

## 소목 추출물의 항균활성과 Brazilin의 구조분석

권현정 · 김용현 · 남궁우<sup>1</sup> · 김선기<sup>2</sup> · 방인석<sup>3</sup> · 한만덕\*

순천향대학교 생명과학과, <sup>1</sup>정산생명공학(주), <sup>2</sup>선바이오(주), <sup>3</sup>호서대학교 생명과학과

### Antibacterial Activities of *Caesalpinia sappan* L. Extract and Structural Analysis of Its Related Brazilin. Kwon, Hyun-Jung, Yong-Hyun Kim, Kung-Woo Nam<sup>1</sup>, Sun-Ki Kim<sup>2</sup>, In-Soek Bang<sup>3</sup>, Man-Deuk Han\*.

Department of Biology, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan Chungnam 336-745, Korea, <sup>1</sup>Jung San Bio Technology Co., Asan Chungnam 336-140, Korea, <sup>2</sup>Sunbio Co. Asan Chungnam 336-822, Korea, <sup>3</sup>Department of Biology, College of Natural Science, Hoseo University, Asan Chungnam 336-795, Korea – *Caesalpinia sappan* L. has long been commonly used in oriental folk medicines to treat diseases. To investigate the antibacterial effects from *C. sappan* L. heart wood, the MeOH soluble extract was successively fractionated by using hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, MeOH, and H<sub>2</sub>O. Among of these extracts, the EtOAc fraction which partitioned to 3.94% of the highest yields was to be the most active against all human pathogenic bacteria in this experiment. In addition, the antibacterial activities of the EtOAc fraction were more effective against Gram (+) bacteria compared to those against Gram (-) bacteria, which showed difference of the antibacterial activities against Gram (-) bacteria. To confirm the identity of the active substances, the EtOAc fraction was further separated by silica gel adsorption column, high performance liquid chromatography, and 98.48% purity of brazilin (1.67 mg)/ EtOAc (10 mg) fraction was obtained from 300 g of *C. sappan* L. heart wood. The isolated active substance was a single compound of yellow crystalline, and was identified as brazilin (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>) by MS, and <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. These results suggest that the brazilin in the EtOAc fraction from MeOH extract of *C. sappan* L. has a potential as a natural therapeutic agent against human pathogenic Gram (+) bacteria such as *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** *Caesalpinia sappan* L., ethyl acetate fraction, antibacterial activity, brazilin, structural analysis

## 서 론

소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 인도, 말레이시아, 중국 남부의 열대 아시아에 분포하는 낙엽 관목의 콩과(Liguminosae) 식물로 밝은 홍색을 띠는 심재를 약용 및 홍색염료로 사용한다. 소목 추출물에 관한 생리활성 연구로는, 항통증, 항염증[12], 조혈 강장, 거담, 통경[1, 32], 진정, 항경련, 진경[2, 31], 혈관이완[8, 41], 항동맥경화, 항보체활성[24], 면역조절[6], 면역관용의 유도[20], 항균[19, 39], 세포독성[27, 38], 항바이러스[4], 혈당저하[26, 42], 항산화[23, 9] 효과 등이 보고되었다. 특히 소목의 주 성분 가운데 약 2%를 차지하는 염료성 화합물은 무색의 flavonoid 구조를 갖는 brazilin이며, 이는 공기 중에 산화되어 brazilein이 된다[7, 9]. Brazilin은 Benz(b)-Indeno(2,1-d) pyran 유도체로 주로 염료나 산 및 알칼리 지시약 또는 식품첨가물 등으로 사용해 왔다[29]. 또한 한방에서 brazilin은 어혈로 인한 타박손상, 월경통, 월경폐색, 현훈, 출산 후 각종 증상에 사용해 왔다[2, 32, 35,

41]. Moon 등[21]은 brazilin이 고혈압에 효과가 있음을 보고하였고, Hwang 등[10]은 brazilin이 혈소판에서 칼슘농도를 조절함을 보고하였으며, Kim 등[14]은 혈액에서 brazilin의 혈당저하 작용을 보고하였다. 또한 Lee 등[16]은 brazilin이 그늘음제(tanning agent) 효과가 있다고 보고하였다. 그 외 소목의 주요성분으로는 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, hematein, sappanin, volatile oils, protosappanin A, B, E 등이 밝혀졌다[43].

인간은 의료, 식품, 축산 등의 분야에서 세균을 통제하기 위해 수많은 항생물질을 개발하여 왔다. 그러나 최근 화학 합성 항생제에 내성을 가지는 균주가 증가함으로써 새로운 문제로 대두되고 있으며, 이를 극복 할 수 있는 새로운 천연 항생물질의 개발이 요구되고 있다. 즉 기존의 항생제는 다른 작용메커니즘을 통하여 항생제 내성 균주에 항균효과를 나타내야 하며, 사용 후 분해가 잘 되어 체내나 자연계에서 잔류성의 위험이 없는 환경 친화적 항균제 개발이 필요하다[25, 36, 40]. 최근 식물에는 다양한 항균물질에 대한 연구가 활발한데[3, 15], 식물에 들어 있는 항균물질은 alkaloid류, flavonoid류, terpenoid류, phenolic compound류, quinone류 및 volatile oil 등의 2차 대사산물이거나 그 유도체들로 알려 졌다[11]. 그럼에도 이들 항균물질은 기존의 항생물질에

\*Corresponding author

Tel: 82-41-530-4702, Fax: 82-41-530-1256

E-mail: mdhan@sch.ac.kr

비해 항균 활성이 적어 현재 실용화는 미미하나 연구 개발의 잠재성은 매우 크다.

본 연구는 소목의 심재로부터 MeOH 추출에 따른 일련의 유기용매 및 H<sub>2</sub>O 분획에서 인체병원성 세균에 대한 항균활성 효과를 알아보고, 이에 대한 효과가 우수한 분획을 정제하여 MS 및 NMR을 통하여 항균활성 물질의 본체 규명을 하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 소목은 서울 경동시장에서 건조물을 구입하여 선별한 후 실험에 사용하였다.

### 사용 균주 및 배지

소목의 유기용매 별 분획의 항균활성에 사용한 인체 병원성 균주는 *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 속의 Gram (+) 세균 6종과 Gram (-) 세균 14종을 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양 받아 사용하였다. 모든 균주에 대한 생육 배지로 Brain heart infusion(Difco, USA) 액체배지를 사용하였고, 항균활성 실험은 Müller Hinton agar(Difco, USA) 고체배지를 사용하였다.

### 항균활성 물질의 추출

건조 소목의 심재를 300 g에 대한 중량의 3배 분량인 methanol(MeOH)을 첨가하여 4°C에서 72시간 냉침 시킨 후, Whatman No. 2로 여과하여 회전 감압농축기(Rotavapor, Büchi RE-111, Switzerland)를 사용해 45°C 항온수조(Büchi B-485, Switzerland)에서 감압 농축시켰다. 농축한 MeOH 추출물과 물, 그리고 *n*-hexane의 비율이 1 : 9 : 10(v/v)이 되도록 혼합하여 용매가 잘 섞이도록 반복적으로 강하게 흔들어 준 혼합물을 12시간 동안 정제하여 *n*-hexane 층과 물 층이 분리되도록 하였다. 하층에 형성된 물 층은 다른 분액깔때기에 보관하고, 유기용매 *n*-hexane을 동일한 방법으로 첨가하여 3회 반복하여 추출하였다. 분리된 *n*-hexane 층은 45°C에서 감압 농축하여 소목의 *n*-hexane 분획물을 얻었다. *n*-hexane 층과 분리된 하층에는 chloroform(CHCl<sub>3</sub>)를 1:1(v/v)로 가한 다음, 3회 반복 추출하여 45°C에서 감압 농축하여 CHCl<sub>3</sub> 분획물을 얻었다. 이와 같은 방법으로 ethyl acetate(EtOAc), *n*-butanol(*n*-BuOH), 및 MeOH 분획물 순으로 용매의 극성을 이용한 순차적 분획 시료를 얻었다. 또한 소목의 열수추출은 유기용매로 추출하고 남은 잔사에 1차 증류수를 넣어 100°C에서 30분간 끓인 후 동일한 방법으로 여과 및 감압 농축하여 최종적으로 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었으며, 각각의 분획물은 멸균한 dimethyl sulfoxide(DMSO) 용액을 용매로 하여 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용

하였다.

### 분획 별 항균활성 측정

유기용매 및 H<sub>2</sub>O 분획물에 대한 항균활성은 평판배지에서 연속 희석법에 의한 최소저해농도(MIC; minimum inhibitory concentration)로 측정하였다. 각 분획물의 최초 농도를 10 mg/mL로 1/2이 되도록 연속하여 17단계까지 희석하여 Müller hinton agar 배지에 혼합하여 각 농도 별 plate를 만들었다. 각각의 균주가 접종된 Brain heart infusion 액체배지에서 37°C에서 18~24시간 동안 배양하여 560 nm에서 O.D.값 0.6으로 흡광도를 조절하여 replicator(Oxoid, USA)를 이용하여 각각의 균주를 배지에 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양하여 균이 증식하지 않은 농도를 육안으로 확인하였다. 대조군으로는 gentamicin sulfate(Sigma, USA)를 실험군과 동일한 방법으로 점적시켰다.

### 항균활성 물질의 정제

상기의 수율과 항균활성이 가장 높은 EtOAc 분획물에 대하여 silica gel adsorption column 및 high performance liquid chromatography로 항균활성 물질을 정제 확인하였다. Silica gel(300 g, 200~400 mesh, Merck)을 CHCl<sub>3</sub>: MeOH (15: 1, V/V)로 slurry를 만들어 column에 충전 시킨 후, CHCl<sub>3</sub>-MeOH 용매계의 MeOH 농도를 순차적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 용출하였다. 수득한 5개의 분획물 중 3번째 부-분획물은 Hexane : EtOAc(1:2, 1:3)을 이용하여 다시 4개의 하위 분획으로 나누었다. 수득한 하위분획 중 2번째 하위분획을 sephadex LH-20를 이용하여 column chromatography한 후 다시 ethyl ether로 재결정하였다. 재결정된 단일 peak의 활성 fraction을 C<sub>18</sub> reversed-phase column에 MeOH-water(1: 4, V/V) 용매계에서 MeOH 농도를 증가시켜 1 mL/min의 유속으로 240 nm의 UV 검출기가 장착된 HPLC(Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 순도를 측정하였다.

### 항균활성 물질의 구조분석

정제된 활성물질의 질량분석은 LCMS-IT-TOF mass spectrometer(Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 MS에 직접 주입(direct injection)하여 대기압 화학 이온화(Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) 방식으로 negative mode를 측정하였다. 정확한 구조분석을 위하여 충돌유도해리(collisions-induced dissociation, CID) 방식으로 target ion을 작은 조각으로 깨뜨려 각각의 조각 이온의 패턴 및 구조를 확인하기 위해 MS, MS/MS, MS/MS/MS까지 측정하여 각각을 identification함으로써 구조를 확인하였다. 구조분석을 위한 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR은 JNM-LA 400 spectrometer(Jeol Co., Japan)로 용매는 CD<sub>3</sub>OD를 사용하였으며 내부표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다.

결과 및 고찰

유기용매 및 H<sub>2</sub>O 분획물의 수율

소목의 심재 300 g에서 얻어진 14.51 g의 MeOH 추출물을 *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, MeOH, 및 열수로 순차 분획한 결과, 각 분획물의 수율은 Table 1과 같이 나타났다. 소목의 *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, MeOH, 및 열수 분획물은 각각 0.013%, 0.07%, 3.94%, 0.17%, 0.41%, 0.08%로 나타나, CHCl<sub>3</sub>의 수율이 가장 낮았고 EtOAc 분획물의 수율이 3.94%로 가장 높았다.

분획물의 항균활성 검색

6가지의 소목 분획물의 인체 병원성 세균에 대한 MIC 농도를 측정하여 항균활성 효과를 알아본 결과(Table 2), EtOAc 분획물에서 Gram (-) 균주 보다 Gram (+) 균주 모두에 대하여 특히 높은 활성을 보였으며, Gram (-) 균주에 대해서는 균주에 따른 항균력이 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 Shin 등[34]이 소목의 ethanol 추출물이 병원성 미생물에 대하여 항균효과가 매우 높으며, *S. aureus*에 대해서 가장 우수하다고 보고한 결과와 일치하였다. 또한 Lee 등[18]이 *E. coli*와 *S. aureus* 등에 성장억제 효과가 있으며, 조 등[5]이 *E. coli*에 대하여 높은 항균성을 밝힌 내용과도 일치함을 알 수 있다. 항균활성 물질을 추출할 때 추출온도, 용매농도, 및 용매의 종류에 따라 항균력에 차이가 난다[28]. Rivero-Cruz[30]의 12가지의 병원성 세균 및 진균에 대한 실험

Table 1. Yield of various fractions obtained from the total MeOH extract<sup>1</sup> of *C. sappan* L. heart wood.

Extraction	Dried weight (g)	Yield (%) <sup>2</sup>
<i>n</i> -Hexane fraction	0.38	0.13
CHCl <sub>3</sub> fraction	0.21	0.07
EtOAc fraction	11.83	3.94
<i>n</i> -Butanol fraction	0.50	0.17
MeOH fraction	1.23	0.41
H <sub>2</sub> O fraction	0.25	0.08

<sup>1</sup>MeOH extract (14.51 g) obtained from 300 g of *C. sappan* L.

<sup>2</sup>Yield (%) =  $\frac{\text{Dried weight of extract fraction (g)}}{\text{Dried weight } C. \text{ sappan } L. \text{ (g)}} \times 100$

결과와 소목의 MeOH 추출물이 *Porphyromonas gingivalis* 균주에서 8.7 µg/mL의 농도에서 우수한 항균활성 효과가 있는 것으로 보고하였고, Lee[17]의 연구에서는 EtOAc 분획물이 가장 높은 항균활성을 보고하였다. 본 결과에서는 조사된 모든 균주에 대하여 EtOAc 분획물에서 가장 높았으며, 다음으로는 MeOH, H<sub>2</sub>O 분획물 순으로 항균활성 효과를 보였다. 따라서 EtOAc 분획물에서 항균활성이 집중되어 활성 본체의 순수분리를 우선 시도하였다.

항균활성물질의 분리

항균활성이 우수하고 수율이 가장 높은 EtOAc 분획물(11.83 g)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 용매계를 이용한 silica gel adsorption

Table 2. Minimum inhibitory concentrations of *C. sappan* L. fraction extract on the growth of human pathogenic bacteria.

Strains	MIC (mg/mL)						GEN* (µg/mL)
	IP-1	IP-2	IP-3	IP-4	IP-5	IP-6	
<i>Streptococcus pyogenes</i> A308	0.32	2.56	0.04	5.16	0.64	0.08	0.20
<i>Streptococcus pyogenes</i> A77	0.64	2.56	0.04	5.16	0.64	0.16	0.05
<i>Streptococcus faecium</i> MD8b	1.28	2.56	0.04	2.56	1.28	0.16	0.40
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	0.64	1.28	0.02	2.56	0.32	0.04	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> 285	0.64	1.28	0.02	5.16	0.32	0.04	0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> 503	0.64	1.28	0.02	2.16	0.32	0.04	0.05
<i>Escherichia coli</i> O 78	1.28	2.56	0.32	10.24	1.28	0.32	0.40
<i>Escherichia coli</i> DC 0	2.56	2.56	0.16	10.24	1.28	0.32	0.40
<i>Escherichia coli</i> DC 2	1.28	5.16	0.16	5.16	1.28	0.64	0.40
<i>Escherichia coli</i> TEM	2.56	5.16	0.16	5.16	2.56	0.64	0.40
<i>Escherichia coli</i> 1507E	2.56	5.16	0.64	5.16	1.56	0.64	0.40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	2.56	10.24	0.64	10.24	2.56	1.28	0.79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1592E	2.56	5.16	1.28	10.24	2.26	1.28	0.79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771	2.56	5.16	1.28	10.24	1.28	1.28	0.40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771M	2.56	2.56	0.64	5.16	1.28	0.64	0.40
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.28	5.16	0.64	10.24	0.64	0.64	0.40
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1082E	1.28	5.16	1.28	5.16	0.64	0.64	0.40
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E	1.28	5.16	0.64	2.56	0.64	1.28	0.40
<i>Enterobacter cloacae</i> P99	2.56	10.24	1.28	10.24	1.28	1.28	0.20
<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E	2.56	10.24	0.64	10.24	1.28	1.28	0.20

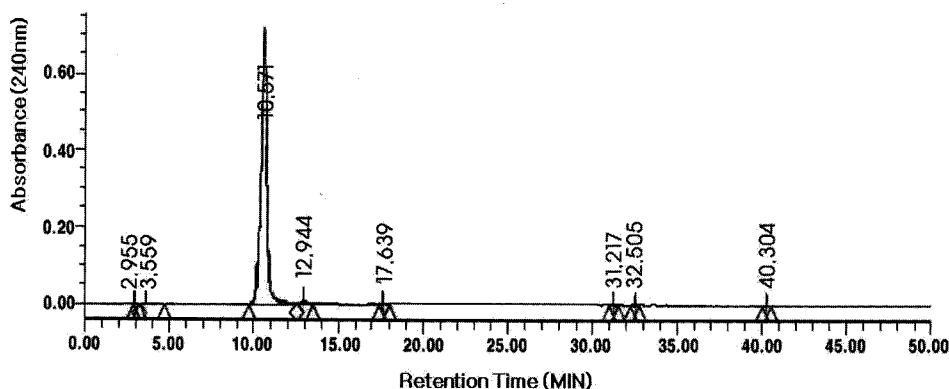
\*GEN: gentamicin (as positive control).

column chromatography로 용출 분획한 결과, 33% MeOH 용출 분획에서 항균활성이 나타났다. 이어 Hexane-EtOAc (1:2; 1:3)으로 column chromatography한 2번째 활성 분획을 Sephadex LH-20를 이용하여 column chromatograph하여 분자량에 따라 분리하였다. 주요 성분을 HPLC로 확인하여 수득한 후 ethyl ether에서 재결정하여 단일 물질을 분리하였다. 분리된 단일물질을 HPLC에 의한 분석결과 retention time이 10.57분에서 주요 peak를 나타내는 순도 98.48%의 단일물질 brazilin(350 mg)을 분리하였다(Fig. 1).

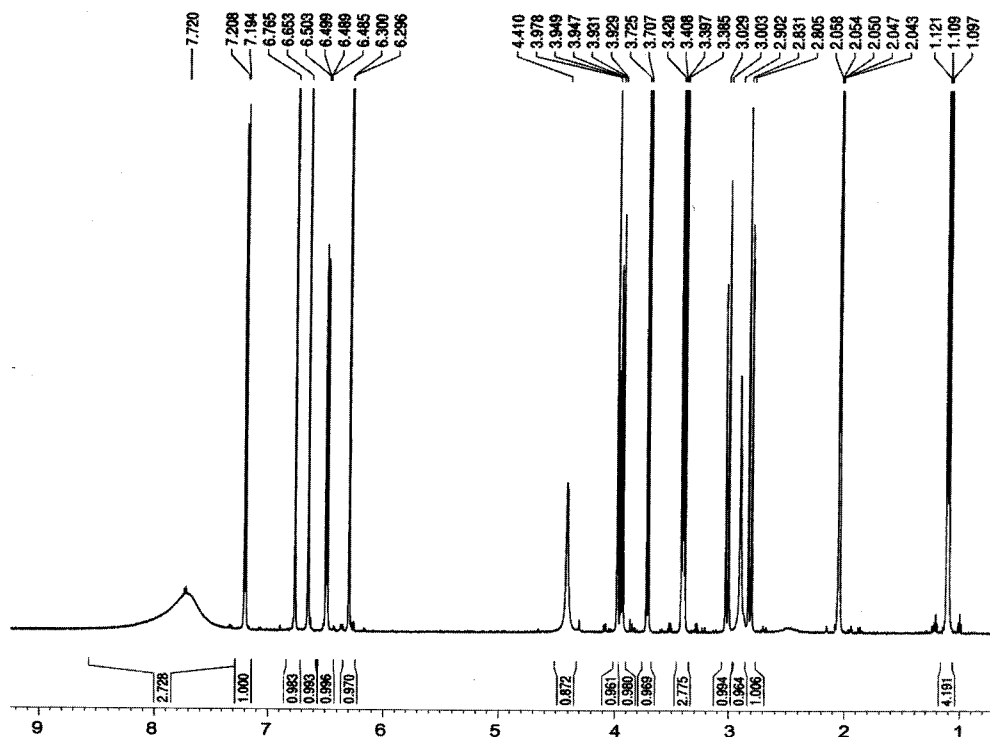
**분리된 물질의 구조확인(구조분석)**

소목의 EtOAc 분획물에서 최종 정제된 활성물질은 UV

288.3nm에서 최대 흡수피크를 나타내었으며, NMR spectrum과 LCMS-IT-TOF MS system을 통해 분석하였다. 그 결과 <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) spectrum에서는 7.06(1H, d, J=8.8 Hz, H-1), 6.61(1H, s, H-8), 6.50(1H, s, H-11), 6.36(1H, dd, J=2.4, 8.8 Hz, H-2), 6.20(1H, d, J=2.4 Hz, H-4), 3.86(1H, br. s, H-12), 3.82(1H, dd, J=1.2, 11.2 Hz, H-6), 3.58(1H, d, J=11.2 Hz, H-6), 2.92(1H, d, J=15.6 Hz, H-7), 2.65(1H, d, J=15.6 Hz, H-7)로 나타났으며(Fig. 2), <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>C</sub>) spectrum에서는 157.69(C-4a), 155.61(C-3), 145.52(C-9), 145.20(C-10), 137.41(C-11a), 132.21(C-1), 131.34(C-7a), 115.52(C-1a), 112.88(C-8), 112.42(C-11), 109.96(C-2), 104.24(C-4), 78.05(C-6a),



**Fig. 1. HPLC chromatogram of the active substance.** The active substance in the EtOAc fraction from MeOH extract of *C. sappan* L. was final purified by HPLC using C<sub>18</sub> reversed-phase column with eluted fraction from silica gel absorption column.



**Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the active substance of *C. sappan* L. heart wood.**

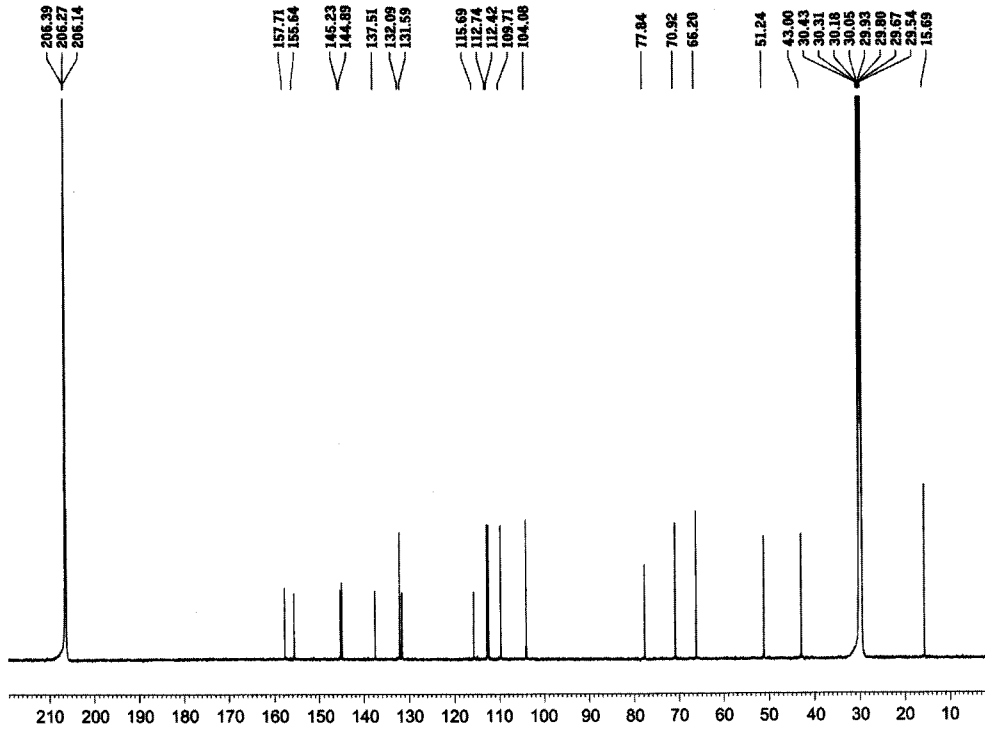


Fig. 3.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the active substance of *C. sappan* L. heart wood.

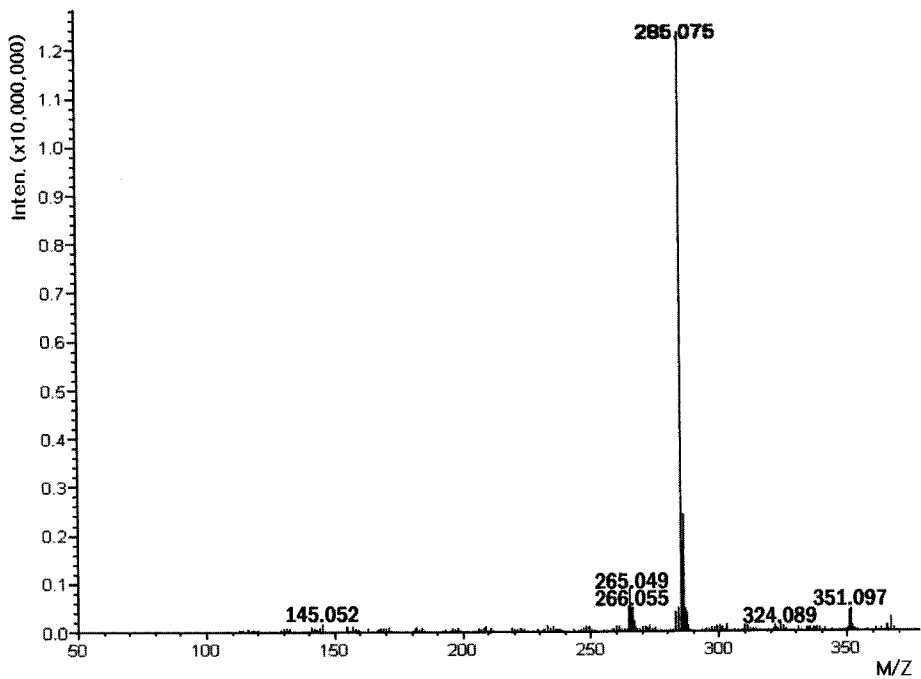


Fig. 4. MS spectrum of the active substance of *C. sappan* L. heart wood.

70.77(C-6), 50.95(C-12), 42.79(C-7)로 나타났고(Fig. 3), MS 분석결과 Fig. 4와 같이 molecular ion( $\text{M}^+$ )이 m/z 285.075로 나타났다. 이상의 MS 및  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR의 분석에 의해 소목의 EtOA 분획물에서 분리된 항균활성 물질은 분자량 285, 분자식  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ 인 brazilin으로 동정되었다(Fig. 5).

소목의 유기용매 별 분획에서 brazilin은 주로 EtOAc 분획에 존재하였으며, 인체에 유해한 병원성 Gram (+) 세균에 우수한 항균력이 있어 천연 항균제로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

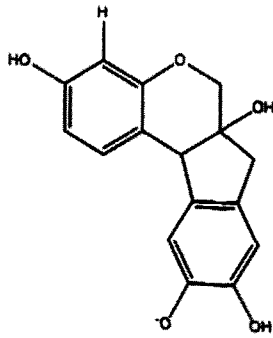


Fig. 5. Structure of brazilin elucidated by MS and NMR spectrum in *C. sappan* L. heart wood.

## 요 약

소목은 전통적으로 타박상, 염증 등의 질병치료를 위해 민간의학에서 오래 동안 사용되어 온 한약재이다. 소목의 심재로부터 항균효과를 조사하기 위하여 MeOH 추출에 의한 hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, MeOH 및 H<sub>2</sub>O 분획을 얻었다. 분획 시료 중 3.94%의 가장 높은 수율의 EtOAc 분획이 조사된 인체 병원성 세균에 대해 가장 강한 항균활성을 나타냈다. 또한 EtOAc 분획의 항균활성은 Gram (-) 균주보다 Gram (+) 균주에 더 효과적이며, Gram (-) 균주에 대해서는 세균에 따른 항균활성의 차이를 보였다. EtOAc 분획은 silica gel adsorption column chromatography 및 Sephadex LH-20을 이용하여 분리하였으며 수득한 주요 성분은 재결정을 통하여 얻어진 단일물질을 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였다. 300g의 *C. sappan*으로부터 3.94%의 EtOAc분획을 얻었으며 EtOAc분획물은 분석한 결과 10 mg에는 1.67 mg의 brazilin을 포함하였다. 분리된 활성물질은 옅은 황색 결정의 단일 화합물로 MS에 의해 분자량이 285로 나타났으며, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR에 의한 구조분석으로 brazilin(C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>)을 동정하였다. 이 같은 결과는 소목의 MeOH 추출에 의한 EtOAc 분획에 존재하는 brazilin이 *S. aureus*와 같은 인체 병원성 Gram (+) 균주에 대한 생약치료제로 활용이 가능할 것을 시사한다.

## REFERENCES

1. Badami, S., S. Moorkoth, S. R. Rai, E. Kannan, and S. Bhojraj. 2003. Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heart wood. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 1534-1537.
2. Baek, N. I., S. G. Jeon, E. M. Ahn, J. T. Hahn, J. H. Bahn, J. S. Jang, S.W. Cho, J. K. Park, and S. Y. Choi. 2000. Anticonvulsant compounds from the wood of *Caesalpinia sappan* L. *Arch. Pharmacol. Res.* **23**: 344-348.
3. Beuchat, L. R. and D. A. Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* **43**: 134-138.
4. Chiang, L. C., W. Chiang, M. C. Liu, and C. C. Lin. 2003. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**: 194-198.
5. Cho, J. Y., I. Choi, and E. K. Hwang. 2003. Antimicrobial activity of extracts from medicinal herbs against *Escherichia coli*. *Korea J. Vet. Res.* **43**: 625-631.
6. Choi, S. Y., K. M. Yang, S. D. Jeon, J. H. Kim, L. Y. Khil, T. S. Chang, and C. K. Moon. 1997. Brazilin modulates immune function mainly by augmenting T cell activity in halothane administered mice. *Planta. Med.* **63**: 405-408.
7. de Oliveira, L. F. C., H. G. M. Edwards, E. S. Velozo, and M. Nesbitt. 2002. Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilin, the main constituents of brazilwood from Brazil. *Vib. Spectrosc.* **28**: 243-249.
8. Hu, C. M., J. J. Kang, C. C. Lee, C. H. Li, J. W. Liao, and Y. W. Cheng. 2003. Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin. *Eur. J. Pharmacol.* **468**: 37-45.
9. Huang, K. C., 1993. The pharmacology of Chinese herbs. America CRC Press. 266.
10. Hwang, G. S., J. Y. Kim, T. S. Chang, S. D. Jeon, D. S. So, and C. K. Moon. 1998. Effects of Brazilin on the phospholipase A2 activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelets. *Arch. Pharm. Res.* **21**: 774-778.
11. Kang, J. M., I. H. Cha, Y. K. Lee, and H. S. Ryu. 1997. Identification of volatile essential oil, and flavor characterization and antimicrobial effect of fractions from *Houttuynia cordata thunb.* *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 209-213.
12. Kim, D. S., N. I. Baek, S. R. Oh, K. Y. Jung, I. S. Lee, and H. K. Lee. 1997. NMR assignment of brazilin. *Phytochemistry.* **46**: 177-178.
13. Kim, K. J., H. H. Yu, S. I. Jeong, J. D. Cha, S. M. Kim, and Y. O. You. 2004. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* **91**: 81-87.
14. Kim, S. G., Y. M. Kim, L. Y., Khil, S. D. Jeon, D. S. So, C. H. Moon, and C. K. Moon. 1998. Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver. *Arch. Pharm. Res.* **21**: 140-146.
15. Lee, B. W. and D. H. Shin. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**: 200-204.
16. Lee, K. T. and J. H. Kim. 1997. Brazilin as a new sunless tanning agent. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **23**: 82-85.
17. Lee, S. G. 2003. Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* against animal husbandry disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 242-249.
18. Lee, S. H., W. S. Moon, and K. N. Park. 2000. Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. extracts and its effect on preservation of ground meats. *J. Kor. Soc. Food sci. Nutr.* **29**: 888-892.
19. Lim, M. Y., J. H. Jeon, E. Y. Jeong, C. H. Lee, and H. S. Lee. 2007. Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1,4-naphtho-

- quinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria. *Food Chem.* **100**: 1254-1258.
20. Mok, M. S., S. D. Jeon, K. M. Yang, D. S. So, and C. K. Moon. 1998. Effects of brazilin on induction of immunological tolerance by sheep red blood cells in C57BL/6 female mice. *Arch. Pharmacol. Res.* **21**: 769-773.
  21. Moon, C. K., K. S. Park, S. G. Kim, H. S. Won, and J. H. Chung. 1992. Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl<sub>3</sub>-induced toxicity. *Drug Chem. Toxicol.* **15**: 81-91.
  22. Namikoshi, M., H. Nakata, M. Nuno, T. Ozawa, and T. Saitoh. 1987. Homoisoflavonoids and related compounds. III. Phenolic constituents of *Caesalpinia japonica* SIEB. Et ZUCC. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 3568-3575.
  23. Nguyen, M. T., S. Awale, Y. Tezuka., J. Y. Ueda, Q. Tran, and S. Kadota. 2006. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*. *Planta. Med.* **72**: 46-51.
  24. Oh, S. R., D. S. Kim, I. S. Lee, K. Y. Jung, J. J. Lee, and H. K. Lee. 1998. Anticomplementary activity of constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*. *Planta. Med.* **64**: 456-458.
  25. Otvos, L. Jr. 2000. Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.* **6**: 497-511.
  26. Parameshwar, S., K. K. Srinivasan, and C. M. Rao. 2002. Oral antidiabetic activities of different extracts of *Caesalpinia bonducella* seed kernels. *Pharm. Biol.* **40**: 590-595.
  27. Park, K. J., S. Yang, Y. A. Eun, S. Y. Kim, H. H. Lee, and H. Kang. 2002. Cytotoxic effects of Korean medicinal herbs determined with hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharm. Biol.* **40**: 189-195.
  28. Park, U. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herbs extracts. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**: 91-96.
  29. Puchtler, H., S. N. Meloan, and F. B. Waldrop. 1986. Application of current concepts to metal-hematein and -brazilein stains. *Histochemistry.* **85**: 353-364.
  30. Rivero-Cruz, J. F. 2008. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *J. Ethnopharmacol.* **119**: 99-103.
  31. Rodriguez-Lopez V., L. Salazar, and S. Estrada. 2003. Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. *Fitoterapia.* **74**: 725-728.
  32. Safitri, R., P. Tarigan, H. J. Freisleben, R. J. Rumampuk, and A. Murakami. 2003. Antioxidant activity in vitro of two aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* L. *Biofactors.* **19**: 71-77.
  33. Saitoh, T., S. Sakashita, H. Nakata, T. Shimokawa, J. Kinjo, J. Yamahara, M. Yamasaki, and T. Nohara. 1986. 3-Benzylchroman derivatives related to brazilin from *Sappan lignum*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 2506-2511.
  34. Shin, D. H., M. S. Kim, and J. S. Han. 1997. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 808-816.
  35. Shin, D. W. 2003. Screening and using of antioxidative effect and antimicrobial activity from plant. *Food Science industry.* **36**: 81-89.
  36. Sitaram, N. and R. Nagaraj. 2002. Host-defense antimicrobial peptides: Importance of structure for activity. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 727-742.
  37. Son, E. J., J. H. Kim, H. A. Kim, S. H. Baek, Y. H. Kho, M. R. Kim, and C. H. Lee. 2003. A Caspase inducing inhibitor isolated from *Caesalpinia sappan*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **35**: 680-683.
  38. Ueda, J. Y., Y. Tezuka, A. H. Banskota, Q. L. Tran, Q. K. Tran, Y. Harimaya, I. Saiki, and S. Kadota. 2002. Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 753-760.
  39. Woldemichael, G. M., M. P. Singh, W. M. Maiese, and B. N. Timmermann. 2003. Constituents of antibacterial extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk. *Z. Naturforsch.* **58**: 70-75.
  40. Wu, M., E. Maier, R. Benz, and R. E. Hancock. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **38**: 7235-7242.
  41. Xie, Y. W., D. S. Ming, H. X. Xu, H. Dong, and P. P. But. 2000. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* Involvement of endogenous nitric oxide. *Life Sci.* **67**: 1913-1918.
  42. You, E. J., L. Y. Khil, W. J. Kwak, H. S. Won, S. H. Chae, B. H. Lee, and C. K. Moon. 2005. Effects of brazilin on the production of fructose-2,6-bisphosphate in rat hepatocytes. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 53-57.
  43. Zhao, H., H. Bai, Y. Wang, W. Li, and K. A. Koike. 2008. New homoisoflavan from *Caesalpinia sappan*. *Nat. Med.* **62**: 325-327.

(Received Jan. 13, 2010/Accepted Feb. 24, 2010)