creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

碩士學位論文

수박 지상부 추출물의 항염 및 미백 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

全 娥 琳

2016年 2月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

수박 지상부 추출물의 항염 및 미백 활성 성분 연구

指導敎授 李 南 昊

全 娥 琳

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 2月

全娥琳의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ㊞

委 員 _____ ㊞

委 員 _____ ㊞

濟州大學校 大學院

2016年 2月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Identification of Anti-inflammatory, Anti-bacterial and Skin whitening Constituents from the Aerial Parts of *Citrullus lanatus*

Ah Lim Jeon
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2016. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman, ...

Dissertation Committee, ...

Dissertation Committee, ...

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

목 차

List of Schemes ····· iii
List of Tables ····· iii
List of Figures ····· iii
List of Abbreviations ····· vi
Abstract ····· vii

I. 서론 ····· 1
1. 기능성 화장품 ····· 1
2. 화장품 부작용과 염증 ····· 2
3. 미백(Skin whitening) ····· 4
4. 화장품 성분의 관심과 천연물 연구 ····· 5

II. 재료 및 방법 ····· 8
1. 시약 및 기기 ····· 8
2. 재료 ····· 9
3. 추출, 분획 및 분리 ····· 10
3-1. 수박지상부의 추출 및 분획 ····· 10
3-2. *n*-hexane 분획의 활성 성분 분리 ····· 11
3-3. Ethyl acetate 분획의 활성 성분 분리 ····· 12
4. 활성실험 ····· 13
4-1. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 ····· 13
4-1-1. 세포배양 ····· 13
4-1-2. Nitric oxide 생성억제 평가 실험 ····· 13
4-1-3. 세포독성평가 ····· 14
4-1-3-1. MTT assay ····· 14
4-1-3-2. LDH assay ····· 15

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4-2. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 ····· 16
4-2-1. 세포배양 ····· 16
4-2-2. 시료의 전처리 ····· 16
4-2-3. Melanogenesis 저해 활성 측정 실험 ····· 16
4-2-4. Intracellullar tyrosinase 저해 활성 측정 실험 ····· 17
4-2-5. 세포독성평가 ····· 17
4-2-5-1. MTT assay ····· 17
4-2-5-2. LDH assay ····· 17
4-3. 항균 활성 실험 ····· 19
4-3-1. 균주배양 ····· 19
4-3-2. Paper disc diffusion method ····· 19

III. 결과 및 고찰 ····· 20
1. 화합물의 구조 결정 ····· 20
1-1. Compound 1의 구조해석 ····· 20
1-2. Compound 2의 구조해석 ····· 23
1-3. Compound 3의 구조해석 ····· 28
2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과 ····· 34
2-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가 결과 ····· 34
2-2. 분리된 화합물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가 결과 ····· 38
2-3. 분리된 화합물의 전염증성 cytokiones(IL-6, TNF-α) 생성 억제 평가 결과 ··· 40
3. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 결과 ····· 41
3-1. Melanogenesis 저해 활성 측정 실험 결과 ····· 41
3-1-1. 추출물 및 분획물의 melanogenesis 저해 활성 및 세포독성평가 결과 ···· 41
3-1-2. 분리된 화합물의 melanogenesis 저해 활성 및 세포독성평가 결과 ····· 45
3-2. Intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과 ····· 48
3-2-1. 추출물 및 분획물의 intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과 ····· 48
3-2-2. 분리된 화합물의 intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과 ····· 50
4. 항균 활성 실험 결과 ····· 51

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4-1. 추출물 및 분획물의 paper disc diffusion 실험결과 ····· 51

IV. 요약 및 결론 ····· 52

V. 참고문헌 ····· 54

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and fractionation from *Citrullus lanatus* ·· 10
Scheme 2. Procedure of isolation of compound **1** from *Citrullus lanatuse* ····· 11
Scheme 3. Procedure of isolation of compounds **2**, **3** from *Citrullus lanatuse* ·· 12

List of Tables

Table 1. 화장품 부작용 증상 ····· 3
Table 2. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts of compound **1** ····· 21
Table 3. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts of compound **2** ····· 25
Table 4. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts of compound **3** ····· 30
Table 5. Paper disc diffusion of extract and solvent layers from the aerial parts of *Citrullus lanatuse* ····· 51

List of Figures

Figure 1. LPS-induced inflammation pathway ····· 4
Figure 2. Process of melanogenesis ····· 6
Figure 3. Organic agricultural product certificate ····· 9
Figure 4. Principle of MTT assay ····· 15
Figure 5. Chemical structure of compound **1** ····· 20
Figure 6. ^{1}H-NMR spectrum of compound **1** (in $CDCl_3$) ····· 22
Figure 7. ^{13}C-NMR spectrum of compound **1** (in $CDCl_3$) ····· 22
Figure 8. Chemical structure of compound **2** ····· 24

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 9. ^{1}H-NMR spectrum of compound **2** (in C_5D_5N) ····· 26
Figure 10. ^{13}C-NMR spectrum of compound **2** (in C_5D_5N) ····· 26
Figure 11. DEPT-135 spectrum structure of compound **2** (in C_5D_5N) ····· 27
Figure 12. Chemical structure of compound **3** ····· 29
Figure 13. ^{1}H-NMR spectrum of compound **3** (in CD_3OD) ····· 31
Figure 14. ^{3}C-NMR spectrum of compound **3** (in CD_3OD) ····· 31
Figure 15. DEPT-135 spectrum structure of compound **3** (in CD_3OD) ····· 32
Figure 16. HMQC spectrum structure of compound **3** (in CD_3OD) ····· 32
Figure 17. HMBC spectrum structure of compound **3** (in CD_3OD) ····· 33
Figure 18. NO production inhibitory activities of extract and solvent layers · 35
Figure 19. Cell viabilities and cytotoxicities of extract and solvent layers in RAW 264.7 cell ····· 35
Figure 20. NO production inhibitory activities of *n*-Hex layer ····· 36
Figure 21. Cell viabilities and cytotoxicities of *n*-Hex layer in RAW 264.7 cell ····· 36
Figure 22. NO production inhibitory activities of EtOAc layer ····· 37
Figure 23. Cell viabilities and cytotoxicities of EtOAc layer in RAW 264.7 cell ····· 37
Figure 24. NO production inhibitory activities of compound **1** ····· 38
Figure 25. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **1** in RAW 264.7 cell ····· 38
Figure 26. NO production inhibitory activities of compound **3** ····· 39
Figure 27. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **3** in RAW 264.7 cell ····· 39
Figure 28. Inhibition of cytokine IL-6 of compound **1**, **3** ····· 40
Figure 29. Inhibition of cytokine TNF-α of compound **1**, **3** ····· 40
Figure 30. Melanin contents of extract and solvent layers ····· 42
Figure 31. Cell viabilities and cytotoxicities of extract and solvent layers in B16F10 melanoma cell ····· 42

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 32. Melanin contents of *n*-Hex layer ····· 43
Figure 33. Cell viabilities and cytotoxicities of *n*-Hex layer in B16F10 melanoma cell ····· 43
Figure 34. Melanin contents of EtOAc layer ····· 44
Figure 35. Cell viabilities and cytotoxicities of EtOAc layer in B16F10 melanoma cell ····· 44
Figure 36. Melanin contents of compound **1** ····· 46
Figure 37. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **1** in B16F10 melanoma cell ····· 46
Figure 38. Melanin contents of compound **3** ····· 47
Figure 39. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **3** in B16F10 melanoma cell ····· 47
Figure 40. Intracellular tyrosinase inhibition of *n*-Hex ····· 49
Figure 41. Intracellular tyrosinase inhibition of EtOAc ····· 49
Figure 42. Intracellular tyrosinase inhibition of compound **1** ····· 50
Figure 43. Intracellular tyrosinase inhibition of compound **3** ····· 50

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Abbreviations

CC	Column chromatography
CD_3OD	Methanol-d_4
$CDCl_3$	Chloroform
C_5D_5N	pyridine-d_5
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethylsulfoxide
D.W	Distilled water
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Fr.	Fraction
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
int	Integration
J	Coupling constant (Hz)
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MTT	Dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium salt
multi	Multiplet
n-BuOH	*n*-butanol
n-Hex	*n*-hexane
NMR	Nuclear magnetic resornance
O.D	Optical density
s	Singlet
t	Triplet
V	Vial
VLC	Vacuum liquid chromatography
α-MSH	α-Melanocyte-stimulating hormone

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Abstract

Identification of Anti-inflammatory and Skin-whitening Constituents from the Aerial Parts of *Citrullus lanatus*

Ah Lim Jeon

Department of Chemistry, Graduate School

Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

In this study, anti-inflammatory and skin-whitening activities were examined on the extract from *Citrullus lanatus* stems and leaves.

The *Citrullus lanatus* stems and leaves were extracted three times for 24h each with 70% ethanol. The ethanol extract was then suspended in distilled water and partitioned successively with *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water.

Repeated column chromatography on normal-phase silica gel and Sephadex LH-20 resulted in the isolation of three compounds, α-linolenic acid (**1**), sigmast-7-en-O-β-D-glucopyranoside (**2**) and 1-feruloyl-β-D-glucopyranoside (**3**).

The elucidation of the chemical structure of the compounds **1-3** were accomplished using spectroscopic data including 1D and 2D NMR spectra, and by the comparison of their data to the literature values. In anti-inflammatory screenings, *n*-hexane, ethyl acetate layers and compounds **1**, **3** showed nitric oxide production inhibitory activity in LPS-induced RAW 264.7 cell. Moreover, on screening of skin whitening activities, the *n*-hexane, ethyl acetate layers

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

and compounds **1**, **3** showed considerable inhibition on the production of melanin contents in α-MSH induced B16F10 murine melanoma cell without showing cytotoxicity.

Based on these reults, *Citrullus lanatus* stems and leaves extract were suggested for use as the novel ingredients in functional cosmetics.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 서 론

1. 기능성화장품

과학의 발달과 함께 인간의 수명은 점점 늘어가고 있으며, 21세기에 들어와 생활수준의 향상과 젊고, 아름다운 인생을 즐기려는 욕망이 강하게 나타나고 있다. 인터넷과 TV와 같은 영상매체의 발달로 인하여 사람들은 나이에 관계없이 아름답고 매력적으로 보이기를 원하게 되었다. 아름다운 외모에 대한 동경은 더 젊어 보이고자 하는 잠재적 의식적이며 유전적인 자극에 이끌리는 의식적 요구일 것이다. 이는 인간의 아름다움을 향한 욕망을 사업화하기에 이르렀다. 아름다움은 화장품에 의해여 외모를 향상시키고자 하는 욕구에 박차를 가하는 강력한 동기이다. 이렇듯, 인간이 아름다움을 추구할수록 화장품 시장은 지속적으로 성장하고 있다. 이처럼 성장세인 화장품 산업에 큰 변화가 일고 있다.[1-3)]

최근 국내 화장품 시장은 꾸준히 증가하고 있으며, 그 중 특히 2001년부터 도입된 기능성화장품은 그 시장규모가 점차 늘어나고 있는 추세이다. 기능성화장품은 화장품과 의약품의 중간적인 성격을 갖는 제품이라 볼 수 있는데, 일반화장품이 안전성을 강조하는데 비해 기능성화장품은 안정성 외에 특히 효능·효과를 강조한 제품이다.[1)] 기능성화장품은 영어로 「코스메디컬」또는 「코스메슈티컬」등으로 불려 지는데, 코스메디컬은 영어로 화장품을 의미하는 코스메틱과 의료를 의미하는 메디컬이 합해져서 만들어진 말이고 코스메슈티컬은 코스메틱에 약물을 의미하는 파마슈티컬의 합성어라 볼 수 있다.[2)]

식품의약품안전처의 화장품법 시행규칙에 따르면 제2조 기능성화장품의 범위는

1) 피부에 멜라닌색소가 침착하는 것을 방지하여 기미·주근깨 등의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품
2) 피부에 침착된 멜라닌 색소의 색을 엷게 하여 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품
3) 피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능을 가진

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

화장품

4) 강한 햇볕을 방지하여 피부를 곱게 태워주는 기능을 가진 화장품

5) 자외선을 차단 도는 산란시켜 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능을 가진 화장품

이라 고시하고 있다.[4)]

기능성 화장품은 의약품과 달리 일정기간 특정한부위에 사용하지 않고, 장기간 지속적으로 인체의 전체를 대상으로 사용하는 물품이기 때문에 인체에 대한 부작용이 없어야 한다. 화장품이 갖춰야할 요건인 안전성, 안정성, 사용성, 유효성 즉, 구체적인 효능·효과가 강조된 의약품적 성격과 피부에 대한 안전성이 강조된 화장품적 성격을 동시에 가지고 있어야 한다.[2)]

이러한 효능·효과에도 불구하고 아직은 기능성화장품에 대한 소비자의 만족도는 그다지 높지 않은 상태이다. 소비자는 보다 높은 효능의 기능성 화장품 개발을 요구하고 있다. 이러한 기능성 화장품을 개발하기 위해서는 피부생리에 대한 기본적인 메커니즘 연구를 기반으로 한 피부활성 물질 의 개발 및 이를 효과적으로 전달할 적절한 제형의 개발이 선행되어하므로,[1)] 본 연구에서는 천연물로부터 유효성분을 추출 분리 정제하여 효능을 검증하여 효능이 높은 새로운 소재를 개발하고자 시작하였다.

2. 화장품 부작용과 염증

화장품은 피부를 건강하게 유지하고 보호하기 위해 사용되는 물품으로 의사처방이 있어야만 사용 가능한 의약품과는 달리, 불특정 다수의 사람들이 장기간 사용하기 때문에 화장품을 제조할 때 여러 가지 측면을 고려하여 피부 부작용의 발생을 최소화 하여야 한다.[5)] 그러나 화장품의 부작용에 의한 사례가 매년 급증하고 있으며, 소비자 안전센터의 「화장품 부작용 모니터링(2010」에 따르면, 화장품 사용 후 발생한 이상증상 전체 982건 중, 접촉성 피부염이 420건(42.8%)으로 가장 높게 나타났으며, 접촉성 피부염은 화장품 부작용으로 일어날 수 있는 가장 흔한 질환의 일종으로 발진, 가려움증, 통증 등 여러 가지 증상을 유발시킨다.[6)]

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 1. 화장품 부작용 증상

종 류	건	%
접촉성피부염	420	42.8%
발 진	182	18.5%
홍 반	101	10.3%
부 종	63	6.4%
통 증	44	4.5%
가려움증	44	4.5%
표피탈락	25	2.6%
열 감	19	1.9%
여드름, 아토피 악화	18	1.8%
피부탈변색	17	1.7%
화 상	15	1.5%
물 집	2	0.2%
기 타	32	3.3%
합 계	982	100.0%

자료출처 : 소비자안전센터

피부 자극반응의 메커니즘은 정확히 밝혀져 있지는 않았으나, 피부자극이 일어나기 위해서는 피부 방어벽에 이상이 생겨 화장품에 의한 피부 침투가 일어나야 하며, 이들이 표피 혹은 진피 세포와 상호작용을 함으로써 면역체계가 활성화되어 자극이 일어나며 염증반응을 더 확대 시킨다고 알려져 있다.[7)]

이렇듯, 피부자극을 유발하는데 있어 염증은 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 염증은 생체조직에서 병원체의 침입이나 외부 자극에 대한 방어 반응중 하나이다. 생체조직이 화학적, 물리적, 생물학적 자극에 의하여 손상되었을 때, 손상을 국소화 시키고 원래 상태로 회복시키려는 생체의 방어기작중 하나로[8)] 염증성 질환 환자는 다른 질환의 전체 환자 중 큰 비중을 차지하고 있어, 이를 치료하기 위한 항염 활성 물질에 대한 관심이 높아지고 있으며, 천연물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 항염 성분은 피부의 진정효과가 우수하여 예민성 피부를 위한 저자극성 화장품에 적극적으로 사용된다.[9)]

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

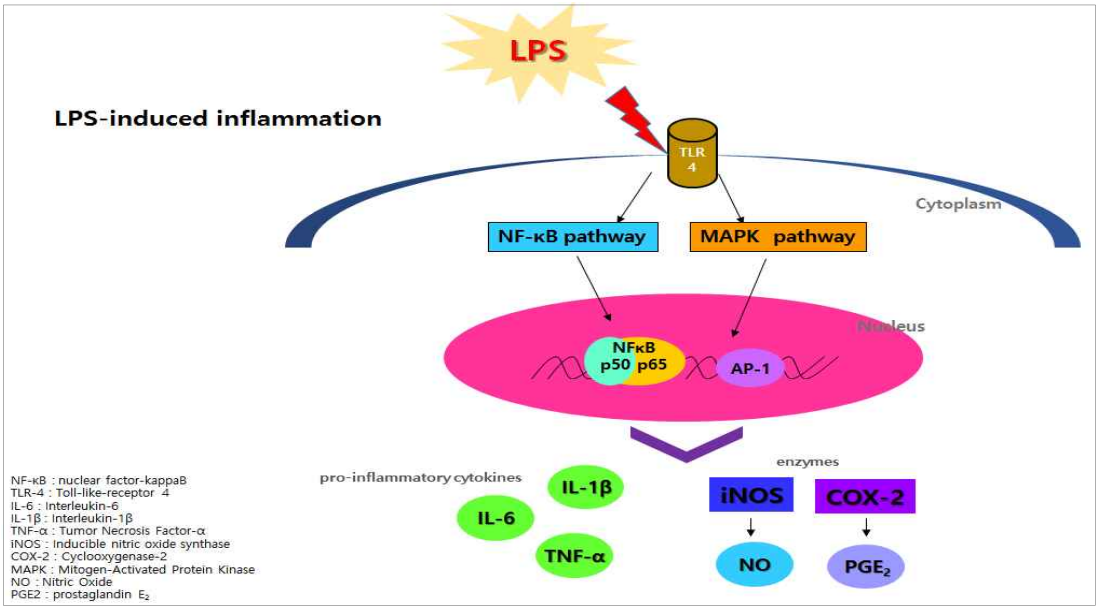


Figure 1. LPS-induced inflammation pathway.

염증반응의 조절은 비정상적인 자극에 대하여 다양한 면역세포가 관여하지만, 그중 대식세포는 혈액의 단핵세포로부터 분화한 조직세포로 염증 반응에서 방어적 역할을 한다. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성 세균의 세포외막에 존재하며, 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여, 다양한 염증 발병 인자로 알려진 TNF-α, IL-6, IL-1β 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 염증 매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성으로 인해 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 바뀌는 과정 및 nitric oxide (NO) 형성과정으로 이어지게 된다. NO는 염증 매개제로 NO synthase (NOS)에 의해 생성되며, 두 가지로 분류되어진다. cNOS는 다양한 세포에서 발견되어지고, inducible NOS (iNOS)는 유도되어지는 형태로 대식세포나 간세포 등에서 interferon-ɣ (IFN-ɣ) 또는 LPS에 의해 자극을 받을 때 발현되어 다량의 NO를 생성한다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과도하게 발현된 NO는 염증 매개체의 생성을 촉진하여 조직의 손상, 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

심화시키는 것으로 알려져 있다. Cycolooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 PGs으로 전환시키는 효소로서 COX-1, COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장 기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하지만, COX-2는 염증 매개물질인 prostaglandin E_2 (PGE_2)를 형성 시킨다. PGE_2 와 같은 물질은 염증반응, 면역반응 등에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.[8-11)]

따라서, 본 연구에서는 murine macrophage RAW 264.7 세포내에 염증 매개 물질인 NO, 염증 cytokine인 IL-6, TNF-α를 측정함으로서 염증반응을 얼마나 저해하는지를 측정하였다.

3. 미백(Skin-whitening)

미백 화장품은 동아시아 여성들에게 많은 관심을 끌고 있는 제품으로 한국을 비롯한 일본, 중국, 동아시아 등의 시장에서 규모가 크게 성장할 것으로 보고 있다. 미백제품은 기능성화장품의 시장 확대와 발전을 선도하는 중추적인 역할을 수행하고 있으며, 점점 그 범위를 확대해 나가고 있다.[2)]

사람의 피부는 인체를 자외선으로부터 보호하는 역할을 하고 있다. 자외선이 피부에 미치는 영향은 피부에 유해한 활성산소의 생성, 이로 인한 세포손상, 결과적으로 피부의 노화를 촉진하는 역할을 한다. 피부 내에 이러한 유해한 활성산소의 생성을 억제하기 위한 방어 작용으로 멜라닌화를 들 수 있는데 피부 내에 생성된 멜라닌은 자외선을 흡수하여 에너지를 분산시킴으로서 피부에 미치는 자외선의 해를 감소시킨다. 하지만 이러한 긍정적인 역할에도 불구하고 과잉으로 생산된 멜라닌은 여성들의 주요 고민인 기미, 주근깨 등을 유발하는 원인이 되어 왔다. 이러한 이유로 멜라닌 생성을 억제하려는 많은 노력 들이 기울어져왔다.[1)]

멜라닌은 피부 기저층에 존재하는 melanocyte라는 멜라닌 생성세포 내 소기관인 melanosome으로부터 합성되며, 특이적인 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1)과 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 등을 함유하고 있다. 이중에서 가장 핵심적인 효소는 속도결정단계를 조절하는 중합효소의 일종인 tyrosinase이다. Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-dihydroxy phenylalanine (L-DOPA)으로, L-DOPA을 DOPAquinone으로 변화시킨다. TRP-1은 black과

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

brown 색소인 eumelanin 생성에 관여하며 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 등의 발현에 관여하는 전사인자로 이들 효소의 유전자 발현을 증가시켜 멜라닌을 합성하게 된다. 외부자극에 의하여 과 발현된 멜라닌을 억제하고 미백효과를 얻기 위해서는 멜라닌 합성 효소의 발현을 저해시켜야한다.[7,12)]

따라서, 본 연구에서는 α-melanin stimulating hormone (α-MSH)에 의하여 활성화된 B16F10 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 합성량과 tyrosinase 저해효과를 확인하였다.

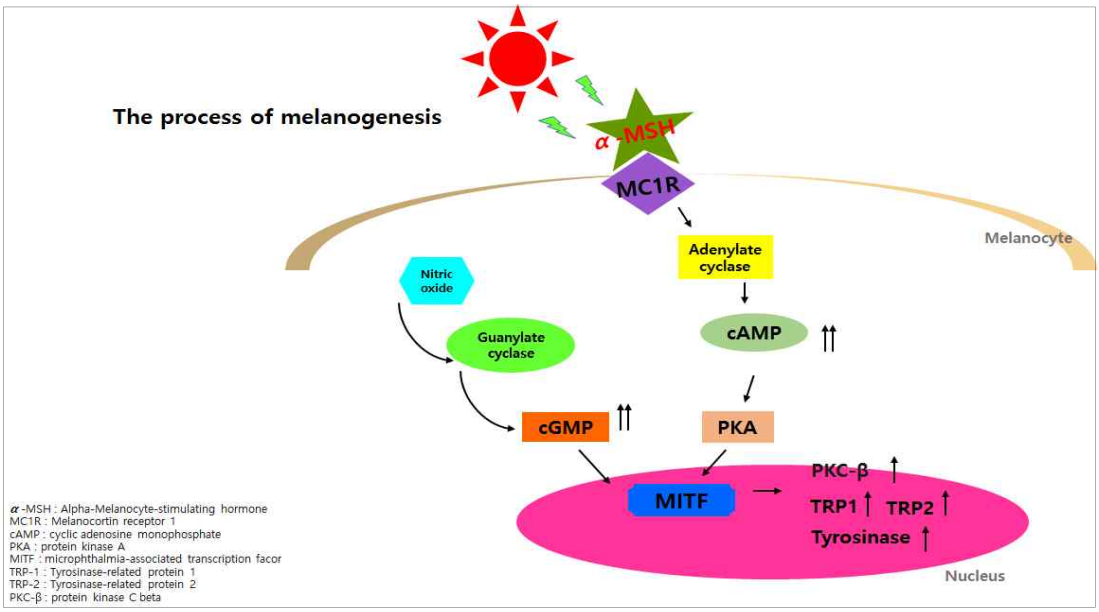


Figure 2. Process of melanogenesis.

4. 화장품 성분 관심과 천연물 연구

2008년 10월 18일 화장품법이 개정되면서 출하되는 화장품은 제조에 사용된 모든 성분을 표시하도록 의무화 되었다. 이 개정의 목적은 화장품 소비자의 선택권 확보와 부작용이 발생할 때 원인규명을 용이하게 하기 위한 것이다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

당신의 키스에 독이 담겨있다.
화장품의 화학물질이 당신의 몸에 스며들고 있다.
화장품 광고가 아닌 성분으로 말하라.

스테이시 맬컨의 저서「화장품 회사가 당신에게 알려주지 않는 진실」, 폴라비 가운의 저서「나 없이 화장품 사러 가지마라」에서는 소비자들에게는 어렵고, 몰랐던 우리가 사용하는 화장품의 성분에 대해 중요하게 다루고, 화장품속 유해 성분들을 꼬집고, 안전성에 대해 많은 화장품 소비자들에게 알 권리를 제공해주고 있다.

또한, 스마트폰의 발전으로 소비자들이 평소에 알기 어려웠던 각종 화장품의 성분들을 브랜드별, 카테고리별로 쉽게 찾을 수 있는 어플리케이션의 다운로드 수가 100만이 넘어감에 따라, 소비자들이 화장품을 선택할 때 기능뿐만 아니라 성분에도 관심을 가짐을 알 수 있다.

소비자들이 화장품의 성분의 안전성과 효능을 중요시함에 따라, 천연소재에서 유효 추출물을 찾아내는 것이 중요하며, 이를 이용한 미백, 주름 및 자외선 차단 기능을 가진 기능성 화장품의 개발이 이루어지고 있다.[14)]

수박은 박목과의 박과 쌍떡잎식물로 체내에 흡수가 잘되는 대표적인 여름과일이다. 수박에는 시트룰린(citrulline)이 함유되어있어 이뇨작용이 있고, 칼륨의 함량이 높아 나트륨 배설에 효과적이라고 알려져 있다. 또한 여러 연구를 통해 수박과육에서 항균, 미백, 항염, 수박외피에서는 미백, 항산화, 수박씨에서는 항균, 미백, 항염, 수박줄기와 잎에서는 항균에 대한 연구결과가 보고되어 있다.[15-20)] 수박의 잎과 줄기에 대해서는 많은 연구가 되어있지 않음에 따라, 본 연구에서는 수박(*Citrullus lanatus*)의 지상부(잎과 줄기)를 가지고 추출, 분리, 정제하여 인체에 부작용이 적고, 안정성이 높은 기능성 화장품으로서의 소재 탐색에 목적을 두고 연구를 진행하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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 silica gel (2-25 μm, Sigma Co.)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. 분리 과정에 사용된 TLC (thin-layer chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (silica gel 60 F_{254}, 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 $KMnO_4$ 수용액(3 % $KMnO_4$, 20 % K_2CO_3, 0.25 % NaOH) 및 1 % anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 Sunrise^{TM} (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 CD_3OD, $CDCl_3$, pyridine-d_5를 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 재료

실험에 사용된 수박(*Citrullus lanatus*) 지상부(시료번호 : 414)는 한국 농식품 인증원 주식회사에서 유기농 농산물로 인증 받은 한울영농조합 농가에서 2013년 7월에 채집하였다. 채집한 수박 지상부는 실온 및 음지에서 완전 자연 건조하여 분쇄하여 사용하였다(Figure 3).

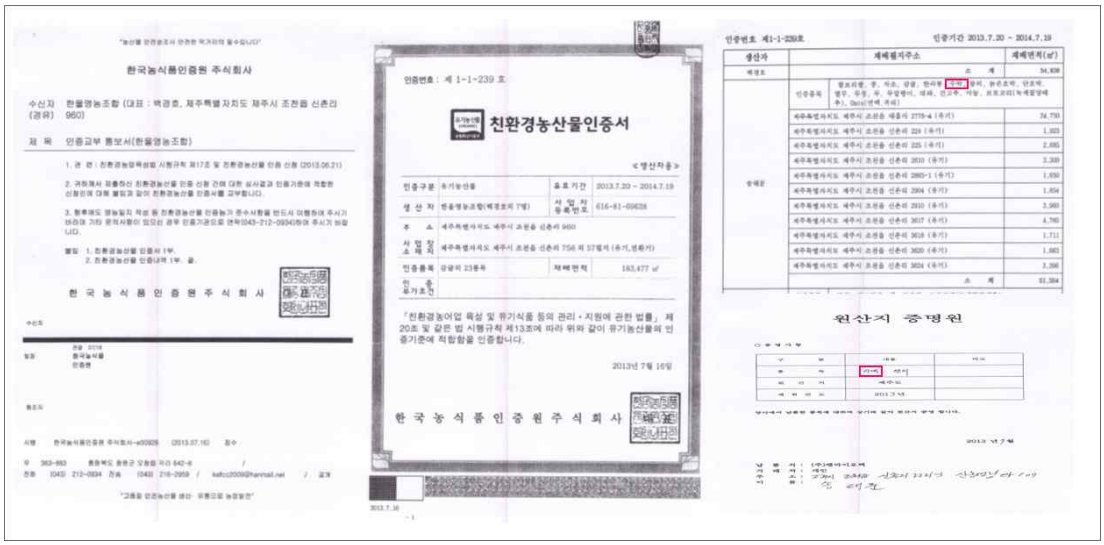


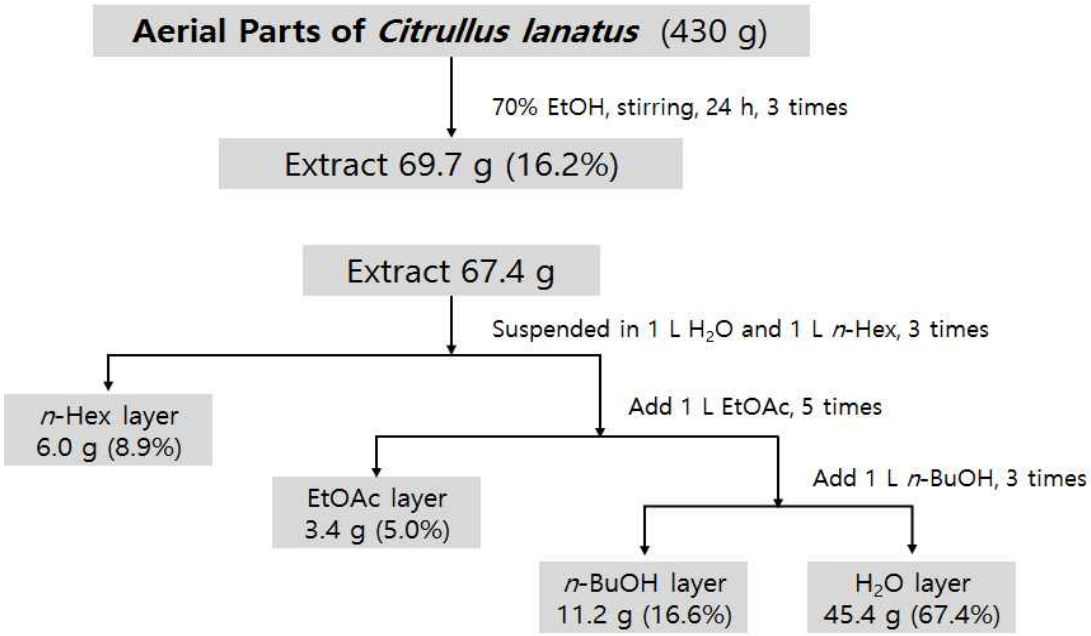
Figure 3. Organic agricultural product certificate.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 수박 지상부의 추출 및 분획

건조된 수박 지상부 430 g을 분쇄한 후, 이를 70 % 에탄올 5 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 ℃ 이하의 수욕 상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70 % 에탄올 추출물 69.7 g을 얻었다. 이 중 추출물 67.4 g을 증류수 4 L에 현탁 시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer, ethyl acetate layer, *n*-butanol layer, water layer 등 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다(Scheme 1).



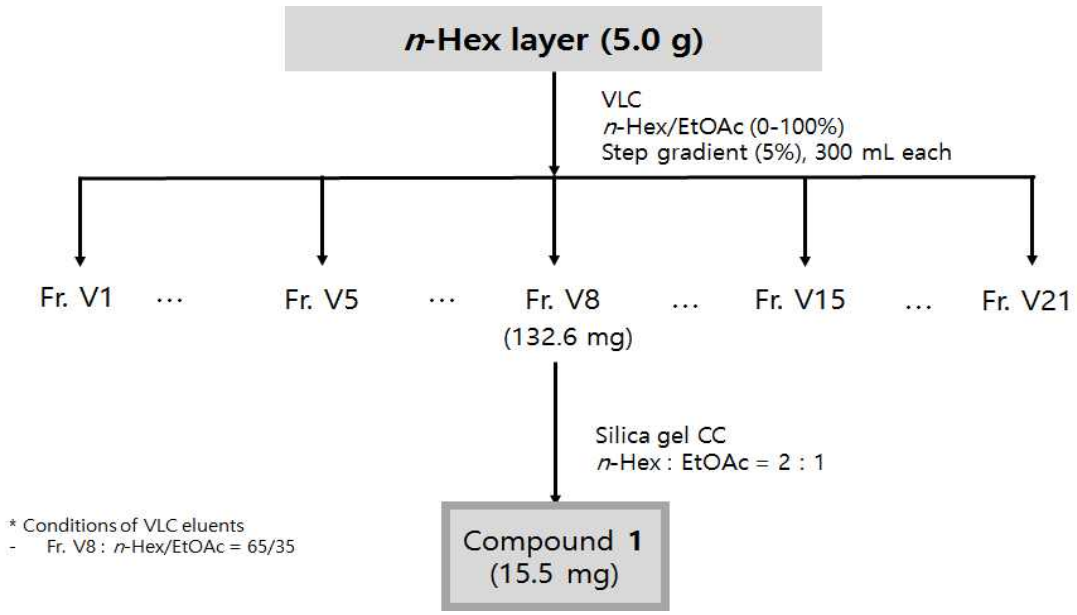
Scheme 1. Procedure of extraction and fractionation from *Citrullus lanatus*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3-2. *n*-hexane 분획의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 *n*-hexane layer 5.0 g을 분획하기 위하여 순상 silica gel로 충진한 glass filter를 이용하여 VLC (vacuum liquid chromatography)를 수행하였다. *n*-Hex/EtOAc(0～100%)로 용매 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 21개의 fraction을 얻었다(Fr. V1～V21).

Fr. V8(38% EtOAc in *n*-Hex) 132.6 mg을 *n*-Hex : EtOAc = 2 :1의 용매조건으로 순상 silica gel CC를 수행하여 compound **1**(15.5 mg)를 분리하였다(Scheme 2).



Scheme 2. Procedure of isolation of compound **1** from Aerial Part of *Citrullus lanatus*.

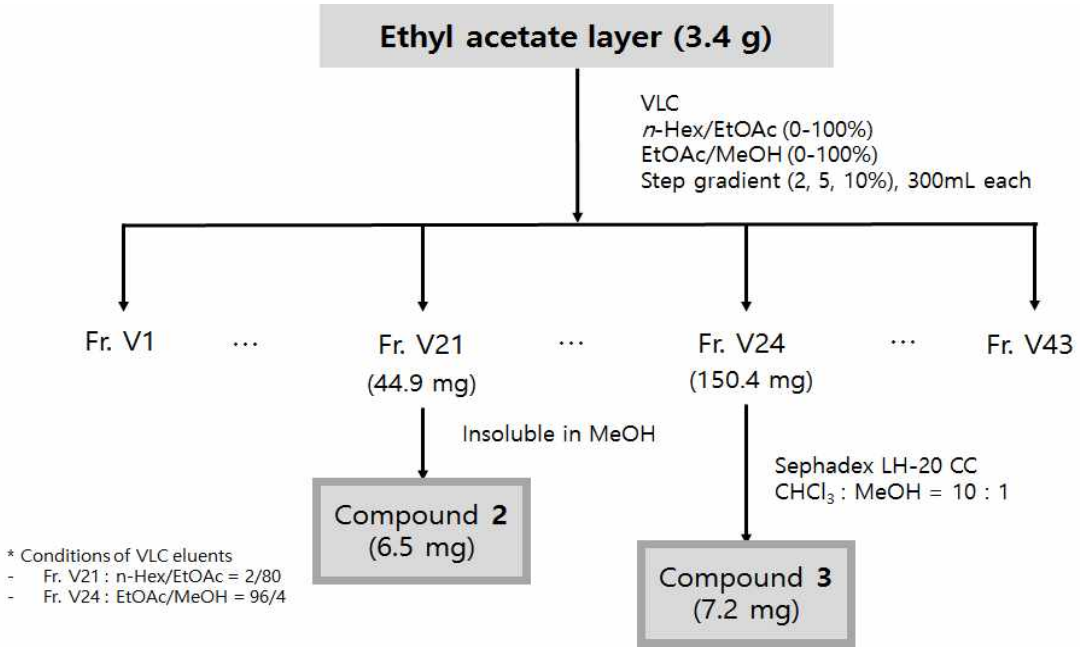
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3-3. Ethyl acetate 분획의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 3.4 g을 분획하기 위하여 순상 silica gel로 충진한 glass filter를 이용하여 VLC (vacuum liquid chromatography)를 수행하였다. *n*-Hex/EtOAc(0～100%), EtOAc/MeOH(0～100%)로 용매 극성을 2, 5, 10%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 43개의 fraction을 얻었다(Fr. V1～V43).

VLC fration들 중 Fr. 21(80% EtOAc in *n*-Hex) 43.9 mg을 감압농축한 후 MeOH을 첨가하였을 때 녹지 않는 powder가 생성되었다. 이를 MeOH을 이용해 재결정하여 compound **2**(6.5 mg)을 얻었다.

Fr. V24(4% MeOH in EtOAc) 150.4 mg 은 $CHCl_3$: MeOH = 10 :1의 용매조건으로 sephadex LH -20 CC를 수행하여 compound 3(7.2 mg)를 분리하였다 (Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of isolation of compounds **2**, **3** from *Citrullus lanatus*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. 활성실험

4-1. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

4-1-1. 세포배양

마우스 대식 세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(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, YY, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator 조건에서 배양하였으며, 2 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-1-2. Nitric oxide 생성 억제 평가 실험

24 well plate에 RAW 264.7 cells를 2×10^5 cells/mL로 분주하고 37 ℃, 5% CO_2 incubator 조건하에 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cells을 1 μg/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 이용하여 세포배양액 중에서 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 이용하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4-1-3. 세포 독성 평가

4-1-3-1. MTT assay

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 B16F10 murine melanoma cell을 6 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 37 ℃, 5 % CO_2 조건하에서 24 시간 배양 후, 시료를 처리하였다. 72 시간 배양 후, 배양액 200 μL를 취하고 나머지 배양액에 500 μg/mL 농도로 MTT를 첨가하여 37 ℃에서 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.

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

$A_{control}$: 570 nm에서 용매를 처리한 control의 흡광도

A_{sample} : 570 nm에서 시료를 처리한 sample의 흡광도

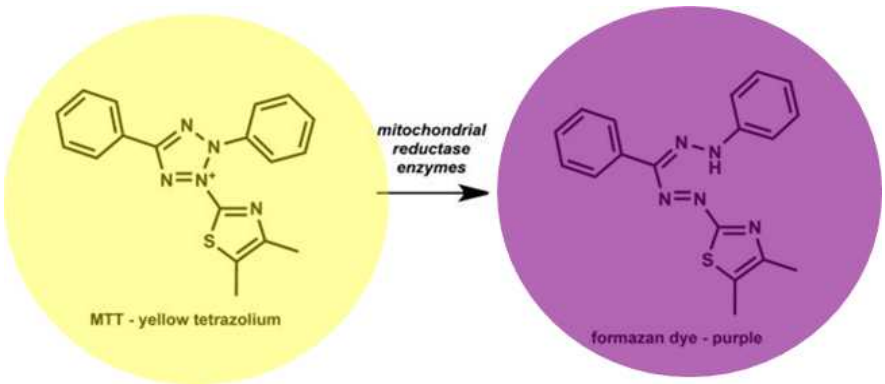


Figure 4. Principle of MTT assay.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4-1-3-2. LDH 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 diapholase의 촉매에 의해 테트라졸리움염(INT)을 환원시켜 490 nm의 흡수를 갖는 적색의 formazan 색소가 형성되며 이 formazan의 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가한다.

LDH assay는 다음과 같다. B16F10 murine melanoma cell을 6 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 37 ℃, 5 % CO_2 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.

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

A_{sample} : 시료를 처리한 samle의 흡광도

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

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

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4-2. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백활성 실험

4-2-1. 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, YY, USA) 배지를 사용하여 37 ℃, 5 % CO_2 incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-2-2. 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.

4-2-3. Melanogenesis 저해 활성 측정 실험

배양이 끝나면 배지를 PBS buffer로 세척한 후 trypsin-EDTA를 300 μL 처리하여 cell들을 걷어내고 DMEM배지 700 μL를 넣어 microtube에 세포를 회수하였다. 회수한 pellet을 원심분리 시켜 상등액을 제거하고, pellet에 sonication buffer (6.7 mM sodium phosphate buffer containing 1 % triton X-100 and 0.2 mM PMSF)를 500 μL씩 넣어 voltexing을 해주었다. 그 다음 hand sonicator로 cell을 두 번 깨준 뒤, 30 분정도 반응시키고 다시 원심분리를 시행하였다. 그 후에 상층액은 intracellular tyrosinase 저해 활성을 측정하였고, pellet은 melanogenesis 저해 효과 측정 실험을 진행하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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

96 well plate에 상층액을 80 μL씩 넣고 25 mM L-Dopa와 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)을 1 : 3의 비율로 만든 용액을 160 μL씩 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.

4-2-5. 세포 독성 평가

4-2-5-1. MTT assay

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 B16F10 murine melanoma cell을 6 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 37 ℃, 5 % CO_2 조건하에서 24 시간 배양 후, 시료를 처리하였다. 72 시간 배양 후, 배양액 200 μL를 취하고 나머지 배양액에 500 μg/mL 농도로 MTT를 첨가하여 37 ℃에서 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.

4-2-5-2. 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 diapholase의 촉매에 의해 테트라졸리움염(INT)을 환원시켜 490 nm의 흡수를 갖는 적색의 formazan 색소를 형성되며 이 formazan의 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가한다.

LDH assay는 다음과 같다. B16F10 murine melanoma cell을 6 well plate에

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5×10^4 cells/mL로 분주하고 37 ℃, 5 % CO_2 조건하에서 24 시간 배양 후, 시료를 처리하였다. 72 시간 배양 후, 배양액 200 μL를 취하여 LDH-cytotoxicity detection Kit (TaKaRa BIO INC.)를 이용하여 평가하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4-3. 항균활성 실험

4-3-1. 균주 배양

시료의 항균활성을 측정하기 위해 *Staphylococcus aureus* (CCARM 0027, 3708)와 *Propionibacterium acnes* (CCARM 9009, 0081) 총 4개의 균주를 사용하였다. *S. aureus*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 μL 넣고, 이와 같은 방법으로 3 번 계대하였다.

4-3-2. Paper disc diffusion method

시료의 항균활성을 측정하기 위해 *Staphylococcus aureus, Propionibacterium acnes*에 대하여 paper disc diffusion 법으로 생육 억제율을 측정하였다. *S. aureus*는 한천 0.8 %를 포함하는 T.S.B 배지 8 mL에 *S. aureus* 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 ℃에서 24 시간동안 배양하여 disc 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 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 ℃, 48 시간동안 혐기 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1의 ^{1}H-NMR spectrum에서 δ 5.34~5.41 (6H, m) 의 signal로 보아 sp^2혼성을 갖는 olefin 구조의 proton임을 예상하였다. δ 2.82~2.79 (4H, m), δ 2.03~2.10 (4H, m)은 알릴자리의 proton이라 예상하였다. δ 2.35 (2H, t, J = 7.33 Hz)의 signal은 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접한 proton으로 예상하였다. δ 1.63 (2H, m), 1.26 (8H, m)의 signal들은 지방사슬의 methylen proton이라 예상하였다. δ 0.98 (3H, t, J = 7.79 Hz)에서 지방사슬의 말단인 methyl proton이라 예상하였다(Figure 6). ^{13}C-NMR spectrum을 통해 18개의 carbon이 있는 것을 확인하였고, δ 179.5 signal은 carbonyl기 carbon이라 예상하였으며, δ 132.1, 130.4, 128.4, 128.4, 127.9, 127.3의 6개의 signal을 통해 sp2 혼성의 olefin carbon으로 예상하였다. δ 14.4~34.1에 분포되어있는 signal들은 sp^3 혼성을 가진 carbon으로 예상하였다. 이중 δ 14.4의 signal은 methyl carbon이라 예상하였다(Figure 7). 이를 바탕으로 compound 1는 문헌[21,22]과 비교한 결과 α-linolenic acid로 동정하였다(Figure 5).

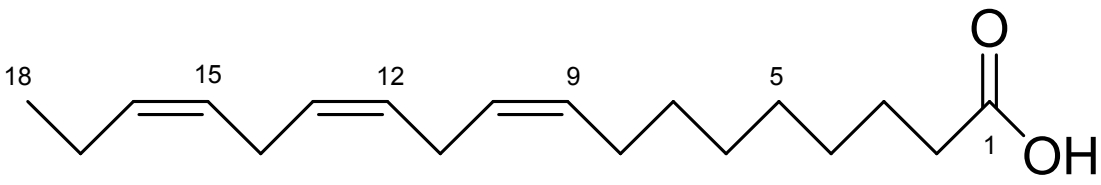


Figure 5. Chemical structure of compound 1

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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

No.	Compound **1**	
	δ_C	δ_H(int, multi, J Hz)
1	179.5	
2	34.1	2.35 (2H, t, 7.2)
3	29.2 to 29.9	1.61-1.65 (2H, m)
4		
5		1.26-1.37 (8H, m)
6		
7		
8	27.4	2.03-2.10 (4H, m)
9	127.3 to 132.1	5.34-5.41 (6H, m)
10		
11	24.9 to 25.8	2.79-2.82 (4H, m)
12	127.3 to 132.1	5.34-5.41 (6H, m)
13		
14	24.9 to 25.8	2.79-2.82 (4H, m)
15	127.3 to 132.1	5.34-5.41 (6H, m)
16		
17	20.7	2.03-2.10 (4H, m)
18	14.4	0.98 (3H, t, 7.56)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

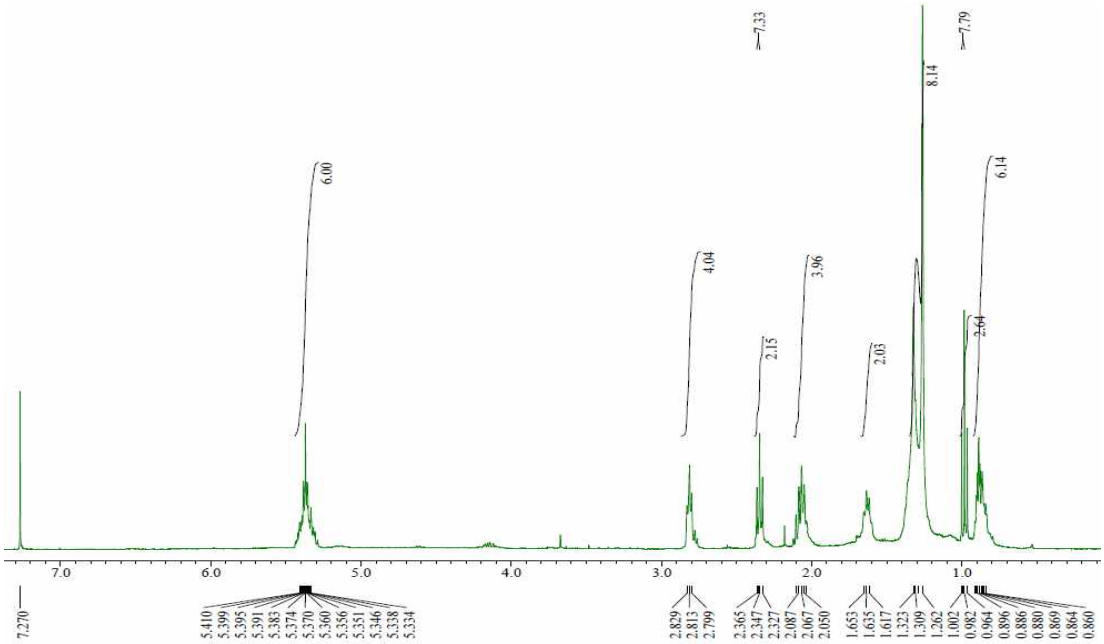


Figure 6. ^{1}H-NMR spectrum of compound **1** (in $CDCl_3$).

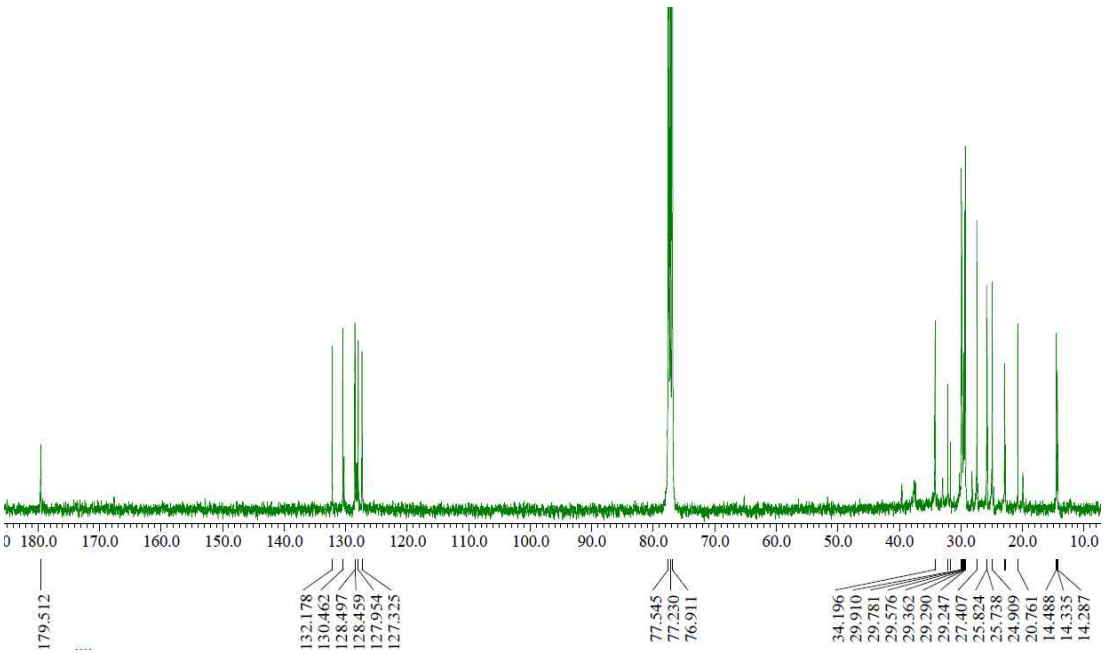


Figure 7. ^{13}C-NMR spectrum of compound **1** (in $CDCl_3$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2은 ^{1}H-NMR spectrum 분석결과 δ 5.19 (1H, s)의 signal로부터 sp^2 혼성을 갖는 olefin 구조의 proton을 예상하였다. δ 5.07 ~ 3.97의 signal을 통하여 당이 결합되어 있을 것이라 예상하였으며, 그중 δ 5.07(1H, d, J = 7.79 Hz)의 signal은 당의 anomeric proton으로 coupling constant를 통해 β-form을 가지고 있을 것이라 예상하였다. δ 4.09 (1H, m)의 signal로부터 산소에 인접한 methine proton을 예상하였다. δ 2.10~1.19에서 다수의 methylen과 methine proton signal을 확인하였고, δ 1.00 (3H, d, J = 6.41 Hz), δ 0.88 (9H, t, J = 7.79 Hz), δ 0.73 (3H, s), δ 0.58 (3H, s)의 signal로부터 총 6개의 methyl proton을 확인하였다(Figure 9). ^{13}C-NMR spectrum 분석결과 carbon의 개수가 총 35개임을 확인하였다. δ 140.0, 118.2 signal로부터 ^{1}H-NMR spectrum에서 예상한 olefin carbon이라 예상하였다. δ 102.7, 79.1, 79.0, 75.8, 72.2, 63.3의 6개의 signal과 ^{1}H-NMR spectrum에서의 anomeric proton 의 coupling constant를 통하여 β-D-glucopyrnoside임을 예상하였다. δ 77.5에서 산소에 인접한 methine carbon임을 확인하였다. δ 20.4, 19.6, 19.6, 13.5, 12.6, 12.5에서 6개의 methyl carbon이 있는 것을 통해 sterol 계통의 화합물임을 예상하였다(Figure 10). 이를 바탕으로 compound 2은 문헌[23,24]과 비교하여 sigmast-7-en-O-β-D-glucopyranoside로 동정하였다(Figure 8).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

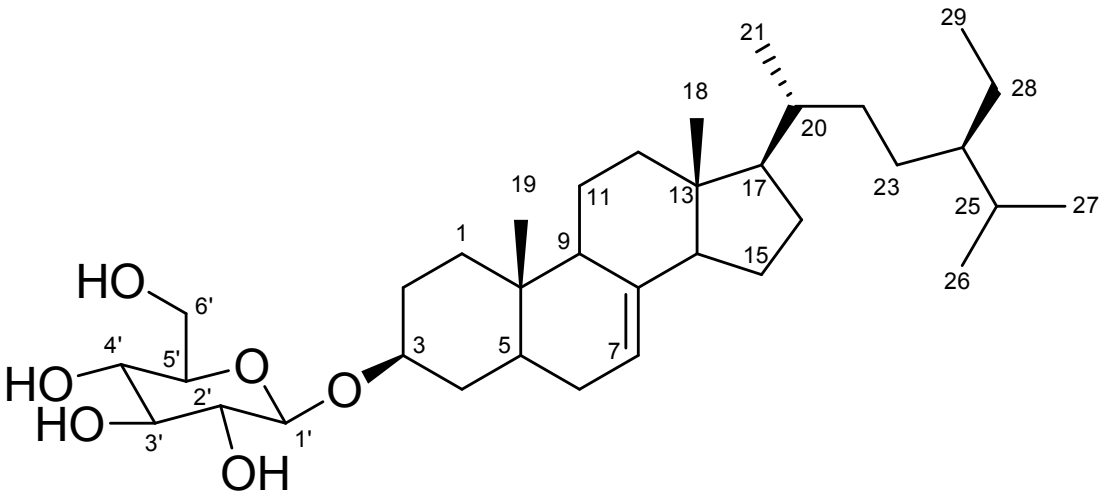


Figure 8. Chemical structure of compound 2

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 3. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts of compound **2** (400 and 100 MHz, C_5D_5N).

No.	Compound **2**	
	δ_C	δ_H(int, multi, J Hz)
1	37.7	
2	30.4	
3	77.5	4.09 (1H, m)
4	35.1	
5	40.6	
6	30.4	
7	118.2	
8	140.0	
9	50.0	
10	34.9	
11	22.2	
12	40.2	
13	44.0	
14	55.6	
15	23.8	
16	28.7	
17	56.7	
18	12.5	0.58 (3H, s)
19	13.5	0.73 (3H, s)
20	37.3	
21	19.6	1.00 (3H, d, 6.41)
22	34.6	
23	26.9	
24	46.5	
25	29.9	
26	19.6	0.88 (9H, t, 7.79)
27	20.4	
28	23.7	
29	12.6	0.88 (9H, m)
1□	102.7	5.07(1H, d, 7.79)
2□	75.8	4.64-3.97 (sugar H)
3□	79.1	
4□	72.2	
5□	79.0	
6□	63.3	

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

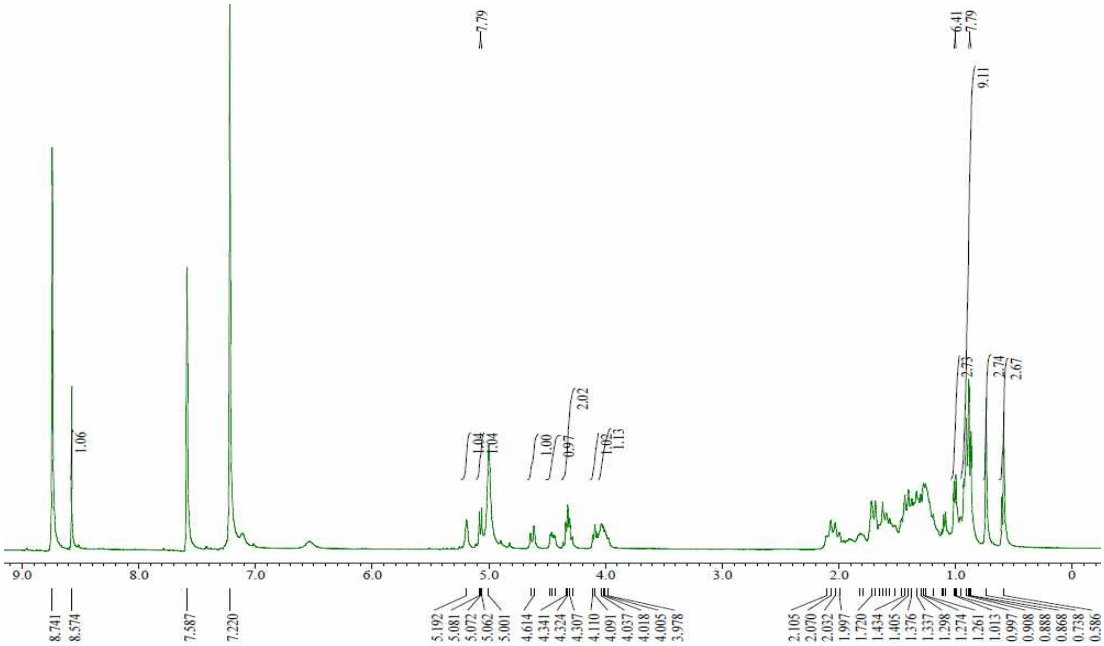


Figure 9. ^{1}H-NMR spectrum of compound **2** (in C_5D_5N).

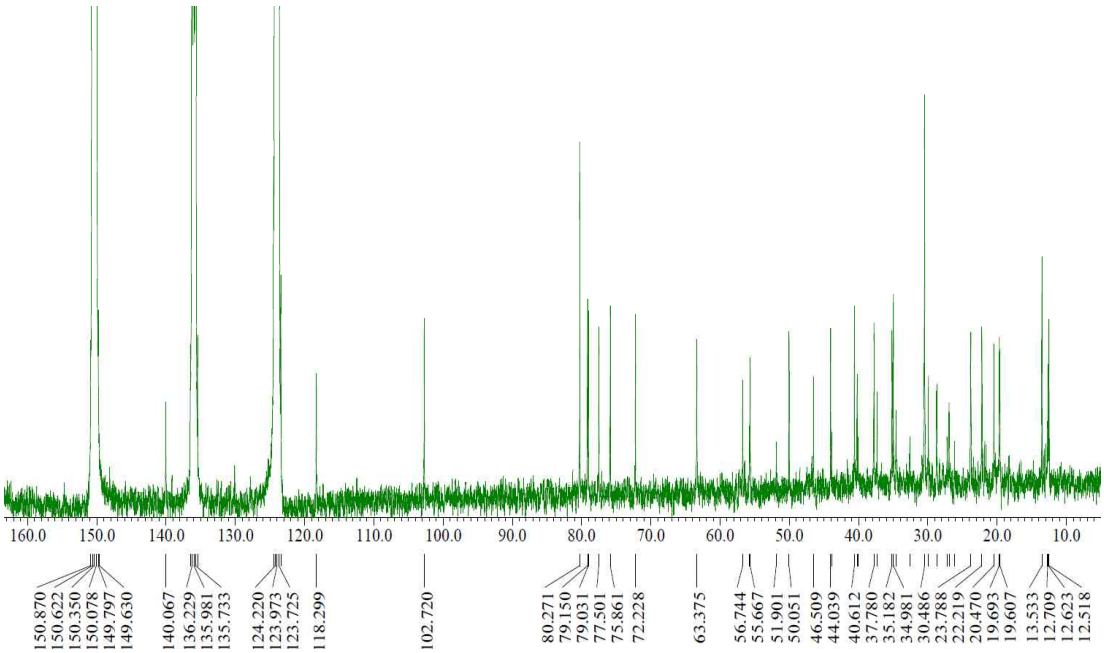


Figure 10. ^{13}C-NMR spectrum of compound **2** (in C_5D_5N).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

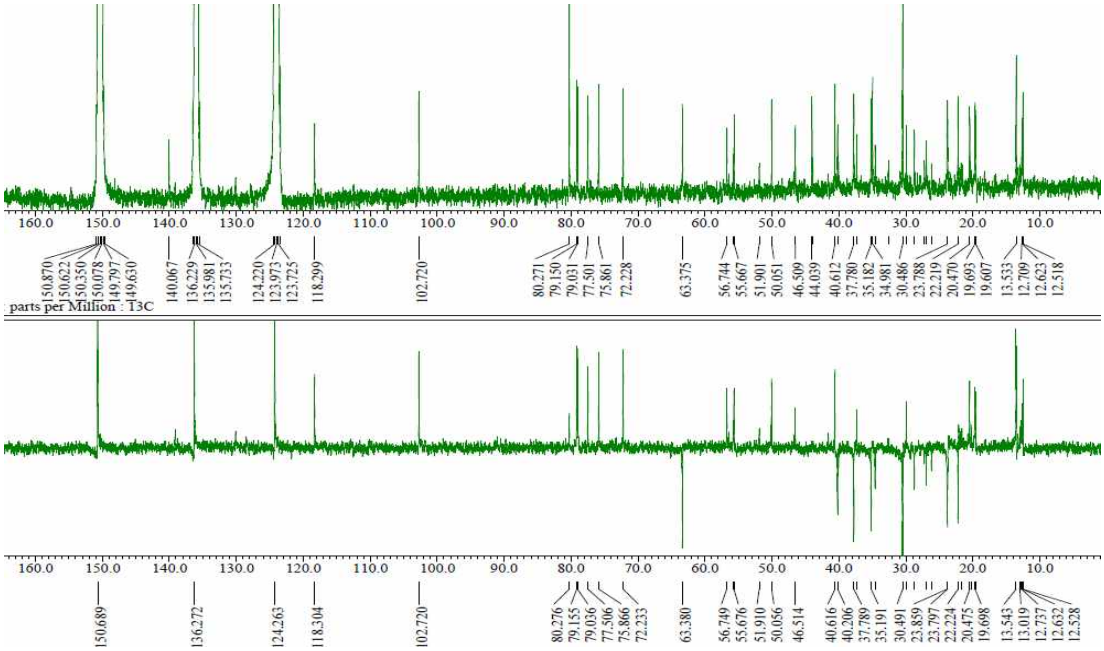


Figure 11. DEPT-135 spectrum of compound **2** (in C_5D_5N).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1-3. Compound **3**의 구조해석

Compound **3**의 ^{1}H-NMR spectrum에서 δ 7.73 (1H, d, J = 15.57 Hz), δ 6.40 (1H, d, *J* = 16.03 Hz)의 signal에서 coupling constant를 보아 *trans*형태의 olefin proton으로 예상하였다. δ 7.21 (1H, d, *J* = 1.83 Hz), 7.10 (1H, dd, *J* = 1.83, 8.24 Hz), 6.82 (2H, d, *J* = 8.24 Hz)의 signal에서 coupling constant를 보아 *ortho*-, *meta*-coupling을 하고 있는 벤젠의 proton으로 예상하였다. δ 5.58 ~ 3.30의 signal을 통해 당이 결합되어 있을 것이라 예상하였으며, 그 중 δ 5.58 (1H, d, *J* = 7.79 Hz)의 signal은 당의 anomeric proton으로 coupling constant를 보아 β-form을 가지고 있을 것이라 예상하였다. δ 3.89 (3H, s)의 signal은 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소에 인접한 methyl proton이라 예상하였다(Figure 13). ^{13}C-NMR spectrum 분석결과 δ 167.86의 signal은 carbonyl 기로 예상하였다. δ 151.1, 149.5, 148.3, 127.7, 124.5, 116.6, 114.8, 111.9의 8개의 signal들은 sp^2 혼성의 carbon이라 예상하였으며 δ 151.1, 149.5, 148.3은 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 치환기가 붙어있을 것이라 예상하였다. δ 95.9, 78.9, 78.1, 74.20, 71.2, 62.4의 6개의 signal과 ^{1}H-NMR spectrum에서의 anomeric proton의 coupling constant를 통해 β-D-glucopyranoside임을 예상하였다. δ 56.5의 signal은 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합된 sp^3 carbon으로 예상하였다(Figure 14). ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT-135(Figure 15)를 통해 예상한 부분 구조에서 배당체가 연결되어 있는 정확한 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 분석하였다. HMQC를 통해 proton과 carbon 사이의 one-bond coupling과 HMBC를 통해 proton과 carbon 사이의 long range coupling관계를 확인하였다(Figure 16, 17). 이를 바탕으로 compound **3**은 문헌[25] 과 비교하여 1-feruloyl-β-D-glucopyranoside로 동정하였다(Figure 12).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

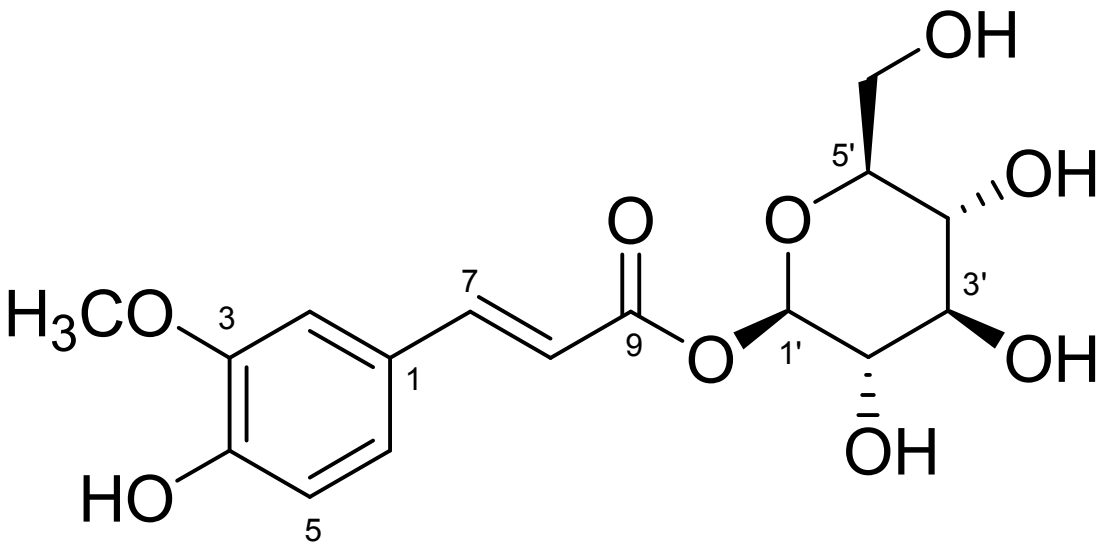


Figure 12. Chemical structure of compound **3**

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 4. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts of compound **3** (400 and 100 MHz, CD_3OD).

No.	Compound **3**	
	δ_C	δ_H(int, multi, *J* Hz)
1	127.7	
2	111.9	7.20 (1H, d, 1.83)
3	149.5	
4	151.1	
5	114.8	6.82 (2H, d, 8.24)
6	124.5	7.10 (1H, dd, 1.83, 8.24)
7	148.3	7.73 (1H, d, 15.57)
8	116.6	6.40 (1H, d, 16.03)
9	167.8	
1□	95.9	5.58 (1H, d, 7.79)
2□	74.2	
3□	78.1	
4□	71.2	
5□	78.9	
6□	62.4	
$-OCH_3$	56.5	3.89 (3H, s)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

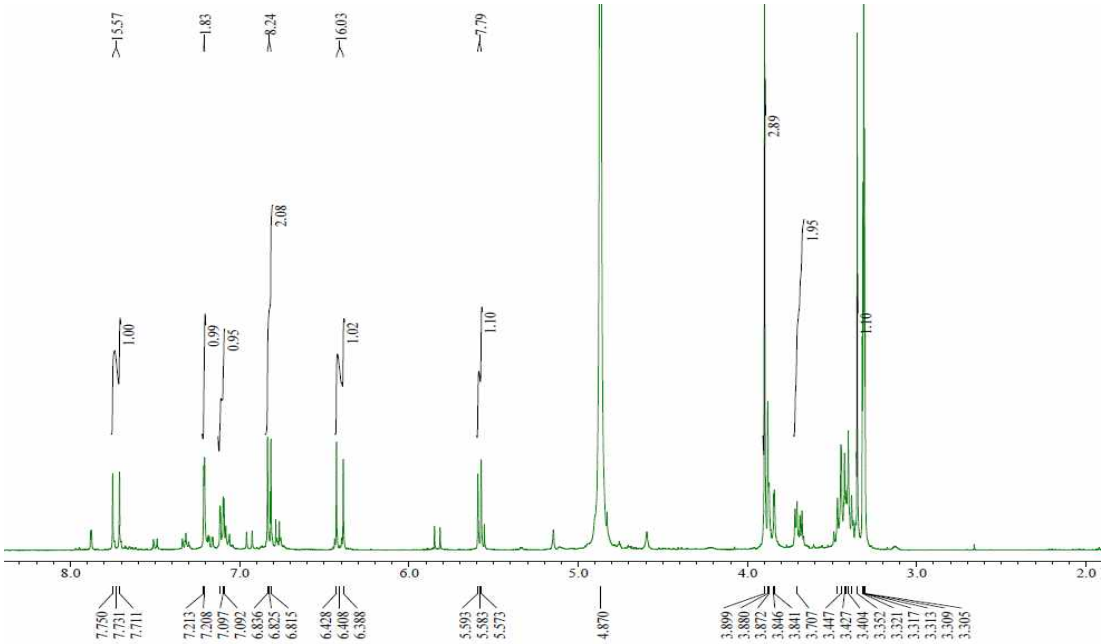


Figure 13. ^{1}H-NMR spectrum of compound **3** (in CD_3OD).

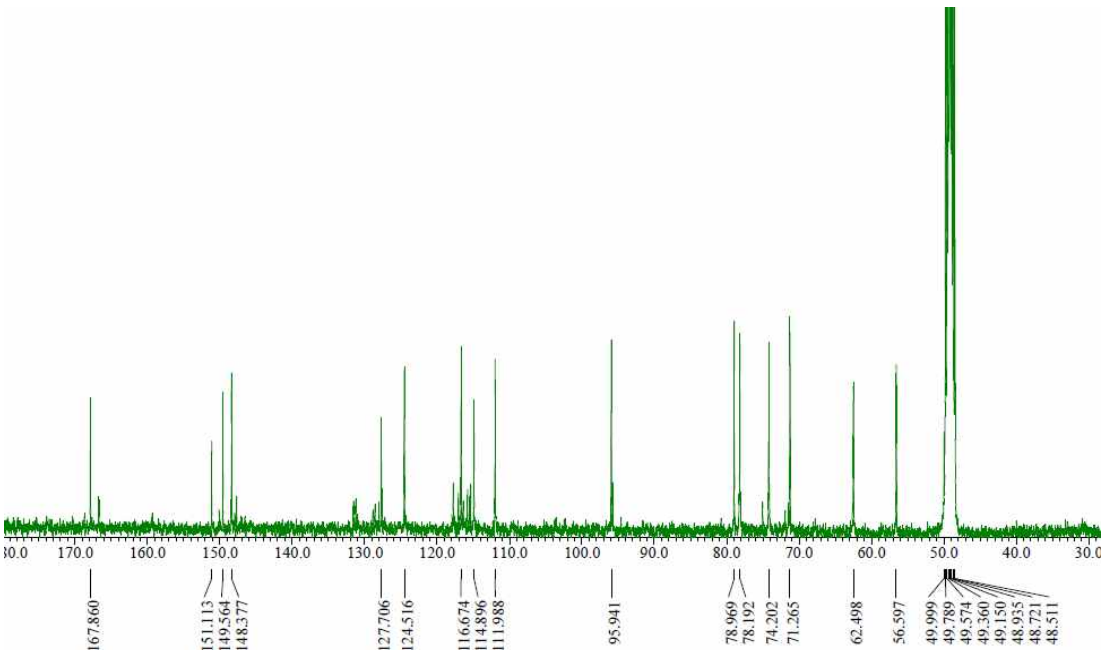


Figure 14. ^{13}C-NMR spectrum of compound **3** (in CD_3OD).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

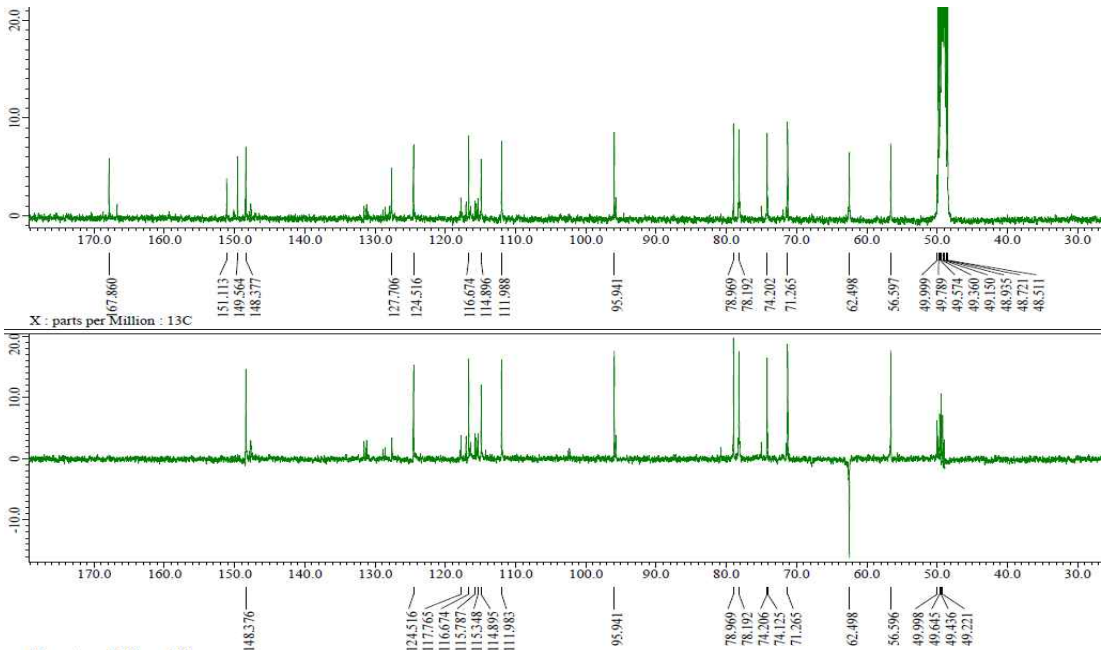


Figure 15. DEPT-135 spectrum of compound **3** (in CD_3OD).

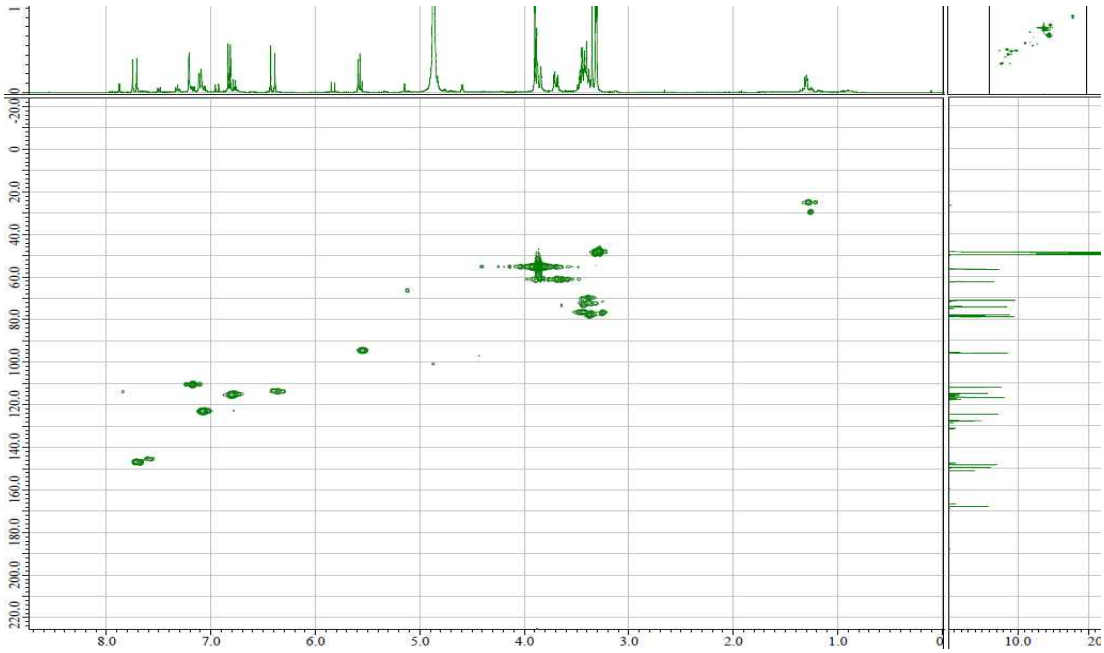


Figure 16. HMQC spectrum of compound **3** (in CD_3OD).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

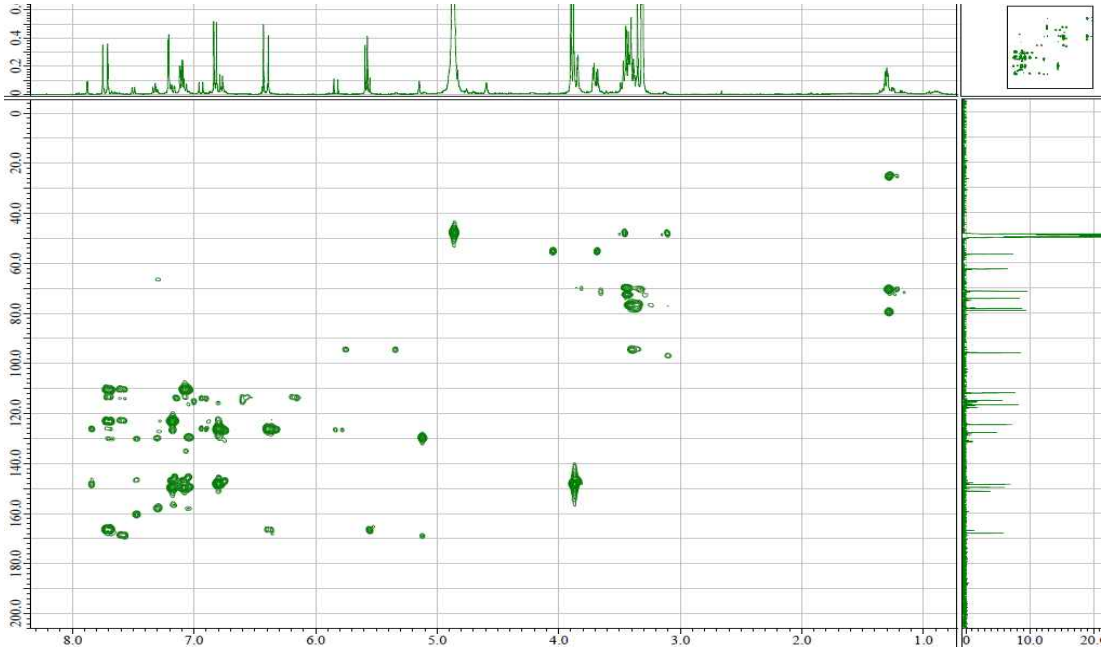


Figure 17. HMBC spectrum of compound **3** (in CD_3OD).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. RAW264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험결과

2-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포독성 평가

수박 지상부 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell 에서 NO 생성 저해능을 확인하였다. Sample의 농도는 100 μg/mL로 하였으며, NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다.

측정 결과 추출물에서 13.8%의 NO 생성 저해율을 나타났으며, 분획물 *n*-Hex 과 EtOAc layer 에서 각각 51.4 %, 70.4%의 NO 생성 저해함을 확인하였다. 또한, 80~95%의 세포 생존율을 보여 큰 세포독성 없이 NO 생성을 저해함을 알 수 있었다 (Figure 18, 19).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

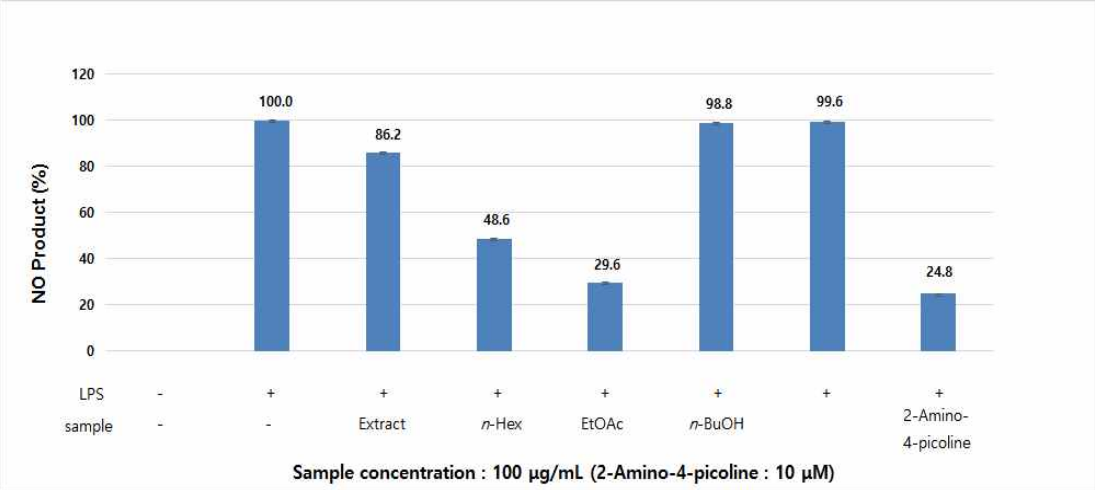


Figure 18. NO production inhibitory activities of extract and solvent layers.

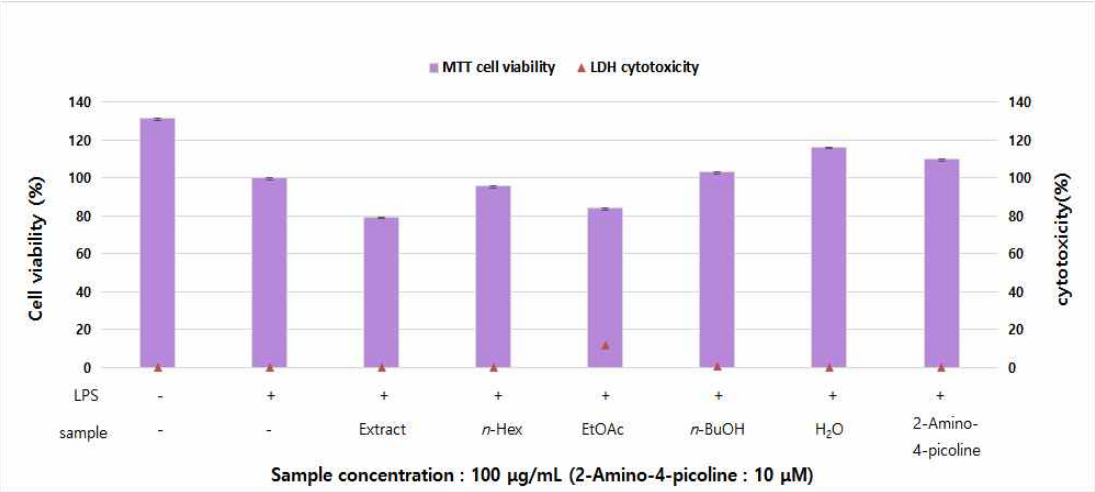


Figure 19. Cell viabilities and cytotoxicities of extract and solvent layers in RAW 264.7 cell.

위 결과를 바탕으로 100 μg/mL 농도에서 큰 세포독성 없이 좋은 활성을 보였던 *n*-Hex 과 EtOAc layer에 대해 농도별로 추가실험을 진행하였다(Figure 20, 21, 22, 23).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

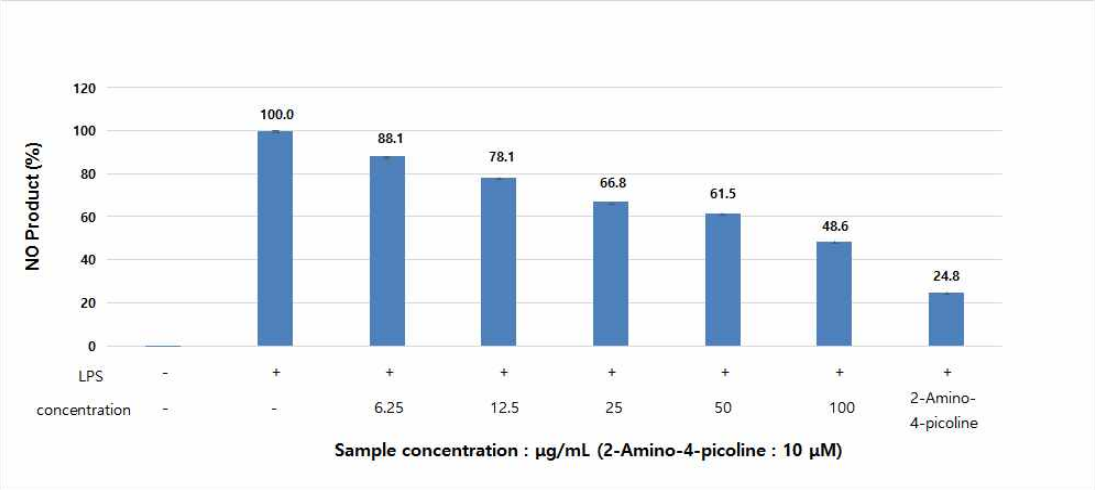


Figure 20. NO production inhibitory activities of *n*-Hex layer.

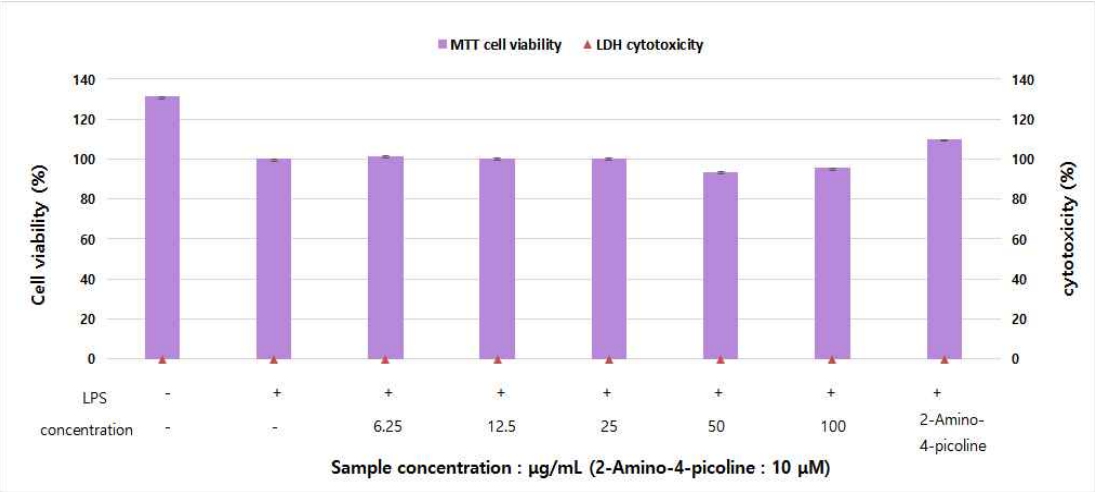


Figure 21. Cell viabilities and cytotoxicities of *n*-Hex layer in RAW 264.7 cell.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

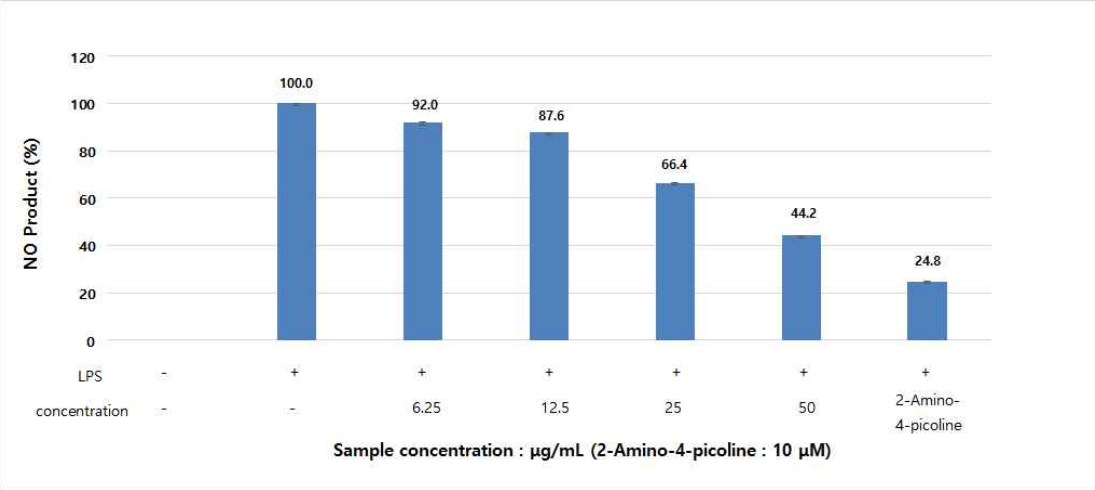


Figure 22. NO production inhibitory activities of EtOAc layer.

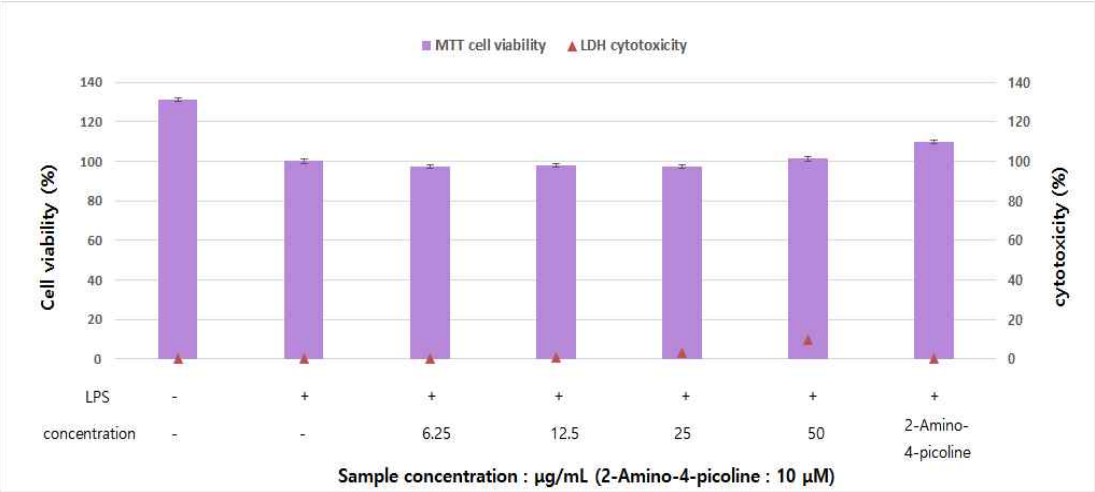


Figure 23. Cell viabilities and cytotoxicities of EtOAc layer in RAW 264.7 cell.

그 결과, *n*-Hex layer에서 93~100%의 세포 생존율을 보여, 큰 세포 독성 없이 농도가 증가함에 따라 NO 생성이 저해됨을 알 수 있었다. EtOAc layer에서 큰 세포 독성 없이 농도가 증가함에 따라 NO 생성 저해하는 좋은 결과를 확인하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2-2. 분리된 화합물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포독성 평가

수박 지상부로부터 분리한 화합물에 대하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell 에서 NO 생성 저해능을 확인하였다. NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다.

Compound **1** 실험결과 50, 100 μM 농도에서 세포 독성 없이 각각 60.0, 81.8%의 NO 생성 저해함을 확인하였다(Figure 24, 25).

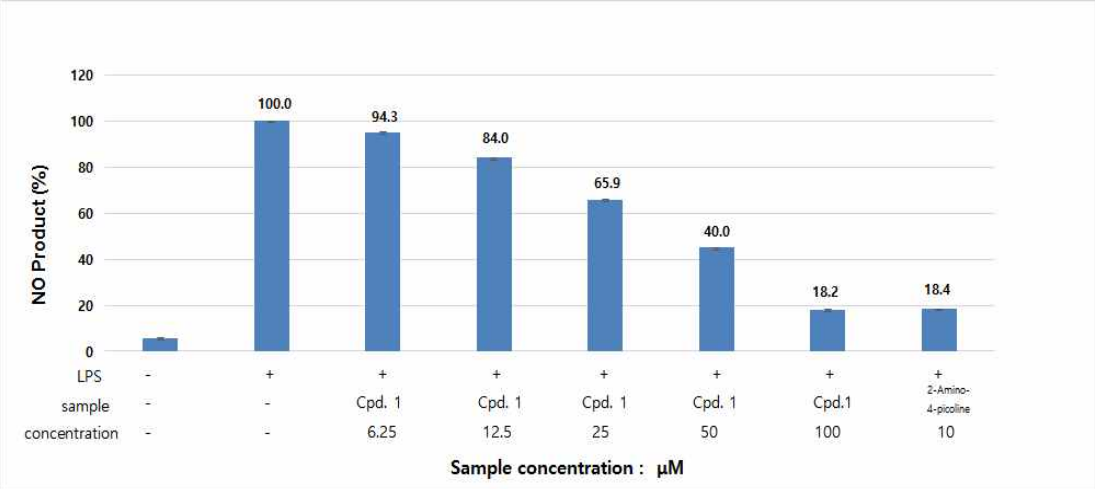


Figure 24. NO production inhibitory activities of compound **1**.

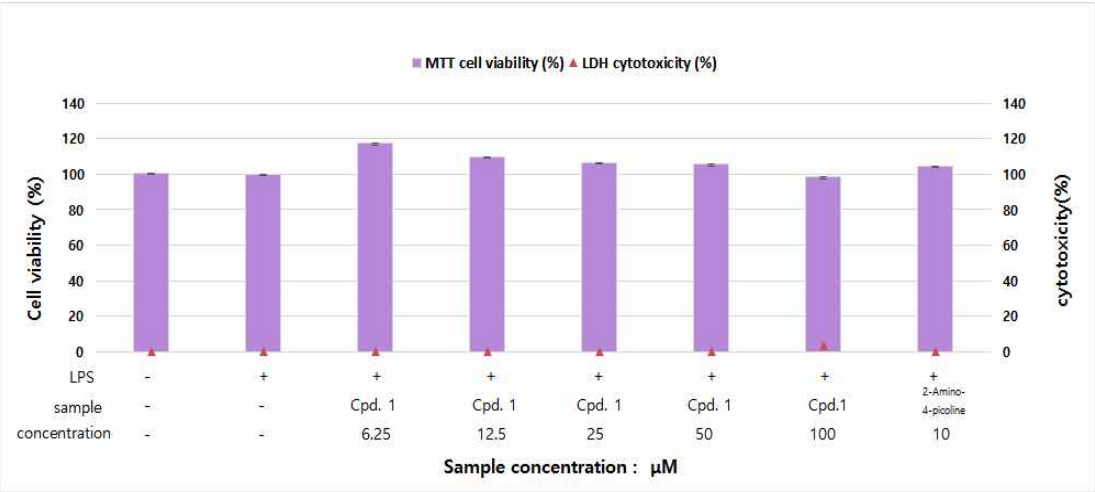


Figure 25. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **1** in RAW 264.7 cell.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Compound **3** 실험결과 100, 200, 300 μM 농도에서 각각 29.7, 40.3, 55.6%로 세포독성 없이 NO 생성 저해함을 확인하였다(Figure 26, 27).

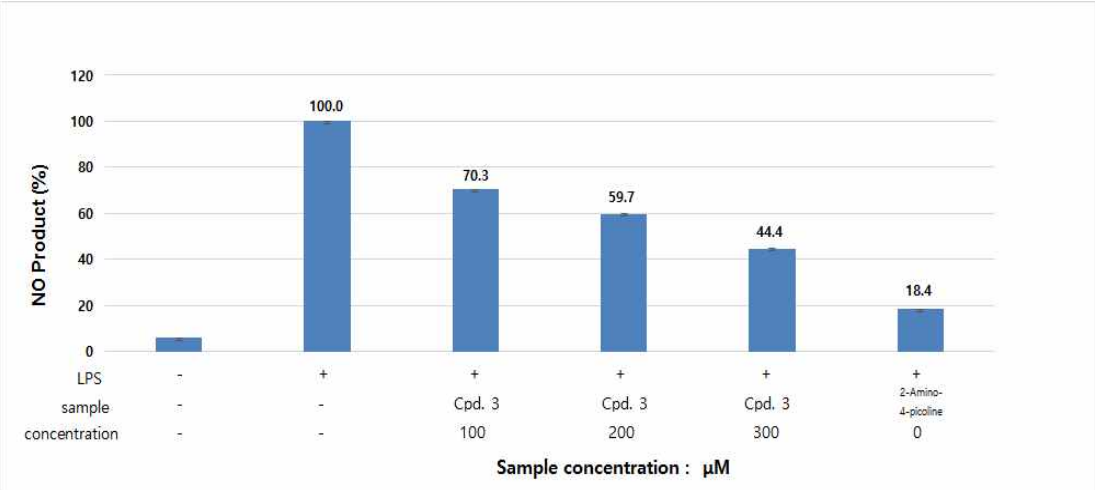


Figure 26. NO production inhibitory activities of compound **3**.

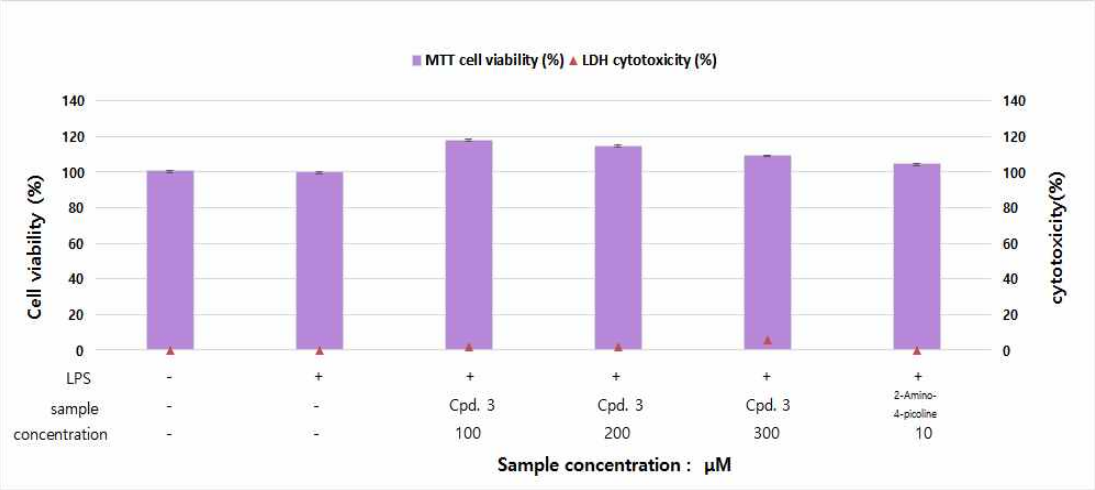


Figure 27. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **3** in RAW 264.7 cell.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2-3. 분리된 화합물의 전염증성 cytokines (IL-6, TNF-α) 생성 억제 평가 결과

RAW 264.7 cell에서 compounds **1**, **3**이 초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용하는 염증성 cytokine으로 알려진 IL-6와 TNF-α의 발현에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 실험을 진행하였다. compound **1**의 농도를 25, 50, 100 μM, compound **3**의 농도를 100, 200, 300 μM로 처리하여 IL-6와 TNF-α의 생성 억제 활성을 확인한 결과 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Figure 28, 29).

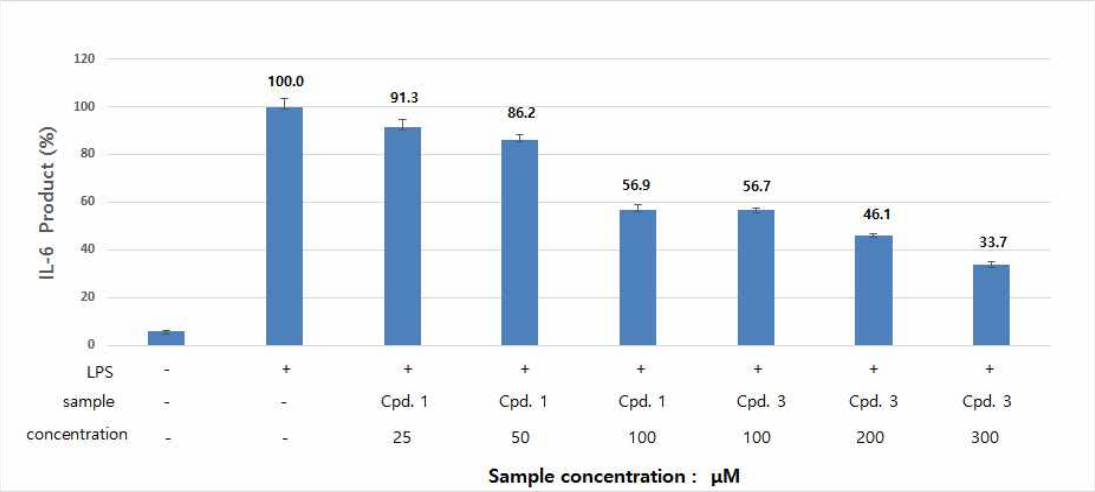


Figure 28. Inhibition of cytokine IL-6 of compounds **1**, **3**

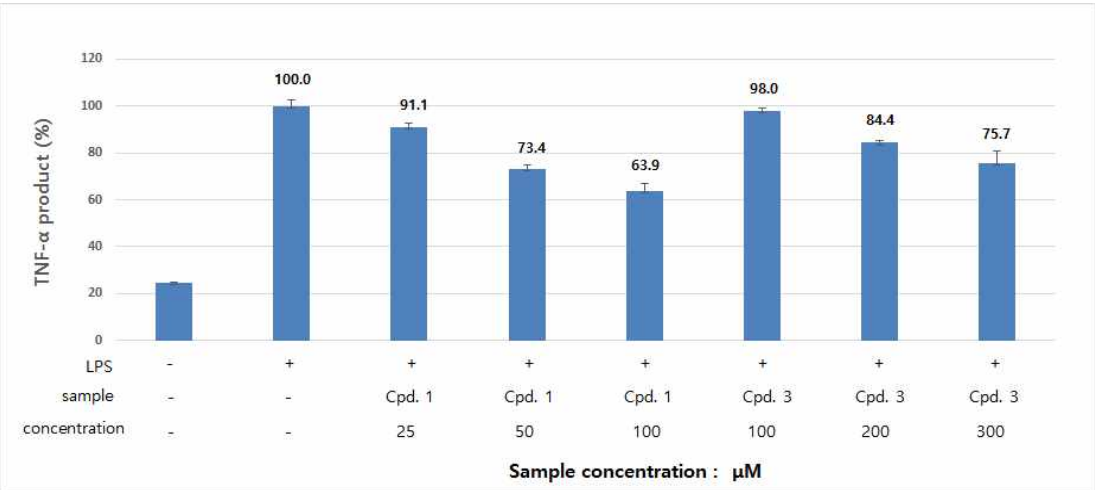


Figure 29. Inhibition of cytokine TNF-α of compounds **1**, **3**

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 미백 활성 실험 결과

3-1. Melanogenesis 저해 활성 측정 실험 결과

3-1-1. 추출물 및 분획물의 melanogenesis 저해 활성 및 세포독성 실험 결과

수박 지상부 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 melanin 합성 억제 활성을 측정하기 위해 B16F10 murine melanoma cell을 α-MSH 처리하여 melanin 합성을 유도하였으며, 100 μg/mL의 농도로 melanin contents와 세포독성 평가를 측정하였다.

그 결과, 추출물에서 50.4%의 저해율을 보였으며 *n*-Hex layer과 EtOAc layer에서 각각 76.1%, 72.3%로 대조군인 melasov와 비교하였을 때 좋은 melanin 합성 저해율을 나타내었다. MTT viability assay를 이용하여 세포 생존율 측정한 결과 추출물, *n*-Hex, EtOAc layer에서 69.8 ~ 87.7%의 생존율을 보여, 세포들이 사멸하였는지에 대해 LDH cytotoxicity assay를 이용하여 세포독성을 측정한 결과, 세포가 사멸한 것이 아니라 생장을 억제하는 효과가 있었음을 알 수 있었다(Figure 30, 31).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

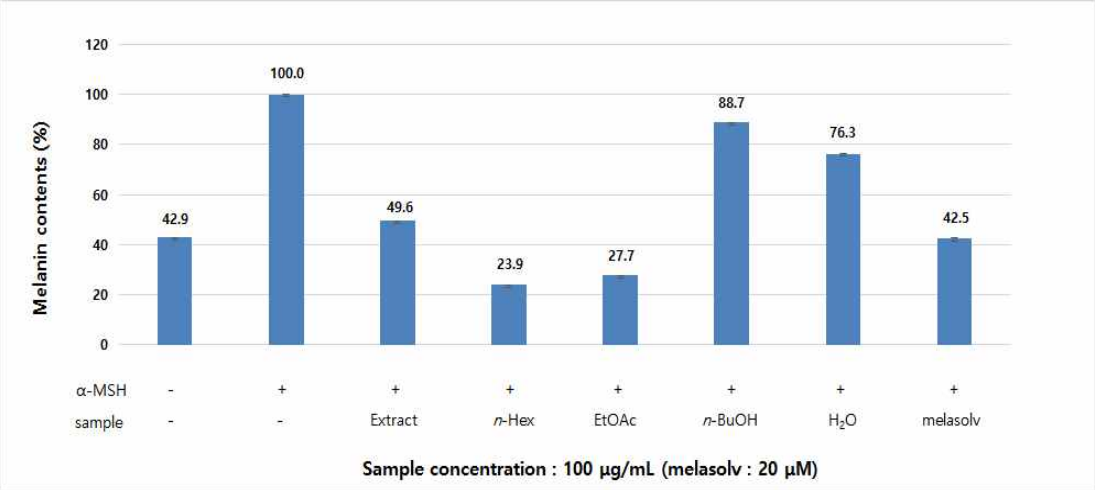


Figure 30. Melanin contents of extract and solvent layers.

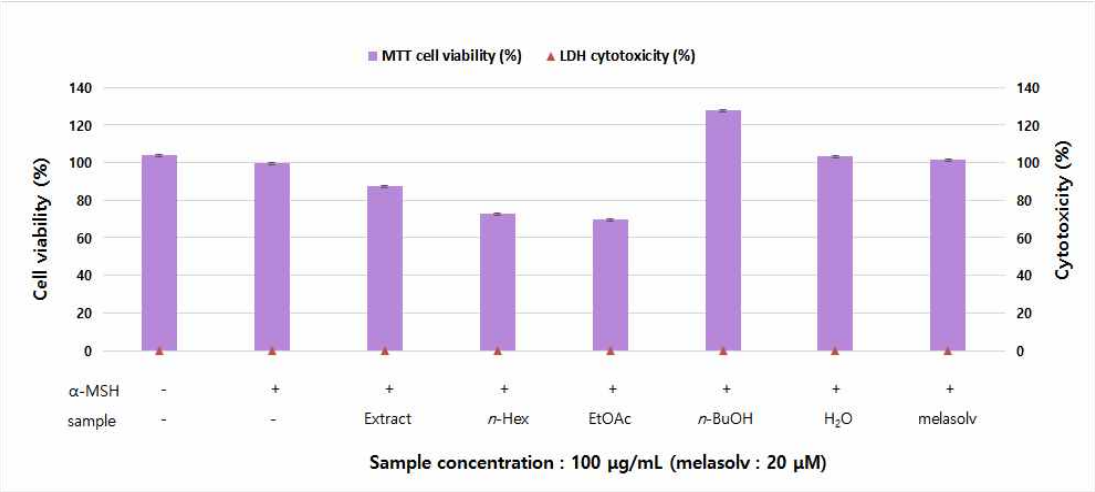


Figure 31. Cell viabilities and cytotoxicities of extract and solvent layer in B16F10 murine melanoma cell

위 결과를 바탕으로 100 μg/mL 농도에서 활성을 보였던 *n*-Hex 과 EtOAc layer에 대해 농도별로 추가실험을 진행하였다 (Figure 32, 33, 34, 35).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

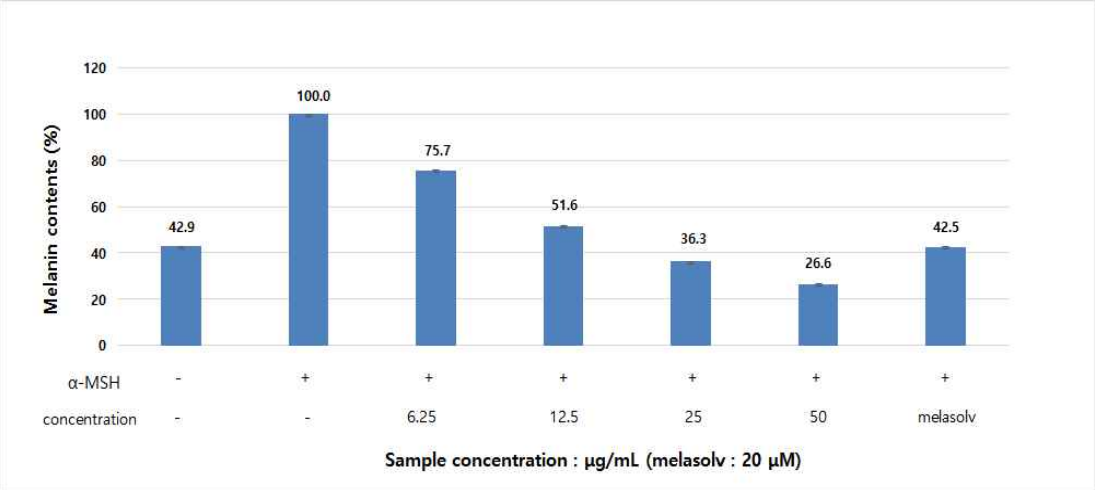


Figure 32. Melanin contents of *n*-Hex layers.

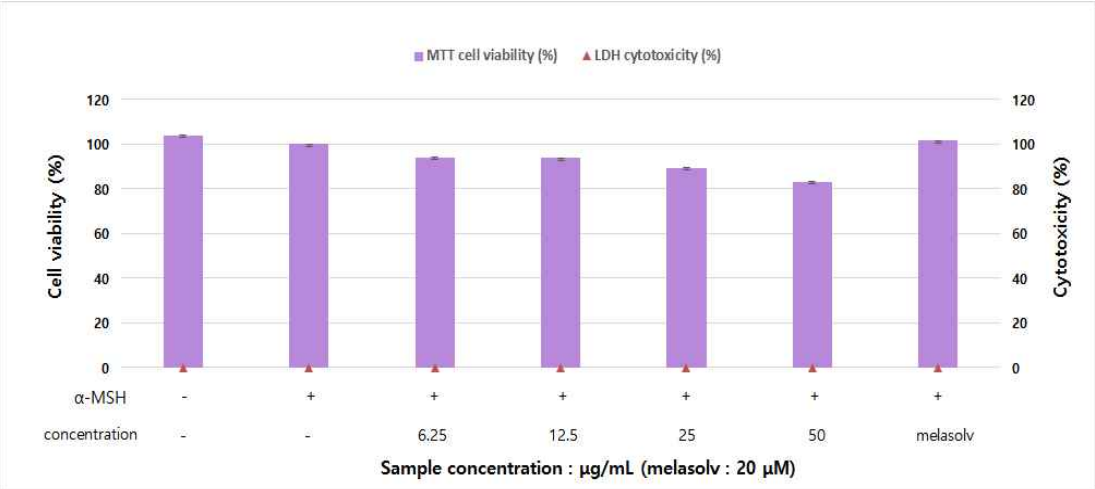


Figure 33. Cell viabilities and cytotoxicities of *n*-Hex layer in B16F10 murine melanoma cell.

n-Hex layer 실험결과 6.25, 12.5, 25, 50 μg/mL의 농도에서 세포 독성 없이, 각각 24.3, 48.4, 63.7, 73.4%로 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해 하는 것을 확인하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

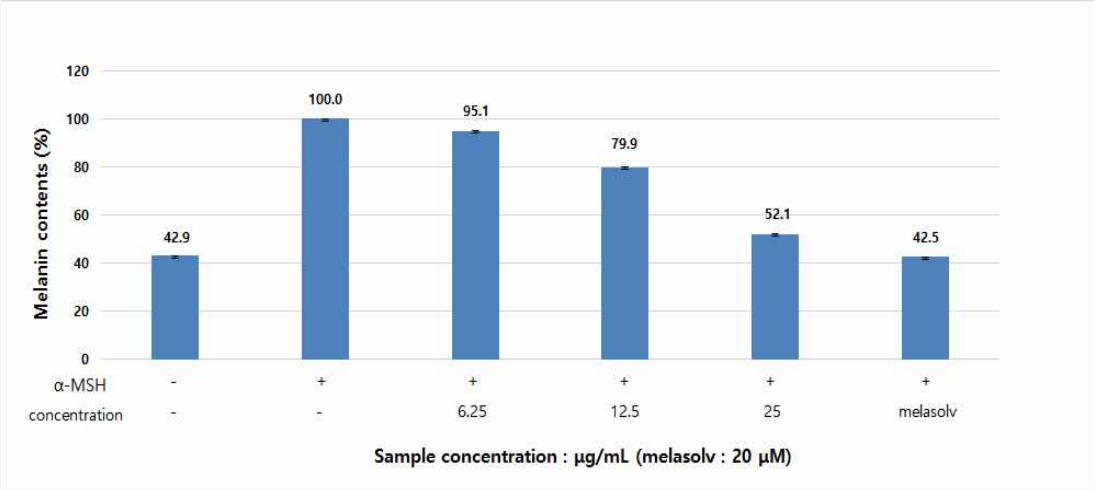


Figure 34. Melanin contents of EtOAc layers.

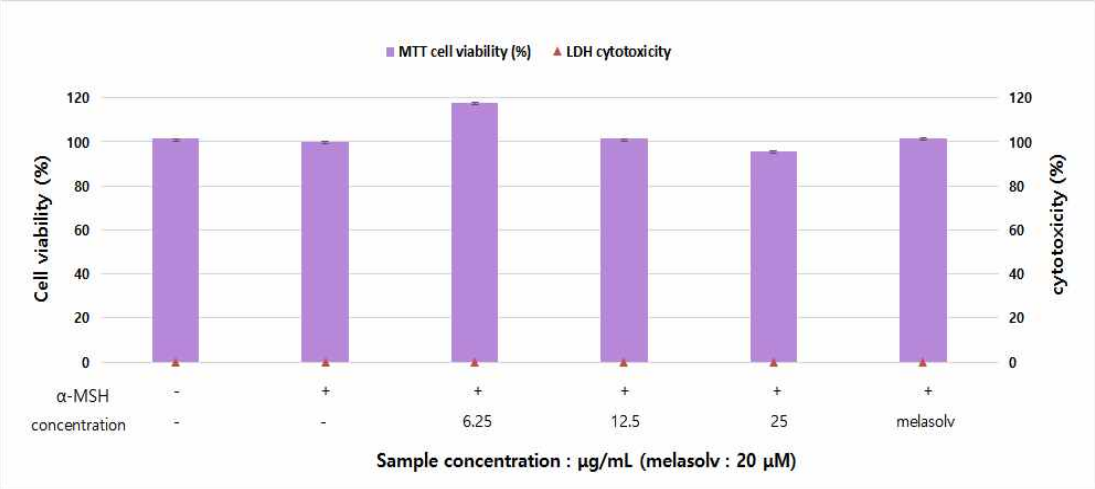


Figure 35. Cell viabilities and cytotoxicities of EtoAc layer in B16F10 murine melanoma cell.

EtOAc layer 실험결과 12.5, 25 μg/mL의 농도에서 세포 독성 없이, 각각 20.1, 47.9%로 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해 하는 것을 확인하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3-1-2. 분리된 화합물의 melanogenesis 저해 활성 및 세포독성 실험 결과

수박 지상부로부터 분리한 화합물에 대하여 melanin 합성 억제 활성을 측정하기 위해 B16F10 murine melanoma cell을 α-MSH 처리하여 melanin 합성을 유도하였으며, 100 μg/mL의 농도로 melanin contents와 세포독성 평가를 측정하였다.

Compound **1**의 실험결과 50, 100 μM에서 각각 30.7, 52.8%로 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해하는 것을 확인하였다. MTT viability assay를 이용하여 세포생존율 측정한 결과 91.4 ~ 104.1%의 생존율을 보였으며, LDH cytotoxicity assay를 이용하여 세포독성을 측정한 결과, 세포독성이 없음을 확인하였다 (Figure 36, 37).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

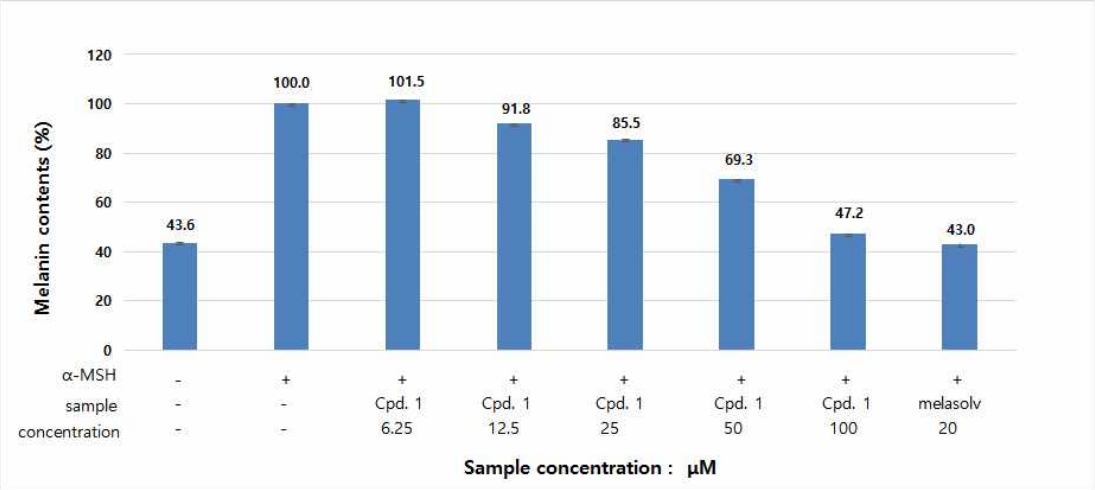


Figure 36. Melanin contents of compound **1**.

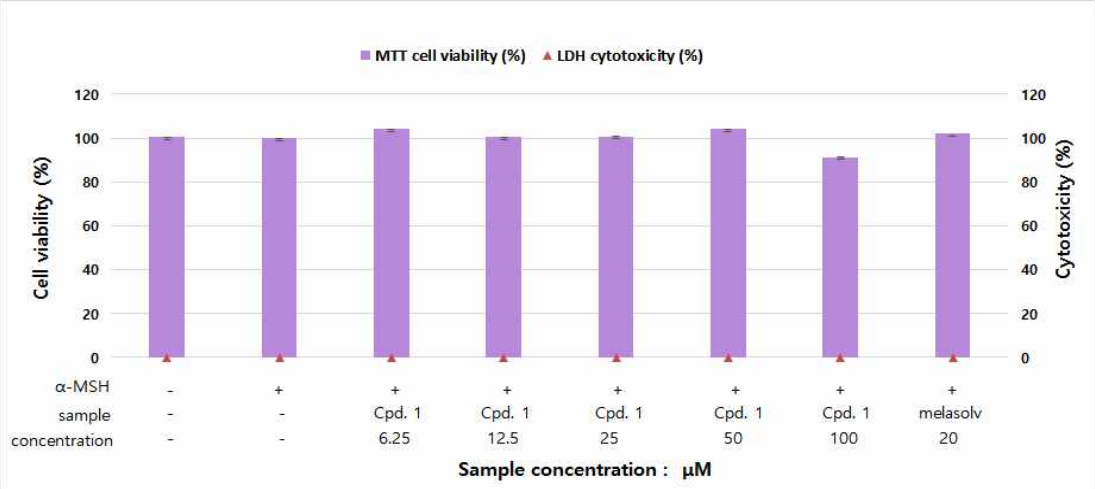


Figure 37. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **1** in B16F10 murine melanoma cell.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Compound **3**의 실험결과 200, 300 μM에서 각각 18.8 , 38.4%로 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해하는 것을 확인하였다. MTT viability assay를 이용하여 세포 생존율 측정한 결과 84.6 ~ 107.0%의 생존율을 보여, 세포들이 사멸하였는지에 대해 LDH cytotoxicity assay를 이용하여 세포독성을 측정한 결과, 세포가 사멸한 것이 아니라 생장을 억제하는 효과가 있었음을 알 수 있었다(Figure 38, 39).

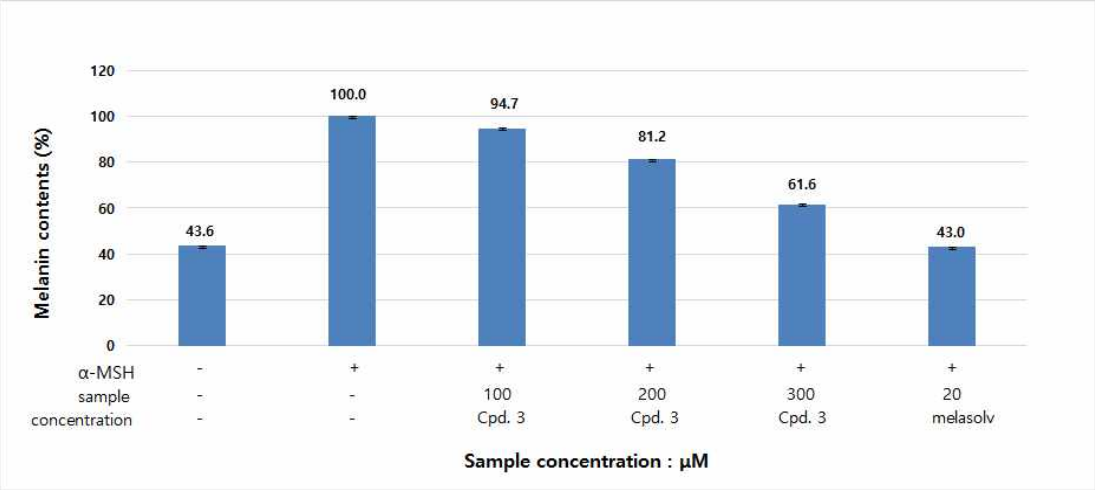


Figure 38. Melanin contents of compound **3**.

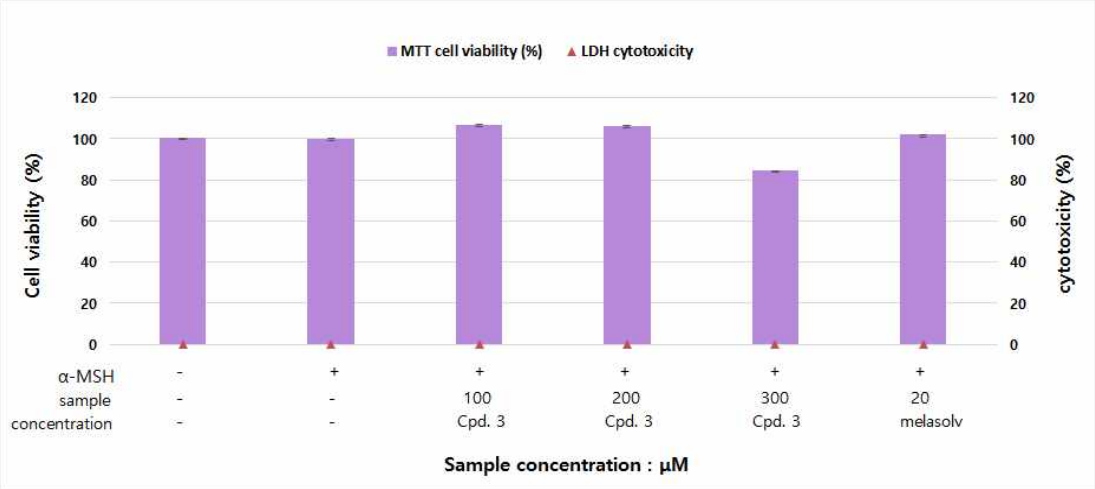


Figure 39. Cell viabilities and cytotoxicities of compound **3** in B16F10 murine melanoma cell.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

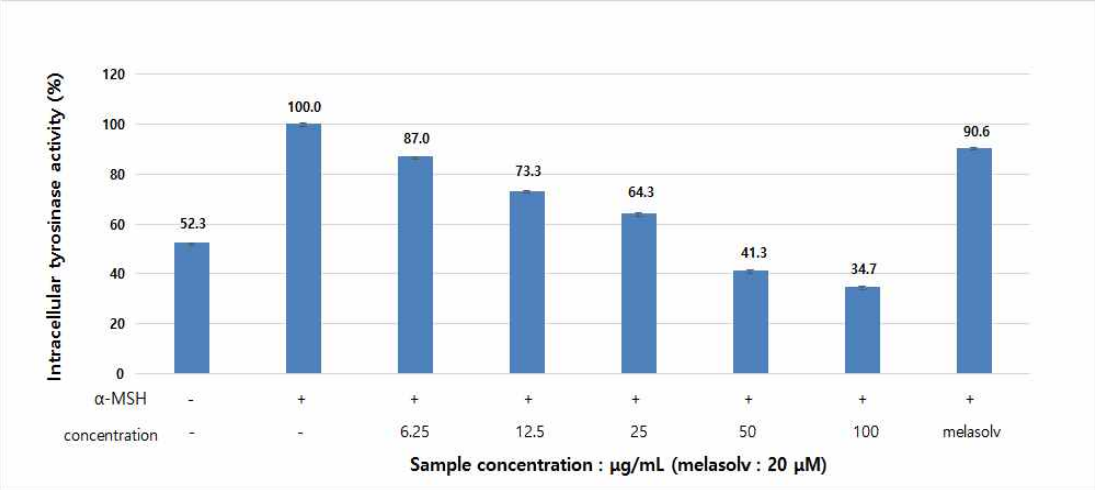
3-2. Intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과

3-2-1. 추출물 및 분획물의 intracellular tyrosinase 저해 활성 실험 결과

수박 지상부 70% 에탄올 추출물의 분획물인 *n*-Hex과 EtOAc layer에 대해 melanin 합성에 주요한 조절적 작용을 하는 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 확인하였다. B16F10 murine melanoma cell을 α-MSH 처리하여 tyrosinase의 생성을 유도하였다.

실험 결과 *n*-Hex과 EtOAc layer에서 농도 의존적으로 세포내의 tyrosinase 생성을 저해하는 것을 알 수 있었다(Figure 40, 41).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



Figurer 40. Intracellular tyrosinase inhibition of *n*-Hex layers.

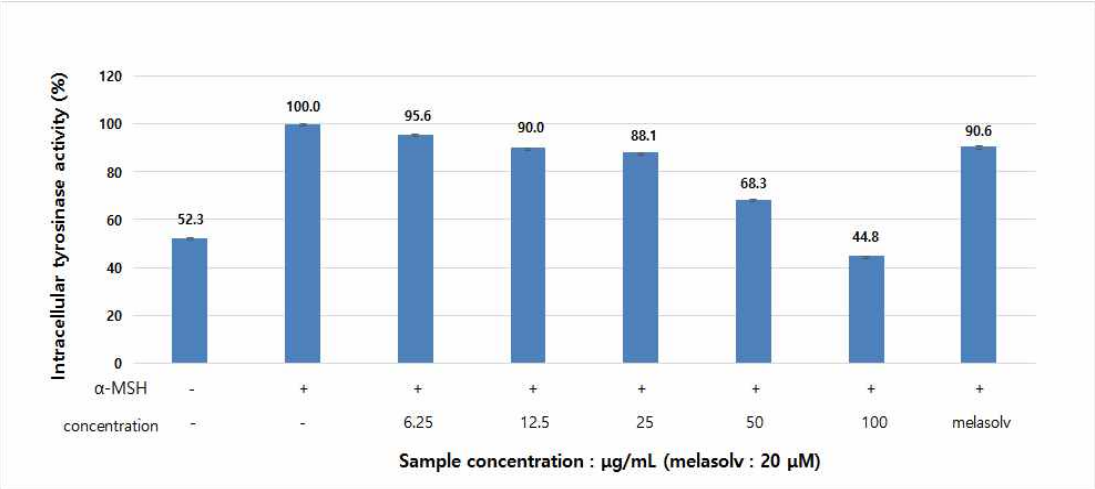


Figure 41. Intracellular tyrosinase inhibition of EtOAc layers.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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

수박 지상부로부터 분리된 화합물들에 대해 melanin 합성에 주요한 조절적 작용을 하는 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 확인하였다. B16F10 murine melanoma cell을 α-MSH 처리하여 tyrosinase의 생성을 유도하였다.

실험 결과 compound **1**과 **3**은 농도 의존적으로 세포내의 tyrosinase 생성을 저해하는 것을 확인하였다(Figure 42, 43).

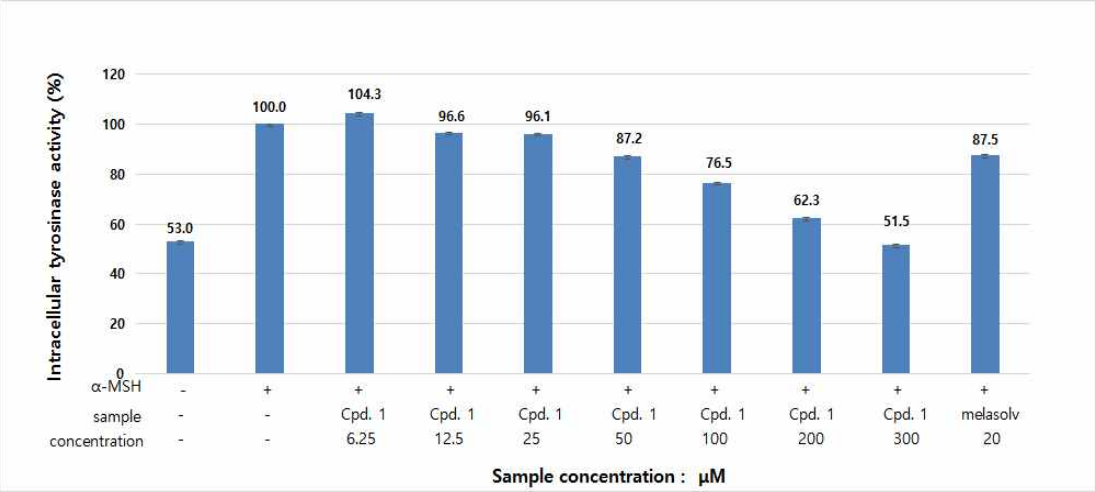


Figure 42. Intracellular tyrosinase inhibition of compound **1**.

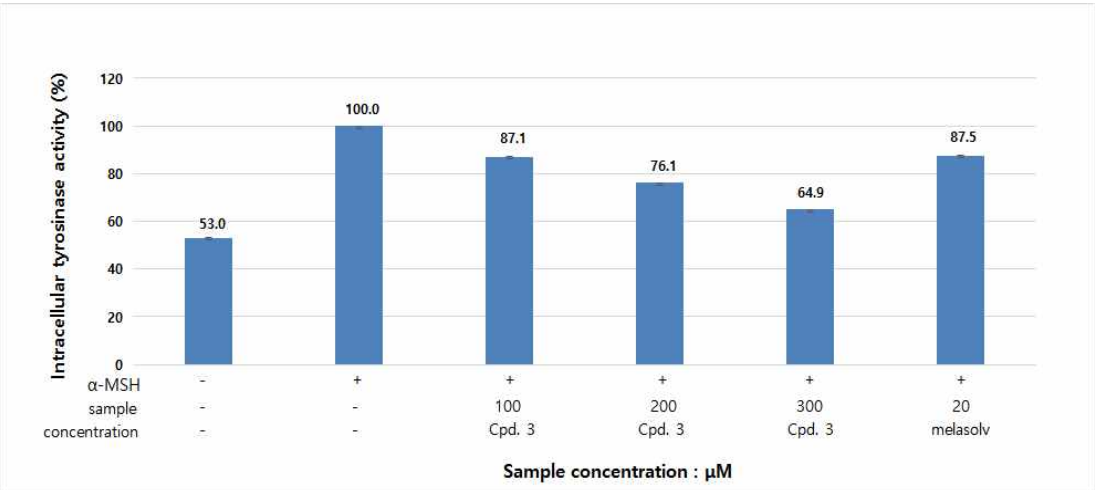


Figure 43. Intracellular tyrosinase inhibition of compound **3**.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. 항균 활성 실험 결과

4-1. 추출물 및 분획물의 paper disc diffusion 실험 결과

수박 지상부의 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 항균 활성을 측정하였다. *S. aureus* 0027과 3708 에서 항균활성을 보였으며, *P.acnes* 0081과 9009에서는 약간의 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

Table 5. Paper disc diffusion of extract and solvent layers from the aerial parts of *Citrullus. lanatus.*

		S. aureus CCARM 0027	*S. aureus* CCARM 3708	*P.acnes* CCARM 0081	*P.acnes* CCARM 9009
		Clear zone (mm)[a)]			
Sample[c)]	Extract	9	11	8.5	8.5
	n-hexane layer	9	9.5	8.5	8.5
	EtOAc layer	8.5	10.5	8.5	8.5
	n-BuOH layer	8.5	10	8.5	8.5
	H_2O layer	9	10	8.5	8.5
Negative control	DMSO: EtOH (1:1)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Positive control[c)]	Erythromycin	25	15	14	30

a) The diameter of the paper disc, 8 mm.
b) Not detected.
c) Concentration : sample (2 mg), erythromycin (0.2 mg).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

IV. 요약 및 결론

본 논문은 수박 지상부를 추출하여 그 추출물로부터 화합물들을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 항염 및 피부미백 효과를 연구하여, 천연 소재로 활용 가능성을 알아보고자 연구를 진행하였다.

수박 지상부 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water layer를 얻었다. 이 추출물과 분획물들에 대해 항염 및 미백 활성을 진행하였다.

추출물 및 분획물들의 항염 활성 실험은 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell을 사용하여 nitric oxide 생성량을 비교하여 측정하였으며, MTT cell viability assay로 새포의 생존율을 측정하였으며 LDH cytotoxicity assay를 통해 세포독성을 측정하였다. 그 결과 *n*-Hex과 EtOAc layer에서 큰 세포독성 없이 농도 의존적으로 nitric oxide 생성 저해함을 알 수 있었다.

추출물 및 분획물들의 미백 활성 실험은 B16F10 murine melanoma cell을 α-MSH 처리하여 melanin 합성을 유도하였으며, MTT cell viability assay로 세포의 생존율을 측정하였으며 LDH cytotoxicity assay를 통해 세포독성을 측정하였다. 그 결과 *n*-Hex과 EtOAc layer에서 세포 사멸 없이 세포의 생장만 억제시켜 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해하였다. 또한, melanin 합성에 주요한 조절적 작용을 하는 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 확인한 결과, *n*-Hex과 EtOAc layer은 농도 의존적으로 tyrosinase 생성을 저해하는 것을 확인하였다.

추출물 및 분획물의 항균 활성 실험은 paper disc diffusion 법을 이용하였다. 그 결과, *S. aureus* 0027과 3708 에서 항균활성을 보였으며, *P.acnes* 0081과 9009에서는 약간의 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

이와 같은 결과를 바탕으로 *n*-Hex과 EtOAc layer에서 화합물 분리를 진행하였으며, vacuum liquid chromatography (VLC), 순상 silica gel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 1D, 2D NMR technique를 이용하여 구조를 확인하였고, 문헌들과 비교하여 다시 구조를 확인하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

동정이 완료된 화합물은 α-linolenic acid (**1**) sigmast-7-en-O-β-D-glucopyranoside (**2**), 1-feruloyl-β-D-glucopyranoside (**3**) 으로 확인하였다. 이렇게 분리된 화합물들에 대해 항염 및 미백활성에 대해 실험을 진행하였다.

항염 활성 실험 결과 compound **1**에서 50, 100 μM 농도에서 각각 60.0, 81.8%의 NO 생성 저해함을 확인하였다. Compound **3** 실험결과 100, 200, 300 μM 농도에서 각각 29.7, 40.3, 55.6%로 세포독성 없이 NO 생성 저해함을 확인하였다. 초기 염증반응에 중요하게 작용하는 염증성 cytokine인 IL-6와 TNF-α의 실험결과 compound **1**, **3** 모두 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다.

미백 활성 실험 결과 compound **1**에서 큰 세포독성없이 50, 100 μM에서 각각 30.7, 52.8%로 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해하는 것을 확인하였다.

Compound **3**의 실험결과 200, 300 μM에서 각각 18.8 , 38.4%로 농도 의존적으로 melanin 합성을 저해하는 것을 확인하였다. MTT viability assay를 이용하여 세포 생존율 측정한 결과 84.6 ~ 107.0%의 생존율을 보여, 세포들이 사멸하였는지에 대해 LDH cytotoxicity assay를 이용하여 세포독성을 측정한 결과, 세포가 사멸한 것이 아니라 생장을 억제하는 효과가 있었음을 알 수 있었다.

intracellular tyrosinase 실험결과 compound **1**과 **3**에서 농도 의존적으로 세포내 tyrosinase 저해함을 확인하였다.

따라서, 본 연구의 실험결과를 바탕으로 수박 지상부는 항염 및 피부 미백활성 관련 천연기능성 화장품 소재로의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

V. 참고문헌

1) 김동수; 배경민, “화장품산업 연구개발 추진전략과 정책 현황”, 산업정책분석원 Rlsearch 센터, 2013.

2) 임팩트(imFact), “2013 기능성화장품 및 소재 시장실태와 전망”, 2013.

3) 이선주, “기능성화장품과 피부학 및 법령”, 제주대학교 물산업인재양성센터, 2012.

4) 식품의약품안전처, “화장품법 시행규칙”, 시행 2015. 07. 29.

5) 김상민; 김영찬; 김웅국;, 김정일;, 랑문정;, 문권기;, 박찬익;, 이명섭;, 이영근;, 이진영 등, “현대화장품 이론 및 제조 실습”, 신광출판사, *82*, 2014.

6) 소비자안전센터, “화장품 부작용 모니터링”, 2010.

7) 현창구, 이근수, 김길남, 김상철, 강성일, “ 화장품소재 탐색 개론”, 제주대학교 LINC 사업단,; 제주테크노파크 바이오융합센터, 2014.

8) 송상목, “RAW264.7 cell 에서 까마귀쪽나무(Litsea japonica) 종자 초임계 추출물의 염증 억제 효과” 제주대학교 석사학위논문 2015.

9) 현승수, “항염 활성을 갖는 벼 유래 신규 폴리페놀계 미백제 연구” 아주대학교 박사학위논문 2015.

10) Park, S.H.; Jeong, J.H.; Park, B.J.; Jeong, T.H. “Anti-inflammatory Effect of *Fallopia sachalinensis* RonseDecr. Fruit” *J. Soc. Cosmet. Sci.* Korea 2015, 237-241.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

11) Nam, G.S.; Jang, SA.; Sohn, EH.; Bak, JP.; Sohn, ES.; Koo, HJ.; Yoon, WJ.; Kwon, JE.; Jeong, YJ.; Xeng, X.; Han, HS.; Kang, SC. “Comparative Study of *Litsea japonica* Leaf and Fruit Extract on the Anti-inflammatory Effects” *Korean J. Plant Res.* 2015, *28*(2), 145-152.

12) Kang, H.C.; Cha MY; Kim, JY. “A Study of the Antioxidant Activities and Whitening Activities of Areca semen Extracts as Cosmetic Ingredient”, *J. Soc. Cosmet. Sci.* Korea 2015, 269-277.

13) 한영숙 “항염증성 천연 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향” 2002 아주대학교 대학원 박사학위논문.

14) 장아람; 송연숙; 김명곤; 이근광. “무궁화나무(*Hibiscus syriacus*) 수피 추출물의 페놀산 조성 및 기능성 화장품 가능성 평가”, *한국미용학회지, 제21권 제5호* 2015 895-902.

15) Loiy et al., “*In vitro* Antimicrobial activities of chloroformic, hexane and ethanolic extracts of *Citrullus lanatus* var. citroides (Wild melon)”, *Journal of Medicinal Pants Research*, 2011, Vol. *5*(8) 1338-1344.

16) Takashi, K et al., “Pyrazole alkaloids from watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds.” *Phytochemistry Letters,* 2015, *12*, 94-97.

17) 허다정; 김수정; 최애란; 박해룡; 이승철., “수박 열수 추출물의 Tyrosinase 저해능과 신경세포 보호효과”, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2013, *42*(10), 1707-1711.

18) Madhavi P ea al., “Evaluation of Anti-inflammatory Activity of *Citrullus*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

lanatus Seed Oil by *In-vivo* and *In-vitro* Models", *Int. Res J Pharm. App* 2012, *Sci 2*(4)., 104-108.

19) Siddig ea al., "Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition", *Fitoterapia* 2011, *82*, 1190-1197.

20) Duan, Y; 김민아; 김한수; 장성호; 강동수, "수박(*Citrullus vulgaris* L.) 외피의 항산화 활성 탐색", *Journal of Environmental Science International* 2014, 23(7), 1233-1239.

21) 김형민, "해조류 패(*Ishige okamurae*)로부터 항산화, 주름개선, 미백 및 항균 활성 성분 규명", 제주대학교 석사학위논문 2015.

22) Alamsjah, M.A; Hirao, S.; Ishibashi, F.; Fujita, Y. M. "Isolation and Structure Determination of Algicidal Compounds", *Biosci. Biotechnol. Biochem,* 2005, *69*(11), 2186-2192.

23) Tang, J.; Qiu, M. H.; Zhang, X. M.; Zhou, L. G.; "Chemical constituents from Stem of Cucumis sativus L.", *天然産物研究与開發 Nat Prod Res Dev* 2009, *21*, 66-69.

24) 고하나, "소사나무 가지로부터 항산화 및 항염 활성 성분 규명", 제주대학교 석사학위 논문, 2012

25) Kim, J. S,; Kwon, Y. S.; Sa, Y. J.; Kim, M. J. "Isolation and Identification of Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides) Phenolics with Antioxidant Activity and α -Glucosidase Inhibitory Effect", *J. Agric. Food Chem*, 2011, *59*, 138-144.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감사의 글

남들보다는 조금은 늦게 대학원에 들어와 2년이라는 석사과정의 시간이 훌쩍 지나가 버렸습니다. 4학기 내내 “졸업 못할 거 같아요...” 징징 거렸었는데, 논문 수정을 드디어 마치고 감사의 글을 적고 있으니, ‘풉’ 웃음이 납니다. 부족한 저를 이 자리에 있게 해주신 많은 분들께 감사의 인사를 드리고자 합니다.

타과에서 온 저를 제자로 받아 주시고, 무사히 끝날 수 있게 가르쳐 주신 지도교수님이신 이남호 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 화학에 많은 가르침을 주신 김용해 교수님, 정덕상 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 이선주 교수님, 김원형 교수님, 현창구 교수님께 진심으로 감사의 말씀 드립니다.

제가 대학원생활에 잘 적응할 수 있게 많은 조언과 가르침 그리고, 용기를 준 우리 유기화학실험실 식구들 상희언니, 정은, 주미, 하나, 승리, 희수, 연정, 종택, 정말 감사합니다. 여러분들 아니었으면 저 정말 졸업 포기 했을 거예요. 졸업 발표에 대해 팁을 준 지미, ‘누나 졸업 할 수 있어요. 걱정 마세요.’ 라고 말해주는 형민, 용범, 승준, 준오, 마지막에 균 실험 가르쳐준 종석에게 고맙다는 말을 전하며, 화학과에 계신 모든 선생님들과 대학원 선배님, 후배님들께 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

연구원이라는 직업에 첫발을 내밀어 인턴생활을 했던, 제주특별자치도개발공사 연구개발팀 식구들, 연구원의 방향을 잡는 계기가 되었던, 생물종다양성연구소 식구들 다들 잘 지내고 계시죠? 다들 감사합니다.

우리 오공주 지현언니, 유미언니, 소현이, 수경이 여러분 저 드디어 졸업 합니다. 우리 언제 완전체로 뭉쳐요!

지금은 모임 때 밖에 못 만나는 고등학교 생활의 전부인 21기 친구들, 다들 바빠서 연락이 뜸했던 해성오빠, 언니보다 먼저 유부녀 되어버린 우리 설아, 결혼하고 얼굴 안보여주는 주혜 그리고, 내 인생의 반을 친구로 지내고 있는 쏠메달 다래, 나 이제 칼퇴 하니깐 우리 자주자주 만납시다.

마지막으로 다 큰 딸 다시 학교 보내주신 세상에서 가장 존경하고, 사랑하는 아빠, 엄마, ‘욱아 누나 문~’ 새벽 늦게 집에 들어가도 누나가 집에 들어올 때

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

까지 기다렸다 문열어주는 착하고, 듬직한 내동생 욱이 감사합니다.

그리고, 사랑한다는 말보다 힘내라고 격려를 더 많이 해주는 꽃피는 봄이 오면, 평생 내 옆에 있을 서민철씨! 사랑의 마음을 담아 진심으로 고맙고, 사랑합니다. 이제 힘들다고 안 할 테니깐 사랑한다고 많이 말해주세요.

좀 더 발전된 나의 모습을 상상하며 시작 하였고, 많은 분들의 도움으로 무사히 마치게 되었습니다. 항상 감사의 마음을 잊지 않겠습니다. 다시 사회로 나가 예전의 나보다 조금은 발전된 나의 모습으로 출발을 하겠습니다.

감사합니다.

2015년 12월 22일

전아림 올림

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY