



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

소사나무 가지로부터 항산화 및
항염 활성 성분 규명

濟州大學校 大學院

化 學 科

고 하 나

2012年 2月

소사나무 가지로부터 항산화 및 항염 활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

高 하 나

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2012年 2月

高하나의 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

2012年 2月

Identification of Anti-oxidative and
Anti-inflammatory Constituents from the
Branches of *Carpinus turczaninowii*

Ha Na Ko

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2012. 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 Schemes | iii |
| List of Tables | iii |
| List of Figures | iii |
| List of Abbreviations | vi |
| Abstract | vii |
| | |
| I. 서론 | 1 |
| | |
| II. 재료 및 방법 | 6 |
| 1. 시약 및 기기 | 6 |
| 2. 재료 | 7 |
| 3. 추출, 분획 및 분리 | 8 |
| 3-1. 소사나무 가지의 추출 및 분획 | 8 |
| 3-2. Ethyl acetate 분획의 활성 성분 분리 | 9 |
| 4. 활성실험 | 11 |
| 4-1. 항산화 활성 실험 | 11 |
| 4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정 | 11 |
| 4-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정 | 11 |
| 4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험 | 12 |
| 4-1-4. ABTS radical cation 소거 활성 실험 | 13 |
| 4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 | 15 |
| 4-2-1. 세포배양 | 15 |
| 4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가 | 15 |
| 4-2-3. 세포독성 평가 | 15 |
| 4-2-4. 염증성 cytokine IL-6(interleukin-6) 생성 억제 평가 | 16 |
| | |
| III. 결과 및 고찰 | 17 |

| | |
|---|----|
| 1. 화합물의 구조 결정 | 17 |
| 1-1. Compound 1과 Compound 2의 구조해석 | 17 |
| 1-2. Compound 3과 Compound 4의 구조해석 | 22 |
| 1-3. Compound 5와 Compound 6의 구조해석 | 27 |
| 1-4. Compound 7과 Compound 8의 구조해석 | 36 |
| 2. 항산화 활성 실험 결과 | 41 |
| 2-1. 총 폴리페놀 함량 측정 | 41 |
| 2-2. 총 플라보노이드 함량 측정 | 42 |
| 2-3. DPPH radical 소거 활성 | 44 |
| 2-3-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성 | 44 |
| 2-3-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성 | 45 |
| 2-4. ABTS radical cation 소거 활성 | 46 |
| 2-4-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성 | 46 |
| 2-4-2. 분리된 화합물의 ABTS radical cation 소거 활성 | 48 |
| 3. 항염 활성 실험 결과 | 49 |
| 3-1. 추출물 및 분획물의 Nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가 | 49 |
| 3-2. Compound 5, 6의 Nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가 | 51 |
| 3-3. 염증성 cytokine IL-6 생성 억제 평가 | 52 |
| IV. 요약 및 결론 | 53 |
| V. 참고문헌 | 55 |

List of Schemes

| | |
|--|----|
| Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from <i>C. turczaninowii</i> | 8 |
| Scheme 2. Procedure of isolation of compounds 1, 3, 4 from <i>C. turczaninowii</i> | 9 |
| Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 2, 5, 6, 7, 8 from <i>C. turczaninowii</i> | 10 |

List of Tables

| | |
|--|----|
| Table 1. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 1 and 2 | 19 |
| Table 2. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 3 and 4 | 24 |
| Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 5 and 6 | 29 |
| Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 7 and 8 | 38 |
| Table 5. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds | 45 |
| Table 6. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of isolated compounds | 48 |

List of Figures

| | |
|---|---|
| Figure 1. Oxidative and anti-oxidative systems in the cells | 2 |
| Figure 2. Chemical structures of some anti-oxidants | 3 |
| Figure 3. Isolated flavanone and flavonol glucosides of <i>C. turczaninowii</i> | 5 |
| Figure 4. Picture of <i>Carpinus turczaninowii</i> | 7 |

| | |
|--|----|
| Figure 5. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant | 12 |
| Figure 6. Scavenging of ABTS ⁺ radical by an anti-oxidant | 14 |
| Figure 7. Chemical structure of compound 1 | 18 |
| Figure 8. Chemical structure of compound 2 | 18 |
| Figure 9. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 | 20 |
| Figure 10. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 | 20 |
| Figure 11. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 | 21 |
| Figure 12. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 | 21 |
| Figure 13. Chemical structure of compound 3 | 23 |
| Figure 14. Chemical structure of compound 4 | 23 |
| Figure 15. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 | 25 |
| Figure 16. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 | 25 |
| Figure 17. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 | 26 |
| Figure 18. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 | 26 |
| Figure 19. Chemical structure of compound 5 | 28 |
| Figure 20. Chemical structure of compound 6 | 28 |
| Figure 21. ¹ H-NMR spectrum of compound 5 | 30 |
| Figure 22. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5 | 30 |
| Figure 23. DEPT-135 spectrum of compound 5 | 31 |
| Figure 24. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 5 | 31 |
| Figure 25. HMQC spectrum of compound 5 | 32 |
| Figure 26. HMBC spectrum of compound 5 | 32 |
| Figure 27. ¹ H-NMR spectrum of compound 6 | 33 |
| Figure 28. ¹³ C-NMR spectrum of compound 6 | 33 |
| Figure 29. DEPT-135 spectrum of compound 6 | 34 |
| Figure 30. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 6 | 34 |
| Figure 31. HMQC spectrum of compound 6 | 35 |
| Figure 32. HMBC spectrum of compound 6 | 35 |
| Figure 33. Chemical structure of compound 7 | 37 |

| | |
|--|----|
| Figure 34. Chemical structure of compound 8 | 37 |
| Figure 35. ¹ H-NMR spectrum of compound 7 | 39 |
| Figure 36. ¹³ C-NMR spectrum of compound 7 | 39 |
| Figure 37. ¹ H-NMR spectrum of compound 8 | 40 |
| Figure 38. ¹³ C-NMR spectrum of compound 8 | 40 |
| Figure 39. Calibration curve for quantification of total phenolic compounds .. | 41 |
| Figure 40. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers | 41 |
| Figure 41. Calibration curve for quantification of total flavonoids | 43 |
| Figure 42. Total flavonoids of extract and solvent layers | 43 |
| Figure 43. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers | 44 |
| Figure 44. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers | 45 |
| Figure 45. DPPH radical scavenging activities of compounds 4 , 5 , 8 and vitamin C | 46 |
| Figure 46. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers | 47 |
| Figure 47. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers | 47 |
| Figure 48. ABTS ⁺ radical scavenging activities of compounds 4 , 5 , 6 , 8 and vitamin C | 48 |
| Figure 49. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract and solvent layers | 49 |
| Figure 50. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract, EtOAc layer and <i>n</i> -BuOH layer | 50 |
| Figure 51. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of compounds 5 and 6 | 51 |
| Figure 52. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6 by compounds 5 and 6 | 52 |

List of Abbreviations

| | |
|-------------------------|--|
| ABTS | 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) |
| brs | Broad singlet |
| <i>C. turczaninowii</i> | <i>Carpinus turczaninowii</i> |
| CC | Column chromatography |
| CD ₃ OD | Methanol- <i>d</i> ₄ |
| CDCl ₃ | Chloroform- <i>d</i> |
| CHCl ₃ | Chloroform |
| COSY | Correlation spectroscopy |
| d | Doublet |
| dd | Doublet of doublet |
| DEPT | Distortionless enhancement by polarization transfer |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl |
| EtOAc | Ethyl acetate |
| EtOH | Ethanol |
| Fr. | Fraction |
| HMBC | Heteronuclear multiple bond correlation |
| HMQC | Heteronuclear multiple quantum coherence |
| int | Integration |
| IL-6 | interleukin-6 |
| <i>J</i> | Coupling constant (Hz) |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| m | Multiplet |
| MeOH | Methanol |
| MTT | Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| <i>n</i> -BuOH | <i>n</i> -butanol |
| <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -hexane |
| s | Singlet |
| SC ₅₀ | Scavenging concentration of 50% |
| se | Sephadex LH-20 CC subfraction |
| TLC | Thin layer chromatography |
| V, v | VLC subfraction |
| Vit.C | Vitamin C |
| VLC | Vacuum liquid chromatography |

Abstract

Identification of Anti-oxidative and Anti-inflammatory Constituents from the Branches of *Carpinus turczaninowii*

Ha Na Ko

Department of Chemistry, Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

In this study, anti-oxidative and anti-inflammatory activities were examined on the extract from *Carpinus turczaninowii* branches and their biologically active constituents were identified.

The repeated column chromatography of ethyl acetate-soluble layer in this ethanol extract led to isolation eight constituents such as β -sitosterol (1), daucosterol (2), betulinic acid (3), pyracrenic acid (4), carpinontriol B (5), carpinontriol A (6), afzelin (7) and quercitrin (8). The structures of these compounds were identified by spectroscopic methods and by comparing their data to those in the literature. As far as we know, all of the compounds except quercitrin (8) were isolated for the first time from this plant.

To investigate the anti-oxidative and anti-inflammatory activities of the compounds, DPPH radical scavenging activity, ABTS⁺ radical scavenging activity and nitric oxide production inhibitory activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cell were examined.

The total phenolic contents for the extract and solvent layers (*n*-Hex,

EtOAc, *n*-BuOH, water) were estimated as 20.3, 3.1, 43.7, 35.4 and 13.8 mg (GAE/100 mg) respectively. In addition, the total flavonoid contents were measured as 9.0, 29.4, 14.9 and 2.4 mg (quercetin/100 mg) respectively for the extract and EtOAc, *n*-BuOH and water fractions.

For the anti-oxidation tests, the compounds **4** and **8** showed strong DPPH radical scavenging activities with SC_{50} of 55.2 and 62.4 μ M respectively, whose activities were comparable to a positive control vitamin C (SC_{50} 43.5 μ M). In addition, compounds **4**, **5**, **6** and **8** showed strong ABTS⁺ radical scavenging activities with SC_{50} of 34.1, 42.1, 45.8 and 29.6 μ M respectively, showing comparable activity to vitamin C (SC_{50} 31.6 μ M).

On the screening of anti-inflammatory activities, the compounds **5** and **6** showed the considerable inhibition on the production of nitric oxide for the RAW 264.7 cell without any cell toxicity.

Based on these results, *C. turczaninowii* branch extract could be potentially applicable as anti-oxidant and anti-inflammatory agent in cosmeceutical and/or pharmaceutical ingredient.

I. 서론

최근 의학의 발달과 생활환경의 개선에 의해 인간의 수명이 크게 연장됨에 따라 노화에 대한 관심이 높아지고, 이와 함께 많은 노화관련 연구가 이루어지고 있지만 노화현상은 매우 복잡하여 한 가지 기전으로 설명하기는 어렵다. 하지만 그 중에서도 현재 노화연구 분야에서 가장 주목을 받고 있는 것은 free radical설이다. Free radical설에 따르면 생물은 나이에 따라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 손상이 증가하는데, 이들 ROS는 생체가 외부로부터의 방사선, 자외선 등의 노출, 대기오염 물질, 항생제의 남용과 더불어 체내의 생화학적 반응에 의해 생성되며, 여러 가지 문제를 야기한다고 알려져 있다.^{1,2)}

인체는 약 60조개의 세포로 이루어져 있으며, 세포내 미토콘드리아에서 산소는 영양물질을 이용해서 에너지를 만드는 대사과정에 이용되며 약 2% 정도가 활성산소로 변하게 된다.³⁾ 생성된 활성산소는 식세포의 세포막에서 방출되어 세포에 침입한 이물질을 제거하는 살균작용을 하여 병원체로부터 인체를 보호하게 된다. 그러나 현대 산업화사회에 따르는 각종 오염(환경오염, 화학물질, 자외선, 혈액순환장애, 스트레스 등)으로 기인하여 인체의 자율처리능력 이상으로 발생되기도 한다.⁴⁾ 인체를 덮고 있는 최외부 기관인 피부는 여러 유해 환경과 접촉하고 있으며, 특히 산소와 항상 접촉하고 있다. 또한, 태양 자외선에 노출됨으로써 활성산소종으로 유도된 광산화적 손상을 지속적으로 받고 있다. 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화 반응의 개시, 단백질의 산화, DNA의 산화, 결합조직 성분인 콜라겐과 히아루론산 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 활성산소종이 관여함으로써 피부노화를 가속화시킨다.⁵⁾

일반적으로 활성산소종에는 $O_2^{\cdot-}$ (superoxide anion radical), $\cdot OH$ (hydroxyl radical)등의 oxygen radical 뿐만 아니라, H_2O_2 (hydrogen peroxide), 1O_2 (singlet oxygen)과 같은 몇 종류의 비라디칼, 그 외 생체성분과의 반응으로 유래된 $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$, $HOCl$ 등이 있다. 이들은 광산화-환원 반응과 수종의 효소 반응을 포함하는 다양한 과정 내에서 생성될 수 있다(Figure 1).

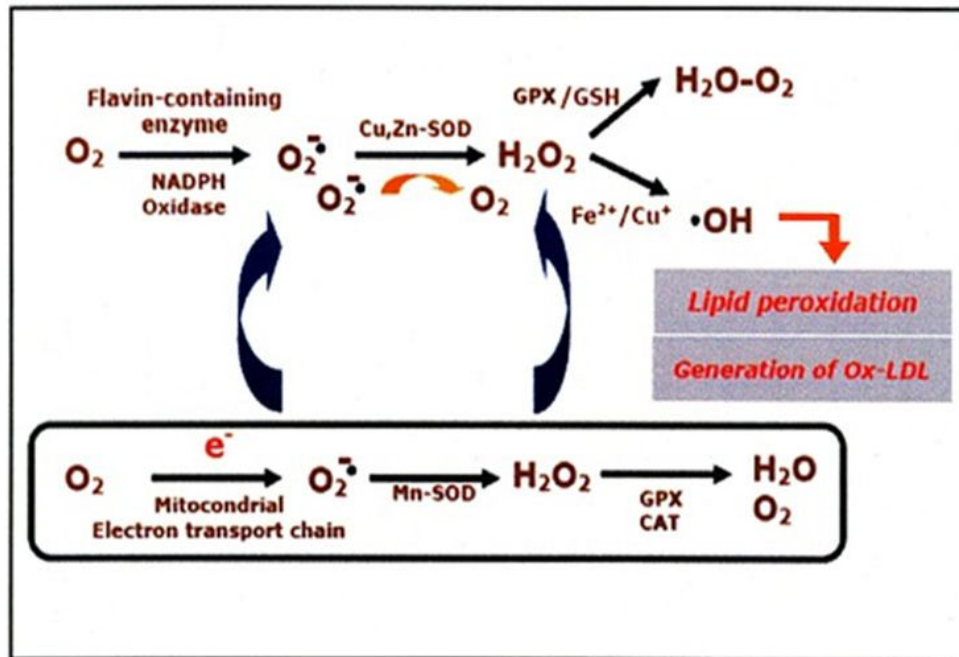


Figure 1. Oxidative and anti-oxidative systems in the cells

생체 내에는 이들에 대한 방어 기구로서 superoxide dismutase, catalase, peroxidase 등의 항산화 효소와, vitamin, glutathione과 같은 항산화 물질이 존재하여 활성산소에 대한 체내 항상성을 유지한다. 그러나 나이가 들거나 면역력이 저하되어 있는 경우, 생체 내 산화조절 시스템이 붕괴되어 세포는 산화적 공격을 적절히 방어하기가 어렵게 된다. 따라서 이러한 경우 외부에서 항산화제를 보충하여 항산화의 항상성을 유지케 하여 주어야 한다.⁶⁾

항산화제는 크게 합성 항산화제와 천연 항산화제로 구분하는데, 현재 널리 쓰이고 있는 대표적인 합성 항산화제로는 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), TBHQ(tertiary butylhydroquinone), PG(propyl gallate) 등이 있고, 대표적인 천연 항산화제로는 tocopherol과 ascorbic acid, carotenoids, flavonoids 등이 있다(Figure 2). BHA 및 BHT와 같은 합성 항산화제는 뛰어난 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되어 왔지만 발암성에 대한 의심이 있고, 체내 에너지 생산과 세포대사 및 호흡작용을 방해하며, 독성이 강하다는 문제점이 보고되어 사용이 제한적이다. 이에 안전성이 확보된 천연 항산화제

에 대한 관심이 고조되고 있다. 한편, tocopherol과 같은 대부분의 천연 항산화제는 안전하기는 하나 단독으로는 항산화 활성이 낮고 고가이어서 그 용도에 한계가 있기 때문에 보다 안전하면서도 강한 항산화 활성을 가진 물질을 천연물로부터 탐색하려는 연구가 활발히 전개되고 있다.^{7,8)}

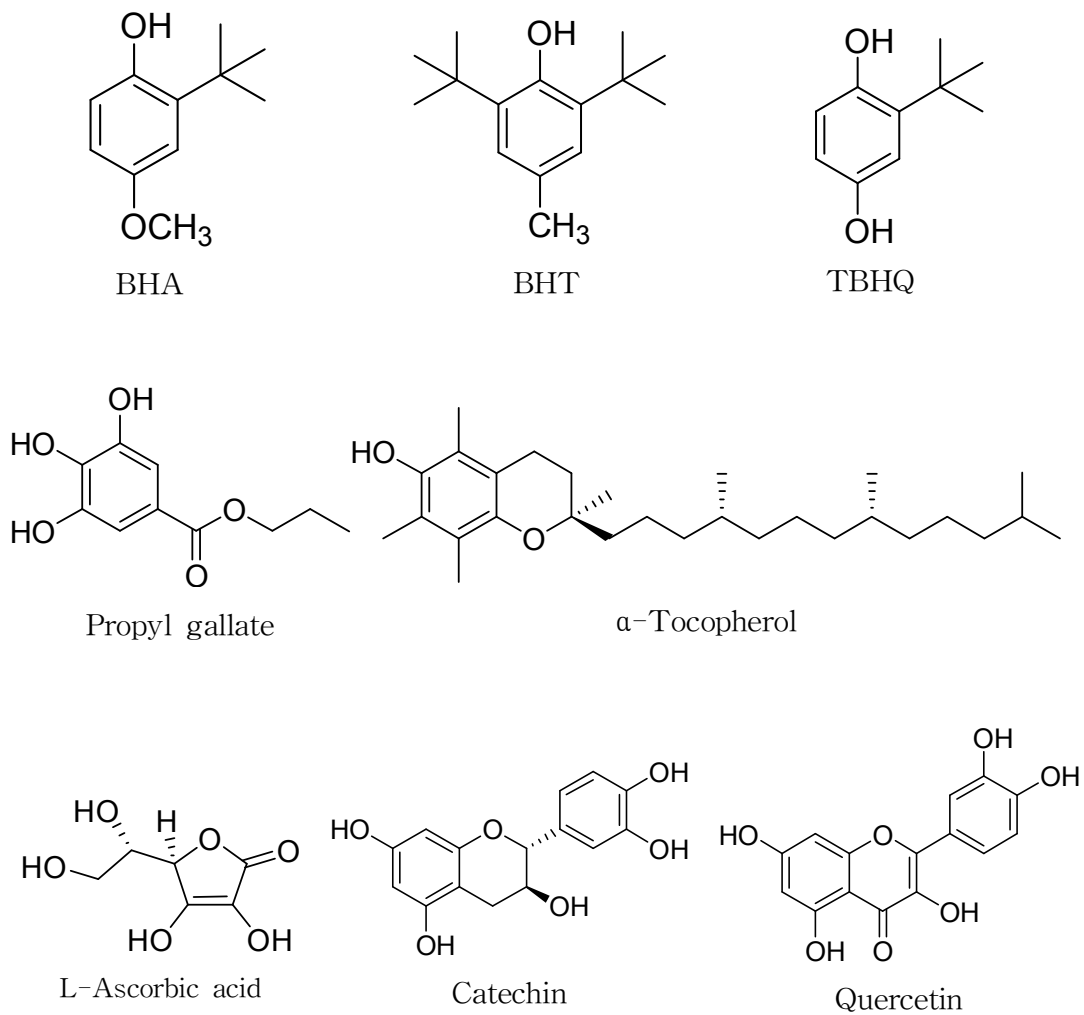


Figure 2. Chemical structures of some anti-oxidants.

염증반응은 상처나 감염, 또는 자가 면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서, 조직의 혈관확장에 의한 부종, 발열, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체반응이다.⁹⁾ 염증을 일으키는 요인으로는 세균에 의한 것이 가장 많으며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandin, hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증이 유발된다. 그런데 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 원인이 된다.¹⁰⁾ 이러한 반응은 주로 macrophage, neutrophil 등의 선천면역을 담당하는 세포가 생산하는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1(IL-1) 및 interleukin-6(IL-6)와 같은 염증성 cytokine 및 염증매개물질인 H₂O₂, prostaglandin E₂(PGE₂) 및 NO에 의하여 유도되는 것으로 보고되고 있다.¹¹⁾ 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7과 같은 macrophage 또는 monocyte에서 TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다. 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 PGE₂ 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase (COX-2)에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.¹²⁾

소사나무(*Carpinus turczaninowii*)는 자작나무과(Betulaceae) 식물로서 한국 특산종으로 제주에서 자라며 낙엽 교목으로 작은 가지와 잎자루에 털이 밀생하고 턱잎은 선형이다. 잎은 어긋나고 달걀모양이며 끝이 뾰족하거나 둔하고 밑은 둥글다. 잎 길이는 2~5 cm로서 겹톱니가 있고 뒷면 맥 위에 털이 있다. 꽃은 5월에 피고 열매는 견과로 달걀모양이며 10월에 익는다. 열매이삭은 길이 2~3 cm

이고 4~6개의 포가 달린다. 포는 반달모양이고 끝이 둔하며 톱니가 있고 밑 부분이 약간 열매를 둘러싼다. 소견과는 달걀모양이며 길이 5 mm 정도로서 지점이 있다.

현재까지 소사나무에 관한 연구로는 식물분류학 분야에서 앞으로부터 flavonoid 배당체¹⁴⁾가 분리 동정되어 보고되어 있다.

본 연구에서는 소사나무 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 유효성분을 분리하여 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화 및 항염 활성에 대한 연구를 진행하였다.

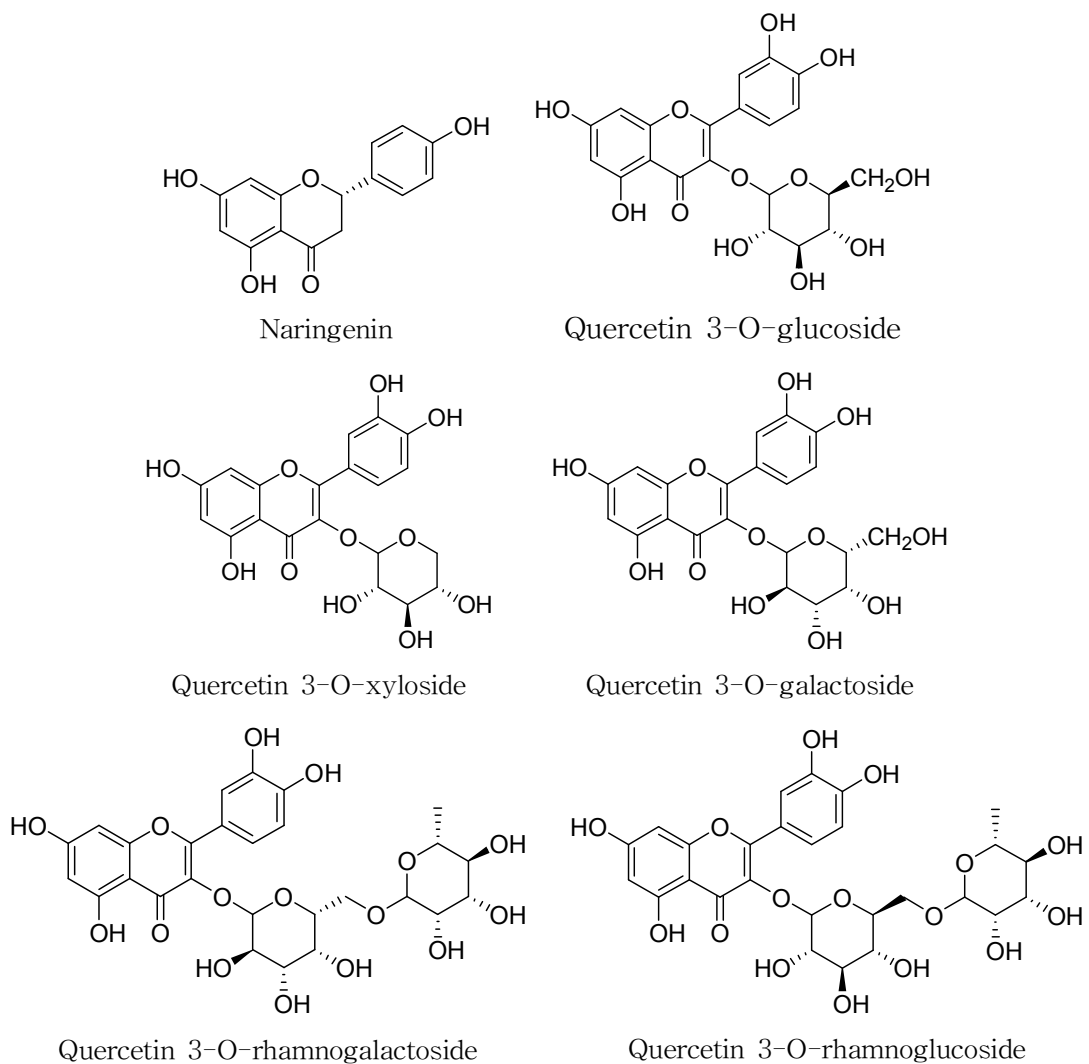


Figure 3. Isolated flavanone and flavonol glucosides of *C. turczaninowii*.¹⁴⁾

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merk, Junsei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography(VLC)에는 silica gel(2-25 μm , Sigma Co.), normal-phased column chromatography(CC)에는 silica gel(95-110 μm , Merk Co.)이 사용되었다. 분리 과정에 사용된 thin-layer chromatography(TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merk Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp(254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 SunriseTM(Tecan Co.)와 Biochrom Libra s22(cambridge Inc., England)를 이용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400(FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용용매로 CD₃OD, CDCl₃, C₅D₅N, DMSO-*d*₆를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 소사나무 가지(시료번호 : 308)는 2009년 12월에 제주 한라수목원에서 채집하였다. 채집한 소사나무 가지는 실온 및 음지에서 완전히 자연 건조하였으며 분쇄하여 사용하였다.

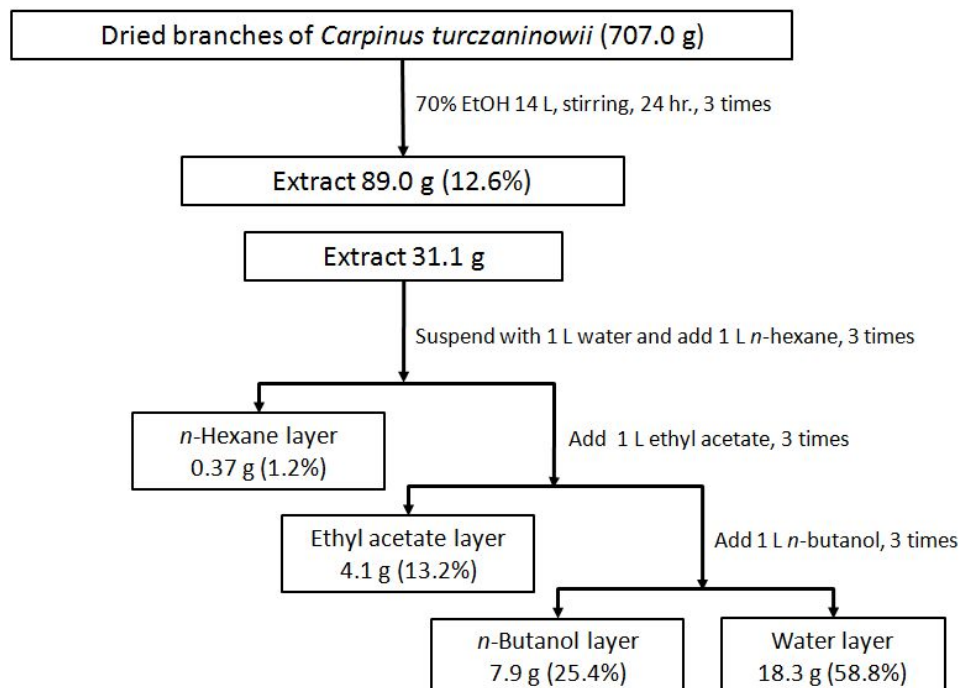


Figure 4. Picture of *Carpinus turczaninowii*

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 소사나무 가지의 추출 및 분획

건조된 소사나무 가지 707.0 g을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 14 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 89.0 g을 얻었다. 이 중 추출물 31.1 g을 증류수 2 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer(0.37 g), ethyl acetate layer(4.1 g), *n*-butanol layer(7.9 g), water layer(18.3 g) 등 총 4개의 용매 분획층을 얻었다(Scheme 1).

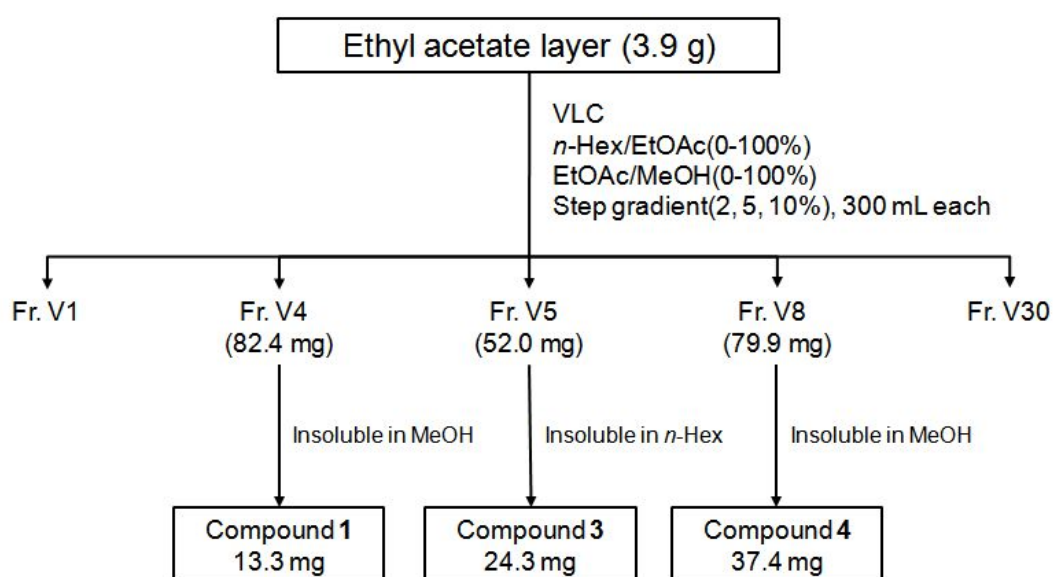


Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from *C. turczaninowii*

3-2. Ethyl acetate 분획의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획 층 중 ethyl acetate layer 3.9 g을 분획하기 위하여 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography(VLC)를 수행하였다. Hex/EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~100%)로 용매 극성을 2, 5, 10%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 30개의 fraction을 얻었다(Fr. V1~V30)

VLC fraction들 중 Fr. V4(25% EtOAc in Hex) 82.4 mg을 감압농축한 후 MeOH을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 1(13.3 mg)을 얻었으며, 같은 재결정법으로 Fr. V8(45% EtOAc in Hex) 79.9 mg에서 compound 4(37.4 mg)를 얻었다. Fr. V5(30% EtOAc in Hex) 52.0 mg은 *n*-Hex을 이용한 재결정법으로 compound 3(24.3 mg)을 분리하였다(Scheme 2).

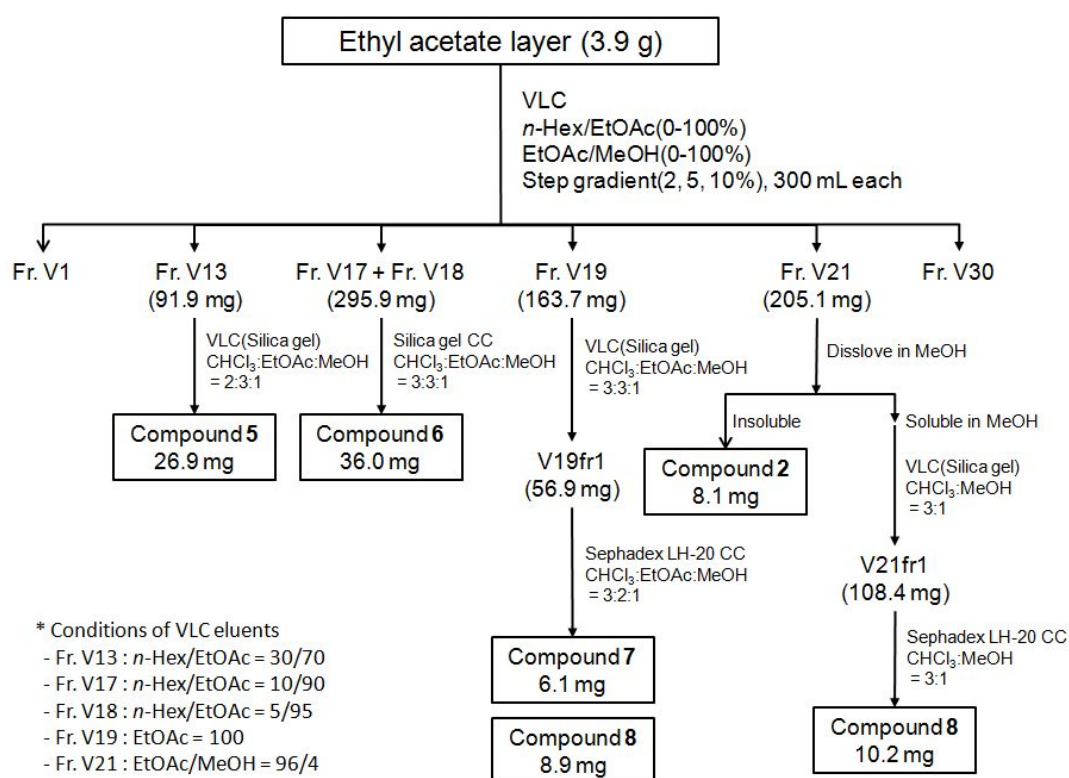


* Conditions of VLC eluents

- Fr. V4 : *n*-Hex/EtOAc = 75/25
- Fr. V5 : *n*-Hex/EtOAc = 70/30
- Fr. V8 : *n*-Hex/EtOAc = 55/45

Scheme 2. Procedure of isolation of compounds 1, 3, 4 from *C. turczaninowii*

Fr. V13(70% EtOAc in Hex) 91.9 mg은 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=2:3:1$ 의 용매조건으로 순상 silica gel을 이용한 VLC를 수행하여 compound 5(26.9 mg)를 얻었다. TLC를 수행하였을 때 같은 spot 패턴을 나타내는 Fr. V17과 Fr. V18(90~95% EtOAc in Hex)을 합한 259.9 mg을 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=3:3:1$ 의 용매조건으로 순상 silica gel CC를 수행하여 compound 6(36.0 mg)을 분리하였다. Fr. V19(100% EtOAc) 163.7 mg을 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=3:2:1$ 의 용매조건으로 순상 silica gel을 이용한 VLC를 수행한 후 얻어진 V19fr1 56.9 mg을 같은 용매조건으로 sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 7(6.1 mg), compound 8(8.9 mg)을 얻었다. Fr. V21(4% MeOH in EtOAc) 205.1 mg을 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 2(8.1 mg)를 분리하고, MeOH에 녹은 부분을 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=3:1$ 의 조건으로 순상 silica gel을 이용한 VLC를 수행한 후 얻어진 V21fr1 108.4 mg을 같은 용매 조건으로 sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 8(10.2 mg)을 분리하였다(Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 2, 5, 6, 7, 8 from *C. turczaninowii*

4. 활성실험

4-1. 항산화 활성 실험

4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법¹⁵⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO:EtOH=1:1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 µL를 micro tube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합하고, 증류수 700 µL를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 함량으로 환산하였다.

4-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis법¹⁶⁾을 변형하여 실시하였다. 각 시료들을 1 mg/mL로 용매에 녹인 다음, micro tube에 시료 용액 15 µL와 ethylene glycol 150 µL를 첨가하여 혼합한 후 다시 0.1 N NaOH 15 µL를 넣고 37°C 항온조에서 1시간동안 반응 후 UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 quercetin을 이용하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radical은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여 받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine(DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되어 515 nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다 (Figure 5).

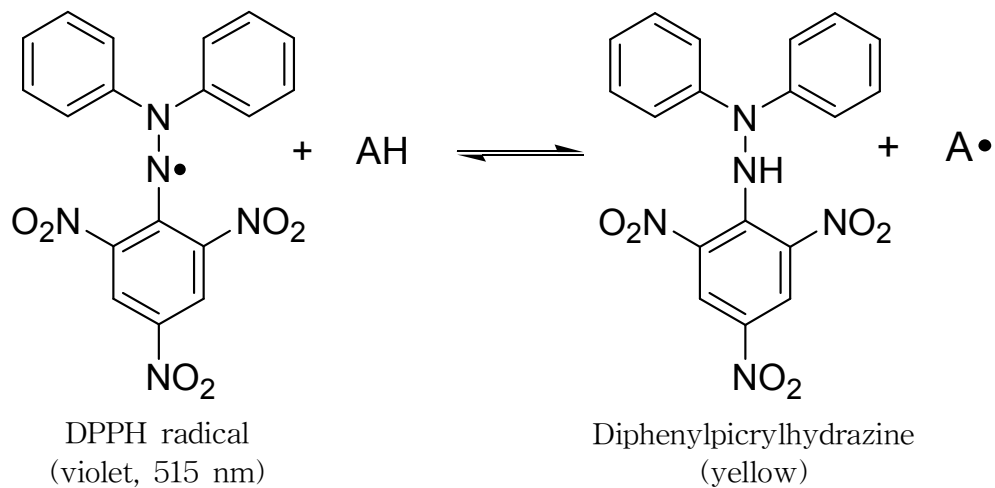


Figure 5. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant.

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 방법¹⁷⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다: 96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 0.2 mM DPPH(in EtOH) 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA Reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

A_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 515 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-1-4. ABTS radical cation 소거 활성 실험

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 total antioxidant activity(TAC)의 측정방법 중의 한 가지로 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 특징적인 청록색을 띠는 ABTS⁺ radical이 형성되는 것을 이용한 방법이다. 이 청록색의 ABTS⁺ radical은 산화될 수 있는 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 그와 반응한 물질의 산화가 일어나게 되어 흡광도의 감소가 일어나게 되면 항산화 능력을 측정할 수 있다(Figure 6).

ABTS radical cation 소거 활성은 Re & Pellegrin 등의 방법¹⁸⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다: ABTS radical cation을 만들기 위하여 7.0 mM ABTS (in D.W) 용액과 2.45 mM potassium persulfate(in D.W) 용액을 1:1로 혼합하여 16시간동안 암소에서 반응시킨다. 반응 시킨 ABTS 용액과 ethanol을 1:60으로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.002가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 µL(in EtOH)와 ABTS 용액 180 µL를 혼합하여 15분간 암소에서 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

A_{control} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 sample과 ABTS 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도

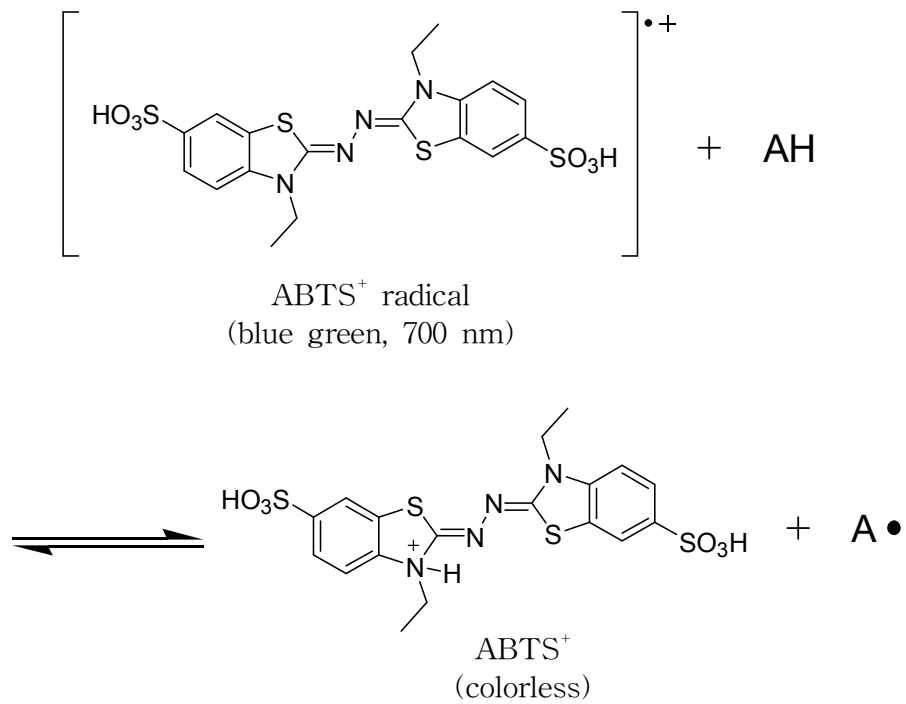


Figure 6. Scavenging of ABTS⁺ radical by an anti-oxidant.

4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

4-2-1. 세포배양

마우스 대식세포 계열(Murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 한국 세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% antibiotic-antimycotic 과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가

24 Well plate에 RAW 264.7 cell을 3×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Greiss 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO₂)를 이용하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다.

4-2-3. 세포독성 평가

MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 3×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 배양 후, 1 µg/mL LPS와 sample을 농도별로 각각 첨가하여

24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 500 µg/mL 농도로 MTT를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음의 식에 의해 계산되었다.

A_{control} : 570 nm에서 용매와 LPS를 처리한 control의 흡광도

A_{sample} : 570 nm에서 시료와 LPS를 처리한 sample의 흡광도

4-2-4. 염증성 cytokine IL-6(interleukin-6) 생성 억제 평가

24 Well plate에 RAW 264.7 cell을 3×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환한 후 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 얻어진 상층액을 이용하여 IL-6를 측정하였다. 측정에는 mouse IL-6 ELISA kit (BD biosciences, USA)를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. Compound 1과 Compound 2의 구조해석

Compound 1은 ^1H -NMR spectrum 분석 결과 δ 5.36(1H, d, $J = 5.2$ Hz)의 signal로부터 sp^2 혼성을 갖는 olefin 구조의 proton을 예상하였고, δ 3.55(1H, m)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methine proton을 예상하였다. δ 2.37 ~ 1.00에서 다수의 methylene과 methine proton signal을 확인하였고, δ 0.68(3H, s), δ 1.01(3H, s), δ 1.01(3H, s)에서 2개의 singlet, δ 0.82(3H, d, $J = 7.1$ Hz), δ 0.84(3H, d, $J = 7.1$ Hz), δ 0.93(3H, d, $J = 6.6$ Hz)에서 3개의 doublet, δ 0.85(3H, t, $J = 7.6, 7.1$ Hz)에서 1개의 triplet으로 총 6개의 methyl proton signal을 확인하였다. ^{13}C -NMR spectrum 분석결과 탄소수가 29개이고 δ 20.0, 19.6, 19.2, 19.0, 12.2, 12.0에서 6개의 methyl carbon이 있는 것을 통해 sterol 계열의 화합물임을 예상하였다. δ 140.9, δ 121.9를 통하여 ^1H -NMR spectrum에서 예상한 olefin carbon과, δ 72.0에서 산소에 인접한 methine carbon을 확인하였다. 이를 바탕으로 compound 1은 문헌¹⁹⁾과 비교하여 대부분의 식물에 함유되어 있는 sterol인 β -sitosterol로 동정하였다(Figure 7).

Compound 2는 ^1H 와 ^{13}C NMR data를 분석한 결과, β -sitosterol과 유사한 경향을 나타내었으며, δ 5.0 ~ 3.0의 signal을 통하여 당이 결합됐을 것이라 예상하였다. 당의 종류는 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 103.0, 78.9, 78.5, 75.8, 72.1, 63.3에서 6개의 signal과 ^1H -NMR spectrum에서 δ 5.07(1H, d, $J = 7.6$ Hz)의 anomeric proton의 coupling constant를 통하여 β -D-glucopyranoside임을 예상하였다. 이를 바탕으로 compound 2는 문헌²⁰⁾과 비교하여 sterol 배당체인 sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside 즉, daucosterol로 동정하였다(Figure 8).

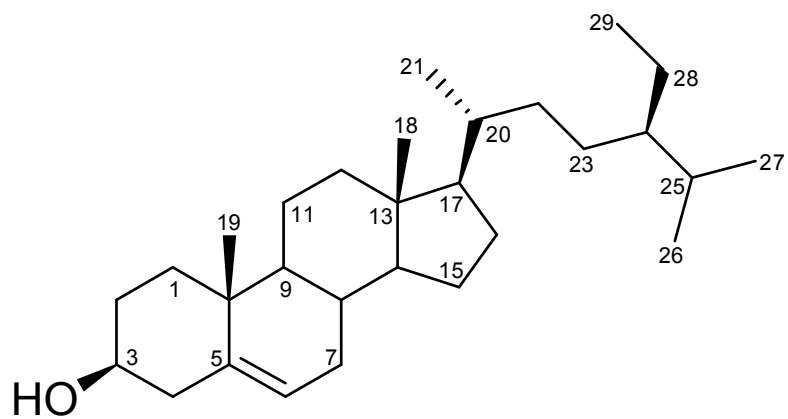


Figure 7. Chemical structure of compound 1

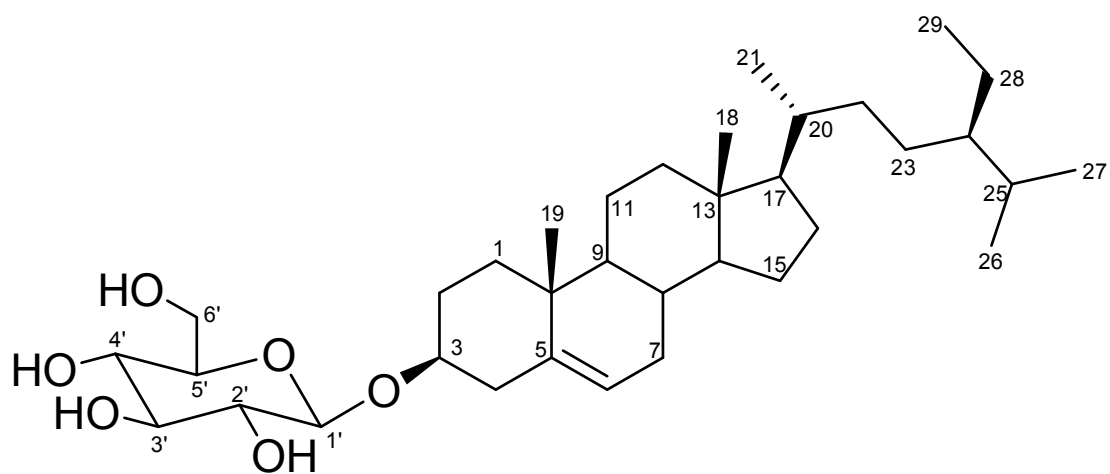


Figure 8. Chemical structure of compound 2

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **1** and **2** (100 and 400 MHz, CDCl_3 and $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

| No. | Compound 1 | | Compound 2 | |
|-----|---------------------|--|---------------------|--|
| | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) |
| 1 | 37.4 | | 37.9 | |
| 2 | 29.9 | | 30.7 | |
| 3 | 72.0 | 3.55(1H, m) | 79.0 | 4.01(1H, m) |
| 4 | 42.5 | | 39.8 | |
| 5 | 140.9 | | 141.3 | |
| 6 | 121.9 | 5.36(1H, d, 5.2) | 122.3 | 5.36(1H, brd, 4.3) |
| 7 | 32.1 | | 32.6 | |
| 8 | 31.8 | | 32.5 | |
| 9 | 50.3 | | 50.8 | |
| 10 | 36.7 | | 37.3 | |
| 11 | 21.3 | | 21.7 | |
| 12 | 39.9 | | 40.4 | |
| 13 | 42.5 | | 42.9 | |
| 14 | 56.9 | | 57.2 | |
| 15 | 24.5 | | 24.9 | |
| 16 | 28.4 | | 29.0 | |
| 17 | 56.2 | | 56.7 | |
| 18 | 12.0 | 0.68(3H, s) | 12.4 | 0.67(3H, s) |
| 19 | 20.0 | 1.01(3H, s) | 19.6 | 0.95(3H, s) |
| 20 | 36.3 | | 36.8 | |
| 21 | 19.0 | 0.93(3H, d, 6.6) | 19.4 | 1.00(3H, d, 6.4) |
| 22 | 34.1 | | 34.6 | |
| 23 | 26.2 | | 26.8 | |
| 24 | 46.0 | | 46.5 | |
| 25 | 29.3 | | 29.9 | |
| 26 | 19.6 | 0.84(3H, d, 7.1) | 20.4 | 0.92(1H, d, 7.8) |
| 27 | 19.2 | 0.82(3H, d, 7.1) | 19.8 | 0.90(1H, d, 8.4) |
| 28 | 23.2 | | 23.8 | |
| 29 | 12.2 | 0.85(3H, t, 7.6, 7.1) | 12.6 | 0.88(1H, d, 7.6) |
| 1' | | | 103.0 | 5.07(1H, d, 7.6) |
| 2' | | | 75.8 | 4.60–3.61(sugar H) |
| 3' | | | 78.9 | |
| 4' | | | 72.1 | |
| 5' | | | 78.5 | |
| 6' | | | 63.3 | |

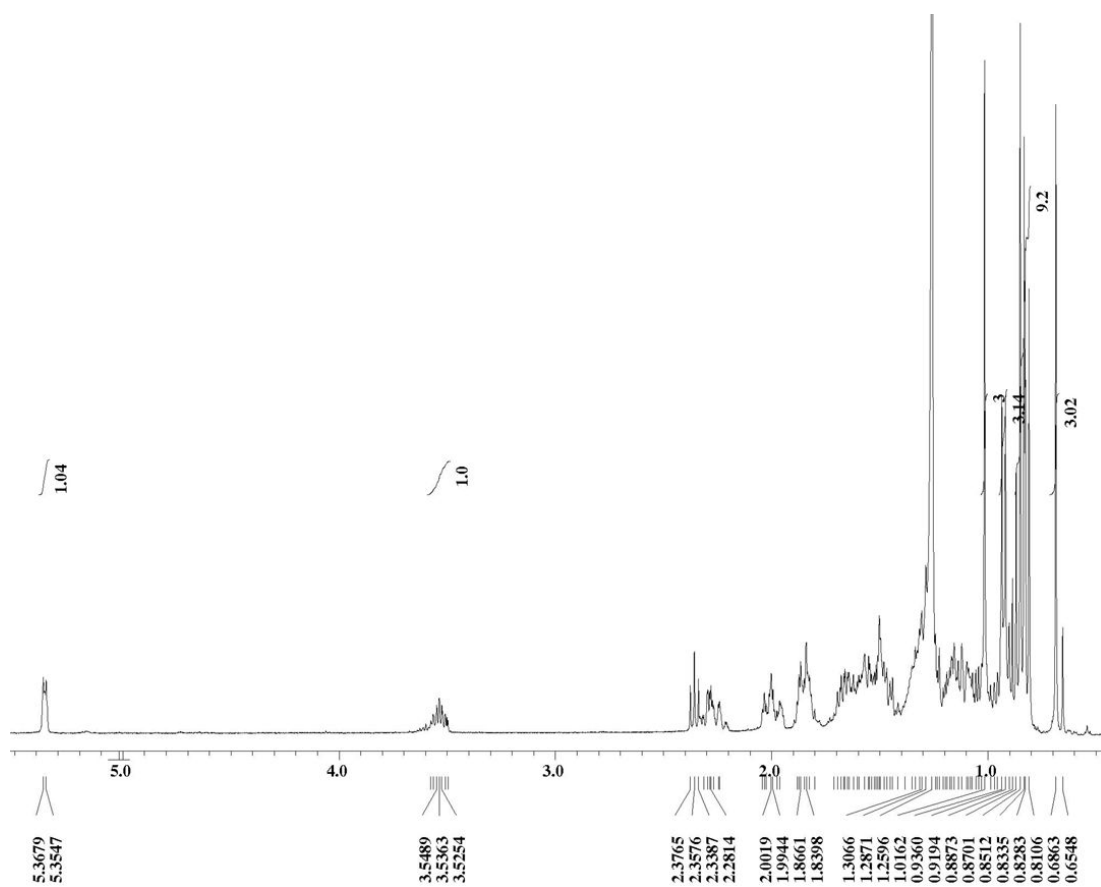


Figure 9. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

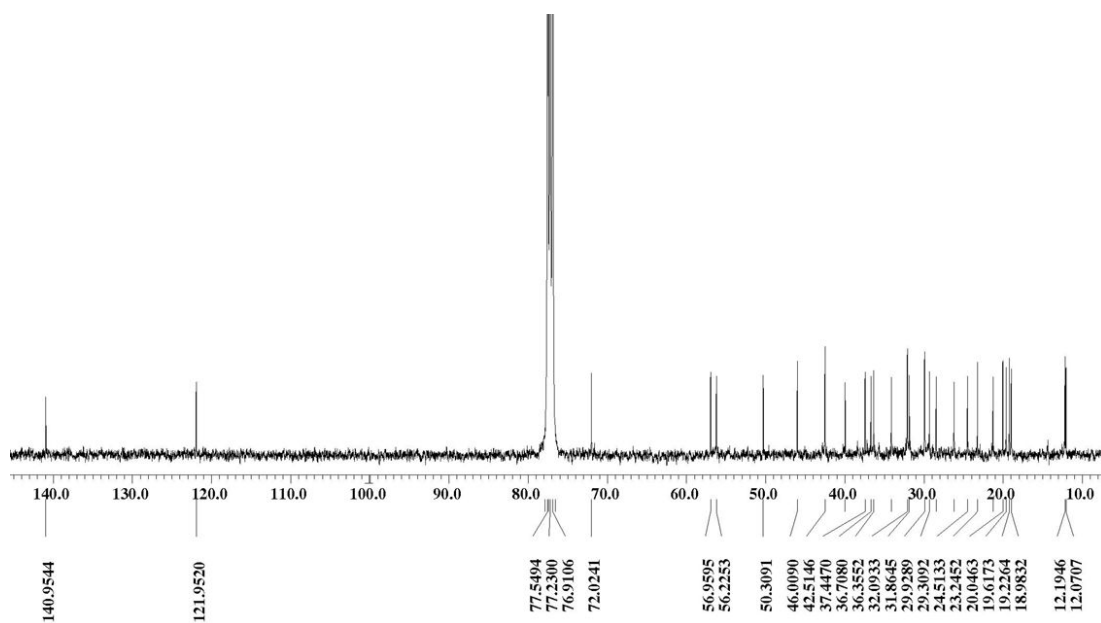


Figure 10. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

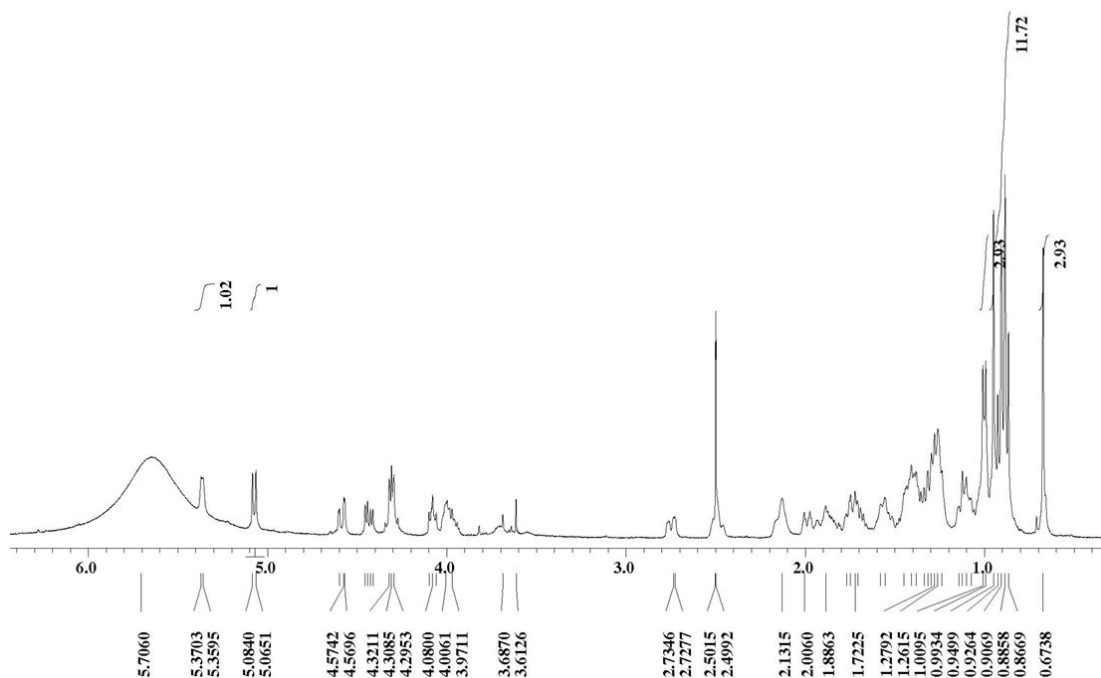


Figure 11. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

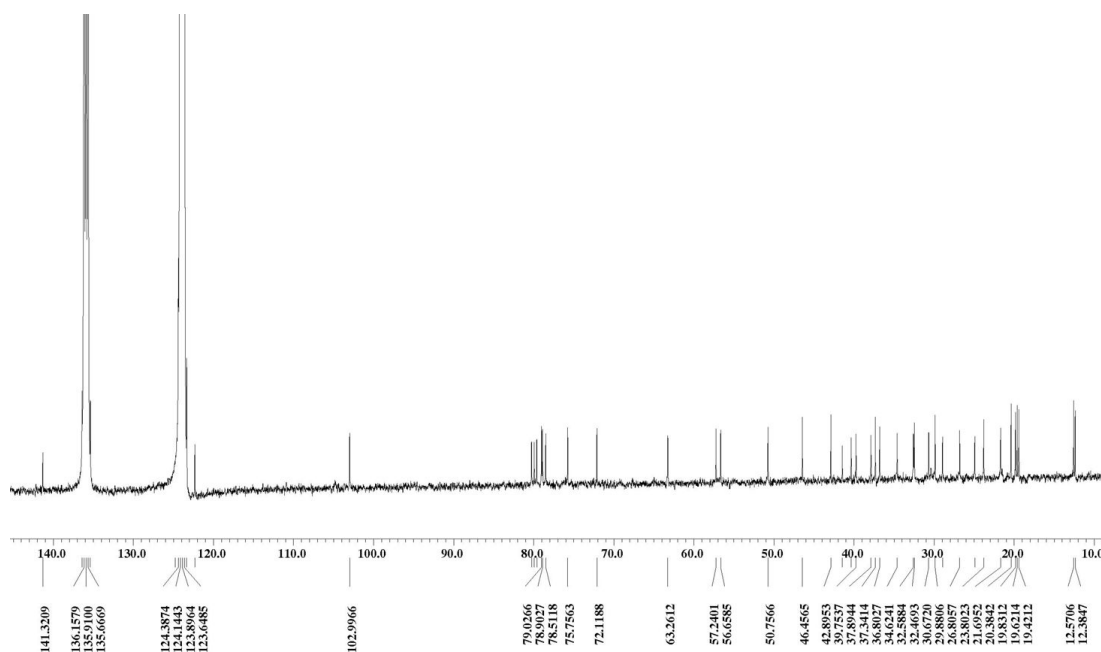


Figure 12. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

1-2. Compound 3과 Compound 4의 구조해석

Compound 3는 ^{13}C -NMR spectrum에서 30개의 carbon signal과 ^1H -NMR spectrum에서 6개의 methyl group의 단일 피크를 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예측하였다.

^{13}C -NMR spectrum에서 δ 180.2는 carboxylic acid, δ 152.1과 δ 110.3의 signal은 vinyl carbon(4차 carbon인 δ 152.1, CH_2 인 δ 110.3)임을 알 수 있었고, δ 79.8의 signal은 산소에 인접한 위치의 methine의 특성 피크로 예상 할 수 있었다. 이들을 바탕으로 compound 3는 betulinic acid로 예상하였으며, 문헌²¹⁾과 비교하여 동정하였다(Figure 13).

Compound 4는 ^1H 와 ^{13}C NMR data를 관찰한 결과, betulinic acid 유도체로 예상되며 ^1H -NMR spectrum에서 δ 4.47(1H, m)의 signal로 보아 aromatic ester가 3번 탄소에 결합된 것으로 예상되었다.

^1H -NMR에서 δ 6.22(1H, d, $J = 15.9$ Hz)와 δ 7.43(1H, d, $J = 15.9$ Hz)의 signal은 coupling constant 값을 통하여 *trans*-olefin 구조로 예상되며, δ 6.74(1H, d, $J = 8.2$ Hz), δ 6.98(1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz), δ 7.03(1H, d, $J = 2.0$ Hz)의 signal은 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하고 있는 1, 3, 4번 위치가 치환된 aromatic ring으로 예상하였고 두 부분구조가 연결되어있는 caffeate로 확인되었다. 이를 바탕으로 compound 4를 문헌²²⁾과 비교하여 betulinic acid 3 β -O-caffeate 즉, pyracrenic acid로 동정하였다(Figure 14).

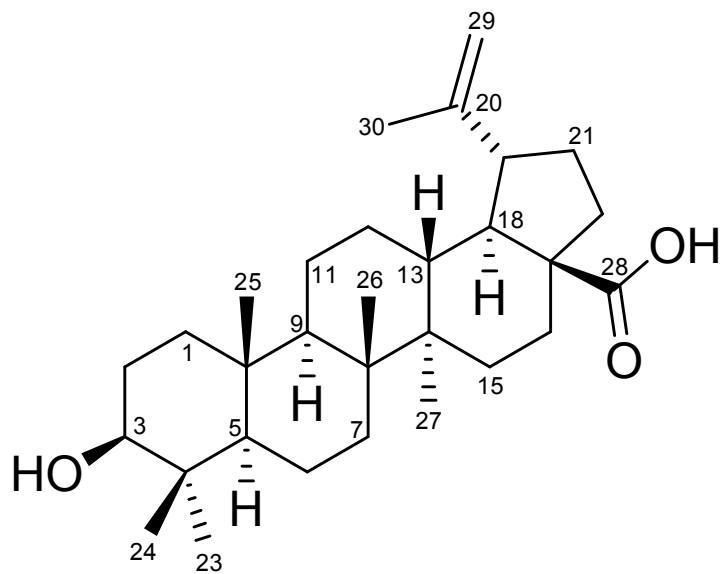


Figure 13. Chemical structure of compound 3

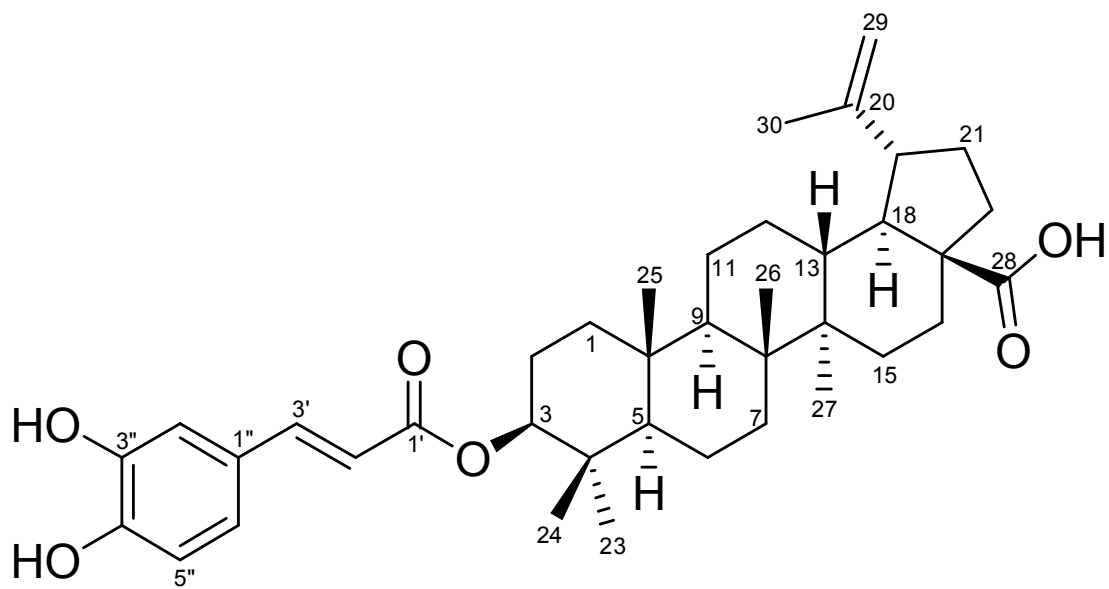


Figure 14. Chemical structure of compound 4

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **3** and **4** (100 and 400 MHz, CD_3OD and $\text{DMSO}-d_6$)

| No. | Compound 3 | | Compound 4 | |
|-----|---------------------|--|---------------------|--|
| | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) |
| 1 | 40.1 | | 40.3 | |
| 2 | 28.2 | | 23.5 | |
| 3 | 79.8 | 3.01(1H, t) | 79.7 | 4.47(1H, m) |
| 4 | 39.8 | | 37.6 | |
| 5 | 57.0 | | 54.7 | |
| 6 | 19.6 | | 17.8 | |
| 7 | 33.5 | | 33.7 | |
| 8 | 40.2 | | 42.0 | |
| 9 | 52.1 | | 49.7 | |
| 10 | 38.3 | | 36.3 | |
| 11 | 22.2 | | 20.5 | |
| 12 | 27.0 | | 25.1 | |
| 13 | 38.5 | 2.29(1H, m) | 37.8 | |
| 14 | 42.1 | | 46.6 | |
| 15 | 31.0 | | 29.2 | |
| 16 | 31.8 | 2.23(1H, m) | 31.7 | |
| 17 | 57.6 | | 55.4 | |
| 18 | 50.6 | | 48.6 | |
| 19 | 43.7 | 3.01(1H, m) | 48.5 | 2.95(1H, m) |
| 20 | 152.1 | | 150.3 | |
| 21 | 30.9 | | 30.1 | |
| 22 | 35.7 | | 36.7 | |
| 23 | 28.8 | 0.99(3H, s) | 27.7 | 0.81(3H, s) |
| 24 | 16.3 | 0.85(3H, s) | 15.7 | 0.87(3H, s) |
| 25 | 16.9 | 0.74(3H, s) | 16.5 | 0.83(3H, s) |
| 26 | 16.8 | 0.94(3H, s) | 15.9 | 0.88(3H, s) |
| 27 | 15.2 | 0.95(3H, s) | 14.3 | 0.95(3H, s) |
| 28 | 180.2 | | 177.2 | |
| 29 | 110.3 | 4.58(1H, s), 4.69(1H, s) | 109.6 | 4.56(1H, s), 4.69(1H, d, 2.1) |
| 30 | 19.7 | 1.68(3H, s) | 18.9 | 1.65(3H, s) |
| 1' | | | 166.3 | |
| 2' | | | 115.7 | 6.22(1H, d, 15.9) |
| 3' | | | 145.6 | 7.43(1H, d, 15.9) |
| 1'' | | | 125.5 | |
| 2'' | | | 114.8 | 7.03(1H, d, 2.0) |
| 3'' | | | 144.8 | |
| 4'' | | | 148.3 | |
| 5'' | | | 114.4 | 6.74(1H, d, 8.2) |
| 6'' | | | 121.3 | 6.98(1H, dd, 8.2, 2.0) |

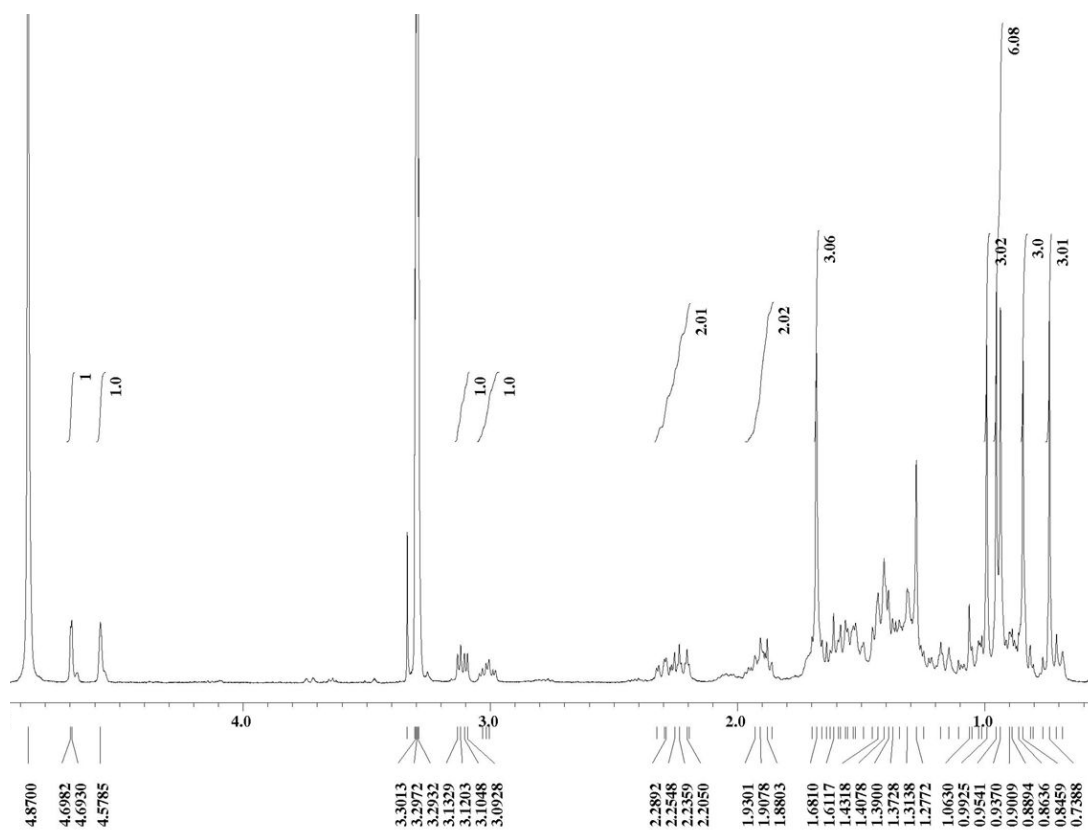


Figure 15. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 3 in CD_3OD

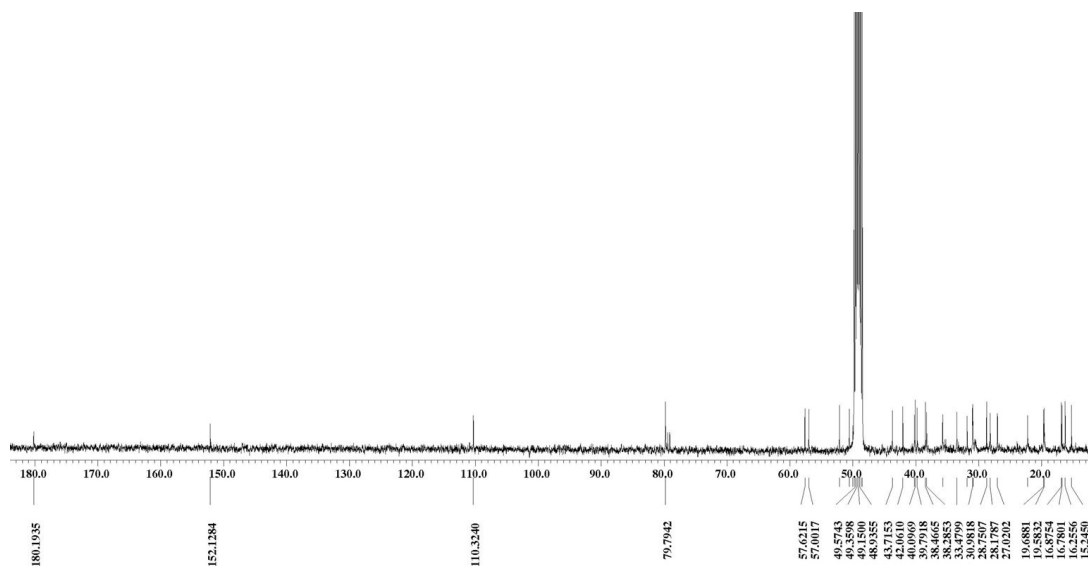


Figure 16. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 3 in CD_3OD

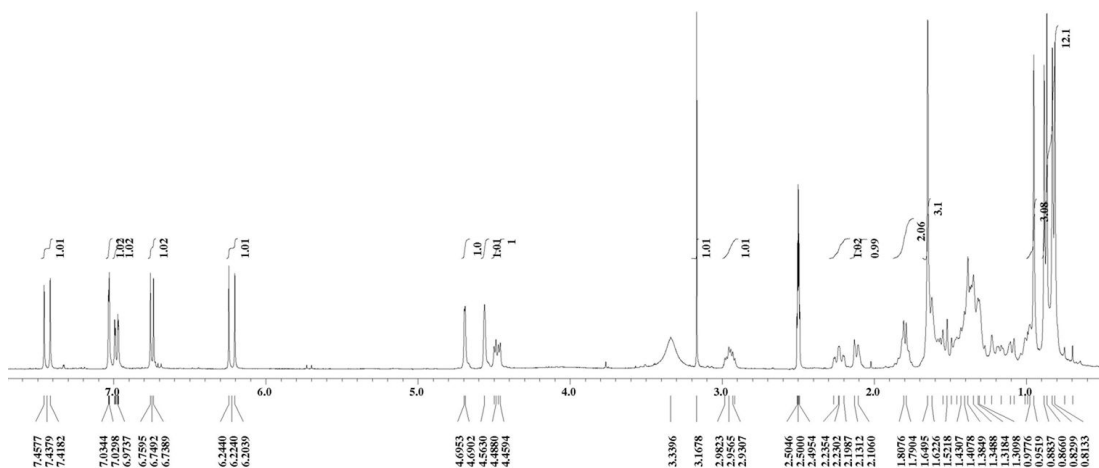


Figure 17. ^1H -NMR spectrum of compound 4 in $\text{DMSO}-d_6$

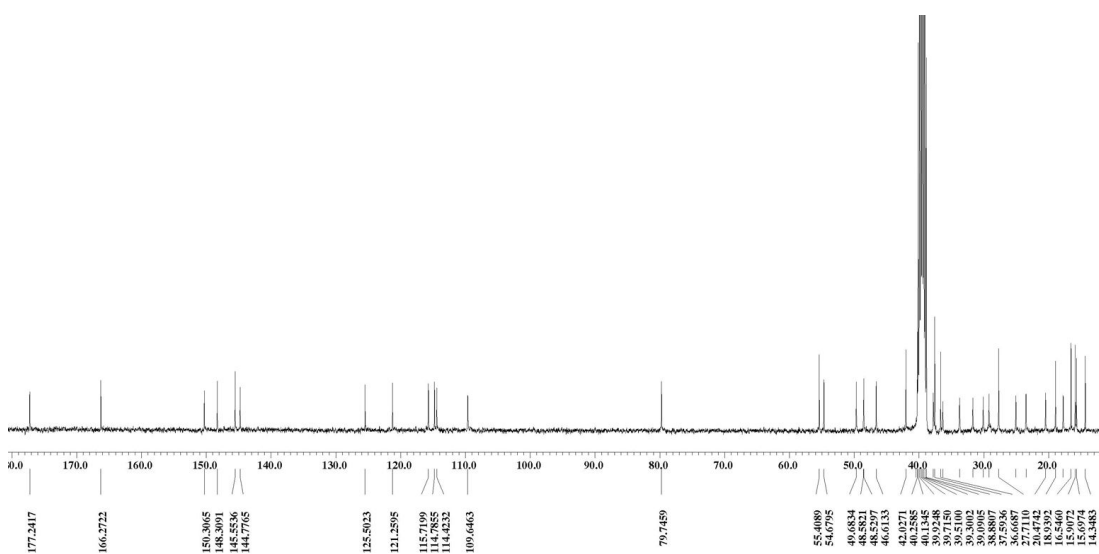


Figure 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 in $\text{DMSO}-d_6$

1-3. Compound 5와 Compound 6의 구조해석

Compound 5는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과, δ 7.04(1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz), δ 6.98(1H, dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz), δ 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), δ 6.75(1H, d, $J = 8.2$ Hz), δ 6.63(1H, s), δ 6.32(1H, s)의 signal은 sp^2 혼성을 갖는 proton들이 이들의 coupling constant를 통하여 proton들 간의 *ortho*-, *meta*-coupling을 하고 있는 2개의 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 또한 δ 4.70(1H, dd, $J = 11.7, 4.4$ Hz), δ 4.20(1H, d, $J = 10.1$ Hz), δ 3.86(1H, d, $J = 10.3$ Hz)의 signal은 전기음성도 큰 산소에 인접한 proton들로 예상할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum과 DEPT 분석 결과, 탄소수가 19개이고 그 중 4차 탄소가 7개, 3차 탄소가 9개, 2차 탄소가 3개 있음을 확인하였다. δ 215.7의 signal은 carboxyl carbon으로 예상되며, δ 152.8 ~ 117.0의 signal은 $^1\text{H-NMR}$ data에서 예상하였던 aromatic ring의 carbon들로 이 중 δ 152.8과 δ 152.0의 signal은 전기음성도가 큰 hydroxyl group이 결합되어 있을 것으로 예상하였다. 또한 δ 78.7, δ 69.8, δ 68.6의 signal도 전기음성도가 큰 산소가 결합되어 있는 methine carbon임을 확인하였다.

^1H 과 ^{13}C NMR data를 비교한 결과, 두 개의 aromatic ring에 aliphatic chain이 결합되어 있는 구조인 diarylheptanoid 계열의 화합물로서, HMBC spectrum에서 aromatic ring의 δ 6.63(1H, s)의 proton signal이 또 다른 aromatic ring의 carbon인 δ 126.6과 연결 관계가 나타나는 것으로 보아 고리 형태의 diarylheptanoid 화합물로 예상되었다. 이러한 결과를 바탕으로 문헌²³⁾과 비교한 결과 compound 5는 carpinontriol B로 동정하였다(Figure 19).

Compound 6은 ^1H 와 ^{13}C NMR data을 관찰한 결과, compound 5와 유사한 구조를 가지고 있을 것이라 예상하였으며, aliphatic chain의 hydroxyl group의 위치만 달라졌을 것이라 예측할 수 있었다.

$^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum에서 δ 4.02-3.99(2H, m)의 signal은 각각 δ 2.84(1H, dd, $J = 14.8, 8.3$ Hz), δ 2.93(1H, dd, $J = 15.9, 3.1$ Hz) 및 δ 2.71(1H, dd, $J = 18.6, 8.5$ Hz), δ 3.70(1H, d, $J = 18.3$ Hz)와 연결되어 있음을 확인하였다. HMBC spectrum에서는 δ 4.39(1H, dd, $J = 6.6, 2.0$ Hz)의 signal이 carbonyl

carbon인 δ 218.8의 signal과 연결되어 있음을 확인하였다. 그러므로 aliphatic chain의 hydroxyl group은 compound 5와는 달리 C-8, C-9, C-12로 예상되며, 이러한 결과를 바탕으로 compound 6은 문헌²³⁾과 비교하여 carpinontriol A로 동정하였다(Figure 20).

Carpinontriol A와 B는 까치박달나무(*Carpinus cordata*)로부터 분리되어 신규 화합물로 보고된 바 있다.²³⁾

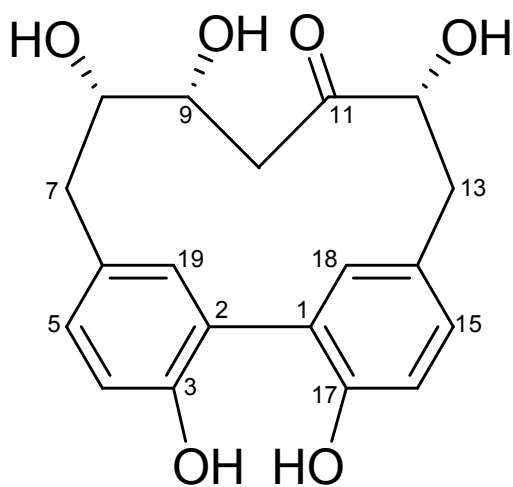


Figure 19. Chemical structure of compound 5

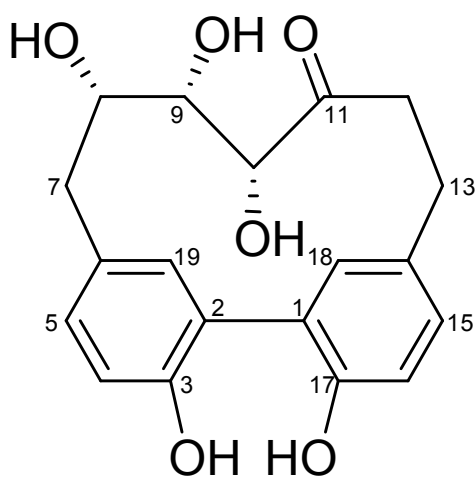


Figure 20. Chemical structure of compound 6

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **5** and **6** (100 and 400 MHz, CD_3OD)

| No. | Compound 5 | | Compound 6 | |
|-----|---------------------|---|---------------------|--|
| | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) |
| 1 | 126.6 | | 128.1 | |
| 2 | 127.6 | | 127.4 | |
| 3 | 152.8 | | 153.2 | |
| 4 | 117.0 | 6.75(1H, d, 8.2) | 117.4 | 6.75(1H, d, 8.2) |
| 5 | 130.8 | 6.98(1H, dd, 8.2, 1.7) | 130.9 | 7.01(1H, dd, 8.2, 2.3) |
| 6 | 130.7 | | 130.5 | |
| 7 | 37.1 | 2.87(1H, dd, 15.5, 12.1) 3.03(1H, dd, 16.0, 4.4) | 39.5 | 2.84(1H, dd, 14.8, 8.3) 2.93(1H, dd, 15.9, 3.1) |
| 8 | 68.6 | 4.70(1H, dd, 11.7, 4.4) | 69.3 | 4.02–3.99(m) |
| 9 | 69.8 | 3.86(1H, d, 10.3) | 73.7 | 4.02–3.99(m) |
| 10 | 78.7 | 4.20(1H, d, 10.1) | 46.9 | 2.71(1H, dd, 18.6, 8.5) 3.70(1H, d, 18.3) |
| 11 | 215.7 | | 218.8 | |
| 12 | 37.6 | 2.92(1H, m) 3.49(1H, ddd, 20.0, 12.6, 1.7) | 78.2 | 4.39(1H, dd, 6.6, 2.0) |
| 13 | 25.3 | 2.81(1H, m) 3.11(1H, dd, 17.1, 12.8) | 39.5 | 2.82(1H, dd, 15.2, 6.5) 3.48(1H, d, 15.6) |
| 14 | 131.4 | | 129.8 | |
| 15 | 129.6 | 7.04(1H, dd, 8.2, 2.0) | 131.6 | 6.95(1H, dd, 8.2, 2.4) |
| 16 | 117.0 | 6.79(1H, d, 8.2) | 117.0 | 6.73(1H, d, 8.0) |
| 17 | 152.0 | | 153.4 | |
| 18 | 135.2 | 6.32(1H, brs) | 135.2 | 6.51(1H, d, 2.3) |
| 19 | 135.0 | 6.63(1H, brs) | 135.7 | 6.60(1H, d, 2.3) |

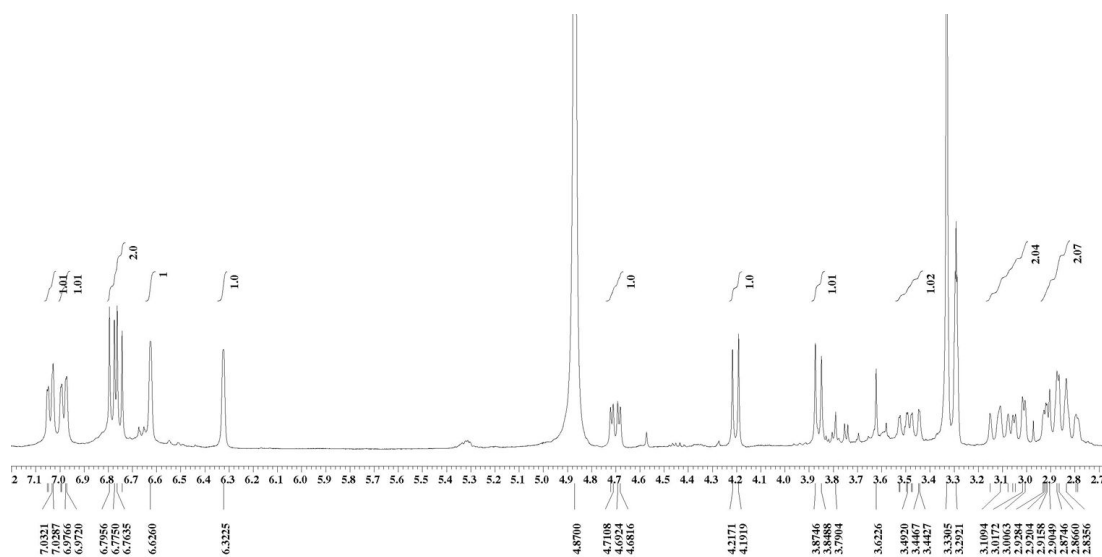


Figure 21. ^1H -NMR spectrum of compound **5** in CD_3OD

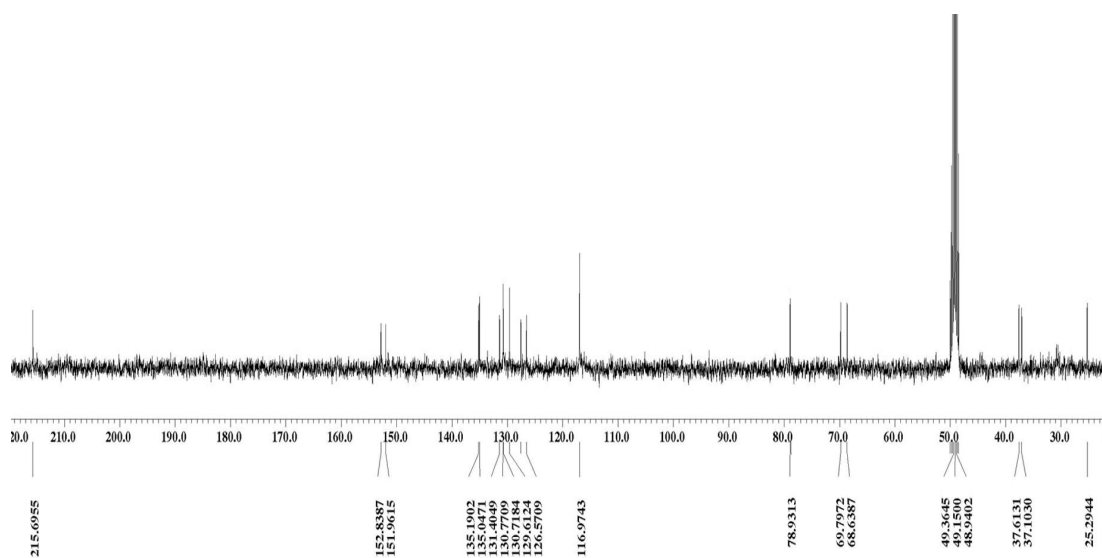


Figure 22. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5** in CD_3OD

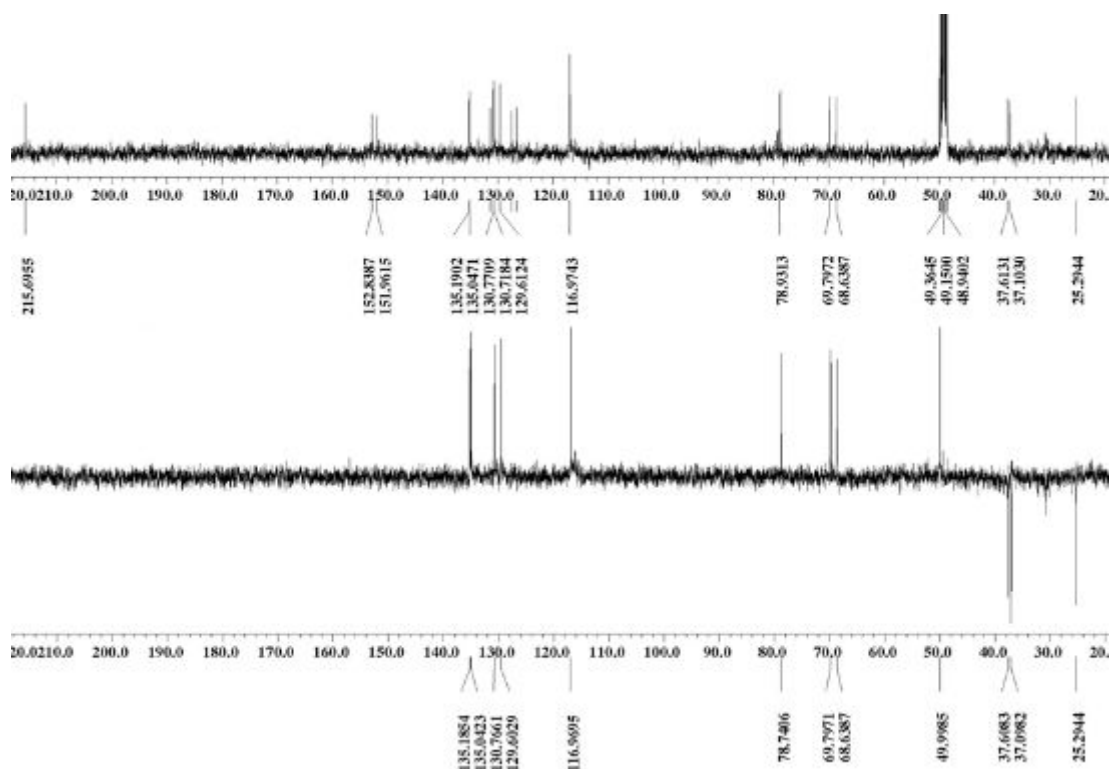


Figure 23. DEPT-135 spectrum of compound 5 in CD₃OD

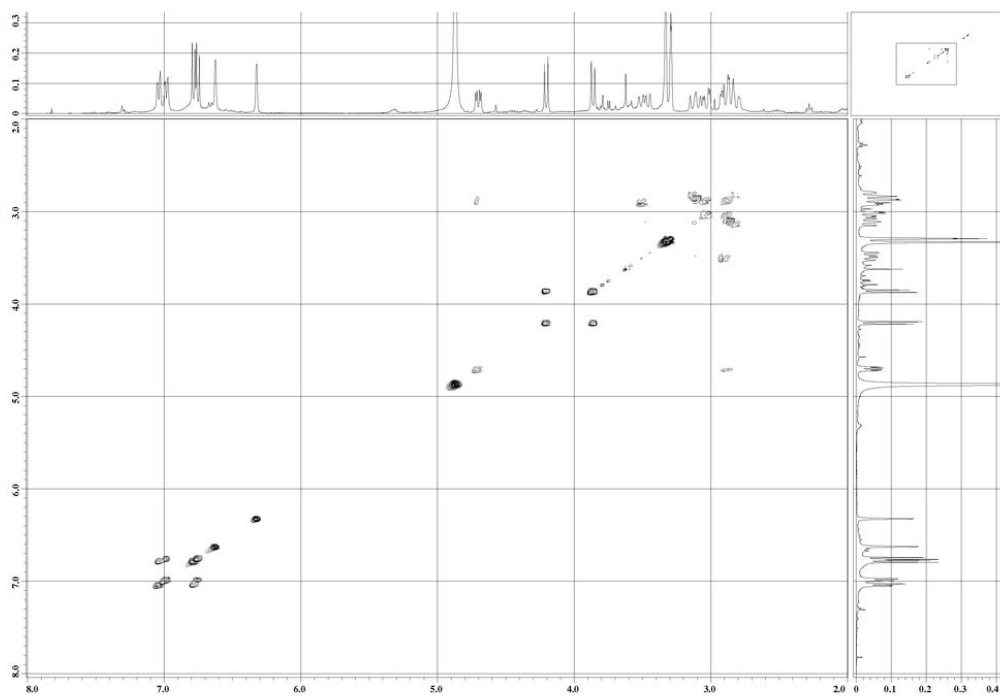


Figure 24. ¹H-¹H COSY spectrum of compound 5 in CD₃OD

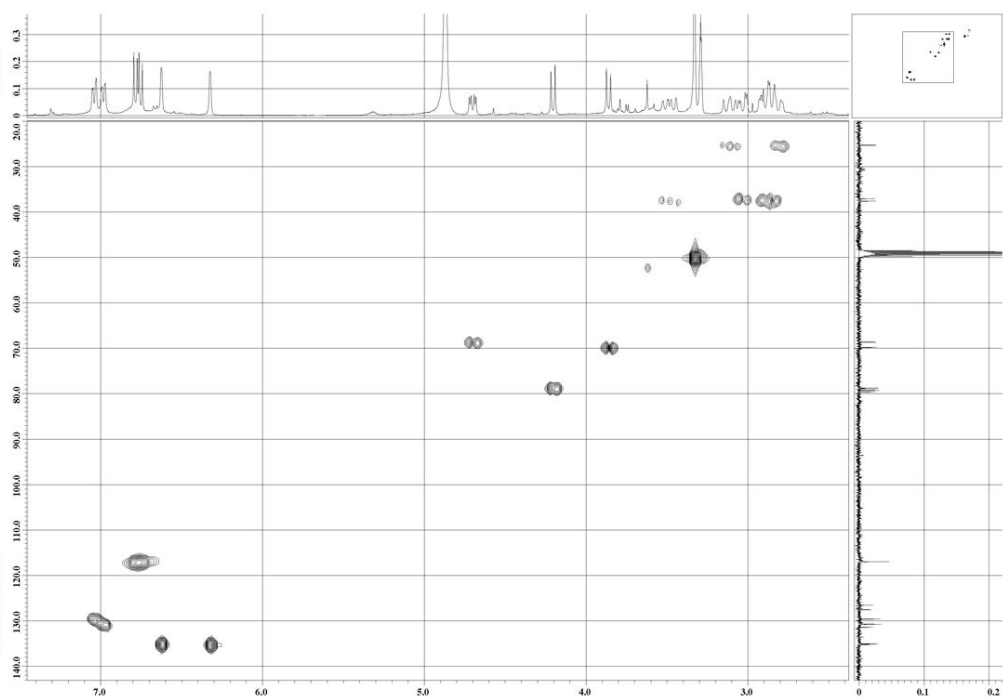


Figure 25. HMQC spectrum of compound 5 in CD₃OD

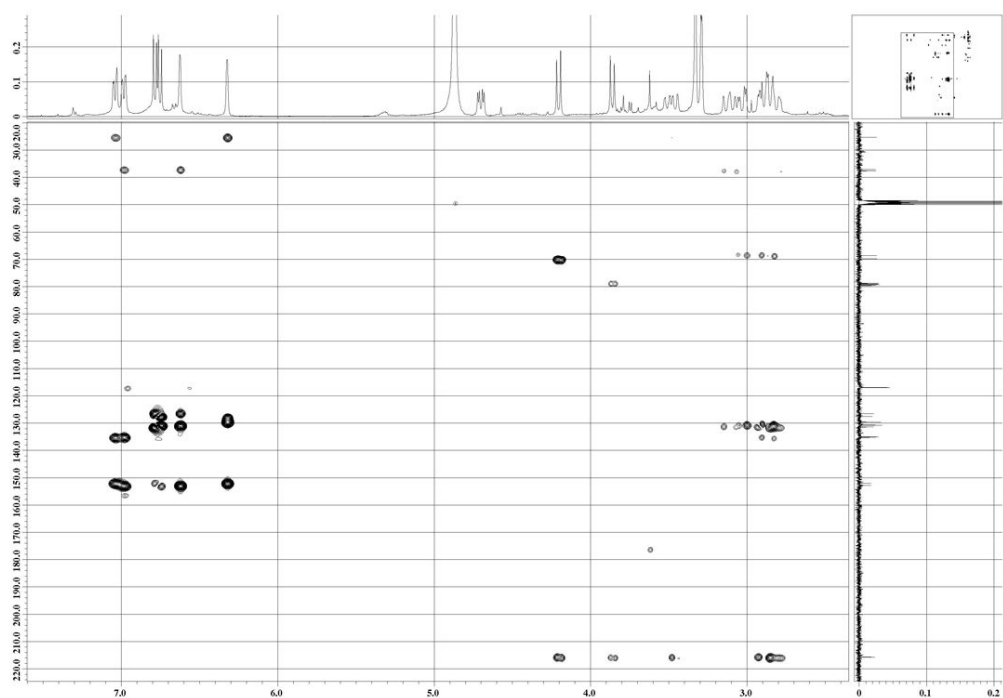


Figure 26. HMBC spectrum of compound 5 in CD₃OD

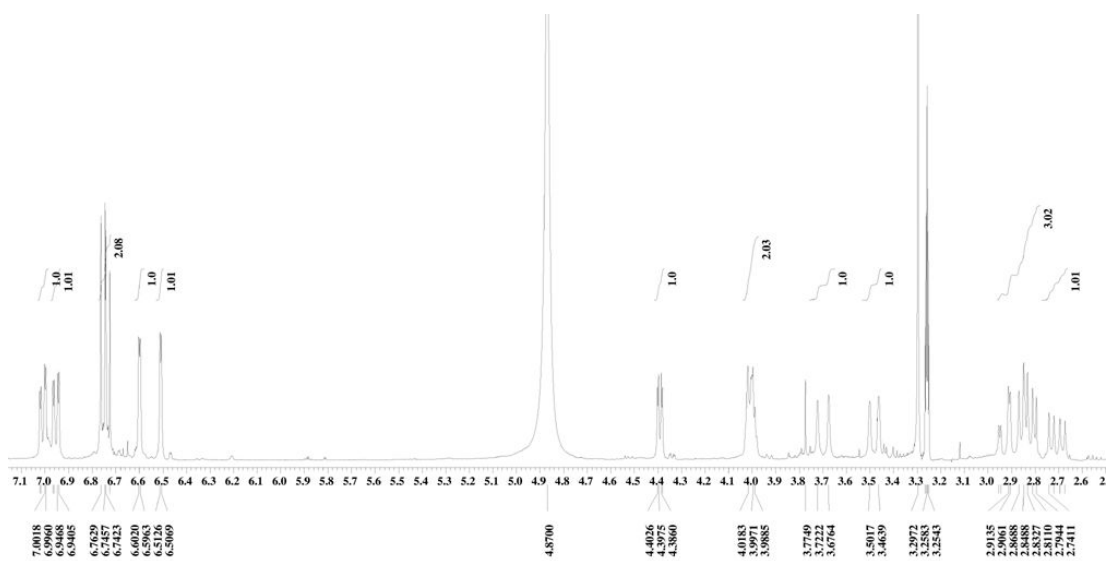


Figure 27. ^1H -NMR spectrum of compound **6** in CD_3OD

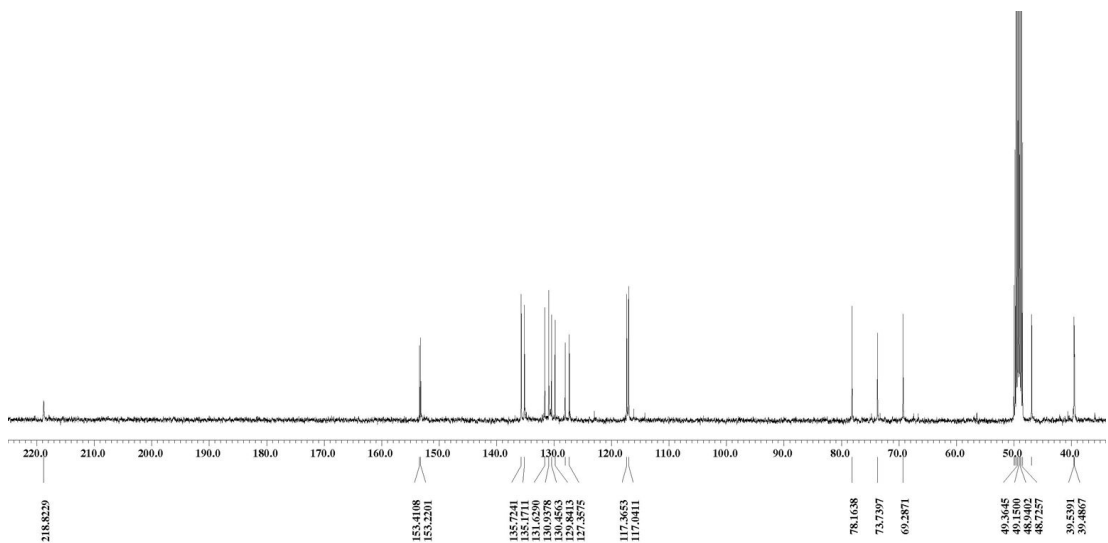


Figure 28. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in CD_3OD

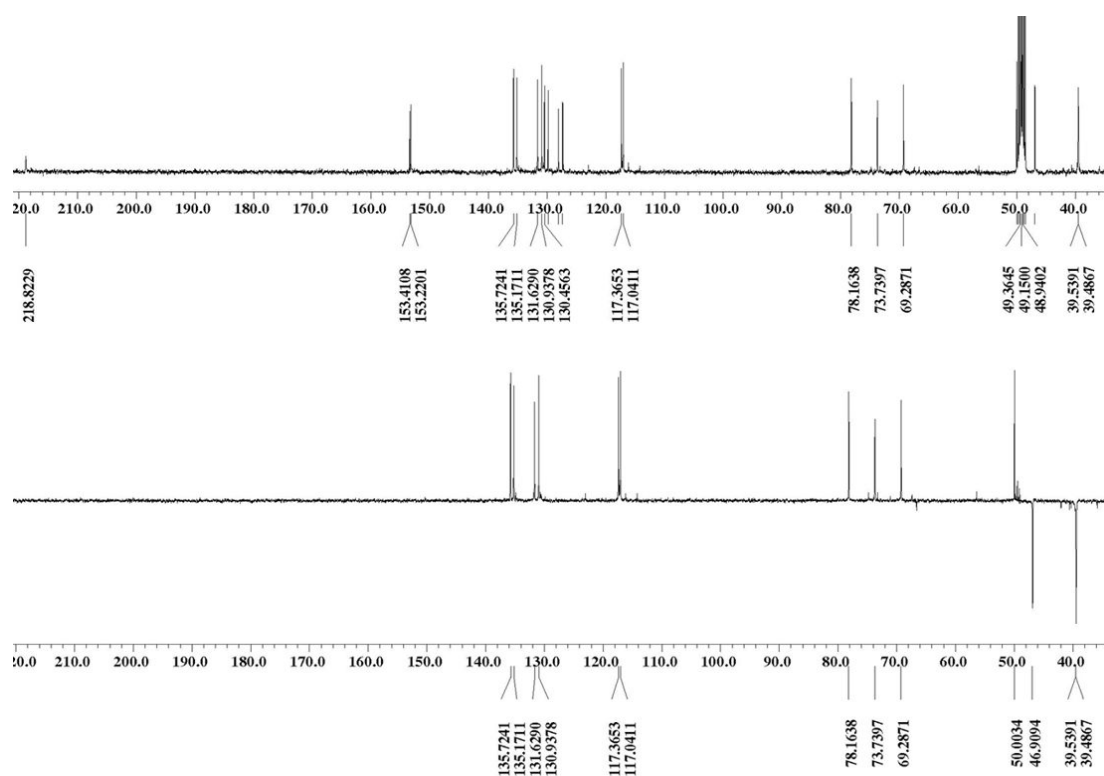


Figure 29. DEPT-135 spectrum of compound 6 in CD₃OD

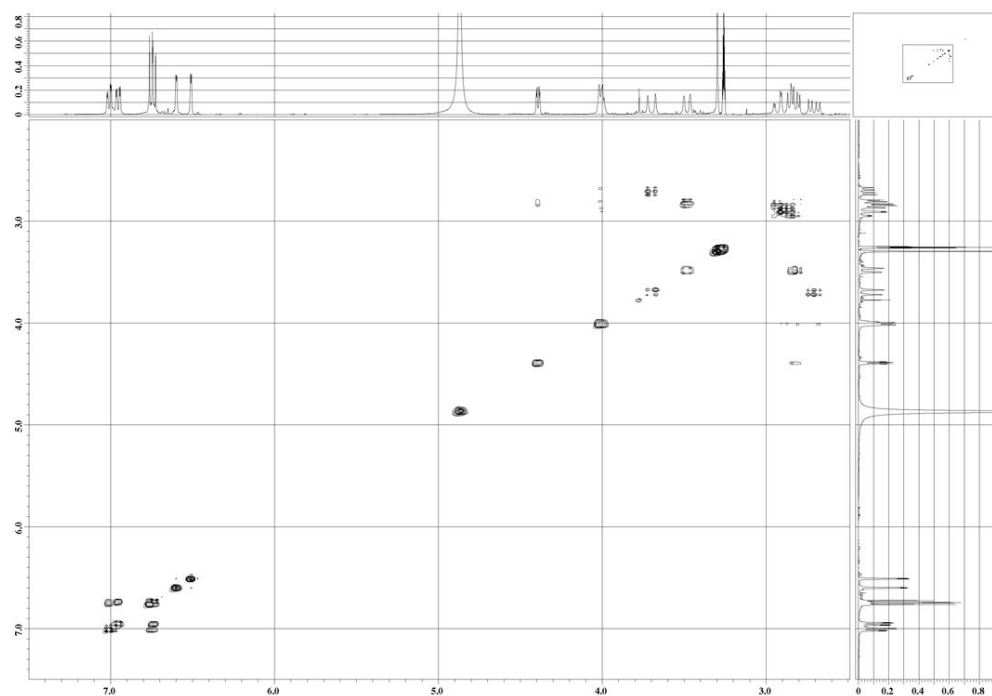


Figure 30. ¹H-¹H COSY spectrum of compound 6 in CD₃OD

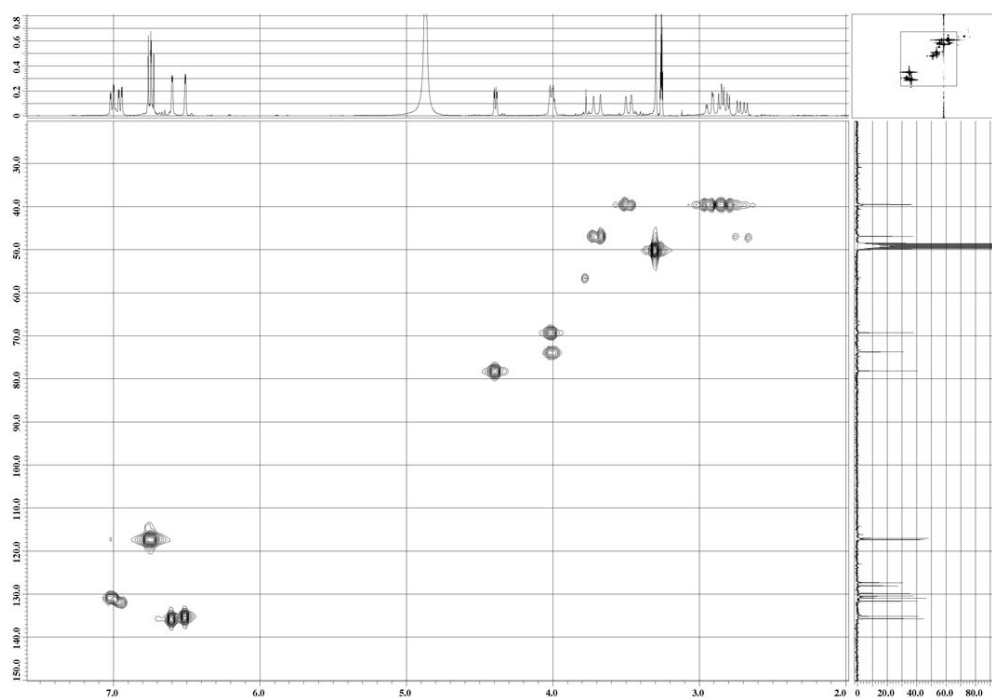


Figure 31. HMQC spectrum of compound **6** in CD₃OD

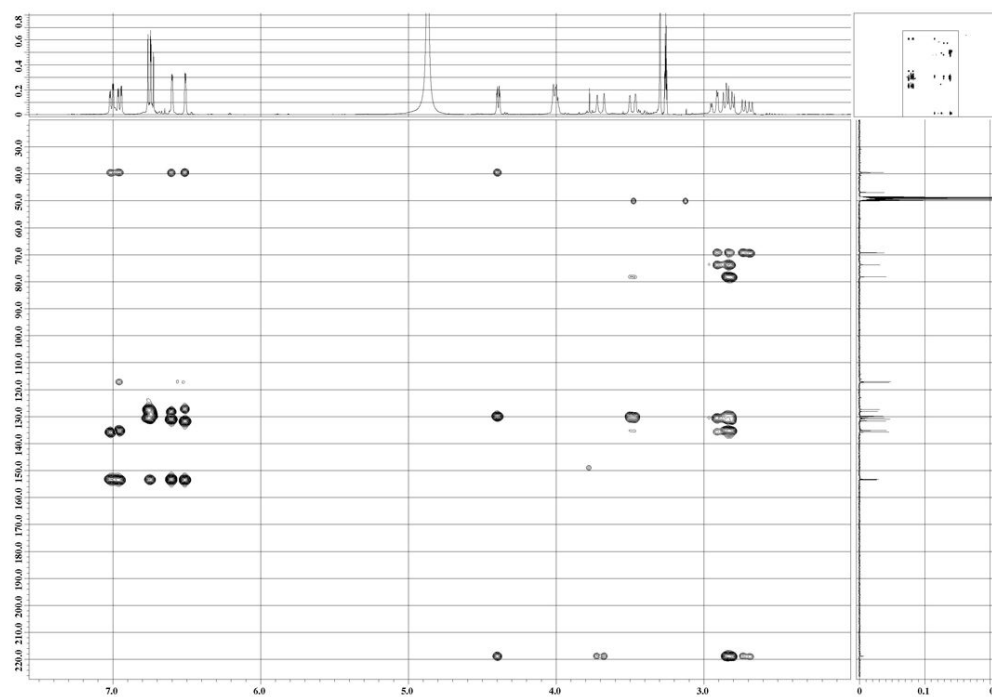


Figure 32. HMBC spectrum of compound **6** in CD₃OD

1-4. Compound 7과 Compound 8의 구조해석

Compound 7의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과, δ 6.92(2H, d, $J = 9.0$ Hz)와 δ 7.78(2H, d, $J = 9.0$ Hz)의 signal은 aromatic ring의 proton으로 적분 값과 coupling constant 값을 통하여 *ortho*-coupling을 하는 대칭구조임을 예상할 수 있었고, δ 6.18(1H, d, $J = 2.1$ Hz)과 δ 6.35(1H, d, $J = 2.1$ Hz)의 signal은 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하는 sp^2 proton으로 예상하였다. 또한 δ 5.36(1H, d, $J = 1.6$ Hz) 및 δ 4.21 ~ 4.06 부근의 복잡한 signal로부터 당이 하나 치환된 구조임을 알 수 있었는데, δ 0.91(3H, d, $J = 6.0$ Hz)에서 doublet으로 나타나는 특징적인 methyl proton peak를 통하여 치환된 당이 rhamnose인 것으로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석결과, 19개 이상의 carbon signal과 δ 158.6(C-2), 136.2(C-3), 179.5(C-4)의 carbon peak로부터 flavone 3-ol의 골격임을 알 수 있었으며,²⁴⁾ ^1H 과 ^{13}C NMR data를 비교한 결과 aglycone은 kaempferol이며 3번 위치에 rhamnose가 치환되어 있는 것으로 예상하였다. 치환된 당의 signal은 δ 103.5, 73.2, 72.1, 72.0, 17.7이며 anomeric proton의 coupling constant 값($J = 1.6$ Hz)을 통하여 문헌²⁵⁾과 비교하여 α -L-rhamnopyranoside임을 확인하였다. 이를 바탕으로 compound 7은 kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside 즉, afzelin으로 동정하였고 문헌²⁶⁾과 일치함을 확인하였다(Figure 33).

Compound 8의 ^1H 과 ^{13}C NMR data를 비교한 결과, compound 7과 비슷한 경향을 보이는 것으로 보아 이 역시 rhamnose가 치환된 flavonoid로 예상하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 6.14(1H, d, $J = 2.1$ Hz)와 δ 6.30(1H, d, $J = 2.1$ Hz)의 signal은 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하는 sp^2 proton으로 예상하였으며, δ 6.89(1H, d, $J = 8.2$ Hz), δ 7.27(1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz) 및 δ 7.31(1H, d, $J = 2.1$ Hz)의 signal은 aromatic ring의 proton으로 coupling constant 값을 통하여 각각 *ortho*- 및 *meta*-coupling하는 것으로 나타났으며 flavonoid B-ring의 3', 4'번 위치가 치환되어 있는 것을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 문헌²⁷⁾과 비교하여 compound 8은 quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside 즉, quercitrin으로 동정하였다(Figure 34).

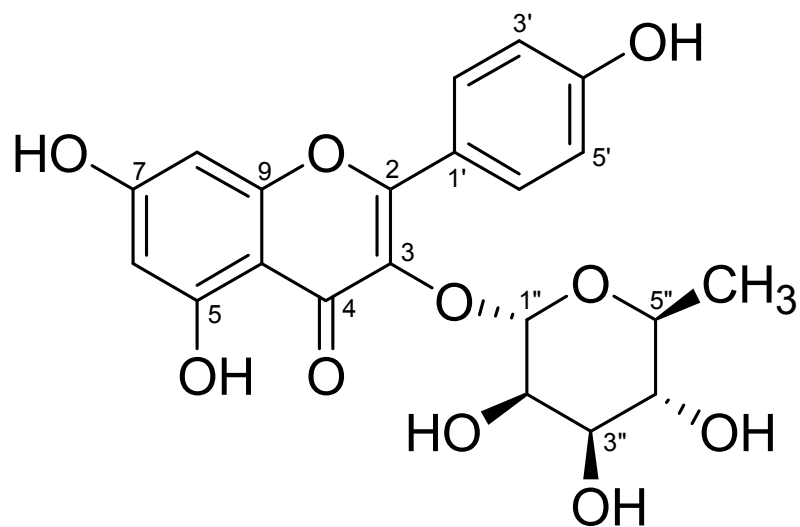


Figure 33. Chemical structure of compound 7

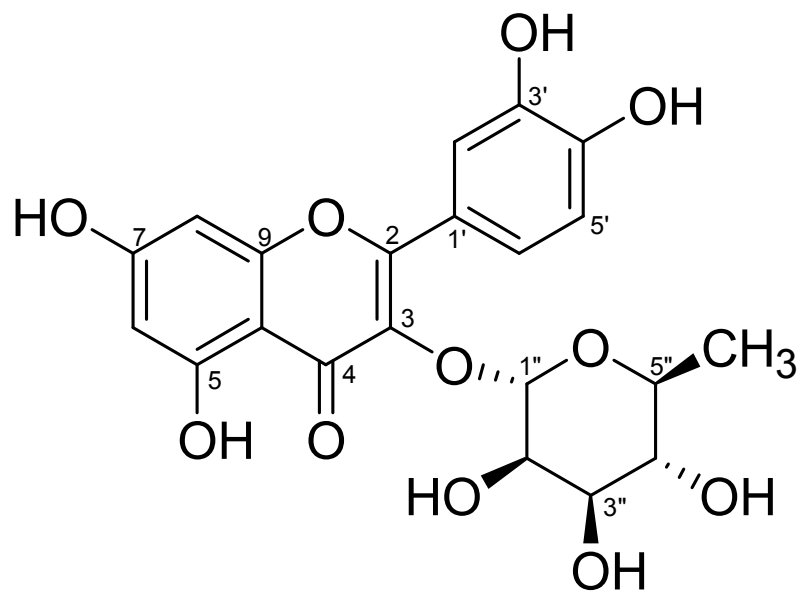


Figure 34. Chemical structure of compound 8

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **7** and **8** (100 and 400 MHz, CD_3OD)

| No. | Compound 7 | | Compound 8 | |
|-----|---------------------|--|---------------------|--|
| | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) | δ_{C} | δ_{H} (int, multi, J Hz) |
| 2 | 158.6 | | 158.8 | |
| 3 | 136.2 | | 136.2 | |
| 4 | 179.5 | | 179.6 | |
| 5 | 163.2 | | 159.2 | |
| 6 | 100.1 | 6.18(1H, d, 2.1) | 100.6 | 6.14(1H, d, 2.1) |
| 7 | 166.7 | | 168.0 | |
| 8 | 94.9 | 6.35(1H, d, 2.1) | 95.3 | 6.30(1H, d, 2.1) |
| 9 | 159.2 | | 163.3 | |
| 10 | 105.7 | | 105.5 | |
| 1' | 122.6 | | 123.1 | |
| 2' | 131.9 | 7.75(1H, d, 9.0) | 117.0 | 7.31(1H, d, 2.1) |
| 3' | 116.5 | 6.92(1H, d, 9.0) | 146.7 | |
| 4' | 161.6 | | 150.1 | |
| 5' | 116.5 | 6.92(1H, d, 9.0) | 116.5 | 6.89(1H, d, 8.2) |
| 6' | 131.9 | 7.75(1H, d, 9.0) | 123.0 | 7.27(1H, dd, 8.2, 2.1) |
| 1'' | 103.5 | 5.36(1H, d, 1.6) | 103.7 | 5.32(1H, d, 1.4) |
| 2'' | 71.9 | 4.21–4.06(sugar H) | 72.2 | 4.19–3.28(sugar H) |
| 3'' | 72.0 | | 72.3 | |
| 4'' | 73.2 | | 73.4 | |
| 5'' | 72.1 | | 72.1 | |
| 6'' | 17.7 | 0.91(3H, d, 6.0) | 17.8 | 0.92(3H, d, 6.2) |

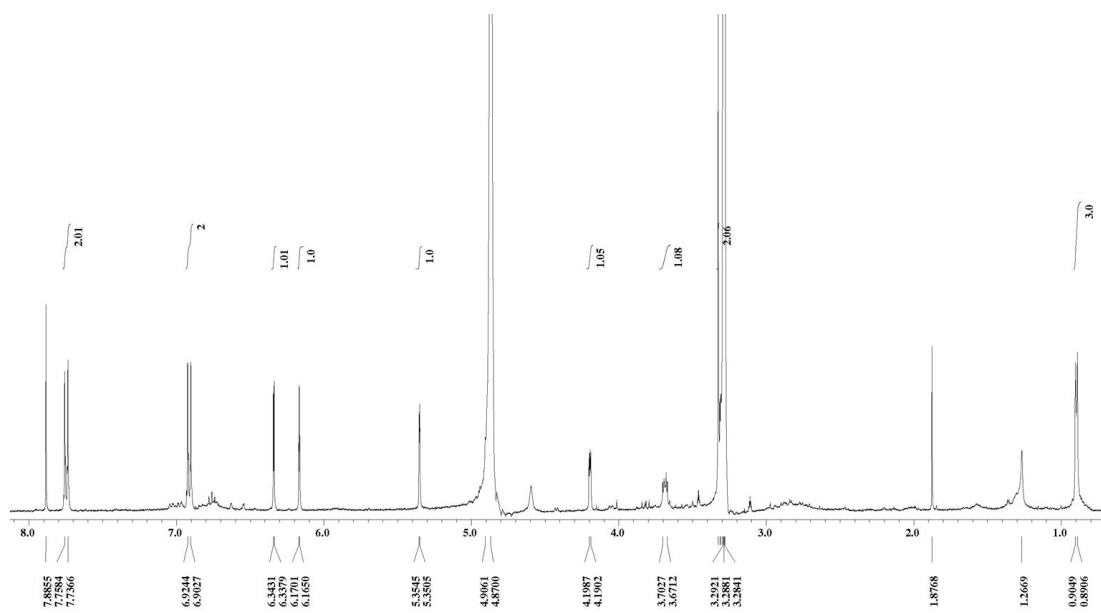


Figure 35. ^1H -NMR spectrum of compound 7 in CD_3OD

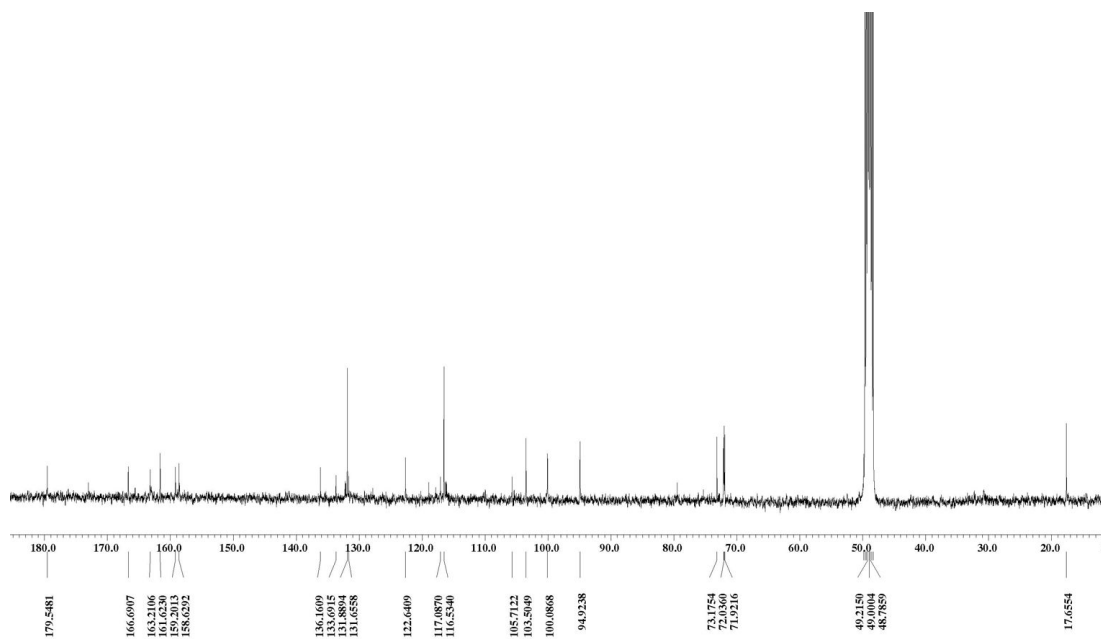


Figure 36. ^{13}C -NMR spectrum of compound 7 in CD_3OD

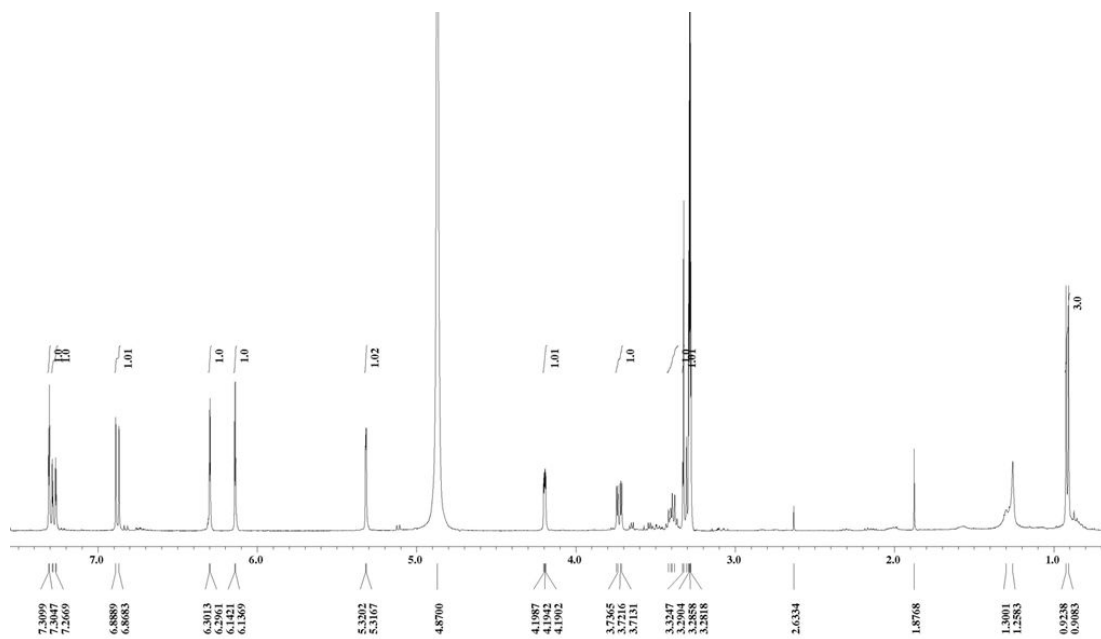


Figure 37. ^1H -NMR spectrum of compound **8** in CD_3OD

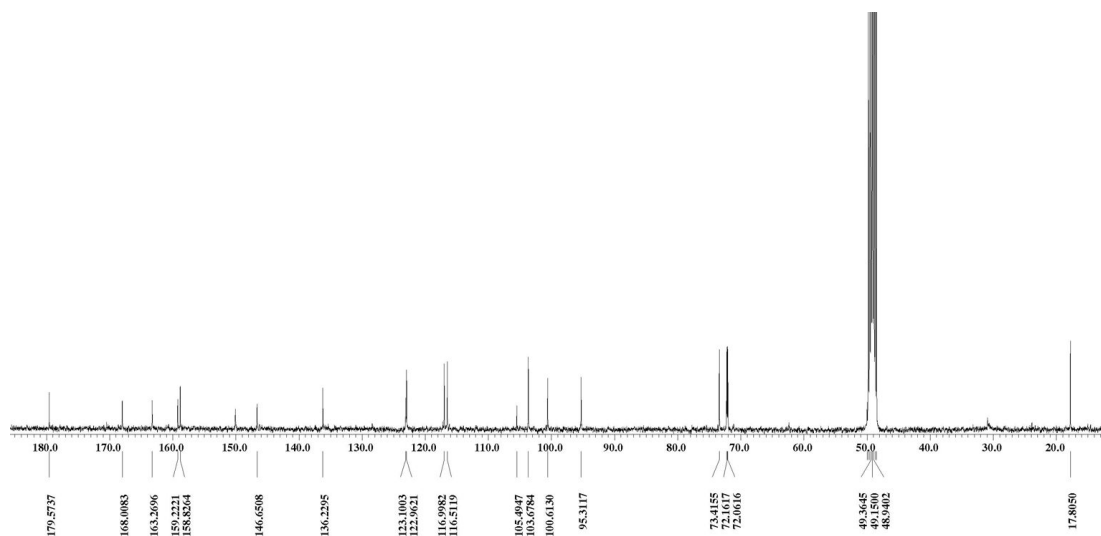


Figure 38. ^{13}C -NMR spectrum of compound **8** in CD_3OD

2. 항산화 활성 실험 결과

2-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀계 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합을 하는 성질을 가지며 항암 및 항산화 효과와 같은 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 39)을 작성하여 소사나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 100 mg 당 함유하고 있는 gallic acid 의 양(GAE; Gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서 20.3 mg GAE/100 mg, 분획물 중 EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 43.7, 35.4 mg GAE/100 mg 으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 40). 이는 다른 항산화 실험결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.

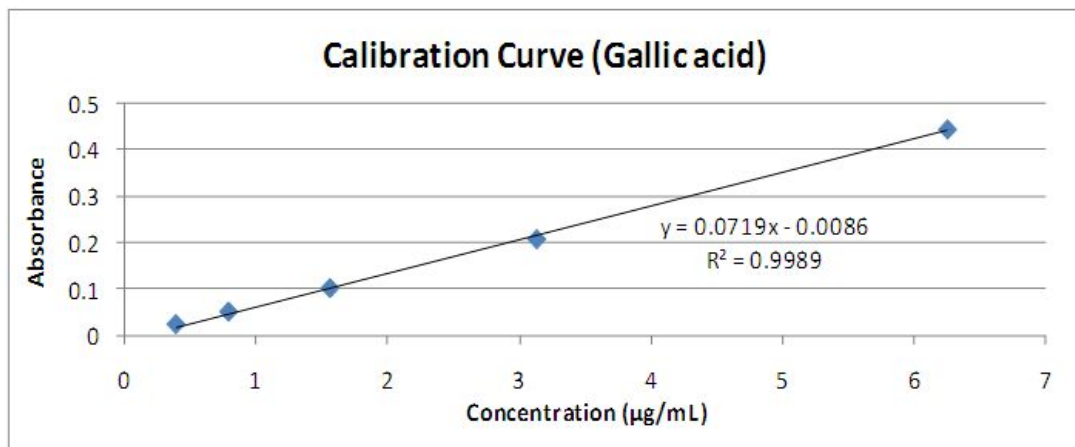


Figure 39. Calibration curve for quantification of total phenolic compounds.

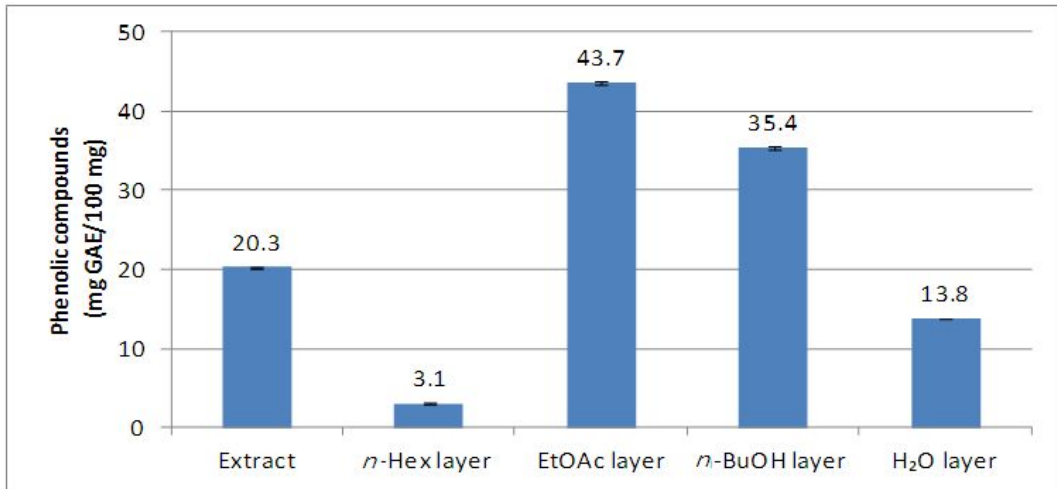


Figure 40. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers.

2-2. 총 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드는 페닐기 2개가 C₃사슬을 매개하여 결합한 C₆-C₃-C₆형 탄소골격 구조로 되어 있으며, 이것이 여러 당류와 에테르(ether) 결합을 통해 배당체(glycosides)의 형태로 존재하는 경우가 많다. 넓은 의미의 플라보노이드는 안토크산틴류(anthoxanthins)와 안토시아닌류(anthocyanins), 카테킨류(catechins)를 포함하지만, 좁은 의미에서는 안토크산틴류만을 말한다. 항균·항암·항바이러스·항알레르기 및 항염증 활성을 지니며, 독성은 거의 나타나지 않는 것으로 보고되고 있다.

Quercetin 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 41)을 작성하여 소사나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 100 mg 당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다. 실험결과 *n*-Hex layer에서는 측정되지 않았으며, 분획물 중 EtOAc layer에서 29.4 mg quercetin/100 mg으로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 42).

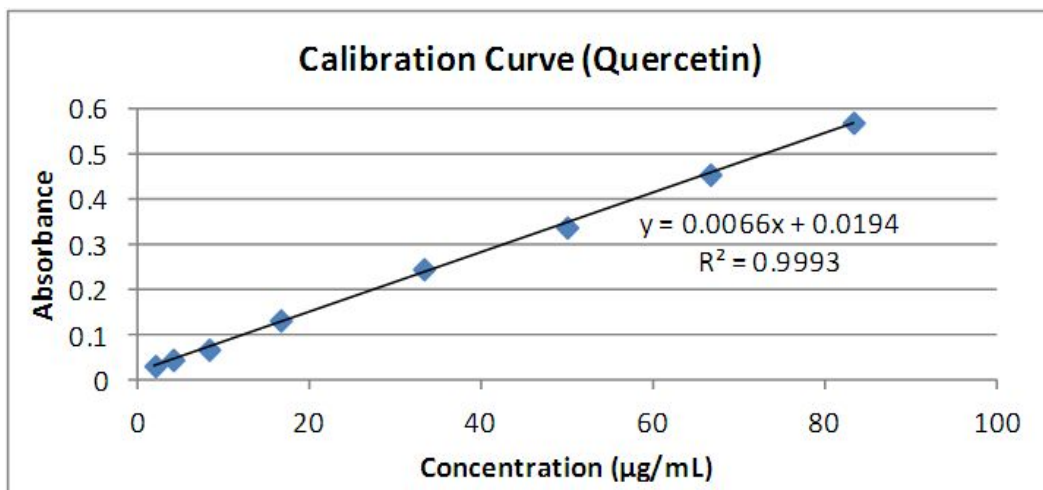


Figure 41. Calibration curve for quantification of total flavonoids.

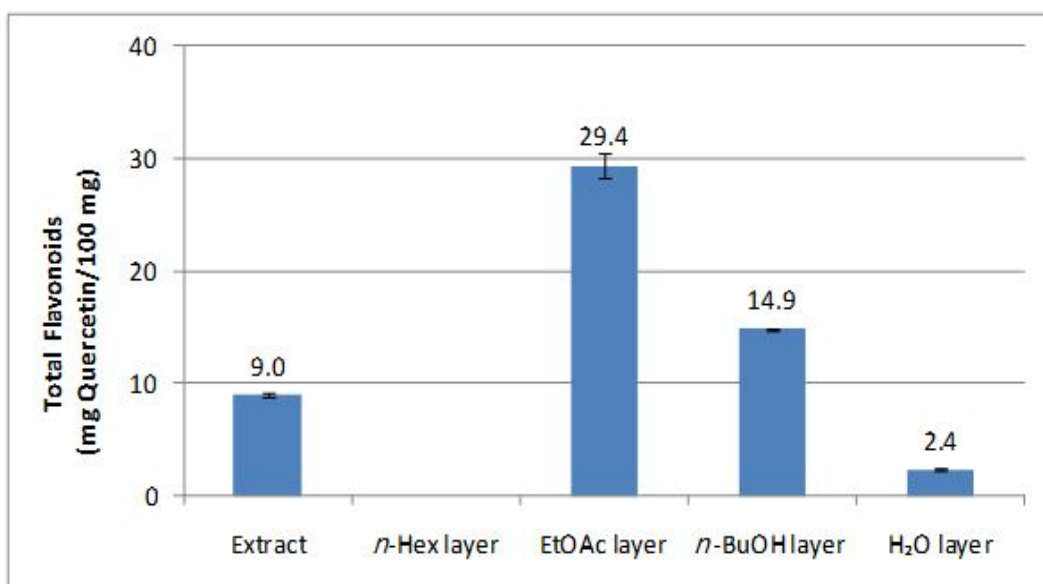


Figure 42. Total flavonoids of extract and solvent layers.

2-3. DPPH radical 소거 활성

2-3-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성

소사나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 그 중 100 µg/mL에서 활성이 없었던 *n*-Hex layer를 제외하고, 추출물과 나머지 분획물에 대하여 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀ 값을 계산하였다(Figure 43-44).

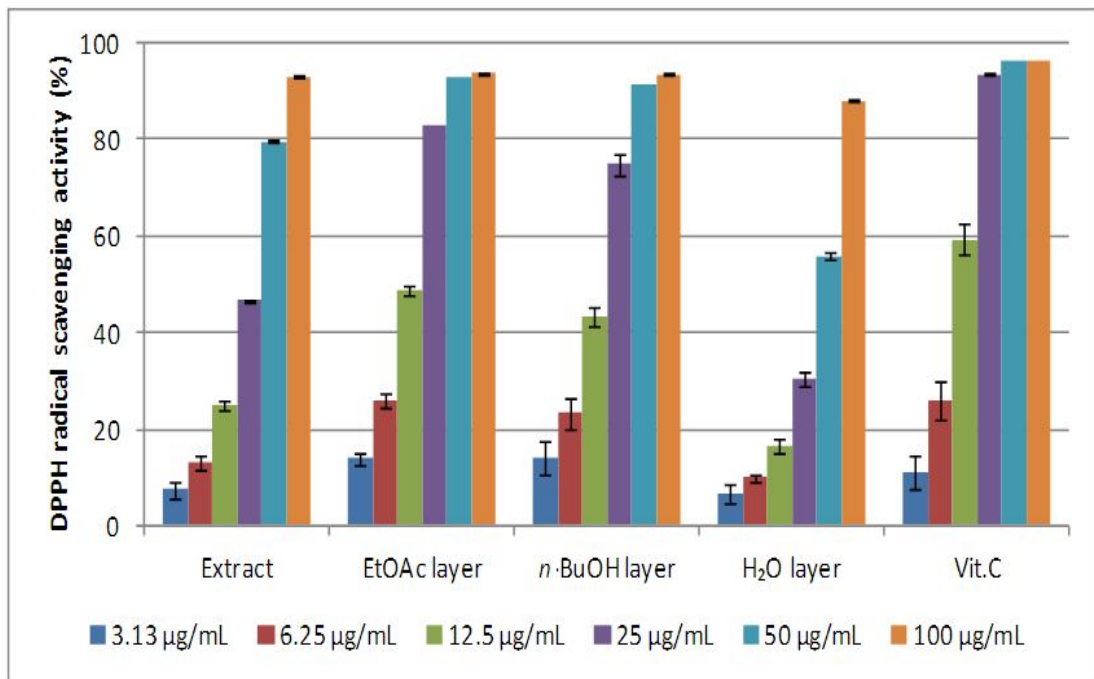


Figure 43. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.

그 결과, 추출물에서 28.8 µg/mL, EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 13.7, 15.6 µg/mL로 대조군인 vitamin C(10.3 µg/mL) 만큼의 좋은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다.

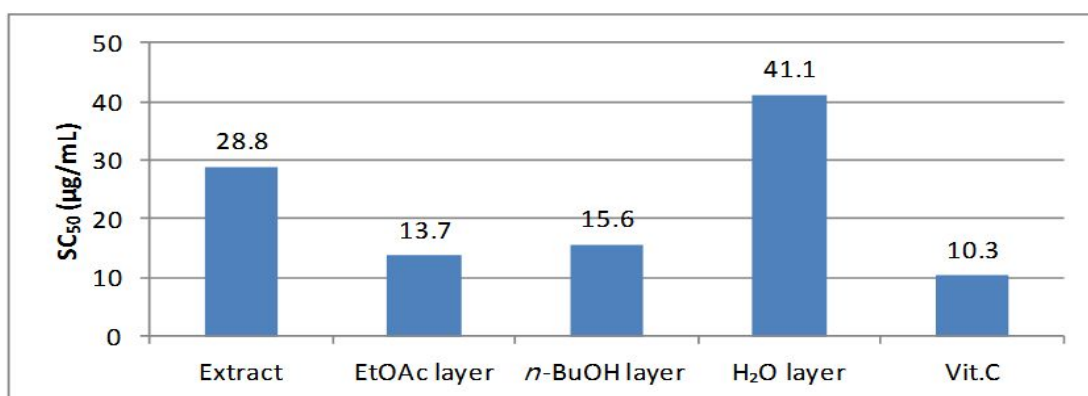


Figure 44. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.

2-3-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성

소사나무 가지로부터 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 25, 50, 100, 300, 500 µM의 농도로 실험을 진행하여 SC₅₀ 값을 계산하였다(Table 5).

Table 5. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds.

| Compound No. | Compound name | SC ₅₀ (µM) |
|------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | β-sitosterol | >500 |
| 2 | daucosterol | >500 |
| 3 | betulinic acid | >500 |
| 4 | pyracrenic acid | 55.2 |
| 5 | carpinontriol B | 244.3 |
| 6 | carpinontriol A | >500 |
| 7 | afzelin | >500 |
| 8 | quercitrin | 62.4 |
| Positive control | vitamin C | 43.5 |

그 결과 compound 4, 8의 SC₅₀ 값이 각각 55.2, 62.4 μM로 대조군인 vitamin C(43.5 μM)와 유사한 값으로 이들 화합물들이 우수한 radical 소거 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

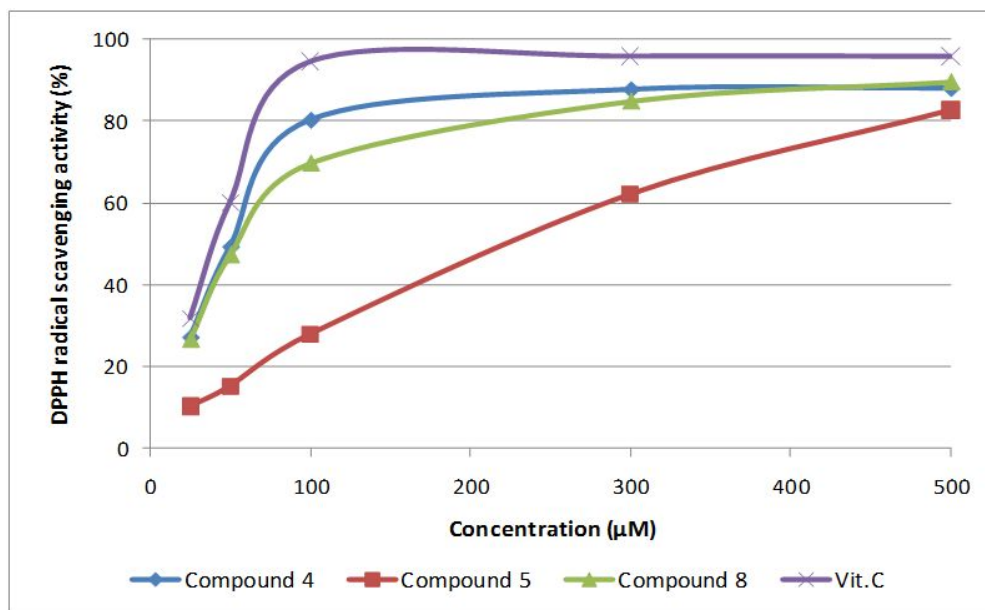


Figure 45. DPPH radical scavenging activities of compounds 4, 5, 8 and vitamin C.

2-4. ABTS radical cation 소거 활성

2-4-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성

소사나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성을 측정하였다. 그 중 100 μg/mL에서 활성이 없었던 *n*-Hex layer를 제외하고, 추출물과 나머지 분획물에 대하여 3.13, 6.26, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과, 추출물에서 10.7 μg/mL,

EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 4.5, 6.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C(11.6 $\mu\text{g/mL}$)보다 더 좋은 ABTS radical cation 소거 활성을 나타내었다(Figure 46-47).

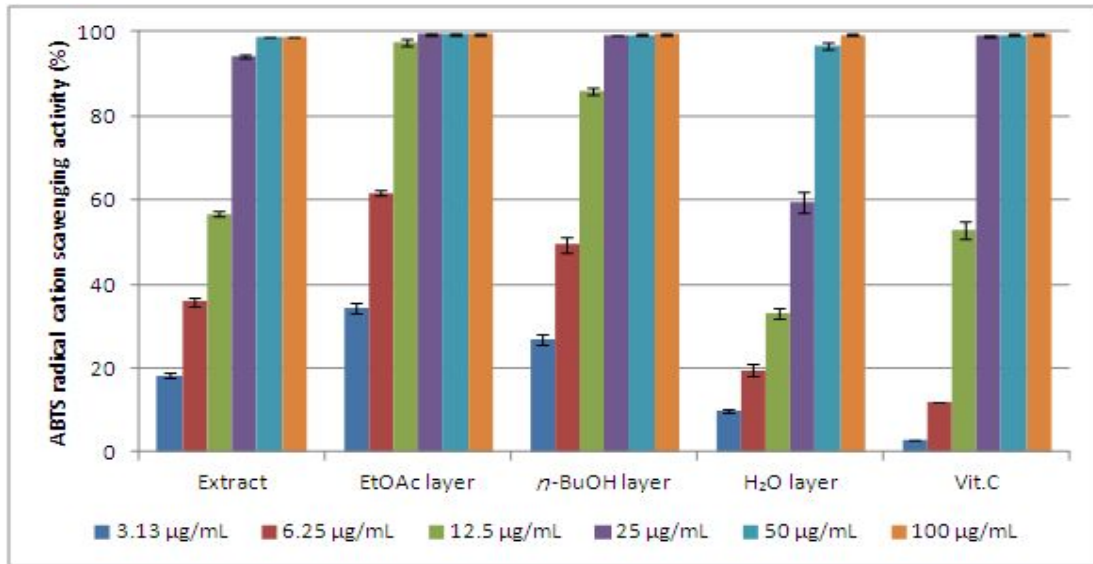


Figure 46. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers.

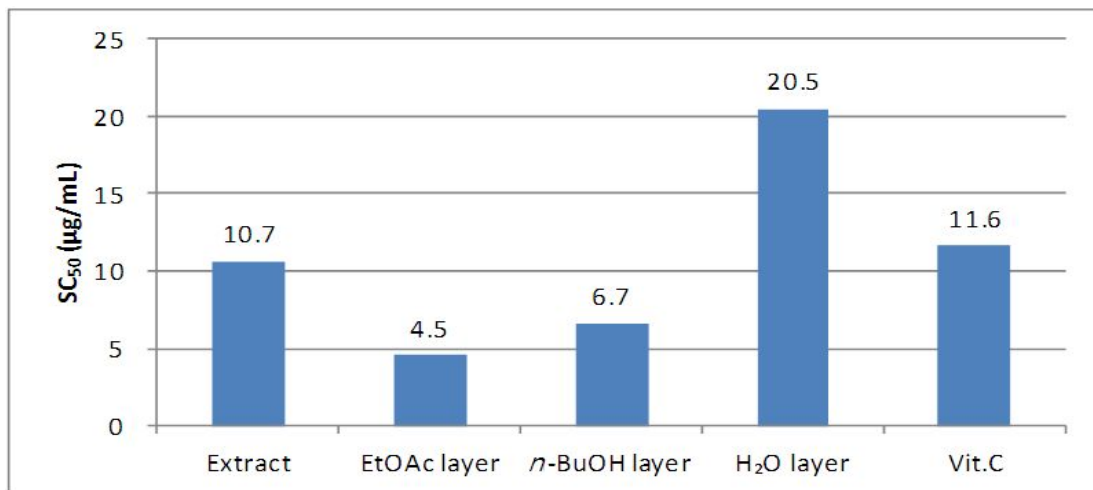


Figure 47. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers.

2-4-2. 분리된 화합물의 ABTS radical cation 소거 활성

소사나무 가지로부터 분리된 화합물의 ABTS radical cation 소거활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도로 실험을 진행하여 SC_{50} 값을 계산하였다(Table 6).

Table 6. SC_{50} values of ABTS^+ radical scavenging activities of isolated compounds.

| Compound No. | Compound name | $\text{SC}_{50}(\mu\text{M})$ |
|------------------|---------------------|-------------------------------|
| 1 | β -sitosterol | >100 |
| 2 | daucosterol | >100 |
| 3 | betulinic acid | >100 |
| 4 | pyracrenic acid | 34.1 |
| 5 | carpinontriol B | 42.1 |
| 6 | carpinontriol A | 45.8 |
| 7 | afzelin | >100 |
| 8 | quercitrin | 29.6 |
| Positive control | vitamin C | 31.6 |

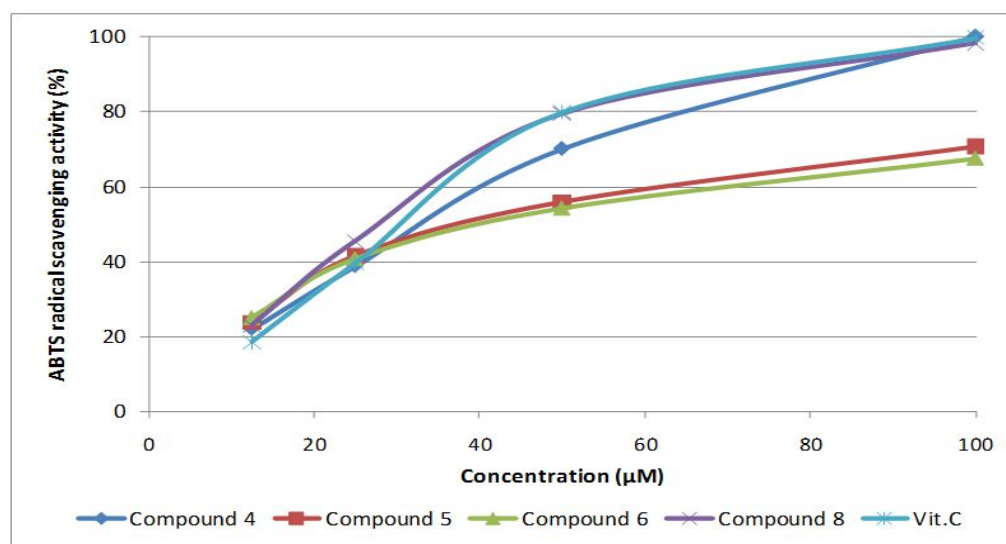


Figure 48. ABTS^+ radical scavenging activities of compounds 4, 5, 6, 8 and vitamin C.

그 결과 compound 4, 5, 6, 8의 SC₅₀ 값이 각각 34.1, 42.1, 45.8, 29.6 μM로 대조군인 vitamin C(31.6 μM)와 유사한 값으로 이들 화합물들이 우수한 radical 소거 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

3. 항염 활성 실험 결과

3-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가

RAW 264.7 cell을 이용하여 소사나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대한 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포독성을 측정하였다. 우선 sample 100 μg/mL의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, 70% 에탄올 추출물에서는 14.6 μM로 43.1%가 감소하였으며 EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 4.3 μM, 16.2 μM로 83.4%, 36.7%가 감소하는 것을 확인하였다. *n*-Hex layer의 경우에는 cell에 대해 독성이 있었다(Figure 49).

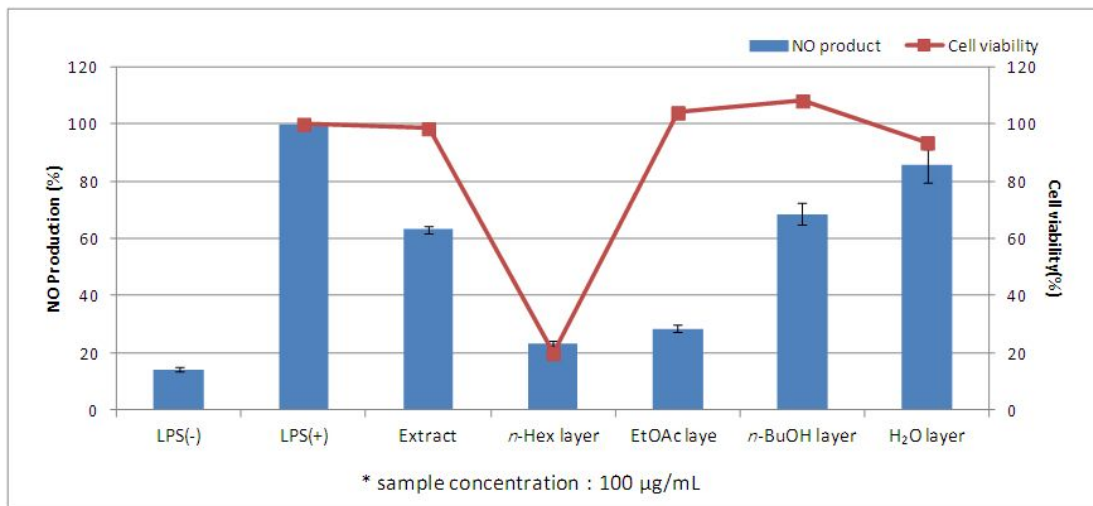


Figure 49. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract and solvent layers.

위 결과를 바탕으로 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포독성은 없으며 활성이 있던 sample들에 대해 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 더 진행하였다.

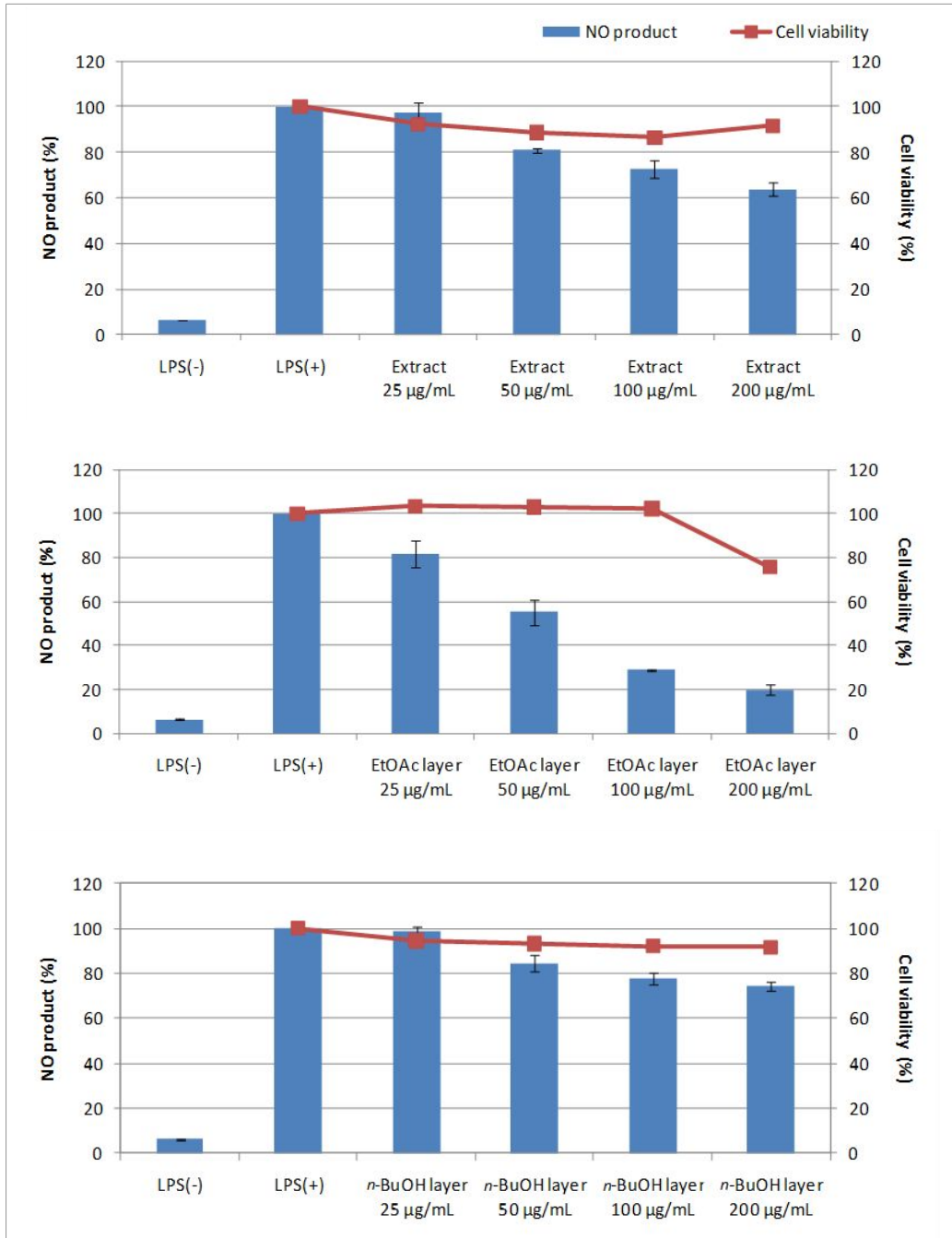


Figure 50. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract, EtOAc layer and *n*-BuOH layer.

그 결과 70% 에탄올 추출물과 *n*-BuOH layer는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포 독성 없이 NO 생성량을 더 많이 감소시키는 것을 확인하였고, EtOAc layer의 경우 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약간의 세포독성을 나타내었지만 70% 에탄올 추출물과 *n*-BuOH layer에 비해 더 좋은 NO 생성 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다(Figure 50).

3-2. Compound 5, 6의 Nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가

분리된 화합물 중 문헌²⁹⁻³³⁾과 비교하여 아직 항염 활성 및 세포독성에 대해 알려지지 않은 compound 5, 6에 대하여 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포독성을 측정하였다(Figure 51).

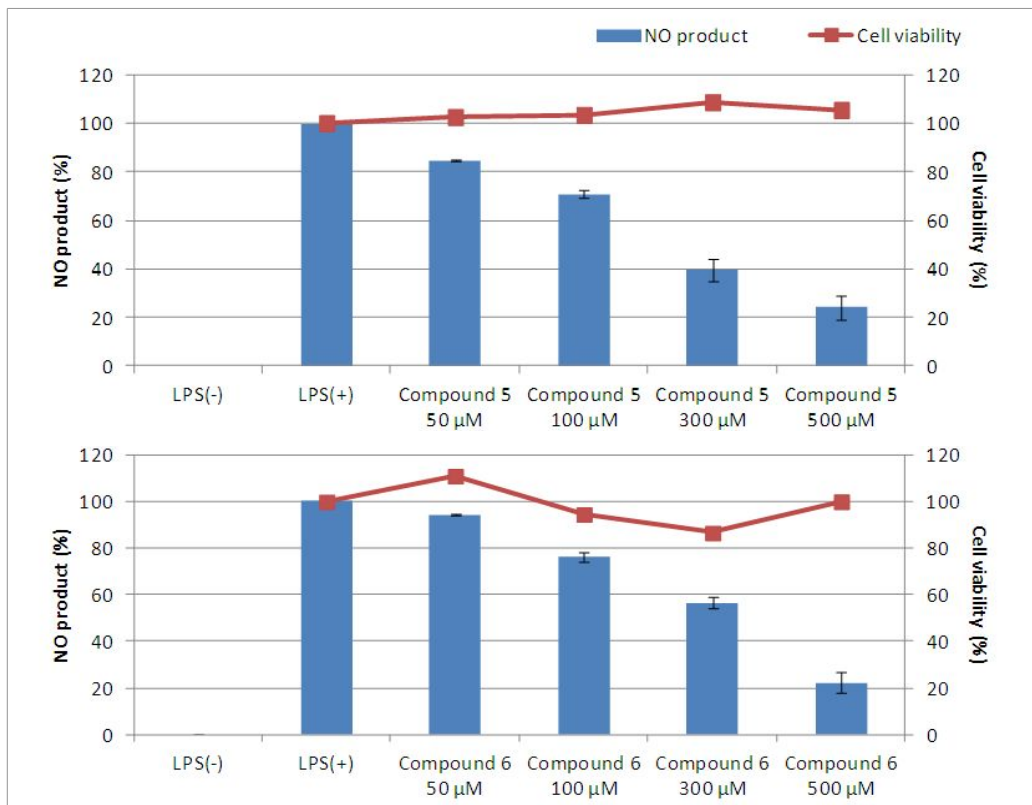


Figure 51. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of compounds 5 and 6.

실험 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, compound 5, 6 모두 세포 독성이 없었으며 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

3-3 염증성 cytokine IL-6 생성 억제 평가

염증성 cytokine으로 알려진 IL-6는 초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용한다. 분리된 화합물 중 compound 5, 6의 IL-6 양을 측정된 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 농도 의존적으로 IL-6 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 52).

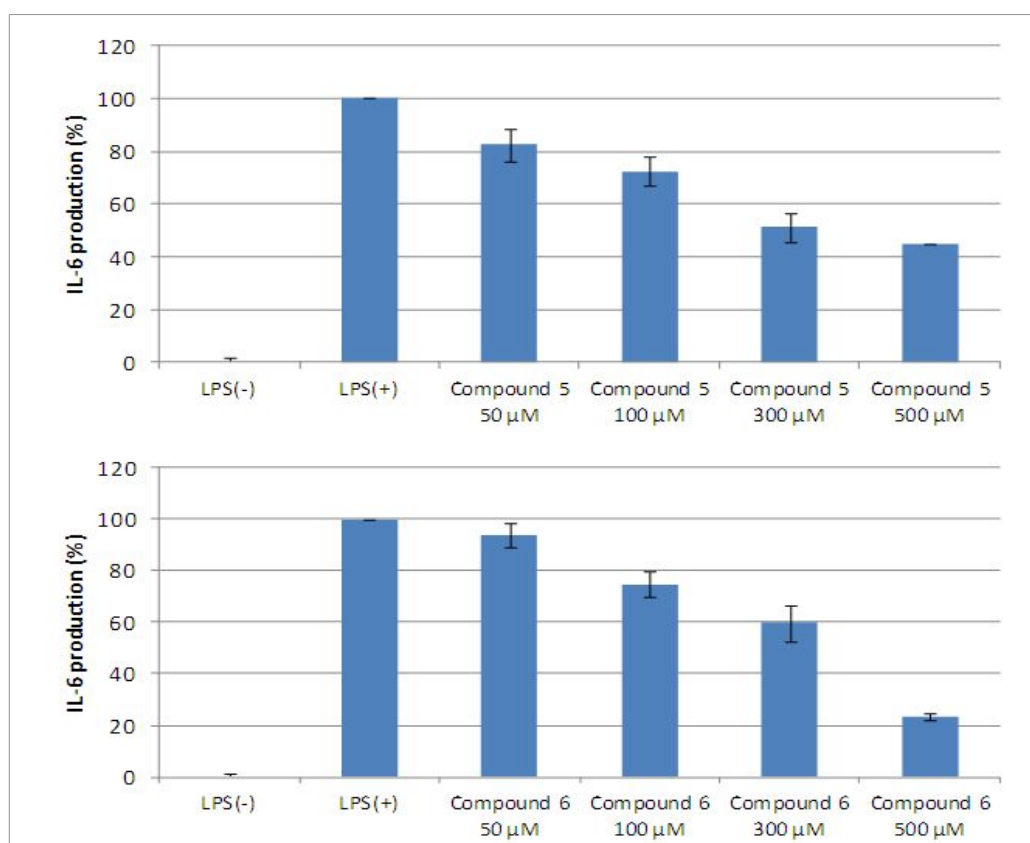


Figure 52. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6 by compounds 5 and 6.

IV. 요약 및 결론

제주에 자생하고 있는 소사나무(*Carpinus turczaninowii*) 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고, 화합물을 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화 및 항염 활성화에 대한 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 진행하게 되었다.

소사나무 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water layer를 얻었다. 이들 중 ethyl acetate 분획물에 대해 vacuum liquid chromatography(VLC), 순상 silica gel chromatography, sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR을 이용하여 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 8개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 β -sitosterol (1), daucosterol (2), betulinic acid (3), pyracrenic acid (4), carpinontriol B (5), carpinontriol A (6), afzelin (7), quercitrin (8)으로 확인되었다.

항산화 활성 검색에서 추출물 및 분획물에 대한 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 측정 실험 결과, ethyl acetate layer에서 시료 100 mg 당 총 폴리페놀 (43.7 mg GAE/100 mg) 및 플라보노이드(29.4 mg quercetin/100 mg) 함량이 가장 높았다. DPPH radical 및 ABTS radical cation 소거활성 실험에서는 추출물, ethyl acetate 및 *n*-butanol layer에서 좋은 소거 활성을 보였다.

분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성 실험에서는 compound 4, 8의 SC₅₀ 값이 각각 55.2 μ M, 62.4 μ M로 대조군인 vitamin C(43.5 μ M)와 유사한 활성이 있음을 확인하였다. 그리고 ABTS radical cation 소거 활성 실험에서는 compound 4, 5, 6, 8의 SC₅₀ 값이 각각 34.1 μ M, 42.1 μ M, 45.8 μ M, 29.6 μ M로 대조군인 vitamin C에 비해 좋은 활성을 나타내었다.

항염 활성 검색에서 추출물 및 분획물에 대한 RAW 264.7 cell을 이용한 NO 생성 억제 실험에서는 추출물, ethyl acetate, *n*-butanol layer에서 세포독성 없이

NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 분리된 화합물의 항염 실험에서는 compound 5, 6이 세포 독성 없이 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며 염증성 cytokine인 IL-6 역시 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 소사나무 가지를 이용한 천연 항산화제 및 항염 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 1) Lee, H. J.; Park, S. N. "Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Quercus salicina* Blume Extracts" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 2011, 37(2), 143-152.
- 2) Ahn, Y. J.; Kim, S. Y.; Ok, J. H.; Wang, H.; Park, C. H.; Kim, S. H.; Heo, Y. S.; Jeon, Y. H.; Park, S. S. "Antioxidant Activity of *Persicaria perfoliata* Extracts" *J. Soc. Coemet. scientists Korea*, 2009, 35(3), 235-241.
- 3) 손장락, "생노병사의 열쇠, 활성산소와 항산화제", 바이오메디컬, 2004, 15.
- 4) Heo, S. I.; Wang, M. H. "Antioxidant Activity and Cytotoxicity Effect of Extracts from *Taraxacum mongolicum* H." *Kor. K. Pharmacogn.* 2008, 39(3), 255-259.
- 5) Lee, S. Y.; Kim, H. J.; Choi, S. W. "Study on the Antioxidant Activity of *Geranium nepalense* subsp. thunbergii Extract" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 2011, 37(1), 61-66.
- 6) Moon, M. Y.; Baik, J. S.; Kim, S. S.; Jang, W. J.; Kim, M. S.; Lee, N. H. "Identification of Antioxidative Constituents from The Branches of *Quercus gilva* Blume" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 2009, 35(3), 251-256.
- 7) Doh, E. S.; Chang, J. P.; Kil, K. J.; Choi, M. S.; Yang, J. K.; Yun, C. W.; Jeong, S. M.; Jung, Y. H.; Lee, G. H. "Antioxidative Activity and Cytotoxicity of Fermented *Allium victorialis* L. Extract" *Korean J. Plant*

Res., 2011, 24(1), 30-39.

- 8) Kang, M. A.; Kim, M. B.; Kim, J. H.; Ko, Y. H.; Lim, S. B. "Integral Antioxidative Capacity and Antimicrobial Activity of Pressurized Liquid Extracts from 40 Selected Plant Species" *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2010, 39(9), 1249-1256.
- 9) Park, Y. H.; Lim, S. H.; Ham, H. J.; Kim, H. Y.; Jeong, H. N.; Kim, K. H.; Kim, S. M. "Isolation of Anti-inflammatory Active Substance β -sitosterol from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Stam" *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2010, 39(7), 980-985.
- 10) Lee, J. Y.; Kang, M. C.; Lee, J. A.; Ko, K. H.; Kim, B. S.; Han, J. H.; Kim, S. J.; Kim, G. O. "Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Ethanol Extract of *Malus micromalus* Makino in Jeju Island" *KSBB Journal*, 2009, 24, 327-333.
- 11) Jo, S. Y.; Lee, U. Y.; Kim, E. Y.; Lee, S. J.; Her, K. W.; Yoon, T. J. "A Study on the Anti-inflammatory and Anti-allergic Effect of *Salvia plebeia* R. extracts" *Kor. J. Pharmacogn.*, 2010, 41(1), 31-37.
- 12) Yoon, W. J.; Lee, J. A.; Kim, K. N.; Kim, J. Y.; Park, S. Y. "In vitro Anti-inflammatory Activity of the *Artemisia fukudo* Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells" *Korean J. Food Sci. Technol.*, 2007, 39(4), 464-469.
- 13) Park, G. H.; Lee, J. Y.; Kim, D. H.; Cho, Y. J.; An, B. J. "Anti-Oxidant and Antiinflammatory Effects of *Rosa multiflora* Root" *Journal of Life Science*, 2011, 21(8), 1120-1126.

- 14) Jeon, J. I.; Jang, J. S. "Foliar flavonoids of genus *Carpinus* in eastern Asia primarily based on native taxa to Korea" *Kor. J. Plant Tax.*, **2000**, *30*(2), 139-153.
- 15) Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine" *J. Biol. Chem.*, **1915**, *22*, 305-308.
- 16) Davis, F. B.; Middleton, E.; Davis, P. J.; Blas, S. D. "Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity" *Cell Calcium*, **1983**, *4*, 71-81.
- 17) Blois, M. S. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.
- 18) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A. Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, *26*, 1231-1237.
- 19) Sohn, B. H.; Park, J. H.; Lee, D. Y.; Cho, J. G.; Kim, Y. S.; Jung, I. S.; Kang, P. D.; Baek, N. I. "Isolation and Identification of Lipids from the Silkworm (*Bombyx mori*) Droppings" *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **2009**, *52*(4), 336-341.
- 20) Lee, S. H.; Kim, K. S.; Jang, J. M.; Park, Y. M.; Kim, Y. B.; Kim, B. K. "Phytochemical Constituents from the Herba of *Artemisai apiacea*" *Arch Pharm Res*, **2002**, *25*(3), 285-288.
- 21) Yun, Y. H.; Han, S. H.; Park, E. J.; Yim, D. S.; Lee, S. K.; Lee, C. K.;

- Cho, K. H.; Kim, K. J. "Immunomodulatory Activity of Betulinic Acid by Producing Pro-inflammatory Cytokines and Activation of Macrophages" *Arch Pharm Res*, **2003**, *26*(12), 1087-1095.
- 22) Kim, J. H.; Byun, J. C.; Bandi, A. K. R.; Hyun, C. G.; Lee, N. H. "Compounds with elastase inhibition and free radical scavenging activities from *Callistemon lanceolatus*" *Journal of Medicinal Plants Research*, **2009**, *3*(11), 914-920.
- 23) Lee, J. S.; Kim, H. J.; Park, H. K.; Lee, Y. S. "New Diarylheptanoids from the Stems of *Carpinus cordata*" *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1367-1370.
- 24) Burn, D. C.; Ellis, D. A.; March, R. E. "A predictive tool for assessing ¹³C NMR chemical shifts of flavonoids" *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, *45*, 835-845.
- 25) 천연물화학 교재편찬위원회, "천연물화학", 영림사, **2003**, 130-131.
- 26) Chung, S. K.; Kim, Y. C.; Takaya, Y.; Terachima, K.; Niwa, M. "Novel Flavonol Glycoside, 7-O-Methyl Mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and Its Antioxidant Effect" *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *54*, 4664-4668.
- 27) Lee, J. H.; Ku, C. H.; Baek, N. I.; Kim, S. H.; Park, H. W.; Kim, D. K. "Phytochemical Constituents from *Diodia teres*" *Arch Pharm Res*, **2004**, *27*(1), 40-43.
- 28) Lee, K. I.; Kim, S. M. "Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts" *J. Kor. Soc.*, **2009**, *38*(3), 264-27.

- 29) Lee, J. H.; Lee, J. Y.; Park, J. H.; Jung, H. S.; Kim, J. S.; Kang, S. S.; Kim, Y. S.; Han, Y. M. "Immunoregulatory activity by daucosterol, a β -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice" *Vaccine*, **2007**, *25*(19), 3834-3840.
- 30) Yazawa, K.; Suga, K.; Honma, A.; Shirosaki, M.; Koyama, T. "Anti-Inflammatory Effects of Seeds of the Tropical Fruit Camu-Camu (*Myrciaria dubia*)" *J Nutr Sci Vitaminol*, **2011**, *57*, 104-107.
- 31) Pan, M. H.; Chen, C. M.; Lee, S. W.; Chen, Z. T. "Cytotoxic Triterpenoids from the Root Bark of *Helicteres angustifolia*" *Chemistry&Biodiversity*, **2008**, *5*, 565-574.
- 32) Rho, H. S.; Ghimeray, A. K.; Yoo, D. S.; Ahn, S. M.; Kwon, S. S.; Lee, K. H.; Cho, D. H.; Cho, J. Y. "Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties" *Molecules*, **2011**, *16*, 3338-3344.
- 33) Kim, S. K.; Kim, H. J.; Choi, S. E.; Park, K. H.; Choi, H. K.; Lee, M. W. "Anti-oxidative and Inhibitory Activities on Nitric Oxide (NO) and Prostaglandin E₂ (COX-2) Production of Flavonoids from Seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg" *Arch Pharm Res*, **2008**, *31*(4), 424-428.

감사의 글

선배들의 말처럼 2년이라는 석사과정의 시간이 너무도 빨리 지나가버렸습니다. 논문 수정을 마치고 이렇게 감사의 글을 적고 있자니 그동안의 일들이 머릿속을 스쳐지나가며 아쉬움 또한 많이 남는 것 같습니다. 부족한 저를 이 자리에 있게 해주신 많은 분들에게 감사의 인사를 드리고자 합니다.

학부시절부터 석사과정에 이르기까지 화학이라는 분야에 무한 관심과 흥미를 가지게 해주신 우리 화학과 정덕상 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 이선주 교수님, 김원형 교수님, 그리고 저의 지도교수님이신 이남호 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

부족한 저에게 실험에 대한 많은 조언과 가르침을 주신 우리 실험실 종석 선생님, 상숙 선생님, 진석 선생님, 태현 선생님, 정미 선생님, 지영 선생님께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 만날 때마다 격려해주고 물음에 언제나 반갑게 답해주신 미연언니, 려경언니, 주희언니, 항상 자신의 일처럼 챙겨주신 유미언니,정은언니, 성환오빠, 상희언니, 준환오빠에게 감사하다는 말을 전하며, 많이 챙겨주지 못해 미안했던 실험실 후배들 인정이, 수영이, 정환이, 지미, 라겸이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 06학번 친구들, 학부에서 석사과정, 조교까지 저와 언제나 함께했던 친구 승희, 만나면 한바탕 수다를 떨게 되는 반가운 유재, 미애, 미주, 준오, 형민, 승준, 승환이에게도 고맙다는 말을 전하며, 화학과에 계신 모든 선생님들, 대학원 생활을 함께한 선배님과 후배들에게도 진심으로 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

자주 연락은 못했지만 그래도 멀리서나마 석사과정 생활을 하며 틈틈이 안부를 묻던 보고 싶은 나의 오랜 벗 지연이, 보고 싶은 삼식이 누리, 보람이, 정윤이, 선영이, 지연이, 혜정이 늘 고맙습니다.

마지막으로, 제가 여기까지 올 수 있도록 언제나 지켜봐주시고 사랑으로 아껴 주며 믿어주신 부모님. 가끔 티격태격 하지만 그래도 하나밖에 없는 동생 경훈이.

그리고, 언제나 제 옆에 함께하며 힘든 투정도 다 받아주고, 격려도 아끼지 않으며, 언제나 웃을 수 있도록 나의 엔돌핀과 비타민이 되어주는 성천이에게 사랑의 마음을 담아 진심으로 고맙고 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다.

이제 겨우 시작인 듯합니다. 여러분들의 도움이 있었기에 여기까지 올 수 있었습니다. 항상 잊지 않겠습니다.

앞으로 더욱 더 열심히 최선을 다하는 모습으로 언제 어디서든 꼭 필요한 사람이 되도록 노력하겠습니다.

감사합니다.

2012년 1월
고하나 올림