



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

뽕잎피나무 (*Tilia taquetii*)
잎으로부터 향염 및 주름개선
활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

金 秀 穎

2013年 2月

뽕잎피나무 (*Tilia taquetii*)
잎으로부터 항염 및 주름개선
활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

金 秀 穎

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

金秀穎의 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

2013年 2月

Identification of Anti-inflammatory and
Anti-wrinkle Constituents from
the Leaves of *Tilia taquetii*

Su Yeong Kim
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2013. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목차

List of Schemes	iv
List of Tables	iv
List of Figures	v
List of Abbreviations	viii
Abstract	ix
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 시약 및 기기	7
2. 재료	8
3. 추출, 분획 및 분리	9
3-1. 뽕잎피나무 잎의 추출 및 분획	9
3-2. Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리	10
3-2-1. VLC에 의한 분획과정 (제1차)	10
3-2-1-1. VLC를 수행한 분획물에서 화합물 1, 2 분리과정	10
3-2-2. VLC에 의한 분획과정 (제2차)	11
3-2-2-1. VLC를 수행한 분획물에서 화합물 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 분리과정	11
4. 활성 실험	13
4-1. DPPH radical scavenging activity test	13
4-2. Elastase inhibition activity test	15
4-3. 세포배양	16
4-4. RAW 264.7 cell에서의 nitric oxide (NO) 생성 억제 평가	16
4-5. RAW 264.7 cell에서의 염증성 cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성 억제 평가	17

4-6. Immunoblotting	18
4-7. Human normal fibroblasts cell 에서의 MMP-1 저해 활성 실험	19
4-8. 세포독성 평가 실험	20
III. 결과 및 고찰	21
1. 화합물의 구조 결정	21
1-1. 화합물 1의 구조 동정	21
1-2. 화합물 2의 구조 동정	24
1-3. 화합물 3, 4의 구조 동정	28
1-4. 화합물 5의 구조 동정	33
1-5. 화합물 6, 7, 8의 구조 동정	40
1-6. 화합물 9의 구조 동정	46
2. DPPH radical scavenging activity	50
2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성	50
2-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성	51
3. Elastase inhibition activity	54
3-1. 추출물 및 분획물의 elastase inhibition activity	54
3-2. 분리된 화합물의 elastase inhibition activity	55
4. Human normal fibroblast cell을 이용한 주름개선 실험 결과	57
4-1. 세포 독성 평가	57
4-1-1. 추출물 및 분획물의 세포 독성 평가	57
4-1-2. 분리한 화합물의 세포 독성 평가	58
4-2. Collagenase (MMP-1) 저해활성 결과	61
5. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과	63
5-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가	63
5-2. 화합물 1, 7, 8의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가	66
5-3. 염증성 cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성 억제 평가	69
5-4. COX-2, iNOS의 발현 저해 활성	73
IV. 요약 및 결론	76

V. 참고문헌 78

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fractionation from <i>T. taquetii</i>	9
Scheme 2. Procedure of isolation of compounds 1 , 2 from <i>T. taquetii</i>	10
Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 3–9 from <i>T. taquetii</i>	12

List of Tables

Table 1. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1	21
Table 2. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 2	26
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 3 and 4	30
Table 4. Informations of compound 5 from <i>T. taquetii</i>	34
Table 5. ¹ H NMR, ¹³ C NMR Chemical shifts and informations of HMBC of compound 5	35
Table 6. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 6–8	42
Table 7. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 9	48
Table 8. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds	52

List of Figures

Figure 1. Chemical structures of some anti-oxidants and anti-wrinkle ingredients	3
Figure 2. Isolated compounds of <i>T. taquetii</i>	6
Figure 3. Picture of <i>Tilia taquetii</i>	8
Figure 4. Scavenging of the DPPH radical by an anti oxidant	13
Figure 5. Chemical structure of compound 1	21
Figure 6. ¹ H NMR spectrum of compound 1	23
Figure 7. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	23
Figure 8. Chemical structure of compound 2	25
Figure 9. ¹ H NMR spectrum of compound 2	27
Figure 10. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	27
Figure 11. Chemical structures of compounds 3 and 4	29
Figure 12. ¹ H NMR spectrum of compound 3	31
Figure 13. ¹³ C NMR spectrum of compound 3	31
Figure 14. ¹ H NMR spectrum of compound 4	32
Figure 15. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	32
Figure 16. Chemical structures of compounds 5	34
Figure 17. ¹ H-NMR spectrum of compound 5	36
Figure 18. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5	36
Figure 19. DEPT-135 spectrum of compound 5	37
Figure 20. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 5	37
Figure 21. HMQC spectrum of compound 5	38
Figure 22. HMBC spectrum of compound 5	38
Figure 23. NOESY spectrum of compound 5 in CDCl ₃	39
Figure 24. ESI-MS spectrum of isolated compound 5	39
Figure 25. Chemical structures of compounds 6-8	41

Figure 26. ^1H NMR spectrum of compound 6	43
Figure 27. ^{13}C NMR spectrum of compound 6	43
Figure 28. ^1H NMR spectrum of compound 7	44
Figure 29. ^{13}C NMR spectrum of compound 7	44
Figure 30. ^1H NMR spectrum of compound 8	45
Figure 31. ^{13}C NMR spectrum of compound 8	45
Figure 32. Chemical structure of compound 9	47
Figure 33. ^1H NMR spectrum of compound 9	49
Figure 34. ^{13}C NMR spectrum of compound 9	49
Figure 35. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions	50
Figure 36. SC_{50} value of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions	51
Figure 37. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds	52
Figure 38. DPPH radical scavenging activities of compounds 3, 4, 8 and vitamin C	53
Figure 39. Elastase inhibition activities of extract and solvent fractions	54
Figure 40. Elastase inhibition activities of compounds 6, 8 and oleanolic acid, ursolic acid	55
Figure 41. IC_{50} value of elastase inhibition for compounds 6, 8	56
Figure 42. Cell viabilities of human normal fibroblast CCD-986sk treated with extract and solvent fractions	57
Figure 43. Cell viabilities of <i>T. taquetii</i> EtOAc fraction against human normal fibroblast cell	58
Figure 44. Cell viabilities of <i>T. taquetii</i> isolated compounds against human normal fibroblast cell	59
Figure 45. Cell viabilities of compounds 7, 8 against human normal fibroblast cell	60

Figure 46. MMP-1 inhibition activity of EtOAc layer from <i>T. taquetii</i>	61
Figure 47. Collagenase(MMP-1) inhibition activities of compounds 7 , 8 from <i>T. taquetii</i>	62
Figure 48. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract and solvent layers	64
Figure 49. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of EtOAc layer	65
Figure 50. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of isolated compounds	66
Figure 51. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of compounds 1 , 7 and 8	68
Figure 52. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by EtOAc layer	69
Figure 53. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 1	70
Figure 54. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 7	71
Figure 55. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 8	72
Figure 56. Inhibitory effect of EtOAc fraction on iNOS, COX-2 and β -actin protein expression in RAW 264.7 cell	74
Figure 57. Inhibitory effect of (A) compound 1 (B) compound 7 and (C) compound 8 on iNOS, COX-2 and β -actin protein expression in RAW 264.7 cell	75

List of Abbreviations

brs	Broad single
COX-2	Cyclooxygenase-2
CC	Column chromatography
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i>
CHCl ₃	Chloroform
COSY	Correlation spectroscopy
Cpd	Compound
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 correlation
iNOS	inducible nitric oxide synthase
int	Integration
IL-6	interleukin-6
IL-1 β	interleukin-1 β
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LPS	Lipopolysaccharide
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
MMP-1	matrix metalloproteinase-1
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%
TLC	Thin layer chromatography
<i>T. taquetii</i>	<i>Tilia taquetii</i>
V, v	VLC subfraction
Vit.C	Vitamin C
VLC	Vacuum liquid chromatography

ABSTRACT

Phytochemical investigation of the ethanol extract from *Tilia taquetii* leaves resulted in the isolation of nine constituents; phytol (1), chlorophyll c1 (2), *epi*-catechin (3), isoquercitrin (4), 3,12,13 - trihydroxyoleanan-28-oic acid (5), oleanolic acid (6), arjunolic acid (7), maslinic acid (8), daucosterol (9). The structures of these compounds were confirmed by comparing their spectroscopic data to those in the literature. As far as we know, all of the compounds except *epi*-catechin (3) were isolated for the first time from this plant.

In order to study the skin-related properties for the isolated compounds, bioactivity screenings on anti-oxidation, anti-inflammatory activities and anti-elastase activities were conducted.

For the anti-oxidation tests, the compounds 3, 4 and 8 showed strong DPPH radical scavenging activities with SC_{50} of 5.41, 12.41, 9.75 $\mu\text{g/mL}$ respectively, whose activities were comparable to a positive control vitamin C (SC_{50} 5.71 $\mu\text{g/mL}$).

On the elastase inhibition studies, the compounds 6 and 8 showed stronger activities with IC_{50} 43.6 $\mu\text{g/mL}$ and 89.5 $\mu\text{g/mL}$ whose activities were comparable to a positive control oleanolic acid (IC_{50} 44.94 $\mu\text{g/mL}$) and ursolic acid (IC_{50} 32.74 $\mu\text{g/mL}$).

Effect on human normal fibroblast function, the ethyl acetate fraction and compounds 7, 8 inhibited collagenase (MMP-1) production in a dose-dependent manner by human normal fibroblast cell.

On the screening of anti-inflammatory activities, the compounds 1, 7 and 8 showed the considerable inhibition on the production of nitric oxide for the RAW 264.7 cell without any cytotoxicity. In addition, they reduced LPS-induced secretion of interleukin-6 (IL-6) and

interleukin-1 β (IL-1 β) in RAW 264.7 cell. Also, the ethyl acetate fraction and compound **1**, **7** and **8** suppressed the production of NO and IL-6, IL-1 β through the decreased expression of iNOS and COX-2, an indication of anti-inflammatory effects.

Based on these results, *T. taquetii* leaves extract could be potentially applicable as anti-aging and anti-inflammatory agent in cosmeceutical and/or pharmaceutical ingredient.

I. 서론

최근 우리나라는 생활수준의 향상으로 건강한 삶에 대한 관심이 꾸준히 증가하고 있으며, 이에 따라 질병의 예방 및 개선을 위해 동, 식물 등으로부터 얻어지는 생리활성 물질들을 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁾

특히 화장품 산업에는 약품의 기능이 첨가된 기능성화장품 혹은 약용화장품의 개념이 도입되어, 세계적으로 폭 넓게 이용되고 있다.²⁾ 새로운 기능성 화장품의 개발에서 원하는 활성을 보유한 원료물질의 개발이 우선되어야 하며, 관심의 대상이 되는 효과로 미백, 주름개선, 항산화, 항염 효과 등이 있다.

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 활발히 이루어지고 있다.³⁾

사람이 나이가 들면서 나타나는 노화는 매우 복잡하게 생물학적으로 진행되고 있으며, 원인으로서는 유전적인 요인뿐만 아니라 영양상태, 흡연, 알코올, 환경적인 원인과 같은 외인적인 요인에 의해 영향을 받게 된다. 특히 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인하여 노화를 가속화 시키게 되는데, 이러한 산화적 스트레스는 reactive oxygen species(ROS)를 형성하는데 주도적인 작용을 하며,⁴⁾ DNA를 손상시킨다. 이렇게 손상된 DNA는 최종적으로 collagen을 파괴시킬 뿐만 아니라 형성된 ROS로 인하여 염증(inflammation), 광손상(photodamage), 발암(carcinogenesis) 등을 유발하게 된다. 특히 문제가 되는 것은 활성산소가 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및

성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 항산화물질은 산화적 손상을 무력화 시킬 뿐만 아니라 세포내외의 스트레스요인으로부터 세포를 보호하는 작용을 하게 된다.⁵⁾ 이러한 노화는 전신 장기 중 특히 피부는 노화가 가장 현저하게 나타나는 조직이다. 나이에 따라 진피 섬유아세포의 collagenase RNA는 증가하고 전교원질 형은 감소하게 되어 교원질 합성은 감소하고 쉽게 분해되어 교원질은 1년에 약 1% 씩 감소하게 된다. 결국 진피의 노화로 인하여 피부는 경직되고, 탄력성이 없어지고 반응성이 떨어지며, 스트레스에 의한 반응에 잘 적응하지 못하게 된다.⁶⁾

지금까지 보고된 피부노화 과정은 반복적인 자외선(ultraviolet radiation, UV) 노출에 의해 일어나는 광노화와 시간이 흘러감에 따라 자연스럽게 나타나는 내인성 노화로 구분되고 있다.^{7,8)} 광 노화의 기전은 자외선 조사에 의해 콜라겐 합성이 감소하는 동시에 기질 금속단백 분해효소인 MMPs(matrix metalloproteinases)의 발현이 증가하여 기질의 주요 구성 성분인 콜라겐과 엘라스틴 등의 분해가 증가되어 주름살을 비롯한 광 노화 현상이 진행되는 것으로 알려져 있다.^{9,10)} MMPs는 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백 분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen) 형태로 분비된다. 그 중 가장 많이 알려져 있는 것이 기질 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinase-1, MMP-1, collagenase)이다.¹¹⁾ Elastase 역시 탄력섬유 분해과정에서 탄력소를 분해하는 효소로 자외선 조사에 의해 그 활성이 증가하여 광 노화 현상에 관여하게 된다. 그러므로 피부노화와 주름의 개선에 있어 활성산소를 제거하는 항산화 물질이나 collagenase의 작용을 억제하고 콜라겐의 합성을 촉진시키는 소재의 발굴이 중요하다고 할 수 있다. 현재 주름개선의 치료제나 약물로 이용되는 것들은 비타민 A와 그 유도체, 비타민 C와 그 유도체, 그 외 많은 항산화제가 있다. 하지만 이러한 물질들을 화장품에 적용 시 피부에 대한 안정성에 문제점이 있어 이를 해결하고자 비교적 부작용이 적은 천연물에서 주름개선 소재를 탐색하여 미용기능 식품으로 개발하고자 노력을 기울이고 있다. 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있는데, 이 화합물은 하나 또는 둘 이상의 히드록시기로 치환된 방향족환을 가지고 있으며 자연에 대략 8000여종이 존재한다. 또한 주름 개선 물질로는 oleanolic acid, ursolic

acid, dehydroepiandrosterone (DHEA) 등이 있다(Figure 1).

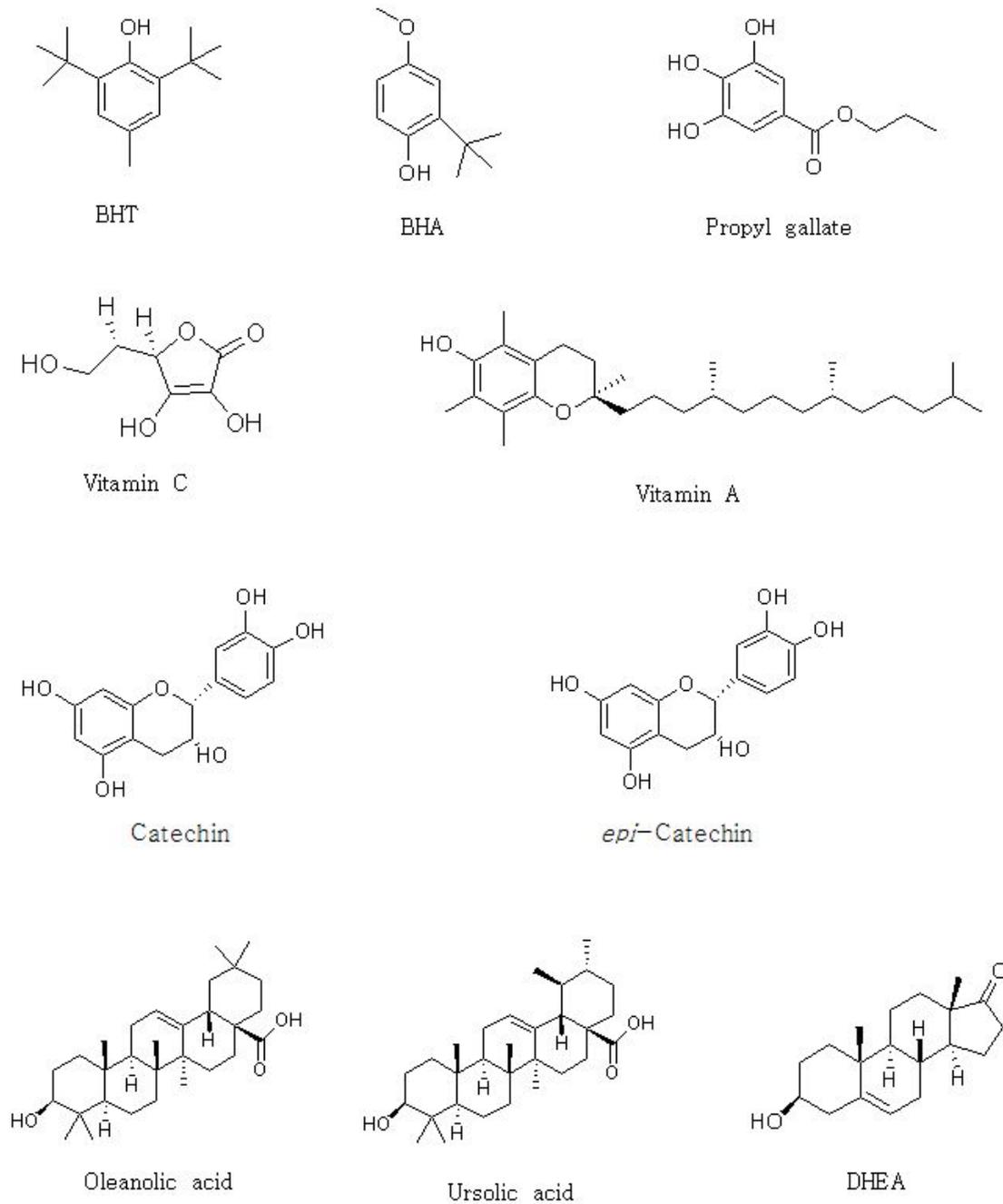


Figure 1. Chemical structures of some anti-oxidants and anti-wrinkle ingredients

염증반응은 생체나 조직에 물리적 충격이나 화학물질 및 세균감염 등의 작용에 대한 생체 방어 기전이며, 지속적인 염증반응은 점막손상을 촉진시켜 결과적으로 관절염, 당뇨병, 동맥경화증 및 암 등의 발생을 이끈다.¹²⁾ 이러한 염증반응은 체내에서 발생한 산화적 스트레스에 의해 촉진되는데, 산화적 스트레스는 세포사멸 뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증 반응을 개시하거나 악화시킨다. 유해한 자극 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발생되면 세포막 인지질로부터 arachidonic acid(AA)가 유리된 후 cyclooxygenase(COX)의 작용을 거쳐 prostaglandin(PG)류의 다양한 염증반응의 매개체들을 생성한다.¹³⁾

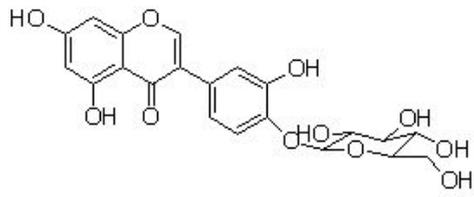
대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다.¹⁴⁾ 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7과 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다. 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E₂(PGE₂)등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성된다. 동물세포에서 NO는 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS) 그리고 inducible NOS(iNOS) 세가지 형태의 NOS에 의해 합성된다. nNOS와 eNOS는 세포내에 항상 존재하지만 iNOS는 interferon- γ , lipopolysaccharide(LPS) 그리고 다양한 염증 유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다. 이렇게 유래된 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다.¹⁶⁾ 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 중양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시

키는 것으로 알려져 있다.^{17,18)} COX에는 2가지 isozyme이 존재하며 COX-1은 거의 모든 조직에 항상 내재적으로 존재하며, PG를 생성하여 생리적 기능을 유지시킨다. 반면, COX-2는 정상적인 상태에서는 발현되지 않고 염증자극, cytokine(IL-1), 성장인자 등의 자극에 의하여 대식세포와 활막세포와 같은 염증세포에서 발현되는 조기 면역 유전자로 주로 조직에서 다양한 PG를 생성하여 염증상태로 유도된다.¹⁹⁾

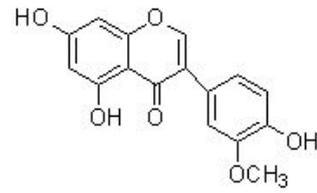
뽕잎피 나무(*Tilia taquetii*)는 쌍떡잎 식물 아욱목 피나무과(Tiliaceae)의 낙엽 활엽 교목이다. 뽕피나무 라고도 하며, 한국 특산종으로서 강원·평북·충북·전남·전북·제주 등에 분포한다. 어린 가지에 갈색 털이 뺨뺨이 나기도 하며, 높이는 5m이다. 잎은 어긋나고 달걀 모양이며, 끝은 갑자기 길어져 뽕족하고 밑은 심장밑 모양이다. 잎 가장자리에 잔 톱니가 있고, 뒷면 맥액(脈腋)에는 갈색 털이 뺨뺨이 난다. 잎자루는 길이 7~45mm로 털이 없거나 갈색 털이 있다. 꽃은 6월에 피고 양성으로 산방상 취산꽃차례에 달리며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

현재까지 뽕잎피나무에 관한 연구로는 식물분류학 분야에서 가지로부터 화합물이 분리 동정되어 보고되어 있다²⁰⁾ (Figure 2).

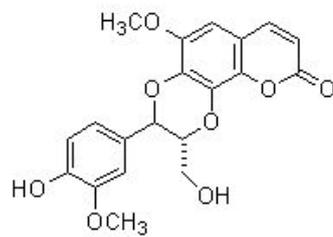
본 연구에서는 뽕잎피나무 잎 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 유효성분을 분리하여 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화, 항염 및 주름개선 효과에 대한 연구를 진행하였다.



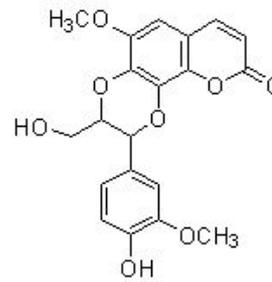
Orobol 4'-o-b-glucopyranoside



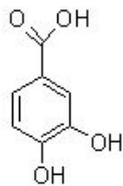
3'-o-methylorobol



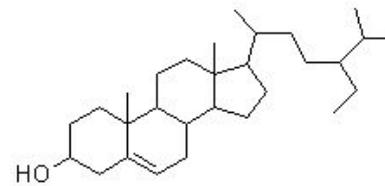
Cleomiscosin A



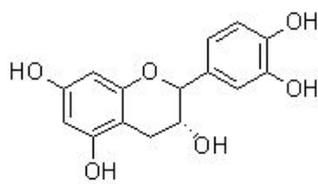
Cleomiscosin B



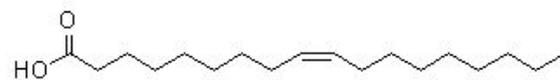
3,4-dihydroxybenzoic acid



β -sitosterol



epi-catechin



Oleic acid

Figure 2. Isolated compounds of *T. taquetii*

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Jusei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography(VLC)에는 silica gel(0.002–0.025 mm, Sigma), normal-phased column chromatography(CC)에는 silica gel 60 (0.04–0.063 mm, Merck)이 사용되었다. Gel filtration chromatography(GFC)에는 Sephadex™ LH-20(0.1–0.025 mm)을 사용하였다. 분리 과정에서 사용된 thin layer chromatography(TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 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.

여러 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 Sunrise™(Tecan Co.)와 Biochrom Libra s22(cambridge Inc., England)를 이용하였다.

Immunoblotting 실험에 전기영동시 사용한 gel은 NuPAGE 4–12% Bis–Tris Gel (1.5 mm X 10well, novex)을 사용하였으며, transfer에 사용한 membrane으로는 PVDF membrane (Polyvinylidene fluoride, invitrogen)을 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM–ECX 400(FT–NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR 측정 용매는 CIL의 NMR 전용 용매로 CD₃OD, CDCl₃, pyridine–d₅를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 뽕잎피나무 잎(시료번호 : 234)은 2011년 9월에 제주 한라수목원에서 채집하였다. 채집한 뽕잎피나무 잎은 실온 및 음지에서 완전히 자연건조하였으며, 분쇄하여 사용하였다(Figure 3).

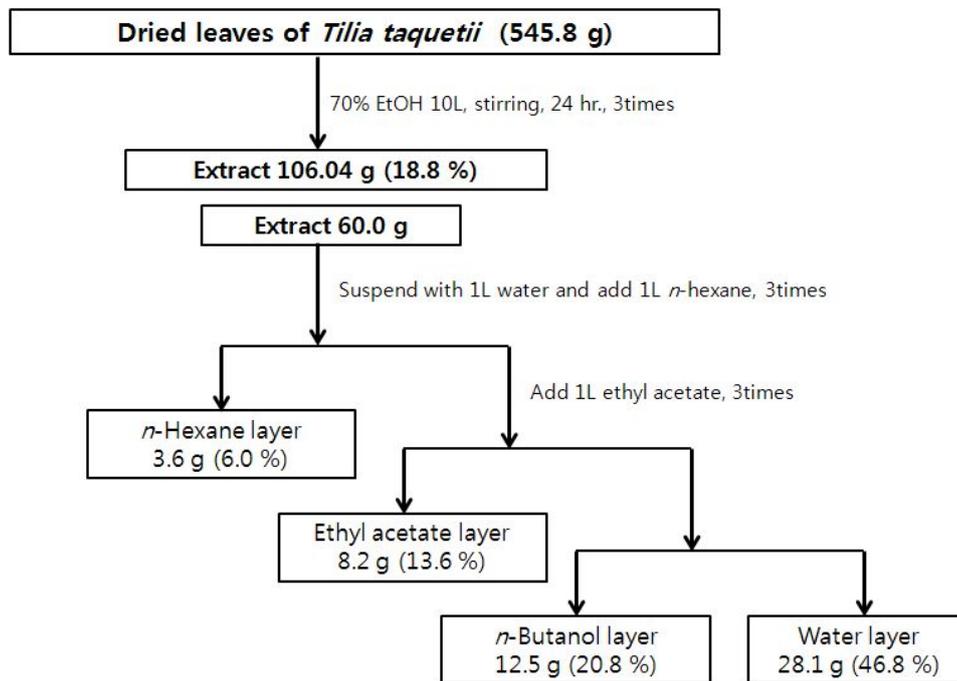


Figure 3. Picture of *Tilia taquetii*

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 뽕잎피나무 잎의 추출 및 분획

건조된 뽕잎피나무 잎 545.8 g을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 10 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 106.04 g을 얻었다. 이 중 추출물 60.0 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer(3.6 g), ethyl acetate layer(8.2 g), *n*-butanol layer(12.5 g), water layer(28.1 g) 등 총 4개의 용매 분획층을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fractionation from *T. taquetii*

3-2-2. VLC에 의한 분획과정 (제2차)

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 4.90 g을 분획하기 위하여 vacuum liquid chromatography(VLC)를 수행하였다. Hex/EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 40개의 fraction을 얻었다(Fr. V1~V40).

3-2-2-1. VLC를 수행한 분획물에서 compound 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 분리과정

VLC fraction들 중 Fr. V8(20% EtOAc in Hex) 306.8 mg은 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 6 (8.5 mg)을 분리하고, MeOH에 녹은 부분을 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=25:2:1$ 의 조건으로 순상 silica gel 컬럼을 수행하여 compound 6 (53.6 mg)을 분리하였다.

또한 Fr. V9(40% EtOAc in Hex) 165.5 mg은 MeOH을 이용해 재결정하여 마찬가지로 compound 6 (45.7 mg)을 분리하였다.

Fr. V10(45% EtOAc in Hex) 120.0 mg은 MeOH을 첨가하였을 때 녹는 부분과 안 녹는 부분으로 나뉘었고, 녹는 부분을 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=20:1$ 의 조건으로 순상 silica gel 컬럼을 수행한 후 얻어진 V10-2 (69.7 mg)을 다시 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}:=20:10:1$ 의 조건으로 순상 silica gel 컬럼을 수행하여 compound 5 (13.5 mg)을 분리하였다.

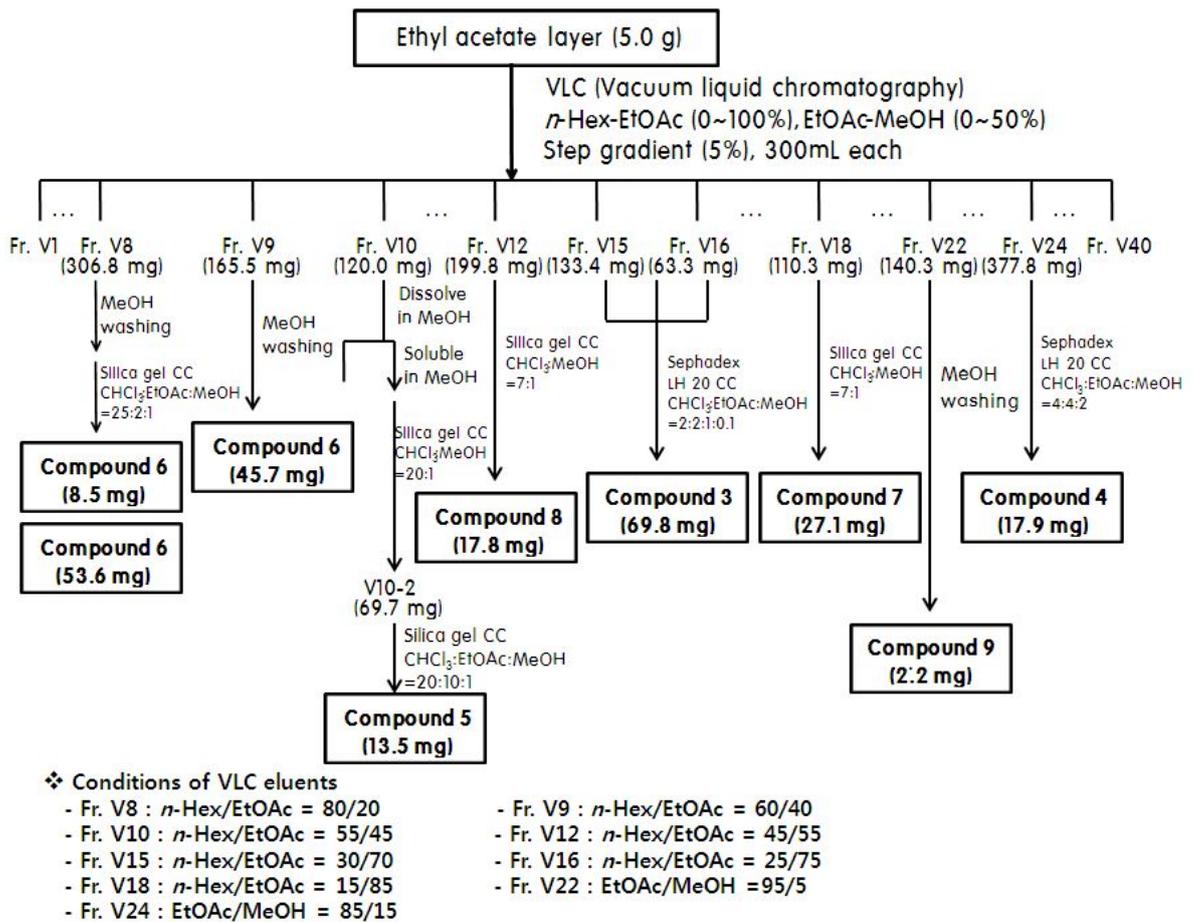
또한, Fr. V12(55% EtOAc in Hex) 199.8 mg을 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=7:1$ 의 조건으로 순상 silica gel 컬럼을 수행하여 compound 8 (17.8 mg)을 분리하였다.

그리고 Fr. V15와 Fr.V16(70~75% EtOAc in Hex) 196.7 mg은 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=2:2:1:0.1$ 의 조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 3 (69.8 mg)을 분리하였다.

Fr. V18(85% EtOAc in Hex) 110.3 mg을 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=7:1$ 의 조건으로 순상 silica gel 컬럼을 수행하여 compound 7 (27.1 mg)을 분리하였다.

또한 Fr. V22(5% MeOH in EtOAc) 140.3 mg에 MeOH을 첨가하였을 때 녹

지 않고 vial에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 9 (2.2 mg)을 분리하였고, Fr. V24(15% MeOH in EtOAc) 377.8 mg은 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=4:4:2$ 의 조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 4 (17.9 mg)을 분리하였다(Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 3-9 from *T. taquetii*

4. 활성 실험

4-1. DPPH radical scavenging activity test

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 불안정 하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515nm에서 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 515nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다(Figure 4).

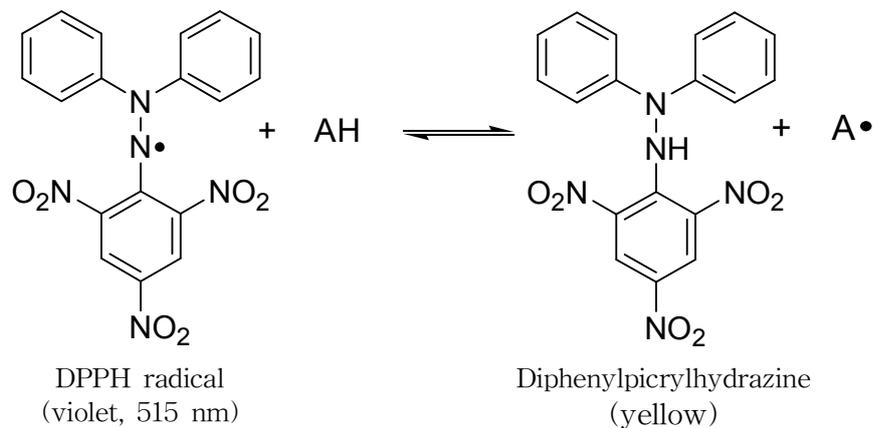


Figure 4. Scavenging of the DPPH radical by an antioxidant

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 방법²¹⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 0.2mM DPPH(in EtOH) 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA Reader를 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

A_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 515 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-2. Elastase inhibition activity test

돼지췌장 elastase(Porcine pancreatic elastase, PPE) 저해활성은 기질로 N -succ(Ala)₃- p -nitroanilide(SANA)와 함께 분광광도법을 사용한 방법으로 실시되었다.

0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0), 0.1 mg/mL elastase, 기질로 12.5 mM SANA, 그리고 각 시료들을 농도별로 준비한다.

본 실험에서는 96 well plate에 buffer 165 μ L, SANA 5 μ L, elastase 10 μ L, 그리고 시료용액 20 μ L를 넣고 25°C에서 15분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 이를 바탕으로 elastase의 활성을 50% 저해시키는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)를 계산하였다.

대조군으로는 oleanolic acid, ursolic acid를 사용하였다.

Elastase inhibition activity (%)

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

A_{sample} : 시료 반응용액의 흡광도

A_{blank} : 시료만의 흡광도

A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

$A_{\text{c-blank}}$: 시료와 elastase를 첨가하지 않은 용액의 흡광도

4-3. 세포배양

마우스 대식세포 계열(Murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell, human normal fibroblast cell인 CCD-986sk은 한국세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-4. RAW 264.7 cell에서의 nitric oxide(NO) 생성 억제 평가

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

4-5. RAW 264.7 cell에서의 염증성 cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성 억제 평가

마우스 대식세포 계열(Murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell(3×10^5 cells/mL)는 1% penicillin-streptomycin과 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 배양하였다.

24 Well plate에 3×10^5 cells/mL의 RAW 264.7 cell을 18시간 배양한 후, 1 μ g/mL LPS가 포함된 배지로 교환하여 cytokine 생성을 자극하여 동시에 시료를 농도별로 처리하였다. 24시간 동안 동일 조건으로 배양 후 얻어진 상층액을 이용하여 TNF- α , IL-6와 IL-1 β 양을 측정하였다. 측정에는 mouse TNF- α , IL-6, IL-1 β ELISA kit (BD biosciences, USA)를 이용하였다.

4-6. Immunoblotting

다양한 조건으로 세포에 처리하여, 배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 150 μ L의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시켰다. Cell lysis 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다.

20~30 μ g의 동일량의 lysate를 4~12% gel SDS-PAGE로 전기영동한 후 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200mA로 35분 동안 transfer하였다.

단백질이 transfer 된 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액을 사용하여 상온에서 4시간 혹은 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. 1차 항체로는 anti-rabbit iNOS (1:1000), anti-rabbit COX-2 (1:100), anti-goat actin (1:1000)를 TTBS 용액으로 희석하여 상온에서 4시간 반응시킨 후 TTBS와 증류수로 5회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG, anti-goat IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1:1000으로 희석하여 상온에서 40분 간 반응시킨 후, TTBS와 증류수로 3회 세정하여 반응을 일으킨 밴드는 Opti-4CN substrate (Amplified Opti-4CN, Bio Rad) 을 이용하여 확인하여 scan 하였다.

4-7. Human normal fibroblasts cell에서의 MMP-1 저해 활성 실험

24 Well plate에 5×10^4 cells/mL의 CCD-986sk cell을 24시간 배양한 후, 원배지를 제거한 후 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하였다. FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지로 교환하여 동시에 시료를 농도별로 처리하였다.

24시간 동안 동일 조건으로 배양 후 배양한 배지를 96well-plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T(phosphate buffered saline + 0.1% Tween 20)로 3회 세척하고, 3% bovine serum albumin (BSA)로 37°C에서 2시간 동안 blocking 하였다. 항체로는 rabbit anti-matrix metalloproteinase-1 (anti-MMP-1)을 3% BSA에 희석하여 100 μ L씩 분주하고 37°C에서 90분 동안 반응시킨 후, PBS-T로 3회 세척하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG를 마찬가지로 3% BSA에 희석하여 100 μ L씩 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척한 다음, TMB substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma and hydrogen peroxide in a buffered solution)을 100 μ L 넣고, 실온에서 30분간 반응시킨 후, stop solution (1N H₂SO₄) 100 μ L를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4-8. 세포독성 평가 실험

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 처리하여 24시간 배양하였다. 마찬가지로, human fibroblast cell인 CCD-986sk을 24-well plate에 5×10^4 cell/mL로 분주하고 24시간 배양 후, 시료를 농도별로 처리하여 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.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

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

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

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. 화합물 1의 구조 동정

Compound 1은 ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 5.41 (1H, tq, $J = 6.8, 1.2$ Hz)의 signal로부터 sp^2 혼성을 갖는 olefin 구조의 proton이 있음을 예상할 수 있었으며, δ 4.15 (2H, d, $J = 6.9$ Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 double methylene proton이 있음을 예상할 수 있었다. 또한 δ 1.97 (2H, t, $J = 7.5$ Hz)의 signal로부터 allyl methylene proton이 있음을 예상하였고, δ 0.82 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.86 (3H, s), 0.88 (3H, s)로부터 총 5개의 methyl proton signal을 확인하였다.

^{13}C NMR 스펙트럼에서는 총 20개의 carbon 피크가 관찰되었으며, 그 중 δ_c 22.7, 22.6, 19.7, 19.7, 16.2에서 앞서 ^1H NMR spectrum에서 예상한 5개의 methyl carbon 임을 확인하였다. δ_c 140.3, δ_c 123.1를 통해서 ^1H NMR spectrum에서 예상한 olefin carbon과, δ_c 59.4에서 산소에 인접한 methylene carbon을 확인하였다. 이를 바탕으로, 문헌^{22,23)}과 대조한 결과 이 화합물은 클로로필 분해생산, 들깨잎, 냉이 등에 많이 포함되어 있는 phytol임을 확인하였다(Figures 5-7, Table 1).

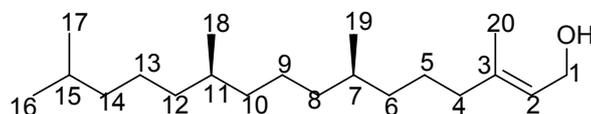


Figure 5. Chemical structure of compound 1

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1** (400 and 100 MHz, CDCl_3)

No.	Compound 1	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1	4.15 (2H, d, 6.9)	59.4
2	5.41 (1H, tq, 6.8, 1.2)	123.1
3		140.3
4	1.97 (2H, t, 7.5)	39.4
5		25.1
6		36.7
7		32.7
8		37.4
9		24.5
10		37.4
11		32.8
12		37.3
13		24.8
14		39.7
15		28.0
16	0.86 (3H, s)	22.6
17	0.88 (3H, s)	22.7
18	0.82 (3H, s)	19.7
19	0.85 (3H, s)	19.7
20	0.85 (3H, s)	16.2

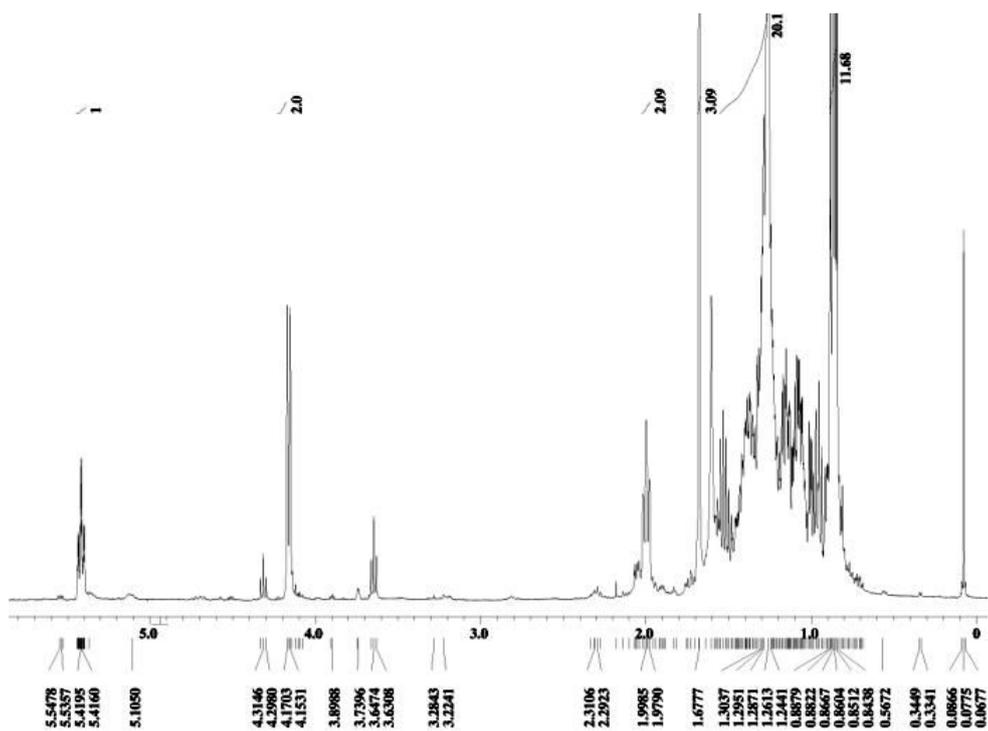


Figure 6. ^1H NMR spectrum of compound 1 in CDCl_3

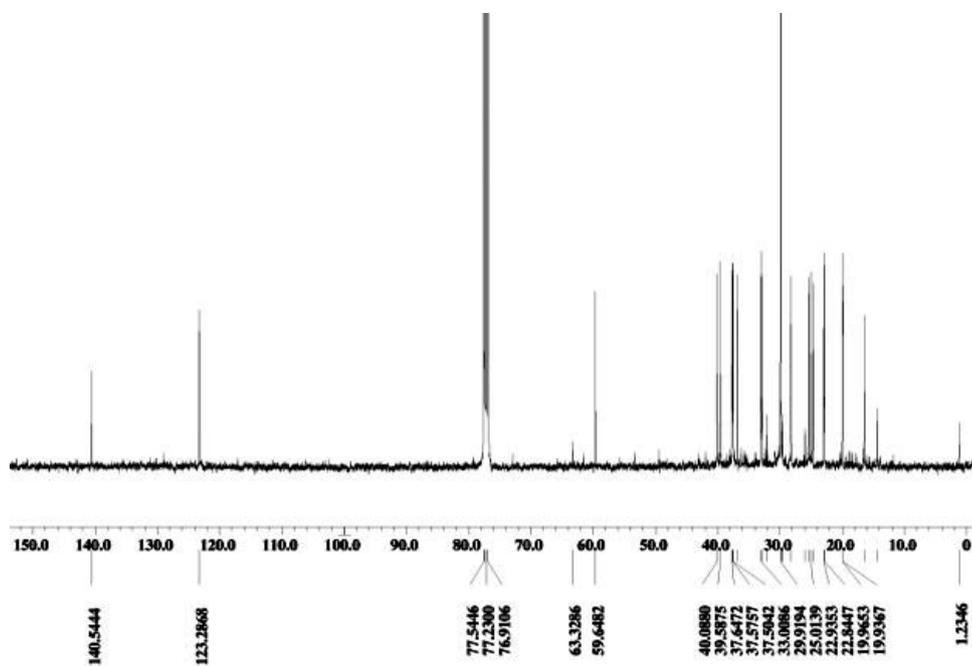


Figure 7. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 in CDCl_3

1-2. 화합물 2의 구조 동정

Compound 2은 ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ_{H} 1.8 ppm 이하에 나타난 signal들로부터 sp^3 혼성을 갖는 methyl group의 proton들로 예상되며, δ_{H} 3~4 ppm에 나타난 signal들은 마찬가지로 sp^3 혼성을 갖는 methyl group의 proton 들로 예상되는데, 이는 일반적으로 1.5 ppm에 나타나는 signal보다 그 값이 약간 deshielded된 영역에서 나타난 것으로 보아 F, I, N, S 등과 같은 원자가 이웃해 있을 것이라 예상하였다. 또한, 6ppm 부근에 나타난 signal들은 vinyl group의 proton일 것이라 예상되며, 8~9.5 ppm 부근에서 나타나는 signal은 4개의 pyrrole group을 고리형태로 문헌²²⁾과 비교하여 결합하는 부분의 양성자들이 링 전류효과로 나타나는 peak로 확인되었다. 이를 바탕으로, 문헌^{22,23)}과 대조한 결과 이 화합물은 chlorophyll c1으로 동정하였다.

Chlorophyll은 자연계에서 가장 풍부하게 존재하는 색소임에도 불구하고 활성 실험의 결과가 극히 제한적인데, 이는 순수하게 분리된 chlorophyll과 이들 유도체를 확보하기가 어렵고 또, 구조적 파괴의 계기가 되는 불안정성 때문이다 (Figures 8-10, Table 2).

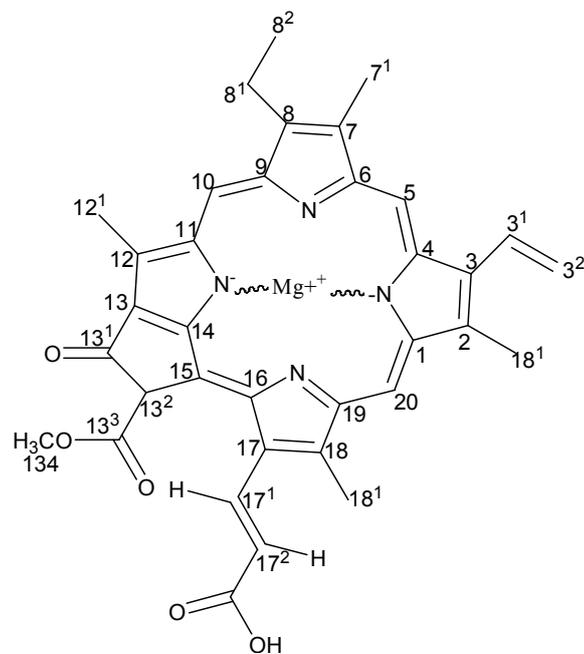


Figure 8. Chemical structure of compound 2

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz, CDCl_3)

No.	Compound 2	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
2 ¹	3.65 (1H, s)	
3 ¹		
3 ²	6.26 (1H, d, 16.5)	
3 ²	6.13 (1H, d, 11.6)	
5		
7 ¹	3.40 (1H, s)	
8 ¹		
8 ²	1.65 (1H, t, 7.8)	
10		
12 ¹	3.85 (1H, s)	
13 ²		
13 ³		
13 ⁴		
17 ¹		
17 ²		
17 ³		
18		
18 ¹		
20		

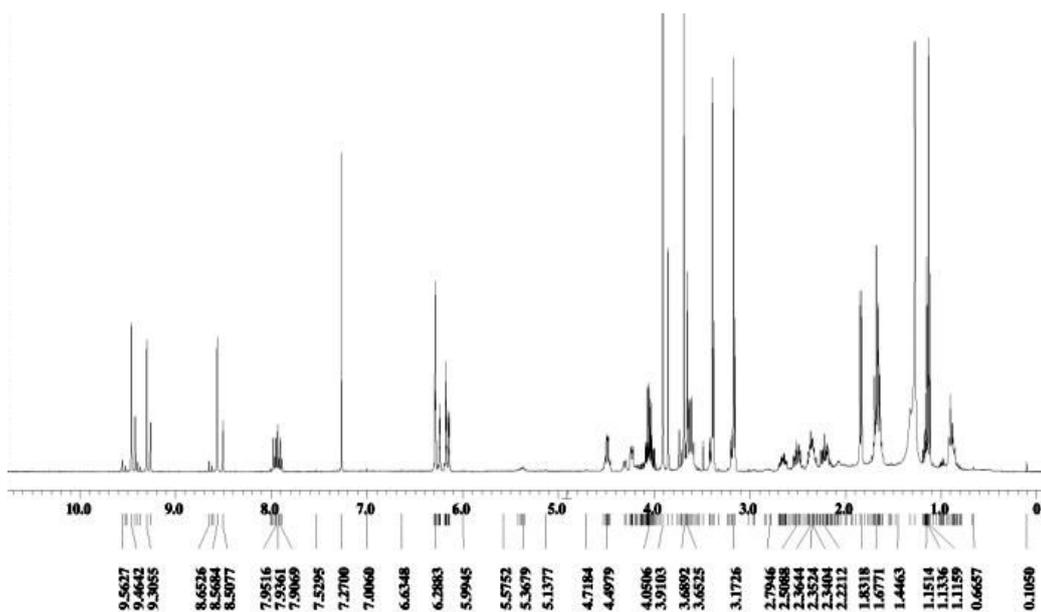


Figure 9. ^1H NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3

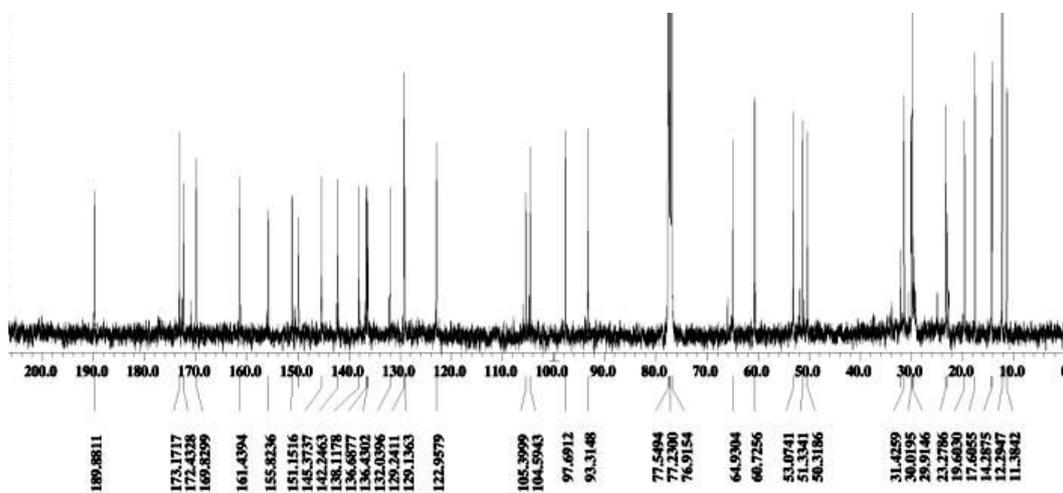


Figure 10. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3

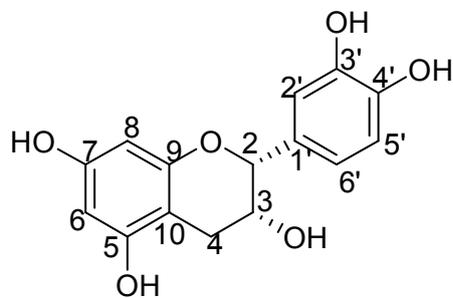
1-3. 화합물 3, 4의 구조 동정

Compound 3은 ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 6.73(1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.78 (1H, dd, $J = 2.1, 8.4$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) signal은 aromatic ring의 proton으로 coupling constant 값을 통하여 각각 ortho- 및 meta-coupling하는 것으로 나타났으며, δ 5.86 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)과 δ 5.88 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) signal은 coupling constant 값을 통하여 meta-coupling을 하는 sp^2 proton으로 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, δ_c 100~160 영역의 signal을 통해, aromatic ring이 있음을 알 수 있었으며, 15개의 탄소를 가지고 있는 것으로 보아 이는 전형적인 flavonoid임을 알 수 있었다. 이를 바탕으로, 문헌²⁶⁾과 대조한 결과 compound 3은 *epi*-catechin으로 구조 동정 하였다.

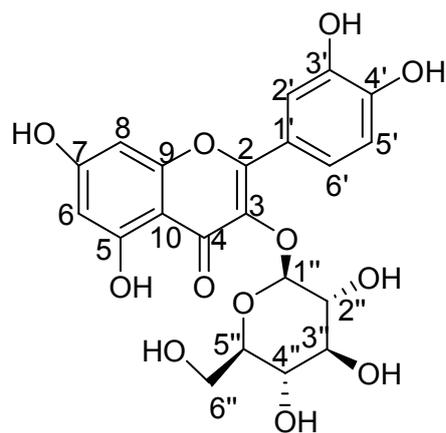
Compound 4 ^1H NMR spectrum 분석 결과, 전형적인 flavonoid signal임을 예상 할 수 있었으며, δ 6.19 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), δ 6.37 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)의 signal은 aromatic ring의 proton으로 적분 값과 coupling constant 값을 통하여 meta-coupling을 하는 대칭구조임을 예상할 수 있었고, δ 6.85 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), δ 7.57 (1H, dd, $J = 2.2, 9.0$ Hz) 및 δ 7.71 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)의 signal은 aromatic ring의 proton으로 coupling constant 값을 통하여 각각 ortho- 및 meta-coupling을 하는 것으로 나타났다. δ 5.22 (1H, d, $J = \text{Hz}$)의 anomeric proton의 coupling constant를 통해 β -D-glucopyranoside임을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석결과, 탄소수가 21개이고, 15개의 aglycone carbon signal인 6개의 sugar carbon signal이 있음을 예상 할 수 있었다. δ_c 179.4의 signal은 carbonyl carbon임을 예상하였고, δ_c 94.9 - 166.8 signal들은 sp^2 carbon으로 예상하였다. 치환된 당의 signal은 δ_c 104.4, 78.4, 78.1, 71.2, 75.7, 62.5이며, anomeric proton의 coupling constant 값 ($J = \text{Hz}$)을 통하여 문헌과 비교하여 β -D-glucopyranoside임을 확인하였다.

^1H 와 ^{13}C NMR data를 비교한 결과 3번 위치에 당이 치환된 flavonoid glycosides로 예상할 수 있었다. 이를 바탕으로 compound 4는 문헌²⁷⁾과 비교

하여 quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside 즉, isoquercitrin으로 동정하였다(Figure 11-15, Table 3).



compound 3



compound 4

Figure 11. Chemical structures of compounds 3, 4

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **3**, **4** (400 and 100 MHz, CD_3OD)

No.	Compound 3		Compound 4	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
2	4.75 (1H, s)	80.0		158.5
3	4.13 (1H, m)	67.6		135.6
4	2.68 (1H, dd, 2.8, 16.8) 2.80 (1H, dd, 4.6, 16.6)	30.6		179.4
5		158.1		163.0
6	5.88 (1H, d, 2.3)	96.4	6.19 (1H, d, 1.6)	100.1
7		157.8		166.8
8	5.86 (1H, d, 2.3)	95.9	6.37 (1H, d, 1.6)	94.9
9		157.5		158.9
10		100.1		105.4
1'		132.4		123.2
2'	6.92 (1H, d, 2.1)	115.4	7.71(1H, d, 2.2)	116.0
3'		146.0		149.9
4'		145.9		145.9
5'	6.73 (1H, d, 8.4)	115.9	6.85 (1H, d, 9.0)	117.5
6'	6.78 (1H, dd, 2.1, 8.4)	119.4	7.57(1H, dd, 2.2, 9.0)	123.0
1''			5.22 (1H, d, 2.4)	104.4
2''				75.7
3''				78.4
4''				71.2
5''			3.20 (1H, m)	78.1
6''			3.69 (1H, dd, 2.4, 11.9) 3.56 (1H, dd, 5.6, 11.9)	62.5

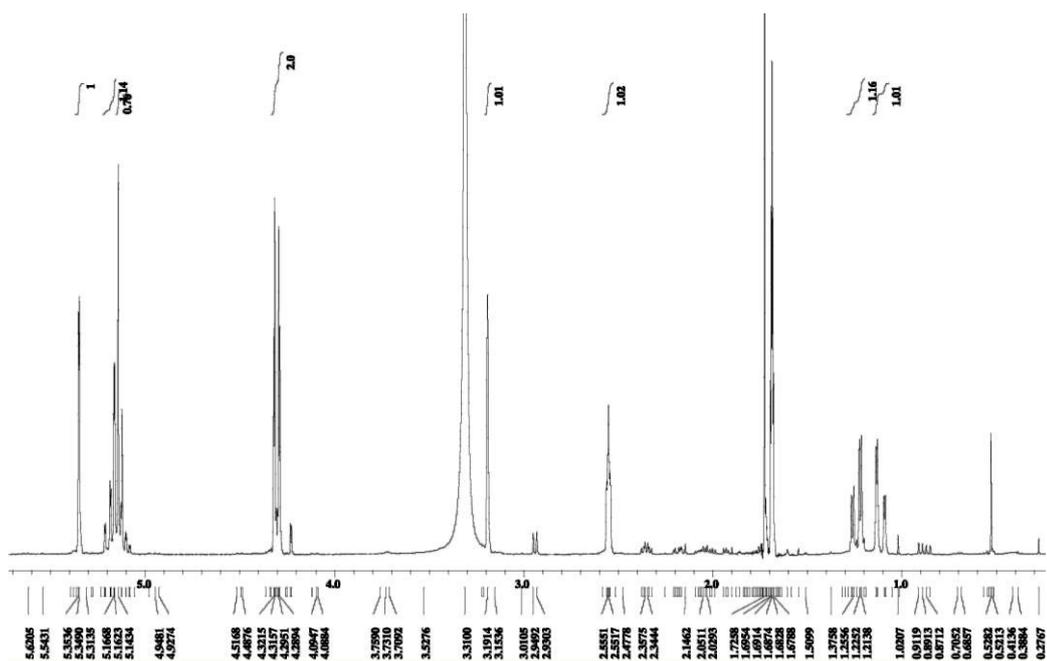


Figure 12. ^1H NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

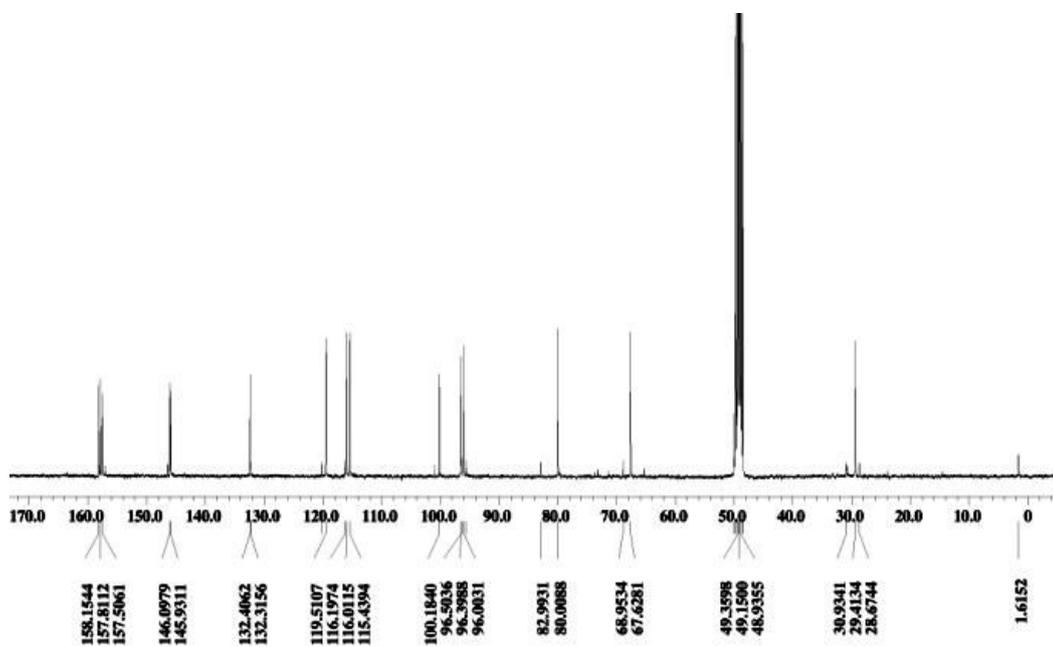


Figure 13. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

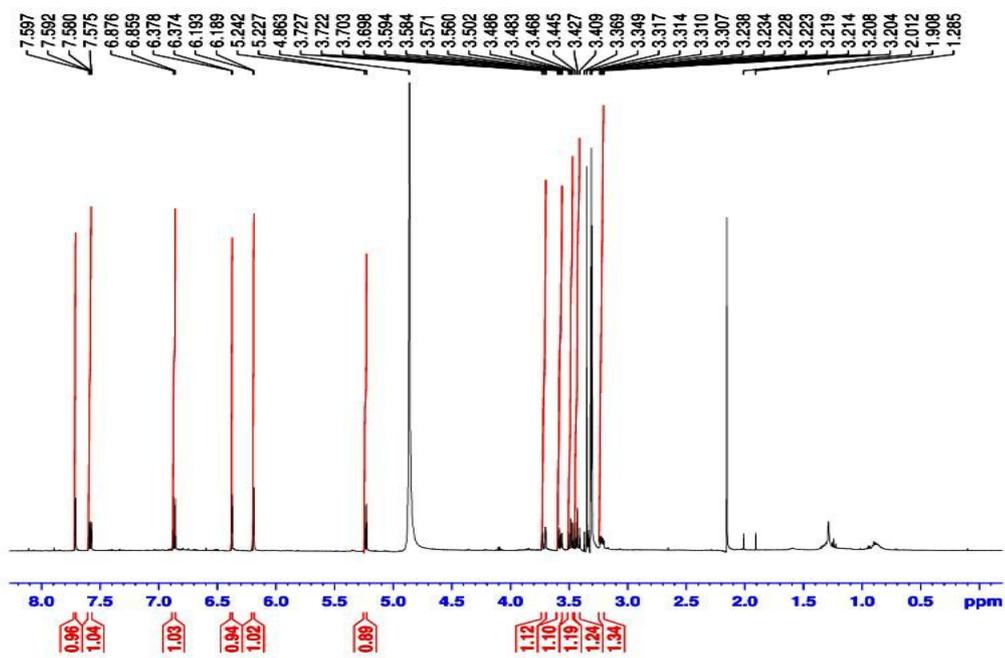


Figure 14. ^1H NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD

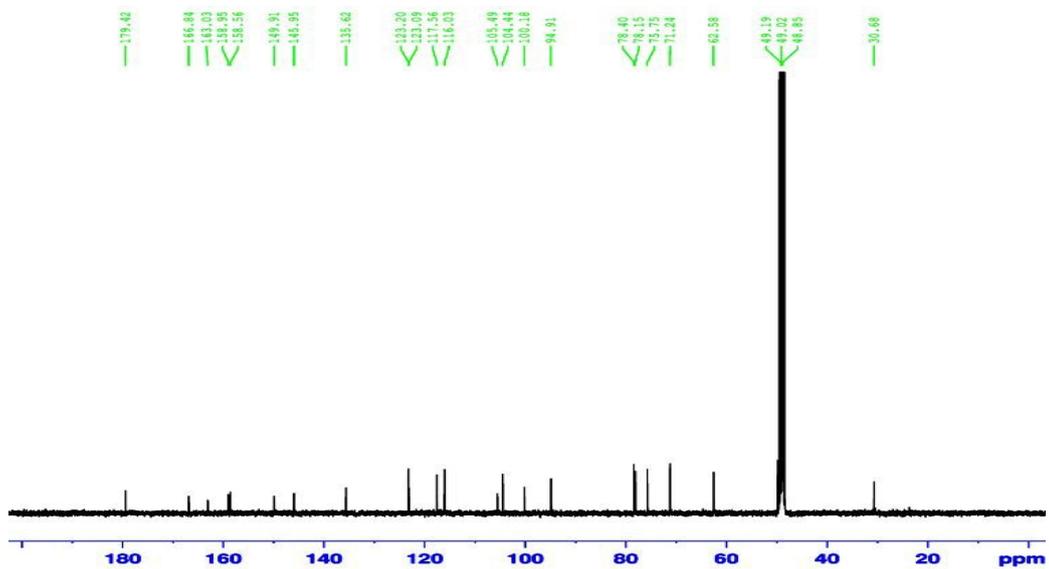


Figure 15. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD

1-4. 화합물 5의 구조 동정

Compound 5의 구조는 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz), ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz), DEPT-135, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC, ESI MS를 통하여 확인하였다. ^1H -NMR spectrum 분석 결과 δ 3.21 (1H, dd, $J = 5.1, 11.2$ Hz)의 signal로부터 sp^3 혼성을 갖는 proton을 예상하였고, 전형적으로 1~2ppm 대에 나타나는 proton들 보다 약간 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 치환되어 있을 것이라 예상하였다. 대부분 2ppm 이하에서 나온 signal들은 aliphatic 탄소에 결합된 proton들 일 것이라 예상하였으며, 그 중 δ 1.45 (3H, s), 1.25 (3H, s), 1.04 (3H, s), 0.99 (6H, s), 0.98 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.82 (3H, s)에서 총 7개의 methyl proton signal을 확인하였다. ^{13}C -NMR spectrum 분석 결과 δ_c 181.8의 carboxyl기의 carbon signal 과, δ_c 90.7, 77.5, 76.9 signal을 통해 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 methine carbon으로 3개의 산소에 인접한 위치의 carbon이 있음을 예상 할 수 있었다. 또한, ^1H -NMR data와 마찬가지로 대부분의 signal이 15.5, 16.5, 18.7, 18.8, 24.1, 28.1, 33.4에 분포하였으며 이 signal 또한 포화 된 혼성 탄소로 7개의 methyl기가 있음을 예상하였다.

^{13}C NMR를 통해 화합물이 30개 이상의 탄소로 이루어졌음을 예상하였고, DEPT-135를 통해 9개의 4차 탄소, methine기가 13개, methylene이 10개 있음을 확인하였다(Figure 19).

^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-135를 통해 예상한 부분 구조의 정확한 구조 동정을 위해 2D NMR을 분석하였다. ^1H - ^1H COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling 하고 있는 수소를 확인하였고, HMQC를 통해서는 탄소에 직접 연결 되어 있는 수소를, HMBC를 통해서는 각 탄소에 대해 long-range 결합을 하고 있는 수소를, NOESY를 통하여 공간적으로 가까운 거리에 있는 수소의 관계를 확인하였다.

1D NMR과 2D NMR을 통해 compound 5을 분자식이 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$ 인 화합물로 예상하였다. 이를 토대로 ESI-MS로 분석한 결과 m/z 495.3425 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$ 로 예상했던 화합물의 분자량 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Na}$ 495.4125와 일치함

을 확인하였다(Figure 24).

각각의 기기분석 data를 기본으로 하여 문헌²⁸⁾ 을 검색한 결과 compound 5을 $3\beta,12\alpha,13\beta$ -trihydroxyoleanan-28-oic acid로 확인 동정하였고, 이 화합물은 합성과정을 통해 논문으로 보고 된 바는 있으나, 천연물에서는 처음으로 분리 된 화합물로 밝혀졌다. 이 화합물의 광학회절은 $[\alpha]_D^{20} = +4.39^\circ$ ($c. 0.011, \text{CDCl}_3$)이며, 기기분석을 통한 compound 5의 정보는 다음 표(Table 4)와 같다(Figure 16-24, Table 4, 5).

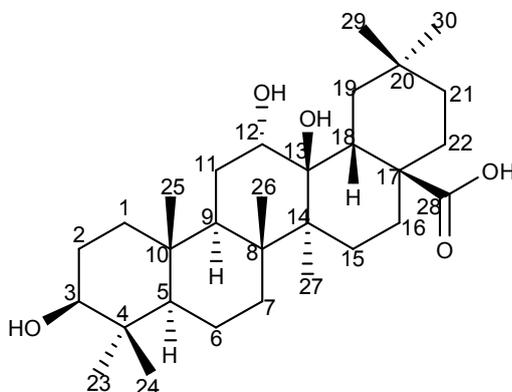


Figure 16. Chemical structures of compound 5

Table 4. Informations of compound 5 from *T.taquetii*

Feature	White powder
Molecular formular	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$
Molecular weight	490.2
specific optical rotation	$[\alpha]_D^{20} = +4.39^\circ$ ($c. 0.011, \text{CDCl}_3$)

Table 5. ¹H NMR, ¹³C NMR Chemical shifts and informations of HMBC of compound 5

NO.	Compound 5		
	δ_C	δ_H (int, mult, <i>J</i> in Hz)	HMBC (H→C)
1	39.0		
2	27.4		
3	77.5	3.21 (1H, dd, 5.1, 11.2)	C-23, C-24
4	39.6		
5	55.3		
6	17.9		
7	34.3		
8	42.2		
9	44.9		
10	36.6		
11	29.0		
12	76.9	2.18 (1H, m)	C-13
13	90.7		C-26, C-27
14	42.4		
15	28.2		
16	21.3		
17	44.7		
18	51.3		
19	39.1		
20	31.7		
21	34.1		
22	27.6		
23	28.1	1.15 (3H, s)	
24	15.5	0.99 (3H, s)	
25	16.5	0.88 (3H, s)	
26	18.8	1.01 (3H, s)	
27	18.7	1.31 (3H, s)	
28	180.1		
29	24.1	0.90 (3H, s)	
30	33.4	0.78 (3H, s)	

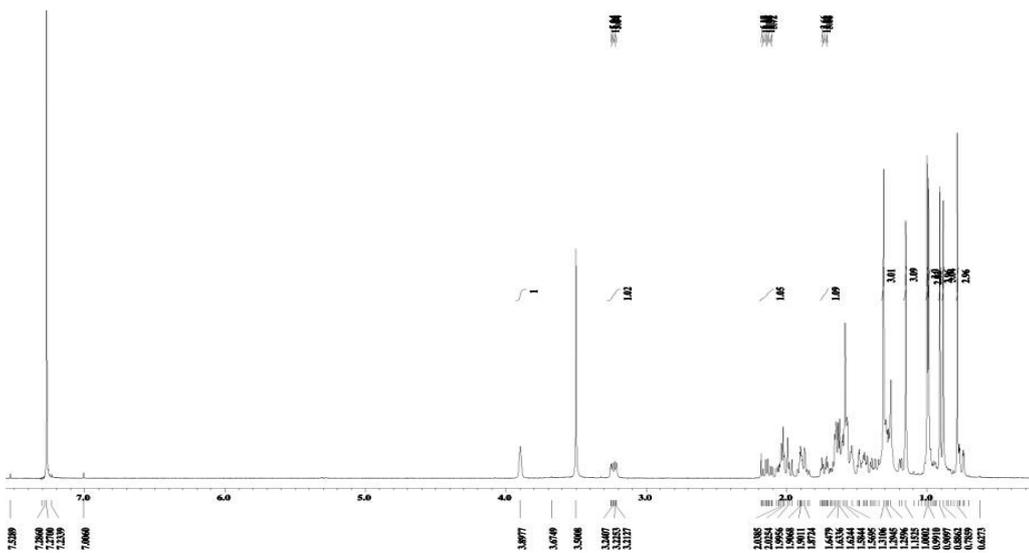


Figure 17. ^1H -NMR spectrum of compound **5** in CDCl_3

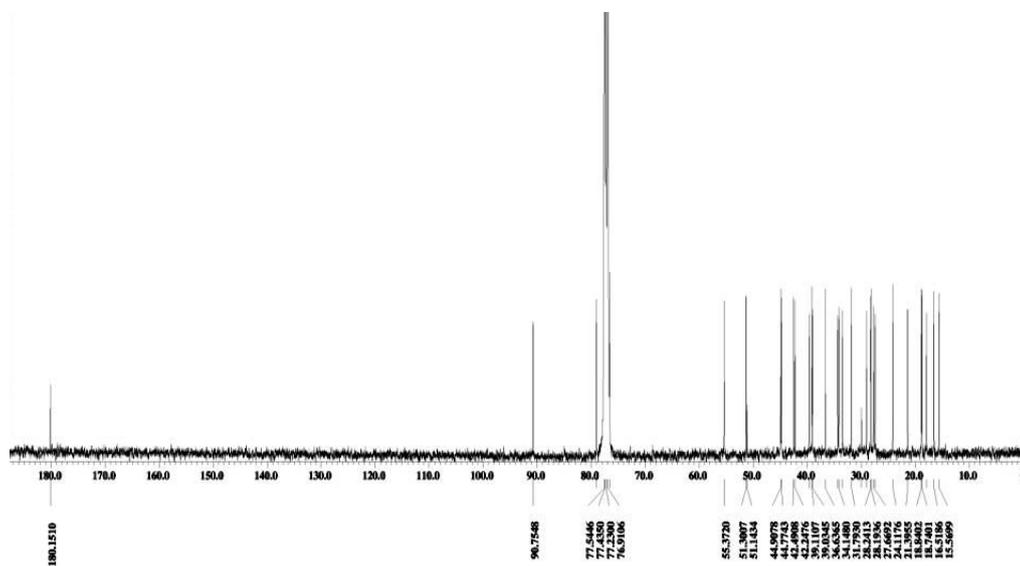


Figure 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5** in CDCl_3

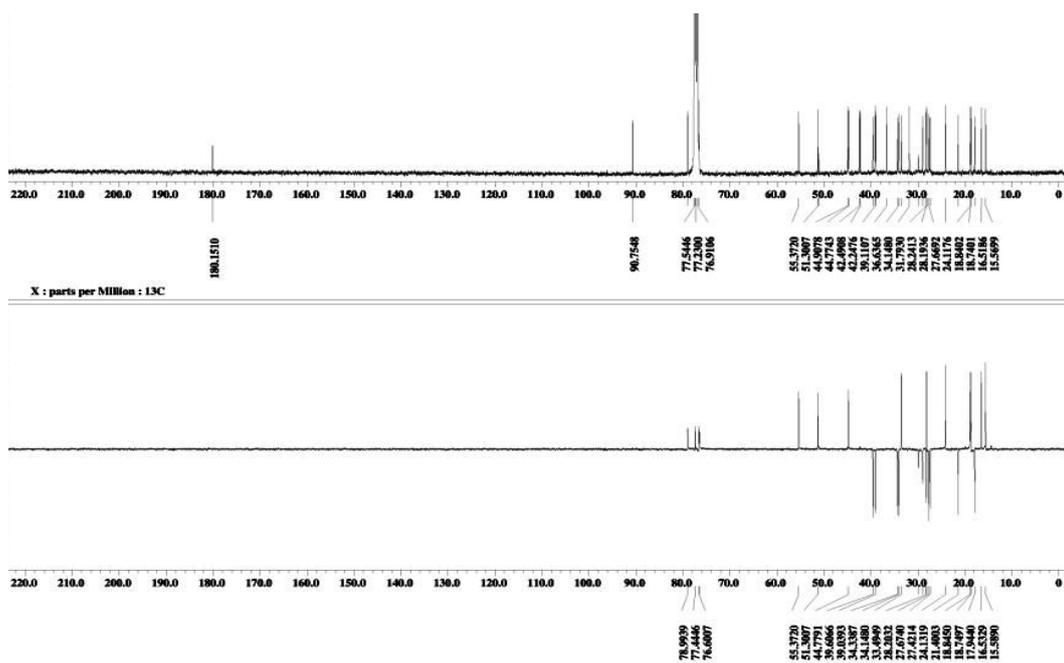


Figure 19. DEPT-135 spectrum of compound 5 in CDCl_3

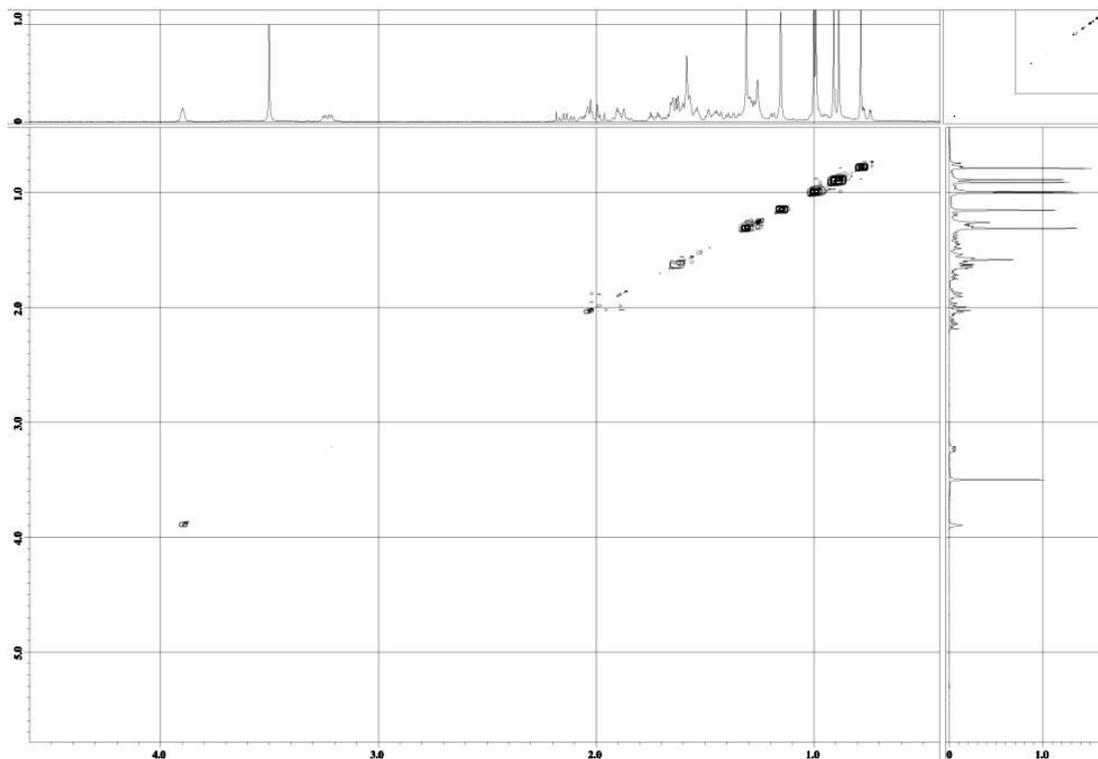


Figure 20. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 5 in CDCl_3

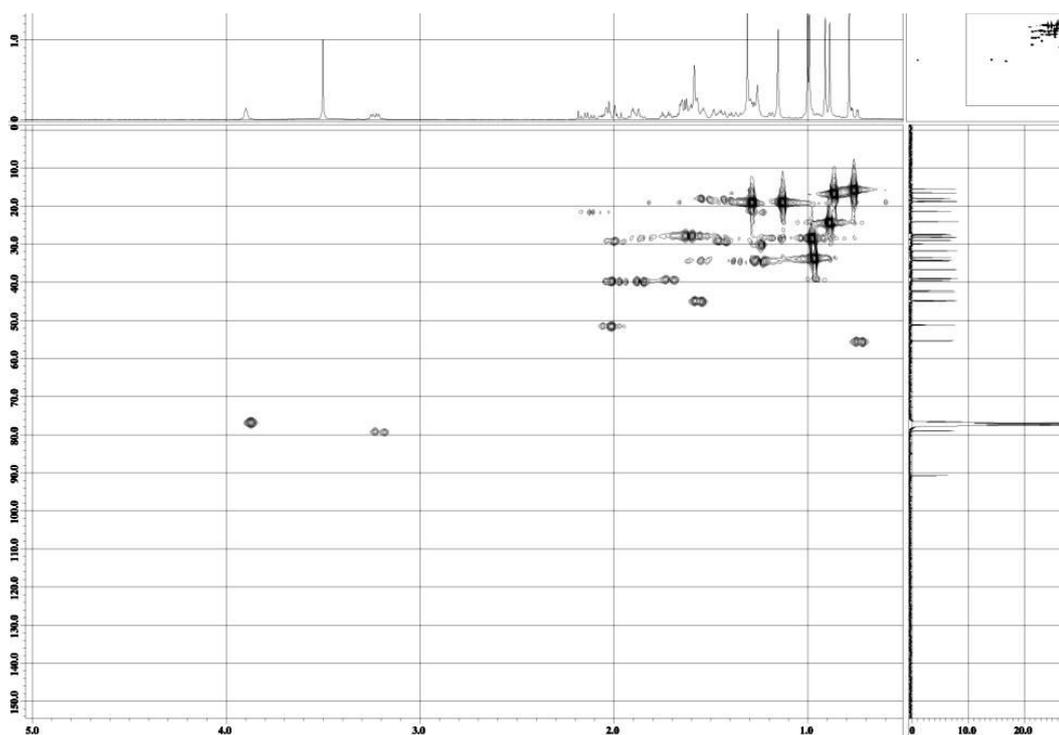


Figure 21. HMQC spectrum of compound 5 in CDCl_3

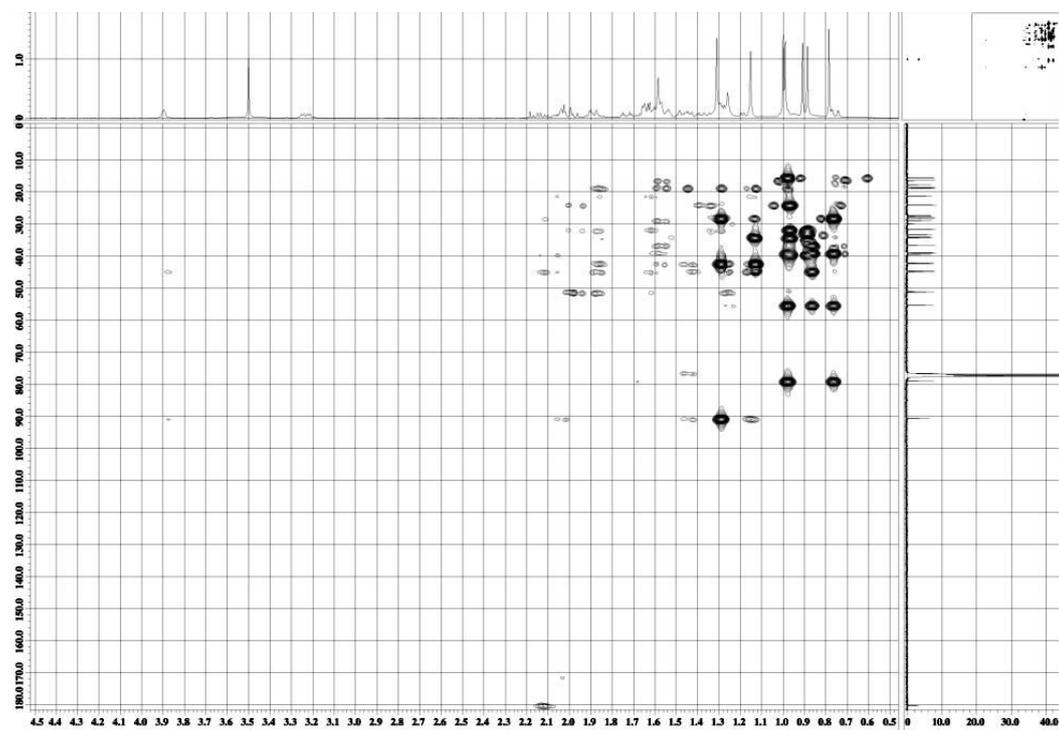


Figure 22. HMBC spectrum of compound 5 in CDCl_3

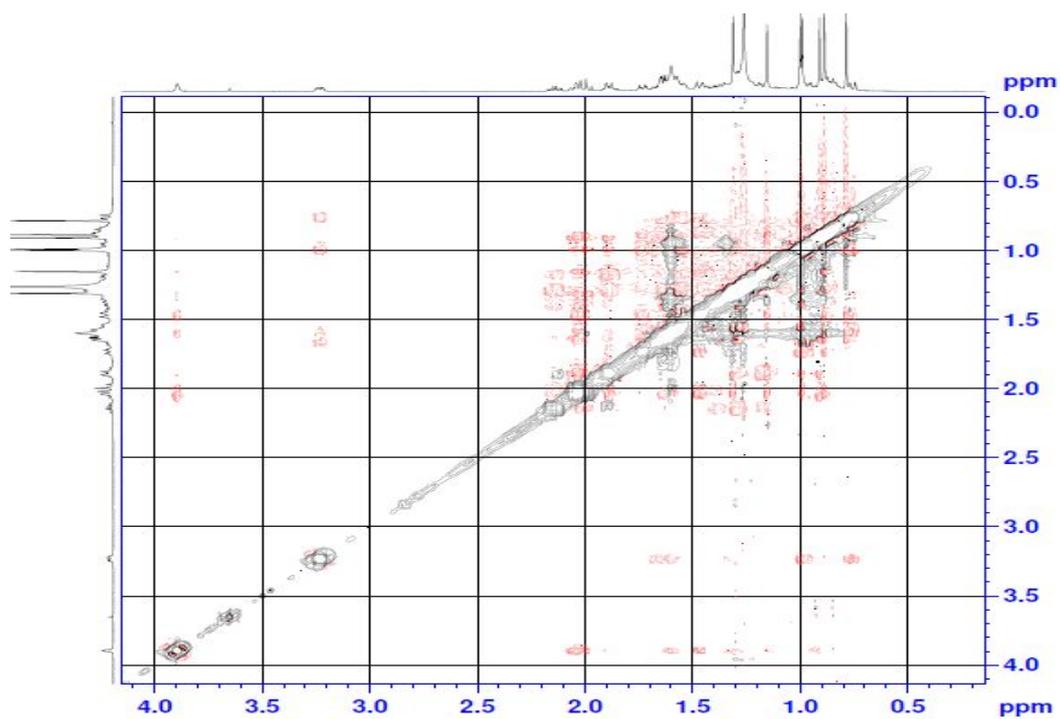


Figure 23. NOESY spectrum of compound 5 in CDCl_3

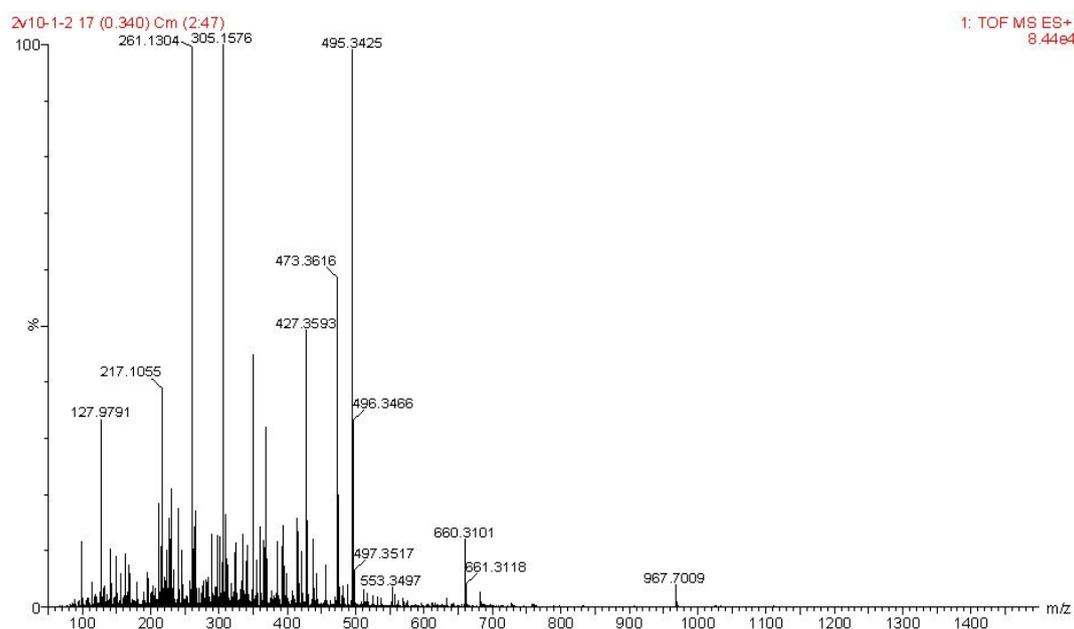


Figure 24. ESI-MS spectrum of isolated compound 5

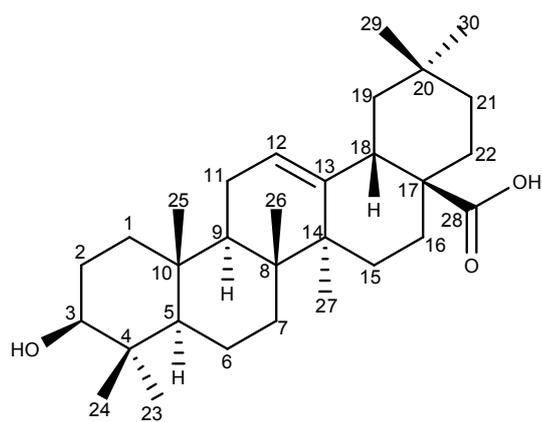
1-5. 화합물 6, 7, 8의 구조 동정

Compound 6은 현재 널리 알려진 화합물로서, 문헌²⁹⁾를 통해 compound 6은 oleanolic acid로 확인되었다.

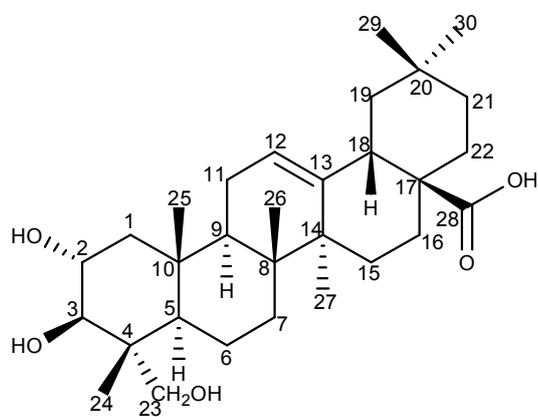
compound 7, 8은 ^1H NMR과 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 비교해보았을 때, oleanolic acid와 비슷한 양상을 나타내어, 이 역시 oleanane skeleton을 가진 triterpene일 것으로 예상 되었다.

Compound 7은 ^1H -NMR spectrum 분석 결과 δ 5.25 (1H, t, $J = 3.4$ Hz)의 signal로부터 sp^2 혼성을 갖는 olefin 구조의 proton을 예상하였고, δ 3.66 (1H, ddd, $J = 10.5, 10.5, 4.6$ Hz), δ 3.50 (1H, d, $J = 11.0$ Hz)의 signal들로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다. δ 2.85 (1H, dd, $J = 13.3, 4.0$ Hz)의 signal로부터 methine proton 일 것이라 예상하였다. 또한, δ 1.18 (3H, s), 1.04 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.84 (6H, s), 0.70 (3H, s)에서 총 6개의 methyl proton signal을 확인하였다. ^{13}C -NMR spectrum 분석 결과 δ_c 181.8의 carbonyl carbon signal과, δ_c 144.9, 121.4 signal을 통해 전형적인 olean type의 olefin carbon signal임을 확인 할 수 있었다. 또한 δ_c 78.5, 68.0, 67.6 signal을 통해 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 methine carbon으로 3개의 산소에 인접한 위치의 carbon이 있음을 예상 할 수 있었다. 이러한 분석 결과들을 통해 compound 7의 구조를 $2\alpha, 3\beta, 23$ -trihydroxyolean-12en-28-oic acid로 추정하였고, 기존의 문헌³⁰⁾과 비교하여 $2\alpha, 3\beta, 23$ -trihydroxyolean-12en-28-oic acid로 확인 동정하였다.

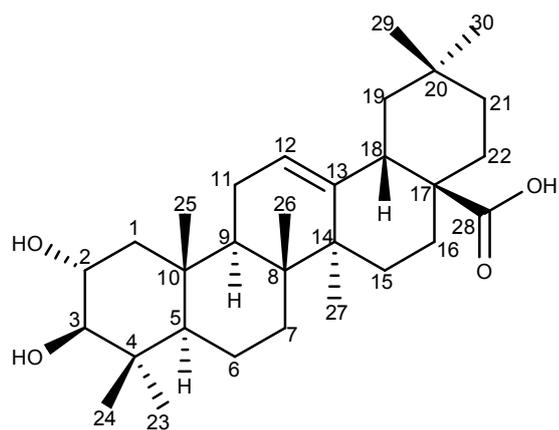
Compound 8은 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum을 통해 compound 7와 거의 비슷한 양상의 peak값을 나타내었지만, ^1H -NMR spectrum에서 δ 1.29 (3H, s), 1.28 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.02 (3H, s), 1.01 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.96 (3H, s)을 통해 7개의 methyl proton signal과 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_c 84.5, 69.6 signal을 통해 관찰된 2개의 산소에 인접한 위치의 carbon이 있음을 예상하였고, 이를 바탕으로 문헌³¹⁾과 비교하여 maslinic acid 동정하였다(Figure 25-31, Table 6).



Compound 6



Compound 7



Compound 8

Figure 25. Chemical structures of compounds 6–8

Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **6–8** (400 and 100 MHz, CD_3OD and pyridine- d_5)

No.	Compound 6		Compound 7		Compound 8	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1		39.0		45.8	2.25 (1H, dd, 4.3, 12.4)	48.2
2		28.1	3.66 (1H, ddd, 4.6, 10.5, 10.5)	68.0	4.08 (1H, ddd, 4.2, 10.3, 10.3)	69.6
3	3.44 (1H, dd, 5.7, 10.0)	78.2	3.50 (1H, d, 11.0)	78.5	3.40 (1H, d, 9.2)	84.5
4		39.4		42.3		40.6
5		55.9		47.8		56.8
6		18.8		17.8	1.80 (1H, m)	19.7
7		33.4		32.5		35.0
8		39.8		38.9		40.7
9		48.2		47.3		48.4
10		37.4		37.6		39.3
11		23.8		22.7		24.1
12	5.28 (1H, t, 3.6)	122.6	5.25 (1H, t, 3.4)	121.4	5.48 (1H, t, 3.4)	123.5
13		144.8		144.1		145.5
14		42.2		41.5		42.8
15		28.4		29.3		28.9
16		23.8		27.3		24.7
17		46.7		46.3		47.7
18	3.31 (1H, dd, 4.1, 13.7)	42.1	2.85 (1H, dd, 4.0, 13.3)	41.1	3.28 (1H, dd, 4.0, 13.0)	43.0
19		46.6		45.7		47.3
20		31.0		30.5		31.7
21		34.3		33.6		33.9
22		33.2		31.8		33.7
23	1.25 (3H, s)	28.8		67.6	1.28 (3H, s)	29.3
24	0.99 (3H, s)	16.5	1.04 (3H, s)	12.5	1.02 (3H, s)	17.6
25	0.91 (3H, s)	15.6	0.95 (3H, s)	16.5	1.10 (3H, s)	17.2
26	1.04 (6H, s)	17.5	0.84 (6H, s)	16.4	0.99 (3H, s)	17.8
27	1.30 (3H, s)	26.2	1.18 (3H, s)	25.5	1.29 (3H, s)	26.5
28		180.0		181.8		182.1
29	0.97 (3H, s)	33.4	0.70 (3H, s)	32.7	0.96 (3H, s)	34.0
30		23.8		23.1	1.01 (3H, s)	24.1

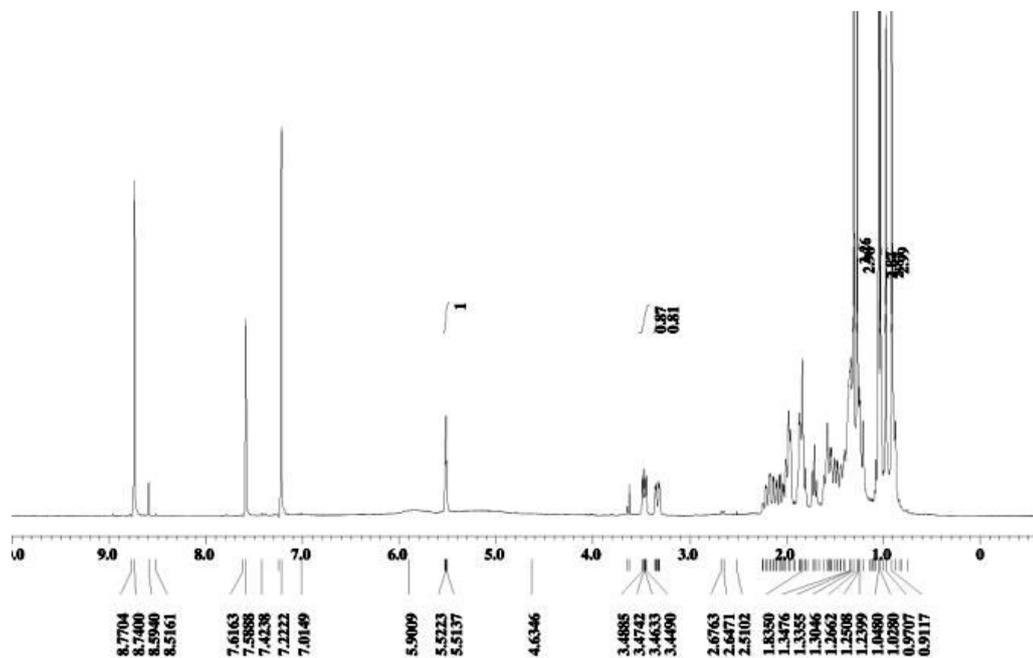


Figure 26. ^1H NMR spectrum of compound 6 in pyridine- d_5

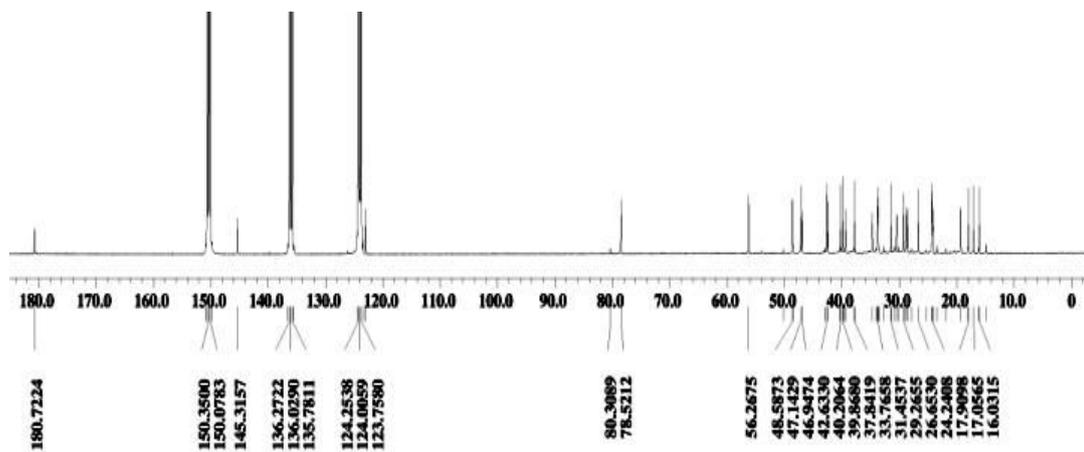


Figure 27. ^{13}C NMR spectrum of compound 6 in pyridine- d_5

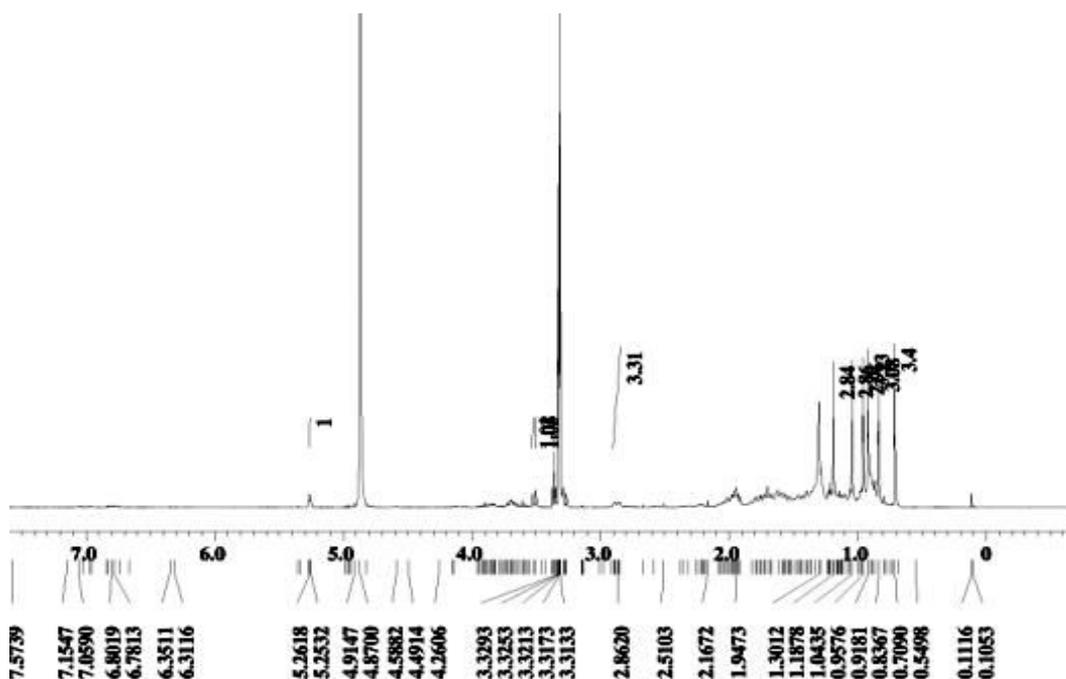


Figure 28. ^1H NMR spectrum of compound 7 in CD_3OD

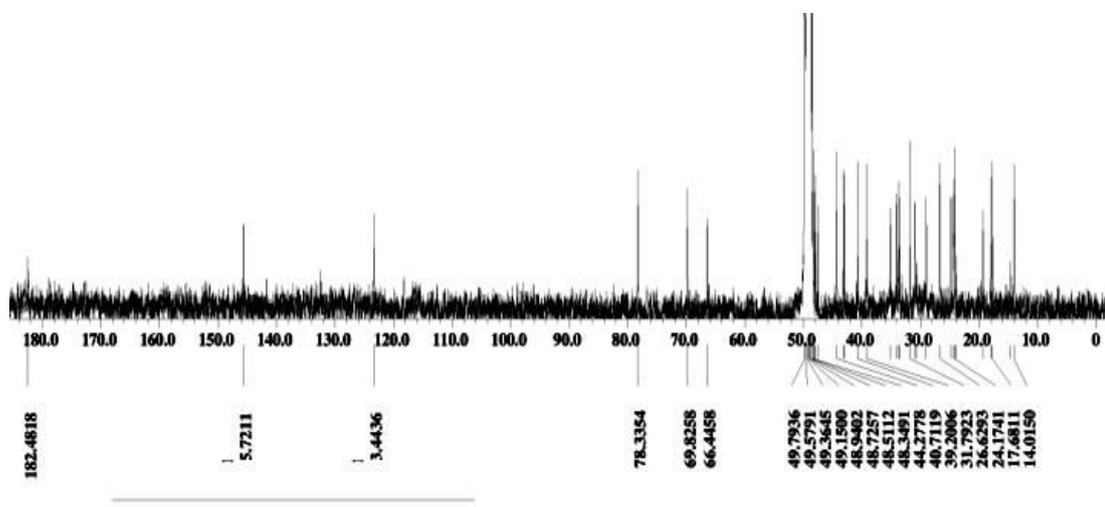


Figure 29. ^{13}C NMR spectrum of compound 7 in CD_3OD

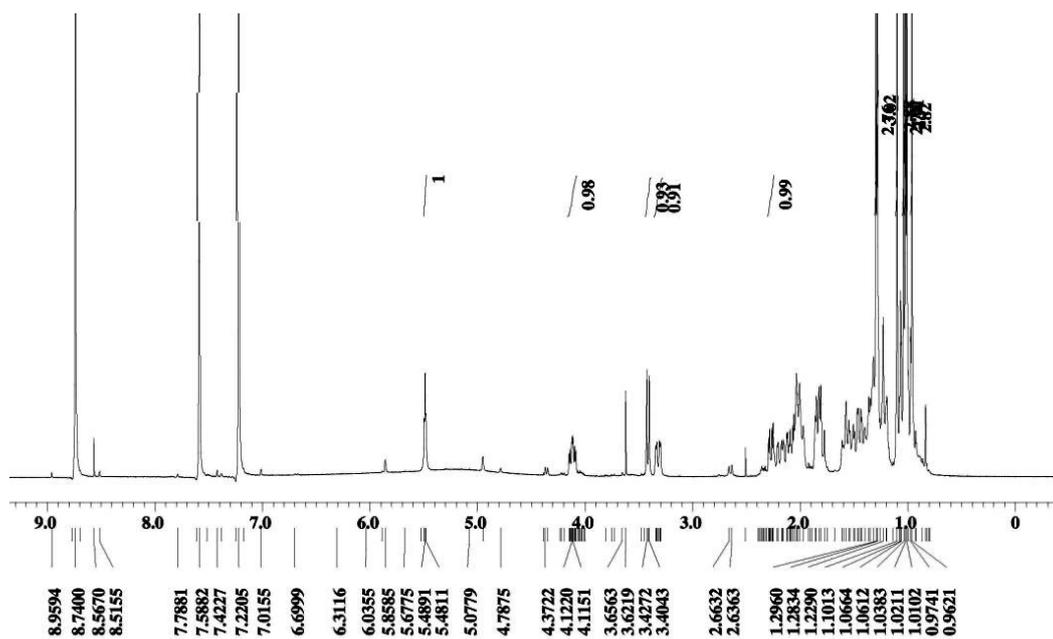


Figure 30. ^1H NMR spectrum of compound 8 in pyridine- d_5

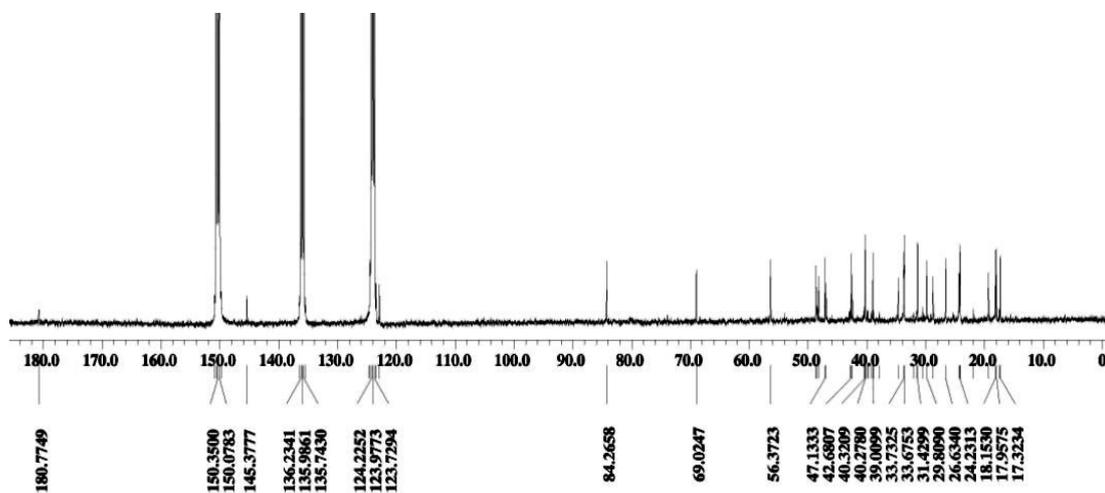


Figure 31. ^{13}C NMR spectrum of compound 8 in pyridine- d_5

1-6. 화합물 9의 구조 동정

Compound 9은 ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 5.36 (1H, d, $J = 5.0$ Hz)의 signal로부터 sp^2 혼성을 갖는 olefin 구조의 proton을 예상하였고, δ 4.01 (1H, m)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methine proton을 예상하였다. δ 0.67 (3H, s), δ 0.87 (3H, s), δ 0.89 (3H, s), δ 0.91 (3H, s), δ 0.95 (3H, s), δ 1.00 (3H, s)로부터 총 6개의 methyl proton signal을 확인하였다. 또한, δ 3.62-4.60의 signal을 통하여 당이 결합됐을 것이라 예상하였으며, δ 5.07 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)의 anomeric proton의 coupling constant를 통하여 β -D-glucopyranoside임을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 δ 141.3, δ 122.4를 통하여 ^1H NMR spectrum에서 예상한 olefin carbon과 δ 78.9에서 산소에 인접한 methine carbon을 확인하였다. 결합된 당의 종류는 δ 103.0, 79.1, 78.5, 75.8, 72.1, 63.4에서 6개의 signal과 ^1H NMR data를 통하여 앞서 예상한 β -D-glucopyranoside임을 문헌³²⁾를 통해 확인하였다. 이를 바탕으로 compound 9는 문헌^{32,33)}과 비교하여 sterol 배당체인 sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside 즉, daucosterol로 동정하였다 (Figure 32-34, Table 7).

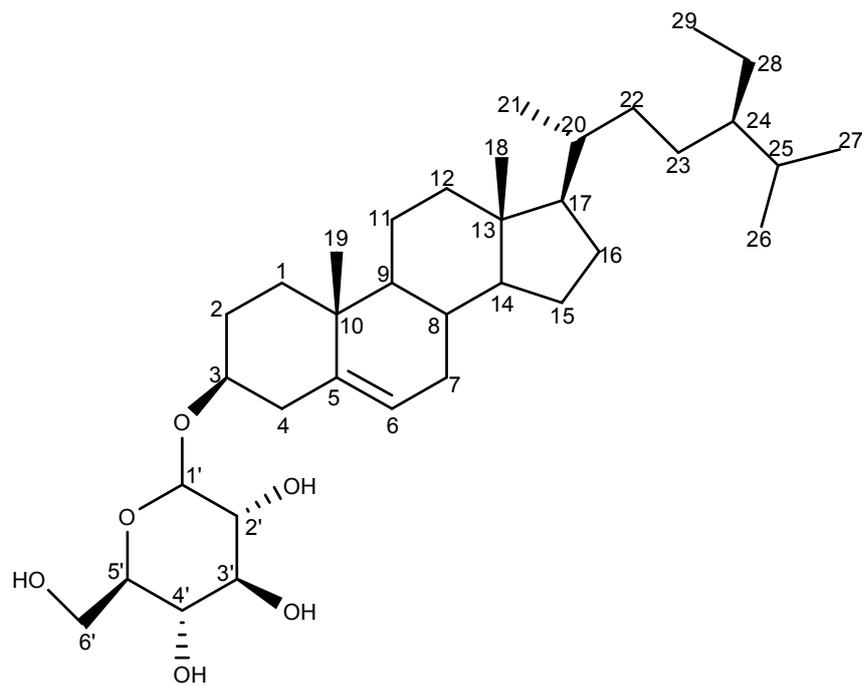


Figure 32. Chemical structure of compound 9

Table 7. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **9** (400 and 100 MHz, pyridine- d_5)

No.	Compound 9	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1		37.4
2		30.4
3	4.01 (1H, m)	78.9
4		40.3
5		141.3
6	5.36 (1H, d, 5.0)	122.4
7		32.5
8		32.6
9		50.8
10		39.8
11		21.7
12		37.9
13		42.9
14		57.4
15		24.9
16		29.0
17		56.7
18	0.67 (3H, s)	12.4
19	0.95 (3H, s)	20.4
20		36.8
21	1.00 (3H, d, 6.4)	19.9
22		34.6
23		26.8
24		46.5
25		29.9
26	0.91 (3H, s)	19.6
27	0.89 (3H, s)	19.4
28		23.8
29	0.87 (3H, s)	12.6
1'	5.07 (1H, d, 7.7)	103.0
2'	4.60–3.62 (suga H)	75.8
3'		79.1
4'		72.1
5'		78.5
6'		63.4

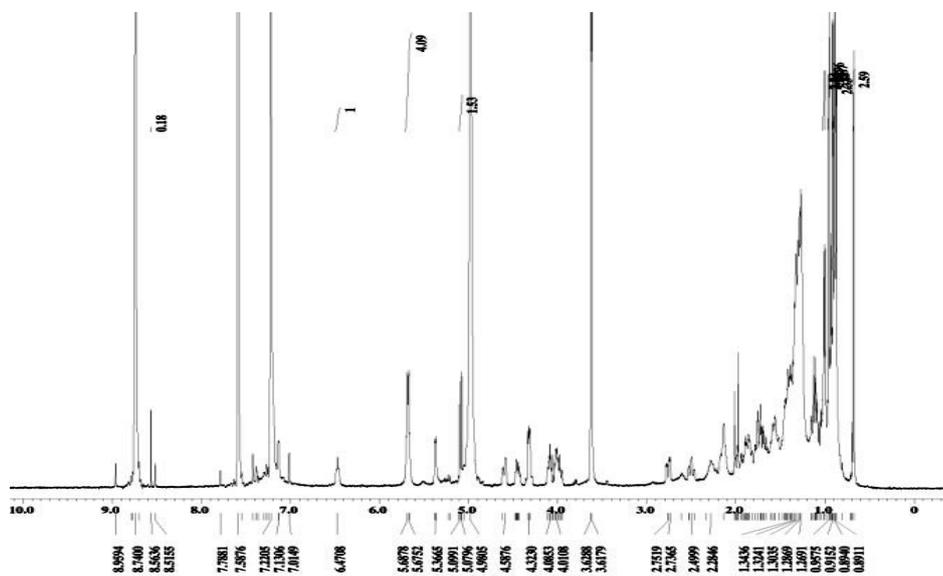


Figure 33. ^1H NMR spectrum of compound **9** in pyridine- d_5

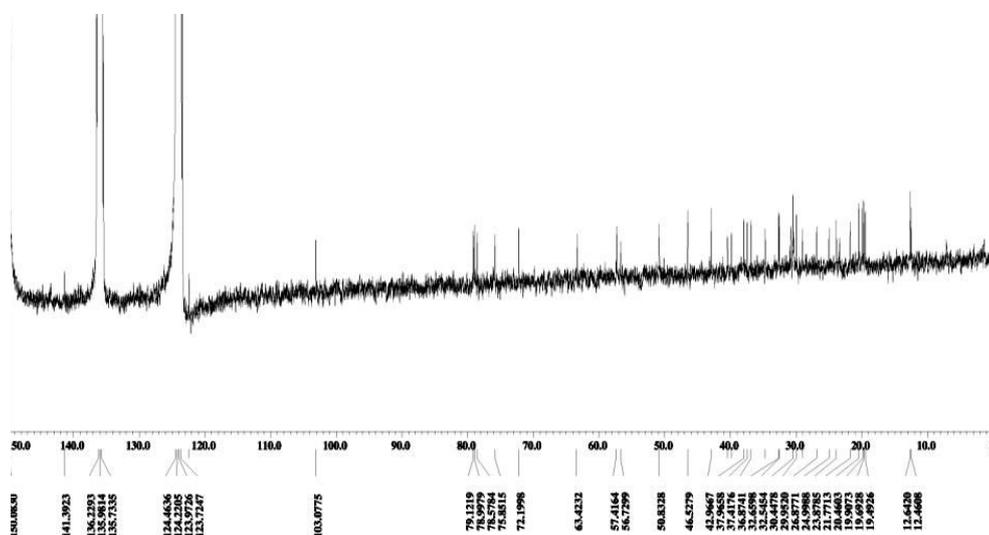


Figure 34. ^{13}C NMR spectrum of compound **9** in pyridine- d_5

2. DPPH radical scavenging activity

2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성

뽕잎피나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 나머지 분획물에 대하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여, SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과 SC_{50} 값이 추출물의 경우 52.18 $\mu\text{g/mL}$, EtOAc layer 24.68 $\mu\text{g/mL}$, *n*-BuOH fraction 34.43 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C(5.78 $\mu\text{g/mL}$) 보다는 떨어지지만, 이들 역시 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 35, 36).

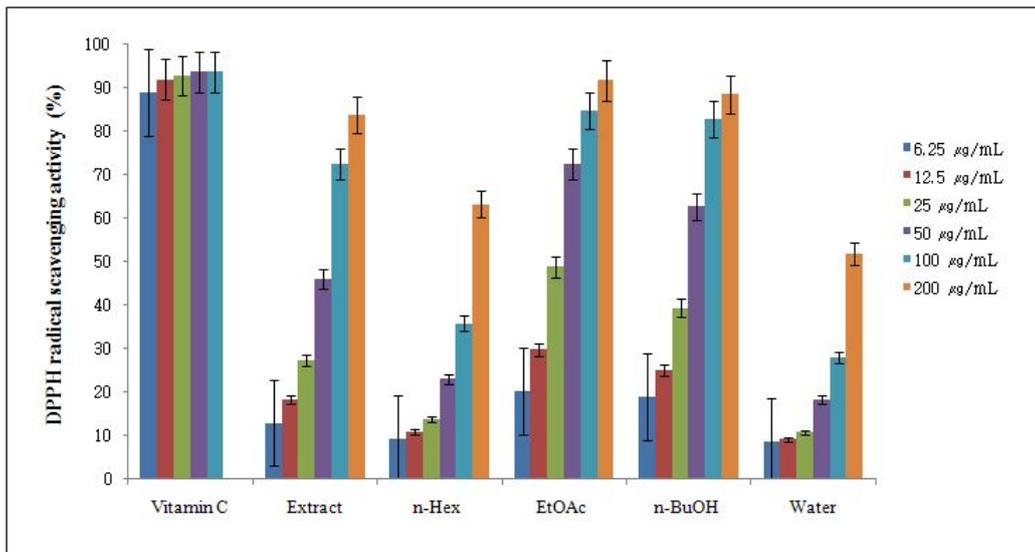


Figure 35. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions

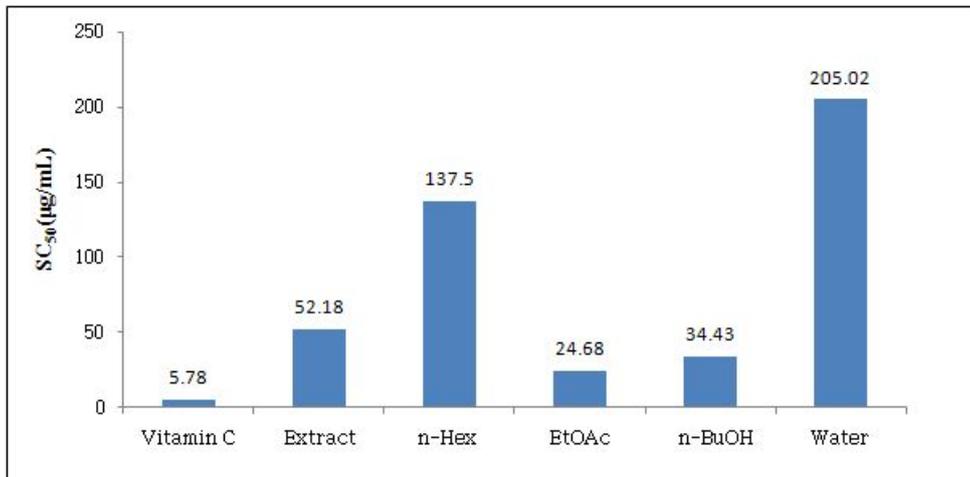


Figure 36. SC₅₀ value of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions

2-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성

뽕잎피나무 잎으로부터 분리된 compound들의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 진행하여 SC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과 compound 3, 4, 8의 SC₅₀ 값이 각각 5.41, 12.41, 9.75 µg/mL로 대조군인 vitamin C(5.71 µg/mL)와 유사한 값으로 이들 compound들이 우수한 radical 소거 활성 능력을 가짐을 확인 할 수 있었다(Figure 37, 38, Table 8).

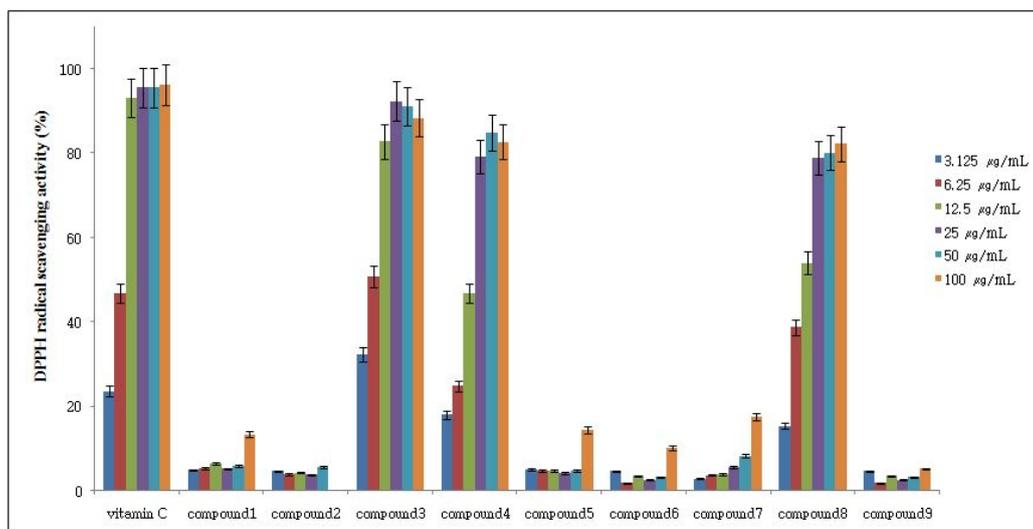


Figure 37. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds

Table 8. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds

Compound No.	Compound name	SC ₅₀ (µg/mL)
1	<i>β</i> -sitosterol	>100
2	chlorophyll c1	>100
3	<i>epi</i> -catechin	5.41
4	isoquercitrin	12.41
5	3,12,13-trihydroxyolanan -28-oic acid	>100
6	oleanolic acid	>100
7	arjunolic acid	>100
8	maslinic acid	9.75
9	daucosterol	>100
Positive control	vitamin C	5.71

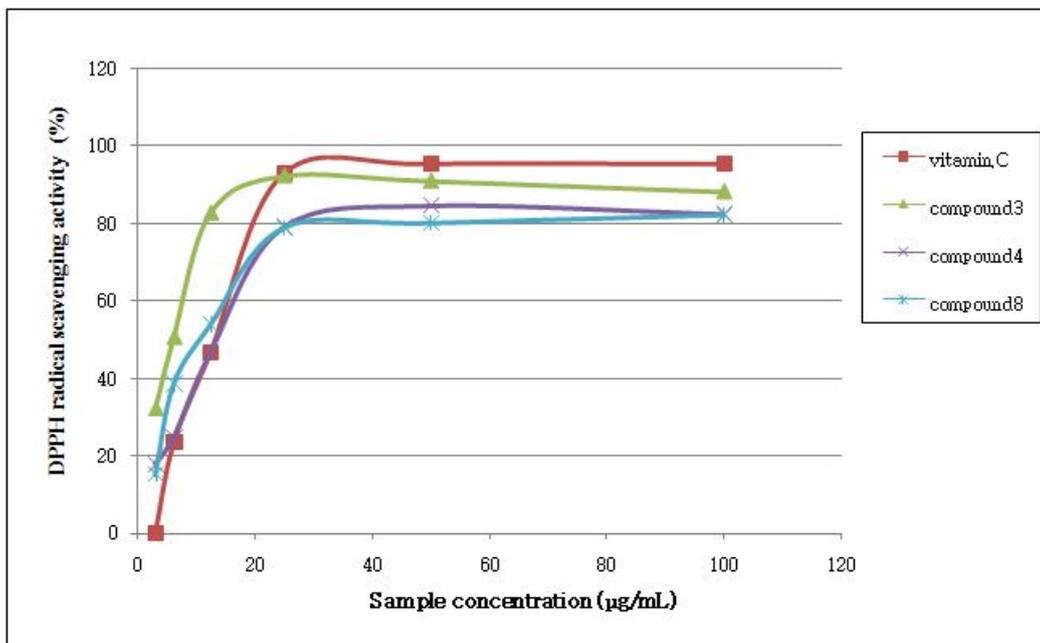


Figure 38. DPPH radical scavenging activities of compounds 3, 4, 8 and vitamin C

3. Elastase inhibition activity

3-1. 추출물 및 분획물의 elastase inhibition activity

뽕잎피나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성을 측정하였다. 실험은 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실시하였으며, 그 결과 추출물 및 EtOAc 층에서 elastase 저해 활성이 약간 있음을 확인할 수 있었다(Figure 39).

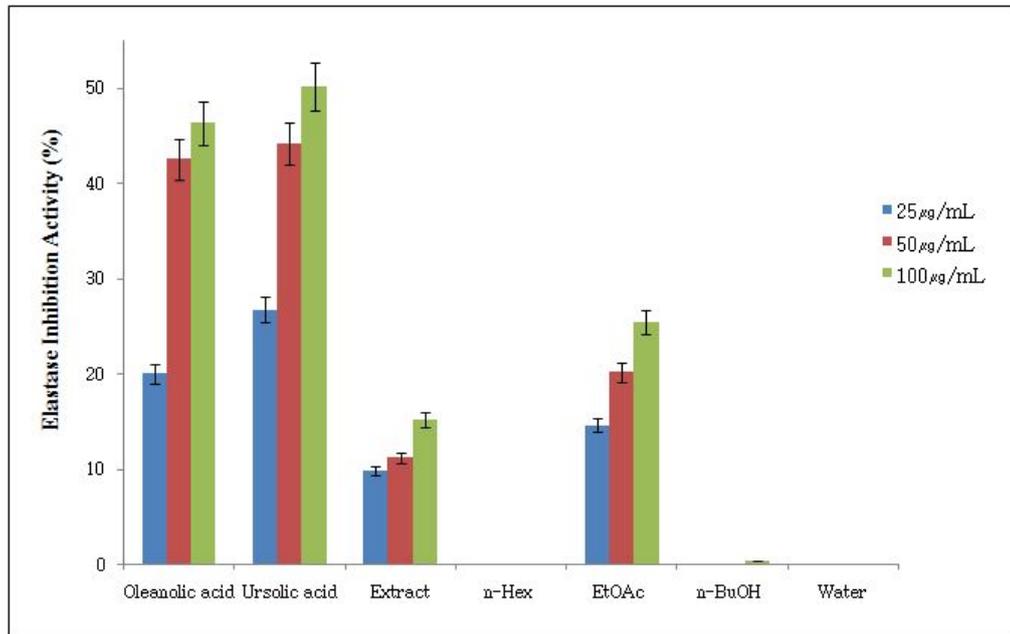


Figure 39. Elastase inhibition activities of extract and solvent fractions

3-2. 분리된 화합물의 elastase inhibition activity

뽕잎피나무 잎으로부터 분리된 compound들의 elastase 저해 활성을 측정하였다. 그 중 활성이 있는 compound 6, 8에 대해서만 100, 50, 25의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여, IC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과 compound 6, 8의 IC₅₀ 값이 43.6, 89.52 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 oleanolic acid(44.94 $\mu\text{g/mL}$), Ursolic acid(32.74 $\mu\text{g/mL}$)와 유사한 값으로 이들 화합물들이 elastase 저해 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 40, 41).

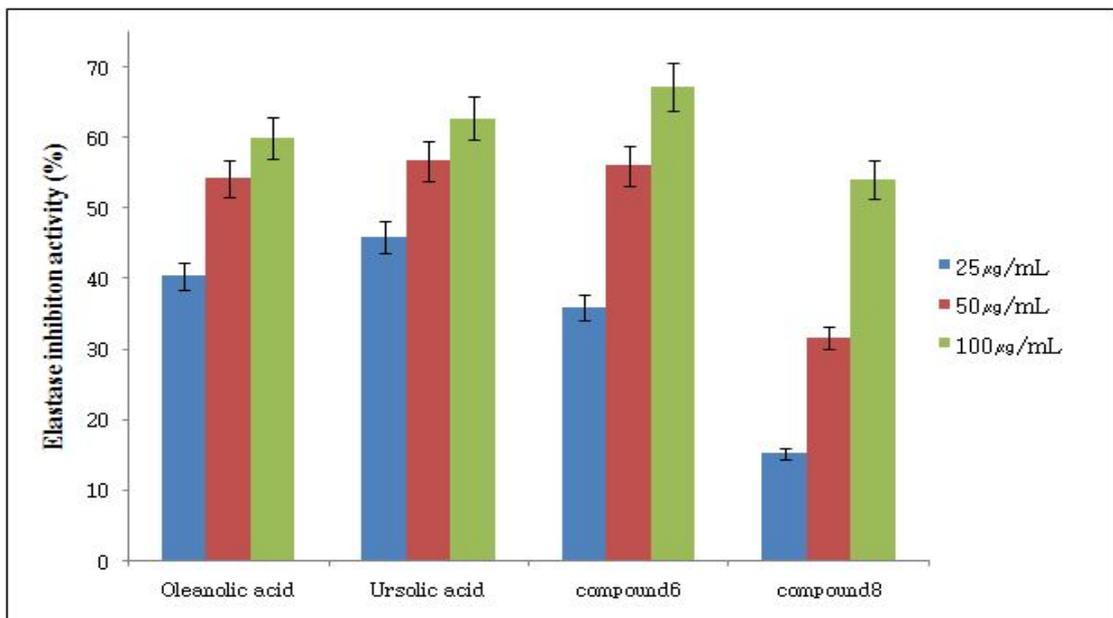


Figure 40. Elastase inhibition activities of compounds 6, 8 and oleanolic acid, ursolic acid

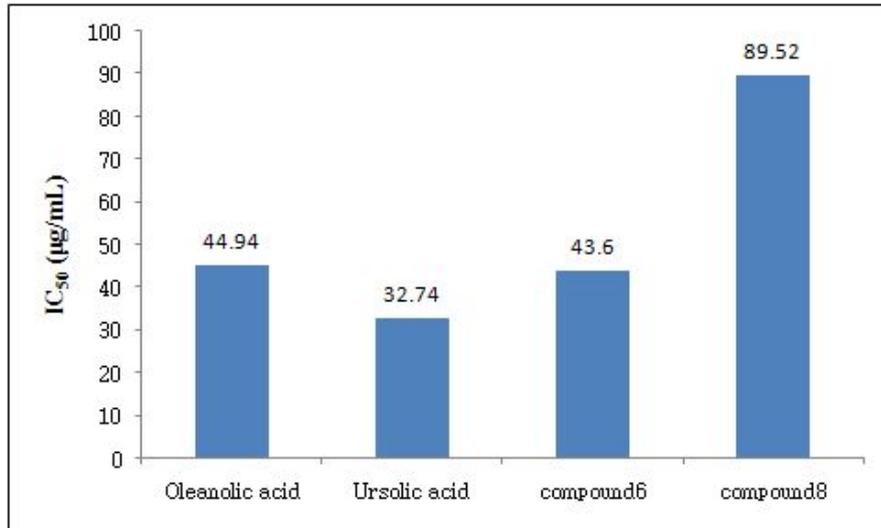


Figure 41. IC₅₀ value of elastase inhibition for compounds 6, 8

4. Human normal fibroblast cell을 이용한 주름개선 실험 결과

4-1. 세포 독성 평가

4-1-1. 추출물 및 분획물의 세포 독성 평가

뽕잎피 나무 잎 추출물 및 분획물의 세포독성 결과, 사람 정상 섬유아세포인 human normal fibroblast cell(CCD-986sk)에 샘플을 같은 농도(100 μ g/mL)로 처리하였을때, sample을 녹인 용매를 control로 처리하여, 그 결과 값이 100%의 생존율을 가질 때 각각의 값을 구하여 그래프로 나타내었다. 처리한 결과, *n*-Hex layer에서는 상대적으로 독성을 나타내었으며, EtOAc layer과 *n*-BuOH layer은 오히려 cell 수가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 42).

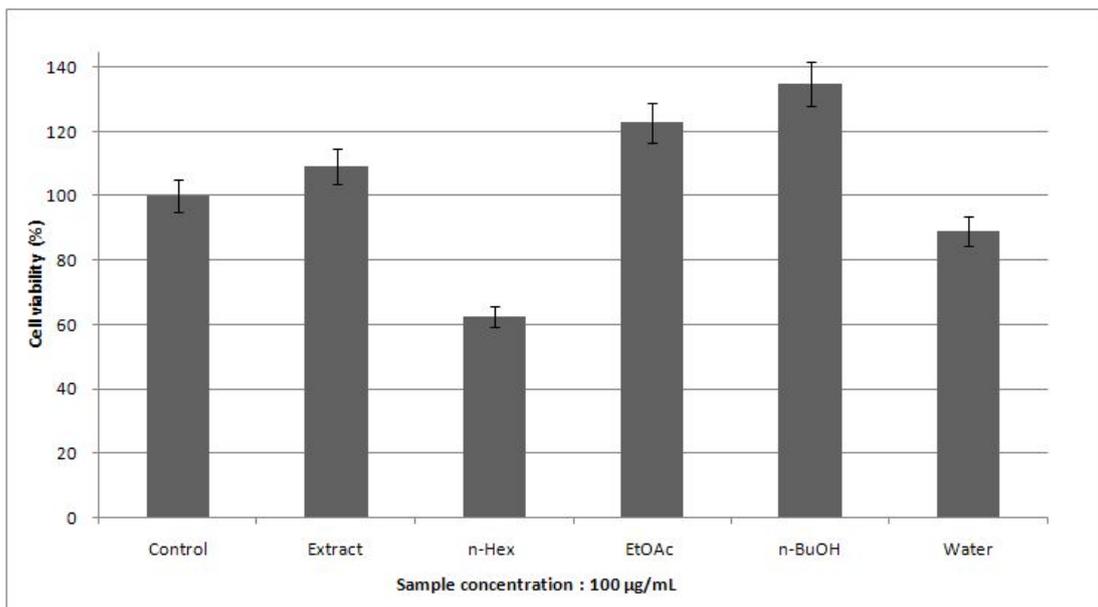


Figure 42. Cell viabilities of human normal fibroblast CCD-986sk treated with extract and solvent fractions

세포 증식 효과를 나타내었던, ethyl acetate 층에 대해 25, 50, 100, 200,

300 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 더 실시해본 결과, 농도 의존적으로 셀이 증가 하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 43). 따라서 어떠한 영향이 있는지 확인하기 위해 배양액을 걷어 추가 실험을 더 진행하고자 하였다.

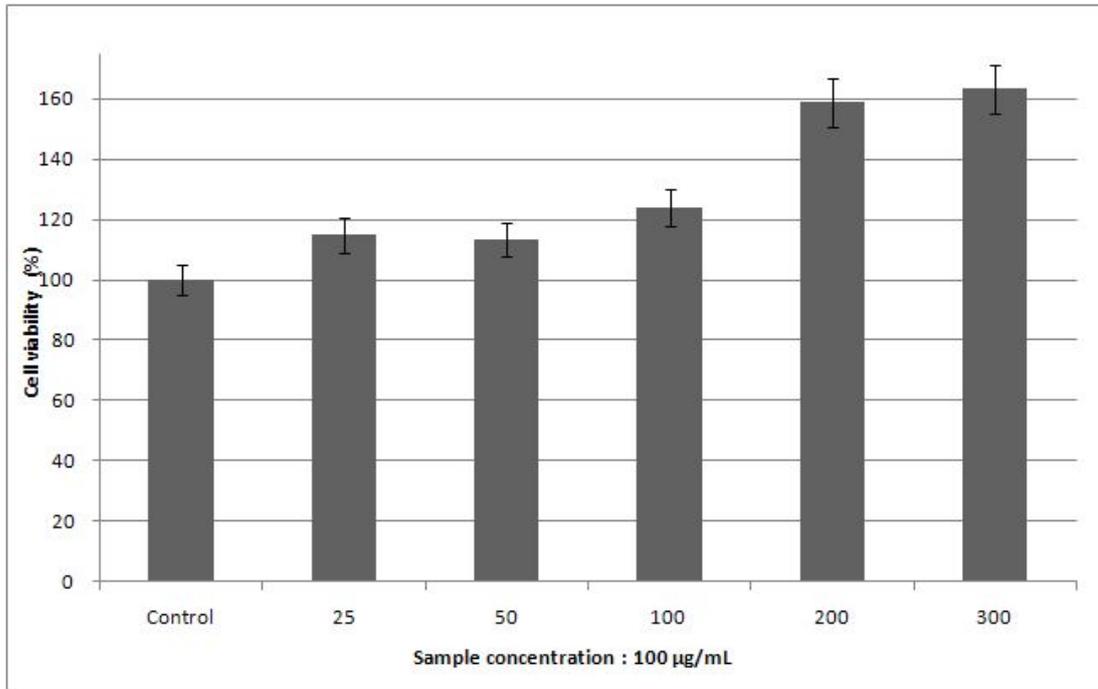


Figure 43. Cell viabilities of *T. taquetii* EtOAc fraction against human normal fibroblast cell

4-1-2. 분리한 화합물의 세포 독성 평가

뽕잎피 나무 잎으로부터 분리한 화합물들의 세포독성 결과, 사람 정상 섬유아세포인 human normal fibroblast cell(CCD-986sk)에 샘플을 같은 농도(100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였을때, Sample을 녹인 용매를 control로 처리하여, 그 결과 값이 100%의 생존율을 가질 때 각각의 값을 구하여 그래프로 나타내었다. 처리한 결과, compound 2를 제외하고 대부분의 분리한 화합물에서 80% 이상의 생존

를 나타내었고, compound 3, 7 and 8은 오히려 cell 수가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 44).

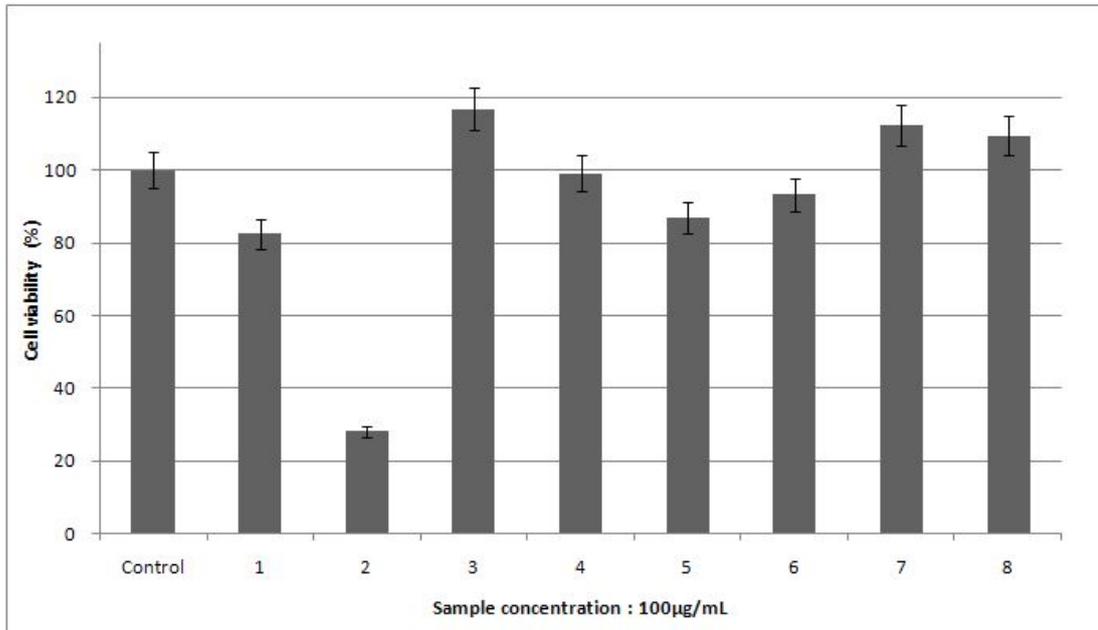


Figure 44. Cell viabilities of *T. taquetii* isolated compounds against human normal fibroblast cell

Compound 3, 7 and 8 중 문헌²⁹⁾과 비교하여 아직 주름활성에 대해 알려지지 않은 compound 7, 8에 대해 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 실시해본 결과, 두 compound 모두 농도 의존적으로 셀이 증가 하는 것을 확인 할 수 있었고, 배양액을 걷어 추가 실험을 진행하였다(Figure 45).

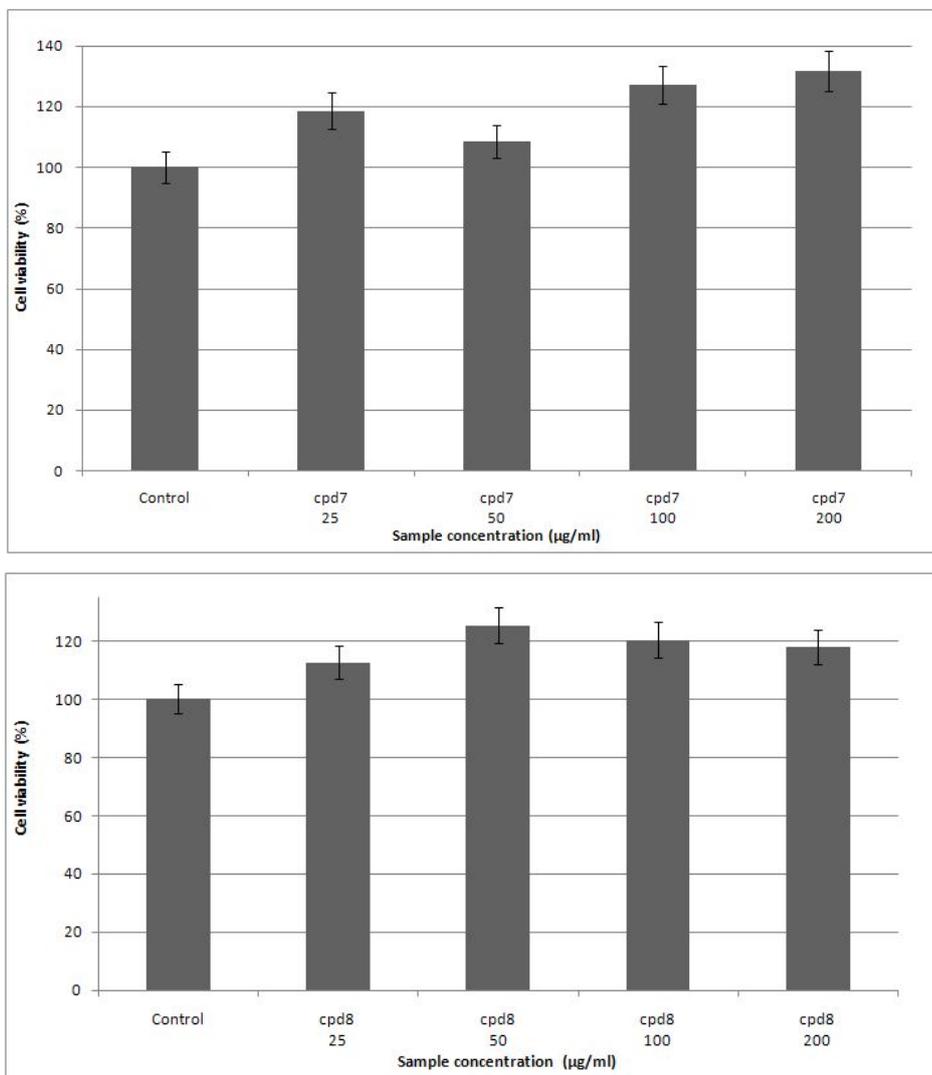


Figure 45. Cell viabilities of compounds 7, 8 against human normal fibroblast cell

4-2. Collagenase (MMP-1) 저해활성 결과

콜라겐은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하는 단백질의 70%를 차지한다. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 MMP-1으로 이러한 MMP-1의 효소활성을 저해하거나 발현을 억제하는 활성을 가진 물질은 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지한다.³⁵⁾

따라서 MMP 저해 효과가 있는 소재는 주름을 개선하고 탄력 있는 피부유지에 유용하게 사용될 수 있으므로 셀 증식효과가 나타났던 ethyl acetate층과, compound 7, 8에 대한 MMP-1 효소활성 저해 효과를 측정하였다. 그 결과, 농도 의존적으로 효소활성을 저해하는 것을 확인할 수 있었고, 즉 ethyl acetate층과 compound 7, 8이 MMP-1 효소활성 부위에 대한 직접적인 저해 활성에 대한 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Figure 46, 47).

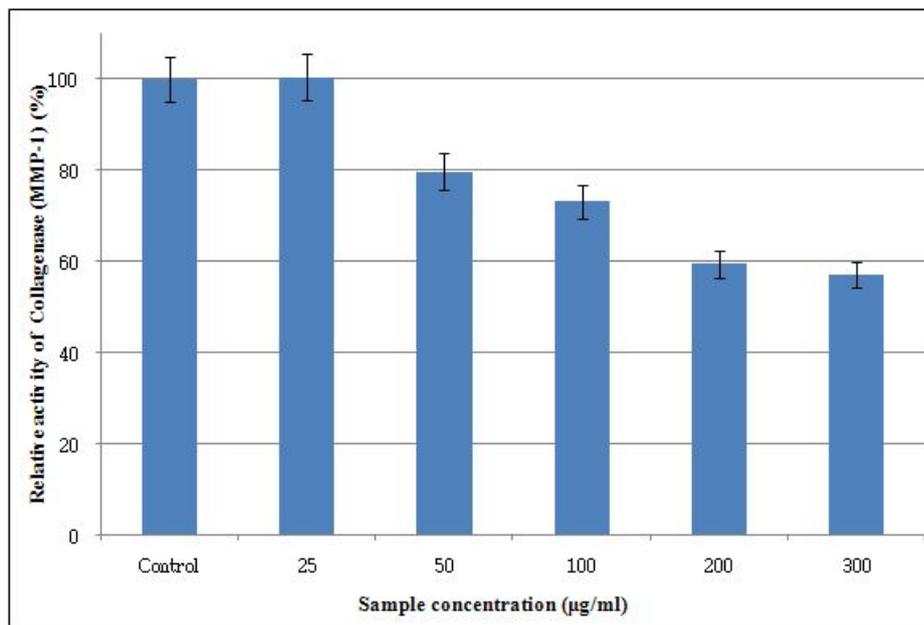


Figure 46. Collagenase(MMP-1) inhibition activity of EtOAc layer from *T. taquetii*

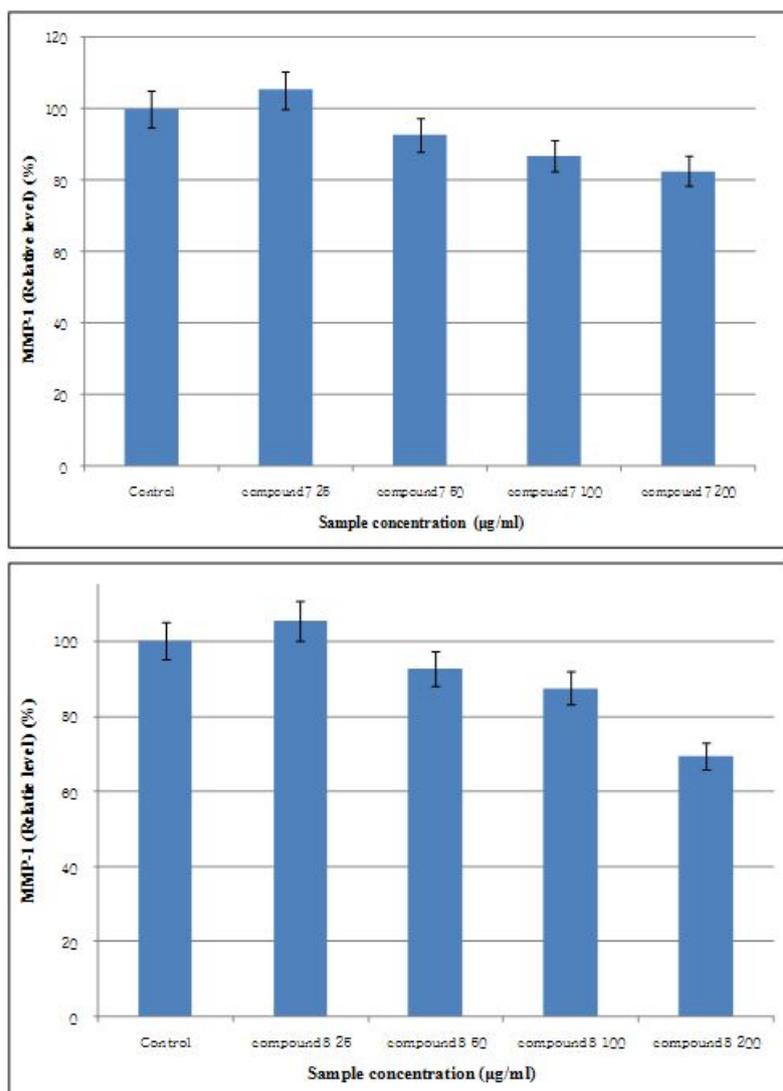


Figure 47. Collagenase(MMP-1) inhibition activities of compounds 7, 8 from *T. taquetii*

5. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과

5-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가

뽕잎피나무 잎이 항염효과에 미치는 영향을 알아보기 위해 먼저 뽕잎피나무 잎 추출물 및 분획물이 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 우선 sample 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, 70% 에탄올 추출물에서는 23.58 μM 로 19.1%가 감소하였으며 EtOAc layer에서 각각 9.63 μM 로 67.0%가 감소하는 것을 확인하였다. *n*-Hex layer의 경우에는 NO 생성량이 줄어들었으나, cell에 대해 약 20% 정도의 세포독성이 있었다(Figure 48).

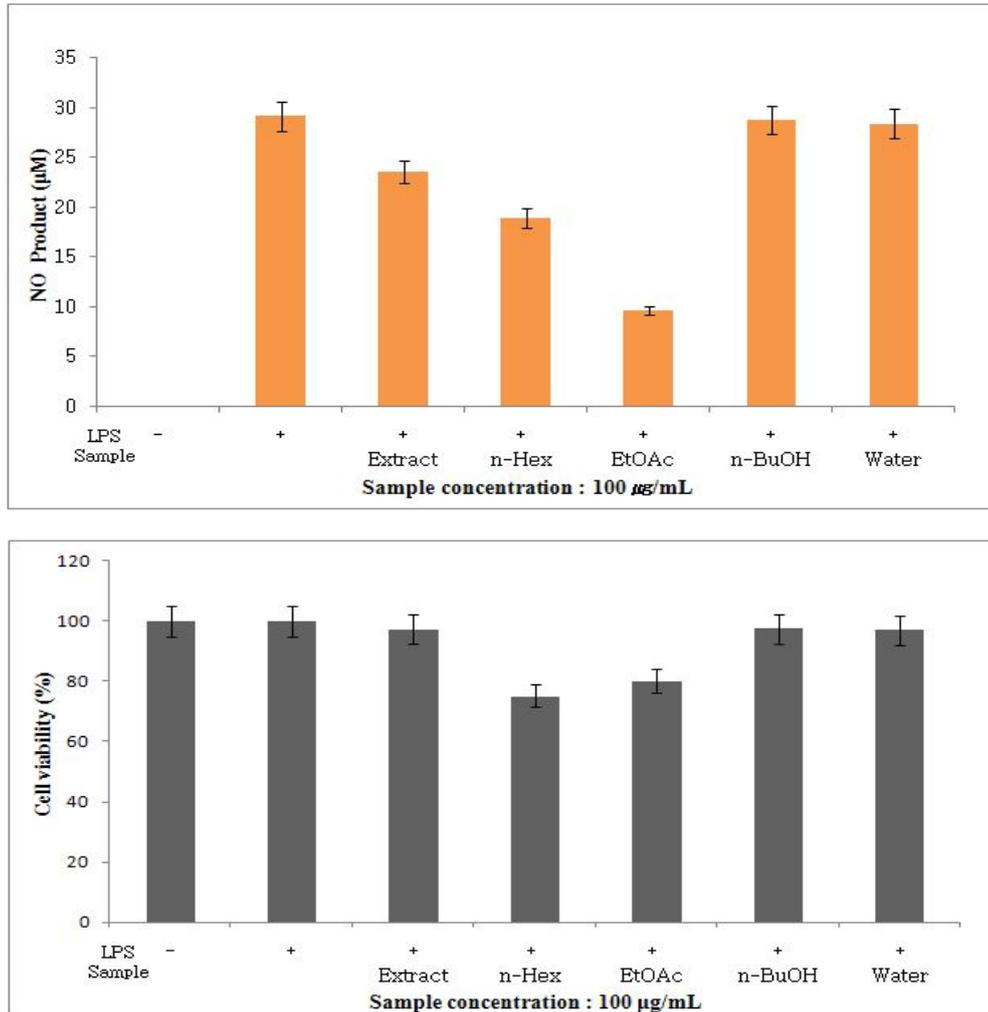


Figure 48. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract and solvent layers

위 결과를 바탕으로 100 µg/mL 농도에서 세포독성은 없으며 활성이 있던 EtOAc layer에 대해 25, 50, 100, 200, 300 µg/mL의 농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과 EtOAc layer는 300, 200 µg/mL의 농도에서 세포 독성 없이 NO생성량을 더 많이 감소시키는 것을 확인하였다(Figure 49).

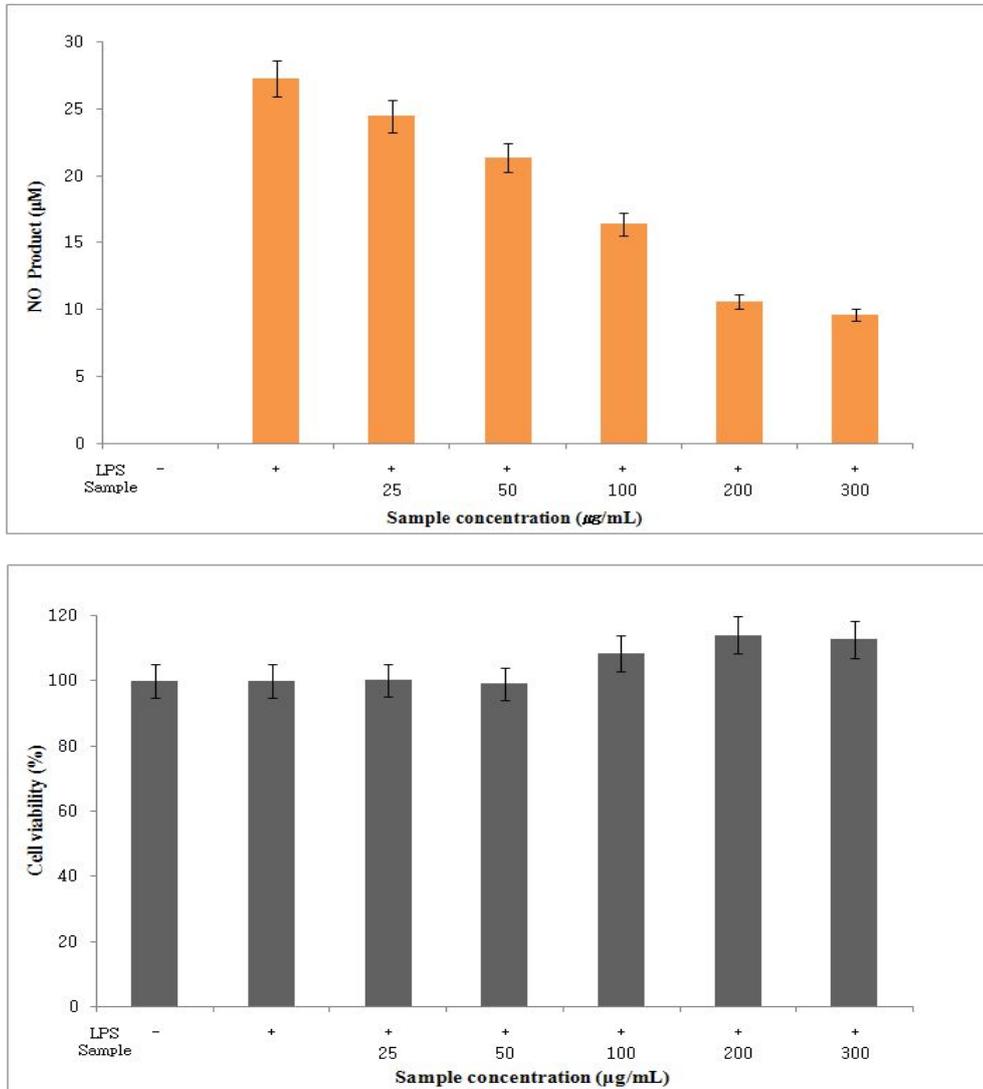


Figure 49. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of EtOAc layer

5-2. 화합물 1, 7, 8의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가

뽕잎피나무 잎으로부터 분리된 compound들의 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포독성을 측정하였다. 우선 sample 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, compound 1, 7, 8는 각각 2.39, 3.29, 6.21 μM 로 90.6, 87.1, 79.5%가 감소하는 것으로, compound 1, 7의 경우에는 cell에 대해 약간 세포 독성이 있으나, compound 7, 8 모두 세포 독성이 없이 NO 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 50).

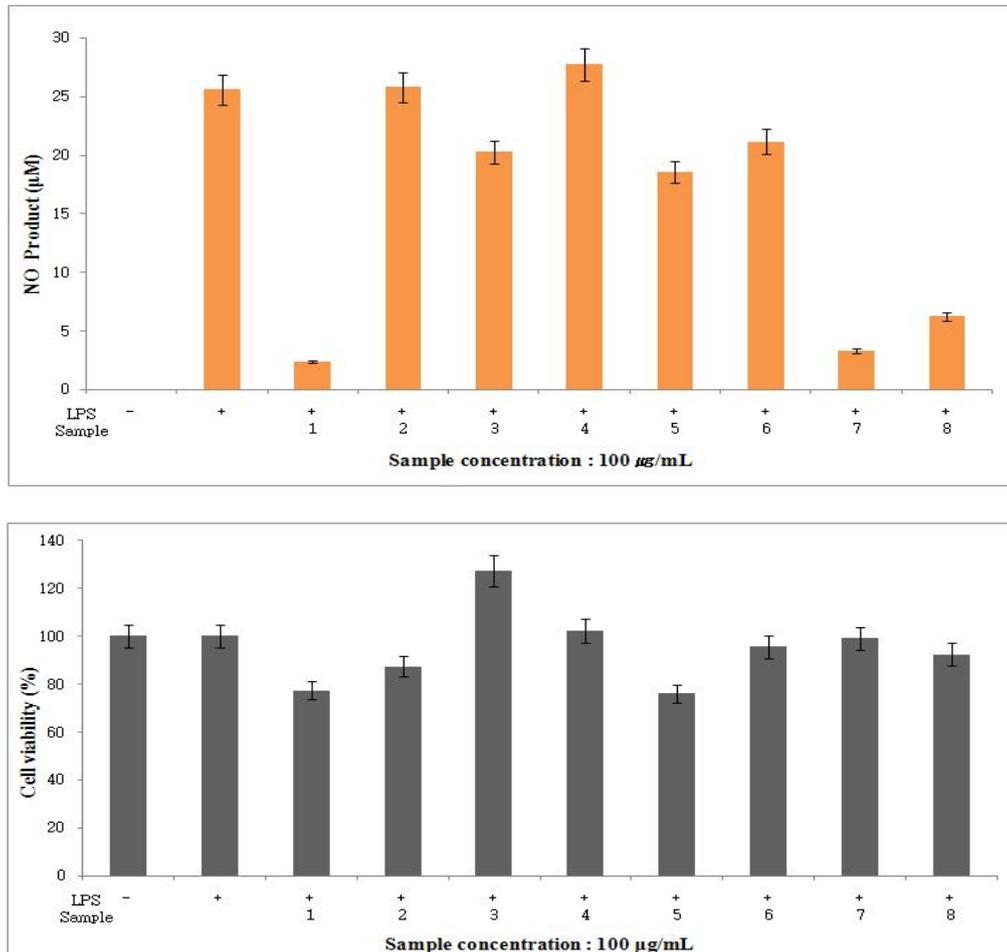


Figure 50. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of isolated compounds

위 결과를 바탕으로 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포독성은 없으며 활성이 있던 compound 1, 7, 8들에 대해 compound 1, 7은 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로, compound 8은 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 더 진행하였다.

실험 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, compound 1, 7, 8 모두 세포 독성이 없었으며 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 51).

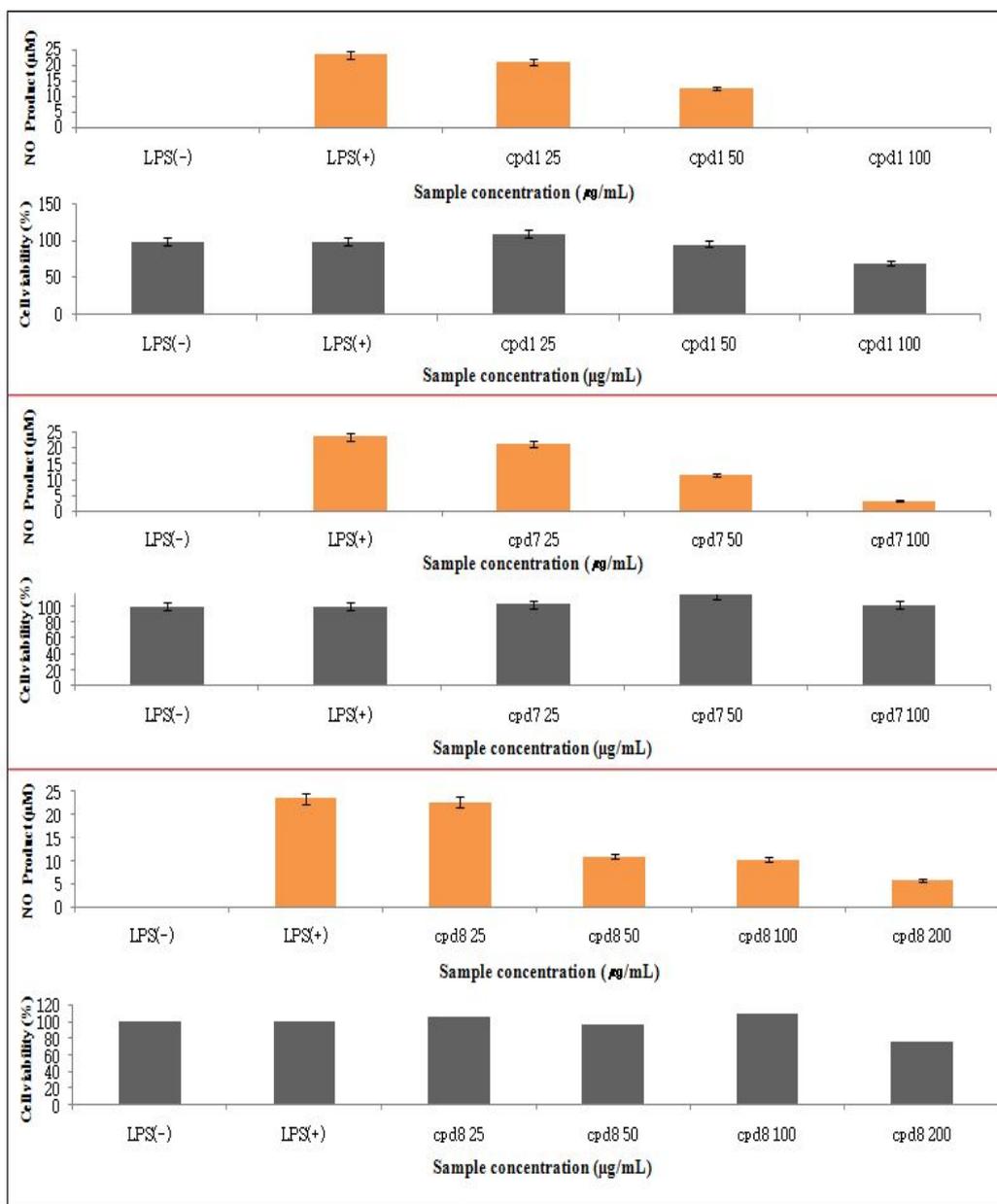


Figure 51. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of compounds 1, 7 and 8

5-3. 염증성 cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성 억제 측정

농도별로 강한 NO 생성 억제 활성을 나타내었던 ethyl acetate 층을 가지고, 초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용하는 염증성 cytokine으로 알려진 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성량 측정 실험을 더 진행하였다. EtOAc layer의 TNF- α , IL-6, IL-1 β 양을 측정한 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 TNF- α 는 생성량에 변화량이 없었던 반면, IL-6, IL-1 β 생성이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 52).

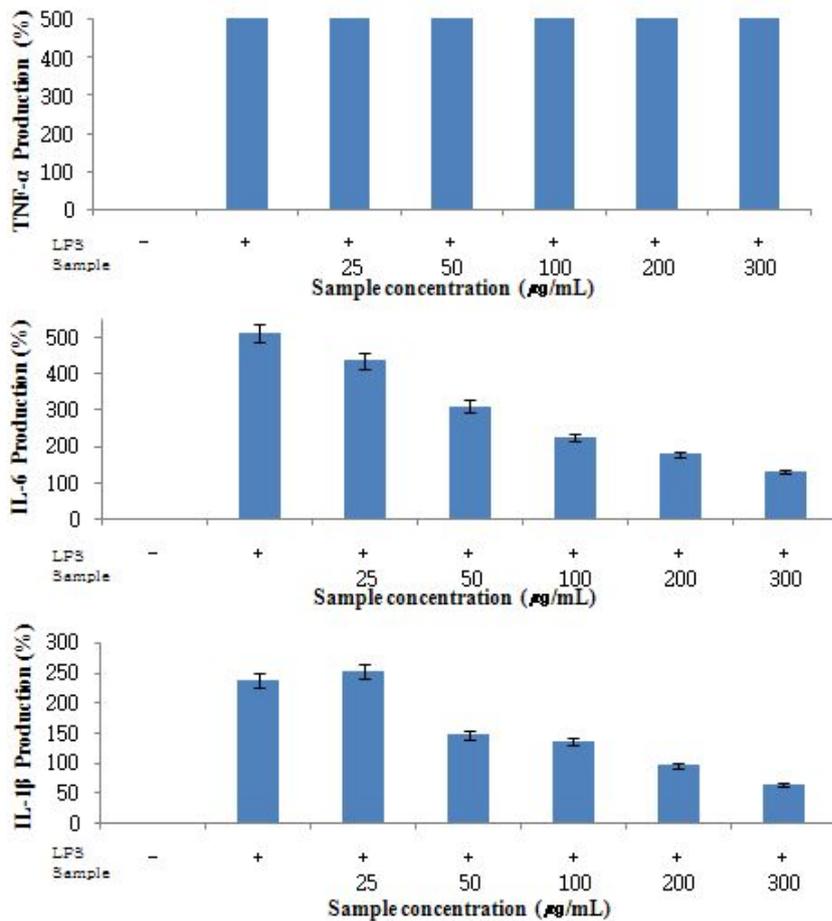


Figure 52. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6 and IL-1 β by EtOAc layer

마찬가지로, 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 나타내었던 compound 1, 7 and 8에 대해서도 초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용하는 염증성 cytokine으로 알려진 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β 의 생성량 측정 실험을 더 진행하였다. 측정된 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때, $\text{TNF-}\alpha$ 는 생성량에 변화량이 없었던 반면, compound 1, 7 and 8 모두 농도 의존적으로 IL-6, IL-1 β 생성이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 53-55).

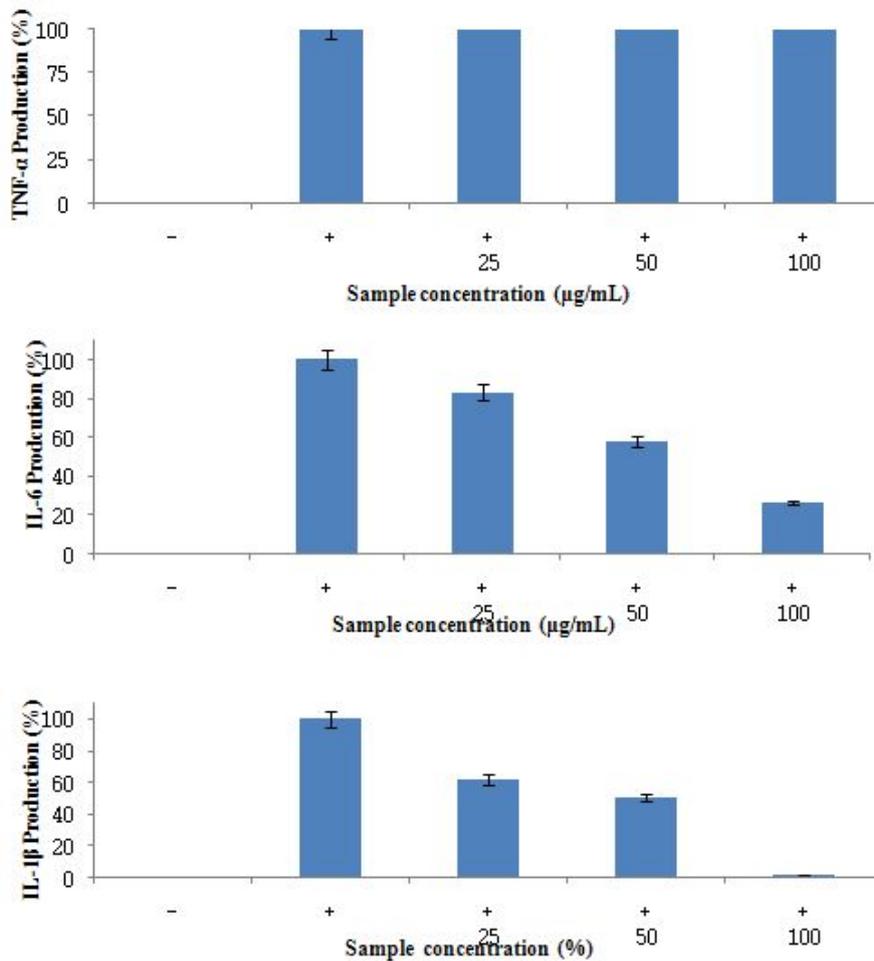


Figure 53. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β by compound 1

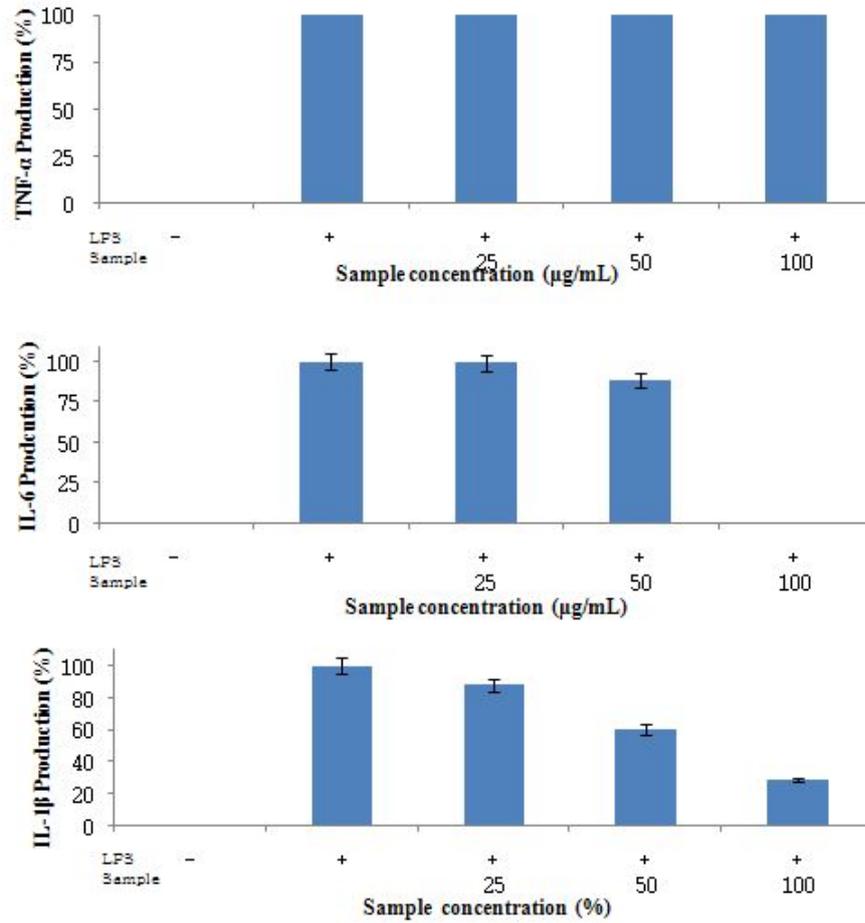


Figure 54. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 7

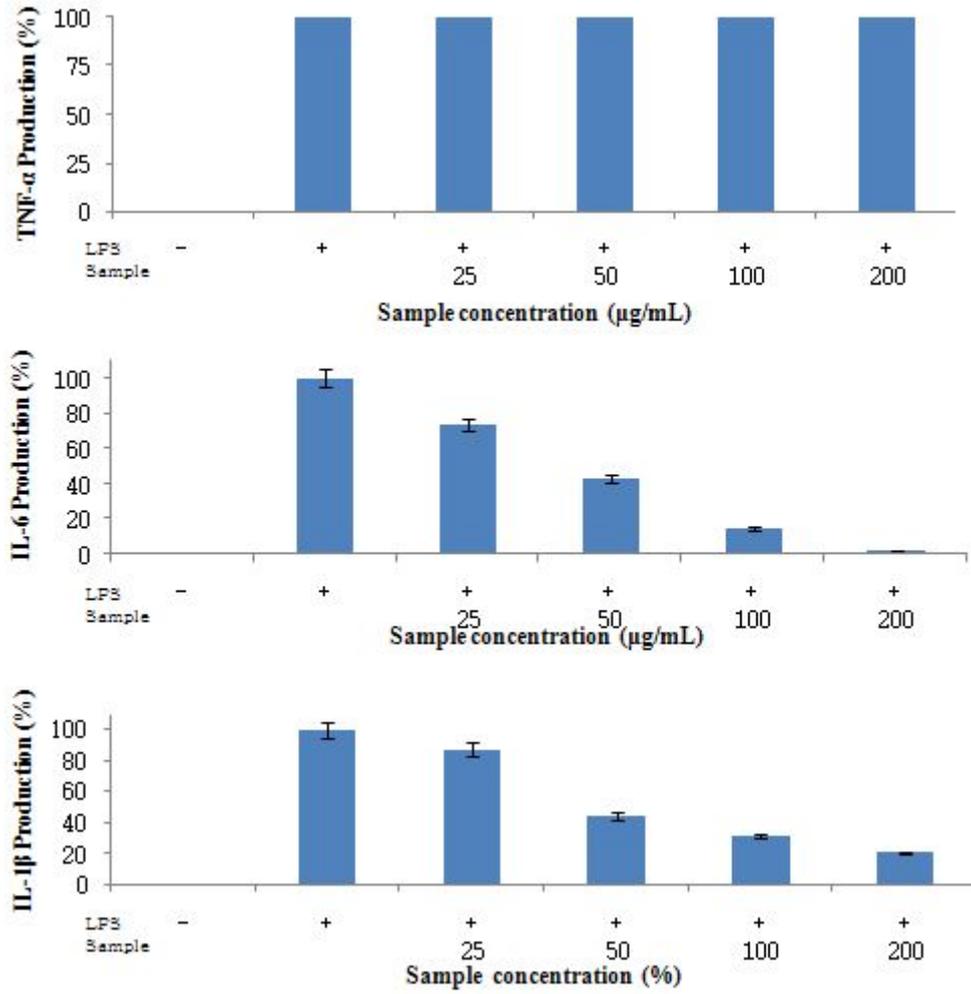


Figure 55. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 8

5-4. COX-2, iNOS의 발현 저해 활성화

염증반응에서 대식세포 (macrophage)는 병원체에 반응하여 tumor necrotic factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 염증 유발인자를 생성하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 합성하여 NO 및 prostaglandin E₂(PGE₂)를 생성한다. 이때 내독소로 잘 알려진 LPS는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며 RAW264.7과 같은 대식세포에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 생리학적으로 NO는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하고나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다. 그러나 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO를 생성하고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이 등을 유발하여 염증반응을 촉진시키게 된다. 또한 PGE₂는 염증이 일어나면 대식세포의 COX-2에 의해 생성되게 된다.^{35,36)}

따라서, 염증을 유발하는 주요 인자인 iNOS와 COX-2의 세포내에서의 발현을 억제하여 염증을 저해할 수 있다.

뽕잎피나무 잎의 항염 활성을 확인하기 위해 NO와 cytokine(IL-6, IL-1 β)의 생성 억제를 확인하였고, 이 결과와 iNOS, COX-2 단백질의 발현 억제와의 관련성을 확인하기 위해 Western blot을 이용하여 두 단백질의 발현 정도를 비교하였다. 저해 활성을 나타내었던 ethyl acetate층과 compound 1, 7 and 8에 대해서 농도별로 실험을 진행하였다. 실험 결과, LPS를 처리하지 않아 활성화가 이루어 지지 않은 (-)에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 보이지 않았으나, LPS와 용매만을 처리한 (+)에서 iNOS와 COX-2의 발현이 관찰되었다.

Compound 7에서는 COX-2의 발현은 저해되지 않았던 반면, iNOS의 발현은 농도 의존적으로 저해하는 것을 관찰할 수 있었으며, ethyl acetate 층과 compound 1 and 8은 앞서 관찰되었던 NO와 cytokine(IL-6, IL-1 β)와 같은 양상인 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 56, 57).

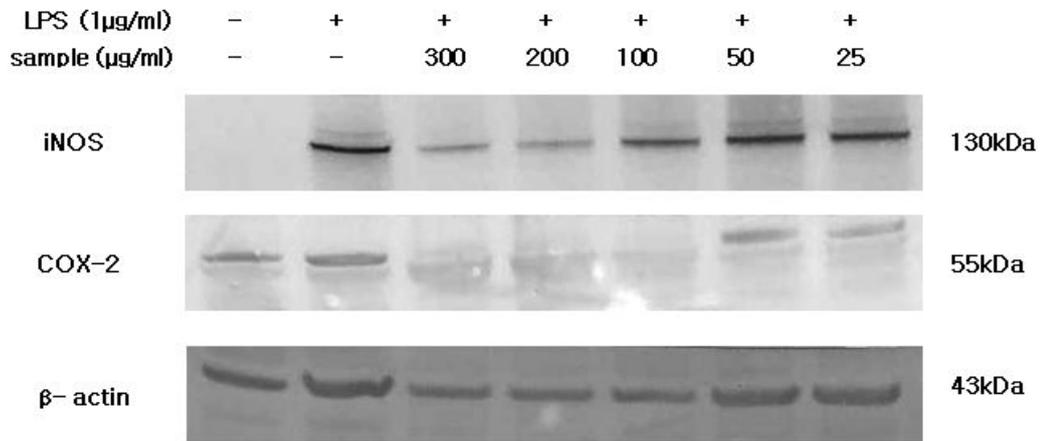


Figure 56. Inhibitory effect of EtOAc fraction on iNOS, COX-2 and β -actin protein expression in RAW 264.7 cell stimulated with LPS

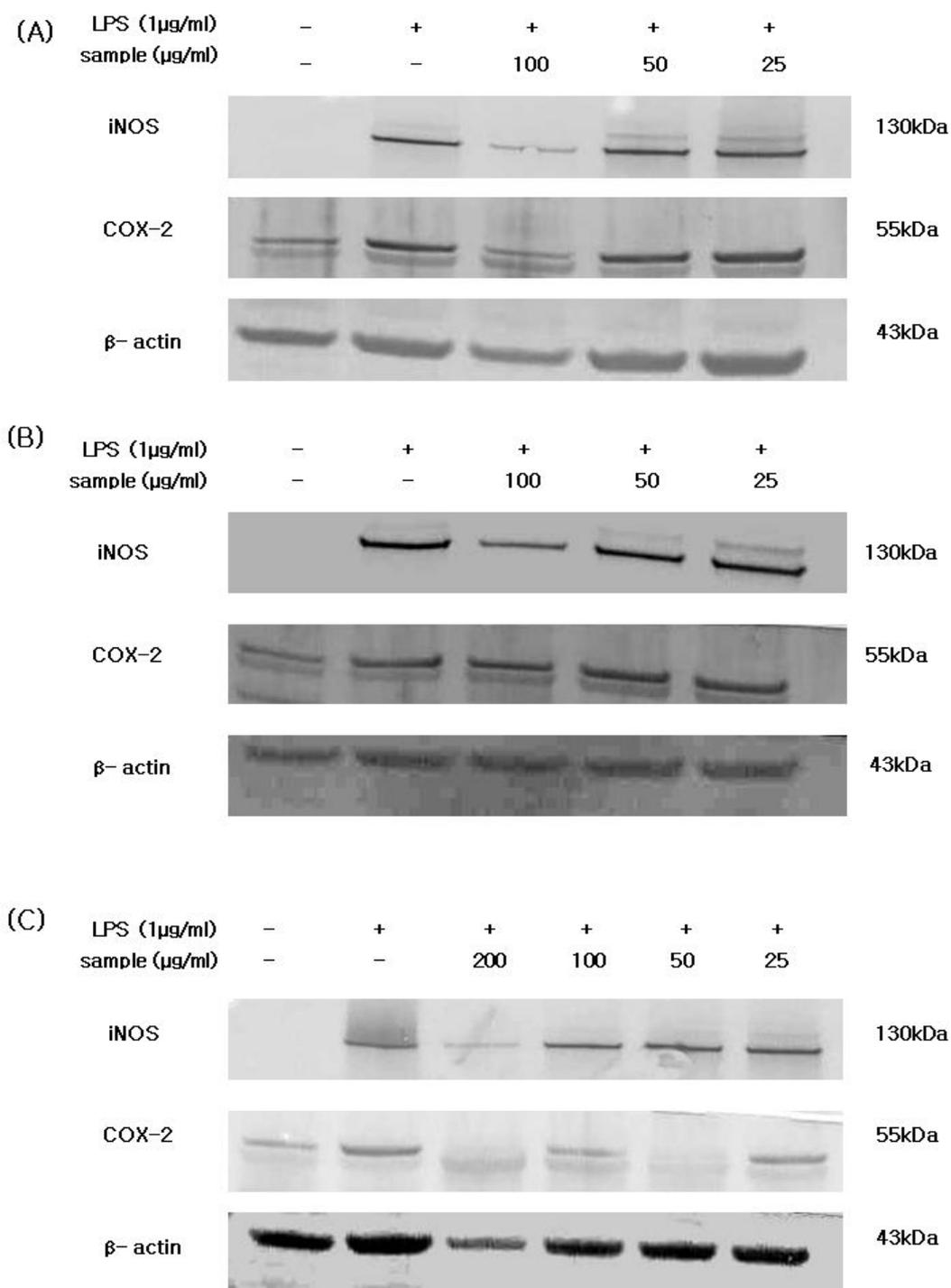


Figure 57. Inhibitory effect of (A) coomound 1, (B) compound 7 and (C) compound 8 on iNOS, COX-2 and β -actin protein expression in RAW 264.7 cell stimulated with LPS

IV. 요약 및 결론

제주에 자생하고 있는 뽕잎피나무(*Tilia taquetii*) 잎 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고, 화합물을 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물의 항염 활성, 주름개선 효과를 검색하여 천연 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보 고자 본 연구를 진행하게 되었다.

뽕잎피나무 잎 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획 하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다. 이들 중 ethyl acetate fraction에 대해 vacuum liquid chromatography(VLC), Sephadex LH-20 및 순상 silica gel column chromatography를 수행하여 1D, 2D NMR을 이용해 화합물의 구조를 확인하였고 문헌과 비교하여 총 9개의 화합물을 분리·동정 하였다.

분리된 화합물은 phytol (1), chlorophyll c1 (2), *epi*-catechin (3), isoquercitrin (4), 3,12,13-trihydroxyoleanan-28-oic acid (5), oleanolic acid (6), arjunolic acid (7), maslinic acid (8), daucosterol (9)로 확인되었 다. 이들은 중 *epi*-catechin (3)을 제외하고, 모두 뽕잎피나무에서 처음으로 분 리된 화합물이다. 그 중 화합물 5 (3,12,13 - trihydroxyoleanan-28-oic acid)은 1D, 2D NMR data를 통해 triterpenoid 계열의 신규화합물로 예상하 고, 화합물에 대한 더 정확한 정보를 수집하기 위해 ESI MS, polarimeter의 data를 분석하였고, 그 결과 참고문헌²⁸⁾을 통하여 합성으로는 논문상에 보고 된 바 있으나 천연물에서는 처음으로 분리된 신물질로 결론지었다. 신규화합물을 포 함한 총 9개의 분리 화합물에 대한 생리활성 실험을 수행하였다.

항산화 활성 검색 결과 추출물, ethyl acetate 및 *n*-butanol fraction에서 좋 은 DPPH radical 소거 활성을 보였다. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활 성 실험에서는 compound 3, 4, 8의 SC₅₀ 값이 5.41 μ g/mL, 12.41 μ g/mL, 9.75 μ g/mL로 대조군인 vitamin C(5.71 μ g/mL)와 유사한 활성이 있음을 확 인하였다.

주름개선 효과를 보는 elastase 저해 활성 실험에서는 추출물 및 분획물의 활 성은 거의 없었으나, 분리된 화합물 중 compound 6, 8의 IC₅₀ 값이 43.6 μ

g/mL, 89.52 μ g/mL로 대조군인 oleanolic acid(44.94 μ g/mL), ursolic acid(32.74 μ g/mL)와 유사한 값으로 좋은 활성이 있음을 확인하였다. 그 중 compound 6은 oleanolic acid로 구조동정 되었으며, oleanolic acid와 ursolic acid와 구조적으로 유사성을 갖음으로 좋은 활성이 나타났음을 확인 할 수 있었다.

사람 섬유아세포(CCD-986sk)를 이용한 실험에서는 ethyl acetate 분획물과 분리된 화학물 중 compound 7, 8에서 농도 의존적으로 셀 증식효과를 나타내어 프로콜라겐 측정을 해보았으나 프로콜라겐 증식 효과는 나타나지 않았지만, collagenase(MMP-1) 활성 실험 결과, 모두 농도 의존적으로 MMP-1 생성이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다.

항염 활성 검색에서 추출물 및 분획물에 대한 RAW 264.7 cell을 이용한 NO 생성 억제 실험에서는 추출물, ethyl acetate layer에서 세포독성 없이 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 분리된 화합물의 항염 실험에서는 compound 1, 7, 8이 세포 독성 없이 NO 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있었으며, 초기 염증 인자인 사이토카인 측정에서도 마찬가지로 IL-6와 IL-1 β 를 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 NO와 사이토카인 억제는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 억제를 통해 이루어졌다는 사실을 Western blotting 실험을 통하여 확인 할 수 있었다.

신규화합물인 compound 5에서는 별 다른 생리활성이 나타나지 않았다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 뽕잎피나무 잎을 이용한 주름개선, 항산화 및 항염 활성에 효과가 있는 천연 기능성 화장품 소재로의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 1) Tsuji, N., S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa. "The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity" *Photochem. Photobiol*, **2001**, *74*, 283–290.
- 2) Kligman, D. *Cosmeceuticals. Dermatol. Clin.* **2000**, *18*, 609–615.
- 3) Kim, Y. G., Y. H. Lee, M. K. Kang, B. H. Lee, J. K. Yun, S. B. Kim, and C. J. Kim. "Preparation of functional cosmetics containing β -carotene derived from recombinant *Escherichia coli* and evaluation of anti-wrinkle efficacy by clinical testing" *Korean J. Microbiol. Biotechnol*, **2009**, *37*, 399–404.
- 4) Getoff, N. "Anti-aging factors in life: the role of free radicals" *J. Rad. Phys. Chem*, **2007**, *76*(10), 1577.
- 5) Christine, M., Choi, M. D., Diane, S. and Berson, M.D. "Cosmeceuticals" *Semin Cutan Med Surg*, **2006**, *25*(3), 163.
- 6) 대한 피부과 교과서 편찬위원회 "피부과학, 4개정판" 여문각, 서울, **2001**, *p.* 24.
- 7) Li JJ, Dong Z, Dawson MI, Colburn NH. "Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids the transrepress AP-1 without transactivation retinoic acid response element" *Cancer Res*, **1996**, *56*, 483–489.

- 8) Huang C, Ma WY, Dawson MI, Rincon M, Flavell RA, Dong Z. "Blocking activator protein 1 activity, but not activation retinoic response effect of retinoic acid" Proc Acad Sci, **1997**, *94*, 5826–5832.
- 9) A. Hashem, K. Y. Jun, E. Y. Lee, S. Y. Lim, H. Y. Park Choo, and Y. J. Kwon. "A rapid and sensitive screening system for human type I collagen with the aim of discovering potent anti-aging or anti-fibrotic compounds" Mol. Cells OS, **2008**, *26*(6), 625.
- 10) W. M. Yang, H. M. Kim, M. S. Chang, W. S. Park, W. N. Kim, S. W. Kim, D. G. Choi, H. C. Lee, Y. K. Kim, and S. K. Park. "Effects of ethanol extract of *Nelumbo nucifera* leaves on anti-oxidation and type I procollagen expression in CCD-986sk cell" The Korean Journal of Oriental Medical Prescripton, **2006**, *14*(2), 67.
- 11) Gwan Sub, Jin Hwa Kim et al. "Anti-Oxidative and Inhibitory Effect of Saussurea involucreta on MMP-1 in UVA-irradiated Human Dermal Fibroblast" J. Soc. Cosmet. Scientists Korea, **2005**, *31*(4), 329–35.
- 12) Liao JF, Chiou Wf, Shen YC, Wang GJ, Chen CF. "Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (Wuzhuyu) and its major bioactive components" Chinese Med, **2011**, *6*, 1–8.
- 13) Funk CD. "Prostaglandins and leukotrienes" Advances in eicosanoid biology Science, **2011**, *294*, 1871–1875.

- 14) Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T. "Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages" *J. Immunol*, **1990**, *144*, 1425-1431.
- 15) Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T, Huez G. "Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences" *J. Inflamm*, **1995-1996**, *46*, 1-12.
- 16) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology" *Pharmacol. Rev*, **1991**, *43*, 109-142.
- 17) Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. "Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage" *Phytother. Res*, **2003**, *17*, 485-489.
- 18) Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. "The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells" *J. Endotoxin. Res*, **2001**, *7*, 431-438.
- 19) Seybold VS, Jia YP, and Abrahams LG. "Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation, Pain, **2003**, *105*, 47-55.

- 20) 강유미. "뽕잎피나무 가지로부터 향산화 및 미백활성 성분 분리" 제주대학교 대학원, 석사학위논문청구, 2011
- 21) Blois, M. S. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, **1958**, *181*, 1199–1200.
- 22) CY Ragasa, ESC Javier, IG Tan. "Antimutagenic Terpenes and Sterol from *Vitex parviflora*" *Philippine Journal of Science*, **2003**, *132*(1), 21–25.
- 23) CA Schuhr, T Radykewicz, S Sagner, C Latze. "Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy" *Phytochemistry Reviews*, **2003**, *2*, 3–16.
- 24) Endo, Y., R. Usuki, and T. Kaneda. "Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects" *J. of American Oil Chem. Soc.*, **1985**, *62*(9), 1375–1378.
- 25) Endo, Y., R. Usuki, and T. Kaneda. "Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll" *J. of American Oil Chem. Soc.*, **1985**, *62*(9), 1387–1390.
- 26) TS Martin, H Kikuzaki, M Hisamoto. "Constituents of Amomum tsaoko and their radical scavenging and antioxidant activities" **2000**, *77*(6), 667–673.

- 27) JH Lee, CH Ku, N Baek, SH Kim, HW Park. " Phytochemical constituents from *Diodia teres*" Arch Prarm Res, **2004**, *27*(1), 40–43.
- 28) Song YL, Wang YH, Qing L, Qiao HJ, Cheng YX. "Triterpenoids from the Edible Leaves of *Photinia serrulata*" HELVETICA CHIMICA ACTA, **2008**, *91*(4), 665–672.
- 29) W Seebacher, N Simic, R Weis, R Saf. "Complete assignments of 1H and 13C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives" Magn. Reson. Chem. **2003**, *41*, 636-638.
- 30) J Ghosh, J Das, P Manna, PC Sil. "Arjunolic acid, a triterpenoid saponin, prevents acetaminophen (APAP)-induced liver and hepatocyte injury via the inhibition of APAP bioactivation and JNK-mediated mitochondrial protection" Free Radical Biology and Medicine, **2010**, *48*, 535–553.
- 31) H Saimaru, Y Orihara, P Tansakul, YH Kang. "Production of Triterpene Acids by Cell Suspension Cultures of *Olea europaea*" Chem. Pharm. Bull, **2007**, *55*(5), 784–788.
- 32) 김상숙, "새덕이나무 추출물의 활성성분 및 제주 자생식물 에센셜 오일의 항균, 항염 활성 규명" 제주대학교 대학원, 박사학위논문청구, **2011**.
- 33) 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 Pham Res, **2002**, *25*(3), 285–288.

- 34) Hatano, T. "Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species—Tannins and related polyphenols—" *Natural Medicines*, **1995**, *49*, 357–362.
- 35) 이동훈, 손동섭, 조대윤, 김범준. "LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 고삼 뿌리 추출물의 항염증과 항산화 효과" *대한의진균학회지*, **2010**, 제 14권, 제 2호.
- 36) Chwen-Tzuei C; Shyh. H; Shiang.L "Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya Japonica* ex vivo and in vivo" *Food Chemistry*, **2011**, *127*, 1131–1137.

감사의 글

지난 2년 동안의 대학원 석사 생활이 어떻게 지나간지 모를 정도로 시간이 너무 빠르게 흘러간 것 같습니다. 학부를 졸업하고, 대학원에 들어왔을 때 겁도 많이 나고 부족한 부분도 많은 저였지만, 어느덧 시간이 흘러 제 이름으로 석사생활을 마무리를 짓는 논문을 쓰게 되어 감회가 정말 새롭습니다.

먼저, 석사 생활 동안 꾸준히 믿음과 용기를 주시며, 가르침을 주신 이남호 교수님께 진심으로 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 학부시절부터 화학이라는 분야에서 항상 열정을 가지고 가르쳐주시며, 부족한 저를 따뜻하게 감싸주신 화학과 정덕상 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 이선주 교수님, 김원형 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

오래 실험실 생활을 하지 않은 부족한 저에게 실험실 생활을 하며, 논문을 쓰기까지 많은 가르침과 도움과 조언을 아끼지 않으셨던 우리 실험실의 종석 선생님, 태현 선생님, 상숙 선생님, 정미 선생님, 진석 선생님, 지영 선생님께 이 자리를 빌려 정말 정말 감사의 말씀을 드립니다. 같이 실험실 생활을 하지는 않았지만, 만나면 격려를 아끼지 않으시고 반갑게 인사해주시던 미연언니, 주희언니, 바쁘신 데도 실험을 가르쳐 주셨던 려경언니, 언제나 모르는 것이 있으면 하나라도 더 가르쳐 주려하시며, 동생처럼 친근하게 아껴주고 정말 많은 도움을 받았던 정은언니, 하나언니 그리고 많은 조언과 자신의 일처럼 챙겨주시고 가르쳐 주신 상희언니와 유미언니에게 감사하다는 말을 전하며, 같이 실험실 생활을 하면서 많은 즐거움을 주었던 성천오빠, 뒤늦게 들어온 형민오빠, 언제나 반듯한 승리오빠 많이 챙겨주지 못했던 승협이와 실험실 후배들 지미, 필리핀 간 라겸이, 다향이, 희수에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 우리 잊지 못할 졸업 동기들, 특히 대학원에도 다 같이 많이 진학해 더 돈독해지고 친해진 준환오빠, 승훈오빠, 준오 오빠, 그리고 지영이 모두모두 같이 졸업하게 돼서 너무 기쁘고 고맙다는 말을 전하며, 나랑 동기이면서 같이 실험실 생활하며 서로 많이 의지도 하고, 나에

게 모르는 것도 잘 가르쳐 주었던 인정이에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

늘 피곤하다며 집에서는 말 한마디 잘 안해도 묵묵히 응원해주고 힘이 되주었던 우리 부모님, 그리고 하나뿐인 언니, 자주 연락하고 만나지는 못했지만 가끔 봐도 힘이 되고 힐링이 되었던 내 친구들 은지, 희정이, 은성이, 주연이, 규라, 연희, 또 언니이지만 때로는 친구처럼 언제나 편하게 투정도 받아주고 힘이 되주었던 너무너무 고마운 우리 콩치(주연)언니, 1년 동안 대학원 생활을 같이 하게 되며 더 가까워지고 더 친해진 서로 티격태격 많이 다투기도 했지만 의지도 많이 하며 배우기도 하며 대학원생활을 재밌게 마무리할 수 있게 해준 내 친구 켄바(정환이)에게 정말 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로.....

학부생활 4년, 대학원생활 2년의 6년이라는 긴 시간동안 너희가 없었으면 어찌 그 시간들을 견뎌올 까 하는 생각까지 들게 하는 우리 삼총사. 중도 패밀리 은영이, 현아. 가장 젊은 시절 뜨거웠던 시절 그리고 정말 열심히 공부할 수 있던 시절을 너희와 함께 보냈던 것 같아서 잊지 못할 것 같고, 이제 정말 다른 곳에서 따로 또 같이 생활 하게 되겠지만 마음만은 그때 그 열정과 우정 잃지 않고 항상 열심히 생활하는 우리가 되었으면 한다.

고3을 졸업하고 대학에 입학했던 것처럼 지금 석사 과정을 마치게 된 것이 또 하나의 시작에 불과 하다고 생각합니다. 너무 많은 고마운 사람들의 도움이 있었기에 한 걸음 더 성장 할 수 있었던 것 같습니다. 그 마음 항상 잊지 않겠습니다. 아직 배울 것도 더 많기에, 앞으로 더욱 더 열심히 노력하며 어느 자리에서나 필요한 사람이 되도록 최선을 다하겠습니다.

감사합니다.

2013년 1월
김수영 올림.

