

총 설

Oxyresveratrol의 기원, 생합성, 생물학적 활성 및 약물동력학

임영희 · 김기현¹ · 김정근^{1,*}

고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부, ¹한국산업기술대학교 생명화학공학과

Source, Biosynthesis, Biological Activities and Pharmacokinetics of Oxyresveratrol

Young-Hee Lim, Ki-Hyun Kim¹, and Jeong-Keun Kim^{1,*}

School of Biosystem and Biomedical Science, Korea University

¹Department of Chemical Engineering and Biotechnology, Korea Polytechnic University

Abstract Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) has been receiving increasing attention because of its astonishing biological activities, including antihyperlipidemic, neuroprotection, antidiabetic, anticancer, antiinflammation, immunomodulation, antiaging, and antioxidant activities. Oxyresveratrol is a stilbenoid, a type of natural phenol and a phytoalexin produced in the roots, stems, leaves, and fruits of several plants. It was first isolated from the heartwood of *Artocarpus lakoocha*, and has also been found in various plants, including *Smilax china*, *Morus alba*, *Varatrum nigrum*, *Scirpus maritimus*, and *Maclura pomifera*. Oxyresveratrol, an aglycone of mulberroside A, has been produced by microbial biotransformation or enzymatic hydrolysis of a glycosylated stilbene mulberroside A, which is one of the major compounds of the roots of *M. alba*. Oxyresveratrol shows less cytotoxicity, better antioxidant activity and polarity, and higher cell permeability and bioavailability than resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene), a well-known antioxidant, suggesting that oxyresveratrol might be a potential candidate for use in health functional food and medicine. This review focuses on the plant sources, chemical characteristics, analysis, biosynthesis, and biological activities of oxyresveratrol as well as describes the perspectives on further exploration of oxyresveratrol.

Keywords: oxyresveratrol, stilbenoid, biosynthesis, biological activity, phamacokinetics

서 론

Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene)은 4개의 수산기를 갖는 스틸베노이드(stilbenoid)로 식물이 미생물의 침입에 의한 생물학적 스트레스 및 자외선, 상처 등의 물리적 스트레스가 있을 때 자신을 보호하기 위해 만드는 파이토알렉신(phytoalexin)이다(Fig. 1). Oxyresveratrol은 열대지방의 *Artocarpus lakoocha*의 심재(heart wood)에서 최초로 분리되었으며(1) 이후 뽕나무(*Morus alba*), 청미래덩굴(*Smilax china*), 오세이지 오렌지(*Maclura pomifera*), 참여로(*Varatrum nigrum*) 등의 가지 및 뿌리에서 확인되었다(2-5). Oxyresveratrol 제조법은 3,5-다이하이드록시아세토펜론(dihydroxyacetophenone)을 출발물질로 하는 합성법 이외에 뽕나무에 다량 함유된 글리코사이드인 멀베로사이드(mulberroside) A로부터 효소가수분해에 의한 생물전환 방법으로 비교적 쉽게 제조할 수 있다(6).

최근 oxyresveratrol은 항산화(7), 항고지혈(8,9), 항당뇨(10), 항암(11,12), 항염증(13), 항바이러스(14), 뇌신경보호(15), 미백효과

(16,17), DNA 손상회복(18), 간 보호 기능(19) 등의 다양한 생리 기능이 'French paradox' 물질로 잘 알려진 resveratrol 보다 우수한 것으로 알려지면서 큰 관심을 끌고 있다. 따라서 본 review에서는 oxyresveratrol을 생성하는 식물, 물리적 성질 및 합성, 생합성과정, 분석법, 다양한 약물학적 특성, 건강 기능성 식품으로의 전망 등에 대하여 기술하였다.

Oxyresveratrol를 생성하는 식물

Oxyresveratrol은 열대지방의 "Monkey fruit 혹은 Monkey Jack"으로 알려진 *A. lakoocha*의 심재(heart wood)로부터 최초로 분리되었다(1). 식물 중에서 스틸베노이드를 생산하는 과(family)로는 뽕나무과(Moraceae), 포도과(Vitaceae), 백합과(Liliaceae), 청미래덩굴과(Smilacaceae), 사초과(Cyperaceae) 등이 알려져 있다. 이들 중에서 oxyresveratrol을 생산한다고 알려진 종(species)은 뽕나무과의 *A. lakoocha*, *A. heterophilus*, *A. gomezianus*, *M. alba* (백상), *M. bombycis* (산상), *M. lhou Koidz* (노상), *Cudrania tricuspidata* (꾸지뽕), *M. pomifera*, 청미래덩굴과의 *S. china*, *S. glabra*, *S. kampestris*, 백합과의 *V. grandiflorum*, 사초과의 *Scirpus maritimus* 등이며 이들의 잎, 가지, 뿌리, 열매에서 oxyresveratrol의 존재가 확인되었다(2-5,20-22). 최근 oxyresveratrol을 생산하기 위해 가장 많이 연구되는 식물 중은 수천 년간 중국, 한국, 일본, 태국, 터키 등에서 전통의약품으로 사용해온 뽕나무 백상(*M. alba*)이다(23-26).

*Corresponding author: Jeong-Keun Kim, Department of Chemical Engineering and Biotechnology, Korea Polytechnic University, Siheung 15073, Korea

Tel: 82-31-8041-0615

Fax: 82-31-8041-0629

E-mail: kjkim@kpu.ac.kr

Received April 6, 2015; revised July 2;

accepted August 12

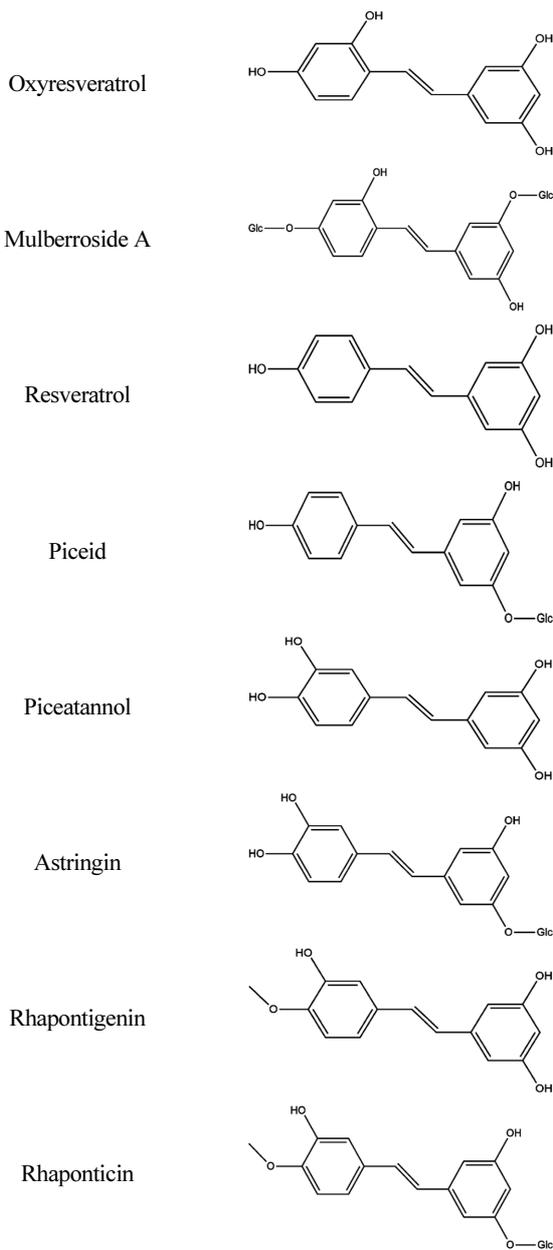


Fig. 1. A variety of stilbene derivatives.

Oxyresveratrol의 생합성 과정

식물에서 스틸베노이드의 합성은 페닐알라닌(phenylalanine) 혹은 타이로신(tyrosine)을 출발점으로 phenylalanine/폴리말로네이트(polymalonate) 경로로 합성된다(Fig. 2). Phenylalanine은 phenylalanine ammonia lyase (PAL)에 의해 cinnamic acid로 되고 이는 시남산-4-하이드록시화효소(cinnamate-4-hydroxylase) (C4H)에 의해 파라하이드록시시남산(*p*-hydroxycinnamic acid)로 전환된다. Tyrosine은 tyrosine ammonia lyase (TAL)에 의해 *p*-hydroxycinnamic acid로 전환된다. 이와 같이 형성된 *p*-hydroxycinnamic acid는 4-coenzyme A ligase (4CL)에 의해 파라쿠마로일(*p*-coumaroyl) CoA로 전환되고 이는 3개의 말로닐(malonyl) CoA와 스틸벤합성효소(stilbene synthase) (STS)에 의한 축합반응에 의해 레스베라트롤(resveratrol)로 합성되는데 이 과정이 전체 반응속도를 결정한다

다(27). 합성된 resveratrol은 산화에 의해 oxyresveratrol로 되고 이는 글리코실기전달효소(glycosyltransferase)에 의해 당화되어 최종적으로 mulberroside A를 합성한다(28,29). Stilbene synthase는 분자량 90 kDa으로 45 kDa의 소단위 두개로 구성된 단백질이며 플라보노이드 합성효소인 chalcone synthase와는 아미노산 homology가 65% 이상 유사하다(30).

한편, 포도나무 재배지에 존재하는 높은 농도의 중탄산나트륨은 철분 부족을 유발시키는데 포도나무의 철분 결핍은 phenylalanine 합성의 시킴산(shikimate) 경로를 활성화하여 resveratrol 합성을 촉진한다. 따라서 석회석 스트레스 하에서 성장시킨 포도에는 정상조건의 포도보다 약 5.5배의 resveratrol과 피세아탄올(piceatannol) 양이 증가하였다(31). 식물내의 resveratrol, piceatannol 함량은 수확 후의 숙성 기간에 따라 5-50배 이상 증가하였다(32). 또한 포도의 resveratrol 양은 수확 후 수분의 감소에 따라 급격히 증가하였는데 이는 수분의 감소에 따라 stilbene synthase 발현량의 증가에 의한 것으로 보고되었다(33). 포도를 수확한 후 자외선 C의 조사는 resveratrol, piceatannol 양을 1.5-2배 증가시켰다(34). 이는 스틸벤 물질의 함량이 재배지의 환경, 수확 후의 수분 함량 및 효소에 의한 후숙에 의해 증가 될 수 있음을 나타낸다.

뽕나무의 경우, 상백피(*Mori Cortex*)는 oxyresveratrol보다 배당체인 mulberroside A의 양이 더 많은 것으로 나타났다. 그러나 상지(*M. Ramulus*)는 oxyresveratrol 함량이 mulberroside A 보다 높게 나타났으며 oxyresveratrol은 품종, 지역, 계절에 따라 함량이 크게 차이를 보였다(26,29).

Oxyresveratrol의 물리적 성질 및 제조

국제 순수·응용화학연합(IUPAC)의 명명법에 따른 oxyresveratrol의 공식명칭은 4-[(*E*)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol이고 약칭은 *trans*-2,3',4,5'-테트라하이드록시스틸벤(tetrahydroxystilbene)이다. Oxyresveratrol은 분자내의 스타이렌(styrene) 이중결합 때문에 트랜스(*trans*) 혹은 시스(*cis*)형의 이성질체로 발견되는데 *trans*형이 더 안정하고 약효도 높다. Oxyresveratrol은 C₁₄H₁₂O₄의 분자식을 갖는 분자량 244.24 g/mol의 열은 노란색 분말로 CAS 번호 29700-22-9의 물질이다. Oxyresveratrol은 밀도 1.468 g/cm³, 녹는점 201°C, 끓는점 523.8°C, 인화점 260.9°C, 굴절률 1.8, 최대흡수 파장 329 nm의 물리적 성질을 갖는 물질로 -20°C 암소에서 2년 이상 안전하게 보관할 수 있다. Oxyresveratrol의 용매에 대한 용해도는 메탄올(methanol) 406.6 mg/mL, 다이에틸에테르(diethylether) 355.3 mg/mL, 에탄올(ethanol) 328 mg/mL, 아이소부탄올(isobutanol) 173.5 mg/mL, 1-헥산올(hexanol) 114.1 mg/mL로 유기용매에서 용해도가 높은 반면 물과 인산 완충액(pH 7.2)에서는 각각 0.64 mg/mL, 0.1 mg/mL의 낮은 용해도를 보인다. Oxyresveratrol의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과, 알칼리 용액에서는 불안정하여 0.01 N NaOH (pH 10.5)의 용액에서 쉽게 분해되었다.

알려진 oxyresveratrol 합성법은 출발물질인 3,5-dihydroxyacetophenone을 methylation하여 3,5-다이메톡시페닐아세트산(dimethoxyphenylacetic acid)를 얻고 이를 Willgerodt-Kindler 반응에 의해 3,5-dimethoxyacetophenone을 제조한다. 이로부터 Perkin 축합반응에 의해 *E*-2,3-diacryrylic acid를 제조한 후 decarboxylation하여 *cis*-stilbene 중간체를 만들고 이를 demethylation과 isomerization 공정을 거쳐 oxyresveratrol을 제조한다(Fig. 3). 이 합성법의 수율은 30% 이었지만 *trans*형의 oxyresveratrol 제조를 위한 특이적인 합성법으로 편리하고 경비 절감적이다(35). 한편, Kim 등(6)은 뽕나

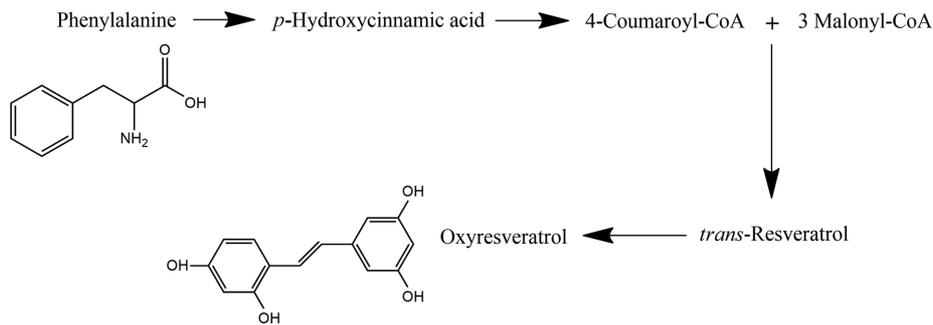


Fig. 2. Biosynthesis of resveratrol and oxyresveratrol via the phenylalanine/polymalonate pathway (27).

무 뿌리인 상백피로부터 추출된 배당체 mulberoside A를 Pectinex 효소로 가수분해하여 oxyresveratrol를 제조하였다. Oxyresveratrol의 정제는 실리카겔 칼럼을 사용하여 ethylacetate와 petroleum ether (1:1)용액으로 분획하였다. 농축된 정제분획은 물에서 재결정한 후 80°C에서 진공 건조하여 무수 oxyresveratrol을 제조하였다(36).

Oxyresveratrol의 확인 및 분석

Oxyresveratrol의 정량 분석법으로는 gravimetry, capillary zone electrophoresis, thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) 등이 알려져 있으나 HPLC 분석법이 가장 일반적으로 사용된다. HPLC에 의한 분석법으로 Mei 등(37)은 diode array detector, Alltech Alltima™ C₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm), 210-380 nm, 25°C, 1 mL/min 조건하에서 이동상의 용매 A는 증류수(0.1% formic acid 포함), 용매 B는 methanol을 사용하여 용매 B를 5%부터 100%까지 상승시키며 38분 동안 기울기 용리하였다. 또 다른 방법으로 Zorbax Eclipse SB-C₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm), 303 nm, 30°C, 1 mL/min의 조건하에서 이동상 용매 A는 methanol, 용매 B는 증류수를 사용하여 용매 A:B=29:71로 분석하였다(38). Zhou 등(29)은 Hypersil BDS C₁₈ (200×4.6 mm, 5 μm), 320 nm, 40°C, 1.0 mL/min 조건에서 이동상 용매 A는 acetonitrile, 용매 B는 증류수(1.0% 액상 formic acid 포함, v/v)를 용매 A:용매 B (5:95, v/v)에서 용매 A:용매 B (30:70, v/v)로 25분간 기울기 용리하였다. Maneechai 등(39)은 phenyl-hexyl (150×4.6 mm), 254 nm, 0.1 mL/min, 이동상은 methanol:증류수=8:2의 조건을 사용하였다. Oxyresveratrol 투여 후 쥐 소변 중의 oxyresveratrol 정량은 Luna C₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm), 320 nm, 0.6 mL/min, 이동상 용매 A는 acetonitrile, 용매 B는 증류수(0.04% formic acid 포함)를 30:70의 조건으로 행하였다(40). Oxyresveratrol과 같이 4개의 수산기를 함유하고 있는 piceatannol의 분석은 Kingsorb S5 C₁₈ (250×4.6 mm), Perkin Elmer LS 30 fluorescence detector, excitation과 emission wavelength (345, 405 nm), 1.5 mL/min, 이동상 용매 A는 acetonitrile, 용매 B는 증류수(0.04% formic acid 포함)를 25:75의 조건에서 행하였다(41).

한편, *A. lakoocha*내의 oxyresveratrol의 확인 및 정량에는 TLC densitometric 방법이 사용되었다. 분석 조건은 TLC aluminum sheet (silica gel 60 F₂₅₄ plate, 20×10 cm), 전개용매는 methylene chloride:methanol=85:15를 사용하고, TLC scanner를 사용하여 254 nm에서 분석하였다(39).

Oxyresveratrol의 생물학적 활성

Oxyresveratrol의 항고지혈증 효과

고지혈증(hyperlipidemia)은 혈액 내 lipid 수준이 정상보다 높은 수준으로 심혈관 질병(cardiovascular disease)의 주된 원인이다. 동맥경화증(atherosclerosis)에 의한 관상동맥질환(coronary heart disease), 뇌졸중(stroke), 심근경색(myocardial infraction), 뇌경색(cerebral infraction)과 같은 심혈관 질병을 예방하기 위해서는 콜레스테롤의 축적 억제와 low density lipoprotein cholesterol (LDL)의 산화 억제가 필요하다. 고지혈증 치료법으로 혈액 내 총콜레스테롤(total cholesterol)과 LDL의 수준은 낮추고 HDL (high density lipoprotein cholesterol) 수준은 높이는 약물이 이용되는데 현재 LDL 산화를 억제하는 물질인 스타틴 계열의 약물이 주로 이용된다. 그러나 스타틴 계열의 물질은 횡문근융해증(rhabdomyolysis), 근육통(myalgia), 간과 신장의 기능장애 등의 다양한 부작용이 있어 이러한 부작용이 적은 항고지혈증 물질의 개발은 매우 필요한 실정이다(8).

최근 고지혈증을 감소시키기 위한 물질로 식물로부터 유래된 천연물질인 phytochemical에 대한 연구가 많이 진행되어 스틸벤, 플라보노이드, 카테킨 등의 항산화력을 갖는 물질로부터 LDL 감소와 LDL의 산화억제 효과가 확인되었다. Alloxan으로 당뇨를 유도한 토끼에 1 mg/kg의 resveratrol과 그 유도체들을 40일간 투여 후 고지혈증 효과를 검토한 결과, resveratrol 유도체가 resveratrol보다 총 콜레스테롤과 LDL을 감소시켰고 HDL은 증가시켰다(42). 한편, Jo 등(43)은 oxyresveratrol의 유도체인 라폰티게닌(rhapontigenin)을 고콜레스테롤 식이 쥐에 투여한 시험에서 총 콜레스테롤과 LDL, triglyceride 양은 현저히 감소하였으나 HDL은 감소하지 않는 결과를 얻었다. 또한 고콜레스테롤 식이 쥐에게 5 mg/kg oxyresveratrol을 투여한 시험에서 oxyresveratrol 투여 쥐는 LDL, 총콜레스테롤, triglyceride 양이 현저히 감소하나 HDL은 증가하는 결과를 얻었다. 특히 oxyresveratrol 섭취군의 간세포를 조사한 결과 고콜레스테롤 투여에 의해 형성되었던 지방구가 거의 사라진 것으로 나타났다(8). Oxyresveratrol의 4종의 스틸벤 물질을 사용하여 간에서 콜레스테롤 합성의 율속인자(rate limiting factor)인 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase)와 squalene synthase의 저해 활성을 비교한 결과, rhapontigenin과 oxyresveratrol의 저해 활성이 우수하게 나타났다(9). 따라서 oxyresveratrol 혹은 oxyresveratrol를 다량 함유한 상지 주정추출물은 고지혈증 개선 약품 혹은 건강 기능성 식품으로서 개발 가능성이 클 것으로 사료된다.

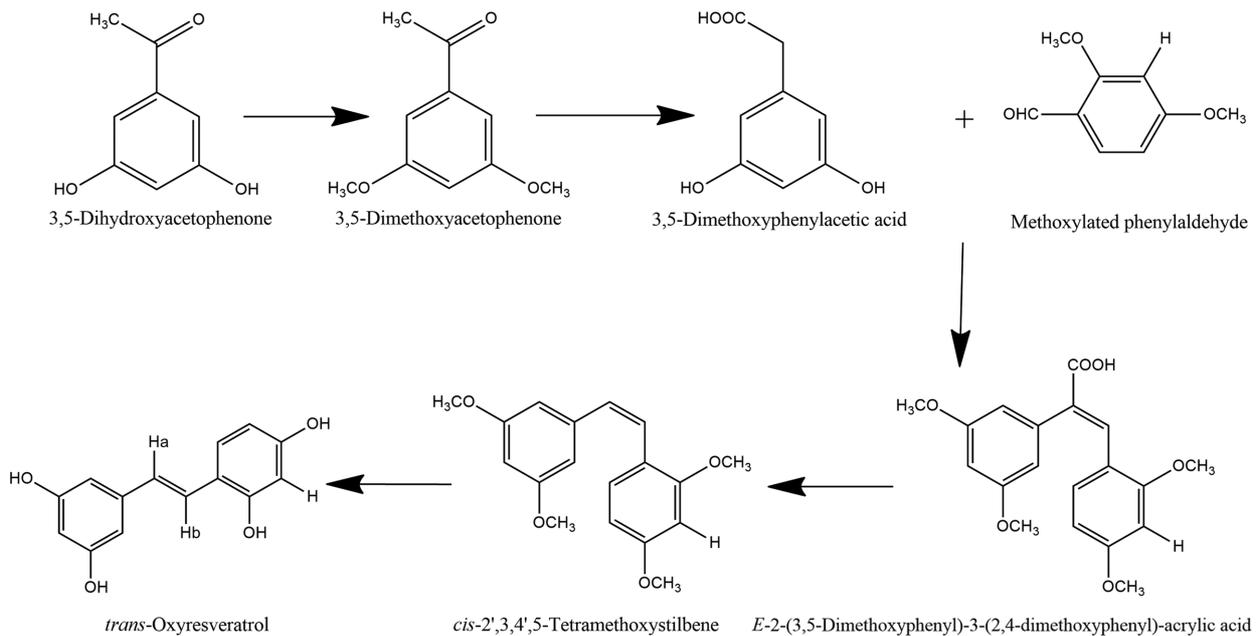


Fig. 3. The synthetic route of oxyresveratrol (36).

Oxyresveratrol의 신경 보호 효과

신경세포(neuron)의 퇴화에 기인하여 발생된 신경세포퇴행성 질환은 파킨슨병과 같은 운동 장애 질환과 알츠하이머 질환과 같은 실어증(aphasia), 기억상실(amnesia), 인지불능증(agnosia), 운동 불능(apraxia) 등의 다기능장애로 나타난다. 조직병리학 연구에 따르면 알츠하이머의 일반적인 특징은 뇌에 tau 단백질과 베타아밀로이드 펩타이드(β -amyloid peptide)의 과도한 축적이다. β -Amyloid의 축적은 amyloid 플라크 형성과 neurofibrillary 엉킴을 유도하여 염증을 일으키고 뇌독성 경로를 활성화하여 뇌세포의 파괴 혹은 기능장애로 나타난다(44). 아직까지 이 질병들은 증상을 완화시키는 것 이외의 확실한 치료법이나 예방법이 개발되지 않아 스틸벤, 플라보노이드, 카테킨 등의 천연물로부터 예방 및 치료제를 개발하기 위한 연구가 집중되고 있다.

뇌경색(cerebral stroke)후의 뇌손상 감소효과를 측정하기 위해 뇌 허혈성 모델(rat middle cerebral artery occlusion)의 쥐에 oxyresveratrol (10 혹은 20 mg/kg)을 복강 내 주입한 결과, 뇌출혈성 경색(brain infarct)의 크기가 54, 63% 각각 감소하였다. 또한 oxyresveratrol의 투여는 세포사멸의 지표인 cytochrome C, caspase-3, 그리고 뇌 안의 세포사멸 핵수가 현저히 감소하였다(15).

조직 배양된 쥐 cortical neuron을 사용하여 β -amyloid 유발 신경독성에 대한 oxyresveratrol의 효과를 검토한 결과, oxyresveratrol은 Ca^{2+} 증가를 억제함에 의해 β -amyloid에 의해 유발되는 뇌세포 손상 억제, ROS (reactive oxygen species) 발생 억제, glutamate 방출 억제 등의 효과를 보여 신경보호 약물로서의 가능성이 최초로 확인되었다(45). 뇌손상이 있는 쥐와 뇌손상이 없는 쥐를 사용하여 oxyresveratrol의 혈액-뇌 장벽 통과율을 조사한 결과, 뇌손상이 있는 쥐의 oxyresveratrol 투과율이 6배 높게 나타났다. 따라서 oxyresveratrol은 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier) 통과가 가능하여 뇌경색시 산화적인 스트레스에 의해 나타나는 퇴행성 뇌 질환 치료를 위한 상호보완적인 약물이 될 수 있음이 증명되었다(46). Jeon 등(47)은 *S. rhizoma*의 추출물이 β -secretase 저해 활성이 높은 것을 확인하고 이로부터 resveratrol, oxyresveratrol, veraphenol, scirpusin 등의 물질을 분리 정제하였다. 이들 물질 중

oxyresveratrol은 비경쟁적(non-competitively) 억제제로 K_i 5.4×10^{-6} M, IC_{50} 7.6×10^{-6} M이었으며 resveratrol 보다 약 2배 강한 저해활성을 나타내었다. Chao 등(48)은 neuron 독성 물질인 6-hydroxydopamine을 neuroblastoma SH-SY5Y 세포에 처리한 후 oxyresveratrol과 resveratrol의 neuron 보호 효과를 비교하였다. 이 실험에서 oxyresveratrol은 resveratrol보다 세포 파괴의 지표 효소인 lactate dehydrogenase와 caspase-3 활성을 현저히 감소시켰고 반면에 SIRT1 함량은 크게 증가시키는 것으로 나타나 oxyresveratrol이 resveratrol 보다 파킨슨 질환 치료 물질로 더 가능성이 크다고 보고하였다.

Oxyresveratrol, resveratrol, piceatannol 등의 스틸벤류들과 curcumin을 사용하여 β -amyloid 형성 억제에 의한 신경보호 효과를 *in vitro* 모델에서 검토한 결과, ϵ -veniferin glucoside가 93%로 가장 우수하였으며 resveratrol은 63%, oxyresveratrol은 32%, piceatannol은 25%의 순서로 나타나 oxyresveratrol보다 resveratrol이 β -amyloid 형성 억제 효과가 우수한 것으로 나타났다(49). Weber 등(50)은 neuron과 glia를 동시 배양한 *in vitro* stretch-induced trauma 모델에 glutamate를 높은 농도로 노출시킨 후 oxyresveratrol의 효과를 조사하였다. 사전 실험에서 외상 후 oxyresveratrol의 처리는 현저한 세포 사멸을 억제한 것으로 나타났으나 높은 농도의 glutamate에 노출 후 oxyresveratrol의 처리는 세포 사멸을 억제하지 못하였다.

Oxyresveratrol의 암 예방 및 항암 효과

2012년 WHO의 보고에 따르면 암은 전 세계적으로 5년 내 진단받은 누적 환자수가 3,260만 명, 일년 내 새롭게 발병된 환자수가 1,410만 명, 일 년에 이 질병으로 사망한 숫자가 820만 명인 질병이다. 최근 역학조사에 따르면 특정 암의 발생률과 포도주, 과일, 채소 등의 건강식품을 늘 섭취한 사람과는 상반되는 경향이 나타나 암을 예방(chemopreventive)하는 식품에 대한 연구가 많이 진행 중에 있다.

Jang 등(51)에 의해 resveratrol의 암예방(cancer chemopreventive) 활성이 최초로 보고된 후 다양한 암 예방 및 항암 연구가

진행되었다. Resveratrol의 analogues를 사용한 항암효과 시험에서 resveratrol보다 항암 활성은 높고 정상세포에 대한 세포 독성은 낮은 다양한 물질들이 확인되었다(52-55). Tan 등(56)은 뽕나무인 *M. wittiorum*의 줄기 껍질을 추출 정제하여 얻은 9종의 물질 중 oxyresveratrol이 인간 난소암 세포와 위암 세포에 대한 세포독성이 IC₅₀ 0.66, 1.31 μM로 각각 나타나 가장 우수하다고 보고하였다. 인간 결장암 세포인 HT-29를 사용한 실험에서 oxyresveratrol이 resveratrol과 piceatannol보다 높은 세포독성을 나타내었다. HT-29 cell의 세포독성은 apoptosis에 기인한 것으로 caspase와 Bax의 활성화, Bcl2와 COX-2 (cyclooxygenase)는 하향 조절되었다(57). 이상의 결과에서와 같이 oxyresveratrol은 지금까지 많은 연구가 진행된 resveratrol 보다 높은 암 예방효과와 항암효과를 가지고 있어 암 예방 및 항암 건강 기능성 식품으로 개발 가능성이 크다고 사료된다.

Oxyresveratrol의 항당뇨 효과

당뇨병은 복잡한 대사성 질환으로 type 1과 type 2로 구분된다. Type 1 당뇨병은 췌장 β cell의 자가 면역반응에 의한 파괴로부터 초래되는 인슐린 의존성 질환으로 전체 당뇨 환자의 10% 미만이다. Type 2 당뇨병은 인슐린 민감성(insulin sensitivity), 포도당 저항성(glucose tolerance), 인슐린 분비(insulin secretion)등의 작용기작에 결함이 발생하여 나타나는 질환으로 당뇨병 환자의 90% 이상을 차지한다. 현재 항당뇨 치료제로는 인슐린을 비롯하여 α-glucosidase 억제제, sulfonylurea, biguanide 등이 사용되고 있지만 이들 모두 심각한 부작용을 가지고 있어 최근 항당뇨 활성을 갖는 새로운 천연물에 대한 요구가 증가하고 있다(42).

마우스에서 resveratrol 섭취는 생명연장 단백질로 알려진 SIRT1과 PGC-1α를 활성화하여 미토콘드리아 기능 향상, 대사질환으로부터 보호, 당대사와 인슐린 분비작용이 있다고 보고되었다(58-61). 또한, 4개의 hydroxy기를 갖고 있는 oxyresveratrol의 이성질체인 piceatannol은 당 대사에 중요한 역할을 하는 adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)의 활성화와 glucose transport 4의 이동을 원활하게 하여 항당뇨 효과를 나타내었다(62).

마우스를 사용한 혈당효과 시험에서 oxyresveratrol은 α-glucosidase 활성을 억제하여 type 2 당뇨병을 예방하고 치료할 수 있는 효과를 보였다. Oxyresveratrol과 mulberroside A를 다량 함유한 뽕나무 가지 껍질을 30% 에탄올에 추출한 건조물의 α-glucosidase와 sucrase의 IC₅₀ 값은 8.0과 0.24 μg/mL로 나타났다. Oxyresveratrol을 type 2형 마우스에 식사와 함께 투여한 후 식후 고혈당(postprandial hyperglycemia)의 조절을 조사한 결과, 혈당이 현저히 감소한 결과를 나타내어 당뇨병 치료제로서의 가능성이 제시되었다(63). 당화(glycation)는 포도당 및 과당과 같은 당 분자와 단백질 혹은 지방이 비효소적 공유 결합을 하는 것으로 당뇨병을 일으키는 중요한 인자로 알려져 있는데 oxyresveratrol의 항당화 활성은 aminoguanidine (IC₅₀: 10±0.08 μg/mL)의 1/5인 2.0±0.03 μg/mL를 나타내어 유용한 당뇨병치료제로 개발될 수 있을 것으로 보고되었다(64).

Oxyresveratrol의 항말라리아, 항세균, 항진균, 항바이러스 효과

Oxyresveratrol은 식물이 세균, 곰팡이, 바이러스, 곤충 등의 침입에 의한 생물학적 스트레스가 있을 때 자신을 보호하기 위해 만드는 피토폰알렉신으로 다양한 미생물에 대하여 살균 및 증식억제 작용을 갖는다. Oxyresveratrol은 항말라리아 치료제인 chloroquine에 내성을 갖는 *P. falciparum* 3D7에 대한 *in vitro* 항말라리아

시험에서 IC₅₀ 0.05 μg/mL의 강한 항말라리아 활성을 보였다(65). 또한 Swiss 마우스를 사용한 *in vivo* 실험에서 ED₅₀은 10.26 mg/kg으로 항말라리아 효과가 매우 우수한 것으로 나타났다. 따라서 oxyresveratrol은 기존의 chloroquine에 내성을 보이는 말라리아균에 대한 항말라리아 약으로의 사용 가능성이 제시되었다.

피부병의 원인이 되는 진균인 *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum gypsum*, *Epidermophyton floccosum* 등에 대한 oxyresveratrol의 MIC (minimum inhibitory concentration)는 대략 2.0 mM로 보고되었다(66). Senapong 등(67)이 *A. lakoocha* 건조 추출물(oxyresveratrol 함량 80% 이상 (w/w))을 사용하여 11종 *Candida*에 대한 항진균 활성을 측정 한 결과 MIC는 0.05-3.12 mg/mL, MFC (minimum fungicidal concentration)는 0.10-25 mg/mL이었고 바이오필름 형성을 억제하였다. 따라서 *A. lakoocha* 추출물은 *Candida*증 치료 및 예방을 위한 약물로의 개발 가능성이 있다고 보고하였다.

뽕나무로부터 oxyresveratrol, 2-arylbenzofuran, cyclomorusin, morusin, kuwanon C 등을 분리하여 이들 물질의 *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. flavus*, *S. faecalis*, *S. abony*, *P. aeruginosa* 등 6개 미생물에 대한 MIC를 측정 한 결과 oxyresveratrol의 MIC는 125-250 μg/mL 수준을 보였다(68). 한편, 치주염의 원인균으로 알려진 혐기성 그람 음성균인 *P. gingivalis*와 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 oxyresveratrol의 MIC는 0.08 mg/mL과 0.04 mg/mL, MBC (minimum bactericidal concentration)는 0.16 mg/mL과 0.08 mg/mL로 나타나 효과적인 구강청결제인 chlorohexidine보다 강한 항균 효과를 보였다. 또한 lipopolysaccharide (LPS)로 처리된 human periodontal ligament (hPDL) 세포에서 항염증 효과를 검토한 결과, IL-1β, IL-6, IL-8의 발현을 억제하여 항염증 효과가 확인되었다(69). *A. lakoocha* 추출 건조분말(oxyresveratrol 함량: 95% 이상)의 충치 및 치주염의 원인균인 *S. mutans* 외 10종에 대한 항균 효과와 바이오필름 형성 저해 시험에서 MIC는 0.1-0.39 mg/mL, MBC는 0.2-3.12 mg/mL로 충치 미생물에 대한 항균력과 바이오필름 형성 억제 효과를 확인하였다. 따라서 *A. lakoocha* 추출물은 구강청결제 혹은 치약첨가제로의 가능성이 제시되었다(70).

임상에서 분리된 약물에 내성을 갖는 단순포진바이러스(Herpes simplex virus, HSV)에 대한 oxyresveratrol의 IC₅₀은 20 μg/mL으로 HSV-1과 HSV-2의 초기 및 후기 단계의 바이러스 복제를 억제하였다. 또한 30% oxyresveratrol 함유 연고를 하루 다섯 번 마우스에 국소적으로 사용한 결과 피부 손상을 억제하였고 바이러스 감염에 의한 사망을 억제하였다(71). HSV에 대한 국소 치료용으로 만든 oxyresveratrol의 마이크로에멀전은 바셀린으로 제조한 oxyresveratrol 연고보다 항바이러스 효과가 우수한 것으로 나타났다(72). 항바이러스제인 acyclovir에 대하여 내성을 갖는 수두대상포진바이러스(varicella-zoster virus, VZV)에 대한 실험에서 oxyresveratrol은 acyclovir와는 다른 항바이러스 기전으로 항 VZV 효과를 보였으며 광역 스펙트럼을 보였다(73). Oxyresveratrol, resveratrol, dihydroxykaempferol, kaempferol-7-O-β-glucoside, dihydroxykaempferol-3-O-α-L-rhamnoside 등 5종의 폴리페놀의 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)에 대한 증식 억제는 0.8-4 μg/mL의 낮은 농도에서는 resveratrol이 가장 우수한 효과를 나타낸 반면에 20-100 μg/mL의 높은 농도에서는 oxyresveratrol이 가장 강한 증식억제 효과를 나타내었다(74). Galindo 등(75)에 의하면 30 μg/mL oxyresveratrol은 아프리카돼지열병바이러스(African swine fever virus) 증식을 98-100% 억제하였으며 이들 물질은 초기 바이러스 단백질 합성은 허용하였으나 viral DNA replication, 후기 바이러스 단백질 합성은 억제하는 것으로 보고하였다.

Oxyresveratrol의 항산화작용

세포내에서 끊임없이 생산되는 반응성이 매우 높은 활성 산소종(ROS)은 산화스트레스(oxidative stress)를 유발하여 잠재적으로 세포에 해를 주는 물질로 알려져 있다. 따라서 ROS를 제거하기 위한 많은 연구들이 이루어지고 있으며 최근에는 특히 항산화 작용을 보이는 phytochemicals에 대해 관심이 증가하고 있는 추세이며 flavonoids, polyphenols, stilbenes 등에 대한 항산화 활성 연구가 보고되고 있다(76-79). 스틸벤 물질 중 oxyresveratrol이 resveratrol 보다 강한 항산화력을 보이는 것으로 보고되었다. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 방법 등을 사용한 자유라디칼 소거능을 보면 oxyresveratrol의 경우가 resveratrol 보다 월등히 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다. 또한, DPPH 시험 결과는 oxyresveratrol 및 resveratrol의 IC₅₀ 값이 28.9 μM, 38.5 μM을 보였다(7). Oh 등(80)의 보고에 의하면 oxyresveratrol의 경우 Hep G2 세포의 tacrine 유도 세포독성에 대해 세포보호효과를 보였으며 우수한 DPPH free radical scavenging 효과 (IC₅₀=23.4±1.5 μM), superoxide scavenging 효과 (IC₅₀=3.81±0.5 μM)를 나타내었다. FeSO₄/H₂O₂에 의한 lipid peroxidation에 대해서도 강한 저해 효과를 보였다(13). Oxyresveratrol은 다양한 기전에 의한 항산화력을 보이는 것으로 보고되고 있는데 nitric oxide synthase의 발현을 저해하는 작용을 하며, heme-induced *in vitro* oxidation assay에 의해 oxyresveratrol은 resveratrol 보다 더 뛰어난 metal chelation 효과를 보이는 것으로 보고되었다(13). 또한 oxyresveratrol은 riboflavin photoreaction 반응에서 항산화력이 높은 trolox 및 ascorbic acid보다 더 높은 DNA 보호능을 보였다(18).

Oxyresveratrol은 4개의 hydroxyl groups에 기인하는 구조적인 특성으로 인해 우수한 항산화력을 보이므로 산화스트레스를 감소시키는데 유용하게 이용될 수 있는 물질로 의약품의 원료로 이용가능성이 매우 높은 물질이다. 항산화제로 널리 알려진 resveratrol에 대한 연구는 다양한 분야에서 연구가 진행된 반면 resveratrol 보다 항산화력이 우수한 oxyresveratrol에 대한 연구는 미흡한 실정으로 앞으로 oxyresveratrol의 항산화 기능에 대한 연구가 활발히 진행되면 다양한 용도로 이용될 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

Oxyresveratrol의 항염증 작용 및 면역증강 작용

다양한 질병과 관련된 염증반응을 저해하는 것은 많은 종류의 질병 치료 및 예방에 도움이 된다. 따라서 우수한 항염증 반응을 보이는 oxyresveratrol에 대한 연구 및 oxyresveratrol을 다량 함유하고 있는 약용식물 특히 뽕나무 추출물을 이용한 항염증 효과 및 염증반응이 원인이 되는 질병의 치료효과에 대한 결과들이 많이 보고되었다. Oxyresveratrol은 *in vivo* 실험에서 신경면역성 반응(neuroimmune response)을 감소시키는데 이는 선택적으로 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) 생성을 저해하는 효과에 의한 것으로 보고되었다(81). 뽕잎 메탄올 추출물을 이용한 항염증 반응에 대한 연구결과에 의하면 LPS로 유도된 RAW264.7 macrophage 염증모델에서 nitric oxide (NO) 생성을 억제하였으며, TNF-α와 같은 염증 매개체들의 생성을 억제하였고, COX-2 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 활성 저해 효과를 보여 oxyresveratrol을 유효성분으로 함유하고 있는 뽕잎 추출물이 우수한 항염증효과를 나타낼 수 있었다(82). 또한 뽕나무과의 *A. heterophyllum*의 추출물로부터 분리한 oxyresveratrol의 경우에도 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시키는 효과가 보고되었다(83). 뽕나무 추출물로부터 분리 정제한 oxyres-

veratrol을 이용한 *in vivo* 및 *in vitro* 항염증 효과 실험의 결과, LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 nitrite 축적을 저해하는 효과를 보였으나 특이적으로 iNOS 효소 활성 저해에는 효과가 없었다. 그러나 oxyresveratrol은 iNOS 발현을 농도 의존적으로 저해하여 iNOS 효소활성 보다는 발현에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(13). 또한 oxyresveratrol은 LPS에 의한 nuclear factor κB (NF-κB)의 핵 내 이동을 저해하고 COX-2 활성을 현저히 저해시키는 효과를 보였다. 따라서 oxyresveratrol은 염증촉진물질인 NF-κB 활성 및 COX-2 활성을 크게 저해함으로써 iNOS 발현을 저해하여 항염증 효과를 보이는 것으로 생각된다. Oxyresveratrol의 또 다른 항염증 기전은 MEK/ERK signaling cascade를 저해함으로써 CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) 매개 T 세포 이동을 감소시켜 항염증 반응을 보이는 것으로 보고되었다(84). 뽕잎 메탄올추출물을 이용한 면역반응에 미치는 실험 결과에서는 추출물 처리에 의해 혈청 내 immunoglobulin 수준이 증가되었으며 마우스에서 병원성균인 *Pasteurella multocida* 감염 유도에 의한 사망률을 저하시키는 결과를 보였다. 또한 탄소제거시험(carbon clearance test)을 통해 macrophage의 이물질 탐식에 미치는 영향을 측정된 결과 phagocytic index가 현저히 증가하였으며 DNA 복제를 저해하는 부작용을 나타내는 항암제인 cyclophosphamide로 유도된 호중구감소증에 대해 보호 효과를 보여 체액성 면역(humoral immunity) 뿐만 아니라 세포매개성 면역(cell-mediated immunity) 반응도 증가시키는 것으로 보고되었다(85). 이와 같은 결과들을 종합해보면 oxyresveratrol은 다양한 경로를 통해 염증 제어 효과를 보이는 물질로 항염증 치료에 이용 가능성이 높은 물질이다.

Oxyresveratrol에 대한 다양한 생물학적인 활성을 Table 1에 정리하였다.

Oxyresveratrol의 pharmacokinetics

식·의약품의 원료로 인체 내에서 기능성을 보이기 위해서는 조직내 투과성이 높은 물질이 유리한 점을 가지고 있다. Oxyresveratrol은 조직내의 투과성이 높은 것으로 보고되었는데 상백피열수추출물을 쥐에 경구투여 후 혈장, 요 및 담즙을 분석한 결과 mulberroside A가 체내에서 대부분 oxyresveratrol로 전환되었으며 oxyresveratrol은 순환계로 수송되고 흡수율이 50% 이상이었으며 조직으로 수송된 후의 흡수력이 높게 나타났다(86). 이는 oxyresveratrol의 구조에 기인한 것으로 생각되는데 당을 함유하는 배당체 mulberroside A 보다 비배당체인 oxyresveratrol의 경우가 조직내 흡수율이 높은 것으로 생각된다. Huang 등(87)은 쥐 혈장에서의 oxyresveratrol 및 resveratrol에 대한 pharmacokinetics를 HPLC를 이용하여 검증할 수 있는 방법을 보고하고 쥐에 청미래덩굴(*S. china*) 추출물을 경구 투여시킨 후 담즙 및 요에서의 oxyresveratrol 및 resveratrol을 정량적으로 측정하였다. 담즙에서 oxyresveratrol 및 resveratrol의 누적배출량을 보면 각각 0.29% 및 0.97%, 요에서는 각각 0.81% 및 0.65%였다. 청미래덩굴 추출물에서 분리 정제된 oxyresveratrol을 쥐에 경구 투여 후 요 및 담즙 시료를 LC-MS/MS로 분석한 결과 7종의 대사산물이 분리되었으나 그 중 주 대사산물은 conjugated oxyresveratrol로 glucuronidated, methylated 및 sulfated conjugates였다(Fig. 4)(88). Glucuronidation이 쥐의 뇨 및 담즙에서 가장 보편적인 oxyresveratrol의 대사경로였으며 sulfated 대사체의 경우는 담즙에서만 분리되었다. 이와 같은 conjugation은 oxyresveratrol의 친수성을 증가시켜 배출을 향상시키는 것으로 생각된다. Oxyresveratrol의 배당체인 mulberroside A

Table 1. Biological activities of oxyresveratrol

Biological activities	Test models and assay	Effects	References
Anti-hyperlipidemic effect	Rats fed a high-cholesterol diet	Decreases total cholesterol, LDL, and triglyceride, but increases HDL	8
	Brain ischemic rats	Reduces the brain infarct volume	15
Neuroprotective effect	Cortical neuron induced β -amyloid	Prevents β -amyloid-induced neuronal cell damage by interfering with the increase of $[Ca^{2+}]$ and by inhibiting glutamate release and ROS generation	45
	Ischemic and non-ischemic rats	Increases blood-brain barrier permeability in stroke model compared with healthy model.	46
	Inhibitory activity of β -Secretase (BACE1)	Non-competitively inhibits BACE1 with the K_i value of 5.4×10^{-6} M and IC_{50} value of 7.6×10^{-8} M	47
	Neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to 6-hydroxydopamine	Decreases the activities of caspase-3 and lactate dehydrogenase, but increases the levels of SIRT1	48
	Inhibition of β -Amyloid formation	Inhibits 32% of β -amyloid fibril formation	49
Anti-cancer effect	Ovarian and stomach cancer cells	Shows toxicities to ovarian and stomach cancer cells with IC_{50} values of 0.66 and 1.31 μ M/L, respectively	56
Anti-diabetic effect	Type 2 diabetic mice	Inhibits the activities of α -glucosidase and sucrase	63, 64
		Shows strong antiglycation activity with IC_{50} value of 2.0 μ g/mL	
Anti-microbial effect	In vitro anti-malaria test	Shows a very high anti-malaria activity with IC_{50} value of 0.05 μ g/mL	65
	Anti-fungal effect	Exhibits antifungal effect against <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>M. gypseum</i> , and <i>E. floccosum</i>	66
		Shows anticandidal activity with MIC range 0.05-3.12 mg/mL and MFC range 0.10-25 mg/mL	67
	Anti-bacterial activity	Shows antibacterial activity against <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. flavus</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. abony</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. gingivalis</i> , and <i>A. actinomycetem-comitans</i>	68, 69
	Anti-HSV effect	Exhibits anti-HSV effect by inhibiting late protein synthesis and shows synergistic effect with the combination of oxyresveratrol and acyclovir	71
Anti-oxidant effect	DFRSA ^a and SSA ^b	Exhibits antioxidant activity by scavenging using ABTS ⁺ radical and exhibits a DFRSA with IC_{50} value of 23.4 μ M and SSA with IC_{50} value of 3.81 μ M	7, 80
Anti-inflammatory effect	RAW264.7 macrophages	Inhibits the production of inflammation mediators such as TNF- α and nitric oxide Exhibits the inhibitory activities on COX-2 and iNOS	82

^aDFRSA: DPPH free radical scavenging activity

^bSSA: superoxide scavenging activity

가 장내세균에 의해 생물전환되어 생성된 oxyresveratrol은 Caco-2 세포에의 투과도가 mulberoside A에 비해 월등히 증가되었는데 이는 efflux (*p*-glycoprotein 및 MRPs) 매개 기전이 관련되었다 (37). 또한 oxyresveratrol의 경우 전반적으로 간에서 glucuronidation이 일어나는 대사과정을 거쳐 세포에의 투과성이 증가하는 것으로 보고되었다. Tian 등(89)에 의하여 저농도의 oxyresveratrol을 분석할 수 있는 HPLC-MS/MS 분석법으로 쥐에 oxyresveratrol을 경구투여한 후에 측정된 elimination half-life ($t_{1/2}$)는 $0.693/K_e$ (K_e : elimination rate constant) 값을 보였다. Oxyresveratrol은 강력한 신경보호작용을 보이는데 oxyresveratrol이 blood-brain barrier (BBB)를 통과할 수 있는지를 확인한 결과 생리학적인 조건에서는 oxyresveratrol은 미량 측정되었으나 허혈성 빈혈, 허혈재관류 손상의 상황에서는 oxyresveratrol의 함량이 급격히 증가하는 것으로 나타났는데 중대뇌동맥폐쇄(middle cerebral artery occlusion) 쥐의 허혈조직에서 brain oxyresveratrol이 660% 증가하였다(46).

이는 oxyresveratrol의 BBB 통과가 증가되 허혈조직에서의 신경 보호 효과를 보이는 것으로 보고되었다. Oxyresveratrol은 mulberoside A보다 흡수면에서도 유리한 구조를 가지고 있으며 또한 흡수된 후에도 glucuronidation 등이 일어나 배출이 용이한 형태로 전환되는 것으로 생각된다. 또한 BBB 통과가 가능한 것으로 보고되어 뇌신경질환의 예방 및 치료에도 사용 가능한 기능성 식품의 원료로서 뿐만 아니라 의약품 원료로서도 중요한 특징을 보유하고 있다.

결론 및 전망

스틸벤 화합물 중 mulberoside A, oxyresveratrol, resveratrol, piceatannol은 여러가지 생리활성을 나타내는 것으로 알려짐에 따라 이와 같은 스틸벤 물질들은 다양한 질병을 예방 및 치료할 수 있는 잠재적 기능성을 보유하고 있는 것으로 생각된다. 최근의

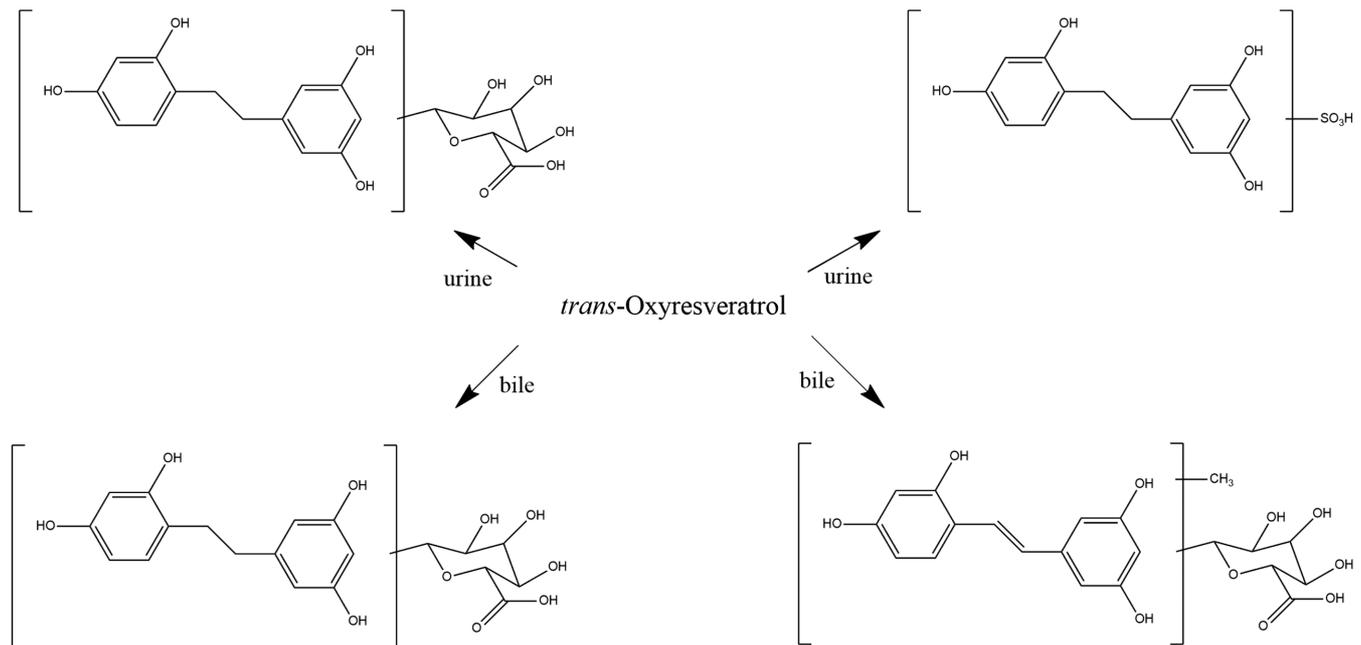


Fig. 4. The metabolites pathways of oxyresveratrol in rat urine and bile sample after oral administration of 100 mg/kg oxyresveratrol (88).

연구결과에 의하면 oxyresveratrol은 배당체인 mulberoside A 및 hydroxyl group이 하나 적은 resveratrol에 비해 항산화력을 비롯한 다양한 생리기능이 더 우수한 것으로 보고되었다. Oxyresveratrol은 항산화뿐만 아니라 항염증 작용, 혈중지질 개선, 항당뇨, 항암, 미백효과 등이 알려지면서 최근 큰 관심을 끌고 있다. 특히 항산화력이 mulberoside A 및 resveratrol 보다 우수하므로 산화적 스트레스와 관련된 많은 질병(암, 고혈압, 고지혈, 당뇨 등)의 예방 및 치료에 효과적일 것으로 생각된다. 최근 고령화 사회가 진행됨에 따라 노년층에서 퇴행성 질환의 발병률이 급속히 증가하여 퇴행성관절염 및 알츠하이머 등 산화적 스트레스가 원인이 되는 질병의 발생률이 증가하고 있는 추세이므로 이를 개선하기 위한 건강기능식품 또는 의약품 등으로 oxyresveratrol을 이용하고자 하는 연구도 진행 중에 있다.

Oxyresveratrol 제조는 식물로부터 직접 분리하는 방법, resveratrol로부터 합성하는 방법 그리고 뽕나무 뿌리에 다량 존재하는 mulberoside A로부터 미생물 혹은 효소 가수분해에 의한 방법 등으로 제조할 수 있다. Oxyresveratrol은 특히 전 세계적으로 재배되고 있는 뽕나무의 줄기(상지) 및 뿌리(상백피)에 다량 함유된 것으로 알려져 있다. 또한 상지중의 oxyresveratrol은 봄에서 가을, 겨울로 계절이 변화됨에 따라 배당체인 mulberoside A로부터 비배당체인 oxyresveratrol로 전환이 일어나서 oxyresveratrol의 함량이 증가하고 그에 따라 항산화력을 비롯한 기능성이 증가하는 것으로 보고되었다. Oxyresveratrol의 다양한 기능성을 바탕으로 oxyresveratrol을 미백 및 항산화 작용을 갖는 화장품의 원료로, 항암 및 고지혈 개선 효과를 보이는 의약품 및 의약품 보조제 그리고 건강기능식품의 원료로 사용이 가능할 것이다. 특히 소비자들의 요구에 따라 천연물 유래의 기능성 성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 추세에 따라 oxyresveratrol에 대한 기능성 연구를 더욱 활발히 진행하여 알려진 기능성과 더불어 새로운 기능성을 발굴하는 연구도 진행되어야 할 것으로 생각된다. 더 나아가 oxyresveratrol과 기능성이 있는 flavonoids류의 혼합에 의해 시너지 효과를 얻기 위한 연구도 진행되어야 할 것이다.

의약품으로 개발하기 위해서는 세포독성 및 안정성에 대해 추

가 연구를 비롯하여 pharmacokinetics에 대한 연구가 구체적으로 진행되어야 한다. 약리적인 특성에 대한 연구 및 인체적용시험을 통해 정제된 oxyresveratrol은 관련 질병의 개선효과를 보이는 의약품 및 의약품 보조제로 개발이 가능할 것이며, 전 세계적으로 오랫동안 전통의약품 및 식품으로 이용되어 온 oxyresveratrol을 다량 함유하고 있는 상지, 상백피를 비롯한 천연재료 등은 건강 기능성 식품의 소재로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 연구사업(고부가가치식품기술개발사업, 114033-03 및 313028-3)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Mongolsuk S, Robertson A, Towers R. 429. 2,4,3',5'-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha*. J. Chem. Soc. 2231-2233 (1957)
- Ayinampudi S, Wang YH, Avula B, Smillie TJ, Khan I. Quantitative analysis of oxyresveratrol in different plant parts of *Morus* species and related genera by HPTLC and HPLC. JPC-J. Planar. Chromatogr. 24: 129-129 (2011)
- Shao B, Guo HZ, Cui YJ, Liu AH, Yu HI, Guo H, Xu M, Guo DA. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in *Smilax china* by high performance liquid chromatography. J. Pharmaceut. Biomed. 44: 737-742 (2007)
- Djapic N, Djarmati Z, Filip S, Jankov RM. A stilbene from the heartwood of *Maclura pomifera*. J. Serb. Chem. Soc. 68: 235-237 (2003)
- Hanawa F, Tahara S, Mizutani J. Antifungal stress compounds from *Veratrum grandiflorum* leaves treated with cupric chloride. Phytochemistry 31: 3005-3007 (1992)
- Kim JK, Kim MJ, Cho SG, Kim MK, Kim SW, Lim YH. Biotransformation of mulberoside A from *Morus alba* results in enhancement of tyrosinase inhibition. J. Ind. Microbiol. Biot. 37: 631-637 (2010)
- Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TFW.

- Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 9: 64-76 (2003)
8. Jo SP, Kim JK, Lim YH. Antihyperlipidemic effects of stilbenoids isolated from *Morus alba* in rats fed a high-cholesterol diet. *Food Chem. Toxicol.* 65: 213-218 (2014)
 9. Park KT, Kim JK, Lim YH. Deglycosylation of stilbene glucoside compounds improves inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and squalene synthase activities. *Food Sci. Biotechnol.* 23: 647-651 (2014)
 10. He H, Lu YH. Comparison of inhibitory activities and mechanisms of five mulberry plant bioactive components against α -glucosidase. *J. Agr. Food Chem.* 61: 8110 - 8119 (2013)
 11. Wu LS, Wang XJ, Wang H, Yang HW, Jia AQ, Ding Q. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. *J. Ethnopharmacol.* 130: 460-464 (2010)
 12. Chillemi R, Sciuto S, Spatafora C, Tringali C. Anti-tumor properties of stilbene-based resveratrol analogues: Recent results. *Nat. Prod. Commun.* 2: 499-513 (2007)
 13. Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, Moon JO. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 55: 1695-1700 (2003)
 14. Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Benchanak K, Lipipun V, Mathew J, Schinazi RF. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Nat. Prod. Res.* 19: 177-182 (2005)
 15. Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol (*trans*-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1017: 98-107 (2004)
 16. Kim JK, Park KT, Lee HS, Kim MJ, Lim YH. Evaluation of the inhibition of mushroom tyrosinase and cellular tyrosinase activities of oxyresveratrol: Comparison with mulberroside A. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 27: 495-503 (2012)
 17. Park KT, Kim JK, Hwang DH, Yoo YM, Lim YH. Inhibitory effect of mulberroside A and its derivatives on melanogenesis induced by ultraviolet B irradiation. *Food Chem. Toxicol.* 49: 3038 - 3045 (2011)
 18. Chatsumpun M, Chuanasa T, Sritularak B, Likhitwitayawuid K. Oxyresveratrol protects against DNA damage induced by photosensitized riboflavin. *Nat. Prod. Commun.* 6: 41-44 (2011)
 19. Zhang Z, Jin J, Shi L. Protective function of cis-mulberroside A and oxyresveratrol from *Ramulus mori* against ethanol-induced hepatic damage. *Environ. Toxicol. Phar.* 26: 325-330 (2008)
 20. Powell RG, Bajaj R, McLaughlin JL. Bioactive stilbenes of *Scirpus maritimus*. *J. Nat. Prod.* 50: 293-296 (1987)
 21. Likhitwitayawuid K, Chaiwiriya S, Sritularak B, Lipipun V. Antihyperthermic flavones from the heartwood of *Artocarpus gomezianus*. *Chem. Biodivers.* 3: 1138-1143 (2006)
 22. Xu L, Liu C, Xiang W, Chen H, Qin X, Huang X. Advances in the study of oxyresveratrol. *Int. J. Pharmacol.* 10: 44-54 (2014)
 23. Butt MS, Nazir A, Sultan MT, Schron K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trends Food Sci. Tech.* 19: 505-512 (2008)
 24. Devi B, Sharma N, Kumar D, Jeet K. *Morus alba* Linn: A phytopharmacological review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5: 14-18 (2013)
 25. Zafar MS, Muhammad F, Javed I, Akhtar M, Khaliq T, Aslam B, Waheed A, Yasmin R, Zafar H. White mulberry (*Morus alba*): A brief phytochemical and pharmacological evaluations account. *Int. J. Agric. Biol.* 15: 612620 (2013)
 26. Choi SW, Jang YJ, Lee YJ, Leem HH, Kim EO. Analysis of functional constituents in mulberry (*Morus alba* L.) twigs by different cultivars, producing areas, and heat processings. *Prev. Nutr. Food Sci.* 18: 256-262 (2013)
 27. Jeandet P, Delaunois B, Conreux A, Donnez D, Nuzzo V, Cordeiller S, Clment C, Courtois E. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactors* 36: 331-341 (2010)
 28. Hammerbacher A, Ralph SG, Bohlmann J, Fenning TM, Gershenzon J, Schmidt A. Biosynthesis of the major tetrahydroxystilbenes in spruce, astringin and isorhapontin, proceeds via resveratrol and is enhanced by fungal infection. *Plant Physiol.* 157: 876-890 (2011)
 29. Zhou J, Li SX, Wang W, Guo XY, Lu XY, Yan XP, Huang D, Wei BY, Cao L. Variations in the levels of mulberroside A, oxyresveratrol, and resveratrol in mulberries in different seasons and during growth. *Sci. World J.* 2013: 380692 (2013)
 30. Schrder G, Brown JWS, Schrder J. Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur. J. Biochem.* 172: 161-169 (1988)
 31. Bavaresco L, Civardi S, Pezzutto S, Vezzulli S, Ferrari F. Grape production, technological parameters, and stilbenic compounds as affected by lime-induced chlorosis. *J. Vitis* 44: 63-65 (2005)
 32. Boue SM, Shih BY, Burow ME, Eggleston G, Lingle S, Pan YB, Kim D, Bhatnagar D. Postharvest accumulation of resveratrol and piceatannol in sugarcane with enhanced antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 61: 8412-8419 (2013)
 33. Deluc LG, Decendit A, Papastamoulis Y, Merillon JM, Cushman JC, Cramer GR. Water deficit increases stilbene metabolism in *Cabernet sauvignon* berries. *J. Agr. Food Chem.* 59: 289-297 (2011)
 34. Cantos E, Espn JC, Fernndez MJ, Oliva J, Toms-Barbern FA. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *J. Agr. Food Chem.* 51: 1208-1214 (2003)
 35. Sun HY, Xiao CF, Cai YC, Chen Y, Wei W, Liu XK, Lv ZL, Zou Y. Efficient synthesis of natural polyphenolic stilbenes: Resveratrol, piceatannol and oxyresveratrol. *Chem. Pharm. Bull.* 58: 1492-1496 (2010)
 36. Poopyruchpong N, Rungruangsak K, Nimmanpisut S, Panijpan B, Ratanabanangkoon K. Some physico-chemical properties of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene. *J. Sci. Soc. Thailand* 4: 163-167 (1978)
 37. Mei M, Ruan JQ, Wu WJ, Zhou RN, Lei JPC, Zhao HY, Yan R, Wang YT. *In vitro* pharmacokinetic characterization of mulberroside A, the main polyhydroxylated stilbene in mulberry (*Morus alba* L.), and its bacterial metabolite oxyresveratrol in traditional oral use. *J. Agr. Food Chem.* 60: 2299-2308 (2012)
 38. Song W, Wang HJ, Bucheli P, Zhang PF, Wei DZ, Lu YH. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *J. Agr. Food Chem.* 57: 9133-9140 (2009)
 39. Maneechai S, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Palanuvej C, Ruangrunsi N, Sirisa-Ard P. Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad'. *Med. Prin. Pract.* 18: 223-227 (2009)
 40. Bertram RM, Takemoto JK, Remsberg CM, Vega-Villa KR, Sablani S, Davies NM. High-performance liquid chromatographic analysis: Applications to nutraceutical content and urinary disposition of oxyresveratrol in rats. *Biomed. Chromatogr.* 24: 516-521 (2010)
 41. Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KC, Lamb JH, Farmer PB, Stanley LA, Burke MD. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Brit. J. Cancer* 86: 774-778 (2002)
 42. Al-Jumaily EF, Shafiq ZA, Al-Bayati RI. Antihyperlipidemic effects of resveratrol and its derivative on alloxan diabetic rabbits. *Che. Sci. Rev. Lett.* 2: 278-286 (2013)
 43. Jo SP, Kim JK, Lim YH. Antihyperlipidemic effects of rhapontin and rhapontigenin from *Rheum undulatum* in rats fed a high-cholesterol diet. *Planta Med.* 80: 1067-1071 (2014)
 44. Vingdeux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 9: S6 (2008)
 45. Ban JY, Jeon SY, Nguyen TTH, Bae KH, Song KS, Seonga YH. Neuroprotective effect of oxyresveratrol from *Smilacis chiniae* Rhizome on Amyloid β Protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2419-2424 (2006)
 46. Breuer C, Wolf G, Andrabi SA, Lorenz P, Horn TFW. Blood-brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. *Neurosci. Lett.* 393: 113-118 (2006)
 47. Jeon SY, Kwon SH, Seong YH, Bae K, Hur JM, Lee YY, Suh

- DY, Song KS. β -secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax rhizoma*. *Phytomedicine* 14: 403-408 (2007)
48. Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RCC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Free Radical Bio. Med.* 45: 1019-1026 (2008)
 49. Richard T, Pawlus AD, Iglisias ML, Pedrot E, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Monti JP. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1215: 103-108 (2011)
 50. Weber JT, Lamont M, Chibrikova L, Fekkes D, Vlug AS, Lorenz P, Kreutzmann P, Slemmer JE. Potential neuroprotective effects of oxyresveratrol against traumatic injury. *Eur. J. Pharmacol.* 680: 55-62 (2012)
 51. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220 (1997)
 52. Nam KA, Kim SH, Heo YH, Lee SK. Resveratrol analog, 3,5,2',4'-tetramethoxy-trans-stilbene, potentiates the inhibition of cell growth and induces apoptosis in human cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* 24: 441-445 (2001)
 53. Chowdhury SA, Kishino K, Satoh R, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Shirataki Y, Sakagami H. Tumor-specificity and apoptosis-inducing activity of stilbenes and flavonoids. *Anticancer Res.* 25: 2055-2063 (2005)
 54. Lee SK, Nam KA, Hoe YH, Min HY, Kim EY, Ko HJ, Song SY, Lee TH, Kim SH. Synthesis and evaluation of cytotoxicity of stilbene analogues. *Arch. Pharm. Res.* 26: 253-257 (2003)
 55. Son PS, Park SA, Na HK, Jue DM, Kim SH, Surh YJ. Piceatannol, a catechol-type polyphenol, inhibits phorbol ester-induced NF- κ B activation and cyclooxygenase-2 expression in human breast epithelial cells: Cysteine 179 of IKK β as a potential target. *Carcinogenesis* 31: 1442-1449 (2010)
 56. Tan Y, Liu C, Chen R. Phenolic constituents from stem bark of *Morus wittiorum* and their anti-inflammation and cytotoxicity. *China J. Chin. Mater. Medica* 35: 2700-2703 (2010)
 57. Li, H. Resveratrol derivatives as colorectal cancer chemopreventive agents. PhD thesis, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong (2010)
 58. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127: 1109-1122 (2006)
 59. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* 6: 307-319 (2007)
 60. Zabolotny JM, Kim YB. Silencing insulin resistance through SIRT1. *Cell Metab.* 6: 247-249 (2007)
 61. Koo SH, Montminy M. In vino veritas: A tale of two Sirt1s? *Cell* 127: 1091-1093 (2006)
 62. Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K. Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood glucose levels in type 2 diabetic model db/db mice. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 422: 469 - 475 (2012)
 63. Wang S, Fang M, Ma YL, Zhang YQ. Preparation of the branch bark ethanol extract in mulberry *Morus alba*, its antioxidation, and antihyperglycemic activity *In vivo*. *Evid.-Based Compl. Alt.* 2014: 569652 (2014)
 64. Povichit N, Phrutivorapongkul A, Suttajit M, Leelapornpisid P. Antiglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Maejo Int. J. Sci. Tech.* 4: 454-461 (2010)
 65. Suhartati T, Yandri, Suwandi JF, Hadi S. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of oxyresveratrol and artonine isolated from two *Artocarpus* plants in Indonesia. *Orient. J. Chem.* 26: 825-830 (2010)
 66. Ratanabanangkoon K, Poopyruchpong N, Charoensiri K. A preliminary study on the antifungal activity of 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene on dermatophytes. *J. Sci. Soc. Thailand* 2: 202-205 (1976)
 67. Senapong S, Puripattanavong J, Teanpaisan R. Anticandidal and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* extract. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 36: 451-457 (2014)
 68. Mazimba O, Majinda RRT, Motlhanka D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *Acad. J.* 5: 751-754 (2011)
 69. Phoolcharoen W, Sooampon S, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Kuvatanasuchati J, Pavasant P. Anti-periodontal pathogen and anti-inflammatory activities of oxyresveratrol. *Nat. Prod. Commun.* 8: 613-616 (2013)
 70. Teanpaisan R, Senapong S, Puripattanavong J. *In vitro* antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. *Trop. J. Pharm. Res.* 13: 1149-1155 (2014)
 71. Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antivir. Res.* 80: 62-70 (2008)
 72. Sasivimolphan P, Lipipun V, Ritthidej G, Chitphet K, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: Physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 13: 1266-1275 (2012)
 73. Sasivimolphan P, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Takemoto M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication *in vitro*. *Antivir. Res.* 84: 95-97 (2009)
 74. Wang WX, Qian JY, Wang XJ, Jiang AP, Jia AQ. Anti-HIV-1 activities of extracts and phenolics from *Smilax china* L. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27: 147-151 (2014)
 75. Galindo I, Hernez B, BernJ, Fenoll J, Cenis JL, Escribano JM, Alonso C. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication. *Antivir. Res.* 91: 57-63 (2011)
 76. Sureda A, Tejada S, del Mar Bibiloni M, Antoni Tur J, Pons A. Polyphenols: Well beyond the antioxidant capacity: Polyphenol supplementation and exercise-induced oxidative stress and inflammation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15: 373-379 (2014)
 77. Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv. Nutr.* 5: 404-417 (2014)
 78. Flamini R, Mattivi F, de Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 19651-19669 (2013)
 79. Aftab N, Likhitwitayawuid K, Vieira A. Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. *Nat. Prod. Res.* 24: 1726-1733 (2010)
 80. Oh H, Ko EK, Jun JY, Oh MH, Park SU, Kang KH, Lee HS, Kim YC. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of prenylflavonoids, coumarin, and stilbene from *Morus alba*. *Planta Med.* 68: 932-934 (2002)
 81. Mouihate A, Horn TF, Pittman QJ. Oxyresveratrol dampens neuroimmune responses *in vivo*: A selective effect on TNF- α . *Am. J. Physiol.-Reg. I.* 291: R1215-R1221 (2006)
 82. Choi EM, Hwang JK. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia* 76: 608-613 (2005)
 83. Fang SC, Hsu CL, Yen GC. Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of *Artocarpus heterophyllus*. *J. Agr. Food Chem.* 56: 4463-4468 (2008)
 84. Chen YC, Tien YJ, Chen CH, Beltran FN, Amor EC, Wang RJ, Wu DJ, Mettling C, Lin YL, Yang WC. *Morus alba* and active compound oxyresveratrol exert anti-inflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling. *BMC Complem. Altern. M.* 13: 45 (2013)
 85. Bharani SE, Asad M, Dhamanigi SS, Chandrakala GK. Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Morus alba* Linn.

- (mulberry) leaves. Pak. J. Pharm. Sci. 23: 63-68 (2010)
86. Qiu F, Komatsu K, Saito K, Kawasaki K, Yao X, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicines. XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. Biol. Pharm. Bull. 19: 1463-1467 (1996)
87. Huang HL, Zhang JQ, Chena GT, Lu ZQ, Sha N, Guo DA. Simultaneous determination of oxyresveratrol and resveratrol in rat bile and urine by HPLC after oral administration of *Smilax china* extract. Nat. Prod. Commun. 4: 825-830 (2009)
88. Huang H, Chen G, Lu Z, Zhang J, Guo DA. Identification of seven metabolites of oxyresveratrol in rat urine and bile using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 24: 426-432 (2010)
89. Tian F, Wei H, Jia T, Tian H. An improved highly sensitive method to determine low oxyresveratrol concentrations in rat plasma and its pharmacokinetic application. Biomed. Chromatogr. 28: 667-672 (2014)