

碩士學位論文

한국산 유근피(榆根皮)의  
생리활성 검색



濟州大學校 大學院

化學科

李 禎 娥

2005年 2月

# 한국산 유근피(榆根皮)의 생리활성 검색

指導教授 鄭 惠 商

李 禎 娥

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함  
2005年 2月

李禎娥의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 李 南 昊 印

委 員 李 璿 柱 印

委 員 鄭 惠 商 印

濟州大學校 大學院

2005年 2月

Studies on the screening of Biological activities of the  
extracts from root bark of *Ulmus devidiana* in Korean

Jung-A Lee

(Supervised by professor Duk-Sang Jung)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE  
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
NATURAL SCIENCE  
2005. 2.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

ABSTRACT .....	ii
List of Tables .....	iii
List of Figures .....	iv
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 재료 .....	4
2. 시약 및 기기 .....	4
3. 실험방법 .....	5
3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	5
3-2. NO생성억제 효과 .....	6
3-3. 라디칼 소거 활성 측정 .....	7
3-4. HL-60 백혈병 세포의 대사활성 측정 .....	7
3-5. 미백효과 측정 .....	8
III. 결과 및 고찰 .....	12
1. NO생성억제 효과 .....	12
1-1. 80% 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 NO생성 억제효과 .....	12
1-2. <i>n</i> -Hexane 분획물들에 대한 NO생성 억제효과 .....	14
1-3. EtOAc 분획물들에 대한 NO생성 억제효과 .....	15
2. 라디칼 소거 활성 .....	15
2-1. 80% 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 라디칼 소거 활성 .....	16
2-2. EtOAc 분획물들에 대한 라디칼 소거 활성 .....	16
2-3. JUD-C와 JUD-D에 대한 라디칼 소거 활성 .....	17
3. 암세포 증식 억제효과 .....	18
4. 미백효과 측정 .....	19
4-1. Tyrosinase의 저해 효과 .....	19

4-2. Melanin contents 측정 .....	20
4-3. UV에 대한 세포의 viability 측정 .....	21
5. 유효성분에 대한 분리 .....	22
5-1. JUD-A, JUD-B의 분리 및 동정 .....	22
5-2. JUD-C, JUD-D의 분리 및 동정 .....	24
IV. 결    론 .....	28
V. 참    고    문    헌 .....	30



## ABSTRACT

We studied the screening of biological activities of the extracts from korean *Ulmus davidiana*.

To search for the active components, the extract was suspended in water and subjected to successive partitioning with *n*-Hexane, EtOAc and *n*-Butanol. Since the fraction of *n*-Hexane showed significant inhibitory effects on Nitric Oxide (NO) production in LPS activated RAW264.7 cells. JUD-A and B were obtained from *n*-Hexane fraction which showed effective inhibition against Nitric Oxide (NO) production. JUD-A and JUD-B inhibited growth of HL-60 cell, and JUD-B has shown good activity for whitening effect.

In addition, the 80% ethanol extract was partitioned with *n*-Hexane, EtOAc and *n*-Butanol. *n*-BuOH-soluble fraction and EtOAc-soluble fraction had a significantly higher radical-scavenging activity than other fractions.

The JUD-C and JUD-D isolated from EtOAc fraction were exhibited the anti-oxidative activities.



## List of Tables

Table 1. Comparison of the inhibitory effect of Korean and Chinese of several extracts from root bark of <i>Ulmus davidiana</i> .....	13
Table 2. Comparison of the inhibitory effect of Korean and Chinese of JUD-A and JUD-B from root bark of <i>Ulmus davidiana</i> .....	14
Table 3. DPPH radical scavenging effects (RC <sub>50</sub> ) of several extracts of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> Korean and Chinese .....	16
Table 4. DPPH radical scavenging effects(RC <sub>50</sub> ) of several EtOAc extracts of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> Korean and Chinese .....	17
Table 5. DPPH radical scavenging effects(RC <sub>50</sub> ) of JUD-C and JUD-D of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> Korean and Chinese .....	18
Table 6. Tyrosinase inhibitory activity of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C and D of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> .....	20

## List of Figures

Figure 1. Isolation procedure of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> .....	10
Figure 2. Isolation procedure of EtOAc layer of Root bark of <i>Ulmus davidiana</i> .....	11
Figure 3. The Inhibitory effect of several extracts of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> on NO production in RAW264.7 cells .....	13
Figure 4. The Inhibitory effect of <i>n</i> -Hexane extracts (JUD-A and JUD B) of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> on NO production in RAW264.7 cells .....	14
Figure 5. The Inhibitory effect of EtOAc extracts (JUD-A and JUD B) of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> on NO production in RAW264.7 cells .....	15
Figure 6. Inhibitory effect of several extracts of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> on the growth of HL-60 cells .....	19
Figure 7. Inhibitory activity of melanin synthesis of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C, D of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> on B16F10 melanoma cell .....	21
Figure 8. Cell viability using B16F10 melanoma of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C, D of root bark of <i>Ulmus davidiana</i> .....	22
Figure 9. Structure of 9,12-octadecadienoic acid (linoleic acid) .....	23
Figure 10. <sup>1</sup> H NMR spectrum of JUD-A .....	25
Figure 11. <sup>1</sup> H NMR spectrum of linoleic acid .....	25
Figure 12. <sup>13</sup> C NMR spectrum of JUD-A .....	26
Figure 13. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of linoleic acid .....	26
Figure 14. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of JUD-B .....	27
Figure 15. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of JUD-B .....	27



# I. 서론

최근 천연물을 이용한 신물질 탐색 연구가 활발히 진행되면서 천연물이 함유하는 생리활성물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 천연물로부터 추출 분리한 생리 활성물질은 매우 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치의 물질로서 실제 생활에 유용하게 응용되고 있으며, 이러한 노력은 인류의 생명연장, 질병 치료에도 크게 기여해 오고 있다. 특히, 천연물로부터 제조된 생리활성 물질은 인공 합성품에 비해 부작용이 적고, 인체 내에서 안전성이 높아 매우 유리한 장점이 있어 천연물의 이용분야는 더욱 더 넓어질 것으로 생각된다.

Nitric oxide (nitrogen monoxide, NO)는 매우 작고 지용성이 큰 자유 라디칼 기체로서 biological membrane barriers를 통해 근접한 세포의 intracellular compartments에 급속히 확산되지만, 상대적으로 불안정하여 반감기가 2~5초 정도로 매우 짧은 편이다. NO는 감염균이나 종양 세포의 증식을 억제하거나 죽이는 등 주로 대식 세포의 활성화에 의해 매개되는 숙주의 방어 기작에 관여하고 또한 신경계 및 순환계의 생리적 전달에 중요한 조절자로서 작용하고 있음이 밝혀졌다.<sup>1)</sup>

생체내에서 일어나는 NO의 화학 반응은 peroxynitrite의 형성으로 라디칼 상태의 NO가 superoxide ( $O_2^-$ )와 반응하여 peroxynitrite ( $ONOO^-$ )를 형성하여 강력한 산화제로 작용하거나,<sup>2)</sup> superoxide 또는 산소분자가 존재하지 않는 상황에서 단백질의 cysteine 잔기와 반응하여 nitrosothiol 기를 형성하여 세포 내 효소나 전사 조절인자들의 disulfide bridge의 형성과 해체를 변화시킴으로써 단백질의 3차 구조에 영향을 미칠 수 있게 한다.<sup>3)</sup> 간단한 화학구조인 NO가 세포내 신호 조절인자로서 작용할 수 있는 이유 중 하나로는 이들이 강력한 라디칼로써 세포내 다양한 화학반응을 유도 할 수 있다는 점이다. 그리고 이러한 화학 반응들이 생물학적 기능과 밀접하게 맞물려 생물학적인 NO의 효과로 나타난다.<sup>4)</sup>

Nitric oxide synthase (NOS)는 물리화학적 성질에 따라 Type I, II, III등 3종류의 동종 효소로 분류된다. 즉 Type I (neuronal NOS, nNOS)과 Type III (endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS (constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독

소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II인 inducible NOS (iNOS)가 있다.<sup>5)</sup> 이러한 NOS에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 NO가 형성된다.<sup>6)</sup> 자극에 의해 유도된 iNOS인 경우 오랜 기간동안 다량의 NO를 생성하게 되고, 생성된 NO는 매우 작으면서도 반응성이 있고 전기적으로 중성이기 때문에 합성된 곳에서 곧바로 확산되어 사방으로 퍼져 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>7,8)</sup> 이처럼, 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 돌연변이유발, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.<sup>9)</sup> 그러므로 NO생성 저해제는 폐혈성 쇼크, 당뇨, 동맥경화 등의 만성질환 치료제로의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 이런 질병에 대한 치료제를 개발할 목적으로, 최근에는 천연물로부터 NO생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>10)</sup>

또한, 생체 내에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 자외선, 방사선, 화학반응, 대사 과정을 통하여 생성되어 DNA 분절, 지질 과산화, 단백질의 비활성화 등을 통하여 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심-혈관 질환, 신부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>11-13)</sup> 질병의 발생과정에 관여하는 활성 산소 종으로는 superoxide anion, hydroxy radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등이 있다. 이들 활성산소는 생체 대사과정에서 생성되어 세포막지방질을 과산화시키고 세포막투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발시킨다고 보고되어 있으며, 이러한 활성산소종들을 소거시킬 수 있는 역할을 할 수 있는 물질로서 페놀화합물, 카로티노이드, 유기산 및 스테로이드성 알칼로이드 화합물 등이 연구되어 있다.<sup>14)</sup> 산업화로 인해 발생하는 다양한 공해물질에 노출되는 것을 피할 수 없는 현대인의 환경조건에서는 각종 활성산소종이 체내에 축적될 기회가 많을 뿐 아니라, 생체 내 산소 라디칼 반응은 생체조직의 노화나 악성종양을 비롯한 성인병 발병의 원인이 되고 있다. 항산화 물질은 지방 및 지방을 함유한 식품의 산화를 억제해 줄 뿐만 아니라 생체 내에서 생성되는 활성산소 및 활성산소에 의해 유도되는 지질과산화 반응을 억제하는 생리활성 물질로써 크게 각광을 받고 있다.<sup>15,16)</sup>

우리나라를 비롯한 동양권에서 오랜 기간 동안 질병치료와 예방의 목적으로 사용

되어 온 한약재는 식물의 2차 대사산물이 가지는 생체에 대한 생리활성 효과를 이용하는 천연재료로서 경험적으로 선택 · 이용되면서 인체에 대한 안정성이 대체로 검증된 것들이라 할 수 있기 때문에 이러한 한약재의 이용이 용이하다고 보여진다.

본 실험에 사용한 유근피 (Root bark of *Ulmus davidiana* var, japonica)는 느릅나무과 (Ulmaceae)에 속하는 느릅나무 (*Ulmus davidiana* var, japonica)의 코르크층을 벗긴 수피 및 근피를 건조한 것으로 유백피, 백유피라고도 한다.<sup>17,18)</sup> 이의 성분으로는 catechin, catechin-5-O-apiofuranoside, mansonone C, G, 7-hydroxy cadalenal, 3-methoxy-7-hydroxy- cadalenal, friedelin, epifriedelanol, taraxerol 등이 보고 되어 있다.<sup>19,20,21)</sup> 느릅나무는 낙엽 활엽교목으로 한국, 일본, 사할린, 쿠릴열도, 중국 북부, 동시베리아 등에 분포되어 있다. 느릅나무의 크기는 높이가 약 20cm, 지름이 약 60cm까지 자라며, 나무껍질은 회갈색이고, 작은 가지에 적갈색의 짧은 털이 있고 잎은 어긋나고 넓은 달걀을 거꾸로 세운 모양 또는 달걀을 거꾸로 세운 모양의 타원형으로 봄에 어린잎은 식용한다.<sup>22)</sup> 느릅나무에는 종류가 여러 가지가 있다. 그 중 참느릅나무와 둥근 참느릅나무, 좀참느릅나무는 열매가 9-10월에 익고, 당느릅나무, 흑느릅나무, 떡느릅나무 등은 4-5월에 익는다. 이들 나무는 열매 익는 시기와 껍질의 생김새만 다를 뿐 잎 모양이나 약으로의 쓰임새는 같다. 또한, 느릅나무의 껍질을 벗겨서 입으로 씹어보면 끈적끈적한 점액이 많이 나오는데 이 점액이 갖가지 종기나 종창을 치료하는 좋은 약이 된다. 약으로는 느릅나무 뿌리껍질을 쓰는데, 이른 봄에 뿌리껍질을 벗겨내어 그늘에서 말려서 쓴다. 유근피는 한방에서 이뇨, 각종 염증, 위궤양, 암등의 질환의 치료에 사용되어 왔고 약리학적 작용으로 진통작용과 부종억제작용 그리고 백혈구 유주 억제작용<sup>23)</sup>이 보고되어 있다.

유근피의 성분에 대해서는 이미 많이 보고 되어있으나, 본 실험에서는 한국산 유근피를 이용하여 항염 및 항산화 효과를 나타내는 성분을 분리 및 동정하였고, 이렇게 분리된 물질에 대하여 항암 및 미백효과에 대하여 검색해 보았다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 사용되는 한국산 유근피는 약재상에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co., junsei Co., Hyman Co.사의 제품을 사용하였다. Normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60 (230-400mesh ASTM, Merck), Reverse-phase column chromatography에는 Silica gel 100 (RP-18, 230-400 mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC (Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. 구조분석에 이용되는 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400 (FT NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 CD<sub>3</sub>OD과 CDCl<sub>3</sub>이 사용되었다.

Nitric oxide (NO) assay 실험시 사용되는 Murine macrophage cell line인 RAW 264.7세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3일에 한번씩 시행하였다.

Lipopolysaccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

항산화 활성 측정 시 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Aldrich사 (USA)에서 구입하여 사용하였다.

활성 측정 시 사용한 자외선 분광광도계 (UV-visible spectrophotometer)는 Hewlett Packard 8453을 사용하였다.

### 3. 실험방법

#### 3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

##### 3-1-1. 한국산 유근피의 에탄올 추출 및 용매분획

건조된 한국산 유근피 2 kg을 80% 에탄올 3 L에 침적하고, 실온에서 3개월간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였다. 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 2회 반복 실시하였다. 이렇게 얻어진 여액을 40°C에서 회전농축기를 이용 농축하여 80% 에탄올 추출물 122.074 g을 얻었다. 이 80% 에탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁하고 separatory funnel에서 *n*-Hexane과 EtOAc, *n*-Butanol, H<sub>2</sub>O을 사용하여 순차적으로 용매분획하여 *n*-Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H<sub>2</sub>O층을 얻었다.

##### 3-1-2. Normal-phase column chromatography에 의한 분리과정

용매분획하여 얻어진 각 분획층들 중에서 *n*-Hexane층 (0.2810 g)을 normal-phase column chromatography (6×20, Kieselgel 60)에서 *n*-Hexane/EtOAc/MeOH (7/3/0.1)의 전개용매로 전개시켜 6개의 분획을 얻었다.

##### 3-1-3. Reverse-phase column chromatography에 의한 분리과정

용매 분획하여 얻어진 각 분획층들 중에서 EtOAc층 (300 mg)을 reverse-phase column chromatography (3×15, Silica gel C<sub>18</sub>-Reversed phase)로 분리하였다. 용출용매는 0%, 20%, 40%, 60%, 80% , 100% 메탄올을 순차적으로 사용하였다. 이렇게 얻어진 분획들을 회전농축기로 농축하여 6개의 분획들을 얻을 수 있었다.

#### 3-1-4. Normal-phase column chromatography에 의한 분리과정

3-1-3에서 얻어진 6개의 분획 중에서 0% (0.3565 g)메탄올 분획을 normal-phase column chromatography (6×20 cm, Kieselgel 60)에서 CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O = 4/3/3/0.1의 전개용매로 전개시켜 3개의 분획을 얻을 수 있었다.

#### 3-2 NO생성억제 효과



##### 3-2-1. Nitric oxide (NO) assay

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1.5 \times 10^5$  cell/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시료 농도 100  $\mu\text{g/ml}$ 과 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 를 동시에 처리하여 48시간 배양하였다. 처리한 LPS (lipopolysaccharide)는 내독소 (endotoxin)로 잘 알려진 그람-음성세균의 세포외막에 존재하며, 단핵식세포로부터 다양한 염증 발병 인자로 알려진 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )과 같은 pro-inflammatory cytokines를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 배양 후 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu\text{l}$ 와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylene diamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 비교하였다.

### 3-3. 라디칼 소거 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 자유라디칼 소거활성은 Yoshida et al. (1989)등의 방법을 변형하여 실시하였다.<sup>24)</sup> 0.1 mM의 DPPH용액 0.9 ml에 시료용액 0.1 ml을 혼합한 후 vortex하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이 때 DPPH 라디칼 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였으며, 라디칼 소거활성 정도가 50% 감소할 때 시료의 농도를 나타내는  $RC_{50}$ 값으로 효과를 표시하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [A-(B-C)/A] \times 100 \quad (\text{식 1})$$

A : absorbance of not adding samples

B : absorbance of adding samples

C : absorbance of samples



### 3-4. HL-60 백혈병 세포의 대사활성 측정<sup>25)</sup>

#### 3-4-1. 세포배양

진골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60세포주를 한국 세포주 은행 (KCLB)으로 부터 분양 받아 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum (FBS)가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다.

#### 3-4-2. 세포의 대사활성 측정

HL-60 세포를  $3 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 96 well plate의 각 well에 넣고, 시료를 100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. 이를 4일간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 100  $\mu\text{g}$ 을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO) 150  $\mu\text{l}$ 를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하여 성장억제정도를 조사하였다.

### 3-5. 미백효과 측정

#### 3-5-1. Tyrosinase의 저해 효과 (Tyrosinase inhibitory activity)

Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성억제 효과 정도를 *in vitro*에서 확인함으로써 미백 성분의 함유 정도를 검색할 수 있다.<sup>26-27)</sup>

Tyrosinase 활성저해 측정 방법은 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrom을 비색법에 의해 측정하는 방법을 이용하여 UV/Vis spectrophotometer로 측정하였다.<sup>28)</sup>

$$\text{Tyrosinase Inhibition rate(\%)} = 100 - [(A-B)/(C-D)] \times 100 \quad (\text{식 2})$$

A : Absorbance at 475 nm in the presence of test sample and enzyme

B : Absorbance at 475 nm in the presence of test sample and in the absence of enzyme

C : Absorbance at 475 nm in the absence of test sample and in the presence of enzyme

D : Absorbance at 475 nm in the absence of test sample and enzyme

시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH6.5) 420  $\mu\text{l}$ 와 시료액 25  $\mu\text{l}$  그리고 25  $\mu\text{l}$ 의 mushroom tyrosinase (75~100 units/mL)를 순서대로 넣는다. 이 용액에 30  $\mu\text{l}$ 의



L-Tyrosine 수용액(0.6 mM)을 넣고 37 °C에서 10~15분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 475 nm에서 흡광도를 측정한다. 공시료액으로 시료액 대신 0.1 M 인산염완충액 (pH6.5)을 넣으며 이 때, tyrosinase 활성저 해율은 (식 2) 에 따라 계산하였다.

### 3-5-2. Melanogenesis inhibition (Melanin contents 측정)

B16F10 melanoma 세포를 이용한 melanogenesis 저해효과는 Maeda 와 Fukuda의 방법을 변형하여 측정하였다.<sup>29)</sup> B16F10 cells ( $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ )를 culture plate에 seeding (3 ml)하고 전 배양한다. 부착된 cell에 sample 처리한 후 4일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양하였다. plate의 배지 제거 후 Trypsin-EDTA로 세포를 수확하여 원심분리 후 상정액을 제거하고 cell pellet을 얻었다. 세포수를  $2.0 \times 10^5$  cells/ml로 조정하여 1 N NaOH 200  $\mu\text{l}$ 를 넣고 95°C에서 5분간 melanin을 녹인 후에 450 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교한다. 합성 melanin을 이용하여 standard solution을 만들고 sample과 standard solution을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정한다. 흡광도 값은 합성 멜라닌으로 작성된 표준 직선에 적용하여 멜라닌 양으로 환산한다.

### 3-5-3. UV에 대한 세포의 viability 측정 (MTT assay)

B16F10 cells ( $5.0 \times 10^4/\text{ml}$ )을 96well plate에 200  $\mu\text{l}$  넣고 cell을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 전 배양 (overnight)시켰다. 부착된 cell에 sample 처리한 후 4일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양하였다. 배양된 세포에 MTT (50 mg/ml) 시약을 처리 (0.1 mg)하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 4시간 배양시켜 formazan을 형성시켰다. 원심분리 (2000 rpm, 15분)를 통해 상정액을 제거하고 DMSO 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C에서 천천히 교반 하면서 형성된 formazan을 녹였다. 형성된 formazan은 540 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례하며 다음과 같이 나타낸다.

(mean optical density in test well)/(mean optical density in control well)×100

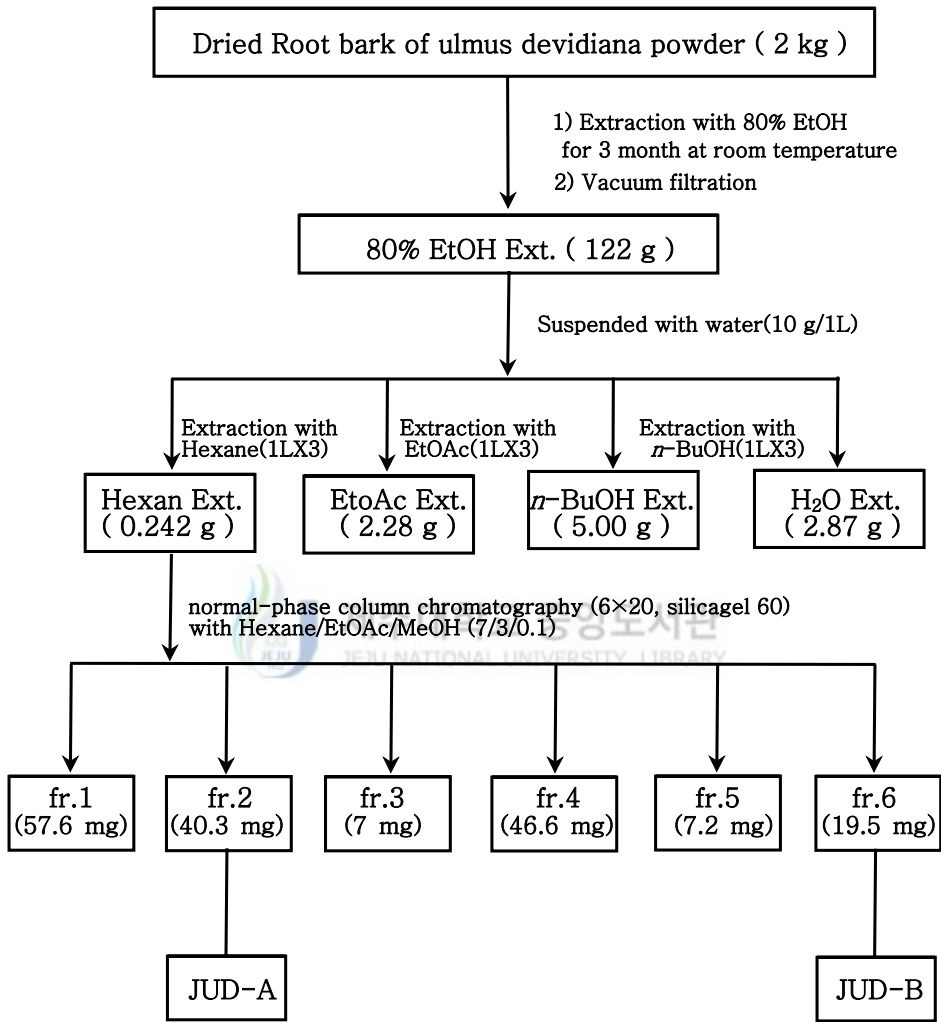


Figure 1. Isolation procedure of root bark of *Ulmus davidiana*

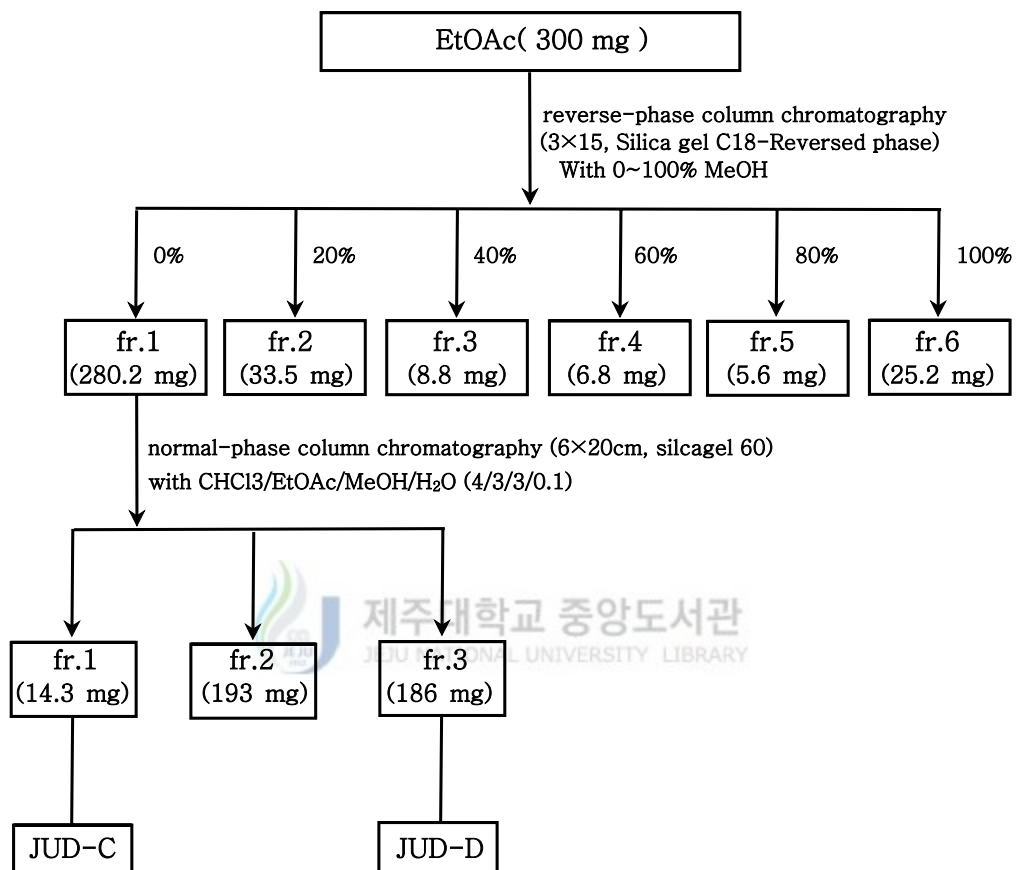


Figure 2. Isolation procedure of EtOAc layer of root bark of *Ulmus davidiana*

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. NO생성 억제효과

염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 RAW264.7 세포에 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 유근피 분획물을 처리하였다. 내독소로 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성세균의 세포외막에 존재하며, 단핵식세포 (macrophage 또는 monocyte)로부터 다양한 염증 발병인자로 알려진 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )과 같은 pro-inflammatory cytokines를 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>30)</sup> 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다.



#### 1-1. 80% 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 NO생성 억제효과

유근피 80% 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 NO생성 억제효과 측정 결과 LPS 단독 처리군에서  $36.42 \mu\text{M}$ 로 NO가 과량 생성 되었으며, 이들 중에서 *n*-Hexane 분획물에서  $24.05 \mu\text{M}$ 로 감소함을 알 수 있었다. (Figure 3.) 또한, 중국산 유근피 추출물을 한국산 유근피와 같은 방법으로 분리하였으며, 이렇게 분리한 중국산 유근피의 경우에도 한국산 유근피와 비슷한 저해효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다. (Table 1.)

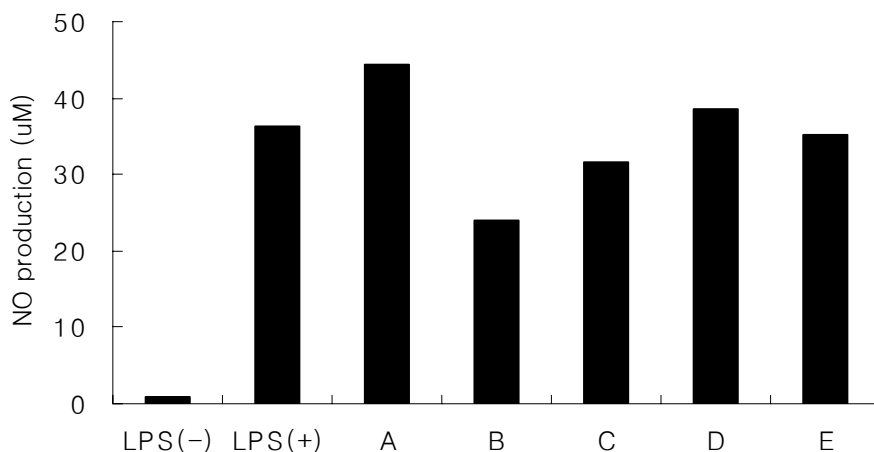


Figure3. The Inhibitory effect of several extracts of root bark of *Ulmus davidiana* on NO production in RAW264.7 cells

A : treatment of 80% EtOH Ext. B : treatment of *n*-Hexane Ext.  
 C : treatment of EtOAc Ext. D : treatment of *n*-Butanol Ext.  
 E : treatment of H<sub>2</sub>O Ext.

extraction	NO Inhibition(%) (Korean)	NO Inhibition(%) (Chinese)
EtOH	-21.97	-32.45
<i>n</i> -Hexane	33.95	34.45
EtOAc	12.98	4.49
<i>n</i> -BuOH	-5.99	-27.96
H <sub>2</sub> O	3.49	-17.47

Table 1. Comparison of the inhibitory effect of Korean and Chinese of several extracts from root bark of *Ulmus davidiana*

## 1-2. *n*-Hexane 분획물들에 대한 NO생성 억제효과

앞의 추출물에서 NO생성 저해효과를 나타내는 *n*-Hexane 분획물에 대해 NO생성 억제효과를 측정하기 위해 *n*-Hexane 분획물을 순상실리카겔 column chromatography를 이용하여 단일 화합물로 분리된 JUD-A와 JUD-B의 NO생성 억제효과를 알아보았다. 측정결과 LPS 단독 처리군에서 86.31  $\mu$ M로 NO가 과량 생성 되었으며, JUD-A에서 0.37  $\mu$ M로 JUD-B에서 16.64  $\mu$ M로 크게 감소함을 알 수 있었다. (Figure 4.) 중국산 유근피와의 비교를 통해서도 한국산 유근피의 경우에 활성이 좀 더 좋게 나왔음을 알 수 있었다. (Table 2.)

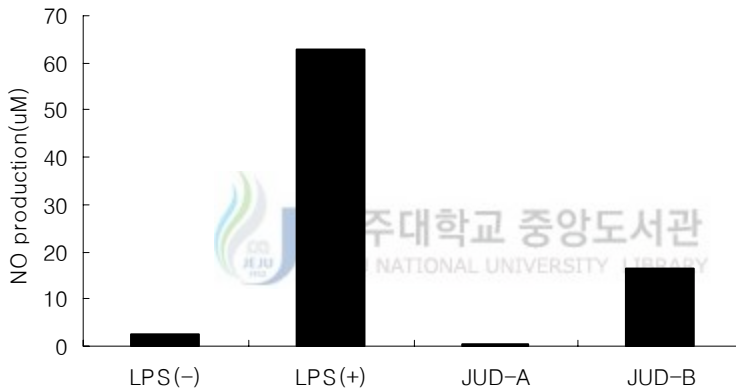


Figure 4. The Inhibitory effect of *n*-Hexane extracts (JUD-A and JUD B) of root bark of *Ulmus davidiana* on NO production in RAW264.7 cells

Fraction	NO Inhibition(%) (Korean)	NO Inhibition(%) (Chinese)
JUD-A	99.76	61.08
JUD-B	79.93	55.97

Table 2. Comparison of the inhibitory effect of Korean and Chinese of JUD-A and JUD-B from root bark of *Ulmus davidiana*

### 1-3. EtOAc 분획물들에 대한 NO생성 억제효과

EtOAc 분획물들에 대해서도 위와 같이 NO생성 억제효과를 측정하였다. 그 결과 *n*-Hexane 분획물에서의 결과와는 대조적으로 EtOAc 분획물 중 JUD-C와 JUD-D의 경우 NO생성 억제효과가 낮음을 알 수 있었다. (Figure 5.)

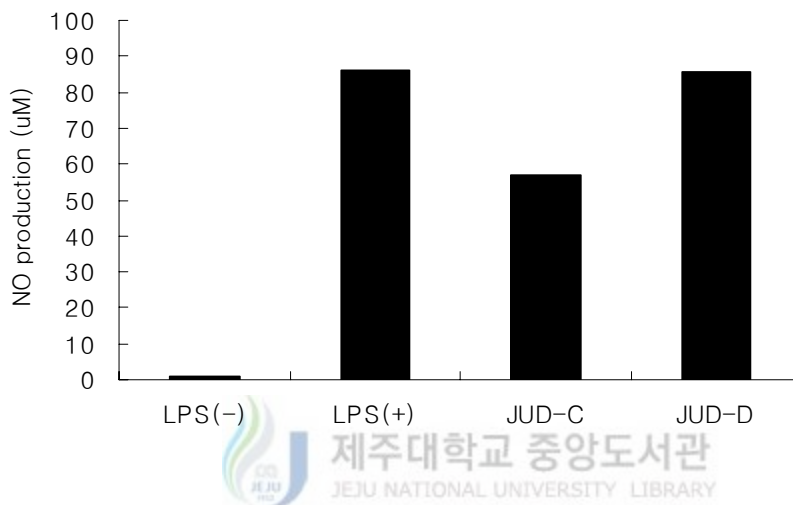


Figure 5. The Inhibitory effect of EtOAc extracts (JUD-A and JUD B) of Root bark of *Ulmus davidiana* on NO production in RAW264.7 cells

## 2. 라디칼 소거 활성

유근피 추출물 및 각 분획물을 활성이 좋다고 알려져 있는 Ascorbic acid를 대조군으로 하여 DPPH radical 소거법에 의한 항산화 활성 실험을 실시하였다. 라디칼 소거 활성 능력 측정에 사용된 DPPH는 그 자체가 매우 안정한 자유 라디칼 화합물로서, 시료에 의하여 라디칼이 제거되면 517 nm에서 흡수파장이 사라지게 되며, 항산화 효과는 DPPH 용액만 존재할 때와 DPPH 용액과 각 추출물 및 분획물이 들어 있는 반응용액의 흡광도 차이로 표현된다. 이 차이의 값이 클수록 항산화 활성이 높다고 판단되며, 이 실험에서는 농도별로 DPPH radical 소거활성을 측정하여  $RC_{50}$ 값으로 표현하

였다. RC<sub>50</sub>값이 작을수록 활성이 좋음을 의미한다.

## 2-1. 80% 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 라디칼 소거 활성

유근피 80% 에탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 라디칼 소거 활성 측정 결과 활성이 좋다고 알려진 Ascorbic acid의 경우 RC<sub>50</sub>값이 2.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 나타내었고, 유근피 에탄올 추출물의 경우에도 5.24  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 Ascorbic acid와 비슷한 활성을 보였다. 각 용매분획들에 대해서도 EtOAc층과 *n*-BuOH층에서 각각 5.38  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4.80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로 비슷한 라디칼 소거 활성을 보였다. 그와는 대조적으로 NO 생성 억제효과에서 좋은 활성을 보였던 *n*-Hexane 분획의 경우에는 좋은 활성을 나타내지 않았다. (Table 3.)

Fraction	DPPH radical scavenging effect	
	RC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	Korean	Chinese
Ascorbic acid	2.32	
EtOH	5.24	6.15
<i>n</i> -Hexane	61.47	40.23
EtOAc	5.38	5.40
BuOH	4.80	6.26

Table 3. DPPH radical scavenging effects (RC<sub>50</sub>) of several extracts of root bark of *Ulmus davidiana* Korean and Chinese

## 2-2. EtOAc 분획물들에 대한 라디칼 소거 활성

앞에서 활성이 좋다고 알려진 EtOAc 분획물을 reverse-phase column chromato-



graphy로 분리하여 얻어진 6개의 분획을 가지고 라디칼 소거 활성을 측정해 보았다. 그 결과 0% MeOH 분획에서 RC<sub>50</sub>값이 3.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 좋은 라디칼 소거 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. (Table. 4)

Fraction	DPPH radical scavenging effect	
	RC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	Korean	Chinese
fr.1	3.12	4.41
fr.2	4.64	4.64
fr.3	28.05	6.59
fr.4	66.48	10.99
fr.5	>100	59.31
fr.6	>100	>100

Table 4. DPPH radical scavenging effects(RC<sub>50</sub>) of several EtOAc extracts of Root bark of *Ulmus davidiana* Korean and Chinese

### 2-3. JUD-C와 JUD-D에 대한 라디칼 소거 활성

앞의 실험에서 활성이 가장 좋았던 0% MeOH 분획에서 분리한 JUD-C와 JUD-D에 대한 라디칼 소거 활성을 측정해 보았다. 그 JUD-C와 JUD-D 분획물들은 각각 9.51  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 5.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 라디칼 소거 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. (Table 5.)

Fraction	DPPH radical scavenging effect	
	RC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	Korean	Chinese
JUD-C	9.51	13.07
JUD-D	5.25	11.08

Table 5. DPPH radical scavenging effects(RC<sub>50</sub>) of JUD-C and JUD-D of root bark of *Ulmus davidiana* Korean and Chinese

### 3. 암세포 증식 억제효과

유근피의 80% 에탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후, MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정함으로써 HL-60세포의 세포 증식에 따른 대사활성을 확인 하였다. 그 결과, *n*-Hexane층에서 HL-60세포의 세포 증식을 현저히 억제시킴을 알 수 있었다. 또한 *n*-Hexane층을 분리하여 얻은 JUD-A와 JUD-B에서도 HL-60세포의 세포 증식을 억제시키는 것을 알 수 있었다. (Figure 6.)

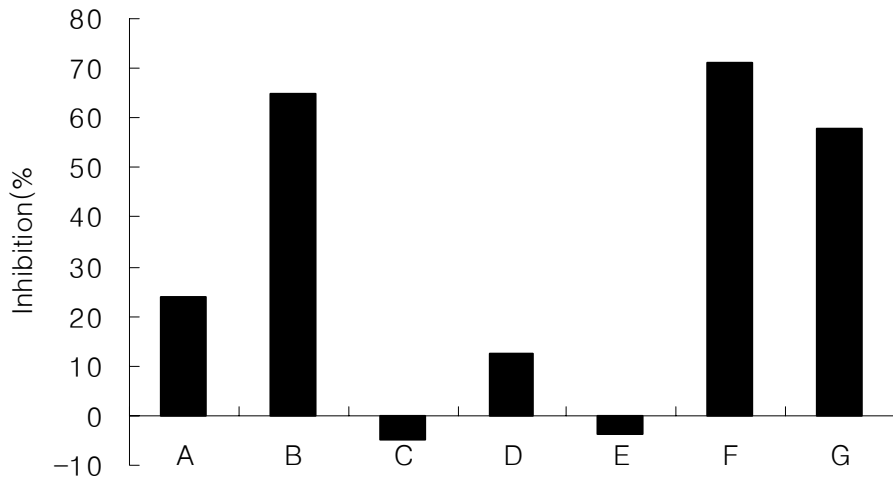


Figure 6. Inhibitory effect of several extracts of root bark of *Ulmus davidiana* on the growth of HL-60 cells

A : treatment of 80% EtOH Ext.                      B : treatment of *n*-Hexane Ext.

C : treatment of EtOAc Ext.                      D : treatment of *n*-Butanol Ext.

E : treatment of H<sub>2</sub>O Ext.                      F : treatment of JUD-A

G : treatment of JUD-B

#### 4. 미백효과 측정

##### 4-1. Tyrosinase의 저해 효과

Tyrosinase inhibition 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군과, enzyme과 sample이 들어있는 반응시료액의 흡광도 차이를 백분율을 이용하여 표현되며 수치가 높을수록 tyrosinase inhibition 효과가 우수한 경우이다. 이 실험에서는 tyrosinase 저해효과가 좋다고 알려진 arbutin과 유근피의 에탄올 추출물, 그리고 이들로부터 분리한 JUD-A, B, C와 D의 tyrosinase 저해효과를 살펴보았다.

실험결과 JUD-B의 tyrosinase 저해효과가 77.18%로 좋은 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다. (Table 6.)

Fraction	Inhibition of tyrosinase activity (%)
Arbutin	47.915
EtOH	-22.43
JUD-A	-6.52
JUD-B	77.18
JUD-C	-8.54
JUD-D	-21.265

Table 6. Tyrosinase inhibitory activity of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C and D of root bark of *Ulmus davidiana*



#### 4-2. Melanin contents 측정

세포 수준에서의 실험 시료의 멜라닌 최종 생성 억제 정도를 확인하기 위하여 B16F10 cell에 시료를 처리 3일 후 최종 생성된 멜라닌 양을 측정하였다. 최종적으로 생성되는 멜라닌의 양이 적을수록 미백활성이 있다고 판단되어진다. 이 실험에 사용된 시료들 역시 위의 tyrosinase 저해 효과에 사용했던 시료들을 농도별로 사용하여 실험하였다. 그 결과 JUD-A와 JUD-B에서 Arbutin과 거의 비슷한 경향을 나타내고 있는 것을 확인할 수 있었다. (Figure 7.)

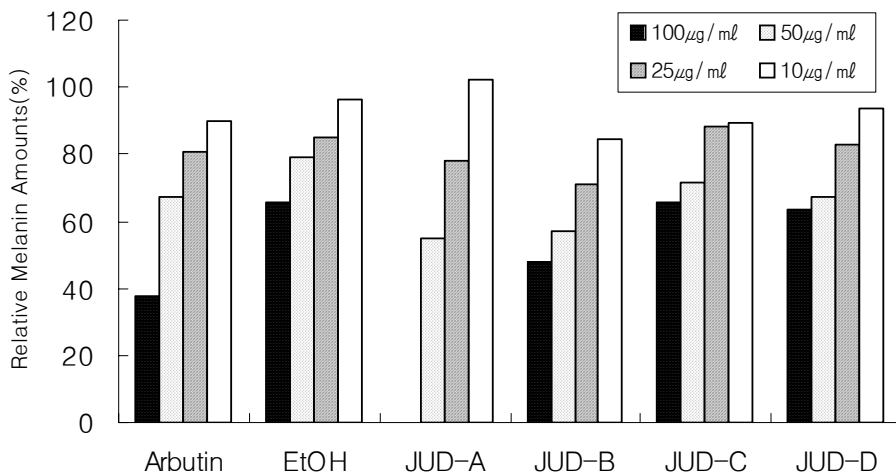


Figure 7. Inhibitory activity of melanin synthesis of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C, D of root bark of *Ulmus davidiana* on B16F10 melanoma cell



#### 4-3. UV에 대한 세포의 viability 측정

Melanin contents 측정을 하기에 앞서 이들 melanoma 세포에 대한 유근피 분획물들의 독성을 확인하기 위하여 B16F10 cells ( $5.0 \times 10^4 / \text{ml}$ )을 처리한 후 MTT를 처리하여 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 확인해 보았다. Arbutin과 비교하여 보았을 때 분획물들은 Arbutin보다 세포 생존률이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. (Figure 8.)

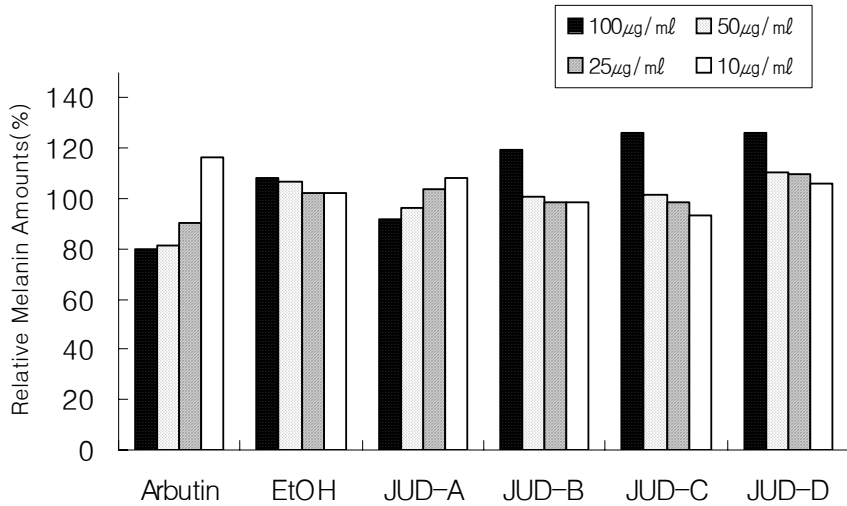


Figure 8. Cell viability using B16F10 melanoma of Arbutin, EtOH extract and JUD-A, B, C, D of root bark of *Ulmus davidiana*



## 5. 유효성분에 대한 분리

### 5-1. JUD-A, JUD-B의 분리 및 동정

유근피(2kg)를 80% 에탄올로 추출한 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 각각 *n*-hexane층, EtOAc층, *n*-butanol층 그리고 H<sub>2</sub>O층으로 분리하였다. 이 용매 분획층 중 *n*-Hexane층을 가지고 normal-phase column chromatography (Hexane/EtOAc/MeOH=7/3/0.1)로 분리한 결과 6개의 분획을 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 분획들 중 단일 물질이라 여겨지는 JUD-A와 JUD-B 두 개의 분획을 NMR기로 확인 하였다.

시료 JUD-A의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Figure 10.)에서는 5.3631 ppm의 multiplet 신호에서 vinyl proton의 존재를 알 수 있었다. 그리고 2.7784 ppm의 triplet 신호에서 두개의 이중결합 사이에 위치한 메틸렌기가 존재함을 알 수 있었으며, 1.2638 ppm의 큰 신

호에서 CH<sub>2</sub>기가 다수 존재함을 알 수 있었다.

시료 JUD-A의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Figure 12.)에서는 127-131 ppm에 존재하는 4개의 신호에서 이중결합이 2개 존재함을 알 수 있었다. 이 사실과 <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 분석결과를 종합하여 CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH가 이 물질에 1개 존재하며 다른 형태의 이중결합은 존재하지 않음을 알 수 있었다. 또한 180.329 ppm의 위치로 보아서 유기산 형태인 RCOOH의 탄소가 존재함을 예측 할 수 있었다.

이상의 분석에서 JUD-A는 9,12-octadecadienoic acid (linoleic acid)로 예측을 하고, 시중에 판매중인 linoleic acid의 <sup>1</sup>H-NMR (Figure 11.)과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Figure 13.)과 비교하였다.

linoleic acid의 NMR data 비교 결과 앞에서 보았던 JUD-A와 data가 같은 것으로 보아 JUD-A는 linoleic acid (Figure 9)라는 것을 예측할 수 있었다.



Figure 9. Structure of JUD-A (9,12-octadecadienoic acid, linoleic acid)

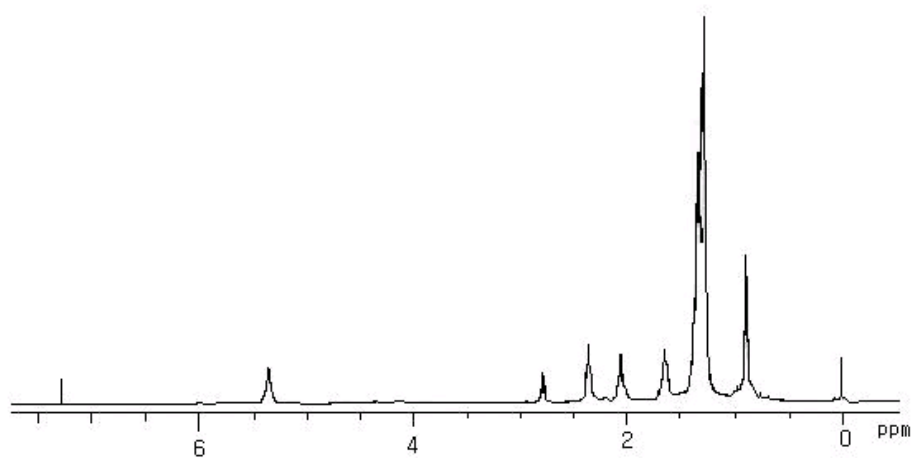
JUD-B의 NMR data를 확인한 결과, 원하는 순도에는 못 미치지만 거의 순수하게 분리된 것으로 보여진다. <sup>1</sup>H-NMR data (Figure 14.)를 확인한 결과 앞에서 분리한 linoleic acid의 <sup>1</sup>H-NMR data와 거의 유사하였다. JUD-B의 분획물이 linoleic acid와 다른 부분은 3-5ppm 부근에 peak가 나타난다는 점이다. 이 부분의 peak로 보아 이 분획물은 linoleic acid에 당이 결합되어 있는 형태일 것이라 예상되어 진다.

## 5-2. JUD-C, JUD-D의 분리 및 동정

앞에서 분리한 용매분획층들 중에서 ethyl acetate층을 가지고 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올을 사용하여 역상실리카겔 column chromatography로 분리한 결과 6개의 분획을 얻을 수 있었다. 이 중 0% MeOH 분획을 이용하여 순상실리카겔 column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 4/3/3/0.1$ )로 JUD-C와 JUD-D를 얻었다. 이 두 분획물의 경우 TLC와 NMR data를 확인한 결과 거의 순수하게 분리된 것으로 보여지기는 하지만, 좀 더 깨끗하게 분리할 필요가 있다고 보여지며, 구조분석 또한 필요할 것으로 보여진다.

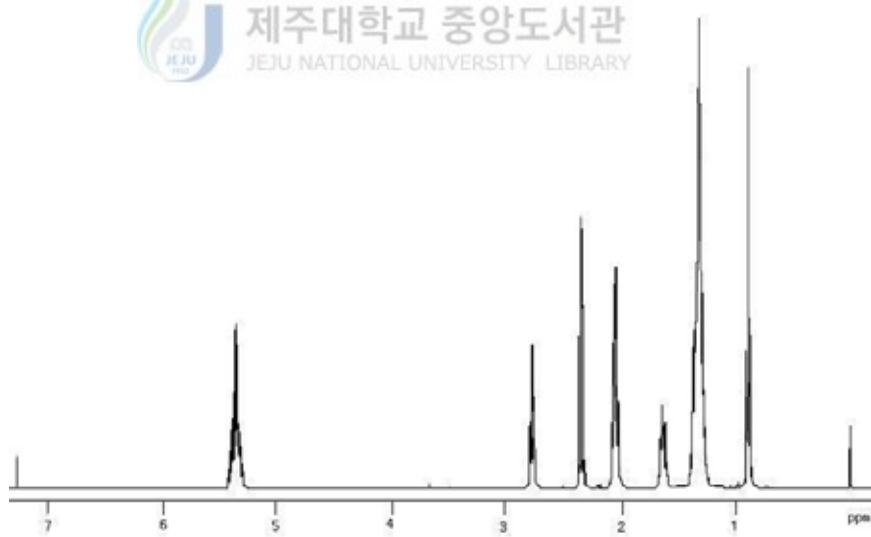






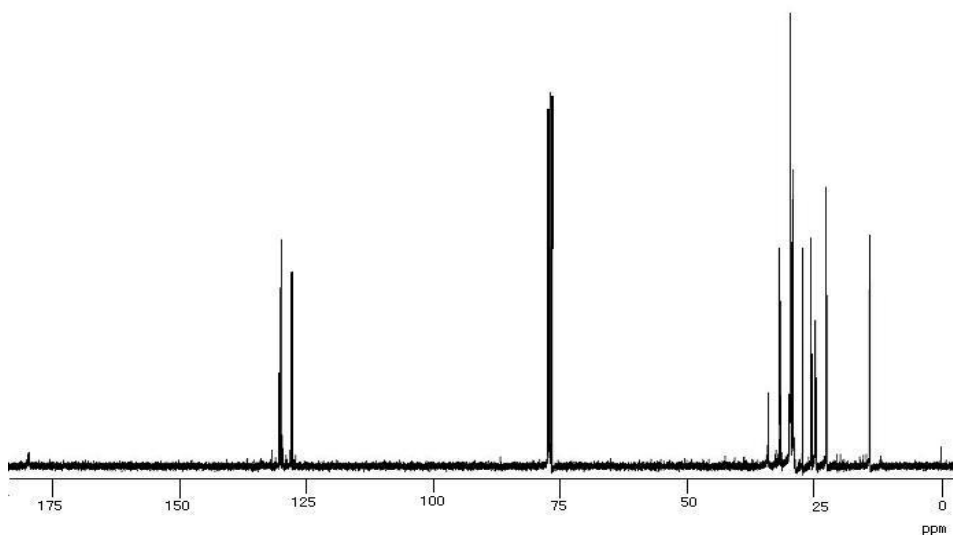
$^1\text{H-NMR}$  : 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 10.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of JUD-A



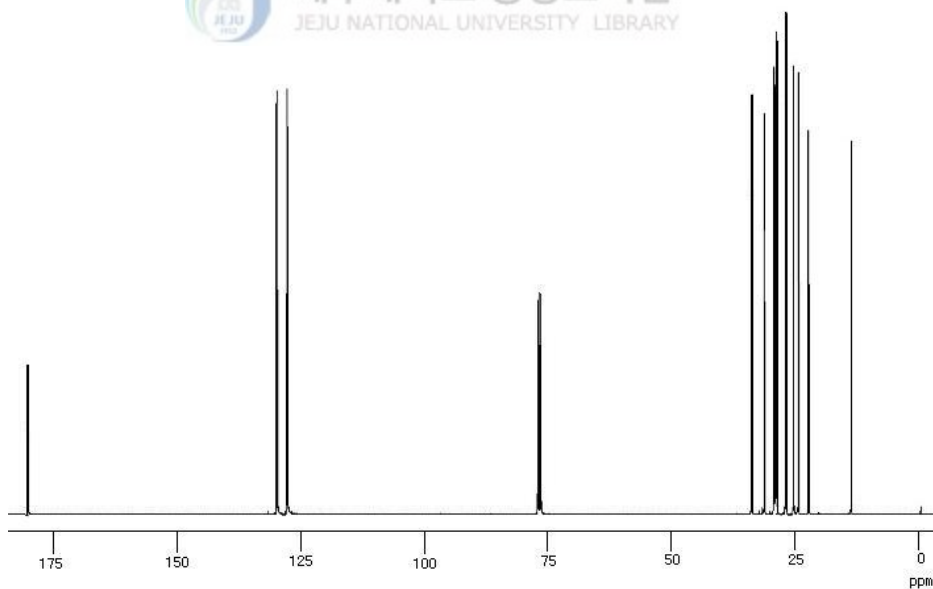
$^1\text{H-NMR}$  : 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 11.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of linoleic acid



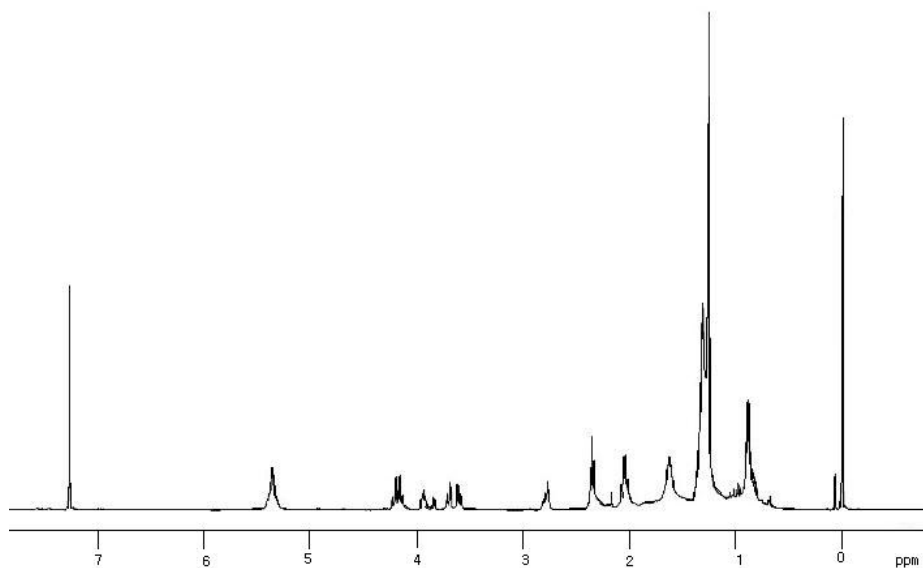
$^{13}\text{C}$ -NMR : 100 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 12.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of JUD-A



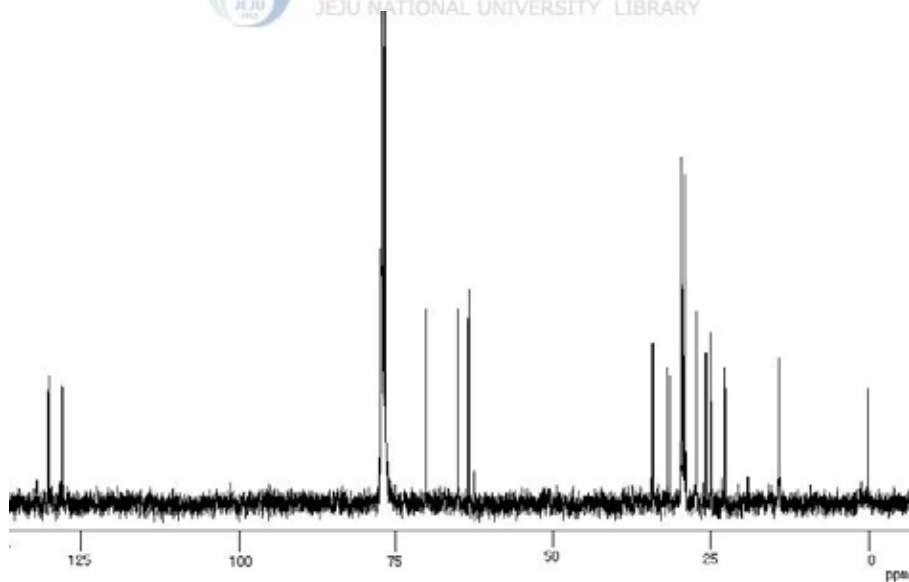
$^{13}\text{C}$ -NMR : 100 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 13.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of linoleic acid



$^1\text{H-NMR}$  : 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 14.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of JUD-B



$^{13}\text{C-NMR}$  : 100 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 15.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of JUD-B

## IV. 결 론

한국산 유근피와 중국산 유근피를 80% 에탄올로 추출한 추출물과 각각의 용매분획층 *n*-Hexan, EtOAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O을 가지고 nitric oxide (NO) assay와 라디칼 소거 활성 효과를 측정하였다.

Nitric oxide (NO) assay는 LPS로 RAW264.7 세포를 자극하여 NO를 생성시킨 후 여기에 sample을 처리하여 NO가 저해된 정도를 확인해 보았다. 그 결과 유근피의 *n*-Hexane층에서 NO 억제효과가 33.95%로 용매분획한 sample들 중 가장 좋은 활성을 나타내었다. 그래서 이 *n*-Hexane층을 분리해 보았으며, 이 *n*-Hexane층에서 단일물질이라 여겨지는 JUD-A와 JUD-B를 분리하였다. 이들의 NO억제 효과는 각각 99.76%와 79.93%로 좋은 활성을 갖고 있는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 유근피의 라디칼소거활성을 실험한 결과, RC<sub>50</sub>값이 5.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 Ascorbic acid의 RC<sub>50</sub>값이 2.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인것과 비교하여 볼때, 아주 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다. 용매분획층의 라디칼 소거활성을 확인해 본 결과 EtOAc층과 *n*-BuOH층에서 각각 5.38  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4.80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 좋은 활성을 나타냈으며, Nitric oxide (NO) assay에서 좋은 활성을 보였던 *n*-Hexane층에서는 활성을 거의 나타내지 않았다.

EtOAc층을 역상실리카겔 column chromatography를 이용하여, 0% MeOH, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, 100% MeOH의 6개의 분획에 대한 라디칼 소거 활성을 확인해 본 결과 0%에서 RC<sub>50</sub>값이 3.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으며, 수득률도 가장 높게 나왔으므로 EtOAc층의 역상0% MeOH 분획을 순상실리카겔 column chromatography를 이용하여 분리하였으며, 단일 물질이라고 보여지는 JUD-C와 JUD-D를 분리하였다.

이 실험은 한국산 유근피와 중국산 유근피를 동시에 실험하여 활성 data를 비교하였으며 거의 비슷한 활성 결과가 나타나는 것을 확인하였다.

이렇게 얻어진 JUD-A, JUD-B, JUD-C와 JUD-D를가지고 MTT시약을 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정함으로써 HL-60세포의 세포 증식에 따른 대사활성을 확인하였다. 그 결과는 Nitric oxide (NO) assay에서와 비슷한 경향을 나타냈으며, JUD-A와 JUD-B에서 저해율이 각각 71.144%와 57.906%로 다른 분획들에 비해서 좋은 저해효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

또한, 위의 분리된 물질을 가지고 미백효과를 확인하였다. Tyrosinase저해 활성을 확인한 결과 JUD-B의 저해 활성이 77.18%로 Arbutin (47.975%)과 비교하여 더 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 멜라닌의 최종 생성 억제 정도를 확인하기 위하여 B16F10 cell에 시료를 처리 3일 후 최종 생성된 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 JUD-A와 JUD-B에서 억제효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 마지막으로 melanoma 세포에 대한 유근피 분획물들의 독성을 확인하기 위하여 B16F10 cells을 처리한 후 MTT를 처리하여 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 확인해 보았다. 그 결과 멜라닌 양을 측정하여 억제효과가 있음을 확인한 JUD-A와 JUD-B의 경우 세포 독성이 거의 없다는 것을 알 수 있었다.

JUD-A의 NMR data를 확인한 결과 문헌상의 data들과 비교해 볼 때 이 물질은 linoleic acid임을 예측할 수 있었다. 그러나 NMR data의 peak가 같은 위치에 나타났다고 하여 같은 물질이라고 말할 수는 없으므로 JUD-A를 고순도로 확보하여 명확한 구조 동정이 필요하다고 여겨지며, NMR data를 이용한 구조분석 이외에 다른 분석도 더 필요하다고 보여진다.

JUD-B의 경우는 NMR data를 확인하여 볼 때 순수한 물질이라고 보여지며, 앞에서 분리한 linoleic acid의 NMR data와 비교하여 볼때 3-5ppm에서의 peak만 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. JUD-B의 경우 구조상의 차이로 인하여 linoleic acid와는 다르게 tyrosinase 저해효과 및 melanin contents에서 좋은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그러므로 향후 JUD-B 물질을 고순도로 확보하여, 더욱 명확한 구조동정과정이 필요할 것으로 보여지며, 미백효과에 대한 또 다른 활성실험을 확인하는 작업이 진행되어야 할 것이다.

JUD-C와 JUD-C의 경우에도 TLC와 NMR상으로는 단일물질이라고 보여지기는 하지만 이 두 물질에 대한 구조동정과정이 더 필요할 것으로 보여지며, 이 두 물질에 대한 활성 data를 더 확보해야 할 것으로 보여진다.

## V. 참고문헌

1. Brett, DS and SH Snyder Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **1994** *63*: 175-195
2. Reiter, CD, RJ Teng and JS Beckman superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxyxynitrite. **2000** *J Biol Chem* *275*: 32460-35466
3. Shinyashiki, M, KT Chiang, CH Switzer, EB Gralla, JS Valentine, DJ Thiele and JM Fukuto The interaction of nitric oxide(NO) with the yeast transcription factor Ace1:a model system for NO-protein thiol interactions with implications to metal metabolism. **2000** *Proc Natl Acad Sci USA* *97*:2491-2496
4. 맹옥희, 김용찬, 김영상, 백상기, 이혜영 Nitric oxide(NO)의 조절과 기능; 대식세포 주에서 NO에 의해 상향 조절되는 유전자의 분석, **2002** *Bulletin of Biotechnology* CNU. *vol.8*, No2, 1-9
5. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **1992** *FASEB J.* *6*, 3051
6. Knowles, R. G. and Mocada, S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. **1992** *TIBS.* *17*,399
7. Scott, M. G. and Hancock, R. E. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit.* **2000** *Rev. Immunol.* *20*,
8. Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y. and Ryu. J. H. Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells. **1998** *Yakhak Hoeji* *42*, 5.
9. Cerutti, P.A Oxy-radicals and cancer. **1994** *Lancet* *344*(8926):862-863
10. 노태철, 최희철, 김보연, 김영호, 안중식, 김영국, 이현성 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 Nitric Oxide 생성 저해활성, **1999** *Kor, J, Pharmacogn.* *30*(4):413-416
11. Kensler, T. W., Trush, M. A. Role of oxygen radicals in tumor promotion. **1984** *Environ. Mutagen.* (*4*):593-616
12. Richter, C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? **1988** *FEBS Lett.* *241*(1-2):1-5.
13. Cerutti, P.A Oxy-radicals and cancer. **1994** *Lancet* *344*(8926):862-863
14. Gung, G. T. Ju, I. O, Choi, J. s, Hong, J. S. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of schizandra chinensis RUPRECHT (Omija) seed.

2000 *Korean J. Food Sci. Technol.* 32(4):928-935

15. Fukuzawa, K., Takaishi, Y. Antioxidants. 1990 *J. Act. Oxy. Free Rad.* 1:55-61

16. Frei, B. Novezymatic antioxidant defense systems. In Natural antioxidants in human health and disease, Briviba, K. and Sies, H.(eds), 1994 *Academic press*, London, pp107-120

17. 보건사회부, 대한약전의 생약규격집(한약), 1987 pp215

18. 영림사 신 민교, 원색임상본초학, 1984 pp165,

19. Son, B. W., Park, J. H., and zee, O. P., Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*., 1989 *Arch Pharm. Res.*, 12, 219

20. Chen, F. C., Lin, Y. M., Chen, A. H., 1972 *Phytochemistry*, 11, 1190

21. Kim, S. H., Hwang, K T. and Park, J. C., Isolation of flavonoids and detemination of rutin from the leaves of *ulmus parviflora*., 1992 *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 229

22. 박종희 한국 민간약의 기원에 관한 조사보고 생약학회지 1993 24, 322-327

23. Hong, N. D., Rho, Y. S., Kim, J. S., A study on efficacy of *Ulmi cortex*., 1990 *Kor. J. Pharmacogn.*, 21, 217

24. Tagashira, M. and Ohtake, Y. ; A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *M elissa officinalis*. 1998 *Planta M ed.*, 64, 555

25. 김상철, 박수영, 허규희, 김세재, 강희경 HL-60 백혈병 세포의 성장에 대한 노랑하늘타리의 효과, 2001 *Cheju journal of Life Science*, Vol.4. No.4, 95-102

26. Kaxuhisa M., Minoru F. Arbutin : Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, 1996 *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276 : 765-769.

27. Kyung Tae Kim, Jin Cuk Kim, Anti-melanogenesis Effect of Phenolic Compound Isolated from *Gastrodia elata*, 2004 30 : 33-38

28. Ishihara Y., Oka M., Tsunakawa M., Tomita K., Hatori M., Yamamoto H., Kamei H., Kamei H., Miyaki T., Konishi M. and Oki T., Melanostati, a new synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. 1991 *J. Antibiotics*, 44, 25.

29. K. Maeda, and M. Fukuda, In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, **1991** *J. Soc. Cosmet. Chem.*, *42*, 361.
30. K. M. Ashutosh, A. Amita and N. Sita. Gold Sodium Thiomalate(GSTM) Inhibits Lipopolysaccharide Stimulated Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Through Ceramide Pathway. **2002** *Cell Immunol.* *219*:1-10
31. 부희정, 이은숙, 김경범, 김영대, 이선주 파리폴(*Phryma leptostachya*)추출액의 기능성화장품 성분 검색 *J. of Basic Sciences*, **2004** *Cheju Nat'l Univ.* *17(1)*, 129-137,
32. 김경태, 김진국, 박선희, 이정하, 이수희, 김기호, 박수남 천마(*Gastrodia elata*)추출물로부터 분리된 페놀성 물질의 멜라닌 생성 억제작용 **2004** *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea Vol. 30*, No, May 33-38
33. Jong-Pyung Kim, Won-Gon Kim, Hiroyuki Soshino, Jin Jung and Ick-Dong Yoo Sesquiterpene O-Naphthoquinones from the Root bark of *ULMUS DAVIDIANA*, *Phytochemistry*, **1996** *Vol. 43*. No. 2, pp. 425-430,





## 감사의 글

어느덧 대학원 생활에 마지막이 되어가고 있습니다. 조교생활과 졸업논문이라는 두 가지의 일을 겸용하면서 많이 힘들기도 하였습니다. 이제는 다 지나가는 시간이 되었습니다. 논문이 완성되기까지의 많은 도움을 주시고 지켜봐 주신 많은 분들께 이 감사의 글을 올립니다.

제가 여기까지 올수 있게 많은 조언과 도움을 주신 정덕상 교수님께 감사의 글을 먼저 올립니다. 그리고 저에게 화학의 가르침을 주신 한성빈 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 이선주 교수님, 김원형 교수님, 이남호 교수님께 감사의 글을 올립니다. 그리고 저의 논문이 나오기까지 많은 도움을 주신 백종석 선배님에게 감사드리며 실험의 조언과 도움을 주신 부희정 선배님과 저의 동기 은숙이와 진욱 오빠에게 감사의 글을 남깁니다. 또한 항상 저에게 도움을 많이 준 원혁 오빠와 실험실의 봉석 오빠, 대경이, 미연이 에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 한충훈 선배님, 진석 선배님과 정미 선배님, 태현 오빠와 지영이 언니 및 대학원 동기 및 후배님들에게도 감사의 글을 올립니다.

매일 늦게 집에 가면 그 시간까지 기다리느라 고생 많이 하셨던 부모님과 군대에 있는 올 동생에게도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 미약한 부분이 있는 저에게 많은 관심과 조언을 아끼지 않은 많은 선배님들과 후배님들에게 이 감사의 글을 올리며 바쁜단 핑계로 못만나도 항상 옆에서 지켜주던 친구들에게도 감사의 글을 올립니다.