

碩士學位論文

종가시나무, 조록나무 및 수련을  
이용한 기능성 화장품 활성성분 규명



濟州大學校 大學院  
化學科

高麗暻

2007 年 12 月

종가시나무, 조록나무 및 수련을  
이용한 기능성 화장품 활성성분 규명

指導教授 李 南 昊

高 麗 暎

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2007年 12月

高麗暎의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_ (인)

濟州大學校 大學院

2007年 12月

Isolation and Identification of Cosmetically  
Active  
Compounds from *Quercus glauca*, *Distylium  
racemosum* and *Nymphaea tetragona*.

Ko, Ryeo Kyeong

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
NATURAL SCIENCE

2007. 12.

This thesis has been examined and approved.

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

List of Figures .....	iv
List of Tables .....	vi
List of Abbreviations .....	viii
ABSTRACT .....	ix
I. 서론 .....	1
II. 시약 및 기기 .....	7
III. 연구과제 1 : ‘종가시나무 잎’의 유효성분 및 활성검색 .....	8
1. 재료 .....	8
2. 실험방법 .....	10
2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	10
2-1-1. 종가시나무 잎의 70% EtOH 추출물 및 용매분획 .....	10
2-1-2. Celite column chromatography에 의한 분획과정 .....	10
2-1-3. EtOAc 분획물에서 compound 1-4 분리과정 .....	10
2-1-4. EtOAc 분획물에서 compound 12, 13 분리과정 .....	11
2-1-5. <i>n</i> - Butanol 분획물에서 compound 6-11 분리과정 .....	11
2-2. 활성 검색 .....	13
2-2-1. DPPH radical scavenging test .....	13
3. 결과 .....	14
3-1. 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 DPPH radical scavenging test .....	14
3-2. Compound 1의 분리 및 구조 확인 .....	15
3-3. 종가시나무(잎)에서 11종의 다른 화합물 확인 .....	23
3-4. 종가시나무(잎)에서 분리된 화합물에 대한 항산화 실험결과 .....	29
4. 결론 .....	31

IV. 연구과제 2 : ‘조록나무 가지’의 유효성분 및 활성검색 .....	32
1. 재료 .....	32
2. 실험방법 .....	34
2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	34
2-1-1. 조록나무 가지의 70% EtOH 추출물 및 용매분획 .....	34
2-1-2. Celite column chromatography에 의한 분획과정 .....	34
2-1-3. Celite Et <sub>2</sub> O 분획물에서 compound 1-13, 15-18 분리과정 .....	34
2-1-4. Celite EtOAc 분획물에서 compound 8, 14, 19, 20 분리과정 .....	35
2-2. 활성 검색 .....	37
2-2-1. DPPH radical scavenging test .....	37
2-2-2. Tyrosinase inhibition test .....	37
2-2-3. Elastase inhibition test .....	38
3. 결과 .....	39
3-1. 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 활성 실험결과 .....	39
3-1-1. 항산화 실험결과 .....	39
3-1-2. Tyrosinase 저해 활성 실험결과 .....	40
3-1-3. Elastase 저해 활성 실험결과 .....	40
3-2. Compound 16의 분리 및 구조 확인 .....	41
3-3. 조록나무(가지)에서 S-1과 같은 종류의 3종에 화합물 확인 .....	50
3-4. 조록나무(가지)에서 2종에 다른 새로운 화합물 확인 .....	55
3-5. 조록나무(가지)에서 14종의 다른 화합물 확인 .....	59
3-6. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 활성실험 결과 .....	66
3-6-1. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 항산화 실험결과.....	66
3-6-2. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 tyrosinase inhibition test .....	68
3-6-3. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물 대한 elastase inhibition test .....	70
4. 결론 .....	72

V. 연구과제 3 : ‘수련 뿌리’의 유효성분 및 활성검색.....	74
1. 재료 .....	74
2. 실험방법 .....	76
2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	76
2-1-1. 수련 뿌리에서 70% EtOH 추출물 및 용매분획 .....	76
2-1-2. Celite column chromatography에 의한 분획과정 .....	76
2-1-3. Celite Et <sub>2</sub> O 분획물에서 compound 1-8 분리과정 .....	76
2-2. 활성 검색 .....	78
2-2-1. DPPH radical scavenging test .....	78
2-2-2. Tyrosinase inhibition test .....	78
3. 결과 .....	79
3-1. 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 활성 실험결과.....	79
3-1-1. 항산화 실험결과 .....	79
3-1-2. Tyrosinase 억제 실험결과 .....	80
3-2. Compound 6의 분리 및 구조 확인 .....	80
3-3. 수련(뿌리)에서 7종에 다른 화합물 확인 .....	86
3-4. 수련(뿌리)에서 분리된 화합물에 대한 활성실험 결과 .....	90
3-4-1. 수련(뿌리)에서 분리된 화합물에 대한 항산화 실험결과 .....	90
3-4-2. 수련(뿌리)에서 분리된 화합물에 대한 tyrosinase inhibition 실험결과 .....	92
4. 결론 .....	94
VI. 결론 .....	95
VII. 참고문헌 .....	96
감사의 글.....	105

## List of Figures

Figure 1. 기능성 미백제 활성성분 구조 .....	3
Figure 2. 기능성 주름 개선제 활성성분 구조 .....	5
Figure 3. Picture of <i>Quercus glauca</i> Thub .....	9
Figure 4. Picture of <i>Q. glauca</i> leaves .....	9
Figure 5. Picture of <i>Q. glauca</i> fruit .....	9
Figure 6. Isolation procedure of compounds from <i>Q. glauca</i> leaves .....	12
Figure 7. Radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>Q. glauca</i> leaves .....	14
Figure 8. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	18
Figure 9. <sup>13</sup> C-NMR and DEPT spectrum of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	19
Figure 10. <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY NMR spectrum of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	20
Figure 11. HMQC NMR spectrum of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	20
Figure 12. HMBC NMR spectrum of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	21
Figure 13. HR FAB-MASS spectrum of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	22
Figure 14. Radical scavenging effect of the isolated compounds from <i>Q. glauca</i> leaves ....	29
Figure 15. Picture of <i>Distylium racemosum</i> Siebold & Zucc .....	33
Figure 16. Picture of <i>D. racemosum</i> leaves .....	33
Figure 17. Picture of <i>D. racemosum</i> flower .....	33
Figure 18. Isolation procedure of compounds from <i>D. racemosum</i> branch .....	36
Figure 19. Radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>D. racemosum</i> branch .....	39
Figure 20. Tyrosinase inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>D. racemosum</i> branch .....	40
Figure 21. Elastase inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>D. racemosum</i> branch .....	41
Figure 22. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	45
Figure 23. <sup>13</sup> C-NMR and DEPT spectrum of compound <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch ....	46
Figure 24. HMQC NMR spectrum of compound <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	47
Figure 25. HMBC NMR spectrum of compound <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	47
Figure 26. NOESY NMR spectrum of compound <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	48
Figure 27. HR FAB-MASS spectrum of compound <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	49

Figure 28. HMBC, COSY NMR spectrum of compound <b>13</b> from <i>D. racemosum</i> branch ...	56
Figure 29. HMBC, COSY NMR spectrum of compound <b>15</b> from <i>D. racemosum</i> branch ...	58
Figure 30. Radical scavenging effect of the isolated compounds from <i>D. racemosum</i> branch .....	66
Figure 31. Tyrosinase inhibition effect of the isolated compounds from <i>D. racemosum</i> branch .....	68
Figure 32. Elastase inhibition effect of the isolated compounds from <i>D. racemosum</i> branch	70
Figure 33. Picture of <i>Nymphaea teragona</i> Georgi .....	75
Figure 34. Picture of <i>N. teragona</i> flower .....	75
Figure 35. Picture of <i>N. teragona</i> root .....	75
Figure 36. Isolation procedure of compounds from <i>N. teragona</i> root .....	77
Figure 37. Radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>N. teragona</i> root .....	79
Figure 38 Tyrosinase inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from <i>N. teragona</i> root .....	80
Figure 39. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>6</b> from <i>N. teragona</i> root .....	84
Figure 40. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>6</b> from <i>N. teragona</i> root .....	85
Figure 41. Radical scavenging effect of the isolated compounds from <i>N. teragona</i> root ....	90
Figure 42. Tyrosinase effect of the isolated compounds from <i>N. teragona</i> root .....	92



## List of Tables

Table 1. 기능성 미백제 고시 품목.....	2
Table 2. 기능성 주름 개선제 고시 품목.....	4
Table 3. Yield for extract and each solvent fraction from <i>Q. glauca</i> leaves .....	15
Table 4. 1D and 2D NMR data of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	17
Table 5. Information of compound <b>1</b> from <i>Q. glauca</i> leaves .....	21
Table 6. Isolated compound <b>2, 3</b> from <i>Q. galuca</i> leaves .....	23
Table 7. Isolated compound <b>4, 9</b> from <i>Q. galuca</i> leaves .....	24
Table 8. Isolated compound <b>5, 6</b> from <i>Q. galuca</i> leaves .....	26
Table 9. Isolated compound <b>7, 8</b> from <i>Q. galuca</i> leaves .....	27
Table 10. Isolated compound <b>10-12</b> from <i>Q. galuca</i> leaves .....	28
Table 11. Radical scavenging effect of the isolated compounds from <i>Q. glauca</i> leaves .....	30
Table 12. Yield for extract and each solvent fraction from <i>D. racemosum</i> branch .....	42
Table 13. 1D and 2D NMR data of compound. <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	44
Table 14. Information of compound. <b>16</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	48
Table 15. Structure of same series three new compounds (compound <b>17, 18, 19</b> ) from <i>D. racemosum</i> branch .....	50
Table 16. Information of compound <b>17</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	51
Table 17. Information of compound <b>18</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	52
Table 18. Information of compound <b>19</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	53
Table 19. Information of compound <b>17, 18, 19</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	54
Table 20. Information of compound <b>13</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	55
Table 21. Information of compound <b>15</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	57
Table 22. Isolated compound <b>1, 3, 5</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	59
Table 23. Isolated compound <b>2, 4, 6, 7</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	61
Table 24. Isolated compound <b>8-10</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	62
Table 25. Isolated compound <b>11, 12</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	63
Table 26. Isolated compound <b>14, 20</b> from <i>D. racemosum</i> branch .....	64
Table 27. Radical scavenging effect of the isolated compounds from <i>D. racemosum</i> branch .....	67
Table 28. Tyrosinase inhibition effect of the isolated compounds from <i>D. racemosum</i> branch	

.....	69
Table 29. Elastase inhibition effect of the isolated compounds from <i>D. racemosum</i> branch .....	71
Table 30. Yield for extract and each solvent fraction from <i>N. tetragona</i> root .....	81
Table 31. 1D NMR data of compound <b>6</b> with data of two reference .....	82
Table 32. Isolated compound <b>1-5</b> from <i>N. tetragona</i> root .....	86
Table 33. Isolated compound <b>7, 8</b> from <i>N. tetragona</i> root .....	88
Table 34. Radical scavenging effect of the isolated compounds from <i>N. tetragona</i> root .....	91
Table 35. Tyrosinase inhibition effect of the isolated compounds from <i>N. tetragona</i> root .....	93



## List of Abbreviations

Plant Name				Solvent and Reagent			
<i>Q. glauca</i>	<i>Quercus glauca</i> Thunb.			MeOH	methanol		
<i>D. racemosum</i>	<i>Distylium racemosum</i> Siebold & Zucc.			EtOH	ethanol		
<i>N. tetragona</i>	<i>Nymphaea tetragona</i> Georgi var.			Hex	<i>n</i> -hexane		
Experiment Term				CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	methylene chloride		
				CHCl <sub>3</sub>	chloroform		
Ext.	extraction, Extract			Me <sub>2</sub> CO	acetone		
RP	reverse-phase			Et <sub>2</sub> O	diethyl ether		
NP	normal-phase			EtOAc	ethyl acetate		
Fr.	fraction			BuOH	<i>n</i> -butanol		
aq.	aqueous solution			H <sub>2</sub> O	water		
RC <sub>50</sub>	reduction concentration of 50 percent			CD <sub>3</sub> OD	methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>		
SC <sub>50</sub>	scavenging concentration of 50 percent			DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl		
IC <sub>50</sub>	inhibition concentration of 50 percent			Vit-C	vitamin-C		
TLC	thin layer chromatography			Arb.	arbutin		
C.C.	column chromatography			Bin Ext.	betel palm extract		
Terms used in Structure Analysis							
UV/VIS	ultraviolet/visible						
NMR	nuclear magnetic resonance						
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer						
COSY	correlation spectroscopy						
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation						
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation						
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy						
O.R.	optical rotation						
1D	one dimension			2D	two dimension		
HHDP	hexahydroxydiphenyl						
M.P.	melting point			M.W.	molecular weight		
<i>J</i>	coupling constant(Hz)	s	singlet	d	doublet	dd	doublet of doublet
t	triplet	m	multiple	ppm	chemical shift	int	integration

## ABSTRACT

With a view of proper utilization of plants in Jeju island, we have studied three plant species in order to develop functional cosmetic additives. Dried samples were extracted with 70% ethanol and the crude extracts were subjected to solvent fractionations. The active components from the selected fractions were obtained by a series of chromatographic separations. Phytochemical study of the 70% ethanol extract of *Quercus glauca*, *Distylium racemosum*, *Nymphaea teragona* afforded seven new compounds along with thirty-three known compounds. The identification of the isolated compounds were made using extensive 1D and 2D NMR, HR FAB-MS experiments. We have examined the isolated compounds for the activities on tyrosinase and elastase inhibition as well as DPPH radical scavenger.

## I. 서론

2000년 7월 1일 시행된 화장품법 2조 1항에 따르면 “화장품은 인체를 대상으로 사용되는 것으로서 인체를 청결, 미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부 또는 모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것”으로 정의된다. 기능성화장품(functional cosmetics)은 일반화장품에 비하여 생리활성이 강조된 화장품 또는 기능이 강조된 화장품을 말한다. 2000년 7월부터 시행된 국내 화장품법에서는 “기능성화장품은 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품 및 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는 데 도움을 주는 제품”으로 정의하고 있다. 기능성 화장품은 의약품과 화장품의 중간적인 성격의 제품으로 코스메슈티컬(cosmeceutical), 코스메디컬(cosmedical) 또는 약용화장품으로도 불린다. 이 중 가장 일반적인 것은 코스메슈티컬로 미국 펜실바니아 의과대학 교수 Albert Klingman에 의하여 제안된 것이다.

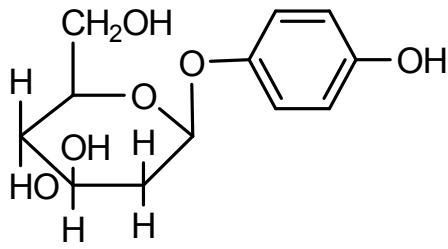
천연 화장품 및 저자극 화장품은 향후 기능성 화장품을 포함한 모든 화장품 산업 전반으로 확장되어, 화장품 산업의 근간을 이루는 트렌드로 자리잡을 것으로 예상된다. 이러한 천연 화장품 및 웰빙 화장품이 화장품 시장을 주도하고 효능효과를 강조한 기능성 화장품의 중요성이 강조된다면, 앞으로의 천연물을 이용한 기능성 화장품의 개발은 산업적으로 매우 중요한 연구과제가 될 것이다.

미백화장품은 피부에 멜라닌 색소가 침착되는 것을 방지하여 기미, 주근깨 등의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품, 피부에 침착된 멜라닌 색소의 색을 얇게 하여 피부의 미백에 도움을 주는 화장품 및 피부의 표면을 깨끗이 할 수 있는 제품을 말한다. 미백화장품의 연구동향을 살펴보면, 멜라닌 생성의 주효소인 tyrosinase의 활성을 직접 조절하여 미백원료를 개발하려는 데에 가장 많은 노력이 이루어졌다.<sup>1)</sup> 최근에는 멜라닌 합성에 영향을 주는 물질인 다양한 신호전달 물질, 즉, 사이토카인(즉, endothelin)을 조절하거나 melanocyte 표면에 있는 수용체를 조절하여 외부신호를 차단함으로써 melanogenesis를 억제하는 방향으로도 연구가 진행되고 있다.

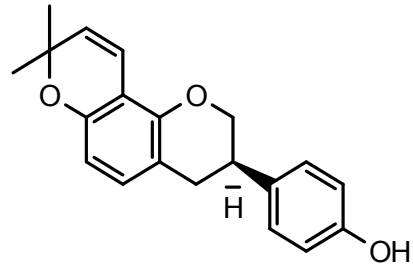
현재 국내에서 기능성화장품 원료의 유효성과 안전성은 한국식품의약품안전청 (KFDA)의 허가를 받아 고시되고 있다. 현재 KFDA의 미백제로서 고시를 얻은 성분은 다음과 같다.

Table 1. 기능성 미백제 고시 품목

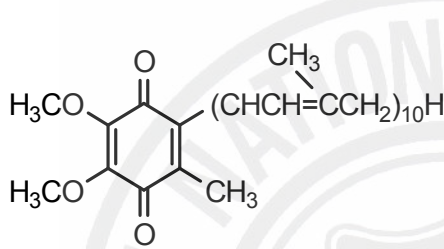
이름	특성	주성분	사용 또는 제조회사	비고
알부틴	Tyrosinase 저해 (registered as functional cosmetic raw material by KFDA, 2%)		바이오랜드 (한국, 제조)	일괄고시
유효성 감초추출물	Tyrosinase 저해 (registered, 0.05%)	glabridin	마루젠 (일본, 제조) 바이오랜드 (한국, 제조)	일괄고시
닥나무 추출물	Tyrosinase 저해 (registered, 2%)	Kazinol F	태평양 (한국, 제조/사용)	일괄고시
에칠아스코빌에텔	Tyrosinase 저해 (registered, 2%)	3-Ethoxy-Vit-C (HX-01B)	국내장업사 (한국, 사용)	일괄고시
상지추출물	Tyrosinase 저해	oxyresveratrol morusin	코리아나 (한국, 사용) 바이오랜드 (한국, 제조)	개별고시
L-Ascorbic acid-2-Glucoside	항산화제	AA-2G	히야시바라 (일본, 제조)	개별고시
Vitamic C magnesium phosphate	항산화제		국내장업사 (한국, 사용)	개별고시
Vitamic C	항산화제		한불, 코스맥스 (한국, 사용)	개별고시
Phytoclear EL-1	Suppress melanogenic enzymes		LG H&H (한국, 제조/사용)	개별고시
Lucinol	Tyrosinase 저해		Pola (일본, 제조) 엔프라니 (한국, 사용)	개별고시
Coenzyme Q-10	콜라겐섬유 손상 방지 표피세포의 재생	ubiquinone	태평양 (한국, 사용)	개별고시



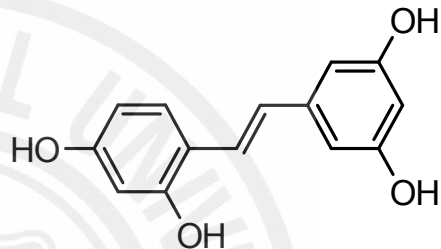
Arbutin



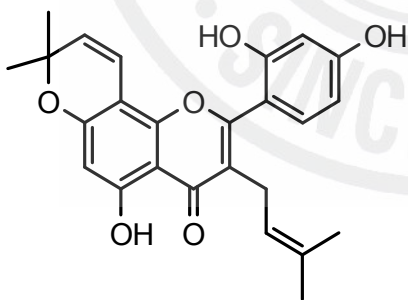
Glabridin



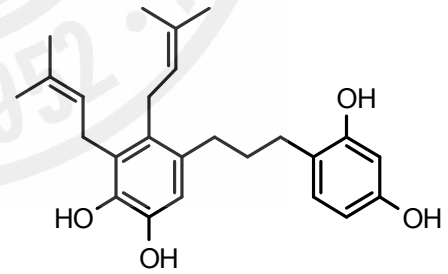
Coenzyme Q-10



Oxyresveratrol



Morusin



Kazinol F

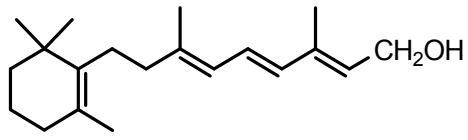
Figure 1. 기능성 미백제 활성성분 구조

주름개선 화장품이란 연령의 증가에 따라 발생하는 주름 완화와 관련되어 주름생성 예방 및 완화제품, 주름치유 제품 및 신개념 항노화제품으로 크게 구분된다. 현재 주름개선 화장품 연구경향을 보면, 진피층의 콜라겐 및 엘라스틴 생성을 촉진시키거나 분해를 저해하는 물질의 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>2)</sup> 현재, 국내에서 기능성 주름개선제로서 한국식약청(KFDA)에서 유효성과 안전성을 입증받아 사용허가를 얻은 고시품목은 다음과 같다.

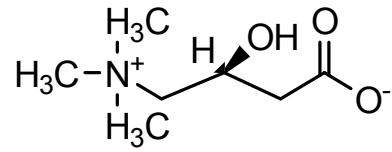
Table 2. 기능성 주름 개선제 고시 품목

이름	특성	사용 또는 제조회사	비고
Retinol	세포분화 촉진 단백질합성 촉진	국내장업사(한국, 사용)	일괄고시
폴리에톡시레이트 레틴아마이드	세포분화 촉진 단백질합성 촉진	LG H&H(한국, 제조/사용)	일괄고시
우르솔릭엑시드	Elastase 저해	참존(한국, 사용)	개별고시
빈랑자 추출물	Elastase 저해	바이오랜드(한국, 제조) 코리아나(한국, 사용)	개별고시
L-Carnitine	단백질합성 촉진	한불(한국, 사용)	개별고시
카이네틴	섬유아세포 DNA 촉진 콜라겐합성 촉진	엔프라니(한국, 사용)	개별고시
작약 추출물	콜라겐합성 촉진 Elastase 저해	LG H&H(한국, 사용)	개별고시
하이드록시프릴린(HP)	Elastase 저해	LG H&H(한국, 사용)	개별고시
인돌 아세트산	세포분화 촉진	코스맥스(한국, 사용)	개별고시
α-Tocopherol	항산화제	한국 콜마(한국, 사용)	개별고시
Oleanolic acid	Elastase 저해	태평양(한국, 사용)	개별고시
Fructose 1,6-diphosphate	항산화제	태평양(한국, 사용)	개별고시
아테노신	섬유아세포 DNA 촉진 단백질 합성 증가 세포기능 향상	한국화장품(한국, 사용)	개별고시
예덕나무 추출물	콜라겐합성 촉진 Elastase 저해	코리아나(한국, 사용)	개별고시
Tensolin-F	MMP-1 저해	한불(한국, 제조/사용)	개별고시

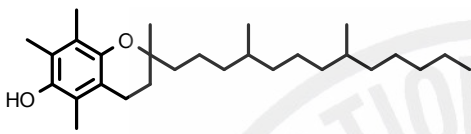




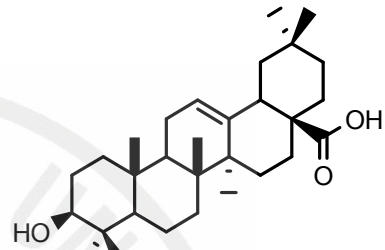
Retinol



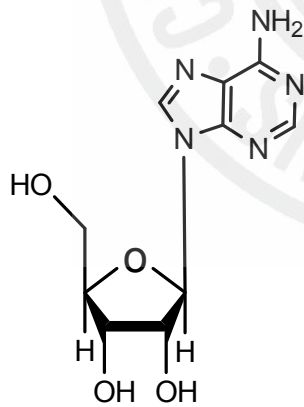
L-Carnitine



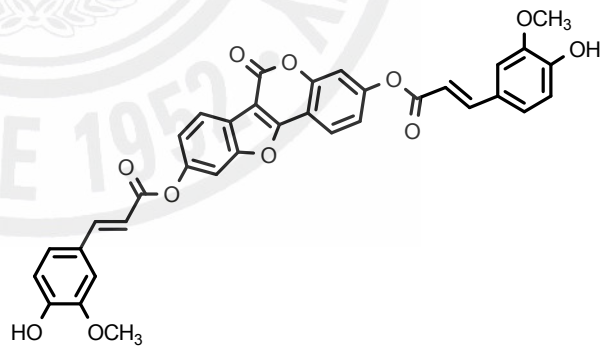
$\alpha$ -Tocopherol



Oleanolic acid



Adenosin



Tensolin-F

Figure 2. 기능성 주름 개선제 활성성분 구조

제주도는 한반도로부터 약 130 km 남쪽에 위치한 섬으로, 중앙에는 높이 1950 m의 한라산이 있으며, 지리적으로 한반도, 일본, 중국의 중앙부에 위치하여 있다. 저지대는 구로시오의 영향을 받아 연중 온화하며 고도의 변화에 따른 기온 변화가 뚜렷하다. 강수량은 많으나 비교적 건조하기 쉬운 지형과 토양을 갖고 있다. 이러한 환경적 영향으로 국내에서는 특이하고 다양한 생물자원을 보유하고 있다. 제주도는 한라산을 중심으로 338종의 약용식물을 포함하여 총 2,100종의 자생식물이 서식하고 있으며, 타 지역과 다른 다양하고 특이한 분포형태를 유지하고 있다. 이러한 식물상은 지리산 1,300여 분류군, 설악산 1,200여 분류군, 울릉도 650 분류군에 비하여 국내에서는 가장 다양한 분포형태를 나타내고 있다.

본 연구에서는 제주도 내에 자생하고 있는 식물을 시료로 이용하여 추출물을 제조하고 화장품관련 활성 검색(tyrosinase 억제활성, elastase 억제활성, DPPH 라디칼 소거활성)을 실시하였다. 그 중에서 유효한 활성이 검색되었던 종가시나무(잎), 조록나무(가지), 수련(뿌리)에 대하여 활성성분을 분리하여 그 구조를 동정하였다. 또한, 분리된 화합물에 대한 활성실험을 실시하여 천연 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 검토하였다.

## II. 시약 및 기기

본 실험에서 시약은 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck CO., Junsei Co.의 제품을 사용하였다. Celite column chromatography에는 Celite(Celite 545, Celite Korea Ltd.)가 사용되었으며, normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(0.063-0.200 mm, Merck Co.), Silica gel 60(0.040-0.063 mm, Merck Co.), Silica gel(0.025-0.0020 mm, Sigma Co.)이 사용되었고, reverse-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 100(RP-18, 230-400 mesh, Merck Co.)와 YMC-gel(ODS-A, AA12S75, S75 um, 12 nm, 500 g Sephadex LH-20(0.1 mm-0.025 mm)이 사용되었다. 분리과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silicagel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck Co.)와 precoated silica gel aluminium sheet(RP-18 Silica gel F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV/VIS lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO<sub>4</sub> 수용액 (3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25% NaOH), 1% anisaldehyde-MeOH, 2% FeCl<sub>3</sub>-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL Co.) 혹은 NMR(Bruker Co. 500MHz) 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 NMR전용 Merck Co.에 CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O, CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>, Pyridine-*d*<sub>6</sub>을 사용하였다. 분리 물질의 광학회절을 확인하기 위해 polarimeter는 Jasco P-1030을 사용하였고, MeOH과 H<sub>2</sub>O를 용매로 하여 측정하였다. 새로운 화합물에 대한 UV측정에는 Biochrom Co., LibraS22를 사용하였으며, 녹는점 측정에 사용된 기기는 Fisher scientific Co.에 12-142T를 사용하였다. 분리된 화합물의 질량분석을 위해서는 한국 기초과학지원연구소(서울센터)의 HR FAB-MS를 사용하였다.

### Ⅲ. 연구과제 1 : ‘종가시나무 잎’의 유효성분 및 활성검색

#### 1. 재료

종가시나무(*Quercus glauca* Thunb.)는 제주 방언으로 가시낭이라 불리며, 쌍떡잎 식물 참나무목 참나무과의 상록교목으로 주로 한국(남쪽섬)·일본·중국·히말라야 등지에 북사면에서는 해발 400 m, 남사면에서는 600 m이하의 난대림이나 계곡등에 분포하고 있으며, 특히 제주에서는 꽃자왈에서 자생하고 있다. 높이는 15 m정도 이며 가지에 털이 없고, 나무껍질은 녹색 빛이 나는 회색이다. 잎은 어긋나고 넓은 타원형에서 달걀을 거꾸로 세운 모양의 타원형이며, 표면에 윤기가 있고, 꽃은 4~5월에 피며 암꽃이삭은 새가지 중앙부의 잎겨드랑이에서 위로 곧게 서고 2~3개의 꽃이 달린다. 주로, 건축재·가구재·기구재로 사용하며, 그릇이나 솥을 만드는 데 쓰인다. 그리고 열매는 견과로 10월에 익으며 란원형으로 길이 2 cm정도로 식용한다.

종가시나무 잎에 대해 현재 알려진 물질로는 triterpenes, alkanes, saponins, gallates 등이 있으며,<sup>3-8)</sup> 이들에 대한 생리활성은 항산화 활성이 연구 보고된 바가 있다.

본 연구에서는 제주에서 자생하고 있는 종가시나무 잎에서 컬럼크로마토그래피를 통하여 다른 활성물질을 탐색 및 분리·동정하고, 신물질로 분리된 한개의 lignan화합물에 대해 구조분석을 하였다.



Figure 3. Picture of *Quercus glauca* Thub



Figure 4. Picture of *Q. glauca* leaves



Figure 5. Picture of *Q. glauca* fruit

## 2. 실험방법

### 2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

#### 2-1-1. 종가시나무 잎의 70% EtOH 추출물 및 용매분획

제주도 한라수목원에서 자생하는 종가시나무를 채집하여 부위별로 세분시킨 후, 음지에서 풍건하여 분쇄한 건조분말 298.4 g을 70% EtOH 6 L에 침적하고 실온에서 24시간동안 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통해 여액을 취해 감압농축 하였으며, 분리된 잔사는 추출과정을 동일한 조건에서 2회 반복하였다. 이 과정을 통해 70% 에탄올 추출물 64.8 g을 얻었다. 감압농축된 70% 에탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 각각 1 L씩 *n*-hexane 층, ethyl acetate 층, *n*-butanol 층 및 H<sub>2</sub>O 층 4개의 용매분획층을 얻었다(Figure 6).

#### 2-1-2. Celite column chromatography에 의한 분획과정

용매분획 하여 얻어진 EtOAc 분획층을 celite로 충전한 glass column을 이용하여 분획을 하였다. 사용된 용출용매는 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, MeOH을 사용하여 각각 4개의 분획을 얻었다(Figure 6).

#### 2-1-3. EtOAc 분획물에서 compound 1-4 분리과정

2-1-2에서 얻어진 EtOAc 분획(3 g)을 분리하기 위해, 역상 silica gel을 충전시켜 gradient 용매(H<sub>2</sub>O/MeOH)조건을 이용하여 8개의 분획층을 얻었고, 그중 RP-Fr-2을 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1/1, 1/2) 조건을 사용하여 10개의 분획을 나누었고, 그 중 Fr-2-2에서 compound 1(46 mg)과 Fr-2-6에서 compound 2(41.5 mg)을 얻었다. RP-Fr-3을 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH =

1/4)을 사용해 9개의 분획으로 나누었고, 그 중 Fr-3-3에서 compound **3** (16.2 mg)을 얻었다. RP-Fr-5은 60% MeOH에 현탁시킨 후 용매 분획하여 Et<sub>2</sub>O 층을 얻었고, 얻어진 Et<sub>2</sub>O 층을 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용해 10개 분획을 얻었다. 그 중 Fr-5-4을 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용해 Fr-5-4-2에서 compound **4**(6.2 mg)을 얻었다(Figure 6).

#### 2-1-4. EtOAc 분획물에서 compound **12**, **13** 분리과정

2-1-2에서 얻어진 EtOAc 분획(3 g)을 순상 silica gel gradient 조건(Hex/EtOAc→EtOAc/MeOH)을 사용해 7개의 분획물을 얻었고, 그 중 NP-Fr-1을 역상 silica gel gradient 조건(H<sub>2</sub>O/MeOH)을 사용하여 11개의 분획으로 나누었다. 그 중 Fr-1-3을 순상 silica gel(Hex/EtOAc/MeOH = 10/10/2)을 사용해 8개의 분획을 얻었고, Fr-1-3-2에서 compound **12**(13.2 mg)을 얻었다. Fr-1-6은 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 5/1)을 사용해 3개의 분획으로 나뉘었으며, 그 중 Fr-1-6-3을 재결정시켜 compound **13**(1 mg)을 얻었다(Figure 6).

#### 2-1-5. *n*-butanol 분획물에서 compound **6-11** 분리과정

2-1-2에서 얻어진 *n*-butanol 분획(10 g)을 순상 silica gel gradient 조건(EtOAc/MeOH)을 사용해 11개의 분획물을 얻었다. 그 중 NP-Fr-7을 재결정시켜 compound **6**(81.4 mg)을 얻었다. NP-Fr-2은 순상 silica gel(Hex/EtOAc = 2/1)을 사용해 4개의 분획층으로 나누었고, 그 중 Fr-2-1에서 compound **7**(10.2 mg)과 Fr-2-2에서 compound **8**(4.4 mg)을 얻었다. Fr-2-4는 순상 silica gel(Hex/EtOAc/MeOH = 1/20/1)을 사용하여 4개의 분획층으로 나누었고, Fr-2-4-1에서 compound **9**(3.2 mg)을 얻었다. NP-Fr-4은 순상 silica gel gradient 조건(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Me<sub>2</sub>CO)을 사용해 11개의 분획을 얻었고, 그중 Fr-4-4에서 compound **10**(18.2 mg)을 얻었다. Fr-4-5은 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용해 6개의 분획을 얻었고, 그중 Fr-4-5-3을 순상 silica gel(EtOAc/MeOH = 3/1)을 사용해 compound **11**(16.5 mg)을 얻었다(Figure 6).

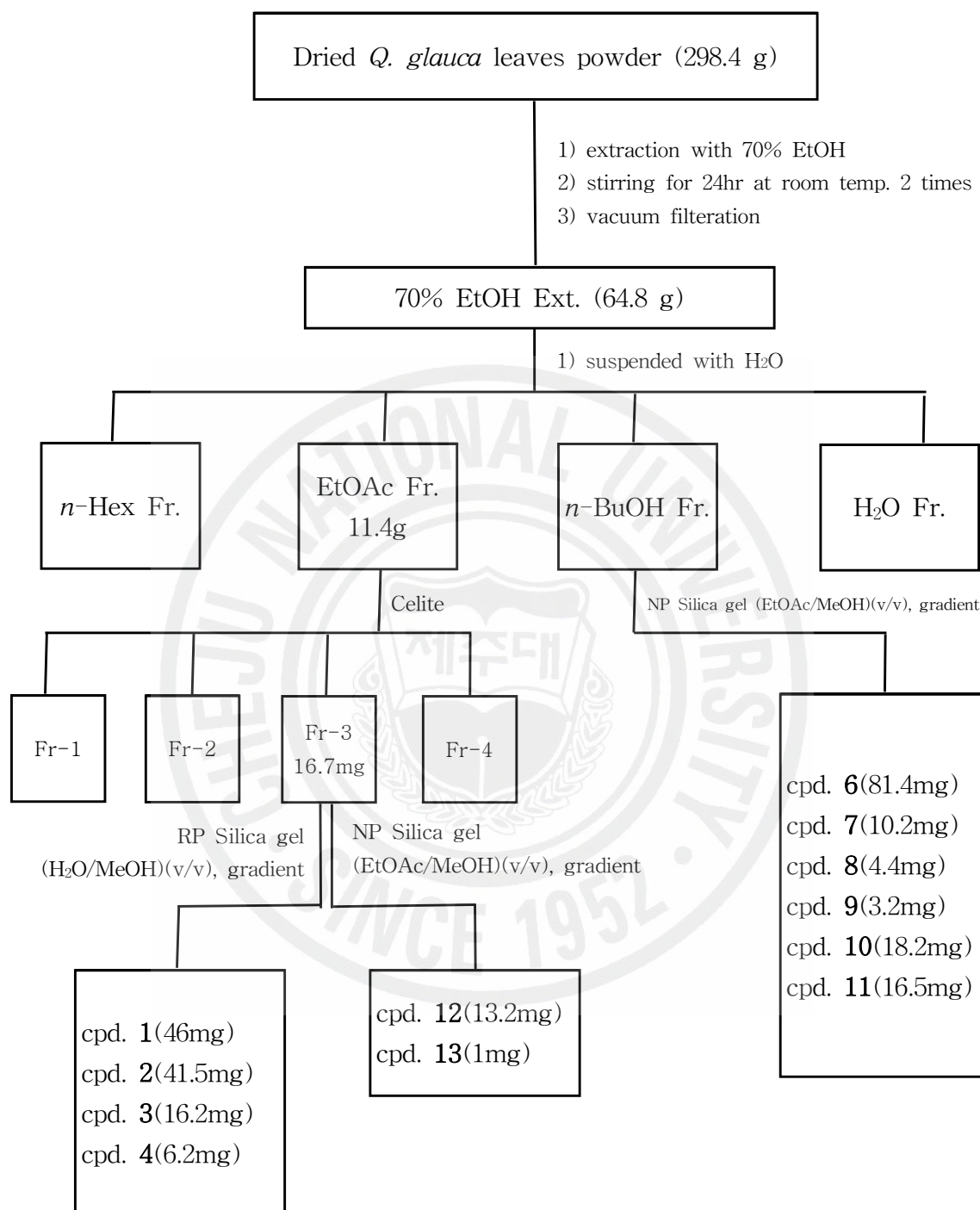


Figure 6. Isolation procedure of compounds from *Q. glauca* leaves



## 2-2. 활성 검색

### 2-2-1. DPPH radical scavenging test

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois방법<sup>9,10)</sup> 을 응용하여 사용하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 사용하였고, 사용된 용매는 70% EtOH을 사용하였다.

실험방법은 sample 0.2 mL(1 mg/mL, stock), 70% EtOH 0.8 mL, 0.2 mM DPPH solution 0.5 mL을 넣고, 최종 부피가 1.5 mL로 맞춘다. 상온(25 ℃)에서 10분간 반응시킨 후, 525 nm에서 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 소거능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 RC<sub>50</sub>를 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 녹차 추출물(1 mg/mL, stock), Vitamin-C (1 mg/mL, stock)을 사용하였다.<sup>11)</sup>

$$\text{Scavenging effect(\%)} = [A_0 - (A - A_b) / A_0 \times 100]$$

A<sub>0</sub> : 525 nm DPPH의 흡광도.

A : 520 nm DPPH와 시료반응액의 흡광도.

A<sub>b</sub> : 525 nm 시료의 흡광도.

### 3. 결과

#### 3-1. 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 DPPH radical scavenging test

중가시나무(잎)의 70% 에탄올 추출물과 각각의 용매분획물을 DPPH radical scavenging test를 실시하였다. 실험을 위해, DPPH용액은 0.2 mM로 제조하였고, sample을 70% EtOH를 이용해 1 mg/ml로 제조하였다. 4개의 농도별(100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ )로 DPPH용액과 sample 용액을 상온(25  $^{\circ}\text{C}$ )에서 10분간 반응시켜, UV/VIS 흡광 광도계를 이용해 525 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 중가시나무잎의 70% 에탄올 추출물이  $\text{RC}_{50}$  수치 46.9  $\mu\text{g/ml}$ 를 보였으며, 각각 분획물에 대한 항산화결과는 EtOAc 분획층( $\text{RC}_{50} = 21.2 \mu\text{g/ml}$ ), *n*-BuOH 분획층( $\text{RC}_{50} = 21.9 \mu\text{g/ml}$ ), H<sub>2</sub>O 분획층( $\text{RC}_{50} = 74.2 \mu\text{g/ml}$ )으로 대조군으로 사용한 녹차추출물( $\text{RC}_{50} = 8.45 \mu\text{g/ml}$ )과 비교하였을때, 비슷한 수준의 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Figure 7).

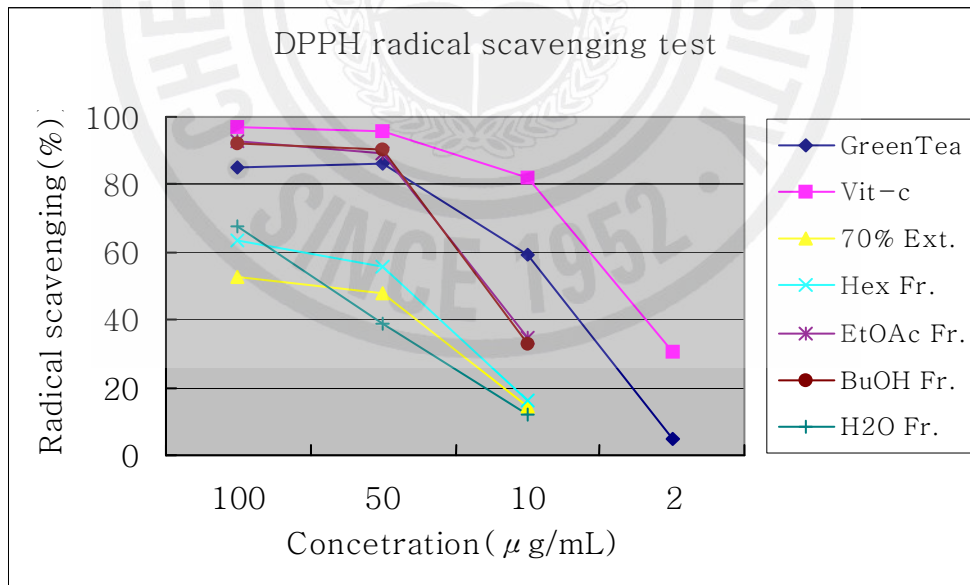


Figure 7. Radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *Q. glauca* leaves

### 3-2. Compound 1의 분리 및 구조 확인

종가시나무(잎) 건조분말(298.4 g)을 70% EtOH로 추출한 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 용매분획 하였다. 4개의 용매분획물을 가지고 항산화 실험결과 EtOAc층에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 따라서 EtOAc층을 가지고 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, MeOH을 사용하여 celite column chromatography로 분리하여 각각 4개의 분획을 얻었다(Figure 6). 이 중 celite EtOAc 층을 가지고 gradient 조건(H<sub>2</sub>O/MeOH)을 사용하여 역상 silica gel column chromatography로 분리한 결과 8개의 분획들을 얻을 수 있었다. 이 중 RP-Fr-2을 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1/1)를 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatography로 분획을 하였고, 각 분획들을 TLC로 확인하여 10개의 분획을 얻었다. 그 중 Fr-2-3에서 compound 1 (46 mg)을 얻었다(Table 3).

Table 3. Yield for extract and each solvent fraction from *Q. glauca* leaves

Ext. solvent	Yield (%)
70% EtOH Ext.	21.7
<i>n</i> -hexane Fr.	5.8
EtOAc Fr .	17.5
<i>n</i> -butanol Fr.	18.8
H <sub>2</sub> O Fr.	62.9
Compound 1	0.07

화합물 1의 구조 확인은 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC, HR FAB-MASS를 통하여 확인하였다.

<sup>1</sup>H NMR을 통하여 확인 한 결과 δ 6.94(2H, d, *J* = 2.0), δ 6.83(2H, dd, *J* = 8.0, 2.0), δ 6.69(2H, d, *J* = 8.0)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음을 예상하였고, coupling constant를 통해 방향족 고리의 수소가 ortho,

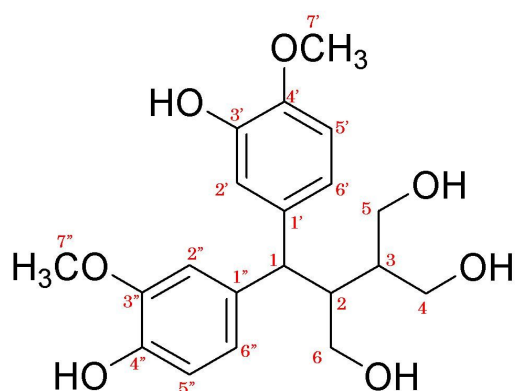
meta 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상할 수 있었다.  $\delta$  3.98(1H, d,  $J = 14.0$ ),  $\delta$  3.70-3.72(2H, m),  $\delta$  3.69(1H, m),  $\delta$  3.61(1H, dd,  $J = 11.5, 4.4$ ),  $\delta$  3.53(1H, dd,  $J = 11.5, 2.2$ ),  $\delta$  3.38(1H, dd,  $J = 11.5, 5.5$ )에서 나타나는 signal을 보아  $sp^3$  혼성구조에 전기음성도가 큰 산소원자가 붙어 있는 형태라는 것을 예상하였고,  $\delta$  3.53(6H, s)에서 나타나는 signal을 보아 화합물 내에 2개의 methoxy group이 있음을 예상하였다.  $\delta$  2.64(1H, m),  $\delta$  1.96(1H, m)에서 나타나는 signal을 보아  $sp^3$  혼성에 의한 포화탄화수소임을 예상할 수 있었다(Figure 8).

$^{13}\text{C}$  NMR을 통해서도 화합물 탄소의 총 개수가 20개 이상임을 예상하였다. DEPT ( $45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ )을 통해  $\delta$  150-130사이에서 나타나는 6개의 peak가  $4^\circ$  탄소를 확인하였고,  $\delta$  122-112사이에서 나타나는 6개의 peak와  $\delta$  52.259,  $\delta$  45.151,  $\delta$  44.069에서 나타나는 peak가 3차 탄소를 확인하였다.  $\delta$  65-59 사이에서 나타나는 3개의 peak와  $\delta$  56에서 나타나는 2개의 peak는 1차 탄소를 확인하였다(Figure 9).

또한 compound 1의 정확한 구조동정을 위해 2D NMR data를 분석하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum을 통해 각각 coupling하고 있는 수소를 확인하였고(Figure 10), HMQC NMR spectrum에서 14개의 수소 피크가 각 예상탄소와 교차하고 있는것을 확인함으로써, 각각 수소가 연결된 탄소를 확인하였다(Figure 11). HMBC NMR spectrum을 통해 각 수소와 탄소간의 long-range coupling을 확인하였다(Figure 12). 이와 같이 NMR data를 분석하여(Table 4), compound 1의 분자식이  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_7$ 임을 예상하였고, HR-FAB MASS 결과 [ $m/z = 378.1692$  ( $\text{M}^+$ )]를 통하여 분자량이 예상했던 분자량인 378.1679와 거의 흡사하게 일치함을 증명하였다(Figure 13).

각각의 기기분석 자료를 토대로 분자구조를 문헌 검색한 결과 compound 1은 현재 문헌상 알려져 있지 않은 신물질로 추정되었고, compound 1의 구조를 살펴본바 seco-lignan 종류의 화합물임을 알수 있었다.<sup>12,13</sup> 이 화합물은 280.6 nm에서 최고 흡광도를 가지고, 광학회절이  $[\alpha]_D^{20} = -11$  (0.1%, MeOH), 녹는점은  $122^\circ\text{C}$ 을 가짐을 기기분석을 통해 알 수 있었다(Table 5).

Table 4. 1D and 2D NMR data of compound **1** from *Q. glauca* leaves



Position	Compound 1				
		$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	COSY (H→H)	HMBC (H→C)
1	R	52.2 (d)	3.98 (1H, d, 14.0)	H-2	C-2, C-3, C-6, C-1', C-2', C-6' C-1'', C-2'', C-6''
2	S	45.1 (d)	2.64 (1H, m)	H-3, H-6	C-2, C-3, C-4, C-5
3	T	44.0 (d)	1.96 (1H, m)	H-2, H-4, H-5	C-1, C-5, C-6
4	M	63.7 (d)	3.69 (1H, m) 3.61 (1H, dd, 11.5, 4.4)	H-3	C-2, C-3, C-5
5	O	59.8 (t)	3.70 – 3.72 (2H, m)	H-3	C-3
6	N	60.3 (t)	3.53 (1H, dd, 11.5, 2.2) 3.38 (1H, dd, 11.5, 5.5)	H-2	C-2, C-3
1'	E	137.9 (s)	-	-	-
2'	K	113.1 (d)	6.95 (1H, d, 2.0)	-	C-1', C-3', C-4', C-6'
3'	C	145.9 (s)	-	-	-
4'	A	149.2 (s)	-	-	-
5'	I	116.4 (d)	6.70 (1H, d, 8.0)	H-6'	C-1', C-3', C-4
6'	G	121.8 (d)	6.83 (1H, dd, 8.0, 2.0)	H-5'	C-2', C-4'
7'	P	56.6 (q)	3.83 (3H, s)	-	C-4'
1''	F	137.3 (s)	-	-	-
2''	L	112.9 (d)	6.94 (1H, d, 2.0)	-	C-1'', C-3'', C-4'', C-6''
3''	B	148.9 (s)	-	-	-
4''	D	145.8 (s)	-	-	-
5''	H	121.4 (d)	6.69 (1H, d, 8.0)	H-6''	C-1'', C-3'', C-4''
6''	J	116.2 (d)	6.83 (1H, dd, 8.0, 2.0)	H-5''	C-2'', C-4''
7''	Q	56.5 (q)	3.82 (3H, s)	-	C-3''

<sup>1</sup>H NMR : 400 MHz in CD<sub>3</sub>OD, <sup>13</sup>C NMR : 100 MHz in CD<sub>3</sub>OD

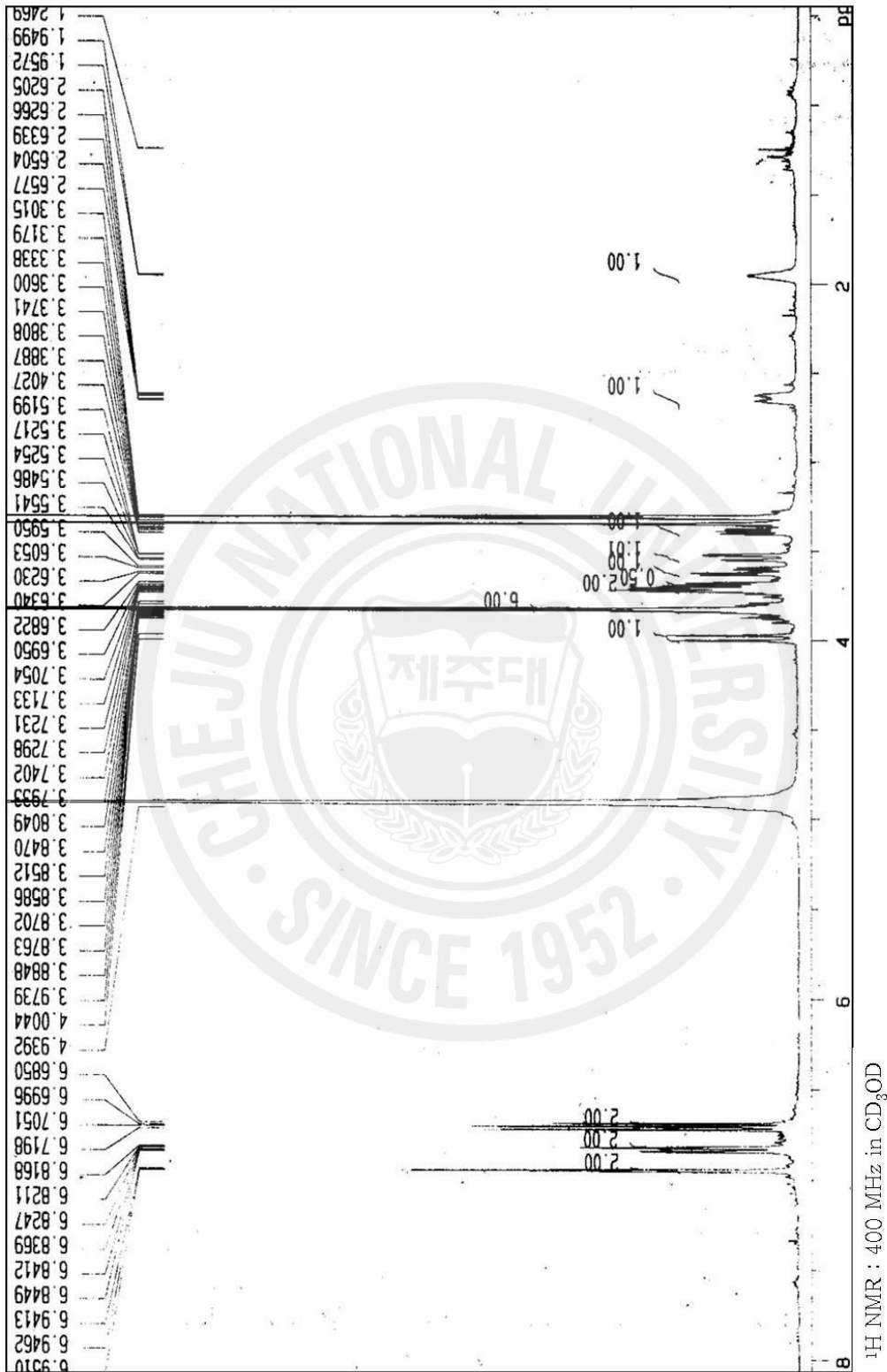


Figure 8. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 1 from *Q. glauca* leaves

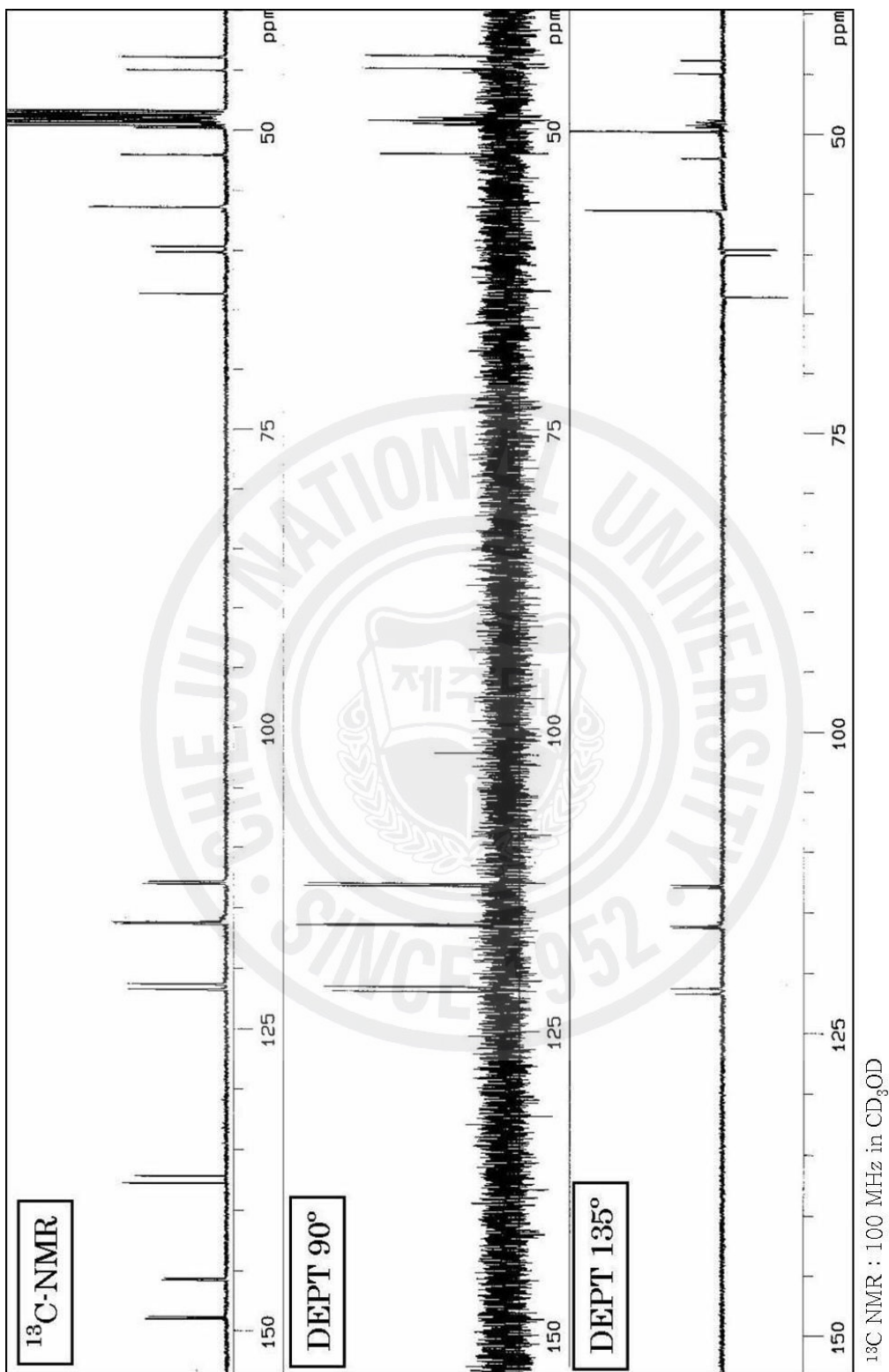


Figure 9.  $^{13}\text{C}$ -NMR and DEPT spectrum of compound 1 from *Q. glauca* leaves

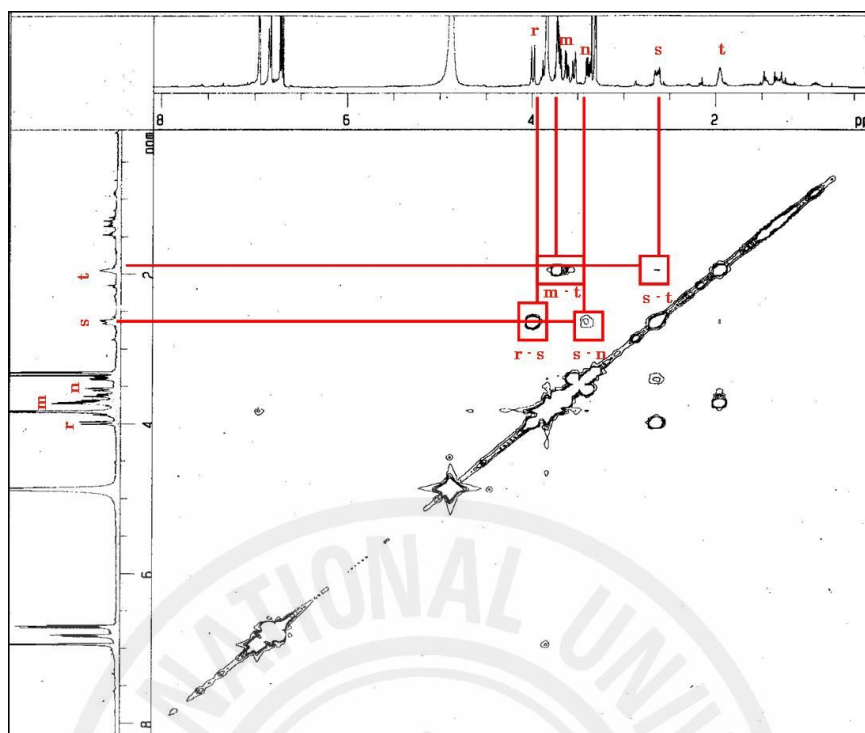


Figure 10.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum of compound **1** from *Q. glauca* leaves

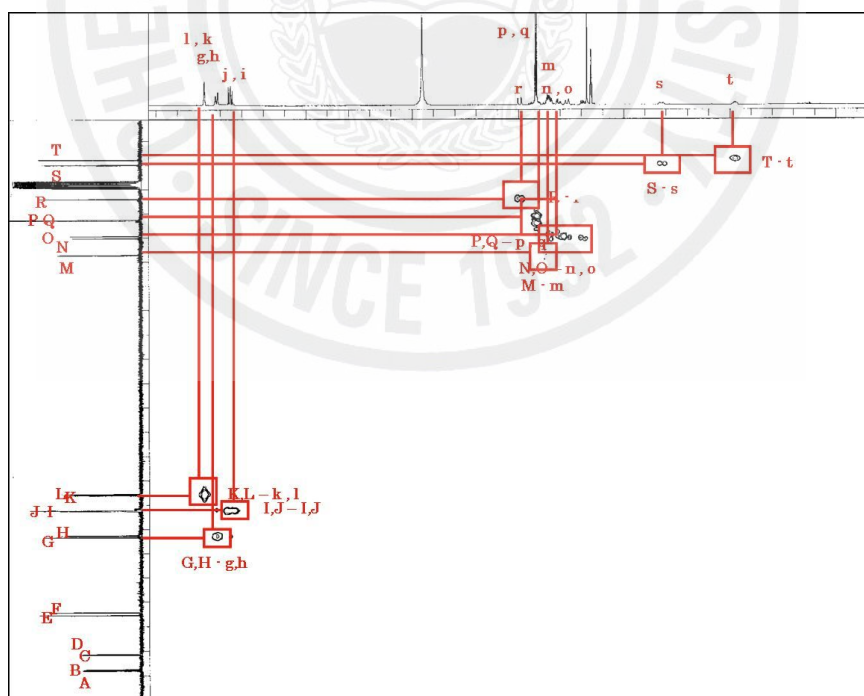


Figure 11. HMQC NMR spectrum of compound **1** from *Q. glauca* leaves



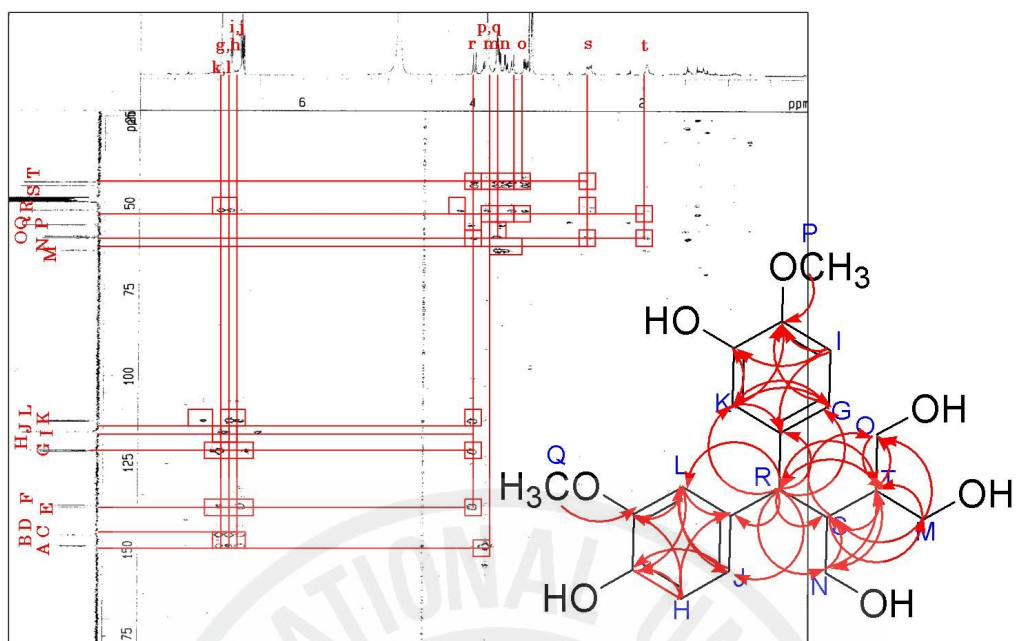


Figure 12. HMBC NMR spectrum of compound **1** from *Q. glauca* leaves

Table 5. Information of compound **1** from *Q. glauca* leaves

Appearance	Dark brown amorphous powder
Chemical Formula	$C_{20}H_{26}O_7$
UV $\lambda$ max (nm)	280.6
Melting Point	122 °C
Molecular Weight	378.2
Optical Rotation	$[\alpha]_D^{20} = -11$ (0.1%, MeOH)

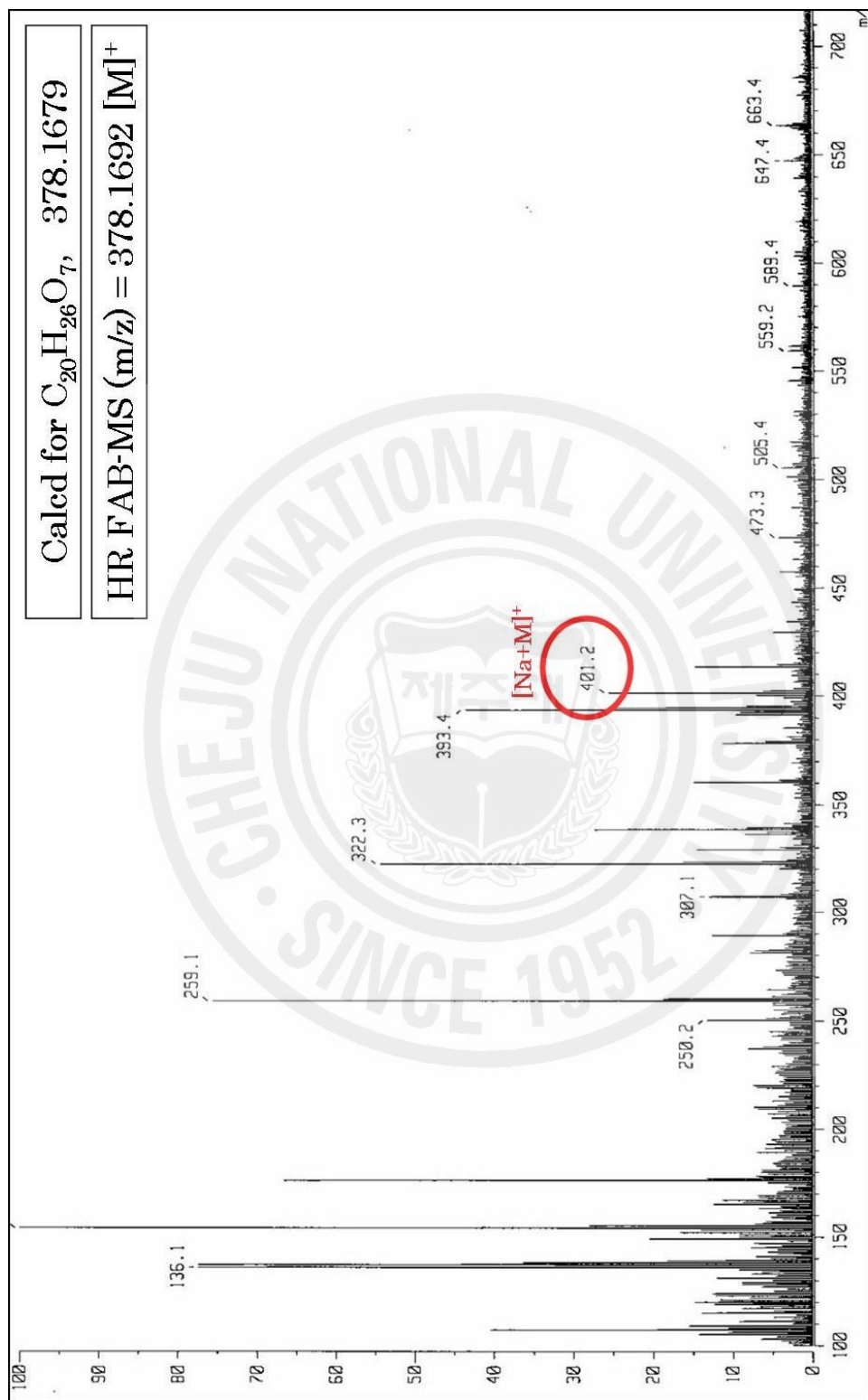
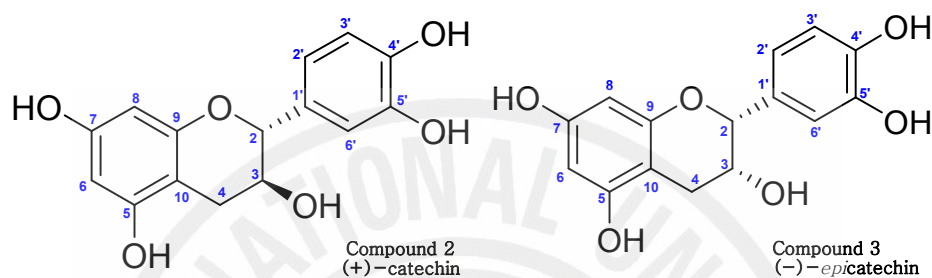


Figure 13. HR FAB-MASS spectrum of compound 1 from *Q. glauca* leaves

### 3-3. 종가시나무(잎)에서 11종에 다른 화합물 확인

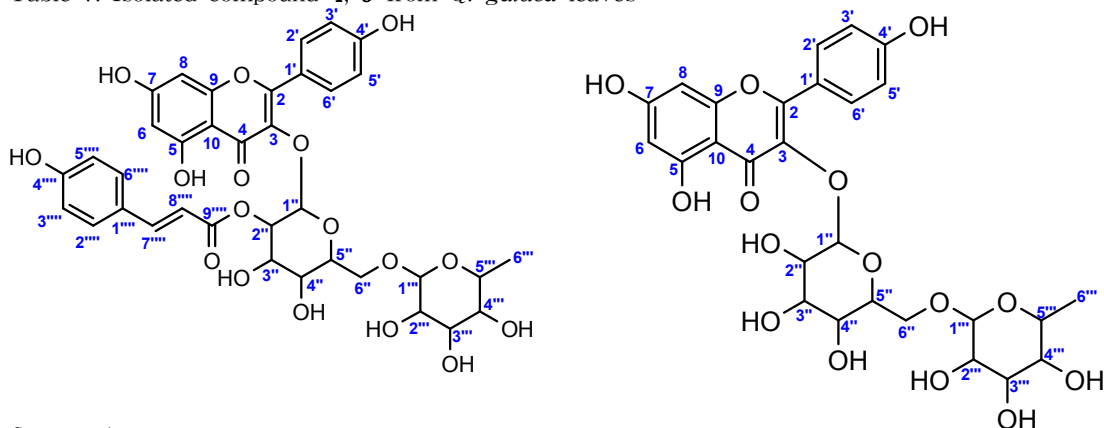
Compound 1과 같이 column chromatography를 이용해 분리·정제된 11종에 대한 화합물 또한 1D, 2D NMR을 이용하여 화합물을 예측하였고, 문헌과 대조하여 동정하였다(Table 6-10).

Table 6. Isolated compound 2, 3 from *Q. galuca* leaves



Position	Compound 2 <sup>14)</sup>		Compound 3 <sup>15)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
2	82.9	4.54 (1H, d, $J=7.6$ )	79.9	4.81(1H, s)
3	68.9	3.98 (1H, m)	67.5	4.17 (1H, m)
4	28.6	4a 2.84 (1H, dd, $J=5.4, 16.0$ )	29.3	4a 2.86 (1H, dd, $J=4.6, 16.7$ )
		4b 2.51 (1H, dd, $J=8.3, 16.0$ )		4b 2.73 (1H, dd, $J=2.7, 16.7$ )
5	157.9		158.1	
6	96.4	5.85 (1H, d, $J=2.4$ )	96.0	5.92 (1H, d, $J=2.4$ )
7	157.7		157.9	
8	95.6	5.92 (1H, d, $J=2.4$ )	96.5	5.94 (1H, d, $J=2.4$ )
9	157.0		157.7	
10	100.9		100.2	
1'	132.3		132.4	
2'	115.3	6.71 (1H, dd, $J=1.9, 8.3$ )	115.3	6.81 (1H, dd, $J=1.5, 8.2$ )
3'	116.3	6.76 (1H, d, $J=8.0$ )	144.9	6.77 (1H, d, $J=8.2$ )
4'	146.4		146.3	
5'	144.5		116.3	
6'	120.1	6.83 (1H, d, $J=1.9$ )	119.5	6.98 (1H, d, $J=1.7$ )

Table 7. Isolated compound **4**, **9** from *Q. galuca* leaves



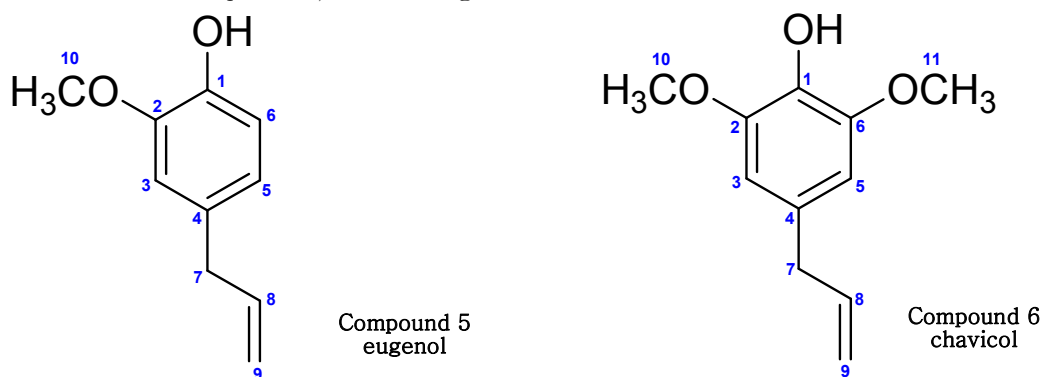
**Compound 4**  
kaempferol-3-O- $\beta$ -D-(2''-trans-*p*-coumaryl)-rutinoside

**Compound 9**  
kaempferol-3-O- $\beta$ -rutinoside

Position	Compound <b>4</b> <sup>16,17)</sup>		Compound <b>9</b> <sup>18)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
2	158.8		158.6	
3	134.7		135.5	
4	179.0		178.7	
5	163.0		159.0	
6	102.3	6.15 (1H, d, <i>J</i> =2.2)	102.6	6.26 (1H, d, <i>J</i> =2.0)
7	166.2		164.1	6.10 (1H, d, <i>J</i> =2.0)
8	94.8	6.34 (1H, d, <i>J</i> =2.2)	96.2	
9	158.4		162.8	
10	105.7		105.3	
1'	122.8		122.8	
2'	132.2	7.99 (1H, d, <i>J</i> =9.0)	132.4	8.05 (1H, d, <i>J</i> =9.0)
3'	116.2	6.90 (1H, d, <i>J</i> =7.9)	116.3	6.87 (1H, d, <i>J</i> =9.0)
4'	161.2		161.8	
5'	116.2	6.90 (1H, d, <i>J</i> =7.9)	116.3	6.87 (1H, d, <i>J</i> =9.0)
6'	132.2	7.99 (1H, d, <i>J</i> =9.0)	132.4	8.05 (1H, d, <i>J</i> =9.0)
1''	100.7	5.56 (1H, d, <i>J</i> =8.0)	101.9	5.03 (1H, d, <i>J</i> =7.3)

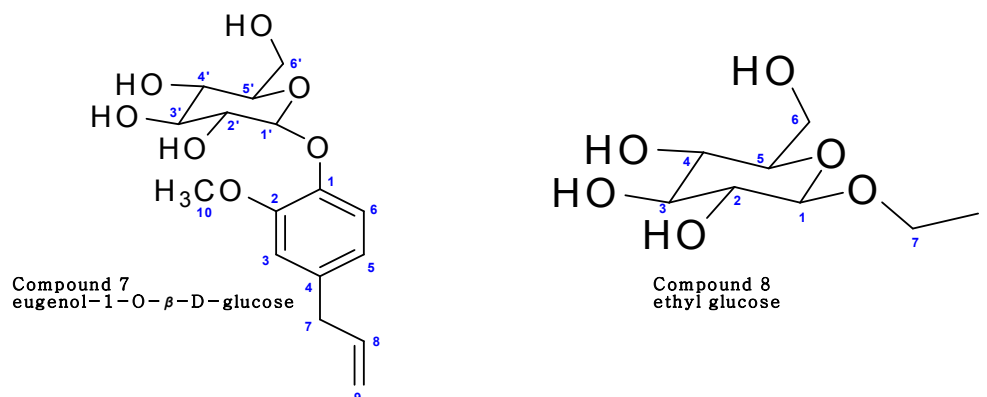
2"	76.2	6.34 (1H, t, $J=8.0$ )	75.9	3.90-3.22 (6H, m)
3"	75.6	3.94-3.25 (5H, m)	78.1	
4"	72.3		71.5	
5"	77.4		77.4	
6"	68.2		68.6	
1"	99.9		4.54 (1H, d, $J=1.4$ )	98.4
2"	72.1	3.94-3.25 (4H, m)	72.2	3.90-3.22 (4H, m)
3"	71.7		72.4	
4"	73.8		74.1	
5"	69.7		69.9	
6"	17.8		1.13 (3H, d, $J=6.3$ )	
1"	127.3			
2"	131.2	7.47 (1H, d, $J=8.7$ )		
3"	116.4	6.82 (1H, d, $J=8.5$ )		
4"	161.3			
5"	116.4	6.82 (1H, d, $J=8.5$ )		
6"	131.2	7.47 (1H, d, $J=8.7$ )		
7"	146.9	7.71 (1H, d, $J=15.8$ )		
8"	114.6	6.39 (1H, d, $J=15.8$ )		
9"	168.4			

Table 8. Isolated compound 5, 6 from *Q. galuca* leaves



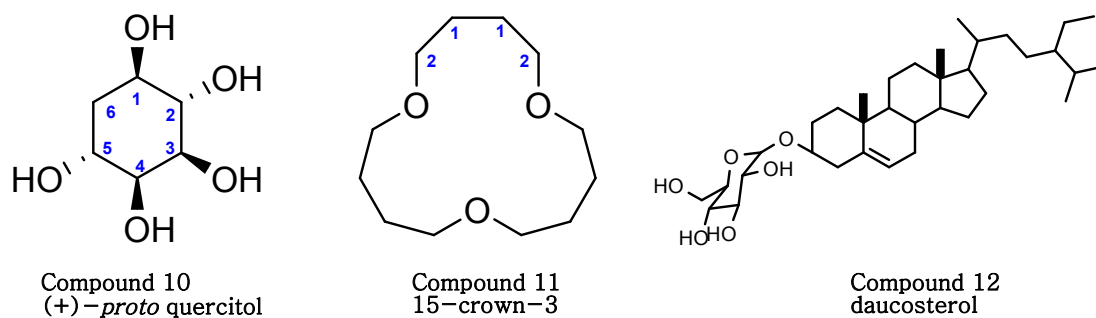
Position	Compound 5 <sup>19-21)</sup>		Compound 6 <sup>19-21)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
1	145.9		149.3	
2	149.0		115.7	
3	116.2	6.73 (1H, d, $J=1.9$ )	106.9	6.45 (1H, s)
4	133.0		132.3	
5	122.1	6.60 (1H, dd, $J=1.9, 8.0$ )	106.9	6.45 (1H, s)
6	113.4	6.70 (1H, d, $J=8.0$ )	115.7	
7	40.9	5.06-4.98 (2H, m)	41.3	5.08-4.99 (2H, m)
8	139.6	5.94 (1H, ddt, $J=6.6, 10.2, 16.5$ )	139.4	5.94 (1H, ddt, $J=6.2, 10.2, 16.3$ )
9	115.5	3.28 (2H, d, $J=6.6$ )	106.9	3.28 (2H, m)
10	56.4	3.82 (3H, s)	56.8	3.81 (3H, s)
11			56.8	3.81 (3H, s)

Table 9. Isolated compound **7**, **8** from *Q. galuca* leaves



Position	Compound <b>7</b> <sup>19-21)</sup>		Compound <b>8</b> <sup>22-25)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
1	146.5		104.2	4.25 (1H, d, $J=7.8$ )
2	150.9		75.2	
3	118.4	6.83 (1H, d, $J=1.9$ )	78.0	
4	136.6		71.8	3.98-3.13 (6H, m)
5	122.2	6.72 (1H, dd, $J=1.9, 8.3$ )	78.2	
6	114.3	7.08 (1H, d, $J=8.3$ )	62.9	
7	40.0	5.08-5.00 (2H, m)	66.3	3.16 (2H, dd, $J=7.8, 13.0$ )
8	139.1	5.95 (1H, ddt, $J=6.8, 10.0, 16.2$ )	15.5	1.23 (3H, t, $J=7.0$ )
9	115.9			
10	56.8	3.84 (3H, s)		
1'	103.2	4.79 (1H, d, $J=7.2$ )		
2'	75.1			
3'	78.3			
4'	71.5	3.88-3.10 (6H, m)		
5'	77.9			
6'	62.6			

Table 10. Isolated compound **10-12** from *Q. galuca* leaves



Position	Compound <b>10</b> <sup>26-29)</sup>		Compound <b>11</b> <sup>30)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in $D_2O$ +Acetone- $d_6$	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in $CD_3OD$
1	60.8	3.60 (2H, m)	27.7	1.62 (12H, m)
2	66.5	3.41 (1H, t, $J=3.4$ )	71.8	3.44 (12H, m)
3	62.9	3.60 (1H, m)		
4	64.2	4.79 (1H, t, $J=3.4$ )		
5	60.5	3.88 (1H, q, $J=3.0$ )		
6	25.3	6a 1.84 (1H, tt, $J=4.3, 40.0, 14.0$ )		
		6b 1.67 (1H, m)		



### 3-4. 종가시나무(잎)에서 분리된 화합물에 대한 항산화 실험결과

Column chromatography를 통하여 분리된 신규화합물의 11종에 대해 DPPH 라디칼 소거활성 실험을 통해 라디칼 소거 능력을 확인하였다. 그 결과 compound 1의  $RC_{50}$ 은  $15.725 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었고, 그 외 화합물에 대한 항산화 활성은 다음 표에 나타내었다(Table 11). compound 1을 비롯하여 *epi*-catechin ( $RC_{50} = 5.199 \mu\text{g/ml}$ ), catechin( $RC_{50} = 8.124 \mu\text{g/ml}$ ), eugenol( $RC_{50} = 18.026 \mu\text{g/ml}$ ), chavicol( $RC_{50} = 10.939 \mu\text{g/ml}$ )은 대조군으로 사용한 녹차추출물( $RC_{50} = 8.671 \mu\text{g/ml}$ )과 비교하였을때, 좋은 라디칼 소거 활성을 보였다(Figure 14, Table 11).

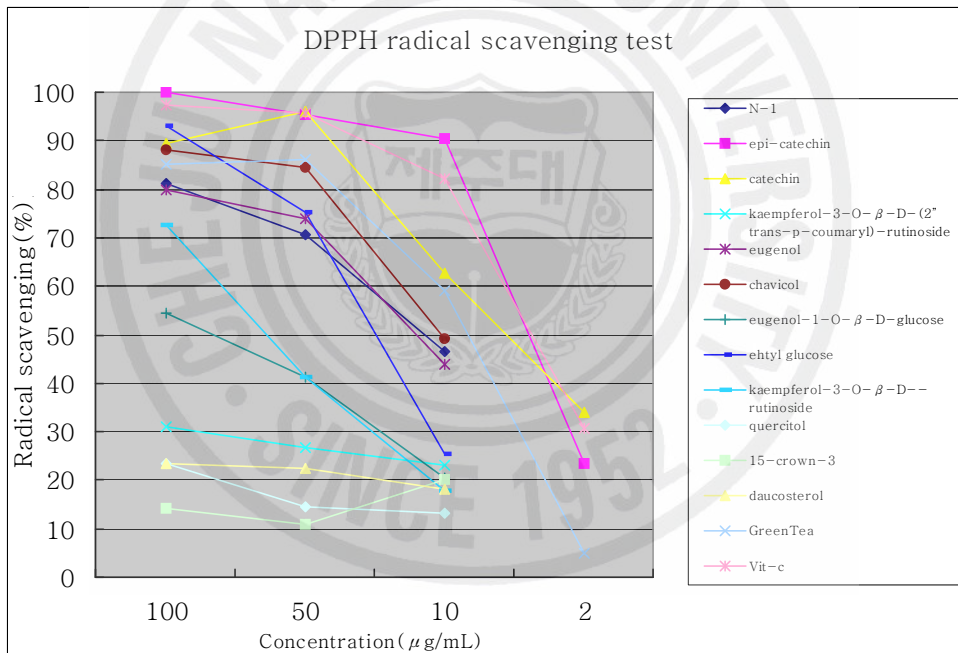


Figure 14. Radical scavenging effect of the isolated compounds from *Q. glauca* leaves

Table 11. Radical scavenging effect of the isolated compounds from *Q. glauca* leaves

	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	RC <sub>50</sub>
N-1	81.301	70.554	46.542	N.A.	15.772
<i>epi</i> -catechin	100.00	95.266	90.560	23.304	5.137
catechin	89.431	95.958	62.569	34.136	6.429
kaempferol-3-O- $\beta$ -D-(2''-trans- <i>p</i> -coumaryl)-rutinoside	31.010	26.790	23.161	N.A.	> 100
eugenol	79.791	74.018	44.018	N.A.	18.026
chavicol	88.037	84.527	49.177	N.A.	10.939
eugenol-1-O- $\beta$ -D-glucose	54.355	41.109	20.527	N.A.	83.709
ethyl glucose	92.915	75.289	25.357	N.A.	29.835
kaempferol-3-O- $\beta$ -D-rutinoside	72.706	41.109	17.892	N.A.	64.093
quercitol	23.577	14.550	13.172	N.A.	> 100
15-crown-3	14.286	10.855	18.088	N.A.	> 100
daucoesterol	23.577	22.402	18.002	N.A.	> 100
GreenTea Ext.	85.062	86.104	59.097	4.923	8.688

#### 4. 결론

중가시나무(잎) 70% 에탄올 추출물을 *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 층으로 용매분획하고, 분획물에 대하여 항산화 실험결과 4개의 분획층에서 EtOAc 층이 가장 높은 활성을 보여(RC<sub>50</sub> = 21.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), celite column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, 순상 silica gel chromatography, 역상 silica gel chromatography를 사용하여, 화합물들을 분리하였다. 분리된 화합물들은 1D, 2D NMR 기기 data를 바탕으로 구조 동정을 하였고, 문헌들과 비교한 결과 *epi*-catechin, catechin, kaempferol-3-O- $\beta$ -D-(2''-trans-*p*-coumaryl)-rutinoside, eugenol, chavicol, eugenol-1-O- $\beta$ -D-glucose, ethyl glucose, kaempferol-3-O- $\beta$ -D-rutinoside, (+)-*proto*-quercitol, 15-crown-3, daucosterol로 동정하였고, 11종의 화합물을 순수하게 분리·정제하였음을 확인할 수 있었다. 그 중 compound 1은 1D, 2D NMR, HR FAB-Mass data를 종합하여 문헌 검색한 결과 *seco*-lignan 계열의 신규화합물임을 알고, 보다 정확한 화합물정보를 위해 UV/VIS spectrum, polarimeter data 등의 기기분석자료를 토대로 신물질로 결론지었다.

Column chromatography를 통해 분리된 compound 1을 포함한 12종에 화합물에 대해 DPPH radical scavenging test 결과 compound 1(RC<sub>50</sub> = 15.725  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), *epi*-catechin(RC<sub>50</sub> = 5.199  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), catechin(RC<sub>50</sub> = 8.124  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), eugenol(RC<sub>50</sub> = 18.026  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), chavicol(RC<sub>50</sub> = 10.939  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 나타냄으로써, 높은 라디칼 소거 활성을 보였다. 따라서 본 연구의 실험결과를 토대로 중가시나무(잎)을 이용해 항산화제 개발 가능성에 기대를 엿볼 수 있었다.<sup>31-34)</sup>

## IV. 연구과제 2 : ‘조록나무 가지’의 유효성분 및 활성검색

### 1. 재료

조록나무(*Distylium racemosum*)는 쌍떡잎식물 장미목 조록나무과의 상록교목으로 한국(제주, 완도)·일본에 산기슭 저지대에 주로 자생하고 있다. 높이 20 m, 들레는 3 m에 달하며 어린 가지에 정상모(星狀毛:여러 갈래로 갈라져 별 모양의 털)가 있다가 없어지며, 잎에 커다란 벌레집이 많이 생기고, 그속에는 오배자충이 들어있어 제주 방언으로는 ‘조래기낭’, ‘조로기낭’이라 불리며, ‘영평 조록나무’라 하여 제주도기념물 21호로 지정되어있다. 꽃은 4월에 피며, 꽃잎은 없고 꽃받침 조각은 3-6개, 수술은 6-8개이며 암술은 1개이다. 열매는 9-10월에 결실하며 삭과(殼果)로 목질이고 겉에 털이 밀생하며 2개로 갈라져서 종자가 나온다. 심재(心材)는 검은 자홍색이며, 단단하여 울타리·정원수·공원수·독립수·열식·실내조경·기구재·악기재·조각재로 사용되고 있으며, 목회즙은 도자기의 유액으로 사용하고 있으며, 현재까지 조록나무 가지에 대해서는 연구 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 제주에서 자생하고 있는 조록나무 가지에서 생리활성 물질을 탐색 및 분리·동정하고, 신물질로 분리된 화합물들에 대해 구조분석 및 활성실험으로 DPPH radical scavenging test, tyrosinase inhibition test, elastase inhibition test를 실시 하였다.



Figure 15. Picture of *Distylium racemosum* Siebold & Zucc



Figure 16. Picture of *D. racemosum* leaves

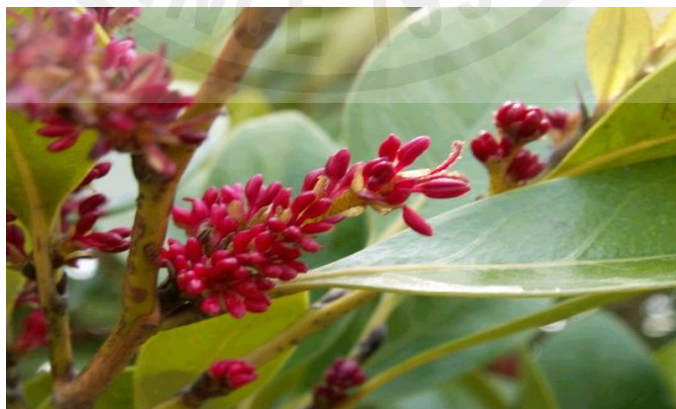


Figure 17. Picture of *D. racemosum* flower

## 2. 실험방법

### 2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

#### 2-1-1. 조록나무 가지의 70% EtOH 추출물 및 용매분획

조록나무(가지)를 쇠질하여 굵게 간 분말 2500 g을 70% EtOH 25 L에 침적하고, 실온에서 24시간동안 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통해 여액을 취해 감압농축 하였으며, 분리된 잔사는 추출과정을 동일한 조건에서 2회 반복하였다. 이 과정을 통해 70% 에탄올 추출물 273.2 g을 얻었다. 얻어진 70% 에탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔대기를 이용해 각각 1 L씩 *n*-hexane 층, EtOAc 층, *n*-butanol 층 및 H<sub>2</sub>O 층 4개의 용매분획층을 얻었다 (Figure 18).

#### 2-1-2. Celite column chromatography에 의한 분획과정

용매분획 하여 얻어진 EtOAc 분획층을 celite로 충전한 glass column을 이용하여, 분획을 하였다. 사용된 용출용매는 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, Et<sub>2</sub>O, EtOAc, Me<sub>2</sub>CO을 사용하여 각각 6개의 분획을 얻었다(Figure 18).

#### 2-1-3. Celite Et<sub>2</sub>O 분획물에서 compound 1-13, 15-18 분리과정

2-1-2에서 얻어진 Et<sub>2</sub>O 분획(10 g)을 분리하기 위해 역상 silica gel을 충전시켜 gradient 조건(H<sub>2</sub>O/MeOH)을 사용해 12개의 분획을 얻었고, RP-Fr-3을 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용하여 4개의 분획을 얻었고, Fr-3-1에서 compound 1(10.1 mg)을 얻었고, Fr-3-2에서 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 7/2)을 사용하여 compound 11(7.2 mg)과 compound 12(1.4 mg)을 얻었다. Fr-3-4에서는 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용하여 5개의

분획을 얻었고, 그중 Fr-3-4-1을 재결정시켜 compound 2(12.4 mg)을 얻었으며, Fr-3-4-3에서는 compound 3(60.7 mg)을 얻었다. RP-Fr-5을 순상 silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/2)를 사용하여 4개로 분획하였고, Fr-5-1을 Sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/1)을 사용하여 Fr-5-1-1에서 compound 4(9.2 mg), compound 5(12.2 mg)을 얻었다. Fr-5-5는 순상 silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 13/10)을 사용하여 3개로 분획을 하였고, Fr-5-5-3을 Sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/1)을 하여 Fr-5-5-3-2에서 compound 7(1.4 mg), Fr-5-5-3-2에서 compound 15(1.5 mg)을 얻었다. RP-Fr-6은 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1)을 사용하여 3개의 분획을 얻었고, Fr-6-1을 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1)을 사용하여 Fr-6-1-1에서 compound 6(15.6 mg)을 얻었다. RP-Fr-8은 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/2)을 사용하여 3개의 분획물을 얻었고, Fr-8-2을 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/1)을 사용하여 4개의 분획으로 나누었다. 그중 Fr-8-2-3을 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1)을 사용하여 Fr-8-2-3-1에서 compound 13(4.6 mg)을 얻었고, Fr-8-2-4를 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/1)사용하여 Fr-8-2-4-2에서 compound 14(12.2 mg)을 얻었다. RP-Fr-9은 순상 silica gel(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1)로 정제 후 재결정법을 통해 compound 6(63.9 mg)을 얻었다. Fr-10은 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 8/1)을 사용해 Fr-10-1에서 compound 17(9.6 mg), Fr-10-2에선 compound 18 (4.9 mg)을 얻었다. Fr-12은 재결정법을 통해 compound 10(15.2 mg)을 얻었다 (Figure 18).

#### 2-1-4. Celite EtOAc 분획물에서 compound 8, 14, 19, 20 분리과정

2-1-2에서 얻어진 EtOAc 분획(2.8 g)을 분리하기 위해 역상 silica gel을 충전시켜 gradient 조건(H<sub>2</sub>O/MeOH)을 사용하여 15개의 분획을 얻었고, 그중 RP-Fr-5은 Sephadex LH-20 gradient 조건 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O)을 사용해 7개의 분획을 얻었다. Fr-5-1을 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1)을 사용하여 3개의 분획을 얻었고, Fr-5-1-2을 순상 silica gel(Hex/EtOAc/MeOH = 10/5/8)을 사용해 Fr-5-1-2-2에서 compound 19(4.4 mg)을 얻었다. Fr-5-3는 Sephadex LH-

20(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 5/2)을 사용하여 3개의 분획을 얻었고, 그중 Fr-5-3-1에서 compound **20**(11.2 mg)을 얻었다. RP-Fr-7은 다시 역상 silica gel을 충전 시켜 gradient 조건(H<sub>2</sub>O/MeOH)을 사용해 9개의 분획을 얻었으며, Fr-7-2을 역상 silica gel, 20% MeOH을 사용하여 4개의 분획을 얻었고, 그 중 Fr-7-2-3에서 compound **14**(20.7 mg)을 얻었다. Fr-7-9은 순상 silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =

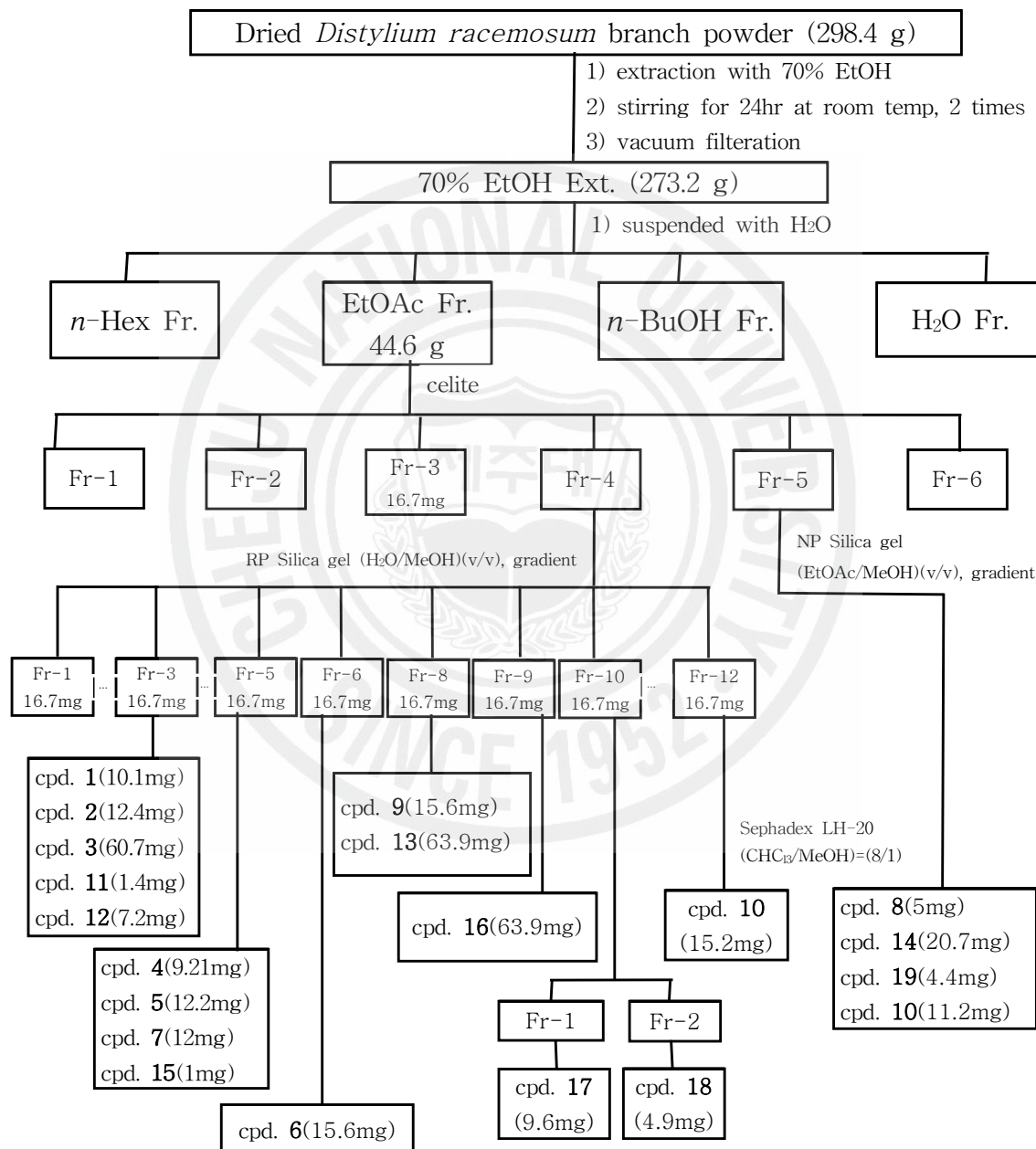


Figure 18. Isolation procedure of compounds from *D. racemosum* branch



3/1)을 사용하여 3개의 분획을 얻었고, 그중 Fr-7-9-1을 Sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1)을 사용하여 Fr-7-9-1-2에서 compound 8(5 mg)을 얻었다 (Figure 18).

## 2-2. 활성 검색

### 2-2-1. DPPH radical scavenging test

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois방법을<sup>9,10)</sup> 응용하여 사용하였고, 실험방법은 sample 0.2 mL(1 mg/mL, stock), 70% EtOH 0.8 mL, 0.2 mM DPPH solution 0.5 mL을 넣고, 상온(25 °C)에서 10분간 반응시킨 후, 525 nm에서 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, 소거능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 RC<sub>50</sub>를 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 녹차 추출물(1 mg/mL, stock), Vitamin-C(1 mg/mL, stock)을 사용하였다.<sup>11)</sup>

$$\text{Scavenging effect(\%)} = [A_0 - (A - A_b) / A_0 \times 100]$$

A<sub>0</sub> : 525 nm DPPH의 흡광도

A : 520 nm DPPH와 시료반응액의 흡광도

A<sub>b</sub> : 525 nm 시료의 흡광도

### 2-2-2. Tyrosinase inhibition test

Tyrosinase inhibition test는 DOPA chrome법<sup>35)</sup>을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 사용하였고, 사용된 기질로써 L-tyrosine(L-3[Hydroxyphenyl]alanine)을 사용하였다.

실험방법은 buffer 1.0 mL, sample 0.9 mL(20 mg/mL, stock), L-tyrosine(0.3 mg/mL, substrate) 1 mL, mushroom tyrosinase(1250 units/mL, Enzyme) 0.1 mL을 넣고, 37 °C에서 10분간 반응시킨 후, 480 nm에서 UV/VIS 분광광도계를 이용하

여 흡광도를 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC<sub>50</sub>을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 arbutin(20 mg/ml, stock), kojic acid(20 mg/ml, stock)을 사용하였다.<sup>36)</sup>

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

A : sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

A : 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

### 2-2-3. Elastase inhibition test

Elastase inhibition test는 James법<sup>37)</sup>을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.9)를 사용하였고, 사용된 기질은 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide를 사용하였다.

실험은 buffer 84(pH 8.0), sample 1(10 mg/ml, stock), N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 10(4 mM, substrate), elastase 1(100 µg/ml, Enzyme) 비율로 섞고, 25 °C에서 15분간 반응시킨 후 410 nm에서 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC<sub>50</sub>을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 oleanolic acid(10 mg/ml, stock), 빈랑자추출물(10 mg/ml, stock)을 사용하였다.<sup>36)</sup>

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

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

### 3. 결과

#### 3-1. 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 활성 실험결과

##### 3-1-1. 항산화 실험결과

조록나무(가지)의 70% 에탄올 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 DPPH radical scavenging test 실험 결과, 조록나무 가지의 70% 에탄올 추출물은  $RC_{50}$  수치  $18.384 \mu\text{g/ml}$ 을 보였으며, 각각 분획물에 대한 항산화결과는 EtOAc 분획층 ( $RC_{50} = 5.644 \mu\text{g/ml}$ ), *n*-BuOH 분획층( $RC_{50} = 6.979 \mu\text{g/ml}$ ), H<sub>2</sub>O 분획층( $RC_{50} = 14.413 \mu\text{g/ml}$ )으로 *n*-Hex 분획층을 제외한 전 분획층에서 70% 에탄올 추출물보다 더 높은 항산화 결과를 나타내었고, 대조군으로 사용한 녹차추출물( $RC_{50} = 8.66 \mu\text{g/ml}$ )과 Vitamin-C( $RC_{50} = 5.00 \mu\text{g/ml}$ )과 비교하였을때도, 더 우수한 항산화 활성결과를 나타내었다(Figure 19).

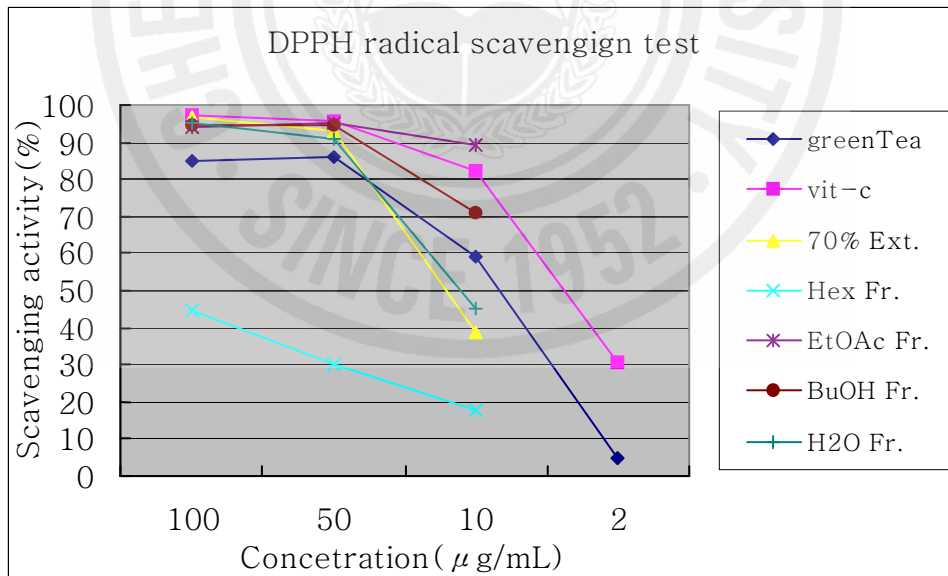


Figure 19. Radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *D. racemosum* branch

### 3-1-2. Tyrosinase 저해 활성 실험결과

조록나무(가지)의 70% 에탄올 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 tyrosinase 저해 실험결과, 조록나무 가지의 70% 에탄올 추출물은  $IC_{50}$  수치  $35.23 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 보였으며, 각각 분획물에 대한 tyrosinase 저해 실험결과는 EtOAc 분획층( $IC_{50} = 27.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), *n*-BuOH 분획층( $IC_{50} = 29.60 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), H<sub>2</sub>O 분획층( $IC_{50} = 47.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 나타내었고, EtOAc 분획층과 *n*-BuOH 분획층은 70% 에탄올 추출물 보다 더 높은 효소활성을 저해하는 결과를 나타내었다. 또한 대조군으로 사용한 arbutin( $IC_{50} = 48.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ )과 kojic acid( $IC_{50} = 36.224 \mu\text{g}/\text{ml}$ )과 비교하였을때도, 더 높게 효소활성을 저해하는 결과를 나타내었다(Figure 20).

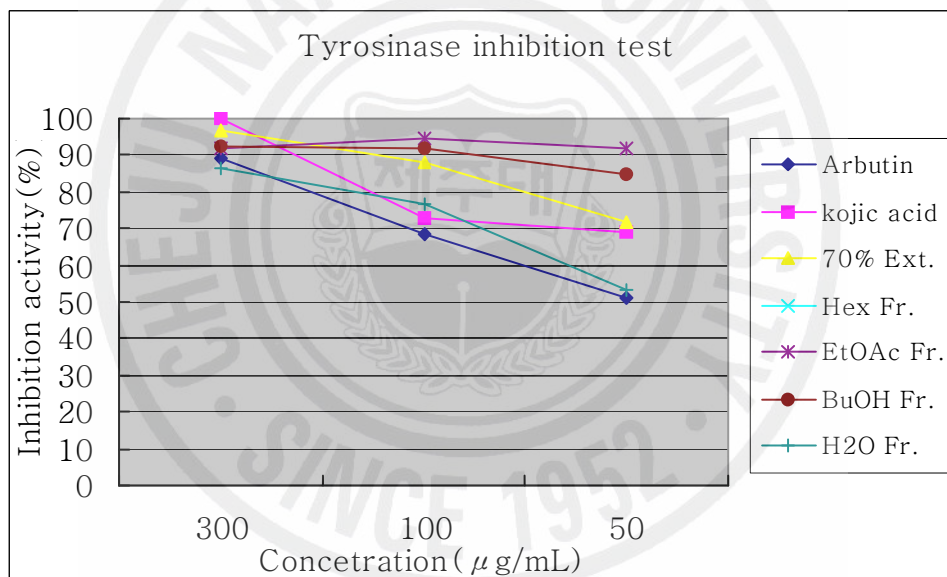


Figure 20. Tyrosinase inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *D. racemosum* branch

### 3-1-3. Elastase 저해 활성 실험결과

조록나무(가지)의 70% 에탄올 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 elastase 저해 실험결과, 조록나무 가지의 70% 에탄올 추출물은  $IC_{50}$  수치  $33.95 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을

보였으며, 각각 분획물에 대한 elastase 저해 실험결과는 EtOAc 분획층( $IC_{50} = 40.21\mu\text{g}/\text{ml}$ ), *n*-BuOH 분획층( $IC_{50} = 37.68\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 나타내었다. 대조군으로 사용한 oleanolic acid( $IC_{50} = 9.69\mu\text{g}/\text{ml}$ )와 빈랑자 추출물( $IC_{50} = 25.54\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 비교하였을때도, 우수한 효소 활성저해 결과를 나타냄을 알 수 있었다(Figure 21).

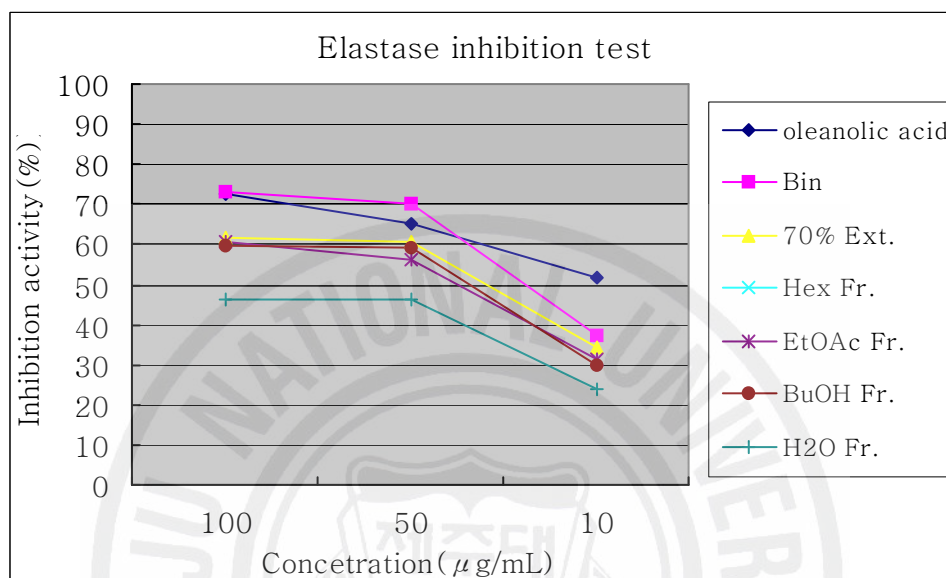


Figure 21. Elastase inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *D. racemosum* branch

### 3-2. Compound 16의 분리 및 구조 확인

조록나무(가지) 건조분말(2.5 kg)을 70% EtOH로 추출한 후 얻어진 70% 에탄올 추출물을 가지고, *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 각각 *n*-hexane 층, EtOAc 층, *n*-butanol 층 및 H<sub>2</sub>O 층으로 용매분획 하였다. 4개의 용매분획을 항산화 실험과 tyrosinase inhibition test, elastase inhibition test 결과 EtOAc 분획층에서 가장 높은 활성을 나타내어, EtOAc 분획층을 가지고 *n*-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, Et<sub>2</sub>O, EtOAc, Me<sub>2</sub>CO을 사용하여 celite column chromatography로 분리하여 각각 6개의 분획을 얻었다(Figure 18). 이 중 celite Et<sub>2</sub>O 층을 가지고, 역상 silica gel을 충전 시켜 gradient 조건(H<sub>2</sub>O/ MeOH)을

사용하여 12개의 분획을 얻었고, 그중 RP-Fr-9을 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 4/1), 순상 silica gel를 이용해 정제 후 재결정법을 통해 compound **16**(63.9 mg)을 얻었다(Figure 18, Table 12).

Table 12. Yield for extract and each solvent fraction from *D. racemosum* branch

Ext. solvent	Yield (%)
70% EtOH Ext.	10.9
<i>n</i> -hexane Fr.	6.4
EtOAc Fr.	16.3
<i>n</i> -butanol Fr.	25.6
H <sub>2</sub> O Fr.	51.5
Compound <b>16</b>	0.003

화합물 1의 구조 확인은 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC, HR-FAB MASS를 통하여 확인하였다.

<sup>1</sup>H-NMR을 통하여 확인 한 결과 δ 11.830(1H, s)과 δ 11.357(1H, s)에서 나타나는 signal로 보아 화합물내에 -OH기가 있음을 예상하였고, δ 7.71(1H, d, *J* = 8.0)과 δ 7.68(1H, d, *J* = 8.0)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음을 예상하였고, coupling constant를 통해 방향족 고리의 수소가 ortho 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상할수 있었다. δ 7.17(1H, s) signal을 보아 방향족 고리에 인접한 수소 없이 혼자 방향족 고리에 연결되어 있는 수소가 있을것이라고 예상할 수 있었고, δ 4.12(3H, s)와 δ 4.10(3H, s)의 signal을 보아 화합물내에 methoxy group이 존재하고 있음을 예상하였다. δ 2.98(3H, s)에서 나타나는 signal을 보아 화합물내에 methoxy group이 있음을 예상할 수 있었다 (Figure 22).

<sup>13</sup>C NMR을 통해서는 화합물 탄소의 총 개수가 15개 이상임을 예상하였다. DEPT (45°, 90°, 135°)을 통해 δ 152-117 사이에 나타나는 9개의 peak가 4차 탄소임을 확인하였고, δ 116.1-107.5 사이에 나타나는 3개의 peak가 tertiary 탄소임을 확인하였다. δ 61.4-61.3에서 나타나는 2개의 peak와 δ 22.4에서 나타나는

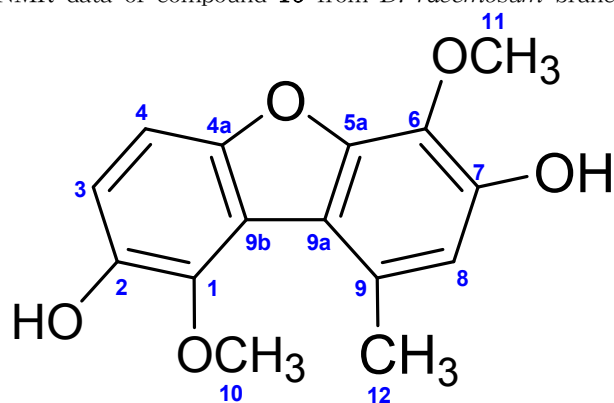
1개의 peak는 primary형태의 탄소임을 확인하였다(Figure 23).

또한 compound **16**의 정확한 구조동정을 위해 2D NMR data를 분석하였다.

HMQC NMR spectrum에서 6개의 수소 피크가 각 예상탄소와 정확하게 교차함을 확인하였다(Figure 24). HMBC NMR spectrum을 통해 각 수소와 탄소간의 long-range coupling을 확인 하였다(Figure 25). 또한 NOESY NMR spectrum을 통하여, 입체구조상 서로 가까이하고 있는 수소를 확인함으로써 보다 더 정확한 구조를 예상할 수 있었다(Figure 26). 이와 같이 NMR data를 분석하여 (Table 13), compound **16**의 분자식이  $C_{15}H_{14}O_5$ 임을 예상하였고, HR FAB-MASS 결과  $[m/z = 274.1 (M)^+]$ 를 통하여 분자량이 예상했던 분자량인 274.083와 거의 흡사하게 일치함을 증명하였다(Figure 27).

각각의 기기분석 자료를 토대로 compound **16**의 분자구조를 문헌 검색한 결과 이 화합물은 현재 문헌상 알려져 있지 않은 신물질로 추정되었고, compound **16**의 구조를 살펴본바 dibenzofuran 종류의 화합물임을 알 수 있었다.<sup>12,13)</sup> 이 화합물은 290.4 nm에서 최고 흡광도를 가지며, 녹는점은 178-182 °C을 가짐을 기기 분석을 통해 알 수 있었다(Table 13).<sup>38,39)</sup>

Table 13. 1D and 2D NMR data of compound **16** from *D. racemosum* branch



position		compound <b>16</b> (S-1)			
		$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	HMBC (H→C)	NOESY (H→H)
1	E	140	-	-	-
2	D	145	-	-	-
3	K	114	$\delta$ 7.68 (1H, d, <i>J</i> = 8.8)	C-1	-
4	L	106	$\delta$ 7.71 (1H, d, <i>J</i> = 8.8)	-	-
4a	A	149	-	-	-
5a	C	148	-	-	-
6	F	130	-	-	-
7	B	149	-	-	-
8	J	114	$\delta$ 7.17 (1H, s)	-	H-12
9	G	127	-	-	-
9a	I	115	-	-	-
9b	H	118	-	-	-
10	N	60	$\delta$ 4.11 (3H, s)	C-1	H-12
11	M	60	$\delta$ 4.12 (3H, s)	C-6	
12	O	21	$\delta$ 2.96 (3H, s)	C-8, C-9	H-8, H-10

<sup>1</sup>H-NMR : 400 MHz in Pyridine-*d*<sub>6</sub>, <sup>13</sup>C-NMR : 100 MHz in Pyridine-*d*<sub>6</sub>



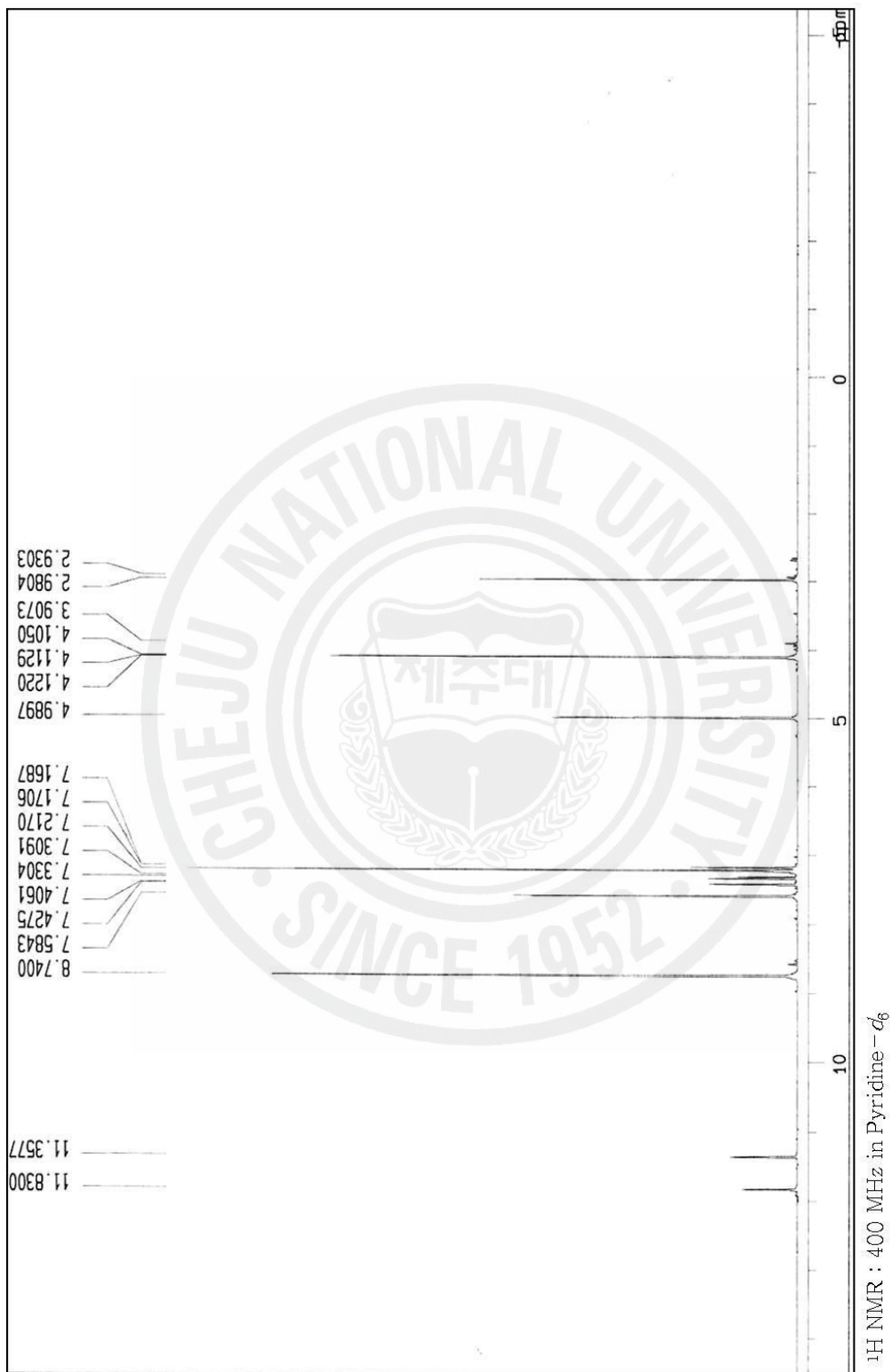


Figure 22.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 16 from *D. racemosum* branch

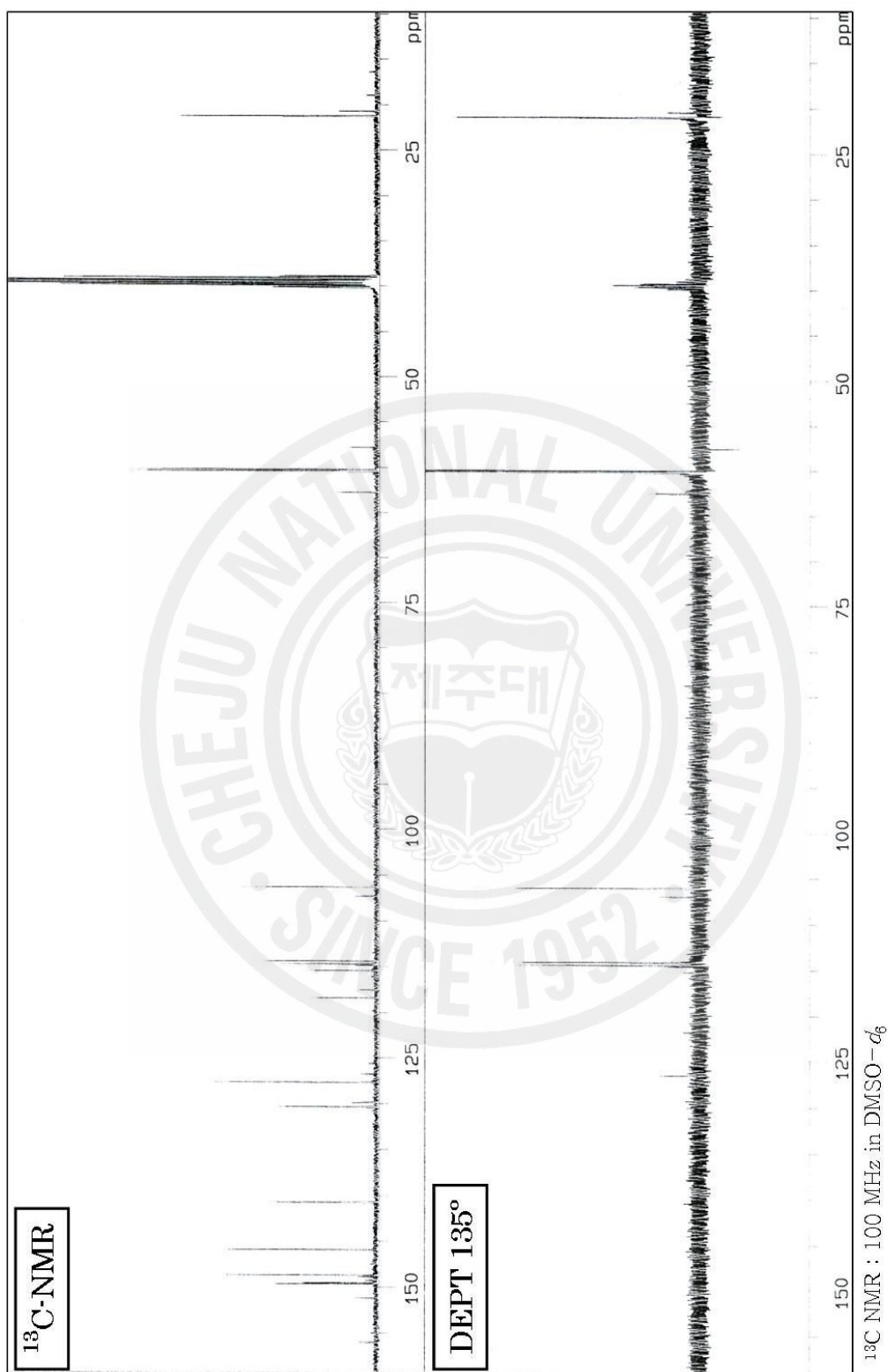


Figure 23.  $^{13}\text{C}$  NMR and DEPT spectrum of compound 16 from *D. racemosum* branch

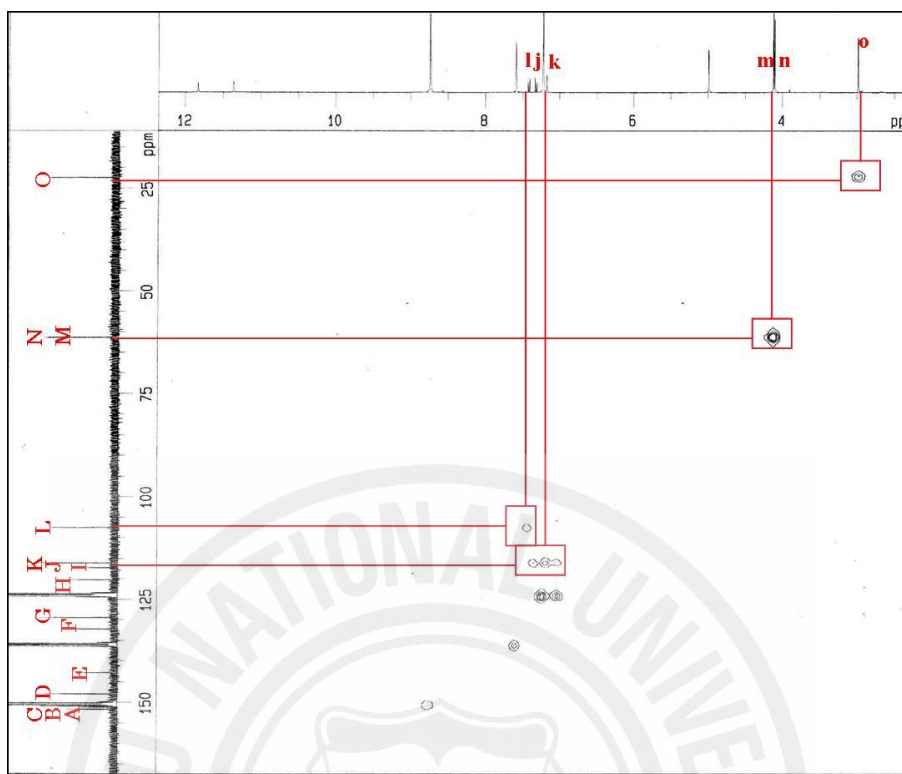


Figure 24. HMBC NMR spectrum of compound **16** from *D. racemosum* branch

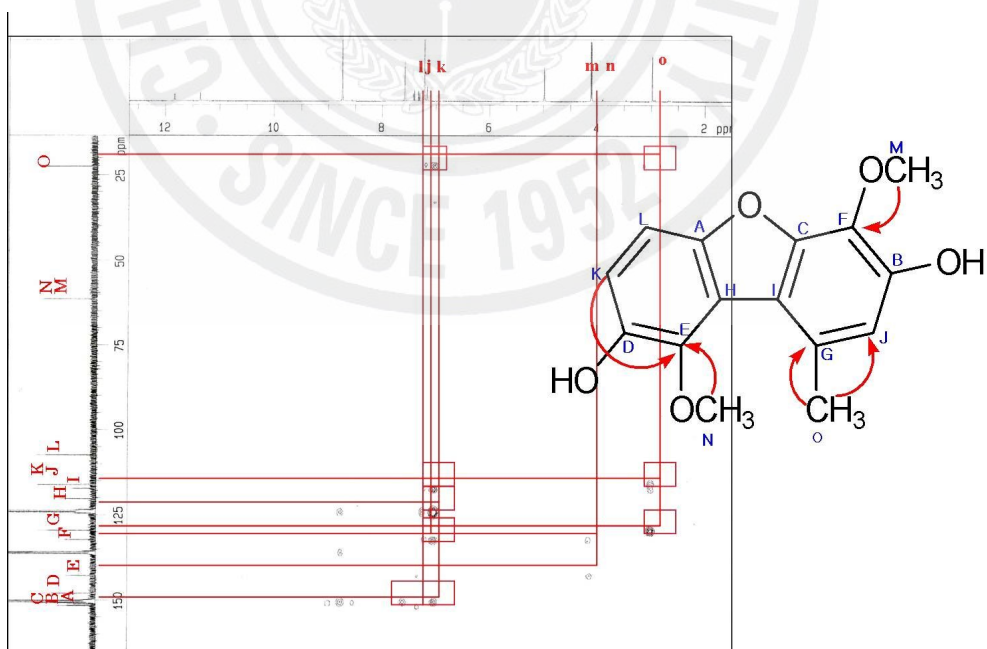


Figure 25. HMBC NMR spectrum of compound **16** from *D. racemosum* branch

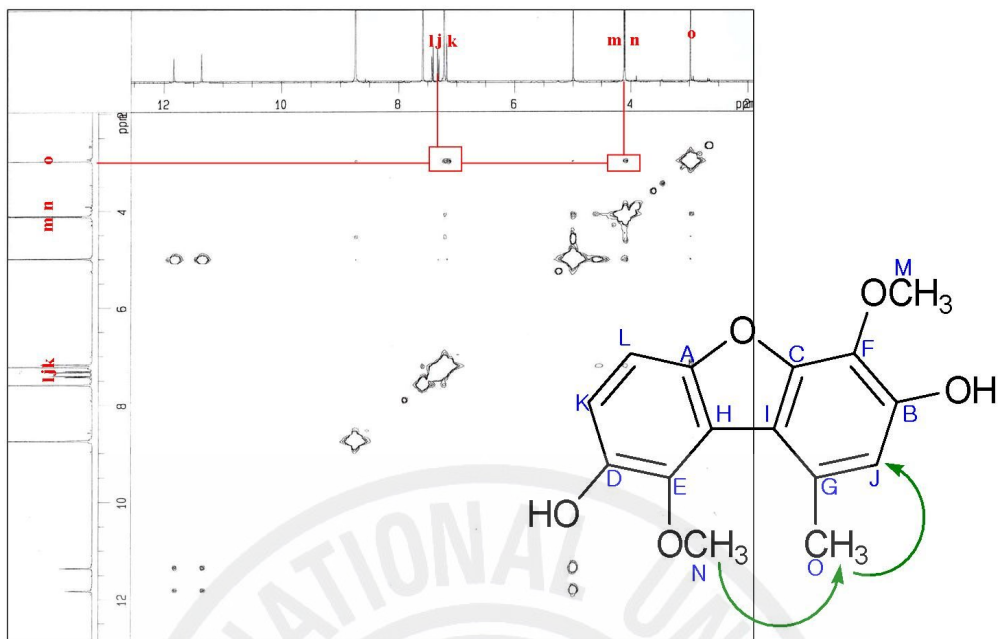


Figure 26. NOESY NMR spectrum of compound **16** from *D. racemosum* branch

Table 14. Information of compound **16** from *D. racemosum* branch

Appearance	white amorphous powder
Chemical Formula	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
UV λ max (nm)	290.4
Melting Point	178–182 °C
Molecular Weight	274.1

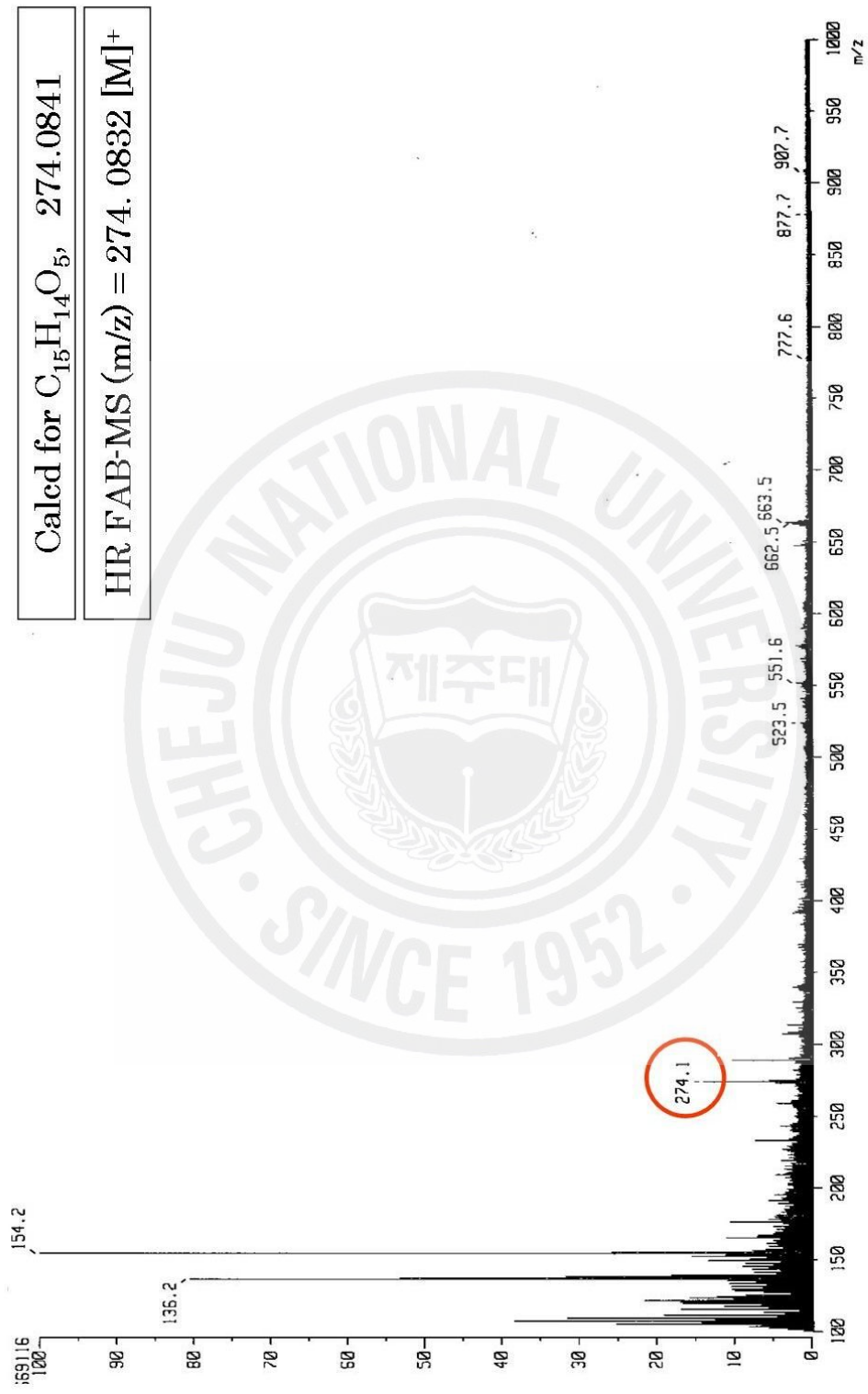
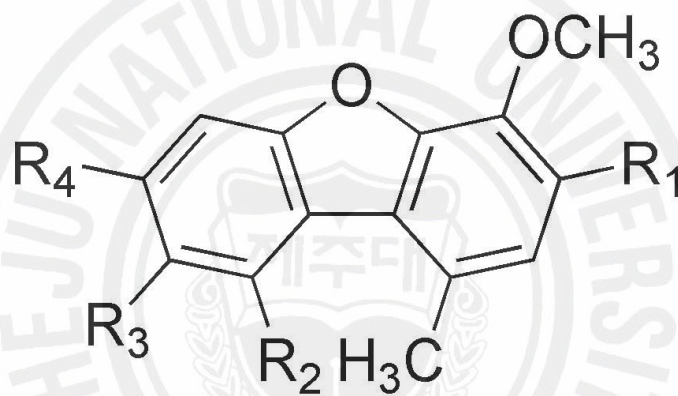


Figure 27. HR FAB-MASS spectrum of compound 16 from *D. racemosum* branch

3-3. 조록나무(가지)에서 S-1과 같은 종류에 3종에 화합물 확인

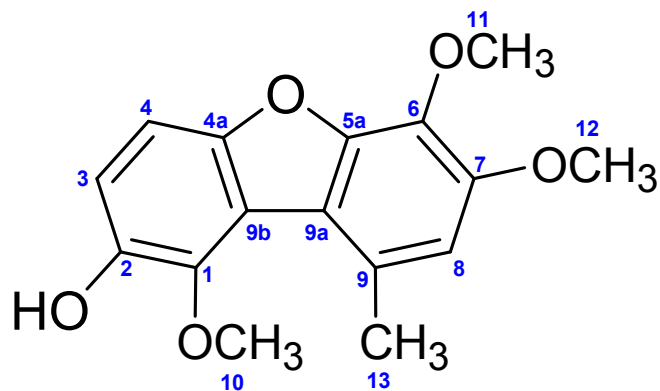
S-1과 같이 column chromatography를 이용해 분리·정제된 compound 17, 18, 19 화합물 또한 1D, 2D NMR, HR FAB-MASS을 이용하여 화합물을 예측한 결과, S-1과 같은 dibenzofuran계열에 신규화합물임을 기기분석 및 문헌검색을 통해 동정하였다(Table 15-19).<sup>38,39)</sup>

Table 15. Structure of same series three new compounds (compound 17, 18, 19) from *D. racemosum* branch



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
S-1	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H
S-2	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H
S-3	OH	H	CH <sub>3</sub>	OH
S-4	glucose	H	CH <sub>3</sub>	OH

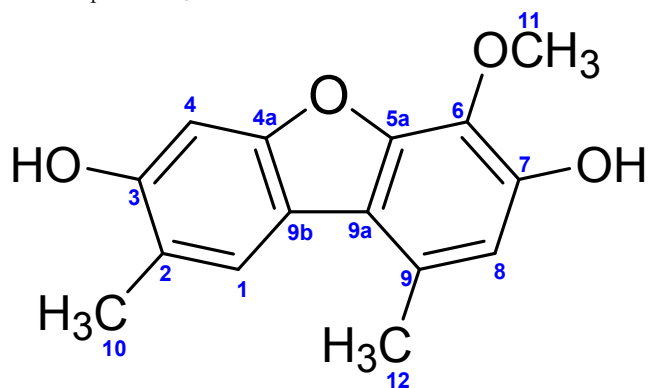
Table 16. Information of compound **17** from *D. racemosum* branch



Position		Compound <b>17</b> (S-2)			
		$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	HMBC (H→C)	NOESY (H→H)
1	E	142			
2	D	147			
3	K	116	$\delta$ 7.15 (1H, d, <i>J</i> = 8.8)	C-1, C-4a	H-13, H-12
4	L	107	$\delta$ 6.96 (1H, d, <i>J</i> = 8.8)	C-2, C-3, C-4a, C-9b	
4a	A	152			
5a	C	151			
6	F	134			
7	B	152			
8	J	116	$\delta$ 6.82 (1H, s)	C-6, C-7, C-13, C-9a	
9	G	129			
9a	H	119			
9b	I	119			
10	N	61.6	$\delta$ 3.91 (3H, s)	C-1	H-13
11	M	61.7	$\delta$ 3.98 (3H, s)	C-6	
12	O	57.4	$\delta$ 3.92 (3H, s)	C-7	H-3
13	P	22.2	$\delta$ 2.85 (3H, s)	C-9, C-8, C-9a	H-3, H-10

<sup>1</sup>H NMR : 500 MHz in CD<sub>3</sub>OD, <sup>13</sup>C NMR : 125 MHz in CD<sub>3</sub>OD

Table 17. Information of compound **18** from *D. racemosum* branch

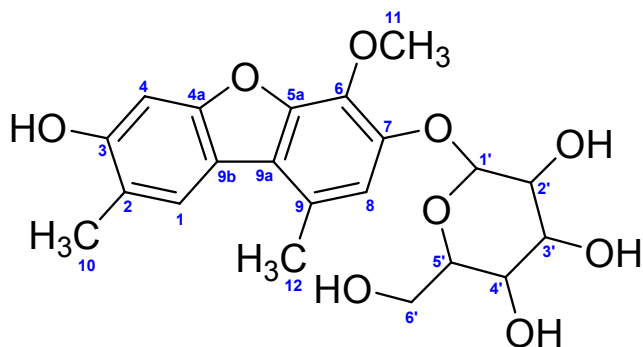


Position		Compound <b>18</b> (S-3)			
		$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	HMBC (H→C)	NOESY (H→H)
1	G	123	$\delta$ 7.58 (1H, s)	C-4a, C-3, C-10	H-10, H-12
2	H	121			
3	B	155			
4	L	98	$\delta$ 6.94 (1H, s)		
4a	A	157			
5a	C	149			
6	E	132			
7	D	148			
8	K	114	$\delta$ 6.60 (1H, s)	C-6, C-9a	
9	F	127			
9a	I	118			
9b	J	118			
10	O	16	$\delta$ 2.30 (3H, s)	C-2, C-3	H-1
11	M	61	$\delta$ 4.03 (1H, s)	C-6	
12	N	19	$\delta$ 3.25 (3H, s)	C-8, C-9, C-9a	H-1

<sup>1</sup>H NMR : 400 MHz in CD<sub>3</sub>OD, <sup>13</sup>C NMR : 100 MHz in CD<sub>3</sub>OD



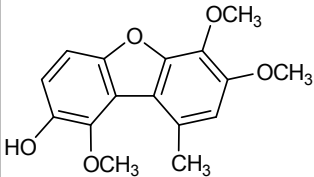
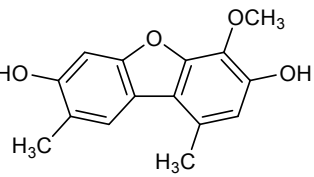
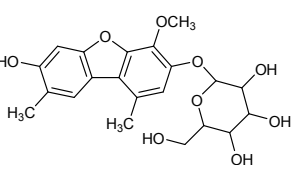
Table 18. Information of compound **19** from *D. racemosum* branch



Position		Compound <b>19</b> (S-4)			
		$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	HMBC (H→C)	NOESY (H→H)
1	G	123	$\delta$ 7.65 (1H, s)	C-4a, C-3	H-2CH <sub>3</sub> , H-9
2	H	122			
3	B	156			
4	M	98	$\delta$ 6.91 (1H, s)	C-4a	
4a	A	157			
5a	C	49			
6	E	134			
7	D	148			
8	K	115	$\delta$ 7.03 (1H, s)	C-7, C-6	H-9, H-1'
9	F	127			H-1, H-8
9a	I	121			
9b	J	117			
1'	L	102	$\delta$ 4.96 (1H, d, <i>J</i> = 7.3)		H-8
2'	P	75	$\delta$ 3.05 - 3.37 (6H, m)		
3'	N	178			
4'	Q	71			
5'	O	78		C-1	
6'	R	62			
10	U	16	$\delta$ 2.85 (3H, s)	C-1, C-2, C-3	H-1
11	S	62		C-6	
12	T	19		C-8, C-9, C-9a	

<sup>1</sup>H NMR : 400 MHz in CD<sub>3</sub>OD, <sup>13</sup>C NMR : 100 MHz in CD<sub>3</sub>OD

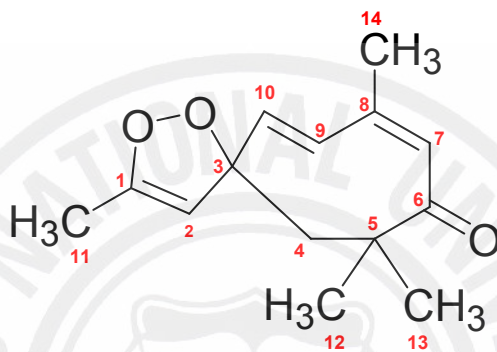
Table 19. Information of compound **17**, **18**, **19** from *D. racemosum* branch

Name	Compound <b>17</b> (S-2)	Compound <b>18</b> (S-3)	Compound <b>19</b> (S-4)
Structure			
Series	dibenzofuran	dibenzofuran	dibenzofuran
Appearance	white amorphous powder	white amorphous powder	light yellow amorphous powder
Chemical Formula	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>
UV λ max (nm)	289.5	296.4	289.3
Molecular Weight	288	258	420
Optical Rotation	-	-	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> = -16 (0.021%, MeOH)

3-4. 조록나무(가지)에서 2종에 다른 새로운 화합물 확인

Column chromatography를 이용해 분리·정제된 compound **13**, **15** 화합물 또한 1D, 2D NMR, HR FAB-MASS을 이용하여 화합물을 동정하였고, 문헌검색한 결과 신규화합물임을 기기분석 및 문헌검색을 통해 알 수 있었다(Figure 28-29, Table 20-21).

Table 20. Information of compound **13** from *D. racemosum* branch



Position		Compound <b>13</b> (V-1)			
		$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	B	167	-	-	-
2	F	127	$\delta$ 5.91 (1H, t, <i>J</i> =1.2, 1.2)	C-3	-
3	H	81	-	-	-
4	I	51	$\delta$ 2.56 (1H, d, <i>J</i> =16.8) $\delta$ 2.19 (1H, d, <i>J</i> =16.8)	C-3, C-6, C-12	-
5	J	43	-	-	-
6	A	201	-	-	-

7	G	121	$\delta$ 5.76 (1H, s)	C-9, C-14	-
8	C	148	-	-	-
9	E	129	$\delta$ 7.75 (1H, d, $J=16.0$ )	C-3, C-14	H-10
10	D	138	$\delta$ 6.20 (1H, d, $J=16.0$ )	C-3, C-8	H-9
11	N	19	$\delta$ 1.93 (3H, d, $J=1.4$ )	C-1, C-2, C-3-	-
12	K	23	$\delta$ 1.02 (3H, s)	C-3, C-4, C-5, C-13	H-13
13	L	24	$\delta$ 1.06 (3H, s)	C-4, C-5, C-12	H-12
14	M	21	$\delta$ 2.01 (3H, d, $J=1.2$ )	C-7, C-8, C-9	-

$^1\text{H}$  NMR : 400 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$   $^{13}\text{C}$  NMR : 100 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$

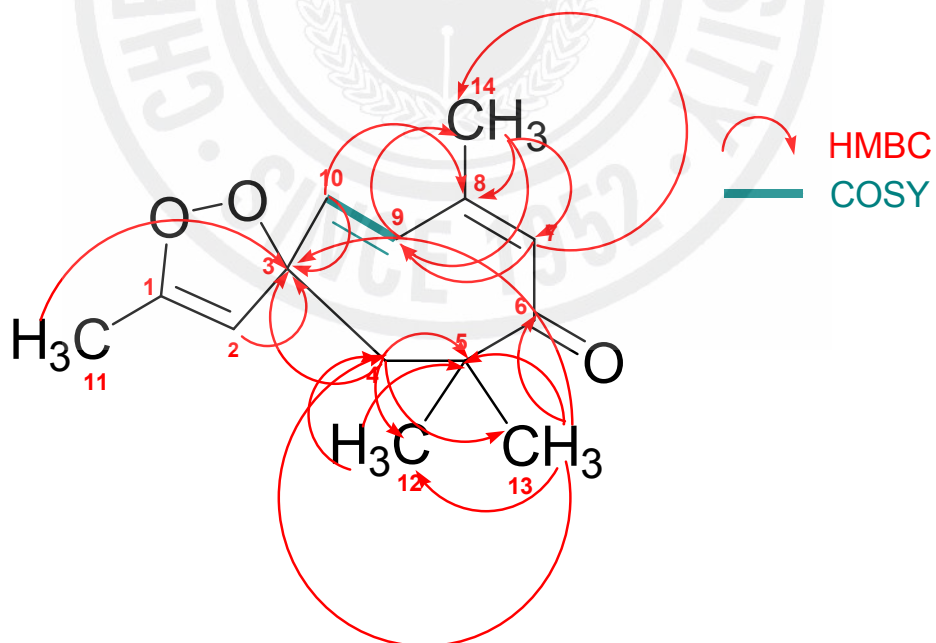
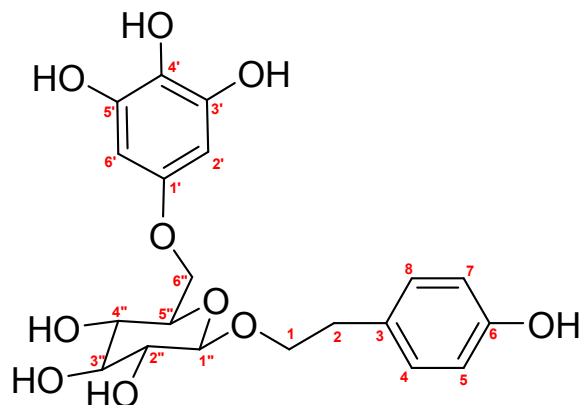


Figure 28. HMBC, COSY NMR spectrum of compound **13** from *D. racemosum* branch

Table 21. Information of compound **15** from *D. racemosum* branch



Position		Compound <b>15</b> (Z-1)			
		$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	M	72	$\delta$ 3.95–3.92 (1H, m) $\delta$ 3.74–3.69 (1H, m)	C-1''	H-2
2	P	36	$\delta$ 2.87–2.77 (2H, m)	C-4, C-8	H-1
3	F	130	–	–	–
4	D'	131	$\delta$ 7.00 (1H, d, <i>J</i> =8.5)	C-2, C-6	–
5	G'	116	$\delta$ 6.67 (1H, d, <i>J</i> =8.5)	–	–
6	B	156	–	–	–
7	G	116	$\delta$ 6.67 (1H, d, <i>J</i> =8.5)	C-3	H-8
8	E	131	$\delta$ 7.00 (1H, d, <i>J</i> =8.5)	C-2, C-6	H-7
1'	A	168	–	–	–
2'	H	110	$\delta$ 7.11 (1H, s)	C-1', C-4', C-3'	–
3'	C	146	–	–	–
4'	D	140	–	–	–
5'	C'	146	–	–	–

6'	H'	110	$\delta$ 7.11 (1H, s)	-	-
1''	I	104	$\delta$ 4.35 (1H, d, $J=7.5$ )	C-1	H-2''
2''	L	75	$\delta$ 3.23 (1H, dd, $J=7.5, 7.5$ )		H-1''
3''	J	77	$\delta$ 3.46-3.38 (2H, m)	-	-
4''	N	71		C5'', C-6''	-
5''	K	75	$\delta$ 3.57 (1H, ddd, $J=9.0, 6.0, 2.0$ )	-	H-6''
6''	O	64	$\delta$ 4.53 (1H, dd, $J=12.0, 2.0$ ) $\delta$ 4.45 (1H, dd, $J=12.0, 6.0, 2.0$ )	C-1'	H-5''

$^1\text{H}$  NMR : 500 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$   $^{13}\text{C}$  NMR : 125 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$

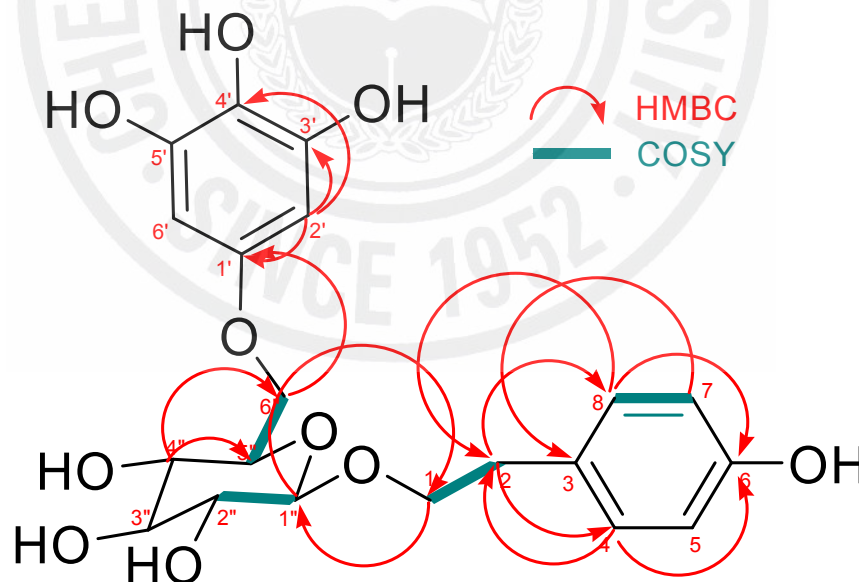
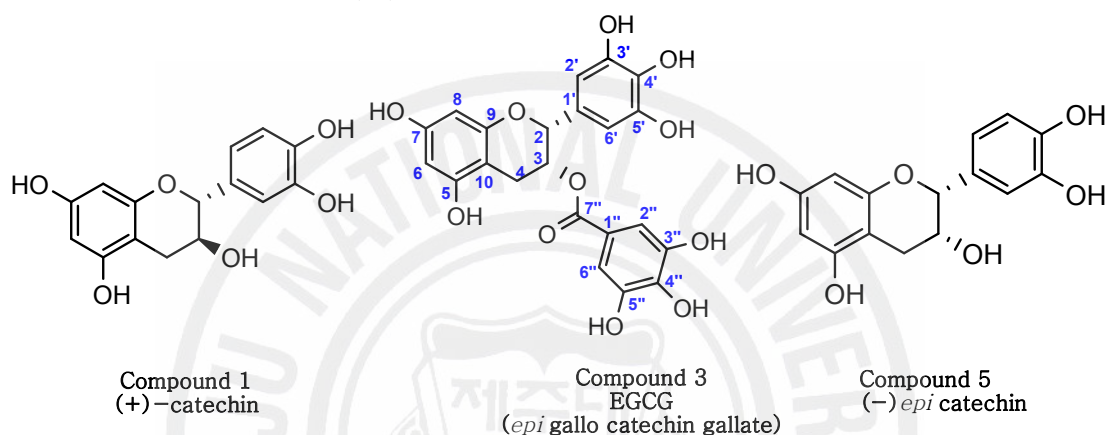


Figure 29. HMBC, COSY NMR spectrum of compound **15** from *D. racemosum* branch

3-5. 조록나무(가지)에서 14종에 다른 화합물 확인

Column chromatography를 이용해 분리·정제된 14종에 대한 화합물 또한 1D, 2D NMR을 이용하여 화합물을 예측하였고, 문헌과 대조하여 동정하였다 (Table 22-26).

Table 22. Isolated compound 1, 3, 5 from *D. racemosum* branch

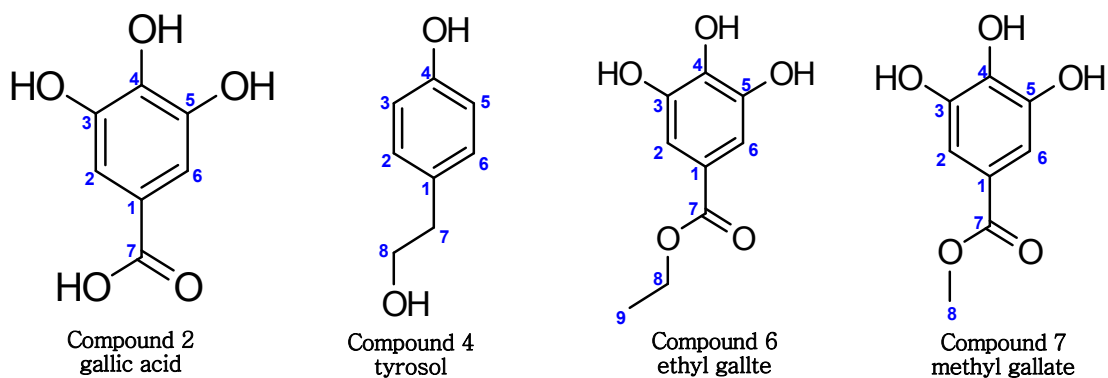


Position	Compound 3 <sup>14,15,40-44</sup>		
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	
2	78.9	4.97 (1H, s)	
3	70.2	5.53 (1H, m)	
4	27.1	4a	2.98 (1H, dd, <i>J</i> =4.6, 17.0)
		4b	2.84 (1H, dd, <i>J</i> =2.4, 17.0)
5	158.1		
6	96.8	5.96 (1H, d, <i>J</i> =2.2)	
7	158.1		
8	96.1	5.96 (1H, d, <i>J</i> =2.2)	
9	157.5		

10	99.7	
1'	131.1	
2'	110.5	6.95 (1H, s)
3'	146.9	
4'	134.0	
5'	146.9	
6'	110.5	6.95 (1H, s)
1"	121.8	
2"	107.1	6.50 (1H, s)
3"	146.5	
4"	140.1	
5"	146.5	
6"	107.1	6.50 (1H, s)
7"	167.9	



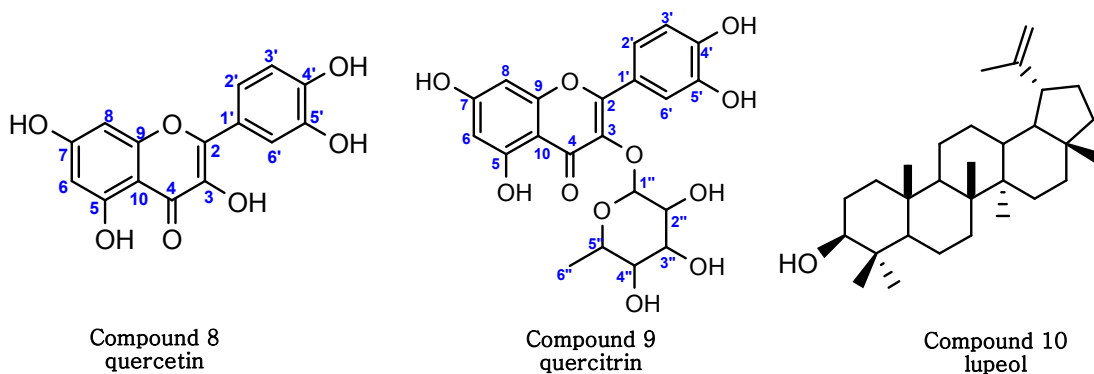
Table 23. Isolated compound 2, 4, 6, 7 from *D. racemosum* branch



Position	Compound 2 <sup>45-50)</sup>		Compound 4 <sup>51)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in pyridine- $d_5$	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
1	120.2		131.0	
2	110.9	7.50 (1H, s)	146.6	7.02 (1H, d, $J=8.5$ )
3	148.0		116.2	6.69 (1H, d, $J=8.5$ )
4	140.8		168.7	
5	148.0		116.2	6.69 (1H, d, $J=8.5$ )
6	110.9	7.50 (1H, s)	146.6	7.02 (1H, d, $J=8.5$ )
7	170.0		39.5	2.71 (2H, t, 6.69 $J=7.0$ )
8			64.7	3.67 (2H, t, 6.69 $J=7.3$ )

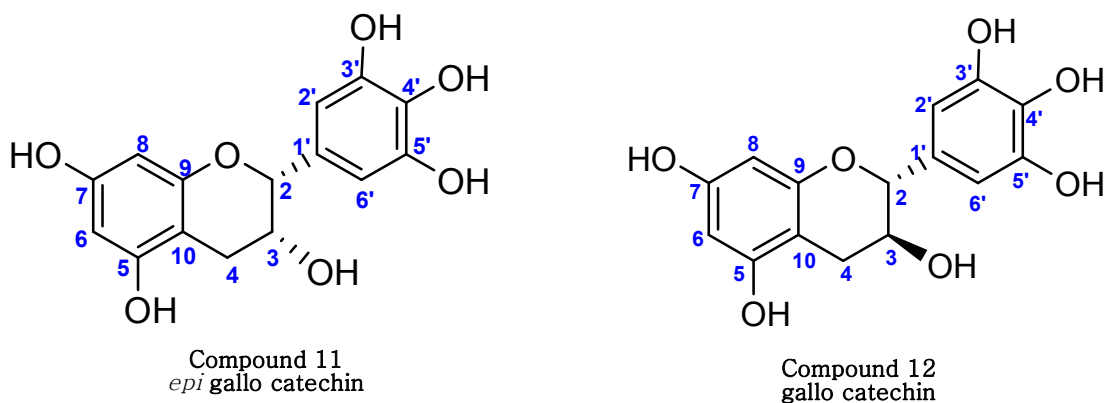
Position	Compound 6 <sup>45-49)</sup>		Compound 7 <sup>45-49)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
1	121.8		121.2	
2	110.1	7.03 (1H, s)	110.3	7.03 (1H, s)
3	146.6		146.8	
4	139.8		133.0	
5	146.6		146.8	
6	110.1	7.03 (1H, s)	110.3	7.03 (1H, s)
7	168.6		169.3	
8	61.8	4.27 (2H, q, $J=7.0$ )	52.6	3.84 (3H, s)
9	14.7	1.34 (3H, t, $J=7.0$ )		

Table 24. Isolated compound 8–10 from *D. racemosum* branch



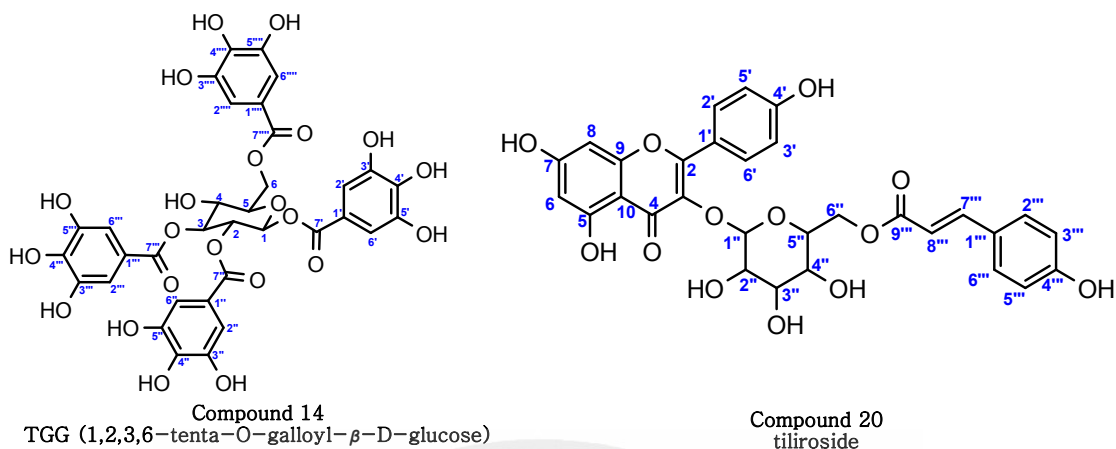
Position	Compound 8 <sup>52)</sup>		Compound 9 <sup>52)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
2	146.9		150.1	
3	135.9		136.5	
4	176.0		179.9	
5	156.3		158.9	
6	98.3	6.18 (1H, d, $J=1.9$ )	103.9	6.33 (1H, d, $J=1.9$ )
7	164.0		166.6	
8	93.5	6.40 (1H, d, $J=1.9$ )	100.2	6.17 (1H, d, $J=1.9$ )
9	160.9		163.5	
10	103.1		106.1	
1'	122.1		123.3	
2'	120.1	6.99 (1H, dd, $J=3.4, 8.8$ )	123.2	7.30 (1H, dd, $J=2.2, 8.2$ )
3'	115.7	7.91 (1H, d, $J=8.8$ )	117.2	6.90 (1H, d, $J=8.2$ )
4'	147.8		159.6	
5'	145.2		146.8	
6'	115.2	6.63 (1H, d, $J=3.4$ )	116.7	7.33 (1H, d, $J=2.2$ )
1''			95.1	5.34 (1H, d, $J=1.6$ )
2''			72.4	3.76–3.34 (3H, m)
3''			72.3	
4''			73.6	
5''			72.2	4.22 (1H, q, $J=1.7$ )
6''			18.0	0.94 (3H, q, $J=6.0$ )

Table 25. Isolated compound **11**, **12** from *D. racemosum* branch



Position	Compound <b>11</b> <sup>40-44)</sup>		Compound <b>12</b> <sup>40-44)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
2	79.9	4.75 (1H, s)	83.0	4.53 (1H, d, $J=7.0$ )
3	67.6	3.98 (1H, m)	68.9	3.97 (1H, m)
4	29.2	4a 2.74 (1H, dd, $J=3.2, 16.6$ )	28.4	4a 2.82 (1H, dd, $J=5.3, 16.1$ )
		4b 2.51 (1H, dd, $J=7.8, 16.6$ )		4b 2.51 (1H, dd, $J=7.8, 16.1$ )
5	158.0		157.9	
6	96.4	5.94 (1H, d, $J=2.4$ )	96.4	5.92 (1H, d, $J=2.2$ )
7	157.7		157.7	
8	95.9	5.22 (1H, d, $J=2.4$ )	95.6	5.86 (1H, d, $J=2.2$ )
9	157.4		156.9	
10	100.2		100.8	
1'	131.6		131.7	
2'	107.0	6.52 (1H, s)	107.3	6.40 (1H, s)
3'	146.7		147.0	
4'	133.6		134.1	
5'	146.7		147.0	
6'	107.0	6.52 (1H, s)	107.3	6.40 (1H, s)

Table 26. Isolated compound **14**, **20** from *D. racemosum* branch



Position	Compound <b>14</b> <sup>45,53-57)</sup>		Position	Compound <b>20</b> <sup>58-60)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in D <sub>2</sub> O		$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
1	94.0	6.10 (1H, d, $J=8.0$ )	2	158.9	
2	72.5	5.60–3.93 (6H, m)	3	135.5	
3	76.7		4	179.5	
4	69.8		5	163.2	
5	76.6		6	100.0	6.28 (1H, d, $J=2.2$ )
6	64.1		7	166.0	
1'	121.8		8	95.7	6.11 (1H, d, $J=2.2$ )
2'	111.3	7.14 (1H, s)	9	159.0	
3'	145.9		10	105.0	
4'	139.8		1'	123.2	
5'	145.9		2'	132.5	8.00 (1H, d, $J=8.0$ )
6'	111.3	7.14 (1H, s)	3'	116.4	6.81 (1H, d, $J=9.0$ )
7'	169.9		4'	161.9	
1''	121.4		5'	116.4	6.81 (1H, d, $J=9.0$ )
2''	111.0	7.02 (1H, s)	6'	132.5	8.00 (1H, d, $J=8.0$ )
3''	145.8		1''	104.6	5.20 (1H, d, $J=8.0$ )
4''	139.7		2''	76.2	4.31–3.32 (6H, m)
5''	145.8		3''	78.4	

6''	111.0	7.02 (1H, s)	4''	72.2	
7''	168.6		5''	76.1	
1'''	120.9		6''	64.6	
2'''	111.0	6.95 (1H, s)	1'''	127.4	
3'''	145.7		2'''	131.5	7.33 (1H, d, $J=7.5$ )
4'''	139.7		3'''	117.2	6.80 (1H, d, $J=9.0$ )
5'''	145.7		4'''	161.6	
6'''	111.0	6.95 (1H, s)	5'''	117.2	6.80 (1H, d, $J=9.0$ )
7'''	168.1		6'''	131.5	7.33 (1H, d, $J=7.5$ )
1''''	117.9		7'''	146.9	6.08 (1H, d, $J=16.0$ )
2''''	111.0	6.79 (1H, s)	8'''	114.9	7.41 (1H, d, $J=16.0$ )
3''''	145.7		9'''	169.2	
4''''	139.7				
5''''	145.7				
6''''	111.0	6.79 (1H, s)			
7''''	167.1				

### 3-6. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 활성실험 결과

#### 3-6-1. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 항산화 실험결과

Column chromatography를 통하여 분리된 신규화합물 6종의 14종에 대한 DPPH 라디칼 소거 능력을 확인하였다. 그 결과 compound 16은 대조군과 비교했을때, 다소 낮은 라디칼소거반응을 보였고( $10 \mu\text{g/ml} = 15.358$ ), 그 외 화합물에 대한 항산화 활성은 다음 표에 나타내었다(Table 27). 조록나무에서 분리된 화합물 중 catechin( $\text{RC}_{50} = 6.2897 \mu\text{g/ml}$ ), gallic acid( $\text{RC}_{50} = 83.9514 \mu\text{g/ml}$ ), EGCG ( $\text{RC}_{50} = 4.5851 \mu\text{g/ml}$ ), tyrosol( $\text{RC}_{50} = 4.7368 \mu\text{g/ml}$ ), *epi*-catechin( $\text{RC}_{50} = 7.2495 \mu\text{g/ml}$ ), ethyl gallate( $\text{RC}_{50} = 3.7882 \mu\text{g/ml}$ ), methyl gallate( $\text{RC}_{50} = 2.9098 \mu\text{g/ml}$ ), *epi*-gallo catechin( $\text{RC}_{50} = 6.2711 \mu\text{g/ml}$ ), gallo catechin( $\text{RC}_{50} = 6.7403 \mu\text{g/ml}$ ), TGG( $\text{RC}_{50} = 5.7844 \mu\text{g/ml}$ )는 대조군으로 사용한 녹차추출물( $\text{RC}_{50} = 8.653 \mu\text{g/ml}$ )과 강력 항산화제로 알려진 Vitamin-C( $\text{RC}_{50} = 5.003 \mu\text{g/ml}$ )와 비교하였을때, 더 우수한 라디칼 소거 활성을 보였다(Figure 30, Table 27).

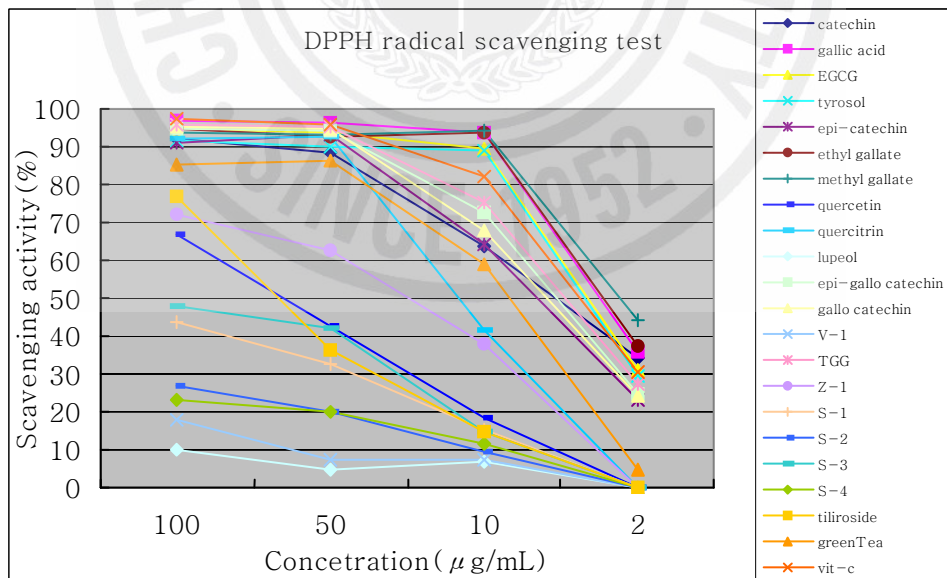


Figure 30. Radical scavenging effect of the isolated compounds from *D. racemosum* branch

Table 27. Radical scavenging effect of the isolated compounds from *D. racemosum* branch

Name	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	RC <sub>50</sub>
catechin	92.157	88.301	63.812	34.136	6.289
gallic acid	96.950	96.288	93.897	35.777	3.951
EGCG	94.553	93.701	89.615	31.182	4.585
tyrosol	91.721	89.989	89.079	29.540	4.736
<i>epi</i> -catechin	91.068	92.913	64.133	23.304	7.249
ethyl gallate	94.771	92.801	93.897	37.527	3.788
methyl gallate	93.900	93.363	94.433	44.311	2.909
quercetin	66.993	42.520	18.522	3.812	65.34
quercitrin	92.157	92.801	41.542	8.042	16.60
lupeol	10.24	6.949	6.852	N.A.	> 100
<i>epi</i> -gallo catechin	94.771	94.038	72.377	24.726	6.271
gallo catechin	95.098	94.713	67.773	24.070	6.740
V-1	18.088	7.631	7.622	N.A.	> 100
TGG	95.752	95.163	75.482	27.133	5.784
Z-1	72.235	62.642	37.998	7.538	29.46
S-1	43.894	32.802	15.358	N.A.	> 100
S-2	26.843	19.818	9.443	N.A.	> 100
S-3	47.696	42.141	14.676	N.A.	> 100
S-4	23.387	20.046	11.718	N.A.	> 100
tiliroside	76.797	36.333	14.989	3.025	66.81
Green Tea Ext.	85.062	86.104	59.097	4.923	8.653
Vit-C	97.234	95.640	82.216	30.744	5.003

### 3-6-2. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물 대한 tyrosinase inhibition test

Tyrosinase inhibition test 실험결과 compound **16**의 대조군과 비교했을때, tyrosinase 저해활성은 낮았고( $50 \mu\text{g/ml} = 22.419$ ), 그 외 화합물에 대한 tyrosinase 저해활성 자료는 다음 표에 나타내었다(Figure 31, Table 28).

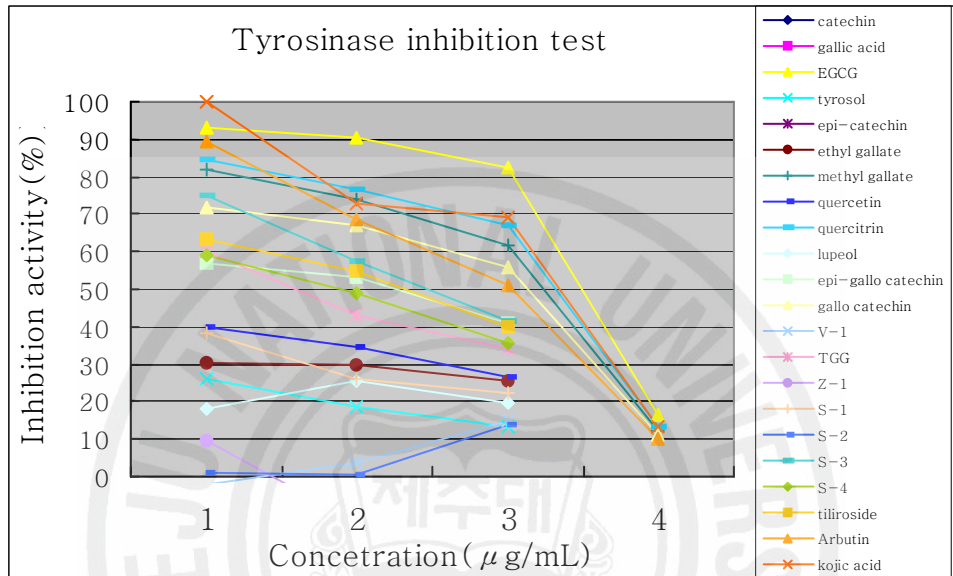


Figure 31. Tyrosinase inhibition effect of the isolated compounds from *D. racemosum* branch

조록나무에서 분리된 화합물 중 EGCG( $IC_{50} = 30.20857 \mu\text{g/ml}$ ), methyl gallate ( $IC_{50} = 40.5668 \mu\text{g/ml}$ ), quercitrin( $IC_{50} = 37.7594 \mu\text{g/ml}$ ), epi-gallo catechin( $IC_{50} = 87.3019 \mu\text{g/ml}$ ), gallo catechin( $IC_{50} = 44.8038 \mu\text{g/ml}$ )은 대조군으로 사용한 arbutin( $IC_{50} = 48.778 \mu\text{g/ml}$ )과 kojic acid( $IC_{50} = 36.224 \mu\text{g/ml}$ )와 비교하였을때도, 더 우수한 tyrosinase 저해 활성을 보였고, S-3( $IC_{50} = 76.363 \mu\text{g/ml}$ ), S-4 ( $IC_{50} = 122.11 \mu\text{g/ml}$ ), TGG( $IC_{50} = 181.76 \mu\text{g/ml}$ ), tiliroside( $IC_{50} = 83.129 \mu\text{g/ml}$ )는 대조군 보다 높은 저해 활성을 보이지 못했으나, tyrosinase 저해 활성이 있음을 알 수 있었다(Figure 31, Table 28).



Table. 28 Tyrosinase inhibition effect of the isolated compounds from *D. racemosum* branch

Name	300 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	IC <sub>50</sub>
catechin	-828.570	-248.880	-148.204	N.A.	> 300
gallic acid	-67.391	-25.680	-12.575	N.A.	> 300
EGCG	93.168	90.332	82.335	16.345	30.208
tyrosol	26.224	18.429	13.174	N.A.	> 300
<i>epi</i> -catechin	-472.360	-217.825	-100.000	N.A.	> 300
ethyl gallate	30.124	29.607	25.749	N.A.	> 300
methyl gallate	81.677	74.018	61.677	12.396	40.566
quercertin	40.062	34.743	26.347	N.A.	> 300
quercitrin	84.472	76.737	66.766	13.382	37.759
lupeol	18.323	25.378	19.461	N.A.	> 300
<i>epi</i> -gallo catechin	57.143	53.172	40.719	N.A.	87.301
gallo catechin	72.050	66.767	55.689	10.994	4.803
V-1	-1.954	3.514	14.749	N.A.	> 300
TGG	60.248	42.900	33.832	N.A.	181.760
Z-1	9.446	-12.141	-4.130	N.A.	> 300
S-1	38.436	25.879	22.419	N.A.	> 300
S-2	0.977	0.319	13.569	N.A.	> 300
S-3	74.919	57.508	41.593	N.A.	76.363
S-4	58.958	48.882	35.398	N.A.	122.11
tiliroside	63.043	54.985	40.120	N.A.	83.129
arbutin	89.130	68.580	51.198	10.260	48.778
kojic acid	100	72.81	69.162	13.519	36.224

### 3-6-3. 조록나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 elastase inhibition test

Elastase inhibition test 실험결과 compound 16의  $IC_{50}$ 은  $97.428 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 나타내었고, 그 외 화합물에 대한 elastase 저해활성은 다음 표에 나타내었다(Figure 32, Table 29).

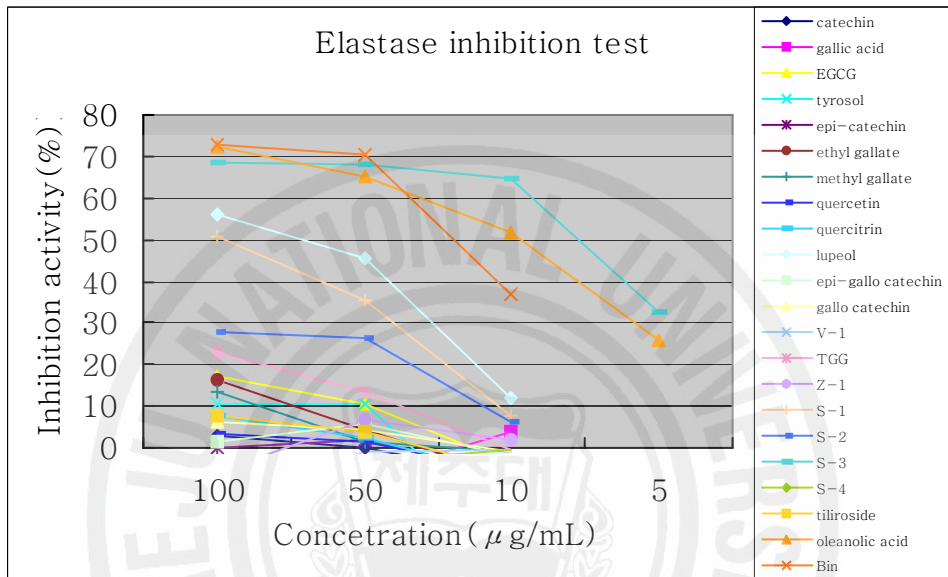


Figure 32. Elastase inhibition effect of the isolated compounds from *D. racemosum* branch

조록나무에서 분리된 화합물 중 S-3( $IC_{50} = 7.705 \mu\text{g}/\text{ml}$ )은 대조군으로 사용한 oleanolic acid( $IC_{50} = 9.7435 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 빈랑자 추출물( $IC_{50} = 25.4032 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 비교하였을때, 더 우수한 elastase 저해활성을 보였으며, lupeol( $IC_{50} = 72.1824 \mu\text{g}/\text{ml}$ )은 우수한 elastase 저해활성을 보이지 못했으나, elastase 저해 활성이 있음을 알 수 있었다(Figure 32, Table 29).

Table 29. Elastase inhibition effect of the isolated compounds from *D. racemosum* branch

Name	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	IC <sub>50</sub>
catechin	2.867	0.181	-6.818	> 100
gallic acid	-4.839	-6.510	3.977	> 100
EGCG	17.384	10.669	-3.598	> 100
tyrosol	10.573	10.488	-22.083	> 100
<i>epi</i> -catechin	-0.179	1.989	-6.818	> 100
ethyl gallate	16.487	4.159	-6.629	> 100
methyl gallate	13.441	1.266	-1.136	> 100
quercetin	3.405	1.627	-5.682	> 100
quercitrin	7.885	2.351	-6.629	> 100
lupeol	55.914	45.570	12.121	72.1824
<i>epi</i> -gallo catechin	1.613	5.787	-2.083	> 100
gallo catechin	6.452	4.159	-1.136	> 100
V-1	-12.479	-0.896	-0.450	> 100
TGG	22.760	13.562	-0.379	> 100
Z-1	-5.983	6.716	2.102	> 100
S-1	50.769	35.672	7.508	97.428
S-2	27.692	26.418	6.456	> 100
S-3	68.376	67.910	64.865	7.705
S-4	-22.906	-3.433	-0.450	> 100
tiliroside	7.706	3.978	-5.114	> 100
oleanolic acid	72.401	65.099	51.705	9.7435
Bin Ext.	72.939	70.344	37.121	25.403

#### 4. 결론

조록나무(가지) 70% 에탄올 추출물을 *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O층으로 용매분획하고, 분획물에 대하여 항산화 실험, tyrosinase inhibition test, elastase inhibition test 결과 *n*-hexane 분획층을 제외한 나머지 분획층에서 대조군과 비교했을 때, 좋은 활성을 나타내었고, 분획층 중 세 개의 활성실험에서 가장 높은 활성을 보였던 EtOAc 분획층을 가지고, celite column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, 순상 silica gel chromatography, 역상 silica gel chromatography를 사용하여 화합물들을 분리하였다. 분리된 화합물들은 1D, 2D NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 catechin, gallic acid, EGCG(*epi*-gallo catechin gallate), tyrosol, *epi*-catechin, ethyl gallate, methyl gallate, quercetin, quercitrin, *epi*-gallo catechin, gallo catechin, lupeol, TGG(1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose), tiliroside로 동정하였고, 14종의 화합물을 순수하게 분리·정제하였음을 확인할 수 있었다. 그 중 compound 16은 1D, 2D NMR, HR FAB-Mass data를 종합하여 문헌 검색한 결과 dibenzofuran 계열의 신규화합물임을 알고, 보다 정확한 화합물정보를 위해 UV/VIS spectrum, polarimeter data 등의 기기 분석자료를 토대로 신물질로 결론지었다. 그 외에도 compound 17, 18, 19에서도 같은 dibenzofuran 계열의 신물질 3종이 분리되었음을 동정하였고, compound 13에서는 polyketide 계열, compound 15에서는 phenethyl glycoside 계열의 또 다른 신물질 2종을 기기 분석자료 및 문헌검색을 통해 동정 하였다. Column chromatography를 통해 분리된 신물질 6종을 포함한 20종에 화합물에 대해 DPPH radical scavenging test, tyrosinase inhibition test, elastase inhibition test 결과 항산화 실험에서는 분리된 화합물이 대조군과 비교하였을 때, 대부분의 화합물에서 뛰어난 라디칼소거 활성이 있음을 알았고, tyrosinase inhibition test 결과 methyl gallate(IC<sub>50</sub> = 40.566  $\mu$ g/ml), quercitrin(IC<sub>50</sub> = 37.759  $\mu$ g/ml), gallo catechin(IC<sub>50</sub> = 55.8034  $\mu$ g/ml)은 대조군으로 사용한 arbutin(IC<sub>50</sub> = 48.778  $\mu$ g/ml)이나 kojic acid(IC<sub>50</sub> = 36.224  $\mu$ g/ml)와 비교했을 때 거의 비슷한 tyrosinase 저해

활성을 나타내는 것을 실험을 통해 확인하였고, EGCG( $IC_{50} = 30.2095 \mu\text{g}/\text{ml}$ )는 대조군보다 높은 tyrosinase 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다. elastase inhibition test 결과 S-3( $IC_{50} = 7.705 \mu\text{g}/\text{ml}$ )은 대조군으로 사용한 oleanolic acid ( $IC_{50} = 9.7435 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 빈랑자 추출물( $IC_{50} = 25.403 \mu\text{g}/\text{ml}$ )과 비교했을때도, 더 높은 elastase 저해활성을 보였으며, S-1( $IC_{50} = 97.428 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), lupeol( $IC_{50} = 72.1824 \mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 낮은수치지만, elastase 저해활성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 실험결과를 토대로 조록나무(가지)를 이용해 항산화제 개발, 미백소재 및 주름개선 소재로 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.<sup>31-34)</sup>



## V. 연구과제 3 : ‘수련 뿌리’의 유효성분 및 활성검색

### 1. 재료

수련(*Nymphaea tetragona* Georgi var.)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 수련과 수련속 식물로써, 한국(중부 이남)·일본·중국·인도·시베리아 동부등에 분포되어 있고, 여러해살이 수중식물로 굵고 짧은 땅속줄기에서 많은 잎자루가 자라서 물 위에서 잎을 편다. 잎몸은 길이 뚜꺼운 달걀 모양 원형이고 밑부분은 화살뿔처럼 깊게 갈라지고, 앞면은 녹색이고 윤기가 있으며, 뒷면은 자줏빛이고 질이 두껍다. 꽃은 긴 꽃자루 끝에 1개씩 달리며 흰색이다. 꽃은 5-9월에 피며, 꽃받침 4개, 꽃잎은 8-15개이며 정오경에 피었다가 저녁 때 오므라들며 3-4일간 되풀이한다. 수련속에는 온대성 종류와 열대성 종류로 나뉘고, 40종 내외의 기본종과 많은 인공잡종이 있으며 모두 수련으로 통한다. 한방에선 수련이라 하며 더위 먹은 데 사용하거나 소아경풍, 불면증 등에 사용하며, 민간요법으로는 꽃을 지혈제, 강장제로 쓰고 서양에선 위장약 성분으로 추출해 쓰기도 한다.

수련 뿌리에 대해 보고된 화합물로는 amino acids, alkaloid가 있고,<sup>61)</sup> 이들에 대한 생리활성 연구는 보고된 바가 없다.

따라서, 본연구에서는 수련 뿌리에서 컬럼크로마토그래피를 통하여 분리·동정하고, 기능성화장품소재개발에 맞춰 DPPH radical scavenging test, tyrosinase inhibition test, elastase inhibition test을 살펴보았다.

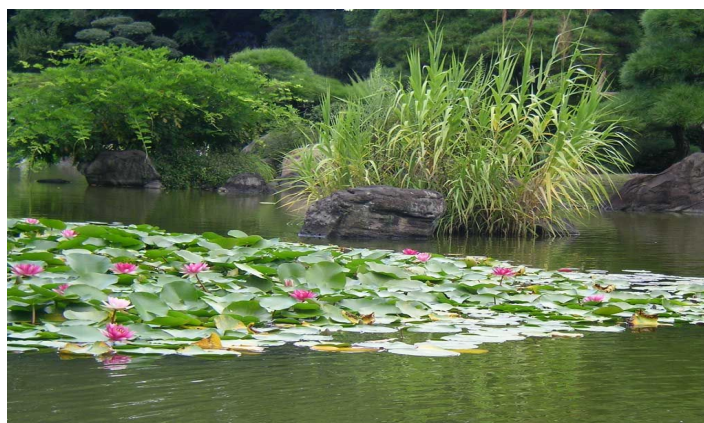


Figure 33. Picture of *Nymphaea tetragona* Georgi var



Figure 34. Picture of *N. teragona* flower



Figure 35. Picture of *N. teragona* root

## 2. 실험방법

### 2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

#### 2-1-1. 수련 뿌리에서 70% EtOH 추출물 및 용매분획

마른 수련 뿌리를 쇠질하여 굵게 간 분말 2500 kg을 70% EtOH에 침적하고 실온에서 24시간동안 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통해 여액을 취해 감압농축 하였으며, 분리된 잔사는 추출과정을 동일한 조건에서 2회 반복하였다. 이 과정을 통해 70% 에탄올 추출물 250 g을 얻었다. 70% 에탄올 추출물 57.6 g을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔대기를 이용해 각각 1 L씩 *n*-hexane 층, EtOAc 층, *n*-butanol 층 및 H<sub>2</sub>O 층 4개의 용매분획층을 얻었다(Figure 36).

#### 2-1-2. Celite column chromatography에 의한 분획과정

용매분획 하여 얻어진 EtOAc 분획층을 celite로 충전한 glass column을 이용하여 분획을 하였다. 사용된 용출용매는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O, EtOAc, Me<sub>2</sub>CO을 사용하여 각각 4개의 분획을 얻었다(Figure 36).

#### 2-1-3. Celite Et<sub>2</sub>O 분획물에서 compound 1-8 분리과정

2-1-2에서 얻어진 Et<sub>2</sub>O 분획층(9 g)을 분리하기 위해 순상 silica gel gradient 조건(Hex/EtOAc→EtOAc/MeOH)을 사용하여 6개로 분획하였고, 그중 NP-Fr-2에서 compound 1(86.2 mg)과 NP-Fr-3에서 compound 2(143 mg)을 얻었다. NP-Fr-5은 Amberlite XAD-16 gradient 조건(H<sub>2</sub>O/MeOH)을 사용해 5개의 분획을 얻었고, Fr-5-2을 Sephadex LH-20 gradient 조건(H<sub>2</sub>O/MeOH)을 사용해 Fr-5-2-1에서 compound 3(33.1 mg), Fr-5-2-2에서 compound 6(42.3 mg), Fr-5-2-4에



서 compound 8(182 mg)을 얻었다. Fr-5-2-5는 Sephadex LH-20 gradient(H<sub>2</sub>O/EtOH)를 사용하여 7개의 분획 중 Fr-5-2-5-7에서 compound 7(15.3 mg)을 얻었다. Fr-5-3에서는 compound 4(163 mg)을 얻었다(Figure 36).

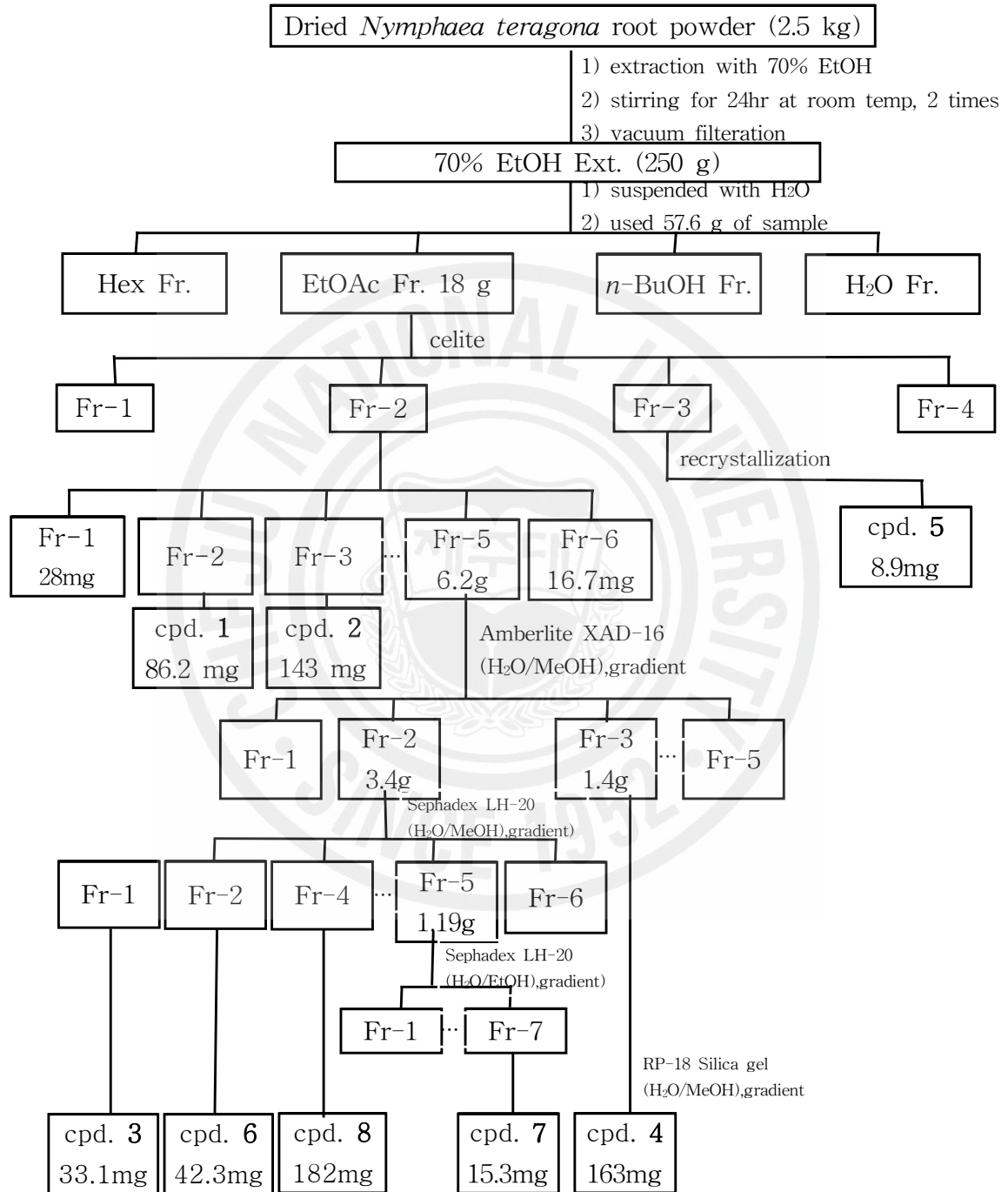


Figure 36. Isolation procedure of compounds from *N. teragona* root

## 2-2. 활성 검색

### 2-2-1. DPPH radical scavenging test

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois방법<sup>9,10)</sup>을 응용하여 사용하였고, 실험방법은 종가시나무(잎)과 조록나무(가지)에서 행하였던 방법과 동일하다.<sup>11)</sup>

### 2-2-2. Tyrosinase inhibition test

Tyrosinase inhibition test는 DOPA chrome법<sup>35)</sup>을 응용하여 사용하였고, 실험방법은 조록나무(가지)에서 행하였던 방법과 동일하다.<sup>36)</sup>



### 3. 결과

#### 3-1. 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 활성 실험결과.

##### 3-1-1. 항산화 실험결과.

수련(뿌리)의 70% 에탄올 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 DPPH radical scavenging test 실험 결과, 수련뿌리의 70% 에탄올 추출물은  $RC_{50}$  수치  $5.79 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 보였으며, 각각 분획물에 대한 항산화결과는 *n*-Hex 분획층( $RC_{50} = 68.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), EtOAc 분획층( $RC_{50} = 22.21 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), *n*-BuOH 분획층( $RC_{50} = 24.34 \mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $H_2O$  분획층( $RC_{50} = 19.87 \mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 70% 에탄올 추출물에 대한 항산화 결과는 대조군으로 사용한 녹차추출물( $RC_{50} = 8.66 \mu\text{g}/\text{ml}$ )과 Vitamin-C( $RC_{50} = 5.00 \mu\text{g}/\text{ml}$ )과 비교하여도 뛰어난 항산화 활성결과를 나타내었다. 또한, 각각 분획물에 대한 활성정도는 추출물에 비해 낮아졌지만 대조군과 비교했을 때, 높은 수준의 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Figure 37).

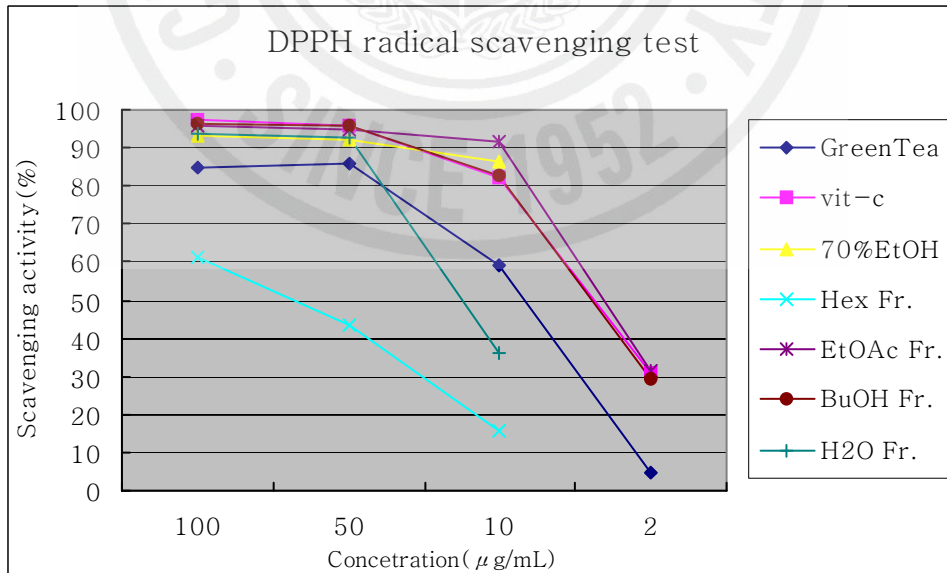


Figure 37. Radical scavenging effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *N. teragona* root

### 3-1-2. Tyrosinase 억제 실험결과

수련(뿌리)의 70% 에탄올 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 tyrosinase 저해 실험결과, 수련뿌리의 70% 에탄올 추출물은  $IC_{50} = 112.8 \mu\text{g/ml}$ 을 보였으며, 각각 분획물에 대한 tyrosinase 저해 실험결과는 EtOAc 분획층이  $IC_{50}$  수치  $88.01 \mu\text{g/ml}$ 을 보였고, *n*-Hex, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획층에서는 농도 내  $IC_{50}$ 에 tyrosinase를 저해하지 못하였다. 하지만, 70% 에탄올 추출물과 EtOAc 분획층에 대한 tyrosinase 저해 정도는 대조군으로 사용한 arbutin( $IC_{50} = 49.02 \mu\text{g/ml}$ )과 kojic acid( $IC_{50} = 36.15 \mu\text{g/ml}$ )와 비교하여 높은 tyrosinase 억제를 보임을 알수 있었다 (Figure 38).

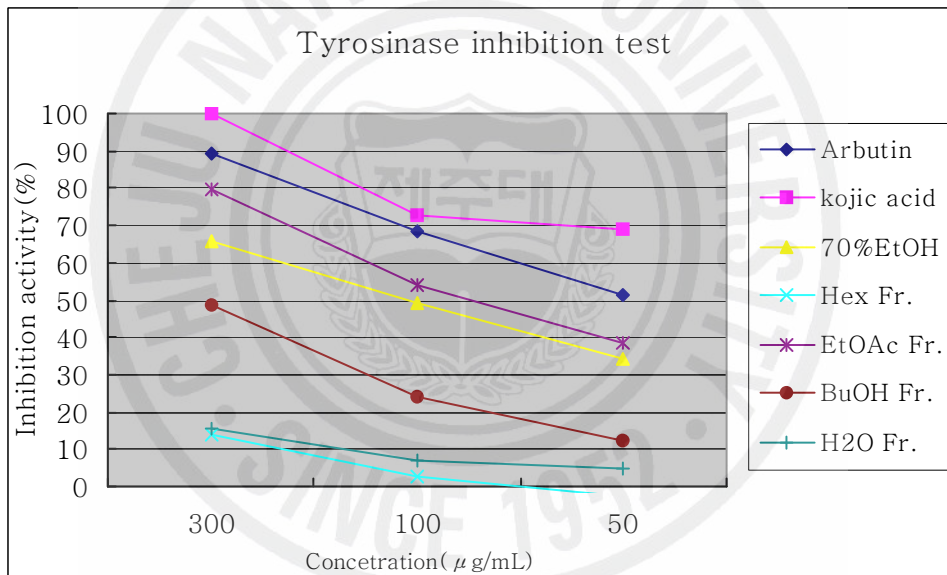


Figure 38. Tyrosinase inhibition effect of 70% EtOH Ext. and solvent Fr. from *N. teragona* root

### 3-2. Compound 6의 분리 및 구조 확인

수련(뿌리) 건조분말(2.5 kg)을 70% EtOH로 추출한 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 각각 *n*-hexane 층, EtOAc 층, *n*-butanol 층

및 H<sub>2</sub>O 층으로 용매분획 하였다. 4개의 용매분획을 가지고 항산화 실험, tyrosinase inhibition test 결과 EtOAc 분획층에서 가장 높은 활성을 나타내어 EtOAc 분획층을 가지고 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O, EtOAc, Me<sub>2</sub>CO을 사용하여 celite column chromatography로 분리하여 각각 4개의 분획을 얻었다(Figure 36). 이 중 celite Et<sub>2</sub>O 층을 가지고 순상 silica gel gradient 조건(Hex/EtOAc→EtOAc/MeOH)을 사용해 6개로 분획하였고, 그 중 NP-Fr-5을 Amberlite XAD-16 gradient(H<sub>2</sub>O/MeOH)를 사용해 5개의 분획을 얻었다. Amberlite 분획중 Fr-5-2을 Sephadex LH-20 gradient(H<sub>2</sub>O/MeOH)를 사용하여 Fr-5-2-2에서 compound **6**(42.3 mg)를 얻었다(Tabel 30).

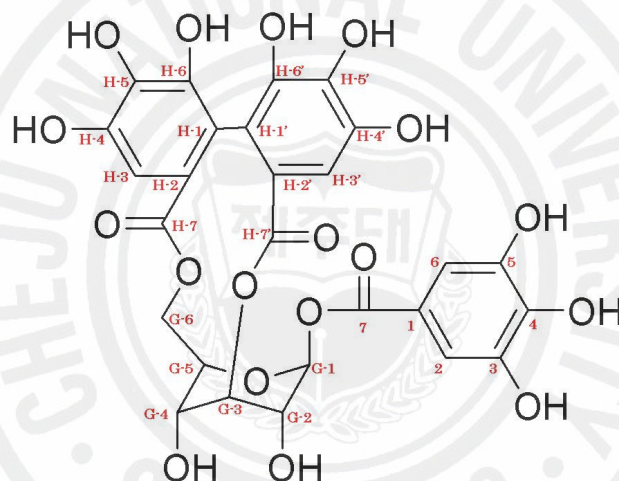
Table 30. Yield for extract and each solvent fraction from *N. tetragona* root

Ext. solvent	Yield(%)
70% EtOH Ext.	12.5
<i>n</i> -hexane Fr.	1.33
EtOAc Fr.	90.0
<i>n</i> -butanol Fr.	3.91
H <sub>2</sub> O Fr.	0.02
Compound <b>6</b>	0.73

Compound **6**의 구조 확인은 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR spectrum data와 문헌대조를 통하여 확인하였다. <sup>1</sup>H NMR을 통하여 확인 한 결과 δ 7.051(2H, s)에서 galloyl기에 의한 2H 분의 singlet signal과 δ 6.69(1H, s), δ 6.65(1H, s)에서 각각 1H 분의 HHDP기에 의한 singlet signal이 나타나는 것을 보아 화합물내에 각각 한 개의 galloyl기와 HHDP기가 존재하는 것을 예상할 수 있었고, δ 6.36(1H, d, *J*=1.96)에서 나타나는 signal과 함께 δ 4.98 - 3.97(6H, m)로 보아 화합물내에 glucose가 α form으로 결합하고 있음을 예상할 수 있었다. <sup>13</sup>C NMR을 통해서도 화합물 탄소의 총 개수가 25개 이상임을 예상하였다. 당으로부터 기인하는 singal δ 76.4, 71.8, 69.6, 65.2, 62.6로 glucose의 C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 5개의 signal과 δ 95.1 에서 glucose의 C-1 signal이 관찰되어 한개의 glucose가

결합되어 있는 것을 예상할 수 있고, glucose의 C-1 signal이 일반적인 배당체로 존재하는 glucose의 ppm값과 비교하여 약  $\delta$  10 ppm정도 upfield shift함을 미루어보아 glucose C-1에 다른 치환기가 결합해있음을 예상하였다. 또한,  $\delta$  146.5와  $\delta$  111.1에 signal의 적분값이 다른 signal의 2배이상인 것을 미루어보아 화합물 내에대칭탄소가 2개 이상임을 예상하였고,  $\delta$  170.2, 168.6, 166.8에서 ester (-COO-)기에 의한 3개의 signal을 관찰할 수 있었다. 이상의 기기분석 자료를 토대로 문헌 data를 비교한 결과 compound 6은 ellagictannin계열의 분자식  $C_{27}H_{22}O_{18}$ , M.P. 212  $^{\circ}C$ 를 갖는 corilagin으로 확인 동정하였다.<sup>65-68)</sup>

Table 31. 1D NMR data of compound 6 with data of two reference



Compound 6 (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)			Reference 1 <sup>43)</sup> (300 MHz, Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> + D <sub>2</sub> O )		Reference 2 <sup>44)</sup> (300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> +D <sub>2</sub> O)	
Position	$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult,, <i>J</i> in Hz)	$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz)	$\delta_c$ (mult) <sup>a</sup>	$\delta_H$ (int, mult,, <i>J</i> in Hz)
1	120.7	-	120.61	-	118.7	-
2	111.1	7.05 (1H, s)	110.34	7.14 (2H, s)	109.0	7.03 (2H, s)
3	146.5	-	145.74	-	145.6	-
4	140.5	-	140.09	-	139.0	-
5	146.5	-	145.74	-	145.6	-

6	111.1	7.05 (1H, s)	110.92	7.14 (2H, s)	109.0	7.03 (2H, s)
7	166.8	-	166.46	-	164.9	-
G-1	95.1	6.36 (1H, d, $J=2.0$ )	94.66	6.39 (1H, d, $J=2.7$ )	92.2	6.20 (1H, d, $J=2.3$ )
G-2	69.6	4.98 - 3.97 (6H, m)	69.12	4.01 - 4.85 (6H, m)	71.7	3.88 (1H, dd, $J=7.3, 2.3$ )
G-3	65.2		71.39		77.7	4.58 (1H, br s)
G-4	71.8		62.30		64.0	4.22 (1H, br s)
G-5	76.4		75.50		76.4	4.35 (1H, t, $J=7.3$ )
G-6	62.6		64.58		62.2	4.25 (1H, dd, $J=11.2, 6.2$ )
						3.95 (1H, dd, $J=11.2, 6.2$ )
H-1	116.8	-	117.1	-	123.9	-
H-2	125.6	-	125.6	-	106.9	-
H-3	108.4	6.68 (1H, s)	108.1	6.73 (1H, s)	143.9	6.58 (1H, s)
H-4	145.5	-	145.3	-	135.6	-
H-5	137.8	-	136.9	-	144.9	-
H-6	145.8	-	145.2	-	115.8	-
H-7	170.2	-	169.4	-	167.3	-
H-1'	117.4	-	116.2	-	123.0	-
H-2'	125.6	-	125.5	-	106.1	-
H-3'	110.3	6.65 (1H, s)	108.1	6.86 (1H, s)	144.2	6.49 (1H, s)
H-4'	145.4	-	145.3	-	135.4	-
H-5'	138.4	-	130.6	-	144.8	-
H-6'	146.2	-	145.2	-	115.6	-
H-7'	168.7	-	168.1	-	166.8	-

$^1\text{H}$  NMR : 400 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR : 100 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$

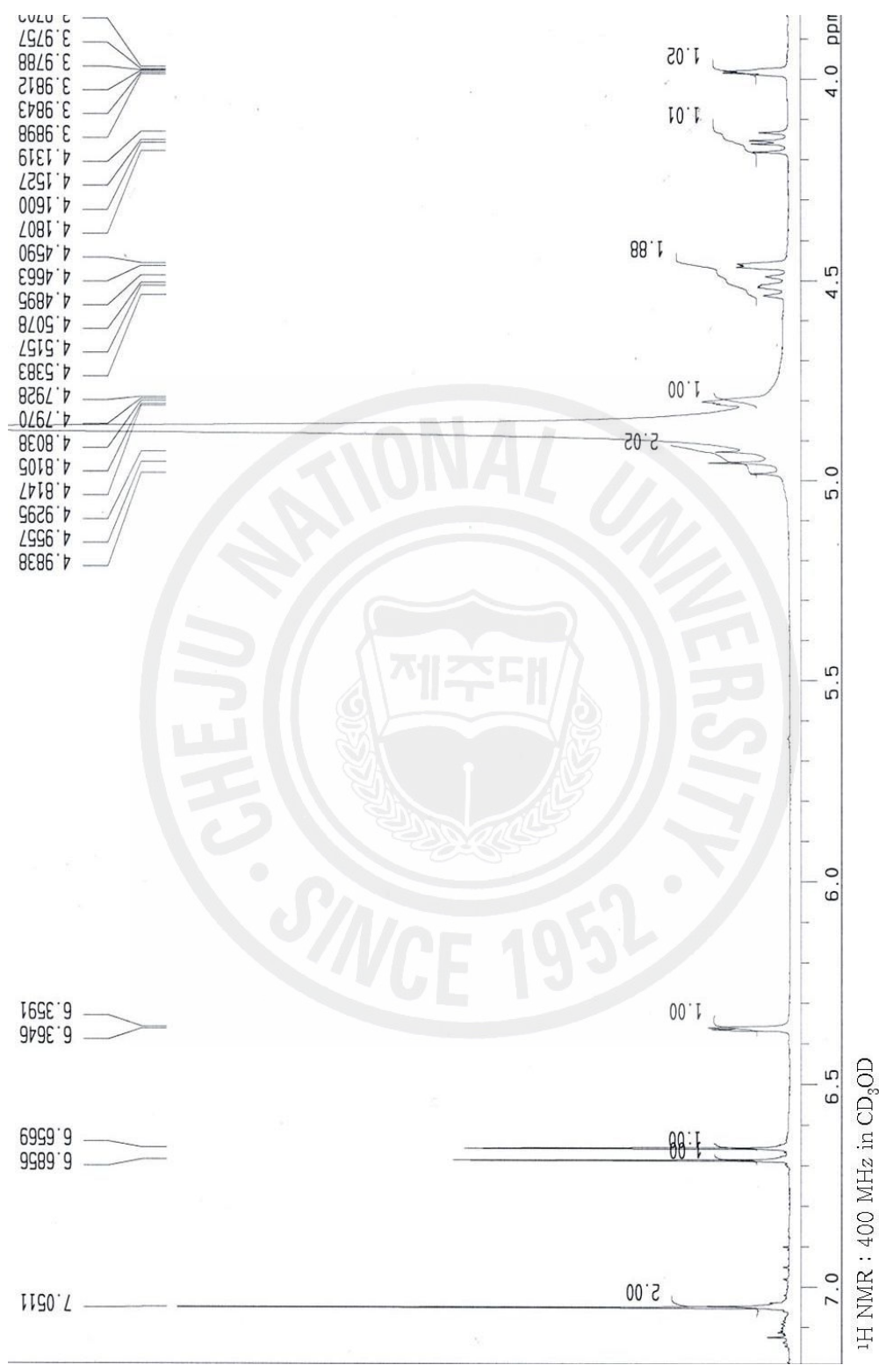


Figure 39. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 6 from *N. teragona* root



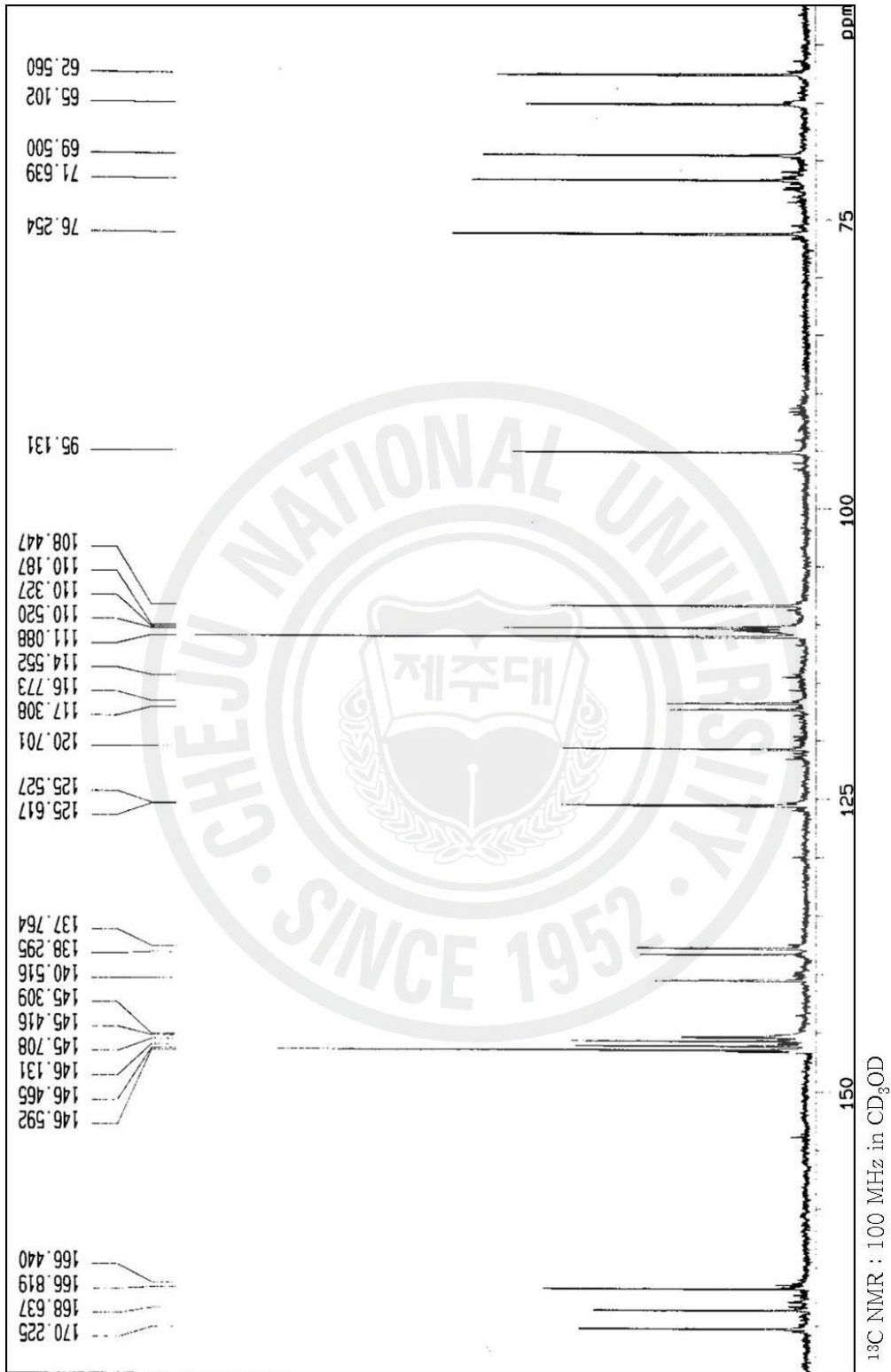
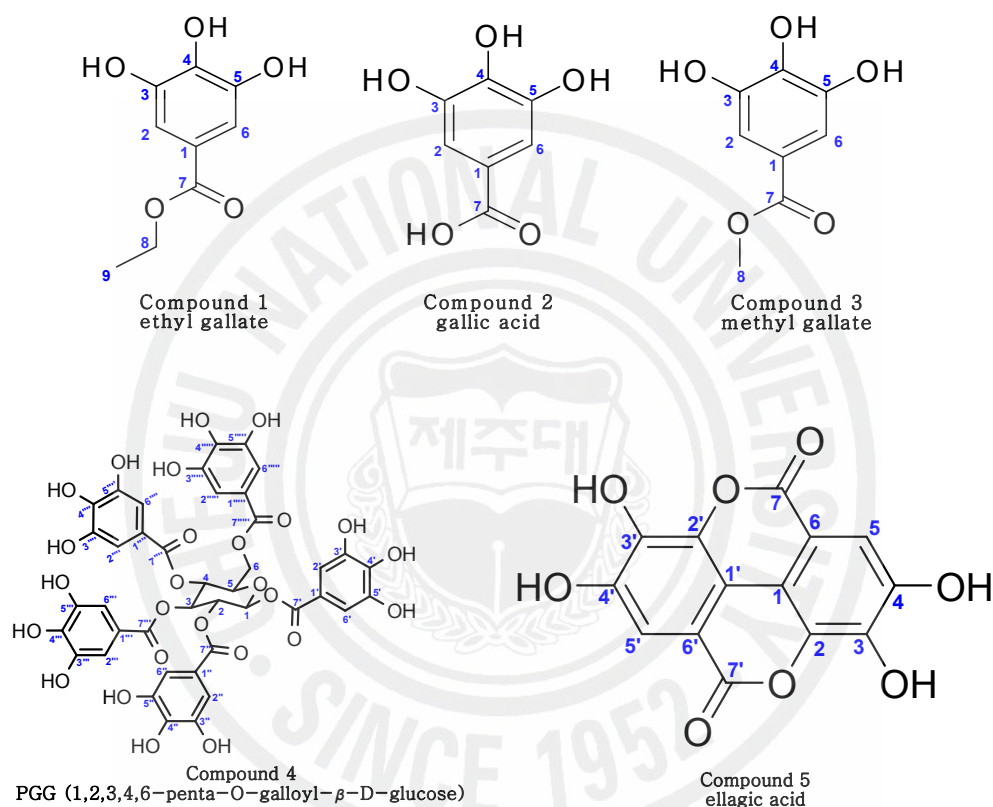


Figure 40. <sup>13</sup>C NMR spectrum of compound 6 *N. teragona* root

### 3-3. 수련(뿌리)에서 7종에 다른 화합물 확인

Compound 6과 같이 column chromatography를 이용해 분리·정제된 7종에 대한 화합물 또한 1D, 2D NMR을 이용하여 화합물을 예측하였고, 문헌과 대조하여 동정하였다(Table 32-33).

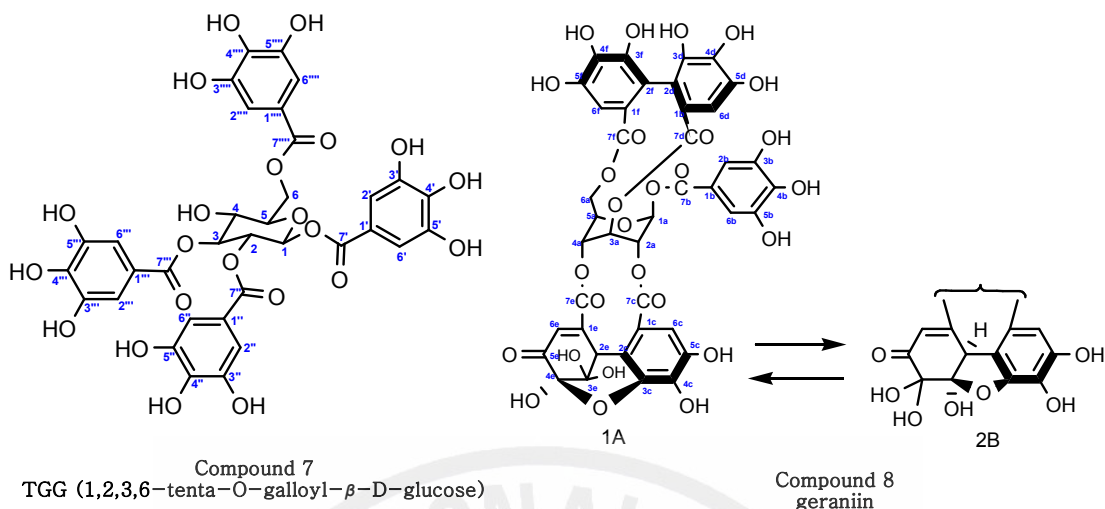
Table 32. Isolated compound 1-5 from *N. tetragona* root



Position	Compound 4 <sup>49,53-57)</sup>		Position	Compound 5 <sup>45-48,50)</sup>	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in $CD_3OD$		$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, $J$ in Hz) 400 MHz in $DMSO-d_6$
1	109.1	6.10 (1H, d, $J=8.0$ )	1	112.3	
2	72.3	5.60-3.93 (6H, m)	2	136.3	
3	74.5		3	139.9	
4	69.9		4	148.1	
5	74.2		5	110.0	7.45 (1H, s)
6	62.9		6	107.2	

1'	121.4		7	159.1	
2'	110.7	7.14 (1H, s)	1'	112.3	
3'	146.7		2'	136.3	
4'	140.8		3'	139.9	
5'	146.7		4'	148.1	
6'	110.7	7.14 (1H, s)	5'	110.0	7.45 (1H, s)
7'	167.4		6'	107.2	
1"	121.0		7'	159.1	
2"	110.6	7.02 (1H, s)			
3"	146.6				
4"	140.7				
5"	146.6				
6"	110.6	7.02 (1H, s)			
7"	168.6				
1'''	120.3				
2'''	110.5	6.95 (1H, s)			
3'''	146.6				
4'''	140.4				
5'''	146.6				
6'''	110.5	6.95 (1H, s)			
7'''	167.1				
1''''	120.1				
2''''	110.4				
3''''	146.5	6.79 (1H, s)			
4''''	140.3				
5''''	146.5				
6''''	110.4				
7''''	167.0				
1'''''	120.1				
2'''''	110.3				
3'''''	146.4				
4'''''	140.1	6.79 (1H, s)			
5'''''	146.4				
6'''''	110.3				
7'''''	166.4				

Table 33. Isolated compound **7**, **8** from *N. tetragona* root



Position	Compound <b>8</b> <sup>(63,64,66)</sup>			
	1A		2B	
	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD	$\delta_c$ 100 MHz	$\delta_H$ (int, mult, <i>J</i> in Hz) 400 MHz in CD <sub>3</sub> OD
1a	108.3	6.21 (1H, s)	108.2	6.21 (1H, s)
2a	70.9	5.59 (1H, br, s)	70.3	5.58 (1H, br, s)
3a	64.7	5.56 (1H, br, s)	64.5	5.55 (1H, br, s)
4a	67.3	5.46 (1H, br, s)	66.6	5.45 (1H, br, s)
5a	73.7	5.20 (m)	73.5	5.20 (m)
6a	63.1	5.46 (1H, t, <i>J</i> =10.0)	64.0	4.79 (2H, t, <i>J</i> =10.0)
		4.40 (1H, dd, <i>J</i> =8.0, 10.0)		4.30 (1H, dd, <i>J</i> =8.0, 10.0)
1b	125.7		125.5	
2b	111.0	7.24 (2H, s)	111.2	7.21 (2H, s)
3b	146.6		146.6	
4b	130.2		129.5	
5b	146.6		146.6	
6b	111.0	7.24 (2H, s)	111.2	7.21 (2H, s)
7b	167.6		167.2	
1c	119.3		119.1	
2c	114.1		115.1	

3c	110.5		148.5	
4c	138.8		138.9	
5c	145.4		145.7	
6c	114.1	7.10 (2H, s)	114.1	7.08 (2H, s)
7c	166.5		166.5	
1d	124.4		124.4	
2d	116.3		115.6	
3d	145.7		145.7	
4d	125.7		125.7	
5d	146.6		146.6	
6d	114.1	6.90 (2H, s)	114.4	6.86 (2H, s)
7d	166.3		166.3	
1e	150.4		150.4	
2e	42.3	5.43 (1H, br, s)	52.7	5.43 (1H, br, s)
3e	92.8		110.5	
4e	98.2		92.8	
5e	192.3		195.2	
6e	130.2	6.57 (2H, s)	125.5	6.55 (2H, s)
7e	166.1		166.1	
1f	125.7		125.5	
2f	117.7		117.2	
3f	145.7		145.4	
4f	125.5		125.5	
5f	146.3		146.2	
6f	115.3	6.63 (2H, s)	114.7	6.63 (2H, s)
7f	165.7		165.7	

### 3-4. 수련(뿌리)에서 분리된 화합물에 대한 활성실험 결과

#### 3-4-1. 수련(뿌리)에서 분리된 화합물에 대한 항산화 실험결과

Column chromatography를 통하여 분리된 corilagin의 7종에 대해 DPPH 라디칼 소거활성 실험을 하여 라디칼 소거 능력을 확인하였다. 그 결과 compound 6의  $RC_{50}$ 은  $4.1 \mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다. 대조군으로 사용한 녹차추출물( $RC_{50} = 8.671 \mu\text{g/ml}$ )과 Vit-C( $RC_{50} = 4.97 \mu\text{g/ml}$ )비교하였을때, compound 6이 더 우수한 라디칼 소거 활성을 보였다. 그 외 화합물에 대한 항산화 활성은 다음 표에 나타내었다(Table 34). Corilagin을 비롯하여 분리된 7종의 화합물들 gallic acid( $RC_{50} = 3.907 \mu\text{g/ml}$ ), ethyl gallate( $RC_{50} = 3.757 \mu\text{g/ml}$ ), methyl gallate( $RC_{50} = 2.973 \mu\text{g/ml}$ ), PGG( $RC_{50} = 4.493 \mu\text{g/ml}$ ), TGG( $RC_{50} = 4.778 \mu\text{g/ml}$ ), ellagic acid( $RC_{50} = 7.465 \mu\text{g/ml}$ ), geraniin( $RC_{50} = 3.92 \mu\text{g/ml}$ ) 또한 대조군과 비슷한 활성을 갖거나 더 높은 좋은 라디칼 소거 활성을 보였다(Figure 41).

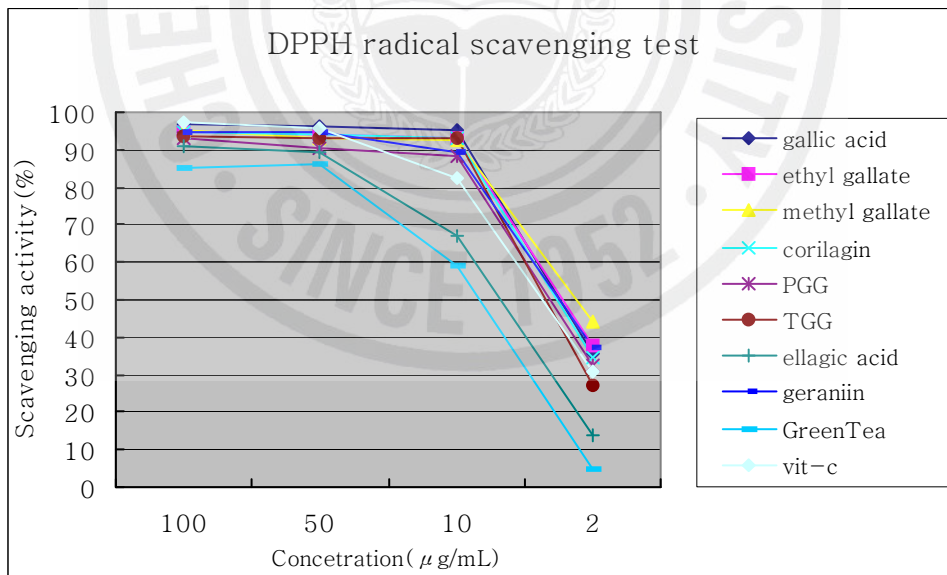


Figure 41. Radical scavenging effect of the isolated compounds from *N. teragona* root

Table 34. Radical scavenging effect of the isolated compounds from *N. tetragona* root

	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	RC <sub>50</sub>
gallic acid	96.841	96.175	95.289	35.777	3.907
ethyl gallate	94.553	94.038	93.255	37.527	3.757
methyl gallate	94.989	93.026	92.291	44.311	2.973
corilagin	94.553	94.263	93.148	34.792	4.10
PGG	93.137	90.664	88.223	32.604	4.493
TGG	93.791	93.251	93.148	27.133	4.778
ellagic acid	90.741	89.426	67.131	13.830	7.465
geraniin	94.553	94.826	89.615	37.418	3.920
GreenTea Ext.	85.062	86.104	59.097	4.923	8.669
Vit-C	97.234	95.640	82.216	30.744	4.979

3-4-2. 수련(뿌리)에서 분리된 화합물에 대한 tyrosinase inhibition 실험결과

Compound 6의 7종에 대해 tyrosinase inhibition 실험을 하여 tyrosinase 저해능력을 확인하였다. 그 결과 corilagin의  $IC_{50}$ 은  $300 \mu\text{g/ml}$  이상에서 나타내어 tyrosinase 저해능력은 떨어지는 것을 알 수 있었고, 그 외 화합물에 대한 tyrosinase inhibition은 다음 표에 나타내었다(Table 35). 그 중 PGG(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose)는  $IC_{50} = 94.227 \mu\text{g/ml}$ , TGG(1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose)는  $IC_{50} = 65 \mu\text{g/ml}$ 로 대조군으로 사용한 arbutin( $IC_{50} = 49.02 \mu\text{g/ml}$ )과 kojic acid( $IC_{50} = 36.15 \mu\text{g/ml}$ )과 비교했을때, 더 높은 tyrosinase inhibition 결과를 얻지는 못했지만, 비교적 높은 저해 활성을 나타내는 것을 실험을 통해 알 수 있었다(Figure 42).

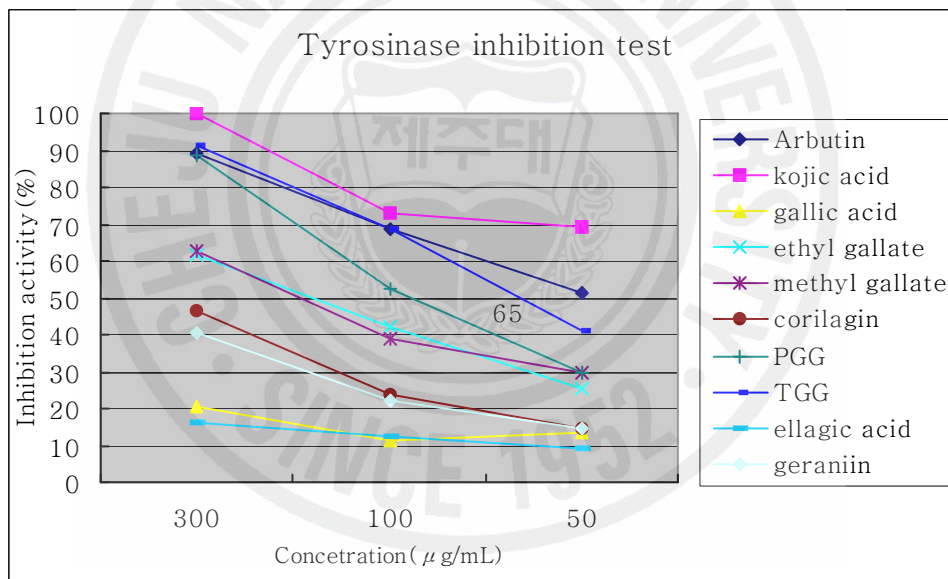


Figure 42. Tyrosinase effect of the isolated compounds from *N. teragona* root



Table 35. Tyrosinase inhibition effect of the isolated compounds from *N. tetragona* root

	300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	IC <sub>50</sub>
gallic acid	20.380	11.559	13.625	> 300
ethyl gallate	61.685	41.935	25.545	181.15
methyl gallate	62.500	38.978	29.563	193.55
corilagin	46.467	23.656	14.653	> 300
PGG	88.859	52.688	29.563	94.227
TGG	91.304	68.817	40.874	65.000
ellagic acid	15.978	12.366	9.254	> 300
geraniin	40.489	22.312	14.396	> 300
Arbutin	89.130	68.58	51.198	49.022
Kojic acid	100.000	72.810	69.162	36.158

#### 4. 결론

수련(뿌리) 70% 에탄올 추출물을 *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 층으로 용매분획하고, 분획물에 대하여 항산화 실험결과 4개의 분획층에서 EtOAc 분획층이 가장 높은 활성을 보여(RC<sub>50</sub> = 22.21  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), celite column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, Amberlite XAD-16, 역상 silica gel chromatography를 사용하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물들은 1D, 2D NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 gallic acid, ethyl gallate, methyl gallate, corilagin, PGG(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose), TGG (1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose), ellagic acid, geraniin 8종의 화합물을 순수하게 분리·정제하였음을 확인할 수 있었다.

Column chromatography를 통해 분리된 compound 6을 포함한 8종에 화합물에 대해 DPPH radical scavenging test 결과 compound 6을 비롯하여 분리된 7종의 화합물에서 대조군과 비슷한 활성을 갖거나 더 높은 좋은 라디칼 소거 활성을 보였고{gallic acid(RC<sub>50</sub> = 3.907  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ethyl gallate(RC<sub>50</sub> = 3.757  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), methyl gallate(RC<sub>50</sub> = 2.973  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), PGG(RC<sub>50</sub> = 4.493  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), TGG(RC<sub>50</sub> = 4.778  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ellagic acid(RC<sub>50</sub> = 7.465  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), geraniin(RC<sub>50</sub> = 3.92  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )}, tyrosinase inhibition 실험에서는 PGG(IC<sub>50</sub> = 94.227  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )와 TGG(IC<sub>50</sub> = 65  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )가 대조군으로 사용한 arbutin(IC<sub>50</sub> = 49.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 kojic acid(IC<sub>50</sub> = 36.15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )와 비교 해봤을때도, 비교적 높은 tyrosinase저해 활성을 나타내는 것 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 실험결과를 토대로 수련 (뿌리)를 이용해 항산화제 및 미백관련 소재 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.<sup>31-34,67-79)</sup>

## VI. 결 론

제주도내에 자생하고 있는 식물을 이용해 기능성 화장품 소재개발을 위해 여러종에 지상식물에 대한 활성검색을 하였다. 그 중 미백, 주름개선, 항산화 효과 실험에서 활성이 좋았던 종가시나무(잎), 조록나무(가지), 수련(뿌리)에 대한 분리 및 화합물 구조동정을 하였고, 분리된 화합물에 대한 활성실험을 실시하여 천연 기능성 화장품소재의 활용여부 및 개발 가능성을 제시하고자 본 연구를 하였다.

각각 세 개의 식물은 건조 후 분쇄하여 70% EtOH을 가지고 추출한 뒤 용매 분획 후 EtOAc 분획층에 대해 celite column chromatography, RP silica gel column chromatography, NP silica gel column chromatography, Sephadex LH-20, Amberlite XAD-16 column chromatography등을 사용하여 분리를 하였다. 분리한 분획들을 1D, 2D NMR 기기로 확인하였고, 문헌들과 비교한 결과 종가시나무(잎) 12종, 조록나무(가지) 20종, 수련(뿌리) 8종을 순수 · 정제 되었음을 확인할 수 있었다.

또한 1D, 2D NMR 및 HR FAB-Mass, UV/VIS spectrum 등 여러 기기분석을 통하여 구조를 확인하였고, 문헌검색 결과 종가시나무(잎)에서 1종, 조록나무(가지)에서 6종에 화합물이 현재 보고된 바 없는 신물질로 결론지었다. Column chromatography를 통하여 분리된 화합물들은 DPPH radical scavenging test, tyrosinase inhibition test, elastase inhibition test 결과 대부분의 화합물이 DPPH 라디칼 소거활성이 대조군과 비교했을때 우수한 활성을 가지고 있음을 알 수 있었고, 분리된 화합물 중 몇 종은 tyrosinase inhibition 또한 우수한 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

본 연구의 실험결과를 토대로 청정지역인 제주도에서 자생하고 있는 육상식물을 이용해 기능성 화장품 소재 개발 가능성을 기대해 볼 수 있었다.

## VII. 참고 문헌

- 1) Parvez, S.; Kang, M-K.; Chung, H-S.; Cho, C-W.; Hong, M-C.; Shin, M-K.; Bae, H-S. "Survey and of Depigmenting and Lightening Agents." *Phaytother. Res.*, **2006**, *20*, 921-934.
- 2) Lee, B. C.; Lee, J. J.; Park, S. M.; Kim, C. B.; Sim, G. S.; Kim, J. H.; Lee, G. S.; Lee, C. I.; Pyo, H. B. "3,9-Diferuloyl-6-oxopterocarpen (Tersolin-F<sup>®</sup>): a Novel Anto-wrinkle Agent for Cosmeceuticals." *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2004**, *30*, *1*, 7-13.
- 3) Fontana, N.; Bisio, A.; Romussi, G. "Triterpene saponins and flavonoids from *Quercus glauca*. Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag." **1998**, *53*, *9*, 653.
- 4) Sheu, S. Y.; Hsu, F. L.; Lin, Y. C. "Two gallates from *Quercus glauca*." *Phytochemistry*, **1992**, *31*, *7*, 2465.
- 5) Kamano, Y.; Tachi, Y.; Sawada, J.; Tanaka, I. "Studies on the constituents of *Quercus spp.* VI. Triterpenes of *Quercus glauca* Thunb., structure of cyclobalanone." *Yakugaku Zasshi*, **1976**, *96*, *10*, 1207.
- 6) Suga, T.; Kondo, S. "Alkanes and triterpenoids of *Quercus glauca*." *Phytochemistry*, **1974**, *13*, *2*, 522-3.
- 7) Tachi, Y.; Taga, S.; Kamano, Y.; Manki, K. "Isolation and structure of a new triterpene, cyclobalanone and 24-mehtylenecycloartanone obtained from *Quercus glauca*." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1971**, *19*, *10*, 2193.
- 8) Sheu S. Y.; Tsiung Y. H.; Hsu F. L.; Lu F. J.; Chiang H. C. "Superoxide anion scavenge effect of *Quercus glauca* Thunb. in whole blood of patients with ankylosing spondylitis." *The American journal of Chinese medicine*, **1997**, *25*, 3-4, 307.
- 9) Shu-fung, L.; Satish Manohar, N.; Banisree, M.; Susan, M.; Chung-Li, C.; Chao-Lin, K.; Hsin-Sheng, T. "In vitro Propagation by Aymbolitic Seed Germination and 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl(DPPH) Radical Scavenging Activity Studies of Tissues Culture

Raised Plants of Three Medicinally Important Species of *Dendrobium*." *Biol. Phar., Bull.*, **2004**, *27*, 731-735.

10) Blois M. S.; et al.; Editors Free Radicals in Biological Systems. **1961**, 405.

11) 이남호; 백종석; 오태현; 김정미. "제주산 담팔수(*Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*)로부터 Cucurbitacin F의 분리 및 분석." *기초과학연구 제주대학교*. **2005**, *18*, *2*, 57.

12) Piao, L. Z.; Lee, Y. J.; PhamPhu, T. T.; Shin, J. K. "Dibenzocyclooctene lignan compounds isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* Baill." *Natural Product Sciences*, **2005**, *11*, *4*, 248.

13) Govindachare, T. R.; Krishna Kumari, G. N.; Partho, P. D. "Two secolignans from *Peperomia Dindigulensis*." *Phytochemistry*. **1998**, *49*, *7*, 2129.

14) 방면호; 송정준; 이상양; 박남규; 백남인. "작약뿌리로부터 항산화활성 물질의 분리." *한국농화학회지*, **1999**, *42*, *2*, 170.

15) 강인호; 차자현; 한정훈; 이성완; 김홍진; 권석형; 함원혜; 황보식; 황완균. "국산 산사나무 잎으로부터 항산화 활성성분의 분리." *생약학회지*, **2005**, *36*, *2*, 121.

16) Roberto S.; Gallegos, O.; Nidea, F.; Roque.; Vanderlan da S. Bolzani. "Acylated Flavonol Glycosides and Terpenoids from the leaves of *Alibertia sessili*." *J. Brazilian Chemical Society*, **1997**, *8*, *3*, 257.

17) Chamel, N.; Micheline H. B.; Annelise, L. G.; Robert, A. "kaempferol coumaroyl glucorhamnoside from *Ginkgo biloba*." *Phytochemistry*, **1986**, *25*, *3*, 770.

18) Sohn, S.; Won, S.; Kim, S.; Chun, W.; Chang. M. "Chemical constituents of the leaves of *staphylea bumalda*." *Natural Product Sciences*, **2004**, *10*, *4*, 173.

19) 김성교; 박준철; 박숙형. "Chemical investigation on the reaction between calcium hydroxide intracanal medicament and zinc oxide-eugenol." *大韓齒科保存學會誌*, **2002**, *25*, *2*.

20) 이주용 : Antibacterial effect of cinnamomi cortex extracts against porcine respiratory

pathogenic bacteria. Graduate School of KonKuk Univ, 2002.

- 21) 이대우 : 산조팝나무와 삼백초의 LDL 항산화 및 ACAT 저해 활성. 忠南大學校 大學院, 2004.
- 22) 공태욱 : 열대 약용식물로부터 항당뇨 물질의 정제 및 활성 연구. 연세대학교 대학원 2000년도 석사학위 청구논문.
- 23) 김준환; 김중국; 강우원; 하영선; 최상원; 문광덕. "홍화의 부위별 화학성분과 DPPH Radical 소거 활성." *한국식품영양과학회지*, 2003, 32, 5.
- 24) 류병호; 정진웅; 김동석; 박종욱. "해양에서 분리한 Bacillus sp. RH-5에 의한 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)산화에 대한 항산화 활성." *한국식품위생안전성학회지*, 1998, 13, 1.
- 25) 정창호; 허재연; 심기환. "밤나무 잎의 화학성분, 항산화 및 항균활성." *농산물저장유통학회지*, 2002, 9, 2.
- 26) 문희경 : Cyclohexene의 oxyselenenylation을 이용한 inositol 및 quercitol의 합성. 연세대학교 대학원 1998학년도 석사청구논문.
- 27) Carlavilla, D.; Villamiel, M.; Martinez-Castro, I.; Moreno-Arribas, M. V. "Occurrence and Significance of Quercitol and Other Inositols in Wines during Oak Wood Aging." *American journal of enology and viticulture*, 2006, 57, 4.
- 28) 이용주 : (+)-Mandelic acid를 chiral source로 이용하여 3-bromocyclohexene으로부터 광학적으로 순수한 cyclitol의 합성. 연세대학교 대학원 2001학년도 석사학위 청구논문.
- 29) Yoshiyuki, M.; Rumi, N.; Isoko, K.; Kohei, K. " $\beta$ -Sitosterol-3-O-B-D-glucopyranoside : A eukaryotic DNA polymerase  $\lambda$  inhibitor." *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2006, 99, 2-3 100-107.
- 30) Mitchell J. P.; Mark A.; Norhaus, K. W. "Stagliano synthesis and isolation of Butylene crown ethers. *Synthesis*, 1997, 7, 1193-9.
- 31) 심태흠; 김영선; 사재훈; 신인철; 허성일; 왕명현. 도토리 가루의 성분분석과 항산화능 평가. *한국식품과학회지*, 2004, 36, 5, 800-803.

- 32) 강정숙 : DPPH 방법을 통한 녹차의 항산화 활성에 대한 연구. 제주대 자연과학대학 식품영양학과.
- 33) 이경민; 정귀택; 박돈희. "Study of Antimicrobial and DPPH Radical Scavenger Activity of Wood Vinegar." *Kor. J. Pharmacogn.* **2004**, 19, 5, 381-384.
- 34) Choi, S.; Chang, E.; Kim, H. "Antioxidative Activities of Catechin Derivatives from *Persimmon* leaves." *응용과학연구논문집*, **1997**, 5, 209-215.
- 35) Gutfinger, T. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1981**, 58, 966.
- 36) 윤진석 : 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica*)의 라디칼 소거 활성, Tyrosinase 억제 활성, 항알레르기 활성 검색 및 유효성분 분리. 제주대학교 대학원 2000년도 석사학위 청구논문.
- 37) James, A. E. K.; Timothy, D. W.; Gordon, L. *Biochemistry*. **1996**, 35, 9090.
- 38) Nakhata, D. T. "Determination of relative formation rates of dibenzofurans via gassphase condensation of phenols." *Georgia institute of Technology*, **2002**, 142.
- 39) Kouken, K.; Takashi, O.; Yukinori, Y.; Masami, I. A-C, "Novel cytotoxic dibenzofurans isolated from the myxomycete *Trichia favoginea* var. *persimilis*." *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 1505-1508.
- 40) 강지훈; 박영광; 정성택; 노경호. "Extraction and Purification of EGCG(*epi-gallo catechin Gallate*) from *Green Tea*." *한국생물공학회지*, **1999**, 14, 4.
- 41) Shin, M.; Min, E. "EGCG inhibitors tumor growth by inhibiting Matrix Metalloproteinase-9 induction in UM-SCC-1 cells." *대한안면성형재건외과학회지*, **2001**, 23, 6.
- 42) 진선두; 신상우; 양재하; 권영규; 김광중. "The Effect of Epigallocatechin Gallate(EGCG) on Anticancer and Apoptosis in Cancer Line U937." *동의병리학회지*, **2002**, 15, 4.
- 43) Choi, S.; Chang, E.; Kim, H. "Antioxidative Activities of Catechin Derivatives from *Persimmon* Leaf." *응용과학연구논문집*, **1997**, 5.

- 44) 김진혁 : 마늘 혹은 epigallocatechin gallate (EGCG)를 투여한 mouse내 지방조직에서의 유전자 발현 profile에 대한 microarray 분석. 단국대학교 대학원 2006년도 석사학위 청구논문.
- 45) Yumiko, N.; Sumiko, T. "Method for Analysis of Tannic Acid and Its Metabolites in Biological Samples ; Application to Tannic acid Metabolism in the Rat." *Agricultural and food chemistry*, **2003**, 331-339.
- 46) Taghvan, G.; Madgavan, V.; Annie, S. "Activity Guided Isolation of Antioxidant Tannoid Principles from *Anogeissus latifolia*." *Natural Product Sciences*, **2005**, 11, 3, 174-178.
- 47) Choi, B. R. "Antioxidant Constituents from *Portulaca oleracea*." *Natural Product Sciences*. **2005**, 11, 4, 229-232.
- 48) 박종철; 양한석; 이승호. 해당화 지하부에서 분리한 탄닌 화합물. **1993**, 24, 4, 319-321.
- 49) Oh, G.; Kim, S.; Chun, B.; Park, C.; Son, K. "Isolation of Antimicrobial Components from *Moutan Cortex*." *Kor. J. Pharmacogn*, **1999**, 30, 3, 340-344.
- 50) Jose, H.; Isaza, H. I.; Takashi, Y. "Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*." **2004**, 65, 359-367.
- 51) Komissarenko, N. F.; Krivoruchko, E. V.; Kislichenko, V. S.; Kovalev, V. N. "Tyrosol from *Ribes nigrum*. Chemistry of Natural Compounds." *Translation of Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, **1997**, 33, 1, 97.
- 52) Kim, M.; Lee, S.; Hwang, Y.; Lee, H.; Baek, B. "Isolation of Xanthine Oxidase Inhibitors from *Ginkgo biloba* Leaves-Derived Components." *Journal of Food Science and Nutrition*, **2002**, 7, 1.
- 53) Edwin, H. "Natural Polyphenols as Drugs : Possible Modes of Action." *Natural Product Sciences*. **1996**, 59, 205-215.
- 54) 이동호; 이승호; 노재섭; 이경순. Phenolic Components from the Leaves of *Cornus controversa* H. *생약학회지*, **1995**, 26, 4, 327-336.



- 55) Lee, S.; Park, J.; Kim, S. "Isolation of inhibitory components on Tyrosinase Activity from the Bark of *Paeonia moutan*." *Yakhak Hoeji*, **1998**, 42, 4, 353-358.
- 56) Kim, H.; Gerald M.S.; Choi, S. "Isolation and identification of Tyrosinase inhibitor from *Galla Rhois*." *Food science and biotechnology*, **1998**, 7, 1, 56-59.
- 57) Lee, S. J.; Tack, A. "Effect of *Paeonia lactiflora* extracts on  $\alpha$ -Glucosidase." *Natural Product Sciences*, **2004**, 10, 5, 223-227.
- 58) Jung, K. Y.; Oh, S. R.; Park, S. H.; Lee, I. S.; Ahn, K. S.; Lee, J. J.; Lee, H. "Anti-complement Activity of Tiliroside from the Flower Buds of *Magnolia fargesii*." *Biological & pharmaceutical bulletin*, **1998**, 21, 10.
- 59) Nowak, R. "Separation and Quantification of Tiliroside from Plant Extracts by SPE/RP-HPLC." *Pharmaceutical Biology*, **2003**, 41, 8.
- 60) 권미원 : 영실의 성분연구 및 항산화 효과. 중앙대학교 의약식품대학원 2005년도 석사학위 청구논문.
- 61) Ukai, T.; Arata, Y.; Ohashi, T.; Seto, S. "Paper chromatographic studies on the constituents of *Nymphaeaceae*." *Kanazawa Univ., Ann. Rept. Fac. Pharm. Kanazawa Univ.*, **1953**, 3, 8-9.
- 62) 황완균; 오인세; 함인혜; 한덕룡. "여우주머니 잎의 phenol성 성분." *Kor. J. Pharmacogn*, **1994**, 25, 2, 113-116.
- 63) 왕도미나 : 여우주머니 phenol성 화합물. 중앙대학교 대학원 2000년도 석사학위 청구논문.
- 64) Park, B. H. : Hepatoprotective Activity of Tannins from *Phyllanthus urinaria*. 서울대학교 석사학위 2004년도 청구논문.
- 65) Klaus Peter, L.; Herbert, K. "Pelargoniins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*." *Phytochemistry*. **2000**, 54, 701-708.
- 66) Hideyuki, K.; Jun, K.; Mutsuo, H. "Geraniin, a Hydrolyzable Tannin from *Nymphaea tetragona* Georgi(Nymphaeaceae)." *Biosci. Biotech. Biochem*, **1993**, 57, 9, 1570-1571.

- 67) Awatif A.; Elegami; Catharine, B.; Alexander I.; Gray, S. P.; Mackay, G. G.; Skellern, R.D.W. "Two very unusual macrocyclic flavonoids from the *water lily Nymphaea lotus*." *Phytochemistry*, **2003**, 64, 727-731.
- 68) Torgils, F.; Asmund, L.; Bernard T. K.; Oyvind M. A. "Flavonoids from blue flowers of *Nymphaea caerulea*." *Phytochemistry*, **1999**, 51, 1133-1137.
- 69) Torgils, F.; Nils, A.F.; Oyvind M. "myricetin 3-rhamnosyl(1→6)galactoside from *Nymphaea X marliacea*." *Phytochemistry*, **1998**, 49, 7, 1999-2000.
- 70) Zhizhen, Z.; Hala, N.; Elsohly, X. C. L. "Phenolic compounds from *Nymphaea odorata*." *Natural Product Sciences*, **2003**, 66, 548-550.
- 71) Ulla, S.; Heikki, V.; Juha, K. "Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers." *Phytochemistry*, **2002**, 60, 821-825.
- 72) Masaaki, N.; Hirota, T.; Daisuke, I. "Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation by tannins." *Phytochemistry*, 2005, 66, 2038-2046.
- 73) Sayed A. A.; El, T.; Hans, W. R. "Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood." *Phytochemistry*, **2002**, 61, 971-974.
- 74) Fayed E.; Kandil, M. H. G. "Polyphenols from *Cornulaca monacantha*." *Phytochemistry*, **2001**, 58, , 611-613.
- 75) 이주상; 김정아; 조세훈; 손애량; 장태수; 소명숙; 정시련; 이승호. 감초의 Tyrosinase 활성 억제 성분. *생약학회지*, **2003**, 34, 1, 33-39.
- 76) Kim, H.; Ha, S. Choi, S. "Inhibition of Tyrosinase and Lipoxygenase Activities by Resveratrol and Its Derivatives from *Seeds of Paeonia lactiflora*." *Nutraceuticals & Food*, **2002**, 7, 447-450.
- 77) Wang, K.; Lin, R.; Hsu, F. "Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines." *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**, 106, 353-359.

- 78) Kittisak, L.; Boonchoo, S.; Wanchai, D. "Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus gomezianus*." *Planta Medica*, **2000**, 66.
- 79) Lee, S.; Kim, S.; Kim, J. "The isolation of the inhibitory constituents on Melaninpolymer Formation from the leaves of *Cercis chinensis*." *Kor. J. Pharmacogn*, **1999**, 30, 4, 397-403.
- 80) 이유선 : 강원도 자생식물로부터 향료 자원의 탐색. 강원대학교 대학원 2006학년도 석사학위 청구 논문.
- 81) 하병조 : 기능성 화장품. *신평출판사*, **1999**.
- 82) 추옥희 : 기능성화장품의 발달과 활용성에 연구. 한성대학교 대학원 2001학년도 석사학위 청구 논문.
- 83) 이성하 : 흑측 물추출물이 미백에 미치는 영향. 카톨릭대학교 대학원 2005학년도 박사학위 청구 논문.
- 84) 하병조 : 화장품학. *수문사*, **2004**.
- 85) (주)한국학술정보 : 화장품 기술 용어집, **2004**.
- 86) 김남주 : 기능성 화장품 개발을 위한 천연물의 선별효과. 부경대학교 대학원 2005학년도 석사학위 청구논문.
- 87) 국주희 : 개오동 나무 열매와 잎에 함유된 항산화 및 항균물질의 규명. 전남대학교 대학원 2003학년도 학사학위 청구논문.
- 88) 김정미 : 제주산 두릅의 사포닌 성분 분리에 관한 연구. 제주대학교 대학원 2000년도 석사학위 청구논문.
- 89) 문지영 : 우묵사스레피(*Eurya emarginata*)를 이용한 활성성분 Eutigosides의 분리. 제주대학교 대학원 2000년도 석사학위 청구논문.
- 90) 함영민 : 감태(*Ecklonia cava*)를 이용한 항산화물질의 분리 및 구조분석. 제주대학교 대학원 2005년도 석사학위 청구논문.

91) 김정범 : 차풀(*Cassia mimosoides* var.nomame)로부터 Luteolin의 분리, 동정 및 활성분. 제주대학교 대학원 2006학년도 석사학위 청구논문.

92) 김정아; 최지영; 손애량; 박성희; 허광화; 이종구; 오인석; 김진준; 장현욱; 정시련; 장태수; 이승호. 대극과 식물로부터 분리한 천연폴리페놀의 멜라닌 생성 억제효과. *Kor. J. Pharmacogn*, 2004, 35, 2, 157-163.

93) 이선영 : Anti-complement and anti-ICAM-1 activity of compounds from leaf of *Litsea japonica*. 충남대학교 대학원 2003년도 석사학위 청구논문.



## 감 사 의 글

마지막으로 논문 수정을 마치고, 감사의 글을 쓰자니 피식하고 웃음부터 나옵니다. 논문을 쓰고, 감사의 인사를 올리게 될 날이 왔다는게 솔직히 믿기지 않아요. 길고도 짧았던 석사과정 동안의 경험은 이제까지 보내온 그 어떠한 2년이란 시간안에 경험 수보다 값지고, 소중했습니다. 공부에 재미와 성과에 대한 기쁨, 그리고 할 수 있다는 자신감을 갖게 해준 소중한 이들에게 감사의 마음을 전합니다.

우선, 이 자리에 설 수 있게 항상 지켜봐주신 하느님께 감사드립니다.

검증 안된 세계 기회를 주시고, 해낼 수 있다는 믿음과 열심히 하면 다 된다던 교수님표 격려, 작은 일에도 후한 칭찬을 아낌없이 주셨던 이남호 교수님. 진심으로 감사드립니다. 실험은 즐겁고 즐거야 가능하게 된다고 말씀 해주신 한성빈 교수님, 항상 웃음으로 대답해주신 정덕상 교수님, 많이 먹고 힘내라며 어깨를 토닥여주신 김덕수 교수님, 복도에서 마주칠때마다 열심히 하는 모습이 보기 좋다며 어루만져 주신 변종철 교수님, 쉬어가면서 하라고 늘 가득한 미소로 챙겨주셨던 강창희 교수님, 주관적인 생각인데도 관심을 갖고 대해주신 이선주 교수님, 볼때마다 항상 따뜻한 조언을 주신 김원형 교수님께 감사의 인사 올립니다.

잠자는 시간을 제외한 나머지 시간을 함께 보내며, 좋은 일, 힘든일 함께 하고, 기댈 수 있는 어깨가 되어준 실험실 식구들. 종석 선생님, 진석 선생님, 태현 선생님, 정미 선생님, 미연, 주희, 성환, 정은, 형민, 하나, 은경언니, 미정언니 지금은 가까이 없어도, 볼 때마다 조언과 힘이 되주셨던 홍철 선생님, 지영 선생님, 영민 언니, Dr. Nasim, Neaz, 화학과에 계신 모든 선생님들, 대학원 생활을 함께 한 선배님과 후배들, 동기들에게도 감사드립니다.

저 때문에 맘고생 많이 하시고도 구부러진 어깨에 고운 날개 달아주시고, 제 기능을 못하고, 등에서 떨어질 때면 수천번 수만번 전보다 더 크고 좋은 날개를 달아주셨던 부모님. 모두들 아니라고 했을때 훨훨 하늘을 날아다닐꺼라는 굳은 믿음과 사랑으로, 지켜주셔서 정말 감사 드립니다. 그리고, 하늘에서 저를 밝은 길로만 인도해주신 외할아버지, 아가페 사랑을 몸소 보여주신 외할머니, 또 다른 인생선배이자 나의 역할 모델이 되어준 큰오빠, 큰언니, 작은오빠, 작은언니, 삼촌, 숙모, 이모, 이모부 모두 존경하고 사랑합니다.

늦게까지 일하느라 힘들어도 내 일이라면, 한 걸음에 달려와 준 병욱오빠, 수경이. 힘들어 포기하고 싶을때 쓰러지지 않도록 가장 가까운 곳에서 든든한 버팀목이 되어주고, 지쳐서 쉬고싶을때 그루터기가 되어준 나의 소울메이트들. 고맙습니다.

이 모든 것, 당신들의 도움이 있었기에, 결실을 맺을 수 있었다는 것을 깊이 간직하겠습니다. 저는 이제 제 앞에 단혀있던 문을 박차고 나가려합니다. 항상 정직 하게 자존감을 지키며 최선을 다하는 모습으로 생활하도록 노력하는 모습 지켜봐주세요.

고맙습니다.

사랑합니다.

2007년 12월  
고 려 경 올림