



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](#)

博士學位論文

윤노리나무 가지 및 제주 흑무  
추출물로부터 기능성 화장품  
소재 개발 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

고 하 나

2018年 2月



# 윤노리나무 가지 및 제주 흑무 추출물로부터 기능성 화장품 소재 개발 연구






指導教授 李南昊

고 하 나

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2017年 12月

고하나의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	玄昌久	
委員	尹景奭	
委員	姜昌禧	
委員	金原亨	
委員	李南昊	

濟州大學校 大學院

2017年 12月

Development of Functional Cosmetic  
Ingredients from *Pourthiaea villosa* Branches  
and Jeju Black Radish  
(*Raphanus sativus* L. var. *niger*)

Ha Na Ko  
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement  
for the degree of Doctor of Philosophy

2017. 12.

This dissertation has been examined and approved.

CHANG-GU HYUN

Kyung-Sup Yoon

Chang Hee Kang

Won Hyung Kim

Nam Ho Lee

12/17  
Date

Department of Chemistry  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

List of Tables .....	vi
List of Figures .....	vii
List of Abbreviations .....	xiii
Abstract .....	xvi
<b>I. 서론</b> .....	1
1. 기능성 화장품 .....	2
2. 항산화 .....	3
3. 항염 .....	5
4. 미백 .....	7
<b>II. 연구 방법</b> .....	9
1. 시약 및 기기 .....	9
2. 기능성 소재 탐색을 위한 활성 평가 .....	11
1) 항산화 .....	11
(1) 총 폴리페놀 함량 측정 .....	11
(2) 총 플라보노이드 함량 측정 .....	11
(3) DPPH radical 소거 활성 .....	12
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	13
2) 항염 .....	14
(1) RAW 264.7 세포 배양 .....	14
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	14
(3) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성 .....	14
(4) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성 .....	15
3) 미백 .....	16

(1) B16F10 melanoma 세포 배양 .....	16
(2) Melanogenesis 억제 활성 .....	16
(3) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	16
(4) TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질 발현 억제 활성 .....	17
4) 세포독성 평가 .....	18
3. 통계 처리 .....	18
<b>III. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>19</b>
<b>제 1 절 윤노리나무 가지 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구 .....</b>	<b>19</b>
1. 재료 .....	19
2. 윤노리나무 가지의 추출, 분획 및 분리 .....	20
1) 시료의 추출 및 분획 .....	20
2) Ethyl acetate 분획물로부터 활성 성분 분리 .....	21
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	23
1) Compound 1, 2 .....	23
2) Compound 3 .....	27
3) Compound 4 .....	30
4) Compound 5, 6, 7 .....	35
4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	41
1) 항산화 .....	41
(1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 .....	41
(2) DPPH radical 소거 활성 .....	43
(3) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	44
2) 항염 .....	45
(1) Nitric oxide 생성 억제 활성 .....	45
(2) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성 .....	47
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	48
1) 항산화 .....	48

(1) DPPH radical 소거 활성 .....	48
(2) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	50
2) 항염 .....	52
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	52
(2) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성 .....	54
(3) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성 .....	55
6. 연구결과 및 고찰 .....	57
<b>제 2 절 제주 흑무 뿌리 추출물의 미백 및 항염 활성 성분 연구 .....</b>	<b>59</b>
1. 재료 .....	59
2. 흑무 뿌리의 추출, 분획 및 분리 .....	61
1) 시료의 추출 및 분획 .....	61
2) Ethyl acetate 분획물로부터 활성 성분 분리 .....	62
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	63
1) Compound 1 .....	63
2) Compound 2 .....	68
3) Compound 3 .....	71
4) Compound 4, 5, 6 .....	74
4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	80
1) 항염 .....	80
(1) Nitric oxide 생성 억제 활성 .....	80
(2) PGE <sub>2</sub> 생성 억제 활성 .....	82
(2) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성 .....	83
(3) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6) 생성 억제 활성 .....	85
2) 미백 .....	86
(1) Melanogenesis 억제 활성 .....	86
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	88
1) 항염 .....	88
(1) Nitric oxide 생성 억제 활성 .....	88

2) 미백 .....	90
(1) Melanogenesis 억제 활성 .....	90
(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	92
(3) TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 발현 억제 활성 .....	93
6. 연구결과 및 고찰 .....	95
<b>제 3 절 제주 흑무 지상부 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구</b> .....	98
1. 재료 .....	98
2. 흑무 지상부의 추출, 분획 및 분리 .....	99
1) 시료의 추출 및 분획 .....	99
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리 .....	100
3) <i>n</i> -Butanol 분획물의 활성 성분 분리 .....	102
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	103
1) Compound 1, 2, 3 .....	103
2) Compound 4 .....	109
3) Compound 5, 6 .....	112
4) Compound 7 .....	116
5) Compound 8 .....	119
4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	122
1) 항산화 .....	122
(1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 .....	122
(2) DPPH radical 소거 활성 .....	124
(2) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	125
2) 항염 .....	126
(1) Nitric oxide 생성 억제 활성 .....	126
(2) PGE <sub>2</sub> 생성 억제 활성 .....	128
(3) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성 .....	129
(4) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성 .....	130
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	132



1) 항산화 .....	132
(1) DPPH radical 소거 활성 .....	132
(2) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	134
2) 항염 .....	136
(1) Nitric oxide 생성 억제 활성 .....	136
6. 연구결과 및 고찰 .....	138
IV. 요약 및 결론 .....	140
V. 참고문헌 .....	142

## List of Tables

Table 1. The categories of functional cosmetics .....	2
Table 2. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>1</b> and <b>2</b> .....	24
Table 3. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>3</b> .....	28
Table 4. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>4</b> .....	31
Table 5. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>5-7</b> .....	37
Table 6. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. villosa</i> branches .....	43
Table 7. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. villosa</i> branches .....	44
Table 8. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities of isolates <b>1-7</b> from <i>P. villosa</i> branches .....	49
Table 9. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of isolates <b>1-7</b> from <i>P. villosa</i> branches .....	51
Table 10. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>1</b> .....	64
Table 11. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>2</b> .....	69
Table 12. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>3</b> .....	72
Table 13. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>4-6</b> .....	76
Table 14. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>1-3</b> .....	105
Table 15. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>4</b> .....	110
Table 16. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>5</b> and <b>6</b> .....	113
Table 17. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>7</b> .....	117
Table 18. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>8</b> .....	120
Table 19. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts .....	124
Table 20. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts .....	125

Table 21. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of isolates 1-8 from black radish aerial parts .....	133
Table 22. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of isolates 1-8 from black radish aerial parts .....	135

## List of Figures

Figure 1. Chemical structures of anti-oxidants .....	4
Figure 2. Inflammation mechanism in macrophage cell .....	6
Figure 3. Mechanism of melanogenesis in melanosome .....	7
Figure 4. Picture of <i>Pourthiaea villosa</i> (Thunb.) Decne .....	19
Figure 5. Extraction and solvent fractionation of <i>P. villosa</i> branches .....	20
Figure 6. Isolation of compounds from <i>P. villosa</i> branches .....	22
Figure 7. Chemical structures of isolated compounds <b>1</b> and <b>2</b> from <i>P.</i> <i>villosa</i> branches .....	23
Figure 8. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	25
Figure 9. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	25
Figure 10. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	26
Figure 11. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	26
Figure 12. Chemical structure of isolated compound <b>3</b> from <i>P. villosa</i> branches .....	27
Figure 13. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	29
Figure 14. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	29
Figure 15. Chemical structure of isolated compound <b>4</b> from <i>P. villosa</i> branches .....	31
Figure 16. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	32
Figure 17. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	32
Figure 18. COSY NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	33

Figure 19. HMQC NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	33
Figure 20. HMBC NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	34
Figure 21. Chemical structures of isolated compounds <b>5-7</b> from <i>P. villosa</i> branches .....	36
Figure 22. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	38
Figure 23. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	38
Figure 24. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	39
Figure 25. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	39
Figure 26. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>7</b> .....	40
Figure 27. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>7</b> .....	40
Figure 28. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from <i>P. villosa</i> branches .....	42
Figure 29. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>P. villosa</i> branches .....	42
Figure 30. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. villosa</i> branches .....	43
Figure 31. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. villosa</i> branches .....	44
Figure 32. Nitric oxide production and cell viability effects of extract and solvent fractions of <i>P. villosa</i> branches .....	46
Figure 33. Nitric oxide production and cell viability effects of ethyl acetate fraction of <i>P. villosa</i> branches .....	46
Figure 34. Effects of ethyl acetate fraction from <i>P. villosa</i> branches on the levels of iNOS and COX-2 protein .....	47
Figure 35. DPPH radical scavenging activities of isolates <b>5-7</b> from <i>P.</i> <i>villosa</i> branches .....	48
Figure 36. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of isolates <b>4-7</b> from <i>P.</i> <i>villosa</i> branches .....	50
Figure 37. Nitric oxide production and cell viability effects of isolated	

compounds from <i>P. villosa</i> branches .....	53
Figure 38. Nitric oxide inhibition and cell viability effects of isolated compound <b>4</b> isolated from <i>P. villosa</i> branches .....	53
Figure 39. Effects of isolated compound <b>4</b> from <i>P. villosa</i> branches on the levels of iNOS and COX-2 protein .....	54
Figure 40. Effect of isolated compound <b>4</b> from <i>P. villosa</i> branches on production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and IL-6 .....	56
Figure 41. Picture of black radish roots .....	60
Figure 42. Extraction and fractionation of black radish roots .....	61
Figure 43. Isolation of compounds from black radish roots .....	62
Figure 44. Chemical structure of isolated compound <b>1</b> from black radish roots .....	63
Figure 45. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	65
Figure 46. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	65
Figure 47. DEPT-135° NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	66
Figure 48. COSY NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	66
Figure 49. HMQC NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	67
Figure 50. HMBC NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	67
Figure 51. Chemical structure of isolated compound <b>2</b> from black radish roots .....	69
Figure 52. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	70
Figure 53. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	70
Figure 54. Chemical structure of isolated compound <b>3</b> from black radish roots .....	71
Figure 55. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	73
Figure 56. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	73
Figure 57. Chemical structures of isolated compounds <b>4-6</b> from black radish roots .....	75
Figure 58. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	77

Figure 59. $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	77
Figure 60. $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	78
Figure 61. $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	78
Figure 62. $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	79
Figure 63. $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	79
Figure 64. Nitric oxide production and cell viability of extract and solvent fractions from black radish roots .....	81
Figure 65. Nitric oxide production and cell viability of ethyl acetate fraction from black radish roots .....	81
Figure 66. Effect of ethyl acetate fraction from black radish roots on $\text{PGE}_2$ production .....	82
Figure 67. Effects of ethyl acetate fraction from black radish roots on the levels of iNOS and COX-2 protein .....	84
Figure 68. Effects of ethyl acetate fraction from black radish roots on production of TNF- $\alpha$ and IL-6 .....	85
Figure 69. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of black radish roots .....	87
Figure 70. Melanin contents and cell viability of <i>n</i> -hexane and ethyl acetate fractions from black radish roots .....	87
Figure 71. Nitric oxide production and cell viability of isolated compounds from black radish roots .....	89
Figure 72. Melanin contents and cell viability of isolated compounds from black radish roots .....	90
Figure 73. Melanin contents and cell viability of isolated compound <b>1</b> from black radish roots .....	91
Figure 74. Intracellular tyrosinase activity of isolated compound <b>1</b> from black radish roots .....	92
Figure 75. Effects of isolated compound <b>1</b> from black radish roots on the levels of TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein .....	94

Figure 76. Chemical structures of analyzed glucosinolates from white radish ( <i>R. sativus</i> L. <i>sativus</i> ) .....	96
Figure 77. Pictures of black radish aerial parts .....	98
Figure 78. Extraction and fractionation of black radish aerial parts .....	99
Figure 79. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of black radish aerial parts .....	101
Figure 80. Isolation of compounds from <i>n</i> -butanol fraction of black radish aerial parts .....	102
Figure 81. Chemical structures of isolated compounds <b>1-3</b> from black radish aerial parts .....	104
Figure 82. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	106
Figure 83. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	106
Figure 84. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	107
Figure 85. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	107
Figure 86. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	108
Figure 87. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	108
Figure 88. Chemical structure of isolated compound <b>4</b> from black radish aerial parts .....	109
Figure 89. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	111
Figure 90. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	111
Figure 91. Chemical structures of isolated compounds <b>5</b> and <b>6</b> from black radish aerial parts .....	113
Figure 92. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	114
Figure 93. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	114
Figure 94. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	115
Figure 95. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>6</b> .....	115
Figure 96. Chemical structure of isolated compound <b>7</b> from black radish aerial parts .....	116
Figure 97. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>7</b> .....	118

Figure 98. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>7</b> .....	118
Figure 99. Chemical structure of isolated compound <b>8</b> from black radish aerial parts .....	119
Figure 100. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>8</b> .....	121
Figure 101. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>8</b> .....	121
Figure 102. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from black radish aerial parts .....	123
Figure 103. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from black radish aerial parts .....	123
Figure 104. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts .....	124
Figure 105. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts .....	125
Figure 106. Nitric oxide production and cell viability of extract and solvent fractions from black radish aerial parts .....	127
Figure 107. Nitric oxide inhibition and cell viability of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts .....	127
Figure 108. Effect of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts on PGE <sub>2</sub> production .....	128
Figure 109. Effects of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts on the levels of iNOS and COX-2 protein .....	129
Figure 110. Effects of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts on production of TNF-α, IL-1β and IL-6 .....	131
Figure 111. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from black radish aerial parts .....	132
Figure 112. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of isolated compounds from black radish aerial parts .....	134
Figure 113. Nitric oxide production and cell viability of isolated compounds from black radish aerial parts .....	137



## List of Abbreviations

### 1. Plant name

- *R. sativus* L. var. *niger* : *Raphanus sativus* L. var. *niger*
- *P. villosa* : *Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne

### 2. Terms in experiment

- CC : column chromatography
- Fr. : fraction
- GAE : gallic acid equivalent
- HPLC : high pressure liquid chromatography
- MPLC : medium pressure liquid chromatography
- MP : MPLC fraction
- QE : quercetin equivalent
- SC<sub>50</sub> : scavenging concentration of 50 percent
- TLC : thin-layer chromatography
- VLC : vacuum liquid chromatography
- V : VLC fraction

### 3. Solvents

- CHCl<sub>3</sub> : chloroform
- DMSO : dimethyl sulfoxide
- EtOH : ethanol
- EtOAc : ethyl acetate
- MeOH : methanol
- *n*-BuOH (BuOH) : *n*-butanol
- *n*-Hex (Hex) : *n*-hexane
- H<sub>2</sub>O : water

#### 4. Terms used in structure analysis

- NMR : nuclear magnetic resonance
- COSY : correlation spectroscopy
- DEPT : distortionless enhancement by polarization transfer
- HMBC : heteronuclear multiple bond correlation
- HMQC : heteronuclear multiple quantum correlation
- 1D/2D : one/two dimension
- brs : broad singlet
- $J$  : coupling constant (Hz)
- d : doublet
- dd : doublet of doublets
- dt : doublet of triplets
- int. : integration
- m : multiple
- ppm : parts per million
- s : singlet
- t : triplet

#### 5. Terms used in bio-assay

##### 5-1. Anti-oxidation

- DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid)
- BHT : butylated hydroxytoluene
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

##### 5-2. Cell culture and cell viability

- DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
- FBS : fetal bovine serum
- MTT : 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

- PBS : phosphate buffered saline
- TBS : Tris-buffered saline

### **5-3. Anti-inflammation**

- COX-2 : cyclooxygenase-2
- iNOS : inducible nitric oxide synthase
- IL-1 $\beta$  : interleukin-1 $\beta$
- IL-6 : interleukin-6
- LPS : lipopolysaccharide
- NO : nitric oxide
- PGE<sub>2</sub> : prostaglandin E<sub>2</sub>
- TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$

### **5-4. Anti-melanogenesis**

- L-DOPA : 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine
- $\alpha$ -MSH :  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone
- TRP-1 : tyrosinase related protein-1
- TRP-2 : tyrosinase related protein-2
- MITF : microphthalmia-associated transcription factor

## Abstract

For the development of functional cosmetic ingredients, we investigated bioactive components from *Pourthiaea villosa* branches as well as black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) roots and aerial parts.

Dried plant samples were extracted with 70% aqueous ethanol, and crude extracts were subjected to solvent fractionation according to polarity. The chemical structures of the isolates were elucidated by analyzing the spectroscopic data including 1D and 2D NMR spectra, as well as comparison of those in the literatures. The screenings of bioactivities (anti-oxidation, anti-inflammation, and anti-melanogenesis) were evaluated for each fractions and isolated compounds.

*P. villosa* branches showed good activities for anti-oxidative and anti-inflammatory effects. Seven compounds were isolated from ethanol extract of *P. villosa* branches; ursolic acid (1), arjunolic acid (2), daucosterol (3), myricanol (4), myricetin (5), myricitrin (6) and quercitrin (7). As far as know, compound 1-6 were isolated for first time from *P. villosa*. Among the isolates, compounds 4-6 showed potent free radical scavenging activities. Also, the compound 4 showed strong anti-inflammatory activity.

Black radish roots showed anti-inflammation and melanogenesis inhibition effects. Six compounds were isolated from the ethanol extract of black radish roots; 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione (1), ascorbigen (2),  $\beta$ -sitosterol (3), palmitic acid (4),  $\alpha$ -linolenic acid (5) and 1-linolenoyl glycerol (6). Among the isolates, compounds 4-6 showed anti-inflammatory activities and compound 1 showed potent melanogenesis inhibition activity.

Black radish aerial parts have shown potent activities for anti-oxidative

and anti-inflammatory effects. Eight compounds were isolated from ethanol extract of black radish aerial parts; kaempferitrin (1), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (2), afzelin (3), loliolide (4), *p*-coumaric acid (5), ethyl caffeate (6), fulgic acid (7) and tryptophan (8). Among these compounds, compounds 1, 2, 3, 5 and 6 showed good free radical scavenging activity. Also, compound 6 showed strong anti-inflammatory activity.

This study demonstrated that extract of *P. villosa* and *R. sativus* L. var. *niger* could be applied in the industry as cosmeceutical ingredients.

## I. 서론

젊고 아름다운 모습을 오랫동안 간직하고 싶은 것은 인간의 오랜 꿈 중 하나이다. 인류의 소득이 증가함에 따라 삶의 질에 대한 욕구도 높아지면서 성별과 세대를 불문하고 건강과 미용에 대한 관심이 높아졌다.<sup>1</sup> 최근에는 웰빙(well-being)보다 더 포괄적이고 광범위한 개념의 로하스(LOHAS; Lifestyles of Health and Sustainability)에 대한 관심이 고조되고 있으며 건강을 겸비한 아름다움을 추구하고자 하는 욕구가 사회 전반에 걸쳐 나타나고 있고 이러한 사회적 변화는 화장품 산업에도 영향을 주게 되었다. 과거의 화장품은 단순히 피부에 보습 효과 등을 주어 피부를 보호하거나 입술이나 눈썹 등을 메이크업하여 아름다움을 제공하는 정도의 개념이었지만, 이제는 보다 적극적으로 피부의 상태를 개선하려는 목적으로 변화하였다. 예를 들면 기미나 주근깨를 예방하거나 지연시키는 미백화장품의 영역은 물론 모발 성장을 돕는 육모 및 두피 각질화 등을 방지하는 비듬방지제, 아토피성 피부로 인한 건조함 등을 완화하는데 도움을 주는 화장품 등 그 범주가 점점 확대되고 있다.<sup>2</sup>

이에 따라 최근 화장품 연구는 치유개념이 도입된 기능성 화장품 개발에 집중되어 있다. 기능성 화장품이란 화장품과 의약품의 중간적인 성격을 갖는 제품으로 안전성을 강조한 일반 화장품에 비해 부가적으로 효능과 효과를 강조한 것이다. 기능성 화장품을 의미하는 코스메슈티컬(cosmeceutical)은 독일의 피부과학자 Kligman이 제안한 단어로서, 화장품을 의미하는 cosmetic과 약물을 의미하는 pharmaceutical의 합성어이다.<sup>3</sup> 특별한 기능을 갖는 화장품을 의미하는 기능성 화장품의 정의는 전 세계적으로 통일되어 있지는 않지만 개념을 종합하자면 건강한 피부를 미화시키거나 유지하기 위하여 피부노화 축진을 방지하고, 주근깨, 기미, 주름, 여드름의 생성을 개선할 목적으로 사용되거나 신체의 위화감, 불쾌감 등을 방지하기 위하여 사용되는 인체에 대한 작용이 경미한 화장품을 일컫는다.<sup>4,5,6</sup>

## 1. 기능성화장품

우리나라의 기능성 화장품은 화장품법에서 관리, 규정하고 있으며, 화장품법은 1999년 9월 7일에 약사법에서 독립·제정되었다(법률 제6025호). 화장품법에서 정의하고 있는 화장품은 ‘인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 바르고 문지르거나 뿌리는 등 이와 유사한 방법으로 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것’을 말하며 의약품에 해당하는 물품은 제외하고 있다(화장품법 제2조 1항). 이와 더불어 법적 의미의 기능성 화장품은 화장품법 제2조 2항에 규정된 화장품으로, 2000년 7월 1일에 화장품법이 시행된 이후 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는 데에 도움을 주는 제품의 세 품목에 제한됐던 기능성 화장품 범위가 2017년 5월 30일을 기준으로 모발의 색상 변화·제거 또는 영양공급에 도움을 주는 제품, 피부나 모발의 기능 약화로 인한 건조함, 갈라짐, 빠짐, 각질화 등을 방지하거나 개선하는 데에 도움을 주는 제품 등으로 확대·시행되었다(Table 1).

Table 1. The categories of functional cosmetics

범위 (화장품법 제2조 2항)	기능성 화장품 유형
미백	① 피부에 멜라닌 색소가 침착되는 것을 방지하여 기미·주근깨 등의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품
	② 피부에 침착된 멜라닌색소의 색을 얇게 하여 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품
주름개선	③ 피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능을 가진 화장품
자외선	④ 강한 햇볕을 방지하여 피부를 곱게 태워주는 기능을 가진 화장품
	⑤ 자외선을 차단 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능을 가진 화장품
모발 색상 변화·제거	⑥ 모발의 색상을 변화시키는 기능을 가진 화장품
	⑦ 체모를 제거하는 기능을 가진 화장품
피부나 모발의 기능 강화	⑧ 탈모 증상의 완화에 도움을 주는 화장품
	⑨ 여드름성 피부를 완화하는데 도움을 주는 화장품 (세정제)
	⑩ 아토피성 피부로 인한 건조함 등을 완화하는데 도움을 주는 화장품
	⑪ 튼살로 인한 붉은 선을 없게 하는데 도움을 주는 화장품

이에 따라 기능성 화장품 개발에 관한 연구의 범위도 넓어졌으며, 기능성 소재 발굴에도 많은 연구가 이루어지고 있다. 기능성 화장품의 소재 개발은 약학, 생명과학, 피부과학 분야에서 이미 효능이 알려진 물질을 도입하는 방법과 천연물로부터 기능성 물질을 추출·분리·정제하여 유효성분에 대한 효능을 검증하는 방법, 완전히 새로운 신소재의 개발 및 유도체를 합성하는 방법 등이 있다.<sup>7</sup>

본 연구에서는 천연물로부터 유효 성분을 추출, 분리, 정제하고 활성 성분에 대한 효능 검증을 통하여 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 모색해보고자 하였다.

## 2. 항산화

대기의 약 21%를 차지하고 있는 산소는 지구상의 호기성 생물의 생명 유지를 위해서는 절대적으로 필요한 원소이다. 정상적인 대사과정에 있어서 호흡을 통해 들어온 산소는 당, 지방 등의 영양소를 원료로 하여 세포내 미토콘드리아에서 에너지(ATP)를 생산해내며, 그 과정에서 약 2-3% 정도의 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성된다.<sup>8</sup> 생성된 활성산소는 신체 방어 기작으로 우리 몸에 침입한 바이러스나 곰팡이, 세균에 대하여 살균 작용을 하기도 하지만 환경오염, 화학물질, 자외선, 살충제와 같은 유해독성에 의해 과도하게 생성될 때 활성산소들은 세포 구성 성분들인 당, 단백질, 지질, DNA 등에 대하여 비가역적, 비선택적으로 파괴 작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨병 등의 노화질환과 피부질환, 염증 및 자가 면역질환 등의 원인으로 작용한다.<sup>9</sup> 특히 우리의 인체에서 가장 큰 기관이자 최외각에 있는 피부는 많은 양의 자외선에 노출되어 있으며 이로 인해 높은 농도의 활성산소종이 생성될 수 있다.<sup>10</sup>

인체에 손상을 미치는 대표적인 활성산소종에는  $\cdot O_2^-$  (superoxide anion radical),  $\cdot OH$  (hydroxy radical) 등의 oxygen radical,  $^1O_2$  (singlet oxygen),  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide)와 같은 몇 종류의 비라디칼 뿐만 아니라 생체 성분과의 반응에서 유래된  $ROO\cdot$  (peroxyl radical),  $RO\cdot$  (alkoxyl radical),  $ROOH$



(hydroperoxide), NO (nitric oxide) 등이 있다.<sup>11</sup>

이러한 활성산소들의 산화적 손상을 억제하기 위한 생체 방어 기구로는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px), catalase 등의 항산화 효소가 존재하여 체내의 항상성을 유지시켜주지만, 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있는 피부는 그 항산화성 방어망의 불균형이 일어나 산화 생성물 및 과산화지질 등이 축적되어 피부 노화가 촉진된다. 이에 필요이상의 활성산소를 제거할 수 있는 외부 항산화제를 보충하여 항산화 네트워크를 회복시켜 피부 조직을 보호할 수 있게 해줄 필요가 있다.<sup>12</sup>

외부 항산화제 종류는 크게 천연 항산화제와 합성 항산화제로 구분할 수 있으며, 천연 항산화제에는 ascorbic acid, tocopherol, flavonoid, carotenoid 등이 있고, 합성 항산화제에는 페놀계 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) 등이 있다 (Figure 1). 하지만 합성 항산화제의 경우, 고온에서 불안정하거나 다량 투여 시 발암 및 기형 발생 인자로 작용할 수 있다는 보고가 있다.<sup>13</sup> 이에 천연 자원 탐색을 통하여 경제적이면서 인체에 보다 안전하고 높은 활성을 가진 천연 항산화제에 대한 연구가 요구되고 있다.

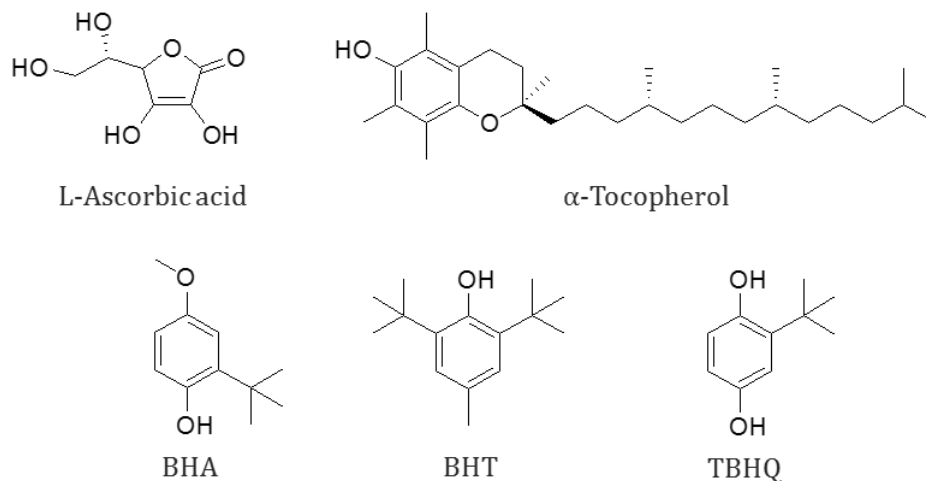


Figure 1. Chemical structures of anti-oxidants.

### 3. 항염

체내 염증반응은 조직의 손상 혹은 바이러스나 박테리아와 같은 병원균의 침입을 인지한 면역세포가 생체를 보호하기 위해 일어나는 중요한 기전이다.<sup>14</sup> 이러한 염증은 일반적인 상태에서는 초기상태가 지난 후 정상으로 돌아오나, 염증을 일으키는 염증인자들이 없어지지 않거나, 반응이 심화되면 정상 세포와 조직에도 손상을 입혀 만성 염증질환이나 자가 면역질환의 원인이 된다.<sup>15</sup> 우리의 피부와 관련해서는 과도한 염증반응으로 인하여 아토피성 피부질환, 습진, 여드름성 피부질환 등이 나타날 수 있다.<sup>16</sup>

대식세포(macrophage)는 염증반응에 관여하는 주요 세포로 동물 체내 모든 조직에 분포하며 체내에서 선천적으로 면역반응을 담당하는 세포이며, 외부로부터 침입한 세균, 이물질, 바이러스 및 체내 노폐 세포 등을 포식하여 제거하는 역할을 한다. 대식세포는 그람 음성균 외막에 존재하는 박테리아성 내독소로 알려진 LPS (lipopolysaccharide) 등에 의해 자극받게 되면 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) 및 IL-1 $\beta$ 와 같은 염증 매개체들의 분비를 촉진시킨다. 이들 염증 매개체들의 생성은 염증을 심화시키는 leukotriene, prostaglandin 및 nitric oxide (NO)의 대량 생산 등에 관여한다(Figure 2).<sup>17,18</sup>

Nitric oxide (NO)는 NO synthase (NOS) 효소에 의해 L-arginine으로부터 합성되는 물질로, 혈압조절 및 혈액응고, 암세포에 대한 면역 등 다양한 생리 기능을 나타내지만, NO가 체내에 과량으로 존재하면 세포 손상을 야기한다. NO의 생성에 관여하는 NOS는 크게 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)로 나눌 수 있으며, 이 중 iNOS가 외부 자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 다량의 NO를 생성시킨다.<sup>19</sup>

COX (cyclooxygenase)는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시키는 효소로써, COX-1, COX-2로 나눌 수 있다. COX-1은 체내에서 위벽보호, 혈소판의 형성, 신장 기능 유지 등의 정상적인 생체기능에 작용하지만, COX-2는 염증 매개 물질인 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 형성시켜 염증반응과 면역반응 등에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>20</sup>

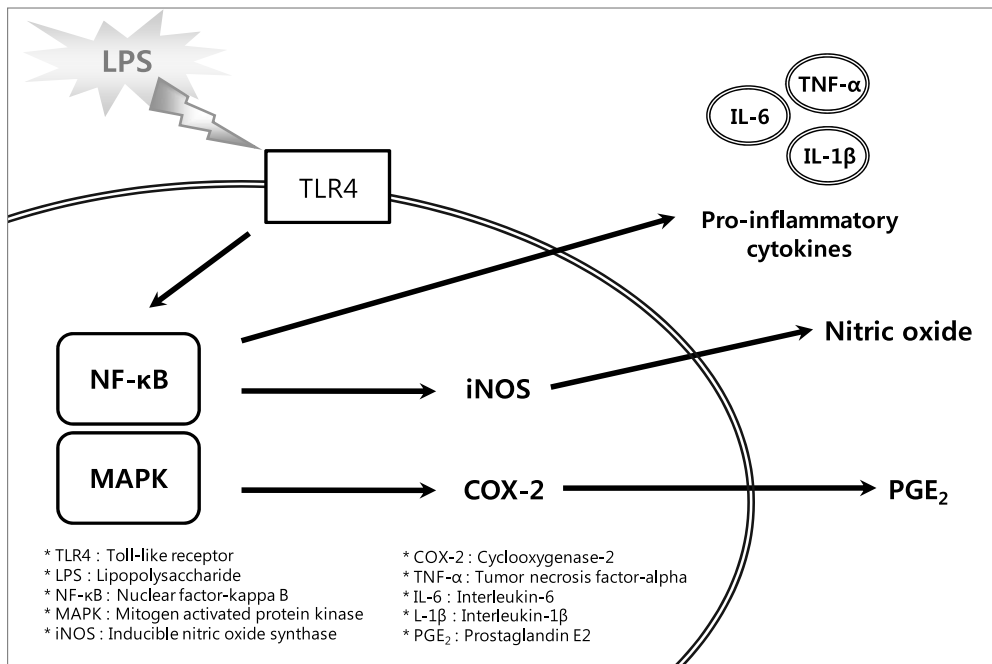


Figure 2. Inflammation mechanism in macrophage cell.

따라서 iNOS, COX-2와 같은 효소를 저해시키는 물질은 염증성 질환을 치료하는 항염증제로써의 개발 가능성이 높다고 할 수 있으며, 이러한 항염증 소재들은 피부 자극 완화 효과를 나타내어 여드름 및 아토피를 완화하는데 도움을 주는 화장품 등에 활용되고 있다.<sup>21</sup> 지금까지 개발된 항염증제로는 스테로이드계 (hydrocortisone, prednisolone, dexamethasone 등)와 비스테로이드계 (aspirin, indomethacin, ibuprofen 등)로 나눌 수 있는데, 모두 염증반응의 주요 매개체인 prostaglandin의 합성을 억제시키는 기전으로 항염증 작용을 나타내는 약제이다. 그러나 이들 항염증제들은 위염, 신장염 및 심장질환 등을 초래한다고 알려져 있으며,<sup>22</sup> 스테로이드계 항염증제의 경우 화장품에서의 사용이 엄격히 금지되고 있다. 때문에 이러한 제제를 대체할 수 있는 천연물 유래의 항염증 소재에 관한 연구가 계속해서 이루어지고 있다.

#### 4. 미백

멜라닌(melanin)은 피부색을 결정하는 중요한 내적인자이다. 멜라닌은 피부에 존재하는 색소 성분으로 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 melanosome이라는 소포체에서 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2, 등에 의한 tyrosine의 산화반응과 효소반응을 통해 생합성 된다(Figure 3).<sup>23</sup>

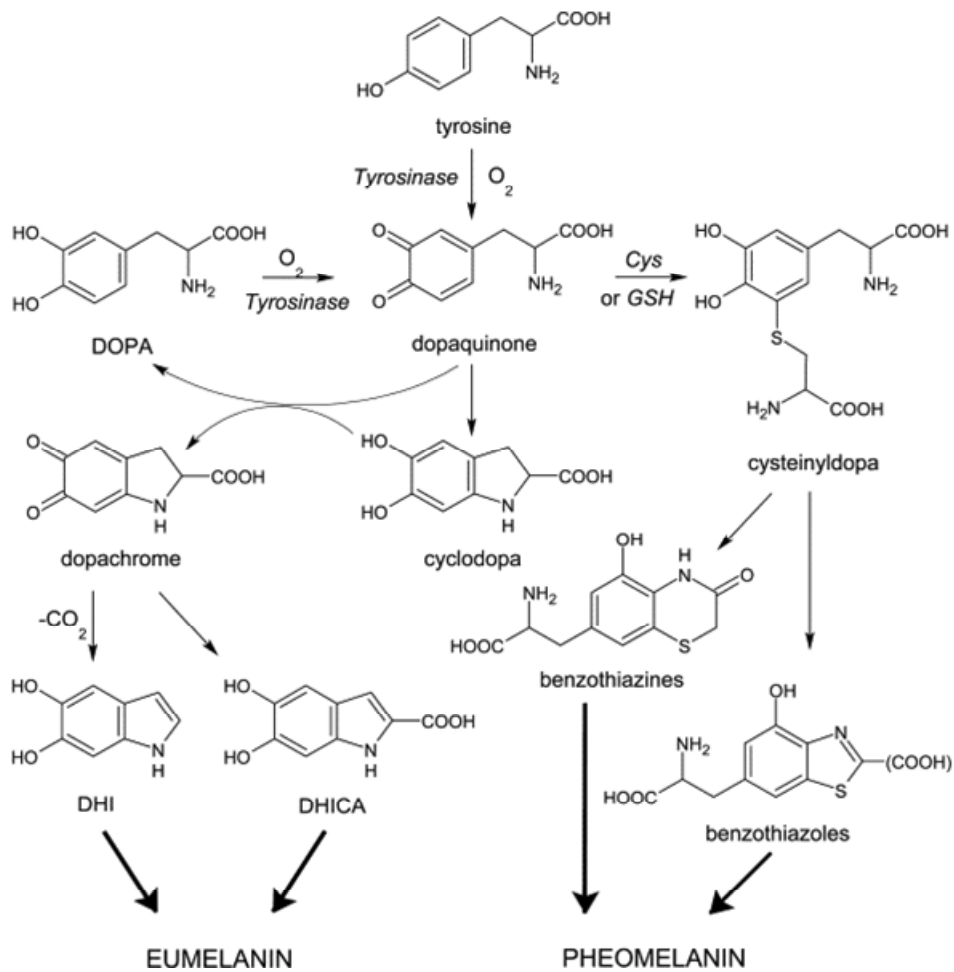


Figure 3. Mechanism of melanogenesis in melanosome.

Tyrosinase는 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA-quinone으로 산화시킨다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)을 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 전환시킨다. TRP-2는 DOPA chrome tautomerase로 작용하여 DOPA chrome을 DHICA로 전환시키게 된다. 또한 멜라닌세포의 성장과 분화에 중요한 전사 조절 인자인 MITF (microphthalmia-associated transcription factor)는 멜라닌 생성에 관여하는 TRP-1, TRP-2, tyrosinase 등의 발현을 촉진한다. 이에 따라 MITF, TRP-1, TRP-2의 작용 기작 억제를 통해 피부 미백 효과를 기대해 볼 수 있다.<sup>24</sup>

대표적인 미백 소재로는 arbutin, kojic acid, 감초추출물, 닥나무추출물 등이 있으며 이들은 tyrosinase의 활성을 억제해 미백효과를 나타내게 된다. Arbutin은 멜라닌의 전구체인 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용해 멜라닌 생성을 억제시키며, kojic acid는 tyrosinase의 활성 부위를 킬레이팅하여 효소 작용을 방해하게 된다. Arbutin과 kojic acid는 강력한 미백효과가 있으나 피부자극 및 안전성 문제로 일부 부작용이 보고되고 있어 이를 개선하기 위해 천연 유래의 미백 활성 소재 개발을 위한 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>25</sup>

본 연구에서는 제주에서 자생하는 윤노리나무(*Pourthiaea villosa*) 가지 및 흑무(*Raphanus sativus* L. var. *niger*) 추출물과 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고, 유효 성분의 분리 및 구조 동정을 통해 기능성 화장품 천연 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 단일물질 분리에 사용된 용매들은 OCI (Seoul, Korea) 및 대정화금(Siheungsi, Gyeonggi-do, Korea)의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (2-25  $\mu\text{m}$ , Sigma Co., St. Louis, MO, USA), normal-phased column chromatography (CC)에는 silica gel (40-63  $\mu\text{m}$ , Merck Co., Darmstadt, Germany), gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex<sup>TM</sup> LH-20 (GE Healthcare Life Sciences, PA, USA)이 사용되었다. Medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co., Uppsala, Sweden)에는 KP-C18-HS 120 g (Biotage Co., Uppsala, Sweden), high pressure liquid chromatography (HPLC, Waters Co., MA, USA)에는 Atlantis<sup>®</sup> dC18 column (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Waters Co., MA, USA)을 사용하였고 MPLC와 HPLC 용매는 HPLC-grade의 methanol과 water (Fisher scientific Korea Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였다. 분리 과정에 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck Co., Darmstadt, Germany)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, 발색 시약에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. 발색 시약으로는 1% anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 및 KMnO<sub>4</sub> 수용액 (3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25% NaOH)을 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 Sunrise<sup>TM</sup> (Tecan Co., Mannedorf, Swiss)를 이용하였다. 구조분석에 이용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)과 AVANCE III (FT-NMR system, Bruker Co., Billerica, MA, USA)를 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge

Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, USA)과 Merck사의 NMR 전용 용매로 methanol- $d_4$ , chloroform- $d$ , pyridine- $d_5$ , dimethyl sulfoxide- $d_6$ 를 사용하였다.

## 2. 기능성 소재 탐색을 위한 활성 평가

### 1) 항산화

#### (1) 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀류 화합물의 함량은 Folin-Denis<sup>26</sup> 방법을 변형하여 실시하였다. 정량을 위한 표준검정곡선 작성에는 gallic acid 표준품을 이용하였다. Gallic acid 1 mg을 DMSO:EtOH=1:1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 two-fold-dilution법을 이용해 15.625-500 µg/mL가 되도록 희석하여 준비하였다. 각 시료들은 1 mg/mL 농도로 용매에 녹여 준비하였다. 각 시료 100 µL를 microtube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합해 실온에 3분간 방치한 후, 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 200 µL, 증류수 700 µL를 넣어 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨다. 이후 상등액을 취하여 microplate reader를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 측정값을 표준검정곡선에 대입하여 폴리페놀의 함량을 환산하였으며, 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.

#### (2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis<sup>27</sup> 방법을 변형하여 실시하였다. 각 시료들을 1 mg/mL로 용매에 녹인 후, 96 well plate에 시료 용액 15 µL와 ethylene glycol 150 µL를 첨가하여 혼합했다. 여기에 0.1 N NaOH 15 µL를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품인 quercetin을 이용하여 표준검정곡선을 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 환산하였다. 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.



### (3) DPPH radical 소거 활성

Blois<sup>28</sup> 등에 의해 소개된 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay는 시료의 수소 공여 능력이나 free radical 소거 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radical은 반응성이 커서 불안정하지만, DPPH는 안정한 free radical을 가진 화합물로서 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 DPPH가 항산화 물질로부터 수소를 공여 받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되며 515 nm에서의 흡광도가 감소하게 되는데, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 능력을 측정할 수 있다.

실험방법은 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20  $\mu$ L와 0.2 mM DPPH (in EtOH) 용액 180  $\mu$ L를 혼합하여 상온에서 20-30분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군(positive control)으로는 L-ascorbic acid (vitamin C)와 BHT를 사용하였으며, 라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산하였고, 각 시료의 소거활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하였다.

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

$A_{\text{control}}$  : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

#### (4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 청록색을 띠는 ABTS<sup>+</sup> radical이 형성되는데, 이 청록색의 ABTS<sup>+</sup> radical이 항산화 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 흡광도의 감소가 일어나게 되는 원리를 이용하여 항산화 능력을 측정할 수 있다.

ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성은 Re & Pellegrin 등의 방법<sup>29</sup>을 변형하여 측정하였다. ABTS<sup>+</sup> radical을 형성하기 위해 7.0 mM ABTS (in D.W) 용액과 2.45 mM potassium persulfate (in D.W) 용액을 1:1로 혼합하여 16시간 암소에서 반응시킨다. 이 용액을 ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가  $0.78 \pm 0.002$ 가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다.

96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20  $\mu$ L와 ABTS 용액 180  $\mu$ L를 혼합하여 15분간 암소에서 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군(positive control)으로는 L-ascorbic acid (vitamin C)와 BHT를 사용하였으며, 라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산하였고, 각 시료의 소거활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하였다.

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

$A_{\text{control}}$  : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 700 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

## 2) 항염

### (1) RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 cell은 마우스의 대식세포(Murine macrophage cell line)로 ATCC (American Type Cell Culture, USA)에서 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO Inc., NY, USA), 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

### (2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW 264.7 cell을  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell의 배지를 1 µg/mL LPS (Lipopolysaccharide)가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. 세포 배양 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<sub>2</sub>)를 이용하여 standard curve를 작성해 정량하였다. 대조군으로는 2-amino-4-picoline (10 µM)을 사용하였다.

### (3) PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW 264.7 cell을  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 배양한 후, 전 배양시킨 cell의 배지를 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환하여, 시료를 농도별로 각각 첨가해 24시간 배양하였

다. 이후 세포 배양 상등액의 PGE<sub>2</sub> 및 cytokine 함량을 sandwich ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kit를 이용하여 정량하였으며, PGE<sub>2</sub> 및 각 cytokine 표준품에 대한 standard curve의 r<sup>2</sup> 값은 0.98 이상이었다.

#### (4) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성화

60 mm culture dish에  $9 \times 10^5$  cell/dish로 세포를 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 배양한 후, 전 배양시킨 cell의 배지를 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환하여, 시료를 농도별로 각각 첨가해 24시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 cold PBS로 세척한 후, lysis buffer (1×RIPA; 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride)를 이용해 4°C, overnight해 lysis 시킨 후, 원심분리 (15,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 standard로 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다.

정량한 단백질 20 µg을 8-12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer 시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk가 포함된 TBS-T (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2시간 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:1000, SantaCruz), COX-2 antibody (1:1000, BD) 및 β-actin antibody (1:20000, Sigma)를 이용하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이후 TBS-T 용액으로 5회 세척 후, peroxidase-conjugated 된 2차 항체(1:5000 또는 1:20000, Santacruz)와 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 TBS-T 용액으로 5회 세척하였다. 단백질은 WESTAR NOVA 2.0 (CYANAGEN, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 확인하였다.

### 3) 미백

#### (1) B16F10 melanoma 세포 배양

Murine B16F10 melanoma cell은 ATCC (American Type Cell Culture, USA)로부터 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO Inc., NY, USA), 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

#### (2) Melanogenesis 억제 활성

6 well plate에  $6 \times 10^4$  cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1 N NaOH 300 µL를 첨가하여 70°C에서 30분간 반응시켜 세포내의 melanin을 녹여 내어 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 melasolv (20 µM)를 사용하였다.

#### (3) Intracellular tyrosinase 저해 활성

6 well plate에  $6 \times 10^4$  cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양한 후, 전 배양 시킨 cell의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환하여 시료를 농도별로 각각 첨가해 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 cold PBS로 세척한 후, lysis buffer (1×RIPA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl

fluoride)를 이용해 4°C, overnight해 lysis 시킨 후, 원심분리(15,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 단백질 상등액만 분리하여 효소액으로 사용하였다.

96 well plate에 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 8 mM L-DOPA 160 µL와 단백질 상등액 20 µL를 혼합하여 37°C에서 1-2시간 반응시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 standard로 Bradford 시약을 사용해 정량하여 보정하였다.

#### (4) TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질 발현 억제 활성

60 mm culture dish에  $9 \times 10^4$  cells/dish로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양한 후, 전 배양 시킨 cell의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환하여 시료를 농도별로 각각 첨가해 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 cold PBS로 세척한 후, lysis buffer (1×RIPA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용해 4°C, overnight해 lysis 시킨 후, 원심분리(15,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 standard로 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다.

정량한 단백질 30 µg을 8-12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer 시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk가 포함된 TBS-T (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2시간 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 TRP-1, TRP-2, tyrosinase antibody (1:1000, SantaCruz) 및 β-actin antibody (1:20000, Sigma)를 이용하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이후 TBS-T 용액으로 5회 세척 후, peroxidase-conjugated 된 2차 항체 (1:2000 또는 1:20000, Santacruz)와 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 TBS-T 용액으로 5회 세척하였다. 단백질은 WESTAR NOVA 2.0 (CYANAGEN, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc

(Fusion solo, VILBER LOURMAT, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 확인하였다.

#### 4) 세포독성 평가

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 RAW 264.7 및 B16F10 cell을 well plate에 실험 조건에 맞게 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 전배양한 후, LPS (1 µg/mL) 또는 α-MSH (100 nM)와 시료를 농도별로 처리하여 배양하였다. 배양 후, 500 µg/mL 농도로 MTT를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 생존률은 다음의 식에 의해 계산되었다.

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

$A_{\text{control}}$  : 시료를 첨가하지 않은 반응 용액의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 시료 반응 용액의 흡광도

### 3. 통계 처리

본 연구의 모든 실험은 동일 조건 하에서 3회 반복 실시하여 실험 결과를 얻었으며, 모든 실험 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 표기하였다. 모든 통계 분석은 Excel software (version 2007, Microsoft Corp., Washington, USA)를 사용하여 student's t-test를 실시하여 평가하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계적 검정 후  $p$  값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미가 있다고 판단하였다. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 제 1 절 윤노리나무 가지 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구

##### 1. 재료

윤노리나무(*Pourthiaea villosa*)는 장미과(Rosaceae) 식물로서 윤노리라는 이름은 우리나라의 전통놀이인 윷놀이의 재료로 쓰였다하여 붙여진 이름이다. 우리나라 중부 이남에서 자생하며 낙엽관목으로 높이는 5 m에 달한다. 잎은 어긋나고 달걀을 거꾸로 세워놓은 모양이거나 긴 타원형이며 길이는 3-8 cm로 양면에 털이 있다. 백색 꽃과 적색 열매가 아름다워 조경수로 이용되었으며 목재의 재질이 굳고 단단하여 농기구 등으로도 이용되어 왔다.<sup>30</sup>

현재까지 보고된 윤노리나무에 관한 연구로는 열매에서 9개의 페놀성 화합물이 분리되었으며,<sup>31</sup> 윤노리나무 가지 추출물에 대하여 항염 및 항산화 활성 연구<sup>32</sup>가 이루어졌으나 이러한 효능이 어떤 성분에 의해 나타나는지는 보고되지 않았다. 이에 본 연구에서는 윤노리나무 가지로부터 활성 성분을 분리, 구조 동정하고 그들의 항염 및 항산화 활성 연구를 진행하고자 하였다.

실험에 사용한 윤노리나무 가지는 2014년 10월에 서귀포 난대산림연구소에서 채집하였다. 채집한 윤노리나무 가지는 물로 세척한 후에 40℃의 열풍 건조기에서 3일 동안 건조시켰으며, 건조물은 분쇄한 후 추출 과정에 사용하였다.



Figure 4. Picture of *Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne.



## 2. 윤노리나무 가지의 추출, 분획 및 분리

### 1) 시료의 추출 및 분획

건조 및 분쇄된 윤노리나무 가지 750 g을 70% 에탄올 7.5 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치와 ADVANTEC사의 Grade No. 131 filter paper를 통해 추출액을 여과하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과한 여액은 40℃ 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 38.6 g을 얻었다. 이 중 추출물 30.0 g을 증류수 2 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (1.7 g), ethyl acetate (8.3 g), *n*-butanol (7.4 g) 및 water (10.8 g) 분획물을 얻었다(Figure 5).

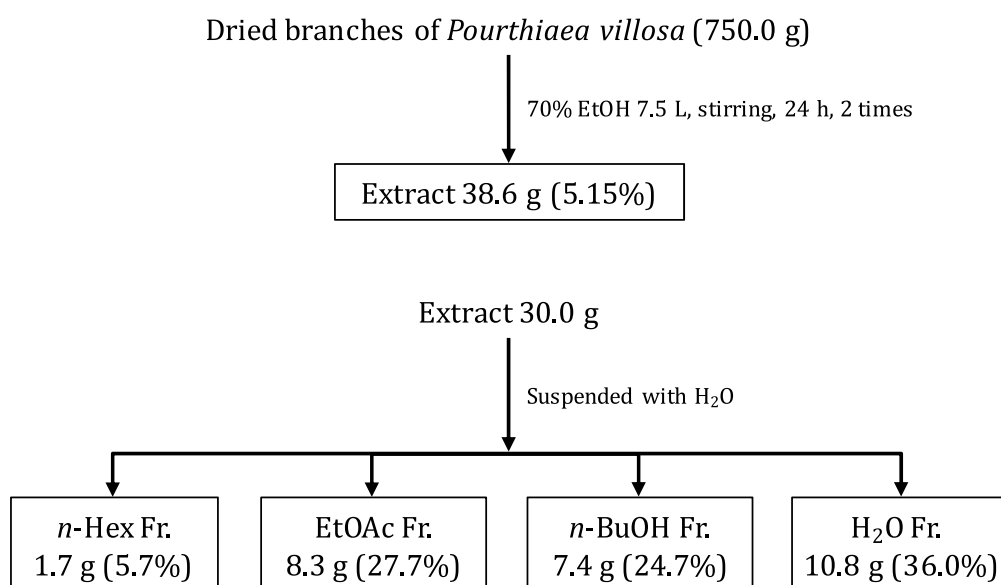


Figure 5. Extraction and solvent fractionation of *P. villosa* branches.

## 2) Ethyl acetate 분획물로부터 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 5.0 g을 분획하기 위하여 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. *n*-Hex/EtOAc (0-100%), EtOAc/MeOH (0-100%)로 용매 극성을 5-10%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 30개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-V30).

VLC fraction들 중 Fr. V6 (35% EtOAc in Hex) 80.4 mg을 감압 농축한 후에 chloroform을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial에 가라앉는 powder를 분리하여 compound **1** (19.3 mg)을 얻었으며, Fr. V7 (40% EtOAc in Hex) 25.7 mg은 단일 화합물 compound **4**로 확인되었다.

Fr. V11 (60% EtOAc in Hex) 108.0 mg은 CHCl<sub>3</sub>-EtOAc-MeOH (5:3:1)의 용매조건으로 재결정하여 compound **5** (19.4 mg)을 얻었다.

Fr. V19 (100% EtOAc) 240.5 mg을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (12:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **2** (1.6 mg)와 compound **7** (4.4 mg)을 얻었으며, Fr. V21 (10% MeOH in EtOAc) 710.4 mg은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (3:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통해 compound **3** (14.4 mg)과 compound **6** (361.4 mg)을 얻었다(Figure 6).

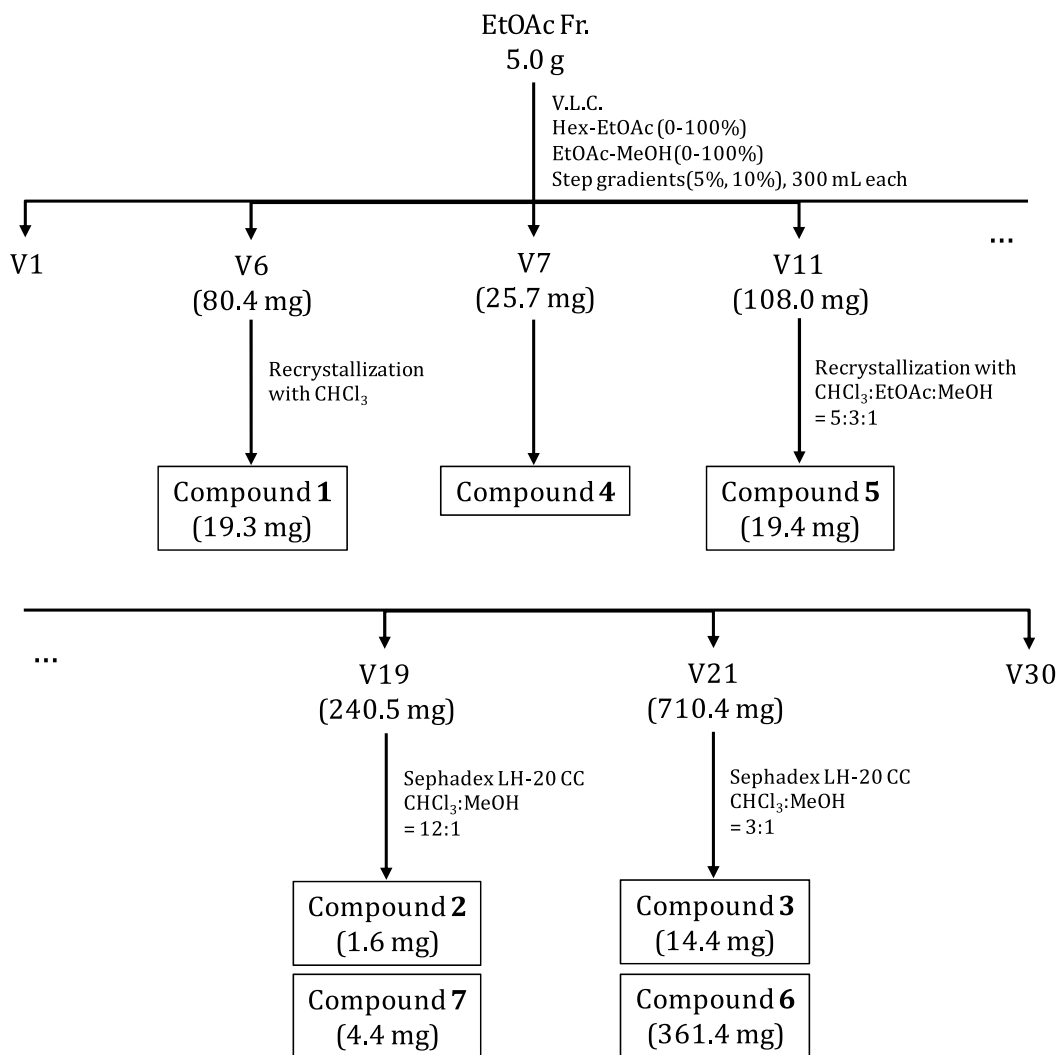


Figure 6. Isolation of compounds from *P. villosa* branches.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2

Compound 1은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 30개의 carbon peak와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 7개의 methyl group을 포함한 aliphatic signal들을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ 와 DEPT-NMR spectrum을 통해 1개의 carbonyl ( $\delta_{\text{C}}$  178.3)과 1개의 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  138.2, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  124.6) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  76.8의 특성 peak들을 확인하였다. 이들을 바탕으로 compound 1은 문헌<sup>33</sup>과 비교하여 3 $\beta$ -hydroxy-12-ursen-28-oic acid, 관용명으로는 ursolic acid임을 확인하였다 (Figure 7-9, Table 2).

Compound 2는 compound 1과 유사한 구조이나,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 6개의 methyl group과 산소와 인접한 위치의 2개의 methine carbon ( $\delta_{\text{C}}$  69.8, 78.3)과 1개의 methylene carbon ( $\delta_{\text{C}}$  66.4)의 특성 피크들이 관찰되었다. 이를 문헌<sup>34</sup>과 비교하여 compound 2는 2 $\alpha,23$ -dihydroxyoleanolic acid, 관용명으로는 arjunolic acid임을 확인하였다(Figure 7, 10, 11, Table 2).

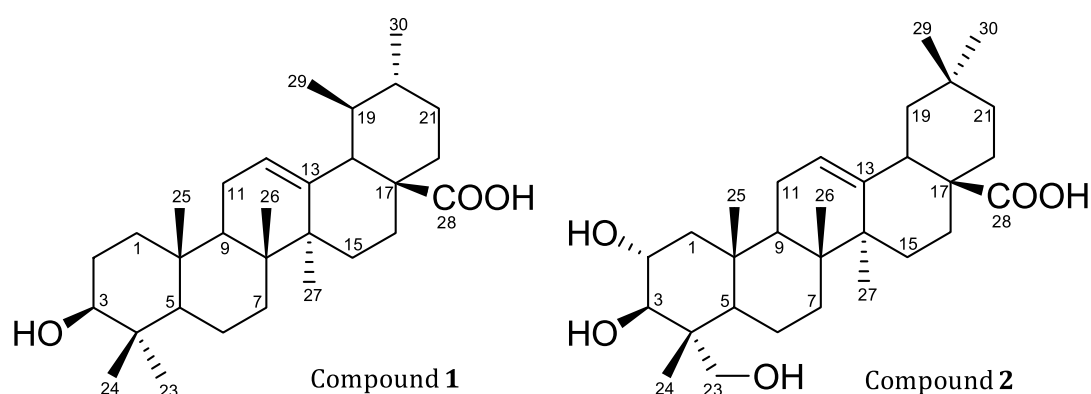


Figure 7. Chemical structures of isolated compounds 1 and 2 from *P. villosa* branches.

Table 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **1** and **2** (500 and 125 MHz, DMSO- $d_6$  and methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
1	38.4		44.3	
2	27.5		69.8	3.68 (1H, t, 3.0)
3	76.8	4.31(1H, d, 5.5)	78.3	3.50 (1H, d, 11.5)
4	38.5		43.0	
5	54.8		49.8	
6	17.1		19.3	
7	32.7		31.8	
8	39.4		35.2	
9	47.0		48.3	
10	36.3		34.1	
11	22.9		24.2	
12	124.6	5.12 (1H, m)	123.3	5.24 (1H, m)
13	138.2		145.9	
14	41.7		40.7	
15	28.3		29.0	
16	23.8		26.6	
17	46.8		47.6	
18	52.4	2.10 (1H, d, 11.0)	39.2	2.87 (1H, dd, 4.5, 13.0)
19	38.5		43.2	
20	38.4		30.5	
21	30.2		33.8	
22	36.5		30.9	
23	27.0	0.89 (3H, s)	66.4	
24	16.1	0.89 (3H, s)	14.0	1.03 (3H, s)
25	15.3	0.98 (3H, s)	18.0	0.95 (3H, s)
26	16.9	0.74 (3H, s)	17.7	0.90 (3H, s)
27	23.3	1.09 (3H, s)	24.8	1.17 (3H, s)
28	178.3		183.0	
29	16.9	0.86 (3H, s)	33.5	0.69 (3H, s)
30	21.1	0.87 (3H, s)	24.3	0.83 (3H, s)

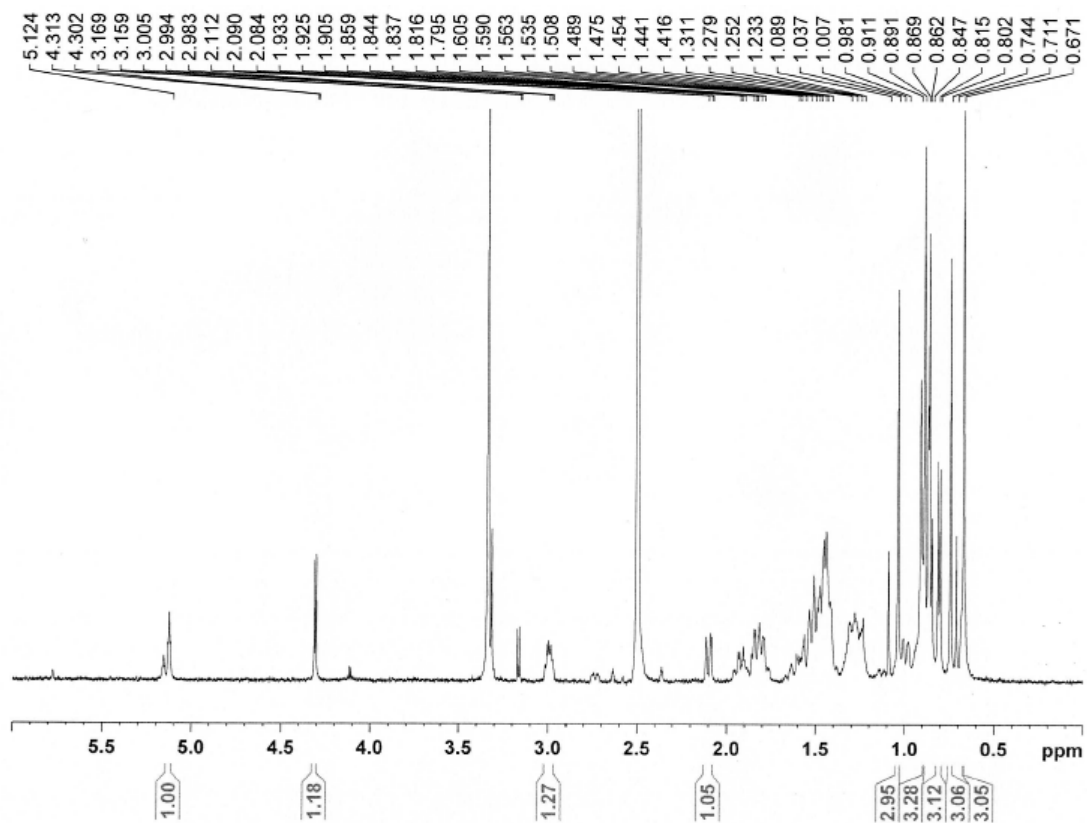


Figure 8.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{DMSO}-d_6$ .

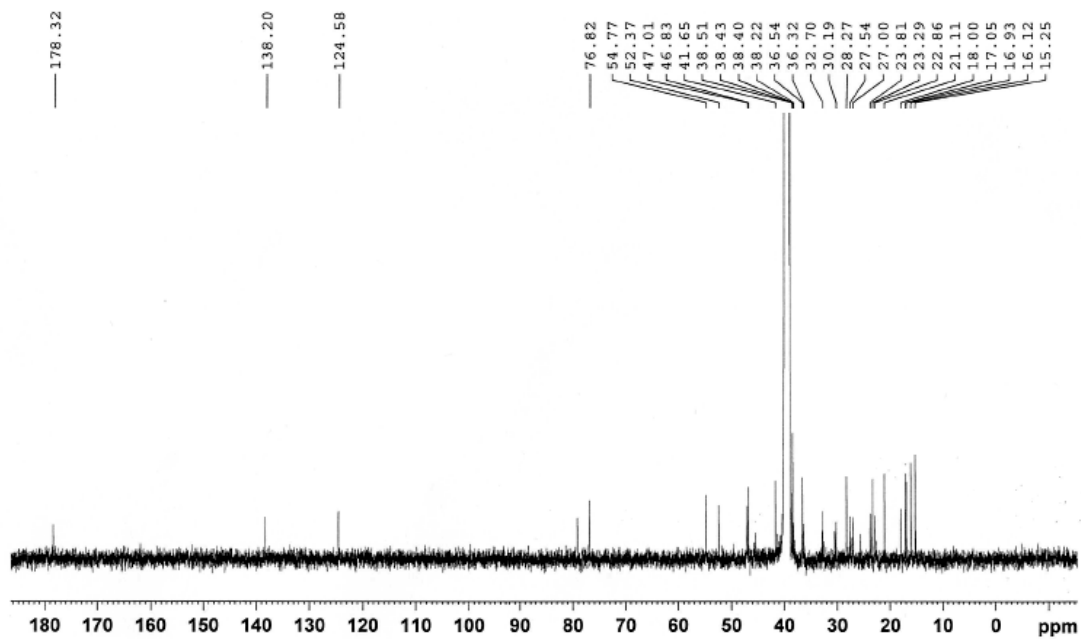


Figure 9.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{DMSO}-d_6$ .

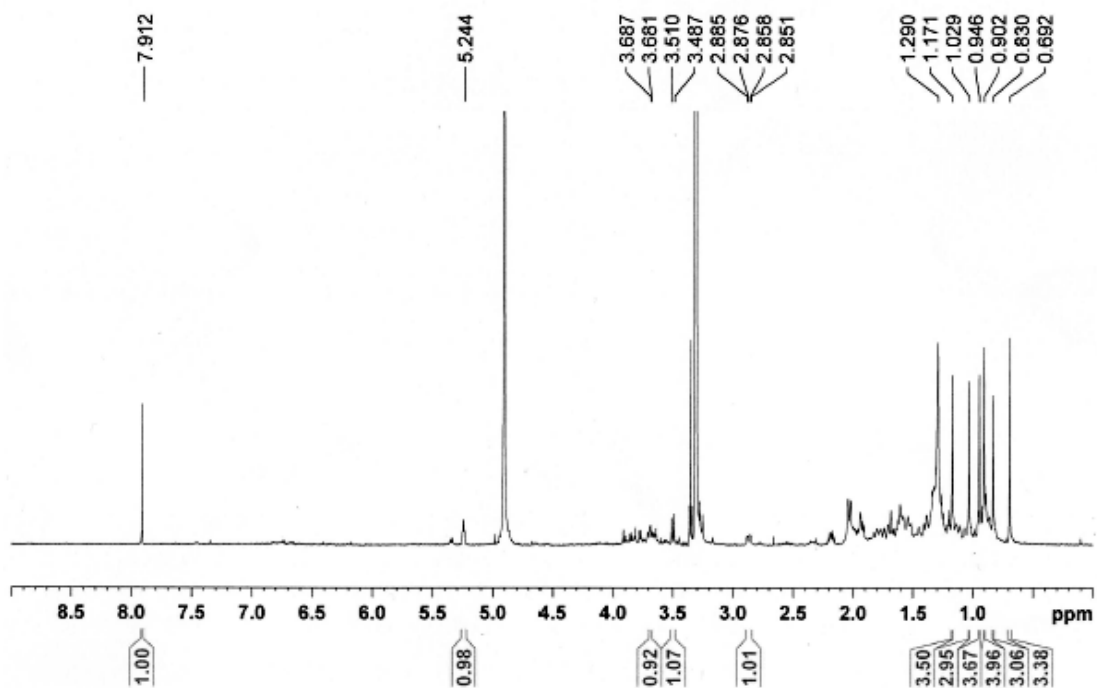


Figure 10.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in methanol- $d_4$ .

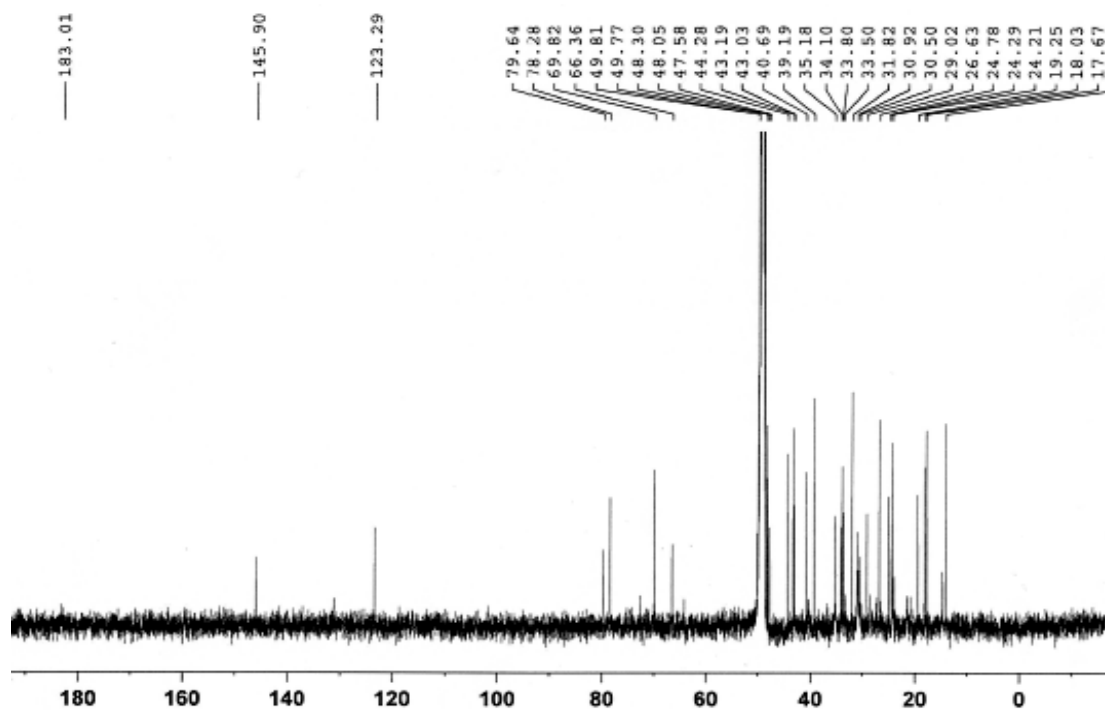


Figure 11.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in methanol- $d_4$ .

## 2) Compound 3

Compound **3**은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과  $\delta_{\text{H}}$  5.36 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz)의 signal로부터  $sp^2$  혼성을 갖는 olefin 구조의 proton을 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.01 (1H, m)의 signal로부터 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methine proton을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  4.61-3.97에서 나타난 peak 패턴을 통해 1개의 당이 있을 것이라 예상할 수 있었으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.10 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz)의 anomeric proton의 coupling constant를 통해 이 당은  $\beta$ -form을 가지고 있을 것이라 예측하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum 분석 결과 총 35개의 carbon peak를 확인하였으며, 이 중 6개의 methyl group ( $\delta_{\text{C}}$  20.5, 19.9, 19.7, 19.5, 12.7, 12.5)과 6개의 sugar carbon을 통해 sterol 배당체 계열의 화합물임을 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  141.3, 122.4 peak는 proton에서도 예상하였던 olefin group의 carbon이며  $\delta_{\text{C}}$  79.1에서 산소가 인접해있는 methine carbon을 확인하였다. 당의 종류는  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  103.0, 79.0, 78.5, 75.8, 72.1, 63.3의 6개의 signal들과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 anomeric proton의 coupling constant 값을 조합하여  $\beta$ -D-glucopyranoside임을 예상하였다. 이를 바탕으로 compound **3**은 문헌<sup>35</sup>과 비교하여 sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, 관용명으로는 daucosterol임을 확인하였다(Figure 12-14, Table 3).

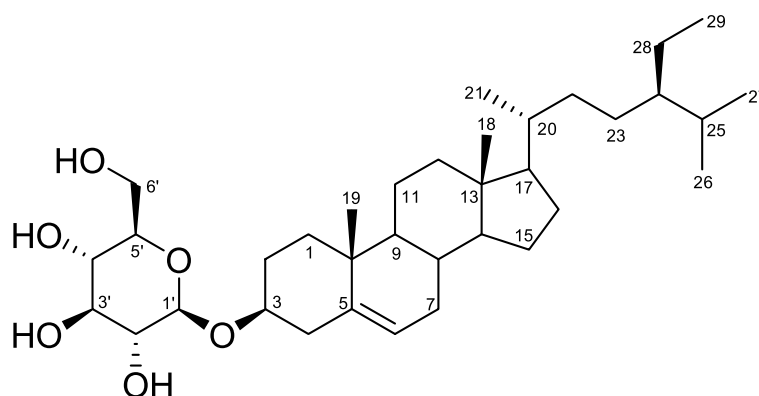


Figure 12. Chemical structure of isolated compound **3** from *P. villosa* branches.



Table 3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **3** (500 and 125 MHz, pyridine- $d_5$ ).

No.	Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
1	37.4	
2	30.5	
3	79.1	4.01 (1H, m)
4	39.8	
5	141.3	
6	122.4	5.36 (1H, d, 5.0)
7	32.5	
8	30.7	
9	50.8	
10	36.9	
11	21.8	
12	40.4	
13	42.9	
14	57.3	
15	25.0	
16	29.0	
17	56.7	
18	12.5	0.66 (3H, s)
19	19.7	0.95 (3H, s)
20	34.6	
21	19.5	0.99 (3H, d, 6.5)
22	32.6	
23	26.8	
24	46.5	
25	29.9	
26	20.5	0.93 (3H, d, 6.5)
27	19.9	0.91 (3H, d, 7.5)
28	23.8	
29	12.7	0.87 (3H, d, 7.0)
1'	103.0	5.10 (1H, d, 7.5)
2'	75.8	4.61–3.97 (5H, sugar H)
3'	79.0	
4'	72.1	
5'	78.5	
6'	63.3	

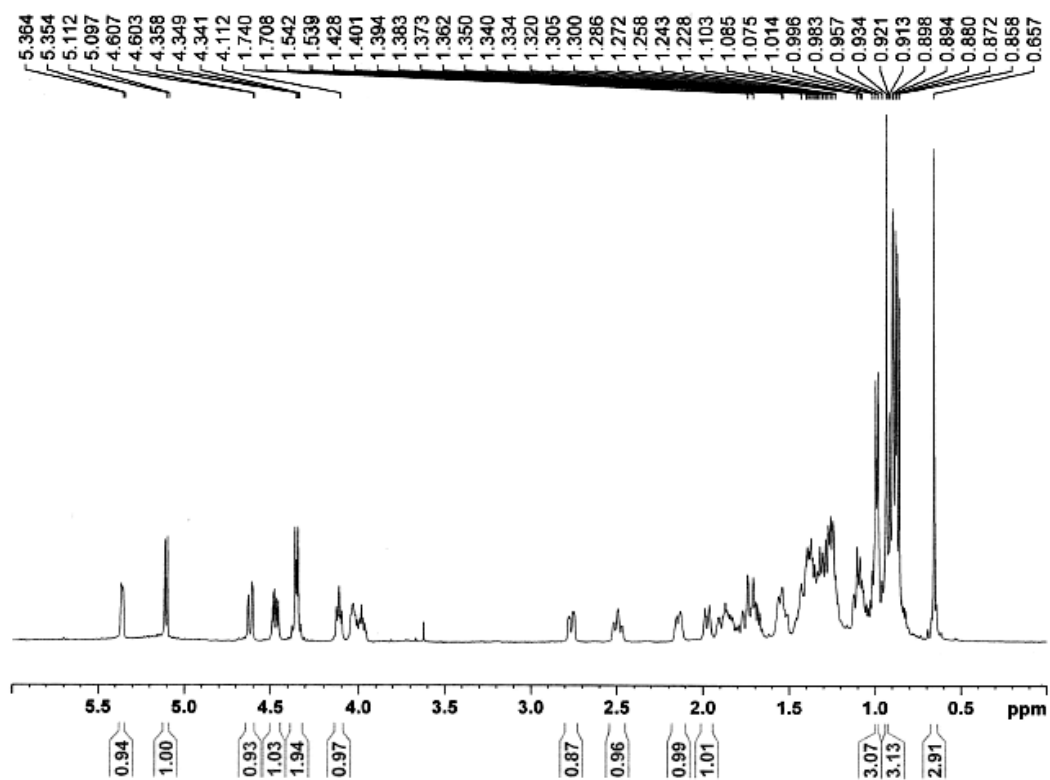


Figure 13.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in pyridine- $d_5$ .

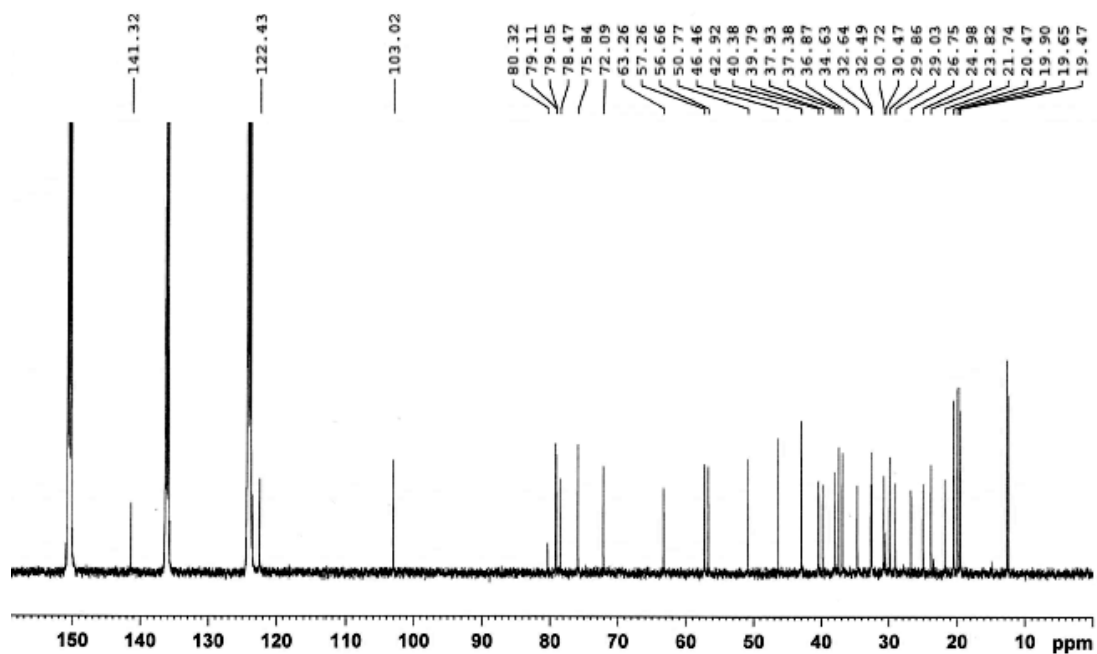


Figure 14.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **3** in pyridine- $d_5$ .

### 3) Compound 4

Compound 4는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.14 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.02 (1H, dd,  $J = 10.0, 2.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.78 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz) signal들을 통하여 서로 *ortho*-, *meta*-coupling을 하고 있는 하나의 aromatic ring과  $\delta_{\text{H}}$  6.82 (1H, s) peak를 통한 하나의 proton만을 갖고 있는 또 다른 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.96 (1H, t,  $J = 12.0$  Hz)의 peak는 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methine proton임을 예상할 수 있었으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.89 (3H, s) 3.85 (3H, s)의 peak들은 적분값을 통하여 methoxy group으로 예상하였다.

$^{13}\text{C}$ 과 DEPT-NMR spectrum을 통하여 총 21개의 carbon이 있음을 확인하였으며, 이들은 2개의 methoxy carbon ( $\delta_{\text{C}}$  61.7, 61.5)과 7개의 aliphatic carbon ( $\delta_{\text{C}}$  69.1, 40.0, 35.6, 27.9, 27.0, 26.6, 24.0), 12개의 aromatic carbon ( $\delta_{\text{C}}$  152.7-117.3) signal 임을 예상할 수 있었다. 2개의 methoxy carbon을 제외한 나머지 peak들을 통해 이 화합물이 diarylheptanoid 계열의 화합물로 예상할 수 있었으며, HMBC spectrum에서 aromatic ring의  $\delta_{\text{H}}$  6.82 (1H, s)의 signal이 또 다른 aromatic ring의 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  126.6과 연결 관계를 나타내는 것으로 보아 이 화합물은 cyclic diarylheptanoid 화합물로 예상되었다.

또한 HMBC spectrum을 통해  $\delta_{\text{C}}$  61.7, 61.5의 methoxy group들이 각각 aromatic ring의 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  148.4, 141.0의 carbon들과 연결되어 있음을 확인하였고, COSY spectrum을 통하여 aliphatic carbon들의 배열을 예상할 수 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 문헌<sup>36</sup>과 비교한 결과 compound 4는 myricanol임을 확인하였다(Figure 15-20, Table 4).

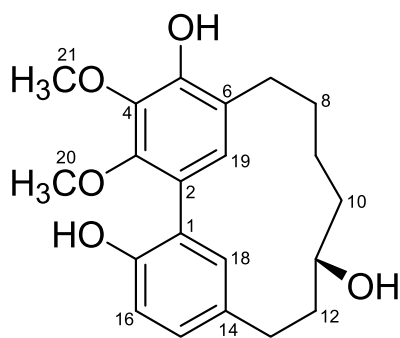


Figure 15. Chemical structure of isolated compound **4** from *P. villosa* branches.

Table 4.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **4** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
1	126.6	
2	124.3	
3	148.4	
4	141.0	
5	150.3	
6	124.0	
7	26.6	2.73 (1H, m), 1.11 (1H, m)
8	27.0	1.95-1.82 (2H, m)
9	24.0	0.96-0.94 (2H, m)
10	40.0	1.57-1.51 (2H, m)
11	69.1	3.96 (1H, m)
12	35.6	2.28 (1H, m), 1.67-1.61 (1H, m)
13	27.9	2.85 (2H, m)
14	131.8	
15	130.6	7.02 (1H, dd, 8.0, 2.0)
16	117.3	6.78 (1H, d, 8.0)
17	152.7	
18	134.6	7.14 (1H, d, 2.0)
19	130.4	6.82 (1H, s)
20	61.7	3.85 (3H, s)
21	61.5	3.89 (3H, s)

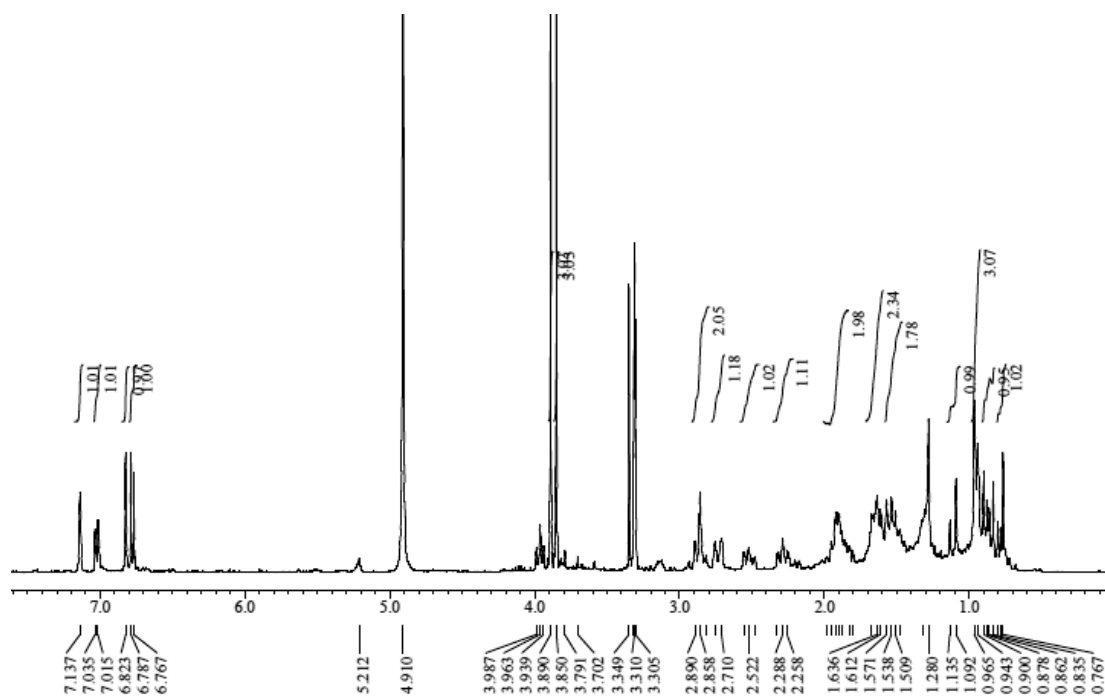


Figure 16.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **4** in methanol- $d_4$ .

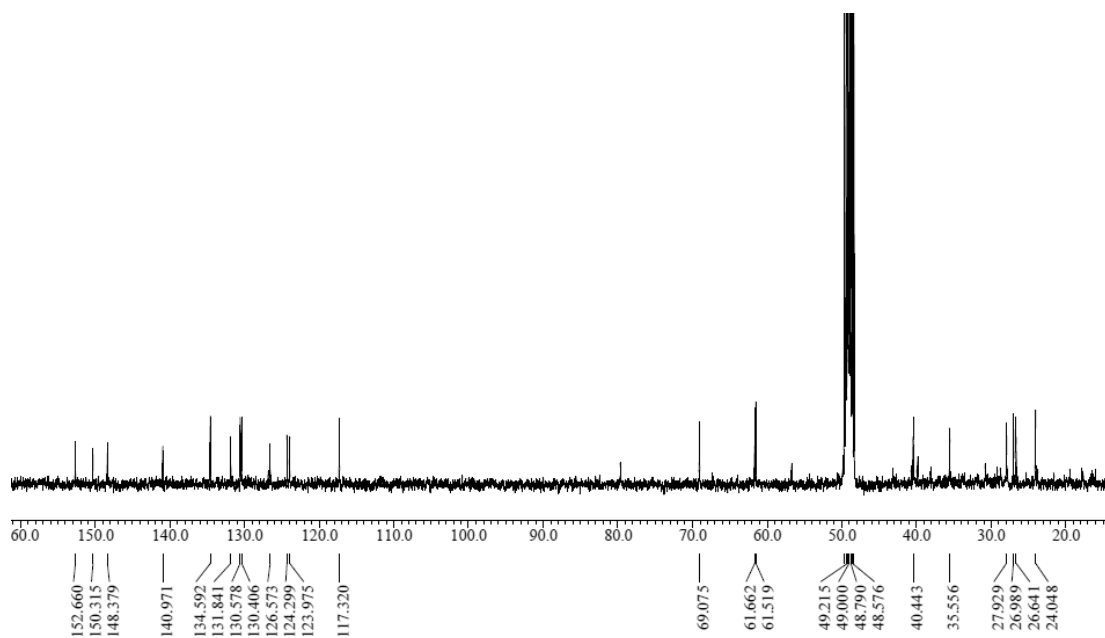


Figure 17.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **4** in methanol- $d_4$ .

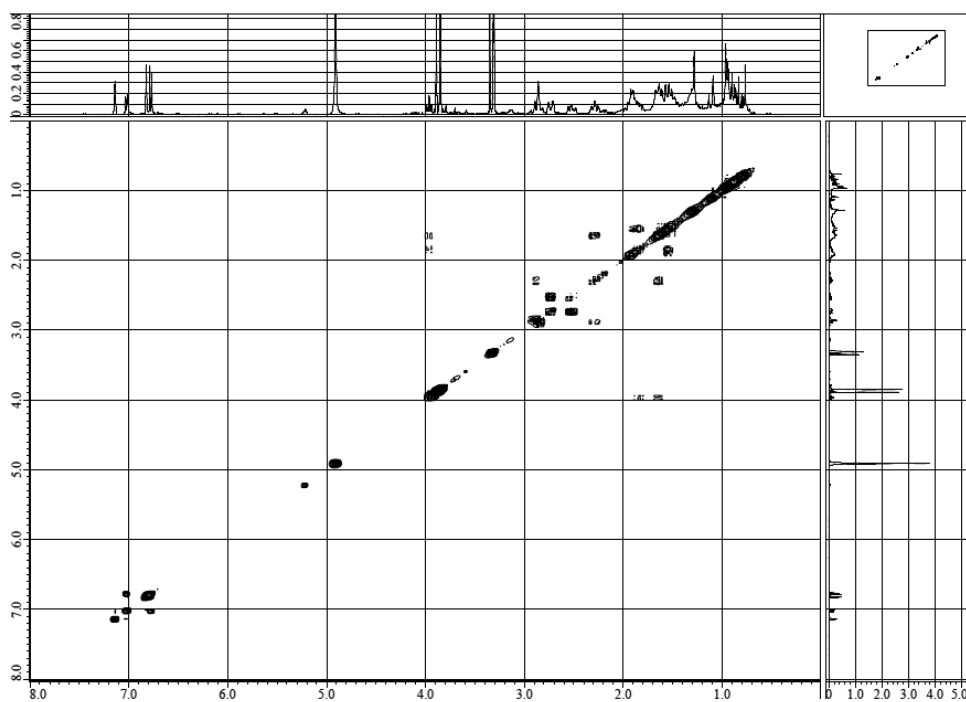


Figure 18. COSY NMR spectrum of compound **4** in methanol- $d_4$ .

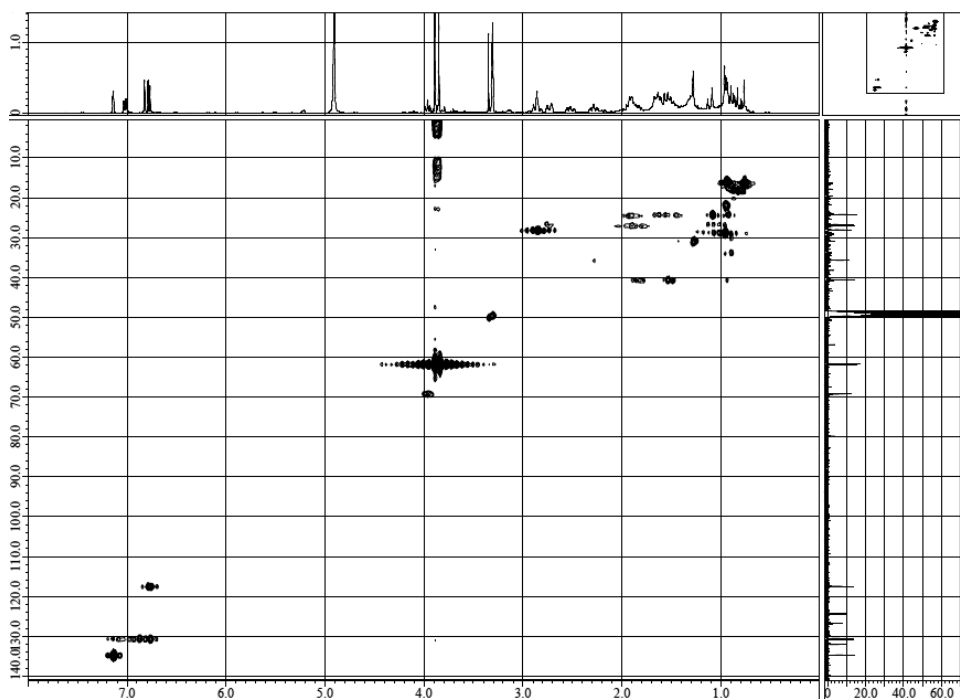


Figure 19. HMQC NMR spectrum of compound **4** in methanol- $d_4$ .

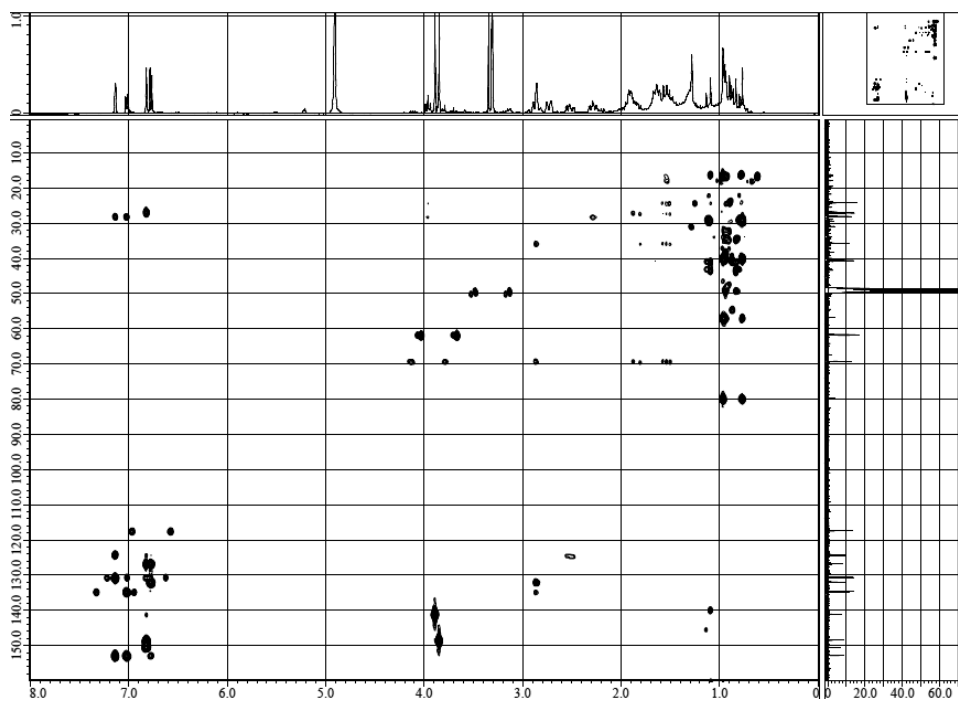


Figure 20. HMBC NMR spectrum of compound 4 in methanol- $d_4$ .

#### 4) Compound 5, 6, 7

Compound 5는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 통해 총 13개의 carbon peak가 확인되었으며, 이 중  $\delta_{\text{C}}$  146.8과  $\delta_{\text{C}}$  108.6의 signal들은 대칭 carbon으로 나타났고, 총 15개의 carbon peak들을 통해 flavonoid 계열의 화합물로 예상할 수 있었다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.34 (2H, s)를 통해 flavonoid의 B환이 대칭구조의 형태를 가지고 있을 것이라 예상할 수 있었으며, 또한  $\delta_{\text{H}}$  6.37 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)과  $\delta_{\text{H}}$  6.17 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)의 signal을 통해 flavonoid A환이 *meta*-coupling을 하고 있을 것이라 예측하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>37</sup>과 비교하여 compound 5는 myricetin임을 확인하였다(Figure 21-23, Table 5).

Compound 6은  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 통해 compound 5에 당이 결합된 구조로 예상할 수 있었으며, 당의 형태는  $\delta_{\text{C}}$  103.8, 73.5, 72.3, 72.2, 72.0, 17.8의 6개의 carbon peak들과  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 나타난  $\delta_{\text{H}}$  5.32 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz), 0.96 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz)의 특성 peak들을 통해  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside로 예상하였다. 이를 바탕으로 compound 6은 myricetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, 관용명은 myricitrin으로 동정하였고 문헌<sup>38</sup>과 일치함을 확인하였다(Figure 21, 24, 25, Table 5).

Compound 7은  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 비교한 결과, compound 6과 비슷한 형태를 보이는 flavonoid 배당체로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.33 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 7.30 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.0$  Hz), 6.91 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz)의 signal들을 통해 flavonoid의 B환이 서로 *ortho*-, *meta*-coupling을 하고 있음을 예상할 수 있었다. 이를 바탕으로 문헌<sup>63</sup>과 비교하여 compound 7은 quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, 관용명으로는 quercitrin임을 확인하였다(Figure 21, 26, 27, Table 5).



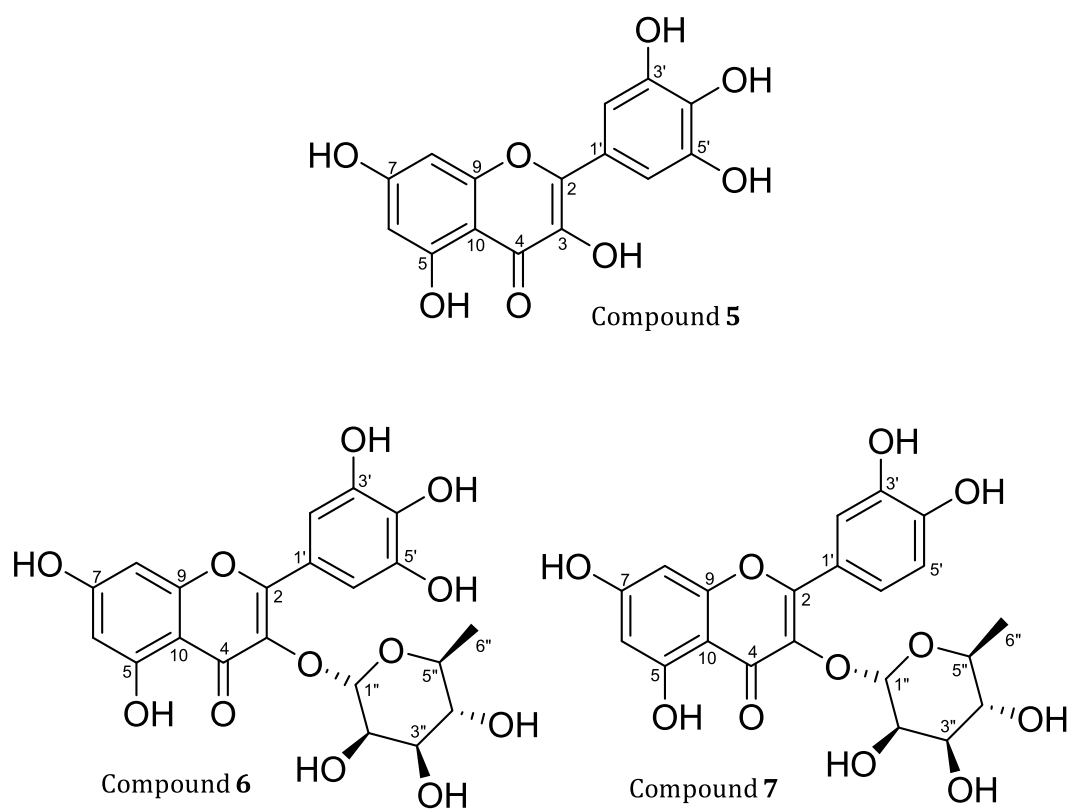


Figure 21. Chemical structures of isolated compounds 5-7 from *P. villosa* branches.

Table 5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **5-7** (500 and 125 MHz, methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>		Compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
2	148.1		159.6		158.7	
3	137.5		136.5		136.3	
4	177.4		179.8		179.7	
5	162.6		163.4		159.3	
6	94.5	6.17 (1H, d, 2.0)	99.9	6.20 (1H, d, 2.0)	100.0	6.18 (1H, d, 2.0)
7	165.7		166.0		166.9	
8	99.3	6.37 (1H, d, 2.0)	94.8	6.36 (1H, d, 2.0)	95.0	6.35 (1H, d, 2.0)
9	158.3		158.7		163.3	
10	104.6		106.0		105.8	
1'	123.2		122.1		123.1	
2'	108.6	7.34 (1H, s)	109.7	6.95 (1H, s)	117.3	7.33 (1H, d, 2.0)
3'	146.8		147.0		146.6	
4'	137.0		138.0		150.0	
5'	146.8		147.0	6.95 (1H, s)	116.5	6.91 (1H, d, 8.5)
6'	108.6	7.34 (1H, s)	109.7		123.0	7.30 (1H, dd, 8.5, 2.0)
1"			103.8	5.32 (1H, d, 1.5)	103.5	5.34 (1H, d, 1.5)
2"			72.0	4.22-3.51	72.2	4.20-3.50
3"			72.3	(4H, sugar H)	72.2	(4H, sugar H)
4"			73.5		73.3	
5"			72.2		72.0	
6"			17.8	0.96 (3H, d, 6.1)	17.8	0.94 (3H, d, 6.0)

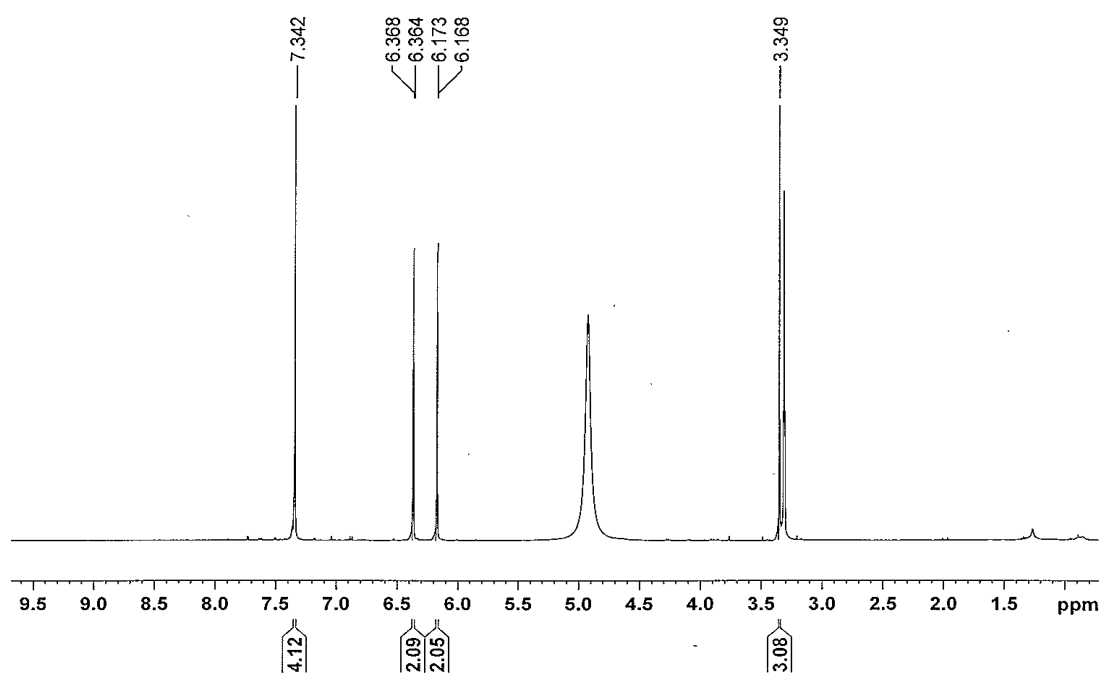


Figure 22.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **5** in methanol- $d_4$ .

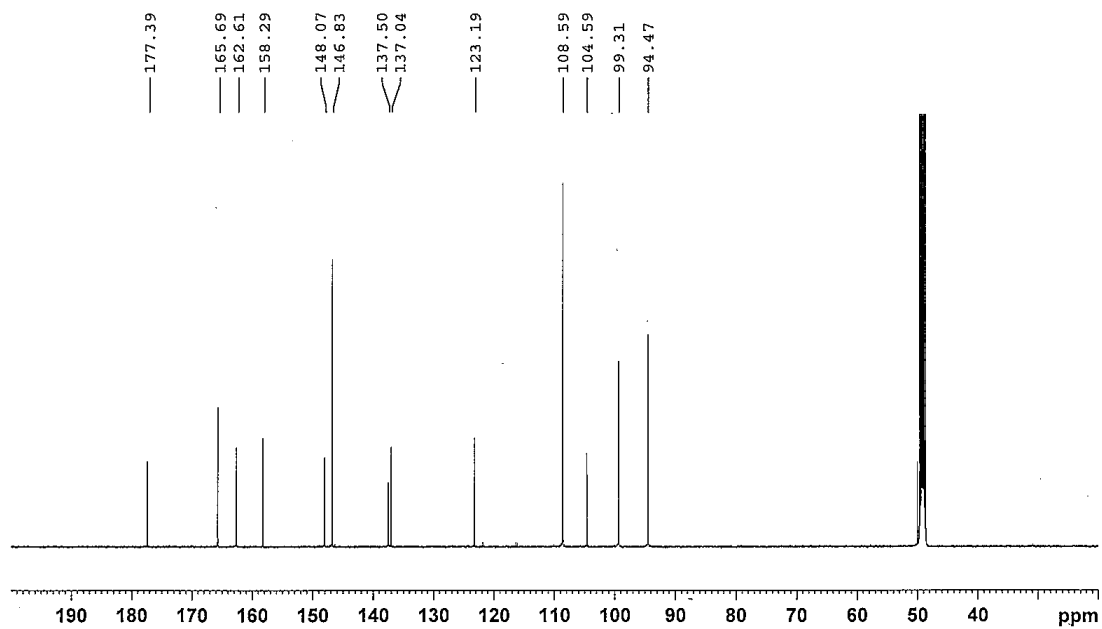


Figure 23.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **5** in methanol- $d_4$ .

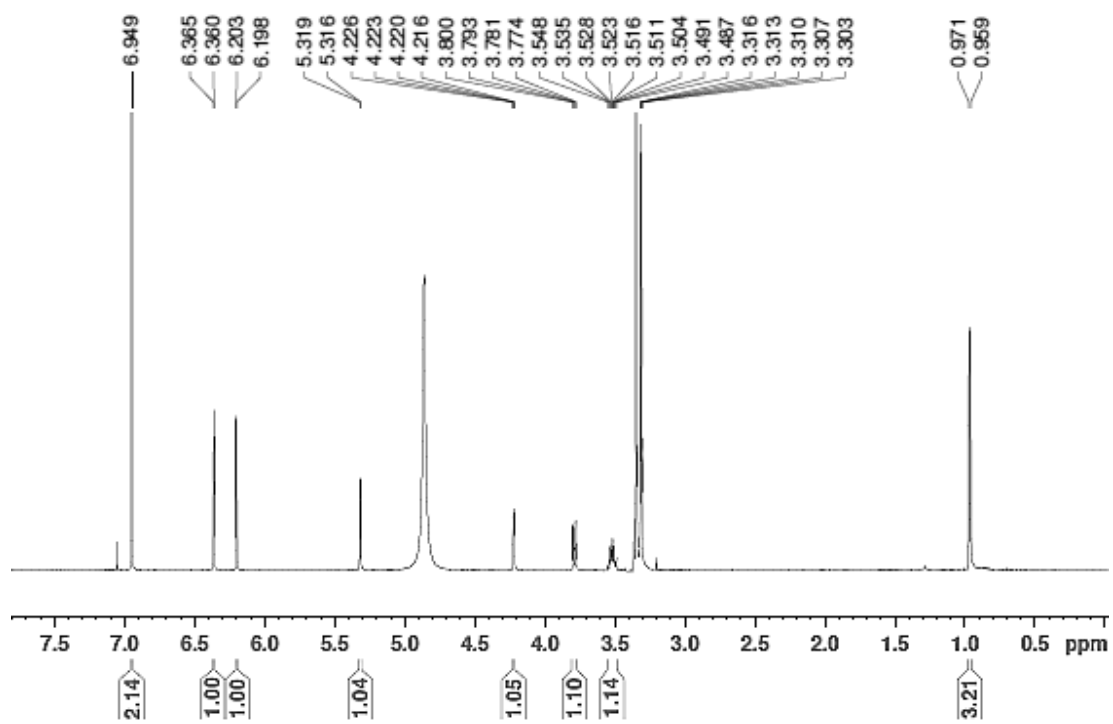


Figure 24.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **6** in methanol- $d_4$ .

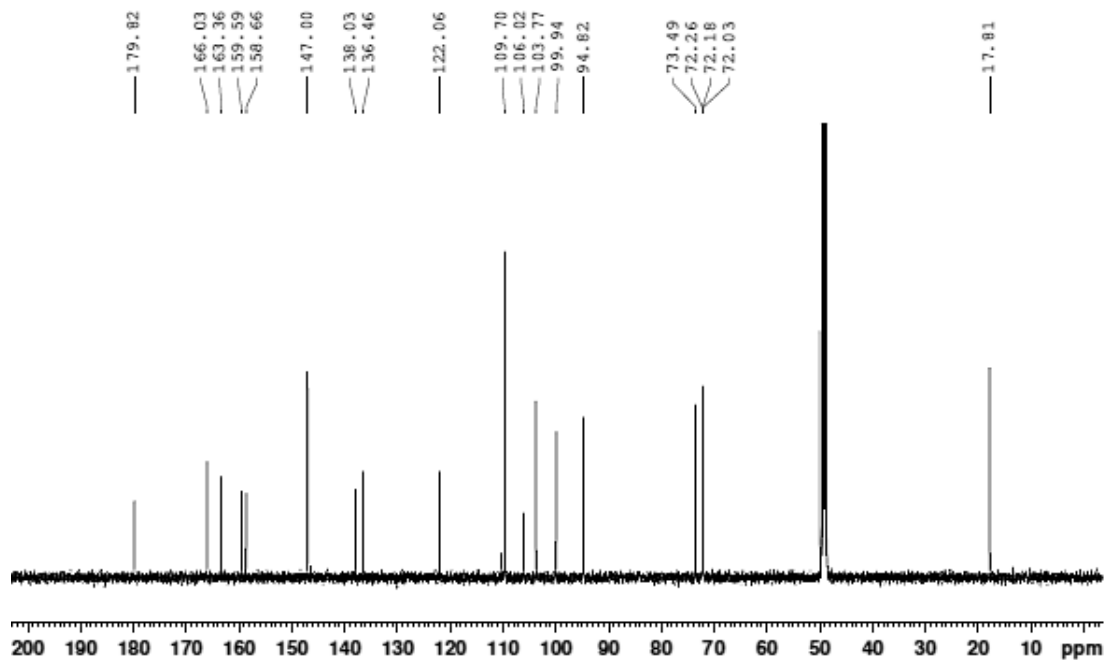


Figure 25.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **6** in methanol- $d_4$ .

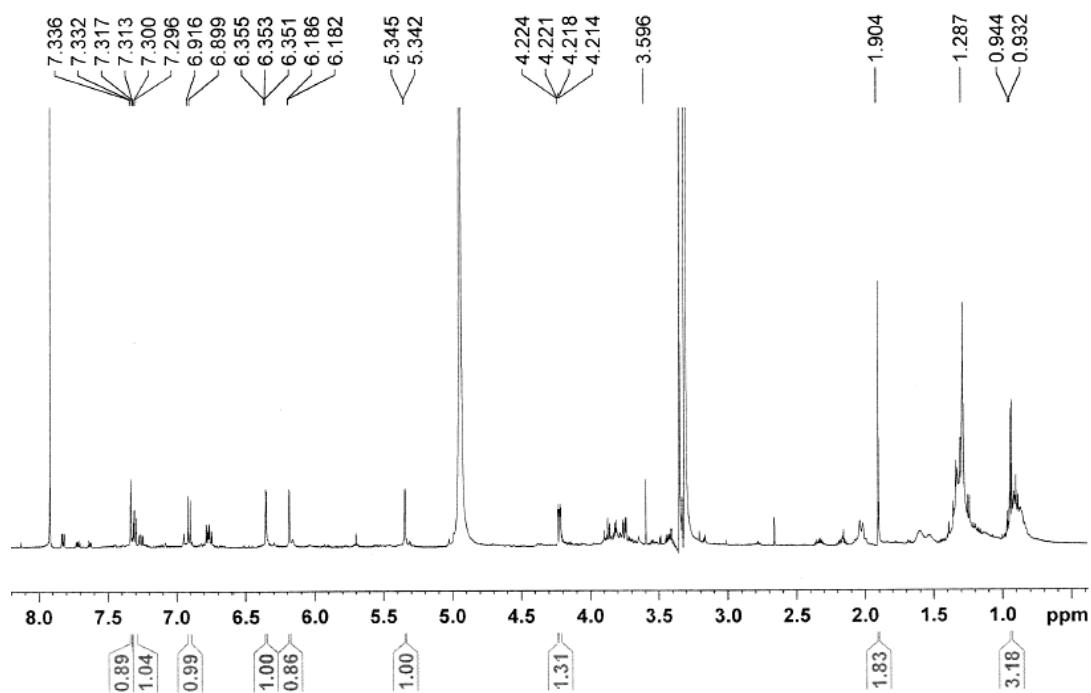


Figure 26.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **7** in methanol- $d_4$ .

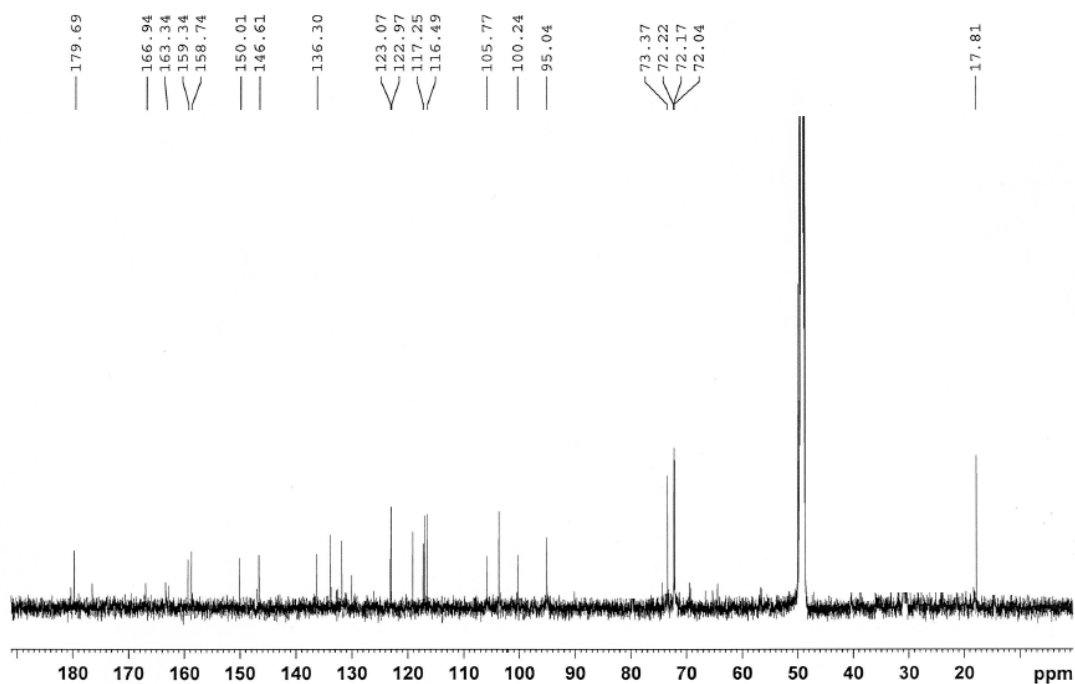


Figure 27.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **7** in methanol- $d_4$ .

#### 4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항산화

###### (1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 검정곡선을 이용하여 윤노리나무 가지 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서  $244.7 \pm 2.8$  mg/g GAE, 분획물 중 EtOAc 및 BuOH fraction에서 각각  $294.9 \pm 5.8$ ,  $288.1 \pm 0.9$  mg/g GAE로 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 28).

또한 총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin의 검정곡선을 이용하여 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었으며, 실험 결과 추출물과 분획물 중 EtOAc fraction에서  $194.7 \pm 3.3$  mg/g QE로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 29).

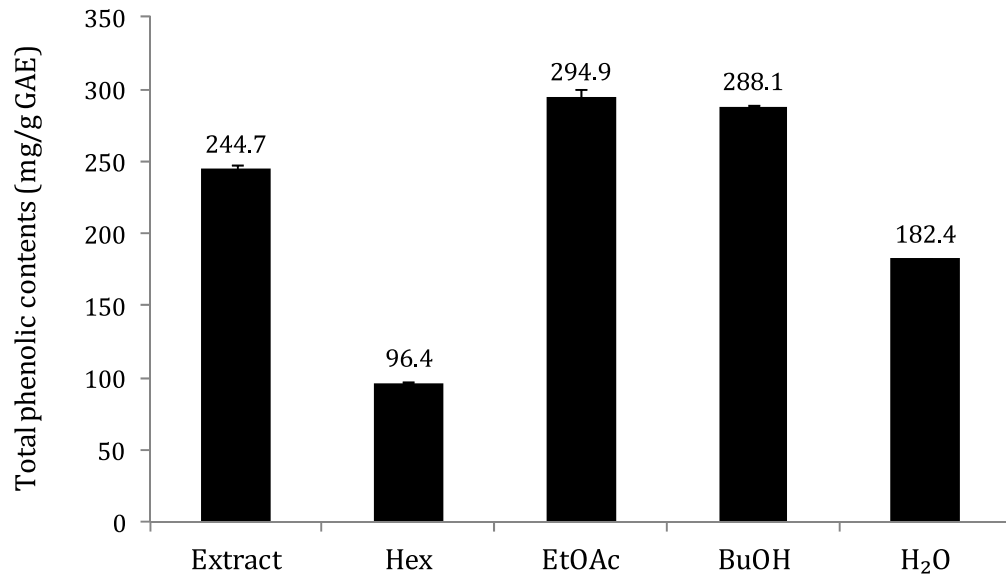


Figure 28. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from *P. villosa* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

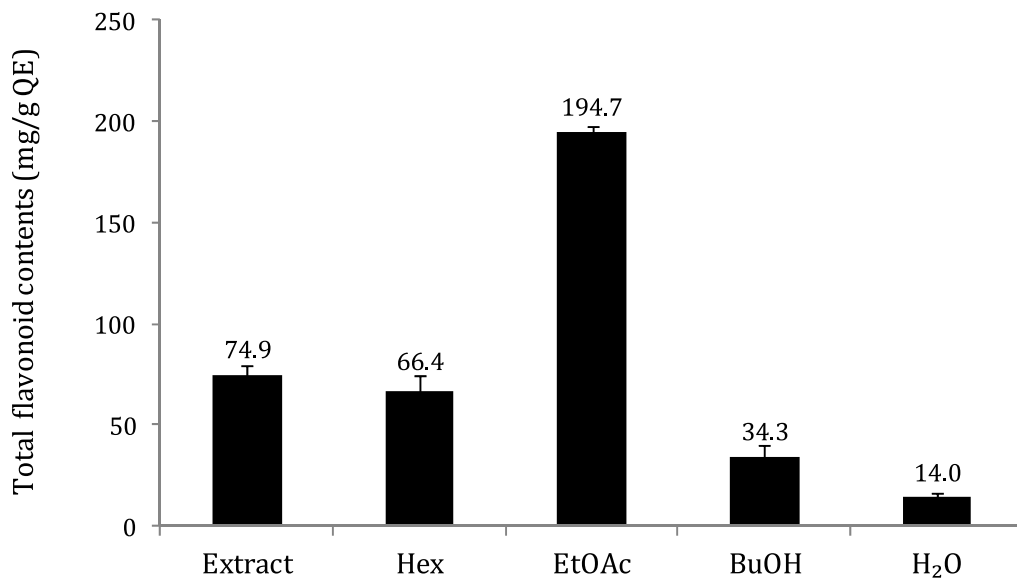


Figure 29. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *P. villosa* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(2) DPPH radical 소거 활성

윤노리나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들에 대하여 3.13-100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각의 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

그 결과, Hex 분획물을 제외한 추출물, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 13.8, 10.8, 10.0, 17.1 µg/mL로 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid (SC<sub>50</sub> = 8.8 µg/mL) 만큼의 DPPH radical 소거활성이 있음을 확인하였다 (Figure 30, Table 18).

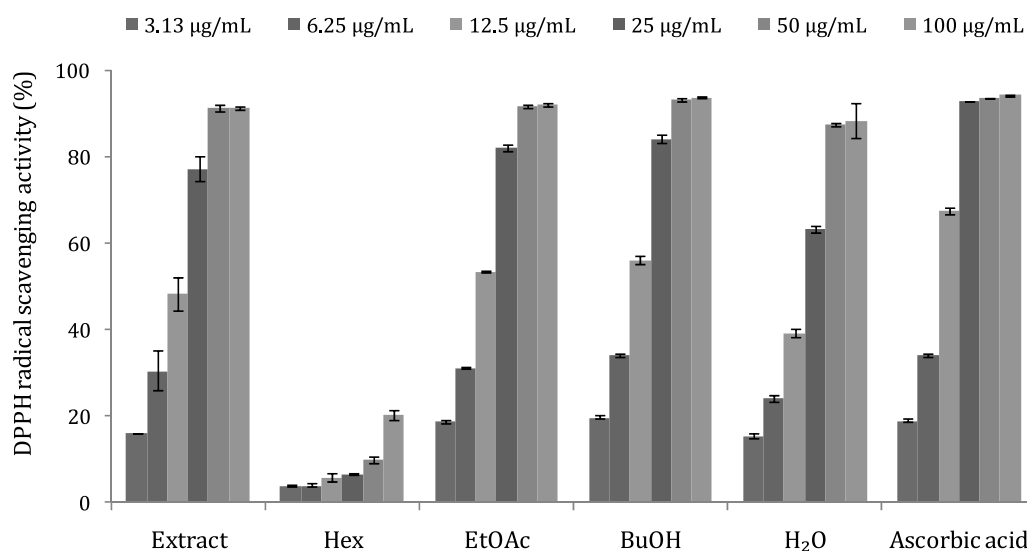


Figure 30. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. villosa* branches. The data are expressed as a percentage and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 6. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. villosa* branches.

	Extract	Hex	EtOAc	BuOH	H <sub>2</sub> O	Ascorbic acid
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	13.8	>100	10.8	10.0	17.1	8.8



### (3) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

윤노리나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들에 대하여 3.13-100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각의 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

그 결과, 추출물, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 6.7, 5.1, 5.7, 11.3 µg/mL로 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid (SC<sub>50</sub> = 15.5 µg/mL) 보다 높은 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성이 있음을 확인하였다(Figure 31, Table 7).

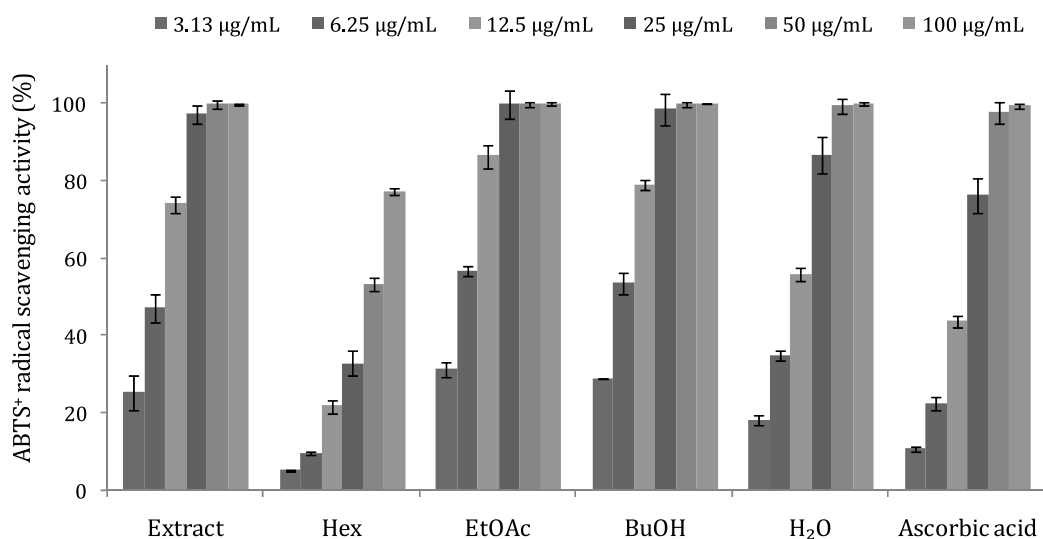


Figure 31. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. villosa* branches. The data are expressed as a percentage and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 7. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. villosa* branches.

	Extract	Hex	EtOAc	BuOH	H <sub>2</sub> O	Ascorbic acid
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	6.7	43.7	5.1	5.7	11.3	15.5

## 2) 항염

### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell을 이용하여 윤노리나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 우선 추출물 및 각 분획물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 실험을 진행한 결과, 추출물은 세포독성 없이 14.5%의 NO 생성 억제를 나타냈으며, 특히 EtOAc 분획물이 세포독성 없이 NO 생성을 54.1% 억제함을 확인할 수 있었다(Figure 32).

위 결과를 바탕으로 NO 생성 억제 활성이 우수했던 EtOAc 분획물에 대하여 추가적으로 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과, 윤노리나무 가지 EtOAc 분획물은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 이하에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시킴을 확인할 수 있었다(Figure 33).

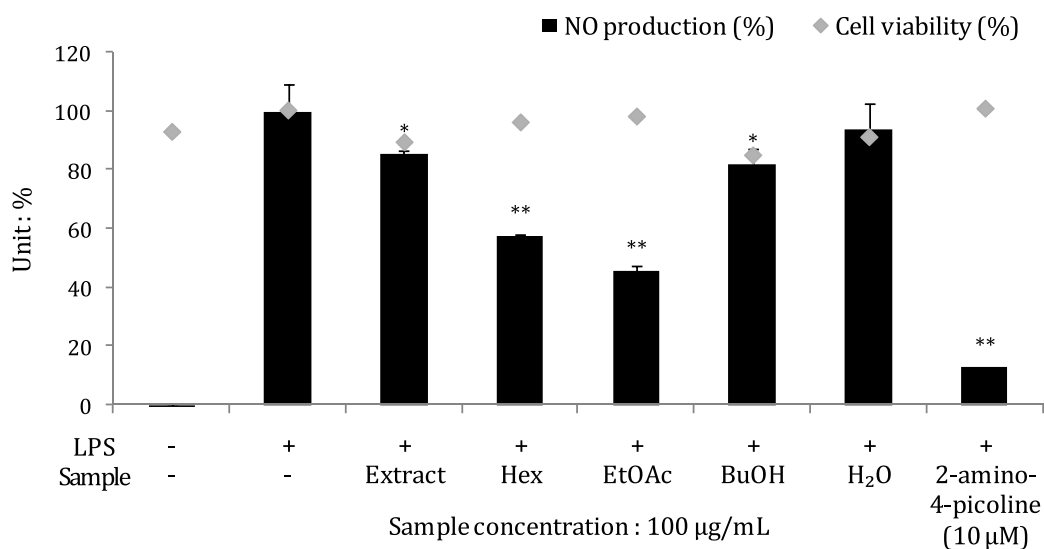


Figure 32. Nitric oxide production and cell viability effects of extract and solvent fractions of *P. villosa* branches in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  <0.05; \*\* $p$  <0.01

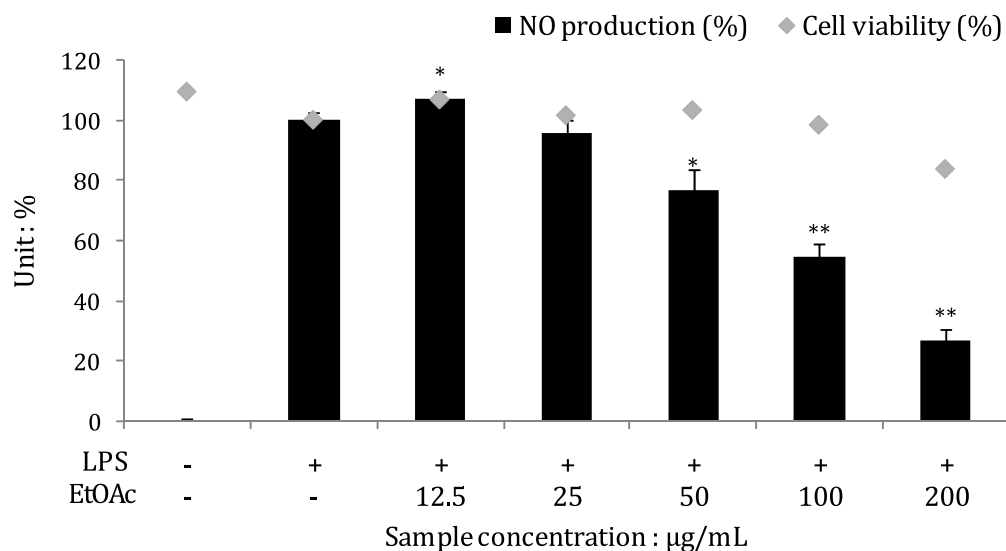


Figure 33. Nitric oxide production and cell viability effects of ethyl acetate fraction of *P. villosa* branches in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  <0.05; \*\* $p$  <0.01

(2) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성

윤노리나무 가지 EtOAc 분획물에 대하여 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 측정  
한 결과, iNOS 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었  
으며 이는 NO 생성 억제 평가 결과와도 같은 경향을 나타내는 것을 알 수 있었  
다. 하지만 COX-2의 경우 유의적인 억제 활성을 나타내지 않음을 확인하였다  
(Figure 34).

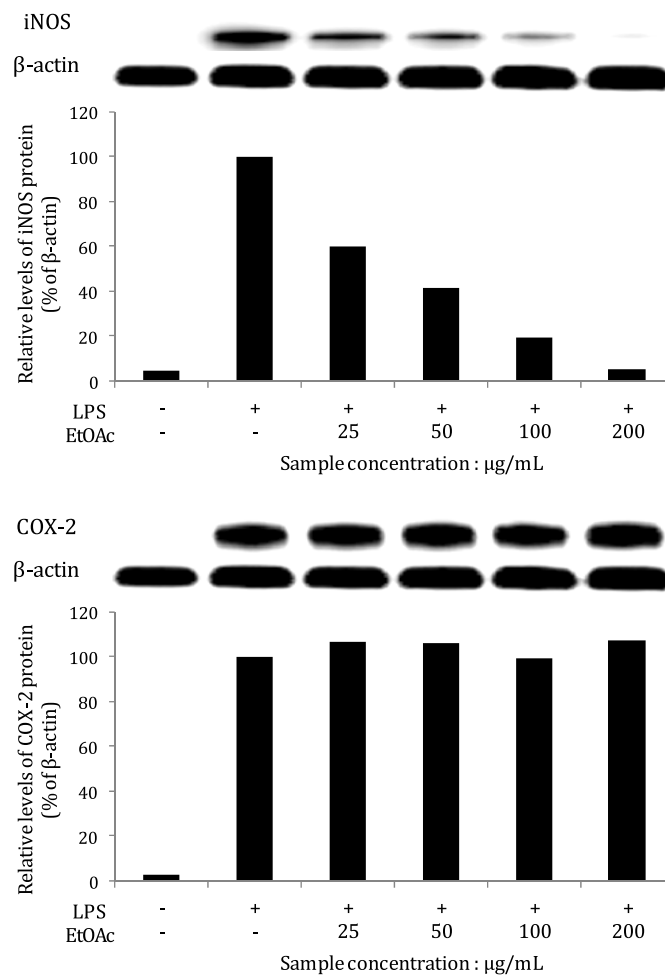


Figure 34. Effects of ethyl acetate fraction from *P. villosa* branches on the levels of iNOS and COX-2 protein in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The iNOS or COX-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of  $\beta$ -actin.

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항산화

#### (1) DPPH radical 소거 활성

윤노리나무 가지로부터 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물들에 대하여 3.13-100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하여  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다.

그 결과, compound 5, 6, 7의  $\text{SC}_{50}$  값이 각각 11.6, 15.1, 23.3  $\mu\text{M}$ 로 대조군인 L-ascorbic acid ( $\text{SC}_{50} = 48.0 \mu\text{M}$ )보다 낮은  $\text{SC}_{50}$  값을 나타냈으며 이들 화합물들이 우수한 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figure 35, Table 8).

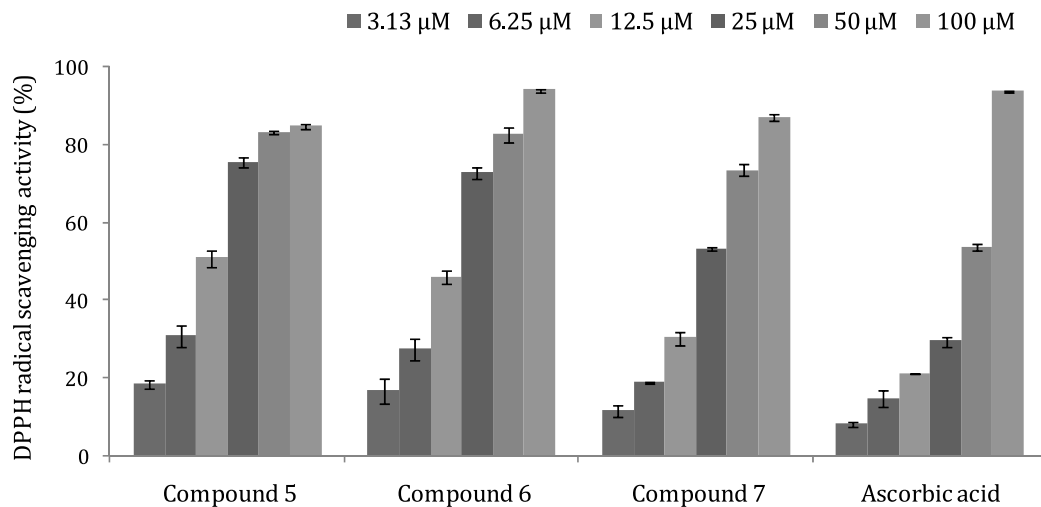


Figure 35. DPPH radical scavenging activities of isolates 5-7 from *P. villosa* branches. The data are expressed as a percentage and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 8. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of isolates 1-7 from *P. villosa* branches.

Compound No.	Compound name	SC <sub>50</sub> (μM)
1	Ursolic acid	>100
2	Arjunolic acid	>100
3	Daucosterol	>100
4	Myricanol	>100
5	Myricetin	11.6
6	Myricitrin	15.2
7	Quercitrin	23.3
Positive control	L-Ascorbic acid	48.0

## (2) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

윤노리나무 가지로부터 분리된 화합물의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물들에 대하여 3.13-100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하여 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

그 결과, compound 5, 6, 7의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 5.4, 7.9, 15.8  $\mu\text{M}$ 로 대조군인 L-ascorbic acid (SC<sub>50</sub> = 25.0  $\mu\text{M}$ )보다 좋은 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성이 있음을 확인할 수 있었다.(Figure 36, Table 9).

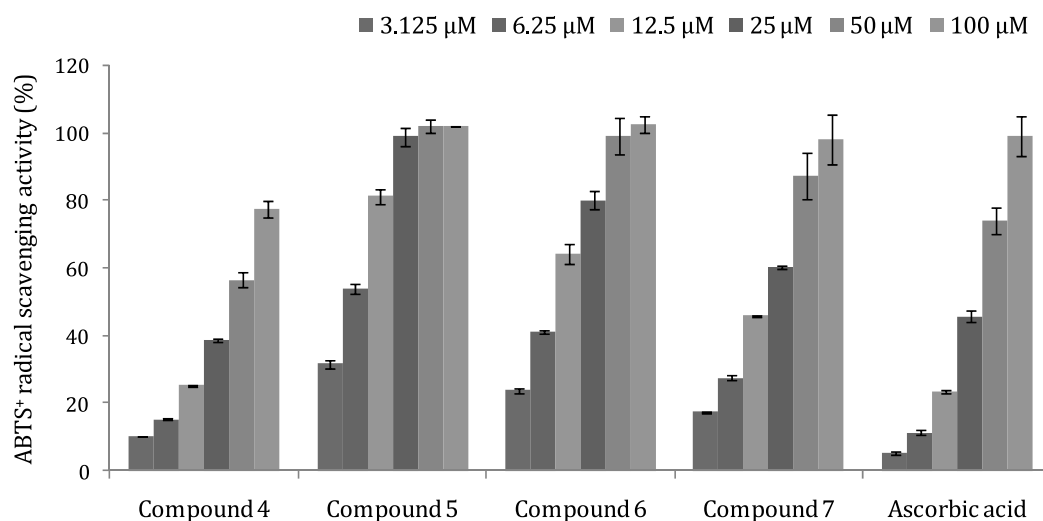


Figure 36. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of isolates 4-7 from *P. villosa* branches. The data are expressed as a percentage and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 9. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of isolates 1-7 from *P. villosa* branches.

Compound No.	Compound name	SC <sub>50</sub> (μM)
1	Ursolic acid	>100
2	Arjunolic acid	>100
3	Daucosterol	>100
4	Myricanol	38.2
5	Myricetin	5.4
6	Myricitrin	7.9
7	Quercitrin	15.8
Positive control	L-Ascorbic acid	25.0



## 2) 항염

### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell을 이용하여 윤노리나무 가지로부터 분리된 화합물들의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 우선 각 화합물들을 100  $\mu$ M 농도로 실험을 진행한 결과, compound 4가 세포독성 없이 NO 생성을 81.4% 억제함을 확인하였다. Compound 1의 경우, 70.8%의 NO 생성 억제 효과를 나타내었으나 세포 생존율이 34.8%로 세포독성에 의한 결과임을 예상할 수 있었다(Figure 37).

이 결과를 바탕으로 NO 생성 억제 활성이 우수했던 compound 4에 대하여 추가적으로 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M 농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과, compound 4는 100  $\mu$ M 농도 이하에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시킴을 확인할 수 있었다(Figure 38).

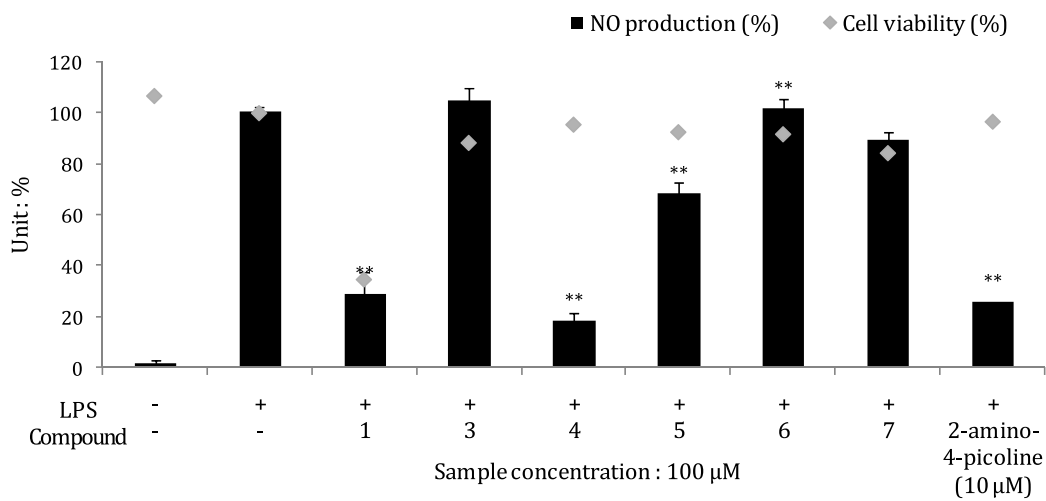


Figure 37. Nitric oxide production and cell viability effects of isolated compounds from *P. villosa* branches in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p < 0.01$

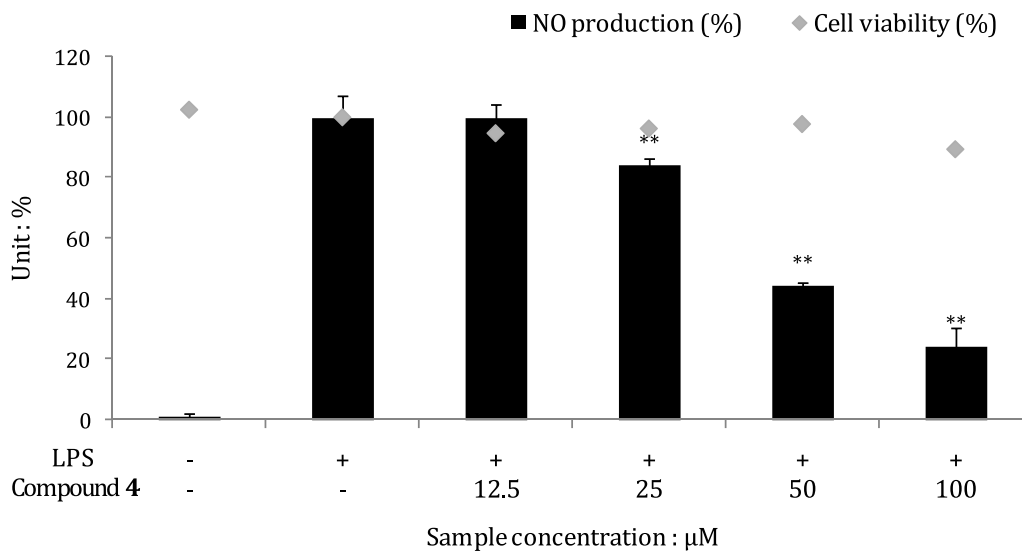


Figure 38. Nitric oxide inhibition and cell viability effects of isolated compound 4 isolated from *P. villosa* branches in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p < 0.01$

(2) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성

실험결과 compound 4는 NO 생성과 관련된 iNOS 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 이는 NO 생성 억제 평가 결과와도 같은 경향을 나타내는 것을 알 수 있었다. 하지만 COX-2 단백질의 경우는 유의적인 억제 활성을 나타내지 않음을 확인하였다(Figure 39).

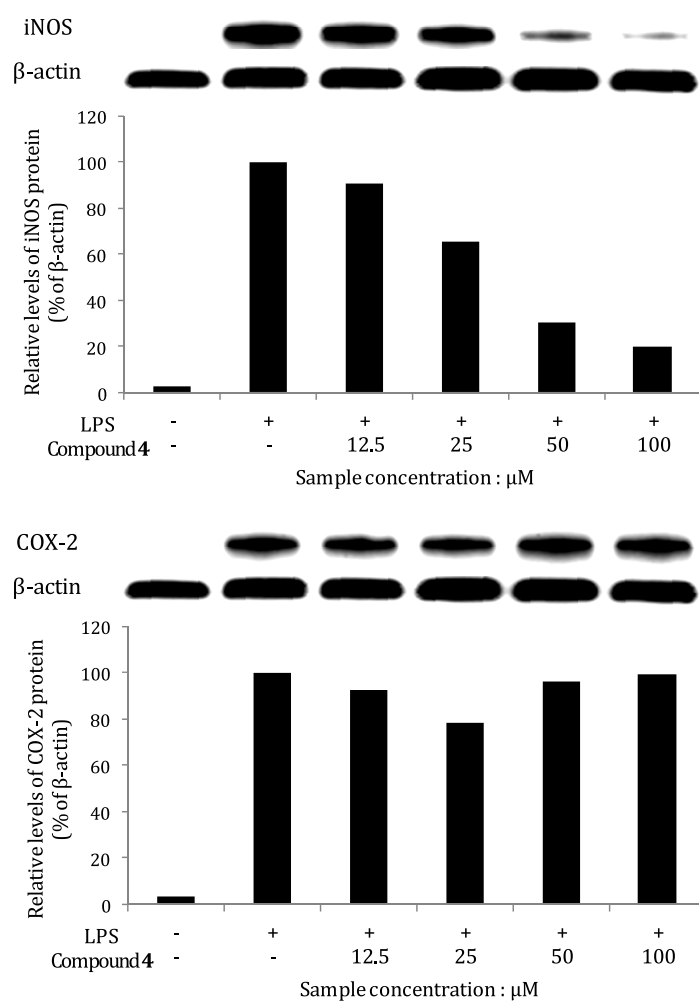


Figure 39. Effects of isolated compound 4 from *P. villosa* branches on the levels of iNOS and COX-2 protein in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The iNOS or COX-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin.

(3) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell을 이용하여 윤노리나무 가지로부터 분리된 compound 4에 대한 전염증성 cytokine인 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  및 IL-6 생성 억제 활성을 확인하였다. 실험 결과 compound 4는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 40).

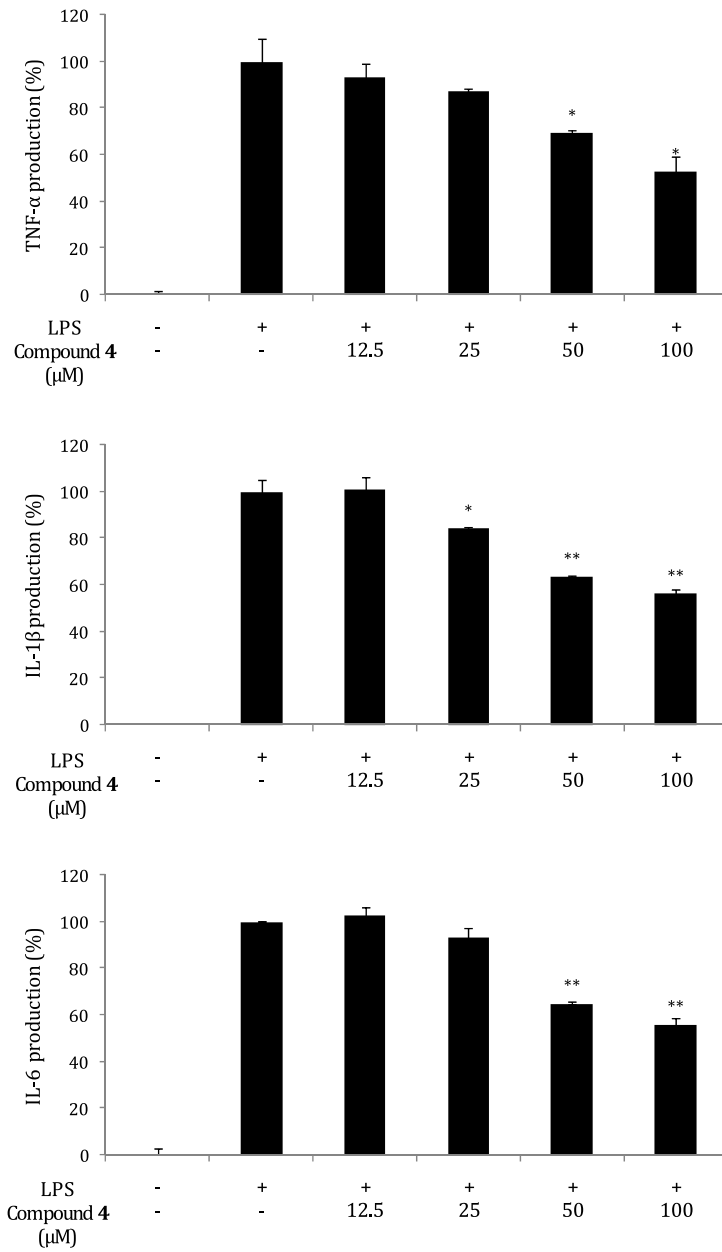


Figure 40. Effect of isolated compound 4 from *P. villosa* branches on production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01

## 6. 연구결과 및 고찰

현재까지 추출물의 항산화 및 항염 활성만이 알려져 있던 윤노리나무 (*Pourthiaea villosa*) 가지의 활성 성분을 알아보기 위하여 화합물 분리 및 구조 동정을 실시하였으며, 분리된 화합물에 대하여 기능성 화장품의 천연소재로서의 응용 가능성을 모색해보고자 본 연구를 진행하게 되었다.

윤노리나무 가지 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 및 water 분획물을 얻었다. 이들 중 EtOAc 분획물에 대하여 vacuum liquid chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography 및 순상 silica gel column chromatography 등을 수행하여 단일물질로 분리하고,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR을 이용하여 분리된 화합물들의 구조를 확인하였으며 문헌과 비교하여 총 7개의 화합물을 분리, 동정하였다.

분리된 화합물은 ursolic acid (1), arjunolic acid (2), daucosterol (3), myricanol (4), myricetin (5), myricitrin (6), quercitrin (7)으로 확인되었다. 분리된 화합물 중 compound 1-6은 윤노리나무에서 처음 분리된 화합물들이다.

윤노리나무 가지에 대한 항산화 활성을 확인하기 위하여 추출물과 분획물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과, EtOAc와 BuOH 분획물에서 각각 294.9, 288.1 mg/g GAE로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량은 EtOAc 분획물이 194.7 mg/g QE로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성 실험에서, Hex 분획물을 제외한 추출물과 분획물 모두에서 대조군인 L-ascorbic acid 만큼의 radical 소거활성을 나타내었다. 분리된 화합물에 대한 항산화 활성 실험 결과, DPPH radical 소거활성 실험에서는 compound 5-7의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 11.6, 15.2, 23.3 μM로 대조군인 L-ascorbic acid (SC<sub>50</sub> = 48.0 μM) 보다 우수한 DPPH radical 소거 활성을 보였으며, ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성 실험에서는 compound 4-7의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 38.2, 5.4, 7.9, 15.8 μM로 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 있음을 확인하였다.

Mouse의 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 윤노리나무 가지의 항염 활

성을 확인한 결과, 추출물과 분획물 중 EtOAc 분획물이 100 µg/mL 이하의 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰으며, Western 실험 결과 윤노리나무 가지 EtOAc 분획물이 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현을 억제시킴으로써 NO의 생성을 감소시키는 것으로 확인되었다. 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험에서는, compound 4가 100 µM 이하의 농도에서 세포독성 없이 가장 높은 NO 생성 억제 효과를 나타내었으며, Western blot 실험 결과, compound 4가 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 저해시킴으로써 NO 생성을 억제시키는 것이 관찰되었으며, 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β)의 생성을 억제하는 것을 확인하였다.

Diarylheptanoid 화합물들의 항염 활성은 이미 여러 논문<sup>39,40,41</sup>들을 통해 보고되었으며, 특히 compound 4 (myricanol)와 이전 연구를 통해 소사나무에서 분리한 carpinontriol A, B는 cyclic diarylheptanoid 화합물로 강한 NO 생성 억제 효과<sup>42</sup>를 나타냄을 확인할 수 있었고, 이는 화합물들의 구조적인 특징에 의하여 항염 효과가 나타나는 것이라 예상해볼 수 있었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 윤노리나무 가지 추출물을 이용한 천연 항산화 및 항염증 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

## 제 2 절 제주 흑무 뿌리 추출물의 미백 및 항염 활성 성분 연구

### 1. 재료

무는 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 식용 작물로서 스페인, 중국, 터키, 러시아 등 전 세계적으로 분포되어 재배되고 있으며, 스페인, 중국, 러시아에서는 전통 약용작물로 알려져 있고 우리나라에서도 민간요법으로 많이 활용되어 왔다.<sup>43</sup>

제주의 월동 무는 감귤에 이어 단일품목 조수입 2위, 채소 작물로는 조수입 1위 작물로 전국 생산량에서 차지하는 비중이 약 28%에 달할 만큼 지역 집중도가 높은 지역 향토 농산물로 자리매김 하고 있다.<sup>44</sup>

하지만 무의 주 소비원은 전통 식품인 김치를 포함한 단무지, 쌈무 등의 요리 재료나 전통적 가공식품인 무말랭이, 무청을 이용한 시래기 등에 그 활용도가 매우 제한적이다.<sup>45</sup> 또한, 월동 무로 재배되는 무는 백무가 97%를 차지하고 있는 만큼 과잉 생산 시 가격불안정 및 시장격리로 인해 상당한 양의 무가 폐기 처분되어 생산농가의 경제적 손실을 야기하게 된다. 이에 무를 활용한 새로운 가공 제품을 개발하거나, 유색 무와 같은 다양한 품종의 무 재배가 고려될 필요가 있다.

흑무(*Raphanus sativus* L. var. *niger*)는 무의 유색 무 품종 중 하나로 유럽에서는 채소보다는 약용으로 많이 사용되어 온 작물이다. 백무와 달리 껍질이 검정색인 것이 특징이며, 껍질 추출물은 그람양성균 및 음성균에 대하여 항균 활성<sup>46</sup>이 있는 것으로 보고되어 있다. 유색 무의 이러한 특징적인 색상은 식물의 색소 성분인 안토시아닌(anthocyanin)에 의해 결정되게 되는데, 무에서 분리된 안토시아닌 성분으로는 적무(red radish)로부터 pelargonidin 3-sophoroside-5-glucoside와 같은 pelargonidin 배당체에 대한 성분 연구<sup>47,48</sup>가 이루어져 있으며, 흑무에 대해서는 아직 보고된 바 없다. 하지만 흑무와 같은 블랙 푸드의 안토시아닌 성분을 살펴보자면, 서리태, 서목태, 흑미, 블루베리, 블랙커런트 등에서 delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside,



cyanidin-3-arabinoside 등의 안토시아닌 성분이 있는 것으로 보고되었다.<sup>49,50</sup> 이러한 안토시아닌 성분은 항산화 및 항염 활성을 나타내며 세포증식 억제 및 세포사멸유도 등을 통해 강력한 항암 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>51</sup>

최근 보고에 의하면 흑무에는 다량의 glucosinolate 성분이 함유 되어 있으며, 그에 대한 항암 효과<sup>52,53</sup> 및 체내 콜레스테롤 수치를 낮춰주어 혈관 질환을 개선시켜주는 효과<sup>54</sup>가 있는 것으로 알려져 있고, 흑무 뿌리 착즙액에 대한 항산화 활성<sup>55</sup>이 보고되어 있다. 흑무에 대한 성분 연구로는 흑무 종자로부터 isothiocyanate를 포함한 휘발성 성분의 분리<sup>56</sup>와 무에 많이 함유되어 있다고 알려진 glucosinolate 성분에 대한 HPLC 분석<sup>57</sup>만이 이루어져 있으며, 이러한 연구들은 대부분 흑무 뿌리만을 대상으로 한 연구가 주를 이루고 있다.

이에 본 연구에서는 흑무(뿌리 및 지상부)에 대하여 기능성화장품 소재로써의 활용 가능성을 알아보고자 다양한 생리활성 실험 및 활성 성분에 관한 연구를 진행하였다.

실험에 사용한 흑무 뿌리는 2016년 12월에 제주 성산읍에서 채집하였다. 채집한 흑무 뿌리는 물로 세척한 후에 동결 건조기에서 96시간 동안 건조시켰으며, 건조물은 분쇄한 후 추출 과정에 사용하였다.



Figure 41. Picture of black radish roots.

## 2. 흑무 뿌리의 추출, 분획 및 분리

### 1) 시료의 추출 및 분획

건조 및 분쇄된 흑무 뿌리 500.0 g을 70% 에탄올 5 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 추출액을 여과하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과한 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 152.0 g을 얻었다. 이 중 추출물 30 g씩을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 흑무 뿌리 에탄올 추출물 총 120.0 g을 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (0.53 g), ethyl acetate (1.6 g), *n*-butanol (16.5 g) 및 water (101.2 g) 분획물을 얻었다(Figure 42).

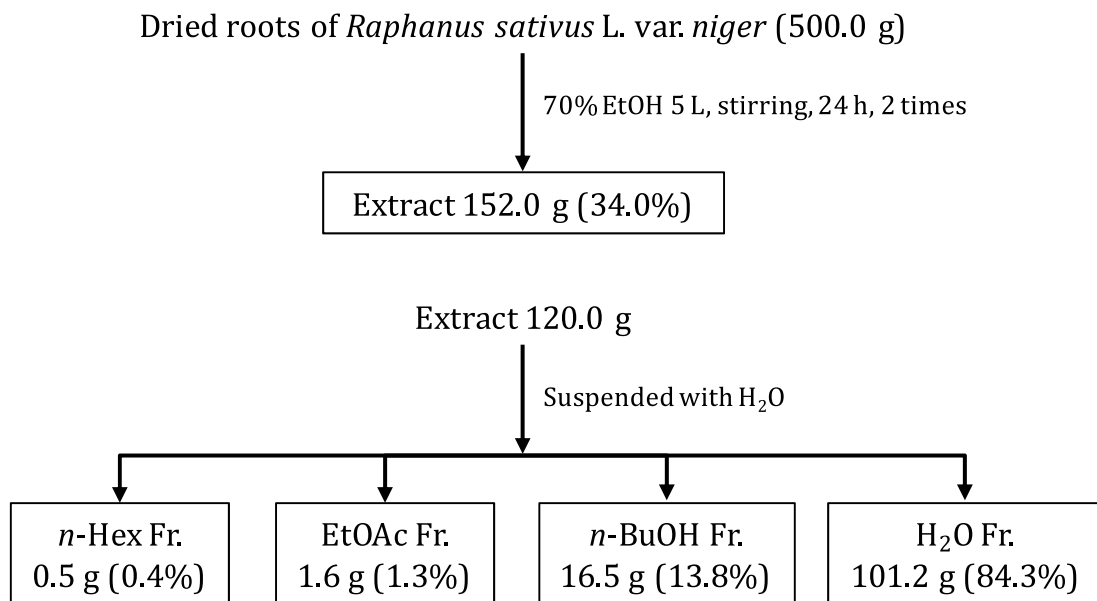


Figure 42. Extraction and fractionation of black radish roots.

## 2) Ethyl acetate 분획물로부터 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 1.0 g을 분획하기 위하여 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. *n*-Hex/EtOAc (0-100%), EtOAc/MeOH (0-100%)로 용매 극성을 10%씩 높이는 방법으로 각 100 mL씩 용출시켜 총 21개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-V21)

VLC fraction들 중 Fr. V4와 V5 (30-40% EtOAc in Hex)를 합한 75.5 mg을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (25:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound 3 (14.3 mg), compound 4 (19.0 mg), compound 5 (17.7 mg)을 얻었으며, Fr. V8 (70% EtOAc in Hex) 55.7 mg을 H<sub>2</sub>O-MeOH (4:6)의 조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 1 (14.7 mg)을 분리하였다.

Fr. V7 (60% EtOAc in Hex) 43.4 mg과 Fr. V10 (90% EtOAc in Hex) 10.0 mg은 각각 단일화합물인 compound 6과 compound 2로 확인되었다 (Figure 43).

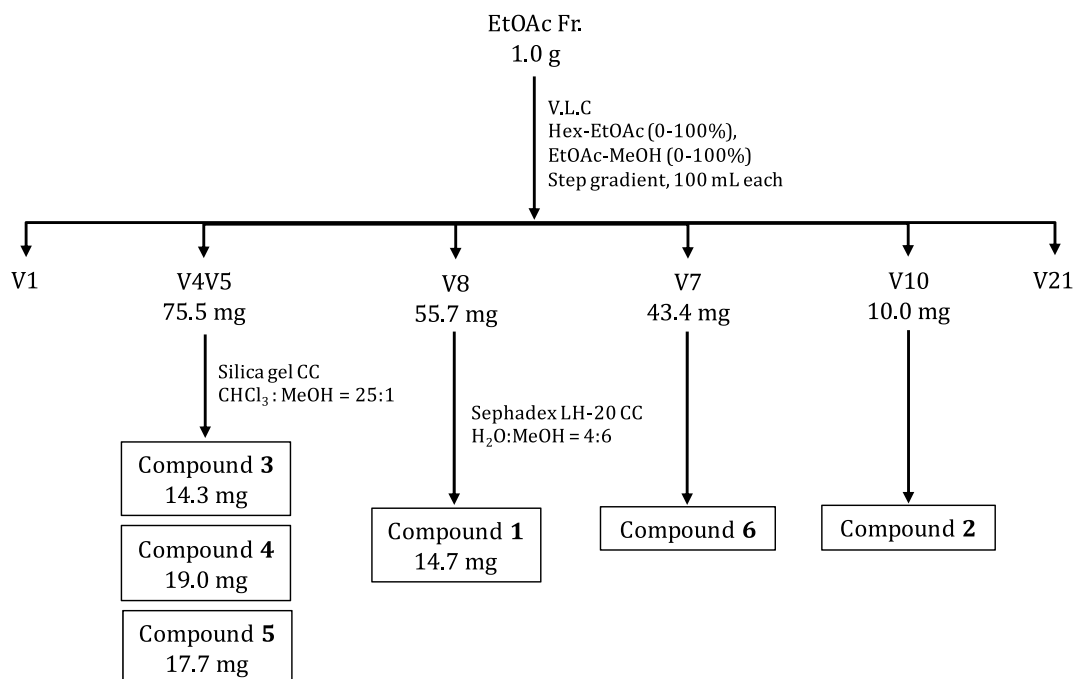


Figure 43. Isolation of compounds from black radish roots.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1

Compound 1은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 6개의 carbon peak가 관찰되었으며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  194.9의 signal은 carbonyl과 비슷한 형태를 가지는 것으로 예상할 수 있고,  $\delta_{\text{C}}$  139.2와 136.1의 signal들은  $sp^2$  혼성을 지닌 olefine 구조의 4차 탄소와 3차 탄소로 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  47.1, 27.2의 peak들은 2개의 methylene carbon으로 관찰되었으며, 이 중  $\delta_{\text{C}}$  47.1의 peak는 일반적인 methylene carbon에 비해 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있음을 예상할 수 있다.  $\delta_{\text{C}}$  17.5의 peak는 DEPT( $135^\circ$ )-NMR spectrum을 통하여 methyl기로 확인되었다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  2.51 (3H, s)의 signal은 적분값을 통해 methyl proton으로 예상하였으나 일반적인 methyl기에 비해 deshielding 되어 있고, 이와 연결되는 carbon peak의 화학적 이동 값이  $\delta_{\text{C}}$  17.5로 methoxy group에 비해서는 shielding된 형태를 보여 문헌<sup>58</sup>을 검색한 결과, methylthio 형태를 가지고 있을 것이라 예상할 수 있었다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  7.47 (1H, t,  $J = 2.8$  Hz)의  $sp^2$  혼성 proton과  $\delta_{\text{H}}$  2.73 (2H, dt,  $J = 7.0, 2.8$  Hz)의 signal들은 coupling constant를 통해 서로 long range coupling을 하고 있을 것이라 예상할 수 있었다. 이상의 결과들을 바탕으로 문헌<sup>59</sup>과 비교한 결과, compound 1은 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione임을 확인하였다(Figure 44-50, Table 10).

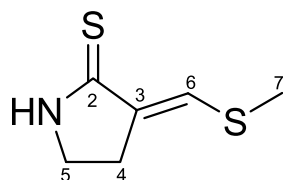


Figure 44. Chemical structure of isolated compound 1 from black radish roots.

Table 10.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **1** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>1</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
2	194.9	
3	136.1	
4	27.2	2.73 (2H, dt, 7.0, 2.8)
5	47.1	3.62 (2H, t, 7.0)
6	139.2	7.47 (1H, t, 2.8)
7	17.5	2.51 (3H, s)

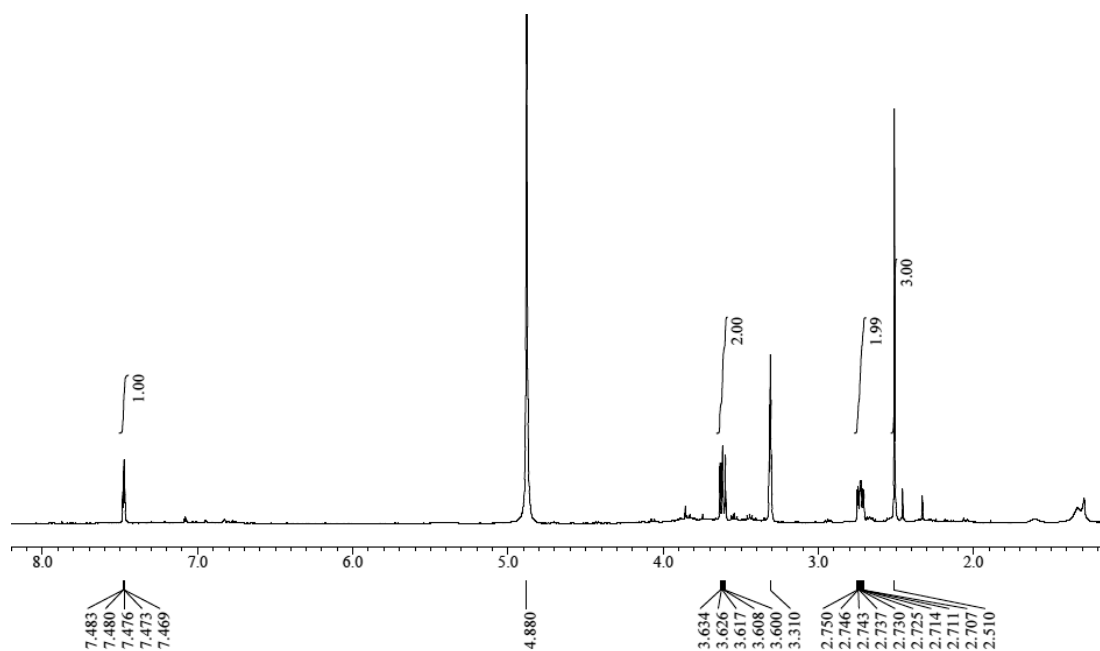


Figure 45.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .

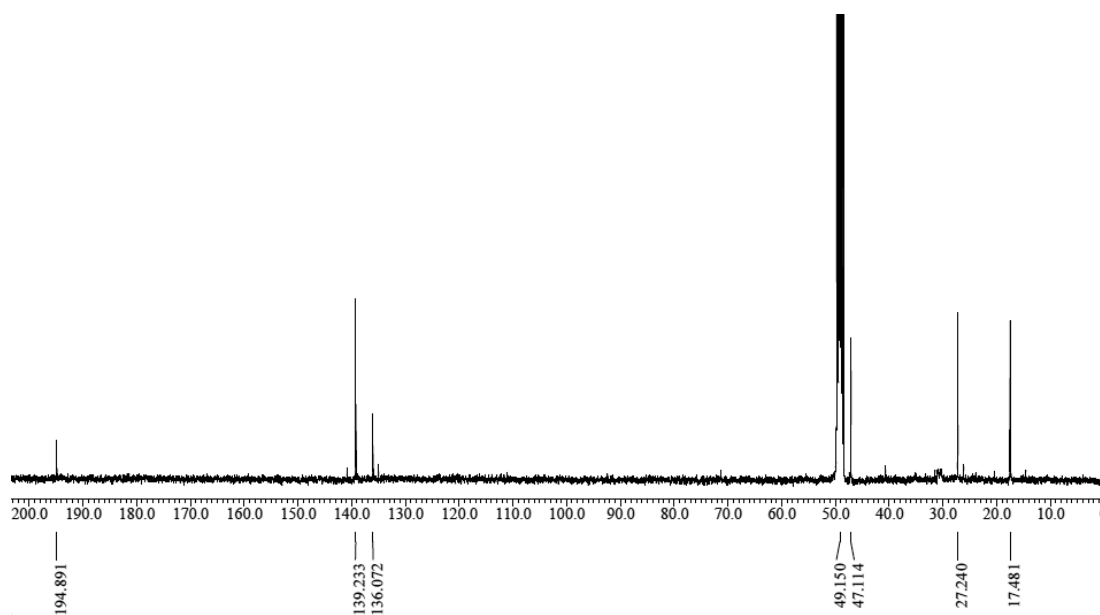


Figure 46.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .

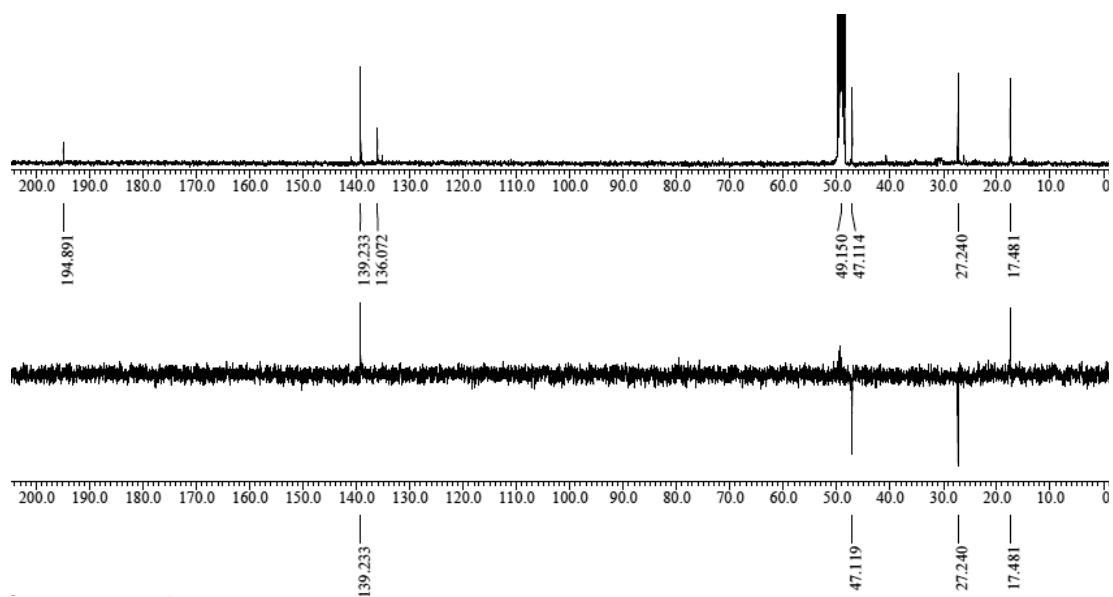


Figure 47. DEPT-135° NMR spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .

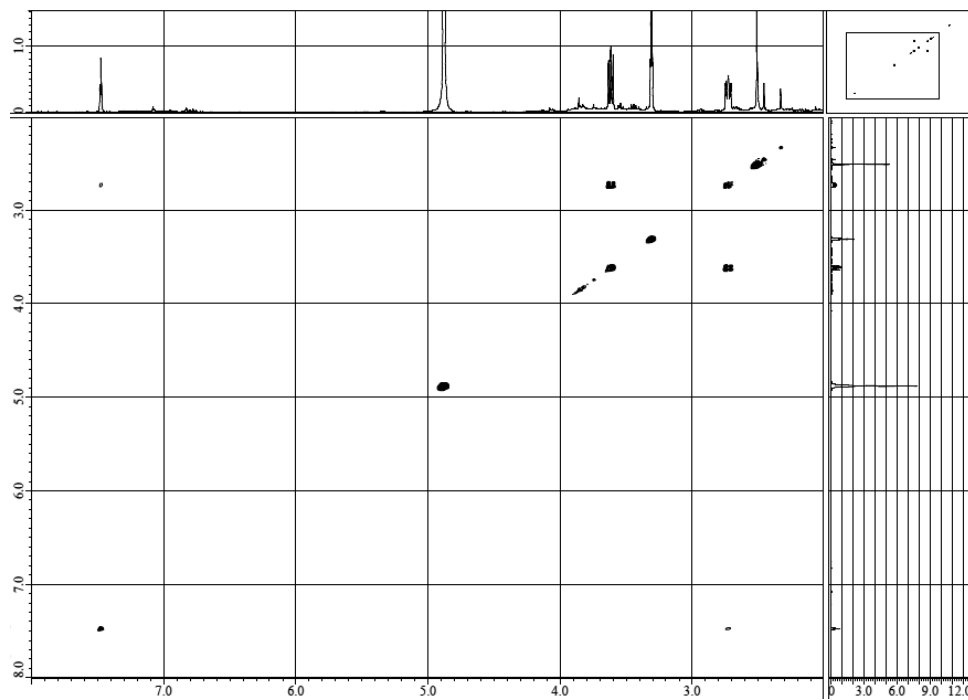


Figure 48. COSY NMR spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .

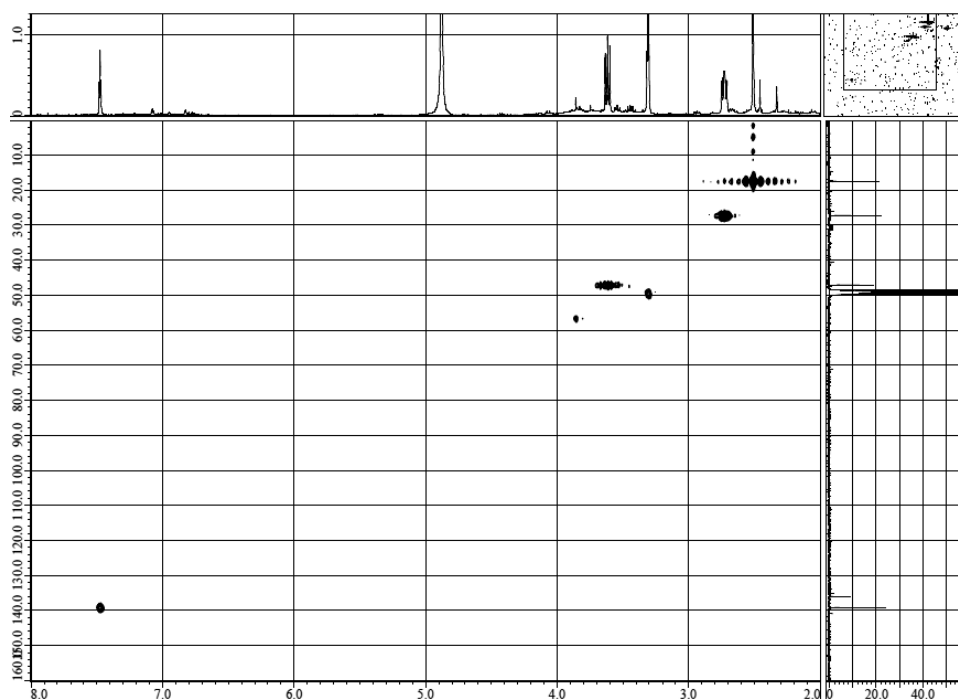


Figure 49. HMQC NMR spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .

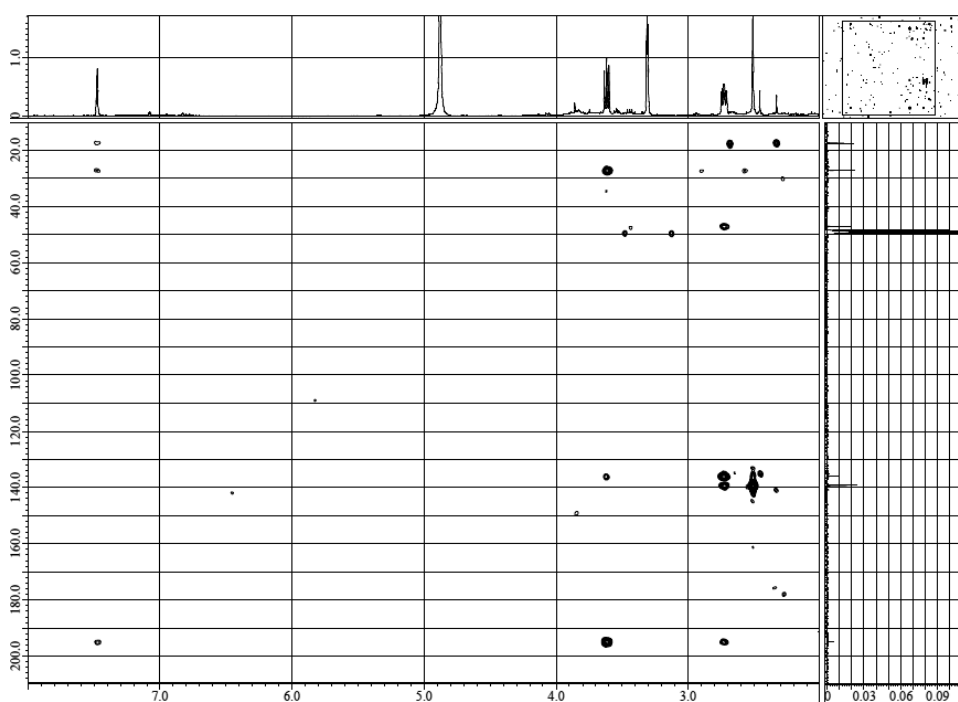


Figure 50. HMBC NMR spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .



## 2) Compound 2

Compound 2의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.61 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.31 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.06 (1H, dt,  $J = 8.2, 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.96 (1H, dt,  $J = 8.2, 0.9$  Hz)의 signal들을 통해 이들 proton들이 서로 coupling하고 있는 aromatic ring이 있을 것이라 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  4.20 (1H, dd,  $J = 6.0, 3.2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.12 (1H, dd,  $J = 9.6, 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.98 (1H, dd,  $J = 9.6, 3.2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.77 (1H, s)의 signal들은  $sp^3$  혼성 구조를 갖는 methine proton들로 일반적인 methine proton에 비해 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있을 것이라 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum 분석 결과, 총 15개의 carbon peak가 관찰되었다. 이중  $\delta_{\text{C}}$  178.9의 peak는 carbonyl group으로 예상할 수 있으며, 8개의  $sp^2$  혼성구조를 갖는 carbon peak들이 관찰되었고, DEPT(135°)-NMR spectrum을 통하여  $\delta_{\text{C}}$  75.7, 32.0의 2개의 methylene carbon을 확인하였다. 이 중  $\delta_{\text{C}}$  75.7의 peak는 전기음성도가 큰 산소가 인접해있을 것으로 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  88.5, 75.7의 peak들 역시 산소가 인접해 있는 methine carbon으로 예상되었다.

COSY, HMQC, HMBC NMR spectrum을 통해 각각의 연결 관계를 확인한 결과,  $sp^2$  혼성 구조를 갖는 carbon들의 연결이 indole 계열의 화합물 형태를 갖는 것을 예상할 수 있었으며,  $\delta_{\text{C}}$  32.0의 methylene carbon과 carbonyl group 및 methine이 indole과 인접해 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>60</sup>과 비교한 결과, compound 2는 ascorbigen임을 확인하였다(Figure 51-53, Table 11).

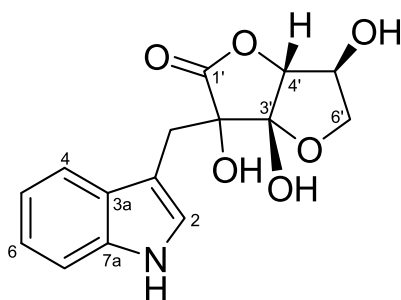


Figure 51. Chemical structure of isolated compound **2** from black radish roots.

Table 11.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
2	126.7	7.20 (1H, s)
3	107.7	
3a	129.3	
4	120.2	7.61 (1H, d, 7.8)
5	119.9	6.96 (1H, dt, 8.2, 0.9)
6	122.4	7.06 (1H, dt, 8.2, 1.4)
7	112.2	7.31 (1H, d, 8.2)
7a	137.8	
1'	178.9	
2'	81.1	
3'	108.9	
4'	88.5	3.77 (1H, s)
5'	75.7	4.20 (1H, dd, 6.0, 3.2)
6'	75.7	4.12 (1H, dd, 9.6, 6.0) 3.98 (1H, dd, 9.6, 3.2)
CH <sub>2</sub>	32.0	3.40 (1H, d, 14.2)
		3.22 (1H, d, 14.2)

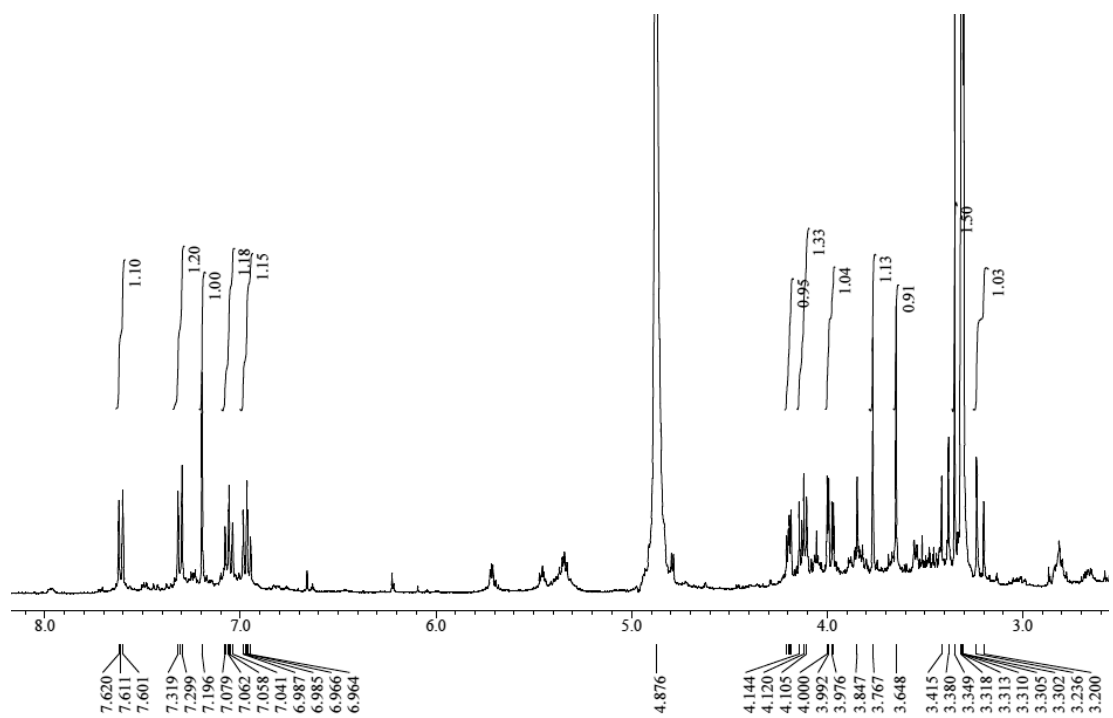


Figure 52.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in methanol- $d_4$ .

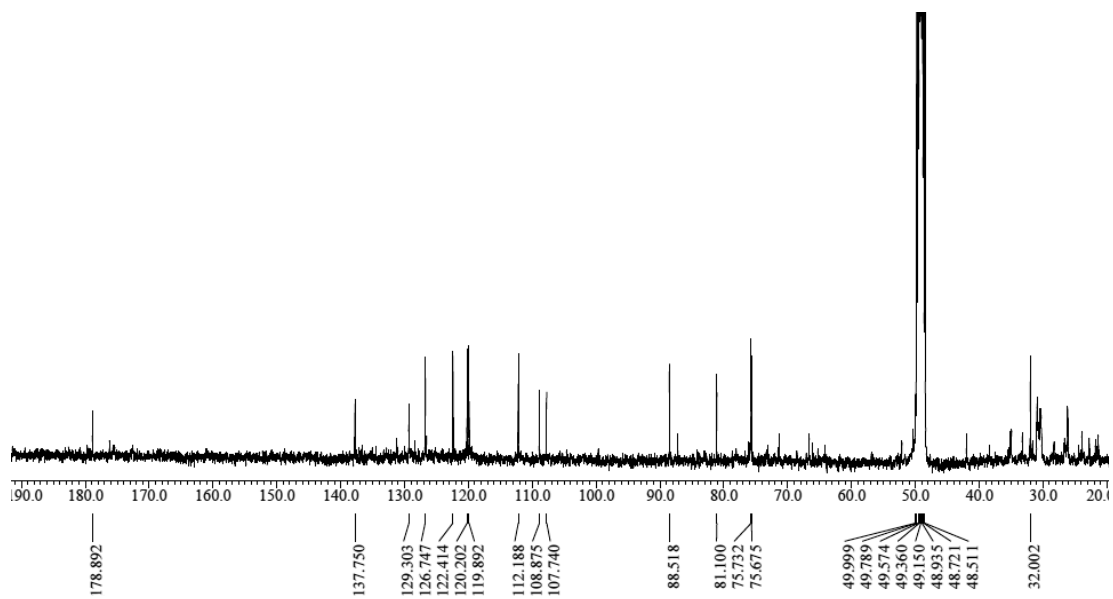


Figure 53.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in methanol- $d_4$ .

### 3) Compound 3

Compound **3**은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  5.33 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz)의 signal은 olefin 구조의 proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.50 (1H, m)의 signal은 산소가 인접해 있는  $sp^3$  혼성의 methine proton으로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  2.26-0.65에서 나타난 다수의 aliphatic proton들과  $\delta_{\text{H}}$  1.01 (3H, s), 0.89 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz), 0.82 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz), 0.81 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz), 0.79 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz), 0.65 (3H, s)의 signal들로부터 총 6개의 methyl proton을 확인하였다.

$^{13}\text{C}$  및 DEPT( $135^\circ$ )-NMR spectrum을 통해 총 29개의 carbon peak가 관찰되었으며, 이중  $\delta_{\text{C}}$  20.0, 19.6, 19.3, 19.0, 12.2, 12.1의 signal들은 methyl carbon으로 이들을 종합하여 보았을 때 sterol 계열의 화합물로 예상되었다.  $\delta_{\text{C}}$  141.0과  $\delta_{\text{C}}$  121.9의 peak는 각각 olefin group의 4차 탄소와 3차 탄소로 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  72.0의 peak는 산소가 인접해 있는 methine carbon으로 확인되었다. 이를 바탕으로 문헌<sup>61</sup>과 비교한 결과 compound **3**은 식물 sterol 중 하나인  $\beta$ -sitosterol임을 확인하였다(Figure 54-56, Table 12).

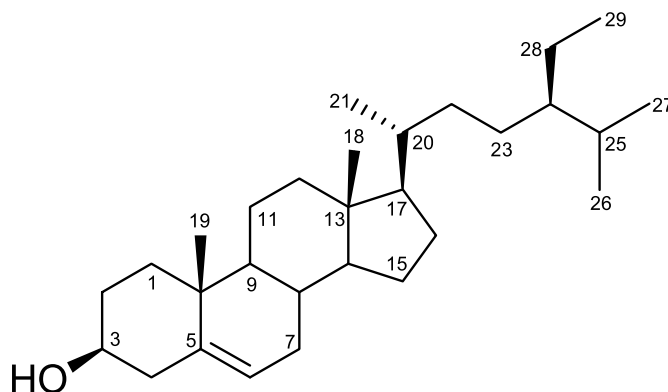


Figure 54. Chemical structure of isolated compound **3** from black radish roots.

Table 12.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)
1	37.8	
2	29.9	
3	72.0	3.50 (1H, m)
4	42.5	
5	141.0	
6	121.9	5.33 (1H, d, 5.1)
7	32.1	
8	31.9	
9	50.3	
10	36.7	
11	21.3	
12	40.0	
13	42.5	
14	57.0	
15	24.5	
16	28.5	
17	56.3	
18	12.1	0.65 (3H, s)
19	20.0	1.01 (3H, s)
20	36.4	
21	19.0	0.89 (3H, d, 6.9)
22	34.2	
23	26.3	
24	46.0	
25	29.3	
26	19.6	0.81 (3H, d, 7.3)
27	19.3	0.79 (3H, d, 6.8)
28	23.3	
29	12.2	0.82 (3H, t, 7.3)

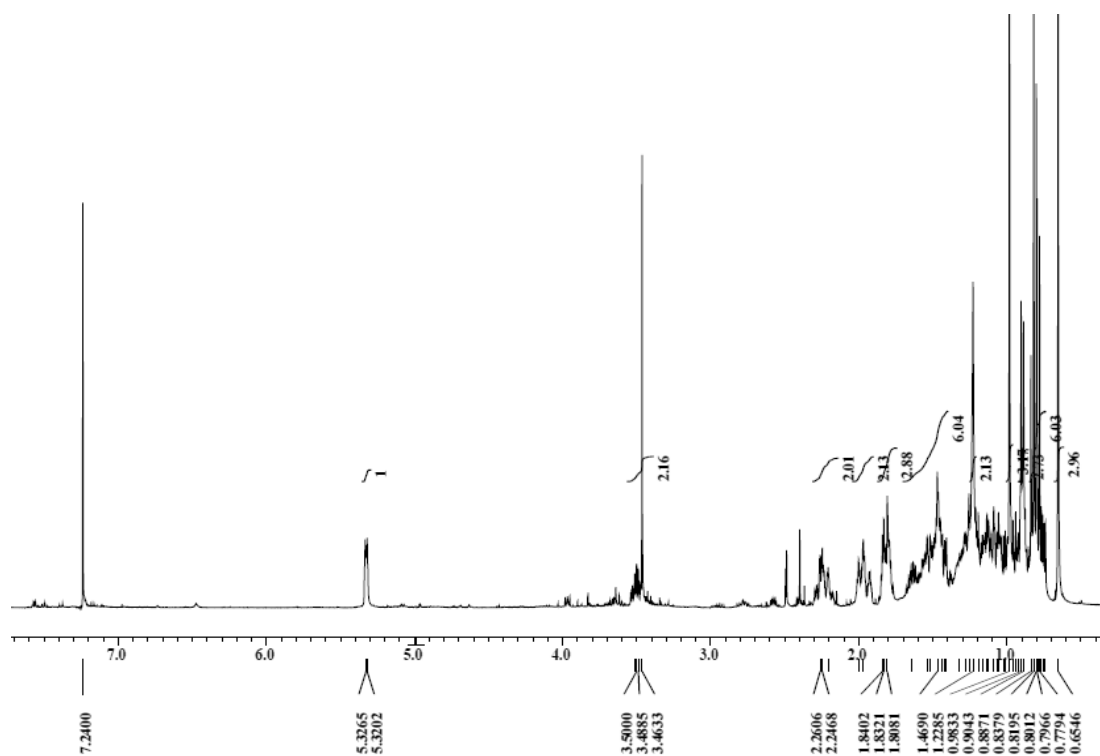


Figure 55.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in chloroform-*d*.

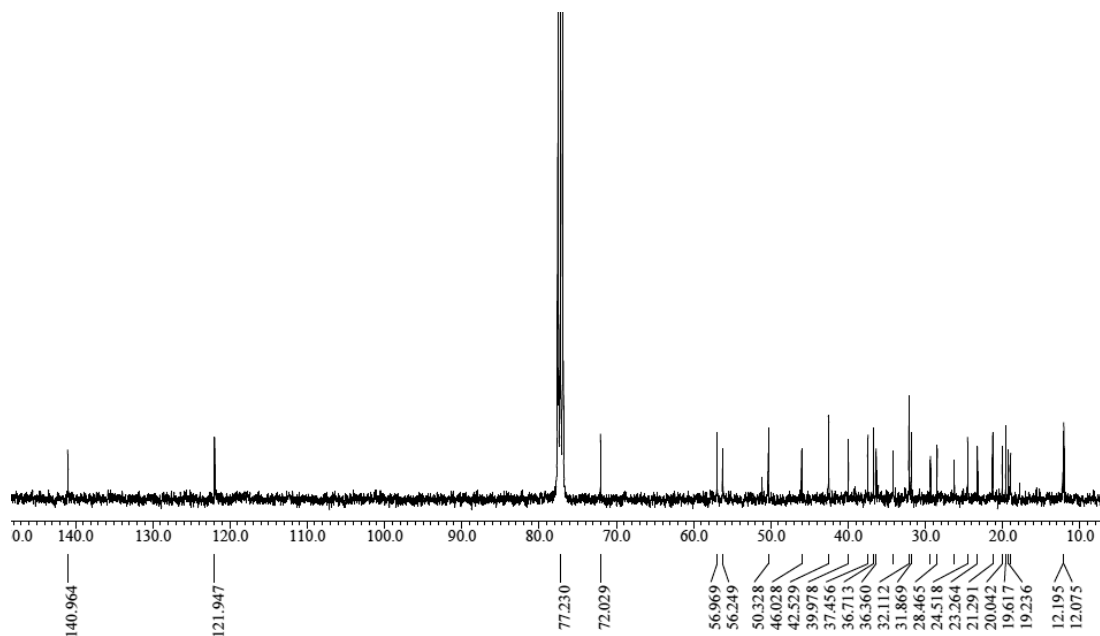


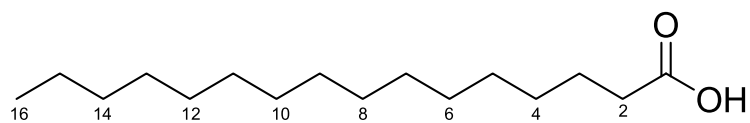
Figure 56.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **3** in chloroform-*d*.

#### 4) Compound 4, 5, 6

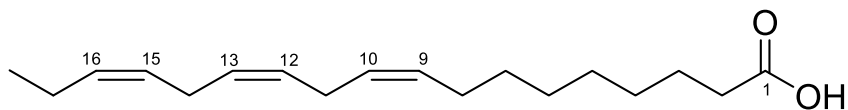
Compound 4는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 통하여 총 16개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $\delta_{\text{C}}$  179.6의 carbonyl group과 15개의 aliphatic carbon을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>62,63</sup>과 비교하여 compound 4는 palmitic acid임을 확인하였다(Figure 57-59, Table 13).

Compound 5의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석 결과, 총 18개의 carbon peak가 관찰되었으며, 이 중  $\delta_{\text{C}}$  132.9, 131.2, 129.4, 129.3, 129.0, 128.4의 signal들을 통하여 3개의 이중결합 구조가 있을 것이라 예상할 수 있다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum을 통하여  $\delta_{\text{H}}$  5.34 (6H, m, overlap)의 peak들은 6개의 olefin methine proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  2.81 (4H, t,  $J = 6.0$  Hz), 2.08 (2H, m), 2.04 (2H, m)의 signal은 일반적인 aliphatic proton에 비해 deshielding 된 것으로 보아 allylic methylene proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, t,  $J = 7.6$  Hz)의 signal은 methyl group으로 예상하였다. 또한 COSY spectrum을 통하여  $\delta_{\text{H}}$  0.86과  $\delta_{\text{H}}$  2.08이 서로 coupling하고 있음을 확인하였으며, 이들은 HMBC를 통하여  $\delta_{\text{C}}$  131.2, 129.0의 peak들과 인접해 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>64</sup>과 비교한 결과, compound 5는  $\alpha$ -linolenic acid임을 확인하였다(Figure 57, 60, 61, Table 13).

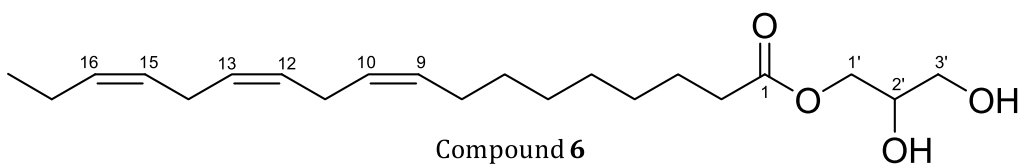
Compound 6은  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 비교한 결과, compound 5와 거의 유사한 형태를 나타내고 있으나,  $^{13}\text{C}$  및 DEPT-NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  71.3, 66.6, 64.2의 산소가 인접한 methine과 methylene carbon을 확인하였으며,  $^1\text{H}$  및 COSY NMR spectrum을 통하여 이들이 glycerol 형태로 연결되어 있을 것이라 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>65</sup>과 비교하여 compound 6은 1-linoleonyl glycerol임을 확인하였다(Figure 57, 62, 63, Table 13).



Compound 4



Compound 5



Compound 6

Figure 57. Chemical structures of isolated compounds 4-6 from black radish roots.



Table 13.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **4-6** (400 and 100 MHz, chloroform- $d$  or methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>4</b>		Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
1	179.6		177.9		175.6	
2	34.2	2.35 (2H, t, 7.6)	35.2	2.27 (2H, t, 7.3)	35.1	2.35 (2H, t, 7.6)
3	24.9	1.65 (2H, m)	26.3	1.60 (2H, m)	26.1	1.62 (2H, m)
4	29.3	1.26 (2H, brs)	30.4	1.31 (2H, m)	30.3	1.34 (2H, m)
5	29.5	1.26 (2H, brs)	30.4	1.31 (2H, m)	30.3	1.34 (2H, m)
6	29.6	1.26 (2H, brs)	30.8	1.31 (2H, m)	30.8	1.34 (2H, m)
7	29.8	1.26 (2H, brs)	30.5	1.31 (2H, m)	30.4	1.34 (2H, m)
8	29.9	1.26 (2H, brs)	28.3	2.08 (2H, m)	28.3	2.08 (2H, m)
9	29.9	1.26 (2H, brs)	132.9	5.34 (1H, m)	132.9	5.34 (1H, m)
10	29.9	1.26 (2H, brs)	128.4	5.34 (1H, m)	128.4	5.34 (1H, m)
11	29.9	1.26 (2H, brs)	26.6	2.81 (2H, t, 6.0)	26.5	2.81 (2H, t, 5.7)
12	29.9	1.26 (2H, brs)	129.4	5.34 (1H, m)	129.3	5.34 (1H, m)
13	29.6	1.26 (2H, brs)	129.3	5.34 (1H, m)	129.3	5.34 (1H, m)
14	32.1	1.26 (2H, brs)	26.7	2.81 (2H, t, 6.0)	26.7	2.81 (2H, t, 5.7)
15	22.9	2.05 (2H, brs)	129.0	5.34 (1H, m)	129.0	5.34 (1H, m)
16	14.5	0.88 (3H, t, 7.3)	131.2	5.34 (1H, m)	131.2	5.34 (1H, m)
17			21.6	2.04 (2H, m)	21.6	2.08 (2H, m)
18			14.8	0.98 (3H, t, 7.6)	14.8	0.98 (3H, t, 7.6)
1'					66.6	4.15 (1H, dd, 11.2, 4.3) 4.06 (1H, dd, 11.5, 6.0)
2'					71.3	3.82 (1H, m)
3'					64.2	3.55 (2H, dd, 5.7, 1.6)

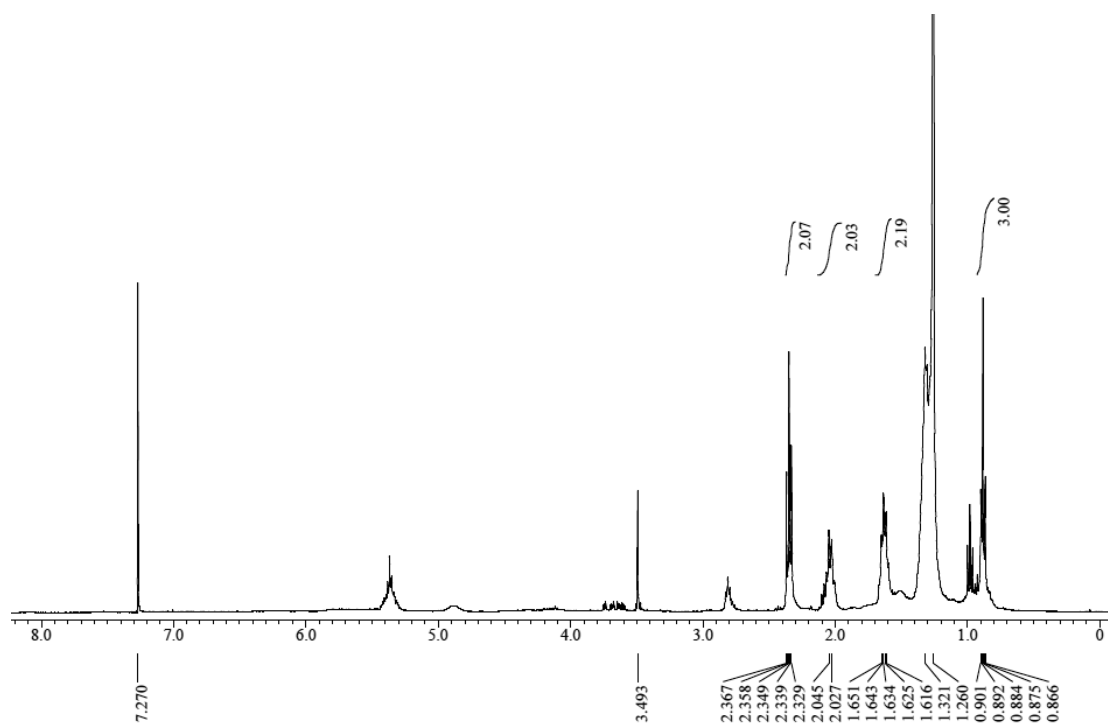


Figure 58.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **4** in chloroform-*d*.

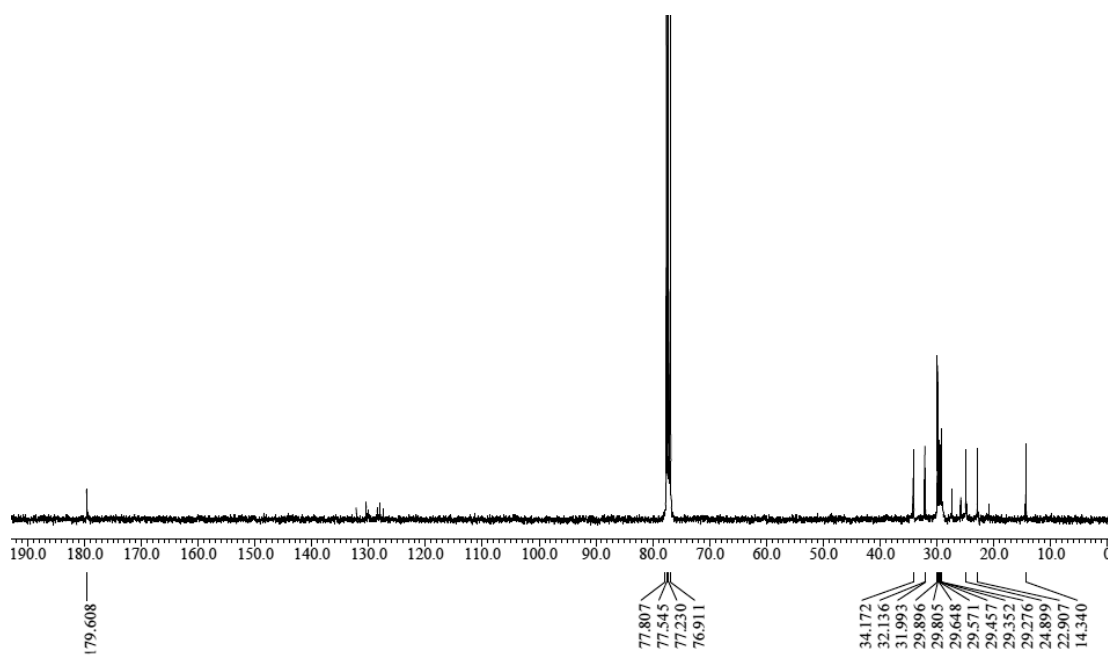


Figure 59.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **4** in chloroform-*d*.

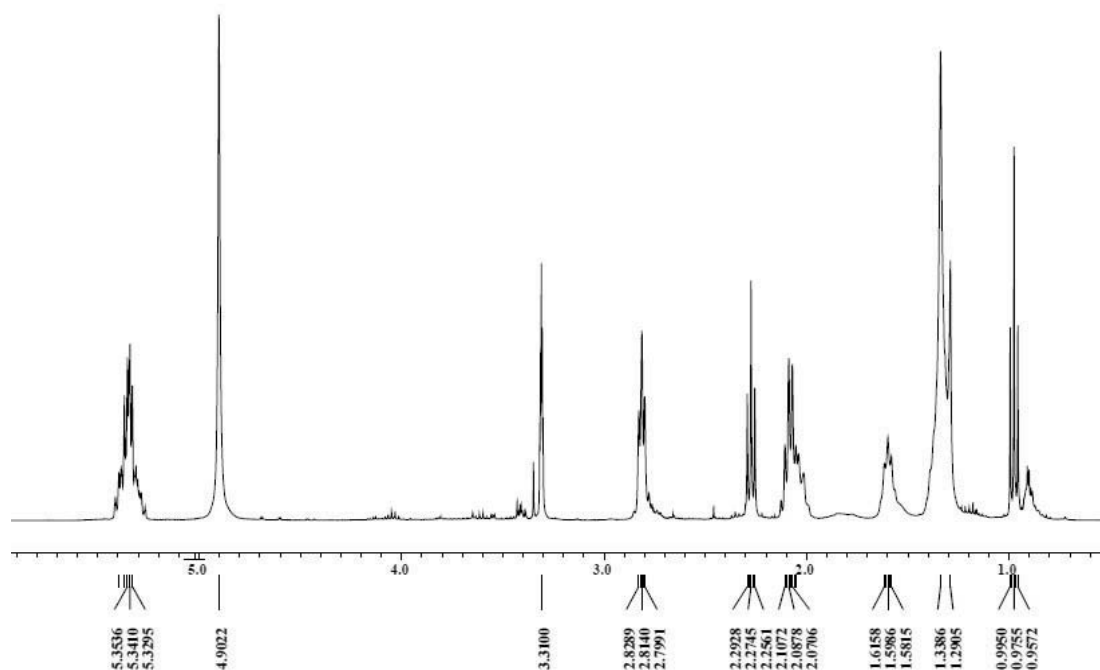


Figure 60.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **5** in methanol- $d_4$ .

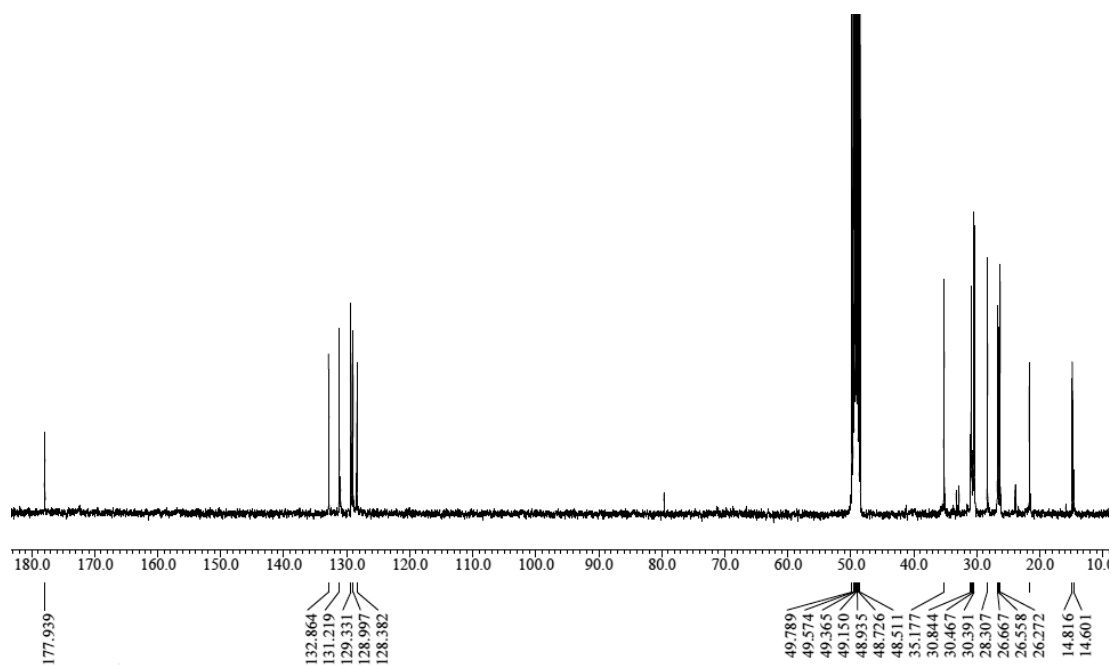


Figure 61.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **5** in methanol- $d_4$ .

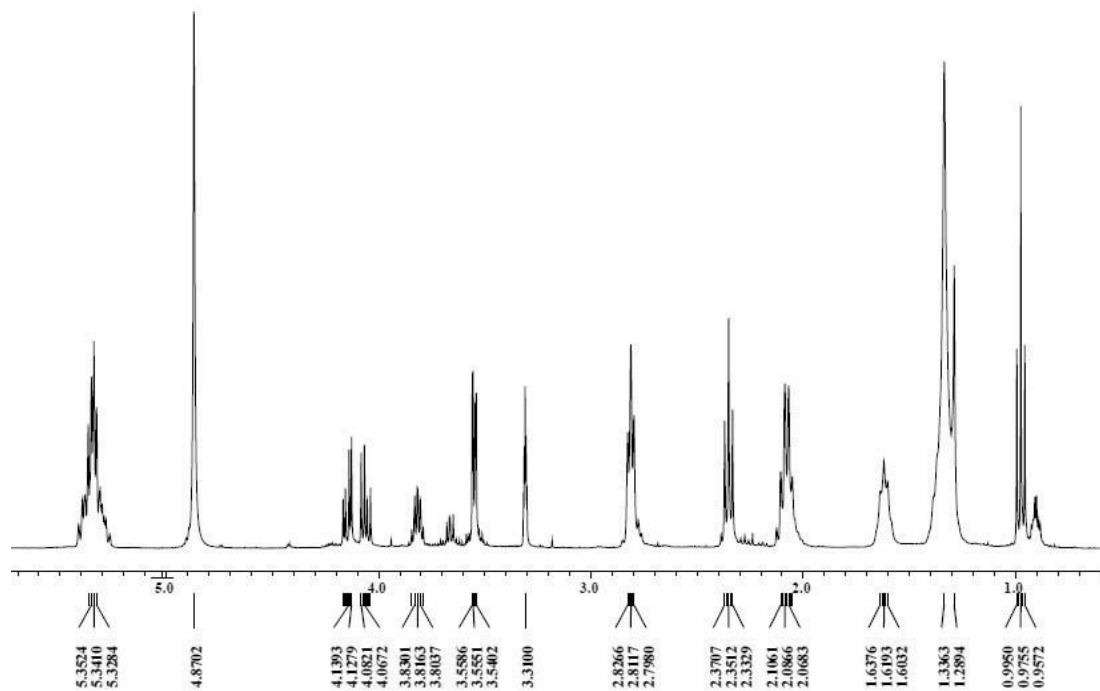


Figure 62.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **6** in methanol- $d_4$ .

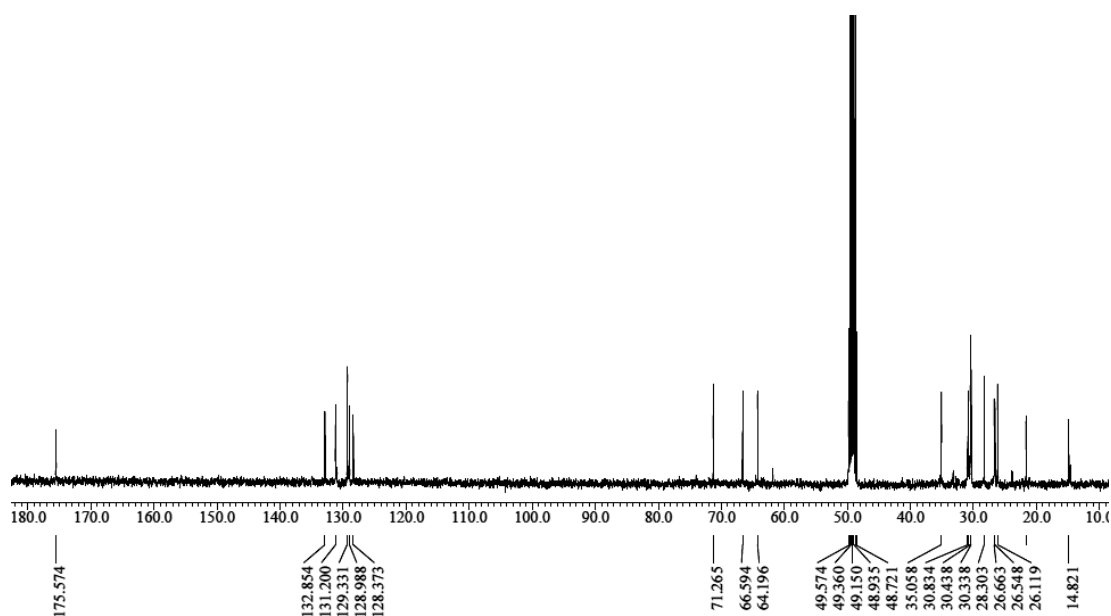


Figure 63.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **6** in methanol- $d_4$ .

#### 4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항염

###### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell을 이용하여 흑무 뿌리 추출물 및 용매 분획물의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 우선 추출물 및 각 분획물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물에서 세포독성 없이 NO 생성을 91.8%로 억제함을 확인할 수 있었다(Figure 64).

이 결과를 바탕으로 NO 생성 억제 활성이 우수했던 EtOAc 분획물에 대하여 추가적으로 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과, 흑무 뿌리 EtOAc 분획물이 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 이하에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰으며,  $\text{IC}_{50}$  값은 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다 (Figure 65).

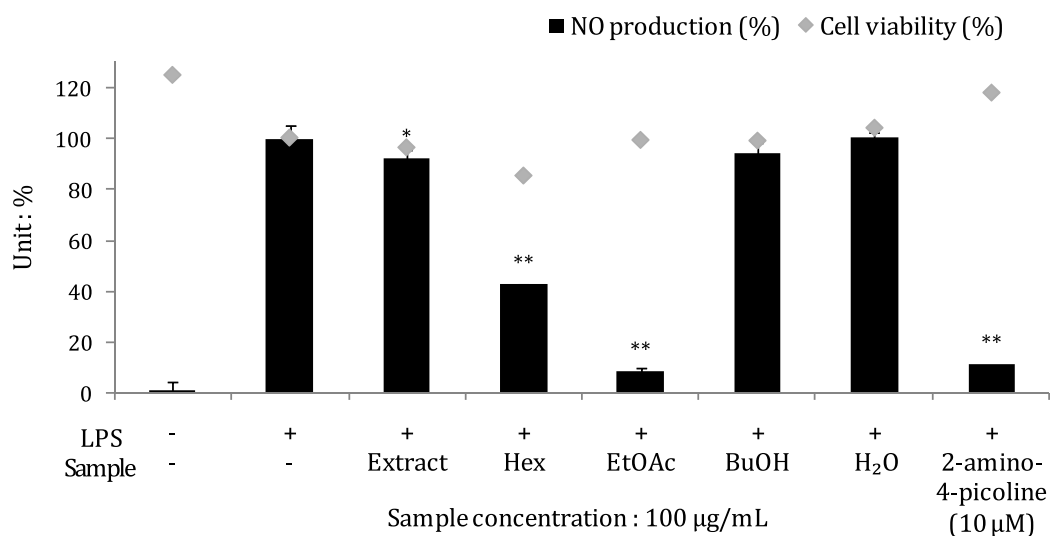


Figure 64. Nitric oxide production and cell viability of extract and solvent fractions from black radish roots in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01

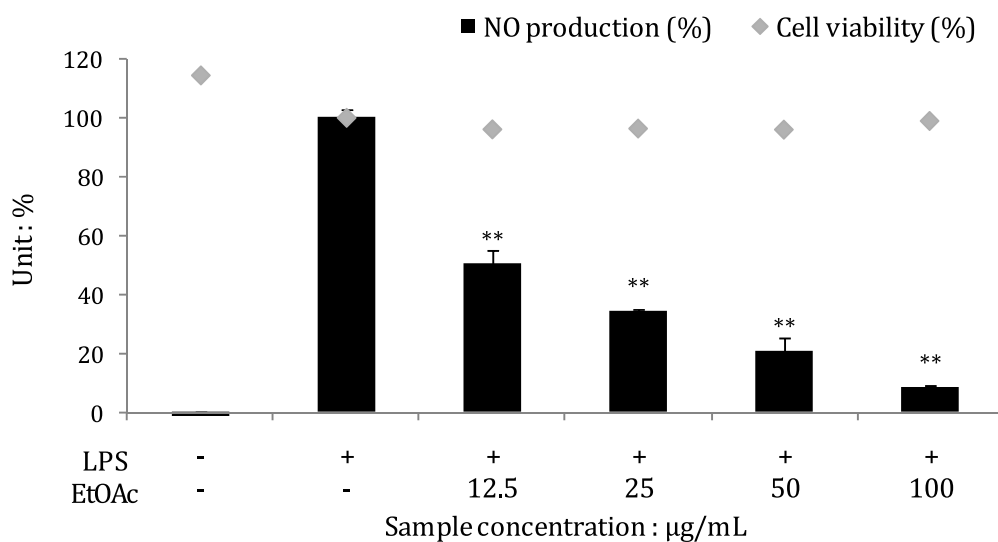


Figure 65. Nitric oxide production and cell viability of ethyl acetate fraction from black radish roots in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p$  < 0.01

## (2) PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성

흑무 뿌리 추출물과 분획물 중 항염 활성을 나타내었던 EtOAc 분획물에 대하여 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. 그 결과, EtOAc 분획물이 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 66).

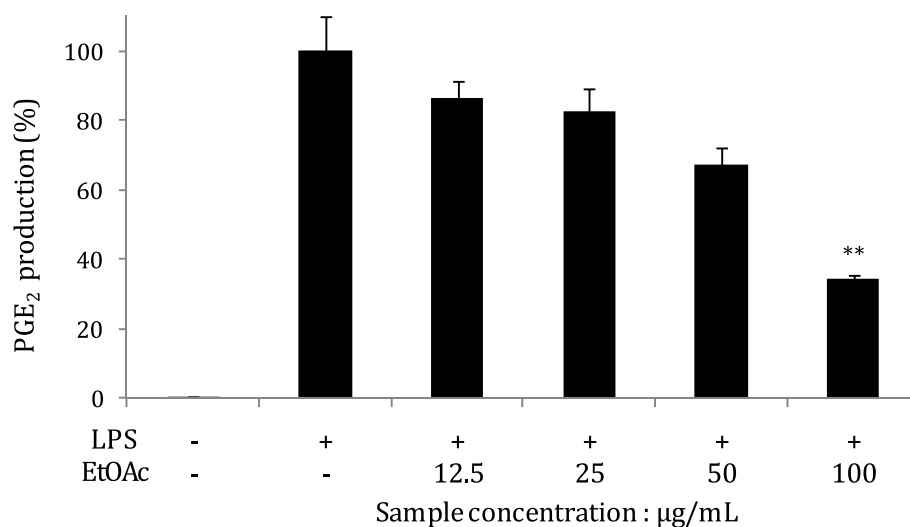


Figure 66. Effect of ethyl acetate fraction from black radish roots on PGE<sub>2</sub> production in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p < 0.01$

## (2) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성

흑무 뿌리 EtOAc 분획물의 iNOS 단백질 발현양을 확인한 결과, NO 생성과 관련된 iNOS 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 COX-2 단백질의 경우 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서는 농도에 따라 COX-2 발현이 감소되었으나, 그 이상에서는 농도 의존적으로 다소 증가하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Figure 67).



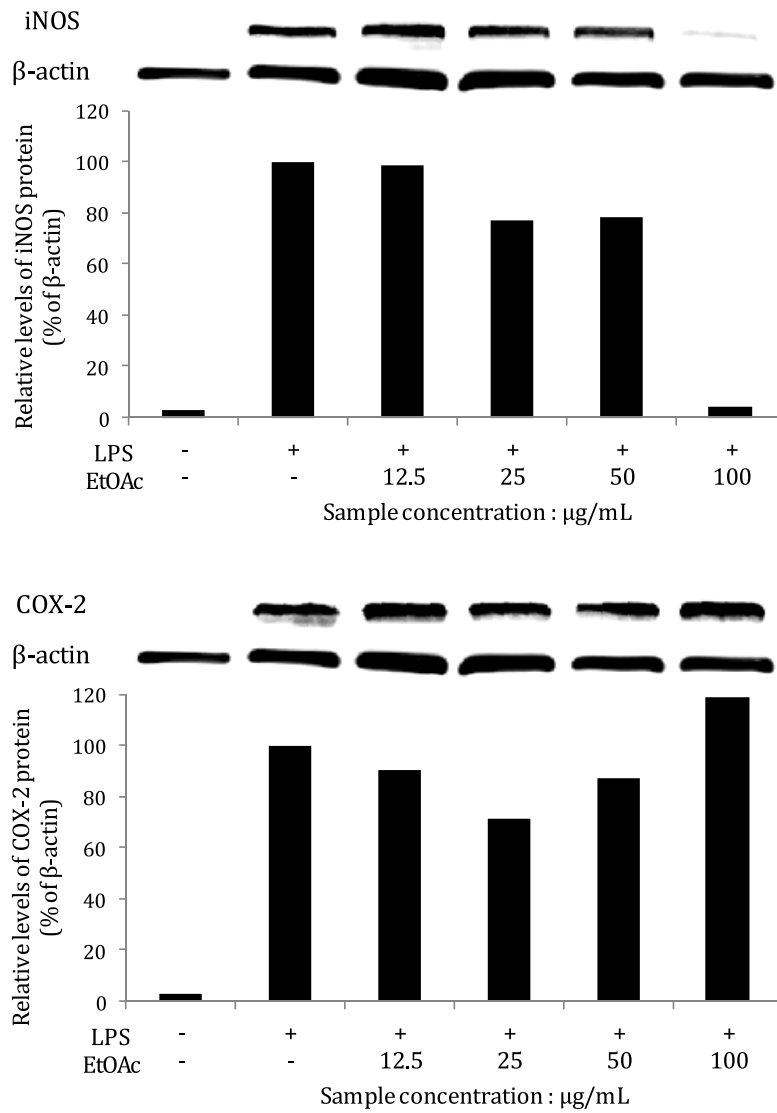


Figure 67. Effects of ethyl acetate fraction from black radish roots on the levels of iNOS and COX-2 protein in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The iNOS or COX-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of  $\beta$ -actin.

(3) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6) 생성 억제 활성

흑무 뿌리 EtOAc 분획물에 대한 항염 기전 연구를 위해 전염증성 cytokine인 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6 생성 억제 활성을 확인하였다. 실험 결과 EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 68).

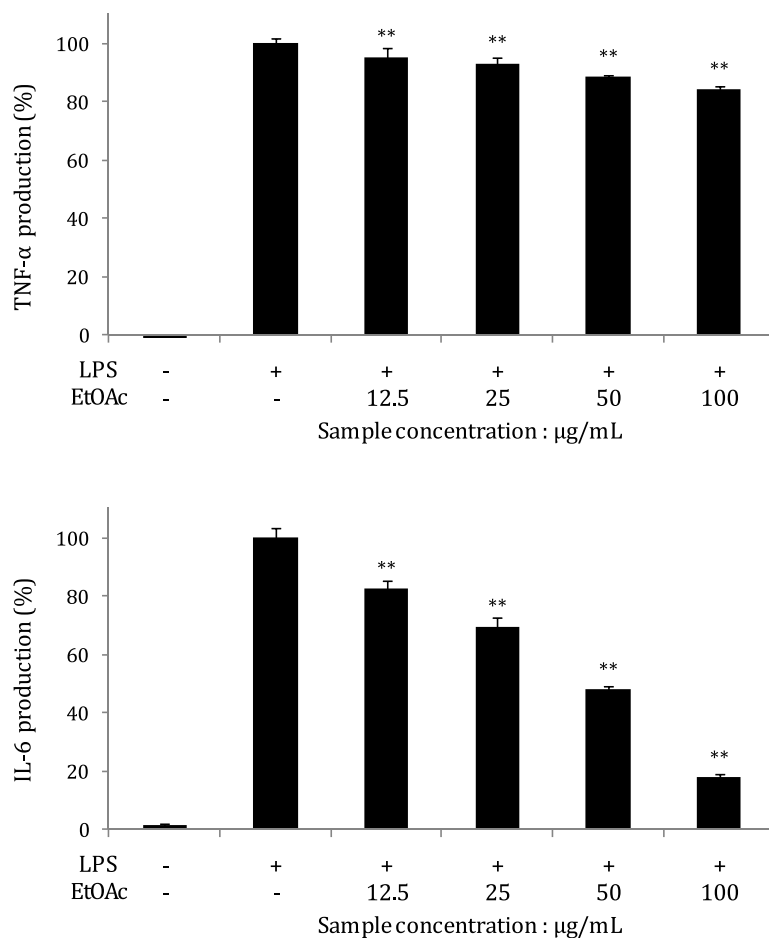


Figure 68. Effects of ethyl acetate fraction from black radish roots on production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p$  < 0.01

## 2) 미백

### (1) Melanogenesis 억제 활성

B16F10 melanoma cell을 이용하여 흑무 뿌리 추출물 및 용매 분획물의 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 우선 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, Hex 분획물이 세포독성 없이 77.2%의 melanin 생성 억제 효과를 나타냈으며, EtOAc 분획물의 경우 75.9%의 melanin 생성 억제 효과를 나타내었으나 세포독성이 약간 있는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 69).

이 결과를 바탕으로 멜라닌 생성 억제 효과가 우수했던 Hex과 EtOAc 분획물에 대하여 추가적으로 10, 20, 40 µg/mL 농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과, 흑무 뿌리 Hex 분획물은 40 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 효과를 나타냈으며, EtOAc 분획물의 경우 40 µg/mL 농도에서는 약간 독성을 나타냈으나 그 이하의 농도에서는 세포독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 70).

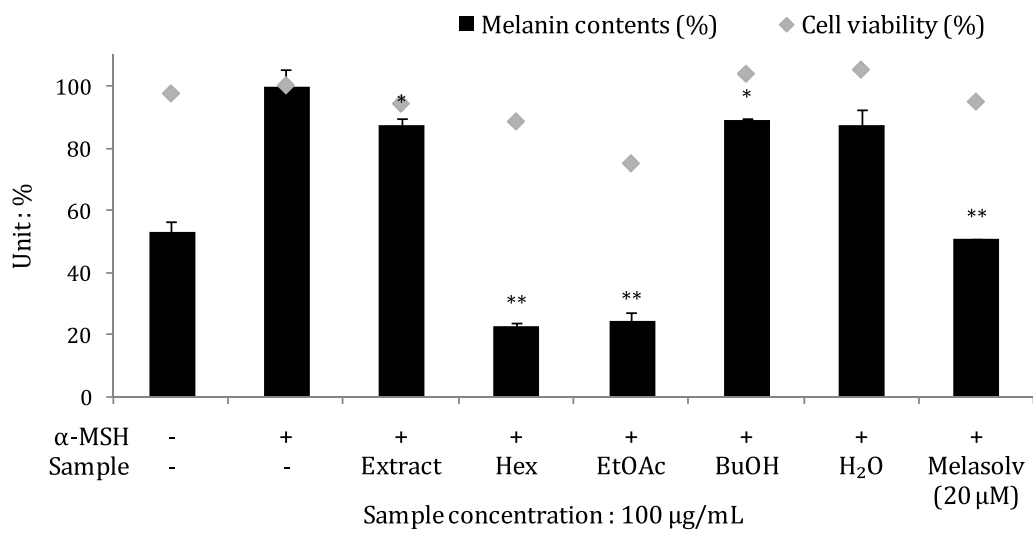


Figure 69. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of black radish roots in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01

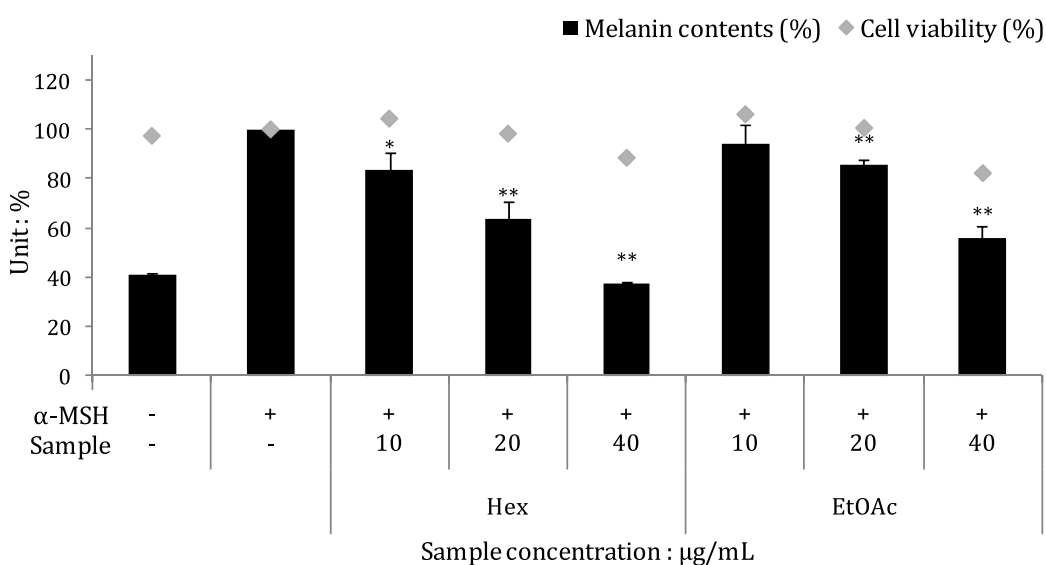


Figure 70. Melanin contents and cell viability of *n*-hexane and ethyl acetate fractions from black radish roots in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항염

#### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell을 이용하여 흑무 뿌리로부터 분리한 화합물들에 대하여 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 각 화합물에 대하여 25, 50, 100, 200  $\mu$ M 농도로 실험을 진행한 결과, 분리된 화합물 중 compound 4, 5, 6이 25-200  $\mu$ M 농도 범위에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 71). Compound 4, 5, 6은 지방산 계열의 화합물로 이들은 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine의 생성을 억제함으로써 항염 활성을 나타낸다는 보고<sup>66,67</sup>가 있어 추가적인 기전 연구는 진행하지 않았다.

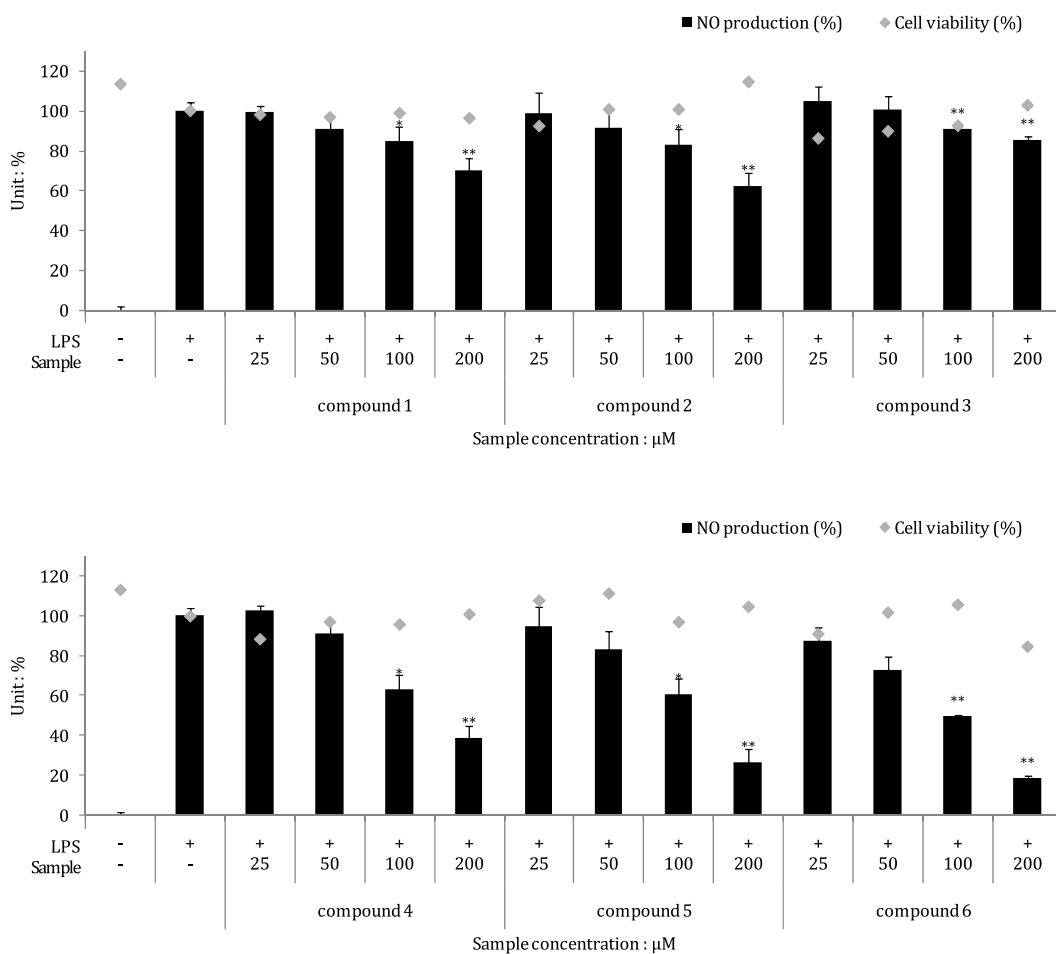


Figure 71. Nitric oxide production and cell viability of isolated compounds from black radish roots in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01

## 2) 미백

### (1) Melanogenesis 억제 활성

B16F10 melanoma cell을 이용하여 흑무 뿌리로부터 분리된 화합물의 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 우선 각 화합물에 대하여 100  $\mu$ M 농도로 실험을 진행한 결과, compound 1에서 세포독성 없이 49.3%의 멜라닌 생성 억제 효과가 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 72).

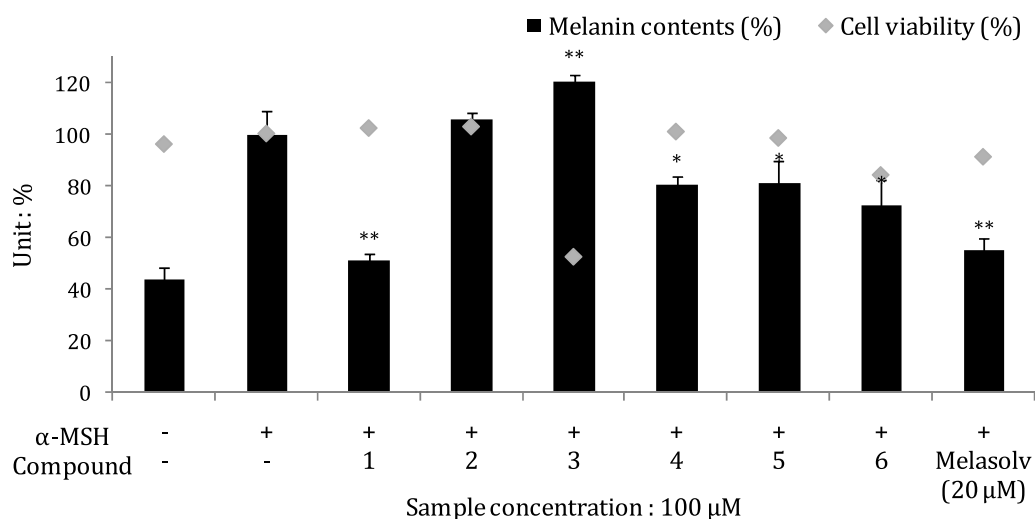


Figure 72. Melanin contents and cell viability of isolated compounds from black radish roots in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

위 결과를 바탕으로 compound 1에 대하여 추가적으로 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  농도로 실험을 더 진행하였다. 실험 결과, compound 1은 25-100  $\mu\text{M}$  농도에서 세포독성 없이 멜라닌의 합성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 73).

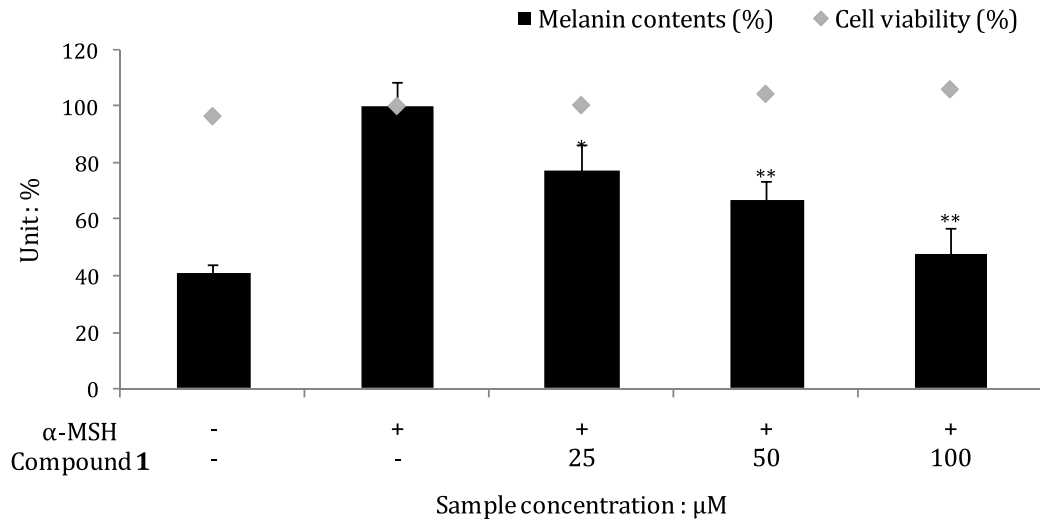


Figure 73. Melanin contents and cell viability of isolated compound 1 from black radish roots in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



## (2) Intracellular tyrosinase 저해 활성

Melanogenesis 억제 효과가 있었던 compound 1에 대하여 B16F10 melanoma 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 실험은 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 진행하였으며, 실험 결과 compound 1이 농도 의존적으로 세포 내 tyrosinase의 활성을 저해시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 74).

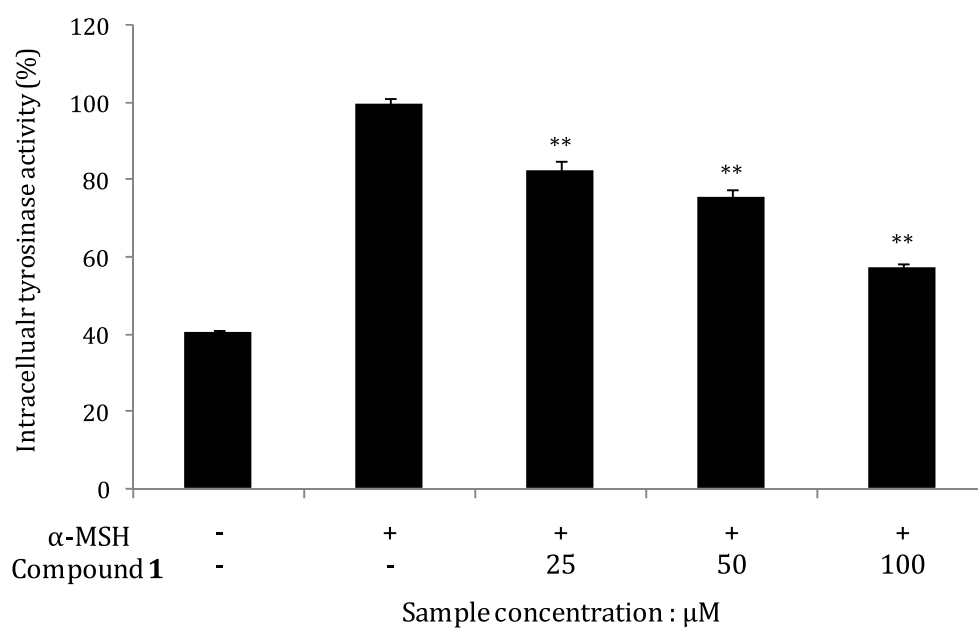


Figure 74. Intracellular tyrosinase activity of isolated compound 1 from black radish roots in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p < 0.01$

### (3) TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 발현 억제 활성

Compound 1에 대하여 멜라닌 합성과 관련된 단백질인 TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 발현양을 Western blot을 이용하여 측정하였다. 실험 결과, compound 1이 TRP-2와 tyrosinase 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 하지만 TRP-1 단백질은 농도에 따른 큰 변화가 관찰되지 않았다(Figure 75).

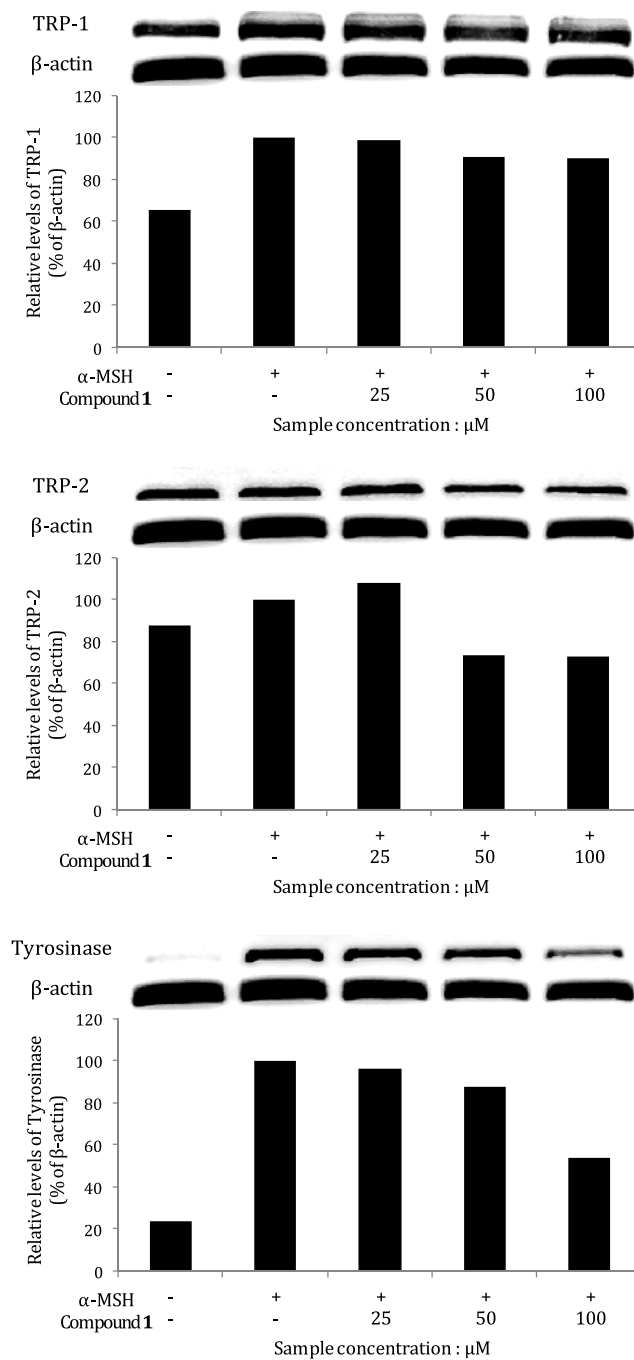


Figure 75. Effects of isolated compound 1 from black radish roots on the levels of TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The TRP-1, TRP-2 or tyrosinase protein levels in each sample was normalized to the quantity of  $\beta$ -actin.

## 6. 연구결과 및 고찰

본 연구는 흑무(*Raphanus sativus* L. var. *niger*) 뿌리 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대하여 기능성 화장품 소재로써의 활용 가능성을 알아보고자, 다양한 생리 활성 실험과 단일 물질 분리 및 구조 동정을 실시하였다.

흑무 뿌리 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 및 water 분획물을 얻었다. 이들 중 EtOAc 분획물에 대해 vacuum liquid chromatography (VLC), 순상 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 화합물을 분리하고, 1D 및 2D NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 6개의 화합물을 분리, 동정하였다. 분리된 화합물은 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione (1), ascorbigen (2),  $\beta$ -sitosterol (3), palmitic acid (4),  $\alpha$ -linolenic acid (5), 1-linoleonyl glycerol (6)로 확인되었다.

한편, 제주에서 많이 재배되고 있는 백무(*Raphanus sativus* L. *sativus*) 뿌리에 관한 성분 연구로는 glucoraphenin, glucoerucin, glucoraphasatin 등과 같은 glucosinolate 성분에 대한 함량 분석<sup>68</sup>이 이루어져 있으며(Figure 76), 그 밖에 *Raphanus* 속에 해당하는 여러 품종의 무에는 raphanusamide, pyrrolidine과 같은 질소화합물과 *trans*-4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate, phenethyl isothiocyanate를 포함하는 황화합물, aesculetin, scopoletin 등의 coumarin계 화합물이 함유되어 있다고 보고되어 있다.<sup>69</sup> 특히 흑무 뿌리에는 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione (1)을 다량 함유하는 것으로 본 연구를 통해 확인되었다.

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 흑무 뿌리의 항염 활성 실험을 진행한 결과, Hex과 EtOAc 분획물이 100  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한 흑무 뿌리로부터 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험에서는 compound 1-6 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰으며, 특히 compound 4-6의 NO 생성 억제 활성이 우수함을 확인하였다.

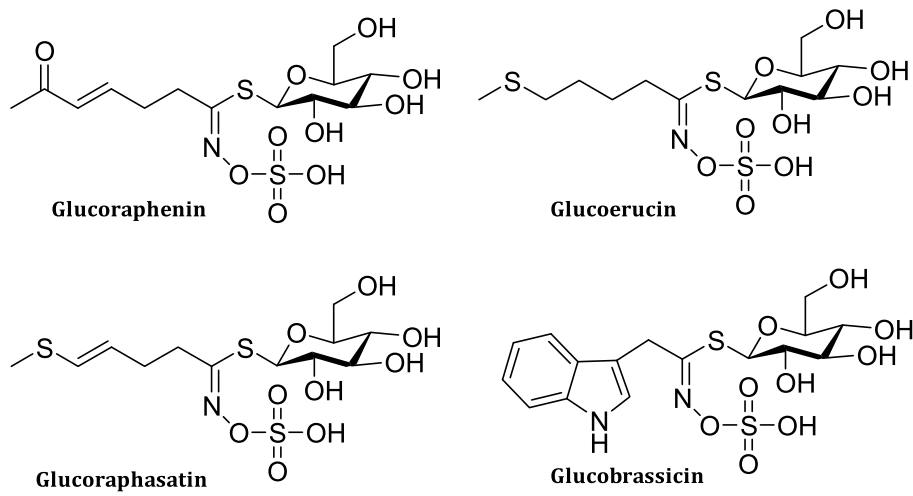


Figure 76. Chemical structures of analyzed glucosinolates from white radish (*R. sativus* L. *sativus*).

또한, 흑무 뿌리의 미백활성 측정을 위하여 B16F10 melanoma cell을 이용하여 melanin 생성량과 세포독성을 측정하였다. 그 결과, Hex 분획물이 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 이하에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 효과를 나타냈으며, EtOAc 분획물의 경우 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 약간 독성을 나타냈으나 그 이하의 농도에서는 세포독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 분리된 화합물에 대한 melanin 생성량 측정에서는 compound 1이 100  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 세포독성 없이 melanin의 합성을 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 미백 활성이 있었던 compound 1에 대하여 Intracellular tyrosinase 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성을 억제시켰으며, 미백 기전과 관련된 TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질의 발현양을 측정한 결과, TRP-2 및 tyrosinase에 대하여 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

Hanlon<sup>70</sup>에 의해 보고된 흑무의 glucosinolate 함량 분석 결과에서 흑무에는 glucoraphasatin의 함량이 glucoraphenin, glucoerucin, glucobrassicin에 비해 높은 함량을 나타내는 것으로 확인되었다. 분리된 화합물 중 compound 1은 glucoraphasatin이 myrosinase에 의해 분해되어 4-methylthio-3-butenyl iso

thiocyanate를 거쳐 생성되는 물질로<sup>71</sup>, glucoraphasatin의 함량 및 myrosinase의 활성이 높을수록 다량 생성됨을 알 수 있다. 또한, compound **1**은 Sakoda<sup>72</sup>에 의해 무삭에서 처음 분리된 화합물로 무삭의 배축 성장 저해 인자로 보고되었으나 아직 다른 활성 연구에 대해서는 보고된 바 없다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidine thione (**1**)을 포함한 흑무 뿌리 추출물을 이용해 항염증제 및 미백 소재로써 개발 가능성을 기대할 수 있었다.

### 제 3 절 제주 흑무 지상부 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구

#### 1. 재료

실험에 사용한 흑무(*Raphanus sativus* L. var. *niger*) 지상부는 2016년 12월에 제주 성산읍에서 채집하였다. 채집한 흑무 지상부는 물로 세척한 후에 40℃의 열풍 건조기에서 48시간 동안 건조시켰으며, 건조물은 분쇄한 후 추출 과정에 사용하였다.

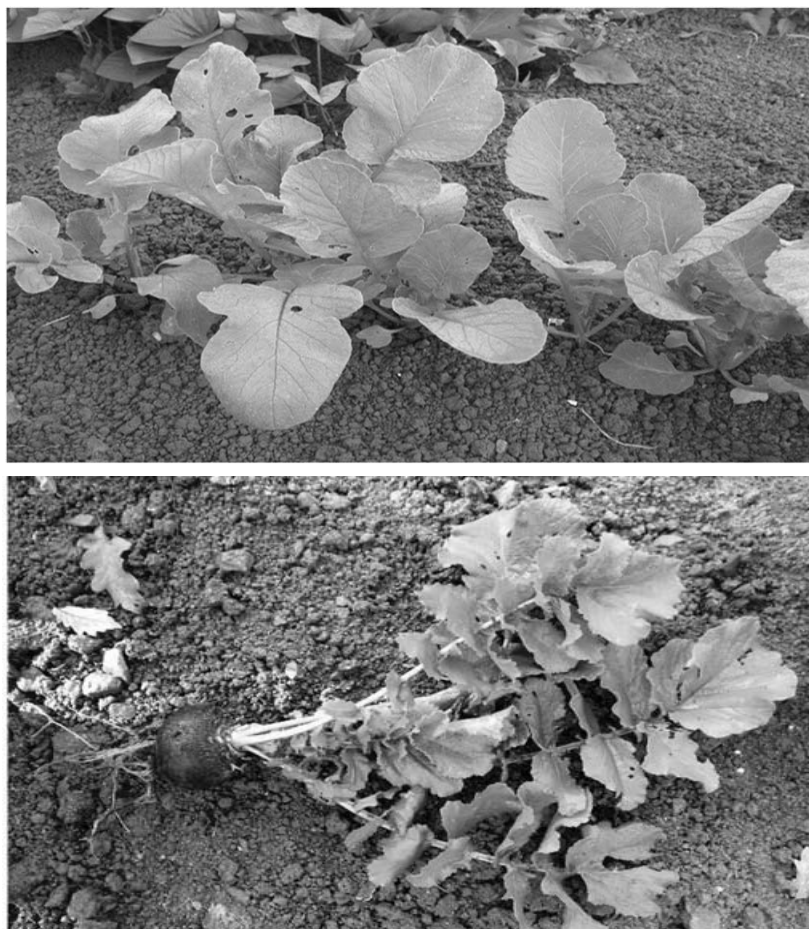


Figure 77. Pictures of black radish aerial parts.

## 2. 흑무 지상부의 추출, 분획 및 분리

### 1) 시료의 추출 및 분획

건조 및 분쇄된 흑무 지상부 가지 705 g을 70% 에탄올 10 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 추출액을 여과하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과한 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 250.1 g을 얻었다. 추출물 25-30 g씩을 각각 증류수 1 L에 현탁시켜 분별 깔때기를 이용해 흑무 지상부 에탄올 추출물 총 136.4 g을 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (10.2 g), ethyl acetate (3.5 g), *n*-butanol (21.0 g) 및 water (100.8 g) 분획물을 얻었다(Figure 78).

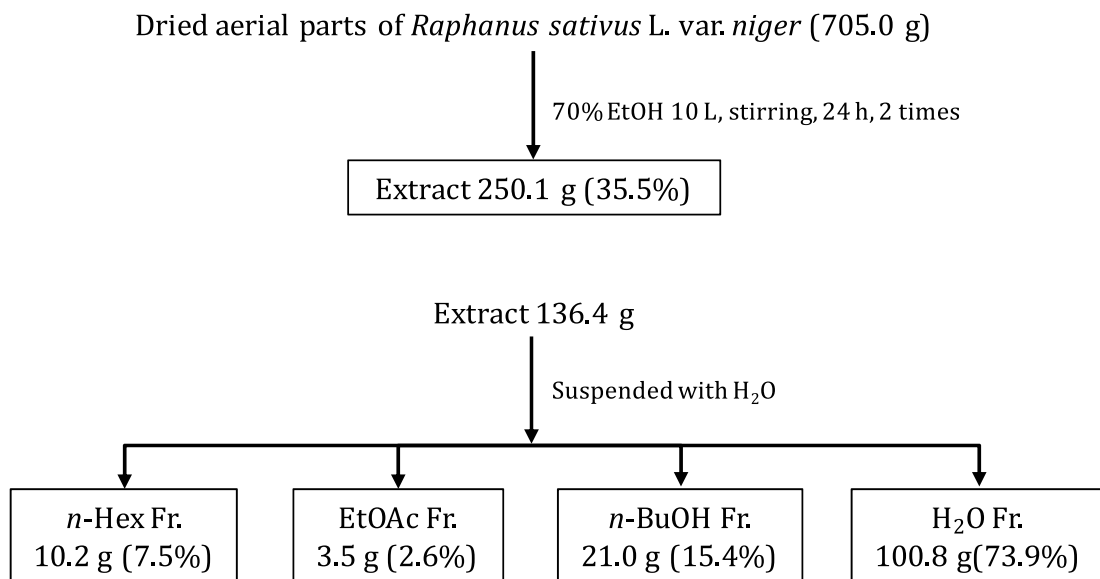


Figure 78. Extraction and fractionation of black radish aerial parts.



## 2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 3.0 g을 분획하기 위하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. MPLC 컬럼은 reverse phase silica gel (KP-C18-HS, 120 g, Biotage Co.)을 사용하였으며, H<sub>2</sub>O-MeOH (10-100%)의 gradient 조건으로 용출하여 총 39개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-MP39).

MPLC fraction들 중 Fr. MP20 (94.1 mg)은 노란색 가루 형태의 단일 화합물로 compound **1**로 확인되었다. Fr. MP17 162.0 mg을 H<sub>2</sub>O-MeOH (1:1)의 조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **2** (13.3 mg)와 compound **5** (7.8 mg)을 얻었으며, Fr. MP18 252.0 mg도 같은 조건으로 Sephadex LH-20 CC를 이용해 compound **4** (2.4 mg)를 얻었다.

Fr. MP23과 MP24를 합한 74.6 mg을 H<sub>2</sub>O-MeOH (2:3)의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **3** (5.4 mg)과 compound **6** (3.2 mg)을 얻었으며, Fr. MP27 (94.1 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7:1)의 용매 조건으로 순상 silica gel CC를 수행하여 compound **7** (9.0 mg)을 얻었다(Figure 79).

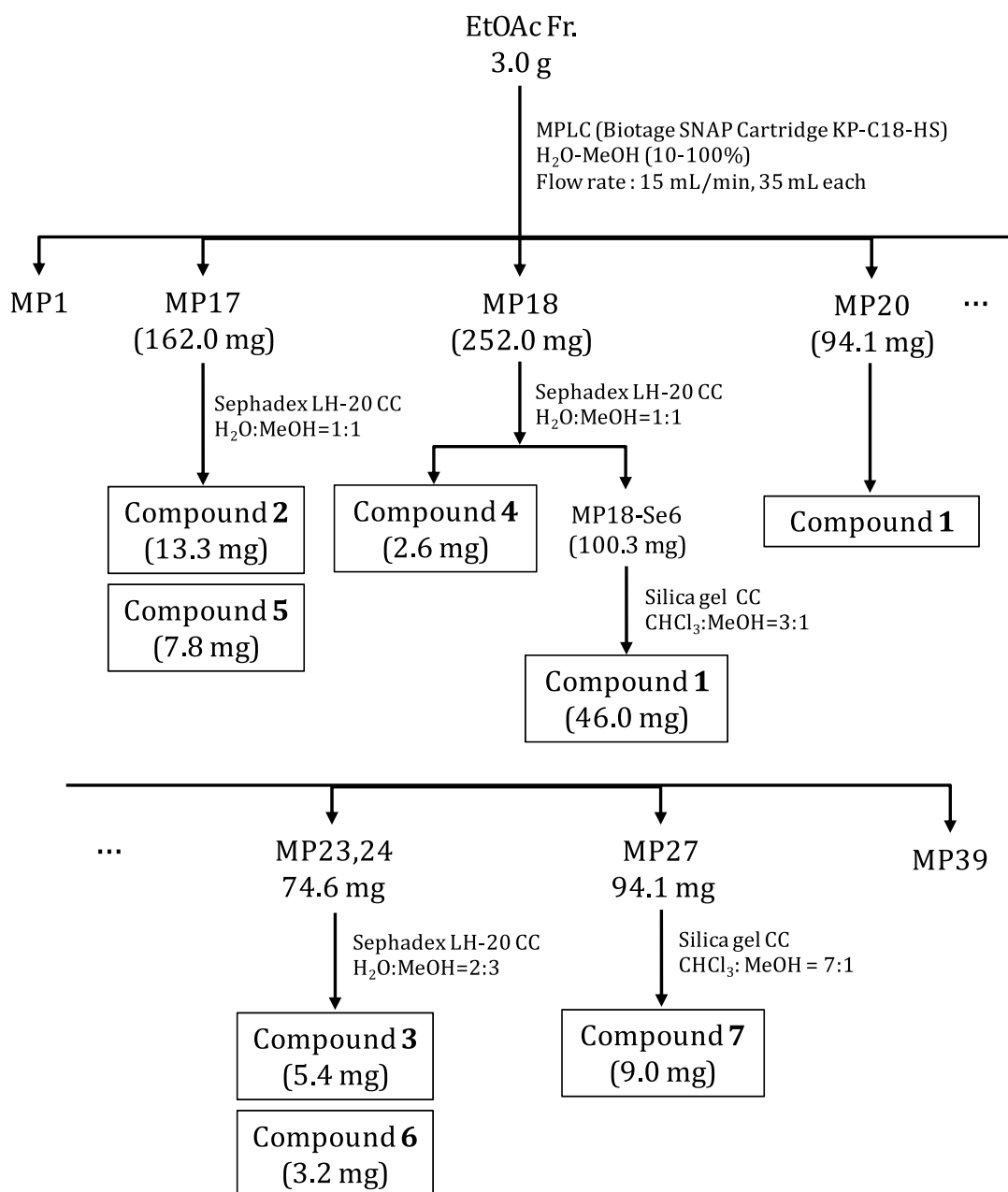


Figure 79. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of black radish aerial parts.

### 3) *n*-Butanol 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 *n*-butanol fraction 5.0 g을 극성에 따라 분획하기 위하여 MPLC를 수행하였다. 컬럼은 reverse phase silica gel (KP-C18-HS, 120 g, Biotage Co.)을 사용하였으며, H<sub>2</sub>O-MeOH (10-100%)의 gradient 조건으로 용출하여 총 39개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-MP39).

얻어진 fraction들 중 Fr. MP8 19.5 mg은 하얀색의 가루 형태의 단일 화합물인 compound **8**로 확인되었다(Figure 80).

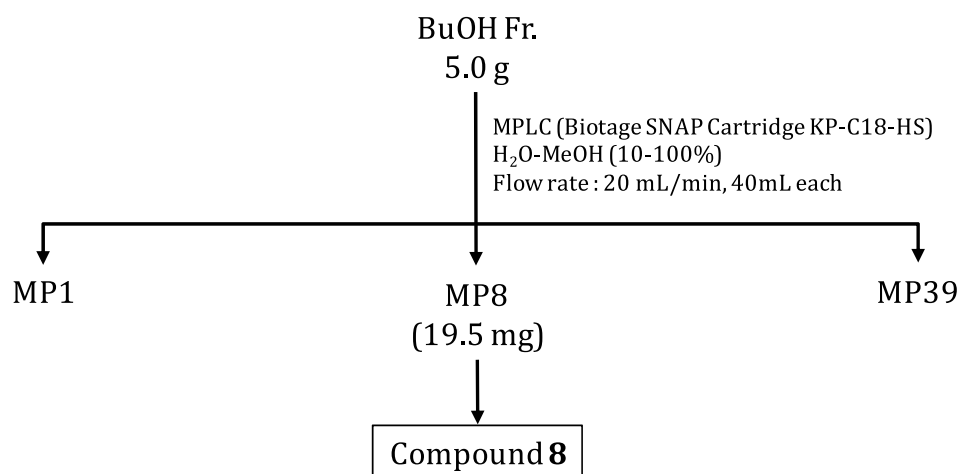


Figure 80. Isolation of compounds from *n*-butanol fraction of black radish aerial parts.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2, 3

Compound 1-3은  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 분석한 결과, 당으로 예상되는 peak들을 제외하고는 거의 유사한 패턴이 나타나는 것으로 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 당을 제외하고 각각 15개의 carbon peak가 관찰되어 flavonoid 계열의 배당체 화합물임을 예상하였다. Compound 1의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.75 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz), 6.92 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)의 signal들을 통하여 flavonoid B환의 proton이 서로 *ortho*-coupling을 하는 대칭 형태의 구조로 예상되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  6.66 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 6.41 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)의 signal들로 flavonoid A환의 proton이 서로 *meta*-coupling을 하고 있음을 예상할 수 있었다. 또한  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 carbonyl group에 해당하는  $\delta_{\text{C}}$  179.8의 peak 및  $\delta_{\text{C}}$  159.8, 136.6의 olefinic carbon들을 통해 문헌<sup>73</sup>과 비교하여 compound 1-3의 aglycone이 kaempferol임을 확인하였다.

Compound 1의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.55 (1H, brs), 5.39 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 2개의 anomeric proton이 관찰되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.24 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz), 0.94 (3H, d,  $J = 5.5$  Hz)의 2개의 methyl proton이 확인되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR 및 HMBC spectrum을 통해  $\delta_{\text{C}}$  103.6, 99.9의 anomeric carbon과  $\delta_{\text{C}}$  73.7-71.4, 18.2, 17.2의 10개의 sugar carbon을 확인하였다. 당 peak들에 대하여 문헌<sup>74</sup>을 참고하여 2개의  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside가 있음을 예상하였고, HMBC spectrum을 통하여 각각의 rhamnose가 kaempferol의 3번과 7번 위치에 연결되어 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>75</sup>과 비교하여 compound 1은 kaempferol 3,7-*O*- $\alpha$ -L-dirhamnopyranoside, 관용명으로는 kaempferitrin임을 확인하였다(Figure 81-83, Table 14).

Compound 2는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.55 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz)의 2개의 anomeric proton이 관찰되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.84-3.16의 signal들과  $\delta_{\text{H}}$  1.12 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz)를 통하여 2개의 당이 있을 것이라 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR 과 HMBC spectrum을 통하여  $\delta_{\text{C}}$  101.2, 98.3의 2

개의 anomeric carbon과 9개의 sugar carbon ( $\delta_C$  71.6–64.3, 17.9)들을 확인하였으며, 당 peak들에 대하여 문헌<sup>46</sup>과 비교하여 1개의  $\alpha$ -L-arabinopyranoside와 1개의  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside로 예상하였다. HMBC spectrum을 통하여 각각의 당들이 arabinose는 kaempferol의 3번 위치에, rhamnose는 7번 위치에 연결되어 있음을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>76</sup>의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum과 비교하여 compound **2**는 kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside임을 확인하였으며, 이 화합물의  $^1\text{H}$ -NMR data는 본 논문을 통하여 처음 밝힌다(Figure 81, 84, 85, Table 14).

Compound **3**은  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 비교하였을 때,  $\delta_C$  103.6, 73.3, 72.2, 72.3, 72.1, 17.8의 6개의 carbon signal들과  $\delta_H$  5.56 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz)의 anomeric proton의 coupling constant 값을 통해  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 하나가 결합되어 있는 것을 예상하였으며, HMBC spectrum을 통하여 kaempferol의 3번 위치에 연결되어 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>77</sup>과 비교한 결과, compound **3**은 kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, 관용명은 afzelin임을 확인하였다(Figure 81, 86, 87, Table 14)

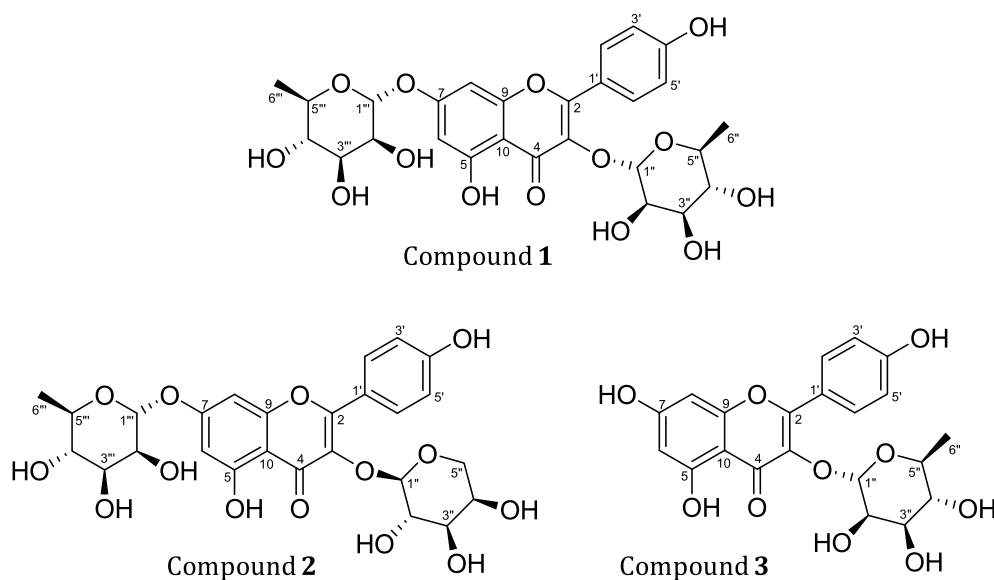


Figure 81. Chemical structures of isolated compounds **1-3** from black radish aerial parts.

Table 14.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **1–3** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$  or DMSO- $d_6$ ).

No.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>		Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
2	159.8		156.7		158.7	
3	136.6		133.8		136.3	
4	179.8		177.7		179.7	
5	163.0		160.8		163.7	
6	100.6	6.41 (1H, d, 2.0)	99.4	6.45 (1H, d, 2.0)	100.1	6.20 (1H, s)
7	163.6		161.6		166.5	
8	95.7	6.66 (1H, d, 2.0)	94.6	6.83 (1H, d, 2.0)	95.0	6.37 (1H, s)
9	158.1		155.9		159.4	
10	107.6		105.6		105.9	
1'	122.5		120.5		122.8	
2',6'	132.1	7.75 (2H, d, 8.7)	131.1	8.13 (2H, d, 8.7)	132.0	7.77 (2H, d, 8.8)
3',5'	116.7	6.92 (2H, d, 8.7)	115.3	6.88 (2H, d, 8.7)	116.7	6.94 (2H, d, 8.8)
4'	161.8		160.3		161.8	
1''	99.9	5.55 (1H, brs)	101.2	5.35 (1H, d, 5.0)	103.6	5.68 (1H, d, 1.6)
2''	71.4	4.03–3.49 (4H, sugar H)	70.8	3.83–3.17 (4H, sugar H)	72.3	4.21–3.35 (4H, sugar H)
3''	72.2		71.5		72.2	
4''	73.7		66.0		73.3	
5''	71.8		64.3		72.1	
6''	18.2	1.27 (3H, d, 6.0)	–		17.8	0.92 (3H, d, 5.6)
1'''	103.6	5.39 (1H, d, 1.4)	98.3	5.55 (1H, d, 1.3)		
2'''	72.0	4.25–3.35 (4H, sugar H)	69.8	3.83–3.17 (4H, sugar H)		
3'''	72.2		70.2			
4'''	73.3		71.6			
5'''	72.2		70.1			
6'''	17.8	0.94 (3H, d, 5.5)	17.9	1.12 (3H, d, 6.4)		

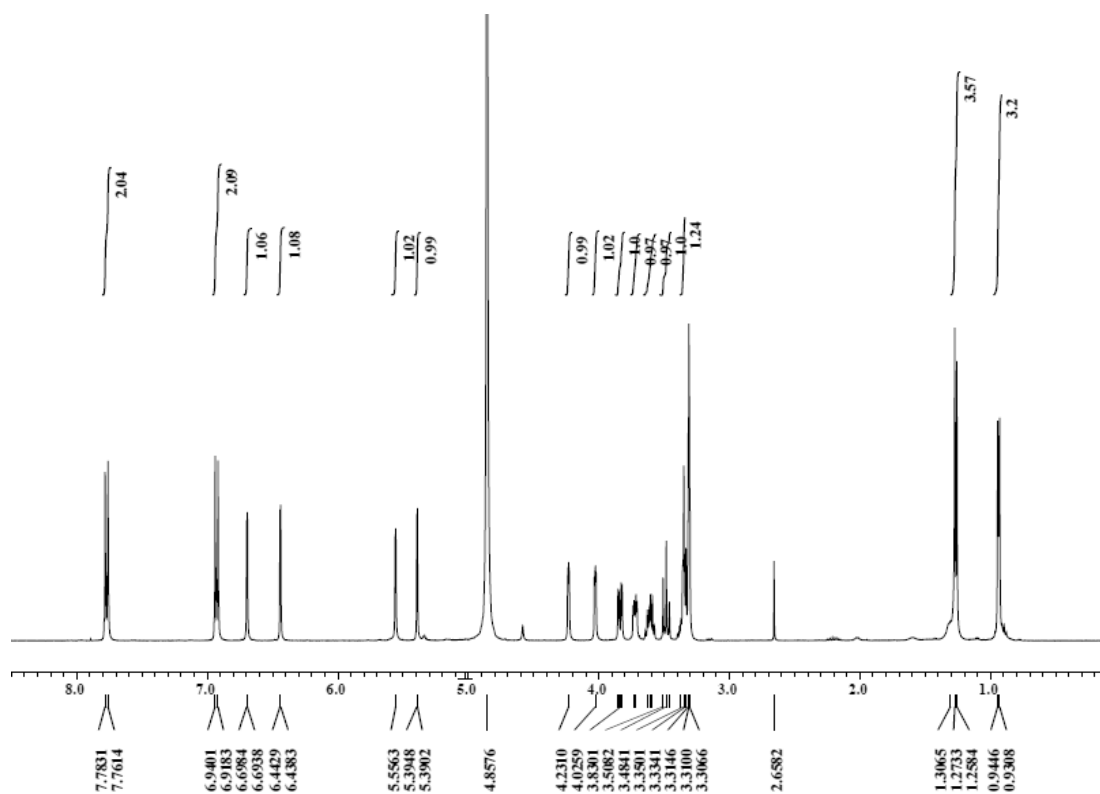


Figure 82.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .

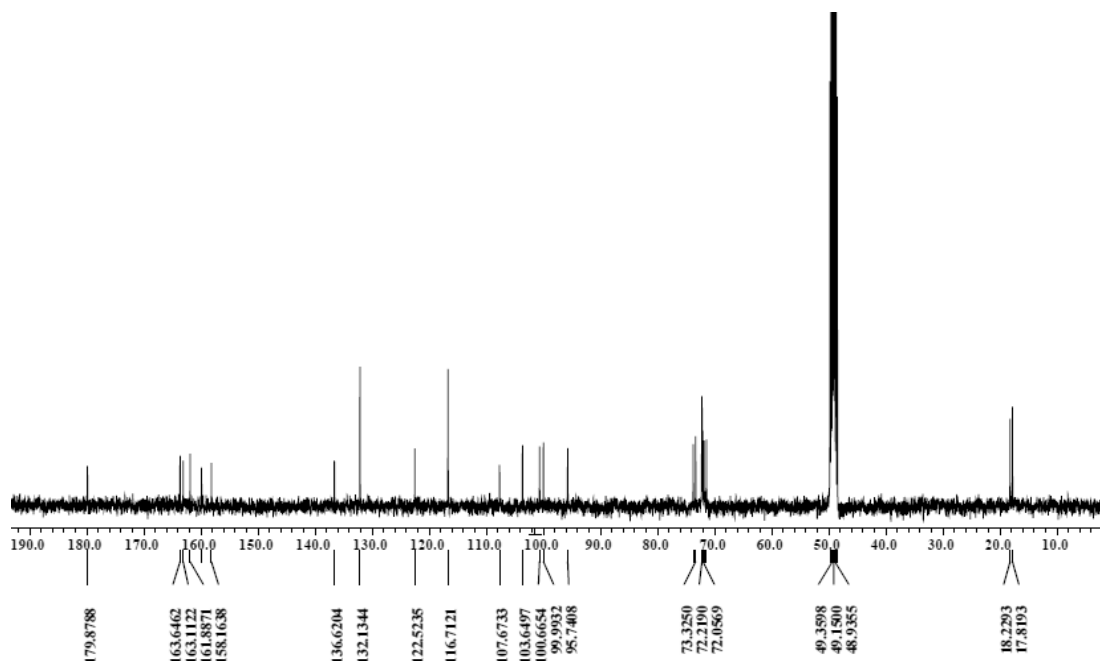


Figure 83.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **1** in methanol- $d_4$ .

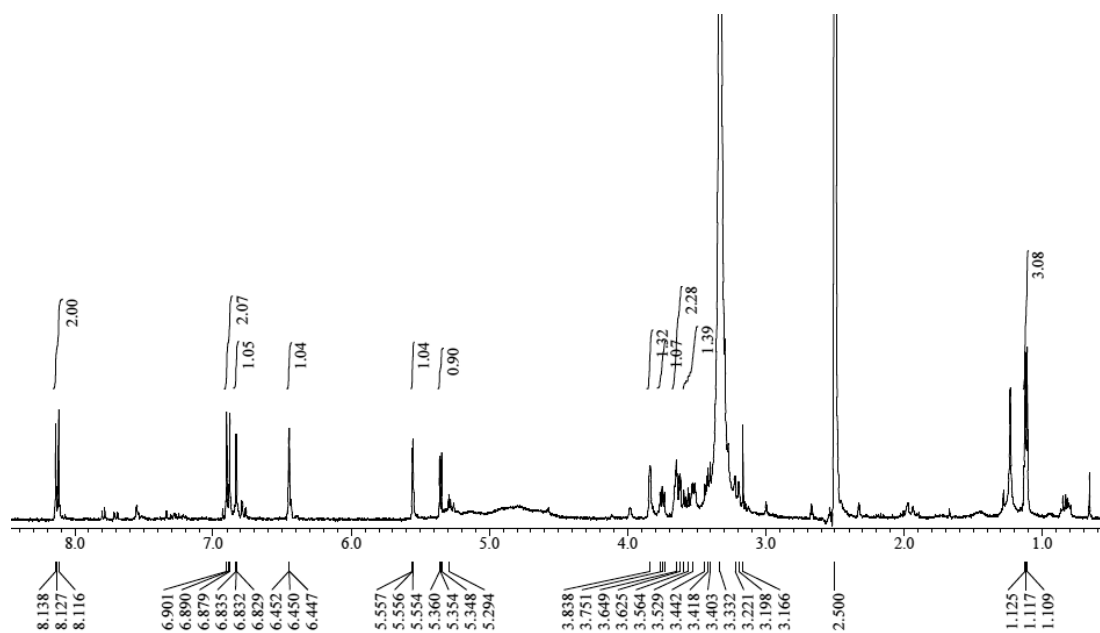


Figure 84.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{DMSO}-d_6$ .

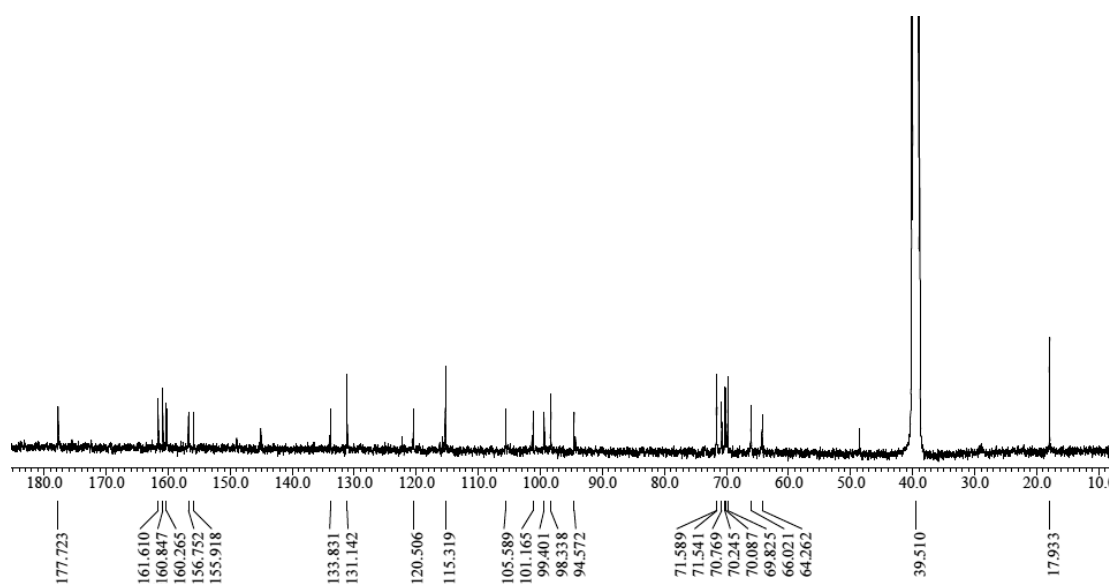


Figure 85.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{DMSO}-d_6$ .



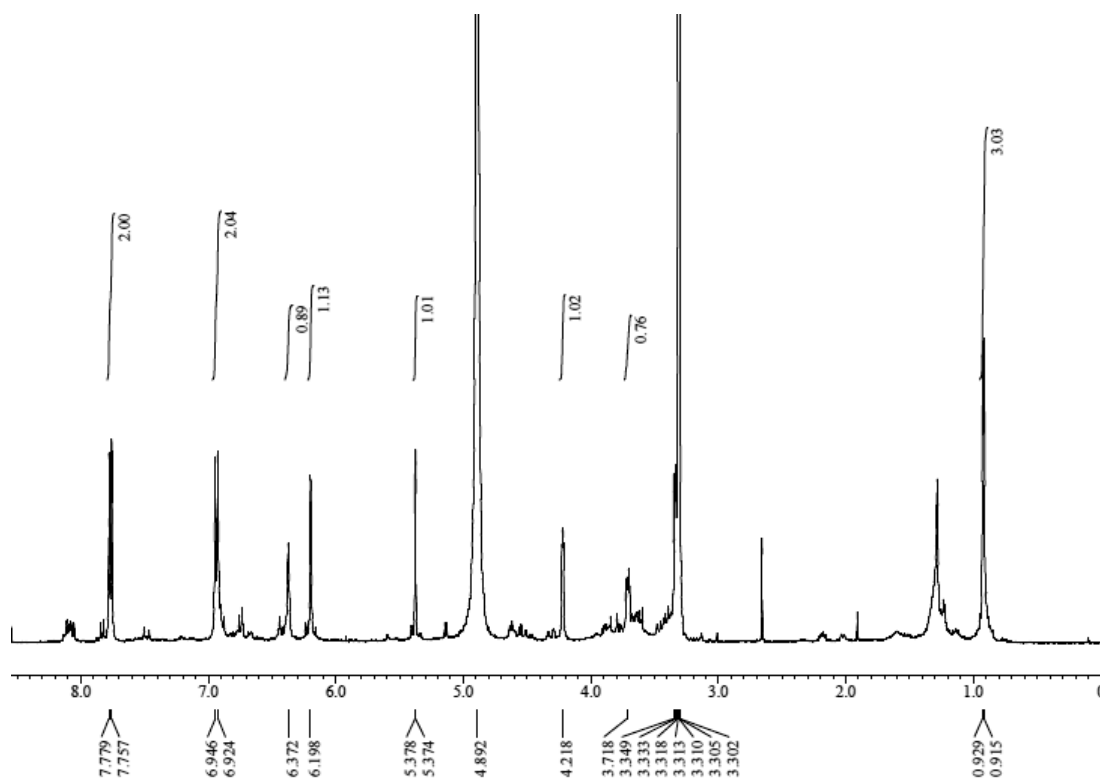


Figure 86.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **3** in methanol- $d_4$ .

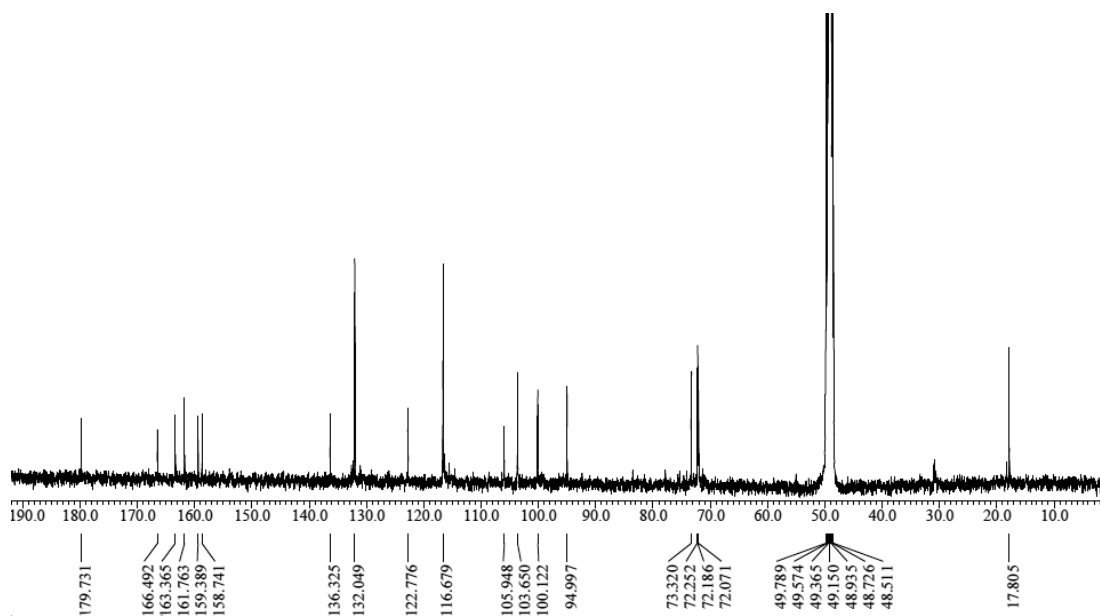


Figure 87.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **3** in methanol- $d_4$ .

## 2) Compound 4

Compound 4는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 11개의 carbon peak가 관찰되었으며, 이 중  $\delta_{\text{C}}$  174.6의 peak는 carbonyl group으로,  $\delta_{\text{C}}$  185.8과 113.5의 peak들은  $sp^2$  혼성을 나타내는 olefin group의 carbon들로 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  89.1과 67.4의 peak들은 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는  $sp^3$  혼성을 갖는 carbon임을 예상할 수 있었고,  $\delta_{\text{C}}$  31.2, 27.6, 27.1의 signal들을 통해 3개의 methyl group이 있는 것이 관찰되었다.

이러한 결과들을 바탕으로 문헌<sup>78</sup>과 비교하여 compound 4는 loliolide임을 확인하였다(Figure 88-90, Table 15).

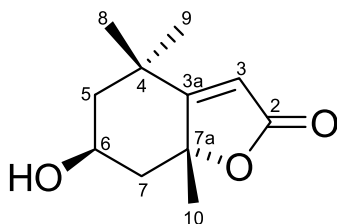


Figure 88. Chemical structure of isolated compound 4 from black radish aerial parts.

Table 15.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **4** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$ )

No.	Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
2	174.6	
3	113.5	5.75 (1H, s)
3a	185.8	
4	37.3	
5	48.1	1.99 (1H, dt, 14.4, 2.4) 1.53 (1H, dd, 14.8, 3.6)
6	67.4	4.22 (1H, m)
7	46.6	2.42 (1H, dt, 13.6, 2.4) 1.73 (1H, m)
7a	89.1	
8	31.2	1.76 (3H, s)
9	27.1	1.27 (3H, s)
10	27.6	1.47 (3H, s)

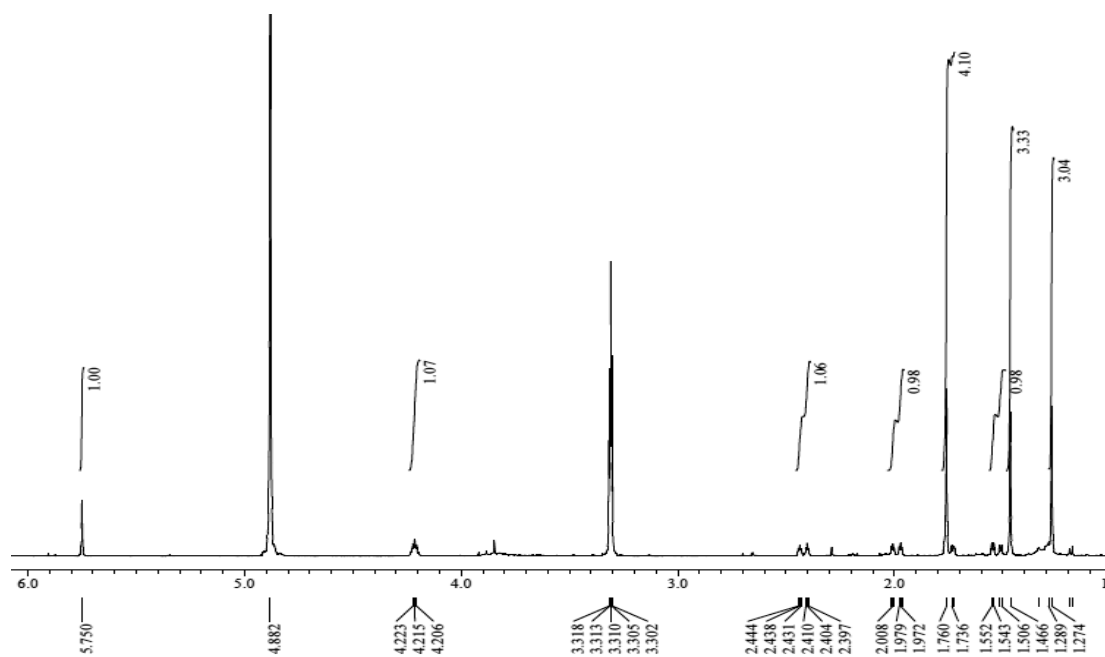


Figure 89.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **4** in methanol- $d_4$ .

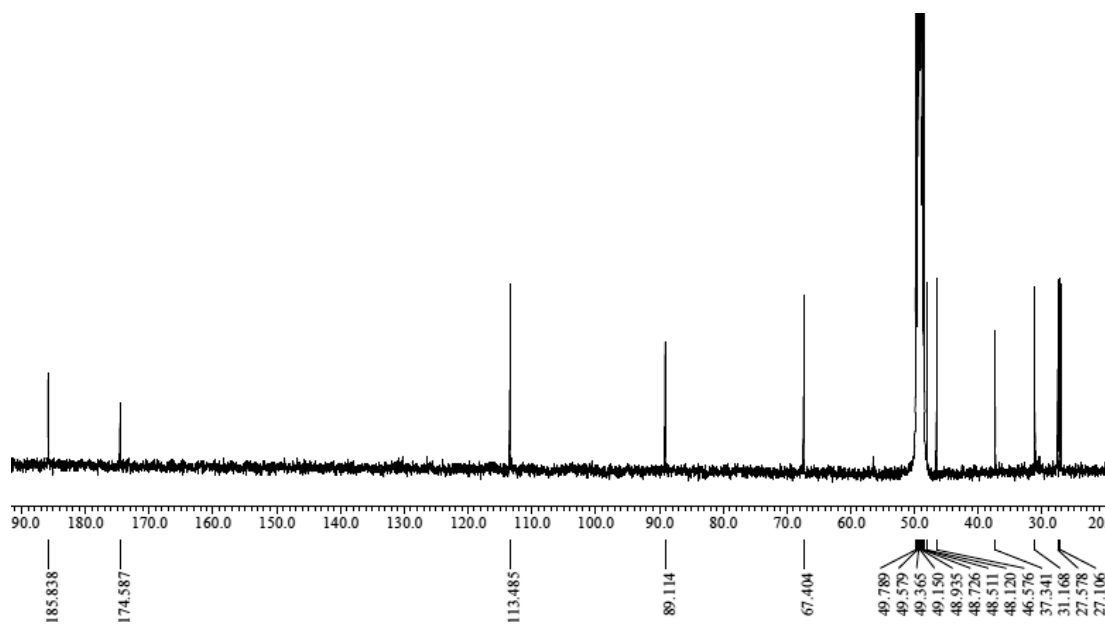


Figure 90.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **4** in methanol- $d_4$ .

### 3) Compound 5, 6

Compound 5는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 통하여 총 9개의 carbon peak가 관찰되었으며 모두  $sp^2$  혼성 구조를 갖고 있음을 예상할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.58 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz)과  $\delta_{\text{H}}$  6.29 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz)의 signal들을 통해 *trans*-olefin 구조를 예상할 수 있었으며,  $\delta_{\text{H}}$  7.44 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)와  $\delta_{\text{H}}$  6.80 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)의 signal들을 통해 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring이 있음을 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서는  $\delta_{\text{C}}$  171.6의 carbonyl group이 관찰되었고,  $\delta_{\text{C}}$  146.4와 116.3의 signal은 olefinic carbon으로 예상하였으며, 나머지  $\delta_{\text{C}}$  161.2, 131.2, 127.5, 116.9의 signal들은 대칭 구조의 aromatic carbon으로 예상하였다. 이러한 결과를 바탕으로 문헌<sup>79</sup>과 비교하여 compound 5는 *p*-coumaric acid임을 확인하였다(Figure 91-93, Table 16).

Compound 6은  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.53 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz)과  $\delta_{\text{H}}$  6.25 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz)의 signal들은 coupling constant 값을 통하여 *trans*-olefin 구조의 proton들로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  7.03 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.94 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.77 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz)의 signal들을 통해 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하고 있는 하나의 aromatic ring이 있을 것이라 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  4.21 (2H, q,  $J = 7.3$  Hz)의 peak는 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는  $sp^3$  혼성의 methylene proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.31 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz)의 methyl group이 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서는 총 11개의 carbon peak가 관찰되었으며, 이들은 1개의 carbonyl group ( $\delta_{\text{C}}$  169.5)과 6개의 aromatic carbon ( $\delta_{\text{C}}$  149.7, 147.0, 123.0, 127.9, 116.6, 115.2)과 2개의 olefinic carbon ( $\delta_{\text{C}}$  146.9, 115.4), 2개의 ethyl group ( $\delta_{\text{C}}$  61.6, 14.8)으로 관찰되었다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>80</sup>과 비교한 결과, compound 6은 ethyl caffeate임을 확인하였다(Figure 91, 94, 95, Table 16).

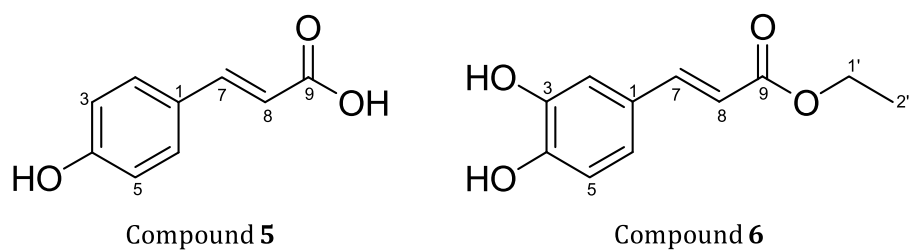


Figure 91. Chemical structures of isolated compounds **5** and **6** from black radish aerial parts.

Table 16.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **5** and **6** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
1	127.5		127.9	
2	131.2	7.44 (1H, d, 8.7)	115.2	7.03 (1H, d, 1.8)
3	116.9	6.80 (1H, d, 8.7)	147.0	
4	161.2		149.7	
5	116.9	6.80 (1H, d, 8.7)	116.6	6.77 (1H, d, 8.2)
6	131.2	7.44 (1H, d, 8.7)	123.0	6.94 (1H, dd, 8.2, 1.8)
7	146.4	7.58 (1H, d, 16.0)	146.9	7.53 (1H, d, 15.6)
8	116.3	6.29 (1H, d, 16.0)	115.4	6.25 (1H, d, 15.6)
9	171.6		169.5	
1'			61.6	4.21 (2H, q, 7.3)
2'			14.8	1.31 (3H, t, 7.3)

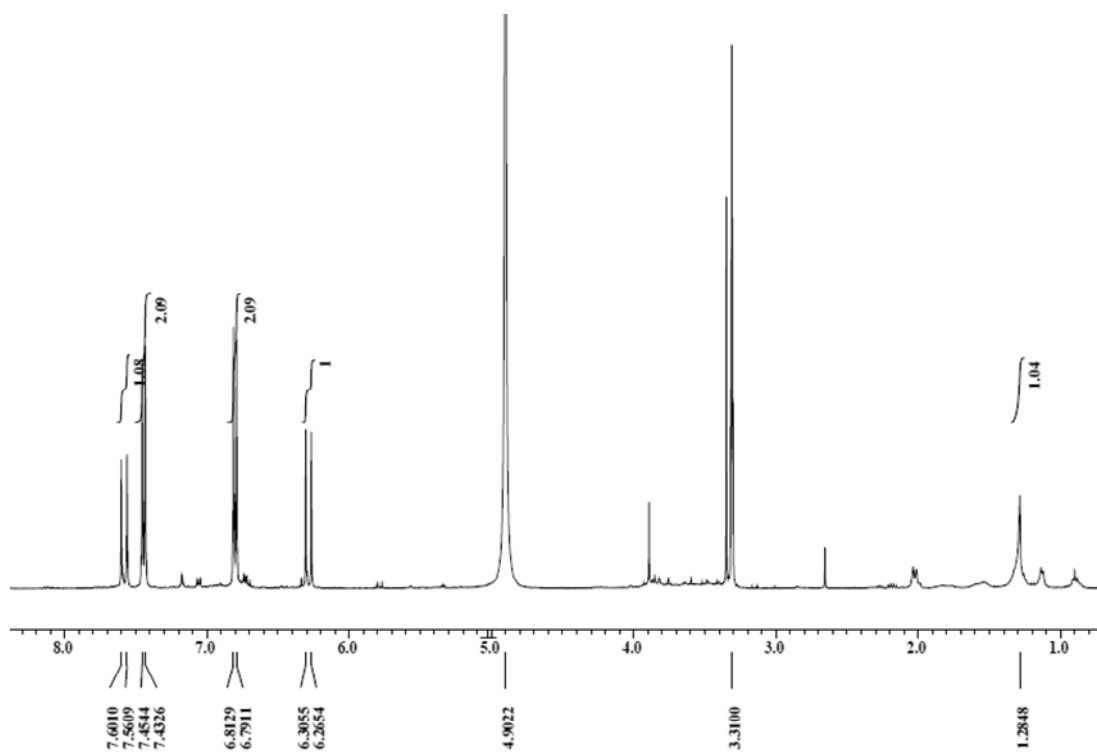


Figure 92.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **5** in methanol- $d_4$ .

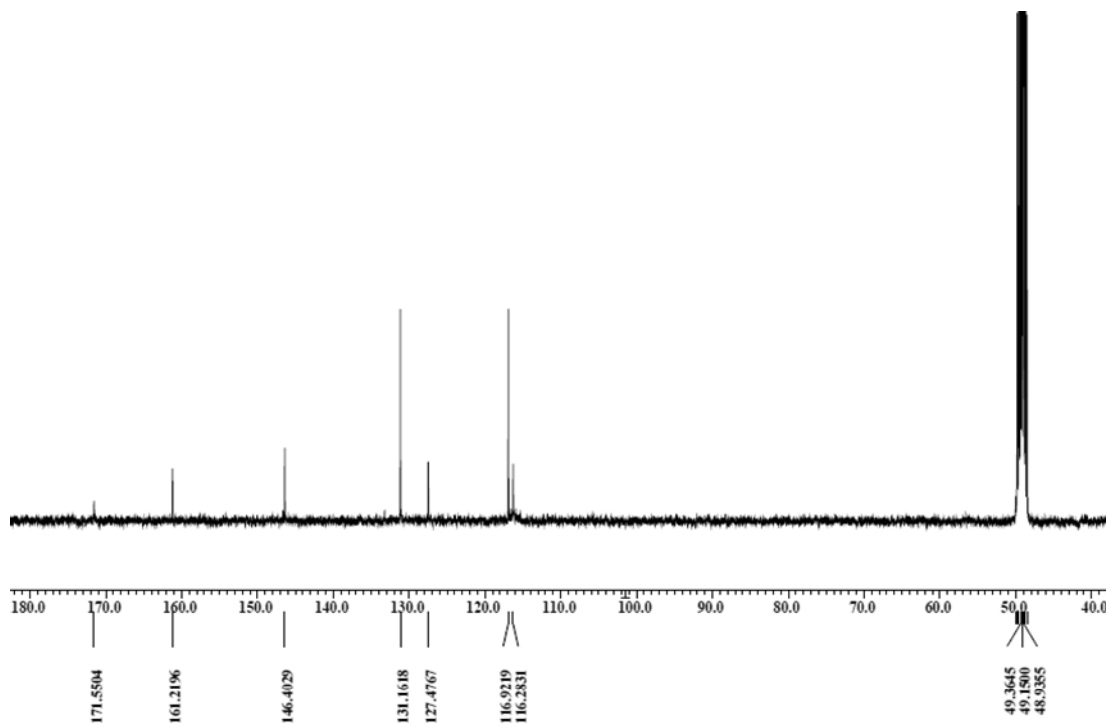


Figure 93.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **5** in methanol- $d_4$ .

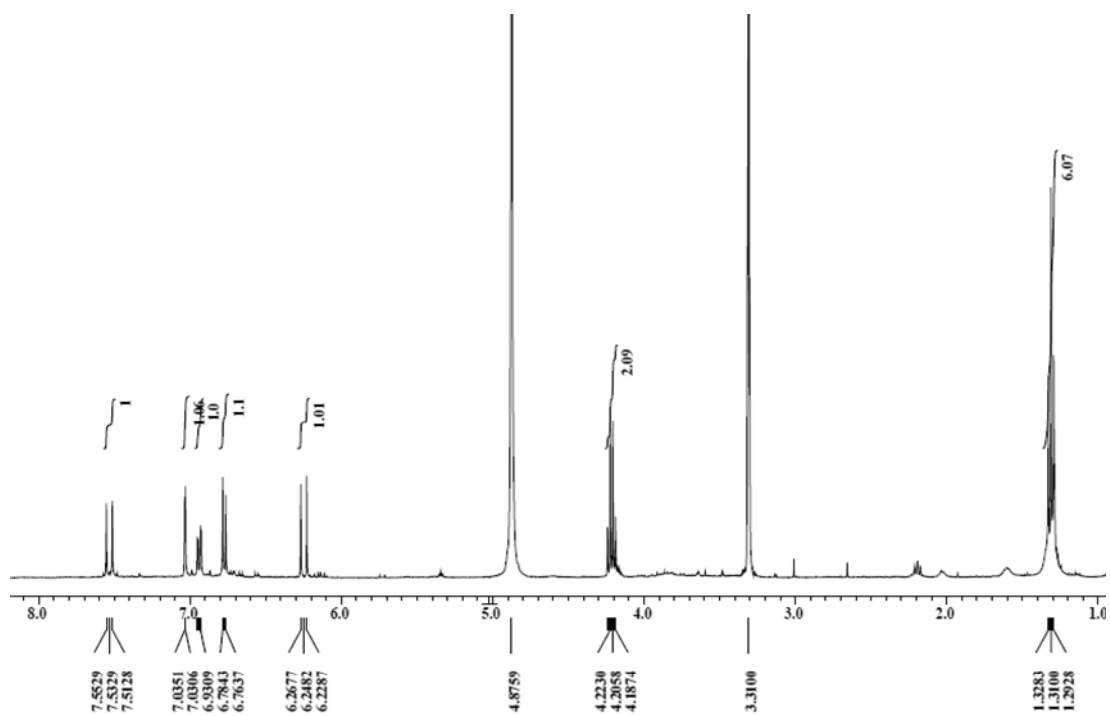


Figure 94.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **6** in methanol- $d_4$ .

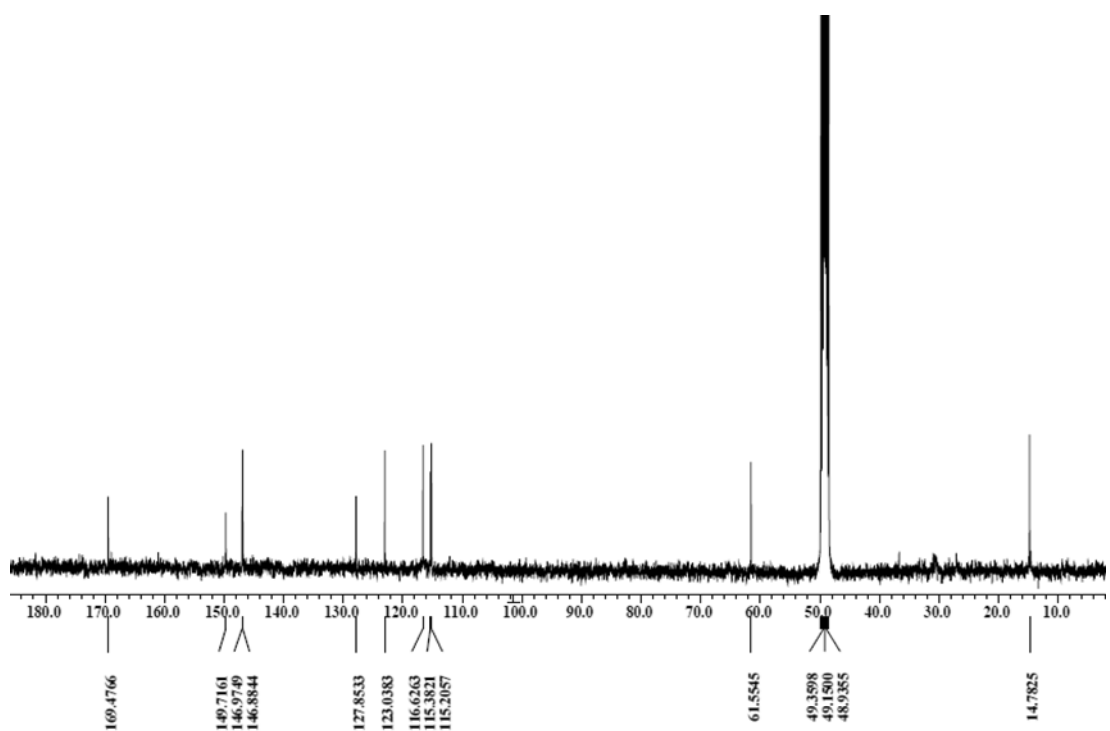


Figure 95.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **6** in methanol- $d_4$ .



#### 4) Compound 7

Compound 7은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석 결과, 총 18개의 carbon peak가 확인되었다.  $\delta_{\text{C}}$  178.9의 carbonyl group이 관찰되었으며,  $\delta_{\text{C}}$  136.7, 134.5, 131.3, 126.5의 signal들을 통해 2개의 이중결합 구조가 있을 것이라 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  76.0, 75.9, 73.2의 signal들은 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 3개의 methine carbon으로 예상하였다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.72 (2H, m), 5.45 (2H, m)의 peak에 해당하는 4개의 olefinic methine proton이 관찰되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.05 (1H, q,  $J = 5.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.96 (1H, t,  $J = 5.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.46 (1H, m)의 signal들은 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methine proton들로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  0.97 (3H, t,  $J = 7.8$  Hz)의 peak는 methyl기로 예상하였다.

HMBC spectrum을 통하여 각 부분구조들의 연결 관계를 확인하였으며, 이를 문헌<sup>81</sup>과 비교한 결과, compound 7은 fulgic acid임을 확인하였다(Figure 96-98, Table 17).

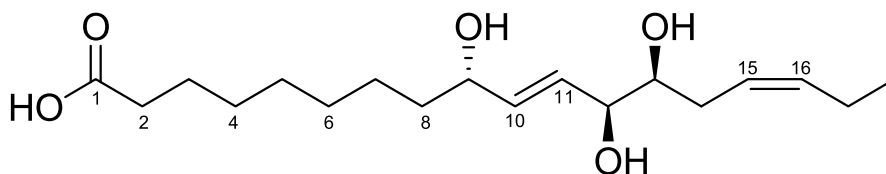


Figure 96. Chemical structure of isolated compound 7 from black radish aerial parts.

Table 17.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **7** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
1	178.9	
2	35.7	2.26 (2H, t, 7.8)
3	26.5	1.60 (2H, m)
4	30.4	1.34-1.29 (2H, m)
5	30.6	1.34-1.29 (2H, m)
6	30.7	1.34-1.29 (2H, m)
7	26.7	1.34-1.29 (2H, m)
8	38.5	1.50 (2H, m)
9	73.2	4.05 (1H, q, 5.0)
10	136.7	5.72 (1H, m)
11	131.3	5.72 (1H, m)
12	75.9	3.96 (1H, t, 5.0)
13	76.0	3.46 (1H, m)
14	31.7	2.34(1H, m) 2.14(1H, m)
15	126.5	5.45 (1H, m)
16	134.5	5.45 (1H, m)
17	21.8	2.04 (2H, m)
18	14.7	0.97 (3H, t, 7.8)

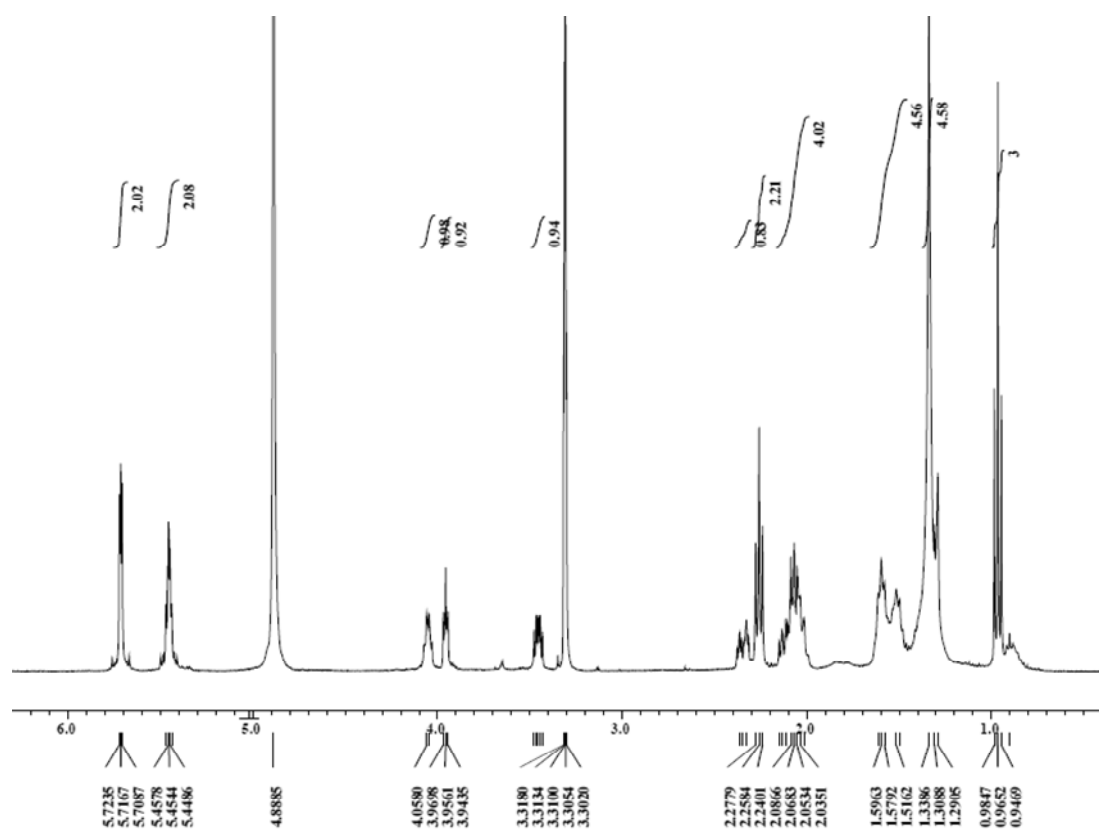


Figure 97.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **7** in methanol- $d_4$ .

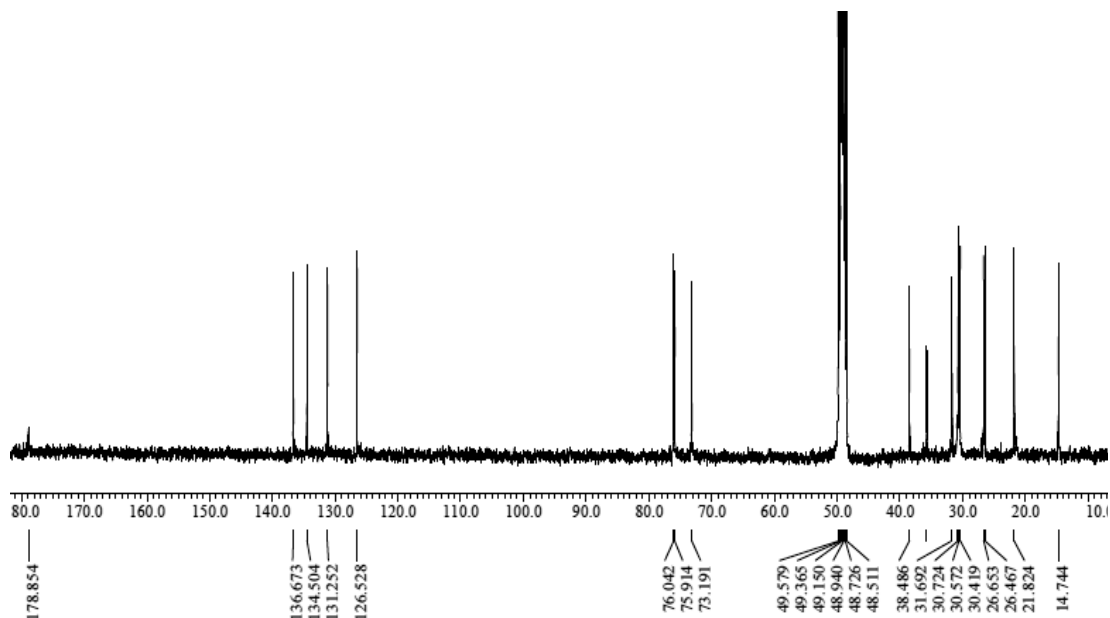


Figure 98.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **7** in methanol- $d_4$ .

## 5) Compound 8

Compound 8의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.69 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.36 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.12 (1H, dt,  $J = 7.3, 0.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.04 (1H, dt,  $J = 7.3, 0.9$  Hz)의 signal들을 통하여 aromatic ring이 있을 것이라 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum 분석 결과, 총 11개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $\delta_{\text{C}}$  174.6의 peak를 통해 carbonyl group이 있을 것이라 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  56.7의 methine carbon과  $\delta_{\text{C}}$  28.6의 methylene carbon을 확인하였으며, 2D-NMR 인 COSY, HMQC, HMBC spectrum을 통하여 각 peak들의 연결 관계를 확인하였고, 그 결과 indole 계열의 화합물에 methylene과 methine carbon 및 carbonyl group이 인접해 있음을 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>82</sup>과 비교하여 compound 8은 tryptophan임을 확인하였다(Figure 99-101, Table 18).

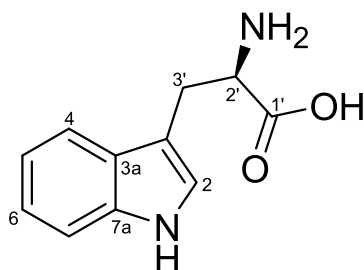


Figure 99. Chemical structure of isolated compound 8 from black radish aerial parts.

Table 18.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **8** (400 and 100 MHz, methanol- $d_4$ ).

No.	Compound <b>8</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)
2	125.3	7.20 (1H, s)
3	109.6	
3a	128.6	
4	119.5	7.69 (1H, d, 7.8)
5	120.2	7.04 (1H, dt, 7.3, 0.9)
6	122.9	7.12 (1H, dt, 7.3, 0.9)
7	112.6	7.36 (1H, d, 7.8)
7a	138.5	
1'	174.6	
2'	56.7	3.89 (1H, dd, 9.4, 4.0)
3'	28.6	3.52 (1H, dd, 15.1, 4.1) 3.16 (1H, dd, 15.1, 9.4)

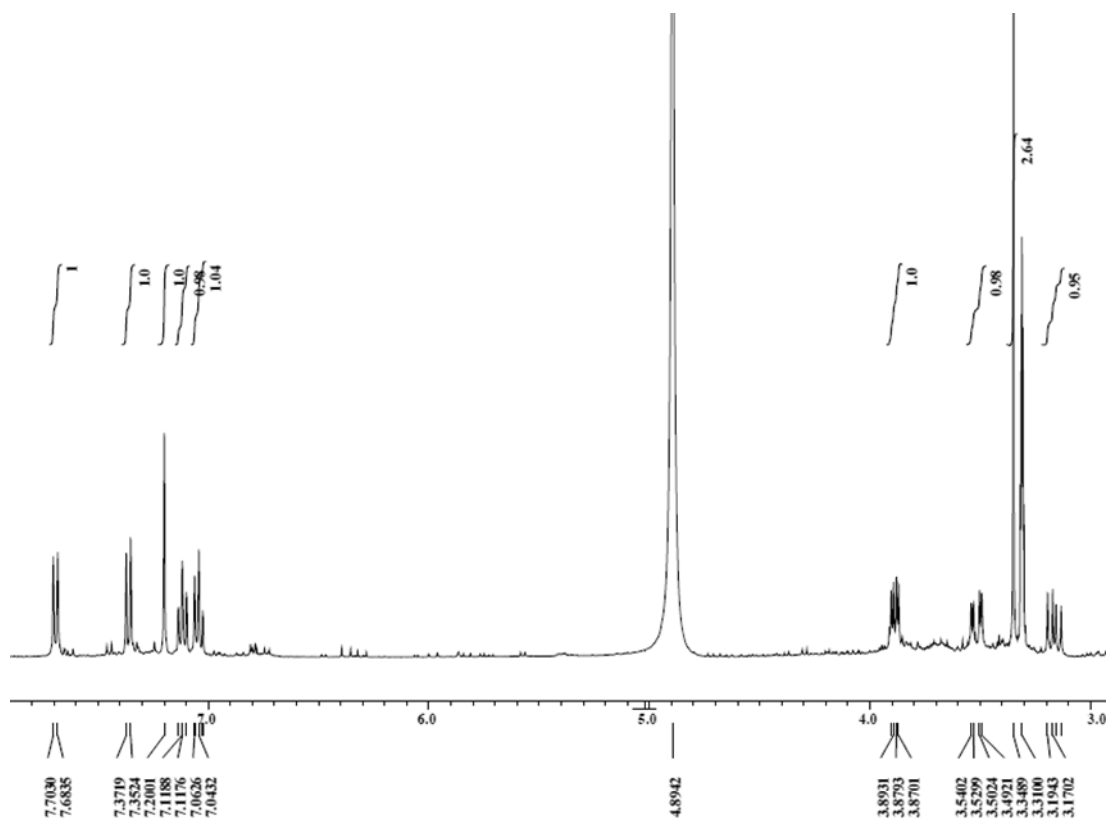


Figure 100.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 8 in methanol- $d_4$ .

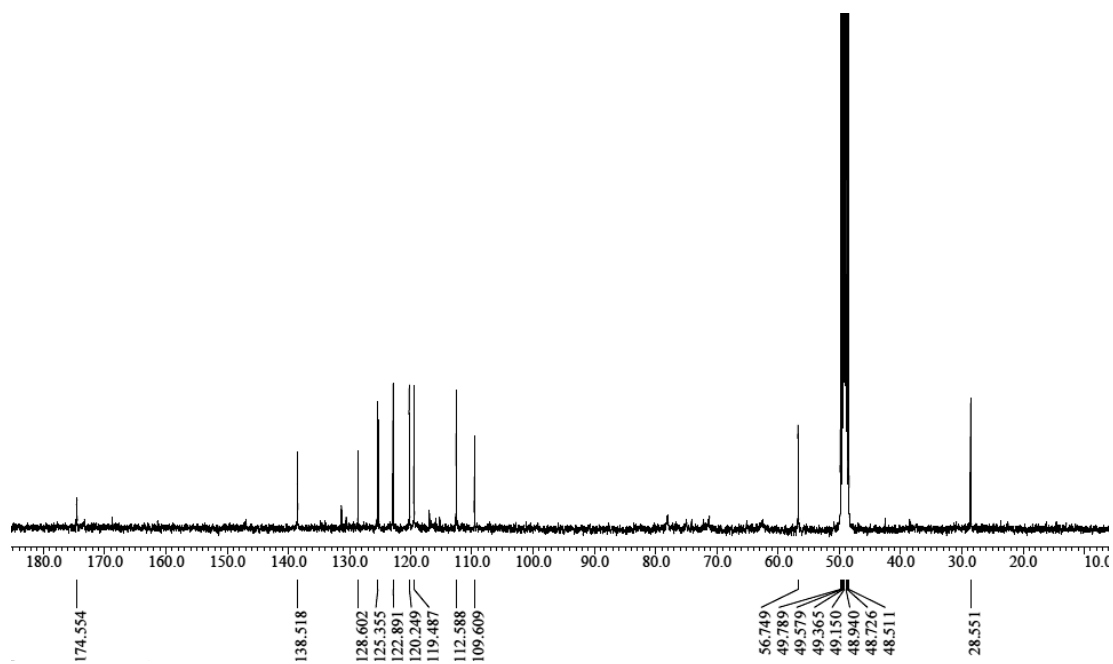


Figure 101.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 8 in methanol- $d_4$ .

#### 4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항산화

###### (1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 검정곡선을 이용하여 흑무 지상부 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서  $101.2 \pm 1.3$  mg/g GAE를 나타내었으며, 분획물 중 EtOAc fraction에서  $269.1 \pm 3.4$  mg/g GAE로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 102).

또한 총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin의 검정곡선을 이용하여 추출물 및 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었으며, 실험 결과 EtOAc와 BuOH fraction에서 각각  $36.2 \pm 2.1$ ,  $17.5 \pm 1.5$  mg/g QE의 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 103).

흑무와 같은 십자화과 식물들의 총 폴리페놀 함량을 선행연구들을 통해 비교해본 결과, 백무 뿌리는  $19.05 \pm 3.32$  mg/g GAE<sup>83</sup>, 백무 무청은  $62.08 \pm 0.12$  mg/g GAE<sup>84</sup>라는 보고가 있으며, 브로콜리 꽃송이 및 줄기에서는 각각  $25.34 \pm 6.25$ ,  $16.87 \pm 0.35$  mg/g TE<sup>85</sup>로 보고되었다. 이러한 데이터들은 사용된 시료, 추출방법, 실험절차, 표준물질 등이 다르기 때문에 각 결과 간의 차이가 크게 나타날 수 있다.

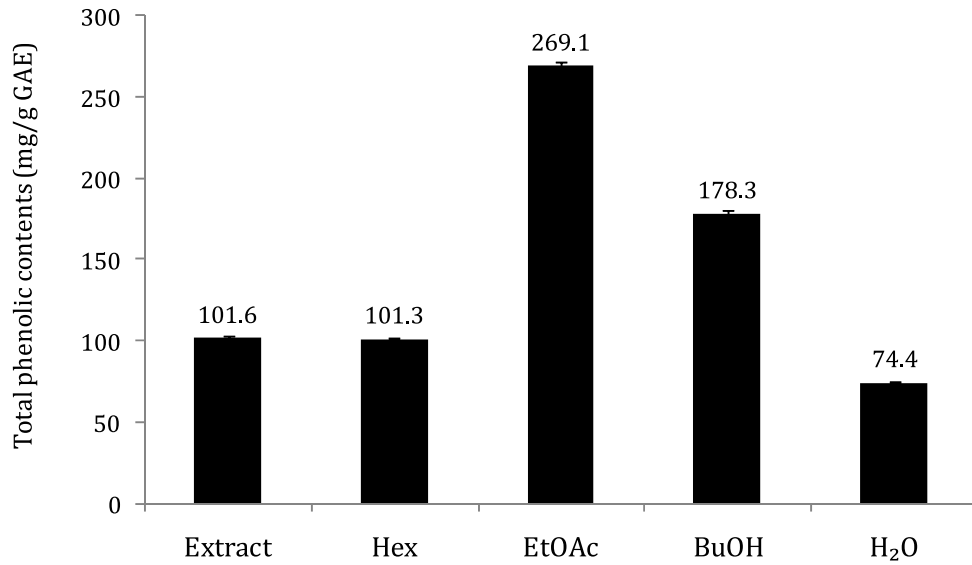


Figure 102. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from black radish aerial parts. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

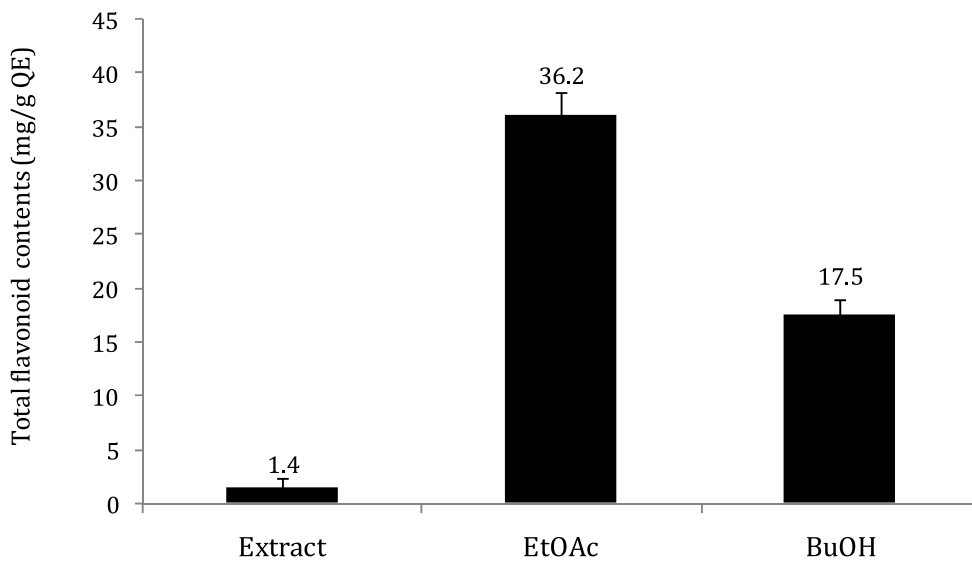


Figure 103. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from black radish aerial parts. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



(2) DPPH radical 소거 활성

흑무 지상부 추출물 및 용매 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들에 대하여 15.63-500 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각의 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

그 결과, EtOAc, BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 207.8, 294.3 µg/mL로 대조군으로 사용한 BHT (SC<sub>50</sub> = 238.8 µg/mL)와 유사한 DPPH radical 소거활성이 있음을 확인하였다(Figure 104, Table 19).

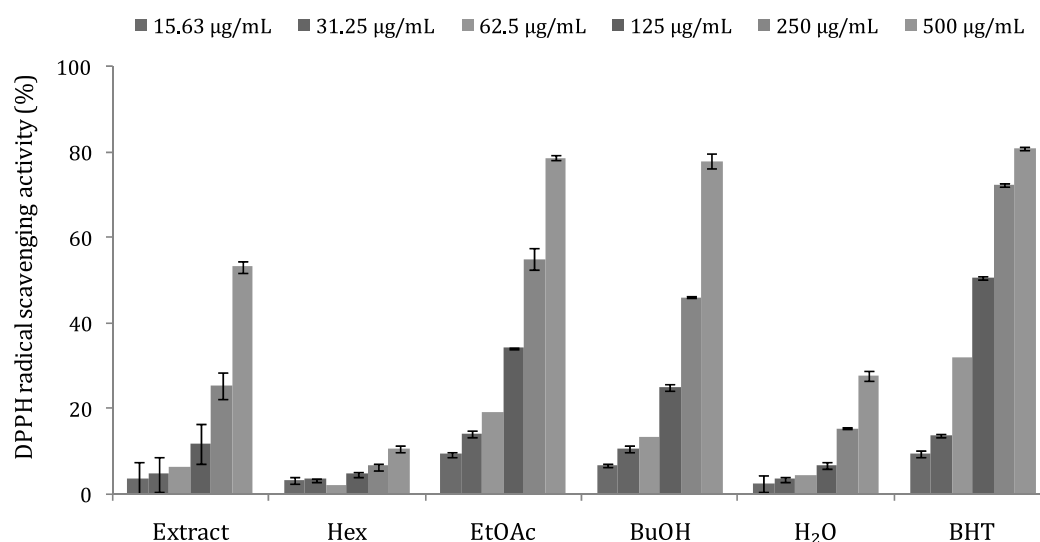


Figure 104. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts. The data are expressed as a percentage and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 19. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts.

	Extract	Hex	EtOAc	BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	471.8	>500	207.8	294.3	>500	238.8

(2) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

흑무 지상부 추출물 및 용매 분획물의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들에 대하여 15.63-500 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각의 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

그 결과, EtOAc 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 57.8 µg/mL로 추출물과 분획물들 중 가장 낮은 SC<sub>50</sub> 값을 나타냈다(Figure 105, Table 20).

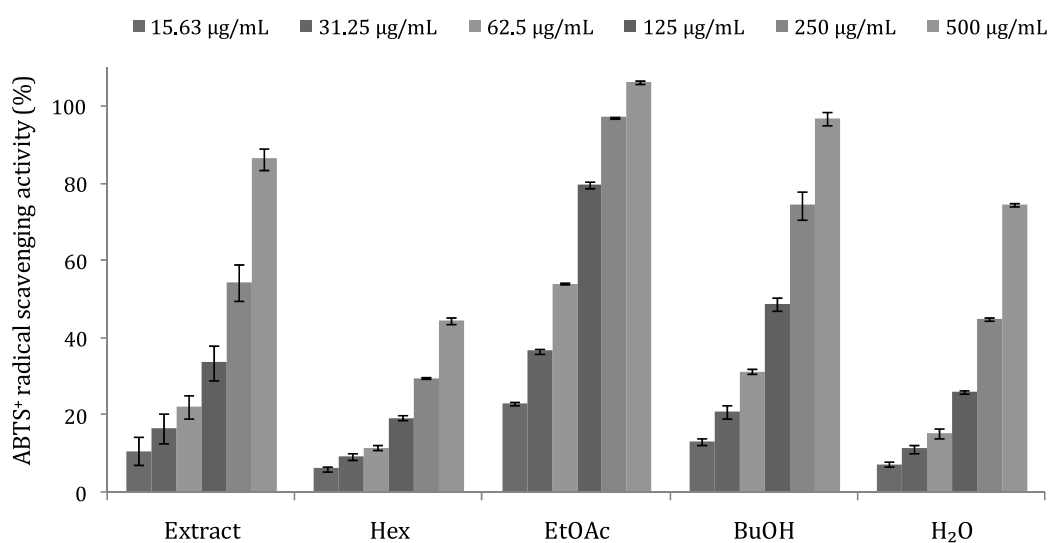


Figure 105. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts. The data are expressed as a percentage and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 20. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from black radish aerial parts.

	Extract	Hex	EtOAc	BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	233.1	>500	57.8	139.1	303.7	6.3

## 2) 항염

### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell을 이용하여 흑무 지상부 추출물 및 용매 분획물의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포독성을 확인하였다. 우선 추출물 및 각 분획물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물이 세포독성 없이 NO 생성을 81.1% 억제함을 확인할 수 있었다(Figure 106).

위 결과를 바탕으로 NO 생성 억제 활성이 우수했던 EtOAc 분획물에 대하여 추가적으로 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과 흑무 지상부 EtOAc 분획물은 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제 시킴을 확인할 수 있었다(Figure 107).

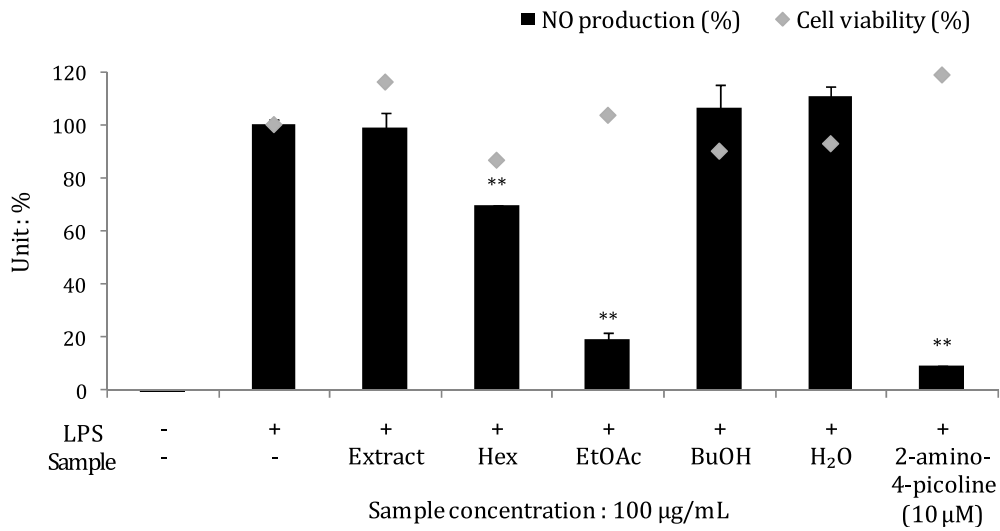


Figure 106. Nitric oxide production and cell viability of extract and solvent fractions from black radish aerial parts in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p < 0.01$

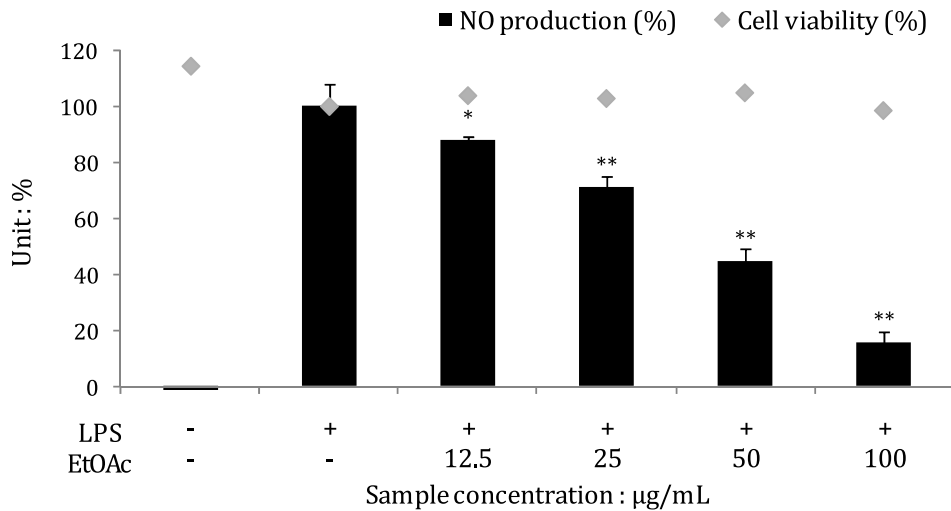


Figure 107. Nitric oxide inhibition and cell viability of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

(2) PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성

흑무 지상부 추출물과 분획물 중 항염 활성을 나타내었던 EtOAc 분획물에 대하여 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. 그 결과, EtOAc 분획물이 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 108).

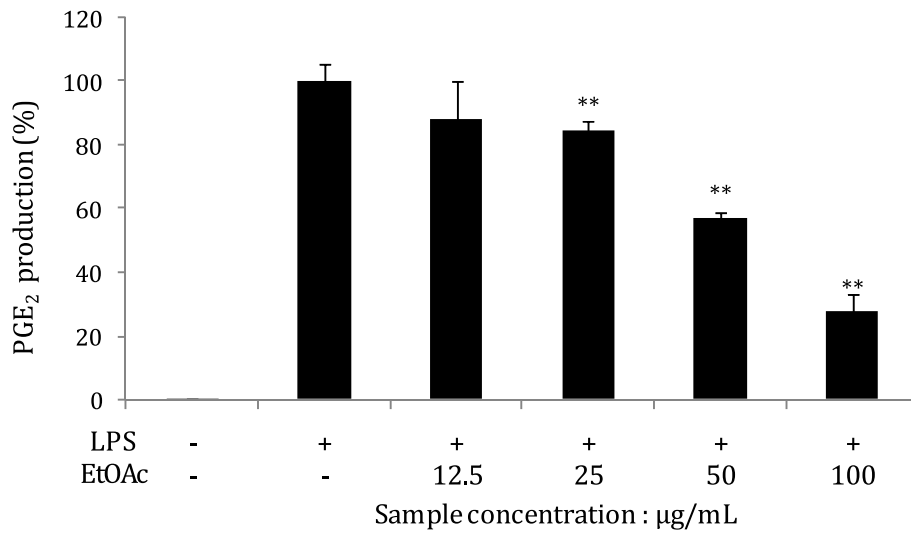


Figure 108. Effect of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts on PGE<sub>2</sub> production in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\* $p < 0.01$

(3) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성

흑무 지상부 EtOAc 분획물의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현양을 확인한 결과, iNOS 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, COX-2의 경우, 큰 변화가 관찰되지 않았다(Figure 109).

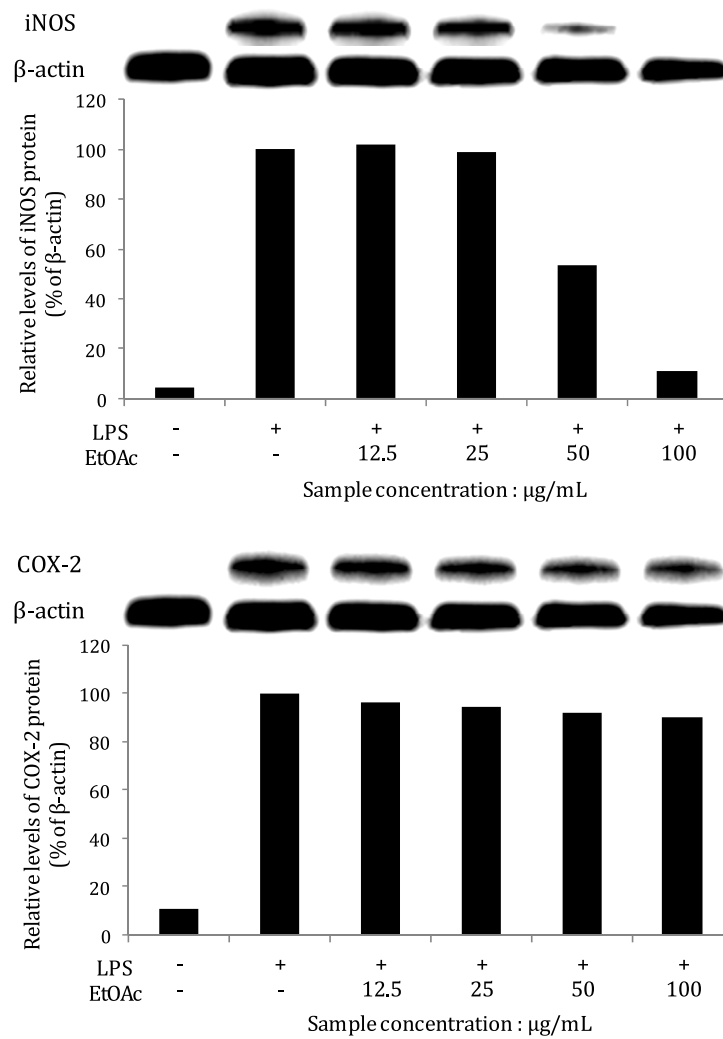


Figure 109. Effects of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts on the levels of iNOS and COX-2 protein in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The iNOS or COX-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of  $\beta$ -actin.

#### (4) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성

흑무 지상부 EtOAc 분획물에 대한 항염 기전 연구를 위해 전염증성 cytokine 인 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  및 IL-6 생성 억제 활성을 확인하였다. 실험 결과 EtOAc 분획물이 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었으며, 실험을 진행한 전염증성 cytokine 중 IL-1 $\beta$ 에 대하여 가장 높은 억제 활성을 보이는 것으로 관찰되었다 (Figure 110).

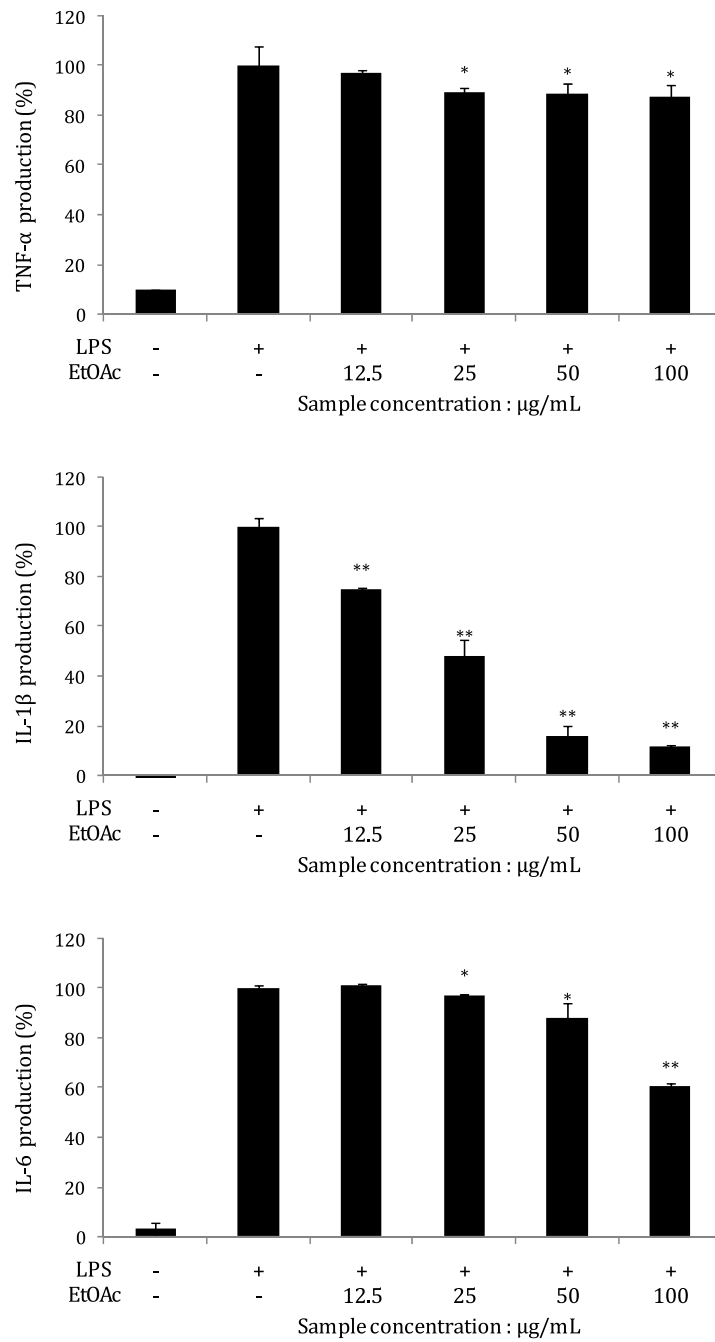


Figure 110. Effects of ethyl acetate fraction from black radish aerial parts on production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01



## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항산화

#### (1) DPPH radical 소거 활성

흑무 지상부로부터 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물들에 대하여 15.63-500  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하여  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다.

그 결과, compound 2, 3, 6의  $\text{SC}_{50}$  값이 각각 205.1, 321.4, 114.1  $\mu\text{M}$ 로 대조군인 BHT ( $\text{SC}_{50} = 409.3 \mu\text{M}$ )보다 우수한 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figure 111, Table 21).

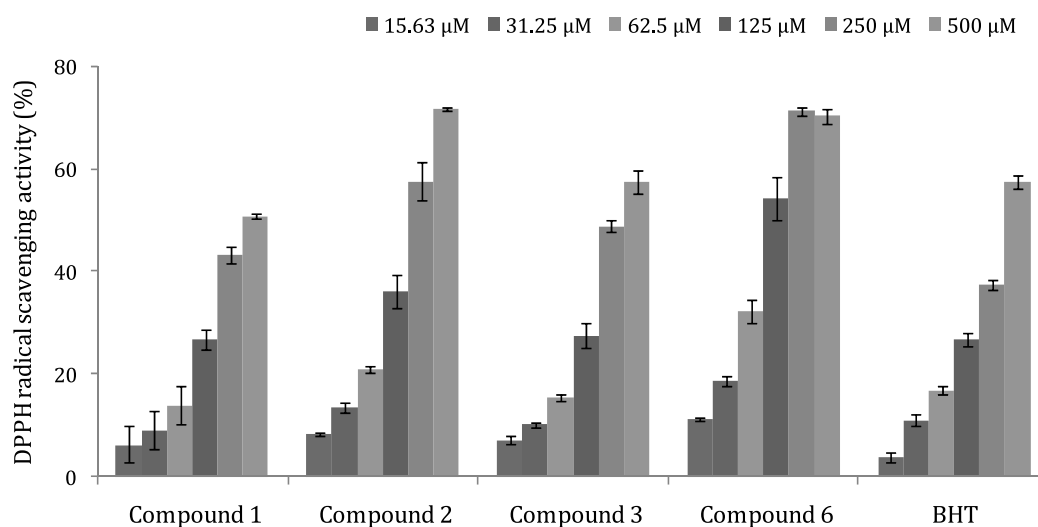


Figure 111. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from black radish aerial parts. The data are expressed as a percentage and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 21. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of isolates 1-8 from black radish aerial parts.

Compound No.	Compound name	SC <sub>50</sub> (μM)
1	Kaempferitrin	465.2
2	Kaempferol 3- <i>O</i> -α-L-arabinopyranoside -7- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside	205.1
3	Afzelin	321.4
4	Loliolide	>500
5	<i>p</i> -Courmaric acid	>500
6	Ethyl caffeate	114.1
7	Fulgidic acid	>500
8	Tryptophan	>500
Positive control	BHT	409.3

## (2) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

흑무 지상부로부터 분리된 화합물의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각각의 화합물들에 대하여 15.63-500  $\mu$ M의 농도로 실험을 진행하여 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

그 결과, 분리된 화합물 중 compound 7을 제외한 나머지 화합물들에서 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 확인할 수 있었으며, 특히 compound 1, 2, 3의 flavonoid 배당체 화합물과 compound 5, 6의 phenyl propanoid계 화합물에서 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 확인되었다(Figure 112, Table 22).

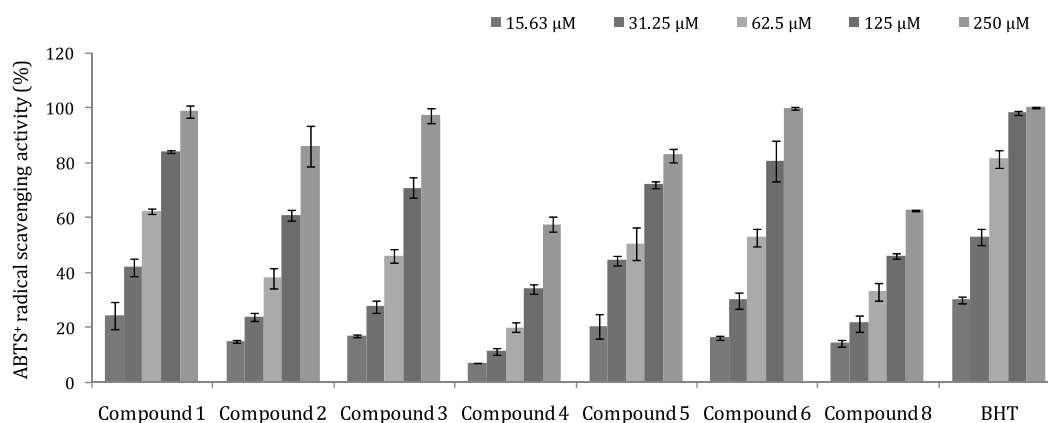


Figure 112. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of isolated compounds from black radish aerial parts. The data are expressed as a percentage and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 22. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of isolates 1–8 from black radish aerial parts.

Compound No.	Compound name	SC <sub>50</sub> (μM)
1	Kaempferitrin	41.0
2	Kaempferol 3- <i>O</i> -α-L-arabinopyranoside -7- <i>O</i> -α-L-rhamnopyranoside	96.2
3	Afzelin	66.4
4	Loliolide	196.4
5	<i>p</i> -Courmaric acid	54.5
6	Ethyl caffeate	55.4
7	Fulgidic acid	>500
8	Tryptophan	142.2
Positive control	BHT	27.5

## 2) 항염

### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

RAW 264.7 cell을 이용하여 흑무 지상부로부터 분리한 화합물들에 대하여 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 각 화합물들에 대하여 100, 200, 400  $\mu$ M 농도로 실험을 진행한 결과, 분리된 화합물 중 compound **6**이 가장 높은 NO 생성 억제 효과를 나타냈으며 100-400  $\mu$ M 농도 범위에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. Compound **6**의 경우 염증반응의 경로 중의 하나인 NF- $\kappa$ B의 경로를 억제하고 염증 매개인자인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제한다는 연구<sup>86</sup>가 보고되어 있어 추가적인 기전연구는 진행하지 않았다(Figure 113).

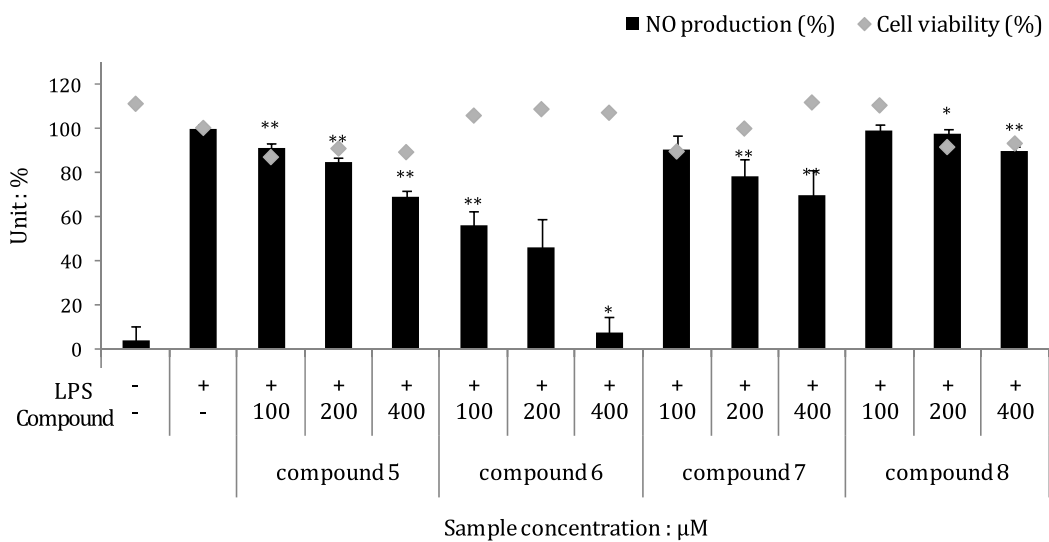
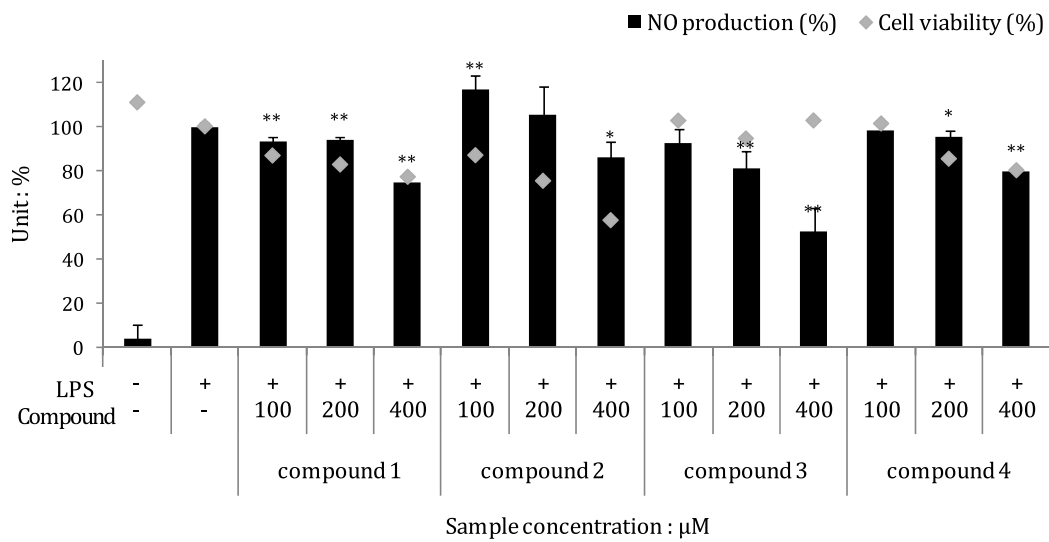


Figure 113. Nitric oxide production and cell viability of isolated compounds from black radish aerial parts in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 6. 연구결과 및 고찰

본 연구는 흑무 지상부 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대하여 기능성 화장품의 천연 소재로서의 개발 가능성을 알아보고자, 다양한 생리 활성 실험과 단일 물질 분리 및 구조 동정을 실시하였다.

흑무 지상부 70% 에탄올 추출물을 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 및 water 분획물을 얻었다. 이들 중 EtOAc와 BuOH 분획물에 대하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC), 순상 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography (CC)를 수행하여 단일 화합물을 분리하고, 1D, 2D NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 8개의 화합물을 동정하였다. 분리된 화합물들은 kaempferitrin (1), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-arabino pyranoside-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (2), afzelin (3), loliolide (4), *p*-coumaric acid (5), ethyl caffeate (6), fulgidic acid (7), tryptophan (8)으로 확인되었다.

한편, 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione과 같은 황화합물 및 지방산의 함량이 많이 나타난 흑무 뿌리와는 달리 지상부에서는 compound 1-3을 포함하는 flavonoid 배당체의 함량이 높게 나타났으며 특히, kaempferitrin이 다량 함유 되어 있음을 본 연구를 통해 확인하였다.

흑무 지상부의 항산화 활성을 확인하기 위하여 추출물과 분획물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, EtOAc 분획물에서 269.1 mg/g GAE로 가장 높은 총 폴리페놀 함량을 보였으며, 총 플라보노이드 함량은 EtOAc, BuOH 분획물이 각각 36.2, 17.5 mg/g QE의 함량을 나타내었다. DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성 실험에서도 폴리페놀과 플라보이드 함량이 가장 높았던 EtOAc 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 207.8, 57.8  $\mu$ g/mL로 가장 좋은 radical 소거 활성을 나타내었다. 분리된 화합물에 대한 항산화 실험 결과, DPPH radical 소거활성에서는 compound 2, 3, 6의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 205.1, 321.4, 114.1  $\mu$ M로 대조군인 BHT (SC<sub>50</sub> = 409.3  $\mu$ M)보다 우수한 활성을 나타냈으며, ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성에서는 compound 1, 3, 5, 6의 SC<sub>50</sub> 값이

각각 41.0, 66.4, 54.5, 55.4  $\mu\text{M}$ 의 radical 소거 활성을 확인하였다.

Mouse의 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 흑무 지상부의 항염 활성을 확인한 결과, 추출물과 분획물 중 EtOAc 분획물이 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시키는 것으로 확인하였으며, Western blot 실험 결과 흑무 지상부 EtOAc 분획물이 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현을 억제시킴으로써 NO의 생성 억제 효과를 나타내었다. 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험에서는, compound 6이 100-400  $\mu\text{M}$  농도 범위에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제시키는 효과를 나타내었으며, compound 6의 경우, 염증반응의 경로 중의 하나인 NF- $\kappa$ B의 경로를 억제하고 염증 매개인자인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제한다는 연구<sup>54</sup>가 보고되어 있다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 흑무 지상부 추출물을 이용한 항산화 및 항염증 관련 소재로서의 개발 가능성을 기대할 수 있었다.



#### IV. 요약 및 결론

본 연구는 제주에서 자생하는 윤노리나무(*Pourthiaea villosa*) 가지 및 흑무(*Raphanus sativus* L. var. *niger*) 추출물과 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고, 추출물로부터 단일 화합물을 분리하여 NMR 등을 이용해 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화, 항염 및 미백 활성을 확인하여 기능성 소재로서의 활용 가능성을 알아보려고 연구를 진행하였다.

각각의 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 및 water 분획물을 얻었으며, 얻어진 용매 분획물을 vacuum liquid chromatography (VLC) 또는 medium pressure liquid chromatography (MPLC) 및 open column chromatography (OCC)를 진행하여 단일 화합물들을 분리하였고, 1D, 2D NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였다.

윤노리나무 가지 EtOAc 분획물은 항산화 및 항염 활성이 우수했으며, 윤노리나무 가지로부터 총 7개의 화합물을 분리, 동정하였다. 분리된 화합물들은 ursolic acid (1), arjunolic acid (2), daucosterol (3), myricanol (4), myricetin (5), myricitrin (6), quercitrin (7)으로 확인되었다. 분리된 화합물 중 compound 1-6은 윤노리나무에서 처음 분리된 화합물들이다. 분리된 화합물들의 항산화 활성 실험 결과, compound 4-7이 대조군인 L-ascorbic acid 만큼의 우수한 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성을 나타내었다. 항염 활성 실험에서는 compound 4가 iNOS 단백질의 발현을 억제해 NO 생성을 억제 시키는 것을 확인하였으며 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)의 생성을 억제시키는 활성을 보였다.

흑무 뿌리 Hex과 EtOAc 분획물은 항염 및 미백 활성이 우수했으며 이를 바탕으로 단일 화합물 분리를 진행한 결과, 총 6개의 화합물을 분리하였다. 분리된

화합물은 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione (1), ascorbigen (2),  $\beta$ -sitosterol (3), palmitic acid (4),  $\alpha$ -linolenic acid (5), 1-linoleonyl glycerol (6)로 확인되었다. 분리된 화합물의 항염 활성을 측정 결과 compound 1-6 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰으며, 특히 compound 4-6의 NO 생성 억제율이 높게 나타났다. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험에서는 compound 1이 100  $\mu$ M 이하의 농도에서 세포독성 없이 melanin 생성을 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었으며, 세포내 tyrosinase 활성과 TRP-2 및 tyrosinase 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

흑무 지상부 EtOAc 분획물은 항산화 및 항염 활성이 나타났으며, 흑무 지상부로부터 총 8개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물들은 kaempferitrin (1), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (2), afzelin (3), loliolide (4), *p*-coumaric acid (5), ethyl caffeate (6), fulgidic acid (7), tryptophan (8)으로 확인되었다. 분리된 화합물의 항산화 실험 결과, compound 1, 2, 3, 5, 6에서 대조군과 비교되는 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 확인하였다. 항염 활성 측정 결과, compound 6이 가장 높은 NO 생성 억제 효과를 나타내었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 윤노리나무 가지 및 흑무 추출물의 항산화, 항염, 미백 효과를 활용한 천연 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

## V. 참고문헌

1. Kim, H. W.; Shin, H. J.; Hwang, D. B.; Lee, J. E.; Jeong, H. L.; Kim, D. W. Functional cosmetic characteristics of *Momordica charantia* fruit extract. *Korean Chem. Eng. Res.* **2015**, *53*(3), 289-294.
2. Song, J. S.; Kim, Y. A. A Study on the future market prospect of domestic functional cosmetics industry. *Journal of the Korean Society of Design Culture* **2009**, *15*(4), 258-271.
3. 하병조, 기능성화장품, *신광출판사*, **2001**, 15.
4. An, J. R. Definition and trends of cosmeceuticals. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **1997**, *23*(1), 21-42.
5. 양현옥, 여대생의 기능성화장품에 대한 교육요구도 조사. *대한피부미용학회지* **2009**, *7*(3), 9-25.
6. 임명훈, 기능성화장품 신소재 개발 03 - 생물전환기술로 화장품 기능성 소재 만든다. *The science & technology* **2011**, *510*, 18-21.
7. 경기열, 기능성화장품 연구개발 동향. *공업화학전망* **2010**, *13*(4), 1-10.
8. 홍재기, 활성산소에 의한 피부노화와 항산화비타민의 효능에 대한 이론적 고찰. *대한피부미용학회지*, **2009**, *7*(2), 51-62.
9. Heo, S. I.; Wang, M. H. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. *Kor. K. Pharmacogn.* **2008**, *39*(3), 255-259.
10. 박수남, 활성산소와 광노화 그리고 천연물. *대한화장품학회지* **2003**, *29*(1), 75-77.
11. You, S. H.; Moon, J. S. A study on anti-oxidative, anti-inflammatory, and melanin inhibitory effects of *Chrysanthemum Sibiricum* extract. *J. of Korean Oil Chemists' Soc.* **2016**, *33*(4), 762-770.
12. Shin, C. H. Studies on the antioxidative character in the ethyl acetate extractions of *Rumex crispus*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **2001**,

16(2), 592-602.

13. Branen, A. L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1975**, 52, 59-63.
14. Abdallah, H. M.; Esmat, A. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the major phenolics from *Zygophyllum simplex* L. *Journal of Ethnopharmacology* **2017**, 205, 51-56.
15. Yoon, Y. I.; Chung, M. Y.; Hwang, J. S.; Goo, T. W.; Ahn, M. Y.; Lee, Y. B.; Han, M. S.; Yun, E. Y. Anti-inflammatory effect of *Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Journal of Life Science* **2014**, 24(4), 370-376.
16. Kim, N. K.; Kim, M. H.; Yoon, C. S.; Shin, W. C. Studies on the anti-inflammatory activity of *Poulownia coreana* Uyeki leaf extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **2006**, 32(4), 241-247.
17. Eun, C. S.; Hwang E. Y.; Lee, S. O.; Yang, S. A.; Yu, M. H. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of barley sprout extract. *Journal of Life Science* **2016**, 26(5), 537-544.
18. Jeon, A. L.; Kim, J. E.; Lee, N. H. Whitening and anti-inflammatory constituents from the extract of *Citrullus lanatus* Vines. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*. **2017**, 43(1), 53-60.
19. Bak, M. J.; Jeong, J. H.; Kang, H. S.; Jin, K. S.; Ok, S.; Jeong, W. S. *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathways in RAW 264.7 Cells, *J. Food Sci Nutr*. **2009**, 14, 269-276.
20. Park, S. H.; Jeong, H. J.; Park, B. J.; Jeong, T. H. Anti-inflammatory effect of *Fallopia sachalinensis* Ronse Decr. Fruit. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **2015**, 41(3), 237-241.
21. Kwon, Y. B.; Yoo, B. S.; Kim, D. S.; Moon, S. J.; Yoon, M. S.; Park, S. N. Anti inflammatory activity of *Viburnum dilatatum* Thunb. extract as cosmetic ingredient. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **2010**, 36(3), 183-191.

22. Leem, H. H.; Kim, E. O.; Seo, M. J.; Choi, S. W. Antioxidant and anti-Inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **2011**, *40*(10), 1361-1370).
23. Jin, K. S.; Lee, J. Y.; Kwon, H. J.; Kim, B. W. Anti-Oxidative, anti-Inflammatory, and anti-melanogenic activities of *Endlicheria Anomala* extract. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *41*(4), 433-441.
24. Jang, T. W.; Park, J. H. Antioxidative activities and whitening effects of ethyl acetate fraction from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum*. *J. Life Science* **2017**, *27*(5), 536-544.
25. Hwang, H. S.; Yoo, D. S.; Shim, J. H. Whitening effect of banana leaf extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **2016**, *42*(1), 37-43.
26. Folin, O.; Denis, W. A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* **1915**, *22*, 305-308.
27. Davis, F. B.; Middleton, E.; Davis, P. J.; Blas, S. D. Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Cell Calcium*, **1983**, *4*, 71-81.
28. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
29. 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.
30. Nam, J. I.; Choi, G. E.; Kim, Y. M.; Park, J. I. Analysis of Morphological Characteristics and Variation among Six Populations of *Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne. var. *villosa* in Korea. *Korean J. Plant. Res.* **2015**, *28*(1), 26-34.
31. Lee, H. J.; Ahn, D. R.; Lee, E. B.; Lee, T. G.; Kim, D. K. Phenolic components from the Fruits of *Pourthiaea villosa*. *Kor. J. Pharmacogn.*

- 2013, 44(1), 16-21.
32. Kim, H. H.; Kwon, J. H.; Park, K. H.; Kim, M. H.; Oh, M. H.; Choe, K. I.; Park, S. H.; Jin, H. Y.; Kim, S. S.; Lee, M. W. Screening of antioxidative activities and antiinflammatory activities in local native plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **2012**, 43(1), 85-93.
  33. Ibrahim, A.; Khalifa, S. I.; Khafagi, I.; Youssef, D. T.; Khan, S.; Mesbah, M.; Khan, I. Microbial Metabolism of Biologically Active Secondary Metabolites from *Nerium oleander* L. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56(9), 1253-1258.
  34. Wang, L. Q.; Huang, R.; Zhang, F. C.; Fu, Q. X.; Chen, Y. G. Chemical constituents of *Combretum punctatum* spp. *squamosum*, *Chemistry of Natural Compounds* **2011**, 47(3), 470-471.
  35. Lee, S. H.; Kim, K. S.; Jang, J. M.; Park, Y. M.; Kim, Y. B.; Kim, B. K. Phytochemical constituents from the Herba of *Artemisai apiacea*. *Arch Pham Res.* **2002**, 25(3), 285-288.
  36. Sun, D.; Zhao, Z.; Wong, H.; Foo, L. Y. Tannins and other phenolics from *Myrica esculenta* bark. *Phytochemistry* **1988**, 27(2), 579-583.
  37. Qu, G. Z.; Si, C. L.; Wang, M. H. Antioxidant constituents from *Leonurus japonicus*. *Natural Product Sciences* **2006**, 12(4), 197-200.
  38. Zhong, X. N.; Otsuka, H.; Ide, T.; Hirata, E.; Takushi, A.; Takena, Y. Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry* **1997**, 46(4), 943-946.
  39. Wang, J.; Dong, S.; Wang, Y.; Lu, Q.; Zhong, H.; Du, G.; Zhang, L.; Cheng, Y. Cyclic diarylheptanoids from *Myrica nana* inhibiting nitric oxide release. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 8510-8515.
  40. Lai, Y. C.; Chen, C. K.; Lin, W. W.; Lee, S. S. A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from the leaves of *Alnus formosana*. *Phytochemistry* **2012**, 73, 84-94.
  41. Sudsai, T.; Prabpai, S.; Kongsaree, P.; Wattanapiromsajul, C.; Tewtrakul, S. Anti-inflammatory activity of compounds from

- Boesenbergia longiflora* rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *154*, 453-461.
42. Ko, H. N.; Oh, T. H.; Baik, J. S.; Hynn, C. G.; Kim, S. S.; Lee, N. H. Anti-inflammatory activities for the extracts and carpinontrols from branches of *Carpinus turczaninowii*. *Int. J. Pharmacol.* **2013**, *9(2)*, 157-163.
43. Lee, S. H.; Hwang, I. G.; Lee, Y. R.; Joung, E. M.; Jeong, H. S.; Lee, H. B. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of heated radish (*Raphanus sativus* L.) extracts. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* **2009**, *38(4)*, 490-495.
44. 제주특별자치도 친환경농정과, 2017 농축산식품 현황. 제주특별자치도, **2017**.
45. 한국농수산물유통공사, 2016 식품산업 원료소비 실태조사. 한국농수산물유통공사, **2016**.
46. Janjua, S.; Shahid, M.; Abbas, F. Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of root peel extract of *Raphanus sativus* L. var. *niger*. *Adv. Med. Plant Res.* **2013**, *1(1)*, 1-7.
47. Tamura, S.; Tsuji, K.; Yongzhen, P.; Kameyama, M. O.; Murakami, N. Six new acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus*). *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58(9)*, 1259-1262.
48. Tatsuzawa, F.; Toki, K.; Saito, N.; Shinoda, K.; Shigihara, A.; Honda, T. Anthocyanin occurrence in the root peels, petioles and flowers of red radish (*Raphanus sativus* L.). *Dyes and Pigments* **2008**, *79(1)*, 83-88.
49. Jeong, I. H.; Oh, M. S.; Jeon, J. S.; Kim, H. T.; Hong, S. R.; Park, K. H.; Yoon, M. H. A comparative study on anthocyanin and polyphenol contents in colored agricultural products. *J. Food Hyg. Saf.* **2017**, *32(5)*, 371-380
50. Katsuzaki, H.; Hibasami, H.; Ohwaki, S.; Ishikawa, K.; Imai, K.; Date, K.; Kimura, Y.; Komiya, T. Cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucoside isolated from skin of black *Glycine max* and other anthocyanins isolated from skin of red grape

- induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 297-300.
51. Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Bruillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **2003**, *64*(5), 923-933.
  52. N'jai, A. U.; Kemp, M. Q.; Metzger, B. T.; Hanlon, P. R.; Robbins, M.; Czuypyrnski, C.; Barnes, D. M. Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) diet enhances clearance of DMBA and diminishes toxic effects on bone marrow progenitor cells. *Nutrition and Cancer* **2012**, *64*(7), 1038-1048.
  53. Hanlon, P. R.; Webber, D. M.; Barnes, D. M. Aqueous extract from spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzymes in the HepG2 human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*(16), 6439-6446.
  54. Ibrahim Guillermo, C. T.; Minarda De la, O. A.; Janeth, G. E.; Elia Brosla, N. R.; Miguel Angel, D. O. *Raphanus sativus* L. var. *niger* as a source of phytochemicals for the prevention of cholesterol gallstones. *Phytother. Res.* **2014**, *28*(2), 167-171.
  55. Lugasi, A.; Dworschak, E.; Blazovics, A.; Kery, A. Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) root. *Phytother. Res.* **1998**, *12*, 502-506.
  56. Afsharypuor, S.; Balam, M. H. Volatile constituents of *Raphanus sativus* L. var. *niger* seeds. *Journal of Essential Oil Reseach* **2005**, *17*(4), 440-441.
  57. Njumbe Ediage, E.; Diana Di Mavungu, J.; Scippo, M. L.; Schneider, Y. J.; Larondelle, Y.; Callebaut, A.; Robbens, J.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. Screening, identification and quantification of glucosinolates in black radish (*Raphanus sativus* L. *niger*) based dietary supplements using liquid chromatography coupled with a photodiode array and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 4398-4405.



58. Crews, P.; Rodriguez, J.; Jaspars, M. *Organic Structure Analysis*, Oxford University Press **2009**, 70-75.
59. Ragasa, C. Y.; Ebajo, V. D.; Tan, M. C. S.; Brkljaca, R.; Urban, S. Chemical constituents of *Raphanus sativus*. *Der Pharma Chemica* **2015**, 7(11), 354-357.
60. Biskov, S.; Olsen, C. E.; Sorensen, H.; Sorensen, S. Supercritical fluid chromatography as basis for identification and quantitative determination of indol-3-ylmethyl oligomers and ascorbigens. *J. Bioshem. Biophys. Methods* **2000**, 43, 175-195.
61. Sohn, B. H.; Park, J. H.; Lee, D. Y.; Cho, J. G.; Kim, Y. S.; Jung, I. S.; Kang, P. D.; Baek, N. I. Isolation and Identification of Lipids from the Silkworm (*Bombyx mori*) Droppings. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **2009**, 52(4), 336-341.
62. Bengsch, E.; Perly, B.; Deleuze, C.; Valero, A. A General Rule for the Assignment of the Carbon-13 NMR Peaks in Fatty Acid Chains. *Journal of Magnetic Resonance* **1986**, 68, 1-13.
63. 정의수, Screening and evaluation of cosmeceuticals from medicinal plants, *성균관대학교* **2007**, 박사학위논문
64. Yang, Q.; Cao, W.; Zhou, X.; Cao, W. Xie, Y.; Wang, S. Anti-thrombotic effects of  $\alpha$ -linolenic acid isolated from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2014**, 14, 348.
65. Lee, S. J.; Jang, H. J.; Kim, Y. S.; Oh, H. M.; Lee, S. Y.; Jung, K. S.; Kim, Y. H.; Lee, S. W.; Rho, M. C. Inhibitory effects of IL-6 induced STAT3 activation of bio-active compounds derived from *Salvia plebeia* R. Br. *Process Biochemistry* **2016**, 51, 2222-2229.
66. Ziboh, V. A. Biosynthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> in human skin: subcellular localization and inhibition by unsaturated fatty acids and anti-inflammatory drugs. *Journal of Lipid Research* **1973**, 44, 377-384.
67. Zhao, G. I Etherton, T. D.; Martin, K. R.; Vanden Heuvel, J. P.; Gillies,

- P. J.; West, S. G.; Kris-Etherton, P. M. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *336*, 909-917.
68. Ishida, M.; Nagata, M.; Ohara, T.; Kakizaki, T.; Hatakeyama, K.; Nishio, T. Small variation of glucosinolate composition in Japanese cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.) requires simple quantitative analysis for breeding of glucosinolate component. *Breeding Science* **2012**, *62*, 63-70.
69. Gutierrez, R. M. P.; Perez, R. L. *Raphanus sativus* (Radish): Their chemistry and biology. *The Scientific World Journal* **2004**, *4*, 811-837.
70. Hanlon, P. R.; Webber, D. M.; Barnes, D. M. Aqueous extracts from spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzymes in the HepG2 human hepatoma cell line. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6439-6446.
71. Montaut, S.; Barillari, J.; Iori, R.; Rollin, P. Glucoraphasatin: Chemistry, occurrence, and biological properties. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 6-12.
72. Sakoda, M.; Hase, T.; Haesgawa, K. A growth inhibitor, 3-(*E*)-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinethione from light-growth radish seedlings. *Phytochemistry* **1990**, *29*(4), 1031-1032.
73. Burn, D. C.; Ellis, D. A.; March, R. E. A predictive tool for assessing <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of flavonoids. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 835-845.
74. 천연물화학 교재편찬위원회, 천연물화학, *영림사* **2003**, 130-131.
75. Rho, H. S.; Ahn, S. M.; Lee, B. C.; Kim, M. K.; Ghimeray, A. K.; Jin, C. W.; Cho, D. H. Changes in flavonoid content and tyrosinase inhibitory activity in kenaf leaf extract after far-infrared treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7534-7536.
76. 김현삼, 케네프(*Hibiscus cannabinus* L.) 잎에서 분리한 kaempferol 배당체들의 구조동정 및 생리활성 검증, *강원대학교* **2011**, 석사학위논문

77. Lee, S. Y.; So, Y. J.; Shin, M. S.; Cho, J. Y.; Lee, J. S. Antibacterial effects of afzelin isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, a leading cause of illness in immunocompromised individuals. *Molecules* **2014**, *19*, 3173–3180.
78. Panyo, J.; Matsunami, K.; Panichayupakaranant, P. Bioassay-guided isolation and evaluation of antimicrobial compounds from *Ixora megalophylla* against some oral pathogens. *Pharmaceutical Biology* **2016**, *54*(9), 1522–1527.
79. Yi, B.; Hu, L.; Mei, W.; Zhou, K.; Wang, H.; Luo, Y.; Wei, X.; Dai, H. Antioxidant phenolic compounds of cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. *Molecules* **2010**, *16*, 10157–10167.
80. Chiou, W. F.; Shen, C. C.; Lin, L. C. Anti-inflammatory principles from *Balanophora laxiflora*. *Journal of Food and Drug Analysis*, **2011**, *19*(4), 502–508.
81. Shin, J. S.; Hong, Y. J.; Lee, H. H.; Ryu, B.; Cho, Y. W.; Kim, N. J.; Jang, D. S.; Lee, K. T. Fulgidic acid isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus* suppresses LPS-induced iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 expression by AP-1 inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 1081–1086.
82. Wang, X.; Liu, R.; Yang, Y.; Zhang, M. Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. *Food Chemistry* **2015**, *187*, 37–43.
83. 김혜정, 황 함유 채소류의 항산화 및 항균활성 평가 연구, *충남대학교* **2010**, 석사학위논문
84. Ku, K. H.; Lee, K. A.; Kim, Y. E. Physiological activity of extracts from radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2008**, *37*(3), 390–395
85. Kim, M. S.; Lee, Y. S.; Kwon, H. Y.; Kim, J. S.; Sohn, H. Y. Antioxidative, antimicrobial, and anti-proliferative activities of the floret and stalk of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *42*(1), 58–66.

86. Chiang, Y. M.; Lo, C. P.; Chen, Y. P.; Wang, S. Y.; Yang, N. S.; Kuo, Y. H.; Shyur, L. F. Ethyl caffeate suppresses NF- $\kappa$ B activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE<sub>2</sub> *in vitro* or in mouse skin. *British Journal of Pharmacology* **2005**, *146*, 352-363.