

# 박달나무로부터 분리된 페놀성 화합물의 항산화 및 Tyrosinase 저해 활성 연구

왕 다 혜 · \*정 하 숙\*

덕성여자대학교 자연과학대학 화학과 석사과정생, \*덕성여자대학교 자연과학대학 식품영양학과 교수

## Identification of Anti-Oxidant and Anti-Tyrosinase Activity of Phenolic Components Isolated from *Betula schmidtii*

Da-Hye Wang and †Ha Sook Chung\*

Graduate Student, Dept. of Chemistry, College of Natural Sciences, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

\*Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Natural Sciences, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

### Abstract

The aim of study to investigate the phytochemicals and biological activities the bark of *Betula schmidtii*. The studies consisted of the solvent extraction, followed by the isolation of phenolic components 1~3 from ethyl acetate-soluble fraction of *Betula schmidtii* Bark. Their chemical structures were identified as arbutin (1),  $\rho$ -coumaric acid (2) and ferulic acid (3) using Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectrophotometer, Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) (negative ion mode),  $^1\text{H}$ -Nuclear Magnetic Resonance (NMR),  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Correlation Spectroscopy (COSY) and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Hetero Nuclear Multiple Quantum Correlation (HMQC) spectral data. Compounds 1~3 shows the anti-oxidant effect with  $\text{IC}_{50}$  values of  $29.74 \pm 1.52$ ,  $21.32 \pm 1.07$  and  $34.41 \pm 1.24$  in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, respectively. Also, compounds 1~3 exhibited mushroom tyrosinase inhibitory activity with  $\text{IC}_{50}$  values of  $31.14 \pm 1.07$ ,  $42.54 \pm 1.46$  and  $69.22 \pm 1.43$   $\mu\text{M}$ , respectively.

Key words: *Betula schmidtii* Bark, phenols, DPPH free radical scavenging, mushroom tyrosinase, phytochemicals

## 서 론

천연물에 존재하는 미량의 식물화학성분(phytochemicals)은 alkaloid, terpenoid, flavonoid와 같이 어느 특정 생물에만 분포되어 있는 2차 대사산물로, 그 구조가 다양하며 고유의 생리활성을 가지고 있으므로 주요한 관심 대상이 되고 있다(Woo WS 2001). 이들 천연물은 전통적으로 사용한 경험과 축적된 정보가 많으므로, 합성물질에 비해 비교적 안전하고 개발기간이 단축될 수 있으므로 건강기능식품과 천연물의약품 소재로 꾸준히 개발되고 있다(Bae EH 2014). 천연물로부터 건강효능이 우수한 식물화학성분을 규명하기 위해서는 천연물의 학명, 산지, 식물의 부위별 효능 및 활성 성분의

물리적, 화학적 특성 등 과학적인 자료를 획득하는 것은 중요하다(Loub 등 1985; Chung HS 2001).

*Betula*속(generic name)에 속한 식물은 다양한 건강효능이 알려져 있으며, 특히 anticancer, anti-inflammatory, immunomodulatory, antioxidant, antidiabetic, antiviral 및 antiarthritic 효과가 우수한 것으로 보고(Rastogi 등 2015)된 바 있으며, 특히 수피(樹皮, bark) 부분은 치료 효과가 우수하여 민간약소재(traditional medicine)로 사용되어 왔다(Kim 등 2010; Menković 등 2011; Yang 등 2018). 우리나라에는 주로 *Betula schmidtii*(박달나무), *Betula chinensis*(개박달나무), *Betula costata*(거제수나무), *Betula davurica*(물박달나무), *Betula ermanii* var. *acutifolia*(사스래나무), *Betula ermanii*

† Corresponding author: Ha Sook Chung, Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Natural Sciences, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea. Tel: +82-2-901-8593, Fax: +82-2-901-8593, E-mail: hasook@duksung.ac.kr

var. *ganzuensis*(왕사스레나무), *Betula gmelini*(좁자작나무), *Betula latifolia*(자작나무) 등이 서식하고 있다(Han & Chi 1974).

박달나무(*Betula schmidtii* Regel)는 원산지가 대한민국이며, 자작나무과(Betulaceae)에 속하는 낙엽 활엽 교목으로, 전라남북도와 황해도를 제외한 전국에 표고 600 m를 중심으로 200~2,000 m 지역 및 백두대간에 분포되어 있다. 목재는 무늬가 아름다울 뿐 아니라 치밀하고 단단하고 연한 홍색으로 가구재 등으로 쓰이며, 껍질은 염료로 활용된다. 특히 수액은 벌목 없이 채취가 가능하며, 자작나무 수액과 함께 식용 및 약용 소재로 널리 이용되고 있다(산림청 자료).

본 연구에서는 박달나무 수피에 함유된 페놀성 식물화학성분을 규명하고, 화합물의 항산화 및 tyrosinase 저해 활성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 시약

실험에 사용된 박달나무(*Betula schmidtii*) 수피는 (주)생명 나무로부터 제공받았다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), L-ascorbic acid, kojic acid는 Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)의 특급시약을 사용하였다. Silica gel (Kieselgel 60, bead size 63~200  $\mu\text{m}$  particle size, Darmstadt, Germany)은 Merck사, 그리고 Sephadex LH-20(bead size 25~100  $\mu\text{m}$ , Uppsala, Sweden)은 GE Healthcare Life Science사의 제품을 각각 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)용 plate는 pre-coated silica gel 60 F<sub>254</sub> plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm, Art. 5715, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, 추출과 분리용 용매는 특급 또는 1급을 사용하였고, 발색시약으로는 1% FeCl<sub>3</sub>, anisaldehyde 시약을 사용하였다.

### 2. 시료 추출 및 분획

자연 건조시킨 박달나무 수피(2 kg)를 곱게 갈은 후 증류수(10 L)를 넣고 120 °C에서 3시간 고압추출기(Ilshin autoclave, Yangju, Korea)로 3회 반복 시행하여 여과지(Whatman No.1, England)를 사용하여 여과시켰다. 여과된 추출물을 감압농축기(Eyela, Japan)로 농축시킨 후, 동결 건조하여 박달나무 수피 열수추출물을 제조하였다. 시료의 열수추출물에 methanol (MeOH)을 첨가하여 분획여두를 이용하여 MeOH 불용부와 가용부로 분리한 후, MeOH 가용부를 용매의 유전률에 따라 유기용매와 증류수를 동량 첨가하여 dichloromethane(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate(EtOAc) 및 *n*-Butanol(*n*-BuOH) 가용성 부분으로 분획하였다(Fig. 1)(Guon & Chung 2016). 제조된 분획물 중 활

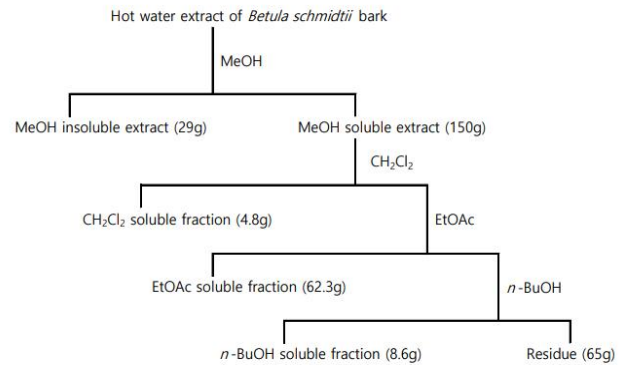


Fig. 1. Extraction and solvent fractionation of *Betula schmidtii* Bark.

성이 우수한 EtOAc 가용성 분획물을 농축, 여과하여 실험재료로 사용하였다.

### 3. 단일 화합물의 분리

시료의 EtOAc/H<sub>2</sub>O 용매분획으로 얻은 EtOAc 농축물(8.0 g)에 대한 silica gel open column chromatography (5.2×120 cm)를 실시하였다. 이동상은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=100:0, 99:1, 97:3, 95:5, 93:7, 90:10, 85:15(v/v) 용액을 step-wise 방법으로 순차적으로 용출(250 mL/fr.)시켰다. Column chromatography를 행하여 얻어진 각 획분을 대상으로 TLC 분석을 행하여 phenol성 화합물의 존재가 확인된 소분획을 re-column chromatography를 시행하여 단일 화합물을 분리하고 순도를 확인하였다. 얻어진 용출획분 중 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH= 97:3 용출물 fraction(v/v, fraction No. 7-11, 316 mg) 및 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=90:10 용출물 fraction(v/v, fraction No. 6-9, 120 mg)을 MeOH을 이동상(500 mL)으로 Sephadex LH-20 open column(1.8×90 cm) chromatography(Guon & Chung 2016)를 시행하여 순수 화합물 1~3을 분리하였다. 단일물질이 전개된 TLC plate에 1% FeCl<sub>3</sub>와 anisaldehyde용액(0.5 mL anisaldehyde, 9 mL EtOH, 0.5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 mL acetic acid)을 각각 분무하고, 105 °C oven에서 가열하여 화합물의 특성을 확인하였다. FeCl<sub>3</sub> 반응에서 녹색 또는 흑색을 나타내면 phenol성 화합물, anisaldehyde 반응이 양성이면 당의 존재를 예견하였다.

### 4. 기기분석

박달나무 수피 EtOAc 가용성 분획물로부터 분리된 화합물 1~3의 화학구조는 UV-Vis(JP/U3010 UV-Vis spectrophotometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), ESI-MS(negative ion mode, JMS-AX 505 WA HP 5890 Series II, HP, Jeol, Tokyo, Japan), <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz), <sup>13</sup>C-NMR(125 MHz), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C

HMQC(Varian UI500 FT-NMR Spectrometer, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) 분석을 행하여 규명하였다. NMR 측정 시 CD<sub>3</sub>OD를 용매로 사용하였으며, chemical shifts를 ppm으로 표시하였고 표준물질은 tetramethylsilane을 사용하여  $\delta$  값으로 표기하였다.

## 5. 시료의 활성 측정

### 1) DPPH radical scavenging 활성 측정

단리한 화합물 1~3의 DPPH free radical scavenging 활성은 Blois MS(1958)의 방법을 활용하여 수행하였다. 항산화효능은 DPPH 용액의 흡광도 값을 50% 감소시키는 시료의 농도를 IC<sub>50</sub>(mg/mL,  $\mu$ M)로 표시하였고, L-ascorbic acid, kojic acid를 positive control로 사용하였다. 시료액 100  $\mu$ L에 0.4 mM의 DPPH용액 100  $\mu$ L를 가하고 실온에서 30분 반응시킨 후 515 nm에서 ELISA reader(SpectraMax, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 2) Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해활성은 Flurkey WH(1991)의 방법을 변형하여 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 dopachrome을 비색법을 이용하여 측정하였다. 0.067 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL, 시료 0.1 mL, 기질 10 mM L-DOPA (dihydroxy-phenylalanine, Sigma-Aldrich Co.) 0.2 mL를 넣고 혼합한 혼합액에 효소액(mushroom tyrosinase, 110 unit/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분 동안 반응시켜 475 nm에서 측정(Bio-Rad Lab. Inc., CA, USA)하고 dopachrome의 변화를 저해능으로 환산하였으며, kojic acid를 양성대조구로 사용하였다.

## 6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고, 실험 결과는 SPSS ver. 22.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 실험 군의 평균과 표준편차로 계산하고 ANOVA 분석 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 단일 화합물의 분리

박달나무 수피 열수 추출물을 용매분획하여 얻어진 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 및 aqueous 가용성 분획물(residue)들의 TLC pattern을 확인하였다. 각각의 용매 분획물을 TLC

plate에 전개(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=100:0~100:12) 후, 10% FeCl<sub>3</sub> 용액을 각각 분무하고, 105°C oven에서 가열하여 페놀성 화합물의 존재를 확인하였다. 분획물 중 발색 시 페놀성 화합물의 존재가 다수 확인되는 EtOAc 가용성 분획물을 농축하여 silica gel 및 Sephadex LH-20 open column chromatography를 시행하였다. 예비실험에서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=90:10로 용출시킨 세분획 중 용출물 No. 6-9 fractions에서 UV(254/365 nm) 상에서 페놀성 화합물의 존재가 예견되었으므로(Woo WS 2001), 이들 분획을 농축하였다. 농축한 세분획을 MeOH을 이동상으로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 시행하여 단일물질을 얻은 후 MeOH로 재결정하여 순수한 화합물 1(18.1 mg)을 획득하였다. 이어서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=97:3 용출물 No. 7-11 fractions에서 역시 페놀성 화합물의 존재가 예견되어 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 수행한 후에 분리된 화합물을 MeOH로 재결정하여 순수 화합물 2(23.7 mg)와 3(42.1 mg)을 획득하였다(Fig. 2).

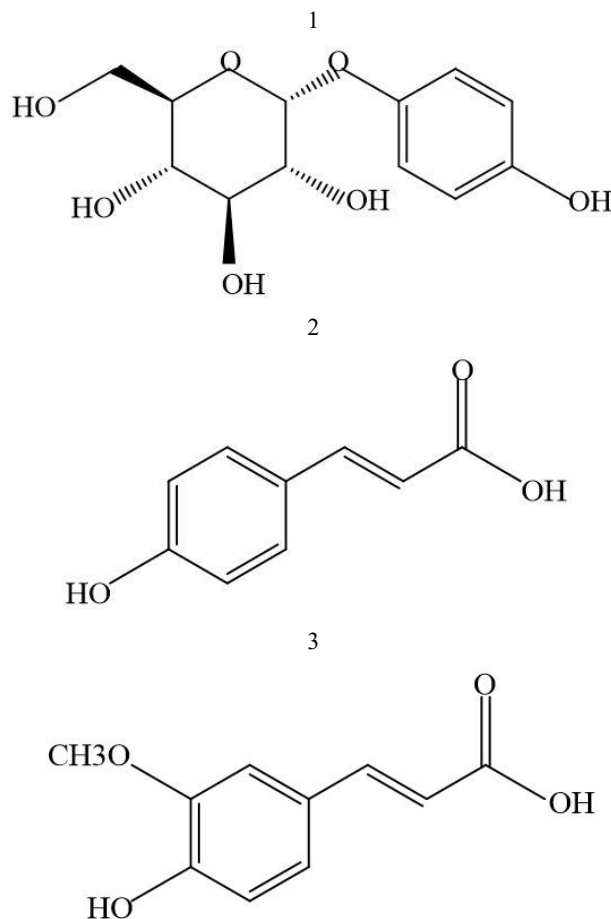


Fig. 2. Chemical structure of compounds 1~3 isolated from *Betula schmidtii* Bark.

## 2. 화학구조 규명

### 1) 화합물 1

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=90:10(v/v) 용매로 용출된 소분획 중 fractions No. 6-9로부터 분리된 화합물 1은 백색 분말로 FeCl<sub>3</sub>와 anisaldehyde 반응에서 양성을 나타내었고, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 전형적인 di-substituted benzene ring에서 유래된 proton signal들이 관찰되었다. 화합물 1의 proton signal과 인접한 proton과의 결합양상을 표시하는 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서 δ 9.01(1H, br s)에서 확인된 1개의 hydroxyl proton peak가 ESI-MS(negative ion mode) *m/z* 253[M-H-OH]<sup>+</sup> fragmentation peak에서 관찰되었다. Anisaldehyde test에서 positive 반응을 나타내고, δ 3.15~δ 3.69의 proton peaks 및 δ 4.65(1H, d, *J*=7.5 Hz) proton peak와 함께 1분자의 당이 분리된 *m/z* 91[M-H-OH-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup> fragmentation peak를 통해 화합물 1에 당이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서 δ 6.67(2H, d)의 proton peaks들은 δ 6.87(2H, d)의 proton peaks들과 서로 *ortho* coupling(*J*=9.0 Hz)하는 것으로 확인되었으며, δ 4.65(1H, d)는 전형적인 anomeric proton peak이며 인접한 phenol group과 β 결합(*J*=7.5 Hz)하는 것으로 관찰되었으며, 이는 <sup>13</sup>C-NMR에서 δ 102.7에서 관찰된 전형적인 anomeric carbon peak로도 확인할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR의 carbon peaks와 동일한 위치에 결합하고 있는 proton과의 결합을 보여주는 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC spectrum에서 δ 151.2(C-1)와 δ 152.6(C-4)에서 quaternary carbon signal들이 관찰되었으며, 이들 peaks들은 δ 6.87(2H, d, *J*=9.0 Hz, H-2,6)의 proton peak들과 결합하는 것으로 확인되었다. 화합물 1의 glycoside 부분은 D-glucopyranoside 유래의 carbon signals인 δ 61.5(C-6'), δ 71.2(C-4'), δ 73.2(C-2'), δ 76.8(C-5'), δ 77.8(C-3') 및 δ 102.7(C-1') peaks와 δ 4.56~δ 5.25의 hydroxy group의 proton peaks들을 통해 확인하였다. 이 화합물은 표준품과의 co-TLC 및 문헌(Deans 등 2018)과 비교하여 화학구조를 *p*-hydroxyphenyl-*O*-β-D-glucopyranoside(arbutin)로 결정하였다.

Arbutin (*p*-Hydroxyphenyl-*O*-β-D-glucopyranoside, C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>) (1)

Bright white powder, FeCl<sub>3</sub>, Anisaldehyde test: positive; UV λ<sub>max</sub>(MeOH, nm): 218, 257, 294, 352; ES-MS(negative ion mode) *m/z* 271.24[M-H]<sup>+</sup>, 253[M-H-OH]<sup>+</sup>, 91[M-H-OH-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.15(H-4'), 3.19(H-2'), 3.24(H-5'), 3.46(1H, m, H-6'a), 3.69(1H, m, H-6'b), 4.56(1H, s, OH), 4.65(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1'), 4.99(1H, s, OH), 5.05(1H, s, OH), 5.25(1H, s, OH), 6.67(2H, d, *J*=9.0 Hz, H-3,5), 6.87(2H, d, *J*=9.0 Hz, H-2,6), 9.01(OH); <sup>13</sup>C-

NMR(125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 61.5(C-6'), 71.2(C-4'), 73.2(C-2'), 76.8(C-5'), 77.8(C-3'), 102.7(C-1'), 115.4(C-3,5), 118.0(C-2,6), 151.2(C-1), 152.6(C-4).

### 2) 화합물 2

Silica gel column chromatography에 의해 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=97:3(v/v) 용매로 용출시킨 소분획 중 fractions No. 7-9로부터 분리된 화합물 2는 백색분말로 FeCl<sub>3</sub> 반응에서 양성을 나타내었고, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 전형적인 di-substituted benzene ring에서 유래된 proton signal들과 trans형 olefinic double bond proton signal들이 관찰되었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서는 δ 9.1(2H, br s)에서 확인된 2개의 proton peaks 및 ESI-MS(negative ion mode) *m/z* 145[M-H-OH]<sup>+</sup> fragmentation peak와 *m/z* 117[M-H-COOH]<sup>+</sup> fragmentation peak를 통해 화합물에 1개의 hydroxyl group과 1개의 carboxylic acid group이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서 δ 6.82(2H, d)의 proton peaks들은 δ 7.46(2H, d)의 proton peaks들과 서로 *ortho* coupling(*J*=9.0 Hz) 결합하는 것으로 확인되었다. 또한 δ 6.29(1H, d)와 δ 7.62(1H, d)의 olefinic proton peaks들은 서로 *ortho* coupling(*J*=16.0 Hz)하는 것으로 확인되었다. 또한 <sup>13</sup>C-NMR의 carbon peaks와 동일한 위치에 결합하고 있는 proton과의 결합을 보여주는 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC spectrum에서도 δ 150.5(C-4)과 δ 170.1(C-9)에서 quaternary carbon signal들이 관찰되었으며, ESI-MS(negative ion mode)에서도 *m/z* 145[M-H-OH]<sup>+</sup> 및 *m/z* 117[M-H-OH]<sup>+</sup> fragmentation peaks로 hydroxyl group과 carboxylic acid group이 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이 화합물은 표준품과의 co-TLC와 문헌(Kim & Kim 2000)을 통해 화학구조를 *p*-coumaric acid로 결정하였다.

*p*-Coumaric acid (3-(4-Hydroxyphenyl)-2-propenoic acid, *p*-Hydroxycinnamic acid, C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (2)

white powder; FeCl<sub>3</sub> test: positive; UV λ<sub>max</sub>(MeOH, nm) 202, 210(sh), 226, 300, 309; ESI-MS(negative ion mode) *m/z* 163[M-H]<sup>+</sup>, 145[M-H-OH]<sup>+</sup>, 127[M-H-2OH]<sup>+</sup>, 117[M-H-COOH]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.29(1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8), 6.82(2H, d, *J*=9.0 Hz, H-2,6), 7.46(2H, d, *J*=9.0 Hz, H-3,5), 7.62(1H, d, *J*=16.0 Hz, H-7), 9.1(2H, br s, OH); <sup>13</sup>C-NMR(125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 114.5(C-8), 115.4(C-2,6), 126.0(C-1), 130.1(C-3,5), 145.4(C-7), 150.5(C-4), 170.1(C-9).

### 3) 화합물 3

Silica gel column chromatography에 의해 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=97:3(v/v) 용매로 용출시킨 소분획 중 fractions No. 10-11로부

터 분리된 화합물 3는 백색분말로 FeCl<sub>3</sub> 반응에서 양성을 나타내었고, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 전형적인 tri-substituted benzene ring에서 유래된 proton signal들과 trans형 olefinic double bond proton signal들이 관찰되었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서는 δ 9.0(2H, br s)의 proton peaks가 ESI-MS (negative ion mode) *m/z* 175[M-H-OH]<sup>+</sup> peak와 *m/z* 147[M-H-COOH]<sup>+</sup> fragmentation peaks를 통해 화합물에 각각 1개의 hydroxyl group과 carboxylic acid가 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었으며, <sup>13</sup>C-NMR에서는 2개의 quaternary carbonyl peak들이 δ 150.5와 δ 171.1에서 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR에서는 δ 3.80(3H, s)에서 1개의 methoxyl peak가 확인되었고, δ 6.82(1H, d), δ 7.07(1H, dd) 및 δ 7.17(1H, d)에서 전형적인 tri-substituted benzene ring의 proton peak들을 확인할 수 있었으며, 이들 peaks는 각각 *ortho* coupling(*J*=8.0 Hz), *ortho*와 *meta* coupling(*J*=2.0, 8.0 Hz) 및 *meta* coupling(*J*=2.0 Hz)하는 것으로 확인되었다. 또한 δ 6.32(1H, d)와 δ 7.61(1H, d)의 olefinic proton peaks들은 서로 *ortho* coupling (*J*=16.0 Hz) 결합하는 것으로 확인되었다. <sup>13</sup>C-NMR의 carbon peaks와 동일한 위치에 결합하고 있는 proton과의 결합을 보여주는 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC spectrum에서 δ 3.80의 methoxyl proton peak가 δ 56.5에 위치한 carbon peak와 결합하는 것이 확인되었다. 또한 δ 9.0(2H, br s)의 2개의 proton peak들이 δ 150.5(C-4)와 δ 171.1(C-9)의 quaternary carbon signal들과 결합하는 것이 관찰되었으며, 이는 ESI-MS(negative ion mode)에서 *m/z* 175[M-H-OH]<sup>+</sup>와 *m/z* 147[M-H-COOH]<sup>+</sup>에서 hydroxyl group과 carboxylic acid group의 존재로도 확인할 수 있었다. 이 화합물은 표준품과의 co-TLC와 문헌(Zduńska 등 2018)을 통해 화학구조를 ferulic acid로 결정하였다.

Ferulic acid (3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propionic acid, C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>) (3)

White powder; FeCl<sub>3</sub> test: positive; UV λ<sub>max</sub>(MeOH, nm): 202, 231(sh), 292, 320; ESI-MS(negative ion mode) *m/z* 193[M-H]<sup>+</sup>, 175[M-H-OH]<sup>+</sup>, 157[M-H-2OH]<sup>+</sup>, 147[M-H-COOH]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.80(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.32(1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8), 6.82(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5), 7.07(1H, dd, *J*=2.0, 8.0 Hz, H-6), 7.17(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.61(1H, d, *J*=16.0 Hz, H-7), 9.0(2H, br s, OH); <sup>13</sup>C-NMR(125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 56.5(OCH<sub>3</sub>), 111.8(C-2), 116.0(C-5), 116.5(C-8), 124.0(C-6), 127.8(C-1), 146.9(C-7), 148.9(C-3), 150.5(C-4), 171.1(C-9).

### 3. 화합물의 활성 측정

박달나무 수피 EtOAc 가용성 분획물로부터 분리된 화합

물 1~3의 DPPH free radical scavenging 및 tyrosinase 저해 활성이 Table 1에 제시되고 있다. 시료의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 가용성 분획물의 활성실험 결과, EtOAc 가용성 분획물이 가장 높은 활성(IC<sub>50</sub>, mg/mL: DPPH free radical activity=37.8±1.42; tyrosinase inhibitory activity=38.1±1.40)을 보여 주었으며 추출용매에 따라 서로 다른 활성을 보이는 것은 용매의 유전률에 따라 용해되는 phytochemicals의 종류와 함량의 차이로 인한 것이다(Nacz & Shahidi 2004; Eom 등 2021). 특히 phenol, flavonoid, tannin과 ursolic acid의 함량이 추출용매에 따라 현저한 차이를 보여주며, 이는 항산화 활성과도 높은 상관관계가 있다(Hong 등 2021). 페놀성 화합물의 항산화 활성은 benzene환에 결합된 수산기의 수 및 결합위치에 따라 활성에 차이를 나타낸다(Zhang 등 2012). DPPH assay에 의한 항산화력은 DPPH radicals과 반응하는 강력한 hydrogen donors가 존재하는 화합물의 경우 높은 활성을 보여준다. 실험 결과, 화합물 1~3의 항산화력은 모두 benzene ring에 존재하는 hydroxyl groups에 의한 DPPH radical-scavenging activity에 의한 것으로 설명될 수 있다. 화합물 2(IC<sub>50</sub>, 21.32±1.07 μM)의 DPPH free radical scavenging 활성이 화합물 3(IC<sub>50</sub>, 34.41±1.24 μM)보다 더 높게 나타난 것은 benzene ring에 결합된 hydroxyl group의 수는 모두 1개로 동일하나, 화합물 3에 존재하는 methoxyl group이 활성에 영향을 준 것으로 판단된다. 천연 항산화제로 사용되는 L-ascorbic acid의 IC<sub>50</sub> value는 2.40±0.17 μM로 기 발표된 문헌(Le 등 2019)과 유사한 결과를 나타내었다. 화합물의 tyrosinase 저해활성은 화합물 1, 31.14±1.07 μM, 2, 42.54±1.46 μM 및 3, 69.22±1.43 μM으로 확인되었으며, 화합물 1이 대조 화합물인 kojic acid보다는 효능이 낮으나 천연물

**Table 1. DPPH free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activity of compounds 1-3 isolated from *Betula schmidtii* Bark**

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>1)</sup>	
	DPPH free radical scavenging activity	Tyrosinase inhibitory activity
1	29.74±1.52 <sup>c</sup>	31.10±1.07 <sup>b</sup>
2	21.32±1.07 <sup>b</sup>	42.54±1.46 <sup>c</sup>
3	34.41±1.24 <sup>d</sup>	69.22±1.43 <sup>d</sup>
L-Ascorbic acid <sup>2)</sup>	2.40±0.17 <sup>a</sup>	-
Kojic acid <sup>2)</sup>	-	21.80±0.24 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> All values are mean±S.D. (n=3).

<sup>2)</sup> Positive control.

<sup>a-d)</sup> Means within the same column are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple range test.

유래 anti-tyrosinase로서의 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. 이번 실험에서 박달나무 수피에서 분리된 화합물 1~3의 DPPH free radical scavenging 및 tyrosinase 저해활성은 화학구조의 차이로 인해 작용기전이 상이할 수 있으나, 화합물의 benzene환에 결합된 hydroxyl group이 주요한 active site로 작용(Kim 등 2019, Sroka & Cisowski 2003)하고 있음을 알 수 있다. DPPH assay에 의한 항산화력은 DPPH radicals과 반응하는 강력한 hydrogen donors가 존재하는 화합물의 경우 높은 활성을 보여주며, 분리된 화합물 1~3에 존재하는 hydroxyl group으로 인해 DPPH radical scavenging 효과를 보여주고 있다.

천연에 존재하는 phenolic acids는 phenol성 화합물 중에서 가장 많은 종류로 구성된 중요한 대사산물로, C6-C1 또는 C6-C3의 기본구조로 이루어져 있으며, 식물의 생합성 과정에서 shikimic acid 또는 phenylpropanoid pathway를 통해 합성이 조절된다(King & Young, 1991). Phenolic acids는 천연물의 중요 화합물인 tannins, coumarins, benzoquinones, naphthoquinones의 전구체로 작용하기도 하며, 특히 caffeic acid, ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, salicylic acid와 gallic acid 등이 이에 포함되며, 천연에 존재하는 페놀성 화합물은 인체에 중요한 건강효능을 제공한다(Siah 등 2016).

박달나무 수피에서 분리된 arbutin(1)은 식물체에 널리 분포된 천연소재이며 1,4-dihydroxybenzene 구조에 1개 분자의 D-glucose가  $\beta$  결합하고 있으며, 항산화, 항균, 피부보호 효과(Maeda & Fukuda 1996; Migas & Krauze-Baranowska 2015; Xu 등 2015) 등 활성이 우수하여 화장품과 건강식품 소재 개발에 널리 활용되고 있다. 최근에는 수요가 증가하고 있으며, 보다 신속하고 효율적인 방법으로 arbutin 대량 생산을 위한 연구가 지속되고 있다. Arbutin의 주요 작용부위는 1,4-dihydroxybenzene group으로 판단되며(Zhou 등 2019), 이번 실험에서 확인된 arbutin의 높은 tyrosinase 활성 저해 효능(IC<sub>50</sub>, 31.14±1.07  $\mu$ M)은 *ortho* 결합한 2개의 hydroxyl groups에 의한 것으로 판단된다. Ferulic acid(3)는 토마토와 밀기울 등 식물 유래의 천연물에 다량으로 존재하며, 독성이 낮고 anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-microbial, anti-cancer, anti-diabetic 등의 활성으로 기능성 식품과 의약품에 널리 이용되고 있다. 또한 ferulic acid는 피부 보호작용이 우수하고, 각질세포, 섬유아세포, 콜라겐, 엘라스틴 형성과 멜라닌 형성을 억제하며, 상처 치료에 효과가 높아 face masks, 보습 크림과 로션 등 화장품 개발 시 0.5~1.0%의 비율로 첨가된다(Zduńska 등 2018). 이번 연구를 통해 박달나무 수피에 존재하는 것으로 확인된 arbutin, *p*-coumaric acid와 ferulic acid는 효능이 높고 비교적 안정한 기능성 소

재로 활용 시 충분한 가치를 지닌 천연물 유래 화합물로 평가된다.

## 요약 및 결론

천연물에 함유된 미량의 식물화학성분(phytochemicals)은 그 화학구조가 다양하며 고유의 생리활성을 가지고 있으므로 꾸준히 연구가 진행되고 있다. 천연물로부터 건강효능이 우수한 식물화학성분을 규명하기 위해서는 화합물을 순수하게 분리하고 화학구조 결정을 위한 기초연구 과정이 필요하다. 박달나무 수피를 열수로 추출하고, MeOH 가용성 부분과 잔사(residue) 부분으로 분획한 후에 MeOH 가용성 분획물을 농축하여 용매의 유전률에 따라 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, water 가용성 분획에 대한 TLC 분석을 수행하였다. UV 및 FeCl<sub>3</sub> 발색반응으로 다수의 페놀성 화합물의 존재가 확인되는 EtOAc 가용성 분획물을 실험재료로 하여 silica gel과 Sephadex LH-20 open column chromatography를 반복 시행하여 순수 화합물 1-3을 분리하였다. UV-Vis, ESI-MS(negative ion mode), <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC spectral data를 사용하여 단일물질의 화학구조를 arbutin(1), *p*-coumaric acid(2), ferulic acid(3)로 규명하였다. 화합물의 DPPH free radical scavenging (IC<sub>50</sub>,  $\mu$ M/mL) 및 tyrosinase 저해 활성(IC<sub>50</sub>,  $\mu$ M/mL)이 각각 화합물 1, 29.74±1.52, 31.10±1.07; 화합물 2, 21.32±1.07, 42.54±1.46; 화합물 3, 34.41±1.24, 69.22±1.43을 나타내었다.

## References

- Bae EH. 2014. Biopharmaceutics Trend Report. Korea Bio-Economy Research Center
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Chung HS. 2001. Isolation of new bioactive phytochemicals from natural products. *Food Ind Nutr* 6:53-59
- Deans BJ, Kilah NL, Jordan GJ, Bissember AC, Smith JA. 2018. Arbutin derivatives isolated from ancient Proteaceae: Potential phytochemical markers present in *Bellendena*, *Cenarrhens*, and *Persoonia* genera. *J Nat Prod* 81: 1241-1251
- Eom HJ, Shin HY, Ji YM, Kwon NR, Yoon HS, Kim IJ, Song Y, Yu KW. 2021. Nutritional components and physiological activity of *Centella asiatica* cultured in Chungju by drying method. *Korean J Food Nutr* 34: 165-173

- Flurkey WH. 1991. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci* 56:93-95
- Guon TE, Chung HS. 2016. Hyperoside and rutin of *Nelumbo nucifera* induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells. *Oncol Lett* 11:2463-2470
- Han BH, Chi HJ. 1974. Triterpenoids of *Betua latifolia* KOMAROV. *Korean J Pharmacogn* 5:45-47
- Hong JJ, Seol HG, Oh JY, Jeong EH, Chang YH. 2021. Effective component contents and antioxidative activities of unripe apple by extraction methods. *Korean J Food Nutr* 34:174-180
- Jeong HS. 2001. Isolation of new bioactive phytochemicals from natural products. *Food Ind Nutr* 6:53-59
- Kim JY, Kim JY, Jenis J, Li ZP, Ban YJ, Baiseitova A, Park KH. 2019. Tyrosinase inhibitory study of flavonolignans from the seeds of *Silybum marianum* (Milk thistle). *Bioorg Med Chem* 27:2499-2507
- Kim SH, Jeon BJ, Kim DH, Kim BR, Lee KY, Kim TB, Park JH, Kim YC, Sung SH. 2010. Cognitive enhancing activity of *Betula platyphylla* sap in scopolamine induced amnesic mice. *Nat Prod Sci* 16:50-53
- Kim SR, Kim YC. 2000. Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of *Scrophularia buergeriana*. *Phytochemistry* 54:503-509
- King A, Young G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Acad Nutr Diet* 99:213-218
- Le DD, Nguyen DH, Zhao BT, Min BS, Song SW, Woo MH. 2019. Quantitation and radical scavenging activity evaluation of iridoids and phenylethanoids from the roots of *Phlomis umbrosa* (Turcz.) using DPPH free radical and DPPH-HPLC methods, and their cytotoxicity. *Nat Prod Sci* 25:122-129
- Loub WD, Farnsworth NR, Soejarto DD, Quinn ML. 1985. NAPRALERT: Computer handling of natural product research data. *J Chem Inf Comput Sci* 25:99-103
- Maeda K, Fukuda M. 1996. Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther* 276:765-769
- Menković N, Šavikin K, Tasić S, Zdunić G, Stešević D, Milosavljević S, Vincek D. 2011. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol* 133:97-107
- Migas P, Krauze-Baranowska M. 2015. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochem Lett* 13:35-40
- Naczek M, Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 1054:95-111
- Rastogi S, Pandey MM, Rawat AKS. 2015. Medicinal plants of the genus *Betula* – Traditional uses and a phytochemical – pharmacological review. *J Ethnopharmacol* 159:62-83
- Siah M, Farzaei MH, Ashrafi-Kooshk MR, Adibi H, Arab SS, Rashidi MR, Khodarahmi R. 2016. Inhibition of guinea pig aldehyde oxidase activity by different flavonoid compounds: An *in vitro* study. *Bioorg Chem* 64:74-84
- Sroka Z, Cisowski W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 41:753-758
- Woo WS. 2001. Study on Natural Products Chemistry. Seoul National University Press
- Xu WH, Liang Q, Zhang YJ, Zhao P. 2015. Naturally occurring arbutin derivatives and their bioactivities. *Chem Biodivers* 12:54-81
- Yang EJ, An JH, Son YK, Yeo JH, Song KS. 2018. The cytotoxic constituents of *Betula platyphylla* and their effects on human lung A549 cancer cells. *Nat Prod Sci* 24:219-224
- Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztein H. 2018. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacol Physiol* 31:332-336
- Zhang HM, Wang CF, Shen SM, Wang GL, Liu P, Liu ZM, Wang YY, Du SS, Liu ZL, Deng ZW. 2012. Antioxidant phenolic compounds from Pu-erh tea. *Molecules* 17:14037-14045
- Zhou H, Zhao J, Li A, Reetz MT. 2019. Chemical and biocatalytic routes to arbutin. *Molecules* 24:3303

---

Received 09 August, 2021

Revised 05 October, 2021

Accepted 14 October, 2021