



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

뽕잎피나무(*Tilia taquetii*) 가지로부터
항산화 및 미백활성 성분 분리



濟州大學校 大學院

化學科

姜唯美

2011年 2月

뽕잎피나무(*Tilia taquetii*) 가지로부터 항산화 및 미백활성 성분 분리

指導教授 李 南 昊

姜 唯 美

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

姜唯美的 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2011年 2月

Antioxidative and Whitening Constituents
from *Tilia taquetii* Branches

Yu-Mi Kang
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2011. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	v
List of Abbreviations	viii
ABSTRACT	ix
I. 서론	1
1. 천연소재와 기능성화장품	1
2. 멜라닌 생성과정과 미백 화장품	2
3. 활성산소와 항산화제	7
II. 시약 및 기기	10
III. 연구과제 : ‘뽕잎피나무 가지’의 유효 성분 분리 및 활성검색	11
1. 재료	11
2. 실험방법	13
2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리	13
2-1-1. 뽕잎피나무 가지의 70% EtOH 추출물 추출 및 용매분획(제1차)	13
2-1-2. VLC에 의한 분획과정(제1차)	13
2-1-3. VLC를 수행한 분획물에서 compound 1, 4, 7, 8 분리과정	13
2-2-1. 뽕잎피나무 가지의 70% EtOH 추출물에 대한 용매분획(제2차)	16
2-2-2. VLC에 의한 분획과정(제2차)	16
2-2-3. VLC를 수행한 분획물에서 compound 2, 3, 5, 6 분리과정	16
2-2. 활성 검색	18
2-2-1. DPPH radical scavenging test	18
2-2-2. ESR를 이용한 DPPH radical scavenging test	18
2-2-3. ESR를 이용한 hydroxyl radical scavenging test	19
2-2-4. Tyrosinase inhibition test	20
3. 결과	21

3-1. 뽕잎피나무(가지) 70% EtOH 추출물과 2-1-1의 각 용매분획물의 수율	21
3-2. 2-1-1의 각 용매분획물의 수율	21
3-3. EtOH 추출물과 각 용매분획들에 대한 DPPH radical scavenging test	22
3-4. 70% EtOH 추출물과 각 용매분획물에 대한 tyrosinase inhibition test	23
3-5. Compound 1의 구조 동정	24
3-6. Compound 2의 구조 동정	31
3-7. Compound 3, 4의 구조 동정	34
3-8. Compound 5의 구조 동정	43
3-9. Compound 6의 구조 동정	46
3-10. Compound 7의 구조 동정	49
3-11. Compound 8의 구조 동정	52
3-12. 뽕잎피나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 활성실험 결과	55
3-12-1. DPPH radical scavenging effect	55
3-12-2. ESR을 통해 확인한 DPPH radical scavenging effect	57
3-12-3. ESR을 통해 확인한 hydroxy radical scavenging effect	59
3-12-4. Tyrosinase inhibition effect	61
4. 결론	63
IV. 참고문헌	66

List of Tables

Table 1. Yields of extract and each solvent fraction from <i>Tilia taquetii</i> branches	21
Table 2. Yields of extract and each solvent fraction from <i>Tilia taquetii</i> branches	22
Table 3. DPPH scavenging inhibitions and IC ₅₀ values of extract and fractions of <i>T. taquetii</i>	22
Table 4. Informations of compound 1	25
Table 5. ¹ H NMR, ¹³ C NMR chemical shifts and HMBC data of compound 1	30
Table 6. ¹ H NMR, ¹³ C NMR chemical shifts of compound 2	33
Table 7. A comparison of ¹³ C chemical shift on v14 and v15 powder Fr. with cleomiscosin A	36
Table 8. A comparison of ¹³ C chemical shift on v14 and v15 powder Fr. with cleomiscosin B	36
Table 9. ¹ H NMR, ¹³ C NMR NMR chemical shifts of compound 3	41
Table 10. ¹ H NMR, ¹³ C NMR chemical shifts and HMBC data of compound 4	42
Table 11. ¹ H NMR, ¹³ C NMR chemical shifts of compound 5	45
Table 12. ¹ H NMR, ¹³ C NMR chemical shifts of compound 6	48
Table 13. ¹ H NMR, ¹³ C NMR chemical shifts of compound 7	51
Table 14. ¹ H NMR, ¹³ C NMR chemical shifts of compound 8	54
Table 15. SC ₅₀ values of isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	55
Table 16. Inhibitions in each concentration and SC ₅₀ values of the isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	56
Table 17. DPPH radical scavenging inhibitions in each concentration and SC ₅₀ values of the isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	57

Table 18. Hydroxyl radical scavenging inhibitions in each concentration and SC ₅₀ values of the isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	59
Table 19. IC ₅₀ values of isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	61
Table 20. Inhibitions in each concentration and IC ₅₀ values of isolated compounds from <i>T.taquetii</i>	62



List of Figures

Figure 1. 기능성화장품 연도별 생산실적 및 시장 점유율(뷰티누리, 2010. 08. 02, 김준한)	2
Figure 2. Biosynthetic pathway of melanin	3
Figure 3. Biosynthetic pathway of melanin with three-emzyme	4
Figure 4. Tyrosinase inhibitors from natural sources	5
Figure 5. Tyrosinase inhibitors from synthetic sources and derivatives of natural compounds	5
Figure 6. New tyrosinase inhibitors from natural source	6
Figure 7. Action of antioxidants	7
Figure 8. Antioxidants from natural source	8
Figure 9. Pictures of <i>Tilia taquetii</i>	12
Figure 10. Scheme of fractionation process of extract(2-1-1)	14
Figure 11. Diagram of isolation process for compound 1, 4, 7, 8 from <i>T. taquetii</i>	15
Figure 12. Diagram of isolation process for compound 2, 3, 5, 6 from <i>T. taquetii</i>	17
Figure 13. DPPH scavenging inhibition of extract and fractions from <i>T. taquetii</i>	23
Figure 14. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 1	26
Figure 15. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 1	26
Figure 16. ¹³ C NMR and DEPT-135 spectrum of isolated compound 1	27
Figure 17. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of isolated compound 1	27
Figure 18. HMQC spectrum of isolated compound 1	28
Figure 19. HMBC spectrum of isolated compound 1	28
Figure 20. HR-FAB MASS spectrum of isolated compound 1	29
Figure 21. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 2 from <i>T.taquetii</i>	32
Figure 22. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 2	32

Figure 23. ^1H NMR spectrum of isolated compound 3	37
Figure 24. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 3	37
Figure 25. ^1H NMR spectrum of isolated compound 4	38
Figure 26. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 4	38
Figure 27. ^{13}C NMR and DEPT-135 spectrum of isolated compound 4	39
Figure 28. ^1H - ^1H COSY spectrum of isolated compound 4	39
Figure 29. HMQC spectrum of isolated compound 4	40
Figure 30. HMBC spectrum of isolated compound 4	40
Figure 31. ^1H NMR spectrum of isolated compound 5	44
Figure 32. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 5	44
Figure 33. ^1H NMR spectrum of isolated compound 6	47
Figure 34. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 6	47
Figure 35. ^1H NMR spectrum of isolated compound 7	50
Figure 36. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 7	50
Figure 37. ^1H NMR spectrum of isolated compound 8	53
Figure 38. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 8	53
Figure 39. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	56
Figure 40. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from <i>T. taquetii</i> (ESR)	58
Figure 41. ESR signals of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	58
Figure 42. Hydroxy radical scavenging activities of isolated compounds from <i>T. taquetii</i> (ESR)	60
Figure 43. ESR signals of hydroxy radical scavenging activities of isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	60
Figure 44. Isolated compounds from <i>T. taquetii</i>	65

List of Abbreviations

CC	column chromatography
CHCl ₃	chloroform
CD ₃ OD	methanol- <i>d</i> ₄
CDCl ₃	chloroform- <i>d</i>
COSY	Correlation Spectroscopy
DMSO	dimethylsulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d	doublet
dd	doublet of doublet
EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl acetate
Ext.	extract
ESR	Electron Spin Resonance
Fr.	fraction
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
int	integration
IC ₅₀	inhibition concentration of 50%
<i>J</i>	coupling constant (Hz)
m	multiplet
MeOH	methanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
np	normal-phase, normal-phase silica gel CC subfraction
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
se	Sephadex LH-20, Sephadex LH-20 CC subfraction
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
s	singlet
<i>T. taquetii</i>	<i>Tilia taquetii</i>
TLC	Thin Layer Chromatography
UV/VIS	ultraviolet/visible
v	VLC subfraction
VLC	vacuum liquid chromatography
Vit. C	vitamin C
1D	one-dimensional
2D	two-dimensional

ABSTRACT

In this study, anti-oxidative and anti-tyrosinase activities were examined on the extract from *Tilia taquetii* branches and their active constituents were identified. This study was designed to evaluate its extract and isolated compounds as the potential ingredient in functional cosmetics.

The extract was prepared from the branches of *T. taquetii* with 70% aqueous ethanol. The ethanol extract was partitioned successively into *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol. The extract and fractions were subjected to DPPH radical scavenging and tyrosinase inhibition tests. In these studies, very strong DPPH radical scavenging activities were observed for the extracts. However, they showed very weak tyrosinase inhibition activities. The identification of the active constituents were conducted with the EtOAc-soluble fraction. Repeated column chromatography on normal-phase silica gel and Sephadex LH-20 resulted in the isolation of eight compounds, orobol 4'-*O*- β -glucopyranoside (1), 3'-*O*-methylorobol (2), cleomiscosin A (3), cleomiscosin B (4), 3,4-dihydroxybenzoic acid (5), β -sitosterol (6), *epi*-catechin (7) and oleic acid (8). Among these, the compound 1 is new, and the other compounds were isolated for the first time from *T. taquetii*. The elucidation of the chemical structure of the compounds 1-8 were accomplished using spectroscopic data including 1D and 2D NMR spectra, and by the comparison of their data to the literature values. The isolated compounds were also subjected to the above biological tests. The compounds 7 (SC_{50} 17.7 μ g/mL) and 2 (SC_{50} 78.5 μ g/mL) showed good DPPH radical scavenging activities compared to ascorbic acid (SC_{50} 7.7 μ g/mL) as a positive control. In addition, DPPH and hydroxy radical scavenging activities were examined using ESR spectrometer, strong activities were observed in

the compounds 5 and 7. For the tyrosinase inhibition test, the compounds 3 (IC_{50} 12.9 $\mu\text{g/mL}$) showed good activities compared to arbutin (IC_{50} 104.6 $\mu\text{g/mL}$) as a positive control.

Based on the above experimental results, it is suggested that the extract from *Tilia taquetii* branches could be potentially applicable in cosmetic formulation as the functional, especially whitening ingredient.



I. 서론

1. 천연소재와 기능성화장품

1999년에 제정된 약사법에서 화장품은 인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로 인체에 대한 작용이 경미한 것이라 정의하고 있다. 하지만 2000년 7월 화장품법이 독립 제정·시행되면서 화장품 산업의 눈부신 발전이 이루어졌다. 화장품의 기술발전 중 손꼽을 수 있는 하나는 바로 기능성화장품의 개발이다.¹⁾

기능성화장품은 화장품법 제2조 제2호에서 다음과 같이 정의하고 있다.

- ㉠ 피부의 미백에 도움을 주는 제품
- ㉡ 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품
- ㉢ 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품

기능성화장품은 의약품은 아니지만 다른 유형의 화장품과 달리 기능적인 효과를 가지고 있어 국내 화장품산업에서 기능성화장품의 중요성이 점차 부각되고 있는 실정이다.

화장품 신문의 보도에 따르면,²⁾ 기능성화장품의 생산실적과 점유율이 10년 새 4배가 증가해 기능성화장품 시장의 급격한 성장을 보여주었다. 식품의약품안전청에 따르면 지난 2000년 7월, 화장품법이 시행되면서 시작된 기능성 화장품 심사는 2001년 40여 업체에서 500여 품목에 불과했으나 지난 2009년에는 250여 업체 6,000여 품목(보고품목 포함)이 심사를 받아 업체 수와 품목 수가 모두 큰 폭으로 증가했고, 생산실적도 2001년 2,700억 원에서 2009년에는 1조 2,000억 원으로

4배가량 급증해 전체화장품 시장의 25% 정도를 차지하는 등 질적이나 양적으로 크게 성장한 것으로 나타났다.

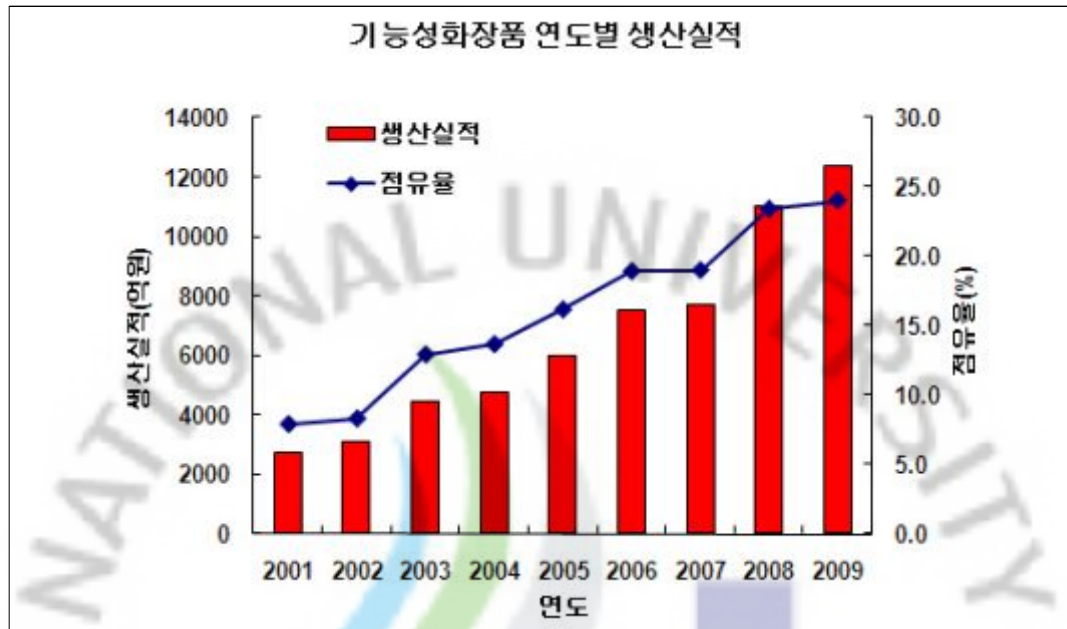


Figure 1. 기능성화장품 연도별 생산실적 및 시장 점유율 (뷰티누리, 2010. 08. 02, 김준한)

2. 멜라닌 생성과정과 미백 화장품

미백 화장품이란 피부의 과도한 멜라닌 색소의 침착을 방지하거나 기존의 침착된 멜라닌 색소의 색을 열게 하여 기미나 주근깨의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품을 말한다.

멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌의 생성과정은 다음과 같다. Tyrosine은 tyrosinase(EC 1.14.18.1)를 촉매로 하여 dopa를 거쳐 dopaquinone으로 산화된다. Dopaquinone은 dopachrome으로 자동산화 된다. Dopachrome의 반응생성물인 DHI(dihydroxyindole)와 DHICA(dihydroxyindole-2-carboxylic acid)의 연속적인

산화반응에 의해 eumelanin이 생성된다. Cysteine 혹은 glutathione의 존재시에는 dopaquinone에 의해 cysteinyl-dopa 또는 glutathionyl-dopa로 전환된다. 그 후에 pheomelanin이 형성된다(Figures 2, 3).⁵⁾

멜라닌 생성(melanogenesis) 저해효과를 측정하기 위해서 tyrosinase 저해효과를 측정하는 방법이 이용되고 있다. 그 이유는 우리가 미지의 물질을 tyrosinase inhibitor로 추정할 때, tyrosine이나 dopa의 존재 하에 dopachrome의 형성정도를 측정하기 때문이다. Ascorbic acid와 같은 dopaquinone의 화학적 감소를 야기하는 환원제, phenolic compound과 같이 대체 효소기질 화합물 등이 tyrosinase inhibitor로 작용된다.⁵⁾

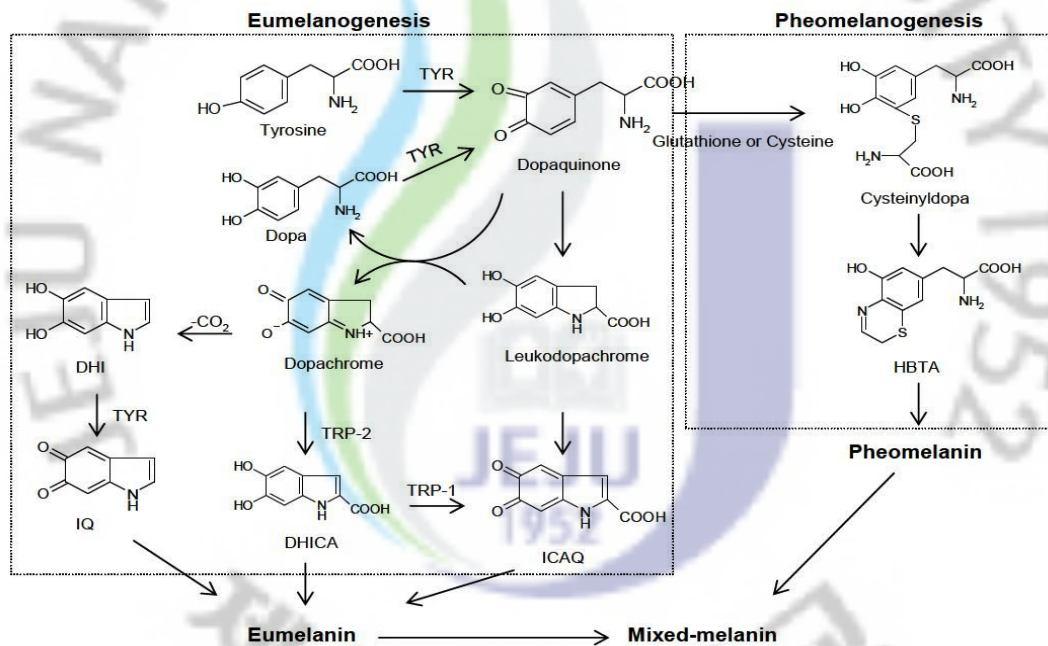


Figure 2. Biosynthetic pathway of melanin
 TYR=tyrosinase; TRP=tyrosinase related protein; Dopa= 3,4-dihydroxyphenylalanine;
 ICAQ=indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone; IQ=indole-5,6-quinone; HBTA=5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine

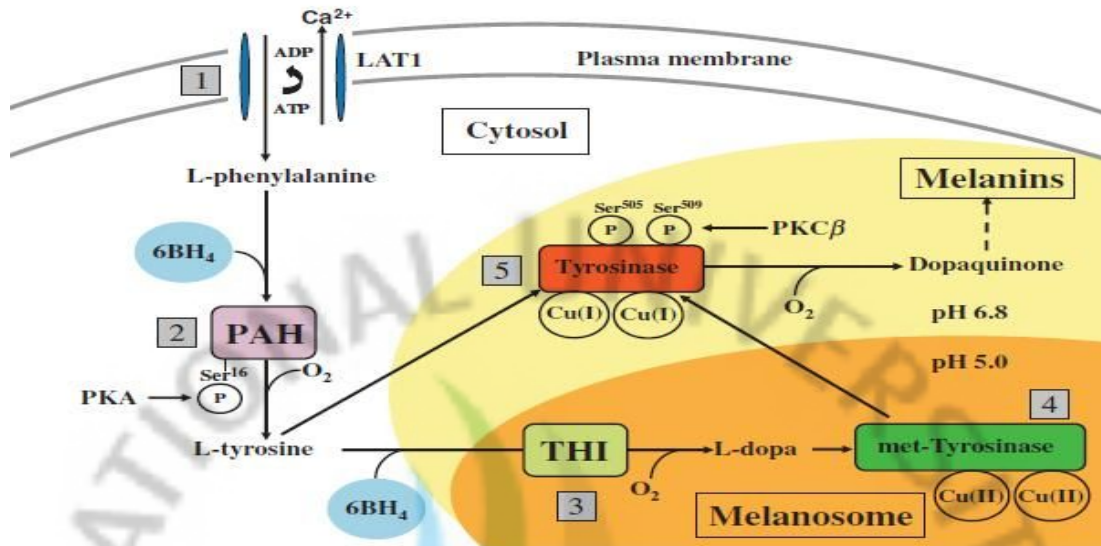


Figure 3. Biosynthetic pathway of melanin with three-enzyme
 PAH=phenylalanine hydroxylase; THI =tyrosine hydroxylase isoform I

현재 알려져 있는 tyrosinase inhibitor로는 천연물에서 얻어진 kaempferol, quercetin, glabridin, L-mimosine, kojic acid 등이 있으며(Figure 4), 합성 화합물 또는 천연 화합물의 유도체인 captopril, topolone, geranyl gallate 등이 있다(Figure 5).⁴⁾

최근의 연구결과에 따르면 천연물로부터 얻어진 tyrosinase inhibitor로서 여러 종류의 flavonoids 뿐만 아니라 oxyresveratrol, chloropirin, 8'-*epi*-cleomiscosin A, physcion analog, (+)-lyoniresinol 등이 보고되어 있다(Figure 6).⁵⁾

이처럼 천연자원에서부터 뛰어난 tyrosinase 저해활성을 가진 화합물들이 분리 보고 됨에 따라 천연 tyrosinase inhibitor의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재 화장품 산업에서 미백 화장품의 원료로 사용되고 있는 arbutin이나 kojic acid는 활성과 안전성의 문제로 사용이 감소하거나 금지되는 추세이다. 그러므로 이들을 대체할 미백 화장품 원료에 대한 활발한 연구가 필요한 실정이다.

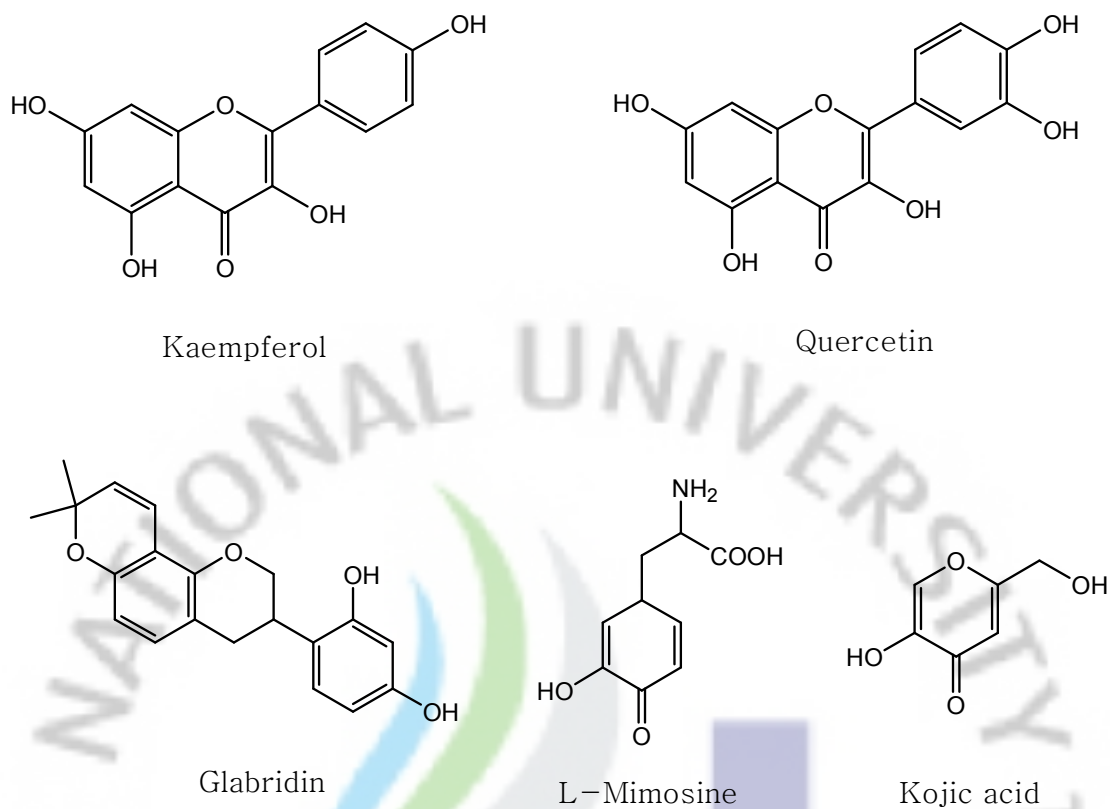


Figure 4. Tyrosinase inhibitors from natural sources

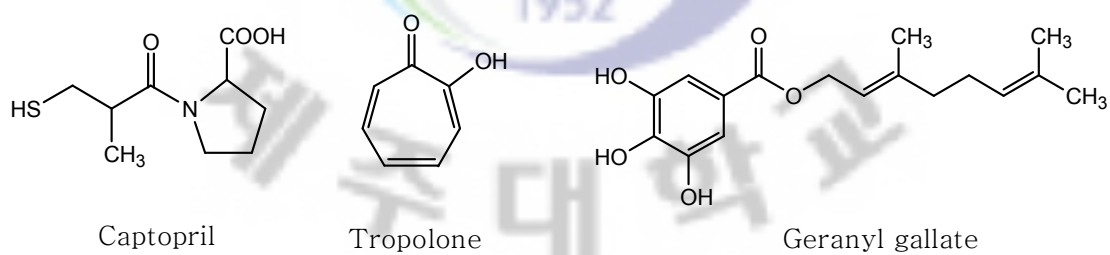


Figure 5. Tyrosinase inhibitors from synthetic sources and derivatives of natural compounds

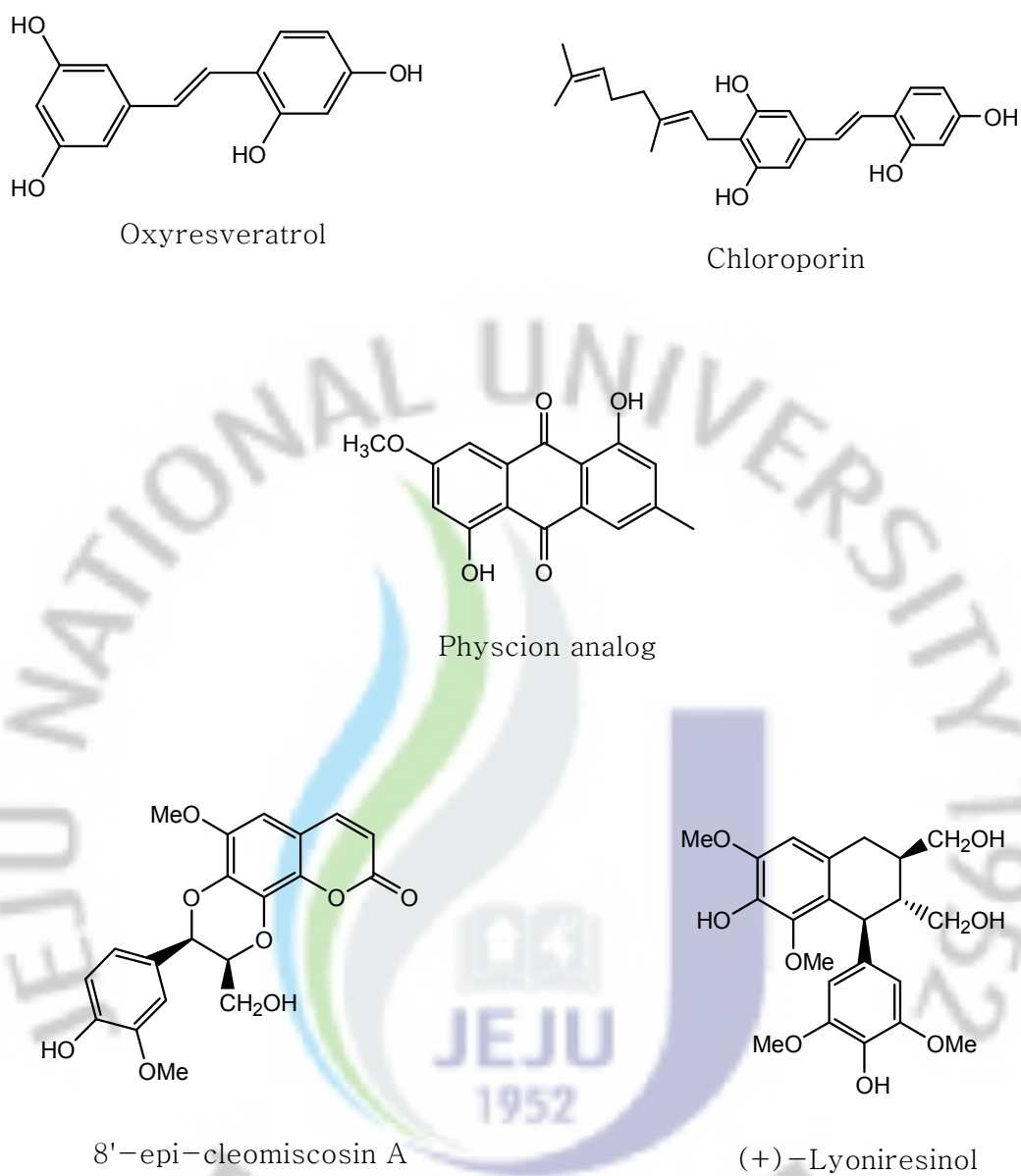


Figure 6. New tyrosinase inhibitors from natural source

3. 활성산소와 항산화제

우리 몸에는 끊임없이 활성산소(유해산소)가 생긴다. 전자를 잃어버려 항상 불안한 이 산소가 세포를 공격해 상처를 입히는데 이를 산화작용이라고 한다. 쇠가 녹슬 듯 세포가 병드는 것이다. 전문가들은 각종 질병의 90%와 노화 과정 등에 활성산소가 영향을 미치는 것으로 분석한다. 미국 터프츠대학 제프리 블룸버그 교수는 ‘항산화 물질은 전자가 없는 유해산소와 자유 라디칼에 자신의 전자를 내어 줌으로써, 유해 산소가 전자를 뺏기 위해 우리 몸을 파괴하는 것을 막아준다’고 설명했다.

일반적으로 항산화제를 산소나 퍼옥사이드에 의한 산화반응 억제 물질로 규정하지만, 생화학자인 Barry Halliwell은 “산화성 물질과 비견할만한 낮은 농도에서 충분히 산화를 지연시키거나 방어할 수 있는 어떤 물질”이라고 포괄적으로 정의 내리고 있다.⁷⁾

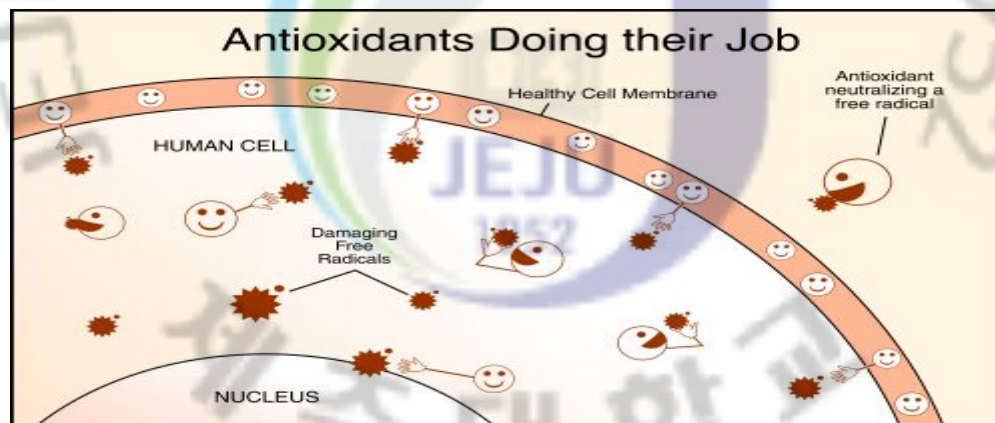


Figure 7. Action of antioxidants

항산화제의 작용으로 가능한 mechanism은 ROS(reactive oxygen specoes)를 제거하거나, ROS의 형성을 막는법 등이 있다. 현재 항산화제로 보고되어 있는 화합물로는 gallic acid, myristicine, *p*-coumaric acid, apigenin, quercetin, eriodictyol, afzalechin, catechin, leucopelargonidin 등이 있다(Figure 8).⁶⁾

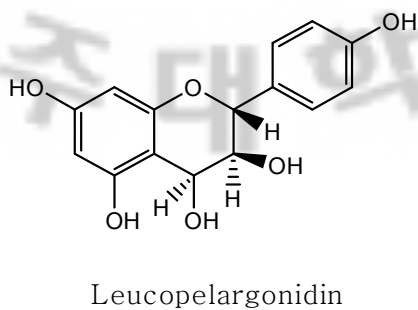
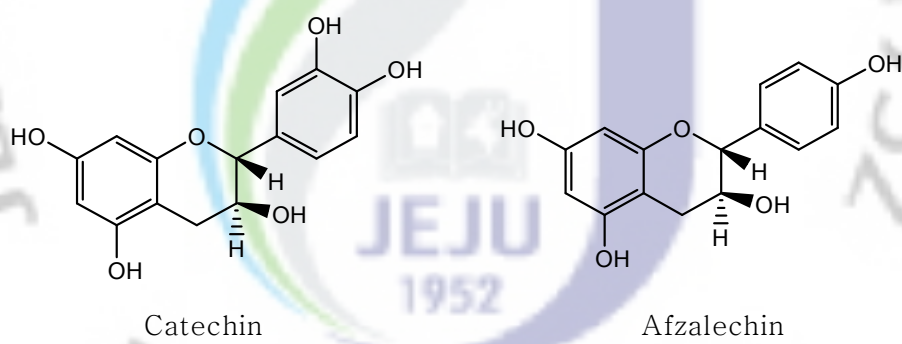
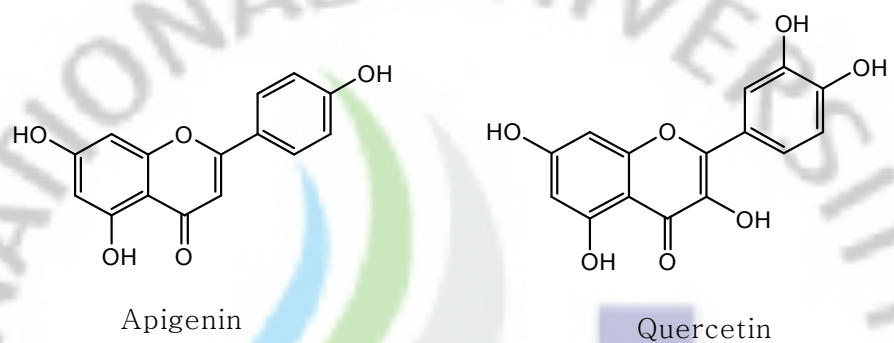
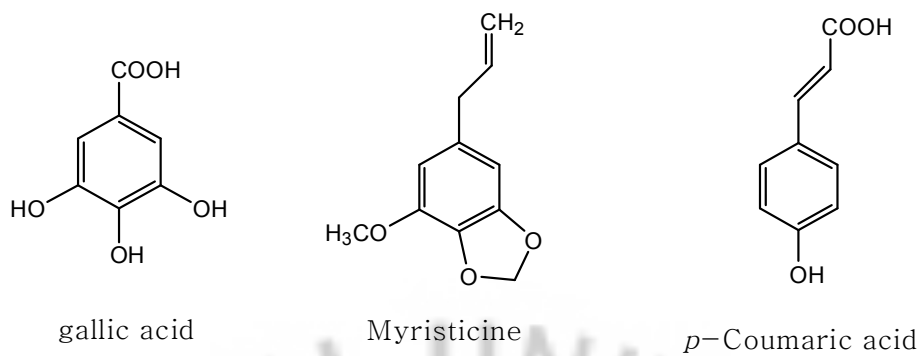


Figure 8. Structures of antioxidants from natural source

이러한 기능성화장품과 항산화제의 원료가 천연물로부터 개발되어진다면, 금상첨화가 아닐까. 기술의 급속한 발전으로 바쁜 일상을 사는 현대인들에게 자연으로 돌아가고 싶다는 회귀 본능의 소망은 천연물소재를 우리의 삶에 접목시킴으로써, 그리고 그러한 천연물 소재와 함께 살아감으로써 이루어질 수 있지 않을까 생각해 본다.

천연자원 중에는 아직 유효성분이나 약리작용이 밝혀지지 않은 것이 많아 개발의 여지가 충분하다는 목소리가 커지고 있다. 특히 제주도 한라산에는 1600여종의 식물이 서식⁸⁾하는 천연자원의 보고이다. 수십종의 특산식물이 자생하는 제주도의 식물에서 유효성분을 분리하는 일은 천연자원을 이용한 산업의 원동력으로 작용 할 것이다. 본 연구는 이러한 사실을 바탕으로 천연자원으로부터 화장품 기능성과 항산화 효과를 가진 천연소재의 개발을 위해 시작되었다.

II. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merk, Junsei의 제품을 사용하였다. VLC(Vacuum Liquid Chromatography)에는 순상 silica gel(2-25 μm , Sigma Co.)이 사용되었고, 순상 silica gel column chromatography에는 silica gel(95-110 μm , Sigma Co.)이 사용되었다. 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20(0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merk Co.)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV/Vis Lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 칩적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액 (3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH), 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다. 구조 분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM ECX-400(JEOL Co. 400 MHz)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 Merk의 NMR 전용용매로서, CD₃OD, CDCl₃, pyridine-*d*₅을 사용하였다. 분리물질의 광학회절을 확인하기 위해 polarimeter는 Jasco P-1030을 이용하였고, MeOH과 chloroform, pyridine을 용매로 하여 측정하였다. 새로운 화합물에 대한 UV 측정에는 Biochrom LibraS22를 이용하였고, 질량분석을 위해서는 대구 공동실험실습관의 HR FAB-MS를 이용하였다. 추출물과 분획물, 분리된 화합물의 생리활성 연구에서 흡광도 측정에는 Thermo Electron-labsystems Multiskan EX(ELISA reader)를 이용하였고, radical 소거활성 측정에는 JES-PA 200(JEOL, Tokyo, Japan) ESR(Electron Spin Resonance) spectrometer를 사용하였다.

Ⅲ. 연구과제 : ‘뽕잎피나무 가지’의 유효 성분 분리 및 활성검색

1. 재료

뽕잎피나무(*Tilia taquetii*)는 쌍떡잎 식물 아욱목 피나무과의 낙엽활엽 교목이다. 뽕피나무 라고도 하며, 한국 특산종으로서 강원·평북·충북·전남·전북·제주 등에 분포한다. 어린 가지에 갈색 털이 백백이 나기도 하며, 높이는 5m이다. 잎은 어긋나고 달걀 모양이며, 끝은 갑자기 길어져 뽕족하고 밑은 심장밑 모양이다. 잎 가장자리에 잔 톱니가 있고, 뒷면 맥액(脈腋)에는 갈색 털이 백백이 난다. 잎자루는 길이 7~45mm로 털이 없거나 갈색 털이 있다. 꽃은 6월에 피고 양성으로 산방상 취산꽃차례에 달리며 밑에 주걱처럼 생긴 포가 있다. 포는 길이 2~3mm이고, 뒷면에는 털이 드문드문 돋는다. 꽃자루는 길이 4~5mm로 털이 없는 것도 있으며 3~5개의 꽃이 달린다. 열매는 긴 달걀을 거꾸로 세운 듯한 모양으로 짧은 털이 백백이 나고 10월에 익는다. 수피는 새끼 대용으로 쓰고, 나무그릇을 만드는 데 사용한다.

뽕잎피나무에 대해서는 아직 유효 활성성분의 분리 및 생리활성 연구가 보고되지 않아 이 연구를 시작하게 되었다.

본 연구에서는 제주에서 자생하고 있는 뽕잎피나무의 가지에서 다양한 분리과정을 통해 활성물질을 탐색 및 분리·동정하고, 신물질로 분리된 화합물에 대해 구조분석을 하였다.



Figure 9. Pictures of *Tilia taquetii*

2. 실험방법

2-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

2-1-1. 뽕잎피나무 가지의 70% EtOH 추출물 추출 및 용매분획(제1차)

제주도 한라수목원에서 자생하는 뽕잎피나무(J-234)를 2009년 9월에 채집하여 부위별로 세분시킨 후 음지에서 자연건조 시켰다. 세분한 가지를 잘게 분쇄하여 얻은 시료 900.0 g을 70% EtOH 18 L에 침적하고 실온에서 24시간 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통해 여액을 취했다. 이 과정에서 남은 잔사는 다시 70% EtOH을 이용해 동일한 조건으로 2회 반복 추출하였다. 감압여과 장치를 통해 추출된 여액을 감압 농축하여 뽕잎피나무의 70% EtOH 추출물 총 61.9 g을 얻었다. 이 중 35.4 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 분획을 실시 하였는데, 각 용매마다 1L씩 3번 반복 실시하여 *n*-hexane층, EtOAc(ethyl acetate)층, *n*-butanol층 및 water층 총 4개의 용매분획층을 얻었다 (Figure 10).

2-1-2. VLC에 의한 분획과정(제1차)

용매분획 하여 얻어진 EtOAc 분획층 3.0 g을 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 감압 액체 크로마토그래피(VLC)를 실시하였다. 사용된 용출액은 *n*-Hex/EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~100%) gradient 용매(300ml) 조건을 이용하였다. 이 과정에서 총 38개의 분획물을 얻었다(Figure 11).

2-1-3. VLC를 수행한 분획물에서 compound 1, 4, 7, 8 분리과정

2-1-2에서 얻어진 38개의 분획물 중 분획물 v23(351.5 mg)을 CHCl₃/MeOH = 3/1~1/3 gradient 의 용매조건으로 Sephadex LH-20을 사용하여 분획하였고, 그

중 분획물 v23-se-5에서 compound 1(11.0 mg)을 얻었다. 분획물 v15(59.4 mg)을 MeOH을 이용하여 재결정하여 compound 4(3.1 mg)을 얻었다. 분획물 v20(322.7 mg)을 EtOAc/MeOH = 100/0~0/100 gradient의 용매조건으로 순상 silica gel CC를 수행하여 분획하였다. 그 중 분획물 v20-np-2(23.7 mg)을 다시 CHCl₃/MeOH = 3/1의 용매조건으로 순상 silica gel CC를 수행하여 분획 후, 분획물 v20-np-2-np-2(5.7 mg)에서 compound 7을 얻었다. 분획물 v6(33.8 mg)을 *n*-Hex/EtOAc = 3/1의 용매조건으로 순상 silica gel CC를 수행하여 분획하고, 그 중 분획물 v6-np1(8.7 mg)에서 compound 8을 얻었다(Figure 11).

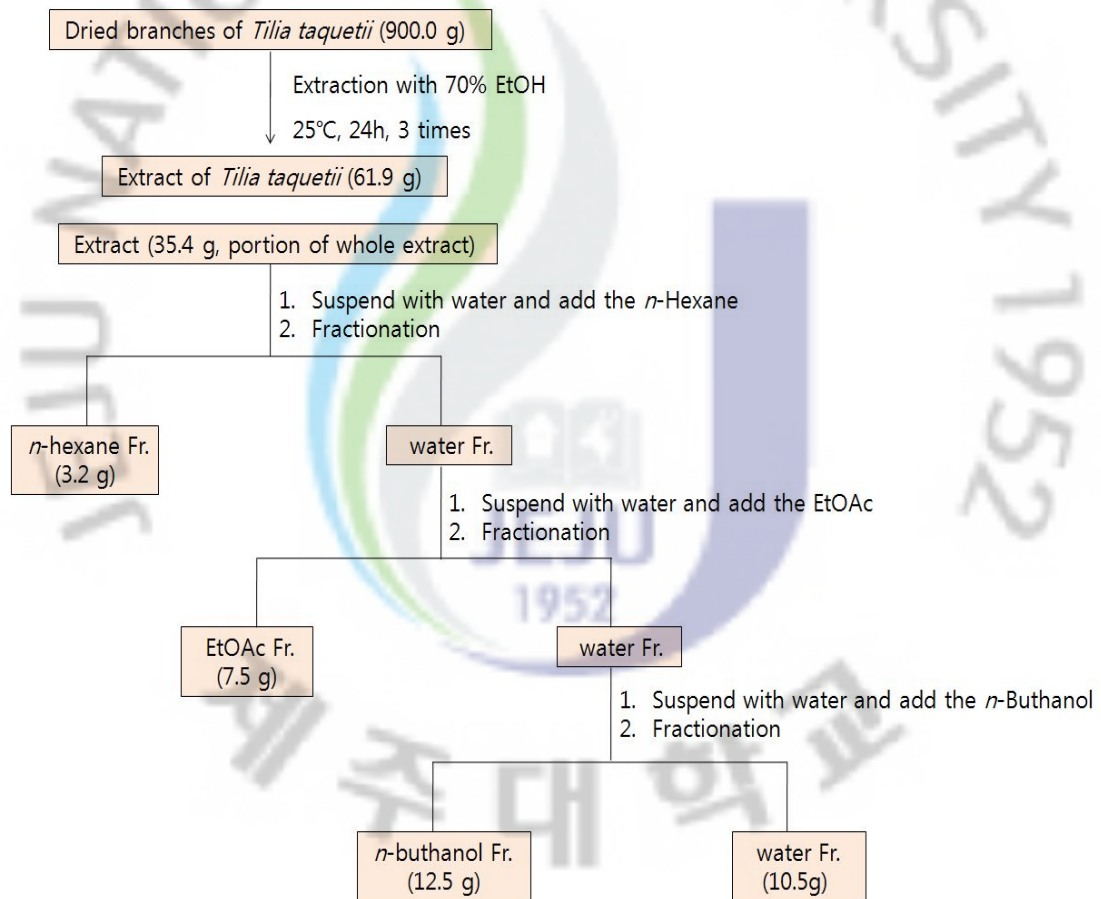
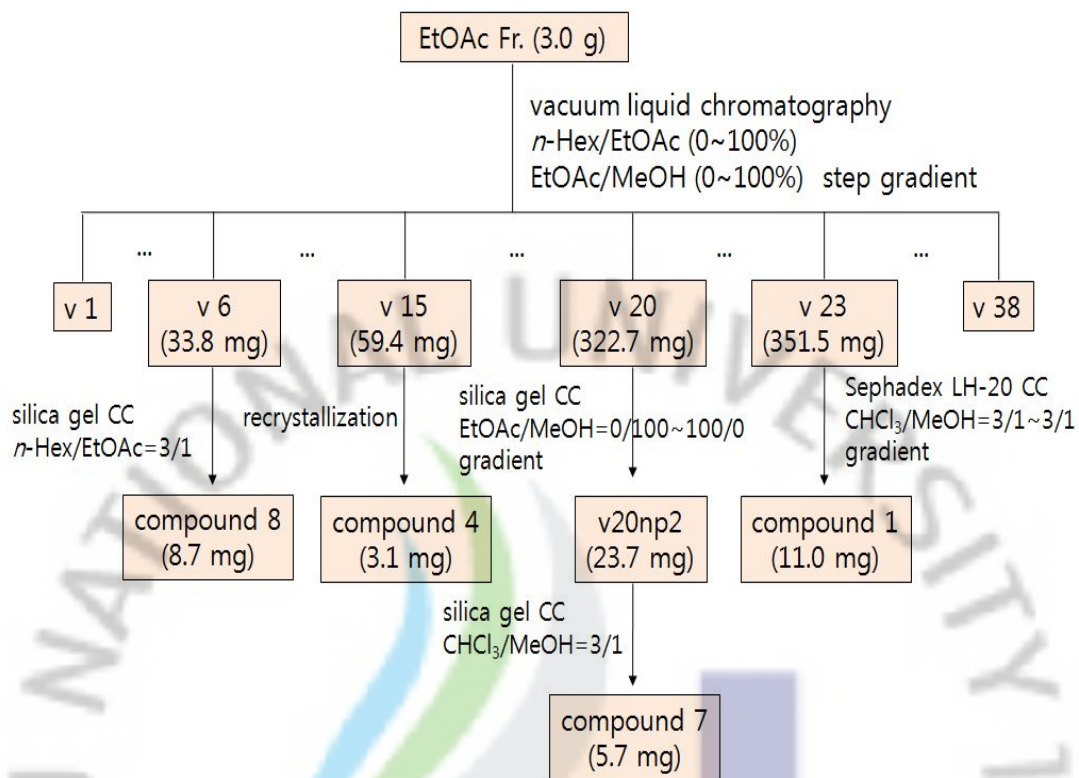


Figure 10. Scheme of fractionation process about extract(2-1-1)



* conditions of eluants

v 6 : *n*-Hex/EtOAc=75/25

v 15 : *n*-Hex/EtOAc=30/70

v 23 : *n*-Hex/EtOAc=5/95

v 23 : EtOAc/MeOH=90/10

Figure 11. Diagram of isolation process of compound 1, 4, 7, 8 from *T. taquetii*

2-2-1. 뽕잎피나무 가지의 70% EtOH 추출물에 대한 용매분획(제2차)

2-1-1에서 얻은 뽕잎피나무 가지의 70% EtOH 추출물 중 2-1-1의 용매분획 제1차에서 사용하지 않고 남은 추출물(70% EtOH 26.6 g 중 22.6 g 사용)을 사용하여 1차와 같은 방법으로 2차 용매분획을 실시하였다. 따라서 2차에서도 1차와 같이 *n*-Hex층, EtOAc(ethyl acetate)층, *n*-butanol층 및 water층 총 4개의 용매분획층을 얻었다.

2-2-2. VLC에 의한 분획과정(제2차)

용매분획 하여 얻어진 EtOAc 분획층 4.9 g을 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 감압 액체 크로마토그래피를 실시하였다. 사용된 용출액은 *n*-Hex/EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~50%) gradient 용매(300ml) 조건을 이용하였다. 이 과정에서 총 26개의 분획물을 얻었다(Figure 12).

2-2-3. VLC를 수행한 분획물에서 compound 2, 3, 5, 6 분리과정

2-2-2에서 얻어진 26개의 분획물 중 분획물 v9(88.6 mg)과 분획물 v10(115.2 mg)을 각각 감압농축한 후 MeOH을 첨가하였을 때 녹지않고 vial 바닥에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 MeOH로 여러 차례 재결정하여 각각 4.1 mg, 14.0 mg의 compound 2를 얻었다. 같은 재결정법을 통해 분획물 v15(95.4 mg), v14(103.2 mg), v16(125.7 mg), v19(162.3 mg), v20(131.1 mg)에서 각각 7.1 mg, 3.1 mg, 3.2 mg, 3.6 mg, 3.3 mg의 compound 3을 얻었다. 마찬가지로 분획물 v5(60.9 mg)에서도 재결정법을 통해 compound 6(3.1 mg)을 얻었다. 분획물 v17(163.2 mg)을 CHCl₃/MeOH =5/1의 용매조건으로 Sephadex LH-20을 수행하여 분획물 v17-se3에서 compound 5(1.5 mg)을 얻었다. TLC를 수행하였을 때 같은 spot 패턴을 나타내는 분획물 v18과 분획물 v19의 재결정 후 남아있는 여액을 합하여 CHCl₃/MeOH =3/1의 용매조건으로 Sephadex LH-20을 수행하여 분획물 v1819-se6에서 compound 5(16.0 mg)을 얻었다(Figure 12).

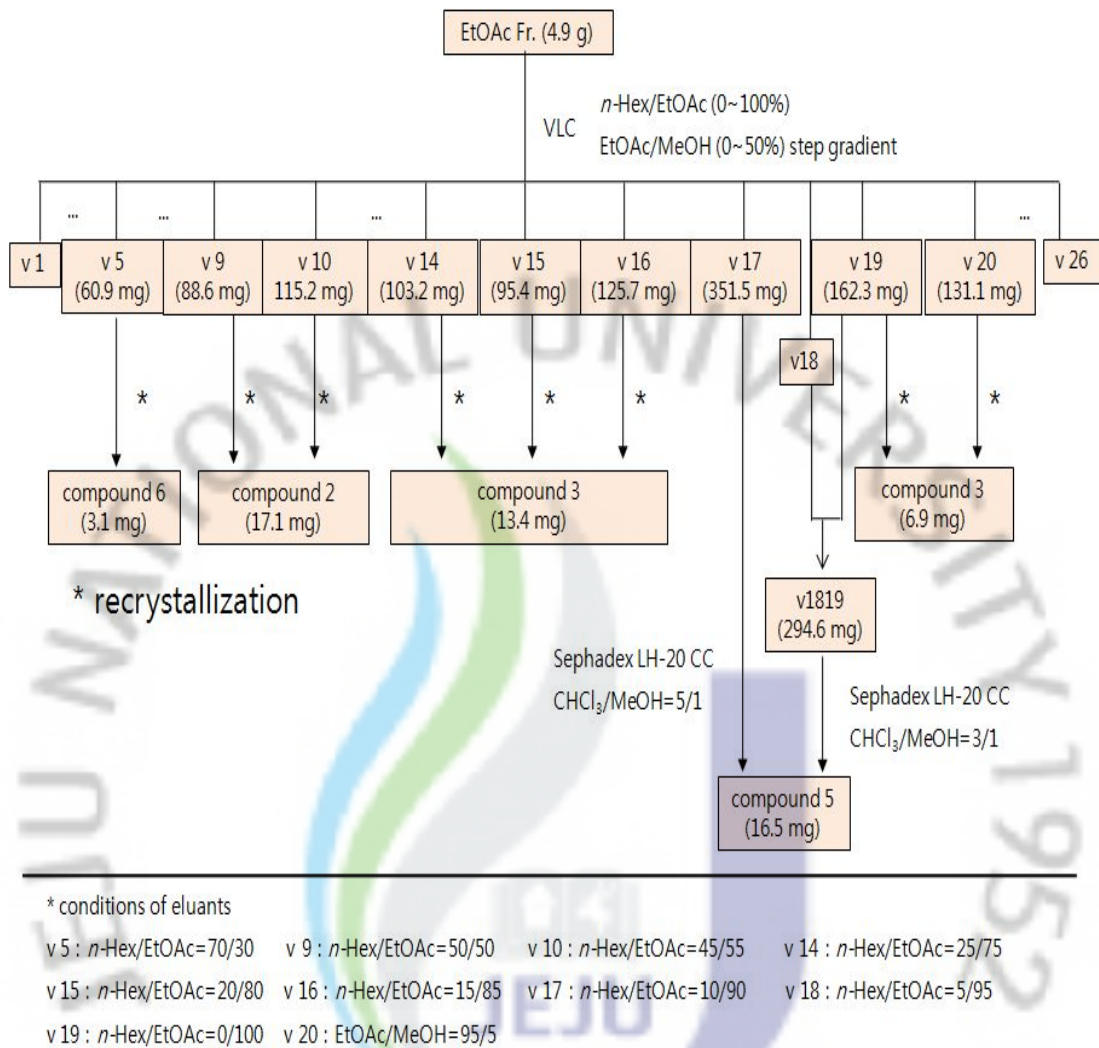


Figure 12. Diagram of isolation process of compound 2, 3, 5, 6 from *T. taquetii*

2-2. 활성 검색

2-2-1. DPPH radical scavenging test

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois^{9,10)} 방법을 응용하여 사용하였다. 실험에는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 사용하였고, DPPH를 용해시키는 용매는 EtOH을 사용하였으며, sample 용해에는 DMSO(dimethylsulfoxide)를 사용하였다.

실험방법은 96 well plate를 사용하여 sample 20 μ L(1 mg/mL, stock), 0.2 mM DPPH 180 μ L을 넣고, 최종부피를 200 μ L로 맞춘다. 상온(25 $^{\circ}$ C)에서 10분간 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능력은 다음의 식에 의해 %로 계산되었으며, 각 시료의 SC₅₀을 구하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 vitamin C(ascorbic acid, 1 mg/mL, stock)를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging effect(\%)} = \{1 - (A - A_b) / A_c\} \times 100$$

A_c : 515nm에서 DPPH의 흡광도

A : 515nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_b : 515nm에서 sample의 흡광도

2-2-2. ESR를 이용한 DPPH radical scavenging test

DPPH radical 소거 활성 실험은 Nanjo¹¹⁾ 등의 방법을 사용하였다. 실험에는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 사용하였고, DPPH와 샘플의 용해에는 MeOH을 사용하였다.

실험방법은 micro tube에 sample 10 μ L(1 mg/mL, stock)와 0.2 mM DPPH 90 μ L을 넣고 2분간 실온에서 반응시킨 후, ESR spectromter를 이용하여 활성을 측정하였다. ESR spectrometer는 magnetic field 337.2 mT, power 1 mW, frequency 9438.1 MHz, amplitude 8 \times 100, scan time 30 sec, scan width 0.8 mT,

time constant 0.03 sec로 설정하였다. 소거능력은 다음의 식에 의해 %로 계산되었으며, 각 시료의 SC₅₀을 구하였다. 이 때 사용된 대조군은 vitamin C(ascorbic acid, 1 mg/mL, stock)이다.

$$\text{Radical scavenging effect(\%)} = \{1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})\} \times 100$$

2-2-3. ESR를 이용한 hydroxyl radical scavenging test

Hydroxyl radical은 Fenton 반응에 의해 발생한다. 그 후에 spin trapper인 DMPO(5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)와 반응한다. 생성된 DMPO-OH를 ESR spectrometer를 이용하여 측정한다.

실험방법은 micro tube에 sample 10 μ L(5 mg/mL, stock)와 0.3 M DMPO 30 μ L, 10 mM FeSO₄ 30 μ L, 10 mM H₂O₂ 30 μ L을 넣고 2분 30초간 실온에서 반응시킨 후, ESR spectrometer를 이용하여 활성을 측정하였다. ESR spectrometer는 magnetic field 336.8 mT, power 1 mW, frequency 9435.7 MHz, amplitude 8 \times 100, scan time 30 sec, scan width 1 mT, time constant 0.03 sec로 설정하였다. 소거능력은 다음의 식에 의해 %로 계산되었으며, 각 시료의 SC₅₀을 구하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 vitamin C(ascorbic acid, 5 mg/mL, stock)를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging effect(\%)} = \{1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})\} \times 100$$

2-2-4. Tyrosinase inhibition test

Tyrosinase inhibition test는 Yagi 등의 방법¹²⁾을 응용하여 수행하였다. Buffer는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 사용하였고, 기질로는 L-tyrosine(L-3[Hydroxyphenyl]alanine)을 2 mM 농도로 하여 사용하였다. 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase(2,500 units/ml, enzyme)이며, 용매는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 사용하였다.

실험방법은 다음과 같다. 96 well plate에 DMSO를 용매로 하여, 여러 농도로 제조한 sample을 20 μ L(1 mg/mL) 넣은 후, L-tyrosine(70 μ L)과 buffer(60 μ L)의 혼합액(total volume 130 μ L), mushroom tyrosinase(5 μ L)과 buffer(45 μ L)의 혼합액(total volume 50 μ L)을 넣고, 37°C에서 10분간 반응시켜, 492 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC₅₀을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 arbutin(1 mg/mL, stock)을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \{1 - (B - C) / A\} \times 100$$

A : sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

B : 효소를 첨가하여 반응한 후의 sample의 흡광도

C : 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 sample의 흡광도

3. 결과

3-1. 뽕잎피나무(가지) 70% EtOH 추출물과 2-1-1의 각 용매분획물의 수율

2009년 9월에 한라수목원에서 채집한 뽕잎피나무 중 가지부분을 세분하고 잘게 분쇄하여(900.0 g) 70% EtOH을 사용하여 교반·침출시킨 후 추출 하였고, 남은 잔사로 2회 반복 추출하여 뽕잎피나무 가지부분의 70% EtOH 추출물을 61.9 g 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물 61.9 g 중 35.4 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 분획을 실시하였다. 각 용매마다 1L씩 3번 반복 실시하여 *n*-hexane층 3.2 g, EtOAc(Ethyl acetate)층 7.5 g, *n*-butanol층 12.5 g 및 water층 10.5 g을 얻었다(Table 1).

Table 1. Yields of extract and each solvent fraction from *Tilia taquetii* branches

Ext. and solvent Fr.	Meaguerment(g)	Yield(%)
70% EtOH Ext	61.9	6.9
<i>n</i> -hexane Fr.	3.2 (from 35.4 g Ext.)	8.9
EtOAc Fr.	7.5 (from 35.4 g Ext.)	21.1
<i>n</i> -butanol Fr.	12.5 (from 35.4 g Ext.)	35.4
water Fr.	10.5 (from 35.4 g Ext.)	29.7

3-2. 2-1-1의 각 용매분획물의 수율

2-1-1에서 얻은 뽕잎피 나무 가지의 70% EtOH 추출물 중 2-1-1의 용매분획 제1차에서 사용하지 않고 남은 추출물(70% EtOH 26.6 g 중 22.6 g 사용)을 이용하여 2-1-1과 같은 방법으로 2차 용매분획을 실시하였다. 70% EtOH 추출물 22.6 g에 대해 *n*-hexane층 2.1 g, EtOAc(ethyl acetate)층 4.9 g, *n*-butanol층 6.6 g 및 water층 7.0 g을 얻었다(Table 2).

Table 2. Yields of extract and each solvent fraction from *Tilia taquetii* branches.

Ext. and solvent Fr.	Meaguerment(g)	Yield(%)
70% EtOH Ext	61.9	6.9
<i>n</i> -hexane Fr.	2.1 (from 22.6 g Ext.)	9.3
EtOAc Fr.	4.9 (from 22.6 g Ext.)	21.7
<i>n</i> -butanol Fr.	6.6 (from 22.6 g Ext.)	29.2
Water Fr.	7.0 (from 22.6 g Ext.)	31.0

3-3. EtOH 추출물과 각 용매분획들에 대한 DPPH radical scavenging test

뽕잎피나무(가지)의 70% EtOH 추출물과 각각의 용매분획물에 대해 DPPH radical scavenging test를 실시한 결과는 다음 표와 같다(Table 3). 뽕잎피나무(가지)의 70% EtOH 추출물과 각각의 용매분획물 중 *n*-hexane Fr.를 제외한 모든 분획층에서 DPPH radical scavenging에 대해 좋은 활성을 나타내었다. 특히 대조군인 vitamin C의 IC₅₀값인 19.3 µg/mL과 비교 했을 때, 28.8, 31.1 28.8 µg/mL의 IC₅₀값을 나타내는 뽕잎피나무 가지 70% 추출물과 그것의 분획물인 EtOAc Fr, BuOH Fr.은 vitamin C 만큼의 좋은 활성을 나타내었다.

Table 3. DPPH scavenging inhibitions and IC₅₀ values of extract and fractions of *T. taquetii*

	Scavenging inhibition (%)					SC ₅₀ µg/mL
	6.25 µg/mL	12.5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	
Vit. C	12.3	31.5	73.3	94.5	95.6	19.3
Extract	16.1	26.5	44.0	69.2	89.5	28.8
<i>n</i> -hex Fr.	0.9	1.9	2.5	3.9	7.0	816.4
EtOAc Fr.	15.2	20.6	41.8	72.6	91.0	31.1
<i>n</i> -butanol Fr.	15.4	25.3	44.1	68.6	91.3	28.8
Water Fr.	6.8	10.2	15.4	25.7	44.8	112.9

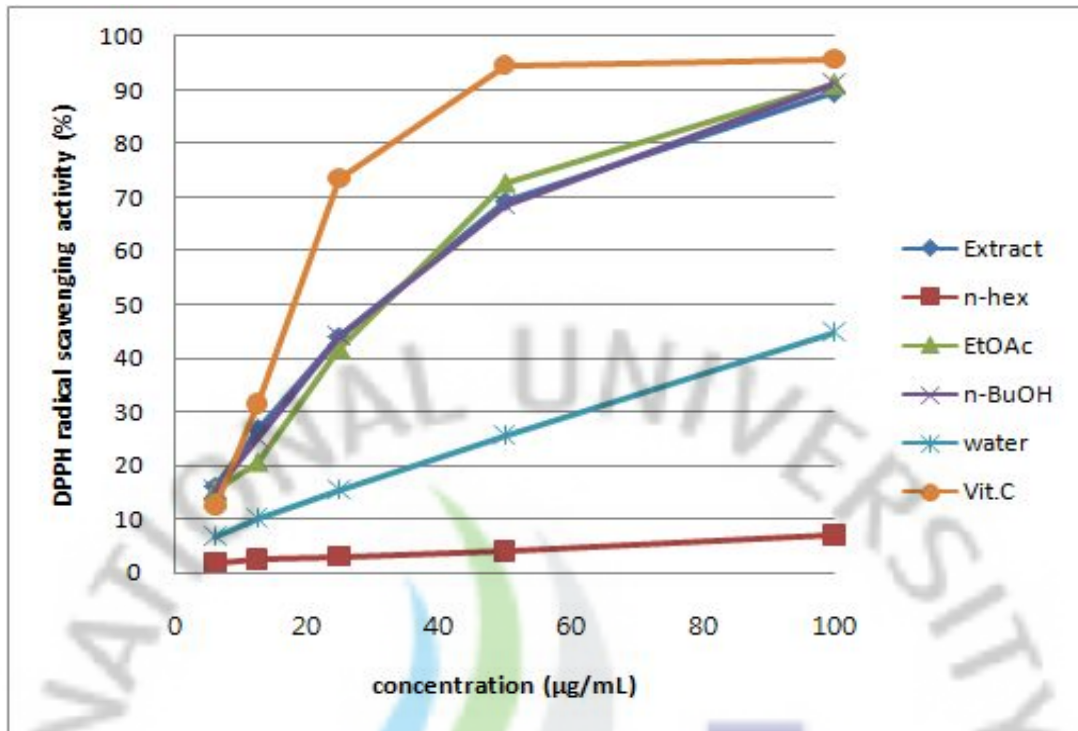


Figure 13. DPPH radical scavenging activities of extract and fractions of *T. taquetii*

3-4. 70% EtOH 추출물과 각 용매분획물에 대한 tyrosinase inhibition test

병잎피나무(가지)의 70% EtOH 추출물과 각각의 용매분획물에 대해 tyrosinase inhibition test를 실시한 결과 70% EtOH 추출물과 모든 분획물층에서 tyrosinase 저해 활성은 나타나지 않았다.

3-5. Compound 1의 구조 동정

잘게 분쇄한 뽕잎피나무 가지 900.0 g을 70% EtOH로 추출한 후 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH을 사용하여 순차적으로 용매분획 하였다. 4개의 용매분획물을 가지고 DPPH radical scavenging test를 시행한 결과 EtOAc층과 *n*-BuOH층에서 좋은 활성을 보였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(2-1-2). VLC를 통해 얻어진 분획물 중 분획물 v23(EtOAc/MeOH = 90/10, 351.5 mg)을 CHCl₃/MeOH = 3/1~1/3 gradient의 용매조건으로 Sephadex LH-20을 사용하여 분획하였고, 그 중 v23-se-5에서 compound 1(11.0 mg)을 얻었다.

Compound 1의 구조는 ¹H NMR(CD₃OD, 400MHz), ¹³C NMR(CD₃OD, 100MHz), DEPT-135, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC, HR-FAB MS를 통하여 확인하였다. ¹H NMR을 통하여 확인한 결과 δ 7.24(1H, d, *J* = 8.3), 7.09(1H, d, *J* = 2.0), 6.95(1H, dd, *J* = 8.3, 2.0)의 signal은 방향족 고리의 수소로 예상하였고, 서로 갈라지게 하는 proton 그룹은 같은 짝지음 상수(*J*)를 갖는다는 기본 이론과 coupling constant의 비교로 방향족 고리의 *ortho*, *meta* 위치에서 서로 coupling 하는 수소로 예상하였다. 마찬가지로 δ 6.33(1H, d, *J* = 2.1), 6.21(1H, d, *J* = 2.1)의 signal로부터 방향족 고리의 *meta* 위치에서 서로 coupling 하는 수소로 예상하였다. δ 3.4~4.8에 분포하는 signal의 splitting 양상을 보았을 때 전 기음성도가 큰 원소가 인접한 sp³ 혼성탄소에 결합된 수소로서 서로 coupling 하고 있거나 혹은 glucose의 proton peak로 예상하였다(Figure 14).

¹³C NMR을 통해 화합물이 21개 이상의 탄소로 이루어졌음을 예상하였고(Figure 15), DEPT-135를 통해 4차 탄소가 9개, methine기가 11개, methylene이 1개임을 확인하였다(Figure 16).

¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT-135를 통해 예상한 부분 구조의 정확한 구조 동정을 위해 2D NMR data를 분석하였다. ¹H-¹H COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling 하고 있는 수소를 확인하였고(Figure 17), HMQC를 통해서도 탄소에 직접 결합되어 있는 수소를(Figure 18), HMBC를 통해서도 각 탄소에 대해 long-range 결합을 하는 수소를 확인하였다(Figure 19).

1D NMR과 2D NMR을 통해 compound 1을 분자식이 C₂₁H₂₀O₁₁인 화합물로 예

상하였다. 이를 토대로 HR-FAB MS로 분석한 결과 m/z 471.0905 $[M+Na]^+$ 로 예상했던 화합물의 분자량 $C_{21}H_{20}O_{11}Na$ 471.0903과 거의 일치함을 확인하였다 (Figure 20).

각각의 기기분석 data를 기본으로 하여 문헌¹³⁾을 검색한 결과 compound 1을 orobol 4'-*O*- β -glucopyranoside로 명명하였고, flavonoid 계열로 현재 문헌상 알려져 있지 않은 신물질로 추정되었다. 이 화합물은 248 nm에서 최대 흡광도를 가지며 광학회절은 $[\alpha]_D^{20} = -40.4^\circ$ (*c.* 0.011, MeOH)이다. 기기분석을 통한 compound 1의 정보는 다음 표와 같다(Table 4).

Table 4. Informations of compound 1 from *T.taquetii*

Feature	Light brown amorphous powder
Molecular formular	$C_{21}H_{20}O_{11}$
λ_{max} in UV/vis range	248 nm
Molecular weight	448.1
specific optical rotation	$[\alpha]_D^{20} = -40.4^\circ$ (<i>c.</i> 0.011, MeOH)



Figure 14. ^1H NMR spectrum of isolated compound 1



Figure 15. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 1

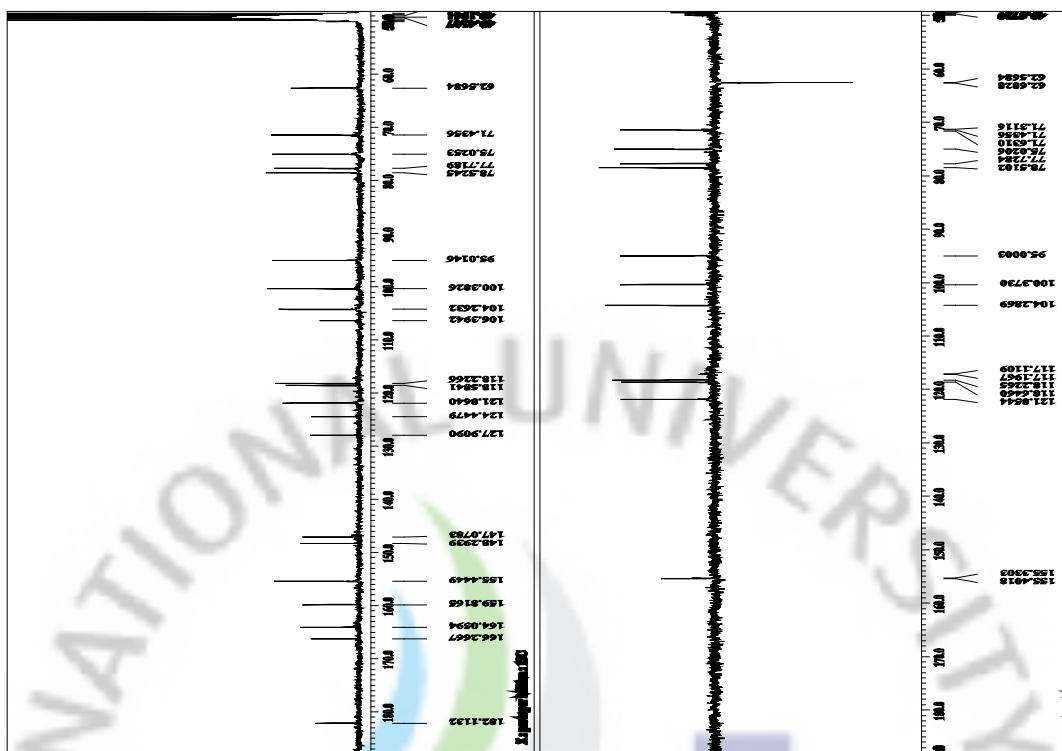


Figure 16. ^{13}C NMR and DEPT-135 spectrum of isolated compound 1

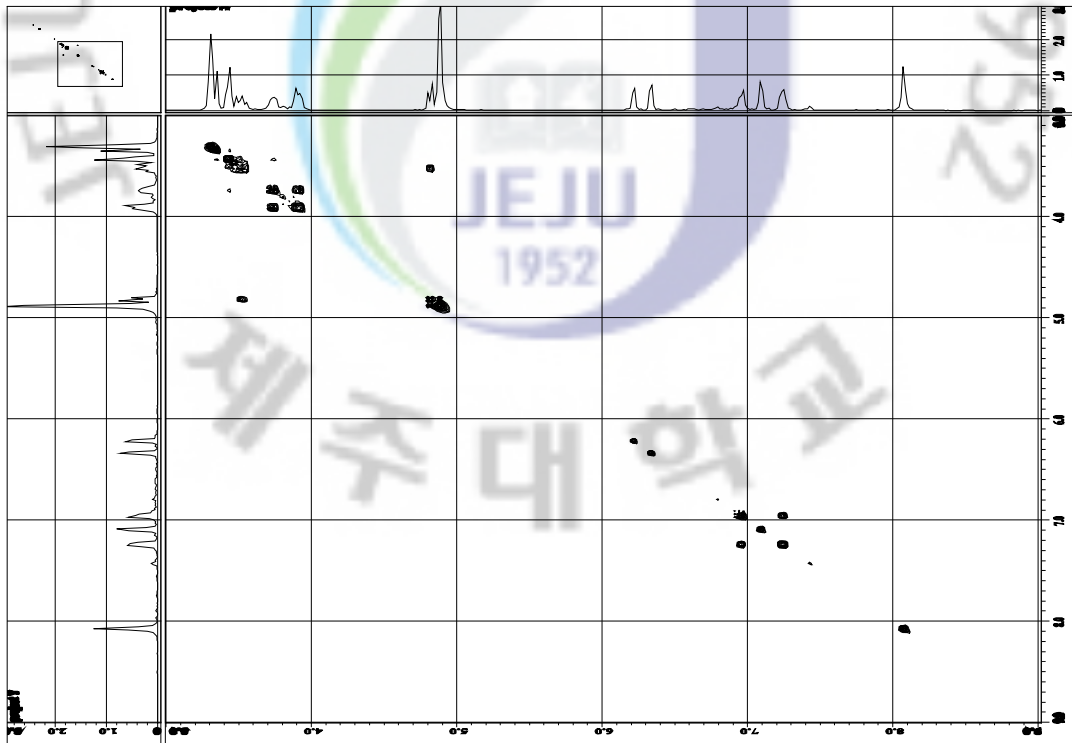


Figure 17. ^1H - ^1H COSY spectrum of isolated compound 1

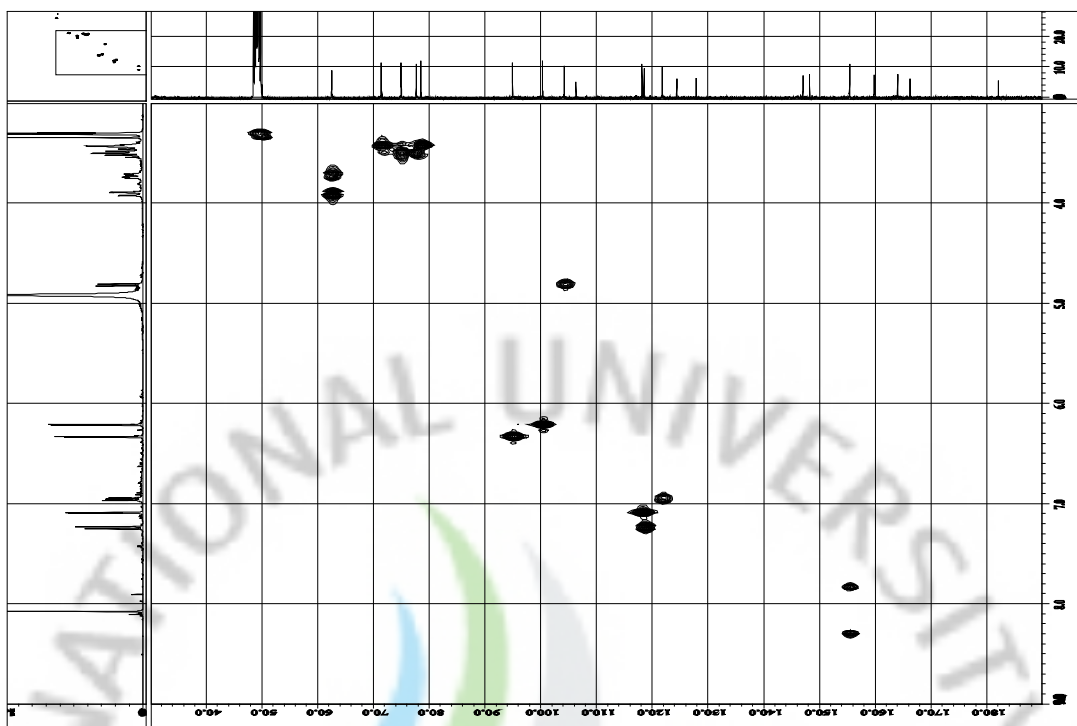


Figure 18. HMQC spectrum of isolated compound 1

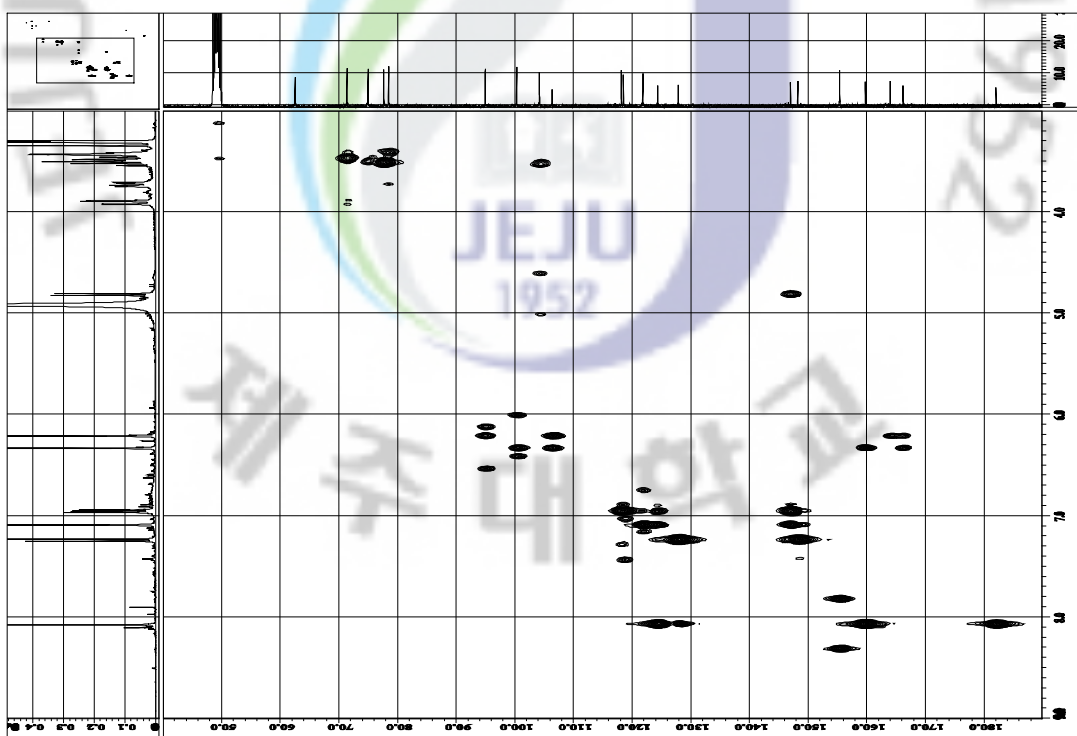
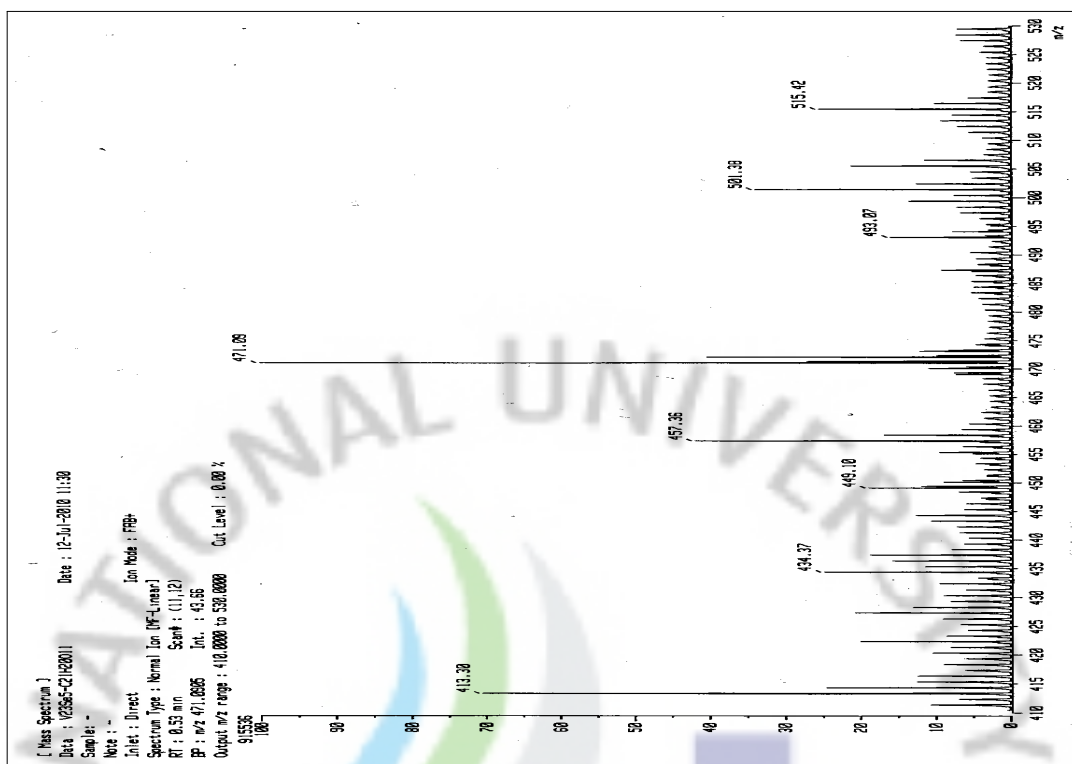


Figure 19. HMBC spectrum of isolated compound 1



Figuer 20. HR-FAB MS spectrum of isolated compound 1

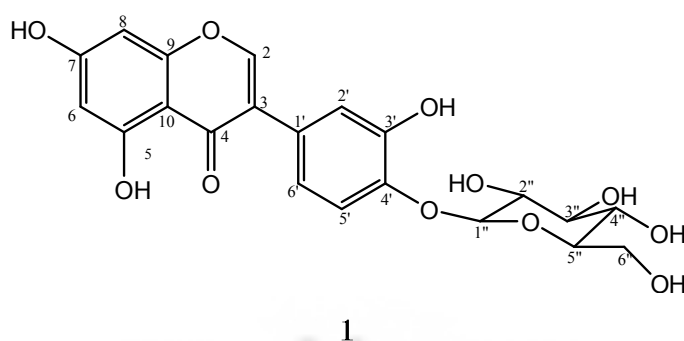


Table 5. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts and HMBC data of compound 1

Position	Compound 1 (^1H NMR : 400 MHz in CD_3OD , ^{13}C NMR : 100 MHz in CD_3OD)		
	δ_{C} (mult) ^a	δ_{H} (int, mult, J in Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	-	-	-
2	155.4 (d)	8.08 (1H, s)	C-4, C-9, C-1'
3	124.4 (s)	-	-
4	182.1 (s)	-	-
5	164.1 (s)	-	-
6	100.4 (d)	6.21 (1H, d, 2.1)	C-8, C-10
7	166.3 (s)	-	-
8	95.0 (d)	6.33 (1H, d, 2.1)	C-6, C-10
9	159.8 (s)	-	-
10	106.4 (s)	-	-
1'	127.9 (s)	-	-
2'	118.2 (d)	7.09 (1H, d, 2.0)	C-4', C-6'
3'	148.3 (s)	-	-
4'	147.1 (s)	-	-
5'	118.5 (d)	7.24 (1H, d, 8.3)	C-1', C-3'
6'	121.8 (d)	6.95 (1H, dd, 8.3, 2.0)	C-3, C-2', C-4'
1''	104.2 (d)	4.81 (1H, d, 7.6)	C-4'
2''	75.0 (d)	3.52 (1H, dd, 9.1, 7.6)	C-4''
3''	77.7 (d)	3.48 (dd, 9.1, 7.8)	C-5''
4''	71.4 (d)	3.43-3.46 (2H, m)	-
5''	78.5 (d)		-
6''	62.6 (t)	3.73 (1H, dd, 13.0, 4.8)	C-4''
		3.91 (1H, dd, 13.0, 1.6)	

^aDetermined by DEPT experiments.

3-6. Compound 2의 구조 동정

잘게 분쇄한 뽕잎피나무 가지 900.0 g을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(2-2-2). VLC 를 통해 얻어진 분획물 중 분획물 v9(*n*-Hex/EtOAc = 50/50, 88.6 mg)와 분획물 v10(*n*-Hex/EtOAc = 45/55, 115.2 mg)을 감압 농축을 시킨 후 메탄올을 첨가하였을 때 powder가 생성되었는데, 이를 메탄올을 이용하여 여러번 washing 하였고, 이러한 재결정 법을 통해 분획물 v9와 분획물 v10의 순수한 powder Fr.을 얻었다. 분획물 v9, 분획물 v10의 powder Fr.의 ¹H NMR을 비교하여 두 분획물이 같은 화합물임을 확인하였고, 이로서 분획물 v9와 분획물 v10 powder Fr.에서 compound 2를 각각 4.1 mg, 14.0 mg 얻었다.

Compound 2의 구조는 ¹H NMR(pyridine-*d*₅, 400MHz), ¹³C NMR(pyridine-*d*₅, 100MHz)를 통하여 확인하였다.

¹H NMR을 통하여 확인한 결과 δ 8.21(1H, s)에서 나타나는 signal은 방향족 고리의 결합된 수소가 인접해 있는 전기음성도가 큰 원소에 의해 deshielding되어 있는 것으로 예상하였다. δ 7.51(1H, d, *J* = 1.83), 7.33(1H, d, *J* = 8.2), 7.31(1H, dd, *J* = 8.2, 1.83)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음을 예상하였다. 서로 갈라지게 하는 proton 그룹은 같은 짝지음 상수를 갖는다는 원리로부터 이 signal은 방향족 고리의 *ortho*, *meta* 위치에서 서로 coupling 하고 있는 수소를 나타냄을 예상하였다. 또한 δ 6.79(1H, d, *J* = 2.06), 6.71(1H, d, *J* = 2.06)에서 나타나는 signal은 방향족 고리의 *ortho* 위치에서 서로 coupling 하는 수소임을 예상하였다. δ 3.86(3H, s)에서 나타나는 signal을 통해 화합물 내에 1개의 methoxy group이 있음을 예상하였다(Figure 21).

¹³C NMR을 통해서도 화합물의 탄소의 개수가 16개 이상임을 알 수 있었다. δ 181.7의 signal을 통해 화합물 내에 carbonyl 기가 있음을 예상하였고, δ 95~160의 signal은 방향족 고리의 탄소로, δ 56의 signal은 methoxy 기의 탄소로 예상하였다(Figure 22).

예상한 부분구조를 바탕으로 문헌¹⁴⁾과 대조하여 구조 동정 하였고, 그 결과 compound 2를 3'-*O*-methylorobol로 동정하였다.

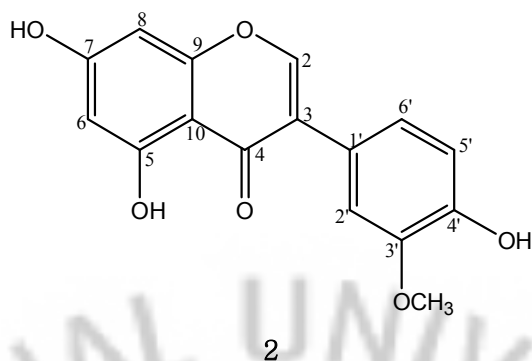


Table 6. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound **2**

Position	Compound 2	
	$(^1\text{H}$ NMR : 400 MHz in Pyridine- d_6 , ^{13}C NMR : 100 MHz in Pyridine- d_6)	
	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	-	-
2	154.1	8.21 (s)
3	125.2	-
4	181.7	-
5	164.2	-
6	100.6	6.71 (1H, d, 2.06)
7	166.6	-
8	95.1	6.79 (1H, d, 2.06)
9	159.2	-
10	106.3	-
1'	123.2	-
2'	114.4	7.51 (1H, d, 1.83)
3'	149.1	-
4'	148.9	-
5'	117.0	7.33 (1H, d, 8.2)
6'	123.2	7.31 (1H, dd, 8.2, 1.83)
-OCH ₃	56.5	3.86 (3H, s)
-OH		13.0 (1H, s)

3-7. Compound 3, 4의 구조 동정

잘게 분쇄한 뽕잎피나무 가지 900.0 g을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(2-1-2). VLC를 통해 얻어진 분획물 중 분획물 v15(*n*-Hex/EtOAc = 30/70, 59.4 mg)을 감압 농축을 시킨 후 메탄올을 첨가하였을 때 powder가 생성되었다. 이를 메탄올을 이용하여 여러 차례 washing 하였고, 이러한 재결정 법을 통해 순수한 분획물 v15의 powder Fr.을 얻었다. 이로서 v15 powder Fr.에서 compound 4를 3.1 mg 얻었다.

n-Hex/EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~50%) gradient 용매(300ml) 조건으로 VLC 실시하여(2-2-2) 얻은 26개의 분획물중에서 감압 농축 시킨 후 메탄올을 가하였을 때 vial 바닥에 powder가 관찰된 분획물은 분획물 v14(*n*-Hex/EtOAc = 25/75, 103.2 mg), v15(*n*-Hex/EtOAc = 20/80, 95.4 mg), v16(*n*-Hex/EtOAc = 15/85, 125.7 mg), v19(*n*-Hex/EtOAc = 0/100, 162.3 mg), v20(EtOAc/MeOH = 95/5, 131.1 mg)이었다. 각각의 powder 분획물의 ¹H NMR과 ¹³C NMR을 비교하여 v14, v15, v16, v19, v20 powder Fr.에서 compound 3을 각각 3.1, 7.1, 3.2, 3.6, 3.3 mg 얻었다.

Compound 4의 구조는 ¹H NMR(pyridine-*d*₅, 400MHz), ¹³C NMR(pyridine-*d*₅, 100MHz), DEPT-135, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC를 통해 확인하였다.

¹H NMR을 통해 δ 7.44(1H, d, *J* = 8.48), 7.39(1H, d, *J* = 8.24), 7.31(1H, d, *J* = 7.2)의 signal은 방향족 고리의 수소임을 예상하였다. δ 6.4~7.7에 분포하는 signal 또한 방향족 고리의 수소로 예상하였는데, δ 6.47(1H, d, *J* = 8.4)와 7.77(1H, d, *J* = 8.4)의 signal은 coupling constant를 비교할 때 *ortho* 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다. δ 3.9~5.6에 분포하는 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접해 deshielding 되어있고, coupling constant로 보아 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다. 또한 δ 3.80(3H, s), 3.72(3H, s)의 signal로 화합물 내에 2개의 methoxy group이 있음을 예상하였다(Figure 25).

¹³C NMR을 통해 화합물이 20개 이상의 탄소로 이루어졌음을 예상하였고, DEPT-135를 통해 4차 탄소가 9개, methine group이 8개, methylene이 1개임을 확인하였다(Figure 26, 27).

^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-135를 통해 예상한 부분 구조의 정확한 구조 동정을 위해 2D NMR data를 분석하였다. ^1H - ^1H COSY NMR Spectrum을 통해서 coupling 하고 있는 수소를 확인하였고(Figure 28), HMQC를 통해서 탄소와 직접 결합되어 있는 수소를(Figure 29), HMBC를 통해서 각 탄소에 대해 long-range 결합을 하는 수소를 확인하였다(Figure 30).

1D NMR과 2D NMR을 통해 예상한 구조를 문헌¹⁵⁾과 비교하였고, 그 결과 compound 4는 coumarino-lignan 계열의 cleomiscosin B로 구조 동정 하였다.

Compound 3의 구조는 ^1H NMR(pyridine- d_5 , 400MHz), ^{13}C NMR(pyridine- d_5 , 100MHz)을 통해 확인하였는데, ^1H NMR data는 compound 4의 signal과 매우 흡사하였다(Figure 23). ^{13}C NMR의 signal 또한 compound 4와 흡사하였으나(Figure 24), 문헌의 cleomiscosin B 계열의 다른 화합물과 비교하였을 때 몇 개의 signal에서 미세한 차이를 관찰 할 수 있었고, 화학적 이동 값의 차이에 따라 compound 3을 compound 4와 같은 계열인 cleomiscosin A로 구조 동정 하였다. compound 3(Fr. v14), 4(Fr. v15)의 차이를 참고한 문헌의 화학적 이동값과 비교하여 다음표에 나타내었다(Table 7, 8).

Table 7. Acomparison of ^{13}C chemical shift on v14 and v15powder Fr. with cleomiscosin A

^{13}C No.	cleomiscosin A δ_c (pyridine- d_5 , 60MHz)	v14powder Fr. δ_c (pyridine- d_5 , 100MHz)	var	v15powder Fr. δ_c (pyridine- d_5 , 100MHz)	var
2	160.8	161.34	0.54	161.39	0.59
3	113.6	114.37	0.77	114.43	0.83
4	144.5	145.09	0.59	145.10	0.60
5	101.1	101.58	0.48	101.57	0.47
6	146.3	146.92	0.62	146.98	0.68
7	138.4	138.90	0.53	138.94	0.54
8	133.0	133.55	0.55	133.60	0.60
9	139.3	139.90	0.60	139.99	0.69
10	111.9	112.40	0.50	112.40	0.50
1'	127.5	128.07	0.57	128.29	0.79
2'	112.3	112.77	0.47	112.78	0.48
3'	150.0	149.62	-0.38	150.10	0.10
4'	149.0	149.39	0.39	149.67	0.67
5'	116.6	117.13	0.53	117.18	0.58
6'	121.7	122.24	0.54	121.20	-0.5
7'	77.5	78.09	0.59	78.15	0.65
8'	79.9	80.46	0.56	80.50	0.60
9'	60.7	61.26	0.56	61.30	0.60
-OCH ₃	55.8	56.31	0.51	56.33	0.53
	56.2	56.66	0.46	56.68	0.48

Table 8. Acomparison of ^{13}C chemical shift on v14 and v15powder Fr. with cleomiscosin B

^{13}C No.	cleomiscosin B δ_c (pyridine- d_5 , 60MHz)	v14powder Fr. δ_c (pyridine- d_5 , 100MHz)	var	v15powder Fr. δ_c (pyridine- d_5 , 100MHz)	var
2	160.7	161.34	0.64	161.39	0.69
3	113.8	114.37	0.57	114.43	0.63
4	144.4	145.09	0.69	145.10	0.7
5	101.2	101.58	0.38	101.57	0.37
6	146.2	146.92	0.72	146.98	0.78
7	138.1	138.90	0.83	138.94	0.84
8	133.2	133.55	0.35	133.60	0.4
9	139.4	139.90	0.5	139.99	0.59
10	111.8	112.40	0.6	112.40	0.6
1'	127.5	128.07	0.57	128.29	0.79
2'	112.3	112.77	0.47	112.78	0.48
3'	150.1	149.62	-0.48	150.10	0
4'	149.1	149.39	0.29	149.67	0.57
5'	116.5	117.13	0.63	117.18	0.68
6'	121.7	122.24	0.54	121.20	-0.5
7'	77.1	78.09	0.99	78.15	1.05
8'	80.2	80.46	0.26	80.50	0.3
9'	61.1	61.26	0.16	61.30	0.2
-OCH ₃	55.9	56.31	0.41	56.33	0.43
	56.1	56.66	0.56	56.68	0.58

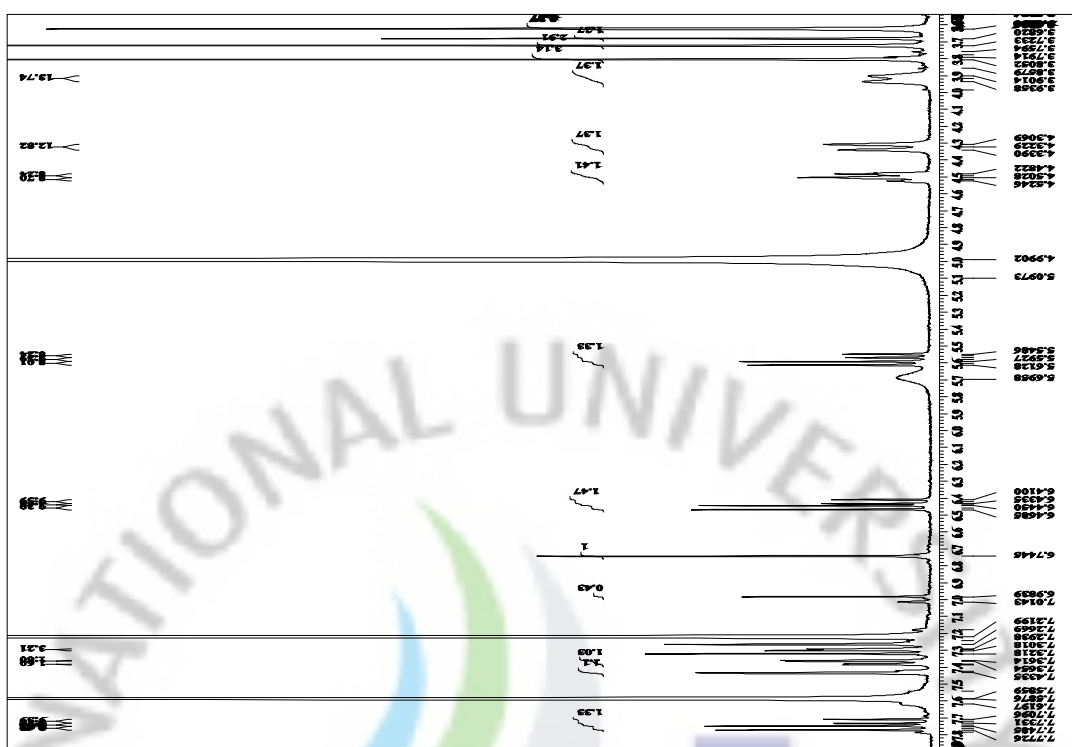


Figure 23. ^1H NMR spectrum of isolated compound 3



Figure 24. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 3

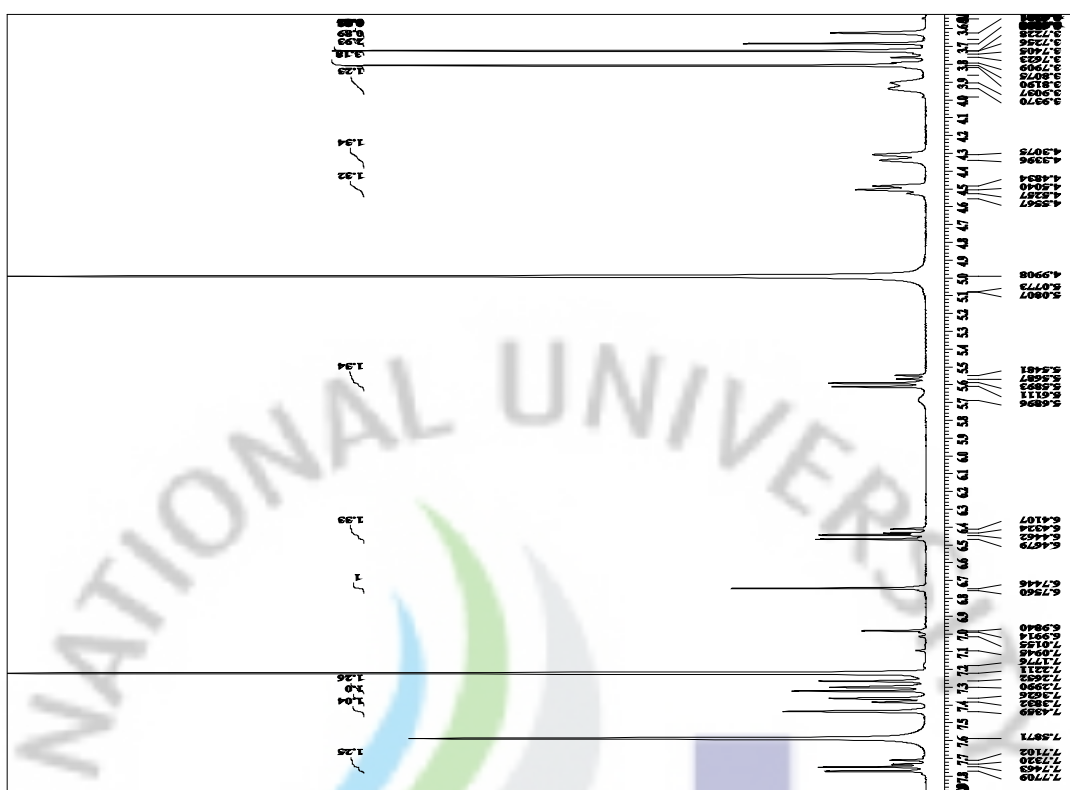


Figure 25. ^1H NMR spectrum of isolated compound 4



Figure 26. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 4

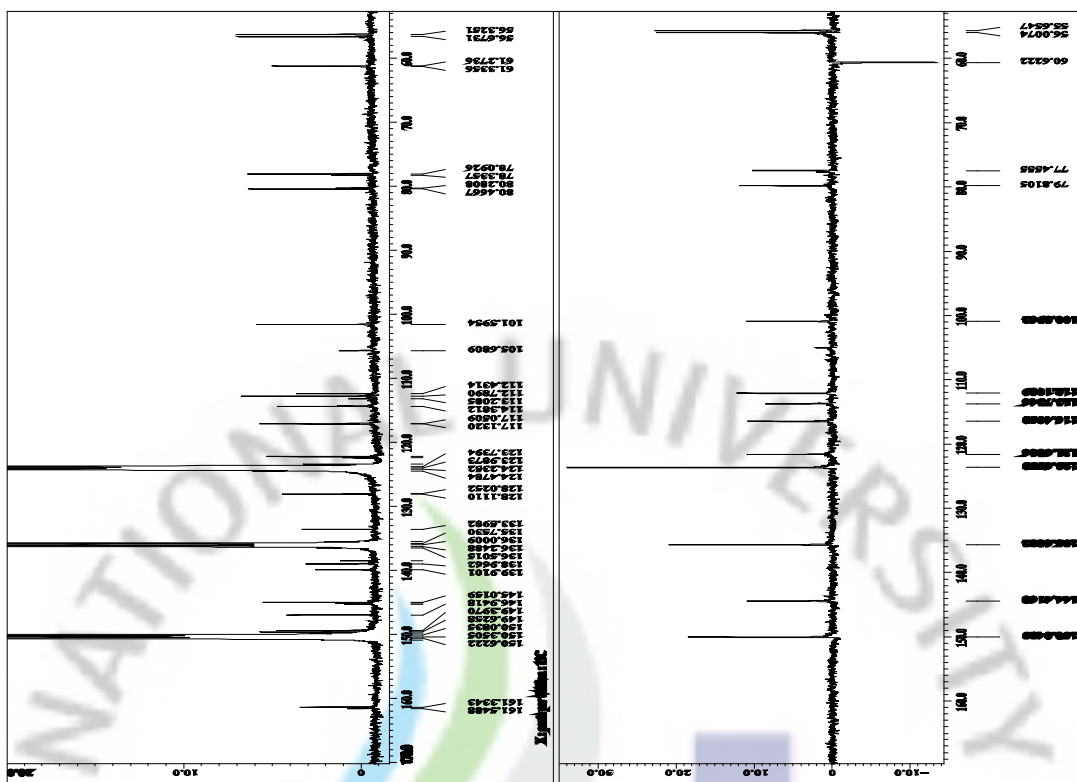


Figure 27. ^{13}C NMR and DEPT-135 spectrum of isolated compound 4

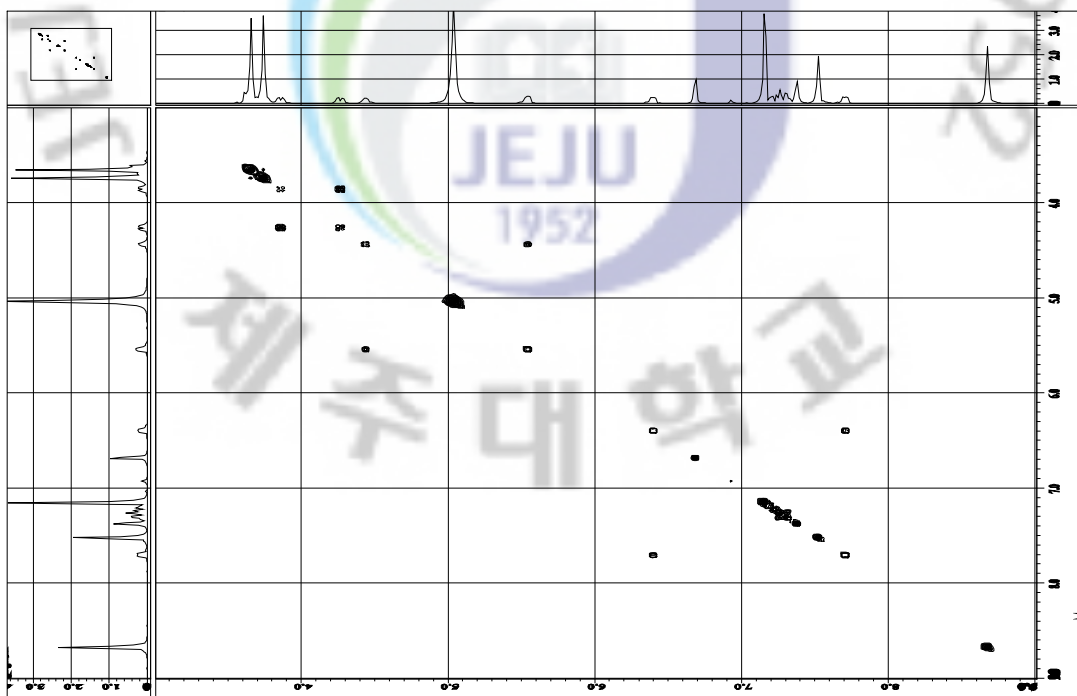


Figure 28. ^1H - ^1H COSY spectrum of isolated compound 4

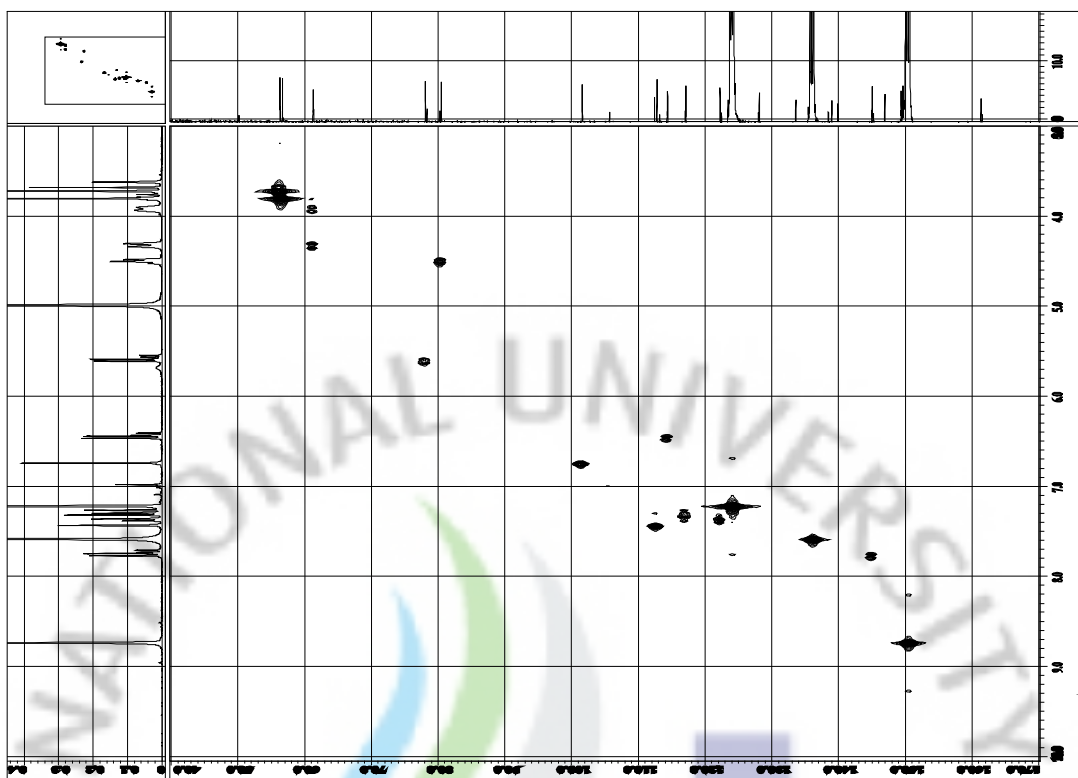


Figure 29. HMQC spectrum of isolated compound 4

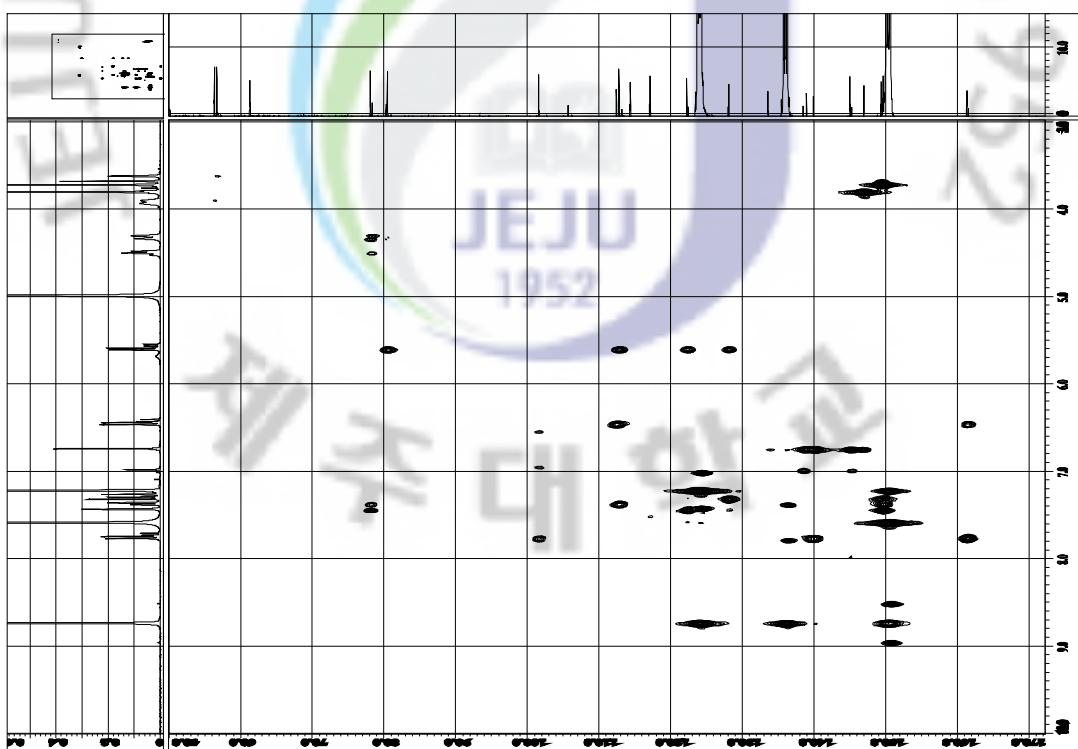


Figure 30. HMBC spectrum of isolated compound 4

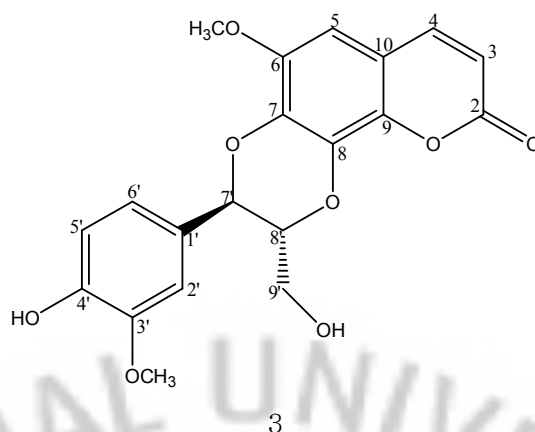


Table 9. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound **3**

Position	Compound 3	
	^{13}C NMR : 100 MHz in Pyridine- d_6	^1H NMR : 400 MHz in Pyridine- d_6
	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	-	-
2	161.3	6.47(1H, d, $J=8.4$)
3	114.1	7.77(1H, d, $J=8.4$)
4	145.1	6.75(1H, s)
5	101.6	-
6	146.9	-
7	139.0	-
8	133.6	-
9	139.9	-
10	112.4	-
1'	128.1	-
2'	112.8	7.44(1H, d, $J=8.48$)
3'	149.6	-
4'	149.4	-
5'	117.1	7.31(1H, d, $J=7.2$)
6'	122.2	7.39(1H, d, $J=8.24$)
7'	80.5	5.62(1H, d, $J=8.0$)
8'	78.1	4.52(1H, d, $J=8.92$)
9'	61.2	3.93(1H, d, $J=11.92$) 4.33(1H, d, $J=12.84$)
-OCH ₃	56.6	3.81(3H, s)
	56.3	3.72(3H, s)

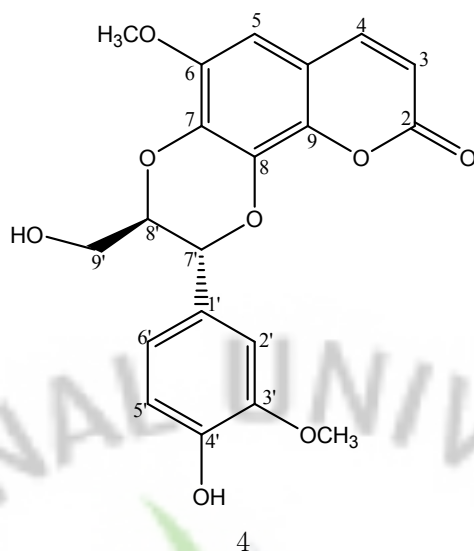


Table 10. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts and HMBC data of compound 4

Position		Compound 4 (^1H NMR : 400 MHz in Pyridine- d_6 , ^{13}C NMR : 100 MHz in Pyridine- d_6)		
		δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1		-	-	-
2		161.3	6.47(1H, d, $J=8.4$)	C-2, C-4
3		114.3	7.77(1H, d, $J=8.4$)	C-2, C-6, C-10
4		145.1	6.75(1H, s)	C-4, C-7, C-8, C-10
5		101.6	-	-
6		146.9	-	-
7		138.9	-	-
8		133.6	-	-
9		139.9	-	-
10		112.4	-	-
1'		128.1	-	-
2'		112.8	7.44(1H, d, $J=8.48$)	C-6', C-7'
3'		149.6	-	-
4'		149.3	-	-
5'		117.1	7.31(1H, d, $J=7.2$)	-
6'		122.2	7.39(1H, d, $J=8.24$)	C-2', C-7'
7'		78.1	5.62(1H, d, $J=8.0$)	C-1', C-2', C-6'
8'		80.4	4.52(1H, d, $J=8.92$)	
9'		61.2	3.93(1H, d, $J=11.92$) 4.33(1H, d, $J=12.84$)	C-7'
-OCH ₃		56.6	3.81(3H, s)	C-7
		56.3	3.72(3H, s)	

3-8. Compound 5의 구조 동정

잘게 분쇄한 뽕잎피나무 가지 900.0 g을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(2-2-2). VLC를 통해 얻어진 분획물 중 분획물 v17(*n*-Hex/EtOAc = 10/90, 163.2 mg)을 CHCl₃/MeOH = 5/1 의 용매조건으로 Sephadex LH-20을 사용하여 분획하였고, 그 중 분획물 v17-se-3에서 compound 5(1.5 mg)을 얻었다.

또한 같은 방법으로(2-2-2) 얻어진 분획물 중 분획물 v18과 재결정 후 남아있는 분획물 v19의 여액을 TLC 수행한 결과 같은 spot pattern을 나타내었다. 따라서 두 개의 분획물을 합하여 CHCl₃/MeOH = 3/1 의 용매조건으로 Sephadex LH-20을 사용하여 분획하였고, 그 중 분획물 v1819-se-6에서 compound 5(16 mg)을 얻었다.

Compound 5의 구조는 ¹H NMR(CD₃OD, 400MHz), ¹³C NMR(CD₃OD, 100MHz)을 통하여 확인하였다. ¹H NMR에서는 아주 단순한 peak를 관찰 할 수 있었는데 3개의 peak 모두 방향족 고리의 수소로 예상 할 수 있었다. 서로 갈라지게 하는 proton 그룹은 같은 짝지음 상수를 갖는다는 것과 짝지음 하는 핵과 핵 사이의 결합이 길어질 수록 짝지음 상수값이 감소한다는 이론을 기본으로 δ 7.42(1H, d, *J* = 2.06), 7.38(1H, dd, *J* = 8.13, 1.83, 2.06), 6.75(1H, d, *J* = 8.24)의 signal을 통해 방향족 고리의 *ortho*, *meta* 위치에서 서로 coupling 하는 수소임을 예상하였다(Figure 31).

¹³C NMR data 또한 7개 정도의 적은 수의 peak가 관찰 되었는데, δ 115~150의 signal은 방향족 고리의 탄소로, δ 175.0의 signal은 carboxyl기로 예상하였다(Figure 32). 예상한 부분구조를 바탕으로 문헌²²⁾과 대조하여 구조 동정 하였는데, 그 결과 compound 5는 3,4-dihydroxybenzoic acid로 동정하였다.



Figure 31. ^1H NMR spectrum of isolated compound 5

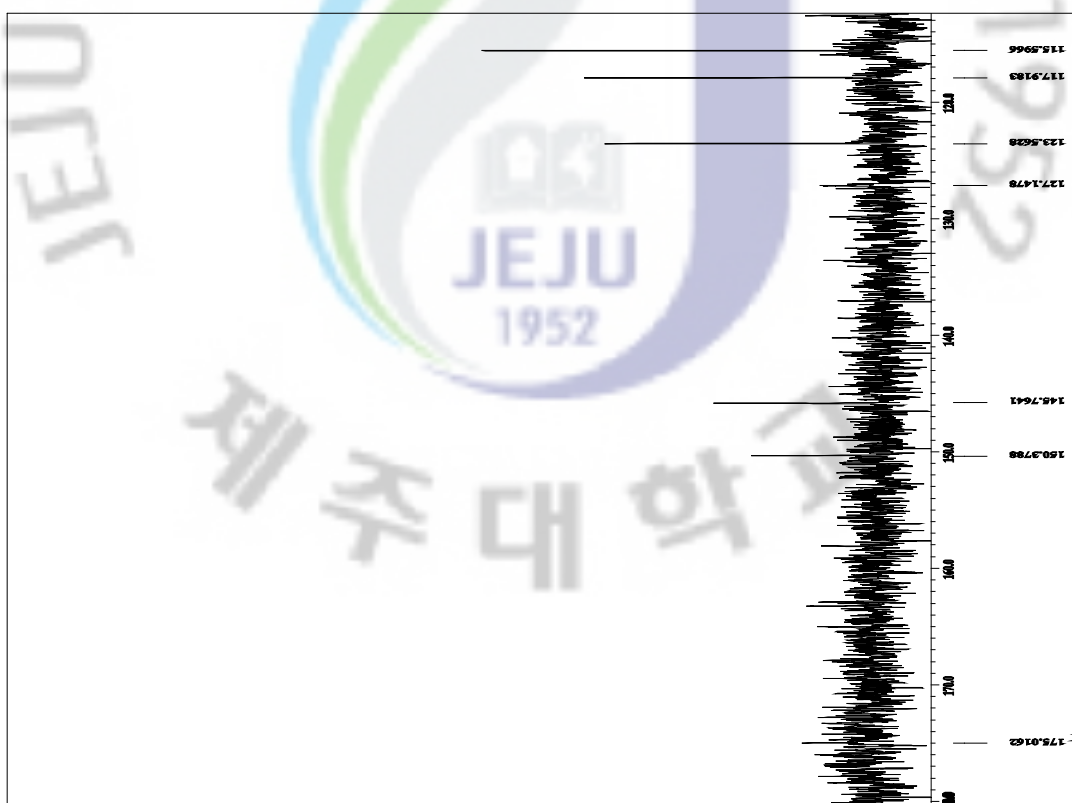
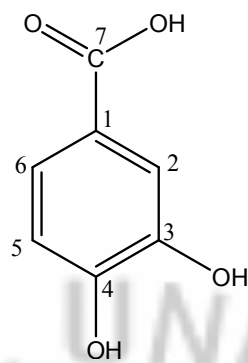


Figure 32. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 5



5

Table 11. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound 5

Position	Compound 5 (^1H NMR : 400 MHz in CD_3OD , ^{13}C NMR : 100 MHz in CD_3OD)	
	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	127.1	-
2	115.6	7.42 (1H, d, 2.06)
3	145.8	-
4	150.4	-
5	117.9	6.75 (1H, d, 8.24)
6	123.6	7.38 (1H, dd, 8.13, 1.83, 2.06)
-COOH	175.0	-

3-9. Compound 6의 구조 동정

잘게 분쇄한 뽕잎피나무 가지 900.0 g을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(2-2-2). VLC를 통해 얻어진 분획물 중 분획물 v5(*n*-Hex/EtOAc = 70/30, 60.9 mg)을 감압 농축을 시킨 후 메탄올을 첨가하였을 때 하얀 powder가 생성되었다. 상층액과 powder를 따로 구분하여 나누었고, 구분된 powder를 메탄올을 이용하여 여러번 washing 하였다. 이러한 재결정 법을 통해 순수한 분획물 v5 powder Fr.에서 compound 6(3.1 mg)을 얻었다.

Compound 6의 구조는 ^1H NMR(pyridine-*d*₅, 400MHz), ^{13}C NMR(pyridine-*d*₅, 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR data에서는 대부분의 peak 가 δ 0.7~2.13에 분포하였으며 이는 포화 탄화수소의 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다. δ 3.88(1H, m)의 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있는 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다(Figure 33).

^{13}C NMR data에서도 마찬가지로 대부분의 peak가 δ 12~57에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. 반면 δ 71.5에서 나타나는 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 탄소로 예상하였다. δ 142.4, 121.0의 signal은 불포화된 sp^2 혼성탄소로 예상하였다(Figure 34). 비교적 난해한 ^1H NMR data로 인해 ^{13}C NMR data에 의존하여 문헌²³⁾과의 대조과정을 거쳐 compound 6을 β -sitosterol로 동정하였다.

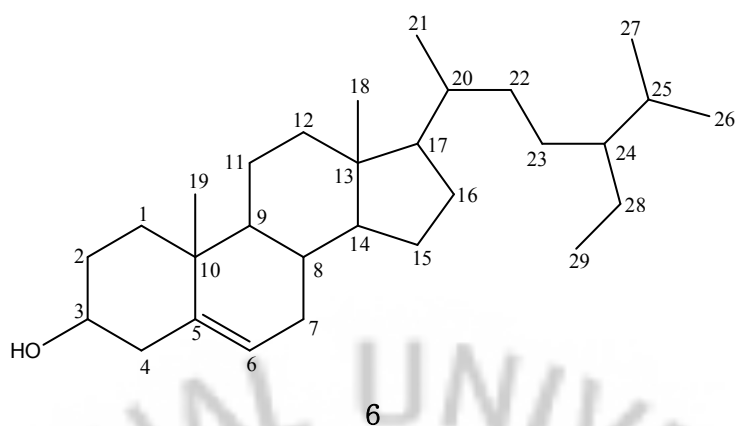


Table 12. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound **6**

Position	Compound 6			
	δ_{C}	reference(δ_{C} , CDCl_3)	δ_{H} (int, mult, J in Hz)	
1	38.3	37.3	3.88 (1H, m)	
2	30.4	31.6		
3	71.5	71.8		
4	44.0	42.3		
5	142.4	140.8	5.44 (1H, d, $J = 4.28$)	
6	121.0	121.7		
7	32.6	32.1		
8	33.1	32.1		
9	50.9	50.2		
10	38.3	36.5		
11	21.8	21.1		
12	40.5	39.8		
13	42.9	42.3		
14	57.4	56.8		
15	20.5	24.3		
16	29.0	28.3		
17	56.7	56.1		
18	12.6	12.0		0.70 (3H, s)
19	20.4	19.1		1.08 (3H, s)
20	36.9	36.2		1.01 (3H, d, $J = 6.41$)
21	19.5	18.8		
22	34.7	34.0		
23	26.8	26.2		
24	46.5	45.2	0.89 (3H, d, $J = 4.2$)	
25	29.9	29.2		
26	19.7	18.9		
27	20.0	19.1	0.87 (3H, s)	
28	23.8	23.1	0.91 (3H, s)	
29	12.5	11.9		

3-10. Compound 7의 구조 동정

잘게 분쇄한 뽕잎피나무 가지 900.0 g을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획을 실시하였다(2-1-2). VLC를 통해 얻어진 분획물 중 분획물 v20(*n*-Hex/EtOAc = 5/95, 322.7 mg)을 EtOAc/MeOH = 100/0~0/100 gradient의 용매조건으로 순상 silica gel CC을 사용하여 분획하였고, 그 중 분획물 v20-np2(23.7 mg)을 얻었다. 다시 분획물 v20-np2를 CHCl₃/MeOH = 3/1의 용매조건으로 순상 silica gel CC를 통해 얻어진 분획물 v20-np2-np2에서 compound 7(5.7 mg)을 얻었다.

Compound 7의 구조는 ¹H NMR(CD₃OD, 400MHz), ¹³C NMR(CD₃OD, 100MHz)을 통하여 확인하였다. ¹H NMR data를 통하여 확인한 결과 δ 6.97, 6.75, 5.93, 5.91의 signal은 방향족 고리의 수소임을 예상하였다. δ 6.97(1H, d, *J* = 1.83), 그리고 같은 짝지음 상수를 갖는 δ 6.8(1H, d, *J* = 8.28), 6.75(1H, d, *J* = 8.24)는 각각 방향족 고리의 *ortho*, *meta* 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다. δ 4.81(1H, s), 4.17(1H, m)의 signal은 전기음성도가 큰 원소에 인접한 *sp*³ 탄소에 결합되어 있는 수소로 예상 하였고, δ 2.86(1H, dd, *J* = 16.72, 4.58), 2.73(1H, dd, *J* = 16.84, 2.98, 2.75)의 signal은 *sp*³ 혼성에 의한 수소이고, 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다(Figure 35).

¹³C NMR data를 통해서도 화합물의 탄소의 개수가 15개 이상임을 알 수 있었다. δ 29~80의 signal은 포화된 *sp*³ 혼성의 탄소이거나 전기음성도가 큰 원소가 인접한 포화된 *sp*³ 혼성의 탄소에 예상하였고, δ 100~158의 signal은 불포화된 *sp*² 탄소 혹은 방향족 고리의 탄소에 예상하였다(Figure 36).

예상한 부분 구조를 기본으로 문헌²⁸⁾과 대조하여 구조 동정 하였고, 그 결과 compound 7은 *epi*-catechin으로 동정하였다.

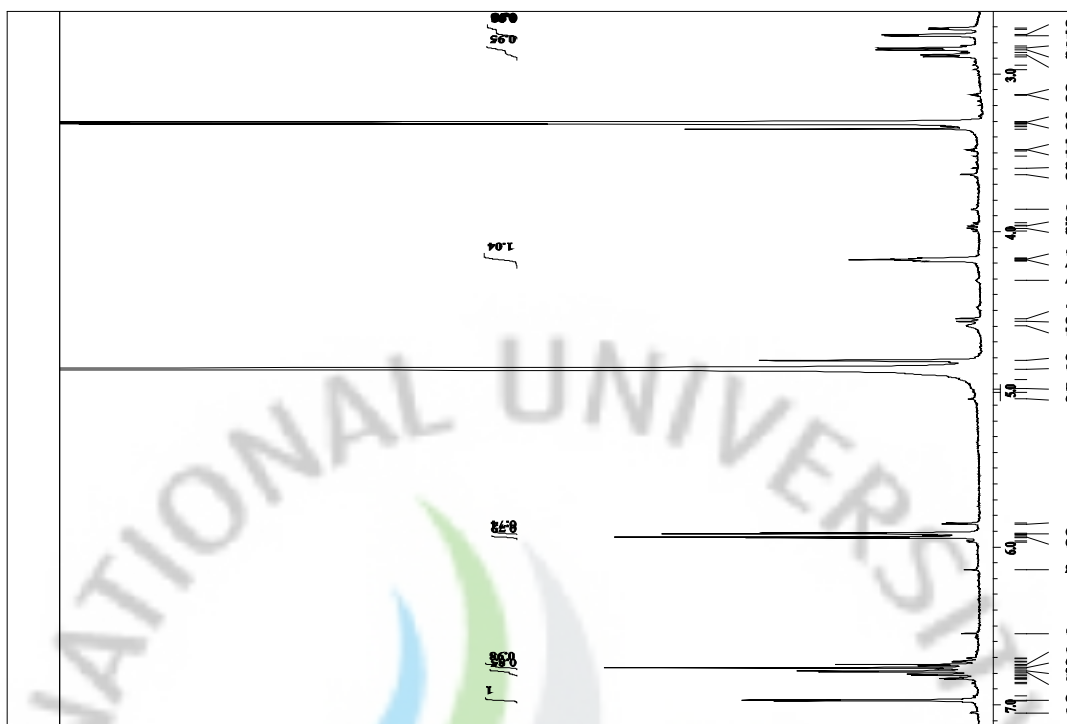


Figure 35. ^1H NMR spectrum of isolated compound 7



Figure 36. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 7

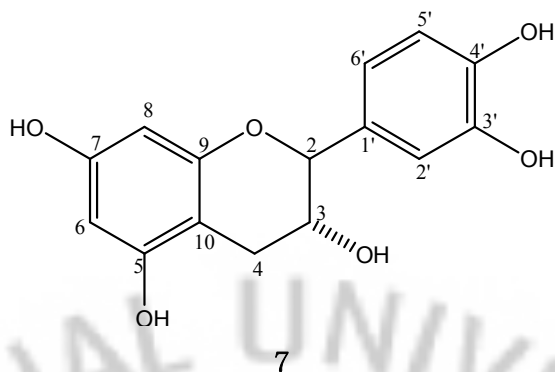


Table 13. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound 7

Position	Compound 7 (^1H NMR : 400 MHz in CD_3OD , ^{13}C NMR : 100 MHz in CD_3OD)	
	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	-	-
2	80.0	4.81 (1H, s)
3	67.6	4.17 (1H, m)
4	29.4	α_{H} : 2.73 (1H, dd, 16.84, 2.98, 2.75)
		β_{H} : 2.86 (1H, dd, 16.72, 4.58)
5	157.5	-
6	96.5	5.91 (1H, d, 2.29)
7	157.8	-
8	96.0	5.93 (1H, d, 2.29)
9	158.2	-
10	100.2	-
1'	132.4	-
2'	115.5	6.97 (1H, d, 1.83)
3'	146.1	-
4'	145.9	-
5'	116.0	6.75 (1H, d, 8.24)
6'	119.5	6.8 (1H, d, 8.28)

3-11. Compound 8의 구조 동정

잘게 분쇄한 뽕잎피나무 가지 900.0 g을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(2-1-2). VLC를 통해 얻어진 분획물 중 분획물 v6(*n*-Hex/EtOAc = 75/25, 33.8 mg)을 *n*-Hex/EtOAc = 3/1의 용매조건으로 순상 silica gel CC을 사용하여 분획하였고, 그 중 분획물 v6-np1에서 compound 8(8.7 mg)을 얻었다.

Compound 8의 구조는 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR data에서는 대부분의 peak가 δ 0.7~2.4에 분포하였으며 이는 포화 탄화수소의 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다(Figure 37).

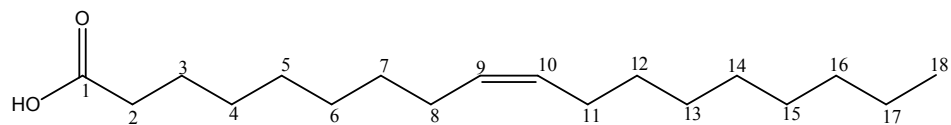
^{13}C NMR data에서도 마찬가지로 대부분의 peak가 δ 14~35에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. δ 129.9, 130.2의 signal은 불포화된 sp^2 혼성탄소로 예상하였고, δ 179.7에서 나타나는 signal은 carboxyl기로 예상하였다(Figure 38). 비교적 난해한 ^1H NMR data로 인해 ^{13}C NMR data에 의존하여 문헌³⁰⁾과의 대조과정을 거쳐 compound 8을 oleic acid로 동정하였다.



Figure 37. ^1H NMR spectrum of isolated compound 8



Figure 38. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 8



8

Table 14. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound 8

Position	Compound 8 (^1H NMR : 400 MHz in CDCl_3 , ^{13}C NMR : 100 MHz in CDCl_3)		
	δ_{C}	reference(δ_{C} , CDCl_3)	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	179.9	180.9	
2	34.2	34.3	2.35 (2H, t)
3	24.8	24.8	1.63 (2H, m)
4	29.2	29.2	
5	29.4	29.3	
6	29.5	29.4	
7	29.9	29.9	
8	27.4	27.4	2.01 (2H, m)
9	129.9	129.9	
10	130.2	130.2	
11	27.3	27.3	
12	29.9	30.0	
13	29.6	29.6	
14	29.8	29.8	
15	29.5	29.5	
16	32.1	32.1	
17	22.9	22.9	
18	14.3	14.3	0.88 (3H, t)

3-12. 뽕잎피나무(가지)에서 분리된 화합물에 대한 활성실험 결과

3-12-1. DPPH radical scavenging effect

뽕잎피나무(가지) 70% EtOH 추출물의 EtOAc 분획층을 column chromatography를 이용해 분리한 8개의 화합물에 대한 DPPH radical scavenging 결과로서 각 화합물의 SC₅₀값은 다음표의 내용과 같다. Compound 1의 SC₅₀ 값은 추세선에 의해 계산된 값이다(Table 15).

Table 15. SC₅₀ values of isolated compounds from *T. taquetii*

compound No.	compound name	SC ₅₀ (μg/mL)
1	orobol 4'-O-β-glucopyranoside	125.1
2	3'-O-methylorobol	78.5
3	cleomiscosin A	>100
4	cleomiscosin B	>100
5	3,4-dihydroxybenzoic acid	10.2
6	β-sitosterol	>100
7	<i>epi</i> -catechin	17.7
8	oleic acid	>100
control	Vit. C	7.7

위의 표의 내용과 같이 대조군인 vitamin C에 비해 신물질인 compound 1, orobol 4'-O-β-glucopyranoside는 그다지 좋은 활성을 나타내지 않았다. Compound 2, 5, 7은 DPPH radical 소거활성을 보였는데, 그 중 화합물 3,4-dihydroxybenzoic acid의 scavenging inhibition은 농도 의존적으로 활성이 변화되지 않았다. 이는 화합물 자체의 색이 진한 노란색으로 흡광도 측정에 있어 간섭을 일으킨 것으로 생각된다. 다음의 표는 좋은 활성을 가지는 화합물들의 여

러 농도에서의 DPPH radical 저해율과 SC₅₀값을 나타낸다(Table 16).

Table 16. Inhibitions in each concentration and SC₅₀ values of the isolated compounds from *T. taquetii*

	Inhibition (%)					SC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	6.25 ($\mu\text{g/mL}$)	12.5 ($\mu\text{g/mL}$)	25 ($\mu\text{g/mL}$)	50 ($\mu\text{g/mL}$)	100 ($\mu\text{g/mL}$)	
3'-O-methylorobol	13.1	19.7	31.3	39.5	54.3	78.5
3,4-dihydroxybenzoic acid	39.6	67.3	89.0	78.1	69.0	10.2
<i>epi</i> -catechin	21.4	38.5	60.3	88.1	92.7	17.7
Vit. C	38.8	72.7	96.1	96.7	96.9	7.7

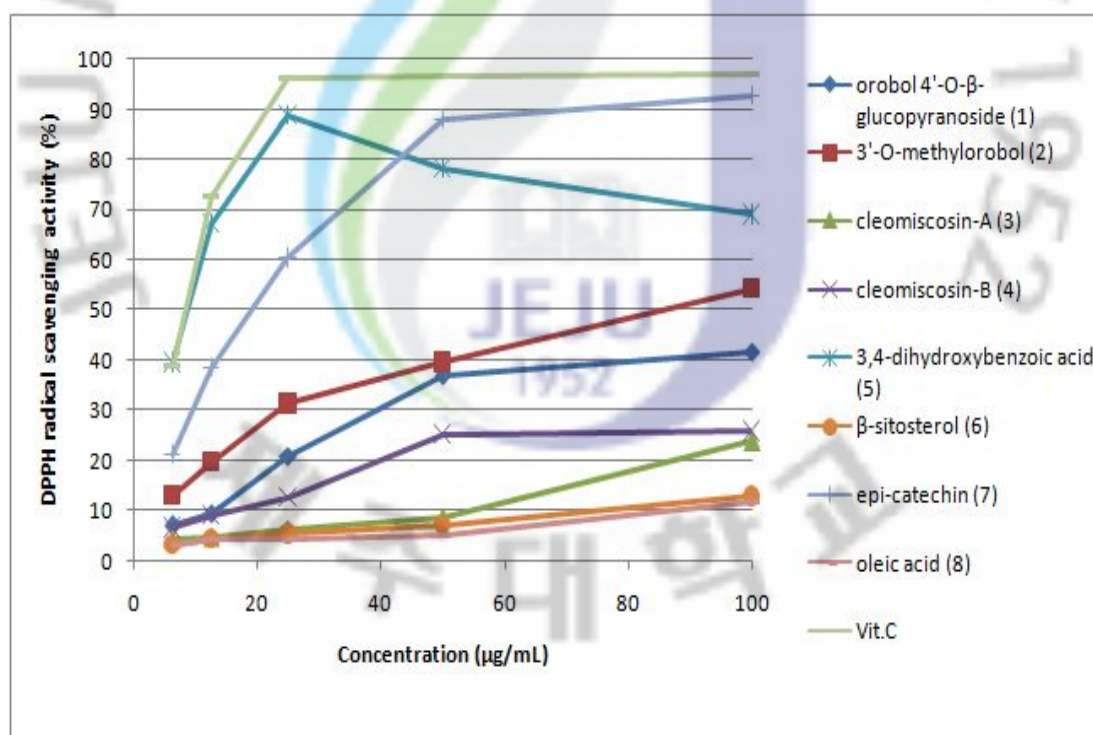


Figure 39. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from *T. taquetii*

3-12-2. ESR을 통해 확인한 DPPH radical scavenging effect

3-12-1에 보여 지는 것처럼 뽕잎피나무 가지로부터 분리된 3,4-dihydroxybenzoic acid는 흡광도에 간섭을 일으키는 것으로 예상되어 보다 정확한 DPPH radical 소거활성을 측정하기 위해 흡광도를 통한 측정방법이 아닌 radical detection의 방법으로 활성을 측정하였다. Vit. C를 대조군으로 사용하여 3,4-dihydroxybenzoic acid과 3-12-1에서 활성이 좋았던 *epi*-catechin의 소거율과 SC₅₀값은 다음표(Table 17)의 내용과 같다. Figure 48은 각 sample의 ESR signal을 나타낸다.

Table 17. DPPH radical scavenging inhibitions in each concentration and SC₅₀ values of few isolated compounds from *T. taquetii*

	Inhibition (%)							SC ₅₀ (µg/mL)
	1.56 (µg/mL)	3.12 (µg/mL)	6.25 (µg/mL)	12.5 (µg/mL)	25 (µg/mL)	50 (µg/mL)	100 (µg/mL)	
3,4-dihydroxybenzoic acid	28.1	37.7	68.6	85.4	96.6	97.4	97.9	4.2
<i>epi</i> -catechin	16.4	31.2	68.3	90.0	95.1	95.8	96.2	4.3
Vit. C	35.6	66.2	96.0	96.5	97.1	97.8	98.1	2.4

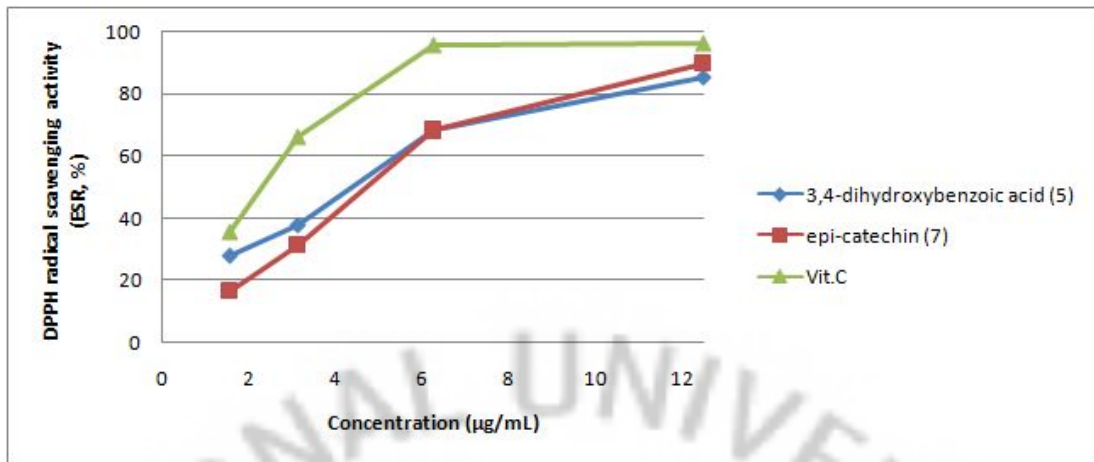


Figure 40. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from *T. taquetii* (ESR)

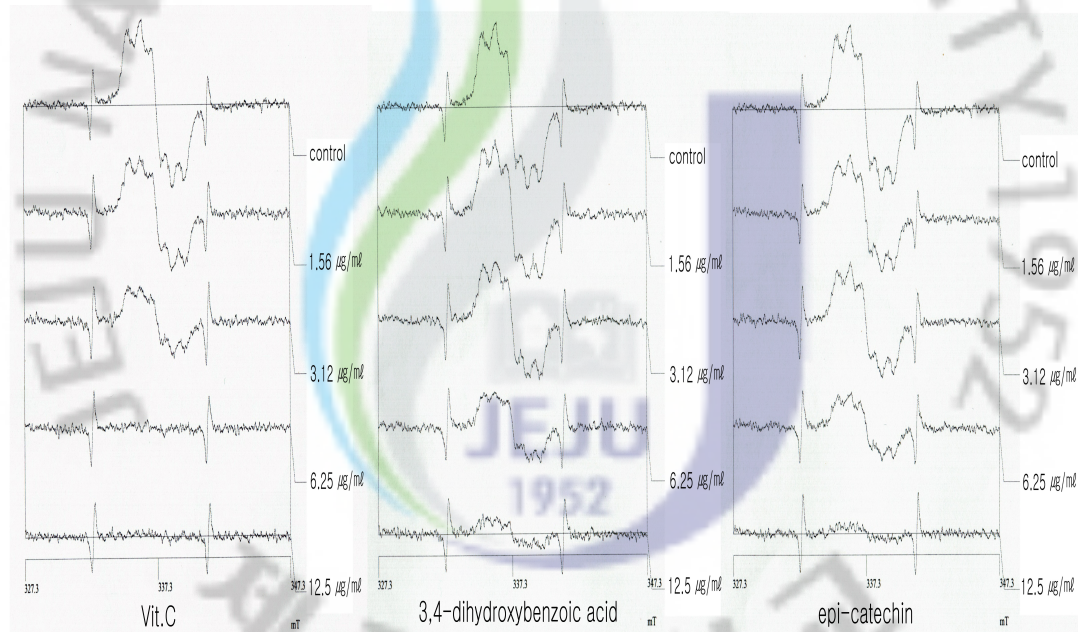


Figure 41. ESR signals of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from *T. taquetii*

위의 표의 내용과 같이 대조군인 vitamin C와 비교할 때, 화합물 3,4-dihydroxybenzoic acid와 epi-catechin은 DPPH radical 소거활성이 매우 뛰어나음을 알 수 있다. ESR signal에서 control은 sample 대신 용매를 넣었을 때를 의미하고, control의 signal보다 signal의 높이가 낮을수록 활성이 좋음을 의미한다.

다(Figure 49).

3-12-3. ESR을 통해 확인한 hydroxy radical scavenging effect

Vit. C를 대조군으로 사용하여 DPPH radical 소거활성이 좋은 화합물 (3-12-2)에 대해 ESR spectrometer를 이용하여 hydroxy radical 소거 활성을 측정하였고, 그 결과는 다음표(Table 18)의 내용과 같다. 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때, 화합물 3,4-dihydroxybenzoic acid와 *epi*-catechin이 비교적 좋은 활성을 가짐을 알 수 있다. Figure 51은 각 sample의 ESR signal이다.

Table 18. Hydroxy radical scavenging inhibitions in each concentration and SC₅₀ values of the isolated compounds from *T. taquetii*

	Inhibition (%)				SC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	62.5 ($\mu\text{g/mL}$)	125 ($\mu\text{g/mL}$)	250 ($\mu\text{g/mL}$)	500 ($\mu\text{g/mL}$)	
3,4-dihydroxybenzoic acid	25.1	34.9	42.1	52.0	441.2
<i>epi</i> -catechin	N.D ^{a)}	8.3	18.7	35.6	696.5
Vit. C	36.1	67.6	75.4	80.4	94.7

^{a)} N.D : No Data

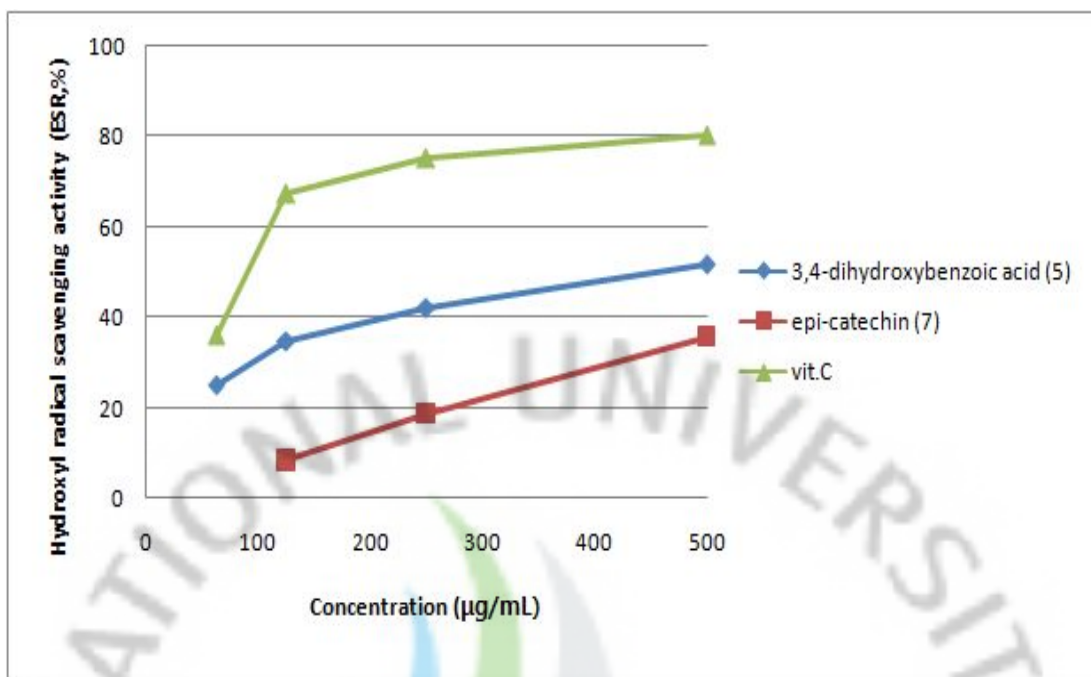


Figure 42. Hydroxy radical scavenging activities of isolated compounds from *T. taquetii* (ESR)

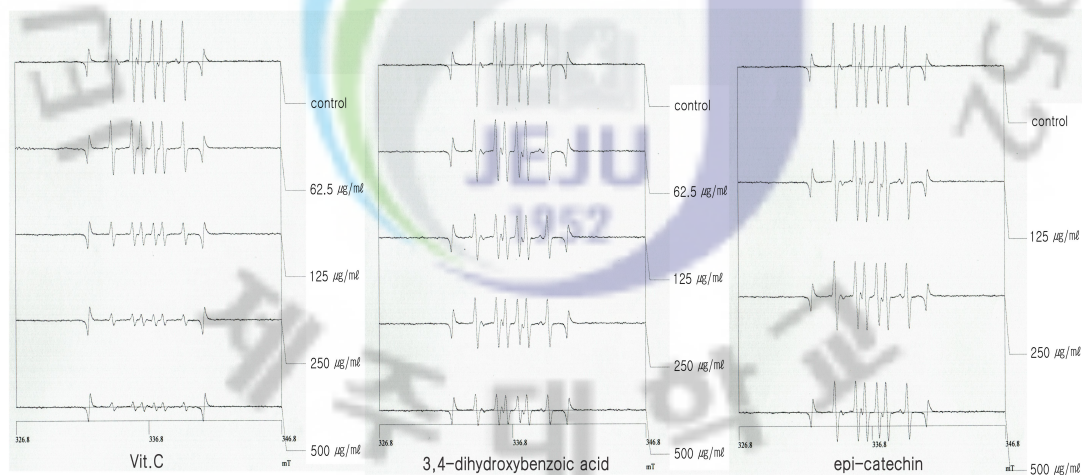


Figure 43. ESR signals of hydroxy radical scavenging activities of isolated compounds from *T. taquetii*

3-12-4. Tyrosinase inhibition effect

뽕잎피나무(가지) 70% EtOH 추출물의 EtOAc 분획층을 column chromatography를 이용해 분리한 8개의 화합물에 대한 tyrosinase inhibition 결과와 IC₅₀ 값은 다음표의 내용과 같다(Table 19).

Table 19. IC₅₀ values of isolated compounds from *T. taquetii*

compound No.	compound name	IC ₅₀ (μg/mL)
1	orobol 4'-O-β-glucopyranoside	>100
2	3'-O-methylorobol	>100
3	cleomiscosin A	12.9
4	cleomiscosin B	109.8
5	3,4-dihydroxybenzoic acid	>100
6	β-sitosterol	>100
7	<i>epi</i> -catechin	>100
8	oleic acid	>100
control	arbutin	104.6

앞의 표에서 알 수 있듯이 8개의 분리된 화합물 중 compound 4, cleomiscosin B의 IC₅₀값은 추세선에 의해 계산된 값으로서, 대조군인 arbutin과 비슷한 값을 나타내었고, compound 3, cleomiscosin A은 arbutin에 비해 매우 높은 활성을 나타내었다. 각각의 농도에서 이 화합물들의 저해율은 다음표와 같다(Table 20).

Table 20. Inhibitions in each concentration and IC₅₀ values of isolated compounds from *T. taquetii*

	Inhibition (%)								IC ₅₀ (µg/mL)
	1.56 (µg/mL)	3.12 (µg/mL)	6.25 (µg/mL)	12.5 (µg/mL)	25 (µg/mL)	50 (µg/mL)	100 (µg/mL)	200 (µg/mL)	
cleomiscosin A	7.8	14.4	19.7	41.0	86.9	92.5	99.1	N.D ^{a)}	12.9
cleomiscosin B	N.D	N.D	N.D	N.D	9.6	20.9	46.1	N.D	109.8
arbutin	N.D	N.D	N.D	N.D	13.6	28.5	48.0	72.5	104.6

^{a)} N.D : No Data



4. 결론

제주도에 자생하는 식물을 이용하여 천연 항산화성분과 기능성화장품 소재 개발 가능성을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 소재개발에 대한 연구는 제주 자생식물 중 뽕잎피나무의 가지부분을 이용하여 화합물을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 항산화와 기능성화장품으로 활용 가능한 생리활성을 검색하는 것으로 진행되었다.

뽕잎피나무(가지) 70% EtOH 추출물을 *n*-hexane층, EtOAc(ethyl acetate)층, *n*-butanol층 및 H₂O층으로 용매분획하고, 분획물에 대하여 항산화 실험(DPPH radical scavenging test), tyrosinase inhibition test를 실시하였다. 그 결과 tyrosinase inhibition test에서는 추출물 및 모든 분획물 층에서 활성을 나타내지 않았지만, 항산화 실험에서는 *n*-hexane층을 제외한 모든 층에서 좋은 활성을 보였다. 좋은 활성을 보인 EtOAc 분획층을 가지고 VLC(Vacuum Liquid Chromatography), Sephadex LH-20 chromatography, 순상 silica gel chromatography를 사용하여 화합물들을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR을 이용하여 확인하였고, 그 자료를 토대로 문헌과 비교한 결과, orobol 4'-*O*- β -glucopyranoside, 3'-*O*-methylorobol, cleomiscosin A, cleomiscosin B, 3,4-dihydroxybenzoic acid, β -sitosterol, *epi*-catechin, oleic acid로 구조 동정 하였다(Figure 49). 그 중 화합물 1(orobol 4'-*O*- β -glucopyranoside)은 1D, 2D NMR data를 통해 flavonoid 계열의 신규화합물로 예상하고, 화합물에 대한 더 정확한 정보를 수집하기 위해 HR-FAB MS, UV/Vis spectrometer, polarimeter의 data를 분석하였고, 그 결과 신물질로 결론 지었다. 신규화합물을 포함한 총 8개의 분리 화합물에 대해 항산화 실험(DPPH radical scavenging test), tyrosinase inhibition test를 수행하였다. 그 결과 항산화 실험에서는 vitamin C(ascorbic acid, SC₅₀ = 7.7 μ g/mL)와 비교했을 때, *epi*-catechin은 17.7 μ g/mL의 SC₅₀값을 가져 매우 좋은 활성을 나타내었다. 3'-*O*-methylorobol의 SC₅₀값은 78.5 μ g/mL로서 비교적 낮은 수치 이지만, 항산화 활성이 있음을 알 수 있었다. 흡광도 측정으로 알아본 DPPH radical 소거 활

성에서 3,4-dihydroxybenzoic acid는 화합물이 가지는 자체 색깔에 의해서 흡광도에 간섭을 일으켜 inhibition이 농도 의존적이지 않다고 생각하였다. 이를 명확히 할 필요가 있어 ESR spectrometer를 이용하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였고, vitamin C의 SC₅₀값이 2.4 µg/mL인 것에 대해 3,4-dihydroxybenzoic acid은 4.2 µg/mL의 SC₅₀값을 가져 매우 좋은 활성을 가짐을 확인하였다. 또한 *epi*-catechin의 SC₅₀값은 4.3 µg/mL로 이 화합물 또한 매우 좋은 항산화 활성을 나타내었다. ESR spectrometer를 이용한 hydroxy radical 소거활성에 대해서는 화합물 3,4-dihydroxybenzoic acid와 *epi*-catechin 모두 대조군인 vitamin C에 대해 비교적 좋은 활성을 나타내었다. Tyrosinase inhibition test에서는 대조군인 arbutin의 IC₅₀값인 104.6 µg/mL과 비교했을 때, cleomiscosin A의 IC₅₀값은 12.9 µg/mL으로 tyrosinase inhibition에서 매우 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다.

본 연구의 실험결과를 바탕으로 뽕잎피나무(가지)를 이용한 항산화성분과 미백 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

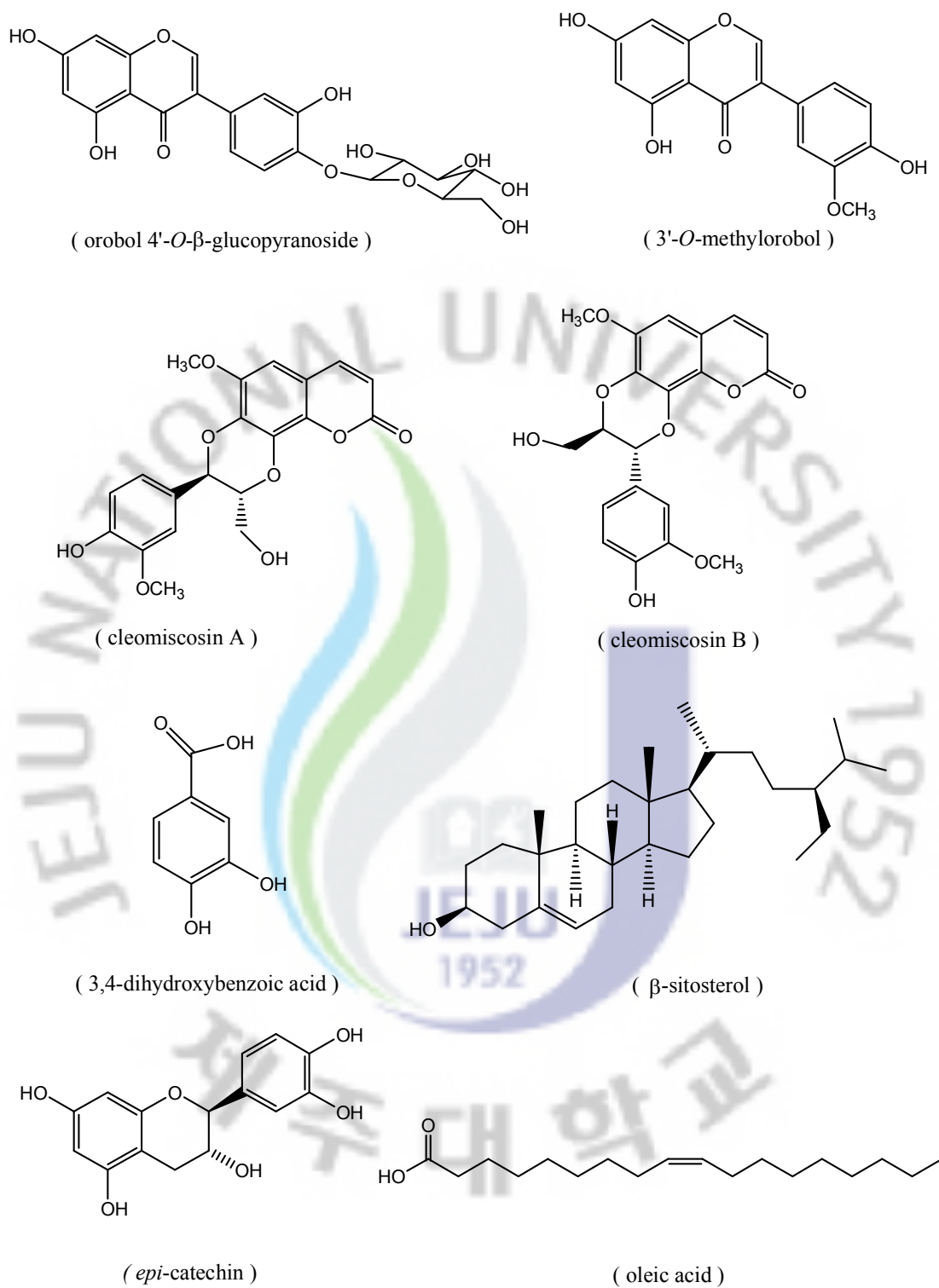


Figure 44. Isolated compounds from *T. taquetii*

IV. 참고문헌

- 1) 김은화; “천연 추출물을 이용한 미백화장품 개발 동향에 관한 연구” *대한피부미용학회지*, 2008, 4, 2, 195-203.
- 2) 김준한; “기능성화장품 10년새 4배 증가” *뷰티누리*, 2010. 08. 02.
- 3) Karin U. Schallreuter; Sonal Kothari; Bhaven Chavan; Jennifer D. Spencer. "Regulation of melanogenesis - controversies and new concepts." Blackwell Munksgaard, *Experimental Dermatology*, 2007, 17, 395-404.
- 4) Y.-J. Kim; H.Uyama. "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future" *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62, 1707-1723.
- 5) Te-Sheng Chang; "An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors." *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10, 2440-2475.
- 6) M. G. Miguel; "Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review." *Flavour Fragr. J.*, 2010, 25, 291-312.
- 7) Adam Matkowski; "Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants-A review." *Biotechnology Advances*, 2008, 26, 548-560.
- 8) Tchang Bok Lee; "Endemic and Rare Plants of Mt. Halla." *Seoul Nat'l Univ., Coll. of Agric. Rese.*, 1985, 10, 2(1), 1-16.
- 9) Shu-fung. L.; Satish Manohar. N.; Banisree. M.; Susan. M.; Chung-Li. C.; Chao-Lin. K.; Hsin-Sheng. T. "In vitro Propagation by Aseptic 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) Marsden S. Blois "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical" *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.

11) Nanjo F; Goto K; Seto R; Sakai M; Hara Y. "Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical." *Free Radic Biol Med.*, **1996**, 21(6), 895-902.

12) Yagi, A.; Kanbara, T.; Morinobu, N. "The effect of tyrosinase inhibition for aloe" *Planta Medica*, **1986**, 39(1), 517-519.

13) Silcia Marquina; Jaime Bonilla-Barbosa; Laura Alvarez "Comparative phytochemical analysis of four Mexican *Nymphaea* species" *Phytochemistry*, **2005**, 66, 921-927.

14) Satoshi Tahara; John L. Ingham; Shiro Nakahara; Junya Mizutani; Jeffrey B. Harborne "Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*" *phytochemistry*, **1984**, 23(9). 1889-1900.

15) Anil B. Ray; Sumil K. Chattopadhyay; Sandeep Kumar; Chohachi Konno; Yoshinobu Kiso; Hiroshi Hikino "Structures of cleomiscosins, coumarinolignoids of *Cleome Viscosa* seeds" *Tetrahedron*, **1985**, 41(1), 209-214.

16) Sajeli Bengum; Bhagawati Saxena; Madhur Goyal; Rakesh Ranjan; Vijaya B. Joshi; Ch V. Rao; Sairam Krishnamurthy; Mahendra Sahai "Study of

anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of seeds of *Hyoscyamus niger* and isolation of a new coumarinolignan." *Fitoterapia*, **2010**, 81, 178-184.

17) WenYi Jin; Phuong Thien Thuong; Nguyen Duy Su, Byung Sun Min; Kun Ho Son; Hyeun Wook Chang; Hyun Pyo Kim; Sam Sik Kang; Dai Eun Sok; Ki Hwan Bae "Antioxidant Activity of Cleomiscosins A and C Isolated from *Acer okamotoanum*" *Arch Pharm Res*, **2007**, 30(3), 275-281.

18) Lumonadio Luyengi; Nanjoo Suh; Harry H. S. Fong; John M. Pezzuto; Douglas Kinghorn "A lignan and four terpenoids from *Brucea Javanica* That induce differentiation with cultured HL-60 Promyelocytic leukemia cells." *Phytochemistry*, **1996**, 43(2), 409-412.

19) Hitoshi Tanka; Ichiro Kato; Kazuhiko Ichino; Kazuo Ito "Coumarinolignoids, Cleomiscosin A and Cleomiscosin B, from *Aesculus tubinata*." *J. Nat. Prod.*, **1986**, 49(2), 366-367.

20) Francesco Guglielmi; Cristina Luceri; Lisa Giovannelli; Piero Dolara; Maura Lodovici "Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa." *British Journal of Nutrition*, **2003**, 89, 581-587.

21) Roberto Andreozzi; Vincenzo Caprio; Raffaele Marotta "Oxidation of 3,4-dihydroxybenzoic acid by means of hydrogen peroxide in aqueous goethite slurry" *Water Research*, **2002**, 36, 2761-2768.

22) Rong Wei Teng; De Zu Wang; Yun Shan Wu; Yang Lu; Qi Tai Zheng; Chong Ren Yang "NMR assignments and single-crystal X-ray diffraction analysis of deoxyloganic acid" *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 92-96.

- 23) N. V. Konganko; Zh. N. Kashkan; E. V. Borisov; E. V. Batura "¹³C NMR spectra of β -sitosterol derivatives with oxidized rings A and B." *Chemistry of Natural Compounds*, **1999**, 35(6), 646-649.
- 24) Irene M. Villasenor; Jennifer Angelada; Arlyn P. Canlas; Deborah Echegoyen "Bioactivity Studies on β -sitosterol and its Glucoside." *Phytotherapy research*, **2002**, 16, 417-421.
- 25) M. Rowshanul Habib; Farjana Nikkon; Matiar Rahman; M. Ekramul Haque; M. Rezaul Karim "Isolation of Stigmasterol and β -sitosterol from Methanolic Extract of Root Bark of *Calotropis gigantea* (Linn)." *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2007**, 10(22), 4174-4176.
- 26) Seung-Lark Hwang; Ha-Na Kim; Hyun-Hee Jung; Ji-Eun Kim; Dong-Kyu Choi; Jong-Moon Hur; Jai- Youl Lee; Hebok Song; Kyung-Sil Song; Tae-Lin Huh "Beneficial effects of β -sitosterol on glucose and lipid metabolism in L6 myotube cells are mediated by AMP-activated protein kinase" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2008**, 377, 1253-1258.
- 27) Adrienne L. Davis; Ya Cai; Alan P. Davies; J. R. Lewis "¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols." *Magn. Reson. Chem.*, **1996**, 34, 887-890.
- 28) Ju Yeon Ban; So-Young Jeon; KiWhan Bae; Kyung-Sik Song; Yeon Hee Seong "Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation" *Life Sciences*,

2006, 79, 2251-2259.

29) Mouming Zhao; Bao Yang; Jinshui Wang; Baozhen Li; Yueming Jiang "Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities." *Food Chemistry*, 2006, 98, 539-544.

30) Se-Ra Won; Mi-Jung Hong; Young-Mu Kim; Chun Ying Li; Jang-Won Kim "Oleic acid: An efficient inhibitor of glucosyltransferase" *FEBS Letters*, 2007, 581, 4999-5002.

32) Ryeo Kyeong Ko; Nam Ho Lee "Isolation of a new Secolignan Compound from *Quercus glauca*" *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2008, 29(12), 2531-2532.

32) Nasim Sultana; Nam Ho Lee "New Phenylpropanoids from *Sasa quelpaertensis* Nakai with Tyrosinase inhibition Activities." *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2009, 30(8), 1729-1732.

33) Ryeo Kyeong Ko; Sunjoo Lee; Chang-Gu Hyun, Nam Ho Lee "New Dibenzofurans from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc" *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2009, 30(6), 1376-1378.

34) Jeong Mi Kim; Ryeo Kyeong Ko; Duk Sang Jung; Sang Suk Kim; Nam Ho Lee "Tyrosinase Inhibitory Constituents from the Stems of *Maackia fauriei*." *Phytother. Res.*, 2010, 24(1), 70-75.

35) Mahmud Tareq Hassan Khan; Muhammad; Iqbal Choudhary; Khalid Mohammed Khan; Mubeen Rani; Atta-ur-Rahman "Structure-activity relationships of tyrosinase inhibitory combinatorial library of 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazole analogues." *Bioorganic & Medicinal*

Chemistry, 2005, 13, 3385-3395.

36) Sunil K. Chattopadhyay; Satyanshu Kumar; Sarita Tripathi; Anil K. Gupta "High-performance liquid chromatographic method for identification and quantification of two isomeric coumarinolignoids-cleomiscosin A and cleomiscosin B-in extracts of *Cleome viscosa*." *Biomed. Chromatogr.*, 2007, 21, 1214-1220.

37) L. Y. Jiang; S. He; Y. J. Pan; C. R. Sun "Bioassay-guided isolation and EPR-assisted antioxidant evaluation of two valuable compounds from mango peels" *Food Chemistry*, 2010, 119, 1285-1292.

38) Keith P. Madden; Hitoshi Taniguchi "The role of the DMPO-hydrated electron spin adduct in DMPO-OH spin trapping" *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 30(12), 1374-1380.

39) Areum Daseul Kim; Kyoung Ah Kang; Rui Zhang; Chae Moon Lim; Youngheun Jee; Nam Ho Lee; Ho Jin You; Kyoung Soo Ko; Jin Won Hyun "Reactive Oxygen Species Scavenging Effects of Jeju Waters Containing Vanadium Components" *Cancer Prevention Research*, 2010, 15(2), 111-117.

40) 현재석; 강성명; 마힌다; 고원준; 양태석; 오명철; 오창경; 전유진; 김수현 "진굴 및 은주밀감 진피의 항산화 활성" *한국식품영양과학회지*, 2010, 39(1), 1-7.

41) 유익동; 기능성화장품 신소재 개발 연구동향. *보건산업기술동향*, 2005, 가을, 52-62.

42) 김정미; 솔비나무, 감태 등의 제주식물들로부터 기능성화장품 소재 개발 연구. *제주대학교 대학원*, 2009년도 박사학위 청구논문.

43) 고려경; 종가시나무, 조록나무 및 수련을 이용한 기능성 화장품 활성성분 규명. 제주대학교 대학원, 2007년도 석사학위 청구논문.

44) 김주희; 병솔꽃나무 가지로부터 엘라스타제 저해활성 및 DPPH 라디칼 소거 활성 성분 분리. 제주대학교 대학원, 2010년도 석사학위 청구논문.

