인 NO 억제활성과 함께 *inducible nitric oxide synthase* 및 *cyclooxygenase-2*의 유전자 발현량 억제를 제시

했는데, 본 연구에서도 추가 실험을 통해 세포내 단백질 수준에서의 평가 또한 필요할 것으로 사료된다. 결론적으로, 시료 3종 중 EtOH 추출물이 염증 생성 매개물질의 생산을 가장 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 나타났으며, 이를 통해 항염증 소재로서의 산업적 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 4. HaCaT 세포의 피부염 억제 활성

인간유래 각질형성 세포인 HaCaT 세포를 통해 피부염 억제활성을 확인하고자 하였다. 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 동시처리(T+I)는 피부세포에 작용하여 IL-6 및 IL-8과 같은 염증성 사이토카인 및 항아토피성 케모카인인 TARC/CCL2의 분비를 촉진하여 피부염을 유발하는 것으로 알려져 있기 때문에(Ha 등 2020; Hwang 등 2021), 본 연구에서는 이를 활용하여 꽃사과 추출물 3종이 IL-6 및 IL-8의

생성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 먼저, IL-6 억제활성 결과는 Fig. 3A에 나타났다. PC로 사용된 dexamethasone (20 µg/mL) 처리군의 경우 T+I 대조군(651.9 pg/mL)과 비교하여 299.3 pg/mL(55.5%)의 유의한 IL-6 억제활성을 확인했다. CW 처리군의 경우, 125~500 µg/mL 농도범위에서 T+I 대조군 대비 통계적으로 유의한 억제활성은 나타나지 않았으며, HW 처리군은 250 µg/mL의 농도에서만 T+I 대조군 대비 545.1 pg/mL(16.8%)의 유의한 억제활성이 확인되었다. EtOH 처리군의 경우, 125 µg/mL의 저농도에서는 통계적으로 유의한 억제활성을 확인되지 않았지만, 250~500 µg/mL의 농도에서는 T+I 대조군 대비 517.2~518.2 pg/mL (21.0~21.2%)의 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성이 확인되었다. IL-8 억제활성 평가 결과는 Fig. 3B에 나타났다. PC 처리군의 경우, T+I 대조군(310.2 pg/mL) 대비 192.3 pg/mL (47.9%)의 통계적으로 유의한 억제활성이 나타났으며, CW 및 HW 처리군은 T+I 대조군 대비 통계적으로 유의한 IL-8 억제활성은 확인되지 않았다. EtOH 처리군의 경우, 125 µg/mL의 농도에서는 통계적으로 유의한 억제활성은 나타나지 않았지만, 250~500 µg/mL의 농도범위에서 T+I 대조군 대비 298.6~262.8 pg/mL(4.7~19.3%)의 통계적으로 유의한 억제활성이 확인되었다. 결론적으로, CW 및 HW 추출물에 비해 EtOH 추출물은 피부염 억제 활성이 우수한 것으로 확인되었다.

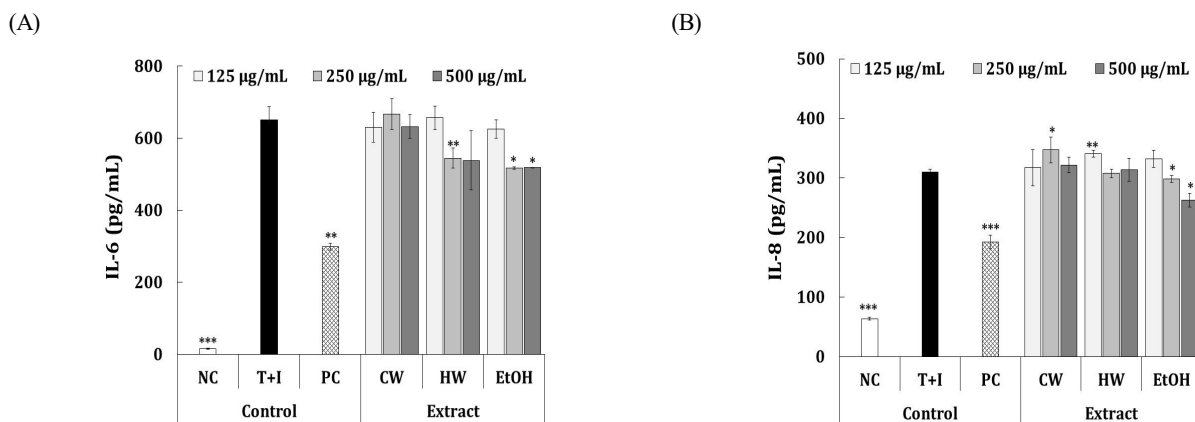
### 5. 정성 분석

상기 RAW 264.7 및 HaCaT 세포를 통한 염증 억제활성 결과를 종합했을 때, EtOH 추출물이 가장 우수한 염증 억제

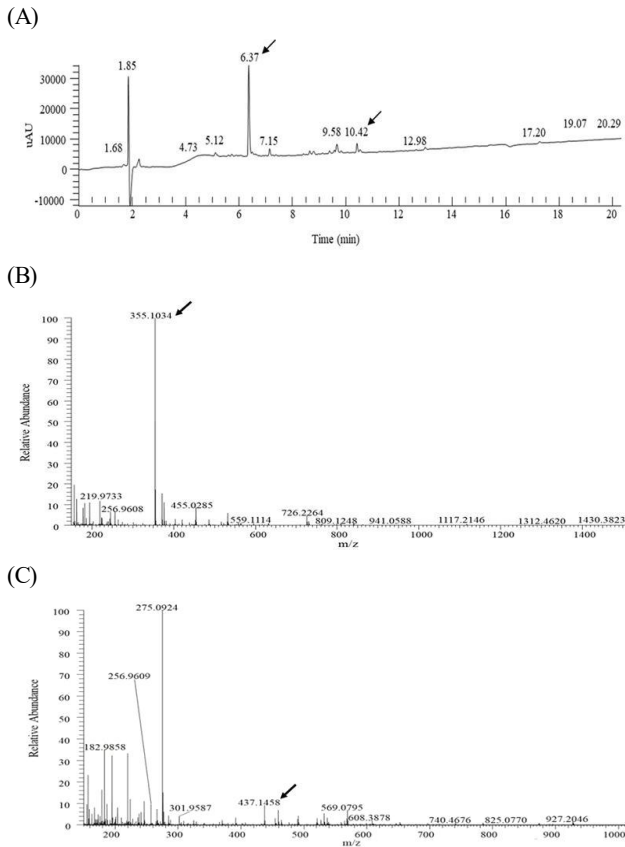
활성을 나타냈으며, 염증 억제 기능성 소재로 활용 가능성이 클 것으로 예상되었다. 이를 통해 본 연구진은 꽃사과 과실 추출물의 산업적 활용 가능성을 높이기 위해 UHPLC-MS 분석을 통해 주요 활성성분을 분석하였다. EtOH 추출물의 PDA spectrum은 Fig. 4A에 나타냈으며, 주요 peak는 MS 분석을 통해 분자량 및 이온화 패턴을 확인하였다(Fig. 4B 및 Fig. 4C). 6.37분에 나타난 major peak는 Fig. 4B에 보이는 것과 같은 mass spectrum을 나타냈으며, 이를 통해 355.1034  $m/z$ 의 분자량을 가지는 물질로 확인되었다. 이는 library search 및 Willems 등(2016)의 연구결과 비교 통해 354.3 g/mol의 분자량의 chlorogenic acid( $C_{16}H_{18}O_9$ )로 추정되었다. 또한, 10.42분의 peak는 Fig. 4C와 같은 이온화 패턴을 보였는데, 이는 Razgonova 등(2021)의 연구에서 확인된 바와 같이 437.1 g/mol의 분자량을 가지는 phlorizin( $C_{21}H_{25}O_{10}$ )로 추정되었다.

### 6. 정량 분석

상기 UHPLC 분석을 통해 확인된 chlorogenic acid 및 phlorizin의 정확한 함량을 도출하기 위해 HPLC-DAD를 이용하여 retention time을 확인해본 결과, 꽃사과 추출물은 chlorogenic acid 및 phlorizin을 함유하고 있음을 확인하였다(Fig. 5). 정량 분석결과는 Table 2에 나타냈는데, chlorogenic acid의 경우, CW(963±26 µg/g ext.), HW(1,013±11 µg/g ext.) 및 EtOH(1,185±58 µg/g ext.)로 확인되었다. Phlorizin의 정량결과, CW(223±29 µg/g ext.), HW(316±19 µg/g ext.) 및 EtOH(470±10 µg/g ext.) 순으로 나타났다. Sun 등(2013)의 연구와 비교해 볼 때 어린 사과에서 chlorogenic acid 및



**Fig. 3. Anti-inflammatory activities on the skin of solvent extracts prepared from *Malus prunifolia* Borkh.** HaCaT keratinocyte were treated with each sample followed by TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$  (T+I) treatment for 24hr, and the production of (A) IL-6 and (B) IL-8 were estimated. A dexamethasone (20 µg/mL) were used as positive control (PC). Results are expressed as mean±S.D. of three independent test in triplicate. Results are expressed as mean±S.D. of three independent test in triplicate. Asterisks mean significant difference between T+I group and each group by Student's *t*-test. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

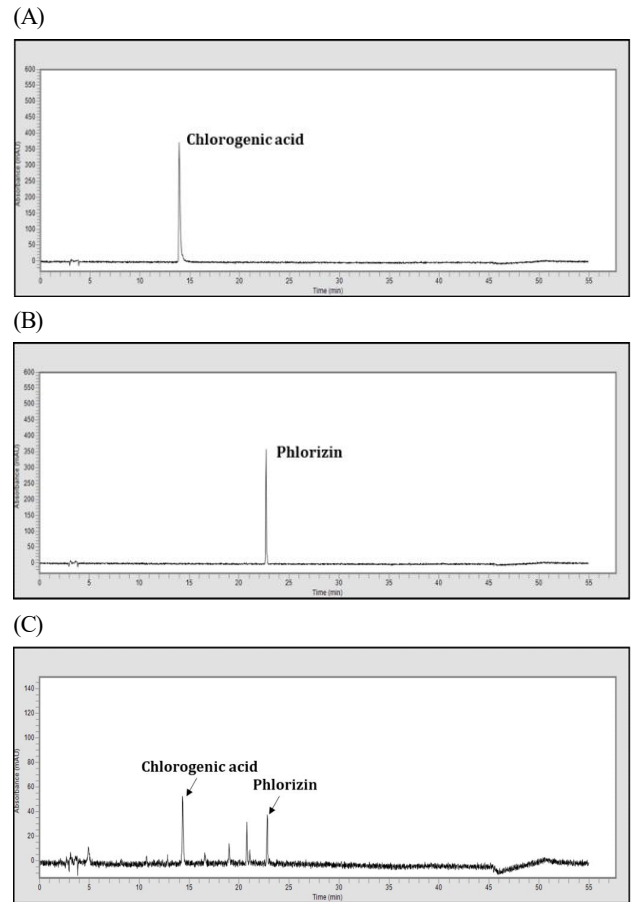


**Fig. 4.** UHPLC chromatogram of EtOH extract prepared from *Malus prunifolia* Borkh. (A) The PDA chromatogram and MS spectra of the peaks on the (B) 6.37min and (C) 10.42min.

phlorizin의 존재를 확인할 수 있었으며 이는 꽃사과의 유효 성분과 유사한 것을 확인할 수 있었다. 유효성분의 정량 분석의 결과를 종합해 볼 때, chlorogenic acid 및 phlorizin의 함량이 70% 주정 추출물에서 높은 것을 확인할 수 있었으며, 이는 염증 억제 활성과의 연관성이 있는 것으로 추정되었다. 또한, 정량 분석평가를 통해 꽃사과 추출물의 산업화를 위한 지표물질로서, chlorogenic acid 및 phlorizin을 이용 가능할 것으로 기대된다.

### 요약 및 결론

꽃사과(*Malus prunifolia* Borkh.)를 기능성 식품 원료로 활용하기 위해 3종류의 시료(냉수와 열수 및 주정 추출물; CW, HW 및 EtOH)를 조제하고 항산화 및 염증 억제활성을 비교 평가하였다. 항산화 활성 평가 결과, ABTS, DPPH 라디칼 소거활성 및 FRAP에서 HW는 각각  $16.7 \pm 1.8$ ,  $8.7 \pm 0.4$  mg AEAC/g ext. 및  $8.5 \pm 0.2$  mg AE/g ext.의 활성을 나타냈



**Fig. 5.** HPLC chromatogram of (A) chlorogenic acid and (B) phlorizin references, and (C) EtOH extract prepared from *Malus prunifolia* Borkh.

**Table 2.** Determination of major compounds from solvent extracts from *Malus prunifolia* Borkh

Sample	Chlorogenic acid ( $\mu\text{g/g ext.}^1$ )	Phlorizin ( $\mu\text{g/g ext.}$ )
CW	$963 \pm 26^b$	$223 \pm 29^c$
HW	$1,013 \pm 11^b$	$316 \pm 19^b$
EtOH	$1,185 \pm 58^a$	$470 \pm 10^a$

All results are expressed as mean $\pm$ S.D. for three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. CW, cold water; HW, hot-water; EtOH, 70% ethanol.

<sup>1)</sup> Extract.

으며, 총 폴리페놀 함량은 HW가  $15.5 \pm 0.7$  mg GAE/g ext.로 가장 높게 함유되어 있었다. 반면, LPS를 통해 염증이 유발된 RAW 264.7 세포주에서 염증억제 활성을 평가한 결과, EtOH가 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS 대조군 대비 TNF- $\alpha$



(39.8%), IL-6(65.5%) 및 NO(34.9%)의 염증촉진 인자의 생산감소를 통한 유의적인 항염증 활성을 보여주었다. 한편, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 로 염증이 유도된 HaCaT 세포에서 피부염 억제활성을 평가한 결과, RAW 264.7 세포와 같은 경향으로 EtOH가 T+I 대조군 대비 유의적인 IL-6(21.1%) 및 IL-8(19.3%) 생산 억제활성이 확인되었다. UHPLC-PDA 및 MS 분석을 통해 EtOH에 존재하는 성분을 확인한 결과, chlorogenic acid 및 phlorizin을 확인하였으며, HPLC-DAD를 통해 정량 분석을 진행한 결과, EtOH가 각각 1,185 $\pm$ 58  $\mu$ g/g ext. 및 470 $\pm$ 10  $\mu$ g/g ext.로 가장 높은 함량을 함유하고 있었다. 결과적으로 본 연구를 통해 꽃사과 과실의 EtOH가 염증 억제활성 효과가 우수한 것으로 확인되었으며, EtOH에 함유된 chlorogenic acid 및 phlorizin을 지표물질 및 기능성 물질로서 이용할 수 있을 것으로 사료되었다.

## 감사의 글

본 논문은 2021년 농촌진흥청의 지원을 받아 수행한 연구로 이에 감사드립니다(과제번호 PJ0152852021).

## References

- Bang HY, Cho SD, Kim D, Kim GH. 2015. Comparison of antioxidative activities of Fuji apples parts according to production region. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 557-563
- Cho KH, Kim JH, Lee JW, Kwon SI, Park JT, Shin IS, Kim SH, Kim DH, Choi IM. 2014. Identification of self-incompatibility genotypes in apple and crabapple cultivars by S-allele specific PCR analysis. *Korean J Breed Sci* 46:364-371
- Ha Y, Lee WH, Jeong JW, Park M, Ko JY, Kwon OW, Lee J, Kim YJ. 2020. *Pyropia yezoensis* extract suppresses IFN-gamma- and TNF-alpha-induced proinflammatory chemokine production in HaCaT cells via the down-regulation of NF- $\kappa$ B. *Nutrients* 12:1238
- Ha YM, Shim KK. 1995. Selection of new crabapple cultivars as pollinizers for apple orchard. *J Korean Soc Hortic Sci* 36:281-291
- Hong JJ, Seol HG, Oh JY, Jeong EH, Chang YH. 2021. Effective component contents and antioxidative activities of unripe apple by extraction methods. *Korean J Food Nutr* 34:174-180
- Hsieh YHP, Ofori JA. 2007. Innovations in food technology for health. *Asia Pac J Clin Nutr* 1:65-73
- Hwang KC, Shin HY, Kim WJ, Seo MS, Kim H. 2021. Effects of a high-molecular-weight polysaccharides isolated from Korean persimmon on the antioxidant, anti-inflammatory, and antiwrinkle activity. *Molecules* 26:1600
- Jeon YJ, Han SH, Lee YW, Lee M, Yang KH, Kim HM. 2000. Dexamethasone inhibits IL-1 $\beta$  gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF- $\kappa$ B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology* 48: 173-183
- Jin SY, Sim KH, Lee EJ, Gu HJ, Kim MH, Han YS, Park JS, Kim YH. 2014. Changes in quality characteristics and antioxidant activity of apples during storage. *Korean J Food Nutr* 27:999-1005
- Kang IK, Lee GJ, Kim MJ, Kwon SI, Peak PY, Choi DG. 2002. Selection of crabapple as pollinizers for major apple cultivars in apple orchard. *Hortic Sci Technol* 20:330-334
- Kang IK. 2004. Selection of crab apples as pollinizers for 'Hongro' apple cultivar. *Hortic Sci Technol* 22:212-215
- Kim GH, Lee EJ, Ryu SM, Sohn HY, Kim JS. 2021. Anti-inflammatory activities of apple extracts and phloretin. *J Life Sci* 31:158-163
- Kim YH. 1999. Stabilities of anthocyanin pigments obtained from crab apple (*Malus prunifolia* Wild. Borkh. "red fruit") by ethanol extraction. *Korean J Food Nutr* 12: 85-90
- Kweon HJ, Park MY, Song YY, Son KM, Sagong DH. 2016. Influence of temperature and plant growth regulators on pollen germination and pollen tube growth of apple cultivars bred in Korea. *Prot Hortic Plant Fact* 25:184-192
- Lee EH, Park HJ, Kim BO, Choi HW, Park KI, Kang IK, Cho YJ. 2020. Anti-inflammatory effect of *Malus domestica* cv. Green ball apple peel extract on RAW 264.7 macrophages. *J Appl Biol Chem* 63:117-123
- Lee KH, Yoon Y, Kwon HW, Lee EH. 2018. Antioxidant component and activity of different part extracts in apple (*Malus domestica* cv. Fuji). *Korean J Food Nutr* 31:858-864
- Lee Y, Ryu M. 2020. A study on the health functional food purchase intentions of Chinese consumers in their 20s and 30s: Focusing on extended model of goal-directed

- behavior. *J Eurasian Stud* 17:41-69
- Lee YY, Kang SA. 2020. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* R. Br extracts. *Korean J Food Nutr* 33:483-492
- Li M, Xue S, Tan S, Qin X, Gu M, Wang D, Zhang Y, Guo L, Huang F, Yao Y, Zhou Z, Fan S, Huang C. 2016. Crabapple fruit extracts lower hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice. *J Funct Foods* 27:416-428
- Li N, Shi J, Wang K. 2014. Profile and antioxidant activity of phenolic extracts from 10 crabapples (*Malus* wild species). *J Agric Food Chem* 62:574-581
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Technol Metall* 40:255-260
- Razgonova MP, Zakharenko AM, Derbush IV, Sabitov AS, Golokhvast KS. 2021. Research of 5 extracts of wild Amur grape *Vitis amurensis* Rupr. and identification of its polyphenolic composition by tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *E3S Web Conf* 254:01012
- Reddy MC, Subhashini J, Mahipal SVK, Bhat VB, Reddy PS, Kiranmai G, Madyastha KM, Reddanna P. 2003. C-phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 304:385-392
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim JE, Lee KH, Bae YJ, Yu KW. 2020. Bioactive compounds, anti-oxidant activities and anti-inflammatory activities of solvent extracts from *Centella asiatica* cultured in Chungju. *Korean J Food Nutr* 33:692-701
- Son KM, Choi DG, Kwon SI, Kim BO, Choi C, Kang IK. 2013. Selection of crabapple pollinizers for 'Fuji' apple through physiological and genetic analysis. *Prot Horticult Plant Fact* 22:116-122
- Stojiljković D, Arsić I, Tadić V. 2016. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. *Ind Crops Prod* 80:165-176
- Sun L, Guo Y, Fu C, Li J, Li Z. 2013. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples. *Food Chem* 136:1022-1029
- Willems JL, Khamis MM, Mohammed Saeid W, Purves RW, Katselis G, Low NH, El-Aneed A. 2016. Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 933:164-174
- Williams RR, Church RM. 1983. Growth and flowering of ornamental *Malus* pollinators in apple orchards. *J Horticult Sci* 58:337-342

---

Received 27 August, 2021

Revised 14 September, 2021

Accepted 26 September, 2021