

백두옹에서 향미생물 활성을 갖는 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic Acid와 3,4-Dihydroxycinnamic Acid의 분리 및 동정

이향희 · 마승진 · 문제학¹ · 박근형*

전남대학교 식품공학과, ¹日本德島大學 食品營養學科

초 록 : 할미꽃(*Pulsatilla koreana* N_{AKAI}) 뿌리인 백두옹의 MeOH 추출물이 세균과 효모 등의 미생물에 대해 향미생물 활성을 나타내자 백두옹에 함유된 향미생물 활성물질의 탐색을 시도하였다. MeOH 추출물을 생물검정법을 지표로 solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography 등으로 정제하고, HPLC에 의해 활성물질을 분리하였다. 분리된 두 활성물질은 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR에 의해 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid와 3,4-dihydroxycinnamic acid로 동정되었다.(1998년 2월 2일 접수, 1998년 2월 27일 수리)

서 론

식품의 보존제는 인공합성품이 주로 이용되고 있으나 그 안전성이 경우에 따라 문제되고 있으며 소비자들의 기피현상 또한 두드러지고 있어 천연 항균성 물질의 개발이 요구되고 있다.

이러한 목적으로 우리나라의 생약재^{1,4)}, 식용식물^{5,7)}로부터 향미생물 활성물질의 개발과 이용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 관심이 날로 더해가고 있는 실정이다⁸⁾.

한편, 할미꽃(*Pulsatilla koreana* N_{AKAI})은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 뿌리는 길고 곧으며 흑갈색을 띠고 4~5월경 암자색의 꽃을 피며 우리나라의 중부평야나 산야에서 자생하고 있다^{9,11)}. 할미꽃은 소염, 진통, 해독, 해열 등의 효능을 가지고 있어 예로부터 약초로서 널리 이용되어져 왔는데^{12,13)}, 신 등¹⁴⁾은 줄기, 잎, 뿌리에서 짜낸 즙액은 항균작용이 있다고 보고한 바 있으며, 정 등¹⁵⁾은 할미꽃 뿌리에서 제초 활성물질을 분리한 바 있다.

할미꽃(*Pulsatilla koreana* N_{AKAI})의 뿌리는 백두옹이라고 하여 옛부터 한약재로 사용되어 왔으며, 이 추출물이 항균 효과가 있음이 보고되어 있으나 항균 활성물질의 규명이 이루어져 있지 않은 상태이어서 백두옹에 포함된 향미생물 활성물질의 탐색을 시도하여 두종의 활성물질을 분리하여 구조 확인하였기에 보고한다.

재료 및 방법

실험 재료와 추출

할미꽃(*Pulsatilla koreana* N_{AKAI})의 뿌리인 백두옹을 한약재료상에서 구입하여 실온에서 건조하여 분쇄한 후 MeOH에 24시간 침지시킨 다음, 과량의 MeOH과 함께 3회 반복

하여 homogenizer(NISSEI BM-2)로 마쇄하면서 추출한 후 G3 glass filter와 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 MeOH 추출물을 얻었다.

사용 미생물과 배지

향미생물 활성 검색을 위해 사용된 미생물은 Gram 양성 세균 7종(*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3100, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus mutans* ATCC 25175), Gram 음성세균 4종(*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Vibrio vulnificus* CDC C7184), 효모 2종(*Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1850)을 사용하였다.

배지는 세균의 경우, 젖산균은 Lactobacilli MRS배지(Difco), *S. mutans*는 BHI배지(Difco), *V. vulnificus*는 LB배지(Difco), 그 밖의 세균은 Nutrient배지(Difco)를 사용하였고, 효모의 경우는 YM배지(Difco)를 사용하였다.

향미생물 활성 측정

세균은 37°C 또는 30°C에서 24시간 동안, 효모는 30°C에서 24시간 동안 3회 반복하여 전배양을 행한 후 접종균주로 사용하였다.

향미생물 활성의 검정은 paper disc (φ 8 mm, Whatman) 방법¹⁶⁾으로 측정하였다. 먼저 pour-plate method¹⁷⁾에 의해 45°C로 조절된 멸균배지 20 ml에 전배양액 0.1 ml를 무균적으로 옮겨 잘 혼합시킨 후 petri dish에 넣고 굳혔다. 여기에 시료의 일정 상당량을 적하하고 용매를 제거한 paper disc를 올린 뒤 0.85% 식염수(65 μl)로 확산시켜 세균은

찾는말 : root of *Pulsatilla koreana*, antimicrobial activity, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid

*연락처자

37°C 또는 30°C에서 16시간, 효모는 30°C에서 16시간 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 크기(mm)로 활성의 정도를 측정하였다.

Solvent fractionation

37°C에서 감압농축하여 MeOH이 제거된 추출물을 마 등¹⁸⁾의 방법에 따라 EtOAc와 buffer용액(0.2 M Na₂HPO₄, 0.2 M NaH₂PO₄, pH 7.5)으로 EtOAc-soluble neutral fraction과 수상(buffer fraction)으로 분획하였다. 수상을 0.1 M HCl을 이용하여 pH 3.0으로 조절한 뒤 다시 EtOAc로 추출하여 EtOAc-soluble acidic fraction과 수용액획분(Aqueous fraction)으로 분획하였다. 또 활성획분을 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, MeOH의 순으로 단계적으로 용매의 극성을 높여서 각 용매의 가용획분별로 분획하였다¹⁹⁾.

Silica gel adsorption column chromatography

Park 등²⁰⁾의 방법에 따라 silica gel (120 g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck사)을 EtOAc로 slurry를 만들어 column (3.0×45 cm)에 충전시킨 다음, EtOAc-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 2, 4, 6%로 단계적으로 증가시킨(단계당 450 ml) step-wise 용출방법으로 분획하였다. 같은 silica gel 54 g을 사용하여 CHCl₃으로 column (2.8×41 cm)에 충전시킨 후, CHCl₃-EtOAc 용매계로 EtOAc 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50%인(단계당 220 ml) step-wise 용출방법으로 분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20 (25~100 mesh, Pharmacia사)을 MeOH-CHCl₃(4:1, v/v) 용매계²¹⁾로 하루밤 팽윤시킨 후, column(4×100 cm; bed volume, 1000 ml)에 충전하고 동 용매계로 용출분획하였다.

HPLC

박 등²²⁾의 방법에 따라 Sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 filter (GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2 μm)로 여과한 후, 30~100% MeOH용매계의 gradient 용출법과 30, 50% MeOH 용매계를 이용한 isocratic 용출법에 의한 HPLC {Delta-PAK C₁₈ column (1.9×30.0 cm, 9 ml/min); μ-Bondapak C₁₈ column (0.39×30.0 cm, 1 ml/min); detector, UV(254 nm)}에 의해 분획하였다.

MS

직접주입장치가 장착된 Jeol JMS-AX 302 WA mass spectrometer를 이용하여 이온화전압(70 eV), ion source temperature 200°C의 조건에서 direct inlet방식으로 분석하였다.

¹H-NMR, ¹³C-NMR

Jeol JNM-L 500(500 MHz) NMR spectroscopy를 사용하여 분석하였고 용매는 CD₃OD를 사용하였으며, 내부기준물

질로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다.

결과 및 고찰

MeOH추출물의 향미생물 활성

백두옹의 0.5 g과 1.0 g에 상당하는 MeOH추출물로 향미생물 활성을 검정하였다. 그 결과 대부분의 세균과 효모에 대해 활성을 보였다. 특히, Gram양성 세균인 *B. subtilis*, *S. aureus*와 Gram음성 세균인 *E. coli*, *P. aeruginosa* 등에 대하여 비교적 강한 생육 억제효과를 보였다.

활성성분의 정제와 분리

백두옹 3 kg에서 얻어진 MeOH 추출물을 용매분획한 후, 각 획분에 대하여 백두옹 1 g 상당 추출물의 향미생물 활성을 검정한 결과(Table 1), EtOAc 가용 산성 및 중성획분에서 활성을 나타냈다. 특히 EtOAc 가용 산성획분은 EtOAc 가용 중성획분보다 광범위한 미생물에 향미생물 활성을 나타냈다.

EtOAc 가용 산성획분(14.145 g/2886 g wt. eq.)을 순차적으로 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, MeOH 가용획분으로 각각 분획하고 *S. aureus*와 *E. coli*를 대상으로 향미생물 활성을 검정한 결과(Table 2), 두 균주 모두 EtOAc 가용획분(12.683 g/2883 g wt. eq.)에 활성을 나타냈으며 특히, *E. coli*에 비해 *S. aureus*에 강한 활성을 보여 이후 정제과정에서의 검정은 *S. aureus*를 지표로 하였다.

활성획분을 EtOAc-MeOH용매계의 silica gel chromatography로 분획하고 향미생물 활성을 검정한 결과, EtOAc-MeOH의 100:0~98:2 (v/v) 용출획분(5.77 g/2862 g wt. eq.)에 활성을 나타냈다. 이어서 CHCl₃-EtOAc용매계의 silica gel adsorption column chromatography로 용출, 분획하여 향미생물 활성을 검정한 결과, CHCl₃-EtOAc의 70:30~60:40 (v/v) 용출획분(1.302 g/2850 g wt. eq.)에 활성을 나타냈다.

이 활성획분(1.302 g)을 MeOH-CHCl₃ (4:1, v/v)용매계의 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분획하고 향미생물 활성을 검정하였다. 그 결과, bed volume에 대한 elution volume의 비(V_e/V_t)가 0.75~0.90 (활성획분 I, 460 mg/2825 g wt. eq.), 0.94~1.00 (활성획분 II, 272 mg/2825 g wt. eq.), 1.06~1.12 (활성획분 III, 434 mg/2825 g wt. eq.)에서 활성을 보여 분자 size가 서로 다른 적어도 3 종이상의 활성물질의 존재가 시사되었다.

활성획분 II는 30~100% MeOH용매계의 gradient용출에 의한 HPLC로 retention time (t_R) 24.4~25.4분의 활성획분(146 mg)을 얻은 다음, isocratic용출에 의한 HPLC (50% MeOH)에 의해 t_R 12.9분에서 peak를 보이는 활성물질을 백색 결정상으로 17 mg 단리하였다.

활성획분 III 역시 동 용매계의 gradient용출에 의한 HPLC로 t_R 21.0~22.5분의 활성획분(9.8 mg)을 얻은 다음, 30% MeOH용매계의 HPLC에 의해 t_R 7.0분에서 peak를 보이는 활성물질을 백색 결정상으로 5 mg 단리하였다.

Table 1. Antimicrobial activities of the solvent fractions from root of *Pulsatilla koreana* against various microorganisms

Microorganisms	Clear zone (mm)			B.A. ²⁾
	Aqueous fr. ¹⁾	EtOAc soluble		
		acidic fr.	neutral fr.	
Gram positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	- ³⁾	14	11	14
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	-	10	9	9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	-	9	-	9
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-	13	-	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	13	13	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	14	15	14
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-	-	-	13
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	-	12	-	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	13	-	14
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	-	12	-	13
<i>Vibrio vulnificus</i> CDC C7184	-	11	11	10
Yeasts				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	11	-	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1850	-	10	-	10

¹⁾Extract of 1.0 g wt. eq./disc.

²⁾0.5 mg benzoic acid/disc.

³⁾No growth inhibition.

Table 2. Antimicrobial activities of the solvent-soluble fractions from root of *Pulsatilla koreana*

Microorganisms	Clear zone (mm)				
	<i>n</i> -Hexane fr. ¹⁾	CHCl ₃ fr.	EtOAc fr.	MeOH fr.	B.A. ²⁾
<i>Staphylococcus aureus</i>	- ³⁾	-	15	-	14
<i>Escherichia coli</i>	-	-	12	-	13

¹⁾Extract of 1.0 g wt. eq./disc.

²⁾0.5 mg benzoic acid/disc.

³⁾No growth inhibition.

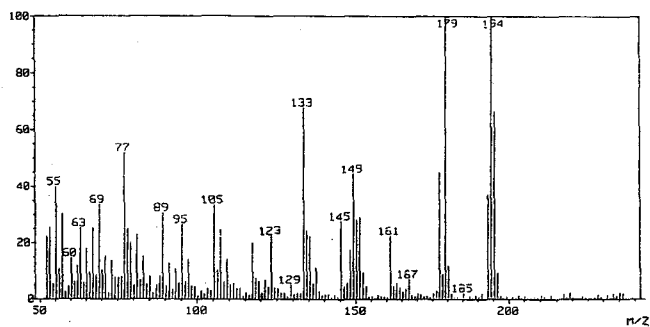


Fig. 1. Direct-EI-mass spectrum of the Act II from root of *Pulsatilla koreana*.

활성물질 II의 구조확인

활성물질 II를 직접도입방식의 EI mass분석을 한 결과 Fig. 1과 같이 molecular ion(M⁺)이 m/z 194 (base peak)에 나타났으며, 특징적인 fragment ion이 m/z 179, 149, 133에 나타났었다. 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시한 결과, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid의 가능성(NIST entry No. 21168)이 시사되었다.

또한, CD₃OD를 용매로 사용하여 ¹H-NMR을 실시한 결과, δ 7.53(1H, d, J=15.6 Hz, H-1'), 7.15(1H, d, J=1.9 Hz,

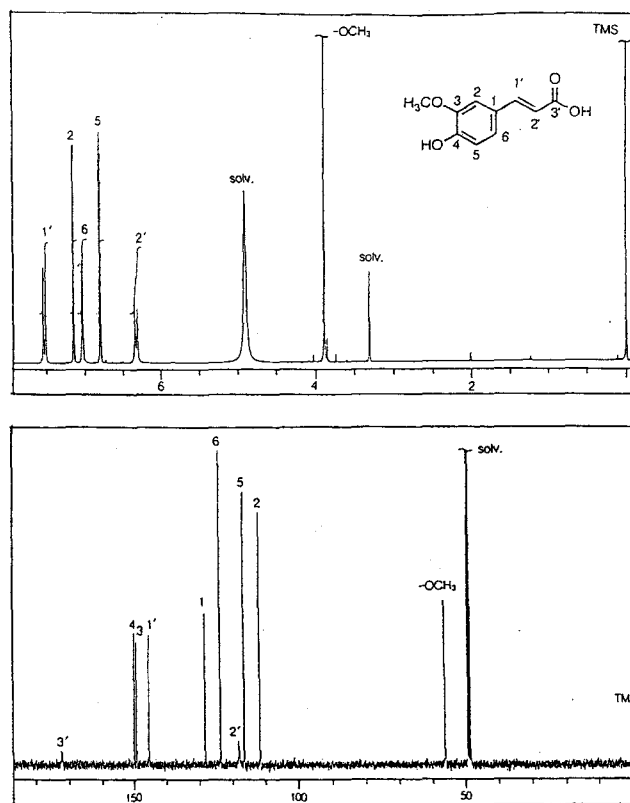


Fig. 2. ¹H, ¹³C-NMR spectra of the Act II from root of *Pulsatilla koreana*.

H-2), 7.04(1H, dd, J=8.2, 1.9 Hz, H-6), 6.80(1H, d, J=8.2 Hz, H-5), 6.33(1H, d, J=15.6 Hz, H-2'), 3.89(3H, s, -OCH₃)에 proton signal이 관찰되어(Fig. 2), 3개의 benzene ring proton (δ 7.15, 7.04, 6.80)과 2개의 olefinic proton(δ 7.53, 6.33)이 인정되었으며 두 개의 olefinic signal의 coupling constant가

15.6 Hz인 사실에서 trans형임을 확인하였다.

한편 ¹³C-NMR을 실시한 결과, δ 172.3(C-3'), 150.1(C-4), 149.3(C-3), 145.5(C-1'), 128.3(C-1), 123.7(C-6), 118.1(C-2'), 116.5(C-5), 111.7(C-2), 56.5 (-OCH₃)에서 각각 carbon signal이 확인되었으며(Fig. 2), 그리고 이들 spectra는 Aldrich library NMR spectra²³⁾의 trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid(2, 1058 A)와 일치하였다.

이상의 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR의 분석에서 백두옹으로부터 향미생물 활성물질로 분리된 활성물질 II는 trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid로 동정되었다.

활성물질 III의 구조확인

활성물질 III를 직접도입방식의 EI mass분석을 한 결과 Fig. 3와 같이 molecular ion(M⁺)이 m/z 180(base peak)에 나타났으며, 특징적인 fragment ion이 m/z 163, 134, 89에 나타났다. 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시한 결과, 3,4-dihydroxycinnamic acid의 가능성(NIST entry No. 14563)이 시사되었다.

또한, CD₃OD를 용매로 사용하여 ¹H-NMR을 실시한 결과, δ 7.39(1H, d, J=15.9 Hz, H-1'), 7.01(1H, d, J=1.8 Hz, H-2), 6.88(1H, dd, J=2.2, 8.1 Hz, H-6), 6.75(1H, d, J=8.3 Hz, H-5), 6.25(1H, d, J=15.9 Hz, H-2')에 proton signal이 관찰되어(Fig. 4), 3개의 benzene ring proton(δ 7.01, 6.88, 6.75)과 2개의 olefinic proton(δ 7.39, 6.25)이 인정되었다. 또한, 활성획분 II와 마찬가지로 olefinic signal의 coupling constant가 15.9 Hz인 사실에서 trans형임을 확인하였다.

한편, ¹³C-NMR을 실시한 결과, δ 173.87(C-3'), 148.65(C-4), 146.70(C-3), 144.06(C-1'), 128.74(C-1), 122.24(C-6), 119.74(C-2'), 116.47(C-5), 114.88(C-2)에서 각각 carbon signal이 확인되었으며(Fig. 4), 이들 spectra는 Aldrich library NMR spectra²³⁾의 trans-3,4-dihydroxy cinnamic acid(2, 1058 B)와 일치하였다.

이상의 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR의 분석에서 백두옹으로부터 향미생물 활성물질로 분리된 활성물질 III는 trans-3,4-dihydroxycinnamic acid로 동정되었다.

4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid는 밀과 보리의 세포벽

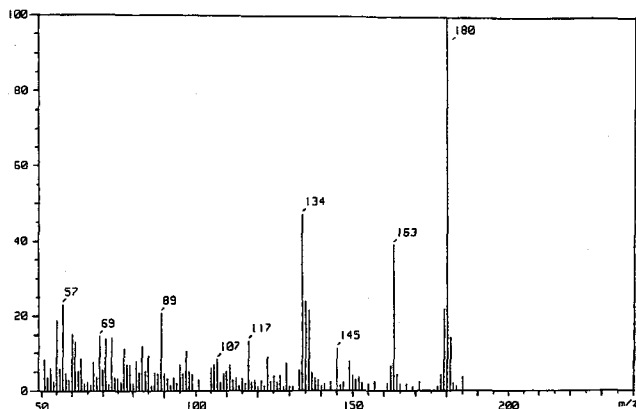


Fig. 3. Direct-EI-mass spectrum the of Act III from root of *Pulsatilla koreana*.

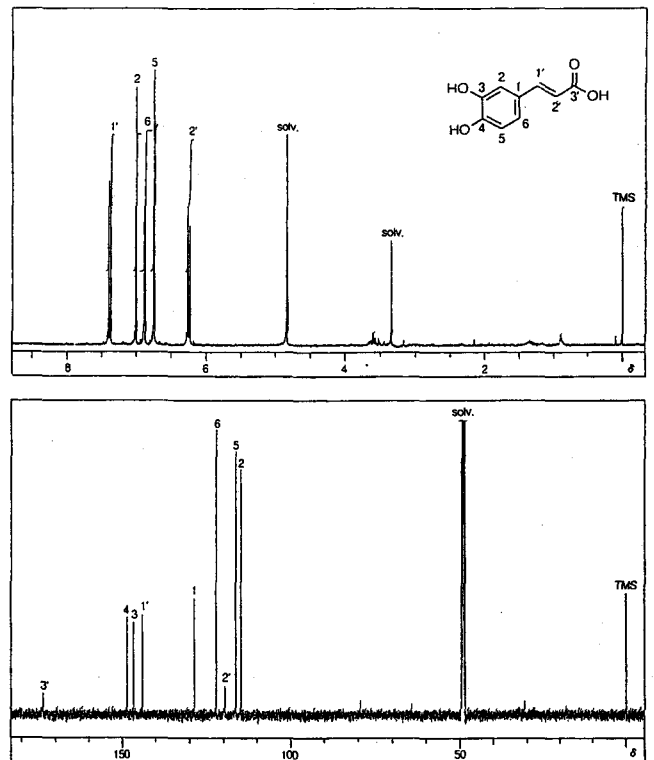


Fig. 4. ¹H, ¹³C-NMR spectra of the Act III from root of *Pulsatilla koreana*.

Table 3. Antimicrobial activities of isolated 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid from root of *Pulsatilla koreana*

Microorganisms	Clear zone (mm)
	1.0 mg ¹⁾
Gram positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	9
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	10
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	9
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	11
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	2)
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	10
<i>Vibrio vulnificus</i> CDC C7184	9
Yeasts	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1850	10

¹⁾mg 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid/disc.

²⁾No growth inhibition..

에 존재하는 물질로 보고된 바 있으며²⁴⁾ 이 물질은 넓은 항균 spectra를 나타냈다(Table 3). 3,4-dihydroxycinnamic acid는 마 등²⁵⁾에 의해 두릅에 함유된 항균 활성물질로 분리된 바 있다. 이 두 물질이 백두옹에서 향미생물 활성물질로 분리, 동정된 것은 본 연구가 처음이라 생각되며, 이 두 활성물질 외에 백두옹에 함유된 항균 활성물질에 대한 추후 연구가 수행되어 백두옹이 갖는 항균성에 대한 전모가 밝혀

지길 기대한다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 농업생명과학연구원과 한국과학기술원 우수연구센터의 지원에 의한 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. You, Y. S., K. M. Park and Y. B. Kim (1993) Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 187-191.
2. Park, S. W. and C. J. Kim (1979) Studies on the food preservation by antimicrobial action of medicinal herbs. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **22**, 91-95.
3. Lee, I. R., S. W. Wee and Y. N. Han (1989) Studies on the pharmacological actions and biologically active components of Korean traditional medicine (VI). Tannins from *Duchesnea indica*. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**, 110-116.
4. Paik, S. B., S. H. Kyung, E. S. Doh, Y. S. Oh and B. K. Park (1994) Screening and identification of fungicidal compounds derived from medicinal plants against cucumber powdery mildew. *Korean J. Environ. Agric.* **13**, 301-310.
5. Cho, S. W., I. W. Seo, J. D. Choi and I. S. Joo (1990) Inhibitory effects of grapefruit seed extract (DF-100) on growth and toxin production of *Penicillium islandicum*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **33**, 169-173.
6. Kim, S. J. and K. H. Park (1995) Antimicrobial activities of the extracts of vegetable *Kimchi* stuff. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 216-220.
7. Sakanaka, S., M. Kim, M. Taniguchi and T. Yamamoto (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2307-2311.
8. Sin, D. H. (1990) Present condition about studies on antimicrobial substances and its utilization. *Food Science and Industry* **23**, 68-77.
9. Kim, I. H. (1981) Medical botany, p. 163, Jinmyung Press, Seoul, Korea.
10. Kim, Y. S., J. B. Song, J. H. Sung, B. H. Lee, Y. P. Hong, I. S. Han, W. H. Jung and S. S. Jang (1989) Wild plants in Korea, p. 286, Nongjinhoe, Seoul, Korea.
11. Lee, T. B. (1982) Illustrated flora of Korea, p. 346, Hyangmunsa, Seoul, Korea.
12. Kwon, H. S. (1993) Studies on the pharmaco-constituents of ether fraction of *Pulsatilla Radix*, *M. S. Thesis*, Joongang Univ., Korea.
13. Baek, Y. H. (1995) Anti-tumor effects of extracts of *Pulsatilla koreana* (SB-31) *in vitro*, *Ph. D. Thesis*, Choongnam National Univ., Korea.
14. Sin, M. K. and B. S. Jung (1990) Herb medicine encyclopedia, p. 495, Younglymsa, Seoul, Korea.
15. Jeong, H. J., K. W. Kim and H. D. Kim (1996) Isolation of herbicidal compounds from *Pulsatilla koreana* roots. *Korean J. Plant. Res.* **9**, 47-54.
16. Zaika, L. L. (1988) Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safty* **9**, 97-118.
17. Harrigan, W. F. and E. M. Margaret (1976) Laboratory methods in food and dairy microbiology, p.25, Academic Press, U.S.A.
18. Ma, S. J., B. S. Ko and K. H. Park (1995) Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia elata*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 807-812.
19. Kuk, J. H., S. J. Ma and K. H. Park (1997) Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 204-210.
20. Park, K. H., J. D. Park, K. H. Hyun, M. Nakayama and T. Yokota (1994) Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid-like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescens* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 2241-2243.
21. K. H. Park, S. J. Kim and K. H. Hyun (1993) Brassinosteroid substances in immature *Cassia tora* seeds. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **36**, 99-104.
22. Park, K. H., S. J. Kim and K. H. Hyun (1993) Brassinosteroid substances in immature *Zea mays* seeds. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**, 300-305.
23. Pouchert, C. J. and J. Behnke (1993) The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, p. 1058, Aldrich Chemical Company, U.S.A.
24. Budavari, S., M.J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman and J. F. Kinneary (1996) The Merck Index. 12th, p. 688, Merck & Co., U.S.A.
25. Ma, S. J., J. K. Kuk, B. S. Ko and K. H. Park (1996) Isolation of 3,4-dihydroxycinnamic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia elata*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 600-603.

Isolation and Characterization of 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic Acid and 3,4-Dihydroxycinnamic Acid with Antimicrobial Activity from Root of *Pulsatilla koreana*

Hyang-Hee Lee, Seung-Jin Ma, Jae-Hak Moon¹ and Keun-Hyung Park* (Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea; ¹Department of Nutrition, University of Tokushima, Tokushima 770-0042, Japan)

Abstract : The MeOH extract from root of *Pulsatilla koreana* was showed antimicrobial activities against bacteria and yeast. The antimicrobial active substances of MeOH extract were successfully purified with solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. The purified two active substances were isolated by HPLC and identified as 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid and 3,4-dihydroxycinnamic acid by MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

Key words : root of *Pulsatilla koreana*, antimicrobial activity, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid

*Corresponding author