

매실나무 가지 추출물의 항산화, 항염, 항균 활성 및 유효성분 연구

김혜빈* · 김정은** · 이남호***,†

*제주대학교 화학·코스메틱스학과, 석사과정

**제주대학교 화학·코스메틱스학과, 연구원

***제주대학교 화학·코스메틱스학과, 교수

(2024년 6월 28일 접수, 2024년 8월 14일 수정, 2024년 8월 27일 채택)

Anti-oxidative, Anti-inflammatory and Anti-bacterial Constituents from the Extract of *Prunus mume* Branches

Hye Bin Kim, Jung Eun Kim, and Nam Ho Lee[†]

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea

(Received June 28, 2024; Revised August 14, 2024; Accepted August 27, 2024)

요약: 본 연구에서는 매실나무(*Prunus mume*, *P. mume*) 가지 추출물의 항산화, 항염, 항균 활성 및 유효성분을 연구하였다. 매실나무 가지의 ethyl acetate (EtOAc) 분획물에서 noreugenin (**1**), naringenin (**2**), prunin (**3**), procyanidin A2 (**4**) 및 epiafzelechin-(2 β →O→7, 4 β →8)-epicatechin (**5**)의 5개 화합물을 분리하여 NMR 스펙트럼을 포함한 분광 데이터를 기반으로 화학 구조를 동정하였다. DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼을 이용한 항산화 실험에서 추출물, EtOAc 및 *n*-butanol (BuOH) 분획물과 분리된 화합물 **4**, **5**는 강력한 라디칼 소거 활성을 보였다. RAW 264.7 대식세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, *n*-hexane (Hex), EtOAc 분획물 및 분리된 화합물 **1** ~ **5**는 세포 독성 없이 농도 의존적으로 nitric oxide (NO)의 생성을 억제하였다. 또한, 추출물과 *n*-Hex, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 *Staphylococcus epidermidis* 및 *Cutibacterium acnes*에 대하여 항균 활성을 보였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 매실나무 가지 추출물, 용매 분획물 및 분리된 화합물은 항산화, 항염 및 항균 효과를 갖는 천연 화장품 소재로 적용 가능할 것이라 사료된다.

Abstract: In this study, we investigated anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial constituents from the extract of *Prunus mume* (*P. mume*) branches. Five phytochemicals were isolated from the ethyl acetate (EtOAc) fraction of *P. mume* branches; noreugenin (**1**), naringenin (**2**), prunin (**3**), procyanidin A2 (**4**) and epiafzelechin-(2 β →O→7, 4 β →8)-epicatechin (**5**). The chemical structures of isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra as well as comparison of the data to the literature values. Upon the anti-oxidative studies by DPPH and ABTS⁺ radicals, potent radical scavenging activities were observed in the extract, EtOAc, *n*-butanol (BuOH) fractions and isolated compounds **4**, **5**. In the anti-inflammatory tests using RAW 264.7 macrophages, the *n*-hexane (Hex), EtOAc fractions and compounds **1-5** inhibited production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. Also, the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-BuOH fractions showed anti-bacterial activities against *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*. Based on these results, it was suggested that the extract, solvent fractions and phytochemicals from *P. mume* branches could be applicable as natural source for cosmetic ingredients.

Keywords: *Prunus mume*, anti-oxidation, anti-inflammation, anti-bacterial, isolation

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

1. 서론

사람의 피부는 노화가 진행되면서 주름이 생기고 시간이 지남에 따라 그 정도가 깊어진다. 노화의 원인은 크게 내인성과 외인성 요인으로 구분된다. 내인성 요인에 의한 노화는 나이가 들면서 자연스럽게 피부의 구조와 생리적 기능이 감퇴하여 진행되는 자연노화를 말한다. 반면, 외인성 노화는 자외선 같은 외부 환경에 장기간 노출되어 진행되는 것으로, 체내에 과잉 생성되는 활성산소 또한 외인성 요인이라 할 수 있다[1]. Superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($\cdot OH$)을 포함하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 인체에서 자연적으로 발생하는 화학종이지만 외부요인에 의해 과잉 생산될 경우 세포의 구조 및 기능에 유해한 산화 스트레스를 초래하게 되어 피부 노화를 가속화시킨다[2,3].

염증은 감염 치유 및 조직 재생 증진의 보호 기능을 지니고 있지만, 조절되지 않은 과도한 염증은 조직 손상이나 질병 유발의 원인이 된다[4]. 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포에서 가장 강력한 염증 활성화제로서 다양한 전염증성 매개체들을 발현시킨다[5]. Nitric oxide (NO)는 염증의 발병기전에서 작용하는 매개체로 항바이러스 및 항종양 등의 유익한 효과가 잘 알려져 있지만, 지속적인 NO의 생성은 여러가지 염증성 질환을 유발하고 유전자 변이 등에도 관여된다[6,7].

피부 마이크로바이옴은 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) 및 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)를 포함하는 다양한 공생 미생물로 구성되어 있으며, 피부 장벽 및 면역 체계를 유지하고 병원성 미생물 성장을 제한하는 데 기여하고 있다[8]. *C. acnes*는 안드로젠의 이상 분비에 의한 피부 지방 조성의 불균형 등으로 과다 증식하게 되면 여드름과 같은 피부질환을 유발한다[9]. 호기성균인 *S. epidermidis*는 외모나이나 모낭의 중간에서 성장하며, 원발성 피부질환 및 여드름 증상의 속발성을 악화시키는 원인균이다. 이러한 *C. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 매개하는 염증성 여드름의 치료에는 항생제가 주로 사용되고 있으나, 이들은 화장품 응용이 부적합한 의약품 항생제나 화학 합성품들이 대부분이며 피부자극, 간독성 혹은 내성 발생 등의 부작용이 알려져 있다[10,11].

매실나무(*Prunus mume*, *P. mume*)는 장미과에 속하는 나무로 매화나무라고도 하며 높이가 5 ~ 10 m이다. 원산지는 중국의 사천성과 호북성의 산간지로 알려져 있으며, 현

재는 주로 일본, 한국, 베트남에서 서식한다. 잎은 매엽, 꽃은 매화, 열매는 매실이라고 하며, 매화를 이용한 우리나라 고유의 식품으로 매화주, 매화죽, 매화차 등이 있고, 매실을 이용한 매실주, 매실초, 매간 등이 있다. 이처럼 다양한 용도로 약용하는 매실나무 열매와 꽃 추출물에 대해서는 항산화, 항염, 항균, 미백 등의 효능이 보고되어 있으나 [12-14], 매실나무 가지를 대상으로 한 효능 및 유효성분 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 매실나무의 가지를 추출 및 용매 분획하여 항산화, 항염 및 항균 효능을 확인하고 유효성분을 분리·동정하여 화장품 소재로의 활용 가능성을 알아보려고 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merk (Germany), 대정화금(Korea) 및 삼전화학(Korea)의 제품을 사용하였다. Medium pressure liquid chromatography (MPLC, BÜCHI, Switzerland)에는 FlashPure EcoFlex C₁₈ (220 g, BÜCHI, Switzerland) 컬럼, gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (25 ~ 100 μ m, GE HealthCare, USA)을 사용하였다. 분리된 화합물의 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer는 JNM-ECX 400 (JEOL, Japan)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (USA)의 NMR 전용 용매를 사용하였다.

2.2. 매실나무 가지의 추출 및 용매 분획

실험에 사용한 매실나무 가지(시료번호 : 403)는 서귀포시 안덕면 동광리에서 2021년 9월에 채집하여 건조한 시료를 제주자연식물연구소(Korea)에서 구입하여 분쇄 후 사용하였다. 시료 1 kg을 70% 에탄올 20 L에 침출시킨 후 교반기를 이용하여 상온에서 24 h 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 여과하고 남은 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1 회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕상에서 감압 농축하고 동결건조하여 추출물 94.8 g을 얻었으며, 얻어진 추출물 45 g을 증류수에 현탁시키고, 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex, 1.4 g), ethyl acetate (EtOAc, 14.3 g), *n*-butanol (BuOH, 13.5 g), H₂O (15.4 g) 분획물을 얻었다.

2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 세분화하기 위해 MPLC를 수행하였으며, H₂O/MeOH의 용매 조건으로 기울기 용리법을 이용해 5 ~ 50% MeOH (90 min), 50 ~ 100% MeOH (20 min), 100% MeOH (20 min)의 조건으로 20 mL/min의 유속으로 용출시켜 총 105 개의 소분획을 얻었다(Fr. MP1 ~ 105). Fr. MP58 ~ 65 (581.4 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CC, CHCl₃ : MeOH = 2 : 1)를 통해 7 개의 소분획(Fr. MP58-1 ~ 7)으로 나누었으며, 그 중 Fr. MP58-6 (271.6 mg)은 Sephadex LH-20 CC (CHCl₃ : MeOH = 3 : 1)를 하여 7 개의 소분획(Fr. MP58-6-1 ~ 7)으로 나누어 화합물 **5** (46.9 mg)를 얻었다. Fr. MP58-6-7 (185.2 mg)은 Sephadex LH-20 CC (CHCl₃ : MeOH = 3 : 1)를 통해 화합물 **4** (5.6 mg)를 분리하였다. Fr. MP76 ~ 82 (470.8 mg)는 Sephadex LH-20 CC (CHCl₃ : MeOH = 5 : 1)를 하여 화합물 **3** (52.7 mg)을 얻었다. Fr. MP90 ~ 93 (181.8 mg)은 Sephadex LH-20 CC (CHCl₃ : MeOH = 3 : 1)를 하여 4 개의 소분획(Fr. MP90-1 ~ 4)으로 나누었으며, 그 중 Fr. MP90-2 (41.9 mg)는 Sephadex LH-20 CC (CHCl₃ : MeOH = 5 : 1)를 통해 화합물 **1** (14.5 mg)을 분리하였으며, Fr. MP90-3 (80.6 mg)은 Sephadex LH-20 CC (CHCl₃ : MeOH = 10 : 1)를 하여 화합물 **2** (79.2 mg)를 얻었다.

Noreugenin (1) ¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H: 6.73 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.63 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 6.12 (1H, s, H-3), 2.10 (3H, s, 2-CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ_C: 183.2 (C-4), 167.6 (C-7), 166.3 (C-5), 163.6 (C-9), 159.3 (C-2), 109.1 (C-3), 105.1 (C-10), 100.4 (C-6), 95.1 (C-8), 20.4 (2-CH₃)

Naringenin (2) ¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H: 7.55 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-2', 6'), 7.24 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3', 5'), 6.50 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 6.40 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 5.51 (1H, dd, *J* = 12.8, 2.8 Hz, H-2), 3.31 (1H, dd, *J* = 17.2, 12.8 Hz, H-3), 2.90 (1H, dd, *J* = 17.2, 2.8 Hz, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ_C: 196.9 (C-4), 169.0 (C-5), 165.6 (C-7), 164.4 (C-9), 159.9 (C-4'), 130.1 (C-1'), 129.2 (C-2', 6'), 116.8 (C-3', 5'), 103.3 (C-10), 97.6 (C-6), 96.5 (C-8), 80.0 (C-2), 43.7 (C-3)

Prunin (3) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.32 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.21 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J* = 1.8 Hz,

H-6), 5.38 (1H, dd, *J* = 12.8, 2.8 Hz, H-2), 4.97 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1''), 3.89~3.40 (6H, overlapped, H-2''~6'') 3.17 (1H, dd, *J* = 17.2, 12.8 Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, *J* = 17.2, 2.8 Hz, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 198.7 (C-4), 167.2 (C-7), 165.1 (C-9), 164.8 (C-5), 159.3 (C-4'), 131.0 (C-2', 6'), 129.3 (C-1'), 116.5 (C-3', 5'), 105.1 (C-10), 101.4 (C-1''), 98.1 (C-8), 97.0 (C-6), 80.9 (C-2), 78.4 (C-5''), 77.9 (C-3''), 74.8 (C-2''), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 44.3 (C-3)

Procyanidin A2 (4) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.15 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-12'), 7.13 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-12), 7.03 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H-16), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, H-16'), 6.84 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-15), 6.82 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-15'), 6.09 (1H, s, H-6'), 6.06 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-8), 5.89 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-6), 5.03 (1H, s, H-2'), 4.40 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-4), 4.24 (1H, brs, H-3'), 4.16 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-3), 2.92 (1H, dd, *J* = 16.9, 4.1 Hz, H-4'), 2.85 (1H, dd, *J* = 16.9, 2.3 Hz, H-4'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 158.3 (C-7), 156.9 (C-5), 156.8 (C-5'), 154.3 (C-9), 152.2 (C-7'), 151.4 (C-9'), 147.0 (C-14'), 147.0 (C-13'), 146.4 (C-14), 145.9 (C-13), 132.5 (C-11), 131.6 (C-11'), 120.0 (C-16'), 119.6 (C-16), 116.3 (C-12), 115.9 (C-15), 115.8 (C-15'), 115.4 (C-12'), 107.1 (C-8'), 104.2 (C-10), 102.0 (C-10'), 100.6 (C-2), 98.1 (C-6), 96.7 (C-8), 96.6 (C-6'), 81.0 (C-2'), 67.9 (C-3), 67.3 (C-3'), 29.6 (C-4'), 29.4 (C-4)

Epiafzelechin-(2β→O→7, 4β→8)-epicatechin (5) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.51 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-12, 16), 7.13 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-12'), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H-16'), 6.85 (1H, dd, *J* = 8.2 Hz, H-15'), 6.83 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-13, 15), 6.09 (1H, s, H-6'), 6.07 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-8), 5.89 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-6), 5.03 (1H, s, H-2'), 4.42 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-4), 4.24 (1H, m, H-3'), 4.17 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-3), 2.95 (1H, dd, *J* = 17.2, 4.1 Hz, H-4'), 2.85 (1H, dd, *J* = 17.2, 2.3 Hz, H-4'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 159.1 (C-14), 158.3 (C-7), 156.9 (C-5), 156.8 (C-5'), 154.3 (C-9), 152.2 (C-7'), 151.5 (C-9'), 146.4 (C-14'), 146.4 (C-13'), 131.9 (C-11), 131.6 (C-11'), 129.7 (C-12, 16), 119.6 (C-16'), 116.3 (C-15'), 115.6 (C-13, 15), 115.4 (C-12'), 107.1 (C-8'), 104.2 (C-10), 102.1 (C-10'), 100.7 (C-2), 98.1 (C-6), 96.7 (C-8), 96.6 (C-6'), 81.0 (C-2'), 67.9 (C-3), 67.3 (C-3'), 29.6 (C-4'), 29.4 (C-4)

2.4. 항산화 활성

2.4.1. DPPH 라디칼 소거 활성

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법[15]을 응용하였고, 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 μ L와 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 30 min 동안 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율(%)을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma, USA)을 사용하였다.

2.4.2. ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma, USA) 양이온 라디칼 소거 활성은 Re 등의 방법[16]을 응용하였고, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate (Sigma, USA)를 혼합하여 실온 및 암소에서 16 h 동안 반응시켜 ABTS⁺ 라디칼을 형성시켰다. 이 용액을 에탄올로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02 가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 μ L와 ABTS⁺ 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 30 min 동안 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성 백분율(%)을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였다.

2.5. 항염 활성

2.5.1. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (GIBCO Inc., USA) 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 2 ~ 3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.5.2. NO 생성 억제 활성

24 well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 배양 후, 배지를 제거하였다. 100 ng/mL의 LPS (Sigma, USA)를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 μ L를 혼합하여 96 well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후

540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO₂, Sigma, USA)를 standard로 사용하여 정량하였다.

2.5.3. 세포 독성 평가(MTT Assay)

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Biossang, Korea) assay는 RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 전배양 후, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 500 μ g/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37 °C에서 3 ~ 4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.6. 항균 활성

2.6.1. 균주 배양

여드름균인 *C. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)와 표피 포도상구균인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)를 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. *C. acnes*는 배양배지를 Gifu anaerobic medium (GAM, MB cell, Korea)으로 하여 37 °C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양하였다. *S. epidermidis*는 배양 배지를 tryptic soy broth (TSB, Difco, USA)로 하여 37 °C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.6.2. 한천확산법(Paper Disc Diffusion Method)

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 한천확산법으로 생육 저지환(clear zone)의 크기를 확인하였다. 0.8% Agar를 포함하는 배지에 *C. acnes*는 5.0×10^7 CFU/mL, *S. epidermidis*는 1.5×10^6 CFU/mL로 맞춰준 후, 하드배지(1.5% agar) 위에 접종하였다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm의 paper disc를 올린 후, *C. acnes*는 37 °C에서 48 h 동안 혐기 배양하고, *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 동안 배양한 후, 형성된 원형 생육 저지환의 크기를 측정하였다. 양성 대조군으로는 erythromycin (Sigma, USA)을 사용하였다.

2.7. 매실나무 가지에서 분리된 화합물의 함량 분석

매실나무 가지에서 분리된 화합물 1 ~ 5의 함량을 확인하기 위해 HPLC (Alliance, Waters Co., USA), Kromasil

100-5-C18 (4.6 × 250 mm, AkzoNobel, Netherlands) 컬럼을 사용하여 정량 분석하였다. 이동상은 0.1% formic acid를 포함하는 증류수(용매 A)와 아세트나이트릴(용매 B)을 사용하였으며 유속은 0.7 mL/min, 주입량은 10 µL로 하였고 검출기는 UV detector (280 nm)를 사용하였다. 용출조건은 gradient mode로 60 min 동안 용매 B를 10 ~ 40%의 비율로 변화시키면서 용출시켰다. 농도별로 제조한 화합물 1 ~ 5의 피크 면적을 구하여 회귀 방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였으며, 검량선의 r² 값은 0.999 이상이었다.

2.8. 통계 분석

모든 실험은 3 회 반복으로 이루어졌으며, 실험 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 또한 excel software (version

2022, Microsoft Corp., USA)의 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성

매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정하였다. 매실나무 가지는 70% 에탄올을 이용하여 추출하였으며, 얻어진 추출물을 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 얻어 실험에 사용하였다. 매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성 실험 결과, 추출물 및

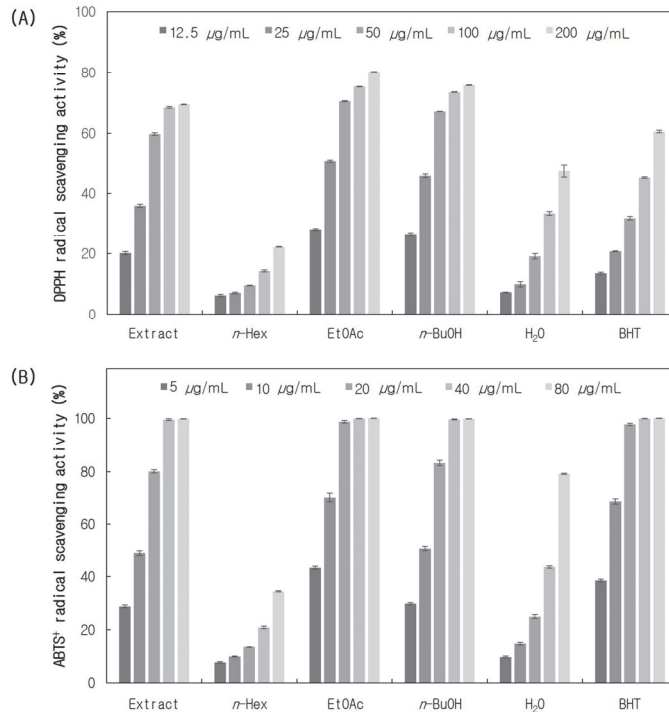


Figure 1. DPPH (A) and ABTS⁺ (B) radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *Prunus mume* (*P. mume*) branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 1. SC₅₀ Values of DPPH and ABTS⁺ Radical Scavenging Activities of Extract and Solvent Fractions from *P. mume* Branches

SC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
DPPH radical	40.1	> 200	24.7	32.5	> 200	130.9
ABTS ⁺ radical	10.9	> 80	5.9	10.3	47.8	6.9

¹⁾SC₅₀; scavenging concentration for 50% of radical

EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 40.1, 24.7, 32.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 BHT (SC₅₀ : 130.9 $\mu\text{g/mL}$) 보다 우수한 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 또한 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험에서도 추출물과 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 10.9, 5.9, 10.3 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 BHT (SC₅₀ : 6.9 $\mu\text{g/mL}$)와 유사한 라디칼 소거 활성을 보이는 것으로 확인되었다(Figure 1, Table 1).

3.2. 매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성

LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포를 이용하여 매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성 억제 활성 및

세포 독성을 측정하였다. 추출물과 용매 분획물을 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험한 결과, 추출물은 세포 독성 없이 NO의 생성을 30.7% 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 NO 생성 억제율이 각각 78.4%, 58.9%로 효능이 우수함을 확인하였다(Figure 2). 이와 같은 결과를 바탕으로 효능이 우수한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 12.5 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 추가적인 실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물 모두 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해하는 효과가 나타났으며, IC₅₀ 값이 *n*-Hex 분획물 13.2 $\mu\text{g/mL}$, EtOAc 분획물 65.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Figure 3).

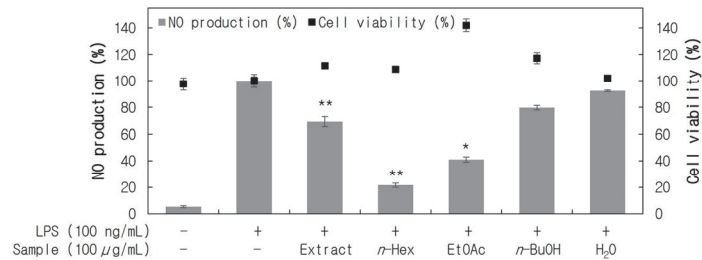


Figure 2. Effects of extract and solvent fractions from *P. mume* branches on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *P. mume* branches for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

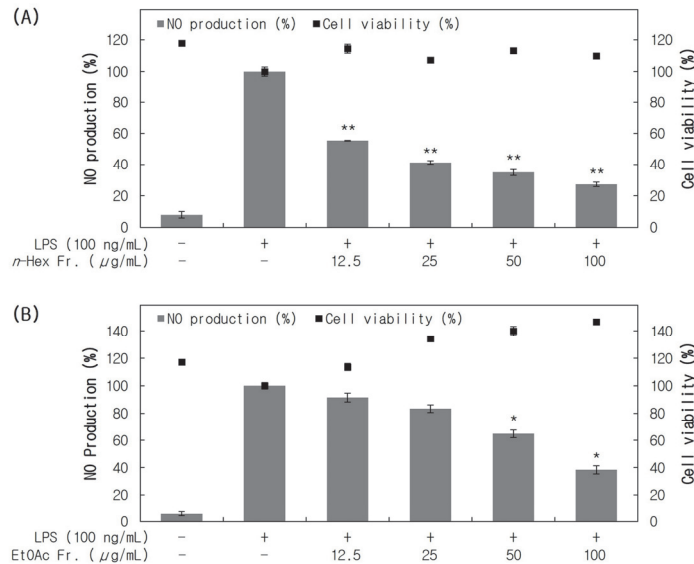


Figure 3. Effects of *n*-Hex (A) and EtOAc (B) fractions from *P. mume* branches on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions from *P. mume* branches for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

3.3. 매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성

매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균 중 여드름 관련 균주인 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*를 이용하여 한천 확산법으로 clear zone의 크기를 측정하였다. 각 시료는 4 mg이 되도록 8 mm paper disc에 주입하였으며, 양성 대조군으로는 erythromycin (40 µg)을 사용하였다. 실험 결과, H₂O 분획물을 제외한 모든 분획물 및 추출물에서 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 우수한 생육 억제 활성이 나타났으며, 특히 매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물은 erythromycin 내성 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3710) 및 *C. acnes* (CCARM 9009, 9010)에 대해서도 항균 효능이 있음을 확인하였다 (Table 2).

3.4. 매실나무 가지 추출물로부터 분리된 화합물의 구조 동정

항산화, 항염 및 항균 효과가 우수한 매실나무 가지 EtOAc 분획물에 대해 MPLC 및 컬럼 크로마토그래피를 하여 5개의 화합물을 분리하였으며, 분리된 화합물은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화학 구조를 동정하였다. 화합물 1은 ¹H NMR에서 δ_H 2.10 (3H, s) 피크의 적분값을 통해 methyl기가 있음을 확인할 수 있으며, δ_H 6.73 (1H, d, *J* = 1.8 Hz) 및 δ_H 6.63 (1H, d, *J* = 1.8 Hz)의 피크를 통해 meta-coupling을 하고 있는 aromatic ring을 예상할 수 있다. 또한 δ_C 183.2의 피크를 통해 carbonyl기를 확인할 수 있으며, ¹H 및 ¹³C NMR 데이터를 종합하여 문헌[17,18]을 통해 화합물 1은 noreugenin으로 동정하였다. 화합물 2는 ¹³C

Table 2. Anti-bacterial Activities of Extract and Solvent Fractions from *P. mume* Branches

	Clear zone (mm) ¹⁾					
	<i>S. epidermidis</i>			<i>C. acnes</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010
Extract	12	12	11	12	12	15
<i>n</i> -Hex	10	8.5	8.5	10	10	10
EtOAc	14	13	12	13	16	17
<i>n</i> -BuOH	12	11	11	12	13	14
H ₂ O	N.A. ²⁾	N.A. ²⁾	N.A. ²⁾	N.A. ²⁾	N.A. ²⁾	N.A. ²⁾
Erythromycin	30	N.A. ²⁾	29	50	N.A. ²⁾	N.A. ²⁾

¹⁾Concentration of sample : 4 mg, erythromycin : 40 µg

²⁾N.A. : no activity

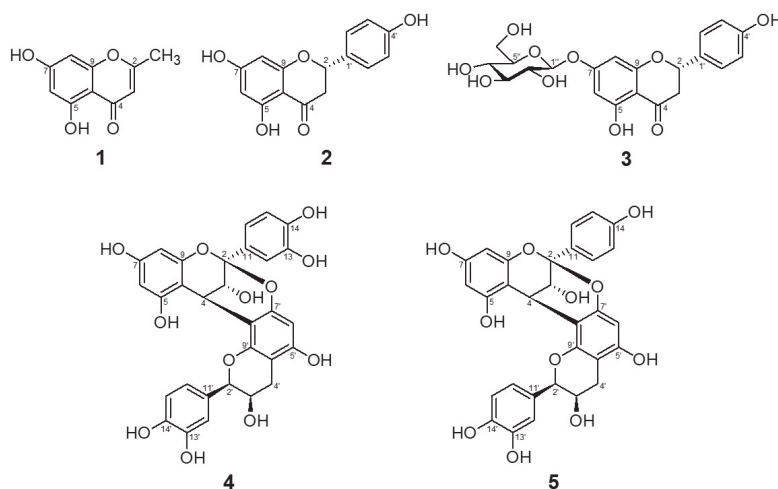


Figure 4. Chemical structures of isolated compounds 1-5 from *P. mume* branches.

NMR에서 13개의 탄소 피크와 δ_H 7.55 (2H, d, $J = 8.2$ Hz) 및 δ_H 7.24 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)의 피크를 통해 플라보노이드의 B ring이 대칭 구조인 것을 예상할 수 있으며, 문헌[19]과 비교하여 naringenin임을 확인하였다. 화합물 3은 화합물 2에 육탄당이 결합되어 있는 구조인 플라보노이드 배당체로 문헌[20,21]을 통해 prunin으로 동정하였다. 화합물 4는 ^{13}C NMR에서 30개의 탄소 피크가 관찰되며, 문헌[22]과 비교하여 *epi*-catechin의 dimer인 procyanidin A2임을 확인하였다. 화합물 5는 화합물 4와 유사한 플라보노이드 dimer 골격이나, δ_H 7.51 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 및 δ_H 6.83 (2H, d, $J = 8.7$ Hz)의 피크를 통해 *ortho*-coupling을 하는 대칭구조의 aromatic ring을 예상할 수 있으며, 문헌[23]과 비교하여 epiafzelechin-(2 β - O -7, 4 β -8)-epicatechin으로 동정하였다(Figure 4).

3.5. 매실나무 가지 추출물로부터 분리된 화합물의 항산화 및 항염 활성

매실나무 가지에서 분리된 화합물 중 플라보노이드 화합물인 naringenin (2), prunin (3) 및 procyanidin A2 (4)는 라디칼 소거 활성이 있는 것으로 알려져 있으며[24-26], 화합물 5를 제외한 분리된 모든 화합물의 항염 활성도 문헌

[27-30]에 보고되어 있다. 따라서 활성이 알려져 있지 않은 화합물인 epiafzelechin-(2 β - O -7, 4 β -8)-epicatechin (5)의 효능을 확인하기 위해 매실나무 가지에서 분리된 5개 화합물의 라디칼 소거 및 NO 생성 억제 활성을 측정하여 비교하였다. 그 결과, 화합물 5의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성에서 SC₅₀ 값이 각각 32.7 및 28.8 μ M로, 플라보노이드 dimer 형태의 비슷한 구조인 화합물 4와 유사한 라디칼 소거 활성을 보이는 것으로 확인하였다(Figure 5, Table 3). 또한 항염 활성 실험 결과, 화합물 5는 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 효과가 있으며, 플라보노이드 화합물인 2 ~ 4와 효능이 유사하게 나타나는 것으로 확인되었다(Figure 6).

Table 3. SC₅₀ Values of DPPH and ABTS⁺ Radical Scavenging Activities of Isolated Compounds 1-5 from *P. mume* Branches

SC ₅₀ ¹⁾ (μ M)	1	2	3	4	5	BHT
DPPH radical	> 200	> 200	> 200	26.1	32.7	> 200
ABTS ⁺ radical	> 200	136.7	150.7	21.8	28.8	74.1

¹⁾SC₅₀: scavenging concentration for 50% of radical

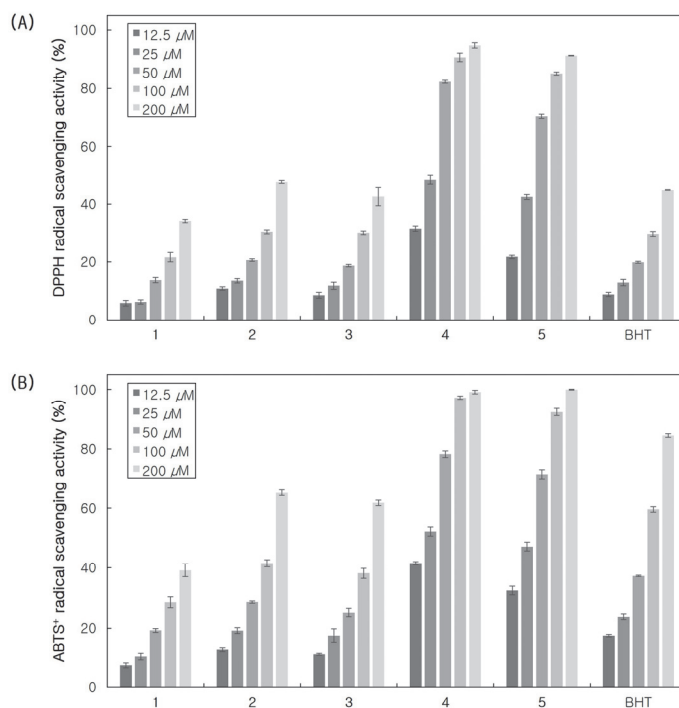


Figure 5. DPPH (A) and ABTS⁺ (B) radical scavenging activities of isolated compounds 1-5 from *P. mume* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

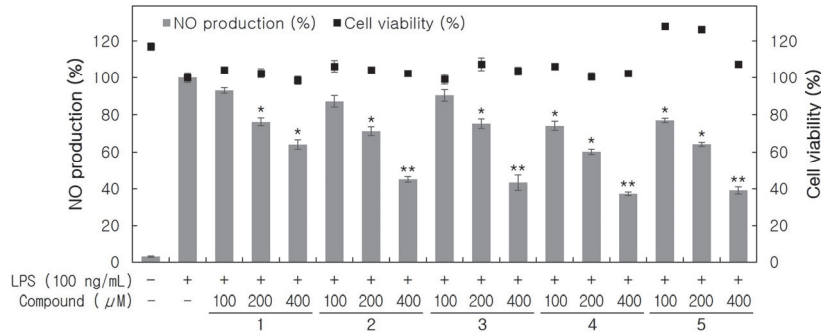


Figure 6. Effects of isolated compounds **1-5** from *P. mume* branches on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus compounds **1-5** from *P. mume* branches for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01)

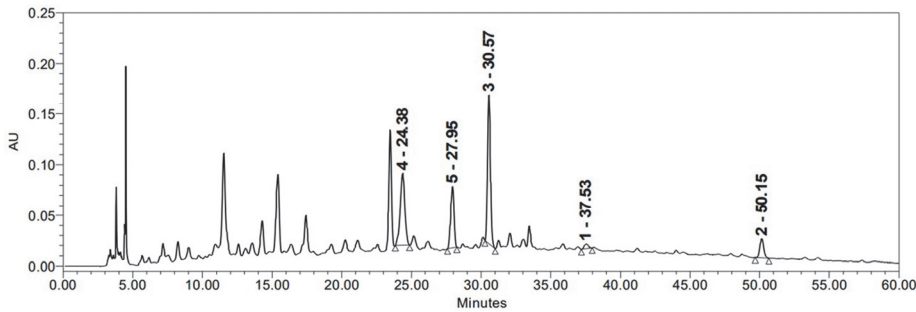


Figure 7. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract from *P. mume* branches at 280 nm.

3.6. 매실나무 가지 추출물로부터 분리된 화합물의 함량 분석

매실나무 가지 추출물에서 분리된 화합물 **1 ~ 5**의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 매실나무 가지 70% 에탄올 추출물 1 g 당 화합물 **1**은 0.8 mg/g (0.08%), 화합물 **2**는 1.5 mg/g (0.15%), 화합물 **3**은 30.7 mg/g (3.07%), 화합물 **4**는 19.5 mg/g (1.95%) 및 화합물 **5**는 23.7 mg/g (2.37%)이 함유되어 있는 것으로 확인되었으며, 화합물 **3**의 함량이 가장 높게 분석되었다(Figure 7).

4. 결 론

다양한 용도로 약용하는 매실나무의 열매(매실)와 꽃(매화) 추출물에 대한 항산화, 항염, 항균, 미백 등의 효능 및 활성 성분은 알려져 있으나, 매실나무 가지를 대상으로 한 효능 및 성분 연구는 보고된 바가 없으므로, 본 연구에서는 매실나무 가지 추출물과 용매 분획물에서 유효성분을 분리·동정하고 효능을 확인하였다. 매실나무 가지 에탄올

추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻고 이들의 항산화, 항염 및 항균 활성을 측정하였다. DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼을 이용한 항산화 활성 실험 결과, 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 대조군인 BHT 보다 우수한 라디칼 소거 활성을 나타냈다. RAW 264.7 대식세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 세포 독성 없이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 보였다. 또한 추출물과 *n*-Hex, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대해 우수한 항균 활성이 있음을 확인하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 우수한 활성을 보인 EtOAc 분획물을 MPLC 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 하여 5개의 화합물을 분리하였으며, ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 동정하였다. 분리된 화합물은 noreugenin (**1**), naringenin (**2**), prunin (**3**), procyanidin A2 (**4**), epiafzelechin-(2β→O→7, 4β→8)-epicatechin (**5**)으로 확인되었다. 이들 중 효능 연구가 보고되어 있지 않은 화합물 **5**의 항산화 및 항염 활성을 측정하였다. 항산화 활성 실험

결과, 화합물 5의 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼에 대한 SC₅₀ 값이 각각 32.7 μ M, 28.8 μ M로 대조군인 BHT 보다 우수한 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 또한 항염 활성 실험 결과, 화합물 5는 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다. 매실나무 가지 추출물에서 분리된 화합물 1 ~ 5의 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 화합물 3의 함량이 가장 높게 분석되었으며, 매실나무 가지 에탄올 추출물 1 g 당 화합물 3은 30.7 mg/g (3.07%)이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 매실나무 가지는 항산화, 항염 및 항균 효과를 갖는 화장품 관련 천연 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2024학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

1. J. S. Rho, H. J. Yeom, M. J. Oh, and J. Y. Lee, A study on the antioxidant and MMPs protein expression inhibitive effect of *Punica granatum* L. extract and its stabilization with liquid crystal emulsion, *J. Life Sci.*, **31**(2), 164 (2021).
2. S. E. Jin, Y. K. Son, B. S. Min, H. A. Jung, and J. S. Choi, Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots, *Arch. Pharm. Res.*, **35**, 823 (2012).
3. D. Wu and A. I. Cederbaum, Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, *Alcohol Res. Health.*, **27**(4), 277 (2003).
4. L. B. Menezes, B. B. Segat, H. Tolentino, D. C. Pires, L. M. M. Mattos, H. M. Hottum, M. D. Pereira, A. Latini, A. Horn, and C. Fernandes, ROS scavenging of SOD/CAT mimics probed by EPR and reduction of lipid peroxidation in *S. cerevisiae* and mouse liver, under severe hydroxyl radical stress condition, *J. Inorg. Biochem.*, **239**, 112062 (2023).
5. H. J. Lee, Y. J. Jeong, T. S. Lee, Y. Y. Park, W. G. Chae, I. K. Chung, H. W. Chang, C. H. Kim, Y. H. Choi, W. J. Kim, S. K. Moon, and Y. Ch. Chang, Moringa fruit inhibits LPS-induced NO/iNOS expression through suppressing the NF- κ B activation in RAW 264.7 cells, *Am. J. Chin. Med.*, **41**(5), 1109 (2013).
6. W. Cho, J. W. Nam, T. Windono, E. K. Seo, and K. T. Lee, Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages, *Int. Immunopharmacol.*, **9**(9), 1049 (2009).
7. S. H. Lee, S. Y. Lee, D. J. Son, H. Lee, H. S. Yoo, S. Song, K. W. Oh, D. C. Han, B. M. Kwon, and J. T. Hong, Inhibitory effect of 2'-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF- κ B activation in RAW 264.7 cells, *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 791 (2005).
8. M. Fournière, T. Latire, D. Souak, M. G. J. Feuilloley, and G. Bedoux, *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics, *Microorganisms*, **8**, 1752 (2020).
9. A. Koreck, A. Pivarsci, A. Dobozy, and L. Kemeny, The role of innate immunity in the pathogenesis of acne, *Dermatology*, **206**(2), 96 (2003).
10. H. S. Kim, Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2011).
11. 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*, *J. Bacteriol. Virol.*, **39**(1), 11 (2009).
12. H. J. Kang, E. O. Choi, J. W. Jeong, S. H. Park, C. Park, S. H. Hong, S. S. Shin, J. H. Cheong, and Y. H. Choi, Inhibition of NO production by ethanol extract of *Prunus mume* fruits in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through regulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway, *Herb. Formula Sci.*, **25**(1), 1 (2017).
13. K. B. Pi and K. B. Lee, *Prunus mume* extract exerts antioxidant activities and suppressive effect of melanogenesis under the stimulation by alpha-melanocyte stimulating hormone in B16-F10 melanoma cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**(10), 1883 (2017).
14. M. J. Kim and S. Y. Park, Bioactivities of feral peach

- (*Prunus persica* Batsch var. *davidiana* Max.) flower extracts and *Prunus mume* flower extracts, *J. Appl. Biol. Chem.*, **64**(2), 133 (2021).
15. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 16. 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).
 17. A. A. Ali, M. A. Makboul, A. A. Attia, and D. T. Ali, Chromones and flavans from *Panacratium maritimum*, *Phytochemistry*, **29**(2), 625 (1990).
 18. P. J. Houghton, I. M. Osibogun, T. Z. Woldemariam, and K. Jones, Heteronuclear NMR studies of the chromone alkaloids and revision of the structure of some piperidino-chromone alkaloids, *Planta Med.*, **61**(2), 154 (1995).
 19. G. Celiz, S. A. Suarez, A. Arias, J. Molina, C. D. Brondino, and F. Doctorovich, Synthesis, structural elucidation and antiradical activity of a copper (II) naringenin complex, *Biometals*, **32**, 595 (2019).
 20. N. H. Tung, J. H. Son, K. Cho, J. A. Kim, J. H. Hyun, H. K. Kang, G. Y. Song, C. J. Park, and Y. H. Kim, Phenolic components from the leaves of *Panax ginseng* and their effects on HL-60 human leukemia cells, *Food Sci. Biotechnol.*, **19**, 271 (2010).
 21. Y. J. Jo, Y. B. Lee, J. S. Hyun, C. Y. Kim, and N. H. Lee, Anti-oxidative and anti-inflammatory constituents from the extract of *Hydrangea macrophylla* flowers, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, **37**(5), 1356 (2020).
 22. W. C. Lu, W. T. Huang, A. Kumaran, C. T. Ho, and L. S. Hwang, Transformation of proanthocyanidin A2 to its isomers under different physiological pH conditions and common cell culture medium, *J. Agric. Food Chem.*, **59**(11), 6214 (2011).
 23. J. O. Vidal, A. Cobo, E. O. Morente, A. Gálvez, M. M. Bailén, S. Salido, and J. Altarejos, Antimicrobial activity of phenolics isolated from the pruning wood residue of European plum (*Prunus domestica* L.), *Ind. Crops Prod.*, **176**, 114296 (2022).
 24. K. Zhang, Z. Ding, W. Duan, M. Mo, Z. Su, Y. Bi, and F. Kong, Optimized preparation process for naringenin and evaluation of its antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities, *J. Food Process. Preserv.*, **44**(12), e14931 (2020).
 25. G. Céliz and M. Daz, Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media, *Process Biochem.*, **46**(1), 94 (2011).
 26. G. W. Plumb, S. P. Teresa, C. S. Buelga, J. C. R. Gonzalo, and G. Williamson, Antioxidant properties of galocatechin and prodelphinidins from pomegranate peel, *Redox Rep.*, **7**(1), 41 (2002).
 27. J. S. Rosa, S. V. G. V. Mello, G. Vicente, Y. J. Moon, F. P. Daltoé, T. C. Lima, R. J. Souza, M. W. Biavatti, and T. S. Fröde, *Calea uniflora* Less. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice, *Int. Immunopharmacol.*, **42**, 139 (2017).
 28. H. Y. Park, G. Y. Kim, and Y. H. Choi, Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor- κ B and inhibiting mitogen-activated protein kinases, *Int. J. Mol. Med.*, **30**(1), 204 (2012).
 29. E. J. Na and J. Y. Ryu, Anti-inflammatory effects of prunin on UVB-irradiated human keratinocytes, *Biomedical Dermatology*, **2**(14), 1 (2018).
 30. Q. Q. Wang, H. Gao, R. Yuan, S. Han, X. X. Li, M. Tang, B. Dong, J. X. Li, L. C. Zhao, J. Feng, and S. Yang, Procyanidin A2, a polyphenolic compound, exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, *PLoS ONE*, **15**(8), e0237017 (2020).