

모과의 추출조건에 따른 Protocatechuic Acid 함량 변화 및 활성 평가

이정호¹ · 임소연¹ · 이왕로^{2*}

¹(재)순창건강장수연구소, ²전북대학교 혁신교육개발원

Protocatechuic Acid Content and Physiological Activities of *Chaenomeles sinensis* Extracts Prepared with Different Methods

Jeong Ho Lee¹, So Yeon Im¹, and Wang Ro Lee^{2*}

¹Sunchang Research Institute of Health and Longevity, Sunchang 56015, Korea

²Faculty of Liberal Education, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Abstract – The aim of this study was to investigate the potential of *Chaenomeles sinensis* as a content of protocatechuic acid and physiological activities. The analyzed the content of protocatechuic acid of *Chaenomeles sinensis* water extract (CSW) according to different extract temperature and time for extraction. It was analyzed as 0.14±0.00 mg/g in the extract at 100°C for 3 h. Protocatechuic acid content increased as extraction time and temperature increased. The activity of the CSW at 100°C for 3 h was measured. As a result of measuring DPPH, ABTS radical scavenging activity and SOD activity, antioxidant activity was found and α -glucosidase inhibition activities. Cell viability was shown for RAW 264.7 cells, and NO (nitric oxide) production was also inhibited. Finally, content of protocatechuic acid increased with increasing extraction time and extraction temperature, and exhibited antioxidant activity, inhibition of NO production, and anti-diabetic activity. It is believed that the *Chaenomeles sinensis* is likely to be developed as a functional material.

Keywords – *Chaenomeles sinensis*, Protocatechuic acid, Antioxidant, α -Glucosidase, Nitric oxide

모과(*Chaenomeles sinensis* Koehne)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 모과나무의 열매로 한국, 중국, 일본 등에 분포한다. 성숙과는 황색으로 향기가 있으며, 신맛이 강하고 짙은맛이 있어 식용보다는 약용, 차 등으로 섭취한다.¹⁻³ 한방에서는 오래 복용하면 근육과 위장을 강화시키고, 통증을 없애주며, 근육이완, 간 기능 강화, 이뇨, 혈액 생성 등의 효능을 가지고 있어 피로회복, 자양강장, 기침, 감기, 천식, 소화불량, 복부팽만감, 관절염, 폐렴, 황달형간염, 세균성이질 등을 치료한다.³⁻⁵ 모과 성분은 protocatechuic acid, β -sistosterol, oleanolic acid, ursolic acid, aspartic acid, glutamic acid, arginine, saponin, flavonoid, tannin, proanthocyanidin, catechin, leucoanthocyan, 유기산 등을 함유하고 있다.^{4,6,7} 모과에 관한 연구는 모과의 화학성분,³ 휘발성과 비휘발성 flavor 성분 분석,⁸ 근분화 및 에너지 대사 조절 발현,⁹ 항산화와 미백효과,¹⁰ 항비만억제,¹¹ 항산화 및

미백효과,¹² 항염증효과,¹³ 항응혈 억제¹⁴ 등이 연구되었다.

생체 내 활성 산소종은 산소에서 유래하여 안정한 분자상태인 triplet oxygen이 화학적 반응, 자외선, 대사과정으로 생성된 활성산소에 의해 지질과산로 생성된 지질과산화물과 체내 과산화물은 세포에 산화적 파괴를 일으켜 각종 기능장애를 일으킨다. 활성 산소종이 정상적으로 제거되지 않고 잔존하면 자유 라디칼에 의한 산화적 스트레스를 받아 질병을 일으킨다.^{9,15,16} DPPH(2,2-diphenyl-1-picorylhydrazyl)는 안정화 라디칼로 아미노산과, aromatic amine 등으로 환원되므로 수소 공여능 및 유리기 소거작용을 측정하는 방법이다.^{15,16} ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 라디칼 소거활성은 수용성 물질과 지용성 물질 모두 활성을 측정할 수 있으며, ABTS 라디칼이 시료의 항산화 물질에 의해 제거되면 탈색되는 현상을 이용하는 실험법이다.¹⁷ SOD(superoxide dismutase) 유사활성은 생체 내에서 활성산소종(superoxide)을 제거하는 효소로 체내 산화적 반응을 억제하는 효능 지표로 표현된다.¹⁸ 산화적 스트레스의 원인 물질인 활성산소종(reactive oxygen species)은

*교신저자(E-mail): wrlee@jbnu.ac.kr

(Tel): +82-63-270-2220

생체 내 반응력이 높아 혈관조직 손상을 유발시키며, 이를 방어하기 위한 생체내 시스템으로 SOD가 있다. SOD는 생성된 자유라디칼을 과산화수소로 전환시키고 산화적 스트레스에서 발생된 과산화수소를 물로 전환시켜 산화적 손상을 방지한다.^{18,19)} Nitric oxide synthase에 의하여 생성된 NO(nitric oxide)는 체내 방어기능, 세포독성, 신경전달 기능을 유지시키지만 합성되면 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 일으킨다. 염증 반응으로 과발현된 NO는 염증반응을 촉진시키고 조직의 산화적 손상과 유전자 변이 등을 일으킨다.^{20,21)} 염증반응 시 대식세포는 NO와 같은 활성질소종과 염증성 cytokine을 생성하며, 염증성 물질이 분비되어 세포손상, 유전자 변이, 신경손상, 조직손상 등의 병변을 발생시킨다. 천연물에 대한 NO 생성 억제 활성은 인체의 염증성 병변을 억제하는 지표라 할 수 있다.^{22,23)} α -Glucosidase는 체내의 탄수화물을 포도당으로 전환시키는 효소이다. α -glucosidase 저해제는 탄수화물의 소화와 흡수를 억제시키고 체내 혈당 증가를 완화시키기 위하여 α -glucosidase와 결합하여 효소의 활성을 억제시켜 당질의 흡수를 지연시키고, 혈당의 상승과 불필요한 인슐린의 분비를 억제 시킨다. α -Glucosidase 저해 활성은 혈당수치 상승억제의 지표로 사용한다.²⁴⁾ 페놀성 화합물은 다양한 화학구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl기가 단백질 등 거대분자와 결합하면 항산화, 항암, 항균 등 생리활성을 가진다.²⁵⁻²⁷⁾ Protocatechuic acid(3,4-dihydroxybenzoic acid)는 페놀화합물로서 항산화 및 항염증 활성을 가지고 있다.^{1,26)} 이에 본 연구에서는 물을 이용하여 모과를 온도별, 시간별로 추출한 후 protocatechuic acid 함량을 측정하였고, 항산화 활성, 세포독성, NO 생성 억제, α -glucosidase 저해 활성, 일반성분 등을 분석하여 건강기능식품 개발을 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 모과는 2018년 (주)음니허브에서 구입하여 우석대학교 약학대학 임재윤교수에게 검증받은 후 실험에 사용하였으며, 표본은 (재)순창건강장수연구소에 보관되어 있다.

추출 - 모과는 동결건조기(IIShinBioBase LP20, Dongducheon, Korea)를 이용하여 완전 건조시켜 분쇄기로 분쇄하여 100 mesh체로 거른 후, 모과 무게의 20배 증류수를 첨가하여 추출하였다. 추출온도는 20, 60, 100°C, 추출시간은 0.5, 1, 2, 3, 6, 9시간 동안 추출한 후 0.4 μ m 필터로 감압 여과시켰다. 여과액은 감압농축기(Eyela N-1000, Tokyo, Japan)를 이용하여 30 mL 이하로 농축시킨 후, 동결건조기(IIShinBioBase LP20, Dongducheon, Korea)를 이용하여 완전 건조시켜 분말화로 제조하여 실험에 사용하였다.

Protocatechuic Acid 분석 - 모과 물 추출물 1 g에 methanol(Burdick & Jackson Co., Muskegon, MI, USA)

50 mL을 넣고 30분 초음파 추출 후, 0.45 μ m syringe filter (Whatman Co., Buckinghamshire, UK)로 여과시켜 분석하였다. Protocatechuic acid(Sigma Chemical Co., USA) 표준 용액은 methanol을 이용하여 1 mg/mL로 조제한 후 0.2 μ m syringe filter(Whatman Co., Buckinghamshire, UK)로 여과하여 분석 시료로 사용하였다. HPLC 분석조건은 Table I에 요약하였으며, 모든 용매는 사용 전 탈기 및 여과하여 사용하였다. Protocatechuic acid의 정량곡선은 피크 면적비와 농도 그래프를 작성하여 함량을 분석하였다.^{3,27-29)}

DPPH 라디칼 소거 활성 - Yoshida의 방법³⁰⁾을 변형하여 측정하였다. DPPH에 대한 수소공여능은 96 well plate에 시료액 20 μ L과 DPPH 용액 80 μ L를 혼합하여 암소에서 30분 동안 실온에 방치한 후 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀)를 구하였으며, 양성대조군은 L-ascorbic acid(A5960, Sigma, USA)를 사용하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성 - Re 등³¹⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 7.4 mM-ABTS를 2.45 mM-potassium persulfate (K₂S₂O₈)에 녹이고, 빛을 차단하여 상온에서 16시간 반응시켜 ABTS radical cation를 형성시키고, 실험 직전에 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 용액을 732 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 PBS(phosphate-buffered saline; pH7.4)를 이용하여 희석하였다. 96 well에 농도별로 희석한 시료액 10 μ L와 흡광도 값이 0.7로 희석된 ABTS 용액 190 μ L를 넣고 빛을 차단하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader system(Nano Quant, Infinite 200 PRO, Tecan, Austria)을 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도가 50%로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC₅₀ 값으로 나타내었으며, 양성대조군은 L-ascorbic acid를 사용하였다.

SOD 유사 활성 측정 - SOD 유사 활성은 SOD assay Kit-WST(Sigma-Aldrich, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 시료 무처리군과 첨가군의 값을 비교하여 IC₅₀로 나타내었다.¹⁸⁾

세포독성 측정 - NO 생성 억제는 RAW 264.7 세포를 한국세포주은행에서 분양받아 Boligon³²⁾ 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 항생제(penicillin G sodium 10,000 unit/mL, streptomycin sulfate 10,000 μ g/mL), 1 mM sodium pyruvate가 첨가된 DMEM 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 계대 배양은 75 cm³ tissue culture flask에 배양하고 confluent 되면 cell dissociation solution을 처리하였다. RAW 264.7 세포를 1 \times 10⁵ cell/well 농도로 96 well에 분주하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 DMEM(Dulbecco's modified Essential medium)

으로 희석시킨 모과 물 추출물을 100 μ L 첨가하고 24시간 배양하였다. 배양시 반응시킨 시료액을 제거한 후 MTT 용액(5 mg/mL)을 50 μ L 첨가한 후 4시간 배양하였다. 배양시킨 well plate의 MTT 용액을 제거하고 건조기에서 30분간 건조시켰다. 건조한 well에 100 μ L DMSO를 첨가시켜 1분 동안 shaking하여 formazan을 완전히 용해시킨 후 microplate reader system을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 세포의 흡광도를 대조군으로 설정하여 흡광도(%)를 환산하였다.³³⁾

Nitric Oxide 생성 억제 측정 - NO의 발생량은 Griess 반응을 이용하여 배양액 내 nitrite 농도 측정을 통해 평가하였다. DMEM 배지를 이용하여 RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^5 cell/mL의 농도로 온도 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 상층액을 제거하고 lipopolysaccharide(1 μ g/mL)를 농도 별로 희석하고 모과 물 추출물을 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양된 well에서 50 μ L의 상층액을 회수하여 96 well plate에 분주하고 1% sulfanilamide(50 μ L)를 첨가한 후 10분간 반응시켰다. 이후 0.1% n-ethylendiamine dihydrochloride(50 μ L)를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시키고 microplate reader system을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. nitric oxide 농도는 표준곡선과 비교하여 산출하였으며, 배지만을 측정할 흡광도를 blank로 설정하였다.³⁴⁾

α -Glucosidase 저해 활성 - α -glucosidase 저해 활성은 Watanabe의 방법³⁵⁾을 변형하여 측정하였다. 반응 혼합액은 0.1 M KH₂PO₄(pH 6.8, potassium phosphate Buffer) 20 μ L에 시료액 10 μ L를 넣고 3 mM p-nitrophenol- α -D-glucopyranoside 20 μ L를 용해시킨 후 대조군에는 증류수 10 μ L를 넣어 37°C에서 5분간 반응시켰다. 5분 후 효소액 α -glucosidase 1 unit/mL(sigma G0660-750UN, 55 unit/mL) 10 μ L를 혼합한 후 37°C에서 5분간 반응 시킨 후 0.1 M Na₂CO₃를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol

은 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, negative control은 시료 무첨가군으로 설정하였고, blank는 기질 무첨가군으로 설정하였다. 양성 대조군으로 acarbose(1.0 mg/mL)를 사용하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

Abs_{sample} : Absorbance of the sample

Abs_{blank} : Absorbance of the blank

Abs_{control} : Absorbance of the control

일반성분 분석 - 일반 성분분석은 AOAC(association of official analytical chemists)의 방법에 따라 식품공전의 분석방법에 준하여 실험하였다. 조단백 함량은 Kjeldahl 질소 정량법, 조회분 함량은 550°C 직접 회화법, 조지방은 Soxhlet 법으로 분석하였다.

통계처리 - 모든 실험은 3회 반복 측정 후 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계분석은 ANOVA(one way analysis of variance)와 Student's t-test를 사용하였다.

결과 및 고찰

Protocatechuic Acid 함량 분석 - Protocatechuic acid는 주로 식물에 함유되어 있는 페놀화합물로 가열하면 함량이 증가하며, 항산화 활성과 항염증 활성을 가지고 있다. Protocatechuic acid의 함량은 모과의 기능성 과도 연관이 있다.²⁶⁾ HPLC를 이용하여 Table I의 분석조건에 따라 모과 물 추출물에 함유된 protocatechuic acid의 함량을 정량분석하였다. Protocatechuic acid 표준용액은 HPLC용 methanol을 이용하여 1 mg/mL로 조제하였으며, 모과 물 추출물 1 g에 HPLC용 methanol 50 mL을 넣고 30분 초음파 추출 후, 0.45 μ m syringe filter로 여과시켰다. Protocatechuic acid의 정량곡선은 피크 면적비와 농도 그래프를 작성하여 함량을

Table I. Analytical conditions of HPLC

Instrument		HPLC system (Shiseido, NANOSPACE SI-2)		
Detector		PDA detector (260 nm)		
Column		Capcellpak C18 Type MG II, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm (Shiseido)		
Temperature		40°C		
Injection volume		10 μ L		
Flow rate		1.0 mL/min		
		Time (min)	0.1% Trifluoroacetic acid	(B) Acetonitrile
		0	95	5
Mobile phase		10	90	10
		30	65	35
		40	10	90
		50	5	95

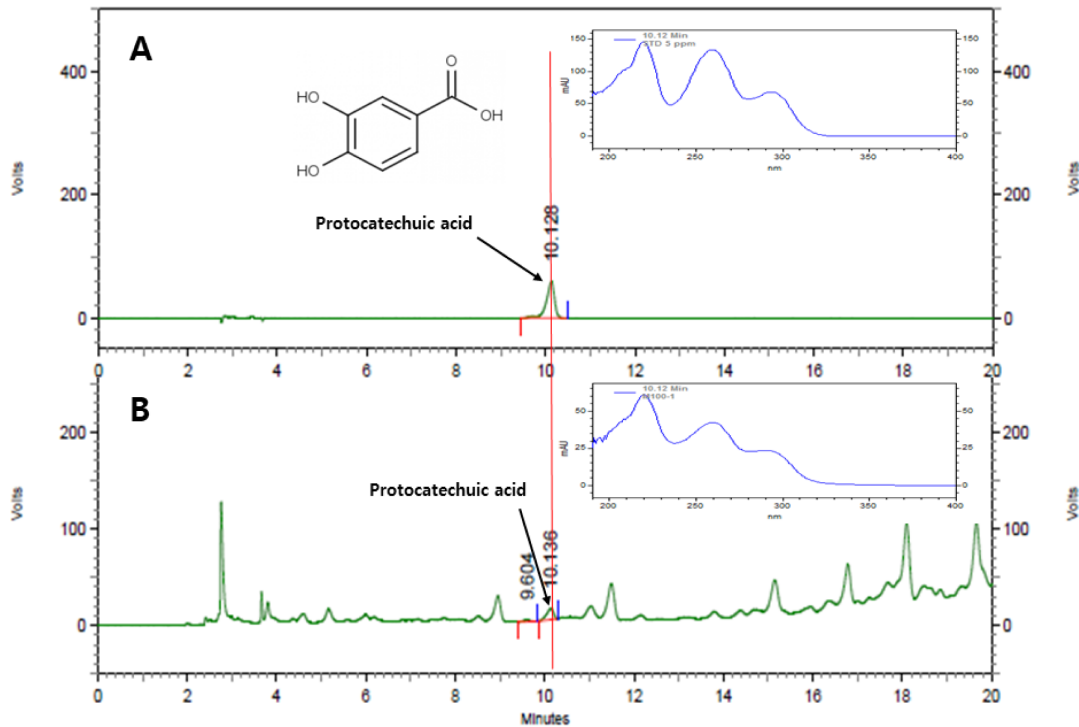


Fig. 1. HPLC chromatogram of (A) protocatechuic acid standard and (B) *Chaenomeles sinensis* water extract.

분석하였다. HPLC 분석기기는 Shiseido NANOSPACE SI-2, PDA detector(Shiseido, Japan) 260 nm에서 분석하였으며, protocatechuic acid 대한 정량 분석을 위하여 Capcellpak C18 Type MG II column(4.6×250 mm ID, 5 μm, Shiseido, Japan)을 사용하였다. 분석 조건은 1.0 mL/min, column 온도는 40°C로 설정하여 0.1% Trifluoroacetic acid/acetonitrile (A/B, v/v)를 B; 0분: 5%, B; 10분: 10%, B; 30분: 35%, B; 40분: 90%, B; 50분: 95%의 조건으로 분석하였다. Protocatechuic acid 표준용액 검량선의 상관계수(R^2)=0.9997 이상의 직선성을 얻었으며, protocatechuic acid 표준용액의 retention time은 10.1분대에서 main peak가 관찰되었다. 모과 추출물에서 protocatechuic acid 표준용액에서와 같은 시간대의 peak가 관찰하였다. Protocatechuic acid peak의 UV 스펙트럼을 확인한 결과, λ_{Max} 값이 260 nm에서 관찰되어 UV 스펙트럼의 패턴이 일치하였다(Fig. 1).

모과 추출온도에 따른 protocatechuic acid 함량을 분석한 결과, 100°C 추출물에서 0.14±0.00 mg/g(수율 45.0%)으로 분석되었으며, 60°C에서 0.10±0.00 mg/g(수율 30.0%), 20°C에서 0.09±0.00 mg/g(수율 21.7%)으로 분석되었다. 추출온도가 증가함에 따라 protocatechuic acid 함량도 증가하였다(Table II).

모과 추출시간에 따른 protocatechuic acid 함량을 분석한 결과, 9시간 추출물에서 0.32±0.02 mg/g(수율 52.6%)으로 분석되었다. 6시간 추출물에서 0.26±0.02 mg/g(수율 48.3%),

Table II. Protocatechuic acid contents according to extraction temperature of *Chaenomeles sinensis* water extracts

Extraction Temperature (°C)	Yield (%)	Protocatechuic acid (mg/g)
20	21.7	0.09±0.00
60	30.0	0.10±0.00
100	45.0	0.14±0.00

All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

3시간 추출물에서 0.18±0.01 mg/g(수율 47.3%)으로 추출시간이 증가함에 따라 protocatechuic acid함량도 증가하였다(Table III). 옷나무 부위별 protocatechuic acid 함량 분석 연구에서 수피 추출물과 목질부 추출물에서 추출온도가 증가함에 따라 함량도 증가하였지만 140°C 이상의 고온에서는 함량이 감소하였고, 160°C에서는 검출되지 않았다. 고온 추출 시 protocatechuic acid는 열분해 또는 불용화로 인하여 추출액으로 이행되어 감소되고, 추출 시간이 길어질수록 열에 의한 탄화 등으로 변성되어 감소되는 것으로 판단된다고 보고되었다.^{26,36)} 이에 따라 모과에 함유된 protocatechuic acid 함량은 추출시간과 추출온도가 증가함에 따라 증가하였다. 향후 100°C 이상의 온도와 9시간 이상의 추출조건에서 추출한 추출물에 대한 연구 수행을 진행하고자 한다.

Table III. Protocatechuic acid contents according to extraction time of *Chaenomeles sinensis* water extracts

Extraction Time (h)	Yield (%)	Protocatechuic acid (mg/g)
0.5	42.3	0.09±0.00
1	45.0	0.12±0.00
2	45.7	0.15±0.00
3	47.3	0.18±0.01
6	48.3	0.26±0.02
9	52.6	0.32±0.02

All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

항산화 활성 - 전자공여능은 대조군을 이용하여 항산화 활성을 측정하는 실험으로 활성 결과에 대한 비교가 매우 용이하여 약용식물 등 천연물의 항산화 활성 평가에 많이 사용된다.³⁷⁾ DPPH는 phenol, flavonoid와 같은 페놀성 화합물에 대한 항산화작용의 지표로서 항산화 활성을 측정하기 위한 기질로 사용된다. DPPH는 일반적으로 517 nm 파장에서 흡수가 일어나 보라빛을 나타내지만 항산화 물질과 반응하면 화학구조가 변하여 노란빛을 띠게 된다. 이러한 원리를 이용하여 DPPH 라디칼의 감소를 분광광도 등을 이용하여 측정한다.^{24,37)} ABTS는 청록색을 띠며, potassium persulfate와 반응하면 ABTS radical을 형성하는데 이때 생성된 양이온(ABTS+)은 항산화성 물질에 의해 제거되어 무색에 가까운 연녹색을 띠게 된다. ABTS 시약은 합성된 radical이나 물, 유기용매 모두에 용해되므로 극성 및 비극성 물질의 항산화 활성 측정에 모두 이용된다. ABTS assay는 DPPH 소거 활성 실험과 비슷한 원리로서 비슷한 경향의 결과가 도출되지만 라디칼의 종류에 따라 표시되는 항산화능이 다를 수 있기 때문에 측정결과가 완전히 일치하지는 않는다.^{24,38,39)} SOD는 항산화 효소로 세포내 활성산소를 과산화산소로 전환을 촉매하는 효소이다. SOD로 생성된 과산화수소는 catalase나 peroxidase에 의하여 물분자와 산소분자로 전환된다.¹⁸⁾ 이에 따라 protocatechuic acid의 함량과 건강기능식품 제조시 원료 제조에 적합하다고 판단된 100°C, 3시간 추출물에 대하여 DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, SOD 유사 활성, 세포 독성, NO 생성 억제 및 α -glucosidase 저해 활성을 측정하였다. 모과

100°C, 3시간 추출물에 대한 항산화 활성은 Table IV에 나타내었다. 모과 물 추출에 대한 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 364.47±25.62 μ g/mL으로 측정되었다. 모과 70% ethanol 추출물의 용매 분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성과 superoxide 소거 활성 연구에서 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였으며, 이는 모과에 함유된 procyanidin polymer, flavonoid 등과 같은 polyphenol성 화합물에 의한 것으로 추정된다고 보고한 연구결과와 유사하게 분석되었다.^{37,38)} 가장 80% 메탄올 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성도 증가한다고 보고되었다.²⁴⁾ ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과 936.58±31.59 μ g/mL으로 측정되었다. 노간주나무 에탄올 추출물에서 ABTS 라디칼 소거활성이 500 μ g/mL에서 79.3%으로 나타났으며, 열수추출물은 76.4%의 활성을 나타났다고 보고한 연구결과보다 낮은 활성이 나타났지만, 모과 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 활성도 증가하였다.³⁹⁾ SOD 유사 활성에서는 605.20±15.54 μ g/mL으로 측정되었다. 매자나무 열수 추출물(100°C, 60분 추출)의 SOD 유사 활성 측정결과 20.27±2.025%보다 SOD 효소 활성이 높게 분석되었다.¹⁵⁾ 모과 물 추출물의 항산화 활성은 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 항산화 활성도 증가하였다. 이는 모과에 함유된 polyphenol성 화합물과 protocatechuic acid 등의 활성 성분의 용출에 의한 것으로 판단된다.⁴⁾

세포독성 - 모과 물 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 측정하였다(Table V). 모과 물 추출물을 DMEM (Dulbecco's modified Essential medium)으로 희석하여 실험하였다. 모과 물 추출물의 처리농도 10 mg/L에서 97.10±5.03%, 1 mg/L에서 94.29±0.70% 세포생존능이 측정되었으며, blank군과 비교한 결과 세포 독성에 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

Nitric Oxide 생성 억제 - NO 합성 효소는 면역 반응, 혈관 확장, 신경전달 등의 생리적인 기능을 조절한다.²³⁾ NO는 자외선에 의해서 생성이 촉진되며, 합성되면 확산되어 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 악화시켜 혈관 투과성, 부종 등 염증 반응을 일으킨다.⁴⁰⁾ 대식세포는 면역체계를 형성하는 세포로 인체가 외부 자극을 받으면 NO 등 염증매개물질을 분비하여 염증반응을 일으킨다.^{22,40)} 모과 물 추출물에 대한 NO 생성 억제를 측정하였다(Table VI). 모과

Table IV. Antioxidant effects of *Chaenomeles sinensis* water extracts

	DPPH IC ₅₀ (μ g/mL)	ABTS ⁺ IC ₅₀ (μ g/mL)	SOD IC ₅₀ (μ g/mL)
CSW	364.47±25.62	936.58±31.59	605.20±15.54
Ascorbic acid	16.14±2.65	82.27±8.48	-

CSW: *Chaenomeles sinensis* water extract. IC₅₀ value in the concentration (μ g/mL) of sample required for 50% inhibition. All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

Table V. Cell viability of *Chaenomeles sinensis* water extract on macrophage Raw 264.7 cells by MTT assay

	(unit: %)	
	Concentration (mg/L)	
	1	10
CSW	94.29±0.70	97.10±5.03
Blank	100±2.46	

CSW: *Chaenomeles sinensis* water extract. All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

Table VI. Effect of *Chaenomeles sinensis* water extract on nitric oxide production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells

	Concentration (µg/mL)	
	1	10
	CSW	13.57±0.77
Blank	10.83±0.34	
LPS	39.38±2.80	

CSW: *Chaenomeles sinensis* water extract. All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

물 추출물의 처리농도 1 µg/mL 처리군에서 13.57±0.77 µg/mL, 10 µg/mL에서 12.21±0.69 µg/mL로 측정되었으며, 처리 농도가 증가함에 따라 NO 생성량이 감소하였다. RAW 264.7세포를 이용한 대두 에탄올 추출물에 대한 NO 생성 저해에 대한 연구에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 NO 생성도 감소한다고 보고되었으며,⁴⁰⁾ RAW 264.7세포를 이용한 녹두 및 대두 에탄올 추출물에 대한 NO 생성 억제 연구에서도 추출물의 농도가 증가함에 따라 NO 생성량도 감소한다고 보고한 연구결과와 유사하게 나타났다.⁴¹⁾ 모과 물 추출물의 NO의 생성을 억제시키는 효능이 있는 것으로 판단되며, 이는 모과에 함유된 flavonoid 물질에 의한 것으로 판단된다.

α-Glucosidase 저해 활성 - α-Glucosidase는 탄수화물을 포도당으로 전환시키는 효소로서, α-glucosidase 저해제는 고인슐린혈증 또는 저혈당을 일으키지 않고, 인슐린 분비를 촉진시켜 글루카곤 분비를 억제하는 glucagon-like peptide-1 분비를 촉진한다. 따라서 α-glucosidase 효소의 저해 활성은 항당뇨 활성의 지표로 이용된다.^{39,41,42)} 모과 물 추출의 α-glucosidase 저해 활성을 50% 억제하는데 필요한 농도 (IC₅₀)을 측정한 결과 737.74±76.51 µg/mL으로 측정되었다 (Table VII). 노간주나무 열수추출물 500 µg/mL 농도에서 48.39% 에탄올 추출물에서 78.14 %의 α-glucosidase 저해 활성이 나타났다고 보고되었으며,³⁹⁾ 토후박 추출물에서 phenolic 함량과 DPPH radical 소거 활성이 높을수록 α-glucosidase 저해활성도 높다고 보고되었다.⁴²⁾ 모과 물 추출물은 비교적 높은 α-glucosidase 저해율이 나타나 기능성 소

Table VII. Effects on α-glucosidase activity of *Chaenomeles sinensis* water extract

	α-Glucosidase IC ₅₀ (µg/mL)
CSW	737.74±76.51
Acarbose	96.49±11.57

CSW: *Chaenomeles sinensis* water extract. IC₅₀ value in the concentration (µg/mL) of sample required for 50% inhibition. All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

Table VIII. Proximate composition of *Chaenomeles sinensis*

Proximate composition	Content
Calorie (kcal/100g)	372.16
Carbohydrate (%)	86.43
Crude protein (%)	2.92
Crude fat (%)	1.64
Saccharide (mg/g) (fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose)	251.60
Saturated fatty acid (g/100g)	0.22

All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

재료 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

일반성분 분석 - 모과에 함유된 일반 성분분석은 AOAC(association of official analytical chemists)의 방법에 따라 식품공전의 분석방법에 준하여 분석한 결과 열량은 372.16 kcal/100g, 탄수화물은 86.43% 조단백질은 2.92%, 조지방은 1.64%, 총당 251.6 mg/g, 포화지방산은 0.22 g/100 g으로 분석되었다(Table VIII).

결 론

모과의 추출온도 추출시간에 따른 protocatechuic acid 함량을 정성·정량분석한 결과 추출시간 3시간, 추출온도 20, 60, 100°C에서 추출한 추출물을 분석한 결과 100°C 추출물에서 0.14±0.00 mg/g, 60°C 추출물 0.10±0.00 mg/g, 20°C 추출물 0.09±0.00 mg/g으로 분석되었으며, 100°C에서 0.5, 1, 2, 3, 6, 9시간 추출한 추출물을 분석한 결과, 9시간 추출물에서 0.32±0.02 mg/g, 6시간 추출물 0.26±0.02 mg/g, 3시간 추출물 0.18±0.01 mg/g으로 분석되었다. 모과에 함유된 protocatechuic acid의 함량은 추출시간 및 추출온도가 증가함에 따라 protocatechuic acid 함량도 증가하였다. 모과 100°C, 3시간 추출물에 대한 활성을 측정하였다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성과 SOD 유사 활성에 대한 IC₅₀ 농도는 각각 364.47±25.62 µg/mL, 936.58±31.59 µg/mL, 605.20±15.54 µg/mL이었으며, α-glucosidase 저해 활성은 737.74±76.51 µg/mL으로 측정되었다. 모과 물 추출물에 대한 RAW 264.7 세포에서 10 mg/L에서 97.10±5.03%, 1 mg/L 94.29±

0.70% 세포생존능이 측정되었으며, NO 생성도 억제되었다. 일반 성분은 열량 372.16 kcal/100g, 탄수화물 86.43% 조단백질 2.92%, 조지방 1.64%, 총당 251.60 mg/g, 포화지방산 0.22 g/100g으로 분석되었다. 모과는 추출시간 및 추출온도에 따라 protocatechuic acid의 함량이 증가하였고, 항산화 활성, 산화질소 생성 억제, 항당뇨 활성이 측정되어 향후 다양한 활성 기작 연구를 통하여 기능성 소재로 개발할 가능성이 있을 것으로 판단되며, 기능성 연구의 기초자료로 활용되리라 사료된다.

사 사

본 연구는 2020년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 “한국연구재단-전통문화융합연구사업(NRF-2016M3C1B5907203)”과 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업(R&D, R0004385)”으로 수행된 연구결과입니다.

인용문헌

- Nam, K. Y. and Lee, J. S. (2012) Dyeability and functionality of *Chaenomeles Fructus* extract. *J. Kor. Soc. Cloth. Ind.* **14**: 478-485.
- Lee, Y. M., Shin, H. D., Lee, J. J. and Lee, M. Y. (2007) Antioxidative effect of *Chaenomeles Fructus* ethanol extract. *Kor. J. Food Preserv.* **14**: 177-182.
- Shin, J. E., Jin, Q., Jin, H. G. and Woo, E. R. (2011) Phytochemical constituents isolated from the stems of *Chaenomeles sinensis* Koehne. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 223-228.
- Kim, J. H., An, C. W., Kim, Y. J., Noh, Y. J., Kim, S. J., Kim, J. E., Shrestha, A. C., Ham, H. N., Leem, J. Y., Jo, H. K., Kim, D. S., Moon, K. H., Lee, J. H., Jeong, K. O. and Kim, D. K. (2018) Antioxidant activity of n-butanol fraction of *Chaenomeles sinensis* fruit in *Caenorhabditis elegans*. *Kor. J. Pharmacogn.* **49**: 40-46.
- Zhang, M., Zhao, R., Zhou, S., Liu, W., Liang, Y., Zhao, Z., Li, S., Wang, X., Wong, T. and Zhao, H. (2018) Chemical characterization and evaluation of the antioxidants in *Chaenomeles* fruits by an improved HPLC-TOF/MS coupled to an on-line DPPH-HPLC method. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **36**: 43-62.
- Kim, J. E., Jo, Y. J. and Leem, J. Y. (2015) The acetylcholinesterase inhibitory activity of the EtOH extract of *Chaenomeles Fructus* and its effects on the metabolism of amyloid precursor protein in neuroblastoma cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**: 327-333.
- Hamaza, Y., Irie, M., Kondo, M. and Fugita, T. (2008) Anti-ulcerative properties of crude polyphenols and juice of apple and chinese quince extracts. *Food Chem.* **108**: 488-495.
- Chung, T. Y., Cho, D. S. and Song, J. C. (1988) Nonvolatile/volatile flavor components in chinese quince fruits, *Chaenomeles sinensis* Koehne. *Korean J. Food Sci. Technol.* **20**: 293-302.
- Kang, S. Y., Hyun, S. Y., Kwon, Yedam., Park, Y. K. and Jung, H. W. (2019) Effects of *Chaenomeles Fructus* extract on the regulation of myoblasts differentiation and the expression of biogenetic factors in C2C12 myotubes. *Kor. J. Herbol.* **34**: 99-107.
- Kim, D. H., Kwon, B. R., Kim, S. J., Kim, H. J., Jeong, S. I., Yu, K. Y. and Kim, S. Y. (2017) Anti-obese Effects and signaling mechanisms of *Chaenomeles sinensis* extracts in 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet. *Herb. Formula Sci.* **25**: 457-469.
- Hur, S. S. and Kim, I. C. (2011) Antioxidative properties and whitening effects of the *Chaenomeles Fructus*, *Armeniaca semen* and *Thujae Semen*. *J. Invest. Cosmetol.* **7**: 383-387.
- Ryu, H. W., Kim, Y. S. and Lim, E. M. (2012) The anti-inflammatory effects of *Chaenomeles Fructus* Herba water extract on mouse RAW 264.7 Cell. *J. Orient Obstet. Gynecol.* **25**: 1-15.
- Yoo, J. H., Han, S. H. and Ki, G. J. (2009) Active effect of anticoagulant effects in *Chaenomeles Fructus* water extract. *Kor. J. Herbol.* **24**: 7-11.
- Ha, J. H., Jeong, M. H., Seo, Y. C., Yong, C. W., Kim, J. S., Kim, H. H., Ahn, J. H. and Lee, H. Y. (2010) Enhancement of antioxidant activities of bark of *Berberis koreana* Palibin by lactic acid fermentation. *Korean. J. Medicinal Crop Sci.* **18**: 421-428.
- Trush, M. A., Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E. (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implication for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochemical Pharmacology* **31**: 3335-3346.
- Woo, K. W., Sim, M. O., Park, E. J., Kim, M. S., Suh, W. S., Cho, H. W., Kwon, H. C., Park, J. C. and Lee, K. R. (2016) Chemical constituents from the stems of *Lagerstroemia indica* and their anti-oxidant effect. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**: 204-210.
- Kim, S. J., Kim, J. A., Kim, S., Youn, J. U., Kim, S. H., Han, S. S., Kim, S. Y. and Jeong, S. I. (2019) Antioxidant and anti-diabetic effects of leaves and stems of *Acanthopanax sieboldianum* (Makino) Koidz. *Kor. J. Pharmacogn.* **50**: 141-147.
- Ha, A. W., Noh, H. L., Chung, Y. S., Lee, K. W., Kim, H. M. and Cho, J. S. (1998) The oxidative stress and the antioxidant system in type 2 diabetics with complications. *J. Korean Diabetes* **22**: 253-261.
- Kim, D. M., Jin, B. and Kim, J. Y. (2014) Comparative radical scavenging and nitric oxide production capacity of water extracts of *Acanthopanax divaricatus* var. *Albeofructus* and *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*. *J. Appl. Biol.*

- Chem.* **57**: 337-340.
21. Kim, J. M., Jeon, Y. H., Jeong, Y. J. and Yoon, K. Y. (2020) Comparison of bioactive composition, antioxidant activity, and nitric oxide inhibition effect of enzyme-treated and commercial noni juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **52**: 75-80.
 22. Cho, E. J., Lee, J. H., Sung, N. Y. and Byun, E. H. (2017) Anti-inflammatory effects of *Annona muricata* leaf ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **46**: 681-687.
 23. Kang, B. K., Kim, K. B. W. R., Kim, M. J., Bark, S. W., Pak, W. M., Kim, B. R., Ahn, N. K., Choi, Y. U. and Ahn, D. H. (2014) Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 729-733.
 24. Park, J. S., Lee, J. S. and Lee, J. H. (2020) Antioxidative and antimutagenic effects of *Panicum miliaceum* L. *Korean J. Food Preserv.* **27**: 261-269.
 25. Middleton, E. and Kandaswami, C. (1994) Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* **48**: 115-119.
 26. Park, H. J., Lee, S. H., Jang, G. Y., Li, M., Kim, M. Y., Kim, S. T., Lee, J. H., Yoon, G. M., Lee, J. and Jeong, H. S. (2015) Phenolic contents of different parts of *Rhus verniciflua* Stokes according to Extraction Conditions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 97-103.
 27. An, H. J., Nam, Y. M., Yang, B. W., Park, J. D., Yook, C. S., Kim, H. C. and Ko, S. K. (2017). The comparison of phytochemical components from the berry of *Acanthopanax* species. *Kor. J. Pharmacogn.* **48**: 5-9.
 28. Yoo, N. H., Kwon, Y. S. and Kim, M. J. (2019) Establishment of HPLC-UV analysis method validation for simultaneous analysis of standard compounds of *Oplopanax elatus* Nakai stem. *Kor. J. Pharmacogn.* **50**: 133-140.
 29. Kim, S. G., Sharma, D. K., Lamichhane, R. Lee, K. H., Han, S. M. and Jung, H. J. (2019) Development of analytical method for quality control from new herbal medicine(HPL-4). *Kor. J. Pharmacogn.* **45**: 338-345.
 30. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989) Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V: Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1919-1921.
 31. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
 32. Boligon, A. A., Machado, M. M. and Athayde, M. L. (2014) Technical evaluation of antioxidant activity. *Med. Chem.* **4**: 517-522.
 33. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**: 589-601.
 34. Chang, Y. H., Lee, S. T. and Lin, W. W. (2001) Effects of cannabinoids on LPS stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J. Cell Biochem.* **81**: 715-723.
 35. Watanabe, J., Kawabata, L., Kurihara, H. and Niki, R. (1997) Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 177-178.
 36. Burdurlu, H. S. and Karadeniz, F. (2003) Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. *Food Chem.* **80**: 91-97.
 37. Im, D. Y., Pyo, B. S., Kim S. M., and Lee, K. I. (2017) Measurement of the anti-oxidative properties of extract from medicinal plants using an on-line HPLC-DPPH assay. *J. Life Science* **27**: 44-49.
 38. Lee, J. H. (1994). Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**: 310-316.
 39. Kim, J. H., Lee, S. Y., Park, J. M., Park, J. H., Kwon, O. J. and Lee, J. Y. (2014) Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Juniperus rigida* Sieb extracts. *Korean J. Food Pre.* **21**: 396-403.
 40. Lim, J. M., Lee, J. S. and Lee, J. H. (2020) Evaluation of physiological activity of soybean extract for cosmetic material development. *J. Invest. Cosmetol.* **16**: 11-22.
 41. Imm, J. Y. and Kim, S. J. (2010) Anti-cancer and anti-inflammatory effects of mung bean and soybean extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 755-761.
 42. Xui, M. L., Wangi, L., Kimi, H. S., Jini, C. W. and Choi, D. H. (2010) Antioxidant and anti-diabetes activity of extracts from *Machilus thunbergii* S.et Z. *Korean J. Medicinal Crop Science* **18**: 34-39.
- (2020. 7. 23 접수; 2020. 8. 14 심사; 2020. 8. 24 게재확정)