

한국산 율나무로부터 추출 · 분리한 생리활성 물질들의 항산화 효과 및 세포독성

최원식 · 김동길 · 이영행¹ · 김장익² · 이성은^{2,*}

순천향대학교 유전공학과, ¹원광대학교 화학과, ²경북대학교 농화학과

(2002년 4월 23일 접수, 2002년 8월 16일 수리)

한국산 율나무의 메탄올추출물과 유기용매 분획의 항산화 효과를 조사하였다. 항산화 효과는 수소공여 억제능, 과산화지질 형성 억제능, xanthine oxidase 저해 활성과 아질산염 소거능으로 측정된 결과, ethyl acetate 분획이 가장 뛰어난 효과를 나타내었다. 이 분획의 생리활성 물질을 분리하기 위하여, rotatory locular counter current chromatography(RLCCC), Sephadex LH-20 column chromatography와 HPLC 등의 방법을 사용하여, 1,2,3-trihydroxybenzene, methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate와 3,4,5-trihydroxybenzoic acid를 분리하였다. 이중 methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate는 butylated hydroxyanisole(BHA)이나 butylated hydroxytoluene(BHT)보다도 강한 항산화 효과를 나타내었다. 그러나 세포독성 실험에서는 이들 물질들이 암세포주에 대하여 활성이 높지 않았다. 이상의 결과로 methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate는 뛰어난 항산화 효과를 지닌 식품첨가물로서의 이용 가능성을 제시할 수 있다.

Key words: 율나무, methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate, 항산화, 세포독성

서 론

활성산소 종(reactive oxygen species, ROS)은 산소에서 유래된 것들로서 안정한 분자 상태인 triplet oxygen(³O₂)이 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리, 화학 및 환경적 요인 등에 의하여 생성되며^{1,4)}, hydroxyl radical(OH·), nitricoxide radical(NO·), superoxide anion radical(O₂⁻·), peroxy radical(HO₂·)과 같은 자유 라디칼들과 라디칼의 형태가 아닌 과산화 수소(H₂O₂), hypochlorous acid(HOCl), singlet oxygen(¹O₂)과 오존(O₃) 등이 있다^{5,6)}.

이러한 활성산소는 정상적인 대사 과정, 광화학 반응, 약물 대사 과정이나 기타 세포 대사의 이상을 초래하는 여러 요인에 의해 그 생성이 증가하며 따라서 생체는 이들에 의하여 일어나는 자유 라디칼 반응의 유해 효과에 항상 노출되어 있다. 또한 이 활성산소는 반응성이 매우 강하여 이들에 의하여 야기되는 자유 라디칼 반응은 세포구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 비선택적, 비가역반응에 의해 파괴함으로써^{7,9)}, 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹²⁾. 그리고 이들 활성산소에 의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러 가지 체내 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기하며¹³⁾, 활성 산소종이 정상적으로 소거되지 않았을 때 잔존하는 자유 라디칼에 의해 산화적 스트레스를 받게 됨으로써 다른 질병의 원인이 되기도 한다¹⁴⁻¹⁶⁾.

또한, 인간의 노화와 치매에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 식품에서도 부패와 독성물질 생성 등으로 유해한 작용을 하는 것으로 알려졌다¹⁷⁾.

따라서 본 연구에서는 예로부터 폐결핵, 구충, 복통, 통경, 변비, 어혈과 여인경맥 불통에 효과가 있는 것으로 알려져 약용 및 식용으로 사용되고 있는 율나무 박피를 메탄올로 추출하여 분획하고 생리활성이 우수한 분획층에서 분리, 정제한 물질의 생리활성을 검색하고자 한다.

재료 및 방법

재료. 본 연구에 사용한 율나무(*Rhus verniciflua* S.)는 서울 경동시장에서 구입하여 정확히 감정한 것을 껍질만을 분리하여 음지에서 건조시킨 후 세절하여 사용하였다.

생리활성물질 분리 및 정제. 음지에서 건조한 율나무 껍질 1 kg을 세절하여 율나무 부피의 두 배 정도의 메탄올을 넣은 후 진탕기로 진탕시키면서 3일 동안 메탄올로 추출을 하였다. 3일 후 여과를 하여 여액을 30°C 이하의 온도에서 감압 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이 물질을 극성에 의해 용매 분획하고 간단한 생리활성을 통해 가장 활성이 우수하였던 에틸 아세테이트 분획을 연속용매 추출 장치(rotatory locular counter current chromatography, RLCCC)와 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 화합물 1, 2 및 3을 얻었다(Fig. 1).

생리활성 검증.

수소공여능 측정(DPPH assay): 수소공여능 측정은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)를 사용하여 Yoshida 등의 방법¹⁸⁾을 변형하여 측정하였다. 메탄올을 이용하여 분리물질 용액을 농도별로 조제한 후 희석한 용액 4 ml와 메탄올로서 1.5

*연락처

Phone: 82-53-950-7751; Fax: 82-53-953-7233

E-mail: selpest@hanmail.net

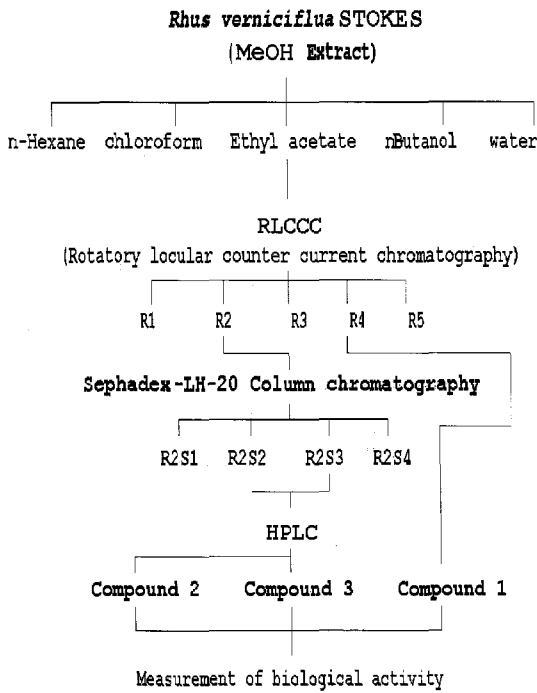


Fig. 1. Scheme of isolation of compounds from Korean *Rhus verniciflua* STOKES.

$\times 10^{-4}$ M의 농도가 되도록 한 DPPH 용액 1 ml씩을 가지고 진탕기를 이용하여 균일하게 혼합한 다음 실온에서 20분간 방치시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(LKB Novaspec II, Sweden)를 이용하여 520 nm에서의 흡광도치를 측정하였다. 농도는 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 메탄올에 용해한 후 사용하였다. 대조군으로는 시료 대신에 메탄올을 사용하여 측정하였다. 항산화 효과는 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(SC_{50})로 표시하였다. 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였다.

과산화지질 형성 억제능 측정: 과산화지질 형성 억제능 측정은 linoleic acid를 자동산화 모델로 하여 측정하였다. 시험액 조제는 20 ml 유리병에 linoleic acid 용액(linoleic acid 2.5 mg을 에탄올 1 ml에 용해) 0.57 ml와 1 M phosphate buffer(pH 7.0) 2.25 ml를 넣고, 에탄올에 각각 10 mg/ml 농도로 희석한 분리물질을 30 μl 씩 첨가하였다. 이 시험액을 38-40°C의 차광시킨 배양기에서 자동산화를 진행시키면서 매일 ferric thiocyanate 방법¹⁹⁾을 이용하여 생성되는 과산화물의 양을 측정하였으며, 대조군으로는 반응액의 분리물질 대신에 에탄올을 첨가하였다. 시험관에 배양된 시험액 50 μl 와 75% 에탄올 4.85 ml를 넣고 잘 섞은 후, 30% ammonium thiocyanate 50 μl 를 가한 후 3분 동안 반응시키고, 3.5% 염산용액에 녹인 20 mM ferrous chloride 50 μl 를 반응액에 가하여 나타나는 붉은색을 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Xanthine oxidase 저해 활성 및 저해 형태 측정: Xanthine oxidase 저해 활성 측정은 Beyer와 Fridovich의 방법²⁰⁾을 변형하여 측정하였다. 1 ml cuvette에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 750 μl 를 넣고, xanthine 용액(1.74 mg/10 ml) 150 μl 를 가

한 후 혼합하고, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 다양한 농도로 용해된 분리물질 용액들을 100 μl 를 가하여 혼합한 후, 여기에 xanthine oxidase[50 unit xanthine oxidase 100 μl 를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.9 ml에 용해] 10 μl 가하고 혼합한 후 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 295 nm에서 3분간 흡광도의 변화량을 측정하였다. 대조군으로는 분리물질 용액 대신에 완충액을 첨가하여 사용하였다.

기질인 xanthine의 농도를 변화시키면서 두 농도의 에틸 아세테이트 분획을 첨가하여 위의 방법으로 활성을 측정하여 저해형태를 결정하였다.

아질산염 소거능 측정: 아질산염 소거능 측정은 Kato와 Lee 등의 방법²¹⁾을 변형시켜서 측정하였다. 1 mM NaNO_2 용액 2 ml에 분리물질 (1,000, 500, 250 및 125 $\mu\text{g/ml}$ 증류수) 용액을 1 ml씩 가하고, 0.1 N 염산과 0.2 M 구연산 완충액을 사용하여 pH를 1.2, 3.0 및 6.0으로 조절한 후 반응 용액의 최종부피를 10 ml로 맞춘다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 반응액을 1.0 ml씩 취하여 2% 초산용액 5.0 ml에 넣은 후 Griess 시약 (30% 초산으로 각각 제조한 1% sulfonilic acid와 1% naphthyl amine을 1:1 비율로 혼합한 것으로 사용직전에 제조하여 사용) 0.4 ml를 가하고 실온에 15분간 반응시키고, UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 520 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

대조군으로는 분리물질 대신에 증류수를 첨가하여 동일한 방법으로 실험하였으며, 아질산염 분해작용은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율로 나타내었다.

세포독성 검사: 세포독성 검사는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 분석 방법²²⁾으로 측정하였다. 즉, 암세포주(A549: Human lung carcinoma cell, Colo205: human colon cancer cell, K562: human leukemic cell, SK-OV-3: human ovarian cancer cell)를 96 wells plate에서 그 농도가 104 cells/well이 되도록 희석시킨 후 24시간 동안 배양시킨다. DMSO에 용해시켜 정밀 여과를 실시하여 멸균한 분리물질의 농도가 well 당 200 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 한 후 단계적으로 희석하였다. 각 농도별 시료에 노출된 암세포주를 A549, K562와 SK-OV-3는 48시간, Colo205는 72시간 동안 배양하였다.

세포 생존율 측정은 MTT 분석 방법과 crystal violet 염색법을 사용하였다. MTT 분석 방법은 MTT를 각 well에 넣은 후 4시간동안 배양을 하고 그 과정에서 생성되는 formazane을 DMSO를 이용하여 용해시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. Crystal violet 염색법은 생존하는 세포를 0.05% crystal violet으로 염색한 후 증류수로 세척하고 건조한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. IC_{50} 값은(50% 억제 농도) linear regression 방법을 이용하여 계산하였다.

결 과

수소공여능 (DPPH assay). 옻나무에서 분리한 물질인 1,2,3-trihydroxybenzene, methyl 3,4,5-trihydroxy benzoate와

Table 1. Electron donating abilities of the isolated compounds from Korean *Rhus verniciflua* STOKES

Compound	SC ₅₀ (µg/ml)
Compound 1	0.54
Compound 2	0.44
Compound 3	0.69
Quercetin	1.05
BHA	5.06
BHT	7.05

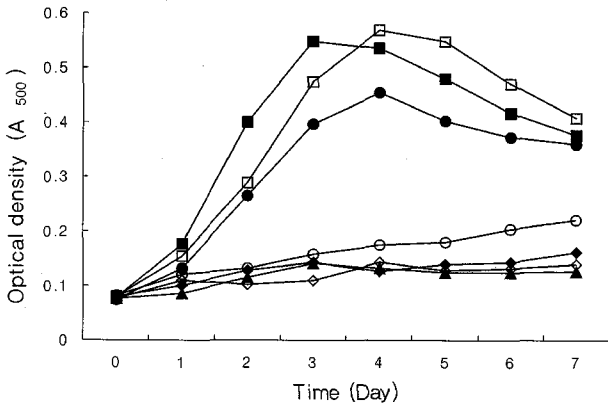


Fig. 2. Antioxidative activities of the compound isolated from *Rhus verniciflua* STOKES on the autooxidation of linoleic acid by ferric thiocyanate method (■: Control; ▲: BHT; ◇: BHA; ○: EA fraction; □: Compound 1; ◆: Compound 2; ●: Compound 3).

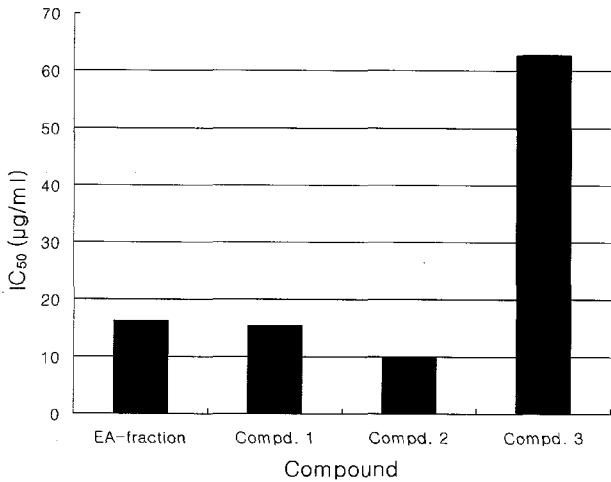


Fig. 3. Inhibitory effects of several compounds isolated from *Rhus verniciflua* STOKES extract in xanthine oxidase.

3,4,5-trihydroxybenzoic acid들은 이미 그 구조가 잘 알려진 물질들이다. 이들의 수소공여능에 대한 결과는 Table 1과 같다. SC₅₀ 값은 화합물 1(1,2,3-trihydroxy-bezene)이 0.54 µg/ml, 화합물 2(methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate)가 0.44 µg/ml이고 화합물 3(3,4,5-trihydroxybenzoic acid)이 0.69 µg/ml로 대조군으로 사용된 합성 항산화제인 BHA(5.06 µg/ml)와 BHT(7.05 µg/ml)보다 월등히 우수한 결과를 나타내었고, 천연 항산화제인 quercetin (1.05 µg/ml) 보다도 더 좋은 활성을 갖는 것이 확인되었다.

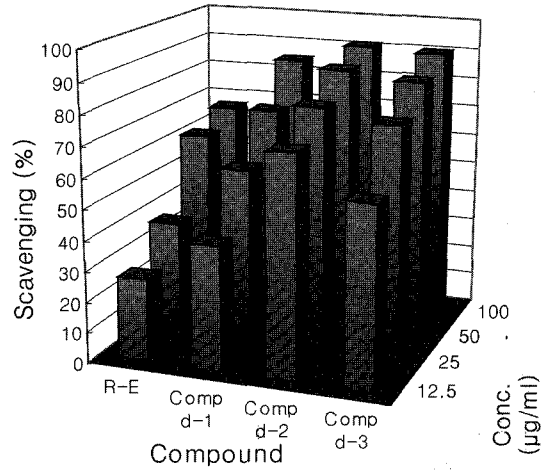


Fig. 4. Nitrite scavenging effect of compounds isolated from *Rhus verniciflua* STOKES at pH 1.2 (1: ethyl acetate fraction; 2: compound 1; 3: compound 3; 4: compound 3).

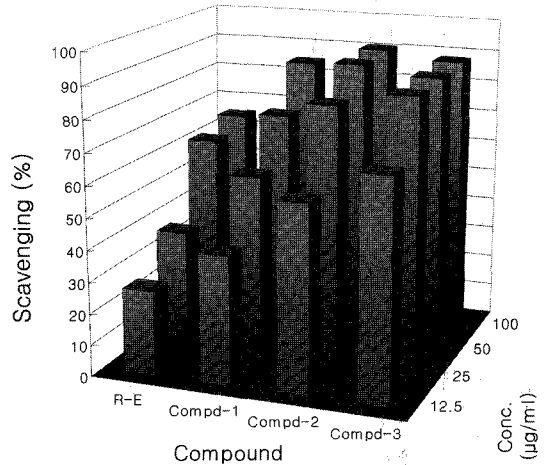


Fig. 5. Nitrite scavenging effect of isolated compounds from *Rhus verniciflua* STOKES at pH 3.0 (1: ethyl acetate fraction; 2: compound 1; 3: compound 3; 4: compound 3).

분리물질의 과산화지질 형성 억제능. 과산화지질 형성 억제능 측정의 결과는 Fig. 2에 나타내었으며 화합물 1과 화합물 3은 시료를 넣지 않은 대조군과 비교하여 낮은 억제 효과를 나타내었지만, 화합물 2는 합성 항산화제인 BHA나 BHT와 비교하여 우수한 효과를 확인하였다.

분리물질의 xanthine oxidase 저해활성 및 저해 형태. Xanthine oxidase 저해 활성은 Fig. 3에 나타내었다. IC₅₀ 값이 화합물 1이 15.9 µg/ml, 화합물 2가 9.96 µg/ml이었고 화합물 3이 62.71 µg/ml이었으며, 이 결과는 에틸 아세테이트 분획 (16.35 µg/ml)과 비교하여 화합물 1과 화합물 2는 활성이 우수하였지만 화합물 3은 활성이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다.

분리물질의 아질산염 소거능 측정. 아질산염의 nitrosamine 화 반응이 인체와 유사한 pH에서 최적조건을 가지므로 pH 1.2, 3.0 및 6.0에서 분리물질을 농도를 조절하여 첨가하였을 때 아질산염의 분해작용을 측정한 결과 Fig. 4-6에 나타내었다.

실험 결과 100 µg/ml 농도의 분리 화합물은 pH 1.2에서 모

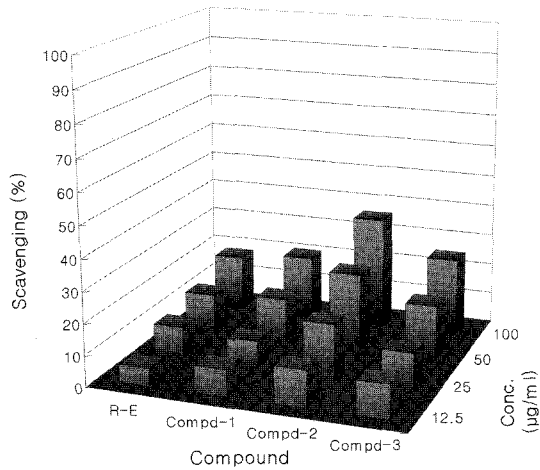


Fig. 6. Nitrite scavenging effect of isolated compounds from *Rhus verniciflua* STOKES at pH 6.0 (1: ethyl acetate fraction; 2: compound 1; 3: compound 3; 4: compound 3).

Table 2. Inhibitory activities of methanol extract (MeOH ext.) and the isolated compounds from *Rhus verniciflua* STOKES in tumor cells

Compound	A549	Colo205	K562	SK-OV-3
MeOH ext.	13.7	N.D.	74.4	60.4
Compound 1	11.5	37.7	14.9	13.2
Compound 2	9.4	28.9	37.1	12.1
Compound 3	31.5	38.9	N.D.	29.6
Doxorubicin	0.77	0.85	0.88	0.89

두 80% 이상의 소거 활성을 나타내었으며, pH 3.0에서도 높은 활성을 나타냄을 확인 하였다. 반면에 pH 6.0에서는 40% 미만의 낮은 활성을 나타내었으며 이 점으로 보아 화합물 1, 2 및 3은 pH 낮을수록 아질산염의 분해능은 높게 나타남을 확인 하였다.

분리물질의 세포독성 검사. 분리된 물질의 세포독성실험 결과는 Table 2와 같았으며 화합물 1과 화합물 2에서 그 활성이 다소 발견됨을 확인하였다. 화합물 1의 경우 human lung carcinoma cell(A549), human leukemic cancer cell(K562)과 human ovarian cancer cell(SK-OV-3)에서 그 효과가 나타났으며, 화합물 2의 경우는 human lung carcinoma cell(A549)과 human ovarian cancer cell(SK-OV-3)에서 그 효과가 나타남을 확인하였으나 화합물 3의 경우는 그 효과가 미비함을 확인하였다.

고 찰

본 실험에서는 옻나무를 메탄올 추출하여 추출물을 극성에 따른 용매 분획을 실시하여 분리된 분획의 생리활성검증을 한 후 그 결과 생리활성이 우수하였던 에틸 아세테이트 분획에서 생리활성 물질을 분리하기 위해 RLCCC와 LH-20 column chromatography와 HPLC를 병행하여 RLCCC만으로 단일 물질을 분리하여 화합물 1을 얻었다. 또한 LH-20 column chromatography를 이용하여 화합물 2와 3을 분리하였다. 이렇

게 분리된 물질들은 NMR, IR, UV 및 GC-MS를 이용하여 그 구조를 확인한 결과 화합물 1, 화합물 2와 화합물 3을 확인하였으며 분리한 화합물의 생리활성을 측정하였다.

생리활성 측정 결과 수소공여능 활성은 화합물 1, 2와 3 모두 합성 항산화제인 BHA와 BHT보다 월등히 높은 활성을 나타내었고 과산화지질 형성 억제능 측정 결과는 화합물 1과 3은 거의 활성이 없었지만 화합물 2는 합성 항산화제인 BHA와 BHT 등과 유사한 활성을 갖는 것을 확인하였으며, 이 결과는 옻나무 중에 수소공여능을 나타내는 물질이 많이 포함되어 있으므로 지질과산화 반응으로 생성된 활성 라디칼에 전자를 공여하여 옻나무가 첨가된 식품 중에서 지질산화를 억제시킬 수 있으며 인체에서도 활성 라디칼에 의한 과산화 지질생성을 억제시키는 작용을 할 것으로 기대하였다.

Xanthine oxidase 억제 활성 실험결과 화합물 1과 화합물 2는 활성이 매우 우수하였지만 화합물 3은 활성이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다. 이 결과는 탄닌류 및 페놀성 물질들이 xanthine oxidase의 저해한다는 것이 Iio 등²³⁾, 정 등²⁴⁾, Hatano 등이²⁵⁾ 보고한 내용과 일치함을 확인 할 수 있었으며, 통풍치료에 옻나무의 사용 가능성을 제시하였다.

아질산염 소거활성 결과는 화합물 1, 2 및 3 모두 pH 1.2~3.0에서 우수한 소거 활성을 갖는 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 아질산염이 Clostridium botulinum의 생육과 독소의 생성을 억제하고 육질의 발색을 양호하게 하는 등 식품가공이나 저장에 널리 이용되지만 일정 농도 이상 섭취 시에 각종 중독을 일으키고 발암성 물질인 nitrosamine의 전구물질임을 고려할 때 이 아질산염의 분해작용은 필요하며 옻나무는 이의 분해에 유용한 자원으로 생체 내에서도 충분한 해독작용이 있을 것으로 기대하였다.

세포독성 실험 결과는 화합물 1과 2의 경우 human lung carcinoma cell(A549), human leukemic cancer cell(K562)과 human ovarian cancer cell(SK-OV-3) 등에서 그 효과가 있음을 확인할 수 있었지만 항암제로서의 가능성을 제시할 만한 수치는 되지 못했다.

참고문헌

1. Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**(4359), 875-880.
2. Bodaness, R. S. and Chan, P. C. (1977) Singlet oxygen as a mediator in the hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP+ in deuterium oxide. *J. Biol. Chem.* **252**(23), 8554-8560.
3. Trush, M. A., Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E. (1982) Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **31**(21), 3335-3346.
4. Aust, S. D., Morehouse, L. A. and Thomas, C. E. (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free radicals Biol. Med.* **1**(1), 3-25.
5. Aruoma, O. I. (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 671-683.
6. Davies, K. J. A. and Goldberg, A. L. (1987) Proteins damaged

- by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.* **262**(17), 8227-8234.
7. Morita, J., N. Kashimura and T. Komano. (1980) The mechanism of interaction of bacteriophage ψ X174 by autooxidizable synthetic polysaccharides. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2971-2978.
 8. Morita, J., N. Kashimura and T. Komano. (1982) Interactive of *Escherichia coli* phages by sugar phosphate. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 279-280.
 9. Adelman, R., Saul, R. L. and Ames, B. N. (1988) Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2706-2708.
 10. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990) In *Methods Enzymol.* **186**; *Oxygen radicals in biological systems. Part B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview.* Academic Press, London. pp. 1-85.
 11. Davies, K. J. A. (1995) In *Environment, Drugs and Food Additives*, Portland Press, Portland. pp. 1-31.
 12. Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**(4617), 1256-1264.
 13. Miquel, J., Quintanilha, A. T. and Weber, H. (1989) In *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine* CRC Press, I: 223.
 14. Pryor, W. A. (1980) In *Free radicals in biology Vol. VI.* Academic Press, New York. pp. 49-90.
 15. Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* **16**, 33-50.
 16. Halliwell, B. and Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**(1-2), 9-19.
 17. Harman, D. (1982) In *Free radicals in Biology V.* Academic Press, New York. pp. 255-275.
 18. Yosida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989) Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(7), 1919-1921.
 19. Haraguch, H., Ishikawa, H., Sanchez, Y., Ogura, T., Kubo, Y. and Kubo, I. (1997) Antioxidant constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 865-871.
 20. Beyer, W. F and Fridovich, I. (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* **161**(2), 559-566.
 21. Kato, H., Lee, I. E., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, E. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1333-1338.
 22. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemark, R. H. and Boyd, M. R. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-601
 23. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N. and Fukumoto, M. (1985) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2173-2176.
 24. Cho, Y. J., An, B. J. and Choi, C. (1993) Isolation and enzyme inhibition of tannins from Korean Green Tea. **26**(3), 84-87.
 25. Hatano, T., Yauhara, T., Fukuda, T., Noro, T. and Okuda, T. (1990) Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1224-1229.

Antioxidative and Cytotoxicity Activities of Compounds Isolated from Korean *Rhus verniciflua* S.

Won-Sik Choi, Dong-Kil Kim, Young-Haeng Lee¹, Jang-Eok Kim² and Sung-Eun Lee^{2,*} (Dept. of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Choong-Nam, Korea; ¹Dept. of Chemistry, Won-Kwang University, Iksan, Chonbuk, Korea; ²Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea)

Abstract: Antioxidative activities of solvent fractions obtained from Korean *Rhus vernicifera*, being used in food industry and as a traditional medicine, were examined by the methods of DPPH scavenging activity, inhibitory effect on autooxidation of linoleic acid, nitrite scavenging activity and the inhibitory effect on xanthine oxidase activity. Ethyl acetate fraction showed potent antioxidative activities. Three compounds were isolated from the ethyl acetate fraction by rotary locular counter current chromatography (RLCCC), Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC. The isolated compounds were 1,2,3-trihydroxybenzene, methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate and 3,4,5-trihydroxybenzoic acid determined by GC/MS and, ¹H and ¹³C NMR. Among the isolated compounds, methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate showed the strongest antioxidative activity than artificial antioxidants, BHA and BHT in various methods. However, these isolated compounds did not show cytotoxicity effects on the human cancer cell lines. Therefore, we may suggest that methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate can be used as a food additive possessing the potent antioxidative activity.

Key words: *Rhus verniciflua*, methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate, antioxidant, cytotoxicity

*Corresponding author.