



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석 사 학 위 논 문

매실나무 가지 추출물의
항산화, 항염, 항균 활성 및 유효성분 연구

김 혜 빈

제주대학교 대학원

화 학 과

2024년 2월

매실나무 가지 추출물의
항산화, 항염, 항균 활성 및 유효성분 연구

이 논문을 이학 석사 학위논문으로 제출함

김 혜 빈

제주대학교 대학원

화 학 과

지도교수 이 남 호

김 혜 빈의 이학 석사 학위논문을 인준함

2023년 12월

심사위원장 인

위 원 인

위 원 인

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

A Thesis submitted to the graduate school of
Jeju National University in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Master of Science
under the supervision of **Nam Ho Lee**

The thesis for the degree of Master of Science
by **Hye Bin Kim**
has been approved by the dissertation committee.

2023. 12.

Chair _____

Member _____

Member _____

목 차

초록	1
List of Tables	2
List of Figures	3
List of Abbreviations	5
I. 서론	7
II. 재료 및 방법	13
1. 시약 및 기기	13
2. 재료	14
3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리	15
1) 매실나무 가지의 추출 및 용매 분획	15
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	16
(1) VLC에 의한 분리과정	16
(2) MPLC에 의한 분리과정	17
4. 생리 활성 평가	19
1) 항산화	19
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	19
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	20
(3) DPPH radical 소거 활성 측정	21
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	22
2) 항염	23
(1) RAW 264.7 세포 배양	23

(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	23
(3) 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	24
(4) 세포 독성 평가 (MTT assay)	24
3) 항균	25
(1) 균주 배양	25
(2) Paper disc diffusion method	25
(3) MIC (minimum inhibitory concentration)	26
(4) MBC (minimum bactericidal concentration)	26
5. HPLC 함량분석	27
6. 통계 처리	29
III. 결과 및 고찰	30
1. 분리된 화합물의 구조 분석	30
1) Compound 1의 구조 동정	30
2) Compound 2의 구조 동정	33
3) Compound 3의 구조 동정	36
4) Compound 4, 5의 구조 동정	39
5) Compound 6의 구조 동정	42
6) Compound 7의 구조 동정	45
2. HPLC 함량 분석	48
3. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	50
1) 항산화	50
(1) 총 폴리페놀 함량	50
(2) 총 플라보노이드 함량	51
(3) DPPH radical 소거 활성	52
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	53
2) 항염	54
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	54
(2) 전염증성 cytokine (TNF- α) 생성 억제 활성	56

3) 항균	57
(1) Paper disc diffusion method	57
(2) MIC 및 MBC	59
4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	61
1) 항산화	61
(1) DPPH radical 소거 활성	61
(2) ABTS ⁺ radical 소거 활성	62
2) 항염	63
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	63
IV. 요약 및 결론	64
V. 참고문헌	66
Abstract	73

매실나무 가지 추출물의 항산화, 항염, 항균 활성 및 유효성분 연구

김 혜 빈

제주대학교 대학원 화학과

요약

본 연구에서는 매실나무(*Prunus mume*) 가지 추출물의 항산화, 항염, 항균 활성 및 유효성분을 연구하였다. 매실나무 가지의 ethyl acetate (EtOAc) 분획물에서 noreugenin (1), naringenin (2), prunin (3), catechin (4), *epi*-catechin (5), procyanidin A2 (6), (+)-*epia*zfelechin-(2 β →*O*→7, 4 β →8)-epicatechin (7)의 7개 성분이 분리되었다. 분리된 화합물의 화학 구조는 NMR 스펙트럼을 포함한 분광 데이터와 문헌 값과의 데이터 비교를 기반으로 동정하였다.

DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼을 이용한 항산화 실험에서 추출물, EtOAc 및 *n*-butanol (BuOH) 분획물과 분리된 화합물 7은 강력한 라디칼 소거 활성을 보였다. RAW 264.7 대식세포를 이용한 항염 실험에서 *n*-hexane (Hex) 및 EtOAc 분획물, 분리된 화합물 7은 세포 독성을 유발하지 않고 농도 의존적으로 nitric oxide (NO) 생성을 억제하였다. 그 중 *n*-Hex 분획물은 TNF- α 의 생성을 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 또한, 추출물과 *n*-Hex, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 *Staphylococcus epidermidis* 및 *Cutibacterium acnes*에 대하여 항균 활성을 보였다. 매실나무 가지에서 분리된 화합물 중 지표성분인 prunin (3)의 함량을 측정하기 위해 HPLC를 이용하였으며, 그 결과 추출물에서 30.2 mg/g (3.02%), EtOAc 분획물에서 78.3 mg/g (7.83%)으로 확인되었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 매실나무 가지의 추출물, 분획물 및 분리된 화합물은 의약 또는 화장품 성분의 천연 원료로써 활용 가능할 것이라 사료된다.

List of Tables

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors	28
Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis	28
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1	31
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 2	34
Table 5. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 3	37
Table 6. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 4 and 5	40
Table 7. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 6	43
Table 8. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 7	46
Table 9. Content of prunin (3) from <i>P. mume</i> branches by HPLC	49
Table 10. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. mume</i> branches	52
Table 11. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. mume</i> branches	53
Table 12. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>P.</i> <i>mume</i> branches	57
Table 13. MIC and MBC values of <i>P. mume</i> branches on <i>S. epidermidis</i>	60
Table 14. MIC and MBC values of <i>P. mume</i> branches on <i>C. acnes</i>	60

List of Figures

Figure 1. Mechanism of inflammation in nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway	10
Figure 2. Picture of <i>Prunus mume</i>	14
Figure 3. Extraction and solvent fractionation of <i>P. mume</i> branches	15
Figure 4. Isolation of compounds from <i>P. mume</i> branches (VLC)	16
Figure 5. Isolation of compounds from <i>P. mume</i> branches (MPLC)	18
Figure 6. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents	19
Figure 7. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents	20
Figure 8. HPLC chromatogram of isolated compound 3 (prunin)	27
Figure 9. Chemical structure of compound 1	30
Figure 10. ^1H -NMR spectrum of compound 1 in pyridine- d_5	32
Figure 11. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in pyridine- d_5	32
Figure 12. Chemical structure of compound 2	33
Figure 13. ^1H -NMR spectrum of compound 2 in pyridine- d_5	35
Figure 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 in pyridine- d_5	35
Figure 15. Chemical structure of compound 3	36
Figure 16. ^1H -NMR spectrum of compound 3 in CD_3OD	38
Figure 17. ^{13}C -NMR spectrum of compound 3 in CD_3OD	38
Figure 18. Chemical structures of compound 4 and 5	39
Figure 19. ^1H -NMR spectrum of compound 4 and 5 in pyridine- d_5	41
Figure 20. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 and 5 in pyridine- d_5	41
Figure 21. Chemical structure of compound 6	42
Figure 22. ^1H -NMR spectrum of compound 6 in CD_3OD	44
Figure 23. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 in CD_3OD	44
Figure 24. Chemical structure of compound 7	45

Figure 25. ^1H -NMR spectrum of compound 7 in CD_3OD	47
Figure 26. ^{13}C -NMR spectrum of compound 7 in CD_3OD	47
Figure 27. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract and EtOAc fraction ..	48
Figure 28. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>P. mume</i> branches	50
Figure 29. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>P. mume</i> branches	51
Figure 30. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. mume</i> branches	52
Figure 31. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. mume</i> branches	53
Figure 32. Effects of extract and solvent fractions from <i>P. mume</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells ..	54
Figure 33. Effects of <i>n</i> -Hex fraction from <i>P. mume</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	55
Figure 34. Effects of EtOAc fraction from <i>P. mume</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	55
Figure 35. Effect of <i>n</i> -Hex fraction from <i>P. mume</i> branches on TNF- α production in LPS-induced RAW 264.7 cells	56
Figure 36. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of <i>P. mume</i> on <i>S. epidermidis</i>	58
Figure 37. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of <i>P. mume</i> on <i>C. acnes</i>	58
Figure 38. DPPH radical scavenging activities of isolated compound 7 from <i>P. mume</i> branches	61
Figure 39. ABTS ⁺ radical scavenging activities of isolated compound 7 from <i>P. mume</i> branches	62
Figure 40. Effects of isolated compound 7 from <i>P. mume</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	63

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BHT	Butylhydroxytoluene
brs	Broad singlet
CC	Column chromatography
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
Fr.	Fraction
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalent
GAM	Gifu anaerobic medium
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
int.	Integration
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MP	MPLC subfraction
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m	Multiplet

<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reactive oxygen species
QE	Quercetin equivalent
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
TLC	Thin layer chromatography
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TSB	Tryptic soy broth
VLC	Vacuum liquid chromatography

I. 서론

최근 현대사회는 과학의 발전과 더불어 의학 기술의 발달로 기대수명이 증가하고 있다. 이러한 사회적 분위기로 인해 다양한 피부질환 및 노화의 개선에 관한 현대인들의 관심이 높아지면서 식품이나 화장품 등 피부 미용에 이용 가능한 제품에 주목하고 있는 추세이다.¹ 특히 기능성 화장품 시장이 확대되었으며, 이러한 기능성 화장품 개발에 피부에 효과적인 생리 활성을 갖는 다양한 소재를 활용하기 위해 활발한 연구가 진행되고 있다. 하지만 기능성 화장품에 주원료로 사용되는 일부 화학 성분이 피부에 악영향을 미칠 수 있다는 가능성과 그로 인한 부작용들이 문제로 제기되고 있다.^{2,3}

그 성분의 예로, *para*-하이드록시벤조산의 에스테르 화합물의 총칭인 파라벤은 화장품이나 의약품에서 방부제로 사용되지만 고농도로는 에스트로겐 유사 작용을 나타내어 유방암을 발병시킬 수 있음이 보고되었다.⁴ 또한 플라스틱 가소제로 널리 사용되는 프탈레이트는 화장품에서 색조, 매니큐어, 착향제로도 쓰이는데, 이는 선천적 결손증이나 정자수의 감소 등의 부작용이 일어날 수 있음이 보고되었다.⁵ 이러한 부작용들이 가시화됨으로써 현대인들은 합성 성분이 아닌 천연 성분이 함유된 화장품을 선호하게 되었다. 따라서 천연화장품 시장도 점차 확대되고 있으며, 상품화할 수 있는 천연 성분의 개발을 목적으로 다양한 연구가 진행되고 있다.³

사람의 피부는 노화되면서 주름이 생기고 나이가 들면서 그 수나 깊이가 증가한다. 노화의 원인은 크게 내인성 요인과 외인성 요인으로 구분된다. 내인성 요인에 의한 노화는 자연노화를 말하며, 나이가 들면서 자연스럽게 피부의 구조와 생리적 기능이 계속해서 감퇴하여 진행되는 것이다. 외인성 요인에 의한 노화는 자외선 같은 외부 환경에 장기간 노출되어 진행되는 것이고 체내에 과잉 생성되는 활성산소 또한 외인성 요인이라 할 수 있다.⁶

Superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)을 포함하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 세포 활동의 자연적 부산물로 형성되어 세포 신호전달에 참여하게 된다.^{7,8} 하지만 신체에서 자연적으로 발생하는 ROS 생성 외에도 방사선, 자외선, 스모그, 담배 연기 등의 외부요인에 의해 과잉 생산될 수 있다. 따라서 그 수치의 증가는 ROS가 단백질, 지질 및 DNA를 포함한 대부분의 세포 거대분자와 반응할 수 있기 때문에 세포 항상성, 구조, 기능에 유해한 영향을 미치고 산화 스트레스를 초래하게 되며 피부 노화를 가속화시킨다.⁹

이러한 피부 손상을 막기 위해 피부에는 catalases (CATs), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx)와 같은 효소적 항산화제 및 vitamins A, C, E, flavonoids와 같은 비효소적 항산화제로 이루어진 피부 항산화 방어계가 있다.¹⁰ 하지만 앞서 언급한 다양한 요인들로 인해 피부의 방어계도 한계가 있기 때문에 피부 노화를 억제하기 위해서는 피부에서 생성되는 과잉의 활성산소 생성 억제 및 생성된 활성산소의 효율적인 제거를 위한 적절한 항산화제의 개발과 보충이 필요하다. 항산화제로는 BHA (butylated hydroxyanisole)와 BHT (butylated hydroxytoluene) 등의 합성 항산화제와 천연물에서 유래된 천연 항산화제가 있다. 하지만 합성 항산화제의 경우 과량으로 사용할 시 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있기 때문에 보다 안전하고 효과가 뛰어난 천연 항산화제 개발을 위하여 다양한 천연물에 대한 연구가 증가하고 있다.¹¹

인체에서는 물리적 또는 화학적 유해 자극, 외부물질에 의해 유발되는 손상에 대한 생물학적 반응인 염증 반응이 일어난다. 이러한 면역체계는 면역세포, 염증 매개체들이 관여하며, 다양한 외부 요인들로부터 우리의 신체를 보호하기 위한 기능을 한다. 염증은 감염을 치유하거나 조직의 재생을 증진시키는 보호의 기능을 하지만 조절되지 않은 염증의 결과로 조직의 손상이나 질병이 일어날 수 있다.¹² 염증의 다양한 원인 중에서, lipopolysaccharide (LPS)는 내독소 역할을 하며 인체 내에서 강한 면역 반응을 이끌어낸다. 또한, LPS는 대식세포에서 가장 강력한 염증 활성화제로 작용하며, 다양한 전염증성 매개체들을 발현시킨다.¹³

Nitric oxide (NO)는 염증의 발병기전에서 잘 알려진 전염증성 매개체이다. Inducible NO synthase (iNOS)에 의해 생성된 NO는 유익한 미생물, 항바이러스, 항기생충 및 항종양 효과가 있는 것으로 보고되었다. 하지만 지속적인 NO의 생산은 많은 염증성 질환의 발병기전에 영향을 줄 수 있으며, 조직 손상 또는 유전자 변이 등을 일으킨다. Cyclooxygenase (COX)에 의해 합성되는 prostaglandin (PG)은 염증의 또 다른 중요한 매개체이다. COX는 크게 두 분류로 나눌 수 있는데, COX-1은 거의 모든 조직에서 구성적으로 발현되며, 위의 세포 보호 및 신장 혈류 조절과 같은 생리적 기능을 유지하기 위해 PG를 합성한다. 대조적으로, COX-2는 성장 인자, cytokine 및 내독소와 같은 여러 전염증성 자극에 의해 유도된다. 특히 염증 부위에서 COX-2의 주요 산물인 PGE₂는 국소 혈류 증가, 부종 형성 및 통증 감작에 기여한다.

Nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 염증 반응 측면에서 가장 중요한 전사 인자 중 하나이다. NF-κB는 주로 p65 및 p50 서브유닛으로 구성된 heterodimer로 iNOS, COX-2, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) 및 IL-1β와 같은 수많은 유전자의 발현을 조절한다. 자극되지 않은 세포에서 NF-κB는 inhibitors of κB (IκB)와의 결합으로 인해 세포질에 위치한다. 그러나 전염증성 자극은 IκB가 IκB kinase (IKK) 복합체를 통해 빠르게 인산화 및 분해되도록 하고, 유리된 NF-κB는 핵으로 전이되어 표적 부위에 결합하고 전염증 매개체의 전사를 유도한다. 따라서 전염증성 매개체 또는 이들이 합성하는 물질의 영향을 감소시켜줄 수 있는 항염증제에 대한 관심이 높아지며, 항염증 활성을 보이는 소재에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다.^{14,15}

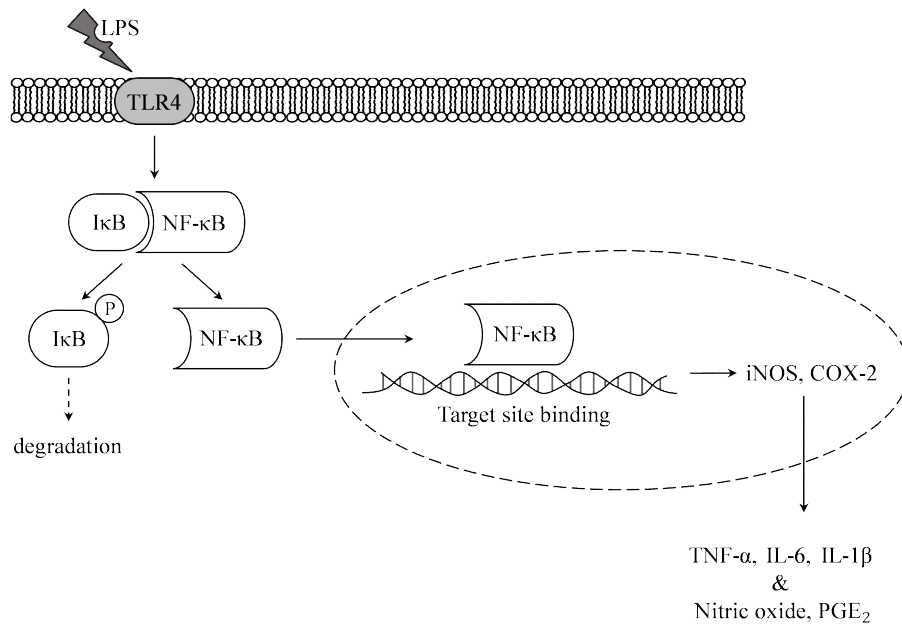


Figure 1. Mechanism of inflammation in nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway.

산화 스트레스 및 염증 상태 외에도 여러 미생물이 건강한 피부를 위해 중요한 역할을 한다. 인체의 가장 큰 기관인 피부는 복잡하고 역동적인 생태계이며 장벽 기능, 열 조절, 유해한 주변 환경으로부터 장기 보호 등 다양한 기능을 가지고 있다. 건강한 피부는 피부 마이크로바이옴에 속하는 *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Malassezia furfur*와 같은 다양한 공생 미생물로 구성되어 있다. 미생물은 피부 장벽, 면역 체계를 유지하고 병원성 미생물 성장을 제한하는 데 도움을 준다. 이에 우리의 피부는 단백질의 가수분해로 인한 아미노산, 각질층의 지방산, 땀, 지질 가수분해 또는 피지 및 땀의 젖산과 같은 필수 영양소를 제공한다. 하지만 dysbiosis라고 불리는 피부 미생물총의 불균형은 *S. aureus* 및 *S. epidermidis*의 증가로 인한 *C. acnes*의 계통 다양성 상실 및 아토피 피부염을 동반한 여드름과 같은 피부 병리학적 질환과 상관관계가 있다.¹⁶

현대적인 치료법에도 불구하고 여드름이나 아토피와 같은 흔한 피부 질환은 사라지지 않고 오히려 증가하는 추세를 보인다.¹⁷ 따라서 피부 미생물에 대한 활성 성분의 영향에 대한 평가 연구, 미생물 다양성과 평형의 유지, 보호 및 복원 뿐만 아니라 균형 잡힌 피부 마이크로바이옴 유지에 기여하는 생리 활성 성분을 찾는 것이 중요하다.¹⁸

화장품 산업의 주요 초점 중 하나는 피부의 건강을 복구 및 유지하고 산화 스트레스의 유해한 영향으로부터 피부를 보호하며 염증을 예방하기 위해 항산화, 항균, 항염증과 같은 다양한 생체 활성을 가진 새로운 천연 성분을 찾는 것이다. 그러나 외부 공격으로부터 피부를 보호하는 많은 제품이 있지만 대부분은 광독성, 세포 돌연변이 및 낮은 안정성으로 문제가 되는 성분이 함유되어 있다. 화장품 소재 개발에 있어서 합성 성분이 아닌 천연에서 유래되는 화합물, 특히 각 특정종에서 유래되는 이차 대사산물들의 생리 활성을 평가하기 위한 활발한 연구가 진행되고 있다.¹⁹

따라서 본 논문에서는 매실나무의 가지를 추출 및 용매 분획하여 항산화, 항염 및 항균 활성을 확인하고, 크로마토그래피, NMR 등을 이용하여 유효 성분의 화학구조를 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물의 생리활성을 분석하여 식품 및 화장품 소재로의 가치 및 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 활성 성분 분리에 사용된 용매들은 SAMCHUN 및 DAEJUNG의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.005-0.04 mm, Supelco Co.), medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co.)에는 FlashPure EcoFlex C₁₈ (220 g, BÜCHI, Switzerland)을 사용하였다. Gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. 분리 과정에 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였으며 TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나 발색 시약에 침적시킨 후 heat gun을 사용하여 건조시켰다. 발색 시약으로는 KMnO₄ 수용액 (3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 anisaldehyde (1% anisaldehyde-5% H₂SO₄)를 사용하였다.

분리된 화합물의 구조 분석을 위해 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance) spectrometer는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CDCl₃, CD₃OD, pyridine-*d*₅를 사용하였다. 분리된 화합물의 함량분석에 사용된 high performance liquid chromatography (HPLC, Alliance 2695, Waters Co.)에는 Kromasil column (100-5-C₁₈, 250×4.6 mm)을 사용하였고 검출기는 2998 PDA Detector (Waters Co.)를 사용하였다.

2. 재료

매실나무(*Prunus mume*)는 장미과에 속하는 나무로 매화나무라고도 하며 높이가 5~10 m이다. 원산지는 중국의 사천성과 호북성의 산간지로 알려져 있으며, 현재는 주로 일본, 한국, 베트남에서 서식한다. 잎은 매엽이라 하며 어긋나고 달걀모양으로 길이가 4~10 cm이다. 꽃은 매화라고 하며 중부지방에서 4월에 잎보다 먼저 피고 연한 붉은색을 띠는 흰빛이며 향기가 난다. 열매는 매실이라고 하며 공 모양의 핵과로 지름이 2~3 cm의 녹색인 매실이 7월에는 노란색으로 익는다(Figure 2). 매화를 이용한 우리나라 고유의 식품으로는 매화주, 매화죽, 매화차 등이 있으며, 매실을 이용한 것으로는 매실주, 매실초, 매간 등이 있다.

이처럼 다양한 용도로 약용하는 매실나무 열매(fruits)와 꽃(flowers) 추출물에 대해서 항산화, 항염, 항균, 미백 등의 효능이 보고되어 있다.²⁰⁻²² 그러나 매실나무 가지(branches)를 대상으로 한 유효성분 연구는 보고된 바가 없으므로 매실나무 가지 부위를 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 매실나무 가지(시료번호: 403)는 제주생물자원(주)를 통해 서귀포시 안덕면 동광리에서 2021년 9월에 채집하여 건조한 상태로 구입하였다. 구입한 시료는 분말화하여 추출하였다.

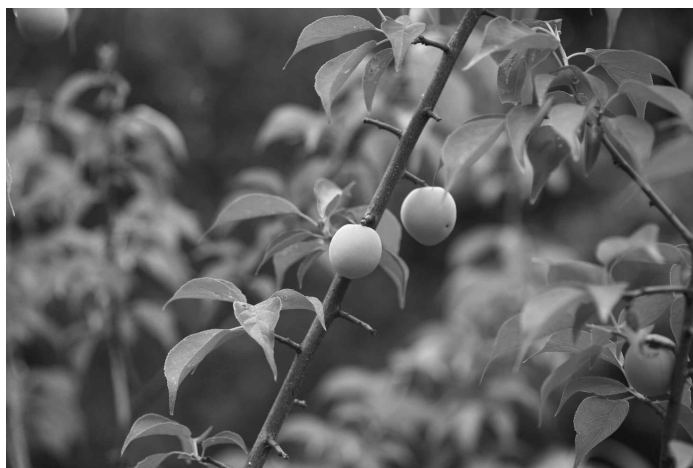


Figure 2. Picture of *Prunus mume*.

3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 매실나무 가지의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 매실나무 가지 1 kg을 70%(v/v) EtOH 20.0 L에 침출시킨 후 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 여과기와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과하고 남은 잔사에 대하여 동일한 조건으로 추출 및 여과를 1회 반복 진행하였다. 얻어진 여액은 40℃ 이하의 수욕 상에서 회전 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 추출물 94.8 g을 얻었다. 얻어진 추출물 중 15.0 g을 증류수 1.0 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) 및 H₂O fraction을 얻었다. 이와 같은 방법으로 3회 반복 실시하여 추출물 총 45.0 g을 용매 분획하였다(Figure 3).

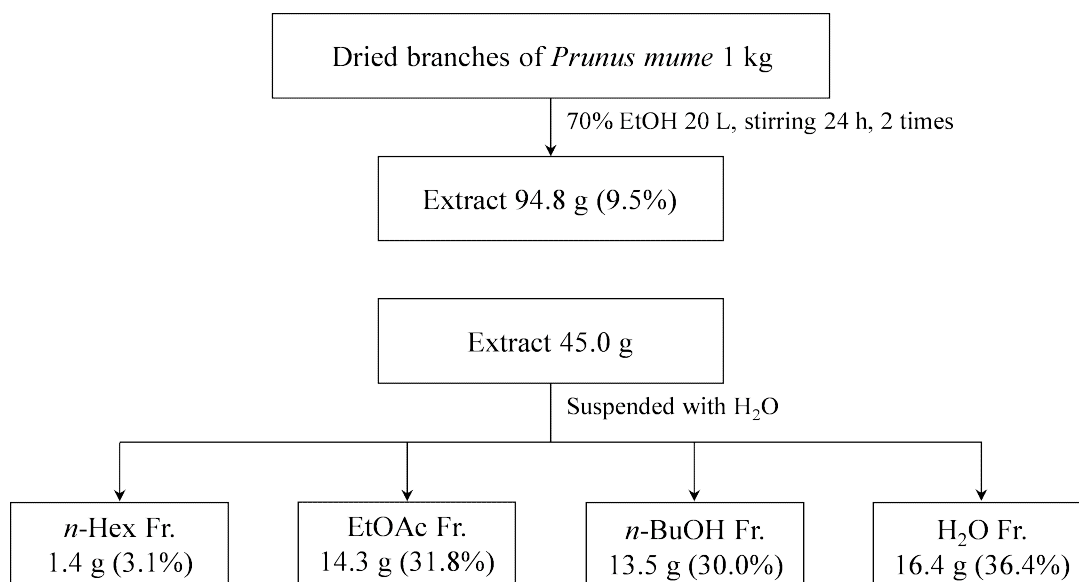


Figure 3. Extraction and solvent fractionation of *P. mume* branches.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

(1) VLC에 의한 분리과정

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위해 glass column에 순상 silica gel로 충전하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. 용매의 극성을 5%씩 높이는 방법으로 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (5-50%)을 각 300 mL씩 용출하여 총 31개의 fraction을 얻었다 (Fr. V1-31).

VLC fraction들 중 Fr. V23 (10% MeOH in EtOAc, 993.0 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=10:1)를 수행하여 4개의 fraction (Fr. V23-1-4)으로 나누었으며, 그 중 Fr. V23-2 (103.6 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=7:1)를 수행하여 compound 2 (10.4 mg)을 분리하였다. 또한 Fr. V23-4 (655.2 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=3:1)를 수행하여 compound 3 (11.4 mg)를 분리하였다(Figure 4).

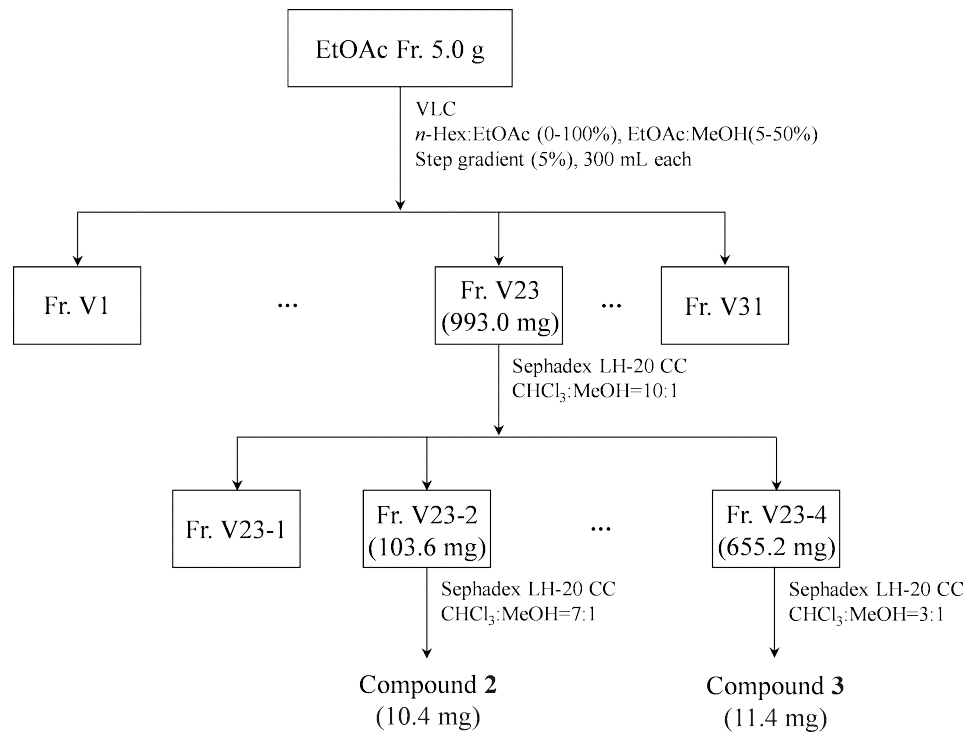


Figure 4. Isolation of compounds from *P. mume* branches. (VLC)

(2) MPLC에 의한 분리과정

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위해 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. 컬럼은 FlashPure EcoFlex C₁₈ (220 g)을 사용하였으며, H₂O/MeOH의 용매조건으로 기울기 용리법을 이용해 5-50% MeOH, 90 min, 50-100% MeOH, 20 min, 100% MeOH, 20 min의 조건으로 분리하였으며, 20 mL/min의 유속으로 각각 25 mL씩 용출시켜 총 105개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-105).

MPLC fraction들 중 Fr. MP28-39 (84.7 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=2.5:1)를 수행하여 compound 4과 compound 5의 혼합물(12.7 mg)을 분리하였다. Fr. MP58-65 (581.4 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=2:1)를 수행하여 7개의 fraction (Fr. MP58-65-1-7)으로 나누었다. 그 중 Fr. MP58-65-6 (271.6 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=3:1)를 수행하여 compound 5 (7 mg)와 compound 7 (46.9 mg)을 분리하였고, 남은 5개의 fraction 중 Fr. MP58-65-6-7 (185.2 mg)은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=3:1)를 수행하여 compound 6 (5.6 mg)을 분리하였다. Fr. MP76-82 (470.8 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=5:1)를 수행하여 compound 3 (52.7 mg)을 분리하였다. Fr. MP90-93 (181.8 mg)은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=3:1)를 수행하여 4개의 fraction (Fr. MP90-93-1-4)으로 나누었으며, 그 중 Fr. MP90-93-2 (41.9 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=5:1)를 수행하여 compound 1 (14.5 mg)을 분리하였고, Fr. MP90-93-3 (80.6 mg)은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=10:1)를 수행하여 compound 2 (79.2 mg)을 분리하였다(Figure 5).

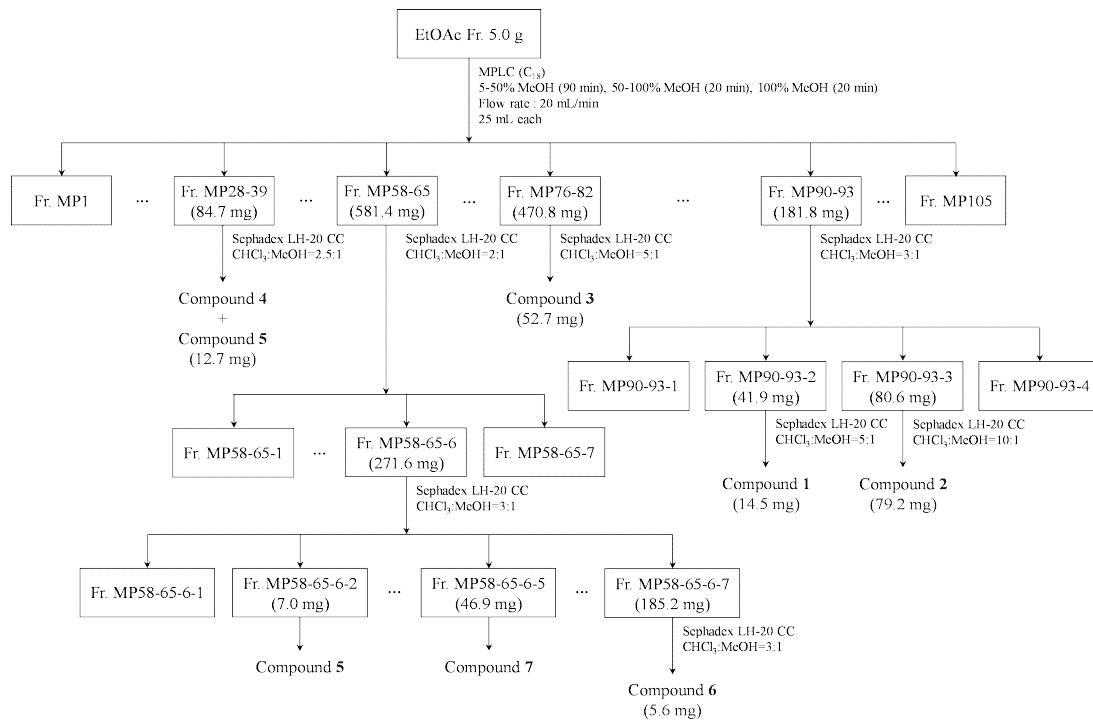


Figure 5. Isolation of compounds from *P. mume* branches. (MPLC)

4. 생리 활성 평가

1) 항산화

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법²³을 응용하여 실시하였다. 정량을 위한 표준검정곡선(standard calibration curve)은 gallic acid 표준물질을 1 mg/mL 농도로 제조한 후, 이를 사용하여 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 희석하여 작성하였으며, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이다(Figure 6). 우선 각 10 mg/mL 농도의 시료용액들과 농도별로 희석한 gallic acid 표준용액을 100 µL씩 취한 후 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 첨가하여 상온에서 3분간 반응시키고, 7%(w/v) Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합한 후 증류수 700 µL를 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 96 well plate에 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정값을 표준검정곡선에 대입하여 시료 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양으로 환산하였다.

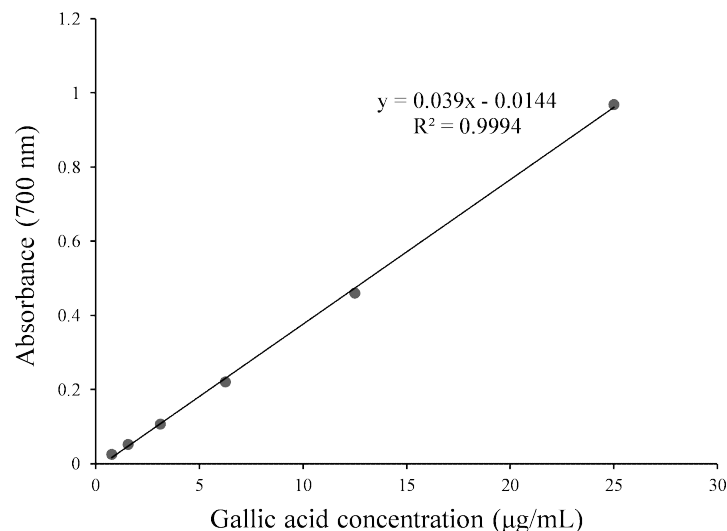


Figure 6. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Moreno 방법²⁴을 응용하여 실시하였다. 정량을 위한 표준검정곡선(standard calibration curve)은 quercetin 표준물질을 1 mg/mL 농도로 제조한 후, 이를 사용하여 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 희석하여 작성하였으며, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이다(Figure 7). 우선 각 10 mg/mL 농도의 시료용액들과 농도별로 희석한 quercetin 표준용액을 100 µL씩 취하고 10% aluminum nitrate 20 µL 와 1 M potassium acetate 20 µL를 순차적으로 혼합하였다. 이 용액에 100% ethanol 300 µL과 증류수 560 µL를 첨가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석한 후 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 96 well plate에 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정값을 표준검정곡선에 대입하여 시료 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하였다.

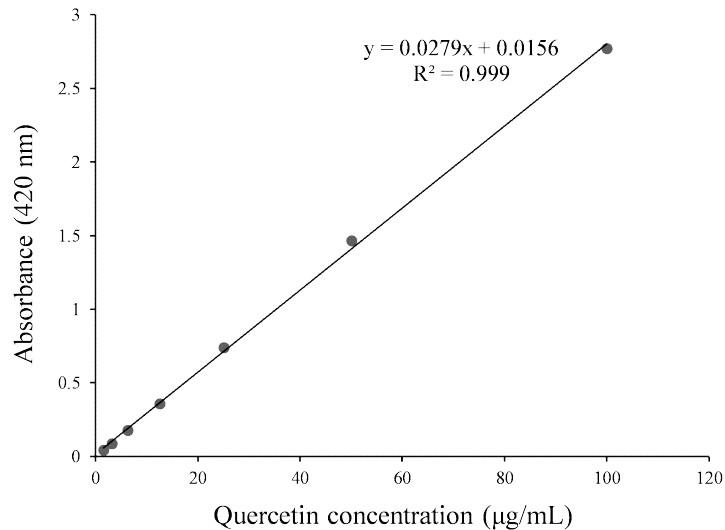


Figure 7. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 방법²⁵을 응용하여 실시하였다. DPPH 시약은 DMSO를 사용하여 20 mM 농도로 녹이고 이를 ethanol을 사용하여 0.2 mM로 희석한 뒤 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료를 각각 20 µL씩 넣고 0.2 mM DPPH 용액을 180 µL씩 가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고 radical 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며 양성 대조군(positive control)은 BHT를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}}{\text{Abs}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

Ab_{Scontrol} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

Ab_{Ssample} : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

Ab_{Sblank} : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] cation radical 소거 활성 실험은 Re 방법²⁶을 응용하여 실시하였다. ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해 7.0 mM ABTS 용액과 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 상온 및 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. ABTS⁺ 용액은 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.02가 되도록 ethanol로 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료를 각각 20 µL씩 가한 후 희석한 ABTS⁺ 용액 180 µL을 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였고 radical 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며 양성 대조군(positive control)은 BHT를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}}{\text{Abs}_{\text{control}}}\right) \times 100$$

Ab_{Scontrol} : 700 nm에서 ABTS⁺의 흡광도

Ab_{Ssample} : 700 nm에서 시료와 ABTS⁺ 반응액의 흡광도

Ab_{Sblank} : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

2) 항염

(1) RAW 264.7 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고 2일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

24 Well plate에 RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 100 ng/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 생성된 nitric oxide의 양을 측정하기 위해 96 well plate에 세포 상등액 100 µL와 griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였으며 sodium nitrite (NaNO₂)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준 검정 곡선을 통해 정량하였고 표준검정곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다. 또한 각 시료의 NO 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다. 양성대조군(positive control)으로는 2-amino-4-picoline (5 µM)을 사용하였다.

(3) 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

24 Well plate에 RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액의 전염증성 cytokine 생성량을 TNF-α (BD Biosciences) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였다. 측정 값은 표준물질에 대한 표준 검정 곡선을 통해 정량하여 백분율로 나타내었으며 표준 검정 곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

(4) 세포 독성 평가 (MTT assay)

세포 독성 평가는 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 이용하였다. 24 Well plate에 RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 100 ng/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT 시약을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3-4시간 동안 반응시킨 후 배지를 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 후 이를 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

3) 항균

(1) 균주배양

피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) 3종 CCARM 3709, CCARM 3710, CCARM 3711과 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) 3종 CCARM 0081, CCARM 9009, CCARM 9010을 항생제 내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *S. epidermidis*는 배양 배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37°C, 호기성 조건에서 24시간마다 계대 배양하였고, *C. acnes*는 배양 배지를 GAM (gifu anaerobic medium)으로 하여 37°C, 혐기 상태로 48시간마다 계대 배양하였다. 균주는 모두 3번 계대 후 실험에 사용하였다.

(2) Paper disc diffusion method

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 paper disc diffusion 법을 실시하여 각 균주에 대한 생육 저지환을 확인하였다. *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)의 균수를 조절하여 0.8% agar를 포함하는 소프트 배지에 넣고 1.5% agar를 포함하는 고체 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C, 호기성 조건에서 24시간 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다. *C. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)는 위와 같은 방법으로 실시하고 37°C, 혐기 상태에서 48시간 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다. *S. epidermidis*는 1.5×10^6 , *C. acnes*는 5.0×10^7 CFU/mL로 균수를 맞추었으며, 양성 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

(3) MIC (minimum inhibitory concentration)

최소 억제 농도(MIC)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소 농도로 미생물에 대한 MIC 값이 낮을수록 시료 물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고 할 수 있다. MIC 측정은 액체 배지 희석법을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽힌 배지 100 μL 와 2.0×10^5 CFU/mL로 조절한 균 100 μL 를 넣어주었다. *S. epidermidis*는 37°C, 호기성 조건에서 24시간 배양하고, *C. acnes*는 37°C, 혐기 상태에서 48시간 배양하여 균의 증식이 나타나지 않는 최소 농도를 확인하였다.

(4) MBC (minimum bactericidal concentration)

MIC는 균의 최소 억제 농도로서 균이 모두 사멸했음을 의미하는 것이 아니므로 균의 최소 사멸 농도(MBC)를 확인하기 위해 MIC 값 이상의 시료 배양액을 고체 배지에 희석 도달하여 배양한 후 colony의 형성 여부를 확인하여 균이 전혀 자라지 않은 농도를 MBC 값으로 하였다. MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 사용해 시료 배양액을 찍어내어 1.5% agar를 포함하는 고체배지에 도달한 후 *S. epidermidis*는 37°C, 호기성 조건에서 24시간 배양하고, *C. acnes*는 37°C, 혐기 상태에서 48시간 배양하여 colony가 형성되지 않는 최소 농도를 확인하였다.

5. HPLC 함량분석

매실나무 가지에서 분리된 prunin (**3**)의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 정량 분석하였다. 분석을 위해 추출물을 5 mg/mL, EtOAc 분획물을 2 mg/mL로 녹인 후, 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과하여 나온 여액을 사용하였다. 분석에는 주입부피 10 μ L, 컬럼온도 40°C, 이동상은 0.1% acetic acid가 함유된 증류수(용매 A)와 acetonitrile (용매 B)을 사용하여 다음과 같은 조건으로 용출시켰고, 1.0 mL/min의 유속으로 60분 동안 분석하였다. 검량선 작성을 위해 분리된 화합물 prunin (**3**)을 각각 100, 200, 300, 400 μ g/mL의 농도로 제조하여 사용하였다. HPLC 데이터를 통해 머무름 시간 중 23.9분이 prunin (**3**)임을 확인하였으며, 각 농도별 peak 면적을 구하여 회귀방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였다(Figure 8, Table 1, 2).

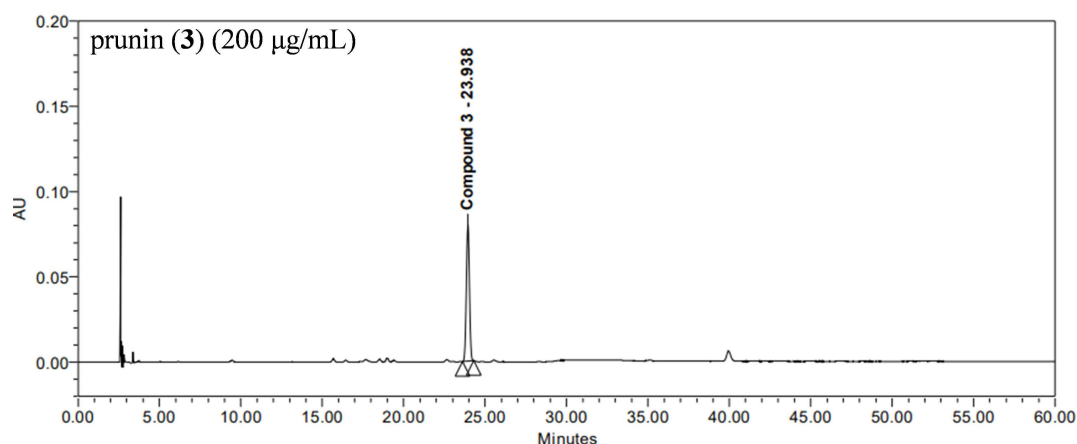


Figure 8. HPLC chromatogram of isolated compound **3** (prunin).

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control Factor	Conditions
Injection Volume	10 μ L
Column	Kromasil 100-5-C ₁₈ (250 \times 4.6 mm) (AkzoNobel)
Mobile phase	A: 0.1% Actic acid in H ₂ O, B: Acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temperature	40°C
Wavelength	282.6 nm
Detector	Waters 2998 PDA (Waters, USA)
Separation Module	Waters 2695 (Waters, USA)

Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis

Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1.0	90	10
60	1.0	55	45

6. 통계 처리

본 연구에서 진행한 모든 실험은 동일 조건 하에서 3회 반복 실시하였으며 모든 통계 분석은 Excel software (version 2019, Microsoft Corp., Washington, USA)를 사용하여 student's t-test를 실시하여 평가하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계적 검정 후 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미 있음을 판단하였다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

III. 결과 및 고찰

1. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1의 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 2.10 (3H, s)의 peak는 적분값을 통하여 methyl기가 분자 내에 포함되어 있음을 예상하였으며, δ_{H} 6.73 (1H, d, $J=1.8$ Hz)와 δ_{H} 6.63 (1H, d, $J=1.8$ Hz)의 peak는 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 183.2 peak를 통해 한 개의 carbonyl group이 분자 내에 포함되어 있음을 확인하였다. 또한 δ_{C} 167.6, 166.3, 163.6, 159.3, 109.1, 105.1, 100.4, 95.1의 8개의 peak들은 sp^2 혼성 carbon이라 예상하였으며, δ_{C} 167.6, 166.3, 163.6, 159.3의 peak는 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 치환기가 결합되어 있을 것이라 예상하였다. 이러한 결과를 문헌^{27,28}과 비교하여 종합해 봤을 때, compound 1은 noreugenin임을 확인하였다(Figure 9-11, Table 3).

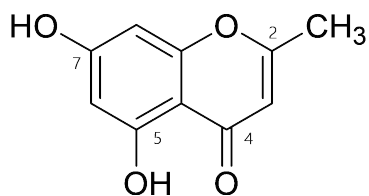


Figure 9. Chemical structure of compound 1

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 1	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		159.3
3	6.12 (1H, s)	109.1
4		183.2
5		166.3
6	6.63 (1H, d, 1.8)	100.4
7		167.6
8	6.73 (1H, d, 1.8)	95.1
9		163.6
10		105.1
2-CH ₃	2.10 (3H, s)	20.4

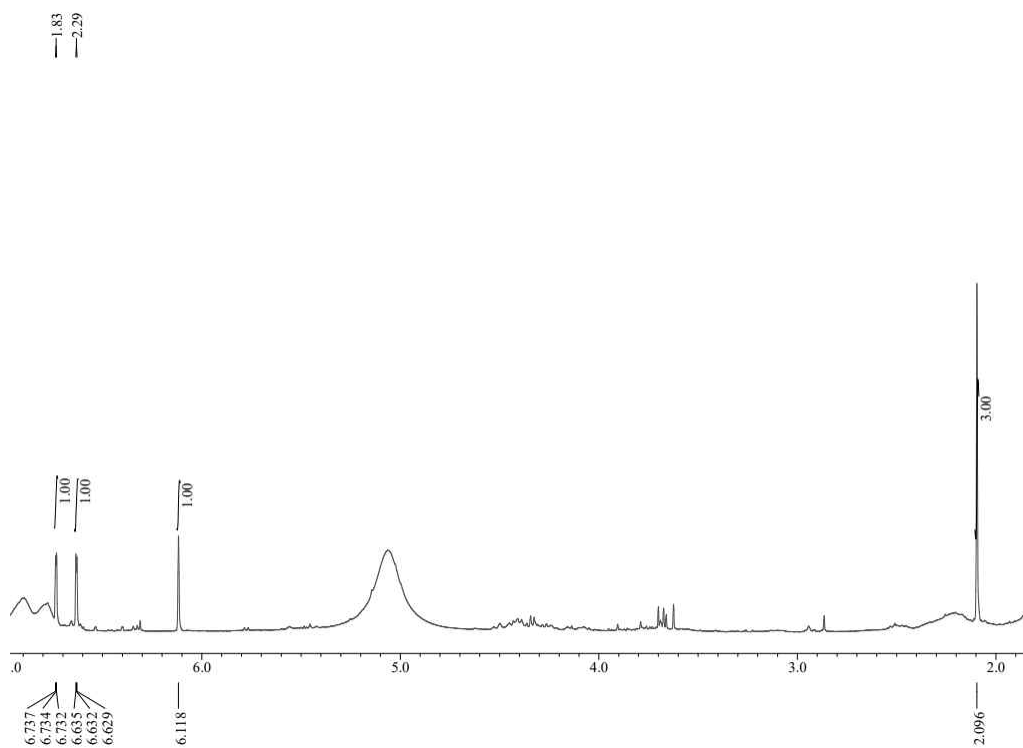


Figure 10. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in pyridine- d_5

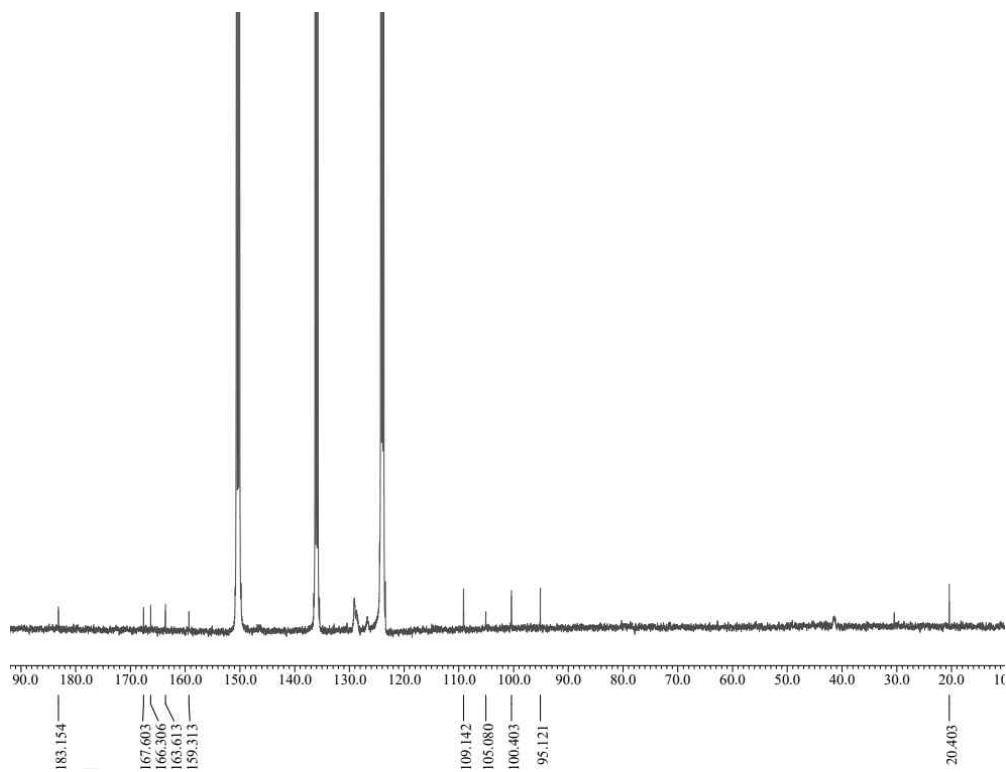


Figure 11. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in pyridine- d_5

2) Compound 2의 구조 동정

Compound 2의 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.55 (2H, d, $J=8.2$ Hz)와 δ_{H} 7.24 (2H, d, $J=8.2$ Hz)의 peak는 coupling constant값과 적분값을 통하여 *ortho*-coupling을 하는 대칭구조임을 예상하였으며, δ_{H} 6.50 (1H, d, $J=1.8$ Hz)와 δ_{H} 6.40 (1H, d, $J=1.8$ Hz)의 peak는 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 15개의 carbon peak가 관찰되었으며, 이를 통해 flavonoid 골격임을 예상하였다. δ_{C} 196.9 peak를 통해 한 개의 carbonyl group이 분자 내에 포함되어 있음을 확인하여 flavanone의 무배당체 구조로 예상하였다. 이러한 결과를 문헌²⁹과 비교하여 종합해봤을 때, compound 2은 naringenin임을 확인하였다(Figure 12-14, Table 4).

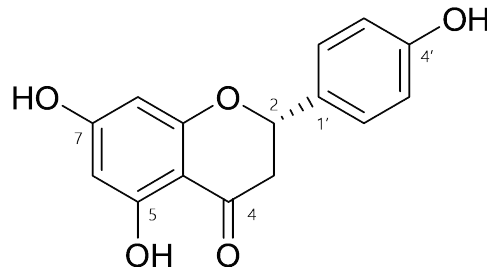


Figure 12. Chemical structure of compound 2

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 2	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2	5.51 (1H, dd, 12.8, 2.8)	80.0
3	3.31 (1H, dd, 17.2, 12.8)	43.7
	2.90 (1H, dd, 17.2, 2.8)	
4		196.9
5		169.0
6	6.50 (1H, d, 1.8)	97.6
7		165.6
8	6.40 (1H, d, 1.8)	96.5
9		164.4
10		103.3
1'		130.1
2'	7.55 (2H, d, 8.2)	129.2
3'	7.24 (2H, d, 8.2)	116.8
4'		159.9
5'	7.24 (2H, d, 8.2)	116.8
6'	7.55 (2H, d, 8.2)	129.2

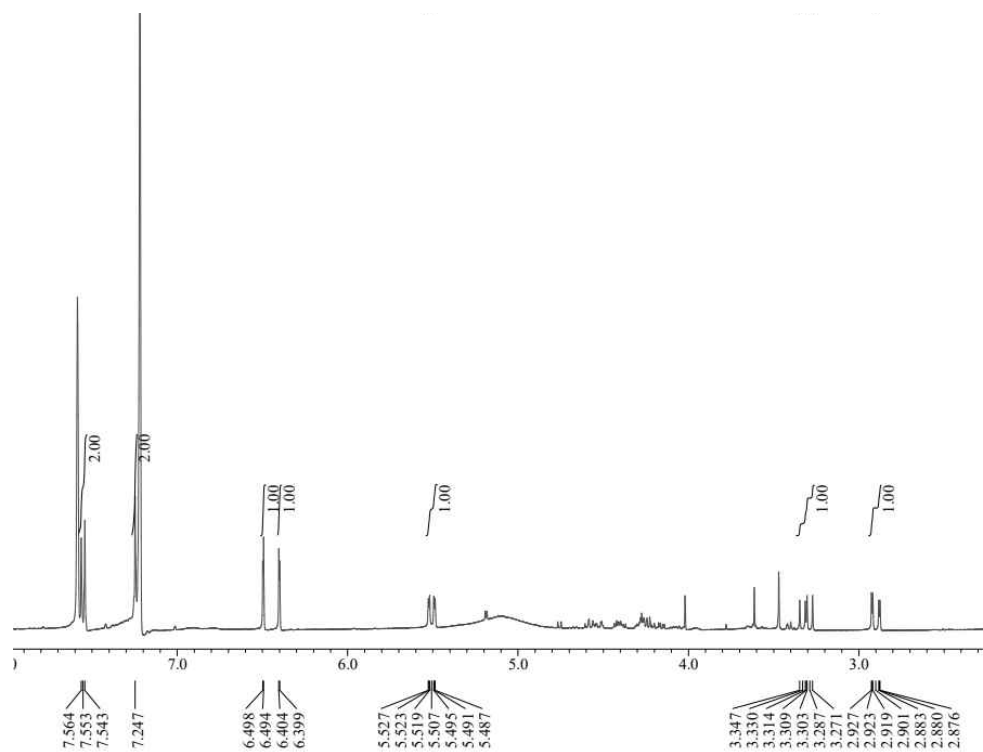


Figure 13. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in pyridine- d_5

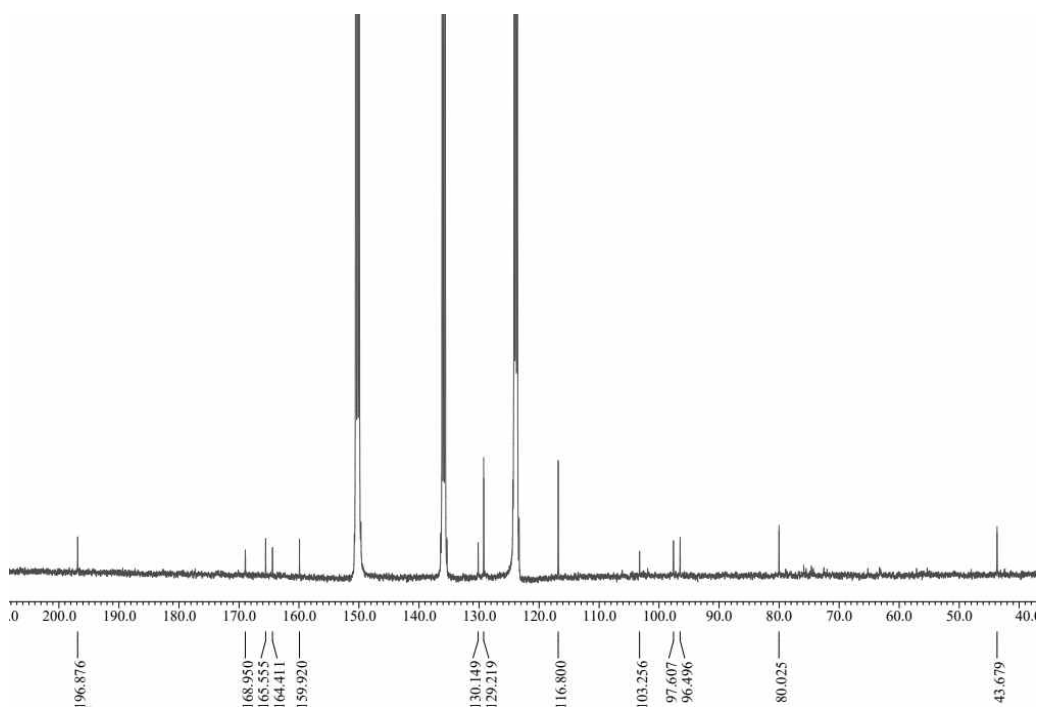


Figure 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in pyridine- d_5

2) Compound 3의 구조 동정

Compound 3의 ^1H 와 ^{13}C NMR data를 비교한 결과, compound 2의 배당체 골격을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.32 (2H, d, $J=8.7$ Hz)와 δ_{H} 6.82 (2H, d, $J=8.7$ Hz)의 peak는 coupling constant 값을 통하여 *ortho*-coupling을 하는 대칭구조임을 예상하였으며, δ_{H} 6.19 (1H, d, $J=1.8$ Hz)와 δ_{H} 6.21 (1H, d, $J=1.8$ Hz)의 peak는 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다. 또한 δ_{H} 3.89-3.40의 proton peak와 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 4.97 (1H, d, $J=7.3$ Hz) peak를 통해 flavanone 골격에 β -form의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 198.7 peak를 통해 한 개의 carbonyl group이 분자 내에 포함되어 있음을 예상하였으며, δ_{C} 101.4 peak와 δ_{C} 78.4, 77.9, 74.8, 71.3, 62.5 peak를 통해 결합되어있는 당은 β -D-glucopyranose로 예상하였다. 이러한 결과를 문헌^{30,31}과 비교하여 종합해봤을 때, compound 3은 prunin임을 확인하였다(Figure 15-17, Table 5).

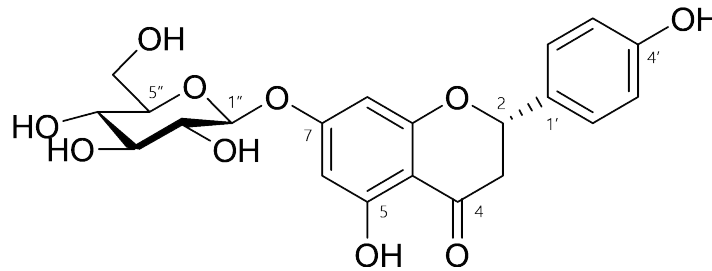


Figure 15. Chemical structure of compound 3

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 3	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2	5.38 (1H, dd, 12.8, 2.8)	80.9
3	3.17 (1H, dd, 17.2, 12.8)	44.3
	2.74 (1H, dd, 17.2, 2.8)	
4		198.7
5		105.1
6	6.19 (1H, d, 1.8)	164.8
7		97.0
8	6.21 (1H, d, 1.8)	167.2
9		98.1
10		165.1
1'		129.3
2'	7.32 (2H, d, 8.7)	131.0
3'	6.82 (2H, d, 8.7)	116.5
4'		159.3
5'	6.82 (2H, d, 8.7)	116.5
6'	7.32 (2H, d, 8.7)	131.0
1''	4.97 (1H, d, 7.3)	101.4
2''		74.8
3''		77.9
4''	3.89–3.40 (sugar 6H)	71.3
5''		78.4
6''		62.5

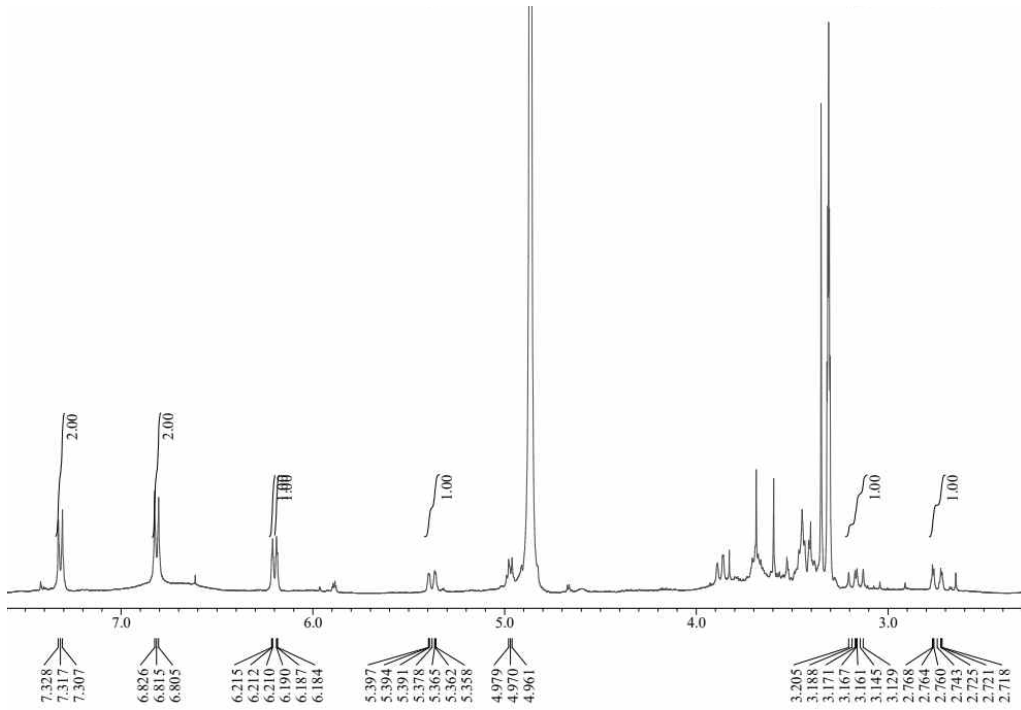


Figure 16. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

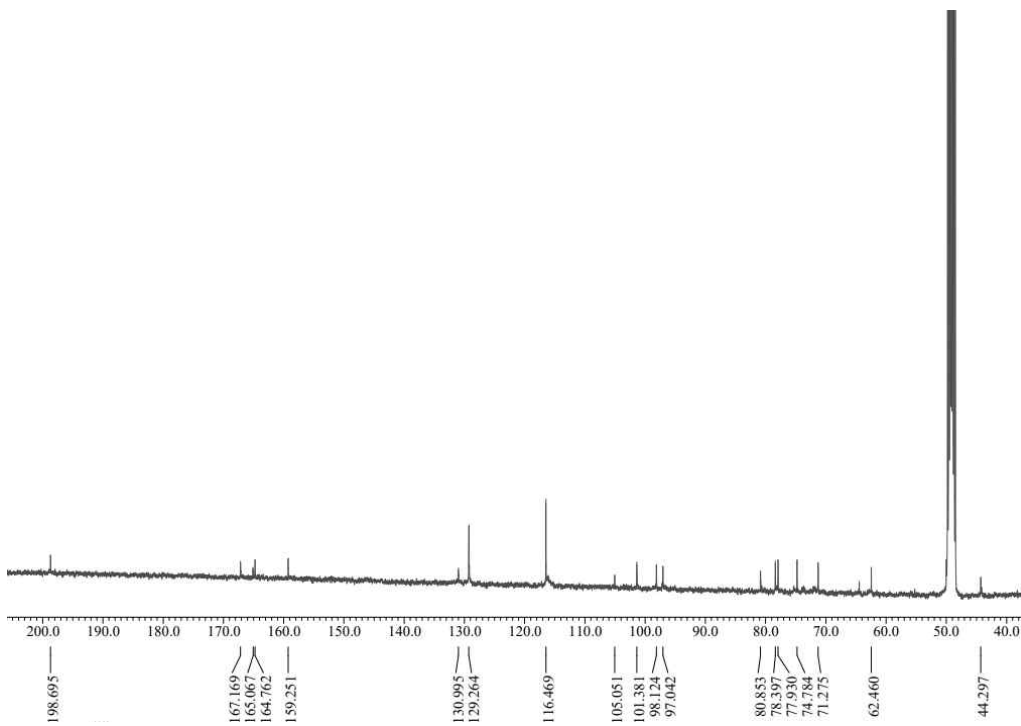


Figure 17. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

4) Compound 4, 5의 구조 동정

Compound 4는 Compound 5와 혼합된 형태로 분리되었다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.94 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 7.29 (1H, d, $J=8.7$ Hz), 7.36 (1H, dd, $J=8.7, 1.8$ Hz) peak의 coupling constant 값을 통해 서로 *ortho*-및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있음을 예상하였으며, δ_{H} 6.68 (1H, d, $J=2.3$ Hz)과 6.73 (1H, d, $J=2.3$ Hz) peak의 coupling constant 값을 통해 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다. δ_{H} 5.25 (1H, d, $J=7.8$ Hz)와 4.64 (1H, m) peak는 전기음성도가 큰 원소에 인접한 carbon에 결합되어 있는 proton으로 예상하였다. 이러한 결과를 문헌³²과 비교하여 종합해 봤을 때, compound 4은 catechin임을 확인하였다.

Compound 5는 compound 4와 유사한 구조로 예상하였으며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 5.39 (1H, s) peak를 통해 flavonoid 3번 위치에 결합된 hydroxy기에 입체 구조가 다를 것이라 예상하였다. 이러한 결과를 문헌³²과 비교하여 종합해 봤을 때, compound 5는 compound 4의 입체이성질체인 *epi*-catechin임을 확인하였다 (Figure 18-20, Table 6).

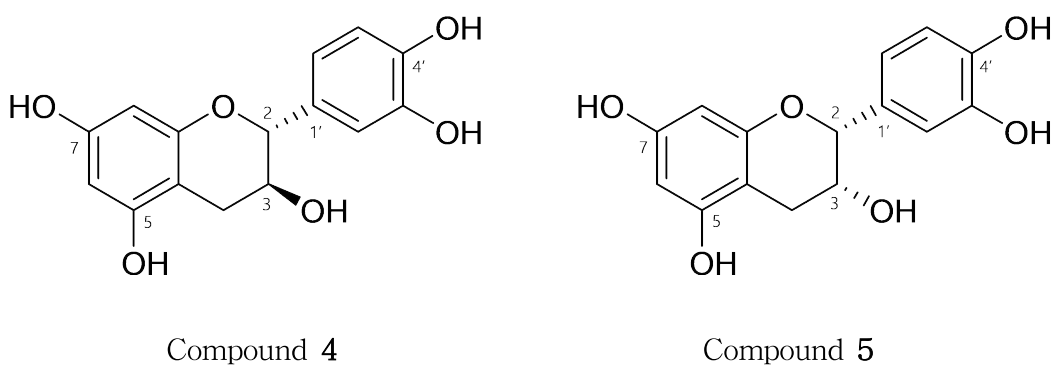


Figure 18. Chemical structures of compound 4 and 5

Table 6. ¹H and ¹³C NMR data of compound **4** and **5** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 4		Compound 5	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2	5.25 (1H, d, 7.8)	83.7	5.39 (1H, s)	80.5
3	4.64 (1H, m)	68.6	4.64 (1H, m)	67.3
4	3.72 (1H, dd, 15.8, 5.5)	30.2	3.56 (1H, dd, 16.5, 3.7)	30.1
	3.36 (1H, dd, 16.0, 8.2)		3.43 (1H, dd, 16.7, 4.6)	
5		157.8		158.1
6	6.68 (1H, d, 2.3)	97.1	6.70 (1H, overlapped)	96.2
7		159.2		159.1
8	6.73 (1H, d, 2.3)	96.0	6.68 (1H, overlapped)	96.0
9		158.8		159.0
10		101.5		100.6
1'		132.6		132.6
2'	7.94 (1H, d, 1.8)	116.6	7.94 (1H, d, 1.8)	116.6
3'		147.6		147.3
4'		147.6		147.2
5'	7.29 (1H, d, 8.7)	116.8	7.29 (1H, d, 8.7)	116.5
6'	7.36 (1H, dd, 8.7, 1.8)	120.2	7.36 (1H, dd, 8.7, 1.8)	119.8

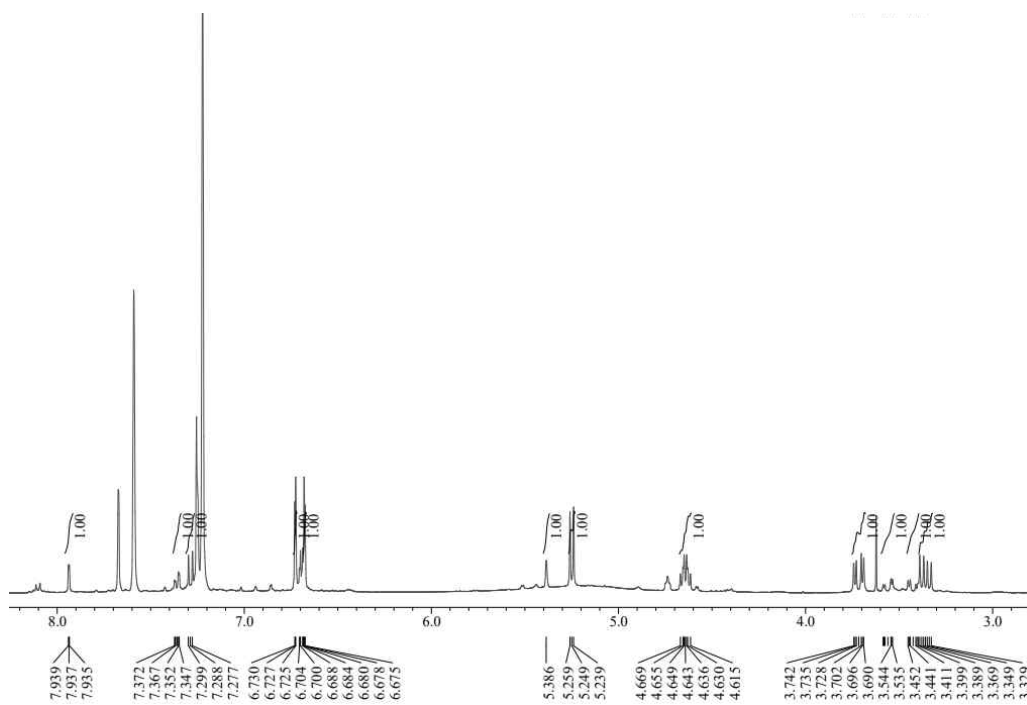


Figure 19. ^1H -NMR spectrum of compound 4 and 5 in pyridine- d_5

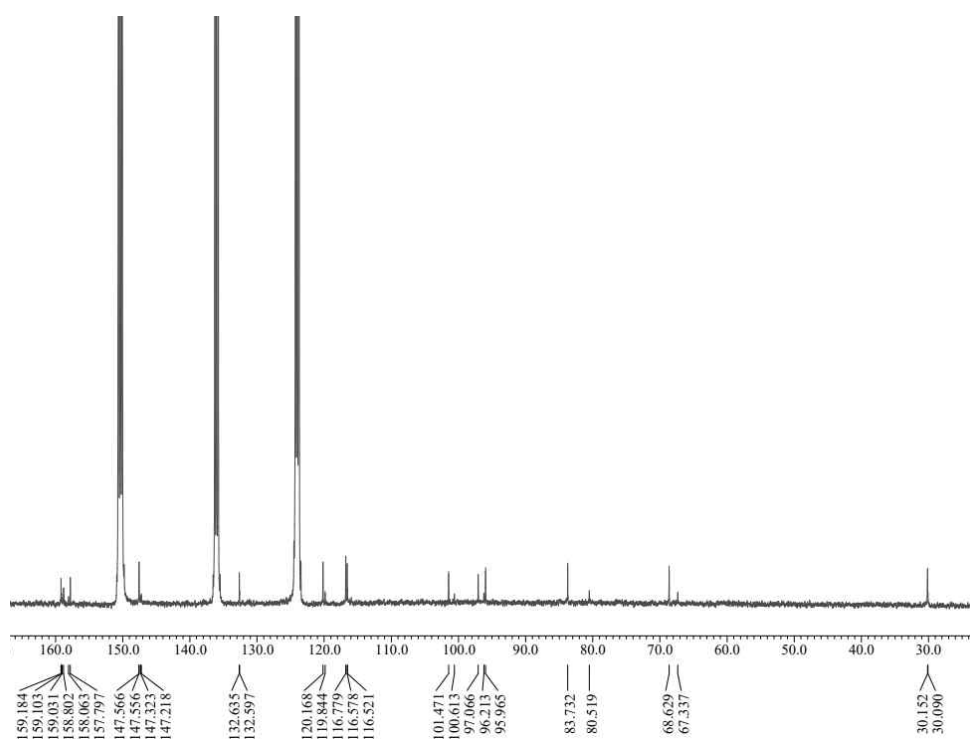


Figure 20. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 and 5 in pyridine- d_5

5) Compound 6의 구조 동정

Compound 6의 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.13 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 6.84 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 7.03 (1H, dd, $J=8.2, 1.8$ Hz) peak의 coupling constant 값을 통해서 *ortho*-및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있음을 예상하였으며, δ_{H} 5.89 (1H, d, $J=2.3$ Hz)와 6.06 (1H, d, $J=2.3$ Hz) peak의 coupling constant 값을 통해 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 30개의 carbon peak를 확인할 수 있었으며, δ_{C} 158.3-102.0의 peak와 δ_{C} 98.1, 96.7, 96.6의 총 24개의 peak들은 sp^2 혼성의 carbon이라 예상하였으며, δ_{C} 158.3-145.8의 peak는 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 치환기가 결합되어 있을 것이라 예상하였다. 이러한 결과를 문헌³³과 비교하여 종합해봤을 때, compound 6은 *epi*-catechin의 dimer 형태인 procyanidin A2임을 확인하였다(Figure 21-23, Table 7).

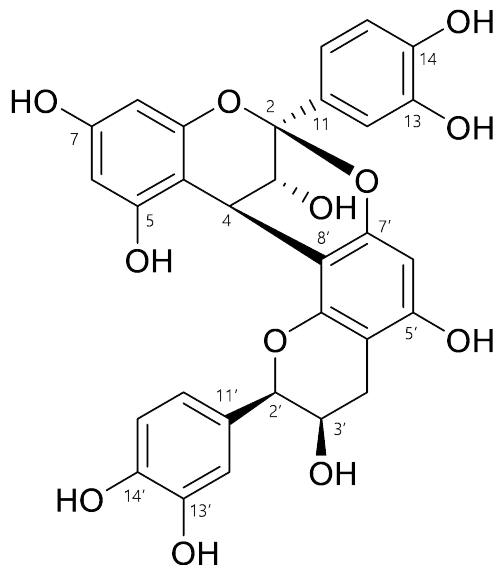


Figure 21. Chemical structure of compound 6

Table 7. ¹H and ¹³C NMR data of compound **6** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 6	
	$\delta_{\text{H}}(\text{int., multi., } J \text{ Hz})$	δ_{C}
2		100.6
3	4.16 (1H, d, 3.7)	67.9
4	4.40 (1H, d, 3.7)	29.4
5		156.9
6	5.89 (1H, d, 2.3)	98.1
7		158.3
8	6.06 (1H, d, 2.3)	96.7
9		154.3
10		104.2
11		132.5
12	7.13 (1H, d, 1.8)	116.3
13		145.8
14		146.4
15	6.84 (1H, d, 8.2)	115.9
16	7.03 (1H, dd, 8.2, 1.8)	119.6
2'	5.03 (1H, s)	81.0
3'	4.24 (1H, brs)	67.3
4'	2.92 (1H, dd, 16.9, 4.1)	29.6
	2.85 (1H, dd, 16.9, 2.3)	
5'		156.8
6'	6.09 (1H, s)	96.6
7'		152.2
8'		107.1
9'		151.4
10'		102.0
11'		131.6
12'	7.15 (1H, d, 2.3)	115.4
13'		147.0
14'		147.0
15'	6.82 (1H, d, 8.2)	115.8
16'	6.95 (1H, dd, 8.2, 2.3)	120.0

6) Compound 7의 구조 동정

Compound 7의 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.51 (2H, d, $J=8.7$ Hz)와 6.83 (2H, overlapped)의 peak는 coupling constant값과 적분값을 통하여 *ortho*-coupling을 하는 대칭구조임을 예상하였다. δ_{H} 7.13 (1H, d, $J=1.8$ Hz)과 δ_{H} 6.95 (1H, dd, $J=8.2, 1.8$ Hz) 및 δ_{H} 6.85 (1H, overlapped)의 peak는 coupling constant 값을 통하여 *ortho*-및 *meta*-coupling을 하는 aromatic proton이 있음을 예상하였으며, δ_{H} 6.07 (1H, d, $J=2.3$ Hz)과 δ_{H} 5.89 (1H, d, $J=2.3$ Hz)의 peak 또한 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 30개의 carbon peak를 확인할 수 있었다. δ_{C} 159.1-102.1의 peak와 δ_{C} 98.1, 96.7, 96.6의 총 24개의 peak들은 sp^2 혼성 carbon이라 예상하였으며, δ_{C} 159.1-146.4의 peak는 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 치환기가 결합되어 있을 것이라 예상하였다. 이러한 결과를 문헌³⁴과 비교하여 종합해봤을 때, compound 7은 (+)-epiafzelechin-(2 β →O→7, 4 β →8)-epicatechin임을 확인하였다(Figure 24-26, Table 8).

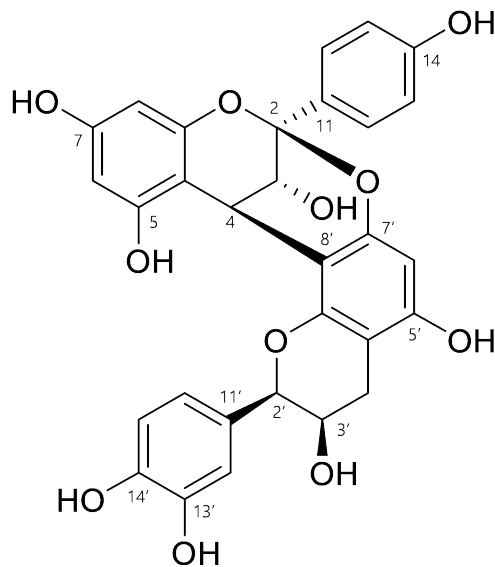


Figure 24. Chemical structure of compound 7

Table 8. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **7** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 7	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		100.7
3	4.17 (1H, d, 3.7)	67.9
4	4.42 (1H, d, 3.7)	294.
5		156.9
6	5.89 (1H, d, 2.3)	98.1
7		158.3
8	6.07 (1H, d, 2.3)	96.7
9		154.3
10		104.2
11		131.9
12	7.51 (2H, d, 8.7)	129.7
13	6.83 (2H, overlapped)	115.6
14		159.1
15	6.83 (2H, overlapped)	115.7
16	7.51 (2H, d, 8.7)	129.7
2'	5.03 (1H, s)	81.0
3'	4.24 (1H, m)	67.3
4'	2.85 (1H, dd, 17.2, 2.3)	29.6
5'	2.92 (1H, dd, 17.2, 4.1)	
6'		156.8
7'	6.09 (1H, s)	96.6
8'		152.2
9'		107.1
10'		151.5
11'		102.1
12'		131.6
13'	7.13 (1H, d, 1.8)	115.4
14'		146.4
15'		146.4
16'	6.85 (1H, overlapped)	116.3
16'	6.95 (1H, dd, 8.2, 1.8)	119.6

2. HPLC 함량분석

매실나무 가지에서 분리된 화합물 중 지표성분인 prunin (**3**)의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 정량 분석을 실시하였다. 그 결과, prunin (**3**)의 함량이 추출물에서 30.2 mg/g (3.02%), EtOAc 분획물에서 78.3 mg/g (7.83%)으로 확인되었다(Figure 27, Table 9).

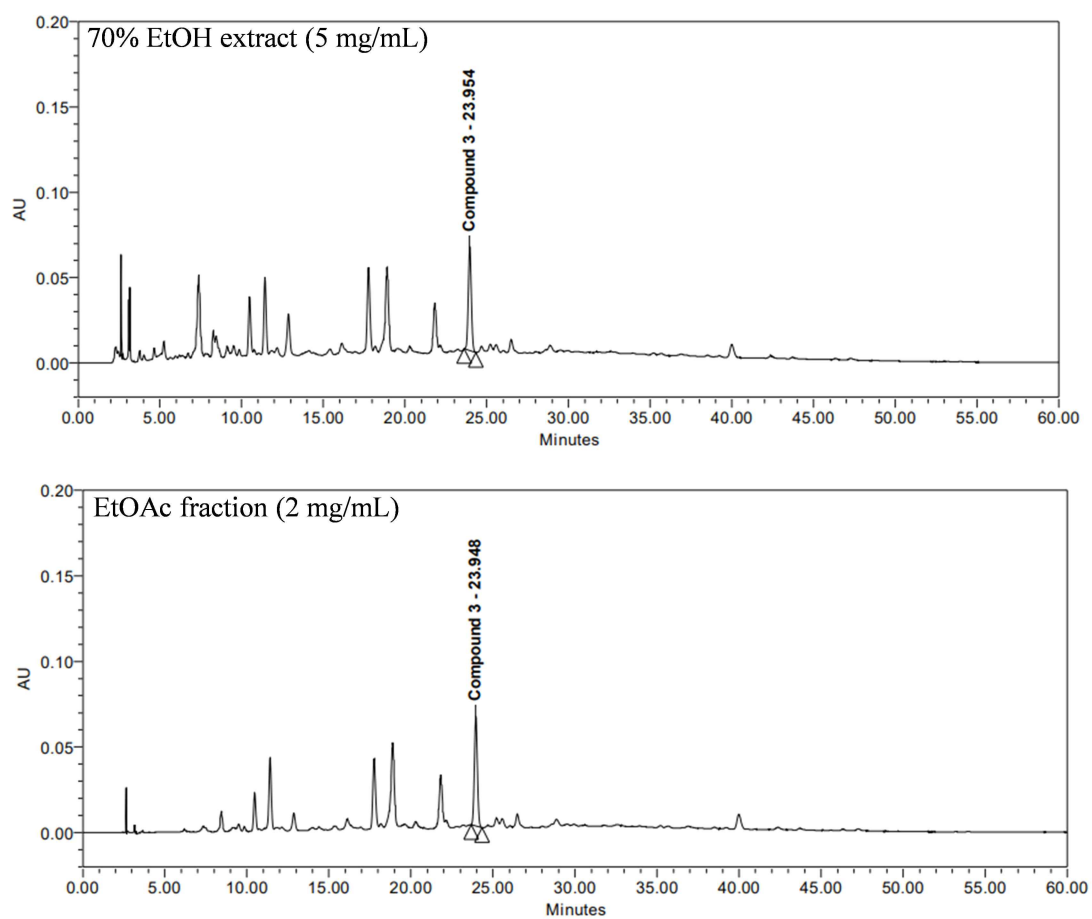


Figure 27. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract and EtOAc fraction.

Table 9. Content of prunin (3) from *P. mume* branches by HPLC.

	prunin (3)
70% EtOH extract	30.2
EtOAc fraction	78.3

Unit: mg/g

3. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항산화

(1) 총 폴리페놀 함량

표준물질 gallic acid를 사용한 표준검정곡선을 작성하여 매실나무 가지 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양 (GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물에서 136.2 ± 0.6 mg/g GAE, *n*-BuOH 분획물에서 125.9 ± 0.3 mg/g GAE, 추출물에서 111.1 ± 0.5 mg/g GAE로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 28).

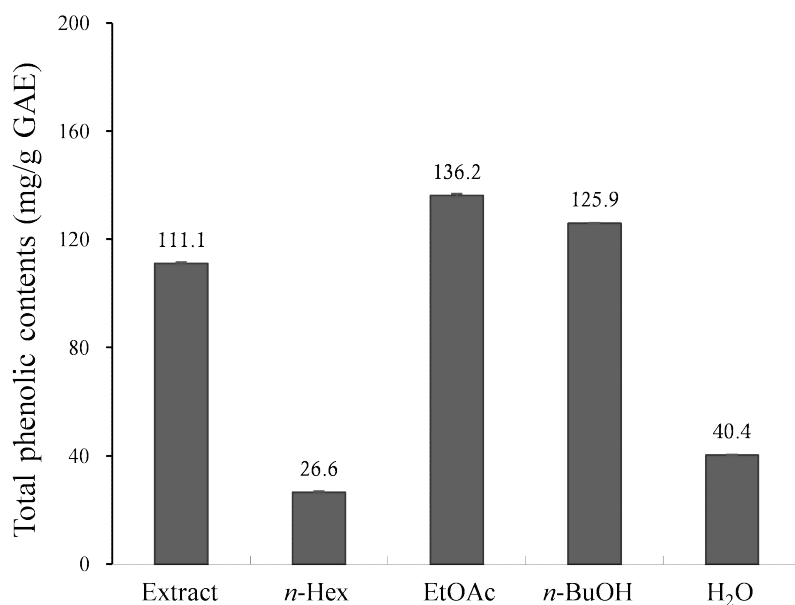


Figure 28. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *P. mume* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량

표준물질 quercetin을 사용한 표준검정곡선을 작성하여 매실나무 가지 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양 (QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, *n*-BuOH 분획물에서 17.4 ± 0.2 mg/g QE로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 29).

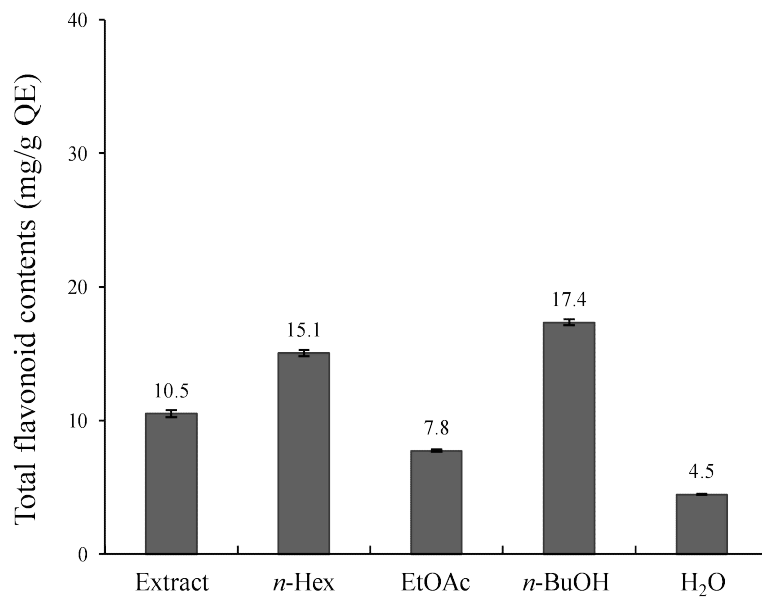


Figure 29. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *P. mume* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

매실나무 가지의 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료의 농도는 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 40.1, 24.7 32.5 µg/mL로, 대조군 BHT (SC₅₀ : 130.9 µg/mL) 보다 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 30, Table 10).

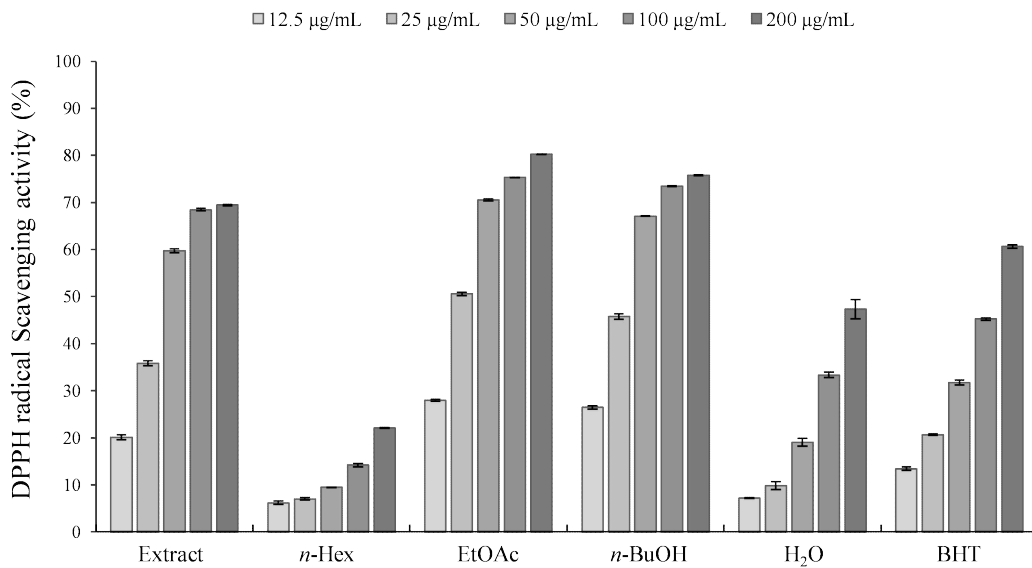


Figure 30. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. mume* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 10. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. mume* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	40.1	>200	24.7	32.5	>200	130.9

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

매실나무 가지의 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 시료의 농도는 5, 10, 20, 40, 80 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 10.9, 5.9, 10.3 µg/mL로 대조군 BHT (SC₅₀ : 6.9 µg/mL)만큼 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 31, Table 11).

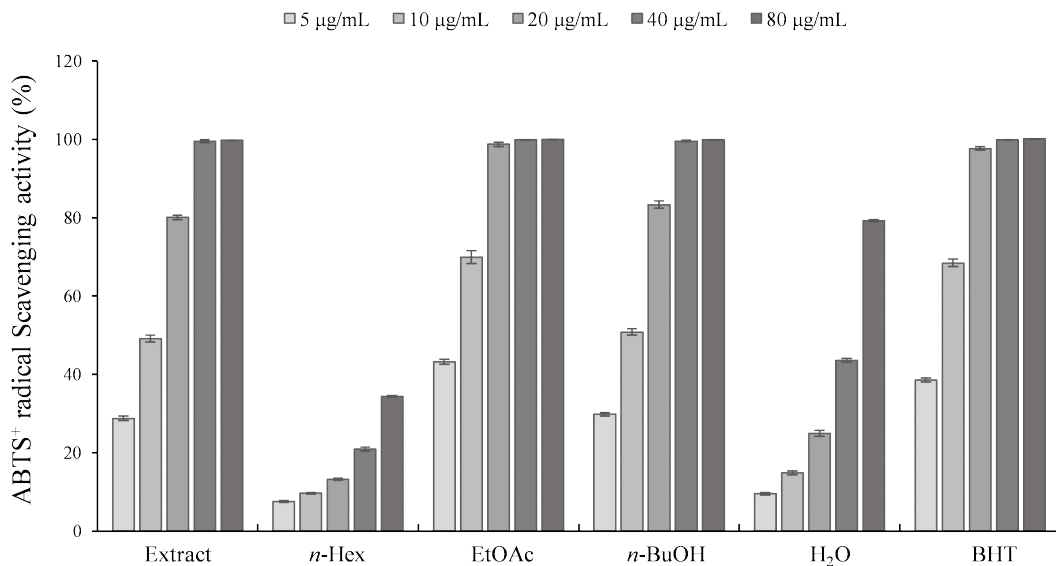


Figure 31. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. mume* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 11. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. mume* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	10.9	>200	5.9	10.3	47.8	6.9

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW 264.7 세포를 이용하여 매실나무 가지 추출물 및 분획물의 NO 생성량 및 세포 독성을 확인하였다. 우선 추출물과 분획물을 100 µg/mL 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 각각 78.4%, 58.9%로 큰 세포 독성 없이 NO 생성 저해 활성을 나타내었다(Figure 32).

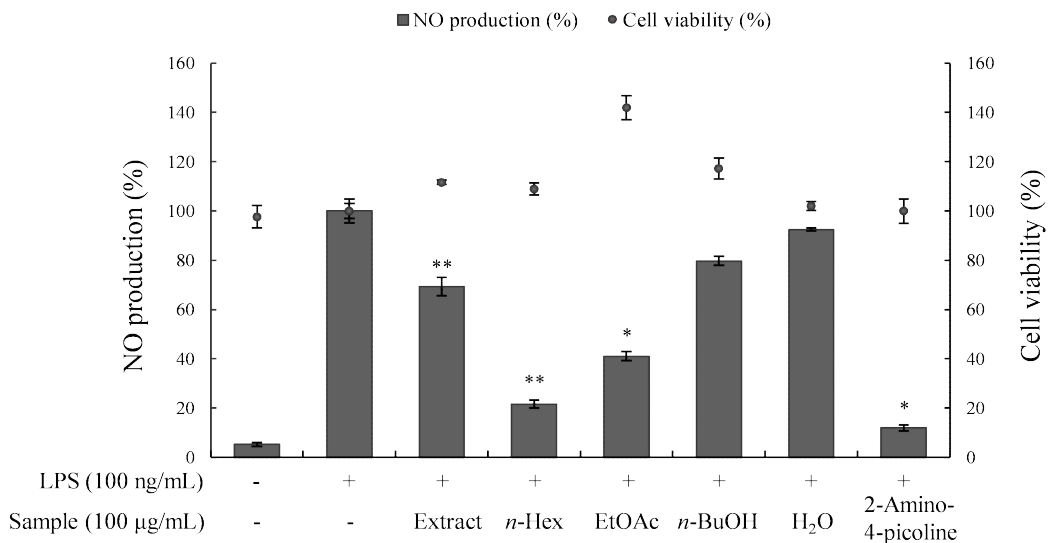


Figure 32. Effects of extract and solvent fractions from *P. mume* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *P. mume* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

위 결과를 바탕으로 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 좋은 활성을 보였던 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대해 똑같은 조건으로 농도만 달리하여(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 추가실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물 모두 큰 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성이 저해됨을 확인하였으며, IC₅₀값은 *n*-Hex 분획물에서 13.2 $\mu\text{g/mL}$, EtOAc 분획물에서 65.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Figure 33, 34).

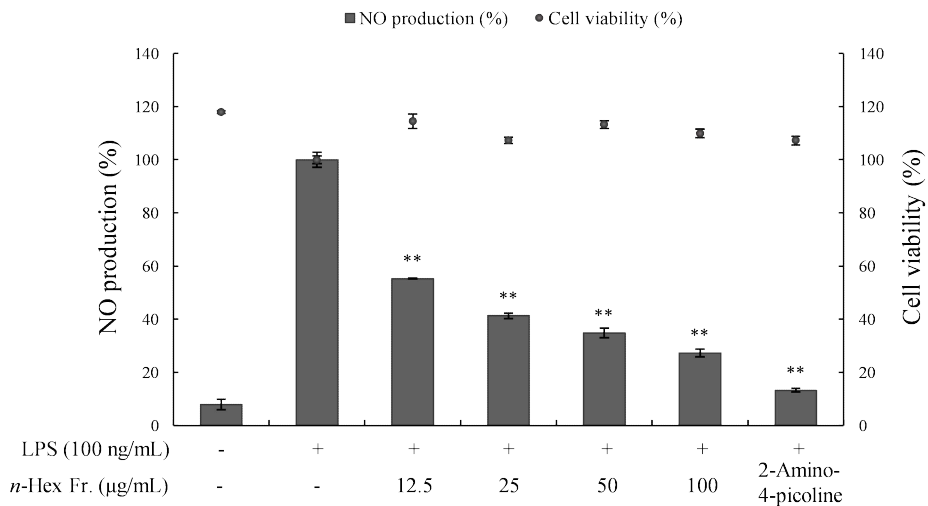


Figure 33. Effects of *n*-Hex fraction from *P. mume* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells.

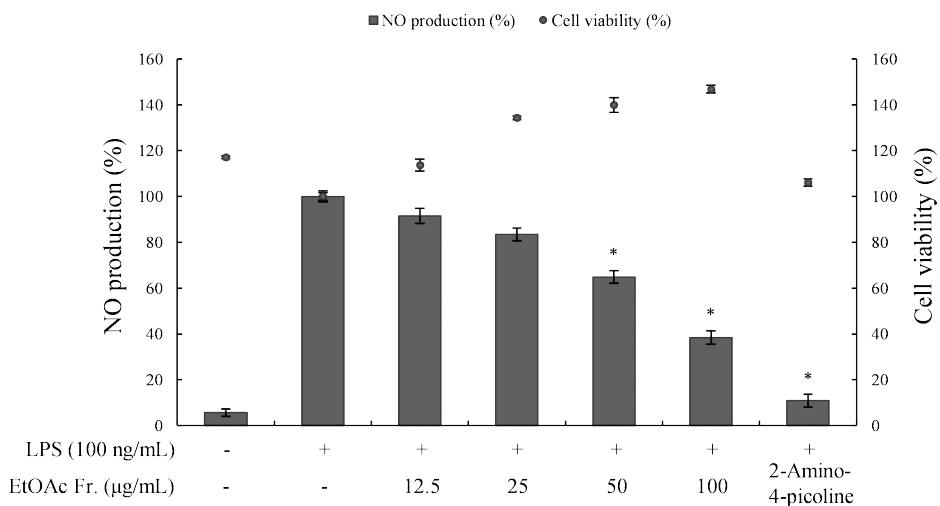


Figure 34. Effects of EtOAc fraction from *P. mume* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells.

(2) 전염증성 cytokine (TNF- α) 생성 억제 활성

매실나무 가지 *n*-Hex 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 세포 독성이 나타나지 않은 농도인 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 이용하여 실험을 진행한 결과, 매실나무 가지 *n*-Hex 분획물은 TNF- α 의 생성을 효과적으로 억제 시키는 것으로 확인하였다 (Figure 35).

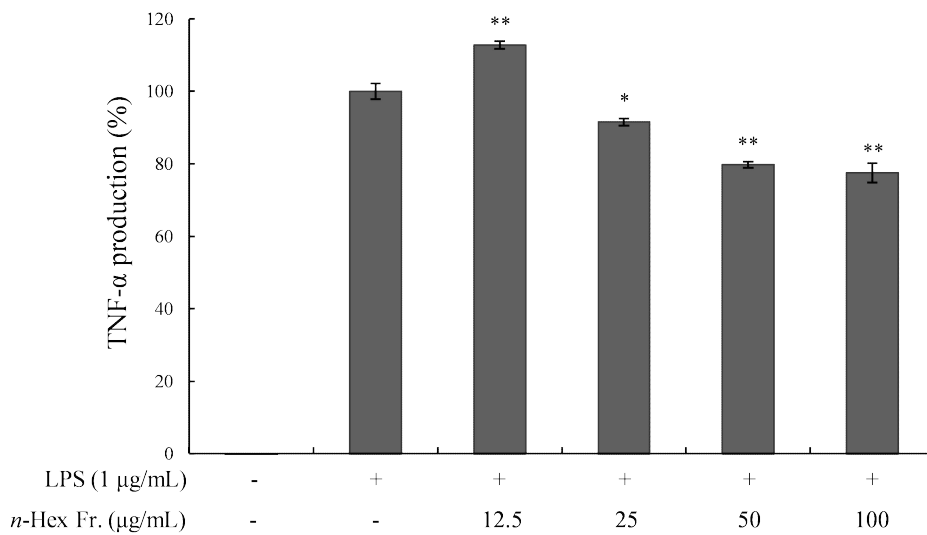


Figure 35. Effect of *n*-Hex fraction from *P. mume* branches on TNF- α production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

3) 항균

(1) Paper disc diffusion method

매실나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)를 사용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 추출물과 H₂O 분획물을 제외한 모든 분획물은 *S. epidermidis*와 *C. acnes*에 대한 좋은 생육억제 활성을 나타내었다(Table 12, Figure 36, 37).

Table 12. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from *P. mume* branches.

	Clear zone (mm)					
	<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.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
positive control	30	N.A.	29	50	N.A.	29

Sample : 4 mg

Positive control : Erythromycin(+) (40 µg)

Disc size : 8 mm × 1.5 mm

N.A. : No Activity

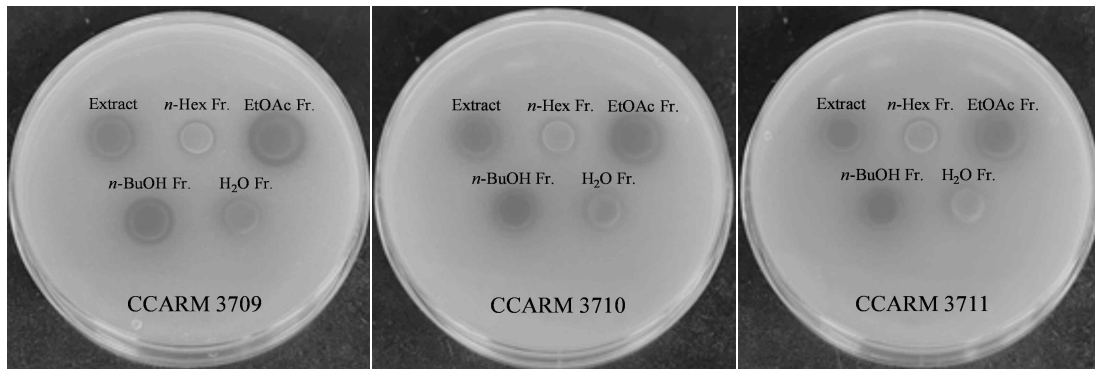


Figure 36. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of *P. mume* on *S. epidermidis*.

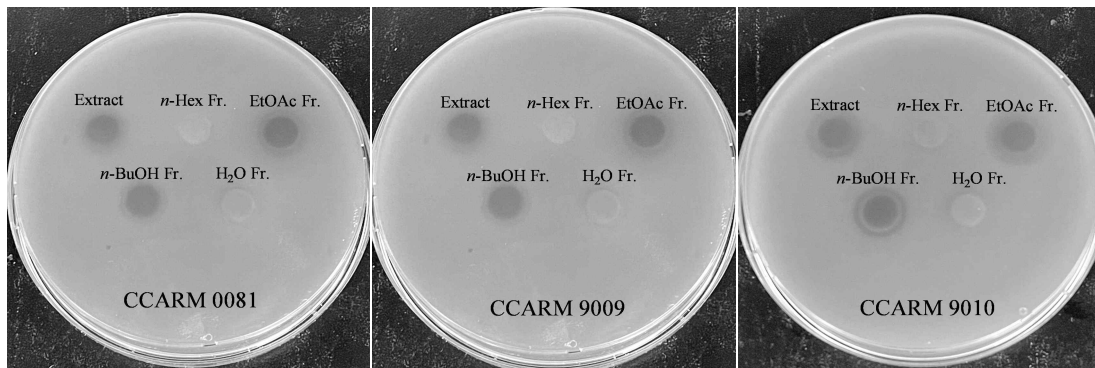


Figure 37. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of *P. mume* on *C. acnes*.

(2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통해 항균 활성을 확인한 후, 활성을 나타낸 시료에 대해 추가적으로 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 시료의 농도를 two-fold-dilution법으로 두 배씩 희석하면서 실시하였다. 가장 높은 농도를 4000 µg/mL로 하여 가장 낮은 농도가 3.9 µg/mL가 되도록 희석하여 실험하였다. 그 결과 추출물과 H₂O를 제외한 모든 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고, 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 이용하여 MBC를 확인하였다. 그 결과, *n*-Hex과 EtOAc 분획물에서 *S. epidermidis* 3종에 대한 MBC 값을 모두 확인할 수 있었으며, 추출물과 *n*-BuOH 분획물의 경우 CCARM 3711에서만 MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 13, 14).

Table 13. MIC and MBC values of *P. mume* branches on *S. epidermidis*.

	<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	2000	>4000	2000	>4000	1000	4000
<i>n</i> -Hex	2000	4000	2000	4000	2000	4000
EtOAc	1000	4000	1000	4000	500	2000
<i>n</i> -BuOH	2000	>4000	2000	>4000	2000	4000
H ₂ O	4000	>4000	>4000	>4000	4000	>4000

Unit : µg/mL

Table 14. MIC and MBC values of *P. mume* branches on *C. acnes*.

	<i>C. acnes</i>					
	CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	2000	>4000	2000	>4000	2000	>4000
<i>n</i> -Hex	1000	>4000	500	>4000	500	>4000
EtOAc	1000	>4000	500	>4000	1000	>4000
<i>n</i> -BuOH	2000	>4000	1000	>4000	2000	>4000
H ₂ O	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000

Unit : µg/mL

4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항산화

(1) DPPH radical 소거 활성

매실나무 가지에서 분리된 compound 7에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료의 농도는 12.5, 25, 50, 100, 200 μM 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC_{50} 값을 계산하였다. 실험 결과, compound 7의 SC_{50} 값은 32.8 μM 로, 대조군 BHT ($\text{SC}_{50} > 200 \mu\text{M}$)보다 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 38).

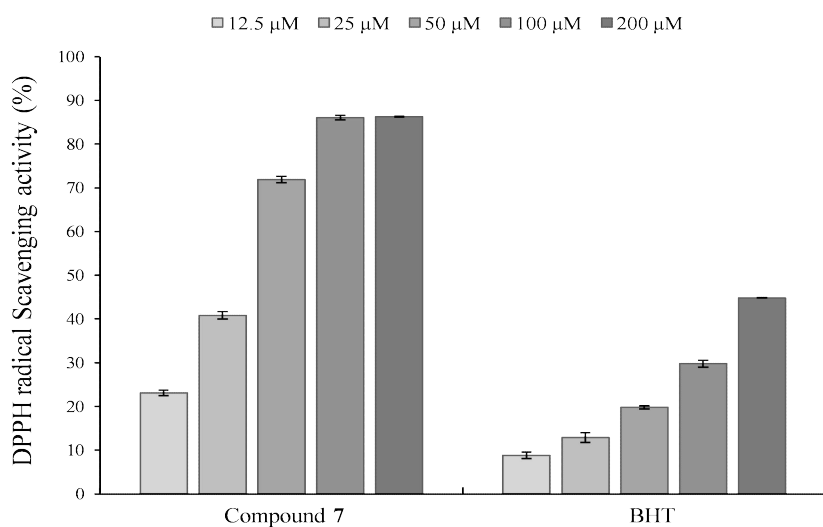


Figure 38. DPPH radical scavenging activities of isolated compound 7 from *P. mume* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) ABTS⁺ radical 소거 활성

매실나무 가지에서 분리된 compound 7에 대한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 시료의 농도는 12.5, 25, 50, 100, 200 μM 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, compound 7의 SC₅₀ 값은 26.8 μM 로, 대조군 BHT (SC₅₀ : 79.0 μM)보다 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 39).

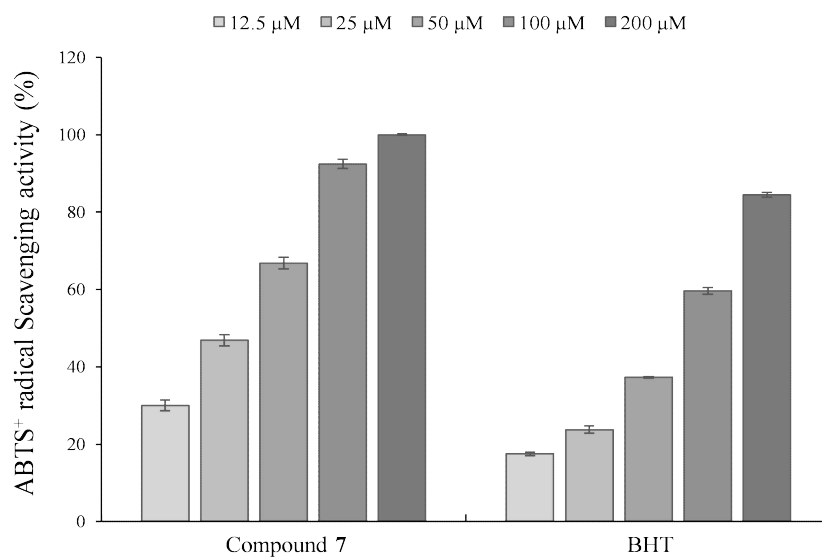


Figure 39. ABTS⁺ radical scavenging activities of isolated compound 7 from *P. mume* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW 264.7 세포를 이용하여 매실나무 가지에서 분리된 compound 7에 대한 NO 생성량 및 세포 독성을 확인하였다. 화합물을 100, 200, 400 μM 의 농도로 실험을 진행한 결과, 400 μM 농도 이하에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제 시켰으며, IC_{50} 값은 313.1 μM 로 확인되었다(Figure 40).

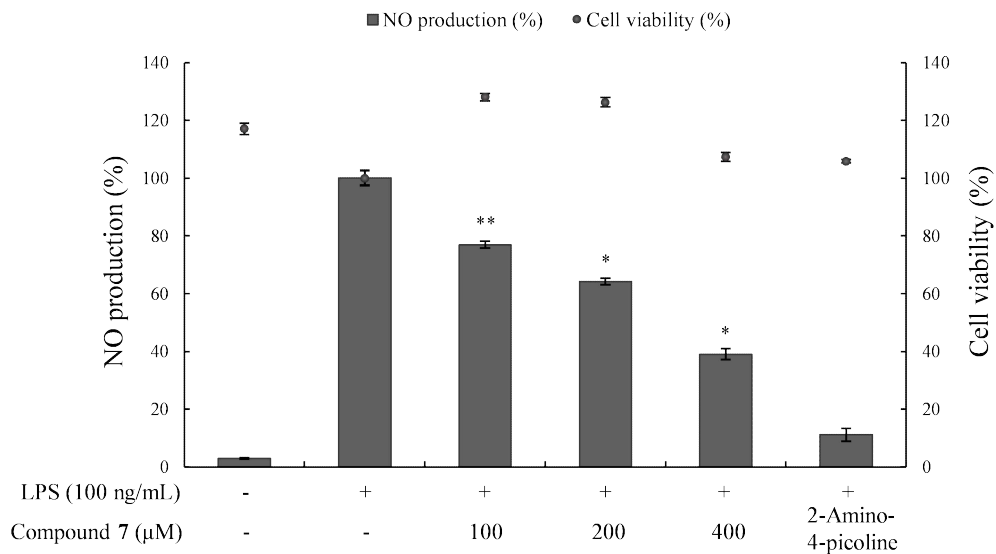


Figure 40. Effects of isolated compound 7 from *P. mume* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound 7 from *P. mume* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 μM) for 24 h. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

IV. 요약 및 결론

본 연구는 의약품 및 화장품의 소재로 쓰이는 합성 물질을 대체할 수 있는 천연물 유래 소재를 찾기 위해 매실나무 가지 추출물과 용매 분획물에서 유효 성분을 분리·동정하고 생리활성을 확인하였다.

매실나무 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻고 이들의 항산화, 항염 및 항균 활성 실험을 진행하였다. 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 총 폴리페놀 함량이 각각 136.2, 125.9 mg/g GAE로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 *n*-BuOH 분획물에서 17.4 mg/g QE로 가장 높은 함량을 나타내었다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험에서 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 대조군인 BHT보다 우수한 radical 소거 활성을 나타내었다. RAW 264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 세포 독성 없이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었다. 또한, 항균 활성 실험 결과, 추출물과 *n*-Hex, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 우수한 항균활성을 나타내었다.

이와 같은 결과를 바탕으로 우수한 활성을 보인 EtOAc 분획물을 MPLC, VLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리된 단일 화합물은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 7개의 화합물을 동정하였다. 분리한 화합물은 noreugenin (1), naringenin (2), prunin (3), catechin (4), *epi*-catechin (5), procyanidin A2 (6), (+)-*epiafzelechin*-(2 β →*O*→7, 4 β →8)-*epicatechin* (7)로 확인되었다.

매실나무 가지에서 분리된 compound 3의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 정량 분석하였다. HPLC 분석 결과, 추출물에서 30.2 mg/g (3.02%), EtOAc

분획물에서 78.3 mg/g (7.83%)의 함량을 나타내었다. 매실나무 가지에서 분리된 화합물 중 플라보노이드 화합물인 naringenin, prunin, catechin, *epi*-catechin와 procyanidin A2는 우수한 radical 소거 활성을 나타낸다는 것으로 많은 문헌³⁵⁻³⁸에 보고되어 있다. 또한, 분리된 화합물 중 (+)-epiafzelechin-(2 β →O→7, 4 β →8)-epicatechin을 제외한 모든 화합물이 항염 활성이 있는 것으로 알려져 있다.³⁹⁻⁴⁶

따라서 활성이 알려져 있지 않은 화합물인 (+)-epiafzelechin-(2 β →O→7, 4 β →8)-epicatechin (**7**)에 대해 항산화 및 항염 활성 실험을 진행하였다. 항산화 활성 실험 결과, DPPH radical 소거 활성 실험에서 compound **7** (SC₅₀ : 32.8 μ M)이 대조군(SC₅₀ >200 μ M)보다 우수한 활성을 나타내었다. 또한, ABTS⁺ radical 소거 활성 실험에서 compound **7** (SC₅₀ : 26.8 μ M)이 대조군 (SC₅₀ : 79.0 μ M)보다 우수한 활성을 나타내었다. 항염 활성 실험 결과, compound **7** (IC₅₀ : 313.1 μ M)은 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 매실나무 가지는 항산화, 항염 및 항균 효과를 갖는 의약품 및 화장품 관련 천연 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

V. 참고문헌

1. 이교영. 천연물 유래 추출물 및 분획물의 항산화 및 피부염증 억제 효과 탐색 연구, 국내석사학위논문 동신대학교 사회개발대학원, 2023.
2. Chaikul, P., Kanlayavattanakul, M., Somkumnerd, J., & Lourith, N. Phyllanthus emblica L.(amla) branch: A safe and effective ingredient against skin aging. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2021, 11.5: 390-399.
3. Kalasariya, H. S., Pereira, L., & Patel, N. B. Pioneering role of marine macroalgae in cosmeceuticals. *Phycology*, 2022, 2.1: 172-203.
4. Kerdudo, A., Burger, P., Merck, F., Dingas, A., Rolland, Y., Michel, T., & Fernandez, X. Development of a natural ingredient - Natural preservative: A case study. *Comptes Rendus Chimie*, 2016, 19.9: 1077-1089.
5. BARRETT, Julia R. Chemical exposures: the ugly side of beauty products. 2005.
6. 노진선, 염현지, 오민정, 이진영. 석류추출물의 항산화와 MMPs 단백질 발현 억제 및 액정 유화물에서의 안정화에 관한 연구. *생명과학회지*, 2021, 31.2: 164-174.
7. Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 2019.

8. Jin, S. E., Son, Y. K., Min, B. S., Jung, H. A., & Choi, J. S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. *Archives of Pharmacal Research*, **2012**, 35: 823-837.
9. Wu, D., & Cederbaum, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol research & health*, **2003**, 27.4: 277.
10. Menezes, L. B., Segat, B. B., Tolentino, H., Pires, D. C., Mattos, L. M. D. M., Hottum, H. M., ... & Fernandes, C. 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. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2023**, 239: 112062.
11. 윤민음, 이예슬, 이윤주, 박영민, & 박수남. 어성초 추출물 및 분획물의 항균, 항산화 및 세포보호활성. *공업화학*, **2018**, 29.4: 452-460.
12. Moilanen, E. Two faces of inflammation: an immunopharmacological view. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, **2014**, 114.1: 2-6.
13. Lee, H. J., Jeong, Y. J., Lee, T. S., Park, Y. Y., Chae, W. G., Chung, I. K., ... & Chang, Y. C. Moringa fruit inhibits LPS-induced NO/iNOS expression through suppressing the NF- κ B activation in RAW264. 7 cells. *The American journal of Chinese medicine*, **2013**, 41.05: 1109-1123.
14. Cho, W., Nam, J. W., Kang, H. J., Windono, T., Seo, E. K., & Lee, K. T. 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. *International immunopharmacology*, **2009**, 9.9: 1049-1057.

15. Lee, S. H., Lee, S. Y., Son, D. J., Lee, H., Yoo, H. S., Song, S., ... & Hong, J. T. Inhibitory effect of 2'-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Biochemical pharmacology*, **2005**, 69.5: 791-799.
16. Fournière, M., Latire, T., Souak, D., Feuilleley, M. G., & Bedoux, G. Staphylococcus epidermidis and Cutibacterium acnes: two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics. *Microorganisms*, **2020**, 8.11: 1752.
17. Soloviova, A. V., Kaliuzhnaia, O. S., & Strilets, O. P. Substantiation of composition of the anti-acne remedy with probiotic. **2019**.
18. Uhlířová, R., Langová, D., Bendová, A., Gross, M., Skoumalová, P., & Márová, I. Antimicrobial Activity of Gelatin Nanofibers Enriched by Essential Oils against Cutibacterium acnes and Staphylococcus epidermidis. *Nanomaterials*, **2023**, 13.5: 844.
19. Susano, P., Silva, J., Alves, C., Martins, A., Pinteus, S., Gaspar, H., ... & Pedrosa, R. Saccorhiza polyschides—A Source of Natural Active Ingredients for Greener Skincare Formulations. *Molecules*, **2022**, 27.19: 6496.
20. Kang, H. J., Choi, E. O., Jeong, J. W., Park, S. H., Park, C., Hong, S. H., ... & Choi, Y. H. 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. *Herbal Formula Science*, **2017**, 25.1: 1-10.

21. Pi, K., & Lee, K. Prunus mume extract exerts antioxidant activities and suppressive effect of melanogenesis under the stimulation by alpha-melanocyte stimulating hormone in B16-F10 melanoma cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **2017**, 81.10: 1883-1890.
22. Kim, M., & Park, S. Bioactivities of feral peach (*Prunus persica* Batsch var. *dauidiana* Max.) flower extracts and *Prunus mume* flower extracts. *Journal of Applied Biological Chemistry*, **2021**, 64.2: 133-140.
23. Folin, O., & Denis, W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *Journal of biological chemistry*, **1915**, 22.2: 305-308.
24. Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacology*, **2000**, 71.1-2: 109-114.
25. Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**, 181.4617: 1199-1200.
26. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, **1999**, 26.9-10: 1231-1237.
27. Ali, A. A., Makboul, M. A., Attia, A. A., & Ali, D. T. Chromones and flavans from *Pancreatium maritimum*. *Phytochemistry*, **1990**, 29.2: 625-627.
28. Houghton, P. J., Osibogun, I. M., Woldemariam, T. Z., & Jones, K.

Heteronuclear NMR studies of the chromone alkaloids and revision of the structure of some piperidino-chromone alkaloids. *Planta medica*, **1995**, 61.02: 154-157.

29. Celiz, G., Suarez, S. A., Arias, A., Molina, J., Brondino, C. D., & Doctorovich, F. Synthesis, structural elucidation and antiradical activity of a copper (II) naringenin complex. *BioMetals*, **2019**, 32: 595-610.

30. Tung, N. H., Son, J. H., Cho, K., Kim, J. A., Hyun, J. H., Kang, H. K., ... & Kim, Y. H. Phenolic components from the leaves of Panax ginseng and their effects on HL-60 human leukemia cells. *Food Science and Biotechnology*, **2010**, 19: 271-274.

31. 조연정, 이용범, 현지선, 김창윤, & 이남호. 수국 꽃 추출물 유래 항산화 및 항염 활성 성분. *한국응용과학기술학회지*, **2020**, 37.5: 1356-1365.

32. 김미애. 보리밥나무 및 생달나무 가지의 항산화, 항염, 항균 활성 성분 연구. **2022**. PhD Thesis. 제주대학교 대학원.

33. Lu, W. C., Huang, W. T., Kumaran, A., Ho, C. T., & Hwang, L. S. Transformation of proanthocyanidin A2 to its isomers under different physiological pH conditions and common cell culture medium. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2011**, 59.11: 6214-6220.

34. Ortega-Vidal, J., Cobo, A., Ortega-Morente, E., Gálvez, A., Martínez-Bailén, M., Salido, S., & Altarejos, J. Antimicrobial activity of phenolics isolated from the pruning wood residue of European plum (*Prunus domestica* L.). *Industrial Crops and Products*, **2022**, 176: 114296.

35. Zhang, K., Ding, Z., Duan, W., Mo, M., Su, Z., Bi, Y., & Kong, F. Optimized preparation process for naringenin and evaluation of its antioxidant and α glucosidase inhibitory activities. *Journal of Food Processing and Preservation*, **2020**, 44.12: e14931.
36. Céliz, G., & Daz, M. Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media. *Process Biochemistry*, **2011**, 46.1: 94-100.
37. Plumb, G. W., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & Williamson, G. Antioxidant properties of galocatechin and prodelpinidins from pomegranate peel. *Redox Report*, **2002**, 7.1: 41-46.
38. Yang, G., Li, T., Zhang, Y., Yang, R., & Li, W. Analysis of in vitro intestinal microbial metabolites of procyanidin A2 and evaluation of their antioxidant activity. *Shipin Kexue/Food Science*, **2018**, 39.21: 155-159.
39. da Rosa, J. S., de Mello, S. V. G. V., Vicente, G., Moon, Y. J. K., Daltoe, F. P., Lima, T. C., ... & Fröde, T. S. *Calea uniflora* Less. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. *International immunopharmacology*, **2017**, 42: 139-149.
40. da Rosa, J. S., Nascimento, M. V. P. D. S., Parisotto, E. B., Lima, T. C., Santin, J. R., Biavatti, M. W., ... & Fröde, T. S. Phenolic compounds isolated from *Calea uniflora* Less. promote anti-inflammatory and antioxidant effects in mice neutrophils (ex vivo) and in mice pleurisy model (in vivo). *Mediators of Inflammation*, **2019**, 2019.

41. Dou, W., Zhang, J., Sun, A., Zhang, E., Ding, L., Mukherjee, S., ... & Mani, S. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *British Journal of Nutrition*, **2013**, 110.4: 599-608.
42. Park, H. Y., Kim, G. Y., & Choi, Y. H. 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. *International journal of molecular medicine*, **2012**, 30.1: 204-210.
43. Na, E. J., & Ryu, J. Y. Anti-inflammatory effects of prunin on UVB-irradiated human keratinocytes. *Biomedical Dermatology*, **2018**, 2: 1-6.
44. Nakano, E., Kamei, D., Murase, R., Taki, I., Karasawa, K., Fukuhara, K., & Iwai, S. Anti-inflammatory effects of new catechin derivatives in a hapten-induced mouse contact dermatitis model. *European Journal of Pharmacology*, **2019**, 845: 40-47.
45. Wang, H., & Cao, Z. Anti-inflammatory effects of (-)-epicatechin in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **2014**, 13.9: 1415-1419.
46. Wang, Q. Q., Gao, H., Yuan, R., Han, S., Li, X. X., Tang, M., ... & Yang, S. Procyanidin A2, a polyphenolic compound, exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells. *PLoS One*, **2020**, 15.8: e0237017.

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

Hye Bin Kim

Department of Chemistry
The Graduate School
Jeju National University

Abstract

In this study, we investigated anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial constituents from branches of *Prunus mume*. Seven constituents were isolated from the ethyl acetate (EtOAc) fraction of *P. mume* branches; noreugenin (1), naringenin (2), prunin (3), catechin (4), *epi*-catechin (5), procyanidin A2 (6), (+)-*epiafzelechin*-(2 β →*O*→7, 4 β →8)-*epicatechin* (7). The chemical structures of the 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 compound 7. In the anti-inflammatory tests using RAW 264.7 macrophages, the *n*-hexane (Hex), EtOAc fractions and compound 7 inhibited the production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. Moreover, the *n*-Hex fraction exhibited the TNF- α inhibition activity. Also, the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-BuOH fractions showed anti-bacterial activities against *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*.

In addition, the content of prunin (**3**) which were the major isolated compounds were determined to be 30.2 mg/g (3.02%) for the 70% EtOH extract and 78.3 mg/g (7.83%) for the EtOAc fraction by HPLC analysis.

Based on these results, it was suggested that the extract, solvent fractions and isolated compounds from *P. mume* branches could be potentially applicable as natural source for pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.