



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

비양나무 가지의 항산화, 미백,  
항염 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

韓 正 煥

2014年 2月

# 비양나무 가지의 항산화, 미백, 항염 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

韓 正 煥

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2014年 2月

韓正煥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

2014年 2月

# Identification of Anti-oxidative, Whitening and Anti-inflammatory Constituents from *Oreocnide fruticosa* Branches

Joung Hwan Han  
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2014. 2.

This thesis has been examined and approved.

.....  
.....  
.....

.....  
Date

Department of Chemistry  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

List of Schemes	iv
List of Tables	iv
List of Figure	v
List of Abbreviations	viii
Abstract	x
I. 서론	1
1. 식물의 2차 대사산물(secondary metabolite)	1
2. 천연물을 연구하기 최적의 조건을 갖춘 섬 ‘제주도’	2
3. 끝없이 성장하는 ‘화장품 산업’	2
4. 항산화(anti-oxidant)	3
5. 미백(skin-whitening)	4
6. 항염(anti-inflammation)	5
7. 천연물 연구의 필요성	5
II. 연구과제 : 비양나무 가지 추출물로부터 생리활성 성분 연구	7
1. 재료	7
2. 실험 방법	8
2-1. 시약 및 기기	8
2-2. 비양나무 가지의 추출 및 용매 분획	9
2-3. 활성성분의 분리과정	10
2-3-1. Compound 1, 2의 분리과정	10
2-3-2. Compound 3~7의 분리과정	11
2-4. 활성실험	13
2-4-1. 총 폴리페놀 함량 측정	13
2-4-2. DPPH radical 소거 활성 실험	13

2-4-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험	15
2-4-4. Tyrosinase inhibition 활성 실험	16
2-4-5. 세포배양	17
2-4-6. Melanogenesis 저해 효과 측정	17
2-4-7. Nitric oxide(NO) 생성 저해 효과 측정	18
2-4-8. 세포독성 평가	19
2-4-9. Western blotting	19
3. 결과	21
3-1. 분리된 화합물의 구조 동정	21
3-1-1. Compound 1과 Compound 2의 구조해석	21
3-1-2. Compound 3의 구조해석	29
3-1-3. Compound 4의 구조해석	32
3-1-4. Compound 5와 Compound 6의 구조해석	35
3-1-5. Compound 7의 구조해석	40
3-2. 비양나무 가지 추출물 및 용매 분획물들의 활성 검색	44
3-2-1. 총 폴리페놀 함량 측정 결과	44
3-2-2. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과	45
3-2-3. ABTS radical cation scavenging 활성 검색 결과	46
3-2-4. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과	47
3-2-5. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 결과	47
3-2-6. B16F10 murine melanoma cell에서 intracellular tyrosinase 측정 결과	50
3-2-7. B16F10 murine melanoma cell에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질량 측정 결과	51
3-2-8. RAW264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염 활성 실험 결과	52
3-2-9. Human normal fibroblast cell, Human keratinocyte cell에서의 세포독성 평가 결과	55
3-3. 비양나무 가지에서 분리한 compound들의 활성 검색	56

3-3-1. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과.....	56
3-3-2. ABTS radical cation scavenging 활성 검색 결과.....	57
3-3-3. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과.....	58
3-3-4. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 결과.....	60
3-3-5. RAW264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염 활성 실험 결과.....	62
4. 결론.....	63
5. 참고문헌.....	65

## List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from <i>O. fruticosa</i> branch.....	9
Scheme 2. Isolation of the compounds <b>1</b> and <b>2</b> from <i>O. fruticosa</i> branch..	10
Scheme 3. Isolation of the compounds <b>3</b> , <b>4</b> , <b>5</b> , <b>6</b> , <b>7</b> from <i>O. fruticosa</i> branch.....	12

## List of Tables

Table 1. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compounds <b>1</b> and <b>2</b> .....	23
Table 2. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>3</b> .....	30
Table 3. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>4</b> .....	33
Table 4. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compounds <b>5</b> and <b>6</b> .....	37
Table 5. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>7</b> .....	41
Table 6. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds.....	56
Table 7. SC <sub>50</sub> values of ABTS radical cation scavenging activities of isolated compounds.....	57
Table 8. IC <sub>50</sub> values of tyrosinase inhibition activities of isolated compounds.....	59



## List of Figures

Figure 1. Melanin synthetic pathway.....	4
Figure 2. Picture of <i>Oreocnide fruticosa</i> .....	7
Figure 3. Scavenging of the DPPH radical by phenol.....	14
Figure 4. Scavenging of ABTS <sup>+</sup> radical by an anti-oxidant.....	16
Figure 5. Principle of Griess reagent.....	18
Figure 6. Principle of MTT reagent.....	19
Figure 7. Chemical structure of compound <b>1</b> .....	22
Figure 8. Chemical structure of compound <b>2</b> .....	22
Figure 9. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	24
Figure 10. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	24
Figure 11. <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spectrum of compound <b>1</b> .....	25
Figure 12. HMBC spectrum of compound <b>1</b> .....	25
Figure 13. HMQC spectrum of compound <b>1</b> .....	26
Figure 14. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	27
Figure 15. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	27
Figure 16. <sup>13</sup> C, DEPT-45, 90, 135 spectrum of compound <b>2</b> .....	28
Figure 17. Chemical structure of compound <b>3</b> .....	29
Figure 18. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	31
Figure 19. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	31
Figure 20. Chemical structure of compound <b>4</b> .....	32
Figure 21. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	34
Figure 22. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	34
Figure 23. Chemical structure of compound <b>5</b> .....	36
Figure 24. Chemical structure of compound <b>6</b> .....	36
Figure 25. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	38
Figure 26. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	38

Figure 27. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	39
Figure 28. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	39
Figure 29. Chemical structure of compound <b>7</b> .....	40
Figure 30. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>7</b> .....	42
Figure 31. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>7</b> .....	42
Figure 32. HMBC spectrum of compound <b>7</b> .....	43
Figure 33. Calibration curve for quantification of total phenolic compounds .....	44
Figure 34. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers·	44
Figure 35. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.....	45
Figure 36. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.....	45
Figure 37. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent layers.....	46
Figure 38. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent layers.....	46
Figure 39. Melanin contents and cytotoxicities of extract and solvent layers.....	48
Figure 40. Melanin contents and cytotoxicities of ethyl acetate layer.....	49
Figure 41. Intracellular tyrosinase inhibition of extract and solvent layers .....	50
Figure 42. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and β-actin protein expression.....	51
Figure 43. Calibration curve for quantification of nitric oxide.....	52
Figure 44. Nitric oxide production and cytotoxicities of extract and solvent layers.....	53
Figure 45. Nitric oxide production and cytotoxicities of ethyl acetate layer.....	54
Figure 46. Cytotoxicities of extract and solvent layers in CCD-986sk cell.....	55
Figure 47. Cytotoxicities of extract and solvent layers in HaCaT cell.....	55

Figure 48. DPPH radical scavenging activities of compounds <b>5</b> , <b>6</b> and vitamin C.....	57
Figure 49. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of compounds <b>5</b> , <b>6</b> and vitamin C.....	58
Figure 50. Tyrosinase inhibition activities of compounds <b>7</b> and arbutin...	59
Figure 51. Melanin contents and cytotoxicities of compounds <b>1-7</b> .....	60-61
Figure 52. Nitric oxide production and cytotoxicities of compound <b>1-7</b> ..	62

## List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BSA	Bovine serum albumin
CC	Column chromatography
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform- <i>d</i>
CD <sub>3</sub> OD	Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>
COSY	Correlation spectroscopy
COX-2	Cyclooxygenase-2
<i>d</i>	Doublet
DCT	Dopachrome tautomerase
<i>dd</i>	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimethylsulfoxide- <i>d</i> <sub>6</sub>
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanine
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	The enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
Fr.	Fraction
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HRP	Horse radish peroxidase
IC <sub>50</sub>	Inhibitory concentration of 50%
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
<i>int</i>	Integration
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LPS	Lipopolysaccharide
MSH	Melanocyte stimulating hormone
MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane

NMR	Nuclear magnetic resonance
NPS	Normal phase silica gel
<i>O. fruticosa</i>	<i>Oreocnide fruticosa</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethane sulfonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RP	Reversed phase
s	Singlet
SC <sub>50</sub>	Scavenging concentration of 50%
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TLC	Thin layer chromatography
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TRP	Tyrosinase related protein
TTBS	Tween 20 in tris buffered saline
UV	Ultraviolet
Vit.C	Vitamin C
VLC	Vacuum liquid chromatography

## Abstract

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

From repeated fractionation procedures, seven compounds were isolated from *Oreocnide fruticosa* branches; friedelin (1), friedelanol (2), 5,7-dihydroxychromone (3), methyl vanillate (4), catechin (5), *epi*-catechin (6) and scopoletin (7). The structures of these compounds were confirmed by comparing their spectroscopic data to those in the literature. All of these compounds (1-7) were isolated for the first time from *O. fruticosa*. In addition, the extract and isolated compounds were examined for anti-oxidative, whitening and anti-inflammatory activities.

For the anti-oxidative activity test, the compounds 5 and 6 showed good DPPH radical scavenging activities with  $SC_{50}$  of 40.05 and 29.92  $\mu\text{M}$  respectively, whose activities were comparable to a positive control vitamin C ( $SC_{50}$  46.23  $\mu\text{M}$ ). In addition, compounds 5, 6 and 7 showed good ABTS radical cation scavenging activity with  $SC_{50}$  of 7.56, 7.21, 64.04  $\mu\text{M}$  respectively, showing comparable activity to vitamin C ( $SC_{50}$  31.32  $\mu\text{M}$ )

On the tyrosinase inhibition activity test, the compound 7 showed good inhibitory activity with  $IC_{50}$  111.80  $\mu\text{M}$ , whose activities were more potent than a positive control arbutin ( $IC_{50}$  209.68  $\mu\text{M}$ ).

For the anti-inflammatory activity test, the compound 7 showed inhibitory activity with 48.5% at 300  $\mu\text{M}$ , without showing any cytotoxicity.

Based on these results, *O. fruticosa* branches extract could be potentially applicable as cosmeceutical ingredient.

# I. 서론

## 1. 식물의 2차 대사산물(secondary metabolite)

모든 생물체는 살아가는 동안 에너지를 포함하여 생존에 필요한 물질들을 만들기 위해 이화작용(catabolism)과 동화작용(anabolism)을 반복한다. 이러한 작용 중 중간 대사의 과정에서 생기는 물질이 대사산물(metabolite)이다.

1차 대사산물은 생물의 생명활동에 필수적인 물질을 공급하는 대사의 산물이며 일반적으로 당, 아미노산, 핵산, 지질 및 그들의 중합체와 같이 모든 생물에 보편적으로 존재하고, 생명유지에 있어 기본적인 역할을 하는 물질이다.

2차 대사산물은 세포의 분열, 성장유지 등과 같은 기능역할과는 관련이 없으나 식물체가 주위환경과 외부의 병해충 침입 및 공격에 대항하여 생존하기 위해 생성하는 방어물질이다. 이들 각각은 특유의 생리활성을 가지지만 기본 대사과정에는 관여하지 않는 알칼로이드(alkaloids), 테르페노이드(terpenoids), 페놀류(phenols), 항생물질(antibiotics), 색소(pigment) 등의 화합물이다. 이러한 2차 대사산물 중 특정 약리성분을 가지는 것은 많은 연구를 거쳐 다양한 약품으로 사용되어지고 있는데, 대표적인 예로는 주목나무 껍질에서 분리하여 항암제로 이용되고 있는 탁솔(taxol)과 버드나무 수피에서 분리하여 해열, 진통제로 이용되고 있는 살리실산(salicylic acid)이 있다. 이러한 천연물의 2차 대사산물을 이용하기 위한 노력은 18세기말부터 본격적으로 시작이 되었고, 천연물의 기능성과 화학구조의 규명, 생물활성의 탐색 그리고 효과적인 생산에 대한 연구가 진행이 된 후에 천연물의 기능성이 확인이 되면 그 효능에 따라서 천연물의약, 고기능성 식품, 화장품 및 살충제등의 고부가가치의 상품으로 활용이 되어왔다.

지구상에는 250,000~500,000종의 식물이 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 식물이 갖고 있는 2차 대사산물은 매우 다양하다. 그렇지만 아직 식물 가운데 극히 일부만이 식물화학적으로 연구되었을 뿐이다.<sup>1)</sup>

## 2. 천연물을 연구하기 최적의 조건을 갖춘 섬 ‘제주도’

대한민국 최남단에 위치한 섬인 제주도는 학술, 문화, 관광, 생태 등의 가치와 중요성을 인정받아 유네스코가 인증하는 자연과학분야에서 세계 유일하게 트리플 크라운(생물권 보전지역, 세계자연유산, 세계지질공원)을 달성하고, 2011년 뉴세븐원더스 재단에서 실시한 투표에서 세계 7대 자연경관으로 선정이 된 청정(淸淨)자연을 품고 있는 생태의 보고이다.

제주도는 남쪽에 위치하고 근해에 난류가 흐르기 때문에 온대 기후를 이루고 있으며 연중 온난하여 제주도 지역의 연평균 기온은 15.3℃이고, 서귀포 지역은 이보다 더 높으며 대한민국에서는 연교차가 가장 적은 해양성 기후를 보이고 있다. 또한 연강수량도 1,500~1,800 mm를 보여 대한민국의 최다우지에 속하고 있다. 눈은 해발 200 m 이하의 해안 저지대에는 대개 내리자마자 녹아버려 잘 쌓이지 않지만, 해발 1,000 m 이상의 한라산의 고지대에는 상당히 많은 눈이 내리고 쌓이며 5월 까지도 눈이 녹지 않고 쌓일 때가 있다.<sup>2,3)</sup>

제주도의 식물분포는 아열대·온대·한대식물 등 3대에 걸쳐 수직으로 분포한다. 제주도의 해안 지역은 연중 대부분의 기간 동안 영상의 기온을 유지하는 아열대성 기후가 나타나며, 상록 활엽수의 자생지가 있다. 제주도의 중산간 일대에는 넓은 초지가 있어 말을 방목하고, 한라산 정상까지 높이 올라갈수록 낙엽 활엽수와 관목림 지역 그리고 침엽수림 지역이 차례로 나타난다. 이러한 환경의 제주도에는 식물자원 2,100여종(약용식물 338종), 해양자원 2,000여종, 동물 및 곤충 3,700여종 등 7,800여종 이상의 생물종이 다양하게 분포하고 있다.<sup>4)</sup> 사면이 바다로 둘러싸여 있어 한반도와는 구별이 되는 독특한 특색을 갖추고, 생물의 종이 다양한 제주도는 천연물을 연구하기 최적의 조건을 갖춘 섬이라고 할 수 있다.

## 3. 끝없이 성장하는 ‘화장품 산업’

아름다운 것을 좋아하고 아름다움을 추구하는 것은 인간의 본능이다. 과학기술



발전에 따른 소득수준의 향상과 생활수준의 향상으로 이러한 본능은 더욱 표면화 되고 있는데, 그 중 하나가 ‘외모’에 대한 것이다. 외모는 자신을 표현하는 중요한 요소이자 경쟁력으로 받아들여지고 있으며 외모에 대한 노력은 자기 자신을 타인에게 적절하게 제시하기 위해 신체적, 정신적, 물리적으로 시간과 비용을 투자하는 등 자신의 경쟁력을 높이기 위한 것들로 받아들여지고 있으며 결점이나 외모에 대한 콤플렉스를 극복하기 위해 다양한 방법들이 시행되어지고 있다. 또한, 예전에는 외모에 거의 신경을 쓰지 않던 남성들이 최근에는 외모에 대한 의식 변화와 관심 증가로 인해 아름다움에 대한 욕구가 지속적으로 증가하여 외모관리를 즐기는 남성들이 증가하고 있고, 이에 따라 관련 소비시장은 끝없이 성장하고 있다.<sup>5,6)</sup>

화장품 산업은 아름다움에 대한 욕구를 바탕으로 지금까지 지속적으로 발전해 왔다. 최근 화장품 시장에 새로운 변화의 바람은 인간의 이러한 꿈의 실현 가능성을 더욱 높여주고 있다. 첨단 기술에 의해 탄생한 신개념의 기능성 화장품이 속속 등장하면서 기능성 화장품의 전성시대를 맞고 있다. 이러한 움직임은 앞으로 꾸준히 지속될 것으로 전망 된다.<sup>7)</sup>

#### 4. 항산화(anti-oxidant)

피부노화의 원인은 여러 가지가 있겠지만 그 중에서 여러 가지 장애나 노화물질의 축적에 의해서 진행된다고 주장하는 환경기인설(environmental etiology)이 많은 사람들의 지지를 받고 있다. 피부는 산소나 자외선 및 유해물질 등의 외부환경에 항상 노출되어 있으므로 피부의 노화는 외부인자들의 영향에 의한 것이라고 할 수가 있다.<sup>8)</sup> 특히 산소는 대사 과정에서 일부분이 superoxide radical( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), hydroxy radical( $HO^{\cdot}$ ), singlet oxygen( $^1O_2$ )과 같은 활성산소(oxygen free radical)로 변해 피부노화에 한몫을 하게 된다. 이러한 작용을 피부 세포의 산화라고 하기 때문에 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제는 피부노화 방지효과를 기대할 수가 있다. 본 연구에서는 DPPH radical과 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능력을 측정함으로써 항산화 능력을 조사하였다.

## 5. 미백(skin-whitening)

피부는 외부환경으로부터 몸을 보호하는데, 피부의 표피에 있는 melanocyte는 melanin을 생성함으로써 햇빛으로부터 몸을 보호하고, 체온조절을 하기도 한다. Melanin은 생물에 널리 분포되어 있는 색소로 melanin의 양, 질 그리고 분포에 의하여 동물의 피부, 머리카락, 눈 등의 색이 결정된다.<sup>9)</sup> 이러한 melanin이 과잉 생산이 되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소 침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하며 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup>

Melanin이 생성되는 과정을 살펴보면 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2(DCT)가 아주 중요하게 작용하는 것을 볼 수 있다(Figure 1). 따라서 본 연구에서는 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2(DCT)의 양을 측정함으로써 미백효능을 평가하였다.

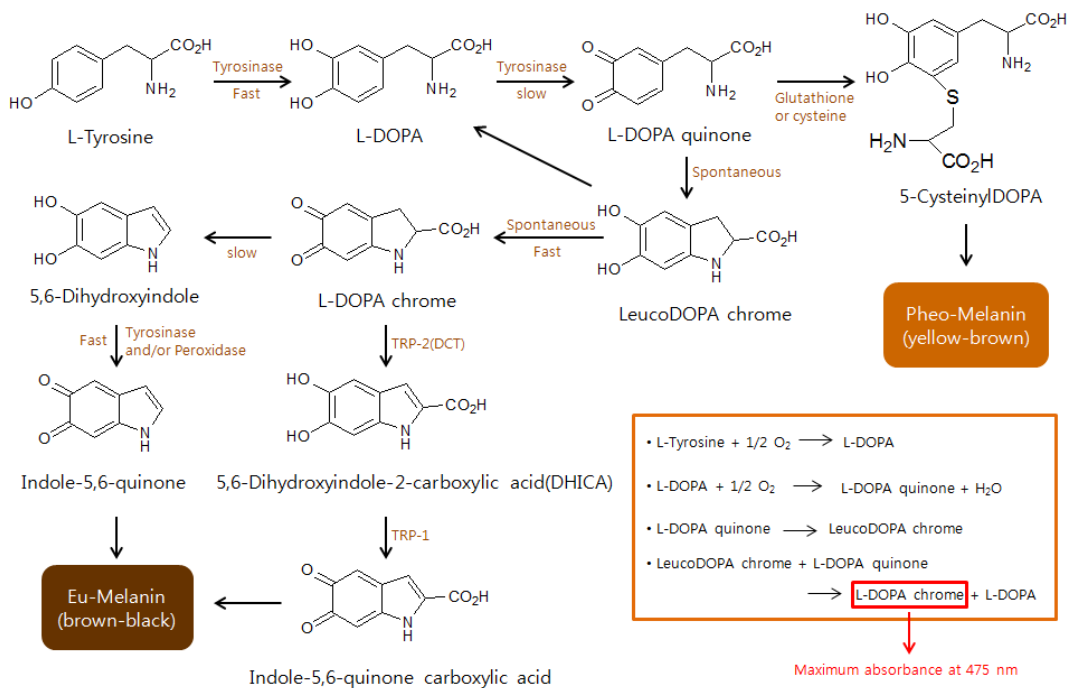


Figure 1. Melanin synthetic pathway

## 6. 항염(anti-inflammation)

염증반응은 생체나 조직에 물리적인 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이다. 그렇지만 과도한 염증반응은 영구적인 조직 손상을 초래하고, 암, 알츠하이머, 관절염, 당뇨병 등과 같은 질병들을 유발시킬 수도 있다.

염증반응은 동물 체내 모든 조직에 분포하여 면역을 담당하는 대식세포(macrophage)에서 일어난다. 박테리아의 세포벽을 구성하고 있는 LPS(lipopolysaccharide)가 대식세포를 자극하면 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등을 증가시키면서 COX-2효소에 의해 prostaglandin을 생성하고, iNOS에 의해 nitric oxide가 생성이 되어 염증반응에 관여하게 된다. 따라서 본 실험에서는 염증 매개 물질인 nitric oxide를 측정함으로써 염증반응을 얼마나 저해하는지를 측정하였다.

## 7. 천연물 연구의 필요성

최근 불법 스테로이드 화장품 등 일련의 안전성을 이슈로 소비자들의 화장품 안전에 대한 인식 및 관심이 확대되고 있고, 정부에서도 화장품의 안전성을 보장하면서도 과도한 규제를 개선하는 방향으로 화장품 법을 개정하고 있는 실정이다.<sup>11)</sup>

현재 사용하는 화장품 소재들은 불안정하거나 효능이 약한 단점을 갖고 있는 것이 많아 이를 개선하기 위한 목적으로 다양한 소재들이 개발되고 있다. 소재 개발은 크게 두 가지 방향에서 접근이 이루어지는데, 첫째는 피부과학이나 약학, 생명과학 등 인접기술 분야에서 그 효능이 알려진 물질을 화장품에 적합하게 도입하는 방법이고, 둘째는 한방 생약재 및 천연물 등으로부터 효능물질을 추출하거나 정밀화학, 생명과학 기술을 응용하여 신물질을 개발하여 효능을 찾아가는 방법이다.<sup>12)</sup> 이들 중 효능이 알려진 물질을 화장품에 도입하는 데는 효능이 알려

진 물질들이 한정되어 있고, 신물질을 개발하는 데는 구조적인 면에서 모방의 한계를 벗어나기 어렵다는 문제점이 있다. 반면에 천연물로부터 효능물질의 추출 및 분리기술의 진보와 첨단 분석기기의 출현에도 불구하고 그 화학성분과 생리활성이 연관되어 체계적으로 연구된 식물은 소수에 불과하여 식물이나 미생물 유래의 천연물에서 발견될 수 있는 물질들은 아직까지도 알려져 있지 않은 새로운 골격의 화학구조가 존재할 가능성이 높아 연구개발의 가능성은 무궁무진하다.<sup>13)</sup>

따라서 본 연구에서는 청정의 섬 제주도에서 약 5 km 정도 떨어진 곳에 위치한 작고, 아름다운 섬인 ‘비양도’에 자생하는 식물인 ‘비양나무’를 분리·정제하여 인체에 부작용이 적고 안정성이 높은 생리활성 물질 탐색에 목적이 있다.

비양나무(*Oreocnide fruticosa* (Gaudich.) Hand.-Mazz.)는 바위모시라고도 알려졌으며 쐐기풀과(urticaceae) 비양나무속에 속하는 낙엽관목으로 줄기는 곧추서서 2 m정도 자라고 작은 가지는 가늘고 암자색을 띠며, 어린 가지에는 가는 털이 있다. 잎의 가장자리에는 톱니가 있고, 그 끝은 얇고 윗면은 약간 거칠며 마르면 검게 변한다. 꽃은 이른 봄에 피며 암·수 딴 그루이다.

현재까지 비양나무에서 분리 보고된 활성성분은 없으며, 이에 본 연구에서는 비양나무 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 유효성분을 분리하여 구조를 동정하였다.

## II. 연구과제 : 비양나무 가지 추출물로부터 생리활성 성분 연구

### 1. 재료

비양나무는 2011년 6월 한라수목원에서 채집하였고, 채집한 비양나무의 가지를 분류하여 추출하였다. 비양나무의 학명은 *Oreocnide fruticosa*이며 바위모시라고도 한다. 비양나무는 켄치과(Urticaceae) 비양나무속(Oreocnide)으로 일본, 중국, 히말라야에 분포하고 국내에는 유일하게 제주도의 청정섬인 비양도의 분화구에 약 100 m<sup>2</sup>의 면적에 군락을 이루는 형태로 한정 분포된 식물로 제주도기념물 제48호로 지정되어 있다.

실험에 사용한 비양나무(시료번호 : 320)는 연구가 거의 되어있지 않았고, 특히 비양나무에서 분리 보고된 활성성분 또한 선행연구가 되어있지 않았다.



Figure 2. Picture of *Oreocnide fruticosa*

## 2. 실험 방법

### 2-1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 DAEJUNG chemical 및 OCI의 제품을 사용하였다. VLC(Vacuum Liquid Chromatography)에는 silica gel(2-25  $\mu\text{m}$ , Sigma Co.), normal-phase silica gel CC(Column Chromatography)에는 silica gel(95-110  $\mu\text{m}$ , Merck Co.)을 사용하였고 reversed-phase silica gel CC에는 silica gel RP-18(230-400 mesh, Merck Co.)을 사용하였다. 분리과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminum sheet(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서의 spot의 확인은 UV lamp(254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO<sub>4</sub> 수용액 (3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH을 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 Sunrise<sup>TM</sup>(Tecan Co.)를 이용하였다.

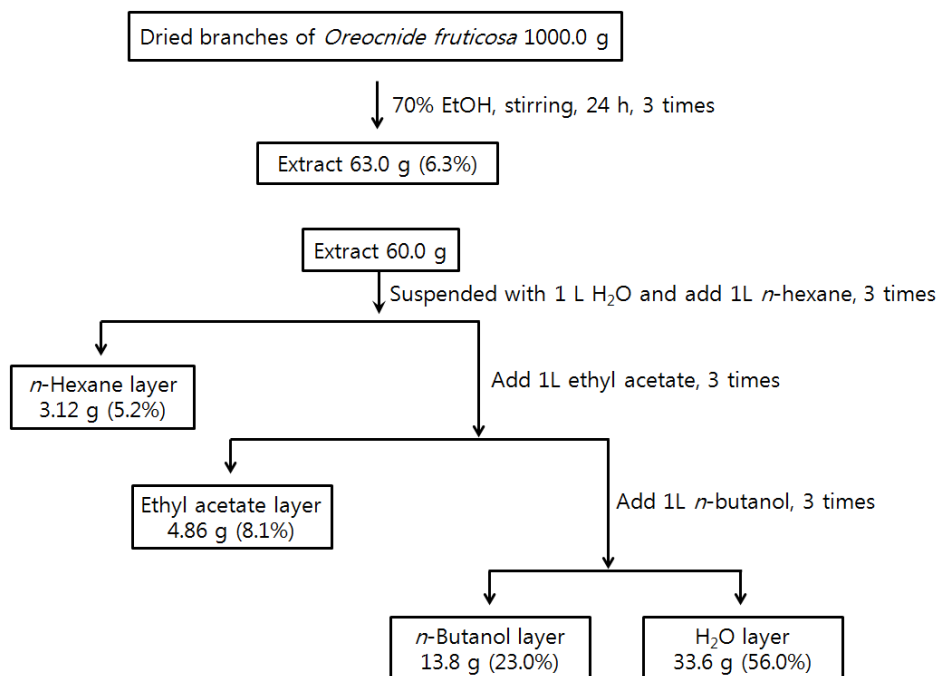
구조분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance) spectrometer는 JNM-ECX 400(FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용용매로 CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, pyridine-*d*<sub>5</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>를 사용하였다.



## 2-2. 비양나무 가지의 추출 및 용매 분획

비양나무 가지를 추출하기 위해 그늘에서 자연환기에 의존하여 잘 말리고, 시료를 잘게 자른 후 추출을 하였다. 추출은 비양나무 가지의 건조무게 1.0 kg의 20배 정도인 70%(v/v) 함수에탄올에 넣고 실온에서 24시간 씩 교반을 하여 추출하였다. 추출액은 whatman 여과지를 이용하여 감압 여과 장치를 이용해 여액만 취하고, 잔사는 동일한 방법으로 2회 더 반복 추출하였다. 이렇게 얻은 여액은 40°C 이하의 물중탕에서 회전 감압 농축장치(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% ethanol 추출물 63.0 g을 얻었다.

얻어진 70% ethanol 추출물을 증류수 1 L에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O fraction을 얻었다. 이러한 방법으로 70% ethanol 추출물 60.0 g을 분획하였고, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O fraction 각각 3.12 g, 4.86 g, 13.8 g, 33.6 g을 얻었다(scheme 1).

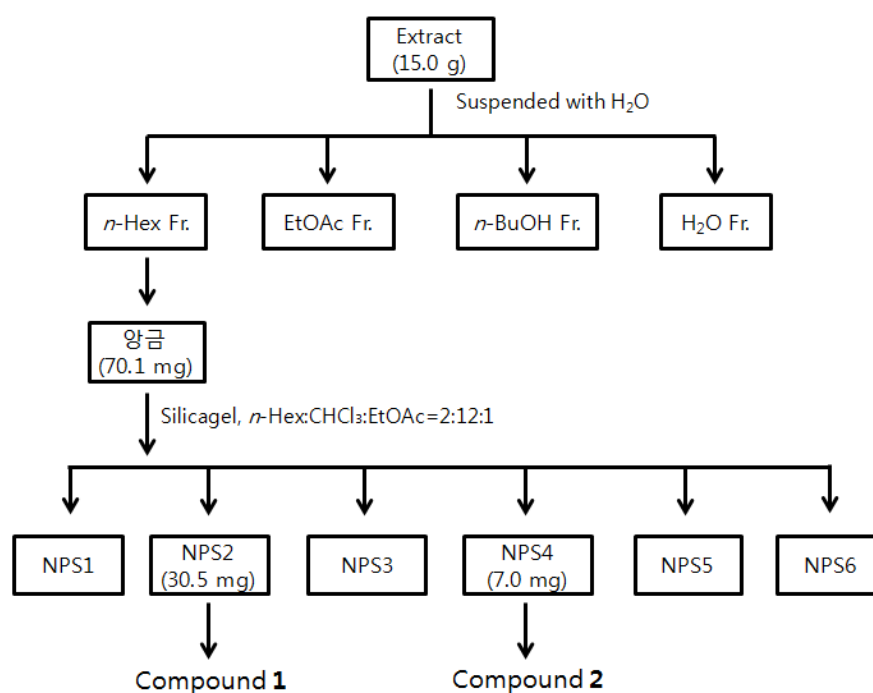


Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from *O. fruticosa*

## 2-3. 활성성분의 분리과정

### 2-3-1. 비양나무 가지의 *n*-Hex 분획물에서 compound 1, 2의 분리과정

용매분획 후 얻어진 *n*-Hex 분획물을 실온에 1~2일 정도 방치하였더니 상아색의 침전물 70.1 mg이 생성되었다. TLC(Thin Layer Chromatography) 분석 결과 혼합물인 것으로 판단되어 TLC 분석을 통해 silica gel column chromatography를 수행하기 위한 용매조성을 정하였다. 상아색의 침전물 70.1 mg을 *n*-Hex:CHCl<sub>3</sub>:EtOAc=2:12:1의 용매조성으로 silica gel column chromatography를 수행하여 TLC 분석을 통해 패턴이 비슷한 것들을 모아 총 6개의 fraction으로 나누었다. 이 중 NPS(normal phase silica gel)2 30.5 mg은 compound 1로 확인이 되었고, NPS4 7.0 mg은 compound 2로 확인되었다 (scheme 2).



Scheme 2. Isolation of the compounds 1 and 2 from *O. fruticosa* branch



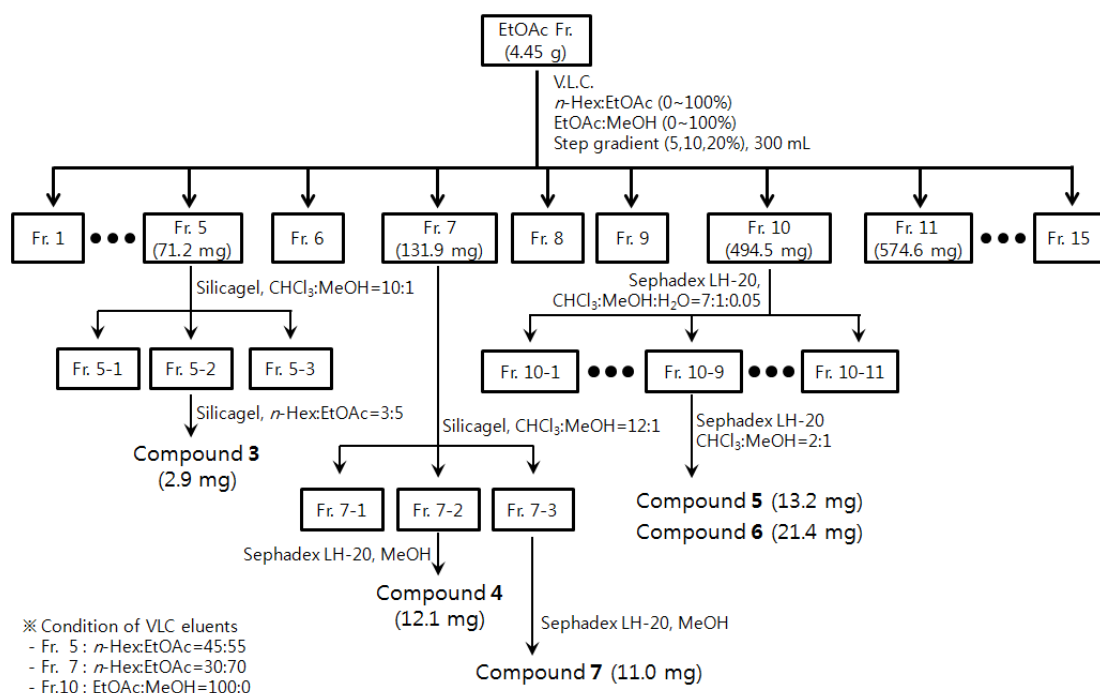
## 2-3-2. 비양나무 가지의 ethyl acetate 분획물에서 compound 3, 4, 5, 6 및 7의 분리과정

Ethyl acetate 분획물을 극성별로 세분화하기 위해 VLC(vacuum liquid chromatography)를 수행하였다. Ethyl acetate 분획물 4.45 g을 적량의 silica gel에 흡착시키고, 이를 silica gel로 충전한 VLC column에 얇고 평평하게 loading하였다. *n*-Hex-EtOAc(0~100%), EtOAc-MeOH(0~100%)의 용매를 step gradient 방법으로 극성을 5, 10, 20%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 15개의 fraction을 얻었다.

VLC fraction들 중 Fr.5 71.2 mg을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=10:1의 용매조건으로 silica gel column을 수행하여 TLC check를 한 후에 spot들의 패턴이 비슷한 것들끼리 모아 3개의 fraction으로 나누었고, 그 중 Fr.5-2를 *n*-Hex :EtOAc=3:5의 용매조건으로 silica gel column을 수행하여 compound 3(2.9 mg)을 얻었다.

Fr.7 131.9 mg을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=12:1의 용매조건으로 silica gel column을 수행하여 TLC check를 한 후에 spot들의 패턴이 비슷한 것들끼리 모아 3개의 fraction으로 나누었다. 그 중 Fr.7-2를 MeOH에 녹여 sephadex LH-20 column을 수행하여 compound 4(12.1 mg)를 얻었고, Fr.7-3을 MeOH에 녹여 sephadex LH-20 column을 수행하여 compound 7(11.0 mg)을 얻었다.

Fr.10 494.5 mg을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=7:1:0.05의 용매조건으로 sephadex LH-20 column을 수행하여 TLC check를 한 후에 spot들의 패턴이 비슷한 것들끼리 모아 11개의 fraction으로 나누고, Fr.10-9를 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=2:1조건으로 sephadex LH-20 column을 내려 compound 5(13.2 mg)와 compound 6(21.4 mg)을 얻었다(scheme 3).



Scheme 3. Isolation of the compound 3, 4, 5, 6, 7 from *O. fruticosa* branch

## 2-4. 활성실험

### 2-4-1. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법<sup>14)</sup>을 약간 변형하여 실시하였다. Calibration curve는 gallic acid 표준용액을 1 mg/mL의 농도로 제조를 하고, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 희석하여 작성하였다. 먼저, 각 시료들을 1 mg/mL의 농도로 제조를 하였다. 그리고 농도별로 희석한 gallic acid 표준용액과 시료를 100 µL씩 취하여 증류수 900 µL를 넣어 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 첨가하여 실온에서 약 3분정도 반응을 시키고, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 (7%, w/v) 200 µL를 가하여 혼합한 후 증류수 700 µL를 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 뒤 상등액을 취하여 ELISA reader를 사용해 700 nm에서 흡광도를 측정하고 폴리페놀 함량으로 환산하였다.

### 2-4-2. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 515 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해 주는 전자 공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색이 점점 없어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거 활성을 측정 할 수 있다(Figure 3).

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois방법<sup>15)</sup>을 응용하여 다음과 같이 실행하였다.

먼저 EtOH:DMSO=1:1의 용매를 만들어 시료를 1 mg/mL의 농도로 녹이고

이를 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL의 농도로 희석한다. DPPH시약은 잘 녹지 않기 때문에 DMSO를 이용하여 2 mM의 농도로 녹여준 뒤 이를 EtOH을 갖고 0.2 mM로 희석하여 사용한다. 시료와 DPPH시약의 준비가 끝나면 96 well plate에 시료를 20  $\mu$ L씩 넣고 multi pipette을 이용하여 DPPH 시약 180  $\mu$ L를 넣어 상온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거율(%)을 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 DPPH radical을 50% 감소시킬 때의 농도(SC<sub>50</sub>)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect(\%)} = \left[ 1 - \frac{B-C}{A} \right] \times 100$$

A : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

B : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

C : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

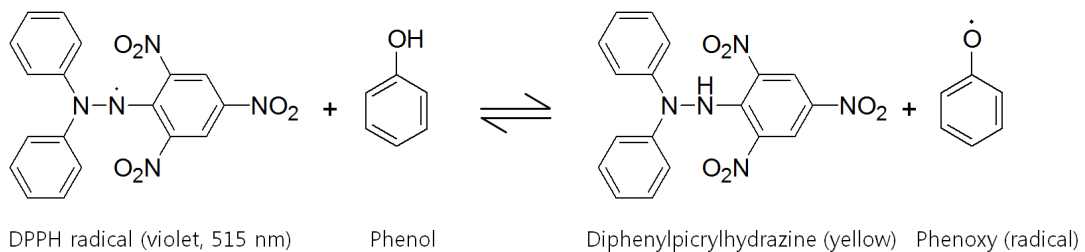


Figure 3. Scavenging of the DPPH radical by phenol

### 2-4-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험

Total antioxidant capacity(TAC)의 측정방법 중의 한 가지로 산화되어 청록색을 띄는 ABTS radical cation이 환원이 되면 무색의 ABTS가 되는데, 이 때 흡광도의 변화를 측정하여 항산화 능력을 측정하는 방법이다(Figure 4).

ABTS radical cation 소거 활성은 Re & Pellegrin 등의 방법<sup>16)</sup>을 응용하였고, 실험은 다음과 같이 진행하였다.

7.0 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 16시간 이상 차광상태에서 반응을 시켜 ABTS radical cation을 만들고, 이 ABTS용액을 ethanol에 희석하여 700 nm에서 흡광도가  $0.78 \pm 0.002$ 가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20  $\mu$ L와 ABTS 180  $\mu$ L를 혼합하여 15분간 차광상태에서 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거율(%)을 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 ABTS<sup>+</sup> radical을 50% 감소시킬 때의 농도(SC<sub>50</sub>)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect(\%)} = \left[ 1 - \frac{B-C}{A} \right] \times 100$$

A : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

B : 700 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

C : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

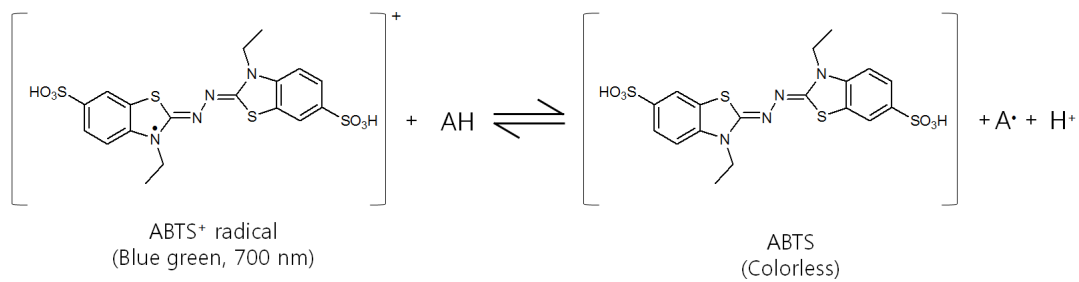


Figure 4. Scavenging of ABTS<sup>+</sup> radical by an anti-oxidant

#### 2-4-4. Tyrosinase inhibition 활성 실험

Tyrosinase inhibition 활성 실험은 mushroom tyrosinase를 이용한 DOPA chrome법<sup>17)</sup>을 응용하여 측정하였다. 먼저, 시료를 1 mg/mL의 농도로 녹이고 이를 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL의 농도로 희석하고, 실험에 사용할 기질인 L-tyrosine은 2 mM의 농도로 제조한다. 준비가 끝나면 96 well plate에 시료를 20  $\mu$ L씩 넣고 L-tyrosine 70  $\mu$ L 그리고 potassium phosphate buffer(pH 6.8) 60  $\mu$ L를 넣어 ELISA reader에서 492 nm로 측정하여 시료와 사용된 용매의 흡광도 값을 구한다. 후에 각 well에 2500 units의 tyrosinase 5  $\mu$ L와 potassium phosphate buffer(pH 6.8) 45  $\mu$ L를 multi pipette을 이용하여 넣어주고, 35 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 ELISA reader를 이용해 492 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 저해율(%)을 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 tyrosinase를 50% 저해할 때의 농도(IC<sub>50</sub>)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 대조군(positive control)으로는 arbutin을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity(\%)} = \left[ 1 - \frac{B-C}{A} \right] \times 100$$

- A : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도
- B : 시료 반응용액의 흡광도
- C : 시료만의 흡광도

#### 2-4-5. 세포배양

B16F10 murine melanoma cell, RAW 264.7 murine macrophage cell, CCD-986sk(human normal fibroblast cell), HaCaT(human keratinocyte cell)은 한국세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL와 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

#### 2-4-6. Melanogenesis 저해 효과 측정

B16F10 murine melanoma cell을 이용하여 추출물과 분획물 및 분리한 compound들의 세포내에서의 미백효과를 측정하기 위해 melanogenesis 저해 효과를 측정하였다.

6 well plate에  $4.5 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 세포를 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 PBS(Phosphate Buffered Saline) buffer로 세척하였다. 그리고 50 nM의  $\alpha$ -MSH를 포함하는 배지로 교환해주고 시료를 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하여 원심분리 시켜 pellet만을 취한다. Pellet에 sonication buffer(1% triton X-100 and 0.2 mM PMSF(Phenylmethyl sulfonyl fluoride in sodium phosphate buffer)를 넣고 세포를 sonication해 준 후에 원심분리 시켜 분리한

pellet에는 1 N NaOH를 300  $\mu$ L 첨가하여 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 melanin contents를 확인하고, 상등액은 L-DOPA와 반응시켜 ELISA reader로 475 nm에서 cell에 있던 tyrosinase를 확인하였다. 대조군으로는 arbutin과 melasolv를 사용하였다.

#### 2-4-7. Nitric oxide(NO) 생성 저해 효과 측정

추출물과 분획물 및 분리한 compound들의 항염증 효과를 측정하기 위해 RAW264.7 murine macrophage cell을 이용하여 세포내에서의 염증 매개 물질인 nitric oxide의 생성량을 측정하였다.

24 well plate에 RAW264.7 murine macrophage cell을  $3 \times 10^5$  cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 18시간 배양한 후 PBS buffer로 세척을 해주고 1  $\mu$ g/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환 후 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 세포배양 상등액 100  $\mu$ L씩 덜어내어 각각 griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100  $\mu$ L와 혼합하여 실온에서 차광상태로 10분 동안 반응시키고, ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 양을 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다(Figure 5). 이때 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 이용하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다.

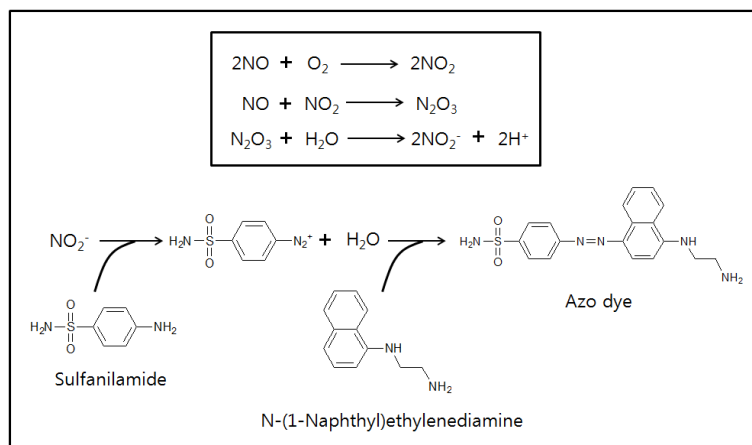


Figure 5. Principle of griess reagent



#### 2-4-8. 세포독성 평가

세포독성 평가는 MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 이용하였다. 위의 B16F10 murine melanoma cell과 RAW 264.7 murine macrophage cell을 이용한 실험에서 시료를 처리하고 각 72시간, 24시간 배양시킨 후에 세포를 배양하고 있는 well에 MTT시약을 500 µg/mL의 농도가 되도록 첨가하였다. MTT시약을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 2~3시간 동안 배양하고, 배지를 제거한 후에 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 ELISA reader에서 570 nm에서 흡광도를 측정한다(Figure 6).

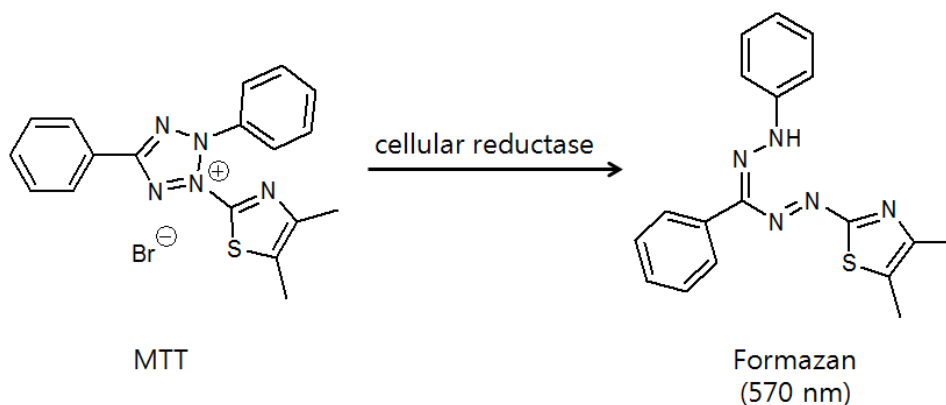


Figure 6. Principle of MTT reagent

#### 2-4-9. Western blotting

B16F10 murine melanoma cell과 RAW264.7 murine macrophage cell을 이용한 실험에서 시료를 처리하고 각 72시간, 24시간 배양시킨 후에 배지를 모두 제거하고 cold PBS로 2번 washing해준다. 그리고 lysis buffer를 첨가하여 30분간 lysis시키고 이를 모두 걸어서 4°C에서 15,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질의 농도는 BSA(bovine serum

albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다.

단백질이 30~50  $\mu\text{g}$ 이 들어가게 정량한 것을 8~12% bis-tris mini gel SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)한 후 이를 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다.

단백질이 transfer된 membrane은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween20 + TBS)용액으로 상온에서 1시간 동안 blocking을 해주었다. 항체로는 anti-mouse tyrosinase(1:1000), anti-mouse TRP-1(1:1000), anti-mouse TRP-2(1:1000)를 TTBS용액으로 희석하여 상온에서 1~2시간 반응시킨 후 TTBS로 3분씩 3회 washing하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1:1000~1:2000으로 희석하여 상온에서 1~2시간 반응시킨 후 TTBS로 3분씩 3회 washing하여 ECL기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1~3분 반응 후 X-ray film에 감광하였다.

### 3. 결과

#### 3-1. 분리된 화합물의 구조 동정

##### 3-1-1. Compound 1과 Compound 2의 구조해석

Compound 1은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 30개의 carbon signal과  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 8개의 methyl group의 단일 피크를 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene구조 일 것이라 예측했고,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  213.4의 signal은 carboxyl group의 carbon으로 예측했다. 이를 바탕으로  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 문헌<sup>18)</sup>과 비교한 결과 compound 1은 friedelin임을 확인할 수 있었다(Figure 7).

Compound 2의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR을 측정하였다. Compound 1 바로 다음에 분리된 성분이고,  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum이 흡사한 것으로 보아 골격이 비슷할 것이라 예상을 하였다. 이를 바탕으로  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 문헌<sup>19)</sup>과 비교한 결과 compound 2는 friedelanol임을 확인할 수 있었다(Figure 8).

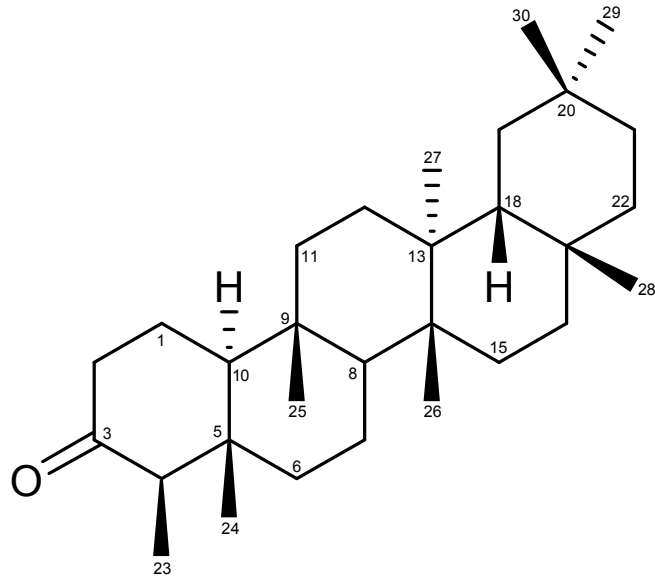


Figure 7. Chemical structure of compound 1

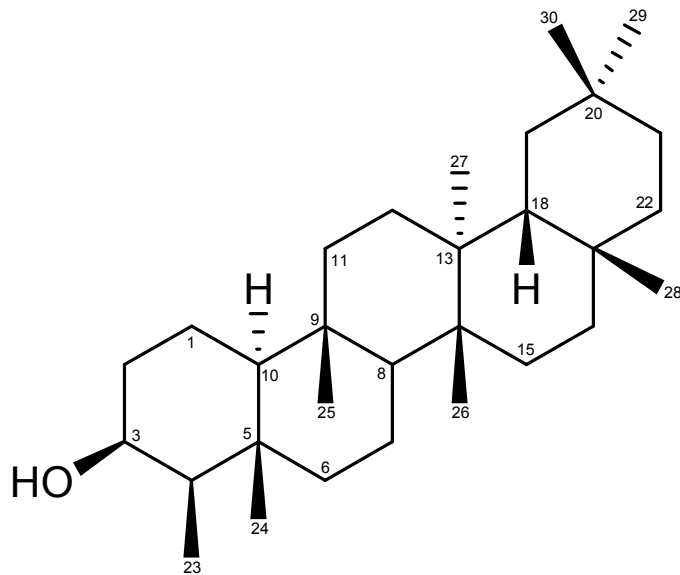


Figure 8. Chemical structure of compound 2

Table 1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **1** and **2** (400 and 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

NO.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		22.4		16.0
2		41.7		35.5
3		213.4		72.9
4	2.25 (1H, m)	58.4		49.3
5		42.3		37.3
6		41.4		41.9
7		18.4		17.7
8		53.3		53.4
9		37.6		38.0
10		59.6		61.5
11		35.8		35.4
12		30.7		30.8
13		38.5		38.5
14		39.9		39.8
15		32.6		33.0
16		36.2		36.2
17		30.2		30.2
18		42.9		43.0
19		35.5		35.7
20		28.3		28.3
21		32.9		32.5
22		39.4		39.4
23	0.89 (3H, s)	7.0	0.99 (3H, s)	11.8
24	0.72 (3H, s)	14.8	1.01 (3H, s)	16.6
25	0.87 (3H, s)	18.1	0.86 (3H, s)	18.4
26	1.01 (3H, s)	20.4	0.95 (3H, s)	18.8
27	1.05 (3H, s)	18.8	1.00 (3H, s)	20.3
28	1.18 (3H, s)	32.3	1.17 (3H, s)	32.3
29	0.95 (3H, s)	35.2	0.93 (3H, s)	35.2
30	1.00 (3H, s)	31.9	0.97 (3H, s)	32.0

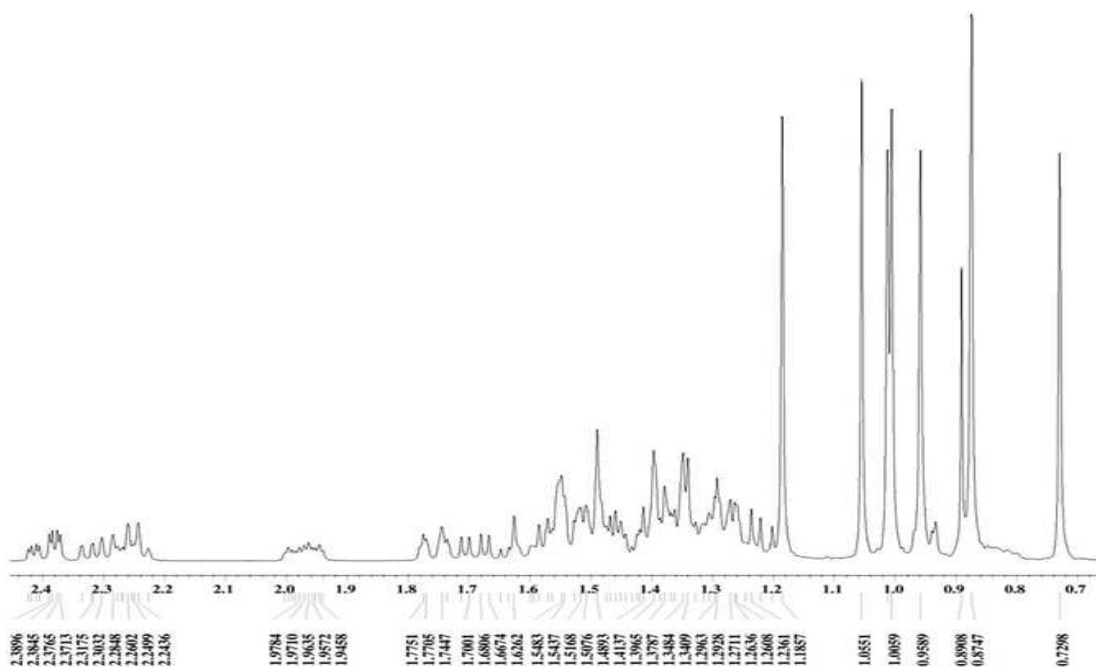


Figure 9.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CDCl}_3$

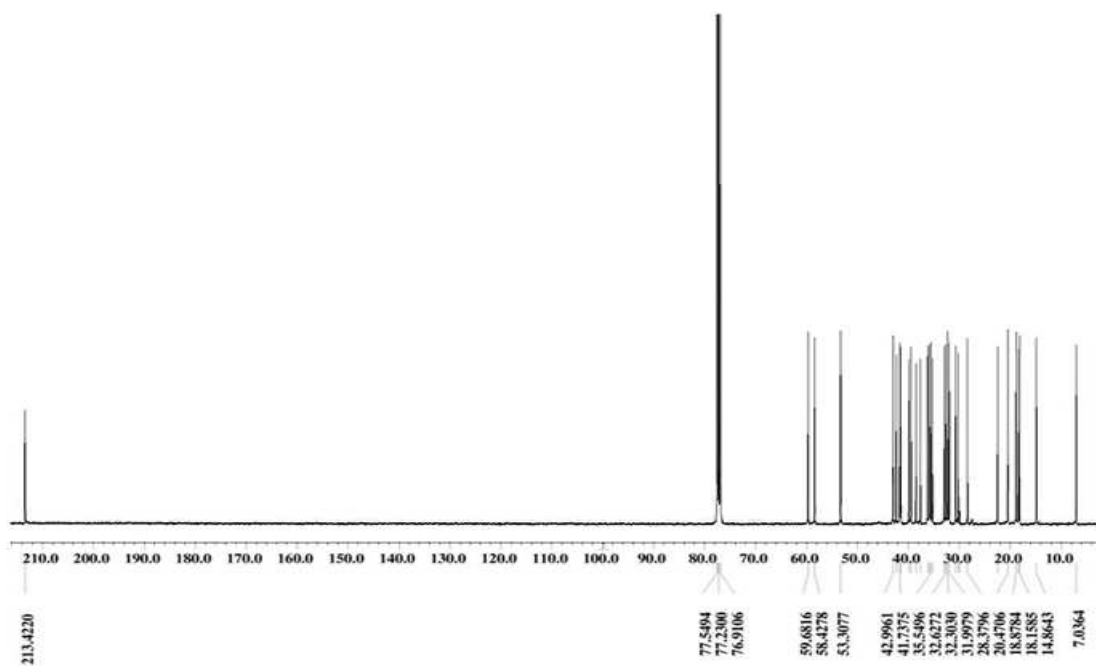


Figure 10.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CDCl}_3$

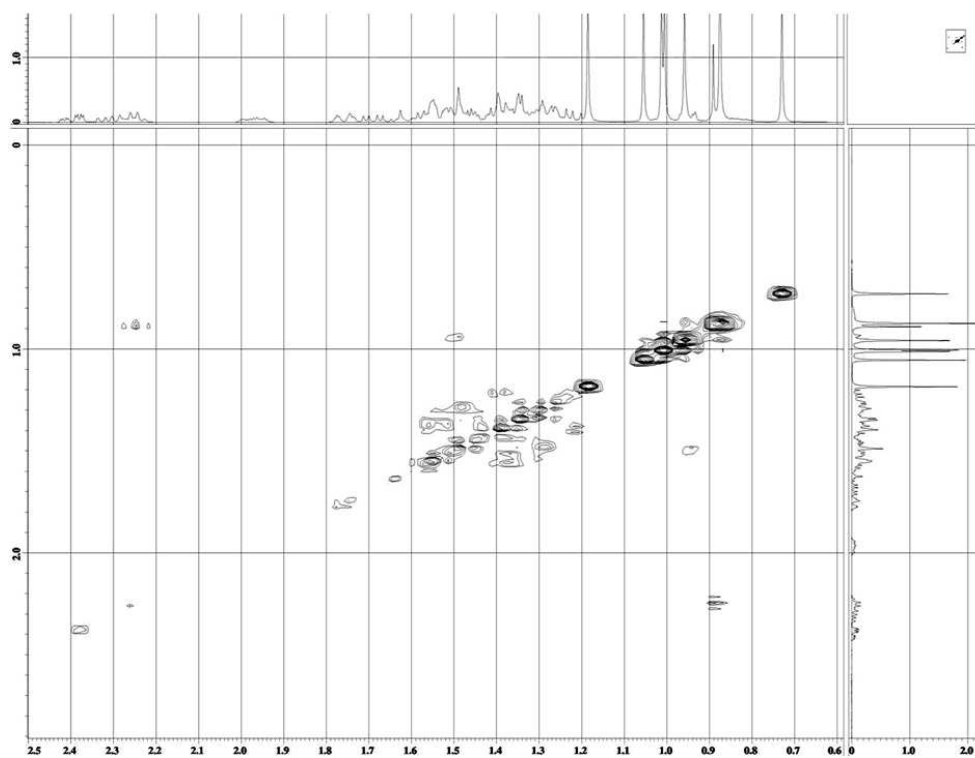


Figure 11.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$

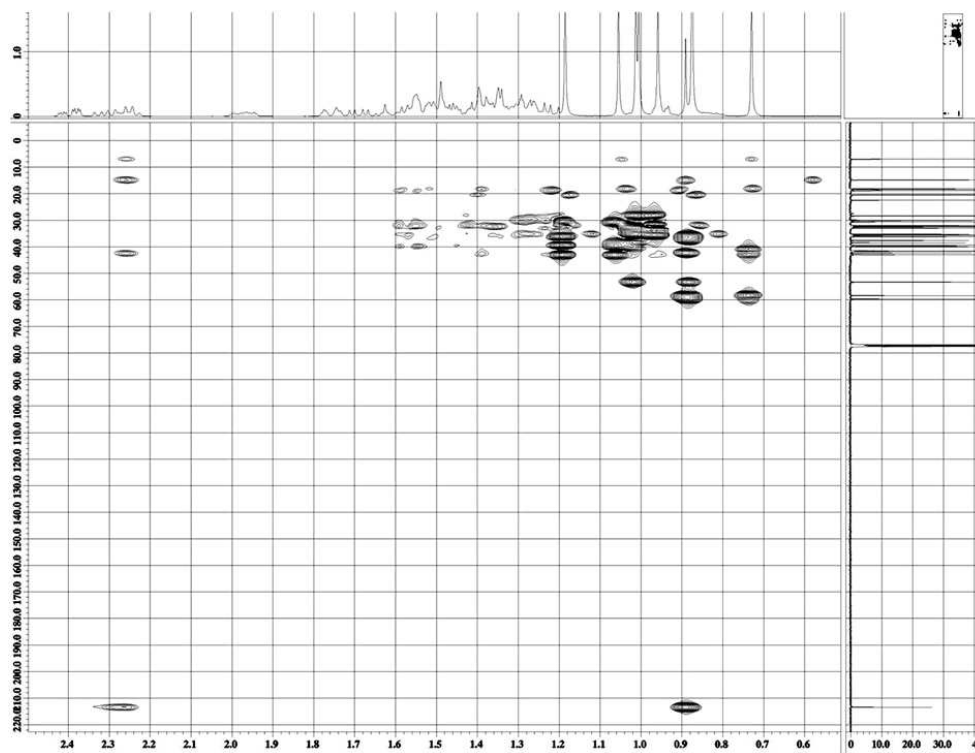


Figure 12. HMBC spectrum of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$

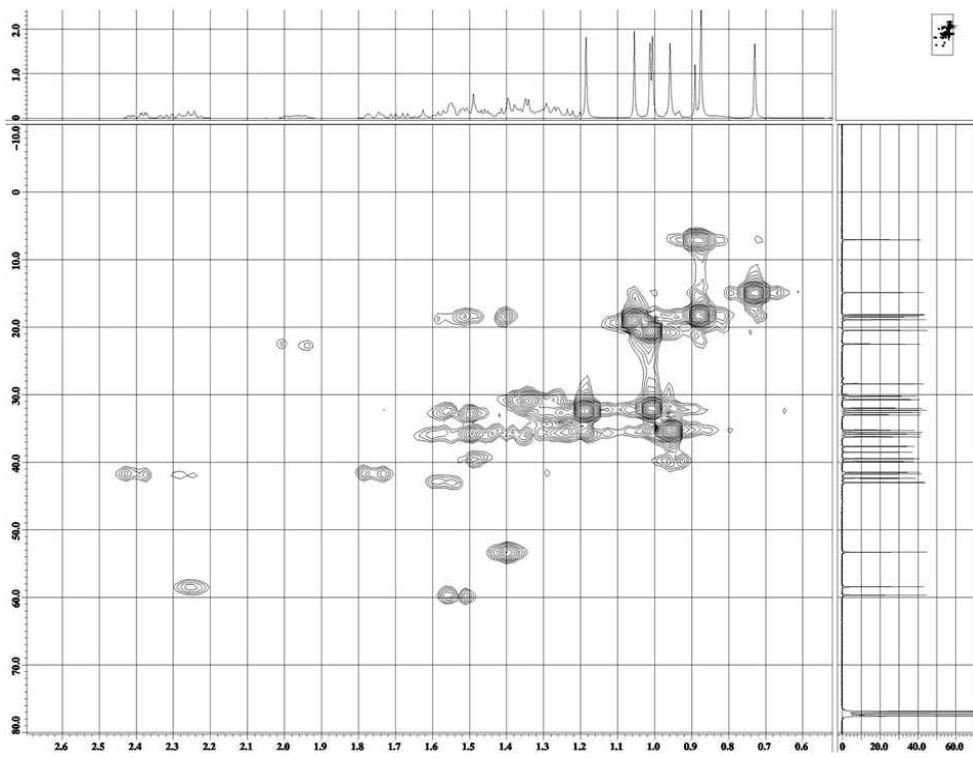


Figure 13. HMQC spectrum of compound **1** in CDCl<sub>3</sub>



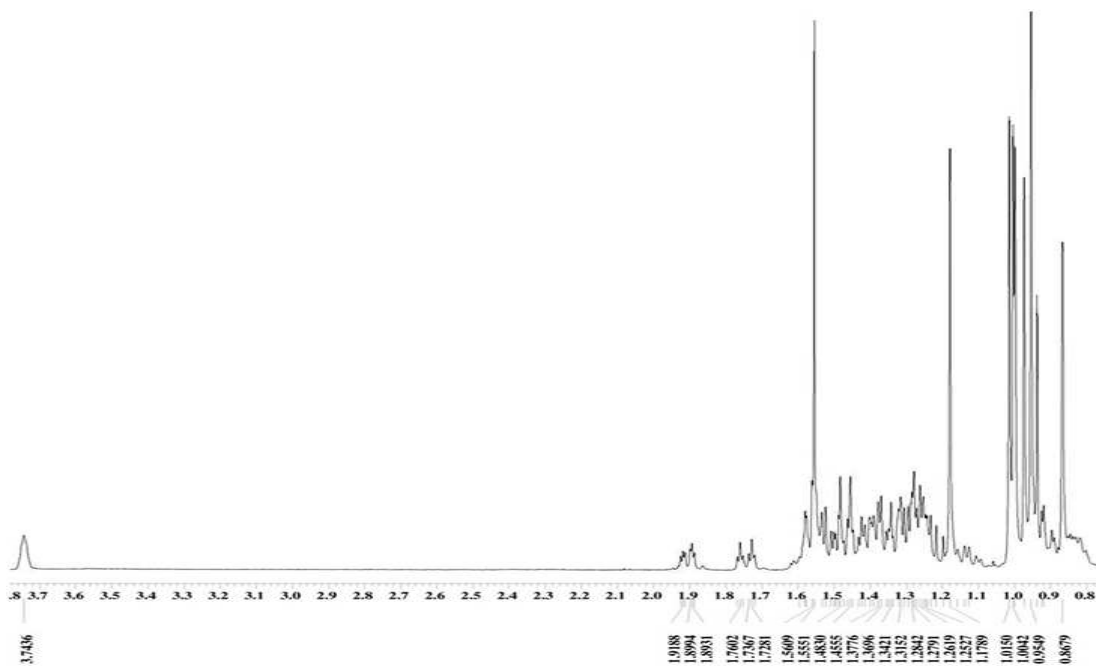


Figure 14.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

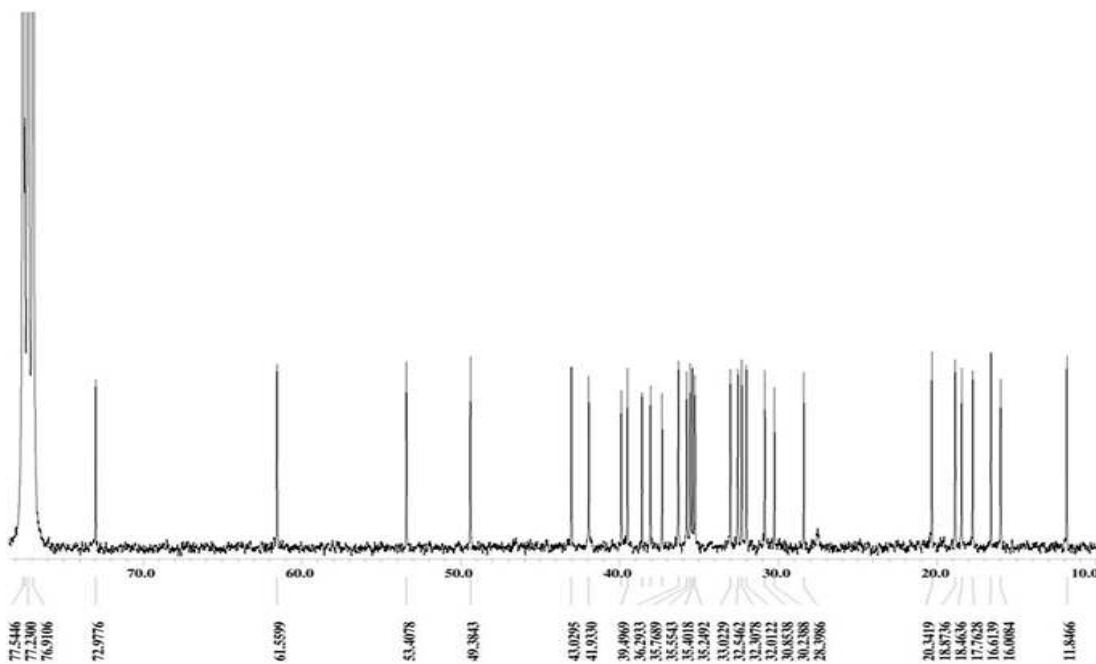


Figure 15.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

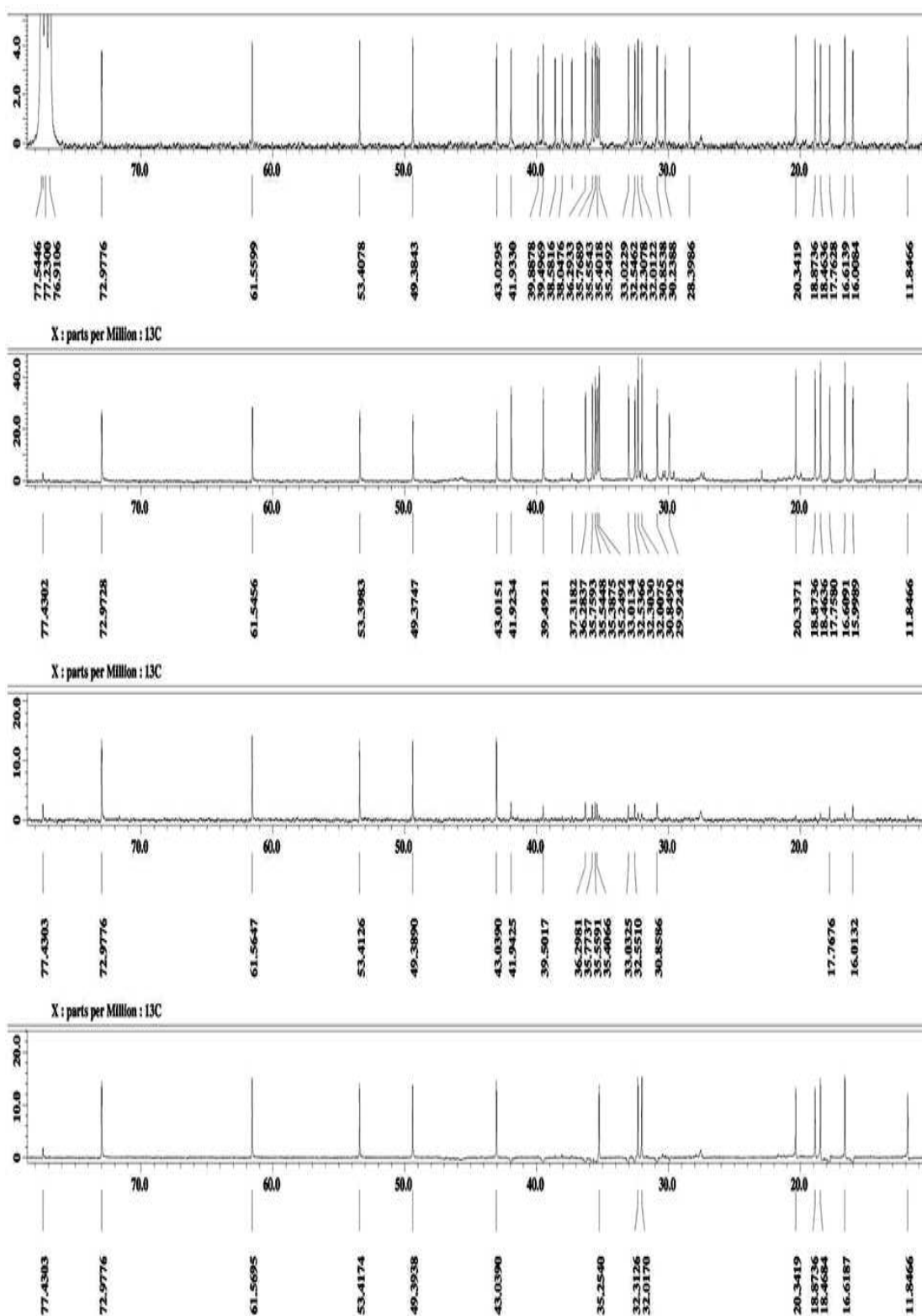


Figure 16.  $^{13}\text{C}$ , DEPT-45, 90, 135 spectrum of compound 2 in  $\text{CDCl}_3$

### 3-1-2. Compound 3의 구조해석

Compound 3의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  95.3~166.8 영역의 carbon signal과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  6.18~7.96에서의 signal에 의해 olefin구조와 aromatic ring의 존재를 예상할 수 있었으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.96(1H, d,  $J = 5.95$  Hz),  $\delta$  6.18(1H, d,  $J = 5.95$  Hz)의 signal에서 coupling constant 값으로 보아 *ortho*-coupling 또는 olefin구조에서 *cis*-형태의 proton임을 예상하였고,  $\delta$  6.31(1H, d,  $J = 2.06$  Hz),  $\delta$  6.19(1H, d,  $J = 2.06$  Hz)의 signal에서 coupling constant값으로 보아 *meta*-coupling된 proton임을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  183.4의 signal은 carboxyl group의 carbon으로 예상되었다. 예상한 부분구조를 기본으로 하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 문헌<sup>20)</sup>과 비교한 결과 compound 3은 5,7-dihydroxychromone임을 확인 할 수 있었다 (Figure 17).

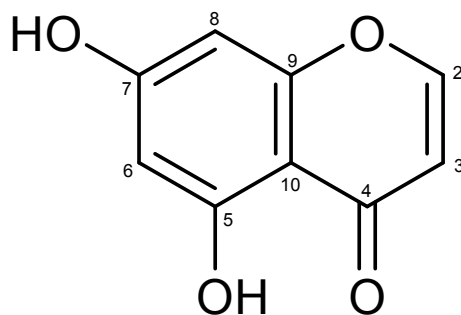


Figure 17. Chemical structure of compound 3

Table 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **3** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NO.	Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	7.96 (1H, d, 5.96)	158.0
3	6.18 (1H, d, 5.96)	111.5
4		183.3
5		163.4
6	6.19 (1H, d, 2.06)	100.3
7		166.7
8	6.31 (1H, d, 2.06)	95.1
9		159.9
10		106.4

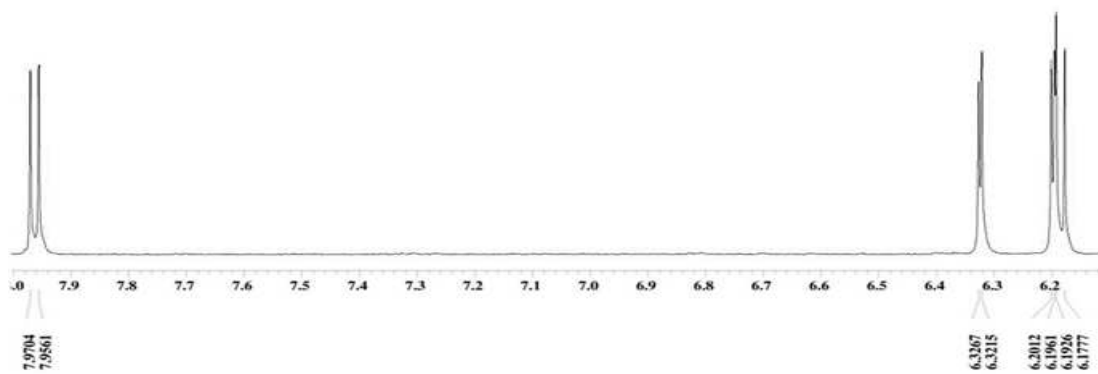


Figure 18.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

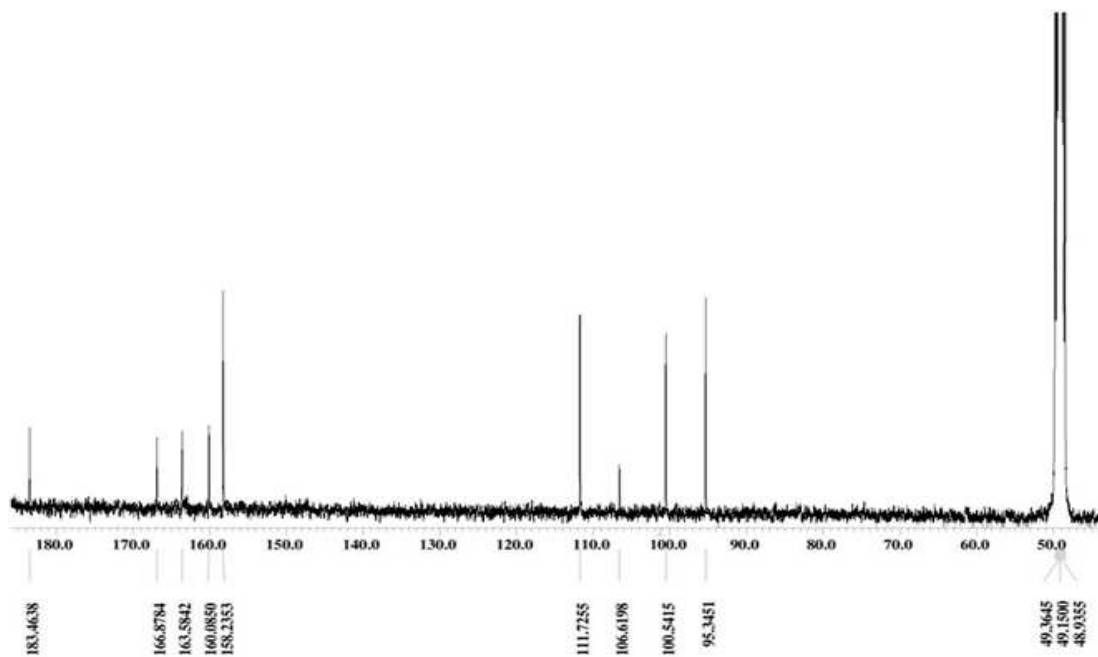


Figure 19.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

### 3-1-3. Compound 4의 구조해석

Compound 4의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  113.6~153.7 영역의 carbon signal과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  6.81~7.43에서의 signal에 의해 aromatic ring의 존재를 예상할 수 있었으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  3.79(3H, s),  $\delta$  3.77(3H, s)의 signal로 보아 전기음성도가 큰 원소에 인접한 carbon에 결합되어 있는 methyl group을 확인하였고,  $\delta$  7.43(1H, dd,  $J = 8.24, 2.06$  Hz),  $\delta$  7.39(1H, d,  $J = 2.06$  Hz),  $\delta$  6.81(1H, d,  $J = 8.24$  Hz)의 signal에서 coupling constant 값으로 보아 한 개의 carbon을 중심으로 *ortho*-, *meta*-coupling된 proton임을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  56.5, 52.4의 signal에서 전기음성도가 큰 원소에 인접한 carbon 2개가 관찰되었고,  $\delta$  168.9의 signal은 carboxyl group의 carbon으로 예상되었다. 예상한 부분구조를 기본으로 하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 문헌<sup>21)</sup>과 비교한 결과 compound 4는 methyl vanillate임을 확인할 수 있었다(Figure 20).

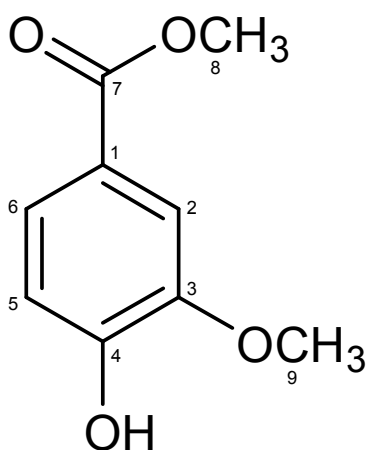


Figure 20. Chemical structure of compound 4

Table 3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **4** (400 and 100 MHz, DMSO- $d_6$  and  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NO.	Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		122.1
2	7.39 (1H, d, 2.06)	113.6
3		149.0
4		153.7
5	6.81 (1H, d, 8.24)	116.2
6	7.43 (1H, dd, 8.24, 2.06)	125.2
7		168.9
8	3.79 (3H, s)	52.4
9	3.77 (3H, s)	56.5

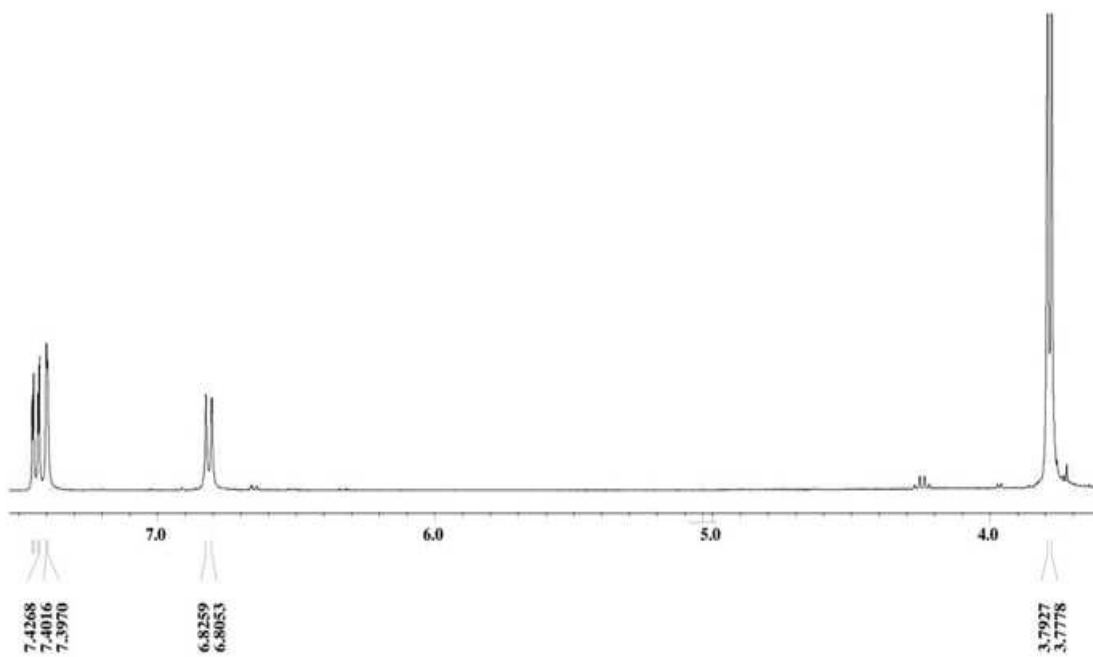


Figure 21.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **4** in  $\text{DMSO}-d_6$

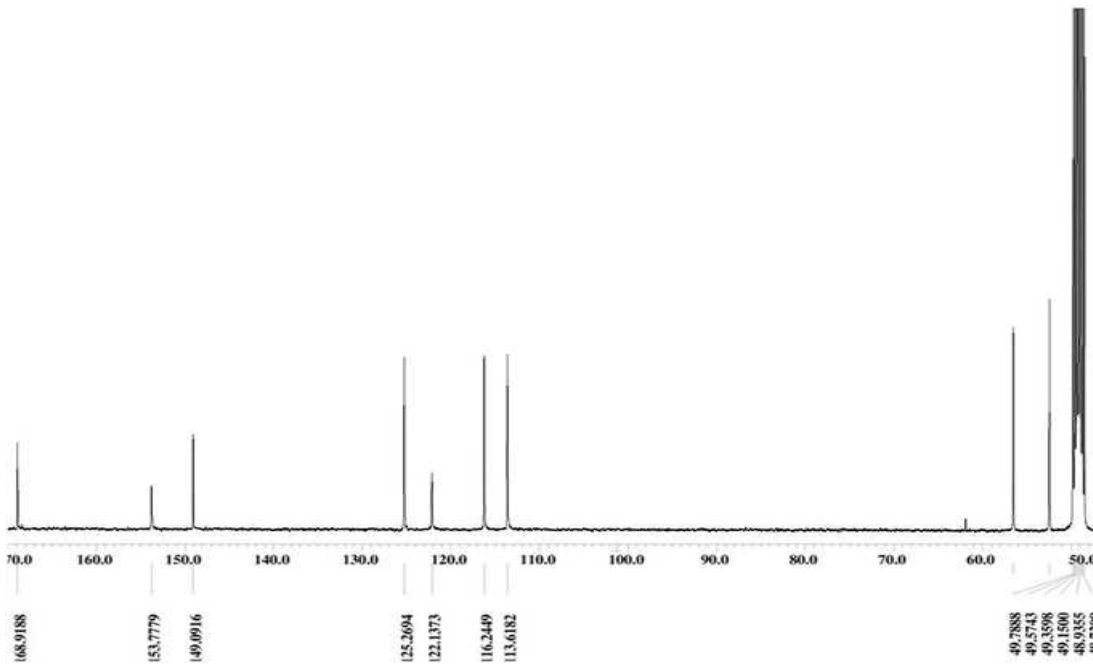


Figure 22.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **4** in  $\text{CD}_3\text{OD}$



### 3-1-4. Compound 5와 Compound 6의 구조해석

Compound 5의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  100~157 영역의 carbon signal과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  5.85~6.83에서의 signal에 의해 aromatic ring의 존재를 예상할 수 있었다. 또한,  $\delta$  6.83(1H, d,  $J = 1.83$  Hz),  $\delta$  6.76(1H, d,  $J = 8.24$  Hz),  $\delta$  6.71(1H, dd,  $J = 8.24, 1.83$  Hz),  $\delta$  5.92(1H, d,  $J = 2.29$  Hz),  $\delta$  5.85(1H, d,  $J = 2.29$  Hz)의 signal에서 coupling constant값으로 보아 2개의 proton은 *ortho*-coupling, 3개의 proton은 *meta*-coupling을 하는 것으로 예상되었으며,  $\delta$  4.56(1H, d,  $J = 7.56$  Hz),  $\delta$  3.97(1H, m)의 signal로 보아 전기음성도가 큰 원소에 인접한 carbon에 결합되어 있는 proton으로 예상하였고,  $\delta$  2.84(1H, dd,  $J = 16.03, 5.27$  Hz),  $\delta$  2.50(1H, dd,  $J = 16.03, 8.24$  Hz)의 coupling constant 값으로 보아 geminal proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것으로 보아 이는 전형적인 flavonoid임을 예측할 수 있었다. 예상한 부분구조를 기본으로 하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 문헌<sup>10)</sup>과 비교한 결과 compound 5는 catechin임을 확인 할 수 있었다(Figure 23).

Compound 6의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  100~168 영역의 carbon signal과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  5.92~6.97에서의 signal에 의해 aromatic ring의 존재를 예상할 수 있었다. 또한,  $\delta$  6.97(1H, d,  $J = 2.06$  Hz),  $\delta$  6.80(1H, dd,  $J = 8.24, 2.06$  Hz),  $\delta$  6.76(1H, d,  $J = 8.24$  Hz),  $\delta$  5.94(1H, d,  $J = 2.29$  Hz),  $\delta$  5.92(1H, d,  $J = 2.29$  Hz)의 signal에서 coupling constant 값으로 보아 2개의 proton은 *ortho*-coupling, 3개의 proton은 *meta*-coupling을 하는 것으로 예상되었으며,  $\delta$  4.81(1H, s),  $\delta$  4.17(1H, m)의 signal로 보아 전기음성도가 큰 원소에 인접한 carbon에 결합되어 있는 proton으로 예상하였고,  $\delta$  2.86(1H, dd,  $J = 16.72, 4.58$  Hz),  $\delta$  2.73(1H, dd,  $J = 16.72, 2.98$  Hz)의 coupling constant 값으로 보아 geminal proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것으로 보아 이는 전형적인 flavonoid임을

예측할 수 있었다. 예상한 부분구조를 기본으로 하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 문헌<sup>10)</sup>과 비교한 결과 compound **6**는 *epi*-catechin임을 확인 할 수 있었다(Figure 24).

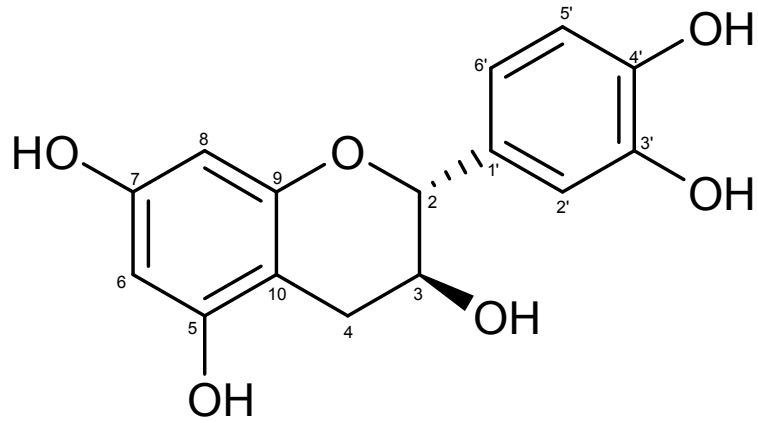


Figure 23. Chemical structure of compound **5**

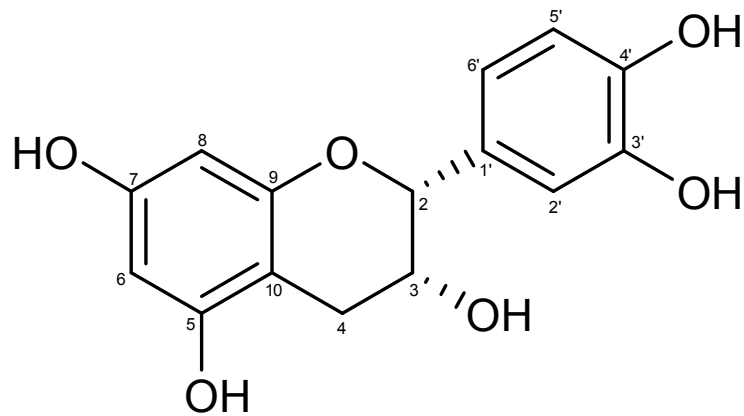


Figure 24. Chemical structure of compound **6**

Table 4.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **5** and **6** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NO.	Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1				
2	4.56 (1H, d, 7.56)	82.9	4.81 (1H, s)	79.9
3	3.96 (1H, m)	68.9	4.17 (1H, m)	67.6
4	2.85 (1H, dd, 16.03, 5.27)	28.6	2.86 (1H, dd, 16.72, 4.58)	29.3
	2.50 (1H, dd, 16.03, 8.24)		2.73 (1H, dd, 16.72, 2.98)	
5		157.7		158.1
6	5.92 (1H, d, 2.29)	96.4	5.94 (1H, d, 2.29)	96.5
7		157.0		157.7
8	5.87 (1H, d, 2.29)	95.6	5.92 (1H, d, 2.29)	96.0
9		157.9		157.4
10		100.9		100.2
1'		132.3		132.4
2'	6.83 (1H, d, 1.83)	115.3	6.97 (1H, d, 2.06)	115.4
3'		146.3		146.0
4'		146.3		145.8
5'	6.76 (1H, d, 8.24)	116.2	6.76 (1H, d, 8.24)	116.0
6'	6.71 (1H, dd, 8.24, 1.83)	120.1	6.80 (1H, dd, 8.24, 2.06)	119.5

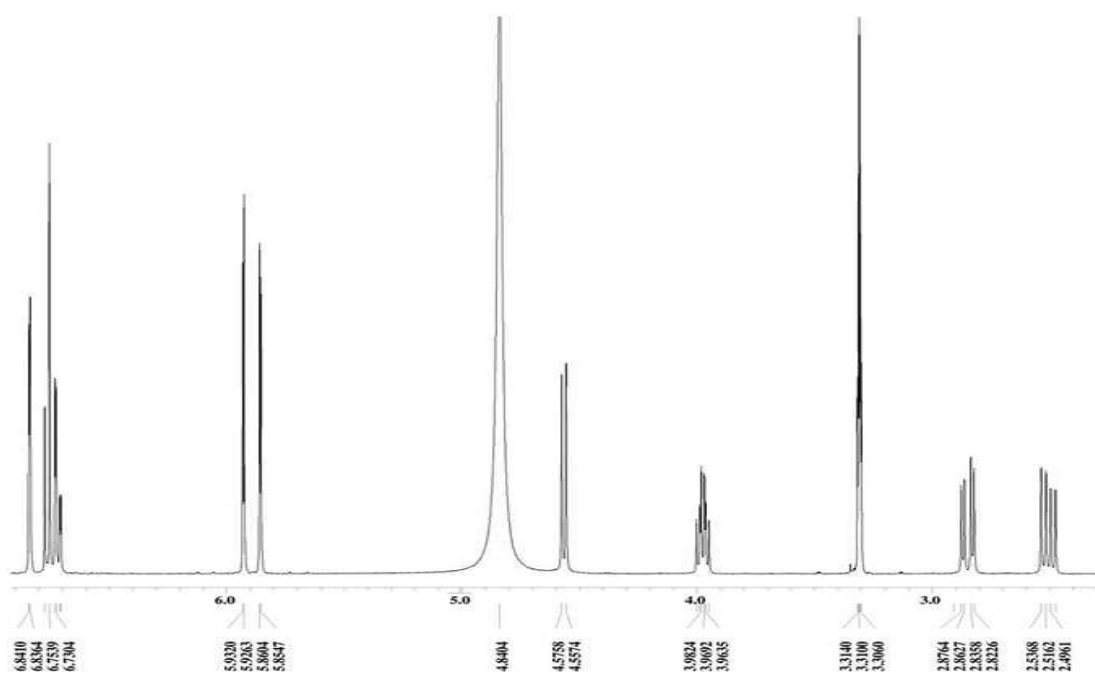


Figure 25.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **5** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

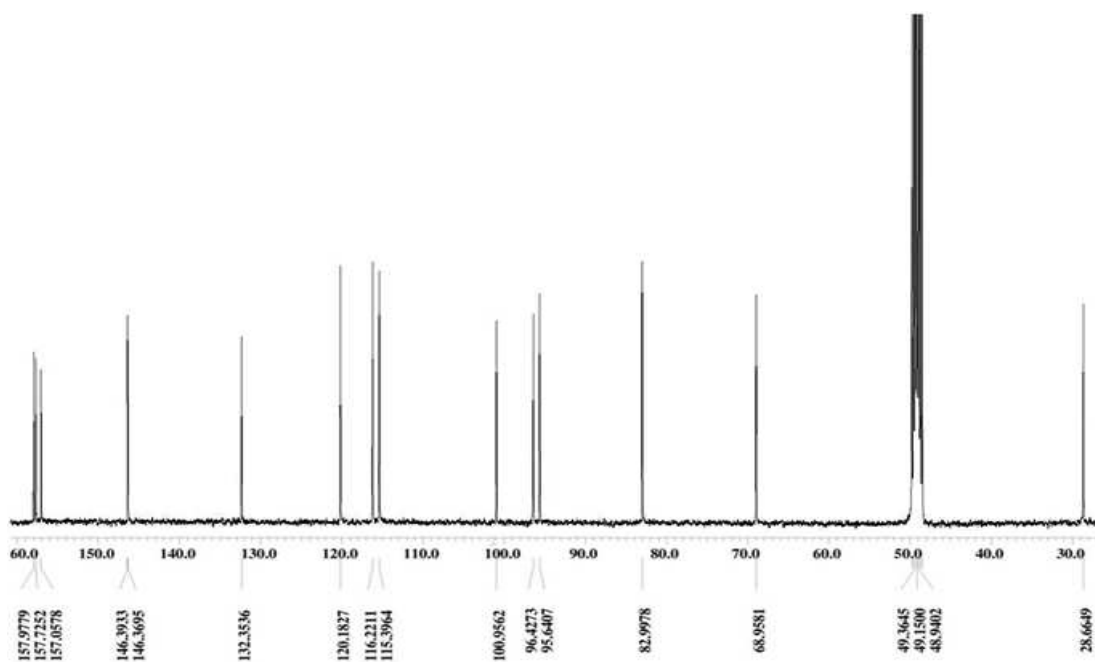


Figure 26.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **5** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

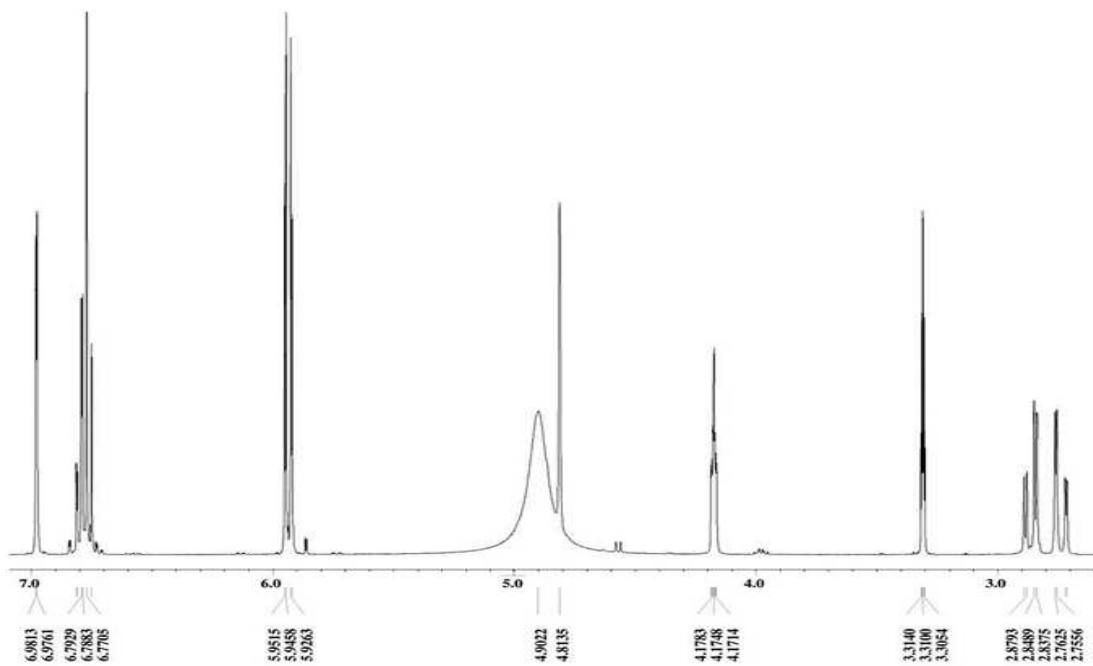


Figure 27.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **6** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

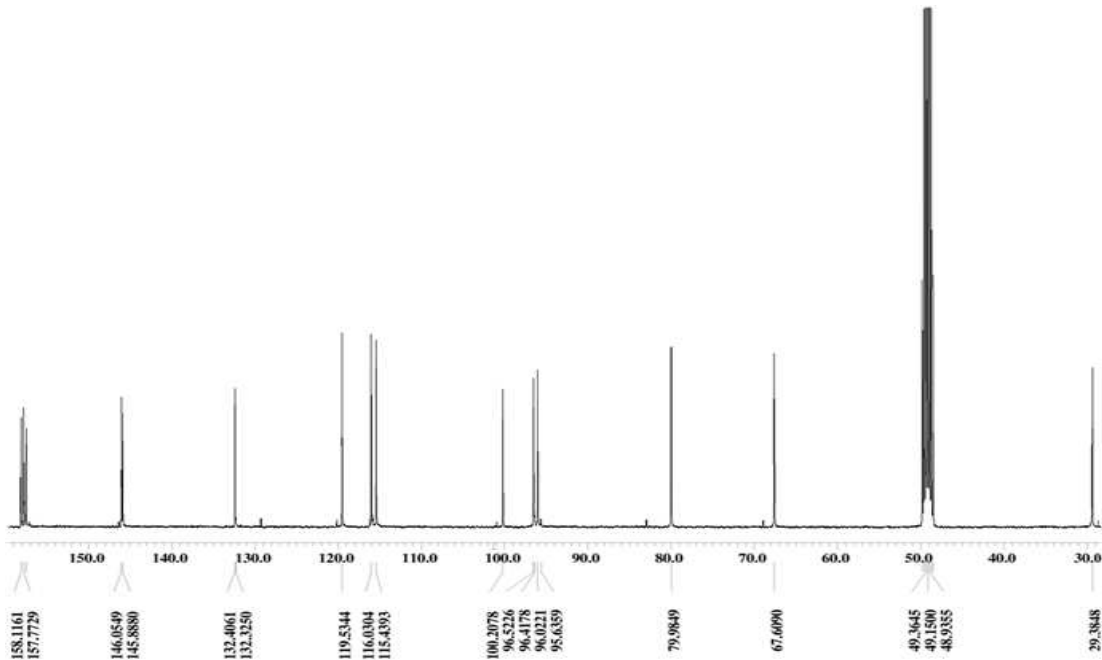


Figure 28.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **6** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

### 3-1-5. Compound 7의 구조해석

Compound 7의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  55.9~160.8 영역의 carbon signal과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum의  $\delta$  3.79~7.88 signal에 의해 olefin 구조와 aromatic ring의 존재를 예상할 수 있었으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.87(1H, d,  $J = 9.16$  Hz),  $\delta$  6.13(1H, d,  $J = 9.16$  Hz)의 signal에서 coupling constant 값으로 보아 *ortho*-coupling 또는 olefin 구조에서 *cis*-형태의 proton임을 예상하였고,  $\delta$  7.15(1H, s),  $\delta$  6.70(1H, s)의 signal에서 aromatic 또는 olefinic proton임을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  160.8의 signal은 carboxyl group의 carbon으로 예상되었다. 예상한 부분구조를 기본으로 하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 문헌<sup>22)</sup>과 비교한 결과 compound 7은 scopoletin임을 확인할 수 있었다(Figure 29).

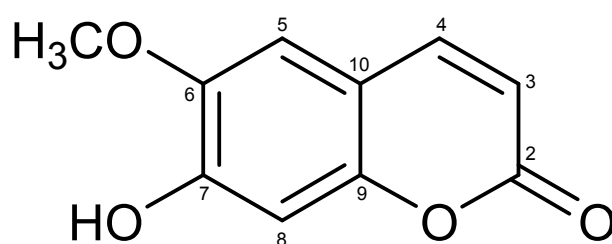


Figure 29. Chemical structure of compound 7

Table 5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **7** (400 and 100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

NO.	Compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		
2		160.8
3	6.13 (1H, d, 9.16)	110.5
4	7.87 (1H, d, 9.16)	144.4
5	7.15 (1H, s)	109.3
6		145.7
7		149.9
8	6.70 (1H, s)	102.7
9		152.9
10		109.6
$-\text{OCH}_3$	3.79 (3H, s)	55.9

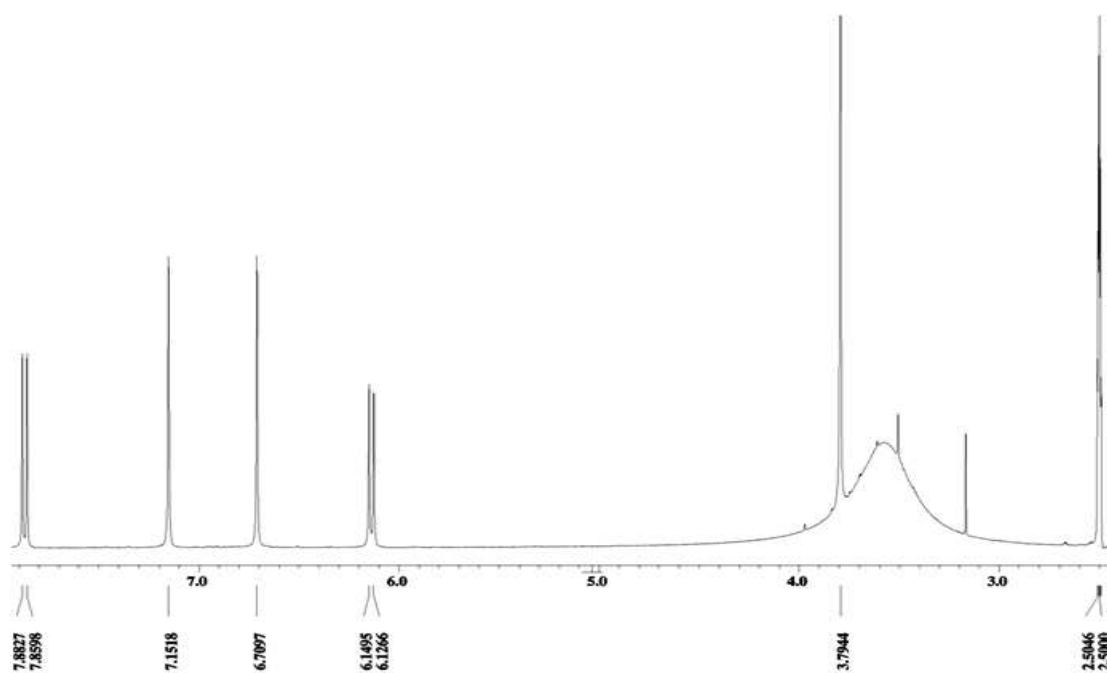


Figure 30.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 7 in  $\text{DMSO-}d_6$

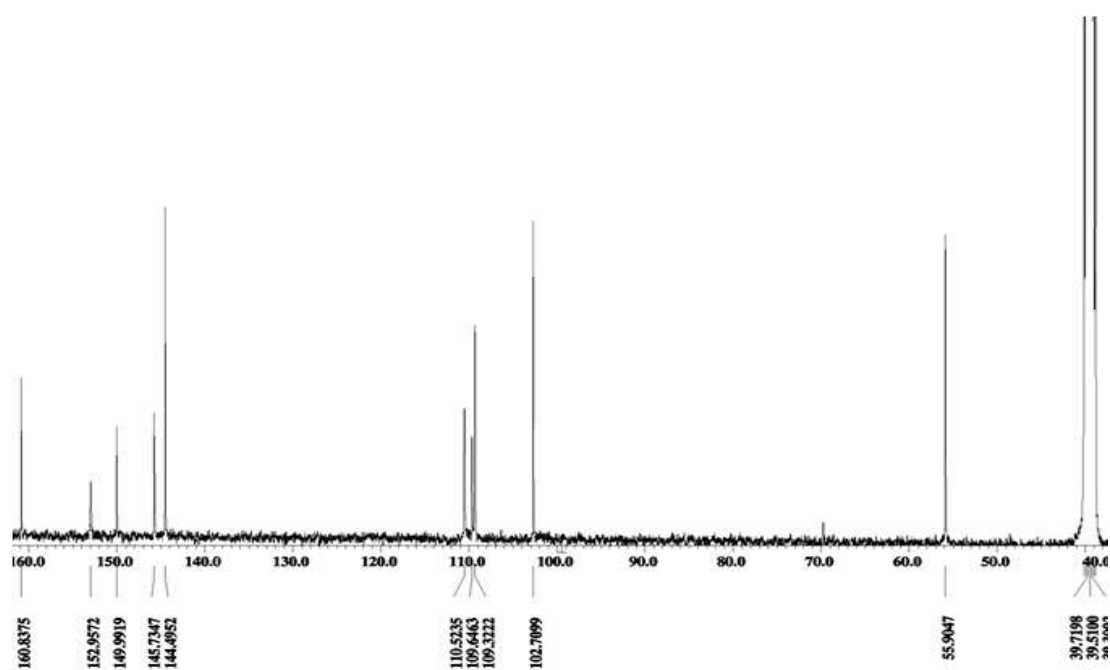


Figure 31.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound 7 in  $\text{DMSO-}d_6$



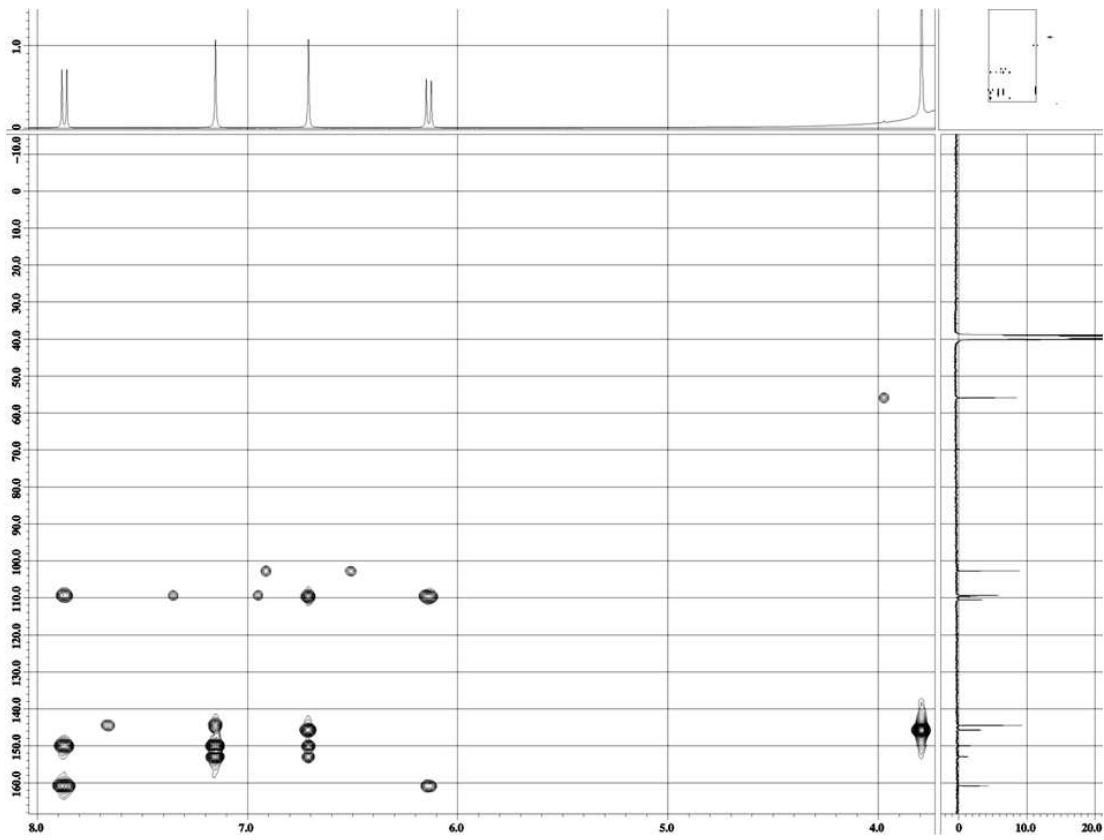


Figure 32. HMBC spectrum of compound 7 in DMSO-*d*<sub>6</sub>

### 3-2. 비양나무 가지 추출물 및 용매 분획물들의 활성 검색

#### 3-2-1. 총 폴리페놀 함량 측정 결과

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

Gallic acid 표준용액을 이용하여 calibration curve를 그렸으며(Figure 33), 비양나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하여 추출물 및 분획물의 중량 100 µg 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE ; gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 실험결과, EtOAc layer에서 31.1 µg GAE/100 µg으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 34).

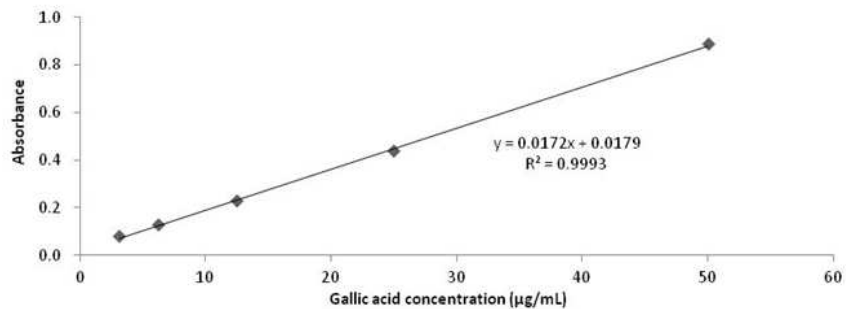


Figure 33. Calibration curve for quantification of total phenolic compounds

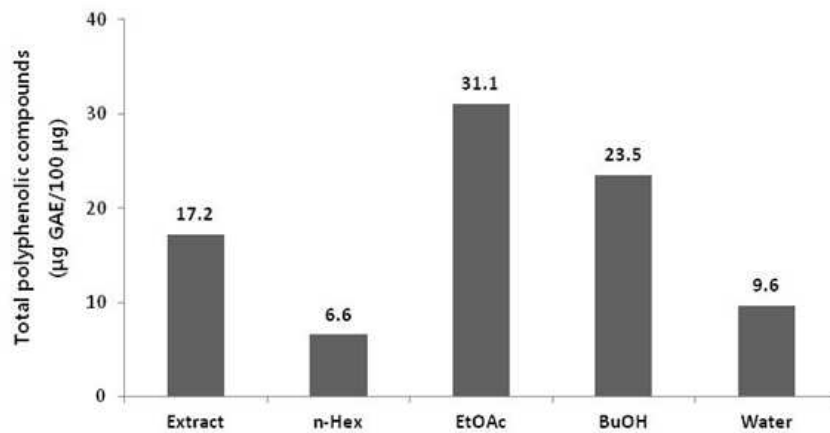


Figure 34. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers

### 3-2-2. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과

비양나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical scavenging 활성을 측정하였다. 추출물 및 분획물에 대하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 실시하여  $\text{SC}_{50}$ 값을 계산하였다. 그 결과, EtOAc와 BuOH layer에서 각각 22.88, 26.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인 vitamin C(8.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 비교하였을 때, 비교적 좋은 DPPH radical scavenging 활성을 보였다(Figure 35-36).

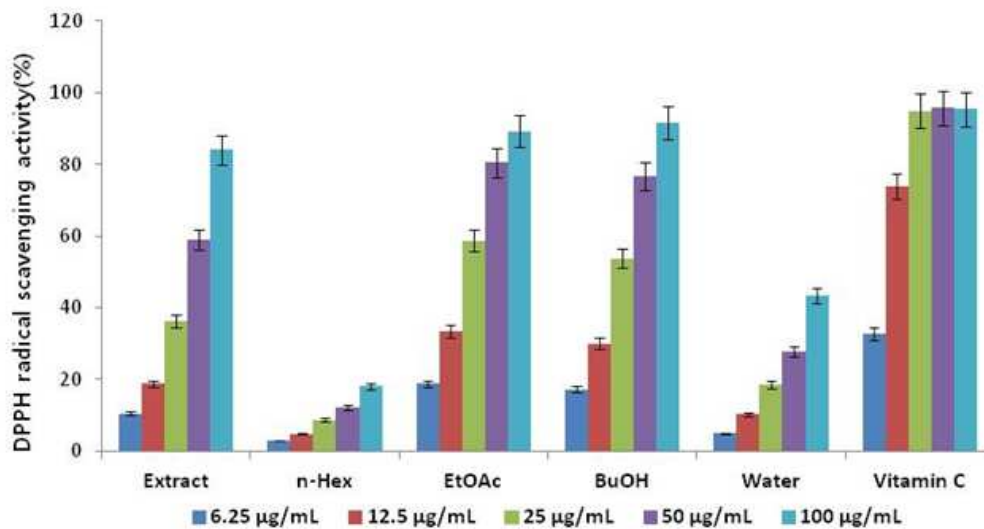


Figure 35. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers

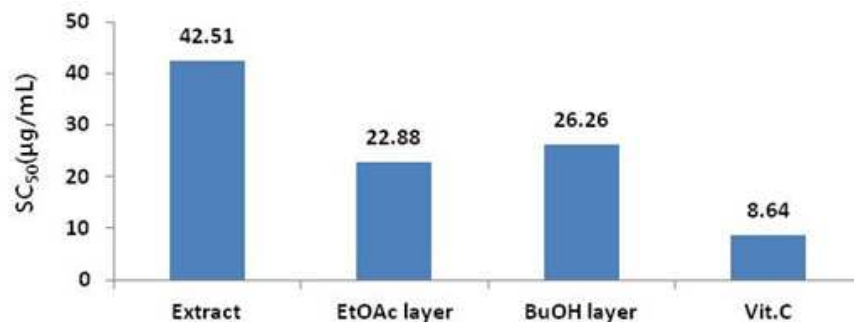


Figure 36.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers

### 3-2-3. ABTS radical cation scavenging 활성 검색 결과

비양나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation scavenging 활성을 측정하였다. 추출물 및 분획물에 대하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 실시하여  $\text{SC}_{50}$ 값을 계산하였다. 그 결과, extract, EtOAc, BuOH 그리고 water layer에서 각각 14.91, 7.06, 10.68, 35.16  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{SC}_{50}$ 값을 보여 대조군인 vitamin C(6.53  $\mu\text{g/mL}$ )와 비교하였을 때 좋은 비교적 좋은 ABTS radical cation scavenging 활성을 보였다(Figure 37-38).

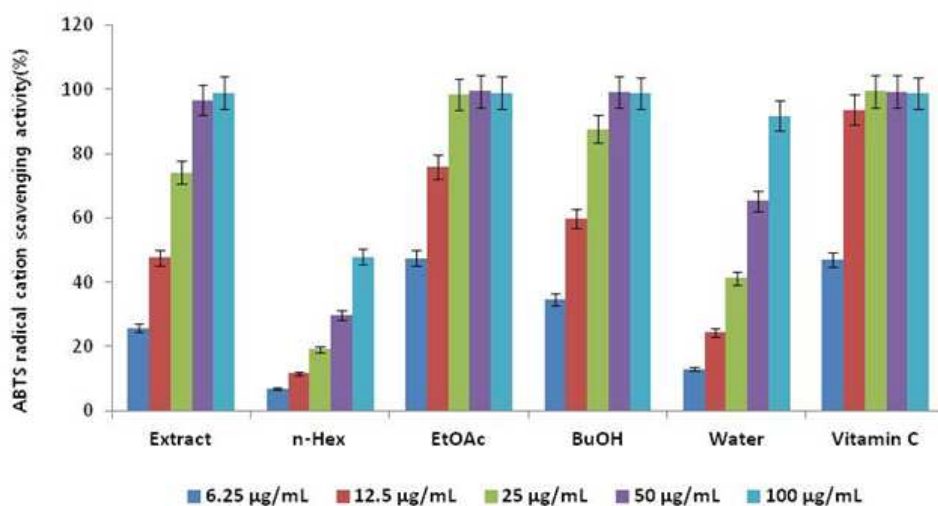


Figure 37.  $\text{ABTS}^+$  radical scavenging activities of extract and solvent layers

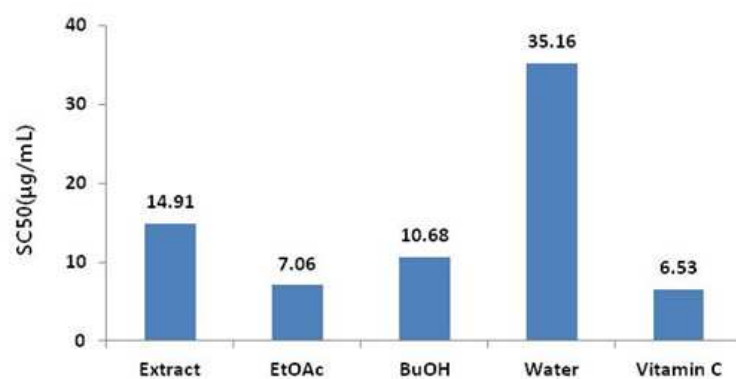


Figure 38.  $\text{SC}_{50}$  values of  $\text{ABTS}^+$  radical scavenging activities of extract and solvent layers

#### 3-2-4. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과

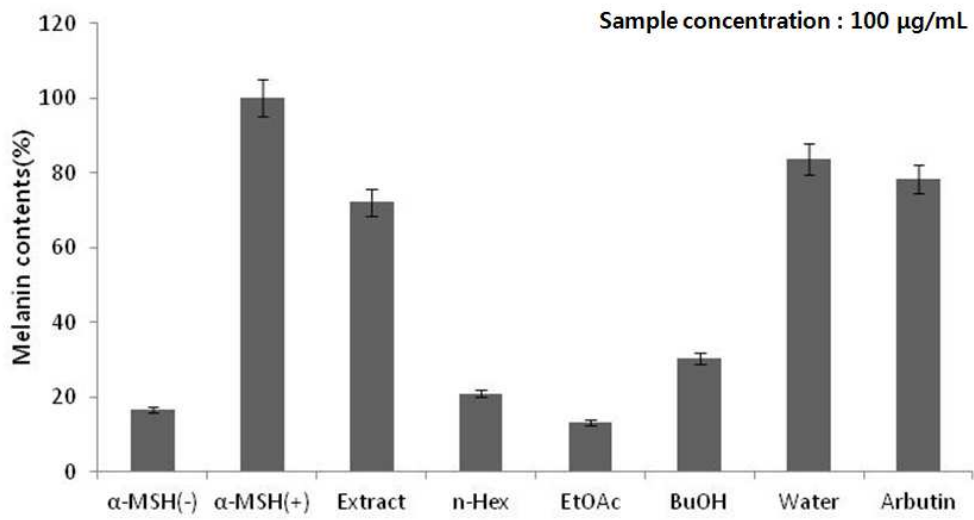
비양나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 tyrosinase inhibition 활성을 측정하였다. 추출물 및 분획물에 대하여 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하였지만 추출물 및 모든 분획물에서 tyrosinase inhibition 활성을 보이지 않았다.

#### 3-2-5. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 결과

피부의 표피에 존재하는 멜라닌 세포(melanocyte)는 햇빛으로부터 몸을 보호하기 위해 melanin을 형성하는데, 이러한 melanin의 양, 질 그리고 분포에 의하여 피부의 색이 결정지어진다. Melanin의 합성은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, cAMP (cyclic adenosine monophosphate)의 유도물질인 ACTH(adrenocorticotrophic hormone), forskolin 그리고 α-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)등에 의해서 조절이 된다<sup>23)</sup>. 따라서 본 실험에서는 α-MSH를 처리하여 melanin 합성을 유도한 B16F10 murine melanoma cell에 시료를 처리한 후 melanin contents를 확인하여 시료에 의해 melanin 합성이 얼마나 저해되는지를 알아보고, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질의 발현량을 측정해 어떤 기전에 의하여 melanin 합성이 저해되는지를 확인하였다.

비양나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL의 농도로 melanin contents 양을 확인한 결과 *n*-Hex layer에서는 세포독성에 의해서 melanin contents의 양이 적은 것을 확인하였고, EtOAc와 BuOH layer는 세포독성 없이 각각 86.73, 69.71%의 melanin 합성을 저해하여 대조군인 arbutin (21.64%의 melanin 합성 저해)보다 훨씬 좋은 melanin 합성 저해율을 보였다 (Figure 39). 그리고 이 중에서 활성이 가장 좋은 EtOAc layer는 농도를 희석하여 melanin contents 양을 측정하였는데, 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해하는 것을 확인하였다(Figure 40).

A)



B)

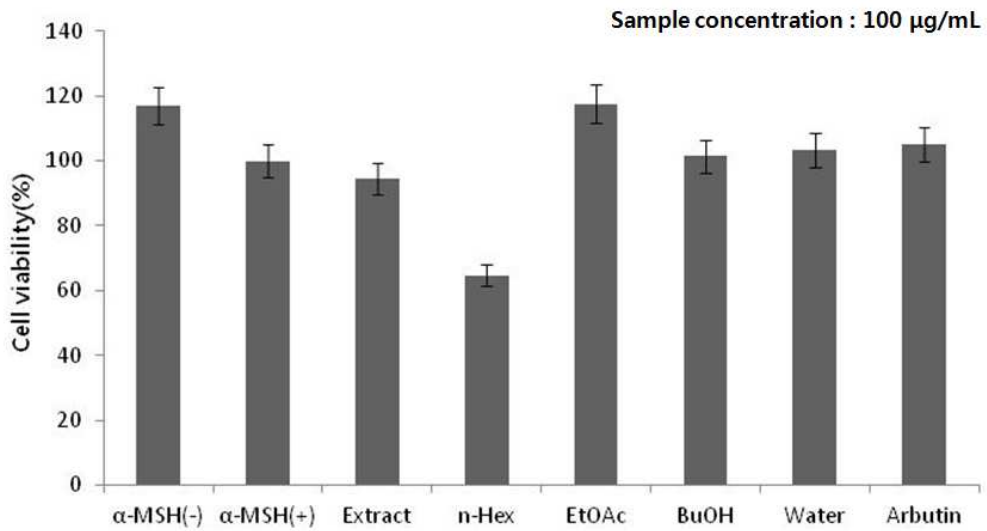
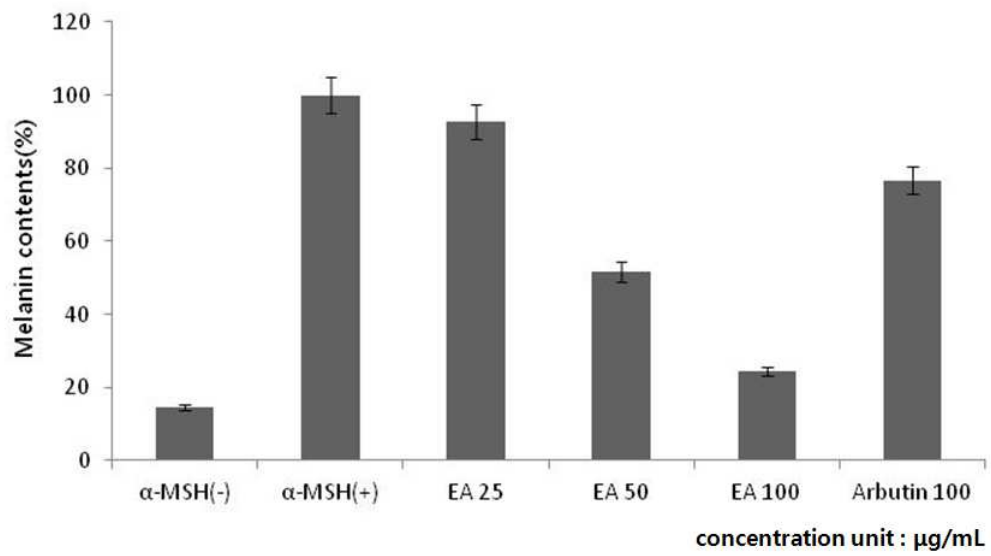


Figure 39. Melanin contents(A) and cytotoxicities(B) of extract and solvent layers

A)



B)

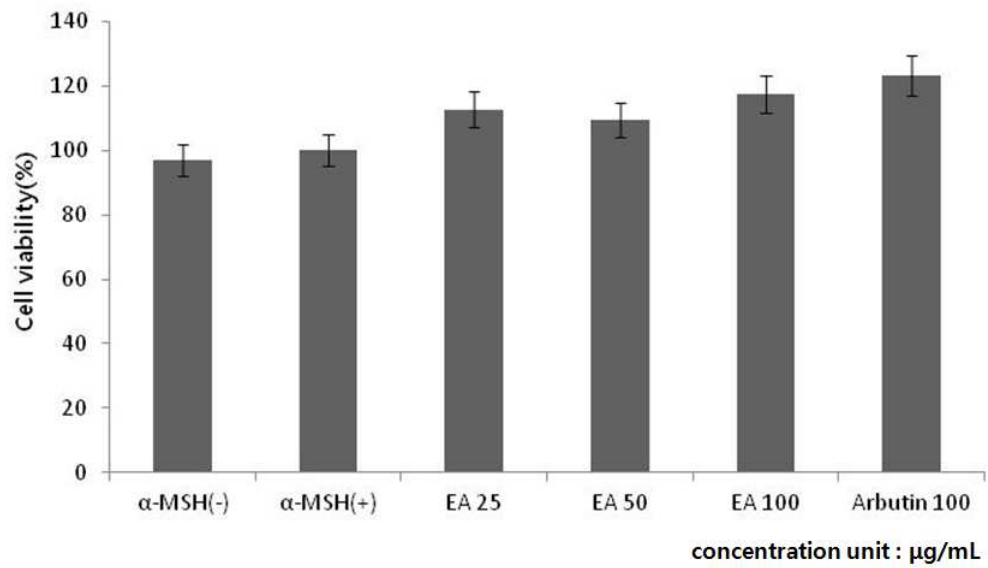


Figure 40. Melanin contents(A) and cytotoxicities(B) of ethyl acetate layer

3-2-6. B16F10 murine melanoma cell에서 intracellular tyrosinase 측정 결과

비양나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL의 농도로 intracellular tyrosinase 양을 확인한 결과 *n*-Hex layer는 세포독성을 보였고, EtOAc layer는 세포독성 없이 67.93%의 intracellular tyrosinase를 저해하여 대조군인 arbutin보다 훨씬 좋은 intracellular tyrosinase 저해율을 보였다. 그리고 이 중에서 활성이 가장 좋은 EtOAc layer는 농도를 희석하여 intracellular tyrosinase양을 측정하였는데, 농도 의존적으로 intracellular tyrosinase를 저해하는 것을 확인하였다(Figure 41).

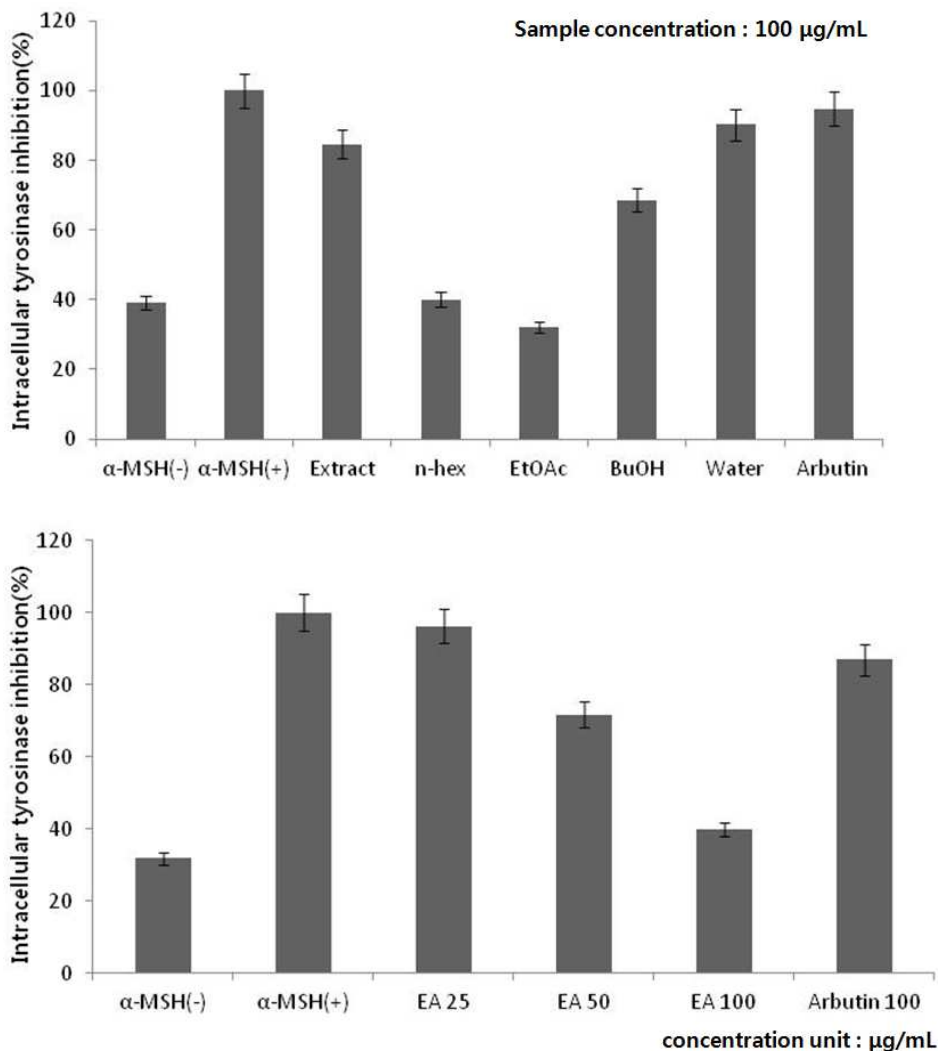


Figure 41. Intracellular tyrosinase inhibition of extract and solvent layers



3-2-7. B16F10 murine melanoma cell에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질량 측정 결과

Melanin contents의 양을 확인하는 실험에서 melanin의 합성을 저해하는 활성이 가장 좋았던 EtOAc layer가 melanin 합성에 관련된 단백질인 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2 단백질에 미치는 영향을 측정하기 위해 western blotting을 실시하였다. 그 결과 농도 의존적이지는 않지만 100 µg/mL의 농도에서 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2 단백질의 발현을 저해하는 것을 확인하였다. 이로써, EtOAc layer는 melanin 합성에 관련된 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현을 억제함으로써 melanin 합성을 저해하는 것으로 여겨진다(Figure 42).

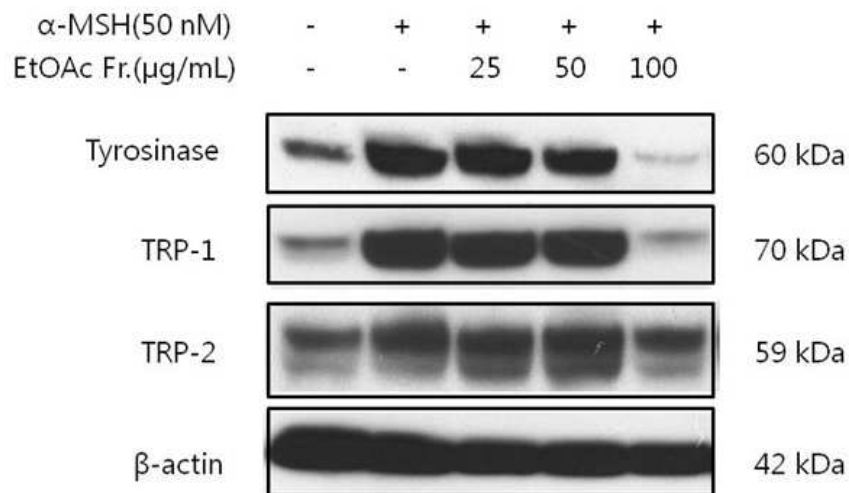


Figure 42. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and  $\beta$ -actin protein expression

### 3-2-8. RAW264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염 활성 실험 결과

NaNO<sub>2</sub> 표준용액을 이용하여 calibration curve를 그렸으며(Figure 43), 비양나무 가지 70% 추출물 및 분획물을 100 µg/mL의 농도로 처리하여 세포내에서의 염증 매개 물질인 nitric oxide의 생성량을 측정한 후, 시료가 nitric oxide의 생성에 미치는 영향을 확인하였다.

그 결과 LPS와 시료를 녹인 용매만을 처리한 LPS(+)와 nitric oxide의 생성량을 비교하였을 때 EtOAc layer에서 세포독성 없이 nitric oxide의 생성을 80.5% 저해하는 것을 확인하였고, 활성이 가장 좋은 EtOAc layer는 농도를 희석하여 nitric oxide의 생성량을 측정하였는데, 농도 의존적으로 nitric oxide의 생성을 저해하는 것을 확인하였다(Figure 44-45).

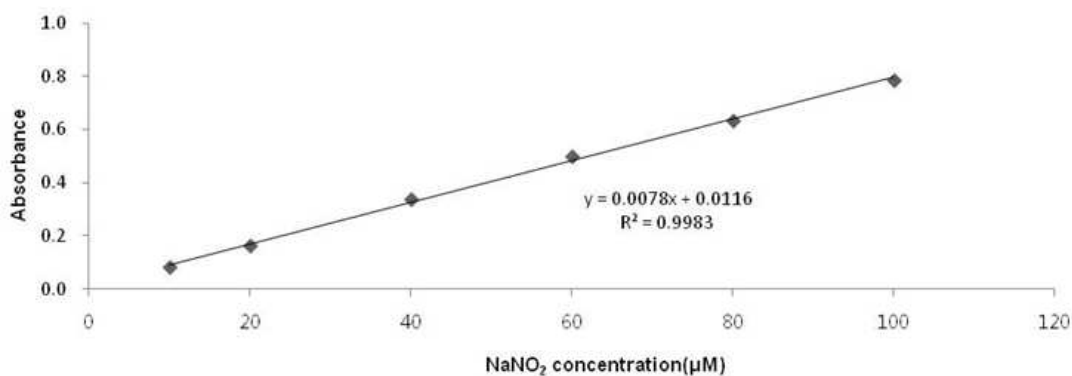
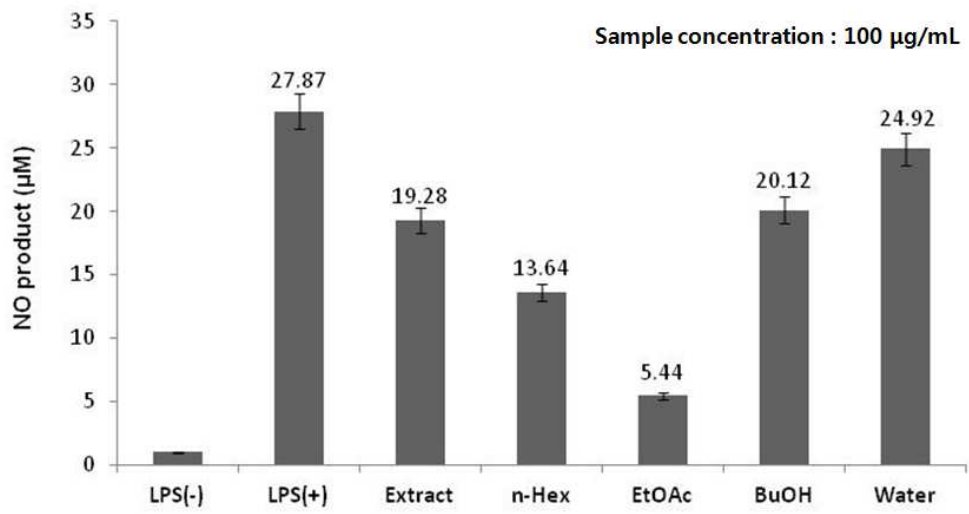


Figure 43. Calibration curve for quantification of nitric oxide

A)



B)

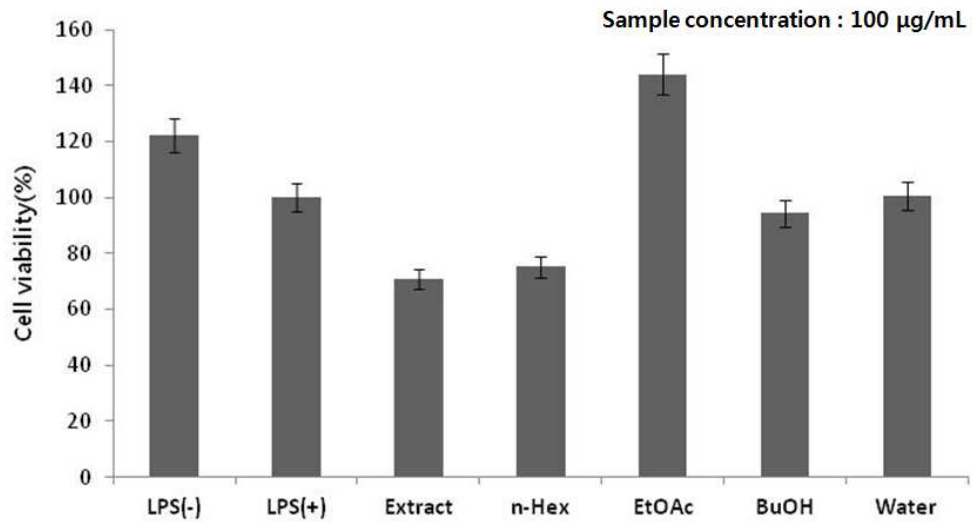


Figure 44. Nitric oxide product(A) and cytotoxicities(B) of extract and solvent layers

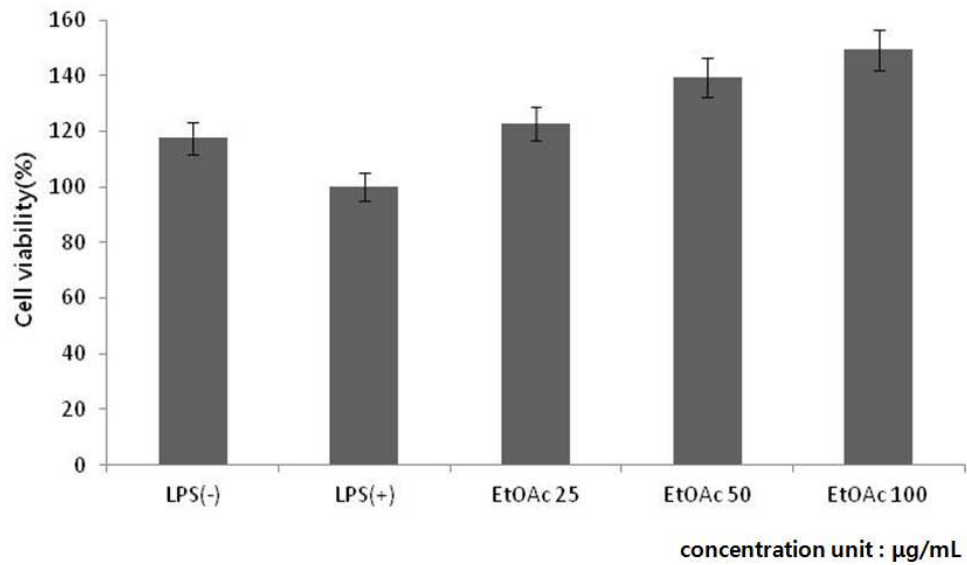
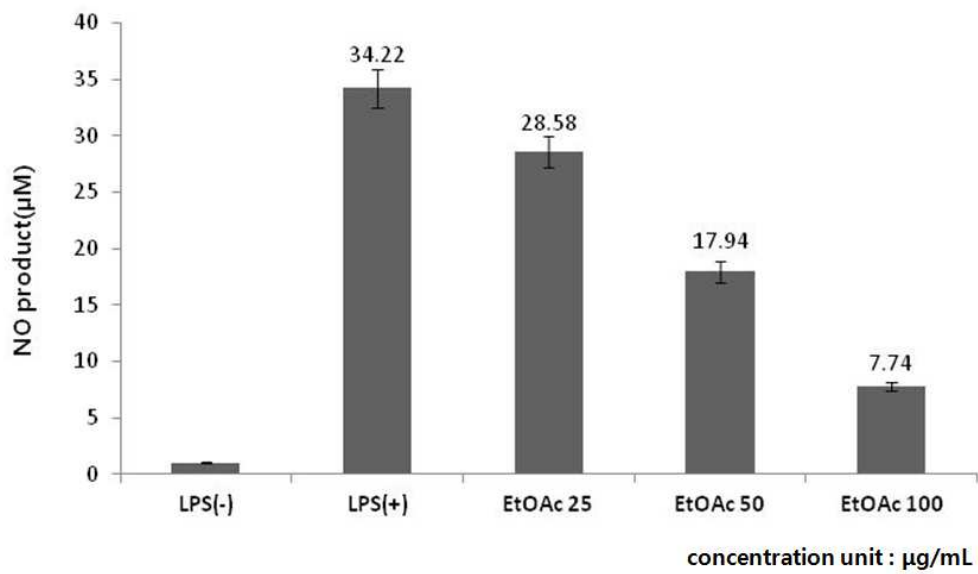


Figure 45. Nitric oxide product and cytotoxicities of ethyl acetate layer

3-2-9. Human normal fibroblast cell, Human keratinocyte cell 에서의 세포 독성 평가 결과

비양나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물들의 세포 독성을 확인하기 위해 CCD-986sk cell(human normal fibroblast cell)과 HaCaT cell(human keratinocyte cell)에 100 µg/mL의 농도로 처리하여 배양하였다. 그 결과 추출물과 *n*-Hex layer에서만 약간의 독성이 보이고, 나머지 분획물들에서는 세포독성을 보이지 않았다(Figure 46-47).

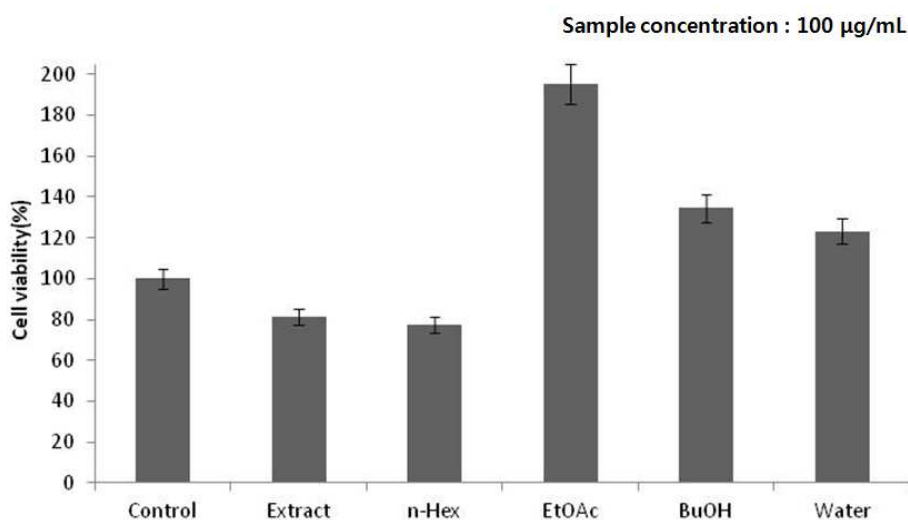


Figure 46. Cytotoxicities of extract and solvent layer in CCD-986sk cell

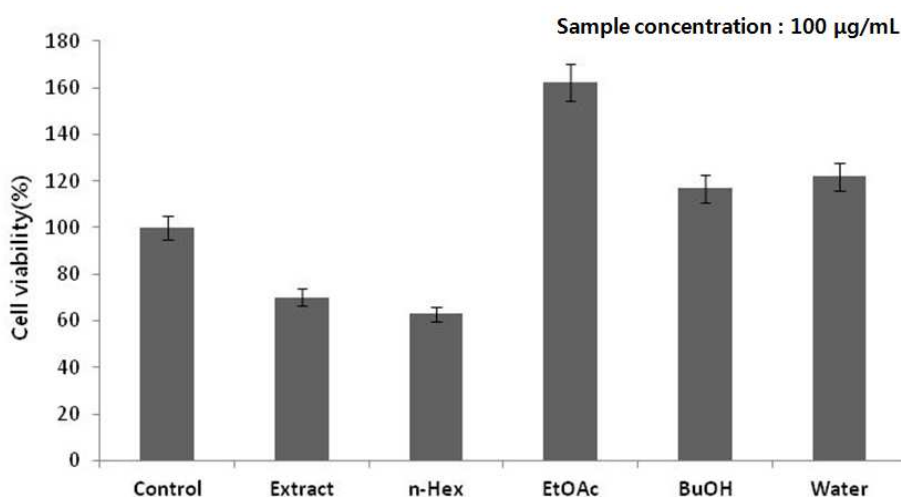


Figure 47. Cytotoxicities of extract and solvent layer in HaCaT cell

### 3-3. 비양나무 가지에서 분리한 compound들의 활성 검색

#### 3-3-1. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과

비양나무 가지로부터 분리한 화합물들의 DPPH radical scavenging 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 25, 50, 100, 300, 500  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하여  $\text{SC}_{50}$ 값을 계산하였다(Table 6).

Table 6.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds

Compound No.	Compound name	$\text{SC}_{50}(\mu\text{M})$
1	Freidelin	>500
2	Friedelanol	>500
3	5,7-Dihydroxychromone	>500
4	Methyl vanillate	>500
5	Catechin	40.05
6	<i>epi</i> -Catechin	29.92
7	Scopoletin	>500
Positive control	Vitamin C	46.23

그 결과 compound 5, 6의  $\text{SC}_{50}$  값이 각각 40.05, 29.92  $\mu\text{M}$ 로 대조군인 vitamin C(46.23  $\mu\text{M}$ )보다 좋은 radical scavenging 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

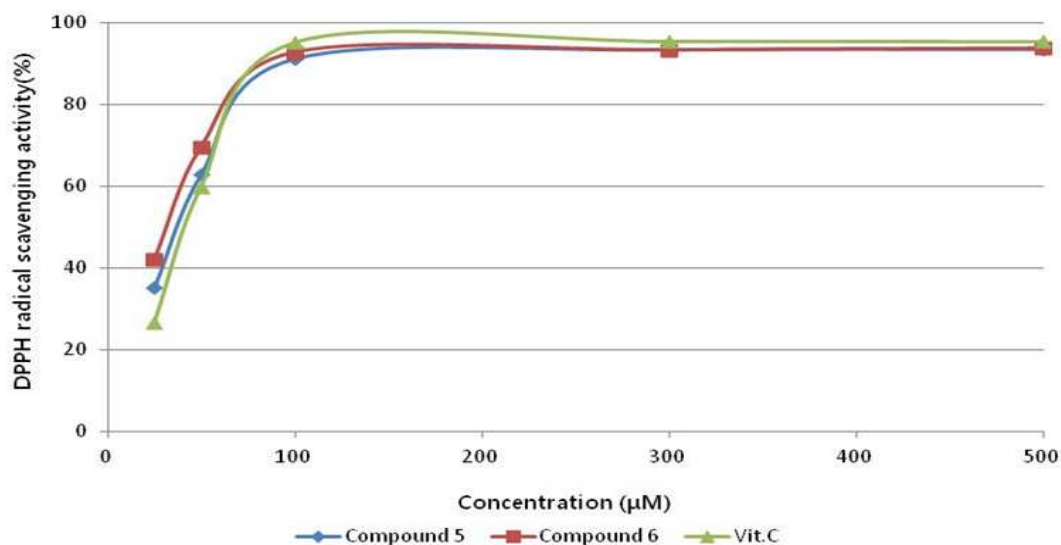


Figure 48. DPPH radical scavenging activities of compounds **5**, **6** and vitamin C.

### 3-3-2. ABTS radical cation scavenging 활성 검색 결과

비양나무 가지로부터 분리한 화합물들의 ABTS radical cation scavenging 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 25, 50, 100, 300, 500 μM의 농도로 실험을 진행하여 SC<sub>50</sub>값을 계산하였다(Table 7).

Table 7. SC<sub>50</sub> values of ABTS radical cation scavenging activities of isolated compounds

Compound No.	Compound name	SC <sub>50</sub> (μM)
1	Freidelin	>500
2	Friedelanol	>500
3	5,7-Dihydroxychromone	>500
4	Methyl vanillate	147.77
5	Catechin	7.56
6	<i>epi</i> -Catechin	7.21
7	Scopoletin	64.04
Positive control	Vitamin C	31.32

그 결과 compound 5, 6의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 7.56, 7.21 μM로 대조군인 vitamin C(31.32 μM)보다 좋은 radical scavenging 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

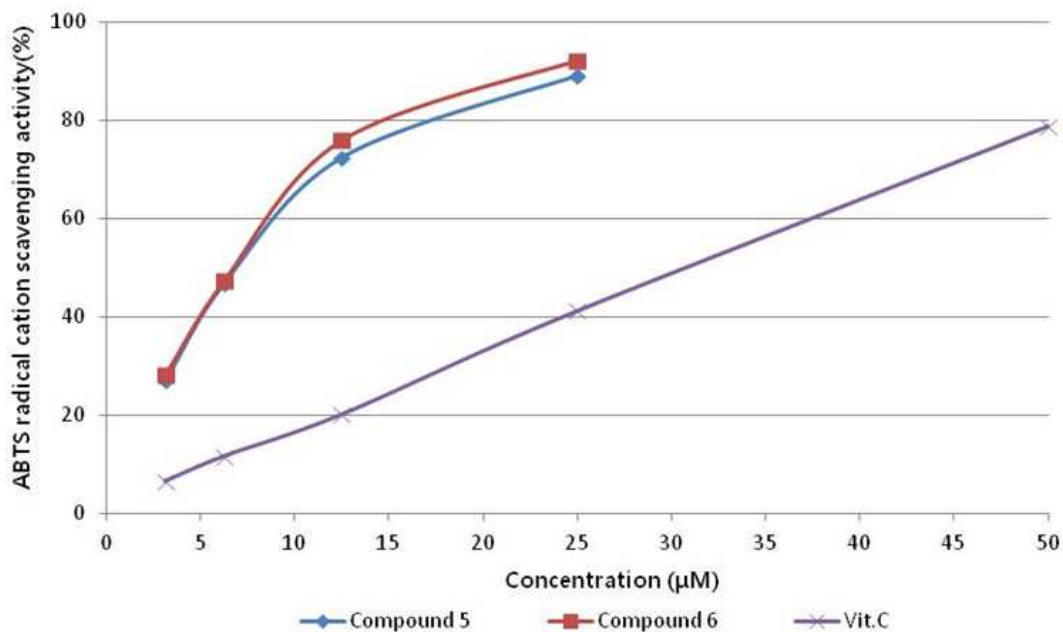


Figure 49. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of compounds 5, 6 and vitamin C

### 3-3-3. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과

비양나무 가지로부터 분리한 화합물들의 tyrosinase inhibition 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 25, 50, 100, 300, 500 μM의 농도로 실험을 진행하여 IC<sub>50</sub>값을 계산하였다(Table 8).

그 결과 compound 7의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 111.80 μM로 대조군인 arbutin (209.68 μM)보다 좋은 tyrosinase inhibition 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.



Table 8. IC<sub>50</sub> values of tyrosinase inhibition activities of isolated compounds

Compound No.	Compound name	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	Freidelin	>500
2	Friedelanol	>500
3	5,7-Dihydroxymone	>500
4	Methyl vanillate	>500
5	Catechin	>500
6	<i>epi</i> -Catechin	>500
7	Scopoletin	111.80
Positive control	Arbutin	209.68

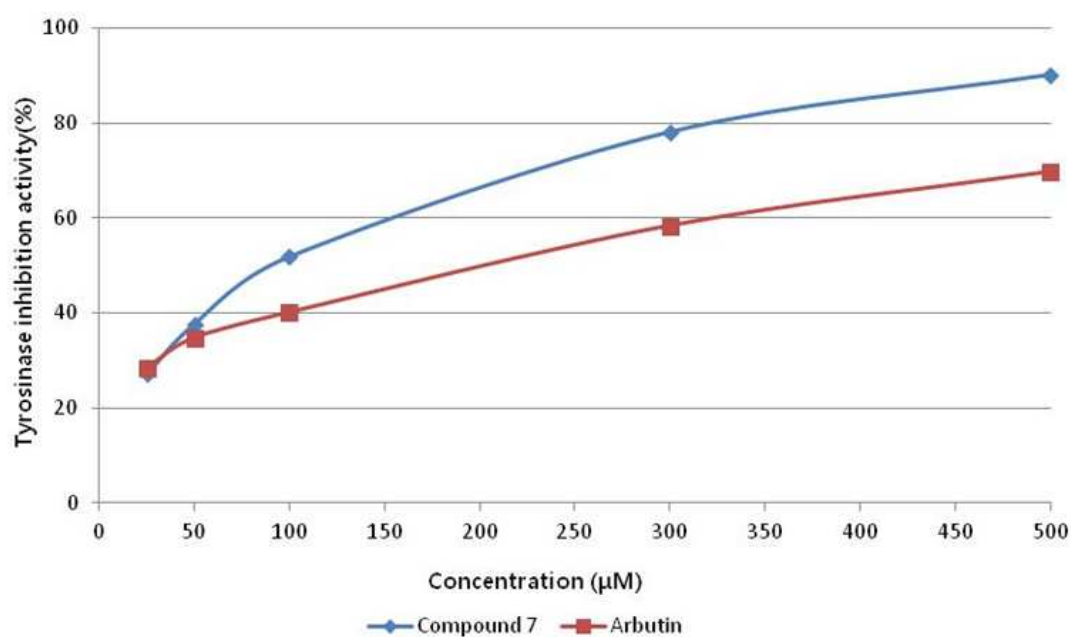


Figure 50. Tyrosinase inhibition activities of compounds **7** and arbutin

### 3-3-4. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 결과

비양나무 가지로부터 분리한 화합물에 대하여 200, 300, 400  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 때의 melanin contents양을 측정하였다. 그 결과 비양나무 가지로부터 분리한 compound 1-7은 모두 melanin합성을 저해하지 않는 것을 확인 할 수 있었고, compound 3은 400  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 melanin합성을 10배 이상 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 51).

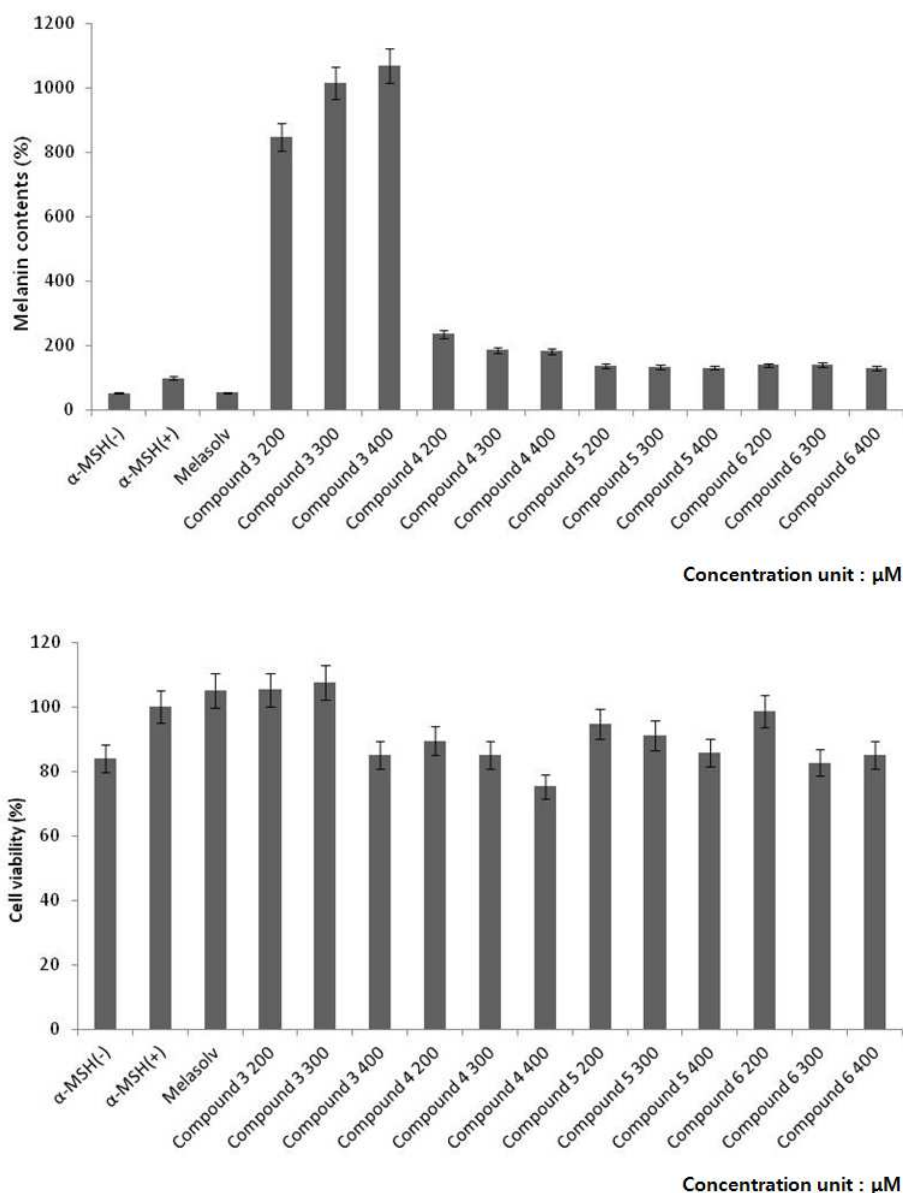


Figure 51. Melanin contents and cytotoxicities of compounds 1-7

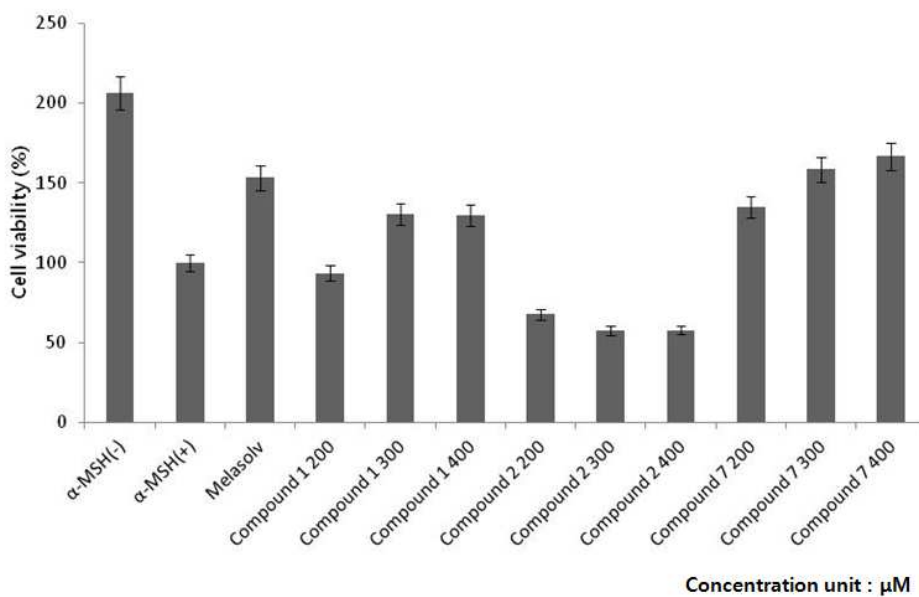
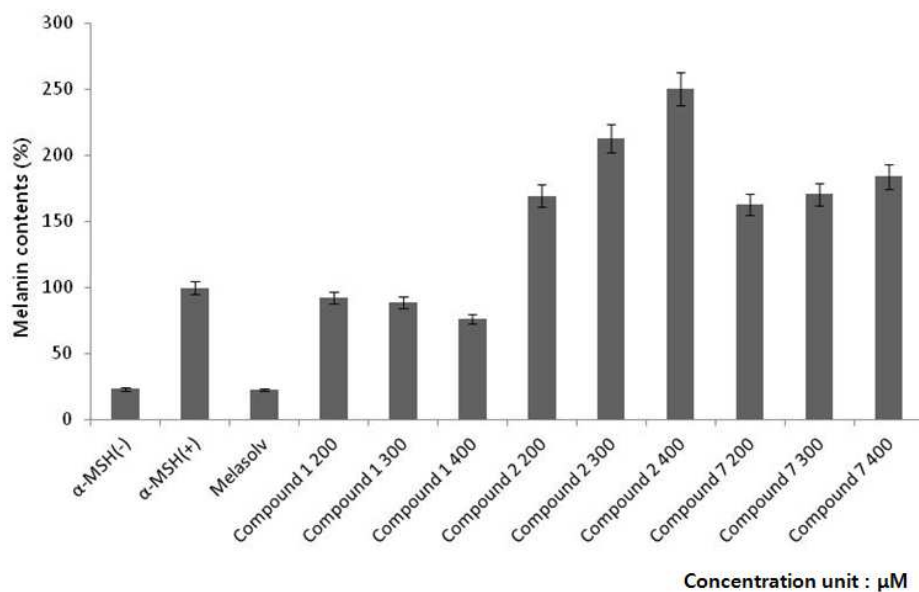


Figure 51. Melanin contents and cytotoxicities of compounds 1-7

### 3-3-5. RAW264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염 활성 실험 결과

NaNO<sub>2</sub> 표준용액을 이용하여 calibration curve를 그렸으며(Figure 43), 비양 나무 가지로부터 분리한 화합물에 대하여 300 μM의 농도로 처리하였을 때의 nitric oxide의 생성량을 측정한 후 시료가 nitric oxide의 생성에 미치는 영향을 확인하였다.

그 결과 LPS와 시료를 녹인 용매만을 처리한 LPS(+)와 nitric oxide의 생성량을 비교하였을 때 compound 7이 nitric oxide의 생성을 48.5% 저해하는 것을 확인하였다(Figure 52).

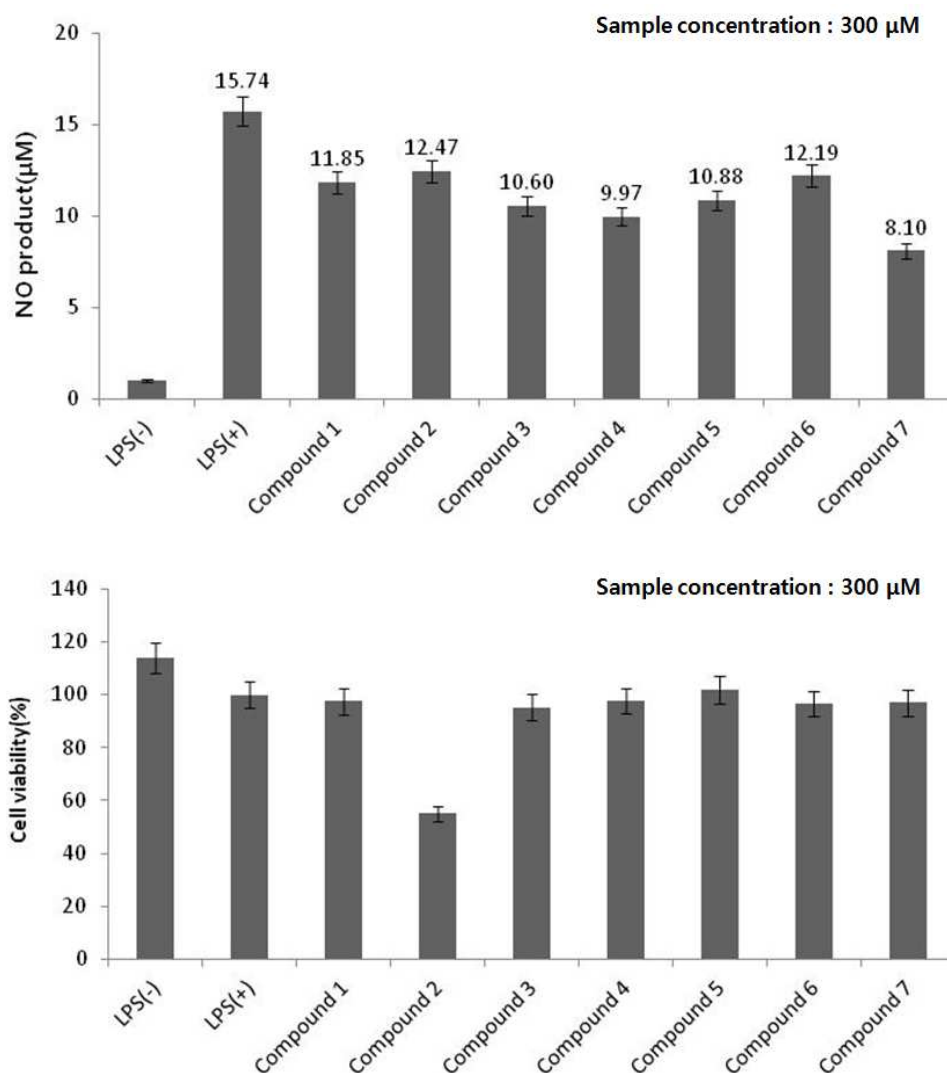


Figure 52. Nitric oxide product and cytotoxicities of compound 1-7

#### 4. 결론

비양나무(*Oreocnide fruticosa*)가지 추출물 및 분획물에 대해 다양한 생리활성을 검색하였고, 화합물을 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물의 항산화 활성 및 피부미백, 항염 효과를 검색하여 천연 항산화제 및 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보려고 본 연구를 진행하였다.

분리한 화합물들은 1D, 2D NMR technique를 이용하여 구조를 확인하였고, 문헌들과 비교하여 다시 한 번 구조를 확인하였다. 동정이 완료된 화합물은 friedelin (1), friedelanol (2), 5,7-dihydroxychromone (3), methyl vanillate (4), catechin (5), *epi*-catechin (6), scopoletin (7) 총 7개이고, 이들은 모두 비양나무에서 처음으로 분리·동정된 화합물이다.

항산화 활성은 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능을 측정하여 확인하였다. 그 결과 추출물 및 분획물 중 ethyl acetate fraction에서 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> radical을 50% 저해할 때의 농도가 각각 22.88, 7.06 µg/mL로 positive control인 vitamin C(SC<sub>50</sub>값이 각각 8.64, 6.53 µg/mL)와 비교하였을 때 좋은 활성을 보였다. 분리된 화합물의 항산화 활성 실험에서는 DPPH radical 소거능 측정 실험에서 compound 5, 6의 SC<sub>50</sub>값이 각각 40.05, 29.92 µM로 positive control인 vitamin C(46.23 µM)와 비교하였을 때 우수한 활성을 보였다.

미백 활성 실험에서는 mushroom tyrosinase와 B16F10 murine melanoma cell을 갖고 실험을 하였는데, 추출물 및 분획물에서는 mushroom tyrosinase에 대해 저해 활성을 보이지 않았고, B16F10 murine melanoma cell에서 melanin contents양을 확인하였을 때는 같은 농도에서 ethyl acetate fraction이 세포독성 없이 positive control인 arbutin보다 약 4배 좋은 melanin합성 저해 활성을 확인할 수 있었다. Ethyl acetate fraction의 농도를 25, 50, 100 µg/mL로 B16F10 murine melanoma cell에 처리하였을 때의 melanin합성에 관련된 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 양을 측정한 결과 이들의 발현을 저해함으로써 melanin의 합성을 저해한다는 것을 확인할 수 있었다. 분리된 화합물들의 미백 활성 실험을 보면, mushroom tyrosinase 저해활성 실험에서는 compound 7의 IC<sub>50</sub>값이 111.80 µM로 positive control인 arbutin(209.68 µM)보다 2배 정

도 뛰어난 저해능력을 보였다. 그리고 B16F10 murine melanoma cell에 compound를 처리하였을 때는 melanin 합성을 저해하는 compound는 보이지 않았다. 그렇지만 compound **3**을 400  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 때 compound를 처리하지 않았을 때보다 10배 이상의 melanin이 합성되는 것을 확인하였다. Compound **3**은 백반증 치료 및 새치 방지에 관한 연구가 진행되면 좋을 것이라 사료된다.

항염 활성 실험에서는 RAW 264.7 murine macrophage에 시료를 처리하여 염증매개 물질인 nitric oxide의 생성량을 측정하였다. 추출물 및 분획물을 처리하였을 때 ethyl acetate fraction이 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포독성없이 nitric oxide의 생성을 80.5 % 저해하면서 가장 좋은 활성을 보였다. 분리된 화합물의 항염 활성실험에서는 compound **7**이 control 대비 nitric oxide의 생성을 48.5% 저해하여 가장 좋은 활성을 보였다.

마지막으로 Human normal fibroblast cell과 human keratinocyte cell에서의 세포독성을 확인한 결과 ethyl acetate fraction에서는 독성을 보이지 않았다.

아직 연구가 더 필요하겠지만, 지금까지의 실험결과들로 보아 비양나무 가지를 이용한 천연 항산화제, 피부미백제, 항염증제로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

## 5. 참고문헌

- 1) 강삼식, “이차 대사산물의 동정 및 구조분석” *한국화학공학회지*, 2000, 6(2), 3661.
- 2) 평년값자료, 대한민국 기상청, 1981-2010, 제주(184).
- 3) 평년값자료, 대한민국 기상청, 1981-2010, 서귀포(189).
- 4) 고희철, “진균, 제주조릿대 및 미역쇠 성분 동정 및 생리활성 연구” *제주대학교 대학원*, 2010, 박사학위논문.
- 5) 전종국, “외모관리를 위한 경락마사지 이용 실태조사” *한국의류학회 학술발표논문집*, 2009, 107.
- 6) 유명미,; 김주덕, “남성들의 생활 습관 및 화장품 구매형태에 관한 연구” *한국미용학회 학술발표논문집*, 2009.
- 7) 송지성,; 김영아, “국내 기능성 화장품 산업의 향후 시장 전망에 관한 연구” *한국디자인문화학회지*, 2009, 15(4).
- 8) 홍재기, “활성산소에 의한 피부노화와 항산화비타민의 효능에 대한 이론적 고찰” *대한피부미용학회지*, 2009, 7(2).
- 9) Lin, J. Y.; Fisher, D. E. "Melanocyte biology and skin pigmentation" *NATURE*, 2007, 445, 843-850.
- 10) 김정은, “비쭈기나무 가지로부터 항산화, 미백 및 주름개선 활성 성분 규명”

제주대학교 대학원, 2011, 석사학위논문.

11) 최명신,; 김도정,; 김강섭,; 김미정,; 권경진,; 홍진태,; 황순옥,; 최보경, “한국, 유럽 및 미국의 화장품 안전성 확보 동향” *FDC 법제연구*, 2011, 6(1,2), 19-28.

12) 경기열, “기능성화장품 연구개발 동향” *Korea Industrial Chemistry News*, 2010, 13(4), 1-10.

13) 김주덕, “한방 화장품의 세계화 및 명품 브랜드 전략에 관한 연구” *한국미용학회 학술발표논문집*, 2007.

14) Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(and phenol derivatives) in urine" *The Journal of Biological Chemistry*, 1915, 22, 305-308.

15) Blois, M. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, 1958, 181, 1199-1200.

16) 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.

17) Mason, H. S.; Peterson, E. W. "Melanoproteins I. reactions between enzyme-generated quinones and amino acids" *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1965, 111(1), 134-146.

18) Escobedo-Martinez, C.; Concepcion Lozada, M.; Hernandez-Ortega, S.;



Villarreal, M. L.; Gnecco, D.; Enriquez, R. G.; Reynolds, W. "<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR characterization of new cycloartane triterpenes from *Mangifera indica*" *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2012**, 50(1), 52-57.

19) Salazar, G. C. M.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A.; Lula, I. S. "Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss:<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shift assignments" *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY*, **2000**, 38, 977-980.

20) Lee, J. H.; Baek, I. Y.; Ha, T. J.; Choung, M. G.; Ko, J. M.; Oh, S. K.; Kim, H. T.; Ryu, H. W.; Park, K. Y.; Park, K. H. "Identification and Characterization of Phytochemicals from Peanut(*Arachis hypogaea* L.) Pods" *Food Science and Biotechnology*, **2008**, 17(3), 475-482.

21) 박성환, "좁은잎천선과로부터 향산화 및 티로시나아제 저해 활성성분 연구" *제주대학교 대학원*, **2011**, 석사학위논문.

22) Xia, Y.; Xiu-zhen, L.; Chen, X. "Chemical constituents from *Viola yedoensis*" *Chemistry of Natural Compounds*, **2010**, 46(5), 809-810.

23) 김상숙, "새덕이나무 추출물의 활성성분 및 제주자생식물 에센셜 오일의 항균, 항염 활성 규명" *제주대학교 대학원*, **2011**, 박사학위논문.