

산벚나무 수피추출물의 생리활성 및 페놀성 화합물 분리

박정미* · 이진영* · 박태순* · 박근혜* · 박강수* · 김태훈** · 조영제***
권오준**** · 최경임***** · 안봉전*†

*대구한의대학교 화장품약리학과, **대구한의대학교 한약재약리학과, ***경북대학교 식품공학과
****경북전략산업기획단, *****대구보건대학 뷰티코디네이션과

Biological Activity Investigation, and Phenol Compounds Isolation from Barks of *Prunus Sargentii* R.

Jung Mi Park*, Jin Young Lee*, Tae Soon Park*, Gun Hye Park*, Kang Soo Park*, Tae Hoon Kim**,
Young Je Cho***, O Jun Kwon****, Kyung Im Choi*****, and Bong Jeun An*†

*Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea.

**Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea.

***Department of Food Engineering, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea.

****Gyeongbuk Regional Innovation Agency, Gyeongsan 712-210, Korea.

*****Department of Beauty Coordination, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea.

ABSTRACT : *Prunus sargentii* of Rosaceae family, has been reported to have radical scavenging activity and anti-inflammatory effect. On these facts, this research was conducted to evaluate pharmaceutical activities of the bark extracts *P. sargentii*. Free radical scavenging activities of fraction (Fr) -5~10 isolated from *P. sargentii* was higher than 80% respectively at 10ppm. The superoxide dismutase (SOD)-like activity of Fr-5, 9 were about 97, 84%, respectively at 1,000 ppm. Xanthine oxidase inhibitory effect of Fr-9, 10 were about 75, 78%, respectively at 1,000 ppm. The tyrosinase inhibitory effect related to skin-whitening was 72, 68% in Fr-2, 9 isolated from *Prunus sargentii* R. at 1,000 ppm. Hyaluronidase inhibition activity related to the anti-inflammation effect was 98% for Fr-8 at 500 ppm. Isolation of the methanol soluble fraction from *P. sargentii* yielded two major phenol compounds, (-)-epicatechin and taxifolin. The structure of the compound was certainly determined by chemical analyses, as well as NMR and Mass spectroscopy. The present study was carried out in a search for new cosmetic material from the bark from *P. sargentii*. and, (-)-epicatechin and taxifolin were isolated as active principles. So *P. sargentii* R. methanolic extracts may be used for the cosmetic material.

Key Words : *Prunus sargentii* R. Biological activities, Epicatechin, Taxifolin

서 언

장미과 (Rosaceae)는 유럽, 북아메리카, 아시아에 많으며 세계적으로 널리 퍼져 있으며, 6아과 115속 3,200종이 알려져 있다. 그 중 한국에는 4아과 35속 207종이 자란다. 그 종류로는 *Fragaria ananassa* (딸기), *Rubus frondosa* (블래베리), *Rubus logano-baccus* (로건베리), *Rubus idaeus* (라즈베리), *Prunus armeniaca* (살구나무), *Prunus avium* (버찌), *Prunus persica* (복숭아), *Prunus salicina* (자두), *Prunus sargentii* (산벚나무), *Malus domestica* (사과), *Pyrus pyrifolia* (배), *Photinia glabra* (홍가시나무), *Chaenomeles sinensis* (모과나

무) 등이 있으며 (Jung *et al.*, 2004), 항산화 (Cho *et al.*, 2003), 항침해수용성 (Choi *et al.*, 2003), 항염증 (Oku *et al.*, 2003), 항소양증 (Matsuda *et al.*, 1994), tyrosinase의 저해제 (Gao *et al.*, 2003)와 항암성 (Kim *et al.*, 2002)을 증진시키는 효과를 가진다고 보고된 바 있다.

이 중 산벚나무는 전국의 표고 1,600 m 이하에 자생하며, 내한성이 강하여 전국 어디서나 적용이 가능하며 바닷가에서도 잘 자란다. 변재는 황색이고 심재는 적갈색으로 무늬가 좋고 치밀하여 건설재, 기구재, 화장대, 약용재 등 고급 가구재로 사용한다 (Lee *et al.*, 2001). 산벚나무 수피의 효능으로는 청열 (靑熱), 해독 (奚毒), 거담 (去痰) 등이 있으며, 감염성 또

†Corresponding author: (Phone) +82-53-819-1429 (E-mail) anbj@dhu.ac.kr
Received January 02, 2008 / Revised March 10, 2008 / Accepted June 09, 2008

는 염증성 질환이나 피부 질환 등에 많이 응용되었다 (Kam, 1981; Kim, 1974; Kim & Cho, 1995; Kim, 1984; Ligaa, 1996; Chae, 1996; Jin, 1992; Ju, 1989). 예부터 벚나무의 줄기 및 껍질은 기침, 담마진, 우육체 등에 민간약으로 이용되어 왔으며 (Lee, 1976), Han & Han (1978)에 의하면 벚나무 껍질이 강력한 면역억제 활성이 있음이 밝혀졌다. 또한 벚나무 기원식물인 화피는 배당체 sakuranin을 함유하고 있으며, 가수분해 시 sakuranetin 및 당이 생성되며 Park & Kang (1996), 주요성분으로는 pinostrobin, naringenin, eriodictyol, taxifolin, pinocembrin, 그리고 flavanone 배당체인 vercundin 등이 분리 보고 되었고, prunetin, angophorol, sakuranetin, isosakuranin 등이 함유되어 있음이 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). 이에 본 연구에서는 항산화 및 항염 효과가 우수한 물질을 탐색하기 위하여, 산벚나무 수피 추출물을 분획하여 생리활성 및 페놀성 화합물을 분리하였으며, 분획된 물질들의 생리활성을 검증하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료 및 추출물 분리정제

경북 포항 죽장면에서 자생하는 산벚나무 (*Prunus sargentii* Rehder) 수피 300 g를 70% 메탄올에 침지하여 실온에서 3회 추출, 여과한 후 감압 농축하여 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피 (메탄올 : 증류수 → 0 : 1 → 1 : 0)로 elution 시키고 마지막으로 아세톤으로 세척한 후, TLC를 실시하여 10개의 fraction (Fr. 1~10)으로 분획하였다. 이중 fraction 3으로부터 MCI gel CHP 20P, Sephadex LH-20을 단계적으로 사용하여 반복 정제하였다. 이때 용출 용매는 메탄올 : 증류수 (20% → 100%), 에탄올 : 증류수 (30% → 100%), 메탄올 : 증류수 (40% → 60%)를 사용하여 화합물 1을 분리하였다. Fraction 5는 MCI gel CHP 20P 및 Sephadex LH-20을 사용하여 정제하였으며, 이때 용출 용매는 메탄올 : 증류수 (20% → 100%) 및 메탄올 : 증류수 (30% → 60%)를 사용하여 화합물 2를 정제하였다 (Fig. 1).

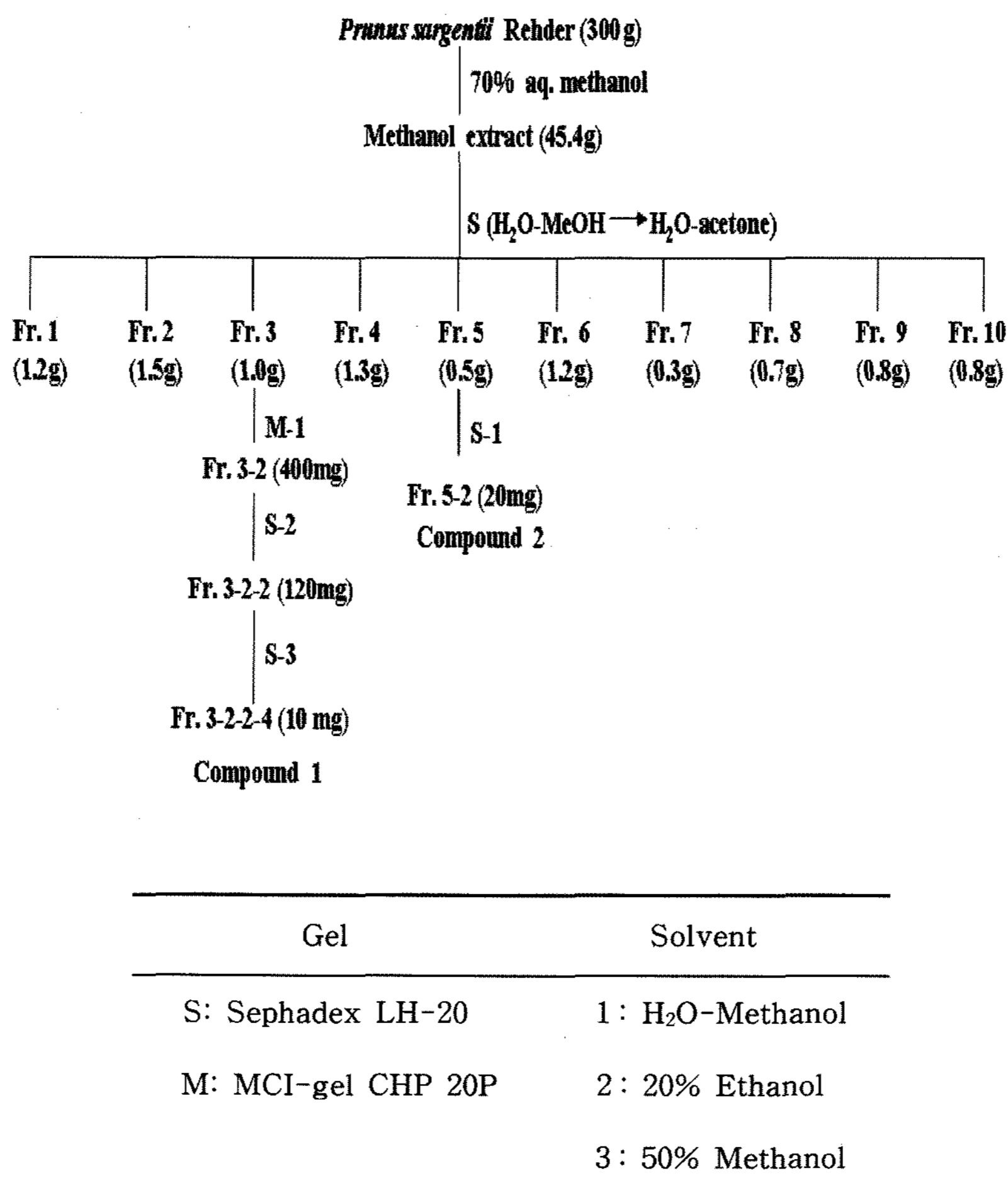


Fig. 1. Isolation procedure of compounds from *Prunus sargentii* R..

2. 박층크로마토그래피 (Thin layer chromatography, TLC)에 의한 phenolic 화합물 동정

TLC상에 전개된 spot 패턴을 UV lamp (ENF60°C, UV-254/365 nm, ENF Co., USA)로 확인하였으며, 발색시약으로는 benzene : ethylformate : formic acid = 2 : 7 : 1의 용액을 사용하였다. 각 분획물을 실리카겔 TLC로 전개시켜 spot 패턴을 확인한 후, 발색시약으로 페놀성 화합물을 동정한 다음, 분획물을 동결건조하여 시료로 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 정량은 AOAC (1984)에 준하여 정량하였다. 즉, 100배 희석한 시료용액 3 ml에 Folin-ciocalteu phenol 용액 1 ml를 가하고, 포화 Na₂CO₃ 용액 1 ml를 가하여 혼합한 후 1시간 실온에서 방치하고, 1 N HCl 0.2 ml을 가하여 640 nm에서 흡광도를 측정 후, 미리 작성한 tannic acid 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

4. 전자공여능 측정

전자공여능 (EDA; electron donating abilities) 측정은 Blois (1958)의 방법을 따라 측정하였다. 각 시료용액 2 ml에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 1 ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

5. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund & Marklund (1974)의 방법에 따라 실시하였다. 각 시료용액 0.2 ml에 Tris-HCl의 완충용액 (50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1.0 N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 실험군과 대조군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

6. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stirpe & Corte (1969)의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1 ml와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 ml에 xanthine (2 mM)을 녹인 기질액 0.2 ml를 첨가하고 xanthine oxidase

(0.2U/ml) 0.1 ml를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 uric acid 생성량}}{\text{무첨가군의 uric acid 생성량}}\right) \times 100$$

7. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi (1986) 등의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 ml에 10 mM L-DOPA 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110U/ml) 0.2 ml를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrom을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

8. Hyaluronidase 저해활성 측정

Hyaluronidase 저해활성 측정은 sodium-hyaluronic acid로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucoxazoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethyl-aminobenzaldehyde (DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정 하였다 (Reissig *et al.*, 1955). 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HAase (7900 U/ml) 0.05 ml와 시료용액 0.1 ml를 혼합하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 12.5 mM CaCl₂ 0.1 ml를 가하고 혼합 후 다시 20분간 배양 하였다. 기질로서 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HA (12 mg/ml)를 첨가하여 다시 40분간 배양하여 0.4 N potassiumtetraborate 0.1 ml 및 0.4 N NaOH 용액 0.1 ml를 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕 상에서 가열한 후 완전히 냉각시켰다. 냉각 시킨 반응물에 발색제로 DMAB시약 3 ml를 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

9. 통계처리

통계처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산 분석 (ANOVA:analysis of variance)을 한 후 α=0.05 수준에서 Duncan의 다중 검증법 (DMRT:Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

10. 수피추출물로부터 단일물질 분리 및 구조 분석

각 분취 시료는 박층크로마토그래피 (Thin layer chromatography, TLC)에 의해 TLC 플레이트상에 전개된 spot 패턴을 UV 램프로 확인 하였으며, 동일 주황색 spot이 확인되면, 서로 합쳐 감압농축한 후 행하였다. 1차 open column에 의해 10개의 분획을 분리한 후, 항산화 실험 및 수율을 고려하여 분획 3과 5를 2, 3, 4차 open column을 실시하여 최종 compound 1과 2를 얻었다. 이 분획물들을 Bondapack C18 stainless steel column (4.6 × 150 mm)을 이용한 고속액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 실시하였다.

11. HPLC를 통한 지표물질 확인

Open column에서 분리된 분획물을 HPLC (Waters, USA)로 정량분석을 실시하였다. Column은 bondapack C18 stainless steel column (4.6 × 150 mm)을 사용하였으며, 분획물의 분석 시 이동상은 methanol : acetic acid : H₂O = 48 : 2 : 50을 이용하여 실온에서 실시하였고, 모든 시약은 methanol 100%에 녹인 후 column에 주입하였다. 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector는 254 nm 에서 측정하였다. 각 시료의 injection volume을 10 µl로 하여 chromatogram을 측정하였다.

12. FT-IR spectrum 측정

분광분석법인 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) 측정은 액막법을 이용하였으며, compound 1과 2 분획물은 Genesis II FT-IRTM spectrometer (Mattson, USA)를 사용하여 측정 하였다. 고체 시료를 에탄올에 녹여 NaCl plate (25 × 4 mm, Spectra-Tech Inc., USA)에 1~2방울 떨어뜨린 후, 또 다른 한 장의 NaCl plate를 겹치게 하여 측정하였다 (An & Lee, 1999; Kim, 2003; An *et al.*, 2006).

13. ¹H- 및 ¹³C-NMR을 통한 분획물의 구조분석

Compound 1과 2의 구조분석은 Varian사 (USA)의 ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum 500 MHz FT-NMR spectrometer를 사용하였으며, 용매는 CD₃OD (Aldrich, USA)를 사용하였고, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane (TMS 0.03%)를 사용하였으며, chemical shift는 ppm 단위로 나타내었다. ¹³C-NMR spectrum도 Varian사의 125 MHz FT-NMR spectrometer를 사용하였으며, ¹H-NMR과 같은 용매와 표준물질을 사용하여 나타내었다.

14. FAB-Mass spectrum을 통한 분자량 측정

Compound 1과 2 분자량 측정은 high resolution mass spectrometer (Jeol, UK) JMS 700을 사용하여 positive FAB-Mass 방법으로 분자량을 측정하였다. 즉 시료 1 mg 을 감압상

Table 1. The contents of total polyphenol fractions isolated from *Prunus sargentii* R.

Samples	Polyphenol contents (mg/100 g)	Samples	Polyphenol contents (mg/100 g)
Fr. 1	351.41 ± 0.1	Fr. 6	649.86 ± 0.14
Fr. 2	79.87 ± 0.03	Fr. 7	1095.78 ± 0.03
Fr. 3	513.83 ± 0.21	Fr. 8	631.63 ± 0.17
Fr. 4	2479.18 ± 0.1	Fr. 9	825.71 ± 0.21
Fr. 5	450.68 ± 0.31	Fr. 10	735.95 ± 0.1

태 (10⁻⁶~10⁻⁸ mmHg)에 가열 (100~300°C) 기화시킨 후 시료를 메탄올에 용해시켜 m-NO₂-Benzyl-OH matrix를 이용하여 측정하였으며, 이온원의 가속압을 2~3 kV, 이온화의 전압은 22~28 eV, 시료 온도는 50°C에서 질량 분석을 하였다.

결과 및 고찰

1. 산벚나무 수피추출물로부터 분획물 동정

산벚나무 추출물을 1차 분획한 결과 fraction (Fr.) 1은 1.17 g, Fr. 2는 1.54 g, Fr. 3은 0.98 g, Fr. 4는 1.29 g, Fr. 5는 0.49 g, Fr. 6은 1.19 g, Fr. 7는 0.32 g, Fr. 8은 0.65 g, Fr. 9는 0.8 g, Fr. 10은 0.77 g를 얻을 수 있었다. 이중 fraction 3으로부터 화합물 1 (10 mg)을 분리하였고, fraction 5로부터 화합물 2 (20 mg)를 분리하였다.

2. 추출물 분획의 총 폴리페놀 함량

분획물의 총 폴리페놀 함량을 tannic acid를 표준곡선으로 하여 Table 1과 같이 100 g당 Fr. 1 (351.41 mg), Fr. 2 (79.87 mg), Fr. 3 (513.83 mg), Fr. 4 (2479.18 mg), Fr. 5 (450.68 mg), Fr. 6 (649.86 mg), Fr. 7 (1095.78 mg), Fr. 8 (631.63 mg), Fr. 9 (825.71 mg) 및 Fr. 10 (735.95 mg)의 폴리페놀 함량을 확인하였다.

3. 추출물 분획의 전자공여능

분획물들의 전자공여능 측정결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 시료 농도 10 ppm에서 Fr. 1~4를 제외한 나머지 분획물(Fr. 5~10)들은 80% 이상의 전자공여능을 나타내었다. Kim (1995) 등의 국내산 생약추출물의 전자공여능의 관찰에서 목단, 황금, 산수유, 작약의 100ppm의 농도에서 각각 65%, 57.1%, 45.8%, 36.7%로 나타난 결과와 비교해 볼 때 산벚나무 수피 추출물 또한 유의한 항산화력을 가지고 있음을 알 수 있었다. Kang (1996) 등은 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenolic 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다.

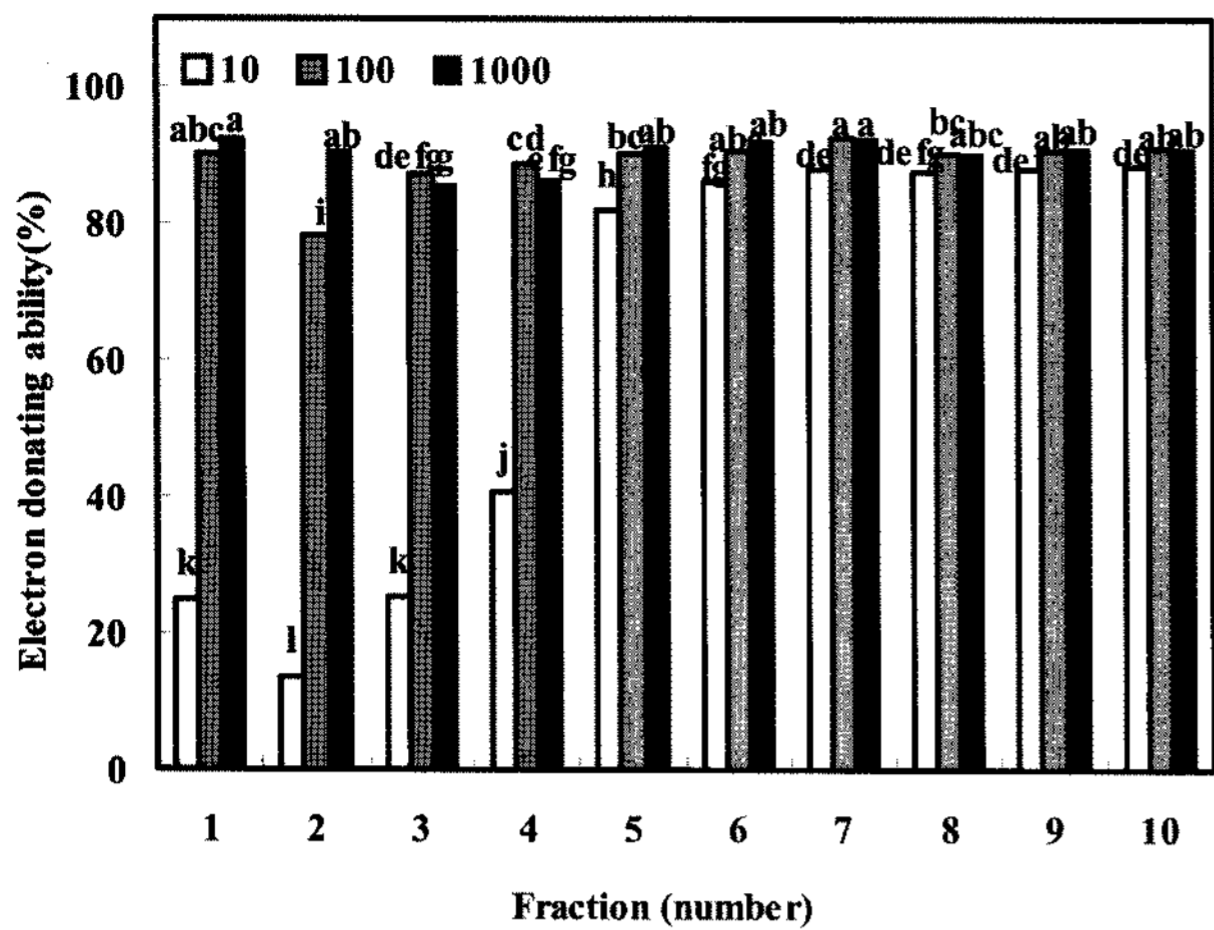


Fig. 2. Electron donating ability of fractions isolated from *Prunus sargentii* R..

□ : 10 ppm ■ : 100 ppm ■ : 1,000 ppm
 Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

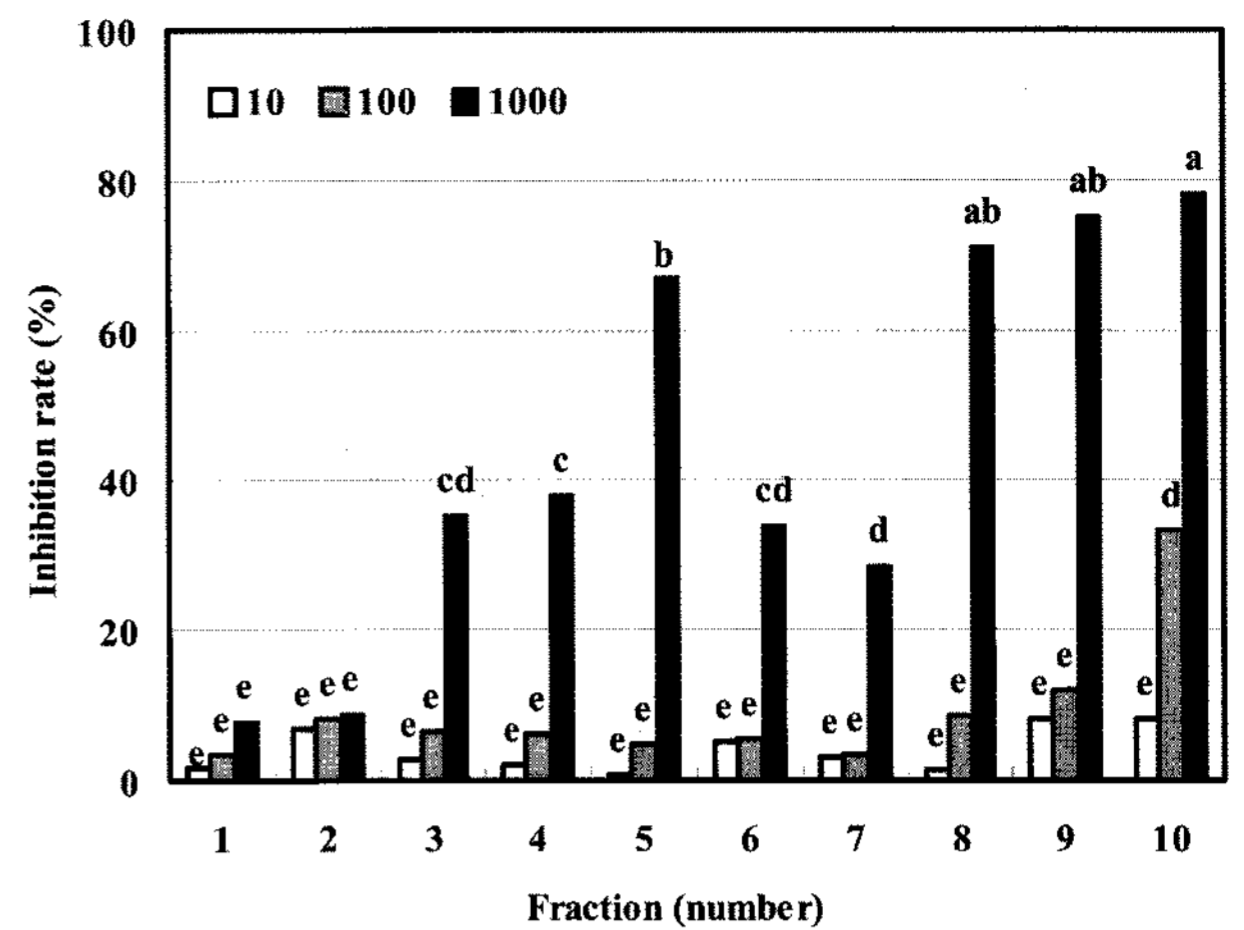


Fig. 4. Inhibition rate of fractions isolated from *Prunus sargentii* R. on xanthine oxidase.

□ : 10 ppm ■ : 100 ppm ■ : 1,000 ppm
 Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

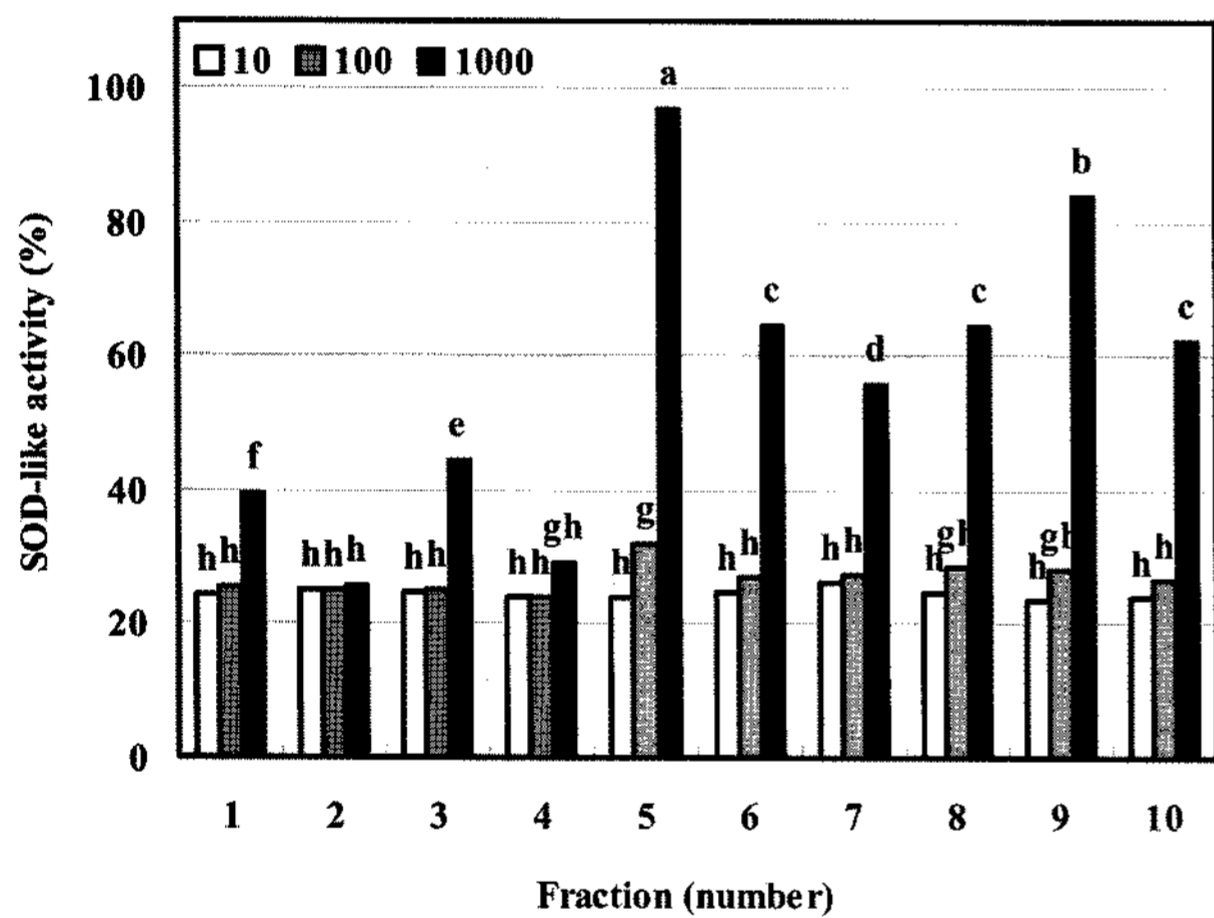


Fig. 3. SOD-like activity of fractions isolated from *Prunus sargentii* R..

□ : 10 ppm ■ : 100 ppm ■ : 1,000 ppm
 Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

4. 추출물 분획의 superoxide dismutase(SOD) 유사활성

분획물들의 SOD 유사활성능을 측정한 결과 Fr. 6은 1,000 ppm에서 64%의 유사활성능을 나타내었으며, Fr. 7은 55%, Fr. 8은 64%, Fr. 9는 84%, Fr. 10은 62%이었고, Fr. 5는 97% 이상의 유사활성능을 나타내어, 분획물들 중 가장 높은 SOD 유사활성능을 나타내었다. 이는 Lim *et al.* (2004) 등의 한국산 약용식물의 SOD 유사활성에서 20% 미만의 활성과 Cho *et al.* (2007) 등의 쑥갓 추출물 1,000 ppm에서 26.1%의 효과를 나타낸 것과 비교할 때 산벚나무 수피 분획물은 유의한 SOD 유사활성을 가지고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3).

4. 추출물 분획의 xanthine oxidase 저해활성

수피 분획물들의 xanthine oxidase의 저해능은 Fig. 4와 같다. 1,000 ppm에서 Fr. 5는 66%, Fr. 8은 71%, Fr. 9는 75%, Fr. 10은 78%의 저해능을 나타내었다. 이는 An *et al.* (2005) 등이 황련 추출물의 xanthine oxidase 저해환에서 에탄올추출물의 경우 18.89%, 열수추출물의 경우 6.95%라고 보고한 것과 비교하여 우수한 저해능을 나타내었으며, Yeo *et al.* (1995) 등은 차 (茶)의 조 catechin 획분에서 증제차의 경우 93.2%, 볶음차의 경우 89.2%, 우롱차의 경우 88.8%, 홍차의 경우 78.7%의 xanthine oxidase의 저해환을 보인다고 하여 산벚나무 수피추출물의 xanthine oxidase 저해능이 우수함을 알 수 있었다. 이는 식물계에 널리 존재하는 flavonoid류는 hydroxyl기의 위치에 따라 xanthine oxidase 저해효과가 다르며 (Hayashi *et al.*, 1988), xanthine oxidase의 저해물질로는 다양한 탄닌류 및 관련 페놀성 물질들이 보고된바 있다 (Cho *et al.*, 1993).

5. 추출물 분획의 tyrosinase 저해 활성

Mushroom tyrosinase 효소를 사용하여 각 분획물의 농도별 tyrosinase 효소활성 저해효과를 측정한 결과 Fig. 5와 같이 1,000 ppm에서 Fr. 2는 72%, Fr. 5는 56%, Fr. 9는 57%, Fr. 10은 68% 이상의 효능을 보였다. 이는 Jung *et al.* (1995) 등의 콩나물, 케일, 취나물의 10% 이하의 낮은 저해능과 비교할 때 비교적 높은 저해활성을 나타내었으며, Lee *et al.* (2005) 등의 백출, 삼백초 열수추출물 500 ppm의 농도에서 10% 이하의 저해능을 나타낸 결과와 비교하여 산벚나무 수피 분획물의 tyrosinase 저해능이 우수함을 확인할 수 있었다.

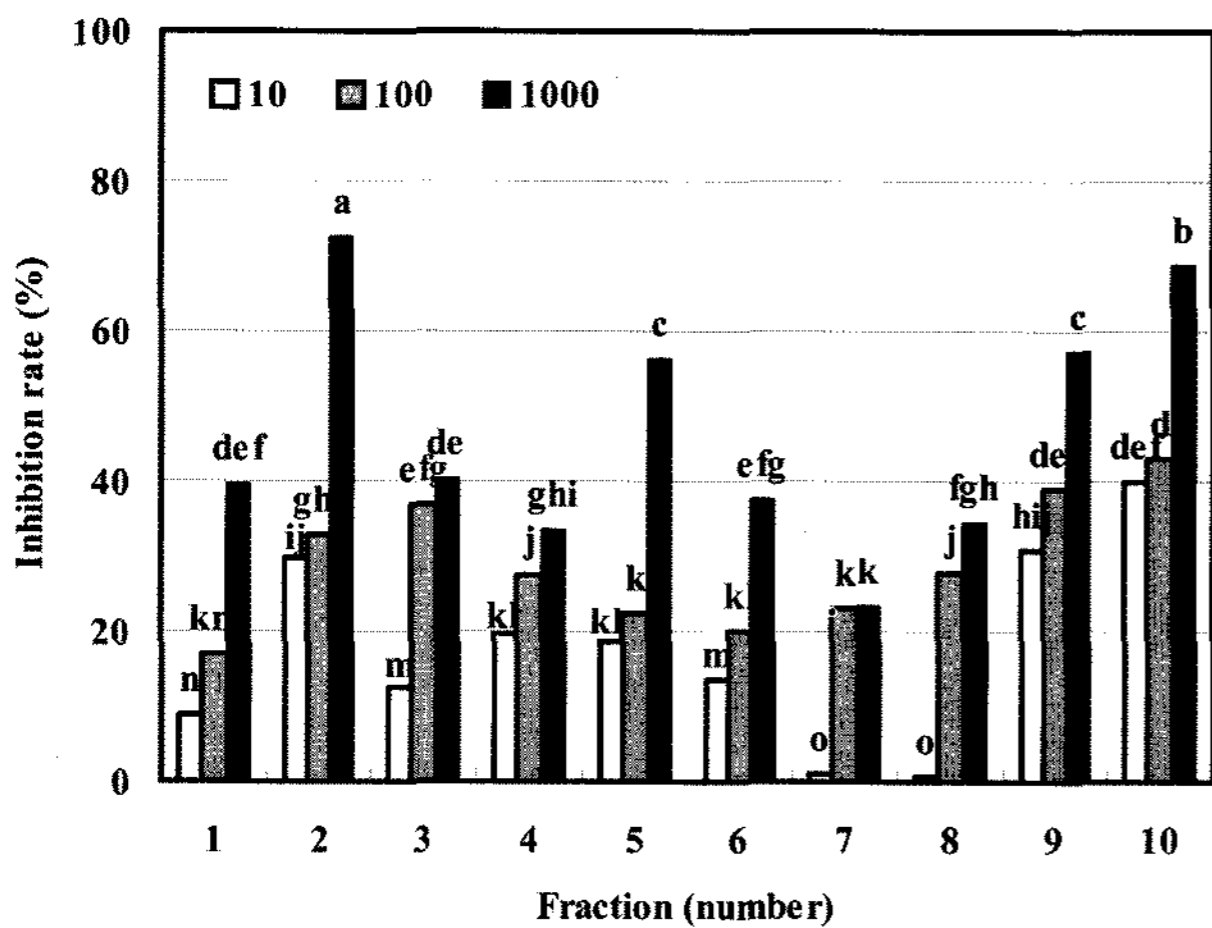


Fig. 5. Inhibition rate of fractions isolated from *Prunus sargentii* R. on tyrosinase.

□ : 10 ppm ■ : 100 ppm ■ : 1,000 ppm
Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

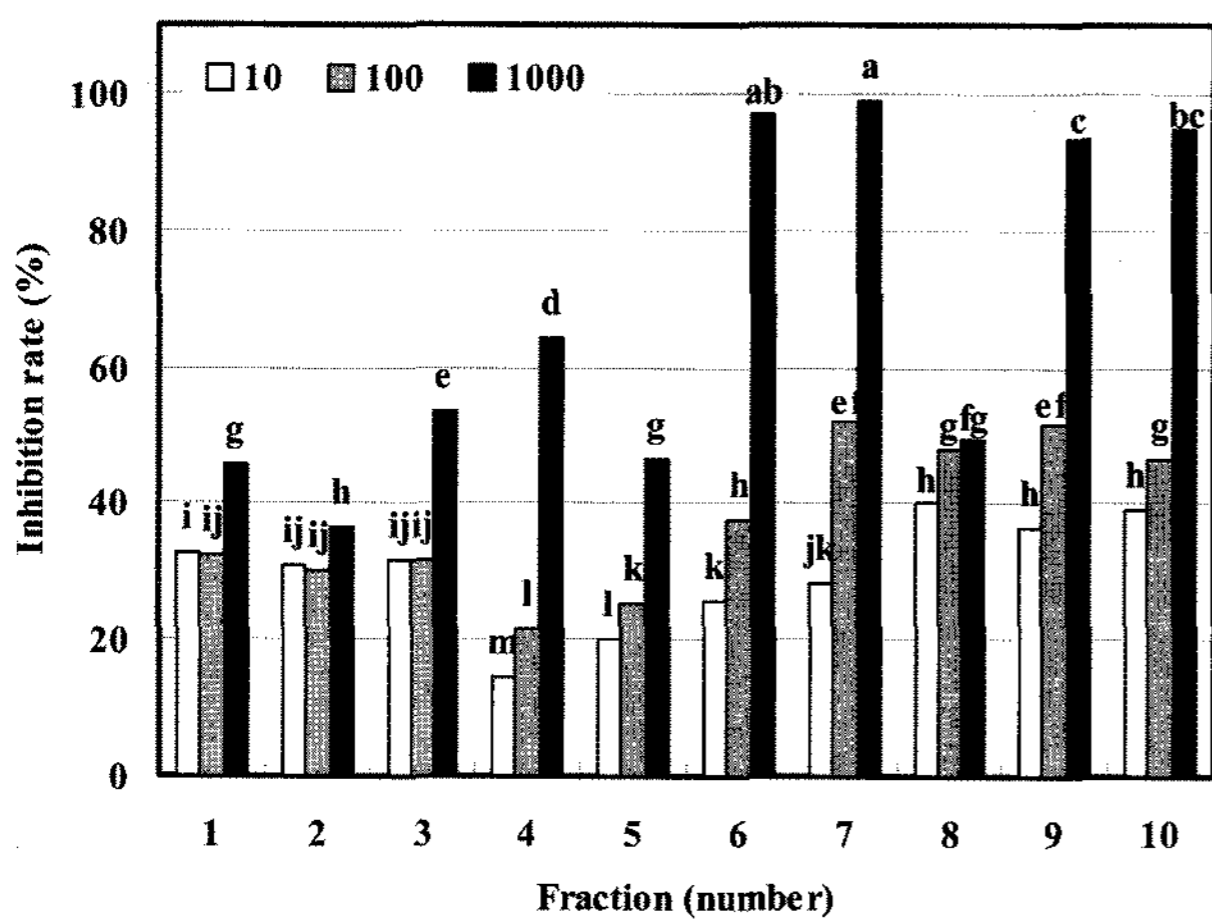


Fig. 6. Inhibition rate of fractions isolated from *Prunus sargentii* R. on hyaluronidase.

□ : 10 ppm ■ : 100 ppm ■ : 1,000 ppm
Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

6. 추출물 분획의 hyaluronidase 저해 활성

수피 분획물들의 hyaluronidase 저해 측정 결과를 살펴보면 Fig. 6과 같이 500 ppm의 농도에서는 Fr. 7, 8, 9, 10의 경우 모두 50% 이상의 저해능을 보였으며, 1,000 ppm의 농도에서 Fr. 4의 경우 64%, Fr. 6은 96%, Fr. 8은 98%, Fr. 9는 93%, Fr. 10은 94%의 효능을 나타내었다. 이 결과는 Cha & Lee (2004) 등이 항산화 효과를 가진 물질이 항염증 효과를 동시에 나타냄으로서 활성산소에 기인한다는 보고와 유사함을 확인할 수 있었고, 산벚나무 수피추출물의 항염증 화장품 소재로서의 유용성을 확인할 수 있었다.

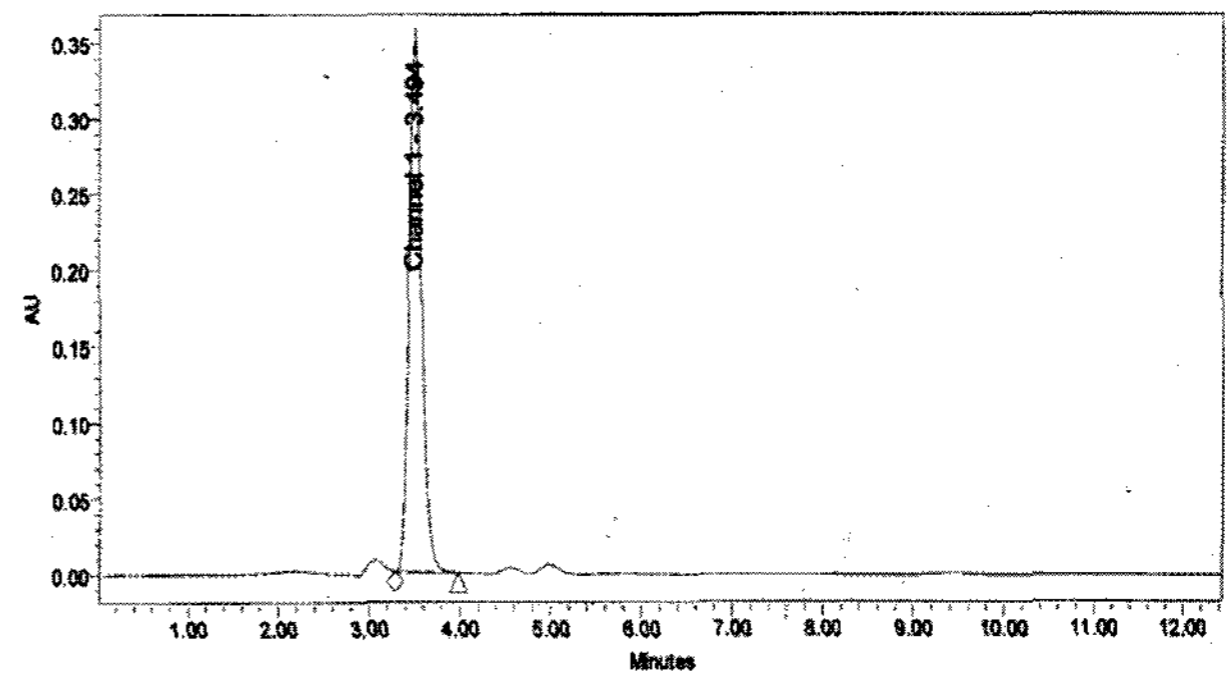


Fig. 7. HPLC chromatogram of compound 1 isolated from bark of *Prunus sargentii* R.

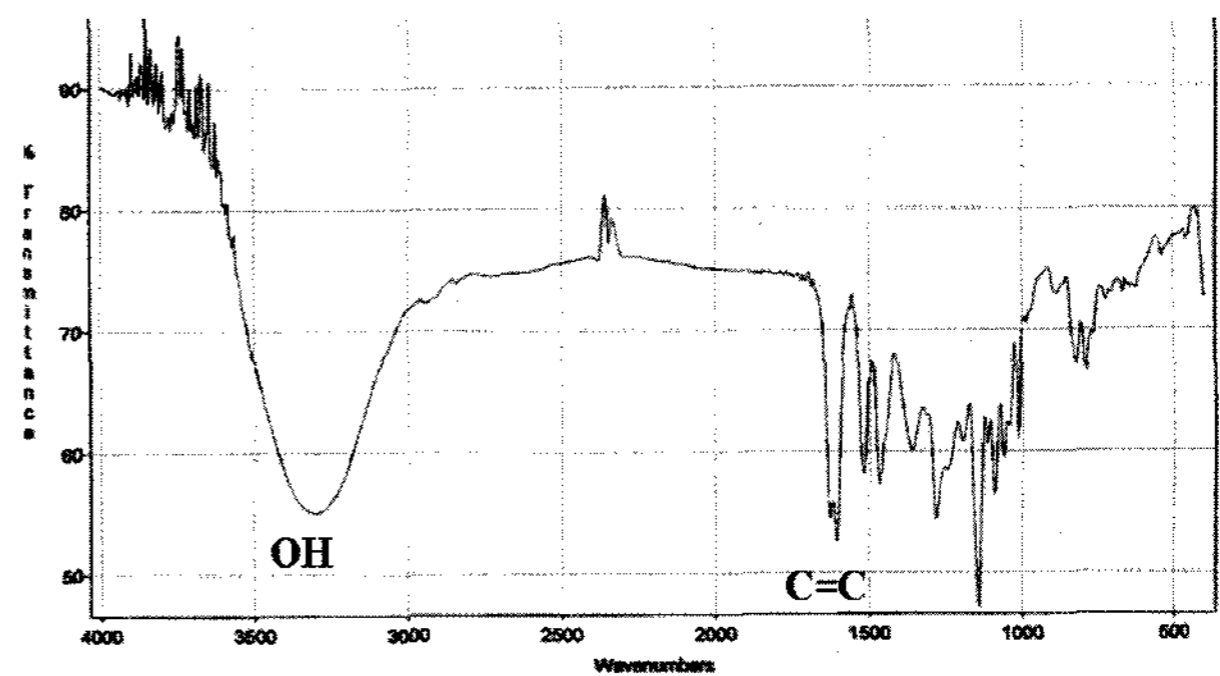


Fig. 8. FT-IR spectrum of compound 1 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

7. 수피추출물로 부터 활성물질 분리 및 구조분석

1) 화합물 1의 구조분석

화합물 1은 메탄올 추출물로부터 백색 분말상태로 얻어졌으며 TLC로 확인 시, UV (254/365 nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, 붉은색으로 발색되었다. HPLC 측정시 Fig. 7과 같이 단일피크를 확인할 수 있었으며, FT-IR 스펙트럼 측정 결과 Fig. 8에서 나타난 바와 같이 OH 및 aromatic C=C로 추정되는 밴드가 강하게 나타났으므로 이 화합물은 페놀성 OH기를 가진 aromatic 화합물로 추정되었다. 또한 ¹H-NMR을 측정한 결과, Fig. 9와 같이 aromatic proton 영역에서 ABX 계 시그널 한쌍과 서로 meta-coupling한 2개의 proton, aliphatic 영역에서 2개의 oxymethine, 1개의 methylene 시그널이 관찰된 것으로부터 문헌과의 비교를 통하여 본 화합물은 카테킨류임을 시사하였다. ¹³C-NMR데이터를 (-)-epicatechin과 비교하였을 때 모든 시그널 데이터가 일치하는 점 및 FAB Mass spectrum의 결과로부터 분자량이 290임을 확인하였다. (Fig. 10, 11) 따라서 본 화합물의 구조를 (-)-epicatechin으로 결정하였으며, 화합물의 절대구조를 결정하기 위해 선광도 값을 측정한 결과 $[\alpha]_D^{21} = -51.2^\circ$ 로 나타나 (-)-epicatechin으로 확정하였다 (Fig. 12).

산벚나무 생리활성 및 페놀성 화합물 분리

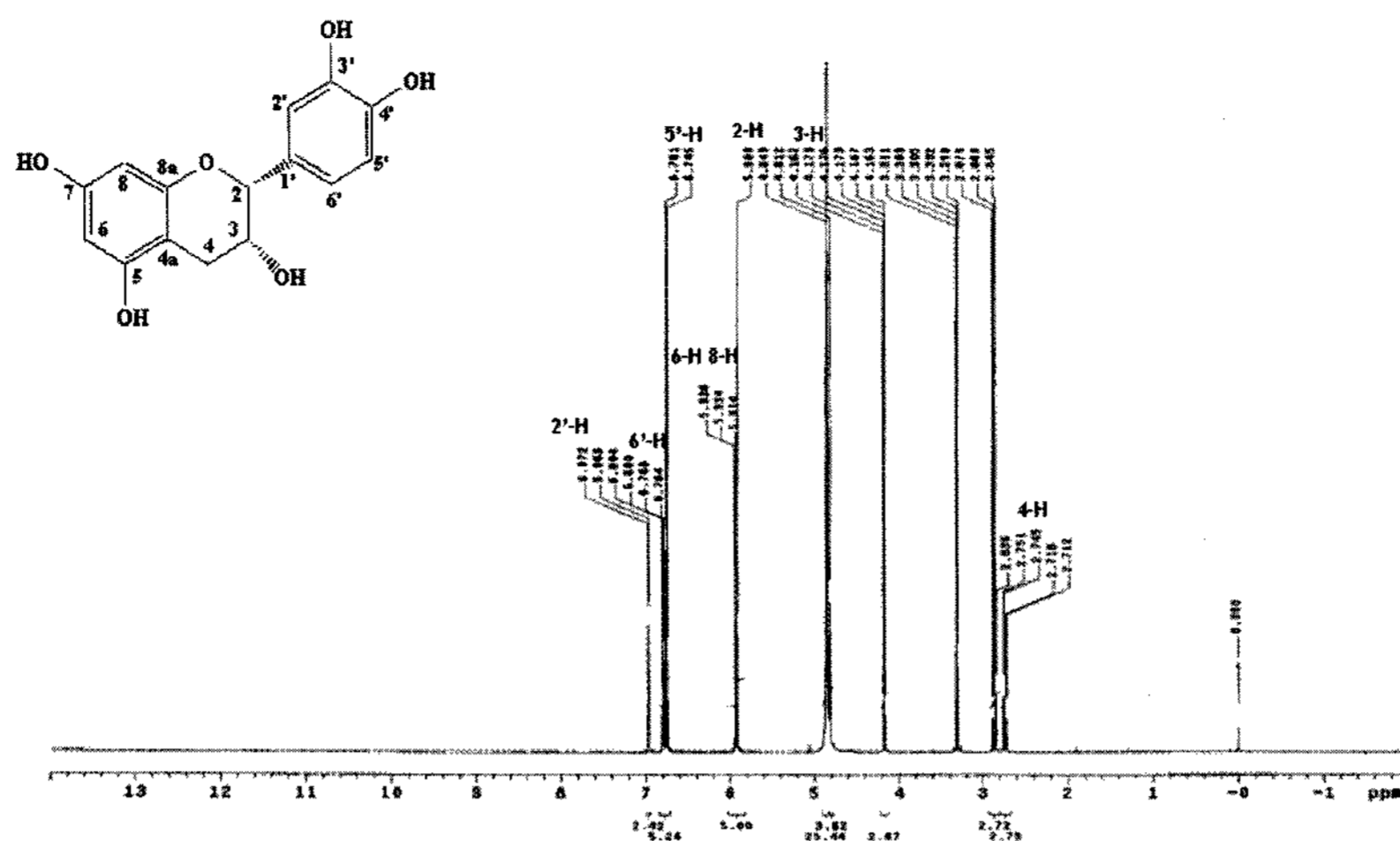


Fig. 9. ¹H-NMR spectra of compound 1 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

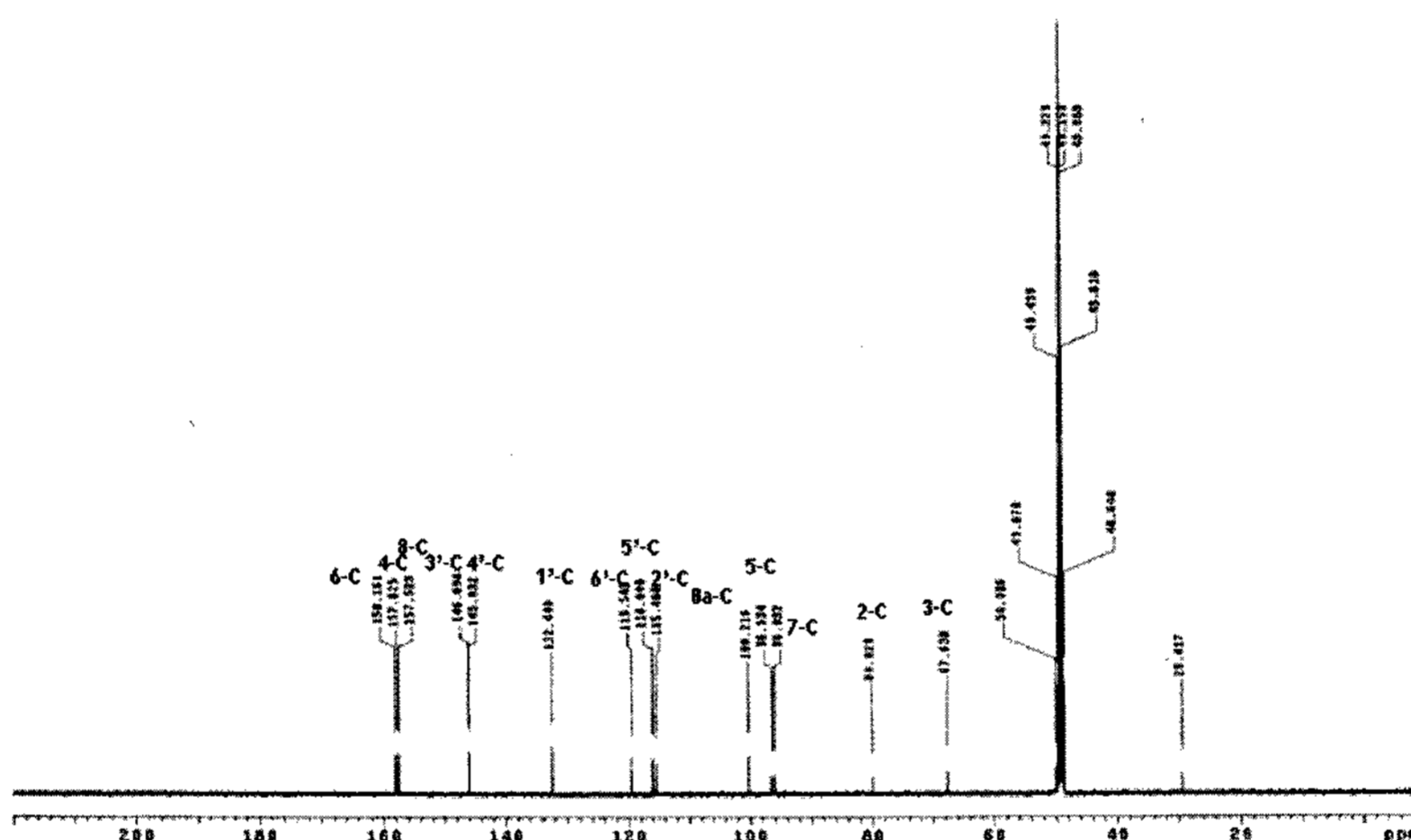


Fig. 10. ¹³C-NMR spectra of compound 1 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

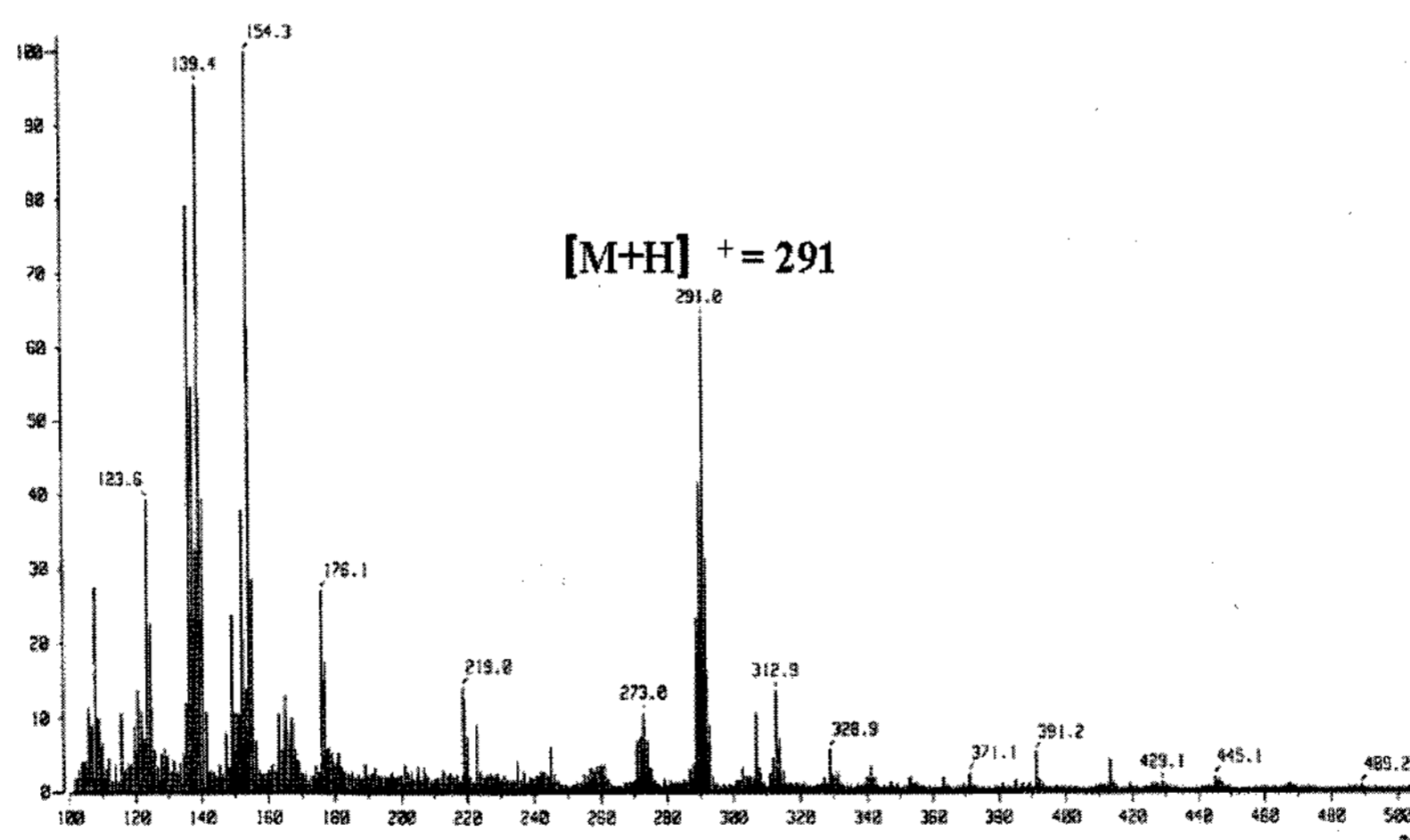
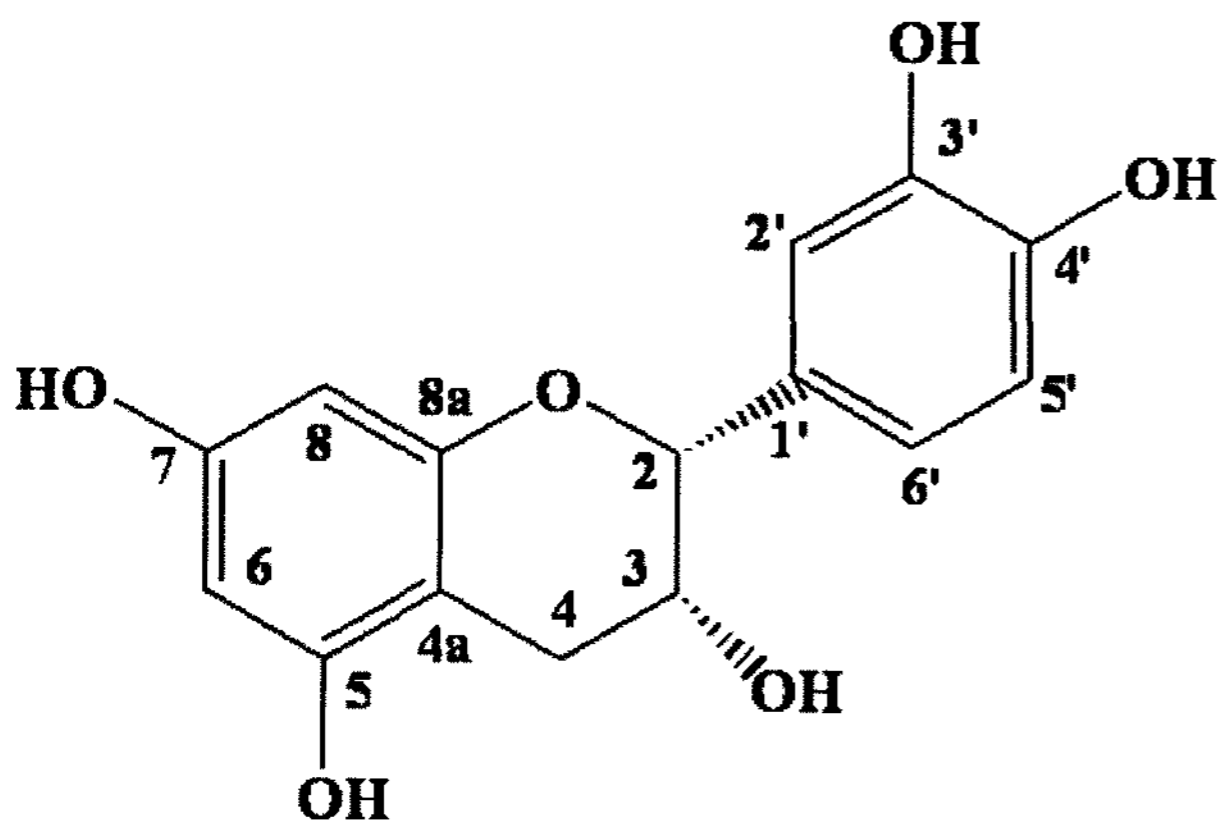


Fig. 11. Mass spectra of compound 1 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..



$C_{15}H_{14}O_6$ (-)-epicatechin

Fig. 12. Chemical structures of compound 1 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

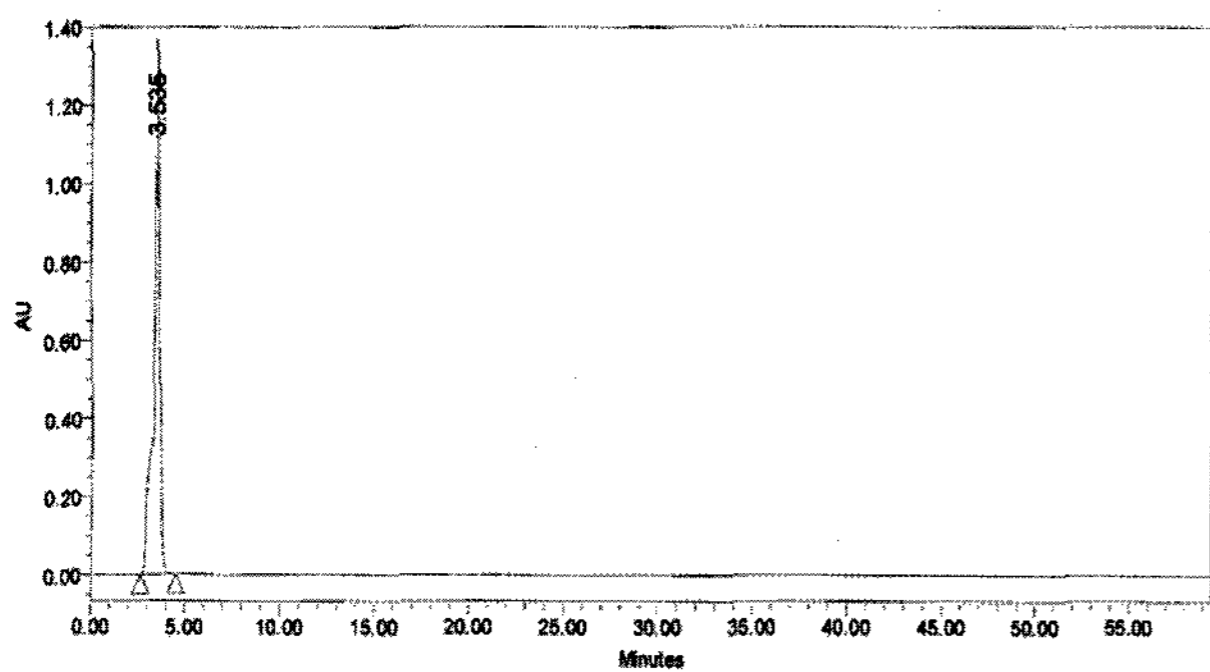


Fig. 13. HPLC chromatogram of compound 2 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

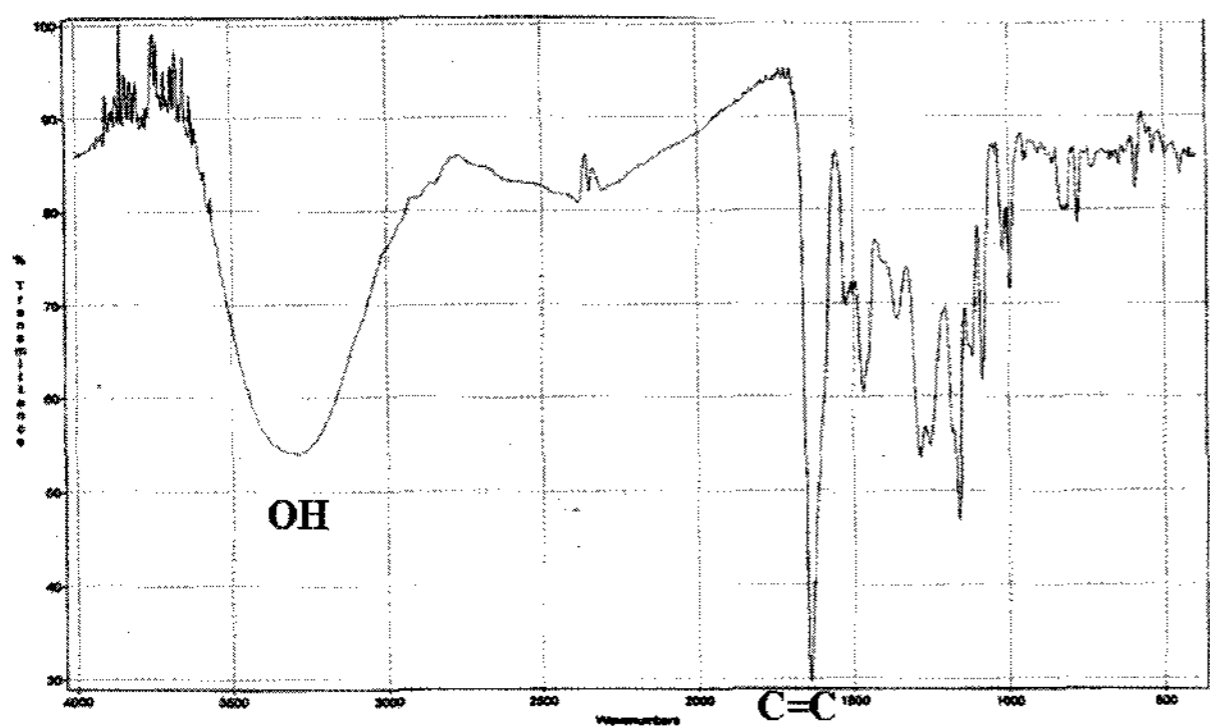


Fig. 14. FT-IR spectrum data of compound 2 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

2) 화합물 2의 구조분석

화합물 2를 분석한 결과는 Fig. 13~18과 같으며, 화합물 2는 백색 분말이며, aromatic 영역에는 ABX계 시그널 한쌍,

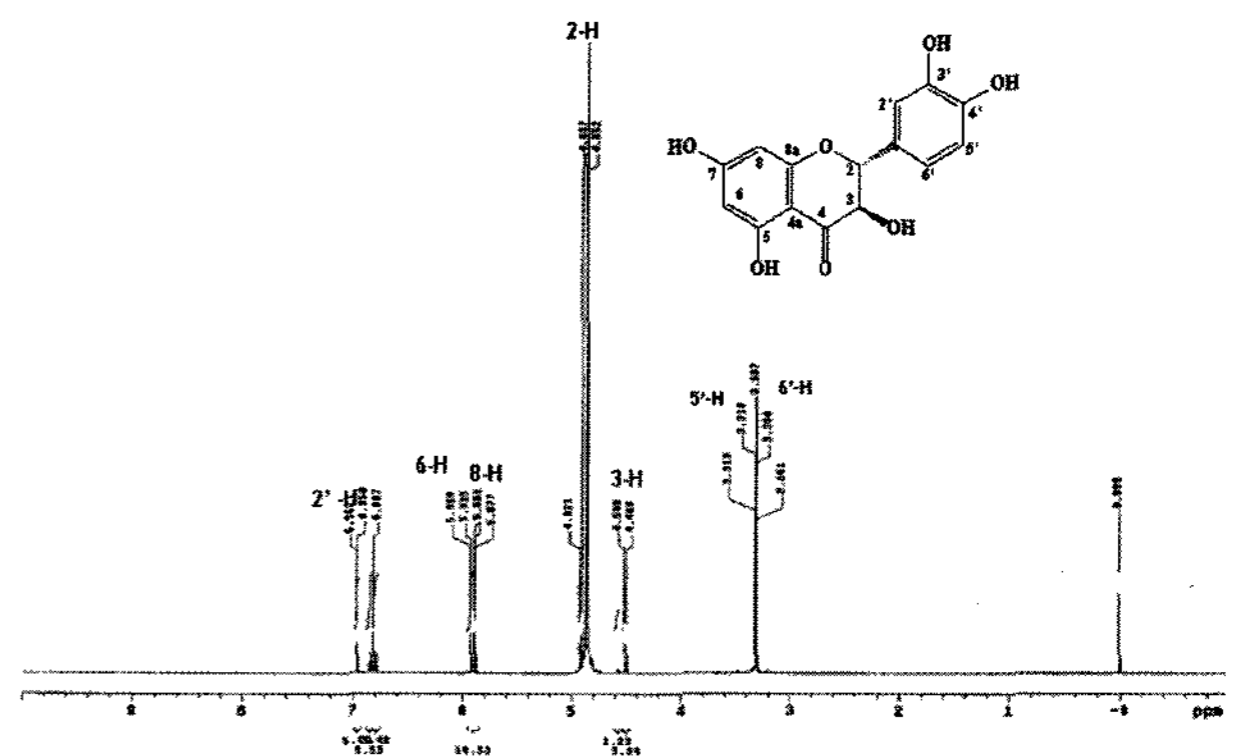


Fig. 15. 1H -NMR spectra of compound 2 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

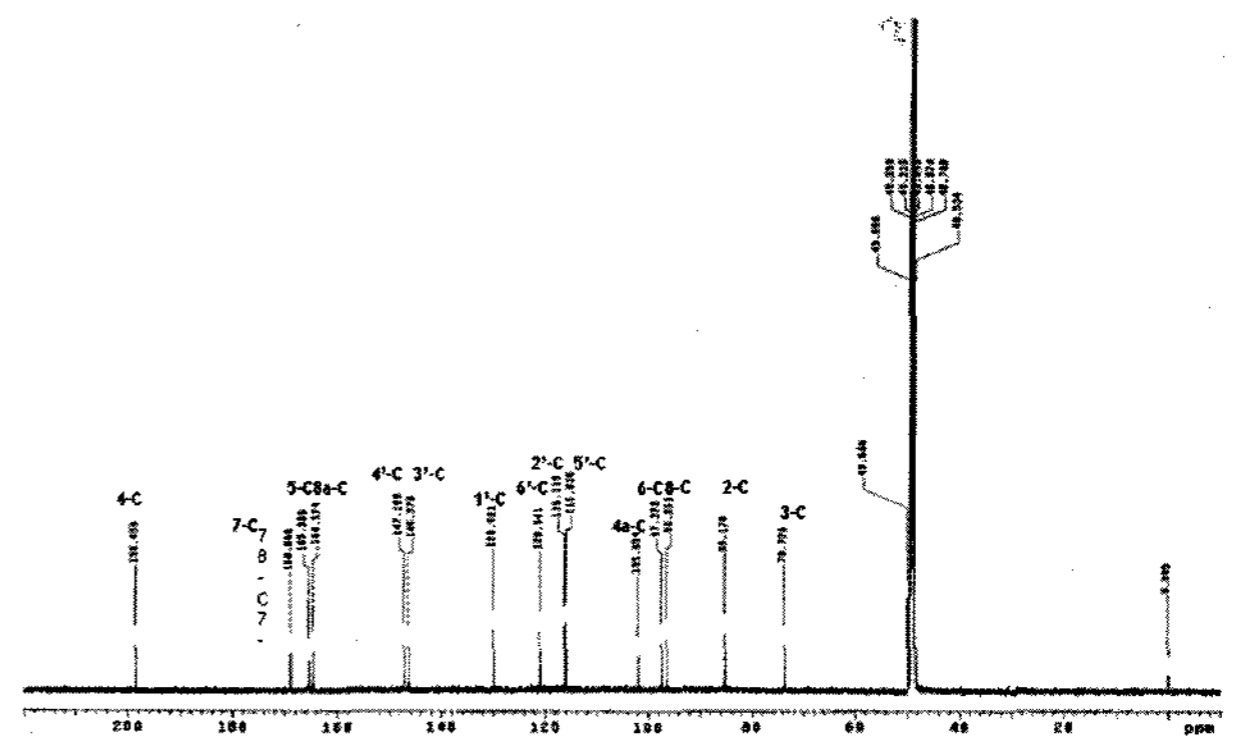


Fig. 16. ^{13}C -NMR spectra of compound 2 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

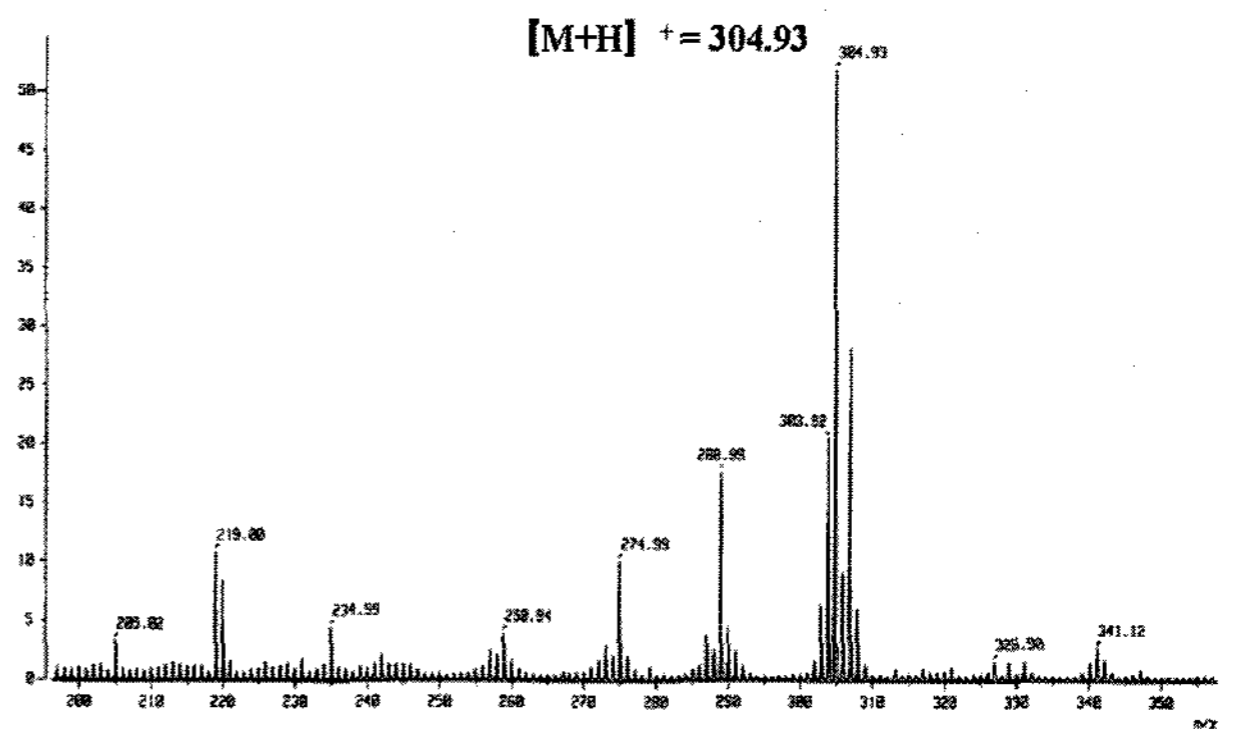
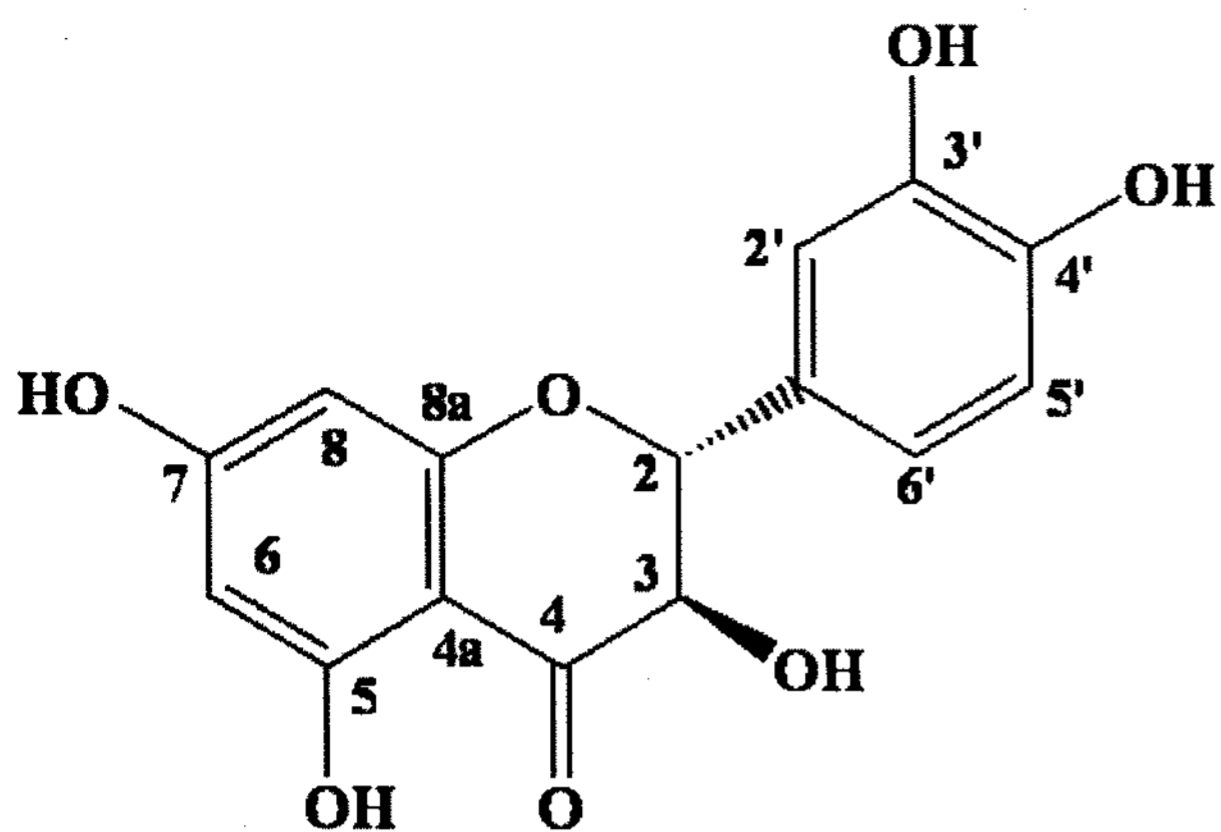


Fig. 17. Mass spectra of compound 2 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

meta coupling한 시그널 2개와 2개의 oxygenated proton이 관찰되었으며, 이는 플라보노이드계 화합물임을 시사했다. 본 화합물의 ^{13}C -NMR 데이터 및 FAB Mass로부터의 분자식을 고려하여 본 화합물은 Fig. 18에 나타난 구조의 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavanone, 즉 dihydroquercetin인 taxifolin임이 증명되었다.



$C_{15}H_{12}O_7$ taxifolin

Fig. 18. Chemical structures of compound 2 isolated from bark of *Prunus sargentii* R..

이상의 결과로부터 산벚나무 수피 메탄올 추출물로부터 2개의 구조를 확인하였다. (-)-epicatechin은 Xu *et al.* (2002)의 풀명자 (*Chaenomeles japonica* L.)와 Do *et al.* (1988)의 멧석딸기 (*Rubus parvifolius* L.) 등의 식물에서 분리되었으며, taxifolin은 Lee *et al.* (2004) 백합나무 (*Liriodendron tulipifera*)와 Wieslaw *et al.* (2002)의 유럽소나무 (*Pinus silvestris*) 등의 식물에서 분리 보고되었다. 단리된 (-)-epicatechin의 항산화 활성을 DPPH법, Ferric-Thiocyanate법, Rancimat법에 의해 실시한 결과 (-)-epicatechin은 대조군인 α -tocopherol 보다도 우수하고, BHA와는 유사 또는 우수한 항산화 효과를 보인다는 보고가 있으며 (Cha *et al.*, 2005), 분리된 taxifolin의 항산화활성을 조사한 결과 합성항산화제인 BHT나 천연항산화제인 α -tocopherol의 2배의 라디칼소거능을 나타내어 항산화활성이 우수하다는 보고가 있다 (Lee *et al.*, 2001).

적 요

산벚나무 수피의 radical 소거능과 항염증 효과가 보고되고 있어, 이를 이용하여 화장품원료로 이용하고자 분획물의 생리활성 및 안정성을 살펴보았다. 산벚나무 수피 추출물의 분획물 Fr. 5, 6, 7, 8, 9, 10의 경우 10 ppm에서 80% 이상의 효능을 보였으며, SOD 유사활성능의 경우 Fr. 5, 9의 경우 1,000 ppm에서 97%, 84%의 활성능을 보였다. Xanthine oxidase 저해능은 1,000 ppm에서 Fr. 9, 10의 경우 75, 78%의 효능을 보였다. 미백효과 검증으로 tyrosinase 저해능을 측정한 결과 1,000 ppm에서 Fr. 2와 9에서 72%, 68%의 효능을 나타내었다. 항염증과 관련된 hyaluronidase 저해능은

500 ppm의 농도 Fr. 8에서 98%의 저해능을 나타내었다. 산벚나무 수피를 70% 메탄올로 추출하고 그 추출물을 Sephadex LH-20과 MCI gel을 반복하여 분리정제 하였다. 분리된 활성물질을 HPLC, FT-IR, 1H , ^{13}C -NMR and FAB-Mass를 통하여 확인한 결과 화합물의 구조는 (-)-epicatechin과 taxifolin으로 결정하였다.

사 사

본 연구는 산업자원부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

LITERATURE CITED

- An BJ, Lee JT (1999) Cosmetic and biological novel materials. Budagaya Press. Seoul. p. 41-69.
- An BJ, Lee JT, Lee CE, Kim JH, Son JH, Kwak JH, Lee JY, Park TS, Bae HJ, Jang MJ, Jo C (2005) A study on physiological activities of *Coptidis Rhizoma* and application for cosmetic ingredients. Kor. J. Herbology. 20:83-92.
- An BJ, Lee JT, Lee CE, Kim YS (2006) Phytochemical. Sunmeongsa Press. Seoul. p. 15-23.
- Association of Analytical Chemists (1984) Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed. Washington (DC): Association of Analytical Chemists INC.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 26:1199-1120.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47:936-942.
- Cha BC, Lee EH (2004) Antioxidant and anti-inflammation activities of *Prunus persica* tree extracts. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 12:289-294.
- Cha BC, Lee EH, Noh MA (2005) Antioxidant activity of *Spatholobus suberectus* Dhnn. Kor. J. Pharmacogn. 36:50-55.
- Chae YM (1996) Chinese medicinal dictionary. Chinese medicine Press. Beijing. p. 260.
- Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim SC, Shibahara N, Park JC (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Phytomedicin. 10:544.
- Cho MJ, Park MJ, Lee HS (2007) Nitrite scavenging ability and SOD-like activity of a sterol glucoside from *Chrysanthemum coronarium* L. var. spatiosum. Kor. J. Food Sci. Technol. 39: 77-82.
- Cho YC, An BJ, Choi C (1993) Isolation and enzyme inhibition of tannins from Korean Green Tea. Kor. J. Biochem. 26:216-223.
- Choi J, Lee KT, Ha J, Yun SY, Ko CD, Jung HJ, Park HJ (2003) Anticiceptive and anti-inflammatory effects of Nigachigioside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. Biol. Pharm. Bull. 26:1436.

- Do JC, Son KH, Kang SS** (1988) Studies on the constituents of the roots of *Rubus parvifolius* (I). Isolation of (-)-epicatechin. Kor. J. Pharmacogn. 19 : 170-173.
- Gao H, Wu L, Kuroyanagi M, Harada K, Kawahara N, Nakane T, Umehara K, Hirasawa A, Nakamura Y** (2003) Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* K. and their activities in JB6 mouse epidermal cells. Chem. Pharm. Bull. 51:1318.
- Han BH, Han YN** (1978) Immuno-suppressant activity of cherry bark extract. J. Pharmacog Kor. 9:173-175.
- Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N** (1988) Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. J. Nat Prod. 51:345-348.
- Jin GS** (1992) A botanical list. Hakwon Press. Beijing. p. 1680-1681.
- Ju YC** (1989) The northeast medicinal plant. Amur river scientific Press. Beijing. p. 212-214.
- Jung S, Jusudurai C, Staton M, Du Z, Ficklin S, Cho I, Abbott A, Tomkins J, Main D** (2004) Genome database for Rosaceae (GDR) integrated web resources for Rosaceae genomics and genetics research. BMC Bioinformatics. 5:130.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS** (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. Kor J. Food Sci. Technol. 27: 891-896.
- Kang YH, Park YK, Lee GD** (1996) The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Kor J Food Sci Technol. 28:232.
- Kam WS** (1981) Pharmaceutical Botany. A national Chinese medicine institute. Seoul. p. 305-306.
- Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY** (1995) Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medical plants. Kor. J. Food Sci. Technol. 27:80-85.
- Kim JG** (1984) The original color nature medicines dictionary. Namsandang Press. Seoul. p. 160.
- Kim JG, Cho BG** (1995) A primary color pictorial book of the orient nature medicines. Yeonglimsa. Seoul. p. 165.
- Kim JO** (2005) In Illustrated Natural Drugs Encyclopedia (Color Edition). Yeokang Press. Seoul. p. 437.
- Kim KS** (2003) New material isolation and structural elucidation. Chosun Univ. Press. Korea. p. 193-251.
- Kim YJ** (1974) Medicinal resources botany. Dongmangsa Press. Seoul. p. 136.
- Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y** (2002) Oxyresveratrol and hydroxystibene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. J. Biol. Chem. 277: 163-164.
- Lee HJ, Lee SS, Choi DH, Atsushi Kato** (2001) Studies on biological activity of wood extractives (VI)-Flavonoids in heartwood of *Prunus sargentii*. Mokchae Konghak. 29:133-139.
- Lee HJ, Lee SS, Choi DH** (2003) Studies on biological activity of wood extractives (VII)-Antimicrobial and antioxidative activities of extractives from the heartwood of *Prunus sargentii*. Mokchae Konghak. 31:16-23.
- Lee YS, Lee HJ, Park Y, Park JI, Choi TH** (2004) Antioxidative constituents from the woods of *Liriodendron tulipifera*. Mokchae Konghak. 32:43-49.
- Lee JT, Jung SH, Jo WA, Kang BY, Choi EY, Jung YS, Son AR** (2005) A study on the materials of functional Korea herb cosmetics using *atractylodis rhizoma alba* and *saururi herba seu radix*. J. applied oriental medicine. 5:7-14.
- Lee SJ** (1976) Korea folk medicine. Seomoondang Press. Seoul. p. 116.
- Lee SS, Lee HJ, Choi DH** (2001) Studies on biological activity of wood extractives(7)-Antimicrobial and antioxidation activities of extractives from the heartwood of *Prunus sargentii*. Mokchae Konghak. 29:140-145.
- Ligaa U** (1996) A pictorial book of the medicinal plant. Korean society of Chunal manual medicine. Seoul. p. 22-23.
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM** (2004) Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal products. Kor. J. Med Crop Sci. 12:191-202.
- Marklund S, Marklund G** (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47:469-474.
- Matsuda H, Nakamura S, Kubo M** (1994) Studies of cuticle drugs from natural sources II. Inhibitory effects of prunus plants on melamin biosynthesis. Biol. Pharm. Bull. 17:1417.
- Oku H, Ueda Y, Ishifuro K** (2003) Antipruritic effects of the fruits of *Chaenomeles sinensis*. Biol. Pharm. Bull. 26:1031.
- Park SJ, Kang YK** (1996) Species identification of *Tripitaka Koreana*. Mokchae Konghak. 24:80-89.
- Reissig JL, Storminger JL, Leloir LF** (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217:959-966.
- Stirpe F, Della Corte E** (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J. Biol. Chem. 244:3855-3863.
- Wieslaw Oleszek, Anna Stochmal, Piotr Karolewski, Ana M, Simonet F, rancisco A, Macias Aldo Tava** (2002) Flavonoids from *Pinus sylvestris* needles and their variation in trees of different origin grown for nearly a century at the same area. Biochemical systematics and ecology. 30:1011-1022.
- Xu YN, Kim JS, Kang SS, Son KH, Kim HP, Chang HW, Bae K** (2002) Components from the roots of *Chaenomeles japonica*. Kor. J. Pharmacogn. 33:267-271.
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N** (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 3981:517-519.
- Yeo SG, Park YB, Kim IS, Kim SB, Park YH** (1995) Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. J. Kor. Soc. Food Nutr. 24:154-159.