



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

박 사 학 위 논 문

분홍바늘꽃, 편백 종자 및 팔배나무  
추출물의 기능성 화장품  
소재 개발 연구

劉 博 士

제주대학교 대학원  
화학과

2023년 8월



분홍바늘꽃, 편백 종자 및 팔배나무  
추출물의 기능성 화장품  
소재 개발 연구

이 논문을 이학 박사 학위논문으로 제출함

劉 博 士

제주대학교 대학원

화 학 과

지도교수 이 남 호

劉博士의 이학 박사 학위논문을 인준함

2023년 6월

심사위원장 玄昌久 인  
위 원尹景燮 인  
위 원裴鎰盈 인  
위 원金基玉 인  
위 원李南昊 인

Development of Functional Cosmetic  
Ingredients from *Epilobium  
angustifolium*, *Chamaecyparis obusa*  
Seeds and *Sorbus alnifolia*

A Dissertation submitted to the graduate school of  
Jeju National University in partial fulfillment of  
the requirements for the degree of Doctor of  
Philosophy in Chemistry  
under the supervision of Nam Ho Lee

The dissertation for the degree of Doctor of Science  
by LIU BO SHI  
has been approved by the dissertation committee.

2023. 6.

Chair	<u>CHANG-GU HYUN</u>
Member	<u>Kyung - Sup Yoon</u>
Member	<u>Ji-Yeong Bae</u>
Member	<u>Grok Kim</u>
Member	<u>Nam Ho Lee</u>

## 목 차

List of Tables .....	ix
List of Figures .....	xiii
List of Abbreviations .....	xxiv
Abstract .....	xxvii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	10
1. 시약 및 기기 .....	10
2. 생리 활성 평가 .....	11
1) 항산화 .....	11
(1) 총 폴리페놀 함량 측정 .....	11
(2) 총 플라보노이드 함량 측정 .....	11
(3) DPPH radical 소거 활성 측정 .....	12
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 측정 .....	13
(5) 세포 보호 효과 .....	14
① HaCaT 세포 배양 .....	14
② 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 .....	14
2) 항균 .....	15
(1) 균주 배양 .....	15
(2) Paper disc diffusion method .....	15
(3) MIC (minimum inhibitory concentration) .....	16
(4) MBC (minimum bactericidal concentration) .....	16
3) 항염 .....	17
(1) RAW264.7 세포 배양 .....	17
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정 .....	17

(3) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정 .....	18
4) 미백 .....	19
(1) Tyrosinase 억제 활성 .....	19
(2) B16F10 melanoma 세포 배양 .....	19
(3) Melanogenesis 억제 활성 .....	20
(4) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	20
5) 세포독성 평가 (MTT assay) .....	21
3. 통계 처리 .....	21

### III. 연구 1 : 분홍바늘꽃 지상부 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성

성분 연구 .....	22
1. 재료 .....	22
2. 분홍바늘꽃 지방부의 추출, 분획 및 활성 성분 분리 .....	24
1) 시료의 추출 및 용매 분획 .....	24
2) <i>n</i> -Hexane 분획물의 활성 성분 분리 .....	25
3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리 .....	26
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	28
1) Compound 1, 2의 구조 동정 .....	28
2) Compound 3, 5, 7, 8의 구조 동정 .....	30
3) Compound 4, 6, 9의 구조 동정 .....	33
4) Compound 10의 구조 동정 .....	36
5) Compound 11, 12의 구조 동정 .....	38
6) Compound 13, 14, 15, 16의 구조 동정 .....	40
7) Compound 17의 구조 동정 .....	43
8) Compound 18의 구조 동정 .....	45
9) Compound 19, 20의 구조 동정 .....	47
10) Compound 21의 구조 동정 .....	49
4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	55
1) 항산화 .....	55

(1) 총 폴리페놀 함량 .....	55
(2) 총 플라보노이드 함량 .....	55
(3) DPPH radical 소거 활성 .....	57
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	58
2) 항균 .....	59
(1) Paper disc diffusion method .....	59
(2) MIC 및 MBC .....	62
3) 항염 .....	64
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	64
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 .....	66
4) 미백 .....	69
(1) Melanogenesis 억제 활성 .....	69
(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	71
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	72
1) 항산화 .....	72
(1) DPPH radical 소거 활성 .....	72
(2) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	73
2) 항염 .....	74
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	74
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 .....	75
3) 미백 .....	77
(1) Melanogenesis 억제 활성 .....	77
(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	78
6. 요약 및 결론 .....	79

#### IV. 연구 2 : 편백 종자 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성 성분

연구 .....	82
1. 재료 .....	82
2. 편백 종자의 추출, 분획 및 활성 성분 분리 .....	84

1) 시료의 추출 및 용매 분획 .....	84
2) <i>n</i> -Hexane 분획물의 활성 성분 분리 .....	85
3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리 .....	86
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	89
1) Compound 1, 2의 구조 동정 .....	89
2) Compound 3, 4, 5의 구조 동정 .....	91
3) Compound 6, 7의 구조 동정 .....	94
4) Compound 8, 9의 구조 동정 .....	97
5) Compound 10의 구조 동정 .....	100
6) Compound 11의 구조 동정 .....	102
7) Compound 12의 구조 동정 .....	108
8) Compound 13, 14의 구조 동정 .....	110
9) Compound 15의 구조 동정 .....	113
10) Compound 16, 17, 18, 19의 구조 동정 .....	118
11) Compound 20, 21, 22, 23의 구조 동정 .....	121
12) Compound 24의 구조 동정 .....	124
13) Compound 25의 구조 동정 .....	126
14) Compound 26, 27의 구조 동정 .....	128
15) Compound 28, 29의 구조 동정 .....	130
16) Compound 30, 31, 32의 구조 동정 .....	133
17) Compound 33의 구조 동정 .....	136
18) Compound 34, 35, 36, 37의 구조 동정 .....	138
19) Compound 38, 39의 구조 동정 .....	141
20) Compound 40, 41의 구조 동정 .....	143
4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	145
1) 항산화 .....	145
(1) 총 폴리페놀 함량 .....	145
(2) 총 플라보노이드 함량 .....	145
(3) DPPH radical 소거 활성 .....	147



(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	148
2) 항균 .....	149
(1) Paper disc diffusion method .....	149
(2) MIC 및 MBC .....	152
3) 항염 .....	154
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	154
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine (TNF-α) 생성 억제 활성 .....	157
4) 미백 .....	160
(1) Tyrosinase 억제 활성 .....	160
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	161
1) 항산화 .....	161
(1) DPPH radical 소거 활성 .....	161
(2) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	162
2) 항균 .....	163
(1) MIC 및 MBC .....	163
3) 항염 .....	165
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	165
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 .....	170
4) 미백 .....	174
(1) Tyrosinase 억제 활성 .....	174
6. 요약 및 결론 .....	175

## V. 연구 3 : 팔배나무 잎 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성 성분

연구 .....	179
1. 재료 .....	179
2. 팔배나무 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리 .....	180
1) 시료의 추출 및 용매 분획 .....	180
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리 .....	181
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	183

1) Compound 1, 2, 3, 4의 구조 동정 .....	183
2) Compound 5의 구조 동정 .....	187
3) Compound 6, 7, 8의 구조 동정 .....	189
4) Compound 9, 10, 11의 구조 동정 .....	192
5) Compound 12의 구조 동정 .....	195
4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	202
1) 항산화 .....	202
(1) 총 폴리페놀 함량 .....	202
(2) 총 플라보노이드 함량 .....	202
(3) DPPH radical 소거 활성 .....	204
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	205
(5) 세포 보호 효과 .....	206
① 세포 독성 평가 .....	206
② 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 .....	207
2) 항균 .....	211
(1) Paper disc diffusion method .....	211
(2) MIC 및 MBC .....	213
3) 항염 .....	215
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	215
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 .....	217
4) 미백 .....	219
(1) Melanogenesis 억제 활성 .....	219
(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	221
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	222
1) 항산화 .....	222
(1) DPPH radical 소거 활성 .....	222
(2) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	223
(3) 세포 보호 효과 .....	224
① 세포 독성 평가 .....	224

② 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	225
2) 항염	227
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	227
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	228
6. 요약 및 결론	230

## VI. 연구 4 : 팔배나무 가지 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성 성분

연구	233
1. 재료	233
2. 팔배나무 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	234
1) 시료의 추출 및 용매 분획	234
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	235
3. 분리된 화합물의 구조 분석	237
1) Compound 1, 2, 3, 4의 구조 동정	237
2) Compound 5, 6의 구조 동정	241
3) Compound 7의 구조 동정	244
4) Compound 8의 구조 동정	246
4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	248
1) 항산화	248
(1) 총 폴리페놀 함량	248
(2) 총 플라보노이드 함량	248
(3) DPPH radical 소거 활성	250
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성	251
(5) 세포 보호 효과	252
① 세포 독성 평가	252
② 과산화수소(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	253
2) 항균	255
(1) Paper disc diffusion method	255
(2) MIC 및 MBC	257

3) 항염 .....	259
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	259
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 .....	261
4) 미백 .....	265
(1) Melanogenesis 억제 활성 .....	265
(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	267
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	268
1) 항균 .....	268
(1) MIC 및 MBC .....	268
2) 항염 .....	269
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	269
(2) PGE <sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 .....	270
6. 요약 및 결론 .....	274
<b>VII. 최종 결론 및 고찰 .....</b>	<b>277</b>
<b>VIII. 참고문헌 .....</b>	<b>283</b>

## List of Tables

Table 1. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>1</b> and <b>2</b> .....	29
Table 2. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>3</b> , <b>5</b> , <b>7</b> and <b>8</b> .....	32
Table 3. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>4</b> , <b>6</b> and <b>9</b> .....	35
Table 4. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>10</b> .....	37
Table 5. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>11</b> and <b>12</b> .....	39
Table 6. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>13</b> , <b>14</b> , <b>15</b> and <b>16</b> .....	42
Table 7. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>17</b> .....	44
Table 8. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>18</b> .....	46
Table 9. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>19</b> and <b>20</b> .....	48
Table 10. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data and HMBC informations of compound <b>21</b> ..	50
Table 11. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	57
Table 12. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	58
Table 13. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from <i>E.</i> <i>angustifolium</i> L. aerial parts .....	61
Table 14. MIC and MBC values of <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts on <i>S.</i> <i>epidermidis</i> .....	63
Table 15. MIC and MBC values of <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts on <i>C.</i> <i>acnes</i> .....	63
Table 16. MIC and MBC values of <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts on <i>S.</i> <i>mutans</i> .....	63
Table 17. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities for compound <b>21</b> from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	72
Table 18. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities for compound <b>21</b> from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	73

Table 19. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>1</b> and <b>2</b> .....	90
Table 20. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>3</b> , <b>4</b> , and <b>5</b> .....	93
Table 21. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>6</b> and <b>7</b> .....	96
Table 22. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>8</b> and <b>9</b> .....	99
Table 23. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>10</b> .....	101
Table 24. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data and informations of HMBC of compound <b>11</b> .....	103
Table 25. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>12</b> .....	109
Table 26. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>13</b> and <b>14</b> .....	112
Table 27. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data and informations of HMBC of compound <b>15</b> .....	114
Table 28. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>16</b> , <b>17</b> , <b>18</b> and <b>19</b> .....	120
Table 29. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> and <b>23</b> .....	123
Table 30. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>24</b> .....	125
Table 31. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>25</b> .....	127
Table 32. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>26</b> and <b>27</b> .....	129
Table 33. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>28</b> and <b>29</b> .....	132
Table 34. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>30</b> , <b>31</b> and <b>32</b> .....	135
Table 35. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>33</b> .....	137
Table 36. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>34</b> , <b>35</b> , <b>36</b> and <b>37</b> .....	140
Table 37. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>38</b> and <b>39</b> .....	142
Table 38. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>40</b> and <b>41</b> .....	144
Table 39. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds .....	147
Table 40. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds .....	148
Table 41. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from <i>C.</i> <i>obusa</i> seeds .....	151
Table 42. MIC and MBC values of <i>C. obusa</i> seeds on <i>S. epidermidis</i> .....	153

Table 43. MIC and MBC values of <i>C. obusa</i> seeds on <i>C. acnes</i> .....	153
Table 44. MIC and MBC values of <i>C. obusa</i> seeds on <i>S. mutans</i> .....	153
Table 45. IC <sub>50</sub> values of tyrosinase inhibition activities for extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds .....	160
Table 46. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities for compounds <b>28-33</b> from <i>C. obusa</i> seeds .....	161
Table 47. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities for compounds <b>28-33</b> from <i>C. obusa</i> seeds .....	162
Table 48. MIC and MBC values of terpenoids compounds <b>3, 10, 11-24</b> from <i>C. obusa</i> seeds on <i>S. epidermidis</i> and <i>C. acnes</i> .....	164
Table 49. IC <sub>50</sub> values of NO production inhibitory activity of isolated compounds <b>11, 13-15, 17, 20, 22</b> from <i>C. obusa</i> seeds .....	166
Table 50. IC <sub>50</sub> values of tyrosinase inhibition activities for compounds <b>11-25</b> from <i>C. obusa</i> seeds .....	174
Table 51. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compounds <b>1, 2, 3</b> and <b>4</b> .....	186
Table 52. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>5</b> .....	188
Table 53. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compounds <b>6, 7</b> and <b>8</b> .....	191
Table 54. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compounds <b>9, 10</b> and <b>11</b> .....	194
Table 55. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data and informations of HMBC of compound <b>12</b> .....	197
Table 56. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	204
Table 57. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	205
Table 58. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from <i>S.</i> <i>alnifolia</i> leaves .....	212
Table 59. MIC and MBC values of <i>S. alnifolia</i> leaves on <i>S. epidermidis</i> .....	214
Table 60. MIC and MBC values of <i>S. alnifolia</i> leaves on <i>C. acnes</i> .....	214
Table 61. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities for compounds <b>9</b>	

-12 from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	222
Table 62. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities for compounds 9-12 from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	223
Table 63. IC <sub>50</sub> values of NO production inhibitory activity of isolated compounds 9-12 from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	227
Table 64. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compounds 1, 2, 3 and 4 .....	240
Table 65. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compounds 5 and 6 .....	243
Table 66. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound 7 .....	245
Table 67. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound 8 .....	247
Table 68. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches .....	250
Table 69. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches .....	251
Table 70. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from <i>S.</i> <i>alnifolia</i> branches .....	256
Table 71. MIC and MBC values of <i>S. alnifolia</i> branches on <i>S. epidermidis</i>	258
Table 72. MIC and MBC values of <i>S. alnifolia</i> branches on <i>C. acnes</i> .....	258
Table 73. MIC and MBC values of compounds 3 and 4 from <i>S. alnifolia</i> branches on <i>S. epidermidis</i> and on <i>C. acnes</i> .....	269



## List of Figures

Figure 1. Chemical structures of anti-oxidants .....	2
Figure 2. Inflammation mechanism in macrophage cell .....	4
Figure 3. Melanogenesis pathway .....	6
Figure 4. The formation mechanism of acne vulgaris .....	8
Figure 5. Pictures of <i>Epilobium angustifolium</i> L. aerial parts .....	23
Figure 6. Extraction and solvent fractionation of <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	24
Figure 7. Isolation of compounds from <i>n</i> -hexane fraction of <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	27
Figure 8. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	27
Figure 9. Chemical structure of compounds <b>1</b> and <b>2</b> .....	28
Figure 10. Chemical structure of compounds <b>3</b> , <b>5</b> , <b>7</b> and <b>8</b> .....	31
Figure 11. Chemical structure of compounds <b>4</b> , <b>6</b> and <b>9</b> .....	34
Figure 12. Chemical structure of compound <b>10</b> .....	36
Figure 13. Chemical structure of compounds <b>11</b> and <b>12</b> .....	38
Figure 14. Chemical structure of compounds <b>13</b> , <b>14</b> , <b>15</b> and <b>16</b> .....	41
Figure 15. Chemical structure of compound <b>17</b> .....	43
Figure 16. Chemical structure of compound <b>18</b> .....	45
Figure 17. Chemical structure of compounds <b>19</b> and <b>20</b> .....	47
Figure 18. Chemical structure of compound <b>21</b> .....	50
Figure 19. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>21</b> .....	51
Figure 20. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>21</b> .....	51
Figure 21. DEPT-135° spectrum of compound <b>21</b> .....	52
Figure 22. <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spectrum of compound <b>21</b> .....	52
Figure 23. HMQC spectrum of compound <b>21</b> .....	53

Figure 24. HMBC spectrum of compound <b>21</b> .....	53
Figure 25. HR-ESI-MS spectrum of compound <b>21</b> .....	54
Figure 26. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	56
Figure 27. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	56
Figure 28. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	57
Figure 29. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	58
Figure 30. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on <i>S. epidermidis</i> , <i>C. acnes</i> and <i>S. mutans</i> .....	60
Figure 31. Effects of extract and solvent fractions from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on NO production and cell viability in LPS- induced RAW264.7 cells. ....	64
Figure 32. Effect of <i>n</i> -Hex and EtOAc fraction from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on NO production and cell viability in LPS- induced RAW264.7 cells .....	65
Figure 33. Effect of <i>n</i> -Hex fraction from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	67
Figure 34. Effect of EtOAc fraction from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	68
Figure 35. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	69
Figure 36. Melanin contents and cell viability of <i>n</i> -Hex and EtOAc	

fractions of aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	70
Figure 37. Intracellular tyrosinase inhibitory activity of <i>n</i> -Hex and EtOAc fractions of aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	71
Figure 38. DPPH radical scavenging activities of compound <b>21</b> isolated from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	72
Figure 39. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of compound <b>21</b> isolated from <i>E. angustifolium</i> L. aerial parts .....	73
Figure 40. Effects of isolated compound <b>21</b> from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. ....	74
Figure 41. Effects of isolated compound <b>21</b> from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	76
Figure 42. Melanin contents and cell viability of isolated compound <b>21</b> from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	77
Figure 43. Intracellular tyrosinase inhibitory activity of isolated compound <b>21</b> from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	78
Figure 44. Pictures of <i>Chamaecyparis obusa</i> seeds .....	83
Figure 45. Extraction and solvent fractionation of <i>C. obusa</i> seeds .....	84
Figure 46. Isolation of compounds from <i>n</i> -hexane fraction of <i>Chamaecyparis obusa</i> seeds .....	87
Figure 47. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of <i>Chamaecyparis obusa</i> seeds .....	88
Figure 48. Chemical structure of compounds <b>1</b> and <b>2</b> .....	90
Figure 49. Chemical structure of compounds <b>3</b> , <b>4</b> and <b>5</b> .....	92

Figure 50. Chemical structure of compounds <b>6</b> and <b>7</b> .....	95
Figure 51. Chemical structure of compounds <b>8</b> and <b>9</b> .....	98
Figure 52. Chemical structure of compound <b>10</b> .....	100
Figure 53. Chemical structure of compound <b>11</b> .....	103
Figure 54. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>11</b> .....	104
Figure 55. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>11</b> .....	104
Figure 56. DEPT-135° spectrum of compound <b>11</b> .....	105
Figure 57. <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spectrum of compound <b>11</b> .....	105
Figure 58. HMQC spectrum of compound <b>11</b> .....	106
Figure 59. HMBC spectrum of compound <b>11</b> .....	106
Figure 60. NOESY spectrum of compound <b>11</b> .....	107
Figure 61. HR-ESI-MS spectrum of compound <b>11</b> .....	107
Figure 62. Chemical structure of compound <b>12</b> .....	108
Figure 63. Chemical structure of compounds <b>13</b> and <b>14</b> .....	111
Figure 64. Chemical structure of compound <b>15</b> .....	114
Figure 65. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>15</b> .....	115
Figure 66. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>15</b> .....	115
Figure 67. DEPT-135° spectrum of compound <b>15</b> .....	116
Figure 68. COSY spectrum of compound <b>15</b> .....	116
Figure 69. HMQC spectrum of compound <b>15</b> .....	117
Figure 70. HMBC spectrum of compound <b>15</b> .....	117
Figure 71. Chemical structure of compounds <b>16</b> , <b>17</b> , <b>18</b> and <b>19</b> .....	119
Figure 72. Chemical structure of compounds <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> and <b>23</b> .....	122
Figure 73. Chemical structure of compound <b>24</b> .....	124
Figure 74. Chemical structure of compound <b>25</b> .....	126
Figure 75. Chemical structure of compounds <b>26</b> and <b>27</b> .....	128
Figure 76. Chemical structure of compounds <b>28</b> and <b>29</b> .....	131
Figure 77. Chemical structure of compounds <b>30</b> , <b>31</b> and <b>32</b> .....	134
Figure 78. Chemical structure of compound <b>33</b> .....	136

Figure 79. Chemical structure of compounds <b>34</b> , <b>35</b> , <b>36</b> and <b>37</b> .....	139
Figure 80. Chemical structure of compounds <b>38</b> and <b>39</b> .....	141
Figure 81. Chemical structure of compounds <b>40</b> and <b>41</b> .....	143
Figure 82. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds .....	146
Figure 83. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds .....	146
Figure 84. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds .....	147
Figure 85. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds .....	148
Figure 86. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of <i>C. obusa</i> seeds on <i>S. epidermidis</i> , <i>C. acnes</i> and <i>S. mutans</i> . .....	150
Figure 87. Effects of extract and solvent fractions from <i>C. obusa</i> seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	154
Figure 88. Effect of Extract, <i>n</i> -Hex and EtOAc fractions from <i>C. obusa</i> seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	156
Figure 89. Effects of Extract from <i>C. obusa</i> seeds on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	157
Figure 90. Effects of <i>n</i> -Hex from <i>C. obusa</i> seeds on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL- 1 $\beta$ production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells .....	158
Figure 91. Effects of EtOAc from <i>C. obusa</i> seeds on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL- 1 $\beta$ production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells .....	159

Figure 92. Tyrosinase inhibition activities of extract and solvent layers from <i>C. obusa</i> seeds .....	160
Figure 93. DPPH radical scavenging activities of compounds <b>28-33</b> from <i>C. obusa</i> seeds .....	161
Figure 94. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of compounds <b>28-33</b> from <i>C. obusa</i> seeds .....	162
Figure 95. Effect of isolated compounds <b>2-3, 10-23, 25</b> from <i>C. obusa</i> seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	165
Figure 96. Effect of isolated compounds <b>11, 13-15, 17, 20, 22</b> from <i>C. obusa</i> seeds on NO production and cell viability in LPS- induced RAW264.7 cells .....	166
Figure 97. Effect of isolated compounds <b>11, 14</b> from <i>C. obusa</i> seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	167
Figure 98. Effect of isolated compounds <b>28-33</b> from <i>C. obusa</i> seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	168
Figure 99. Effect of isolated compounds <b>29, 32</b> from <i>C. obusa</i> seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	169
Figure 100. Effects of isolated compound <b>11</b> from <i>C. obusa</i> seeds on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	170
Figure 101. Effects of isolated compound <b>14</b> from <i>C. obusa</i> seeds on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	171
Figure 102. Effects of isolated compound <b>29</b> from <i>C. obusa</i> seeds on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6 production in LPS-stimulated	

RAW 264.7 cells .....	172
Figure 103. Effects of isolated compound <b>32</b> from <i>C. obusa</i> seeds on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	173
Figure 104. Tyrosinase inhibition activities of terpenoids compounds <b>11-25</b> from <i>C. obusa</i> seeds .....	174
Figure 105. Picture of <i>Sorbus alnifolia</i> (Sieb. et Zucc.) K. Koch leaves ..	179
Figure 106. Extraction and solvent fractionation of <i>S. alnifolia</i> leaves .....	180
Figure 107. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of <i>S.</i> <i>alnifolia</i> leaves .....	182
Figure 108. Chemical structure of compounds <b>1, 2, 3</b> and <b>4</b> .....	185
Figure 109. Chemical structure of compound <b>5</b> .....	187
Figure 110. Chemical structure of compounds <b>6, 7</b> and <b>8</b> .....	190
Figure 111. Chemical structure of compounds <b>9, 10</b> and <b>11</b> .....	193
Figure 112. Chemical structure of compound <b>12</b> .....	196
Figure 113. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>12</b> .....	198
Figure 114. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>12</b> .....	198
Figure 115. DEPT-135° spectrum of compound <b>12</b> .....	199
Figure 116. <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spectrum of compound <b>12</b> .....	199
Figure 117. HMQC spectrum of compound <b>12</b> .....	200
Figure 118. HMBC spectrum of compound <b>12</b> .....	200
Figure 119. HR-ESI-MS spectrum of compound <b>12</b> .....	201
Figure 120. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	203
Figure 121. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	203
Figure 122. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	204
Figure 123. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent	

fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	205
Figure 124. Cell viability of extract and solvent fractions from <i>S.</i> <i>alnifolia</i> leaves in HaCaT cells .....	206
Figure 125. Cell protective effects extract and solvent fractions from <i>S.</i> <i>alnifolia</i> leaves on HaCaT cells damaged by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	208
Figure 126. Cell viability of extract and EtOAc and <i>n</i> -BuOH fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves in HaCaT cells .....	209
Figure 127. Cell protective effects of extract and EtOAc fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves on HaCaT cells damaged by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	210
Figure 128. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves on <i>S. epidermidis</i> and <i>C. acnes</i> .....	211
Figure 129. Effects of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells .....	215
Figure 130. Effects of <i>n</i> -Hex and EtOAc fraction <i>S. alnifolia</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	216
Figure 131. Effect of <i>n</i> -Hex fraction from aerial parts of <i>E. angustifolium</i> L. on PGE <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ production in LPS-induced, RAW264.7 cells .....	217
Figure 132. Effect of EtOAc fraction from <i>S. alnifolia</i> leaves on PGE <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	218
Figure 133. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of <i>S. alnifolia</i> leaves in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	219
Figure 134. Melanin contents and cell viability of <i>n</i> -BuOH fractions of <i>S. alnifolia</i> leaves in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	220



Figure 135. Intracellular tyrosinase inhibitory activity of <i>n</i> -BuOH fraction of <i>S. alnifolia</i> leaves in $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells .....	221
Figure 136. DPPH radical scavenging activities of compounds <b>9-12</b> from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	222
Figure 137. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of compounds <b>9-12</b> from <i>S. alnifolia</i> leaves .....	223
Figure 138. Cell viability of isolated compounds <b>9-12</b> from <i>S. alnifolia</i> leaves in HaCaT cells .....	224
Figure 139. Cell protective effects of isolated compounds <b>10-12</b> from <i>S. alnifolia</i> leaves on HaCaT cells damaged by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	226
Figure 140. Effects of isolated compounds <b>9, 10, 11, 12</b> from <i>S. alnifolia</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. ....	227
Figure 141. Effects of isolated compound <b>11</b> from <i>S. alnifolia</i> leaves on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	228
Figure 142. Effects of isolated compound <b>12</b> from <i>S. alnifolia</i> leaves on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	229
Figure 143. Pictures of <i>Sorbus alnifolia</i> branches .....	233
Figure 144. Extraction and solvent fractionation of <i>S. alnifolia</i> branches ·	234
Figure 145. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of <i>S. alnifolia</i> branches .....	236
Figure 146. Chemical structure of compounds <b>1, 2, 3</b> and <b>4</b> .....	239
Figure 147. Chemical structure of compounds <b>5</b> and <b>6</b> .....	242
Figure 148. Chemical structure of compound <b>7</b> .....	244
Figure 149. Chemical structure of compound <b>8</b> .....	246
Figure 150. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions	

from <i>S. alnifolia</i> branches .....	249
Figure 151. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches .....	249
Figure 152. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches .....	250
Figure 153. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches .....	251
Figure 154. Cell viability of extract and solvent fractions from <i>S.</i> <i>alnifolia</i> branches in HaCaT cells .....	252
Figure 155. Cell protective effects extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches on HaCaT cells damaged by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	254
Figure 156. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches on <i>S. epidermidis</i> and <i>C. acnes</i> .....	255
Figure 157. Effects of extract and solvent fractions from <i>S. alnifolia</i> branches on NO production and cell viability in LPS- stimulated RAW264.7 cells .....	260
Figure 158. Effects of Extract, <i>n</i> -Hex and EtOAc fraction <i>S. alnifolia</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells .....	261
Figure 159. Effects of extract from <i>S. alnifolia</i> branches on PGE <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells .....	262
Figure 160. Effect of <i>n</i> -Hex fraction from <i>S. alnifolia</i> branches on PGE <sub>2</sub> production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	263
Figure 161. Effect of EtOAc fraction from <i>S. alnifolia</i> leaves on PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ production in LPS-induced RAW264.7 cells .....	264
Figure 162. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of <i>S. alnifolia</i> branches in $\alpha$ -MSH induced B16F10	



## List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BHT	Butylhydroxytoluene
brs	Broad singlet
CC	Column chromatography
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform- <i>d</i>
CD <sub>3</sub> OD	Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>
COSY	Correlation spectroscopy
COX-2	Cyclo oxygenase-2
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
dt	Doublet of triplet
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	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HR-ESI-MS	High resolution-electron spray ionization-mass spectrometry

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
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
L-DOPA	Levodopa
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
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>
ppm	Parts per million
ROS	Reactive oxygen species
s	Singlet
SC <sub>50</sub>	Scavenging concentration of 50%
sept	Septet
q	Quartet
QE	Quercetin equivalent
t	Triplet
TLC	Thin layer chromatography
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TSB	Tryptic soy broth

tq	Triplet of quartet
TRP-1	Tyrosinase related protein-1
TRP-2	Tyrosinase related protein-2
V	VLC subfraction
VLC	Vacuum liquid chromatography
2D	Two-dimensional
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone

Development of Functional Cosmetic Ingredients from  
*Epilobium angustifolium*, *Chamaecyparis obusa* Seeds and  
*Sorbus alnifolia*

LIU BO SHI

Department of Chemistry  
The Graduate School  
Jeju National University

Abstract

In this study, we investigated anti-oxidative, anti-bacterial, anti-inflammatory and whitening constituents from aerial parts of *Epilobium angustifolium* L., seeds of *Chamaecyparis obusa* (Siebold. et Zucc.) Endl., leaves and branches of *Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch.

Dried plant samples were extracted with 70% or 50% aqueous ethanol, and crude extracts were subjected to solvent fractionation according to polarity. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR and HR-ESI-MS spectra, as well as comparison of the data to the literature values.

Twenty one constituents were isolated from the extract of *Epilobium angustifolium* L. aerial parts; *n*-dodecane (1), lauric acid (2), ethyl oleate (3), 1-monoolein (4), linoleic acid (5), coriolic acid (6), ethyl linolenate (7),  $\alpha$ -linolenic acid (8), 1-linolenoyl glycerol (9), 15-isopimaren-3 $\beta$ ,8 $\beta$ -diol (10),  $\alpha$ -amyrin (11),  $\beta$ -amyrin (12), ursolic acid (13), oleanolic acid (14), maslinic acid (15), corosolic acid (16),  $\beta$ -sitosterol (17), 5-desmethylinensetin (18), *p*-coumaric acid (19), caffeic acid (20),

(*S*)-danshensu caffeic anhydride (**21**). As far as we know compound **21** was identified as a novel compound found in nature.

Upon the anti-oxidative studies by DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals, potent radical scavenging activities were observed in *n*-butanol (BuOH) fraction and extract. The extract, *n*-hexane (Hex) and ethyl acetate (EtOAc) fractions showed anti-bacterial activities against *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* and *Cutibacterium acnes*. Also, in the anti-inflammatory tests using RAW264.7 mouse macrophages, the *n*-Hex and EtOAc fractions inhibited the production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. In addition, the *n*-Hex and EtOAc fractions reduced production of prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> and pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6 and IL-1 $\beta$ ). In the whitening tests using B16F10 melanoma cells, the *n*-Hex and EtOAc fractions concentration-dependently inhibited cellular melanogenesis and intracellular tyrosinase activity without causing cell toxicity. Moreover, isolated compound **21** from EtOAc fraction showed potent free radical scavenging activities, excellent anti-inflammatory activities, and anti-melanogenesis inhibition effects.

Forty one constituents were isolated from the extract of *Chamaecyparis obusa* (Siebold. et Zucc.) Endl. seeds; (*R*)-*p*-menth-1-en-4,7-diol (**1**), (1*R*,2*R*,4*R*)-*p*-menthane-1,2,4-triol (**2**),  $\alpha$ -eudesmol (**3**),  $\gamma$ -eudesmol (**4**),  $\beta$ -eudesmol (**5**), oplodiol (**6**), 4-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol (**7**), *ent*-4(15)-eudesmen-1 $\alpha$ ,11-diol (**8**), 3-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol (**9**), hinokiic acid (**10**), 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione (**11**), 12-methoxy-8,11,3-abietatriene-7 $\beta$ ,11-diol-3-one (**12**), hinokione (**13**), 1,2-dehydrohinokione (**14**), 1 $\alpha$ -3 $\beta$ -dihydroxytatarol (**15**), hinokiol (**16**), isohinokiol (**17**), sugiol (**18**), ferruginol (**19**), cryptojaponol (**20**), 7 $\alpha$ ,11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene (**21**), 7 $\beta$ -hydroxydeoxocryptojaponol (**22**), 6,7-dehydrodeoxocryptojaponol (**23**), *trans*-communic acid (**24**), chamaecydin (**25**),  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester (**26**),  $\alpha$ -linolenic acid (**27**), deoxypodophyllotoxin (**28**), yatein (**29**),



hinokinin (30), savinin (31), haplomyrfofin (32), sesamin (33), aromadendrin (34), taxifolin (35), taxifolin-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (36), taxifolin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (37), apigenin (38), scutellarein (39), quercetin (40), quercitrin (41). As far as we know the compound 11 was identified as a novel compound found in nature.

Upon the anti-oxidative studies by DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals, potent radical scavenging activities were observed in extract, EtOAc, *n*-BuOH fractions and isolated compound 32. The extract, *n*-Hex and EtOAc fractions showed anti-bacterial activities against *S. epidermidis*, *S. mutans* and *C. acnes*. Also, in the anti-inflammatory tests using RAW264.7 mouse macrophages, the extract and *n*-Hex, EtOAc fractions inhibited the production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. In addition, the extract, *n*-Hex and EtOAc fractions reduced production of pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$ . In the whitening tests using mushroom tyrosinase, the *n*-Hex, EtOAc fractions and isolated compounds 18, 19, 21, 24 concentration-dependently inhibited tyrosinase activity. On the other hand, among the isolates, compounds 3, 10-15, 19, 21, 22, 24 showed potent anti-bacterial activities against *S. epidermidis* and *C. acnes*. Also, isolated compounds 11, 13-15, 17, 20, 22, 29, 32 showed strong anti-inflammatory activities.

Twelve phytochemicals were isolated from the extract of *Sorbus alnifolia* leaves; ursolic acid (1), oleanolic acid (2),  $\alpha$ -amyrin (3), corosolic acid (4), (*E*)-phytol (5),  $\alpha$ -linolenic acid (6),  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester (7), 1-linolenoyl glycerol (8), afzelin (9), kaempferitrin (10), kaempferol 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (11), kaempferol 3-*O*-[deoxy-*ribo*-hexos-3-ulosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (12). As far as we know, the compound 12 was identified as a novel compound found in nature.

On the anti-oxidative tests, the EtOAc, *n*-BuOH fractions and isolated compounds 9, 10, 11, 12 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 compounds **10–12** indicated protective effects against oxidative stress. Upon the anti-bacterial tests using *S. epidermidis* and *C. acnes* the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-BuOH fractions showed activities. In the anti-inflammatory tests using RAW264.7 cells, the *n*-Hex, EtOAc fraction, isolates **11** and **12** inhibited the production of NO without causing cell toxicity. Moreover, the compounds **11** and **12** exhibited the PGE<sub>2</sub> and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) inhibition activity.

Eight phytochemicals were isolated from the extract of *Sorbus alnifolia* branches;  $\beta$ -amyrin (**1**), ursolic acid (**2**), 2-oxopomolic acid (**3**), euscaphic acid (**4**),  $\beta$ -sitosterol (**5**), daucosterol (**6**), *epi*-catechin (**7**), prunasin (**8**).

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 EtOAc and *n*-BuOH fractions indicated protective effects against oxidative stress. Upon the anti-bacterial tests using *S. epidermidis* and *C. acnes* the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-BuOH fractions and isolated compounds **3**, **4** showed anti-bacterial activities. In the anti-inflammatory tests using RAW264.7 cells, the extract, *n*-Hex and EtOAc fractions, as well as isolates **3** and **4** inhibited the production of NO without causing cell toxicity. Moreover, the compound **3** exhibited PGE<sub>2</sub> and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) inhibition activity and compound **4** only decreased production of (TNF- $\alpha$ , IL-6).

Based on these results, it was suggested that the extract and isolated compounds from aerial parts of *Epilobium angustifolium* L., *Chamaecyparis obusa* seeds, *Sorbus alnifolia* leaves and branches could be potentially applicable as natural source for pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

## I. 서론

최근 화장품 산업에서 피부 미백에 도움을 주는 제품이나 주름개선에 도움을 주는 제품 또는 여드름 완화에 도움을 주는 등 특정 기능이 강조된 기능성 화장품 산업이 크게 성장하고 있다.<sup>1</sup> 이에 따라 식물 등 천연물로부터 얻어지는 기능성 물질들을 원료로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>2</sup> 기능성 화장품은 화장품과 의약품의 중간적인 성격을 갖는 제품이라 볼 수 있으며 이들을 일컫는 표현으로 화장품(cosmetics)과 의약 (pharmaceuticals)의 합성어에 해당하는 코스메슈티컬(cosmeceuticals)이란 용어가 사용되고 있다. 일반 화장품이 안전성을 강조한 제품임에 비해 기능성 화장품은 안전성 외에 특히 효능·효과를 강조한 제품이다. 최근에는 천연 유래 원료를 사용한 보습과 피부 안전성 위주의 단순한 기능의 천연 화장품에 만족하지 않고 주름개선, 미백 등의 기능을 갖춘 기능성 천연 화장품을 원하는 소비자들이 늘어나는 추세이다.<sup>3</sup>

### 1. 천연물

최근 천연물을 중심으로 한 학문이 발전하면서 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성 물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 생리활성 물질은 매우 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치의 물질로서 수많은 종류가 인류에게 유용하게 이용되고 있으며, 새로운 물질들에 대한 연구개발이 지속적으로 이루어지고 있다.<sup>4</sup> 이러한 식물유래 유효성분에는 플라보노이드, 폴리페놀, 알칼로이드, 터페노이드 등 다양한 성분들이 존재하며 이들 성분은 인체 내로 흡수되어 항산화, 항염, 항암, 피부진정 등의 효능을 나타낸다. 천연물 유래 소재의 경우 화학공정이 배제되고 피부친화력이 강하기 때문에 안전하고 자연 친화적인 제품으로 인식되어 화장품 개발에 새로운 트렌드가 되고 있다.<sup>5</sup>

기능성 화장품은 넓은 의미에서 주로 피부의 노화 억제, 미백, 자외선 차단 등의 효과를 갖는 제품을 의미하며, 정상인의 건강한 피부 상태를 유지시켜 피부의 이상 및 노화를 지연시키는 데 도움을 주는 화장품을 말한다.<sup>6</sup>

## 2. 항산화

피부 노화는 내인성과 외인성 노화의 두 가지 유형으로 나눌 수 있다. 내인성 노화는 인간의 지속적인 성장과 연령의 점진적인 증가에 따른 자연적 및 유전적 요인에 의한 노화를 말하며, 외인성 노화는 자외선 및 외부 자극 환경의 지속적인 노출로 인해 유발되며, 이러한 외부요인에 의한 노화는 피부 노화에 큰 영향을 미친다.<sup>3</sup> 외인성 노화의 요인인 각종 스트레스, 자외선 조사, 환경오염 물질, 체내 대사작용 등은 인체 내 프리 라디칼 생성을 촉진시키지만 체내 방어 시스템인 항산화 물질과 항산화 효소에 의해 제거된다. 그러나 체내 보호막이 파괴되면서 잔류한 프리 라디칼은 노화를 촉진할 뿐만 아니라 생체 조직에 손상을 줄 수 있다.<sup>7</sup> Nitric oxide, superoxide radical, nitrogen dioxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, alkoxyl radical 등과 같은 활성산소종들은 인간의 대사과정에서 발생하는 물질이지만 인체 내 세포에 손상을 유발하여 노화와 관련된 질병의 주요 인자로 작용하고 있다.<sup>8</sup> 체내 활성산소는 catalase, superoxide dismutase 등과 같은 항산화제에 의해 억제되어 활성산소로 인한 질병을 예방할 수 있다. 프리 라디칼을 억제할 수 있는 외부 천연 항산화제로는 ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol 등이 있다.<sup>9</sup> 또한 대표적으로 많이 쓰이는 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)은 경제적이고 효과가 우수하다는 장점이 있지만, 안전성에 대한 논란이 있어 현재는 사용량이 감소하는 추세이며, 이로 인해 천연물 유래 항산화제에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있는 실정이다.<sup>10</sup>

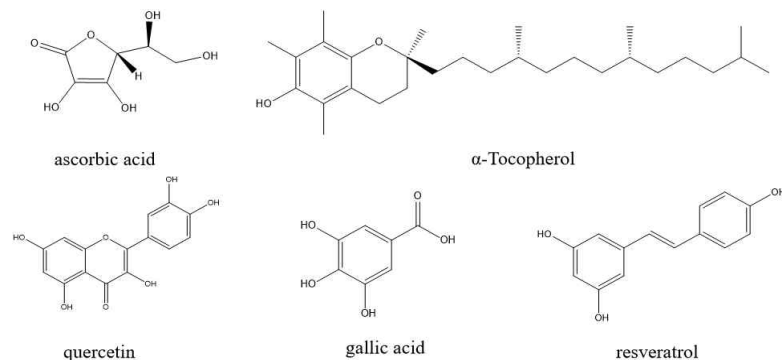


Figure 1. Chemical structures of anti-oxidants.

### 3. 항염

염증반응은 생체 내에 외부 유해 물질이 유입되었을 때 발생하는 조직 손상을 국소화하여 몸을 보호하려는 방어기전이다. 관련 세포로는 대식세포가 있으며, 대식세포는 항상성, 면역 조절, 염증성 질환과 관련된 주요 면역 세포이다.<sup>11</sup> 대식세포막에 존재하는 toll-like receptor 4 (TLR4)는 그람 음성 세균의 외막의 내독소 성분인 LPS를 인식하여 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38를 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호 전달 경로를 유발한다.<sup>12</sup> MAPKs는 세포의 증식, 분화, 염증, 세포 사멸 등 다양한 세포 내 생물학적 반응을 조절한다.<sup>13</sup> MEK/ERK 신호 전달 경로 중 ERK kinase는 MAPKs를 활성화하고, ERK는 핵으로 전위되어 전사 인자를 인산화하여 활성을 조절한다.<sup>14</sup> 활성화된 대식세포는 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 와 같은 염증 매개 물질을 생성하여 염증반응을 촉진시킨다.<sup>15</sup>

그람-음성균(gram-negative bacteria)의 세포 외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포 외막으로부터 방출되어 패혈증과 패혈증성 쇼크를 일으킨다. LPS는 RAW264.7과 같은 단핵 식세포(macrophage 또는 monocyte)로부터 다양한 염증 반응 인자로 알려진 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ 와 같은 염증 전구 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>16,17</sup> 특히 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 iNOS의 발현을 유도한다. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 산화질소 (nitric oxide, NO)를 생성한다.<sup>18</sup> 일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 과도한 NO 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.<sup>19</sup>

COX는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다.<sup>20</sup> COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 PGs의 합성 등 정상적인 생체기능에

작용하며, COX-2는 동물이나 인간의 염증 반응 부위에서 발견된다. COX-2에 의한 PGs의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있으며, 염증매개물질인 PGE<sub>2</sub>를 형성시킨다. PGE<sub>2</sub>는 염증반응, 면역반응 및 혈관형성(angio genesis) 촉진 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>21,22</sup>

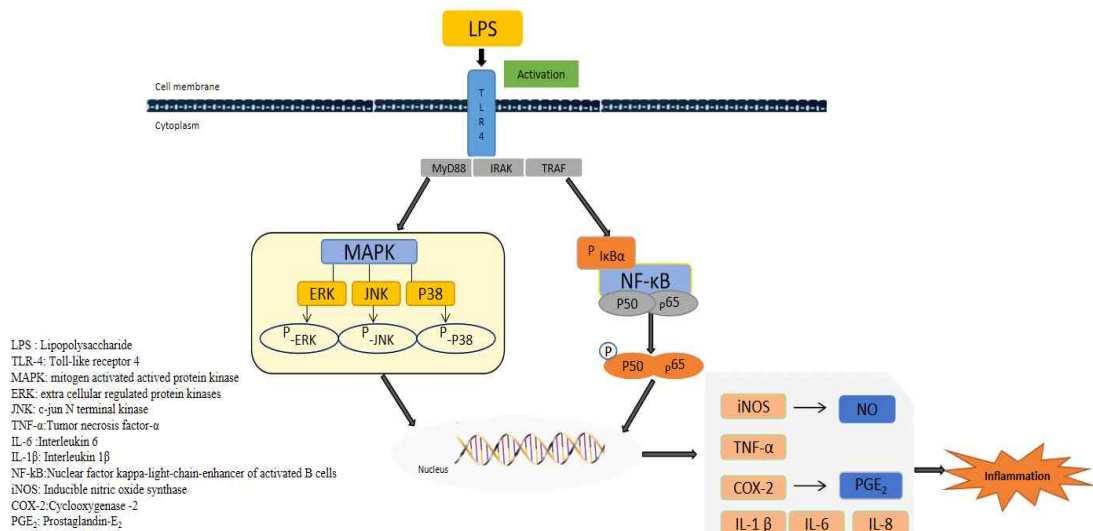


Figure 2. Inflammation mechanism in macrophage cell.

#### 4. 미백

멜라닌(melanin)은 표피에 존재하는 멜라닌세포(melanocytes) 내의 멜라노솜(melanosome)에서 생성된 후, 멜라닌세포의 수지상 돌기(dendrite)를 통해 각질세포(keratinocytes)로 전달되어, 피부 각질층으로 이동하게 된다. 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 중요한 인자로, 자외선을 흡수하거나, 자외선에 의해 발생하는 자유 라디칼(free radical)을 소거함으로써, 피부를 자외선으로부터 보호하는 중요한 방어 시스템의 하나이다.<sup>23,24</sup> 멜라닌은 멜라노솜 내에 있는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등의 여러 가지 효소의 복합 작용에 의해 생성된다. 특히, tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도 조절 단계(rate-limiting step)인 타이로신(tyrosine)이 도파 (3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)로 hydroxylation된 후, 다시 도파퀴논(dopaquinone)으로 산화되는 과정에 작용하는 주요 조절 효소이다.<sup>25-28</sup>

그러나 외부자극에 의하여 과발현된 멜라닌은 기미, 주근깨를 형성하며 나아가 병변으로 발달되어 흑색종으로 발달되기도 한다. 이러한 멜라닌의 과발현을 억제하고 미백효과를 얻기 위해서는 멜라닌합성 효소의 발현을 저해시켜야 한다. 따라서 화장품산업에서는 멜라닌 합성 관련 효소들을 저해하는 원료를 찾기 위하여 천연물을 이용한 미백물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.<sup>1</sup>

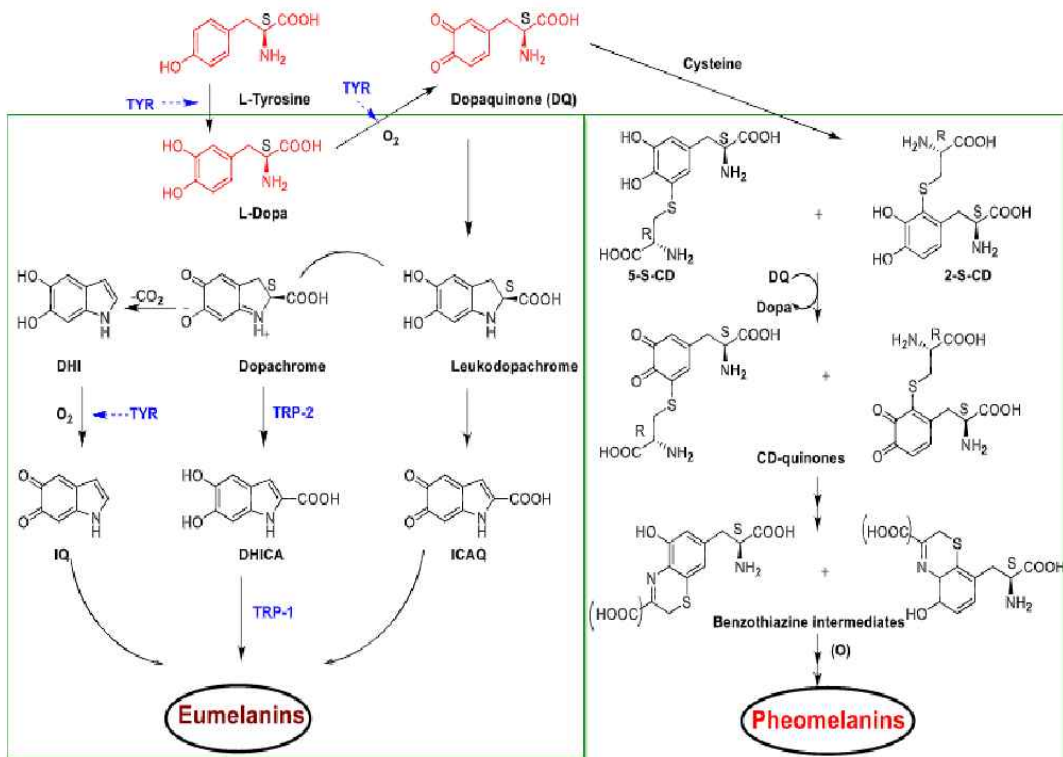


Figure 3. Melanogenesis pathway.



## 5. 여드름

최근 환경오염, 약물 남용, 스트레스 등의 증가로 여드름이 발생하는 연령층이 청소년부터 성인까지 다양하게 퍼져 있으며 심한 여드름은 유전에 기인하는 경우도 많아졌다.<sup>29</sup> 여드름은 면포, 구진, 낭종, 결절, 색소 침착 등 다양한 피부병변으로 얼굴, 등, 가슴에 호발하는 모낭 피지선의 만성 염증 질환이다. 여드름의 발생시기는 사춘기부터 성인기까지 발생 연령대가 다양해지고 있다. 여드름의 중증도가 심해질 경우 수치심, 우울증, 대인기피증, 자신감 저하를 유발하고, 삶의 질을 낮추는 등 생활에 미치는 영향을 간과할 수 없다.<sup>30</sup>

여드름의 발생 기전은 비정상적인 모낭 각화, 피지분비의 증가, 그리고 피지선 내의 *Cutibacterium acne* (*C. acne*)의 증식 및 이에 의한 염증 반응이 대표적인 원인으로 알려져 있다.<sup>31</sup> *C. acne*는 염증성 여드름 형성의 주요 원인으로, 과잉 생성된 피지에 colony를 형성하고, lipase를 분비하여 모낭 피지선에서 중성지방을 지방산으로 분해하는 과정을 통해 염증 반응을 일으킨다. 동시에 leukocyte chemotatic factors를 분비하여 leukocyte를 모낭 피지선으로 유도해 모낭 세포 파괴 및 염증 반응을 일으킨다.<sup>32</sup> 한편, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)와 같은 다른 세균들이 모낭주위에서 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 하기도 한다.<sup>33</sup>

여드름 치료에는 피지 생성을 억제하는 항안드로겐제를 비롯한 스테로이드제, 항생제 및 레티노익산의 비타민 A 유도체를 이용한 방법, benzoyl peroxide, clindamycin, azelaic acid 및 sodium sulfacetamide 등이 사용되고 있으며 이러한 치료제들은 과민반응 등의 부작용이 나타나는 것으로 보고되고 있다.<sup>34</sup> 여드름은 난포벽의 과열 유무에 의해 비화농성과 화농성으로 나뉜다. 비화농성은 가벼운 면포(comedo)인 black head와 white head로 나눌 수 있으며, 화농성은 papule, pustule, nodule, cyst로 나눌 수 있다.<sup>35</sup> 현재 여드름 치료는 항생제를 사용하여 모공 내 과각화된 각질을 제거하거나 피지선의 활동 및 염증 반응을 줄이는데 중점을 두고 있다. 그러나 여드름에 사용되는 항생제는 단기간 사용 시 염증을 해결할 수 있지만 장기간 사용 시 피부착색, 면역력 저하, 여드름균에 대한 내성이 생기는

등의 부작용이 발생하는 한계가 있다.<sup>36</sup> 최근에 많은 사람들이 건강에 더욱 관심이 높아져 동서양을 막론하고 항생제를 사용하지 않는 다양한 치료법이 각광을 받고 있으며,<sup>37</sup> 여러 식물 추출물에서 부작용은 없으면서 항균 작용이 강한 물질을 찾아서 과학적으로 여드름의 치료효과를 입증하기 위한 연구들이 진행되고 있다.<sup>38</sup>

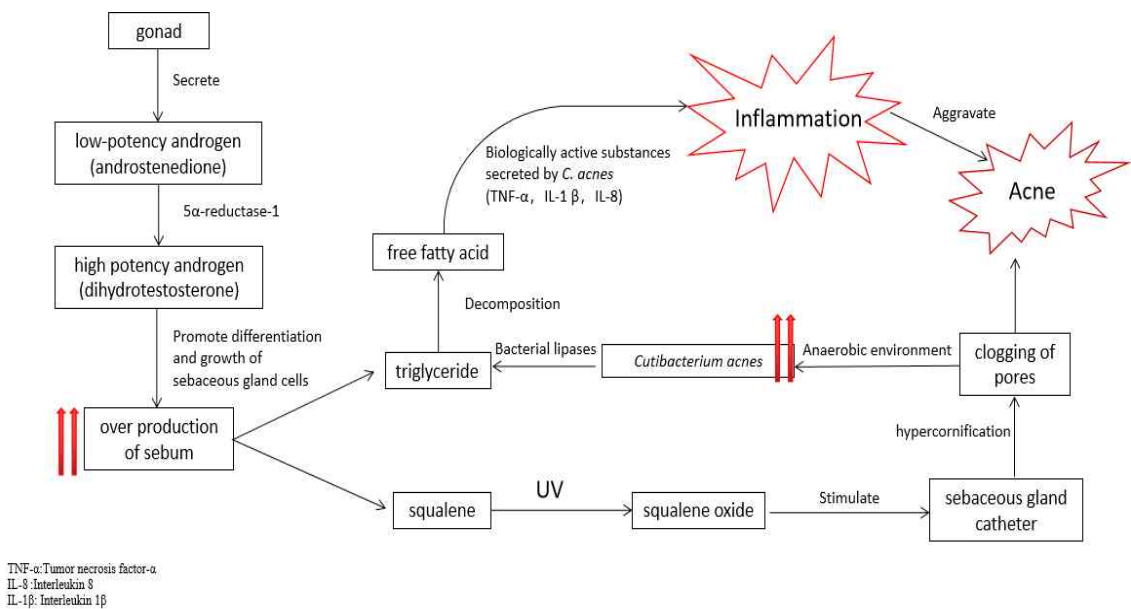


Figure 4. The formation mechanism of acne vulgaris.

현대인들은 생활수준이 높아지고 삶이 윤택해짐에 따라 건강한 피부 유지를 위해 천연소재를 활용한 기능성 화장품에 대한 관심과 수요가 높아지고 있다. 특히 다양한 식물에서 추출한 유효 성분을 활용한 항산화, 항균, 항염, 항노화 등에 관한 피부 생리활성 효능이 알려지면서 천연 추출물은 화장품 소재로 부각되고 있다.<sup>39</sup>

따라서 본 연구에서는 분홍바늘꽃 (*Epilobium angustifolium* L.) 지상부, 편백 (*Chamaecyparis obusa* (Siebold & Zucc.) Endl.) 종자, 팔배나무 (*Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch) 잎 및 가지의 추출물과 용매 분획물의 피부 관련 생리 활성을 탐색하고 크로마토그래피 및 NMR, HR-ESI-MS 등을 이용하여 유효성분의 화학구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성을 확인하여 천연 기능성 화장품 소재로의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 단일 화합물 분리에 사용된 용매들은 대정화금 (Siheungsi, Gyeonggi-do, Korea) 및 OCI (Seoul, Korea)의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. Normal-phased column chromatography (CC)에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck Co., Darmstadt, Germany)을 사용하였고, gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, GE Healthcare Life Sciences, PA, USA)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., Darmstadt, Germany)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO<sub>4</sub> 수용액 (3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물들의 구조 분석을 하기 위하여 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., MA, USA)과 Merck사의 NMR 전용 용매로 CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, acetone-*d*<sub>6</sub> 및 pyridine-*d*<sub>5</sub>를 사용하였다. HR-ESI-MS (High Resolution-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry)는 SYNAPT G2 (Waters, UK)를 이용하였으며, 분자량을 측정하였다. Optical rotation은 PerkinElmer 341 polarimeter (파장 589 nm (D), 20°C)을 이용하였으며, 선광도를 측정하였다.

## 2. 생리 활성 평가

### 1) 항산화

#### (1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정 방법은 Folin-Denis<sup>40</sup>법을 변형하여 진행하였다. 정량 분석을 위한 표준물질로 gallic acid를 사용하였다. Gallic acid를 DMSO:EtOH=1:1 용매를 사용하여 10 mg/mL로 stock solution을 제조한 후 two-fold-dilution법을 이용하여 15.625-250 µg/mL가 되도록 희석하여 준비하였다. 각 시료들은 10 mg/mL 농도로 용매에 녹여 준비하였다. 준비한 Gallic acid 및 시료 100 µL를 microtube에 취하고 증류수 900 µL를 넣어 희석시켰다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 첨가하여 혼합하여 실온에 3분간 반응한 후, 7%(w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 200 µL를 첨가한 후 증류수를 총 부피 (total volume)가 2 mL 되도록 가한 뒤 혼합하여 상온에서 1시간동안 반응시킨 후, 96 well plate에 200 µL씩 반응액을 취하여 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선(Standard calibration curve method)에 대입하여 함량을 환산하였다. 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.

#### (2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정 방법은 Park<sup>41</sup>법을 변형하여 진행하였다. 정량 분석을 위한 표준물질로 quercetin를 사용하였다. Quercetin를 DMSO:EtOH=1:1 용매를 사용하여 10 mg/mL로 stock solution을 제조한 후 two-fold-dilution법을 이용하여 15.625-1000 µg/mL가 되도록 희석하여 준비하였다. 각 시료들은 10 mg/mL 농도로 용매에 녹여 준비하였다. 준비한 quercetin 및 시료 100 µL를 microtube에 취하고 95% EtOH 300 µL를 넣어 희석시켰다. 여기에 10% (w/v)

Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>용액 20 μL를 첨가하여 잘 혼합한 후, 1M CH<sub>3</sub>COONa 용액 20 μL를 첨가한 후 증류수를 총 부피 (total volume)가 1 mL 되도록 가한 뒤 혼합하여 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 96 well plate에 200 μL씩 반응액을 취하여 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 시료의 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선에 대입하여 함량을 환산하였다. 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.

### (3) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay는 Blois 등 방법<sup>42</sup>에 따라 각 연구 시료들의 수소 공여 능력이나 자유 라디칼 소거 능력을 평가하는 실험이다. 우선 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 μL을 넣어준 뒤 0.2 mM DPPH 용액 (in EtOH) 180 μL를 넣어 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고 대조군(positive control)으로는 BHT를 사용하였다. Radical 소거 활성 정도를 소거율(%)로 나타내기 위해 다음과 같은 식으로 계산하였다. 또한, 라디칼 소거율이 50%일 때의 시료 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하였다.

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

$A_{\text{control}}$  : 515 nm에서 DPPH 용액의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 515 nm에서 시료와 DPPH를 혼합한 용액의 흡광도

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

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

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 Re & Pellegrin 등의 방법<sup>43</sup>을 변형하여 실시하였다. 우선 ABTS<sup>+</sup> radical 반응 용액을 제조하기 위하여 7.0 mM ABTS (in D.W)용액과 2.45 mM potassium persulfate (in D.W)용액을 1:1로 혼합하여 상온 및 암소에서 16시간 동안 반응시킨다. 이 용액을 EtOH로 희석하여 700 nm에서 흡광도가  $0.78 \pm 0.02$ 가 되도록 한 다음 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20  $\mu$ L을 넣어준 뒤 ABTS<sup>+</sup> 용액 180  $\mu$ L을 가하여 상온에서 20분 동안 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (positive control)으로는 BHT를 사용하였다. Radical 소거 활성 정도를 소거율(%)로 나타내기 위해 다음과 같은 식으로 계산하였다. 또한, 라디칼 소거율이 50%일 때의 시료 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하였다.

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

$A_{\text{control}}$  : 700 nm에서 ABTS 용액의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 700 nm에서 시료와 ABTS를 혼합한 용액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 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, 100U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 배양하였고, 3일 간격으로 계대 배양하였다.

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. 20분 후 과산화수소를 제거하고 dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)로 2회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지와 시료를 처리하고 배양조건 하에서 24시간 배양한 후 MTT assay로 세포 생존율(%)을 계산하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호효과를 확인하였다.

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

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

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



## 2) 항균

### (1) 균주 배양

표피포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 와 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 항생제 내성균주 은행 (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes) 으로부터 분양 받아 사용하였으며, 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 40105)는 한국 미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms) 로부터 분양받아 사용하였다. *S. epidermidis*인 경우에는 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 사용하여 37°C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다. *C. acnes*인 경우에는 배양배지를 GAM (Gifu Anaerobic Medium) 으로 사용하여 37°C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양하였다. *S. mutans*는 배양 배지를 BHI (Brain Heart Infusion)로 하여 37°C, 호기성 조건에서 하루에 한 번씩 계대 배양하였다.

### (2) Paper disc diffusion method

시료의 항균활성을 측정하기 위하여 paper disc diffusion method로 생육 억제환의 크기를 확인하였다.

*S. epidermidis* ( $1.5 \times 10^6$  CFU/mL) 및 *S. mutans* ( $3.0 \times 10^6$  CFU/mL)는 0.8% agar를 포함하는 소프트 배지에 넣어 1.5% agar를 포함하는 하드 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

*C. acnes* ( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL)로 균수를 조절하여, 0.8% agar를 포함하는 소프트 배지에 넣어, 1.5% agar를 포함하는 하드 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 48시간 동안 혐기성 환경에서 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다. 대조균으로는 erythromycin을 사용하였다.

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

최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로, 미생물에 대한 MIC값이 낮을수록 시료는 그 미생물에 대한 민감성이 높은 것이다. MIC 측정은 액체 배지 희석법 (broth dilution method)을 변형하여 이용하였다.

96 well plate에 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묶히면서 시료를 포함하는 배지를 100  $\mu$ L 넣고, 균주 현탁액의 농도를  $2 \times 10^5$  CFU/mL가 되도록 조절하여 100  $\mu$ L씩 넣어준다. *S. epidermidis*인 경우에는 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, *C. acnes*인 경우에는 37°C에서 48시간 동안 혐기성 환경에서 배양하였다. 배양이 끝난 후에 microplate reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 균주의 증식이 나타나지 않은 최소 농도를 확인하였다.

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

MIC값의 농도에서 균이 모두 사멸한 것은 아니며, 시료의 영향으로 균의 자라지 않음을 보일 수 있기 때문에 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)는 MIC값이 나타난 그 이상의 농도의 시료 배양액을 하드배지에 처리하여 colony를 형성하는지 확인하는 것이다.

우선 하드배지 plate를 준비하고 MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 이용하여 시료 배양액을 찍어내서 하드배지 plate에 streaking을 하였다. *S. epidermidis*인 경우에는 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, *C. acnes*인 경우에는 37°C에서 48시간 동안 혐기성 환경에서 배양한 후, colony가 형성되지 않은 최소 농도를 확인하였다.

### 3) 항염

#### (1) RAW 264.7 cell 배양

RAW 264.7 cell는 마우스 대식세포 (Murine macrophage cell line)이며 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받았다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., NY, USA) 및 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양하였다.

#### (2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW 264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 18시간 배양하였다. 100 ng/mL의 LPS (lipopolysaccharide)를 포함한 배지로 교환한 후, 시료를 농도별로 각각 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양을 측정하기 위하여 세포 배양 상등액 100 µL를 96 well plate에 취하고 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenedi-amine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응물은 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO는 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였으며 표준물질로는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 사용했으며, 생성된 NO의 양은 NaNO<sub>2</sub>의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선법을 통하여 정량하였다. 정량한 값은 백분율로 나타내었으며, 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다. 양성 대조군으로는 2-amino-4-picoline (5 µM)을 사용하였다.

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

24 well plate에 RAW 264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후, 각각 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 다음, 얻어진 세포 배양 상등액에서 PGE<sub>2</sub> 및 cytokine의 생성량을 각각 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 측정하였다. 각각의 표준물질 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이였으며, 이를 통하여 PGE<sub>2</sub> 및 각 전염증성 cytokine을 정량하였다.

#### 4) 미백

##### (1) Tyrosinase 억제 활성

0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), 2 mM L-tyrosine, 2500 unit의 tyrosinase, 그리고 각각 농도별로 시료를 준비한다.

96 well plate에 각 농도별로 시료 20  $\mu$ L을 넣어준 뒤, buffer과 L-tyrosine 용액을 혼합하여 기질로서 130  $\mu$ L 첨가한 후, 13  $\mu$ L tyrosinase가 포함된 buffer 용액 50  $\mu$ L를 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (positive control)으로는 arbutin을 사용하였으며, 저해율(%)을 다음과 같은 식으로 계산하였다. 또한, tyrosinase의 활성을 50% 저해시킬 때 시료의 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하였다.

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

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

$A_{\text{sample}}$  : 시료 반응 용액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 시료만의 흡광도

##### (2) B16F10 melanoma 세포 배양

Murine B16F10 melanoma cell은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받았으며, 세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., NY, USA) 및 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., NY, USA) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

### (3) Melanogenesis 억제 활성

24 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, 1 N NaOH 300 μL를 첨가하여 55°C에서 세포 내의 멜라닌을 녹여 내역 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 melasolv (20 μM)를 사용하였다.

### (4) Intracellular tyrosinase 저해 활성

6 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양한 후, 전 배양시킨 cell의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환하여, 시료를 농도별로 각각 첨가하고 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, lysis buffer (RIPA; 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용하여 4°C 조건에서 overnight하고 lysis 하였다. 이후 단백질을 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 20 min)하여 단백질의 상등액만 분리하여 실험에 사용하였다.

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

### 5) 세포 독성 평가 (MTT assay)

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 RAW 264.7, B16F10 및 HaCaT cell을 well plate에 실험 조건에 맞게 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 전배양한 후, LPS (1 µg/mL) 또는 α-MSH (100 nM)와 시료를 농도별로 처리한 후 배양하였다. 이후 MTT를 500 µg/mL 농도로 배지에 첨가하여 37°C 배양 조건에서 3시간 동안 반응시킨 후, 상등액을 제거하였다. 이후 살아있는 세포와 MTT가 반응하여 생성된 보라색 formazan 침전물을 DMSO를 이용하여 용해시키고 이를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(cell viability)은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

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

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

Abs<sub>sample</sub> : 시료 반응 용액의 흡광도

### 3. 통계 처리

본 연구의 모든 실험은 동일한 조건에서 3회 반복 실시하여 실험 결과를 얻었으며, 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였다. 통계 분석은 Excel software를 사용하여 student's *t-test*를 진행하여 평가를 하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계적 검정 후 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미가 있다고 판단하였다. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01

### Ⅲ. 연구 1 : 분홍바늘꽃 지상부 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성 성분 연구

#### 1. 재료

분홍바늘꽃 (*Epilobium angustifolium* L.)은 바늘꽃과 (Onagraceae) 식물로서 여러해살이풀이다. 북반구의 온대와 한대 지역에서 광범위하게 서식하고 있으며, 특히 중국의 북부지대, 한국의 강원도 황변산 지역 등에 자생하고, 야생 자원이 풍부하다. 양지에서 자라고 높이 1.5 m 내외, 땅속줄기가 옆으로 뻗으면서 때로 모여 나고 가지가 그리 갈라지지 않는다. 잎은 어긋나고 바소꼴로 버들잎 처럼 생겼으며 잔 톱니가 있으나 가장자리가 뒤로 말리기 때문에 밋밋하게 보인다. 잎 끝은 뾰족하고 밑은 좁아져서 줄기에 달리며 뒷면은 분백색이다. 꽃은 7~8월에 피고 분홍색이며 원줄기 끝의 총상꽃차례에 달린다. 씨방에는 짧고 꼬부라진 털이 백백이 난다.<sup>44</sup>

현재까지 분홍바늘꽃의 성분에 관한 연구로는 플라보노이드 배당체, 탄닌 및 페놀성 성분이 보고되어있다. 또한 분홍바늘꽃 추출물의 항산화,<sup>45</sup> 항균 활성,<sup>46</sup> prostaglandins (PG) 발현 억제를 통해 항염 활성, normal human dermal fibroblasts (NHDF)에 대한 matrix metalloproteinase (MMP)-1 및 MMP-3의 전달 억제를 통해 anti-aging 활성 및 광보호 (photo-protection) 활성이<sup>47</sup> 보고되었으나, 분홍바늘꽃에 함유된 화합물에 대한 성분 및 효능에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 분홍바늘꽃 지상부로부터 활성 성분 분리 및 구조를 동정하고 분리된 화합물의 항산화, 미백, 항염, 항균 활성 연구를 진행하였다.

실험에 사용한 분홍바늘꽃 지상부(시료번호 : 496)는 2019년 10월 중국 ANGUO시 약령시장에서 구입하였다. 건조된 분홍바늘꽃 지상부는 분쇄하여 사용하였다.





Figure 5. Pictures of *Epilobium angustifolium* L. aerial parts.

## 2. 분홍바늘꽃 지상부의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

### 1) 시료의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄한 분홍바늘꽃 지상부 0.5 kg을 70% (v/v) EtOH 10.0 L에 넣은 뒤 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 여과 장치와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과한 다음 남은 잔여물을 같은 방법으로 추출 및 여과를 1회 더 반복하였다. 얻은 여과액은 37°C의 수욕 상태에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 128.6 g을 얻었다. 얻은 70% EtOH 추출물 109.2 g을 증류수에 현탁시킨 뒤 분액 깔때기를 이용하여 용매의 극성이 낮은 순서부터 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (5.3 g), ethyl acetate (10.2 g), *n*-butanol (13.4 g) 및 water (73.2 g) 분획물을 얻었다. (Figure 6).

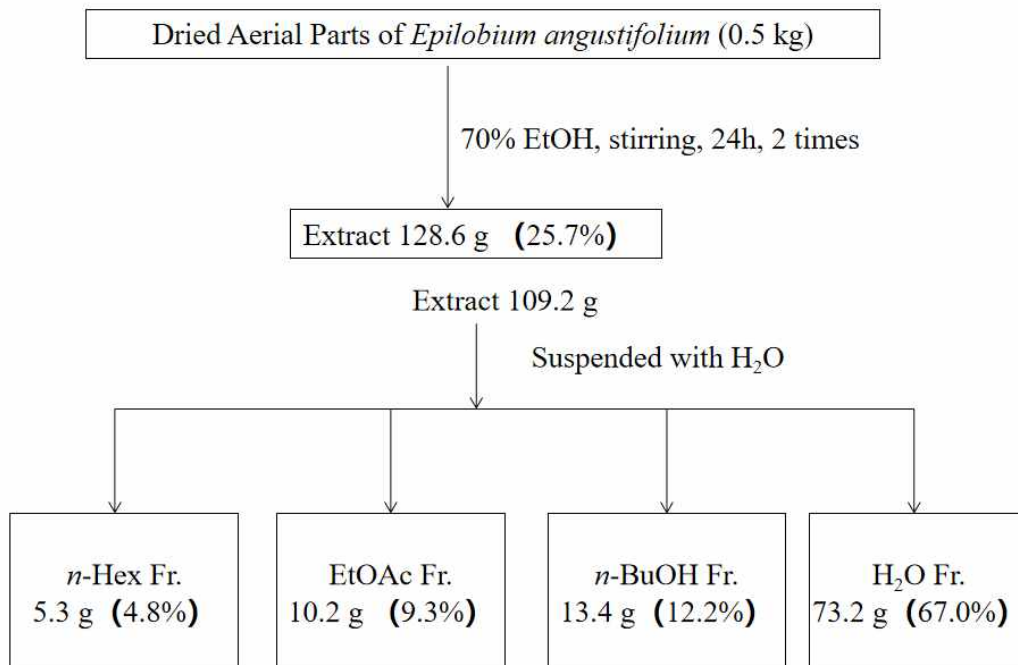


Figure 6. Extraction and solvent fractionation of *E. angustifolium* L. aerial parts

## 2) *n*-Hexane 분획물의 활성 성분 분리

*n*-Hexane fraction 4.5 g을 극성에 따라 분획하기 위하여 silica gel로 충전된 VLC를 진행하였다. 용매의 극성은 3-5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-50%), 100% EtOAc가 될 때 까지 놓은 후 100% MeOH를 각각 300 mL씩 용출하여 총 15개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-15).

Fr. V2 ( 160.2 mg)는 단일 화합물 compound 1으로 확인되었다.

Fr. V4,5 (274.3 mg)를 *n*-Hex:EtOAc (25:1)의 용매조건으로 silica gel column chromatography를 수행하여 compound 3과 compound 7 혼합 상태로 (45.2 mg) 확인하였다.

Fr. V7 (354.6 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (80:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 단일 화합물인 compound 2 (237.8 mg)와 혼합 상태인 compound 11과 compound 12 (40.2 mg)를 얻었다.

Fr. V8 (475.2 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (80:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 compound 17 (40.4 mg)과 compound 5 (286.5 mg)를 얻었다.

Fr. V9 (387.3 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (60:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 compound 10 (4.2 mg)과 compound 8 (183.9 mg)을 얻었다.

Fr. V11 ( 387.3 mg)은 compound 13과 compound 14가 혼합된 형태로 분리하였다.

Fr. V14 (329.7 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (23:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 compound 18 (68.3 mg), compound 4과 compound 9 혼합 상태로(84.8 mg) 얻었으며, compound 6 (41.3 mg) 그리고 compound 15와 compound 16 혼합 상태로(20.3 mg) 얻었다.

### 3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

EtOAc 분획물 5.0 g을 화합물을 분리하기 위하여 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 극성 크기별로 나눔을 통해 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex : EtOAc (0-100%), EtOAc : MeOH (0-50%)가 될 때까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 각각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다 (Fr. V1-32).

VLC fraction 중 Fr. V9 (160.2 mg)는 compound **13**과 compound **14**가 혼합된 형태로 분리하였다.

Fr. V11~13 (350.3 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound **18** (16.9 mg)을 얻었으며, 나머지 부분 중 Fr. V11~13-D (125.0 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (30:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound **13** (24.6 mg)을 얻었다.

Fr. V14~16 (240.8 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (10:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 compound **19** (10.1 mg)와 compound **20** (20.7 mg)을 얻었다.

Fr. V18~22 (240.8 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (4:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 compound **21** (110.2 mg)을 얻었으며, Fr. V24 (420.2 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (3:2)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 compound **21** (30.3 mg)을 얻었다.

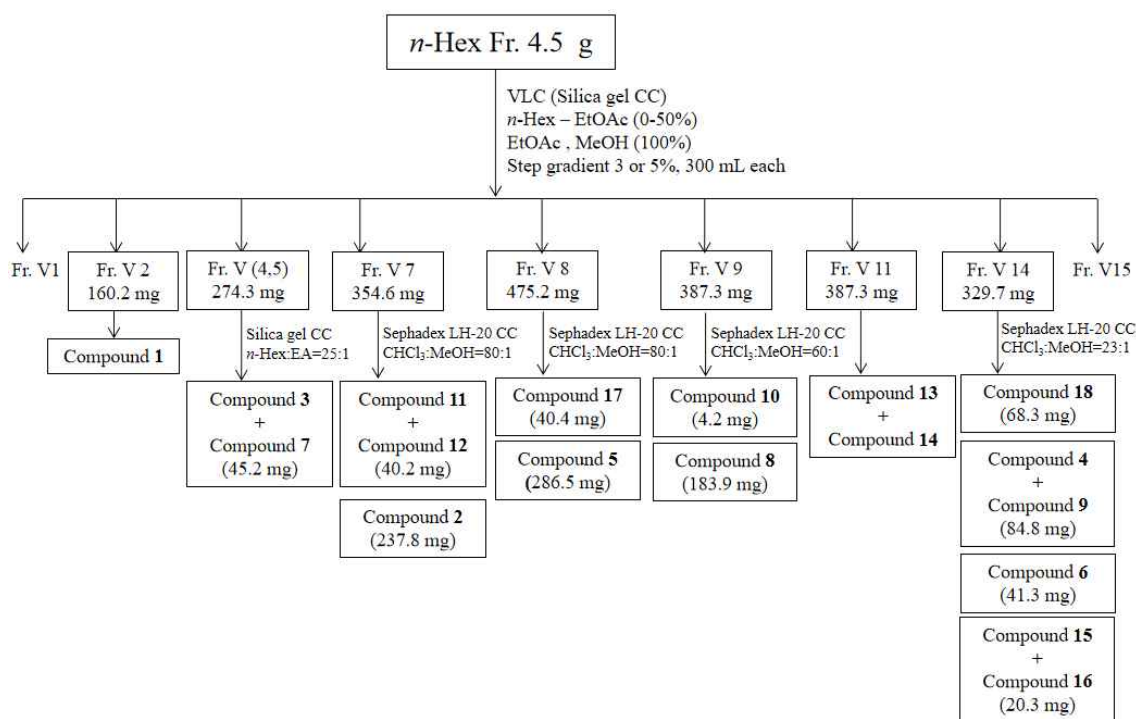


Figure 7. Isolation of compounds from *n*-Hex fraction of *E. angustifolium* L. aerial parts.

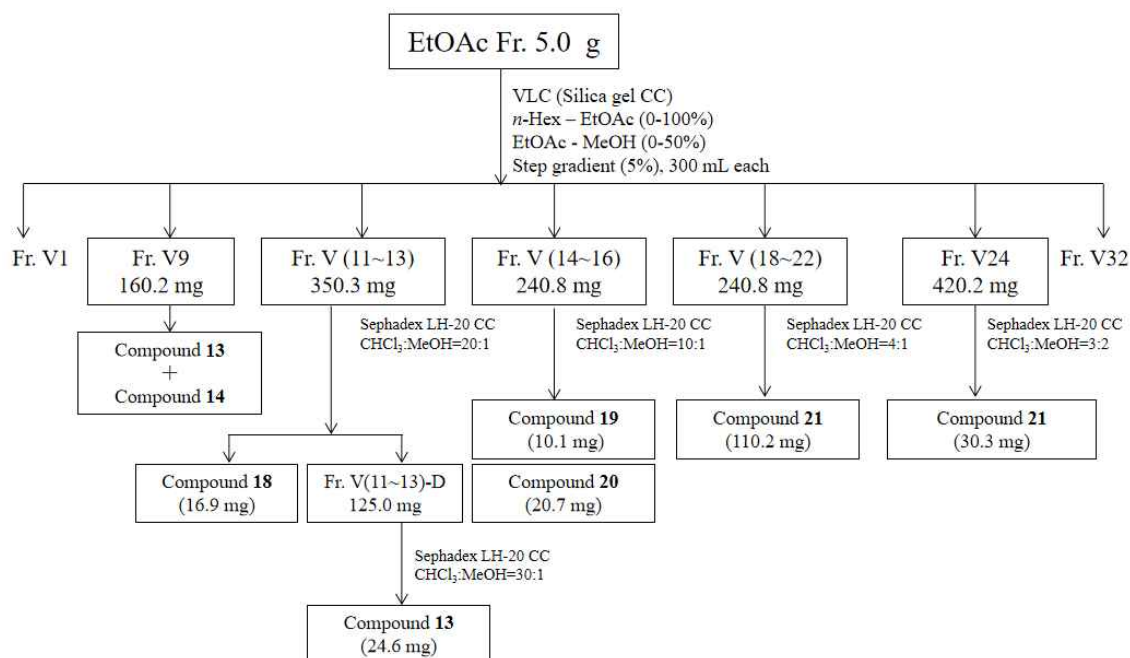


Figure 8. Isolation of compounds from EtOAc fraction of *E. angustifolium* L. aerial parts.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2의 구조 동정

Compound 1은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에 관찰해 보면,  $\delta_{\text{H}}$  1.20~1.28과  $\delta_{\text{H}}$  0.86에 두 위치만 분포하는 것을 통하여 aliphatic alkane의  $sp^3$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 6개의  $sp^3$  혼성 카본 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>48</sup>과 비교하여 compound 1은 *n*-dodecane으로 동정하였다.

Compound 2는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에 관찰해 보면,  $\delta_{\text{H}}$  1.22의 signal과  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2.33 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz) 그리고  $\delta_{\text{H}}$  1.61 (2H, qui,  $J = 7.3$  Hz)들의 signal을 통하여 saturated fatty acid의  $sp^3$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  데이터에 보면,  $\delta_{\text{C}}$  180.0 피크를 통해 한 개의 carbonyl group을 가지고 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  14.3 피크를 통해 한 개의 methyl group을 포함하고 있는 구조를 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>49</sup>과 비교하여 compound 2는 lauric acid로 동정하였다.

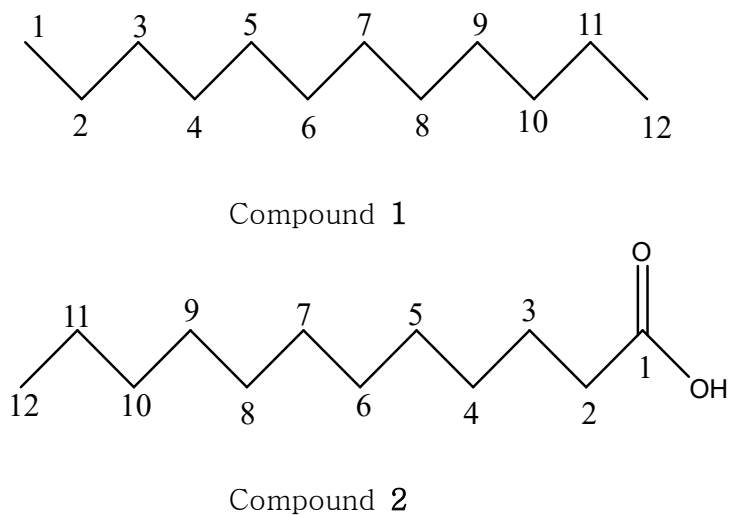


Figure 9. Chemical structure of compounds 1 and 2

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

NO.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	0.86 (3H, m)	14.4		180.0
2	1.20~1.28 (2H, m)	22.9	2.33 (2H, t, 7.6)	34.2
3	1.20~1.28 (2H, m)	32.2	1.61 (2H, q, 7.3)	24.9
4	1.20~1.28 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, m)	29.3
5	1.20~1.28 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.5
6	1.20~1.28 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.6
7	1.20~1.28 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.9
8	1.20~1.28 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.8
9	1.20~1.28 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, m)	29.6
10	1.20~1.28 (2H, m)	32.2	1.23 (2H, m)	32.1
11	1.20~1.28 (2H, m)	22.9	1.23 (2H, m)	22.9
12	0.86 (3H, m)	14.4	0.86 (3H, t, 6.9)	14.3

## 2) Compound 3, 5, 7, 8의 구조 동정

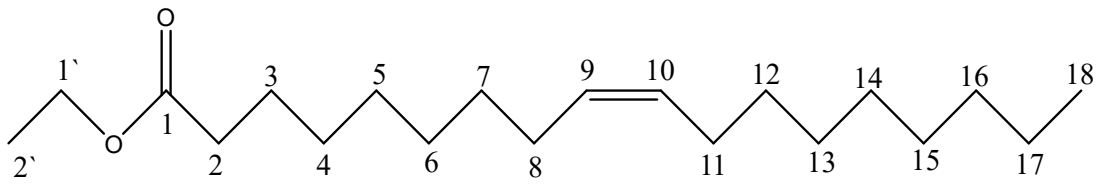
Compound 3의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에 관찰해 보면  $\delta_{\text{H}}$  1.23의 signal과  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, m),  $\delta_{\text{H}}$  2.26 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz) 그리고  $\delta_{\text{H}}$  1.56~1.61 (2H, m)들의 signal을 통하여 fatty acid의  $sp^3$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.27~5.38의 signal은 이중결합의  $sp^2$  혼성 프로톤으로 예상하였다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (2H, q,  $J = 7.3$  Hz) 및 0.86 (3H, m)의 signal은 전기음성도가 큰 산소와 연결된 ethyl를 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  데이터를 보면  $\delta_{\text{C}}$  174.1 피크를 통해 한 개의 ester group을 확인하였고,  $\delta_{\text{C}}$  130.3, 128.5 피크를 통해 한 개의 이중결합이 있는 것으로 확인하였고,  $\delta_{\text{C}}$  60.4 및  $\delta_{\text{C}}$  14.5 피크들을 통해 한 개의 ethyl group을 포함하고 있는 구조를 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>50,51</sup>과 비교하여 compound 3는 ethyl oleate로 동정하였다.

Compound 5의  $^1\text{H-NMR}$  data를 보면  $\delta_{\text{H}}$  0.87 (3H, m)과  $\delta_{\text{H}}$  2.33 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz)의 signal을 통하여 fatty acid의  $sp^3$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.27~5.40의 signal은 이중결합이 있는 fatty acid의  $sp^2$  혼성 탄소의 proton을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  130.4, 130.2, 128.3, 128.1 피크들을 통해 두 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>52,53</sup>과 비교하여 compound 5는 linoleic acid로 동정하였다.

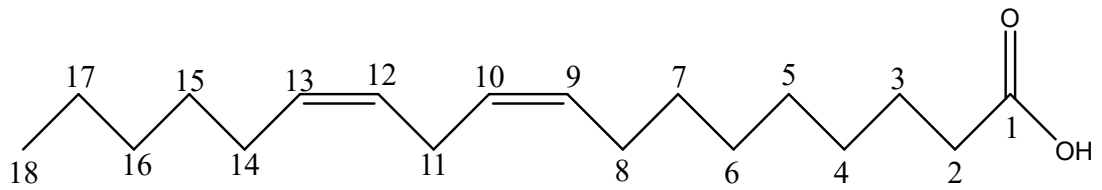
Compound 7의 NMR data를 보면 compound 3과 유사한 구조로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  132.2, 130.4, 128.2, 128.1, 127.9, 127.3 피크들을 통해 세 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>51</sup>과 비교하여 compound 7은 ethyl linolenate로 동정하였다.

Compound 8의 NMR data를 보면 compound 5와 유사한 구조로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  132.2, 130.4, 128.5, 128.4, 127.9, 127.3 피크들을 통해 세 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>54</sup>과 비교하여 compound 8은  $\alpha$ -linolenic acid로 동정하였다.

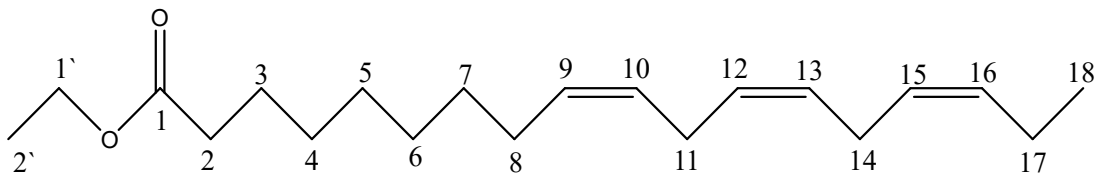




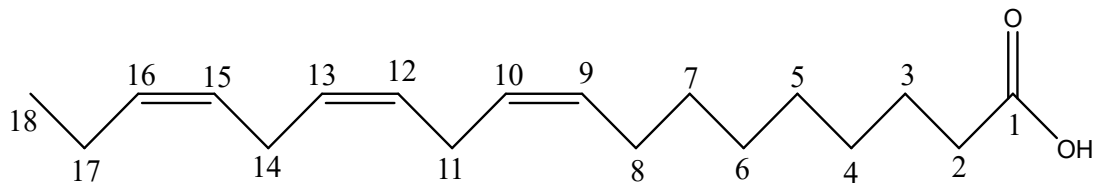
Compound 3



Compound 5



Compound 7



Compound 8

Figure 10. Chemical structure of compounds 3, 5, 7 and 8

Table 2. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **3**, **5**, **7** and **8** (400 and 100 MHz, in CDCl<sub>3</sub>)

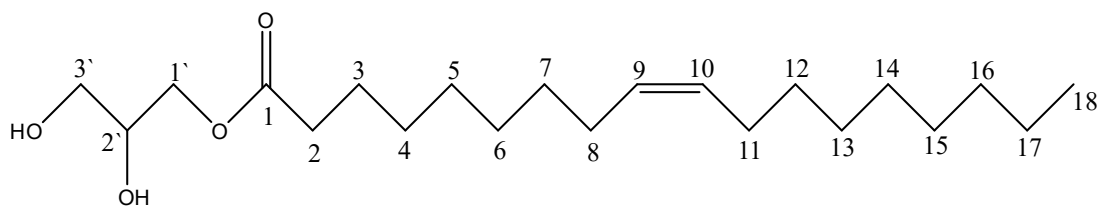
No.	Compound <b>3</b>		Compound <b>5</b>		Compound <b>7</b>		Compound <b>8</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		174.1		180.4		174.2		180.4
2	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6	2.33 (2H, t, 7.6)	34.3	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6	2.33 (2H, t, 7.6)	34.3
3	1.56~1.61 (2H, m)	27.4	2.03 (2H, m)	24.9	1.56~1.61 (2H, m)	27.4	1.61 (2H, q, 7.3)	27.4
4	1.23 (2H, m)	29.4	1.23 (2H, m)	29.4	1.23 (2H, m)	29.4	1.30 (2H, m)	29.3
5	1.23 (2H, m)	29.3	1.23 (2H, m)	29.3	1.23 (2H, m)	29.3	1.30 (2H, m)	29.2
6	1.23 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, m)	29.6	1.30 (2H, m)	29.8
7	1.23 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.9	1.30 (2H, m)	29.4
8	1.98~2.08 (2H, m)	27.4	1.98~2.08 (2H, m)	27.4	1.98~2.08 (2H, m)	25.8	1.98~2.08 (2H, m)	25.7
9	5.27~5.38 (1H, m)	130.3	5.27~5.40 (1H, m)	130.4	5.27~5.38 (1H, m)	132.2	5.27~5.38 (1H, m)	132.2
10	5.27~5.38 (1H, m)	128.5	5.27~5.40 (1H, m)	130.2	5.27~5.38 (1H, m)	127.3	5.27~5.38 (1H, m)	127.3
11	1.98~2.08 (2H, m)	25.2	2.75 (2H, t, 7.3)	25.8	2.78 (2H, t, 7.3)	24.9	2.78 (2H, t, 7.3)	24.9
12	1.23 (2H, m)	29.9	5.27~5.40 (1H, m)	128.3	5.27~5.38 (1H, m)	128.2	5.27~5.38 (1H, m)	128.5
13	1.23 (2H, m)	29.8	5.27~5.40 (1H, m)	128.1	5.27~5.38 (1H, m)	128.1	5.27~5.38 (1H, m)	128.4
14	1.23 (2H, m)	29.7	2.75 (2H, t, 7.3)	27.4	2.78 (2H, t, 7.3)	25.7	2.78 (2H, t, 7.3)	25.8
15	1.23 (2H, m)	29.6	1.61 (2H, q, 7.3)	29.8	5.27~5.38 (1H, m)	127.9	5.27~5.38 (1H, m)	127.9
16	1.23 (2H, m)	29.5	1.30 (2H, m)	31.7	5.27~5.38 (1H, m)	130.4	5.27~5.38 (1H, m)	130.4
17	1.23 (2H, m)	22.9	1.98~2.08 (2H, m)	22.8	1.98~2.08 (2H, m)	22.9	2.04 (2H, m)	20.8
18	0.86 (3H, m)	14.3	0.87 (3H, m)	14.3	0.86 (3H, m)	14.3	0.96 (3H, t, 7.6)	14.3
1'	4.10 (2H, q, 7.3)	60.4			4.10 (2H, q, 7.3)	60.4		
2'	0.86 (3H, m)	14.5			0.86 (3H, m)	14.5		

### 3) Compound 4, 6, 9의 구조 동정

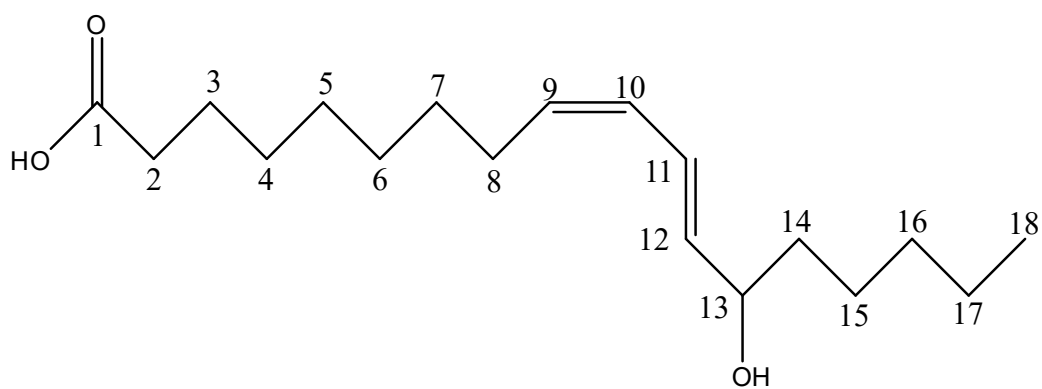
Compound 4는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  174.5 피크를 통해 ester group 관능기를 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  130.4, 130.2 피크를 보면  $^1\text{H}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, 한 개의 탄소-탄소 이중결합이 있음을 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  70.5, 65.4, 63.5 세 개 피크와  $\delta_{\text{H}}$  4.19 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.6$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.13 (1H, dd,  $J = 11.4, 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.91 (1H, m),  $\delta_{\text{H}}$  3.68 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.6$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.58 (1H, dd,  $J = 11.4, 6.0$  Hz)의 signal들을 통해 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 glycerol group이 있음을 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  14.3와  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz) 피크를 통해 한 개 메틸기를 포함하고 있는 구조로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>55</sup>과 비교하여 compound 4는 1-monoolein으로 동정하였다.

Compound 6의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.46 (1H, dd,  $J = 15.3, 10.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.95 (1H, t,  $J = 10.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.66 (1H, dd,  $J = 15.3, 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.42 (1H, m)의 signal은 *cis*-olefin과 *trans*-olefin의 수소로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.13 (1H, dd,  $J = 13.7, 6.9$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 탄소의 proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  0.87 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 methyl기로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  179.0 피크를 통해 carbonyl기로 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  135.9, 133.4, 128.0, 126.1 피크들을 통해 두 개의 이중결합이 있는 것으로 확인하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  73.1 피크를 통해  $^1\text{H}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 탄소를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  14.3 피크를 통해 methyl기로 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>56</sup>과 비교하여 compound 6은 13-hydroxy-9*Z*,11*E*-octadecadienoic acid (coriolic acid)로 동정하였다.

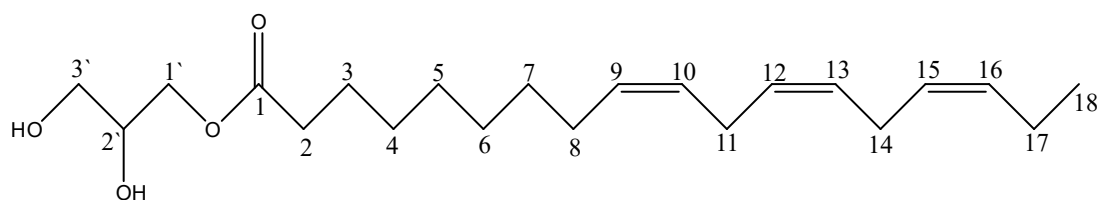
Compound 9의 NMR data를 보면 compound 4와 유사한 구조로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  132.2, 130.4, 128.5, 128.4, 128.1, 127.3 피크들을 통해 세 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>57</sup>과 비교하여 compound 9는 1-linolenoyl glycerol로 동정하였다.



Compound 4



Compound 6



Compound 9

Figure 11. Chemical structure of compounds 4, 6 and 9

Table 3. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **4**, **6** and **9** (400 and 100 MHz, in CDCl<sub>3</sub>)

No.	Compound <b>4</b>		Compound <b>9</b>		Compound <b>6</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		174.5		174.5		179.0
2	2.33 (2H, t, 7.6)	34.3	2.33 (2H, t, 7.6)	34.3	2.32 (2H, t, 7.6)	34.0
3	1.61 (2H, m)	25.1	1.61 (2H, m)	25.1	1.61 (2H, m)	24.8
4	1.23 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, m)	29.3	1.23~1.36 (2H, m)	29.2
5	1.23 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, m)	29.6	1.23~1.36 (2H, m)	29.2
6	1.23 (2H, m)	29.8	1.23 (2H, m)	29.9	1.23~1.36 (2H, m)	29.1
7	1.23 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.9	1.23~1.36 (2H, m)	29.5
8	1.98~2.08 (2H, m)	27.4	2.02 (2H, m)	27.4	2.15 (2H, m)	28.0
9	5.27~5.38 (1H, m)	130.4	5.27~5.38 (1H, m)	132.2	5.42 (1H, m)	133.4
10	5.27~5.38 (1H, m)	130.2	5.27~5.38 (1H, m)	127.3	5.95 (1H, t, 10.8)	128.0
11	1.98~2.08 (2H, m)	25.1	2.78 (2H, m)	25.7	6.46 (1H, dd, 15.3, 10.8)	126.1
12	1.23 (2H, m)	29.9	5.27~5.38 (1H, m)	128.5	5.66 (1H, dd, 15.3, 6.9)	135.9
13	1.23 (2H, m)	29.6	5.27~5.38 (1H, m)	128.4	4.13 (1H, dd, 13.7, 6.9)	73.1
14	1.23 (2H, m)	29.8	2.78 (2H, m)	25.8	1.52 (2H, m)	37.5
15	1.23 (2H, m)	29.4	5.27~5.38 (1H, m)	128.1	1.23~1.36 (2H, m)	25.5
16	1.23 (2H, m)	32.1	5.27~5.38 (1H, m)	130.4	1.23~1.36 (2H, m)	31.7
17	1.23 (2H, m)	22.9	2.02 (2H, m)	20.8	1.23~1.36 (2H, m)	22.8
18	0.86 (3H, t, 6.6)	14.3	0.95 (3H, t, 7.6)	14.3	0.87 (3H, t, 6.9)	14.3
1`	4.19 (1H, dd, 11.4, 4.6)	65.4	4.19 (1H, dd, 11.4, 4.6)	65.4		
	4.13 (1H, dd, 11.4, 6.0)		4.13 (1H, dd, 11.4, 6.0)			
2`	3.91 (1H, m)	70.5	3.91 (1H, m)	70.5		
3`	3.68 (1H, dd, 11.4, 4.6)	63.5	3.68 (1H, dd, 11.4, 4.6)	63.5		
	3.58 (1H, dd, 11.4, 6.0)		3.58 (1H, dd, 11.4, 6.0)			

#### 4) Compound 10의 구조 동정

Compound 10은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.70 (1H, dd,  $J = 17.6, 10.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.84 (1H, dd,  $J = 17.6, 0.9$  Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  4.79 (1H, dd,  $J = 17.6, 0.9$  Hz)의 signal은 chemical shift과 coupling constant에 보면 vinyl에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.19 (1H, dd,  $J = 10.5, 5.5$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C-NMR}$  데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.20 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.79 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.97 (3H, s), 의 signal들은 적 분 값을 통하여 총 4개의 methyl proton을 바탕으로 pimarane-diterpene으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  151.7,  $\delta_{\text{C}}$  108.8의 signal은 vinyl 구조를 확인하며, 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  79.2 피크를 확인하였다.  $\delta_{\text{C}}$  72.5의 signal은 전기음성도가 큰 원자를 연결된 4차 탄소를 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>58</sup>과 비교하여 compound 10은 15-isopimaren-3 $\beta$ ,8 $\beta$ -diol로 동정하였다.

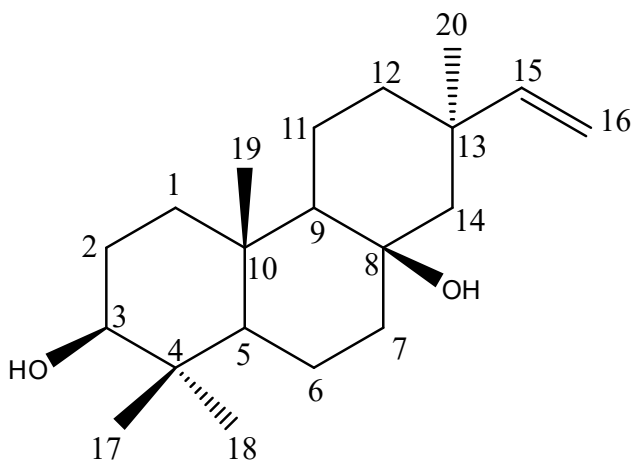


Figure 12. Chemical structure of compound 10

Table 4.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **10** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>10</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		38.2
2		28.4
3	3.19 (1H, dd, 10.5, 5.5)	79.2
4		39.2
5		55.7
6		17.8
7		43.8
8		72.5
9		57.0
10		37.9
11		17.4
12		37.1
13		36.8
14		51.7
15	5.70 (1H, dd, 17.6, 10.3)	151.7
16	4.84 (1H, dd, 17.6, 0.9)	108.8
	4.79 (1H, dd, 10.3, 0.9)	
17	1.20 (3H, s)	27.4
18	0.97 (3H, s)	15.7
19	0.79 (3H, s)	15.9
20	1.23 (3H, s)	24.4

5) Compound 11, 12의 구조 동정

Compound 11은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.10 (1H, t,  $J = 3.7$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.20 (1H, dd,  $J = 10.8, 5.0$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C-NMR}$  데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.11 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.81 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.77 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.84 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 8개의 methyl proton을 바탕으로 ursane-triterpene으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 한 개의 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  139.8, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  124.6) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  79.3 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>59</sup>과 비교하여 compound 11은  $\alpha$ -amyrin으로 동정하였다.

Compound 12의 NMR data를 보면 compound 11과 유사한 구조로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  145.4, 121.9 피크들을 통해 한 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>59</sup>과 비교하여 compound 12는  $\beta$ -amyrin으로 동정하였다.

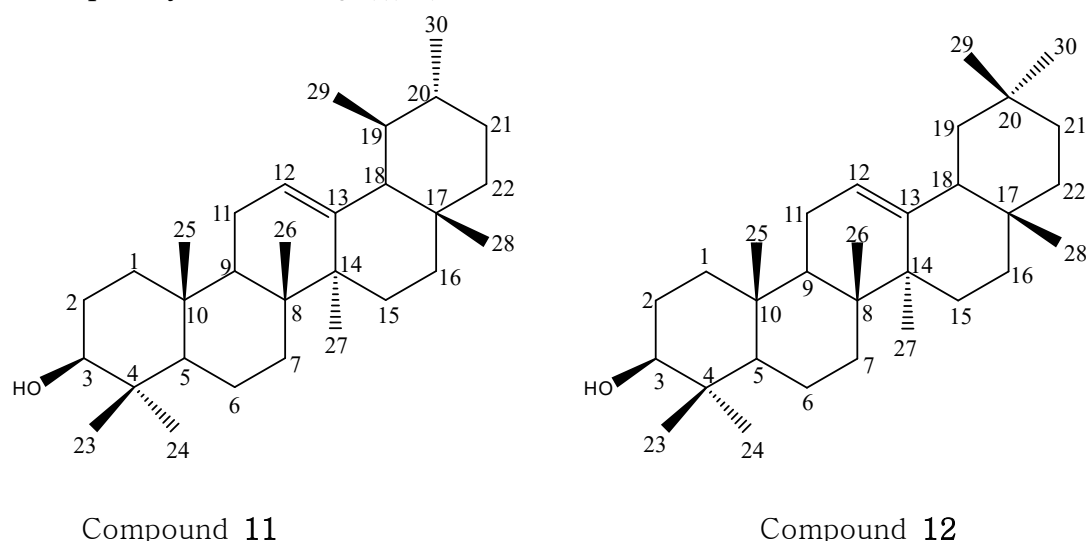


Figure 13. Chemical structure of compounds 11 and 12



Table 5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **11** and **12** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>11</b>		Compound <b>12</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		39.0		38.8
2		27.5		27.4
3	3.20 (1H, dd, 10.8, 5.0)	79.3	3.20 (1H, dd, 10.8, 5.0)	79.2
4		39.0		40.0
5		55.4		55.4
6		18.6		18.6
7		33.1		32.7
8		40.2		41.9
9		47.9		47.8
10		37.1		37.2
11		23.5		23.9
12	5.10 (1H, t, 3.7)	124.6	5.16 (1H, t, 3.7)	121.9
13		139.8		145.4
14		41.7		42.3
15		28.2		27.1
16		26.8		26.4
17		34.0		32.8
18		59.3		47.4
19		39.9		47.0
20		39.8		31.3
21		31.5		34.9
22		40.2		37.3
23	0.81 (3H, s)	28.3	0.85 (3H, s)	28.3
24	0.77 (3H, s)	15.9	0.78 (3H, s)	15.8
25	0.98 (3H, s)	15.8	0.99 (3H, s)	15.7
26	1.11 (3H, s)	17.7	1.11 (3H, s)	17.0
27	1.23 (3H, s)	23.6	1.23 (3H, s)	26.2
28	1.05 (3H, s)	29.0	1.05 (3H, s)	28.6
29	0.84 (3H, d, 7.3)	17.1	0.95 (3H, s)	33.6
30	0.92 (3H, d, 7.3)	21.6	0.93 (3H, s)	23.7

## 6) Compound 13, 14, 15, 16의 구조 동정

Compound 13은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 30개의 카본 피크를 관찰되며,  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  0.91-2.67에 분포하는 것을 통하여 aliphatic의  $sp^3$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.27 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.25 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.08 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.03 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.97 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.91 (3H, s)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (1H, t,  $J = 3.2$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.48 (1H, dd,  $J = 9.3, 6.4$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  180.4의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였으며, 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  78.6등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>60</sup>과 비교하여 compound 13은 ursolic acid (3 $\beta$ -hydroxyurs-12-en-28-oic acid)로 동정하였다.

Compound 14는 compound 13과 같이 나왔다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  1.08 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.91 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.80 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.78 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.75 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.61 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.59 (3H, s)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton을 바탕으로 oleanane-triterpene형 구조를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.09 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.19 (1H, dd,  $J = 13.5, 4.1$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  180.8의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였으며, 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  77.4등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>61</sup>과 비교하여 compound 14는 oleanolic acid로 동정하였다.

Compound 15는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.49 (1H, t,  $J = 3.3$  Hz)의

signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_H$  4.12 (1H, td,  $J = 9.1, 4.1$  Hz) 및  $\delta_H$  3.42 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz) 의 signal은  $^{13}C$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_H$  1.30 (3H, s),  $\delta_H$  1.28 (3H, s),  $\delta_H$  1.14 (3H, s),  $\delta_H$  1.04 (3H, s),  $\delta_H$  1.02 (3H, s),  $\delta_H$  1.00 (3H, s),  $\delta_H$  0.96 (3H, s)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton으로 예상하였다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서  $\delta_C$  180.7의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였으며, 한 개의 olefin group (4차 carbon  $\delta_C$  145.3, 3차 carbon  $\delta_C$  122.9) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_C$  84.3, 69.0등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>62</sup>과 비교하여 compound **15**는 maslinic acid로 동정하였다.

Compound **16**의 NMR data를 보면 compound **15**와 유사한 구조로 예상하였다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서  $\delta_C$  139.8, 126.0피크들을 통해 한 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>63</sup>과 비교하여 compound **16**은 corosolic acid로 동정하였다.

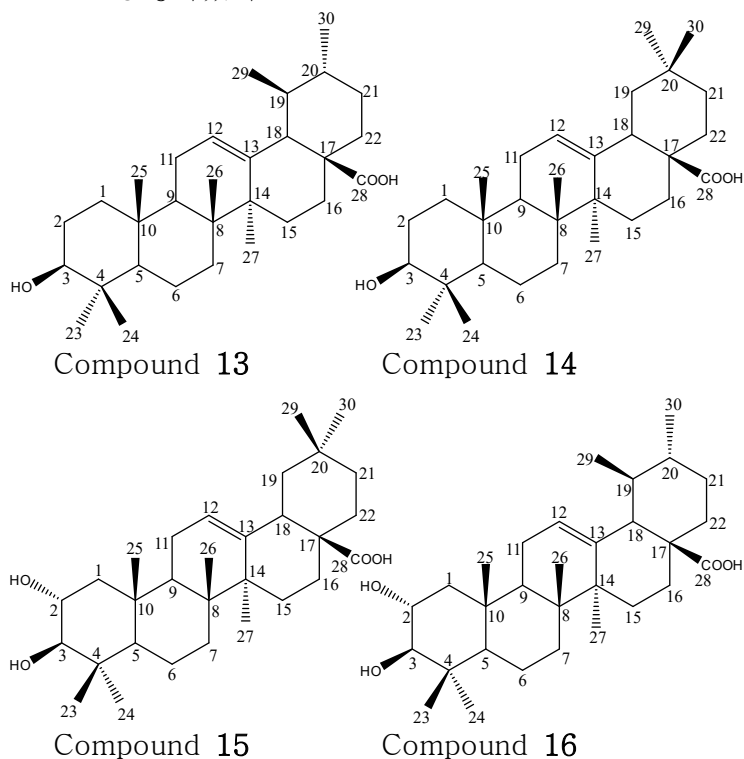


Figure 14. Chemical structure of compounds **13**, **14**, **15** and **16**

Table 6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **13**, **14**, **15** and **16** (in pyridine- $d_5$  or  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD} = 2:1$ )

No.	Compound <b>13</b>		Compound <b>14</b>		Compound <b>15</b>		Compound <b>16</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		39.5		38.6		48.2		48.5
2		28.6		27.9	4.12 (1H, td, 9.1, 4.1)	69.0	4.12 (1H, td, 9.1, 4.1)	69.0
3	3.48 (1H, dd, 6.4, 9.3)	78.6	3.19 (1H, dd, 13.5, 4.1)	77.4	3.42 (1H, d, 9.1)	84.3	3.42 (1H, d, 9.1)	84.3
4		40.0		38.9		40.3		40.3
5		56.3		55.2		56.4		56.4
6		19.2		18.3		19.3		19.3
7		34.0		33.0		33.7		34.0
8		40.4		39.4		48.6		40.5
9		48.5		47.7		48.6		48.5
10		37.9		36.9		39.0		38.9
11		24.1		23.1		24.1		24.2
12	5.52 (1H, t, 3.2)	126.1	5.09 (1H, t, 3.4)	122.2	5.49 (1H, t, 3.3)	122.9	5.48 (1H, t, 3.3)	126.0
13		139.8		143.8		145.3		139.8
14		43.0		41.6		42.7		43.0
15		29.2		27.9		28.7		29.1
16		25.4		23.4		24.2		25.4
17		48.5		46.3		47.1		48.5
18	2.67 (1H, d, 11.4)	54.0	2.65 (1H, dd, 13.5, 3.7)	41.2	3.32 (1H, td, 13.7, 3.2)	46.9	2.65 (1H, d, 11.0)	54.0
19		39.9		45.9		42.5		39.9
20		39.9		30.6		31.4		39.9
21		31.5		33.8		34.7		34.7
22		37.7		32.7		33.7		37.9
23	1.25 (3H, s)	29.3	0.91 (3H, s)	27.9	1.30 (3H, s)	29.8	1.23 (3H, s)	29.8
24	1.05 (3H, s)	17.1	0.80 (3H, s)	16.7	1.14 (3H, s)	17.3	1.07 (3H, s)	17.4
25	0.91 (3H, s)	16.2	0.59 (3H, s)	15.2	1.02 (3H, s)	17.9	0.99 (3H, s)	18.2
26	1.08 (3H, s)	17.9	0.61 (3H, s)	16.9	1.00 (3H, s)	18.2	1.10 (3H, s)	18.0
27	1.27 (3H, s)	24.4	1.08 (3H, s)	25.7	1.28 (3H, s)	26.6	1.30 (3H, s)	24.4
28		180.4		180.8		180.7		180.4
29	1.03 (3H, d, 6.4)	18.0	0.75 (3H, s)	32.9	0.96 (3H, s)	33.7	1.00 (3H, d, 6.4)	17.9
30	0.97 (3H, d, 6.4)	21.9	0.78 (3H, s)	23.4	1.04 (3H, s)	24.2	0.95 (3H, d, 6.4)	21.9

## 7) Compound 17의 구조 동정

Compound 17은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 29개의 카본 피크가 관찰되며,  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  0.66 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.99 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.90 (3H, d,  $J = 6.41$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.81 (3H, d,  $J = 6.9$ Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.79 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.82 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 6개의 methyl proton을 바탕으로 sterol 계통의 화합물임을 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.33 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.50 (1H, m)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 한 개의 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  141.0, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  121.9) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  72.0 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>64</sup>과 비교하여 compound 17은  $\beta$ -sitosterol로 동정하였다.

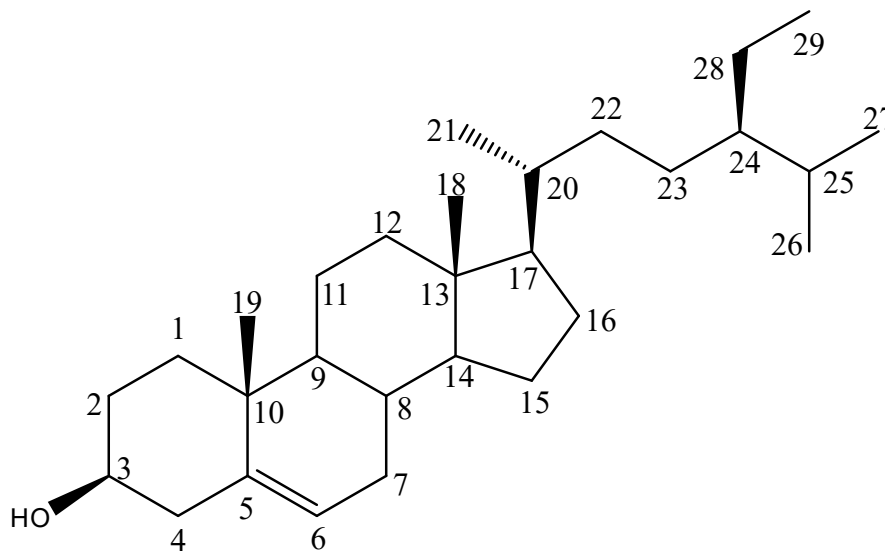


Figure 15. Chemical structure of compound 17

Table 7.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **17** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>17</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		37.4
2		29.9
3	3.50 (1H, m)	72.0
4		42.5
5		141.0
6	5.33 (1H, d, 5.0)	121.9
7		32.1
8		31.9
9		50.3
10		36.7
11		21.3
12		40.0
13		42.5
14		57.0
15		24.5
16		28.5
17		56.2
18	0.66 (3H, s)	12.1
19	0.99 (3H, s)	20.0
20		36.4
21	0.90 (3H, d, 6.9)	19.0
22		34.1
23		26.2
24		46.0
25		29.3
26	0.81 (3H, d, 7.3)	19.6
27	0.79 (3H, d, 6.9)	19.2
28		23.3
29	0.82 (3H, t, 7.3)	12.2

## 8) Compound 18의 구조 동정

Compound 18은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.32 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.51 (1H, dd,  $J = 8.7, 2.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.96 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *ortho*, *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.97 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  3.96 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  3.95 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  3.91 (3H, s)의 signal들은 deshielding 된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 15개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $^1\text{H-NMR}$  data를 종합하여 flavones 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  182.8의 signal은 carbonyl group인 carbon으로 예상하며,  $\delta_{\text{C}}$  61.1, 56.6, 56.4, 56.4의 signal들은  $sp^3$  혼성 탄소로 methoxyl 4개 있음을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>65</sup>과 비교하여 compound 18은 5-desmethylinensetin (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)로 동정하였다.

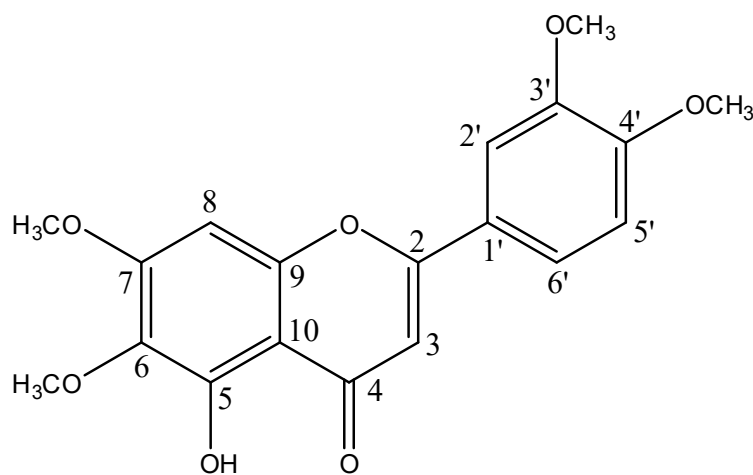


Figure 16. Chemical structure of compound 18

Table 8.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **18** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>18</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		164.2
3	6.54 (1H, s)	104.7
4		182.8
5		153.4
6		132.9
7		159.0
8	6.58 (1H, s)	90.8
9		153.3
10		106.4
1'		124.0
2'	7.32 (1H, d, 2.3)	109.0
3'		149.5
4'		152.5
5'	6.96 (1H, d, 8.7)	111.4
6'	7.51 (1H, dd, 2.3, 8.7)	120.3
6-OCH <sub>3</sub>	3.91 (3H, s)	61.1
7-OCH <sub>3</sub>	3.97 (3H, s)	56.6
3'-OCH <sub>3</sub>	3.95 (3H, s)	56.4
4'-OCH <sub>3</sub>	3.96 (3H, s)	56.4



9) Compound 19, 20의 구조 동정

Compound 19는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.59 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  6.22 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 *trans*-탄소-탄소 이중결합의 proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  7.45 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)와  $\delta_{\text{H}}$  6.80 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)의 signal들은 적분 값이 2이며, coupling constant를 통해 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring 구조를 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 대칭인 두 개의 aromatic ring을 포함하여 총 9개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $^1\text{H-NMR}$  data를 종합하여 phenylpropionic acids 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  171.3의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>66</sup>과 비교하여 compound 19는 *p*-coumaric acid (*trans*-4-hydroxy-cinnamic acid)로 동정하였다.

Compound 20은  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum 분석 결과, compound 19와 유사한 구조를 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  7.03 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.93 (1H, dd,  $J = 8.2, 2.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.78 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *ortho*, *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>67</sup>과 비교하여 compound 20은 caffeic acid로 동정하였다.

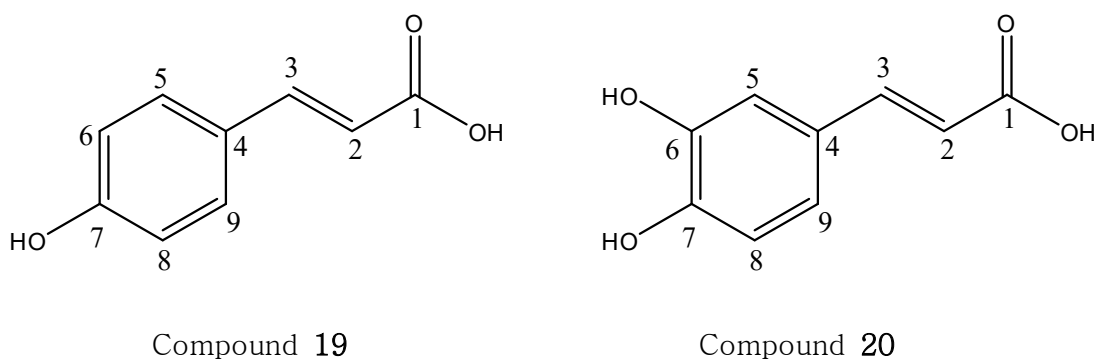


Figure 17. Chemical structure of compounds 19 and 20

Table 9.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **19** and **20** (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>19</b>		Compound <b>20</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		171.3		171.2
2	6.22 (1H, d, 16.0)	116.9	6.22 (1H, d, 16.0)	115.6
3	7.59 (1H, d, 16.0)	146.7	7.53 (1H, d, 16.0)	147.2
4		127.4		127.9
5	7.45 (1H, d, 8.7)	131.2	7.03 (1H, d, 2.3)	115.2
6	6.80 (1H, d, 8.7)	115.9		147.0
7		161.3		149.6
8	6.80 (1H, d, 8.7)	115.9	6.78 (1H, d, 8.2)	116.6
9	7.45 (1H, d, 8.7)	131.2	6.93 (1H, dd, 2.3, 8.2)	123.0

## 10) Compound **21**의 구조 동정

Compound **21**은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.55 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  6.27 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 *trans*-탄소-탄소 이중결합의 proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  7.40 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.95 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.78 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz) 또한  $\delta_{\text{H}}$  6.75 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.61 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.70 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz)의 signal들은 coupling constant를 통해 서로 *ortho*, *meta*-coupling을 하고 있는 2 개의 aromatic ring 구조를 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 과 DEPT- $135^\circ$  spectrum을 통하여 총 18개의 carbon이 있음을 확인하였으며, 이들은 1개 methylene carbon  $\delta_{\text{C}}$  38.1과 8개 quaternary carbon ( $\delta_{\text{C}}$  173.8, 168.6, 149.9, 147.0, 146.3, 145.4, 129.5, 127.8) 나머지 methine carbon이 9개를 나타내었다.  $^1\text{H-NMR}$  data를 종합하여 phenylpropionic acids dimer 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  173.8과  $\delta_{\text{C}}$  168.6의 signal들은 carbonyl group인 carbon으로 예상하였다.

그리고 HMQC spectrum을 통해서  $\delta_{\text{H}}$  5.18 (1H, dd,  $J = 8.5, 4.6$  Hz)의 signal은 직접 대응한 carbon signal은  $\delta_{\text{C}}$  74.9를 확인하였고 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 methylidyne proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.10 (1H, dd,  $J = 14.2, 4.1$  Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  3.00 (1H, dd,  $J = 14.4, 8.7$  Hz)의 signal들은 직접 대응한 carbon signal은  $\delta_{\text{C}}$  38.1을 확인하였고, anisotropic effect 때문에 deshielding된 것으로 보아 aromatic ring의  $sp^3$  혼성에 관여하는 methylene proton으로 예상하였다.

HMBC spectrum을 통하여  $\delta_{\text{C}}$  74.9의 hydroxyl group이 carbonyl carbon인  $\delta_{\text{C}}$  173.8, 168.6 및 methylene carbon인  $\delta_{\text{C}}$  38.1 피크, 그리고 benzene ring 탄소인  $\delta_{\text{C}}$  129.5과 연결되어 있음을 확인하였다.  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY spectrum을 통해 aliphatic carbon들의 배열을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 compound **21**은 (*S*)-danshensu caffeic anhydride로 자연계에서 처음으로 분리된 신규화합물이다. Compound **21**의 HR-ESI-MS 분석 결과  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$

383.0743 (calc. 383.0743)로 예상한 화합물의 분자량과 일치함을 확인하였다.

Optical rotation 측정결과는  $[\alpha]_D^{20} = +5.4$  ( $c$  0.16, MeOH)이다.

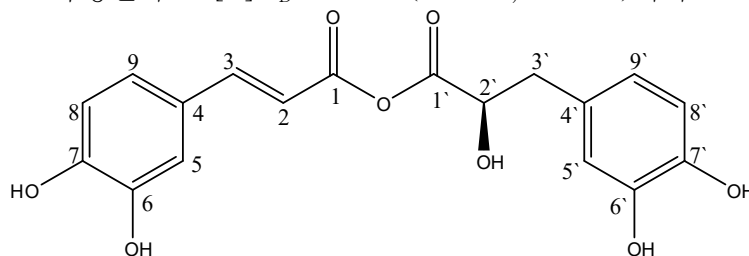


Figure 18. Chemical structure of compound **21**

Table 10.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data and informations of HMBC of compound **21** (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>21</b>			
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC ( $J^2$ )	HMBC ( $J^3$ )
1		168.6		
2	6.27 (1H, d, 16.0)	114.6	168.6(C1)	127.8(C4)
3	7.55 (1H, d, 16.0)	147.8	127.8(C4)	168.6(C1), 115.3(C5), 123.3(9)
4		127.8		
5	7.04 (1H, d, 1.8)	115.3	147.0(C6)	149.9(C7), 123.3(9)
6		147.0		
7		149.9		
8	6.78 (1H, d, 8.2)	116.4	149.9(C7)	127.8(C4), 147.0(C6)
9	6.95 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.3	116.4(C8)	115.3(C5), 149.9(C7)
1'		173.8		
2'	5.18 (1H, dd, 8.7, 4.1)	74.9	173.8(C1'), 38.1(C3')	168.6(C1), 129.5(C4')
3'	3.10 (1H, dd, 14.2, 4.1) 3.00 (1H, dd, 14.2, 8.7)	38.1		173.8(C1'), 74.9(C2'), 129.5(C4'), 117.7(C5'), 121.9(C9')
4'		129.5		
5'	6.75 (1H, d, 1.8)	117.7		38.1(C3'), 145.4(C7'), 121.9(C9')
6'		146.3		
7'		145.4		
8'	6.70 (1H, d, 7.8)	116.6		129.5(C4'), 146.3(C6')
9'	6.61 (1H, dd, 8.0, 1.8)	121.9		38.1(C3'), 117.7(C5'), 145.4(C7')

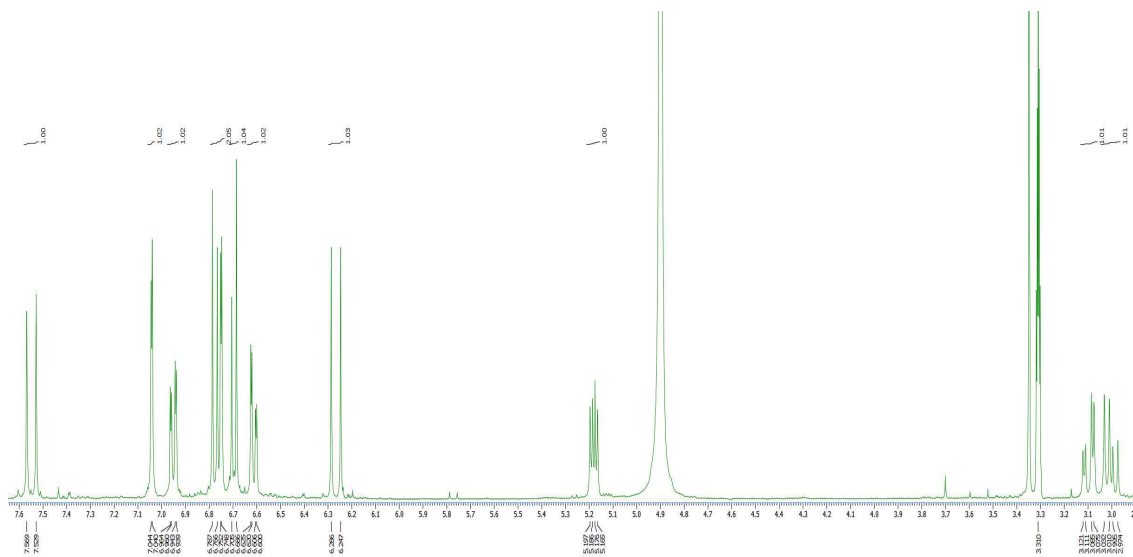


Figure 19.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **21** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

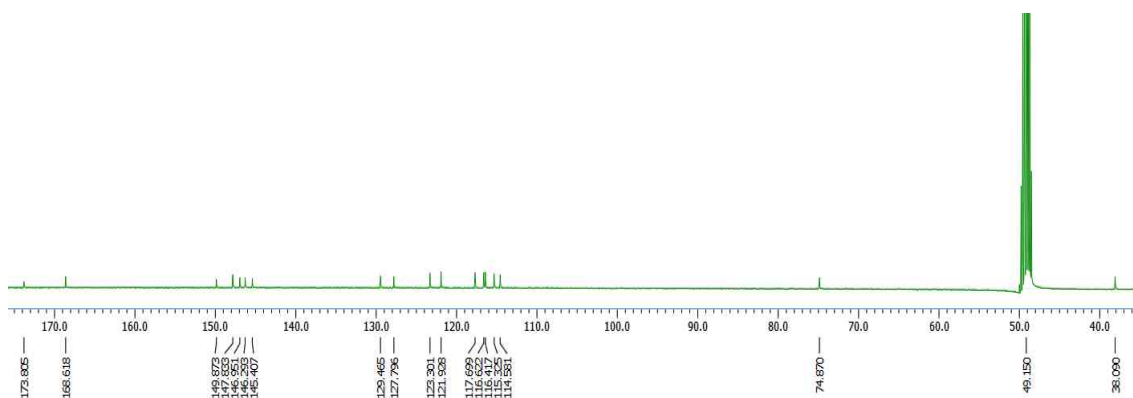


Figure 20.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **21** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

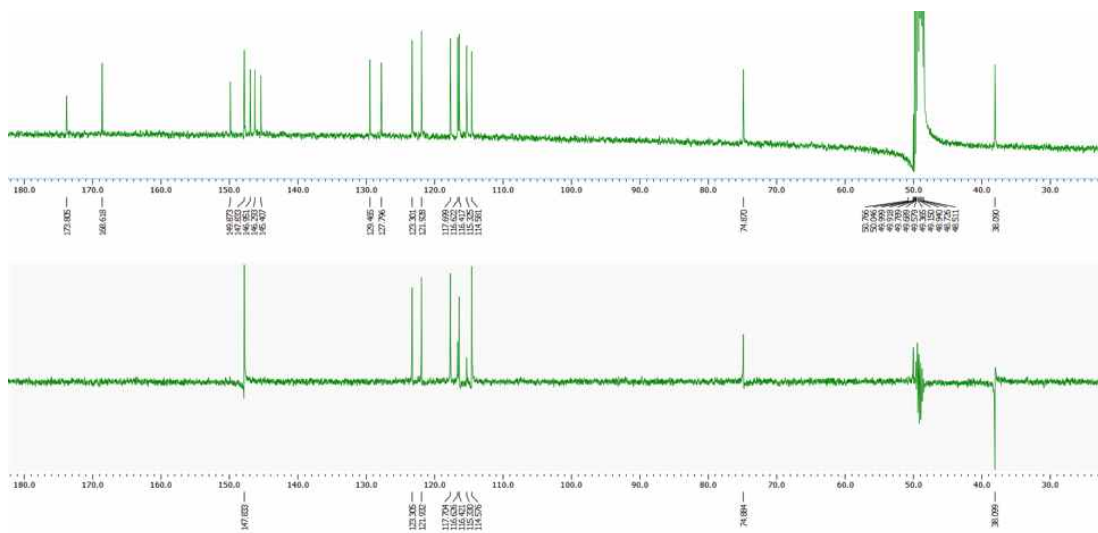


Figure 21. DEPT-135° spectrum of compound **21** (in CD<sub>3</sub>OD)

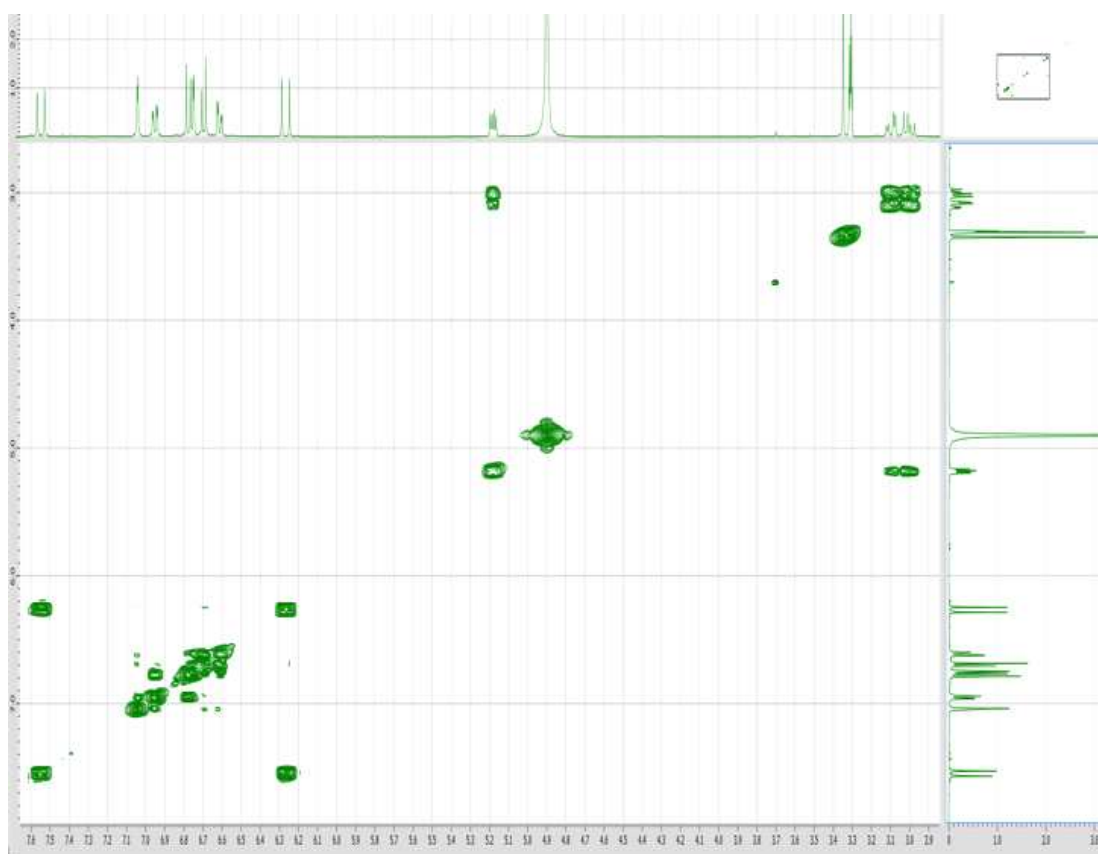


Figure 22. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum of compound **21** (in CD<sub>3</sub>OD)

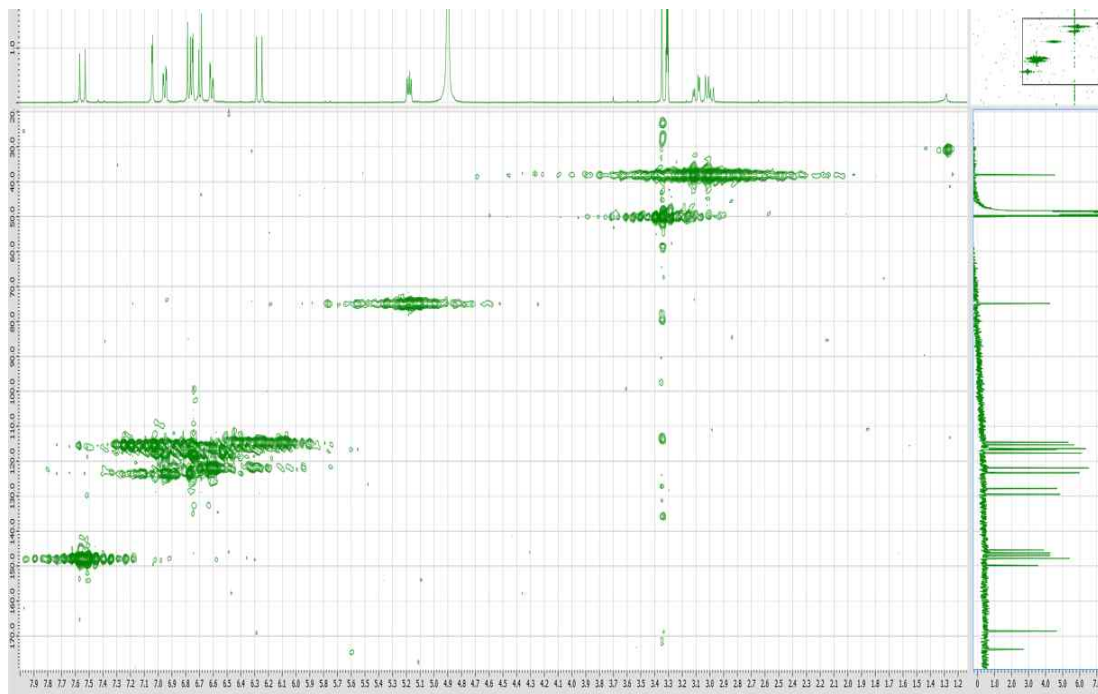


Figure 23. HMQC spectrum of compound **21** (in CD<sub>3</sub>OD)

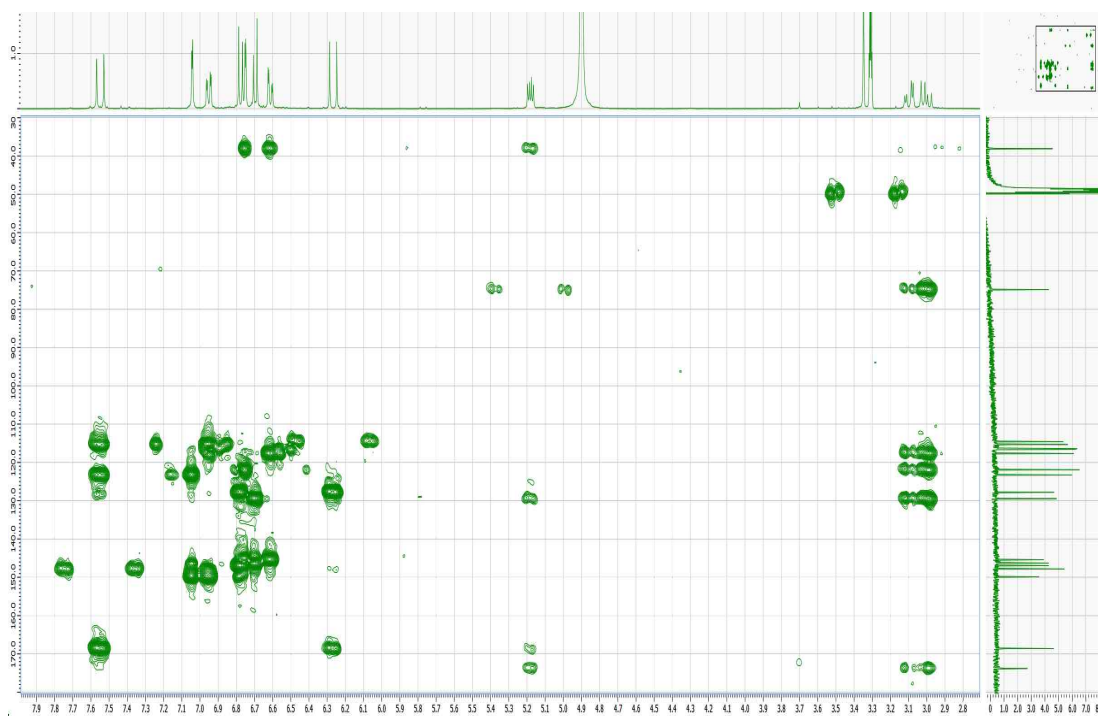


Figure 24. HMBC spectrum of compound **21** (in CD<sub>3</sub>OD)

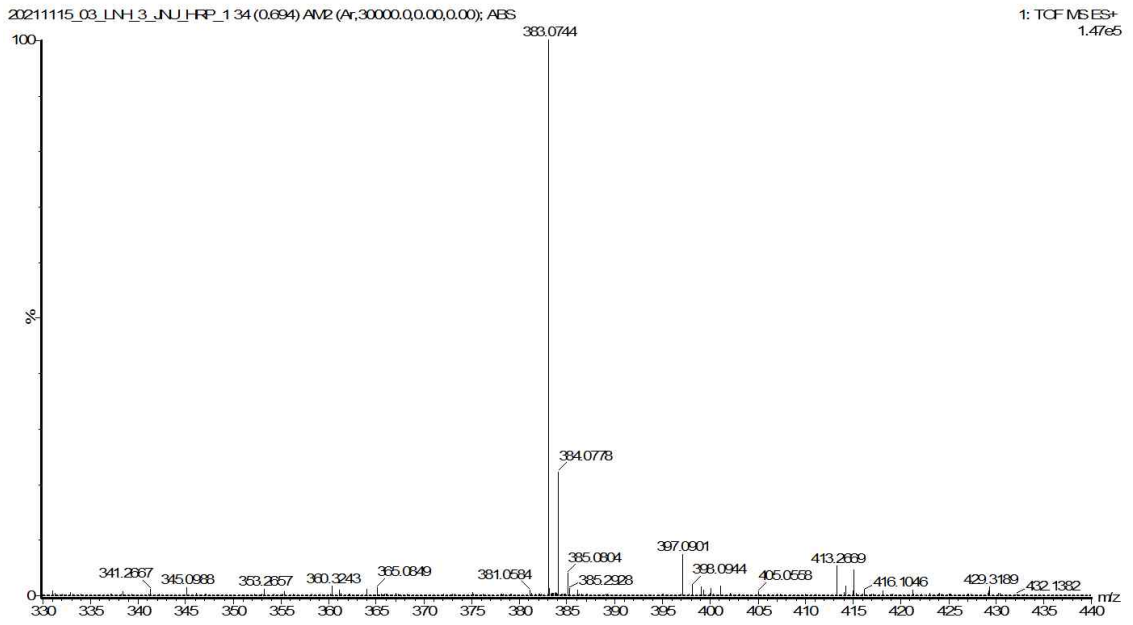


Figure 25. HR-ESI-MS spectrum of compound **21**



#### 4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항산화

###### (1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 gallic acid 검정곡선을 이용하여 분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물에 함유되어 있는 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 측정된 값은 각 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, 추출물 및 *n*-BuOH 분획물에서 각각  $60.84 \pm 1.04$ ,  $65.58 \pm 0.46$  mg/g GAE로 다른 분획물들에 비해 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 26).

###### (2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드는 quercetin을 표준물질로 한 표준검정곡선을 이용하여 분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물에 함유되어 있는 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 측정된 값은 각 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서  $17.07 \pm 2.65$ ,  $18.41 \pm 0.81$  mg/g QE로 추출물 및 다른 분획물들에 비해 가장 많은 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 27).

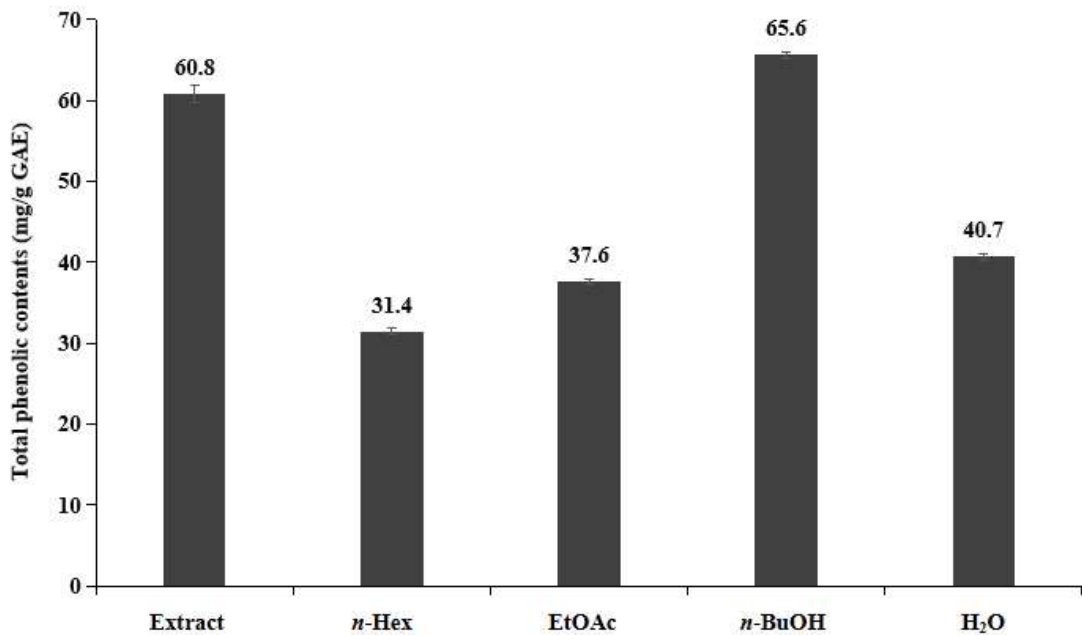


Figure 26. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *E. angustifolium* L. aerial parts. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

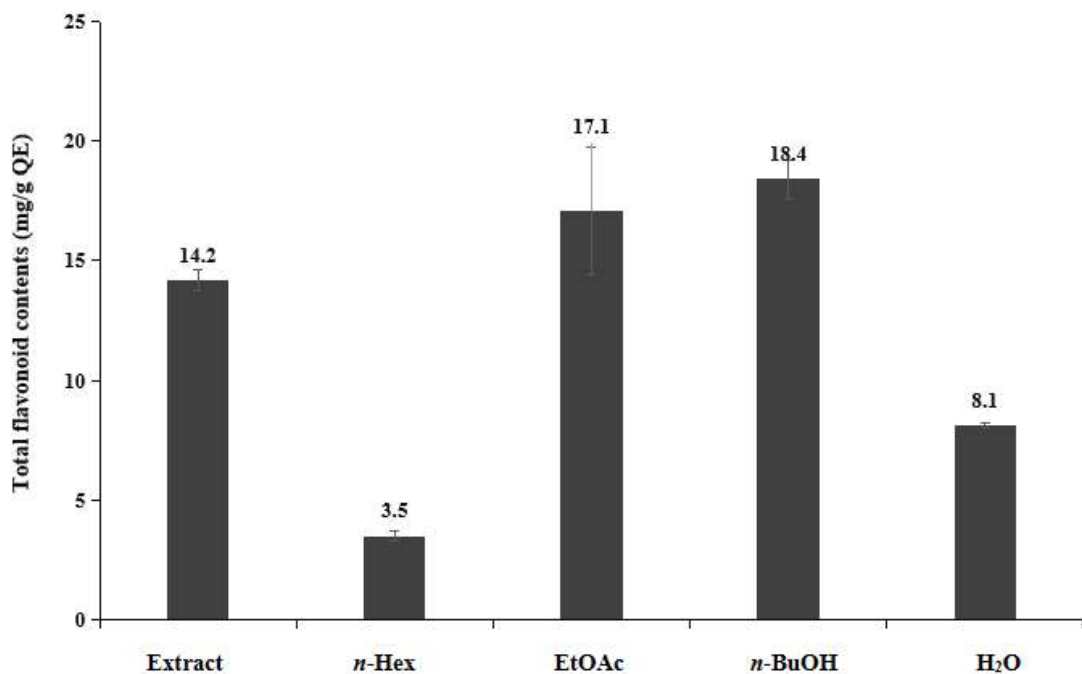


Figure 27. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *E. angustifolium* L. aerial parts. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 25-400 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, 추출물, *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 80.6, 67.2 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 28, Table 11).

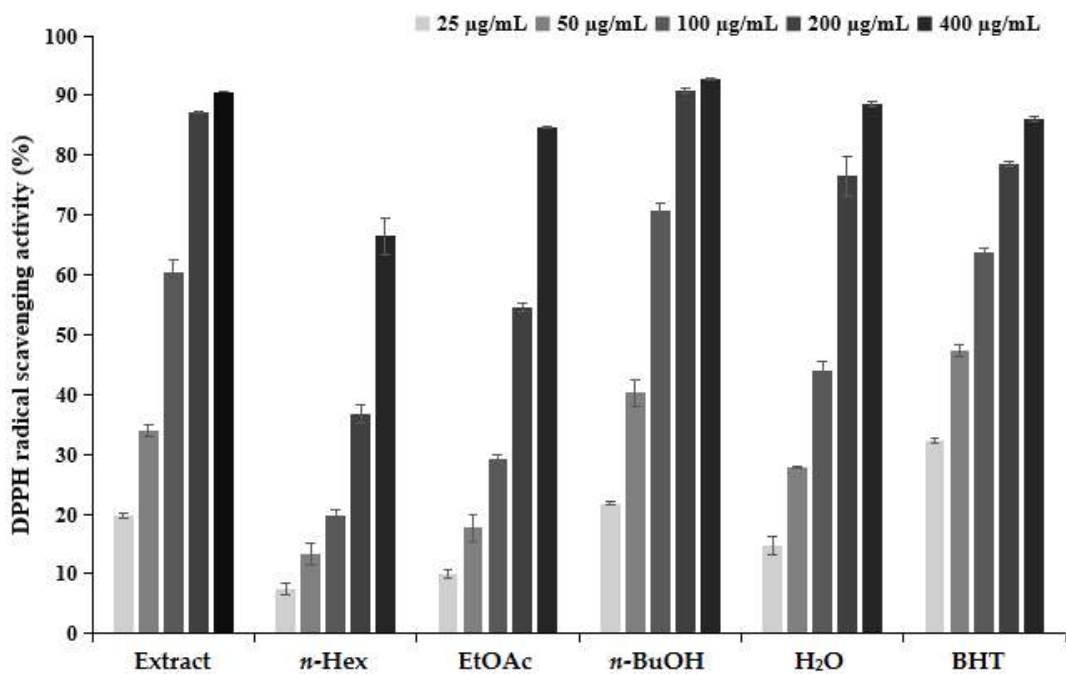


Figure 28. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from *E. angustifolium* L. aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments

Table 11. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *E. angustifolium* L. aerial parts.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	80.6	291.6	182.6	67.2	118.4	63.8

(4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 6.25-400 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, 추출물, *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 53.6, 37.5 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다(Figure 29, Table 12).

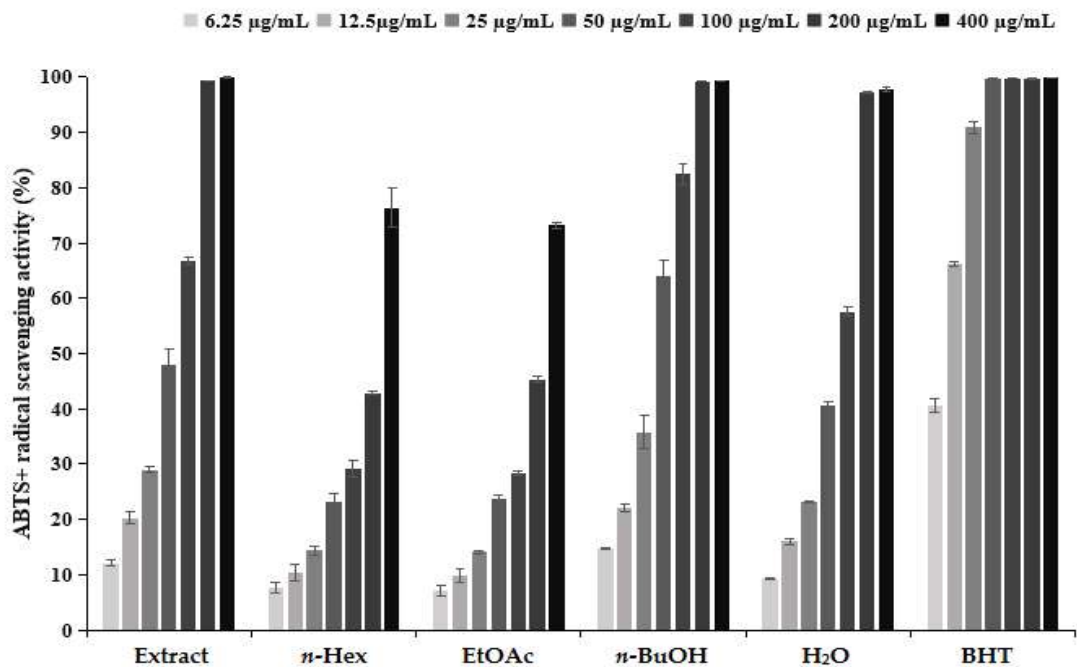


Figure 29. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent layers from *E. angustifolium* L. aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 12. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *E. angustifolium* L. aerial parts.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	53.6	236.5	240.2	37.5	76.8	8.4

## 2) 항균

### (1) Paper disc diffusion method

분홍바늘꽃 지상부 추출물 및 분획물의 항균 활성을 확인하기 위하여 피부 상재균(resident flora)인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 및 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 4015)를 사용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다.

그 결과, 분홍바늘꽃 지상부의 추출물이 *S. epidermidis*에 대한 제일 우수한 항균 활성을 나타내었으며, *n*-BuOH, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 순서로 활성이 우수하게 나타났다.

또한, 분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물이 *C. acnes*에 대하여 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 우수한 항균 활성을 나타냈다.

마찬가지로 분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물이 *S. mutans* 균주에 대해서는 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 모두 우수한 항균 활성을 보였다.



Figure 30. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from aerial parts of *E. angustifolium* L. on *S. epidermidis*, *C. acnes* and *S. mutans*.

Table 13. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from *E. angustifolium* L. aerial parts

Bacterial density ( $1.5 \times 10^6$ CFU/mL)	Clear zone (mm)		
	<i>S. epidermidis</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	9.5	10.5	12.5
<i>n</i> -Hex Fr.	9.0	9.0	9.0
EtOAc Fr.	8.5	8.5	8.5
<i>n</i> -BuOH Fr.	9.0	9.0	10.0
H <sub>2</sub> O Fr.	8.5	N.A.	8.5
Positive control	34.0	N.A.	32.0

Bacterial density ( $1 \times 10^8$ CFU/mL)	Clear zone (mm)			
	<i>C. acnes</i>			
	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
Extract	10.0	10.0	10.0	10.0
<i>n</i> -Hex Fr.	10.0	9.0	10.0	9.0
EtOAc Fr.	9.5	9.0	10.5	9.5
<i>n</i> -BuOH Fr.	8.5	N.A.	9.5	9.5
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Positive control	61.0	N.A.	N.A.	47.0

Bacterial density ( $3 \times 10^6$ CFU/mL)	Clear zone (mm)
	<i>S. mutans</i>
	KCCM 40105
Extract	11.0
<i>n</i> -Hex Fr.	11.5
EtOAc Fr.	12.0
<i>n</i> -BuOH Fr.	9.0
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.
Positive control	39.0

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 분홍바늘꽃 지상부의 항균 활성을 확인하였으며, 활성을 가지고 있는 시료에 대해 추가적으로 균주 성장 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 사용한 시료의 최대 농도는 10000 µg/mL로 하였으며, 최소 농도가 9.76 µg/mL가 되도록 two-fold serial dilutions 방법으로 희석하여 실험하였다.

그 결과, *S. epidermidis*의 경우에는 분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC 값을 확인하였으며, 그 중 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 MBC 값을 확인하였다. 그 결과, EtOAc와 H<sub>2</sub>O 분획물에서 CCAM 3711 균주를 제외하고 나머지 시료의 MBC 값을 모두 확인할 수 있었다(Table 14).

*C. acnes*의 경우에는 분홍바늘꽃 지상부의 *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 MIC와 MBC 값을 모두 확인하였다(Table 15).

*S. mutans*의 경우에는 분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물에서 실험한 모든 시료의 MIC를 확인하였으며, H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 나머지 모든 추출물 및 분획물에서 MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 16).



Table 14. MIC and MBC values of *E. angustifolium* L. aerial parts on *S. epidermidis*.

	<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	2500	5000	2500	10000	2500	5000
<i>n</i> -Hex Fr.	1250	10000	1250	10000	1250	10000
EtOAc Fr.	5000	10000	5000	10000	5000	>10000
<i>n</i> -BuOH Fr.	5000	10000	5000	10000	5000	5000
H <sub>2</sub> O Fr.	10000	10000	10000	10000	10000	>10000

Unit : µg/mL

Table 15. MIC and MBC values of *E. angustifolium* L. aerial parts on *C. acnes*.

	<i>C. acnes</i>							
	CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	625	2500	1250	2500	2500	5000	2500	2500
<i>n</i> -Hex Fr.	78.1	312.5	78.1	625	312.5	625	78.1	625
EtOAc Fr.	312.5	625	156.2	1250	625	1250	156.2	1250
<i>n</i> -BuOH Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
H <sub>2</sub> O Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

Unit : µg/mL

Table 16. MIC and MBC values of *E. angustifolium* L. aerial parts on *S. mutans*.

	<i>S. mutans</i>	
	KCCM 40105	
	MIC	MBC
Extract	1250	5000
<i>n</i> -Hex Fr.	39.1	625
EtOAc Fr.	1250	5000
<i>n</i> -BuOH Fr.	5000	10000
H <sub>2</sub> O Fr.	10000	>10000

Unit : µg/mL

### 3) 항염

#### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

분홍바늘꽃 지상부 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성 억제 활성과 세포 생존율 (MTT)을 확인하기 위하여 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 이용하였다. 우선 추출물과 용매 분획물은 100 µg/mL 농도로 실험을 실행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 세포 독성 없이 우수한 NO 생성억제 활성을 나타내었으며, 억제율은 각각 97.8%, 91.0%로 확인되었다(Figure 31). NO 생성을 50% 억제할 때의 농도(IC<sub>50</sub>)를 확인하기 위하여 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 추가 실험을 진행하였다. *n*-Hex은 6.25-100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, *n*-Hex 분획물은 농도의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보였고, IC<sub>50</sub> 값은 11.7 µg/mL로 확인되었다.

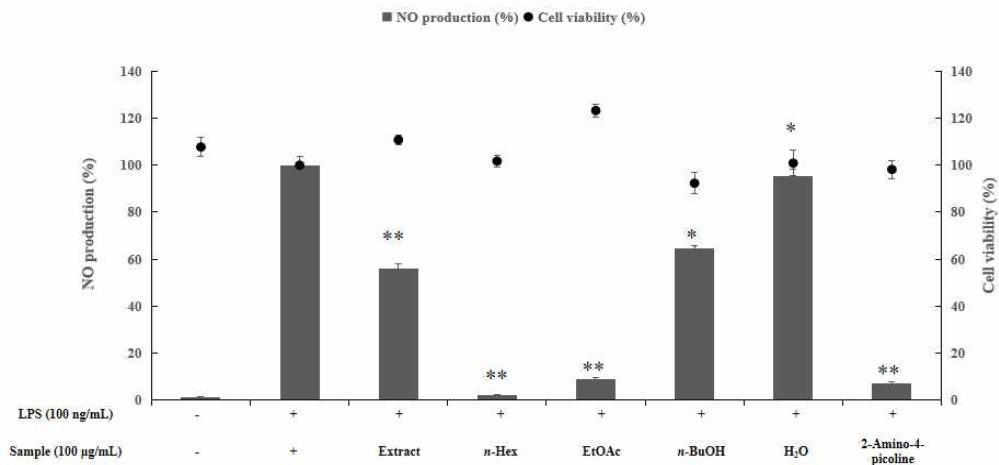


Figure 31. Effects of extract and solvent fractions from aerial parts of *E. angustifolium* L. on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from aerial parts of *E. angustifolium* L. and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

마찬가지로 EtOAc 분획물도 12.5-100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험하여, 농도의존적인 NO 생성 억제 활성을 확인하였고, IC<sub>50</sub> 값은 26.7  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Figure 32).

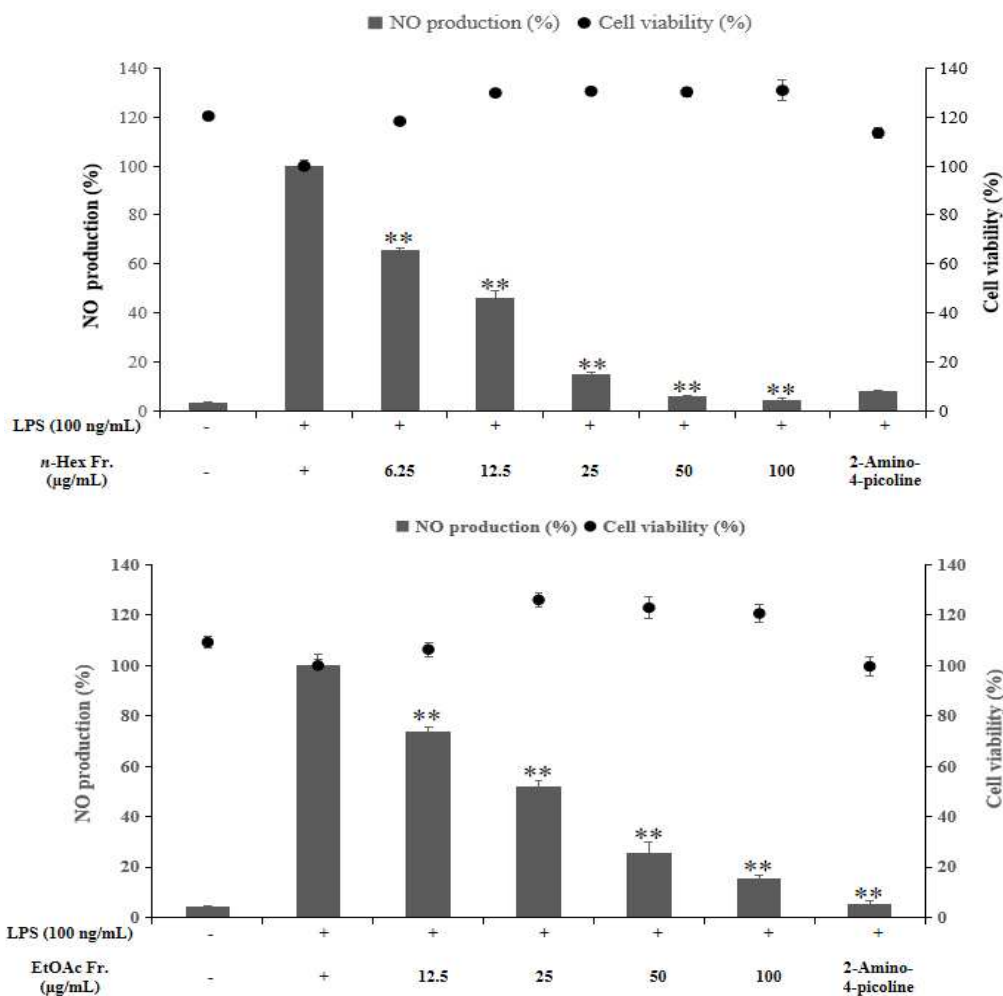
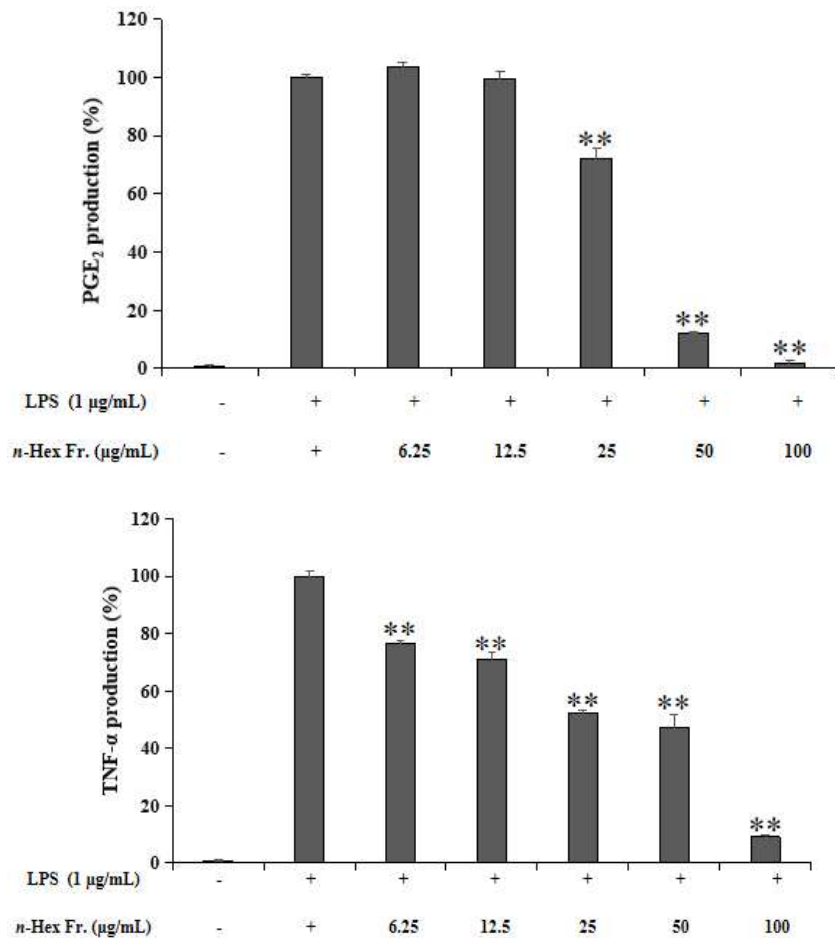


Figure 32. Effects of *n*-Hex and EtOAc fractions from aerial parts of *E. angustifolium* L. on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions from aerial parts of *E. angustifolium* L. and 2-amino-4-picoline (positive control, 5  $\mu\text{M}$ ) 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 cytokine 생성 억제 활성

분홍바늘꽃 지상부 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 분홍바늘꽃 지상부 *n*-Hex 분획물은 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 33).

또한, 분홍바늘꽃 지상부 EtOAc 분획물은 PGE<sub>2</sub> 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시키는 것으로 확인되었다(Figure 34).



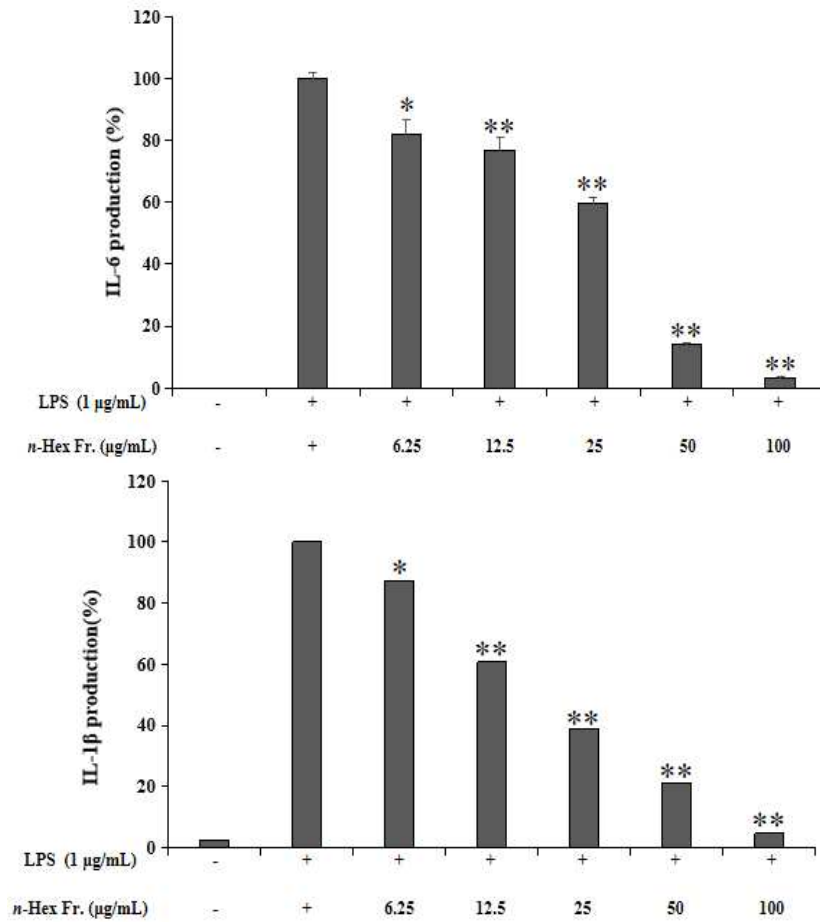


Figure 33. Effects of *n*-Hex fractions from aerial parts of *E. angustifolium* L. on PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-6, IL-1β production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

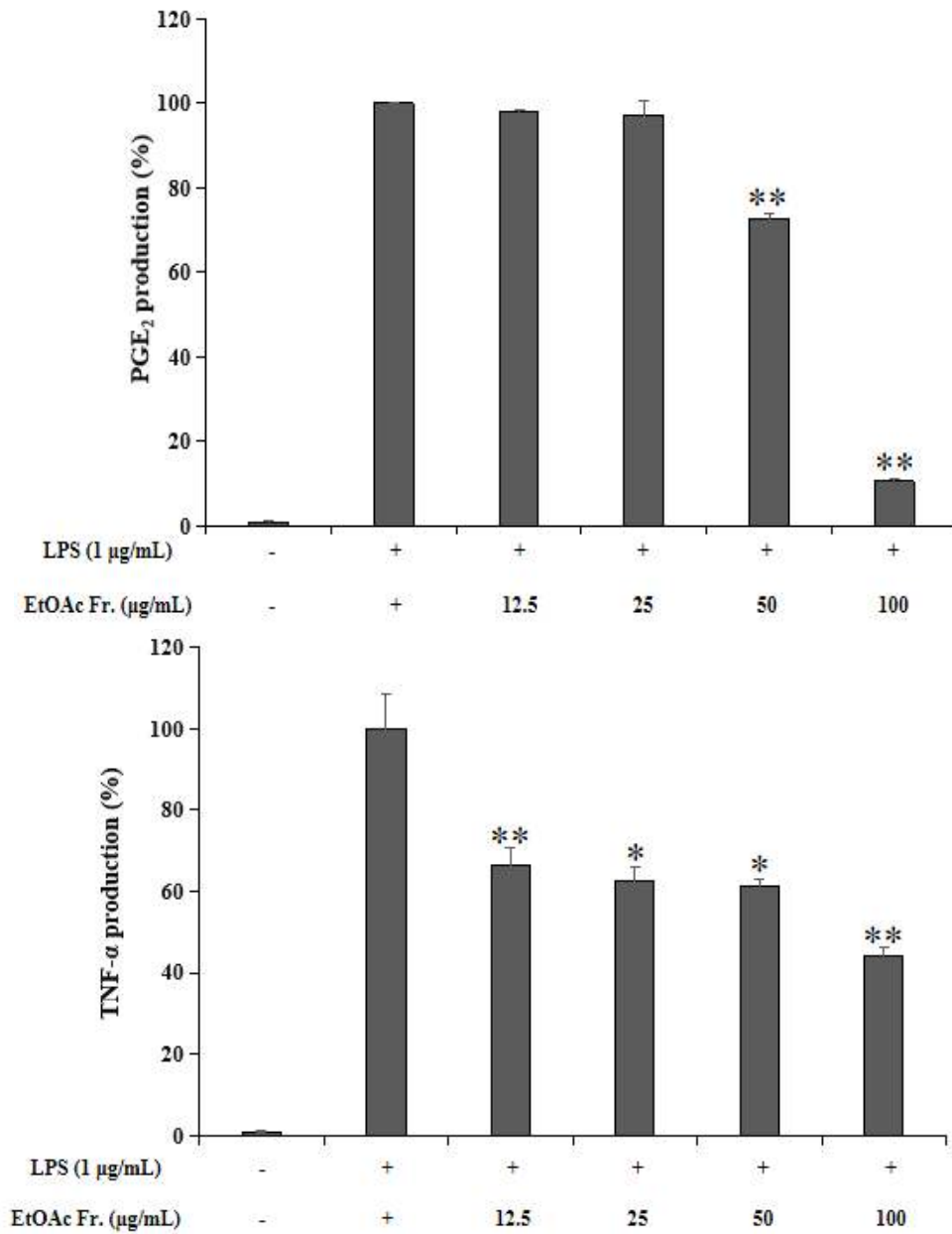


Figure 34. Effects of EtOAc fractions from aerial parts of *E. angustifolium* L. on PGE<sub>2</sub> and TNF-α production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

#### 4) 미백

##### (1) Melanogenesis 억제 활성

B16F10 melanoma cell을 이용하여 분홍바늘꽃 추출물 및 용매 분획물의 멜라닌 생성 억제 활성과 세포 독성을 확인하였다. 우선 추출물 및 각 분획물을 80 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex 분획물 약한 독성을 나타내었으며, 나머지 시료가 세포 독성 없이, 특히 EtOAc 분획물은 62.2% melanin 생성 억제 활성을 나타냈다(Figure 35).

상술한 결과를 바탕으로 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대한 농도를 내리고 추가적으로 melanin 생성 억제 실험을 진행하였으며, 그 결과, *n*-Hex 분획물의 경우에는 20, 30, 40 µg/mL 농도로 처리 후 세포 독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 활성을 확인하였으며, EtOAc 분획물의 경우에는 20, 40, 60, 80 µg/mL 농도로 처리 시 세포 독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 활성을 나타내었다(Figure 36).

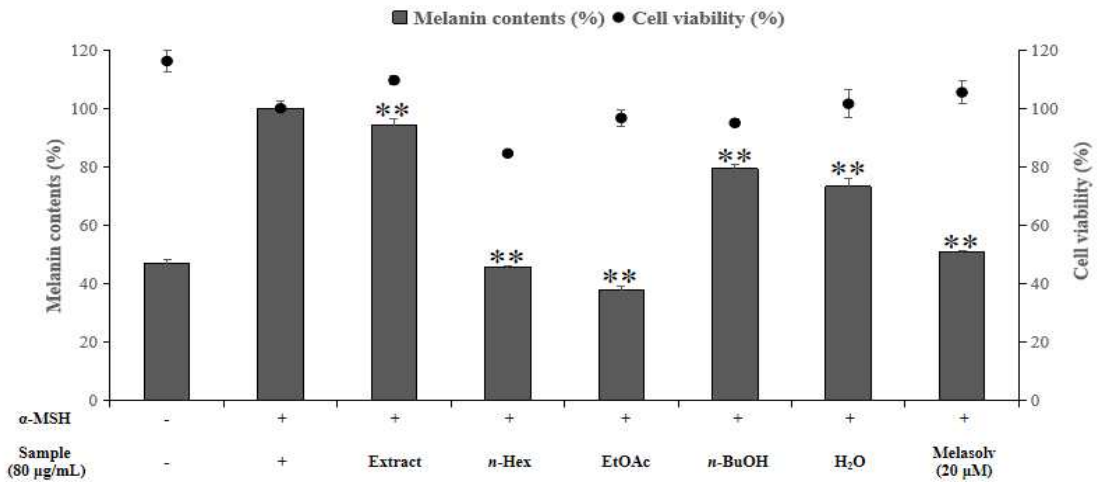


Figure 35. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of aerial parts of *E. angustifolium* L. in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\*  $p < 0.01$

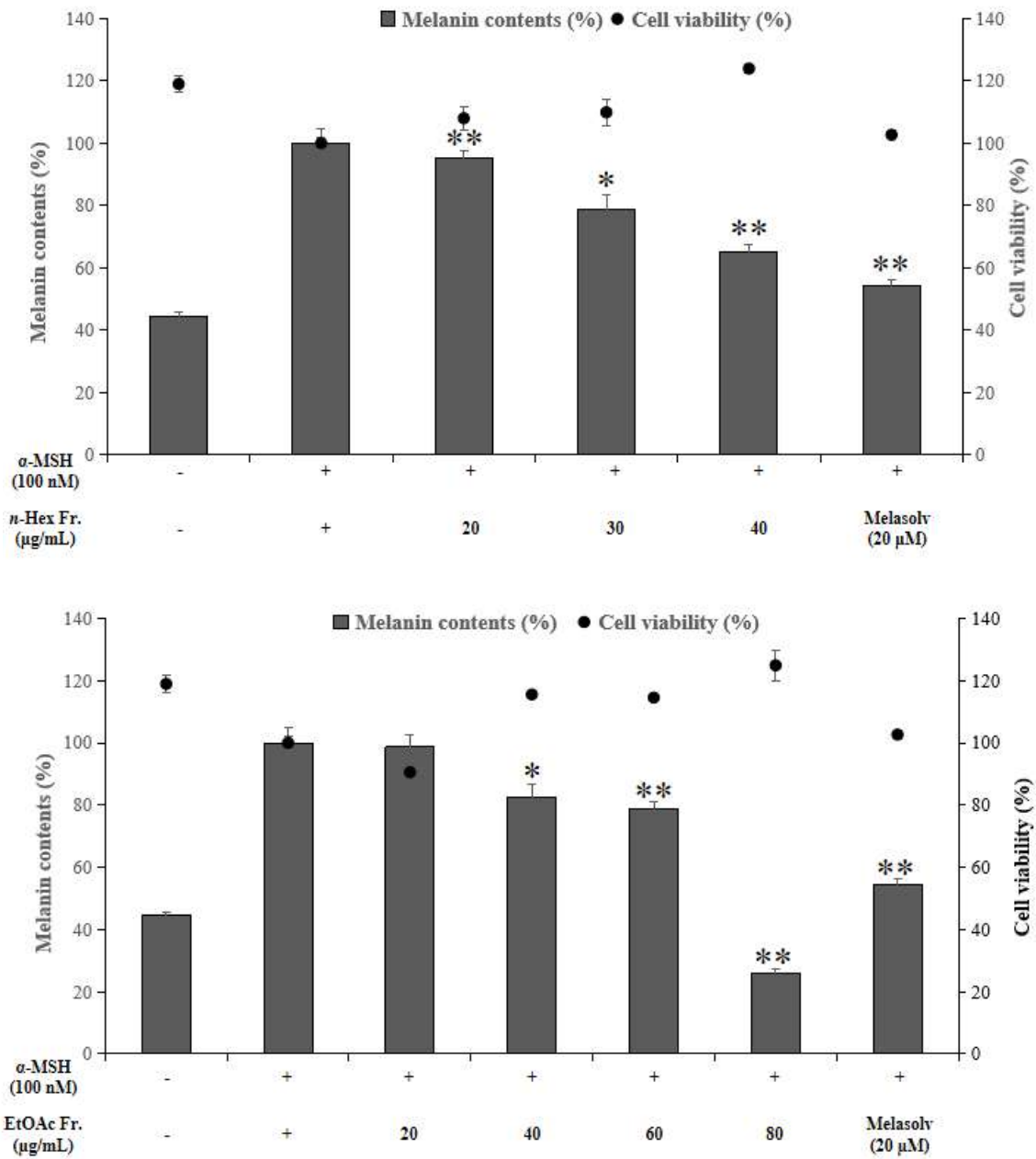


Figure 36. Melanin contents and cell viability of *n*-Hex and EtOAc fractions of aerial parts of *E. angustifolium* L. in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성

Melanogenesis 억제 효과가 있는 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대한 미백 메커니즘을 확인하기 위해서 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 농도 의존적으로 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 확인하였다(Figure 37).

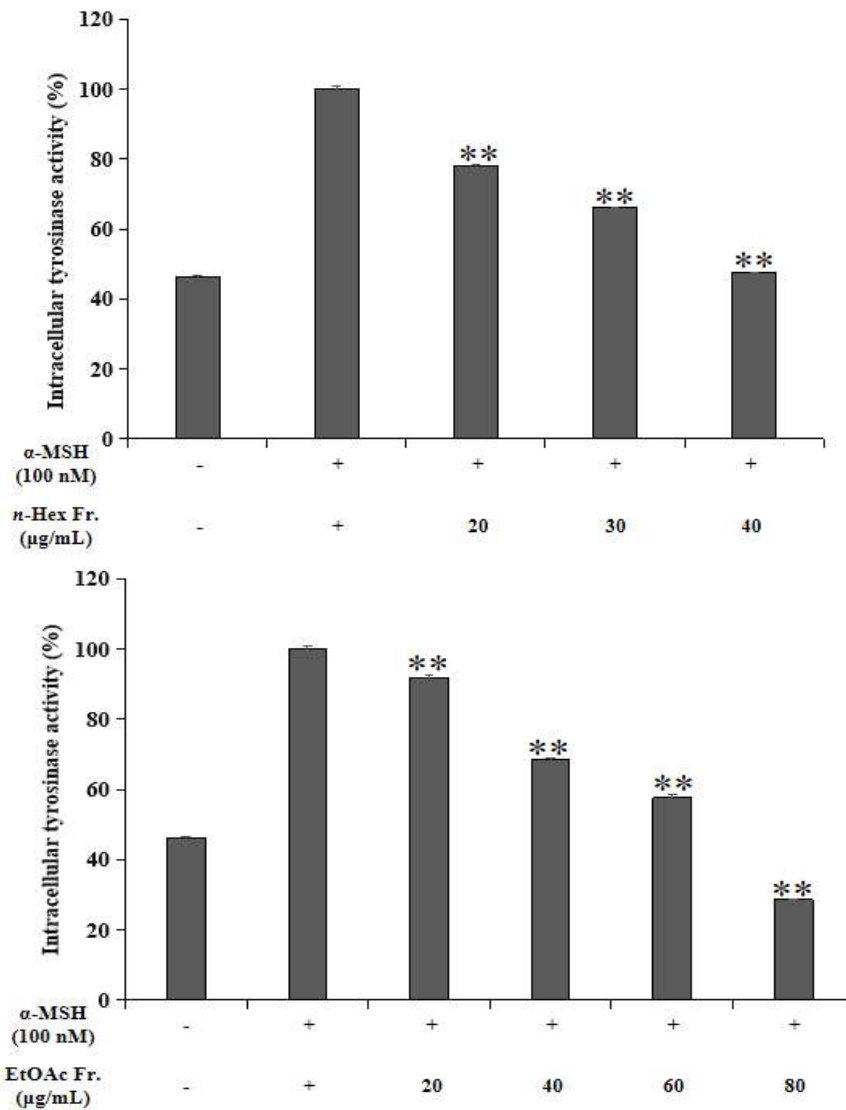


Figure 37. Intracellular tyrosinase inhibitory activity of *n*-Hex and EtOAc fractions of aerial parts of *E. angustifolium* L. in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\*  $p < 0.01$

5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항산화

(1) DPPH radical 소거 활성

분홍바늘꽃 지상부에 분리된 compound **21**에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 12.5-400  $\mu\text{M}$ 의 농도로 진행하였으며,  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다.

실험 결과, compound **21**에서  $\text{SC}_{50}$  값이 34.6  $\mu\text{M}$ 로 양성대조군 BHT에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 38, Table 17).

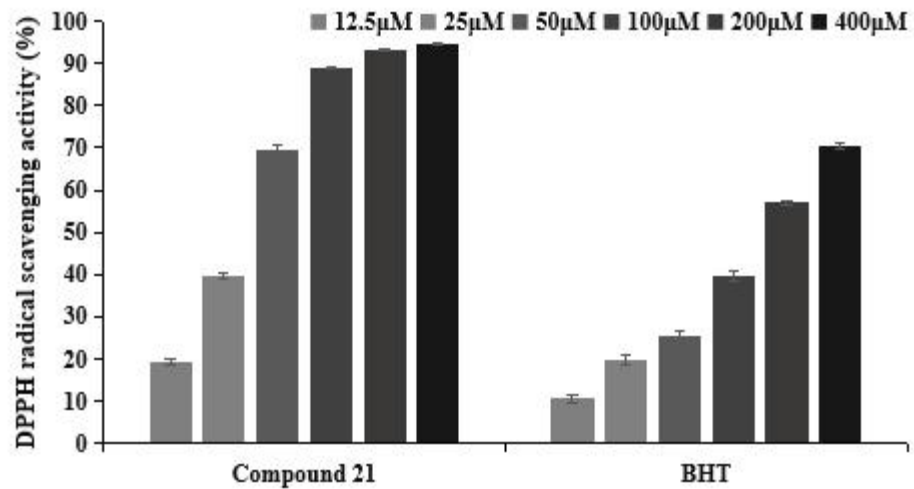


Figure 38. DPPH radical scavenging activities of compound **21** from *E. angustifolium* L. aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 17.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities for compound **21** from *E. angustifolium* L. aerial parts.

	Compound <b>21</b>	BHT
$\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	34.6	162.1

(2) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정

분홍바늘꽃 지상부의 분리된 compound **21**에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 12.5-200 μM의 농도로 진행하였으며, SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, compound **21**에서 SC<sub>50</sub> 값이 81.6 μM로 양성대조군 BHT와 유사한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다(Figure 39, Table 18).

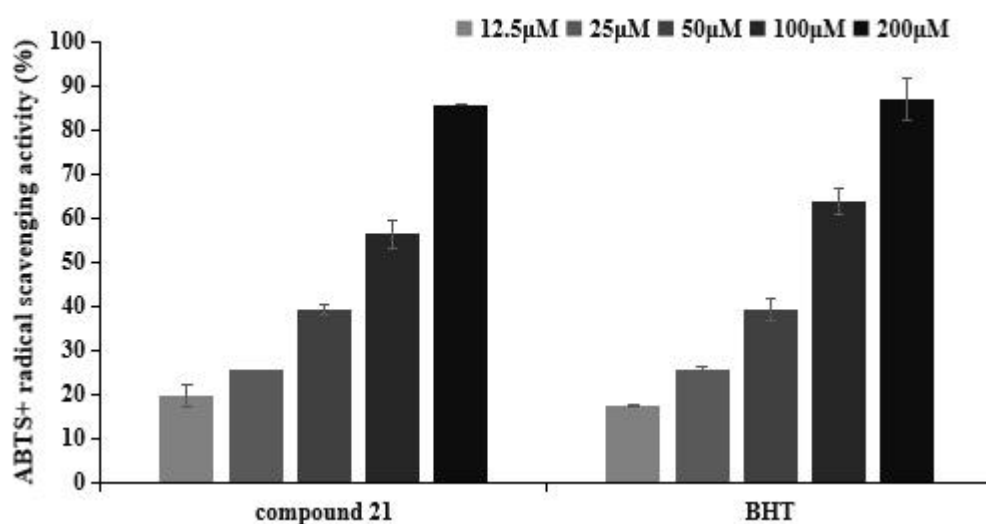


Figure 39. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of compound **21** from *E. angustifolium* L. aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 18. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities for compound **21** from *E. angustifolium* L. aerial parts.

	Compound <b>21</b>	BHT
SC <sub>50</sub> (μM)	81.6	72.3

## 2) 항염

### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

마우스의 대식세포(RAW 264.7)를 이용하여 분홍바늘꽃 지상부로부터 분리된 compound **21**의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성과 세포 독성을 측정하였다. Compound **21**은 50, 100, 200, 400  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, compound **21**은 400  $\mu\text{M}$  농도 이하에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였으며,  $\text{IC}_{50}$  값은 130.3  $\mu\text{M}$ 로 나타났다(Figure 40).

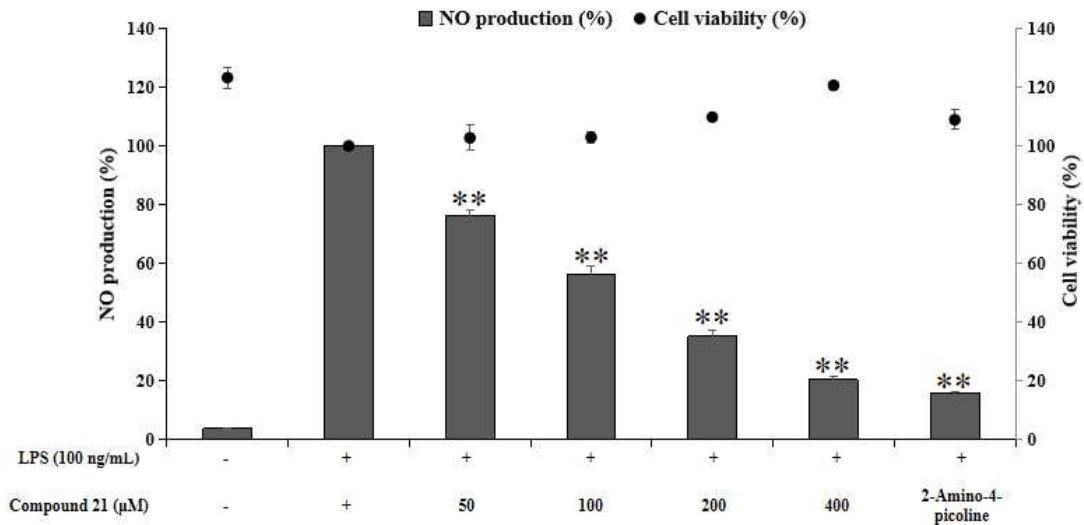
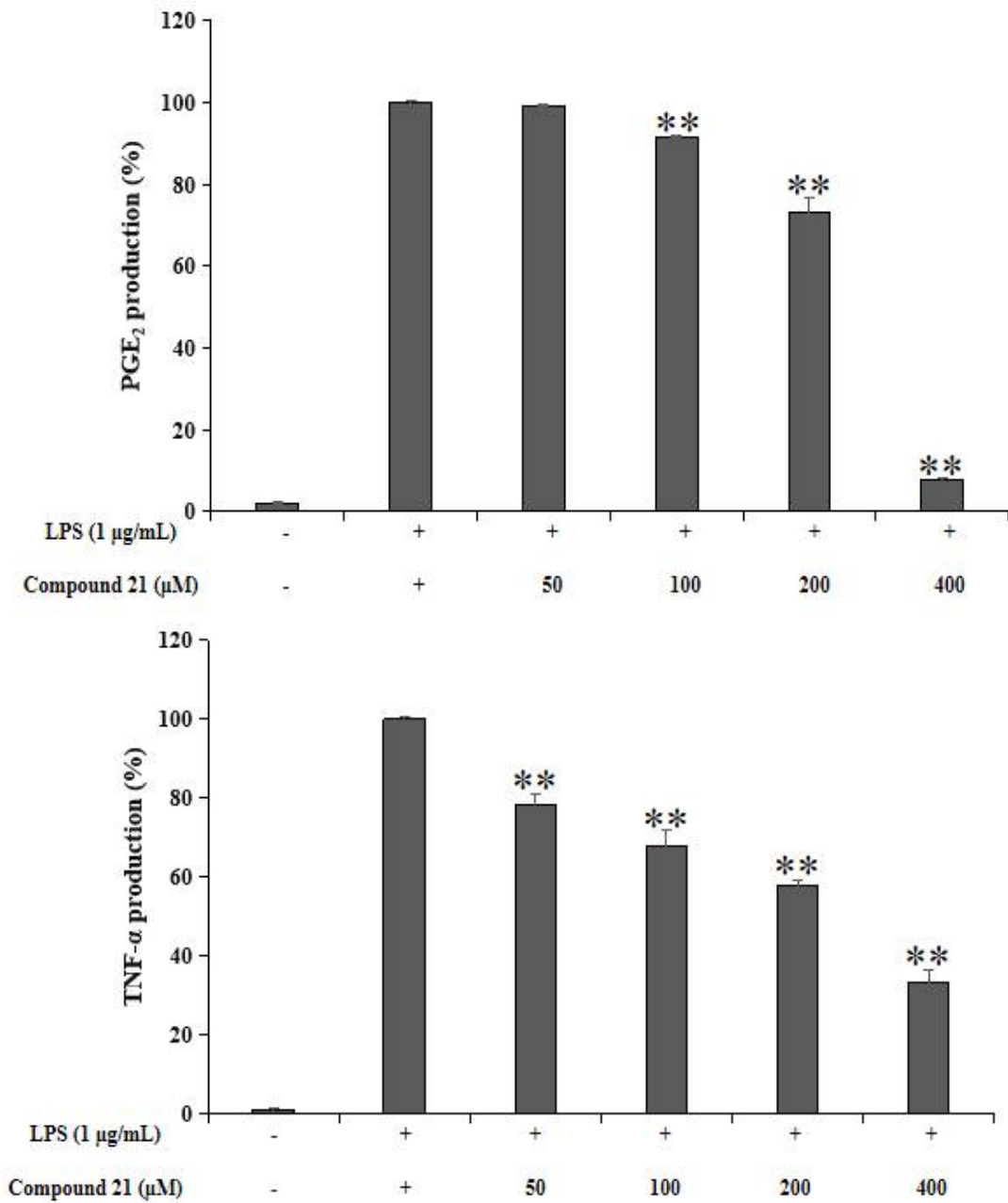


Figure 40. Effects of isolated compound **21** from aerial parts of *E. angustifolium* L. on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound **21** from aerial parts of *E. angustifolium* L. and 2-amino-4-picoline (positive control, 5  $\mu\text{M}$ ) 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 cytokine 생성 억제 활성

Compound 21의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, compound 21은 PGE<sub>2</sub>, TNF-α 및 IL-6의 생성을 효과적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 41).



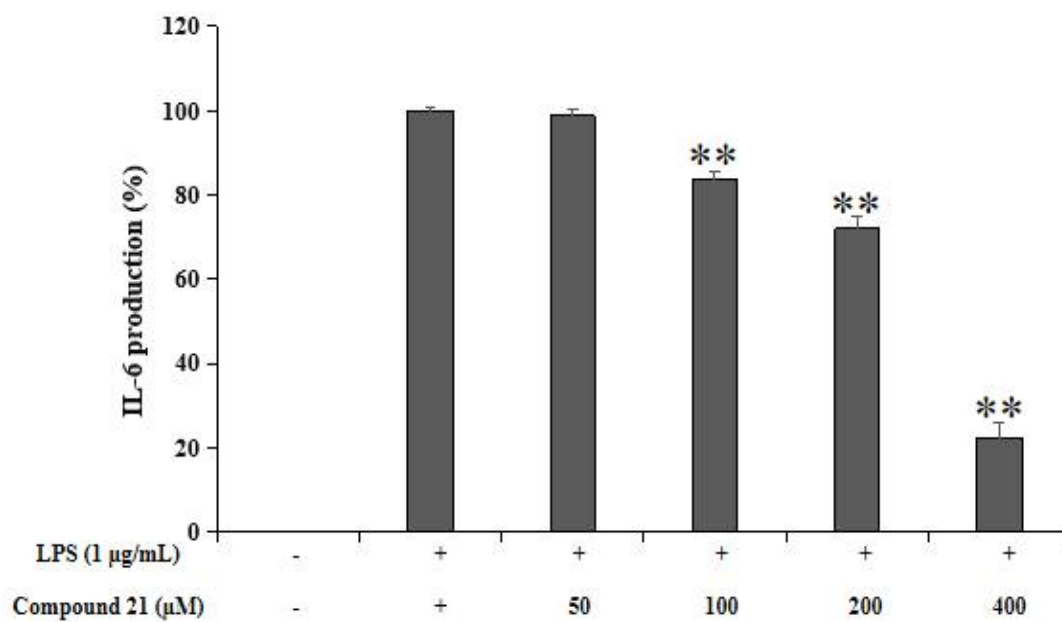


Figure 41. Effects of isolated compound **21** from aerial parts of *E. angustifolium* L. on PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , and IL-6 reduction and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

### 3) 미백

#### (1) Melanogenesis 억제 활성

B16F10 melanoma cell을 이용하여 분홍바늘꽃 추출물로부터 분리된 compound 21의 멜라닌 생성 억제 활성과 세포 독성을 측정하였다. 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행한 결과, compound 21은 세포 독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 활성을 나타냈다(Figure 42).

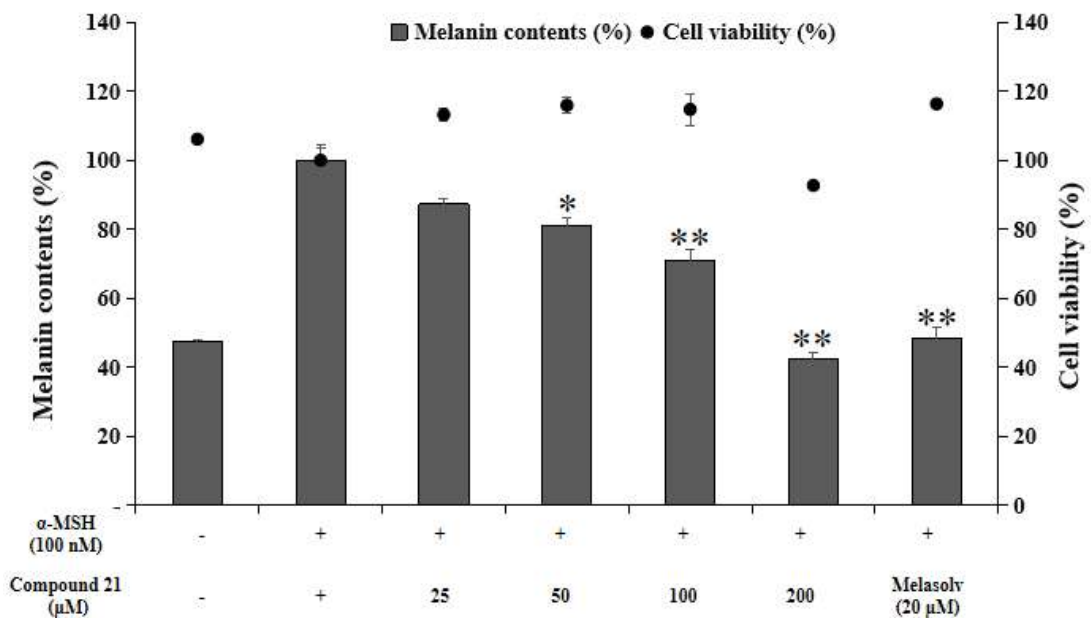


Figure 42. Melanin contents and cell viability of isolated compound 21 from aerial parts of *E. angustifolium* L. in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성

Melanogenesis 억제 효과가 있는 compound **21**에 대한 미백 메커니즘을 확인하기 위해서 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, compound **21**은 농도 의존적으로 세포 내의 tyrosinase 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 43).

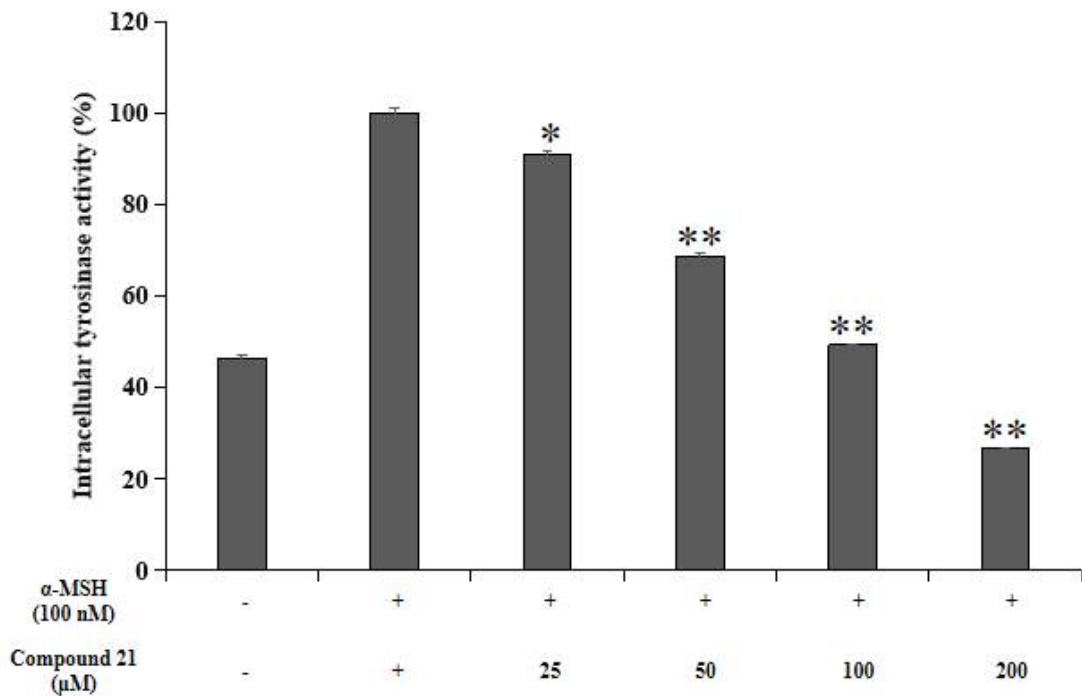


Figure 43. Intracellular tyrosinase inhibitory activity of isolated compound **21** from aerial parts of *E. angustifolium* L. in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



## 6. 요약 및 결론

본 연구는 분홍바늘꽃 지상부 70% 에탄올 추출물 및 용매 분획물이 연구 대상으로 다양한 생리 활성을 확인하고 함유된 식물화학 성분 분리를 하기 위해서 연구를 진행하여 약품, 기능성 화장품 및 식품 등 분야에 관련된 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

분홍바늘꽃 지상부 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 및 EtOAc 분획물은 우선 VLC를 이용할 다음에 silica gel이나 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리된 단일 화합물은 1D, 2D NMR 및 HR-ESI-MS를 이용하여 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 대비하여 총 21개의 화합물을 동정하였다.

분리된 화합물은 *n*-dodecane (1), lauric acid (2), ethyl oleate (3), 1-monoolein (4), linoleic acid (5), coriolic acid (6), ethyl linolenate (7),  $\alpha$ -linolenic acid (8), 1-linolenoyl glycerol (9), 15-isopimaren-3 $\beta$ ,8 $\beta$ -diol (10),  $\alpha$ -amyrin (11),  $\beta$ -amyrin (12), ursolic acid (13), oleanolic acid (14), maslinic acid (15), corosolic acid (16),  $\beta$ -sitosterol (17), 5-desmethylnisensetin (18), *p*-coumaric acid (19), caffeic acid (20), (*S*)-danshensu caffeic anhydride (21)로 확인을 되었으며, compound 21은 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

분홍바늘꽃 지상부의 항산화 실험 결과, *n*-BuOH 분획물과 추출물의 총 폴리페놀 함량이 각각 65.6, 60.8 mg/g GAE로 나타났으며, DPPH radical 소거 활성 실험에서 *n*-BuOH 분획물과 추출물은 대조군인 BHT와 유사한 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 분홍바늘꽃 지상부로부터 분리된 신규 화합물인 compound 21은 DPPH radical에 대한 SC<sub>50</sub> 값이 34.6  $\mu$ M로 양성대조군 BHT (162.1  $\mu$ M)에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, ABTS<sup>+</sup> radical SC<sub>50</sub> 값이 81.6  $\mu$ M로 양성대조군 BHT (72.3  $\mu$ M)와 유사한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다. 이상의 결과를 바탕으로 compound 21이 항산화 능력을 갖는 주요 활성 물질로 확인하였다.

항균 활성을 평가하기 위하여 여드름 질환에 관련된 피부 상재균인

*Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 그리고 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 4015)를 사용하여 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, 분홍바늘꽃 지상부의 추출물 및 용매 분획물은 *S. epidermidis*의 경우 EtOAc, *n*-BuOH, *n*-Hex, 추출물, H<sub>2</sub>O 분획물 차례로 항균 활성을 나타냈으며, MIC 값은 각각 500, 500, 1250, 2500, 10000 µg/mL로 확인되었다. 또한, *C. acnes*의 경우는 *n*-Hex, EtOAc, 추출물 차례로 항균 활성을 나타냈으며, MIC 값이 각각 78.1-312.5, 156.2-625, 625-2500 µg/mL로 확인되었고 MBC 값이 각각 31.2-625, 625-1250, 2500-5000 µg/mL로 확인되었다. 한편, *S. mutans*에 대한 *n*-Hex, EtOAc, 추출물, *n*-BuOH 분획물 차례로 항균 활성을 나타내었으며, MIC 값이 각각 39.1, 1250, 1250, 5000, 10000 µg/mL로 확인되었다. 또한 분리된 화합물 compound **13**, **14**는 문헌<sup>68</sup>을 통하여 우수한 항균 효능이 있음을 확인하였다.

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 분홍바늘꽃 지상부의 항염활성 실험을 진행한 결과, *n*-Hex, EtOAc 분획물이 100 µg/mL 이하의 농도에서 세포독성 없이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 11.7, 26.7 µg/mL로 확인하였다. 또한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 전 염증성 사이토카인 및 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 실험한 결과, *n*-Hex 분획물은 전 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6, IL-1β 그리고 PGE<sub>2</sub>에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였으며, EtOAc 분획물은 전 염증성 사이토카인인 TNF-α 그리고 PGE<sub>2</sub>에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다. 분홍바늘꽃 지상부로부터 분리된 신규 화합물인 compound **21**이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 130.3 µM로 확인하였다. 또한 전 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6 그리고 PGE<sub>2</sub>에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다.

분홍바늘꽃 지상부의 미백 활성 측정을 위하여 B16F10 melanoma cell을 이용

하여 melanin 생성량과 세포 독성을 측정하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물이 40 µg/mL 농도 이하에서 세포독성 없이 효과적인 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내었으며, 세포내 tyrosinase에 대한 농도 의존적으로 억제시킨 것으로 확인하였고, EtOAc 분획물이 80 µg/mL 농도 이하에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 멜라닌 생성 및 세포내 tyrosinase 억제한 것을 확인하였다. 한편, 분홍바늘꽃 지상부로부터 분리된 신규 화합물인 compound **21**이 200 µM 이하의 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 활성을 나타내었고, Intracellular tyrosinase 활성을 측정한 결과, 효과적으로 tyrosinase의 활성을 억제시키는 것으로 확인되었다.

이상의 연구를 바탕으로 (*S*)-danshensu caffeic anhydride (**21**)를 포함한 분홍바늘꽃 지상부 추출물을 이용하여 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성을 갖는 의약품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 사료된다.

## IV. 연구 2 : 편백 종자 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성 성분 연구

### 1. 재료

편백 (*Chamaecyparis obusa* (Siebold. et Zucc.) Endl.)는 측백과 (Cupressaceae)에 속한 상록 침엽 교목으로 나무 1959년부터 원산지 일본에서 도입 재배해 왔으며 주로 한국 남부지방에 서식하고 있다<sup>69</sup>. 편백 크기가 40 m 지름 2 m가량까지 자라며 4월에 꽃이 피고 열매는 구과(毬果)로 둥글고 지름 10~12 mm이며 9~11 월에 갈색으로 익고 8~10개의 씨앗바늘로 되어 있고 중앙부에 있는 재는 작고 뾰족하다. 씨앗바늘은 정사각형으로 종자는 씨앗바늘에 각각 2개씩 들어가 있으며 삼각형으로 길면서 양면이 돌출되어 있다.

식물화학에 따라 편백나무 잎 추출물에 주로 테페노이드 (terpenoid), 리그난 (lignan), 플라보노이드 (flavonoid), 스테로이드 (steroid), 지방산 등 성분을 함유하고 있음이 알려져 있다. 특히 편백과 대만산 편백의 정유에 관한 주요 구성 성분은 모노터펜 (monoterpene)과 세스퀴터펜 (sesquiterpene)을 다량 함유하기 때문에 강력한 항균, 살균 효과를 나타내다<sup>70</sup>. 대만산 편백의 심재 (heartwood)에서 분리된 주유 성분으로 다이터펜 (diterpene)<sup>71</sup>과 리그난<sup>72</sup>화합물들이 보고되어 있다.

현재까지 편백에 관한 생리활성 연구로 보면 편백나무 잎 추출물은 주로 항균, 항염, 항암, 살충 효과가 있음을 알려지었다<sup>73</sup>. 최근의 연구에 따라 편백 잎 추출물은 RAW264.7 세포에 대하여 신호통로인 JAK/STAT axis을 억제를 통하여 염증 반응을 예방할 수 있음을 확인하였다<sup>74</sup>. 하지만 편백 종자의 생리활성에 관한 연구가 아직 보고된 바 없기 때문에 이것 바탕으로 본 연구에서는 제주산 편백 종자로부터 활성 성분을 분리, 구조 동정하고 분리된 화합물의 항산화, 미백, 항염, 항균 활성 연구를 진행하고자 하였다.

실험에 사용한 편백 종자 (시료번호 : 497)는 2019년 12월 서귀포시 광평리에서 채집하여 자연건조를 시킨 후에 분쇄하여 실험에 사용하였다.



Figure 44. Pictures of *Chamaecyparis obusa* (Siebold. et Zucc.) Endl. seeds.

## 2. 편백 종자의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

### 1) 시료의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄한 편백 종자 0.5 kg을 50% (v/v) EtOH 4.0 L에 넣은 뒤 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 여과 장치와 5  $\mu$ m의 filter paper를 이용하여 얻은 여액은 37°C의 수욕 상태에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 50% EtOH 추출물 25.5 g을 얻었다. 이 후 얻은 50% EtOH 추출물 20.7 g을 증류수에 현탁시킨 뒤 분액 깔때기를 이용하여 용매의 극성이 낮은 순서부터 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (6.3 g), ethyl acetate (6.9 g), *n*-butanol (2.8 g) 및 water (4.0 g) 분획물을 얻었다(Figure 45).

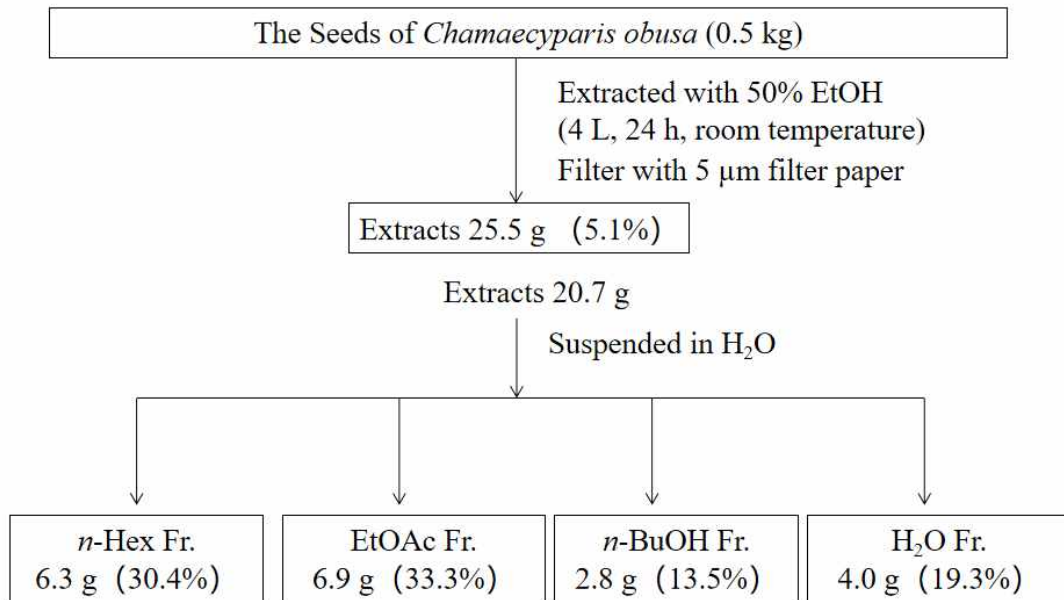


Figure 45. Extraction and solvent fractionation of *C. obusa* seeds.

## 2) *n*-Hexane 분획물의 활성 성분 분리

*n*-Hexane 분획물 4.8 g을 극성 별로 나누기 위하여 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 3%, 5% 또는 10%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%)가 될 때까지 높였으며 그 후 100% MeOH을 각각 300 mL씩 용출하여 총 21개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-21).

VLC fraction들 중 Fr. V6 (645.4 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20:1)의 용매조건으로 silica gel column chromatography를 수행하여 compound **22** (32.2 mg), compound **3** (29.6 mg)과 compound **24** (17.9 mg)를 얻었다.

Fr. V8 (750.6 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **33** (60.3 mg)과 compound **14** (40.4 mg)를 얻었다.

Fr. V9 (820.3 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (60:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **30** (35.1 mg), compound **13** (29.7 mg), compound **14** (45.2 mg)와 compound **10** (84.8 mg)을 얻었다.

Fr. V10~11 (560.2 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (50:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **12** (58.3 mg), compound **27** (59.7 mg)과 compound **17** (49.8 mg)을 얻었다.

Fr. V12~13 (777.0 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **29** (195.3 mg), compound **6**과 compound **7** 혼합 상태로 같이 나오며 총 (45.4 mg)을 얻었으며, 그리고 compound **16** (45.8 mg)을 얻었다.

Fr. V7 (240.8 mg)은 MeOH로 재결정 방법을 통하여 compound **18** (50.4 mg)을 얻었다. Fr. V4 (226.5 mg)는 100% CHCl<sub>3</sub>의 용매조건으로 silica gel column chromatography를 수행하여 compound **19** (68.7 mg)와 compound **20** (110.8 mg)을 얻었다.

Fr. V14 (222.2 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (30:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 단일 화합물 compound **28** (46.6 mg), compound **11** (49.7 mg)을 얻었으며, 혼합된 상태의 compound **8**과 compound **1** (82.6 mg)을 얻었다.

### 3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성 별로 나누기 위하여 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (0-50%)이 될 때까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 각각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-32).

VLC fraction들 중 Fr. V4~5 (310.5 mg)는 *n*-Hex-EtOAc (10:1)의 용매조건으로 silica gel column chromatography를 수행하여 compound **25** (24.2 mg), compound **15** (9.8 mg), compound **19** (67.3 mg)와 compound **3** (12.1 mg)을 얻었다.

Fr. V6 (230.4 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (60:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound **26** (7.1 mg), compound **1** (145.6 mg)과 compound **24** (41.7 mg)를 얻었다.

Fr. V7 (458.4 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (60:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound **26** (20.2 mg), compound **30** (10.9mg)과 compound **13** (266.3 mg)을 얻었다.

Fr. V8 (295.7 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **30** (190.2 mg), compound **14** (22.1 mg), compound **17** (110.6 mg)을 얻었다.

Fr. V9 (285.2 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **31** (56.8 mg), compound **17** (32.6 mg)과 compound **16** (7.7 mg)을 얻었다.

Fr. V10~11 (650.4 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **32** (125.6 mg), compound **11** (141.6 mg)과 compound **16** (6.8 mg)을 얻었다.

Fr. V12~14 (226.5 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (30:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **2** (52.1 mg), compound **34** (56.2 mg)와 compound **35** (10.8 mg)를 얻었다.



Fr. V15~17 (295.7 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (15:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 4개 fraction을 받고 나서 그중 Fr. V15~17-B (100.2 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (14:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound 4, compound 5과 compound 3 혼합 상태로 같이 나오며 총 52.6 mg을 얻으며, 그리고 compound 9 (25.1 mg)를 얻었다.

Fr. V18~19 (330.5 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (15:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 15 (19.6 mg)를 얻으며, Fr. V23 (230.4 mg)은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 36 (38.2 mg)을 얻었다.

Fr. V24 (380.6 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 3개 fraction을 받고 나서 그중 Fr. V24-B (100.2 mg)는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (8:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 36, compound 37과 compound 41 혼합 상태로 같이 나오며 총 35.6 mg을 얻고, 그리고 compound 40 (13.6 mg)을 얻었다.

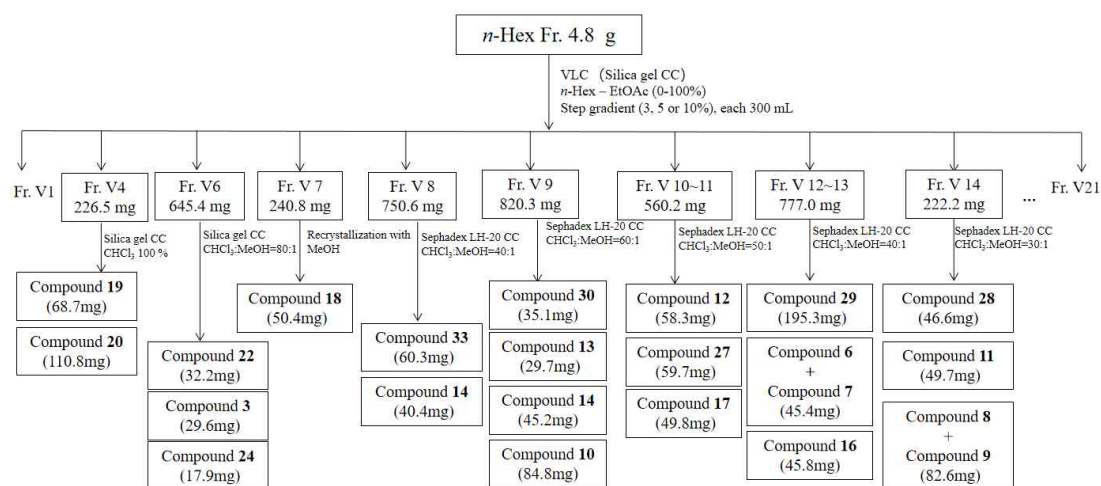


Figure 46. Isolation of compounds from *n*-Hex fraction of *C. obusa* seeds.

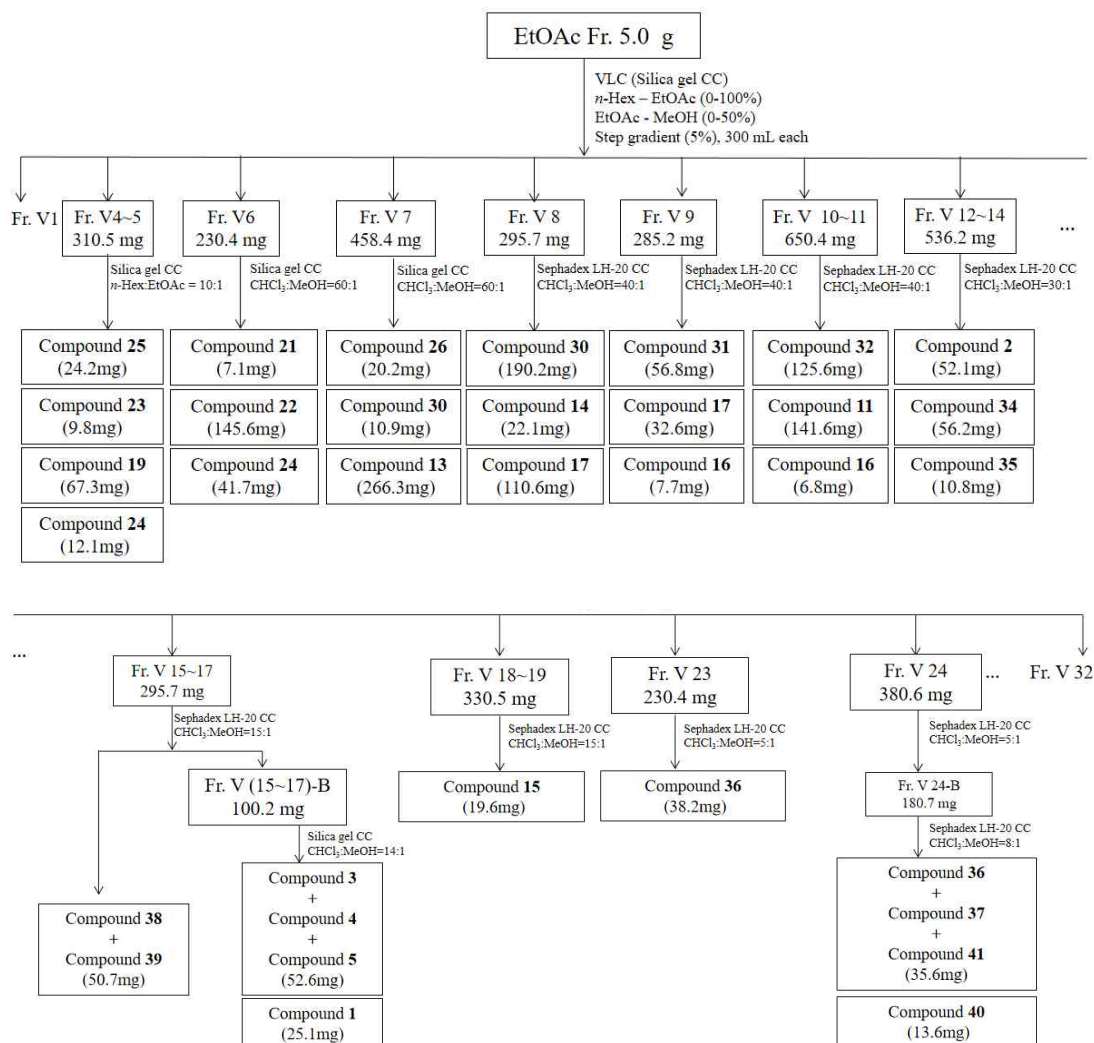


Figure 47. Isolation of compounds from EtOAc fraction of *C. obusa* seeds.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2의 구조 동정

Compound 1은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 10개의 carbon peak가 관찰되며,  $^1\text{H}$ -NMR data를 고려했을 때, monoterpene 구조를 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  137.4,  $\delta_{\text{C}}$  120.4의 signal은 4차 carbon와 3차 carbon인 olefin group 구조로 예상하고,  $\delta_{\text{C}}$  72.4,  $\delta_{\text{C}}$  67.2의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  5.60 (1H, m)의 signal는 olefin group 중 3차 carbon이 대응한 proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  4.02 (2H, s)의 signal은 chemical shift와 적분 값을 통하여 산소에 인접한 위치의 methylene proton임을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  1.67 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^3$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  0.94 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.94 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz)에서 적분 값을 통하여 총 2개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>75</sup>과 비교하여 compound 1은 (*R*)-*p*-menth-1-en-4,7-diol임을 확인하였다.

Compound 2는 compound 1과 비슷한 monoterpene 구조를 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  75.6,  $\delta_{\text{C}}$  75.1,  $\delta_{\text{C}}$  71.8의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  3.51 (1H, dd,  $J = 4.6, 3.2$  Hz)의 signal는 산소에 인접한 위치의 methine proton임을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  1.57 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^3$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.90 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.31 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 3개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 으며 문헌<sup>76</sup>과 비교하여 compound 2는 (1*R*,2*R*,4*R*)-*p*-menthane-1,2,4-triol임을 확인하였다.

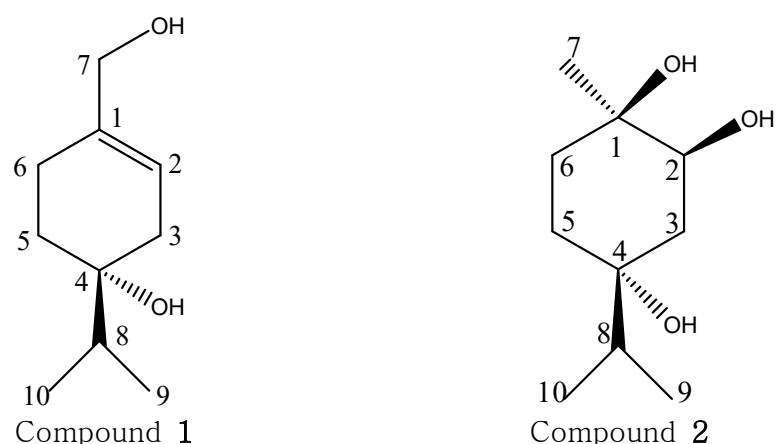


Figure 48. Chemical structure of compounds **1** and **2**

Table 19.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **1** and **2** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound 1		Compound 2	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		137.4		71.8
2	5.60 (1H, m)	120.4	3.51 (1H, dd, 4.6, 3.2)	75.1
3	1.52~1.73 (2H, m)	34.4	1.93 (1H, dd, 14.6, 4.6) 1.72 (1H, dt, 14.6, 3.2)	33.9
4		72.4		75.6
5	2.08 (1H, dd, 5.5, 2.8) 2.04 (1H, dd, 5.5, 1.8)	30.7	2.00 (1H, td, 14.0, 4.1) 1.80 (1H, td, 14.0, 4.1)	29.4
6	1.52~1.73 (2H, m)	22.8	1.43 (2H, m)	29.8
7	4.02 (2H, s)	67.2	1.31 (3H, s)	27.9
8	1.67 (1H, sept, 6.9)	37.2	1.57 (1H, sept, 6.9)	38.7
9	0.91 (3H, d, 6.9)	17.0	0.92 (3H, d, 6.9)	16.9
10	0.94 (3H, d, 6.9)	17.0	0.90 (3H, d, 6.9)	16.9

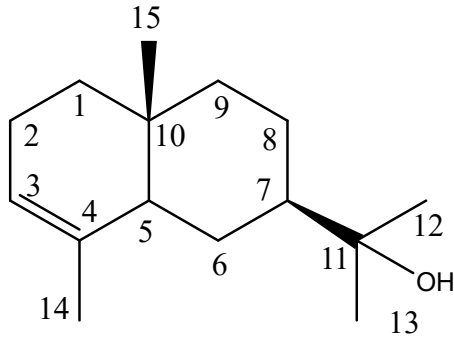
## 2) Compound 3, 4, 5의 구조 동정

Compound 3은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 15개의 carbon peak와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 4개의 methyl group을 포함한 aliphatic signal들을 바탕으로 sesquiterpene으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  135.4과  $\delta_{\text{C}}$  121.2의 signal 및  $\delta_{\text{H}}$  5.30 (1H, br s)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는 olefin group 구조를 확인하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  15.8-73.3에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  73.3의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  0.75-2.02에 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소의 proton으로 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{H}}$  1.60 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.75 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 4개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>77</sup>과 비교하여 compound 3은  $\alpha$ -eudesmol임을 확인하였다.

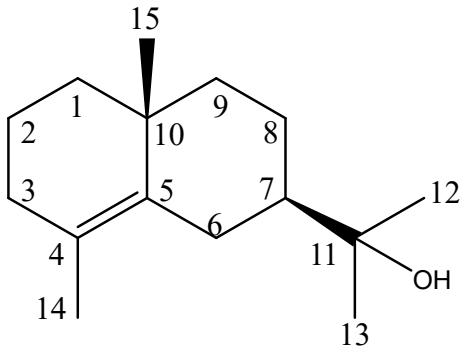
Compound 4는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  0.99-2.61에 분포하는 signal을 통해 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.58 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (6H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.99 (3H, s), 에서 적분 값을 통하여 총 4개의 methyl proton signal을 확인하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에 의해  $\delta_{\text{C}}$  135.0,  $\delta_{\text{C}}$  124.7 signal은 각각 4차 carbon인 olefin group 구조로 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  73.1의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>78</sup>과 비교하여 compound 4는  $\gamma$ -eudesmol로 동정하였다.

Compound 5는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  4.69 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.42 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는 vinyl group의 proton으로 확인하였다.  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (6H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.67 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 3개의 methyl proton signal을 확인하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에 의해  $\delta_{\text{C}}$  151.4과  $\delta_{\text{C}}$  105.5의 signal은 각각 4차 carbon과 2차 carbon의 olefin group 구조로 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  73.1의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕

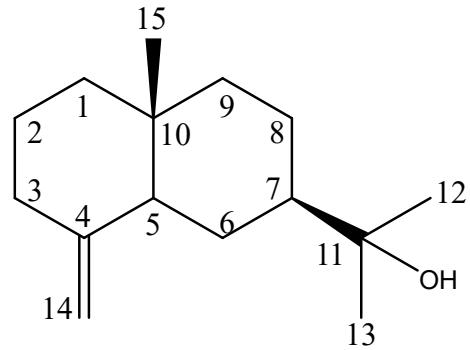
으로 문헌<sup>78</sup>과 비교하여 compound 5는  $\beta$ -eudesmol로 동정하였다.



Compound 3



Compound 4



Compound 5

Figure 49. Chemical structure of compounds 3, 4 and 5

Table 20.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **3**, **4** and **5** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

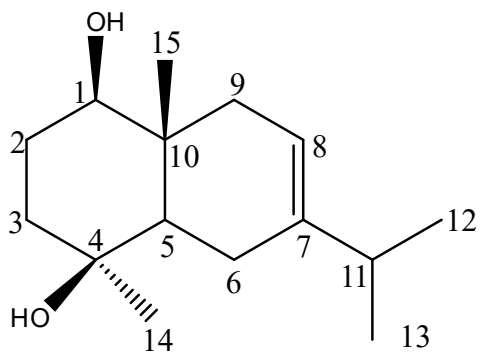
No.	Compound <b>3</b>		Compound <b>4</b>		Compound <b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1.11~1.66 (2H, overlapped)	38.1	1.49 (1H, m) 1.19 (1H, m)	42.4	1.35 (1H, m) 1.13 (1H, m)	42.0
2	1.84 (1H, d, 12.8) 1.91~2.02 (1H, overlapped)	23.2	1.53 (2H, m)	19.3	1.52 (2H, m)	23.7
3	5.30 (1H, br s)	121.2	1.92 (1H, m) 1.83 (1H, m)	33.4	2.28 (1H, m) 1.86 (1H, m)	37.1
4		135.4		124.7		151.4
5	1.91~2.02 (1H, overlapped)	46.8		135.0	1.69 (1H, m)	50.0
6	1.11~1.66 (2H, overlapped)	24.6	2.61 (1H, m) 1.58 (1H, m)	26.5	1.58 (1H, m) 1.10 (1H, m)	25.2
7	1.11~1.66 (1H, overlapped)	50.2	1.21 (1H, m)	50.7	1.31 (1H, m)	49.6
8	1.11~1.66 (2H, overlapped)	22.6	1.63 (1H, m) 1.40 (1H, m)	23.5	1.55 (1H, m) 1.22 (1H, m)	22.6
9	1.11~1.66 (2H, overlapped)	40.4	1.43 (1H, m) 1.23 (1H, m)	40.4	1.45 (1H, m) 1.10 (1H, m)	41.3
10		32.4		34.6		36.1
11		73.3		73.1		73.1
12	1.18 (3H, s)	27.0	1.18 (3H, s)	27.3	1.18 (3H, s)	27.4
13	1.19 (3H, s)	27.8	1.18 (3H, s)	27.0	1.18 (3H, s)	27.0
14	0.75 (3H, s)	15.8	1.58 (3H, s)	19.4	4.69 (1H, d, 1.4) 4.42 (1H, d, 1.4)	105.5
15	1.60 (3H, s)	21.4	0.99 (3H, s)	24.8	0.67 (3H, s)	16.5

### 3) Compound 6, 7의 구조 동정

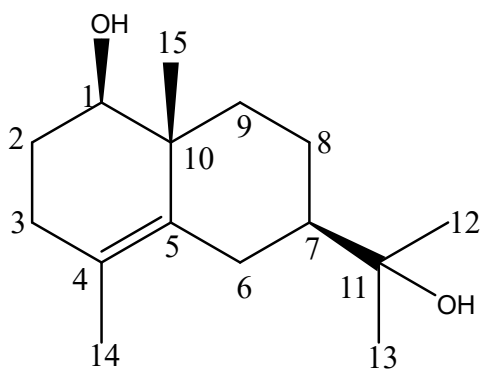
Compound 6, 7은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 30개의 carbon peak를 나타내지만 큰 carbon peak가 15개 있고, 작은 carbon peak가 15개를 나타냈다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum을 종합하여 2개 sesquiterpene으로 예상하였다. Compound 6은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에 의해  $\delta_{\text{C}}$  142.1과  $\delta_{\text{C}}$  116.2의 signal은 각각 4차 carbon와 3차 carbon의 olefin group 구조로 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  80.1,  $\delta_{\text{C}}$  71.2의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.34 (1H, br d,  $J = 5.5$  Hz)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는 olefin group 구조를 확인하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.28 (1H, dd,  $J = 11.7, 4.1$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  2.18 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz) 의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.00 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.99 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.93 (3H, s), 에서 적분 값을 통하여 총 4개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>79</sup>과 비교하여 compound 6은 oplodiol로 동정하였다.

Compound 7은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에 의해  $\delta_{\text{C}}$  133.8,  $\delta_{\text{C}}$  124.1 signal은 각각 4차 carbon인 olefin group 구조로 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  78.6,  $\delta_{\text{C}}$  73.0의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  3.44 (1H, dd,  $J = 8.9, 6.9$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.57 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.15 (6H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.93 (3H, s), 에서 적분 값을 통하여 총 4개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>80</sup>과 비교하여 compound 7은 4-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol로 동정하였다.





Compound 6



Compound 7

Figure 50. Chemical structure of compounds 6 and 7

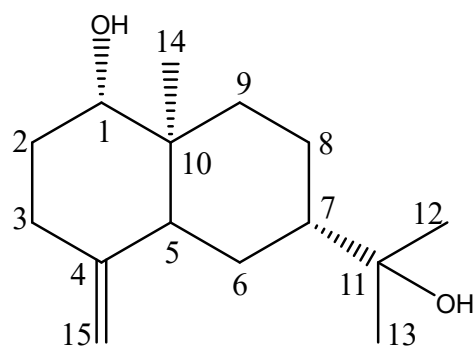
Table 21. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **6** and **7** (400 and 100 MHz, in CDCl<sub>3</sub>)

No.	Compound <b>6</b>		Compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	3.28 (1H, dd, 11.7, 4.1)	80.1	3.44 (1H, dd, 8.9, 6.9)	78.6
2	1.85~1.90 (1H, m)	26.9	1.69 (2H, m)	27.3
	1.84 (1H, dt, 11.7, 3.7)			
3	1.53~1.62 (2H, m)	39.6	2.18 (1H, ddd, 10.1, 5.0, 4.1)	32.1
			1.99 (1H, ddd, 10.1, 4.1, 2.8)	
4		71.2		124.1
5	1.84 (1H, dd, 11.7, 5.5)	46.4		133.8
6	2.07~2.12 (2H, m)	23.2	2.60 (1H, ddd, 13.7, 3.2, 2.3)	26.7
			1.68 (1H, ddd, 13.7, 4.1, 3.2)	
7		142.1		50.0
8	5.34 (1H, br d, 5.5)	116.2		23.1
9	2.07~2.12 (1H, m)	40.8		39.0
	1.85~1.90 (1H, m)			
10		37.8		39.6
11	2.18 (1H, sept, 6.9)	35.2		73.0
12	0.99 (3H, d, 6.9)	22.0	1.15 (3H, s)	26.9
13	1.00 (3H, d, 6.9)	21.4	1.15 (3H, s)	27.4
14	1.19 (3H, s)	30.0	0.93 (3H, s)	17.5
15	0.93 (3H, s)	11.9	1.57 (3H, s)	19.2

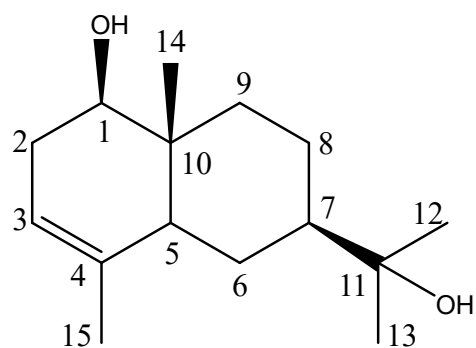
#### 4) Compound 8, 9의 구조 동정

Compound 8, 9는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 30개의 carbon peak를 나타내지만 큰 carbon peak가 15개 있고, 작은 carbon peak가 15개를 나타냈다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum을 종합하여 2개 sesquiterpene으로 예상하였다. Compound 8은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에 의해  $\delta_{\text{C}}$  149.1과  $\delta_{\text{C}}$  107.1의 signal은 각각 4차 carbon와 2차 carbon의 olefin group 구조로 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  79.6,  $\delta_{\text{C}}$  73.1의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  4.75 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.50 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는 vinyl group의 proton으로 확인하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.40 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.6$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  1.20 (6H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.66 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 3개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>81</sup>과 비교하여 compound 8은 *ent*-4(15)-eudesmen-1 $\alpha$ ,11-diol로 동정하였다.

Compound 9는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에 의해  $\delta_{\text{C}}$  135.6,  $\delta_{\text{C}}$  119.7의 signal은 4차 carbon와 3차 carbon인 olefin group 구조로 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  76.6, 73.2의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.26 (1H, dd,  $J = 6.4, 2.3$  Hz)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는 olefin group 구조를 확인하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.51 (1H, dd,  $J = 10.1, 6.4$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.89 (6H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.59 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.73 (3H, s), 에서 적분 값을 통하여 총 4개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>82</sup>과 비교하여 compound 9는 3-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol로 동정하였다.



Compound 8



Compound 9

Figure 51. Chemical structure of compounds 8 and 9

Table 22.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **8** and **9** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>8</b>		Compound <b>9</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	3.40 (1H, dd, 11.4, 4.6)	79.6	3.51 (1H, dd, 10.1, 6.4)	76.6
2	1.82 (1H, m) 1.55 (1H, m)	31.6	2.28 (1H, dd, 6.4, 2.3) 1.85 (1H, dd, 10.1, 2.3)	32.5
3	2.29 (1H, ddd, 13.6, 5.0, 2.3) 2.11 (1H, dt, 13.6, 5.0)	34.4	5.26 (1H, dd, 6.4, 2.3)	119.7
4		149.1		135.6
5	1.71 (1H, m)	47.7	1.66 (1H, dd, 5.7, 3.2)	46.7
6	1.65~1.68 (1H, m) 1.21 (1H, m)	24.6	0.88~1.80 (2H, overlapped)	24.1
7	1.32 (1H, tt, 9.2, 3.2)	49.1	0.88~1.80 (1H, overlapped)	49.4
8	1.65~1.68 (1H, m) 1.23 (1H, m)	22.4	0.88~1.80 (2H, overlapped)	22.2
9	1.96 (1H, m) 1.16 (1H, m)	37.1	0.88~1.80 (2H, overlapped)	35.2
10		40.4		37.6
11		73.1		73.2
12	1.20 (3H, s)	27.3	1.89 (3H, s)	27.8
13	1.20 (3H, s)	27.0	1.89 (3H, s)	27.4
14	0.66 (3H, s)	10.4	0.73 (3H, s)	9.7
15	4.75 (1H, d, 1.4) 4.50 (1H, d, 1.4)	107.1	1.59 (3H, s)	21.1

## 5) Compound 10의 구조 동정

Compound 10은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 15개의 carbon peak와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 3개의 methyl group을 포함하여 넓은 범위에 aliphatic signale들을 바탕으로 sesquiterpene 구조를 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.73~6.76 (1H, m)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 고려했을 때, olefin group 의 proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.11 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.66 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 3개의 methyl proton signal을 확인하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서는  $\delta_{\text{C}}$  181.9의 signal은 carbonyl group으로 예상하였고 olefin group에 해당하는 4차 carbon 인  $\delta_{\text{C}}$  131.4, 3차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  136.0의 signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>83</sup>과 비교하여 compound 10은 hinokiic acid (thujopsenic acid)임을 확인하였다.

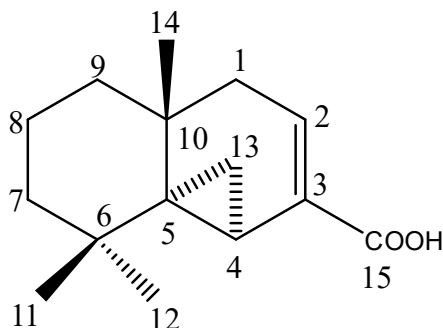


Figure 52. Chemical structure of compound 10

Table 23.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **10** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>10</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1.94 (2H, dd, 18.6, 2.8)	40.2
2	6.73~6.76 (1H, m)	136.0
3		131.4
4	0.81 (1H, dd, 9.2, 5.0)	11.6
5		34.2
6		34.8
7	1.38~1.49 (2H, m)	37.2
8	1.74 (2H, dd, 18.7, 7.3)	19.6
9	1.24 (2H, dd, 18.7, 3.2)	41.7
10		31.7
11	1.11 (3H, s)	28.5
12	1.18 (3H, s)	27.0
13	2.07 (1H, dd, 9.2, 5.0) 0.70 (1H, t, 5.0)	16.7
14	0.66 (3H, s)	29.2
15		172.0

## 6) Compound 11의 구조 동정

Compound 11은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.89 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  6.64 (1H, s)의 signal은  $sp^2$  혼성의 proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  1.11-4.05에 signal은  $sp^3$  혼성 탄소의 proton으로 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{H}}$  4.50 (1H, dd,  $J = 5.0, 3.2$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.10 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.22 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.21 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.24 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.16 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.11 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 5개의 methyl proton signal을 확인하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 과 DEPT-135° spectrum을 통하여 총 20개의 carbon이 있음을 확인하였으며, 이들은 3개 methylene carbon ( $\delta_{\text{C}}$  42.1, 30.5, 20.2)과 7개 quaternary carbon ( $\delta_{\text{C}}$  215.8, 151.8, 140.5, 133.4, 129.9, 47.3, 43.6) 나머지 methyl 및 methine carbon 합쳐서 모두 10개를 나타내었다. 그 중  $\delta_{\text{C}}$  215.8의 signal은 carbonyl group으로 예상하였고, 나머지  $sp^2$  혼성 탄소 6개 있어 가지고, aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있고,  $\delta_{\text{C}}$  151.8의 signal은 산소가 결합한 benzene ring 탄소를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  74.3의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.

또한 HMBC spectrum을 통하여  $\delta_{\text{C}}$  215.8의 carbonyl group이 aliphatic carbon인 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  42.1, 26.7, 21.4의 carbon들과 연결되어 있음을 확인하였고,  $\delta_{\text{C}}$  74.3의 hydroxyl group이 aliphatic carbon인 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  42.1, 22.8들과 연결되어 있음을 확인하였다. 그리고  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY spectrum을 통해 aliphatic carbon들의 배열을 확인하였다. NOESY spectrum을 통해 chiral carbon의 절대 배열은  $\alpha$ 형 -OH기를 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 compound 11은 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione으로 자연계에서 처음으로 분리된 신규 화합물이다. Compound 11의 HR-ESI-MS 분석 결과  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  339.1937 (calc. 339.1936)로 예상한 화합물의 분자량과 일치하는 것을 확인하였다. Optical rotation 측정결과는  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +45.2$  ( $c$  0.2,  $\text{CHCl}_3$ )이다.



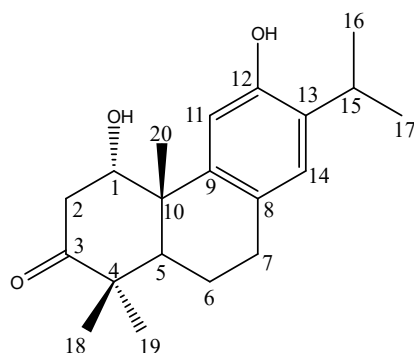


Figure 53. Chemical structure of compound **11**

Table 24.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data and informations of HMBC of compound **11** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>11</b>			
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC ( $J^2$ )	HMBC ( $J^3$ )
1	4.50 (1H, dd, 5.0, 3.2)	74.3		
2	3.01 (1H, dd, 16.5, 5.0) 2.65 (1H, dd, 16.5, 3.2)	42.1	74.3(C1),215.8(C3)	43.6(C10)
3		215.8		
4		47.3		
5	2.34 (1H, dd, 11.9, 2.8)	43.5	47.3(4),20.2(C6),43.6(C10)	30.5(C7),21.4(C18), 26.7(C19),22.8(C20)
6	1.70~1.83 (2H, m)	20.2		43.6(C10)
7	2.77 (1H, ddd, 16.6, 11.9, 5.0) 2.85 (1H, ddd, 16.6, 5.0, 2.8)	30.5	20.2(C6),129.9(C8)	
8		129.9		
9		140.5		
10		43.6		
11	6.64 (1H, s)	110.8	151.8(C12)	129.9(C8),43.6(C10), 133.4(C13)
12		151.8		
13		133.4		
14	6.89 (1H, s)	128.2		30.5(C7),140.5(C9),151.8(C1 2)27.0(C15)
15	3.10 (1H, sept, 6.9)	27.0	133.4(C13),24.2(C17)	151.8(C12),128.2(C14)
16	1.21 (3H, d, 6.9)	22.7	27.0(C15)	133.4(C13),24.2(C17)
17	1.22 (3H, d, 6.9)	24.2	27.0(C15)	133.4(C13),22.7(C16)
18	1.11 (3H, s)	26.7	47.3(4)	43.5(C5),215.8(C3), 21.4(C19)
19	1.16 (3H, s)	21.4	47.3(4)	43.5(C5),215.8(C3), 26.7(C18)
20	1.24 (3H, s)	22.8	43.6(C10)	74.3(C1),140.5(C9)

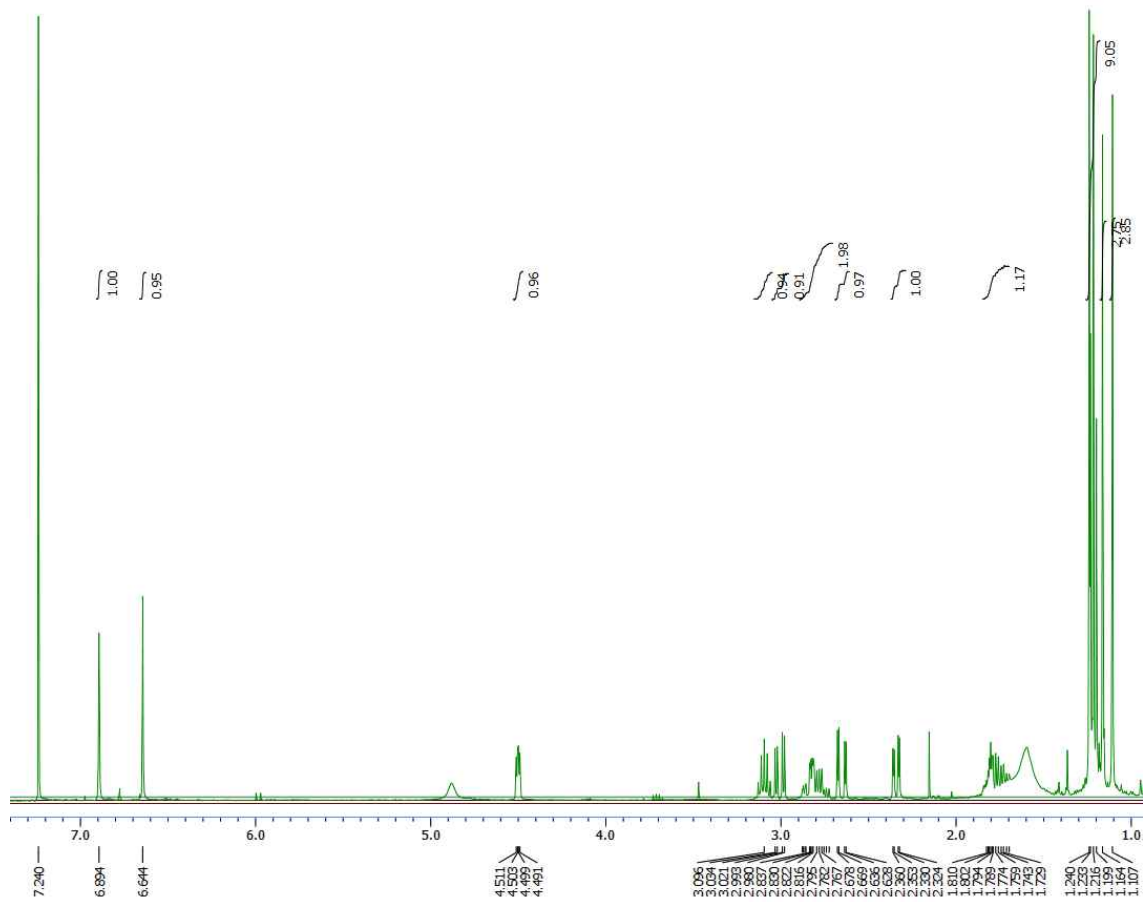


Figure 54.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **11** (in  $\text{CDCl}_3$ )

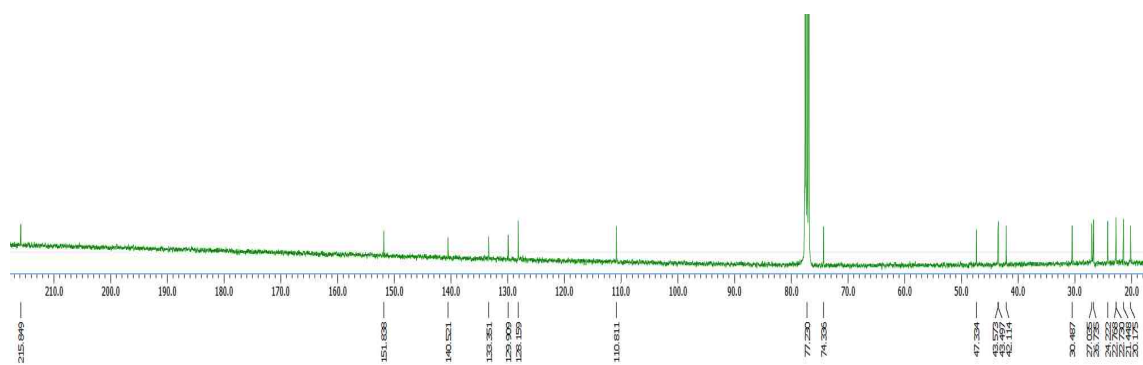


Figure 55.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **11** (in  $\text{CDCl}_3$ )

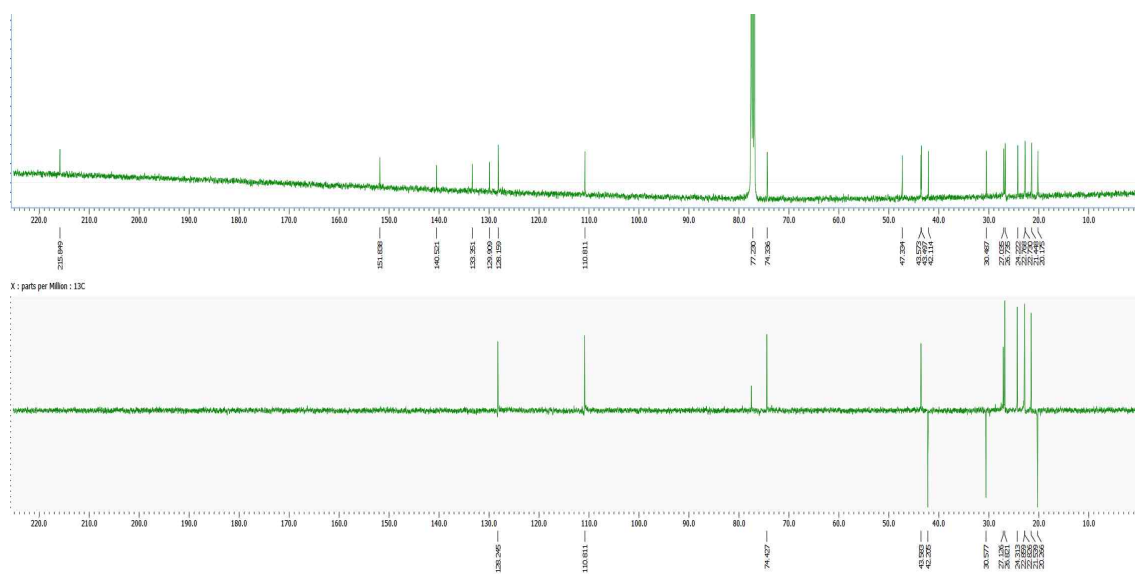


Figure 56. DEPT-135° spectrum of compound **11** (in CDCl<sub>3</sub>)

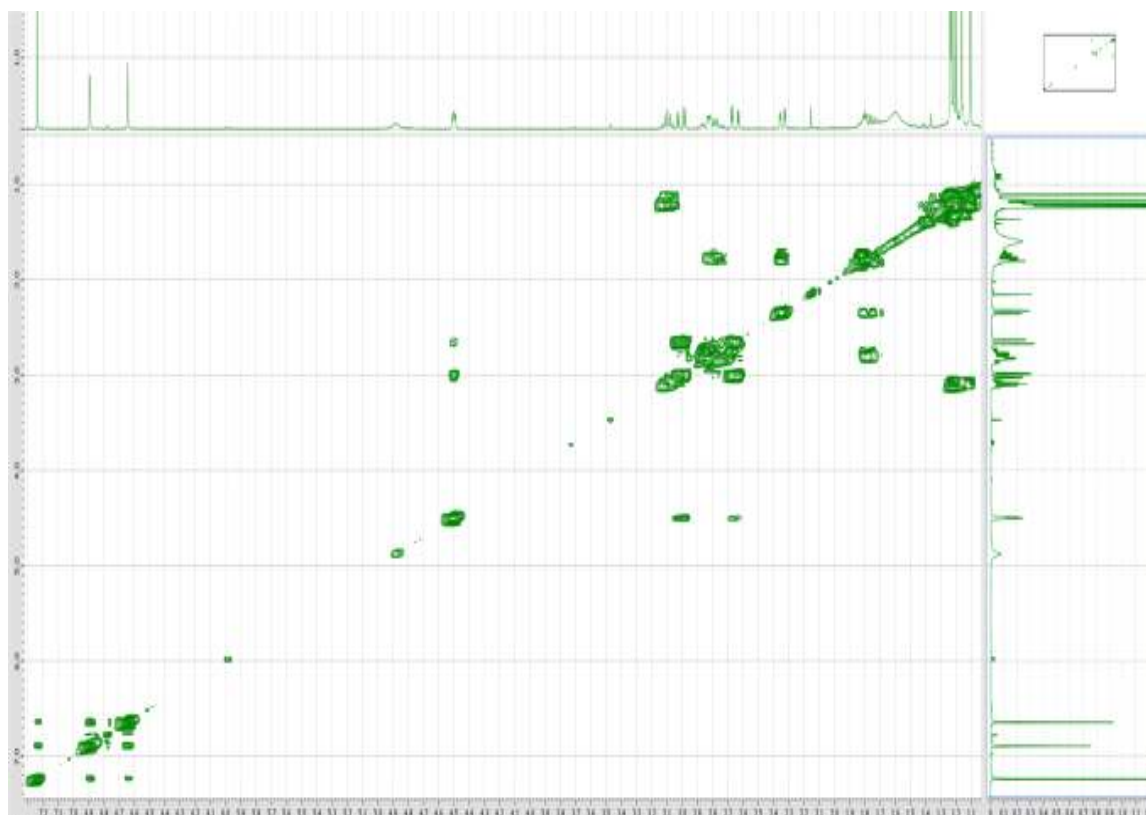


Figure 57. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum of compound **11** (in CDCl<sub>3</sub>)

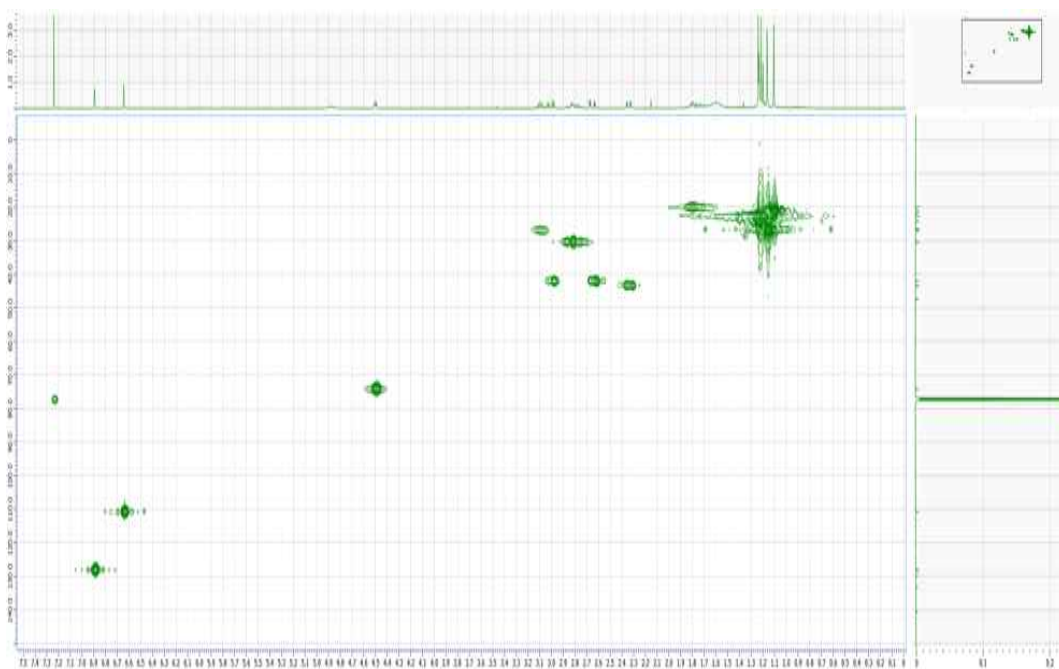


Figure 58. HMQC spectrum of compound **11** (in  $\text{CDCl}_3$ )



Figure 59. HMBC spectrum of compound **11** (in  $\text{CDCl}_3$ )

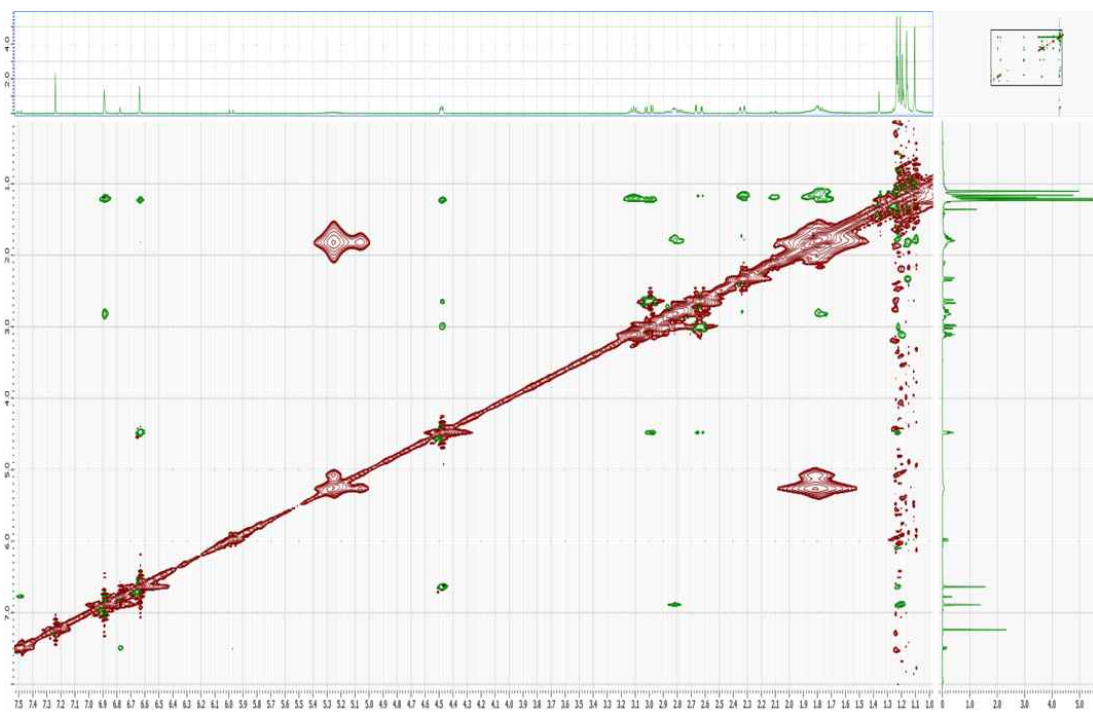


Figure 60. NOESY spectrum of compound **11** (in  $\text{CDCl}_3$ )

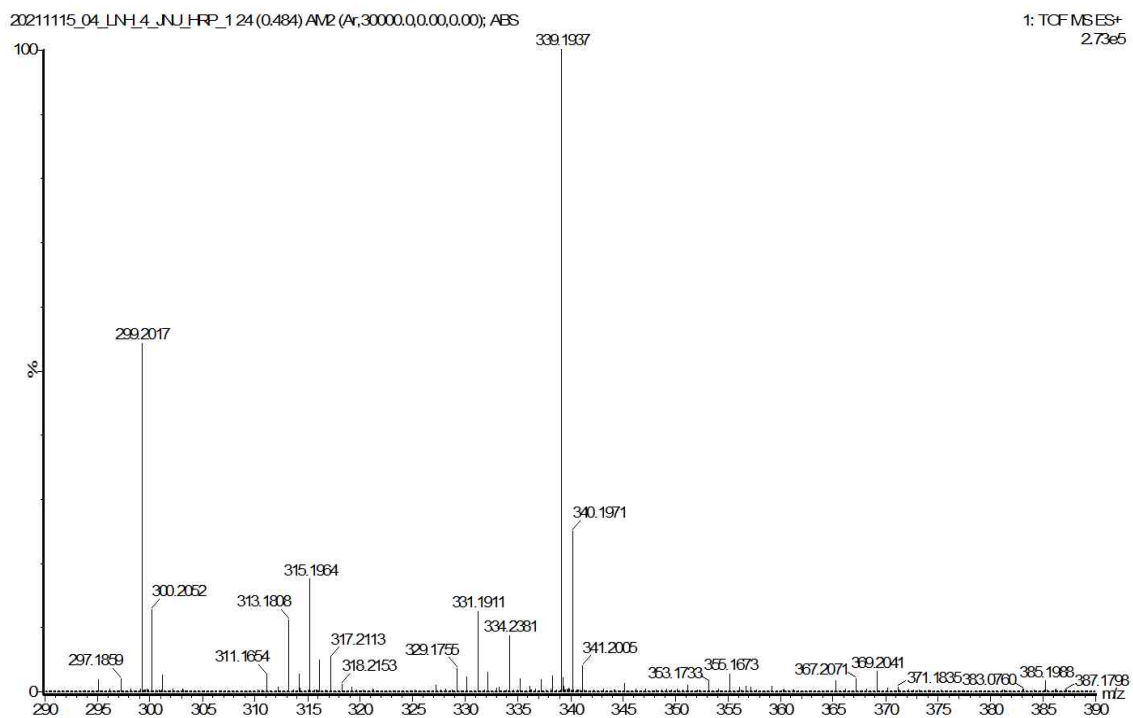


Figure 61. HR-ESI-MS spectrum of compound **11**

## 7) Compound **12**의 구조 동정

Compound **12**는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.05 (1H, s)의 signal은  $sp^2$  혼성을 갖는 aromatic ring 구조의 proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  6.04 (1H, s)의 signal은 disappeared on  $\text{D}_2\text{O}$  exchange때문에 phenolic hydroxyl기로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  1.13-4.70에 signal은  $sp^3$  혼성 탄소의 proton으로 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{H}}$  4.70 (1H, dd,  $J = 11.0, 6.0$  Hz)의 signal으로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.74 (3H, s) 의 signal은 deshielding된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  3.20 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz) 의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.21 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.15 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.13 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.31 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 5개의 methyl proton signal을 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 21개의 carbon peak가 관찰된 것으로  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때, abietane-type diterpenes 구조를 예상하였으며,  $sp^2$  혼성 탄소 모두 7개 있어 가지고, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  218.3 의 signal은 carbonyl group으로 예상하였고 나머지 6개의 signal은  $sp^2$  혼성 탄소인 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며, 또한  $\delta_{\text{C}}$  19.8-71.2에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  71.2과  $\delta_{\text{C}}$  62.1의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>84</sup>과 비교하여 compound **12**는 12-methoxy-8,11,3-abietatriene-7 $\beta$ ,11-diol-3-one임을 확인하였다.

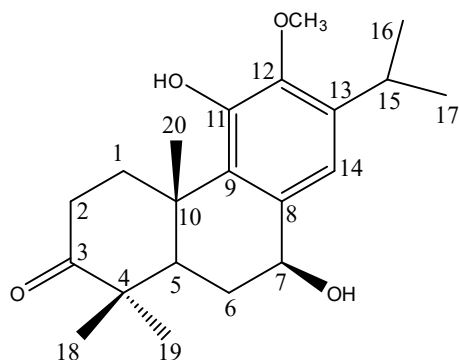


Figure 62. Chemical structure of compound **12**

Table 25.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **12** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

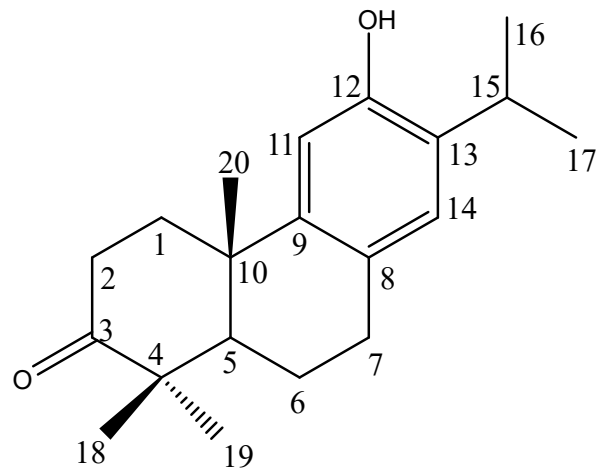
No.	Compound <b>12</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1.35~1.44 (1H, m)	35.6
	3.09 (1H, ddd, 14.1, 8.2, 6.0)	
2	1.61 (1H, m)	34.5
	2.10 (1H, ddd, 14.1, 6.0, 1.4)	
3		218.3
4		47.1
5	2.03 (1H, dd, 11.0, 1.4)	49.1
6	2.63 (1H, ddd, 15.5, 11.0, 6.0)	31.4
	2.47 (1H, ddd, 15.5, 11.0, 6.0)	
7	4.70 (1H, dd, 11.0, 6.0)	71.2
8		136.2
9		130.3
10		38.8
11	6.04 (1H, s, -OH)	146.7
12		144.0
13		139.4
14	7.05 (1H, s)	115.3
15	3.20 (1H, sept, 6.9)	26.8
16	1.21 (3H, d, 6.9)	23.9
17	1.23 (3H, d, 6.9)	23.9
18	1.13 (3H, s)	28.3
19	1.15 (3H, s)	20.7
20	1.31 (3H, s)	19.8
-OCH <sub>3</sub>	3.74 (3H, s)	62.1

### 8) Compound 13, 14의 구조 동정

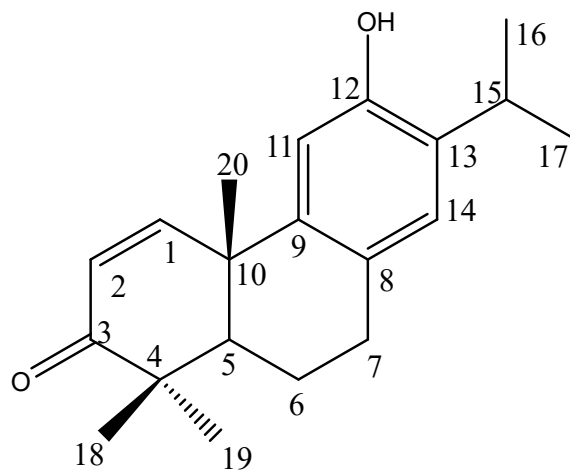
Compound 13은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.84 (1H, s)와  $\delta_{\text{H}}$  6.62 (1H, s)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성 aromatic ring 구조의 서로 *para*-인 proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  1.11-4.68에 signal은  $sp^3$  혼성 탄소의 proton으로 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{H}}$  3.13 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz) 의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.22 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.25 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.14 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.11 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 5개의 methyl proton signal을 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 20개의 carbon peak가 관찰된 것으로  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때 abietane-type diterpenes 구조를 예상하였으며,  $sp^2$  혼성 탄소가 모두 7개 있어서, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  217.9 의 signal은 carbonyl group으로 예상하였고 나머지 6개의 signal은  $sp^2$  혼성 탄소인 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며, 또한  $\delta_{\text{C}}$  151.3의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때 전기음성도가 큰 산소가 결합한 benzene ring 탄소를 예상하였다. 또는  $\delta_{\text{C}}$  20.6-50.7에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>85</sup>과 비교하여 compound 13은 hinokione임을 확인하였다.

Compound 14는  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 비교한 결과, compound 13과 유사한 형태를 나타내고 있으나,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.49 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.99 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz)의 signal은 *cis*-olefin proton으로 예상하였고  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  158.0와  $\delta_{\text{C}}$  127.8의 signal은 대응하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  205.3의 signal은 carbonyl group으로 예상할 수 있지만 compound 13의 해당한 carbonyl기보다 chemical shift 약간 작은 것을 나타내면 *cis*-olefin의 anisotropic effect 중 안쪽에는  $-B_i$  효과를 나타내며, shielding 효과를 여기게 될 것을 생각할 수 있다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>86</sup>과 비교하여 compound 14는 1,2-dehydrohinokione으로 동정하였다.





Compound 13



Compound 14

Figure 63. Chemical structure of compounds 13 and 14

Table 26.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **13** and **14** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>13</b>		Compound <b>14</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	2.34 (1H, ddd, 15.8, 9.8, 4.1) 1.91~1.97 (1H, m)	37.7	7.49 (1H, d, 10.1)	158.0
2	2.66 (1H, ddd, 15.8, 9.8, 7.8) 2.35 (1H, ddd, 15.8, 7.8, 4.1)	34.8	5.99 (1H, d, 10.1)	127.8
3		217.9		205.3
4		47.6		44.9
5	1.87 (1H, dd, 11.7, 2.8)	50.7	2.12 (1H, dd, 11.9, 3.2)	48.2
6	1.69~1.83 (2H, m)	20.6	1.77~1.92 (2H, m)	19.6
7	2.87 (1H, ddd, 16.7, 6.0, 2.8) 2.35 (1H, ddd, 16.7, 11.7, 6.0)	30.3	2.92 (1H, ddd, 16.9, 6.4, 3.2) 2.83 (1H, ddd, 16.9, 11.9, 6.4)	29.7
8		127.1		127.8
9		145.9		142.3
10		37.3		40.2
11	6.62 (1H, s)	112.0	6.78 (1H, s)	111.3
12		151.3		151.2
13		132.5		133.0
14	6.84 (1H, s)	126.9	6.89 (1H, s)	126.7
15	3.13 (1H, sept, 6.9)	27.1	3.12 (1H, sept, 6.9)	27.5
16	1.21 (3H, d, 6.9)	22.7	1.21 (3H, d, 6.9)	22.7
17	1.22 (3H, d, 6.9)	22.9	1.24 (3H, d, 6.9)	22.9
18	1.14 (3H, s)	27.0	1.16 (3H, s)	27.0
19	1.25 (3H, s)	21.3	1.19 (3H, s)	21.5
20	1.11 (3H, s)	24.8	1.36 (3H, s)	28.6

## 9) Compound 15의 구조 동정

Compound 15는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.78 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  6.66 (1H, s)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는 aromatic ring 구조의 서로 *para*-proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  4.37 (1H, t,  $J = 2.8$  Hz)과  $\delta_{\text{H}}$  3.75 (1H, dd,  $J = 12.1, 4.8$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  3.17 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.15 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.87 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.08 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 5개의 methyl proton signal을 확인하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 과 DEPT-135° spectrum을 통하여 총 20개의 carbon이 있음을 확인하였으며, 이들은 3개 methylene carbon ( $\delta_{\text{C}}$  35.0, 32.0, 20.3)과 6개 quaternary carbon ( $\delta_{\text{C}}$  153.8, 144.4, 134.0, 128.7, 44.3, 33.4) 나머지 methyl 및 methine carbon 합쳐서 모두 11개를 나타내었다. 그 중  $sp^2$  혼성 탄소가 6개 있어서, aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있고,  $\delta_{\text{C}}$  153.8의 signal은 산소가 결합한 benzene ring 탄소로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  74.2, 74.0의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 그리고 HMQC spectrum을 통해서  $\delta_{\text{H}}$  6.78 (1H, s)의 signal과 직접 대응한 carbon signal은  $\delta_{\text{C}}$  127.9을 나타내고,  $\delta_{\text{H}}$  6.66 (1H, s)의 signal과 직접 대응한 carbon signal은  $\delta_{\text{C}}$  112.1을 확인하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  4.37 (1H, t,  $J = 2.8$  Hz)과  $\delta_{\text{H}}$  3.75 (1H, dd,  $J = 12.1, 4.8$  Hz)의 signal은 직접 대응한 carbon signal은  $\delta_{\text{C}}$  74.2와  $\delta_{\text{C}}$  74.0을 확인하였다.

또한 HMBC spectrum을 통하여  $\delta_{\text{C}}$  74.2의 hydroxyl group이 aliphatic carbon인  $\delta_{\text{C}}$  74.0, 45.1, 35.0, 26.5와 연결되어 있음을 확인하였고,  $\delta_{\text{C}}$  74.0의 hydroxyl group이 aliphatic carbon인  $\delta_{\text{C}}$  74.2, 35.0, 29.0, 16.4와 연결되어 있음을 확인하였다. 그리고  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY spectrum을 통해 aliphatic carbon들의 배열을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>87</sup>과 비교하여 compound 15는 1 $\alpha$ -3 $\beta$ -dihydroxytatarol임을 확인하였다. 이 화합물은 유기 합성 과정을

통해 논문으로 보고 된 바는 있으나, 천연물에서는 처음으로 분리된 화합물이다.

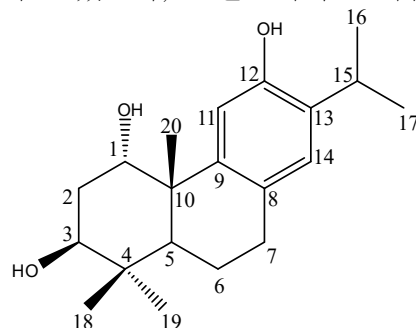


Figure 64. Chemical structure of compound 15

Table 27.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound 15 (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound 15			
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC ( $J^2$ )	HMBC ( $J^3$ )
1	4.37 (1H, t, 2.8)	74.2		74.0(C3),45.1(C5)
2	2.04 (1H, td, 12.9, 2.8) 1.95 (1H, ddd, 12.9, 4.8, 2.8)	35.0	74.2(C1),74.0(C3)	40.2(C4),44.3(C10)
3	3.75 (1H, dd, 12.9, 4.8)	74.0		29.0(C18),16.4(C19)
4		40.2		
5	2.34 (1H, t, 12.8)	45.1	40.2(4),20.3(C6), 44.3(C10)	32.0(C7),29.0(C18), 16.4(C19),26.5(C20)
6	1.86~1.91 (1H, m) 1.69~1.78 (1H, m)	20.3		44.3(C10)
7	2.78 (1H, ddd, 18.3, 6.1, 1.8) 2.74 (1H, dd, 11.3, 6.1)	32.0	20.3(C6),128.7(C8)	45.1(C5),144.4(C9)
8		128.7		
9		144.4		
10		44.3		
11	6.66 (1H, s)	112.1	153.8(C12)	128.7(C8),44.3(C10), 134.0(C13)
12		153.8		
13		134.0		
14	6.78 (1H, s)	127.9		32.0(C7),144.4(C9), 153.8(C12),27.9(C15)
15	3.17 (1H, sept, 6.9)	27.9	134.0(C13),23.3(C17)	153.8(C12),127.9(C14)
16	1.18 (3H, d, 6.9)	23.2	27.9(C15)	134.0(C13),23.3(C17)
17	1.15 (3H, d, 6.9)	23.3	27.9(C15)	134.0(C13),23.2(C16)
18	1.08 (3H, s)	29.0	40.2(C4)	45.1(C5),74.0(C3),16.4(C19)
19	0.87 (3H, s)	16.4	40.2(C4)	45.1(C5),74.0(C3),29.0(C18)
20	1.19 (3H, s)	26.5	44.3(C10)	74.2(C1),144.4(C9)

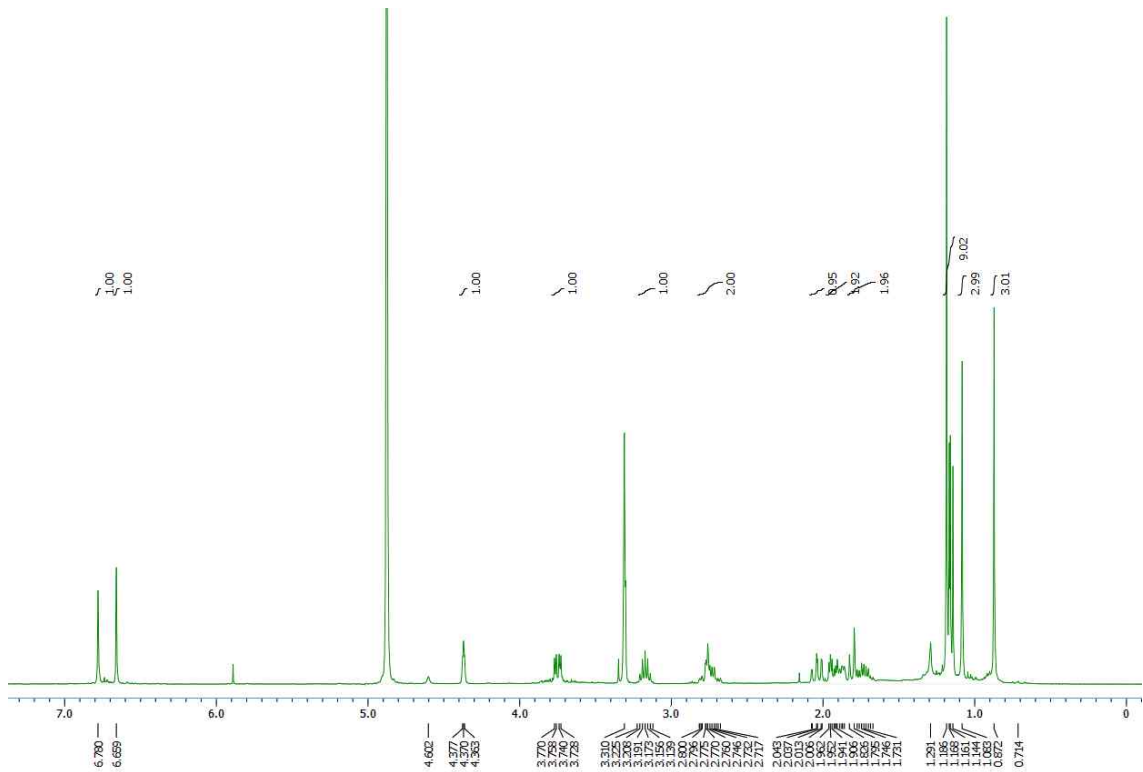


Figure 65.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **15** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

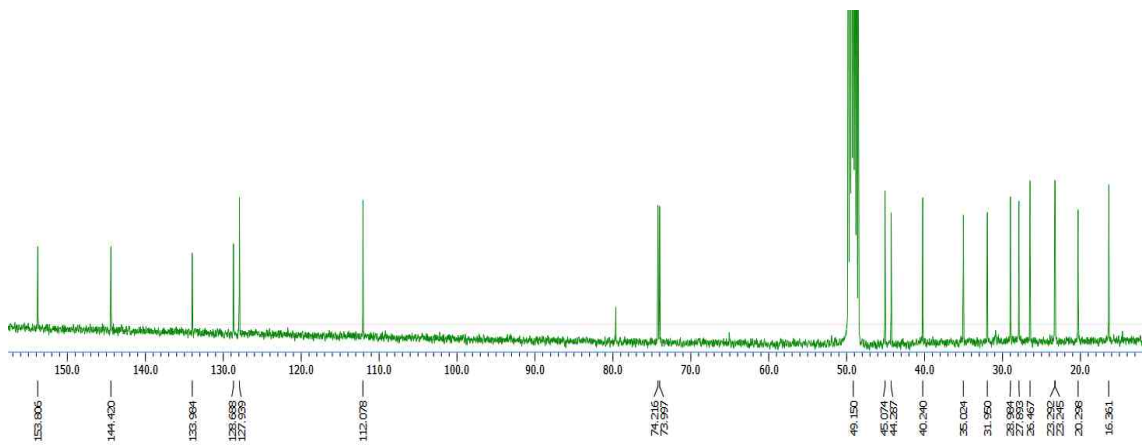


Figure 66.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **15** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

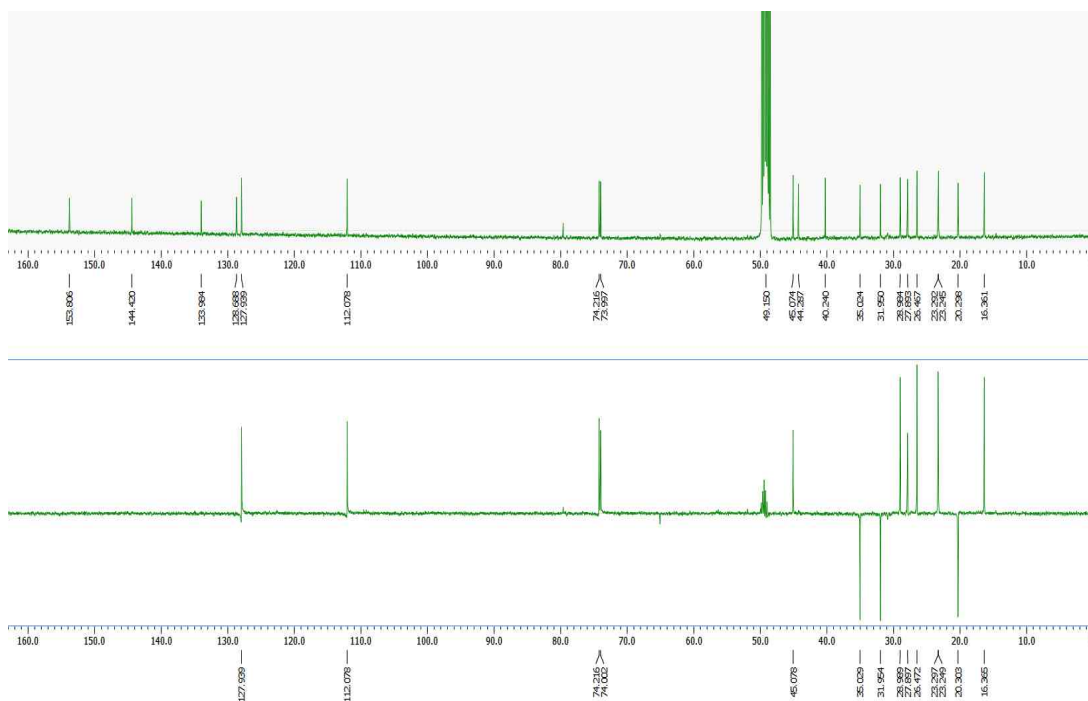


Figure 67. DEPT-135° spectrum of compound 15 (in CD<sub>3</sub>OD)

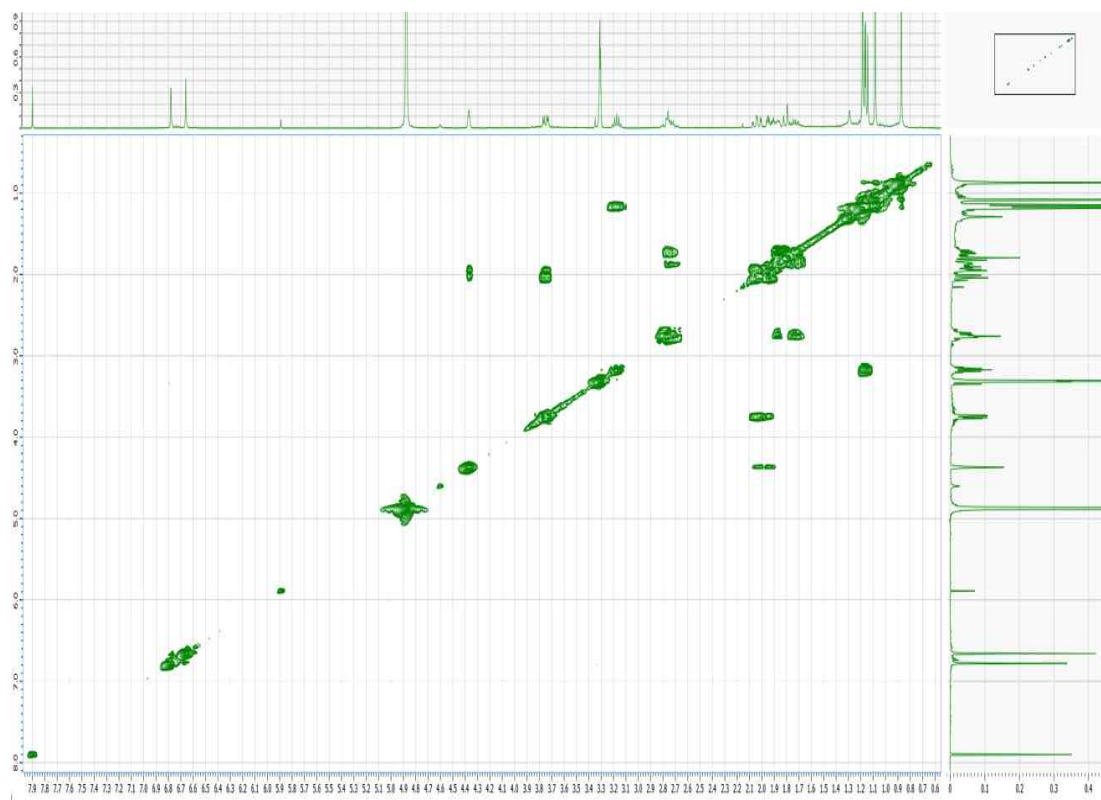


Figure 68. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum of compound 15 (in CD<sub>3</sub>OD)

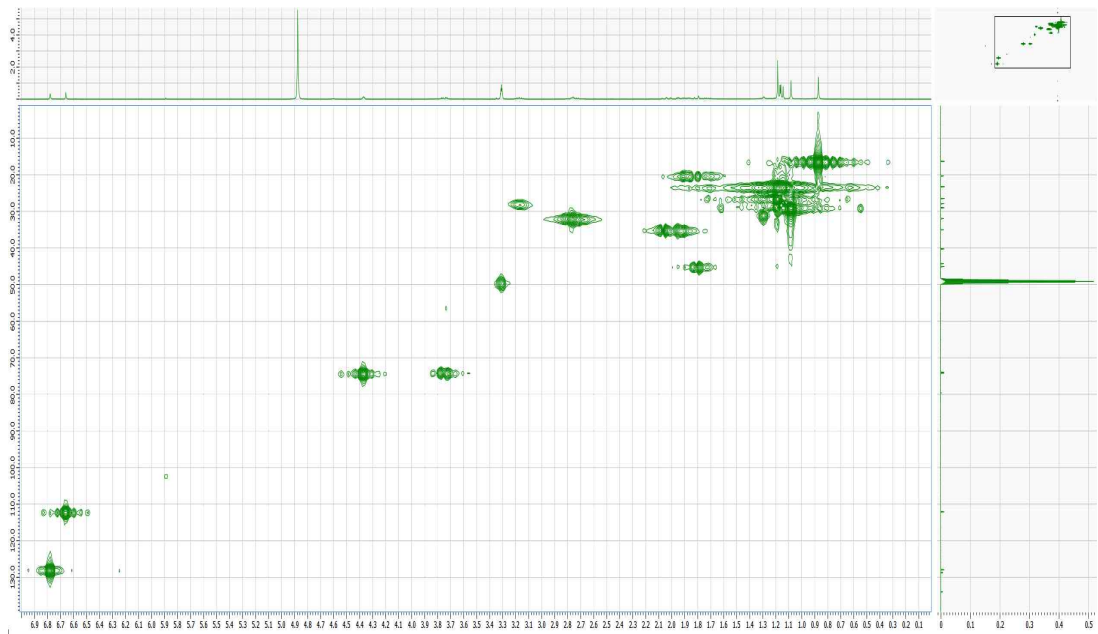


Figure 69. HMBC spectrum of compound 15 in CD<sub>3</sub>OD

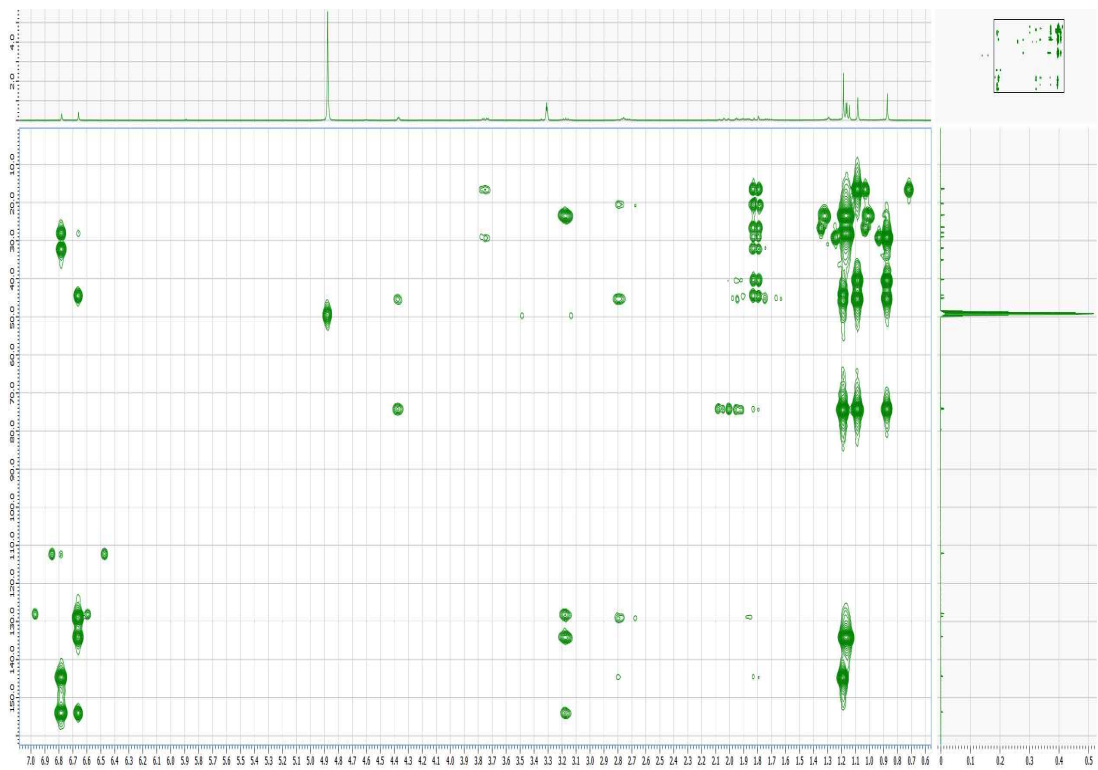


Figure 70. HMBC spectrum of compound 15 in CD<sub>3</sub>OD

### 13) Compound 16, 17, 18, 19의 구조 동정

Compound 16은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 통하여 총 20개의 carbon peak가 관찰되었으며, diterpene 구조를 예상하였다.  $sp^2$  혼성 탄소가 6개 있어서, aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있고,  $\delta_{\text{C}}$  153.6의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $^1\text{H}$ -NMR data를 고려했을 때, 전기음성도가 큰 산소가 결합한 benzene ring 탄소를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  78.9의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소를 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.77 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  6.72 (1H, s)의 signal은  $sp^2$  혼성의 proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  1.13-4.70에 signal은  $sp^3$  혼성 탄소의 proton으로 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{H}}$  3.22 (1H, dd,  $J = 3.9, 1.8$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.21 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.16 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.15 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.86 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 5개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>88</sup>과 비교하여 compound 16은 hinokiol임을 확인하였다.

Compound 17은 Compound 16과 매우 유사한 형태를 나타내고 있으나,  $\delta_{\text{C}}$  76.0의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소를 예상하였으며,  $^1\text{H}$ -NMR data를 고려했을 때,  $\delta_{\text{H}}$  3.48 (1H, t,  $J = 2.8$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 대응하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>89</sup>과 비교하여 compound 17은 isohinokiol임을 확인하였다.

Compound 18은  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 비교한 결과, compound 16과 유사한 형태를 나타내고 있으나,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  197.7의 signal은 carbonyl group으로 예상하였고, 나머지 6개의 signal은  $sp^2$  혼성 탄소인 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며, 또한  $\delta_{\text{C}}$  19.6-50.2에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소를 예상하였으며, 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>90</sup>과 비교하여 compound 18은 sugiol임을 확인하였다.



Compound 19는  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 비교한 결과, compound 16 및 compound 18과 유사한 구조를 나타내고 있으나,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 20개의 carbon peak가 관찰되었으며, 그 중 6개의 signal은  $sp^2$  혼성 탄소인 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며, 또한  $\delta_c$  19.4-50.5에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였으며, 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>91</sup>과 비교하여 compound 19는 ferruginol임을 확인하였다.

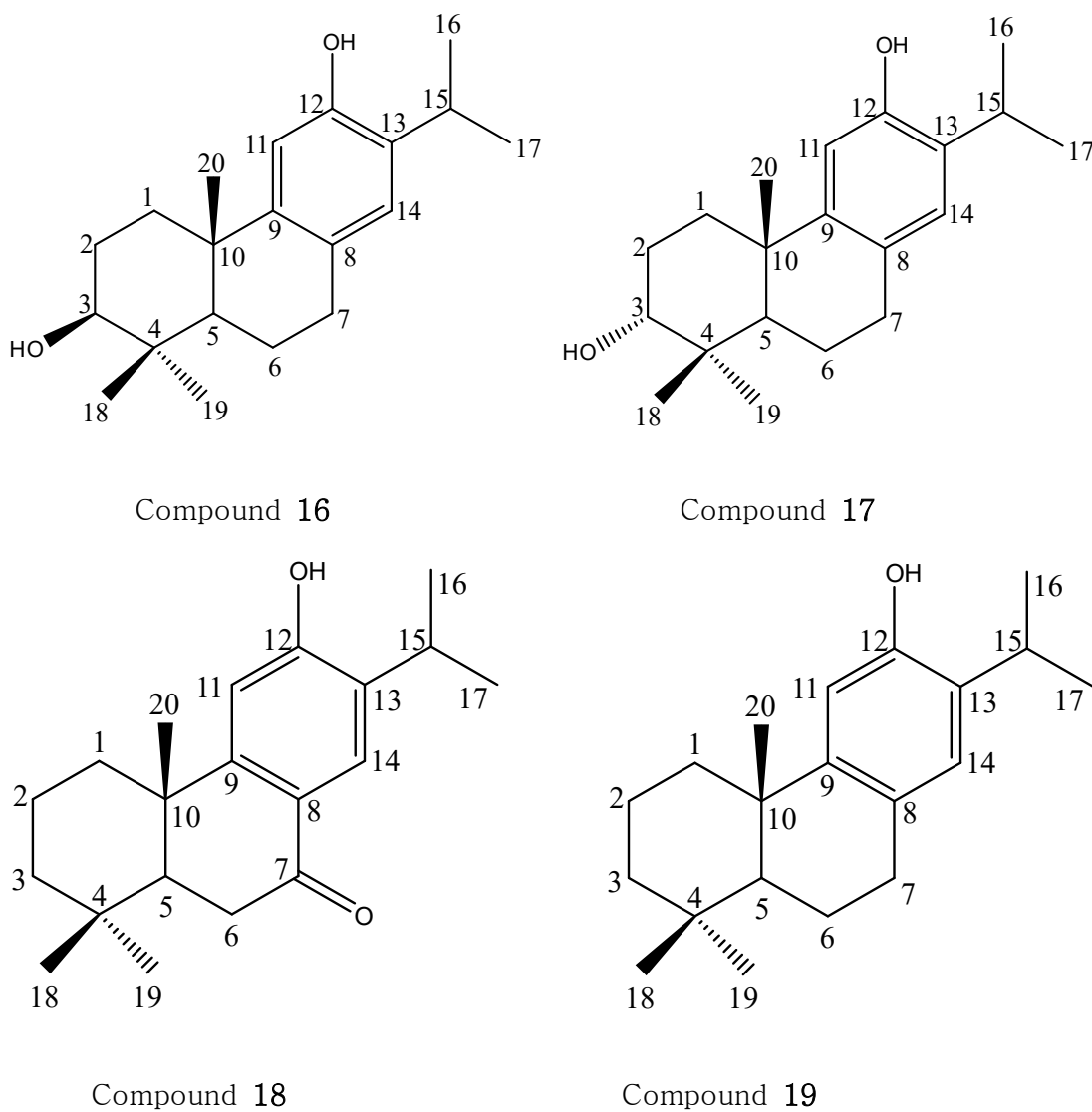


Figure 71. Chemical structure of compounds 16, 17, 18 and 19

Table 28.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **16**, **17**, **18** and **19** (400 and 100 MHz, acrtone- $d_6$  or pyridine- $d_5$  or  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>16</b>		Compound <b>17</b>		Compound <b>18</b>		Compound <b>19</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		38.4		31.8	1.01 (1H, dd, 13.5, 3.2) 2.10 (1H, br d, 13.5)	38.6	1.38 (1H, dt, 12.8, 2.1) 2.15 (1H, br dd, 12.8, 3.6)	39.1
2		29.4		28.4	1.24 ~1.45 (1H, m) 1.57 (1H, m)	19.6	1.64 (1H, dd, 12.8, 6.9) 1.83 (1H, m)	19.4
3	3.22 (1H, dd, 3.9, 1.8)	78.9	3.48 (1H, t, 2.8)	76.0	1.24 ~1.45 (2H, m)	42.0	1.44 (1H, m) 1.26 (1H, d, 2.1)	41.9
4		40.2		37.9		33.7		33.6
5		51.5		43.8	1.79 (1H, dd, 13.5, 3.7)	50.2	1.29 (1H, dd, 12.4, 1.8)	50.5
6	2.74 (1H, dd, 10.8, 7.3)	20.4		22.3	2.71 (1H, dd, 17.9, 13.5) 2.81 (1H, dd, 17.9, 3.7)	36.8	1.71 (1H, td, 12.4, 3.2) 1.58 (1H, m)	19.5
7	2.72 (1H, ddd, 17.2, 10.8, 7.3) 2.82 (1H, ddd, 17.2, 7.3, 1.8)	31.3		29.8		197.7	2.78 (1H, dd, 12.4, 7.3) 2.84 (1H, dd, 16.6, 7.3)	30.0
8		126.8		126.8		124.5		127.5
9		148.9		148.4		157.0		148.9
10		38.5		37.4		38.4		37.7
11	6.72 (1H, s)	112.0	6.61 (1H, s)	111.1	7.14 (1H, s)	110.6	6.61 (1H, s)	111.2
12		153.6		150.9		162.2		150.8
13		133.2		131.7		134.5		131.5
14	6.77 (1H, s)	127.6	6.81 (1H, s)	127.3	8.42 (1H, s)	127.0	6.81 (1H, s)	126.8
15	3.21 (1H, sept, 6.9)	27.9	3.09 (1H, sept, 6.9)	26.1	3.64 (1H, sept, 6.9)	27.7	3.08 (1H, sept, 6.9)	27.0
16	1.18 (3H, d, 6.9)	23.4	1.20 (3H, d, 6.9)	22.7	1.39 (3H, d, 6.9)	23.1	1.22 (3H, d, 6.9)	23.0
17	1.16 (3H, d, 6.9)	23.5	1.21 (3H, d, 6.9)	23.0	1.37 (3H, d, 6.9)	23.3	1.20 (3H, d, 6.9)	22.8
18	0.86 (3H, s)	29.2	0.92 (3H, s)	27.0	0.83 (3H, s)	33.0	0.89 (3H, s)	33.5
19	1.05 (3H, s)	16.6	1.01 (3H, s)	19.0	0.87 (3H, s)	21.8	0.92 (3H, s)	21.8
20	1.15 (3H, s)	25.8	1.16 (3H, s)	24.8	1.16 (3H, s)	23.8	1.15 (3H, s)	25.0

## 11) Compound 20, 21, 22, 23의 구조 동정

Compound 20은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.59 (1H, s)의 signal은  $sp^2$  혼성을 갖는 aromatic ring 구조의 proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  6.04 (1H, s)의 signal은 compound 12와 같이 disappeared on  $\text{D}_2\text{O}$  exchange 때문에 phenolic hydroxyl기로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.79 (3H, s)의 signal은 deshielding된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  3.18 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (3H, d,  $J = 7.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.22 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.37 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.00 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 5개의 methyl proton signal을 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 21개의 carbon peak가 관찰된 것으로  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때, abietane-type diterpenes 구조를 예상하였으며,  $sp^2$  혼성 탄소가 모두 7개 있어서, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  199.4의 signal은 carbonyl group으로 예상하였고, 나머지 6개의 signal은  $sp^2$  혼성 탄소인 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며, 또한  $\delta_{\text{C}}$  18.2-62.1에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소를 예상하였으며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  62.1의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소를 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>92</sup>과 비교하여 compound 20은 cryptojaponol임을 확인하였다.

Compound 21은 compound 20과 유사한 구조를 예상하며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  4.71 (1H, br s)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 통하여 총 21개의 carbon이 있음을 확인하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  69.5의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소를 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>93</sup>과 비교하여 compound 21은 7a,11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene임을 확인하였다.

Compound 22는 compound 21과 유사한 구조를 예상하며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.00 (1H, s)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는

aromatic ring 구조의 proton을 예상하였고,  $\delta_H$  4.68 (1H, dd,  $J = 17.6, 6.9$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 proton임을 예상하였다.  $\delta_C$  72.2의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>94,95</sup>과 비교하여 compound **22**는 7-hydroxydeoxocryptojaponol임을 확인하였다.

Compound **23**은 compound **20**과 유사한 구조를 예상하며,  $^1H$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_H$  6.46 (1H, s)의 signal은  $sp^2$  혼성을 갖는 aromatic ring 구조의 proton을 예상하였고,  $\delta_H$  6.40 (1H, dd,  $J = 10.1, 2.8$  Hz),  $\delta_H$  5.91 (1H, dd,  $J = 10.1, 2.8$  Hz)의 signal은 olefin methine proton으로 예상하였다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서  $sp^2$  혼성 탄소 모두 8개 있어 가지고, 그 중  $\delta_C$  130.4,  $\delta_C$  129.4의 signal은 다 3차 carbon인 olefin 구조로 예상하였고, 나머지 6개의 signal은  $sp^2$  혼성 탄소인 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>96</sup>과 비교하여 compound **23**은 6,7-dehydrodeoxocryptojaponol임을 확인하였다.

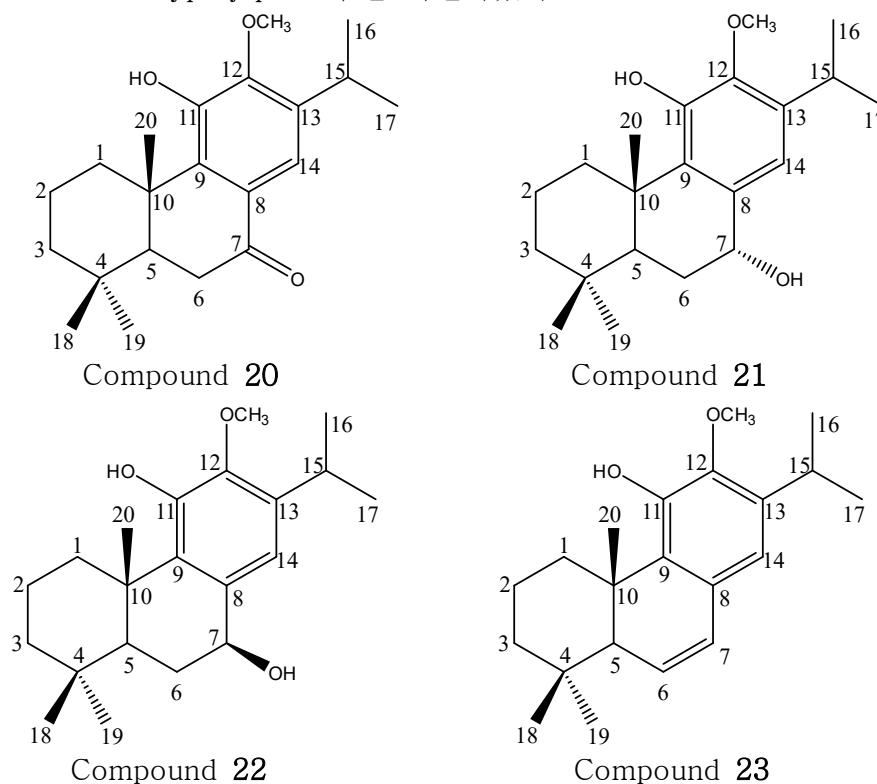


Figure 72. Chemical structure of compounds **20**, **21**, **22** and **23**

Table 29. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **20**, **21**, **22** and **23** (400 and 100 MHz, in CDCl<sub>3</sub>)

No.	Compound <b>20</b>		Compound <b>21</b>		Compound <b>22</b>		Compound <b>23</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1.39 (1H, dt, 13.7, 3.7)	36.4	3.15 (1H, dd, 13.0, 5.5)	36.3	1.30 (1H, d, 11.9)	36.4		36.7
	3.22 (1H, ddd, 13.7, 3.7, 1.4)		1.73 (1H, dt, 14.6, 5.5)		3.11 (1H, dt, 13.3, 3.2)			
2	1.58 (1H, m)	19.2	1.05~1.12 (1H, m)	19.5	1.52 (1H, br d, 11.9)	19.8		19.4
	1.73 (1H, m)		1.29~1.37 (1H, m)		1.71 (1H, td, 13.3, 3.2)			
3	1.48 (1H, ddd, 13.2, 3.2, 1.4)	41.4	1.47~1.53 (1H, m)	41.7	1.63 (1H, d, 8.7)	41.5		41.1
	1.26 (1H, ddd, 13.2, 6.9, 3.2)		1.20~1.32 (1H, m)		1.45 (1H, m)			
4		33.7		33.4		33.6		33.2
5	1.84 (1H, dd, 14.4, 3.2)	50.5	1.67 (1H, dd, 12.8, 1.1)	45.8	2.17 (1H, s)	50.3	2.18 (1H, t, 2.8)	51.8
6	2.64 (1H, dd, 16.9, 3.2)	35.8	1.92 (1H, dt, 13.7, 3.9)	28.1	1.30 (1H, d, 11.9)	30.4	5.91 (1H, dd, 10.1, 2.8)	129.4
	2.53 (1H, dd, 16.9, 14.4)		1.81 (1H, dd, 12.8, 3.9)		2.17 (1H, dd, 11.9, 6.9)			
7		199.4	4.71 (1H, br s)	69.5	4.68 (1H, dd, 17.6, 6.9)	72.2	6.40 (1H, dd, 10.1, 2.8)	130.4
8		129.0		134.7		136.8		128.2
9		138.3		133.3		133.1		131.5
10		40.4		39.8		40.3		40.9
11	6.07 (1H, s, -OH)	146.7	6.01 (1H, s, -OH)	147.0	6.00 (1H, s, -OH)	146.5	5.93 (1H, s, -OH)	146.0
12		149.3		144.4		143.9		144.2
13		139.3		139.0		138.7		138.2
14	7.59 (1H, s)	117.5	6.76 (1H, s)	119.4	7.00 (1H, s)	115.8	6.46 (1H, s)	116.3
15	3.18 (1H, sept, 6.9)	26.9	3.16 (1H, sept, 6.9)	26.7	3.18 (1H, sept, 6.9)	26.8	3.16 (1H, sept, 6.9)	26.6
16	1.23 (3H, d, 6.9)	23.8	1.21 (3H, d, 6.9)	23.8	1.23 (3H, d, 6.9)	24.0	1.18 (3H, d, 6.9)	24.0
17	1.22 (3H, d, 6.9)	23.7	1.22 (3H, d, 6.9)	24.0	1.20 (3H, d, 6.9)	23.9	1.21 (3H, d, 6.9)	23.8
18	0.92 (3H, s)	33.4	0.96 (3H, s)	33.9	0.93 (3H, s)	33.8	0.94 (3H, s)	33.4
19	1.00 (3H, s)	21.7	0.92 (3H, s)	22.3	0.91 (3H, s)	22.2	1.01 (3H, s)	22.7
20	1.37 (3H, s)	18.2	1.25 (3H, s)	18.6	1.35 (3H, s)	19.4	1.10 (3H, s)	18.3
-OCH <sub>3</sub>	3.79 (3H, s)	62.1	3.74 (3H, s)	62.0	3.74 (3H, s)	62.0	3.74 (3H, s)	62.0

12) Compound **24**의 구조 동정

Compound **24**는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 20개의 carbon peak와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 3개의 methyl group을 포함하여 넓은 범위에 aliphatic signal들을 바탕으로 diterpene으로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.31 (1H, dd,  $J = 17.4, 10.5$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.02 (1H, d,  $J = 17.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.86 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 말단-olefin 구조를 예상하였고  $\delta_{\text{H}}$  4.82 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  4.44 (1H, s)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 고려했을 때, olefin의 geminal proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  5.39 (1H, t,  $J = 6.6$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 고려했을 때, olefin group의 proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.71 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.63 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 3개의 methyl proton signal을 확인하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서는 1개의 carbonyl group ( $\delta_{\text{C}}$  181.9)과 3개의 olefin group 한 쌍은 4차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  148.1, 2차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  107.8, 다음 한 쌍은 4차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  133.7, 3차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  134.1, 마지막 한 쌍은 3차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  141.8, 2차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  109.2을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 labdane-type diterpenes 구조를 예상하였으며 문헌<sup>97</sup>과 비교하여 compound **24**는 *trans*-communic acid임을 확인하였다.

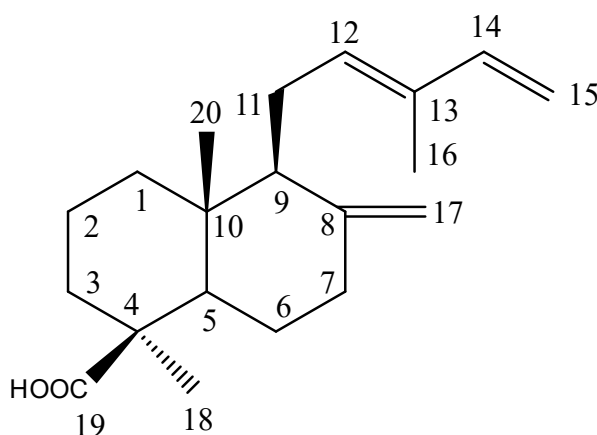


Figure 73. Chemical structure of compound **24**

Table 30.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **24** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>24</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	2.37 (1H, m)	38.7
	1.95 (1H, m)	
2	1.85 (1H, m)	20.1
	1.56 (1H, m)	
3	2.15 (1H, m)	38.2
	1.12 (1H, m)	
4		44.3
5	1.81 (1H, m)	56.6
6	1.88 (1H, m)	39.4
	1.07 (1H, m)	
7	1.98 (1H, m)	26.0
	1.88 (1H, m)	
8		148.1
9	1.34 (1H, m)	56.4
10		40.5
11	2.37 (1H, m)	23.5
12	5.39 (1H, t, 6.6)	134.1
13		133.7
14	6.31 (1H, dd, 17.4, 11.0)	141.8
15	5.02 (1H, d, 17.4)	110.2
	4.86 (1H, d, 11.0)	
16	1.71 (3H, s)	12.1
17	4.82 (1H, s)	107.8
	4.44 (1H, s)	
18	1.23 (3H, s)	29.2
19		181.9
20	0.63 (3H, s)	13.1

### 13) Compound 25의 구조 동정

Compound 25는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 30개의 carbon peak가 관찰된 것으로  $^1\text{H}$ -NMR data를 고려했을 때, triterpenes 구조를 예상하였으며,  $sp^2$  혼성 탄소가 모두 8개 있어서, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  206.0,  $\delta_{\text{C}}$  182.9의 signal은 2개 carbonyl group으로 예상하였고, 나머지 6개의 signal ( $\delta_{\text{C}}$  152.1,  $\delta_{\text{C}}$  149.7,  $\delta_{\text{C}}$  145.4,  $\delta_{\text{C}}$  144.9,  $\delta_{\text{C}}$  136.1,  $\delta_{\text{C}}$  123.9)들은 모두 4차 탄소인 olefin group 구조가 3개 있을 것이라 예상할 수 있으며, 또한  $\delta_{\text{C}}$  13.5-58.2에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.71 (1H, s)의 signal은 disappeared on  $\text{D}_2\text{O}$  exchange 때문에 phenolic hydroxyl기로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  3.18 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.78 (1H, sept,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아 하나는  $sp^2$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton, 하나는  $sp^3$  혼성 탄소에 결합된 isopropyl proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  1.29 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.27 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.85 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.79 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.15 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.97 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.95 (3H, s)에서 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton signal을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>97</sup>과 비교하여 compound 25는 chamaecydin임을 확인하였다.

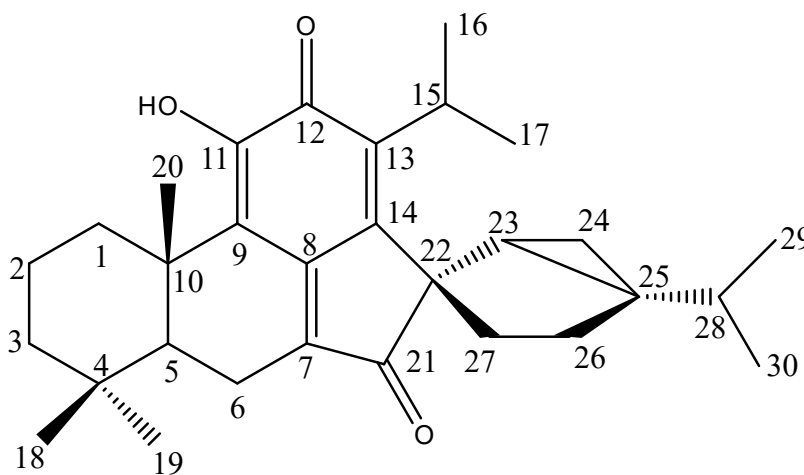


Figure 74. Chemical structure of compound 25



Table 31.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **25** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>25</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		36.8
2		18.9
3		41.9
4		34.1
5		51.1
6		19.7
7		136.1
8		145.4
9		144.9
10		38.9
11	7.71 (1H, s, -OH)	152.1
12		182.9
13		123.9
14		149.7
15	3.16 (1H, sept, 6.9)	31.9
16	1.29 (3H, d, 6.9)	20.3
17	1.27 (3H, d, 6.9)	20.7
18	0.95 (3H, s)	31.2
19	0.97 (3H, s)	22.3
20	1.15 (3H, s)	19.4
21		206.0
22		58.2
23		33.7
24		13.5
25		35.0
26		30.1
27		31.0
28	1.78 (1H, sept, 6.9)	29.0
29	0.85 (3H, d, 6.9)	20.0
30	0.79 (3H, d, 6.9)	20.5

14) Compound **26**, **27**의 구조 동정

Compound **26**은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.33 (6H, m, overlap)의 signal은 6개의 olefin methine proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  2.78 (2H, m),  $\delta_{\text{H}}$  2.74 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2.02 (2H, m),  $\delta_{\text{H}}$  1.98 (2H, m)의 signal은 aliphatic proton에 비해 deshielding된 것으로 보며, allylic methyl group으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  3.64 (3H, s) 의 signal은 deshielding된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  0.85 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은 적분 값을 통해 methyl group으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 19개의 carbon peak가 관찰된 것으로  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때, fatty acid 유도체 구조를 예상하였으며,  $sp^2$  혼성 탄소가 모두 7개 있어서, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  174.6 과  $\delta_{\text{C}}$  51.7의 signal들은 ester group으로 예상하였고, 나머지 6개  $\delta_{\text{C}}$  130.4, 130.2, 130.2, 130.0, 128.1, 128.2의 signal들은  $sp^2$  혼성 탄소인 3개 이중결합 구조가 있을 것이라 예상할 수 있다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>98</sup>과 비교하여 compound **26**은  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester임을 확인하였다.

Compound **27**은 compound **26**과 유사한 구조를 예상하며,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 18개의 carbon peak가 관찰된 것으로  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때, fatty acid 구조를 예상하였으며,  $sp^2$  혼성 탄소는 모두 7개로, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  179.1의 signal은 carboxyl group으로 예상하였고, 나머지 6개  $\delta_{\text{C}}$  132.2, 130.5, 128.5, 128.4, 127.9, 127.3의 signal들은  $sp^2$  혼성 탄소인 3개 이중결합 구조가 있을 것이라 예상할 수 있다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>54</sup>과 비교하여 compound **27**은  $\alpha$ -linolenic acid임을 확인하였다.

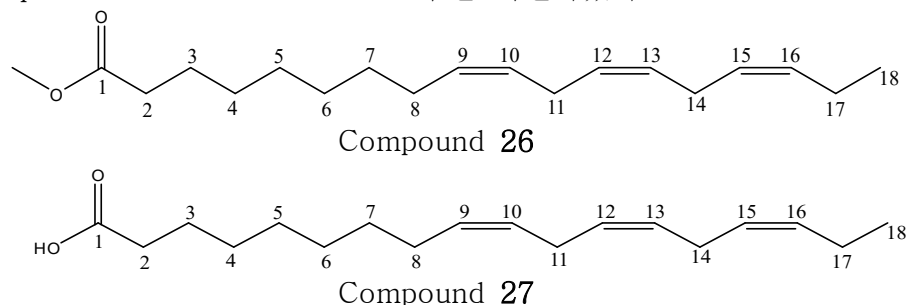


Figure 75. Chemical structure of compounds **26** and **27**

Table 32.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **26** and **27** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>26</b>		Compound <b>27</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		174.6		179.1
2	2.28 (2H, t, 7.6)	34.3	2.32 (2H, t, 7.6)	34.1
3	1.60 (2H, m)	25.2	1.60 (2H, m)	27.4
4	1.28 (2H, m)	29.4	1.29 (2H, m)	29.3
5	1.28 (2H, m)	29.3	1.29 (2H, m)	29.2
6	1.28 (2H, m)	29.9	1.29 (2H, m)	29.8
7	1.28 (2H, m)	29.5	1.29 (2H, m)	29.4
8	1.98 (2H, m)	29.3	2.02 (2H, m)	25.8
9	5.33 (1H, m)	130.4	5.34 (1H, m)	132.2
10	5.33 (1H, m)	128.1	5.34 (1H, m)	127.3
11	2.74 (2H, t, 6.6)	22.9	2.78 (2H, t, 6.0)	24.9
12	5.33 (1H, m)	130.2	5.34 (1H, m)	128.5
13	5.33 (1H, m)	130.0	5.34 (1H, m)	128.4
14	2.78 (2H, m)	25.8	2.78 (2H, t, 6.0)	25.7
15	5.33 (1H, m)	128.2	5.34 (1H, m)	127.9
16	5.33 (1H, m)	130.2	5.34 (1H, m)	130.5
17	2.02 (2H, m)	27.4	2.04 (2H, m)	20.8
18	0.85 (3H, t, 6.9)	14.3	0.95 (3H, t, 7.6)	14.5
19	3.64 (3H, s)	51.7		

## 15) Compound 28, 29의 구조 동정

Compound 28은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.65 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  6.50 (1H, s)의 signal을 통해 서로 aromatic ring 구조에 있는 *para*-위치의 proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  6.32 (2H, s)의 signal은 적분 값을 통해 화학적 환경이 같은 대칭구조를 가지고 있는 aromatic ring을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  5.93 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.91 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 methylene proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.73 (6H, s),  $\delta_{\text{H}}$  3.78 (3H, s)의 signal들은 deshielding된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  4.44 (1H, dd,  $J = 8.7, 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.90 (1H, td,  $J = 10.1, 2.3$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methylene proton임을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  4.58 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz)의 signal는 deshielding된 것으로 보아  $sp^2$  혼성 탄소에 연결된 methine proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 21개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때,  $sp^2$  혼성 탄소 11개 있어 가지고 2개 aromatic ring 구조가 있고 그 중 한 개는 대칭 구조를 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  175.2의 signal은 lactone group인 carbon으로 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  101.4의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때, 전기음성도가 큰 산소가 결합한 methylene carbon ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ )으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  70.0,  $\delta_{\text{C}}$  72.3과 2개의  $\delta_{\text{C}}$  56.4의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 aryl-naphthalenes-type lignans 구조를 예상하였으며 문헌<sup>99</sup>과 비교하여 compound 28은 deoxypodophyllotoxin (Anthricin)임을 확인하였다.

Compound 29는 compound 28과 유사한 구조를 나타내며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.43 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.65 (1H, dd,  $J = 7.3, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.71 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz)의 signal는 coupling constant를 통해 서로 *ortho*-, *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  6.43 (2H, s)의 signal은 적분 값을 통해 화학적 환경이 같은 대칭구조를 가지고 있는 aromatic ring를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.80 (6H, s),  $\delta_{\text{H}}$  3.80 (3H, s)의 signal

들은 deshielding된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하였고,  $\delta_H$  4.15 (1H, dd,  $J = 9.4, 7.3$  Hz),  $\delta_H$  3.85 (1H, dd,  $J = 9.2, 7.3$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methylene proton임을 예상하였다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서 총 19개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $\delta_C$  178.7의 signal은 lactone group인 carbon으로 예상하였다. 또한  $\delta_C$  71.4과  $\delta_C$  62.0, 2개의  $\delta_C$  56.3의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 dibenzyltyrolactones-type lignans 구조를 예상하였으며 문헌<sup>100</sup>과 비교하여 compound **29**는 yatein임을 확인하였다.

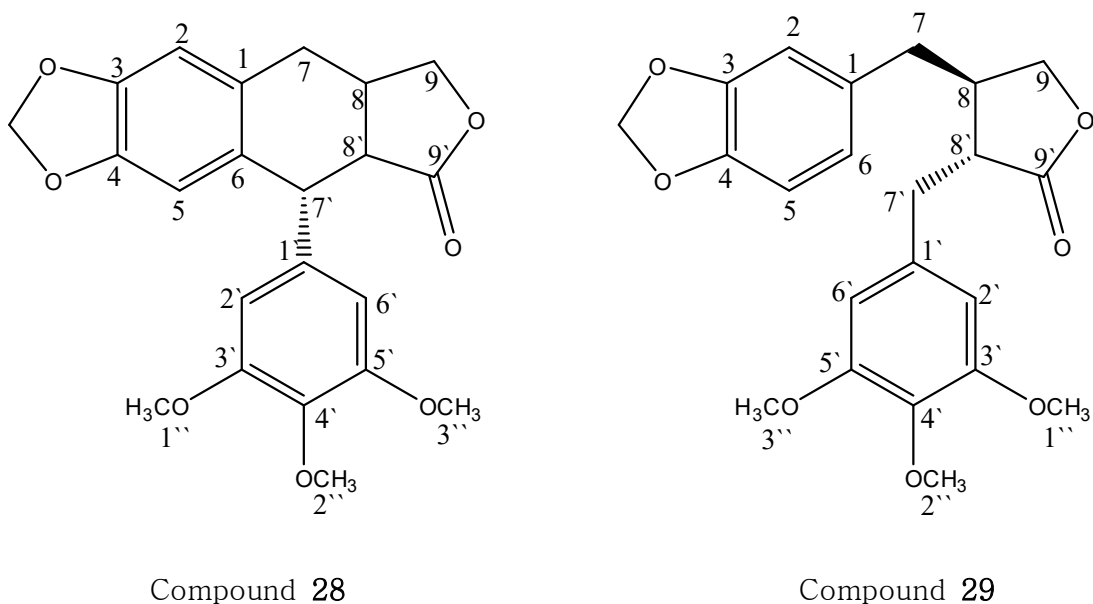


Figure 76. Chemical structure of compounds **28** and **29**

Table 33.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **28** and **29** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>28</b>		Compound <b>29</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		128.5		131.7
2	6.65 (1H, s)	108.7	6.43 (1H, d, 1.8)	108.9
3		147.2		148.1
4		146.9		146.6
5	6.50 (1H, s)	110.7	6.65 (1H, d, 7.3)	108.5
6		130.8	6.44 (1H, dd, 7.3, 1.8)	121.7
7	2.74 (1H, m) 3.06 (1H, br d, 10.1)	33.3	2.43~2.62 (2H, m)	35.4
8	2.74 (1H, m)	32.9	2.43~2.62 (1H, m)	46.6
9	3.90 (1H, td, 10.1, 2.3) 4.44 (1H, dd, 8.7, 6.0)	72.3	3.85 (1H, dd, 9.2, 7.3) 4.15 (1H, dd, 9.4, 7.3)	71.4
1`		136.5		133.5
2`	6.32 (1H, s)	108.4	6.33 (1H, s)	106.3
3`		152.7		153.4
4`		137.2		137.0
5`		152.7		153.4
6`	6.32 (1H, s)	108.4	6.33 (1H, s)	106.3
7`	4.58 (1H, d, 3.2)	43.9	2.86~2.89 (2H, m)	38.5
8`	2.74 (1H, m)	47.7	2.43~2.62 (1H, m)	41.2
9`		175.2		178.7
-OCH <sub>2</sub> O-	5.93 (1H, d, 1.4) 5.91 (1H, d, 1.4)	101.4	5.90 (1H, d, 1.4) 5.91 (1H, d, 1.4)	101.3
1`` , 3``	3.73 (6H, s)	56.4	3.80 (6H, s)	56.3
2``	3.78 (3H, s)	61.0	3.80 (3H, s)	61.0

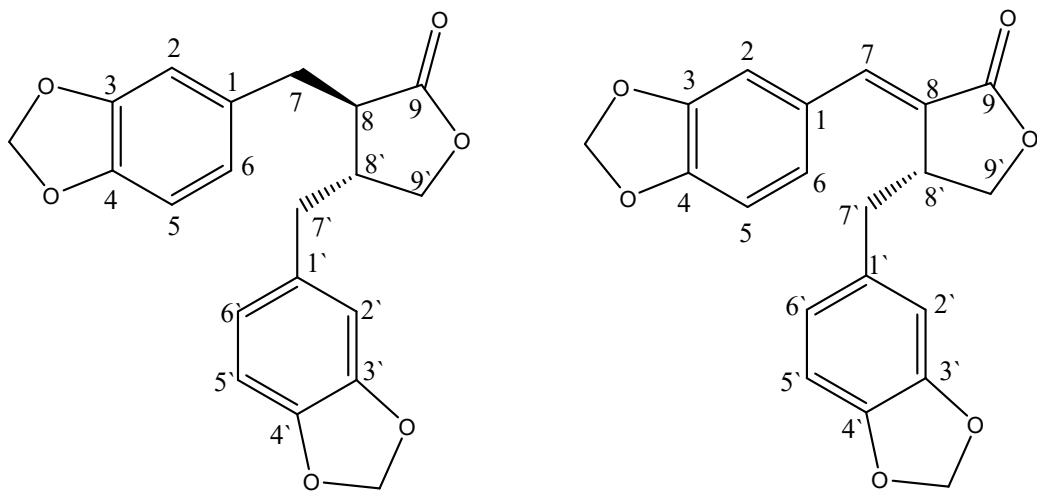
## 16) Compound **30**, **31**, **32**의 구조 동정

Compound **30**은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.44 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.58 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.71 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz)의 signal과  $\delta_{\text{H}}$  6.61 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.44 (1H, dd,  $J = 8.7, 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.68 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *ortho*-, *meta*-coupling을 하고 있는 2개 aromatic ring 구조를 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  5.92 (4H, m)의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 methylene proton 2개로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (1H, dd,  $J = 9.4, 7.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.84 (1H, dd,  $J = 9.2, 7.3$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methylene proton임을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 19개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $sp^2$  혼성 탄소가 13개 있어서 2개 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  178.6의 signal은 lactone group인 carbon으로 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  101.2의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때 전기음성도가 큰 산소 2개가 결합한 methylene carbon ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ )으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  71.9의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 dibenzyltyrolactones-type lignans 구조를 예상하였으며 문헌<sup>101</sup>과 비교하여 compound **30**은 hinokinin임을 확인하였다.

Compound **31**은 compound **30**과 유사한 구조를 나타내며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum  $\delta_{\text{H}}$  7.48 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz)의 signal은 olefin methine proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  4.23 (2H, m)의 signal은 산소에 인접한 위치의 methylene proton임을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 20개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $\delta_{\text{C}}$  172.8의 signal은 lactone group인 carbon으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  69.7의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 dibenzyltyrolactones-type lignans 구조를 예상하였으며 문헌<sup>102</sup>과 비교하여 compound **31**은 savinin임을 확인하였다.

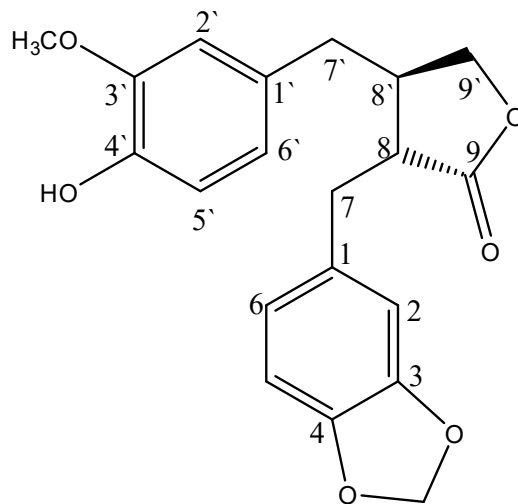
Compound **32**는 NMR spectrum에 보면 compound **30**과 유사한 것을 나타내

며, 총 20개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $\delta_C$  178.9의 signal은 lactone group인 carbon으로 예상하였다. 또한  $\delta_C$  71.4의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다.  $\delta_H$  3.64 (3H, s)의 signal은 deshielding된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하며  $^{13}C$ -NMR data를 고려했을 때,  $\delta_C$  56.0의 signal에 대응한다. 이상의 결과를 바탕으로 dibenzyltyrolactones-type lignans 구조를 예상하며 문헌<sup>102</sup>과 비교하여 compound **32**는 haplomyrfoin임을 확인하였다.



Compound **30**

Compound **31**



Compound **32**

Figure 77. Chemical structure of compounds **30**, **31** and **32**



Table 34.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **30**, **31** and **32** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>30</b>		Compound <b>31</b>		Compound <b>32</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		131.8		128.4		131.8
2	6.44 (1H, d, 1.8)	108.5	7.02 (1H, d, 1.8)	108.8	6.44 (1H, d, 1.4)	109.0
3		148.1		148.2		148.0
4		146.6		149.4		146.5
5	6.71 (1H, d, 7.8)	108.6	6.86 (1H, d, 8.2)	108.7	6.81 (1H, d, 8.2)	108.5
6	6.58 (1H, dd, 7.8, 1.8)	121.8	6.62 (1H, dd, 8.2, 1.8)	126.3	6.64 (1H, dd, 8.2, 1.4)	122.2
7	2.96 (1H, dd, 14.2, 5.0)	35.0	7.48 (1H, d, 1.8)	137.5	2.42~2.66 (2H, m)	34.8
	2.82 (1H, dd, 14.2, 7.3)					
8	2.40~2.54 (1H, m)	46.7		126.0	2.42~2.66 (1H, m)	46.8
9		178.6		172.8		178.9
1`		131.5		131.7		129.6
2`	6.61 (1H, d, 1.4)	109.6	6.64 (1H, d, 1.8)	109.4	6.64 (1H, d, 2.3)	111.7
3`		148.1		148.1		146.9
4`		146.7		146.8		144.7
5`	6.68 (1H, d, 8.7)	109.0	6.72 (1H, d, 7.8)	109.0	6.66 (1H, d, 7.3)	114.4
6`	6.44 (1H, dd, 8.7, 1.4)	122.4	7.06 (1H, dd, 7.8, 1.8)	122.3	6.60 (1H, dd, 7.3, 2.3)	121.7
	2.55~2.60 (1H, m)		2.97 (1H, dd, 14.2, 4.6)		2.93 (1H, dd, 14.2, 5.0)	
7`	2.40~2.54 (1H, m)	38.6	2.57 (1H, dd, 14.2, 10.1)	37.7	2.86 (1H, dd, 14.2, 7.1)	38.4
8`	2.40~2.54 (1H, m)	41.5	3.72 (1H, m)	40.1	2.42~2.66 (1H, m)	41.2
9`	4.10 (1H, dd, 9.4, 7.3)	71.4	4.23 (2H, m)	69.7	4.09 (1H, dd, 9.2, 7.1)	71.4
	3.84 (1H, dd, 9.2, 7.3)				3.84 (1H, dd, 7.1, 1.8)	
-OCH <sub>3</sub>					3.82 (3H, s)	56.0
-OCH <sub>2</sub> O-	5.92 (4H, m)	101.2	5.92 (2H, d, 1.4)	101.9	5.91 (1H, d, 1.4)	101.2
		101.2	5.91 (2H, d, 1.4)	101.3	5.89 (1H, d, 1.4)	

17) Compound **33**의 구조 동정

Compound **33**은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.72~6.82 (6H, m)의 signal을 통해  $sp^2$  혼성을 갖는 2개 aromatic ring 구조의 proton을 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  5.93 (4H, s)의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 methylene proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  4.67 (2H, d,  $J = 4.6$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methine proton임을 예상하였고  $\delta_{\text{H}}$  4.21 (2H, dd,  $J = 9.2, 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.84 (2H, dd,  $J = 9.2, 4.6$  Hz)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methylene proton로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 10개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $sp^2$  혼성 탄소가 6개 있어서 aromatic ring 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  101.2의 signal은 deshielding된 것으로 보아  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때 전기음성도가 큰 산소 2개가 결합한 methylene carbon ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ )으로 예상하고, 완전 대칭구조를 가지고 있는 화학 구조를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  86.0과  $\delta_{\text{C}}$  71.9의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 furofurans-type lignans 구조를 예상하였으며 문헌<sup>103</sup>과 비교하여 compound **33**은 sesamin임을 확인하였다.

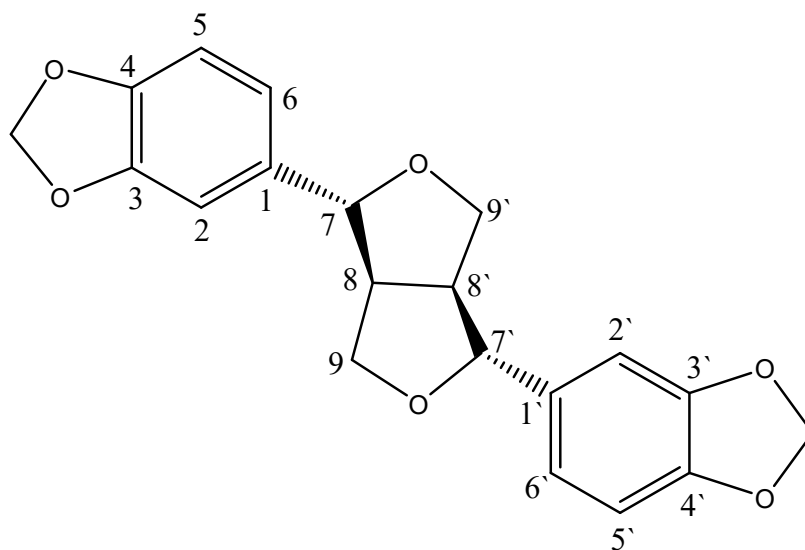


Figure 78. Chemical structure of compound **33**

Table 35.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **33** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>33</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		135.2
2	6.76~6.82 (1H, m)	106.7
3		148.2
4		147.3
5	6.76~6.82 (1H, m)	108.4
6	6.76~6.82 (1H, m)	119.6
7	4.67 (1H, d, 4.6)	86.0
8	3.02 (1H, m)	54.5
9	4.21 (1H, dd, 9.2, 6.9)	71.9
	3.84 (1H, dd, 9.2, 4.6)	
1`		135.2
2`	6.76~6.82 (1H, m)	106.7
3`		148.2
4`		147.3
5`	6.76~6.82 (1H, m)	108.4
6`	6.76~6.82 (1H, m)	119.6
7`	4.67 (1H, d, 4.6)	86.0
8`	3.02 (1H, m)	54.5
9`	4.21 (1H, dd, 9.2, 6.9)	71.9
	3.84 (1H, dd, 9.2, 4.6)	
2 × - OCH <sub>2</sub> O-	5.93 (4H,s)	101.3

18) Compound **34**, **35**, **36**, **37**의 구조 동정

Compound **34**는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.92 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.88 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  7.35 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.83 (2H, d,  $J = 8.2$  Hz)의 signal은 적분 값과 coupling constant를 통해 서로 *ortho*-coupling을 가지고 있는 aromatic ring 또는 화학적 환경이 같은 대칭구조로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  4.98 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.54 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz)의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 2개 methine proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 15개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $^1\text{H-NMR}$  data를 종합하여 flavanone 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  198.6의 signal은 carbonyl group인 carbon으로 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  85.1,  $\delta_{\text{C}}$  73.8의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한  $sp^3$  혼성 탄소로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>104</sup>과 비교하여 compound **34**는 aromadendrin임을 확인하였다.

Compound **35**는  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에 보면 compound **34**와 유사한 것을 나타내지만 compound **34**의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과에 대비하여 flavanone 구조의 B ring만 차이가 있을 것으로 관찰되며,  $\delta_{\text{H}}$  6.96 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.85 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.80 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *ortho*, *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>105</sup>과 비교하여 compound **35**는 taxifolin임을 확인하였다.

Compound **36**은 compound **35**의  $^1\text{H}$  와  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에 비교하여 동일한 aglycone 구조인 taxifolin으로 예상하였으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.74 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.87 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.94 (1H, dd,  $J = 11.7, 4.6$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.06 (1H, dd,  $J = 11.7, 8.2$  Hz)의 signal들은 deshielding된 것으로 보아 당의 proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  102.6, 75.9, 73.6, 70.9, 66.1의 signal들은 치환된

당의 carbon으로 예상하며, anomeric proton의 coupling constant 값을 통하여 문헌과 비교하여  $\beta$ -D-xylopyranoside임을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>106</sup>과 비교하여 compound **36**은 taxifolin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranoside로 동정하였다.

Compound **37**은 compound **35**의 <sup>1</sup>H-NMR와 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에 비교하여 동일한 aglycone 구조인 taxifolin으로 예상하였으며, <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서  $\delta_c$  102.2, 73.9, 72.2, 71.9, 70.6, 18.0의 signal들은 치환된 당의 carbon으로 예상하였으며, anomeric proton의 coupling constant 값을 통하여 문헌과 비교하여  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside임을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>107</sup>과 비교하여 compound **37**은 taxifolin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside로 동정하였다.

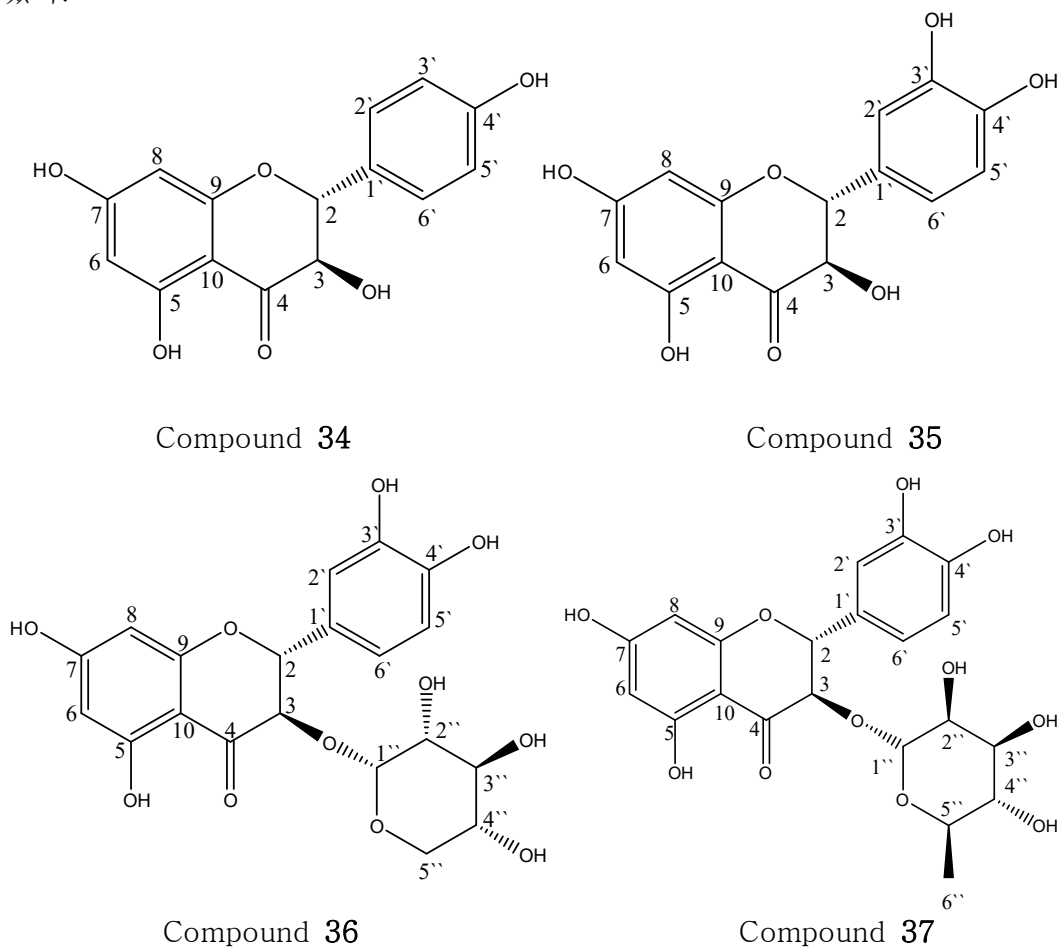


Figure 79. Chemical structure of compounds **34**, **35**, **36** and **37**

Table 36. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **34**, **35**, **36** and **37** (400 and 100 MHz, in CD<sub>3</sub>OD)

No.	Compound <b>34</b>		Compound <b>35</b>		Compound <b>36</b>		Compound <b>37</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.98 (1H, d, 11.4)	85.1	4.91 (1H, d, 11.4)	85.3	5.52 (1H, d, 10.1)	83.7	5.07 (1H, d, 10.5)	84.1
3	4.54 (1H, d, 11.4)	73.8	4.50 (1H, d, 11.4)	73.8	4.74 (1H, d, 10.1)	77.6	4.58 (1H, d, 10.5)	78.7
4		198.6		198.5		195.8		196.1
5		169.0		169.1		165.6		165.7
6	5.92 (1H, d, 1.8)	97.5	5.92 (1H, d, 1.8)	97.5	5.90 (1H, d, 1.8)	96.4	5.93 (1H, d, 1.8)	97.5
7		165.5		165.5		169.1		169.0
8	5.88 (1H, d, 1.8)	96.4	5.88 (1H, d, 1.8)	96.5	5.91 (1H, d, 1.8)	97.4	5.90 (1H, d, 1.8)	96.4
9		164.7		164.6		164.2		164.2
10		102.0		101.9		103.2		102.6
1`		129.4		130.0		129.1		129.3
2`	7.35 (1H, d, 8.2)	130.5	6.96 (1H, d, 1.8)	116.0	6.95 (1H, d, 1.4)	115.8	6.96 (1H, d, 1.4)	115.6
3`	6.83 (1H, d, 8.2)	116.3		147.3		146.6		146.6
4`		159.4		146.5		147.5		147.5
5`	6.83 (1H, d, 8.2)	116.3	6.80 (1H, d, 8.2)	116.2	6.78 (1H, d, 8.2)	116.4	6.81 (1H, d, 8.2)	116.3
6`	7.35 (1H, d, 8.2)	130.5	6.85 (1H, dd, 8.2, 1.8)	121.0	6.83 (1H, dd, 8.2, 1.4)	121.0	6.84 (1H, dd, 8.2, 1.4)	120.6
1``					3.87 (1H, d, 10.1)	102.6	4.04 (1H, d, 1.4)	102.2
2``					3.23 (1H, m)	73.6	under the MeOH	71.9
3``					3.23 (1H, m)	75.9	3.54 (1H, dd, 2.3, 1.7)	72.2
4``					3.49 (1H, m)	70.9	3.67 (1H, dd, 8.5, 2.3)	73.9
5``					3.94 (1H, dd, 11.7, 4.6)	66.1	4.25 (1H, m)	70.6
					3.06 (1H, dd, 11.7, 8.2)			
6``							1.18 (3H, d, 6.0)	18.0

19) Compound **38**, **39**의 구조 동정

Compound **38**, **39**은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 26개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $^1\text{H}$ -NMR data를 고려했을 때, flavonoids 계열 화합물을 예상하였다. Compound **38**은  $\delta_{\text{H}}$  6.26 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.54 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  8.00 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.05 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz)의 signal은 적분 값과 coupling constant를 통해 서로 *ortho*-coupling을 가지고 있는 aromatic ring 또는 화학적 환경이 같은 대칭구조로 예상하였고, 또한  $\delta_{\text{H}}$  6.70 (1H, s)의 signal은 olefin methine proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  183.2의 signal은 carbonyl group인 carbon으로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>108</sup>과 비교하여 compound **38**은 apigenin임을 확인하였다.

Compound **39**는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.82 (1H, s)의 signal은 benzene ring 하나 밖에 없는  $sp^2$  혼성 탄소의 proton으로 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  8.03 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.12 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz)의 signal은 적분 값과 coupling constant를 통해 서로 *ortho*-coupling을 가지고 있는 aromatic ring 또는 화학적 환경이 같은 대칭구조로 예상하였고, 또한  $\delta_{\text{H}}$  6.72 (1H, s)의 signal은 olefin methine proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  183.6의 signal은 carbonyl group인 carbon으로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>109</sup>과 비교하여 compound **39**는 scutellarein임을 확인하였다.

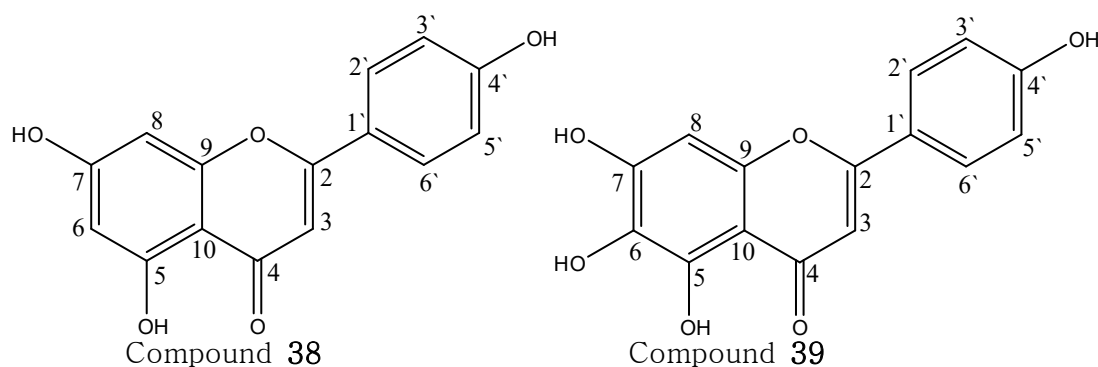


Figure 80. Chemical structure of compounds **38** and **39**

Table 37.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **38** and **39** (400 and 100 MHz, in acetone- $d_6$ )

No.	Compound <b>38</b>		Compound <b>39</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		165.7		164.6
3	6.70 (1H, s)	130.8	6.72 (1H, s)	105.5
4		183.2		183.6
5		163.5		163.5
6	6.26 (1H, d, 2.3)	99.8		162.2
7		165.7		155.4
8	6.54 (1H, d, 2.3)	94.9	6.82 (1H, s)	95.6
9		158.9		154.8
10		105.1		105.9
1`		123.2		125.9
2`	8.00 (1H, d, 9.2)	129.5	8.03 (1H, d, 9.2)	129.1
3`	7.05 (1H, d, 9.2)	117.0	7.12 (1H, d, 9.2)	116.6
4`		162.0		161.9
5`	7.05 (1H, d, 9.2)	117.0	7.12 (1H, d, 9.2)	116.6
6`	8.00 (1H, d, 9.2)	129.5	8.03 (1H, d, 9.2)	129.1



20) Compound 40, 41의 구조 동정

Compound 40은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.39 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.18 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  7.33 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.31 (1H, dd,  $J = 8.7, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.85 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *ortho*, *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 15개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $^1\text{H-NMR}$  data를 종합하여 flavonols 구조가 있을 것이라 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  177.5의 signal은 carbonyl group인 carbon으로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>104</sup>과 비교하여 compound 40은 quercetin으로 동정하였다.

Compound 41은 compound 40의  $^1\text{H}$  와  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에 비교하여 동일한 aglycone 구조인 quercetin으로 가지는 것을 예상하였으며,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  103.7, 73.4, 72.2, 72.2, 72.0, 17.8의 signal들은 치환된 당의 carbon으로 예상하며, anomeric proton의 coupling constant 값을 통하여 문헌과 비교하여  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside임을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>106</sup>과 비교하여 compound 41은 quercitrin (quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside)으로 동정하였다.

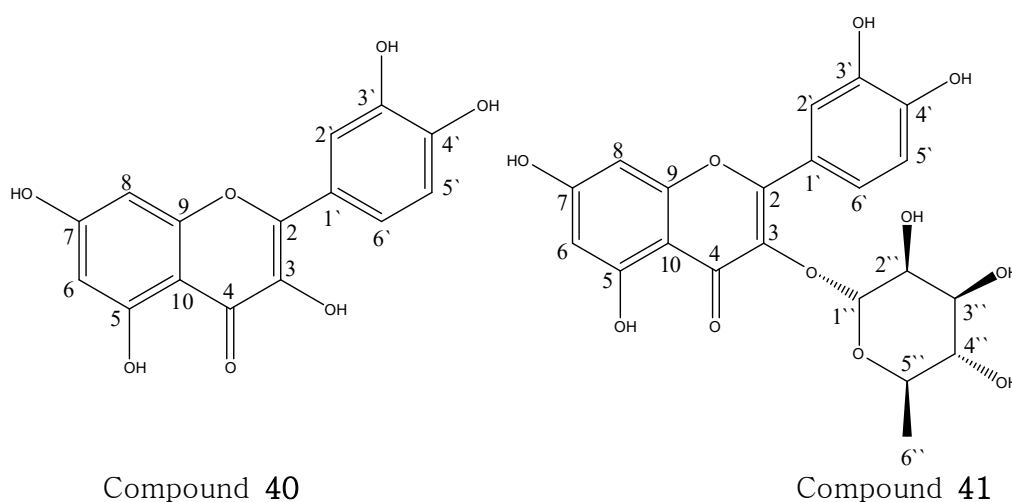


Figure 81. Chemical structure of compounds 40 and 41

Table 38.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **40** and **41** (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>40</b>		Compound <b>41</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		148.1		159.4
3		137.4		136.4
4		177.5		179.8
5		158.4		163.4
6	6.18 (1H, d, 2.3)	99.4	6.21 (1H, d, 2.3)	99.9
7		165.7		166.0
8	6.39 (1H, d, 2.3)	94.5	6.37 (1H, d, 2.3)	94.8
9		162.6		158.6
10		104.6		106.0
1`		124.3		123.1
2`	7.73 (1H, d, 1.8)	116.1	7.34 (1H, d, 1.8)	116.5
3`		146.4		146.4
4`		148.9		149.9
5`	6.88 (1H, d, 8.7)	116.4	6.85 (1H, d, 8.2)	116.4
6`	7.63 (1H, dd, 8.7, 1.8)	121.8	7.31 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.0
1``			5.35 (1H, d, 1.4)	103.7
2``			4.22 (1H, br d, 3.2)	72.2
3``			3.75 (1H, dd, 8.7, 1.4)	72.2
4``			3.35 (1H, m)	73.4
5``			3.44 (1H, m)	72.0
6``			0.94 (3H, d, 6.0)	17.8

#### 4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항산화

###### (1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 gallic acid 검정곡선을 이용하여 편백 종자의 추출물 및 분획물에 함유되어있는 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 측정된 값은 각 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, *n*-BuOH 및 EtOAc 분획물에서  $121.9 \pm 1.43$ ,  $87.0 \pm 1.04$  mg/g GAE로 다른 추출물과 분획물들에 비해 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와 연관이 있을 것으로 예상하였다(Figure 82).

###### (2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드는 quercetin을 표준물질로 한 표준검정곡선을 이용하여 편백 종자의 추출물 및 분획물에 함유되어 있는 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 측정된 값은 각 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서  $12.73 \pm 0.31$ ,  $13.34 \pm 0.75$  mg/g QE로 추출물 및 다른 분획물들에 비해 가장 많은 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 83).

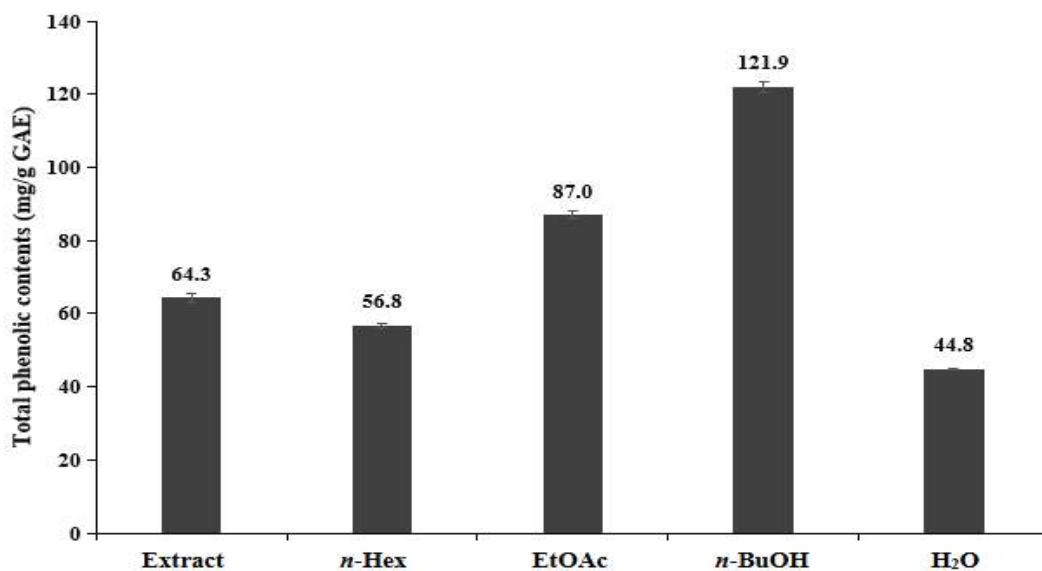


Figure 82. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from *C. obusa* seeds. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

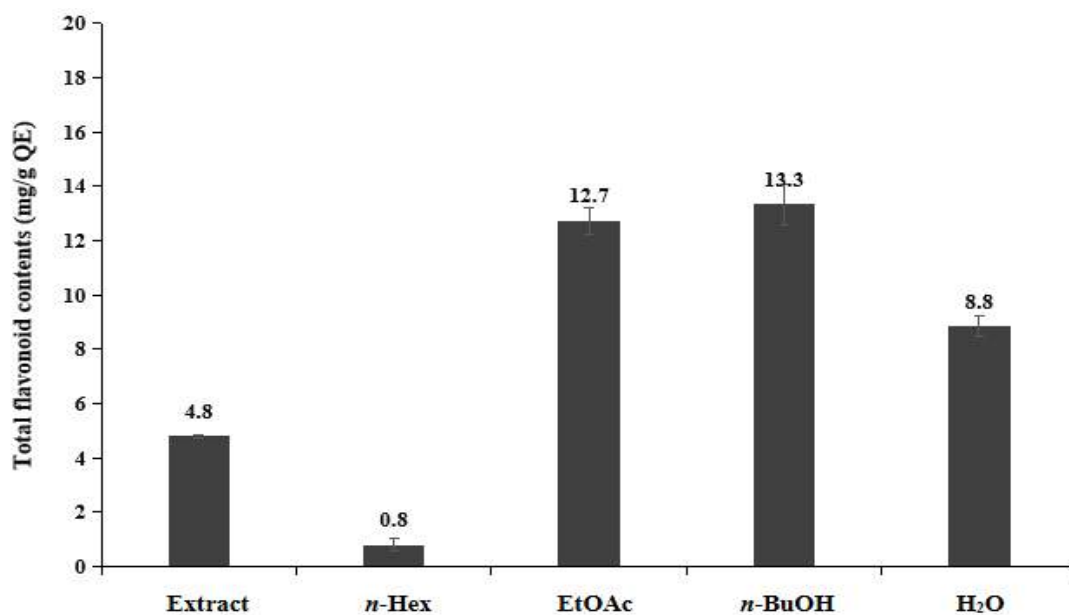


Figure 83. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. obusa* seeds. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

편백 종자의 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 25-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다.

실험 결과, *n*-BuOH 분획물의  $\text{SC}_{50}$  값이 42.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 양성 대조군 BHT 및 다른 분획물들에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 84, Table 39).

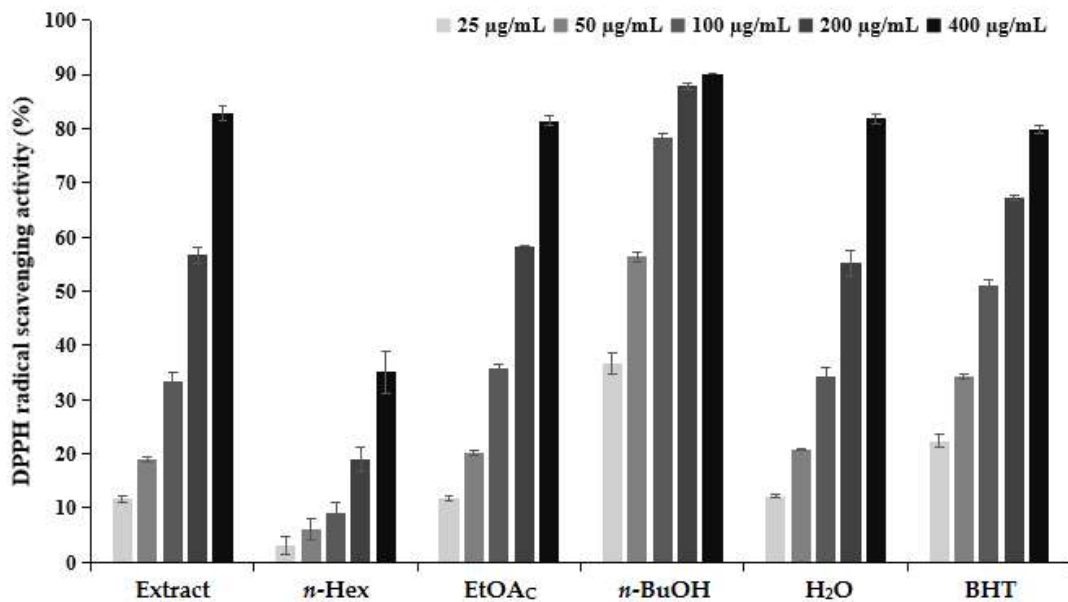


Figure 84. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from *C. obusa* seeds. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 39.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *C. obusa* seeds.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
$\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	171.6	>400	164.2	42.0	175.4	97.1

(4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정

편백 종자의 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 6.25-200 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, *n*-BuOH, 추출물, EtOAc 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 20.3, 31.7, 35.5 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다(Figure 85, Table 40).

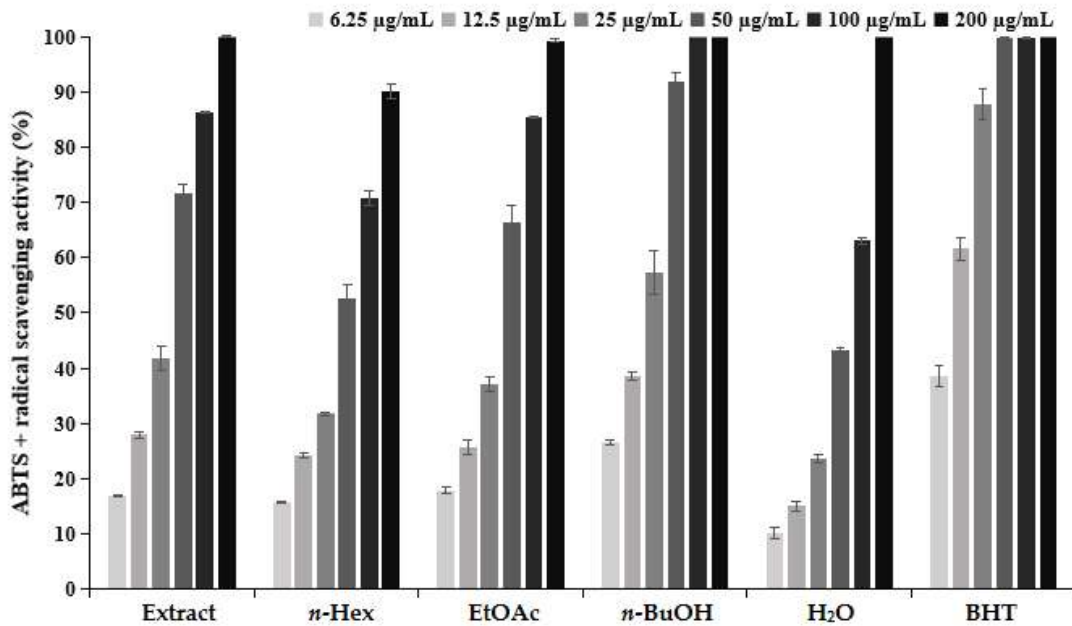


Figure 85. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent layers from *C. obusa* seeds. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 40. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *C. obusa* seeds.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	31.7	47.0	35.5	20.3	71.5	9.6

### 3) 항균

#### (1) Paper disc diffusion method

편백 종자 추출물 및 분획물의 항균 활성을 확인하기 위하여 피부 상재균 (resident flora)인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 및 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 4015)를 사용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다.

그 결과, 편백 종자의 추출물 및 분획물이 *S. epidermidis*에 대하여 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 모두 우수한 항균 활성을 나타내었다.

편백 종자의 추출물 및 분획물이 *C. acnes*에 대하여 *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 모두 우수한 항균 활성을 보였다.

마찬가지로 편백 종자의 추출물 및 분획물이 *S. mutans*균주에 대해서는 *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 모두 우수한 항균 활성을 나타내었다.



Figure 86. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of *C. obusa* seeds on *S. epidermidis*, *C. acnes* and *S. mutans*.



Table 41. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from branches of *C. obusa* seeds.

Bacterial density ( $1.5 \times 10^6$ CFU/mL)	Clear zone (mm)		
	<i>S. epidermidis</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	11.0	10.0	11.5
<i>n</i> -Hex Fr.	9.5	9.5	9.5
EtOAc Fr.	12.5	11.0	10.5
<i>n</i> -BuOH Fr.	10.5	10.0	11.5
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.	N.A.	N.A.
Positive control	33.5	N.A.	32.0

Bacterial density ( $1 \times 10^8$ CFU/mL)	Clear zone (mm)			
	<i>C. acnes</i>			
	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
Extract	15.0	14.5	13.0	13.0
<i>n</i> -Hex Fr.	14.5	13.5	12.5	13.0
EtOAc Fr.	13.5	12.5	12.5	13.5
<i>n</i> -BuOH Fr.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Positive control	61.0	N.A.	N.A.	47.0

Bacterial density ( $3 \times 10^6$ CFU/mL)	Clear zone (mm)
	<i>S. mutans</i>
	KCCM 40105
Extract	12.0
<i>n</i> -Hex Fr.	12.0
EtOAc Fr.	10.5
<i>n</i> -BuOH Fr.	N.A.
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.
Positive control	39.0

Sample : 4 mg  
 Positive control (Erythromycin) : 40 µg  
 Disc size : 8 mm × 0.9 mm  
 N.A. : No Activity

## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통해 편백 종자의 항균 활성을 확인하였으며, 활성을 가지고 있는 시료에 대해 추가적으로 균주 성장 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 사용한 시료의 최대 농도는 10,000 µg/mL (*C. acnes*의 경우는 최대 농도로 4,000 µg/mL)로 실행하여 최소 농도가 9.76 µg/mL (*C. acnes*의 경우는 최소 농도가 3.91 µg/mL)가 되도록 two-fold serial dilutions 방법으로 희석하여 실험하였다.

그 결과, *S. epidermidis*의 경우에는 편백 종자의 추출물 및 각종 분획물에서 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 실험한 모든 균주의 MIC 값을 확인하였으며, 그 중 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 MBC 값을 확인하였다. 그 결과, *n*-Hex 분획물이 제일 우수한 항균 활성을 확인하였다(Table 42).

*C. acnes*의 경우에는 편백 종자의 H<sub>2</sub>O 과 *n*-BuOH 분획물에서 CCARM 9089 균주를 제외하고 실험한 모든 균주의 MIC 값을 확인하였으며, 그 중 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 MBC 값을 확인하였다. 그 결과, 추출물이 제일 우수한 항균 활성을 확인하였으며, MBC 값은 125 µg/mL로 나타내었다(Table 43).

*S. mutans*의 경우에는 편백 종자의 추출물 및 각종 분획물에서 H<sub>2</sub>O 과 *n*-BuOH 분획물을 제외하고 실험한 모든 시료의 MIC와 MBC 값을 모두 확인하였다(Table 44).

Table 42. MIC and MBC values of *C. obusa* seeds on *S. epidermidis*

	<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	156.2	10000	312.5	10000	625	5000
<i>n</i> -Hex Fr.	156.2	10000	156.2	10000	312.5	10000
EtOAc Fr.	1250	10000	2500	10000	2500	5000
<i>n</i> -BuOH Fr.	1250	10000	2500	10000	1250	5000
H <sub>2</sub> O Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

Unit : µg/mL

Table 43. MIC and MBC values of *C. obusa* seeds on *C. acnes*

	<i>C. acnes</i>							
	CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	31.2	62.5	31.2	62.5	62.5	125	15.6	125
<i>n</i> -Hex Fr.	31.2	125	62.5	125	62.5	250	15.6	2000
EtOAc Fr.	31.2	125	62.5	2000	62.5	2000	31.2	2000
<i>n</i> -BuOH Fr.	1000	>4000	1000	4000	2000	>4000	>4000	>4000
H <sub>2</sub> O Fr.	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000

Unit : µg/mL

Table 44. MIC and MBC values of *C. obusa* seeds on *S. mutans*

	<i>S. mutans</i>	
	KCCM 40105	
	MIC	MBC
Extract	39.1	78.1
<i>n</i> -Hex Fr.	39.1	78.1
EtOAc Fr.	156.2	625
<i>n</i> -BuOH Fr.	>10000	>10000
H <sub>2</sub> O Fr.	>10000	>10000

Unit : µg/mL

### 3) 항염

#### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

편백 종자 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성 억제 활성과 세포 생존율 (MTT)을 확인하기 위하여 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 이용하였다. 우선 추출물과 용매 분획물은 5 µg/mL 농도로 실험을 실행하였다. 그 결과, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 세포 독성 없이 우수한 NO 생성억제 활성을 나타내었으며, 억제율을 각각 63.7%, 61.7%, 64.9%로 확인하였다(Figure 87).

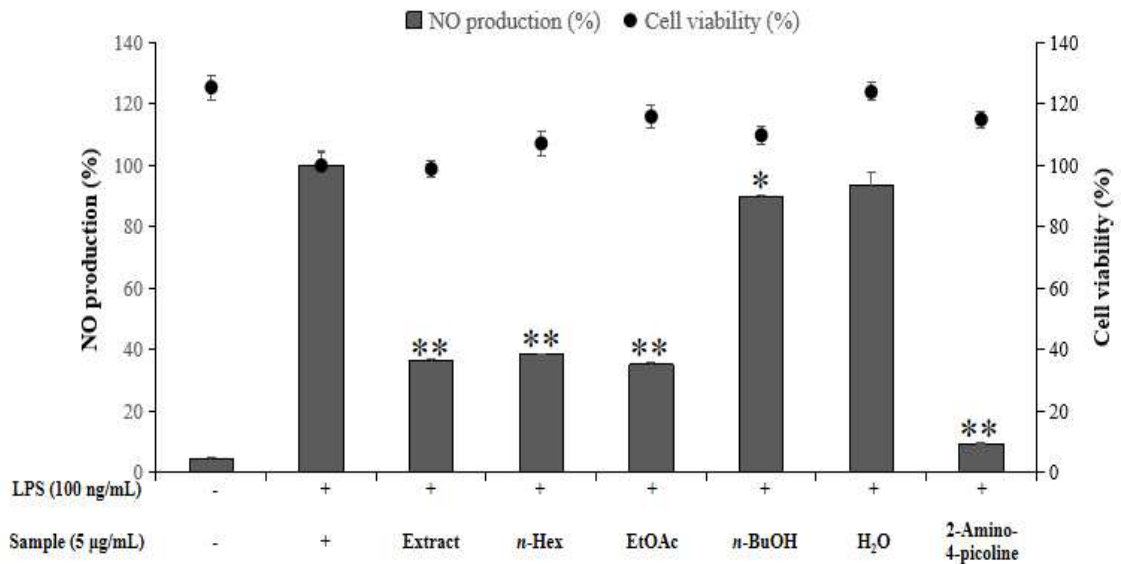
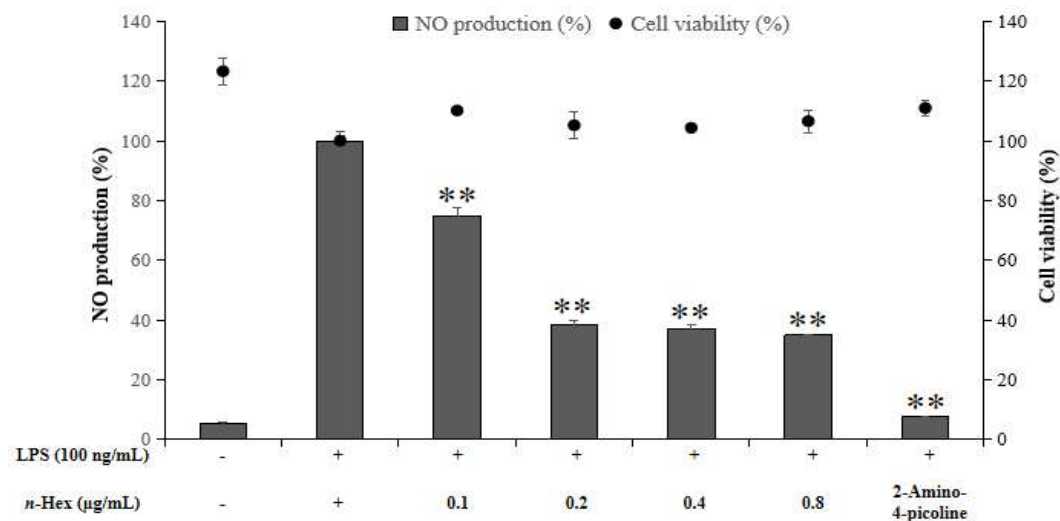
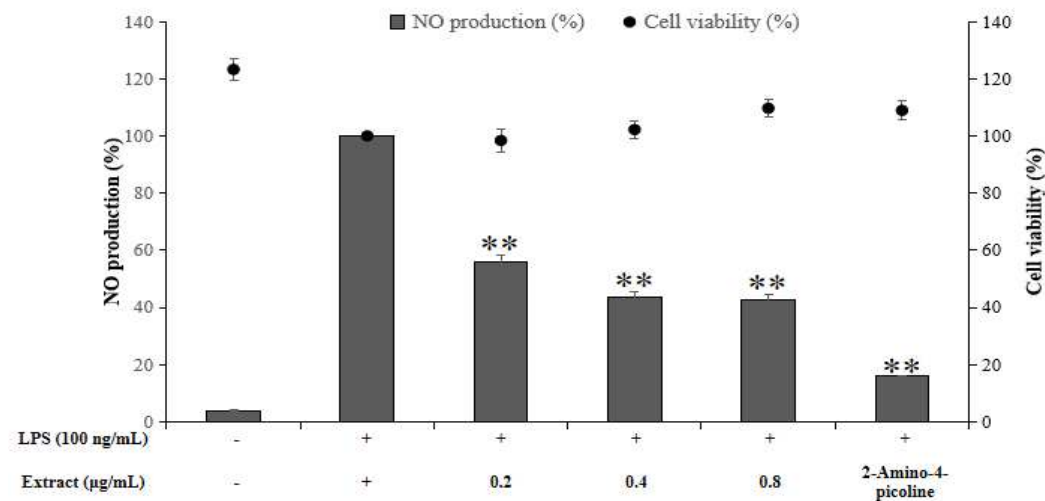


Figure 87. Effects of extract and solvent fractions from *C. obusa* seeds on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *C. obusa* seeds and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

추출물에서 NO 생성 억제율이 50%일 때의 농도(IC<sub>50</sub>)를 확인하기 위하여 추가적으로 추출물은 0.2-0.8 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 추출물은 농도의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보였고, IC<sub>50</sub> 값은 0.27 µg/mL로 확인되었다.

마찬가지로 *n*-Hex과 EtOAc 분획물도 각 0.1-0.8 µg/mL의 농도를 실험을 하여, 모두 농도의존적인 NO 생성 억제 활성을 확인하였고, IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.17 µg/mL, 0.19 µg/mL로 나타났다(Figure 88).



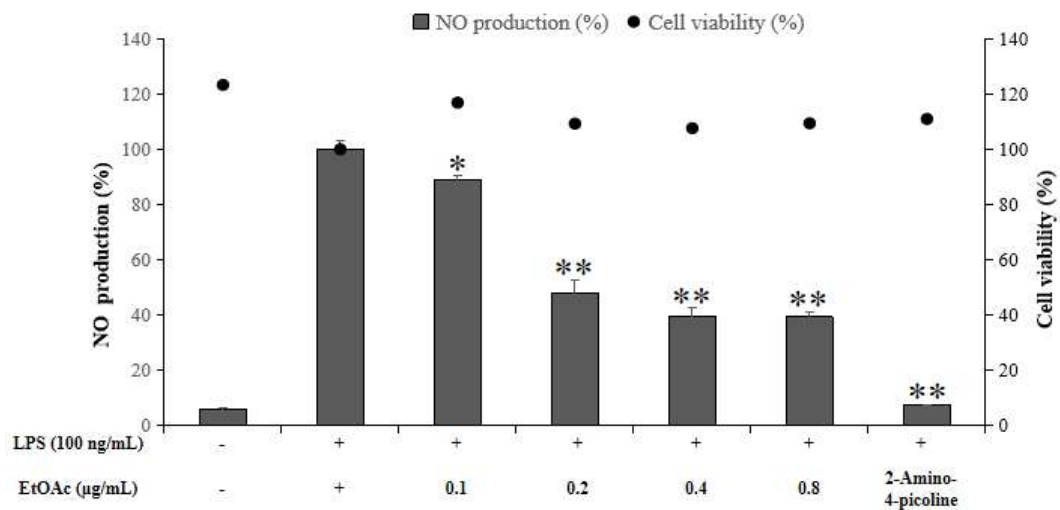


Figure 88. Effects of Extract, *n*-Hex and EtOAc fractions from *C. obusa* seeds on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions from *C. obusa* seeds and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

(2) PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine (TNF-α) 생성 억제 활성

편백 종자 추출물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 편백 종자 추출물은 TNF-α의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다 (Figure 89).

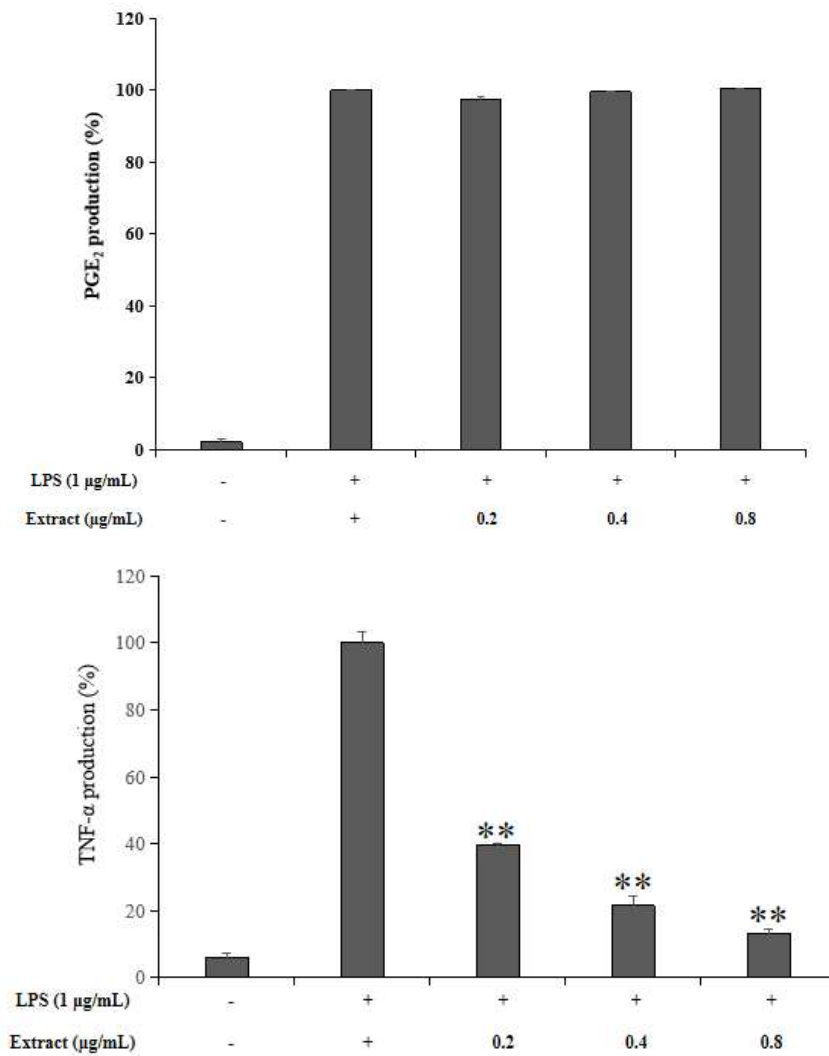


Figure 89. Effects of Extract from *C. obusa* seeds on PGE<sub>2</sub> and TNF-α production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

편백 종자 *n*-Hex 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 편백 종자 *n*-Hex 분획물은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 90).

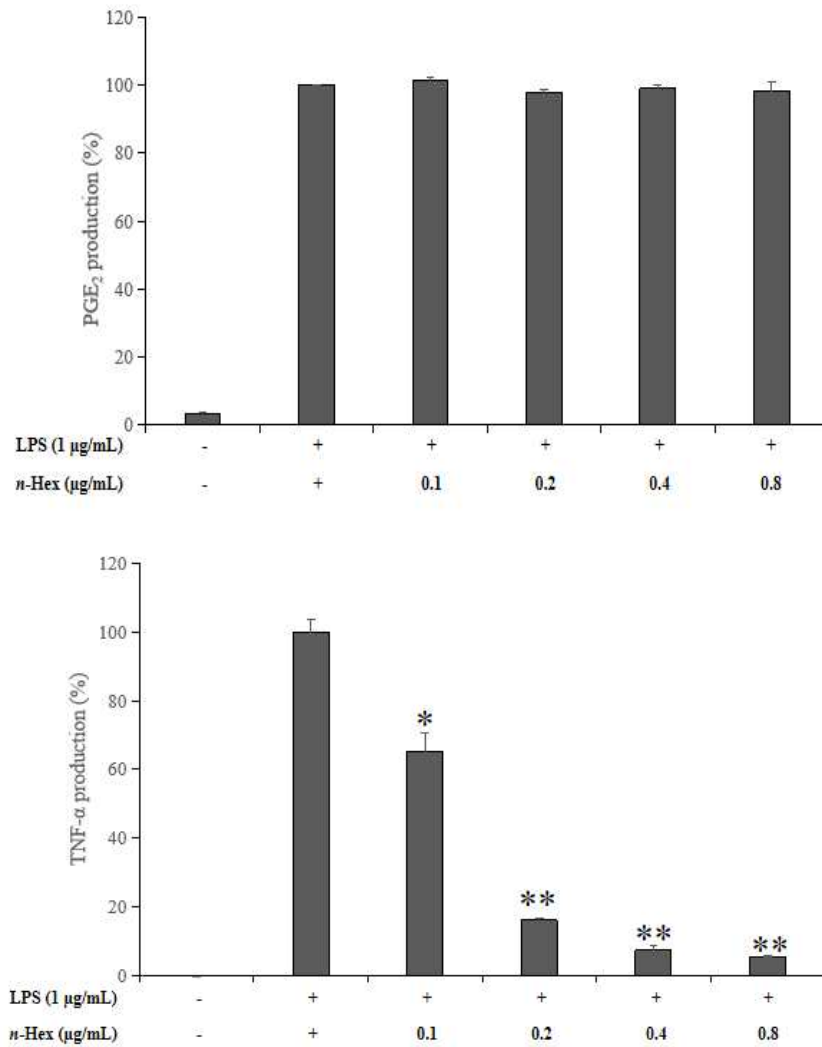


Figure 90. Effects of *n*-Hex fraction from *C. obusa* seeds on PGE<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



또한, 편백 종자 EtOAc 분획물은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 91).

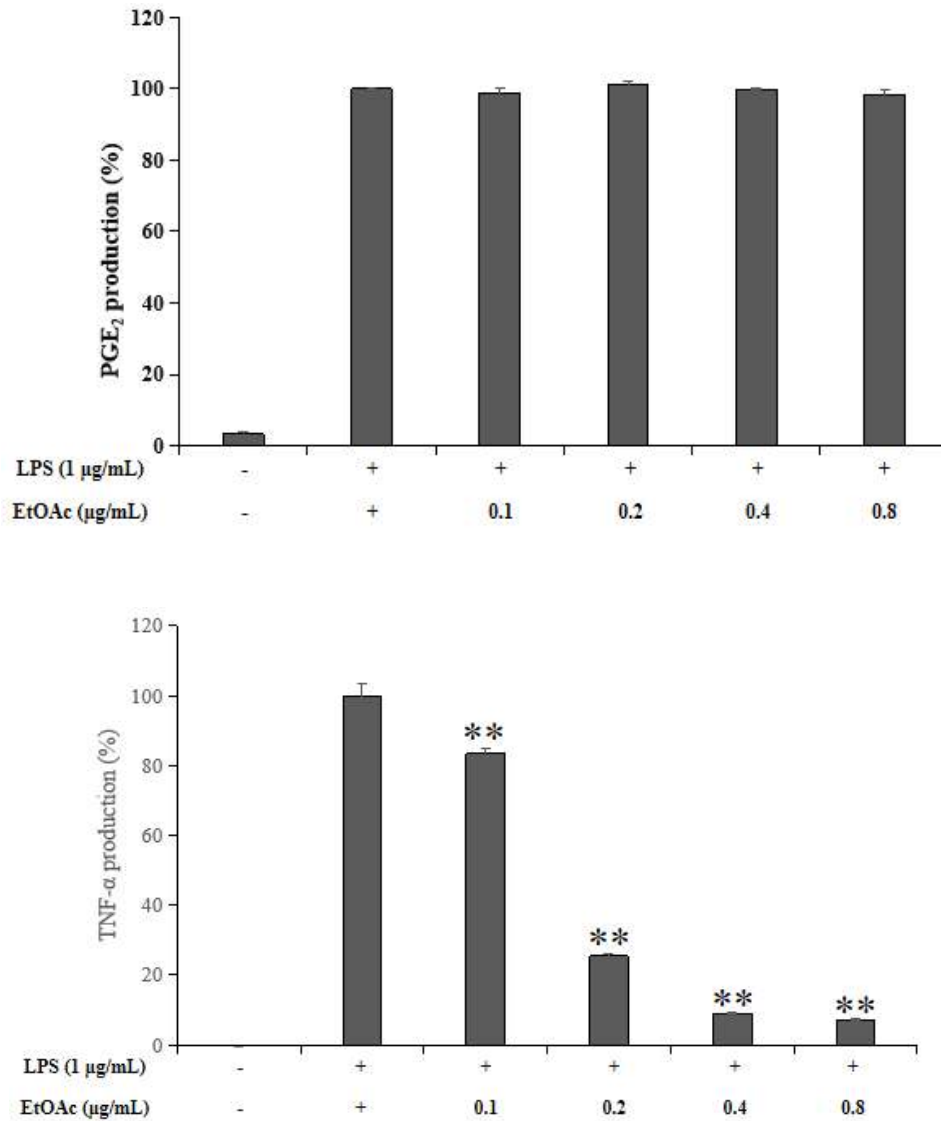


Figure 91. Effects of EtOAc fraction from *C. obusa* seeds on PGE<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

#### 4) 미백

##### (1) Tyrosinase 억제 활성 측정

편백 종자 추출물 및 분획물에 대한 미백 활성을 측정하기 위해 tyrosinase 억제 활성을 측정하였다. 실험은 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 139.0, 183.0 µg/mL로 tyrosinase 억제 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 특히 *n*-Hex 분획물은 양성 대조군인 Arbutin의 IC<sub>50</sub> 값과 유사한 것으로 확인하였다(Figure 92, Table 45).

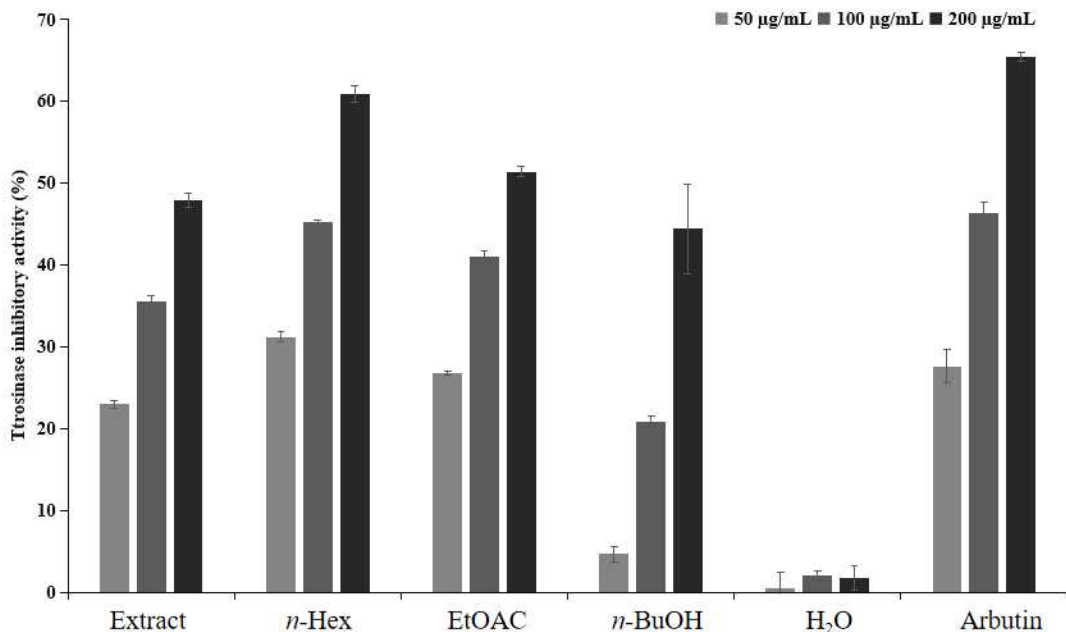


Figure 92. Tyrosinase inhibition activities of extract and solvent layers from *C. obusa* seeds. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 45. IC<sub>50</sub> values of tyrosinase inhibition activities for extract and solvent fractions from *C. obusa* seeds.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	Arbutin
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	>200	139.0	183.0	>200	>200	131.4

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항산화

#### (1) DPPH radical 소거 활성 측정

편백 종자로부터 분리된 리그난 화합물 compounds **28-33**의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 12.5-400  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다.

실험 결과, compound **32**에서  $\text{SC}_{50}$  값이 384.80  $\mu\text{M}$ 로 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 93, Table 46).

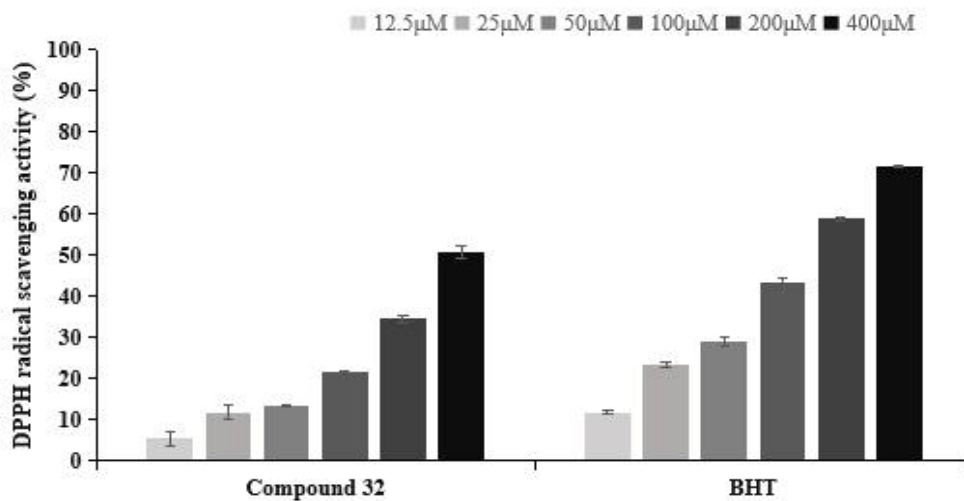


Figure 93. DPPH radical scavenging activities of compounds **28-33** from *C. obusa* seeds. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 46.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities for compounds **28-33** from *C. obusa* seeds.

	Compound <b>28</b>	Compound <b>29</b>	Compound <b>30</b>	Compound <b>31</b>	Compound <b>32</b>	Compound <b>33</b>	BHT
$\text{SC}_{50}(\mu\text{M})$	>400	>400	>400	>400	384.8	>400	149.0

(2) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정

편백 종자로부터 분리된 리그난 화합물 compounds 28-33의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 12.5-200 μM의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, compound 32에서 SC<sub>50</sub> 값이 56.39 μM로 양성 대조군 BHT보다 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다(Figure 94, Table 47).

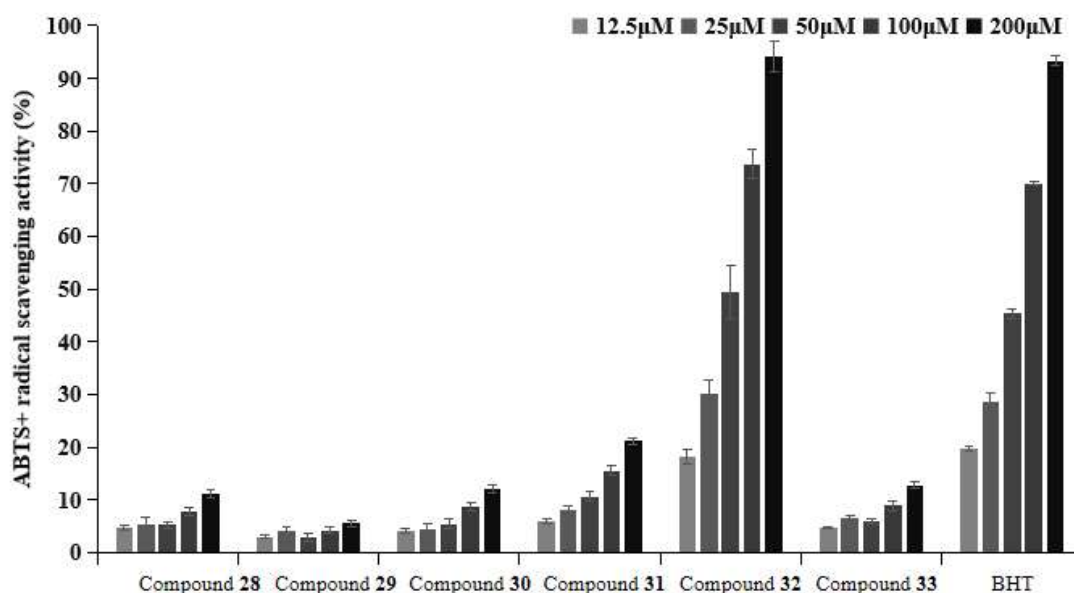


Figure 94. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of compounds 28-33 from *C. obusa* seeds. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 47. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities for compounds 28-33 from *C. obusa* seeds.

	Compound 28	Compound 29	Compound 30	Compound 31	Compound 32	Compound 33	BHT
SC <sub>50</sub> (μM)	>400	>400	>400	>400	56.4	>400	62.0

## 2) 항균

### (1) MIC 및 MBC

편백 종자 추출물로부터 분리된 화합물 3, 10, 11-24들에 대하여 항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균(resident flora)인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 균주 성장 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 사용한 시료의 최대 농도는 4000  $\mu\text{M}$ 로 하였으며, 최소 농도가 3.91  $\mu\text{M}$ 가 되도록 two-fold serial dilutions 방법으로 희석하여 실험하였다.

그 결과, *S. epidermidis*의 경우에는 compound 16, 18, 21 및 12에서 3709과 3711 균주, compound 20에서 3711 균주 및 compound 17에서 3710과 3711 균주를 제외하고 실험한 모든 균주의 MIC 값을 확인하였으며, 특히 compounds 19, 14, 13, 11들은 *S. epidermidis*에 대한 우수한 항균 활성을 확인할 수 있었다. 그 중 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 MBC 값을 확인하였다. 그 결과, compound 14와 compound 11에서 우수한 살균 활성을 확인하였다(Table 48).

*C. acnes*의 경우에는 편백 종자로부터 분리된 14개 diterpenoids 화합물에서 compound 16을 제외하고 실험한 모든 균주의 MIC 값을 확인하였으며, 그 중 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 MBC 값을 확인하였다. 그 결과, compounds 19, 14, 24, 11, 13에서 우수한 항균 활성을 확인하였다 (Table 48).

Table 48. MIC and MBC values of compounds **3**, **10**, **11-24** from *C. obusa* seeds. on *S. epidermidis* and *C. acnes*

	<i>S. epidermidis</i>						<i>C. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
compound <b>3</b>	1000	>4000	1000	>4000	1000	>4000	62.5	125	125	>4000	125	2000	125	4000
compound <b>10</b>	2000	4000	1000	>4000	2000	4000	250	500	250	2000	250	2000	250	500
compound <b>11</b>	250	1000	250	2000	250	4000	15.62	31.25	62.5	250	62.5	250	31.25	62.5
compound <b>12</b>	>4000	>4000	4000	>4000	>4000	>4000	250	500	250	>4000	250	>4000	250	>4000
compound <b>13</b>	125	>4000	125	>4000	250	>4000	15.62	31.25	62.5	125	62.5	500	62.5	500
compound <b>14</b>	62.5	1000	62.5	500	62.5	1000	15.62	31.25	15.62	125	31.25	125	15.62	125
compound <b>15</b>	1000	4000	1000	4000	1000	4000	125	250	250	1000	250	1000	250	1000
compound <b>16</b>	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
compound <b>17</b>	4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	250	>4000	500	>4000	1000	>4000	500	>4000
compound <b>18</b>	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	1000	2000	1000	4000	1000	4000	1000	4000
compound <b>19</b>	15.62	4000	15.62	>4000	31.25	>4000	7.81	7.81	7.81	31.25	7.81	31.25	15.62	15.62
compound <b>20</b>	4000	>4000	4000	>4000	>4000	>4000	125	250	1000	>4000	500	>4000	500	>4000
compound <b>21</b>	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	31.25	62.5	62.5	2000	125	>4000	125	>4000
compound <b>22</b>	1000	>4000	1000	>4000	1000	>4000	15.62	125	31.25	>4000	31.25	>4000	31.25	>4000
compound <b>23</b>	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000	31.25	62.5	31.25	>4000	500	>4000	250	>4000
compound <b>24</b>	500	>4000	1000	>4000	2000	>4000	31.25	62.5	31.25	125	31.25	125	31.25	250

Unit:: μM

### 3) 항염

#### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

마우스 대식세포(RAW 264.7)를 이용하여 편백 종자로부터 분리된 17개 compounds **2-3, 10-23, 25**의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성과 세포 독성을 측정하였다. 우선 분리된 각각의 화합물들은 20  $\mu$ M의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 모든 화합물에서 세포 독성 없이 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며(Figure 95), 이 중 compounds **11, 13-17, 20, 22**는 20  $\mu$ M 농도로 처리했을 때 30% 이상의 NO 억제율을 나타내기 때문에 우수한 항염 활성을 확인할 수 있었으며, compound **16** (hinokiol)은 문헌<sup>110</sup>에 의해 이미 항염 활성이 보고되어 있었다. 따라서 compounds **11, 13-15, 17, 20, 22**의 추가적인 실험을 진행하였다. 그 결과, compound **14, 11, 17, 22, 13, 20, 15**의 순서로 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보였고, IC<sub>50</sub> 값은 각각 2.4, 8.0, 23.2, 23.7, 47.7, 55.9, 62.6로 확인되었다(Figure 96, Table 49).

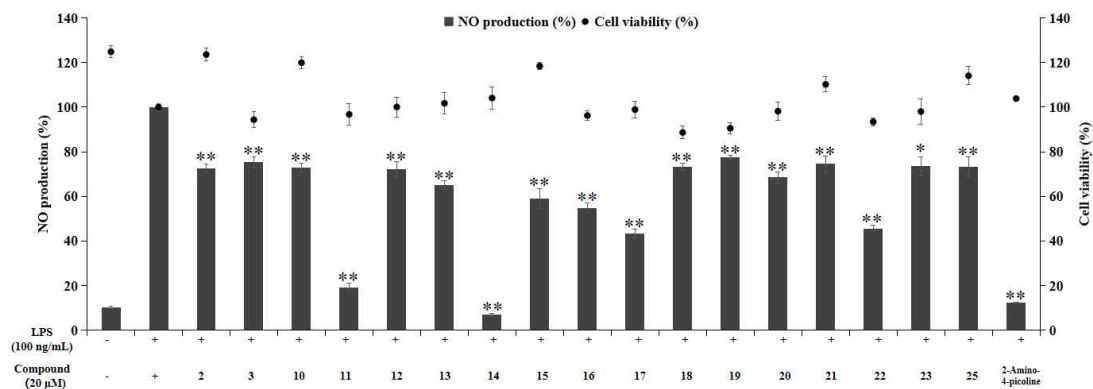


Figure 95. Effects of isolated compounds **2-3, 10-23, 25** from *C. obusa* seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

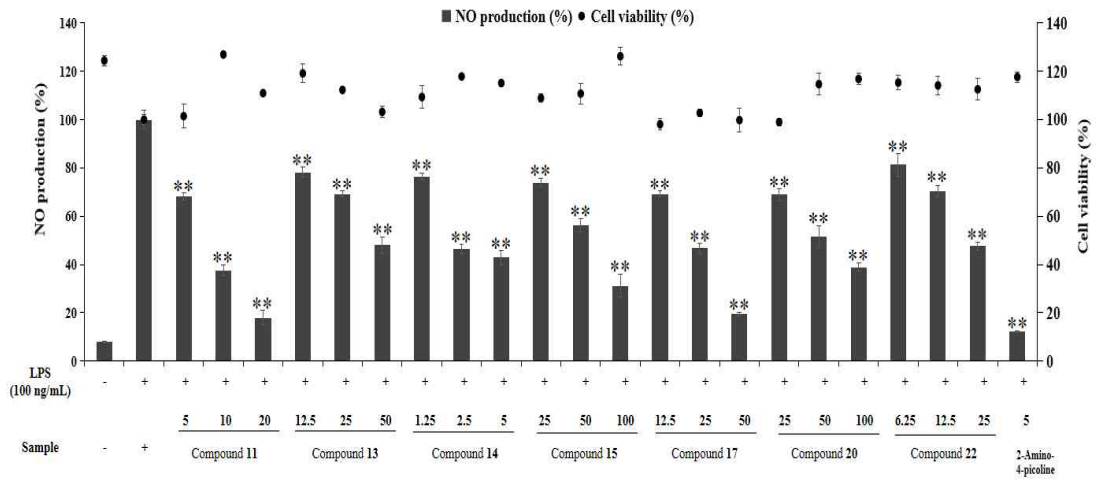


Figure 96. Effects of isolated compounds 11, 13–15, 17, 20, 22 from *C. obusa* seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

Table 49. IC<sub>50</sub> values of NO production inhibitory activity of isolated compounds 11, 13–15, 17, 20, 22 from *C. obusa* seeds.

	Compound 11	Compound 13	Compound 14	Compound 15	Compound 17	Compound 20	Compound 22
IC <sub>50</sub> (µM)	8.0	47.7	2.4	62.6	23.2	55.9	23.7

상술한 결과에서 compound 11과 14는 NO 생성 억제에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 10 µM 이하로 나타내기 때문에 추가적으로 compound 11, 14에 대한 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성을 측정하였다. 그 결과, Compound 14는 1.25–20 µM의 농도로 실험을 진행하였고, Compound 11는 2.5–20 µM의 농도로 실험을 진행한 결과, compound 11과 14는 20 µM 농도 이하에서 모두 세포 독성 없이 농도 의존적인 NO 생성 억제 활성을 확인하였다(Figure 97).



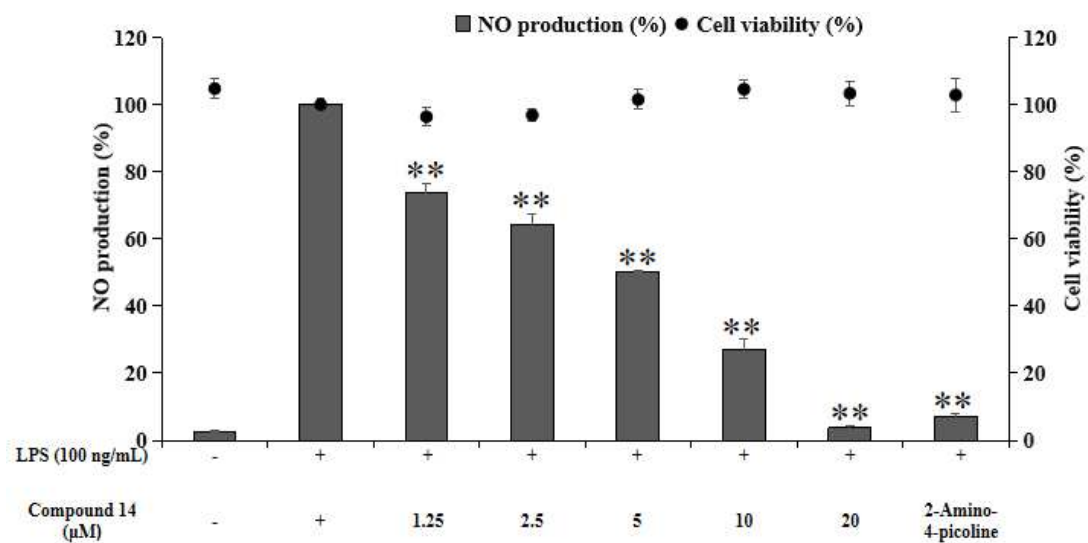
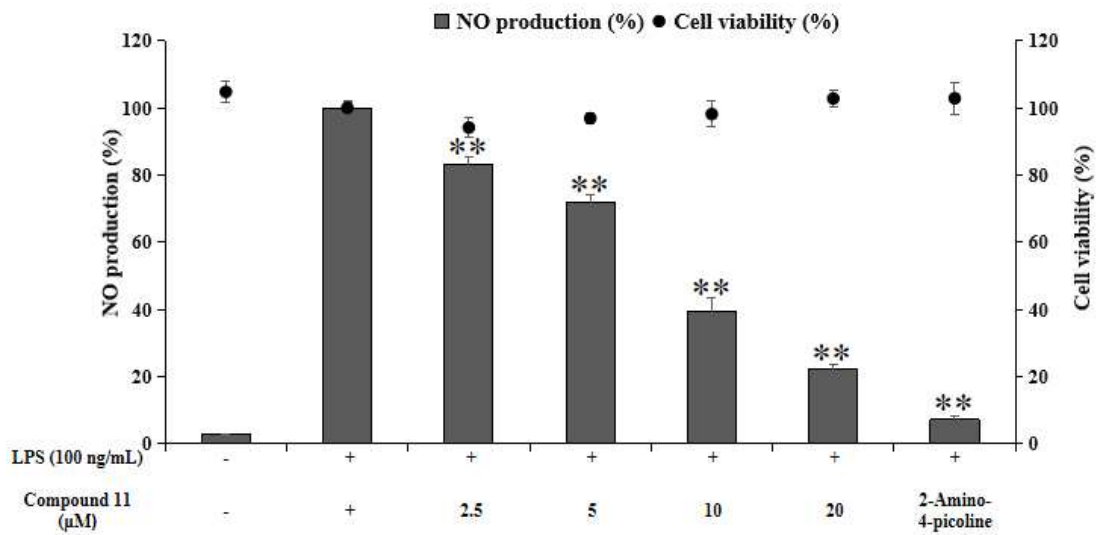


Figure 97. Effects of isolated compounds **11**, **14** from *C. obusa* seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound **11** or **14** from *C. obusa* and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 μM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*\*  $p < 0.01$

한편, 편백 종자로부터 분리된 6개 lignan형 compounds 28-33의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성과 세포 독성을 확인하기 위하여 마우스 대식세포 (RAW 264.7)를 이용하였다. 우선 분리된 각각의 화합물들은 20  $\mu$ M의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 모든 화합물에서 세포 독성 없이 NO 생성 억제를 나타내었다(Figure 98). 이 중 compounds 28, 29, 31-33들은 20  $\mu$ M 농도로 처리했을 때 40% 이상의 NO 억제율을 나타내어 우수한 항염 활성을 확인할 수 있었으며, compound 28<sup>111</sup>, 31<sup>112</sup>, 33<sup>113</sup>의 항염 활성은 문헌에 보고되어 있었다. 따라서 효능 보고가 이루어지지 않은 compounds 29, 32의 추가 실험을 진행하였다. 그 결과, compounds 29, 32는 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보였고, IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.04, 1.62  $\mu$ M로 확인되었다(Figure 99).

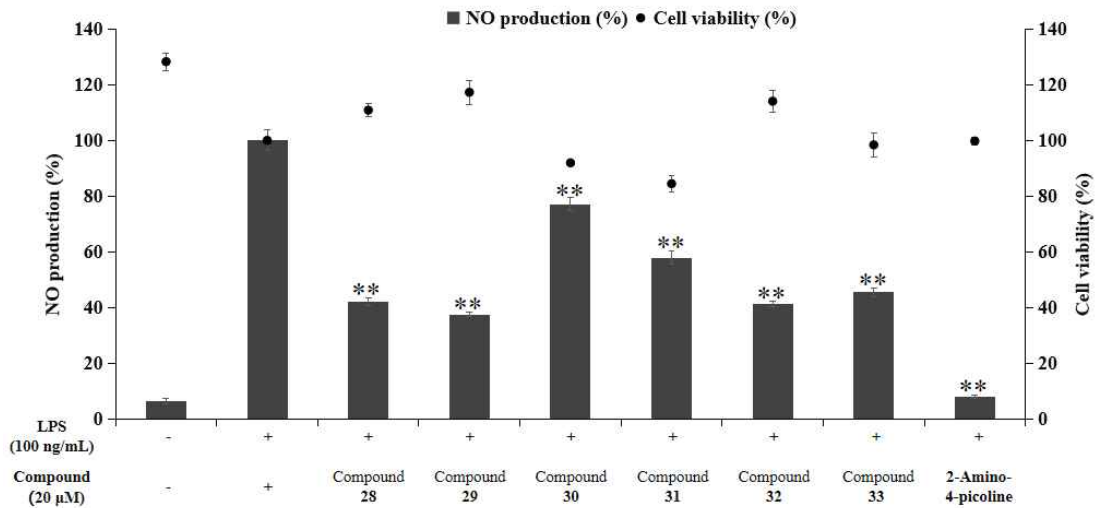


Figure 98. Effects of isolated compounds 28-33 from *C. obusa* seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* \*  $p < 0.01$

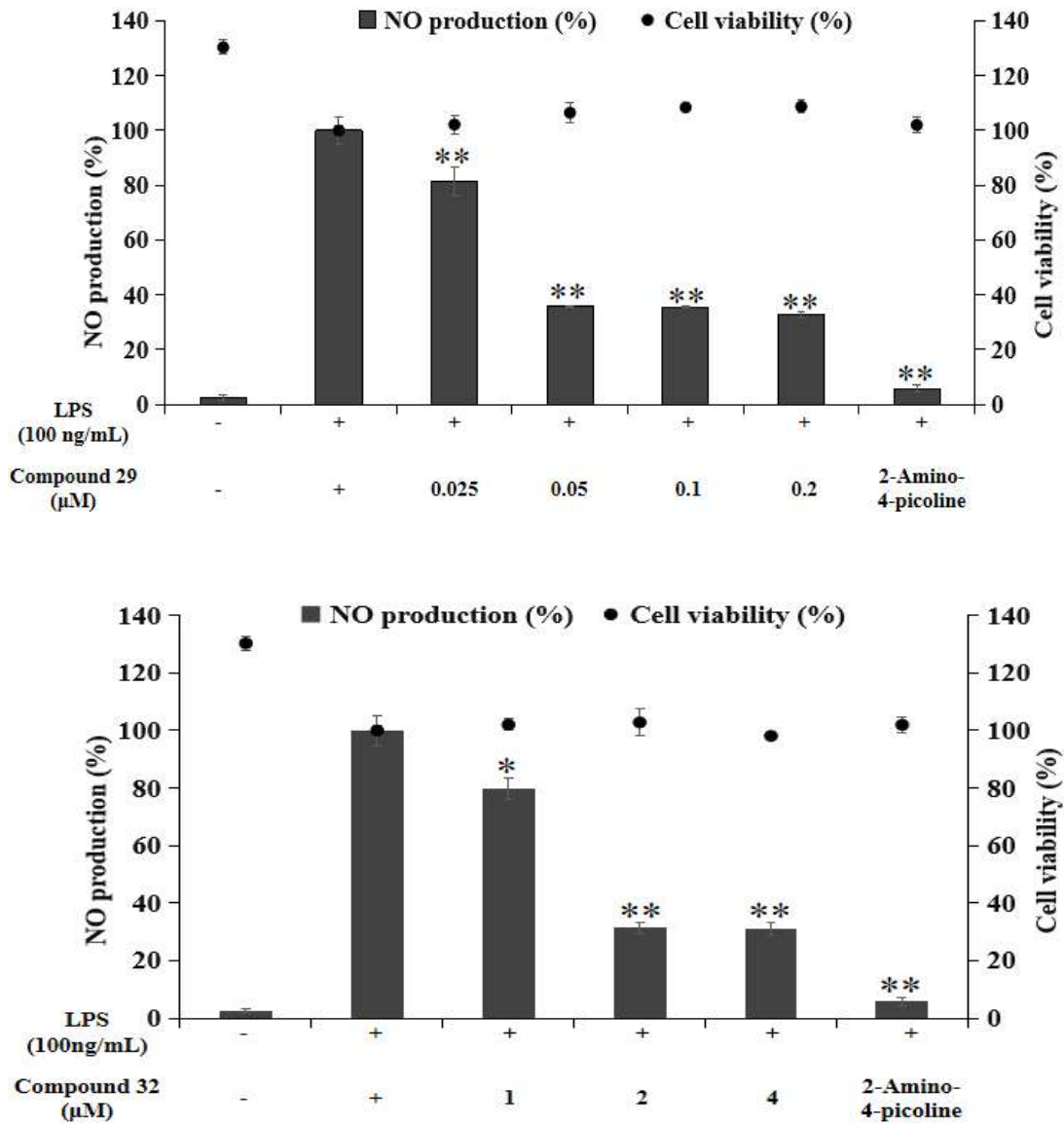


Figure 99. Effects of isolated compounds **29**, **32** from *C. obusa* seeds on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound **29** or **32** from *C. obusa* seeds and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 μM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

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

NO 생성 억제 활성이 우수한 abietane-diterpenoid compounds **11**, **14**에 대하여 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 전염증성 cytokine 및 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. 그 결과, compound **11**은 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 생성을 저해 시키는 것을 확인하였다(Figure 100).

또한, compound **14**는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 농도 의존적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 101).

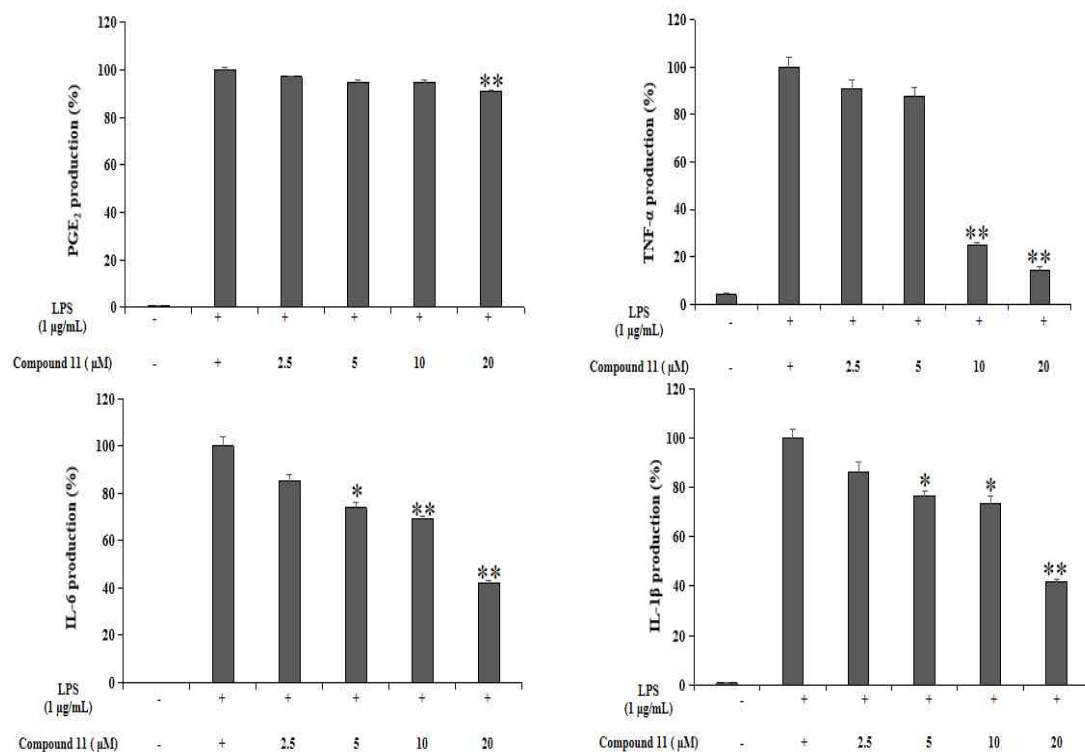


Figure 100. Effects of isolated compound **11** from *C. obusa* seeds on PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p$  < 0.05; \*\*  $p$  < 0.01

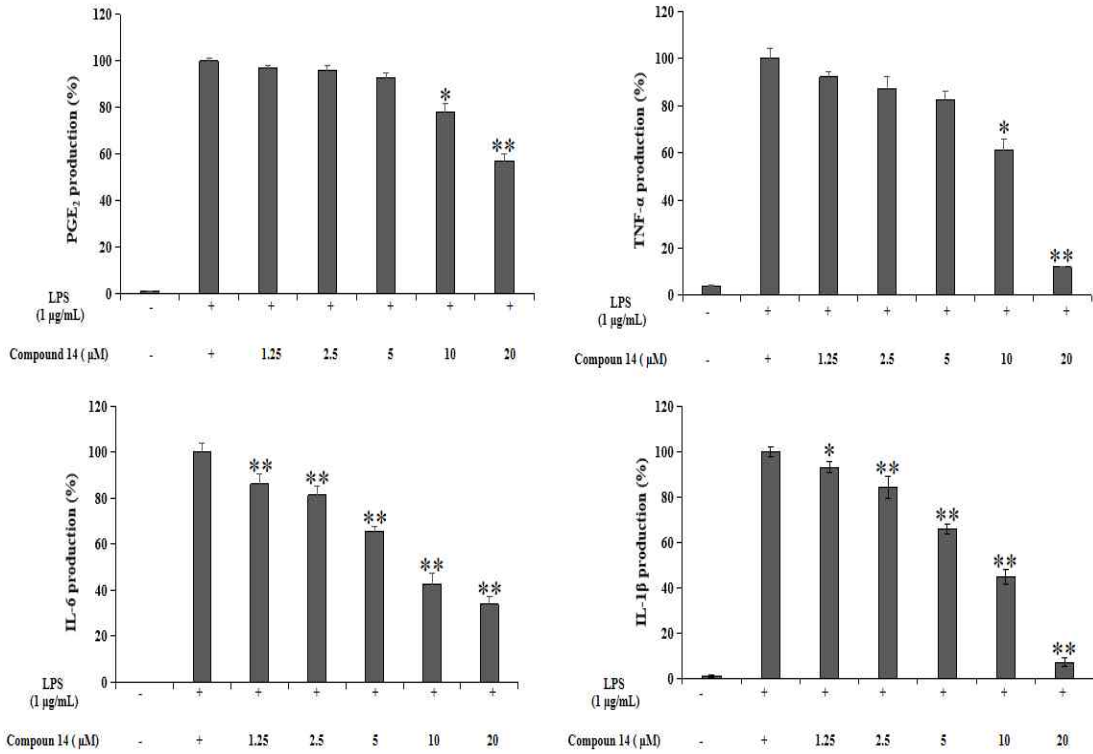


Figure 101. Effects of isolated compound **14** from *C. obusa* seeds on PGE<sub>2</sub> and TNF-α, IL-6, IL-1β production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

한편, NO 생성 억제 활성이 우수한 lignan형 compounds **29**, **32**에 대하여 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 전염증성 cytokine 및 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. 그 결과, compound **29**, **32**은 TNF-α, IL-6 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 모두 농도 의존적으로 저해 시키는 것을 확인하였다(Figure 102, 103).

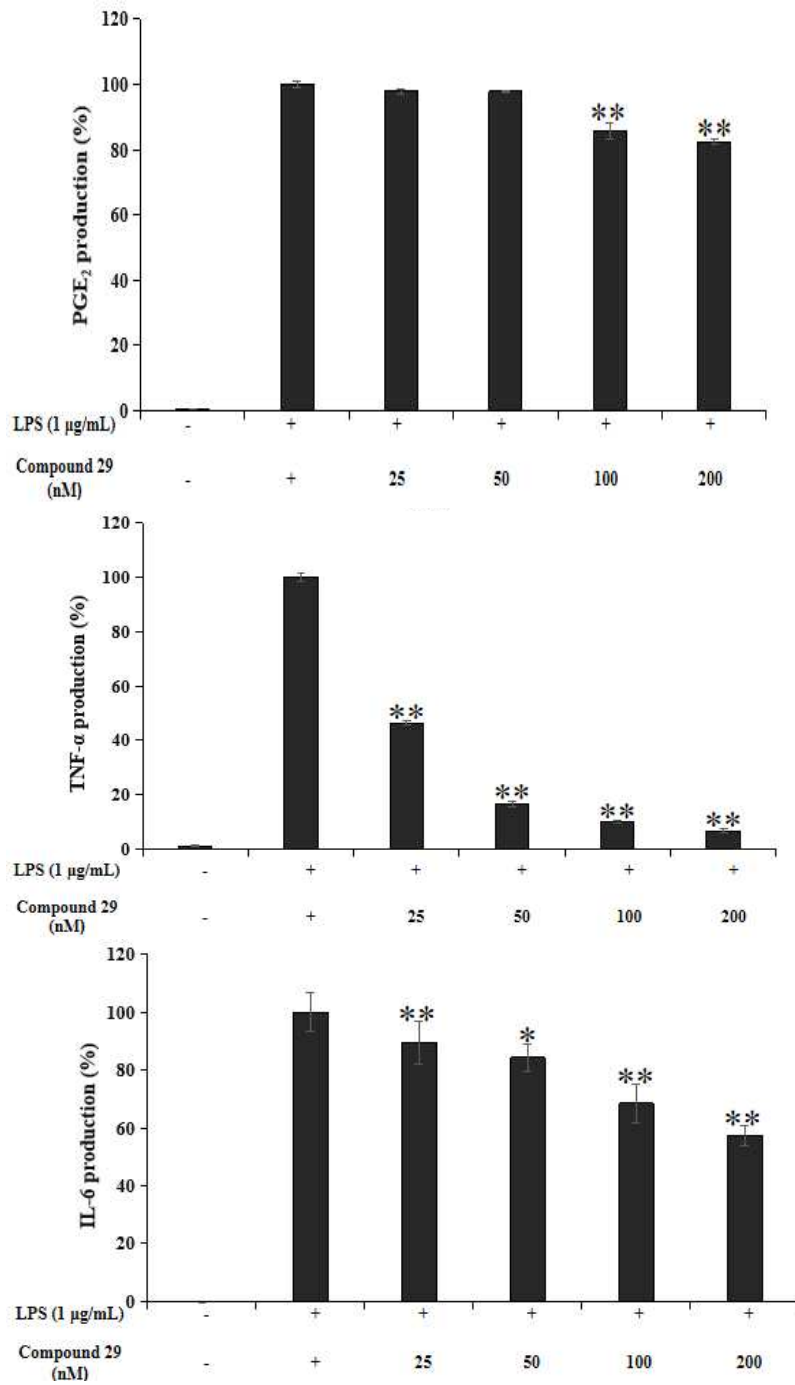


Figure 102. Effects of isolated compound 29 from *C. obusa* seeds on PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-6 production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

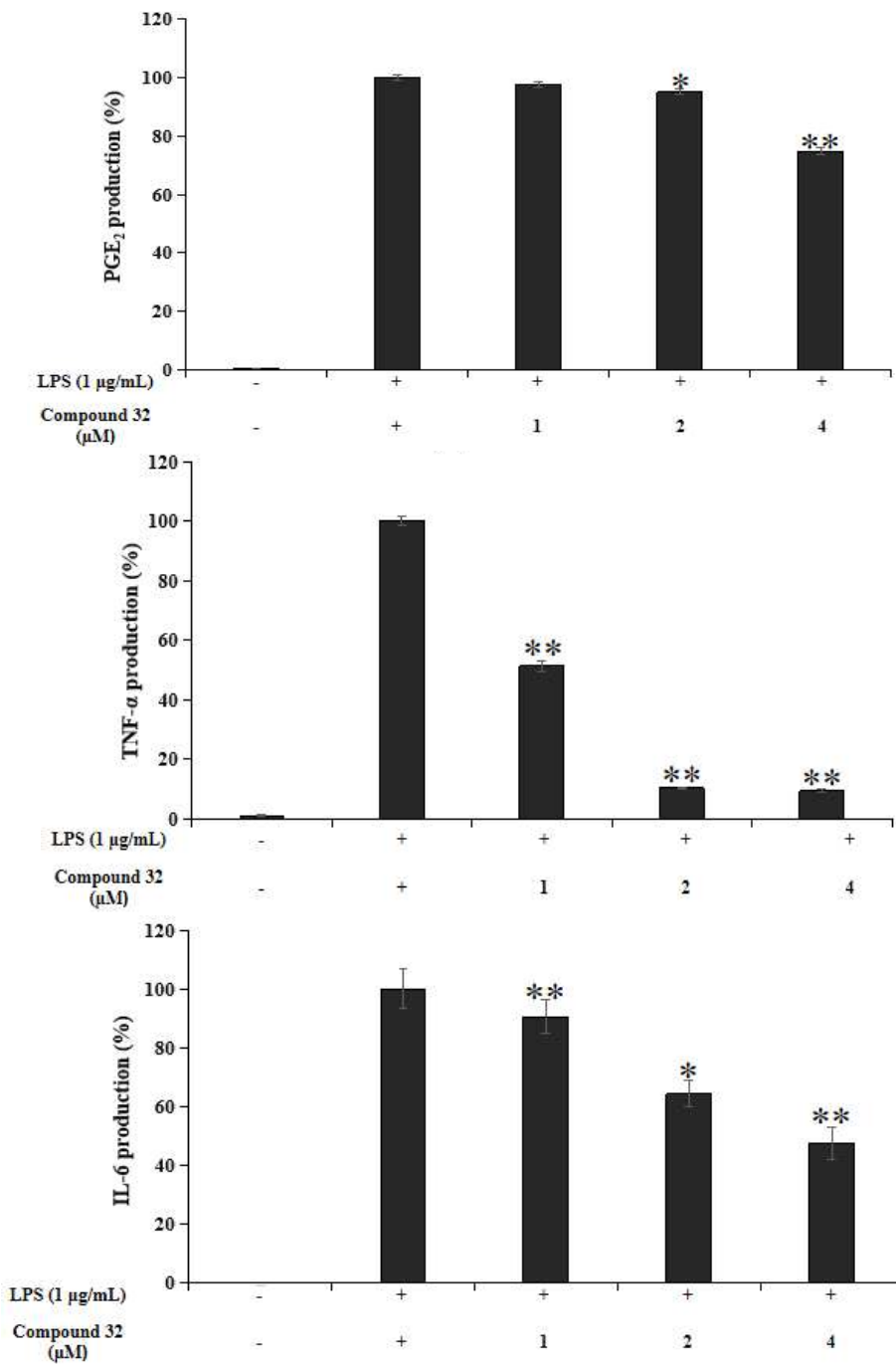


Figure 103. Effects of isolated compound **32** from *C. obusa* seeds on PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-6 production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

#### 4) 미백

##### (1) Tyrosinase 억제 활성 측정

편백 종자로부터 분리된 compounds 11-25의 미백 활성을 측정하였다. 시료는 50-400  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한  $\text{IC}_{50}$  값을 계산하였다.

실험 결과, compounds 24, 18, 19, 21에서  $\text{IC}_{50}$  값이 각각 160.86  $\mu\text{M}$ , 191.5  $\mu\text{M}$ , 376.8  $\mu\text{M}$ , 380.4  $\mu\text{M}$ 로 양성 대조군 arbutin보다 우수한 tyrosinase 억제 활성이 나타내었다(Figure 104, Table 50).

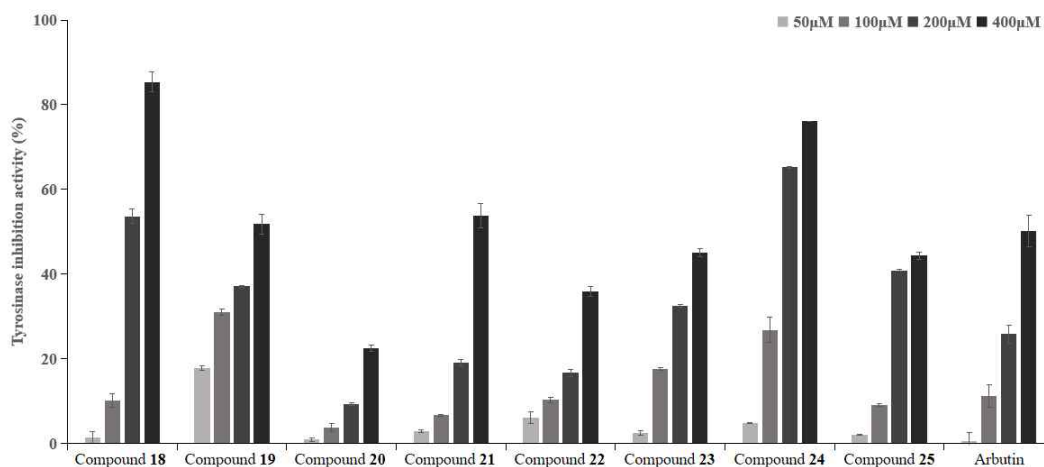


Figure 104. Tyrosinase inhibition activities of compounds 11-25 from *C. obusa* seeds. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 50.  $\text{IC}_{50}$  values of tyrosinase inhibition activities for compounds 11-25 from *C. obusa* seeds.

	Compound 11	Compound 12	Compound 13	Compound 14	Compound 15	Compound 16	Compound 17	Compound 18	Compound 19	Compound 20	Compound 21	Compound 22	Compound 23	Compound 24	Compound 25	Arbutin
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	191.5	376.8	>400	380.4	>400	>400	160.9	>400	395.8



## 6. 요약 및 결론

본 연구는 편백 종자 50% 에탄올 추출물 및 용매 분획물에 대하여 약품 및 기능성 화장품 분야에 관련된 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자, 다양한 생리 활성을 확인하고 함유된 식물화학 성분 분리 및 구조 동정을 하기 위해서 연구를 진행하여 하였다.

편백 종자 50% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 이 중 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 VLC를 이용하여 극성별로 세분화한 후 silica gel 또는 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리된 화합물은 1D, 2D NMR 및 HR-ESI-MS를 이용하여 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 41개의 화합물을 동정하였다.

분리된 화합물은 (*R*)-*p*-menth-1-en-4,7-diol (1), (1*R*,2*R*,4*R*)-*p*-menthane-1,2,4-triol (2),  $\alpha$ -eudesmol (3),  $\gamma$ -eudesmol (4),  $\beta$ -eudesmol (5), oplodiol (6), 4-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol (7), *ent*-4(15)-eudesmen-1 $\alpha$ ,11-diol (8), 3-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol (9), hinokiic acid (10), 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione (11), 12-methoxy-8,11,3-abietatriene-7 $\beta$ ,11-diol-3-one (12), hinokione (13), 1,2-dehydrohinokione (14), 1 $\alpha$ -3 $\beta$ -dihydroxytatarol (15), hinokiol (16), isohinokiol (17), sugiol (18), ferruginol (19), cryptojaponol (20), 7 $\alpha$ ,11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene (21), 7 $\beta$ -hydroxydeoxocryptojaponol (22), 6,7-dehydrodeoxocryptojaponol (23), *trans*-communic acid (24), chamaecydin (25),  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester (26),  $\alpha$ -linolenic acid (27), deoxypodophyllotoxin (28), yatein (29), hinokinin (30), savinin (31), haplomyrfofin (32), sesamin (33), aromadendrin (34), taxifolin (35), taxifolin-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (36), taxifolin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (37), apigenin (38), scutellarein (39), quercetin (40), quercitrin (41)로 확인되었으며, compound 11은 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

편백 종자의 항산화 실험 결과, *n*-BuOH, EtOAc 분획물의 총 폴리페놀 함량이 각각 121.9, 87.0 mg/g GAE로 나타났으며, DPPH radical 소거 활성 실험에서

*n*-BuOH 분획물은 SC<sub>50</sub> 값이 42.0 µg/mL로 양성대조군 BHT (97.1 µg/mL)에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다. 한편, 편백 종자로부터 분리된 리그난 구조인 compound **32**는 DPPH radical에 대한 SC<sub>50</sub> 값이 149.0 µM로 확인하였고, ABTS<sup>+</sup> radical SC<sub>50</sub> 값이 56.4로 양성대조군 BHT (62.0 µM)에 비해 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다. 또한, 편백 종자로 분리된 8 개 플라보노이드 화합물인 compounds **34-41**은 문헌<sup>114,115,116,117,118</sup>을 통해 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

항균 활성을 평가하기 위하여 여드름 질환에 관련된 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 그리고 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 4015)를 사용하여 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, 편백 종자의 추출물 및 용매 분획물은 *S. epidermidis*에 경우 우수한 항균 활성을 나타냈으며, *n*-Hex, 추출물, EtOAc, *n*-BuOH 차례로 MIC 값이 각각 156.2-312.5, 156.2-625, 1250-2500, 1250-2500 µg/mL로 확인하였고, MIC 효과가 있는 MBC 값이 모두 5000-10000 µg/mL로 확인하였. 또한, *C. acnes*에 경우는 추출물, *n*-Hex, EtOAc 분획물 차례로 뛰어난 항균 활성을 나타냈으며, MIC 값이 각각 15.6-62.5, 15.6-62.5, 31.25-62.5 µg/mL로 확인하였고 MBC 값이 각각 62.5-125, 125-2000, 125-2000 µg/mL로 확인하였다. 한편, *S. mutans*에 대한 추출물, *n*-Hex, EtOAc 분획물 차례로 항균 활성을 나타내었으며, MIC 값이 각각 39.1, 39.1, 156.2 µg/mL로 확인하였으며, MBC 값이 각각 78.1, 78.1, 625 µg/mL로 확인하였다. 편백 종자로부터 분리된 14 개 diterpenes인 compounds **11-24**와 2 개 sesquiterpenes인 compounds **3, 10**에 대한 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 여드름균인 *C. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 균주를 항균 실험을 진행하였다. 그 결과, *S. epidermidis*에 경우에는 ferruginol (**19**), 1,2-dehydrohinokione (**14**), hinokione (**13**), 1a-hydroxy-hinokione (**11**)이 차례로 우수한 항균 활성을 나

타냈고, MIC 값이 각각 15.6-31.2, 62.5, 125-250, 250  $\mu$ M로 확인하였다. 한편, *C. acnes*에 경우는 ferruginol (19), 1, 2-dehydrohinokione (14), 7 $\beta$ -hydroxydeoxocryptojaponol (22), *trans*-communic acid (24), 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione (11), hinokione (13), 7 $\alpha$ ,11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene (21),  $\alpha$ -eudesmol (3), 1 $\alpha$ -3 $\beta$ -dihydroxytatarol (15), hinokiic acid (10), 12-methoxy-8,11,3-abietatriene-7 $\beta$ ,11-diol-3-one (12) 들은 차례로 우수한 항균 활성을 나타냈고, MIC 값이 각각 7.8-15.6, 15.6-31.2, 15.6-31.2, 31.2, 15.6-62.5, 15.6-62.5, 31.2-125, 62.5-125, 125-250, 250, 250  $\mu$ M로 확인하였으며, 그 중 compound 19, 14, 24, 11, 13 에 우수한 살균 효과를 나타냈고, MBC 값이 각각 7.8-31.2, 31.2-125, 62.5-250, 31.2-250, 31.2-500  $\mu$ M로 확인하였다. 따라서 편백 종자에서 함유한 abietane-diterpenoids 및 sesquiterpenes 성분이 주요 항균 활성 물질로써 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 항균 효과를 나타낸 것으로 확인되었다. 또는, 이번 실험을 통해서 13 개 abietane-diterpenoids가 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 항균 활성과 구조의 structure activity relationship (SAR)에 관련된 것 이며, 구체적으로 7번의 위치에 관능기가 있으면 활성이 떨어지나 없어도 3번의 위치에 관능기가 있으면 활성을 유지하고 또한, carbonyl기로 연결된 것이 히드록실기로 연결된 것보다 강한 항균 활성을 보인 것으로 확인하였다.

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 편백 종자의 항염 활성 실험을 진행한 결과, 추출물, *n*-Hex, EtOAc 분획물이 5  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서 세포독성 없이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 0.3, 0.2, 0.2  $\mu$ g/mL로 확인하였다. 또한 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 전염증성 사이토카인 및 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 실험한 결과, 분리된 sample은 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 에 대하여 모두 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다. 편백나무 종자로부터 분리된 17 개 terpenoids인 compounds 3, 10-25 가 20  $\mu$ M 농도로 처리했을 때, compounds 14, 11, 22, 13, 20, 17, 15가 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 2.4, 8.0, 23.7, 47.7, 55.9, 23.2, 62.6  $\mu$ M로 확인하였다. 그 중, NO 생성 억제 효과가 우수한 1,2-dehydrohinokione (14), 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione (11)에 대하여 전염증성

사이토카인 및 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 실험을 진행하였다. 그 결과, compound **14**이 전 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  및 PGE<sub>2</sub>에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였으며, compound **11**이 전 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다. 한편, 편백 종자로부터 분리된 6 개 lignans인 compounds **28-33**가 20  $\mu$ M 농도로 처리했을 때 compounds **29, 32**가 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 0.04, 1.6  $\mu$ M로 확인하였고, 다음에 전 염증성 사이토카인 및 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 실험을 진행하였다. 그 결과, yatein (**29**), haplomyrfofin (**32**)이 전 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>에 대한 다 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다.

편백 종자의 미백 활성 측정을 위하여 mushroom tyrosinase을 이용하여 억제 활성을 측정하였다. 실험 결과, *n*-Hex, EtOAc 분획물이 200  $\mu$ g/mL 농도 이하에서 tyrosinase에 대하여 농도 의존적으로 억제시켰으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 139.0, 183.0  $\mu$ g/mL로 확인하였고 특히 *n*-Hex 분획물이 양성 대조군 arbutin (IC<sub>50</sub> 131.4  $\mu$ g/mL)과 유사한 억제 활성을 나타낸 것으로 확인하였다. 한편, 편백 종자로부터 분리된 15 개 terpenoids인 compound **11-25**가 400  $\mu$ M 이하의 농도에서 mushroom tyrosinase 억제 활성을 나타낸 결과, *trans*-communic acid (**24**), sugiol (**18**), ferruginol (**19**), 7 $\alpha$ ,11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene (**21**)이 농도 의존적으로 mushroom tyrosinase 억제 활성을 보이고 IC<sub>50</sub> 값이 각각 160.9, 191.5, 376.8, 380.4  $\mu$ M로 확인하였으며, 양성 대조군 arbutin (IC<sub>50</sub> 395.8  $\mu$ M)보다 우수한 tyrosinase 억제 활성이 있음을 확인하였다.

이상의 연구를 바탕으로 편백 종자 추출물을 이용하여 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성을 갖는 의약품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 사료된다.

## V. 연구 3 : 팔배나무 잎 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성 성분 연구

### 1. 재료

팔배나무 (*Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch)는 쌍떡잎식물 장미과 (Rosaceae)의 낙엽활엽 교목으로서 깊은 산에서 높은 산까지 100~1,300 m 고지의 메마른 능선이나 평원지대의 음지 쪽, 너덜바위 지역, 계곡가에 주로 서식한다. 길이 5~10 cm 정도의 잎이 가지에 어긋나게 달린다. 끝이 점점 뾰족해지는 달걀 모양이며 가장자리에 불규칙하고 날카로운 겹톱니가 있다. 좌우의 잎맥은 8~10쌍이며, 주로 한국·중국·일본에 분포한다<sup>119</sup>.

연구에 따라, *Sorbus* L. 식물은 민족의학에서는 호흡과 위장계 질환뿐만 아니라 류머티즘, 암, 당뇨병 등에도 사용한 것으로 보고되었다<sup>120</sup>. 1960년대부터 *Sorbus* L.의 화학성분을 연구하여 현재까지 38개 중에서 250여 종의 화합물이 검출되었으며 가장 철저하게 연구된 물질은 페놀성 화합물, 예로 플라보노이드와 페놀산등이 있으며, 다른 성분으로는 테페노이드, 스테로이드, 쿠마린 등 선분이 있다<sup>121</sup>. 그러나 지금까지 팔배나무를 대상으로 한 추출물의 효능 및 화학성분의 분리에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 팔배나무 잎으로부터 활성 성분 분리 및 구조를 동정하고 분리된 화합물의 항산화, 항균, 항염, 미백 활성 연구를 진행하였다. 실험에 사용한 팔배나무 잎 (시료번호 : 501)은 서귀포시 광평리 2022년 5월에 채집하고 제주생물자원(株)로부터 구입하였다. 건조된 팔배나무 잎은 분쇄하여 사용하였다(Figure 105).



Figure 105. Picture of *Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch leaves.

## 2. 팔배나무 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

### 1) 시료의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄한 팔배나무 잎 290 g을 70% (v/v) EtOH 5.8 L에 넣은 뒤 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 여과 장치와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과한 다음 남은 잔여물을 같은 방법으로 추출 및 여과를 1회 더 반복하였다. 얻은 여액은 37 °C의 수욕 상태에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 68.4 g을 얻었다. 얻은 70% EtOH 추출물 53.4 g을 증류수에 현탁시킨 뒤 분액 깔때기를 이용하여 용매의 극성이 낮은 순서부터 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (3.9 g), ethyl acetate (9.0 g), *n*-butanol (11.4 g) 및 water (28.0 g) 분획물을 얻었다(Figure 106).

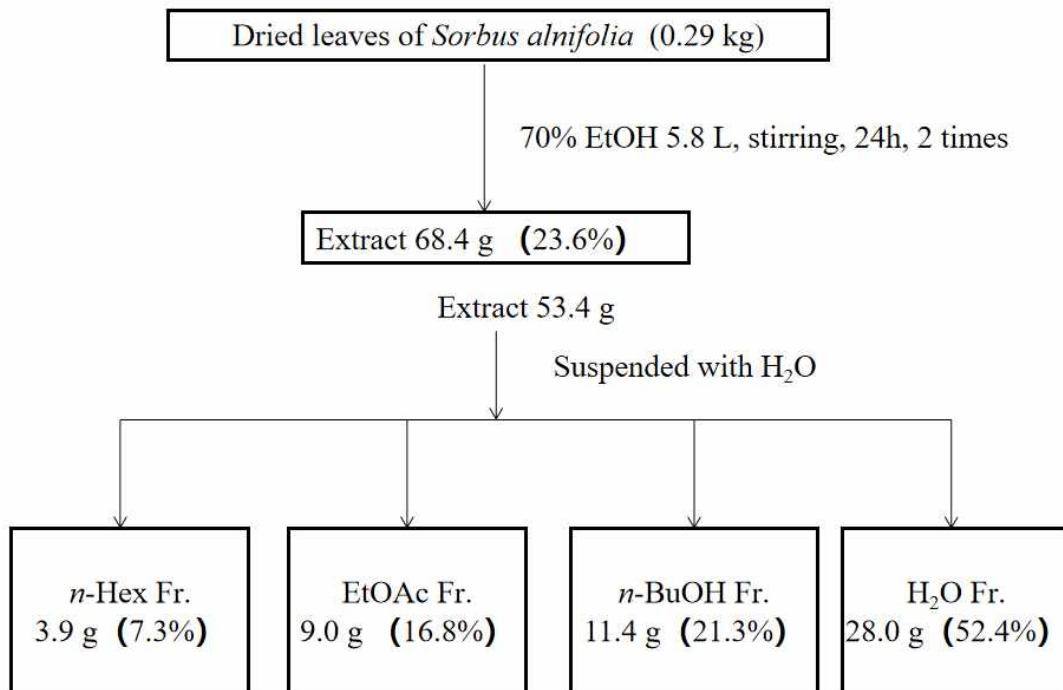


Figure 106. Extraction and solvent fractionation of *S. alnifolia* leaves.

## 2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성 별로 나누기 위하여 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (0-50%)가 될 때 까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 각각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-32).

VLC fraction들 중 Fr. V11 (350.3 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40:1)의 용매조건으로 Silica gel column chromatography를 수행하여 compound **1** (70.8 mg)과 compound **3** (80.3 mg)을 얻었다.

Fr. V10 (71.5 mg)은 compound **1**과 compound **2**가 혼합된 형태로 분리되었다.

Fr. V14~16 (214.6 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (25:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound **8** (50.4 mg)와 compound **4** (71.5 mg)를 얻었다.

Fr. V7 (22.1 mg)과 Fr. V17 (37.2 mg)은 TLC를 통해서 단일 점을 나타내기 때문에 각각 compound **5**와 compound **7** 분리하였다.

Fr. V8~9 (55.0 mg)를 *n*-Hexene:EtOAc (6:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound **6** (34.8 mg)을 얻었다.

Fr. V25 (301.3 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (4:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **9** (19.3 mg)를 얻었으며, Fr. V29 (373.3 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (3:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 통하여 compound **11** (16.8 mg)을 얻었다.

Fr. V27 (580.4 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7:2)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound **10** (81.1 mg)을 얻은 다음에, 나머지 부분 중 Fr. V27-2 (164.5 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (13:4)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound **12** (16.4 mg)를 얻었다.

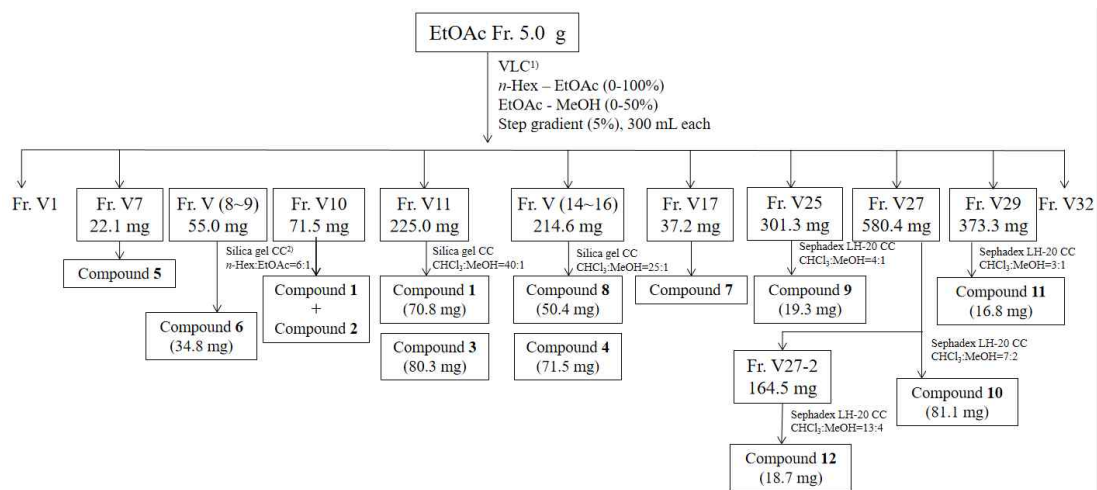


Figure 107. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of *S. alnifolia* leaves.



### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2, 3, 4의 구조 동정

Compound 1은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 30개의 카본 피크를 관찰되며,  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  1.27 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.25 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.08 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.03 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.97 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.91 (3H, s)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (1H, t,  $J = 3.2$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.48 (1H, dd,  $J = 7.3, 8.2$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  180.4의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였으며, 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  139.8, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  126.1) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  78.6 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>51</sup>과 비교하여 compound 1은 ursolic acid (3 $\beta$ -hydroxyurs-12-en-28-oic acid)로 동정하였다.

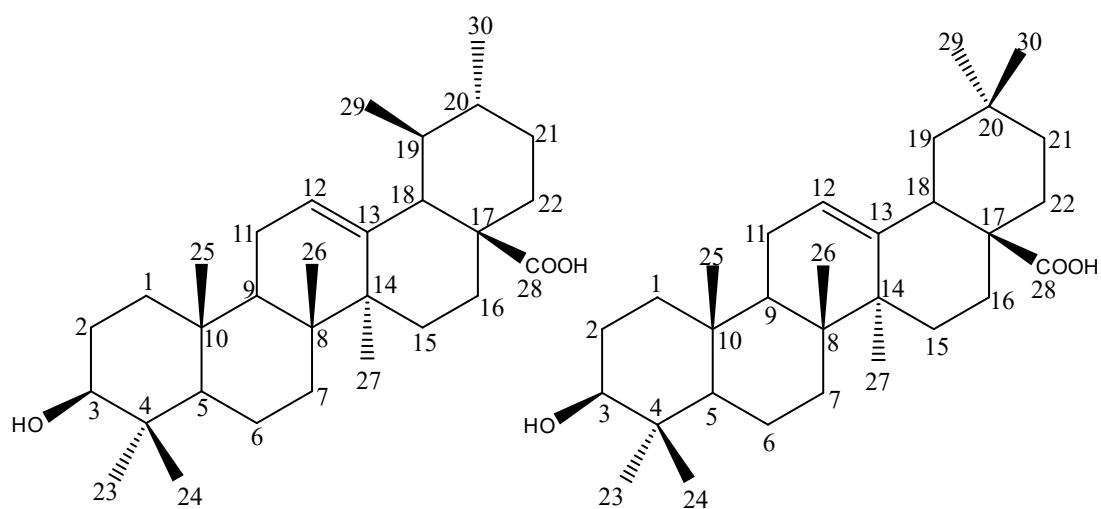
Compound 2는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 30개의 카본 피크를 관찰되며,  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  1.31 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.25 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.03 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.02 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.97 (3H, s)의 signal들을 통하여 총 7개의 methyl proton을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.51 (1H, t,  $J = 3.2$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.47 (1H, dd,  $J = 10.1, 5.5$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  180.6의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였으며, 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  145.1, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  123.0) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  78.5 피크들을 확인하였

다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>52</sup>과 비교하여 compound 2는 oleanolic acid로 동정하였다.

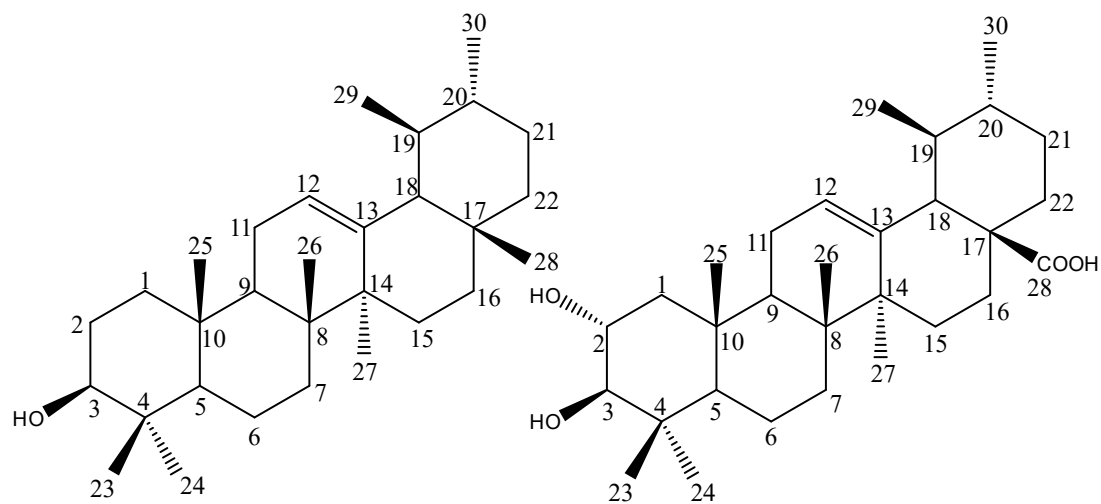
Compound 3은 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta_H$  5.24 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_H$  3.20 (1H, dd,  $J = 10.8, 5.0$  Hz)의 signal은 <sup>13</sup>C-NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였으며,  $\delta_H$  1.23 (3H, s),  $\delta_H$  1.06 (3H, s),  $\delta_H$  0.98 (3H, s),  $\delta_H$  0.91 (3H, s),  $\delta_H$  0.83 (3H, s),  $\delta_H$  0.76 (3H, s),  $\delta_H$  0.92 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_H$  0.85 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 8개의 methyl proton을 바탕으로 ursane-triterpene으로 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_C$  138.1, 3차 carbon  $\delta_C$  126.1 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_C$  79.3 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>60</sup>과 비교하여 compound 3은  $\alpha$ -amyrin으로 동정하였다.

Compound 4는 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta_H$  5.48 (1H, t,  $J = 3.3$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_H$  4.12 (1H, td,  $J = 10.3, 4.1$  Hz) 및  $\delta_H$  3.42 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz)의 signal은 <sup>13</sup>C-NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다. 또한  $\delta_H$  1.30 (3H, s),  $\delta_H$  1.23 (3H, s),  $\delta_H$  1.10 (3H, s),  $\delta_H$  1.07 (3H, s),  $\delta_H$  0.99 (3H, s),  $\delta_H$  1.00 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_H$  0.95 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton으로 예상하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서  $\delta_C$  180.7의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였으며, 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_C$  139.8, 3차 carbon  $\delta_C$  126.0) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_C$  84.3, 69.0 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>67</sup>과 비교하여 compound 4는 corosolic acid로 동정하였다.



Compound 1

Compound 2



Compound 3

Compound 4

Figure 108. Chemical structure of compounds 1, 2, 3 and 4

Table 51.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **1**, **2**, **3**, **4** (400 and 100 MHz, in pyridine- $d_5$  or  $\text{CDCl}_3$ )

NO.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>		Compound <b>3</b>		Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		39.6		39.4		39.0		48.4
2		28.6		28.6		27.4	4.12 (1H, td, 10.3, 4.1)	69.0
3	3.48 (1H, dd, 7.3, 8.2)	78.6	3.47 (1H, dd, 10.1, 5.5)	78.5	3.20 (1H, dd, 10.8, 5.0)	79.3	3.42 (1H, d, 10.3)	84.3
4		40.0		39.8		38.8		40.3
5		56.3		56.3		52.9		56.4
6		19.3		19.2		18.5		19.3
7		34.0		33.7		33.0		33.7
8		40.4		40.0		39.7		40.5
9		48.5		48.6		48.1		48.2
10		38.0		37.8		37.2		37.9
11		24.1		24.1		23.8		24.3
12	5.52 (1H, t, 3.2)	126.1	5.51 (1H, t, 3.2)	123.0	5.24 (1H, t, 3.4)	126.1	5.48 (1H, t, 3.3)	126.0
13		139.8		145.3		138.1		139.8
14		43.0		42.6		42.2		42.7
15		29.2		28.8		28.2		28.8
16		25.4		24.1		27.2		26.6
17		48.5		47.1		33.2		48.5
18	2.67 (1H, d, 11.4)	54.0	3.34 (1H, dd, 14.0 4.1)	42.5		55.4	2.65 (1H, d, 11.0)	54.0
19		39.9		46.9		39.2		39.9
20		39.9		31.4		39.0		42.6
21		31.6		34.7		30.8		27.6
22		37.8		33.7		39.5		39.0
23	1.25 (3H, s)	29.3	1.25 (3H, s)	29.2	0.83 (3H, s)	28.3	1.23 (3H, s)	29.9
24	1.05 (3H, s)	17.1	1.03 (3H, s)	17.0	0.76 (3H, s)	15.8	1.07 (3H, s)	21.9
25	0.91 (3H, s)	16.2	0.97 (3H, s)	16.0	0.91 (3H, s)	15.7	0.99 (3H, s)	17.4
26	1.08 (3H, s)	17.9	1.05 (3H, s)	17.9	1.06 (3H, s)	17.3	1.10 (3H, s)	17.9
27	1.27 (3H, s)	24.4	1.31 (3H, s)	26.6	1.23 (3H, s)	23.5	1.30 (3H, s)	25.4
28		180.5		180.6	0.98 (3H, s)	29.2		180.7
29	1.03 (3H, d, 6.4)	18.0	0.98 (3H, s)	34.0	0.85 (3H, d, 6.0)	17.2	1.00 (3H, d, 6.4)	27.6
30	0.97 (3H, d, 6.4)	21.9	1.02 (3H, s)	24.2	0.92 (3H, d, 6.0)	21.4	0.95 (3H, d, 6.4)	17.2

## 2) Compound 5의 구조 동정

Compound 5는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  1.65 (3H, br s),  $\delta_{\text{H}}$  0.84 (6H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.83 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.82 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 5개의 methyl proton을 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.39 (1H, dt,  $J = 6.9, 1.4$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.13 (2H, d,  $J = 6.9$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C-NMR}$  데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.50 (1H, sept,  $J = 6.4$  Hz)의 signal은 isopropyl proton으로 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 20개의 카본 피크를 관찰되어 보며, 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  140.6, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  123.2 및 산소가 인접한 위치의 methylene carbon인  $\delta_{\text{C}}$  59.6 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>122</sup>과 비교하여 compound 5는 (*E*)-phytol로 동정하였다.

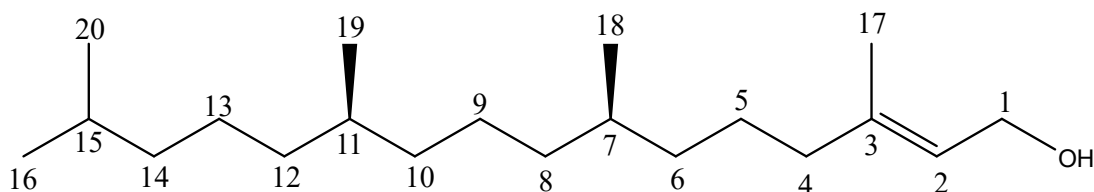


Figure 109. Chemical structure of compound 5

Table 52.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **5** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

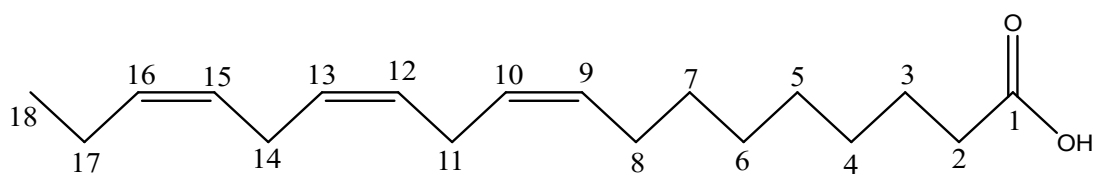
No.	Compound <b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	4.13 (2H, d, 6.9)	59.6
2	5.39 (1H, dt, 6.9, 1.4)	123.2
3		140.6
4	1.97 (2H, t, 7.8)	39.6
5		25.3
6		36.9
7		32.9
8		37.6
9		24.7
10		37.6
11		33.0
12		37.5
13		25.0
14		40.1
15	1.50 (1H, sept, 6.4)	28.2
16	0.84 (3H, d, 6.4)	22.8
17	1.65 (3H, br s)	22.9
18	0.83 (3H, d, 6.4)	19.9
19	0.82 (3H, d, 6.4)	20.0
20	0.84 (3H, d, 6.4)	16.4

### 3) Compound 6, 7, 8의 구조 동정

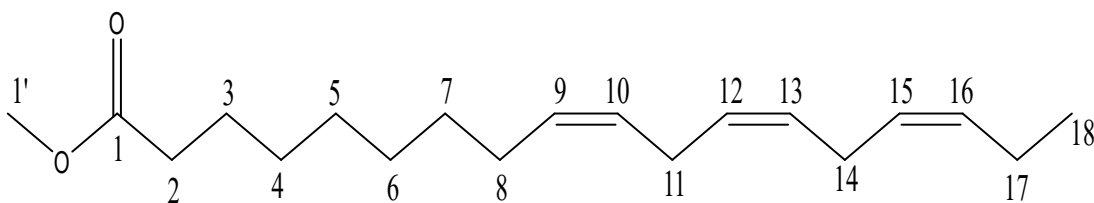
Compound 6의  $^1\text{H-NMR}$  data를 보면  $\delta_{\text{H}}$  0.95 (3H, t,  $J = 8.9$  Hz)와  $\delta_{\text{H}}$  2.33 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz)들의 signal을 통하여 fatty acid의  $sp^3$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.28~5.38의 signal은 이중결합이 있는 fatty acid의  $sp^2$  혼성 탄소의 proton을 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  180.6 피크를 통해 한 개의 carbonyl group을 가지고 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  132.4, 130.5, 128.5, 128.4, 128.0, 127.3 피크들을 통해 세 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>70</sup>과 비교하여 compound 6은  $\alpha$ -linolenic acid로 동정하였다.

Compound 7의 NMR data를 보면 compound 6과 유사한 구조로 예상하였으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  3.64 (3H, s) 의 signal은 deshielding된 것과 적분 값을 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 19개의 carbon peak가 관찰된 것으로  $^1\text{H-NMR}$  data를 고려했을 때, fatty acid 유도체 구조를 예상하였으며,  $sp^2$  혼성 탄소가 모두 7개 있어서, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  174.6 과  $\delta_{\text{C}}$  51.7의 signal들은 ester group으로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>99</sup>과 비교하여 compound 7은  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester임을 확인하였다.

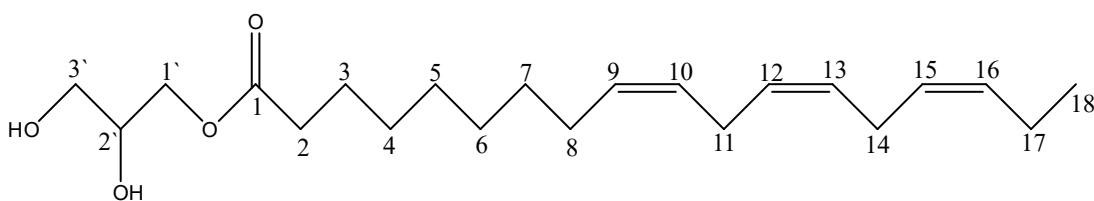
Compound 8은  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  174.5 피크를 통해 ester group 관능기를 예상하였고  $\delta_{\text{C}}$  132.2, 130.4, 128.5, 128.4, 128.0, 127.3 피크를 보면  $^1\text{H-NMR}$  데이터를 고려했을 때, 세 개 탄소-탄소 이중결합이 있음을 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  70.4, 65.8, 63.0 세 개 피크와  $\delta_{\text{H}}$  4.37 (1H, dd,  $J = 12.1, 3.2$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.19 (1H, dd,  $J = 12.1, 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.99 (1H, m),  $\delta_{\text{H}}$  3.89 (1H, dd,  $J = 11.0, 5.5$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3.70 (1H, dd,  $J = 11.0, 6.4$  Hz)의 signal들을 통해 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 glycerol group이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>64</sup>과 비교하여 compound 8은 1-linolenoyl glycerol로 동정하였다.



Compound 6



Compound 7



Compound 8

Figure 110. Chemical structure of compounds 6, 7 and 8



Table 53.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **6**, **7** and **8** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>6</b>		Compound <b>7</b>		Compound <b>8</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		180.4		174.6		173.7
2	2.33 (2H, t, 7.6)	34.3	2.28 (2H, t, 7.6)	34.3	2.30 (2H, t, 7.3)	34.5
3	1.60 (2H, q, 7.6)	27.4	1.60 (2H, m)	25.2	1.58 (2H, m)	25.1
4	1.30 (2H, m)	29.3	1.28 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, m)	29.3
5	1.30 (2H, m)	29.2	1.28 (2H, m)	29.3	1.23 (2H, m)	29.4
6	1.30 (2H, m)	29.8	1.28 (2H, m)	29.4	1.23 (2H, m)	29.8
7	1.30 (2H, m)	29.4	1.28 (2H, m)	29.5	1.23 (2H, m)	29.9
8	1.98~2.08 (2H, m)	25.7	2.02 (2H, m)	29.3	2.02 (2H, m)	27.4
9	5.28~5.38 (1H, m)	132.2	5.27~5.38 (1H, m)	130.4	5.27~5.38 (1H, m)	132.2
10	5.28~5.38 (1H, m)	127.3	5.27~5.38 (1H, m)	128.1	5.27~5.38 (1H, m)	127.3
11	2.78 (2H, m)	24.9	2.78 (2H, t, 6.0)	27.4	2.78 (2H, m)	25.7
12	5.28~5.38 (1H, m)	128.5	5.27~5.38 (1H, m)	130.2	5.27~5.38 (1H, m)	128.5
13	5.28~5.38 (1H, m)	128.4	5.27~5.38 (1H, m)	130.0	5.27~5.38 (1H, m)	128.4
14	2.78 (2H, m)	25.8	2.78 (2H, t, 6.0)	25.8	2.78 (2H, m)	25.8
15	5.28~5.38 (1H, m)	127.9	5.27~5.38 (1H, m)	128.2	5.27~5.38 (1H, m)	128.0
16	5.28~5.38 (1H, m)	130.4	5.27~5.38 (1H, m)	130.2	5.27~5.38 (1H, m)	130.4
17	2.04 (2H, m)	20.8	2.06 (2H, m)	22.9	2.04 (2H, m)	20.8
18	0.95 (3H, t, 8.9)	14.3	0.95 (3H, t, 7.6)	14.3	0.95 (3H, t, 7.6)	14.5
1`			3.64 (3H, s)	51.7	4.37 (1H, dd, 12.1, 3.2)	65.8
2`					4.19 (1H, dd, 12.1, 6.4)	70.4
3`					3.99 (1H, m)	
					3.89 (1H, dd, 11.0, 5.5)	63.0
					3.70 (1H, dd, 11.0, 6.4)	

#### 4) Compound 9, 10, 11의 구조 동정

Compound 9의  $^1\text{H}$ -과  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 분석하여 보면 flavonoid의 glycoside 구조를 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.70 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)와  $\delta_{\text{H}}$  6.96 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)들의 signal을 통하여 플라보노이드 B환의 프로톤이 서로 *ortho*-coupling을 가지고 있는 대칭 구조를 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  6.38 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.21 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz)의 시그널은 플라보노이드 A환의 프로톤이 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 구조를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.39 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 시그널은 한 개의 anomeric proton이 관찰되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.21~3.33의 signal들과  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (3H, d,  $J = 5.5$  Hz)의 signal을 통하여 메틸기가 있는  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside를 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  179.8 피크를 통해 한 개의 carbonyl group을 가지고 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  159.4, 136.4 두 개의 피크들을 통해 compound 9는 aglycone이 kaempferol임을 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  103.6, 73.3, 72.2, 72.1, 72.0, 17.8의 6개의 sugar carbon을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>123</sup>과 비교하여 compound 9는 kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (afzelin)로 동정하였다.

Compound 10의  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 비교하여 보면 compound 9의 aglycone 구조를 같은 kaempferol임을 추측하였다. Compound 10의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.55 (1H, br s),  $\delta_{\text{H}}$  5.39 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 두 개의 anomeric proton이 관찰되었으며,  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.93 (3H, d,  $J = 5.5$  Hz)의 2개의 methyl 프로톤을 확인하였다. Compound 10의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  103.6, 100.0 2개의 anomeric carbon과  $\delta_{\text{C}}$  73.7~71.4 8개의 peak 그리고  $\delta_{\text{C}}$  18.2, 17.8 두 개의 메틸기의 피크를 통하여 2개의  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>124</sup>과 비교하여 compound 10은 kaempferol 3,7-*O*- $\alpha$ -L-dirhamnopyranoside (kaempferitrin)로 동정하였다.

Compound 11의  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 비교하여 보면 compound 10의 구조를 비슷하게 kaempferol의 glycosides임을 추측하였다. 그러나 compound 10과 다른 것은 compound 11의 구조에는 3개 당이 연결된 것으로 보인다.

Compound **11**의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.56 (1H, br s),  $\delta_{\text{H}}$  5.44 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.29 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz)의 세 개의 anomeric proton이 관찰되었으며, 그중  $\delta_{\text{H}}$  1.00 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz)의 2개의 methyl 프로톤이 확인하였다. Compound **11**의  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  107.6, 103.3, 100.0 3개의 anomeric carbon을 가지고 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  18.2, 17.8 두 개의 메틸기의 피크를 통하여 2개의  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  107.6, 77.9, 75.4, 71.1, 67.2의 5개의 sugar carbon은 xylose를 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌<sup>125</sup>과 비교하여 compound **11**는 kaempferol 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside로 동정하였다.

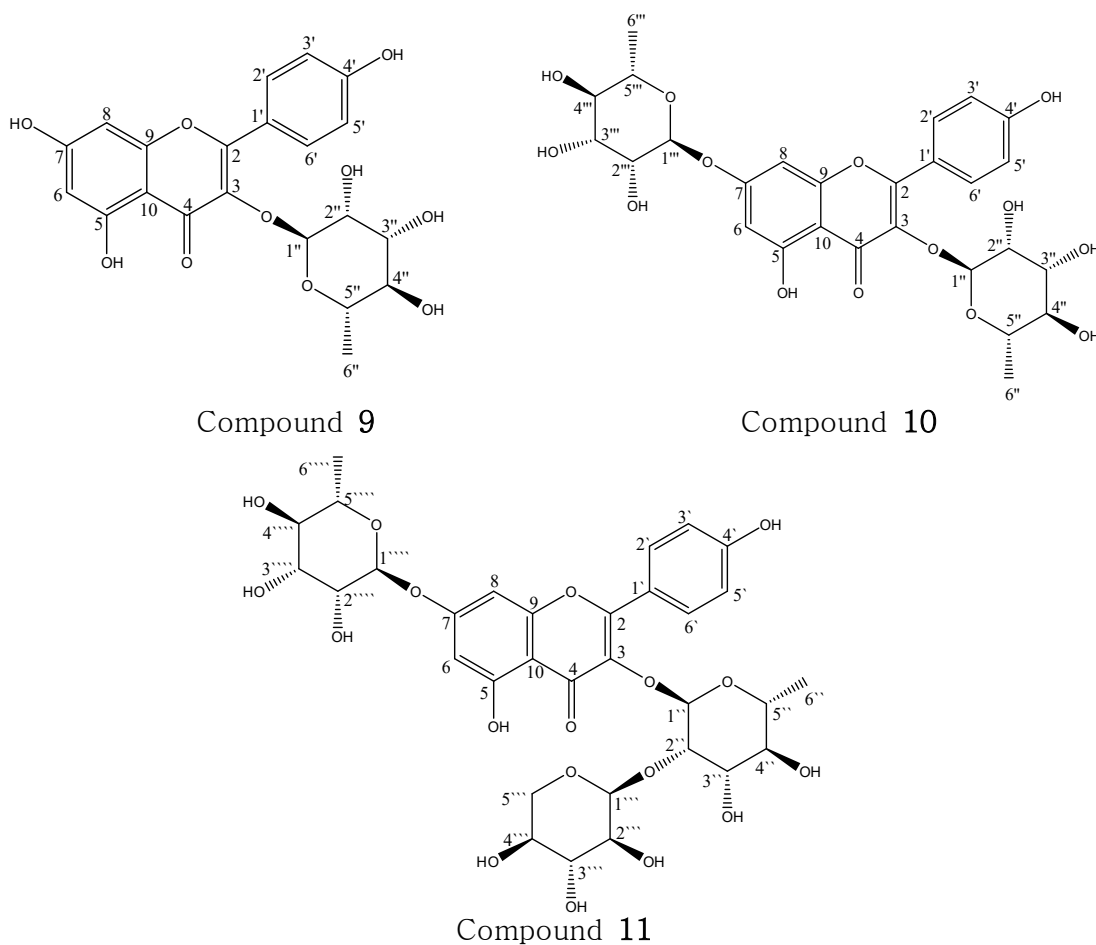


Figure 111. Chemical structure of compounds **9**, **10** and **11**

Table 54.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **9**, **10** and **11** (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>9</b>		Compound <b>10</b>		Compound <b>11</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		159.4		159.9		159.9
3		136.4		136.6		137.2
4		179.8		179.8		180.0
5		163.4		163.1		163.1
6	6.21 (1H, d, 1.8)	100.0	6.43 (1H, d, 1.8)	100.6	6.45 (1H, d, 1.8)	100.7
7		166.0		163.6		163.7
8	6.38 (1H, d, 1.8)	94.9	6.68 (1H, d, 1.8)	95.7	6.72 (1H, d, 1.8)	95.7
9		158.7		158.1		158.2
10		106.1		107.6		107.9
1 <sup>`</sup>		122.8		122.5		122.4
2 <sup>`</sup>	7.70 (1H, d, 8.7)	132.0	7.76 (1H, d, 8.7)	132.1	7.79 (1H, d, 8.7)	132.1
3 <sup>`</sup>	6.96 (1H, d, 8.7)	116.7	6.92 (1H, d, 8.7)	116.8	6.95 (1H, d, 8.7)	116.8
4 <sup>`</sup>		161.8		161.9		162.0
5 <sup>`</sup>	6.96 (1H, d, 8.7)	116.7	6.96 (1H, d, 8.7)	116.7	6.95 (1H, d, 8.7)	116.8
6 <sup>`</sup>	7.70 (1H, d, 8.7)	132.0	7.81 (1H, d, 8.7)	132.1	7.79 (1H, d, 8.7)	132.1
1 <sup>``</sup>	5.39 (1H, d, 1.4)	103.6	5.39 (1H, d, 1.4)	100.0	5.44 (1H, d, 1.4)	103.3
2 <sup>``</sup>	4.21 (1H, dd, 3.21, 1.4)	72.2	4.23 (1H, m)	71.4	4.21 (1H, dd, 3.2, 1.8)	82.8
3 <sup>``</sup>	3.71 (1H, m)	72.0	3.72 (1H, dd, 8.5, 2.8)	72.2	3.83 (1H, dd, 9.4, 3.2)	72.2
4 <sup>``</sup>	3.33 (1H, m)	73.3	3.35 (1H, t, 8.5)	73.7	3.33 (1H, t, 9.4)	73.7
5 <sup>``</sup>	3.49 (1H, m)	72.1	3.35 (1H, m)	71.8	3.68 (1H, m)	72.0
6 <sup>``</sup>	0.92 (3H, d, 5.5)	17.8	0.93 (3H, d, 5.5)	18.2	1.00 (3H, d, 6.4)	17.8
1 <sup>'''</sup>			5.55 (1H, br s)	103.6	4.29 (1H, d, 7.3)	107.6
2 <sup>'''</sup>			4.02 (1H, m)	72.0	3.19 (1H, dd, 9.2, 7.3)	75.4
3 <sup>'''</sup>			3.83 (1H, dd, 9.6, 3.2)	72.2	3.30 (1H, m)	77.9
4 <sup>'''</sup>			3.48 (1H, t, 9.6)	73.3	3.40 (1H, m)	71.1
5 <sup>'''</sup>			3.60 (1H, m)	72.2	3.68 (1H, m) 3.07 (1H, t, 10.78)	67.2
6 <sup>'''</sup>			1.26 (3H, d, 6.4)	17.8	-	-
1 <sup>''''</sup>					5.56 (1H, br s)	100.0
2 <sup>''''</sup>					4.03 (1H, br s)	71.8
3 <sup>''''</sup>					3.83 (1H, dd, 9.4, 3.2)	72.0
4 <sup>''''</sup>					3.48 (1H, t, 9.4)	73.7
5 <sup>''''</sup>					3.61 (1H, m)	71.4
6 <sup>''''</sup>					1.26 (3H, d, 6.4)	18.2

## 5) Compound 12의 구조 동정

Compound 12의  $^1\text{H}$ -과  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 분석하여 보면 compound 10, 11과 비슷한 구조로 flavonoid의 glycoside 구조를 예상하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.81 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)와  $\delta_{\text{H}}$  6.95 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz)들의 signal을 통하여 플라보노이드 B환의 프로톤이 서로 *ortho*-coupling을 가지고 있는 대칭 구조를 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  6.73 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.46 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz)의 시그널은 플라보노이드 A환의 프로톤이 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 구조를 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.67 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.56 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.51 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz)의 세 개의 anomeric proton이 관찰되었으며, 그리고  $\delta_{\text{H}}$  1.33 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz)의 3개의 methyl 프로톤이 확인하였다.  $\delta_{\text{H}}$  4.35~3.35의 signal들은 당의 3차 탄소인 proton으로 또한 2개의  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside를 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 flavonoid의 aglycone 구조가 compound 10, 11의 카본 데이터와 대비해 보면 비슷한 피크를 나타내며, 각각  $\delta_{\text{C}}$  179.9, 163.7, 163.1, 162.0, 159.9, 158.2, 137.1, 132.2, 122.4, 116.8, 107.6, 100.7, 95.8에 13개의 피크를 통해 kaempferol의 3번과 7번 위치에 각각  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside로 연결되어 있음을 확인하였다. 나머지 6개 피크를 가일층 확인하기 위하여 DEPT-135°와 2D-NMR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSY, HMQC, HMBC)를 측정하였다.

DEPT-135° spectrum을 통하여 총 21개의 carbon이 있음을 확인하였으며, 그 중 methylene carbon이 없었으며, 18개 methine carbon과 3개 methyl carbon이 나타났고  $\delta_{\text{C}}$  205.8의 피크는 DEPT-135° spectrum에서 피크를 나타내지 않기 때문에 carbonyl carbon으로 확인하였다. 다음 HMQC spectrum을 통해서  $\delta_{\text{H}}$  5.67 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.56 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.51 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz)의 세 개의 anomeric proton의 signal은 직접 대응한 carbon signal은 각각  $\delta_{\text{C}}$  103.0, 100.0, 108.1을 확인하였고  $\delta_{\text{H}}$  1.33 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz)의 3개의 methyl 프로톤의 signal은 직접 대응한 carbon signal은 각각  $\delta_{\text{C}}$  19.0, 18.2, 17.8로 확인

하였다. 또한  $\delta_H$  4.35 (1H, dd,  $J = 3.2, 1.4$  Hz) 및  $\delta_H$  4.20(1H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz)의 signal들은 직접 대응한 carbon signal은  $\delta_C$  83.0과 78.9을 확인하였다.

HMBC spectrum을 통하여  $\delta_H$  5.67 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 signal은  $\delta_C$  137.1, 83.0, 72.2와 연결 관계가 나타내기 때문에 하나의  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside이 flavonoid 의 3번 위치와 연결되어 있음을 확인하였다.  $\delta_H$  5.56 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 signal은  $\delta_C$  163.7, 72.1 71.8와 연결 관계가 나타내기 때문에 하나의  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside이 flavonoid 의 7번 위치에 연결되어 있음을 확인하였다.  $\delta_H$  4.35 (1H, dd,  $J = 3.2, 1.4$  Hz) signal은  $\delta_C$  108.1, 73.6와 연결 관계가 있으며, 3번에  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside의 2번 위치에 연결되어 있음을 확인하였다. 다음  $\delta_H$  1.33 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz)의 signal은  $\delta_C$  78.9, 74.3와 연결 관계가 나타내며, 또한 HMQC spectrum을 통하여  $\delta_C$  78.9 와  $\delta_C$  74.3직접 대응한 proton은 이미 알고 있으며, 두 개의 signal은 또  $\delta_C$  205.8와 연결 관계가 있음을 확인하였다. 그래서 두 개  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside에 제외하고 또 하나의 구조는 2''-Deoxy-ribo-hexos-3-ulose로 확인하였다.  $^1H$ - $^1H$  COSY spectrum을 통해 aliphatic carbon들의 배열을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 compound **12**는 kaempferol 3-*O*-[deoxy-ribo-hexos-3-ulosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside로 자연계에서 처음으로 분리된 신규화합물이다. Compound **12**의 HR-ESI-MS 분석 결과  $m/z$   $[M+Na]^+$  745.1956 (calc. 745.1956)로 예상한 화합물의 분자량과 일치하는 것을 확인하였다. Optical rotation 측정결과는  $[\alpha]_D^{20} = -71.1$  ( $c$  0.1, MeOH)이다.

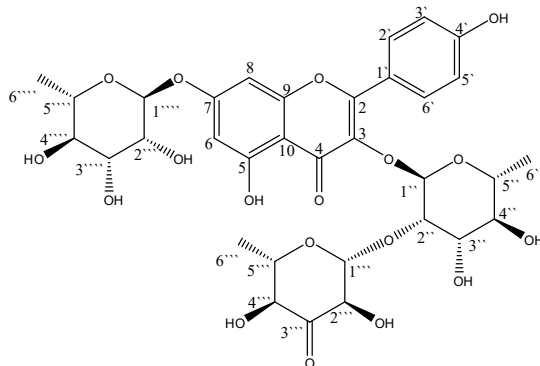


Figure 112. Chemical structure of compound **12**

Table 55.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data and informations of HMBC of compound **12** (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>12</b>			
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC ( $J$ 2)	HMBC ( $J$ 3)
2		159.9		
3		137.1		
4		179.9		
5		163.1		
6	6.46 (1H, d, 1.8)	100.7	163.1 (C5)	95.8 (C8), 158.2 (C10)
7		163.7		
8	6.73 (1H, d, 1.8)	95.8	163.7 (C7), 107.6 (C9)	100.7 (C6), 158.2 (C10)
9		158.2		
10		107.6		
1'		122.4		
2'	7.81 (1H, d, 8.7)	132.2	116.8 (C3')	162.0 (C4'), 159.9 (C2)
3'	6.95 (1H, d, 8.7)	116.8	162.0 (C4')	122.4 (C1')
4'		162.0		
5'	6.95 (1H, d, 8.7)	116.8	162.0 (C4')	122.4 (C1')
6'	7.81 (1H, d, 8.7)	132.2	116.8 (C5')	162.0 (C4'), 159.9 (C2)
1''	5.67 (1H, d, 1.4)	103.0	137.1 (C3), 83.0 (C2'')	72.2 (C3'')
2''	4.35 (1H, dd, 3.2, 1.4)	83.0	108.1 (C1''')	73.6 (C4'')
3''	3.82 (1H, dd, 6.9, 5.0)	72.2		
4''	3.35 (1H, t, 9.6)	73.6	72.2 (C3'')	17.8 (C6'')
5''	3.56 (1H, dd, 12.8, 6.4)	71.9	73.6 (C4'')	72.2 (C3'')
6''	0.98 (3H, d, 6.0)	17.8		73.6 (C4'')
1'''	4.51 (1H, d, 8.2)	108.1	83.0 (C2''), 78.7 (C2''')	
2'''	3.80~3.86 (1H, m)	78.7		
3'''		205.8		
4'''	4.20 (1H, dd, 7.8, 1.8)	78.9	205.8 (C3''')	108.1 (C1''')
5'''	3.80~3.86 (1H, m)	74.3	19.0 (C6''')	205.8 (C3''')
6'''	1.33 (3H, d, 6.0)	19.0	74.3 (C5''')	78.9 (C4''')
1''''	5.56 (1H, d, 1.4)	100.0	163.7 (C7), 71.8 (C2''')	72.1 (C3''')
2''''	4.02 (1H, dd, 3.0, 1.4)	71.8		73.7 (C4''')
3''''	3.84 (1H, dd, 9.6, 5.0)	72.1	73.7 (C4'''), 71.8 (C2''')	
4''''	3.48 (1H, t, 9.6)	73.7	72.1 (C3'''), 71.4 (C5''')	18.2 (C6''')
5''''	3.60 (1H, dd, 9.6, 6.0)	71.4	72.1 (C3'''), 73.7 (C4''')	
6''''	1.26 (3H, d, 6.0)	18.2	71.4 (C5''')	73.7 (C4''')





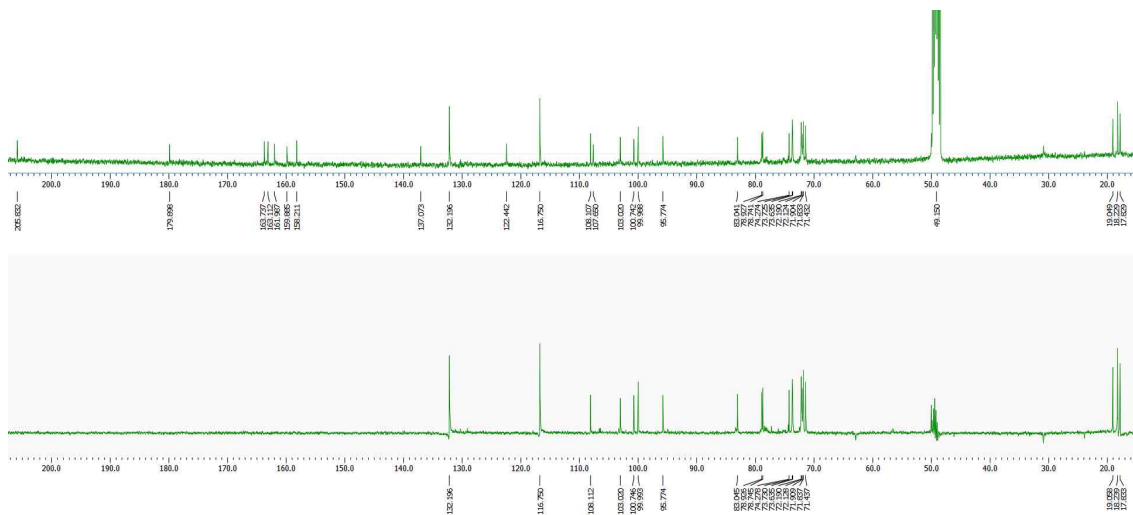


Figure 115. DEPT-135° spectrum of compound **12** (in CD<sub>3</sub>OD)

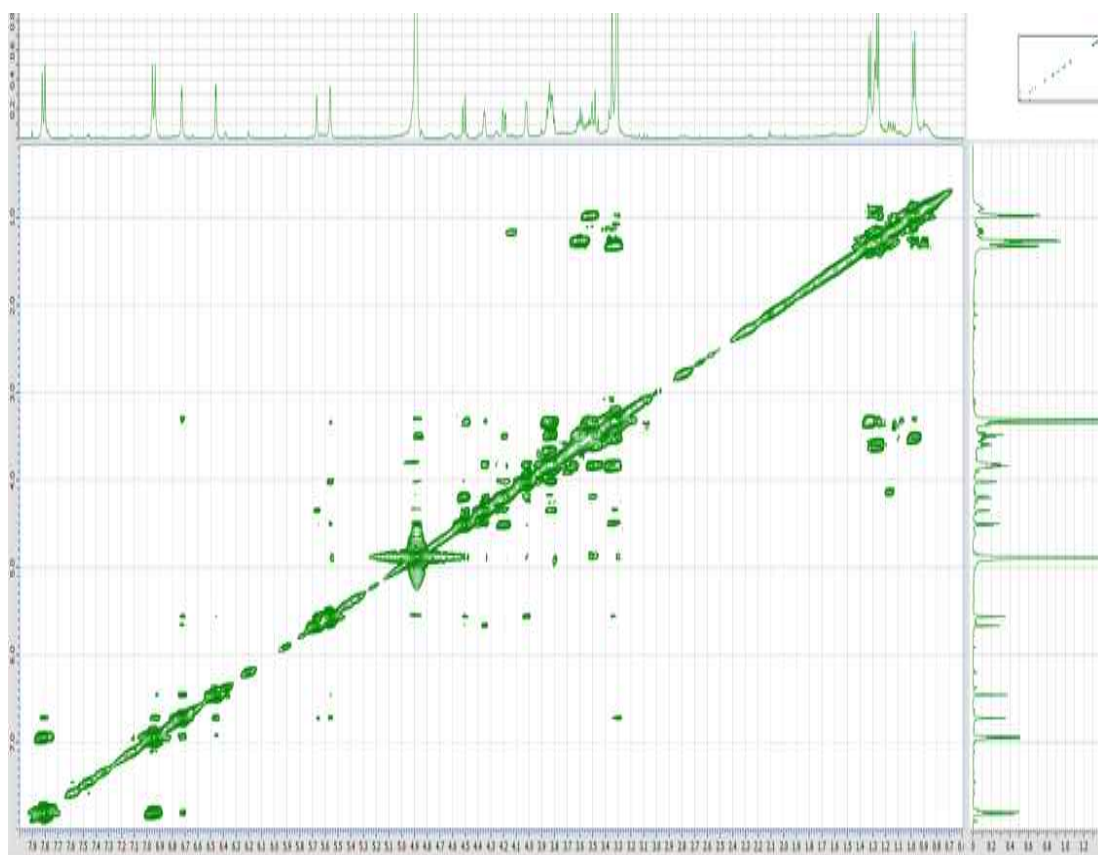


Figure 116. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum of compound **12** (in CD<sub>3</sub>OD)

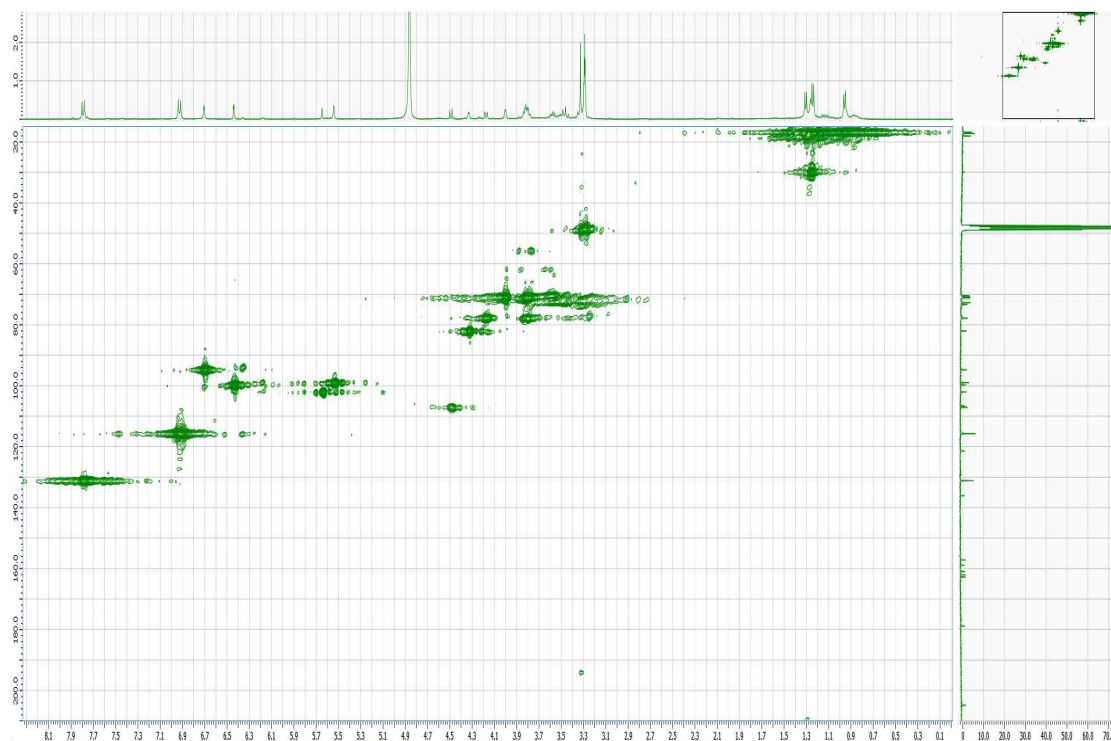


Figure 117. HMQC spectrum of compound **12** (in CD<sub>3</sub>OD)

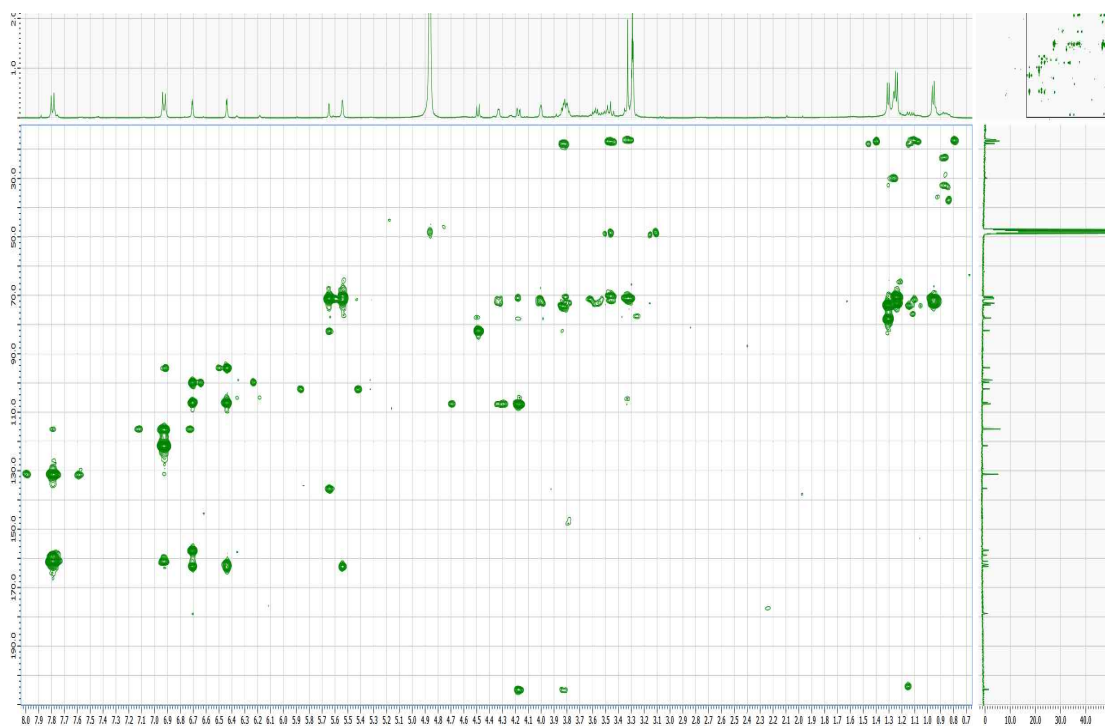


Figure 118. HMBC spectrum of compound **12** (in CD<sub>3</sub>OD)

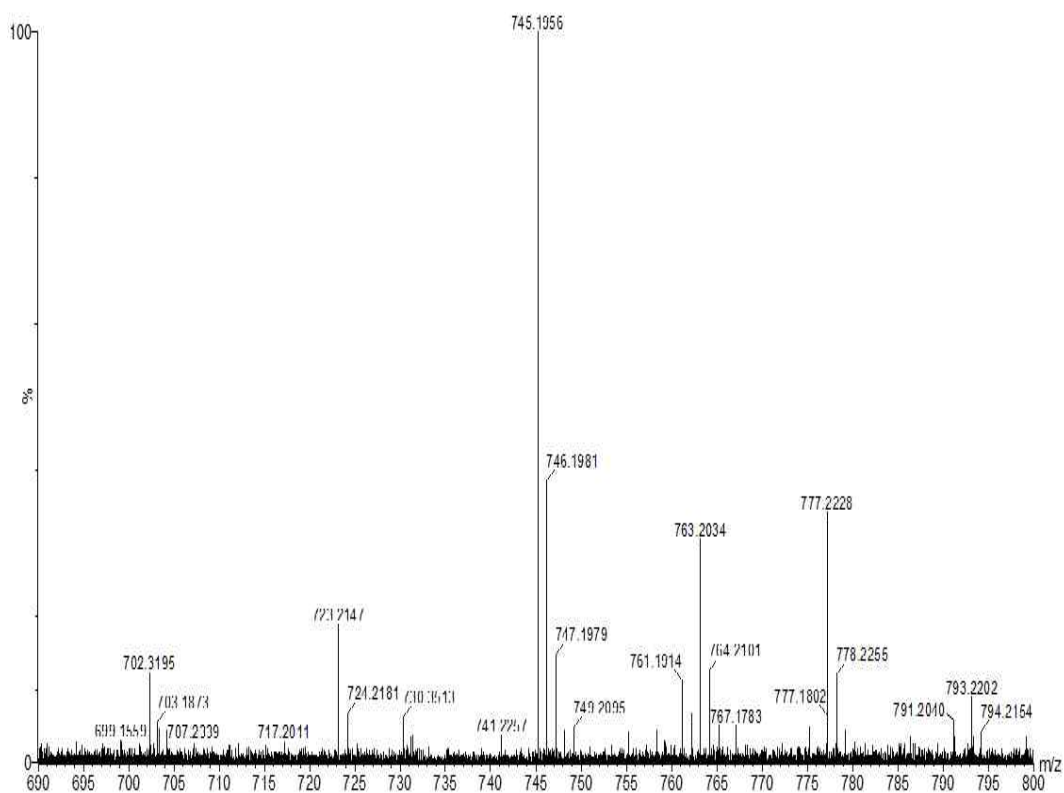


Figure 119. HR-ESI-MS spectrum of compound 12

#### 4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항산화

###### (1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 gallic acid 검정곡선을 이용하여 팔배나무 잎의 추출물 및 분획물에 함유되어 있는 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 측정된 값은 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양 (GAE; gallic acid equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, *n*-BuOH 및 EtOAc 분획물에서  $121.34 \pm 0.99$ ,  $109.24 \pm 1.0$  mg/g GAE로 다른 분획물들에 비해 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 120).

###### (2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드는 quercetin을 표준물질로 한 표준검정곡선을 이용하여 분홍 바늘꽃 지상부의 추출물 및 분획물에 함유되어 있는 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 측정된 값은 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양 (QE; quercetin equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, *n*-BuOH 및 EtOAc 분획물에서  $44.74 \pm 0.6$ ,  $35.23 \pm 2.3$  mg/g QE로 추출물 및 다른 분획물들에 비해 가장 많은 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 121).

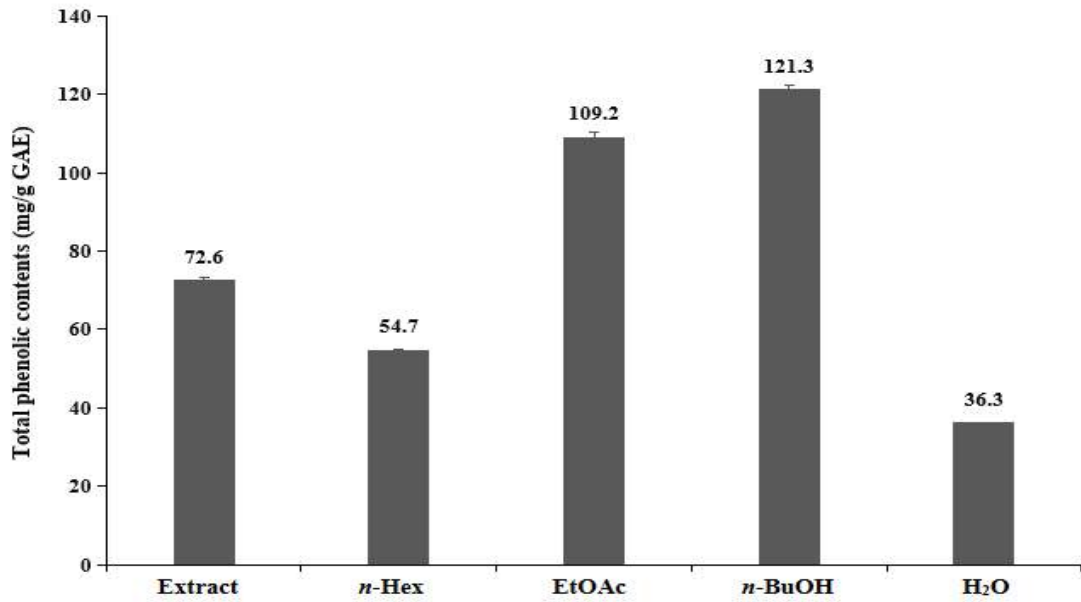


Figure 120. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

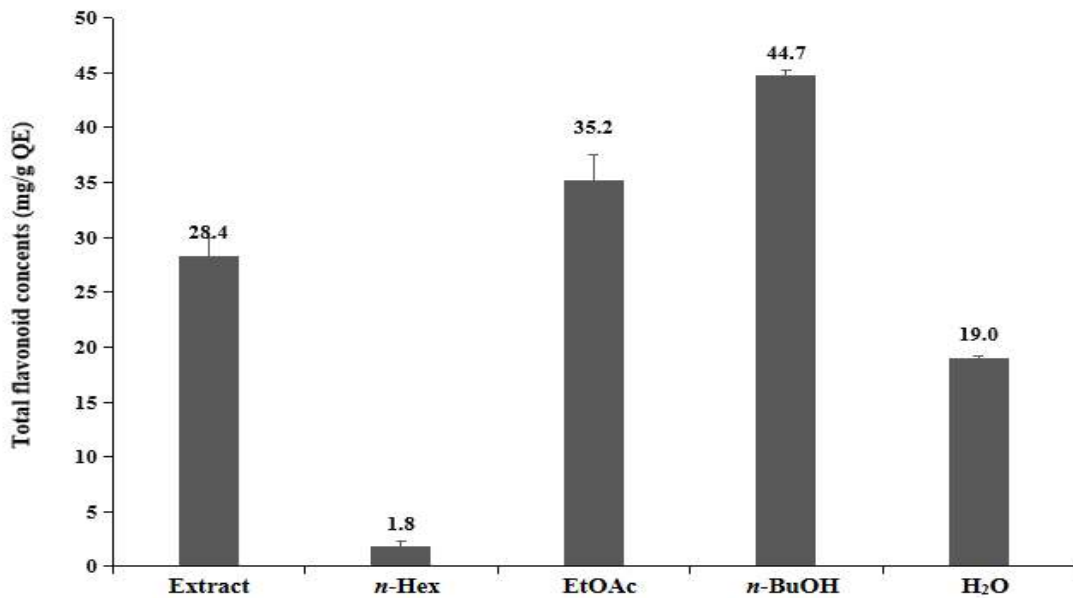


Figure 121. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

팔배나무 잎의 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 25-400 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 66.0, 72.5 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 122, Table 56).

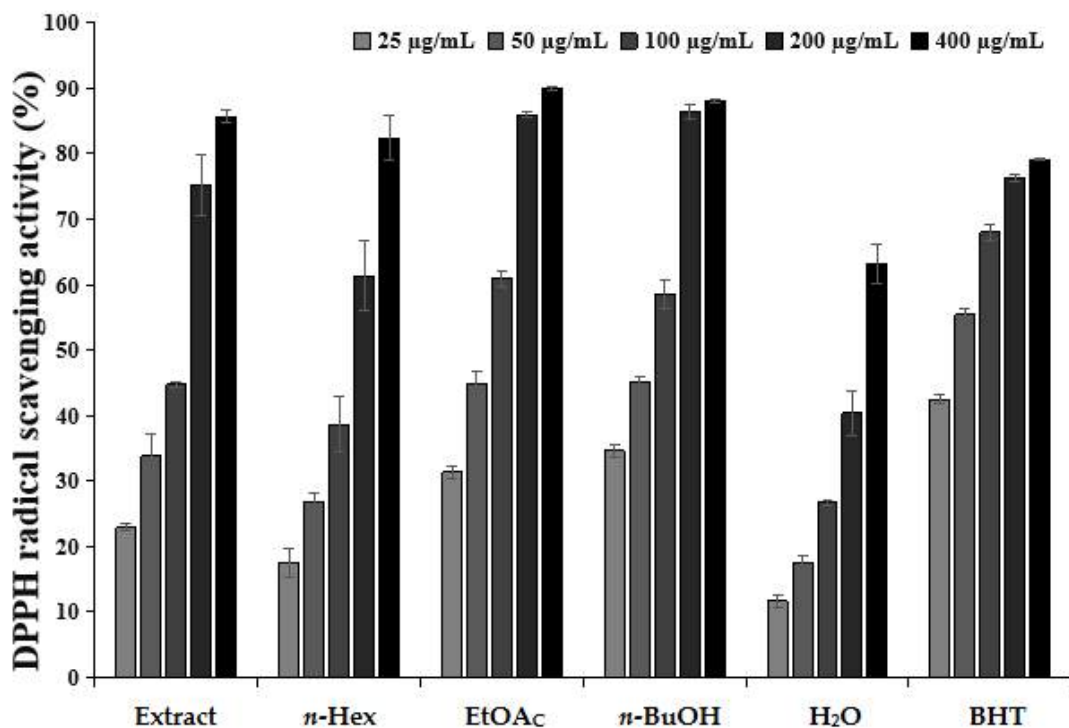


Figure 122. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from *S. alnifolia* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 56. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	117.4	150.2	66.0	72.5	287.7	39.5

(4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

팔배나무 잎의 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 6.25-200 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, *n*-BuOH, EtOAc 분획물과 추출물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 33.9, 64.9, 77.2 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다(Figure 123, Table 57).

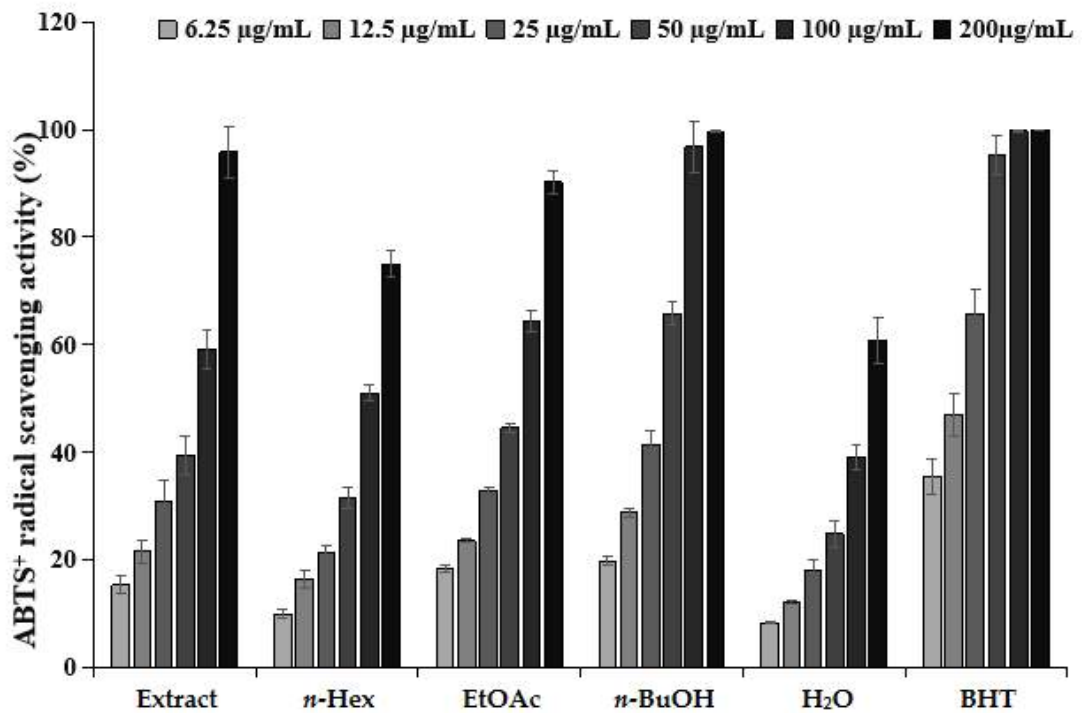


Figure 123. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent layers from *S. alnifolia* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 57. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	77.2	97.2	64.9	33.9	150.2	14.6

(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 측정하였다. 우선, 실험에 사용될 시료의 농도를 측정하기 위해 HaCaT 세포에 대한 추출물 및 용매 분획물의 세포 독성을 평가하였다. 그 결과, 팔배나무 잎 추출물과 각 용매 분획물은 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포 생존율이 모두 90% 이상으로 나타났다(Figure 124). 따라서 본 실험에서 사용될 시료의 농도는 세포 독성을 나타내지 않은 농도인 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 실행하였다.

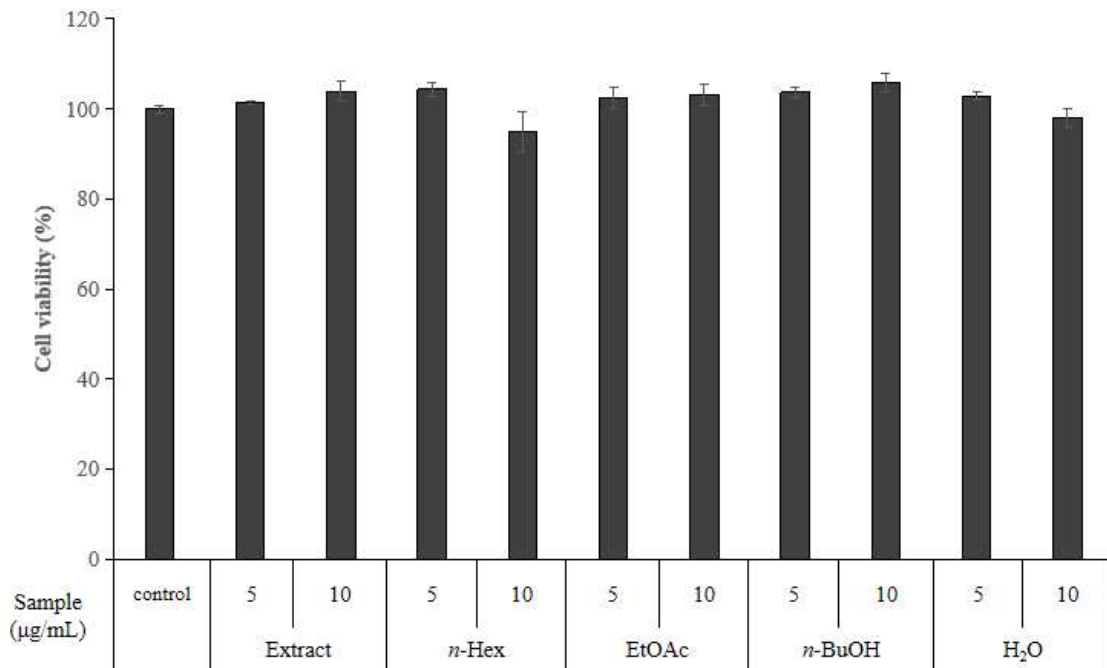


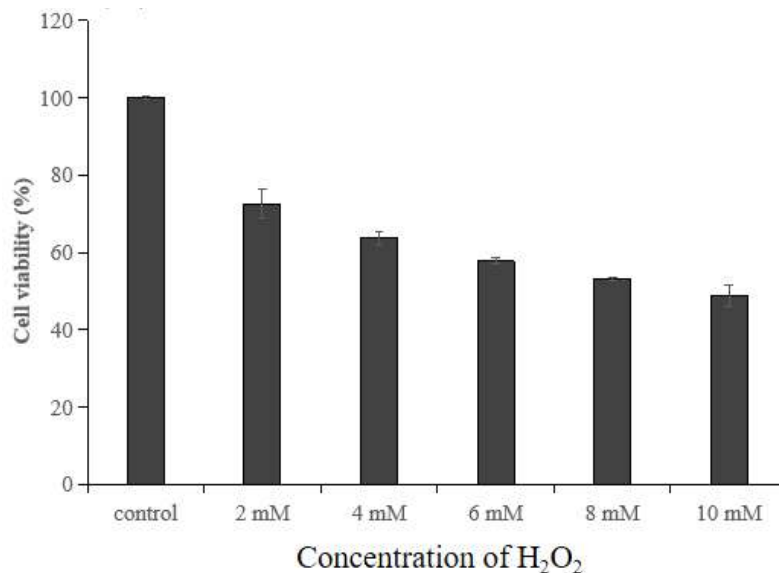
Figure 124. Cell viability of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



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

과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 앞서, 실험에 사용될 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 정하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 따라 HaCaT cell의 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 6 mM의 농도 하 세포 생존율이 57.8%로 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 6 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 다음에 팔배나무 잎 추출물 및 각 용매 분획물은 5, 10 µg/mL의 농도로 손상된 세포에 실험을 실행하였다. 그 결과, 팔배나무 잎 추출물은 5, 10 µg/mL의 농도에서 각각 60.7, 65.9%의 세포 생존율이 확인되었으며, 추출물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 1.5, 6.7%의 세포 보호 효과를 확인하였다. 팔배나무 잎의 EtOAc 분획물은 5, 10 µg/mL의 농도에서 각각 62.5, 71.6%의 세포 생존율이 확인되었으며, EtOAc 분획물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 3.3, 12.4%의 세포 보호 효과를 확인하였다. 또한 팔배나무 잎의 *n*-BuOH 분획물은 5, 10 µg/mL의 농도에서 각각 64.4, 73.5%의 세포 생존율이 확인되었으며, EtOAc 분획물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 5.2, 14.3%의 세포 보호 효과를 확인하였다(Figure 125).

(A)



(B)

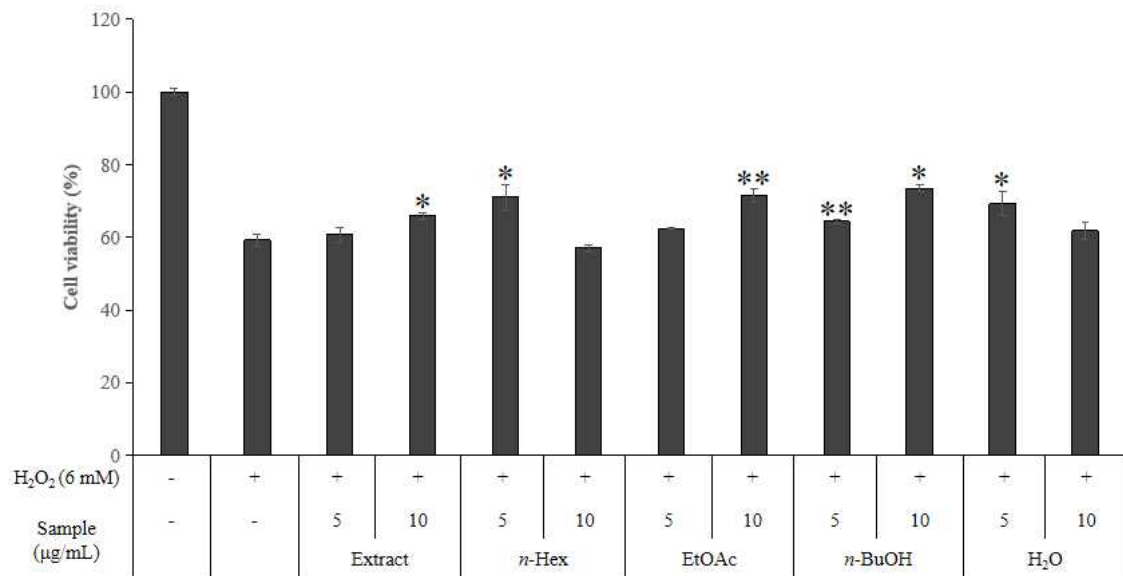


Figure 125. (A) Cell viability on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cells. (B) Cell protective effects of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves on HaCaT cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

한편, 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과가 있는 팔배나무 잎의 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 추가적으로 농도를 10, 20, 40 µg/mL로 하여 추가 실험을 진행하였다. 그 결과, 팔배나무 잎 추출물 40 µg/mL이하의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 확인하였으며, EtOAc 분획물은 20 µg/mL이하의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다. *n*-BuOH 분획물은 20, 40 µg/mL에 처리할 때 세포 독성이 있음을 확인하였다(Figure 126). 따라서 팔배나무 잎의 추출물은 5-40 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였고, EtOAc 분획물은 5-20 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다.

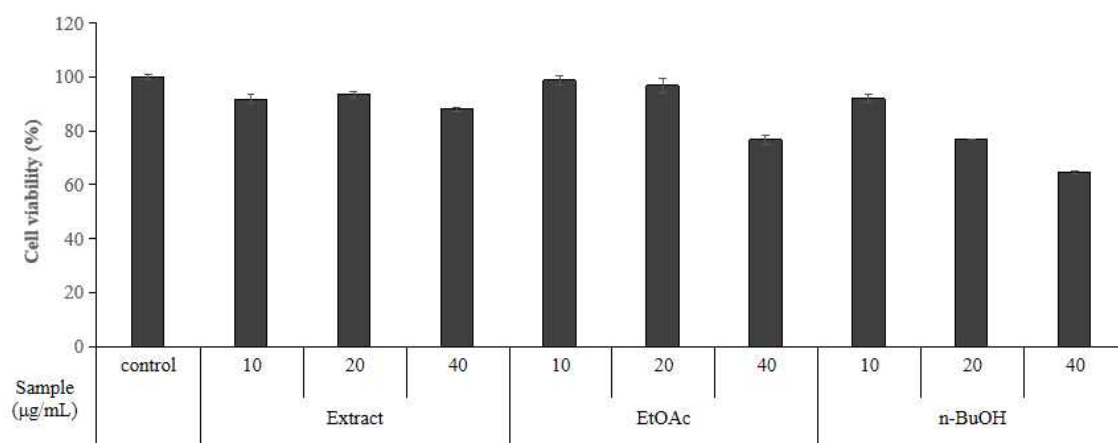
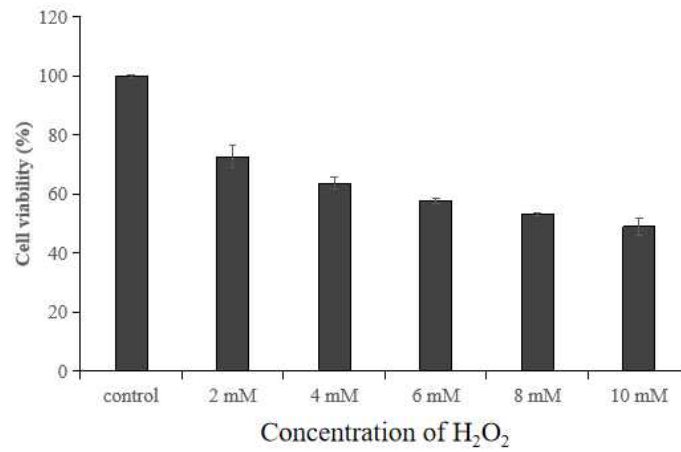


Figure 126. Cell viability of extract and EtOAc and *n*-BuOH fractions from *S. alnifolia* leaves in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

추가적으로 추출물 및 EtOAc 분획물이 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 실험 결과이다. 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 앞서, 실험에 사용될 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 정하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 따라 HaCaT cell의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 6 mM의 농도 하 세포 생존율이 57.8%로 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 6 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 다음에 팔배나무 잎 추출물은 5, 10, 20, 40 µg/mL의 농도로 손상된 세포에 실험을 실행하였으며, EtOAc 분획물은 5, 10, 20 µg/mL의 농도로 손상된 세포에 실험을 실행하였다. 그 결과, 팔배나무 잎 추출물은 5, 10, 20, 40 µg/mL의 농도에서 각각 59.8, 65.5, 68.5, 75.5%의 세포 생존율이 확인되었으며, 추출물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 1.8, 7.5, 10.5, 17.5%의 세포 보호 효과를 확인하였다. 또한, 팔배나무 잎의 EtOAc 분획물은 5, 10, 20 µg/mL의 농도에서 각각 62.2, 69.5, 79.1%의 세포 생존율이 확인되었으며, EtOAc 분획물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 4.2, 11.5, 21.1%의 세포 보호 효과를 확인하였다(Figure 127).

(A)



(B)

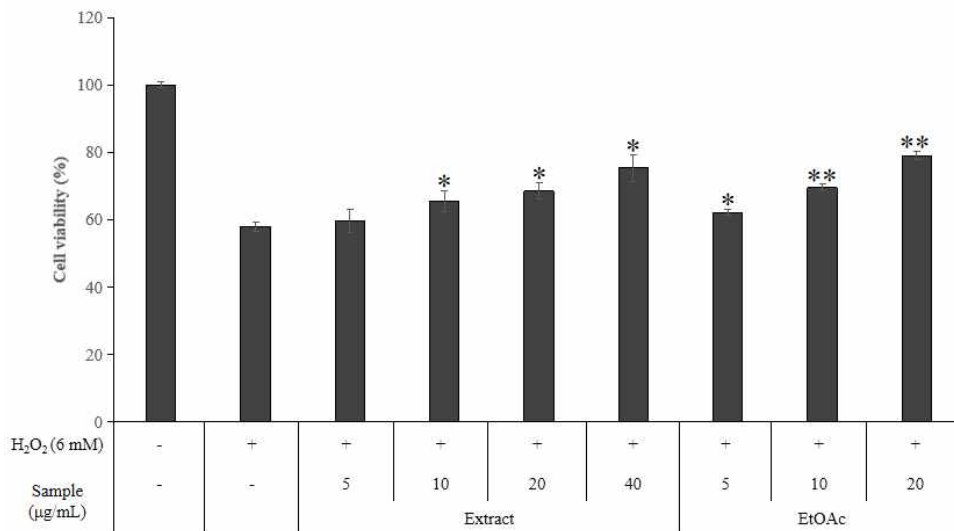


Figure 127. (A) Cell viability on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cells. (B) Cell protective effects of extract and EtOAc fractions from *S. alnifolia* leaves on HaCaT cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

## 2) 항균

### (1) Paper disc diffusion method

팔배나무 잎 추출물 및 분획물의 항균 활성을 확인하기 위하여 피부 상재균 (resident flora)인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 사용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다.

그 결과, 팔배나무 잎 *n*-Hex과 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고, *n*-BuOH, EtOAc 분획물 및 추출물의 순서로 활성이 우수하게 나타났다.

또한, 팔배나무 잎의 추출물 및 분획물이 *C. acnes*에 대하여 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 우수한 항균 활성을 나타내었다.



Figure 128. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from leaves of *S. alnifolia* on *S. epidermidis* and *C. acnes*.

Table 58. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from leaves of *S. alnifolia*

Bacterial density ( $1.5 \times 10^6$ CFU/mL)	Clear zone (mm)		
	<i>S. epidermidis</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	10.5	9.0	9.0
<i>n</i> -Hex Fr.	N.A.	N.A.	N.A.
EtOAc Fr.	12.0	9.0	9.0
<i>n</i> -BuOH Fr.	14.0	11.0	10.0
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.	N.A.	N.A.
Positive control	34.0	N.A.	33.0

Bacterial density ( $1 \times 10^8$ CFU/mL)	Clear zone (mm)			
	<i>C. acnes</i>			
	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
Extract	10.0	10.0	9.0	9.0
<i>n</i> -Hex Fr.	9.5	N.A.	N.A.	N.A.
EtOAc Fr.	11.0	9.0	9.5	9.0
<i>n</i> -BuOH Fr.	10.0	12.0	13.0	12.0
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Positive control	64.0	N.A.	N.A.	46.0

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 팔배나무 잎의 항균 활성을 확인하였으며, 활성을 가지고 있는 시료에 대해 추가적으로 균주 성장 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 사용한 시료의 최대 농도는 10000 µg/mL로 하였으며, 최소 농도가 9.76 µg/mL가 되도록 two-fold serial dilutions 방법으로 희석하여 실험하였다.

그 결과, *S. epidermidis*의 경우에는 팔배나무 잎의 추출물 및 각종 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC 값을 확인하였으며, 그 중 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 MBC 값을 확인하였다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 *S. epidermidis*에 MIC 값을 625 µg/mL로 확인하였고 제일 우수한 항균 활성을 나타내었고, *n*-BuOH 분획물에서 *S. epidermidis*에 MIC 값을 1250-2500 µg/mL로 확인하였으며, 추출물에 경우에는 *S. epidermidis*에 MIC 값을 2500 µg/mL로 확인하였다. MBC 값의 결과는 EtOAc 분획물에서 *S. epidermidis*에 MBC 값을 10000 µg/mL로 확인하였고, 추출물이 CCARM 3709와 CCARM 3710 균주에 MBC 값을 각각 5000 µg/mL, 10000 µg/mL로 확인하였다(Table 59).

*C. acnes*의 경우에는 팔배나무 잎의 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 모두 우수한 항균 활성을 나타내었다. 특히 *n*-Hex 분획물이 *C. acnes*에 대한 MIC 값을 1250 µg/mL로 확인하였고, EtOAc 분획물이 *C. acnes*에 대한 MIC 값을 1250-2500 µg/mL로 확인하였다. 하지만 팔배나무 잎의 추출물 및 용매 분획물에서 *C. acnes*의 MBC 값에 대해 활성이 없는 것으로 보였다(Table 60).

Table 59. MIC and MBC values of *S. alnifolia* leaves on *S. epidermidis*.

	<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	2500	5000	2500	10000	2500	>10000
<i>n</i> -Hex Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
EtOAc Fr.	625	10000	625	10000	625	10000
<i>n</i> -BuOH Fr.	1250	>10000	1250	>10000	2500	>10000
H <sub>2</sub> O Fr.	10000	>10000	10000	>10000	>10000	>10000

Unit : µg/mL

Table 60. MIC and MBC values of *S. alnifolia* leaves on *C. acnes*.

	<i>C. acnes</i>							
	CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	10000	>10000	10000	>10000	10000	>10000	10000	>10000
<i>n</i> -Hex Fr.	1250	>10000	1250	>10000	1250	>10000	1250	>10000
EtOAc Fr.	2500	>10000	1250	>10000	2500	>10000	2500	>10000
<i>n</i> -BuOH Fr.	5000	>10000	5000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
H <sub>2</sub> O Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

Unit : µg/mL



### 3) 항염

#### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

팔배나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성 억제 활성과 세포 생존율(MTT)을 확인하기 위하여 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 이용하였다. 우선 추출물과 용매 분획물은 100 µg/mL 농도로 실험을 실행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 세포 독성 없이 우수한 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, 억제율이 각각 65.7%, 61.8%로 확인되었다(Figure 129). *n*-Hex과 EtOAc 분획물에서 NO 생성 억제율이 50%일 때의 농도(IC<sub>50</sub>)를 확인하기 위하여 추가적으로 *n*-Hex은 12.5-100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, *n*-Hex 분획물은 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보였고, IC<sub>50</sub> 값은 66.0 µg/mL로 확인되었다(Figure 129). 마찬가지로 EtOAc 분획물도 12.5-100 µg/mL의 농도로 실험하여, 농도 의존적인 NO 생성 억제 활성을 확인하였고, IC<sub>50</sub> 값은 82.3 µg/mL로 나타났다(Figure 130).

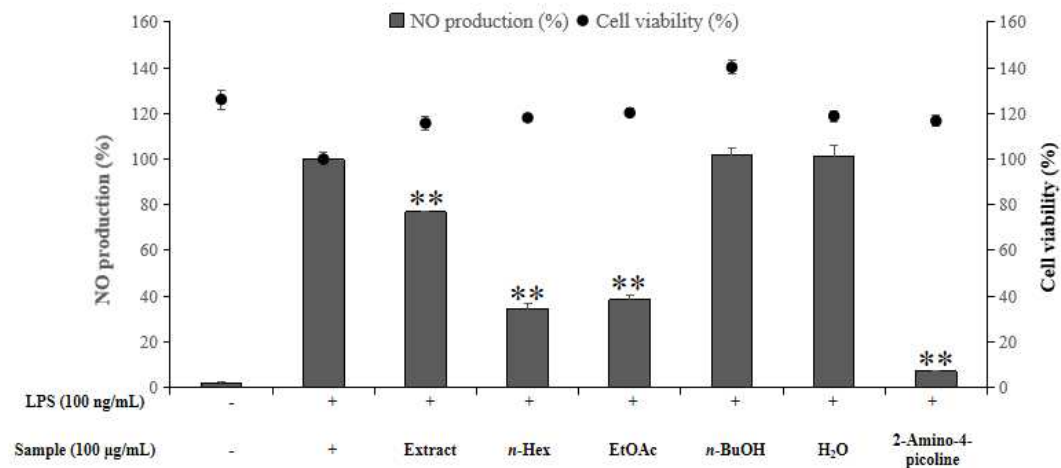


Figure 129. Effects of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *S. alnifolia* leaves and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

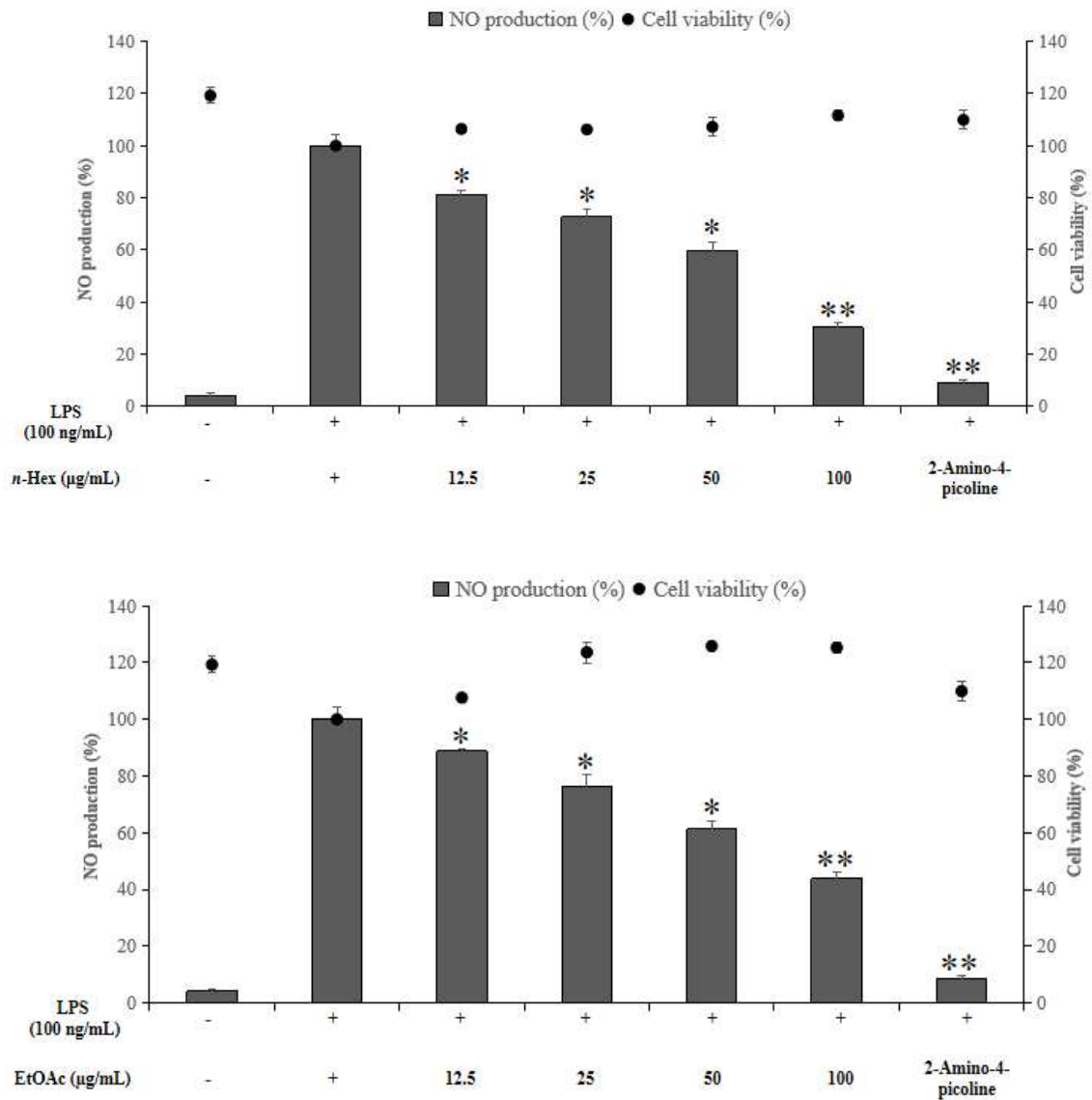


Figure 130. Effects of *n*-Hex and EtOAc fractions from *S. alnifolia* leaves on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions from *S. alnifolia* leaves and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

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

팔배나무 잎 *n*-Hex 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 팔배나무 잎 *n*-Hex 분획물은 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제한 효과가 없고 IL-1β의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 131).

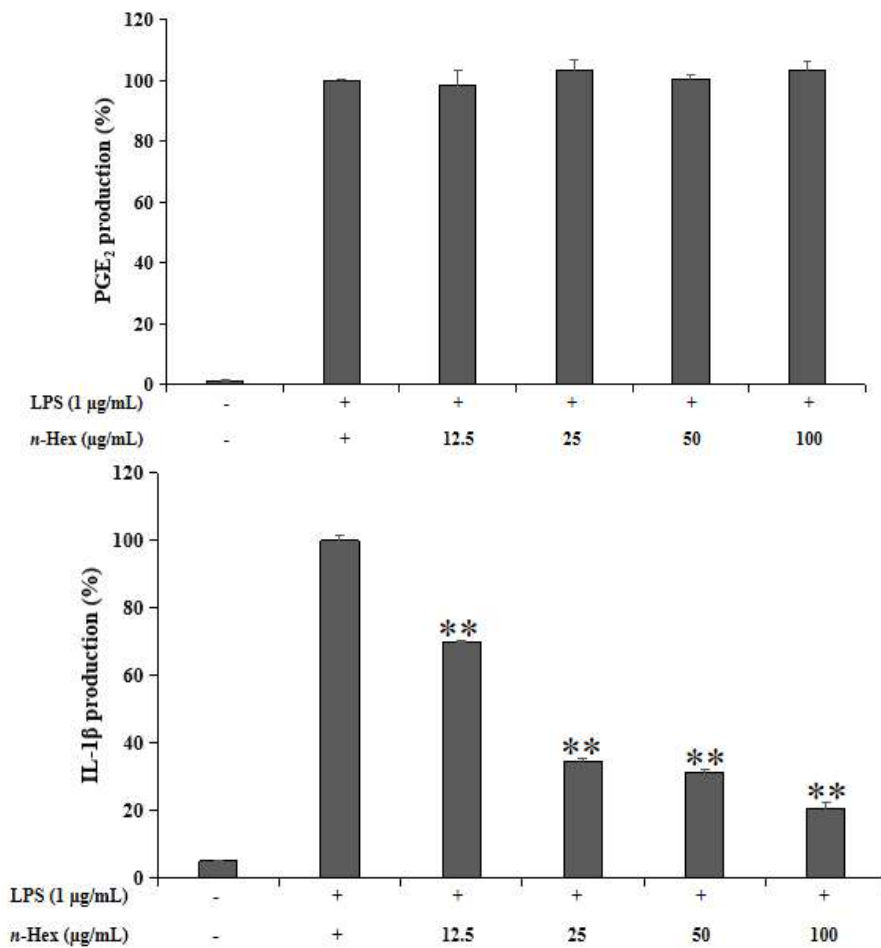


Figure 131. Effects of *n*-Hex fractions from *S. alnifolia* leaves on PGE<sub>2</sub>, IL-1β production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

마찬가지로 팔배나무 잎 EtOAc 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 팔배나무 잎 EtOAc 분획물은 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제한 효과가 없고 IL-1β의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 132).

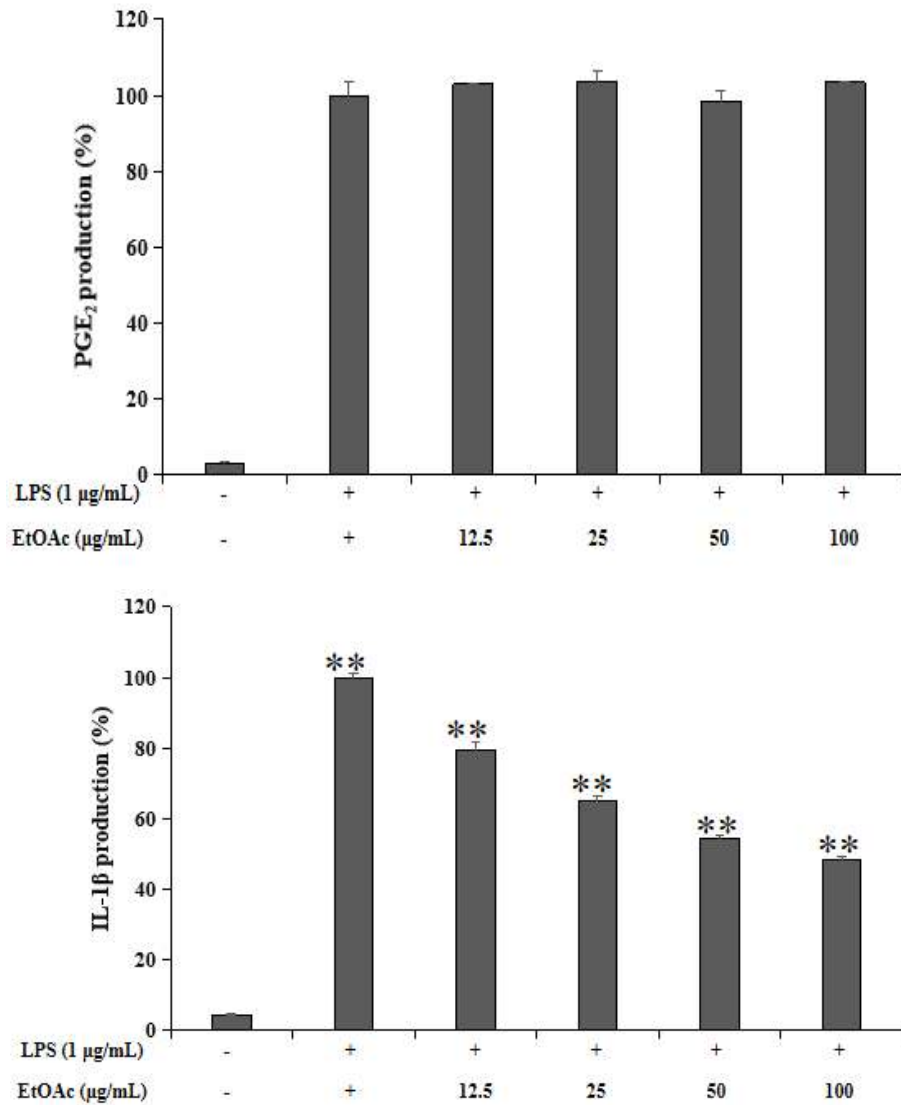


Figure 132. Effects of EtOAc fractions from *S. alnifolia* leaves on PGE<sub>2</sub>, IL-1β production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

#### 4) 미백

##### (1) Melanogenesis 억제 활성

B16F10 melanoma cell을 이용하여 팔배나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 멜라닌 생성 억제 활성과 세포 독성을 확인하였다. 우선 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-BuOH 분획물은 세포 독성 없이 39.0% melanin 생성 억제 효과를 나타냈다(Figure 133).

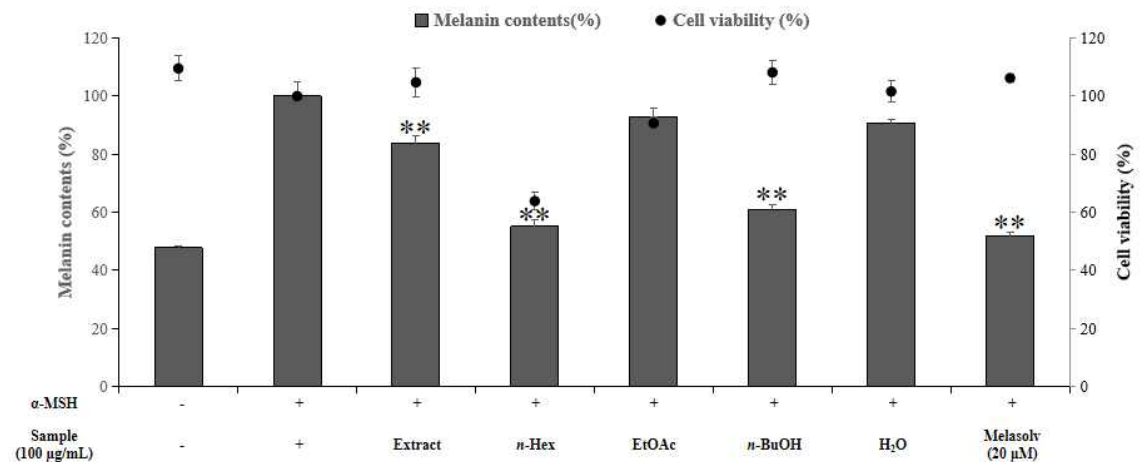


Figure 133. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of *S. alnifolia* leaves in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\*  $p < 0.01$

상술한 결과를 바탕으로 추가적인 *n*-BuOH 분획물에 대한 melanin 생성 억제 실험을 진행하였으며, 그 결과, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리한 후 세포 독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 활성이 확인되었다(Figure 134).

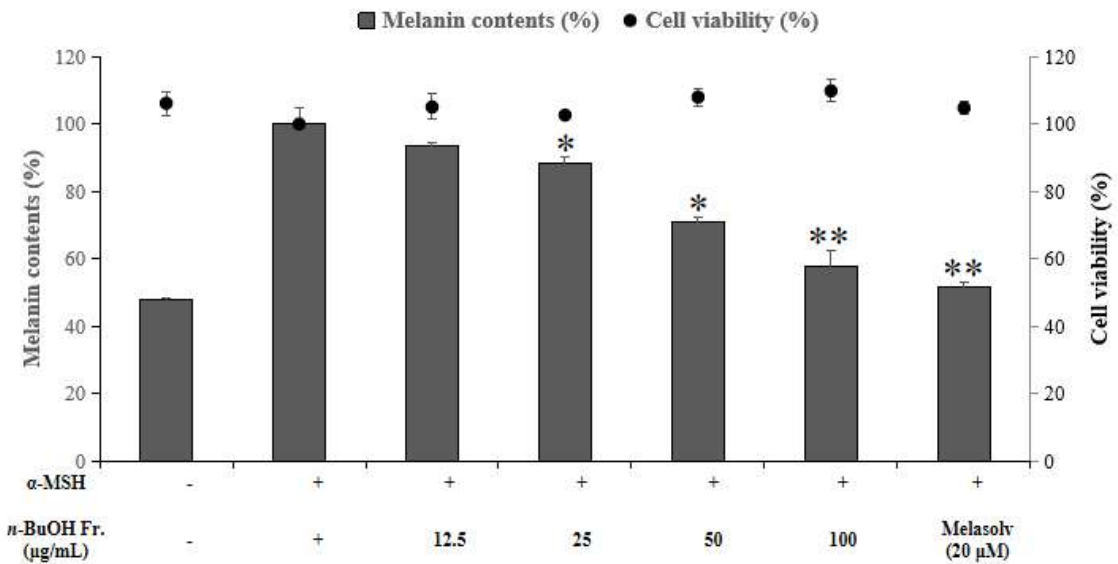


Figure 134. Melanin contents and cell viability of *n*-BuOH fractions of *S. alnifolia* leaves in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  <0.05; \*\* $p$  <0.01

(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성

Melanogenesis 억제 효과가 있는 *n*-BuOH 분획물에 대한 미백 메커니즘을 한층 확인하기 위해서 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, *n*-BuOH 분획물은 농도 의존적으로 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 확인되었다(Figure 135).

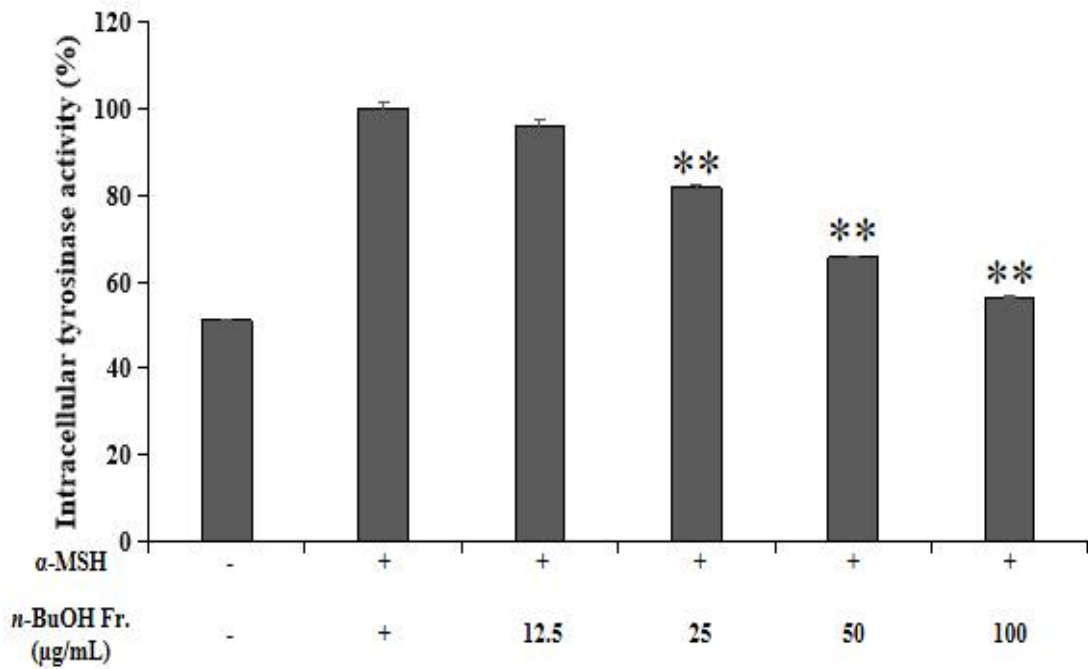


Figure 135. Intracellular tyrosinase inhibitory activity of *n*-BuOH fractions of *S. alnifolia* leaves in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\*  $p < 0.01$

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항산화

#### (1) DPPH radical 소거 활성

팔배나무 잎으로부터 분리된 4개 flavonol 배당체 화합물인 compound 9, 10, 11, 12에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 화합물들은 15.6–500  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대해  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다.

실험 결과, compound 9, 10, 11, 12에서  $\text{SC}_{50}$  값이 각각 256.4, 372.8, 304.3, 310.7  $\mu\text{M}$ 로 양성 대조군 BHT ( $\text{SC}_{50}$  443.7  $\mu\text{M}$ )에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 136, Table 61).

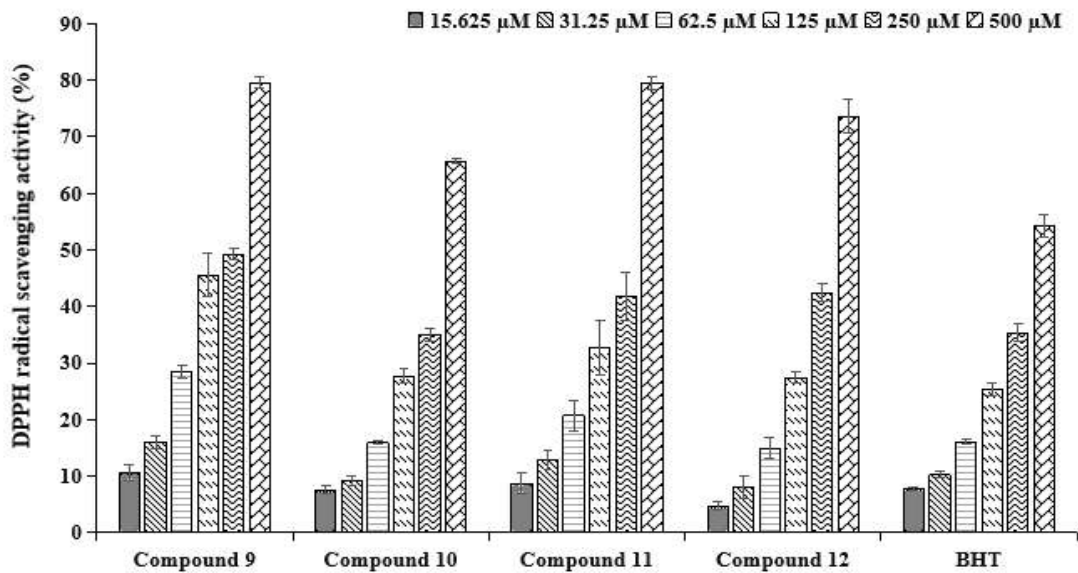


Figure 136. DPPH radical scavenging activities of compounds 9–12 from *S. alnifolia* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 61.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities for compounds 9–12 from *S. alnifolia* leaves.

	Compound 9	Compound 10	Compound 11	Compound 12	BHT
$\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	256.4	372.8	304.3	310.7	443.7



(2) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정

팔배나무 잎으로부터 분리된 4개 flavonol 배당체 화합물인 compound 9, 10, 11, 12에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 화합물들은 15.6–250 μM의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, compound 9, 10, 11, 12에서 SC<sub>50</sub> 값이 각각 96.8, 190.5, 141.0, 109.7 μM로 좋은 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다(Figure 137, Table 62).

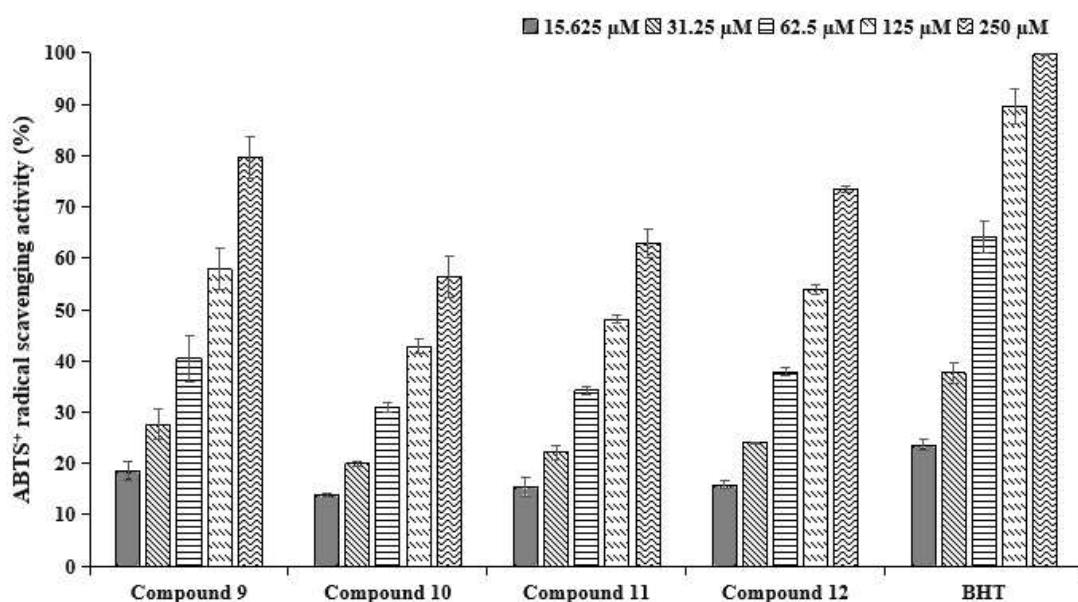


Figure 137. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of compounds 9–12 from *S. alnifolia* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 62. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities for compounds 9–12 from *S. alnifolia* leaves.

	Compound 9	Compound 10	Compound 11	Compound 12	BHT
SC <sub>50</sub> (μM)	96.8	190.5	141.0	109.7	45.8

### (3) 세포 보호 효과

#### ① 세포 독성 평가 (MTT assay)

HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소( $H_2O_2$ )로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 측정하였다. 우선, 실험에 사용될 시료의 세포 독성을 측정하기 위해 HaCaT 세포에 대한 팔배나무 잎으로부터 분리된 화합물 9, 10, 11, 12의 세포 독성을 평가하였다. 그 결과, 화합물 9, 10, 11, 12는 25, 50, 100  $\mu M$ 의 농도에서 compound 9가 세포 독성을 나타내었으나 compound 10, 11, 12는 세포 생존율이 모두 90% 이상으로 나타났다(Figure 138). 따라서 화합물 9를 제외하고 본 실험에서 사용될 시료의 농도는 세포 독성을 나타내지 않은 농도인 25, 50, 100  $\mu M$ 로 실행하였다.

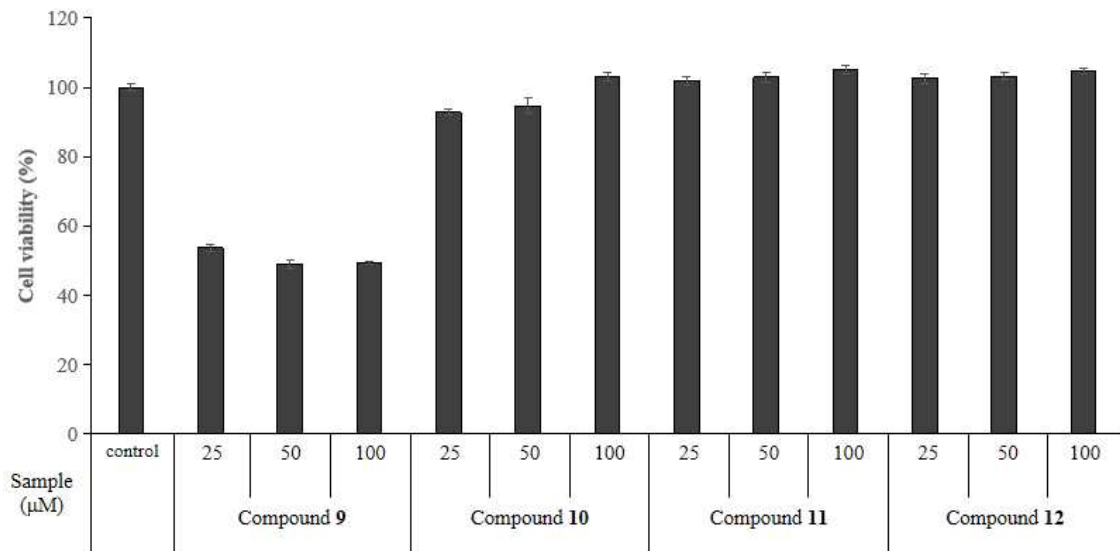
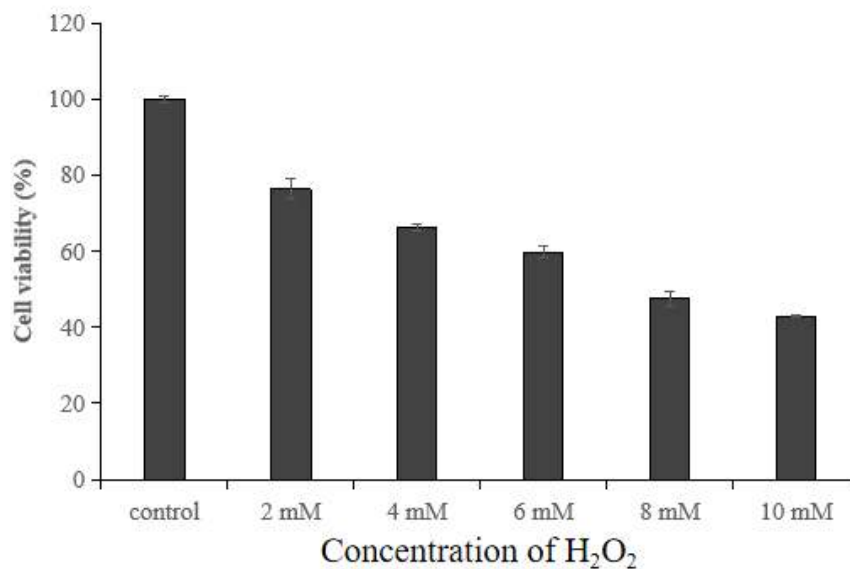


Figure 138. Cell viability of isolated compounds 9-12 from *S. alnifolia* leaves in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

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

과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 앞서, 실험에 사용될 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 정하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 따라 HaCaT cell의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 6 mM의 농도로 처리했을 때 세포 생존율이 59.8%로 확인하였으며, 본 실험에서는 6 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 다음, compound 10, 11, 12는 25, 50, 100 µM의 농도로 손상된 세포에 실험을 실행하였다. 그 결과, compound 10은 25, 50, 100 µM의 농도에서 각각 65.2, 71.2, 84.9%의 세포 생존율이 확인되었으며, compound 10은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 5.4, 11.4, 25.1%의 세포 보호 효과를 확인하였다. 다음 compound 11은 25, 50, 100 µM의 농도에서 각각 66.6, 80.4, 92.9%의 세포 생존율이 확인되었으며, compound 11은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 6.8, 20.6, 33.1%의 세포 보호 효과를 확인하였다. 또한 compound 12는 25, 50, 100 µM의 농도에서 각각 71.4, 79.6, 88.4%의 세포 생존율이 확인되었으며, compound 12는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 11.6, 19.8, 28.6%의 세포 보호 효과를 확인하였다(Figure 139).

(A)



(B)

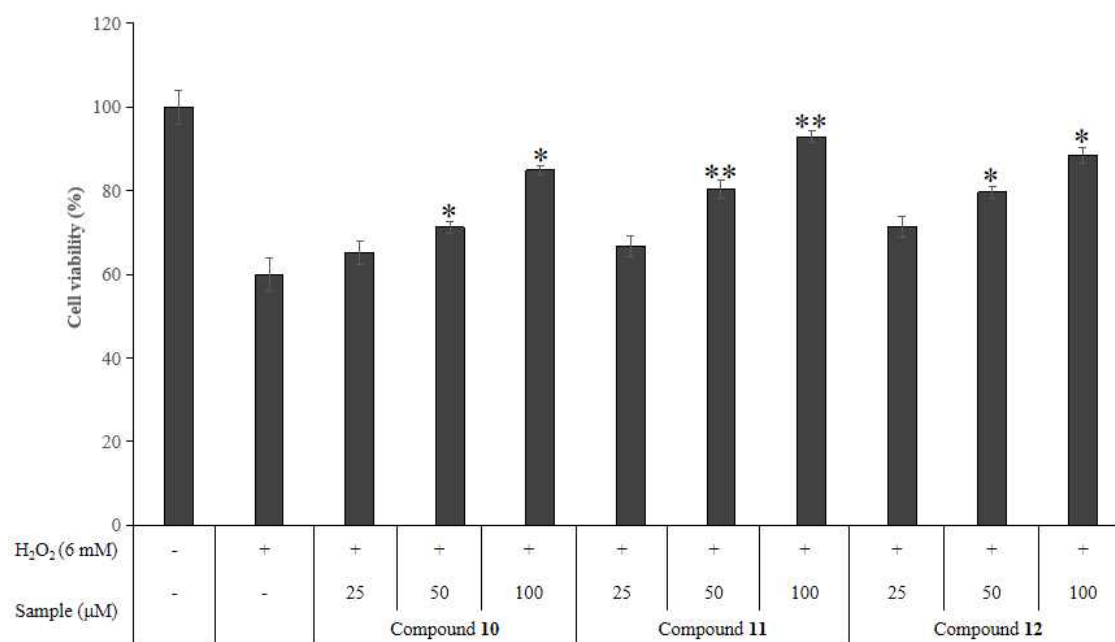


Figure 139. (A) Cell viability on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cells. (B) Cell protective effects of isolated compounds 10-12 from *S. alnifolia* leaves on HaCaT cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24h 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

마우스 대식세포(RAW 264.7)를 이용하여 팔배나무 잎으로부터 분리된 4개 flavonoid glycoside compounds의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성과 세포 독성을 측정하였다. 각각의 화합물은 25-200  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, compound 9, 10, 11, 12는 모두 세포 독성 없이 농도 의존적으로 우수한 NO 생성 억제 활성을 보였고,  $\text{IC}_{50}$  값은 각각 137.8, 117.4, 186.3, 128.3로 확인되었다(Figure 140, Table 63). 이 중 compound 9 및 10은 문헌<sup>126</sup>에 의해 항염 활성이 이미 보고되어 있으니 compound 11, 12를 가지고 추가적인 항염 기전에 관한 실험을 진행하였다.

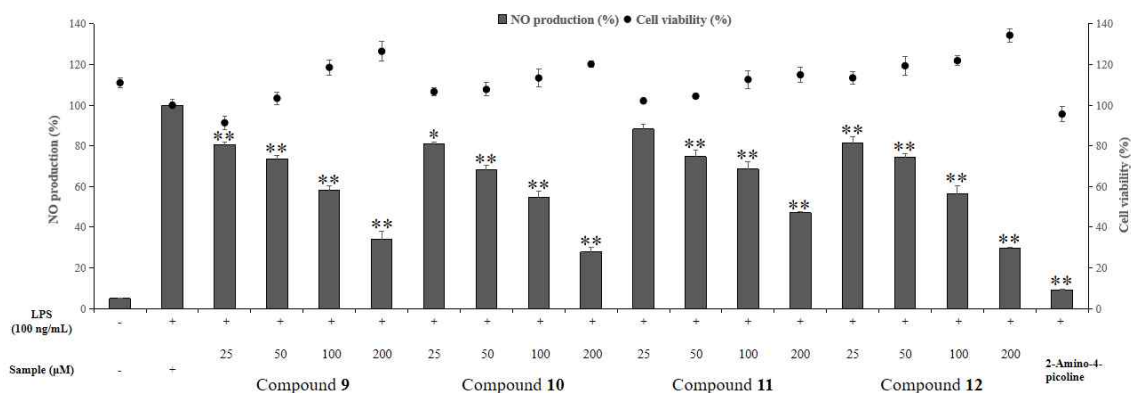


Figure 140. Effects of isolated compound 9, 10, 11, 12 from *S. alnifolia* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.01$

Table 63.  $\text{IC}_{50}$  values of NO production inhibitory activity of isolated compounds 9-12.

	Compound 9	Compound 10	Compound 11	Compound 12
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	137.8	117.4	186.3	128.3

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

Compound 11 및 12의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 전염증성 cytokine 및 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. 그 결과, compound 11은 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다 (Figure 141). 또한, compound 12는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 142).

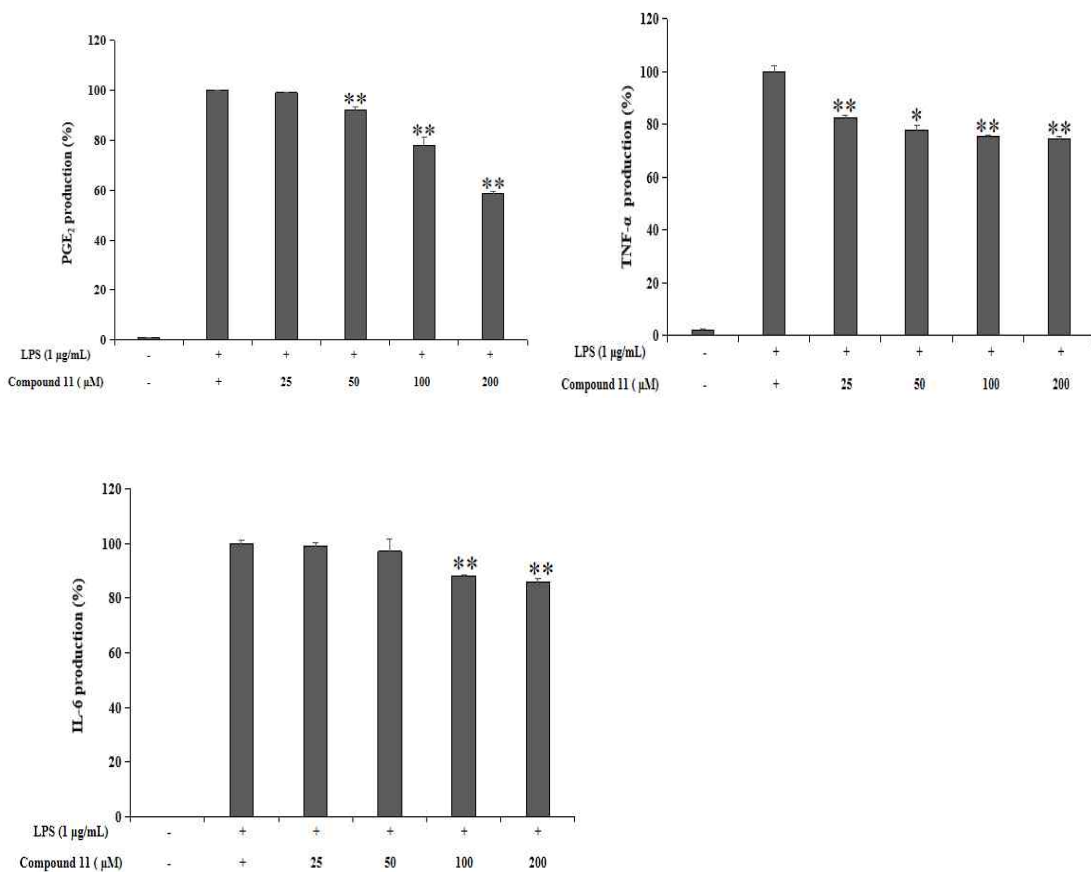


Figure 141. Effects of isolated compound 11 from *S. alnifolia* leaves on PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p$  < 0.05; \*\*  $p$  < 0.01

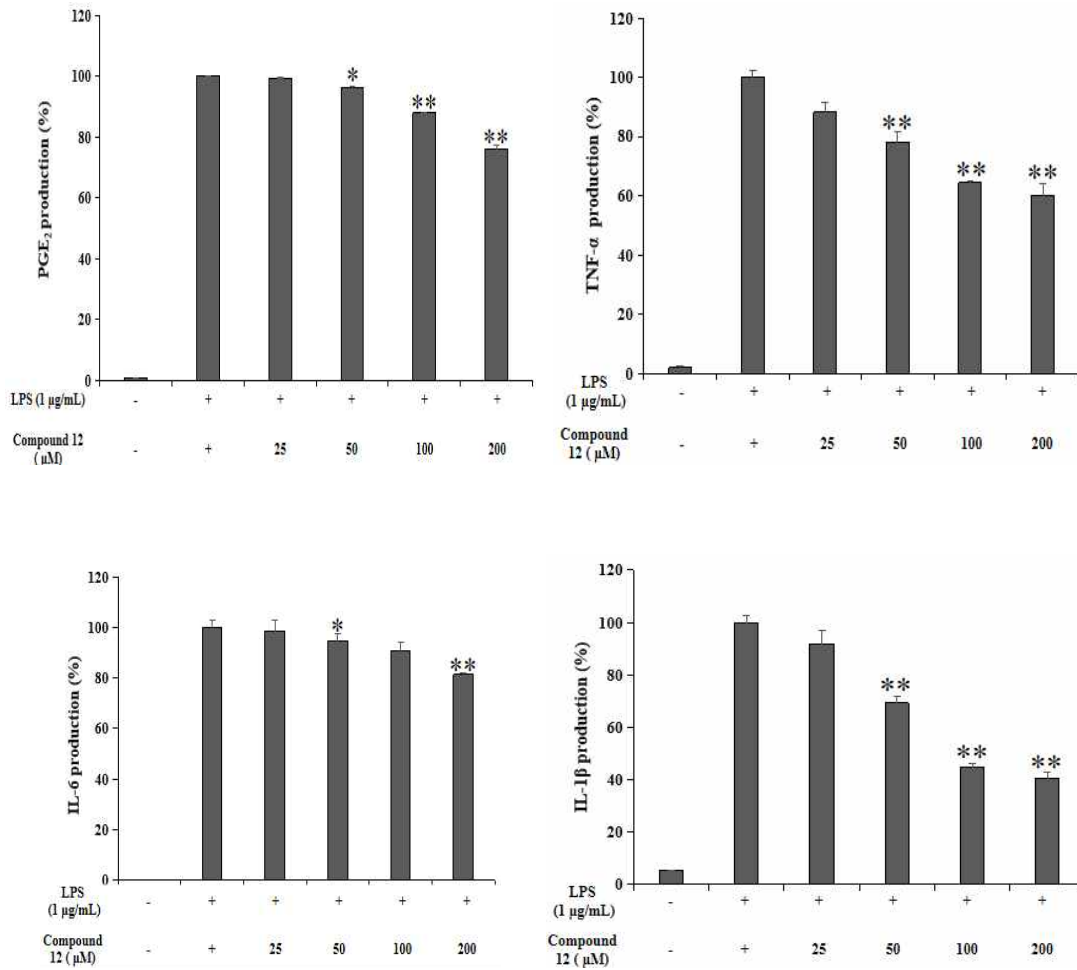


Figure 142. Effects of isolated compound **12** from *S. alnifolia* leaves on PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-6, IL-1β production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

## 6. 요약 및 결론

본 연구는 팔배나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 용매 분획물이 연구 대상으로 다양한 생리 활성을 확인하고 함유된 식물화학 성분 분리를 하기 위해서 연구를 진행하여 약품, 기능성 화장품 및 식품 등 분야에 관련된 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

팔배나무 잎 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 및 EtOAc 분획물은 우선 VLC를 이용할 다음에 silica gel이나 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리된 단일 화합물은 1D, 2D NMR 및 HR-ESI-MS를 이용하여 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 대비하여 총 12개의 화합물을 동정하였다.

분리된 화합물은 ursolic acid (1), oleanolic acid (2),  $\alpha$ -amyrin (3), corosolic acid (4), (*E*)-phytol (5),  $\alpha$ -linolenic acid (6),  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester (7), 1-linolenoyl glycerol (8), afzelin (9), kaempferitrin (10), kaempferol 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (11), kaempferol 3-*O*-[deoxy-*ribo*-hexos-3-ulosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (12)로 확인을 되었으며, compound 12는 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

팔배나무 잎의 항산화 실험 결과, *n*-BuOH, EtOAc 분획물의 총 폴리페놀 함량이 각각 121.3, 109.2 mg/g GAE로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량이 각각 44.7, 35.2 mg/g QE로 나타났다. 또한, DPPH radical 소거 활성 실험에서 EtOAc, *n*-BuOH 분획물은 대조군인 BHT와 유사한 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 또한, HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 그 결과, 팔배나무 잎의 추출물은 40  $\mu$ g/mL에서 세포독성 없이 17.5% 세포 보호 효과를 확인하였으며, EtOAc 분획물은 20  $\mu$ g/mL에서 세포독성 없이 21.1% 세포 보호 효과를 확인하였다. 한편, 팔배나무 잎으로부터 분리된 4 개 플라보노이드 배당체인 화합물인 compound 9, 10, 11, 12는 DPPH radical에 대한 SC<sub>50</sub> 값이 각각 256.4, 372.8, 304.3,



310.7  $\mu\text{M}$ 로 양성대조군 BHT (443.7  $\mu\text{M}$ )보다 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다. 또한, HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인한 결과, compound 10, 11, 12는 100  $\mu\text{M}$ 에서 세포독성 없이 각각 25.1%, 33.1%, 28.6% 세포 보호 효과를 확인하였다.

항균 활성을 평가하기 위하여 여드름 질환에 관련된 피부 상재균에 속한 표피포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 그리고 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 사용하여 한천 확산법 (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, 팔배나무 잎의 추출물 및 용매 분획물은 *S. epidermidis*에 경우 EtOAc, *n*-BuOH 분획물, 추출물 차례로 항균 활성을 나타냈으며, MIC 값이 각각 625, 1250-2500, 2500  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인하였으며, EtOAc 분획물의 MBC 값이 10000  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인하였다. 또한, *C. acnes*에 경우는 *n*-Hex, EtOAc, 추출물 차례로 항균 활성을 나타냈으며, MIC 값이 각각 1250, 1250-2500, 10000  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인하였다. Compound 1, 2는 문헌<sup>1</sup>을 통하여 우수한 항균 효능이 있음을 알려져 있다.

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 팔배나무 잎의 항염 활성 실험을 진행한 결과, *n*-Hex, EtOAc 분획물이 100  $\mu\text{g/mL}$  이하의 농도에서 세포독성 없이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 66.0, 82.3  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인하였다. 팔배나무 잎으로부터 분리된 4 개 플라보노이드 배당체인 화합물인 compound 9, 10, 11, 12는 200  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 137.8, 117.4, 186.3, 128.3  $\mu\text{M}$ 로 확인하였다. 이 중 compound 11에 대하여 전 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6 그리고 PGE<sub>2</sub>에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였으며, 신규 화합물인 compound 12에 대하여 전 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  그리고 PGE<sub>2</sub>에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다.

팔배나무 잎의 미백 활성 측정을 위하여 B16F10 melanoma cell을 이용하여 melanin 생성량과 세포 독성을 측정하였다. 실험 결과, *n*-BuOH 분획물이 100

µg/mL 농도 이하에서 세포독성 없이 효과적인 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내었으며, 세포내 tyrosinase에 대한 농도 의존적으로 억제시킨 것을 확인하였다. 한편, 팔배나무 잎으로부터 분리된 화합물인 compound 6, 7은 문헌<sup>127,128</sup>을 통하여 melanin 생성 억제 효능이 있음이 알려져 있다.

이상의 연구를 바탕으로 팔배나무 잎 추출물을 이용하여 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성을 갖는 의약품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 사료된다.

## VI. 연구 4 : 팔배나무 가지 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성 성분 연구

### 1. 재료

팔배나무 (*Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch) 가지는 햇가지이면 붉은 자줏빛 도는 갈색을 띠며 윤이 나고 묵으면 회갈색이 된다. 흰 갈색의 껍질눈이 항상 있다.

실험에 사용한 팔배나무 가지 (시료번호 : 502)는 서귀포시 광평리 2022년 6월에 채집하고 제주생물자원(株)로부터 구입하였다. 팔배나무 가지는 건조 후 분쇄하여 사용하였다. (Figure 143).



Figure 143. Pictures of *Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch branches.

## 2. 팔배나무 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

### 1) 시료의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄한 팔배나무 가지 0.82 kg을 70% (v/v) EtOH 16.4 L에 넣은 뒤 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출을 진행하였다. 추출한 시료를 감압 여과 장치와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과한 다음 남은 잔여물을 같은 방법으로 추출 및 여과를 1회 더 반복하였다. 얻은 여액은 37 °C의 수욕 상태에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 70.7 g을 얻었다. 얻은 70% EtOH 추출물 56.2 g을 증류수에 현탁시킨 뒤 분액 깔때기를 이용하여 용매 낮은 극성 순서부터 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (4.8 g), ethyl acetate (10.7 g), *n*-butanol (16.2 g) 및 water (24.0 g) 분획물을 얻었다(Figure 144).

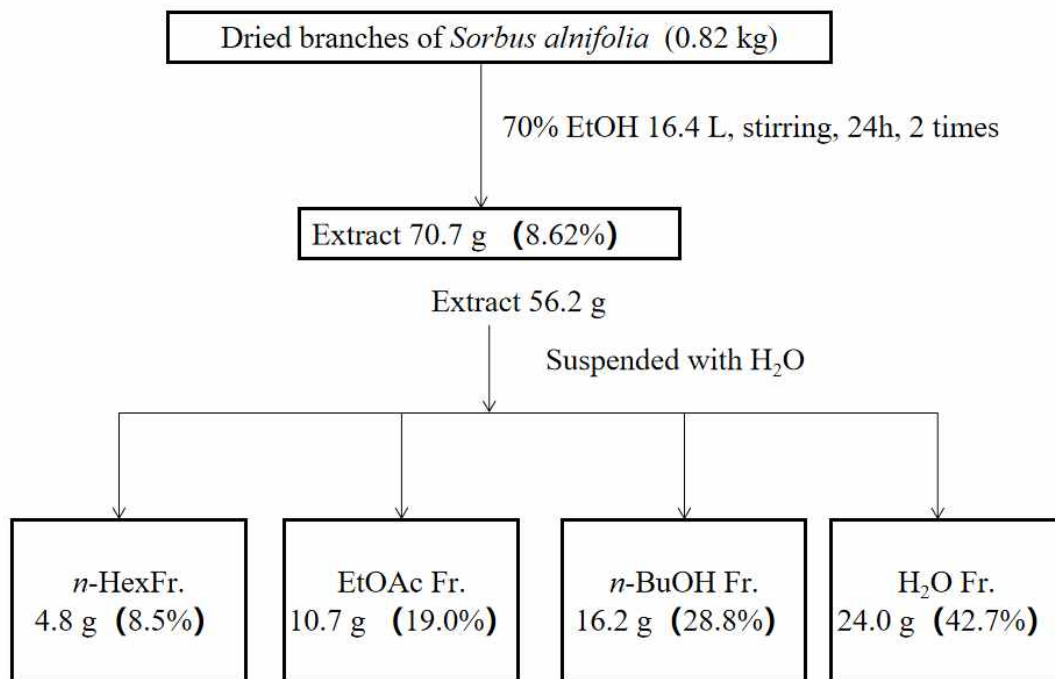


Figure 144. Extraction and solvent fractionation of *S. alnifolia* branches.

## 2) Ethyl acetate 분획물로부터 활성 성분 분리

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성 별로 나누기 위하여 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (0-50%)이 될 때 까지 높였으며 그 후 100% MeOH을 각각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-32).

VLC fraction들 중 Fr. V 6,7 (52.5 mg)을 *n*-Hexene:EtOAc (10:1)의 용매조건으로 Silica gel column chromatography를 수행하여 compound 1 (12.6 mg)을 얻었다.

Fr. V11 (76.0 mg)은 TLC를 통해서 단일 점을 나타내기 때문에 compound 2를 얻었다.

Fr. V12 (123.7 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (30:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound 3 (18.4 mg)을 얻었다.

Fr. V15~16 (120.7 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (25:1)의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound 4 (12.6 mg)를 얻었다.

Fr. V8 (32.7 mg)은 TLC를 통해서 단일 점을 나타내기 때문에 compound 5를 얻었다.

Fr. V18 (240.7 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 7 (45.9 mg)을 얻었으며, Fr. V20 (320.3 mg)를 TLC에 찍어 보면 단일 점을 나타내기 때문에을 NMR를 통해서 상기 같은 구조 compound 7으로 얻었다. 또한 Fr. V25 (520.4 mg)를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5:2)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 7 (23.4 mg)과 compound 8 (9.2 mg)을 분리하였다.

Fr. V26 (307.2 mg)를 우선 MeOH로 결정하였다가 compound 6 (9.8 mg)을 얻은 다음에, 나머지 부분은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (4:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 8 (15.2 mg)을 얻었다.

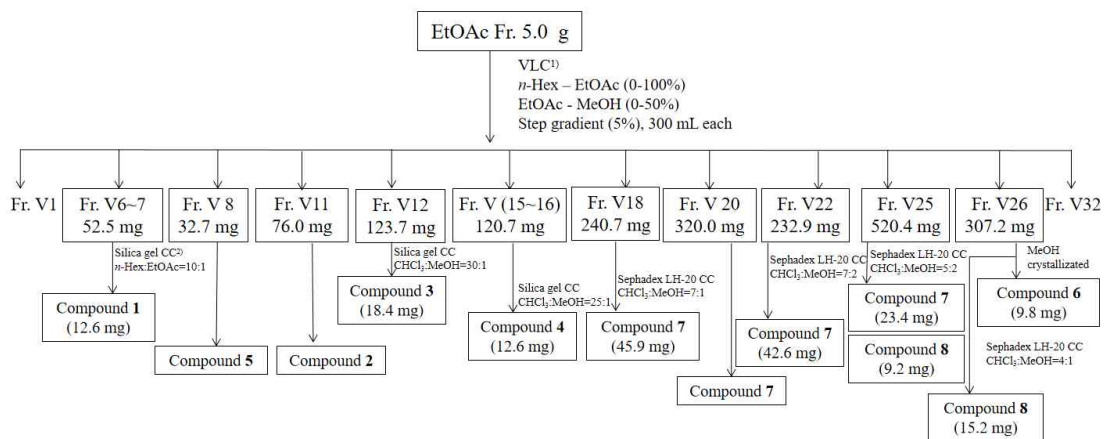


Figure 145. Isolation of compounds from ethyl acetate fraction of *S. alnifolia* branches.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2, 3, 4의 구조 동정

Compound 1은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  0.77 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.85 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.95 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.00 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.11 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (3H, s)의 signal들을 통하여 총 8개의 methyl proton을 가지고 있으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.16 (1H, t,  $J = 3.7$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며, 이상 data를 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.18 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.5$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C-NMR}$  데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  145.4, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  121.9) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  79.2 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>60</sup>과 비교하여 compound 1은  $\beta$ -amyrin으로 동정하였다.

Compound 2는  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 30개의 카본 피크가 관찰되고,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  1.27 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.25 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.08 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.04 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.91 (3H, s)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal을 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.48 (1H, dd,  $J = 15.6, 6.4$  Hz)의 signal은  $^{13}\text{C-NMR}$  데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  180.5의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였으며, 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  139.8, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  126.2) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  78.6등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>51</sup>과 비교하여 compound 2는 ursolic acid

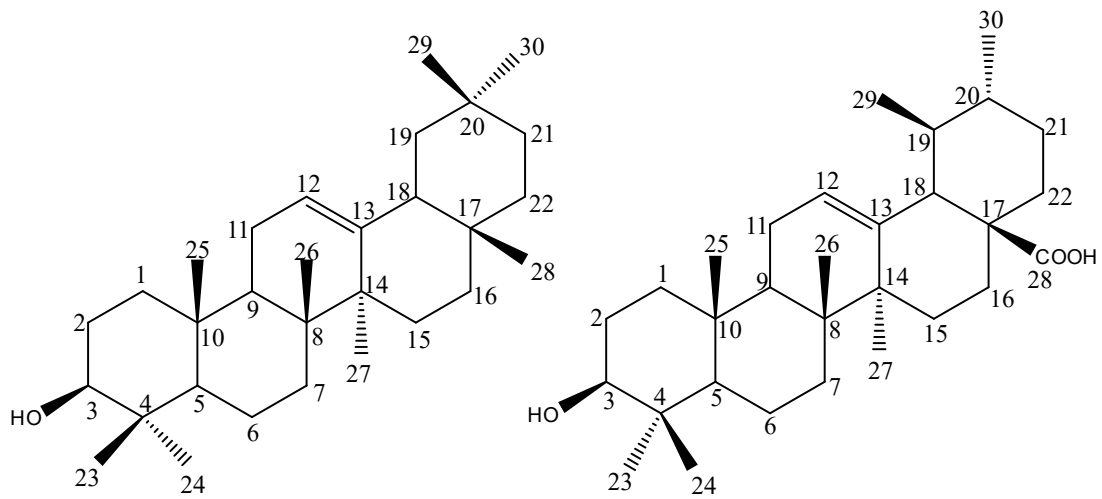
(3 $\beta$ -hydroxyurs-12-en-28-oic acid)로 동정하였다.

Compound **3**은  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 1.76 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.47 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.34 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.15 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.06 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.90 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.90 (3H, s)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.59 (1H, t,  $J = 3.2$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.23 (1H, s)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  211.8의 signal은 carbonyl group으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  181.3의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였다. 다음에 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  140.6, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  127.9) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  84.0하고 quaternary carbon인 73.2 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>129</sup>과 비교하여 compound **3**은 2-oxopomolic acid로 동정하였다.

Compound **4**는  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 데이터에 대비해 보고 compound **3**과 비슷한 구조로 생각하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 1.66 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.43 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.28 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.13 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.13 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1.00 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.92 (3H, s)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 7개의 methyl proton을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.60 (1H, t-like)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.32 (1H, m)와  $\delta_{\text{H}}$  3.78 (1H, d,  $J = 2.75$  Hz)의 signal들은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.

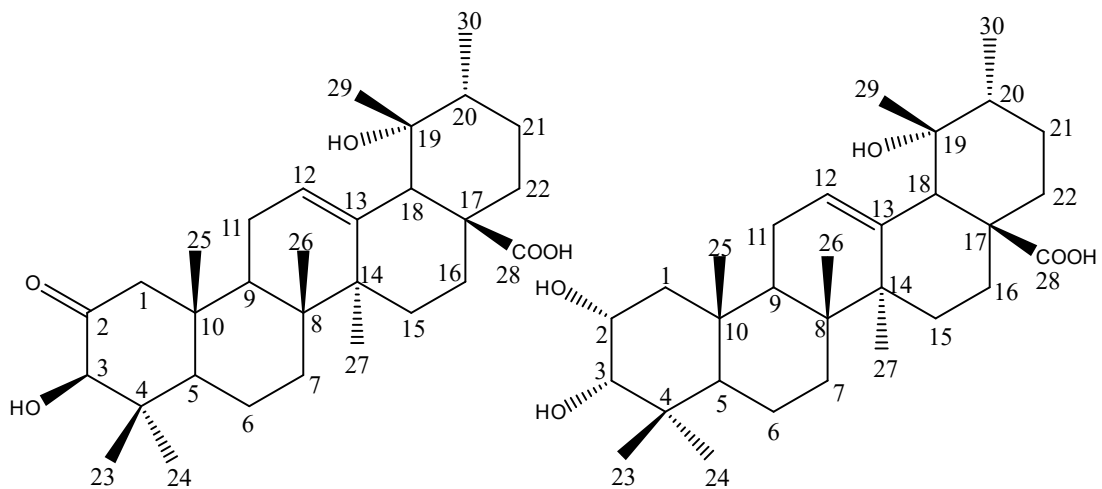
$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  181.2의 signal은 carboxyl group인 carbon으로 예상하였다. 다음에 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  140.4, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  128.4) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  79.8과  $\delta_{\text{C}}$  66.6하고 quaternary carbon인 73.1 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>130</sup>과 비교하여 compound **4**는 euscaphic acid로 동정하였다.





Compound 1

Compound 2



Compound 3

Compound 4

Figure 146. Chemical structure of compounds 1, 2, 3 and 4

Table 64. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **1**, **2**, **3** and **4** (400 and 100 MHz, in pyridine-*d*<sub>5</sub> or CDCl<sub>3</sub>)

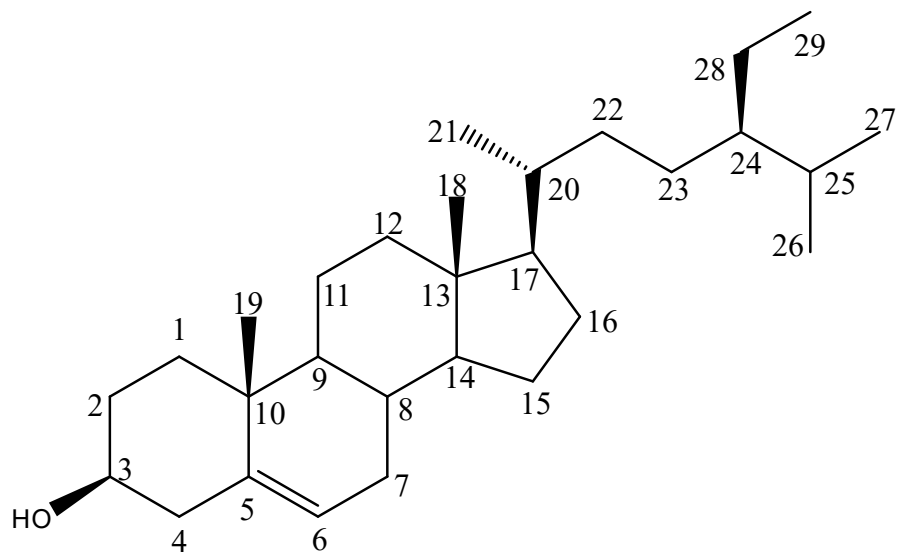
No.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>		Compound <b>3</b>		Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		38.8		39.6	2.50 (1H, d, 12.4)	54.3	2.50 (1H, d, 12.4)	42.8
2		27.4		28.6		211.8	4.32 (1H, m)	66.6
3	3.18 (1H, dd, 11.2, 5.5)	79.2	3.48 (1H, dd, 15.6, 6.4)	78.6	4.23 (1H, s)	84.0	3.78 (1H, d, 2.8)	79.8
4		40.0		40.0		46.4		39.3
5		55.4		56.3		55.4		49.2
6		18.6		19.3		19.7		19.1
7		32.7		34.1		33.7		34.0
8		41.9		40.5		41.2		41.0
9		47.8		48.6		47.9		48.1
10		37.2		38.0		44.2		39.1
11		23.9		24.1		25.1		24.5
12	5.16 (1H, t, 3.7)	121.9	5.52 (1H, t, 3.4)	126.2	5.59 (1H, t, 3.2)	127.9	5.60 (1H, t-like)	128.4
13		145.4		139.8		140.6		140.4
14		42.5		43.0		42.8		43.3
15		27.1		29.2		29.9		29.9
16		26.4		25.4		26.9		26.8
17		32.8		48.6		48.8		48.7
18		47.4	2.66 (1H, d, 11.4)	54.0	3.17 (1H, s)	55.1	3.06 (1H, s)	55.0
19		47.0		39.9		73.2		73.1
20		31.3		39.9		42.9		42.6
21		34.9		31.6		27.6		27.4
22		37.3		37.8		39.0		39.0
23	0.85 (3H, s)	28.3	1.25 (3H, s)	29.3	1.34 (3H, s)	30.0	1.28 (3H, s)	30.5
24	0.77 (3H, s)	15.8	1.05 (3H, s)	17.1	0.90 (3H, s)	17.4	0.92 (3H, s)	22.7
25	1.00 (3H, s)	15.7	0.91 (3H, s)	16.2	1.06 (3H, s)	16.9	1.00 (3H, s)	17.1
26	1.11 (3H, s)	17.0	1.08 (3H, s)	18.0	0.90 (3H, s)	17.9	1.13 (3H, s)	17.7
27	1.23 (3H, s)	26.2	1.27 (3H, s)	24.4	1.76 (3H, s)	24.4	1.66 (3H, s)	25.1
28	1.05 (3H, s)	28.6		180.5		181.3		181.2
29	0.95 (3H, s)	33.6	1.04 (3H, d, 6.0)	18.0	1.47 (3H, s)	27.5	1.43 (3H, s)	27.5
30	0.92 (3H, s)	23.7	0.98 (3H, d, 6.0)	21.9	1.15 (3H, d, 6.9)	17.3	1.13 (3H, d, 6.4)	17.3

## 2) Compound 5, 6의 구조 동정

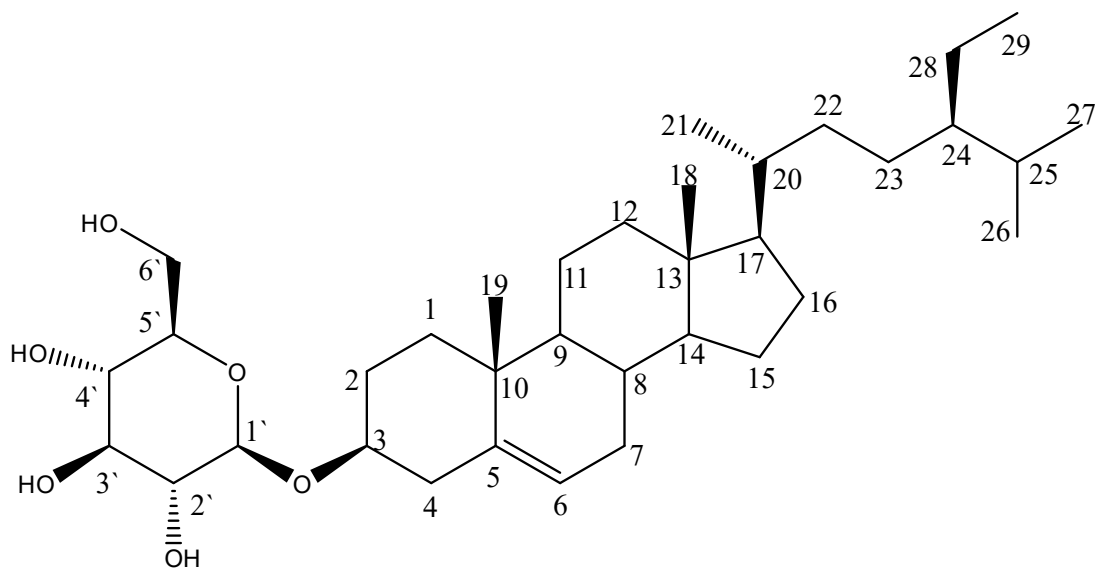
Compound 5는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 29개의 카본 피크가 관찰되며,  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  0.66 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.98 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  0.90 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.81 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.79 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  0.82 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz)의 signal들은 적분 값을 통하여 총 6개의 methyl proton을 바탕으로 sterol 계통의 화합물임을 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.33 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz)의 signal은 olefin의  $sp^2$  혼성에 관여하는 signal으로 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  3.50 (1H, m)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 한 개 olefin group (4차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  141.0, 3차 carbon  $\delta_{\text{C}}$  121.9) 및 산소가 인접한 위치의 methine carbon인  $\delta_{\text{C}}$  72.0 등 피크들을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>61</sup>과 비교하여 compound 5는  $\beta$ -sitosterol로 동정하였다.

Compound 6은  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 종합하여 compound 5와 유사한 경우를 나타내었으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.09-3.62에 분포하는 signal을 통하여 당의 구조를 가지고 있는  $\beta$ -sitosterol의 배당체이라 예상하였다. 당의 종류는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  103.0, 79.0, 78.6, 75.8, 72.2, 63.3에서 6개의 signal과  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 glycosidation shift를 생긴  $\delta_{\text{H}}$  5.09 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz)의 anomeric proton의 커플링 컨스탄트를 통하여  $\beta$ -D-glucoopyranoside임을 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>131</sup>과 비교하여 compound 6은 daucosterol (sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucoopyranoside)로 동정하였다.



Compound 5



Compound 6

Figure 147. Chemical structure of compounds 5 and 6

Table 65.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **5** and **6** (400 and 100 MHz, in  $\text{CDCl}_3$  and  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

No.	Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		37.4		37.4
2		31.9		30.5
3	3.50 (1H, m)	72.0	4.01 (1H, m)	79.1
4		42.5		39.8
5		141.0		141.4
6	5.33 (1H, d, 5.0)	121.9	5.37 (1H, d, 1.8)	122.4
7		32.1		32.5
8		32.1		30.7
9		50.3		50.8
10		36.7		36.9
11		21.3		21.8
12		40.0		40.4
13		42.5		43.0
14		57.0		57.3
15		24.5		25.0
16		28.5		29.0
17		56.2		56.7
18	0.66 (3H, s)	12.1	0.68 (3H, s)	12.5
19	0.98 (3H, s)	20.0	0.95 (3H, s)	19.7
20		36.4		34.7
21	0.90 (3H, d, 6.9)	19.0	1.00 (3H, d, 6.4)	19.5
22		34.1		32.7
23		26.2		26.8
24		46.0		46.5
25		29.3		29.9
26	0.81 (3H, d, 7.3)	19.6	0.92 (3H, d, 7.8)	20.5
27	0.79 (3H, d, 7.3)	19.2	0.90 (3H, d, 7.8)	19.9
28		23.3		23.9
29	0.82 (3H, t, 7.3)	12.2	0.88 (3H, t, 7.3)	12.6
1`			5.09 (1H, d, 7.8)	103.0
2`			3.92~4.63 (sugar H)	75.8
3`			3.92~4.63 (sugar H)	79.0
4`			3.92~4.63 (sugar H)	72.2
5`			3.92~4.63 (sugar H)	78.6
6`			3.92~4.63 (sugar H)	63.3

### 3) Compound 7의 구조 동정

Compound 7은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.97 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.80 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.76 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *ortho*-, *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였으며,  $\delta_{\text{H}}$  5.94 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.92 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz)의 signal은 coupling constant를 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring 구조를 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  4.82 (1H, s)와  $\delta_{\text{H}}$  4.18 (1H, m)의 signal는 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 15개의 carbon peak가 관찰되었으며,  $^1\text{H-NMR}$  data를 종합하여 flavan-3-ol 구조가 있을 것이라 예상할 수 있다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>132</sup>과 비교하여 compound 7은 *epi*-catechin으로 동정하였다.

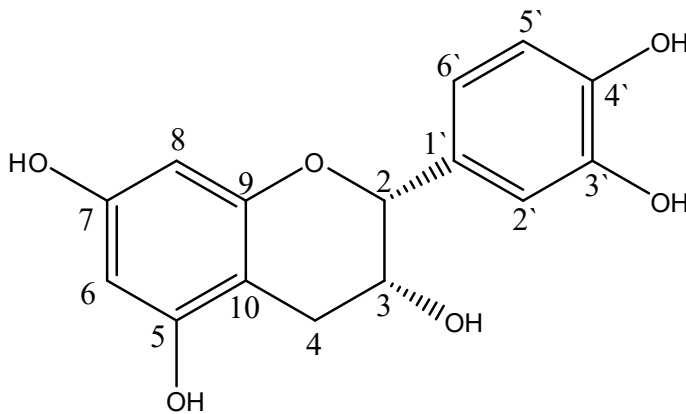


Figure 148. Chemical structure of compound 7

Table 66.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **7** (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.82 (1H, s)	80.0
3	4.18 (1H, m)	67.6
4	2.86 (1H, dd, 16.5, 4.6)	29.4
	2.74 (1H, dd, 16.5, 2.8)	
5		158.1
6	5.94 (1H, d, 2.3)	96.5
7		157.8
8	5.92 (1H, d, 2.3)	96.0
9		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

#### 4) Compound 8의 구조 동정

Compound 8은  $\delta_H$  7.58–7.60 (2H, m),  $\delta_H$  7.45–7.47 (3H, m)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 종합하여  $\delta_C$  135.0, 131.2, 130.3, 129.1의 피크를 통하여 대칭하는 aromatic ring 구조를 예상하였으며,  $\delta_C$  102.1, 78.5, 78.0, 74.9, 71.6, 62.9에서 6개의 signal과  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 glycosidation shift  $\delta_H$  4.24 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz)의 anomeric proton의 커플링 컨스탄트를 통하여  $\beta$ -form의 glucopyranoside가 한 개 연결되어 있음을 예상하였다. 또한  $\delta_H$  5.92 (1H, s)의 signal은  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며  $sp^3$  혼성에 관여하는 proton으로 예상하였다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌<sup>133</sup>과 비교하여 compound 8은 prunasin으로 동정하였다.

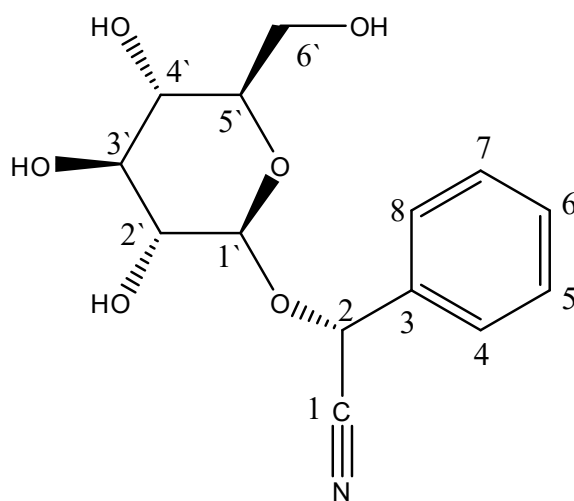


Figure 149. Chemical structure of compound 8



Table 67.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **8** (400 and 100 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>8</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		119.6
2	5.92 (1H, s)	68.5
3		135.0
4	7.58–7.60 (1H, overlapped)	130.3
5	7.45–7.47 (1H, overlapped)	129.1
6	7.45–7.47 (1H, overlapped)	131.2
7	7.45–7.47 (1H, overlapped)	129.1
8	7.58–7.60 (1H, overlapped)	130.3
1'	4.24 (1H, d, 7.3)	102.1
2'	3.20–3.35 (1H, overlapped)	74.9
3'	3.20–3.35 (1H, overlapped)	78.0
4'	3.20–3.35 (1H, overlapped)	71.6
5'	3.20–3.35 (1H, overlapped)	78.5
6'	3.92 (1H, dd, 11.9, 2.3)	62.9
	3.70 (1H, dd, 11.9, 6.0)	

#### 4. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항산화

###### (1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 gallic acid 검정곡선을 이용하여 팔배나무 가지 추출물 및 분획물에 함유되어 있는 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 측정된 값은 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, *n*-BuOH 및 EtOAc 분획물에서  $241.06 \pm 1.10$ ,  $222.87 \pm 2.43$  mg/g GAE로 다른 분획물들에 비해 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 150).

###### (2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드는 quercetin을 표준물질로 한 표준검정곡선을 이용하여 추출물 및 분획물에 함유되어 있는 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 측정된 값은 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물에서  $75.33 \pm 2.02$  mg/g QE로 추출물 및 다른 분획물들에 비해 가장 많은 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 151).

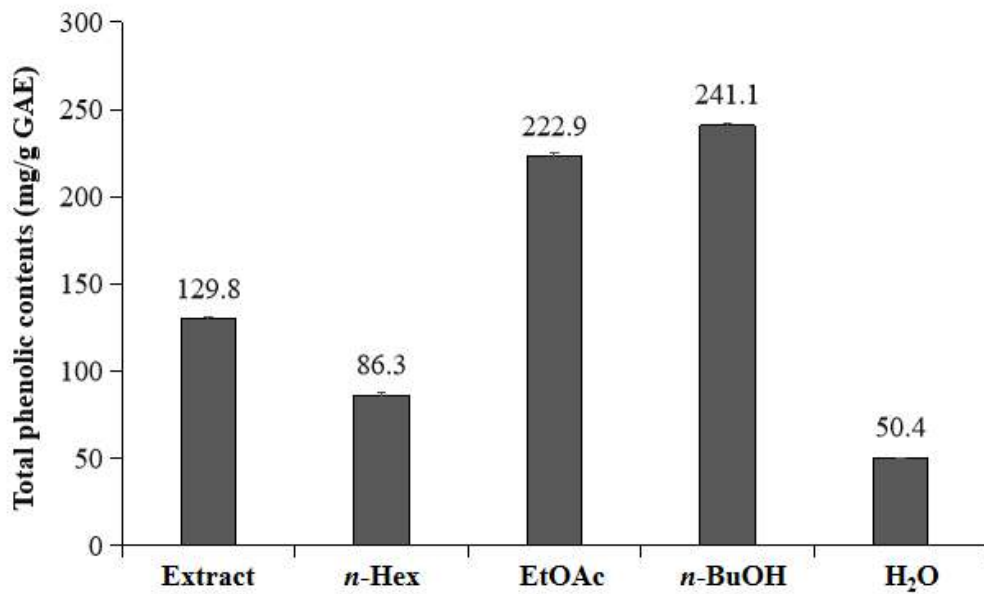


Figure 150. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

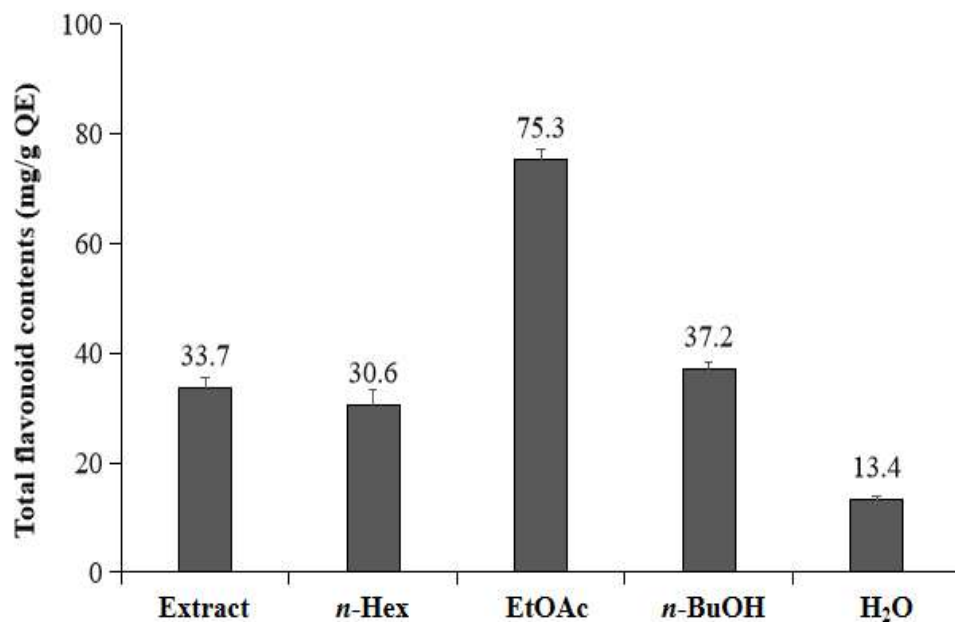


Figure 151. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

팔배나무 가지의 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 25-400 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 66.0, 72.5 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 152, Table 68).

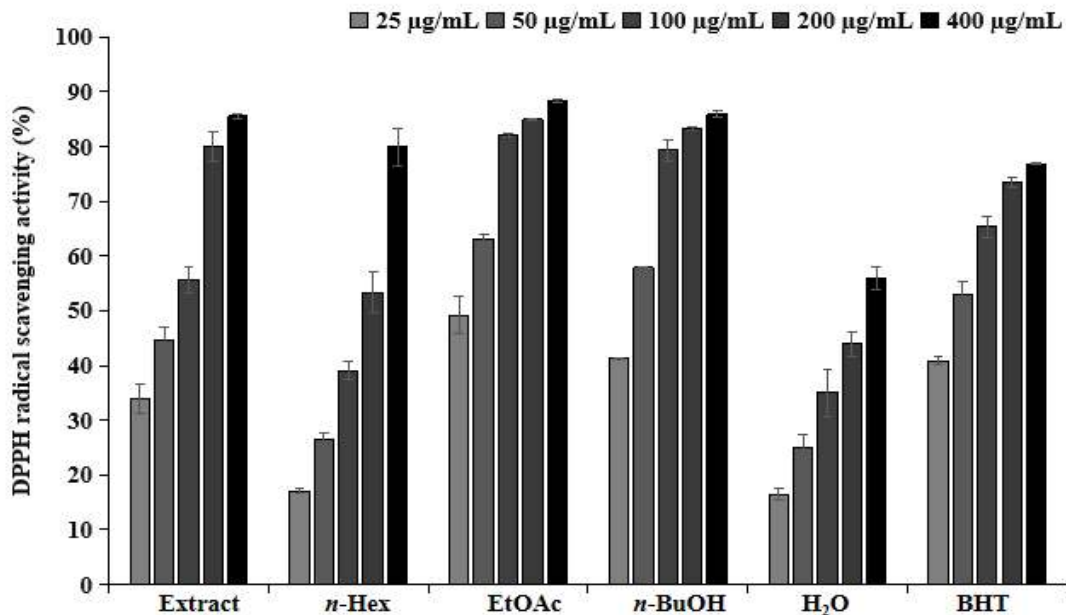


Figure 152. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from *S. alnifolia* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 68. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	74.0	178.5	26.4	38.1	300.6	44.0

(4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

팔배나무 가지의 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 6.25–200 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대한 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

실험 결과, *n*-BuOH, EtOAc 분획물과 추출물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 33.9, 64.9, 77.2 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 나타났다(Figure 153, Table 69).

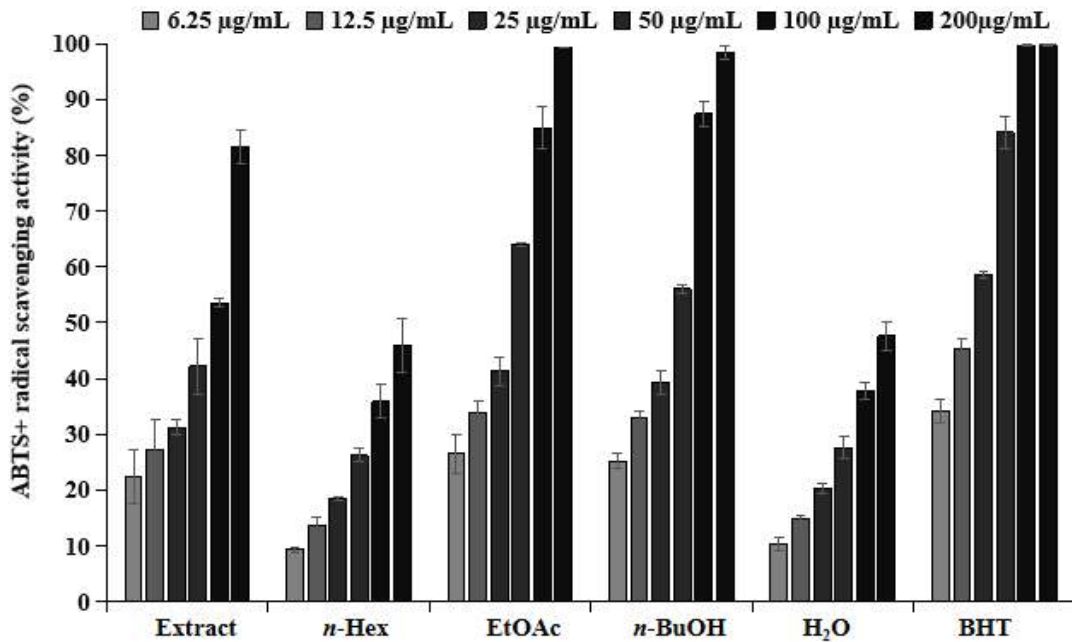


Figure 153. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent layers from *S. alnifolia* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 69. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	82.3	>200	34.5	40.9	>200	17.0

(5) 세포 보호 효과

① 세포 독성 평가 (MTT assay)

HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 측정하였다. 우선, 실험에 시용될 시료의 세포 독성을 측정하기 위해 HaCaT 세포에 대한 추출물 및 용매 분획물의 세포 독성을 평가하였다. 그 결과, 팔배나무 가지 추출물과 각 용매 분획물은 5, 10 µg/mL의 농도에서 세포 생존율이 모두 90% 이상으로 나타났다(Figure 154). 따라서 본 실험에서 사용될 시료의 농도는 세포 독성을 나타내지 않은 농도인 5, 10 µg/mL로 실행하였다.

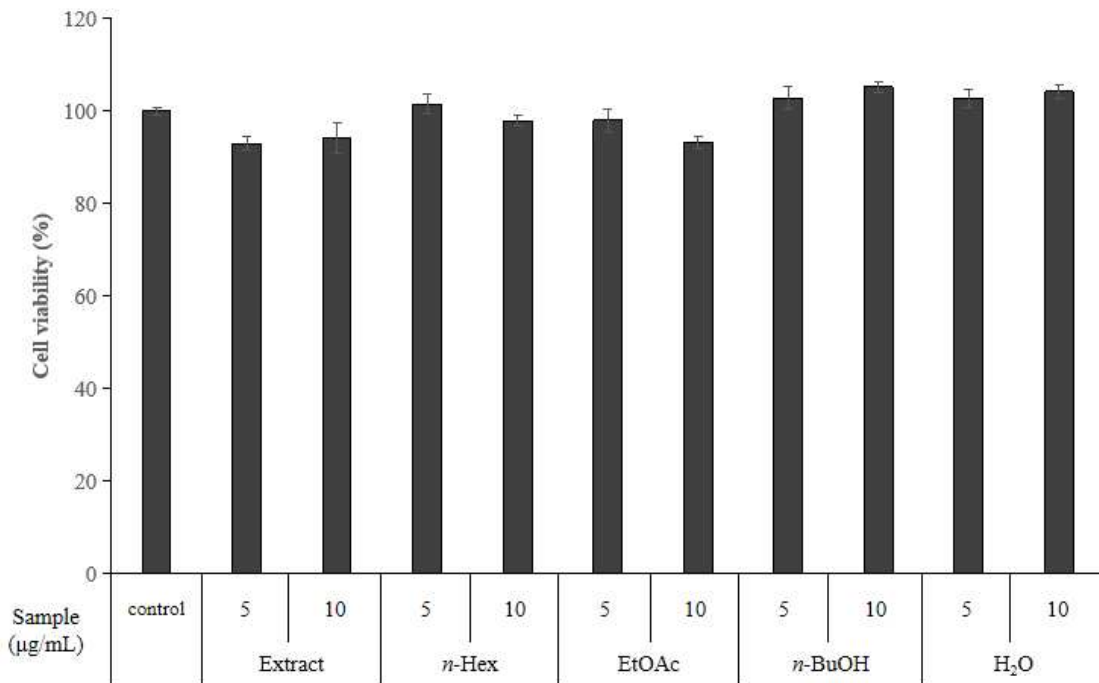
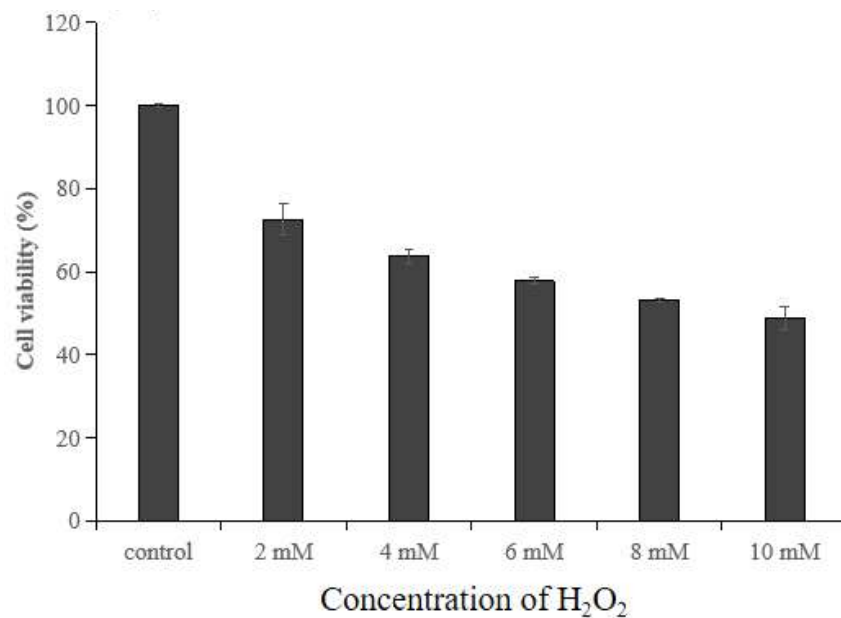


Figure 154. Cell viability of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

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

과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 앞서, 실험에 사용될 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 정하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 따라 HaCaT cell의 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 6 mM의 농도 하 세포 생존율이 57.8%로 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 6 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 다음 팔배나무 가지 추출물 및 각 용매 분획물은 5, 10 µg/mL의 농도로 손상된 세포에 실험을 실행하였다. 그 결과, 팔배나무 가지의 EtOAc 분획물은 5, 10 µg/mL의 농도에서 각각 65.6, 77.3%의 세포 생존율이 확인되었으며, EtOAc 분획물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 3.9, 15.6%의 세포 보호 효과를 확인하였다. 또한 팔배나무 가지의 *n*-BuOH 분획물은 5, 10 µg/mL의 농도에서 각각 66.6, 76.5%의 세포 생존율이 확인되었으며, *n*-BuOH 분획물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 4.9, 14.8%의 세포 보호 효과를 확인하였다(Figure 155).

(A)



(B)

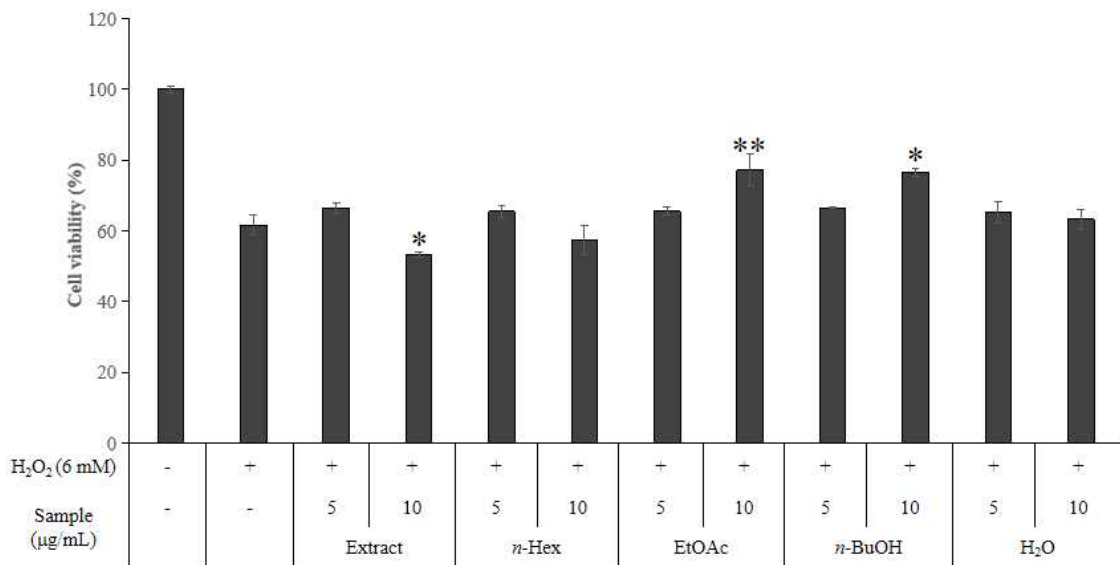


Figure 155. (A) Cell viability on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cells. (B) Cell protective effects of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches on HaCaT cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  <0.05; \*\* $p$  <0.01



## 2) 항균

### (1) Paper disc diffusion method

팔배나무 가지 추출물 및 분획물의 항균 활성을 확인하기 위하여 피부 상재균 (resident flora)인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 및 충치균인 *Streptococcus mutans* (KCCM 4015)를 사용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다.

그 결과, 팔배나무 가지의 추출물 및 분획물이 *S. epidermidis*에 대한 EtOAc 분획물이 우수한 항균 활성을 나타내었으며, *n*-BuOH, 추출물 및 *n*-Hex 분획물의 순서로 활성이 우수하게 나타났다.

또한, 팔배나무 가지의 추출물 및 이 *C. acnes*에 대하여 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외하고 우수한 항균 활성을 나타냈다.

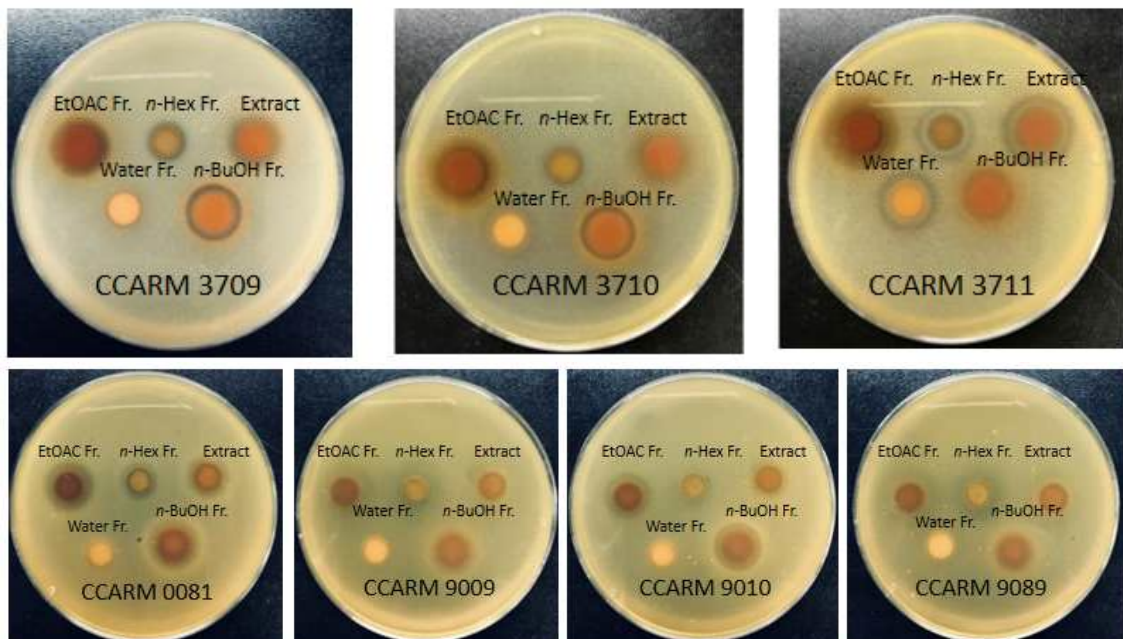


Figure 156. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches on *S. epidermidis* and *C. acnes*.

Table 70. Antibacterial activities of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches

Bacterial density ( $1.5 \times 10^6$ CFU/mL)	Clear zone (mm)		
	<i>S. epidermidis</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	12.0	9.0	9.5
<i>n</i> -Hex Fr.	9.5	9.0	9.5
EtOAc Fr.	16.0	13.5	12.0
<i>n</i> -BuOH Fr.	14.5	14.0	10.0
H <sub>2</sub> O Fr.	9	N.A.	N.A.
Positive control	30.0	N.A.	31.0

Bacterial density ( $1 \times 10^8$ CFU/mL)	Clear zone (mm)			
	<i>C. acnes</i>			
	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
Extract	13.0	10.0	12.0	10.0
<i>n</i> -Hex Fr.	11.0	8.5	9.0	9.0
EtOAc Fr.	15.0	11.0	14.0	11.0
<i>n</i> -BuOH Fr.	16.0	14.0	15.0	14.0
H <sub>2</sub> O Fr.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Positive control	64.0	N.A.	N.A.	46.0

Sample : 6 mg

Positive control (Erythromycin) : 60  $\mu$ g

Disc size : 8 mm  $\times$  1.5 mm

N.A. : No Activity

## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통해 팔배나무 가지의 항균 활성을 확인하였으며, 활성을 가지고 있는 시료에 대해 추가적으로 균주 성장 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 사용한 시료의 최대 농도는 10000 µg/mL로 하였으며, 최소 농도가 9.76 µg/mL가 되도록 two-fold serial dilutions 방법으로 희석하여 실험하였다.

그 결과, *S. epidermidis*의 경우에는 팔배나무 가지의 추출물 및 용매 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC 값을 확인하였으며, 그 중 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도달하여 MBC 값을 확인하였다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 *S. epidermidis*에 대한 MBC 값을 2500 µg/mL로 확인하였으며, *n*-BuOH 분획물에서 *S. epidermidis*에 대한 MBC 값을 2000-5000 µg/mL로 확인하였고, 추출물의 경우에는 *S. epidermidis*에 대한 MBC 값을 5000-10000 µg/mL로 확인되었다(Table 71).

*C. acnes*의 경우에는 팔배나무 가지의 *n*-Hex, EtOAc 분획물, 추출물 및 *n*-BuOH 분획물은 *C. acnes*에 대한 차례로 항균 활성을 보였다(Table 72).

Table 71. MIC and MBC values of *S. alnifolia* branches on *S. epidermidis*.

	<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	1250	10000	1250	5000	1250	5000
<i>n</i> -Hex Fr.	2500	>10000	2500	>10000	2500	10000
EtOAc Fr.	625	2500	625	2500	625	2500
<i>n</i> -BuOH Fr.	1250	2500	1250	2500	1250	5000
H <sub>2</sub> O Fr.	5000	>10000	5000	>10000	5000	>10000

Unit : µg/mL

Table 72. MIC and MBC values of *S. alnifolia* branches on *C. acnes*.

	<i>C. acnes</i>							
	CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	2500	>10000	5000	>10000	5000	>10000	2500	>10000
<i>n</i> -Hex Fr.	1250	>10000	1250	>10000	1250	>10000	1250	>10000
EtOAc Fr.	2500	10000	2500	10000	2500	>10000	2500	>10000
<i>n</i> -BuOH Fr.	5000	>10000	5000	>10000	5000	>10000	5000	>10000
H <sub>2</sub> O Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

Unit : µg/mL

### 3) 항염

#### (1) Nitric oxide 생성 억제 활성

팔배나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성 억제 활성과 세포 생존율(MTT)을 확인하기 위하여 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 이용하였다. 우선 추출물과 용매 분획물은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 실험을 실행하였다. 그 결과, *n*-Hex 분획물을 제외하고 다른 시료의 세포 독성 모두 없는 것으로 보였다. 또한 추출물 및 EtOAc 분획물에서 우수한 NO 생성억제 활성을 나타내었으며, 억제율이 각각 83.2%, 85.8%로 확인되었다.(Figure 157). 추출물에서 NO 생성 억제율이 50%일 때의 농도(IC<sub>50</sub>)를 확인하기 위하여 추가적으로 추출물은 12.5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 팔배나무 가지 추출물은 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보였고, IC<sub>50</sub> 값은 48.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었으며, *n*-Hex 분획물은 5-40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex 분획물은 세포 독성도 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 확인하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 17.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 마찬가지로 EtOAc 분획물은 12.5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물은 세포 독성도 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보였고, IC<sub>50</sub> 값은 22.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Figure 158).

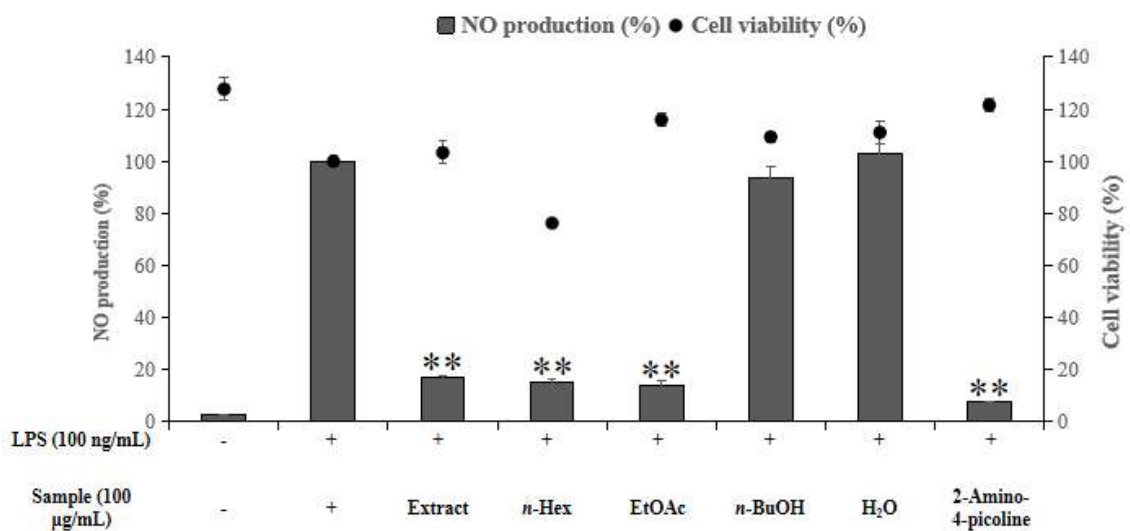
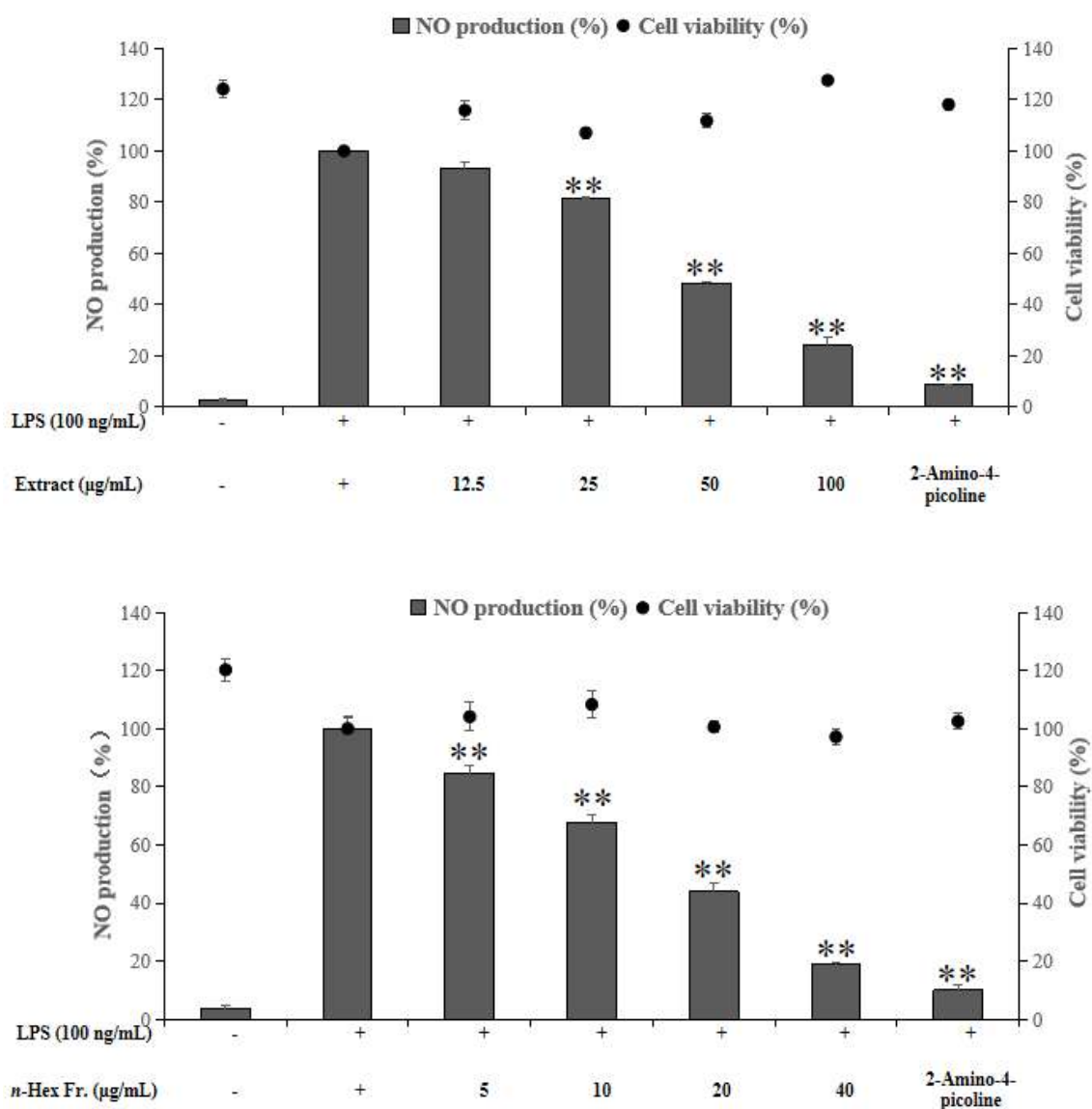


Figure 157. Effects of extract and solvent fractions from *S. alnifolia* branches on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 5  $\mu$ M) for 24 h. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



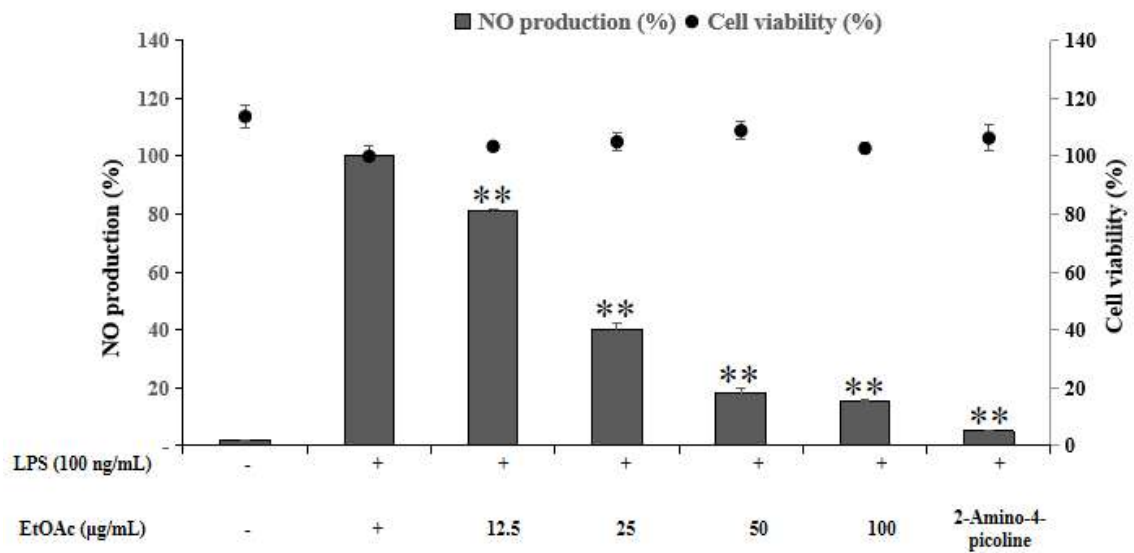


Figure 158. Effects of Extract, *n*-Hex and EtOAc fractions from *S. alnifolia* branches on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions from *Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \**p* <0.05; \*\**p* <0.01

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

팔배나무 가지 추출물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 팔배나무 가지 추출물은 PGE<sub>2</sub> 및 IL-1β의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 159).

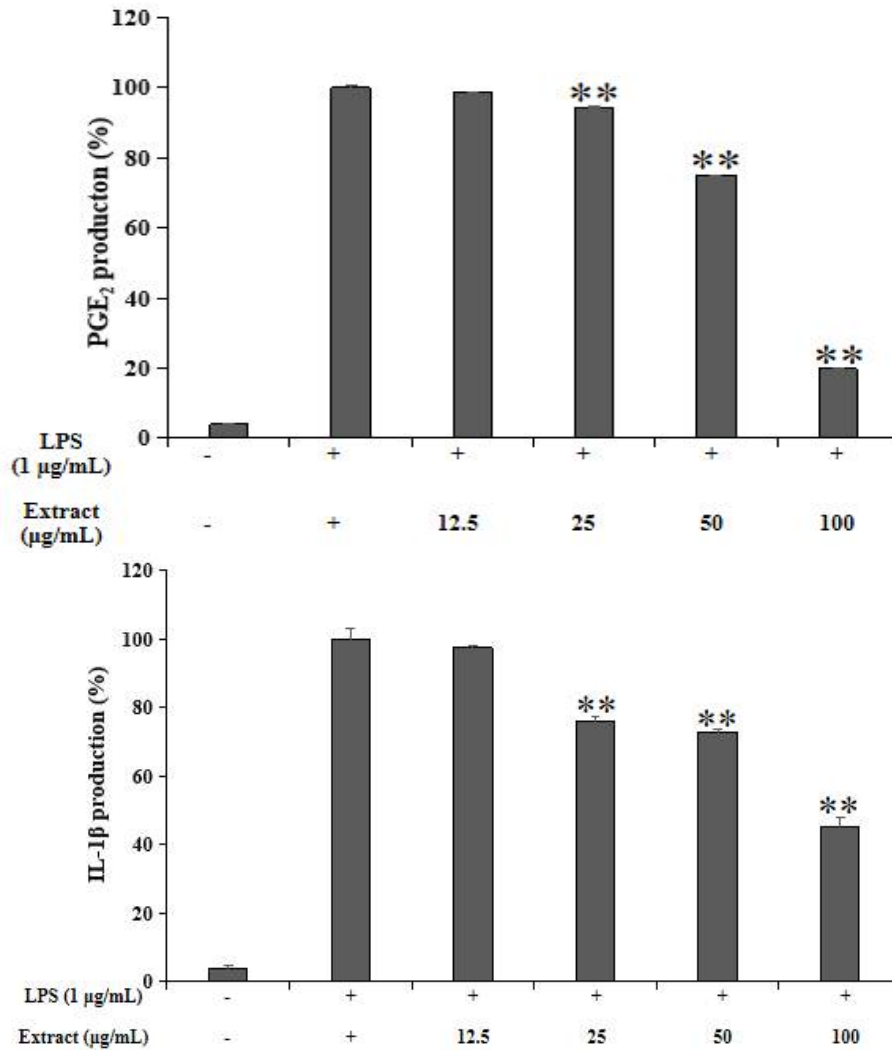


Figure 159. Effects of extract from *S. alnifolia* branches on PGE<sub>2</sub>, IL-1β production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

팔배나무 가지 *n*-Hex 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 팔배나무 가지 *n*-Hex 분획물은 PGE<sub>2</sub>의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 160).



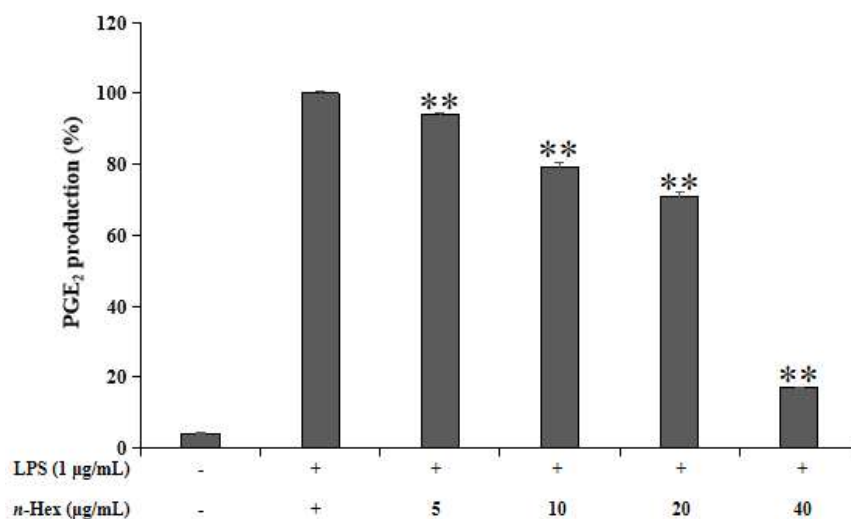
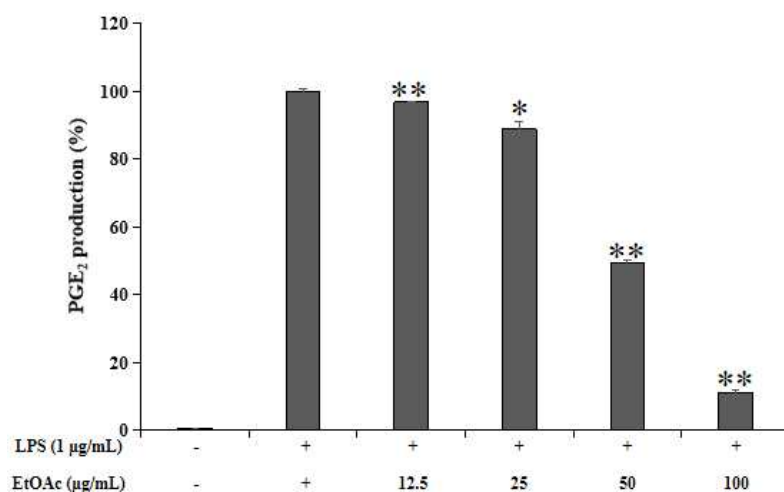


Figure 160. Effects of *n*-Hex fractions from *S. alnifolia* branches on PGE<sub>2</sub> production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \**p* <0.05; \*\**p* <0.01

또한, 팔배나무 가지 EtOAc 분획물의 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 팔배나무 가지 EtOAc 분획물은 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성인자인 TNF-α, IL-1β의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 161).



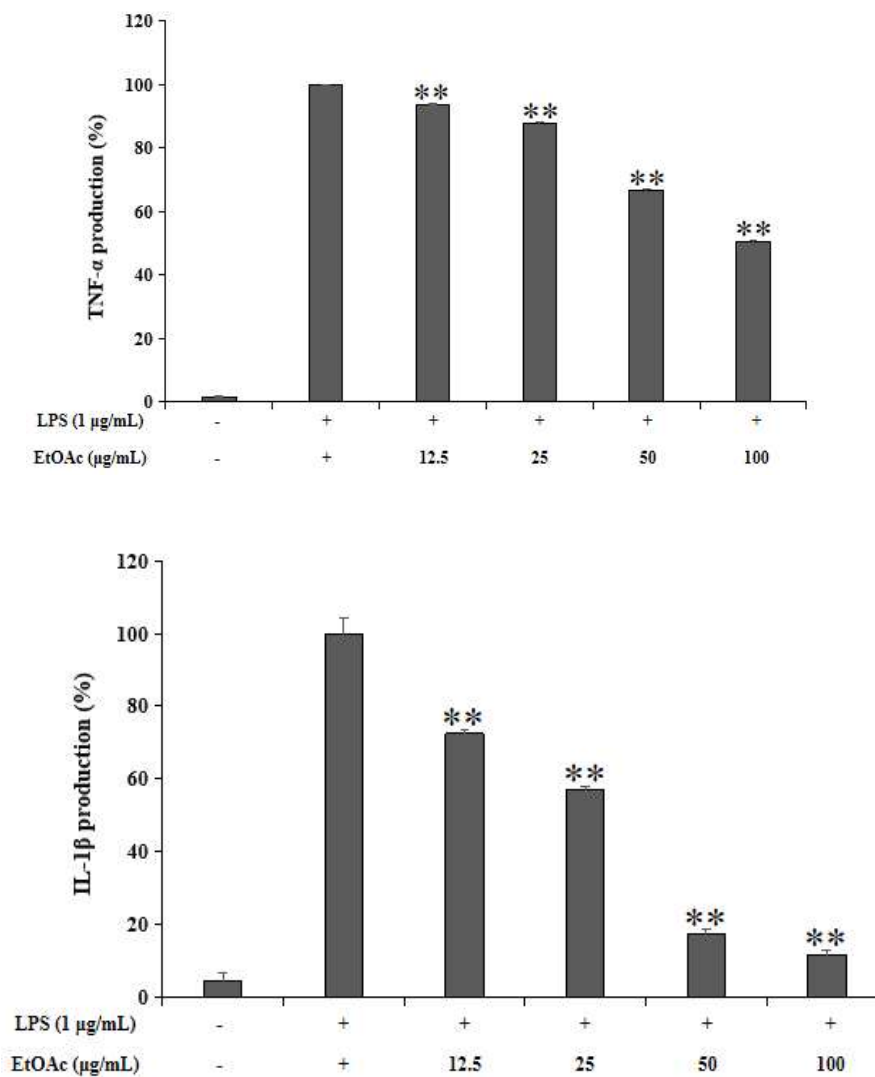


Figure 161. Effects of EtOAc fractions from *S. alnifolia* branches on PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p$  < 0.05; \*\*  $p$  < 0.01

#### 4) 미백

##### (1) Melanogenesis 억제 활성

B16F10 melanoma cell을 이용하여 팔배나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 멜라닌 생성 억제 활성과 세포 독성을 측정하였다. 우선 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-BuOH 분획물 시료가 세포 독성 없이 42.0%로 melanin 생성 억제 활성을 나타냈으나, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 세포 독성이 있는 것으로 보였다(Figure 162).

상술한 결과를 바탕으로 추출물에 대한 농도를 내리고 세포 독성이 없을 때까지 20, 30, 40, 50 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 추출물은 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 활성을 확인하였다. 또한, *n*-BuOH 분획물의 경우에는 12.5-100 µg/mL의 농도로 실험을 진행한 결과, 세포 독성 없이 농도 의존적으로 melanin 생성 억제 활성을 확인하였다(Figure 163).

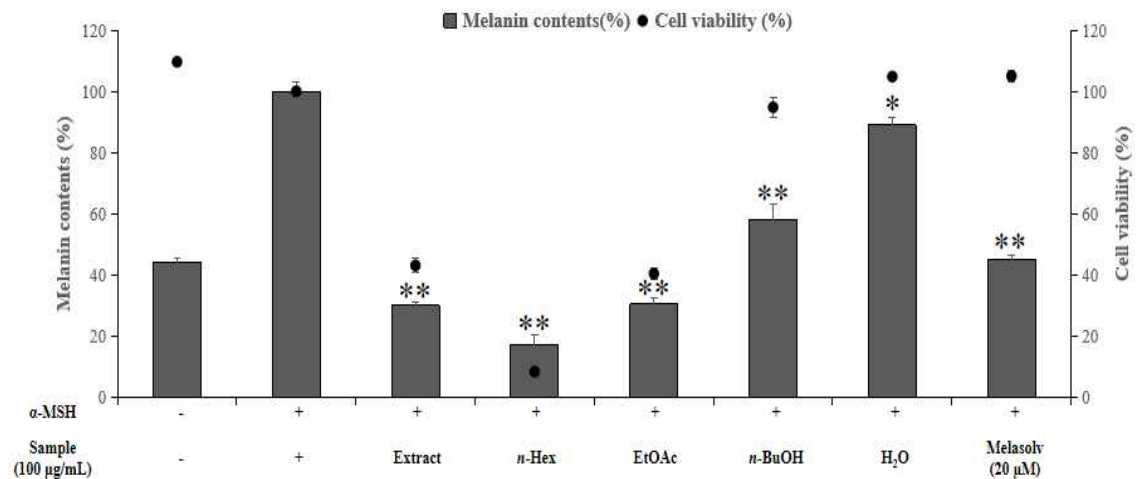


Figure 162. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fractions of *S. alnifolia* branches in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

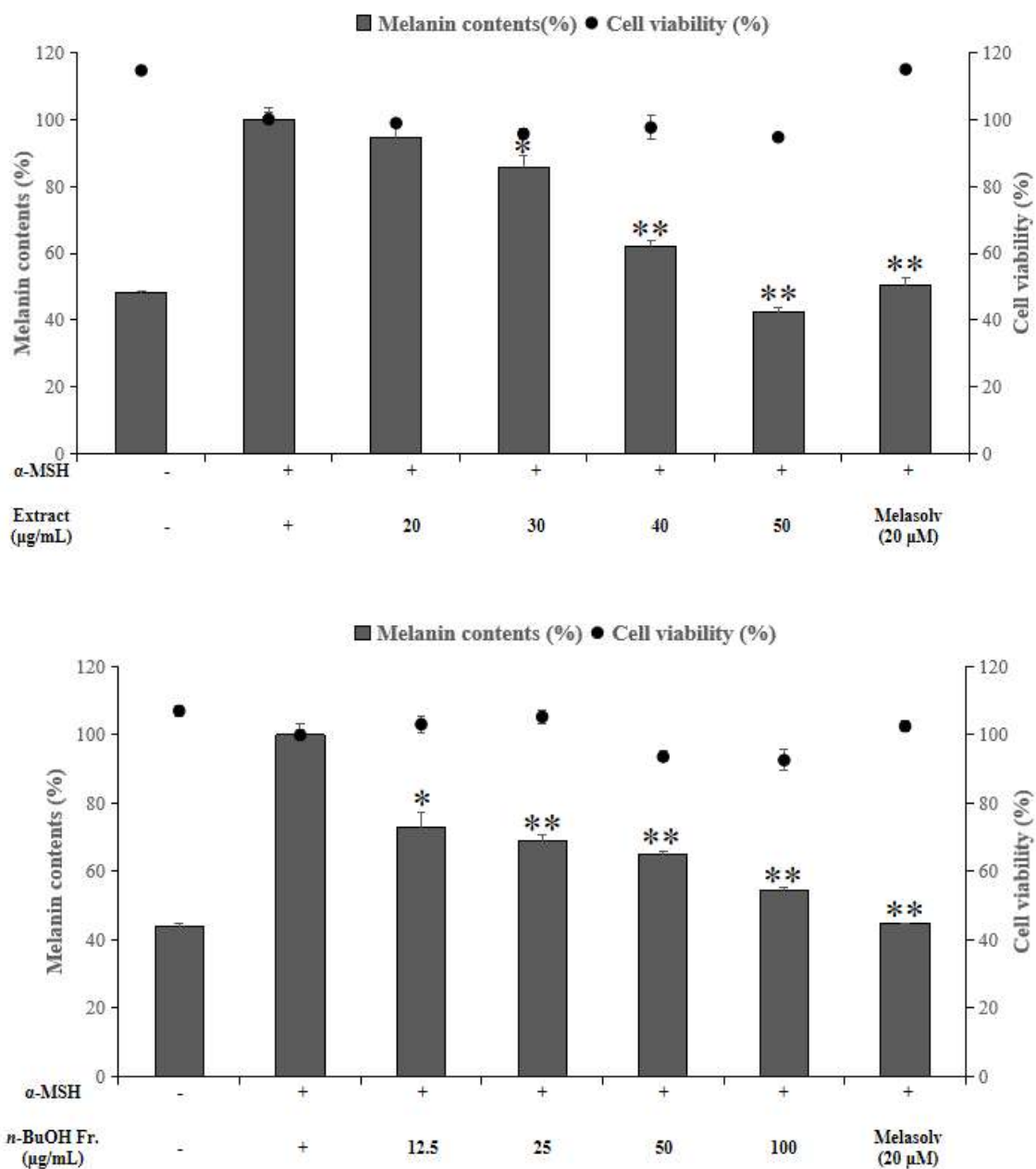


Figure 163. Melanin contents and cell viability of Extract and *n*-BuOH fractions of *S. alnifolia* branches in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성

Melanogenesis 억제 효과가 있는 추출물 및 *n*-BuOH 분획물에 대한 미백 메커니즘을 확인하기 위해서 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, 추출물 및 *n*-BuOH 분획물은 모두 농도 의존적으로 세포 내의 tyrosinase 저해 시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 164).

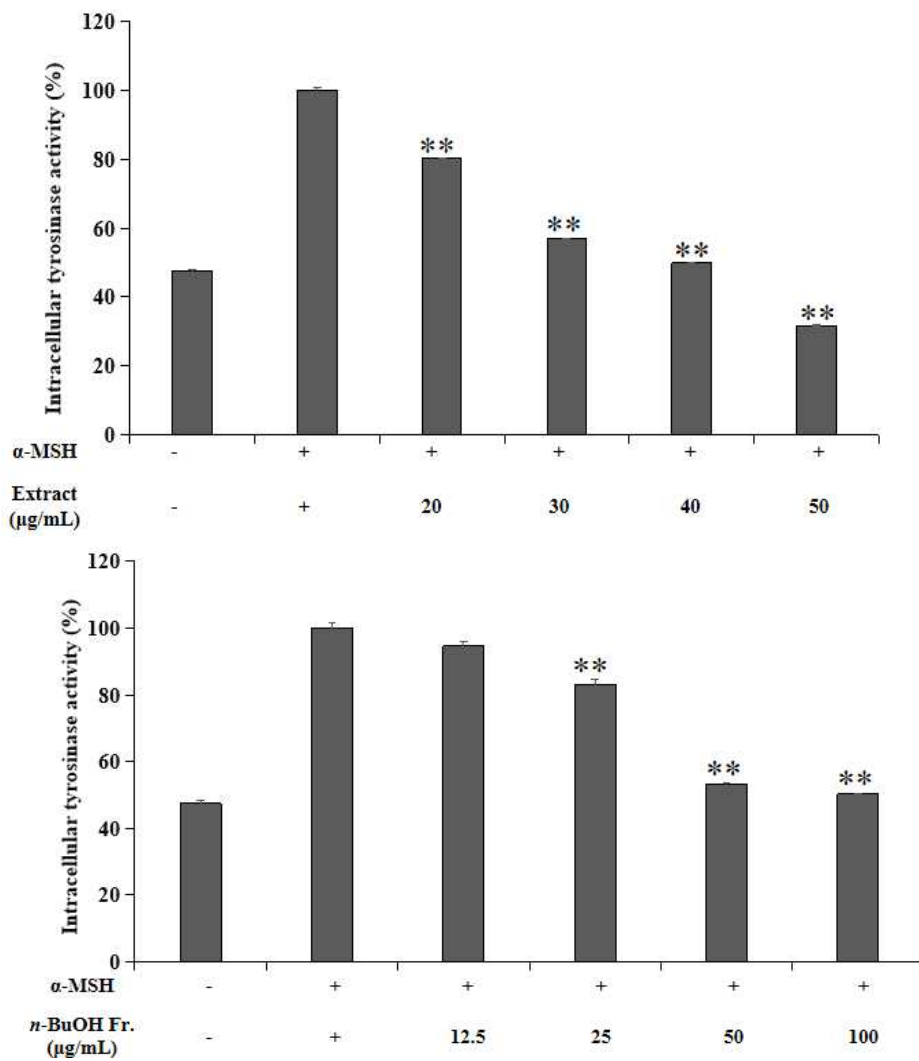


Figure 164. Intracellular tyrosinase inhibitory activity of Extract and *n*-BuOH fractions of *S. alnifolia* branches in α-MSH induced B16F10 melanoma cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*\*  $p < 0.01$

## 5. 분리된 화합물의 활성을 실험 결과

### 1) 항균

#### (1) MIC 및 MBC

팔배나무 가지 추출물로부터 분리된 2개의 triterpenoids 화합물에 대해 항균 활성을 확인하기 위하여 피부 상재균(resident flora)인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 균주 성장 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 사용한 시료의 최대 농도는 2000  $\mu\text{M}$ 로 하였으며, 최소 농도가 1.95  $\mu\text{M}$ 가 되도록 two-fold serial dilutions 방법으로 희석하여 실험하였다.

그 결과, *S. epidermidis*의 경우에는 팔배나무 가지로부터 분리된 2개의 triterpenoids 화합물에서 compound 3의 MIC 값을 250-500  $\mu\text{M}$ 로 확인하였으며, compound 4의 MIC 값을 1000-2000  $\mu\text{M}$ 로 확인하였다. 다음 compound 3 및 4는 *S. epidermidis*에 각각 MBC 값을 확인하기 위하여 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 실험을 진행한 결과, compound 3은 3711 균주만에 대한 활성을 나타내며 MBC 값을 1000  $\mu\text{M}$ 로 확인하였으나, compound 4는 모두 균주에 대한 2000 $\mu\text{M}$  하에서 MBC 값을 안 나타낸 것으로 보였다.

또한, *C. acnes*의 경우에는 팔배나무 가지로부터 분리된 2개의 triterpenoids 화합물에서 compound 3의 MIC 값을 62.5-1000  $\mu\text{M}$ 로 확인하였으며, compound 4의 MIC 값을 125-2000  $\mu\text{M}$ 로 확인하였다. 다음 compound 3 및 4는 *C. acnes*에 각각 MBC 값을 확인하기 위하여 MIC 값 이상의 시료 배양액을 배지에 도말하여 실험을 진행하였으며, compound 3은 9010 균주를 제외하고 나머지 모든 균주에 활성을 나타냈고 MBC 값을 500-2000  $\mu\text{M}$ 로 확인하였으며, compound 4는 0081, 9009 균주를 제외하고 나머지 균주에 대한 MBC 값을 250-2000  $\mu\text{M}$ 로 확인하였다.

Table 73. MIC and MBC values of compounds **3** and **4** from *S. alnifolia* branches on *S. epidermidis* and *C. acnes*.

	<i>S. epidermidis</i>						<i>C. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>3</b>	250	>2000	250	>2000	500	1000	250	500	1000	2000	250	>2000	62.5	500
<b>4</b>	1000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	1000	>2000	250	2000	125	250

Unit:  $\mu\text{M}$

## 2) 항염

### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

마우스 대식세포(RAW 264.7)를 이용하여 팔배나무 가지로부터 분리된 compound **3**, **4**의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 우선 compound **3**에 대하여 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$  농도로 실험을 진행한 결과, 200  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 버였고,  $\text{IC}_{50}$  값은 94.4  $\mu\text{M}$ 로 확인되었다. 마찬가지로 compound **4**에 대하여 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ 의 농도로 실험을 진행한 결과, 20  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 확인하였고,  $\text{IC}_{50}$  값은 13.8  $\mu\text{M}$ 로 나타났다(Figure 165).

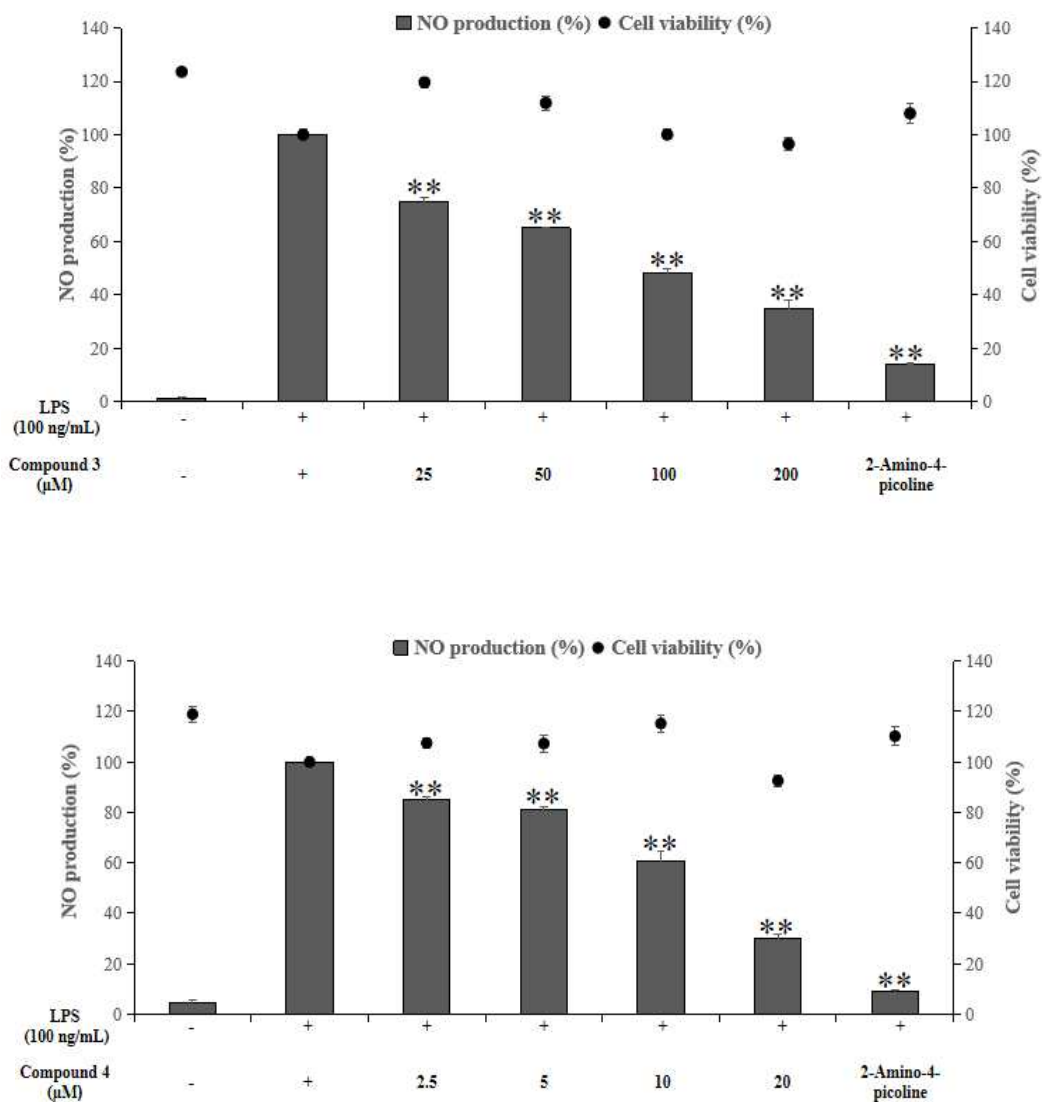
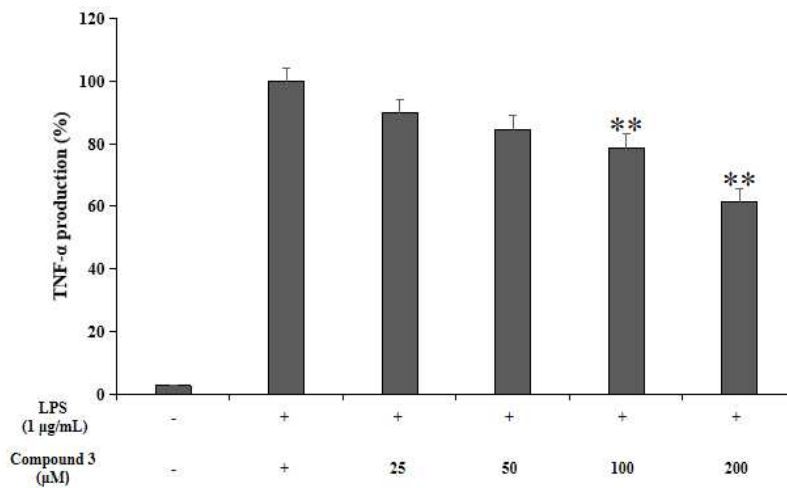
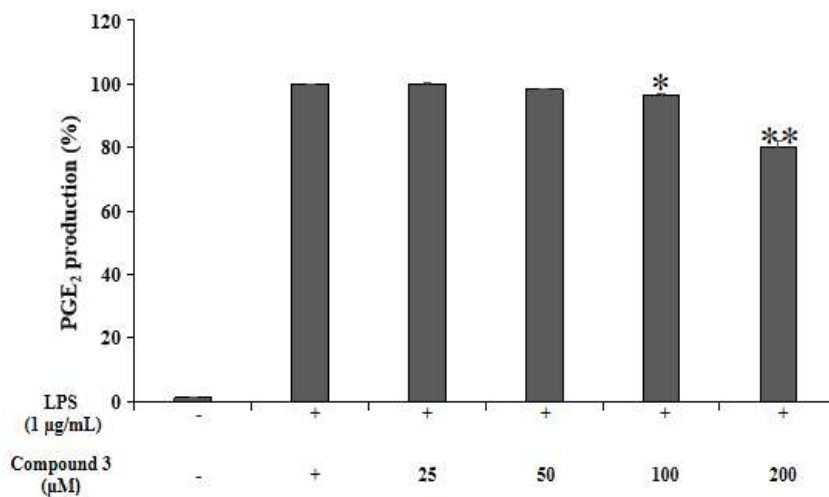


Figure 165. Effects of isolated compounds **3**, **4** from *S. alnifolia* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds **3**, **4** from *S. alnifolia* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 5 μM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



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

NO 생성 억제 활성이 우수한 compound 3 및 4에 대하여 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 전염증성 cytokine 및 PGE<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다. 그 결과, compound 3은 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 저해시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다(Figure 166). 또한, compound 4는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 167).



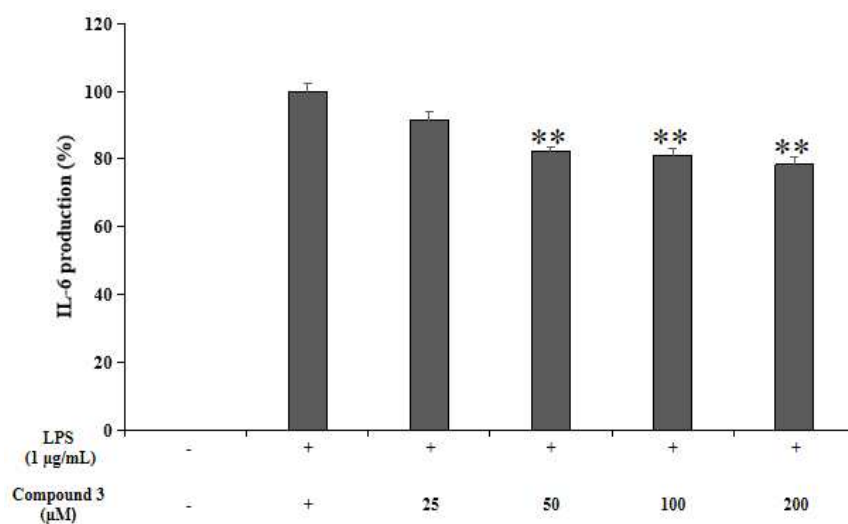
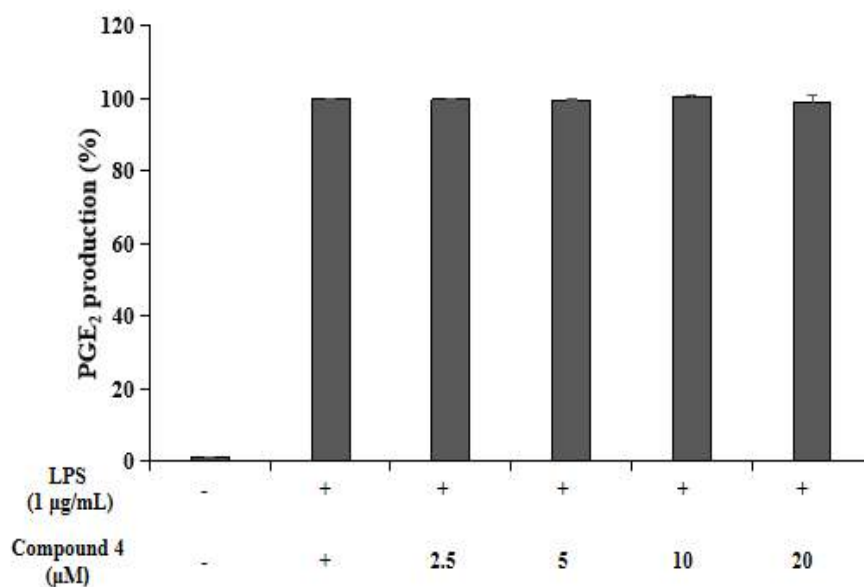


Figure 166. Effects of isolated compound **3** from *S. alnifolia* branches on PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-6 production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



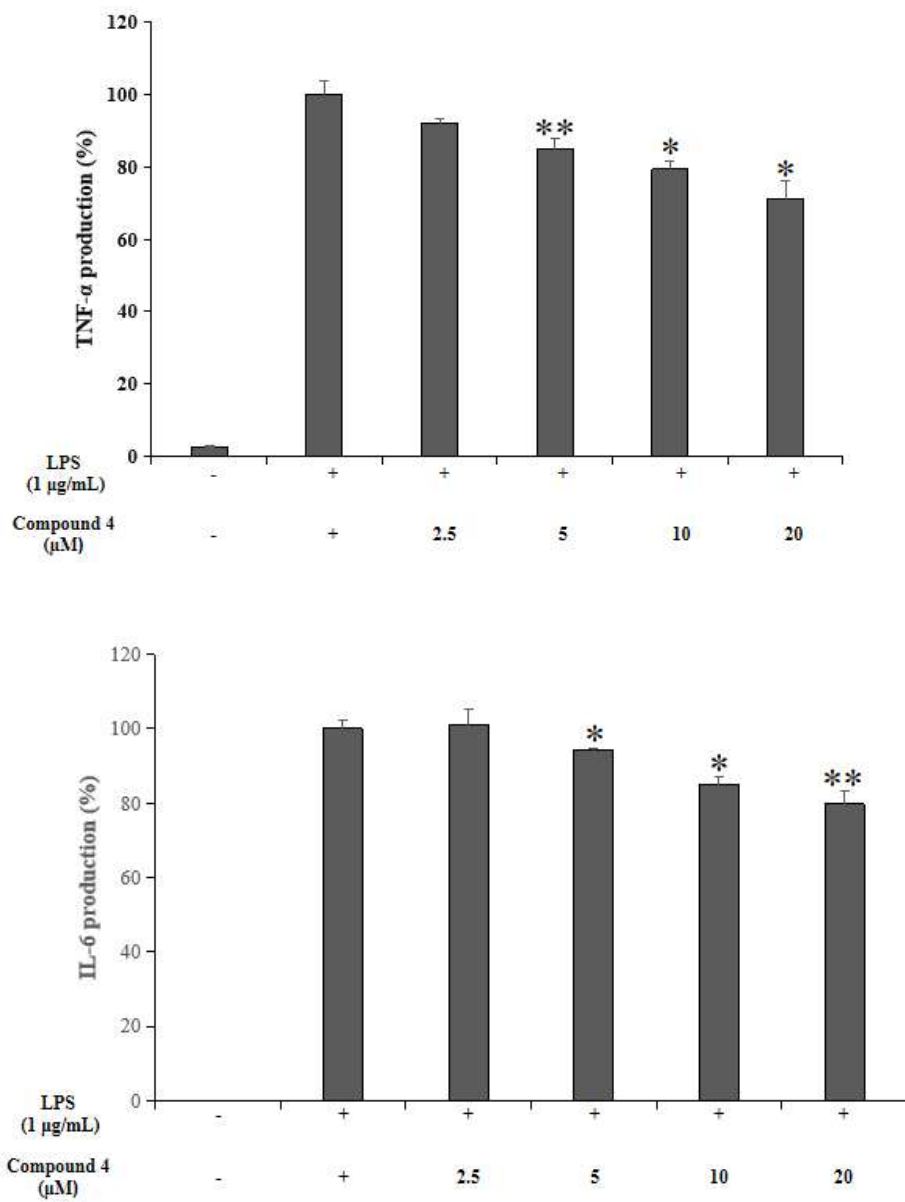


Figure 167. Effects of isolated compound 4 from *S. alnifolia* branches on TNF- $\alpha$ , IL-6 production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The data are represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

## 6. 요약 및 결론

본 연구는 팔배나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 용매 분획물을 연구 대상으로 다양한 생리 활성을 확인하고 함유된 식물화학 성분 분리를 하기 위해서 연구를 진행하여 약품, 기능성 화장품 및 식품 등 분야에 관련된 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

팔배나무 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 및 EtOAc 분획물은 우선 VLC를 이용할 다음에 silica gel 또는 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리된 단일 화합물은 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR를 이용하여 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 대비하여 총 12개의 화합물을 동정하였다.

분리된 화합물은  $\beta$ -amyrin (1), ursolic acid (2), 2-oxopomolic acid (3), euscaphic acid (4),  $\beta$ -sitosterol (5), daucosterol (6), *epi*-catechin (7), prunasin (8)로 확인을 되었다.

팔배나무 가지의 항산화 실험 결과, *n*-BuOH, EtOAc 분획물의 총 폴리페놀 함량이 각각 241.1, 222.9 mg/g GAE로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량이 각각 75.3, 37.2 mg/g QE로 나타났다. 또한, DPPH radical 소거 활성 실험에서 EtOAc, *n*-BuOH 분획물은 대도균인 BHT보다 우수한 라디칼 소거 활성을 나타내었으며, SC<sub>50</sub> 값이 각각 26.4, 38.1  $\mu$ g/mL로 확인하였다. 또한, HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 그 결과, 팔배나무 가지의 추출물 및 용매 분획물은 5, 10  $\mu$ g/mL에서 다 세포독성 없이, EtOAc 분획물은 각각 3.9, 15.6% 세포 보호 효과를 확인하였고, *n*-BuOH 분획물은 각각 4.9, 14.8% 세포 보호 효과를 확인하였다. 팔배나무 가지로 분리된 *epi*-catechin (7)는 문헌<sup>132,134</sup>을 통하여 우수한 항산화 및 세포 보호 효능이 있음을 알려져 있다.

항균 활성을 평가하기 위하여 여드름 질환에 관련된 피부 상재균에 속한 포피포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 그리고 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 사용하여 한천 확산 법 (Paper disc diffusion method)을 통한 생육저지황 (clear

zone)최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 그 결과, 팔배나무 가지의 추출물 및 용매 분획물은 *S. epidermidis*에 경우 EtOAc, *n*-BuOH, 추출물, *n*-Hex, H<sub>2</sub>O 분획물 차례로 항균 활성을 나타냈으며, MIC 값이 각각 625, 1250, 1250, 2500, 5000 µg/mL로 확인하였으며, EtOAc, *n*-BuOH 분획물, 추출물의 MBC 값이 각각 2500, 2500-5000, 2500-10000 µg/mL로 확인하였다. 또한, *C. acnes*에 경우는 *n*-Hex, EtOAc, 추출물, *n*-BuOH 분획물 차례로 항균 활성을 나타냈으며, MIC 값이 각각 1250, 2500, 2500-2500, 5000 µg/mL로 확인하였다. 팔배나무 가지에서 분리된 compound **3**, **4**은 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 항균 실험을 한 결과, compound **3**는 *S. epidermidis*과 *C. acnes*에 MIC 값이 각각 250-500, 62.5-1000 µM로 확인하였고, compound **4**는 *S. epidermidis*과 *C. acnes*에 MIC 값이 각각 1000-2000, 125-2000 µM로 확인하였다.

마우스의 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 팔배나무 가지의 항염 활성 실험을 진행한 결과, 추출물, EtOAc 분획물이 100 µg/mL 이하의 농도에서 세포독성 없이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 48.7, 22.0 µg/mL로 확인하였으며, *n*-Hex 분획물이 40 µg/mL 이하의 농도에서 세포독성 없이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 17.5 µg/mL로 확인하였다. 또한 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 전 염증성 사이토카인 및 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 실험한 결과, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 PGE<sub>2</sub>에 대한 모두 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인했다. 팔배나무 가지로부터 분리된 2 개 triptenoids 화합물인 compound **3**, **4**은 항염 활성 실험을 한 결과, 2-oxopomolic acid (**3**)는 25-200 µM 범위 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 99.7 µM로 확인하였으며, 전 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6 그리고 PGE<sub>2</sub>에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다. 한편, euscaphic acid (**4**)는 2.5-20 µM 범위 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 13.8 µM로 확인하였으며, 전 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6에 대한 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 확인하였다.

팔배나무 가지의 미백 활성 측정을 위하여 B16F10 melanoma cell을 이용하여 melanin 생성량과 세포 독성을 측정하였다. 실험 결과, 추출물에 경우 50  $\mu$ g/mL 농도 이하에서 세포독성 없이 효과적인 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내었으며, 세포내 tyrosinase에 대한 농도 의존적으로 억제시킨 것을 확인하였으면, *n*-BuOH 분획물에 경우 100  $\mu$ g/mL 농도 이하에서 세포독성 없이 효과적인 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내었으며, 세포내 tyrosinase에 대한 농도 의존적으로 억제시킨 것을 확인하였다. 한편, 팔배나무 가지로부터 분리된 화합물인 compound **3**, **4**은 문헌<sup>135</sup>을 통하여 melanin 생성 억제 효능이 있음을 알려져 있다.

이상의 연구를 바탕으로 팔배나무 가지 추출물을 이용하여 항산화, 항균, 항염 및 미백 활성을 갖는 의약품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 사료된다.

## VII. 종합 결론 및 고찰

본 연구는 의약품, 식품 및 화장품의 원료로 쓰이는 화학 합성 물질을 대체할 수 있는 새로운 천연물 유래 소재를 찾기 위하여 분홍바늘꽃 (*Epilobium angustifolium* L.) 지상부, 편백 (*Chamaecyparis obusa* (Siebold. et Zucc.) Endl.) 종자, 팔배나무 (*Sorbus alnifolia* (Sieb. et Zucc.) K. Koch) 잎 및 가지의 추출물과 용매 분획물에서 유효 성분을 분리하여 NMR, HR-ESI-MS 등을 이용하여 구조를 동정하였으며, 항산화, 항균, 항염 및 미백 등 다양한 생리 활성을 검색하였다.

분홍바늘꽃 지상부 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성 실험 결과, 추출물 및 *n*-BuOH 분획물에서 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였다. 여드름 질환에 관련된 *S. epidermidis* 및 *C. acnes* 그리고 충치 질환에 관련된 *S. mutans*에 대한 항균 활성 실험 결과, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 모든 균주에서 우수한 항균 활성을 나타냈다. 또한, LPS로 유도된 RAW264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 100 µg/mL 이하 범위에서 세포독성 없이 NO의 생성을 억제하는 것으로 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 항염 메커니즘 연구를 하기 위해 ELISA 실험을 수행하였으며, *n*-Hex 분획물은 PGE<sub>2</sub> 및 cytokine(TNF-α, IL-6)의 생성을 억제시키는 것을 확인하였고, EtOAc 분획물은 PGE<sub>2</sub> 및 TNF-α의 생성을 저해시키는 것으로 확인하였다. 또한, α-MSH로 자극된 B16F10 세포를 이용한 미백 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 세포 독성이 없는 농도 범위에서 멜라닌 생성 및 세포내 tyrosinase 활성을 억제시키는 것으로 확인하였다.

분홍바늘꽃 지상부에서 분리 및 구조 동정된 화합물은 *n*-dodecane (1), lauric acid (2), ethyl oleate (3), 1-monoolein (4), linoleic acid (5), coriolic acid (6), ethyl linolenate (7), α-linolenic acid (8), 1-linolenoyl glycerol (9), 15-isopimaren-3β,8β-diol (10), α-amyrin (11), β-amyrin (12), ursolic acid (13), oleanolic acid (14), maslinic acid (15), corosolic acid (16), β-sitosterol (17), 5-desmethylnisensetin (18), *p*-coumaric acid (19), caffeic

acid (20), (S)-danshensu caffeic anhydride (21)로 확인되었으며, 그 중 (S)-danshensu caffeic anhydride (21)는 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

분홍바늘꽃 지상부로부터 자연계에서 처음으로 분리된 (S)-danshensu caffeic anhydride (21)는 DPPH radical에 대해 양성대조군인 BHT보다 우수한 라디칼 소거 활성이 있는 것으로 확인하였고, 400  $\mu\text{M}$  이하 농도 범위에서 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며,  $\text{IC}_{50}$  값이 130.3  $\mu\text{M}$ 로 확인되었다. 그리고  $\text{PGE}_2$  및 전염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-6)에 대하여 농도 의존적으로 생성 억제 효과를 나타내었다. 또한 200  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 세포독성 없이 농도의존적으로 melanin 생성 및 세포내 tyrosinase 억제 활성을 나타내었다. 항균 실험에는 ursolic acid (13), oleanolic acid (14)은 문헌<sup>68</sup>을 통하여 우수한 항균 효능이 있음이 알려져 있다.

편백 종자 50% 에탄올 추출물 및 용매 분획물에 대하여 의약품 및 기능성 화장품 분야에 관련된 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자, 다양한 생리 활성을 확인하고 함유된 식물화학 성분 분리 및 구조 동정을 하기 위해서 연구를 진행하여 하였다.

편백 종자 50% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및  $\text{H}_2\text{O}$  분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성 실험 결과, 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였다. 여드름 질환에 관련된 *S. epidermidis* 및 *C. acnes* 그리고 충치 질환에 관련된 *S. mutans*에 대한 항균 효능 실험 결과, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 모든 균주에서 우수한 항균 활성을 나타냈다. 또한, LPS로 유도된 RAW264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 세포독성 없는 농도 범위에서 NO의 생성을 억제시키는 것으로 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 항염 메커니즘 연구를 하기 위해 ELISA 실험을 수행하였으며, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시키는 것으로 확인하였다. Mushroom tyrosinase를 이용한 미백 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하에서 농도의존적으로 효소의 활성을 억제시키는 것을 확인하였다.



편백 종자에서 분리된 화합물은 (*R*)-*p*-menth-1-en-4,7-diol (1), (1*R*,2*R*,4*R*)-*p*-menthane-1,2,4-triol (2),  $\alpha$ -eudesmol (3),  $\gamma$ -eudesmol (4),  $\beta$ -eudesmol (5), oplodiol (6), 4-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol (7), *ent*-4(15)-eudesmen-1 $\alpha$ ,11-diol (8), 3-eudesmene-1 $\beta$ ,11-diol (9), hinokiic acid (10), 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione (11), 12-methoxy-8,11,3-abietatriene-7 $\beta$ ,11-diol-3-one (12), hinokione (13), 1,2-dehydrohinokione (14), 1 $\alpha$ -3 $\beta$ -dihydroxytatarol (15), hinokiol (16), isohinokiol (17), sugiol (18), ferruginol (19), cryptojaponol (20), 7 $\alpha$ ,11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene (21), 7 $\beta$ -hydroxydeoxocryptojaponol (22), 6,7-dehydrodeoxocryptojaponol (23), *trans*-communic acid (24), chamaecydin (25),  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester (26),  $\alpha$ -linolenic acid (27), deoxypodophyllotoxin (28), yatein (29), hinokinin (30), savinin (31), haplomyrfofin (32), sesamin (33), aromadendrin (34), taxifolin (35), taxifolin-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (36), taxifolin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (37), apigenin (38), scutellarein (39), quercetin (40), quercitrin (41)으로 확인되었으며, 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione (11)는 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

편백 종자로부터 분리된 haplomyrfofin (32)는 우수한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다. 또는, 편백 종자로부터 분리된 플라보노이드 화합물인 aromadendrin (34), taxifolin (35), taxifolin-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (36), taxifolin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranopyranoside (37), apigenin (38), scutellarein (39), quercetin (40) quercitrin (41)은 문헌<sup>114,115,116,117,118</sup>을 통해 항산화 효능이 있음을 확인하였다. 항균 활성에 대한 실험 결과, 편백 종자로부터 분리된 ferruginol (19), 1,2-dehydrohinokione (14), 7 $\beta$ -hydroxydeoxocryptojaponol (22), *trans*-communic acid (24), 1 $\alpha$ -hydroxy-hinokione(11), hinokione (13), 7 $\alpha$ -11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene (21),  $\alpha$ -eudesmol (3), 1 $\alpha$ -3 $\beta$ -dihydroxytatarol (15), hinokiic acid (10), 12-methoxy-8,11,3-abietatriene-7 $\beta$ ,11-diol-3-one (12)들은 차례로 우수한 항균 활성을 나타냈다. 또한 항염 활성 실험 결과, 편백 종자로부터 분리된 terpenoid 화합물인 compound 14, 11, 17, 22, 13, 20, 15가 효과적인 NO 생

성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 2.4, 8.0, 23.2, 23.7, 47.7, 55.9, 62.6 μM로 확인되었다. 특히 1,2-dehydrohinokione (14) 및 1α-hydroxy-hinokione (11)에 대하여 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인의 생성 억제 실험을 진행한 결과, compound 14가 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6을 농도 의존적으로 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으며, compound 11은 TNF-α 및 IL-6을 농도 의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다. 한편, 편백 종자로부터 분리된 lignan인 compound 29, 32가 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 0.04, 1.6 μM로 확인되었다. 추가적으로 전염증성 사이토카인 및 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 활성 실험을 진행한 결과, yatein (29) 및 haplomyrfofin (32)이 PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-6을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 편백 종자로부터 분리된 terpenoid인 compound 18, 19, 21 및 24가 mushroom tyrosinase 억제 활성을 보였으며, IC<sub>50</sub> 값이 각각 191.5, 376.8, 380.4, 160.9 μM로 확인되었으며, 이는 양성 대조군인 arbutin (IC<sub>50</sub> 395.8 μM)보다 tyrosinase 억제 활성이 우수함을 확인하였다.

팔배나무 잎 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였으며, HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대하여 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물이 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다. 여드름 질환에 관련된 균주인 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 항균 활성 실험 결과, 추출물, *n*-Hex, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 모든 균주에 대해 우수한 항균 활성을 나타냈다. 또한, LPS로 유도된 RAW264.7 세포를 이용하여 항염 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 세포독성 없이 NO의 생성을 억제시킴을 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 항염 메커니즘 연구를 하기 위해 ELISA 실험을 수행하였으며, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 IL-1β의 생성을 억제시키는 효과가 나타났다. α-MSH로 자극된 B16F10 세포를 이용한 미백 활성 실험 결과, *n*-BuOH 분획물이 세포 독성이 없는 농도 범위에서 멜라닌 생성 및 세포내 tyrosinase 활성을 억제시키는 것을 확인하였다.

팔배나무 잎으로부터 분리된 화합물은 ursolic acid (1), oleanolic acid (2), α

-amyirin (3), corosolic acid (4), (*E*)-phytol (5),  $\alpha$ -linolenic acid (6),  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester (7), 1-linolenoyl glycerol (8), afzelin (9), kaempferitrin (10), kaempferol 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (11), kaempferol 3-*O*-[deoxy-*ribo*-hexos-3-ulosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]-7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (12)로 확인되었으며, compound 12는 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

팔배나무 잎으로부터 분리된 플라보노이드 배당체인 compound 10, 11, 12는 DPPH radical에 대하여 BHT보다 우수한 소거 활성이 나타났다. 또한, HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 compound 10, 11, 12는 100  $\mu$ M에서 세포독성 없이 각각 25.1%, 33.1%, 28.6%의 세포 보호 효과를 나타냈다. 항균 활성은 ursolic acid (1) 및 oleanolic acid (2)가 문헌<sup>68</sup>을 통하여 우수한 항균 효능이 있음이 알려져 있다. 한편, compound 9, 10, 11, 12는 200  $\mu$ M 이하의 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, compound 11과 신규 화합물인 compound 12는 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-6)을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다.  $\alpha$ -linolenic acid (6) 및  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester (7)는 기초 문헌<sup>127,128</sup>에서 통하여 melanin 생성 억제 효능이 있음이 보고되어 있다.

팔배나무 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성 실험 결과, 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였으며, HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포 손상에 대하여 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다. 여드름 질환에 관련된 균주인 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 항균 활성 실험 결과, 추출물, *n*-Hex, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 모든 균주에 대해 우수한 항균 활성을 나타냈다. 또한, LPS로 유도된 RAW264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 NO의 생성을 억제시키는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 항염 메커니즘 연구를 하기 위해 ELISA 실험을 수행하였으며, 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물

은 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제시키는 것을 확인하였다. α-MSH로 자극된 B16F10 세포를 이용하여 미백 활성 실험 결과, 추출물 및 *n*-BuOH 분획물이 세포 독성이 없는 농도 범위에서 멜라닌 생성 및 세포내 tyrosinase 활성을 억제시키는 것을 확인하였다.

팔배나무 가지에서 분리된 화합물은 β-amyrin (1), ursolic acid (2), 2-oxopomolic acid (3), euscaphic acid (4), β-sitosterol (5), daucosterol (6), *epi*-catechin (7), prunasin (8)로 확인되었다.

팔배나무 가지로 분리된 *epi*-catechin (7)는 문헌<sup>132,134</sup>을 통하여 우수한 항산화 및 세포 보호 효능이 있음이 보고되어 있다. 분리된 화합물 중 2-oxopomolic acid (3), euscaphic acid (4)는 우수한 항균 활성을 보였다. 또한, 2-oxopomolic acid (3)는 25-200 μM 범위 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제시켰으며, PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6)을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다. 그리고 euscaphic acid (4)는 2.5-20 μM 범위 농도에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 나타내었으며, TNF-α 및 IL-6을 농도 의존적으로 저해 시킴을 확인하였다. 한편, 2-oxopomolic acid (3) 및 euscaphic acid (4)는 문헌<sup>135</sup>을 통하여 melanin 생성 억제 효능이 있음이 알려져 있다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 분홍바늘꽃 지상부, 편백 종자, 팔배나무 잎 및 가지 추출물의 항산화, 항균, 항염 및 미백 효능을 활용한 천연 의약품, 기능성 식품 및 화장품 관련 소재로써 개발 가능성을 확인하였다.

## VIII. 참고문헌

1. Kang, H. C.; Cha, M. Y.; Kim, J. Y. A Study of the Antioxidant Activities and Whitening Activities of *Areca semen* Extracts as Cosmetic Ingredient. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kotra.* **2015**, *41*(3), 269-277.
2. Wiedow, O.; Schröder, J. M.; Gregory, H.; Young, J. A.; Christophers, E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*(25), 14791-14795.
3. Pi, B. S.; Choi, D. W.; Park, S. I.; Nam, J.; Kim, Y. J.; Han, S. H. Development of a Solubilization Product Containing Oleanolic Acid with Hydrogenated Lecithin. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kotra.* **2011**, *37*(4), 289-295.
4. Lee, B. G.; Kim, J. H.; Ham, S. G.; Lee, C. E. Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. branch. *Korean J. Plant Res.* **2014**, *27*, 29-34.
5. 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. Cosmetol.* **2015**, *13*, 377-383
6. Song, W. S.; Lee, S. Y.; Yun, S. J. 실버세대의 체취개선용 기능성 기초화장품 개발. *The Plant Resources Society of Korea* **2011**, 6-7.
7. Dang, S. M. Development of Anti-aging from Natural Materials by Inhibition of UV Stimulating. *J. Korea. Convergence. Soc.* **2021**, *12*(1), 251-257.

8. Shim, J. S.; Kim, S. D.; Kim, T. S.; Kim, K. N. Biological activities of flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **2005**, *37*(1), 78-83.
9. Park, C. H.; Kang, H.; Lee, S. G. Antioxidant activity of ethanol extracts and fractions from *Castanea crenata* inner shell. *J. Plant Biol.* **2022**, *49*(2), 150-154.
10. Kim, Y. J.; Kim, S. Y.; Jeong, M. J.; Lee, U. T.; Choo, S. T.; Youn, S. N.; Kim, M. R. Antioxidant effect of ethanol extract from *Plantaginis Herba*. *Korea J. Herbol.* **2018**, *33*(3), 37-43.
11. Sung, J. Y.; Kim, Y. M. Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effects of *Rumex acetosa* L. in RAW 264.7. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* **2022**, *48*(3), 213-223.
12. Gasparri, M.; Afrin, S.; Forbes-Hernández, T. Y.; Cianciosi, D.; Reboredo-Rodríguez, P.; Amici, A.; Giampieri, F. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. *Food. Chem. toxicol.* **2018**, *120*, 578-587
13. Kim, D. W.; Yun, H. J.; Heo, J. Y.; Kim, T. H.; Cho, H. J.; Park, S. D. Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of Do-Ki-Tang methanol extract in mouse macrophage cells. *Kor. J. Herbology.* **2010**, *25*(4), 103-112.
14. Peyssonnaud, C.; Eychène, A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell.* **2001**, *93*(1-2), 53-62.

15. Kim, S. J. Master's Thesis Dissertation, Semyung Univ. Jecheon, Korea, 2020.
16. Lesslauer, W.; Tabuchi, H.; Gentz, R.; Brockhaus, M.; Schlaeger, E. J.; Grau, G.; Loetscher, H. Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide-induced lethality. *Eur. J. Immunol.* **1991**, *21*(11), 2883-2886.
17. Mohler, K. M.; Torrance, D. S.; Smith, C. A.; Goodwin, R. G.; Stremmler, K. E.; Fung, V. P.; Widmer, M. B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.* **1993**, *151*(3), 1548-1561.
18. Hyun, E. A.; Lee, H. J.; Yoon, W. J.; Park, S. Y.; Kang, H. K.; Kim, S. J.; Yoo, E. S. Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage RAW264. *Yakhak Hoeji.* **2004**, *48*(2), 159-164.
19. Weisz, A.; Cicatiello, L.; Esumi, H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide and N G-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **1996**, *316*(1), 209-215.
20. Moon, T. C.; Chung, K. C.; Son, K. H.; Kim, H. P.; Kang, S. S.; Chang, H. W. Screening of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors from natural products. *Yakhak Hoeji.* **1998**, *42*(2), 214-219.
21. Masferrer, J. L.; Zweifel, B. S.; Manning, P. T.; Hauser, S. D.; Leahy, K. M.; Smith, W. G.; Seibert, K. Selective inhibition of inducible

cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*(8), 3228-3232.

22. Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*(25), 12013-12017.
23. Gilchrist, B. A.; Eller, M. S; DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1999**, *4*(1), 35-40.
24. Taylor, S. C. Skin of color: biology, structure, function, and implications for dermatologic disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2002**, *46*(2), S41-S62.
25. Leiter, U.; Garbe, C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. Sunlight, vitamin D and skin cancer. *Adv. Exp. Med. Bio.* **2008**, *624*, 89-103.
26. Hearing, V. J.; Jiménez, M. Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **1987**, *19*(12), 1141-1147.
27. Kuzumaki, T.; Matsuda, A.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Ishikawa, K. Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes. *Exp. Cell. Res.* **1993**, *207*(1), 33-40.
28. Del Marmol, V.; Beermann, F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS lett.* **1996**, *381*(3), 165-168.



29. Ku, J. E.; Park, C. H. Research trends in effective medicinal plants for acne. *Korean Soc. Cosmet. Cosmetol.* **2018**, *8*(3), 431-445.
30. Ahn, B. K.; Lee, S. J.; Namkoong, K.; Chung, Y. L.; Lee, S. H. Quality of life of acne patients. *Korean J. Dermatol.* **2005**, *43*(1), 6.
31. Zaenglein, A. L. Acne vulgaris and acneiform eruption. *Fitzpatrick's dermatol. gene. medi.* **2008**, 690-703.
32. Lee, E. J.; Bae, S. Y.; NamKung, W.; Lee, Y. H. Antibacterial and anti-inflammatory effects of medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kotra.* **2010**, *36*(1), 57-63.
33. Nishijima, S.; Kurokawa, I.; Katoh, N.; Watanabe, K. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from *acne lesions*. *The J. dermatol.* **2000**, *27*(5), 318-323.
34. Webster, G. F.; Grabger, E. M. Antibiotic treatment for acne vulgaris. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2008**, *27*(3), 183-187.
35. 백혜연; 김주덕. 여드름의 실태 및 인식에 관한 연구. *한국미용학회지*, **2009**, *15*(3), 910-920.
36. 김성, Cussutae semen 추출물이 20대 대학생 여드름에 미치는 영향, 건국대학교 **2011**, 석사학위논문.
37. 박미경, 피부관리실 이용자의 아로마 이용형태 및 관련요인 분석, 대구한의대 **2004**, 박사학위논문.

38. 오성문, 약용식물로부터 여드름 원인 미생물에 대한 천연 항균제 탐색, 연세대 2006, 석사학위논문.
39. Ann, G. W.; Kang, T. W.; Jeong, J. H.; Jo, B. K. Clinical studies on the irritation effects of Mung Bean extract in cosmetics. *J. Cosmetol. Sci.* 2004, 30(1), 23-28.
40. Folin, O.; Denis, W. A. colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry.* 1915, 22(2): 305-308.
41. Park, Y. K.; Koo, M. H.; Ikegaki, M.; Contado, J. O. S. E. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Technol.* 1997, 97-106.
42. Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958, 181(4617): 1199-1200.
43. 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(9-10), 1231-1237.
44. 두산백과, "분홍바늘꽃", NAVER 지식백과, <https://terms.naver.com/entry.naver?docId=1104805&cid=40942&categoryId=32696>
45. Hulya, C. O.; Ayse, Y.; Gulen, T.; Refiye, Y. Elastase, tyrosinase and lipooxygenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. *Journal of*

*Medicinal Plants Research.* **2012**, 6(5), 716-726.

46. Battinelli, L.; Tita, B.; Evandri, M. G.; Mazzanti, G. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *Il Farmaco.* **2001**, 56(5-7), 345-438.
47. Ruzsová, E.; Cheel, J.; Pávek, S.; Moravcová, M.; Hermannová, M.; Matějková, I.; Kubala, L. *Epilobium angustifolium* extract demonstrates multiple effects on dermal fibroblasts in vitro and skin photo-protection in vivo. *Gen. Physiol. Biophys.* **2013**, 32(3), 347-359.
48. Nikki, K. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR aromatic solvent-induced shifts of n-alkanes. *Magnetic resonance in chemistry.* **1990**, 28(5), 385-388.
49. Gunstone, F. D. High resolution <sup>13</sup>C NMR study of synthetic branched-chain acids and of wool wax acids and isostearic acid. *Chemistry and physics of lipids.* **1993**, 65(2), 155-163.
50. 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. Biome. Sci* **2017**, 1(1), 1-5.
51. Lao, A.; Fujimoto, Y.; & Tatsuno, T. Studies on the constituents of *Artemisia argyi* Levl et Vant. *Chem. pharm. bull.* **1984**, 32(2), 723-727.
52. Huh, S.; Kim, Y. S.; Jung, E.; Lim, J.; 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.
53. Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Resonance in chemistry.* **1997**, *35*(13), S133-S145.
54. Alamsjah, M. A.; Hirao, S.; Ishibashi, F.; Fujita, Y. Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 2005, *69*(11), 2186-2192.
55. Nitbani, F. O.; Siswanta, D.; Sholikhah, E. N.; Nurohmah, B. A. An improved synthesis of 1-monoolein. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* **2020**, *823*(1), 012004
56. Hanh, T. T. H.; Hang, D. T. T.; Van Minh, C.; Dat, N. T. Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* **2011**, *4*(10), 760-763.
57. Lee, S. J.; Jang, H. J.; Kim, Y.; Oh, H. M.; Lee, S.; Jung, K.; Kim, T. 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.
58. Bae, S.; Han, J. W.; Dang, Q. L.; Kim, H.; Choi, G. J. Plant Disease Control Efficacy of *Platyclusus orientalis* and Its Antifungal Compounds. *Plants.* **2021**, *10*(8), 1496.
59. Viet, T. D.; Xuan, T. D.; Anh, L. H.  $\alpha$ -Amyrin and  $\beta$ -Amyrin

- Isolated from *Celastrus hindsii* Leaves and Their Antioxidant, Anti-Xanthine Oxidase, and Anti-Tyrosinase Potentials. *Molecules*. **2021**, *26*(23), 7248.
60. Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. Complete assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR resonances of oleanolic acid,  $18\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2003**, *41*(8), 636-638.
61. Gohari, A. R.; Saeidnia, S.; Hadjiakhoondi, A.; Abdoullahi, M.; Nezafati, M. Isolation and Quantificative Analysis of Oleanolic Acid from *Satureja mutica* Fisch. & CA Mey. *Journal of Medicinal Plants*. **2009**, *8*(29), 65-69.
62. Ikuta, A.; Kamiya, K.; Satake, T.; Saiki, Y. Triterpenoids from callus tissue cultures of Paeonia species. *Phytochemistry*. **1995**, *38*(5), 1203-1207.
63. Saidi, I.; El Ayeb-Zakhama, A.; Harzallah-Skhiri, F.; Ben Jannet, H. Phytotoxicity of pentacyclic triterpene acids from *Citharexylum spinosum* L. to radish, lettuce and canary grass. *Allelopath. J.* **2018**, *45*, 243-254.
64. Shwe, H. H.; Thein, W. W.; Win, S. S.; Pe, N. N.; Win, T. Structural characterization of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from the roots of *Premna herbacea* Roxb. *Int. Eur. Ext. Enablement Sci. Eng. Manag.* **2019**, *7*, 195-201.
65. Benkiniouar, R.; Touil, A.; Zaidi, F.; Rhouati, S.; Chosson, E.; Seguin, E.; Bellvert, F. Isolation and Identification of five free

- flavonoid aglycones from *Thymus numidicus*. *Journal of the Algerian Chemical Society/Journal de Société Algérienne de Chimie*. **2010**, *20*(1).
66. Kuo, W. L.; Huang, Y. L.; Wang, S. T.; Ni, C. L.; Shien, B. J.; Chen, C. C. Chemical constituents of *Trema orientalis*. *J. Chin. Med.* **2007**, *18*(1), 2.
67. Jeong, C. H.; Jeong, H. R.; Choi, G. N.; Kim, D. O.; Lee, U. K.; Heo, H. J. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. *Chinese medicine*. **2011**, *6*(1), 1-9.
68. Wolska, K. I.; Grudniak, A. M.; Fiecek, B.; Kraczkiewicz-Dowjat, A.; & Kurek, A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Central European Journal of Biology*. **2010**, *5*(5), 543-553.
69. Kim, T. L.; Lee, K.; Cho, W.; Park, D.; Lee, I. H.; Lim, H. Genetic Diversity and Physiological Response to Drought Stress of *Chamaecyparis obtuse* from Six Geographical Locations. *Plant breeding and biotechnology*. **2021**, *9*(2), 112-123.
70. Park, M. J.; Lee, S. M.; Gwak, K. S.; Jeung, E. B.; Chang, J. W.; Choi, I. G. Investigation of active antifungal compounds of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* against dermatophytes, *microsporum canis* and trichophyton mentagrophytes. *Journal of The Korean Wood Science and Technology*. **2005**, *33*(3), 72-78.
71. Kuo, Y. H.; Chen, C. H.; Wein, Y. S. New dimeric monoterpenes

and dimeric diterpenes from the heartwood of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. *Helvetica chimica acta*. **2002**, *85*(9), 2657-2663.

72. Kuo, Y. H.; Chen, C. H.; Lin, Y. L. New lignans from the heartwood of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. **2002**, *50*(7), 978-980.
73. Kim, J. H.; Lee, S. O.; Do, K. B.; Ji, W. D.; Kim, S. G.; Back, Y. D.; Kim, K. J. Analysis of the component and immunological efficacy of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. **2018**, *50*(1), 37-43.
74. Kwon, Y. J.; Seo, E. B.; Kim, S. K.; Noh, K. H.; Lee, H.; Joung, Y. W.; Shin, H. M.; Jang, Y. A.; Kim, Y. M.; Lee, J. T.; Ye, S. K. *Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. leaf extracts prevent inflammatory responses via inhibition of the JAK/STAT axis in RAW264. 7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. **2022**, *282*, 114493.
75. Miyazawa, M.; Kumagae, S. Biotransformation of (R)-and (S)-terpinen-4-ol by the larvae of *common cutworm* (*Spodoptera litura*). *Journal of agricultural and food chemistry*. **2001**, *49*(9), 4312-4314.
76. Hammami, S.; Elshamy, A. I.; Mokni, R. E.; Snene, A.; Iseki, K.; Dhaouadi, H.; Asakawa, Y. Chemical constituents of the aerial parts of *Daucus carota* subsp. *hispidus* growing in Tunisia. *Natural Product Communications*. **2019**, *14*(7), 1934578X19863512.

77. Tebbaa, M.; El Hakmaoui, A.; Benharref, A.; Akssira, M. Short and efficient hemisynthesis of  $\alpha$ -eudesmol and cryptomeridiol. *Tetrahedron letters*. **2011**, *52*(29), 3769–3771.
78. Raharivelomanana, P.; Bianchini, J. P.; Cambon, A.; Azzaro, M.; Faure, R. Two-dimensional NMR of sesquiterpenes. 8\*—complete assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of seven sesquiterpene alcohols from *Neocallitropsis pancheri*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **1995**, *33*(3), 233–235.
79. Kwon, H. C.; Lee, K. R. Phytochemical constituents of *Artemisia japonica* ssp. *littoricola*. *Archives of Pharmacal Research*. **2001**, *24*(3), 194–197.
80. Su, W. C.; Fang, J. M.; Cheng, Y. S. Sesquiterpenes from leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*. **1995**, *39*(3), 603–607.
81. Isaka, M.; Palasarn, S.; Lapanun, S.; Chanthaket, R.; Boonyuen, N.; Lumyong, S.  $\gamma$ -Lactones and ent-eudesmane sesquiterpenes from the endophytic fungus *Eutypella* sp. BCC 13199. *Journal of natural products*. **2009**, *72*(9), 1720–1722.
82. Su, W. C.; Fang, J. M.; Cheng, Y. S. Sesquiterpenes from leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*. **1995**, *39*(3), 603–607.
83. Swartley, D. B. Juniper utilization: issues of chemistry and management. **2002**, *degree of Master of Science*, Oregon State University.
84. Ozaki, N.; Hasegawa, S.; Hirose, Y. Terpenoids from the seed of



*Chamaecyparis obtusa*. *Phytochemistry*. **1983**, *22*(8), 1771-1773.

85. Asano, N.; Yamamoto, H. Isolation and Analysis Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Terpenes from Leaf and Cones of *Chamaecyparis obtusa*. *Bull. Col. Edu. Ibaraki Univ. (Nat. Sci.)* **1994**, *43*, 61-73.
86. Yamamoto, H.; Yamaguchi, S.; Murakami, Y.; Hosoda, H. The terpenes from the discolored wood of the *Chamaecyparis obtusa* by woodwasp. *Bull. Col. Edu. Ibaraki Univ. (Nat. Sci.)* **2008**, *57*, 77-83.
87. Mossa, J. S.; Muhammad, I.; El-Feraly, F. S.; Hufford, C. D. 3 $\beta$ , 12-Dihydroxyabieta-8, 11, 13-triene-1-one and other constituents from *Juniperus excelsa* leaves. *Phytochemistry*. **1992**, *31*(8), 2789-2792.
88. Li, B. L.; Tian, G. H.; Zhang, Z. G.; Liang, B.; Wang, W. Crystal structure of hinokiol isolated from *Isodon henryi*. *Chemistry of Natural Compounds*. **2007**, *43*(3), 274-276.
89. Wang, S. Y.; Wu, J. H.; Shyur, L. F.; Kuo, Y. H.; Chang, S. T. Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. **2002**, 487-492.
90. Bajpai, V. K.; Kang, S. C. Isolation and characterization of biologically active secondary metabolites from *Metasequoia glyptostroboides* Miki Ex Hu. *Journal of Food Safety*. **2011**, *31*(2), 276-283.
91. Lee, S. Y.; Choi, D. Y.; Woo, E. R. Inhibition of osteoclast differentiation by tanshinones from the root of *Salvia miltiorrhiza*

- Bunge. *Archives of Pharmacal Research*. **2005**, *28*(8), 909–913.
92. Rodríguez, B.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignments of some natural abietane diterpenoids. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2003**, *41*(9), 741–746.
93. Dellar, J. E.; Cole, M. D.; Waterman, P. G. Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. *Phytochemistry*. **1996**, *41*(3), 735–738.
94. Kuo, Y. H.; Lin, N. H.; Lin, Y. T. Two New Diterpens Phenols-7 $\alpha$ -Methoxydeoxocryptojaponol and 7 $\beta$ -Hydroxydeoxocryptojaponol. *Journal of the Chinese Chemical Society*. **1980**, *27*(1), 19–22.
95. Sen-Sung Cheng. "Analyses and Identification of Antifungal and Insecticidal Compounds from *Cryptomeria japonica*" for the Degree of Doctor of Philosophy in the School of Forestry and Resource Conservation National Taiwan University. June, **2006**.
96. KUO, Y. H.; WU, T. R.; CHENG, M. C.; WANG, Y. Five new compounds from the heartwood of *Juniperus formosana* Hayata. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. **1990**, *38*(12), 3195–3201.
97. Fukushima, J. I.; Yatagai, M.; Ohira, T. Abietane-type and labdane-type diterpenoids from the cones of *Chamaecyparis obtusa*. *Journal of wood science*. **2002**, *48*(4), 326–330.
98. Chira, N. A.; Nicolescu, A.; Stan, R.; Rosca, S. Fatty Acid Composition of Vegetable Oils Determined from  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectra. *Rev. Chim*. **2016**, *67*, 1257–1263.

99. Suthiwong, J.; Wandee, J.; Pitchuanom, S.; Sojikul, P.; Kukongviriyapan, V.; Yenjai, C. Cytotoxicity against cholangiocarcinoma and HepG2 cell lines of lignan derivatives from *Hernandia nymphaeifolia*. *Medicinal Chemistry Research*. **2018**, *27*(8), 2042-2049.
100. Miyata, M.; Itoh, K.; & Tachibana, S. Extractives of *Juniperus chinensis* L. I: Isolation of podophyllotoxin and yatein from the leaves of *J. chinensis*. *Journal of wood science*. **1998**, *44*(5), 397-400.
101. Arruda, C.; Eugênio, D. D. S.; Moreira, M. R.; Simaro, G. V.; Bastos, J. K.; Martins, C. H. G. Ambrósio, S. R. Biotransformation of (-)-cubebin by *Aspergillus* spp. into (-)-hinokinin and (-)-parabenzlactone, and their evaluation against oral pathogenic bacteria. *Natural product research*. **2018**, *32*(23), 2803-2816.
102. Takaku, N.; Choi, D. H.; Mikame, K.; Okunishi, T.; Suzuki, S.; Ohashi, H.; Umezawa, T.; Shimada, M. Lignans of *Chamaecyparis obtusa*. *Journal of wood science*. **2001**, *47*(6), 476-482.
103. Wang, X.; Lin, Y.; Geng, Y.; Li, F.; Wang, D. Preparative separation and purification of sesamin and sesamolin from sesame seeds by high-speed counter-current chromatography. *Cereal Chemistry*. **2009**, *86*(1), 23-25.
104. Zhou, L.; Li, D.; Wang, J.; Liu, Y.; Wu, J. Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. *Natural*

*Product Research*. 2007, 21(4), 283-291.

105. Lee, I. C.; Bae, J. S.; Kim, T.; Kwon, O. J.; Kim, T. H. Polyphenolic constituents from the aerial parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* collected on Ulleung Island. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2011, 54(5), 811-816.
106. Kim, S. H.; Kim, J. K.; Lee, Y. S.; Bae, Y. S.; Lim, S. S. Inhibitory Effect of quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside from *Chamaecyparis obtuse* on Aldose Reductase and Sorbitol Accumulation. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2010, 18(5): 305-310.
107. 김정은, 비쭈기나무 가지로부터 항산화, 미백 및 주름개선 활성 성분 규명, 제주대학교 2011, 석사학위논문.
108. Chan, L. P.; Chou, T. H.; Ding, H. Y.; Chen, P. R.; Chiang, F. Y.; Kuo, P. L.; Liang, C. H. Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2012, 1820(7), 1081-1091.
109. Xia, H.; Qiu, F.; Zhu, S.; Zhang, T.; Qu, G.; Yao, X. Isolation and identification of ten metabolites of breviscapine in rat urine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007, 30(7), 1308-1316
110. Fan, S. Y.; Zeng, H. W.; Pei, Y. H.; Li, L.; Ye, J.; Pan, Y. X.; Zhang,

- J. G.; Yuan, X.; Zhang, W. D. The anti-inflammatory activities of an extract and compounds isolated from *Platyclusus orientalis* (Linnaeus) Franco *in vitro* and *ex vivo*. *Journal of ethnopharmacology*. **2012**, *141* (2), 647-652.
111. Lee, S. H.; Son, M. J.; Ju, H. K.; Lin, C. X.; Moon, T. C.; Choi, H. G.; Son, J. K.; Chang, H. W. Dual inhibition of cyclooxygenases-2 and 5-lipoxygenase by deoxypodophyllotoxin in mouse bone marrow-derived mast cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2004**, *27*(6), 786-788.
112. Li, X. J.; Kim, K. W.; Oh, H.; Liu, X. Q.; Kim, Y. C. Chemical constituents and an antineuroinflammatory lignan, savinin from the roots of *Acanthopanax henryi*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2019**, *2019*.
113. Qiang, L.; Yuan, J.; Shouyin, J.; Yulin, L.; Libing, J.; Jian-An, W. Sesamin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibition of TLR4 signaling pathways. *Inflammation*. **2016**, *39*(1), 467-472.
114. Brighente, I. M. C.; Dias, M.; Verdi, L. G.; Pizzolatti, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical biology*. **2007**, *45*(2), 156-161.
115. Liu, Q.; Li, X.; Ouyang, X.; Chen, D. Dual effect of glucuronidation of a Pyrogallol-type phytophenol antioxidant: A comparison between scutellarein and scutellarin. *Molecules*. **2018**, *23*(12), 3225.
116. Yang Kuo, L. M.; Zhang, L. J.; Huang, H. T.; Lin, Z. H.; Liaw, C. C.;

- Cheng, H. L.; Lee, K. H.; Morris-Natschke, S. L.; Kuo, Y. H.; Ho, H. O. Antioxidant lignans and chromone glycosides from *Eurya japonica*. *Journal of natural products*. **2013**, *76*(4), 580-587.
117. Rammohan, A.; Bhaskar, B. V.; Camilo Jr, A.; Gunasekar, D.; Gu, W.; Zyryanov, G. V. In silico, in vitro antioxidant and density functional theory based structure activity relationship studies of plant polyphenolics as prominent natural antioxidants. *Arabian Journal of Chemistry*. **2020**, *13*(2), 3690-3701.
118. Materska, M.; Perucka, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and food Chemistry*. **2005**, *53*(5), 1750-1756.
119. 지식백과, "팔배나", NAVER 지식백과, <http://terms.naver.com/entry.nave?docId=1157415&cid=40942&categoryId=32718>
120. Khan, S.; Kazmi, M. H.; Inamullah, F.; Afaq, S.; Farhad, M. Z.; Ferheen, S.; Ismail, S. Genus *Sorbus* L.: A phytochemical review. *Int J Boil Biotech*. **2019**, *16*, 211-220.
121. Sołtys, A.; Galanty, A.; Podolak, I. Ethnopharmacologically important but underestimated genus *Sorbus* : a comprehensive review. *Phytochemistry reviews*. **2020**, *19*(2), 491-526.
122. Pongprayoon, U.; Baeckström, P.; Jacobsson, U.; Lindström, M.; Bohlin, L. Antispasmodic activity of  $\beta$ -damascenone and *E*-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica*. **1992**, *58*(01), 19-21.
123. Lee, S. Y.; So, Y. J.; Shin, M. S.; Cho, J. Y.; Lee, J. Antibacterial

- effects of afzelin isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, a leading cause of illness in immunocompromised individuals. *Molecules*. **2014**, *19*(3), 3173–3180.
124. Chen, C.; Hsieh, S.; Hsieh, M.; Hsieh, S.; Hsieh, T. Substituent chemical shift of rhamnosides from the stems of *Cinnamomum osmophloeum*. *CHINESE PHARMACEUTICAL JOURNAL-TAIPEI-*. **2004**, *56*(3/6), 141.
125. Lin, H. Y.; Chang, S. T. Kaempferol glycosides from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum* and their nitric oxide production inhibitory activities. *Carbohydrate research*. **2012**, *364*, 49–53.
126. Rho, H. S.; Ghimeray, A. K.; Yoo, D. S.; Ahn, S. M.; Kwon, S. S.; Lee, K. H.; Cho, D. H.; Cho, J. Y. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*. **2011**, *16*(4), 3338–3344.
127. Ando, H.; Ryu, A.; Hashimoto, A.; Oka, M.; Ichihashi, M. Linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Archives of dermatological research*. **1998**, *290*(7), 375–381.
128. Huh, S.; Kim, Y. S.; Jung, E.; Lim, J.; Jung, K. S.; Kim, M. O.; Lee, J.; Park, D. Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated from *Oxalis triangularis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2010**, *33*(7), 1242–1245.
129. Ragasa, C. Y.; Rideout, J. A.; Alimboyoguen, A. B. A Triterpene from *Rosa* sp. *Journal of Research in Science, Computing and Engineering*.

2007, 4(2), 1-1.

130. Chen, J.; Li, W. L.; Wu, J. L.; Ren, B. R.; Zhang, H. Q. Euscaphic acid, a new hypoglycemic natural product from *Folium Eriobotryae*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008, 63(10), 765-767.
131. Ahn, E. M.; Lee, M. H.; Rho, Y. D.; Baek, N. I. Isolation of daucosterol from the rice hull of *Oryza sativa* L. *Applied Biological Chemistry*. 1998, 41(6), 486-488.
132. 김미애, 보리밥나무 및 생달나무 가지의 향산화, 항염, 항균 활성 성분 연구, 제주대학교 2022, 석사학위논문.
133. Seigler, D. S.; Pauli, G. F.; Nahrstedt, A.; Leen, R. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*. 2002, 60(8), 873-882.
134. Moon, M. Y.; Baik, J. S.; Kim, S. S.; Jang, W. J.; Kim, M. S.; Lee, N. H. Identification of antioxidative constituents from the branches of *Quercus gilva* Blume. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 2009, 35(3), 251-256.
135. Song, N. Y.; Cho, J. G.; Im, D.; Lee, D. Y.; Wu, Q.; Seo, W. D.; Kang, H. C.; Lee, Y. H.; Baek, N. I. Triterpenoids from *Fragaria ananassa* calyx and their inhibitory effects on melanogenesis in B16-F10 mouse melanoma cells. *Natural Product Research*. 2013, 27(23), 2219-2223.