



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

보리밭나무 및 생달나무 가지의  
항산화, 항염, 항균 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

金 美 愛

2022年 2月

# 보리밥나무 및 생달나무 가지의 항산화, 항염, 항균 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

金 美 愛

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021年 12月

金美愛의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ ⑩

委 員 \_\_\_\_\_ ⑩

委 員 \_\_\_\_\_ ⑩

濟州大學校 大學院

2021年 12月

Anti-oxidative, Anti-inflammatory and Anti-bacterial  
Constituents from Branches of *Elaeagnus macrophylla*  
and *Cinnamomum yabunikkei*

Mi Ae Kim

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2021. 12.

This thesis has been examined and approved.

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

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

List of Tables .....	v
List of Figures .....	vii
List of Abbreviations .....	xi
Abstract .....	xiii
<b>I. 서론</b> .....	<b>1</b>
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	<b>6</b>
1. 시약 및 기기 .....	6
2. 생리 활성 평가 .....	7
1) 항산화 .....	7
(1) 총 폴리페놀 함량 측정 .....	7
(2) 총 플라보노이드 함량 측정 .....	8
(3) DPPH radical 소거 활성 측정 .....	9
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 측정 .....	10
(5) 세포 보호 효과 .....	11
① HaCaT 세포 배양 .....	11
② 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 .....	11
2) 항염 .....	12
(1) RAW264.7 세포 배양 .....	12
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정 .....	12
(3) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정 .....	13
(4) 세포 독성 평가 (MTT assay) .....	13
3) 항균 .....	14
(1) 균주 배양 .....	14
(2) Paper disc diffusion method .....	14

(3) MIC (minimum inhibitory concentration) .....	15
(4) MBC (minimum bactericidal concentration) .....	15
3. HPLC 함량분석 .....	16
4. 통계 처리 .....	18
<b>III. 연구 1 : 보리밥나무 가지 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구</b> ..	19
1. 재료 .....	19
2. 추출, 분획 및 활성 성분 분리 .....	20
1) 보리밥나무 가지의 추출 및 용매 분획 .....	20
2) <i>n</i> -Hexane 분획물의 활성 성분 분리 .....	21
3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리 .....	22
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	24
1) Compound 1, 2의 구조 동정 .....	24
2) Compound 3의 구조 동정 .....	27
3) Compound 4의 구조 동정 .....	30
4) Compound 5, 6의 구조 동정 .....	33
5) Compound 7의 구조 동정 .....	36
6) Compound 8, 9의 구조 동정 .....	39
7) Compound 10, 11의 구조 동정 .....	42
8) Compound 12의 구조 동정 .....	45
4. 보리밥나무 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	48
1) 항산화 .....	48
(1) 총 폴리페놀 함량 .....	48
(2) 총 플라보노이드 함량 .....	49
(3) DPPH radical 소거 활성 .....	50
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	51
2) 항염 .....	52
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	52
(2) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ ) 생성 억제 활성 .....	54

3) 항균 .....	55
(1) Paper disc diffusion method .....	55
(2) MIC 및 MBC .....	57
5. 요약 및 결론 .....	59
<b>IV. 연구 2 : 생달나무 가지 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구</b> · 61	
1. 재료 .....	61
2. 추출, 분획 및 활성 성분 분리 .....	62
1) 생달나무 가지의 추출 및 용매 분획 .....	62
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리 .....	63
(1) VLC에 의한 분리과정 .....	63
(2) MPLC에 의한 분리과정 .....	64
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	65
1) Compound 1의 구조 동정 .....	65
2) Compound 2의 구조 동정 .....	68
3) Compound 3의 구조 동정 .....	75
4. HPLC 함량 분석 .....	82
5. 생달나무 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	84
1) 항산화 .....	84
(1) 총 폴리페놀 함량 .....	84
(2) 총 플라보노이드 함량 .....	85
(3) DPPH radical 소거 활성 .....	86
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	87
(5) 세포 보호 효과 .....	88
① 세포 독성 평가 (MTT assay) .....	88
② 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 .....	89
2) 항염 .....	91
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	91
3) 항균 .....	93
(1) Paper disc diffusion method .....	93

(2) MIC 및 MBC .....	95
6. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	97
1) 항산화 .....	97
(1) 세포 보호 효과 .....	97
① 세포 독성 평가 (MTT assay) .....	97
② 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 .....	98
2) 항염 .....	100
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	100
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성 .....	102
7. 요약 및 결론 .....	104
V. 최종 결론 및 고찰 .....	106
VI. 참고문헌 .....	108



## List of Tables

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors .....	17
Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis .....	17
Table 3. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>1</b> and <b>2</b> .....	25
Table 4. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>3</b> .....	28
Table 5. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>4</b> .....	31
Table 6. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>5</b> and <b>6</b> .....	34
Table 7. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>7</b> .....	37
Table 8. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>8</b> and <b>9</b> .....	40
Table 9. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>10</b> and <b>11</b> .....	43
Table 10. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>12</b> .....	46
Table 11. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> branches .....	50
Table 12. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> branches .....	51
Table 13. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>E.</i> <i>macrophylla</i> branches .....	56
Table 14. MIC and MBC values of <i>E. macrophylla</i> branches on <i>S.</i> <i>epidermidis</i> .....	58
Table 15. MIC and MBC values of <i>E. macrophylla</i> branches on <i>C. acnes</i> .....	58
Table 16. MIC and MBC values of <i>E. macrophylla</i> branches on <i>S. mutans</i> .....	58
Table 17. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>1</b> .....	66
Table 18. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>2</b> .....	70
Table 19. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>3</b> .....	77
Table 20. Content of <i>epi</i> -catechin ( <b>1</b> ) from <i>C. yabunikkei</i> branches by HPLC .....	83
Table 21. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of extract and	

solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	86
Table 22. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	87
Table 23. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	94
Table 24. MIC and MBC values of <i>C. yabunikkei</i> branches on <i>S. epidermidis</i> .....	96
Table 25. MIC and MBC values of <i>C. yabunikkei</i> branches on <i>S. mutans</i> .....	96

## List of Figures

Figure 1. LPS-induced inflammation pathway .....	3
Figure 2. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents .....	7
Figure 3. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents .....	8
Figure 4. Picture of <i>Elaeagnus macrophylla</i> .....	19
Figure 5. Extraction and solvent fractionation of <i>E. macrophylla</i> branches .....	20
Figure 6. Isolation of compounds from <i>E. macrophylla</i> branches .....	21
Figure 7. Isolation of compounds from <i>E. macrophylla</i> branches .....	23
Figure 8. Chemical structure of compound <b>1</b> and <b>2</b> .....	24
Figure 9. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> and <b>2</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	26
Figure 10. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> and <b>2</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	26
Figure 11. Chemical structure of compound <b>3</b> .....	27
Figure 12. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	29
Figure 13. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	29
Figure 14. Chemical structure of compound <b>4</b> .....	30
Figure 15. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	32
Figure 16. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>4</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	32
Figure 17. Chemical structure of compound <b>5</b> and <b>6</b> .....	33
Figure 18. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>5</b> and <b>6</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	35
Figure 19. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>5</b> and <b>6</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	35
Figure 20. Chemical structure of compound <b>7</b> .....	36
Figure 21. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>7</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	38
Figure 22. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>7</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	38
Figure 23. Chemical structure of compound <b>8</b> and <b>9</b> .....	39
Figure 24. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>8</b> and <b>9</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	41

Figure 25. $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <b>8</b> and <b>9</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	41
Figure 26. Chemical structure of compound <b>10</b> and <b>11</b> .....	42
Figure 27. $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound <b>10</b> and <b>11</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	44
Figure 28. $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <b>10</b> and <b>11</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	44
Figure 29. Chemical structure of compound <b>12</b> .....	45
Figure 30. $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound <b>12</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	47
Figure 31. $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <b>12</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	47
Figure 32. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> branches .....	48
Figure 33. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> branches .....	49
Figure 34. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> branches .....	50
Figure 35. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> branches .....	51
Figure 36. Effects of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. ....	52
Figure 37. Effect of <i>n</i> -Hex and EtOAc fraction from <i>E. macrophylla</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	53
Figure 38. Effect of <i>n</i> -Hex fraction from <i>E. macrophylla</i> branches on TNF- $\alpha$ production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	54
Figure 39. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of <i>E. macrophylla</i> on <i>S. epidermidis</i> and <i>S. mutans</i> .....	55
Figure 40. Pictures of <i>Cinnamomum yabunikkei</i> .....	61
Figure 41. Extraction and solvent fractionation of <i>C. yabunikkei</i> branches .....	62
Figure 42. Isolation of compounds from <i>C. yabunikkei</i> branches (VLC) .....	63

Figure 43. Isolation of compounds from <i>C. yabunikkei</i> branches (MPLC) .....	64
Figure 44. Chemical structure of compound <b>1</b> .....	65
Figure 45. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	67
Figure 46. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	67
Figure 47. Chemical structure of compound <b>2</b> .....	69
Figure 48. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	71
Figure 49. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	71
Figure 50. DEPT-135° spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	72
Figure 51. COSY spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	72
Figure 52. NOESY spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	73
Figure 53. HMQC spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	73
Figure 54. HMBC spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	74
Figure 55. HR-ESI-MS spectrum of compound <b>2</b> .....	74
Figure 56. Chemical structure of compound <b>3</b> .....	76
Figure 57. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	78
Figure 58. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	78
Figure 59. DEPT-135° spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	79
Figure 60. COSY spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	79
Figure 61. NOESY spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	80
Figure 62. HMQC spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	80
Figure 63. HMBC spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	81
Figure 64. HR-ESI-MS spectrum of compound <b>3</b> .....	81
Figure 65. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract, EtOAc fraction .....	82
Figure 66. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	84
Figure 67. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	85
Figure 68. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	86

Figure 69. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	87
Figure 70. Cell viability of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	88
Figure 71. Cell protective effects extract and EtOAc fraction from <i>C. yabunikkei</i> branches on HaCaT cells damaged by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	90
Figure 72. Effects of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	91
Figure 73. Effect of EtOAc fraction from <i>C. yabunikkei</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	92
Figure 74. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of <i>C. yabunikkei</i> on <i>S. epidermidis</i> and <i>S. mutans</i> .....	93
Figure 75. Cell viability of isolated compound <b>1</b> from <i>C. yabunikkei</i> branches .....	97
Figure 76. Cell protective effect of isolated compound <b>1</b> from <i>C. yabunikkei</i> branches on HaCaT cells damaged by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	99
Figure 77. Effects of isolated compounds <b>2</b> , <b>3</b> from <i>C. yabunikkei</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	101
Figure 78. Effect of isolated compound <b>2</b> from <i>C. yabunikkei</i> branches on PGE <sub>2</sub> production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	102
Figure 79. Effects of isolated compound <b>3</b> from <i>C. yabunikkei</i> branches on IL-1 $\beta$ and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	103

## List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butylhydroxytoluene
CC	Column chromatography
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform- <i>d</i>
CD <sub>3</sub> OD	Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>
COSY	Correlation spectroscopy
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
Fr.	Fraction
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalent
GAM	Gifu anaerobic medium
HMBC	Heterinuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
IC <sub>50</sub>	Inhibition concentration of 50%
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6

iNOS	Inducible nitric oxide synthase
int.	Integration
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MP	MPLC subfraction
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PBS	Phosphate buffered saline
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
ROS	Reactive oxygen species
QE	Quercetin equivalent
s	Singlet
SC <sub>50</sub>	Scavenging concentration of 50%
t	Triplet
TLC	Thin layer chromatography
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TSB	Tryptic soy broth
VLC	Vacuum liquid chromatography
2D	Two-dimensional



## Abstract

In this study, we investigated anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial constituents from branches of *Elaeagnus macrophylla* and *Cinnamomum yabunikkei*.

Twelve constituents were isolated from the extract of *E. macrophylla* branches; ethyl oleate (1), ethyl linolenate (2), oleic acid (3), linolenic acid (4), 1-monoolein (5), 1-linolenoyl glycerol (6),  $\beta$ -sitosterol (7), catechin (8), *epi*-catechin (9), gallic acid (10), *epi*-gallic acid (11), caffeic acid (12). The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values.

Upon the anti-oxidative studies by DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals, potent radical scavenging activities were observed in ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (BuOH) fractions. In the anti-inflammatory tests using RAW264.7 macrophages, the *n*-hexane (Hex) and EtOAc fractions inhibited the production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. Also, the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-BuOH fractions showed anti-bacterial activities against *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* and *Cutibacterium acnes*.

Three phytochemicals were isolated from the extract of *C. yabunikkei* branches; *epi*-catechin (1), 3',4'-dihydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyflavone 4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (2), 7,4'-dihydroxy-3,5,6,8-tetramethoxyflavone 4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (3). As far as we know, compound 2 and 3 were identified as a novel compounds found in nature.

On the anti-oxidative tests, the extract, EtOAc and *n*-BuOH fractions showed potent free radical scavenging activities. Also, for the cellular protective effects on HaCaT keratinocytes damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the extract, EtOAc fraction and isolated compound **1** indicated protective effects against oxidative stress. In the anti-inflammatory tests using RAW264.7 cells, the EtOAc fraction, isolates **2** and **3** inhibited the production of NO without causing cell toxicity. Moreover, the compound **2** exhibited the prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> inhibition activity and compound **3** decreased production of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6. Upon the anti-bacterial tests using *S. epidermidis* and *S. mutans*, the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-BuOH fractions showed activities. In addition, the contents of *epi*-catechin (**1**) isolated from this plant was determined by HPLC and the quantity was about 14.0 mg/g for the 70% ethanol extract and 40.3 mg/g for the EtOAc fraction, respectively.

Based on these results, it was suggested that the extract and isolated compounds from *E. macrophylla* and *C. yabunikkei* branches could be potentially applicable as natural source for pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

## I. 서론

생활수준의 향상과 의학의 발달에 따른 인간수명의 증가로 건강과 아름다움에 대한 소망과 함께 화장품에 대한 관심이 높아지고 있다. 이로 인해 화장품은 단순한 미용의 개념에서 진화하여 노화방지는 물론 피부질환 예방의 개념이 추가되었다.<sup>1</sup> 또한 최근 피부질환의 예방을 위해 자연친화적인 천연물을 활용하여 건강을 지키려는 경향이 증가하고 있으며, 화학성분을 기초로 하는 기존 화장품과 달리 국내의 자연친화적인 원료를 사용한 천연 화장품이 큰 영향력을 보이고 있으며 이에 따라 천연물을 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다.<sup>2</sup>

천연물은 1차 대사물과 2차 대사물로 나눌 수 있는데, 1차 대사물은 모든 생물에 존재하여 생명체의 기본대사에 관여하는 물질로 당, 지방산, 아미노산 등이 이에 해당된다. 2차 대사물은 식물이 환경에 적응하고 자기 스스로를 방어하기 위하여 생산하는 물질이며 구조적 특징에 따라 플라보노이드(flavonoid), 탄닌(tannin), 알칼로이드(alkaloid), 테페노이드(terpenoid) 등으로 분류된다.<sup>3</sup> 이와 같은 성분들은 인체 내로 흡수되어 항산화, 항염, 항암, 피부진정 등의 효능을 나타낸다.<sup>4</sup>

본래 인체는 산화촉진물질(pro-oxidant)과 산화억제물질(antioxidant)로 균형이 이루고 있지만 여러 가지 요인들에 의해 불균형한 상태가 된다. 이러한 균형이 깨어지게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되며 잠재적인 세포손상 및 각종 질병을 일으키게 된다.<sup>5</sup> 산화적 스트레스의 직접적 원인인 활성산소종은 superoxide radical ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) 등이 있으며, 인체는 이러한 활성산소종으로부터 세포손상을 방지하고 항상성을 유지하기 위해 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase 등과 같은 항산화 효소를 분비한다. 그러나 나이가 들거나 면역력이 저하되어 있는 경우, 세포는 산화적 스트레스를 방어하기가 어렵게 된다. 이러한 경우 항산화제를 섭취하는 것이 생체 내 항산화 시스템이 정상적으로 유지하도록 도움을 준다.<sup>6</sup>

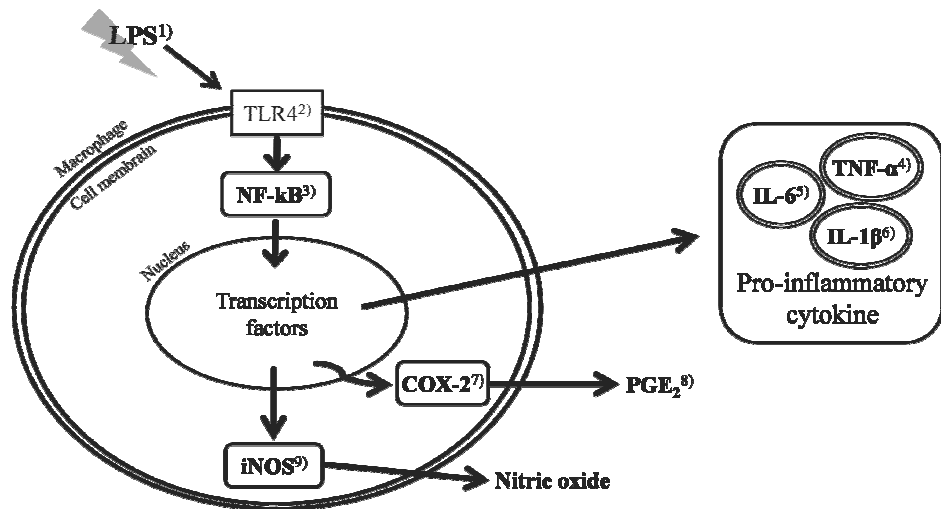
항산화제는 크게 합성 항산화제와 천연 항산화제로 나눌 수 있으며, 합성 항산화제는 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), TBHQ(tertiary butylhydroquinone), PG(propyl gallate) 등으로 탁월한 효과와 경제성 때문에 폭넓게 이용되고 있으나 독성으로 인한 안전성의 문제가 있어서 근래에는 인간이 안전하게 오랫동안 먹어왔던 식물로부터 항산화 효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다.<sup>7</sup>

지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 주로 식물 유래의 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있으며, 폴리페놀 화합물은 일반적으로 tannin, phenyl propanoid(lignan, flavonoid 등)로 분류된다. 폴리페놀에 존재하는 다수의 하이드록시기는 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화, 항염, 항암 등의 효과를 나타낸다고 알려져 있으며 의약품과 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다.<sup>8</sup>

또한 산화적 스트레스는 염증반응을 촉진시키기도 한다. 염증반응은 생체에 이물질이 감염 또는 침입하였거나 물리 화학적 손상을 입었을 때 이를 방어하기 위한 국소적 현상이지만, 과잉의 생체 방어 반응은 염증 국소 주위에 있는 정상 조직을 손상시켜 염증질환을 일으킨다.<sup>9</sup> 대식세포(macrophage)는 식균 작용을 통해 염증반응에 관여하며, 감염초기에 nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  등을 생산 분비하여 생체방어에 중요한 역할을 한다.<sup>10</sup>

대식세포에서 사이토카인(cytokine)이나 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극은 염증반응 전사인자인 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B를 활성화 시키며, 이는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase (COX)-2를 발현시키고, iNOS와 COX-2는 다시 NO와 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 염증반응을 일으킨다(Figure 1).<sup>11</sup> 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과발현된 NO는 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상을 일으킨다. 또한 NF- $\kappa$ B를 통해 활성화된 사이토카인은 다시 NF- $\kappa$ B를 활성화시켜 cytokine cascade를 증폭하고 염증상태를 확장시킨다.<sup>9,11</sup>

현재 개발된 항염증제는 위염, 신장염 및 심장질환 등의 부작용을 일으킬 수 있으며 그 사용이 일부 제한되고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 염증성 매개체들의 생성을 억제하거나 염증발현 증개 물질 등을 억제하는 천연 유래 물질을 탐색하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.<sup>12</sup>



- LPS<sup>1)</sup>: Lipopolysaccharide
- TLR4<sup>2)</sup>: toll-like receptor 4
- NF-κB<sup>3)</sup>: Nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- TNF-α<sup>4)</sup>: Tumor necrosis factor-alpha
- IL-6<sup>5)</sup>: Interleukin 6
- IL-1β<sup>6)</sup>: Interleukin 1 beta
- COX-2<sup>7)</sup>: Cyclooxygenase-2
- PGE<sub>2</sub><sup>8)</sup>: Prostaglandin E<sub>2</sub>
- iNOS<sup>9)</sup>: Inducible nitric oxide synthase

Figure 1. LPS-induced inflammation pathway.

피부는 가장 바깥부분으로 노출되어 있기 때문에 세균의 발육에 적합한 환경을 갖는다. 태생기엔 무균적이었던 피부도 각종 세균에 의해 오염되어 피부 염증이 일어나게 된다. 건강한 피부는 유익균과 유해균 비율이 8:2로 약산성을 이룬다. 그러나 잘못된 세정습관이나 과도한 유분공급, 호르몬의 과다한 분비는 피지분비를 유도하여 피부의 항상성을 깨지게 한다. 이로 인한 피지선의 막힘은 모낭내의 미생물이 번식하기에 알맞은 조건을 형성하며 혐기성균, 호기성구균, 진균 등이 번식하게 된다.<sup>13</sup>

피부에 염증을 일으키는 피부질환미생물은 *Cutibacterium acnes*와 *Staphylococcus epidermidis* 가 대표적이며, 이들은 피부나 생활환경에 존재하여 피부의 세포나 장벽 기능을 손상시켜 아토피 피부염이나 여드름을 유발한다.<sup>13</sup> 여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 염증성 질환으로, 발생기전은 androgen이 피지 분비를 촉진하고 *C. acnes*가 피지를 triglyceride와 유리 지방산으로 가수분해하면서 염증이 일어난다. 이때 모공이 두꺼운 각질로 채워지며 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 여드름이 발생하는 것으로 알려져 있다.<sup>14</sup> 또한, *S. epidermidis*는 피부 내에 정상적으로 분포하는 호기성 피부 상재균으로 염증의 일차적 원인은 아니지만, 염증 발생 부위를 더욱 확장시키며 여드름을 악화시킨다.<sup>15</sup>

구강 내에는 다양한 미생물들이 번식하고 있으며, 이들에 의해서 치아우식증 및 치주염 같은 여러 구강질환이 발생된다. 구강 세균 중 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*가 인간의 구강 내에서 가장 많이 발견되고 우식 부위에 존재하는 주요 원인균으로 알려져 있다. 특히 *S. mutans*는 glucosyltransferase 및 fructosyltransferase와 같은 당 전이 효소를 생산하여 설탕과 같은 당류로부터 불용성 glucan을 생성한다. 생성된 불용성 glucan은 미생물 집단이 치아에 쉽게 부착, 증식하도록 하고 유기산을 생산한다. 이 유기산에 의해 무기질의 탈회가 일어나며 치아우식증을 일으켜 결국 치아를 상실하게 된다.<sup>16</sup>

이러한 피부 상재균 및 기타 세균에 의한 질환의 발생을 감소시키고 피부를 보호하기 위해서 항균제의 사용은 필수적이다. 그러나, 현재 주로 사용되는 항균제인 triclosan, erythromycin, tetracycline 등의 지속적인 사용은 내성을 일으킬 뿐만 아니라 조직 및 장기 손상, 과민반응 등과 같은 부작용을 일으킬 수 있다.<sup>17</sup> 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해 항균력이 우수하면서도 인체 독성이 적은 천연 유래 물질 개발에 대한 필요성이 증대되고 있다.

본 연구에서는 제주도 자생 식물인 보리밥나무 및 생달나무의 가지(branches)를 추출 및 용매 분획하여 다양한 생리활성을 확인하고 크로마토그래피, NMR 등을 이용해 유효 성분을 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물의 생리활성을 확인하여 식품 및 화장품 소재로서의 응용가능성을 판단하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 활성 성분 분리에 사용된 용매들은 Merck, OCI 및 대정화금의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co.), medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co.)에는 FlashPure EcoFlex C<sub>18</sub> (220 g, BÜCHI, Switzerland) 컬럼을 사용하였고, gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex<sup>TM</sup> LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 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.)를 사용하였으며 TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나 발색 시약에 침적시킨 후 heat gun을 사용하여 건조시켰다. 발색 시약으로는 KMnO<sub>4</sub> 수용액 (3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25% NaOH) 및 anisaldehyde (1% anisaldehyde-5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 사용하였다.

화합물의 구조 분석을 위해 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance) spectrometer는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD를 사용하였다. 분리된 화합물의 함량분석에 사용된 high performance liquid chromatography (HPLC, Alliance 2695, Waters Co.)에는 Kromasil column (100-5-C<sub>18</sub>, 250×4.6 mm)을 사용하였고 검출기는 2998 PDA Detector (Waters co.)를 사용하였다.



## 2. 생리 활성 평가

### 1) 항산화

#### (1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법<sup>18</sup>을 응용하여 실시하였다. 정량을 위한 표준 검정 곡선(standard calibration curve)에는 gallic acid를 표준물질로 사용하였다. 1 mg/mL 농도의 시료와 농도별로 희석한 gallic acid 표준 용액을 100  $\mu$ L 씩 취한 후 증류수 900  $\mu$ L를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100  $\mu$ L를 첨가하여 상온에서 3분간 반응시키고, 7%(w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 200  $\mu$ L를 가하여 혼합한 후 증류수 700  $\mu$ L을 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 96 well plate에 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정값을 표준 검정 곡선에 대입하여 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양으로 환산하였다. 표준 검정 곡선의  $r^2$  값은 0.99 이상이었다 (Figure 2).

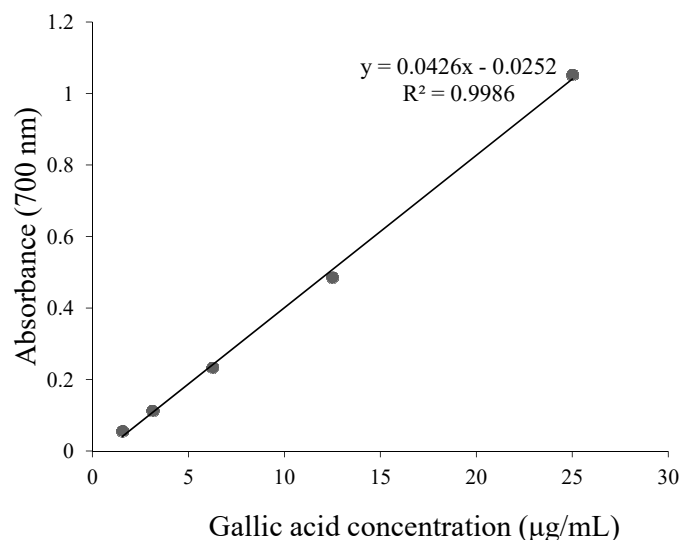


Figure 2. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents

## (2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법<sup>19</sup>을 응용하여 실시하였으며 표준물질로 quercetin을 사용하였다. 96 well plate에 표준물질과 시료를 15  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 ethylene glycol 150  $\mu\text{L}$ 와 0.1 N NaOH 15  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 총 180  $\mu\text{L}$ 가 되도록 혼합하였다. 이를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료의 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준 검정 곡선 (standard calibration curve)을 통해 구하였으며 표준 검정 곡선의  $r^2$  값은 0.99 이상이었다(Figure 3).

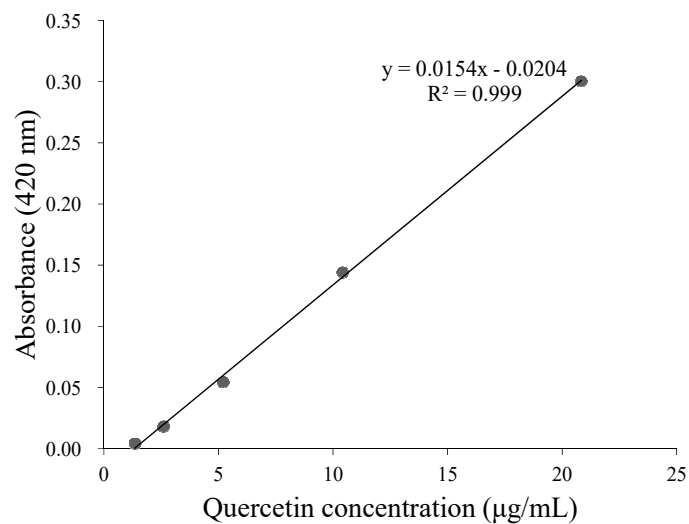


Figure 3. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.

### (3) DPPH radical 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법<sup>20</sup>을 응용하여 실시하였다. DPPH 시약은 DMSO를 사용하여 20 mM 농도로 녹이고 이를 EtOH을 사용하여 0.2 mM로 희석한 뒤 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료를 각각 20 µL씩 넣고 0.2 mM DPPH 용액을 180 µL씩 가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고 radical 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC<sub>50</sub>)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며 양성 대조군 (positive control)은 BHT를 사용하였다.

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

Abs<sub>control</sub> : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

Abs<sub>sample</sub> : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

Abs<sub>blank</sub> : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

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

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] cation radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법<sup>21</sup>을 응용하여 실시하였다. ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하기 위해 7.0 mM ABTS 용액과 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 상온 및 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS<sup>+</sup> radical을 형성시켰다. ABTS<sup>+</sup> 용액은 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.02가 되도록 ethanol로 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료를 농도별로 각각 20 µL씩 가한 후 희석한 ABTS<sup>+</sup> 용액 180 µL을 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC<sub>50</sub>)을 구하였다. 양성 대조군(positive control)은 BHT를 사용하였으며 radical 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였다.

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

Abs<sub>control</sub> : 700 nm에서 ABTS<sup>+</sup>의 흡광도

Abs<sub>sample</sub> : 700 nm에서 시료와 ABTS<sup>+</sup> 반응액의 흡광도

Abs<sub>blank</sub> : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

(5) 세포 보호 효과

① HaCaT 세포 배양

Immortalised human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 Korean Cell Line Bank (KLCB)로부터 분양 받아 실험에 사용하였으며, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% fetal bovin serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였고, 3일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

② 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로부터 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

HaCaT cell을 96 well plate에  $1.0 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 24시간 전배양하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 제거하고 세포독성 평가로 결정된 농도의 과산화수소를 처리하여 배양하였다. 30분 후 과산화수소를 제거하고 dulbecco's phosphate buffered saline (1× DPBS)로 2회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 처리하고 배양조건 하에서 24시간 배양한 후 MTT assay로 세포 생존율(%)을 계산하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호효과를 확인하였다.

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

Abs<sub>control</sub> : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs<sub>sample</sub> : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

## 2) 항염

### (1) RAW264.7 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였고 2일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

### (2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 100 ng/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 생성된 nitric oxide의 양을 측정하기 위해 96 well plate에 세포 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였으며 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준 검정 곡선을 통해 정량하였고 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다. 또한 각 시료의 NO 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC<sub>50</sub>)를 구하였다. 양성대조군(positive control)으로는 2-amino-4-picoline (10 µM)을 사용하였다.

### (3) PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 0.1 및 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액의 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 각각 PGE<sub>2</sub> (R&D Systems, USA), IL-6 (invitrogen, USA), IL-1β (R&D Systems, USA), TNF-α (BD Biosciences) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였다. 측정값은 각각의 표준물질에 대한 표준 검정 곡선을 통해 정량하여 백분율로 나타내었으며 표준 검정 곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.

### (4) 세포 독성 평가 (MTT assay)

세포 독성 평가는 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 이용하였다. 24 well plate에 RAW264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 100 ng/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT 시약을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 3-4시간 동안 반응시킨 후 배지를 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 후 이를 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

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

### 3) 항균

#### (1) 균주배양

피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) 3종 CCARM 3709, CCARM 3710, CCARM 3711과 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) 3종 CCARM 0081, CCARM 9009, CCARM 9010를 항생제 내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였으며, 충치균인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) KCCM 40105는 한국 미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)로부터 분양받아 사용하였다. *S. epidermidis*는 배양 배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37°C, 호기성 조건에서 24시간마다 계대 배양하였고, *C. acnes*는 배양 배지를 GAM (gifu anaerobic medium)으로 하여 37°C, 혐기 상태로 48시간마다 계대 배양하였다. *S. mutans*는 배양 배지를 BHI (Brain Heart Infusion)로 하여 37°C, 호기성 조건에서 24시간마다 계대 배양하였다.

#### (2) Paper disc diffusion method

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 paper disc diffusion 법을 실시하여 각 균주에 대한 생육 저지환을 확인하였다. *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *S. mutans* (KCCM 40105)의 균수를 조절하여 0.8% agar를 포함하는 소프트 배지에 넣고 1.5% agar를 포함하는 고체 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다. *C. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)는 위와 같은 방법으로 실시하고 37°C에서 48시간 혐기 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다.

*S. epidermidis*는  $1.5 \times 10^6$ , *S. mutans*는  $3.0 \times 10^6$  그리고 *C. acnes*는  $5.0 \times 10^7$  CFU/mL로 균수를 맞추었으며, 양성 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.



### (3) MIC (minimum inhibitory concentration)

최소 억제 농도 (MIC)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소 농도로 미생물에 대한 MIC 값이 낮을수록 시료 물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고 할 수 있다. MIC 측정은 액체 배지 희석법을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 two-fold-dilution 법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽힌 배지 100  $\mu\text{L}$ 와  $2.0 \times 10^5$  CFU/mL로 조절한 균 100  $\mu\text{L}$ 를 넣어주었다. *S. epidermidis* 및 *S. mutans*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *C. acnes*는 37°C에서 48시간 혐기 조건하에서 배양하여 균의 증식이 나타나지 않는 최소 농도를 확인하였다.

### (4) MBC (minimum bactericidal concentration)

MIC는 균의 최소 억제 농도로서 균이 모두 사멸했음을 의미하는 것이 아니므로 균의 최소 사멸 농도 (MBC)를 확인하기 위해 MIC 값 이상의 시료 배양액을 고체 배지에 희석 도달하여 배양한 후 colony의 형성 여부를 확인하여 균이 전혀 자라지 않은 농도를 MBC 값으로 하였다. MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 사용해 시료 배양액을 찍어내어 1.5% agar를 포함하는 고체배지에 도달한 후 *S. epidermidis* 및 *S. mutans*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *C. acnes*는 37°C에서 48시간 혐기 조건하에서 배양하여 colony가 형성되지 않는 최소 농도를 확인하였다.

Abs<sub>control</sub> : 시료를 첨가하지 않은 반응 용액의 흡광도

Abs<sub>sample</sub> : 시료 반응 용액의 흡광도

### 3. HPLC 함량 분석

생달나무 가지에서 분리된 *epi*-catechin (1)의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 정량 분석하였다. 분석을 위해 추출물 및 분획물을 5 mg/mL로 녹인 후, 0.45  $\mu$ m PTFE filter를 여과하여 나온 여액을 사용하였다. 분석에는 주입부피 10  $\mu$ L, 컬럼온도 40  $^{\circ}$ C, 이동상은 0.1% acetic acid가 함유된 증류수(용매 A)와 acetonitrile (용매 B)을 사용하여 다음과 같은 조건으로 용출시켰고, 1.0 mL/min의 유속으로 40분 동안 분석하였다. 검량선 작성을 위해 표준품인 *epi*-catechin(sigma.,  $\geq 90\%$ )을 사용하였다. *epi*-catechin은 50, 100, 200  $\mu$ g/mL의 농도로 제조하여 사용하였으며, 각 농도별 peak 면적을 구하여 회귀방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였다(Table 1-2).

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control Factor	Conditions
Injection Volume	10 $\mu$ L
Column	Kromasil 100-5-C <sub>18</sub> (250 $\times$ 4.6 mm) (AkzoNobel)
Mobile phase	A: 0.1% Actic acid in H <sub>2</sub> O, B: Acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Wavelength	280 nm
Detector	Waters 2998 PDA (Waters, USA)
Separation Module	Waters 2695 (Waters, USA)

Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis

Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1.0	90	10
40	1.0	83	17

#### 4. 통계 처리

본 연구에서 진행한 모든 실험은 동일 조건 하에서 3회 반복 실시하였으며 모든 통계 분석은 Excel software (version 2019, 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 의미 있다고 판단하였다. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### Ⅲ. 연구 1 : 보리밥나무 가지 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구

#### 1. 재료

보리밥나무(*Elaeagnus macrophylla*)는 보리수나무과(Elaeagnaceae)에 속하는 상록 관목 식물로 바닷가 주변 산지에서 자라며, 주로 한국, 중국, 일본, 타이완에서 서식한다. 보리밥나무 잎은 어긋나고 넓은 난형으로 원형에 가깝고 표면에 은백색 인모로 덮였다가 앞면의 것은 떨어진다. 꽃은 9~11월에 잎겨드랑이에서 몇 개씩 모여 달린다. 열매는 이듬해 3~4월에 적색으로 익고 표면에 은백색 인모가 밀생한다.

보리밥나무 잎(leaves) 추출물에 대해서는 항염, 미백 등의 효능이 알려져 있고 *n*-Hex 분획물에서 다량의 methyl linolenate가 분리되어 미백 활성이 우수한 것으로 보고되어 있다.<sup>22</sup> 그러나 보리밥나무 가지(branches)를 대상으로 한 유효 성분 연구는 보고된 바가 없으므로 보리밥나무 가지 부위를 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 보리밥나무 가지(시료번호 : 492)는 제주도 한림읍 금능리에서 2019년 1월에 채집한 것을 제주생물자원(주)로부터 구입하였으며, 구입한 보리밥나무 가지는 동결 건조기에서 건조한 후 분쇄하여 사용하였다(Figure 4).

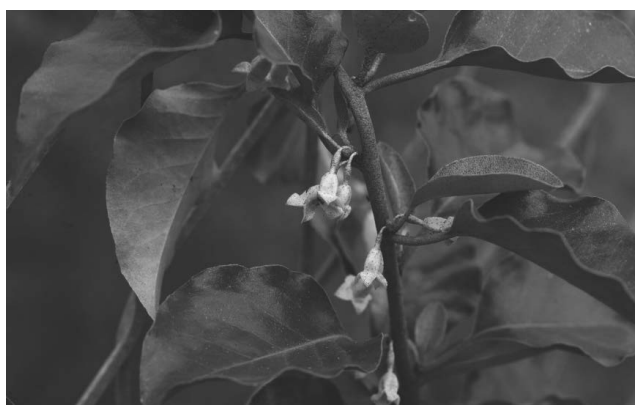


Figure 4. Picture of *Elaeagnus macrophylla*.

## 2. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

### 1) 보리밥나무 가지의 추출 및 용매 분획

건조된 보리밥나무 가지 2 kg을 분쇄하여 70%(v/v) EtOH 40.0 L에 침출시킨 후 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 여과기와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과하고 남은 잔사에 대하여 동일한 조건으로 추출 및 여과를 1회 반복 진행하였다. 얻어진 여액은 40 °C 이하의 수욕 상에서 회전 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 추출물 120.9 g을 얻었다. 얻어진 추출물 중 16.0 g을 증류수 1.0 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) fraction을 얻었다. 이와 같은 방법으로 5회 반복 실시하여 추출물 총 96.0 g을 용매 분획하였다(Figure 5).

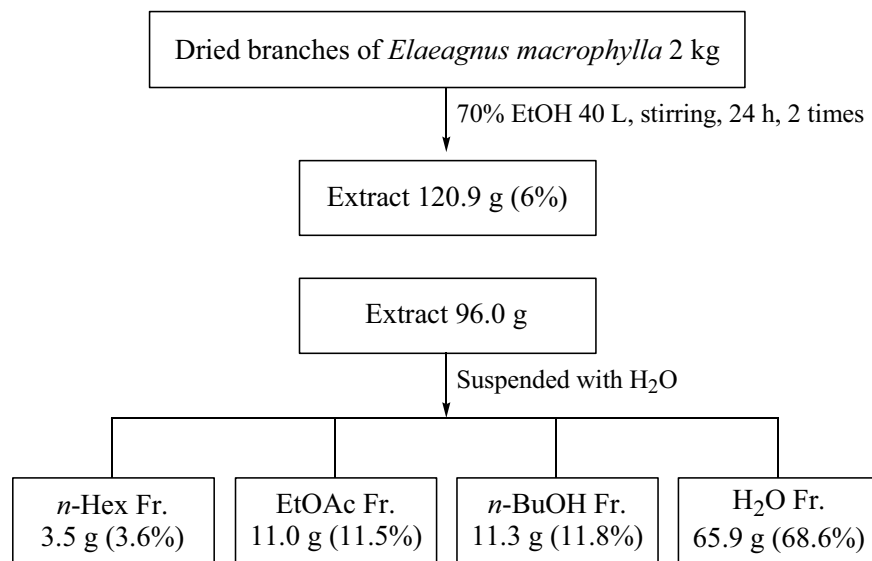


Figure 5. Extraction and solvent fractionation of *E. macrophylla* branches.

## 2) *n*-Hexane 분획물의 활성 성분 분리

*n*-Hex 분획물 2.3 g을 극성에 따라 나누기 위해 한 glass column에 순상 silica gel을 충전하여 VLC를 진행하였다. 용매의 극성은 3%씩 높이는 방법으로 *n*-Hex:EtOAc (0-30%)가 될 때까지 100 mL씩 용출시킨 후 100% EtOAc와 100% MeOH를 용출하여 총 15개의 fraction을 얻었다(Fr. HV1-15).

VLC fraction 중 Fr. HV4 (125.1 mg)는 compound 1과 compound 2가 혼합되어 있는 것으로 확인되었다. Fr. HV6은 단일 화합물인 compound 3 (129.6 mg)으로 확인되었으며, Fr. HV10은 단일 화합물인 compound 4 (42.4 mg)로 확인되었다. Fr. HV14 (92.0 mg)는 compound 5와 compound 6이 혼합되어 있는 것으로 확인되었다(Figure 6).

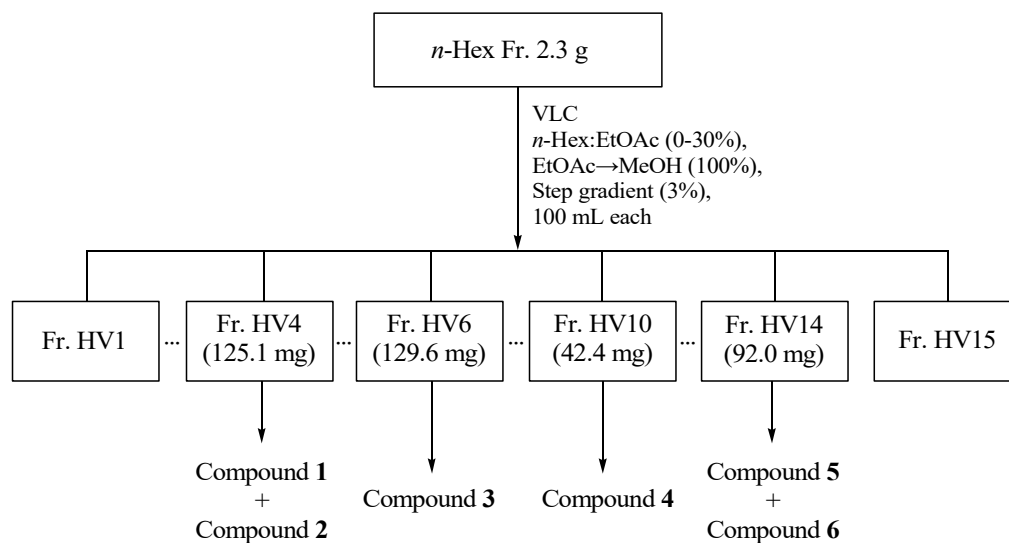


Figure 6. Isolation of compounds from *E. macrophylla* branches.

### 3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 세분화하기 위해 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. 용매의 극성을 5%씩 높이는 방법으로 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (5-50%)을 각 300 mL씩 용출하여 총 31개의 fraction을 얻었다(Fr. EV1-31).

VLC fraction들 중 Fr. EV3 (68.4 mg)는 compound 1과 compound 2가 혼합되어 있는 것으로 확인되었다. Fr. EV6 (128.9 mg)을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=40:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 7 (26.8 mg)을 얻었다. Fr. EV7은 단일 화합물인 compound 3 (97.1 mg)으로 확인되었으며 Fr. EV9는 단일 화합물인 Compound 4 (35.5 mg)로 확인되었다. Fr. EV13 (45.8 mg)은 compound 5와 compound 12가 혼합되어 있는 것으로 확인되었고 Fr. EV14 (47.4 mg)는 단일 화합물인 Compound 6으로 확인되었다. Fr. EV17 (55.8 mg)과 Fr. EV18 (89.9 mg)은 Compound 8과 Compound 9가 혼합되어 있는 것으로 확인되었다. Fr. EV19-20 (205.2 mg)은 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 10과 compound 11 혼합물 (3.1 mg)을 분리하였다(Figure 7).



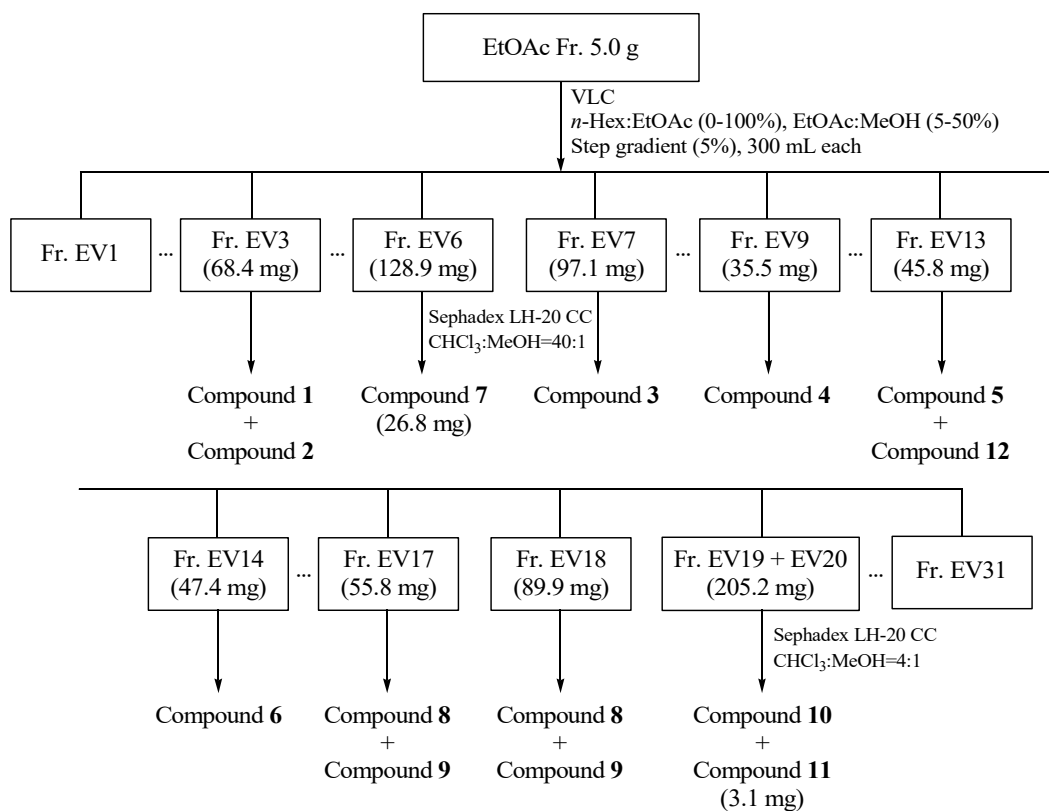


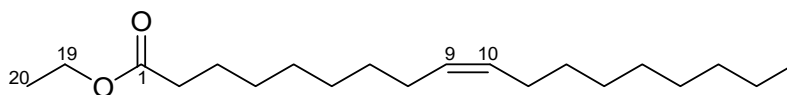
Figure 7. Isolation of compounds from *E. macrophylla* branches. (VLC)

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

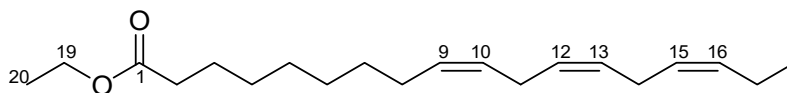
#### 1) Compound 1과 Compound 2의 구조 동정

Compound 1의  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  174.1 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 분자 내에 포함되어 있을 것이라 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  130.0, 128.5 피크를 통해 하나의 이중결합이 있을 것으로 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (2H, q,  $J=7.3$  Hz) 및  $\delta_{\text{C}}$  60.4 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는  $sp^3$  혼성 carbon이 있음을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, m) 및  $\delta_{\text{C}}$  14.5 피크를 통해 한 개의 methyl group이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>23,24</sup>과 비교한 결과, compound 1은 ethyl oleate으로 확인되었다(Figure 8-10, Table 3).

Compound 2는 NMR data를 통해 compound 1과 유사한 구조로 예상하였으며,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 132.2, 130.5, 130.2, 128.5, 127.9, 127.3 피크를 통해 세 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>25</sup>과 비교한 결과, compound 2는 ethyl linolenate로 확인되었다(Figure 9-11, Table 3).



Compound 1



Compound 2

Figure 8. Chemical structure of compound 1 and 2.

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

No.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		174.1		174.1
2	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6
3	1.61–1.58 (2H, m)	25.2	1.61–1.58 (2H, m)	25.2
4		27.4		27.4
5		29.3		29.3
6		29.6		29.6
7		29.9		29.9
8	2.08–1.98 (2H, m)	27.4	2.08–1.98 (2H, m)	27.4
9	5.36–5.31 (1H, m)	130.0	5.36–5.31 (1H, m)	132.2–127.3
10	5.36–5.31 (1H, m)	128.5	5.36–5.31 (1H, m)	132.2–127.3
11	2.08–1.98 (2H, m)	25.2	2.08–1.98 (2H, m)	25.2
12		30.0	5.36–5.31 (1H, m)	132.2–127.3
13		29.8	5.36–5.31 (1H, m)	132.2–127.3
14		29.7	2.08–1.98 (2H, m)	27.4
15		29.5	5.36–5.31 (1H, m)	132.2–127.3
16		29.4	5.36–5.31 (1H, m)	132.2–127.3
17		22.9	2.08–1.98 (2H, m)	22.9
18	0.86 (3H, m)	14.3	0.86 (3H, m)	14.3
19	4.10 (2H, q, 7.3)	60.4	4.10 (2H, q, 7.3)	60.4
20	0.86 (3H, m)	14.5	0.86 (3H, m)	14.5

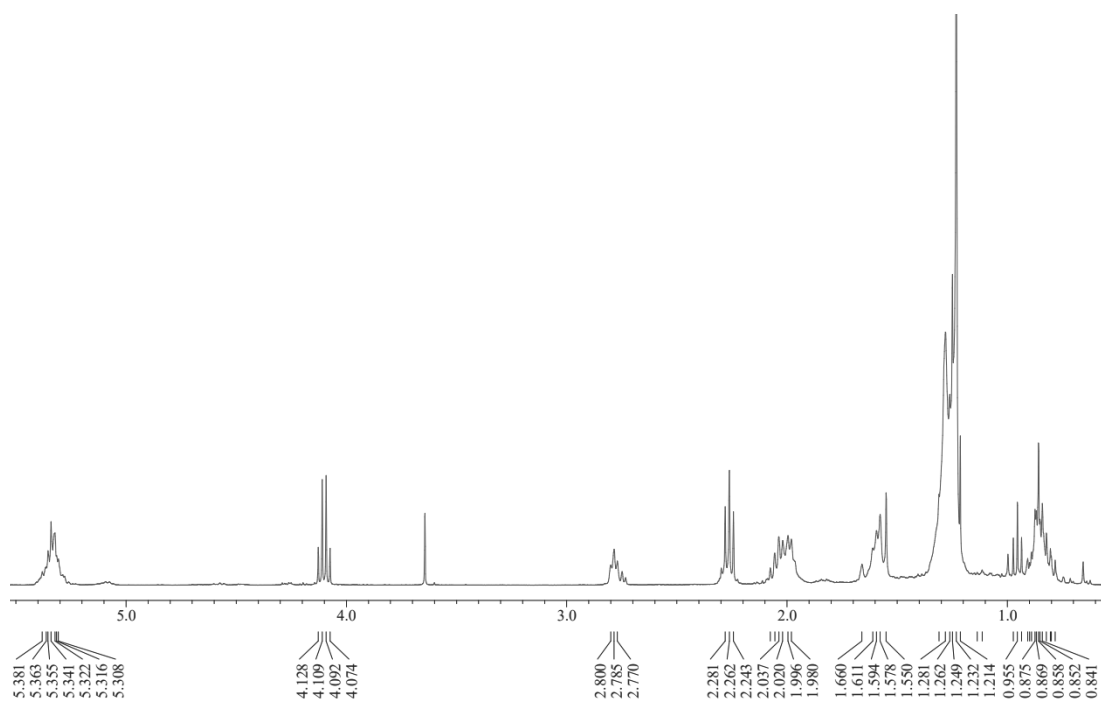


Figure 9.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1 and 2 in  $\text{CDCl}_3$

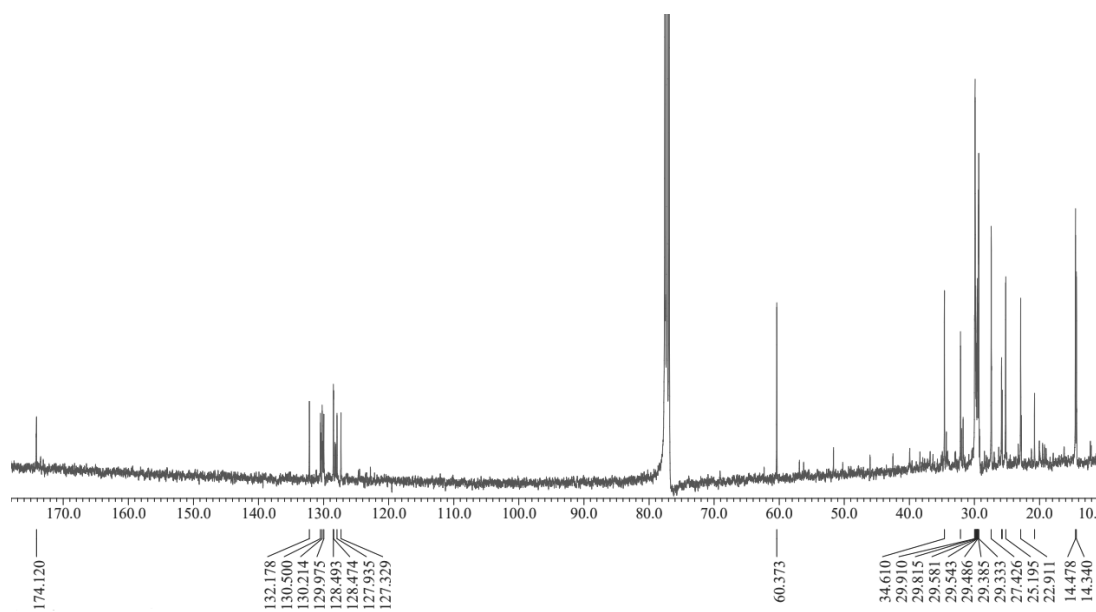


Figure 10.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1 and 2 in  $\text{CDCl}_3$

## 2) Compound 3의 구조 동정

Compound 3은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 총 18개의 carbon 피크가 관찰되었으며,  $\delta_{\text{C}}$  179.9 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 분자 내에 포함되어 있음을 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{C}}$  130.2, 129.9 피크를 통해 하나의 이중결합이 있을 것으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, m) 및  $\delta_{\text{C}}$  14.3 피크를 통해 한 개의 methyl group을 포함하는 구조로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>26</sup>과 비교한 결과, compound 3은 oleic acid로 확인되었다(Figure 11-13, Table 4).

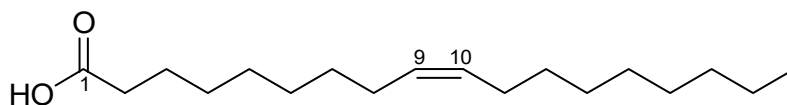


Figure 11. Chemical structure of compound 3

Table 4. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz)

No.	Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		179.9
2	2.33 (2H, t, 7.6)	34.2
3	1.66-1.57 (2H, m)	24.9
4		29.3
5		29.4
6		29.5
7		29.9
8	2.06-1.97 (2H, m)	27.4
9	5.37-5.32 (1H, m)	129.9
10	5.37-5.32 (1H, m)	130.2
11	2.06-1.97 (2H, m)	27.4
12		29.9
13		29.7
14		29.8
15		29.6
16		32.1
17		22.9
18	0.86 (3H, m)	14.3

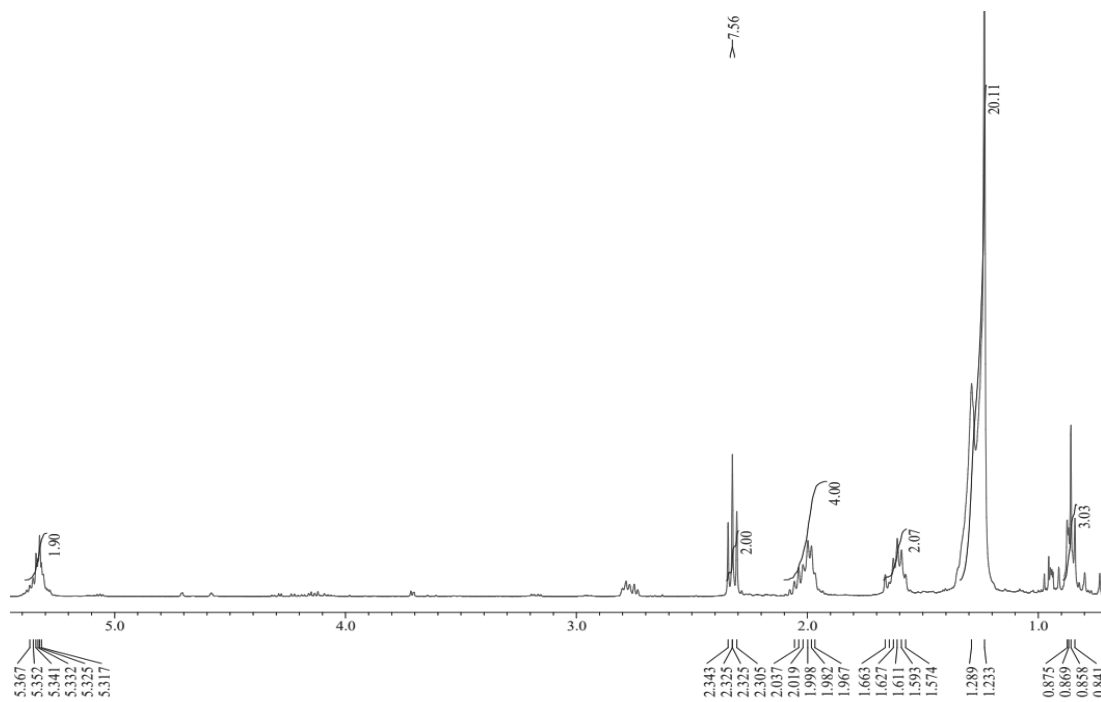


Figure 12.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **3** in  $\text{CDCl}_3$

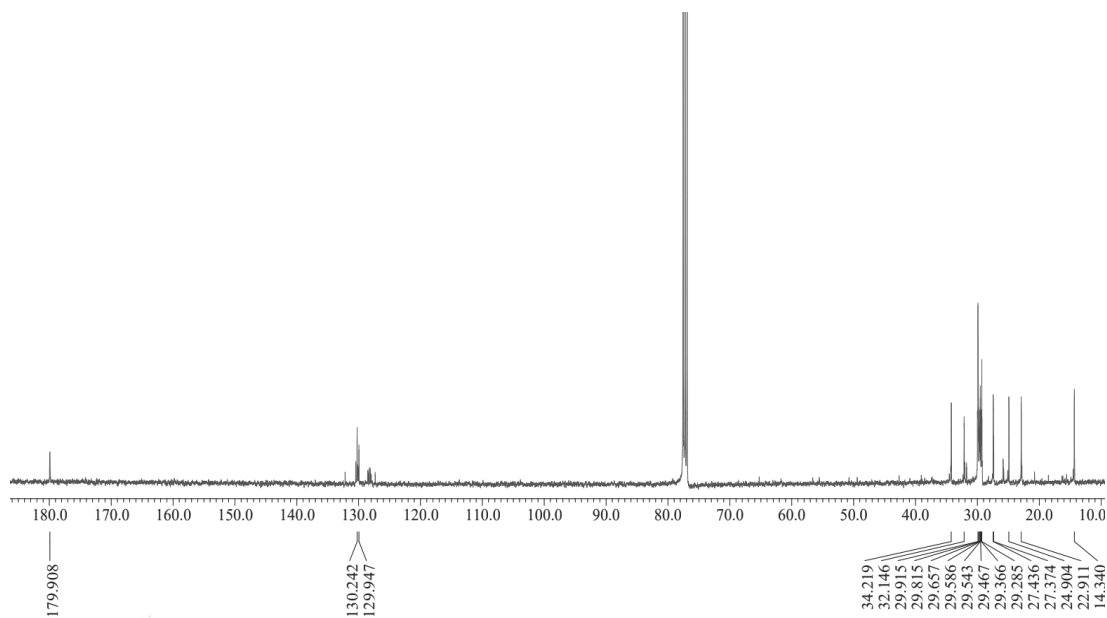


Figure 13.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **3** in  $\text{CDCl}_3$

### 3) Compound 4의 구조 동정

Compound 4는  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 총 18개의 carbon 피크가 관찰되었으며,  $\delta_{\text{C}}$  179.4 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 분자 내에 포함되어 있음을 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{C}}$  132.2, 130.5, 128.5, 128.4, 128.0, 127.3 피크를 통해 세 개의 이중결합이 있을 것으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  0.96 (3H, t,  $J=7.6$  Hz) 및  $\delta_{\text{C}}$  14.5 피크를 통해 한 개의 methyl group을 포함하고 있는 구조로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>27</sup>과 비교한 결과, compound 4는 linolenic acid로 확인되었다(Figure 14-16, Table 5).

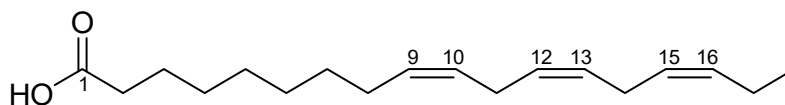


Figure 14. Chemical structures of compound 4



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

No.	Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		179.4
2	2.32 (2H, t, 7.6)	34.1
3	1.63–1.57 (2H, m)	29.9–29.2
4		29.9–29.2
5		29.9–29.2
6		29.9–29.2
7		29.9–29.2
8	2.09–1.98 (2H, m)	27.4
9	5.41–5.26 (1H, m)	132.2–127.3
10	5.41–5.26 (1H, m)	132.2–127.3
11	2.80–2.77 (2H, m)	25.8
12	5.41–5.26 (1H, m)	132.2–127.3
13	5.41–5.26 (1H, m)	132.2–127.3
14	2.80–2.77 (2H, m)	25.7
15	5.41–5.26 (1H, m)	132.2–127.3
16	5.41–5.26 (1H, m)	132.2–127.3
17	2.09–1.98 (2H, m)	20.8
18	0.96 (3H, t, 7.6)	14.5

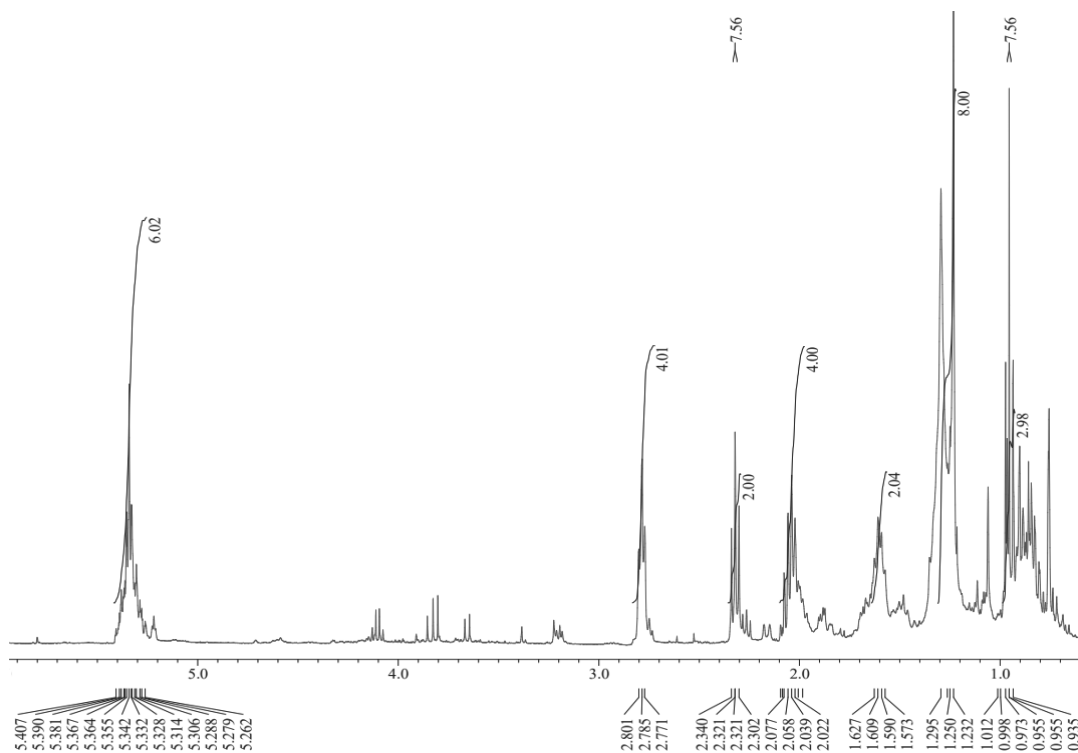


Figure 15.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$

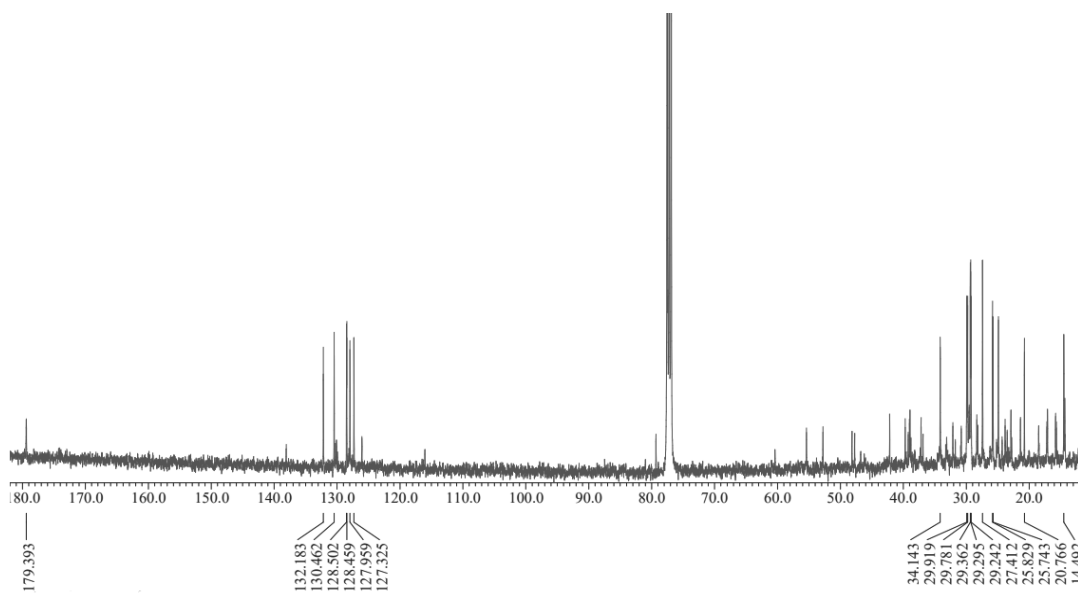
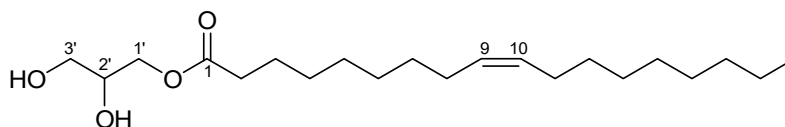


Figure 16.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$

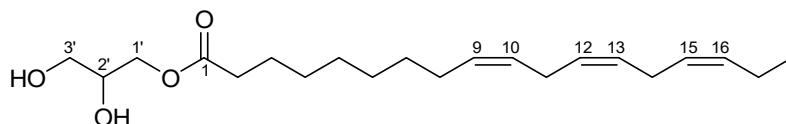
#### 4) Compound 5와 6의 구조 동정

Compound 5의  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  174.6 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 분자 내에 포함되어 있음을 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  130.4, 130.2 피크를 통해 하나의 이중결합이 있을 것으로 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  4.19 (1H, dd,  $J=11.9, 4.6$  Hz), 4.13 (1H, dd,  $J=11.5, 6.0$  Hz), 3.91 (1H, m), 3.68 (1H, dd,  $J=11.5, 4.1$  Hz), 3.58 (1H, dd,  $J=11.5, 6.0$  Hz) 피크와  $\delta_{\text{C}}$  65.4, 70.5, 63.5 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는  $sp^3$  혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, t,  $J=6.6$  Hz) 및  $\delta_{\text{C}}$  14.3 피크를 통해 한 개의 methyl group을 포함하고 있는 구조로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>28</sup>과 비교한 결과, compound 5는 1-monoolein으로 확인되었다(Figure 17-19, Table 6).

Compound 6은 NMR data를 통해 compound 5와 유사한 구조로 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  132.2, 130.4, 128.5, 128.4, 128.0, 127.3 피크를 통해 세 개의 이중결합이 있는 구조로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>29</sup>과 비교한 결과, compound 6은 1-linolenoyl glycerol로 확인되었다(Figure 17-19, Table 6).



Compound 5



Compound 6

Figure 17. Chemical structure of compound 5 and 6

Table 6. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound **5** and **6** (400 and 100 MHz)

No.	Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>	
	$\delta_{\text{H}}(\text{int.}, \text{multi.}, J \text{ Hz})$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}(\text{int.}, \text{multi.}, J \text{ Hz})$	$\delta_{\text{C}}$
1	2.33 (2H, t, 7.6)	174.6	2.33 (2H, t, 7.6)	174.6
2	1.61 (2H, m)	34.3	1.61 (2H, m)	34.3
3		25.1		25.1
4		29.5		29.3
5		29.5		29.5
6		29.7		30.0
7		29.8		29.9
8		27.4	2.02 (2H, m)	27.4
9	5.34 (1H, m)	130.4	5.34 (1H, m)	132.2
10	5.34 (1H, m)	130.2	5.34 (1H, m)	127.3
11		25.1	2.78 (2H, m)	25.7
12		29.9	5.34 (1H, m)	128.5
13		29.6	5.34 (1H, m)	128.4
14		29.8	2.78 (2H, m)	25.8
15		29.4	5.34 (1H, m)	128.0
16		32.1	5.34 (1H, m)	130.4
17		22.9	2.02 (2H, m)	20.8
18	0.86 (3H, t, 6.6)	14.3	0.95 (3H, t, 7.3)	14.3
1'	4.19 (1H, dd, 11.9, 4.6)	65.4	4.19 (1H, dd, 11.9, 4.6)	65.4
	4.13 (1H, dd, 11.5, 6.0)		4.13 (1H, dd, 11.5, 6.0)	
2'	3.91 (1H, m)	70.5	3.91 (1H, m)	70.5
3'	3.68 (1H, dd, 11.5, 4.1)	63.5	3.68 (1H, dd, 11.5, 4.1)	63.5
	3.58 (1H, dd, 11.5, 6.0)		3.58 (1H, dd, 11.5, 6.0)	

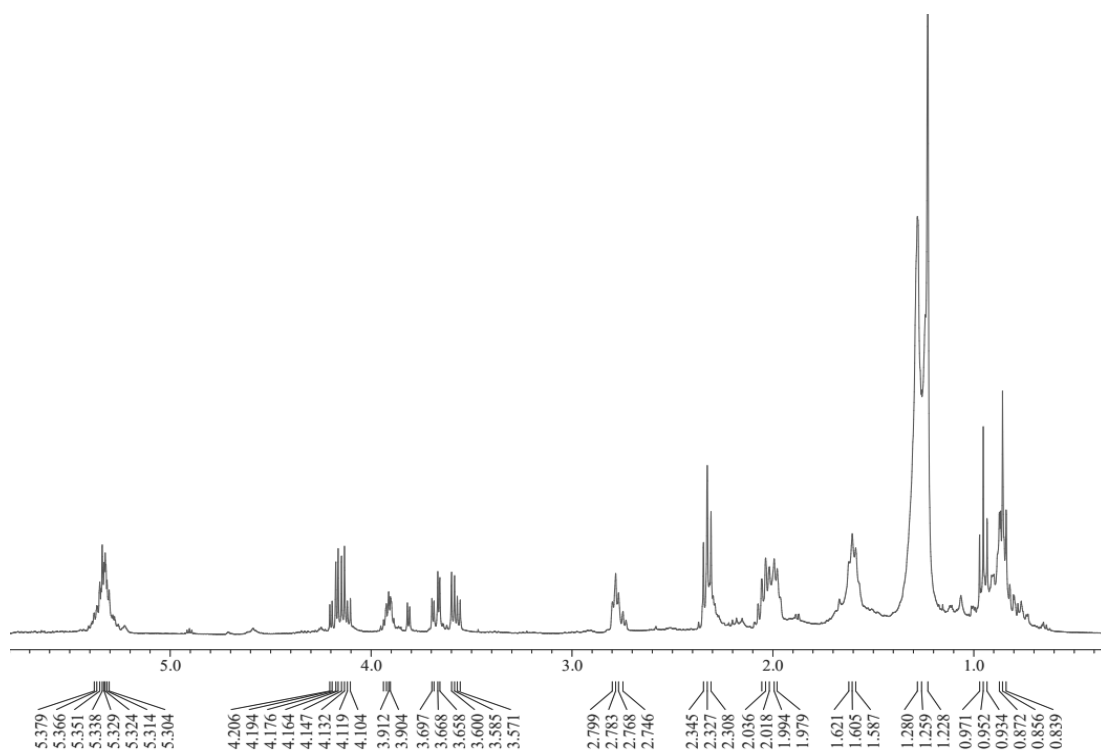


Figure 18.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **5** and **6** in  $\text{CDCl}_3$

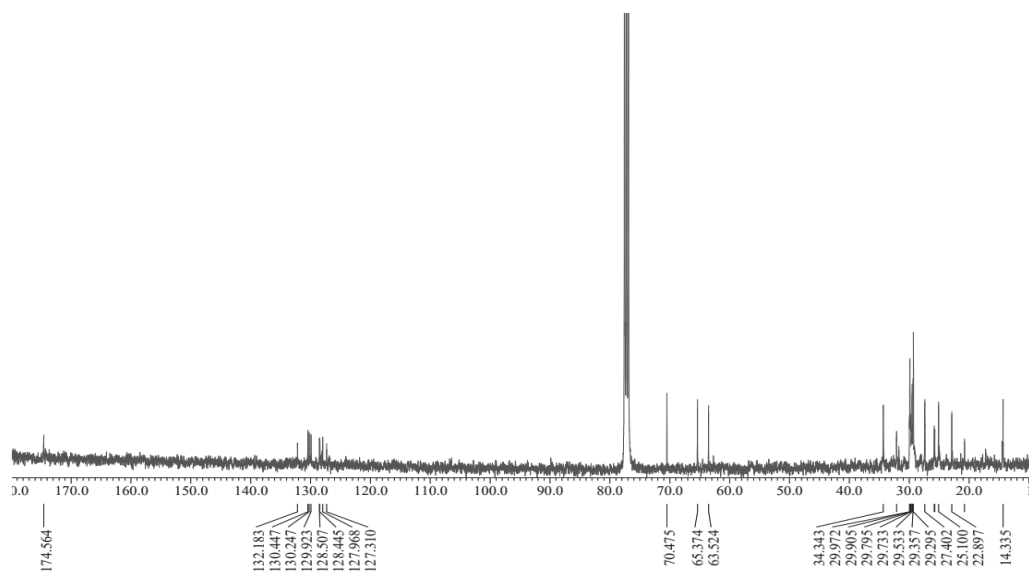


Figure 19.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **5** and **6** in  $\text{CDCl}_3$

5) Compound 7의 구조 동정

Compound 7은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 29개의 carbon 피크와 methyl proton인 총 6개의  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, s), 0.90 (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,  $J=6.9$  Hz), 0.66 (3H, s) 피크를 통해 sterol 계통의 화합물임을 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{C}}$  141.0, 121.9 피크를 통해 이중결합이 한 개 있음을 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  72.0 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소가 결합된  $sp^3$  혼성 carbon이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌과 비교한 결과 compound 7은  $\beta$ -sitosterol로 확인되었다(Figure 20-22, Table 7).

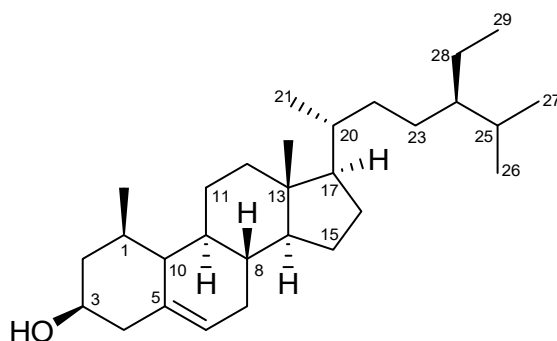


Figure 20. Chemical structures of compound 7

Table 7.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **7** (400 and 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		37.5
2		31.9
3	3.50 (1H, m)	72.0
4		42.5
5		141.0
6	5.33 (1H, d, 5.5)	121.9
7		32.1
8		32.1
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	0.66 (3H, s)	12.1
19	0.98 (3H, s)	20.0
20		36.4
21	0.90 (3H, d, 6.9)	19.0
22		34.2
23		26.3
24		46.0
25		29.4
26	0.81 (3H, d, 7.3)	19.6
27	0.79 (3H, d, 6.9)	19.3
28		23.3
29	0.82 (3H, t, 7.3)	12.2

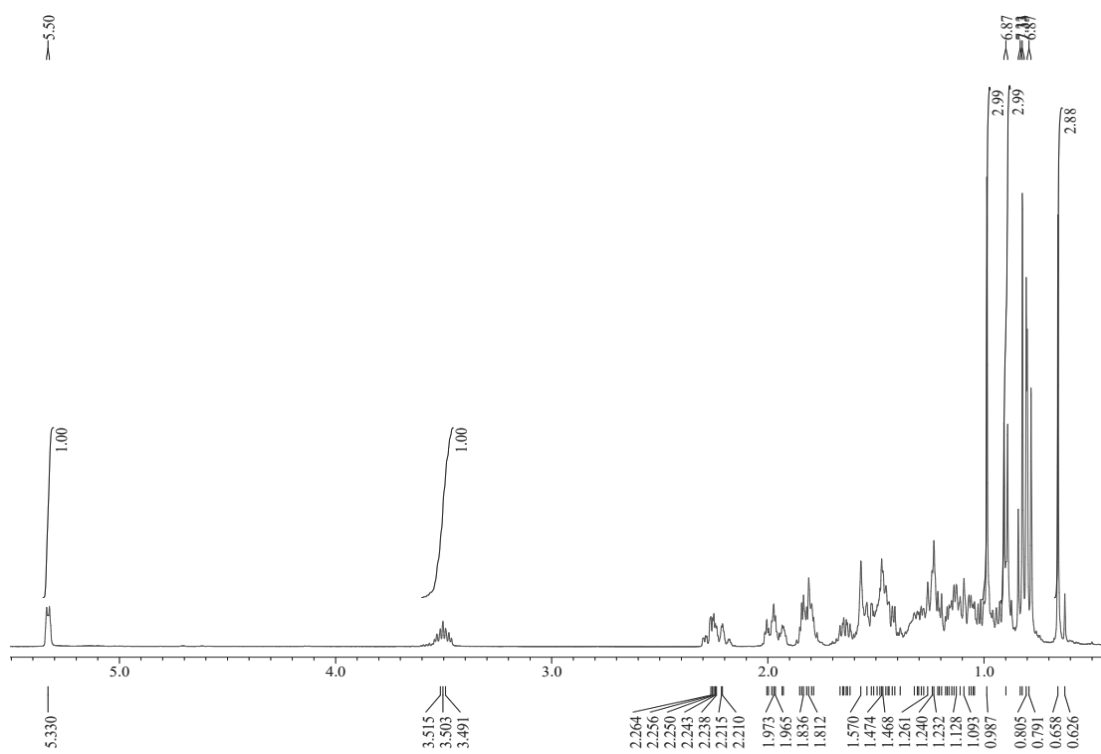


Figure 21.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{CDCl}_3$

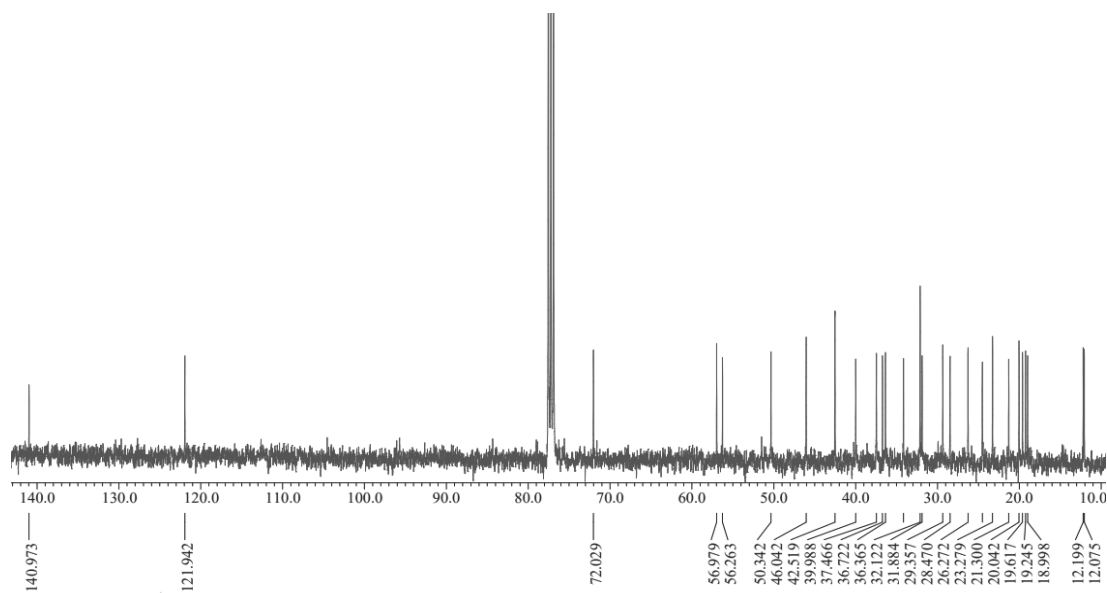


Figure 22.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{CDCl}_3$



6) Compound 8과 9의 구조 동정

Compound 8은 Compound 9와 혼합된 형태로 분리되었다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.84 (1H, d,  $J=1.8$  Hz), 6.76 (1H, d,  $J=8.2$  Hz), 6.72 (1H, dd,  $J=8.2, 1.8$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *ortho*-와 *meta*- coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있음을 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.86 (1H, d,  $J=2.3$  Hz)과 5.93 (1H, d,  $J=2.3$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  4.56 (1H, d,  $J=7.3$  Hz)와 4.18 (1H, m) 피크는 전기음성도가 큰 원소에 인접한 carbon에 결합되어 있는 proton으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>31</sup>과 비교한 결과, compound 8은 catechin으로 확인되었다(Figure 23-25, Table 8).

Compound 9는 compound 8과 유사한 구조로 예상하였으며,  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  4.82 (1H, s) 피크를 통해 flavonoid 3번 위치에 결합된 hydroxy기에 입체 구조가 다를 것이라 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>32</sup>과 비교한 결과, compound 9는 compound 8의 입체이성질체인 *epi*-catechin으로 확인되었다(Figure 23-25, Table 8).

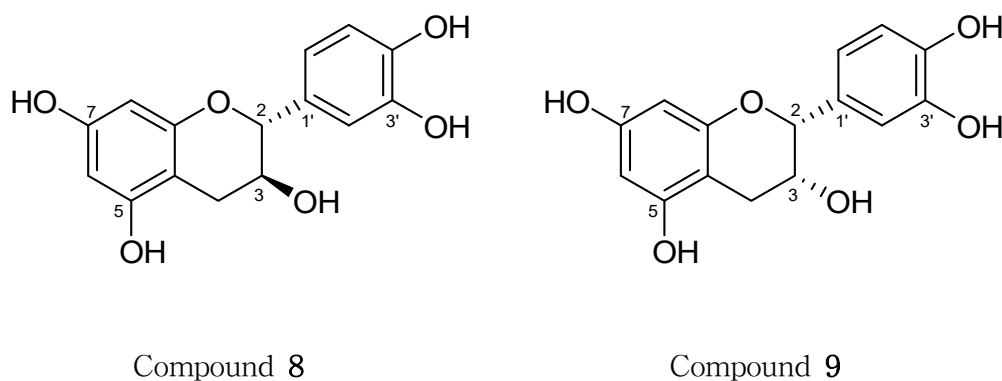


Figure 23. Chemical structure of compound 8 and 9

Table 8. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound **8** and **9** (400 and 100 MHz)

No.	Compound <b>8</b>		Compound <b>9</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.56 (1H, d, 7.3)	83.0	4.82 (1H, s)	80.0
3	4.18 (1H, m)	69.0	4.18 (1H, m)	67.6
4	2.85 (1H, dd, 16.0, 5.5) 2.50 (1H, dd, 16.3, 8.2)	28.7	2.86 (1H, dd, 16.3, 4.6) 2.74 (1H, dd, 16.9, 2.8)	29.4
5		157.1		158.2
6	5.86 (1H, d, 2.3)	96.4	5.94 (1H, d, 2.3)	96.5
7		158.1		157.8
8	5.93 (1H, d, 2.3)	95.6	5.92 (1H, d, 2.3)	96.0
9		157.7		157.5
10		100.9		100.2
1'		132.3		132.4
2'	6.84 (1H, d, 1.8)	115.4	6.97 (1H, d, 1.8)	115.4
3'		146.4		146.1
4'		146.4		145.9
5'	6.76 (1H, d, 8.2)	116.2	6.76 (1H, d, 8.2)	116.0
6'	6.72 (1H, dd, 8.2, 1.8)	120.2	6.80 (1H, dd, 8.2, 1.8)	119.5

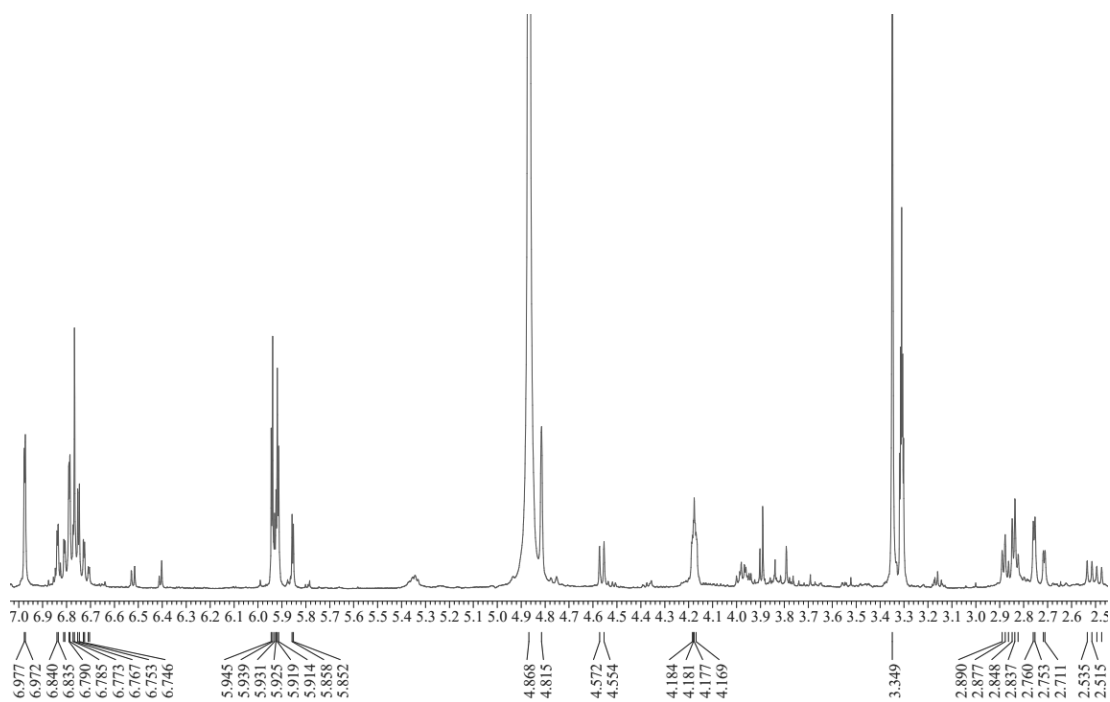


Figure 24.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **8** and **9** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

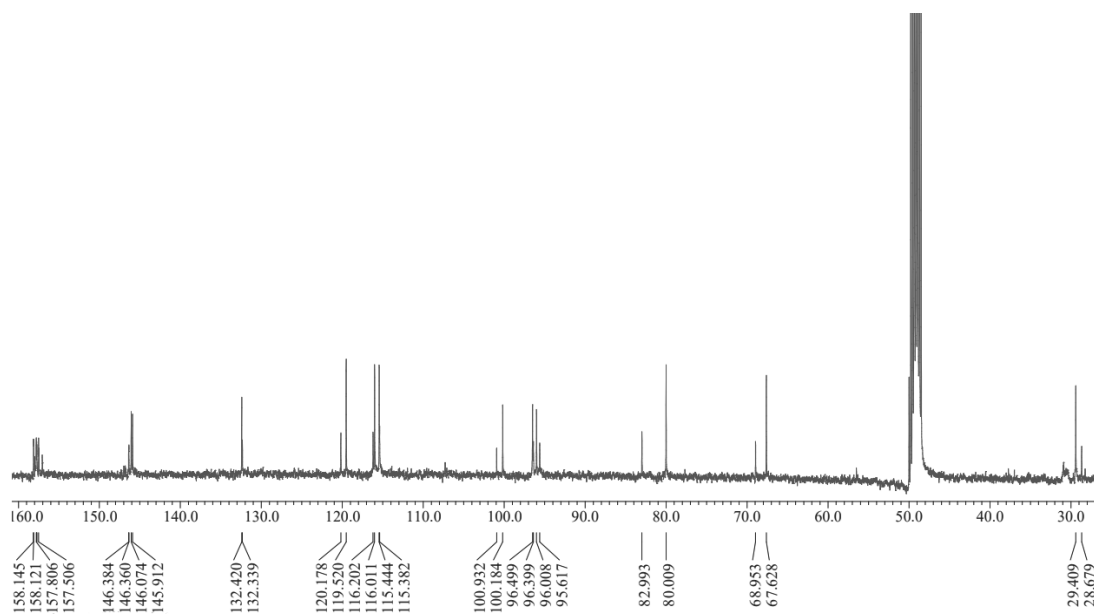


Figure 25.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **8** and **9** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

7) Compound 10과 11의 구조 동정

Compound 10은 Compound 11과 혼합된 형태로 분리되었다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.92 (1H, d,  $J=2.3$  Hz)와 5.86 (1H, d,  $J=2.3$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  6.40 (2H, s) 피크의 적분 값을 통해 대칭 구조의 aromatic proton이 있음을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  4.53 (1H, d,  $J=6.9$  Hz)와 4.16 (1H, m) 피크는 전기음성도가 큰 원소에 인접한 carbon에 결합되어 있는 proton으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>33</sup>과 비교한 결과, compound 10은 gallocatechin으로 확인되었다(Figure 26-28, Table 9).

Compound 11은 compound 10과 유사한 구조로 예상하였으며,  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  4.75 (1H, s) 피크를 통해 flavonoid 3번 위치에 결합된 hydroxy기에 입체 구조가 다를 것이라 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>33</sup>과 비교한 결과, compound 11은 compound 10의 입체이성질체인 *epi*-gallocatechin으로 확인되었다(Figure 26-28, Table 9).

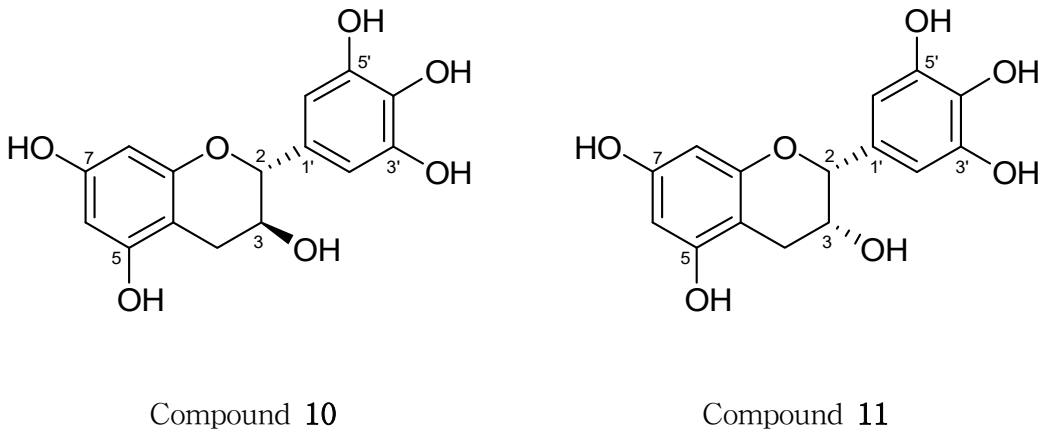


Figure 26. Chemical structure of compound 10 and 11

Table 9.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **10** and **11** (400 and 100 MHz)

No.	Compound <b>10</b>		Compound <b>11</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.53 (1H, d, 6.9)	83.0	4.75 (1H, s)	80.1
3	4.16 (1H, m)	68.9	4.16 (1H, m)	67.7
4	2.81 (1H, dd, 15.6, 4.6) 2.50 (1H, dd, 16.3, 7.8)	28.3	2.84 (1H, dd, 16.5, 4.6) 2.73 (1H, dd, 16.9, 2.8)	29.3
5		158.0		158.2
6	5.92 (1H, d, 2.3)	96.4	5.93 (1H, d, 2.3)	96.5
7		157.8		157.8
8	5.86 (1H, d, 2.3)	95.6	5.91 (1H, d, 2.3)	96.0
9		157.0		157.5
10		100.8		100.2
1'		131.7		131.7
2', 6'	6.40 (2H, s)	107.3	6.51 (2H, s)	107.1
3'		147.0		146.8
4'		131.7		133.7
5'		147.0		146.8

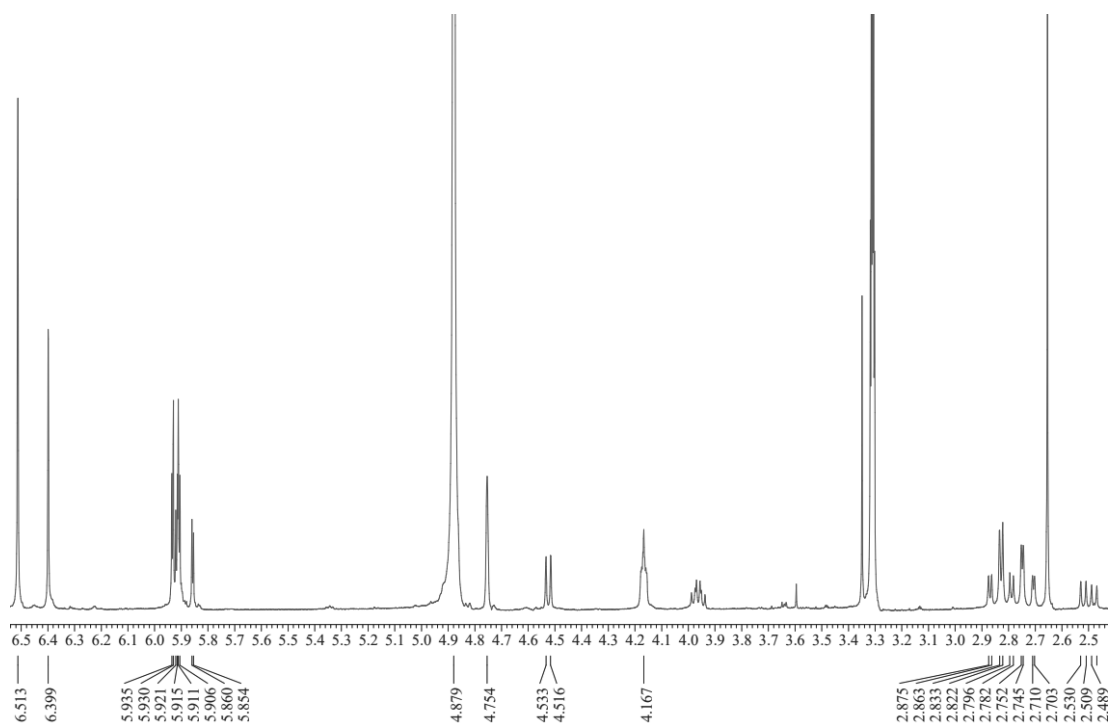


Figure 27.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 10 and 11 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

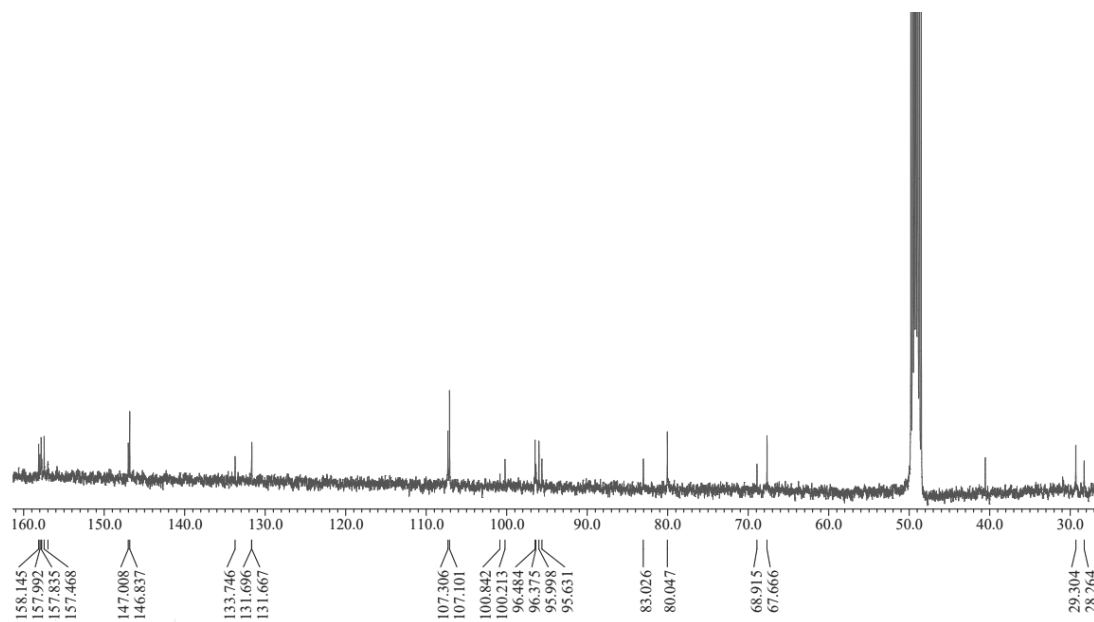


Figure 28.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 10 and 11 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 8) Compound 12의 구조 동정

Compound 12는  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  169.3 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 있는 것으로 예상하였으며,  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.03 (1H, d,  $J=1.8$  Hz)와 6.78 (1H, d,  $J=8.2$  Hz), 6.94 (1H, dd,  $J=8.2, 1.8$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *ortho*-와 *meta*- coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있음을 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  6.24 (1H, d,  $J=16.0$  Hz)와 7.52 (1H, d,  $J=16.0$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 *trans*-form으로 연결된 이중결합 carbon에 붙어있는 proton으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>34</sup>과 비교한 결과, compound 12는 caffeic acid로 확인되었다(Figure 29-31, Table 10).

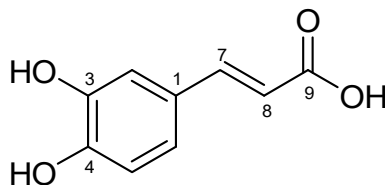


Figure 29. Chemical structures of compound 12

Table 10.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **12** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>12</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		130.9
2	7.03 (1H, d, 1.8)	115.2
3		146.8
4		149.7
5	6.78 (1H, d, 8.2)	116.7
6	6.94 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.1
7	6.24 (1H, d, 16.0)	147.0
8	7.52 (1H, d, 16.0)	115.7
9		169.3



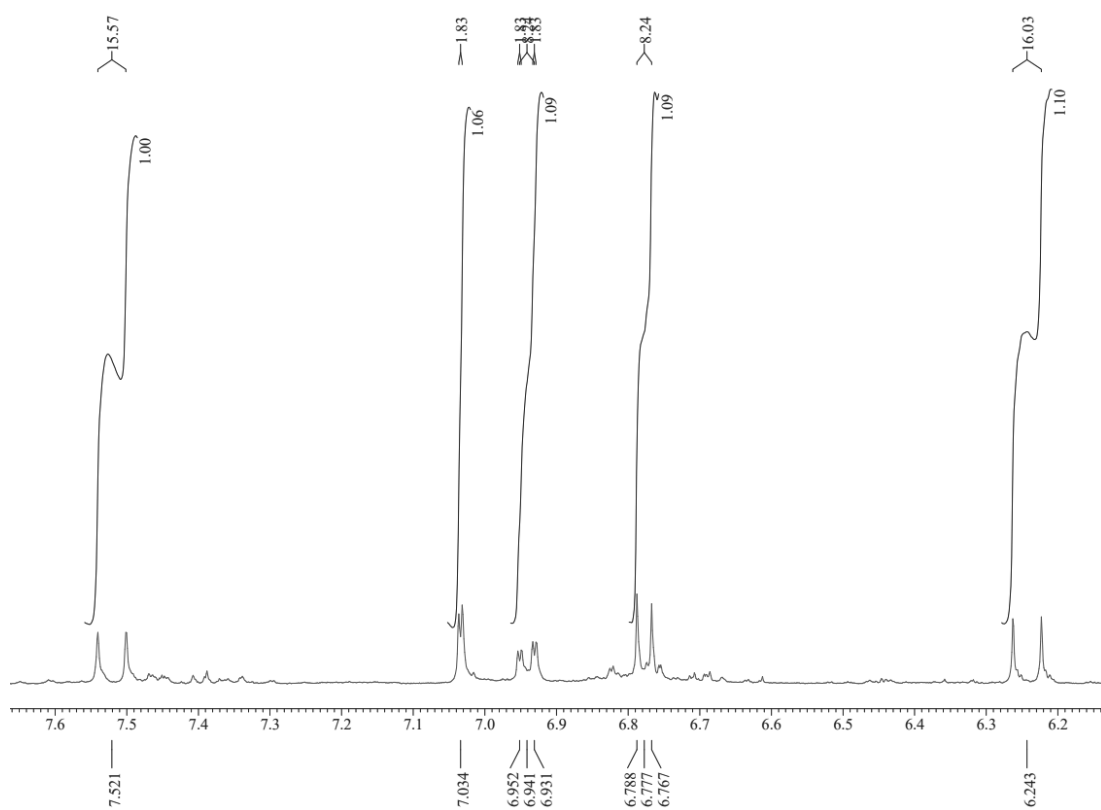


Figure 30.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **12** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

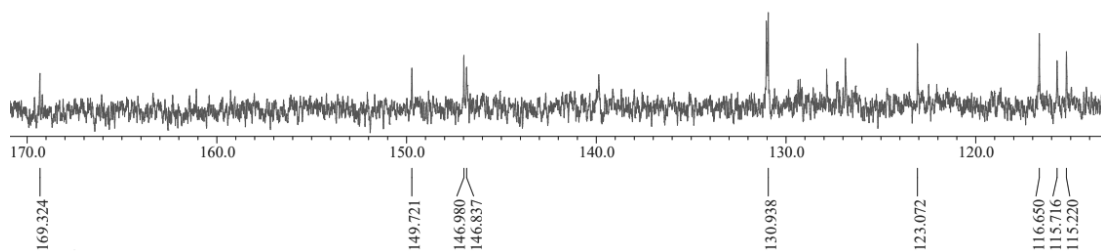


Figure 31.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **12** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

#### 4. 보리밥나무 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항산화

###### (1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 표준검정곡선을 이용하여 보리밥나무 가지 추출물 및 분획물의 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양 (GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이 225.3±0.8 mg/g GAE, *n*-BuOH 분획물이 205.2±0.6 mg/g GAE로 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 32).

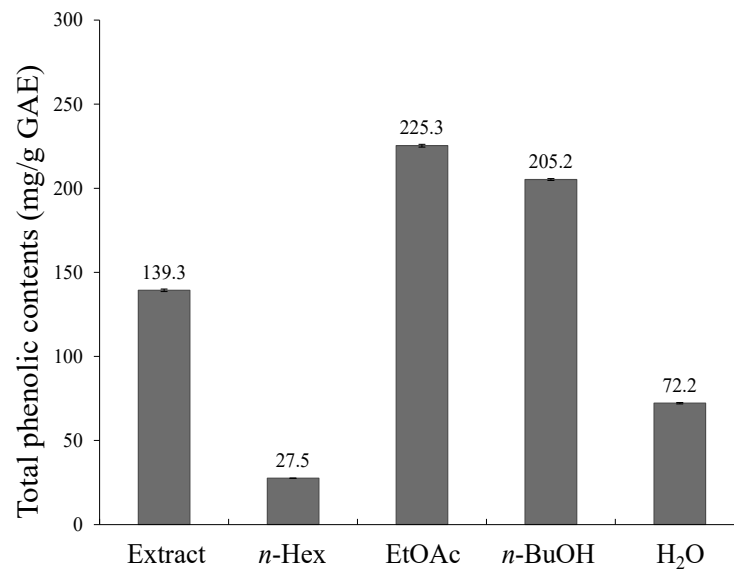


Figure 32. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin의 표준 검정 곡선을 이용하여 보리밥나무 가지 추출물 및 분획물의 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양 (QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이  $20.0 \pm 1.5$  mg/g QE로 분획물 중 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다 (Figure 33).

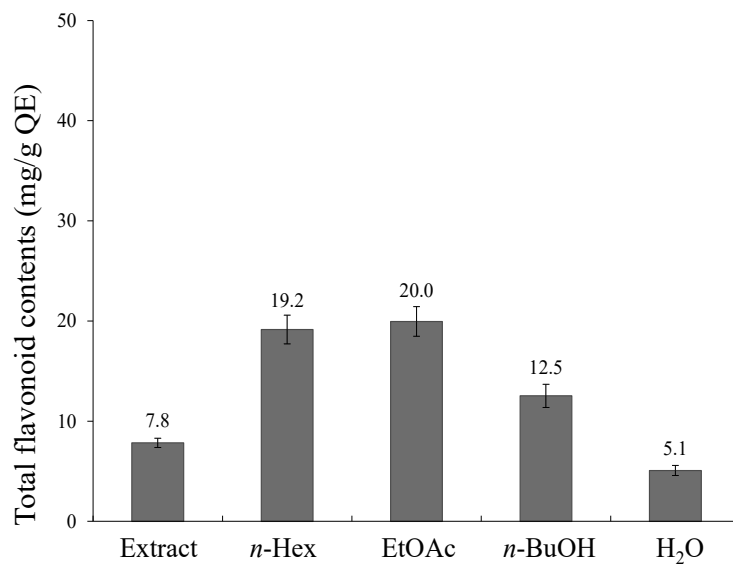


Figure 33. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

### (3) DPPH radical 소거 활성

보리밥나무 가지의 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료는 12.5-200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의  $\text{SC}_{50}$  값이 각각 72.7, 30.3, 76.4  $\mu\text{g/mL}$ 로, 대조군인 BHT ( $\text{SC}_{50}$  : 79.5  $\mu\text{g/mL}$ )보다 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 34, Table 11).

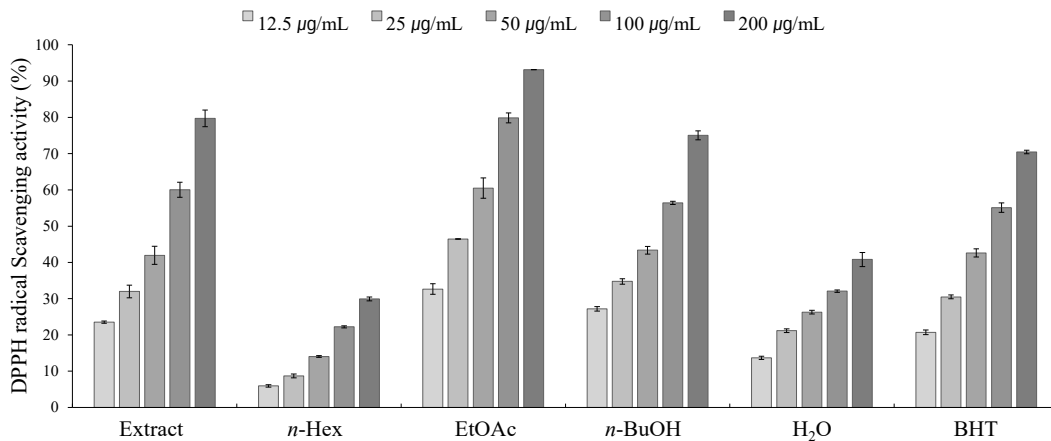


Figure 34. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 11.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
$\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	72.7	>200	30.3	76.4	>200	79.5

(4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

보리밥나무 가지의 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료는 3.125–50 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 12.5, 6.9, 7.9 µg/mL로 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 35, Table 12).

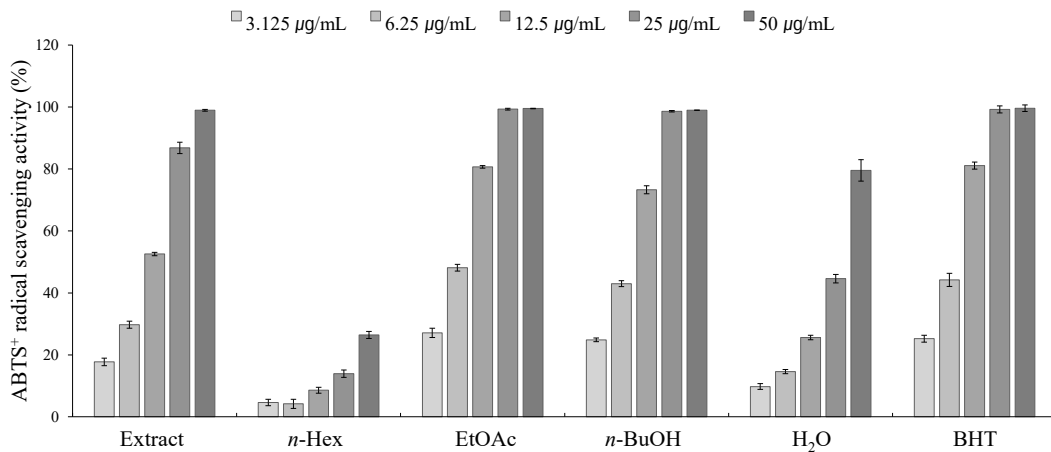


Figure 35. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 12. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	12.5	>50	6.9	7.9	29.2	7.3

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW264.7 세포를 이용하여 보리밥나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성량 및 세포 독성을 확인하였다. 먼저, 추출물과 용매 분획물을 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 nitric oxide 생성이 억제되었지만, *n*-Hex 분획물은 세포독성이 나타나 추가적인 농도에서 실험을 진행하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물은 50 µg/mL 농도 이하에서, EtOAc 분획물은 100 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰으며, IC<sub>50</sub> 값은 각각 22.2, 38.0 µg/mL로 확인되었다(Figure 36, 37).

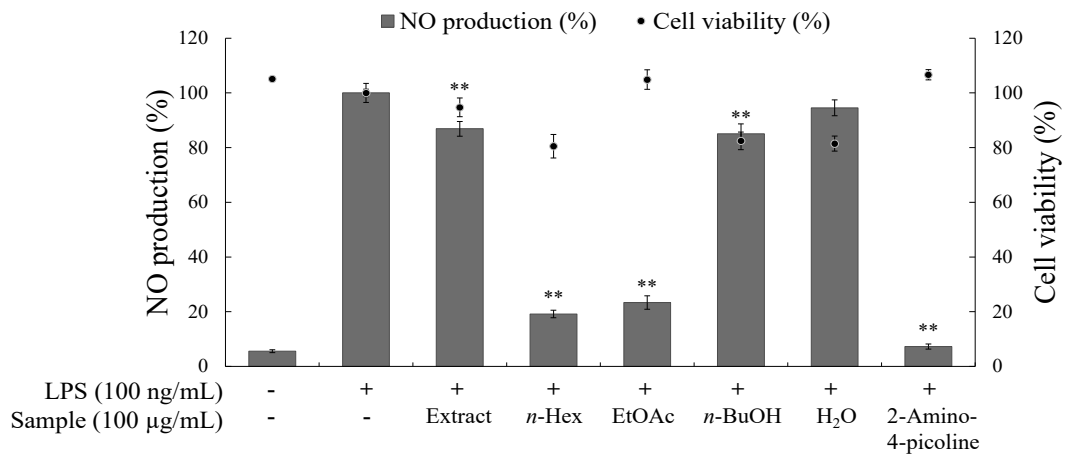


Figure 36. Effects of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

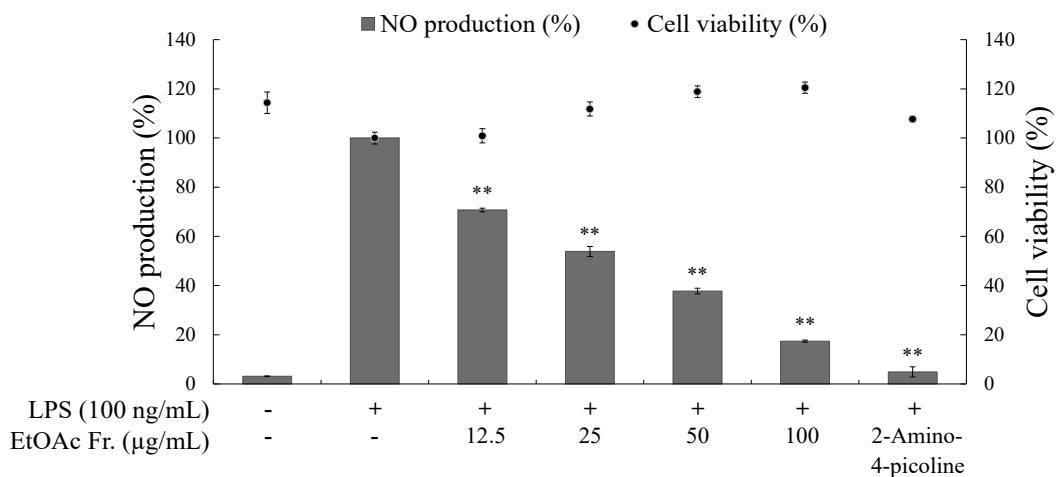
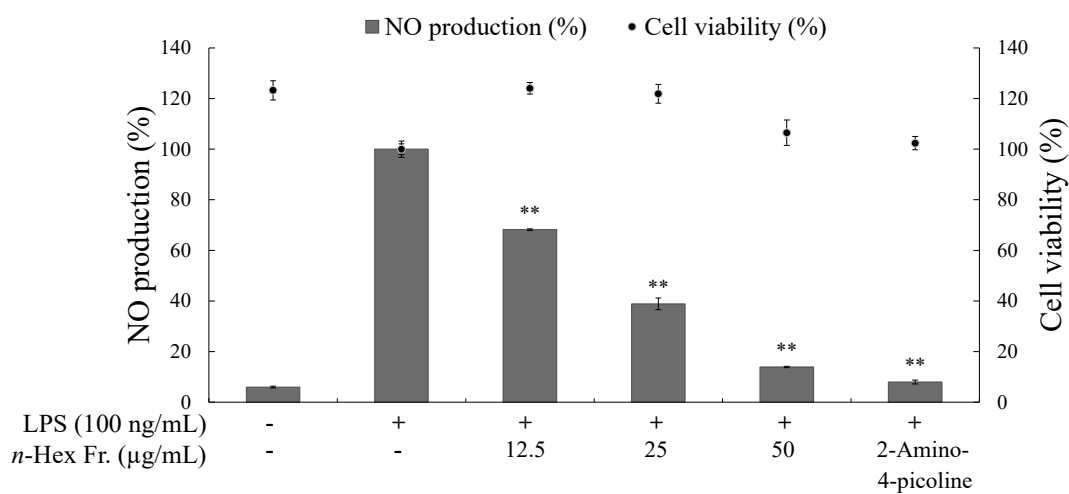


Figure 37. Effects of *n*-Hex and EtOAc fraction from *E. macrophylla* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fraction from *E. macrophylla* branches for 24 h. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

(2) 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ ) 생성 억제 활성

보리밥나무 가지 *n*-Hex 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit 를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 세포 독성이 나타나지 않은 농도인 12.5, 25, 50  $\mu$ g/mL를 이용하여 실험을 진행한 결과, 보리밥 나무 가지 *n*-Hex 분획물은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 효과적으로 억제 시키는 것으로 확인하였다(Figure 38).

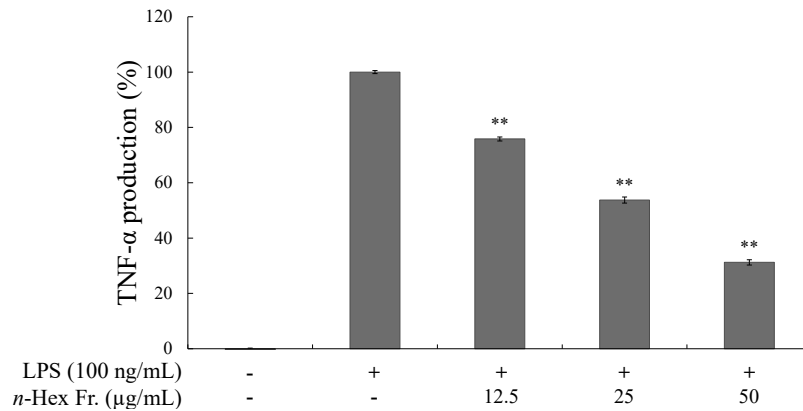


Figure 38. Effect of *n*-Hex fraction from *E. macrophylla* branches on TNF- $\alpha$  production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01



### 3) 항균

#### (1) Paper disc diffusion method

보리밥나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010) 및 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 40105)를 사용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 추출물과 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외한 모든 분획물은 *S. epidermidis*에 대한 뛰어난 생육억제 활성을 나타내었다(Figure 39, Table 13).

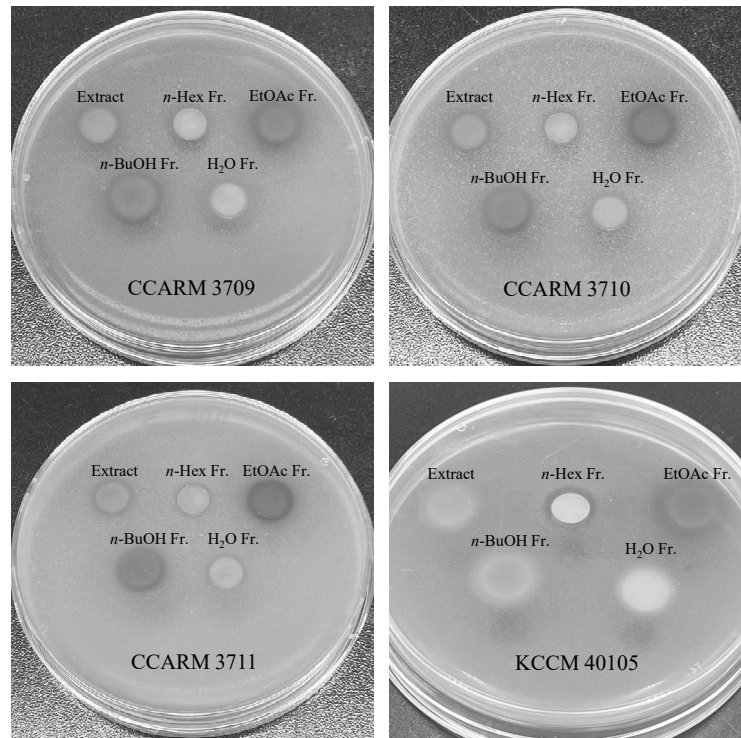


Figure 39. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of *E. macrophylla* on *S. epidermidis* and *S. mutans*.

Table 13. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* branches

	Clear zone (mm)						
	<i>S. epidermidis</i>			<i>C. acnes</i>			<i>S. mutans</i>
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	KCCM 40105
Extract	11	10.5	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>n</i> -Hex	9.5	8.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	12
EtOAc	13	12	11	10	11	N.A.	16
<i>n</i> -BuOH	13.5	12	11	N.A.	10	N.A.	N.A.
H <sub>2</sub> O	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
positive control	35	N.A.	30	50	N.A.	N.A.	46

Sample : 4 mg

Positive control : Erythromycin(+) (40 µg)

Disc size : 8 mm × 1.5 mm

N.A. : No Activity

## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통해 항균 활성을 확인한 후, 활성을 나타낸 시료에 대해 추가적으로 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 시료의 농도를 two-fold-dilution법으로 두 배씩 희석하면서 실시하였다.

*S. epidermidis* 및 *S. mutans*는 가장 높은 농도를 4000 µg/mL로 하여 가장 낮은 농도가 3.9 µg/mL가 되도록 하였으며, *C. acnes*는 가장 높은 농도를 10000 µg/mL로 하여 가장 낮은 농도가 9.8 µg/mL가 되도록 희석하여 실험하였다.

그 결과, *S. epidermidis*의 경우 추출물과 모든 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고, 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 이용하여 MBC를 확인하였다. 그 결과, 추출물과 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서 *S. epidermidis* 3종에 대한 MBC 값을 모두 확인할 수 있었으며, H<sub>2</sub>O 분획물의 경우 CCARM 3709를 제외한 모든 균주에서 MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 14). *C. acnes*의 경우 추출물과 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외한 모든 분획물의 MIC, MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 15). *S. mutans*의 경우 추출물과 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 MIC를 확인하였고 그 이상의 농도의 시료 배양액을 이용하여 MBC를 확인한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 16).

Table 14. MIC and MBC values of *E. macrophylla* branches on *S. epidermidis*.

	<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	500	1000	500	4000	500	2000
<i>n</i> -Hex	2000	>4000	2000	>4000	2000	>4000
EtOAc	250	1000	1000	2000	1000	1000
<i>n</i> -BuOH	250	2000	250	2000	250	1000
H <sub>2</sub> O	1000	>4000	1000	4000	1000	4000

Unit : µg/mL

Table 15. MIC and MBC values of *E. macrophylla* branches on *C. acnes*.

	<i>C. acnes</i>			
	CCARM 0081		CCARM 9009	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	10000	10000	10000	10000
<i>n</i> -Hex	5000	5000	10000	10000
EtOAc	1250	1250	2500	2500
<i>n</i> -BuOH	1250	1250	5000	5000
H <sub>2</sub> O	>10000	>10000	>10000	>10000

Unit : µg/mL

Table 16. MIC and MBC values of *E. macrophylla* branches on *S. mutans*.

	<i>S. mutans</i>	
	KCCM 40105	
	MIC	MBC
Extract	4000	>4000
<i>n</i> -Hex	500	4000
EtOAc	2000	2000
<i>n</i> -BuOH	>4000	>4000
H <sub>2</sub> O	>4000	>4000

Unit : µg/mL

## 5. 요약 및 결론

본 연구는 보리밥나무 가지 추출물의 의약품 및 화장품 소재로써의 가능성을 판단하기 위해 다양한 생리 활성 실험과 성분 연구를 진행하였다.

보리밥나무 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 이 중 *n*-Hex, EtOAc 분획물은 VLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리한 단일 물질은 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 예상한 후 문헌과 비교하여 총 12개의 화합물을 동정하였다.

분리한 화합물은 ethyl linolenate (1), ethyl oleate (2), oleic acid (3), linolenic acid (4), 1-monoolein (5), 1-linolenoyl glycerol (6),  $\beta$ -sitosterol (7), catechin (8), *epi*-catechin (9), gallic acid (10), *epi*-gallic acid (11), caffeic acid (12)로 확인 되었다.

보리밥나무 가지의 항산화 실험 결과, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 총 폴리페놀 함량이 각각 225.3, 205.2 mg/g GAE로 나타났으며, DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 실험에서 EtOAc, *n*-BuOH 분획물은 대조군인 BHT보다 우수하거나 유사한 radical 소거 활성을 나타내었다. Compound 8, 9, 10, 11은 문헌<sup>35</sup>을 통해 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

항염 활성 실험 결과, *n*-Hex, EtOAc 분획물이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었고, *n*-Hex 분획물은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. Compound 4, 6, 7은 cytokine 생성 억제 및 항염 관련 단백질 발현 저해를 통해 NO 생성을 억제하는 것으로 문헌<sup>29,36,37</sup>을 통해 확인하였다.

항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 40105) 그리고 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)를 이용하여

한천 확산 법 (paper disc diffusion method)을 통한 생육저지환 (clear zone), 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 그 결과, 보리밥나무 가지 추출물 및 분획물은 *S. epidermidis*에 대한 우수한 항균활성을 나타내었으며, *C. acnes*에 대한 실험에서는 EtOAc, *n*-BuOH 분획물이, *S. mutans*에 대한 실험에서는 *n*-Hex, EtOAc 분획물이 항균 활성을 나타내었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 보리밥나무 가지는 항산화, 항염 및 항균 활성을 갖는 의약품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 사료된다.

#### IV. 연구 2 : 생달나무 가지 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구

##### 1. 재료

생달나무(*Cinnamomum yabunikkei*)는 녹나무과(lauraceae)에 속하는 상록교목 식물로, 내음성이 강하고 습기가 많은 저지대 경사지에 잘 자란다. 한반도에서는 전라남도 및 제주도에 분포한다. 잎은 어긋나기 또는 마주나기를 하며 좁은 달걀형 또는 긴 타원형이다. 잎의 끝은 뾰족해지다가 둥글게 끝나고 가장자리는 밋밋하다. 잎의 표면에는 광택이 있으며 뒷면은 분백색이다. 목재는 단단하고 치밀하여 가구재로 쓰인다. 생달나무의 잎과 껍질은 오랫동안 민간 요법으로 사용되어 왔으며 항산화, 항염, 항균 등에 효능이 있다고 보고 되어있다.<sup>38,39</sup>

실험에 사용한 생달나무 가지(시료번호 : 484)는 제주시 한경면 청수리에서 2017년 3월에 채집한 것을 제주생물자원(주)로부터 구입하였으며, 구입한 생달나무 가지는 동결 건조기에서 건조한 후 분쇄하여 사용하였다(Figure 40).



Figure 40. Pictures of *Cinnamomum yabunikkei*

## 2. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

### 1) 생달나무 가지의 추출 및 용매 분획

건조된 생달나무 가지 1.1 kg을 분쇄하여 70%(v/v) EtOH 20.0 L에 침출시킨 후 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 여과기와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과하고 남은 잔사에 대하여 동일한 조건으로 추출 및 여과를 1회 반복 진행하였다. 얻어진 여액은 40 °C 이하의 수욕 상에서 회전 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 추출물 141.5 g을 얻었다. 얻어진 추출물 중 17.4 g을 증류수 1.0 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) fraction을 얻었다. 이와 같은 방법으로 6회 반복 실시하여 추출물 총 121.8 g을 용매 분획하였다(Figure 41).

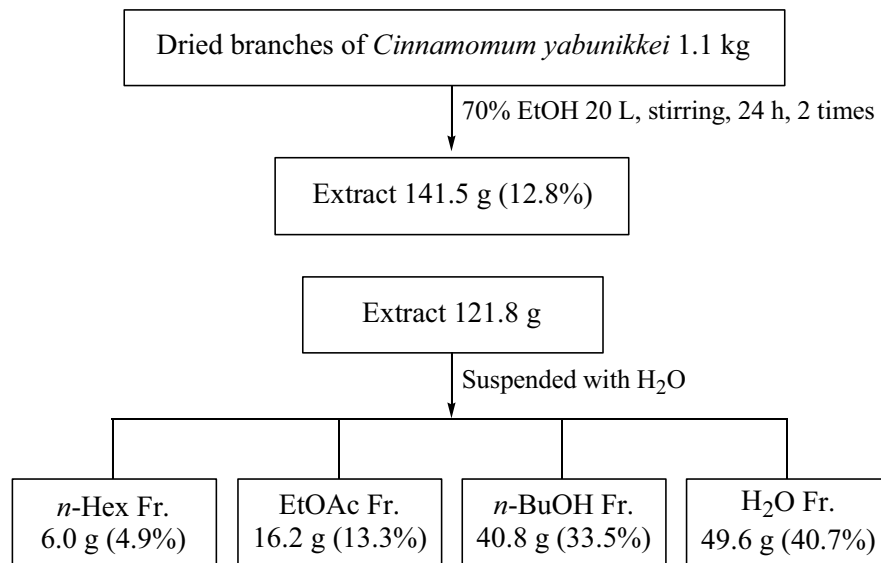


Figure 41. Extraction and solvent fractionation of *C. yabunikkei* branches.



## 2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

### (1) VLC에 의한 분리과정

EtOAc 분획물 4.9 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위해 glass column에 순상 silica gel로 충전하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. 용매의 극성을 5%씩 높이는 방법으로 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (5-50%)을 각 300 mL씩 용출하여 총 31개의 fraction을 얻었다 (Fr. EV1-31).

VLC fraction들 중 Fr. EV24 (943.1 mg)는 MeOH:H<sub>2</sub>O=2:3의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 1 (18.2 mg)을 분리하였다. Fr. EV26 (348.5 mg)을 MeOH:H<sub>2</sub>O=2:3의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 2 (4.0 mg)와 compound 3 (4.3 mg)을 분리하였다(Figure 42).

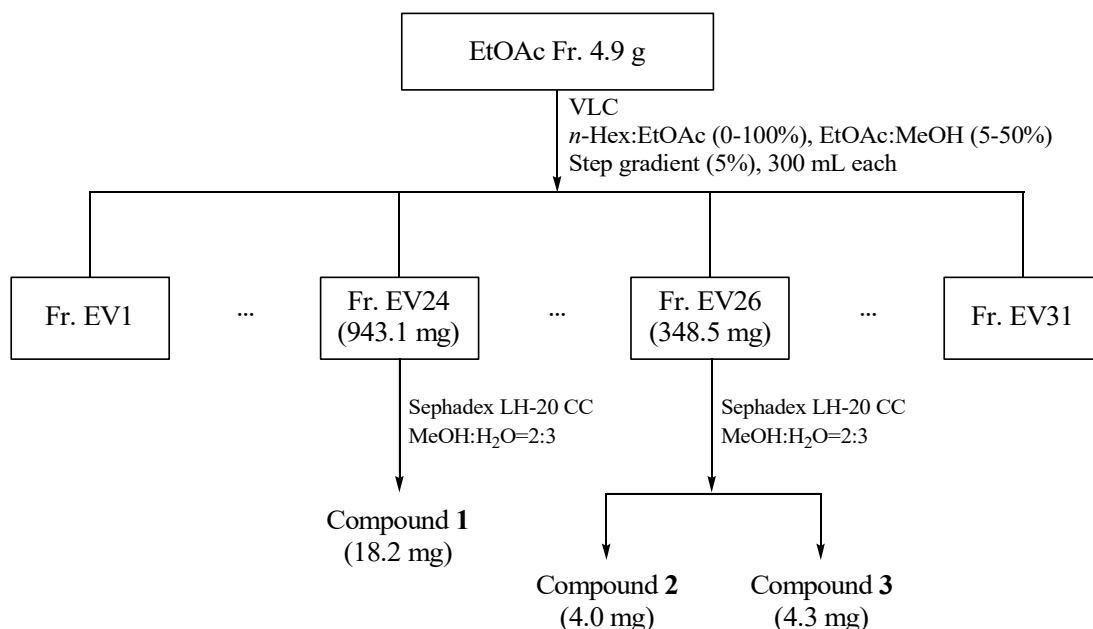


Figure 42. Isolation of compounds from *C. yabunikkei* branches. (VLC)

(2) MPLC에 의한 분리과정

EtOAc 분획물 9.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위해 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. EtOAc 분획물 9.0 g을 MeOH 10.0 mL에 녹이고 0.45  $\mu$ M filter를 이용하여 여과한 후 FlashPure EcoFlex C<sub>18</sub> (220 g) column에 주입하였다. Gradient법을 이용해 MeOH:H<sub>2</sub>O (10~100% MeOH, 120 min), MeOH (100%, 20 min)의 용매 조건을 사용하였으며, 20 mL/min의 유속으로 각각 25 mL씩 용출시켜 총 110개의 fraction을 얻었다(MP1-110).

MPLC fraction들 중 Fr. MP74-81 (397.6 mg)은 MeOH:H<sub>2</sub>O=2:3의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 2 (9.5 mg)와 compound 3 (16.4 mg)을 분리하였다(Figure 43).

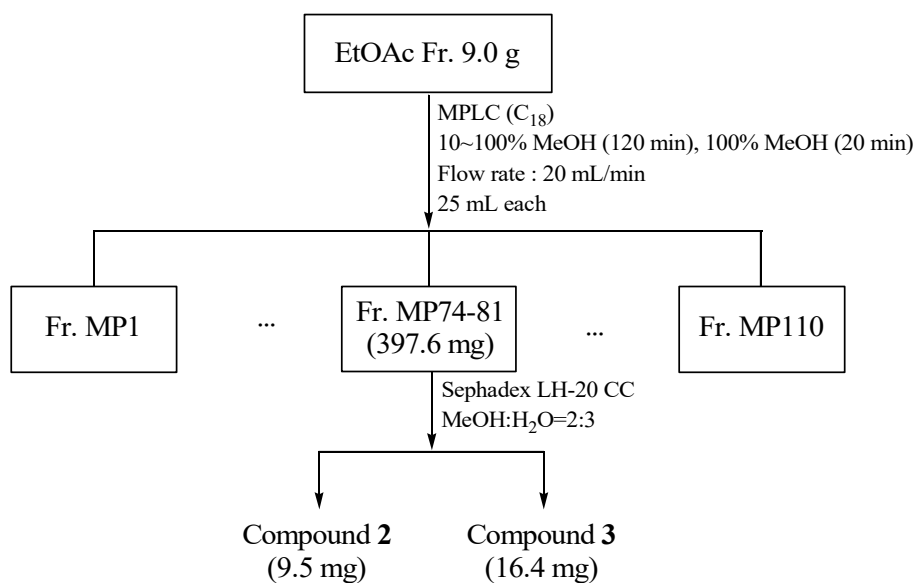


Figure 43. Isolation of compounds from *C. yabunikkei* branches. (MPLC)

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1의  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.97 (1H, d,  $J=1.8$  Hz), 6.80 (1H, dd,  $J=8.2, 1.8$  Hz), 6.76 (1H, d,  $J=8.2$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해서 *ortho*-와 *meta*-coupling을 하고 있는 3개의 aromatic proton이 있음을 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.94 (1H, d,  $J=2.3$  Hz)과 5.91 (1H, d,  $J=2.3$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 분자 내에 존재하고 있음을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  4.82 (1H, s)와 4.18 (1H, m) 피크는 전기 음성도가 큰 원소에 인접한 carbon에 결합되어 있는 proton으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>40</sup>과 비교한 결과, compound 1은 *epi*-catechin으로 확인되었다 (Figure 44-46, Table 17).

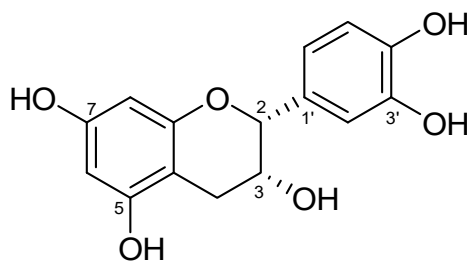


Figure 44. Chemical structure of compound 1

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

No.	Compound <b>1</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.82 (1H, s)	80.0
3	4.18 (1H, m)	67.6
4	2.85 (1H, dd, 16.9, 4.6) 2.73 (1H, dd, 16.9, 2.8)	29.4
5		158.1
6	5.94 (1H, d, 2.3)	96.5
7		157.8
8		96.0
9	5.91 (1H, d, 2.3)	157.5
10		100.2
1'		132.4
2'	6.97 (1H, d, 1.8)	115.4
3'		146.1
4'		145.9
5'	6.76 (1H, d, 8.2)	116.0
6'	6.80 (1H, dd, 8.2, 1.8)	119.5

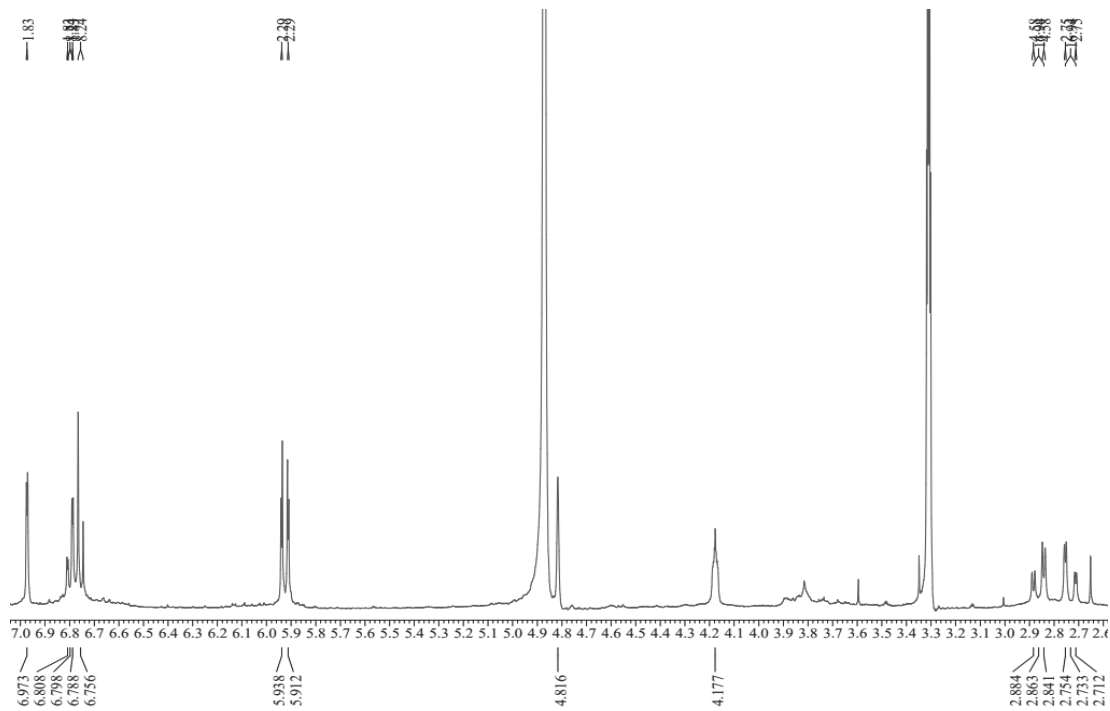


Figure 45.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

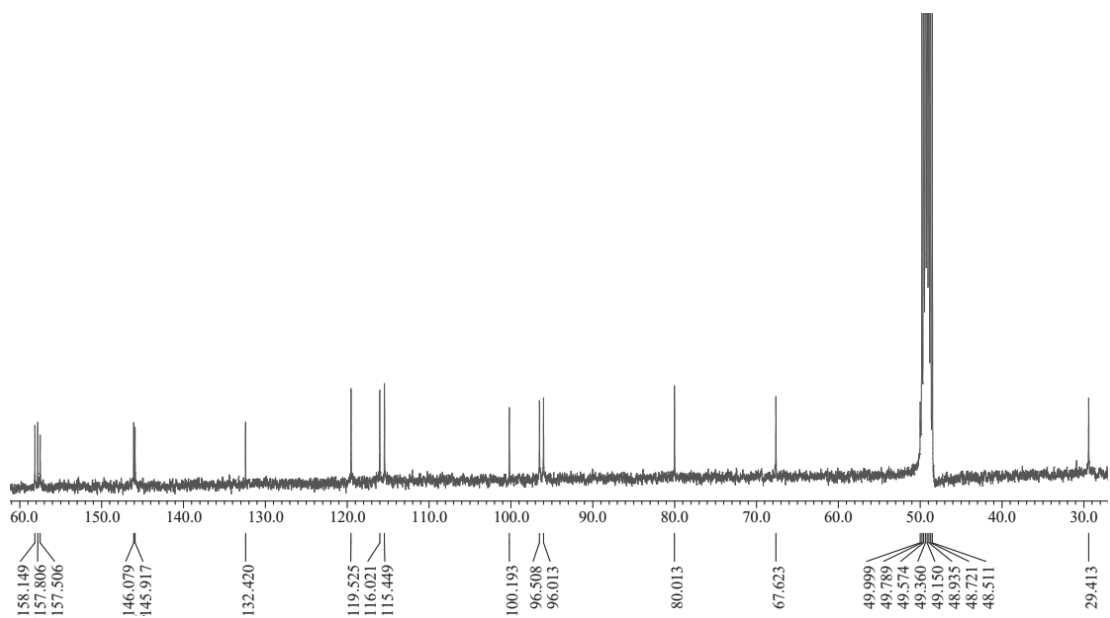


Figure 46.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 2) Compound 2의 구조 동정

Compound 2는  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 총 26개의 carbon 피크가 관찰되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.96~3.40의 proton 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  5.07 (1H, d,  $J=7.3$  Hz) 피크를 통해 flavonoid 골격에  $\beta$ -form의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{C}}$  62.7, 62.4, 61.6, 60.8, 56.9 및  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (3H, s), 3.96 (6H, s), 3.91 (3H, s), 3.75 (3H, s) 피크를 통해 5개의 methoxy group이 있을 것이라 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  180.9 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재하고 있음을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  7.83~7.81 (1H, overlapped), 7.81 (1H, d,  $J=2.3$  Hz), 7.30 (1H, d,  $J=8.7$  Hz) 피크를 통해 서로 *ortho*- 및 *meta*- coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있음을 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  62.6 피크는 DEPT-135° NMR spectrum을 통해 2차 carbon으로 확인되었으며 당의 carbon이라 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  62.6 피크와  $\delta_{\text{C}}$  102.1, 78.5, 78.0, 74.9, 71.4 피크를 통해 결합되어있는 당은  $\beta$ -D-glucopyranose로 예상하였다.

정확한 구조 동정을 위해 2D (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) NMR을 측정하였다. COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling 하고 있는 proton을 분석하였고, NOESY를 통하여 공간적으로 5 Å 이내의 가까운 거리에 있는 proton의 관계를, HMQC를 통해서는 탄소에 직접 결합되어 있는 proton을, HMBC를 통해서는 각 탄소에 대해 long-range coupling을 하고 있는 proton을 확인하였다.

COSY NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.83~7.81 (1H, overlapped)과 7.30 (1H, d,  $J=8.7$  Hz) 피크를 나타내는 proton은 서로 coupling 하고 있음을 확인하였다. NOESY NMR spectrum 분석 결과, 4개의 methoxy group의 proton이 서로 인접한 것으로 확인되었으며, 이를 통해 4개의 methoxy group은 flavonoid의 A-ring에 위치하고 있음을 예상하였다. 또한, HMBC NMR spectrum 분석 결과, glucopyranose는 flavonoid의 4' 위치에 결합되어 있음을 확인하였다.

이러한 결과를 문헌<sup>41-46</sup>과 비교하여 종합해봤을 때, compound 2는 3',4'-dihydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyflavone 4'-O-β-D-glucopyranoside로 동정하였으며, 이 화합물은 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다(Figure 47-55, Table 18). compound 2의 HR-ESI-MS 분석 결과  $m/z$   $[M+Na]^+$  589.1534 (calcd. 589.1533)로 예상한 화합물의 분자량과 일치하는 것을 확인하였다.

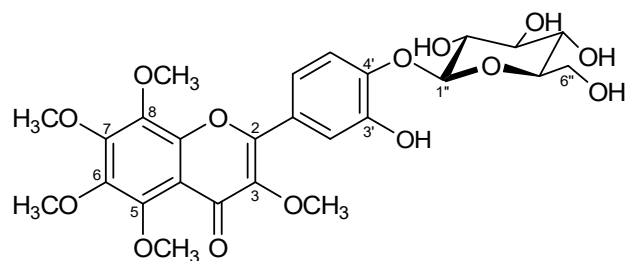


Figure 47. Chemical structure of compound 2

Table 18.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz)

No.	Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		157.6
3		134.5
4		180.9
5		154.6
6		137.5
7		150.9
8		140.3
9		150.1
10		108.6
1'		125.9
2'	7.81 (1H, d, 2.3)	123.6
3'		157.5
4'		150.8
5'	7.30 (1H, d, 8.7)	117.2
6'	7.83~7.81 (1H, overlapped)	113.5
1''	5.07 (1H, d, 7.3)	102.1
2''	3.60-3.54 (1H, m)	74.9
3''	3.88-3.84 (1H, m)	78.0
4''	3.45-3.40 (1H, m)	71.4
5''	3.53-3.48 (1H, m)	78.5
6''	3.96-3.93 (1H, m) 3.75-3.69 (1H, m)	62.6
3-OCH <sub>3</sub>	3.96 (3H, s)	56.9
5-OCH <sub>3</sub>	4.10 (3H, s)	62.7
6-OCH <sub>3</sub>	3.91 (3H, s)	61.6
7-OCH <sub>3</sub>	3.96 (3H, s)	62.4
8-OCH <sub>3</sub>	3.75 (3H, s)	60.8



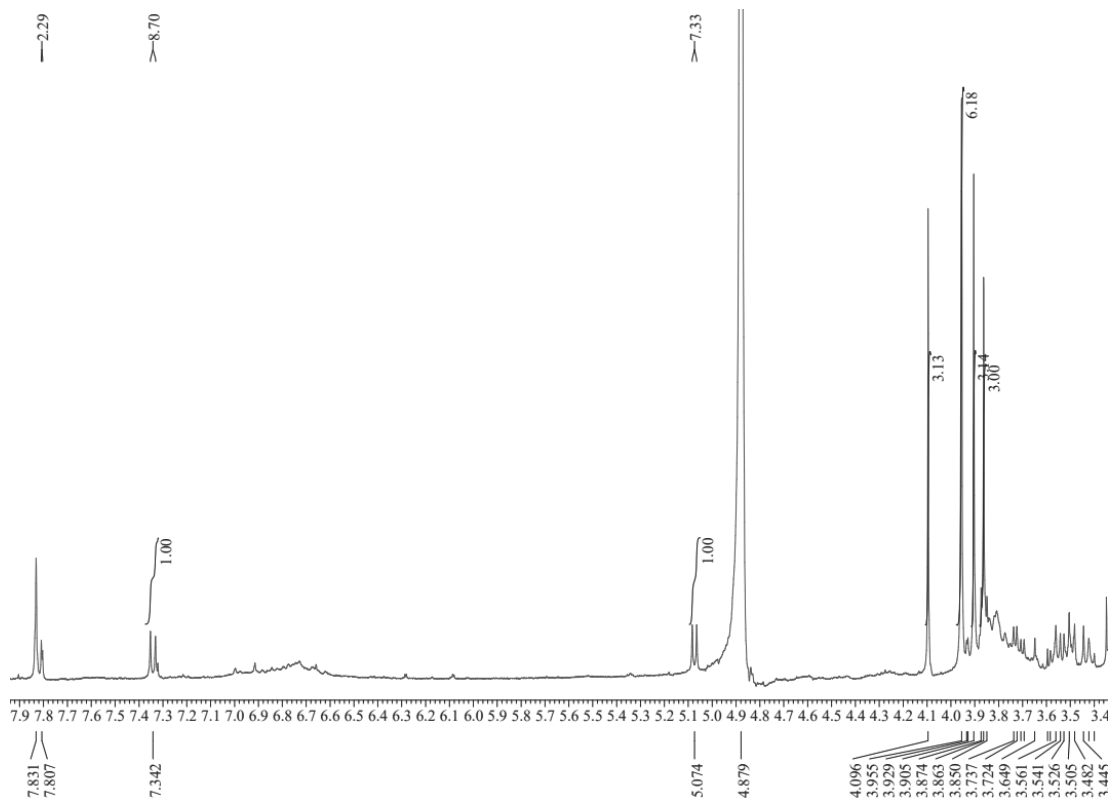


Figure 48.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

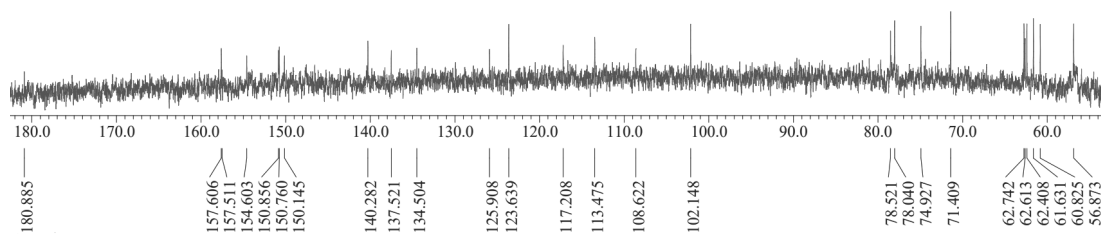


Figure 49.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

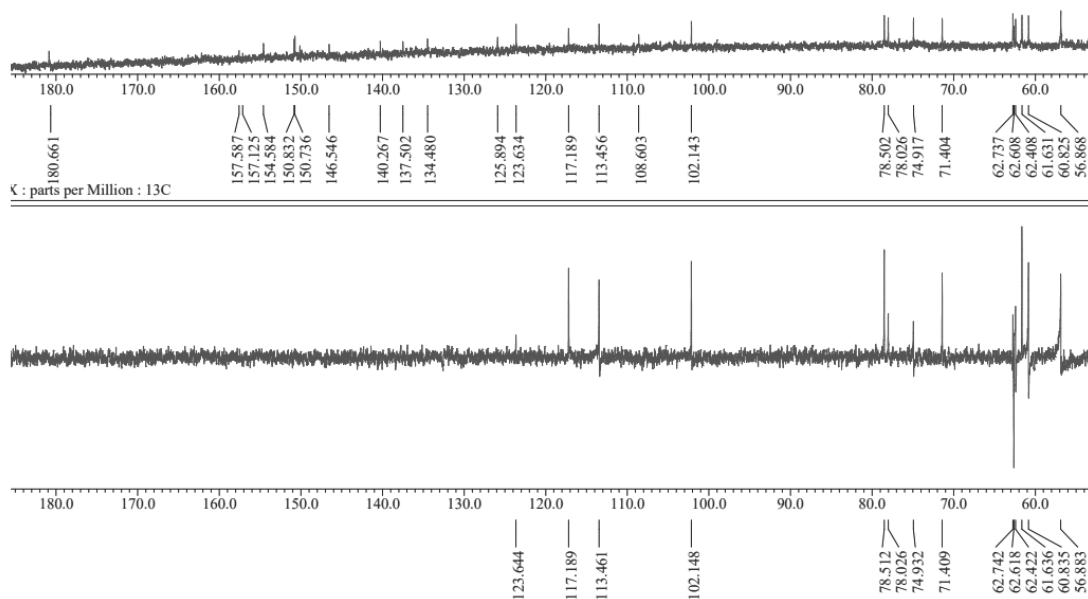


Figure 50. DEPT-135° spectrum of compound **2** in CD<sub>3</sub>OD

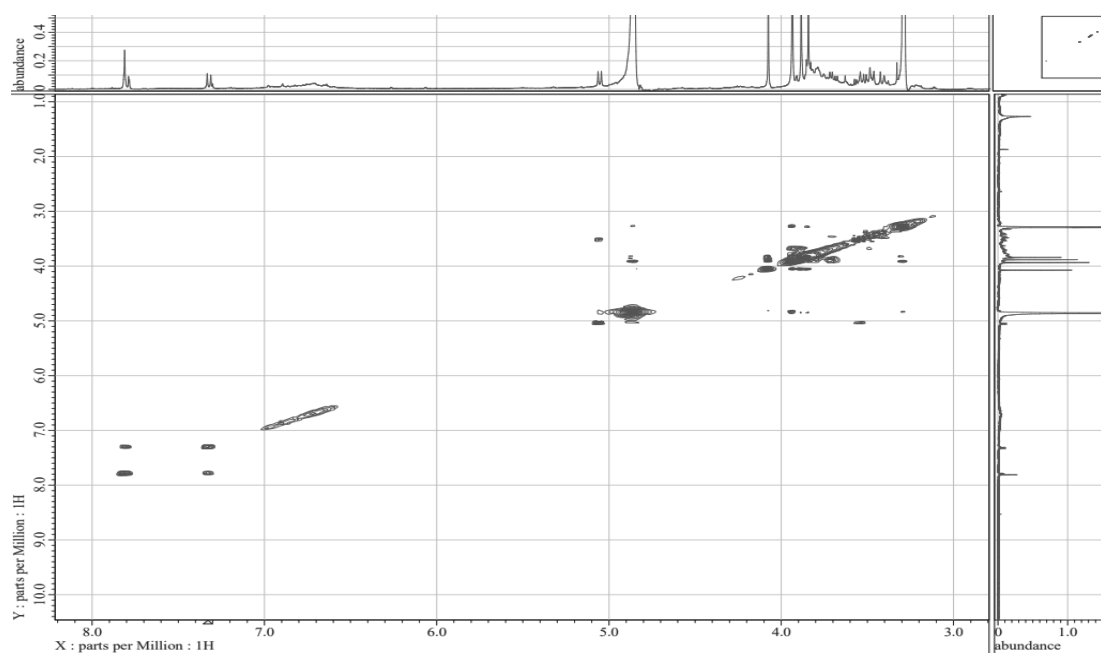


Figure 51. COSY spectrum of compound **2** in CD<sub>3</sub>OD

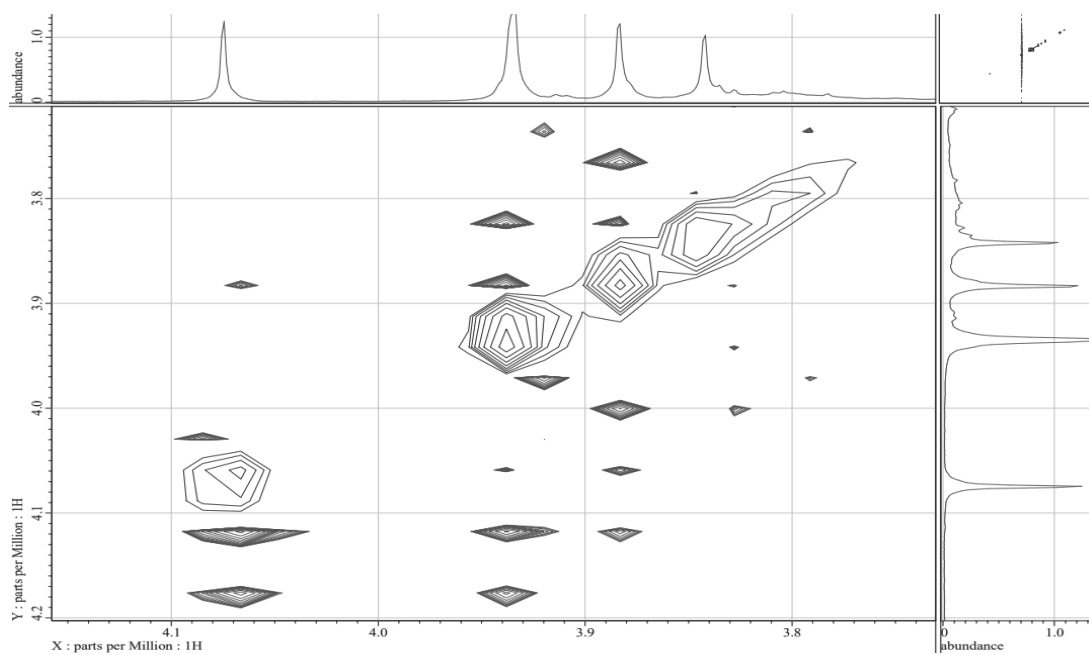


Figure 52. NOESY spectrum of compound **2** in CD<sub>3</sub>OD

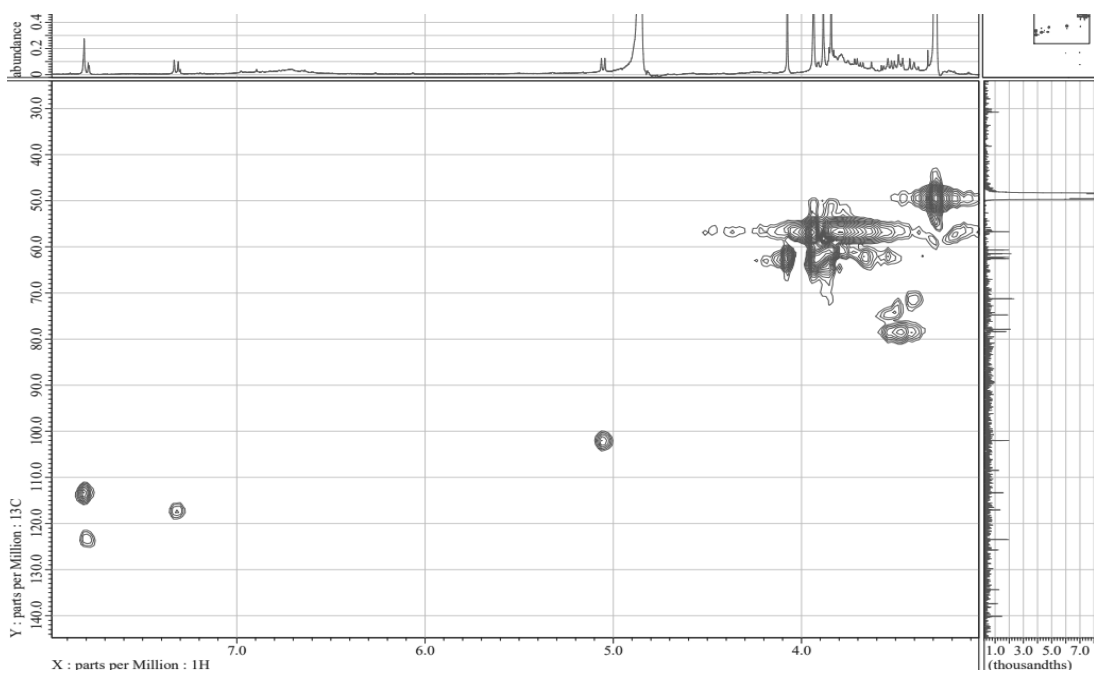


Figure 53. HMQC spectrum of compound **2** in CD<sub>3</sub>OD

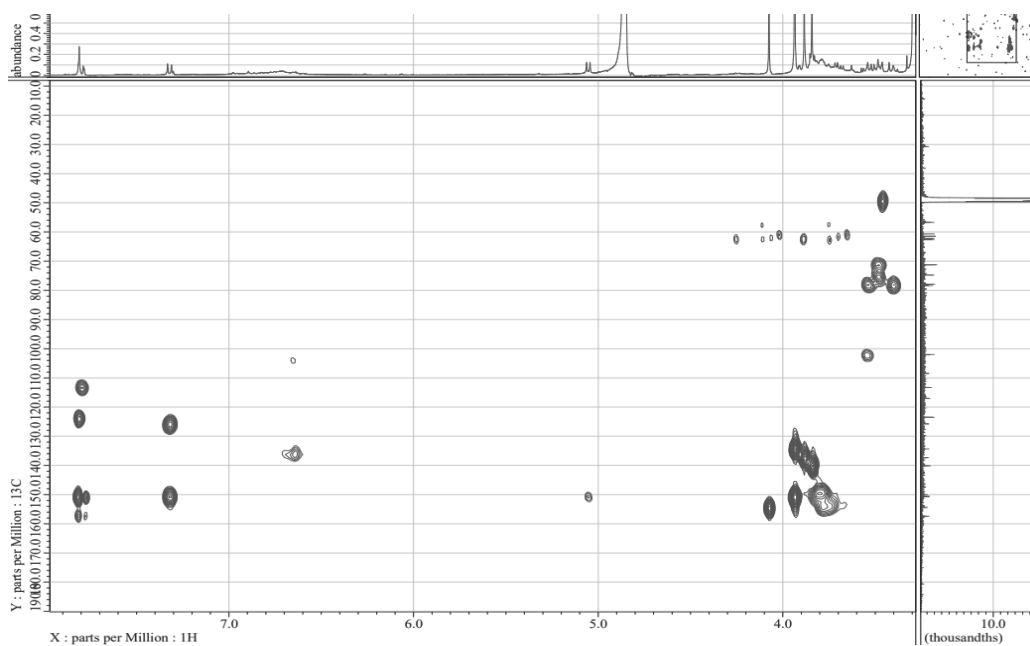


Figure 54. HMBC spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD

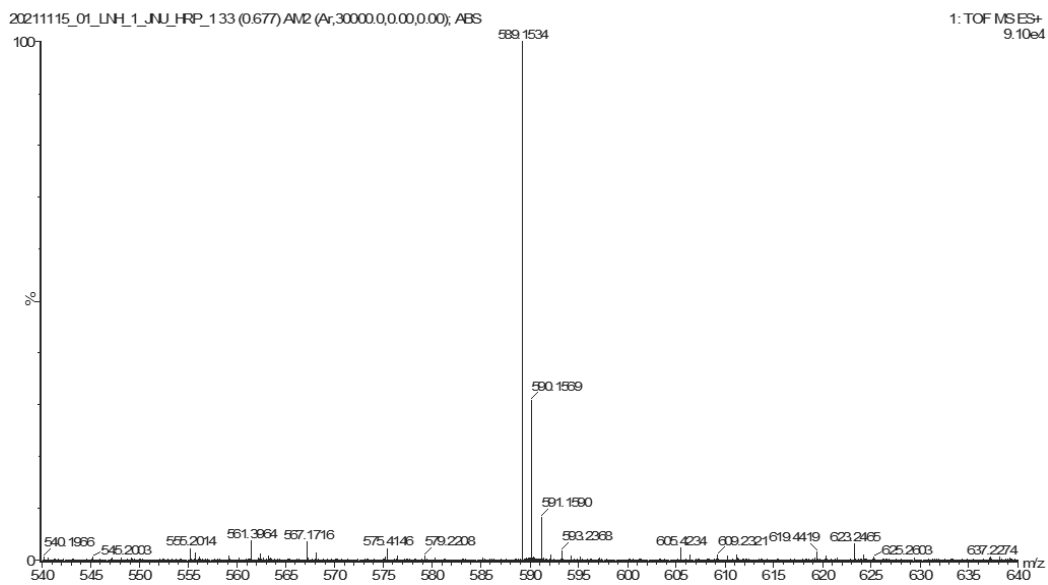


Figure 55. HR-ESI-MS spectrum of compound 2

### 3) Compound 3의 구조 동정

Compound 3은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 대칭인 2개를 포함하여 총 23개의 carbon 피크가 관찰되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.86~3.40의 proton 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  5.1 (1H, d,  $J=7.3$  Hz) 피크를 통해 B-ring이 대칭인 flavonoid 골격에  $\beta$ -form의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{C}}$  62.7, 62.4, 61.6, 60.8 및  $\delta_{\text{H}}$  4.09 (3H, s), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.83 (3H, s) 피크를 통해 4개의 methoxy group이 있을 것이라 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  180.9 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재하고 있음을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  8.14 (2H, d,  $J=8.7$  Hz), 7.27 (2H, d,  $J=8.7$  Hz) 피크를 통해 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic proton이 있음을 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  62.6 피크는 DEPT-135° NMR spectrum을 통해 2차 carbon으로 확인되었으며, 당의 carbon이라 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  62.6 피크와  $\delta_{\text{C}}$  101.9, 78.5, 78.1, 75.0, 71.4 피크를 통해 결합되어 있는 당은  $\beta$ -D-glucofuranose로 예상하였다.

정확한 구조 동정을 위해 2D (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) NMR을 측정하였다. COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling 하고 있는 proton을 분석하였고, NOESY를 통하여 공간적으로 5 Å 이내의 가까운 거리에 있는 proton의 관계를, HMQC를 통해서 탄소에 직접 결합되어 있는 proton을, HMBC를 통해서 각 탄소에 대해 long-range coupling을 하고 있는 proton을 확인하였다.

COSY NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  8.14 (2H,  $J=8.7$  Hz)와 7.27 (2H, d,  $J=8.7$  Hz) 피크에 해당하는 proton은 서로 coupling하고 있음을 확인하였다. NOESY NMR spectrum 분석 결과, 2개의 methoxy group의 proton이 서로 인접한 것으로 확인되었으며, 이를 통해 flavonoid의 7번 자리에 1개의 hydroxy group이 위치하고 있음을 예상하였다. 또한, HMBC NMR spectrum 분석 결과, glucofuranose는 flavonoid의 4' 위치에 결합되어 있음을 확인하였다.

이러한 결과를 문헌<sup>41-43,47,48</sup>과 비교하여 종합해봤을 때, compound **3**은 7,4'-dihydroxy-3,5,6,8-tetramethoxyflavone 4'-O-β-D-glucopyranoside로 동정하였으며, 이 화합물은 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다(Figure 56-64, Table 19). compound **3**의 HR-ESI-MS 분석 결과  $m/z$   $[M+Na]^+$  559.1427 (calcd. 559.1428)로 예상한 화합물의 분자량과 일치하는 것을 확인하였다.

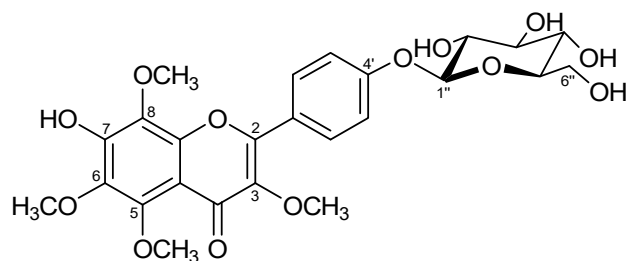


Figure 56. Chemical structure of compound **3**

Table 19.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz)

No.	Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		157.9
3		134.5
4		180.9
5		154.5
6		137.5
7		146.6
8		140.1
9		150.1
10		108.6
1'		125.5
2', 6'	8.14 (2H, d, 8.7)	131.4
3', 5'	7.27 (2H, d, 8.7)	117.9
4'		161.5
1''	5.1 (1H, d, 7.3)	101.9
2''	3.52-3.50 (1H, m)	75.0
3''	3.52-3.50 (1H, m)	78.1
4''	3.52-3.50 (1H, m)	71.4
5''	3.44-3.40 (1H, m)	78.5
6''	3.86-3.83 (1H, m)	62.6
	3.77-3.70 (1H, m)	
3-OCH <sub>3</sub>	3.93 (3H, s)	62.4
5-OCH <sub>3</sub>	3.90 (3H, s)	62.7
6-OCH <sub>3</sub>	4.09 (3H, s)	61.6
8-OCH <sub>3</sub>	3.83 (3H, s)	60.8

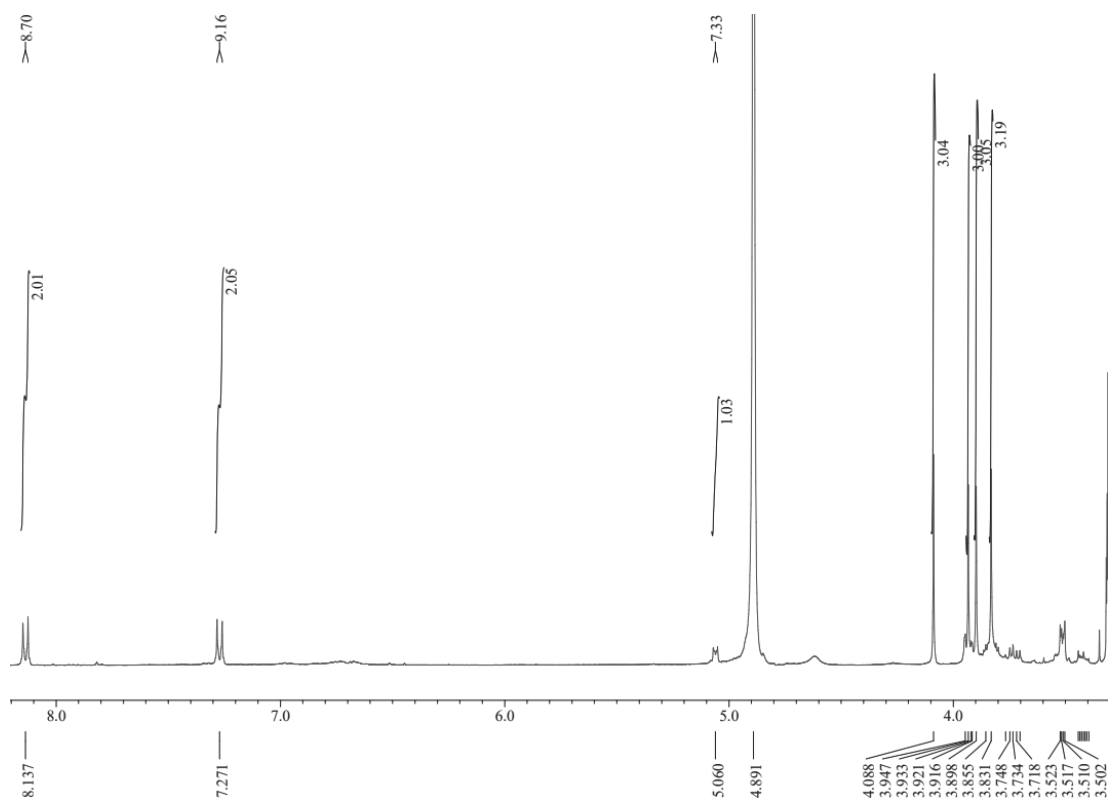


Figure 57.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

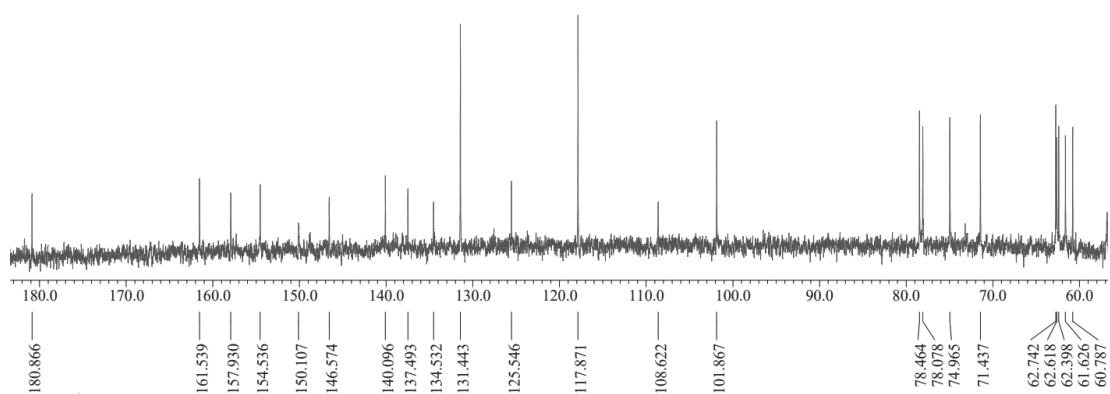


Figure 58.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$



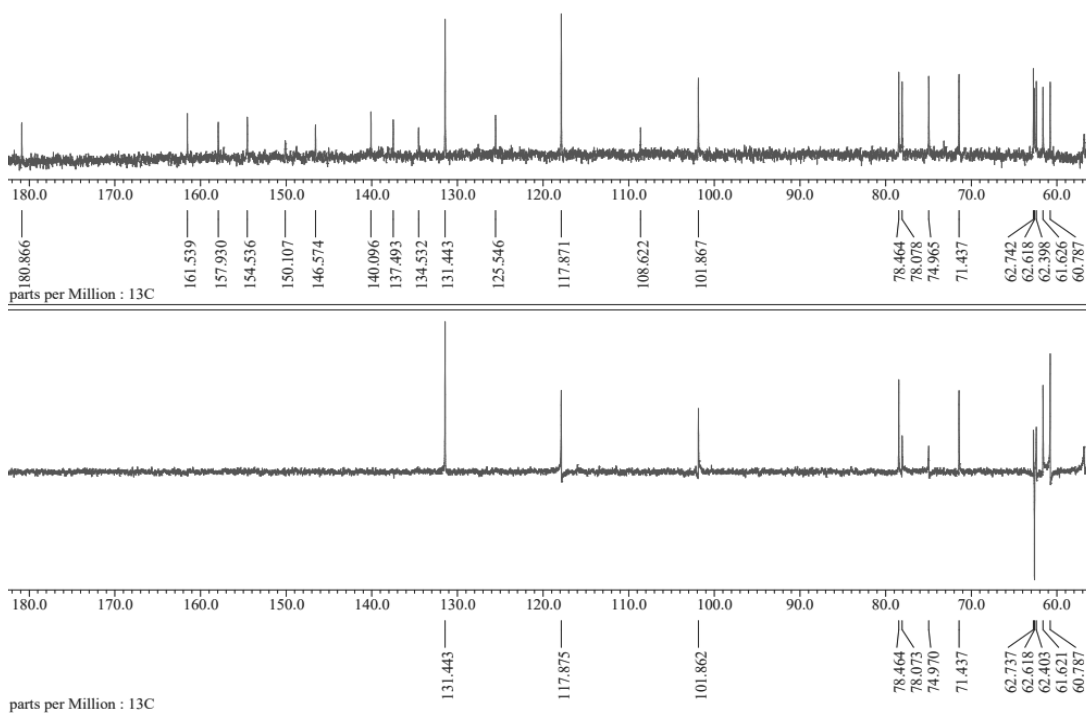


Figure 59. DEPT-135° spectrum of compound **3** in CD<sub>3</sub>OD

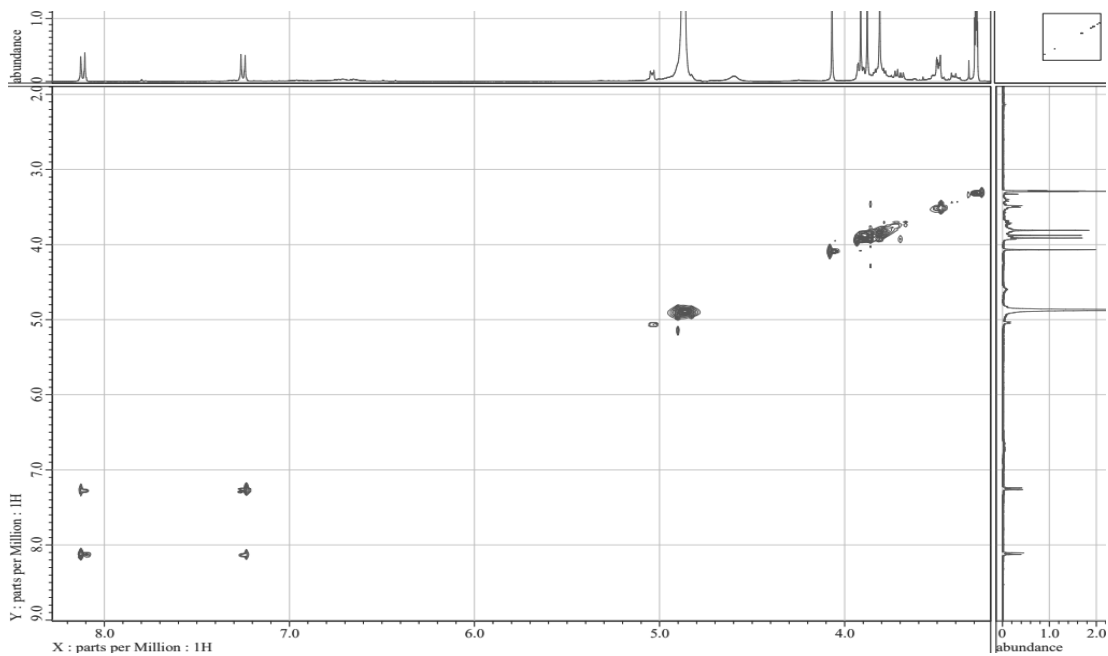


Figure 60. COSY spectrum of compound **3** in CD<sub>3</sub>OD

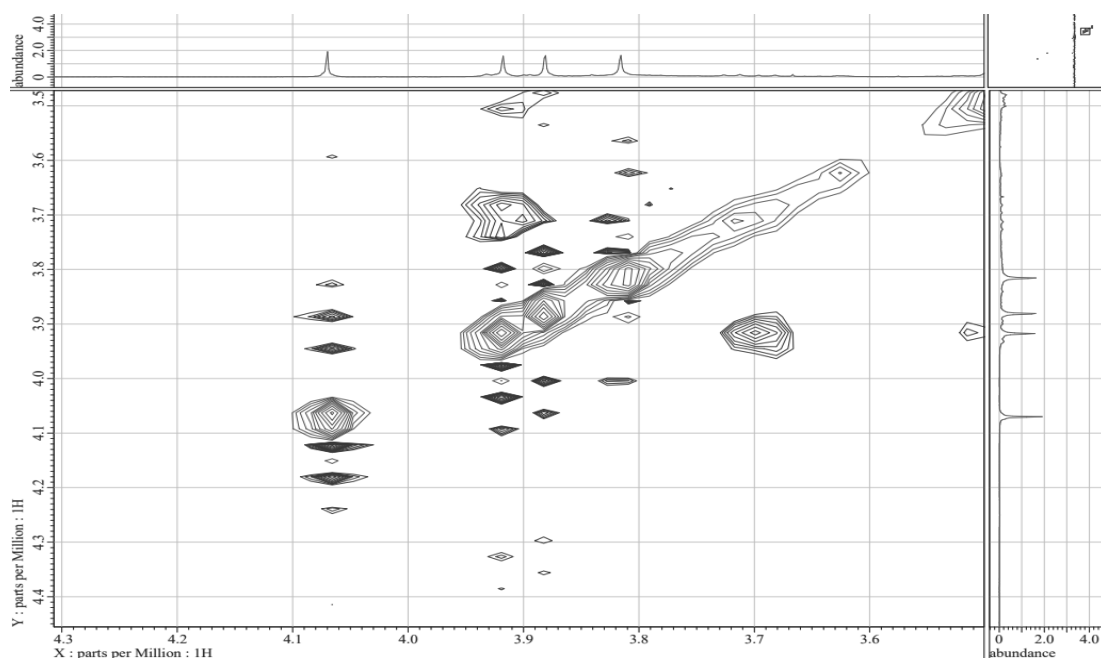


Figure 61. NOESY spectrum of compound **3** in CD<sub>3</sub>OD

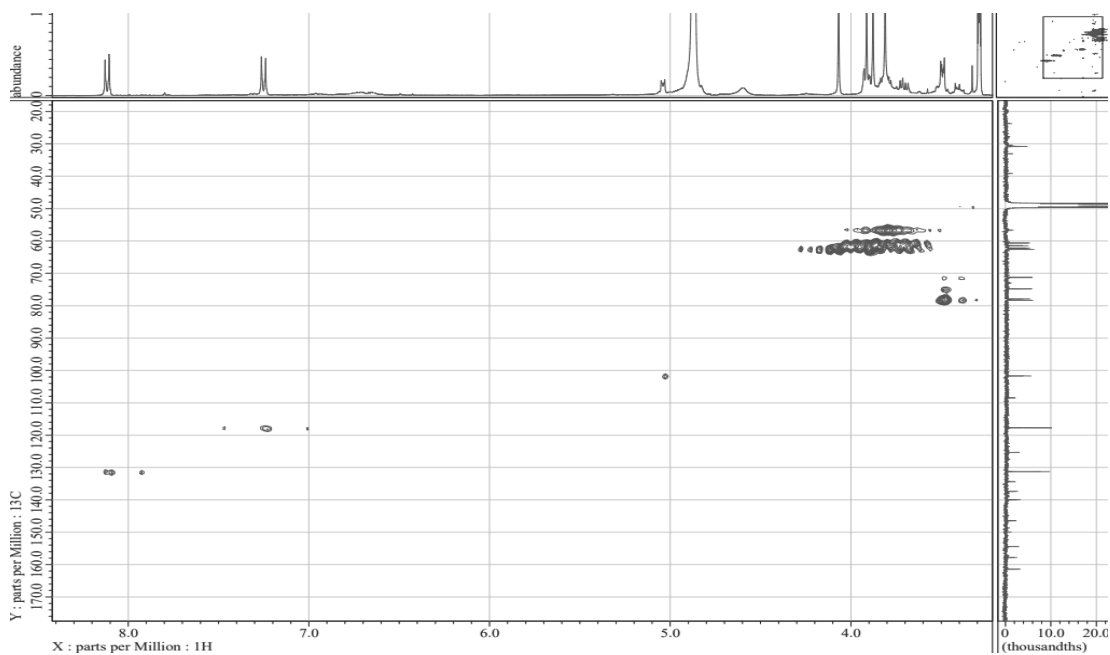


Figure 62. HMBC spectrum of compound **3** in CD<sub>3</sub>OD

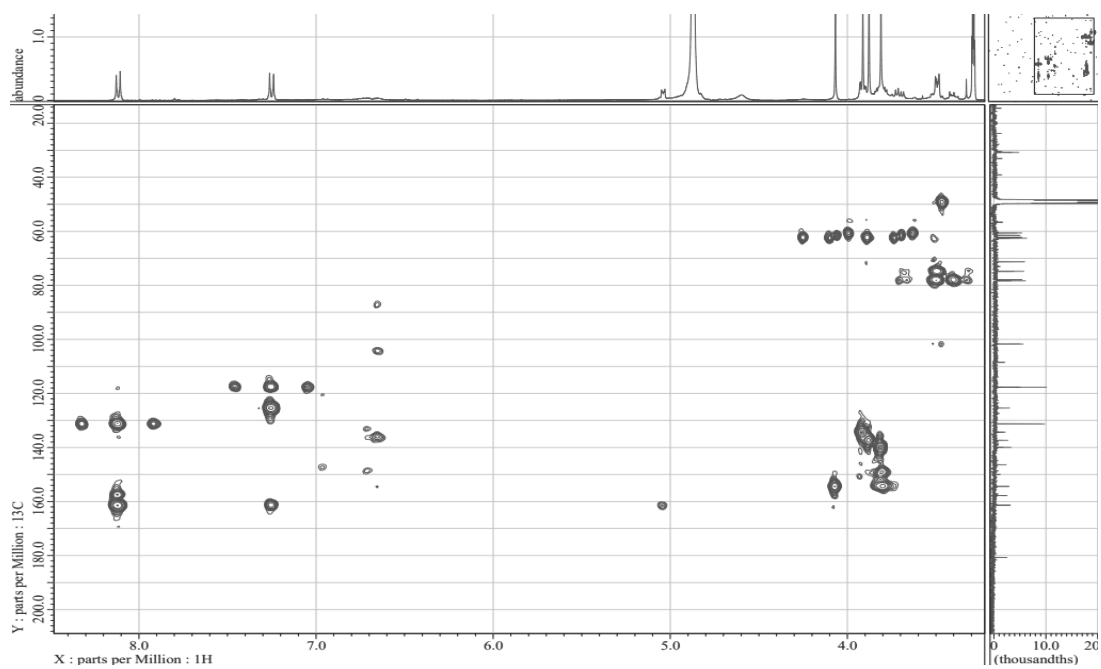


Figure 63. HMBC spectrum of compound **3** in CD<sub>3</sub>OD

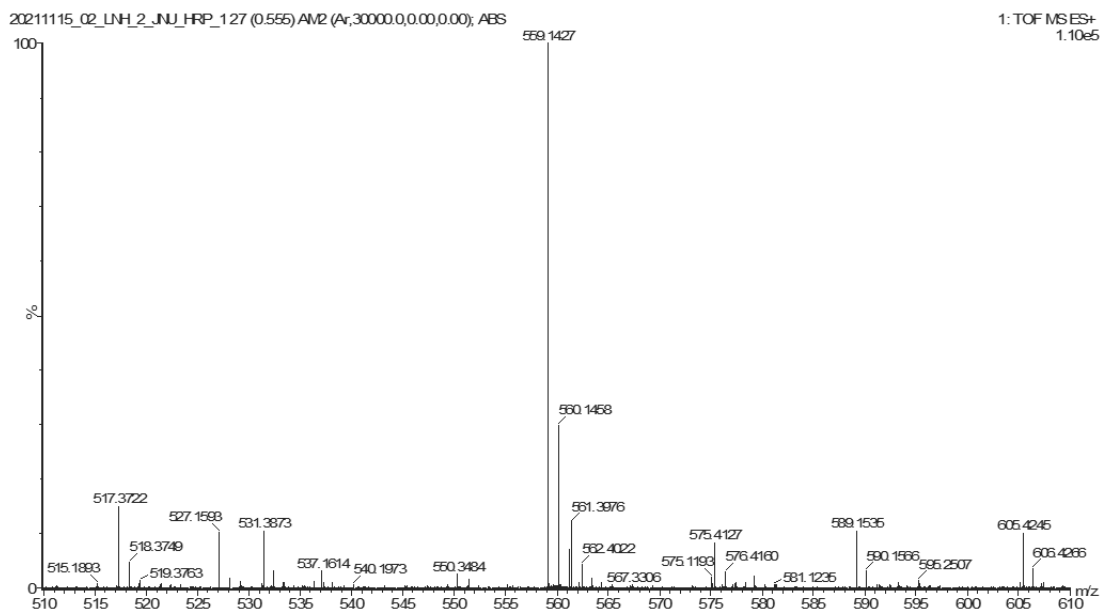


Figure 64. HR-ESI-MS spectrum of compound **3**

#### 4. HPLC 함량분석

생달나무 가지에서 분리된 화합물의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 정량 분석을 실시하였다. HPLC 분석 결과, 추출물 및 EtOAc 분획물 피크의 머무름 시간 중 16.3분은 *epi*-catechin (1)으로 확인되었으며, 함량은 추출물에서 14.00 mg/g, EtOAc 분획물에서 40.34 mg/g으로 확인되었다(Figure 65).

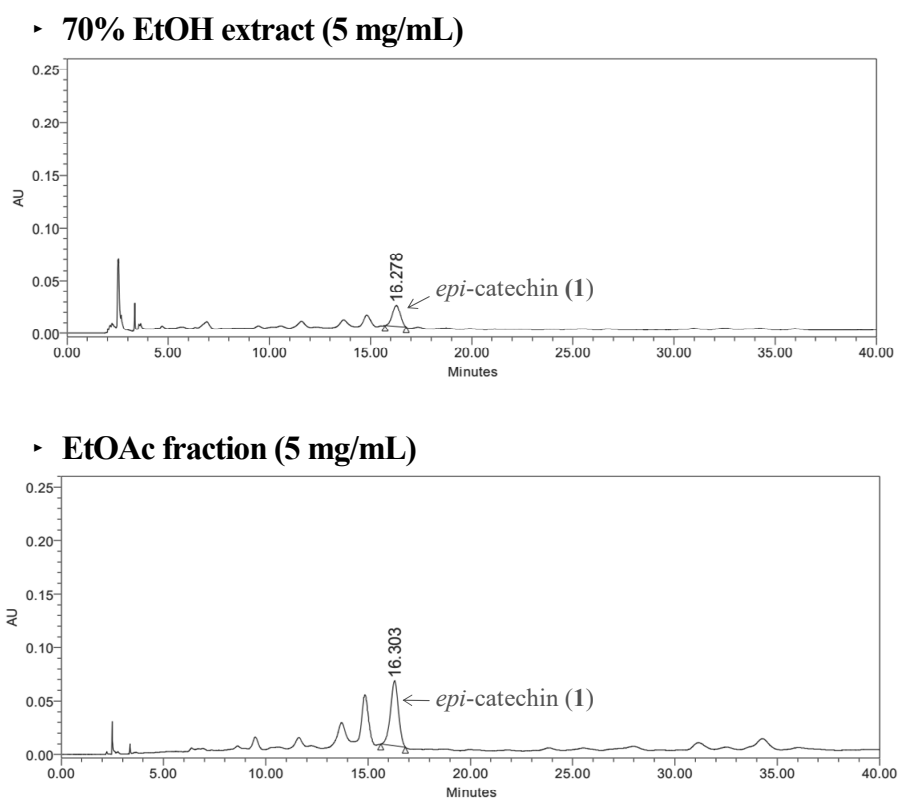


Figure 65. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract, EtOAc fraction.

Table 20. Content of *epi*-catechin (1) from *C. yabunikkei* branches by HPLC

	<i>epi</i> -catechin (1)
70% EtOH extract	14.00
EtOAc fraction	40.34

Unit: mg/g

## 5. 생달나무 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

### 1) 항산화

#### (1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 표준검정곡선을 이용하여 보리밥나무 가지 추출물 및 분획물의 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양 (GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물은  $248.5 \pm 2.6$  mg/g GAE, *n*-BuOH 분획물은  $243.7 \pm 1.1$  mg/g GAE으로 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 66).

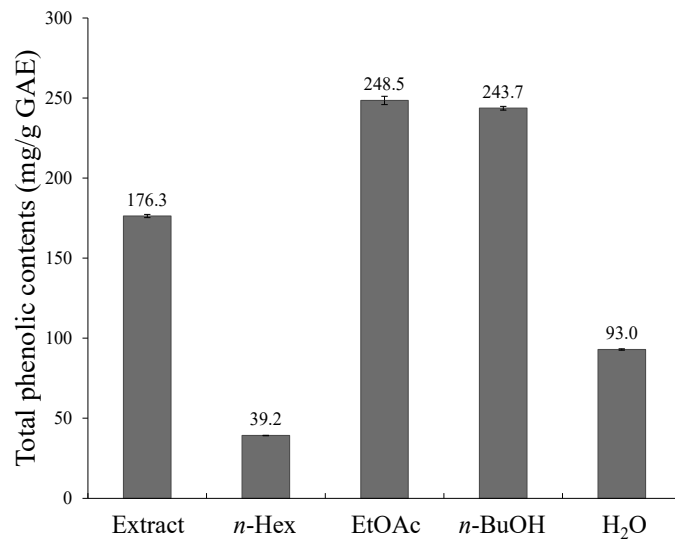


Figure 66. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin의 표준 검정 곡선을 이용하여 생달 나무 가지 추출물 및 분획물의 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양 (QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이  $23.2 \pm 0.5$  mg/g QE로 분획물 중 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다 (Figure 67).

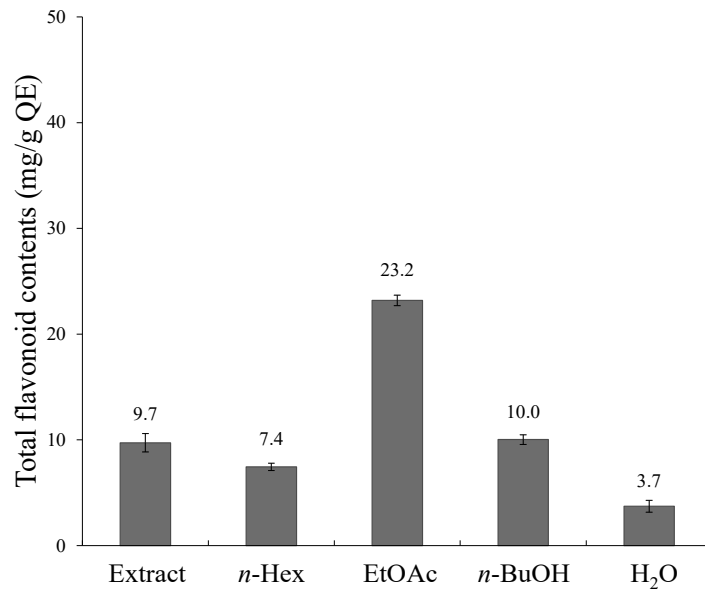


Figure 67. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

### (3) DPPH radical 소거 활성

생달나무 가지의 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료는 12.5-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의  $\text{SC}_{50}$  값이 각각 84.6, 46.2, 85.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로, 대조군인 BHT ( $\text{SC}_{50}$  : 88.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )보다 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 68, Table 21).

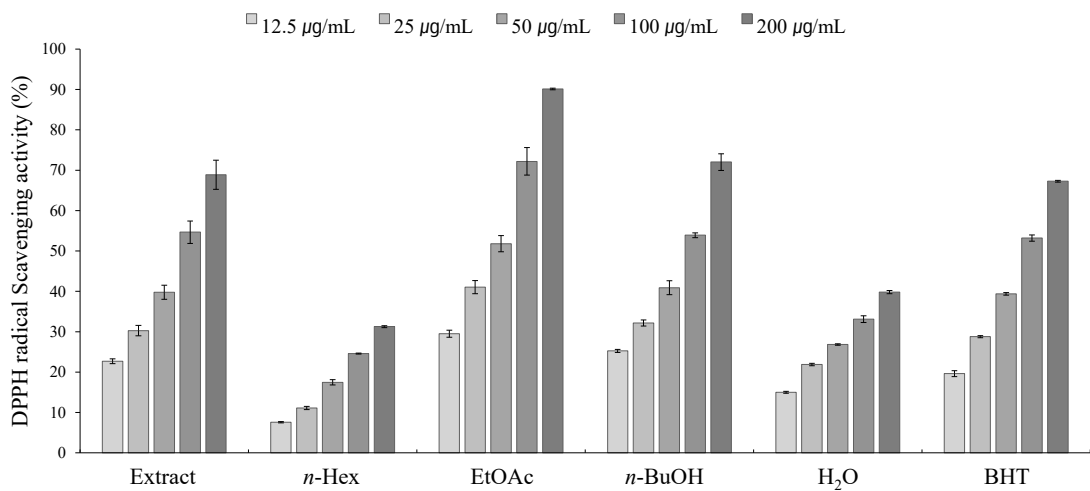


Figure 68. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 21.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
$\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	84.6	>200	46.2	85.2	>200	88.5



(4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

생달나무 가지의 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료는 3.125–50 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 10.7, 6.4, 7.5 µg/mL로 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 나타내었다 (Figure 69, Tabel 22).

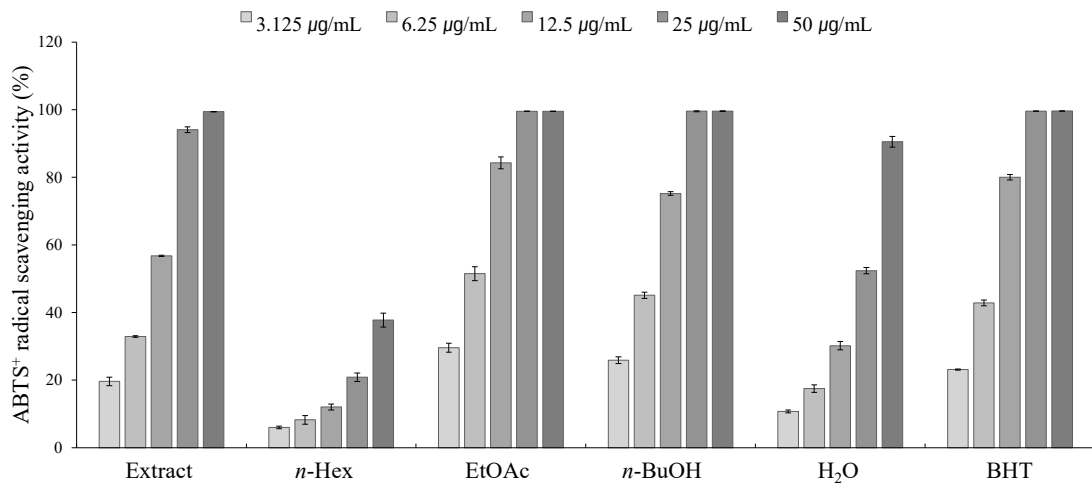


Figure 69. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 22. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	10.7	>50	6.4	7.5	23.6	7.5

(5) 세포 보호 효과

① 세포 독성 평가 (MTT assay)

HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소( $H_2O_2$ )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 시료의 농도를 정하기 위해 HaCaT 세포에 대한 추출물 및 용매 분획물의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 생달나무 가지 추출물 및 분획물은 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 생존율이 모두 90% 이상으로 나타났다(Figure 70). 따라서 본 실험에서 사용될 시료의 농도는 세포 독성을 나타내지 않은 농도인 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ 로 설정하였다.

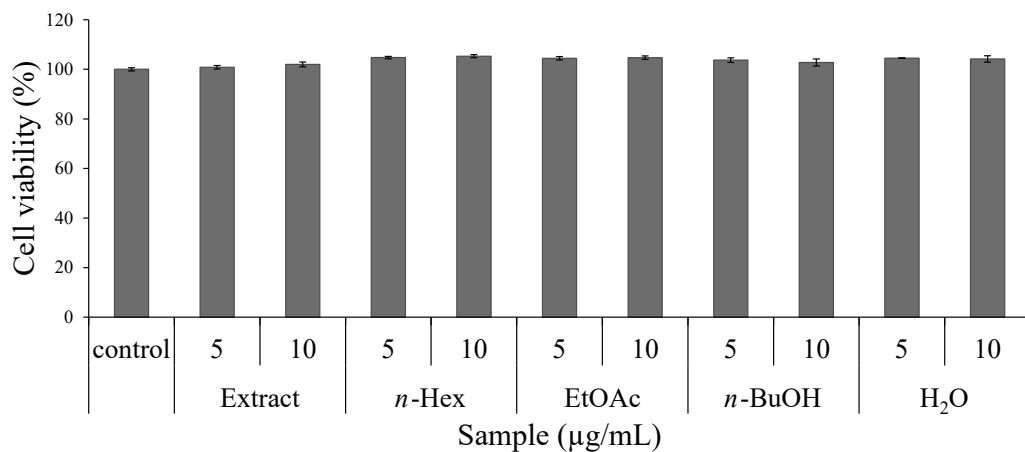
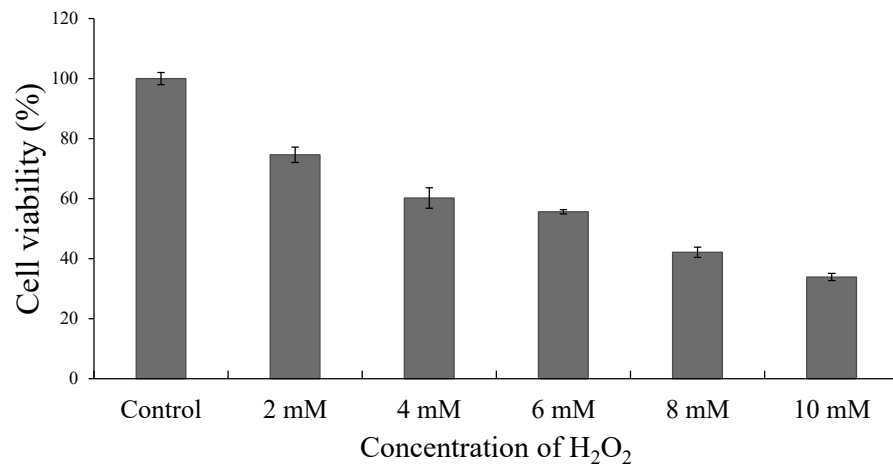


Figure 70. Cell viability of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

② 과산화수소 ( $H_2O_2$ )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

$H_2O_2$ 로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 앞서, 실험에 사용될  $H_2O_2$ 의 농도를 정하기 위해  $H_2O_2$  농도에 따른 HaCaT cell의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 4 mM의 농도에서 세포 생존율이 60.2%로 확인되었다 (Figure 3). 따라서 본 실험에서는 4 mM의  $H_2O_2$ 를 처리하여 손상된 세포에 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 추출물 및 분획물을 처리하였다. 그 결과, 생달나무 가지 추출물은 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 66.6, 71.7%의 세포 생존율이 확인되었으며, 생달나무 가지 추출물은  $H_2O_2$ 로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 5.8, 10.9%의 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다. EtOAc 분획물은 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 70.2, 73.4%의 세포 생존율이 확인되었으며, EtOAc 분획물은  $H_2O_2$ 로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 9.4, 12.6%의 세포 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다 (Figure 71).

(A)



(B)

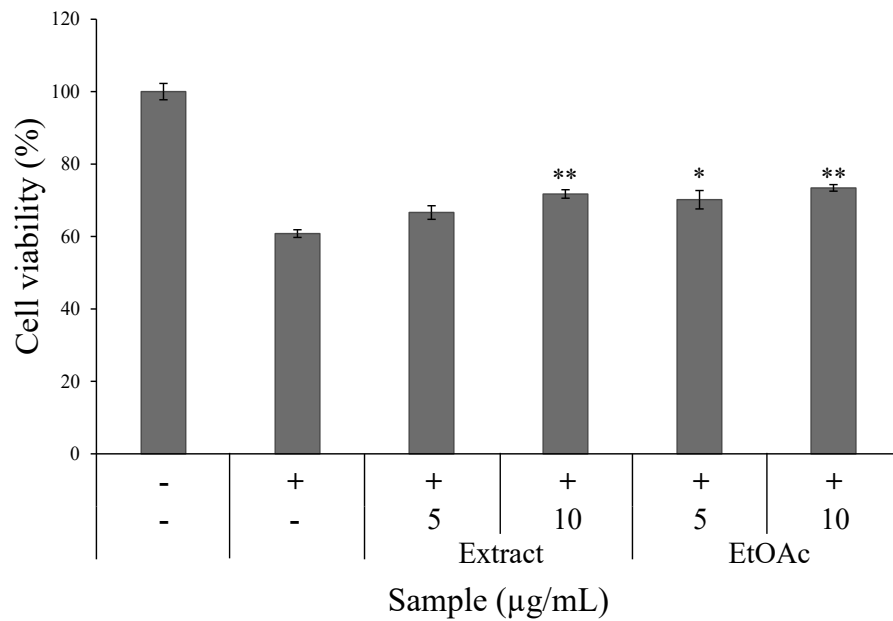


Figure 71. (A) Cell viability on HaCaT cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Cell protective effects of extract and EtOAc fraction from *C. yabunikkei* branches on HaCaT cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01

## 2) 항염

### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW264.7 세포를 이용하여 생달나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성량 및 세포 독성을 확인하였다. 먼저, 추출물과 용매 분획물을 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물에서 nitric oxide 생성 억제 활성을 확인하였다(Figure 72). 추가적인 농도에서 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물은 100 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰으며, IC<sub>50</sub> 값은 38.4 µg/mL로 확인되었다(Figure 73).

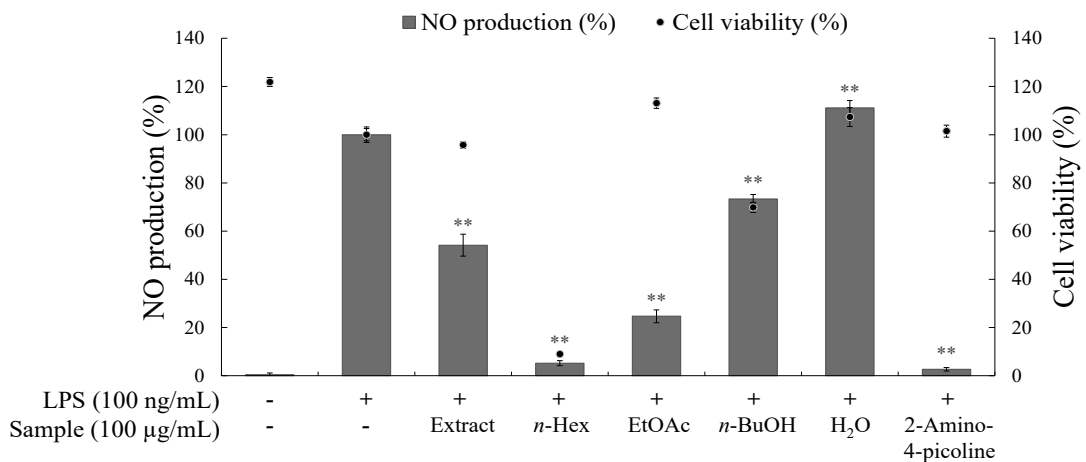


Figure 72. Effects of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

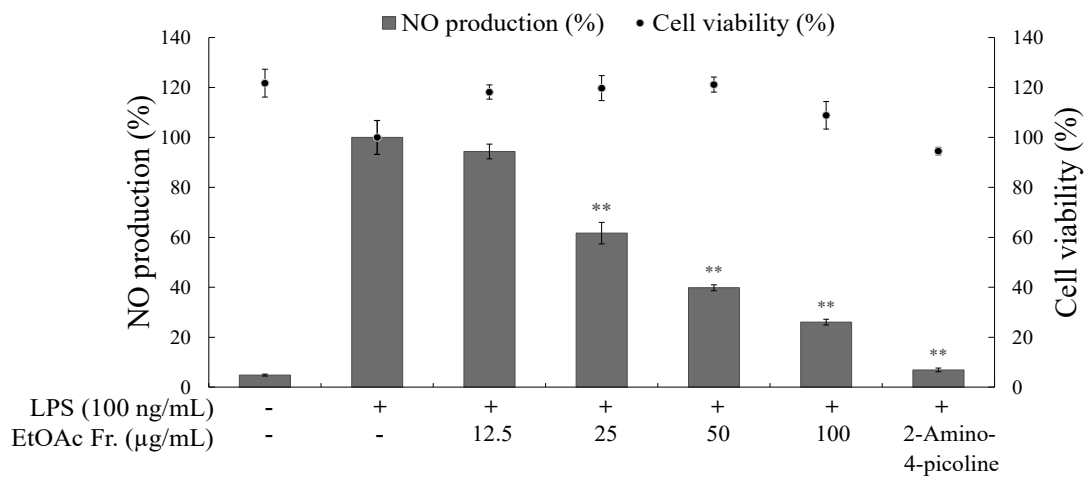


Figure 73. Effect of EtOAc fraction from *C. yabunikkei* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from *C. yabunikkei* branches for 24 h. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### 3) 항균

#### (1) Paper disc diffusion method

생달나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 40105)를 사용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 추출물 및 모든 분획물은 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)에 대해 생육억제 활성을 나타내었다. 또한 *n*-Hex, EtOAc 분획물은 *S. mutans*에 대한 생육억제 활성을 나타내었다(Figure 75, Table 22).

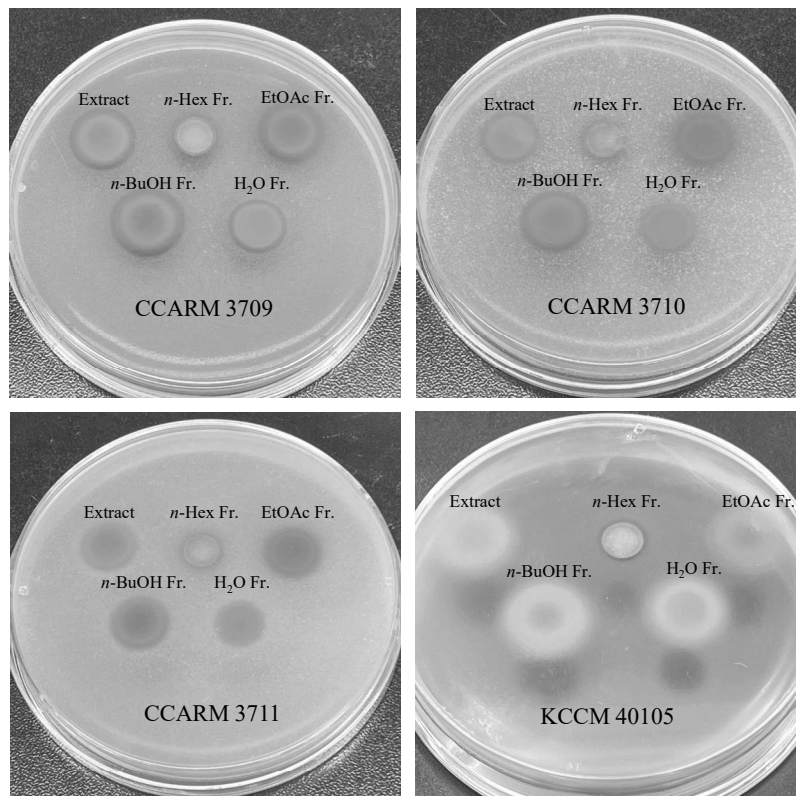


Figure 74. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of *C. yabunikkei* on *S. epidermidis* and *S. mutans*.

Table 23. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* branches

	Clear zone (mm)			
	<i>S. epidermidis</i>			<i>S. mutans</i>
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	KCCM 40105
Extract	14.5	13	12	N.A.
<i>n</i> -Hex	10	11	8.5	10
EtOAc	15	13	11	16
<i>n</i> -BuOH	16	15	13	N.A.
H <sub>2</sub> O	12.5	11	11	N.A.
positive control	36	N.A.	32	40

Sample : 6 mg

Positive control : Erythromycin(+) (60 µg)

Disc size : 8 mm × 1.5 mm

N.A. : No Activity



## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통해 항균 활성을 확인한 후, 활성을 나타낸 시료에 대해 추가적으로 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 시료의 농도를 two-fold-dilution법으로 두 배씩 희석하면서 실시하였으며 가장 높은 농도를 4000 µg/mL로 하여 가장 낮은 농도가 3.9 µg/mL가 되도록 희석하였다.

그 결과 *S. epidermidis*의 경우 70% EtOH 추출물, *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고, 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 이용해 MBC를 확인하였다. 그 결과 EtOAc 분획물에서 *S. epidermidis* 3종에 대한 MBC 값을 모두 확인할 수 있었다(Table 24). *S. mutans*의 경우 70% EtOH 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 MIC를 확인하였고, 그 이상의 농도의 시료 배양액을 이용하여 MBC를 확인한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 25).

Table 24. MIC and MBC values of *C. yabunikkei* branches on *S. epidermidis*.

	<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	1000	>4000	2000	>4000	2000	>4000
<i>n</i> -Hex	1000	>4000	1000	>4000	1000	>4000
EtOAc	1000	4000	1000	4000	1000	4000
<i>n</i> -BuOH	1000	>4000	1000	>4000	2000	>4000
H <sub>2</sub> O	2000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000

Unit : µg/mL

Table 25. MIC and MBC values of *C. yabunikkei* branches on *S. mutans*.

	<i>S. mutans</i>	
	KCCM 40105	
	MIC	MBC
Extract	4000	>4000
<i>n</i> -Hex	1000	4000
EtOAc	1000	4000
<i>n</i> -BuOH	>4000	>4000
H <sub>2</sub> O	>4000	>4000

Unit : µg/mL

## 6. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항산화

#### (1) 세포 보호 효과

##### ① 세포 독성 평가 (MTT assay)

HaCaT 세포를 이용하여 분리된 화합물의 과산화수소( $H_2O_2$ )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 화합물의 농도를 정하기 위해 HaCaT 세포에 대한 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, compound 1은 25, 50, 100  $\mu M$ 의 농도에서 세포 생존율이 90% 이상으로 나타났다(Figure 76). 따라서 본 실험에서 사용될 compound 1의 농도는 세포독성을 나타내지 않은 농도인 25, 50, 100  $\mu M$ 로 설정하였다.

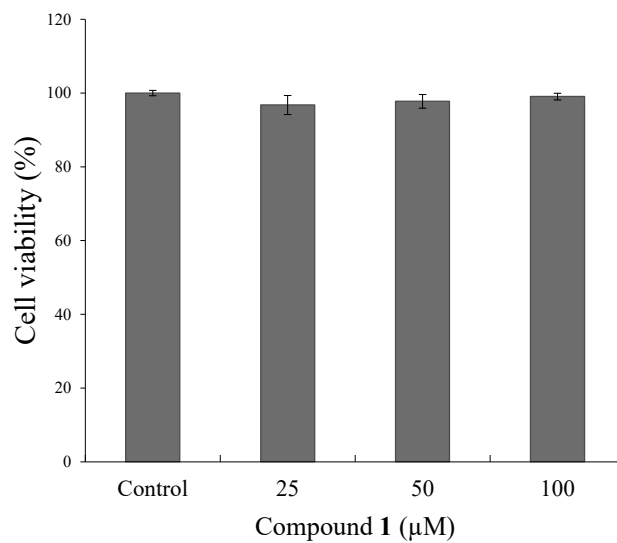
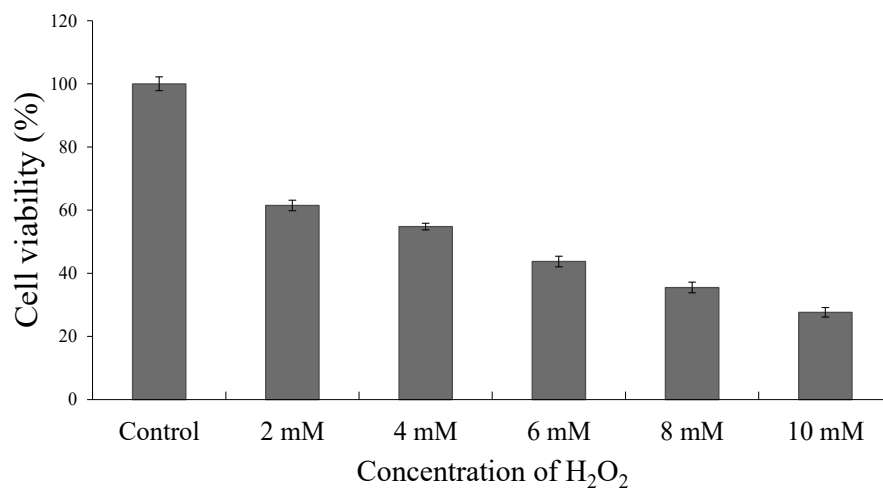


Figure 75. Cell viability of isolated compound 1 from *C. yabunikkei* branches. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

② 과산화수소 ( $H_2O_2$ )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 앞서, 실험에 사용될 과산화수소의 농도를 정하기 위해 과산화수소 농도에 따른 HaCaT 세포의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 2 mM의 농도에서 세포 생존율이 61.5%로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 2 mM의 과산화수소를 처리하여 손상된 세포에 25, 50, 100  $\mu$ M의 compound 1을 처리하였다. 그 결과, compound 1은 25, 50, 100  $\mu$ M의 농도에서 각각 66.7, 72.9, 79.6%의 세포 생존율이 확인되었으며, compound 1은 25, 50, 100  $\mu$ M의 농도에서 각각 5.2, 11.4, 18.1%의 세포 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다(Figure 77).

(A)



(B)

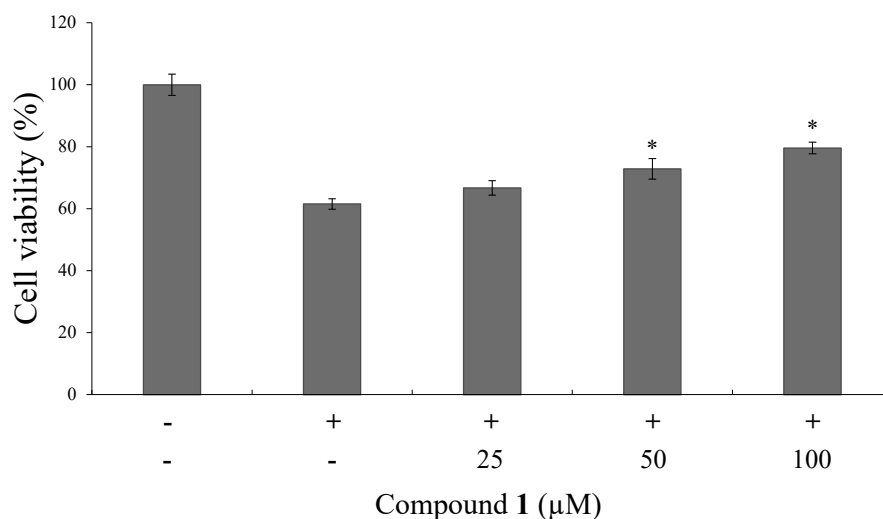


Figure 76. (A) Cell viability on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cells. (B) Cell protective effect of isolated compound 1 from *C. yabunikkei* branches on HaCaT cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 2) 항염

### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW264.7 세포를 이용하여 생달나무 가지에서 분리된 compound 2, 3에 대한 nitric oxide (NO) 생성량 및 세포 독성을 확인하였다. 각 화합물을 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행한 결과, compound 2와 3은 200  $\mu\text{M}$  농도 이하에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제시켰으며, compound 2와 3의  $\text{IC}_{50}$  값은 각각 49.0, 73.3  $\mu\text{M}$ 로 확인되었다(Figure 78).

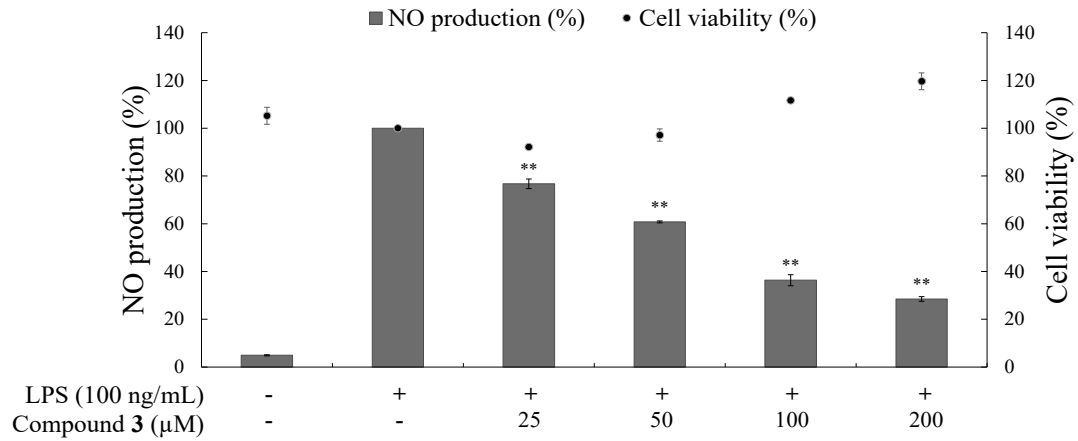
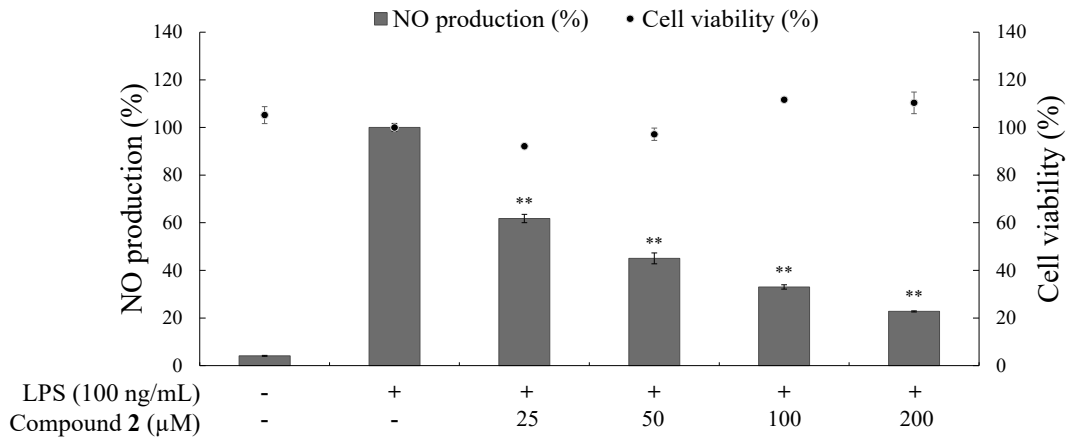


Figure 77. Effects of isolated compounds **2**, **3** from *C. yabunikkei* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds **2**, **3** from *C. yabunikkei* branches for 24 h. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

(2) PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokines (IL-1β, IL-6) 생성 억제 활성

NO 생성 억제 활성이 우수한 compound 2, 3에 대하여 항염 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine의 생성량을 확인하였다. 그 결과 compound 2는 PGE<sub>2</sub>의 생성을, compound 3은 IL-6와 IL-1β의 생성을 효과적으로 억제시켰다(Figure 79-80).

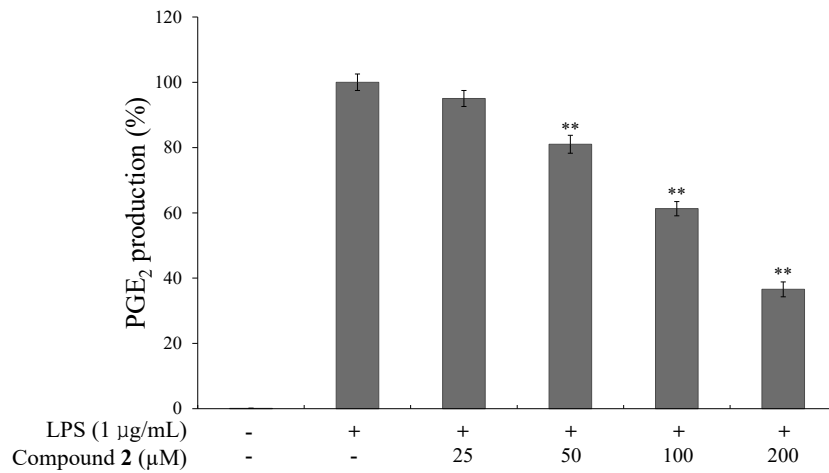
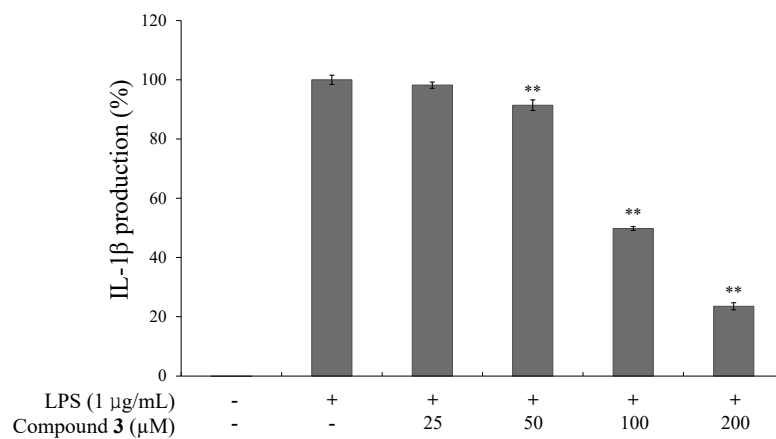


Figure 78. Effect of isolated compound 2 from *C. yabunikkei* branches on PGE<sub>2</sub> production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



(A)



(B)

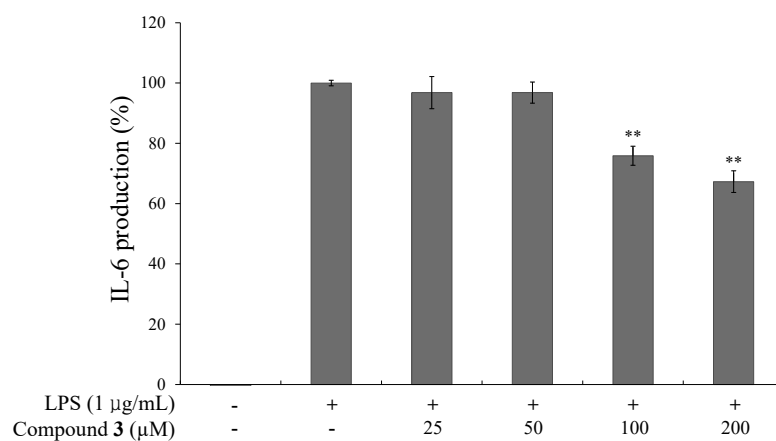


Figure 79. Effects of isolated compound **3** from *C. yabunikkei* branches on IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 6. 요약 및 결론

본 연구는 유효 성분 연구가 보고되지 않은 생달나무 가지를 이용하여 다양한 생리 활성을 확인하고 성분 연구를 진행하여 식품 및 화장품 관련 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

생달나무 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 이 중 EtOAc 분획물을 MPLC, VLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리한 단일 물질은 1D, 2D NMR 및 HR-ESI-MS를 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 3개의 화합물을 동정하였다.

분리된 화합물은 *epi*-catechin (1), 3',4'-dihydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxy-flavone 4'-*O*-β-D-glucopyranoside (2), 7,4'-dihydroxy-3,5,6,8-tetramethoxy-flavone 4'-*O*-β-D-glucopyranoside (3)로 확인 되었으며, compound 2, 3은 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

생달나무 가지에서 분리된 compound 1의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 정량 분석하였다. HPLC 분석 결과, compound 1은 70% EtOH 추출물 및 EtOAc 분획물에서 각각 14.00, 40.34 mg/g의 함량을 나타내었다. 생달나무 가지의 항산화 실험 결과, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 총 폴리페놀 함량이 각각 248.5, 243.7 mg/g GAE로 나타났으며, DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 실험에서 EtOAc, *n*-BuOH 분획물은 대조군인 BHT보다 우수한 radical 소거 활성을 나타내었다. 또한, HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인한 결과, 추출물 및 EtOAc 분획물은 세포 독성을 나타내지 않은 5, 10 μg/mL의 농도에서 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. RAW264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었고, 자연계에서 처음 분리된 compound 2, 3은 200 μM 이하의 농도에서 세포독성 없이 효과적으로 NO의 생성을 억제하였다.

항균 활성 실험 결과, 생달나무 가지 추출물 및 모든 분획물은 *S. epidermidis*에 대한 우수한 항균활성을 나타내었으며, *S. mutans*에 대한 실험에서는 *n*-Hex, EtOAc 분획물이 항균 활성을 나타내었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 생달나무 가지는 항산화, 항염 및 항균 활성을 갖는 의약품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 사료된다.

## V. 종합 결론 및 고찰

본 연구는 의약품 및 화장품의 소재로 쓰이는 합성 물질을 대체할 수 있는 천연물 유래 소재를 찾기 위해 보리밥나무 및 생달나무 가지 추출물과 용매 분획물에서 유효 성분을 분리·동정하고 생리활성을 확인하였다.

보리밥나무 가지의 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 총 12개의 compound를 분리하였다. 분리된 화합물은 ethyl linolenate (1), ethyl oleate (2), oleic acid (3), linolenic acid (4), 1-monoolein (5), 1-linolenoyl glycerol (6),  $\beta$ -sitosterol (7), catechin (8), *epi*-catechin (9), gallicocatechin (10), *epi*-gallicocatechin (11), caffeic acid (12)로 확인 되었다.

보리밥나무 가지에서 분리된 화합물 중 catechin, *epi*-catechin, gallicocatechin, *epi*-gallicocatechin은 플라보노이드 화합물로, 우수한 radical 소거 활성을 나타낸다는 것으로 많은 문헌<sup>35</sup>에 보고되어있다. 또한, linolenic acid, 1-linolenoyl glycerol,  $\beta$ -sitosterol은 항염 활성이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>29,36,37</sup>

*S. epidermidis*, *C. acnes* 및 *S. mutans*에 대한 항균 활성 실험 결과, 보리밥나무 가지 EtOAc 분획물은 CCARM 9010 (*C. acnes*)를 제외한 모든 균주가 우수한 활성을 나타내었다.

생달나무 가지의 EtOAc 분획물에서 총 3개의 compound를 분리하였다. 분리된 화합물은 *epi*-catechin (1), 3',4'-dihydroxy-3,5,6,7,8-pentamethoxyflavone 4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (2), 7,4'-dihydroxy-3,5,6,8-tetramethoxyflavone 4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (3)로 확인 되었으며, compound 2, 3은 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

생달나무 가지에서 분리된 화합물 중 항산화 활성이 뛰어나다고 알려진 *epi*-catechin(1)의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 이용하여 정량 분석하였다. 분석 결과, 생달나무 가지 추출물 및 EtOAc 분획물에서 각각 1.4% (14.0 mg/g)와 4.0% (40.3 mg/g)의 함량을 나타내었으며, 이러한 결과를 통해 생달나무 가지의 EtOAc 분획물은 풍부한 *epi*-catechin에 의해 뛰어난 항산화 활성을 나타낸다는 것으로 사료된다. 또한, 생달나무 가지 추출물과 EtOAc 분획물은 과산화수소를 처리하여 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 나타내었으며, 100  $\mu$ M의 *epi*-catechin(1)은 18.1%의 세포 보호 효과를 나타내었다.

자연계에서 처음 분리된 화합물인 compound 2와 3은 polymethoxyflavone (PMF) 화합물로, PMF는 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine의 생성을 억제하여 NO의 생성을 억제하는 기전으로 항염 활성을 나타낸다는 것으로 문헌에 보고되어 있다. compound 2, 3의 항염 활성 실험을 진행한 결과, compound 2는 PGE<sub>2</sub>의 생성을 저해하는 것으로 확인되었으며, compound 3은 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 생성을 저해하여 NO의 생성을 억제시키는 것으로 확인되었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 보리밥나무 및 생달나무 가지는 항산화, 항염, 항균 효과를 갖는 의약품 및 화장품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 판단된다.

## VI. 참고문헌

1. 유익동. 한방화장품 개발현황과 전망, 한방화장품 국제경쟁력강화 정책개발세미나, *국회복지사회포럼* **2007**, 3-16.
2. You, J. C.; Jung, H. S.; Kim, H. S.; Lee, J. H.; Moh, S. H. The Effect of Roots Extract from *Potentilla chinensis* as Cosmeceutical Material. *Journal of Applied Biological Chemistry* **2016**, *59*(1), 3-17.
3. Kim, M. S.; Lee, E. H.; Cho, Y. J. Anti-oxidative Activities of Extracts from *Chionanthus retusus* leaves, Fruits and Flower. *Current Research on Agriculture and Life Sci.* **2015**, *33*(2), 49-56.
4. Jang, Y. A.; Lee, J. T. The evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging of extract solvent and *Poria cocos* by parts. *Kor. J. Aesthet. Cosmeltol.* **2015**, *13*, 377-383.
5. Yoon, J. H.; Park, S. G.; Lee, M. J.; Park, J. Y.; Seo, K. S.; Woo, K. C.; Lee, C. E. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Bletilla striata* Reichenbach fil. fractions as cosmetic. *J. Life Sci.* **2013**, *23*, 1073-1078.
6. Moon, M. Y.; Kim, S. S.; Jang, W. J.; Kim, M. S.; Lee, N. H. Identification of Antioxidative Constituents from The Branches of *Quercus gilva* Blume. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2009**, *35*(3), 251-256.
7. 신동화, 천연 향산화제의 연구동향과 방향. *식품과학과 산업*, **1997**, *30*(1), 14-21.

8. Kim, E. J.; Choi, J. Y.; Yu, M. R.; Kim, M. Y.; Lee, S. H.; Lee, B. H. Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **2012**, *44*(3), 337-342.
9. Park, G. H.; Lee, J. Y.; Kim, D. H.; Cho, Y. J.; An, B. J. Anti-Oxidant and Antiinflammatory Effects of *Rosa multiflora* Root. *Journal of Life Science* **2011**, *21*(8), 1120-1126.
10. Lee, M. H.; Jeong, J. H.; Jeong, M. S.; Chang, S. H.; Her, E. Anti-inflammatory Function of the *Sophora japonica* Extract Rutin: The Inhibitory Effect of Rutin of Korean *Sophora japonica* on the Productions of NO and TNF-alpha from Mouse Peritoneal Macrophages. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **2010**, *18*(2), 105-112.
11. Ko, W. M.; Lee, D. S.; Jang, M.; Kim, K. S.; Lee, H. S.; Baek, H. Y.; Oh, H. C.; Kim, Y. C. A Comparison of Anti-inflammatory Effects of Sophorae Flos EtOH Extracts at the Different Flowering Stages on LPS-induced Inflammation in RAW264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **2013**, *44*(3), 291-297.
12. Jung, Y. H.; Ryu, M. J. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of *Codonopsis lanceolata* Skin Extracts. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **2018**, *16*(3), 347-357.
13. Lee, S. Y.; Kim, B. A.; Shin, D. C.; Park, K. S.; Yang, J. C. A Study of Antimicrobial Effect of *Zostera marina* Extracts. **2016**, *33*(2), 225-231.
14. Kim, S. Y.; Li, S. H. Effects of *Notoginseng Flos* extract on Anti-oxidative, Anti-inflammatory and Acne skin. *Journal of Oil &*

*Applied Science* **2018**, *35*(1), 43-54.

15. Kim, N. R.; Lee, S. W.; Kim, M. R. Study on Antibacterial Activity of Propolis on *Propionibacterium acnes* as an Acne-Induced Bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **2020**, *49*(6), 586-591.
16. Eum, J. S. Antimicrobial activity of Medicinal plant extracts against *Streptococcus sobrinus* KCOM 1157. *Journal of the Korean Applied Science and Technology.* **2020**, *37*(2), 279-286.
17. Kim, S. S.; Hyun, J. M.; Kim, K. S.; Park, K. J.; Park, S. M.; Choi, Y. H. Influence of Essential Oil in 'Shiranuhi' Immature Fruit on Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **2013**, *21*(6), 493-497.
18. Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine" *J. Biol. Chem.*, **1915**, *22*, 305-308.
19. 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  $Ca^{2+}$ -ATPase activity, *Cell Calcium* **1983**, *4*, 71-81.
20. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
21. 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.



22. 조성미, 등수국 및 보리밥나무 잎 추출물의 항산화, 항염, 미백 활성 성분 연구, 제주대학교 2020, 석사학위논문.
23. El-Askary, H. I.; Haggag, M. Y.; Abou-Hussein, D. R.; Hussein, S. M. Phytochemical investigation of the lipoidal fraction of *passiflora caerulea* L. grown in Egypt. *Rec. Pharm. Biomed. Sci.* 2017, 1(1), 1-5.
24. Lao, A.; Fujimoto, Y.; Tatsuno, T. Studies on the Constituents of *Artemisia argyi* Levl et Vant. *Chem. Pharm. Bull.* 1984, 32(2), 723-727.
25. Huh, S.; Kim, Y. S.; Jung, E. S.; Lim, J. H.; Jung, K. S.; Kim, M. O.; Lee, J. S.; Park, D. H. Melanogenesis Inhibitory Effect of Fatty Acid Alkyl Esters Isolated from *Oxalis triangularis*. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33(7) 1242-1245.
26. Ruksilp, T. Fatty Acids and an Ester from the Leaves of *Millettia utilis* Dunn, *Naresuan University Journal : Science and Technology.* 2020, 28(3), 63-68.
27. Alamsjah, M. A.; Hirao, S.; Ishibashi, F.; Fujita, Y. Isolation and Structure Determination of Algicidal Compounds from *Ulva fasciata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, 69(11), 2186-2192.
28. Nitbani, F. O.; Jumina; Siswanta, D.; Sholikhah, E. N.; Nurohmah, B. A. An improved synthesis of 1-monoolein. *IOP Conference Series : Materials Science and Engineering* 2020, 823.
29. Lee, S. J.; Jang, H. J.; Kim, Y. S.; Oh, H. M.; Lee, S. Y.; Jung, K. S.; Kim, Y. H.; Lee, W. S.; 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*(12), 2222-2229.

30. 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), 336-34.
31. Seto, R.; Nakamura, H.; Nanjo, F.; Hara, Y. Preparation of Epimers of Tea Catechins by Heat Treatment. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*(9), 1434-1439.
32. Shahat, A. A.; Ibrahim, A. Y.; Al-Ghamdi, A. A.; Alsaid, M. S. Phytochemical investigation of *Rhus tripartita* and its activity against cyclooxygenases and acetylcholinesterase. *Tropical Journal of Pharm. Research* **2016**, *15*(8), 1697-1706.
33. 고려경, 종가시나무, 조록나무 및 수련을 이용한 기능성 화장품 활성성분 규명, 제주대학교 **2007**, 석사학위논문.
34. Deyama, T.; Ikawa, T.; Kitagawa, S.; Nishibe, S. The Constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. V. Isolation of Dihydroxydehydrodiconiferyl Alcohol Isomers and Phenolic Compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*(5) 1785-1789.
35. G. W. Plumb; S. de Pascual-Teresa; C. Santos-Buelga; J. C. Rivas-Gonzalo & G. Antioxidant properties of gallic acid and prodelphinidins from pomegranate peel. *Redox Report* **2002**, *7*(1), 41-46.

36. Ren, J.; Han, E. J.; Chung, S. H. *In Vivo* and *In Vitro* Anti-inflammatory Activities of  $\alpha$ -linolenic Acid Isolated from *Actinidia Polygama* Fruits. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*(6), 708-714.
37. Liao, P. C.; Lai, M. H.; Hsu, K. P.; Kuo, Y. H.; Chen, J.; Tsai, M. C.; Li, C. X.; Jeyashoke, N.; Chao, L. L. P. Identification of  $\beta$ -Sitosterol as *in Vitro* Anti-inflammatory Constituent in *Moringa oleifera*. **2018**, *66*, 10748-10759.
38. Kim, S. H.; Kim, J. E.; Lee, N. H. Anti-inflammatory and Anti-oxidative Constituents from the Extract of *Cinnamomum yabunikkei* Leaves. *Journal of the korean chemical society* **2021**, *65*(1), 15-24.
39. Cho, J. S.; Chi, L. W.; Jang, B. K.; Jeong, H. S.; Lee, C. H. Anti-microbial Activities of Ten Lauraceae Species against *Propionibacterium acnes*. *Korean J. Plant Res.* **2018**, *31*(5), 423-432.
40. 한정환, 비양나무 가지의 항산화, 미백, 항염 활성 성분 연구, 제주대학교 **2014**, 석사학위논문.
41. Shin, H. J.; Nam, J. W.; Yoon, U. J.; Han, A. R.; Seo, E. K. Identification of Three New Flavonoids from the Peels of *Citrus unshiu*. *Helvetica Chimica Acta* **2012**, *95*(2), 240-245.
42. Rao, Y. K.; Damu, A. G.; Rao, A. J.; Venkatesan, S.; Kuo, P. C.; Rao, C. V.; Wu, T. S. Flavonoids from *Andrographis viscosula*. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*(12), 1374-1376.

43. 조연정, 부지화 잎·가지 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구, 제주대학교 2017, 석사학위논문.
44. Chen, J.; Montanari, A. M.; Widmer, W. W. Two New Polymethoxylated Flavones, a Class of Compounds with Potential Anticancer Activity, Isolated from Cold Pressed Dancy Tangerine Peel Oil Solids. *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, *45*(2), 364-368.
45. Du, Q.; Chen, H. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. *Food chem.* **2010**, *119*(2), 567-572.
46. Kumamoto, H.; Matsubara, Y.; Iizuka, Y.; Okamoto, K.; Yokoi, K. Structures and Hypotensive Effect of Flavonoid Glycosides in Unshiu Peeling. II. *J. of jpn. oil chem. Soc.* **1986**, *35*(8), 379-381.
47. Chen, J.; Montanari, A. M. Isolation and Identification of New Polymethoxyflavonoids from Dancy Tangerine Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*(4), 1235-1238.
48. Thirupathaiah, A.; Bodo, B.; Rao, G. V. Tephrospinosinol, a flavonol glucoside from *Tephrosia spinosa*. *Oriental Journal of Chemistry* **2008**, *23*(3), 821-824.