Identifying antibacterial activity components of cosmos flower extracts

Mijung Kim¹ · Seunghyun Ahn² · Seyeon Park²

코스모스 추출물의 항균활성 성분 탐색

김미정¹ · 안승현² · 박세연²

Received: 20 July 2020 / Accepted: 3 September 2020 / Published Online: 30 September 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract This study investigated whether the extracts from cosmos flowers exhibit antibacterial activities and identified which components were ascribed to the antibacterial effects. The antibacterial effects of extracts from white, pink, and violet cosmos flowers were observed for 24 h after inoculation with four kinds of bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. Among the three fractions of cosmos flower extracts, the best antibacterial activity against the four bacteria was observed in the extracts isolated from the EtOAc layer. However, the extracts from the CHCl₃ layer were also effective against *S. aureus*. Moreover, the first of white, second of pink, and first of violet silica gel fractions (Fr.) isolated from the EtOAc layer exhibited minimal inhibition at a concentration of 0.1 mg/mL. Comparison of NMR and High-Pressure Liquid Chromatography results between silica gel Fr. and apigenin suggested that the effective fractions can contain a component including apigenin moiety.

Keywords Apigenin · *Cosmos bipinnatus* Cav. · EtOAc fraction · High-Pressure Liquid Chromatography · Nuclear Magnetic Resonance

Seyeon Park (✉)
E-mail: sympark21@dongduk.ac.kr

¹Department of Health and Cosmetics, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Republic of Korea

²Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

코스모스(*Cosmos bipinnatus* Cav.)는 1년생의 내한성초본식물로 여러 해를 걸쳐 씨가 떨어진 곳에 스스로 자라난다[1]. 코스모스는 국화과에 속하며 멕시코와 미국 남서부에서 자생하는데 흰색, 분홍색, 자주색 또는 라벤다색의 꽃을 피운다(2). 꽃의 직경은 5-8 cm 정도이며 6월에서 10월에 걸쳐서 피는데 순우리말로 살사리꽃이라고 부른다. 코스모스는 자라면 줄기가 1~2 m까지 이르는데 뿌리를 제외한 전체 부위를 추영(秋英)이라고 칭하며 한방의 재료로 사용되고 있다. 약재로 사용되는 추영은 눈의 충혈과 종기의 치료에 사용되고 있고 민간에서는 간혈열, 황달, 비장 비대증 등의 치료에 코스모스를 활용하여 왔다[3,4]. 코스모스의 효능이 한방과 민간에서 인정받고 있는데 반해 효능과 관련된 성분에 대한 연구는 활발하지 않고 있다. 코스모스의 성분에 대한 연구들에는 다음과 같은 연구가 있다. Woo 등의 연구[5]에서는 코스모스꽃 80% EtOH 환류냉각 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하였는데 각각 67.96±0.19, 65.46±2.85 mg/g이었다고 하였고 국화과 15 종 식물의 꽃들 중에서 페놀성 물질 함량이 가장 높다고 보고하고 있다. Woo 등의 다른 연구[6]에서는 코스모스 지상부의 80% EtOH 냉각환류 추출물과 초음파 추출물 중에서 초음파 추출물에서 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 각각 80.70, 39.33 mg·g⁻¹이 측정되어 냉각환류 추출물보다 높았다고 하였다. Lee 등의 연구[7]는 국화과 꽃들의 미백화장품 가능성을 타진하기 위해 MeOH 추출물과 4가지 분획물들에 대해 총 페놀함량과 총 플라보노이드 함량을 조사하였다. 이 연구에서 총 페놀 함량은 흰색 코스모스꽃의 *n*-hexane 분획물에서 67.07 mg GAE/g DW, 분홍색 코스모스꽃의 *n*-hexane분획물과EtOAc 분획물에서 각각 36.58, 26.40 mg GAE/g DW로 국화과 식물들 중에서도 상당히 많은 양을 함유하고 있다고 하였다. 총 플라보노이드 함량도 흰색 코스모스꽃과 빨간색 코스모스꽃 EtOAc 분획물들에서 54.38, 54.28 mg NAE/g DW 가 측정되어 다른 식물들의 분획물에 비해

서 높게 나타났다고 하였다. 그리고 Shin의 연구[8]에서는 코스모스꽃 열수 추출물과 80% MeOH 추출물 중에 MeOH 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 62.21 ± 1.92 mg/g, 총 플라보노이드 함량이 77.98 ± 1.90 mg/g으로 나타나 열수 추출물보다 함량이 높았다고 보고하였다. 그러나 열수 추출물에서 rosmarinic acid를 포함한 4종의 페놀산 성분과 플라보노이드 성분 중 quercetin을 분리하였다고 하였다. 페놀성 물질은 자연에서 1,000가지 이상의 물질 구조로 존재하고 있어 아직 대부분의 물질들에 대한 생물학적 작용이나 역할을 확실히 규명, 설명하지 못하고 있다. 규명된 페놀성 물질의 작용들을 보면, 항암 작용, 혈압강화 작용, 피임 작용, 간보호 작용, 진경 작용 등이 있다[9]. 뿐만 아니라 페놀성 물질 중에는 항균 작용이 있는 물질들이 다수 있어서 병원균의 침입에 대한 방어 작용과 식물체 내에서의 저항 작용도 한다고 보고되고 있다[10,11]. 천연물 중에는 코스모스가 국화와 중에서 페놀 또는 플라보노이드 함량이 높다는 연구들이 있고 항염증, 항산화, 항유전성 활성, 티로시나아제 억제에 효과, 미백 효과에 대한 성과도 보고되고 있다[7,8,12-14]. 그리고 코스모스를 에센셜 오일로 추출하여 향기 성분을 분석, 피부 독성 평가를 한 연구와 항균 효과를 살펴본 연구도 있다[16-18]. 코스모스 추출물의 연구는 총 페놀 함량과 플라보노이드 함량을 중심으로 한 *in vitro* 연구가 대부분이며 항산화 중심의 연구가 주류를 이루고 있다[5-8,19]. 이에 본 연구는 코스모스꽃의 항균 활성 효과에 대해 살펴보고 항균 작용을 발휘하는 물질을 밝혀 보고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구의 재료인 코스모스(*Cosmos bipinnatus* Cav.)꽃은 9월에 부산시 사상구 낙동강변의 삼락공원에 서식하는 것을 채집하였다. 코스모스 중에서도 흰색, 분홍색, 자주색의 3가지 꽃을 채취하여 깨끗하게 세척한 후 그늘에서 말려서 실험을 진행하였다. 코스모스꽃의 항균 활성을 알아보기 위해 4가지 박테리아를 사용하였다. 그람양성균으로는 황색포도상구균(*S. aureus*, KCTC 1927; Korean Collection for Type Cultures, Korea), 표피포도상구균(*S. epidermidis*, KCTC 1917; Korean Collection for Type Cultures, Korea)을 그람음성균으로는 녹농균(*P. aeruginosa*, KCTC 2004; Korean Collection for Type Culture, Korea), 대장균(*E. coli*, KCTC 2571; Korean Collection for Type Culture, Korea)이 사용되었다. 박테리아들은 Luria-Bertani (LB) 액체 배지에 접종된 뒤에 shaking incubator (37 °C, 200 rpm) 안에서 배양되었다. LB배지(1 L 기준)는 증류수 950 g에 tryptone (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 10 g과 sodium chloride (NaCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 g, yeast extract (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) 5 g으로 제조하였다.

Silica gel column chromatography는 silica gel 60 (230400 mesh; Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Germany)으로 실험을 진행하였다. 또한, High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) 분석에는 methanol, water 등의 용매를 사용하였고 이는 Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)에서 구입

하였다.

그 외 chloroform, ethanol, ethyl-acetate, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 대정화금의 1급 시약을 사용하였다.

기기

본 연구 가운데 항균 활성에 관한 실험에 사용된 기기에는 auto clave (Dae Han Bio Link Co., Ltd., Eumseong, Korea), rotary evaporator (Rotavapor R-114; Büchi AG, Flawil, Switzerland), shaker (BF-350SK; BioFree, Seoul, Korea), shaking incubator (VS-8480SF; Vision Scientific Co., Ltd., Daejeon, Korea), micro high speed centrifuge (Micro 17TR; Hanil Science Industrial Co., Ltd., Gimpo, Korea), centrifuge (Union 32R; Hanil Science Industrial Co., Ltd.), microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) 등이 있다. 성분 분석과 관련하여 NMR 측정과 HPLC 측정을 진행하였다. NMR 측정은 Unity Inova 500 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하였고 HPLC 측정에는 iLC3300 (LABOGENE, Eresing, Bavaria, Germany)을 사용하여 측정하였다.

시료의 추출

본 연구에서 사용된 코스모스꽃은 채취 후 그늘에서 말려 세척해서 사용하였다. 코스모스 100 g에 85% 에탄올을 처리한 후 빛을 차단한 채로 24 h 동안 보관했다. 이후 감압 여과와 농축의 과정을 통해서 시료 추출물을 얻었다. 이런 과정을 3회 반복하여 모든 1차 추출물에 클로로포름(CHCl_3)과 증류수(DW)를 첨가하여 분획하여 CHCl_3 층을 분리하고 DW층에 에틸아세테이트(EtOAc)를 더하여 DW층과 EtOAc 층을 얻었다. 이 3가지 분획물들을 농축하여 1차 항균 실험을 진행하였다.

Silica gel column chromatography

코스모스꽃 분획물들 중에서도 EtOAc 층 추출물이 우수한 항균 효과가 나타남에 따라 균의 성장을 저지하는 물질에 대해 알아보기 위해 silica gel column chromatography를 실시하였다. Column관에 silica gel 60을 시료량 대비 100배로 충전한 후 전개용매를 2~3번에 나누어 부어주면서 적셔주었다. 전개용매는 chloroform : methanol : hexane = 7:4:1 비율로 제조하였다. 전개용매로 세척되어진 silica gel 위에 전개용매에 용해된 코스모스꽃 EtOAc 층 시료를 loading하였다. 전개용매를 column 관 내로 나누어 가한 후 5 mL씩 이어 받고 이를 TLC를 이용하여 동일한 분획물들끼리 모아 감압 농축하였다.

항균 활성 실험

박테리아 배양하는 액체 배지(LB 배지)는 시험관에 5 mL씩 담은 후 auto clave에서 멸균 처리를 하였다. 실험에 처리된 균주들은 액체 배지에서 배양 후 고체 배지에 처리한 후 얻은 single strain을 18 h 동안 액체 배지에서 배양하여 얻었다. 실험에 사용된 균주들은 멸균 처리가 된 액체 배지에 5 μL 씩 접종되었고 코스모스꽃 시료들은 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL 농도로 처리되었다. LB 배지가 담긴 시험관 마다 처리된 시료와 균주를 고루 섞은 다음 배지를 100 μL 씩 96 well plate에 담아 microplate reader기의 600 nm에서 흡광도값을 측정하였다. 이를 0 h의 측

정값으로 하고 6 h 이후부터 3 h마다 24 h 동안 흡광도값을 측정하였다. 시험관들을 shaking incubator에 보관하면서 측정시간마다 LB배지를 얻어 흡광도값을 측정하여 시간 흐름에 따라 균의 성장과 이에 대응하는 시료의 활성을 살펴 보았다. 항균 활성은 대조군의 점종 초기의 0 h 흡광도값에 대한 각 시간대별 시료군들의 흡광도값을 시료의 색채값을 제한 효과값으로 나타내었다. 또한, 항균 활성을 시간 흐름의 연속적인 형태로 관찰하고 표현하였다.

$$\text{Relative activity (\%)} = (A_t - [A_0 - B_0]/B_0) \times 100$$

A_t: 시료 처리군(균 점종 후 시간별 상태)의 흡광도

B₀: 시료 무처리된 DMSO 용매 대조군의 흡광도(0 h)

A₀: 시료 처리군(균이 없는 상태)만의 흡광도(0 h)

NMR

코스모스꽃의 항균 활성 물질을 살펴보기 위해 silica gel column chromatography 분획물(silica gel 분획물)에 대해 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)을 진행하였다. ¹H의 NMR 분광분석은 한국 기초과학지원연구원에 의뢰하여 Unity Inova 500 (499.5, 125.6 MHz)을 통해서 분석하였다. NMR스펙트럼은 298K의 온도에서 진행하여 결과를 얻었다.

HPLC

코스모스꽃 silica gel 분획물들에 함유된 화합물의 분석을 위해 High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC)를 시행하였다. HPLC분석은 iLC3300을 통해 진행되었는데 YMC-Pack Polyamine II (4.6*250 mm, S-5 μm, 12 nm)의 column을 사용하였다. 분석은 Methanol:Distilled water=3:1 혼합액을 37 °C, 20 min 동안 흘러 보내면서 wave length는 250 nm에서 추적하였다.

통계 분석

본 연구의 실험들은 3회 이상 반복, 시행하였다. 그래프의 값들은 각 실험들의 횟수에 따르는 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)로 나타내었다.

결과 및 고찰

항균 활성 효과

세 가지 다른 색깔의 코스모스꽃 추출물들이 박테리아에 대한 성장 저해 효과를 보이는지 알아보기 위해 그람양성균 2종(*S. aureus*, *S. epidermidis*)과 그람음성균 2종(*P. aeruginosa*, *E. coli*)으로 항균 실험을 진행하였다.

Fig. 1 The extracts from the EtOAc layer inhibited bacterial proliferation activity of *S. aureus* at 0.2 mg/mL for 24 h, whereas those from the CHCl₃ layer showed antibacterial effects at 0.5 mg/mL. The extracts from the DW layer were ineffective

Fig. 2 The pink and violet cosmos flower extracts from the EtOAc layer inhibited the growth of *S. epidermidis* at 0.5 mg/mL. The effect was also observed in white cosmos flower extracts from the EtOAc layer at a concentration of 0.5 mg/mL. The extracts from the CHCl_3 and DW layers were ineffective

3종의 코스모스꽃 추출물들은 *S. aureus*에 대해 항균 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 1). 3종의 코스모스꽃 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc), 클로로포름(CHCl_3), 물(DW)의 세 가지 용매로 분획, 분리하여 활성을 추적하였다. 세 가지 분획물 중에서도 EtOAc층 분획물에서 가장 우수한 항균 활성이 관찰되었고 CHCl_3 층 분획물에서도 균의 성장이 저해되는 양상이 나타났다. 3종의 코스모스꽃 EtOAc층 분획물들은 모두 *S. aureus*에 대해 0.5 mg/mL에서 24 h 키우는 동안 균의 성장을 억제하였으며 그 중 분홍색 코스모스꽃 EtOAc 분획물은 0.2 mg/mL에서도 균의 활성을 저지하였다. 3종의 코스모스꽃 CHCl_3 층 분획물들도 *S. aureus*에 대해 0.5 mg/mL에서 모두 항균 효과를 보였는데 자주색 코스모스꽃 CHCl_3 층 분획물은 0.2 mg/mL에서도 21 h까지 균의 성장을 억제하였다. 분획물 중에 DW층은 항균 효과가 없는 것으로 나타났다. Olufunmiso와 Ashafa의 연구(16)를 보면, 남아프리카에서 자생하는 코스모스의 잎에서 추출한 정유 추출물이 *S. aureus*에 대해 항균 효과가 있다고 하였는데 MIC가 0.16–0.31 mg/mL라고 하였다. 본 연구에서는 잎이 아닌 꽃의 추출물인 차이가 있으나 코스모스꽃 85% 에탄올 추출물을 분획한 CHCl_3 층 분획물과 EtOAc층 분획물에서 각각 0.5 mg/mL와 0.2 g/mL에서 MIC가 측정되어 *S. aureus*에 대해서 유사한 결과가 나타났다. 그러나 Shin의 연구[8]를 보면, 코스

모스꽃 열수추출물과 80% 메탄올 추출물이 *S. aureus*에 대해 1000 ppm에서 무처리구에 비해 17, 10.5%의 항균 효과가 나타났다 하었는데 본 연구에서는 EtOAc층 분획물 0.2 mg/mL에서 균의 성장이 보이지 않아 추출물의 용매와 분획에 따라 항균 효과에서 차이가 있음을 알 수 있었다.

3종의 코스모스꽃 추출물들은 *S. epidermidis*에 대해서도 항균 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 3종의 코스모스꽃 추출물 중에서 EtOAc층 분획물들은 모두 관찰시간 24 h 동안 적용한 농도에서 모두 항균 활성을 보였다. 분획물 중에서 자주색 코스모스꽃 분획물 0.5 mg/mL는 균의 성장이 관찰되지 않았고 분홍색 분획물 0.5 mg/mL는 관찰 6 h 이후로는 균의 활성이 보이지 않았다. 흰색 코스모스꽃 분획물들도 *S. epidermidis*에 대해 24 h 동안 균의 성장을 억제하였다. 그러나 CHCl_3 층과 DW층의 분획물들에서는 *S. epidermidis*에 대한 항균 효과가 관찰되지 않았다.

3종의 코스모스꽃 추출물들은 *P. aeruginosa*에 대해 대해서도 항균 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 3종의 코스모스꽃 분획물들 중에서도 EtOAc층이 가장 우수한 분획물이었고 자주색 코스모스꽃 EtOAc층이 그 중에서도 균의 성장을 효과적으로 저지하는 것으로 관찰되었다. CHCl_3 층도 관찰시간 동안 미약하지만 균의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. DW층은 항

Fig. 3 The extracts from the EtOAc layer showed antibacterial effects against *P. aeruginosa*. The extracts from the CHCl₃ and DW layers exhibited ineffective to very weak effects

균 효과가 아주 미약하거나 일시적으로 나타났다. Shin의 연구 [8] 결과에서는 코스모스꽃 열수 추출물과 80% 메탄올 추출물이 *P. aeruginosa*에 대해 처리 농도에 따라 균이 성장하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 그람양성균인 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 대한 효과만큼은 아니지만 EtOAc층 분획물은 효과가 있었고 CHCl₃층 분획물과 DW층 분획물에서도 미약하지만 효과가 있어서 상이하였다.

3종의 코스모스꽃 추출물들은 *E. Coli*에 대해 대해서도 항균 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 4). 3종의 코스모스꽃 분획물들 중에서 EtOAc층 분획물이 모두 농도의존적으로 균의 성장을 저지하는 것으로 나타났다. 자주색 코스모스꽃과 분홍색 코스모스꽃이 유사하게 항균 활성을 보였고 흰색 코스모스꽃도 0.5 mg/mL에서는 동일한 농도의 다른 분획물들과 유사한 효과가 관찰되었다. CHCl₃층과 DW층에서는 항균 효과가 나타나지 않았다. Olufunmis와 Ashafa의 연구[16]에서는 코스모스잎의 정유 추출물이 *E. coli*에 대해 0.63 mg/mL에서 MIC가 관찰되었다. 그러나 Shin의 연구[8]를 보면, 코스모스꽃 열수 추출물이 농도에 따라서 균이 성장하였고 코스모스꽃 80% 메탄올 추출물에서는 미약한 항균 효과가 나타났다. 본 연구에서는 EtOAc층 분획물에서 항균 효과가 관찰되어 Olufunmis와 Ashafa의 연구(16)와 유사하였고 CHCl₃층 분획물과 DW층 분획물에서 항

균 효과가 없어서 Shin의 연구[8]와 유사하였다. 이를 통해 *E. coli*에 대한 항균 성분이 EtOAc층에 있을 것으로 생각되었다.

3종의 코스모스꽃 분획물들은 4종의 박테리아 모두에 대해 저지하는 능력에서 차이가 있기는 하였지만 항균 효과를 나타내었다. 코스모스꽃은 박테리아 중에서도 *S. aureus*에 대해 낮은 농도에서도 최소저해농도가 나타났고 분획물 중에서는 EtOAc층과 CHCl₃층 분획물에서 최소저해농도가 관찰되었다. 그리고 자주색 코스모스꽃 EtOAc층 분획물은 *S. epidermidis*에 대해서도 0.5 mg/mL에서 최소저해농도가 나타남을 확인할 수 있었다(Table 1). 종합해 보면, 분획물 중에서는 EtOAc층 분획물이 전반적으로 효과가 있는 것으로 나타났고 코스모스꽃 종류 중에서는 자주색과 분홍색이 흰색 코스모스보다 항균 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

코스모스꽃 Silica gel column chromatography 분획물의 항균 활성 효과

3종의 코스모스꽃 추출물들이 보여준 항균 활성 중에서도 EtOAc층 분획물이 *S. aureus*에 대해 나타낸 우수한 항균 효과를 좀 더 살펴 보기 위해 Silica gel column chromatography를 실시하였다. 이를 통해 흰색 코스모스꽃과 분홍색 코스모스꽃 EtOAc층 분획물은 5개로 분획하여 물질을 얻었고 자주색 코스모스꽃

Fig. 4 The extracts from the EtOAc layer showed antibacterial effects against *E. coli*. The CHCl_3 layer and extracts from the DW layer exhibited no antibacterial effects. (A) White *Cosmos bipinnatus* Cav. flowers (B) Pink *Cosmos bipinnatus* Cav. flowers (C) Violet *Cosmos bipinnatus* Cav. flowers

EtOAc층 분획물은 3개의 분획물을 얻었다. 물질의 분리는 TLC를 통해 확인하였다.

코스모스꽃 silica gel column chromatography 분획물(이하, silica gel 분획물)들에 대해 24 h 동안 항균 활성 실험을 진행한 결과 균의 성장이 나타나지 않는 최소저해농도에 대한 결과가 다음과 같이 나타났다(Table 2).

3종의 코스모스꽃 EtOAc층 silica gel 분획물에서 흰색 코스모스꽃과 자주색 코스모스꽃은 Fr. 1의 경우에 관찰 농도 모두에서 균의 성장이 억제되었으며 최소저해농도가 0.1 mg/mL인 것으로 확인되었다. 분홍색 코스모스꽃은 Fr. 2의 경우에 모든 관찰 농도에서 균의 증식이 나타나지 않았으며 최소저해농도는 0.1 mg/mL로 관찰되었다. 코스모스꽃 EtOAc층 silica gel 분획물 중에서도 위의 최소저해농도가 0.1 mg/mL인 분획물뿐만 아니라 0.2, 0.5 mg/mL의 관찰 농도에서도 균이 성장하지 않은 분획물에는 균의 증식을 억제하는데 관여하는 물질이 있을 것으로 생각된다. Olufunmiso와 Ashafa의 연구(16)를 보면, 코스모스잎 정유 추출물의 성분을 분석하였는데 34가지의 알려진 성분이 97.89%이고 알려지지 않은 성분이 1.94%이라고 보고하였다. 그리고 이 성분들 간의 연합이 항균 효과를 나타내는 것으로 판단하였는데 본 연구에서 항균 물질로 파악한 apigenin은 정유 성분 내에는 분석되지 않았다. 이는 추출 방법에 따른 추출 성

분의 차이에서 비롯된 것으로 생각되었다.

코스모스꽃에 함유된 천연단일 물질의 항균 활성 비교

3종의 코스모스꽃 EtOAc층 silica gel 분획물의 관찰 농도 중에서 최소저해농도가 나타난 흰색 코스모스꽃 Fr. 1, 2와 분홍색 코스모스꽃 Fr. 1, 2, 3 그리고 자주색 코스모스꽃 Fr. 1에 함유되었을 것으로 유추되는 물질에 대해 항균 효과를 살펴보았다. 우선, 코스모스꽃에 대한 효과 실험에서 표준물질로 사용되는 cosmosiin과 cosmosiin의 구조에서 당이 제거된 형태인 apigenin을 항균 활성과 관련된 유추물질로 선정하였다. Apigenin의 선정은 cosmosiin이 코스모스꽃에 함유된 물질 중에 높은 비율을 차지하고 있다는 Saito의 연구(19)와 apigenin이 추출과 분획 과정에서 cosmosiin에서 당이 제거될 때 나타나는 구조라는 점에서 근거하였다. 또한, Silica gel 분획물 중에 0.1 mg/mL를 최소저해농도로 가지는 분획물들에서 apigenin과 유사한 밝은 황색의 형광빛이 관찰된 점, Rf 값이 0.88로 동일한 점을 통해서 선정하였다.

선정된 cosmosiin과 apigenin이 *S. aureus*에 대해서 항균 활성을 보이는지 실험을 진행하였다.

실험 결과를 통해 cosmosiin 보다 apigenin이 좀더 항균 효과가 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 관찰 농도 중에서도 100

Table 1 Comparison of antibacterial activity of *Cosmos bipinnatus* Cav. flowers fraction against bacteria strains and MIC

Color	fraction	Bateria stains			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
White	CHCl ₃	≥0.5 mg/mL	-	-	-
	EtOAc	≥0.2 mg/mL	-	-	-
	DW	-	-	-	-
Pink	CHCl ₃	≥0.5 mg/mL	-	-	-
	EtOAc	≥0.2 mg/mL	-	-	-
	DW	-	-	-	-
Violet	CHCl ₃	≥0.2 mg/mL	-	-	-
	EtOAc	≥0.5 mg/mL	≥0.5 mg/mL	-	-
	DW	-	-	-	-

Table 2 Comparison of antibacterial activity of *Cosmos bipinnatus* Cav. flowers EtOAc silica gel fraction against *S. aureus* and MIC

Color Fraction	White cosmos flowers	Pink cosmos flowers	Violet cosmos flowers
Fr. 1	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.1 mg/mL
Fr. 2	0.2 mg/mL	0.1 mg/mL	-
Fr. 3	-	0.2 mg/mL	-
Fr. 4	-	-	-
Fr. 5	-	-	-

μM가 50 μM에 비해 24 h 동안 균의 증식을 좀더 효과적으로 저지하였다. cosmosiin은 관찰 9~15 h에서 일시적으로 항균 효과가 나타났다.

이것으로 분획물들 속에 cosmosiin과 apigenin의 형태가 존재할 가능성이 있을 뿐 아니라 이 중에 apigenin이 우수하지는 않지만 항균 효과와 관련된 물질 중의 하나일 것으로 확인되었다.

3종 코스모스꽃 Silica gel 분획물과 apigenin의 NMR과 HPLC 분석

코스모스꽃 EtOAc층 silica gel 분획물들에서 항균 효과에 영향을 주는 물질에 대해 알아보기 위해 NMR과 HPLC를 진행하였다.

NMR 분석

NMR 분석은 박테리아에 대해 우수한 항균 효과가 나타난 자주색 코스모스꽃 Fr. 1과 함께 분홍색 코스모스꽃 Fr. 3, 흰색 코스모스꽃 Fr. 3에 대해서 시행하였다.

분획물들에 대한 NMR 분석 결과는 다음과 같다(Fig. 6). 자주색 코스모스꽃 Fr. 1의 NMR에서 ¹H의 chemical shift는 8.13(d, *J*=8.9 Hz), 7.65(s), 7.27 (d, *J*=2.0 Hz), 7.20 (dd, *J*=8.2, 2.1 Hz), 6.81 (d, *J*=8.2 Hz), 6.40 (dd, *J*=8.8, 2.4 Hz), 6.27 (d, *J*=2.3 Hz)에서 major peak이 나타났으며 이는 분홍색 코스모스꽃 Fr. 3의 NMR의 결과와 유사하였다. 이 두 분획물들은 항균 활성 실험에서도 유사한 경향으로 효과를 보였다. 그러나 흰색 코스모스꽃 Fr. 3의 NMR에서 ¹H의 chemical shift는 8.25 (d, *J*=9.1 Hz), 7.96 (d, *J*=8.9 Hz), 7.66 (dd, *J*=8.8, 2.5 Hz), 7.53 (d, *J*=2.2 Hz), 7.31 (d, *J*=2.0 Hz), 7.22 (dd, *J*=8.3, 2.1 Hz), 6.81 (d, *J*=8.3 Hz)/6.81 (s) and 6.82 (s), 6.62 (d, *J*=9.0, 2.4 Hz), 6.57 (d, *J*=2.4 Hz), 6.40 (d, *J*=2.0 Hz), 6.19 (d, *J*=2.0 Hz), 5.37 (d, *J*=7.7 Hz), 5.03 (d, *J*=7.6 Hz)로 나타나 앞선 분획물들과 상당히 상이하게 나타났고 이 분획물은 항균 효과가 크지 않았다.

본 결과와 apigenin의 NMR을 비교하는 자료로는 Telange et al.(2017)의 연구(20)의 결과에서 제시된 apigenin의 NMR을 이용하였다. Telange et al.(2017)의 결과를 보면, ¹H의 chemical shift는 12.93 (s, 1H, 5-OH), 10.72 (s, 1H, 7-OH), 10.27 (s,

Fig. 5 Between cosmosine and apigenin, apigenin showed antibacterial effects against *S. aureus*.

Fig. 6 HPLC spectra of EtOAc fractions of *Cosmos bipinnatus* Cav. flowers and apigenin at 250 nm: white (2)- EtOAc fraction of white flowers, pink (2)- EtOAc fraction of pink flowers, violet (2)- EtOAc fraction of violet flowers

1H, 4'-OH), 7.87 (d, 2H, H3'/H5'), 6.92 (d, 2H, H2'/H6'), 6.71 (s, 1H, H3), 6.44 (d, H8), 6.18 (d, H6) 이다. 이를 코스모스꽃 분획물들의 NMR의 chemical shift와 비교해 보면 6.92 (d, 2H, 유사 H2'/H6'), 6.71 (s, 1H, H3), 6.44 (d, H8), 6.18 (d, H6)에서 동일한 peak이 관찰되기에 본 연구의 분획물 내에도 apigenin구조 요소가 존재할 가능성을 타진할 수 있었다.

HPLC 분석

코스모스꽃 EtOAc층 분획물에 존재하는 물질에 대한 분석을 위해 HPLC 분석을 진행하였다. 항균 효과가 우수한 코스모스꽃 EtOAc층 분획물과 apigenin에 대한 HPLC 분석 결과는 다음과 같다(Fig. 6). 그 결과를 살펴 보면, 흰색 코스모스꽃 EtOAc층 분획물은 Rt=3.652 (17%), Rt=4.525 (41.8%)에서 주요한 peak들이 나타났다. 분홍색 코스모스꽃 EtOAc층 분획물은 Rt=3.633 (23%), Rt=4.458 (39.7%)에서 peak들이 관찰되었고 자주색 코스모스꽃 EtOAc층 분획물은 Rt=3.620 (19%), Rt=4.430 (29.7%)에서 peak들이 측정되었다. 이와 함께 유추 물질인 apigenin을 살펴보면, Rt= 3.710 min에서 peak이 관찰되었다. 이를 통해서 코스모스꽃 EtOAc층 분획물에도 apigenin의 peak와 유사한 시간대에 비중이 있는 peak를 확인할 수 있었기에 apigenin의 존재 가능성을 유추할 수 있었다. 그러나 3종의 코스모스꽃 EtOAc층 분획물들의 우수한 항균 활성에 비해 apigenin의 항균 효과가 크지 않았던 점과 HPLC결과를 통해 apigenin은 코스모스꽃 분획물의 항균 활성의 결정적인 물질은 아닌 것으로 판단된다. 그러나 apigenin 구조 요소를 포함한 활성 성분이 항균 활성을 발휘하였거나 비중이 높게 나타났던 peak의 성분이 항균 활성 물질일 것으로 추측된다.

초 록

본 연구는 코스모스꽃 추출물이 박테리아에 대해서 항균 활성이 있는지를 알아보고 이를 통해 항균 효과를 내는 물질에 대해 규명하고자 하였다. 흰색, 분홍색, 자주색의 코스모스꽃이 4종의 박테리아인 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*에 대해 항균 효과가 있는지 접종 후 24 h 동안 관찰하였다. 3종의 꽃 추출물 중에 EtOAc층 분획물에서 4개의 박테리아에 대해 가장 우수한 항균 활성이 관찰되었고 *S. aureus*에 대해서는 CHCl₃층 분획물도 효과를 보였다. 추가적으로 흰색 코스모스꽃 silica gel Fr. 1과 분홍색 코스모스꽃 silica gel Fr. 2, 자주색 코스모스꽃 silica gel Fr. 1은 0.1 mg/mL에서 최소저해농도가 나타났다. 이 분획물들과 코스모스 내에 존재할 것으로 유추되는 apigenin 간의 NMR과 HPLC 비교, 분석한 결과를 통해서 유효 성분내에는 apigenin구조 요소가 함유되어 있는 물질이 있을 것으로 판단되었다.

Keywords 고성능 액체 크로마토그래피 · 아피제닌 · 에틸아세테이트분획 · 코스모스 · 핵자기공명

감사의 글 본 연구는 동덕여자대학교 교내 연구비 (2019) 지원에 의해서 수행되었습니다.

References

1. Dubey S, Singh VK (2011) Population dynamics of *Aphis spiraececola* Patch (Homoptera: Aphididae) on medicinal plant *Cosmos bipinnatus* in

- eastern Uttar Pradesh, India. Adv Life Sci 1: 54–58. doi: 10.5923/j.als.20110102.10
2. Edward FG, Teresa H (1999) *Salvia splendens*. Institute of Food and Agriculture Sciences, Dissertation, University of Florida
 3. Alexandros SB (2007) Plants used traditionally to treat malaria in Brazil. J Ethnobiol Ethnomed 3:18, doi:10.1186/1746-4269-3-18
 4. Molder M, Owens JN (1985) *Cosmos*. CRC handbook of flowering. CRC, Boca Raton
 5. Woo JH, Shin SL, Lee CH (2010) Antioxidant effects of ethanol extracts from flower species of compositae plant. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 159–164, doi: 10.3746/jkfn.2010.39.2.15
 6. Woo J, Shin S, Chang Y, Lee C (2010) Antioxidant effect according to extraction method in extracts of *Dendranthema zawadskii* var. *yezoense* and *Cosmos bipinnatus*. Kor J Hort Sci Technol 28: 462–468
 7. Lee YG, Lee J, Lee NY, Kim NK, Jung DW, Wang W, Kim Y, Kim HG, Nguyen TN, Park H, Baek NI (2017) Evaluation for the flowers of compositae plants as whitening cosmetics functionality. J Appl Biol Chem 60: 511. doi: 103839/jabc.2017.002
 8. Shin YH (2020) A Study on Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Cosmos bipinnatus* Flower Extracts for Cosmeceutical Formulations. Dissertation, University of Hannam
 9. Woo WS (2014) Natural chemical research method. Seoul University Publishing Center, Seoul, pp 63–64
 10. Friend J (1979) Phenolic substances and plant disease. In: Swain T, Harborne JB, Van Suren CF (eds) Biochemistry of Plant Phenolic, Plenum Press, New York, pp 557–588
 11. Friend J (1976) Lignification in infected tissue. In: Friend J, Threlfall DR (eds) Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships, Academic Press, London
 12. Jang (2013) Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory Effects of the Extracts and Fractions of Asteraceae Medicinal Plants. Dissertation, University of Suncheon
 13. Jang IC, Park JH, Park E, Park HR, Lee SC (2008) Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from cosmos (*Cosmos bipinnatus*) flowers. Plant foods Hum Nutr 63: 205–210, doi: 10.1007/s11130-008-0086-8
 14. Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T (1996) Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phytochem 43: 1255–1260, doi:10.1016/S0031-9422(96)00343-3
 15. Kim SY, Lee MH, Park SN (2010) Evaluations of antioxidative activity and whitening effect of extracts from different parts of *Cosmos bipinnatus*. J of the Korean Oil Chemists' Soc 27: 559–567
 16. Olajuyigbe O, Ashafa A (2014) Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. leaves from South Africa. Iran J Pharm Res 13: 1417–1423, doi 10.22037/ijpr.2014.1581
 17. Lee SE, Kim S (2009) Composition and cytotoxicity of Essential Oil Extracted from *Cosmos bipinnatus* Cav. Weed Turf Sci (Conference) 29: 70–72
 18. Shibamoto T (1987) Retention indices in essential oil analysis. In: Sandra P, Bicchi C (eds.) Capillary gas chromatography in essential oils analysis, Huethig, Heidelberg, pp 259–274
 19. Saito K (1979) Quantitative variation of flavonoids and related compounds in *Cosmos bipinnatus*. Acta Soc Bot Pol 48: 317–325, doi: 10.5586/asbp.2011.020
 20. Telange DR, Patil AT, Pethe AM, Fegade H, Anand S, Dave VS (2017) Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, *in vivo* bioavailability, and antioxidant potential. Eur J Pharm Sci 108: 36–49, doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.009