

碩士學位論文

병솔꽃나무 가지로부터 엘라스타제  
저해 활성 및 DPPH 라디칼 소거  
활성 성분 분리

The logo of Jeju National University is a large, stylized 'J' shape. The left vertical stroke of the 'J' is composed of three curved, overlapping bands in blue, green, and grey. The right vertical stroke is a solid purple. At the bottom of the 'J' is a horizontal bar in purple. In the center of the 'J' is a small icon of an open book. Below the book icon, the text 'JEJU' is written in a bold, blue, sans-serif font, and '1952' is written below it in a smaller, blue, sans-serif font. The entire logo is set against a background of a large, faint watermark of the university's name in English and Korean.

濟州大學校 大學院

化學科

金 姝 姬

2010年 2月

병솔꽃나무 가지로부터 엘라스타제  
저해 활성 및 DPPH 라디칼 소거  
활성 성분 분리

指導教授 李 南 昊

金 姝 姬

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2010年 2月

金姝姬의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

濟州大學校 大學院

2010年 2月

Identification of Compounds with Elastase  
Inhibition and DPPH Radical Scavenging  
Activities from *Callistemon lanceolatus*

Kim, Ju Hee  
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of Master of Science

2010. 2.

This thesis has been examined and approved.

.....  
.....  
.....  
.....  
Date

Department of Chemistry

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

List of Schemes .....	iii
List of Tables .....	iii
List of Figures .....	iv
Abstract .....	vi
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
1. 시약 및 기기 .....	3
2. 재료 .....	4
3. 추출, 분획 및 분리 .....	5
3-1. 병솔꽃나무 가지의 추출 및 분획 .....	5
3-2. EtOAc fraction의 VLC를 이용한 활성 성분 분리 .....	6
3-3. Compound 1의 분리과정 .....	6
3-4. Compound 2의 분리과정 .....	6
3-5. Compound 3-5의 분리과정 .....	7
3-6. Compound 6과 7의 분리과정 .....	7
4. 활성 실험 .....	11
4-1. DPPH radical scavenging test .....	11
4-2. Elastase inhibition test .....	13
4-3. 세포 배양 .....	13
4-3-1. Nitric oxide 생성 억제 평가 .....	14
4-3-2. 세포독성 평가(LDH assay) .....	14
III. 결과 및 고찰 .....	15
1. 병솔꽃나무 가지에서 분리된 화합물의 구조 결정 .....	15
1-1. Compound 1과 compound 2의 구조 해석 .....	15
1-2. Compound 3의 구조 해석 .....	20

1-3. Compound 4의 구조 해석 .....	23
1-4. Compound 5의 구조 해석 .....	26
1-5. Compound 6의 구조 해석 .....	29
1-6. Compound 7의 구조 해석 .....	34
2. DPPH radical scavenging activity .....	37
2-1. 병솔꽃 나무 가지 추출물의 항산화 활성 .....	37
2-2. 병솔꽃나무 가지에서 분리된 화합물의 항산화 활성 .....	38
3. Elastase inhibition activity .....	40
3-1. 병솔꽃나무 가지 추출물의 elastase 저해활성 .....	40
3-2. 병솔꽃나무 가지에서 분리된 화합물의 elastase 저해활성 .....	41
4. NO 생성억제 및 LDH assay .....	43
IV. 요약 및 결론 .....	44
V. 참고문헌 .....	46

## LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Procedure of solvent fractionations <i>Callistemon</i> <i>lanceolatus</i> branch .....	5
Scheme 2. Isolation procedure for compounds <b>1</b> , <b>2</b> from <i>Callistemon</i> <i>lanceolatus</i> branch .....	8
Scheme 3. Isolation procedure for compounds <b>3-6</b> from <i>Callistemon</i> <i>lanceolatus</i> branch .....	9
Scheme 4. Isolation procedure for compound <b>7</b> from <i>Callistemon</i> <i>lanceolatus</i> branch .....	10

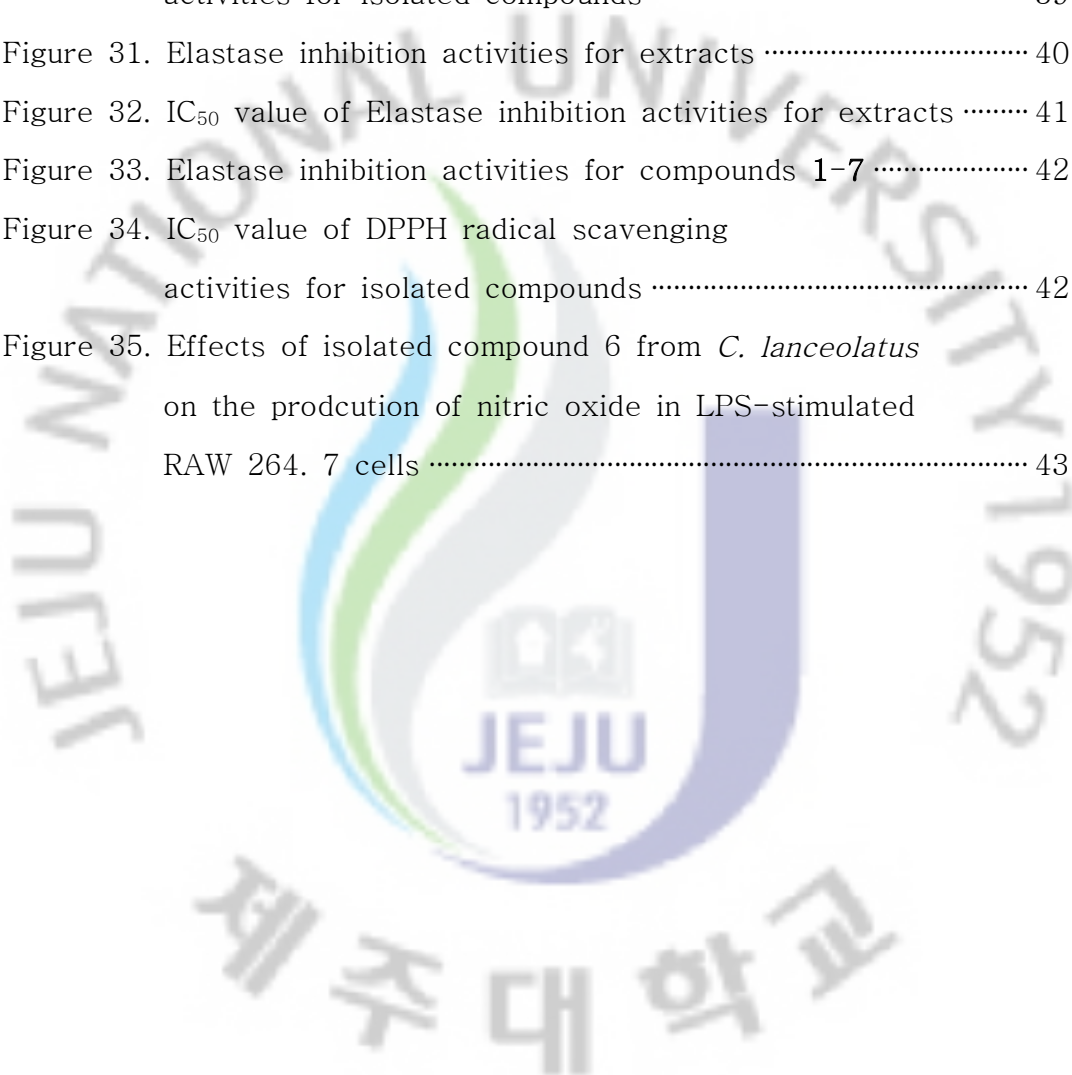
## LIST OF TABLES

Table 1. NMR spectral assignments for compounds <b>1</b> and <b>2</b> .....	17
Table 2. NMR spectral assignments for compound <b>3</b> .....	21
Table 3. NMR spectral assignments for compound <b>4</b> .....	24
Table 4. NMR spectral assignments for compound <b>5</b> .....	27
Table 5. NMR spectral assignments for compound <b>6</b> .....	30
Table 6. NMR spectral assignments for compound <b>7</b> .....	35

## LIST OF FIGURES

Figure 1. Photograph of <i>Callistemon lanceolatus</i> .....	4
Figure 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol .....	12
Figure 3. Chemical structure of compound <b>1</b> .....	16
Figure 4. Chemical structure of compound <b>2</b> .....	16
Figure 5. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	18
Figure 6. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	18
Figure 7. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	19
Figure 8. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	19
Figure 9. Chemical structure of compound <b>3</b> .....	20
Figure 10. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	22
Figure 11. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	22
Figure 12. Chemical structure of compound <b>4</b> .....	23
Figure 13. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	25
Figure 14. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	25
Figure 15. Chemical structure of compound <b>5</b> .....	26
Figure 16. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	28
Figure 17. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	28
Figure 18. Chemical structure of compound <b>6</b> .....	30
Figure 19. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>6</b> in pyridin-d <sub>5</sub> .....	31
Figure 20. <sup>13</sup> C-NMR and DEPT spectrum of compound <b>6</b> in pyridin-d <sub>5</sub> .....	31
Figure 21. COSY and HMQC spectrum of compound <b>6</b> in pyridin-d <sub>5</sub> ..	32
Figure 22. HMBC spectrum of compound <b>6</b> in pyridin-d <sub>5</sub> .....	33
Figure 23. Key HMBC correlations in the compound <b>6</b> .....	33
Figure 24. Chemical structure of compound <b>7</b> .....	34
Figure 25. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>7</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	36
Figure 26. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>7</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	36

Figure 27. DPPH radical scavenging activities for extracts .....	37
Figure 28. RC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for extracts .....	38
Figure 29. DPPH radical scavenging activities for compounds 1-7 .....	39
Figure 30. RC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds .....	39
Figure 31. Elastase inhibition activities for extracts .....	40
Figure 32. IC <sub>50</sub> value of Elastase inhibition activities for extracts .....	41
Figure 33. Elastase inhibition activities for compounds 1-7 .....	42
Figure 34. IC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds .....	42
Figure 35. Effects of isolated compound 6 from <i>C. lanceolatus</i> on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264. 7 cells .....	43





## Abstract

For the purpose of development of novel cosmeceutical materials from native Jeju plants, this study was carried out to investigate the antioxidative and elastase inhibitory constituents from ethanol extract and of *Callistemon lanceolatus*. An antioxidative activity was examined by measuring the radical scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. An elastase inhibition test was performed to isolate the wrinkle-reducing ingredients.

Bioassay-guided investigation of the branch of *Callistemon lanceolatus* led to the isolation of seven compounds such as betulinic acid, pyracrenic acid, arjunolic acid, catechin, piceatannol, diolate compound and ursolic acid-3-acetate. Their structures were elucidated on the basis of spectral studies as well as by comparison with literature data. Also diolate compound was identified by 1D NMR, 2D NMR, IR spectra and HR-FABMS.

Among them, arjunolic acid, catechin and ursolic acid-3-*O*-acetate were isolated for the first time from *C. lanceolatus* branch. And diolate compound was identified as a new compound. Betulinic acid, pyracrenic acid, catechin, piceatannol and ursolic acid acetate showed the elastase inhibition activity and pyracrenic acid, catechin and piceatannol displayed DPPH radical scavenging activity. Pyracrenic acid exhibited very strong elastase inhibition activity with  $IC_{50}$  value of 3.0  $\mu\text{g/mL}$ . On the other hand, catechin displayed strong DPPH radical scavenging activity ( $RC_{50}$  4.4  $\mu\text{g/mL}$ ) comparable to that of ascorbic acid ( $RC_{50}$  4.2  $\mu\text{g/mL}$ ).

## I. 서론

인간은 시간이 흐름에 따라서 생리적인 기능이 저하되는 노화현상을 경험하게 된다. 하지만 모든 사람이 똑같은 현상으로 노화되어가는 것은 아니다. 즉, 다른 사람에 비해 더 늙어 보이기도 또는 젊어 보이기도 하는데 그것은 개개인에 따라 노화의 정도가 차이 있기 때문이다. 이러한 개개인의 생체적인 노화 정도를 판단할 수 있는 가장 큰 지표가 되는 것이 피부(skin)이다. 따라서 대부분의 사람들은 얼굴에 주름이 생기면서부터 노화가 시작되었음을 감지한다.<sup>1)</sup>

노화(aging)란 세월이 흘러감에 따라 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 심하게 퇴화현상이 일어나는 것을 말한다. 각 신체의 노화 중에서 피부노화는 크게 2종류로 나눌 수 있다. 첫째는 내인성 피부노화로서 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화현상을 말하며, 두 번째는 광노화 및 외인성 피부노화로서 햇빛에 지속적으로 노출되어 생기는 피부손상을 말한다.<sup>2)</sup>

피부는 외부환경에 항상 노출되어 있으므로 노화에 따른 피부 변화는 많은 부분이 외부인자들의 영향에 의한 것이라고 할 수 있다. 특히 외부인자 중 자외선과 호흡을 통해 생성되는 활성산소(free radicals)는 피부노화에 가장 중요한 원인으로 간주되고 있다.

활성산소(free radicals)란 다른 분자와의 상호작용으로 한 극을 잃어버린 산소 분자를 말한다. 활성 산소종은 정상적인 대사과정에서도 생성되며, 질병 상태나 스트레스를 받을 때는 과잉으로 생성된다. 특히 피부는 자외선(주로 UV-A)에 노출되어 있어 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어나고 있다. 또한 흡연, 공해 및 세균감염 등도 활성 산소종을 생성시킨다.

피부 세포 및 조직 손상을 주도하는 것은 활성 산소종 중에서 반응성이 가장 큰  $^1\text{O}_2$ 과  $\cdot\text{OH}$ 이다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 피부의 주요 성분인 지질, 단백질, DNA, 탄수화물 등을 산화시켜 변질을 초래한다. 또한 활성 산소종들은 직접적으로 혹은 단백질분해효소(MMPs)를 유발시켜 탄력 및 장력을 나타내는 섬유인 엘라스틴과 콜라겐의 사슬 절단 및 비정상적인 교차 결합 등 피부 구성 성분들의 손상을 야기시킨다. 결국 탄력감소, 주름살로 특징지어지는 피부 노화가 가속화된다.<sup>3)</sup>

Elastin은 콜라겐, 다당류 등과 함께 대부분의 결합조직에 존재하는 탄력성 섬유의 주성분으로 그들은 자신 길이의 서너 배까지 늘릴 수 있으며 장력을 풀어주면 본래의 크기와 모양으로 빠르게 돌아갈 수 있는 특성을 갖고 있는 단백질이다. 또한 elastin은 세포조직에 탄성력을 갖게 하는 단백질 섬유이다.<sup>4,5)</sup>

Elastase는 elastin을 분해하는 단백질 분해효소이며 elastin 뿐만 아니라 collagen, fibrinogen, 면역계 및 혈정 factor를 분해하고, 외부에서 침입하는 미생물을 파괴한다. 그리고 손상된 세포를 제거하여 세포 재생에 필요한 공간을 제공하고, 섭취한 음식물의 단백질을 분해하기도 한다. 그러나 천연 elastase저해제의 생산이 감소하거나, elastase의 합성이 비정상적으로 증가하여 elastase와 천연 elastase저해제 사이의 균형이 깨지면 과도한 elastase의 단백질 분해 작용으로 피부의 elastin과 collagen이 분해되어 피부의 탄력성을 잃게 된다.<sup>6,7,8,9)</sup> 따라서 elastase의 활성을 억제함으로써 주름생성을 억제하려는 많은 연구가 시도되었다.

병솔꽃나무(*Callistemon lanceolatus*)는 도금양과(Myrtaceae)에 속하는 식물로서 병솔나무, 솔꽃, 금보수 등의 이름을 가진다. 원산지는 오스트레일리아(뉴사우스웨일스)로 내한성이 약해 주로 남부도서지방에 분포하며 2~10 m 정도 자라는 관목이다. 단단한 줄기를 가지고 있으며, 줄기는 연갈색이 나고 어린 가지는 붉은 갈색이 난다. 잎은 호생하고 긴 타원상 피침형으로 뺨뺨하며 약간의 광택이 있다. 잎 길이는 8 cm 정도이며 폭은 약 0.6~2 cm 정도이다. 개화기는 6월이고, 수상화서로 병을 닮는 솔같이 밀생하며 붉은 홍색으로 핀다. 수상화서의 길이는 10 cm정도 된다. 길게 눈에 보이는 것은 수술대이며, 수술대는 2~2.5 cm 정도 길며 실제 꽃은 작고 원통형이다.

병솔꽃나무는 제주에 관상용 나무로 정착되었다. 이 식물의 잎과 꽃에서 트라이테페노이드<sup>10,11)</sup>, 플라보노이드<sup>12)</sup>, ellagic acid 그리고 탄닌<sup>13)</sup>이 분리 보고되었다.

본 연구에서는 병솔꽃나무 추출물에서 분리된 화합물들의 DPPH radical scavenging test와 Elastase inhibition test를 실시하여 항산화 효과를 가지며 주름억제 효과를 가지는 유효성분을 천연물로부터 분리 동정하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Jusei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography(VLC)에는 silic gel(0.0020-0.025 mm, Sigma), normal-phase silica gel column chromatography에는 silica gel 60(0.040-0.063 mm, Merck)이 사용되었다. Sephadex column chromatography에는 Sephadex™ LH-20(0.1-0.025 mm)을 사용하였다. 또한 prep-HPLC(preparative Liquid Chromatography)는 Waters Alliance 2695에 column은 Sunfile™ 10 ×250 mm를 장착하여 사용하였다. 분리 과정에서 사용된 TLC(Thin layer chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silicagel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp(254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조 시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다.

미백 활성, 주름개선 활성, 항산화 활성 검색에 사용된 UV/Vis spectrometry는 biochrom사의 Libra S22 UV를 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT-NMR system, JEOL) 혹은 Bruker ultrashield Plus 500(Bruker)을, IR은 IR prestige-21(Shimadzu)를 이용하였다. NMR 측정 용매는 CIL의 NMR 전용 용매로 CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, Pyridin-d<sub>5</sub>를 사용하였다.

## 2. 재료

실험에 사용한 병솔꽃나무는 2008년 1월에 채집하였으며 시료의 동정은 채집하였던 제주 한라수목원에서 이루어졌다. 채집한 병솔꽃나무는 실온에서 완전히 자연 건조시킨 후 잎과, 가지를 분리하였으며, 그 중 가지 부분만 분쇄하여 사용하였다(Figure 1).



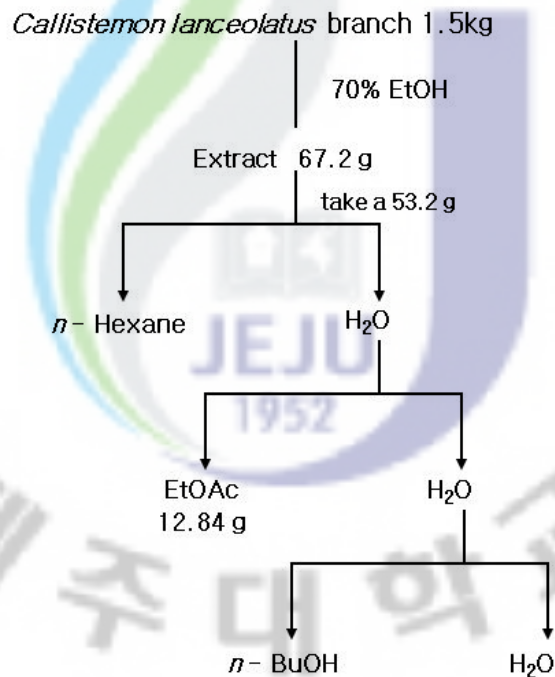
Figure 1. Photograph of *Callistemon lanceolatus*

### 3. 추출, 분획 및 분리

#### 3-1. 병솔꽃나무 가지의 추출 및 분획

건조된 병솔꽃나무 가지 1.5 kg을 70% ethanol 30 L에 침적하여, 실온에서 3 일동안 침출 시켰다. 침출 시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% ethanol 추출물 67.2 g을 얻었다.

얻어진 70% ethanol 추출물을 H<sub>2</sub>O 1 L 에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다(scheme 1).



Scheme1. Procedure of solvent fractionations from *C. lanceolatus* branch

### 3-2. VLC를 이용한 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중에서 EtOAc층(3 g)을 1차 VLC(10 x 5 cm, silica gel, 20~40 mash)에서 Hexane→EtOAc→MeOH을 사용하여, 각 용매의 배합비를 5%씩 증감하여 극성을 높이는 순으로 용액을 제조한 뒤 stepwise 용출방법을 사용하였다. 이 결과로 21개의 분획을 얻었다.

또한 2차, 3차 VLC(10 x 5 cm, silica-gel, 20~40 mash)에서 Hexane→EtOAc→MeOH을 사용하여, 각 용매의 배합비를 증감하여 마찬가지로 각각 14개, 8개의 분획을 얻었다.

### 3-3. Compound 1의 분리과정

1차 VLC에서 Fr.4(250 mg)를 normal phase silica gel로 충전된 glass column에 전개 용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=12/1)를 사용하여 4개의 fraction을 얻었고, Fr.4-2(114 mg)을 가지고 normal phase silica gel로 충전된 glass column에 전개용매(Hexane/EtOAc=2/1)로 전개시켜 3개의 fraction을 얻었으며, 그 중 Fr.4-2-2에서 compound 1(25 mg)을 얻었다.

### 3-4. Compound 2의 분리과정

앞에서 얻은 Fr.5(713.7 mg)을 normal phase silica gel로 충전된 glass column에 CHCl<sub>3</sub>/MeOH=15/1(gradient) 조건으로 loading하여 분취액을 TLC로 확인하여 5개의 fraction을 얻었다. 이 때 얻은 Fr.5-2(407 mg)를 Sephadex LH-20으로 충전된 glass column에 CHCl<sub>3</sub>/MeOH=10/1를 전개조건으로 loading하여 7개의 fraction을 얻었으며, Fr.5-2-se5(66.8 mg)을 위와 같은 Sephadex LH-20에 CHCl<sub>3</sub>/MeOH=3/1의 조건의 용매를 사용하여 3개의 fraction을 얻었다. 그 중 Fr.5-2-se5-s1을 prep-HPLC(ACN/H<sub>2</sub>O=80/20)를 이용하여 compound 2(7.4 mg)을 얻었다(scheme 2).

### 3-5. Compound 3-5의 분리과정

2차 VLC에서 얻은 분획물 Fr.6'( 48 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전 된 glass column에  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=10:1$ 의 용매조건으로 loading하여 5개의 fraction을 얻을 수 있었으며 그 중 Fr.6'-2에서 compound 3(8.3 mg)을 얻었다. 마찬가지로 2차 VLC에서 얻은 분획물 Fr.5'(149.5 mg)을 normal phase silica gel로 충전 된 glass column에 전개용매( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=4/1$ )를 사용하여 7개의 fraction을 얻었다. 그 중 Fr.5'-6와 Fr.5'-4에서 각각 compound 4(14.4 mg)와 5(7.3 mg)를 얻었다.

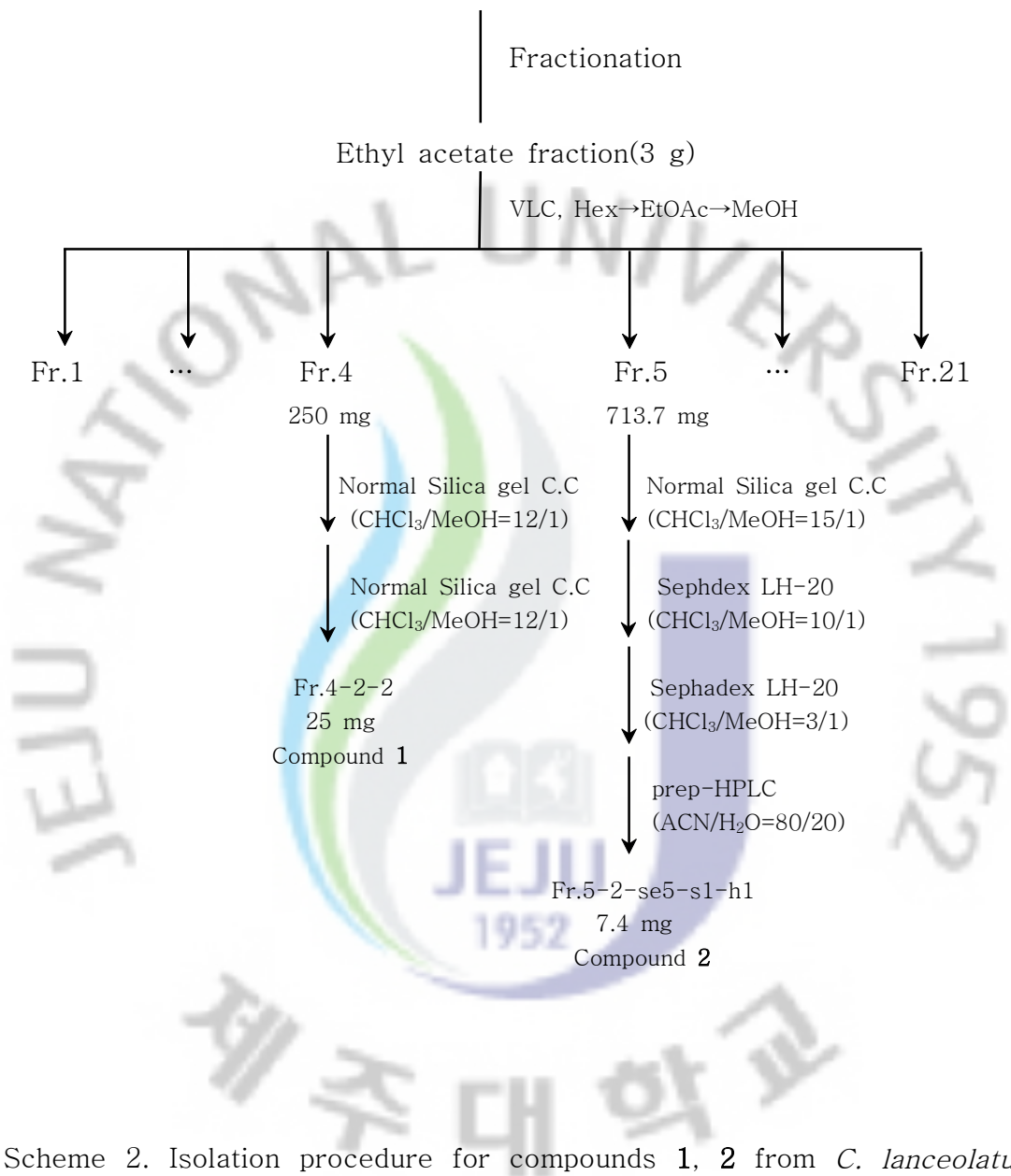
### 3-6. Compound 6과 7의 분리과정

3차 VLC에서 얻은 8개의 fraction에서 V.4를 가지고 normal silica gel C.C를 하여 총 6개의 분획물을 얻었고, 그 중 첫 번째 subfraction인 vnp-1에서 compound 6(52 mg)을 얻었다.

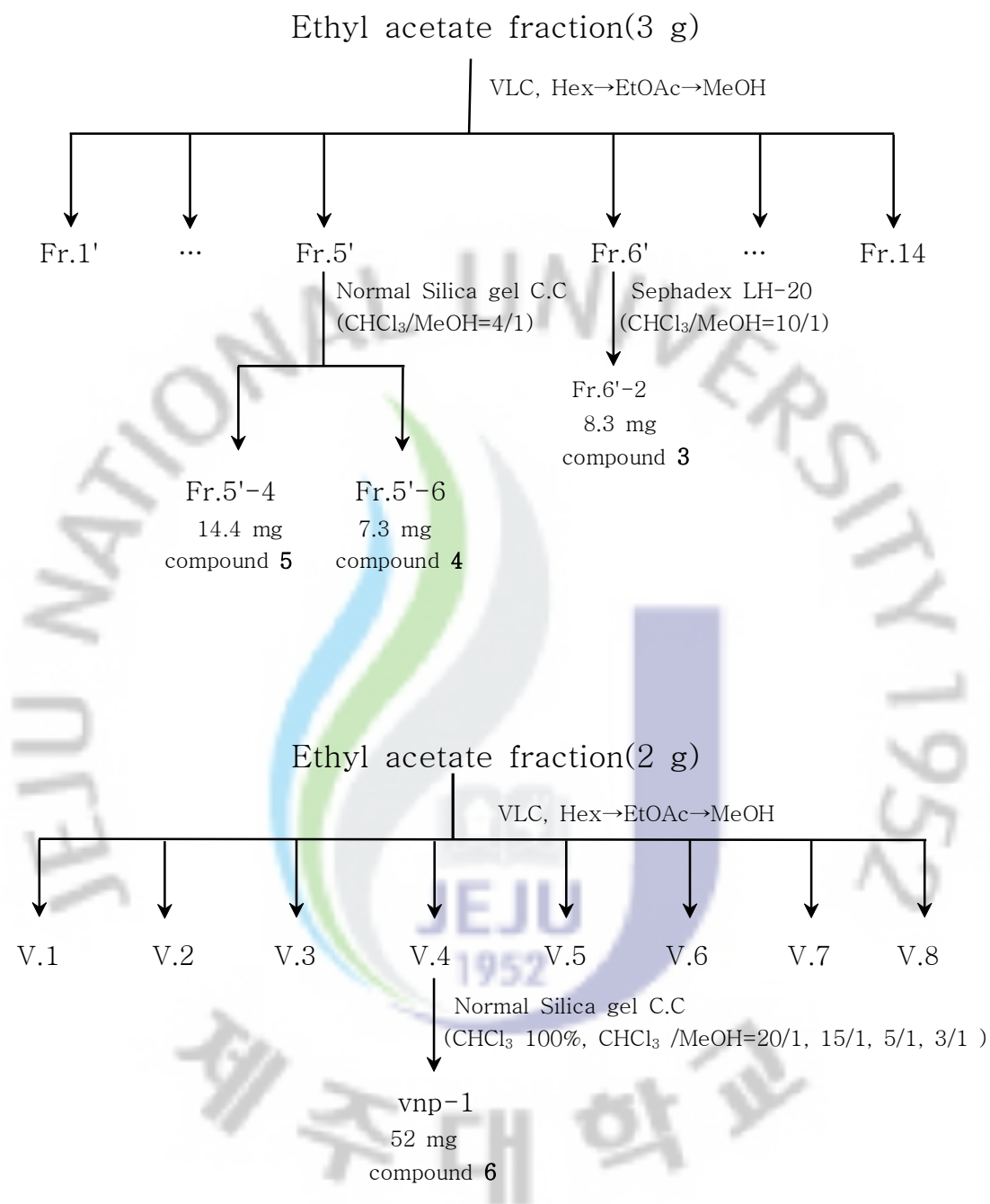
1차와 2차 VLC에서 얻은 Fr.3과 Fr.3'을 가지고 normal silica gel C.C를 하여 5개의 분획물을 얻었고, 그 중 3번째 분획물을 용해도 차이에 의해 2개의 fraction으로 나누었다. Hexane에 녹지 않는 부분인 v1,2-n3-nhs에서 compound 7(16.2 mg)을 얻었다.



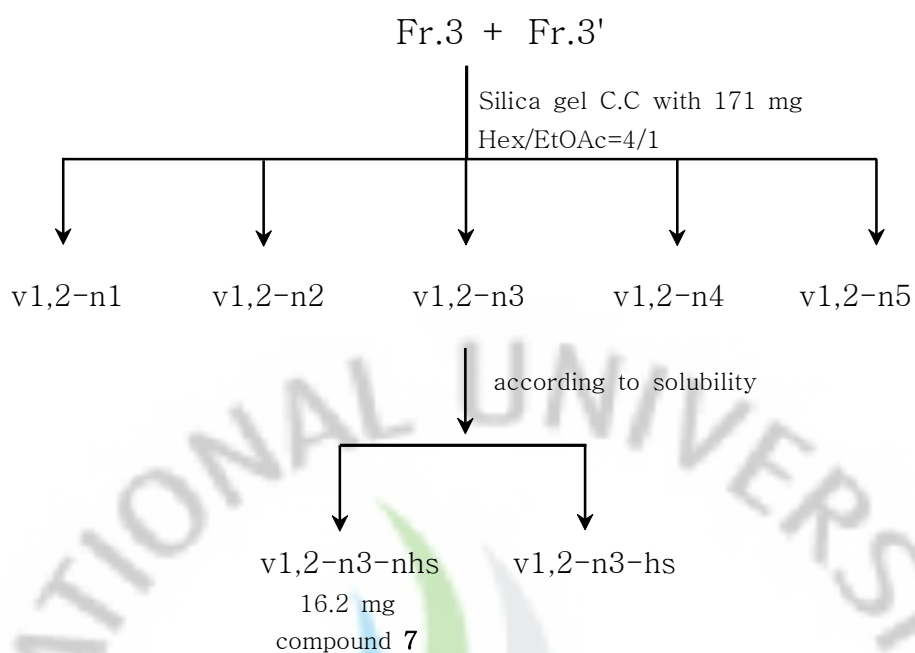
*Callistemon lanceolatus* branch 70% ethanol extract(67.2 g)



Scheme 2. Isolation procedure for compounds 1, 2 from *C. lanceolatus* branch



Scheme 3. Isolation procedure for compounds 3-6 from *C. lanceolatus* branch



Scheme 4. Isolation procedure for compound 7 from *C. lanceolatus* branch

#### 4. 활성 검색

##### 4-1. DPPH radical scavenging test

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색방법으로 특히 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 방법이다. 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 525 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해 주는 전자 공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색이 점점 옅어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다.

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois방법<sup>14)</sup>을 응용하여 다음과 같이 실행하였다.

먼저 시료를 1 mg/mL 의 농도로 70% ethanol을 용매로 하여 녹인다. DPPH 시약은 0.3 mM이 되도록 녹여준 뒤 이를 가지고 희석액을 만든다. 희석액은 총 4.7 mL를 만들 때 0.3 mM 용액 1.2 mL, DMSO 0.5 mL, 100% EtOH 3 mL를 넣어 흡광도가 0.94에서 0.97이 되도록 맞추어 사용하였다. 맞춰진 DPPH 용액 0.54 mL 에 농도가 각각 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL 이 되도록 희석한 시료를 0.06 mL를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 UV/Vis spectrometer를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거작용(%)을 구한다. 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료의 농도(RC<sub>50</sub>)를 계산하였다. 이때 사용된 대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = 1 - \frac{B - C}{A} \times 100$$

A : DPPH의 흡광도

B : DPPH와 시료반응액의 흡광도

C : 시료 자체의 흡광도

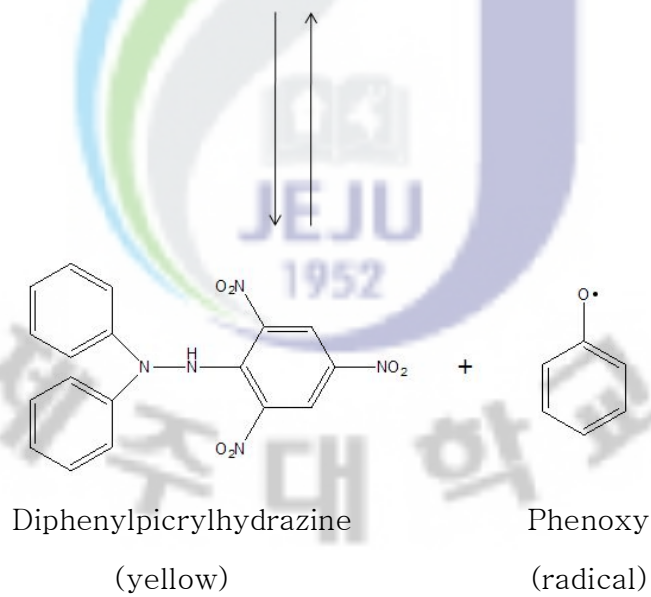
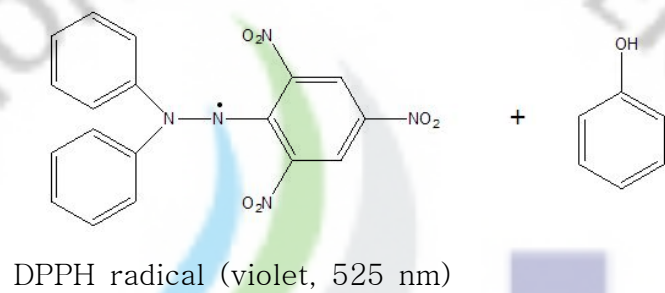


Figure 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol

#### 4-2. Elastase inhibition test

Elastase inhibition test는 James법<sup>15)</sup>을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 사용하였고, 사용된 기질은 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide 을 사용하였다.

실험은 buffer(pH 8.9), sample(10 mg/mL, stock), N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide(4 mM), porcine pancreatic elastase(PPE)(100 µg/mL, stock)를 각각 84:1:10:1의 비율로 섞고 25℃ 에서 15분간 반응 시킨 후 410 nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정 하였다. 시료는 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL의 농도로 각각 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산 되었고, 각 시료의 IC<sub>50</sub> 값을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 oleanolic acid를 사용하였다.

$$\text{Elastase inhibition (\%)} = 1 - \frac{(C - D)}{(A - B)} \times 100$$

- A : sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도
- B : sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하지 않은 상태로 반응한 후의 흡광도
- C : 효소를 첨가하여 반응한 후의 sample의 흡광도
- D : 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 sample의 흡광도

#### 4-3 세포 배양

대식세포 계열 (Murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지 (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양 하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

#### 4-3-1 Nitric oxide 생성 억제 평가

RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 추출물 시료와 LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ )를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는  $\text{NO}_2^-$ 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액  $100 \mu\text{L}$ 와 Griess 시약  $100 \mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )를 standard로 비교하였다.

#### 4-3-2 세포독성 평가 (LDH assay)

RAW 264.7 세포 ( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)를 DMEM 배지에 추출물 시료와 LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ )를 동시에 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH (lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지  $50 \mu\text{L}$ 와 reconstituted substrate mix를  $50 \mu\text{L}$ 를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후  $50 \mu\text{L}$ 의 stop solution을 넣은 후 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 병솔꽃나무 가지에서 분리된 화합물 구조 결정.

##### 1-1. Compound 1, 2의 구조해석

Compound 1은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 30개의 carbon 피크와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 6개의 메틸기의 단일피크를 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예측하였다(figure 5, 6).

$^{13}\text{C}$ 과 DEPT-NMR spectrum에서  $\delta$  178.9는 carboxylic acid,  $\delta$  150.4와 109.0의 signal은 비닐 탄소로 각각 4차탄소와  $\text{CH}_2$ 임을 알 수 있었고,  $\delta$  78.3의 signal은 산소에 인접한 위치의 methine의 특성피크로 예측할 수 있었다. 이로 compound 1이 betulinic acid임을 예측하였으며 문헌<sup>16)</sup>과 비교하여 확인하였다(figure 3).

Compound 2의 NMR data를 조사한 결과 betulinic acid의 유도체로  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  4.55(1H, m)의 signal로 보아 aromatic ester가 3번 탄소에 결합된 것으로 예상되었다(figure 7, 8).

$^1\text{H}$ -NMR에서  $\delta$  6.24(d,  $J = 15.8$  Hz)와  $\delta$  7.52(d,  $J = 15.8$  Hz)로 결합된 트랜스 올레핀 피크와 함께  $\delta$  6.78(d,  $J = 8.0$  Hz),  $\delta$  6.94(dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz) 그리고  $\delta$  7.03(d,  $J = 2.0$  Hz)로 보아 1, 3, 4번 위치에 3개가 치환된 벤젠으로 예상하였고 이를 caffeate로 확인하였다. 따라서 compound 2를 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 betulinic acid 3 $\beta$ -O-caffeate 즉, pyracrenic acid로 동정하였다(figure 4).



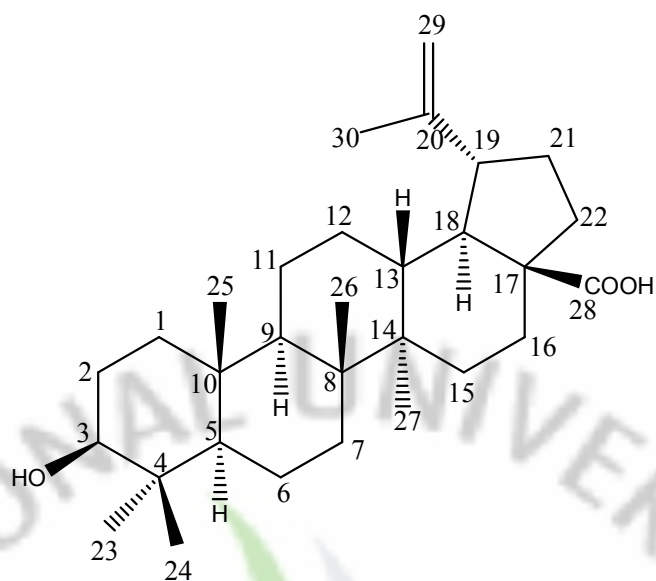


Figure 3. Chemical structure of compound 1

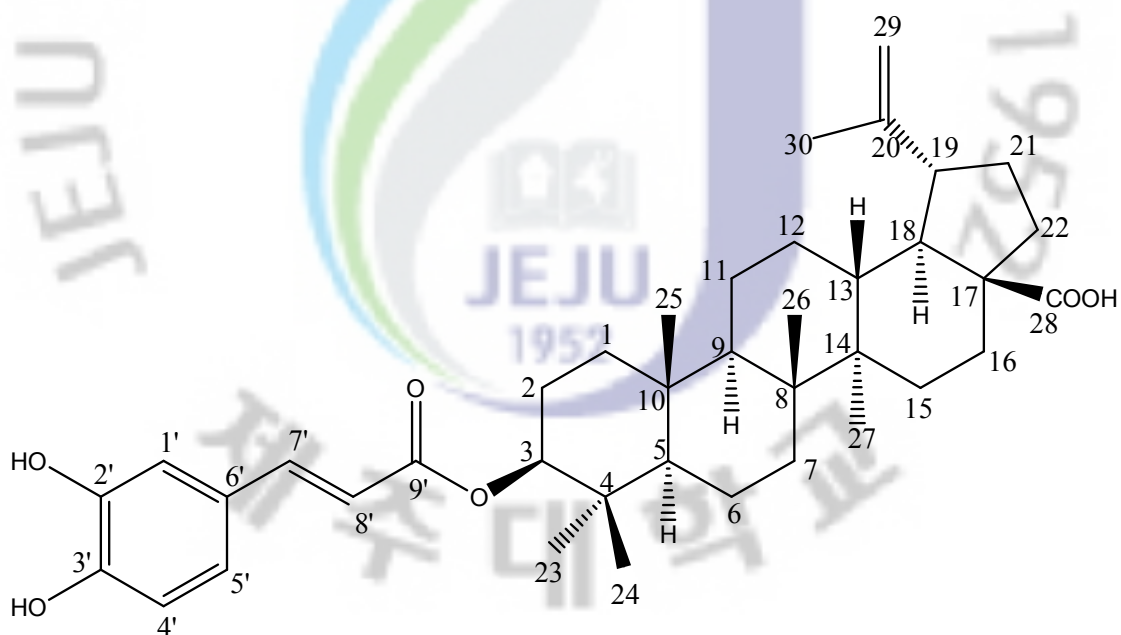


Figure 4. Chemical structure of compound 2

Table 1. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **1** and **2** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD and CDCl<sub>3</sub>)

No.	compound <b>1</b>		compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		38.4		39.6
2		26.5		24.8
3	2.96(1H, t, 7.8, 8.3)	78.3	4.55 (1H, m)	82.3
4		38.4		39.1
5		55.0		56.9
6		17.9		19.3
7		34.0		35.5
8		40.3		41.9
9		50.2		51.9
10		36.8		38.1
11		20.5		22.1
12		25.2		26.8
13		37.9		39.6
14		42.1		43.6
15		30.2		30.8
16		31.9		33.3
17		55.9		57.5
18		48.8		50.4
19	2.83 (1H, m)	46.7	3.03 (1H, m)	48.4
20		150.4		152.0
21		29.3		31.7
22		36.8		38.3
23	0.55 (3H, s)	27.4	0.89 (3H, s)	28.5
24	0.75 (3H, s)	14.9	0.95 (3H, s)	16.6
25	0.63 (3H, s)	15.6	0.92 (3H, s)	17.1
26	0.76 (3H,s)	15.4	0.99 (3H, s)	16.7
27	0.78 (3H, s)	14.2	1.03 (3H, s)	15.1
28		178.9		180.2
29	4.53, 4.39(1H, s)	109.0	4.71, 4.60 (1H, d, 1.7)	110.2
30	1.49 (3H, s)	18.8	1.70 (3H, s)	19.5
1'				115.6
2'			7.03 (1H, d, 2.0)	146.6
3'				149.4
4'				115.1
5'			6.78 (1H, d, 8.0)	122.9
6'			6.95 (1H, dd, 8.0,2.0)	127.7
7'			7.53 (1H, d, 15.8)	146.8
8'			6.25 (1H, d, 15.8)	116.5
9'				169.2

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD and CDCl<sub>3</sub> solution at 400 and 100 MHz, respectively.

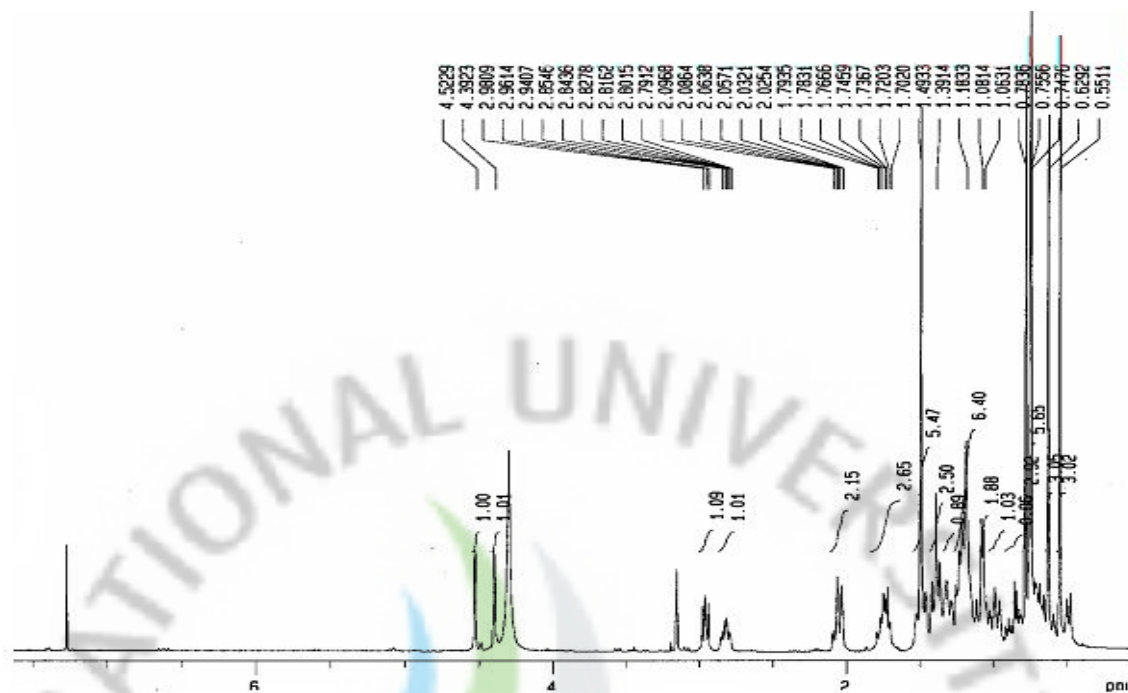


Figure 5.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CDCl}_3$

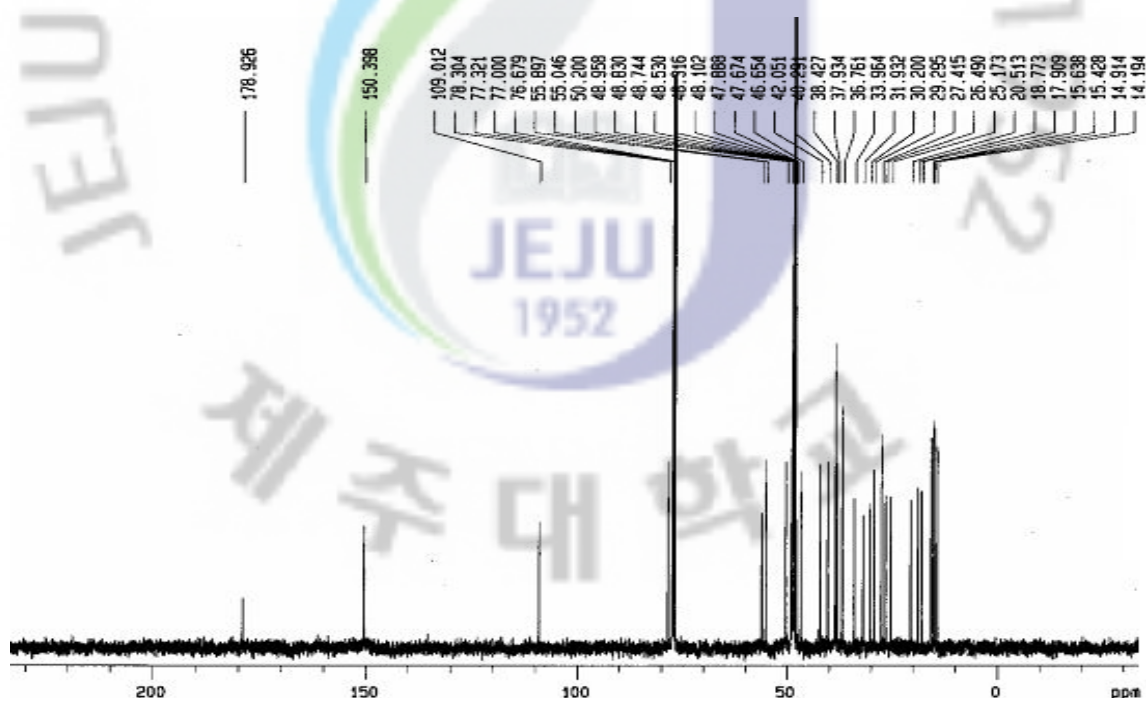


Figure 6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CDCl}_3$

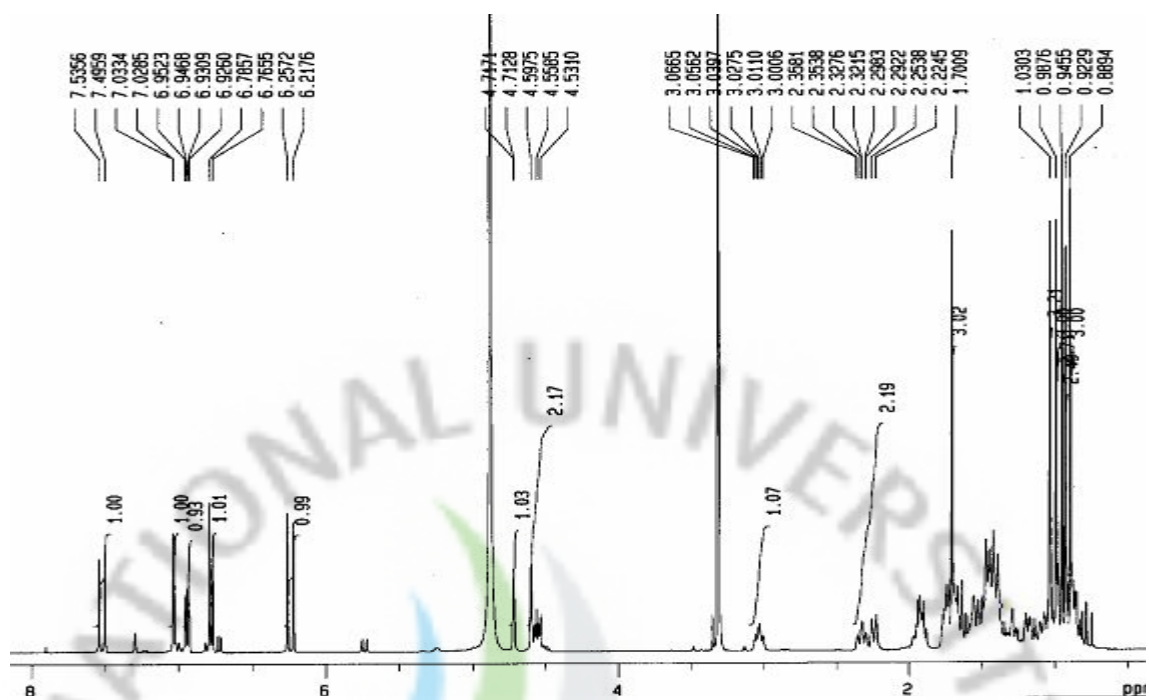


Figure 7.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

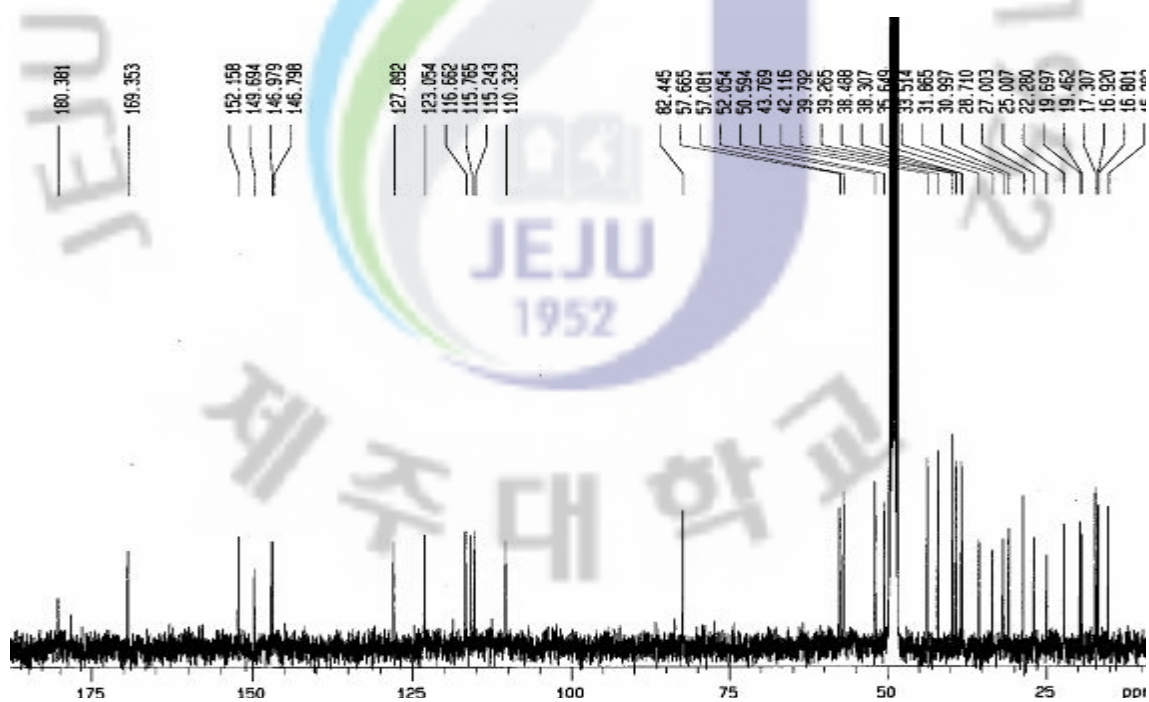


Figure 8.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 1-2. Compound 3의 구조해석

Compound 3은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 30개의 탄소 피크와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 6개의 메틸기의 단일피크를 포함하여 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예측하였다(Figure 10, 11).

$^{13}\text{C}$ 과 DEPT-NMR spectrum에서  $\delta$  181.8의 signal은 carboxylic acid임을 알 수 있었으며, olefin 탄소의 signal인  $\delta$  144.1과  $\delta$  121.4 는 각각 4차탄소와 CH임을  $\delta$  68.0,  $\delta$  78.5는 산소에 인접한 위치의 methines, 그리고  $\delta$  67.6에서 methylene의 특성 피크임을 알 수 있었다. 이를 문헌<sup>18)</sup>과 비교하여 compound 3을 2 $\alpha$ ,23-dihydroxyoleanolic acid 즉, arjunolic acid로 확인하였다(figure 9).

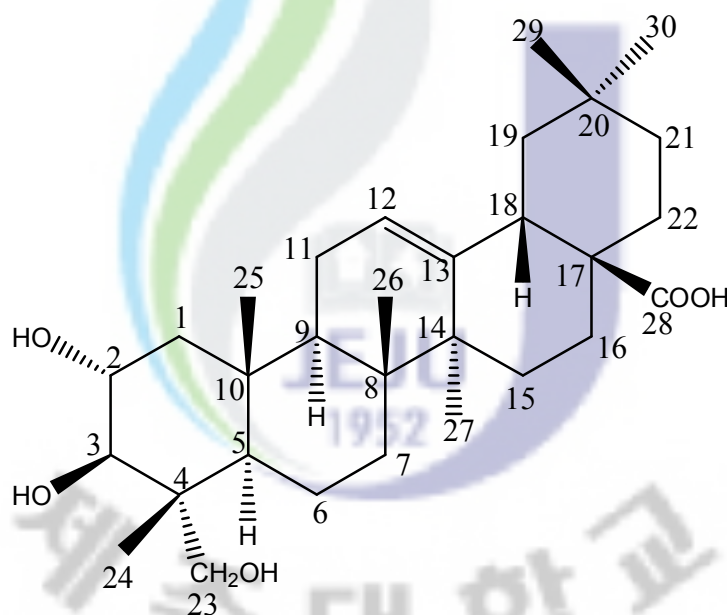


Figure 9. Chemical structure of compound 3

Table 2. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **3** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD)

No.	compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		45.8
2	3.50 (1H, d, 5.8)	68.0
3	3.68 (1H, m)	78.5
4		42.3
5		47.8
6		17.8
7		32.5
8		38.9
9		47.3
10		37.6
11		22.7
12	5.23 (1H, m)	121.4
13		144.1
14		41.5
15		29.3
16		27.3
17		46.3
18	2.84 (1H, dd, 3.7, 10.0)	41.1
19		45.7
20		30.5
21		33.6
22		31.8
23		67.6
24	1.00 (3H, s)	12.5
25	0.92 (3H, s)	16.5
26	0.88 (3H, s)	16.4
27	1.14 (3H, s)	25.5
28		181.8
29	0.71 (3H, s)	32.7
30	0.80 (3H, s)	23.1

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100 MHz, respectively.

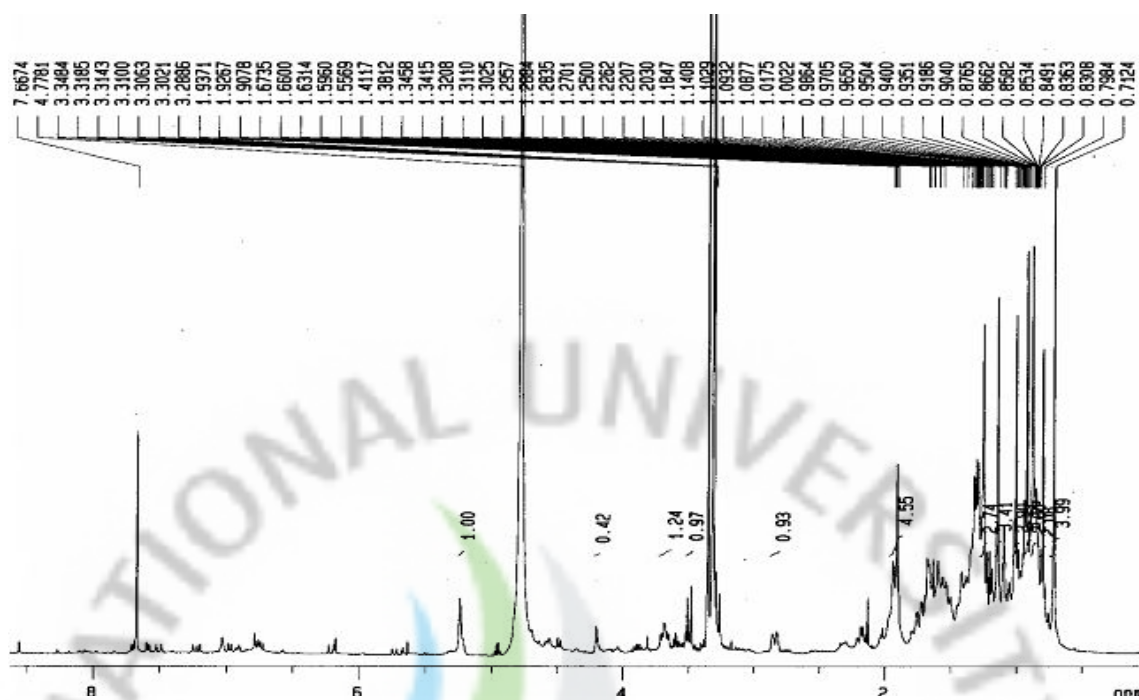


Figure 10.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

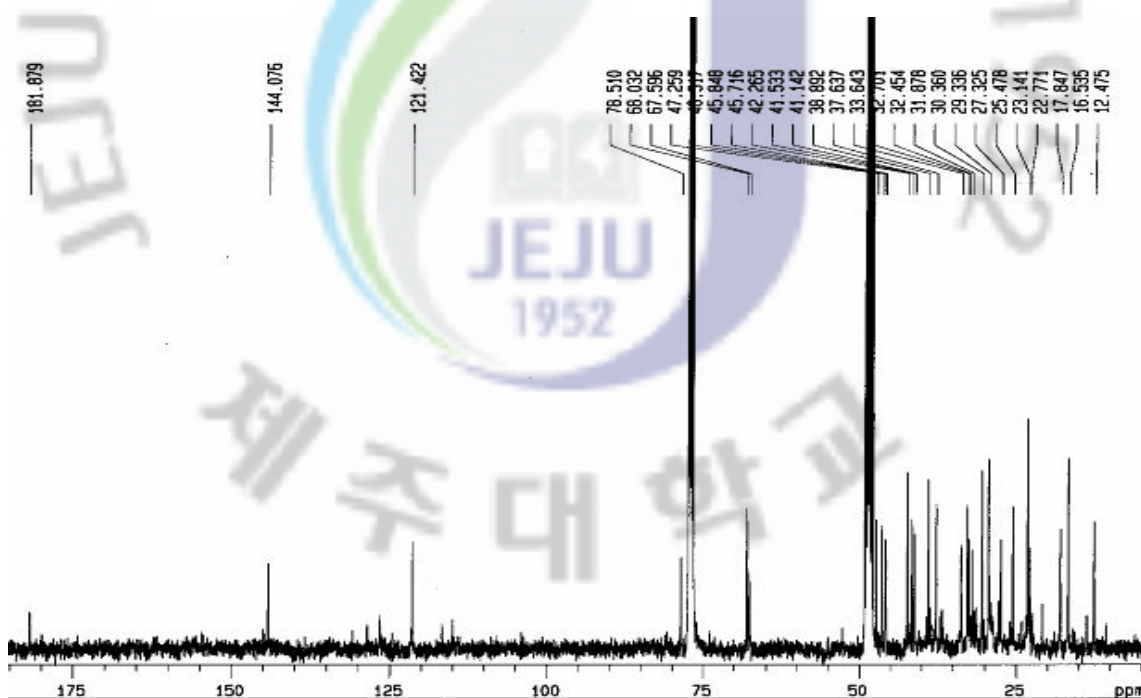


Figure 11.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

### 1-3. Compound 4의 구조해석

Compound 4의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR을 측정하였다(Figure 9, 10.).  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  100~160 영역의 carbon signal과  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  5.85~ 6.84에서의 signal에 의해 aromatic ring이 있음을 알 수 있었으며 (Figure. 13, 14), 1개의 methylene 수소가 관측되었다. 또한  $\delta$  6.84(d,  $J = 2.0$  Hz),  $\delta$  6.77(d,  $J = 8.1$  Hz),  $\delta$  6.71(dd,  $J = 8.1, 2.0$  Hz), 5.92(d,  $J = 2.4$  Hz), 5.85(d,  $J = 2.4$  Hz)에서 커플링 상수 값으로 보아 2개는 *ortho* coupling, 3개는 *meta* coupling을 하는 것으로 관측되었으며,  $^{13}\text{C}$  spectrum으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것으로 보아 이는 전형적인 flavonoid임을 알 수 있었다. 이들  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 문헌<sup>19)</sup>과 비교한 결과 compound 4는 catechin임을 알 수 있었다(figure 12).

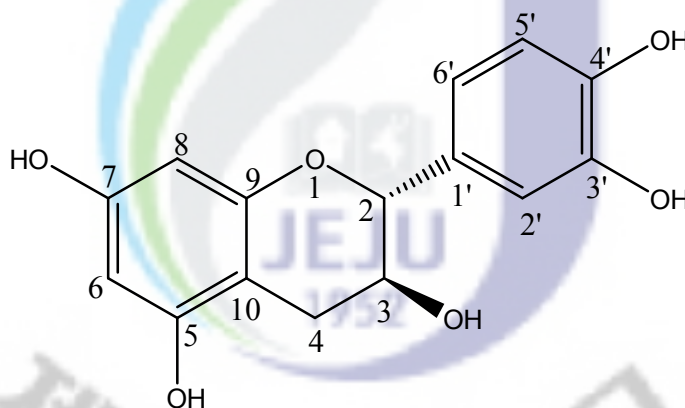


Figure 12. Chemical structure of compound 4



Table 3. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **4** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD)

No.	compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	4.56 (1H, d, 8.0)	83.0
3	3.97 (1H, ddd, 7.8, 7.8, 5.4)	69.0
4	2.85 (1H, dd, 16.0, 5.4)	28.7
	2.50 (1H, dd, 16.0, 8.0)	
5		157.7
6	5.85 (1H, d, 2.4)	96.4
7		157.1
8	5.92 (1H, d, 2.4)	95.7
9		158.0
10		101.0
1'		132.4
2'	6.84 (1H, d, 2.0)	115.4
3'		146.4
4'		146.4
5'	6.77 (1H, d, 8.1)	116.2
6'	6.71 (1H, dd, 8.1, 2.0)	120.2

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100 MHz, respectively.

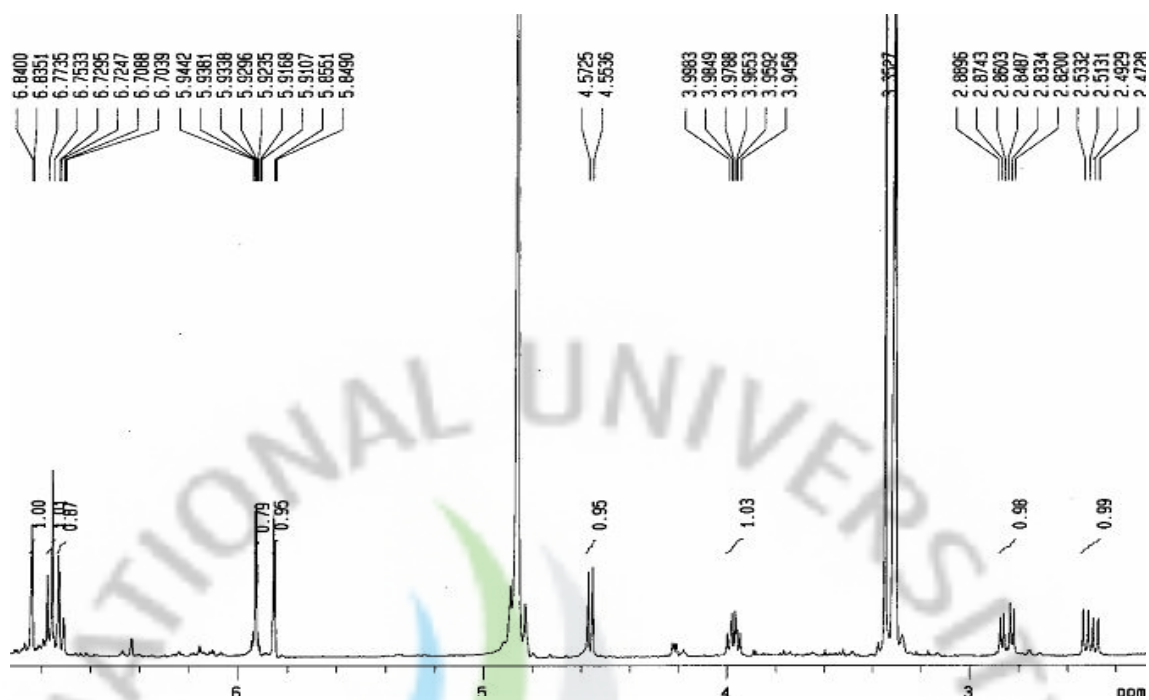


Figure 13.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **4** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

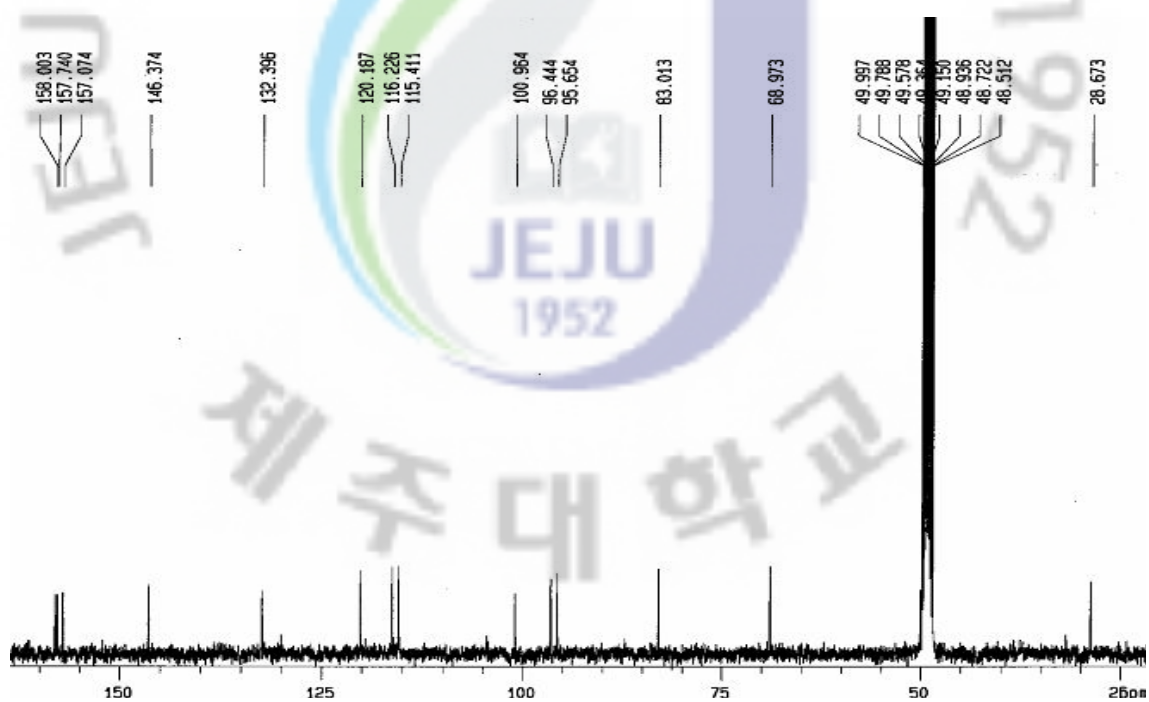


Figure 14.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **4** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

#### 1-4. Compound 5의 구조해석

Compound 5의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 모두 11개의 signal이 관측되었고, 그 중  $\delta$  159.6,  $\delta$  105.8의 peak가 다른 peak에 비해 큰 것으로 보아 대칭 탄소 2개가 존재함을 예상할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 보면  $\delta$  6.97 (d,  $J = 2.0$  Hz),  $\delta$  6.83 (dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz),  $\delta$  6.75 (d,  $J = 8.0$  Hz),  $\delta$  6.43 (d,  $J = 2.0$  Hz)들의 coupling constant 값으로 보아 *meta* 커플링과 *ortho* 커플링을 하고 있음을 알 수 있으며  $\delta$  6.89 (d,  $J = 16.0$  Hz),  $\delta$  6.76 (d,  $J = 16.0$  Hz)의 coupling constant 값으로 보아 이는 vinyl protons에서 *trans* 형태로 존재하고 있음을 예상할 수 있었다(figure 16,17). 종합해 볼 때 이 화합물은 *trans*-stilbene 의 골격을 가짐을 예측할 수 있었고, 문헌<sup>20)</sup>과 비교한 결과 piceatannol으로 구조 동정하였다(figure 15).

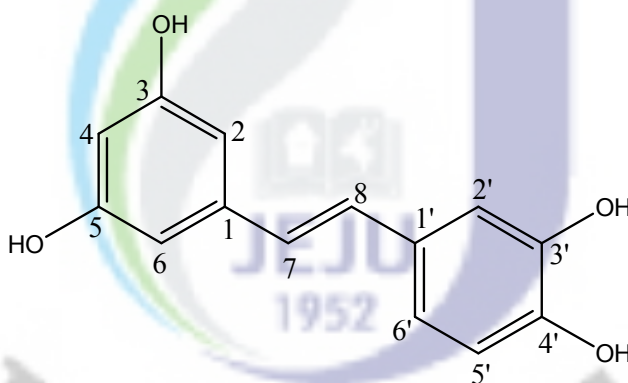


Figure 15. Chemical structure of compound 5

Table 4. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **5** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD)

No.	compound <b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		141.3
2	6.43 (1H, d, 2.0)	105.8
3		159.6
4	6.16 (1H, t, 2.0)	102.6
5		159.6
6	6.43 (1H, d, 2.0)	105.8
7	6.76 (1H, d, 16.0)	127.7
8	6.89 (1H, d, 16.0)	129.7
1'		131.1
2'	6.97 (1H, d, 2.0)	116.4
3'		146.5
4'		146.5
5'	6.75 (1H, d, 8.0)	113.8
6'	6.83 (1H, dd, 8.0, 2.0)	120.2

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100 MHz, respectively.

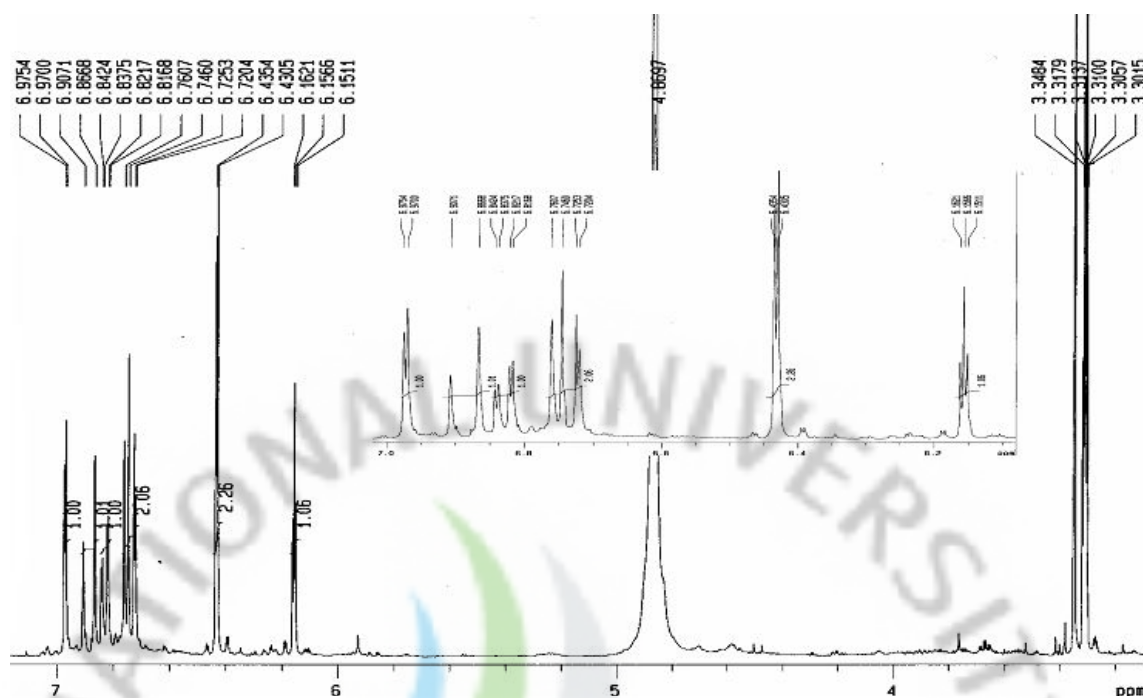


Figure 16.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

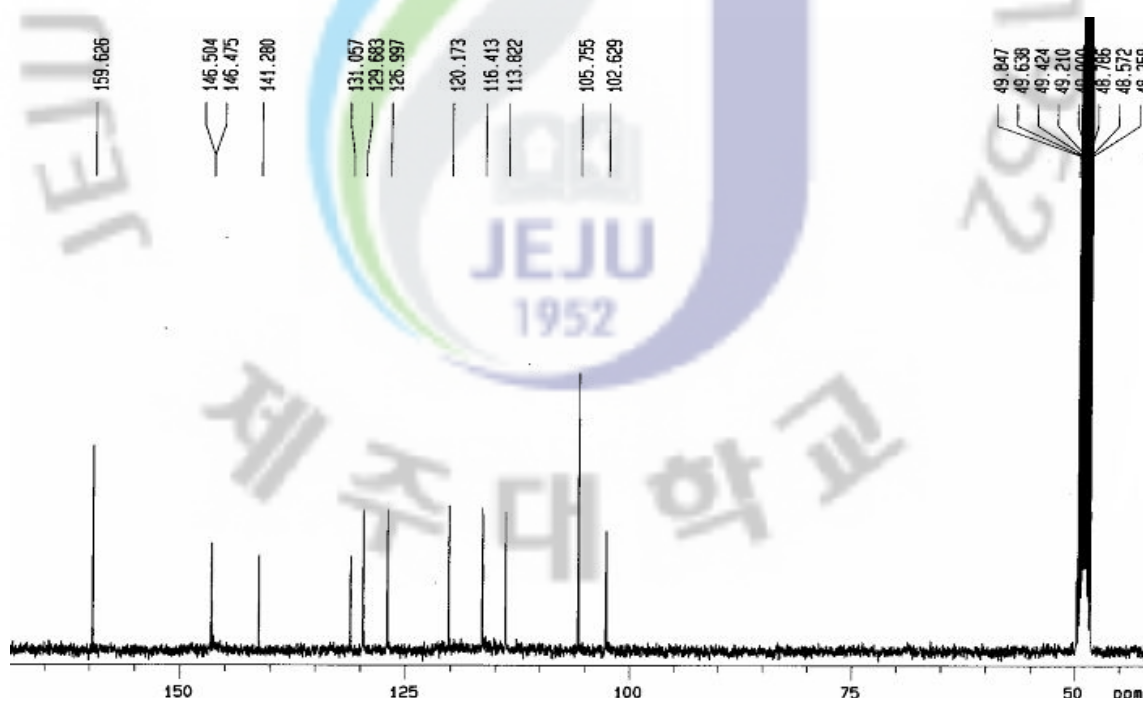


Figure 17.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

#### 1-5. Compound 6의 구조해석

Compound 6의 구조를 분석하기 위해 1D, 2D-NMR과(figure 18,19,20,21), IR 및 HR-FABMS(positive)를 측정하였다. 측정 결과 분자식은  $C_{41}H_{77}O_4N$ 이며,  $m/z$  647.5846(calcd  $m/z$  647.5853)를 보였다. 또한  $[M+H-C_2H_5]^+$ 의 fragmentation인  $m/z$  619.57이 관측되었다. IR spectrum에서  $1737.8\text{ cm}^{-1}$ 의 강한 흡수 피크로 보아 ester 작용기가 있음을 예상할 수 있었다.  $^{13}C$ 과 DEPT-NMR spectrum에서 carbonyl, olefin, 4차 탄소와 2개의 메틸기, methylene의 탄소를 포함하여 22개의 탄소가 있음을 확인하였다. 또한 Mass spectroscopic data를 통해 amino group이 있음을 알 수 있었다.

$^1H$ -NMR spectrum에서  $\delta$  5.53,  $\delta$  2.44,  $\delta$  2.14,  $\delta$  1.72,  $\delta$  0.91에서 특성 피크들이 나타났으며, HMBC를 통해 oleic acid의 일부분이 존재하는 것을 예상할 수 있었다. 또한  $\delta$  28.0과 공명하는 allylic 탄소들(C-8',C-11')이 upfield에서 나타나는 것으로 보아 olefin의 9'탄소의 cis 배열을 확인할 수 있었다.

Oleic acid의 carbonyl signal을 보면 compound 6의 carbonyl이 shielding된 것과, IR spectrum으로 보아 ester 결합을 통해 연결되어 있음을 예상할 수 있다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서 oleic acid 피크를 제외하면 하나의 4차 탄소를 포함한 4개의 signal이 관찰된다.  $^1H$ -NMR spectrum에서 하나의 methylene과 분리된 ethyl group에 해당하는 signal이 보이는데  $^1H$ 의 적분비는 분리된 ethyl group의 적분비보다 2배 큰 것을 확인할 수 있었다. 또한 singlet methylene signal도 분리된 ethyl signal과 비교하면 2배정도 크게 보인다. 이는 oleic acid 2개가 대칭적으로 ethyl 일부분에 연결되어 있음을 예상할 수 있었다. 이들 data를 근거로 각각의 결합을 HMBC를 통해 확인하였다(figure 22). 이로써 이 화합물은 Dioleate 계열의 신규 화합물로 동정하였다.

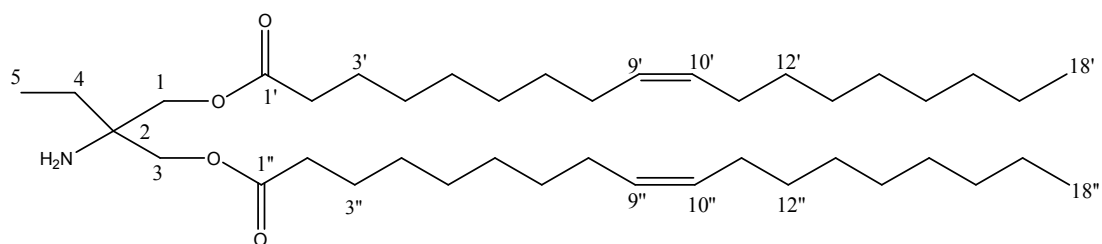


Figure 18. Chemical structure of compound **6**

Table 5. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **6** (500 MHz pyridine-*d*<sub>5</sub>)

No	compound <b>6</b>		
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HMBC (H→C)
1 & 3	4.37 (4H, s)	64.5	C-2, C-4, C-1', C-1''
2		41.7	
4	1.60 (2H, q, 7.5)	24.0	C-1, C-4
5	0.99 (3H, t, 7.5)	8.1	C-2, C-4
1' & 1''		173.7	
2' & 2''	2.44 (4H, t, 7.5)	34.7	C-1', C-1''
3' & 3''	1.72 (4H, dd, 7.5)	25.7	C-1, C-1''
4' & 4''	1.29-1.37 (4H, m)	30.3	
5' & 5''	1.29-1.37 (4H, m)	29.9	
6' & 6''	1.29-1.37 (4H, m)	30.4	
7' & 7''	1.38-1.45 (4H, m)	30.0	
8' & 8''	2.14 (4H, m)	28.0	
9' & 9''	5.53 (2H, m)	130.6	C-7', C-8', C-7'', C-8''
10' & 10''	5.53 (2H, m)	130.7	C-11', C-12', C-11'', C-12''
11' & 11''	2.14 (4H, m)	28.0	
12' & 12''	1.38-1.45 (4H, m)	30.0	
13' & 13''	1.29-1.37 (4H, m)	30.6	
14' & 14''	1.29-1.37 (4H, m)	29.8	
15' & 15''	1.29-1.37 (4H, m)	29.8	
16' & 16''	1.29-1.37 (4H, m)	32.6	
17' & 17''	1.29-1.37 (4H, m)	23.4	
18' & 18''	0.91 (6H, t, 7.5)	14.8	C-16', C-17', C-16'', C-17''

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub> solution at 500 and 125 MHz, respectively. Assignments were based upon HMQC, HMBC experiments.

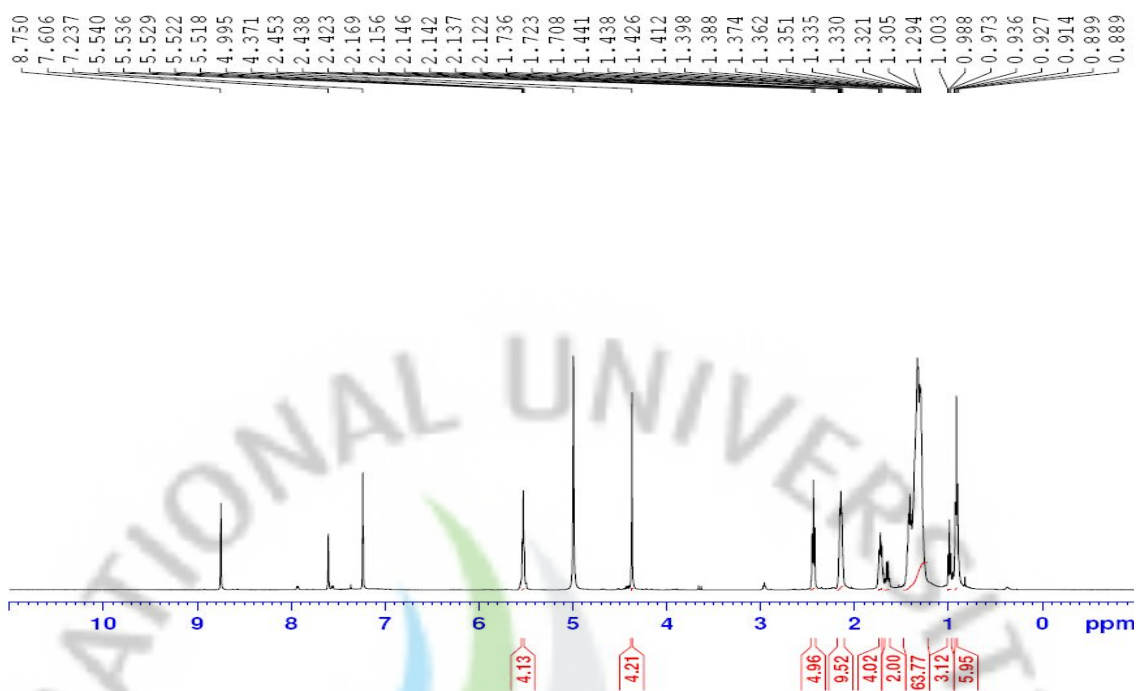


Figure 19.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **6** in pyridine- $d_5$

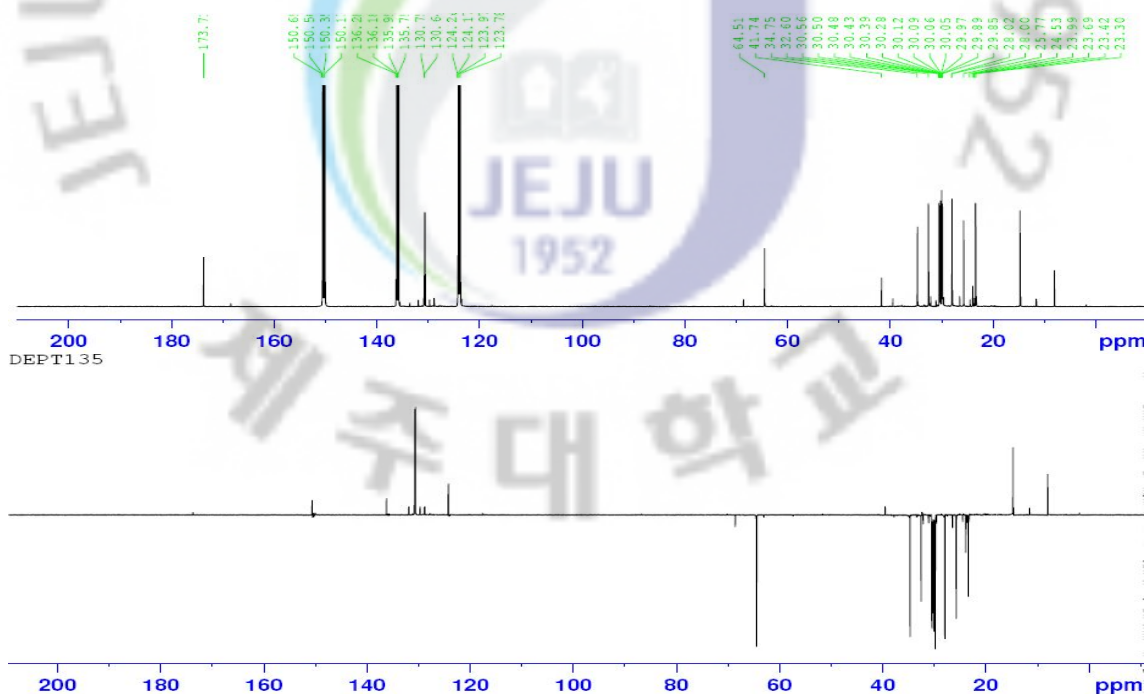


Figure 20.  $^{13}\text{C}$ -NMR and  $135^\circ$  DEPT spectrum of compound **6** in pyridine- $d_5$



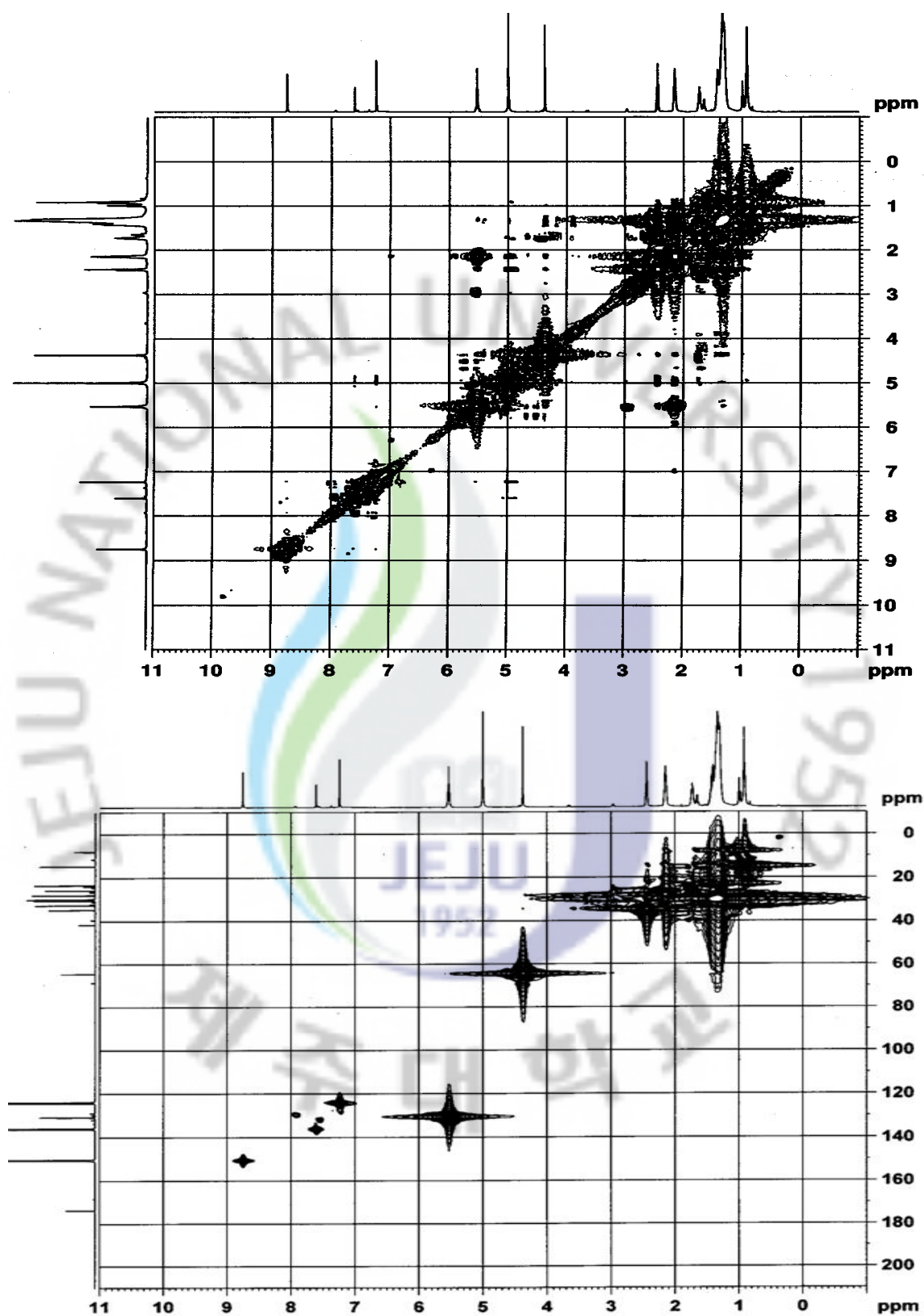


Figure 21. COSY and HMQC spectrum of compound 6 in pyridine-d<sub>5</sub>

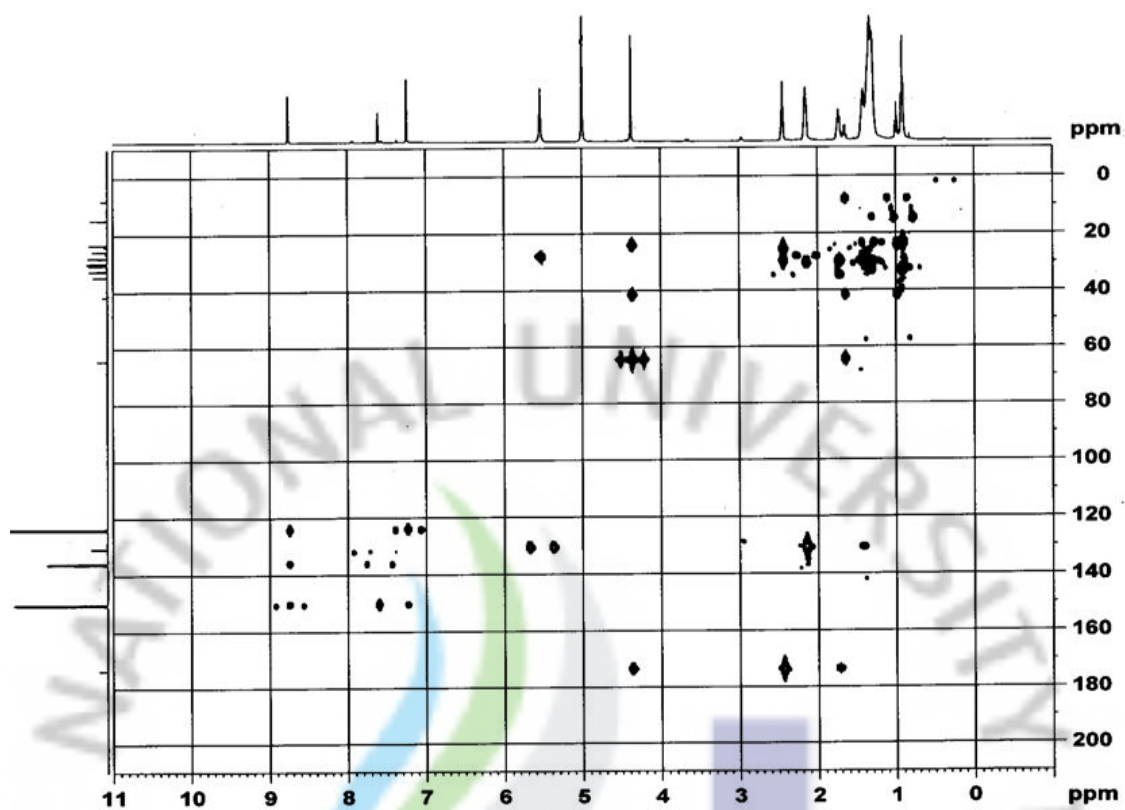


Figure 22. HMBC spectrum of compound 6 in pyridine- $d_5$

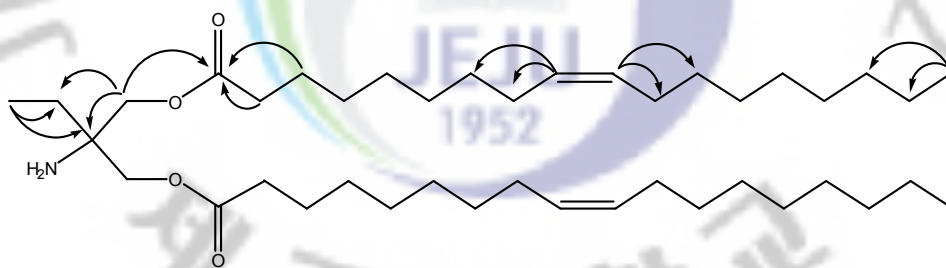


Figure 23. Key HMBC correlations in the compound 6

## 1-6. Compound 7의 구조해석

Compound 7의 구조를 분석하기 위해  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$ -NMR을 측정하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 32개의 카본 피크와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  1.08(3H, s), 0.96(3H, s), 0.87(6H, s), 0.85(6H, s), 0.75(3H, s)의 메틸기와  $\delta$  0.8에서  $\delta$  2.2 사이의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpenoid 계통의 화합물일 것으로 예상하였다(figure 25,26).

$^{13}\text{C}$ 과 DEPT-NMR spectrum에서  $\delta$  183.8의 signal은 carboxylic acid임을 알 수 있었으며  $\delta$  171.1의 signal로 보아 ester가 3번 위치에 결합되어 있을 것으로 예측할 수 있었다. 또한  $\delta$  125.7과  $\delta$  137.9의 signal로 보아 olefin 탄소가 있을 것으로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  2.05(3H, s)의 signal은 ester기에 붙어 있는 메틸기로 예측할 수 있었다. 이들  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 종합해 보았을 때 ursolic acid 구조에 ester가 결합되어 있는 화합물로 예상하였으며 문헌<sup>21,22,23</sup>과 비교하여 ursolic acid-3-acetate로 구조 동정하였다(figure 24).

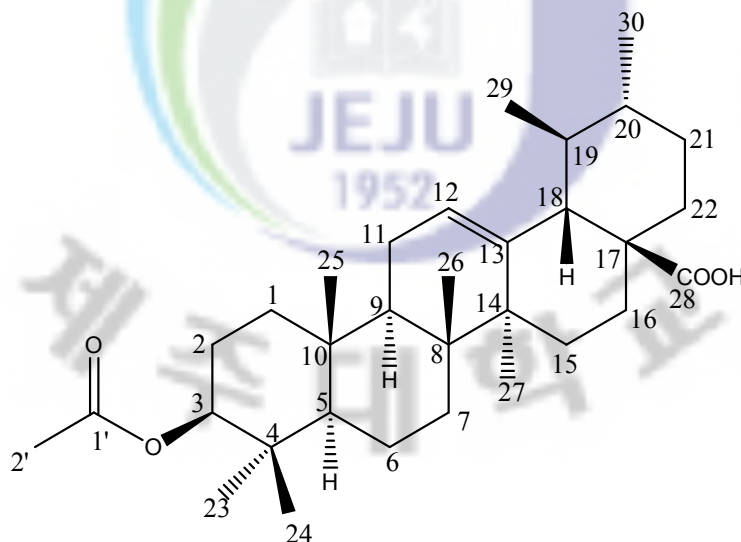


Figure 24. Isolated compound 7 from *C. lanceolatus*

Table 6. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **7** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)

No	compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		38.3
2		23.6
3	4.50 (1H, t, 8.0)	80.9
4		37.7
5		55.3
6		18.1
7		32.8
8		39.5
9		47.4
10		36.9
11		23.3
12	5.24 (1H, m)	125.7
13		137.9
14		41.9
15		28.1
16		24.0
17		47.9
18	2.18 (1H, d, 11.5)	52.5
19		39.0
20		38.8
21		30.6
22		36.7
23	0.85 (3H, s)	28.0
24	0.85 (3H, s)	16.7
25	0.96 (3H, s)	15.5
26	0.75 (3H, s)	17.0
27	1.08 (3H, s)	23.5
28		183.8
29	0.87 (3H, s)	17.1
30	0.87 (3H, s)	21.2
1'		171.1
2'	2.05 (3H, s)	21.3

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub> solution at 400 and 100 MHz, respectively.

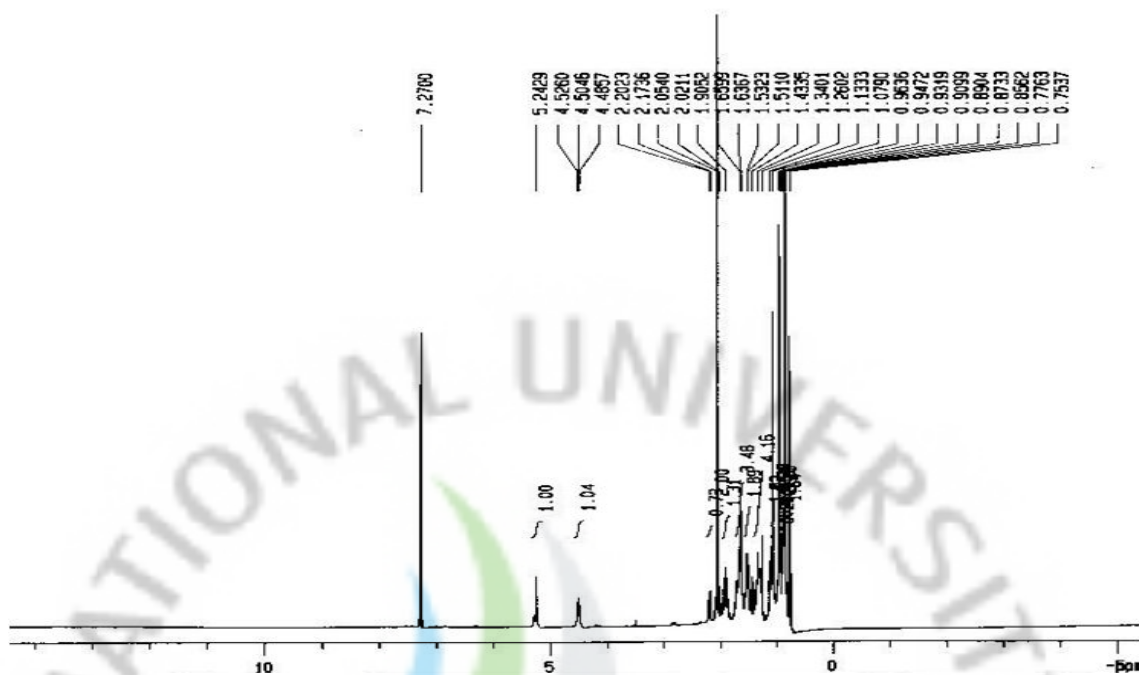


Figure 25.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 7 in  $\text{CDCl}_3$

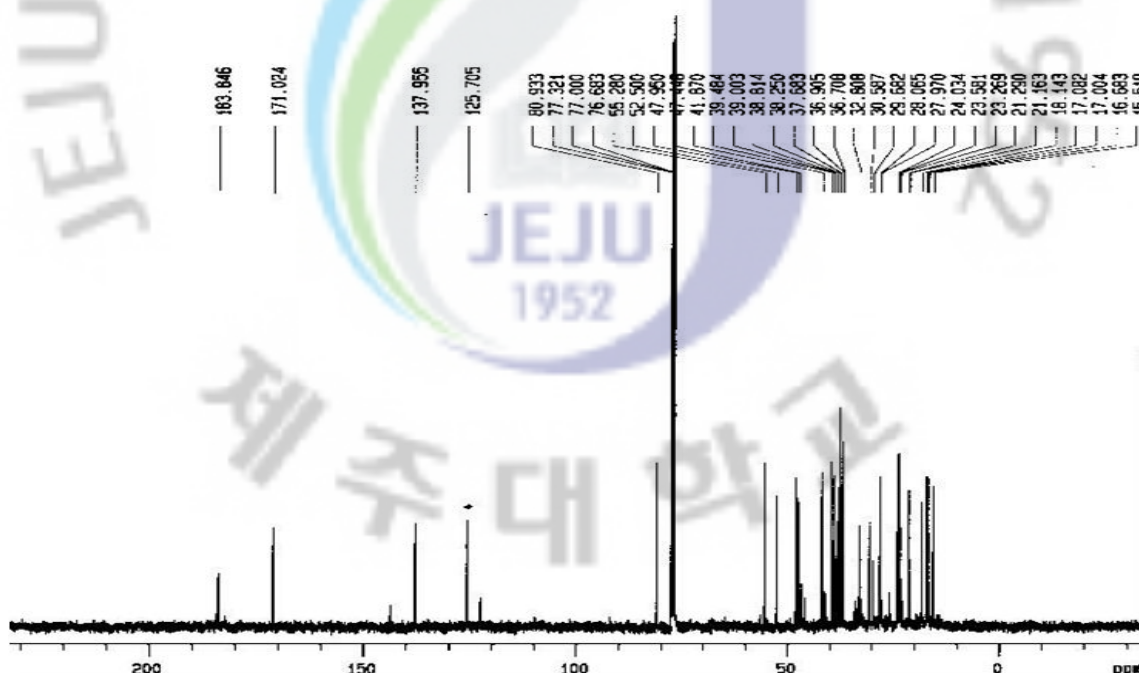


Figure 26.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 7 in  $\text{CDCl}_3$

## 2. DPPH radical scavenging test

DPPH는 질소를 중심으로 그 자체가 매우 안정한 라디칼 구조의 화합물로서, 시료에 의하여 환원되어 라디칼이 소거되면 특유의 보라색이 없어지면서 525 nm에서 보이던 흡수과장이 사라지게 된다. 본 실험에서는 농도별로 DPPH radical 소거활성을 측정하여  $RC_{50}$  값으로 표현하였다.  $RC_{50}$  값이 작을수록 활성이 좋음을 의미한다.

### 2-1. 병솔꽃나무 가지 추출물의 활성 결과

병솔꽃나무 가지의 70% ethanol추출물 및 분획물을 가지고 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 시료의 농도가 100  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 추출물은 83.6%, hexane fraction 13.9%, ethyl acetate fraction 84.4%, butanol fraction 84.5%, water fraction 83.1%의 소거 활성을 보였으며(Figure 27)  $RC_{50}$ 을 측정하기 위해 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 소거활성을 실시하였다. 그 결과 추출물의 경우  $RC_{50}$ 값이 17.0  $\mu\text{g/mL}$ , EtOAc fr. 19.4  $\mu\text{g/mL}$ , BuOH fr. 8.1  $\mu\text{g/mL}$ , water fr. 14.1  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 비타민 C 보다 좋지 않으나 이들 역시 좋은 radical 소거 활성을 보임을 확인할 수 있었다(Figure 28).

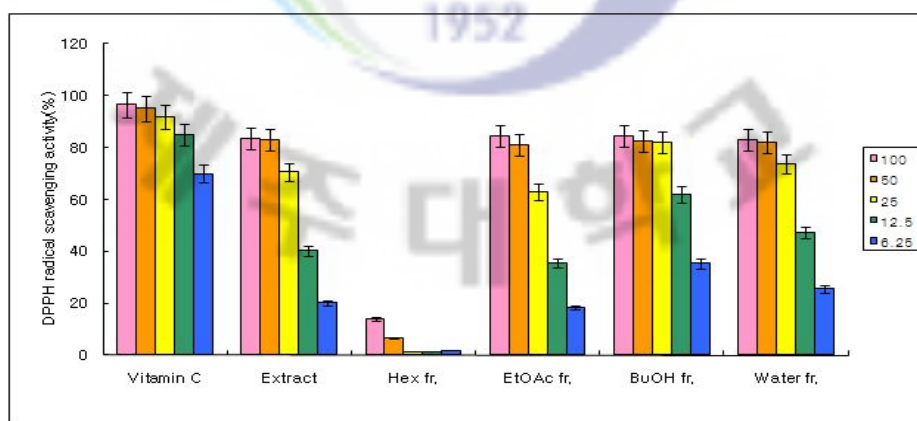


Figure 27. DPPH radical scavenging activities for extracts

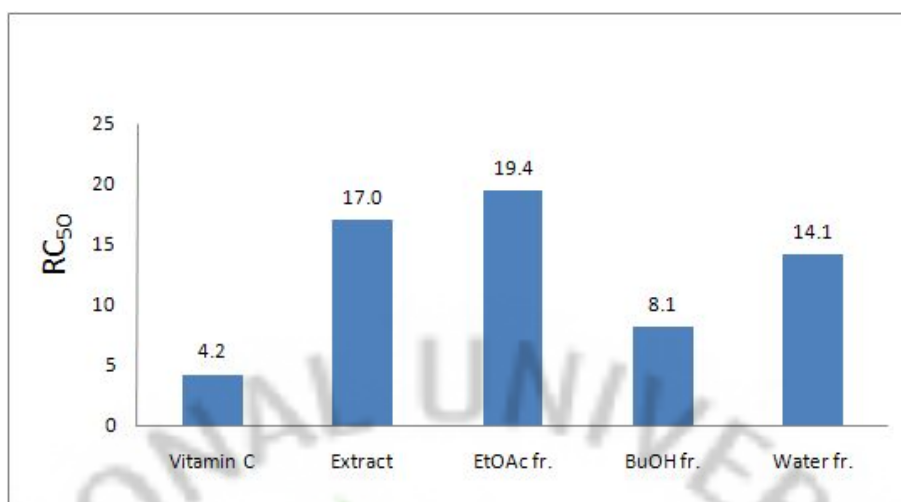


Figure 28. RC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for extracts

## 2-2. 병솔꽃나무 가지로부터 분리된 화합물의 활성 결과

Ethyl acetate층에서 분리된 compounds 1-7의 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. Compound 1과 3, 6, 7은 활성을 가지고 있지 않은 것으로 확인되었고, compounds 2와 4, 5는 시료의 농도가 100 µg/mL일 때 각각 78.1%, 80.1 %, 71.2%의 소거능력을 가지는 것으로 확인 하였다(Figure 29). 이들의 RC<sub>50</sub>을 측정하기 위해 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL의 농도 별로 소거활성을 실시하였다. 그 결과 compound 2는 RC<sub>50</sub>값이 13.1 µg/mL, compound 5는 RC<sub>50</sub>값이 14.5 µg/mL로 ethyl acetate 분획물 보다 좋은 소거능력을 가짐을 알 수 있었다(Figure 30). 또한 compound 4의 경우 대조군인 비타민 C와 유사한 RC<sub>50</sub>값인 4.4 µg/mL의 우수한 radical 소거활성을 가짐을 확인 하였다.

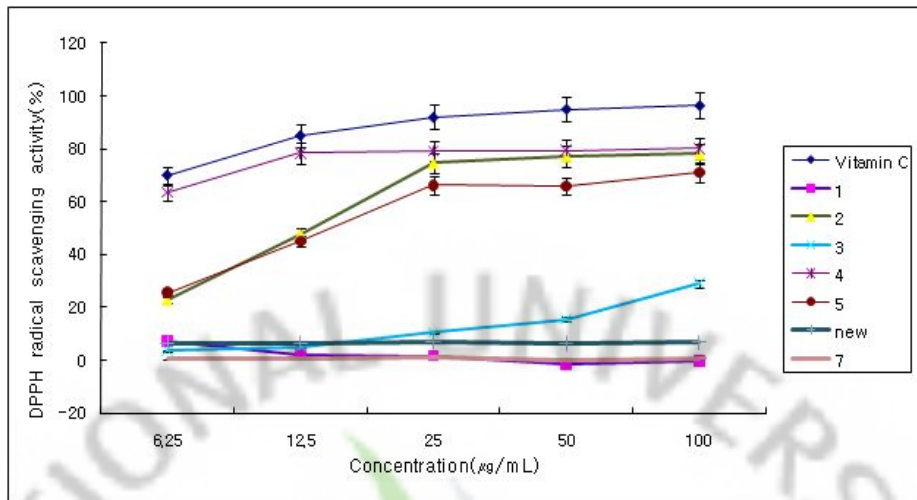


Figure 29. DPPH radical scavenging activities for compounds 1-7

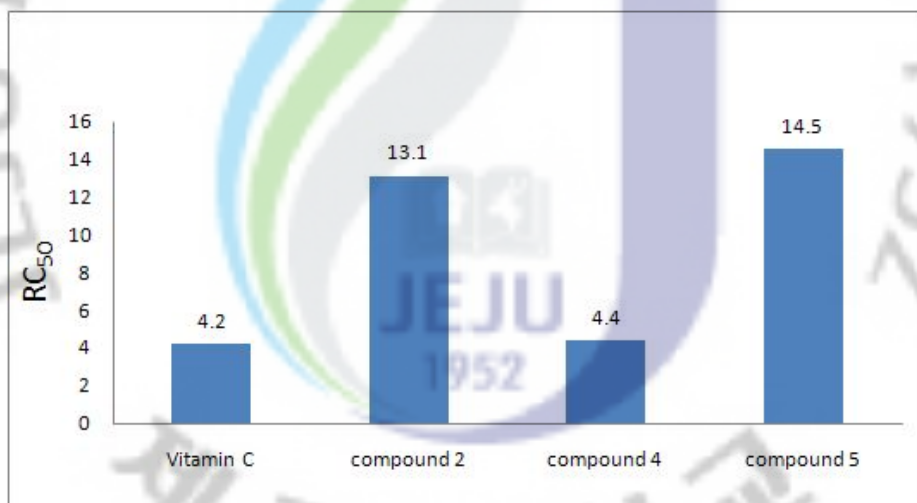


Figure 30. RC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds from *C. lanceolatus*



### 3. Elastase inhibition test

피부조직의 탄력성을 유지하는데 가교결합을 관여하는 elastin을 가수분해하는 효소인 elastase의 활성을 통해 생성되는 *p*-nitroaniline의 양을 흡광도를 측정하여 항주름 효과에 대하여 평가 하였다. 본 실험에서는 농도별로 elastase 활성 억제제를 측정하여 IC<sub>50</sub> 값으로 표현하였다.

#### 3-1. 병솔꽃나무 가지 추출물의 활성 결과

병솔꽃나무 가지의 70% ethanol 추출물 및 분획물을 가지고 elastase 활성 억제 실험을 실시하였다. 시료의 농도가 100 µg/mL일 때 추출물의 경우 67.6%, ethyl acetate fraction 81.8%, butanol fraction 63.9%로 대조군인 oleanolic acid 74.0%와 비교하여 유사한 활성을 보임을 알 수 있었다(Figure 31). 이들의 IC<sub>50</sub>값을 측정하기 위해 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL의 농도별로 저해활성을 측정하였다. 추출물은 IC<sub>50</sub>값이 20.2 µg/mL, EtOAc fr. 11.7 µg/mL, BuOH fr. 40.9 µg/mL로 확인 할 수 있었고(figure 32), 대조군인 oleanolic acid의 IC<sub>50</sub>값인 3.0에 미치지지는 않으나 좋은 억제 효과를 보임을 알 수 있었다.

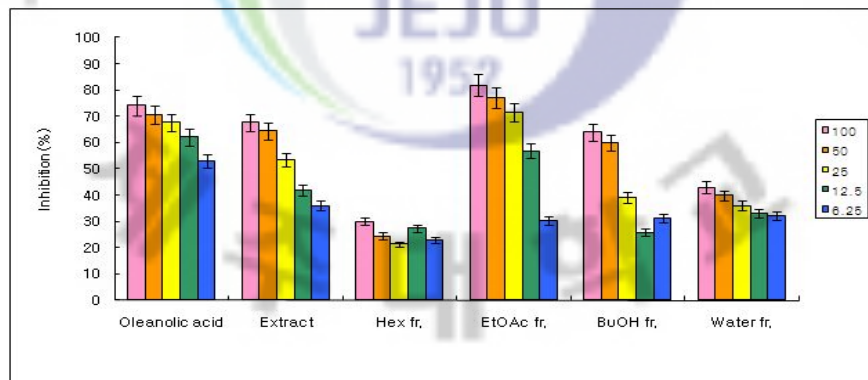


Figure 31. Elastase inhibition activities for extracts

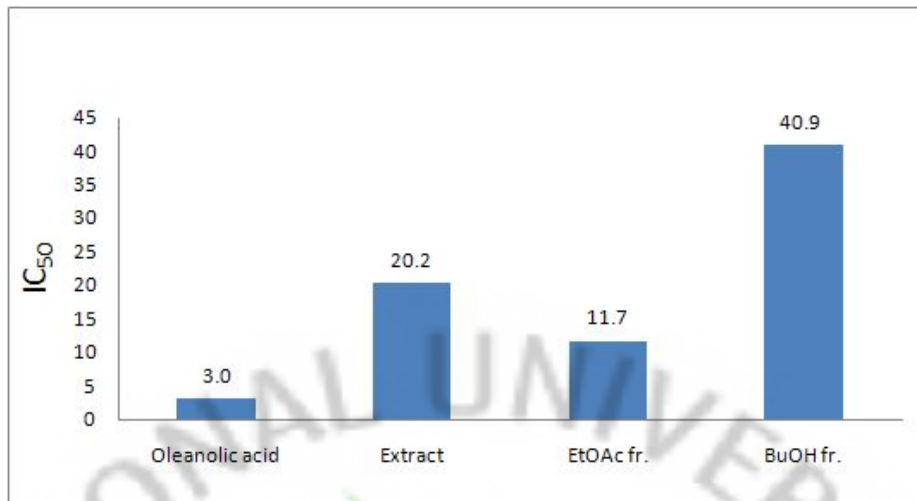


Figure 32. IC<sub>50</sub> value of Elastase inhibition activities for extracts

### 3-2. 병솔꽃나무 가지로부터 분리된 화합물의 활성 결과

Ethyl acetate 분획물에서 분리된 compounds 1-7의 elastase 활성 억제 실험을 실시하였다. Compound 3과 6을 제외하고 모두 좋은 억제 효과를 가짐을 알 수 있었다. 시료의 농도가 100 µg/mL일 때 Compound 1과 4, 5, 7은 각각 73.9%, 80.0%, 71.1%, 65.3% 를 보였으며(Figure. 33) IC<sub>50</sub>값은 각각 21.6 µg/mL, 20.2 µg/mL, 15.6 µg/mL, 17.3 µg/mL으로 확인 하였다(Figure. 34). Compound 2의 경우 농도가 100 µg/mL일 때 65.5%로 대조군인 oleanolic acid의 74.0%보다는 낮은 활성을 보였으나, IC<sub>50</sub>을 계산해본 결과 IC<sub>50</sub>값이 3.0 µg/mL으로 oleanolic acid와 같은 저해 활성을 가짐을 알 수 있었다.

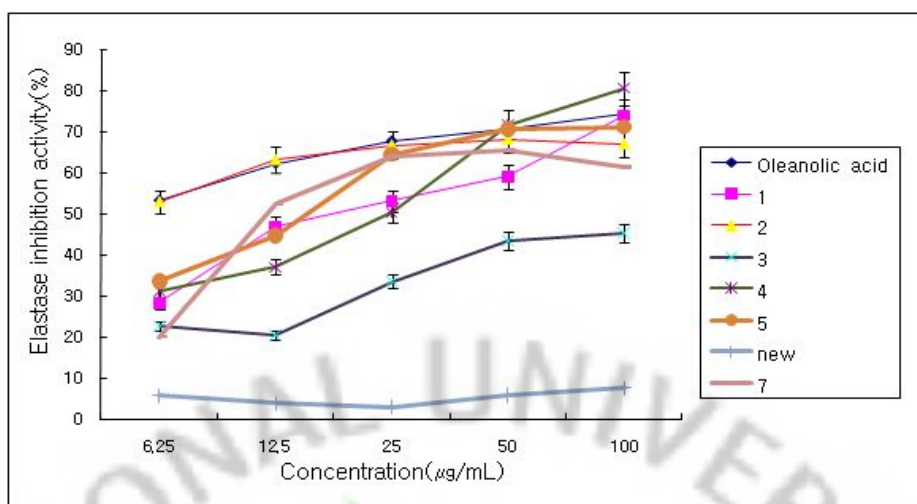


Figure 33. Elastase inhibition activities for compound 1-7

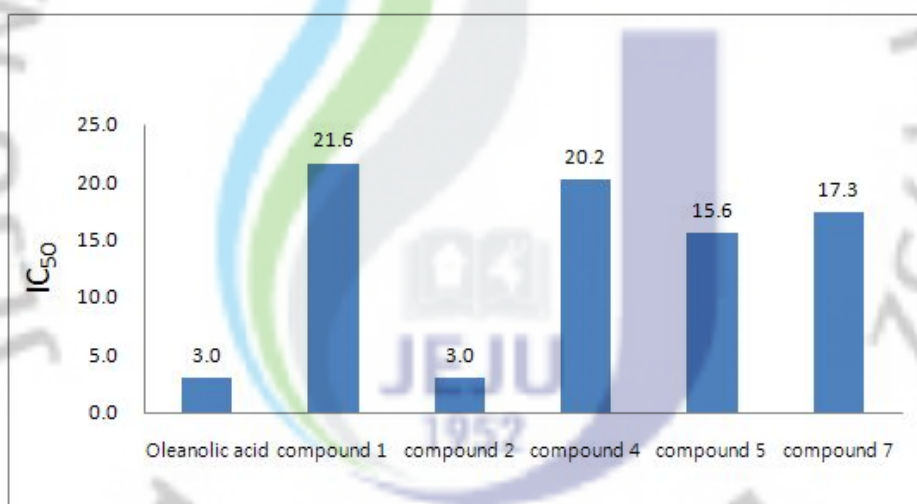


Figure 34. IC<sub>50</sub> value of Elastase inhibition activities for isolated compounds from *C. lanceolatus*

#### 4. NO & MTT assay

Nitric oxide(NO) 생성에 대한 compound 6 의 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 compound 6을 농도별로 처리하였다. 생성된 NO의 양은 Griss 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는  $\text{NO}_2^-$ 의 형태로 측정하였다. 그 결과 세포 독성은 나타나지 않았고, NO의 생성 억제 효과는 나타나지 않았다.

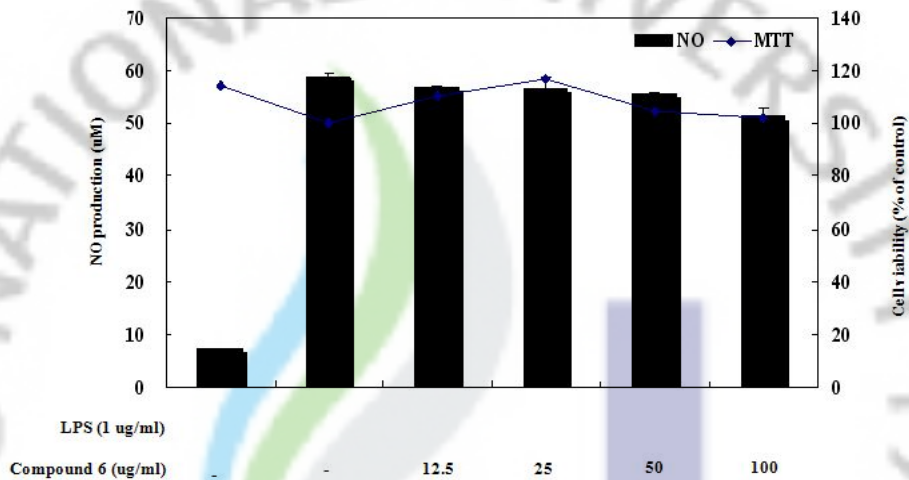


Figure 35. Effects of isolated compound 6 from *C.lanceolatus* on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

#### IV. 요약 및 결론

병솔꽃나무 가지로부터 생리활성 성분을 분리·동정하고, 생리활성 검색을 통해 유효성분의 유·무를 알아보고자 본 연구를 하였다.

병솔꽃나무 가지 70% 추출물을 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법에 의해 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water 순으로 용매분획을 하여 분획물을 얻었다. 이들 중 DPPH radical 소거활성과 elastase 저해 활성을 모두 보이며 다른 분획물 보다 좋았던 ethyl acetate층에 대하여 vacuum liquid chromatography(VLC), sephadex LH-20, normal silica gel column chromatography, prep-HPLC를 실시하여 분리된 분획들을 1D, 2D NMR기기와 IR 및 HR-FABMS를 통하여 확인하였고 문헌들과 비교한 결과 betulinic acid, pyracrenic acid, arjunolic acid, piceatannol, catechin, ursolic acid 3-acetate와 새로운 Dioleate 화합물 1종을 포함하여 총 7개의 화합물을 얻었다.

이 식물의 생리활성을 알아보고자 DPPH radical 소거활성실험과 elastase 저해 활성실험을 추출물과 분획물 및 분리된 화합물에 대하여 각각 실시하였다.

DPPH radical 소거활성의 결과를 보면 추출물 및 분획물의 경우 헥산을 제외하고 모두 좋은 라디칼 소거 활성을 보였다(추출물  $RC_{50} = 17.0 \mu\text{g/mL}$ , EtOAc fr.  $RC_{50} = 19.4 \mu\text{g/mL}$ , BuOH fr.  $RC_{50} = 8.1 \mu\text{g/mL}$ , Water fr.  $RC_{50} = 14.1 \mu\text{g/mL}$ ). 분리된 betulinic acid, arjunolic acid, Dioleate compound, ursolic acid 3-acetate의 경우는 라디칼 소거활성을 보이지 않았으며, pyracrenic acid( $RC_{50} = 13.1 \mu\text{g/mL}$ ), piceatannol( $RC_{50} = 14.0 \mu\text{g/mL}$ )으로 좋은 라디칼 소거 활성을 갖는 것으로 알 수 있었으며 대조군과 보다는 조금 낮은 활성을 보임을 알 수 있었다. 또한 catechin( $RC_{50} = 4.4 \mu\text{g/mL}$ )은 대조군인 비타민 C( $RC_{50} = 4.2 \mu\text{g/mL}$ )와 비슷한 활성을 가짐을 알 수 있었다.

Elastase 저해 활성 실험의 결과를 보면 추출물 및 분획물의 경우 추출물( $IC_{50} = 20.2 \mu\text{g/mL}$ )과, EtOAc fr. ( $IC_{50} = 11.7 \mu\text{g/mL}$ ), BuOH fr. ( $IC_{50} = 40.9 \mu\text{g/mL}$ )층에서 저해 활성을 보임을 알 수 있었다. 분리된 arjunolic acid와 diolate compound는 저해활성을 보이지 않았으며, betulinic acid( $IC_{50} = 21.6 \mu\text{g/mL}$ ),

catechin( $IC_{50} = 20.2 \mu\text{g/mL}$ ), piceatannol( $IC_{50} = 15.6 \mu\text{g/mL}$ ), ursolic acid 3-acetate( $IC_{50} = 17.3 \mu\text{g/mL}$ )는 저해활성을 가짐을 확인할 수 있었다. Pyracrenic acid( $IC_{50} = 3.0 \mu\text{g/mL}$ )의 경우 대조군인 oleanolic acid( $IC_{50} = 3.0 \mu\text{g/mL}$ )와 같은 활성을 가짐을 확인하였다.

이상의 생리활성 검색 결과 pyracrenic acid는 DPPH radical 소거 능력뿐만 아니라, 강한 elastase 저해 활성을 보이는 것으로 확인 되었으며, catechin과 piceatannol 또한 DPPH radical 소거능력과 elastase 저해 활성을 다 가지는 것으로 확인 되었다. 추출물에서 DPPH radical 소거능력과 elastase 저해 활성을 모두 보이는 것은 이 식물에 들어있는 성분들에 의해 나타나는 결과임을 예측할 수 있었다. 따라서 본 연구의 실험결과를 토대로 병솔꽃나무 가지를 이용해 항산화제 및 항 주름 관련 소재 개발 가능성을 기대할 수 있었다.



## V. 참고문헌

- 1) 홍재기. 활성산소에 의한 피부노화와 항산화 비타민의 효능에 대한 이론적 고찰. *대한피부미용학회지*. 2009, 7(2), 51-62
- 2) Lee, K. K.; Kim, J. H.; Cho, J. J. and Choi, J. D. Inhibitory effect of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Inter. J. Cosm. Sci.* 1999, 21(2), 71-82
- 3) 박수남. 피부노화와 활성산소. *서울산업대학교 논문집*. 1999, 50, 329-341
- 4) 태평양 기술 연구원 피부과학 연구소. 화장품 과학자를 위한 피부과학. 화장품과학 총서. 1.
- 5) 김정미, 솔비나무·감태 등의 제주식물로부터 기능성 화장품 소재 개발 연구. *제주대학교 대학원 박사학위 논문*. 2009
- 6) Starkey, P. M.; Barrett, A. J.; Burleigh, M. C. The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases., *Biochimica et biophysica acta*, 1977, 483(2), 386-397
- 7) Brozna, J. P.; Senior, R. M.; Kreutzer, D. L.; Ward, P. A. Chemotactic factor inactivators of human granulocytes. *Journal of clinical investigation*. 197, 60(6), 1280-1288.
- 8) Blondin, J.; Travis, J. The role of lysosomal elastase in the digestion of Escherichia coil proteins by human polymorphonuclear leukocytes: experiments with living leukocytes. *Journal of clinical investigation*. 1976, 58(4), 971-979

- 9) Janoff, A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *American review of respiratory disease*. **1985**, *132*(2), 417-433
- 10) Younes, M. E. G. Chemical examination of local plants. XIV. Triterpenoids from the leaves of Egyptian *Callistemon lanceolatus*. *Australian J. Chem.* **1975**, *28*, 221-224
- 11) Jeong, W. S.; Hong, S.S.; Kim, N. H.; Yang, H. C.; Lee, B. Y.; Eom, S. Y.; Kim, Y. S.; Kim, J. H.; Lee, N. H. Anti-inflammatory activity of *Crinum asiaticum* Linne vat. *japonicum* extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *J. Cosmet. Sci.* **2008**, *59*, 419-430
- 12) Mahmoud, I. I.; Moharram, F. A.; Marzouk, M. S. A.; Linscheid, M. W.; Saleh, M. I. Polyphenolic constituents of *Callistemon lanceolatus* leaves. *Pharmazie*, **2002**, *57*, 494-496
- 13) Marzouk, M. S. A. An acylated flavonol glycoside and hydrolysable tannins from *Callistemon lanceolatus* flowers and leaves. *Phytochem. Anal.* **2008**, *19*, 541-549
- 14) Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*. **1958**, *181*, 1199-1200
- 15) James, A. E. K.; Timothy, D. W.; Claridge and Gordon Lowe. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*. **1996**, *35*, 9090-9096



- 16) Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A.; Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114
- 17) Pan, H.; Lundgren, L. N.; Anderson, R. Triterpene caffeates from bark of *Betula pubescens*. *Phytochemistry*, **1994**, *37*, 795-799.
- 18) Higuchi, R.; Kawasaki, T. Pericap saponins of *Akebia quinata* Decne. I I. Arjunolic acid and norarjunolic acid, and their glycoside. *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 1314-1323.
- 19) 문미연. 개가시나무, 산딸나무 및 벚꽃은 잎의 활성성분 규명. *제주대학교 대학원 석사학위 논문*, **2008**
- 20) Park, Y. K.; Lee, N. H. Anticarcinogenic activity of piceatannol isolated from *Callistemon cetrinus* fruit against *Streptococcus mutans*. *Korean J. Plant Res.* **2008**, *21*, 431-434
- 21) Fujita, R.; Duan, H.; Takaishi, Y. Terpenoid from *Tripterigym hypoglaucum*. *Phytochemistry*, **2000**, *53*, 715-722
- 22) Olafsdottir, E. S.; Omarsdottir, S.; Jaroszewski, J. W. Constituents of three Icelandic *Alchemilla* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2001**, *29*, 959-962
- 23) Santos, G. G.; Alves, J. C. N.; Rodilla, J. M. L.; Duarte, A. P.; Lithgow, A. M.; Urones, J. G. Terpenoids and other constituents of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 1309-1312