



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](#)

The logo of Jeju National University is a circular emblem. It features a stylized flame or leaf shape on the left, a large letter 'J' on the right, and the text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' around the top edge. Inside the 'J' is the text 'JEJU 1952'. Below the logo, the Korean text '제주대학교' is faintly visible.

碩士學位論文

합다리나무(*Meliosma oldhamii*)

가지로부터 향산화 및 주름개선 성분 분리

濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

邊 詳 熹

2012年 2月

합다리나무(*Meliosma oldhamii*) 가지로부터  
항산화 및 주름개선 성분 분리

指導教授 李 南 昊

邊 詳 熹

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2012年 2月

邊詳熹의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

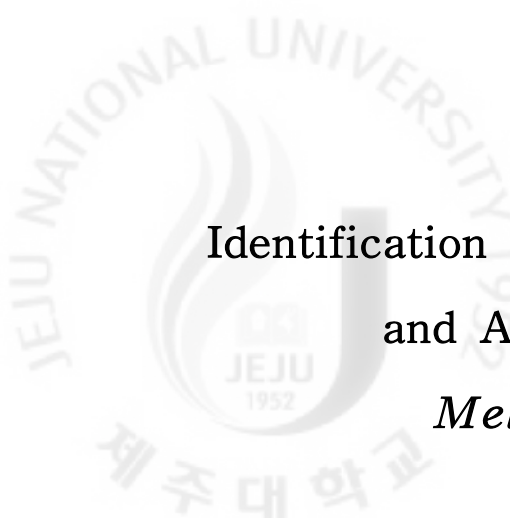
委 員

委 員

姜昌禧 印  
鄭真煥 印  
李南昊 印

濟州大學校 教育大學院

2012年 2月



Identification of Constituents with Anti-oxidative  
and Anti-wrinkle Properties from  
*Meliosma oldhamii* Branches

Sang-Hee Byeon

(Supervised by professor Nam Ho Lee)

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

2011. 12

This thesis has been examined and approved.

Chang Hee Kang

Duk Sang Jung

Nam Ho Lee


(Name and Signature)

MAJOR IN EDUCATION OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 국문초록

제주도에 자생하는 식물을 이용하여 천연 항산화성분과 기능성화장품 소재 개발 가능성을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 소재 개발에 대한 연구는 제주 자생식물 중 합다리나무(*Meliosma oldhamii*)의 가지 부분을 이용하여 화합물을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 항산화와 주름개선 기능성화장품으로 활용 가능한 생리활성을 검색하는 것으로 진행되었다.

합다리나무(가지) 70% EtOH 추출물을 *n*-Hexane층, ethyl acetate층, *n*-Butanol층 및 water층으로 용매 분획하고, 분획물에 대하여 DPPH radical scavenging test와 elastase inhibition test를 실시하였다. 그 결과 DPPH radical scavenging test에서 합다리나무(가지)의 추출물과 각각의 용매분획 물 중 ethyl acetate 층과 *n*-Butanol 층에서 radical scavenging에 대조군인 Vitamin C만큼의 강력한 활성을 나타내었다. Elastase inhibition test에서는 추출물과 모든 분획층에서 elastase inhibition에 대해 대조군인 ursolic acid와 비교 하였을 때 활성이 있음을 확인 할 수 있었다. 이러한 활성 결과에 따라 EtOAc 분획층에 들어있는 화합물을 규명하고자 실험을 진행하였다. EtOAc 분획층을 가지고 VLC(Vacuum Liquid Chromatography)를 사용하여 극성에 따라 분획층을 좀 더 세분화 시키고 normal-phase silica gel과 sephadex LH-20을 이용하여 column chromatography를 실시하여 화합물들은 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR spectrum을 이용하여 확인하였고 그 자료를 토대로 문헌과 비교한 결과; betulin, 3 $\beta$ -acetoxyolean-12-en-28-acid, 3 $\beta$ -acetoxyolean-12-en-28-aldehyde, 3 $\beta$ -acetoxy-28-hydroxyolean-12-ene, lupeol, daucosterol, oleanolic acid, maslinic acid, catechin, *epi*-catechin, vanillic acid의 11개의 화합물 구조를 동정하였다. 이 화합물들은 합다리 나무 가지에서 처음 분리된 화합물이다. Elastase 저해활성 실험에서 대조군인 ursolic acid의 IC<sub>50</sub>값인 28.5  $\mu$ g/mL와 비교했을 때 betulin의 IC<sub>50</sub>값은 39.3  $\mu$ g/mL, oleanolic acid의 IC<sub>50</sub>값은 39.5  $\mu$ g/mL으로 elastase inhibition에서 매우 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다.

The logo of Jeju National University is a circular emblem. It features a stylized flame or torch in the center, with the text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY' around the top and 'JEJU 1952' in the middle. Below the emblem, the Korean text '제주대학교' is written in a curved path.

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

## 목차

국문초록 .....	i
List of Tables .....	v
List of Figures .....	vi
List of Abbreviations .....	viii
I. 서론 .....	1
1. 기능성화장품과 천연소재 개발 .....	1
2. 피부의 구조와 주름형성 .....	3
3. 항산화제와 주름개선제 .....	4
II. 재료 및 실험방법 .....	7
1. 시약 및 기기 .....	7
2. 재료 .....	8
3. 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	10
3-1. 합다리 나무 가지의 70% EtOH 추출물 및 용매 분획 .....	10
3-2. VLC에 의한 과정(제1차) .....	11
3-3. VLC를 수행한 분획물에서 화합물 1, 7, 9, 11분리 과정 .....	11
3-4. VLC에 의한 분리과정(제2차) .....	12
3-5. VLC를 수행한 분획물에서 화합물 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 13 분리과정 .....	13
4. 활성검색 .....	15
4-1. DPPH radical scavenging test .....	15
4-2. Elastase inhibition test .....	15
III. 결과 및 고찰 .....	17
1. 분리된 화합물의 구조 동정 .....	17
1-1. Compound 1의 구조 동정 .....	17
1-2. Compound 2의 구조 동정 .....	21




1-3. Compound 3의 구조 동정 .....	25
1-4. Compound 4의 구조 동정 .....	29
1-5. Compound 5의 구조 동정 .....	33
1-6. Compound 6의 구조 동정 .....	37
1-7. Compound 7의 구조 동정 .....	41
1-8. Compound 8의 구조 동정 .....	45
1-9. Compound 9의 구조 동정 .....	49
1-10. Compound 10의 구조 동정 .....	52
1-11. Compound 11의 구조 동정 .....	55
2. 합다리나무(가지)에 대한 활성실험 결과 .....	58
2-1. DPPH radical scavenging activities .....	58
2-1-1. 추출물과 각 용매 분획들에 대한 DPPH 라디칼 저해 활성 .....	58
2-1-2. 분리된 화합물에 대한 DPPH 라디칼 저해 활성 .....	59
2-2. Elastase inhibition activities .....	60
2-2-1. 추출물과 각 용매 분획물에 대한 Elastase 저해 활성 .....	60
2-2-2. 분리된 화합물에 대한 Elastase 저해 활성 .....	61
IV. 결론 .....	63
V. 참고문헌 .....	67





## List of Tables

Table 1. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>1</b> .....	19
Table 2. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>2</b> .....	23
Table 3. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>3</b> .....	27
Table 4. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>4</b> .....	31
Table 5. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>5</b> .....	35
Table 6. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>6</b> .....	39
Table 7. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>7</b> .....	43
Table 8. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>8</b> .....	47
Table 9. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>9</b> .....	50
Table 10. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>10</b> .....	53
Table 11. $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>11</b> .....	56
Table 12. DPPH radical scavenging inhibition and $\text{SC}_{50}$ values of extract and fraction .....	58
Table 13. DPPH radical scavenging inhibition in each concentration and $\text{SC}_{50}$ values of isolated compound .....	59
Table 14. Elastase inhibition and $\text{IC}_{50}$ values of extract and fraction .....	60
Table 15. Elastase inhibition inhibition in each concentration and $\text{IC}_{50}$ values of isolated compound .....	61



## List of Figures

Figure 1. Structure of anti-oxidant ingredients .....	5
Figure 2. Structure of anti-wrinkle ingredients .....	6
Figure 3. Picture of <i>M. oldhamii</i> .....	9
Figure 4. Scheme of fractionation process .....	10
Figure 5. Diagram of isolation process of compound <b>1, 7, 9, 11</b> .....	12
Figure 6. Diagram of isolation process of compound 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11 .....	14
Figure 7. Chemical structure of compound <b>1</b> .....	18
Figure 8. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	20
Figure 9. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	20
Figure 10. Chemical structure of compound <b>2</b> .....	22
Figure 11. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	24
Figure 12. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	24
Figure 13. Chemical structure of compound <b>3</b> .....	26
Figure 14. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	28
Figure 15. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	28
Figure 16. Chemical structure of compound <b>4</b> .....	30
Figure 17. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	32
Figure 18. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>4</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	32
Figure 19. Chemical structure of compound <b>5</b> .....	34
Figure 20. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>5</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	36
Figure 21. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>5</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	36
Figure 22. Chemical structure of compound <b>6</b> .....	38
Figure 23. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>6</b> pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> .....	40
Figure 24. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>6</b> pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> .....	40

Figure 25. Chemical structure of compound <b>7</b> .....	42
Figure 26. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>7</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	44
Figure 27. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>7</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	44
Figure 28. Chemical structure of compound <b>8</b> .....	46
Figure 29. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>8</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	48
Figure 30. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>8</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	48
Figure 31. Chemical structure of compound <b>9</b> .....	50
Figure 32. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>9</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	51
Figure 33. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>9</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	51
Figure 34. Chemical structure of compound <b>10</b> .....	53
Figure 35. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>10</b> in pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> .....	54
Figure 36. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>10</b> in pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> .....	54
Figure 37. Chemical structure of compound <b>11</b> .....	56
Figure 38. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>11</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	57
Figure 39. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>11</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	57
Figure 40. DPPH radical scavenging inhibiton activities of extract and fractions .....	59
Figure 41. DPPH radical scavenging inhibiton activities of isolated compounds .....	60
Figure 42. Elastase inhibiton activities of extract and fractions .....	61
Figure 43. Elastase inhibiton activities of isolated compounds .....	62
Figure 44. Isolated compounds .....	65
Figure 45. Isolated compounds .....	66

## List of Abbreviation

<i>M. oldhamii</i>	<i>Meliosma oldhamii</i>
CC	column chromatography
CD <sub>3</sub> OD	methanol- <i>d</i> 4
CDCl <sub>3</sub>	chloroform- <i>d</i>
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
MeOH	methanol
CHCl <sub>3</sub>	chloroform
EtOH	ethanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
EtOAc	ethyl acetate
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
Fr.(fr.)	fraction
VLC	vacuum liquid chromatography
np	normal-phase silica gel
	normal-phase silica gel CC
se	Sephadex LH-20
	Sephadex LH-20 CC
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
s	singlet
d	doublet
t	triplet
dd	doublet of doublet
m	multiplet
<i>J</i>	coupling constant (Hz)
int	integration
SC <sub>50</sub>	Scavenging concentration of 50%
IC <sub>50</sub>	inhibition concentration of 50%

# I. 서 론

## 1. 기능성화장품과 천연소재개발

"화장품"이라 함은 인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다. 다만, 「약사법」 제2조제4호의 의약품에 해당하는 물품은 제외된다. 즉, 화장품은 의약품과는 달리 건강한 불특정 다수가 사용하는 물품이기 때문에 인체에 많은 영향을 미치는 것을 인정하지 않고 있다.<sup>1)</sup>

점점 고령화가 되어가는 사회구조의 변화에 의해 외모가 경쟁력이 되어가면서 보다 젊고 건강한 외모를 갖고 싶어 하는 소비자의 욕구에 의해 보다 지속적이고 효과적인 화장품에 대한 소비자의 선호도가 강해짐에 따라 화장품은 단순히 보습, 피부보호를 하기 위한 제품이 아니라 피부의 질감과 색이 개선될 수 있는 미백, 주름개선, 독소제거 등의 약리적 효능, 효과가 목적이 되는 기능성화장품에 대한 소비자의 선호도가 증가하면서, 기능성화장품 시장이 급격히 성장하고 있다.

2010년 개정된 화장품법 제2조 2항에서 기능성화장품에 대해 다음과 같이 정의하고 있다.

가. 피부의 미백에 도움을 주는 제품

나. 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품

다. 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품

기능성 화장품은 화장품과 의약품의 중간적인 성격을 갖는 제품이라 볼 수 있다. 일반 화장품이 안정성을 강조한 제품임에 비해 기능성 화장품은 안정성 외에 특히 약리적 효능, 효과를 강조한 제품이다. 기능성 화장품은 영어로 “코스메디

컬(cosmedical)" 또는 "코스메슈티컬(cosmeceutical)"등으로 불려 지기도 한다. 코스메디컬이란 영어로 화장품을 의미하는 코스메틱(cosmetic)과 의료를 의미하는 메디컬(medical)이 합해져 만들어진 용어이다.<sup>2)</sup>

즉 기능성 화장품이란 이전의 단순한 피부 보습, 피부 보호의 차원에서 벗어나 '피부의 주름', '기미 · 주근깨', '죽은 각질', '피부건조' 등과 같은 문제점들을 적극적으로 해결하는데 도움을 주는 화장품을 말한다. 넓은 의미에서는 피부질환이 없는 건강한 사람이 피부의 상태를 건강하게 유지시켜 피부의 이상 및 노화를 지연시키거나 개선할 목적으로 사용하는 물품을 말한다.<sup>3)</sup>

식품의약품안전청의 발표에 따르면 '10년 국내 화장품 생산실적을 분석한 결과, 화장품 생산실적이 6조146억원으로 '09년에 비하여 16.4% 늘었으며, 수출은 5억9700만달러(약 6,901억원)로 전년대비 43.5% 증가하였다고 밝혔다. 소비자 가격을 고려한 '10년 국내 화장품 시장규모는 13조 4,380억 원으로 전년대비 12.9% 증가한 것으로 나타났으며, 세계 화장품시장 점유율은 2.1%로 세계12위를 기록하였다. 웰빙(Well-being)시대로 접어들면서 기초화장품 뿐만 아니라 추가적으로 미백, 주름개선, 자외선차단제품 등 기능성화장품에 대한 구매자의 수요가 증가하고 그에 따라 기능성화장품 시장이 꾸준히 성장하고 있다. 기능성 화장품은 '10년도 국내 화장품시장의 25.3%(1조 5,186억원)을 차지하며, 전년대비 22.5% 증가하였다.<sup>4)</sup>

기능성 화장품은 막대한 시간과 자금이 투자되는 의약품보다 상대적으로 적은 비용과 시간을 투자하여 세계적으로 경쟁이 가능한 신제품 개발이 가능하고 시장 성장성과 고부가가치 창출에도 상당히 긍정적인 첨단 미래형 산업으로 인식되고 있다. 소비자들은 기능성화장품의 일시적 개선효과 보다는 가시적이고, 지속적인 미백 또는 주름개선 등 실질적인 효과를 요구하고 있으나, 현재까지 개발된 국내의 기능성화장품들은 이를 충분히 만족시켜주지 못하고 있다. 이는 식약청에서 고시한 기능성화장품 원료 pool이 많지 않아 차별성에 한계가 있고 화학적인 원료의 부작용들이 보고되고 있기 때문이다. 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 식물체 유래 천연물에서 기능성 화장품의 원료를 탐색하는 연구가 이루어지고 있다.<sup>5)</sup>

제주도는 동아시아 대륙 연변부에 위치하고 있으며 신생대 제 4기 화산활동으

로 형성된 화산섬으로, 북상하는 쿠로시오 해류의 직접적인 영향을 받는 지역이다. 또한 한라산을 중심으로 사면이 바다로 둘러싸여 있어 한반도와는 구별과는 독특한 환경적 특성을 보여주고 있다. 이러한 특색을 갖는 제주도는 유네스코지정 '생물권보존지역'으로 세계적으로 가치 있는 생물자원의 보고로 알려져 있으며, 식물자원 2,100여종(약용식물 338종), 해양자원 2,000여종, 동물·곤충 3,700여종 등 7,800여종 이상의 생물종다양성이 분포하고 있다.<sup>6)</sup>

따라서 이러한 생물종다양성에 의해 제주도는 천연자원으로부터 기능성 화장품 원료의 탐색할 수 있는 최적의 선택받은 지역이다.

따라서 본 연구는 제주도에 자생하는 식물을 분리·정제하여 인체에 부작용이 적고, 안정성이 높은 생리활성물질을 탐색하는데 목적이 있다. 제주도에 자생하는 나도밤나무과의 합다리 나무에서 현재까지 분리 보고된 활성성분은 없으며, 이에 본 연구에서는 합다리나무 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 합다리나무 가지로부터 분리된 화합물들의 구조를 동정하였다. 또한 지금까지 합다리나무에 대해서는 항산화, 주름 개선 효과에 대한 내용은 보고된 바 없어 다음과 같은 실험을 실시하여 화장품 산업에서의 응용 시 가능성을 가지는 천연소재로서의 역할을 검토하였다.

## 2. 피부의 구조와 주름형성

피부는 크게 표피, 진피, 피하조직으로 구분된다. 진피에는 혈관, 림프시스템, 모공, 섬유아세포 등 피부의 중요한 부속기들이 있고 표피 두께의 15-40배에 해당되는 두꺼운 층으로 피부의 대부분을 차지한다. 진피조직에는 가교섬유인 콜라겐(collagen)과 탄력섬유인 엘라스틴(elastin)으로 이루어져 있는데 이들은 섬유아세포(fibroblast)에서 합성된다. 콜라겐은 실타래가 나선을 형성하면서 감겨 있는 모양의 긴 섬유이며 몸의 지탱, 결합, 경계면을 만드는데 중요한 역할을 한다. 엘라스틴은 신축성(elasticity)이 콜라겐 보다 강해서 붙여진 이름이다. 콜라겐은 피부에 가해지는 압력이나 외부의 힘에 대해 저항하는 역할을 한다. 반면에 엘라스틴은 용수철처럼 피부의 탄력성을 유지하는 역할을 한다. 콜라겐과 엘라스틴이 그물망 구조를 형성하면서 피부의 탄력성을 유지시켜 준다.

피부가 노화됨에 따라 나타나는 징후 중 가장 눈에 띄는 것이 주름인데 이마, 눈 주위, 목덜미, 손발 등의 신체 각 부위에 생기며 나이가 들어감에 따라 그 수나 깊이, 범위가 증가해 간다. 노화는 다음과 같이 내인성 노화와 외인성 노화로 구분되는데 내인성 노화는 나이를 먹으면서 피부의 구조와 생리적 기능이 계속적인 감퇴를 일으키는 것이다. 외적 요인에 의한 노화는 장기간에 걸친 자외선의 노출로 인한 광노화이외에도 바람, 열, 담배 등이 원인으로 알려져 있고, 내인성 노화를 촉진시키거나 그 자체도 피부노화를 유발한다.<sup>7)</sup>

특히 UV B와 같은 자외선은 피부조직 내 활성산소를 형성시켜, 피부에 존재하는 항산화 물질을 감소시킴으로써 산화적 스트레스를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 이러한 과정에서 생성된 활성산소종들은 멜라닌 생성을 촉진하고 교원섬유와 탄력섬유의 합성을 감소시켜 주름을 형성시키는 것으로 알려져 있으며, 각질층의 수분 함량을 감소시켜 DNA 조직에 손상을 야기 하며, 체내의 단백질, 지방, 세포막, 핵산 등을 산화시켜 피부 노화를 더욱 더 촉진시키는 것으로 보고되고 있다.<sup>8)</sup>

또한 최근의 연구에서 섬유아세포에서 생성되는 elastase가 피부탄성섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며 이러한 elastase의 활성증가는 피부의 엘라스틴과 콜라겐을 감소시킴으로써 피부 주름 형성에 기여한다고 알려져 있다. 더군다나 자외선 조사 후 elastase의 활성이 증가하기 때문에 elastase의 활성 변화는 자외선에 의한 피부 탄성도의 감소 및 주름 생성의 주요원인으로 생각된다.<sup>9)</sup> 따라서 항산화제와 elastase의 억제제 소재 개발하면 주름개선에 도움이 될 것이다.

### 3. 항산화제와 주름개선제

합성항산화제인 BHT와 BHA 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 지금까지 널리 사용되어 왔으나 체내 흡수 물질의 독성화, 발암 가능성 등의 안정성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 허용대상 식품이나 안전성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 허용대상 식품이나 사용량이 법적으로 엄격히 규제되어 있다.<sup>10)</sup>





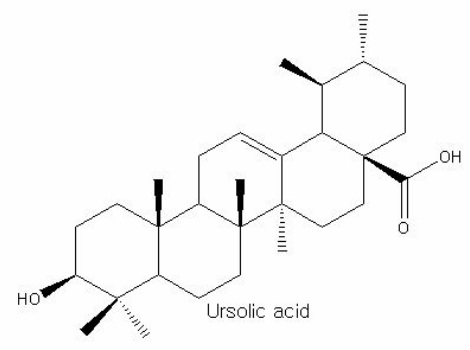
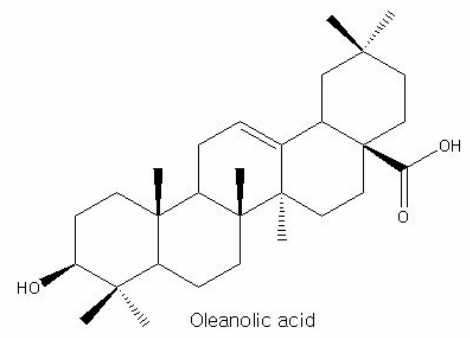
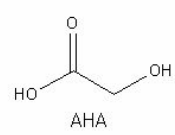
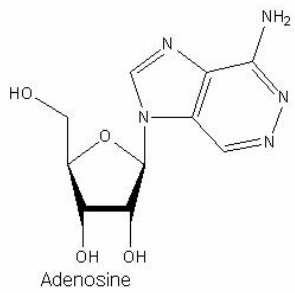
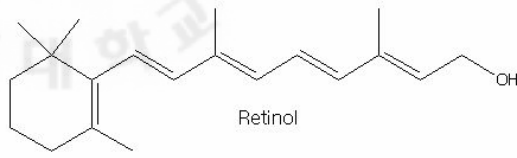
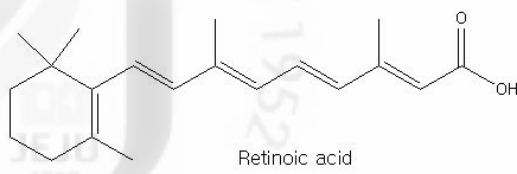


Figure 2. Structure of anti-wrinkle ingredients

## II. 재료 및 실험방법

### 1. 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  $\mu\text{m}$ , Sigma Co.)이 사용되었고, 순상 Silica gel column chromatography에는 silica gel(95-110  $\mu\text{m}$ , Sigma Co.)이 사용되었다. 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20(0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리 과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merk Co.)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV/Vis Lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. visualizing agent로는 KMnO<sub>4</sub> 수용액 (3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25% NaOH), 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다. 구조 분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM ECX-400(JEOL Co. 400MHz)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 Merk의 NMR 전용용매로서, CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, pyridine-d<sub>5</sub>을 사용하였다. 추출물된 분획물, 분리된 화합물의 생리활성 연구에서 흡광도 측정에는 thermo electron-labsystems multiskan EX(ELISA reader)를 이용하였다.

## 2. 재료

합다리나무(*Meliosma oldhamii*)는 쌍떡잎식물 무환자나무목 나도밤나무과(Sabiaceae)의 낙엽교목이다. 우리나라 중부 이남지역에서 자생하는데 한국이 원산지로 국외로는 대만, 일본, 중국 등지에도 분포한다. 추위나 대기 오염에 약하고 건조한 곳에서도 잘 자라지 못한다. 그리고 산기슭 양지쪽에서 잘 자라는데 제주도는 낙엽수림대의 숲 속에 자생한다. 나무는 회갈색의 껍질에 별로 굵지 않고 높이가 10 m 정도로 키만 경충 커 보여서 얼핏 보아 학의 다리는 연상시키기 때문에 학다리로 부르다가 합다리나무라는 이름이 생겼다. 어긋나게 달리는 잎은 홀수 1회 우상복엽(작은 잎이 홀수로 달려 1회 분화한 깃털 모양의 겹잎)으로 9~15장의 작은 잎으로 이루어져 있다. 작은 잎은 긴 타원 모양으로 가장자리에 얇은 톱니가 드문드문 있으며 양면 특히 뒷면 맥 위에 털이 많이 난다. 개화기는 6-7월로 꽃은 흰색이고 가지 끝의 갈라진 작은 가지에 총상으로 달려 원추화서를 이룬다. 꽃잎은 꽃받침의 3배 길이이고 둥근 모양이다. 결실기는 9-10월로 열매는 핵과로 둥근 모양이고 지름 7 mm이며 적색으로 익는다. 새순은 나물로 먹으며, 토목건축이나 내장공사의 기재, 인위적인 방법으로 숲을 조성하는 조림, 숯이나 땀나무로 쓰이는 신탄재, 목재 등으로 쓰인다.

현재까지 제주에서 자생하고 있는 합다리 나무에서 분리 보고된 활성성분은 없으며, 이에 본 연구에서는 제주에서 자생하고 있는 합다리 나무 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 합다리 나무 가지로부터 분리된 화합물들의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화 활성 및 주름개선 효과를 검색하여 천연 항산화제 및 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.



Figure 3. Picture of *M. oldhamii*

### 3. 시료의 추출 및 유효성분 분리

#### 3-1. 합다리나무 가지의 70% EtOH 추출물 및 용매 분획

제주도 한라수목원에서 자생하는 합다리나무(179)를 2009년 9월에 채집하여 부위별로 세분시킨 후 음지에서 자연건조 시켰다. 세분한 가지를 잘게 분쇄하여 얻은 시료 1 kg을 70% EtOH을 이용해 동일한 조건으로 3회 반복 추출하였다. 감압여과 장치를 통해 추출된 여액을 감압 농축하여 합다리나무의 70% EtOH 추출물 총 931g을 얻었다 이 중 57.1g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 분획을 실시하였는데, 각 용매마다 1 L씩 3번 반복 실시하여 *n*-Hexane층, EtOAc(ethyl acetate)층, *n*-butanol층 및 water층 총 4개의 1차 용매 분획층을 얻었다(Figure 4).

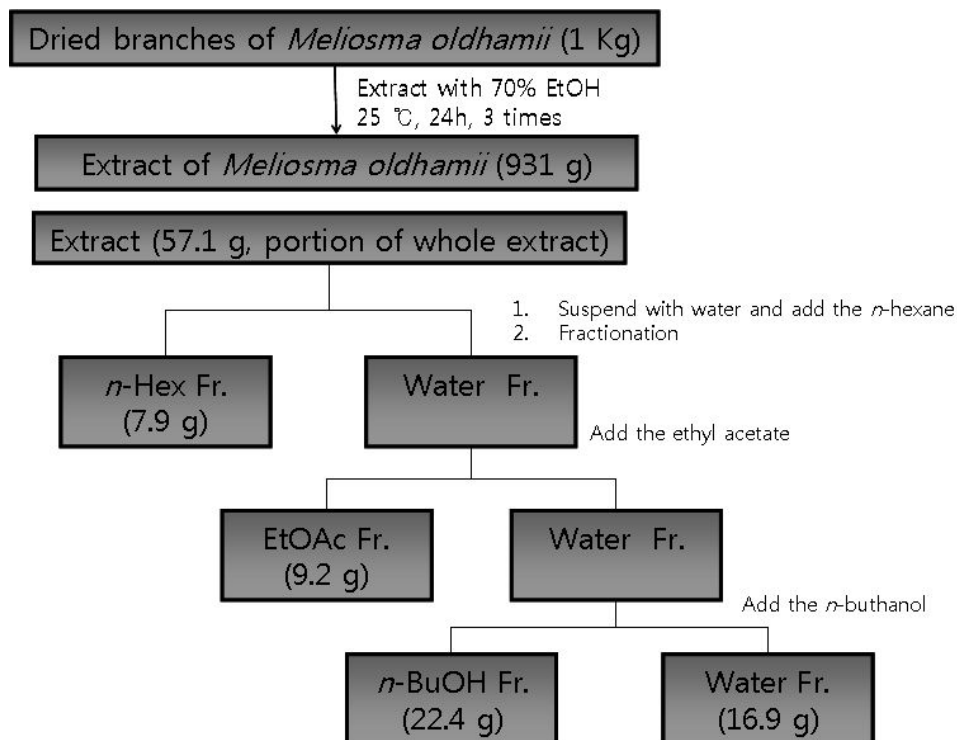


Figure 4. Scheme of fractionation process

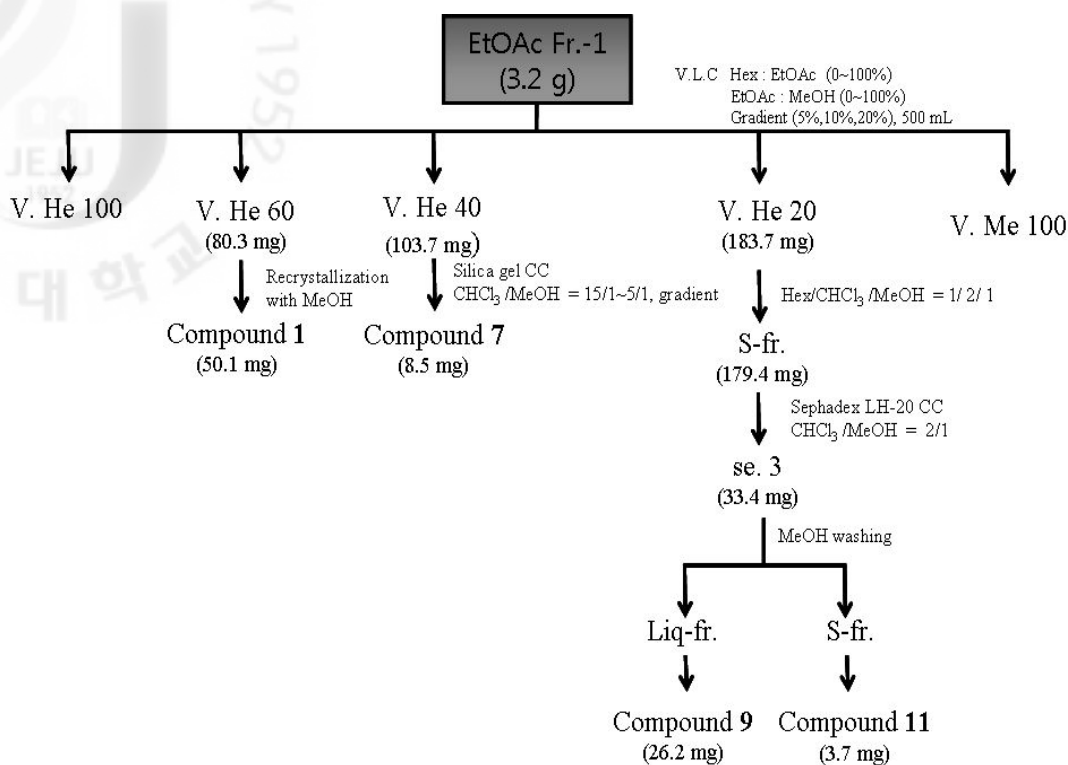


### 3-2. VLC에 의한 분리과정(제1차)

용매 분획하여 얻어진 EtOAc 분획물 3.0 g을 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 감압 액체 크로마토그래피(VLC)를 실시하였다. 사용된 용출액은 *n*-Hexane/ EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~100%) gradient 용매 (500 mL) 조건을 이용하였다. 이 과정에서 총 23개의 분획물을 얻었다(Figure 5).

### 3-3. VLC를 수행한 분획물에서 화합물 1, 7, 9, 11, 분리과정

3-2에서 얻어진 23개의 분획물 중 V.He60(80.3 mg)이 감압농축한 후 methanol을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial 바닥에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 methanol로 여러 차례 재결정하여 50.1mg의 compound 1을 얻었다. V.He40(103.7 mg)을 CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1/15~1/3 gradient의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 분리한 V.He40-np.8(8.5 mg)에서 compound 7을 얻었다. V.He40(103.7mg)을 CH<sub>3</sub>Cl/MeOH = 15/1~3/1 gradient의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 분리한 후 V.He40-np.8(8.3 mg)에서 compound 7을 얻었다. V.He20(183.7mg)을 Hex/CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1/2/1의 혼합용매에 녹은 상층액 Liq-fr.과 녹지 않고 가라앉아있는 S-fr.을 나눈 후에 S-fr.(179.4 mg)을 CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1의 용매조건으로 sephadex LH-20 CC를 수행하여 분리한 V.He20-se.3(33.4 mg)을 다시 Methanol에 녹은 상층액 Liq-fr.(26.2 mg)과 녹지 않고 가라앉아있는 S-fr.(3.7 mg)에서 각각 compound 9와 compound 11을 얻었다(Figure 5).



\* Condition of eluants

V.He60 : *n*-Hex/EtOAc = 60/40  
 V.He40 : *n*-Hex/EtOAc = 40/60  
 V.He20 : *n*-Hex/EtOAc = 20/80

Figure 5. Diagram of isolation process of compound 1, 7, 9, 11

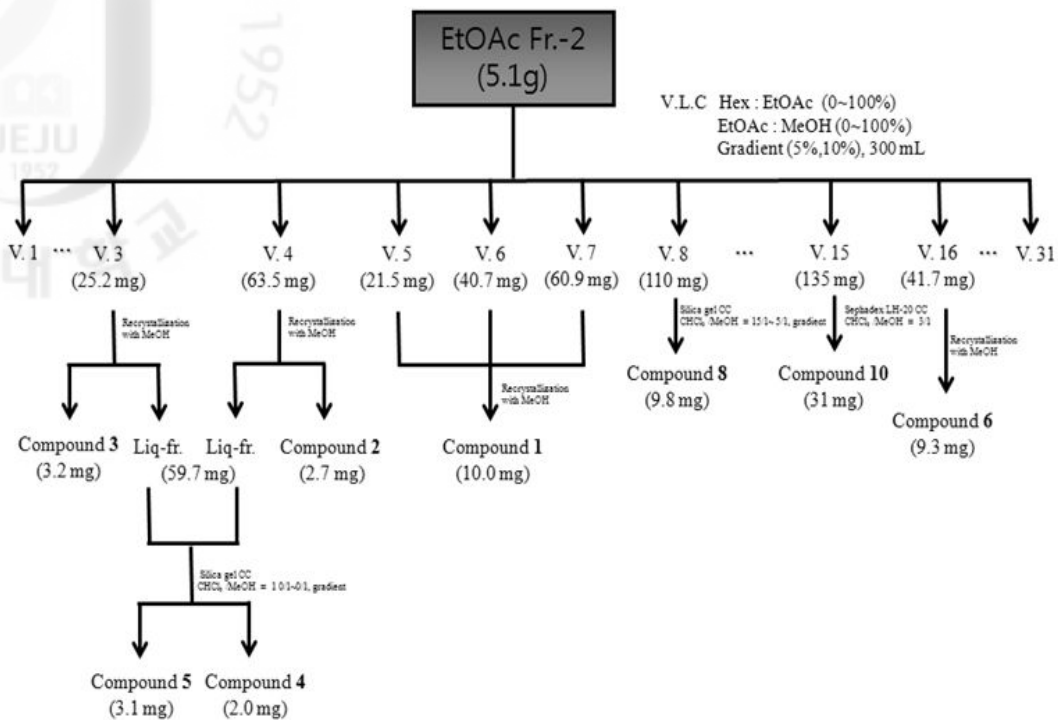
#### 3-4. VLC에 의한 분리과정(제2차)

용매 분획하여 얻어진 EtOAc 분획물 5.1 g을 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 감압 액체 크로마토그래피(VLC)를 실시하였다. 사용된 용출액은 *n*-Hexane/ EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~100%) gradient 용매(300ml) 조건을 이용하였다. 이 과정에서 총 31개의 분획물을 얻었다(Figure 6).



### 3-5. VLC를 수행한 분획물에서 화합물 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 13분리과정

3-4에서 얻어진 31개의 분획물 중 V.3(25.2 mg)과 V.4(63.5 mg)을 감압농축한 후 methanol을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial 바닥에 가라앉는 crystal이 생성되었다. 이를 methanol로 여러 차례 재결정하여 각각 compound 3(3.2 mg)과 compound 2(2.7 mg)을 얻었다. V.3과 V.4를 재결정 시킨 후에 남은 상층액을 모아서  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10/1 \sim 1/0$  gradient의 용매조건으로 silica gel CC을 수행하여 분리하였다. 그 중 Liq-fr의 np.8(3.1 mg)과 np.9(2.0 mg)에서 각각 compound 5과 compound 4을 얻었다. V.5(21.5 mg), V.6(40.7 mg), V.7(60.9 mg)은 TLC상에서 유사한 spot 패턴을 보여 이 세 개의 분획물을 모아서 감압농축 후 methanol을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial 바닥에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 methanol로 여러 차례 재결정하여 10.0 mg의 compound 1을 얻었다. V.8(110 mg)을  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 15/1 \sim 5/1$  gradient의 용매조건으로 silica gel CC을 수행하여 분리한 V.8-np.3(9.8mg)에서 compound 8을 얻었다. V.15(135 mg)을  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 3/1$  gradient의 용매조건으로 Sephadex LH-20을 사용하여 분획하였고, 그 중 분획물 V.15-se.3(31 mg)에서 compound 10을 얻었다. V.16(41.7 mg)이 감압농축한 후 Methanol을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial 바닥에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 methanol로 여러 차례 재결정하여 9.3 mg의 compound 6을 얻었다(Figure 6).



\* Condition of eluants

V.3 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 90/10	V.7 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 70/30
V.4 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 85/15	V.8 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 65/35
V.5 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 80/20	V.15 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 30/70
V.6 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 75/25	V.16 : <i>n</i> -Hex/EtOAc = 25/75

Figure 6. Diagram of isolation process of compound 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11

## 4. 활성 검색

### 4-1. DPPH radical scavenging test

DPPH radical 소거 활성 실험은 다음과 같은 방법으로 실행하였다. 실험에는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 사용하였고, DPPH를 용해시키는 용매는 EtOH를 사용하였으며, sample 용매는 DMSO(dimethylsulfoxide)와 methanol을 1대 1의 부피로 섞어서 사용하였다.

실험 방법은 96 well plate를 사용하여 sample 20 $\mu$ L(1.0 mg/mL, stock), 0.2 mM DPPH 180  $\mu$ L 넣고, 최종부피를 200  $\mu$ L로 맞춘다. 상온(25 $^{\circ}$ C)에서 10분간 반응시킨 후, 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능력은 다음의 식에 의해 %로 계산되었으며, 각 시료의 SC<sub>50</sub>을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 vitamin C(ascorbic acid, 1 mg/mL, stock)을 사용하였다.

Radical scavenging effect(%)

$$= [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

$A_{\text{control}}$  : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 515 nm에서 sample의 흡광도

### 4-2. Elastase Inhibition test

Elastase Inhibition test는 다음과 같은 방법으로 실행하였다. Buffer는 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)을 사용하였고, 기질로는 SANA(N-succ(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide)을 10 mM 농도로 사용하였다. 실험에 사용된 효소는 돼지췌장에서 채취된 elastase(porcine pancreatic elastase, PPE)(1

mg/mL)이며, 용매는 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)을 사용하였다.

실험방법은 다음과 같다. 96well plate에 1대1의 부피로 섞은 DMSO (dimethylsulfoxide)와 methanol 혼합용액을 용매로 하여, 여러 농도로 제조한 sample 20  $\mu$ L를 넣은 후, SANA 7  $\mu$ L와 buffer 123  $\mu$ L의 혼합액(total 130  $\mu$ L), elastase 13  $\mu$ L와 buffer 37  $\mu$ L의 혼합액(total 50  $\mu$ L)을 넣고 25°C에서 15분간 반응시켜, 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC<sub>50</sub>을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 oleanolic acid(1 mg/mL, stock)를 사용하였다.

Elastase inhibition activity(%)

$$= [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{c-blank}}) ] \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  : 410 nm에서 sample와 반응용액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 410 nm에서 sample의 흡광도

$A_{\text{control}}$  : 410 nm에서 반응용액의 흡광도

$A_{\text{c-blank}}$  : 410 nm에서 sample과 elastase를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 분리된 화합물의 구조 동정

##### 1-1. Compound 1의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 5). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.He60(*n*-Hex/EtOAc = 60/40, 80.3 mg)을 감압농축을 시킨 후 methanol을 첨가하여 실온에서 장시간 방치하였더니 methanol이 증발하면서 재결정이 일어나 white powder가 생성되었다. 상층액과 powder를 따로 구분하여 나누었고, 구분된 powder를 Methanol을 이용하여 여러 번 washing 하였다. 이러한 재결정 법을 통해 분획물 V.He powder Fr.에서 compound 1(50.1 mg)를 얻었다.

Compound 1의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz)을 통하여 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서는 대부분의 peak가  $\delta$  0.75, 0.82, 0.96, 0.97, 1.01 에 분포하였으며 포화 탄화수소의  $\text{sp}^3$  혼성화에 관여하는 5개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였으며,  $\delta$  1.67(3H, s)의 signal로 보아  $\text{sp}^2$  혼성 carbon 옆에 붙어 있는 tertiary methyl기로 총 6개의 methyl기가 있음을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서 carbon signal이 30개가 있음을 알 수 있었다. 그리고  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $^1\text{H-NMR}$  data와 마찬가지로 대부분의 peak가  $\delta$  14.9, 15.5, 16.1, 16.3, 28.1 (C-27, 24, 26, 25, 23)에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 혼성 탄소로 5개의 tertiary methyl기가 있음을 예상할 수 있었으며,  $\delta$  19.2(C-30)의 signal은  $\text{sp}^2$  혼성 carbon 옆에 붙어 있는 tertiary methyl로 총 6개의 methyl기가 있음을 예상할 수 있다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  4.61(1H, m, H-29), 4.58(1H, m, H-29) signal은 olefinic proton으로  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  150.6(C-20), 109.9(C-29)의 2개의 불포화된  $\text{sp}^2$  혼성의 olefinic carbon을 보임으로 예상하였다. C-28의 chemical shift는 다르

지만 이러한 NMR data로 미루어 보아 lupeol과 유사한 skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상되었다.

$^1\text{H-NMR}$  data에서 나타나는  $\delta$  3.81(1H, d,  $J = 10.7$ , H-28), 3.34(1H, d,  $J = 10.7$ , H-28) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 수소인 oxygenated proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도 마찬가지로  $\delta$  109.9(C-29) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 oxygenated carbon 으로 예상하였고 적어도 하나 이상의 hydroxyl기가 있음을 예상할 수 있었다.

비교적 난해한  $^1\text{H-NMR}$  data로 인해  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의존하여 문헌<sup>13)</sup>과의 대조 과정을 거쳐 compound 1을 Betulin(3, 28-dihydroxylup-20(29)-ene)로 동정하였다(Figure 7).

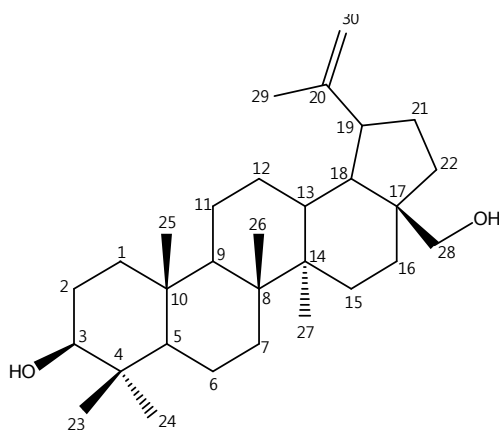


Figure 7. Chemical structure of compound 1

Table 1. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR data of compound 1

Compound 1					
( <sup>1</sup> H-NMR : 400MHz in CDCl <sub>3</sub> , <sup>13</sup> C-NMR : 100MHz in CDCl <sub>3</sub> )					
position	δH (int, mult, <i>J</i> in Hz)	δ <sub>c</sub> (ppm)	position	δH (int, mult, <i>J</i> in Hz)	δ <sub>c</sub> (ppm)
1		38.8	16		29.9
2		27.5	17		47.9
3	3.20 (1H, dd, <i>J</i> = 11.2, 4.8)	79.1	18		48.9
4		39.0	19	2.41(1H, dt, <i>J</i> = 5.8, 10.7)	47.9
5		55.4	20		150.6
6		18.5	21		29.3
7		34.1	22		34.4
8		41.1	23	0.96(3H, s)	28.1
9		50.5	24	0.75(3H, s)	15.5
10		37.4	25	0.82(3H, s)	16.3
11		21.0	26	0.97(3H, s)	16.1
12		25.3	27	1.01(3H, s)	14.9
13		37.3	28	3.81(1H, d, <i>J</i> = 10.7)	60.7
				3.34(1H, d, <i>J</i> = 10.7)	
14		42.9	29	4.61(1H, m)	109.9
				4.58(1H, m)	
15		27.2	30	1.67(3H, s)	19.2

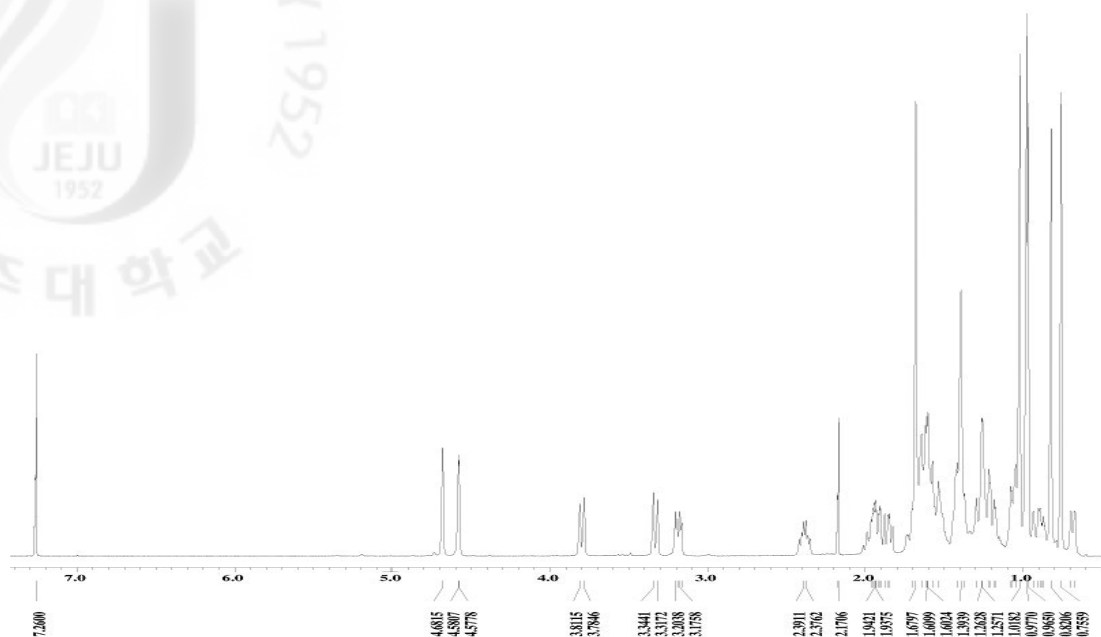


Figure 8.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$

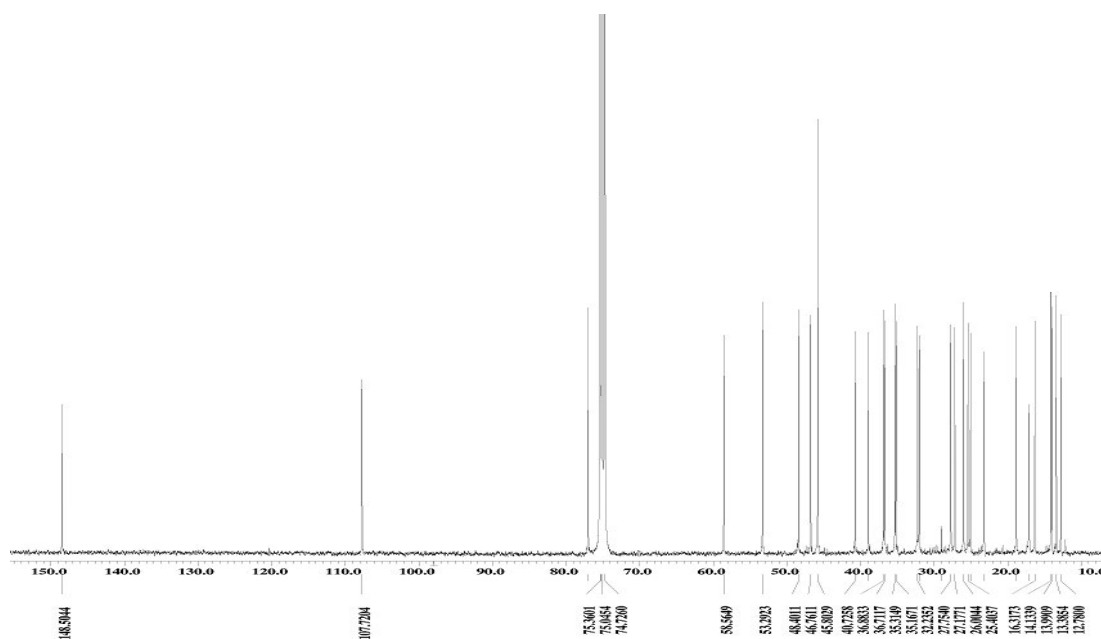


Figure 9.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$



## 1-2. Compound 2의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 6). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.4(*n*-Hex/EtOAc = 95/15, 63.5 mg)을 감압농축을 시킨 후 methanol을 첨가하여 실온에서 장시간 방치하였더니 methanol이 증발하면서 재결정이 일어나 색이 없는 바늘 모양의 crystal이 생성되었다. 상층액과 결정을 따로 구분하여 나누었고, 구분된 결정을 methanol을 이용하여 여러 번 washing 하였다. 이러한 재결정 법을 통해 분획물 V.4에서 compound 2(2.7 mg)를 얻었다.

Compound 2의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz)을 통하여 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서는 대부분의 peak가  $\delta$  0.75, 0.84, 0.86, 0.90, 0.92, 0.95, 1.25에 분포하였으며 포화 탄화수소의  $\text{sp}^3$  혼성화에 관여하는 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서 carbon signal이 32개가 있음을 알 수 있었다. 그리고  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $^1\text{H-NMR}$  data와 마찬가지로 대부분의 peak가  $\delta$  15.5, 16.8, 17.2, 23.7, 25.2, 27.2, 33.2(C-25, 24, 26, 30, 27, 23, 29)에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 혼성 탄소로 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다. 이러한 NMR data로 미루어 보아 oleanane skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상되었다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  5.29(1H, t,  $J = 3.4$ , H-12) signal은 olefinic proton으로  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  143.8(C-13) 122.6(C-12)의 2개의 불포화된  $\text{sp}^2$  혼성의 olefinic carbon을 보임으로 olea-12-ene skeleton을 가지고 있음을 예상할 수 있다.

$^1\text{H-NMR}$  data에서 나타나는 2.04(3H, s) signal은 acetyl methyl proton으로,  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도 마찬가지로  $\delta$  21.5은 acetyl methyl carbon,  $\delta$  182.0(C-28) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 Carboxy기의 carbon으로 예상하였다.

비교적 난해한  $^1\text{H-NMR}$  data로 인해  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의존하여 문헌<sup>13)</sup>과의 대조 과정을 거쳐 compound 2을 oleanolic acid acetate(3 $\beta$

-acetoxyolean-12-en-28-acid)로 동정하였다(Figure 10).

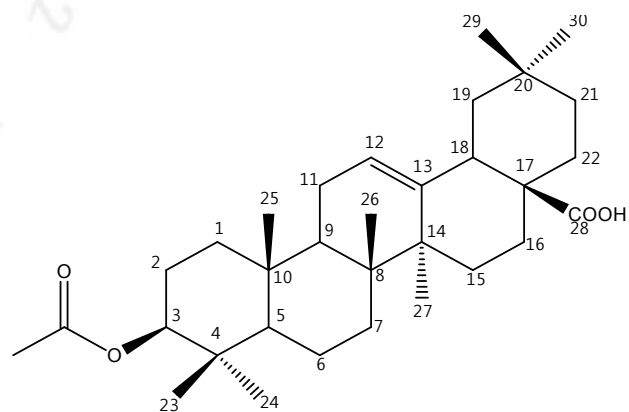


Figure 10. Chemical structure of compound 2

Table 2.  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound 2

Compound 2					
( $^1\text{H}$ -NMR : 400MHz in $\text{CDCl}_3$ , $^{13}\text{C}$ -NMR : 100MHz in $\text{CDCl}_3$ )					
position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_c$ (ppm)	position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_c$ (ppm)
1		38.2	17		46.6
2		23.6	18		41.7
3	4.51(1H, m)	81.1	19		46.0
4		37.8	20		30.8
5		55.4	21		33.9
6		18.3	22		32.7
7		32.5	23	0.86(3H, s)	27.8
8		39.4	24	0.84(3H, s)	16.8
9		47.7	25	0.93(3H, s)	15.5
10		37.1	26	0.75(3H, s)	17.2
11		23.5	27	1.12(3H, s)	25.2
12	5.29(1H, t, $J$ = 3.4)	122.6	28		182.0
13		143.8	29	0.90(3H, s)	33.2
14		41.2	30	0.92(3H, s)	23.7
15		26.0	CO		171.3
16		23.1	$\text{CH}_3$	2.04(3H, s)	21.5

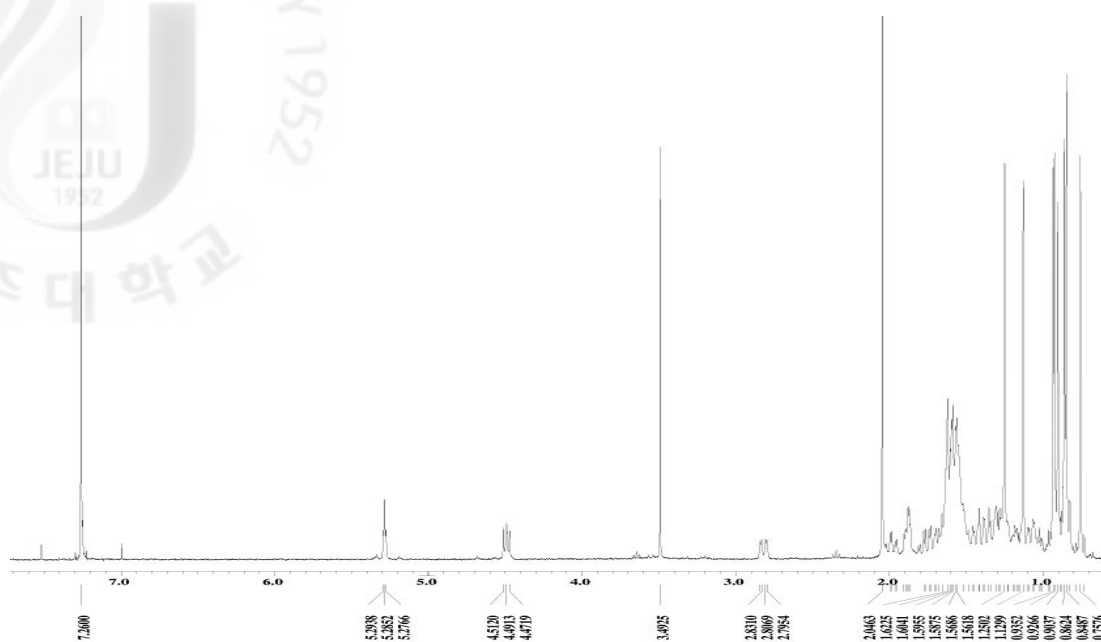


Figure 11.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

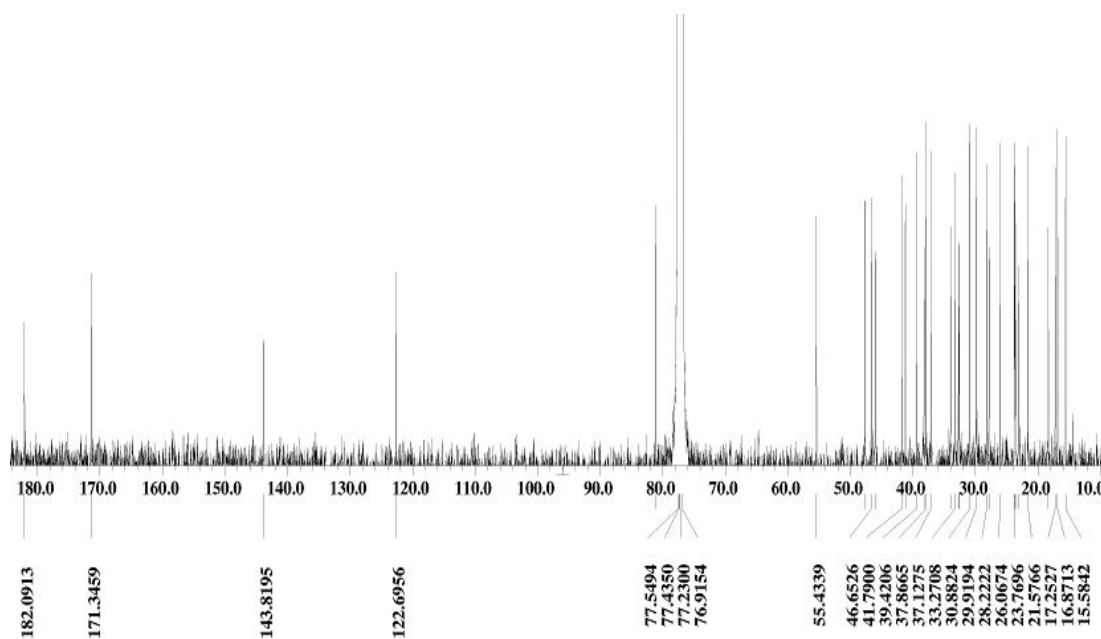


Figure 12.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

### 1-3. Compound 3의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 6). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.3(*n*-Hex/EtOAc = 90/10, 25.2 mg)을 감압농축을 시킨 후 Methanol을 첨가하여 실온에서 장시간 방치하였더니 Methanol이 증발하면서 재결정이 일어나 색이 없는 바늘모양의 crystal이 생성되었다. 상층액과 결정을 따로 구분하여 나누었고, 구분된 결정을 Methanol과 Hexane을 이용하여 여러 번 washing 하였다. 이러한 재결정 법을 통해 분획물 V.3 crystal 에서 compound 3(3.2 mg)를 얻었다.

Compound 3의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz)을 통하여 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  data 에서는 대부분의 peak가  $\delta$  0.73, 0.84, 0.86, 0.97, 0.97, 0.92, 1.13에 분포하였으며 포화 탄화수소의  $\text{sp}^3$  혼성화에 관여하는 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서 carbon signal이 30개가 있음을 알 수 있었다. 그리고  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $^1\text{H-NMR}$  data와 마찬가지로 대부분의 peak가  $\delta$  15.6, 16.9, 17.2, 23.6, 25.7, 27.9, 33.2(C-25, 24, 26, 30, 27, 23, 29)에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 혼성 탄소로 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다. 이러한 NMR data로 미루어 보아 oleanane skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상되었다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  5.34(1H, t,  $J = 3.4$ , H-12) signal은 olefinic proton으로  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  143.3(C-13) 123.3(C-12)의 2개의 불포화된  $\text{sp}^2$  혼성의 olefinic carbon을 보임으로 olea-12-ene skeleton을 가지고 있음을 예상할 수 있다.

$^1\text{H-NMR}$  data에서 에서 나타나는 2.04(3H, s) signal은 acetyl methyl proton으로,  $\delta$  9.3(1H, s)에서 나타나는 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 수소인 aldehyde proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도 마찬가지로  $\delta$  21.5은 acetyl methyl carbon,  $\delta$  207.8(C-28) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 aldehyde carbon 으로 예상하였다.

비교적 난해한  $^1\text{H-NMR}$  data로 인해  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의존하여 문헌<sup>14,15)</sup>과의 대

조과정을 거쳐 compound 3을 oleanolic aldehyde acetate(3 $\beta$ -acetoxyolean-12-en-28-aldehyde)로 동정하였다.(Figure13).

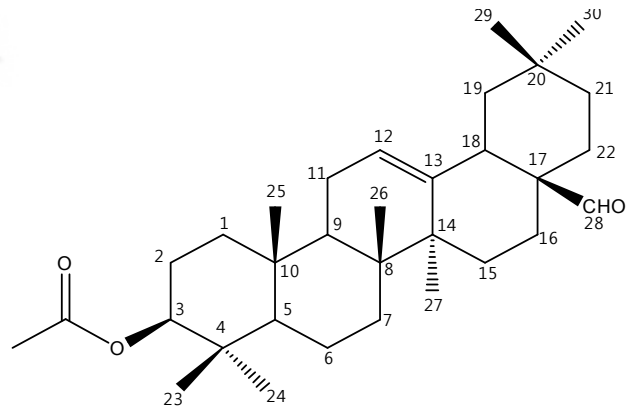


Figure 13. Chemical structure of compound 3

Table 3.  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound **3**

Compound <b>3</b> ( $^1\text{H}$ -NMR : 400MHz in $\text{CDCl}_3$ , $^{13}\text{C}$ -NMR : 100MHz in $\text{CDCl}_3$ )					
position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{c}}$ (ppm)	position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{c}}$ (ppm)
1		38.3	17		49.3
2		23.6	18		40.5
3	4.50(1H, dd, $J = 9.6, 5.0$ )	81	19		45.7
4		37.8	20		30.8
5		55.4	21		33.3
6		18.3	22		32.8
7		28.2	23	0.86(6H, s)	27.9
8		39.7	24	0.84(6H, s)	16.9
9		47.6	25	0.92(3H, s)	15.6
10		37	26	0.73(3H, s)	17.2
11		22.2	27	1.13(3H, s)	25.7
12	5.34(1H, t, $J$ $= 3.4$ )	123.3	28	9.39(1H, s)	207.8
13		143.3	29	0.91(3H, s)	33.2
14		41.8	30	0.91(3H, s)	23.6
15		26.9	CO		171.2
16		23.7	$\text{CH}_3$	2.04(3H, s)	21.5

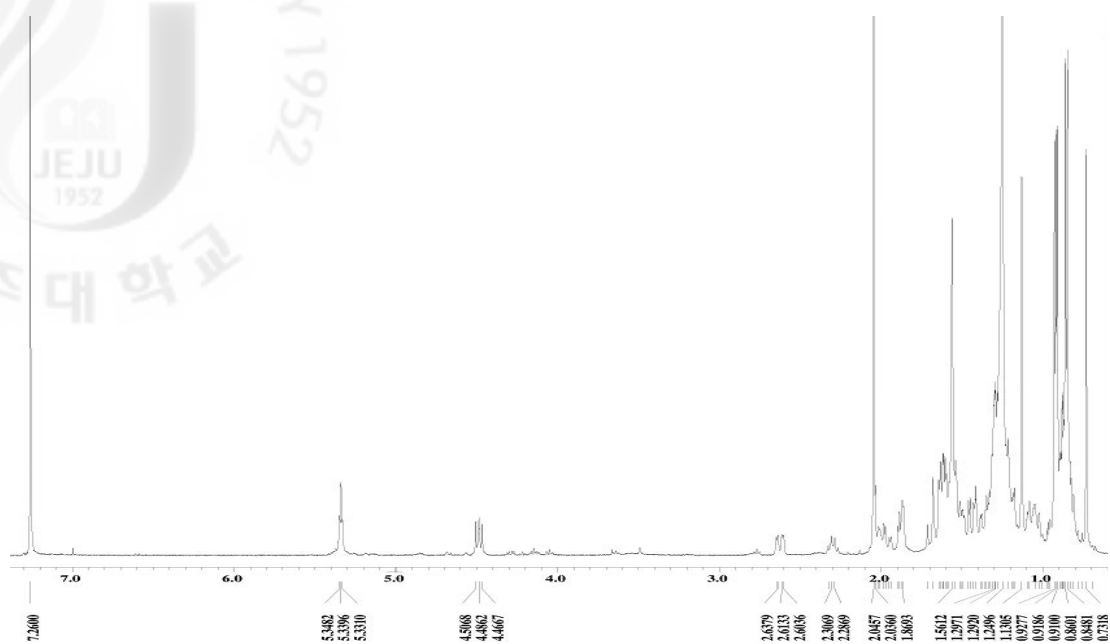


Figure 14.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CDCl}_3$

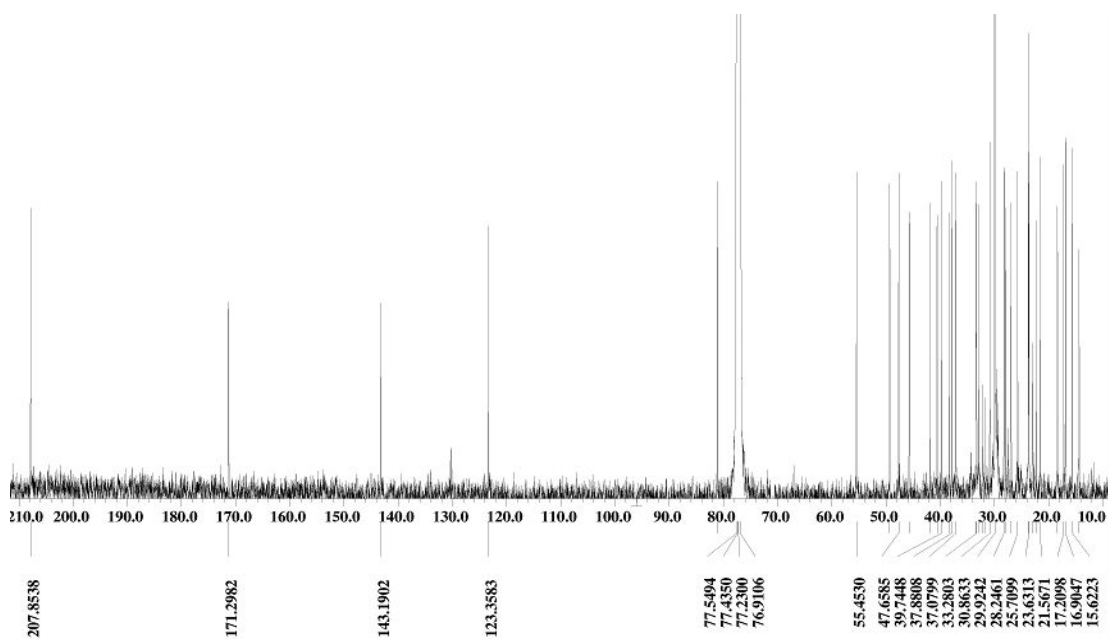


Figure 15.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CDCl}_3$



#### 1-4. Compound 4의 구조동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 6). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.3과 V.4를 재결정 시킨 후에 남은 상층액을 모아서  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10/1 \sim 1/0$  gradient의 용매조건으로 silica gel CC을 수행하여 분리하였다. 그 중 Liq-fr np.9에서 white powder 형태의 compound 4(2.0 mg)를 얻었다.

Compound 4의 구조는  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})$ ,  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100\text{MHz})$ 을 통하여 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서는 대부분의 peak가  $\delta$  0.85, 0.86, 0.88, 0.93, 0.95, 1.15, 1.24에 분포하였으며 포화 탄화수소의  $\text{sp}^3$  혼성화에 관여하는 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서 carbon signal이 32개가 있음을 알 수 있었다. 그리고  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $^1\text{H-NMR}$  data와 마찬가지로 대부분의 peak가  $\delta$  15.7, 16.6, 16.8, 23.7, 26.1, 28.2, 33.4(C-25, 26, 24, 30, 27, 23, 29)에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 혼성 탄소로 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다. 이러한 NMR data로 미루어 보아 oleanane skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상되었다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  5.34(1H, t,  $J=3.4$ , H-12) signal은 olefinic proton으로  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  143.3(C-13) 123.3(C-12)의 2개의 불포화된  $\text{sp}^2$  혼성의 olefinic carbon을 보임으로 olea-12-ene skeleton을 가지고 있음을 예상할 수 있다.

$^1\text{H-NMR}$  data에서 나타나는 2.04(1H, s) signal은 acetyl methyl proton으로, 3.55(1H, d,  $J = 10.9$ , H-28), 3.22(1H, d,  $J = 10.9$ , H-28)에서 나타나는 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 수소인 oxygenated proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도 마찬가지로  $\delta$  21.5은 acetyl methyl carbon,  $\delta$  69.9(C-28) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 oxygenated carbon 으로 예상하였다.

비교적 난해한  $^1\text{H-NMR}$  data로 인해  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의존하여 문헌<sup>112, 113)</sup>과의 대조과정을 거쳐 compound 4을 erythrodiol-3-acetate(3 $\beta$

-acetoxy-28-hydroxyolean-12-ene)로 동정하였다(Figure 16).

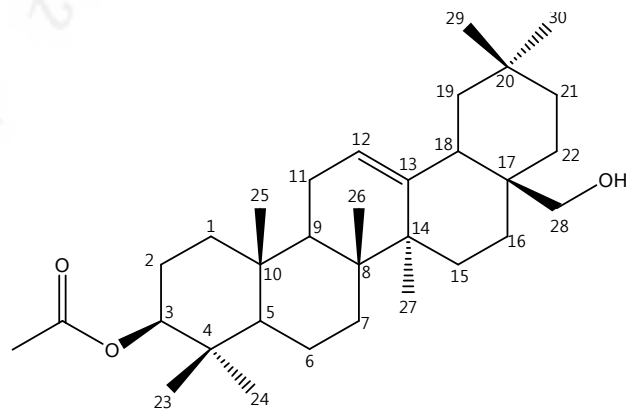


Figure 16. Chemical structure of compound 4

Table 4. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR data of compound 4

Compound 4					
( <sup>1</sup> H-NMR : 400MHz in CDCl <sub>3</sub> , <sup>13</sup> C-NMR : 100MHz in CDCl <sub>3</sub> )					
position	$\delta$ H (int, mult, <i>J</i> in Hz)	$\delta$ <sub>c</sub> (ppm)	position	$\delta$ H (int, mult, <i>J</i> in Hz)	$\delta$ <sub>c</sub> (ppm)
1		38.4	17		36.9
2		22.1	18		42.4
3	4.50(1H, dd, <i>J</i> = 9.9, 6.0)	81.0	19		46.5
4		37.8	20		31.1
5		55.3	21		34.2
6		18.4	22		31.2
7		32.6	23	0.93(3H,s)	28.2
8		39.9	24	1.15(3H,s)	16.8
9		47.6	25	0.88(3H,s)	15.7
10		37.6	26	0.85(3H,s)	16.8
11		22.1	27	1.24(3H,s)	26.1
12	5.19(1H, t, <i>J</i> = 3.5)	122.4	28	3.56(1H, d, <i>J</i> = 10.9)	69.9
				3.22(1H, d, <i>J</i> = 10.9)	
13		144.3	29	0.95(3H,s)	33.4
14		41.8	30	0.86(3H,s)	23.7
15		25.6	CO		171.3
16		23.7	CH <sub>3</sub>	2.04(3H,s)	21.5

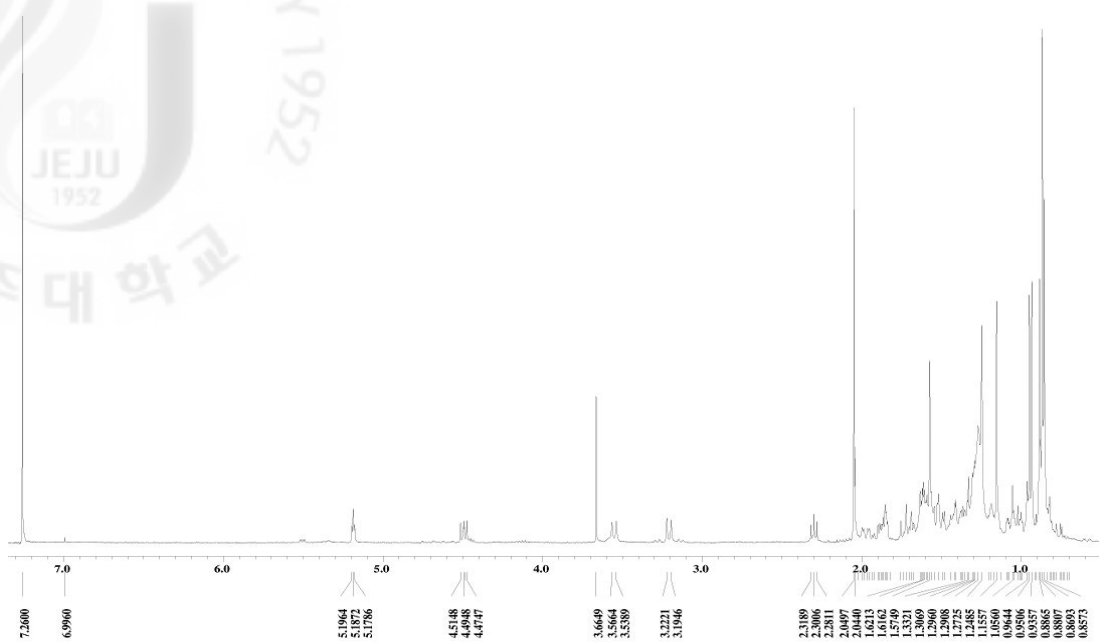


Figure 17.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$

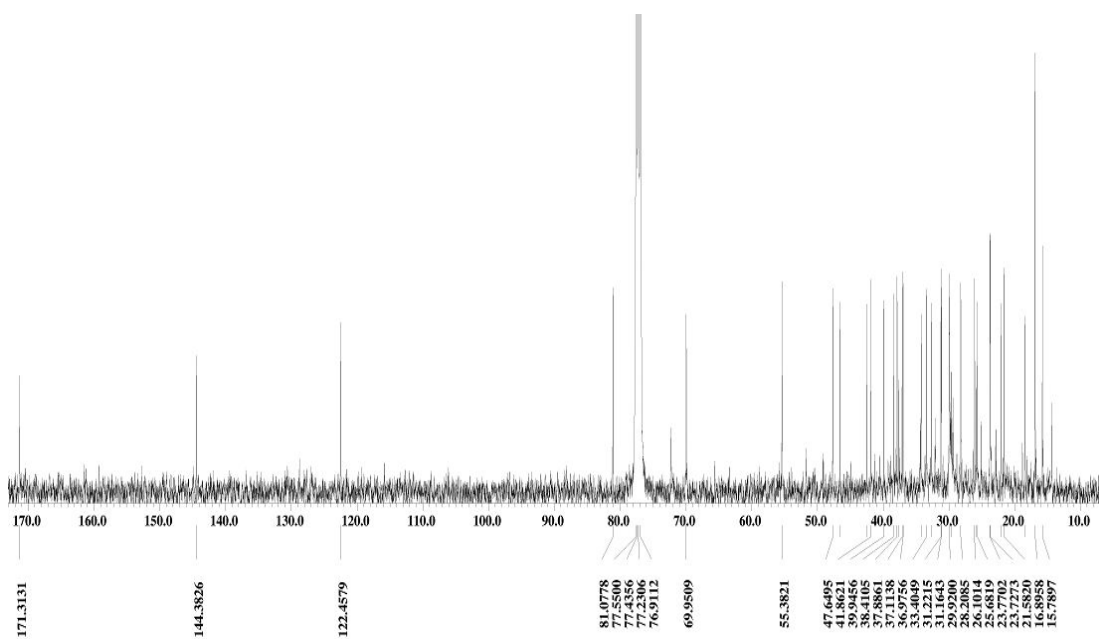


Figure 18.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$

## 1-5. Compound 5의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 6). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.3과 V.4를 재결정 시킨 후에 남은 상층액을 모아서  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10/1 \sim 1/0$  gradient의 용매조건으로 silica gel CC을 수행하여 분리하였다. 그 중 Liq-fr np.8에서 white powder 형태의 compound 5(3.1 mg)를 얻었다.

Compound 5의 구조는  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})$ ,  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100\text{MHz})$ 을 통하여 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서는 대부분의 peak가  $\delta$  0.75, 0.78, 0.82, 0.93, 0.96, 1.02에 분포하였으며 포화 탄화수소의  $\text{sp}^3$  혼성화에 관여하는 6개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였으며,  $\delta$  1.67(3H, s)의 signal로 보아  $\text{sp}^2$  혼성 carbon 옆에 붙어 있는 methyl기임을 예상할 수 있다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서 carbon signal이 30개가 있음을 알 수 있었다. 그리고  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $^1\text{H-NMR}$  data와 마찬가지로 대부분의 peak가  $\delta$  14.7, 15.5, 16.1, 16.3, 18.2, 19.5, 27.6 (C-27, 24, 26, 25, 28, 30, 23)에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 혼성 탄소로 6개의 tertiary methyl기가 있음을 예상할 수 있었으며,  $\delta$  19.5(C-30)의 signal은  $\text{sp}^2$  혼성 carbon 옆에 붙어 있는 methyl기임을 예상할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  4.68(1H, d,  $J = 2.2$ , H-29), 4.56(1H, dd,  $J = 2.5$ , H-29) signal은 olefinic proton으로  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  151.2(C-20), 109.5(C-29)의 2개의 불포화된  $\text{sp}^2$  혼성의 olefinic carbon을 보임으로 예상하였다. 따라서 이러한 NMR data로 미루어 보아 lupane skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상되었다.

$^1\text{H-NMR}$  data에서 예서 나타나는 3.20(1H, dd,  $J = 11.1, 4.9$ , H-3) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 수소인 oxygenated proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도 마찬가지로  $\delta$  79.2(C-3) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 oxygenated carbon으로 예상하였고 적어도 하나 이상의 hydroxyl기가 있음을 예상할 수 있었다. 따라서  $\delta$  27.6(C-23) signal의 deshielding 현상은 전기음성도가 큰 hydroxy기를 가지고

있는  $\delta$  79.2(C-3) signal에 이웃하고 있기 때문이다.

비교적 난해한  $^1\text{H-NMR}$  data로 인해  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 의존하여 문헌<sup>13,16)</sup>과의 대조과정을 거쳐 compound 5을 Lupeol로 동정하였다(Figure 19).

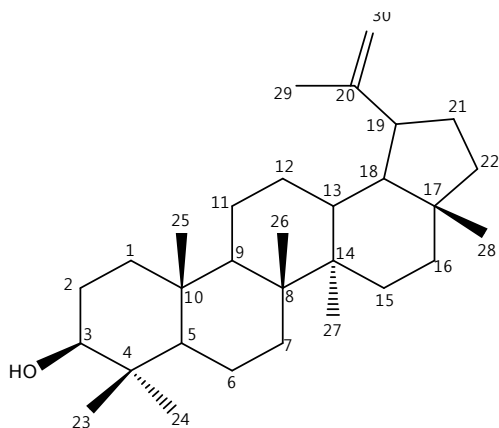


Figure 19. Chemical structure of compound 5

Table 5. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR data of compound 5

Compound 5					
( <sup>1</sup> H-NMR : 400MHz in CDCl <sub>3</sub> , <sup>13</sup> C-NMR : 100MHz in CDCl <sub>3</sub> )					
position	δH (int, mult, J in Hz)	δ <sub>c</sub> (ppm)	position	δH (int, mult, J in Hz)	δ <sub>c</sub> (ppm)
1		40.1	16		35.7
2		25.2	17		43.1
3	3.20(1H, dd, J=11.1, 4.9)	79.2	18		48.4
4		38.8	19	2.41(1H, dt, J=5.5, 10.9)	48.1
5		55.4	20		151.2
6		18.5	21		30.0
7		34.4	22		39.0
8		40.9	23	0.96(3H, s)	27.6
9		50.6	24	0.75(3H, s)	15.5
10		37.3	25	0.82(3H, s)	16.3
11		21.1	26	1.02(3H, s)	16.1
12		27.5	27	0.93(3H, s)	14.7
13		38.2	28	0.78(3H, s)	18.2
14		43.0	29	4.68(1H, d, J=2.2)	109.5
				4.56(1H, dd, J=2.5)	
15		28.1	30	1.67(3H, s)	19.5

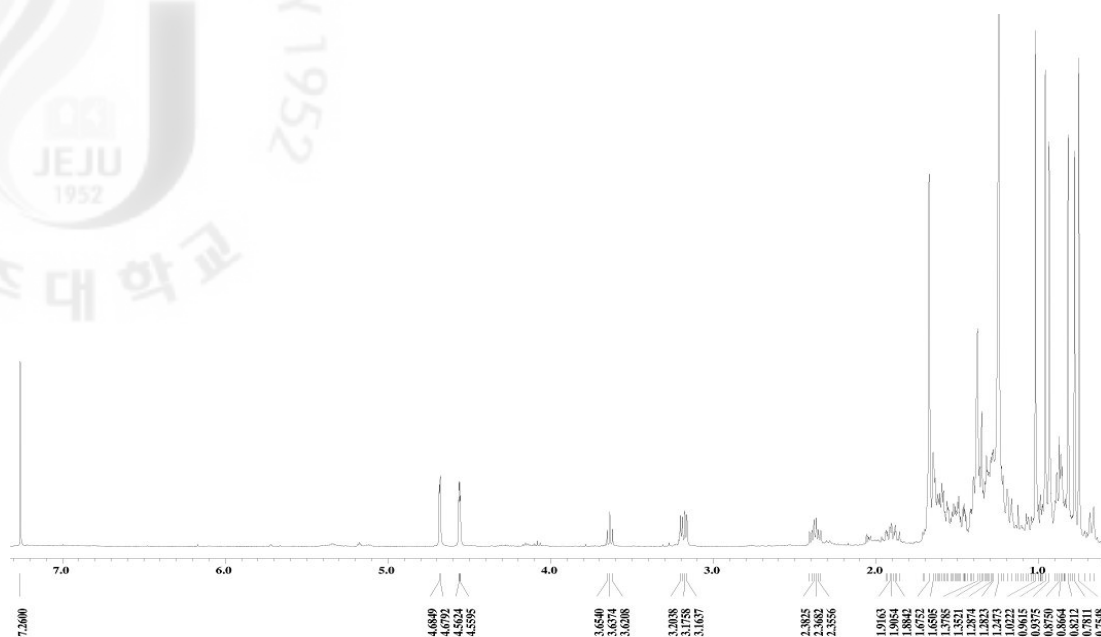


Figure 20.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CDCl}_3$

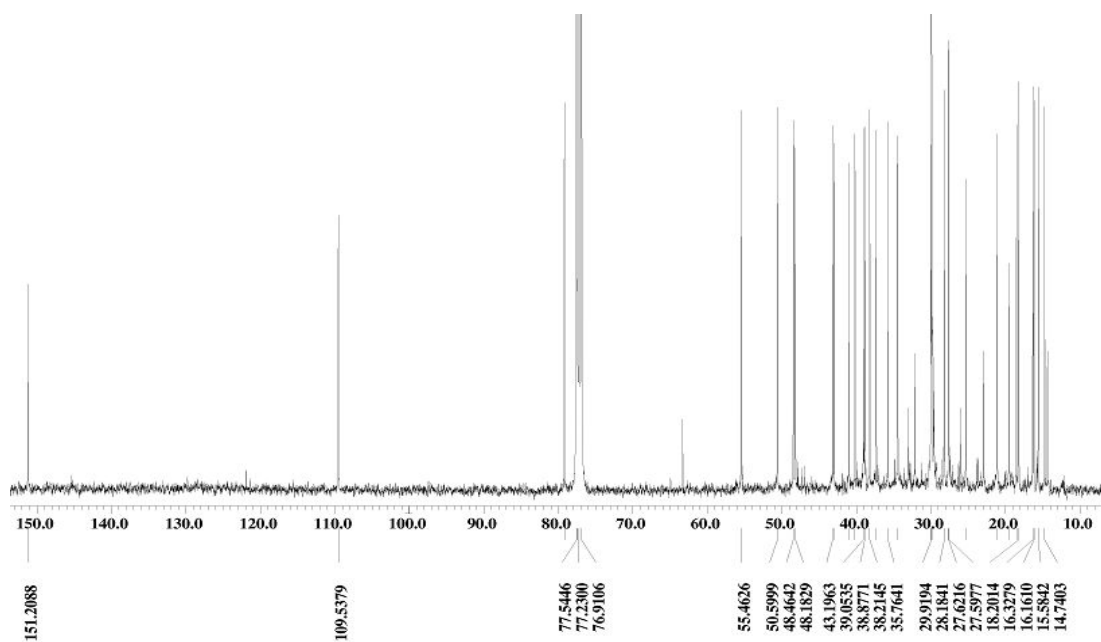


Figure 21.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CDCl}_3$



## 1-6. Compound 6의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 6). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.16(n-Hex/EtOAc = 25/75, 41.7 mg) 감압농축을 시킨 후 methanol을 첨가하여 실온에서 장시간 방치하였더니 methanol이 증발하면서 재결정이 일어나 yellow powder가 생성되었다. 상층액과 powder를 따로 구분하여 나누었고, 구분된 powder를 methanol을 이용하여 여러 번 washing 하였다. 이러한 재결정 법을 통해 순수한 분획물 V.16 powder Fr.에서 compound 6(9.3 mg)를 얻었다.

Compound 6의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- $d_5$ , 400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- $d_5$ , 100MHz)을 통하여 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서는 대부분의 peak가  $\delta$  0.67, 0.86, 0.89, 0.90, 0.95에 분포하였으며 이는 포화탄화수소의  $\text{sp}^3$  혼성화에 관여하는 tertiary methyl기로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도 마찬가지로 대부분의 peak가  $\delta$  12.5, 12.7, 19.6, 19.8, 20.0, 20.6 (C-18, 29, 27, 26, 21, 19)에 분포하였으며 이 signal 또한  $\text{sp}^3$  혼성화에 관여하는 tertiary methyl기로 예상하였다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  5.37(1H, d,  $J=4.8$ , H-6)의 signal은 olefinic proton으로  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  141.5(C-5), 123.8(C-6)의 2개의 불포화된  $\text{sp}^2$  혼성의 olefinic carbon을 보임으로 예상하였다. 따라서 이러한 NMR data로 미루어 보아  $\beta$ -sitosterol과 비슷한 skeleton을 가진 steroid일 것으로 예상되었다.

$^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  5.01(1H, d,  $J = 7.7$ , H-1')의 signal은 anomeric proton으로 예상할 수 있으며,  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  103.1의 signal로 anomeric carbon이 예상되었다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서 나머지 sugar proton이  $\delta$  3.98~4.34부근에서 나타났으며,  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도 나머지 sugar carbon이  $\delta$  72.3~79.2부근에서 나타났다.  $^1\text{H-NMR}$  data에서  $\delta$  4.47(1H, dd,  $J = 11.6$ , 5.0), 4.62(1H, dd,  $J = 11.6$ , 1.6)의 methylene-6' proton임을 예상할 수 있었고,  $^{13}\text{C-NMR}$  data에서도  $\delta$  63.4의 signal로 methylene-6' carbon임을 예상할 수 있었다. 따라서 이러한 NMR data로 미루어 보아  $\beta$ -sitosterol에 glucose가

붙어있는 steroid일 것으로 예상되었다.

$^1\text{H-NMR}$  data와  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 토대로 하여 문헌<sup>17,18,19)</sup>과의 대조과정을 거쳐 compound **6**을 daucosterol로 동정하였다(Figure 22).

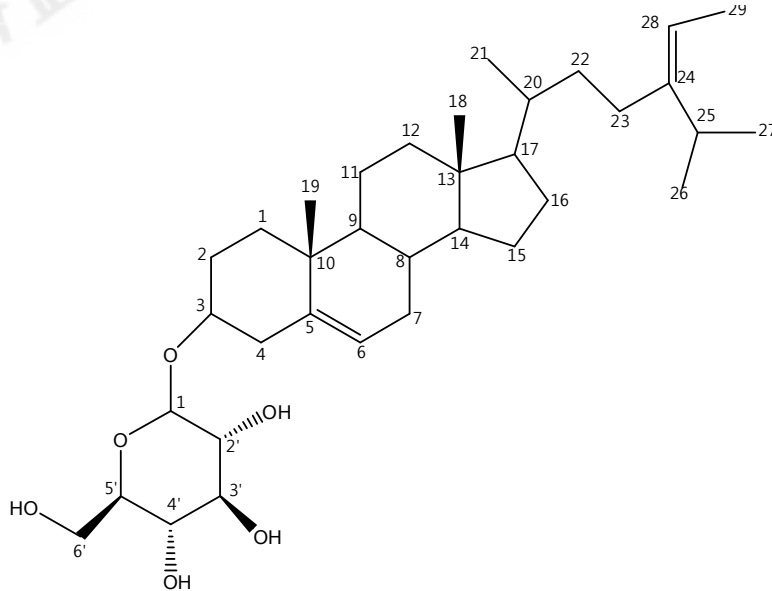


Figure 22. Chemical structure of compound **6**

Table 6.  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound **6**

Compound <b>6</b> ( $^1\text{H}$ -NMR : 400MHz in pyridine- $d_5$ , $^{13}\text{C}$ -NMR : 100MHz in pyridine- $d_5$ )					
position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_c$ (ppm)	position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_c$ (ppm)
1		37.5	19	0.95(3H, s)	20.6
2		30.8	20		37.0
3	4.01(1H, m)	79.2	21	1.01(3H, d, $J = 6.4$ )	20.0
4	2.52(br t, $J = 11.1$ )	40.5	22		34.8
	2.78(1H, ddd, $J=13.0, 4.2, 1.7$ )				
5		141.5	23		26.9
6	5.37(1H, d, $J = 4.8$ )	123.8	24		46.6
7		32.6	25		30.0
8		32.7	26	0.86(3H, s)	19.8
9		50.9	27	0.89(3H, s)	19.6
10		39.9	28		23.9
11		21.8	29	0.90(3H, s)	12.7
12		38.0	1'	5.01(1H, d, $J = 7.7$ )	103.1
13		43.0	2'	4.04(1H, m)	75.9
14		57.4	3'	4.12(1H, t, $J = 8.1$ )	79.2
15		25.1	4'	4.34(1H, m)	72.3
16		29.1	5'	3.98(1H, m)	79.1
17		56.8	6'	4.47(1H, dd, $J = 11.6, 5.0$ )	63.4
				4.62(1H, dd, $J = 11.6, 1.6$ )	
18	0.67(3H, s)	12.5			

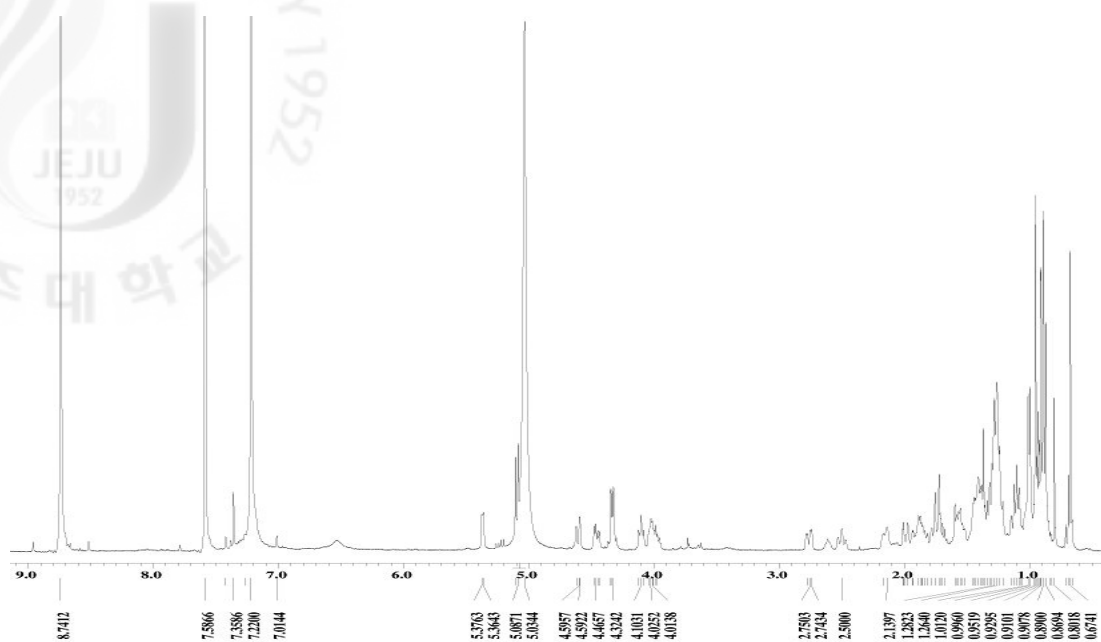


Figure 23.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **6** in pyridine- $d_5$

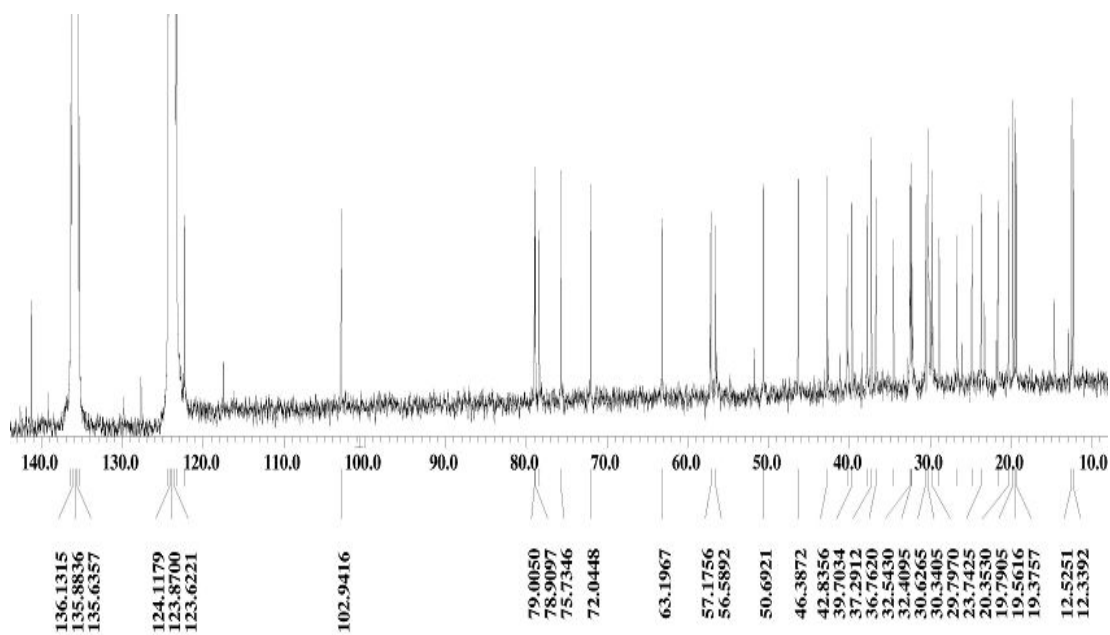


Figure 24.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **6** in pyridine- $d_5$

### 1-7. Compound 7의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 5). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.He40(n-Hex/EtOAc = 40/60, 103.7 mg)을 감압농축을 시킨 후 감압농축을 시킨 후 CH<sub>3</sub>Cl/MeOH = 15/1~3/1 gradient의 용매조건으로 순상 silica gel CC을 사용하여 분획물 V.He40-np.3에서 yellow powder 형태의 compound 7 (8.3 mg)을 얻었다.

Compound 7의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz), <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100MHz)을 통하여 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR data 에서는 대부분의 peak가 δ 0.75, 0.77, 0.90, 0.90, 0.92, 0.98, 1.13에 분포하였으며 포화 탄화수소의 sp<sup>3</sup> 혼성화에 관여하는 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR(pyridine-d<sub>5</sub>, 100MHz) 화합물의 탄소의 개수가 30개임을 알 수 있었다. 그리고 <sup>13</sup>C-NMR data에서도 <sup>1</sup>H-NMR data와 마찬가지로 대부분의 peak가 δ 15.5, 15.7, 17.3, 23.6, 26.1, 28.3, 32.8(C-25, 24, 26, 30, 27, 23, 29)에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 혼성 탄소로 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다. 이러한 NMR data로 미루어 보아 oleanane skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상되었다.

<sup>1</sup>H-NMR data에서 δ 5.28(1H, t, *J* = 3.4, H-12) signal은 olefinic proton으로 <sup>13</sup>C-NMR data에서도 δ 143.8(C-13) 122.8(C-12)의 2개의 불포화된 sp<sup>2</sup> 혼성의 olefinic carbon을 보임으로 olea-12-ene skeleton을 가지고 있음을 예상할 수 있다.

<sup>1</sup>H-NMR data에서 나타나는 3.23(1H, dd, *J* = 10.8, 4.4) signal은 methine proton으로, <sup>13</sup>C-NMR data에서도 마찬가지로 δ 79.2(C-3)은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 methine carbon으로 적어도 한 개 이상의 hydroxyl기가 있음을 예상할 수 있다. 그리고 <sup>13</sup>C-NMR data에서 δ 180.8(C-28) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 carboxy기의 carbon 으로 예상하였다.

비교적 난해한 <sup>1</sup>H-NMR data로 인해 <sup>13</sup>C-NMR에 의존하여 문헌<sup>20,21,22</sup>과의

대조과정을 거쳐 compound 7을 oleanolic acid로 동정하였다(Figure 25).

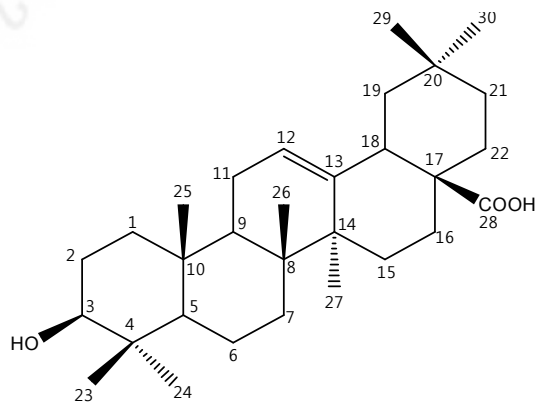


Figure 25. Chemical structure of compound 7

Table 7.  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound **7**

Compound <b>7</b> ( $^1\text{H}$ -NMR : 400MHz in $\text{CD}_3\text{OD}$ , $^{13}\text{C}$ -NMR : 100MHz in $\text{CD}_3\text{OD}$ )					
position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{c}}$ (ppm)	position	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{c}}$ (ppm)
1		38.6	16		23.7
2		27.3	14		46.7
3	3.23(1H, dd, $J$ = 10.8, 4.4)	79.2	18	2.82(1H, dd, $J$ = 13.9, 4.1)	41.2
4		38.9	19		46.1
5		55.4	20		30.8
6		18.5	21		34.0
7		33.2	22		32.6
8		39.4	23	0.90(3H,s)	28.3
9		47.8	24	0.77(3H,s)	15.7
10		37.2	25	0.75(3H,s)	15.5
11		23.1	26	0.92(3H,s)	17.3
12	5.28(1H, t, $J$ = 3.4)	122.8	27	1.13(3H,s)	26.1
13		143.8	28		180.8
14		41.8	29	0.90(3H,s)	32.8
15		27.8	30	0.98(3H,s)	23.6

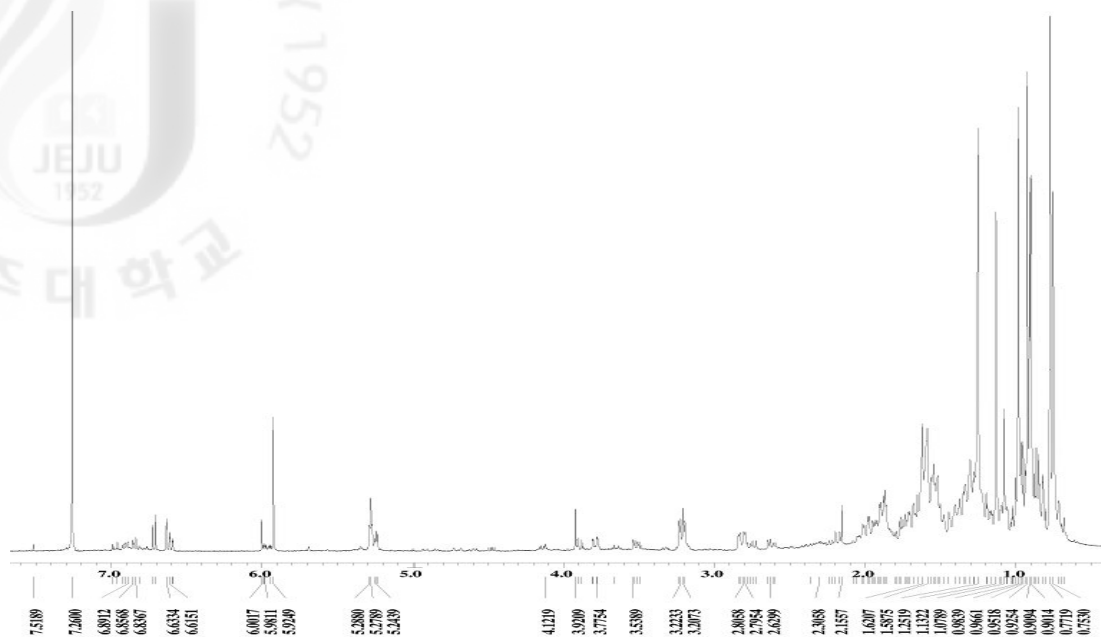


Figure 26.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

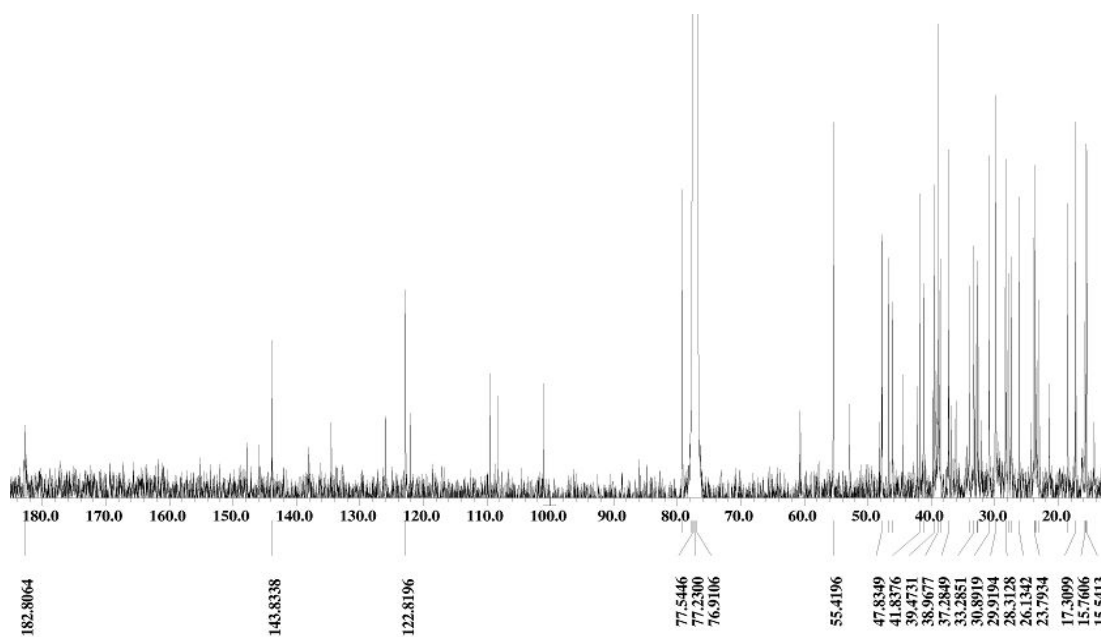


Figure 27.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{CD}_3\text{OD}$



## 1-8. Compound 8의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 6). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.8(n-Hex/EtOAc = 65/35, 110 mg)을 감압농축을 시킨 후 CH<sub>3</sub>Cl/MeOH = 15/1~5/1 gradient의 용매조건으로 silica gel CC을 사용하여 분획물 V.8-np.3에서 white powder 형태의 compound 8 (9.8 mg)을 얻었다.

Compound 8의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz), <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100MHz)을 통하여 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR data에서는 대부분의 peak가 δ 0.81, 0.81, 0.91, 0.94, 1.00, 1.01, 1.16에 분포하였으며 포화 탄화수소의 sp<sup>3</sup> 혼성화에 관여하는 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR(pyridine-d<sub>5</sub>, 100MHz) 화합물의 탄소의 개수가 30개임을 알 수 있었다. 그리고 <sup>13</sup>C-NMR data에서도 <sup>1</sup>H-NMR data와 마찬가지로 대부분의 peak가 δ 17.2, 17.6, 17.8, 24.1, 26.5, 29.3, 34.0 (C-25, 24, 26, 30, 27, 23, 29)에 분포하였으며 이 signal 또한 포화된 혼성 탄소로 7개의 tertiary methyl기가 있음을 예상하였다. 이러한 NMR data로 미루어 보아 oleanane skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상되었다.

<sup>1</sup>H-NMR data에서 δ 5.26(1H, t, J = 3.6, H-12) signal은 olefinic proton으로 <sup>13</sup>C-NMR data에서도 δ 145.5(C-13) 123.5(C-12)의 2개의 불포화된 sp<sup>2</sup> 혼성의 olefinic carbon을 보임으로 olea-12-ene skeleton을 가지고 있음을 예상할 수 있다.

<sup>1</sup>H-NMR data에서 나타나는 3.46(1H, m), 2.91(1H, d, J = 9.6) signal은 methine proton으로, <sup>13</sup>C-NMR data에서도 마찬가지로 δ 84.5(C-3), 69.6(C-2)은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 methine carbon으로 적어도 두 개 이상의 hydroxyl기가 있음을 예상할 수 있다. 그리고 <sup>13</sup>C-NMR data에서 δ 182.1(C-28) signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 carboxy기의 carbon으로 예상하였다.

비교적 난해한 <sup>1</sup>H-NMR data로 인해 <sup>13</sup>C-NMR에 의존하여 문헌<sup>23,24</sup>과의 대조과정을 거쳐 compound 8을 maslinic acid로 동정하였다(Figure 28).

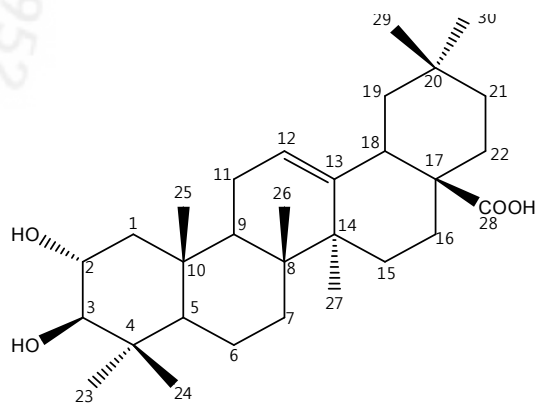


Figure 28. Chemical structure of compound 8

Table 8. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR data of compound **8**

Compound <b>8</b> ( <sup>1</sup> H-NMR : 400MHz in CD <sub>3</sub> OD, <sup>13</sup> C-NMR : 100MHz in CD <sub>3</sub> OD)					
position	δH (int, mult, <i>J</i> in Hz)	δ <sub>c</sub> (ppm)	position	δH (int, mult, <i>J</i> in Hz)	δ <sub>c</sub> (ppm)
1		48.2	16		24.7
2	3.64(1H, m)	69.6	14		47.7
3	2.91(1H, d, <i>J</i> =9.6)	84.5	18	2.86(1H, dd, <i>J</i> =14.0, 3.7)	43.0
4		40.6	19		47.3
5		56.8	20		31.7
6		19.7	21		33.9
7		35	22		33.7
8		40.7	23	1.01(3H,s)	29.3
9		48.4	24	0.80(3H,s)	17.6
10		39.3	25	1.00(3H,s)	17.2
11		24.1	26	0.81(3H, s)	17.8
12	5.26(1H, t, <i>J</i> =3.6)	123.5	27	1.16(3H,s)	26.5
13		145.5	28		182.1
14		42.8	29	0.91(3H,s)	34.0
15		28.9	30	0.94(3H,s)	24.1

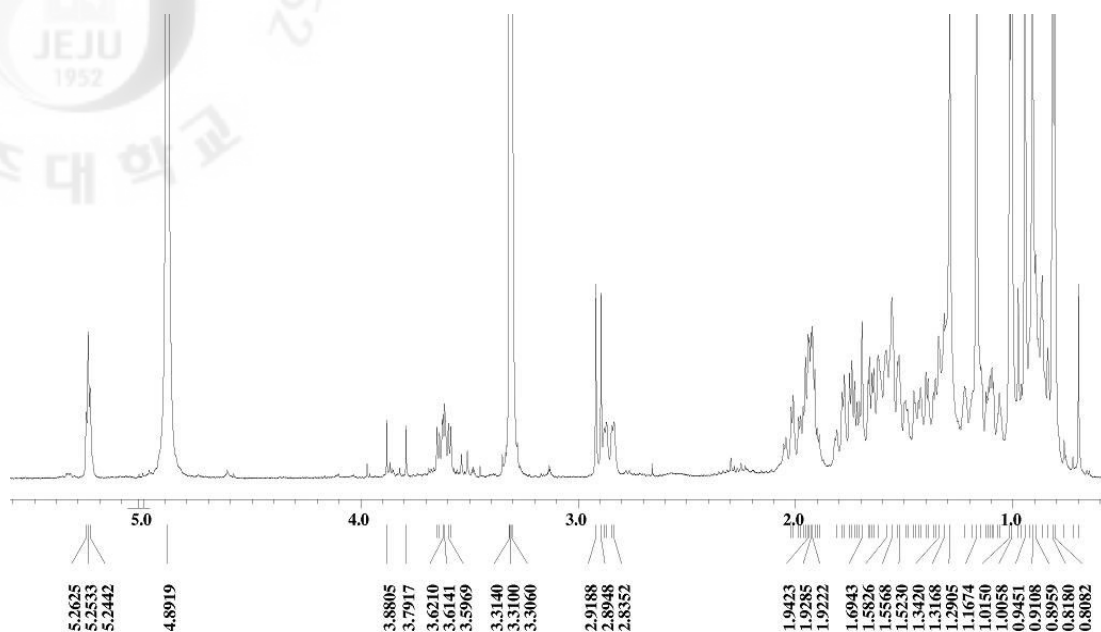


Figure 29.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **8** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

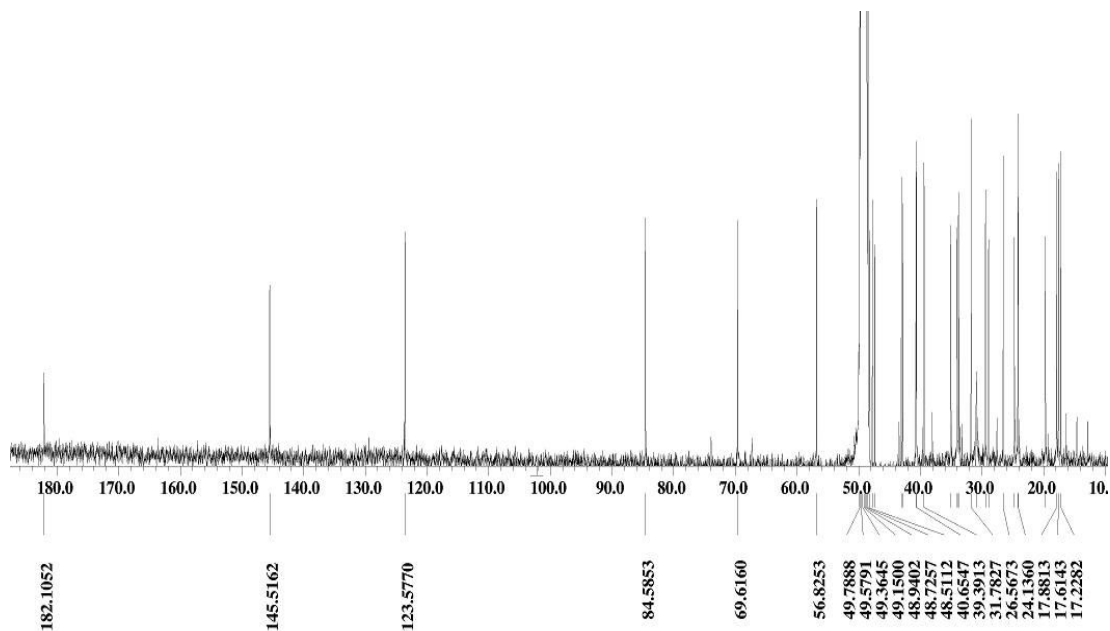


Figure 30.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **8** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

### 1-9. Compound 9의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 5). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.He20(n-Hex/EtOAc = 20/80, 183.7 mg)을 MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/2/1 혼합용매에 녹은 상층액 Liq-fr.(20.6 mg)과 녹지 않고 가라앉아있는 S-fr.(179.4mg)을 나눈 후에 S-fr.(179.4 mg)을 CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1의 용매조건으로 sephadex LH-20 CC을 수행하여 분리한 V.He20-se.3(33.4 mg)을 다시 methanol에 녹은 상층액 Liq-fr.과 녹지 않고 가라앉아있는 S-fr.으로 분리했다. methanol에 녹은 상층액 Liq-fr.에서 compound 9(26.2 mg)를 얻었다.

Compound 9의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 400MHz), <sup>13</sup>C-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)을 통하여 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR data를 통해서 화합물의 탄소의 개수가 15개 이상임을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR data를 통하여 확인한 결과 δ 5.84, 5.91, 6.82, 6.76, 6.71의 signal은 방향족 고리의 수소임을 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR data에서도 δ 100~158의 signal은 불포화된 sp<sup>2</sup>탄소 혹은 방향족 고리의 탄소가 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR data의 δ 6.82(1H, d, *J* = 1.8), δ 6.76(1H, d, *J* = 8.0), 6.71(1H, d, *J* = 8.2)는 각각 방향족 고리의 ortho, meta 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR data에서는 δ 4.56(1H, d, *J* = 7.5), 3.99(1H, m)의 signal은 전기음성도가 큰 원소에 인접한 sp<sup>3</sup>에 결합되어 있는 수소로 예상하였고, δ 2.86(1H, dd, *J* = 16.1, 5.3), 2.52(1H, dd, *J* = 16.0, 5.3)의 signal은 sp<sup>3</sup>혼성에 의한 수소이고, 서로 coupling하고 있음을 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR data에서도 δ 28~96의 signal은 포화된 sp<sup>3</sup>혼성의 탄소이거나 전기음성도가 큰 원소가 인접한 포화된 sp<sup>3</sup>혼성의 탄소를 예상하였다.

예상한 부분 구조를 기본으로 문헌과<sup>25)</sup> 대조하여 구조 동정하였고, 그 결과 compound 9는 우수한 항산화 효과로 널리 알려진 catechin으로 동정하였다.(Figure 31).

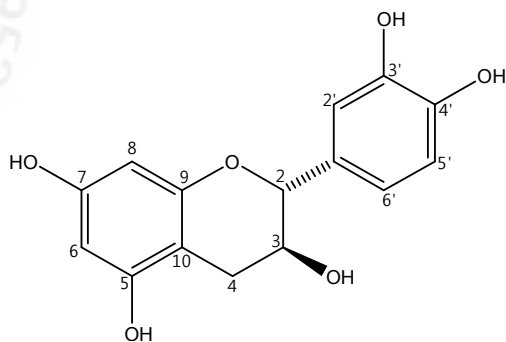


Figure 31. Chemical structure of compound 9

Table 9.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  data of compound 9

position	Compound 9 ( $^1\text{H-NMR}$ : 400MHz in $\text{CD}_3\text{OD}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ : 100MHz in $\text{CD}_3\text{OD}$ )	
	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{c}}$ (ppm)
1		
2	4.56(1H, d, 7.5)	82.9
3	3.99(1H, m)	68.9
4	2.86(1H, dd, 16.1, 5.3)	28.6
	2.52(1H, dd, 8.2, 16.0)	157.7
5		96.3
6	5.91 (1H, d, 2.2)	157.0
7		95.6
8	5.84 (1H, d, 2.2)	157.9
9		100.9
10		132.2
1'		115.3
2'	6.82(1H, d, 1.8)	146.3
3'		146.3
4'		116.2
5'	6.76(1H, d, 8.0)	120.1
6'	6.71(1H, dd, 8.2, 1.8)	

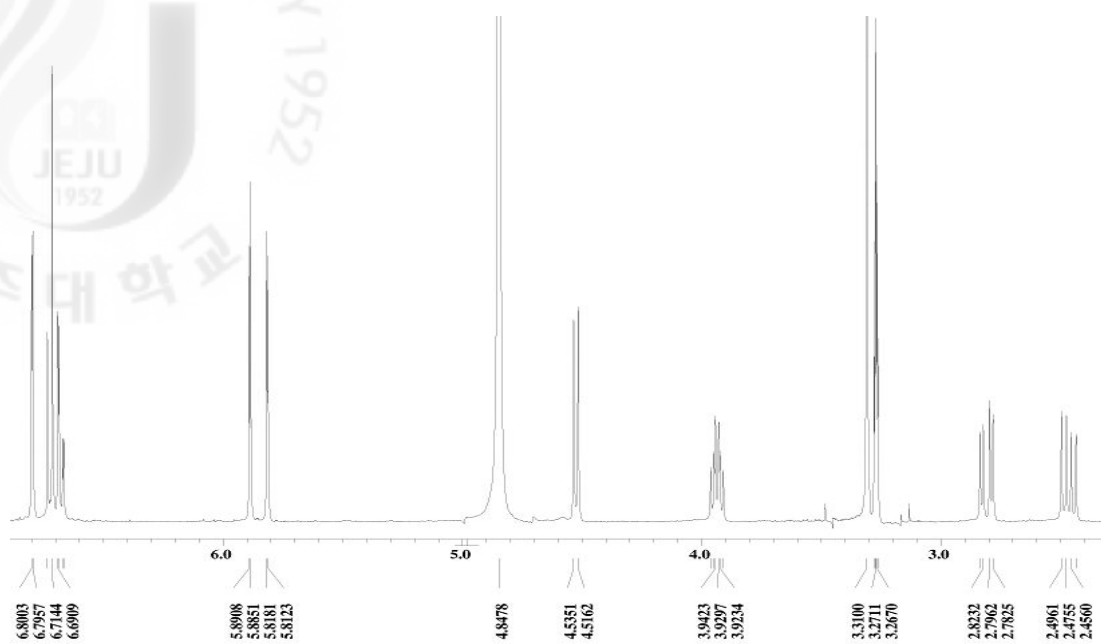


Figure 32.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **9** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

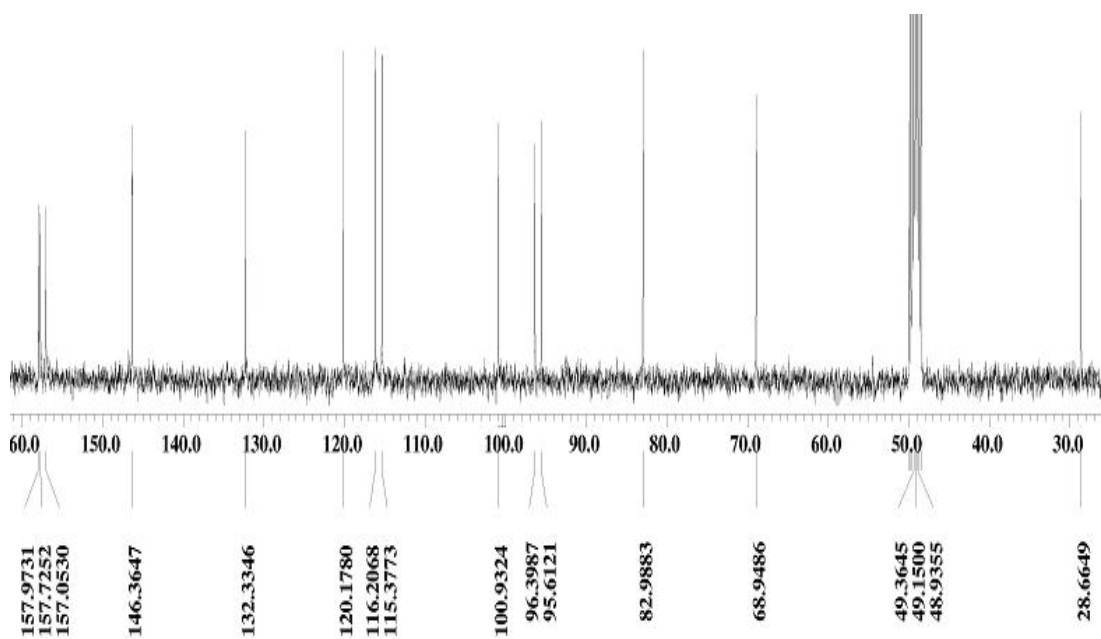


Figure 33.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **9** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 1-10. Compound 10의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 6). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.15(n-Hex/EtOAc = 30/70, 135 mg)을 CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/1의 용매조건으로 shepadex LH-20을 사용하여 분리하였고, 그 중 분획물 V.15-se.3에서 Compound 10 (31 mg)를 얻었다.

Compound 10의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR(pyridine-*d*<sub>5</sub>, 400MHz), <sup>13</sup>C-NMR(pyridine-*d*<sub>5</sub>, 100MHz)을 통하여 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR data를 통해서 화합물의 탄소의 개수가 15개 이상임을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR data를 통하여 확인한 결과 δ 6.68, 6.70, 7.29, 7.37, 7.93의 signal은 방향족 고리의 수소임을 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR data에서도 δ 100~158의 signal은 불포화된 sp<sup>2</sup>탄소 혹은 방향족 고리의 탄소가 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR data의 δ 7.93(1H, d, *J* = 1.8), δ 7.37(1H, dd, *J* = 8.0, 1.9), 7.29(1H, d, *J* = 8.0)는 각각 방향족 고리의 ortho, meta 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR data에서는 δ 4.73(1H, br s), 3.75(1H, m)의 signal은 전기음성도가 큰 원소에 인접한 sp<sup>3</sup>에 결합되어 있는 수소로 예상하였고, δ 3.58(1H, dd, *J* = 16.2, 4.5), 3.46(1H, dd, *J* = 16.1, 3.3)의 signal은 sp<sup>3</sup>혼성에 의한 수소이고, 서로 coupling하고 있음을 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR data에서도 δ 30~96의 signal은 포화된 sp<sup>3</sup>혼성의 탄소이거나 전기음성도가 큰 원소가 인접한 포화된 sp<sup>3</sup>혼성의 탄소를 예상하였다.

예상한 부분 구조를 기본으로 문헌과<sup>26)</sup> 대조하여 구조 동정하였고, 그 결과 Compound 10는 우수한 항산화 효과로 알려진 *epi*-catechin으로 동정하였다(Figure 34).



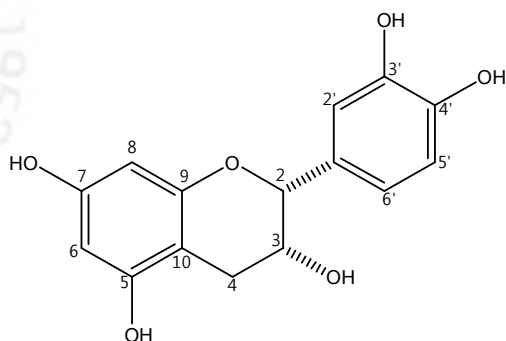


Figure 34. Chemical structure of compound 10

Table 10.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  data of compound 10

position	Compound 10 ( $^1\text{H-NMR}$ : 400MHz in pyridine- $d_5$ , $^{13}\text{C-NMR}$ : 100MHz in pyridine- $d_5$ )	
	$\delta\text{H}$ (int, mult, $J$ in Hz)	$\delta_c$ (ppm)
1		
2	4.73(1H, br s)	80.3
3	3.75(1H, m)	67.2
4	3.46 (1H, dd, 16.2, 4.5)	30.4
	3.58 (1H, dd, 16.1, 3.3)	
5		96.6
6	6.70(1H, d, $J= 2.2$ )	158.9
7		96.0
8	6.68(1H, d, $J= 2.2$ )	159.0
9		100.4
10		132.4
1'		116.4
2'	7.93(1H, d, $J= 1.8$ )	147.2
3'		147.1
4'		116.6
5'	7.29(1H, d, $J= 8.0$ )	123.3
6'	7.37(1H, d, $J= 8.0, 1.9$ )	

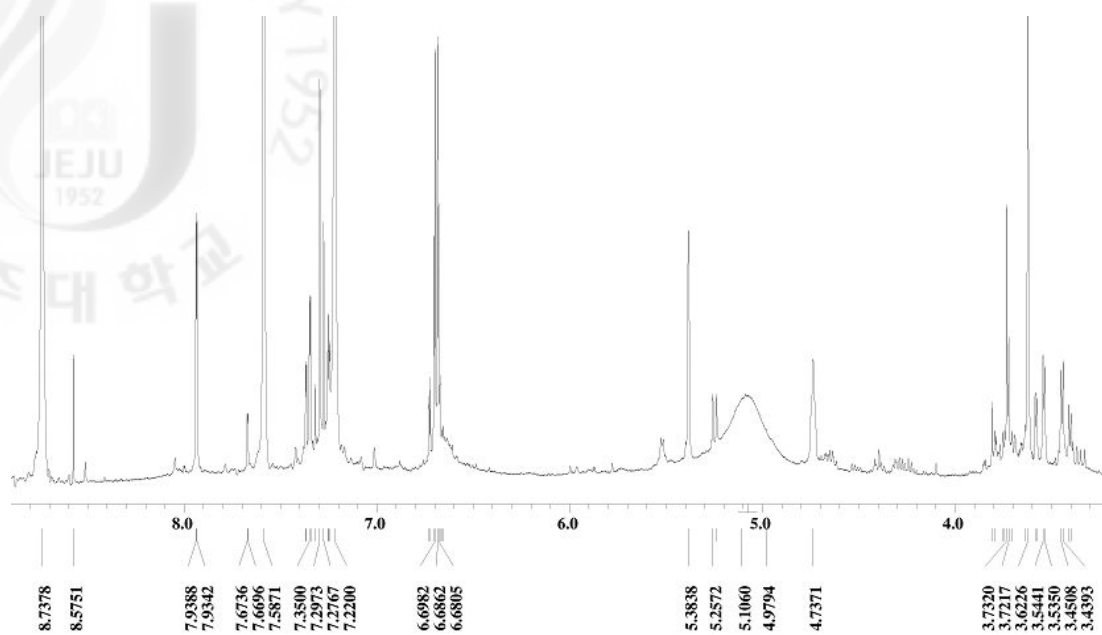


Figure 35.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 10 in pyridine- $\text{d}_5$

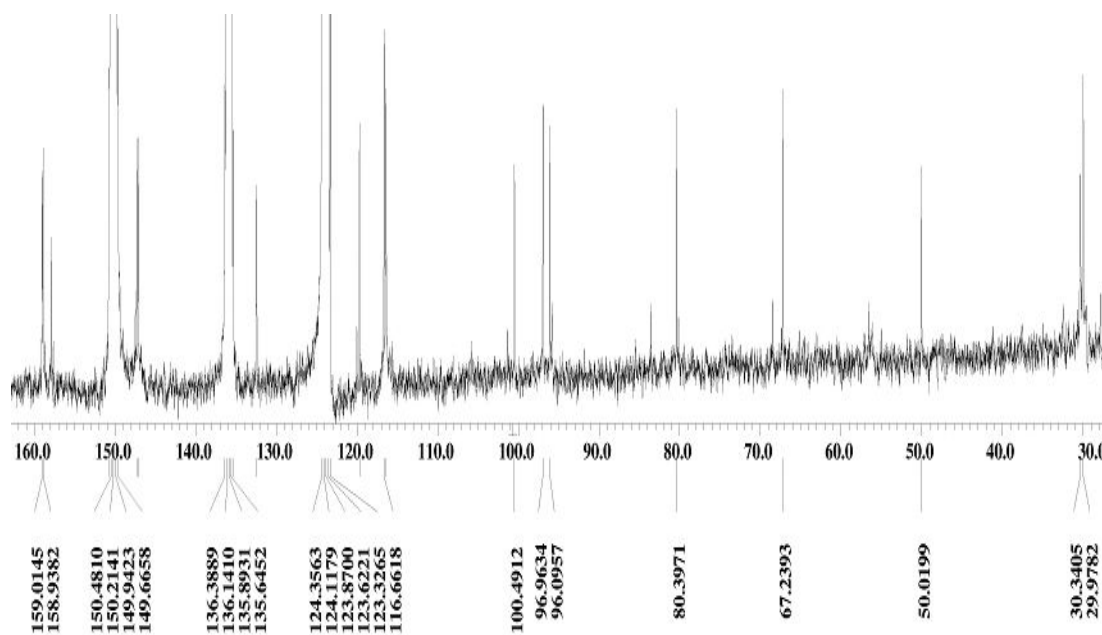


Figure 36.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 10 in pyridine- $\text{d}_5$

### 1-11. Compound 11의 구조 동정

잘게 분쇄한 합다리나무 가지 1 kg을 70% EtOH로 추출한 후 용매분획 하였다. 이 중 EtOAc층을 가지고 감압분획 하였다(Figure 5). VLC를 통해 얻어진 분획물 중에 V.He20(n-Hex/EtOAc = 20/80 , 183.7 mg)을 MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/2/1 혼합용매에 녹은 상층액 Liq-fr.(20.6 mg)과 녹지 않고 가라앉아있는 S-fr.(179.4mg)을 나눈 후에 S-fr.(179.4 mg)을 CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1의 용매조건으로 sephadex LH-20 CC을 수행하여 분리한 V.He20-se.3(33.4 mg)을 다시 methanol에 녹은 상층액 Liq-fr.과 녹지 않고 가라앉아있는 S-fr.으로 분리했다. methanol에 녹은 상층액 Liq-fr.에서 compound 11(3.7 mg)를 얻었다.

Compound 11의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 400MHz), <sup>13</sup>C-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 100MHz)을 통하여 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR data를 통해서 화합물의 탄소의 개수가 8개 이상임을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR data에서 δ 7.56(1H, d, *J* = 2.0, H-1), 7.54(1H, dd, *J* = 8.1, 1.9, H-5), 6.81(1H, d, *J* = 8.2, H-4)는 각각 방향족 고리의 *ortho*, *meta* 위치에서 서로 coupling하고 있음을 알 수 있고, 이로 미루어 보아 서로 인접해 있는 proton으로 benzen ring을 갖는 구조로 예측하였다. <sup>1</sup>H-NMR data에서 δ 3.89(3H, s)와 <sup>13</sup>C-NMR data에서 δ 56.4의 signal로 methoxyl를 예상하였고 <sup>13</sup>C-NMR data에서 δ 171.7의 signal은 carbonyl기의 carbon으로, δ 152.0, 148.6의 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접하고 있어 deshielding 된 것으로 methoxyl기가 인접한 carbon과 hydroxy가 인접한 carbon임을 예상할 수 있었다.

이러한 <sup>1</sup>H-NMR 과 <sup>13</sup>C-NMR data와 문헌과<sup>27)</sup> 비교한 결과 compound 11은 vanillic acid로 구조를 동정하였다(Figure 37).

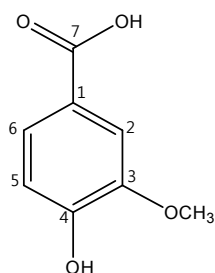


Figure 37. Chemical structure of compound **11**

Table 11. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR data of compound **11**

position	Compound <b>11</b> ( <sup>1</sup> H-NMR : 400MHz in CD <sub>3</sub> OD, <sup>13</sup> C-NMR : 100MHz in CD <sub>3</sub> OD)	
	δH (int, mult, <i>J</i> in Hz)	δ <sub>c</sub> (ppm)
1	7.56(1H, d, <i>J</i> = 2.0)	125.0
2		115.7
3		152.0
4	6.81(1H, d, <i>J</i> = 8.2)	148.6
5	7.54(1H, dd, <i>J</i> = 8.1, 1.9)	113.9
6		125.0
7	3.89(3H, s)	171.7
OCH <sub>3</sub>		56.4

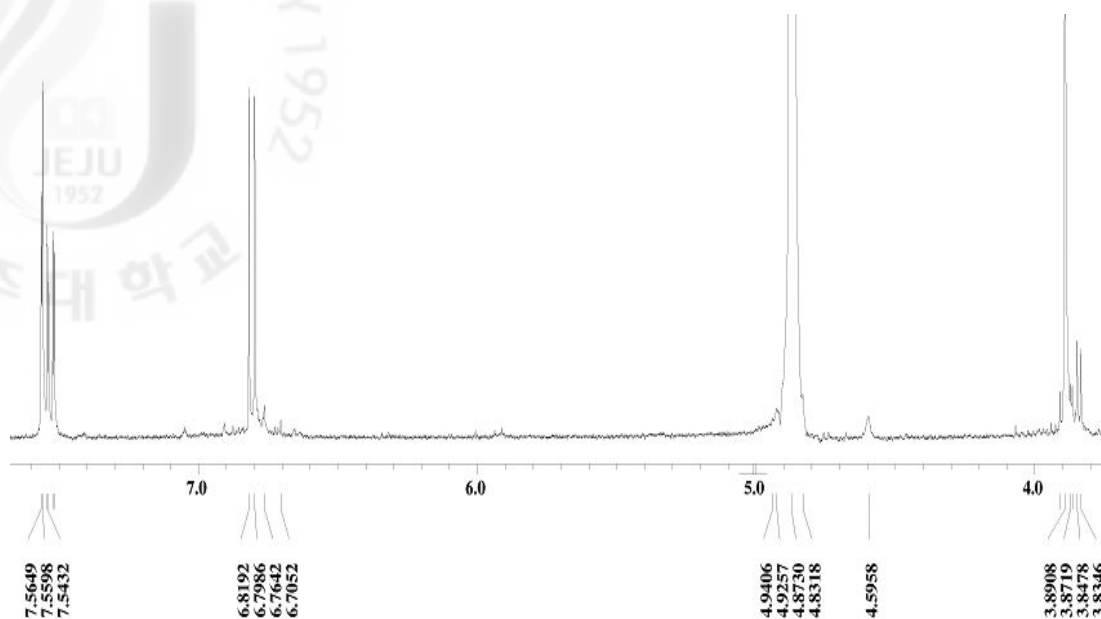


Figure 38.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **11** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

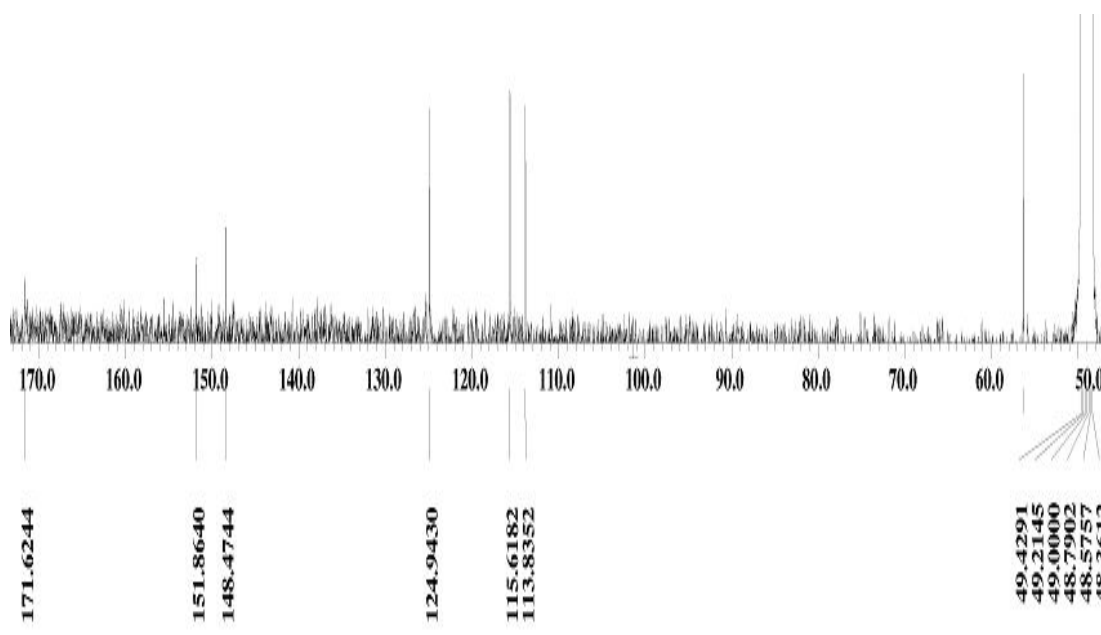


Figure 39.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **11** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 2. 합다리나무(가지)에 대한 활성실험 결과

### 2-1. DPPH radical scavenging activities

#### 2-1-1. 추출물과 각 용매 분획들에 대한 DPPH 라디칼 저해 활성

합다리나무(가지)의 70% EtOH 추출물과 각각의 용매 분획물에 대해 DPPH radical scavenging test를 실시한 결과는 다음 표와 같다(Table 12). 합다리나무(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 SC<sub>50</sub>값인 4.4 µg/mL와 비교했을 때, 8.2 µg/mL의 SC<sub>50</sub>값을 나타내는 EtOAc Fr.은 강력한 항산화제인 vitamin C 만큼의 강력한 활성을 나타내었다.

Table 12. DPPH radical scavenging inhibition and IC<sub>50</sub> values of extract and fraction

	scavenging inhibition(%)					SC <sub>50</sub> µg/mL
	6.25 µg/mL	12.5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	
Vit. C	46.2	81.3	94.8	96.0	96.7	3.46
Extract	26.1	44.3	77.0	91.4	91.9	13.38
<i>n</i> -Hex Fr.	12.4	17.3	19.9	28.0	42.0	>100
EtOAc Fr.	39.4	69.1	90.7	91.8	92.9	5.9
<i>n</i> -BuOH Fr.	23.8	46.4	70.5	91.4	92.5	14.19
Water Fr.	13.0	22.8	41.0	68.2	86.6	28.56

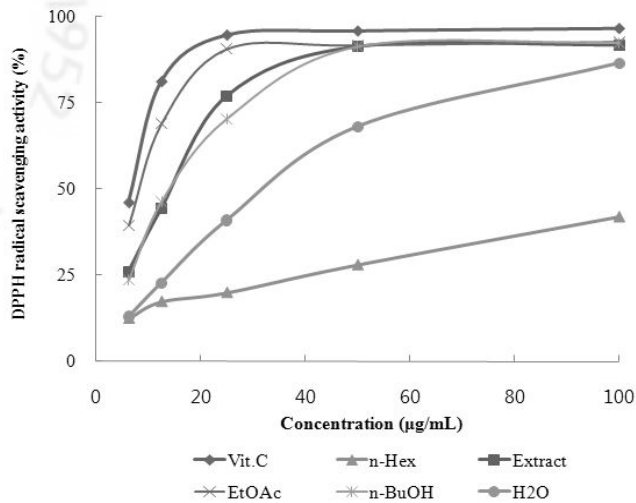


Figure 40. DPPH radical scavenging activities of extract and fraction

### 2-1-2. 분리된 화합물에 대한 DPPH 라디칼 저해 활성

합다리나무(가지) 70% EtOH 추출물의 EtOAc 분획층을 column chromatography를 이용해 분리한 6개의 화합물에 대한 DPPH radical scavenging 결과로서 각 화합물의 SC<sub>50</sub>값은 다음표의 내용과 같다(Table 40). 아래 표의 내용과 같이 대조군이 vitamin C만큼의 강력한 활성을 갖는 화합물은 없는 것으로 보인다.

Table 13. DPPH radical scavenging inhibition in each concentration and SC<sub>50</sub> values of isolated compound

Compound	Compound name	SC <sub>50</sub> (µg/mL)
1	betulin	>100
2	3β-acetoxyolean-12-en-28-acid	>100
3	3β-acetoxyolean-12-en-28-aldehyde	>100
4	3β-acetoxy-28-hydroxyolean-12-ene	>100
5	lupeol	>100
6	daucosterol	>100
control	Vit. C	4.4

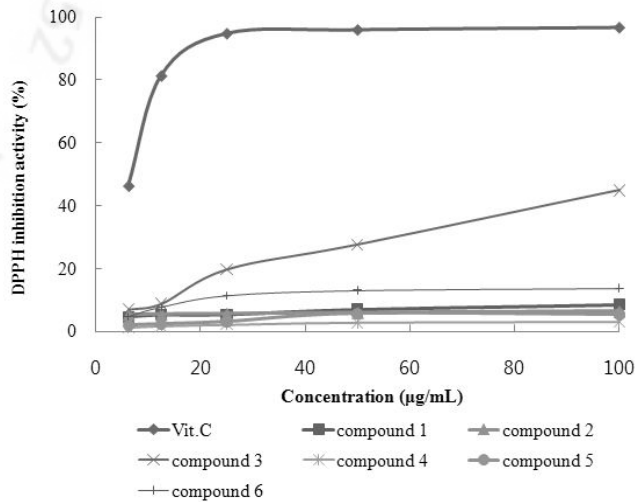


Figure 41. DPPH radical scavenging activities of isolated compound

## 2-2. Elastase inhibition activities

### 2-2-1. 추출물과 각 용매 분획들에 대한 Elastase 저해활성

합다리나무(가지)의 70% EtOH 추출물과 각각의 용매 분획물에 대해 elastase inhibition test를 실시한 결과는 다음 표와 같다(Table 14). 합다리나무 가지 70% 추출물과 모든 분획물은 elastase 저해활성 약하게 가지고 있음을 알 수 있었다.

Table 14. Elastase inhibition and IC<sub>50</sub> values of extract and fraction

	Elastase inhibition(%)					IC <sub>50</sub> µg/mL
	6.25 µg/mL	12.5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	
Ursolic acid	23.3	34.0	45.3	54.5	59.9	28.5
Extract	22.0	26.1	33.3	37.9	44.8	>100
<i>n</i> -Hex Fr.	13.5	20.1	25.3	30.3	37.8	>100
EtOAc Fr.	20.2	23.2	28.3	32.3	36.2	>100
<i>n</i> -BuOH Fr.	24.5	27.1	31.9	36.4	39.8	>100
Water Fr.	34.3	37.8	41.5	43.6	49.2	>100



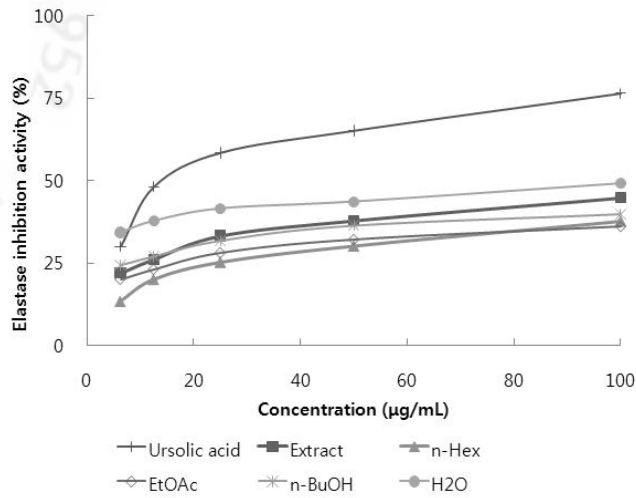


Figure 42. Elastase inhibition activities of extract and fraction

### 2-2-2. 분리된 화합물에 대한 Elastase 저해 활성

합다리나무(가지) 70% EtOH 추출물의 EtOAc 분획층을 column chromatography를 이용해 분리한 6개의 화합물에 대한 Elastase 저해활성 결과로서 각 화합물의 IC<sub>50</sub>값은 다음표의 내용과 같다(Table 15). 아래 표의 내용과 같이 6개의 분리된 화합물 중에 Compound 1(betulin), compound 6(oleanolic acid)은 대조군인 Ursolic acid 만큼의 좋은 활성을 나타내었다.

Table 15. Elastase inhibition inhibition in each concentration and IC<sub>50</sub> values of isolated compound

Compound	Compound name	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1	betulin	39.31
2	3β-acetoxyolean-12-en-28-acid	>100
3	3β-acetoxyolean-12-en-28-aldehyde	>100
4	3β-acetoxy-28-hydroxyolean-12-ene	>100
5	lupeol	88.16
6	daucosterol	>100
7	oleanolic acid	39.53
control	Ursolic acid	28.5

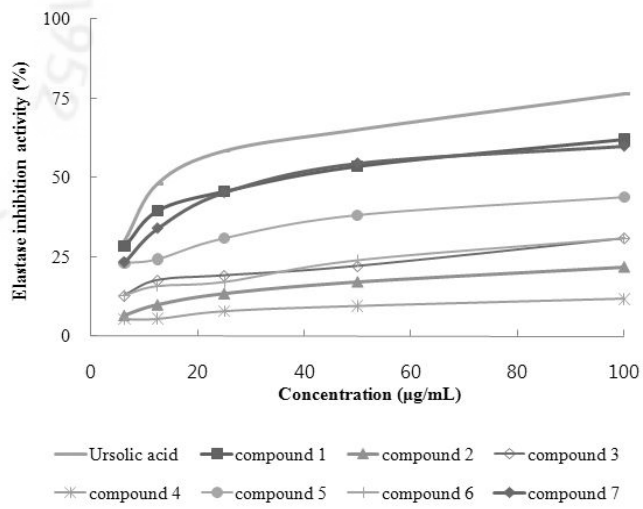


Figure 43. Elastase inhibition activities of isolated compound

#### IV. 결론

제주도에 자생하는 식물을 이용하여 천연 항산화성분과 기능성화장품 소재 개발 가능성을 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다. 소재 개발에 대한 연구는 제주 자생식물 중 합다리나무의 가지 부분을 이용하여 화합물을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 항산화와 주름개선 기능성화장품으로 활용 가능한 생리활성을 검색하는 것으로 진행되었다.

합다리나무(가지) 70% EtOH 추출물을 *n*-Hexane층, ethyl acetate층, *n*-Butanol층 및 Water층으로 용매 분획하고, 분획물에 대하여 DPPH radical scavenging test와 elastase inhibition test를 실시하였다. 그 결과 DPPH radical scavenging test에서 합다리나무(가지)의 추출물과 각각의 용매분획물 중 ethyl acetate층과 *n*-Butanol 층에서 radical scavenging에 대조군인 Vitamin C만큼의 강력한 활성을 나타내었다. Elastase inhibition test에서는 추출물과 모든 분획층에서 elastase inhibition에 대해 대조군인 ursolic acid와 비교 하였을 때 활성이 있음을 확인 할 수 있었다. 이러한 활성 결과에 따라 EtOAc 분획층에 들어있는 화합물을 규명하고자 실험을 진행하였다. EtOAc 분획층을 가지고 VLC(Vacuum Liquid Chromatography)를 사용하여 극성에 따라 분획층을 좀 더 세분화 시키고 normal-phase silica gel과 sephadex LH-20을 이용하여 column chromatography를 실시하여 화합물들은 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR spectrum을 이용하여 확인하였고 그 자료를 토대로 문헌과 비교한 결과, betulin, 3 $\beta$ -acetoxyolean-12-en-28-acid, 3 $\beta$ -acetoxyolean-12-en-28-aldehyde, 3 $\beta$ -acetoxy-28-hydroxyolean-12-ene, lupeol, daucosterol, oleanolic acid, maslinic acid, catechin, *epi*-catechin, vanillic acid의 11개의 화합물 구조를 동정하였다. 이 화합물들은 합다리 나무 가지에서 처음 분리된 화합물이다. Elastase 저해활성 실험에서 대조군인 Ursolic acid 의 IC<sub>50</sub>값인 28.5  $\mu$ g/mL와 비교했을 때 betulin의 IC<sub>50</sub>값은 39.3  $\mu$ g/mL, oleanolic acid 의 IC<sub>50</sub>값은 39.5  $\mu$ g/mL으로 elastase inhibition에서 때

우 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다.

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

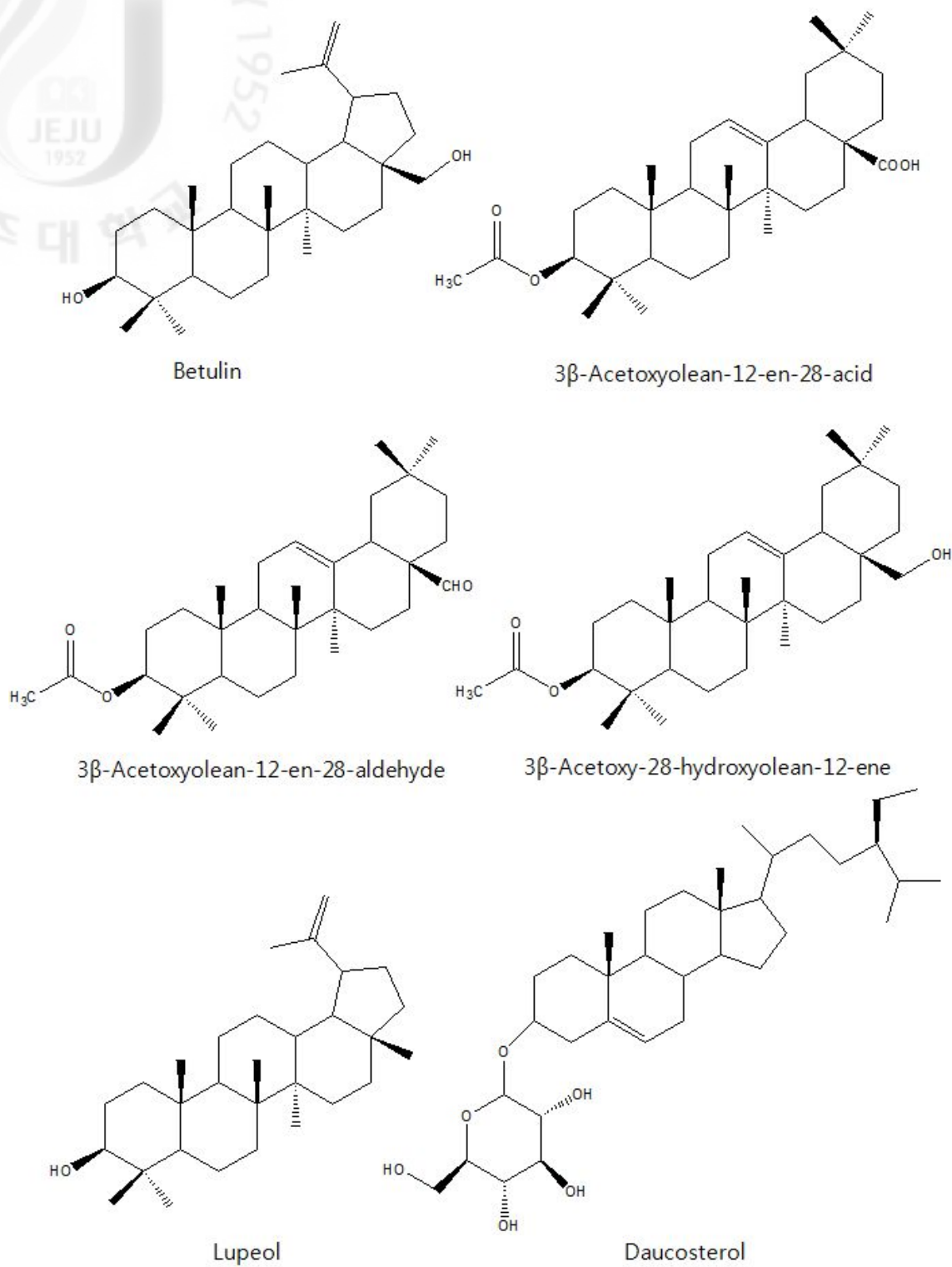
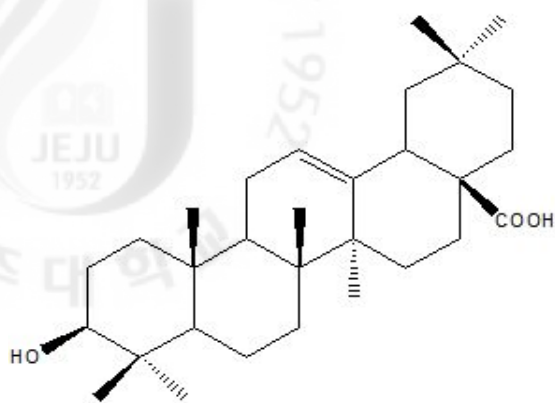
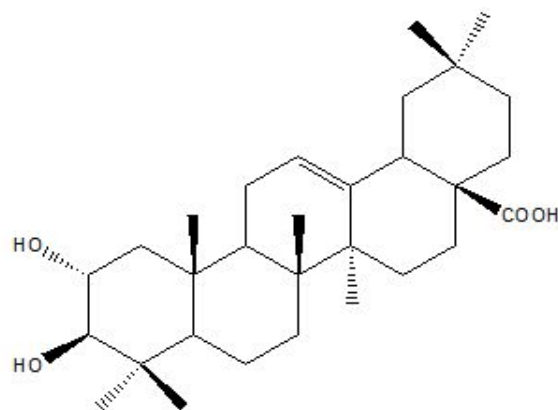


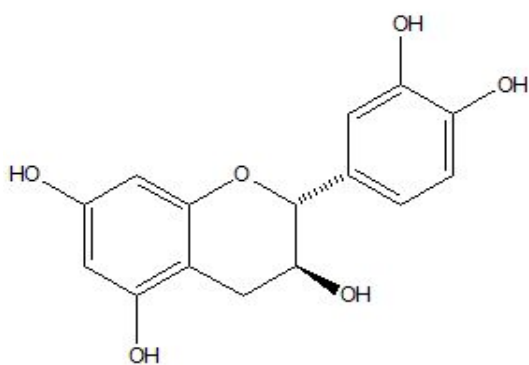
Figure 44. Isolated compound



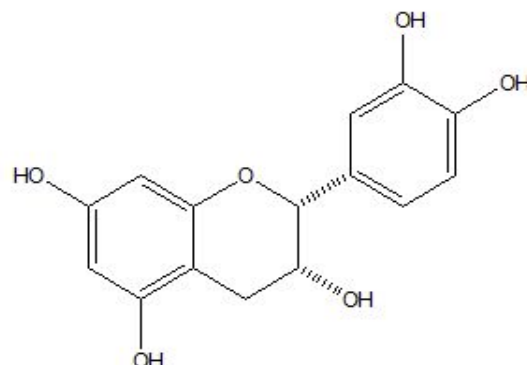
Oleanolic acid



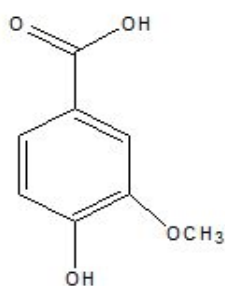
Maslinic acid



Catechin



*epi*-Catechin



Vanillic acid

Figure 45. Isolated compound

## V. 참고문헌

- 1) 경기열 (2006), “기능성화장품 개발 전략”, 한국패션뷰티학회, 4(4), 1-6.
- 2) 이주미 (2007), “기능성 화장품의 현황과 전망에 관한 연구” 한국뷰티학회지, 5(1), 29-46.
- 3) 하병조 (2004), 기능성화장품,신광출판사, p.15.
- 4) 식품의약품안전청(KFDA), <http://www.kfda.go.kr>
- 5) Min-jung Jang, Soon-Ju Cheon, Hui-Yeong Kim, Dae-Jun Kwoen, Hak-Yoon Kim, Sea-Hyun Kim, Jin-Tae Lee, The Anti-Wrinkle and Whitening Effect of Extract of *Castanea crenata* Inner Shell (2011), Journal of Lif Science, 21(5), 734-738.
- 6) 고희철 (2010), 진굴, 제주조릿대 및 미역쇠 성분 동정 및 생리활성 연구, 제주대학교 대학원, 박사학위논문심사청구.
- 7) 성현철, 정홍대, 박경덕, 이원주, 이석중, 김도원, 전종택, 김영주 (2008), 해양 생물 추출물을 함유한 주름 개선제의 치료효과, 대한피부과학회지, 46(7), 896-892.
- 8) Ae-Kyung Lim, Yu-Jung, Kil-Soo Kim, Yong-Hae Kim, Jung-Hoon Kwak, Joo-Heon Hong, Hak Yoon Kim, Dae Ik Kim (2009), Skin UV B Photo Aging Effect from Extract of Fermented *Reynoutria eplliptica*, J Korea Soc Elastase,Society of Cosmetic Scientists of Korea, 35(1), 19-25.
- 9) Mi Hee Oh, Ju Eun Lee, Su Yeon Kim, Kyoung Chan Park, Hye Young Yun, Kwang Jin Baek, Nyoun Soo Kwon, Dong Seak Kim (2009), Screening System Establishment for Potential Anti-wrinkle Agent Using Human Fibroblast Elastase, Society of Cosmetic Scientists of Korea, 35(1) 19-25.
- 11) Se-Jin Choi, Yeon Sil Lee, Jin-Kyung Kim, Jin Kyu Kim, Sung Soon Lim (2010), Physiological Activities of Extract from *Edible Mushrooms*, Korean Society of Food Science and Nutrition, 39(8) 1087-1096.

- 12) Hee Jin Kim, Tagon Kim, Whan Yul Kang, Baek Hyun, Hea Young Cheon, Bo Young Kim, Donguk Kim (2010), Development of Anti-Wrinkle Agent from *Nelumbo nucifera* Root Extract, Korea Chemical Engineering Research, 48(4) 413-416.
- 13) Yunus Ahmed, Md. Hossain Sohrab, Sharif M. Al-Reaz, Faqir Shahidulla Tareq, Choudhury M. Hasan, M.A. Sattar (2010) Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*, Food and Chemical Toxicology, 48(2), 549-552.
- 14) Joo-Hee Kwon, Min-Jung Chang, Hyo-Won S대, Jeong-Hun Lee, Byung-sun Min, Min-Kyun Na, Jin-Cheol Kim, Mi-Hee Woo, Jae-Sue Choi, Hyeong-Kyn Lee, Ki-Hwan Bae (2008) Triterpenoids and a Sterol from the Stem-bark of *Styrax japonica* and their Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition Activities, Phytochemistry Research, 22, 1303-130.
- 15) Mi-Ran Kim, Hyang-Hee Lee, Kyung-Soo Hahm, Young-Hee Moon, Eun-Rhan Moon (2004) Pentacyclic Triterpenoids and Their Cytotoxicity from the Stem Bark *Styrax japonica* S. et Z., Archives of Pharmacal Research, 27(3), 283-286.
- 16) Satomi Furukawa, Naomichi Takagi, Tsuyoshi Ikeda, Masateru Ono, Alaa Mohamed Nafady, Toshihiro Nahara, Hiroyuki sugimoto, Shima Doi, Hideo Yamada (2002) Two Novel Long-Chain Alkanoic Acid Esters of Lupeol from Alecrim-Propolis, Chemical Pharmaceutical Bulletin, 50(3), 439-440.
- 17) Lee J.H., Lee J.Y., Park J.H., Jung H.S., Kim J.S., Kang S.S., Kim Y.S., Han Y (2007) Immunoregulatory activity by daucosterol, a  $\beta$ -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice, Vaccine, 25(19), 3834-3840.
- 18) Muhammad Shaiq Ali, Muhammad Saleem, Waqar Ahmad, Masood Parvez, Raghav Yamdagni (2002), A chlorinated monoterpene keton, acylated  $\beta$ -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia*(Lamiaceae), Phytochemistry, 59(8), 889-895.



- 19) 김상숙 (2011), 새덕이나무 추출물의 활성성분 및 제주 자생식물 에센셜 오일의 항균, 항염 활성 규명, 제주대학교 대학원, 석사학위논문청구.
- 20) Werner Seebacher, Nebojsa Simic, Robert Weis, Robert Saf, Olaf Kunert (2003), Spectral Assignments and Reference Data, *Magenetic Resonance in Chemistry*, 41, 636-638.
- 21) Gohari A.R., Saeidnia S., Haji Akhoundi A., Abd Elahi M., Nezafati M. (2009), Isolation and Quantificative Analysis of Oleanolic Acid from *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey., *Medical Plants*, 8(5), 65-69.
- 22) Yoshiki Kashiwada, Hui-Kang Wang, Tsuneatsu Nagao, Susumu Kitanaka, Ichiro Yasuda, Toshihiro Fujioka, Takashi Yamagishi, L. Mark Cosentino, Mutsuo Kozuka, Hikaru Okabe, Yasumasa Ikeshiro, Chang-Qi Hu, Eric Yeh, Kuo-Hsiung Lee (1998), Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid, Pomolic Acid, and Structurally Related Triterpenoids, *Natural Product*, 61(9), 1090-1095.
- 23) Lom Yang Moo, Norhanom Abdul Wahab, Nordin Haji Lajis, Abdul Manaf Ali (2010), Chemopreventive Properties of Phytosterols and Maslinic Acid Extracted from *Coleus tuberosus* in Inhibition the Expression of EBV Early-Antigen in *Raji* Cells, *Chemistry & Biodiversity*, 7, 1267-1275.
- 24) Júlio C. A. Tanaka, Gentil J. Vidotti, Cleuza C. da Silva (2003), A New tormentic acids derivative from *Luehea diaricata* Mart.(Tiliaceae), *Brazil Chemical Society*, 14(3), 475-478.
- 25) M. Wermeille, E. Turin, L.A. Griffiths (1983) Identification of major urinary metabolites of (+)-catechin and 3-O-methyl-(+)-catechin in man, *Eupopean Journal of Drug Metabolism and Phamacokinetics*, 8(1), 77-84.
- 26) 강유미 (2011), 뽕잎피나무(*Tilia taquetii*) 가지로부터 항산화 미백활성 성분 분리, 제주대학교 대학원, 석사학위논문청구.
- 27) 박성환 (2011) 좁은잎천선과로부터 항산화 및 티로시나아제 저해 활성 성분 규명, 제주대학교 대학원, 석사학위논문청구.

## Abstract

In this study, anti-oxidant and anti-elastase activities were examined on extract from *Meliosma oldhamii* 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 branches of *Meliosma oldhamii* with 70% aqueous ethanol. The ethanol extract was partitioned successively into *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol. The extract and fractions were subjected to DPPH radical scavenging and elastase inhibition tests. In these studies, 70% ethanol extract and ethyl acetate, *n*-butanol fractions showed strong anti-oxidative activity. However, they showed weak elastase inhibition activities. The identification of activities constituent were conducted with the EtOAc-soluble fraction. Repeated column chromatography on normal-phase silica gel and Sephadex LH-20 resulted in the isolation of thirteen compounds; betulin (1), 3 $\beta$ -acetoxyolean-12-en-28-acid (2), 3 $\beta$ -acetoxyolean-12-en-28-aldehyde (3), 3 $\beta$ -acetoxy-28-hydroxyolean-12-ene (4), lupeo (5), daucosterol (6), oleanolic acid (7), maslinic acid (8), catechin (9), *epi*-catechin (10), vanillic acid (11). As far as we know, all of the compounds 1-11 were isolated for the first time from this plant. Their structure was elucidated on the basis spectroscopic data from 1D and/or 2D NMR studies as well as by comparison of the data with the literature values. Compounds 1 (IC<sub>50</sub> 39.3  $\mu$ g/mL) and 7 (IC<sub>50</sub> 39.3  $\mu$ g/mL) showed strong elastase inhibition activities compared to ursolic acid (IC<sub>50</sub> 12.1  $\mu$ g/mL) as a positive. Based on these results, *Meliosma oldhamii* branches could be potentially applicable as anti-oxidant and/or anti-wrinkle ingredient.

## 감사의 글

어느덧 시간은 흘러 깃털 같은 눈방울이 하나씩 떨어지는 겨울이 되었습니다. 교육대학원 합격을 알았을 때, 기나긴 레이스의 출발점에 서 있는 두렵고도 설레는 기분이었습니다. 하지만 그 짧고도 긴 시간이 지나 졸업의 문턱 앞에 서 있습니다. 인내의 그 끝이 달콤함을, 그러기 위한 끈기를, 그리고 실수의 창피함 대신 대안을 찾는 눈과 귀를 갖추는데 걸린 2년 5개월이라는 시간은 결코 짧은 글 몇 줄로 표현할 수 없는 값진 시간이었습니다. 그러한 시간을 보내는데 있어 도움을 주셨던 많은 분들께 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

레이스의 시작하게 되었을 때, 절망하고 좌절하였을 때, 내가 하고 있는 일에 대한 기쁨과 자신감을 가지게 되었을 때 묵묵히 지켜봐 주시고 지원해 주시던 이남호 교수님, 그 분에게서 진정한 멘토의 모습을 배웠습니다. 신뢰와 소통의 중요성을 몸소 보여주신 교수님의 끝자락이라도 닮아가면서 살아가고 싶습니다. 그리고 정말 감사드린다는 말씀을 전하고 싶습니다.

언제나 따듯한 미소로 반겨 주시던 정덕상 교수님, 교육대학원생이란 위치에서 최선을 다하는 길이 무엇인지에 대해 진지하게 조언해 주시던 김덕수 교수님, 잘 가르치기 위하여 학습의 흐름에 대한 전문적 자질을 갖추는 방법에 대해서 열강 해주시던 변종철 교수님, 논문을 준비하면서 저의 모자란 점과 앞으로 갖추어야 할 점을 조언해주신 강창희 교수님, 여유와 창의적인 생각이 사람의 성장에 긍정적인 영향을 미침을 일깨워 주는 김원형 교수님, 자주 뵙지는 못했지만 턱수염이 인상적인 이선주 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

실험실 생활을 하면서 부딪치는 나의 문제점에 대해 해답을 찾을 수 있도록 등불이 되어 주시는 백종석 박사님, 실험실 생활을 하는데 도움을 주신 오태현 박사님, 김상숙 박사님과 이지아 선생님께도 감사의 말씀을 드립니다. 박사과정 김정은, 석사과정인 고하나, 김수영, 양인정, 학부생인 김성천, 한정환, 강지미, 이라점에게도 고맙다고 말하고 싶습니다. 실험실 사람들의 도움이 없었다면 결코 이 논문을 끝을 맺을 수 없었을 것입니다.

커피 한잔 쉽표와 수다의 매력을 알게 해준 분석화학실험실의 김현아, 황은영,

부준오, 이승훈에게도 고맙다고 전하고 싶습니다. 한해가 지날수록 각자 인생의 목표한 바가 달라 자주 만나지 못하지만 언제나 서로를 격려하고 아낌없는 조언을 해주는 내 인생의 빛과 소금인 친구들 권수정, 정원실, 강미숙, 김수연, 이경오, 강향연, 박상임, 양성년, 허근혁, 김민균, 강경진, 김경보에게도 고마움을 전합니다. 2011년 사대부고 교생실습 중에 만난 5월의 따사로운 햇살 같은 인연인 현진아(현수학), 서다예(서중국어), 김수정(김아트), 권정연(권역사)에게도 감사의 말을 전합니다. 이들이 있어서 그동안 힘든 시간도 이겨낼 수 있는 힘이 되었습니다.

그리고 언제나 양손에 두툼하게 사탕을 쥐어 주시면서 미소 지으시던 할아버지 이만근님, 무뚝뚝함 속에 따스함이 배어 있는 할머니 이안지님, 이모 이연정님과 이정희님, 삼촌 이승창님과 이철승님, 10년이라는 시간 동안 울고 웃고 많은 것을 같이한 가족과 같은 사람 이순봉과 그의 부모님 이창환님과 강영자님에게도 감사의 말을 드립니다.

마지막으로 세상 무엇과도 바꿀 수 없는 나의 가족이자 최고의 사랑 엄마 이명선님과 아빠 변한중님에게 감사의 말씀을 드립니다. 언제나 건강하세요. 그리고 사랑합니다. 언제나 혼만 내도 나를 따라주고 좋아해주는 내 영혼의 데칼코마니인 변선희에게도 고맙다고 언제나 언니가 사랑한다고 전하고 싶습니다.

석사과정을 끝맺으면서도 아직은 내 안의 채워짐보다 모자람이 많습니다. 하지만 앞으로 더 끊임없이 노력하고 채워나가겠습니다. 제 자신을 일으켜 세워나가겠습니다. 지금의 여기까지 올 수 있도록 도움을 주신 모든 분들에게 감사드린다는 말을 전합니다. 그리고 졸업은 또 다른 시작이므로 앞으로도 잘 부탁드립니다. 이 말을 전하면서 이 논문의 끝을 맺습니다. 언제나 행복하세요.

2011년 12월  
변 상 희 드림