

碩士學位論文

붉가시나무 (잎)으로부터  
기능성 화장품 활성 성분의 분리



濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

吳 恩 京

2008年 8月

# 붉가시나무 (잎)으로부터 기능성 화장품 활성 성분의 분리

指導教授 李 南 昊

吳 恩 京

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 8月

吳恩京의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이 선주  
委員 정익상  
委員 李南昊

濟州大學校 教育大學院

2008年 8月

# Isolation of Functional Cosmetic Ingredient from *Quercus acuta* Leaves

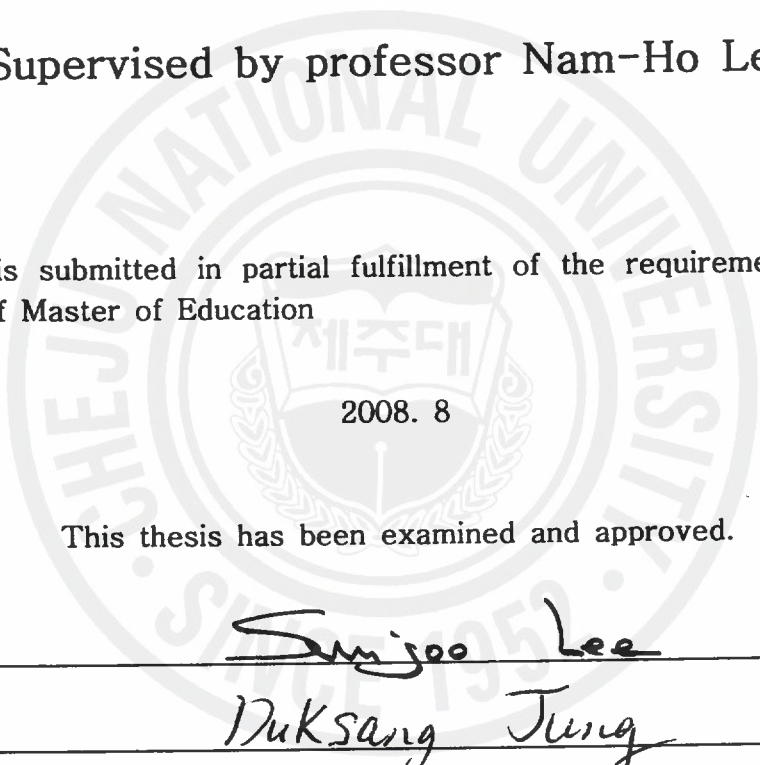
Eun-Kyoung Oh

(Supervised by professor Nam-Ho Lee)

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

2008. 8

This thesis has been examined and approved.

  
\_\_\_\_\_  
Sunjoo Lee

\_\_\_\_\_  
Duksang Jung

\_\_\_\_\_  
Nam Ho Lee

2008, 07.

Date

Major of Chemistry Education  
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

국문초록 .....	i
List of Tables .....	ii
List of Figures .....	iii
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	8
1. 재료 .....	8
2. 시약 및 기기 .....	10
3. 추출, 분획 및 분리 .....	11
3-1. 붉가시나무 잎의 추출 및 분획 .....	11
3-2. 붉가시나무 잎의 활성 성분 분리 .....	12
4. 활성 검색 .....	14
4-1. 항산화 활성 실험 ; DPPH radical 소거 활성 .....	14
4-2. 미백 활성 실험 ; Tyrosinase Inhibition Test .....	17
4-3. 주름 개선 실험 ; Elastase Inhibition Test .....	18
III. 결과 및 고찰 .....	19
1. 에탄올 추출물과 각 용매 분획들에 대한 활성 실험 결과 .....	19
1-1. 항산화 실험 결과 .....	19
1-2. 미백 활성 실험 결과 .....	20
1-3. 주름 개선 실험 결과 .....	21
2. 화합물의 구조 결정 .....	22
2-1. Compound 1의 구조해석 .....	22
2-2. Compound 2의 구조해석 .....	26
2-3. Compound 3의 구조해석 .....	30

3. 화합물에 대한 활성 실험 결과 .....	35
3-1. 항산화 실험 결과 .....	35
3-2. 주름 개선 실험 결과 .....	36
IV. 요약 및 결론 .....	37
V. 참 고 문 헌 .....	38



## 국문초록

본 실험에서는 제주산 식물들의 70% 에탄올 추출물에 대한 활성 테스트를 한 후 활성이 가장 좋았던 붉가시나무 (잎)을 선택하여 활성 성분을 분리하였다.

붉가시나무 (잎)의 70% ethanol 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, butanol, water로 용매 분획하였다.

Ethyl acetate 분획에 대해, celite column chromatography, vacuum liquid chromatography, sephadex LH-20, NP column chromatography를 실시하여 분리된 분획들을 NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 붉가시나무 잎에서 분리한 화합물들을 apigenin, luteolin, quercetin으로 구조 동정하였다.

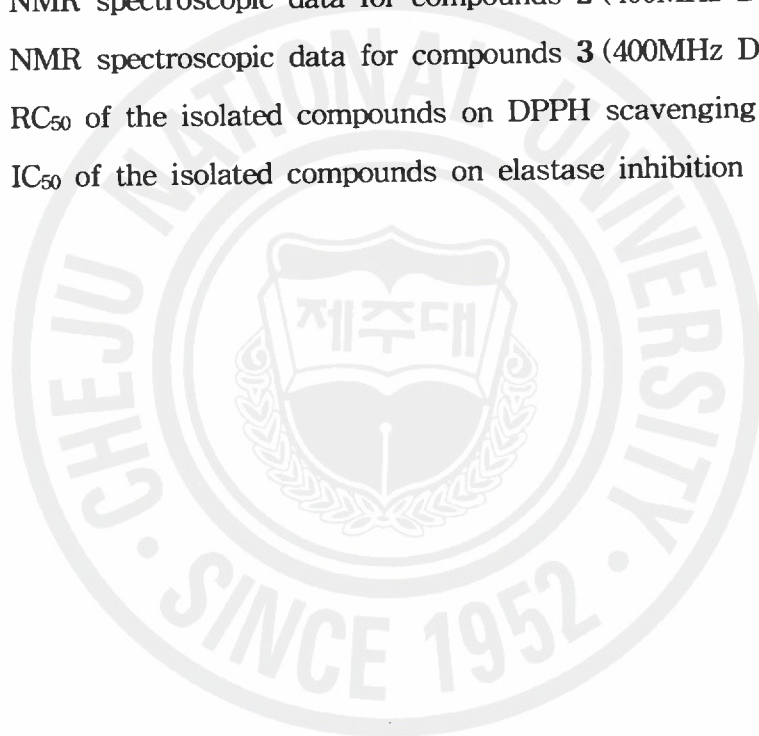
DPPH radical scavenging test 결과 luteolin의  $RC_{50}$  이 8.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  으로 대조군인 비타민 C의  $RC_{50}$ 인 6.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  와 비교하였을 때 우수한 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

Elasatase inhibition test 결과 quercetin의  $IC_{50}$  이 44.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군인 빈랑자의  $IC_{50}$ 인 5.94  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 비교하여 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구의 실험결과를 통하여, 제주도에서 서식하고 있는 붉가시나무 잎에 포함된 화합물을 이용하여 항산화제 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.

## List of Tables

Table 1. DPPH radical scavenging effect of Jeju native plants .....	6
Table 2. Tyrosinase inhibition effect of Jeju native plants .....	7
Table 3. Elastase inhibition effect of Jeju native plants .....	7
Table 4. NMR spectroscopic data for compounds 1 (400MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	25
Table 5. NMR spectroscopic data for compounds 2 (400MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	29
Table 6. NMR spectroscopic data for compounds 3 (400MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	32
Table 7. RC <sub>50</sub> of the isolated compounds on DPPH scavenging test .....	35
Table 8. IC <sub>50</sub> of the isolated compounds on elastase inhibition test .....	36



## List of Figures

Figure 1. The Generation of Free Radical by Environmental Facts .....	1
Figure 2. Procedure of extraction and various fraction from <i>Quercus acuta</i> leaves .....	11
Figure 3. Isolation procedure of the compounds from <i>Quercus acuta</i> leaves	13
Figure 4. Scavenging of the DPPH radical by phenol .....	15
Figure 5. Measurement of DPPH radical scavenging effect .....	16
Figure 6. Measurement of Tyrosinase inhibition effect .....	17
Figure 7. Measurement of Elastase inhibition effect .....	18
Figure 8. DPPH radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>Quercus acuta</i> leaves .....	19
Figure 9. Tyrosinase Inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>Quercus acuta</i> leaves .....	20
Figure 10. Elastase Inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>Quercus acuta</i> leaves .....	21
Figure 11. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d <sub>6</sub> .....	23
Figure 12. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d <sub>6</sub> .....	24
Figure 13. Chemical structure of compound 1 .....	25
Figure 14. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound 2 in DMSO-d <sub>6</sub> .....	27
Figure 15. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound 2 in DMSO-d <sub>6</sub> .....	28
Figure 16. Chemical structure of compound 2 .....	29
Figure 17. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound 3 in DMSO-d <sub>6</sub> .....	31
Figure 18. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound 3 in DMSO-d <sub>6</sub> .....	32
Figure 19. Chemical structure of compound 3 .....	33
Figure 20. Chemical structure of compounds 1-3 .....	34



Figure 21. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 1-3 (100 $\mu$ g /mL) from *Quercus acuta* leaves ..... 35

Figure 22. Elastase Inhibition effect of isolated compounds 1-3 (100 $\mu$ g/mL) from *Quercus acuta* leaves ..... 36



## I. 서론

최근 생활수준이 급속하게 향상됨에 따라 개인 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며, 국가적으로 풍요로움과 건강사회가 구현되는 복지사회국가를 건설하고자 하는 것이 중요 목표가 되고 있다.<sup>1,2)</sup>

첨단과학의 발달과 현대 의학의 혁신적인 발전에 의거하여 사람의 수명이 연장되고 있으며, 이와 더불어 건강에 대한 관심이 날로 높아지면서 성인병, 강장 및 노화의 억제와 관련된 천연 항산화 물질에 대한 연구들이 매우 활발하게 진행되고 있다.<sup>3)</sup>

산소는 지구상에서 가장 많은 원소로서(53.8%) 건조 대기 중의 21%를 차지하고 있으며 호기성 생물은 이렇게 풍부한 산소를 전자 수용체로 하는 호흡을 통해서 생존과 활동에 필요한 에너지(ATP)를 획득한다. 그러나 이와 같이 생명 유지에 절대적으로 필요한 산소이지만 안정한 분자상태인 기저삼중항산소(ground state triplet oxygen)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 superoxide radical( $O_2^-$ ), hydroxyl radical( $HO \cdot$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), singlet oxygen( $^1O_2$ )과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소(active oxygen)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다.<sup>4)</sup>

활성산소종에 관한 연구는 생물학적, 의학적으로 최근 가장 각광받고 있는 분야 중 하나이다. 자외선과 같은 외부 스트레스는 세포 내에서 과량의 활성산소종(Reactive Oxygen Species : ROS)을 발생시키며 이러한 활성산소종은 생체내의 단백질, 세포막, 지방, 핵산 등을 산화시킴으로써 세포의 사멸을 유도하여 암, 관절염, 당뇨병 및 동맥경화증 등 각종 질병을 일으킬 뿐만 아니라, 노인성 치매와 같은 신경 관련 질병, AIDS와 같은 질환과 관련이 있는 것으로 보고 되고 있으며 피부노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Fig-1).<sup>3-9)</sup>

따라서 생체내 free radical의 생성을 억제하는 것은 각종 질병을 예방할 수 있을 뿐만 아니라, 노화 억제에 있어서 매우 중요한 요소로 대두되면서 이에 대한

연구가 활발해지고 있다.<sup>3)</sup>

1956년 Harman에 의하여 노화의 free radical설이 제창된 이후 이설을 지지하는 많은 연구가 보고되고 있는데, 체내에서 발생한 활성산소를 제거하면 인간의 수명을 연장할 수 있다는 것이 이론적으로 가능하다는 보고이다. 활성산소가 심장병이나 암, 뇌 질환등과 관련이 있는 것으로 알려지면서 국내에서도 이에 대한 관심이 높아졌다.<sup>6)</sup>

Free radical이란, 쌍을 이루지 않는 1개의 전자만을 가진 원자 또는 원자단으로 정의한다. 이것은 반응성이 아주 강하고 그 수명이 매우 짧는데, 정상적인 산소는 우리 몸에서 약 100초 이상 머무르는데 반하여 superoxide ( $O_2^-$ ), hydroxyl ( $OH \cdot$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ) 등 유해산소의 수명은 1백만~10억분의 1초에 지나

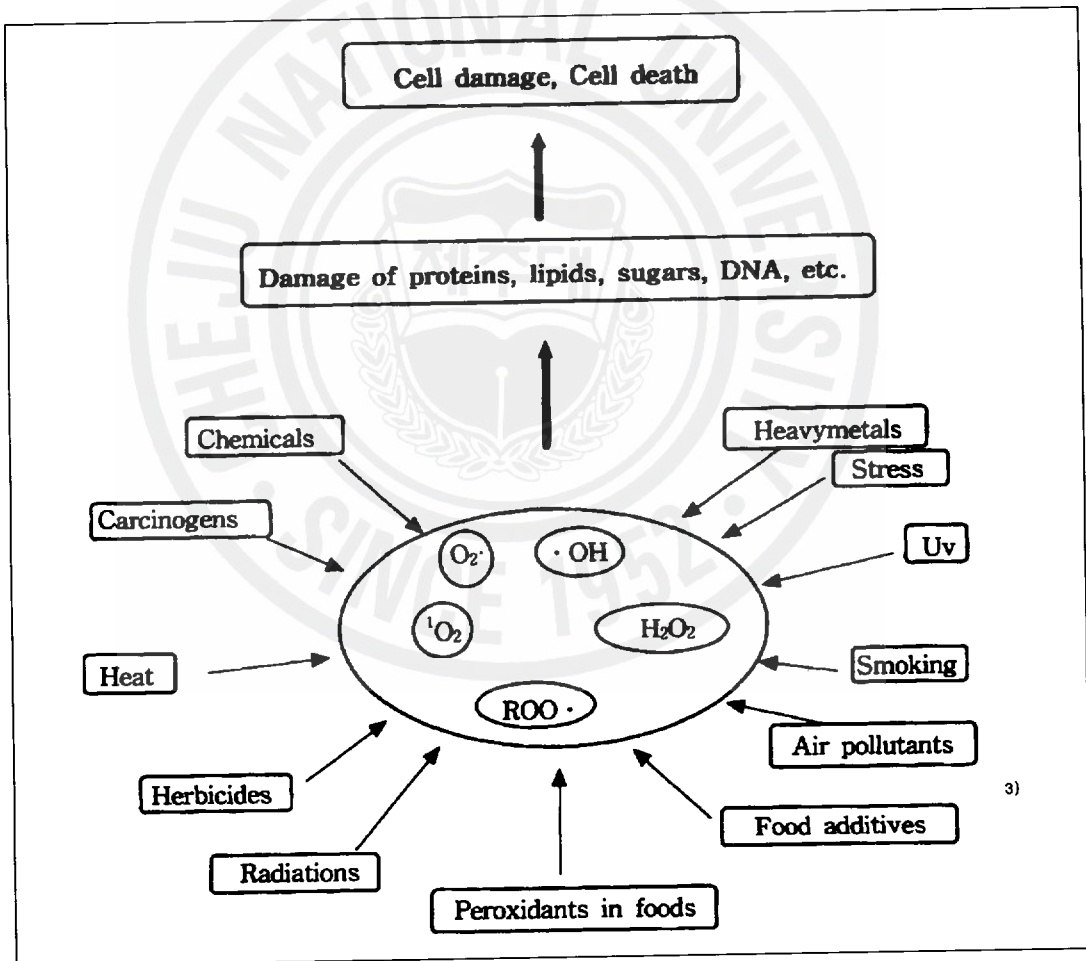


Figure 1. The Generation of Free Radical by Environmental Factors<sup>3)</sup>

지 않는다. 이처럼 짧은 시간이지만 유해산소는 세포막을 형성하는 주성분인 지질의 과산화(lipid peroxidation)현상을 일으켜서 세포막을 파괴하고 각종 신호전달체계와 적혈구를 파괴하기도 한다. 이들 유해산소들은 정상적인 인체의 대사과정에서 끊임없이 만들어지는 물질로서, 통상 우리가 호흡하는 산소의 2~5% 정도는 유해 활성산소로 바뀌어 진다. 유해 활성산소가 위험한 것은 강력한 산화작용 때문인데, 철이 산소와 접촉해 녹슬 듯이 몸 안의 유해 활성산소는 지질, 단백질, DNA를 손상시켜 세포 구조나 기능 신호전달 체계에 이상을 일으킨다.<sup>3)</sup>

항산화제(antioxidant)란 산화성 스트레스(oxidative stress)로 인하여 생성되는 산화물질의 불균화 및 산화 억제 기능을 위해 방어하는 물질 또는 효소로 free radical의 독성을 억제할 뿐만 아니라<sup>3,10)</sup> 유지의 산화속도를 억제하여 주는 물질들이나 요인을 일컫는다. 또한 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하기도 한다.<sup>11)</sup> 이런 항산화제의 작용은 자동 산화의 유도기에서 free radical이나 peroxy radical에서 hydroperoxide를 생성하는 속도를 효과적으로 억제하고 안정한 화합물로 전환시킴으로써 산화를 억제할 수 있다.<sup>2)</sup>

활성산소를 조절할 수 있는 항산화제에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione reductase 등의 효소계열의 예방적 항산화제와 phenol성 화합물, flavone유도체, tocopherol 류, ascorbic acid, carotenoids, glutathione, 아미노산등의 천연 항산화제와 BHA(butylated hydroxy anisole), BHT(butylated hydroxy toluene), PG(propyl), TBHQ(t-butylhydroquinone) 등의 합성 항산화제가 있다.<sup>12)</sup> 그런데 지금까지 널리 이용되어왔던 합성 항산화제인 BHA와 BHT 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 많이 사용되어왔으나 안정성에 논란이 있어<sup>13,14)</sup> 허용대상 식품이나 사용량이 엄격하게 규제되고 있다. 따라서 근래에는 인간이 안전하게 오랫동안 섭취해왔던 천연물로부터, 인체에 안전하고 항산화력이 높은 물질을 분리 이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 천연 항산화제로는  $\alpha$ -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등이 알려져 있는데, 이러한 항산화 효과가 있는 물질은 동식물에 널리 분포되어 있으며, 특히 많은 연구가 이루어진 분야는 식물성 물질들이다.<sup>15)</sup> 특히 식물 유래의 2차 대사산물들은 free radical과 활성산소의 생성을 억제하거나 제거시켜서 산화에 의한 세포손상

을 방지한다는 것이 생체 실험결과 밝혀졌다.<sup>16)</sup> 지금까지 보고 된 대부분의 천연 항산화제는 식물 유래로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있는데,<sup>17)</sup> 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에 활용되어지고 있다.<sup>18)</sup>

세계의 화장품 시장의 규모는 약 2000억 달러에 이르며, 매출비율로 볼 때 EU(28%)와 미국을 중심으로 한 북미(24%)가 높은 비율을 차지하고 있으며, 아시아 국가에서는 일본(14%)이 비교적 높은 시장을 점유하고 있는 반면 한국을 포함한 아시아권은 10% 이내로 저조한 실정이다.

우리나라의 화장품 산업은 적극적인 화장품시장의 개척을 통해 무역적자를 개선하고 고부가가치가 있는 유망한 산업으로 도약시킬 필요가 있는 분야이다. 한편 국내에서는 2000년 7월부터 화장품 법을 시행하여 국내 화장품 산업의 위상을 높여 국가 기간전략산업으로서 기반을 마련하였다. 기능성 화장품 등에 대하여 정의 및 범위를 지정하여 총 26개에 이르는 원료(주름개선, 미백, 자외선 차단)를 고시하기 시작하여 기능성 화장품은 2001년 2천7백9억원의 생산실적을 기록하고 있으며 전체 시장점유율에서도 7.9%로 기초화장용제품류, 메이크업제품류, 두발용제품류에 이어 11개 유형 중 4위에 올라와 있다.

품목별 생산실적을 살펴보면 자외선 차단 제품이 가장 많은 1천5백23억원어치가 생산됐고 주름개선 제품이 6백60억원으로 뒤를 이었으며 미백제품이 5백 150억원어치 생산되었으며 미백화장품의 전체적인 시장규모는 약 800억원에 이른 것으로 판단된다(2003년).<sup>19)</sup>

미백 화장품 특히 동향에 대해 외국 업체들은 90년대 초반까지만 해도 주로 유기 화합물에 대한 출원이 주류를 차지했지만 90년대 후반으로 접어들면서 천연물을 통한 새로운 미백 성분을 집중적으로 연구하고 있는 것으로 나타나 천연 추출물 미백 화장품 성분 연구가 세계적인 흐름으로 정착될 것으로 전망되고 있다.

미백 화장품 소재로는 단풍잎 추출물, 초피나무 씨앗껍질 추출물, 울피와 가자 추출물, 녹차와 빈랑자 추출물 등과 같이 미백 효과는 물론 노화방지 효능까지 겸비한 복합 기능 성분이 출원되고 있으며 또 복합 기능을 희망하는 소비자 욕

구와 더불어 복합 기능의 화장품 관련 기술의 출원이 향후 보다 증가할 것으로 전망된다.<sup>20)</sup>

최근 기능성화, 고급화와 함께 친환경화 경향이 뚜렷이 나타나고 있으며, 이에 따른 한방화장품의 성장과 기능성 화장품의 성장이 돋보인다. 천연 화장품으로 대표되는 한방화장품 시장은 20여개 업체에서 60여 개 브랜드를 선보이고 있으며 2002년 3천5백억원 시장에서 크게 증가할 것으로 추정된다.<sup>21)</sup>

현재 국내의 화장품 분야는 국내시장에서도 의약품의 50%를 이미 넘어섰고, 정밀화학 분야에서도 의약품 다음으로 두 번째 큰 시장을 형성하고 있음에도 불구하고 국내에서는 특히 cosmeceutics(화장품 cosmetics와 의약품 pharmaceuticals의 합성어) 개념을 가진 연구는 미진한 상태이다. 21세기 고부가가치 산업으로 자리매김 할 기능성 화장품 분야가 세계 경쟁력을 갖기 위해서 cosmeceutics로서의 고기능성 신체제의 개발을 위한 연구가 필요하다.<sup>19)</sup>

최근 자연 지향적이고 환경친화적인 소비추세에 따라, 생약을 포함한 식물성 원료에서 해양원료에 이르기까지, 다양한 천연소재를 이용한 화장품의 개발이 이루어져 천연화장품의 전성시대가 도래하고 있다. 웰빙 열풍이 전 세계적으로 거세진 2000년을 기점으로 국내 화장품 마켓에 자연주의를 주요 컨셉으로 한 제품들이 붐몰을 이루고 있으며, 현재 국내에서 판매되고 있는 거의 모든 제품들이 자연주의 화장품임을 내세우고 있을 정도이다. 자연주의 화장품이 포화상태에 이르렀고 자연주의라는 컨셉이 점차 식상해지고 있으며, 유기농이라고 홍보하는 제품들에 대한 소비자들의 신뢰가 떨어지면서 과학적으로 효능이 입증되는 제품과 바이오와 결합된 고기능성 제품이 새롭게 부상할 것이란 예측을 내놓기도 했다.<sup>22)</sup>

제주도는 한반도의 최남단에 위치한 자연환경으로 인한 특이 생물종이 분포해 있고, 공해 산업과 인구 밀도가 적은 청정지역이며, 한라산과 해양에 국내 생물 자원의 50~70%가 서식하여 다양한 천연물이 존재한다. 이러한 제주지역의 특성상 천연물 소재의 기능성 화장품 연구에 유리하다.

본 연구에서는 기능성 화장품 소재 개발을 위해 제주도에 자생하고 있는 10종의 식물을 이용하여 DPPH radical scavenging test, tyrosinase 저해 활성, elastase 저해 활성 등의 활성검색을 하였다(Tables 1~3). 그 중 생리 활성이 좋

고 연구가 많이 이루어지지 않은 붉가시나무(잎)에 대한 분리 및 구조 동정을 하였고, 분리된 화합물에 대한 활성실험을 실시하여 천연 기능성 화장품 소재의 활용여부 및 개발 가능성을 제시하고자 하였다.

Table 1. DPPH radical scavenging effect of Jeju native plants

No.	Sample	Scientific name	DPPH radical scavenging effect
			RC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
1	산다래(잎)	<i>Actinidia arguta</i> Planch. leaves	>200
2	나한송(잎)	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>maki</i> Sieb. leaves	>200
3	나한송(가지)	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>maki</i> Sieb. branch	>200
4	비자나무(잎)	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Siebold & Zucc. leaves	>200
5	비자나무(가지)	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Siebold & Zucc. branch	>200
6	제주조릿대(잎)	<i>Sasa quepaertensis</i> leaves	288.1
7	솔비나무(가지)	<i>Maackia fauriei</i> branch	>500
8	서양측백(잎)	<i>Thuja occidentalis</i> L. leaves	>200
9	서양측백(가지)	<i>Thuja occidentalis</i> L. branch	>200
10	붉가시나무(잎)	<i>Quercus acuta</i> leaves branch	64.17

Table 2. Tyrosinase inhibition effect of Jeju native plants

No.	Sample	Scientific name	Tyrosinase inhibition effect
			IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
1	산다래(잎)	<i>Actinidia arguta</i> Planch. leaves	217.52
2	나한송(잎)	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>maki</i> Sieb. leaves	58.52
3	나한송(가지)	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>maki</i> Sieb. branch	69.29
4	비자나무(잎)	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Siebold & Zucc. leaves	>300
5	비자나무(가지)	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Siebold & Zucc. branch	>300
6	제주조릿대(잎)	<i>Sasa quelpaertensis</i> leaves	246.7
7	솔비나무(가지)	<i>Maackia fauriei</i> branch	86.5
8	서양측백(잎)	<i>Thuja occidentalis</i> L. leaves	105.80
9	서양측백(가지)	<i>Thuja occidentalis</i> L. branch	81.31
10	붉가시나무(잎)	<i>Quercus acuta</i> leaves	42.59

Table 3. Elastase inhibition effect of Jeju native plants

No.	Sample	Scientific name	Elastase inhibition effect
			IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
1	산다래(잎)	<i>Actinidia arguta</i> Planch. leaves	71.84
2	나한송(잎)	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>maki</i> Sieb. leaves	34.45
3	나한송(가지)	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>maki</i> Sieb. branch	31.22
4	비자나무(잎)	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Siebold & Zucc. leaves	>100
5	비자나무(가지)	<i>Torreya nucifera</i> (L.) Siebold & Zucc. branch	>100
6	제주조릿대(잎)	<i>Sasa quelpaertensis</i> leaves	>100
7	솔비나무(가지)	<i>Maackia fauriei</i> branch	>100
8	서양측백(잎)	<i>Thuja occidentalis</i> L. leaves	>100
9	서양측백(가지)	<i>Thuja occidentalis</i> L. branch	>100
10	붉가시나무(잎)	<i>Quercus acuta</i> leaves	>100



## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

붉가시나무(*Quercus acuta*)는 참나무과에 속하며 가새나무, 가랑뿔(전라도), 가시낭, 북가시낭, 홍가시낭, 버레낭(제주도)으로 불린다.

양지바른 산기슭과 계곡에서 자라며 높이 20m, 지름 60cm에 달한다. 줄기는 곧게 자라며 많은 가지와 무성한 잎이 있어 장대한 수형을 이룬다. 수피는 녹색 빛과 회색빛이 도는 검은색이고 어린 가지에 갈색 털이 뽀뽀 나지만 2년생 가지는 털이 없으며 검은 자주색으로 원형 또는 타원형의 피목이 많다.

잎은 어긋나고 처음에는 새 가지와 더불어 노란빛을 띤 갈색 털로 덮이지만 곧 떨어지며 긴 타원형 또는 긴 달걀 모양이다. 잎 앞면은 짙은 녹색이고 뒷면은 노란빛을 띤 녹색이며 가장자리가 밋밋하다. 턱잎은 줄 모양이고 갈색 털이 뽀뽀 나지만 곧 떨어진다.

암수한그루로 꽃은 5월에 피고 미상꽃차례에 달린다. 수꽃이삭은 밑에서 처지고, 암꽃이삭은 위에 달리며 선다. 6개의 화피갈래조각과 3개의 암술머리가 있다. 열매는 견과로서 길이 2cm인 타원형이고 다음해 10월에 익는다. 포비늘은 동심원륜(同心圓輪)이 있다.

한국의 전라남도과 제주도의 해발 350 ~ 500 m에 분포하고 있다.<sup>23)</sup> 일본과 중국, 대만에도 분포한다. 잎의 윗가장자리에 톱니가 있는 것을 개붉가시나무(*for. subserra*)라고 하며 완도에서 자란다.

*Quercus*속 중 잎이 상록이면서 각 두의 포린이 발달하지 않은 수종들(붉가시나무, 가시나무, 참가시나무, 종가시나무, 개가시나무)을 *cyclobalanopsis*속으로 독립시키는 학자도 있다.<sup>24)</sup>

붉가시나무라는 이름은 목재의 색깔이 붉은데서 비롯되었으며,<sup>25)</sup> 목재가 무겁고 잘 쪼개지지 않을 뿐 아니라 보존성이 좋고 잎의 질감이 어느 것보다 좋아서 건축재, 가구재, 기구재(특히 대패의 재료)로 쓰이고 있다.<sup>26-32)</sup> 가을에는 도토리처럼

럼 생긴 열매가 열리고 이 열매는 사람이 먹을 수 있으며, 탄닌 성분이 수렴작용을 하고 설사를 멈추게 하는 작용을 하며, 이질, 대장염, 설사, 젖앓이, 잇몸염, 입안염에 약효가 있다.<sup>33)</sup>

본 연구에서는 제주에서 자생하고 있는 붉가시나무 잎에서 컬럼크로마토그래피를 통해 활성물질을 탐색 및 분리 동정하였다.



## 2. 시약 및 기기

본 실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck 社 제품을 사용하였다. Column packing material은 RP 18 (YMC-GEL ODS-A, 12nm, S-75  $\mu\text{m}$ ), Sephadex<sup>TM</sup> LH-20 (Amersham Biosciences), normal silica gel 60 (230-400mesh ASTM)을 사용하였으며, TLC plate는 silica gel 60 F<sub>254</sub>를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다.

Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. 시료의 흡광도를 측정하기 위해서는 UV/Visible spectrometer는 Biochrom Libra s22 (cambridge Inc., England)를 이용하였으며 구조분석에 이용하였던 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400 (FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며, NMR 측정시 사용되었던 용매는 NMR 전용 Merck 社의 DMSO-d<sub>6</sub>가 사용되었다.

항산화 관련 활성 실험을 하기 위하여 사용하였던 DPPH 시약은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, SIGMA 社)가 사용되었다.

### 3. 추출, 분획 및 분리

#### 3-1. 붉가시나무 잎의 추출 및 분획

건조된 붉가시나무 잎 669.8 g을 70% ethanol 13.4 L에 침적하여, 실온에서 24 시간 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 3회 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% ethanol 추출물 160 g을 얻었다.

이 70% ethanol 추출물을 취하여 H<sub>2</sub>O 1.0 L에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다(Figure 2).

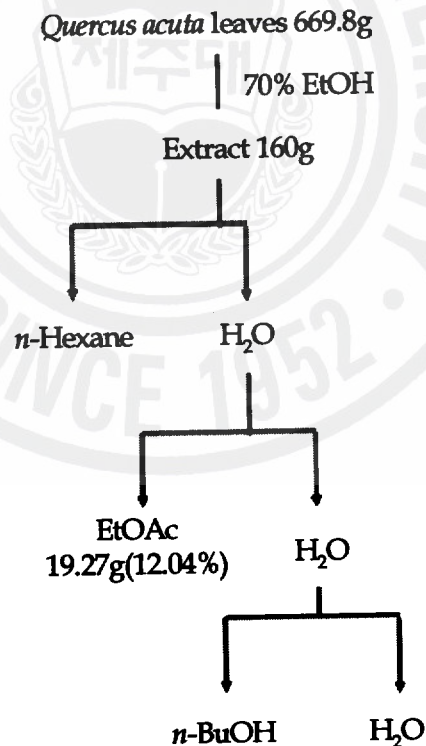


Figure 2. Procedure of extraction and various fraction from *Quercus acuta* leaves

### 3-2. 붉가시나무 잎의 활성 성분 분리

용매 분획하여 얻어진 ethyl acetate fraction(19.27 g, w/w)을 celite로 충전한 glass column을 이용하여 분획을 하였다. 사용된 용출용매는 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, diethyl ether, ethyl acetate, methanol을 사용하여 5개의 분획층을 얻었다.

Celite로 얻어진 diethyl ether 분획물 3.13 g을 전개용매(Hex/EtOAc = 10:1) → (EtOAc/MeOH = 1:10)를 사용하여 step gradient로 vacuum liquid chromatography를 실시해서 TLC로 확인하여 총 6개의 fraction을 얻었다.

VLC로 얻은 6개의 fraction 중 V-3(723.6 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전된 glass column에 loading하여 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용하여 전개시켰다. 이때 얻은 분취액은 TLC로 확인하여 se-1, se-2(318.5 mg), se-3(81.5 mg), se-4(20 mg), se-5(11.2 mg), se-6(58 mg)의 분획물들을 얻었다.

Sephadex 결과 얻어진 se-3을 normal silica gel chromatography를 실시(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10/1)하여 2개의 fraction과 fraction 3-1(1 mg)인 compound 1을 얻었다.

Sephadex 결과 얻어진 se-4 중 MeOH에 녹지 않는 침전을 얻어내어 fraction 4-ppt(1.1 mg)인 compound 2를 얻었다.

Sephadex 결과 얻어진 se-6을 다시 한번 Sephadex LH-20으로 충전된 glass column에 loading하여 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용하여 전개시켰다. 이때 얻은 분취액은 TLC로 확인하여 3개의 fraction과 fraction 6-3(4.9mg)인 compound 3를 얻었다.

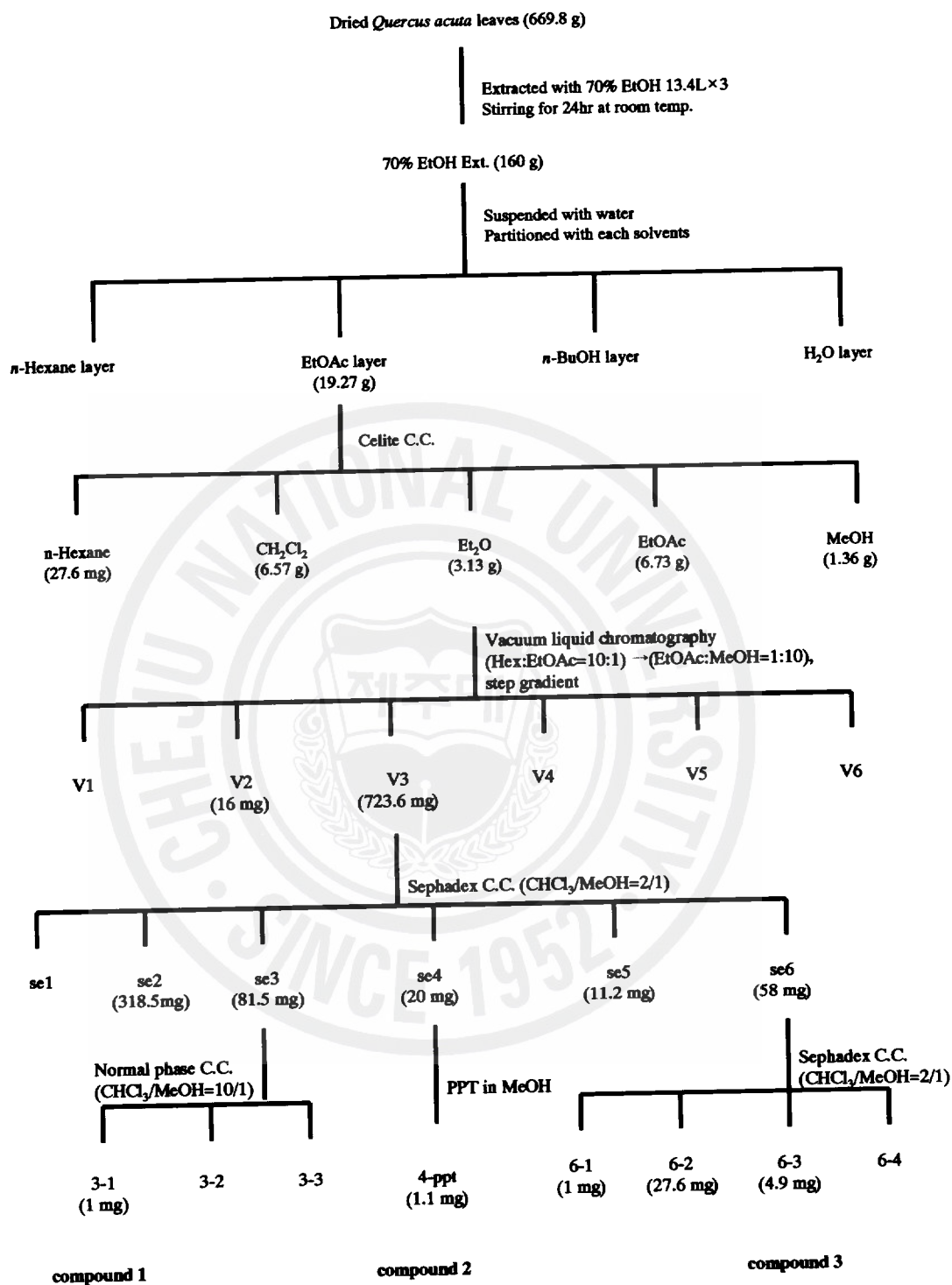


Figure 3. Isolation procedure of the compounds from *Quercus acuta* leaves

#### 4. 활성 검색

##### 4-1 항산화 활성 실험 ; DPPH radical 소거 활성

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 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진 보라색의 DPPH의 색은 점점 옅어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다.<sup>34)</sup>

DPPH 라디칼 소거활성 실험은 Blois 방법<sup>35)</sup>을 응용하여 사용하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 사용하였고, 사용된 용매는 70% ethanol을 사용하였다. 실험 방법은 다음과 같이 실행하였다.

먼저 sample(1 mg/mL) 0.2 mL, 70% EtOH 0.8 mL, DPPH(0.2 mM ) 0.5 mL를 혼합하여, 실온(25°C)에서 10분간 반응시킨 후, 525 nm에서 UV/Visible spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 또한 DPPH를 첨가하지 않고 100% EtOH을 sample과 섞은 후 sample 자체의 흡광도를 측정하였다. 이 두 흡광도를 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 소거활성 백분율이 50%일 때의 시료의 농도(RC<sub>50</sub>)를 계산하였다.<sup>36)</sup>

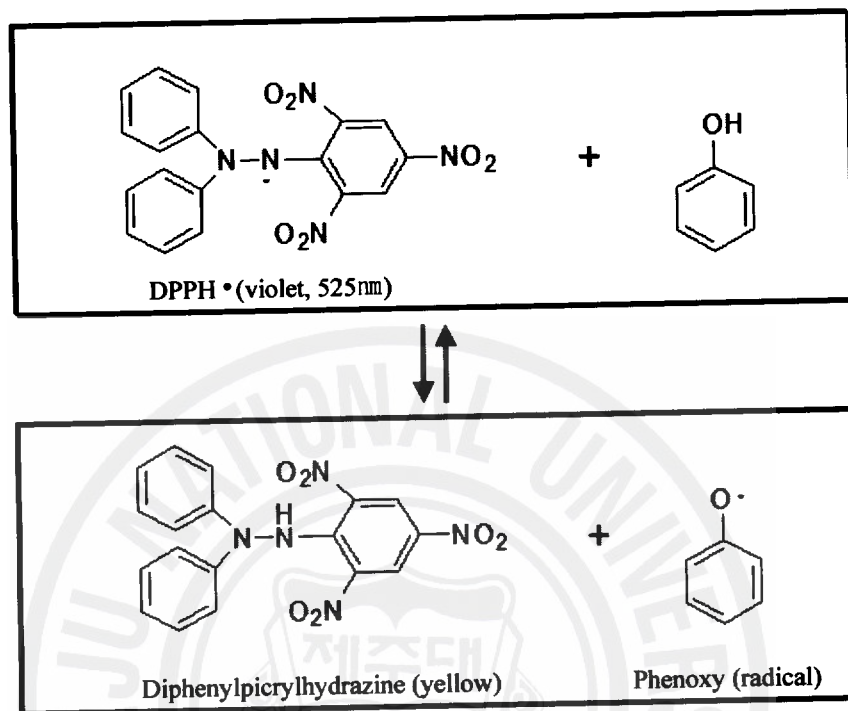


Figure 4. Scavenging of the DPPH radical by phenol



## Free Radical Scavenging Test

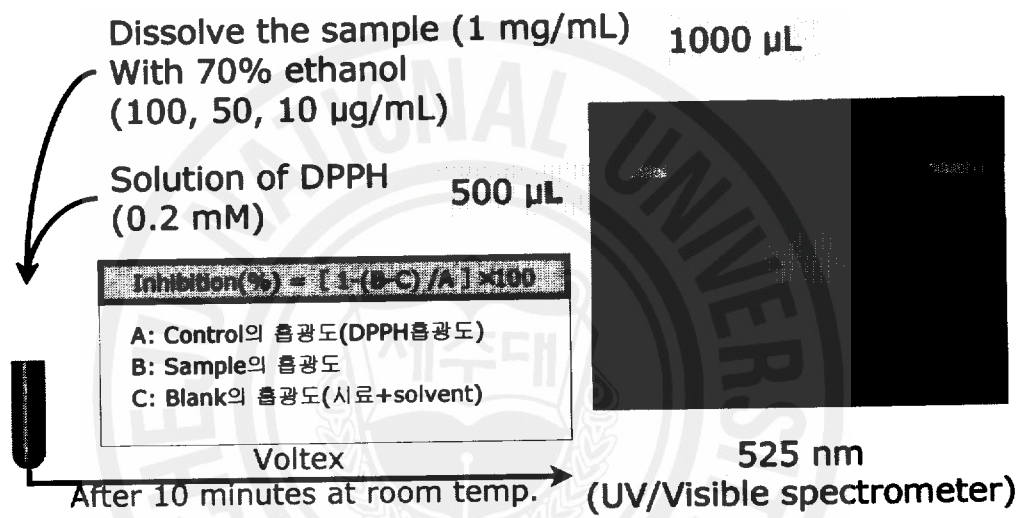


Figure 5. Measurement of DPPH radical scavenging effect

#### 4-2 미백 활성 실험 ; Tyrosinase Inhibition Test

Tyrosinase inhibition test는 DOPA chrome법<sup>37)</sup>을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)를 사용하였고, 기질은 L-tyrosin(L-3[Hydroxyphenyl]alanine)을 사용하였다.

실험방법은 70% EtOH에 녹인 sample(20 mg/mL)에 buffer를 가하여 총 부피가 950  $\mu$ L가 되게 하여 L-tyrosin(0.3 mg/mL) 50  $\mu$ L, mushroom tyrosinase(1250 units/mL) 50  $\mu$ L을 혼합하여, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, 480 nm에서 UV/Visible spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 또한 sample 자체의 흡광도와 buffer의 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 비교하여 tyrosinase 저해활성을 백분율로 나타내고, 저해활성 백분율이 50%일 때의 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였다.<sup>38)</sup>

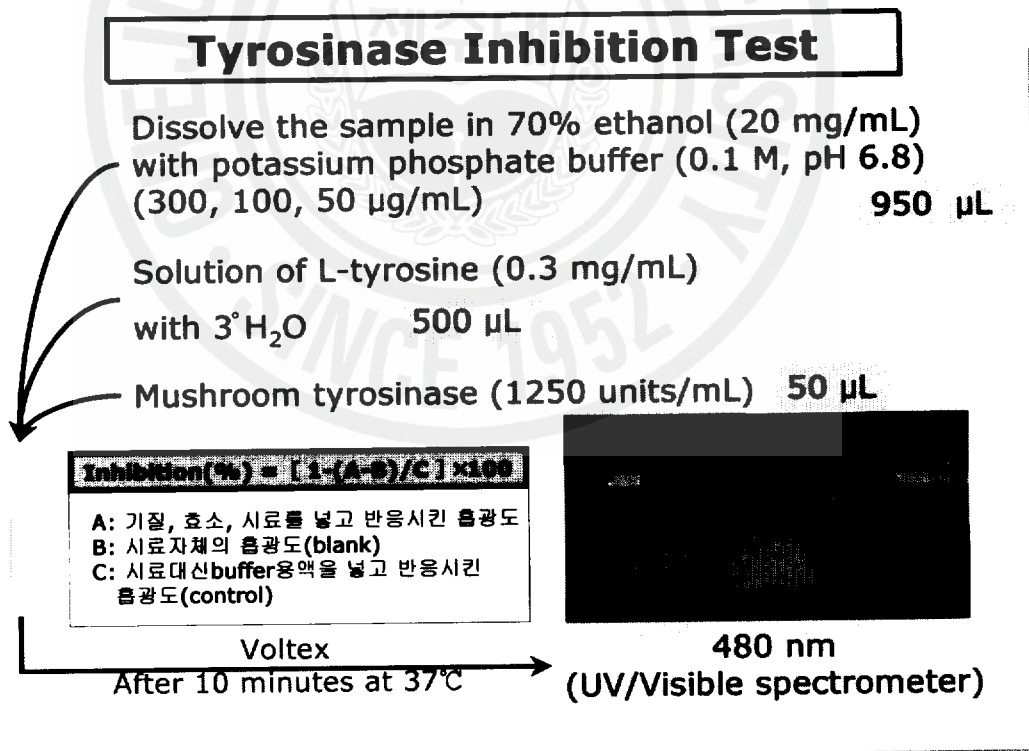


Figure 6. Measurement of Tyrosinase inhibition effect

### 4-3 주름 개선 실험 ; Elastase Inhibition Test

Elastase inhibition test는 James법<sup>39)</sup>을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 사용하였고, 기질은 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid를 사용하였다.

실험방법은 70% EtOH에 녹인 sample(10 mg/mL)에 buffer를 가하여 총 부피가 979  $\mu$ L가 되게 하여(final concentration 100, 50, 10  $\mu$ g/mL), 기질(4 mM) 110  $\mu$ L, elastase(100  $\mu$ g/mL) 11  $\mu$ L를 혼합하여, 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, 410 nm에서 UV/Visible spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 또한 sample 자체의 흡광도와 buffer의 흡광도 등을 측정하였다. 흡광도를 비교하여 elastase 저해 활성을 백분율로 나타내고, 저해 활성 백분율이 50%일 때의 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였다.<sup>40)</sup>

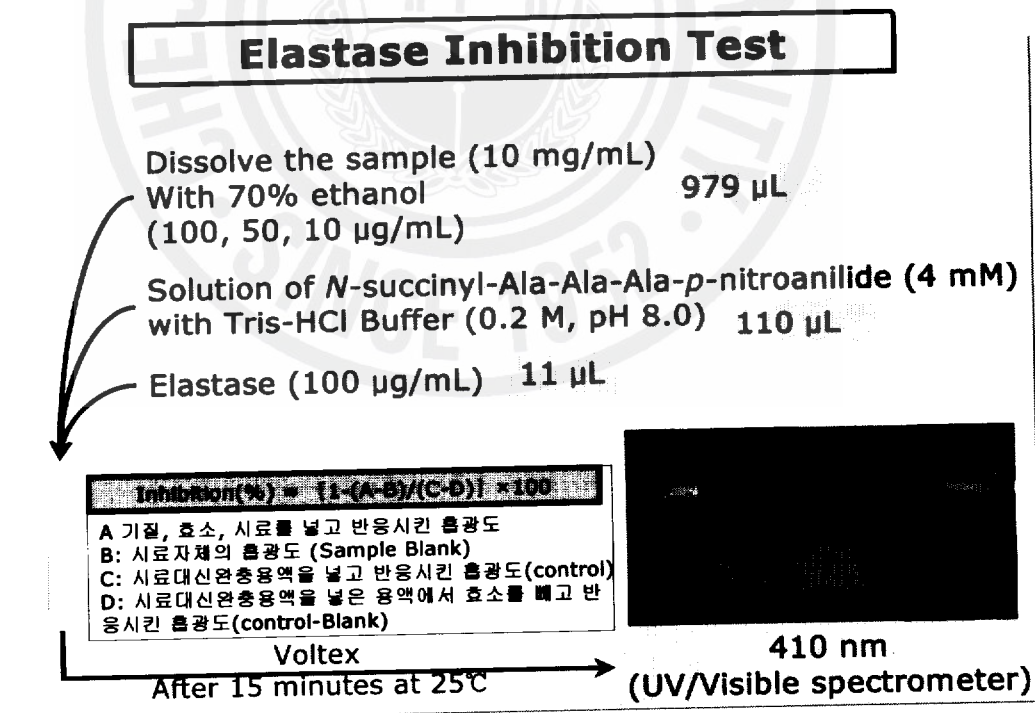


Figure 7. Measurement of Elastase inhibition effect

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 에탄올 추출물과 각 용매 분획들에 대한 활성 실험 결과

##### 1-1 항산화 실험 결과

붉가시나무 잎의 70% ethanol 추출물과 각각의 용매 분획물에 대한 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 70% EtOH 추출물은 54.3%, EtOAc 분획층은 64.2%의 소거 활성을 보였으며, 이는 대조군인 녹차 추출물 (71.9%)과 BHA(79.1%)의 소거 활성과 비교하여 좋은 활성임을 확인할 수 있었다.  $\text{RC}_{50}$  값은 대조군인 녹차 추출물이 24.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며 BHA는 11.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 70% EtOH 추출물은 65.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , EtOAc 분획층은 30.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 좋은 소거 활성을 갖고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

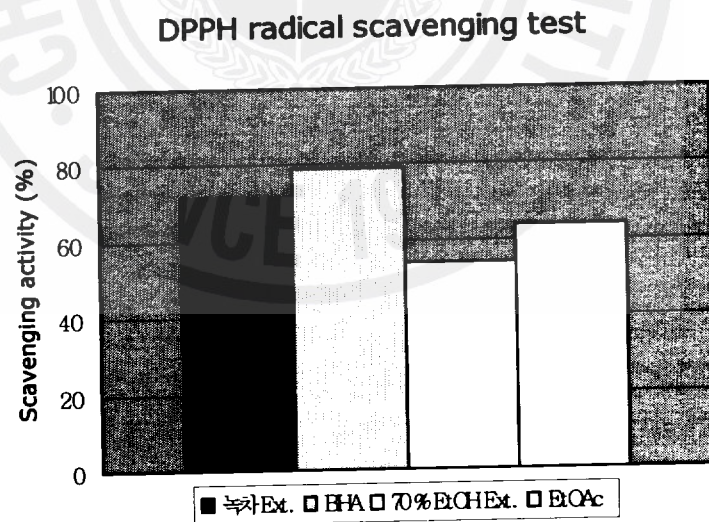


Figure 8. DPPH radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *Quercus acuta* leaves

## 1-2 미백 활성 실험 결과

붉가시나무 잎의 70% ethanol 추출물과 각각의 용매 분획물에 대한 미백 활성을 검색하였다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 70% EtOH 추출물은 46.4%, EtOAc 분획층은 56.1%의 소거 활성을 보였으며, 이는 대조군인 Arbutin (53.3%)과 비교하여 좋은 활성임을 확인할 수 있었다.  $\text{IC}_{50}$  값은 대조군인 Arbutin이 85.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며, 70% EtOH 추출물은 42.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , EtOAc 분획층은 29.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 좋은 소거 활성을 갖고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

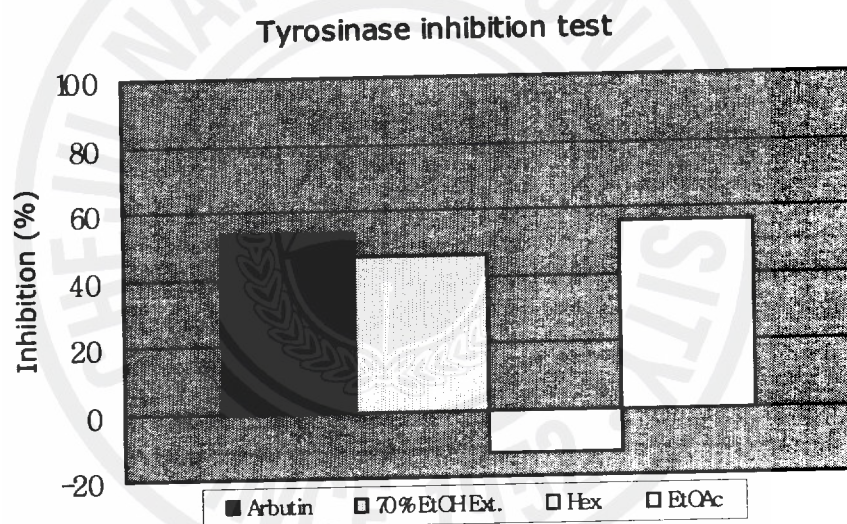


Figure 9. Tyrosinase Inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *Quercus acuta* leaves

### 1-3 주름 개선 실험 결과

붉가시나무 잎의 70% ethanol 추출물과 각각의 용매 분획물에 대한 주름 개선 활성을 검색하였다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 70% EtOH 추출물은 20.0%, EtOAc 분획층은 53.1%의 소거 활성을 보였으며, 이는 대조군인 빈랑자(83.3%)와 비교하여 좋지 않은 활성임을 확인할 수 있었다.  $\text{IC}_{50}$  값은 대조군인 빈랑자가 6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며, EtOAc 분획층은 94.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 활성을 갖고 있지 않았다.



Figure 10. Elastase Inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *Quercus acuta* leaves

## 2. 화합물의 구조 결정

### 2-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR을 측정하였다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  7.92(2H, d,  $J = 9.7$  Hz, H-2' & H-6'),  $\delta$  6.91 (2H, d,  $J = 9.7$  Hz, H-3' & H-5')에서 B-ring의 ortho coupling이 관측되고,  $\delta$  6.78에서 나타난 singlet은 전형적인 apigenin H-3의 peak였으며, A-ring의 두 개의 methine기에 의한 meta coupling이  $\delta$  6.47(1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8)과  $\delta$  6.17(1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6)에서 관찰되었다. 그리고 12.96 ppm에서 5-OH의 signal이 나타났다.

한편  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석에서는 flavonoid C-4번의 위치의 ketone기 peak가  $\delta$  181.74에서 관측되어 flavone 화합물임을 알 수 있었으며, 문헌치<sup>41-42)</sup>와 비교로 aglycone 화합물인 apigenin임을 알 수 있었다. 따라서 Compound 1은 apigenin으로 구조 동정하였다.

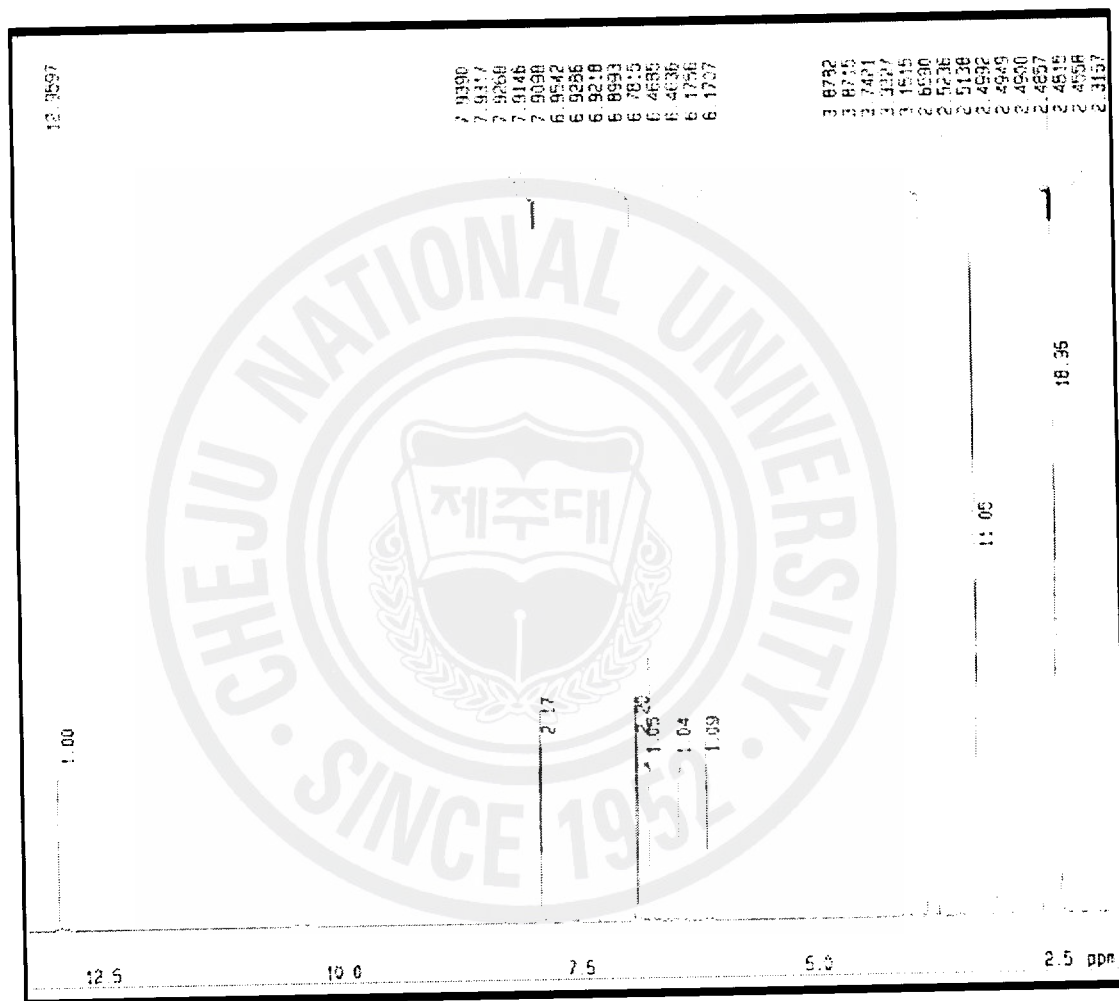


Figure 11.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{DMSO-d}_6$



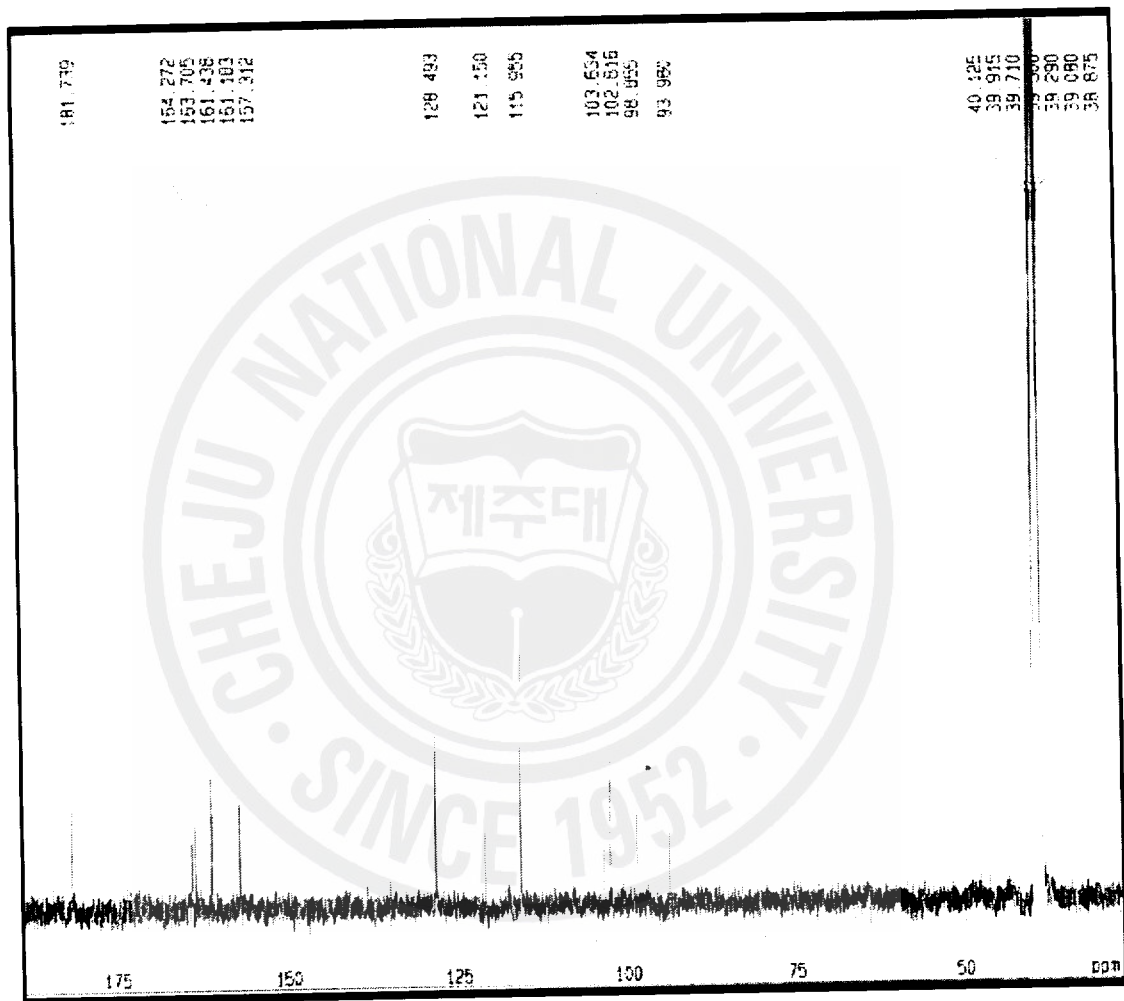
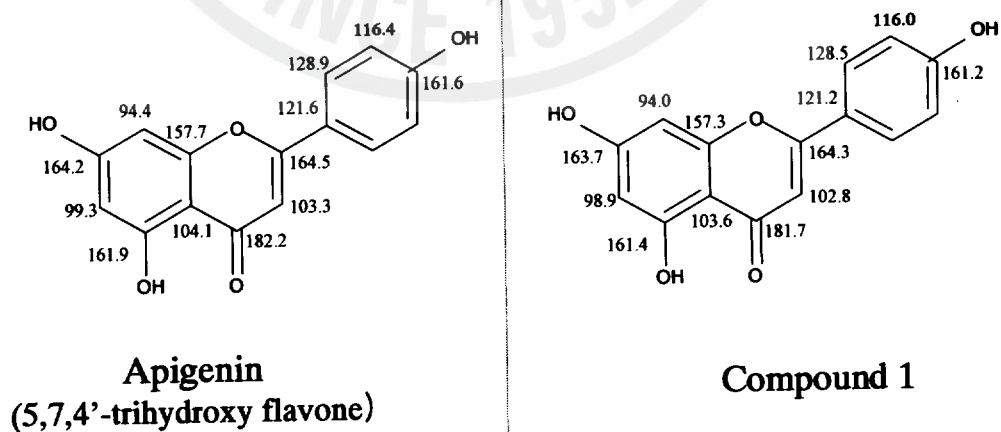


Figure 12.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{DMSO-d}_6$

Table 4. NMR spectroscopic data for compounds 1<sup>43)</sup> (400MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

2		164.5		164.3
3	6.79(1H, s)	103.3	6.78(1H, s)	102.8
4		182.2		181.8
5		161.9		161.4
6	6.20(1H, d, 2.0)	99.3	6.17(1H, d, 2.0)	98.9
7		164.2		163.7
8	6.49(1H, d, 2.0)	94.4	6.47(1H, d, 2.0)	94.0
9		157.7		157.3
10		104.1		103.6
1'		121.6		121.2
2'	7.94(2H, d, 9.7)	128.9	7.92(2H, d, 8.8)	128.5
3'	6.92(2H, d, 9.7)	116.4	6.91(2H, d, 8.8)	116.0
4'		161.6		161.2
5'	6.92(2H, d, 9.7)	116.4	6.91(2H, d, 8.8)	116.0
6'	7.94(2H, d, 9.7)	128.9	7.92(2H, d, 8.8)	128.5

Figure 13. Chemical structure of compound 1



## 2-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR을 측정하였다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 6.50 ppm~8.00 ppm에서 나타나는 signal을 통해 방향족 고리의 수소가 예상되었고,  $\delta$  6.44(1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-8),  $\delta$  6.18 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-6)에서 meta coupling이 관측되고,  $\delta$  7.42(1H, dd,  $J$  = 8.3, 2.2 Hz, H-6')과  $\delta$  7.39(1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-2')  $\delta$  6.88(1H, d,  $J$  = 8.3 Hz, H-5')에서 ortho coupling과 meta coupling을 예측하였다.

한편  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석에서는 탄소수가 15개임을 확인할 수 있었고,  $\delta$  181.6에서 방향족 고리 탄소에 carbonyl group이 존재함을 예상할 수 있었다. 그리고 100ppm~160ppm에서 나타나는 signal을 통해  $\text{sp}^2$  혼성구조를 갖는 방향족 고리의 탄소가 존재함을 예상할 수 있었다.

이상과 같은 정보를 문헌치<sup>44~45)</sup>와 비교하여 luteolin임을 알 수 있었다. 따라서 Compound 2는 luteolin으로 구조 동정하였다.

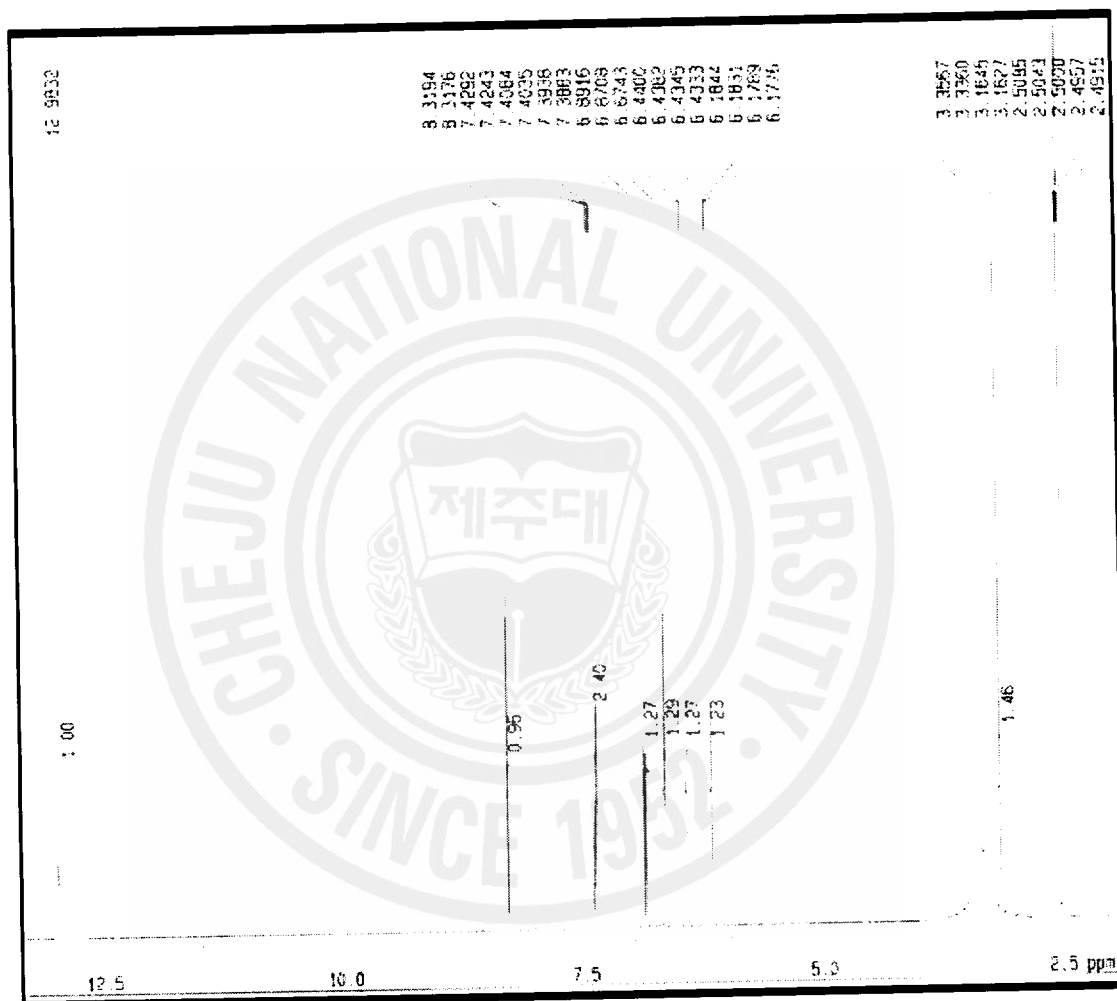


Figure 14.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 2 in  $\text{DMSO-d}_6$

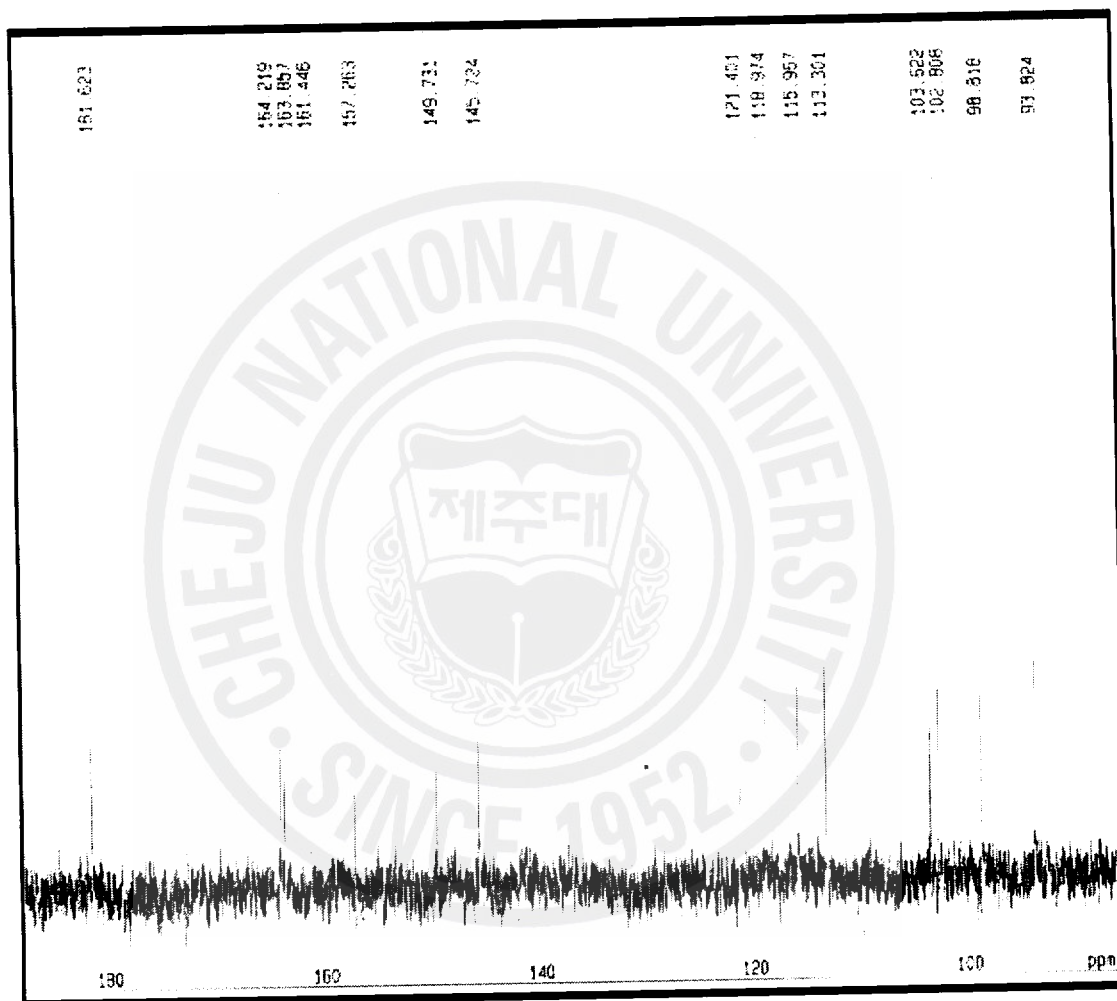
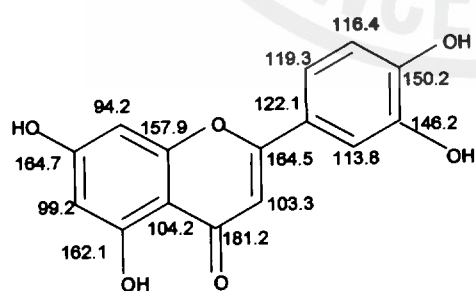


Figure 15.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 2 in  $\text{DMSO-d}_6$

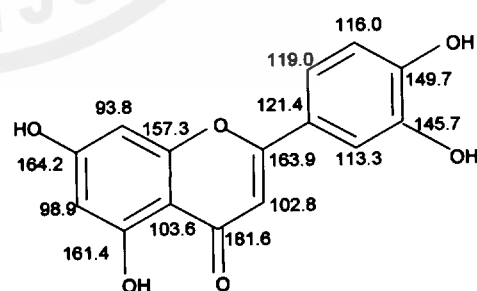
Table 5. NMR spectroscopic data for compounds 2<sup>6)</sup> (400MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

2		164.5		163.9
3	6.64(1H, s)	103.3	6.67(1H, s)	102.8
4		181.2		181.6
5		162.1		161.4
6	6.19(1H, d, 2.0)	99.2	6.18(1H, d, 2.0)	98.8
7		164.7		164.2
8	6.44(1H, d, 2.0)	94.2	6.44(1H, d, 2.0)	93.8
9		157.9		157.3
10		104.2		103.6
1'		122.1		121.4
2'	7.39(1H, br. s)	113.8	7.39(1H, d, 2.2)	113.3
3'		146.2		145.7
4'		150.2		149.7
5'	6.89(1H, d, 8.0)	116.4	6.88(1H, d, 8.3)	116.0
6'	7.40(1H, dd, 8.0, 2.0)	119.3	7.42(1H, dd, 8.3, 2.2)	119.0

Figure 16. Chemical structure of compound 2



**Luteolin**  
(3',4',5,7-tetrahydroxy flavone)



**Compound 2**

### 2-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR을 측정하였다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 aromatic field의 signal이 관찰되는 영역인  $\delta$  6.40(1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8),  $\delta$  6.18(1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6)에서 phloroglucinol A-ring의 전형적인 meta coupling하는 proton signal이 관찰되었으며  $\delta$  7.67(1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'),  $\delta$  7.53(1H, dd,  $J = 8.5, 2.2$  Hz, H-5'),  $\delta$  6.88(1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-6')에서 B-ring에 기인하는 signal로 meta coupling과 ortho coupling하고 있음을 결합정수( $J$ )로 확인하였다. 이러한 결과로 B-ring이 catechol 구조임을 확인할 수 있었고, C-ring과 관련된 proton signal은 관찰되지 않아 flavonol 계열 화합물로 추정할 수 있었다.

한편  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석에서는 135.7 ppm과 147.9 ppm의 signal은 각각 C-3과 C-2로 flavonol 화합물의 특징이다. 147.7 ppm과 145.0 ppm은 B-ring의 C-4'과 C-3'로 hydroxyl group이 결합되어 있는 catechol 구조임을 알 수 있었다. A-ring의 C-8과 C-6은 각각 93.3 ppm과 98.2 ppm에서 나타나며, hydroxyl group이 결합된 C-5, C-7과 C-9는 각각 156.1 ppm, 164 ppm과 160.7 ppm에서 나타남으로써 전형적인 phloroglucinol A-ring으로 구성되어 있음을 알 수 있다.

이상의 결과와 문헌치<sup>47-49)</sup>와 비교하여 quercetin임을 알 수 있었다. 따라서 Compound 3는 quercetin으로 구조 동정하였다.

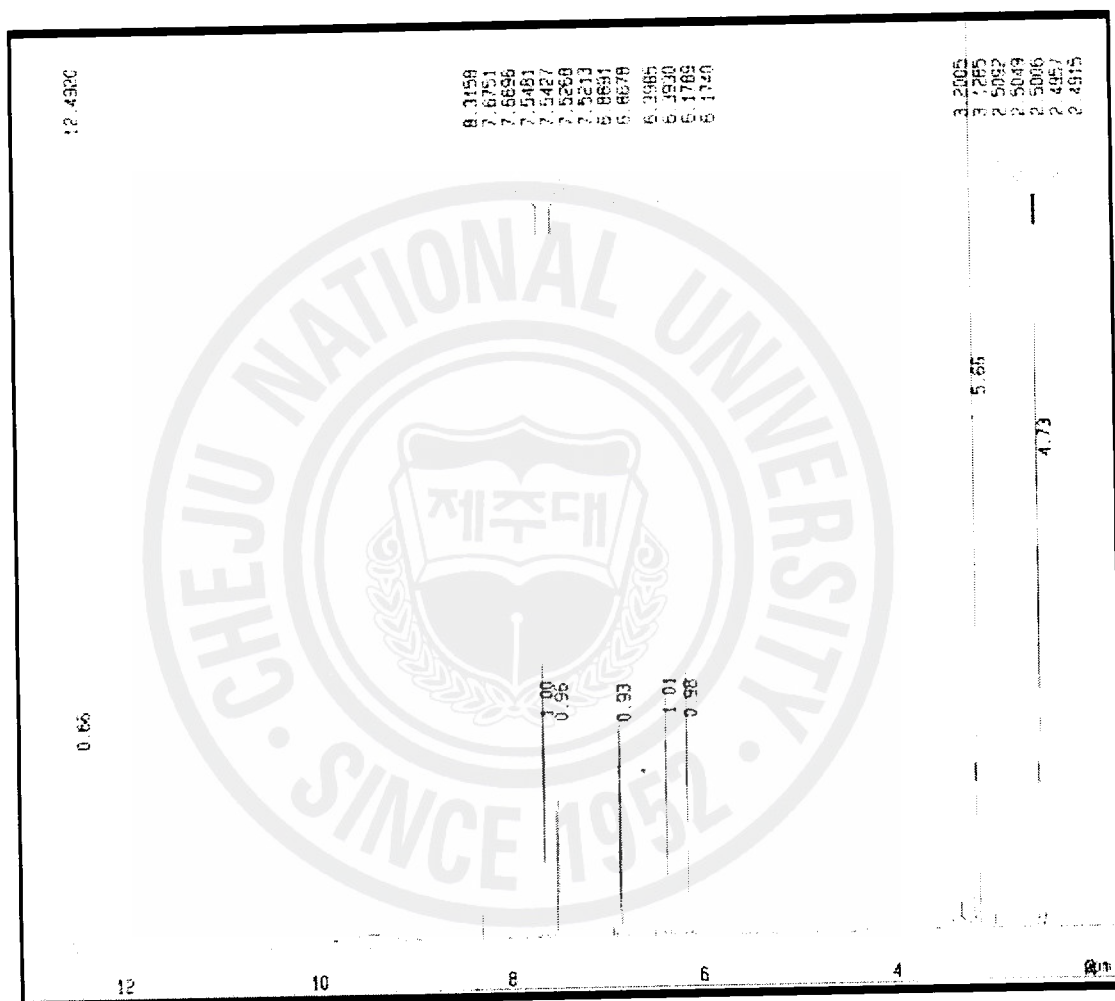


Figure 17.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{DMSO-d}_6$



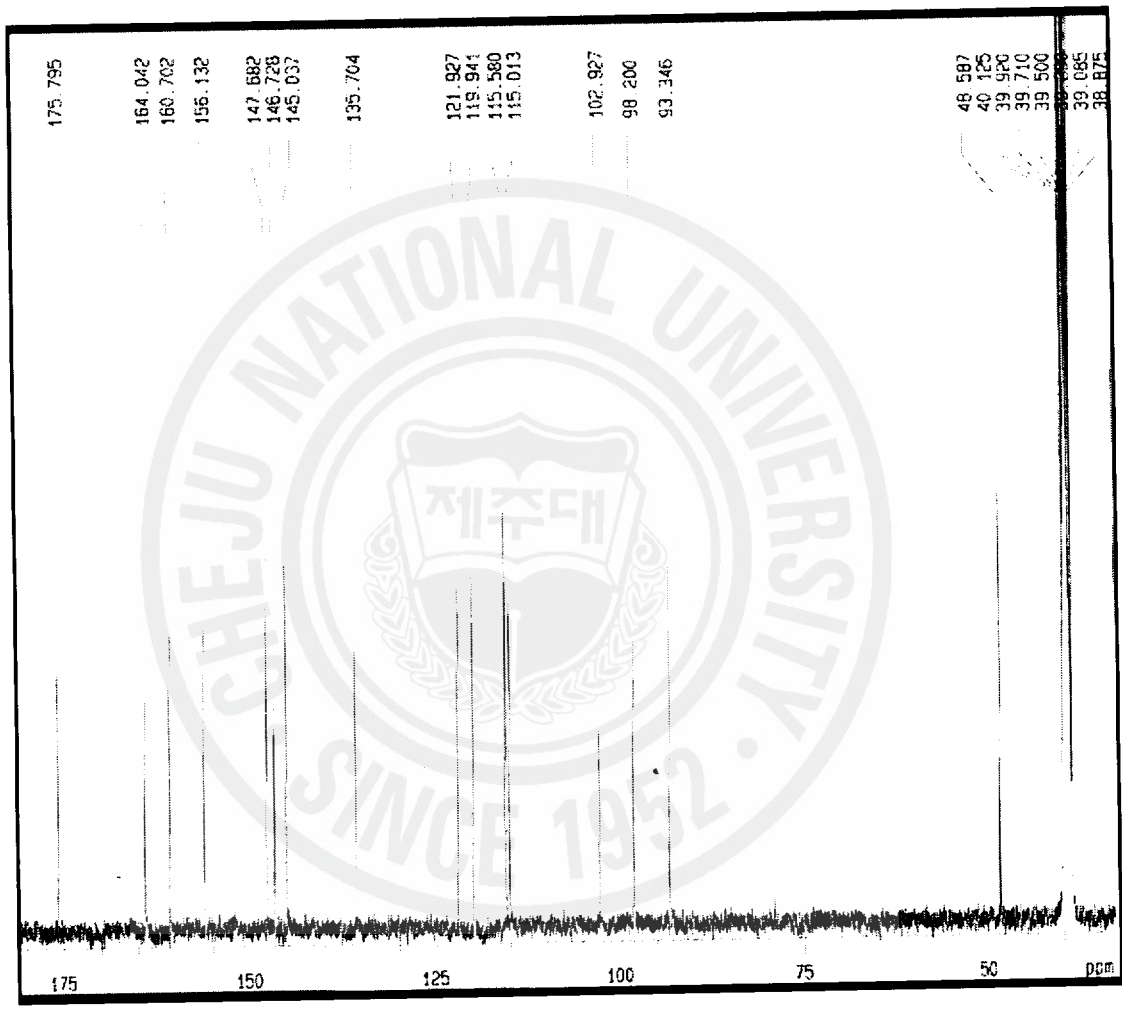
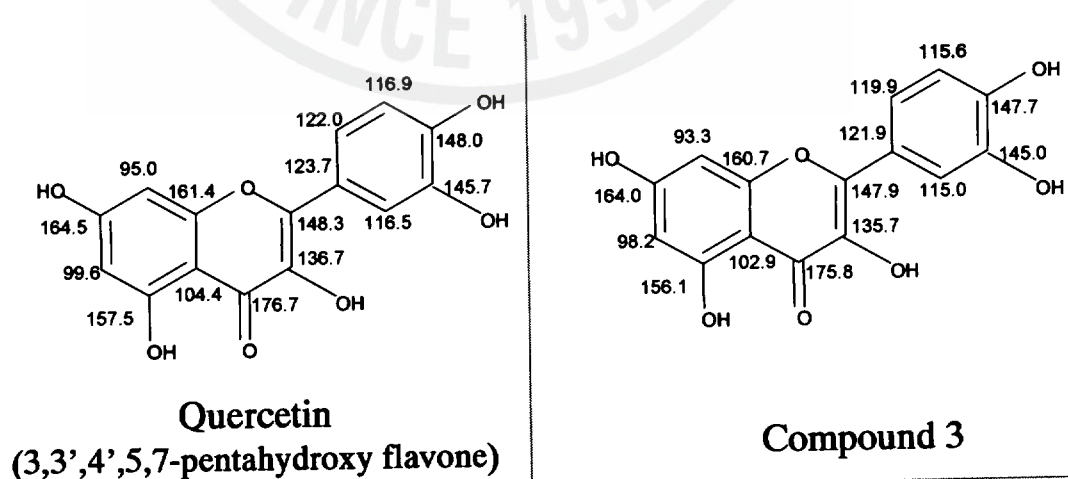


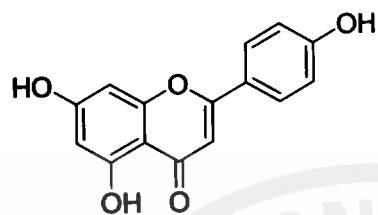
Figure 18.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 3 in  $\text{DMSO-d}_6$

Table 6. NMR spectroscopic data for compounds **3**<sup>50</sup> (400MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

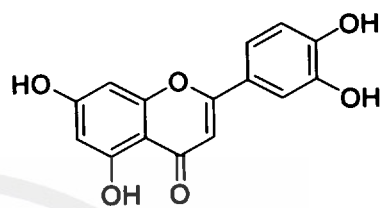
<b>2</b>		<b>148.3</b>		<b>147.9</b>
<b>3</b>		<b>136.7</b>		<b>135.7</b>
<b>4</b>		<b>176.7</b>		<b>175.8</b>
<b>5</b>		<b>157.5</b>		<b>156.1</b>
<b>6</b>	<b>6.27 (1H, d, 2.0)</b>	<b>99.6</b>	<b>6.18 (1H, d, 2.0)</b>	<b>98.2</b>
<b>7</b>		<b>164.5</b>		<b>164.0</b>
<b>8</b>	<b>6.53 (1H, d, 2.0)</b>	<b>95.0</b>	<b>6.40 (1H, d, 2.0)</b>	<b>93.3</b>
<b>9</b>		<b>161.4</b>		<b>160.7</b>
<b>10</b>		<b>104.4</b>		<b>102.9</b>
<b>1'</b>		<b>123.7</b>		<b>121.9</b>
<b>2'</b>	<b>7.82(1H, d, 2.3)</b>	<b>116.5</b>	<b>7.67(1H, d, 2.2)</b>	<b>115.0</b>
<b>3'</b>		<b>145.7</b>		<b>145.0</b>
<b>4'</b>		<b>148.0</b>		<b>147.7</b>
<b>5'</b>	<b>7.70 (1H, dd, 8.5, 2.3)</b>	<b>116.9</b>	<b>7.53 (1H, dd, 8.5, 2.2)</b>	<b>115.6</b>
<b>6'</b>	<b>7.00 (1H, d, 8.5)</b>	<b>122.0</b>	<b>6.88 (1H, d, 8.5)</b>	<b>119.9</b>

Figure 19. Chemical structure of compound **3**

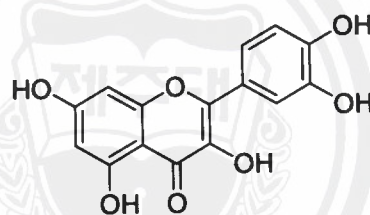




Compound 1 : Apigenin



Compound 2 : Luteolin



Compound 3 : Quercetin

Figure 20. Chemical structure of compounds 1-3

### 3. 화합물에 대한 활성 실험 결과

#### 3-1 항산화 실험 결과

북가시나무 잎의 70% ethanol 추출물에서 분리한 compounds 1-3의 DPPH radical 소거활성을 검색하였다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 compound 2는 75.3%의 소거 활성을 보였으며, 이는 대조군은 비타민 C의 86.5% 와 비교하여 좋은 활성임을 확인할 수 있었다.  $\text{RC}_{50}$  값으로 비교를 해보아도 대조군인 비타민 C가 6.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며 compound 2는 8.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 강력한 소거활성을 갖고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다. 또한, 다른 화합물인 compound 1, compound 3는 각각 7.0%, 39.1%의 소거활성을 가지며, 대조군과 compound 2에 비해 좋지 않은 소거능력을 가지고 있음을 알 수 있었다.

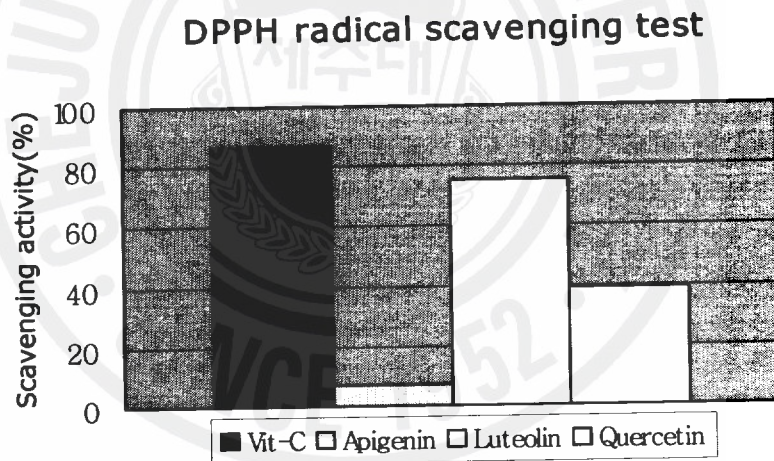


Figure 21. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 1-3 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from *Quercus acuta* leaves

Table 7.  $\text{RC}_{50}$  of the isolated compounds on DPPH radical scavenging test

	Vit-C	Apigenin	Luteolin	Quercetin	Vit-C
$\text{RC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	6.26	>100	8.81	>100	6.26

### 3-2 주름 개선 실험 결과

붉가시나무 잎의 70% ethanol 추출물에서 분리한 compound 1-3의 주름 개선 활성을 검색하였다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 compound 3는 92.6%의 활성을 보였으며, 이는 대조군은 빈랑자의 82.7% 와 비교하여 좋은 활성임을 확인할 수 있었다.  $\text{IC}_{50}$  값으로 비교를 해보아도 대조군인 빈랑자가 5.94  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며 compound 3는 44.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 강력한 소거 활성을 갖고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다. 또한, 다른 화합물인 compound 1, compound 2는 대조군과 compound 3에 비해 좋지 않은 소거능력을 가지고 있음을 알 수 있었다.

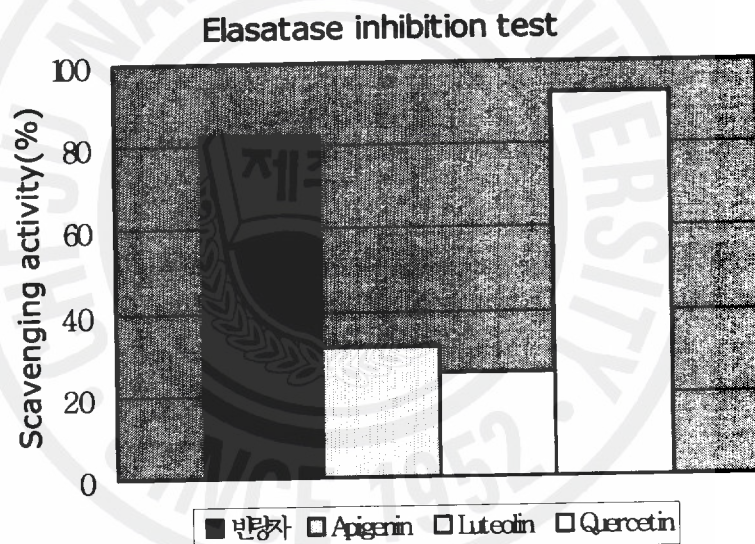


Figure 22. Elastase Inhibition effect of isolated compounds 1-3 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from *Quercus acuta* leaves

Table 8.  $\text{IC}_{50}$  of the isolated compounds on elastase inhibition test

	빈랑자	Apigenin	Luteolin	Quercetin
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5.94	>100	>100	44.55

#### IV. 요약 및 결론

기능성 화장품 소재 개발을 위해 제주도에 자생하고 있는 10종의 식물을 이용하여 DPPH radical scavenging test, tyrosinase 저해활성, elastase 저해활성 등의 활성을 검색하였다. 그 중 생리 활성이 좋고 연구가 많이 이루어지지 않은 붉가시나무(잎)에 대한 분리 및 구조 동정을 하였고, 분리된 화합물에 대한 활성실험을 실시하여 천연 기능성 화장품 소재의 활용여부 및 개발 가능성을 제시하고자 본 연구를 하였다.

붉가시나무 잎의 70% ethanol 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, butanol, water로 용매분획을 하고 ethyl acetate 분획에 대해, celite, vacuum liquid chromatography, sephadex LH-20, normal silica gel chromatography, normal silica gel chromatography를 실시하여 분리된 분획들을 NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 붉가시나무 잎에서 apigenin, luteolin, quercetin을 분리하였다.

Column chromatography를 통하여 분리된 화합물들의 DPPH radical 소거활성 실험을 하였고,  $RC_{50}$ 을 확인해 본 결과, 붉가시나무 잎에서 분리된 luteolin은  $8.81 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 비타민 C ( $6.26 \mu\text{g/mL}$ ) 만큼이나 강력한 소거 능력이 있음을 알 수 있었다. Elastase Inhibition test 결과 quercetin의  $IC_{50}$  이  $44.55 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 빈랑자( $5.94 \mu\text{g/mL}$ )와 비교하여 활성이 있음을 알 수 있었다.

본 연구의 실험결과를 통하여 제주도에 서식하고 있는 붉가시나무 잎에서 분리된 화합물 중에서 활성이 좋았던 화합물을 이용하여 기능성 화장품 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.

## V. 참고 문헌

- 1) 정선우, 당귀와 승검초의 항산화 영향성분과 아질산염 소거능 (Antioxidative components and Nitrite Scavenging ability of root and leaves a *Angelica gigas Nakai*), 충북대학교 대학원 석사학위논문, 2006
- 2) 장현주, 제주도 자생 식물들의 항산화 활성 검색, 제주대학교 교육대학원 석사학위논문, 2007
- 3) 박영미, 천연물로부터 항산화 물질 Screening에 관한 연구 (Study on screening of antioxidant substance from natural products), 建國大學校 農畜大學院 석사학위논문, 2000
- 4) 유익동, 국가지정연구실(NRL)소개 : 항산화소재 연구실 (항산화 기능성 천연 생명공학소재 기술개발) 생물산업, 2002, 15(3), 42~46
- 5) 과학기술부, 활성산소종, 자외선과 항산화제에 의한 세포내 신호전달계 변화 연구, 2004
- 6) 조문정, 모시대(*Adenophora remotiflora*)와 섬쭈부쟁이(*Aster glehni*)의 항산화 영양소 분석과 항산화 활성에 관한 연구 ((A) Study on the Antioxidant Nutrients Analysis and Antioxidative Activities of *Adenophora remotiflora* and *Aster glehni*), 德成女子大學校 一般大學院: 食品營養學科 석사학위논문, 2001
- 7) Nordberg J, Arnr S. Reactive oxyzen species, antioxidants, and the mammallian thiordoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001, 31(11), 287~312.

- 8) Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2001**, 3(5), 323~329
- 9) Ambrosone CB. Oxidants and antioxidants in breast cancer. *Antioxid Redox Signal.* **2000**, 2(4), 903~919
- 10) 김영곤 항산화제, 여문각, **2004**
- 11) 성삼경, 김수민, 조영석, 식물체 추출물의 항산화성 및 아질산염 소거작용 (The Antioxidant Ability and Nitrite Scavenging Ability of Plant Extracts), *한국식품과학회지*, **2001**, 33(5)
- 12) Kang, I.-H. Cha, J.-H. Lee, S.-W. Kim, H.-J. Kwon, S.-H. Ham, I.-H. Hwang, B.-S. Whang, W.-K., *생약학회지*, **2005**, 36(2)
- 13) 양규환, 최석영, 항산화제 BHT 와 BHA 의 안전성 Toxicological Studies of Antioxidants , Butylated Hydroxytoluene(BHT) and Butylated Hydroxyanisole(BHA), *한국식품과학회지*, **1982**, 14(3), 283~288
- 14) Son, J. Y., Rhim, J. H., Son, H. S. Korean J., *Food Nutr.*, **1995**, 8, 88.
- 15) 현선희, 제주 자생식물 추출물의 생리활성, 제주대학교 교육대학원 석사학위 논문, **2007**
- 16) 정성제, 이진희, 송효남, 성낙술, 이승은, 백남인, 약용 식물 추출물의 항산화 활성 검색 (Screening for Antioxidant Activity of Plant Medicinal Extracts), *韓國農化學會誌(Journal of the KoreanAgricultural Chemical Society)*, **2004**, 47(1), 135~140



17) Ho, Chi-Tang, Huang, Mou-Tuan, Lee, Chang Y, Phenolic compounds in food and their effects on health. II , Antioxidants and cancer prevention, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**

18) 김은철, 안소영, 홍은숙, 이광화, 김은기, 노경호, 천연물에 포함된 미백성분의 추출 및 미백효과 (Extraction of Whitening Agents from Natural Plants and Whitening Effect), *공업화학(Journal of the Korean industrial and engineering chemistry)*, **2005**, 16(3), 348~353

19) 식품의약품안전청, 천연물을 이용한 기능성화장품에 대한 평가기술 개발 (Development of evaluation techniques on cosmeceuticals using natural : evaluation techniques of whitening and anti-oxidative cosmetics using natural products contained tannin and related phenolic compounds), **2004**

20) 조종성, 강박광, 과학기술부, 한국과학기술정보연구원, 화장품 기능성 원료 개발동향, **2006**

21) 박무현, 과학기술부, 천연물을 이용한 기능성 물질 개발 및 이용 : 고경력 과학기술자를 활용한 기술정보분석, **2005**

22) <http://thedailycosmetic.com>, 최지홍 기자

23) 오구균, 고정균, 김태환, 한라산 돈내코계곡의 해발고별 식물군집분포, *한국환경생태학회지*, **2007**, 21(2), 141~148

24) 아름다운(강산)아름다운(꽃)

[http://cafe.naver.com/tiger20.cafe?iframe\\_url=/ArticleRead.nhn%3Farticleid=3915](http://cafe.naver.com/tiger20.cafe?iframe_url=/ArticleRead.nhn%3Farticleid=3915)

25) 나무 이름의 유래, 산림지. **1998**, 9월호

- 26) 제주식물도감 (濟州植物圖鑑)
- 27) 두산백과사전 EnCyber &EnCyber.com
- 28) 들뢰곶간 [http://plant.ecolib.kr/flora/dir/main.php?d\\_id=54&ac\\_id=1555](http://plant.ecolib.kr/flora/dir/main.php?d_id=54&ac_id=1555)
- 29) 국가생물종지식정보시스템 <http://www.nature.go.kr/>
- 30) 신현철, 박남창, 황재홍, 한국의 난대수종, 국립산림과학원, 2006
- 31) 손석규, 제주유망수종 신품종 육성, 국립산림과학원, 2006
- 32) 박영하, 제갈영, 우리나라 나무 이야기, 이비락, 2004
- 33) 약초의 성분과 이용, 과학백과사전출판사, 1984
- 34) 문미연, 개가시나무, 산딸나무 및 벚꽃은잎의 활성성분 규명, 제주대학교 일반대학원 석사학위논문, 2008
- 35) Blois M. S., et al., Editdrs Free Radicals in Biological Systems. 1961, 405
- 36) 고동우, Purification and Identification of Antioxdants from Canavalia lineata, 제주대학교 교육대학원 석사학위논문, 2006
- 37) Gutfinger, T. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1981, 58, 966
- 38) 윤진석, 손바닥 선인장 (*Opuntia ficus-indica*)의 라디칼 소거 활성, Tyrosinase 억제 활성, 항알레르기 활성 검색 및 유효성분 분리 (Separation of Active Components, and Screening of the Radical Scavenging Effects,

Tyrosinase Inhibition and Anti-allergic Activities Using *Opuntia ficus-indica*),  
제주대학교 일반대학원 석사학위논문, 2001

39) James, A. E. K., Timothy. D. W., Gordon, L. *Biochemisty*. 1996. 35, 9090

40) 고려경, 종가시나무, 조록나무 및 수련을 이용한 기능성 화장품 활성성분 규  
명, 제주대학교 일반대학원 석사학위논문, 2008

41) Li, T. M., Li, W. K., Yu, j. G., flavonoids from artabotrs hexapetalus,  
*Phytochemistry*, 1997, 45, 831-833

42) Ha, Tae Joung Hwang, Sun Woo Jung, Hwa Jin Park, Ki Hun Yang, Min  
Suk, Apigenin, Tyrosinase Inhibitor Isolated from the Flowers of *Hemisteptia*  
*lyrata* Bunge, *Agricultural Chemisity and Biotechnology*, 2002, 45(4), 170~172

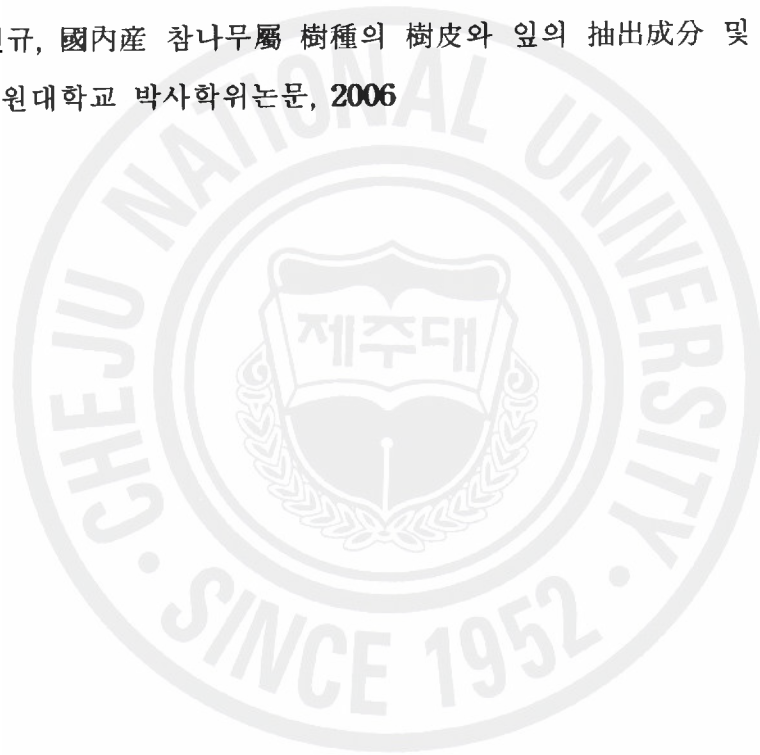
43) 최장기, 고추 잎의 라디칼 소거작용과 apigenin 화합물의 분리 및 화학구조  
결정(DPPH Radical Scavenging Activity and Isolation of Apigenins from the  
Leaves of *Capsicum annum*), 순천대학교 대학원 석사학위논문, 2006

44) 부희정, 산박하를 포함한 제주식물로부터 기능성화장품 원료 개발, 제주대학  
교 일반대학원 박사학위논문, 2008

45) 김대경, 제주산 들깨풀(*Mosla puntulata* Nakai)로 부터 분리된 Luteolin의 구  
조 확인 및 생리활성에 관한 연구, 제주대학교 일반대학원 석사학위논문, 2008

46) 위지향, 땅콩껍질에 함유된 항미생물 및 항산화 물질의 구조해석과 특성  
(Characterization and Identification of Antimicrobial and Antioxidative  
Substances in Peanut Shells), 전남대학교 대학원 박사학위논문, 2003

- 47) Lee, S. K., W. G. Park., Y. S. Bae., Procyanidins from *Lindera obtusiloba* bark. *Mokchaekonhak*. **1997**. 25(2), 110~116
- 48) Chang, Y. C., F. R., Chang and Y. C. Wu. The constituents of *Lindera glauca*, *J. Chin. Chem. Soc.*, **2000**, 47, 373~380
- 49) 노미애, 약용식물로부터 항산화 물질의 탐색 (Screening of Antioxidant Substance from Medicinal plants), 상지대학교 대학원 석사학위논문, **2006**
- 50) 김진규, 國內産 참나무屬 樹種의 樹皮와 잎의 抽出成分 및 生理活性에 關한 研究, 강원대학교 박사학위논문, **2006**



## 감사의 글

추운 겨울, 대학원에 진학하겠다는 결심을 하고 제주대학교 교정을 찾았던 것이 바로 엇그제 같은데 벌써 졸업을 앞두고 있습니다. 2년 반이라는 짧은 대학원 기간은 저에게 많은 것을 느끼고 배울 수 있게 해주었고, 그로 인해 저의 부족함을 더욱 더 깨닫게 해 준 소중한 시간이었습니다.

어린 아들들을 키우며 학업을 병행하는 일이 결코 쉽지는 않았지만 뒤처지지 않고 무사히 졸업을 할 수 있게 된 것은 그동안 저를 도와주시고 격려해주신 많은 고마운 분들이 계셨기에 가능했던 일이라는 것을 알기에 그분들께 감사한 마음을 전하고 싶습니다.

우선 대학원 생활 동안 따뜻한 관심으로 격려해주시고 본 논문이 완성될 수 있도록 아낌없는 지도로 이끌어 주신 이남호 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 실험이 잘되지 않아 힘들어 할 때마다 세세한 투정과 고민까지 진심으로 걱정해주신 이남호 교수님의 배려가 없었더라면 지금 이 순간은 다른 결과로 나타났을 것입니다. 복도에서 마주칠 때마다 ‘니 열심히 하네~’하며 웃어주시던 시인 같은 변종철 교수님, 한결 같은 미소를 지어주시던 정덕상 교수님, 늦은 시간까지 실험하느라 고생한다고 격려해주시며 더 늦은 시간까지 학교에 계시던 강창희 교수님, 늘 즐거운 표정으로 용기를 주시던 멋쟁이 이선주 교수님, 재미있는 이야기뿐만 아니라 여러 가지 조언도 아낌없이 해주시던 김덕수 교수님, 다정하게 저희를 감싸주시며 오랜 친구처럼 편안하게 대해주시던 김원형 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다.

‘실험’이라는 낯선 세계에서 헤맬 때, 많은 관심과 조언으로 인도해주신 백종석 선생님, 털털하고 성격 좋은 웃음으로 고민을 들어주시던 지아 선생님, 꼼꼼하게 설명해주시던 박학다식 다재다능한 맥가이버 오태현 선생님, 실험할 때마다 선택의 길에서 많은 지도를 해주신 김정미 선생님, 나이 든 후배에게 실험도구부터 사용방법까지 세심하게 가르쳐 준 미연씨와 려경씨, 본인이 힘들 때도 귀찮아하지 않고 항상 웃으면서 모든 면에서 위로와 도움을 준 귀여운 미소의 주희씨에

게도 깊은 감사를 드립니다. 종석 선생님과 오태현 선생님, 이쁜 아기 갖게 된 것 미리 축하드립니다. 아기 낳고나서 더욱 더 예뻐지고 있는, 아기와 사랑에 빠진 정미언니, 정말 보기 좋아요. 그리고 유기방의 성환씨, 형민씨, 하나씨, 사랑스런 제자 인정이에게도 고마움을 전하고 싶습니다.

낮선 대학원 생활에 많은 도움이 되었던 교육대학원 화학교육전공 선배님, 후배님들 감사합니다. 외로운 타지에 와서 학교생활과 학업을 병행하며 졸업한 뒤에도 아낌없는 조언을 해 준 승아, 이쁘고 마음 여리지만 나이 많은 후배에게 늘 도움을 주었던 현주, 힘든 학교생활과 학업을 병행하시며 자상한 아빠이기도한 고현욱 선생님, 지연이, 정민이, 정효, 수복이, 나보다 더 뒤늦게 이 길로 뛰어든 두려움 없는 두일 오빠, 터프한 소심녀 미정이, 언니 같은 동생 화숙이, 애교쟁이 한나에게도 고마움을 전합니다. 서로 힘들 때마다 배려해주고 토닥여주던 우리 동기생들, 너무 힘들었던 만큼 같이했던 시간이 너무나 즐거웠고 평생 잊지 못할 것 같습니다. 미정아 화숙아 한나야, 모두 같이 졸업할 수 있게 되어 너무 기쁘지만 한편으로는 이제 자주 같이 할 수 없다니 아쉽다.

자주 연락 못 한다고 서운해 하던 친구 지영이, 영란이, 금선이, 현미, 켈트 모임 언니들, 허순희 선생님, 허복희 선생님, 강승효 선생님, 김양희 선생님, 오희주 선생님, 김명희 선생님, 강봉성 선생님에게도 감사의 마음을 전합니다.

폐렴으로 입원한 민혁이를 두고 대학원 입학시험을 치르러 오던 날부터 마지막까지 항상 용기로 나의 하늘인 현욱 오빠와 나의 희망인 민혁이, 민건이에게도 고맙다고 전하고 싶습니다. 매일 매일이 전쟁 같았던 지난날들 동안 현욱 오빠의 외조가 없었더라면 백만번도 더 포기했을텐데 하는 생각이 듭니다. 어느 것 하나 제대로 하고 있지 못하는 것 같아 속상해하다가도 아이들의 미소와 웃음소리에 힘을 얻을 수 있었습니다.

부족한 며느리지만 따뜻하게 배려해주신 어머니, 아버지, 세 아이들을 키우며 맞벌이를 하시면서 친 언니처럼 조언해주시는 형님, 아주버님, 친 동생처럼 걱정 해주시는 미희 언니, 미영 언니, 미정 언니, 미리 언니에게도 감사의 마음을 전합니다.

언제나 믿고 응원해주시는 엄마, 아빠, 마음 깊은 오빠, 이쁜 동생 은심이에게 너무 사랑하지만 바쁘다는 핑계로 가족을 챙기지 못해서 늘 죄송한 마음이었는

데 이 자리를 빌어 고마움을 전하고 싶습니다.

이날이 있기까지 아낌없는 사랑으로 저를 키워 주신 소중한 부모님(엄마, 아빠, 어머니, 아버지)과 이 세상에서 가장 좋은 아빠이며 내 인생의 동반자인 김현욱 씨에게 작은 결실인 이 논문을 바치고 싶습니다. 사랑합니다.

저를 격려해주시고 응원해주시는 모든 분들의 건강과 행복을 기원합니다.

2008년 07월

오 은 경

