



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

해조류 패 (*Ishige okamurae*)로부터
항산화, 주름개선, 미백 및 항균
활성 성분 규명



濟州大學校 大學院

化 學 科

金 亨 珉

2015年 2月

해조류 패 (*Ishige okamurae*)로부터
항산화, 주름개선, 미백 및 항균
활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

金 亨 珉

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



金亨珉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

2015年 2月

Identification of Anti-oxidative, Anti-wrinkle,
Skin-whitening and Anti-bacterial Constituents
from the *Ishige okamurae*

Hyeong Min Kim
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2015. 2.

This thesis has been examined and approved.



Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	iv
List of Tables	iv
List of Figures	v
List of Abbreviations	viii
Abstract	ix
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 시약 및 기기	6
2. 재료	7
3. 추출, 분획 및 분리	8
3-1. 껍질의 추출 및 분획(1)	8
3-2. 껍질의 추출 및 분획(2)	9
3-3. Ethyl acetate 분획의 활성 성분 분리	10
4. 활성실험	13
4-1. 항산화 활성 실험	13
4-1-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정	13
4-1-2. DPPH radical 소거 활성 실험	13
4-1-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험	15
4-2. 주름개선 활성 실험	17
4-2-1. Elastase 저해 활성 실험	17
4-3. 미백 활성 실험	18
4-3-1. Tyrosinase 저해 활성 실험	18
4-3-2. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 활성실험	19
4-3-2-1. 세포배양	19

4-3-2-2. 시료의 전처리	19
4-3-2-3. Melanogenesis 저해 활성 측정 실험	19
4-3-2-4. Intracellular tyrosinase 저해 활성 측정 실험	20
4-3-2-5. 세포독성평가	21
4-3-2-5-1. MTT assay	21
4-3-2-5-2. LDH (lactate dehydrogenase) assay	22
4-4. 항균 활성 실험	23
4-4-1. 균주 배양	23
4-4-2. Paper disc diffusion method	23
4-4-3. MIC (minimum inhibitory concentration) 실험	24
4-4-4. MBC (minimum bactericidal concentration) 실험	24
III. 결과 및 고찰	25
1. 화합물의 구조 결정	25
1-1. Compound 1의 구조해석	25
1-2. Compound 2의 구조해석	32
1-3. Compound 3의 구조해석	35
1-4. Compound 4의 구조해석	38
1-5. Compound 5의 구조해석	41
1-6. Compound 6의 구조해석	43
2. 항산화 활성 실험 결과	46
2-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정 결과	46
2-2. DPPH radical 소거 활성 실험 결과	48
2-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성 실험 결과	48
2-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험 결과	49
2-3-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성 실험 결과	49
3. 주름개선 활성 실험 결과	51
3-1. Elastase 저해 활성 실험 결과	51
3-1-1. 추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성 실험 결과	51

3-1-2. 분리된 화합물의 elastase 저해 활성 실험 결과	53
4. 미백 활성 실험 결과	54
4-1. Tyrosinase 저해 활성 실험 결과	54
4-1-1. 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해 활성 실험 결과	54
4-1-2. 분리된 화합물의 tyrosinase 저해 활성 실험 결과	55
4-2. Melanogenesis 저해 효과 측정 실험 결과	56
4-2-1. 추출물 및 분획물의 melanogenesis 저해 활성 측정 실험 및 MTT, LDH 세포독성 실험 결과	56
4-2-2. 분리된 화합물의 melanogenesis 저해 활성 측정 실험 및 MTT, LDH 세포독성 실험 결과	59
4-3. Intracellular tyrosinase 저해 활성 측정 실험 결과	62
4-3-1. 추출물 및 분획물의 intracellular tyrosinase 저해 활성 측정 실험 결과 ·	62
4-3-2. 분리된 화합물의 intracellular tyrosinase 저해 활성 측정 실험 결과 ·	64
5. 항균 활성 실험 결과	65
5-1. Paper disc diffusion 실험 결과	65
5-1-1. 추출물 및 분획물의 paper disc diffusion 실험 결과	65
5-2. MIC, MBC 실험 결과	66
5-2-1. 추출물 및 분획물의 MIC, MBC 실험 결과	66
IV. 요약 및 결론	67
V. 참고문헌	69

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and fractionation from <i>I. okamurae</i>	9
Scheme 2. Procedure of extraction and fractionation from <i>I. okamurae</i>	10
Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 1 , 2 from <i>I. okamurae</i>	10
Scheme 4. Procedure of isolation of compound 3 from <i>I. okamurae</i>	11
Scheme 5. Procedure of isolation of compounds 4 , 5 , 6 from <i>I. okamurae</i>	12

List of Tables

Table 1. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 1	27
Table 2. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 2	33
Table 3. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 3	36
Table 4. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 4	39
Table 5. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 5	41
Table 6. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 6	44
Table 7. IC ₅₀ value of elastase inhibition activities of isolated compounds	53
Table 8. IC ₅₀ value of tyrosinase inhibition activities of isolated compounds	55
Table 9. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>I. okamurae</i>	61
Table 10. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>I. okamurae</i>	62
Table 11. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>I. okamurae</i>	62

List of Figures

Figure 1. Melanin synthesis pathway	3
Figure 2. <i>Ishige okamurae</i>	7
Figure 3. Scavenging of DPPH radical by an anti-oxidant	14
Figure 4. Scavenging of ABTS ⁺ radical by an anti-oxidant	16
Figure 5. Principle of MTT assay	21
Figure 6. Principle of LDH assay	22
Figure 7. Chemical structure of compound 1	26
Figure 8. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	28
Figure 9. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	28
Figure 10. DEPT-135 spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	29
Figure 11. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	30
Figure 12. HMBC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	30
Figure 13. HMQC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	31
Figure 14. Chemical structure of compound 2	32
Figure 15. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	34
Figure 16. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	34
Figure 17. Chemical structure of compound 3	35
Figure 18. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃	37
Figure 19. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃	37
Figure 20. Chemical structure of compound 4	38
Figure 21. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃	40
Figure 22. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃	40
Figure 23. Chemical structure of compound 5	41
Figure 24. ¹ H-NMR spectrum of compound 5 in DMSO- <i>d</i> ₆	42
Figure 25. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5 in DMSO- <i>d</i> ₆	42
Figure 26. Chemical structure of compound 6	43

Figure 27. ^1H -NMR spectrum of compound 6 in CDCl_3	45
Figure 28. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 in CDCl_3	45
Figure 29. Calibration curve for quantification of total polyphenolic compounds	46
Figure 30. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers	47
Figure 31. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers	48
Figure 32. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers	49
Figure 33. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers	50
Figure 34. SC_{50} value of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers	50
Figure 35. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers	51
Figure 36. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers	52
Figure 37. IC_{50} value of elastase inhibition activities of extract and solvent layers	52
Figure 38. Elastase inhibition activities of isolated compounds	53
Figure 39. Tyrosinase inhibition activities of extract and solvent layers	54
Figure 40. Tyrosinase inhibition activities of compound 1	55
Figure 41. Melanin contents and cell viability of extract and solvent layers	56
Figure 42. LDH cytotoxicity activities of extract and solvent layers	57
Figure 43. Melanin contents and cell viability of extract and solvent layers of various concentration	57
Figure 44. LDH cytotoxicity activities of extract and solvent layers of various concentration	58
Figure 45. Melanin contents and cell viability of isolated compounds	59
Figure 46. LDH cytotoxicity activities of isolated compounds	60
Figure 47. Melanin contents and cell viability of isolated compounds of various concentration	60
Figure 48. LDH cytotoxicity activities of isolated compounds of various concentration	61

Figure 49. Intracellular inhibition activities of extract and solvent layers62
Figure 50. Intracellular inhibition activities of extract and solvent layers of various concentration 63
Figure 51. Intracellular inhibition activities of isolated compounds64
Figure 52. Intracellular inhibition activities of isolated compounds of various concentration 64



List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
CC	Column chromatography
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CDCl ₃	Chloroform
CFU	Colony forming unit
COSY	Correlation spectroscopy
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
D.W	Distilled water
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Fr.	Fraction
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
<i>I. okamurae</i>	<i>Ishige okamurae</i>
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50 %
int	Integration
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MP	MPLC fraction
MTT	Dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium salt
multi	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
O.D	Optical density
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
s	Singlet
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50 %
t	Triplet
V	Vial
VLC	Vacuum liquid chromatography
α-MSH	α-Melanocyte-stimulating hormone

Abstract

Identification of Anti-oxidative, Anti-wrinkle, Skin-whitening and Anti-bacterial Constituents from the *Ishige okamurae*

Hyeong Min Kim

Department of Chemistry, Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

Ishige okamurae, a brown algae, was investigated to identify the constituents possessing anti-oxidative, anti-wrinkle, skin-whitening and anti-bacterial activities. The dried *Ishige okamurae* (1 kg) was extracted three times for 24 hours using 70% ethanol. The obtained extract was successively partitioned into *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) and water (H₂O) fractions. For the anti-oxidation test, EtOAc fraction has good DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities. Moreover, EtOAc fraction has good skin-whitening, anti-wrinkle and anti-bacterial activities. Therefore, further phytochemical studies were conducted for the EtOAc fraction, which led to isolation of six constituents such as di-phlorethohydroxycarmalol (1), *epi*-loliolide (2), γ -linolenic acid (3), pyromeconic acid (4), phloroglucinol (5) and linoleic acid (6).

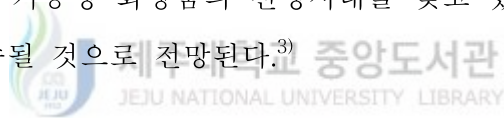
Based on the results, it is suggested that *Ishige okamurae* EtOAc fraction could be potentially applicable in the cosmetical and/or pharmaceutical industries, especially as anti-oxidant, anti-wrinkle, skin-whitening and anti-bacterial ingredient.

I. 서론

1. 연구의 필요성

생활과 소득 수준이 높아지고 향상되면서 사람들은 의식주에 따른 일상적인 라이프스타일에서 벗어나 개인의 미적 생활에도 관심을 갖게 되었다.¹⁾ 이러한 사회 변화에 맞춰, 지난 2013년 상반기에 ‘관상’이라는 영화가 인기를 끌었다. 관상 능력 못지않게 사람의 운명과 행운에 영향을 준다고 생각하는 트렌드의 영향으로 성형 수술까지는 아니더라도, 관상을 좋게 하고, 더 젊어 보이기 위해서 마사지와 피부 관리를 하고 메이크업을 하는 현상도 생겼다.²⁾

이로 인해 화장품 산업은 아름다움에 대한 욕구를 바탕으로 지금까지 발전해왔다. 최근 화장품시장에 새로운 변화의 바람은 인간의 이러한 꿈의 실현 가능성을 더욱 높여주고 있으며 첨단 기술에 의해 탄생한 신개념의 기능성 화장품이 속속히 등장하면서 기능성 화장품의 전성시대를 맞고 있다. 이러한 움직임은 앞으로 꾸준히 지속될 것으로 전망된다.³⁾



2. 항산화(Anti-oxidative)

피부노화의 원인은 여러 가지가 있겠지만 그 중에서 여러 가지 장애나 노화물질의 축적에 의해서 진행된다고 주장하는 환경기인설(enviromental etiology)이 많은 사람들의 지지를 받고 있다. 피부는 산소나 자외선 및 유해물질 등의 외부 환경에 항상 노출되어 있으므로 피부의 노화는 외부인자들의 영향에 의한 것이라고 할 수가 있다.⁴⁾ 특히 산소는 생명유지를 위한 여러 대사반응에 필수요소이고, 인체 내 독극물질 해독을 위해서도 필요하지만 산소가 인체에 유익한 것만은 아니어서 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 광화학반응 등 각종 공해물질, 물리화학적, 환경적 요인 등에 의해 슈퍼옥사이드 라디칼(super oxide radical; $\cdot O_2^-$), 하이드록시 라디칼(hydroxy radical; $HO\cdot$), 과산화수소(hydrogen peroxide; H_2O_2), 일중항산소(singlet oxygen; 1O_2)와 같은 반응성이 매우 큰 free radical로

전환되면 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성이 있다.⁵⁾

이러한 작용을 피부 세포의 산화라고 하기 때문에 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제는 피부노화 방지효과를 기대할 수가 있다. 본 연구에서는 DPPH radical 과 ABTS radical cation 소거능력을 측정함으로써 항산화 능력을 조사하였다.

3. 주름개선(Anti-wrinkle)

최근 현대인들의 경제수준이 향상되고 현대의학의 발전으로 인하여 평균수명이 늘어나고 여유로워짐에 따라 피부건강에도 많은 관심을 가지게 되었다.⁶⁾ 건강한 피부를 유지하고자 하는 목적에 따라 많은 미용관련 화장품 및 식품이 개발되고 있고, 최근 피부주름 개선을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁷⁾

피부의 노화는 그 요인에 따라 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 내인적 노화는 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹으면서 쇠퇴하는 것이며, 외인적 노화는 태양광선 등 누적된 외부 스트레스에 의해 노화 현상이 나타나는 것이다. 특히 각종 오염물질과 자외선 노출 등 외인적 노화에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되고 탄력이 감소될 뿐만 아니라, 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하게 된다.^{8,9)} 자외선에 피부가 노출되면 색소침착이 증가하는 이유는 피부 세포가 자외선 흡수에 의한 손상을 방어하기 위한 목적으로 멜라닌 색소 생성 유도과 밀접한 관계가 있다. 자외선에 의한 피부 노화가 진행되면 멜라닌 증식이 항시적으로 되고 그 결과 기미가 나타난다.¹⁰⁾ 이런 노화들이 진행될수록 피부를 구성하는 물질인 collagen, elastin, hyaluronic acid 등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소하고 type-1 collagenase의 생합성이 증가하여 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 증가되면 진피 내 교원 섬유, 탄력 섬유, fibronectin 과 같은 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력을 떨어뜨리고 피부 주름생성을 야기한다.¹¹⁾

Collagen은 진피의 90% 이상을 차지하고 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 그렇기 때문에 collagen의 감소는 피부노화 및 주름생성과 매우 깊은 관계를 가지고 있다.⁷⁾

4. 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.¹²⁾ 이러한 melanin이 과잉 생산이 되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소 침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하여 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾

Melanin이 생성되는 과정을 살펴보면 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 (DCT; dopachrome tautomerase)가 아주 중요하게 작용하는 것을 볼 수 있다.

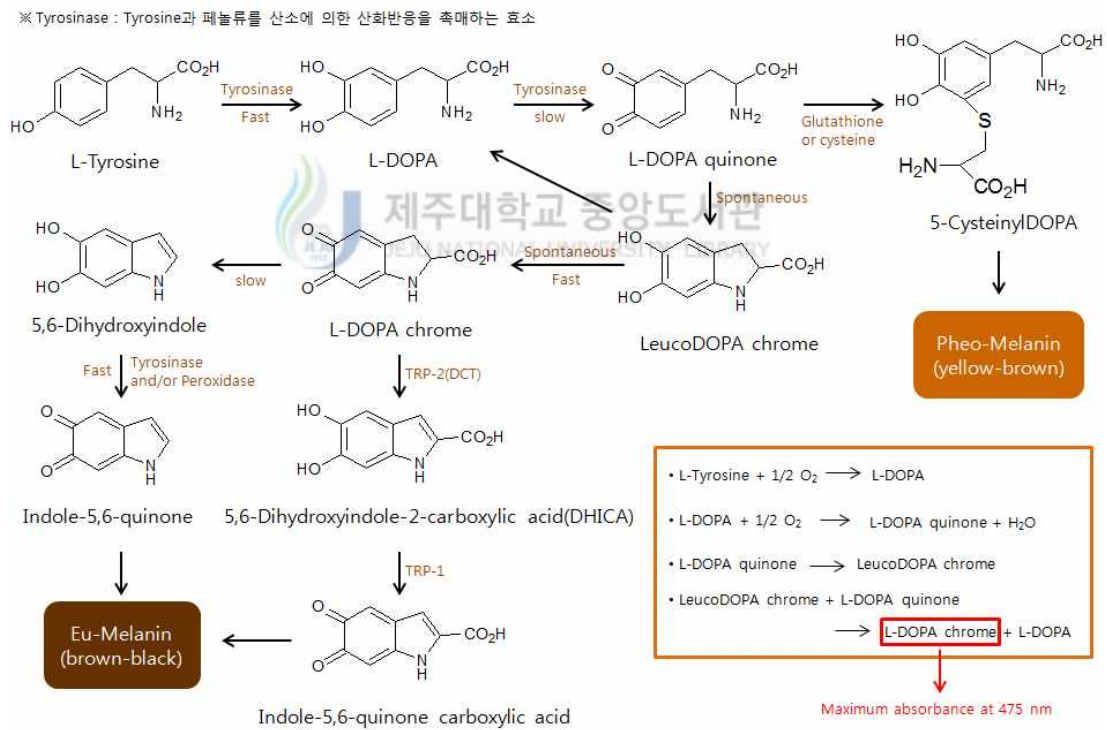


Figure 1. Melanin synthesis pathway.¹⁴⁾

5. 항균(Anti-bacterial)

염증을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다. 피부상재균 중 여드름 유발에 관여하는 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* 등을 들 수 있다. 여드름은 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 이는 주로 사춘기 나이의 사람에게서 발생하는데 이는 사춘기 나이에 분비되기 시작하는 안드로겐이라는 남성호르몬 때문인데, 안드로겐은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 각화를 일으킨다. 피지의 분비 증가와 표피 각화로 모낭-피지선에서 피지가 정체되어 모낭이 막힘에 따라 모낭내부가 *P. acnes*를 비롯한 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다. 동시에 *S. epidermidis*와 같은 다른 세균들이 모낭주위에 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다. 여드름 발생의 병리 조직학적인 기전은 *P. acnes*의 효소, 사이토카인 및 보체와 중성구, 손상된 각질형성세포에서 분비된 cytokine등이 염증을 일으키는데 관여하는 것으로 알려져 있으나, 아직 정확한 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 피부염증이나 여드름의 치료 및 예방을 위해서 원인균에 대한 항균작용을 하는 약제가 일반적으로 사용되고 있다.¹⁵⁾

따라서 이런 문제점을 해결하는 안전성이 확보된 천연물을 이용한 항균효과가 있으면서 부작용이 없는 여드름 치료제를 개발하려고 노력중이다.

6. 해양천연물 연구의 필요성

해양생물의 대사물질에 관한 연구는 과학기술의 학술적인 면과 산업적인 면에서 공히 중요성이 대단히 크다. 천연물과 이들을 생산하는 생물소재에 관한 정보는 정밀화학과 생물산업의 필수적인 기반요소이다. 또한 해양천연물에 대한 과학 지식의 발전은 생물학, 화학, 의약학, 환경학 등 여러 관련분야에 필수적인 정보와 연구수단 및 연구목표를 제공하여 해당분야의 기초 및 응용연구의 발전에 크게 기여하고 있다.

갈조류, 녹조류, 홍조류 등 대형 해조류는 다양한 구조의 생리활성 신물질을 함

유하고 있다. 문헌조사에 의하면 대형해조류 유래의 천연물들의 다수는 피부 관련 생리활성을 나타내어 새로운 향장품이나 피부 의약품의 개발을 위한 소재로서의 가치가 매우 높다. 실제로 일부 국가에서는 해조류 추출물을 피부 각질제거, 보습, 항산화 등의 기능성 화장품으로 사용하고 있다. 해조류 천연물의 피부 관련 소재로서의 개발가능성을 인식한 선진국에서는 최근 해조류 천연물에 기초한 피부 관련 제품의 연구개발을 활발히 진행하고 있다.

연근해에 다양한 해양생물이 서식하고 있음에도 불구하고 우리나라에서의 천연물화학적 관심은 주로 전통약물과 토양미생물 등 육상 환경의 생물자원에 대한 것이 대부분으로 해양천연물은 연구개발의 목표에서 소외되어 있다. 그러나 기존의 탐색연구는 국내 연안의 대형해조류가 외국의 경우에 비하여 손색이 없는 생리활성물질의 훌륭한 원천이며 산업적 개발가치가 큰 것을 나타내고 있다.¹⁶⁾

따라서 본 연구에서는 제주도 연안에 서식하고 있는 갈조류 ‘괘’를 분리, 정제하여 부가가치가 높은 천연 화장품 소재 탐색에 목표를 두고 연구를 진행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck, Junsei의 제품을 사용하였다. VLC (vacuum liquid chromatography)에는 ODS (octa decyl silica gel A-12 nm, S-75 μm , YMC Co., Ltd)를 사용하였으며, CC (normal-phase column chromatography)에는 silica gel (95-110 μm , Merck Co.), 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20 (0.1-0.025 mm)을 사용하였다. 또한 분리를 위하여 MPLC (medium pressure liquid chromatography, KP-C18-HS, Biotage Co.)를 사용하였다. 분리 과정에 사용된 TLC (thin-layer chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하여 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 SunriseTM (Tecan Co.)와 Biochrom Libra S22 (Cambridge Inc., England)을 이용하였다.

구조분석에 이용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL)과 AVANCE III (FT-NMR, Bruker Co.) 을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 Merck의 NMR 전용용매로 CD₃OD, CDCl₃, DMSO-*d*₆를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 갈조류인 패(*Ishige okamurae*)(시료번호 : JSW 001)는 (주)파라 제주를 통해 2013년 5월에 제주 삼양에서 채집하여 건재한 상품을 구입하였다. 패는 일본에 분포되고, 우리나라에서는 남부 해안각지에 분포하며 조간대 중부의 암상에 군락을 이룬다. 몸은 단단하고 색은 암갈색이며 가지는 분지하며 대지에는 잘 붙지 않으며, 건조 시 건조되면 검게 변한다. 구입한 패(*Ishige okamurae*)는 분쇄하여 사용하였다(Figure 2).

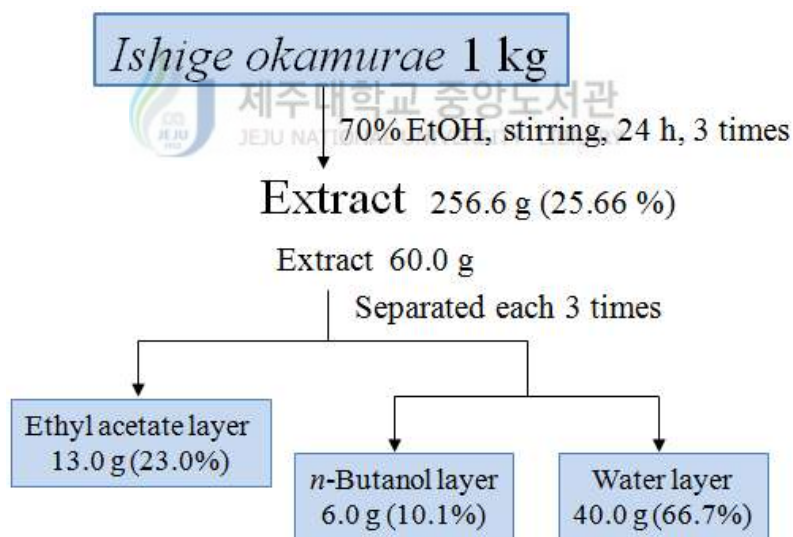


Figure 2. *Ishige Okamurae*.

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 패의 추출 및 분획(1)

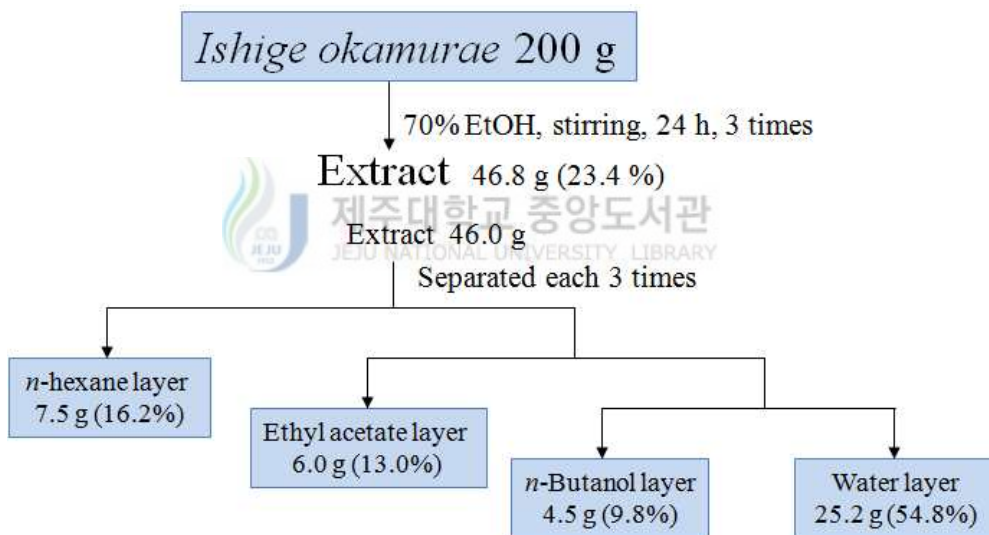
건조된 패 1 kg을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 20 L에 넣고 실온에서 24 시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 3 회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 이하의 수욕 상에서 진공농축기 (rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 256.6 g을 얻었다. 이 중 추출물 60.0 g을 증류수 2 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 ethyl acetate layer, *n*-butanol layer, water layer 등 총 3개의 용매 분획 층을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and fractionation from *I. okamurae*.

3-2. 껍질의 추출 및 분획(2)

건조된 껍질 200 g을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 20 L에 넣고 실온에서 24 시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 3 회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 이하의 수욕 상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 46.8 g을 얻었다. 이 중 추출물 46.0 g을 증류수 2 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer, ethyl acetate layer, *n*-butanol layer, water layer 등 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다(Scheme 2).

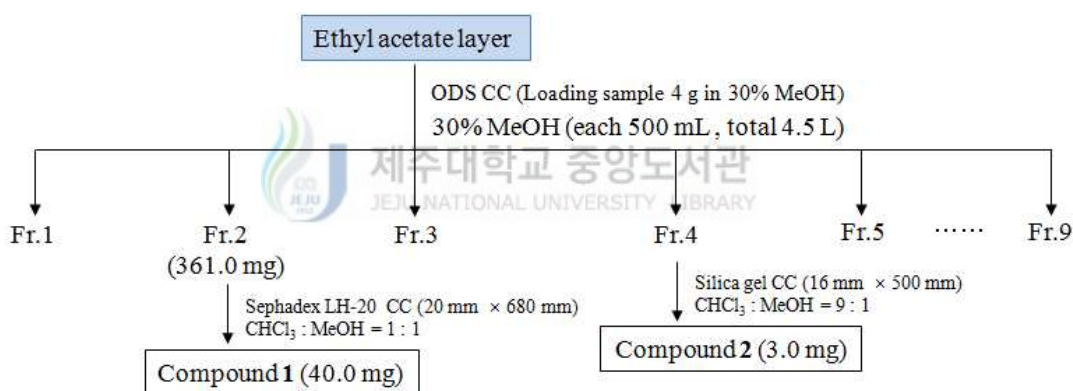


Scheme 2. Procedure of extraction and fractionation from *I. okamurae*.

3-3. Ethyl acetate 분획의 활성 성분 분리

용매분획(1) 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 4.0 g을 분획하기 위하여 역상 silica gel로 충전한 glass filter를 이용하여 VLC (vacuum liquid chromatography)를 수행하였다. 30 % methanol 500 mL에 sample 4.0 g을 녹이고, 30 % methanol 용매를 각 500 mL씩 총 9개의 fraction을 얻었다(Fr.1 ~ Fr.9).

VLC fraction들 중 Fr.2 (361 mg)을 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용해 용매조건을 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 1 : 1$ 로 하여 compound 1 (40 mg)을 얻었다. 그리고 Fr.4 를 순상 silica gel column chromatography를 이용하여 용매조건을 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 9 : 1$ 로 하여 compound 2 (3 mg)를 얻었다(Scheme 3).

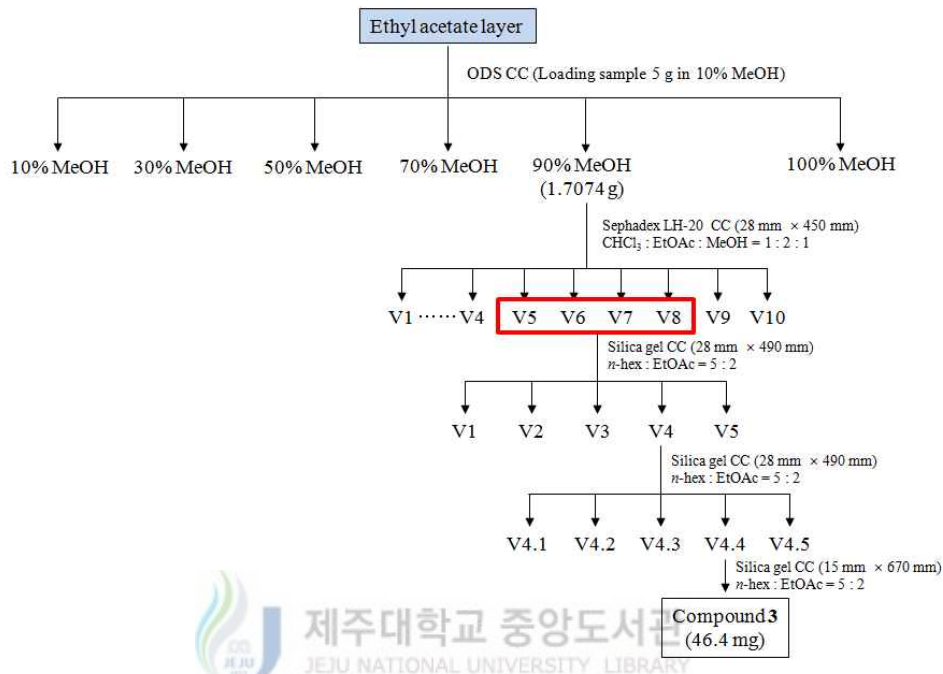


Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 1, 2 from *I. Okamurae*.

용매분획(2) 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 5.0 g을 분획하기 위하여 역상 silica gel로 충전한 glass filter를 이용하여 VLC를 수행하였다. 10% methanol 500 mL에 sample 5.0 g을 녹이고, 용매별로 20 %씩 증가시키면서 10 % methanol, 30 % methanol, 50 % methanol, 70 % methanol, 90 % methanol, 100 % methanol로 총 6개의 fraction을 얻었다.

VLC fraction들 중 90 % methanol fraction (1.7044 g)을 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용해 용매조건을 $\text{CHCl}_3 : \text{EtOAc} : \text{MeOH} = 1 : 2 : 1$ 로 하여 10개의 fraction으로 나누고 이 중 Fr.5 ~ Fr.8을 순상 silica gel column chromatography

를 이용하여 용매조건을 *n*-Hexane : EtOAc = 5 : 2로 총 5 개의 fraction으로 나누었다 (V4.1 ~ V4.5). 그리고 V4.4를 전과 동일한 조건으로 순상 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 3 (46.4 mg)을 얻었다(Scheme 4).



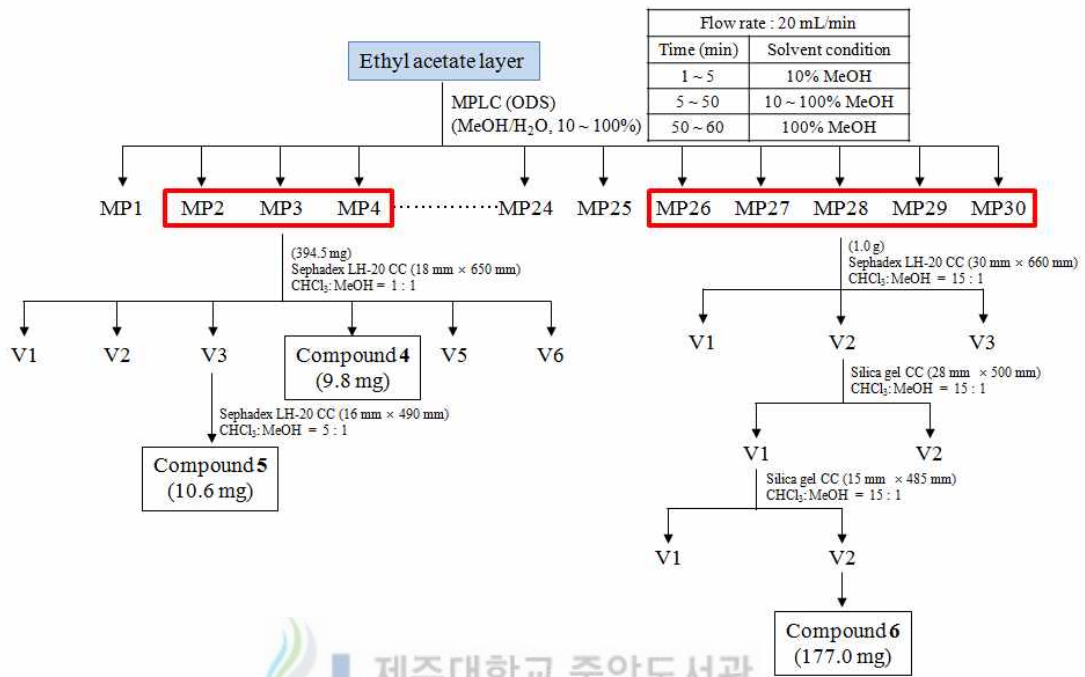
Scheme 4. Procedure of isolation of compounds 3 from *I. okamurae*.

용매분획(2) 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 5.0 g을 분획하기 위하여 MPLC 이용하여 MeOH/H₂O, 10~100 %로 용매조건으로 총 30 개의 fraction으로 나누었다(MP1 ~ MP30).

이 중 MP2 ~ 4 (394.5 mg)을 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 용매조건을 CHCl₃ : MeOH = 1 : 1로 하여 6 개의 fraction으로 나누었으며(V1~V6), 여기서 compound 4 (9.8 mg)을 얻었다. 그리고 V3를 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 용매조건을 CHCl₃ : MeOH = 5 : 1로 하여 compound 5 (10.6 mg)을 얻었다.

그리고 MP26 ~ 30 (800 mg)을 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 용매조건을 CHCl₃ : MeOH = 15 : 1로 하여 3 개의 fraction으로 나누었고(V1 ~ V3), 여기서 V2를 silica gel column chromatography를 이용하여 용

매조건을 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 15 : 1$ 로 하여 2 개의 fraction으로 나누었고, V1을 다시 silica gel column chromatography를 이용하여 용매조건을 chloroform으로 하여 compound 6 (177.0 mg)을 얻었다(Scheme 5).



Scheme 5. Procedure of isolation of compounds 4, 5, 6 from *I. okamurae*.

4. 활성실험

4-1. 항산화 활성 실험

4-1-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법¹⁷⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO : EtOH = 1 : 1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 µL를 microtube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3 분간 방치하였다. 이 용액에 7 % Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합하고, 증류수 700 µL를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1 시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 화합물 함량을 환산하였다.

4-1-2. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radical 화합물들은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되어 515 nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다(Figure 3).

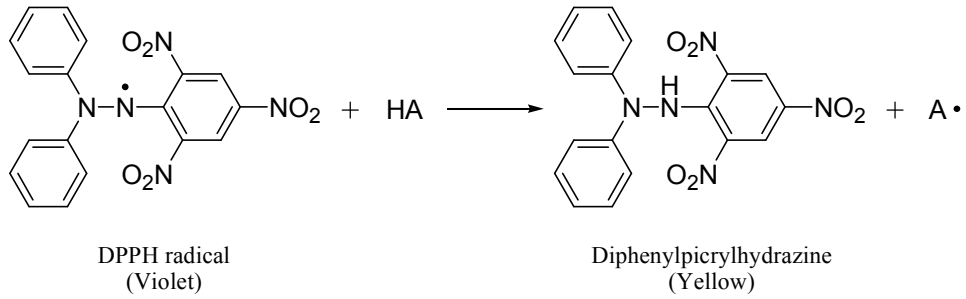


Figure 3. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant.

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 방법¹⁸⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

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

소거율(%)을 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 DPPH를 50% 저해할 때의 농도(SC_{50})를 구하였다. 각 시료는 5회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 대조군(positive control)으로는 BHT (butylated hydroxytoluene)을 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

4-1-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험

ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation 소거 활성 실험은 total antioxidant activity (TAC)의 측정방법 중의 한 가지로 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 특징적인 청록색을 띠는 $ABTS\cdot^+$ (ABTS radical cation)이 형성되는 것을 이용한 방법이다. 이 청록색의 $ABTS\cdot^+$ 은 산화될 수 있는 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 그와 반응한 물질의 산화가 일어나게 되어 흡광도의 감소가 일어나게 되면 항산화 능력을 측정할 수 있다(Figure 4).

ABTS radical cation 소거 활성은 Re, Pellegrin 등의 방법¹⁹⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

ABTS radical cation을 만들기 위하여 7.0 mM ABTS (in D.W) 용액과 2.45 mM potassium persulfate (in D.W)용액을 1 : 1로 혼합하여 16 시간동안 암소에서 반응시킨다. 반응 시킨 ABTS 용액과 ethanol을 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.002 가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다.

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

소거율(%)을 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 DPPH를 50% 저해할 때의 농도(SC_{50})를 구하였다. 각 시료는 5 회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 대조군(positive control)으로는 BHT (butylated hydroxytoluene)을 사용하였다.

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

A_{control} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 sample과 ABTS 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도

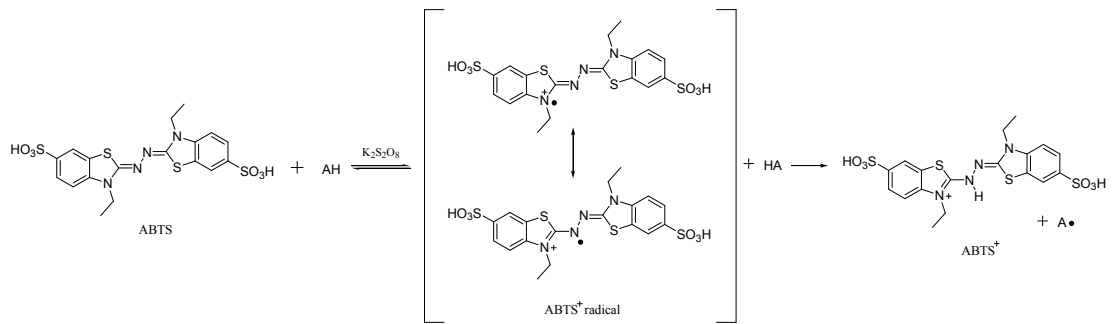


Figure 4. Scavenging of ABTS⁺ radical by an anti-oxidant.

4-2. 주름개선 활성 실험

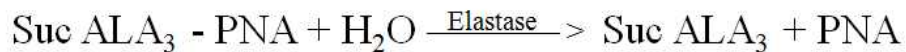
4-2-1. Elastase 저해 활성 실험

돼지췌장 elastase (Porcine pancreatic elastase, PPE) 저해활성은 기질로 *N*-succinyl-ala-ala-ala-*p*-nitroanilide (SANA)와 함께 분광광도법을 사용한 방법으로 실시되었다.²⁰⁾

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 $^{\circ}$ C에서 15 분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해율(%)을 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 elastase를 50% 저해할 때의 농도(IC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 5 회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 대조군(positive control)으로는 oleanolic acid와 ursolic acid를 사용하였다.



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

A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

A_{sample} : 시료 반응용액의 흡광도

A_{blank} : 시료만의 흡광도

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

4-3. 미백 활성 실험

4-3-1. Tyrosinase 저해 활성 실험

Tyrosinase 저해 활성 실험은 mushroom tyrosinase를 이용한 dopa chrome법²¹⁾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 2mM의 농도로 제조한다. 준비가 끝나면 96 well plate에 시료를 20 μ L씩 넣고 L-tyrosine 70 μ L 그리고 potassium phosphate buffer (pH 6.8) 60 μ L를 넣어 ELISA reader에서 480 nm로 측정하여 시료와 사용된 용매의 흡광도 값을 구한다. 후에 각 well에 2500 units의 tyrosinase 5 μ L와 potassium phosphate buffer (pH 6.8) 45 μ L를 multi pipette을 이용하여 넣어주고, 35 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시켜 ELISA reader를 이용해 480 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 저해율 (%)을 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 tyrosinase를 50 % 저해할 때의 농도(IC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 5 회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 대조군(positive control)으로는 arbutin을 사용하였다.

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

A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

A_{sample} : 시료 반응용액의 흡광도

A_{blank} : 시료만의 흡광도

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

4-3-2. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 활성 실험

4-3-2-1. 세포배양

B16F10 murine melanoma cell은 한국세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-3-2-2. 시료의 전처리

6 well plate에 5×10^4 cells/mL의 B16F10 murine melanoma cell을 24 시간 배양한 후, 원 배지를 제거한 후, PBS (phosphate buffered saline)로 세척하였다. 그리고 100 nM의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환해주고 동시에 시료를 처리하여 72 시간동안 배양하였다.

4-3-2-3. Melanogenesis 저해 활성 측정 실험

배양이 끝나면 배지를 PBS buffer로 세척한 후 trypsin-EDTA를 300 μ L 처리하여 cell들을 걷어내고 DMEM배지 700 μ L를 넣어 microtube에 세포를 회수하였다. 걷은 pellet을 원심분리시켜 상등액을 제거하고, pellet에 sonication buffer (6.7 mM sodium phosphate buffer containing 1% triton X-100 and 0.2 mM PMSF)를 500 μ L씩 넣어 vortexing을 해주었다. 그리고나서 hand sonicator로 cell을 두 번정도 깨준 뒤, 30 분정도 놔두고 다시 원심분리를 시행하였다. 그 후에 상층액은 intracellular tyrosinase 저해 활성을 측정하였고, pellet은 melanogenesis 저해 효과 측정 실험을 진행하였다.

4-3-2-4. Intracellular tyrosinase 저해 활성 측정 실험

96 well plate에 상층액을 80 μ L씩 넣고 25 mM L-Dopa와 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)을 1 : 3의 비율로 만든 용액을 160 μ L씩 넣었다. 그 후에 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 90분, 120분에 475 nm에서 흡광도를 측정하여 negative control (-)와 positive control (+)가 가장 많이 차이나는 시간대를 찾았다. 또한 단백질정량을 통해 흡광도 값을 보정하여 저해율(%)을 계산하였다.

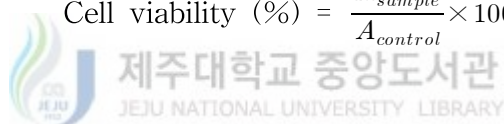


4-3-2-5. 세포 독성 평가

4-3-2-5-1. MTT assay

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay 는 B16F10 murine melanoma cell을 6 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 시간 배양 후, 시료를 처리하였다. 72 시간 배양 후, 배양액 200 μL를 취하고 나머지 배양액에 500 μg/mL 농도로 MTT를 첨가하여 37 °C에서 3 시간 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 용매를 처리한 control의 흡광도

A_{sample} : 570 nm에서 시료를 처리한 sample의 흡광도

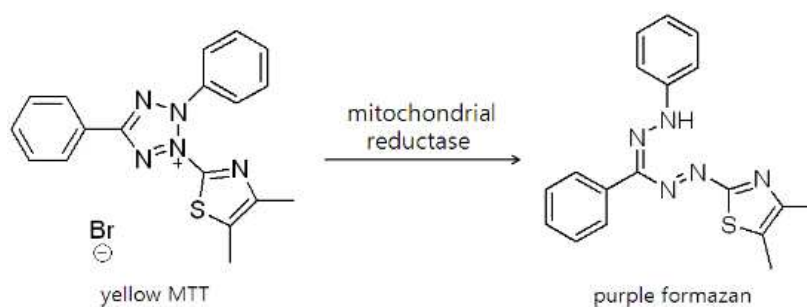



Figure 5. Principle of MTT assay.

4-3-2-5-2. LDH (lactate dehydrogenase) assay

세포독성은 plasma membrane 손상의 양에 의해 평가된다. LDH (lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로 통상은 세포막을 통과하지 않으나 세포막이 손상되면 세포 외부 즉 배지 중으로 방출된다. 방출된 LDH는 젖산의 탈수소화를 촉매해 pyruvate와 NADH를 생성한다. 이 NADH는 diaphorase의 촉매에 의해 테트라졸리움염(INT)을 환원시켜 490 nm의 흡수를 갖는 적색의 formazan 색소를 형성되며 이 formazan의 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가한다(Figure 6).²²⁾

LDH assay는 다음과 같다. B16F10 murine melanoma cell을 6 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 37 °C, 5 % CO₂ 조건하에서 24 시간 배양 후, 시료를 처리하였다. 72 시간 배양 후, 배양액 200 μL를 취하여 LDH-cytotoxicity detection Kit. (TaKaRa BIO INC.)를 이용하여 평가하였으며, cytotoxicity는 다음의 식에 의해 계산되었다.


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{Low control}}}{A_{\text{High control}} - A_{\text{Low control}}} \times 100$$

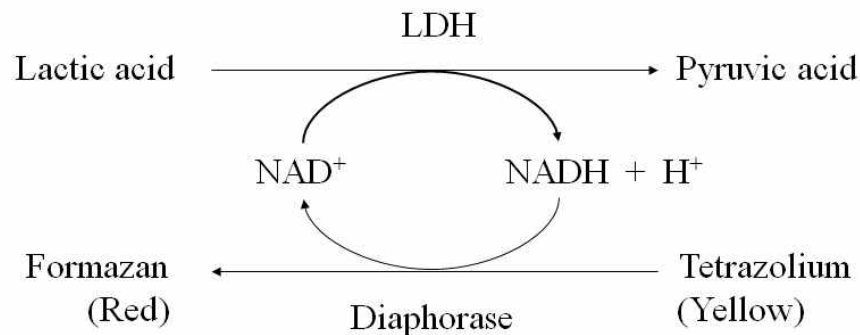


Figure 6. Principle of LDH assay.

A_{sample} : 시료를 처리한 samle의 흡광도

$A_{\text{Low control}}$: 용매를 처리한 control의 흡광도

$A_{\text{High control}}$: 용매와 1 % triton X-100을 처리한 control의 흡광도

4-4. 항균활성 실험

4-4-1. 균주 배양

시료의 항균활성을 측정하기 위해 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 *Propionibacterium acnes* (CCARM 9009, 9010, 0081) 총 6개의 균주를 사용하였다. *S. epidermidis*인 경우, 배양배지를 T.S.B (Tryptic soy broth)로 하여 3 계대 후 사용하였다. *P. acnes*인 경우, 배양배지를 GAM broth로 하여 3 계대 후 사용하였다. 계대 방법으로는 균 stock을 멸균한 액체 배지 10 mL에 상온으로 식힌 균을 100 μ L 넣고, 이와 같은 방법으로 3 번 계대하였다.

4-4-2. Paper disc diffusion method

시료의 항균활성을 측정하기 위해 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 paper disc diffusion 법으로 생육 억제율을 측정하였다. *P. acnes*는 0.8%를 포함하는 GAM 배지에 *P. acnes* 0.5 MacFarland로 넣어 한천 1.5%를 포함하는 GAM 배지위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려서 37 $^{\circ}$ C, 48 시간동안 혐기 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

*S. epidermidis*는 한천 0.8%를 포함하는 T.S.B 배지 8 mL에 *S. epidermidis* 0.5 MacFarland로 넣어 한천 1.5%를 포함하는 T.S.B 배지위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려 37 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 배양하여 disc 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

4-4-3. MIC (minimum inhibitory concentration) 실험

MIC는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로, 미생물에 대한 MIC값이 낮으면 낮을수록 시료물질은 그 미생물에 대해 감수성이 높다고 할 수 있다. 3계대한 균을 O.D (optical density)값이 0.2 ~ 0.3이 되도록 0.85% 생리 식염수를 이용하여 희석한다(O.D값 0.2 ~ 0.3이 약 10^8 CFU/mL). 그다음 O.D값을 맞춘 균주 1 mL를 0.85% 생리식염수를 이용하여 *S. epidermidis*는 10^5 CFU/mL로 *P. acnes*는 10^4 CFU/mL까지 희석하였다.

그리고 96 well plate 각 well에 배지 150 μ L씩 넣어주고, 첫 번째 well에 준비한 sample 150 μ L를 넣어준 후 pipetting하여 혼합한다. 같은 방법으로 반복하여 차례대로 sample을 반씩 희석하는 과정을 거치고난 후, 각 well에 희석한 균액을 15 μ L씩 처리하고 각 균의 배양조건으로 배양하고 결과를 확인하였다.

4-4-4. MBC (minimum bactericidal concentration) 실험

MIC값이 낮다고 해서 그 농도에서 균을 모두 죽인 것은 아니다. 시료의 영향으로 균의 성장을 방해하여 균이 자라지 않아 죽은 것처럼 보일 수 있기 때문에 MBC는 MIC값이 나타난 그 이상의 농도의 시료들을 plate에 처리하여 colony를 형성하는지 확인하여 균의 사멸한 최소농도를 확인하였다.

먼저 agar plate를 준비하고 plate 뒷면에 구획을 나누어 표시한 뒤, MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 이용하여 시료를 찍어내서 구획별로 scratching을 하여 각 균의 배양조건으로 배양하여 결과를 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1은 ^1H -NMR spectrum에서 proton peak 들이 6 ppm 부근에서만 나온 것으로 보아 compound 1은 갈조류에서 흔히 발견되는 phloroglucinol oligomer라 예상하였다. 또한 δ 5.95 (2H, s), 5.87 (2H, d, 1.83 Hz)가 각각 integral 값이 2로서 서로 대칭구조를 갖는 proton이라 예상하였고, 5.87 ppm의 peak는 coupling constant 값이 1.83 Hz 이기에 대칭이면서 meta-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있다고 예상하였다. ^{13}C -NMR spectrum을 통해 24개의 carbon이 있음을 예상하였으며, chemical shift 값이 δ 95 ~ 160 사이에 나온 것으로 보아 sp^2 혼성을 갖는 carbon으로만 이루어진 구조인 aromatic ring이 4개인 구조일 것이라 예상하였다. 그리고 DEPT-135를 통해 δ 95 ~ 100 사이의 carbon peak들은 aromatic proton이 붙어있는 carbon이라 예상하였다. 또한 나머지 peak들이 나오지 않고 deshielding 된 것으로 보아 4 차 탄소이며, hydroxyl 기를 갖는 구조라 예상하였다. 이를 통해 phloroglucinol tetramer라 예상하였고, 이를 바탕으로 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum 을 문헌²³⁾과 비교한 결과 compound 1은 di-phlorethohydroxycarmalol (DPHC)임을 확인할 수 있었다(Figure 7).

또한 ^1H , ^{13}C 과 DEPT-135 NMR data외에 2D-NMR인 COSY, HMBC, HMQC spectrum의 data를 통해 DPHC의 구조를 확인하였다.

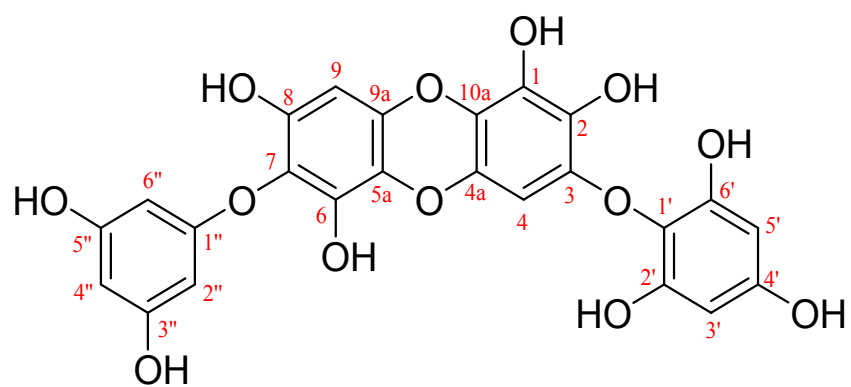
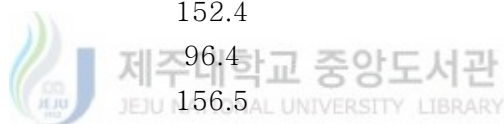


Figure 7. Chemical structure of compound 1.

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

No.	Compound 1	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	136.2	
2	127.6	
3	136.0	
4	95.1	6.14 (1H, s)
4a	144.2	
5a	147.1	
6	140.7	
7	140.7	
8	126.2	
9	95.8	5.97 (1H, s)
9a	128.2	
10a	132.2	
1'	125.8	
2'	152.4	
3'	96.4	5.95 (1H, s)
4'	156.5	
5'	96.4	5.95 (1H, s)
6'	152.4	
1''	161.7	
2''	95.4	5.90 (1H, d, 1.83 Hz)
3''	160.1	
4''	97.4	5.89 (1H, s)
5''	160.1	
6''	95.4	5.87 (1H, d, 1.83 Hz)



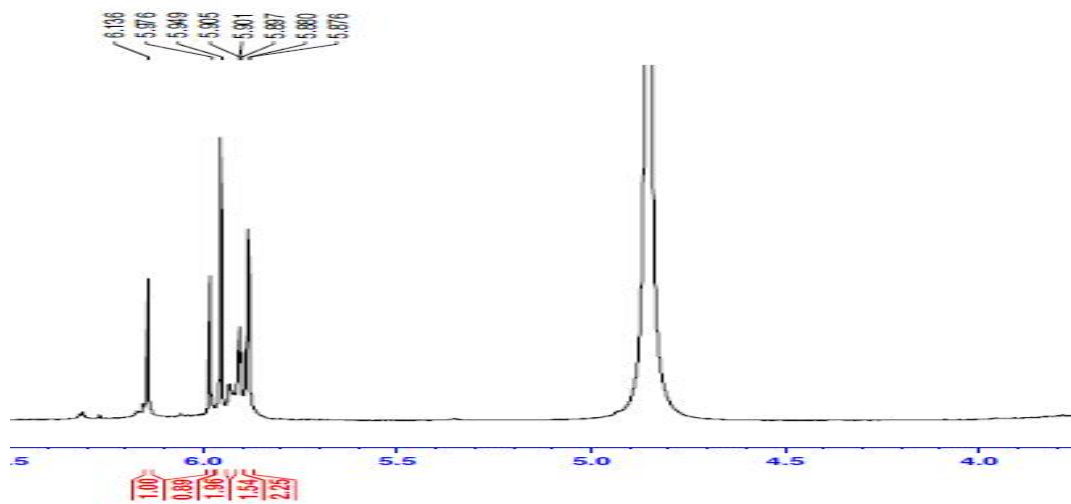


Figure 8. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in CD_3OD .

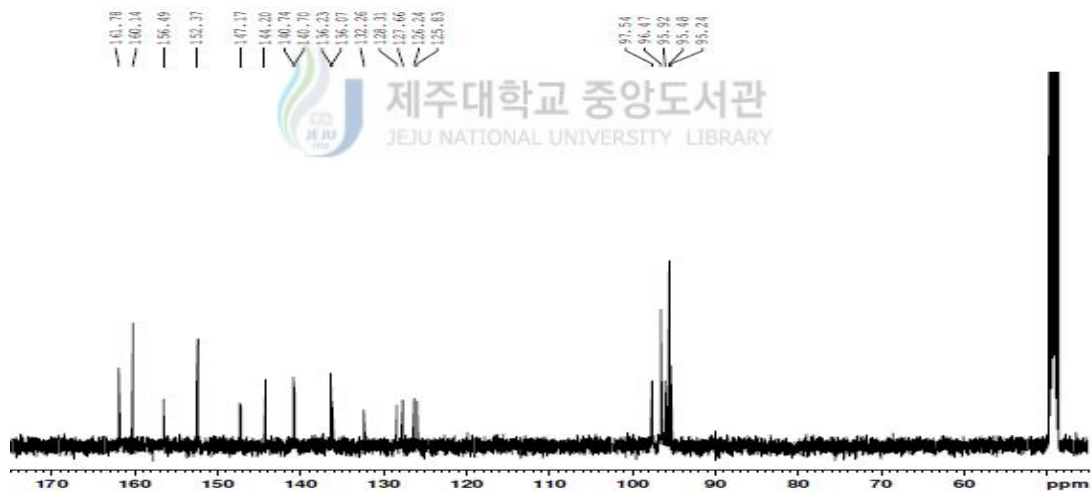


Figure 9. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in CD_3OD .

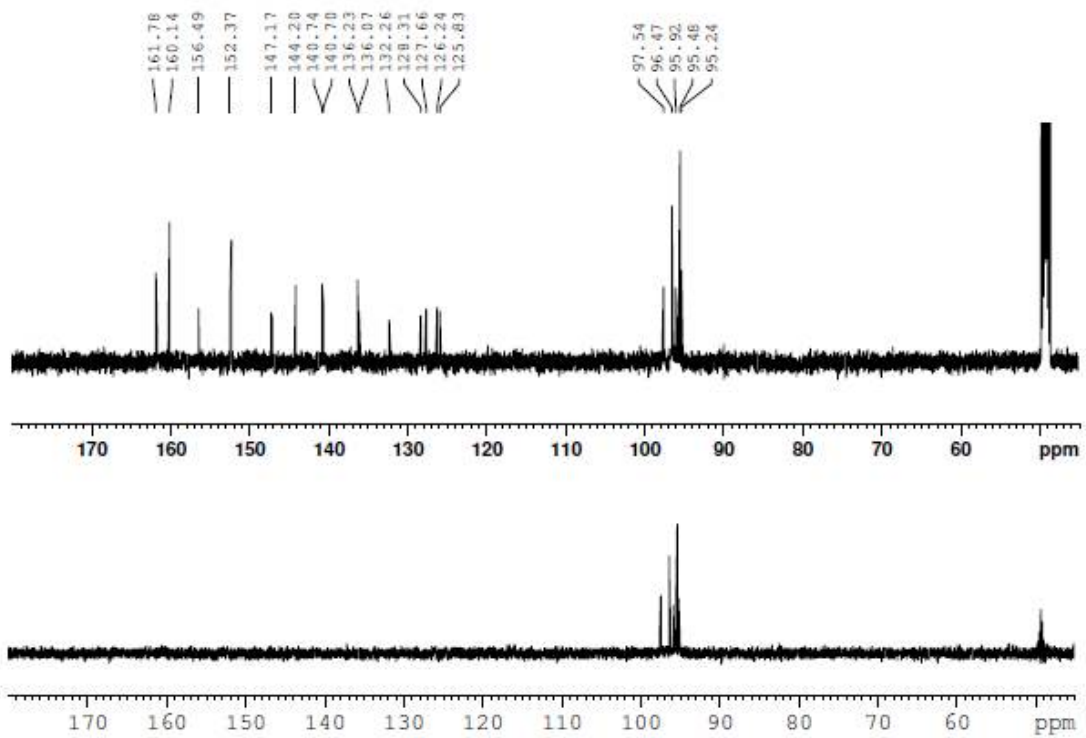


Figure 10. DEPT-135 spectrum of compound **1** in CD₃OD.

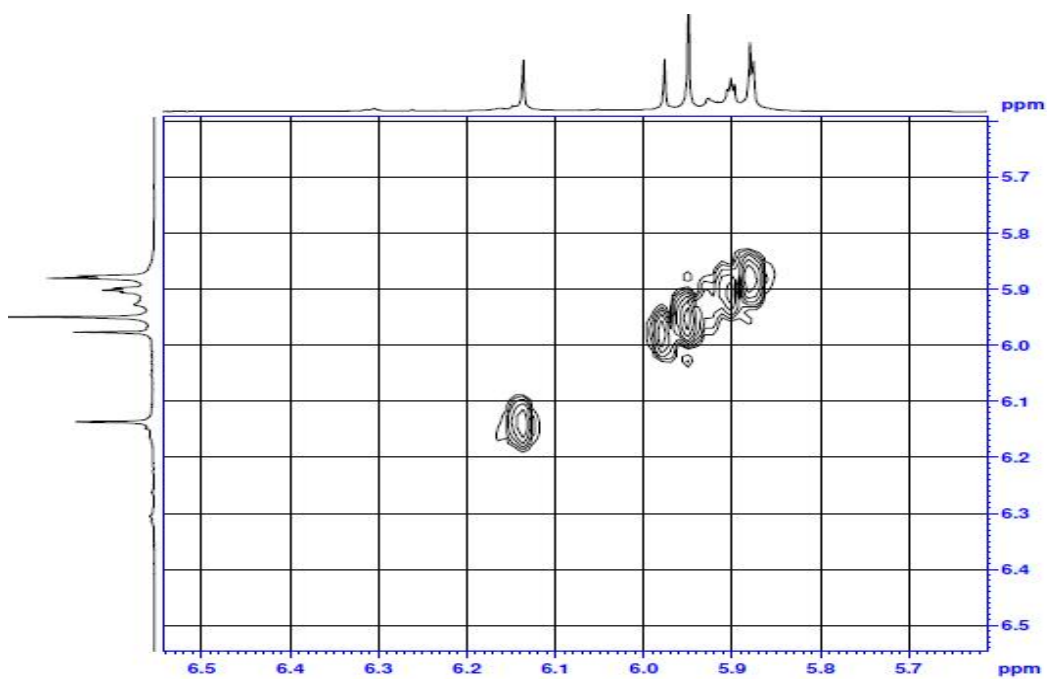


Figure 11. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound **1** in CD_3OD .

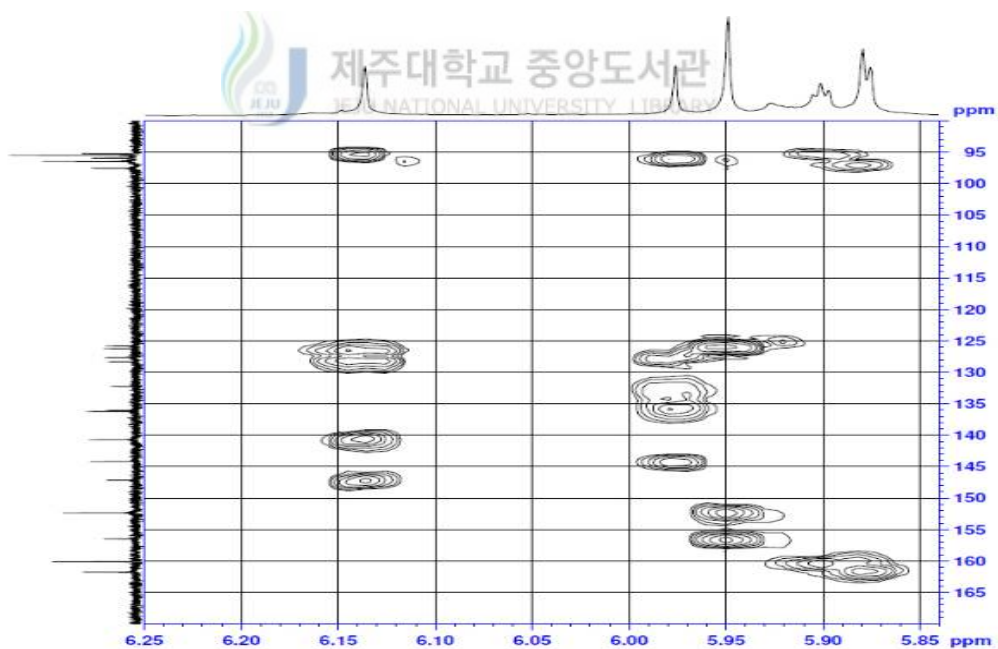


Figure 12. HMBC spectrum of compound **1** in CD_3OD .

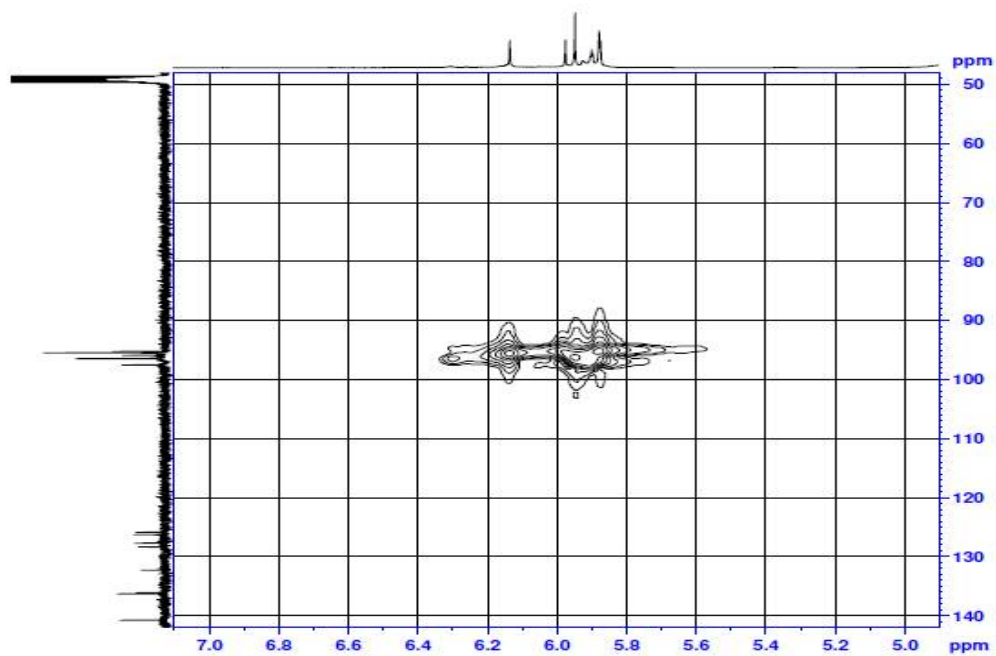


Figure 13. HMQC spectrum of compound **1** in CD₃OD.

1-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.28 (3H, s), 1.31 (3H, s), 1.60 (3H, s)의 peak는 3개의 methyl group이 있음을 예상할 수 있었으며 δ 1.27 (m), 2.00 (ddd, $J = 2$ Hz, 4 Hz, 11.7 Hz), 1.43 (1H, m), 2.47 (ddd, $J = 2$ Hz, 4 Hz, 11.7 Hz), 4.10에서 하나의 carbinol proton과 그에 인접한 두 개의 methylene peak가 있음을 예상하였다. 또한 δ 5.79에서 한 개의 이중결합에 관여하는 proton이 있음을 예상할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 통해 δ 113.9, 174.2, 184.1 은 α,β -불포화 카보닐에 해당하는 특징적인 peak를 확인할 수 있었고, 이를 바탕으로 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 문헌과 비교한 결과 compound 2는 *epi*-loliolide임을 확인하였다.

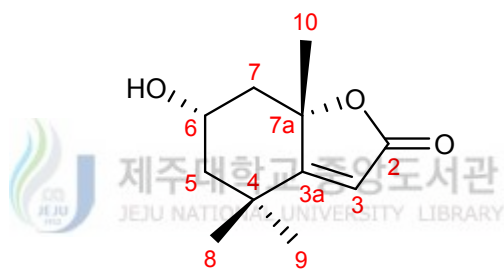
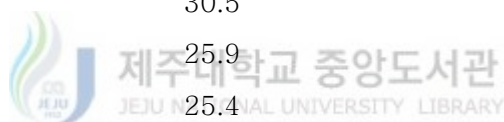


Figure 14. Chemical structure of compound 2.

Table 2. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound **2** (500 and 125 MHz, CD_3OD).

No.	Compound 2	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, <i>J</i> Hz)
1		
2	174.2	
3	113.9	5.79 (1H, s)
3a	184.1	
4	36.4	
5	50.8	1.27 (m), 2.00 (ddd, 2 Hz, 4 Hz, 11.7 Hz)
6	65.4	4.10 (1H, m)
7	50.0	1.43 (1H, m), 2.47 (ddd, 2Hz, 4 Hz, 11.7 Hz)
7a	88.7	
8	30.5	1.60 (3H, s)
9	25.9	1.31 (3H, s)
10	25.4	1.28 (3H, s)



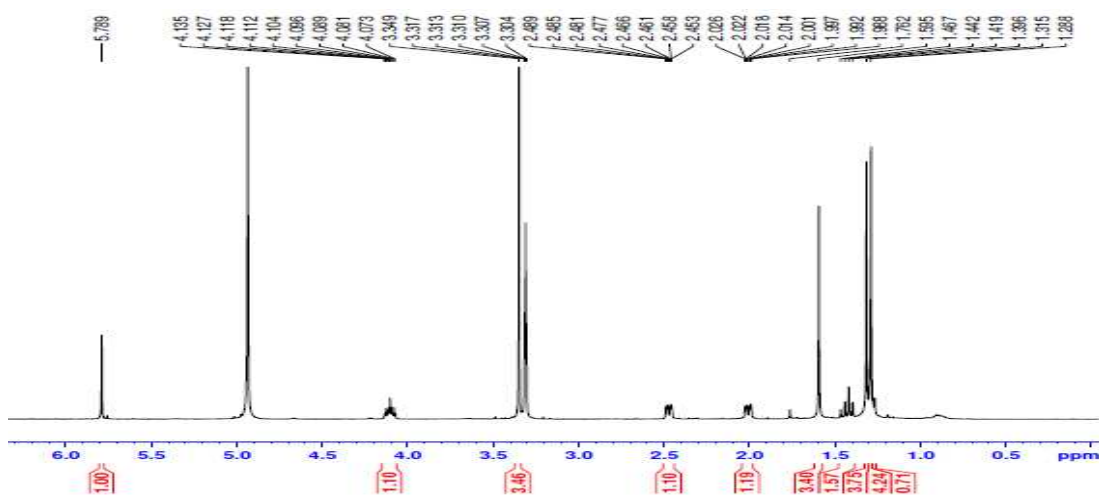


Figure 15. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD .

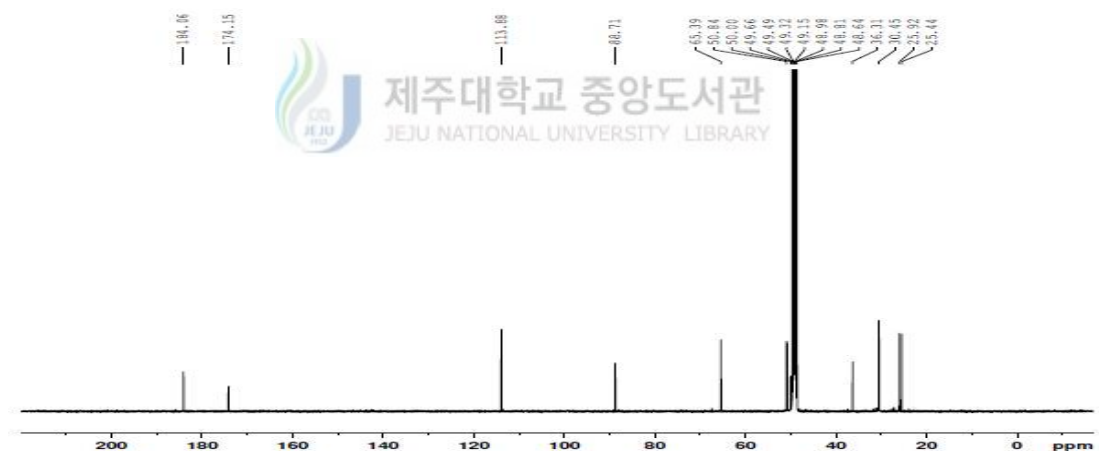


Figure 16. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD .

1-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 5.31의 peak로 보아 이중 결합이 있을 것이라 예상하였고, δ 2.74, 2.00의 peak들은 약간 deshielding 된 것으로 보아 알릴 자리의 proton이라 예상하였다. 그리고 δ 1.60 ~ 1.26의 peak들은 지방 사슬의 methylene proton이라 예상하였고, δ 0.85의 peak는 지방 사슬의 말단인 methyl proton이라 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 통해 18개의 carbon이 있는 것을 확인하였고, δ 180.5의 peak는 carboxylic acid의 carbon이라 예상하였고, δ 128.1 ~ δ 130.4의 peak를 통해 이중결합이 3개가 있을 것이라 예상하였다. 이를 바탕으로 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 문헌과 비교하려하였으나 문헌이 존재하지 않아 γ -linolenic acid 표준물질을 구입하여 비교한 결과 compound 3은 γ -linolenic acid임을 확인하였다.

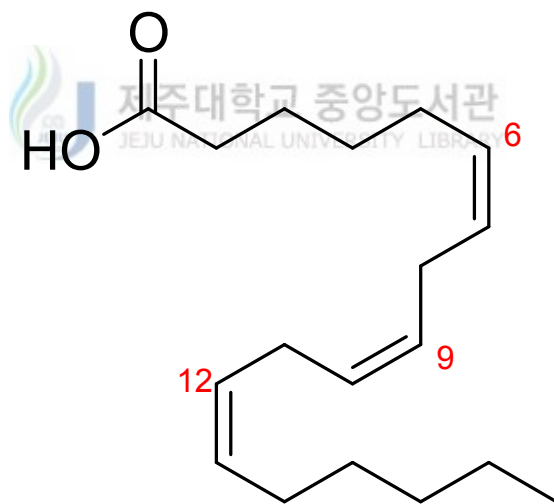


Figure 17. Chemical structure of compound 3.

Table 3. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound **3** (500 and 125 MHz, CDCl_3).

No.	Compound 3	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	180.5	
2	34.4	2.31 (m)
3	25.8	1.60(m)
4	29.3	1.26(m)
5	27.4	2.00(m)
6	128.1 to 130.4	5.31 (m)
7	128.1 to 130.4	5.31 (m)
8	25.0	2.74(m)
9	128.1 to 130.4	5.31 (m)
10	128.1 to 130.4	5.31 (m)
11	25.0	2.74(m)
12	128.1 to 130.4	5.31 (m)
13	128.1 to 130.4	5.31 (m)
14	27.4	2.00(m)
15	29.6	1.26(m)
16	31.7	1.26(m)
17	22.9	1.26 (m)
18	14.3	0.85 (3H, t)



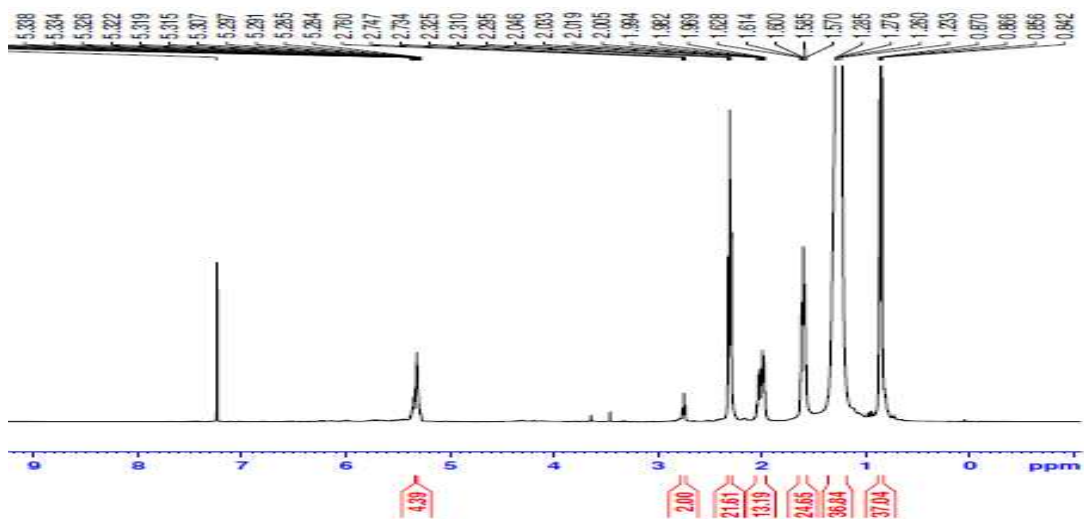


Figure 18. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3 .

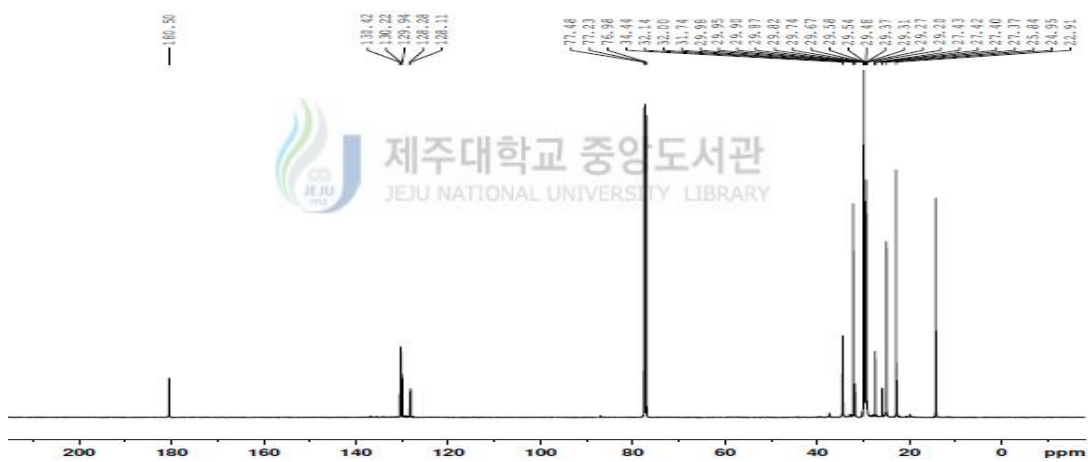


Figure 19. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3 .

1-4. Compound 4의 구조해석

Compound 4의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 proton peak들은 6 ~ 8 ppm 부근에서 나온 것으로 보아 aromatic proton이라 예상하였다. 또한 δ 6.50 (1H, d, 5.50 Hz)과 7.80 (1H, dd, 0.92, 5.50 Hz)의 peak는 동일한 coupling constant 값으로 보아 서로 coupling 하는 것을 예상하였다. 허나 일반적인 coupling constant 값인 경우 ortho는 6 ~ 10 Hz, meta는 1 ~ 4 Hz이지만 이 경우는 5.50 Hz 이기에 benzene ring의 ortho coupling이 아닌 hetero ring의 ortho coupling일 것이라 예상하였다. 부연설명으로 hetero ring인 pyridine의 ortho coupling 값은 4.9 ~ 5.7 Hz이다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 173.8 의 peak는 carbonyl group의 peak라 예상하였으며 이를 바탕으로 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 문헌²⁵⁾과 비교한 결과 compound 4는 pyromeconic acid임을 확인하였다.

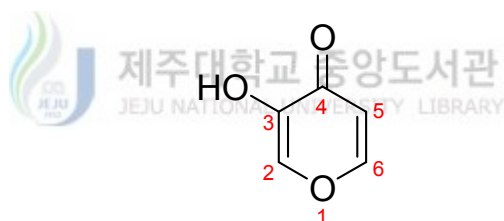


Figure 20. Chemical structure of compound 4.

Table 4. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound **4** (400 and 100 MHz, CDCl_3).

No.	Compound 4	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1		
2	138.7	7.88 (1H, s)
3	146.8	
4	173.8	
5	113.8	6.50 (1H, d, 5.50 Hz)
6	155.8	7.80 (1H, dd, 0.92, 5.50 Hz)

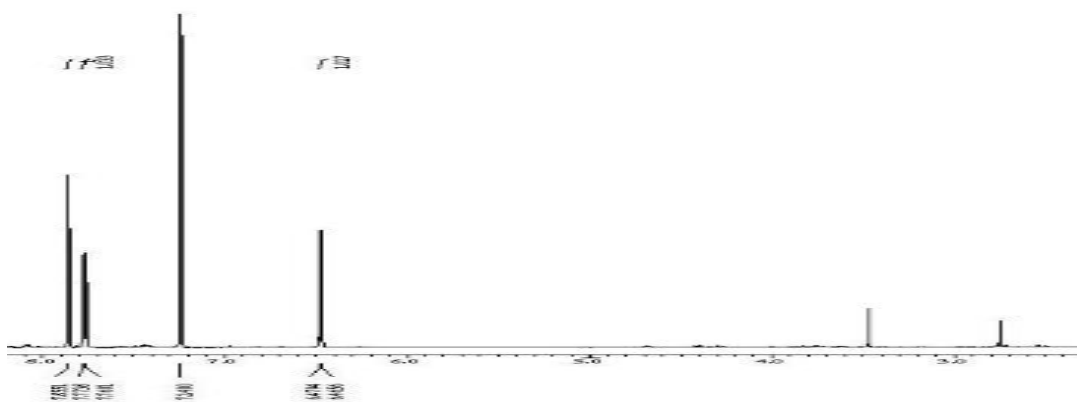


Figure 21. ^1H -NMR spectrum of compound **4** in CDCl_3 .

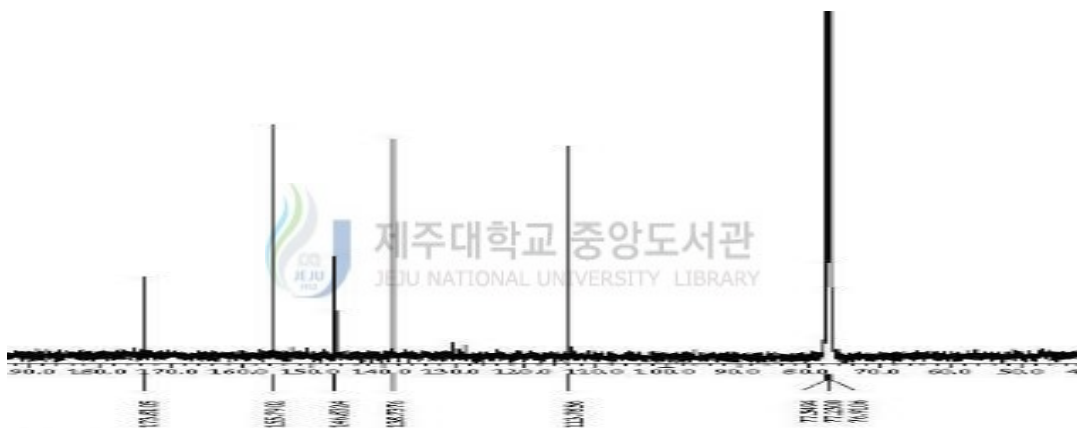


Figure 22. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** in CDCl_3 .

1-5. Compound 5의 구조해석

Compound 5의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 peak들은 각각 2개씩만 나온 것으로 보아 서로 대칭 구조일 것이라 예상하였다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 peak들이 desheiding 된 것으로 보아 sp^2 혼성을 갖는 구조의 proton이라 예상하였다. 이를 바탕으로 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 문헌과 비교한 결과 compound 5는 phloroglucinol임을 확인하였다.

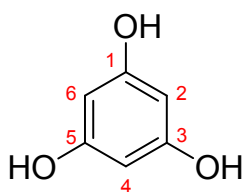


Figure 23. Chemical structure of compound 5.



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

No.	Compound 5	
	δ_c	δ_H (int, multi, J Hz)
1,3,5	158.9	8.95 (3H, s)
2,4,6	94.0	5.65 (3H, s)

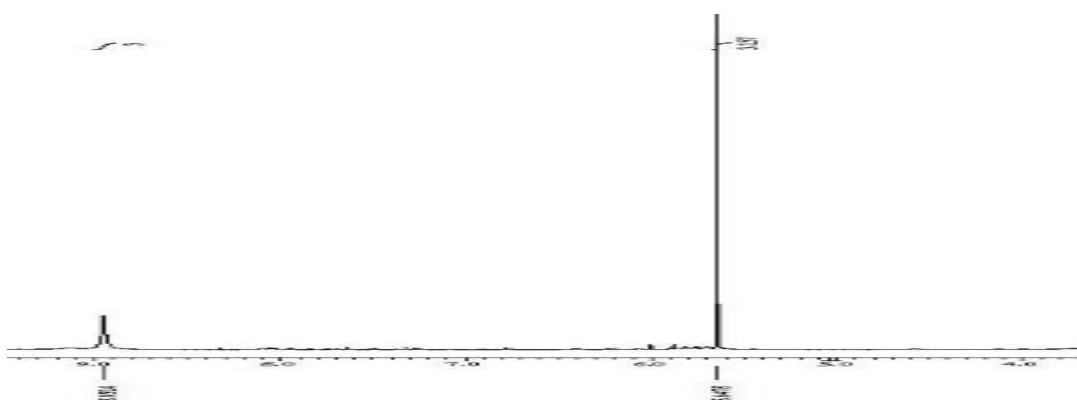


Figure 24. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 5 in DMSO.

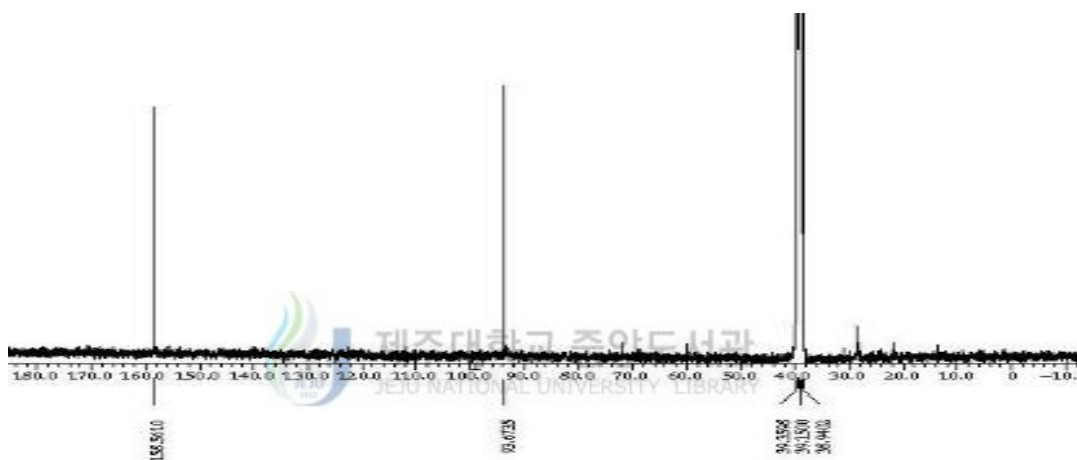


Figure 25. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 5 in DMSO.

1-5. Compound 6의 구조해석

Compound 6의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 5.32의 peak로 보아 이중 결합이 있을 것이라 예상하였고, δ 2.33, 2.00의 peak들은 약간 deshielding 된 것으로 보아 알릴 자리의 proton이라 예상하였다. 그리고 δ 1.60 ~ 1.27의 peak들은 지방 사슬의 methylene proton이라 예상하였고, δ 0.86의 peak는 지방 사슬의 말단인 methyl proton이라 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 통해 18개의 carbon이 있는 것을 확인하였고, δ 180.1의 peak는 carboxylic acid의 carbon이라 예상하였고, δ 130.4, 130.2, 129.9, 128.1의 peak를 통해 이중결합이 2개가 있을 것이라 예상하였다. 이를 바탕으로 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 문헌²³⁾과 비교한 결과 compound 6은 linoleic acid임을 확인하였다.

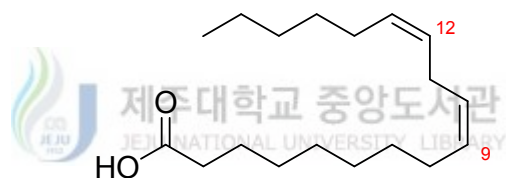


Figure 26. Chemical structure of compound 6.

Table 6. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound **6** (500 and 125 MHz, CDCl_3).

No.	Compound 6	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	180.1	
2	34.2	2.77 (m)
3	25.8	1.60 ~ 1.27 (m)
4	29.4	1.60 ~ 1.27 (m)
5	29.6	1.60 ~ 1.27 (m)
6	29.9	1.60 ~ 1.27 (m)
7	29.9	1.60 ~ 1.27 (m)
8	27.4	2.00 (m)
9	130.4	5.32 (m)
10	129.9	5.32 (m)
11	24.9	2.33 (m)
12	128.1	5.32 (m)
13	130.2	5.32 (m)
14	29.3	2.00 (m)
15	29.5	1.60 ~ 1.27 (m)
16	32.1	1.60 ~ 1.27 (m)
17	22.9	1.60 ~ 1.27 (m)
18	14.3	0.86 (3H, m)

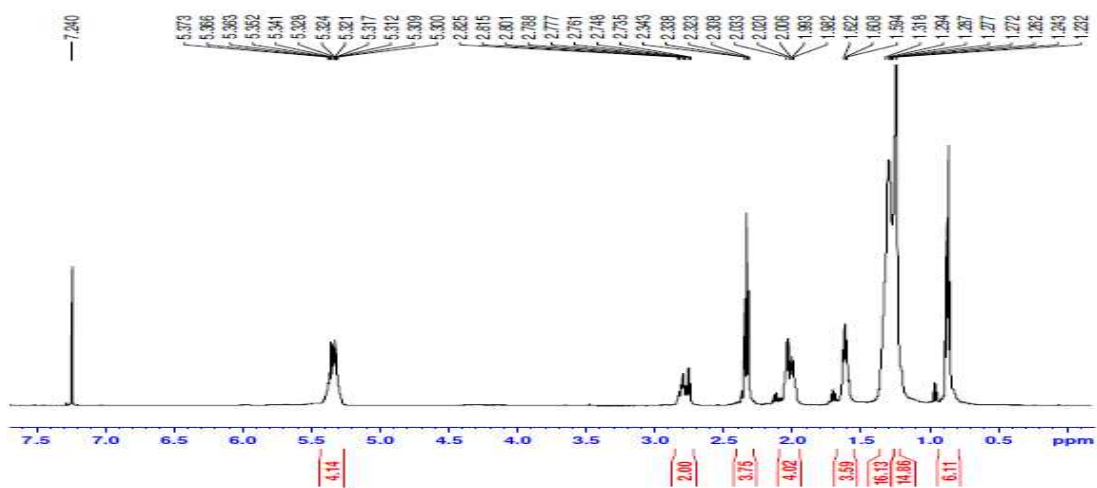


Figure 27. ^1H -NMR spectrum of compound **6** in CDCl_3 .

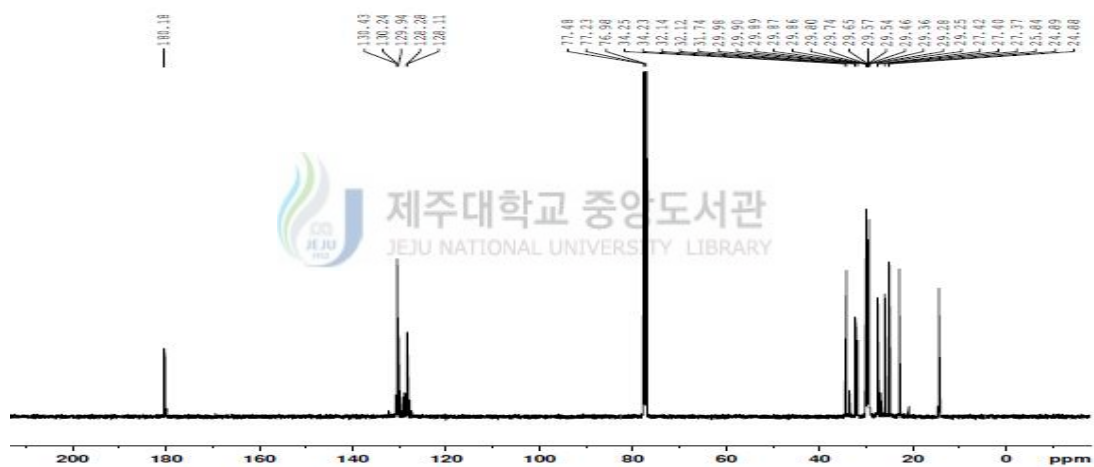


Figure 28. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in CDCl_3 .

2. 항산화 활성 실험 결과

2-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정 결과

Polyphenolic compounds는 식물계에 널리 분포되어 있는 2 차 대사물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한 분자 내에 2 개 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.²⁸⁾

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선을 작성하여 폐 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 polyphenolic compounds 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 1 mg 당 함유하고 있는 gallic acid 의 양(GAE; gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서 99 µg GAE/1 mg, 분획물 중 EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 200, 128 µg GAE/1 mg으로 비교적 높은 polyphenolic compounds 함량을 나타내었다. 이는 다른 항산화 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.

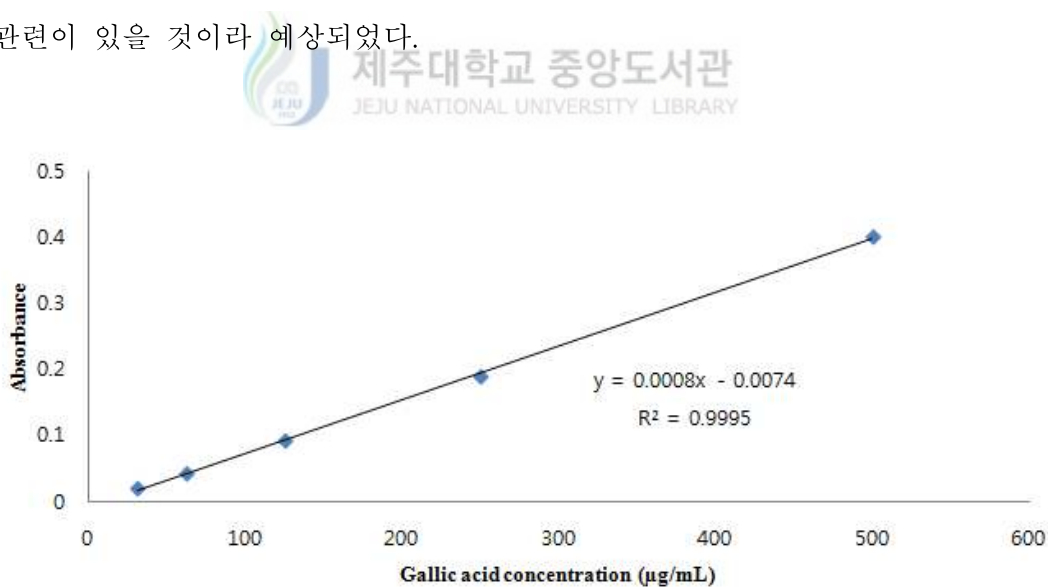


Figure 29. Calibration curve for quantification of total polyphenolic compounds.

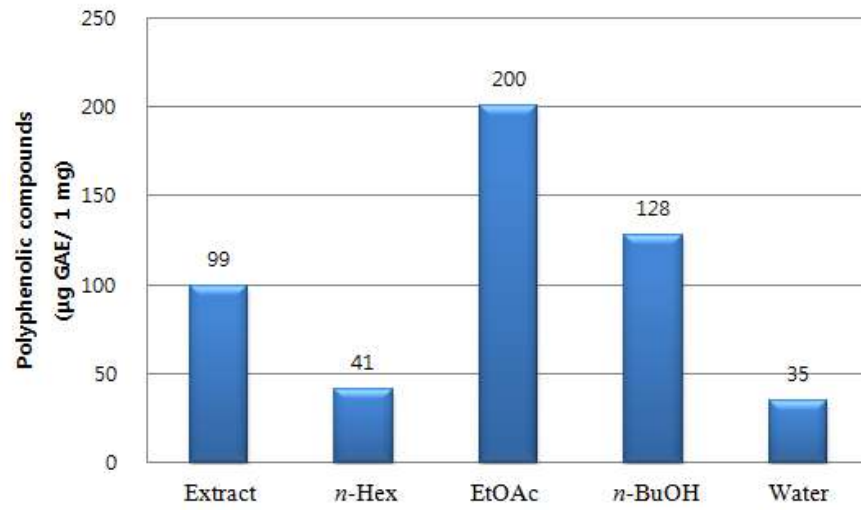


Figure 30. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers.

2-2. DPPH radical 소거 활성 실험 결과

2-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성 실험 결과

꽤 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 각각의 분획물에 대하여 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀값을 계산하였다.

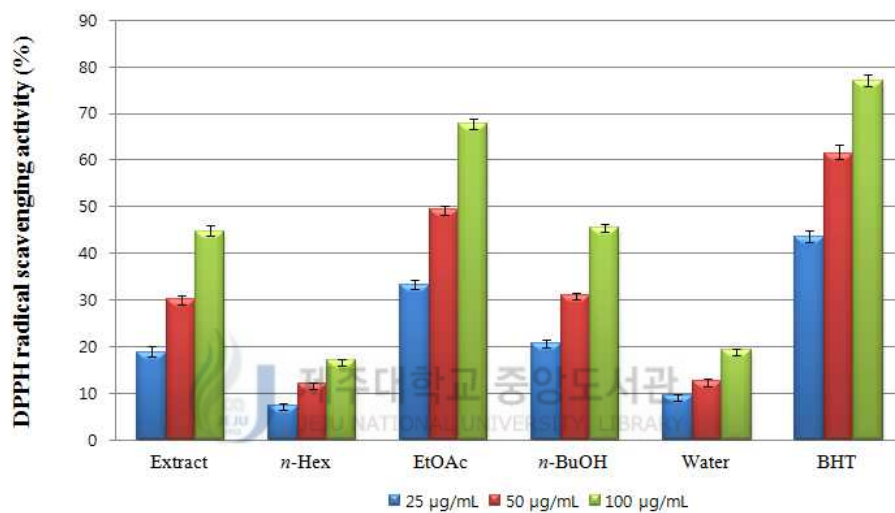


Figure 31. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.

그 결과, DPPH SC₅₀값이 EtOAc layer에서 49.81 µg/mL로 대조군인 BHT (32.30 µg/mL) 만큼의 좋은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 분리한 화합물의 활성은 이미 많이 알려져 있기 때문에 진행하지 않았다.^{28),29)}

2-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험 결과

2-3-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성 실험 결과

패 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 나머지 분획물에 대하여 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 실시하였다(Figure 32). 그 중 Extract, EtOAc, *n*-BuOH layer에서 좋은 활성을 보여 추가적으로 농도를 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 더 낮춰 실험을 진행하였다(Figure 33). 그 결과, 추출물에서 SC_{50} 값이 29.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EtOAc, *n*-BuOH에서 각각 14.8, 27.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인 BHT (8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)만큼 좋은 ABTS radical cation 소거 활성을 나타내었다. 분리한 화합물의 활성은 이미 많이 알려져 있기 때문에 진행하지 않았다.^{28),29)}

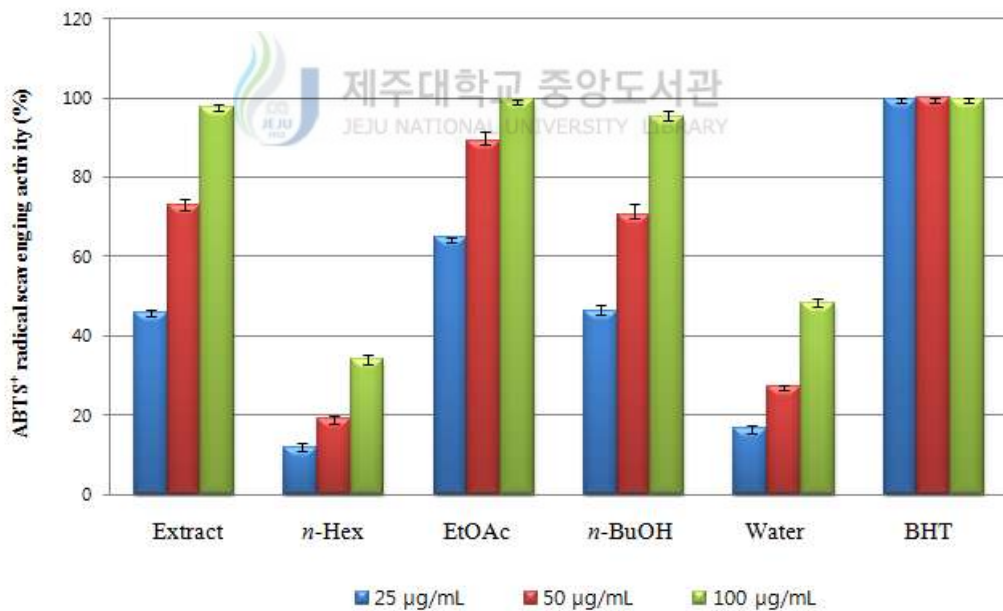


Figure 32 . ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers.

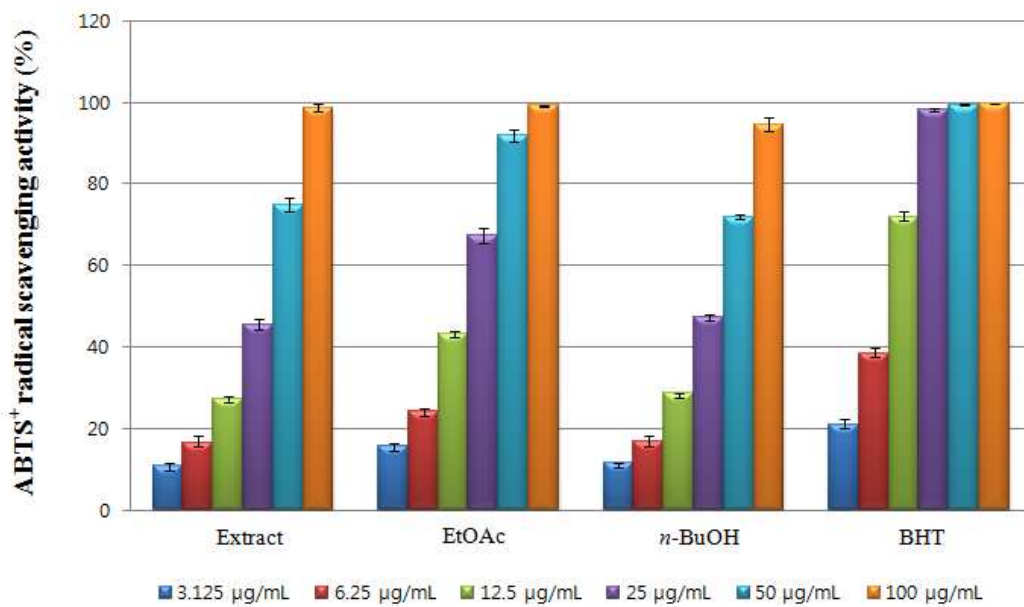


Figure 33. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers.

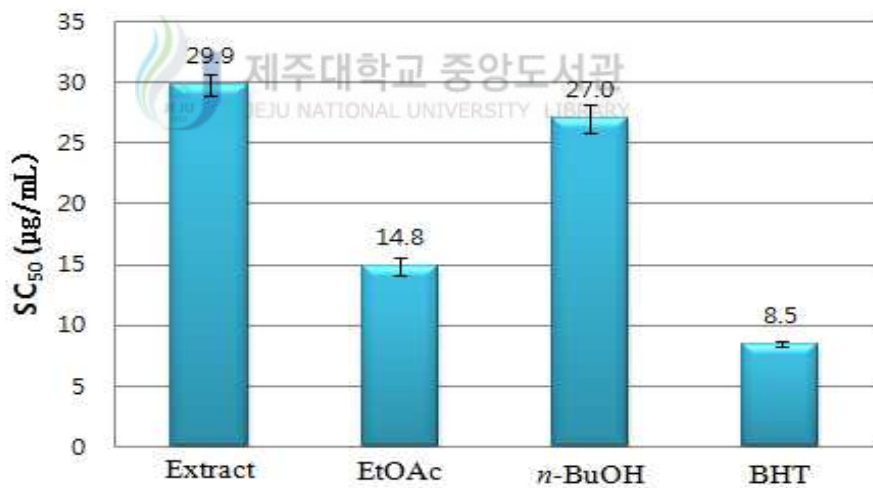


Figure 34. SC₅₀ value of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers.

3. 주름개선 활성 실험 결과

3-1. Elastase 저해 활성 실험 결과

3-1-1. 추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성 실험 결과

패 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성을 측정하였다. 추출물과 나머지 분획물에 대하여 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하였다. 그 중 water layer를 제외한 나머지 층에서 좋은 활성을 보여 추가적으로 농도를 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5 µg/mL의 농도로 낮춰 실험을 진행하였다.

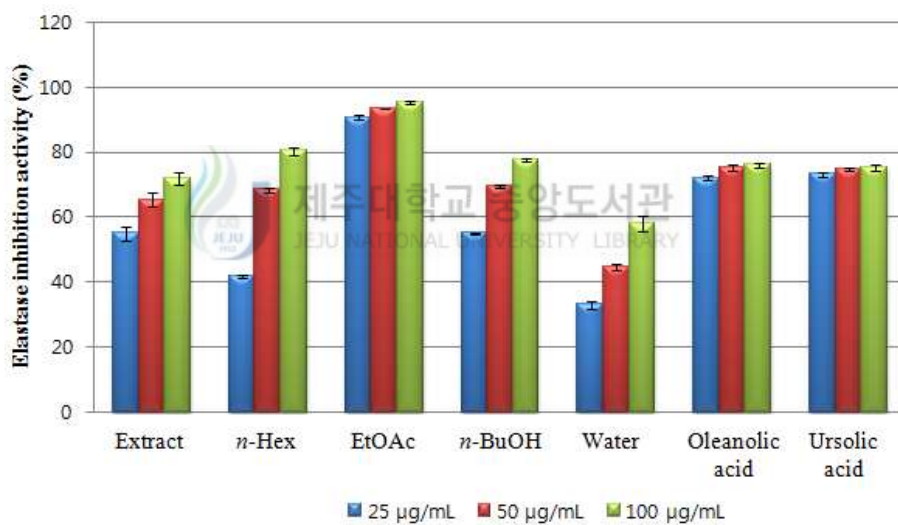


Figure 35. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers.

그 결과, EtOAc layer에서 각각 33.1, 63.0, 82.1, 86.2% 저해 활성을 나타내었으며, IC₅₀값이 4.78 µg/mL로 대조군인 oleanolic acid (4.16 µg/mL), ursolic acid (7.10 µg/mL)만큼 좋은 elastase 저해 활성을 나타내었다.

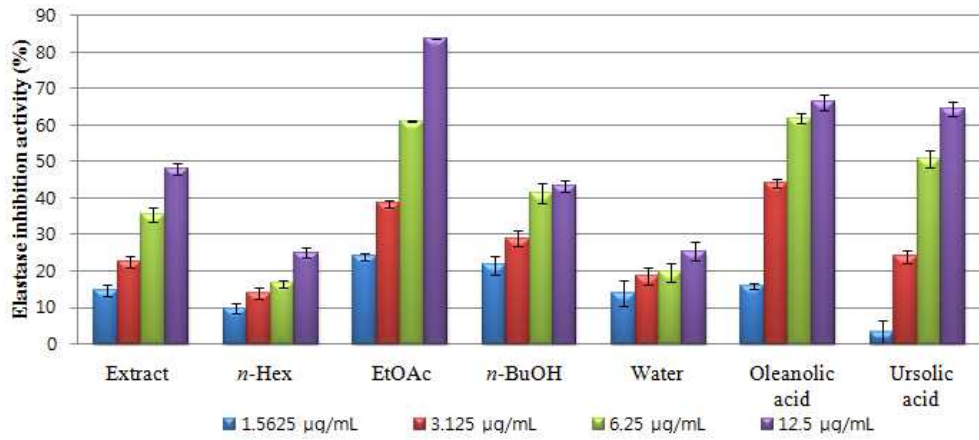


Figure 36. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers.

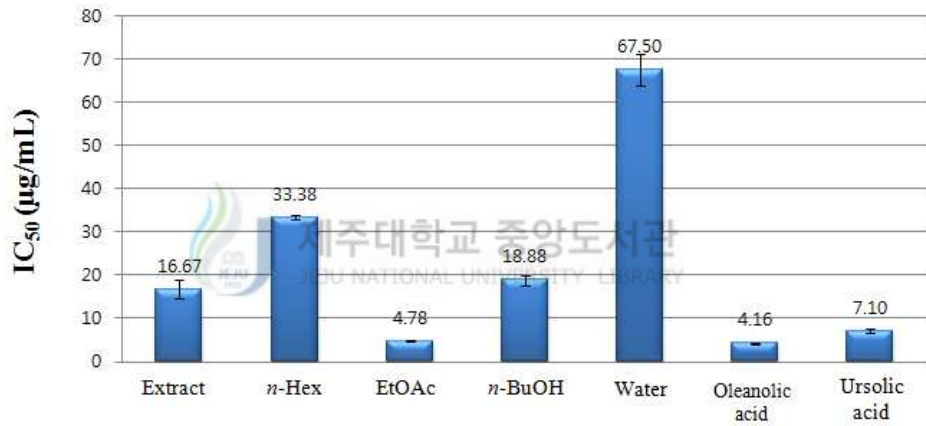


Figure 37. IC₅₀ value of elastase inhibition activities of extract and solvent layers.

3-1-2. 분리된 화합물의 elastase 저해 활성 실험 결과

패로부터 분리한 화합물들의 elastase 저해 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도로 실험을 진행하여 IC_{50} 값을 계산하였다.

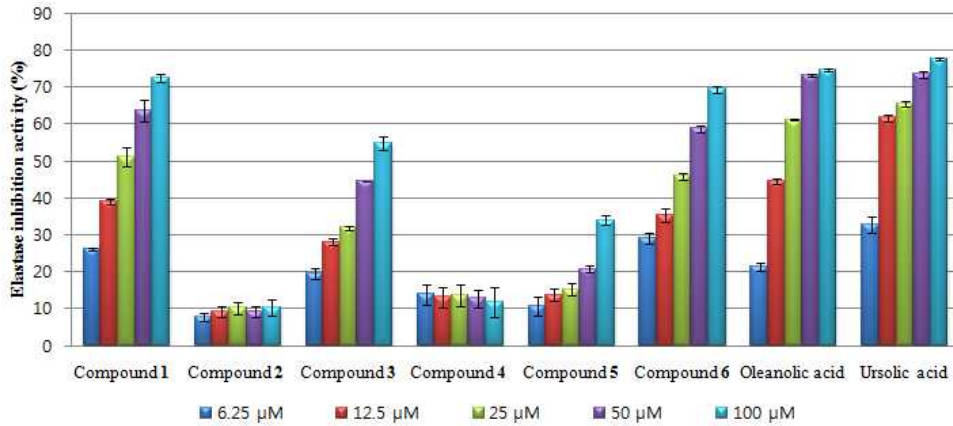


Figure 38. Elastase inhibition activities of isolated compounds.

그 결과, compound 1, 3, 6의 IC_{50} 값이 각각 24.66, 74.13, 31.69 μM 로 대조군인 oleanolic acid (16.18 μM)와 ursolic acid (10.83 μM)만큼 좋은 elastase 저해 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

Table 7. IC_{50} value of elastase inhibition activities of isolated compounds.

Compound No.	Compound name	IC_{50} (μM)
1	diphlorethohydroxycarmalol (DPHC)	24.66
2	<i>epi</i> -loliolide	>100
3	γ -linolenic acid	74.13
4	pyromeconic acid	>100
5	phloroglucinol	>100
6	linoleic acid	31.69
Positive control	Oleanolic acid	16.18
	Ursolic acid	10.83

4. 미백 활성 실험 결과

4-1. Tyrosinase 저해 활성 실험 결과

4-1-1. 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해 활성 실험 결과

패 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 추출물과 나머지 분획물에 대하여 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 IC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, IC₅₀값이 EtOAc layer에서 62.29 µg/mL로 대조군인 arbutin (70.32 µg/mL)보다 좋은 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다.

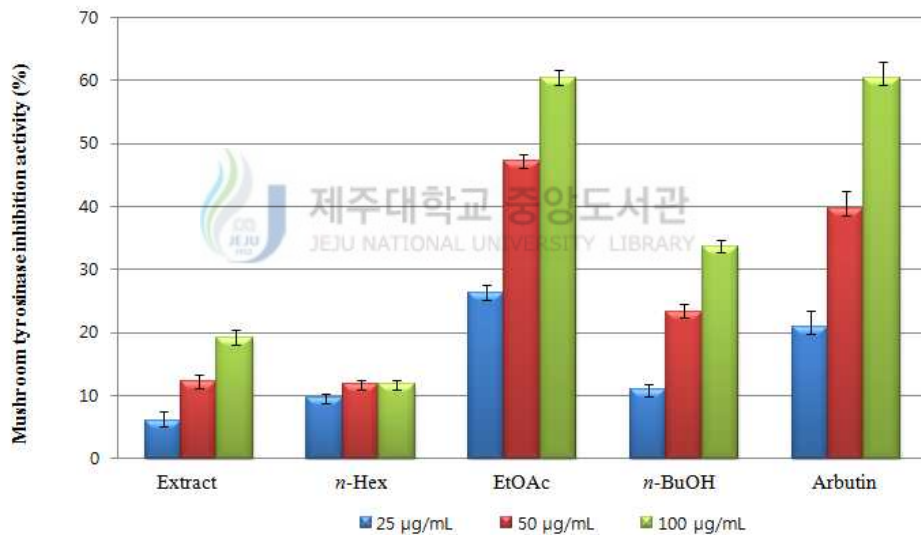


Figure 39. Tyrosinase inhibition activities of extract and solvent layers.

4-1-2. 분리된 화합물의 tyrosinase 저해 활성 실험 결과

패로부터 분리한 화합물들의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 125, 250, 500 μM 의 농도로 실험을 진행하여 IC_{50} 값을 계산하였다. Compound 2, 3, 4, 5, 6 은 활성이 좋지 않아 따로 나타내지 않았다.

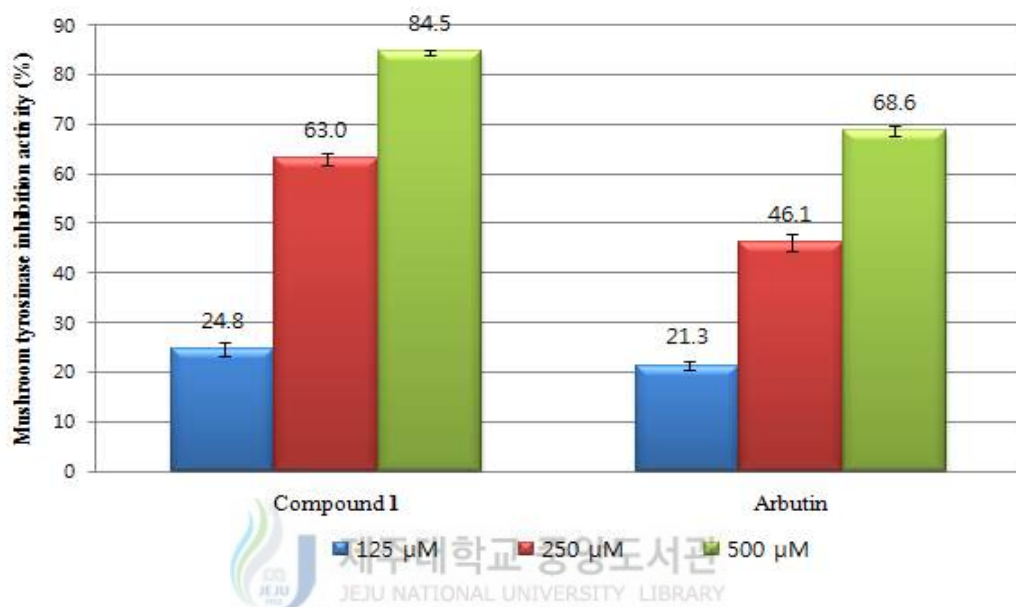


Figure 40. Tyrosinase inhibition activities of compound 1.

그 결과, compound 1의 IC_{50} 값이 210.24 μM 로 대조군인 arbutin (286.94 μM)보다 좋은 tyrosinase 저해 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다.

Table 8. IC_{50} value of tyrosinase inhibition activities of isolated compounds.

Compound No.	Compound name	IC_{50} (μM)
1	diphlorethohydroxycarmalol (DPHC)	210.24
2	<i>epi</i> -loliolide	>500
3	γ -linolenic acid	>500
4	pyromeconic acid	>500
5	phloroglucinol	>500
6	linoleic acid	>500
Positive control	Arbutin	286.94

4-2. Melanogenesis 저해 활성 측정 실험 결과

4-2-1. 추출물 및 분획물의 melanogenesis 저해 활성 측정 실험 및 MTT, LDH 세포독성 실험 결과

패 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL의 농도로 melanin contents를 확인한 결과 *n*-Hex layer에서는 세포독성없이 melanin contents가 적은 것을 확인하였고, EtOAc layer에서는 melanin contents가 40%정도이나, 약 20% 정도의 세포들이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 나머지 *n*-BuOH layer와 water layer에서는 활성이 좋지 않았다. 또한 sample에 의해 세포들이 사멸했는지 확인하기 위해 추가적인 세포독성실험으로 LDH 실험을 진행하였다.

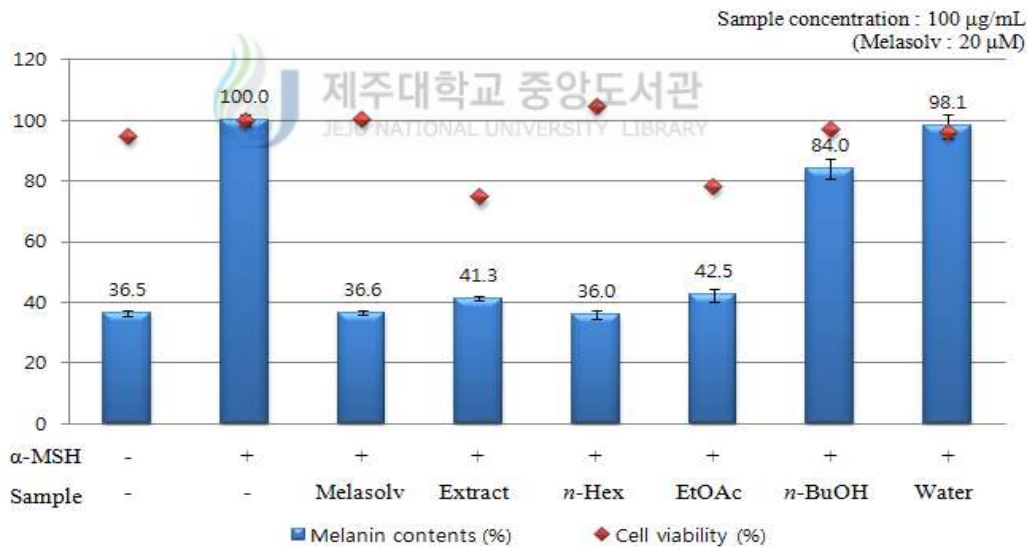


Figure 41. Melanin contents and cell viability of extract and solvent layers.

LDH 세포독성실험을 통해 확인한 결과, 패 70% 에탄올 추출물을 비롯한 모든 layer에서 세포독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

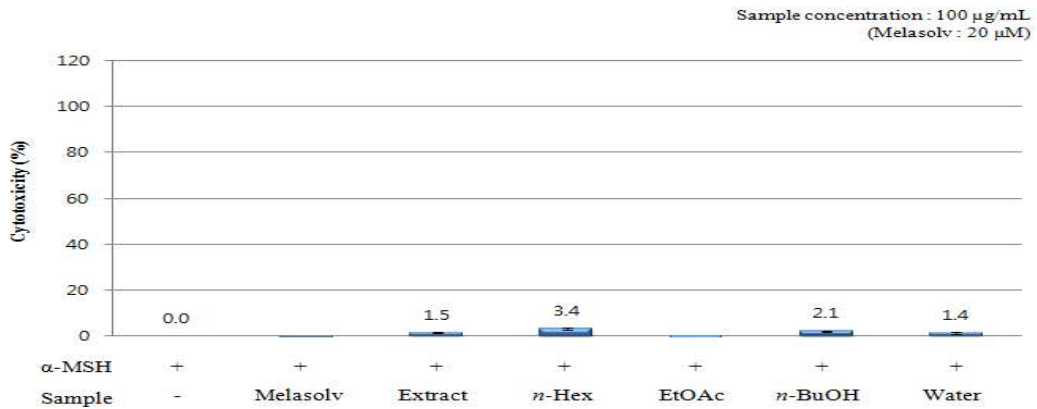


Figure 42. LDH cytotoxicity activities of extract and solvent layers.

이를 통해 추가적으로 농도를 낮춰 실험을 진행하였다. 그 결과, 농도가 증가함에 따라 melanin의 양이 감소한 것을 확인 할 수 있었으며, LDH 세포독성평가에서 독성을 나타내지 않았다.

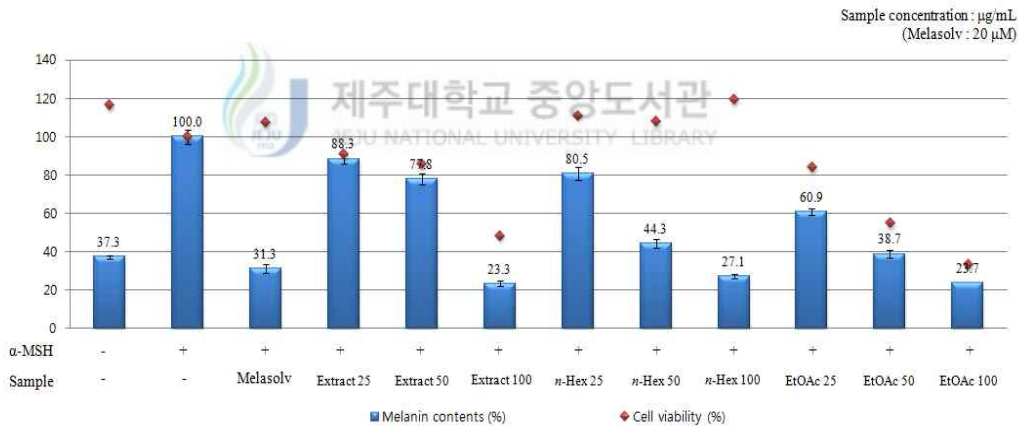


Figure 43. Melanin contents and cell viability of extract and solvent layers of various concentration.

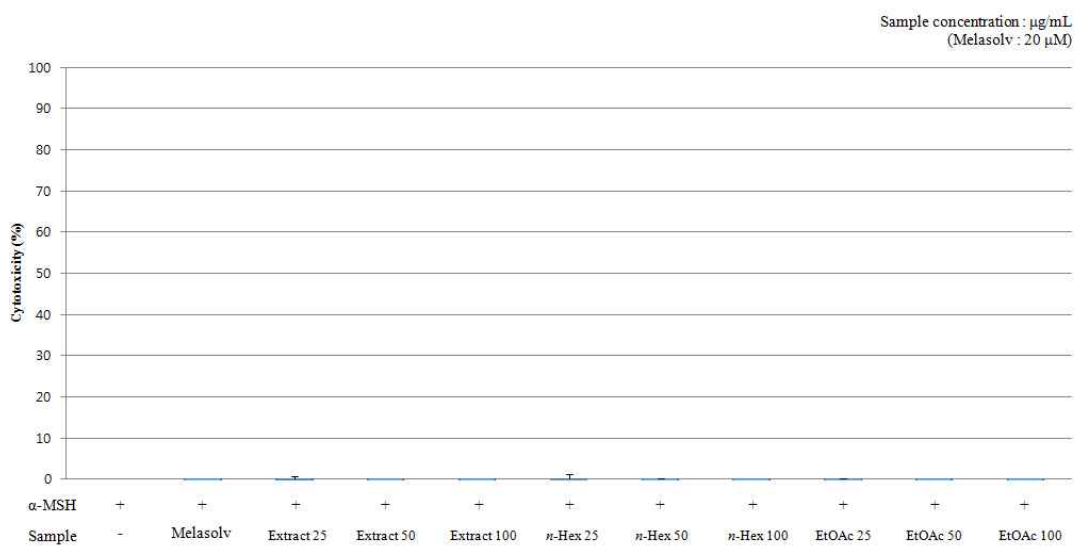


Figure 44. LDH cytotoxicity activities of extract and solvent layers of various concentration.

4-2-2. 분리된 화합물의 melanogenesis 저해 활성 측정 실험 결과 및 MTT, LDH 세포독성 실험 결과

패로부터 분리한 화합물들의 melanogenesis 저해 효과 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 500 μ M의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 패로부터 분리한 compound 1, 2, 3, 6은 대조군인 melasolv와 비슷하게 melanin합성을 저해하는 것으로 나타났다. 허나 compound 1, 3, 6에서 세포의 수가 상대적으로 적은 것을 보고 추가적인 실험으로 LDH 세포독성실험을 진행하였다.

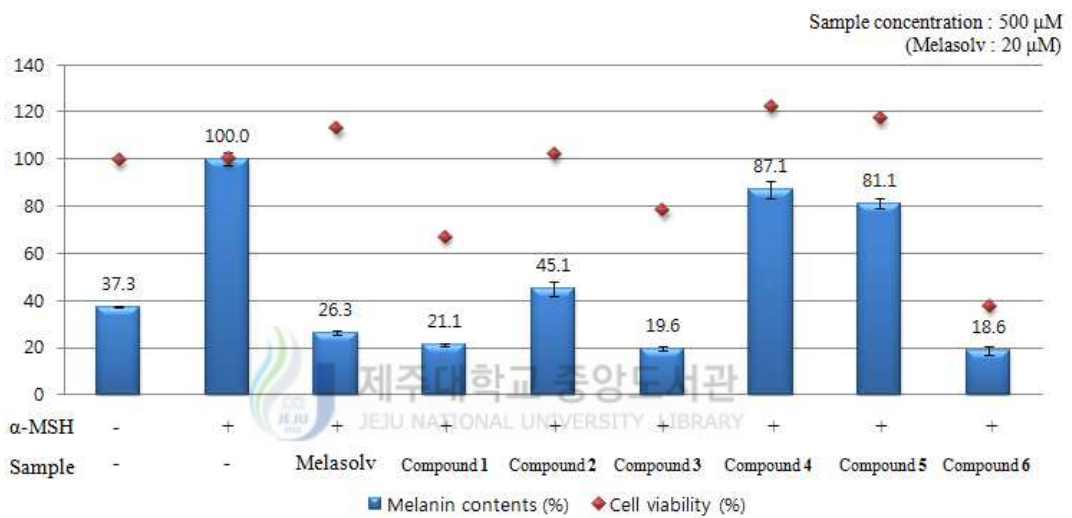


Figure 45. Melanin contents and cell viability of isolated compounds.

LDH 실험 결과, compound 1 ~ 6 모두 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.

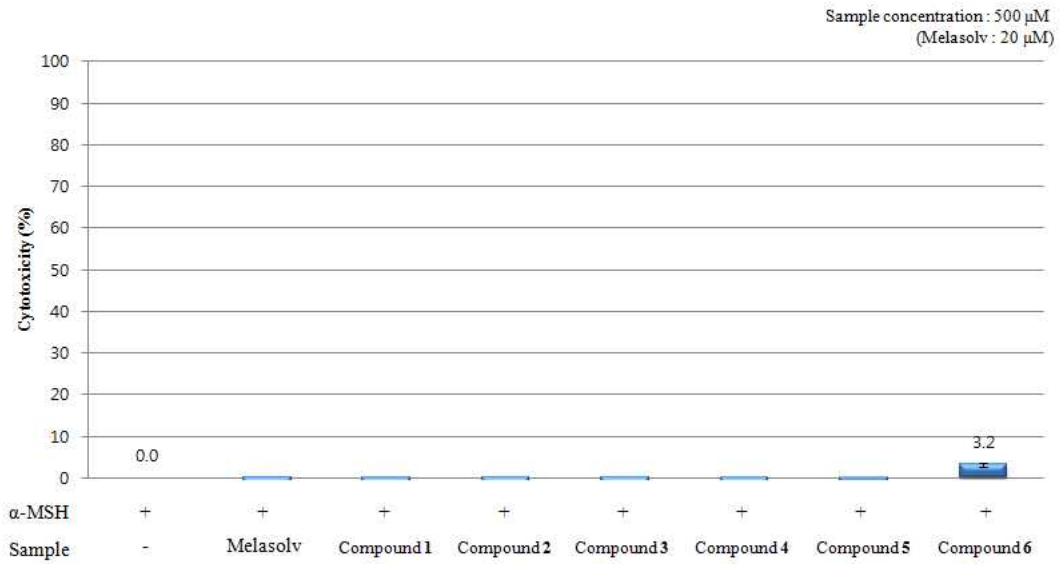


Figure 46. LDH cytotoxicity activities of isolated compounds.

이를 통해 활성이 좋았던 compound 1, 3, 6을 추가적으로 농도를 낮춰 실험을 진행하였다. 그 결과, 농도가 증가함에 따라 melanin의 양이 감소한 것을 확인 할 수 있었으며, LDH 세포독성평가에서 거의 독성을 나타내지 않았다. Compound 2의 경우, 분리한 양이 적어 추가실험을 진행하지 못하였다.

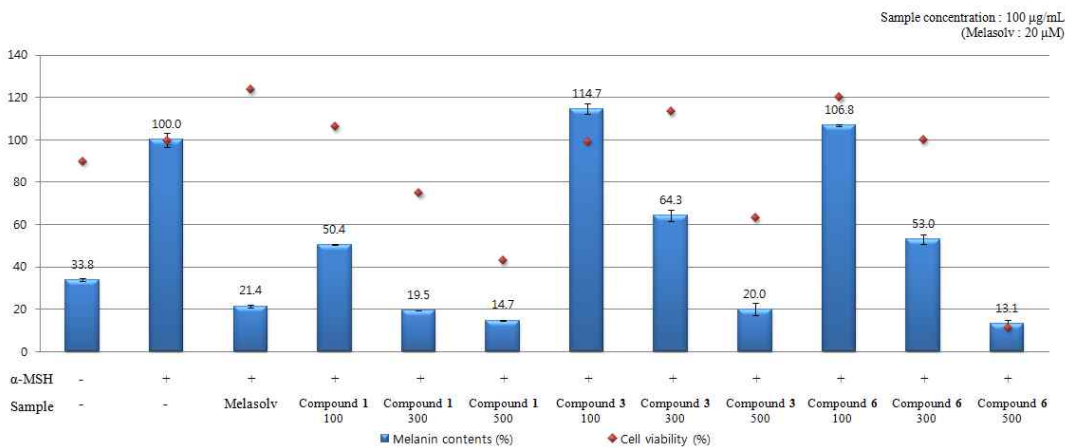


Figure 47. Melanin contents and cell viability of isolated compounds of various concentration.

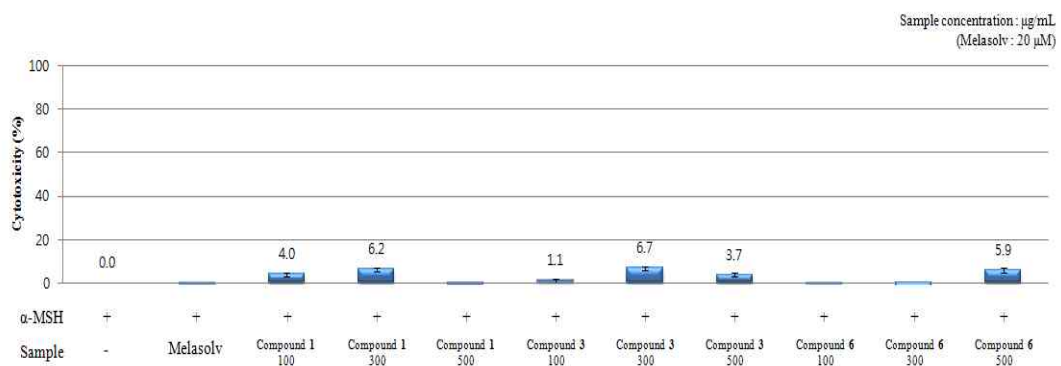


Figure 48. LDH cytotoxicity activities of isolated compounds of various concentration.

4-3. Intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과

4-3-1. 추출물 및 분획물의 intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과

패 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL의 농도로 intracellular tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, 추출물, *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH later에서 intracellular tyrosinase 양이 대조군인 melasolv에 비해 줄어든 것을 확인 할 수 있었다.

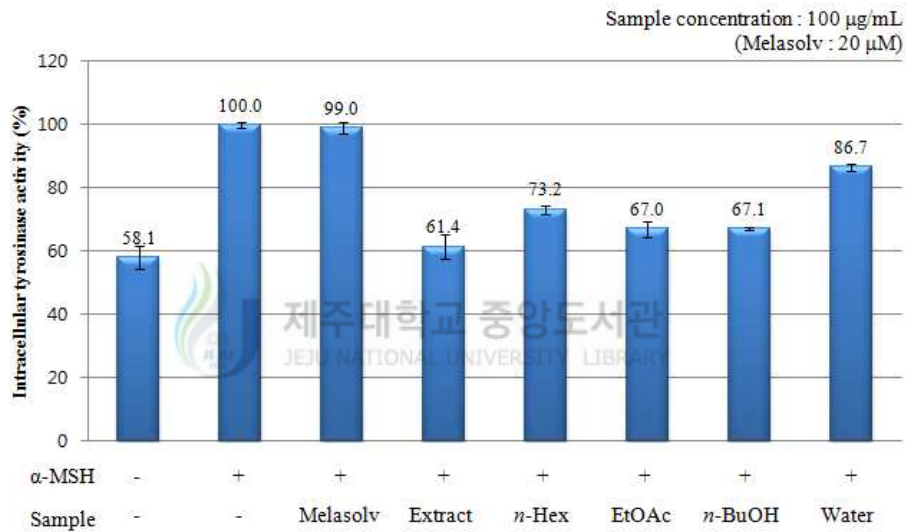


Figure 49. Intracellular inhibition activities of extract and solvent layers.

이를 통해 추가적으로 농도를 낮춰 실험을 진행하였다. 그 결과, 농도가 높아질 수록 농도의존적으로 intracellular tyrosinase 양이 대조군인 melasolv에 비해 줄어든 것을 확인 할 수 있었다.

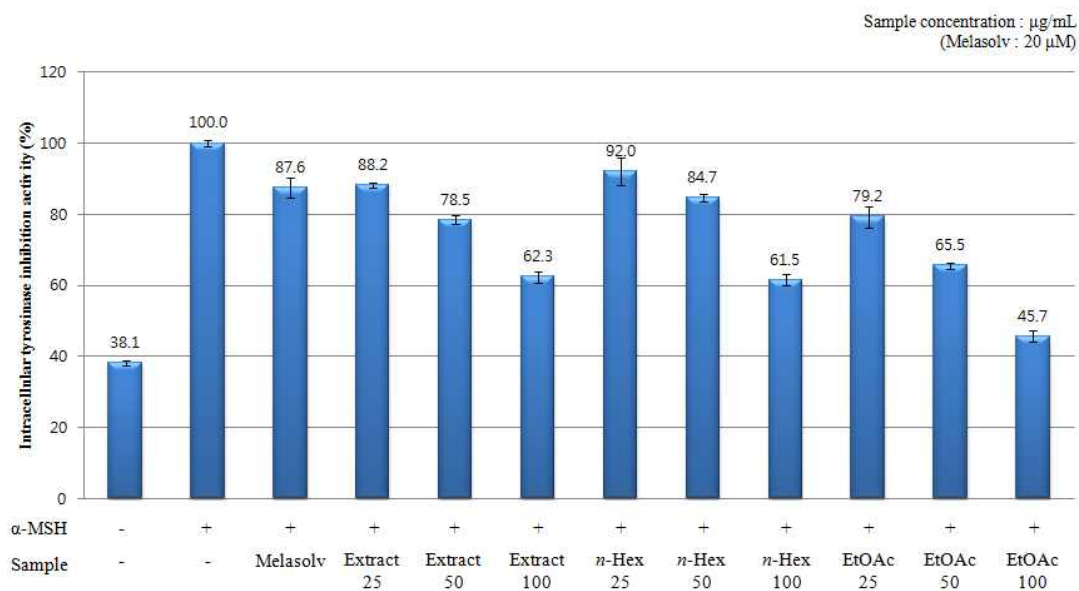


Figure 50. Intracellular inhibition activities of extract and solvent layers of various concentration.

4-3-2. 분리된 화합물의 intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과

패로부터 분리한 화합물들의 intracellular tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 500 μ M의 농도로 실험을 진행하였으며 그 결과, 패로부터 분리한 compound 1, 2, 3, 6은 intracellular tyrosinase 저해 활성이 좋게 나온 것을 확인 할 수 있었다.

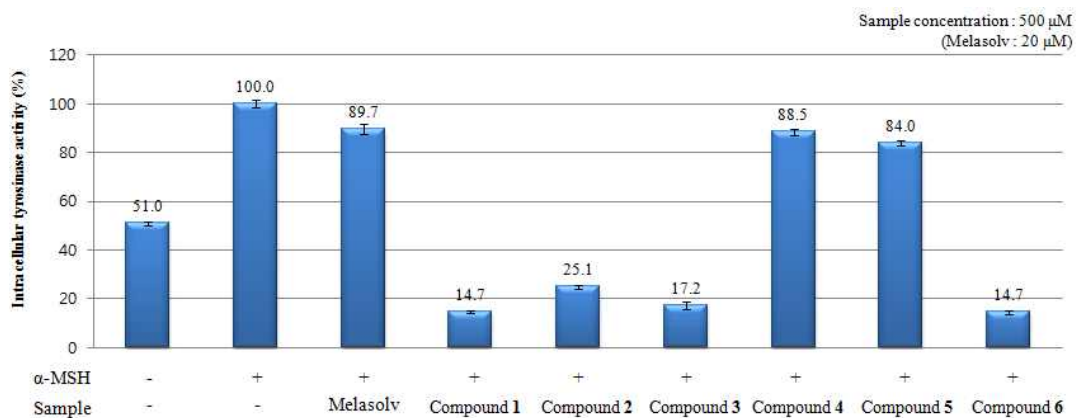


Figure 51. Intracellular inhibition activities of isolated compounds.

이를 통해 추가적으로 농도를 낮춰 실험을 진행하였다. 그 결과, 농도가 높아질수록 농도의존적으로 intracellular tyrosinase 양이 대조군인 melasolv에 비해 줄어든 것을 확인 할 수 있었다.

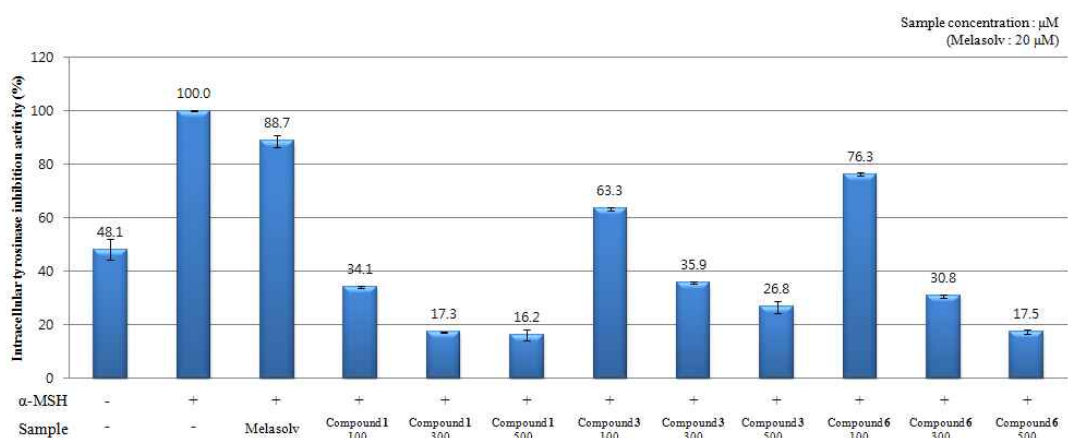


Figure 52. Intracellular inhibition activities of isolated compounds of various concentration.

5. 항균 활성 실험 결과

5-1. Paper disc diffusion 실험 결과

5-1-1. 추출물 및 분획물의 paper disc diffusion 실험 결과

패 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 항균 활성을 측정하였다. 추출물과 분획물에 대하여 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하였다. 그 결과, *S. epidermidis*에서 좋은 항균활성을 보였으며, *P. acnes*에서는 항균활성이 나타나지 않았다.

Table 9. Anti-bacterial activity of extract and solvent layers from *I. okamurae*.

Sample concentration : 100 µg/mL

	Extract	Sample				Positive control Erythromycin (1 mg/mL)
		<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	Water	
Clear zone(mm)						
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	10	9	11	10	-	14
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	10	9	11	10	-	-
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	10	9	10	10	-	14
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	-	-	-	-	-	27
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	-	-	-	-	-	27
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	-	-	-	-	-	30

5-2. MIC, MBC 실험 결과

5-2-1. 추출물 및 분획물의 MIC, MBC 실험 결과

패 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 MIC와 MBC를 측정하였다. 추출물과 분획물에 대하여 각각 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 μ g/mL의 농도로 실험을 실시하였다. 그 결과, *S. epidermidis*에서 항균활성을 보였으며, *P. acnes*에서는 항균활성이 나타나지 않았다.

Table 10. Anti-bacterial activity of extract and solvent layers from *I. okamurae*.

<i>I. okamurae</i>	<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709		<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710		<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	
	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)
Extract	125	500	250	1000	>1000	>1000
<i>n</i> -Hex	125	1000	125	1000	250	>1000
EtOAc	500	1000	500	1000	500	1000
<i>n</i> -BuOH	500	>1000	1000	>1000	1000	>1000
H ₂ O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	<1.95	<1.95	62.50	500	<1.95	<1.95

Table 11. Anti-bacterial activity of extract and solvent layers from *I. okamurae*.

<i>I. okamurae</i>	<i>P. acnes</i> CCARM 9009		<i>P. acnes</i> CCARM 9010		<i>P. acnes</i> CCARM 0081	
	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)
Extract	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>n</i> -Hex	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EtOAc	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>n</i> -BuOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
H ₂ O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	-	-	-	-	-	7.81

IV. 요약 및 결론

본 논문은 해조류 패(*Ishige okamurae*)를 추출하여 그 추출물로부터 화합물들을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 항산화, 주름개선, 미백 및 항균 활성에 대해 천연 소재로 활용 가능성을 알아보고자 연구를 진행하였다.

패 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water layer를 얻었다. 이 추출물과 분획물들에 대해 항산화, 주름개선, 미백 및 항균 활성을 진행하였다.

추출물 및 분획물들의 항산화 활성실험 결과, 총 polyphenolic compounds 함량 측정에서는 EtOAc layer에서 200 µg GAE/1 mg 으로 가장 높게 나왔다.

DPPH radical 소거 활성 실험에서는 EtOAc layer에서 SC₅₀값이 49.81 µg/mL로 대조군인 BHT (32.30 µg/mL)만큼 좋은 활성을 보였다. 또한 ABTS radical cation 소거 활성 실험에서는 추출물, EtOAc, *n*-BuOH layer에서 SC₅₀값이 각각 29.9, 14.8, 27.0 µg/mL로 대조군인 BHT (8.5 µg/mL)만큼의 좋은 활성을 나타내었다.

추출물 및 분획물들의 주름개선 활성실험 결과, elastase 저해 활성 실험에서는 water layer를 제외한 추출물, *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH layer에서 좋은 활성을 나타내었으며 IC₅₀값이 각각 16.67, 33.38, 4.78, 18.88 µg/mL로 대조군인 oleanolic acid (4.16 µg/mL)와 ursolic acid (7.10 µg/mL)만큼의 좋은 활성을 나타내었다.

추출물 및 분획물들의 미백 활성실험 결과, tyrosinase 저해 활성 실험에서는 EtOAc layer에서 IC₅₀값이 62.29 µg/mL로 대조군인 arbutin (70.32 µg/mL)보다 좋은 활성을 나타내었다. 또한 melanogenesis 저해 활성 실험에서는 추출물, *n*-Hex, EtOAc layer에서 용매만을 처리한 α-MSH(+)와 비교하였을 때 melanin contents를 감소시키는 것을 확인할 수 있었고, LDH 세포독성평가를 통해 추출물, 분획물 모두 세포독성이 없다는 것을 확인하였다. 그리고 intracellular tyrosinase 저해 활성 실험에서는 추출물, *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH layer에서 용매만을 처리한 α-MSH(+)보다 intracellular tyrosinase 저해 활성이 좋게 나온 것을 확인할 수 있었다.

추출물 및 분획물들의 항균 활성실험 결과, paper disc diffusion 실험에서는 water layer를 제외한 추출물, *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH layer에서 *S. epidermidis* 균주에 대해 항균활성이 있는 것으로 확인되었다. 또한 MIC, MBC 실험결과에서도 마찬가지로 *S. epidermidis* 균주에 대해 항균활성이 있는 것을 확인하였다.

이 같은 결과를 바탕으로 EtOAc층에서 화합물 분리를 진행하였고, vacuum liquid chromatography (VLC), 순상 silica gel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 NMR을 이용하여 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 6개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 di-phloretrohydroxycarmalol (1), *epi*-loliolide (2), γ -linolenic acid (3), pyromeconic acid (4), phloroglucinol (5) linoleic acid (6)로 확인되었다.

이렇게 분리된 화합물들에 대해 각각의 실험들을 진행하였다. 우선 항산화 실험은 이미 선행연구가 많이 되어 있어서 진행하지 않았다.

Elastase 저해 활성 실험에서는 compound 1, 3, 6이 IC₅₀값이 각각 24.66, 74.13, 31.69 μ M로 대조군인 oleanolic acid (16.18 μ M)와 ursolic acid (10.83 μ M)만큼의 좋은 활성을 나타내었다.

그리고 tyrosinase 저해 활성 실험에서는 compound 1의 IC₅₀값이 210.24 μ M로 대조군인 arbutin (286.94 μ M)보다 좋은 활성을 나타내었다. 또한 melanogenesis 저해 활성 실험에서는 compound 1, 2, 3, 6에서 세포독성없이 melanin contents 생성을 억제 시키는 것을 확인하였으며, intracellular tyrosinase 저해 활성 실험에서도 compound 1, 2, 3, 6에서 좋은 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

따라서 본 연구의 실험결과를 바탕으로 해조류 폐를 이용한 천연 항산화제, 주름개선제, 피부미백제 및 항균 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 1) 편이숙 “기능성 화장품과 기능성 식품의 구매 형태 및 선호도에 관한 연구”서경대학교 대학원, 석사학위논문, **2010**.
- 2) 한상훈 “멀티기능성 제품·원브랜드샵 성장세 지속될 것, 전문가들이 바라보는 2014 보건산업 전망-화장품산업” 12-15.
- 3) 송지성; 김영아 “국내 기능성 화장품 산업의 향후 시장 전망에 관한 연구” 한국디자인문화학회지, **2009**, 15(4), 258-271.
- 4) 홍재기 “활성산소에 의한 피부노화와 항산화비타민의 효능에 대한 이론적 고찰”, 대한피부미용학회지, **2009**, 7(2), 51-62.
- 5) Shin, C.H. "Studies on the Antioxidative Character in the Ethyl Acetate Extraction of *Rumex crispus*", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 16(6), 592-602.
- 6) Kim, S.H.; Yong, H.J.; Shin, C. and Ko, S.G. "Research of traditional herbal medicines for anti-aging, inhibition effect of wrinkle and whitening effect in the skin." *Korean J. Ori. Physiol. Pathol.* **2008**, 22, 691-698.
- 7) Park, K.J.; Park, S.H. and Kim, J.K. "Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosum* extract in Ultraviolet B(UVB)-induced photoaging." *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2010**. 39, 42-46.
- 8) Gilchrest BA. "Skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs*" **1990**, 2, 79-82.

- 9) Kang, K.S.; Kim, I.D.; Kwon, R.H.; Heo, Y.Y.; Oh, S.H.; Kim, M.A.; Jung, H.J.; Kang, H.Y.; Ha, B.J. “The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract” *J. Life Sci*, **2007**, *17*, 1147-1151.
- 10) Wang, K.H.; Lin, R.D.; Hsu, F.L.; Huang, Y.H.; Chang, H.C.; Huang, C.Y.; Lee, M.H. “Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines” *J. Ethnopharmacol*, **2006**, *106*, 353-359.
- 11) Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. “Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events” *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **2002**, *973*, 31-43.
- 12) Lin, J.Y.; Fisher, D.E. “Melanocyte biology and skin pigmentation” *Nature*, **2007**, *445*, 843-850.
- 13) 김정은 “비쭈기나무 가지로부터 향산화, 미백 및 주름개선 활성 성분 규명” **2011**, 제주대학교 대학원, 석사학위논문.
- 14) 한정환 “비양나무 가지의 향산화, 미백, 항염 활성 성분 연구” **2014**, 제주대학교 대학원, 석사학위 논문.
- 15) Kim, J.M.; Oh, H.C.; Song, S.P.; Kim, N.K.; Hwang, C.Y., “Study on the Anti-microbial Activity, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Several Herb-Extract” *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **2006**, *20(1)*, 103~114.
- 16) 신종현 “해조류 유래 신규 향장품 및 피부의약품 소재 개발연구” 교육과학기술부, **2010**

- 17) Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols (phenol derivatives) in urine" *J. Biol. Chem.*, **1915**, *22*, 305-308.
- 18) Blois, M. S. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.
- 19) 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.
- 20) 김수영 "뽕잎피나무 잎으로부터 항염 및 주름개선 활성 성분 연구" **2013**, 제주대학교 대학원, 석사학위논문.
- 21) Pomerantz S.H. "Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma" *The Journal of Biological Chemistry*, **1963**, *238*, 2351-2357.
- 22) http://takara.co.kr/file/catalogue/2013/catalogue_2013_16.pdf
- 23) Ko, R.K. "Chemical constituents and cosmetics-related Activities from plants in Jeju island" **2012**, 제주대학교 대학원, 박사학위논문.
- 24) 박기희; 김유아; 정현아; 이희정; 안종웅; 이범중; 사영환 "갈조류 지층이로부터 분리한 3개의 Norisoprenoids 화합물" *Journal of Korean Chemical Society*, **2004**, *48*(4), 394-398.
- 25) Yasuyuki Hashidoko "Pyromeconic Acid and Its Glucosidic Derivatives from Leaves of *Erigeron annuus*, and the Siderophile Activity of Pyromeconic Acid" *BioSci. Biotech. Biochem.*, **1995**, *59*(5), 886-890.

- 26) Le, Q.T.; Le, Y.; Qian, Z.J.; Kim, M.M.; Kim, S.K. "Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine algae *Ecklonia cava* on histamine release" *Process Biochemistry*, **2009**, *44*, 168-176.
- 27) Lee, K.I.; Kim, S.M. "Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts" *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **2009**, *38*(3), 267-273.
- 28) Heo, S.J.; kim, J.P.; Jung, W.K.; Lee, N.H.; kang, H.S.; Jun, E.M.; Park, S.H.; Kang, S.M.; Lee, Y.J.; Park, P.J.; Jeon, Y.J. "Identification of chemical structure and free radical scavenging activity of diplorehydroxycarmalol isolated from a brown alga, *Ishige okamurae*" *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2008**, *18*(4), 676-681.
- 29) Zou, Y.; Qian, Z.J.; Le, Y.; Kim, M.M.; Lee, S.H. and Kim, S.K. "Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems" *Process Biochemistry*, **2009**, *44*, 168-176.