

## 참꽃나무 잎 추출물 유래 항산화 및 항균 활성 성분

김정은·조성미·이남호†

제주대학교 화학·코스메틱스학과

(2019년 10월 16일 접수, 2019년 11월 13일 수정, 2019년 12월 2일 채택)

### Anti-oxidative and Anti-bacterial Constituents from the Extracts of *Rhododendron weyrichii* Leaves

Jung Eun Kim, Seong Mi Jo, and Nam Ho Lee†

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea  
(Received October 16, 2019; Revised November 13, 2019; Accepted December 2, 2019)

**요약:** 본 연구에서는 참꽃나무 잎 추출물의 항산화 및 항균 활성을 확인하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 동정하였다. 참꽃나무 잎 에탄올 추출물 및 용매 분획물의 DPPH, ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 측정된 결과 추출물 및 ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 분획물의 우수한 라디칼 소거 활성을 확인하였다. 또한 표피포도상구균과 여드름균을 이용한 활성 실험 결과, 추출물 및 *n*-hexane (Hex), EtOAc 분획물에서 항균 활성이 나타났다. EtOAc 분획물의 활성 성분을 규명하기 위해 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 5개의 화합물을 분리하였다; ursolic acid (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3), astragaloside (4), isoquercetin (5). 분리된 화합물 1-5는 모두 참꽃나무에서 처음으로 분리되었다. 분리된 화합물에 대한 항산화 활성 측정 결과 화합물 4, 5의 라디칼 소거 활성이 우수하였으며, 화합물 3은 항균 효과가 있음을 확인하였다. 또한 UPLC 분석을 통해 참꽃나무 잎에서 분리된 astragaloside의 함량을 측정된 결과 추출물에서 8.1 mg/g, EtOAc 분획물에서 34.8 mg/g이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 참꽃나무 잎 추출물을 이용한 항산화 및 항균 효과를 갖는 천연 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

**Abstract:** In this study, we investigated anti-oxidative and anti-bacterial constituents from *Rhododendron weyrichii* leaves. DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities were screened for the ethanol extract and solvent fractions. Potent scavenging activities were appeared from the extract, ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (BuOH) fractions. Upon the anti-bacterial tests using *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*, extract, *n*-hexane (Hex) and EtOAc fractions showed strong activities. To isolate the active constituents, the EtOAc fraction was further purified to afford five phytochemicals; ursolic acid (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3), astragaloside (4) and isoquercetin (5). All of the compounds 1-5 were isolated for the first time from this plant. Among the isolates, the compound 4 and 5 showed strong DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities. Also, compound 3 exhibited the most potent anti-bacterial activity. In addition, the content of astragaloside isolated from this plant was determined by UPLC and the quantity was about 8.1 mg/g for the 70% ethanol extract and 34.8 mg/g for the EtOAc fraction. Based on these results, it is concluded that *R. weyrichii* extract could be potentially applicable as anti-oxidative and anti-bacterial ingredients in cosmetic formulations.

**Keywords:** *Rhododendron weyrichii*, anti-oxidation, anti-bacterial activity, isolation

† 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)  
call: 064) 754-3548

## 1. 서 론

인체에 손상을 미치는 대표적인 활성산소종에는  $\cdot O_2^-$  (superoxide anion radical),  $\cdot OH$  (hydroxyl radical) 등의 산소 라디칼,  $^1O_2$  (singlet oxygen),  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide)와 같은 몇 종류의 비라디칼 뿐만 아니라 생체 성분과의 반응에서 유래된  $ROO\cdot$  (peroxyl radical),  $RO\cdot$  (alkoxyl radical),  $ROOH$  (hydroperoxide),  $NO$  (nitric oxide) 등이 있다[1]. 이러한 활성산소들의 산화적 손상을 억제하기 위한 생체 방어 기구로는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px), catalase 등의 항산화 효소가 존재하여 체내의 항산화성을 유지시켜주지만, 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있는 피부는 그 항산화성 방어망의 불균형이 일어나 산화생성물 및 과산화지질 등이 축적되어 피부 노화가 촉진된다. 이에 필요 이상의 활성산소를 제거할 수 있는 외부 항산화제를 보충하여 항산화 네트워크를 회복시켜 피부 조직을 보호할 수 있게 해줄 필요가 있다[2].

지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 폴리페놀(polyphenol) 화합물인 것으로 알려져 있다. 이 화합물은 하나 또는 둘 이상의 히드록시기로 치환된 방향족 고리(aromatic ring)를 가지고 있으며 자연에 대략 8000여 종이 존재하고 항산화, 항암 등의 기능을 지니고 있다[3]. 특히 폴리페놀의 일종인 플라보노이드(flavonoid)는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로 많이 활용되고 있다[4].

여드름(acne vulgaris)은 가장 호발하는 피부 질환으로 그 리스어로는 아크네(acne)라고 하고, 대부분 남성호르몬인 안드로젠(androgen)의 분비가 가장 현저하게 증가하는 사춘기에서 80%가 발생하며, 피지선이 많이 분포하는 얼굴, 가슴 등에 많이 나타난다. 25세 미만의 성인에서는 남성보다 여성이 많고, 초식을 많이 하는 동양인보다 육식의 비중이 높은 서양인에서 발생빈도가 높다고 알려져 있다 [5,6]. 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)는 피부 내에 존재하는 상재균으로 정상상태에서는 피부면역 시스템에 의해 관용된다. 그러나 안드로젠의 과다 분비에 의한 피부지방 조성의 불균형 및 *P. acnes*의 증식으로 인하여 여드름과 같은 피부질환이 발생한다[7]. 호기성균인 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)는 외모낭이나 모낭의 중간에서 성장하며, 원발성 피부질환 및 여드름 증상의 속발성을 악화시키는 원인균이다. 이러한 *P. acnes*와 *S.*

*epidermidis* 등의 균들이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 주로 사용되고 있다. 현재 여드름 치료제로 쓰이고 있는 약제로는 retinoid, benzoyl peroxide, clindamycin, erythromycin, triclosan 등과 같이 화장품 응용이 부적합한 의료용 항생제나 화학 합성품들이 대부분이며, 이들은 피부자극, 간독성, 내성 발생 등의 부작용이 알려져 있다[8,9]. 천연물을 이용한 천연 항균제의 개발은 무한한 가능성을 내재하고 있다고 볼 수 있으며, 단풍나무에서 분리한 ginnalin, 감귤류의 성분인 hesperidin, 황백이나 황련 등에서 분리된 berberine 등이 항균 효과가 있다고 보고되어 있다[10].

참꽃나무(*Rhododendron weyrichii*)는 제주어로 박달레낭이라고 하며 진달래과(Ericaceae)에 속하는 식물이다. 제주 특산종으로 알려져 있으며, 우리나라에서는 제주도에만 자생하고 일본에도 분포한다고 알려져 있다. 제주의 꽃으로 지정되어 있는 참꽃나무는 진달래나 철쭉에 비해 꽃이 크고 높게 자라나 남성적인 느낌이 든다고 하여 이름이 붙어졌다. 현재까지 알려진 참꽃나무의 생리활성 연구로는 잎 에탄올 추출물의 항산화, 항염, 미백활성[11]이 보고되어 있으나, 아직 이들 활성과 관련된 유효 성분에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 참꽃나무 잎 추출물 및 극성별 용매 분획물의 항산화 및 항균 효능을 확인하고 활성 성분을 규명하기 위해 단일물질 분리 및 구조 동정을 진행하여 천연 화장품 원료 등의 이용 가능성을 알아보려고 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Junsei 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002 - 0.025 mm, Sigma, USA), gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, Fluka, USA)이 사용되었다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)는 AVANCE III (FT-NMR system, Bruker, Germany)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL 사의 NMR 전용 용매인 pyridine-*d*<sub>5</sub>, CD<sub>3</sub>OD을 사용하였다.

### 2.2. 참꽃나무 잎의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 참꽃나무 잎(시료번호: 315)은 제주 사려

니슈길에서 2014년 9월에 채집하였다. 채집한 시료는 실온 및 음지에서 자연 건조 후 분쇄하여 사용하였으며, 시료 126.4 g을 70% 에탄올 3 L에 침적하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕상에서 감압 농축하여 추출물 33.2 g을 얻었으며, 얻어진 추출물 30 g을 증류수에 현탁시키고, 용매 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다.

### 2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

EtOAc 분획물 5.9 g을 극성에 따라 분획하기 위하여 VLC를 수행하였으며, *n*-Hex-EtOAc (0 - 100%), EtOAc-MeOH (0 - 50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 200 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1 - 32). Fr. V11, 12 (167.7 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 20 : 1)을 수행하여 화합물 1 (125 mg)을 분리하였다. Fr. V25 (502.5 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 12 : 1)을 수행하여 화합물 2 (163.5 mg) 및 화합물 3(54.5 mg)을 분리하였다. Fr. V26 (1055.2 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 6 : 1)을 수행하여 화합물 4 (123.8 mg)를 얻었다. Fr. V27 (715.3 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 4 : 1)을 수행하여 화합물 5 (25.9 mg)를 분리하였다.

## 2.4 항산화 활성

### 2.4.1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Deinis 방법[12]을 응용하였고 각 시료 용액 100  $\mu$ L에 증류수 900  $\mu$ L와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100  $\mu$ L를 가하여 상온에서 3 min 간 반응시켰다. 여기에 7% (w / v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 200  $\mu$ L와 증류수 700  $\mu$ L를 가하여 실온에서 1 h 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 gallic acid를 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법[13]을 응용하였고 각 시료 용액 15  $\mu$ L에 ethylene glycol 150  $\mu$ L와 0.1 N NaOH 15  $\mu$ L를 가하여 상온에서 1 h 반응 시킨 후

420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

### 2.4.2. DPPH 라디칼 소거 활성

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법[14]을 응용하였고 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20  $\mu$ L와 0.2 mM DPPH 용액 180  $\mu$ L를 혼합하여 상온에서 10 min 간 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율이 50%일 때의 농도(SC<sub>50</sub>)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을 사용하였다.

### 2.4.3. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 양이온 라디칼 소거 활성은 Re 등의 방법[15]을 응용하였고, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온 및 암소에서 16 h 동안 반응시켜 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 형성시켰다. 이 용액을 에탄올로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20  $\mu$ L와 ABTS<sup>+</sup> 용액 180  $\mu$ L를 혼합하여 상온에서 15 min 간 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율이 50%일 때의 농도(SC<sub>50</sub>)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였다.

## 2.5. 항균 활성

### 2.5.1. 균주 배양

표피포도상구균인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 여드름균인 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양 받아 사용하였다. *S. epidermidis*인 경우, 배양매지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37 °C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다. *P. acnes*인 경우, 배양매지를 GAM broth로 하여 37 °C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

### 2.5.2. 한천확산법- Paper Disc Diffusion Method

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 한천확산법으로 clear

zone의 크기를 확인하였다. 각 균주는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올린 후, *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 동안 배양하고, *P. acnes*는 37 °C에서 48 h 동안 혐기 배양 한 후, 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다. 대조균으로는 erythromycin을 사용하였다.

### 2.5.3. 최소억제농도(MIC) 및 최소사멸농도(MBC)

최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로, 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 실험하였다. 96 well plate에 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 시료를 포함하는 배지를 100  $\mu$ L 넣어준 후, 균 현탁액의 농도를  $2 \times 10^5$  CFU/mL가 되도록 조절하여 100  $\mu$ L 씩 넣어준다. *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 배양하였으며, *P. acnes*는 37 °C, 혐기성 조건에서 48 h 배양하였다. 이후 균의 증식이 나타나지 않는 최소농도를 확인하였다. 최소사멸농도(MBC, minimum bactericidal concentration)는 MIC값이 나타난 그 이상의 농도의 시료 배양액들을 하드배지에 처리하여 colony를 형성하는지 확인하는 것으로, MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 이용하여 시료 배양액을 찍어내서 하드배지에 streaking 하였다. *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 배양하였으며, *P. acnes*는 37 °C, 혐기성 조건에서 48 h 배양하여, colony가 형성되지 않는 최소농도를 확인하였다.

### 2.6. Astragalin의 함량 분석

참꽃나무 잎에서 분리된 화합물인 astragalin (4)의 함량을 확인하기 위해 UPLC (H-Class, Waters Co., USA), ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 column (1.8  $\mu$ m, 2.1  $\times$  150 mm, Waters Co., USA)을 사용하여 정량 분석하였다. 이동상은 0.1% acetic acid이 함유된 증류수(용매 A)와 MeOH(용매 B)을 사용하였으며 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 2  $\mu$ L로 하였고 검출기는 UV detector (265.8 nm)를 사용하였다. 용출조건은 gradient mode로 20 min 동안 용매 B를 10 - 60%의 비율로 변화시켰다. 농도별로 제조한 astragalin의 peak 면적을 구하여 회귀 방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였으며 검량선의  $r^2$  값은 0.999 이상이었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 참꽃나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성

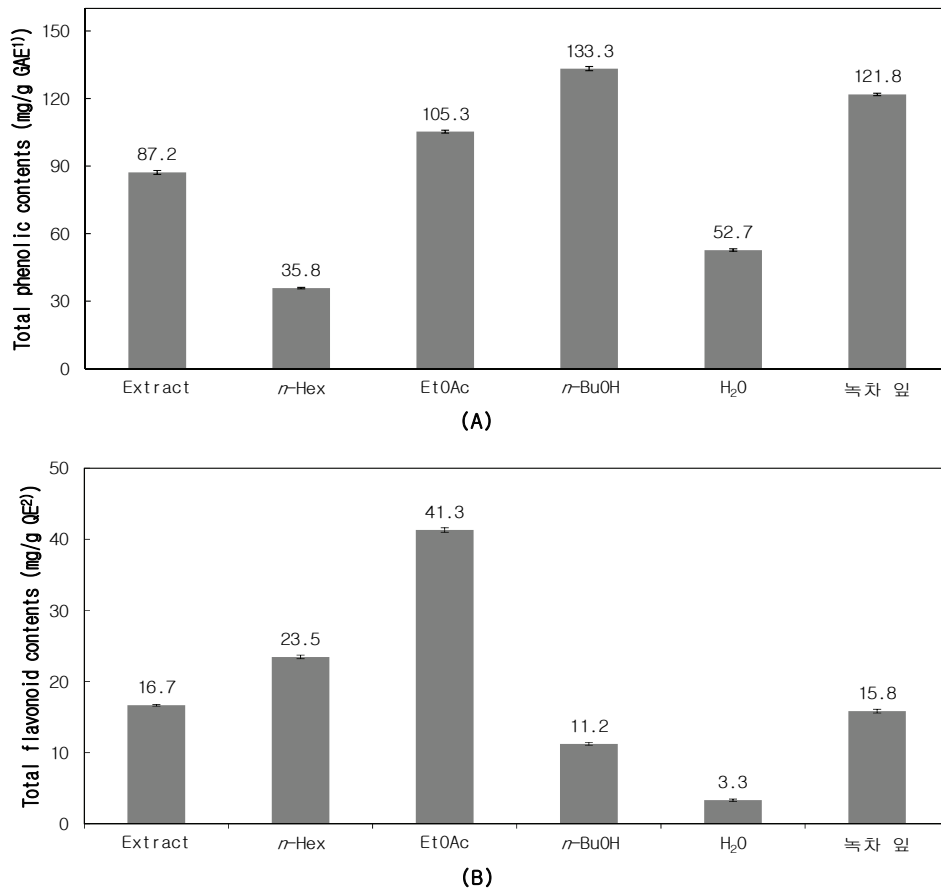
#### 3.1.1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

참꽃나무 잎의 항산화 활성을 확인하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 표준물질인 gallic acid의 검정곡선을 이용하여 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량은 표준물질인 quercetin의 검정곡선을 이용하여 중량 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 참꽃나무 잎은 70% 에탄올을 이용해 추출하였으며 얻어진 추출물을 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물에 대한 총 폴리페놀 함량 측정 결과 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서 많은 폴리페놀(105.3, 133.3 mg/g GAE)이 함유되어 있음을 확인하였다. 또한 총 플라보노이드 함량 측정 결과 EtOAc 분획물이 가장 많은 플라보노이드(41.3 mg/g QE)를 함유하고 있었으며, 녹차 추출물과 참꽃나무 잎 추출물의 플라보노이드 함량이 유사함을 확인하였다(Figure 1).

#### 3.1.2. DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성

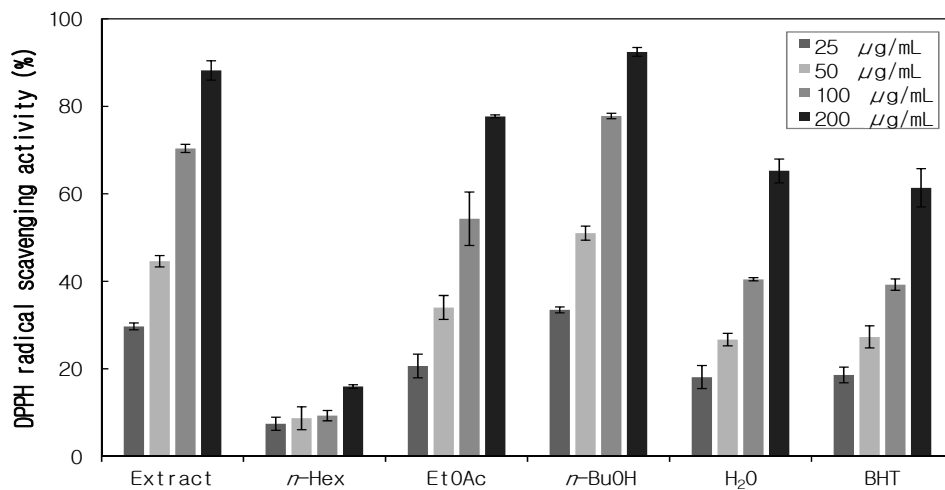
인체에 유해한 활성산소(ROS) 중에서 가장 강력한 유해 인자는 hydroxyl radical (HO·)로 알려져 있다. 따라서, 체내에서 진행되는 유해한 과산화작용을 제어하기 위해서는 라디칼 인자를 제어하는 것이 효과적이다. DPPH는 비교적 안정한 hydrazyl 라디칼 화합물로서, 항산화 기질과 반응하여 중성인 hydrazin으로 변환되며 DPPH 용액의 변색이 수반된다. 식물 추출물의 라디칼 소거 활성 측정법으로서 DPPH 용액의 흡광도 변화를 추적하는 방법이 매우 효과적으로 이용되고 있다. 또한 ABTS<sup>+</sup>를 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS<sup>+</sup> 유리 라디칼이 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법이다. DPPH assay와 마찬가지로 인위적인 라디칼을 제거하는 작용 기작이 공통적이며, DPPH 라디칼 제거능과 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있다[4].

참꽃나무 잎 추출물 및 용매 분획물에 대한 DPPH 라디



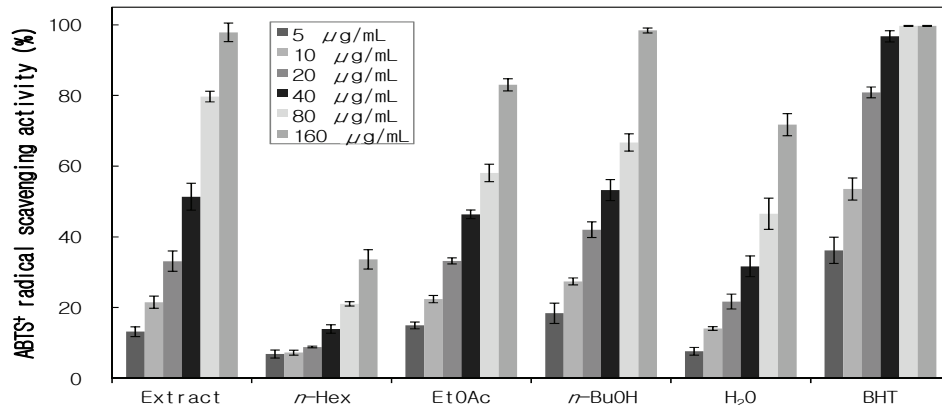
<sup>1</sup>) GAE; gallic acid equivalent, <sup>2</sup>) QE; quercetin equivalent

**Figure 1.** Total polyphenol contents (A) and total flavonoid contents (B) of extract and solvent fractions from *R. weyrichii* leaves. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



**Figure 2.** DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *R. weyrichii* leaves. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.





**Figure 3.** ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *R. weyrichii* leaves. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

**Table 1.** SC<sub>50</sub><sup>1)</sup> Values of Extract and Solvent Fractions from *R. weyrichii* Leaves on DPPH and ABTS<sup>+</sup> Radical Scavenging Activities

Fractions	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
DPPH radical ( $\mu\text{g/mL}$ )	61.7	> 200	89.2	48.6	139.7	149.2
ABTS <sup>+</sup> radical ( $\mu\text{g/mL}$ )	40.5	> 160	52.5	36.7	93.3	9.3

<sup>1)</sup> SC<sub>50</sub>; scavenging concentration for 50% of radical

**Table 2.** Anti-bacterial Activities of *R. weyrichii* Leaves

	Clear zone (mm) <sup>1)</sup>						
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>			
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
Extract	11	-	9	10	-	9	-
<i>n</i> -Hex	9	-	-	11	10	11	9
EtOAc	12	11	9	12	11	12	110
<i>n</i> -BuOH	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-
Erythromycin	22	-	31	50	-	-	30

<sup>1)</sup> Concentration of sample : 2 mg, erythromycin : 20  $\mu\text{g}$

칼 소거 활성 실험 결과 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 61.7, 89.2, 48.6  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 BHT 보다 우수한 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 2, Table 1). ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성 또한 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다(Figure 3, Table 1).

### 3.2. 참꽃나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성

참꽃나무 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 표피포도상구균(*S. epidermidis*) 및 여드름균(*P. acnes*)을 이용하여 한천확산법으로 clear zone을 확

인하였다. 그 결과 참꽃나무 잎 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 나타났으며(Table 2), 활성이 우수한 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에 대해서는 추가적으로 최소억제농도(MIC) 및 최소사멸농도(MBC)를 확인하였다 (Table 3).

### 3.3. 참꽃나무 잎으로부터 분리된 화합물의 구조 동정

항산화 및 항균 활성이 우수한 참꽃나무 잎 EtOAc 분획물에 대해 VLC 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 5개의 화합물을 분리하였으며, <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였다. 화합물 1은 <sup>13</sup>C

**Table 3.** MIC and MBC Values of *R. weyrichii* Leaves

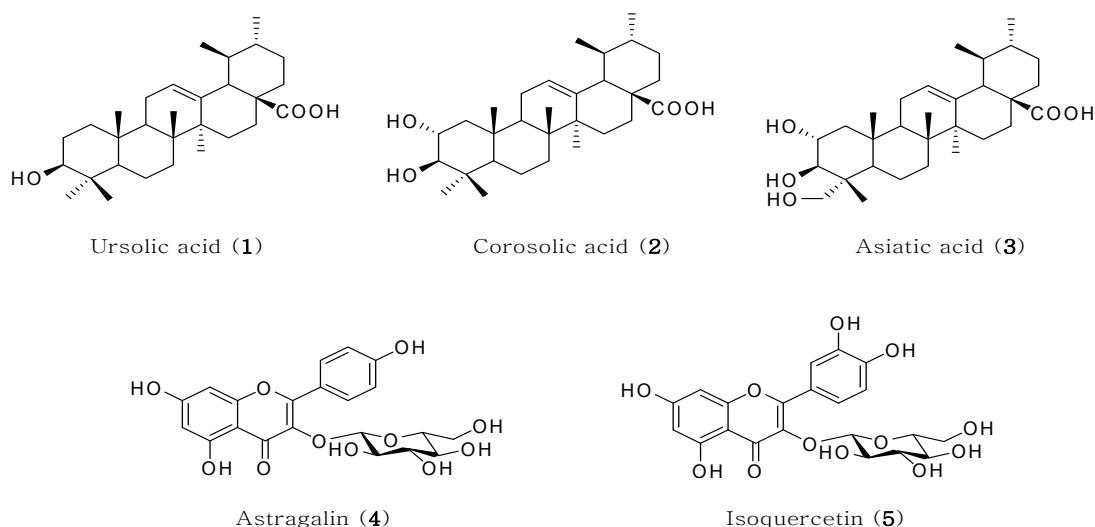
		Extract <sup>1)</sup>	<i>n</i> -Hex <sup>1)</sup>	EtOAc <sup>1)</sup>	
<i>S. epidermidis</i>	CCARM	MIC	500	> 1000	1000
	3709	MBC	1000	> 1000	1000
	CCARM	MIC	> 1000	> 1000	1000
	3710	MBC	> 1000	> 1000	1000
	CCARM	MIC	> 1000	> 1000	> 1000
	3711	MBC	> 1000	> 1000	> 1000
<i>P. acnes</i>	CCARM	MIC	1000	> 1000	500
	0081	MBC	1000	> 1000	1000
	CCARM	MIC	> 1000	> 1000	1000
	9009	MBC	> 1000	> 1000	1000
	CCARM	MIC	1000	> 1000	1000
	9010	MBC	1000	> 1000	1000
	CCARM	MIC	> 1000	> 1000	> 1000
	9089	MBC	> 1000	> 1000	> 1000

<sup>1)</sup> Concentration of sample :  $\mu\text{g/mL}$

NMR 스펙트럼에서 30개의 탄소 피크와 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서 7개의 methyl group을 포함하는 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예상하였으며 문헌[16]을 통해 ursolic acid로 확인되었다. 화합물 2는 화합물 1과 유사한 구조이며, <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼에서 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 2개의 sp<sup>3</sup> 혼성 탄소( $\delta_{\text{C}}$  69.0, 84.3) 등을 통해 2번 및 3번 탄소에 OH group이 결합되어 있음을 예상하였으며, 문헌[17]을 통해 corosolic acid로 확인되었다. 화합물 3 또한 화합물 2와 유사한 구조이며, <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼에서 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 3개의 sp<sup>3</sup> 혼성 탄소( $\delta_{\text{C}}$  66.8, 69.4, 78.6) 등을 통해 2번, 3번 및 23번 위치에 OH group이 결합되어 있음을 예상하였고 문헌[18]을 통해 asiatic acid로 확인되었다 (Table 4). 화합물 4, 5는 flavonoid 배당체로 문헌을 통해

**Table 4.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds 1 – 3 (500 and 125 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

No.	Compound 1		Compound 2		Compound 3	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		39.5		48.5		48.4
2		28.6	4.13 (1H, m)	69.0	4.23-4.28 (overlapped)	69.4
3	3.28 (1H, dd, 6.0, 10.0)	78.6	3.43 (1H, d, 9.5)	84.3	4.23-4.28	78.6
4		40.0		40.3		44.2
5		56.3		56.4		48.3
6		19.2		19.3		
7		34.0		34.0		33.6
8		40.4		40.5		40.5
9		48.5		48.5		48.6
10		37.9		38.9		38.8
11		24.1		24.2		24.3
12	5.52 (1H, t, 3.5)	126.1	5.48 (1H, t, 3.5)	126.0	5.48 (brs)	126.1
13		139.8		139.7		139.8
14		43.0		43.0		43.0
15		29.2		29.1		29.1
16		25.4		25.4		25.4
17		48.5		48.5		48.5
18	2.66 (1H, d, 11.5)	54.0	2.65 (1H, d, 11.0)	54.0	2.63 (1H, d, 11.0)	54.0
19		39.9		39.9		39.9
20		39.9		39.9		39.9
21		31.5		31.5		31.5
22		37.7		37.9		38.0
23	1.25 (3H, s)	29.3	1.23 (3H, s)	29.8	3.75 (1H, d, 10.0) 4.23-4.28 (overlapped)	66.8
24	1.05 (3H, s)	17.1	1.07 (3H, s)	17.4	1.08 (3H, s)	15.0
25	0.90 (3H, s)	16.2	0.99 (3H, s)	18.2	1.07 (3H, s)	18.0
26	1.08 (3H, s)	17.9	1.10 (3H, s)	18.0	1.08 (3H, s)	18.0
27	1.27 (3H, s)	24.4	1.30 (3H, s)	24.4	1.15 (3H, s)	24.4
28		180.4		180.4		180.5
29	1.02 (3H, d, 6.0)	18	1.00 (3H, d, 6.0)	17.9	0.97 (3H, s)	18.0
30	0.97 (3H, d, 6.0)	21.9	0.96 (3H, d, 6.0)	21.9	0.92 (3H, s)	21.9



**Figure 4.** Isolated compounds 1–5 from *R. weyrichii* leaves.

각각 astragalin[19], isoquercetin[20]으로 확인되었다(Table 5). 이들 화합물 모두 참꽃나무에서 처음으로 분리된 물질이다(Figure 4).

**Table 5.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound 4 and 5 (500 and 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound 4		Compound 5	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, J Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		158.4		159.1
3		135.5		135.7
4		179.5		179.6
5		163.3		163.2
6	6.26 (1H, d, 2.0)	100.0	6.19 (1H, d, 2.0)	100.0
7		166.2		166.1
8	6.39 (1H, d, 2.0)	95.0	6.38 (1H, d, 2.0)	94.8
9		158.7		158.6
10		105.8		105.8
1'		112.8		123.2
2'	8.09 (2H, d, 8.5)	132.5	7.71 (1H, d, 2.5)	117.7
3'	6.93 (2H, d, 8.5)	116.3		146.0
4'		161.8		150.0
5'	6.93 (2H, d, 8.5)	116.3	6.86 (1H, d, 8.5)	116.1
6'	8.09 (2H, d, 8.5)	132.5	7.58 (1H, dd, 2.5, 8.5)	123.3
1''	5.50 (1H, d, 7.5)	104.1	5.27 (1H, d, 8.0)	104.4
2''	3.33 - 3.82	76.0	3.21 - 3.86	75.9
3''	3.33 - 3.82	78.9	3.21 - 3.86	78.2
4''	3.33 - 3.82	71.6	3.21 - 3.86	71.3
5''	3.33 - 3.82	78.3	3.21 - 3.86	78.5
6''	3.33 - 3.82	62.8	3.21 - 3.86	62.7

### 3.4. 참꽃나무 잎으로부터 분리된 화합물의 항산화 활성

참꽃나무 잎에서 분리된 화합물의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 측정하였으며 그 결과 flavonoid 계열의 화합물 4, 5에서 라디칼 소거 활성이 나타났다(Table 6). 특히 화합물 5의 라디칼 소거 활성이 매우 뛰어났으며, 이는 flavonoid B ring에 두 개의 OH group이 치환되어 있는 구조이기 때문이다. 이를 통해 aromatic ring에 치환된 OH group의 개수가 라디칼 소거능에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있다.

**Table 6.**  $\text{SC}_{50}^{\text{D}}$  Values of Isolated Compounds 1–5 from *R. weyrichii* Leaves on DPPH and ABTS<sup>+</sup> Radical Scavenging Activities

Compounds	1	2	3	4	5	BHT
DPPH radical ( $\mu\text{M}$ )	> 800	> 800	> 800	277.0	35.9	623.2
ABTS <sup>+</sup> radical ( $\mu\text{M}$ )	> 160	> 160	> 160	123.2	32.4	62.4

<sup>1)</sup> $\text{SC}_{50}$ ; scavenging concentration for 50% of radical

### 3.5. 참꽃나무 잎으로부터 분리된 화합물의 항균 활성

참꽃나무 잎에서 분리된 화합물에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 MIC 및 MBC를 측정하였으며, 가장 높은 농도를 1000  $\mu\text{M}$ 로 하여 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 실험하였다. 그 결과 terpenoid 계열의 화합물 1, 2, 3에서 활성이 나타났으며, 특히 화합물 3의 항균 활성이 우수함을 확인 하였다(Table 7). 항균 활성 또한 유사한 terpenoid 구조에 치환된 OH group의 개수가 활성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있다.



**Table 7.** MIC and MBC Values of Isolated Compounds 1- 5 from *R. weyrichii* Leaves

		1 <sup>1)</sup>	2 <sup>1)</sup>	3 <sup>1)</sup>	4 <sup>1)</sup>	5 <sup>1)</sup>
<i>S. epidermidis</i>	CCARM 3709	MIC > 1000	> 1000	62.5	> 1000	> 1000
		MBC > 1000	> 1000	125	> 1000	> 1000
	CCARM 3710	MIC > 1000	> 1000	125	> 1000	> 1000
		MBC > 1000	> 1000	125	> 1000	> 1000
	CCARM 3711	MIC > 1000	> 1000	125	> 1000	> 1000
		MBC > 1000	> 1000	125	> 1000	> 1000
<i>P. acnes</i>	CCARM 0081	MIC 1000	500	125	> 1000	> 1000
		MBC 1000	500	125	> 1000	> 1000
	CCARM 9009	MIC > 1000	500	125	> 1000	> 1000
		MBC > 1000	500	125	> 1000	> 1000
	CCARM 9010	MIC 1000	500	125	> 1000	> 1000
		MBC 1000	500	125	> 1000	> 1000
	CCARM 9089	MIC > 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000
		MBC > 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000

<sup>1)</sup>Concentration of compound :  $\mu$ M

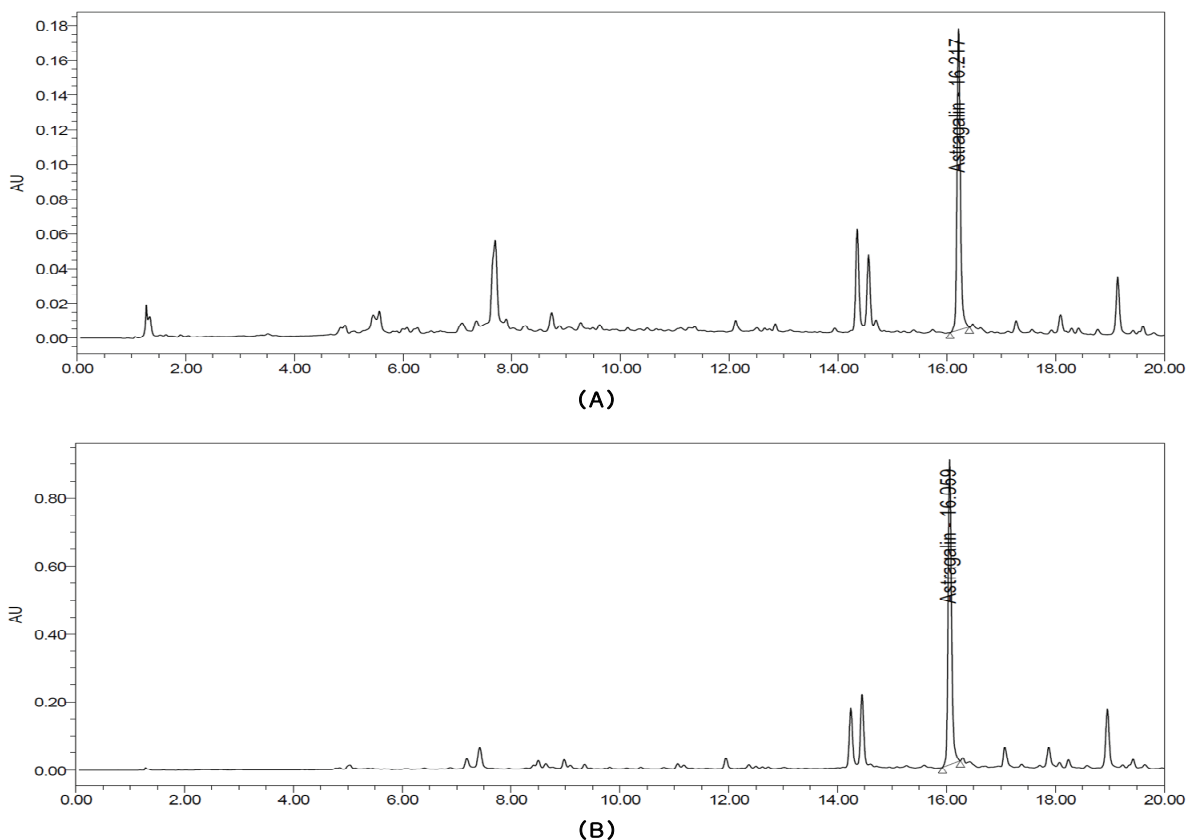
### 3.6. 참꽃나무 잎 추출물의 astragalín 함량 분석

참꽃나무 잎에서 분리된 화합물 중 가장 많이 함유되어 있는 성분인 astragalín (4)의 함량을 UPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과 참꽃나무 70% 에탄올 추출물 1 g 당 astragalín이 8.1 mg/g (0.8%) 함유되어 있으며, EtOAc 분획물에서는 34.8 mg/g (3.5%)이 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Figure 5).

## 4. 결 론

현재 참꽃나무(*R. weyrichii*) 잎 추출물의 활성에 대한 연구는 보고되어 있지만, 유효 성분에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 참꽃나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항산화, 항균 효능을 검색하고 활성 성분을 확인하기 위해 단일물질 분리 과정을 진행하여 유효 성분의 구조를 동정하였다.

참꽃나무 잎 70% 에탄올 추출물을 극성에 따라 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었으며, 항산



**Figure 5.** UPLC chromatogram of 70% EtOH extract (A) and EtOAc fraction (B) from *R. weyrichii* leaves at 265.8 nm.

화 활성 실험 결과 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 항산화 효능을 확인하였다. 또한 피부 관련 균주인 표피포도상구균(*S. epidermidis*) 및 여드름균(*P. acnes*)을 이용한 항균 실험 결과 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 활성이 나타났으며, 이와 같은 결과를 바탕으로 활성 성분을 확인하기 위해 EtOAc 분획물에 대해 VLC 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 5개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR을 이용해 화학구조를 동정하였으며, ursolic acid (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3), astragalol (4), isoquercetin (5)으로 확인되었다.

분리된 화합물에 대한 항산화 활성 실험 결과 flavonoid 계열인 화합물 4, 5의 라디칼 소거 활성이 우수함을 확인하였으며, 항균 활성 실험에서는 화합물 3의 활성이 우수함을 확인하였다. 또한 분리된 화합물 중 참꽃나무 잎에 가장 많이 함유되어 있는 성분인 astragalol (4)의 함량을 분석한 결과 추출물에서 8.1 mg/g, EtOAc 분획물에서 34.8 mg/g 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 참꽃나무 잎 추출물은 항산화 및 항균 효과를 갖는 천연 기능성 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

## Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력권산업 육성사업(No. P0002225, 천연물과 바이오기술을 이용한 민감성 피부 개선 화장품 개발)으로 수행된 연구결과입니다.

## Reference

1. S. H. You, J. S. Moon, A study on anti-oxidative, anti-inflammatory, and melanin inhibitory effects of *Chrysanthemum sibiricum* extract, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **33**(4), 762 (2016).
2. C. H. Shin, Studies on the antioxidative character in the ethyl acetate extractions of *Rumex crispus*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **16**(2), 592 (2001)
3. M. B. Kim, S. H. Hyun, J. S. Park, M. A. Kang, Y. H. Ko, and S. B. Lim, Integral Antioxidative Capacity of Extracts by Pressurized Organic Solvent from Natural Plants in Jeju, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **37**, 1491 (2008).
4. S. H. Park, J. E. Kim, and N. H. Lee, Isolation and evaluation of anti-oxidative constituents from the extract of *Ficus erectavar. sieboldii* King leaves, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(4), 321 (2016).
5. C. N. Collier, J. C. Harper, J. A. Cafardi, W. C. Cantrell, W. Wang, K. W. Foster, and B. E. Elewski, The prevalence of acne in adults 20 years and older, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **58**(1), 56 (2008).
6. J. C. Harper, An update on the pathogenesis of acne, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **51**, 36 (1995).
7. A. Koreck, A. Pivarcsi, A. Dobozy, and L. Kemeny, The role of innate immunity in the pathogenesis of acne, *Dermatology*, **206**(2), 96 (2003).
8. H. S. Kim, Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2011).
9. M. S. Kang, H. J. Oh, H. C. Lee, and J. S. Oh, Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, *Journal of Bacteriology and Virology*, **39**(1), 11 (2009).
10. J. E. Kim, Ph. D. Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2016).
11. T. H. Kim, Master's Thesis Dissertation, Chung-Ang Univ., Seoul, Korea (2015).
12. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**(11), 966 (1981).
13. F. B. Davis, E. Middleton, P. J. Davis, and S. D. Blas, Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, *Cell Calcium*, **4**(2), 71 (1983).
14. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
15. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9-10), 1231 (1999).
16. W. Seebacher, N. Simic, R. weis, R. Saf, and O. Kunert, Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR

- resonances of oleanolic acid, 18  $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives, *Magn. Reson. Chem.*, **41**(8), 636 (2003).
17. L. L. Li, J. X. Pu, W. L. Xiao, and H. D. Sun, Triterpenes from *Isodon xerophilus*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, **10**(4), 307 (2012).
18. W. N. He, J. G. Dai, M. Ye, L. J. Wu, and D. A. Guo, Microbial transformation of asiatic acid by *Alternaria longipes*, *J Asian Nat Prod Res*, **12**(9), 760 (2010).
19. J. H. Lee, C. H. Ku, N. I. Baek, S. H. Kim, H. W. Park, and D. K. Kim, Phytochemical constituents from *Diodia teres*, *Arch. Pharm. Res.*, **27**(1), 40 (2004).
20. J. Fernandez, R. Reyes, H. Ponce, M. Oropeza, M. R. Vancalsteren, C. Jankowski, and M. G. Campos, Isoquercitrin from *Argemone platyceeras* inhibits carbachol and leukotriene D<sub>4</sub>-induced contraction in guinea-pig airways, *Eur. J. Pharmacol.*, **522**(1-3), 108 (2005).