



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

솔잎과 경단구슬모자반으로부터
항산화, 미백 및 주름 개선 활성
성분 규명



濟州大學校 大學院

化 學 科

姜 承 協

2015年 2月

솔잎과 경단구슬모자반으로부터 항산화, 미백 및 주름 개선 활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

姜 承 協

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



姜承協의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2015年 2月

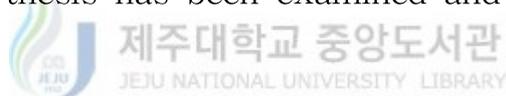
Identification of Anti-oxidative,
Skin Whitening and Anti-wrinkle Constituents
from the Leaves of *Pinus densiflora* and
Sargassum Muticum

Seung Hyeob Kang
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2015. 2.

This thesis has been examined and approved.



Committee Chairman,

Committee Member,

Committee Member,

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	iii
List of Tables	iii
List of Figures	iii
List of Abbreviations	vii
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	10
1. 시약 및 기기	10
2. 재료	11
3. 추출, 분획 및 분리	13
3-1. 솔잎과 경단구슬모자반의 추출 및 분획	13
3-2. Ethyl acetate layer의 화합물 분리	14
4. 활성실험	18
4-1. 항산화 활성 실험	18
4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정	18
4-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정	18
4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험	19
4-1-4. ABTS radical cation 소거 활성 실험	20
4-2. Elastase 저해 활성 실험	22
4-3. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험	23
4-3-1. 세포배양	23
4-3-2. Melanogenesis 저해 효과 측정 실험	23
4-3-3. 세포독성 평가 실험	24

III. 결과 및 고찰	26
1. 화합물의 구조 결정	26
1-1. 솔잎	26
1-1-1. Compound 1의 구조해석	26
1-1-2. Compound 2의 구조해석	29
1-1-3. Compound 3의 구조해석	32
1-1-4. Compound 4의 구조해석	35
1-2. 경단구슬모자반	
1-2-1. Compound 1의 구조해석	38
1-2-2. Compound 2의 구조해석	40
1-2-3. Compound 3의 구조해석	42
2. 항산화 활성 실험 결과	45
2-1. 총 폴리페놀 함량 측정	45
2-2. 총 플라보노이드 함량 측정	47
2-3. DPPH radical 소거 활성	49
2-4. ABTS radical cation 소거 활성	51
3. Elastase 저해 활성 실험 결과	53
4. Melanogenesis 저해 활성 실험 결과	56
IV. 요약 및 결론	60
V. 참고문헌	62

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fractionation from <i>P. densiflora</i>	13
Scheme 2. Procedure of extraction and solvent fractionation from <i>S. muticum</i>	14
Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 1, 2, 3, 4 from <i>P. densiflora</i>	15
Scheme 4. Procedure of isolation of compound 1 from <i>S. muticum</i>	16
Scheme 5. Procedure of isolation of compound 2, 3 from <i>S. muticum</i>	17

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1	27
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 2	30
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 3	33
Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 4	36
Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1	38
Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 2	40
Table 7. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 3	43

List of Figures

Figure 1. Anti-oxidative pathway	1
Figure 2. Chemical structures of anti-oxidants	2
Figure 3. Chemical structures of anti-oxidants and anti-wrinkle ingredients	5

Figure 4. Melanin synthetic pathway	6
Figure 5. Pictures of <i>Pinus densiflora</i>	11
Figure 6. Pictures of <i>Sargssum muticum</i>	12
Figure 7. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant	19
Figure 8. Scavenging of ABTS ⁺ radical by an anti-oxidant	22
Figure 9. Principle of MTT assay	25
Figure 10. Chemical structure of compound 1	27
Figure 11. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	28
Figure 12. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	28
Figure 13. Chemical structure of compound 2	29
Figure 14. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	31
Figure 15. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	31
Figure 16. Chemical structure of compound 3	32
Figure 17. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	34
Figure 18. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	34
Figure 19. Chemical structure of compound 4	35
Figure 20. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	37
Figure 21. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	37
Figure 22. Chemical structure of compound 1	38
Figure 23. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in DMSO- <i>d</i> ₆	39
Figure 24. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in DMSO- <i>d</i> ₆	39
Figure 25. Chemical structure of compound 2	40
Figure 26. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	41
Figure 27. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	41
Figure 28. Chemical structure of compound 3	42
Figure 29. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	44
Figure 30. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	44
Figure 31. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	45

Figure 32. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers of <i>S. muticum</i>	46
Figure 33. Total flavonoids contents of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	47
Figure 34. Total flavonoids contents of extract and solvent layers of <i>S. muticum</i>	48
Figure 35. DPPH radical scvenging activities of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	49
Figure 36. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	50
Figure 37. DPPH radical scvenging activities of extract and solvent layers of <i>S. muticum</i>	50
Figure 38. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	51
Figure 39. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	52
Figure 40. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers of <i>S. muticum</i>	52
Figure 41. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	53
Figure 42. IC ₅₀ values of elastase inhibition activities of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	54
Figure 43. Elastase inhibition activity of H ₂ O layer of <i>P. densiflora</i>	54
Figure 44. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers of <i>S. muticum</i>	55
Figure 45. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of extract and solvent layers of <i>P. densiflora</i>	56
Figure 46. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of extract and solvent layer of <i>S. muticum</i>	57

Figure 47. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of <i>n</i> -Hex layer of <i>P. densiflora</i>	58
Figure 48. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of <i>n</i> -Hex layer of <i>S. muticum</i>	59



List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BHT	Butylated hydroxytoluene
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CHCl ₃	Chloroform
COSY	Correlation spectroscopy
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Fr.	Fraction
int	Integration
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
NMR	Nuclear magnetic resonance
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
<i>P. densiflora</i>	<i>Pinus densiflora</i>
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
<i>S. muticum</i>	<i>Sargassum muticum</i>
TLC	Thin layer chromatography
Vit.C	Vitamin C

Abstract

Identification of Anti-oxidative, skin whitening and Anti-wrinkle Constituents from the Leaves of *Pinus densiflora* and *Sargassum muticum*

Seung Hyeob Kang

Department of Chemistry, Graduate School

Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

Phytochemical investigation of the 70% ethanol extract from *Pinus densiflora* leaves led to isolation of four compounds; catechin (1), shikimic acid (2), icaraside E4 (3), (+)-isolariciresinol (4). In addition, the investigation of *Sargassum muticum* resulted in the isolation of three compounds; mannitol (1), uracil (2), loliolide (3).

For the total phenolic contents for the extract and solvent layers of *P. densiflora* were estimated as 114.6, 48.4, 188.4, 102.1, 108.4 μg (GAE/1 mg) respectively. And the total polyphenolic contents for the extract and solvent layers of *S. muticum* were estimated as 20.9, 23.4, 24.6, 20.9, 18.4 μg (GAE/1 mg) respectively. The total flavonoids contents for the extract and solvent layers of *P. densiflora* were estimated as 16.8, 40.1, 82.6, 10.9, 10.9 μg (quercetin/1 mg) respectively. In case of *S. muticum*, the extract and solvent layers were estimated as 14.3, 10.9, 38.4, 8.4, 8.4 μg (quercetin/1 mg) respectively.

The anti-oxidation tests, the ethanol extract, EtOAc, BuOH and H₂O fractions of *P. densiflora* showed good DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities. However extract and solvent layers of *S. muticum* showed not good

activities.

On the elastase inhibition studies, the extract and solvent layers of *P. densiflora* showed good elastase inhibition activities. But *S. muticum* did not show good elastase inhibition activities.

On the melanogenesis inhibition activity test using B16F10 cell, *n*-Hex layer of *P. densiflora* and *n*-Hex, EtOAc layer of *S. muticum* showed good melanogenesis inhibition activities.

Based on these results, it is suggested that *Pinus densiflora* leaves and *Sargassum muticum* extract could be potentially applicable in the cosmetic and/or pharmaceutical industries, especially as anti-oxidant and anti-aging, skin whitening ingredients.



I. 서론

모든 생명체는 생체 내에서 산소를 전자 수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득하게 되는데 흡입된 대부분의 산소는 대사 과정에서 안전한 물로 환원되지만 일부는 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)로 전환된다.

활성산소는 생체 내 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등과 같은 효소의 항산화 기작에 의해 대부분 소멸된다(Figure 1). 그러나 활성산소가 정상적으로 소멸되지 않을 때 자유 라디칼(free radical)로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에 가해져 세포 구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA, 등에 대하여 비 선택적, 비 가역적인 파괴 작용을 나타냄으로써 노화는 물론 성인병과 암을 비롯하여 각종 질병을 일으키는 원인이 되고 있다.

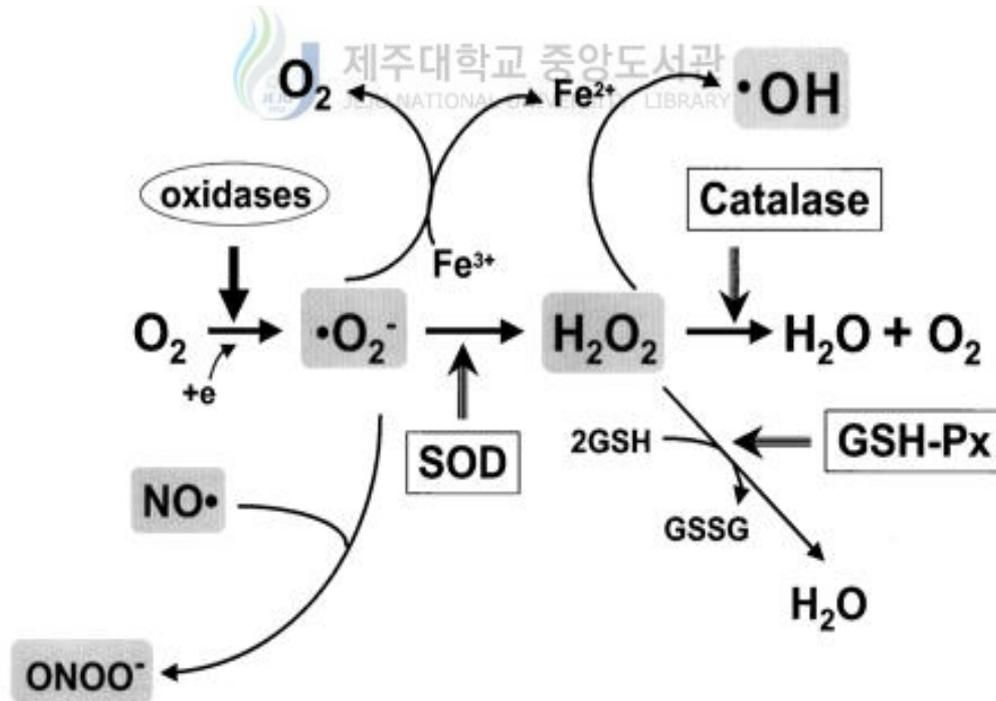


Figure 1. Anti-oxidative pathway.

특히 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 점차 인정되어 짐에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 물질인 항산화제에 대한 관심이 증대되고 있다.

활성산소의 독성을 억제하기 위한 항산화제로는 butylated hydroxyanisole (BHA) 와 butylated hydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제와 tocopherol과 같은 천연 항산화제가 있다(Figure 2).

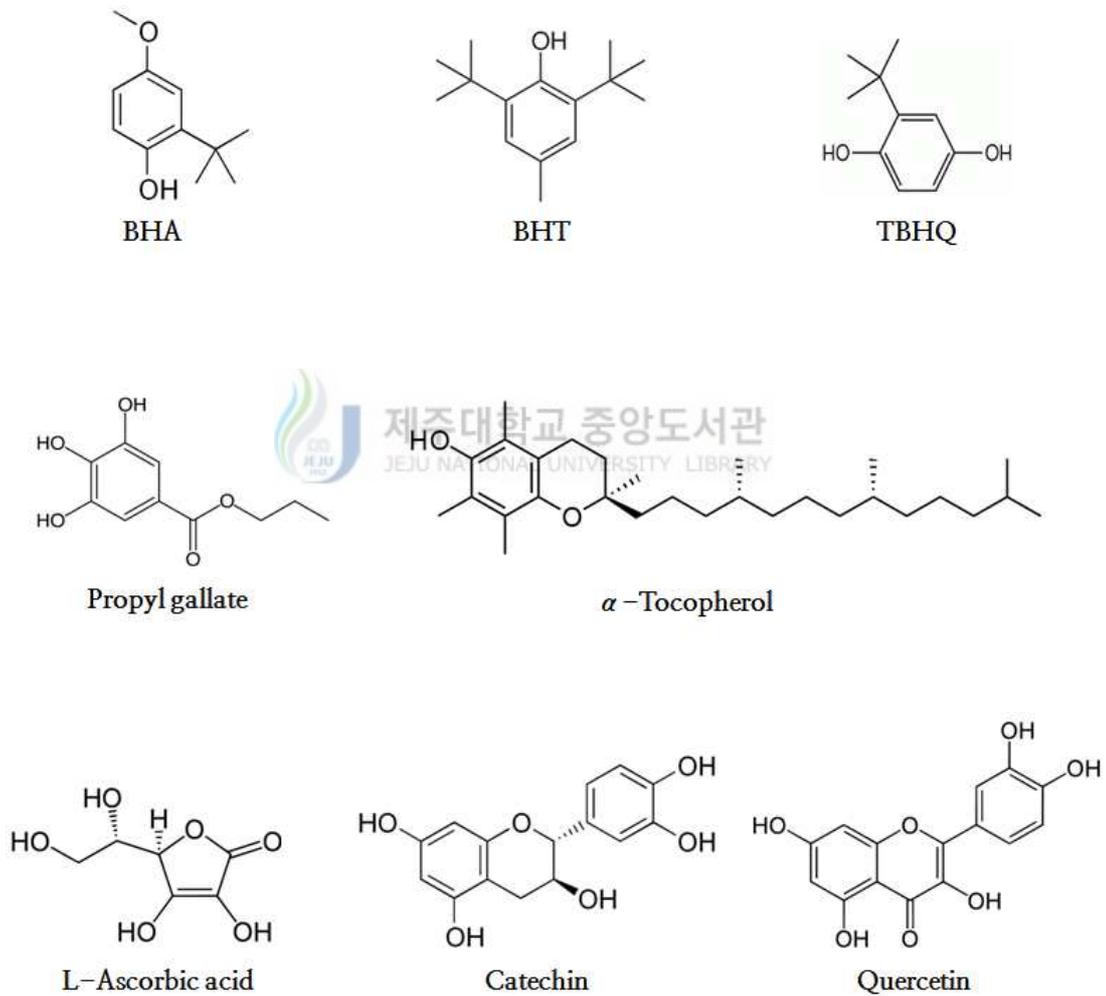


Figure 2. Chemical Structures of Anti-oxidants.

Tocopherol은 천연 항산화제이지만 가격이 높고, BHA와 BHT는 우수한 항산화 능력을 보이고 있지만 과량으로 섭취할 경우 암 유발 가능성 등의 안정성이 논란이 되고 있다. 따라서 생체 내 무해하면서 항산화 방어 시스템을 증가시키거나 활성산소를 조절할 수 있는 합성 또는 천연 항산화제 개발 연구의 필요성이 강조되고 있고 이에 대한 탐색이 활발하게 진행되고 있다.¹⁾

사람이 나이가 들면서 나타나는 피부 노화(skin aging)는 피부세포 및 조직의 구조적 기능적인 변화에 의한 현상으로 내인성 노화(intrinsic aging)와 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분된다. 내인성 노화는 나이가 들어감에 따라 자연스럽게 생기는 변화로 유전적 요인이 가미된 피부 주름의 발생을 의미하고 외인성 노화의 경우는 자외선, 중력, 오염된 공기와 같은 환경적 요인에 의한 피부 주름의 발생을 의미한다. 내인성 노화와 외인성 노화는 모두 피부 진피층에 존재하는 세포외기질(extracellular matrix)의 구조적인 변화로 발생되는데, 그 구성 요소 중 탄력섬유(elastic fiber)의 변성과 교원질(collagen) 양의 감소가 피부의 주름을 야기한다.

노화된 피부의 대표적인 증상은 탄력 저하에 의해 유발된 잔주름의 발생이며, 이는 피부 진피 조직의 교원질에서 피부 탄력과 관련된 collagen 단백질의 현저한 감소에 의해서 발생될 수 있다. Collagen은 진피의 90% 이상을 차지하고 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 그렇기 때문에 collagen의 감소는 피부 노화 및 주름 생성과 매우 깊은 관계를 가지고 있다.

Collagen 분해와 관련된 분자 기작으로 전사 인자인 AP-1 (activating protein-1)에 의해 유도되는 MMPs (matrix metalloproteinases)에 의해서 세포외기질과 type-1 procollagen의 분해가 일어난다. MMP family 중 MMP-1은 collagen을 분해시키는 대표적인 분해 효소로 알려져 있고, 이와는 반대로 TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase)은 collagen 분해 효소의 활성을 억제시키는 억제제로 알려져 있다. 즉, 피부 주름의 형성은 두 효소에 의해 영향을 받게 되고, 대부분 주름 형성의 억제 효과에 관한 연구는 두 인자의 조절을 목적에 두고 있다.

또한, 피부의 노화를 이끄는 주요 요인 중에는 collagen의 감소와 관련하여 자외선이나 스트레스에 의한 활성산소의 생성을 들 수 있다. 피부에서의 활성산소

의 생성은 세포막을 공격함으로써 세포에 손상을 입혀 그 기능을 상실하게 한다.

피부 세포로서의 기능 상실은 피부의 거친 상태를 형성하거나 유지시키고, 윤기를 없애는 결과를 초래함으로써 피부의 주름을 유발하게 된다. 결국, 생체 내 활성산소의 생성은 MMPs 유전자와 collagen 분해 효소의 연쇄적인 활성화를 유도함으로써 collagen의 구조적인 파괴를 유발하고 피부의 탄력을 감소시키는 피부 주름의 형성을 이끌게 된다. 따라서 피부 노화는 collagen 분해 효소와 활성산소의 생성 억제, collagen의 합성을 촉진시킴으로써 피부 노화의 완화 효과를 나타낼 수 있다.²⁾

Elastase 역시 탄력 섬유 분해 과정에서 탄력소를 분해하는 효소로 자외선 조사에 의해 그 활성이 증가하여 광노화 현상에 관여하게 된다. 그러므로 피부 노화와 주름 개선에 있어 활성산소를 제거하는 항산화 물질이나 collagenase의 작용을 억제하고 collagen의 합성을 촉진시키는 소재의 발굴이 중요하다고 할 수 있다. 현재 주름 개선의 치료제나 약물로 이용되는 것들은 비타민 A와 그 유도체, 그 외에 많은 항산화제가 있다. 하지만 그러한 물질들을 화장품에 적용 시 피부에 대한 안정성에 문제점이 있어 이를 해결하고자 비교적 부작용이 적은 천연물에서 주름 개선 소재를 탐색하여 미용 기능 식품으로 개발하고자 노력을 기울이고 있다. 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있는데, 이 화합물은 하나 또는 둘 이상의 하이드록시기로 치환된 방향족 고리를 가지고 있으며 자연에 대략 8000종이 존재한다. 또한 주름 개선 물질로는 oleanolic acid, ursolic acid, dehydroepiandrosterone (DHEA) 등이 있다³⁾(Figure 3).

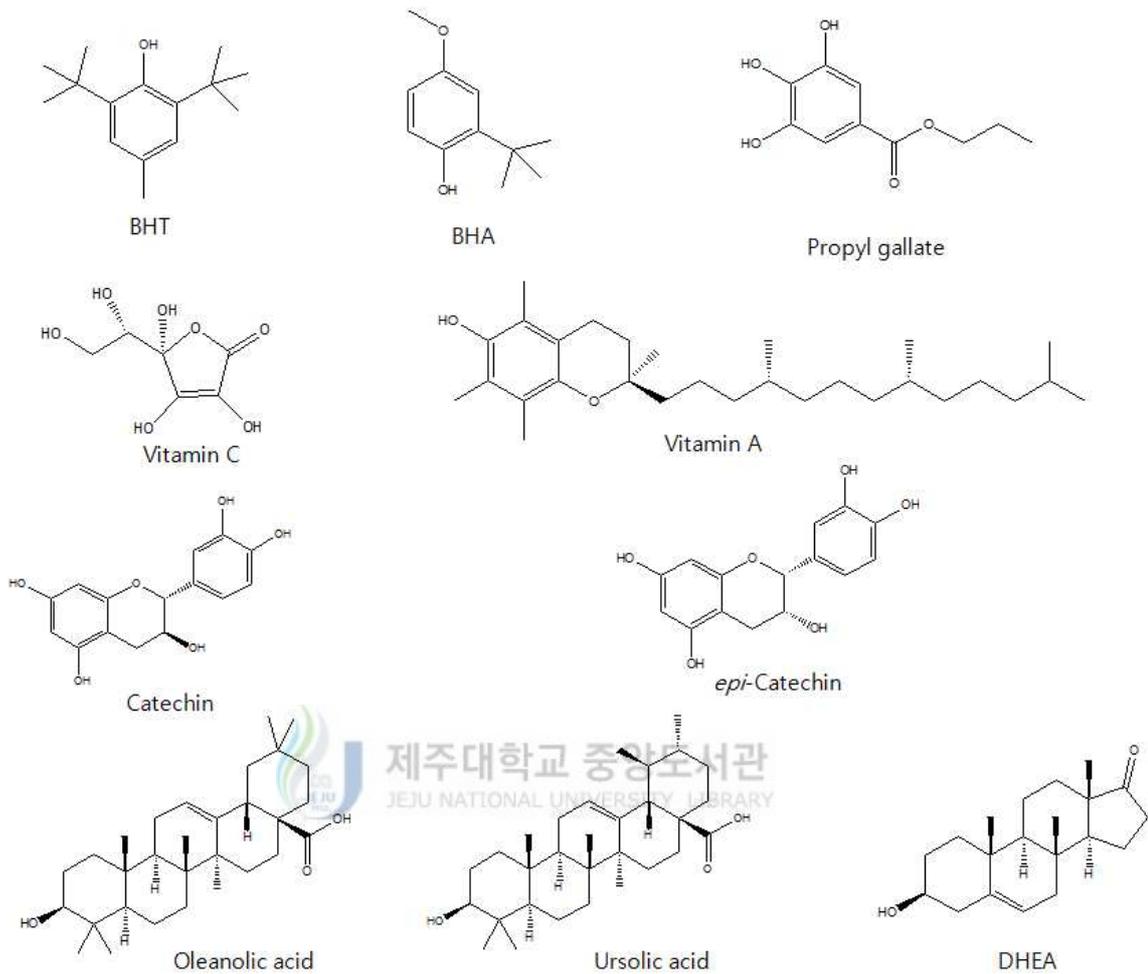


Figure 3. Chemical structures of anti-oxidants and anti-wrinkle ingredients.

자외선과 같은 외부 자극이 피부에 가해지면, 기저층에 있는 melanocyte가 유해한 자극으로부터 피부를 보호하기 위한 방어 기전으로 melanin 합성을 유도한다.

과도한 melanin의 생성은 기미, 주근깨, 일광성 흑점, 과색소 침착증 등의 색소 침착을 야기한다. 특히 이러한 현상은 노화가 진행될수록 더욱 심하게 나타난다. 체내의 melanin 생성은 다양한 기전에 의해 진행되지만 UV노출에 의한 melanin

합성은 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) / protein kinase A(PKA) 경로에 의해 합성된다. 피부가 UV에 노출되면 melanocyte의 cAMP가 증가하여 신호물질인 PKA를 활성화한다. PKA가 활성화 되면 cAMP response element binding protein (CREB)을 거쳐 melanin 합성 과정에서 중요한 전사 조절인자인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진시키는 MITF의 발현이 증가된다. 따라서 melanin의 합성 조절에 대한 연구가 많이 수행되었으며 특히 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosinase에 영향을 주는 요인에 초점이 맞춰져 있다. Tyrosinase는 tyrosine hydroxylase로 작용하여 tyrosine을 DOPA로 전환하고 뿐만 아니라 DOPA oxidase로도 작용하여 DOPA를 dopa-quinone으로 전환하는 속도 결정 단계의 초기 반응에 작용하여 melanin의 합성을 돕는 효소이다(Figure 4).

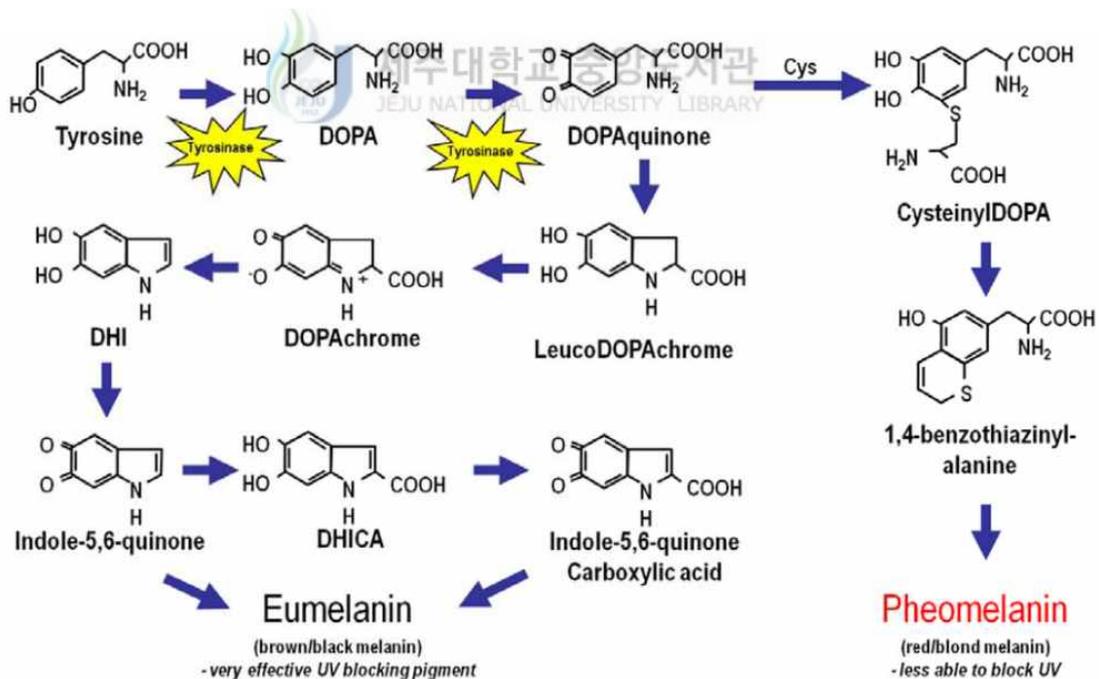


Figure 4. Melanin synthetic pathway.

이러한 피부 노화는 melanin의 축적뿐만 아니라 유해 활성산소종의 축적에 의해서도 야기된다. 체내 항산화 효소계에 의해 제거되지 못한 유해 활성산소종은 세포, 지질, 단백질, DNA 등에 손상을 주어 세포 및 진피 층의 주요 구성을 파괴하여 주름 탄력 저하 등을 야기한다.⁴⁾

현재까지 가장 잘 알려진 미백제로는 arbutin, vitamin C 등이 있다. Arbutin과 vitamin C는 tyrosinase의 활성 부위에 결합하여 tyrosinase에서 DOPA-quinone으로 산화하는 과정을 억제한다. 그러나 현재 피부 안정성 등의 이유로 사용에 제한을 두고 있는 실정이다. 따라서 천연 소재를 이용한 미백제의 연구가 증가하고 있다.⁵⁾



1. 솔잎

소나무는 솔, 솔나무, 소오리나무라고도 한다. 한자어로 송(松), 적송(赤松), 송목, 청송이라 한다. 줄기는 높이 35 m 지름 1.8 m 정도이며 수피는 붉은빛을 띤 갈색이나 밑 부분은 검은 갈색이다. 바늘잎은 2 개씩 뭉쳐나고 길이 8~9 cm, 너비 1.5 mm이다. 2년이 지나면 밑 부분의 바늘잎이 떨어진다.

꽃은 5월에 피고 수꽃은 새 가지의 밑 부분에 달리며 노란색으로 길이 1 cm의 타원형이다. 암꽃은 새 가지의 끝 부분에 달리며 자주색이고 길이 6 mm의 달걀 모양이다. 열매는 달걀 모양으로 길이 4.5 cm, 지름 3cm이며 열매 조각은 70 ~ 100 개이고 다음해 9 ~ 10월에 노란 빛을 띄는 갈색으로 익는다.

종자는 길이 5 ~ 6 cm, 너비 3 mm의 타원형으로 검은 갈색이며 날개는 연한 갈색 바탕에 검은 갈색 줄이 있다. 잎은 각기 소화불량 또는 강장제로, 꽃은 이질에, 송진은 고약의 원료 등에 쓴다. 화분은 송홧가루로 다식을 만들며 껌질은 송기떡을 만들어 식용한다. 건축재, 펄프용재로 이용되고 테레핀유는 페인트, 니스용재, 합성장뇌의 원료로 쓰인다. 관상용, 정자목, 신목(神木), 당산목으로 많이 심었다.

중국 북동부, 우수리, 일본에 분포하고 한국의 북부고원지대를 제외한 전역에 자라며 수직적으로는 1,600 m 이하에 난다. 남북송은 열매인 구과가 가지의 밑 부분에 모여난다. 금송은 잎의 밑 부분을 제외하고 전부 황금 빛깔을 띤다. 여복송은 열매인 구과가 가지의 끝부분에 여러 개가 모여 달린다.

금강 소나무는 줄기가 뭉뚱하고 곧게 자라며 외형적으로 소나무의 형태이나 곰솔의 요소가 있기 때문에 소나무와 곰솔 간의 잡종으로 본다. 처진 소나무는 가지가 가늘고 길어서 아래로 늘어진 형태이다. 반송은 줄기 밑 부분에서 굵은 겉가지가 많이 갈라지며 수형이 우산처럼 다복하다. 은송은 잎에 흰색 또는 황금색의 가는 선이 세로로 있다.⁶⁾

솔잎에 대해서는 항산화활성과 항염 활성이 보고되어 있으며 화합물이 분리 동정되어 보고되어 있다.

2. 경단구슬모자반

엽체는 소반상근에서 단독 직립하고, 0.3 ~ 1 m까지 자란다. 줄기는 짧고 여러 개의 중심 가지를 낸다. 중심가지는 원주상이거나 다소 편압되고, 직경 1.5 ~ 2.0 mm이다. 표피세포는 횡단면에서 길이 25 ~ 30 μm , 폭 10 ~ 12 μm 이고 수층세포는 횡단면에서 수직으로 신장된 타원형으로 장경 20 ~ 55 μm , 단경 18 ~ 20 μm 이며 종단면에서 길이 110 ~ 135 μm 이다. 생육 환경과 지역에 따라 측지의 발달 정도에서 차이를 보인다. 조간대 하부에서 자라는 개체는 측지의 수가 적고 조하대에서 자라는 개체는 호생으로 측지를 계속 낸다. 잎은 주걱형, 장타원형, 썸기 모양이고, 전연 또는 거치가 있으며 길이 1 ~ 1.5 cm, 폭 2~4 mm이고 두께 200 ~ 250 μm 이며 엽병이 짧다. 표피세포는 횡단면에서 길이 25~32 μm , 폭 8 ~ 15 μm 이고 수층세포는 횡단면에서 표피세포 층을 따라 신장된 타원형으로 장경 25 ~ 60 μm , 단경 40 ~ 95 μm , 길이 70 ~ 100 μm 이다. 기낭은 구형 또는 도란형이고 둥글거나 짧은 돌기를 갖는다.

생식기탁은 자웅동주이고, 원주상이며 길이 1 ~ 1.5 cm, 직경 1.0 ~ 1.2 mm이다. 자성, 웅성 생식소는 하나의 생식 기탁이 함께 발달하고 장란기와 장정기가 동일한 생식소에서 형성되기도 한다. 생식소는 횡단면에서 6 ~ 8 개가 형성되고, 중심을 향해 타원형 또는 도란형으로 길이 280 ~ 320 μm , 폭 240 ~ 260 μm 이다. 장란기는 자성 생식소 안에 5 ~ 7 개가 형성되거나 생식소 안에 함께 발달하는 경우에 1 ~ 3 개가 형성되고 구형 또는 타원형이며 길이 130 ~ 150 μm , 폭 80 ~ 110 μm 이다. 장정기는 타원형 또는 도란형으로 길이 21 ~ 28 μm , 폭 9 ~ 15 μm 이다. 본 종은 국내와 일본에서 *S. kjellmanlanum* Yendo (1907)로 알려져 왔으나 Yoshida (1978, 1983)에 의하여 *S. muticum*임이 확인되었다.⁷⁾

경단구슬모자반에 대해서는 화합물이 분리 동정되어 있고 항염 활성이 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 솔잎과 경단구슬모자반의 추출물 및 분획물의 다양한 생리 활성을 검색하고 화합물을 분리하여 구조를 동정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck, Junsei 의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (2-25 μm , Sigma Co.), normal-phase column chromatography (CC)에는 silica gel (95-110 μm , Merck Co.)이 사용되었고, 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20 (0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리 과정에 사용된 thin-layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 SunriseTM (Tecan Co.)을 이용하였다.

구조분석에 이용된 MPLC (Medium pressure liquid chromatography)는 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400(FT-NMR system, JEOL)와 AVANCE III 500 (FT-NMR system, Bruker)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로, NMR 측정 용매는 Merck의 NMR 전용용매로 CD₃OD, CDCl₃, DMSO-*d*₆를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 솔잎(시료번호 : 348)은 2013년 11월에 고산에서 채집하였다. 채집한 솔잎은 실온 및 음지에서 완전히 자연 건조 하였으며 분쇄하여 사용하였다 (Figure 4).



Figure 5. Pictures of *Pinus densiflora*.

경단구슬모자반(시료번호 : SW 001)은 제주 생물 종 다양성 연구소에서 추출물을 분양 받아 사용하였다(Figure 6).



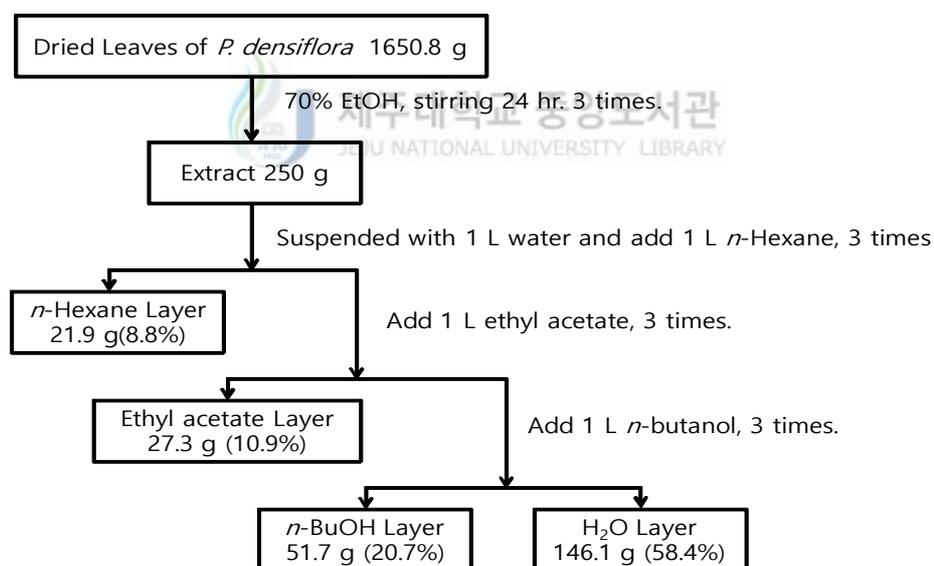
Figure 6. Picture of *Sargassum muticum*.

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 술잎과 경단구슬모자반의 추출 및 분획

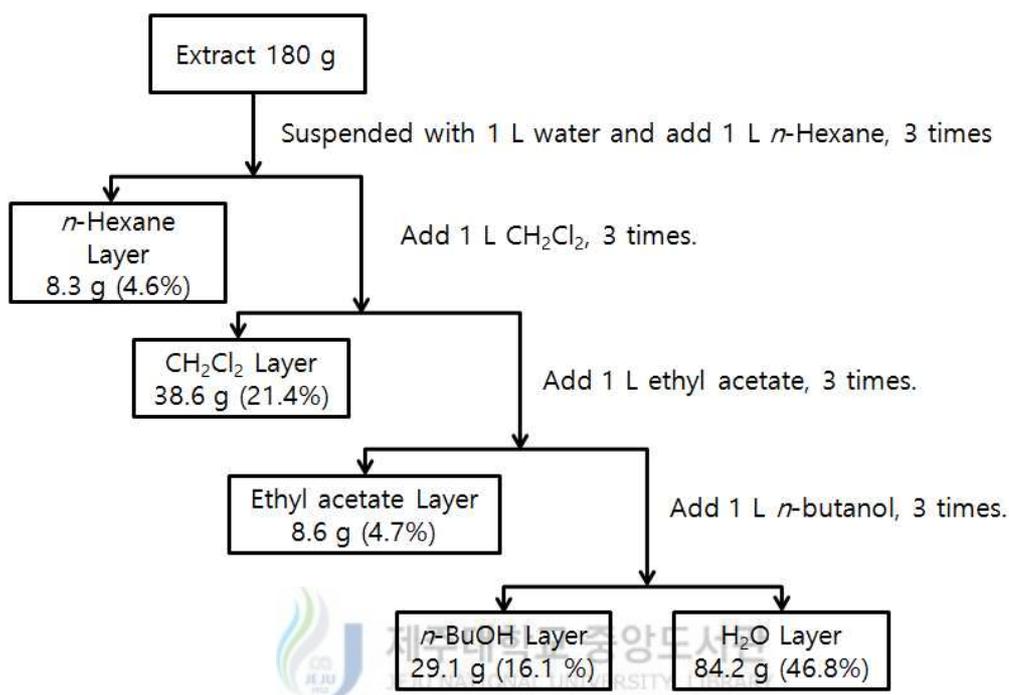
건조된 술잎 1.65 kg을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 20 L에 넣고 실온에서 24 시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 진공 농축기 (rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 459.3 g을 얻었다.

이 중 추출물 250 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer, ethyl acetate layer, *n*-butanol layer, water layer 등 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from *P. densiflora*.

경단구슬모자반 추출물 180 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer, ethyl acetate layer, *n*-butanol layer, water layer 등 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다(Scheme 2).



Scheme 2. Procedure of extraction and solvent fraction from *S. muticum*.

3-2. Ethyl acetate layer에서의 화합물 분리

3-2-1. 솔잎

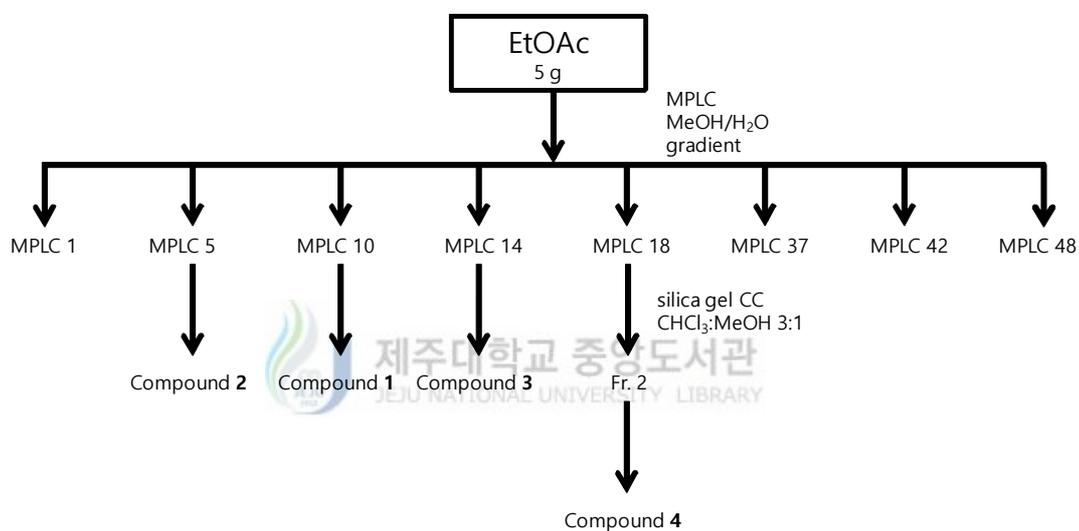
용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 5.0 g을 ODS (C-18) column을 이용하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. H₂O/MeOH 용매조건으로 10% MeOH ~ 90% MeOH로 gradient하여 각 35 mL씩 용출하여 총 48개의 fraction을 얻었다.

MPLC fraction들 중 Fr. MPLC5 (91.6 mg)에서 compound 2 (91.6 mg)를 분

리하였다.

Fr. MPLC10 (53.7 mg)에서는 compound 1 (53.7 mg)을 분리하였다. 또한 Fr. MPLC14 (118.7 mg)에서 compound 3 (118.7 mg)을 분리하였다.

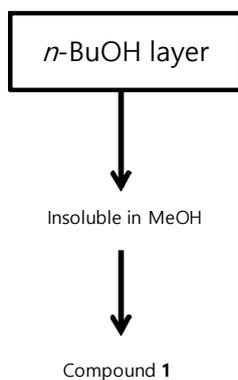
Fr. MPLC18 에서는 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=3:1$ 의 용매조건으로 silica gel CC를 수행하여 compound 4 (12.5 mg)을 분리하였다(Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of isolation of compound 1~4 from *P. densiflora*.

3-2-2. 경단구슬모자반

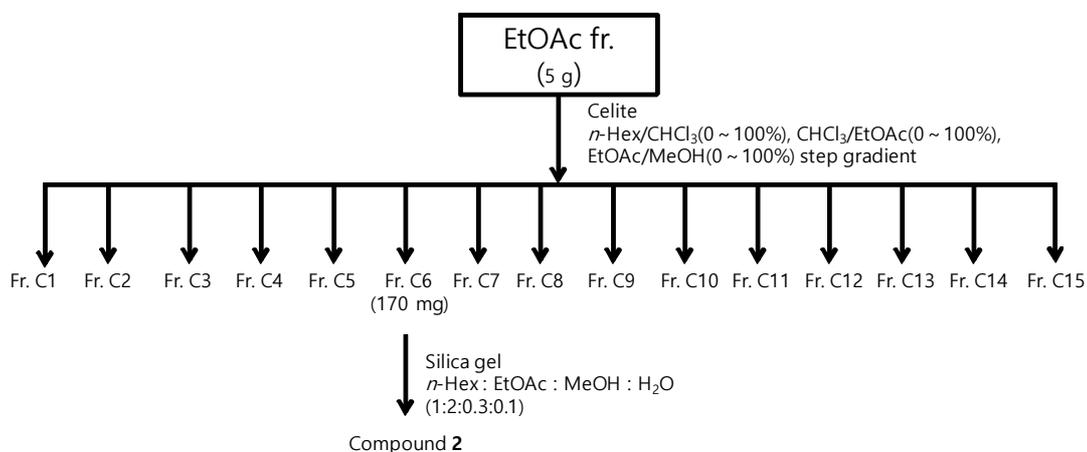
경단구슬모자반의 *n*-BuOH 층에 MeOH를 가했을 때 녹지 않고 가라앉는 것을 이용하여 compound 1 (13.1 mg)을 분리하였다(Scheme 4).



Scheme 4. Procedure of isolation of compound 1 from *S. muticum*.

용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 5 g을 celite를 충전한 column을 이용하여 *n*-Hex/CHCl₃ (0~100%), CHCl₃/EtOAc (0~100%), EtOAc/MeOH (0~100%) 용매조건으로 step gradient 하였다. 이 과정에서 총 15개의 분획물을 얻었다.

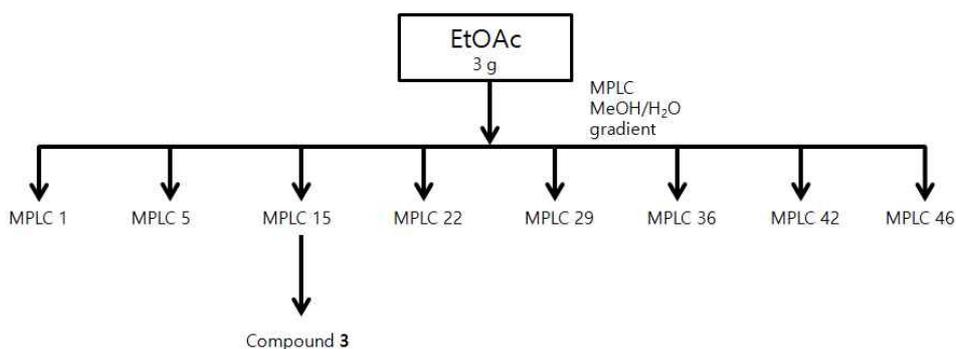
얻어진 15개의 분획물 중 Fr. C2 170 mg을 Hex : EtOAc : MeOH : H₂O=1:2:0.3:0.1의 조건으로 silica gel column을 수행하여 compound 2 (2.1 mg)를 분리하였다(Scheme 5).



Scheme 5. Procedure of isolation of compound 2 from
S. muticum

용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 3.0 g을 ODS (C-18) column을 이용하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. H₂O/MeOH 용매조건으로 10% MeOH ~ 90% MeOH로 gradient하여 각 35 mL씩 용출하여 총 46개의 fraction을 얻었다.

이 중 MPLC15 55.6 mg에서 compound 3 (55.6 mg)을 분리하였다(Scheme 6).



Scheme 6. Procedure of isolation of compound 3 from
S. muticum.

4. 활성실험

4-1. 항산화 활성 실험

4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법⁸⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준 용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준 곡선으로 이용하였다. 표준 곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO:EtOH =1:1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL이 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 µL를 micro tube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합하고, 증류수 700 µL를 가하여 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하고, 총 폴리페놀 함량을 환산하였다.

4-1-2 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis법⁹⁾을 변형하여 실시하였다. 각 시료들을 1 mg/mL로 용매에 녹인 다음, micro tube에 시료 용액 15 µL와 ethylene glycol 150 µL를 첨가하여 혼합한 후 다시 0.1 N NaOH 15 µL를 넣고 37°C 항온조에서 1시간 동안 반응 후 UV-Visible spectrometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 quercetin을 이용하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radical들은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여 받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되어 515 nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다(Figure 7).

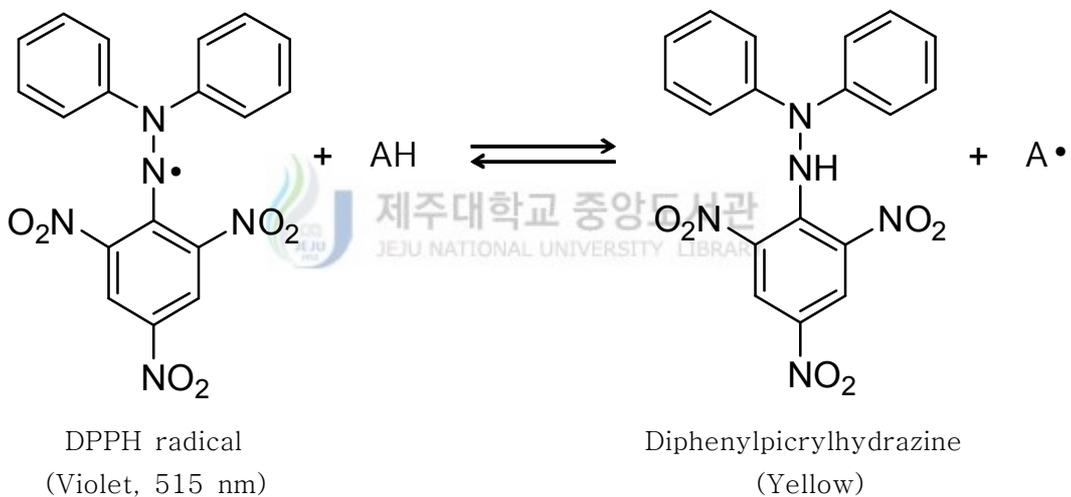


Figure 7. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant.

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 방법¹⁰⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L (in EtOH)와 0.2 mM DPPH (in EtOH) 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 25분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거 활성 백

분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 양성대조군(positive control)으로는 vitamin C와 BHT를 사용하였다.

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

A_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 515 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-1-4. ABTS radical cation 소거 활성 실험

ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 total antioxidant activity (TAC)의 측정방법 중의 한 가지로 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 특징적인 청록색을 띠는 ABTS⁺ (ABTS radical cation)이 형성되는 것을 이용한 방법이다. 이 청록색의 ABTS⁺는 산화될 수 있는 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 그와 반응한 물질의 산화가 일어나게 되어 흡광도의 감소가 일어나게 되면 항산화 능력을 측정할 수 있다 (Figure 8).

ABTS radical cation 소거 활성은 Re, Pellegrin 등의 방법¹¹⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

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

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 µL (in EtOH)와 ABTS 용액 180 µL를 혼합하여 15분간 암소에서 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여

700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거 활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C와 BHT를 사용하였다

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

A_{control} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 sample과 ABTS 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도



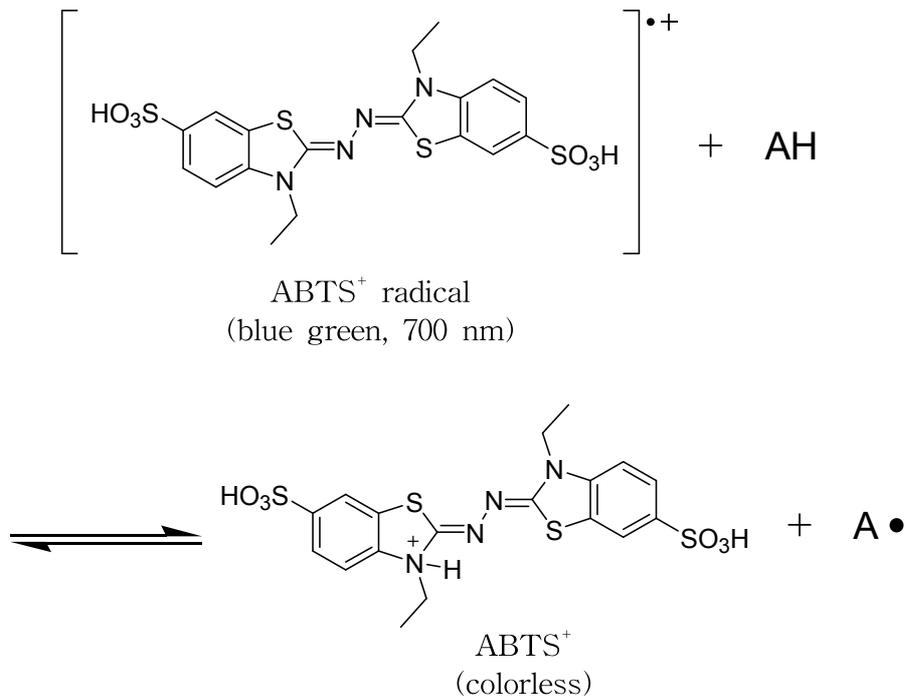


Figure 8. Scavenging of ABTS⁺ radical by an anti-oxidant.



4-2. Elastase 저해 활성 실험

돼지췌장 elastase (Porcine pancreatic elastase, PPE) 저해 활성은 기질로 *N*-succ(Ala)₃-*p*-nitroanilide (SANA)와 함께 분광광도법을 사용한 방법으로 실시되었다.

0.2 M tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.1 mg/mL elastase, 기질로 12.5 mM SANA, 그리고 각 시료들을 농도별로 준비한다.

본 실험에서는 96 well plate에 시료용액을 20 μL, 6.25 mM SANA 와 tris-HCl buffer의 혼합용액 130 μL, elastase와 tris-HCl의 혼합용액 50 μL를 넣고 25°C에서 15분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 이를 바탕으로 elastase의 활성을 50% 저해시키는데 필요한 시료의 농도를 계산하였다.

대조군으로는 oleanolic acid와 ursolic acid를 사용하였다.

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

$\text{Abs}_{\text{sample}}$: 시료 반응용액의 흡광도

$\text{Abs}_{\text{blank}}$: 시료만의 흡광도

$\text{Abs}_{\text{control}}$: 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

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

4-3. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험

4-3-1. 세포배양



Murine B16F10 melanoma cell은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin- streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-3-2. Melanogenesis 저해효과 측정 실험

6 well plate에 B16F10 cell을 3×10^4 cells/mL로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 24시간 배양한 후 100 μM α-MSH를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 72시간 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를

회수하여 원심분리 시켜 pellet만을 취한다. Pellet에 sonication buffer (1% triton X-100 and 0.2 mM PMSF (Phenylmethyl sulfonyl fluoride in sodium phosphate buffer))를 넣고 세포를 sonication해 준 후에 원심분리 시켜 분리한 pellet에는 1 N NaOH를 300 μ L 첨가하여 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 melanin contents를 확인한다.

상등액은 L-DOPA와 반응시켜 ELISA reaser로 475 nm에서 cell에 있던 tyrosinase를 확인한다. 대조군으로는 melasolv를 사용하였다.

4-3-3. 세포독성 평가 실험

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 B16F10 cell을 24 well plate에 3×10^4 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양 후, 100 μ M α -MSH를 포함하는 배지로 교환한 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 72시간 배양하였다. 72시간 배양 후, 500 μ g/mL 농도로 MTT를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음의 식에 의해 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

A_{control} : 570 nm에서 용매와 α -MSH를 처리한 control의 흡광도

A_{sample} : 570 nm에서 시료와 α -MSH를 처리한 sample의 흡광도

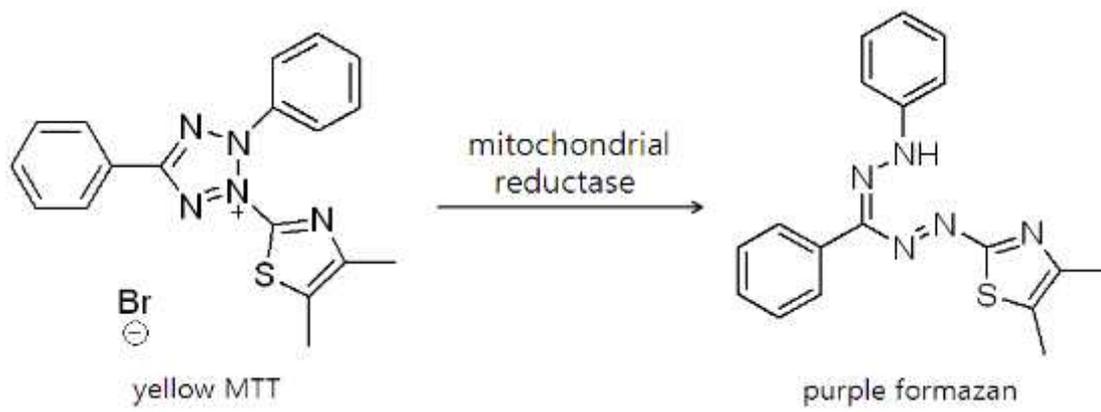


Figure 9. Principle of MTT assay.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

Compound의 구조는 ^1H NMR(CD_3OD , 400 MHz), ^{13}C NMR(CD_3OD , 100 MHz)을 통해 확인하였다.

1-1. 솔잎

1-1-1. Compound 1의 구조해석

^1H -NMR spectrum 분석 결과 δ 6.83 (1H, d, $J = 1.83$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.24$ Hz), 6.72 (1H, dd, $J = 1.83, 8.24$ Hz), 5.90 (1H, d $J = 2.29$ Hz), 5.86 (1H, d, $J = 2.29$ Hz)의 signal로부터 aromatic ring의 수소로 예상했고 또한 coupling constant 값을 통해 δ 6.84 (1H, d, $J = 1.83$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.24$ Hz), 6.72 (1H, dd, $J = 1.83, 8.24$ Hz)은 proton들이 *ortho* 및 *meta* 위치에서 서로 coupling을 하고 있을 것으로 예상하였다. δ 5.90 (1H, d $J = 2.29$ Hz), 5.86 (1H, d, $J = 2.29$ Hz)은 proton들이 *meta* 위치에서 서로 coupling을 하고 있을 것으로 예상했다. δ 4.57 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 3.98 (1H, m)의 signal로 보아 산소와 같이 전기음성도가 큰 치환기가 붙어 있을 것이라고 예상했다.

δ 2.85 (1H, dd, $J = 5.5, 16.0$ Hz), 2.51 (1H, dd, $J = 8.24, 16.0$ Hz)은 sp^3 의 혼성에 의한 proton이며 서로 coupling하고 있을 것으로 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum 분석 결과 15개 이상의 탄소가 있을 것으로 예상하였다. δ 28.5의 signal은 일반적인 sp^3 혼성 탄소로 예상하였고 δ 68.8, 82.9의 signal은 전기음성도가 큰 치환기가 붙은 sp^3 탄소로 예상하였다. 또한 δ 95.5 ~ 157.8의 signal은 불포화 된 sp^2 탄소이거나 aromatic ring의 탄소를 예상하였다. 예상한 구조를 기본으로 문헌^{12), 13), 14)}과 비교하여 구조 동정하였고, 그 결과 compound 1은 catechin으로 확인되었다(Figure 8).

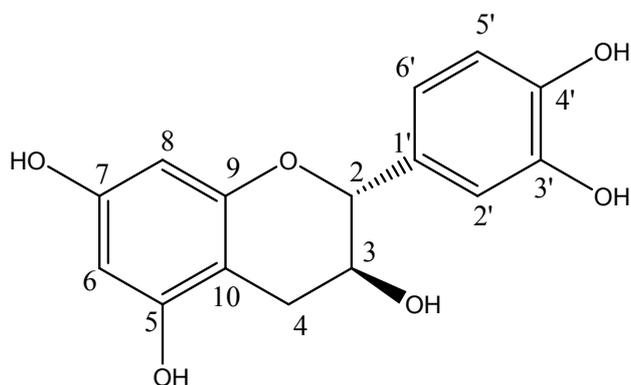


Figure 10. Chemical structure of compound 1.

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

No.	Compound 1	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	82.9	4.57 (1H, d, 7.3)
2	68.8	3.98 (1H, m, 7.3)
3	28.5	2.51 (1H, dd, 16.0, 8.24) 2.85 (1H, dd, 16.0, 5.5)
4	157.6	
5	96.3	5.90 (1H, d, 2.29)
6	156.9	
7	95.5	5.86 (1H, d, 2.29)
8	157.8	
9	100.9	
10	132.2	
1'	115.3	6.83 (1H, d, 1.83)
2'	145.9	
3'	146.3	
4'	116.2	6.76 (1H, d, 8.24)
5'	120.1	6.72 (1H, dd, 8.24, 1.83)
6'		

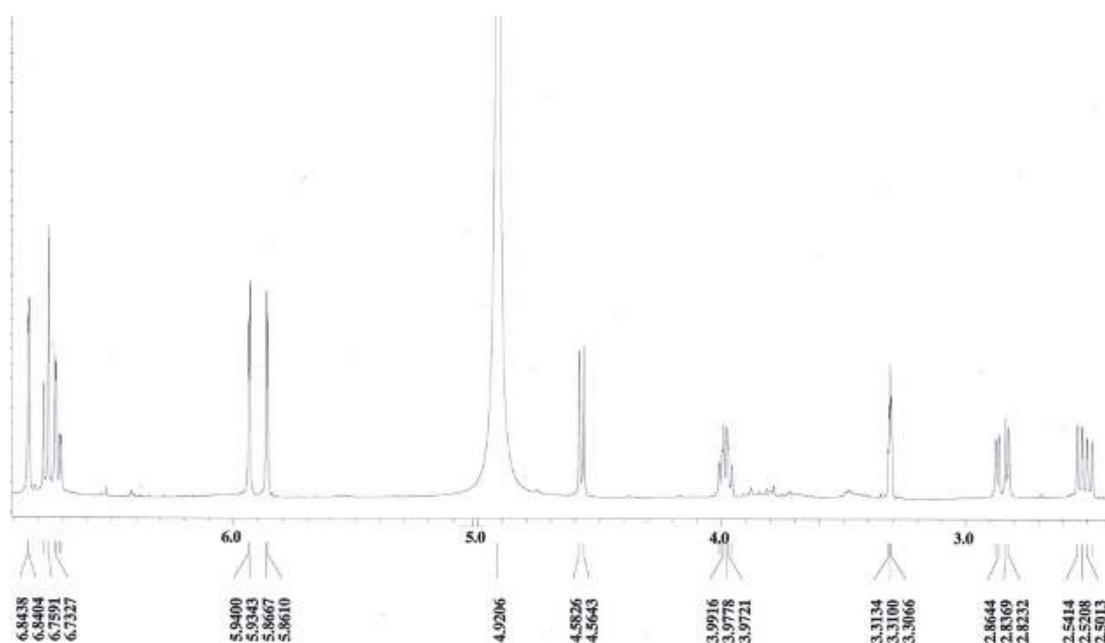


Figure 11. ^1H -NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

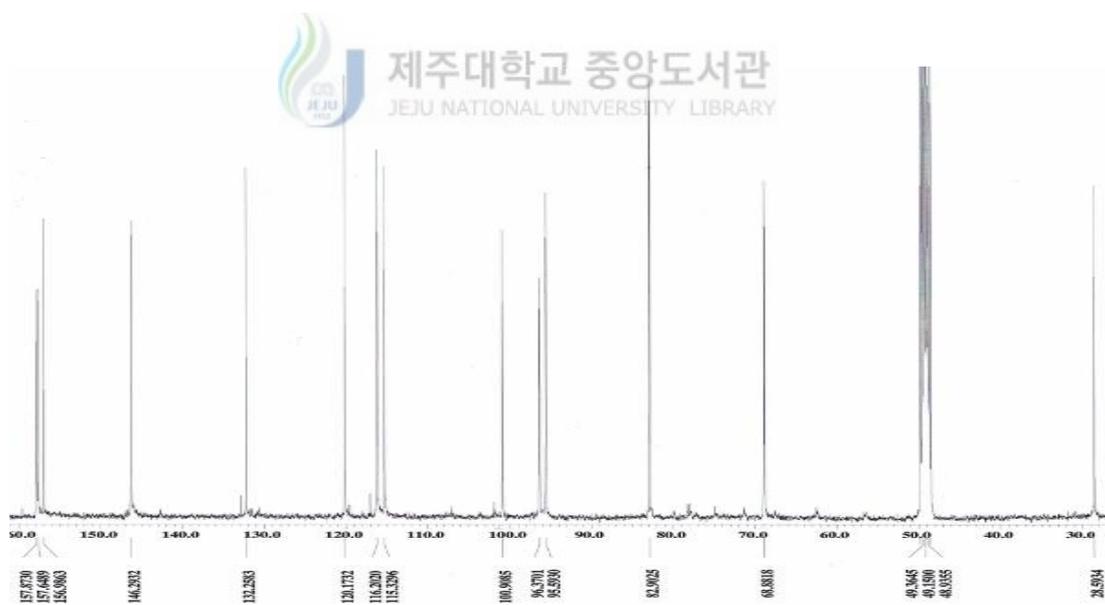


Figure 12. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

1-1-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 6.79 (1H, m)의 signal로부터 sp^2 혼성을 갖는 수소로 예상하였고 δ 4.37 (1H, m), 3.98 (1H, m), 3.68 (1H, m)의 signal은 산소와 같이 전기음성도가 큰 치환기가 결합한 sp^3 혼성을 갖는 수소로 예상하였다. 또한 δ 2.68 (1H, dd, $J = 18.0, 5.04$ Hz)와 2.17 (1H, dd, $J = 18.0, 5.04$ Hz)의 signal을 통해 sp^3 의 혼성을 하며 proton들이 서로 coupling하고 있을 것을 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석결과 탄소 수는 7개 이상으로 예상했으며, δ 170.2의 signal을 통해 carbonyl기가 있으며 deshielding 된 값을 통해 carboxylic acid로 예상하였다. δ 72.7, 68.1, 67.3의 signal은 산소와 같이 전기음성도가 큰 치환기가 붙은 탄소를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌^{12), 15)}과 비교하였고 그 결과 compound 2는 shikimic acid로 확인되었다(Figure 11).

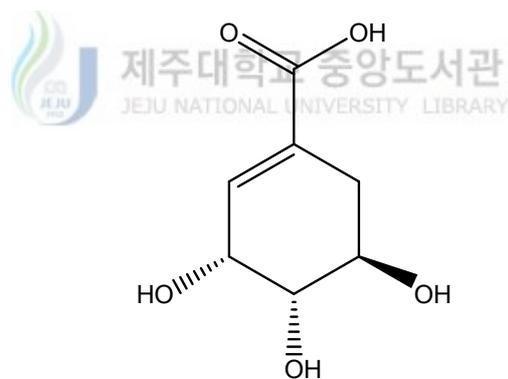


Figure 13. Chemical structure of compound 2.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz, CD_3OD)

No.	Compound 2	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	138.7	
2	31.8	2.17 (1H, dd, 18.0, 5.04)
3	67.3	2.68 (1H, dd, 18.0, 5.04)
4	68.3	3.68 (1H, m)
5	72.8	3.98 (1H, m)
6	130.9	4.38 (1H, m)
7	170.2	6.79 (1H, m)

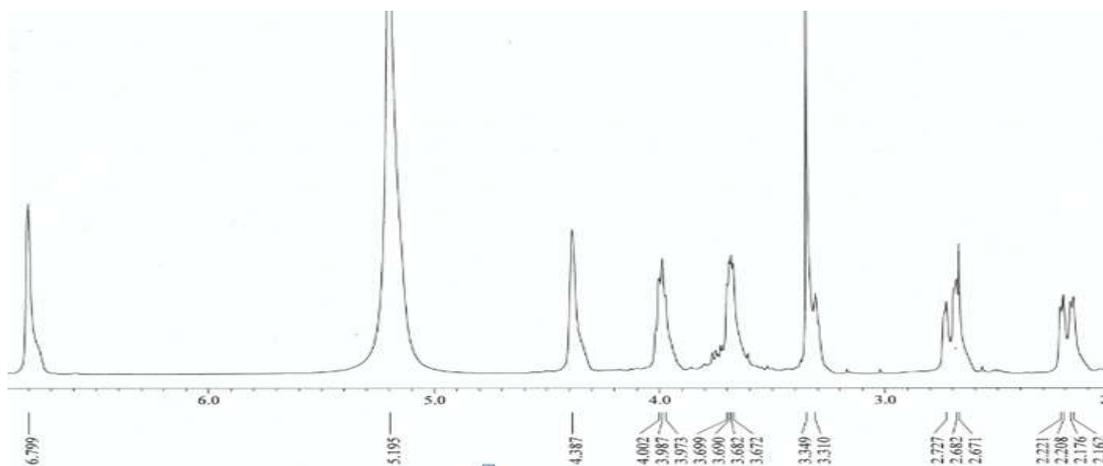


Figure 14. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **2** in CD_3OD .

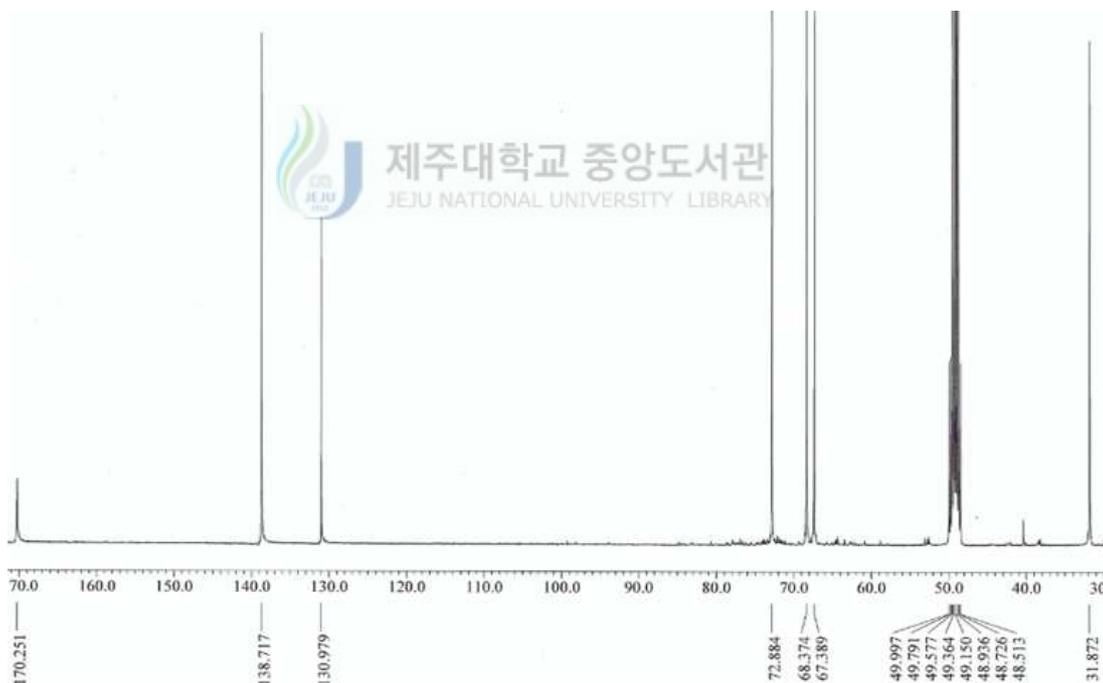


Figure 15. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **2** in CD_3OD .

1-1-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 7.05 (1H, d, $J = 8.24$ Hz), 7.01 (1H, dd, $J = 1.7$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 8.24, 1.7$ Hz)의 signal들은 sp^2 혼성을 갖는 proton들로 이 signal들의 coupling constant값을 통해 aromatic ring에서 proton들이 서로 *ortho* 및 *meta* coupling을 하고 있을 것으로 예상하였다. 또한, δ 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s)의 signal을 통하여 전기음성도가 큰 산소가 결합에 있는 sp^3 의 혼성을 갖는 methoxy기가 2개 있을 것으로 예상하였다. 또한 δ 5.35 (1H, d, $J = 1.3$ Hz) 및 δ 3.34~4.09에서 나타나는 복잡한 signal로부터 당이 하나 치환된 구조라는 것을 예상했는데 δ 1.22 (3H, d, $J = 5.59$ Hz)에서 doublet으로 나타나는 특징적인 methyl proton peak을 통하여 당이 rhamnose인 것으로 확인하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석 결과, 탄소수가 26개 이상이고, δ 56.7, 56.4의 signal을 통해 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 예상하였던 전기음성도가 큰 산소가 결합에 있는 methine carbon을 확인하였다. δ 111.2 ~ 152.0의 12개의 signal은 aromatic ring의 signal임을 예상 하였다.

이러한 결과를 바탕으로 문헌^{12), 16), 17), 18)} 과 비교한 결과 compound 5는 icariside E4로 확인되었다(Figure 14).

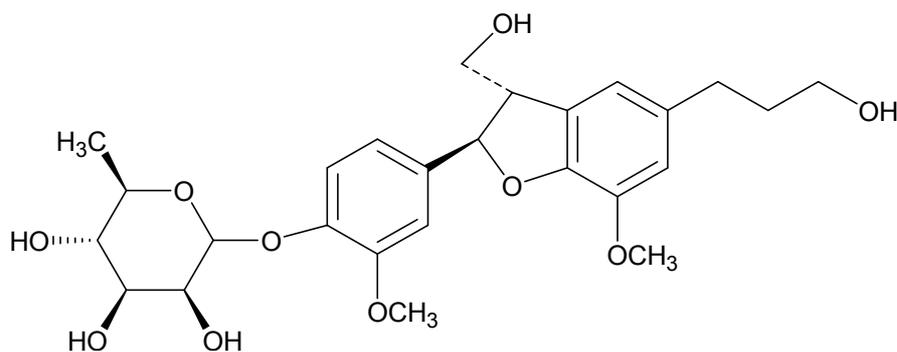


Figure 16. Chemical structure of compound 3.

Table 3. ¹H and ¹³C NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz, CD₃OD)

No.	Compound 3	
	δ_c	δ_H (int, multi, <i>J</i> Hz)
1	138.6	
2	111.2	7.01 (1H, d, 1.7)
3	152.0	
4	146.4	
5	1193.5	7.05 (1H, d, 8.24)
6	119.1	6.89 (1H, dd, 8.24, 1.7)
7	88.5	
8	55.5	3.50–3.53 (4H, m)
9	65.0	
1'	137.0	
2'	113.9	6.70 (1H, br s)
3'	145.2	
4'	147.3	
5'	129.5	
6'	117.9	6.70 (1H, br s)
7'	32.9	2.59 (2H, t, 7.3)
8'	35.7	1.80 (2H, m)
9'	62.3	
1''	101.2	5.35 (1H, d, 1.3)
2''	70.2	3.34–4.09 (sugar H)
3''	72.2	
4''	73.8	
5''	70.8	
6''	18.7	1.22 (3H, d, 5.95)
3-OCH ₃	56.7	3.76 (3H, s)
3'-OCH ₃	56.4	3.82 (3H, s)

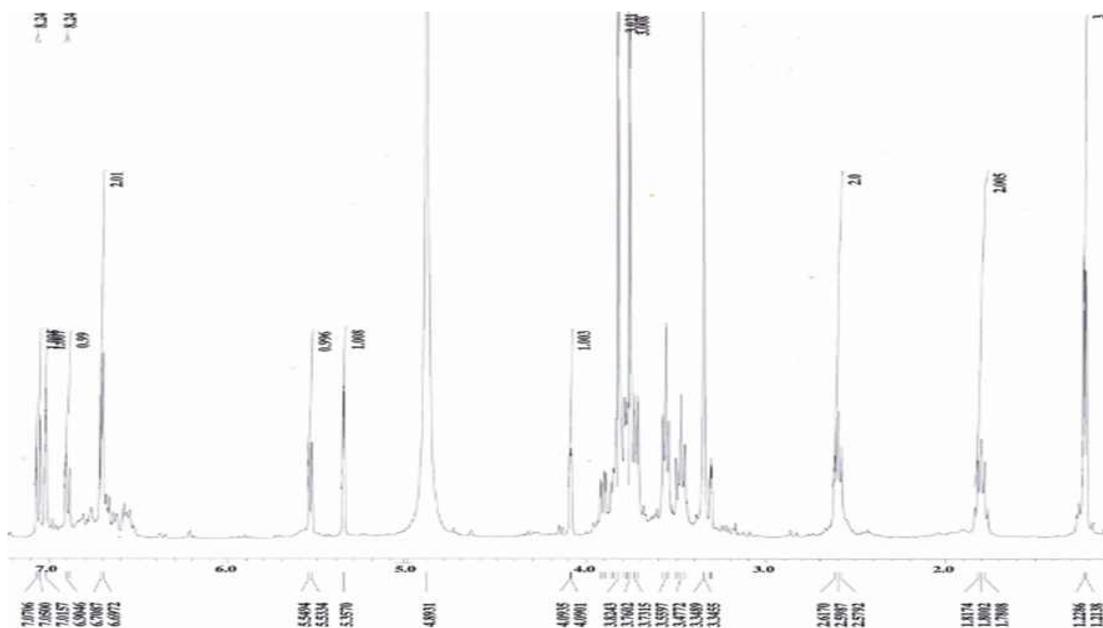


Figure 17. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **3** in CD_3OD .

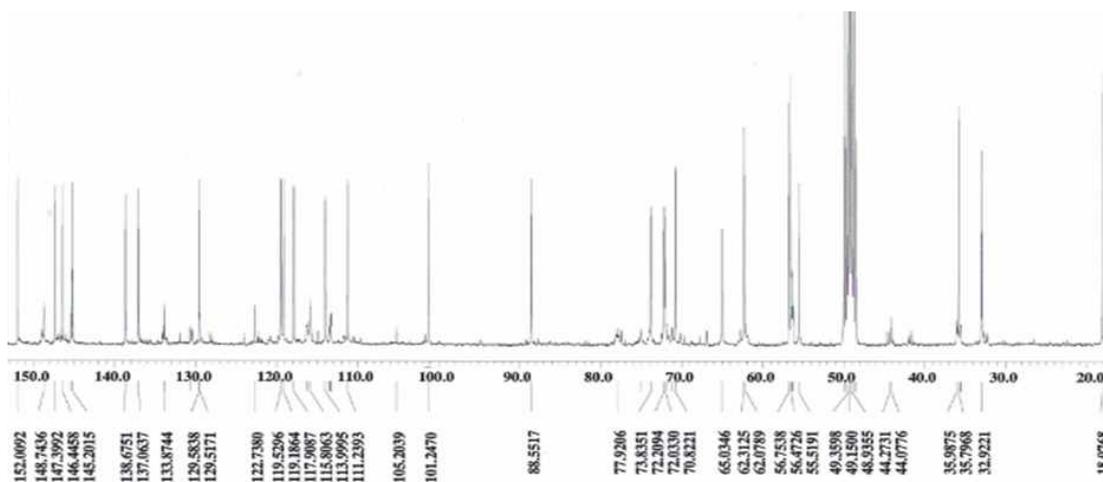


Figure 18. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **3** in CD_3OD .

1-1-4. Compound 4의 구조해석

Compound 4은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.67 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.60 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz)의 signal들은 sp^2 혼성을 갖는 proton들로 이 signal들의 coupling constant값을 통해 aromatic ring에서 proton들이 서로 *ortho* 및 *meta* coupling을 하고 있을 것으로 예상하였다. δ 6.62 (1H, s), 6.18 (1H, s)의 signal로부터 aromatic proton이거나 olefinic proton으로 예상하였다. 또한, δ 3.80 (3H, s), 3.77 (3H, s)의 signal을 통하여 전기음성도가 큰 산소가 결합에 있는 sp^3 의 혼성을 갖는 methoxy기가 2개 있을 것으로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석 결과, 탄소 수가 20개 이상이며, δ 112.4 ~ 149.1의 12개의 signal은 aromatic ring의 signal임을 예상 하였다. δ 56.5, 56.4의 signal로부터 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 예상하였던 전기음성도가 큰 산소가 결합하고 있는 methine carbon을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 문헌^{12), 19), 20)} 과 비교하여 compound 4는 (+)-isolariciresinol로 동정하였다(Figure 19).



Figure 19. Chemical structure of compound 4.

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

No.	Compound 4	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	134.2	
2	113.8	6.67(1H, d, 1.5)
3	147.3	
4	145.4	
5	116.1	6.73(1H, d, 8.0)
6	123.3	6.60(1H, dd, 8.0, 1.5)
7	48.1	2.77(2H, d, 11.7)
8	48.1	1.15(1H, m)
9	62.3	3.70–3.65(4H, m)
1'	129.1	
2'	112.4	6.18(1H, s)
3'	147.3	
4'	146.0	
5'	117.4	6.62(1H, s)
6'	138.7	
7'	33.7	
8'	40.1	2.00(1H, m)
9'	66.0	3.70–3.65(4H, m)
O-CH ₃	56.5	3.77(3H, s)
O-CH ₃	56.4	3.80(3H, s)



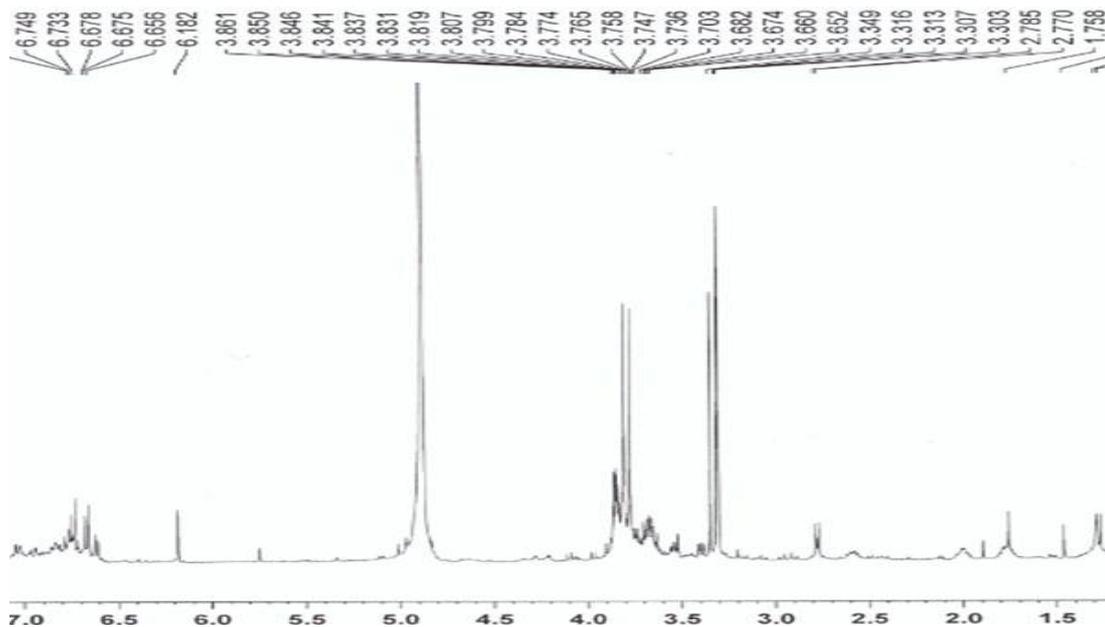


Figure 20. ^1H -NMR spectrum of compound **4** in CD_3OD .

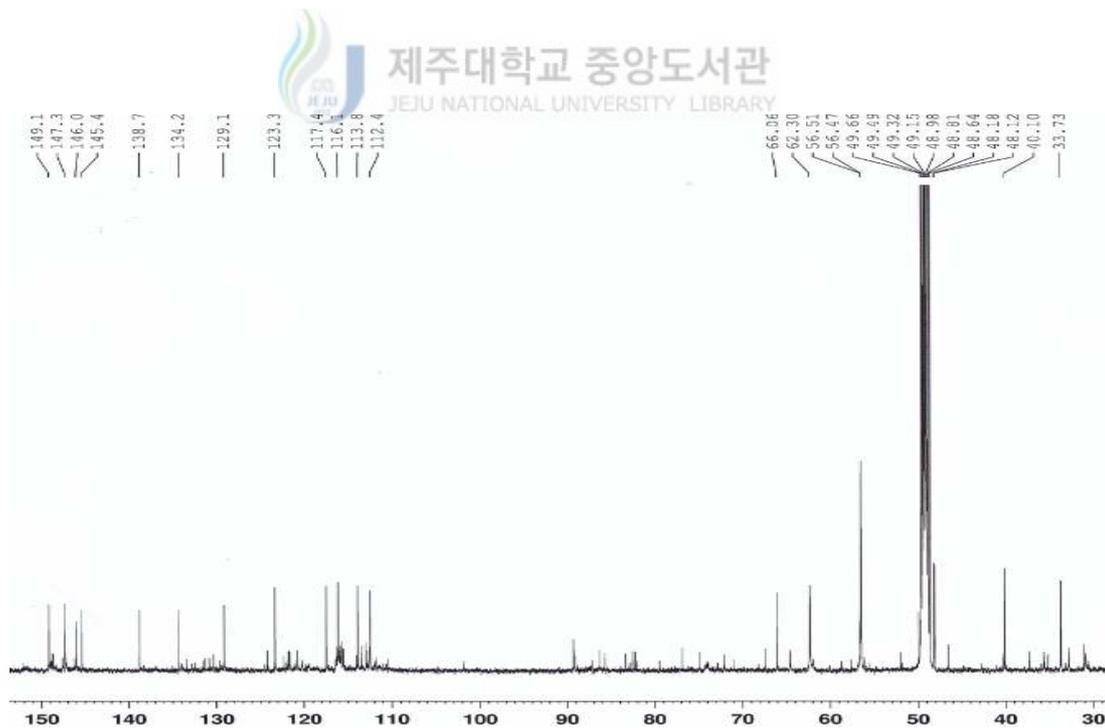


Figure 21. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** in CD_3OD .

1-2. 경단구슬모자반

1-2-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1은 ^1H -NMR spectrum 분석 결과 δ 4.49 (2H, d, 5.5, OH), 4.36 (2H, t, 5.7, OH), 4.25 (2H, d, 7.3, OH)의 signal을 통해 산소와 같이 전기음성도가 큰 치환에 직접 결합한 sp^3 혼성을 갖는 수소들로 예상하였다. 또한 δ 3.60 (2H, dt, 2.2, 3.2), 3.53 (2H, dd, 6.8, 7.7), 3.46 (2H, m), 3.37 (2H, dd, 5.9, 10.9)의 signal은 산소와 같이 전기음성도가 큰 치환기가 붙은 탄소에 결합한 수소들로 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum을 통해 3개 이상의 탄소가 있을 것으로 예상하였고 δ 71.2, 69.6, 63.8의 signal을 통해 산소와 같이 전기음성도가 큰 치환기가 붙은 탄소가 3개 이상 있을 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌^{21), 22)}과 비교한 결과 compound 1은 mannitol로 확인되었다(Figure 22).

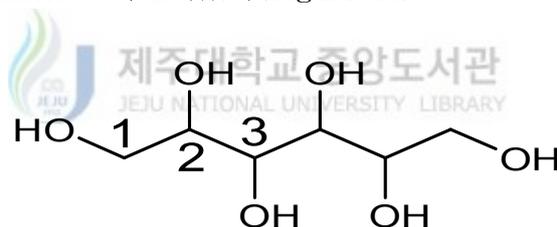


Figure 22. Chemical structure of compound 1.

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

No.	Compound 1	
	δ_c	δ_H (int, multi, J Hz)
1, 6	63.8	3.37 (2H, dd, 5.9, 10.9)
		3.53 (2H, dd, 6.8, 7.7)
		4.49 (2H, d, 5.5, OH)
2, 5	71.2	3.46 (2H, m)
		4.36 (2H, t, 5.7, OH)
3, 4	69.6	3.60 (2H, dt, 2.2, 3.2)
		4.25 (2H, d, 7.3, OH)

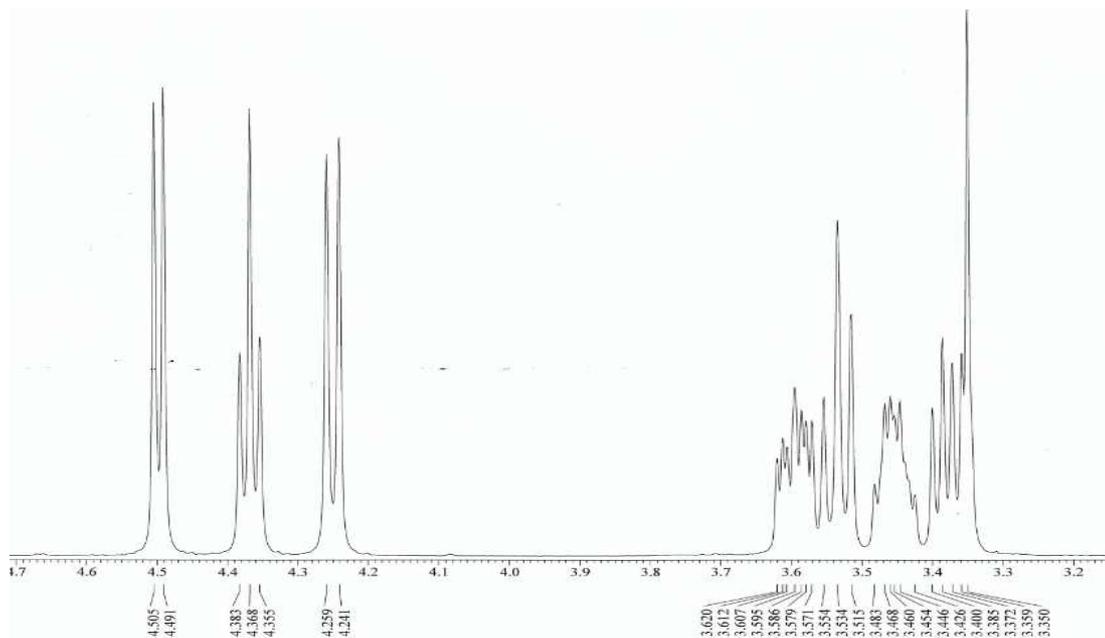


Figure 23. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in $\text{DMSO}-d_6$.

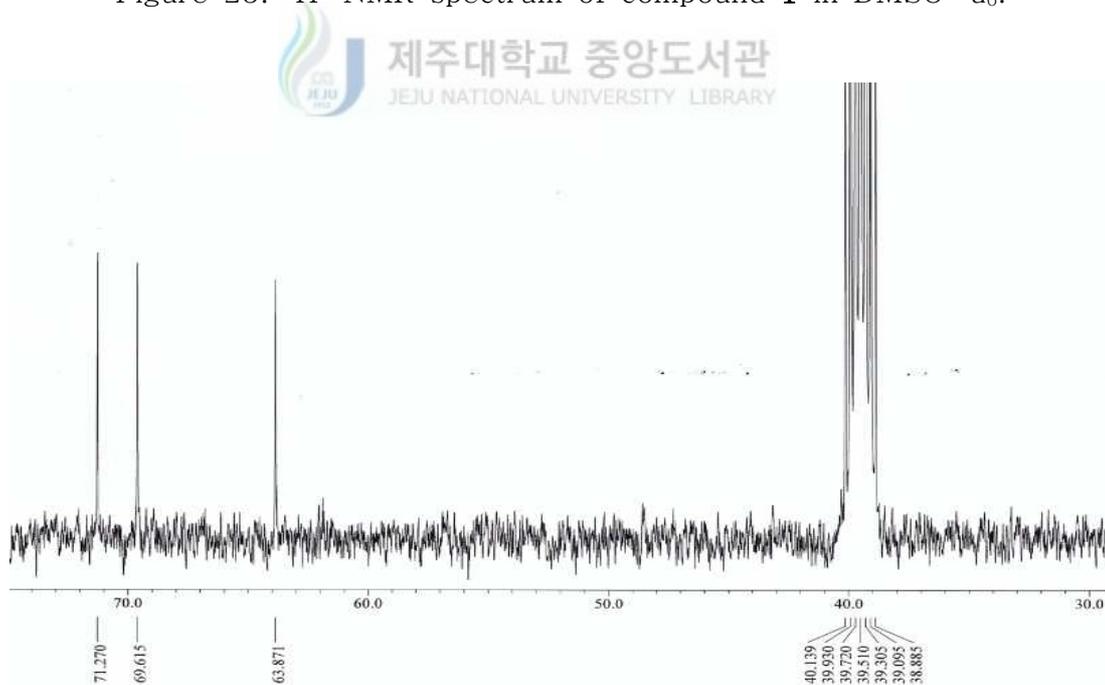


Figure 24. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in $\text{DMSO}-d_6$.

1-2-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2은 ^1H -NMR spectrum 분석 결과 δ 7.38 (1H, d, $J = 7.8$), 5.60 (1H, d, $J = 7.8$)의 signal을 통해 sp^2 의 혼성을 갖는 수소들이 서로 coupling 하고 있을 것으로 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum을 통해 4개 이상의 탄소가 있을 것으로 예상하였고 δ 143.5, 101.8의 signal을 통해 불포화 된 sp^2 혼성을 갖는 탄소일 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²³⁾과 비교한 결과 compound 2는 uracil로 확인되었다 (Figure 25).

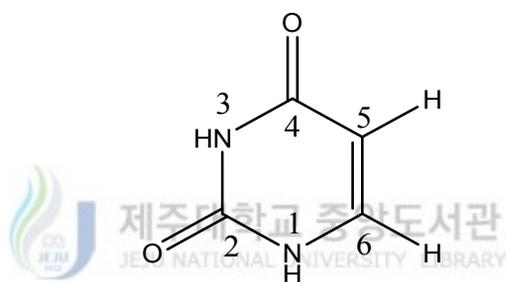


Figure 25. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD .

Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 2 (400 and 100 MHz, CD_3OD)

No.	Compound 2	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
2	153.6	
4	167.4	
5	143.6	5.60 (1H, d, 7.8)
6	101.8	7.39 (1H, d, 7.8)

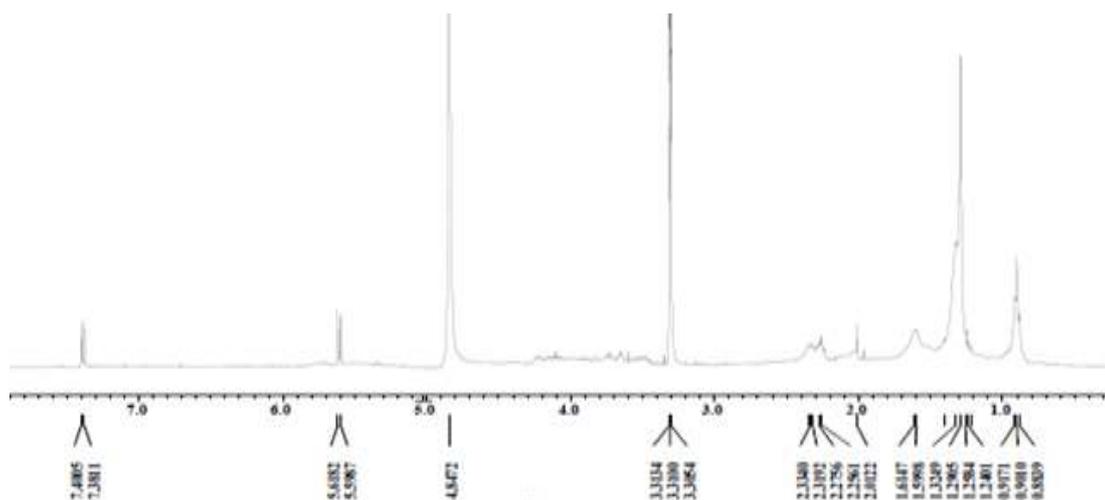


Figure 26. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD .

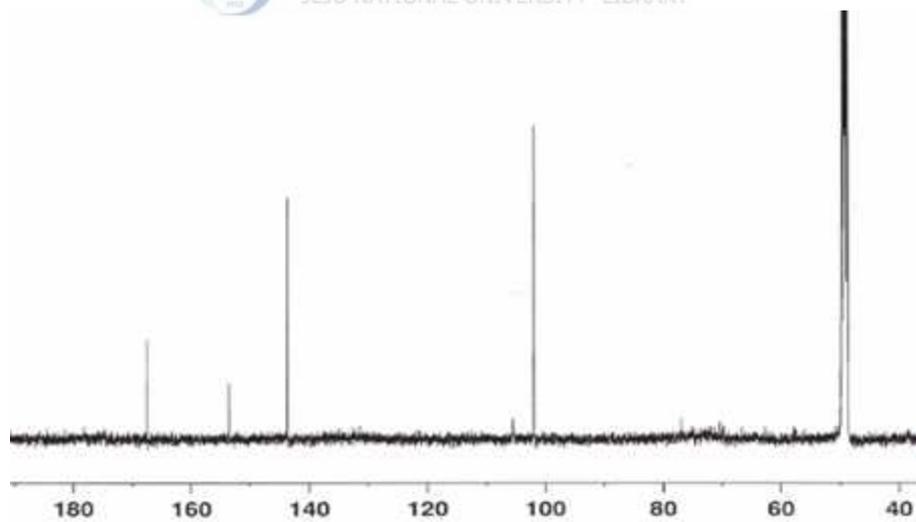


Figure 27. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD .

1-2-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 5.76 (1H, s)의 signal을 통해 sp^2 혼성의 수소로 예상하였다. 또한 δ 4.22 (1H, m, $J = 3.6$), 2.42 (1H, m, $J = 13.5$), 1.99 (1H, m, $J = 14.2, 2.2$), 1, 1.53 (1H, dd, 3.6, 14.4)의 signal을 통해 sp^3 혼성의 수소들이 서로 coupling 하고 있을 것으로 예상하였다. δ 1.76 (3H, s), 1.46 (3H, s), 1.27 (3H, s)의 signal을 통해 methyl proton이 3개 있을 것으로 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석 결과, 탄소수가 11개 이상이고, δ 185.6, 174.5, 113.4의 signal을 통하여 sp^2 혼성의 카본이며, carbonyl기가 있고 그 값을 통해 ester기 또는 carboxylic acid기일 것으로 예상했다. δ 113.5의 signal은 sp^2 혼성을 갖는 탄소일 것으로 예상하였다.

이러한 결과를 바탕으로 문헌^{24), 25), 26)}과 비교한 결과 compound 3는 loliolide로 확인되었다(Figure 28).

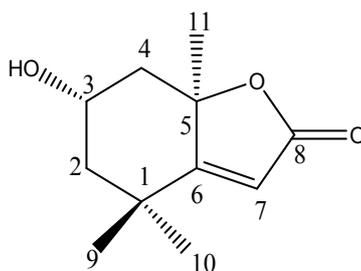


Figure 28. Chemical structure of compound 3.

Table 7. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz, CD_3OD)

No.	Compound 3	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	37.3	
2	48.1	1.53 (1H, dd, 3.6, 14.4)
3	67.3	1.99 (1H, m, 2.2, 14.2)
4	46.5	4.22 (1H, m, 3.6)
5	89.1	
6	185.8	
7	113.4	2.42 (1H, m, 3.8, 14.2)
8	174.6	
9	31.1	5.75 (1H, s)
10	27.5	1.46 (3H, s)
11	27.1	1.27 (3H, s)
		1.76 (3H, s)

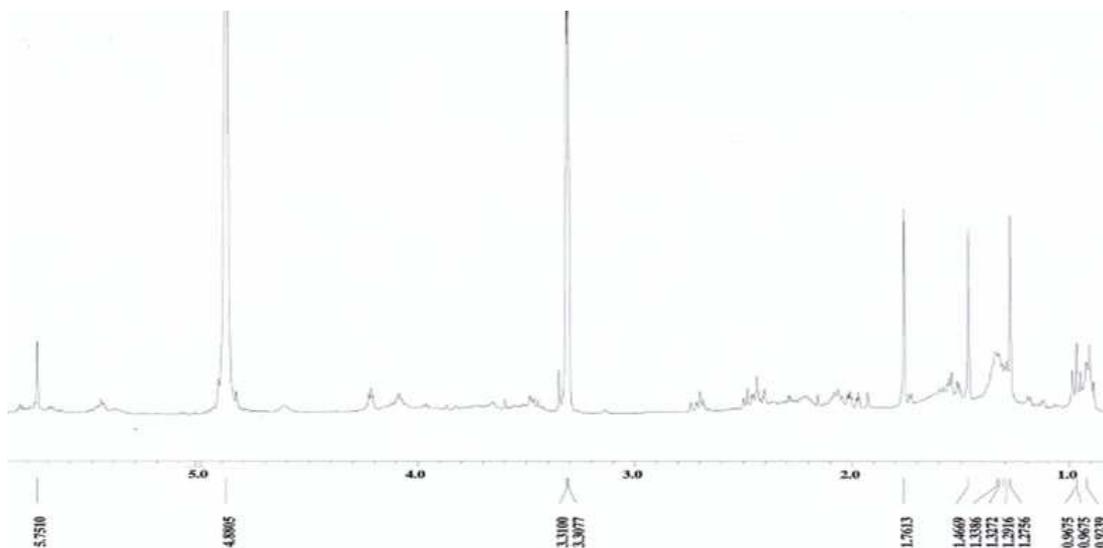


Figure 29. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD .

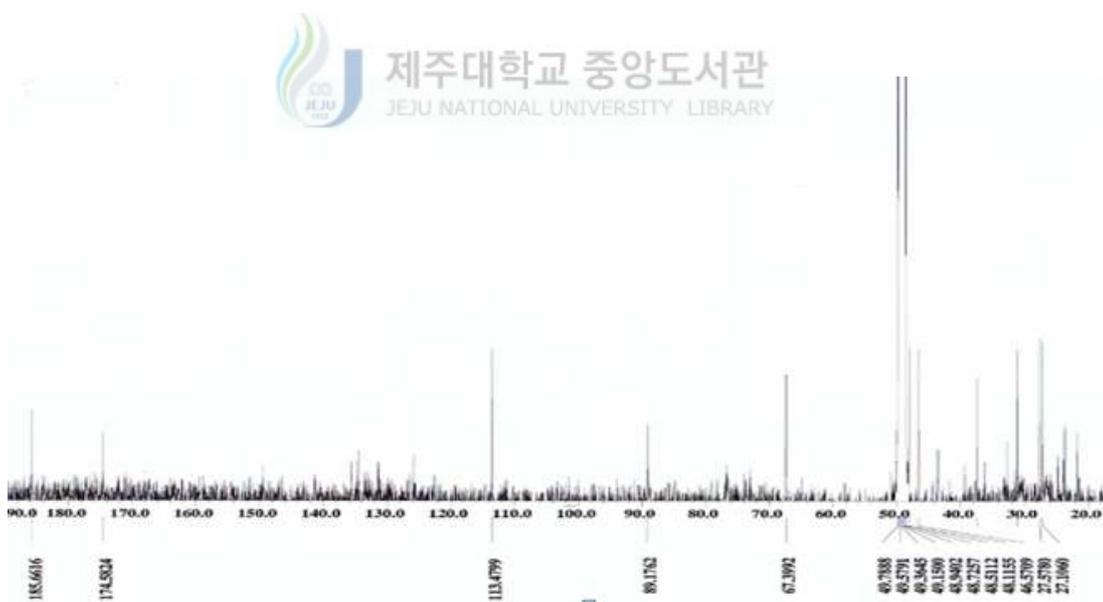


Figure 30. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD .

2. 항산화 활성 실험 결과

2-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며 항암 및 항산화 효과와 같은 다양한 생리 활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾

Gallic acid 표준 용액을 사용한 표준 곡선을 작성하여 솔잎과 경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 1 mg 당 함유하고 있는 gallic acid 의 양(GAE)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서 114.6 μg GAE/1 mg, 분획물 중 EtOAc와 *n*-BuOH, H₂O layer에서 각각 188.4, 102.1, 108.4 μg GAE/1 mg으로 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 31).

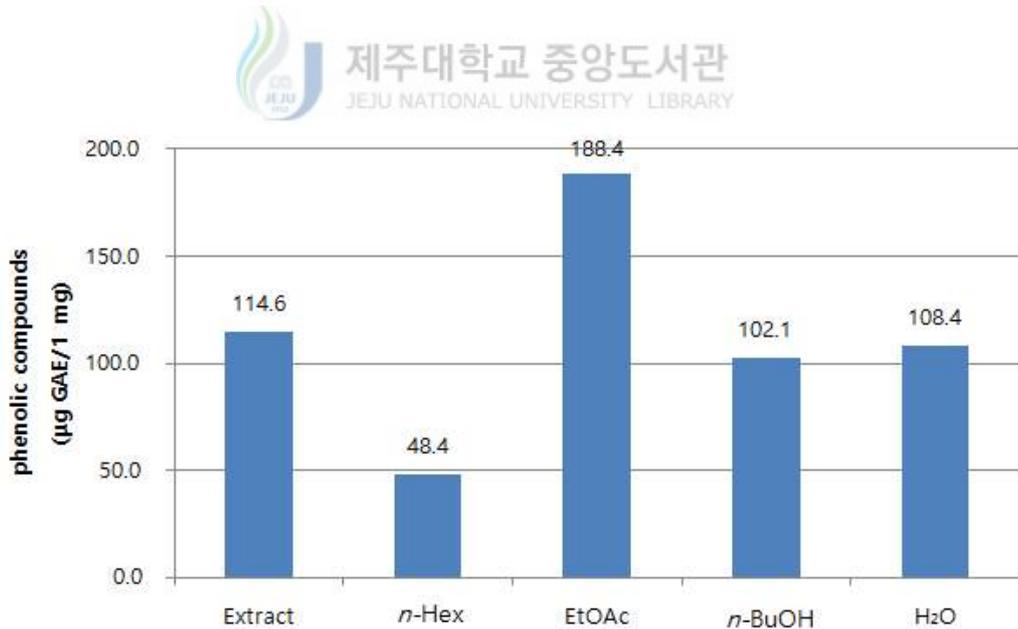


Figure 31. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 실험결과 추출물 및 분획물에서 20.9, 23.4, 24.6, 20.9, 18.4 $\mu\text{g GAE}/1\text{ mg}$ 으로 폴리페놀 함량을 나타내었다 (Figure 32).

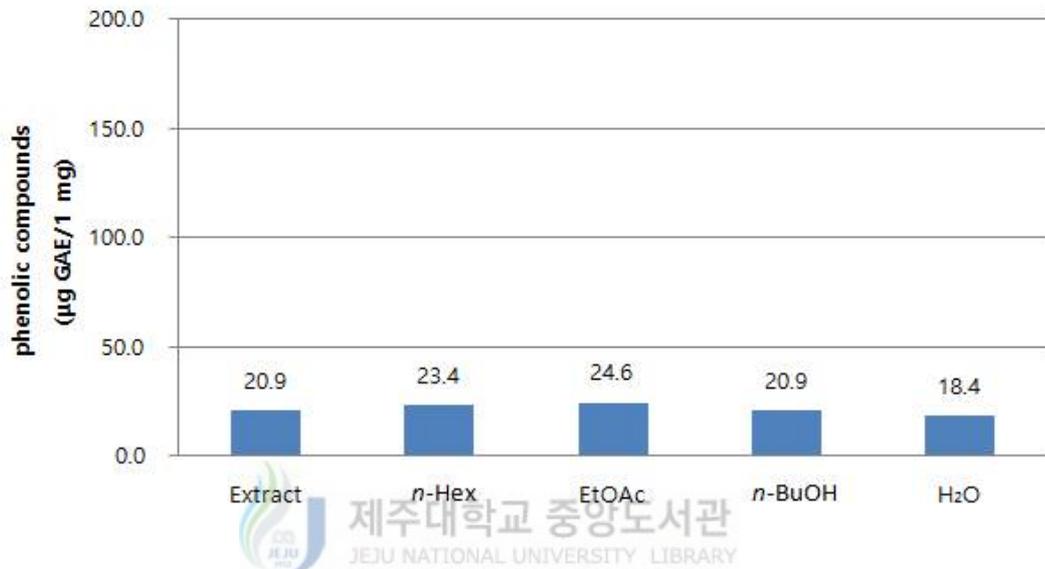


Figure 32. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers of *S. muticum*.

2-2 총 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드는 식물에 널리 분포하는 노란색 계통의 색소로 페닐기 2개가 C3 사슬을 매개하여 결합한 C6-C3-C6형 탄소 골격 구조로 되어 있으며 이것이 여러 당류와 ether 결합을 통해 glucoside의 형태로 존재하는 경우가 많다. 산성에서는 안정하여 색이 더욱 선명해지지만 강한 알칼리에서는 그 구조가 변하여 노란색이나 갈색으로 변한다. 항균·항암·항바이러스·항알러지 및 항염증 활성을 지니며 독성은 거의 나타나지 않는 것으로 보고되고 있다.

Quercetin 표준 용액을 사용한 표준 곡선을 작성하여 솔잎과 경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며 추출물 및 분획물의 중량 1 mg 당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc layer에서 82.6 μg quercetin/1 mg으로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 33).

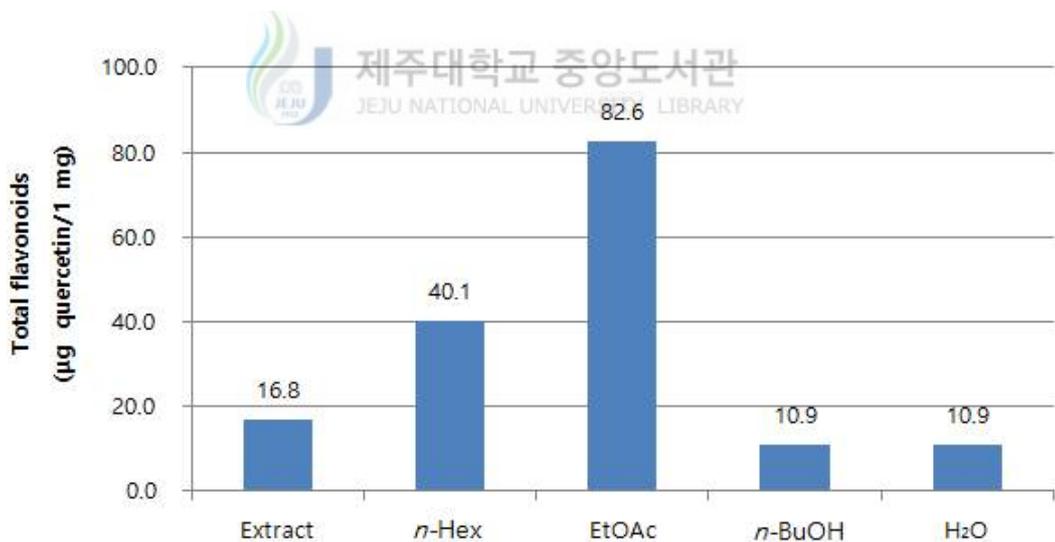


Figure 33. Total flavonoids contents of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

경단구슬모자반은 추출물 및 분획물에서 14.3, 10.9, 38.4, 8.4, 8.4 μg quercetin/1 mg 으로 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 34).

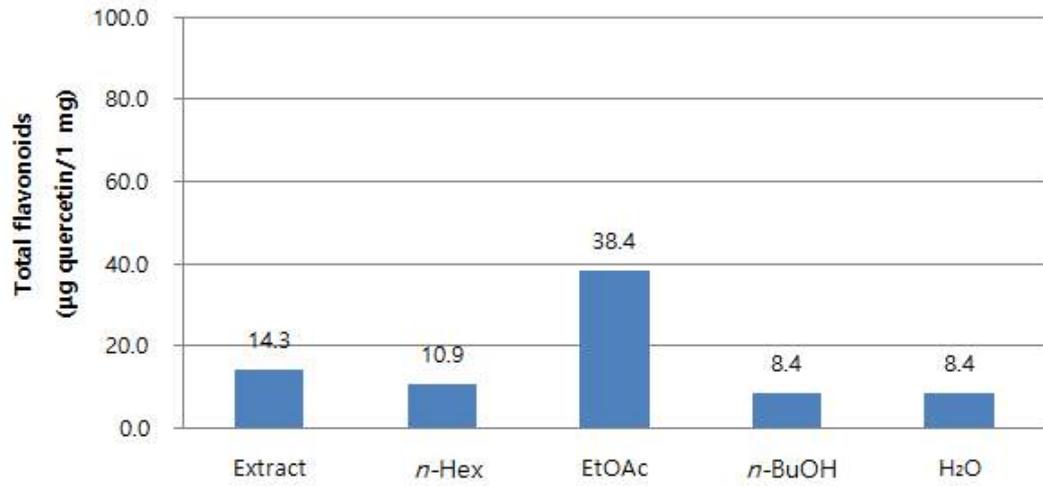
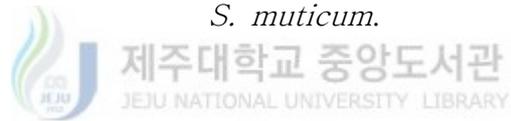


Figure 34. Total flavonoids contents of extract and solvent layers of *S. muticum*.



2-3. DPPH radical 소거 활성

2-3-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성

솔잎과 경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 각각의 분획물에 대하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC_{50} 값을 계산하였다(Figure 35).

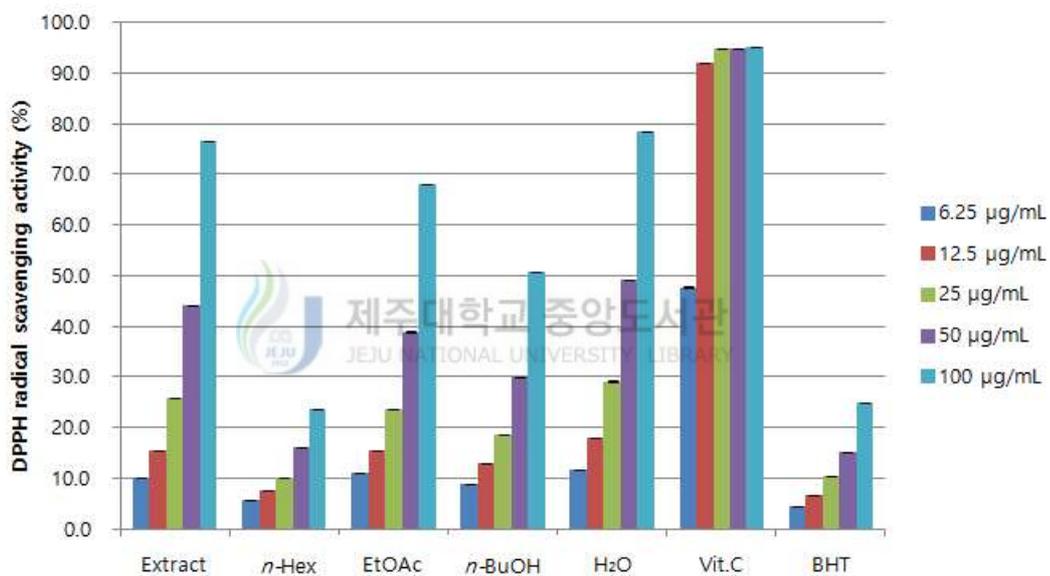


Figure 35. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

솔잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물에서는 추출물, EtOAc, H₂O layer에서 대조군인 Vitamin C (SC_{50} 6.6 μ g/ml)보다는 좋지 않지만 BHT (SC_{50} 216.4 μ g/mL)보다는 좋은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 36).

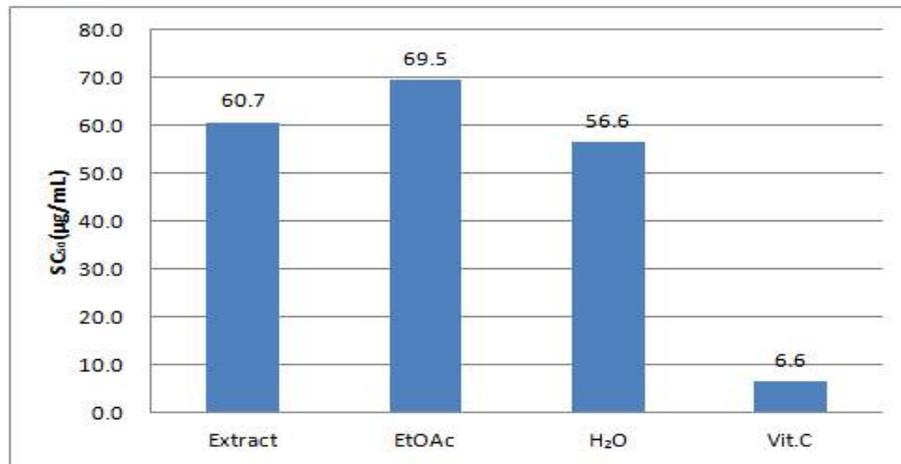


Figure 36. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물에서 모두 100 µg/mL 이상의 SC₅₀ 값을 나타내었다(Figure 37).

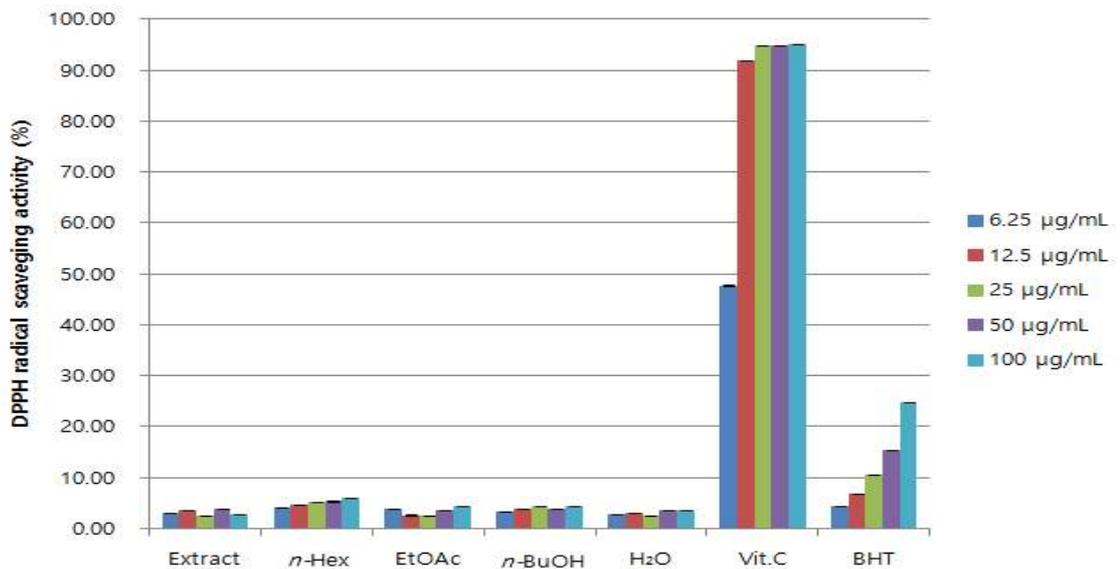


Figure 37. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers of *S. muticum*.

2-4. ABTS radical cation 소거 활성

2-4-1. 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical cation 소거 활성

솔잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical cation 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 나머지 분획물에 대하여 6.26, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과, 추출물에서 20.9 µg/mL, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 각각 17.6, 27.2, 25 µg/mL의 SC₅₀ 값으로 대조군인 vitamin C (5.3 µg/mL)와 BHT (7.1 µg/mL)보다 좋지는 않지만 ABTS⁺ radical cation 소거 활성을 나타내었다(Figure 38, 39).

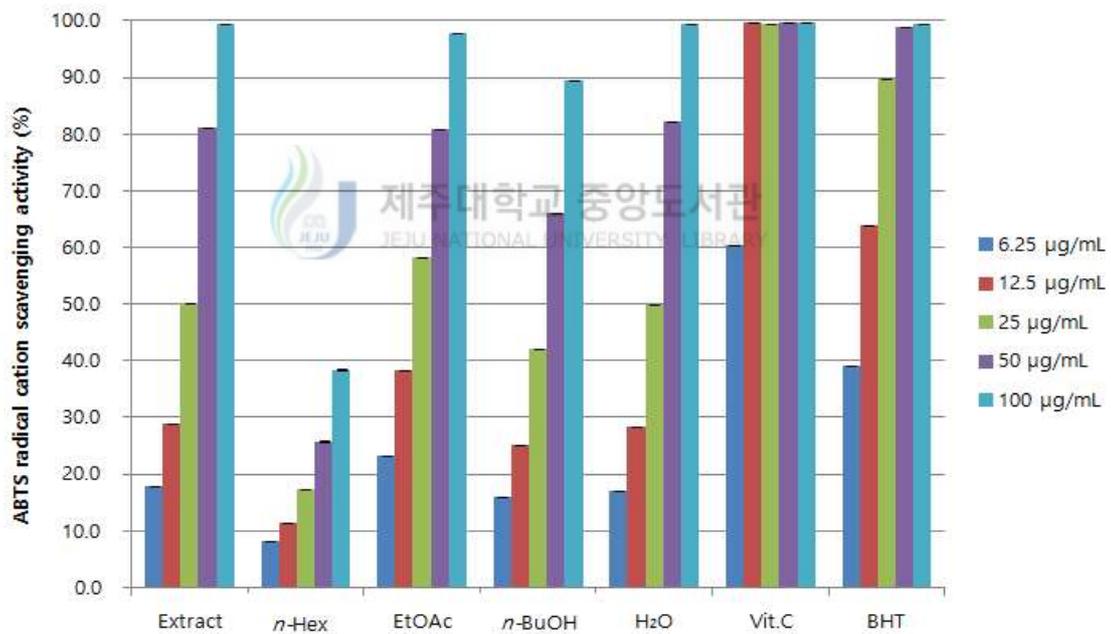


Figure 38. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

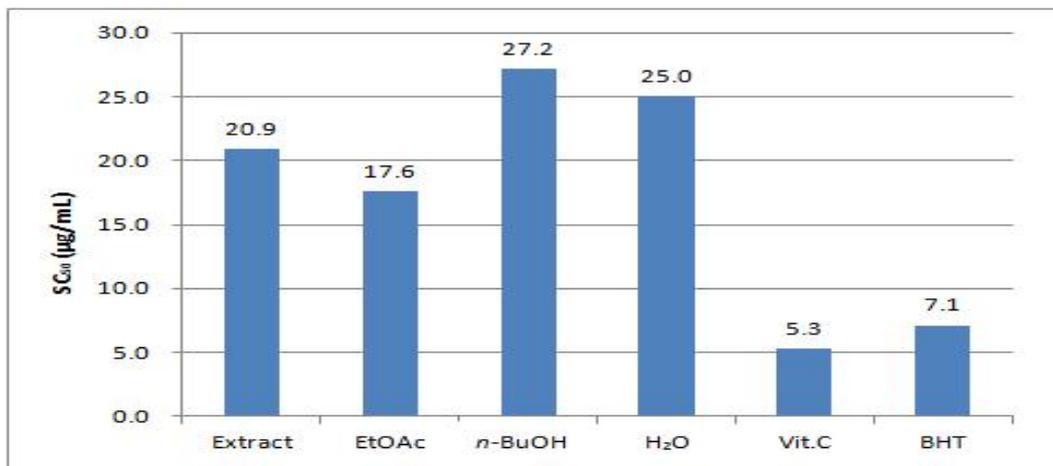


Figure 39. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물에서 모두 100 µg/mL 이상의 SC₅₀ 값을 나타내었다(Figure 40).

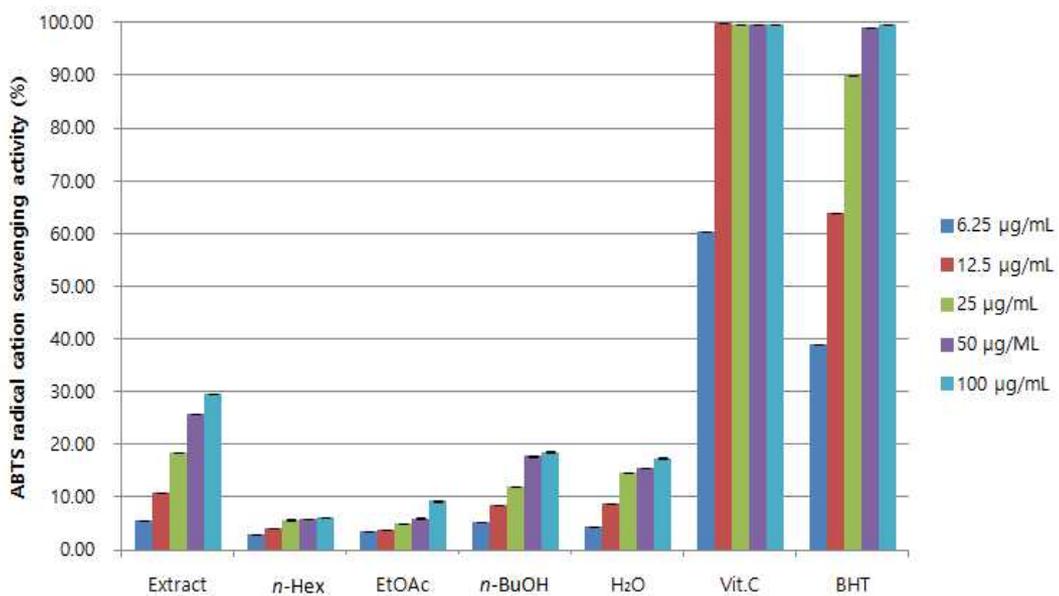


Figure 40. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers of *S. muticum*.

3. Elastase 저해 활성

추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성

솔잎과 경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성을 측정하였다. 실험은 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실시하였으며 그 결과 추출물, *n*-Hex, EtOAc 및 H₂O layer에서 elastase 저해 활성이 있다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 41, 42).

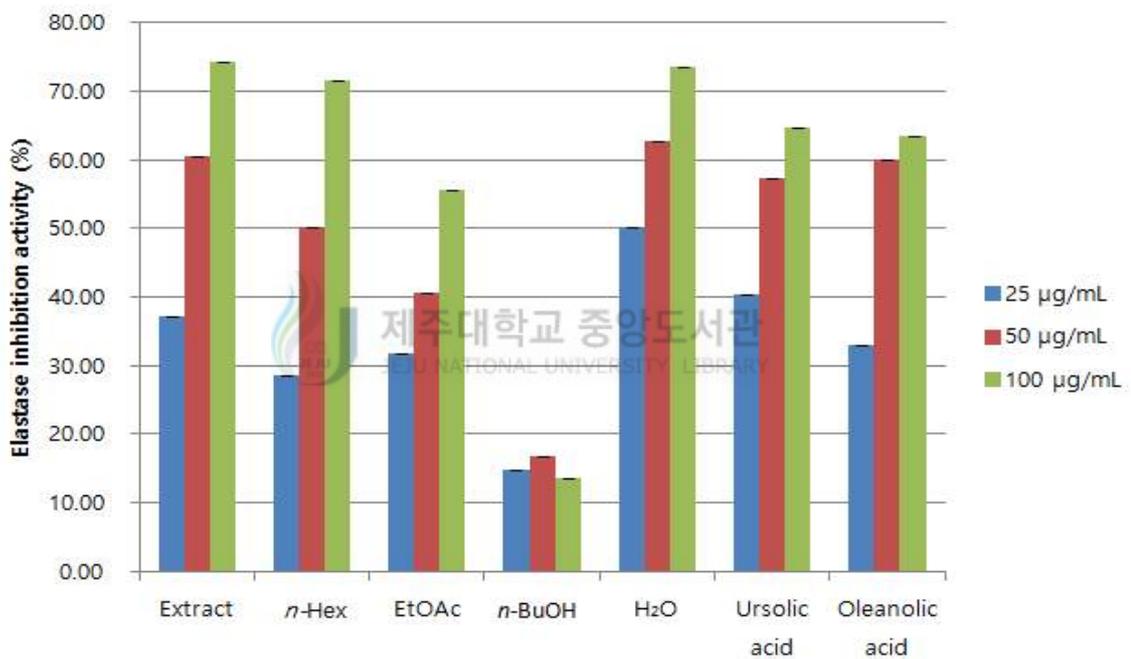


Figure 41. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

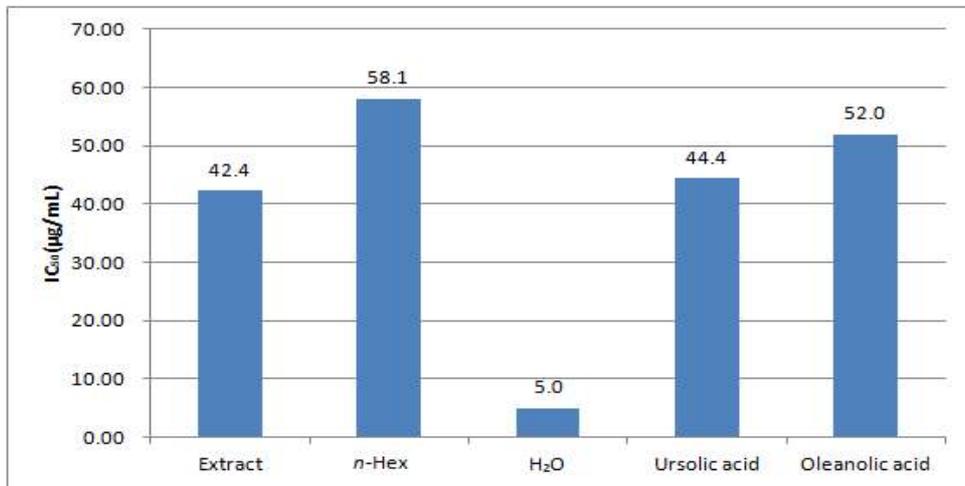


Figure 42. IC₅₀ values of elastase inhibition activities of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

그 중 뛰어난 활성을 보인 H₂O layer의 농도를 더 낮춰서 실험을 했는데 IC₅₀ 값이 29.3 µg/mL로 대조군인 ursolic acid (44.4 µg/mL), oleanolic acid (52.0 µg/mL)보다 더 좋은 활성을 나타내었다. 이를 통해 H₂O layer가 elastase 저해 활성이 있다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 43).

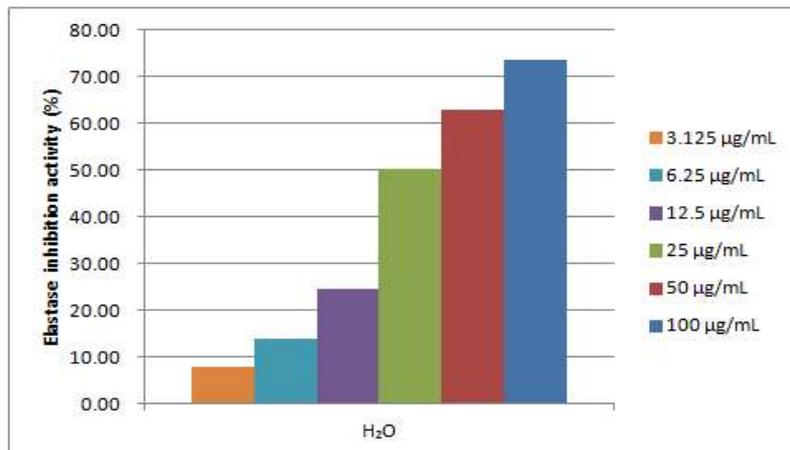


Figure 43. Elastase inhibition activity of H₂O layer of *P. densiflora*.

경단구슬모자반의 70% 에탄올 추출물 및 분획물에서는 모두 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 IC_{50} 값을 나타내었다.(Figure 44)

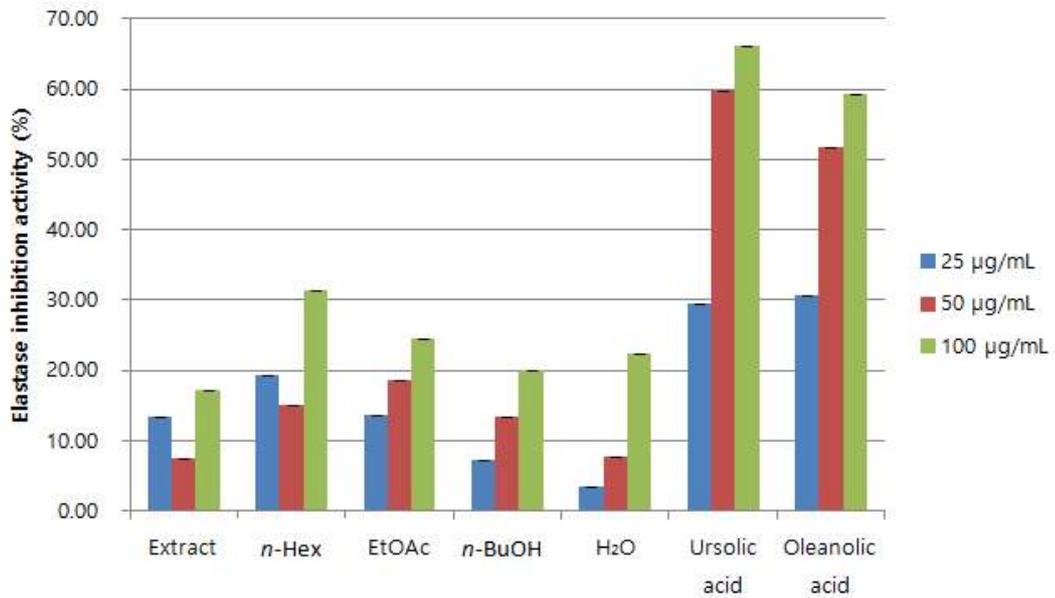


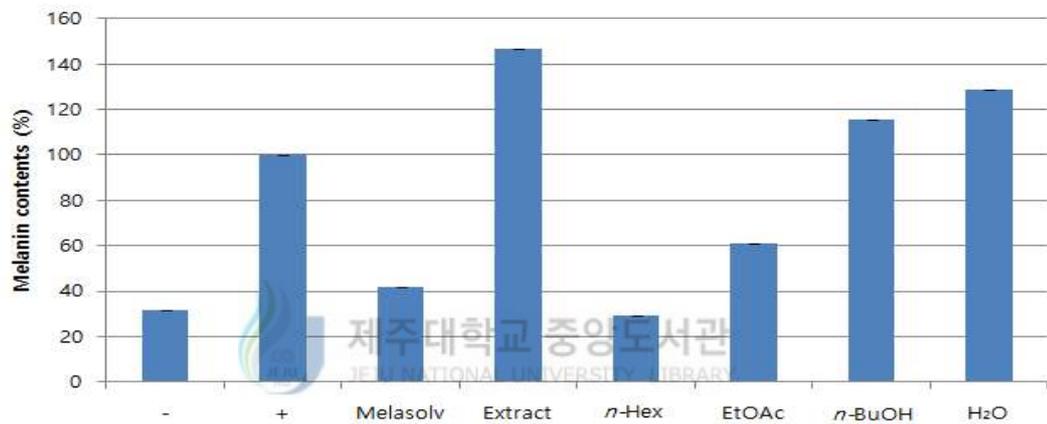
Figure 44. Elastase inhibition activities of extract and solvent layers of *S. muticum*.



4. B16F10 cell을 이용한 melanogenesis 저해 및 세포 독성 평가

술잎과 경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL의 농도로 melanin contents 양을 측정하였다. 그 결과 술잎의 *n*-Hex layer에서 70.8%의 저해율을 보였고 경단구슬모자반의 *n*-Hex layer, EtOAc layer에서 각각 80.7%, 77.1%의 저해율을 보였다. 이는 세포 독성으로 인해 melanin의 양이 적은 것으로 확인하였다(Figure 45, 46).

(A)



(B)

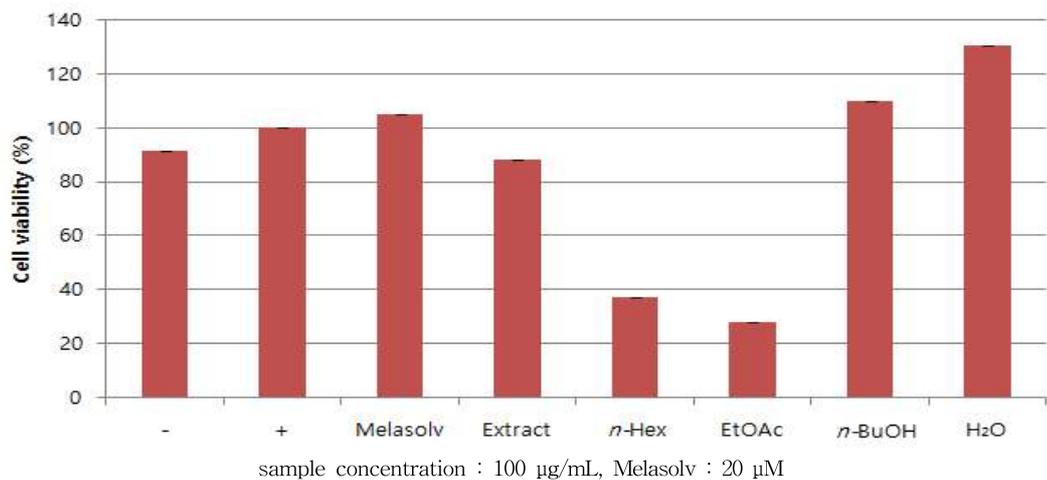
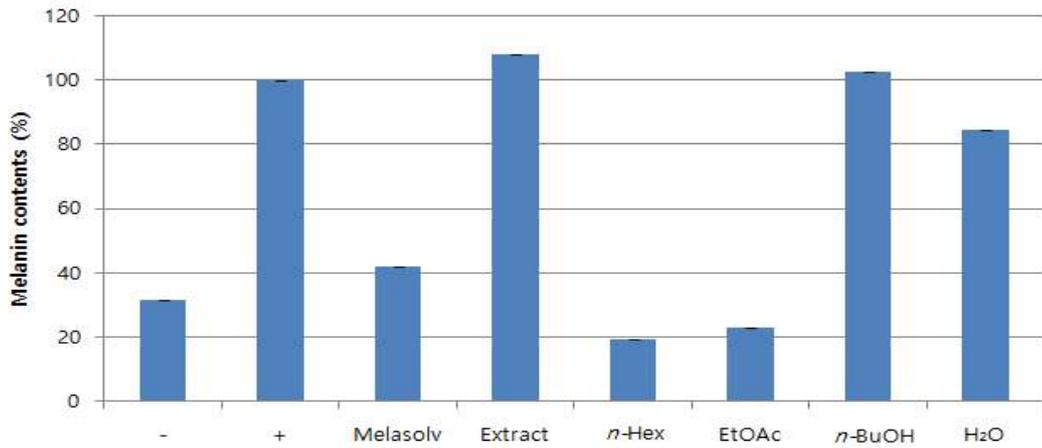


Figure 45. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of extract and solvent layers of *P. densiflora*.

(A)



(B)

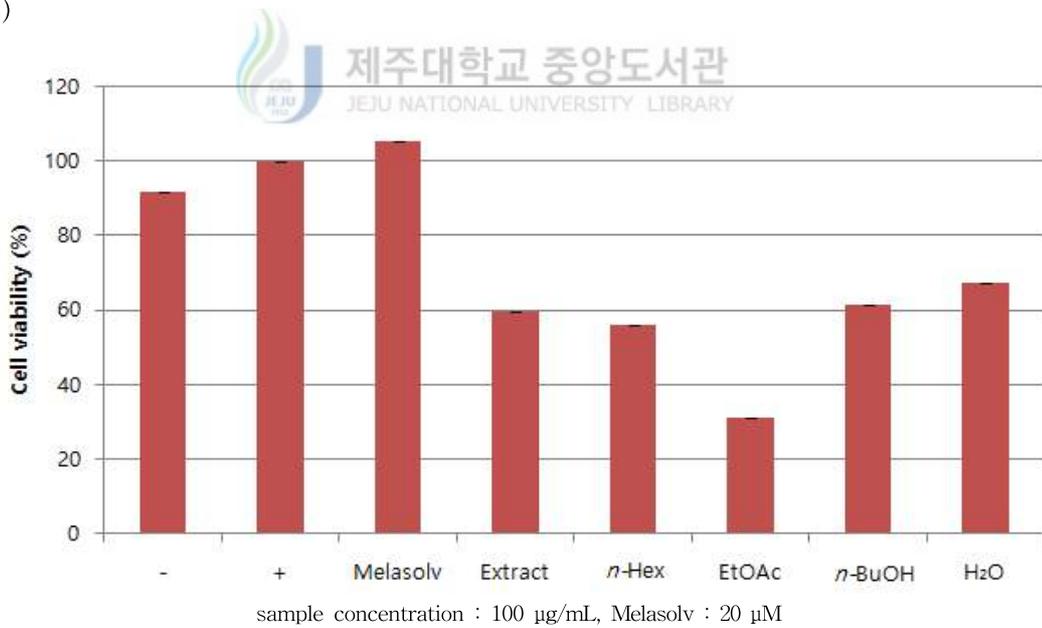
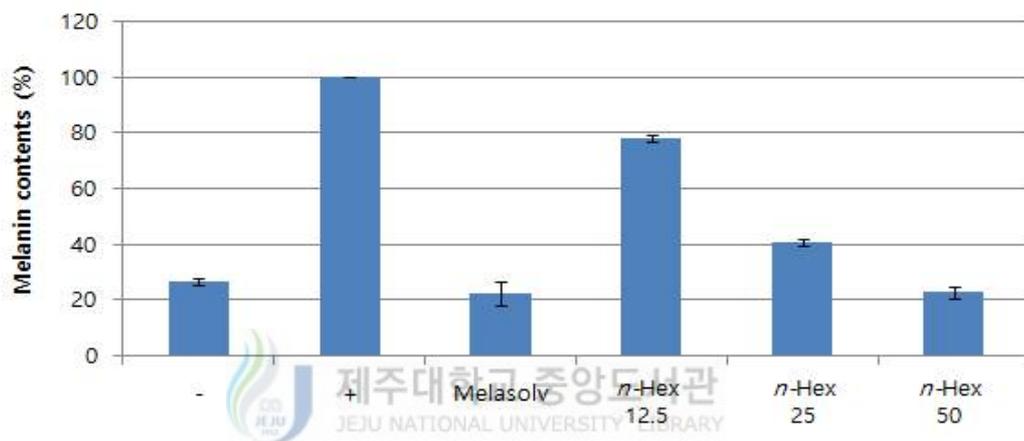


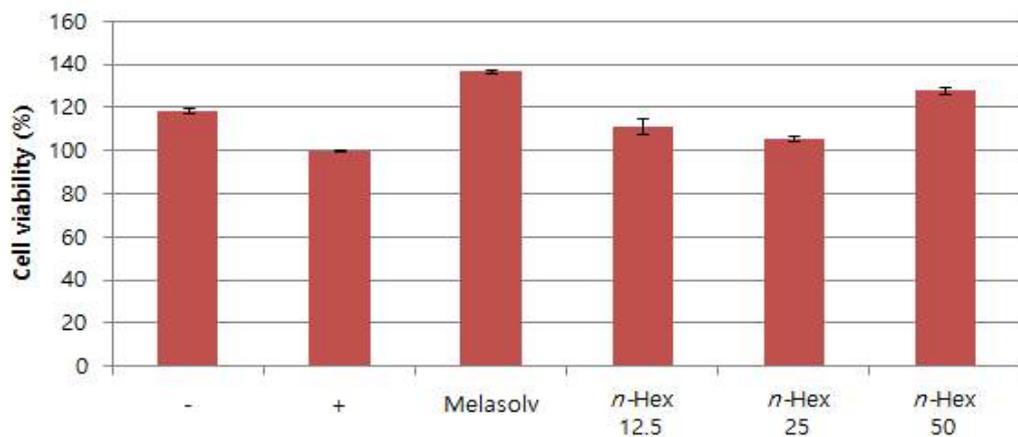
Figure 46. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of extract and solvent layers of *S. muticum*.

따라서 솔잎의 *n*-Hex layer와 경단구슬모자반의 *n*-Hex, EtOAc layer의 농도를 더 낮춰서 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과 세포 독성 없이 농도의존적으로 melanin의 합성을 저해하는 것을 확인하였다. 솔잎의 *n*-Hex layer에서는 각각 21.9, 59.1, 77.2%의 저해율을 보였고 경단구슬모자반의 *n*-Hex layer에서는 각각 54.4, 80.1, 85.8%의 저해율을 보였고 EtOAc layer에서는 각각 46.9, 53.4, 77.8%의 저해율을 보였다(figure 47, 48).

(A)



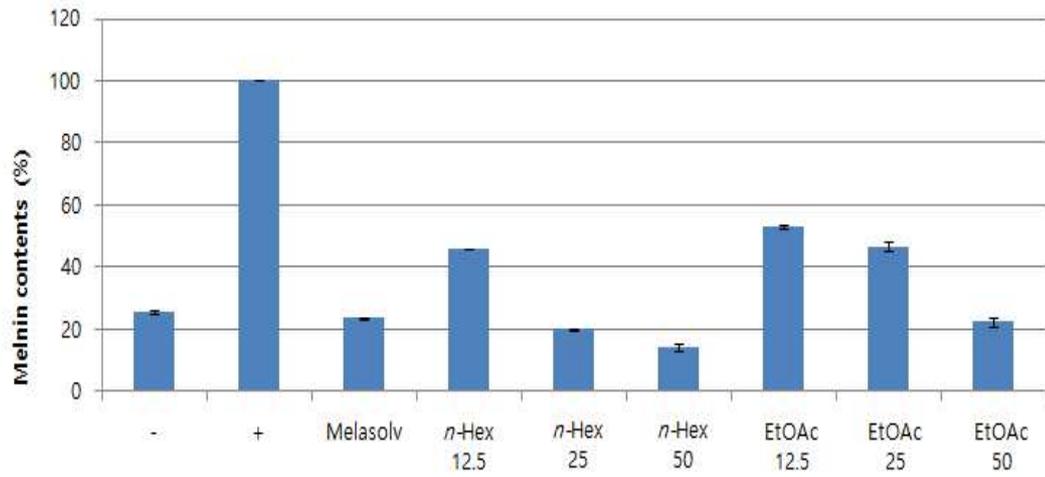
(B)



sample concentration unit : $\mu\text{g/mL}$, Melasolv : 20 μM

Figure 47. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of *n*-Hex layer of *P. densiflora*.

(A)



(B)

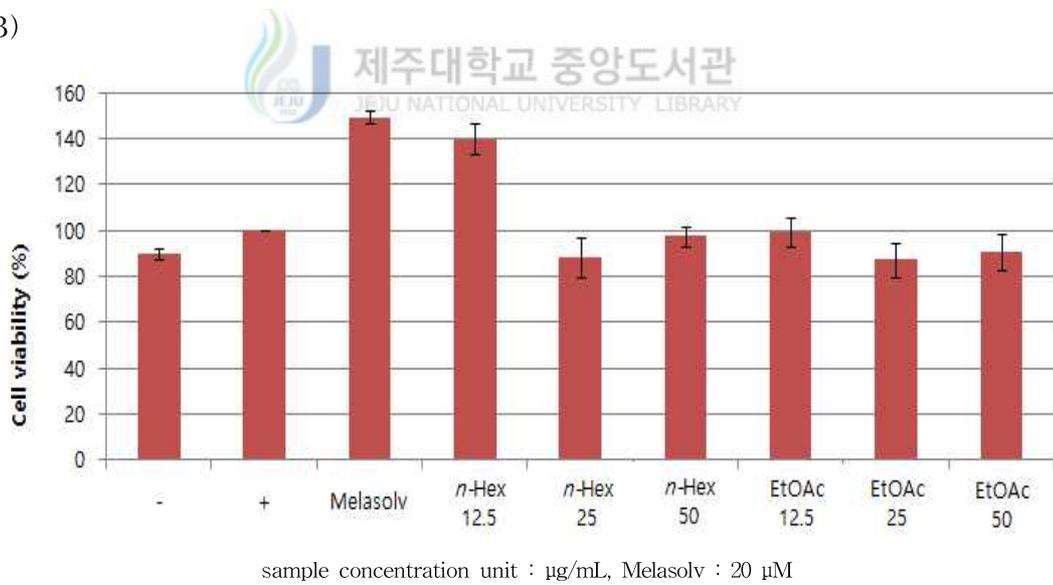


Figure 48. Melanin contents (A) and cell viabilities (B) of n-Hex layer and EtOAc layer of *S. muticum*.

IV. 요약 및 결론

본 논문은 솔잎(*Pinus densiflora* leaves)과 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*)을 추출하여 그 추출물로부터 화합물들을 분리하고, 항산화 및 주름개선, 미백 활성에 대해 천연 소재로 활용 가능성을 알아보고자 연구를 진행하였다.

솔잎과 경단구슬모자반 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O layer를 얻었다. 이 추출물과 분획물들에 대해 항산화 및 elastase 저해 활성, melanogenesis 저해 활성 실험을 진행하였다.

추출물 및 분획물들의 항산화 활성실험 결과, 총 폴리페놀 함량 측정에서는 솔잎의 EtOAc layer에서 188.4 µg GAE/1mg으로 가장 높은 값이 나왔고 경단구슬모자반에서는 추출물 및 분획층에서 모두 낮은 값이 나왔다. 총 플라보노이드 함량 측정에서는 솔잎의 EtOAc layer에서 82.6 µg quercetin/1 mg으로 가장 높은 값이 나왔고, 경단구슬모자반에서는 추출물 및 분획물에서 모두 낮은 값이 나왔다. DPPH 라디칼 소거능 실험에서는 추출물, EtOAc, H₂O layer에서 SC₅₀ 값이 각각 60.7, 69.5, 56.6 µg/mL로 대조군인 vitamin C (SC₅₀ 6.6 µg/mL)보다는 좋지 않은 라디칼 소거 활성을 보였지만 BHT (216.4 µg/mL)보다는 좋은 활성을 나타내었다. 경단구슬모자반에서는 대조군인 vitamin C와 BHT보다 활성이 좋지 않았다. 또한, ABTS⁺ radical cation 소거 활성 실험 결과, 솔잎은 추출물에서 SC₅₀ 값이 32.3 µg/mL, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 SC₅₀ 값이 각각 25.8, 41.7, 32.5 µg/mL로 대조군인 vitamin C (SC₅₀ 5.3 µg/mL), BHT (SC₅₀ 9.0 µg/mL)보다 좋지는 않았지만 어느 정도 ABTS⁺ radical cation 소거 활성을 나타내었다. 경단구슬모자반은 추출물과 분획물 모두 100 µg/mL 이상의 높은 SC₅₀ 값을 나타내었다.

솔잎과 경단구슬모자반의 추출물 및 분획물들의 elastase 저해 활성 실험 결과는 솔잎의 추출물, *n*-Hex, 및 H₂O layer에서 IC₅₀ 값이 각각 42.4, 58.1, 5.0 µg/m

로 대조군인 ursolic acid (44.4 µg/mL), oleanolic acid (52.0 µg/mL)만큼 좋은 elastase 저해 활성을 보였다. 그 중 뛰어난 elastase 저해 활성을 보인 H₂O layer의 농도를 더 낮추어 실험을 진행한 결과 IC₅₀ 값이 49.7 µg/mL로 대조군인 ursolic acid (44.4 µg/mL), oleanolic acid (52.0 µg/mL)와 유사한 값을 나타내었다. 이를 통해 H₂O layer가 elastase 저해 활성이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 B16F10 cell을 이용한 melanin contents를 측정 실험에서는 솔잎의 *n*-Hex layer 100 µg/mL 농도에서 melanin의 양은 줄었지만 세포 독성을 보여서 더 낮은 농도에서 melanin contents 양을 측정했는데 50 µg/mL 농도에서 세포 독성 없이 대조군인 melasolv보다 더 좋은 활성을 나타냈고 농도의존적으로 melanin의 생성을 저해하는 것을 확인하였다. 경단구슬모자반의 *n*-Hex layer와 EtOAc layer에서도 100 µg/mL 농도에서 melanin의 양은 줄었지만 세포 독성을 보여서 더 낮은 농도에서 melanin contents 양을 측정했는데 *n*-Hex layer에서는 50, 25 µg/mL 농도에서, EtOAc layer에서는 50 µg/mL 농도에서 세포 독성 없이 대조군인 melasolv보다 좋은 활성을 나타내었고 농도의존적으로 melanin의 생성을 저해하는 것으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

화합물의 분리는 EtOAc layer에서 진행하였고, medium pressure liquid chromatography (MPLC), 순상 silica gel chromatography, sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 NMR을 이용하여 확인하였고, 문헌과 비교하여 솔잎에서 총 4개의 화합물을, 경단구슬모자반에서 총 3개의 화합물을 분리·동정하였다. 분리된 화합물은 솔잎에서 catechin (1), shikimic acid (2), icariside E4 (3), (+)-isolariciresinol (4)로 확인되었다. 또한 경단구슬모자반에서 mannitol (1), uracil (2), loliolide (3)로 확인되었다.

본 연구의 실험결과를 바탕으로 솔잎을 이용한 천연 항산화 및 미백, 주름 개선 소재로서의 개발 가능성과 경단구슬모자반을 이용한 미백 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 1) Chang Soo Kang, Min Joo Lee, Cheol Bem Park and In Seok Bang. “Study on the Antioxidative and Physiological Activities of *Saururus chinensis* Extract.” *Journal of Life Science*, 2012, 22(6), 807~814.
- 2) Jung-Min Yoo, Yeo-Jin Kang, Hyeong-Bae Pyo, Eui Su Choung, Shin Young, Park3, Ji Ho Choi, Gwi-Jung Han, Choong Hwan Lee and Tack-Joong Kim. “Anti-Wrinkle Effects of Korean Rice Wine Cake on Human Fibroblast.” *Journal of Life Science* 2010, 20.(12), 1838~1843.
- 3) 김수영, “뽕잎피나무(*Tilia taquetii*) 잎으로부터 항염 및 주름개선 활성 성분 연구” 제주대학교 대학원, 2013, 석사학위논문
- 4) Hye-jung Park, Eun-Jeong Kwon, Moon-Moo Kim, Lee Kyeong Rok, Hong il, Lee Do Gyeong and Yunghee Oh. “Whitening Effect of *Poria cocos* Ethanol Extract by Inhibition of Melanin Synthesis.” *Journal of Life Science* 2014, 24(5), 485~490.
- 5) Eun-Jeong Kwon, Hye-Jung Park, Hyang Nam, Su-Gyeng Lee, Su-gyoung Hong, Moon-Moo Kim, Kyeong Rok Lee, Il Hong, Do Gyeong Lee2 and Yunghee Oh. “Whitening and Antioxidant Effects of a Mixture of *Poria cocos*, *Glycyrrhiza uralensis*, and *Ulmus macrocarpa* Extracts.” *Journal of Life Science* 2014, 24(10), 1063~1069.
- 6) 두산백과 “<http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1166564&cid=40942&categoryId=32685>”
- 7) 옥정현, 이인규 “한국산 갈조식물 모자반속(*Sargassum*)의 분류 I. *Bactrophyucus*

아속 *Teretia* 절.” *Algae* **2005**, *20*(2), 77-90.

8) Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine" *J. Biol. Chem.*, **1915**, *22*, 305-308.

9) Davis, F. B.; Middleton, E. ; Davis, P. J.; Blas, S. D. "Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca^{2+} -ATase activity" *Cell Calcium*, **1983**, *4*, 71-81.

10) Blois, M. S. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.

11) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A. Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, *26*, 1231-1237.

12) Joo Hee Kwon, Jee Hun Kim, Sun Eun Choi, Kwan Hee Park and Min Won Lee, "Inhibitory Effects of Phenolic Compounds from Needles of *Pinus densiflora* on Nitric Oxide and PGE2 Production", *Arch Pharm Res*, **2010**, *33*(12), 2011-2016.

13) 김정은, "비쭈기나무 가지로부터 항산화, 미백 및 주름개선 활성 성분 규명" 제주대학교 대학원, **2011**, 석사학위논문

14) 한정환, "비양나무 가지의 항산화, 미백, 항염 활성 성분 연구", 제주대학교 대학원, **2014**, 석사학위논문

15) Lizhi Dang, Guohong Li, Zhongshan Yang, Shaoliu Luo, Xi Zheng, Keqi n Zhang. "Chemical constituents from the endophytic fungus *Trichoderma*

ovalisporum isolated from *Panax notoginseng*" *Ann Microbiol*, **2010**, *60*, 3
17-320.

16) Mingfu Wang, Jiangang Li, Meera Rangarajan, Yu Shao, Edmond J. LaVoie, Tzou-Chi Huang, and Chi-Tang Ho, "Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*)" *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4869-4873.

17) Kyeong Wan Woo, Sang Un Choi, Jong Cheol Park, and Kang Ro Lee, "A New Lignan Glycoside from *Juniperus rigida*" *Arch Pharm Res* **2011**, *34*(12), 2043-2049.

18) Tsutomu Nakanishi, Naoki Iida, Yuka Inatomi, Hiroko Murata, Akira Inada, Jin Murata, Frank A. Lang, Munekazu Iinuma, Toshiyuki Tanaka, "Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*", *Phytochemistry* **2004**, *65* 207 - 13.

19) Byung Hoon Han, Man Ki Park and Yeon-Hwa Park, "A Lignan from *Rubia akane*", *Arch. Pharm. Res.* **1990**, *13*(3), 289-291.

20) Rui-Rui Wang, Qiong Gu, Yun-Hua Wang, Xue-Mei Zhang, Liu-Meng Yang, Jun Zhou, Ji-Jun Chen, Yong-Tang Zheng, "Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*", *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, *117*, 249 - 56.

21) José Antonio Morales-Serna, Eréndira García-Ríos, Domingo Madrigal, Jorge Cárdenas, Manuel Salmón, "Constituents of Organic Extracts of *Cuphea hyssopifolia*", *J. Mex. Chem. Soc.* **2011**, *55*(1), 62-64.

- 22) Alexandro Branco, Jener David G. Santos, Monalisa M.A.M. Pimentel, Juan T.A. Osuna, Luciano S. Lima, Jorge M. David, "d-Mannitol from Agave sisalana biomass waste", *Industrial Crops and Products*, **2010**, *32*, 507 - 10.
- 23) Ruth Staubmann, Manfred Schubert-Zsilavec, Alois Hiermann, Theodor Kartnig, "A complex of 5-hydroxypyrrolidin-2-one and pyrimidine-2,4-dione isolated from *Jatropha curcas*", *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 337-338.
- 24) Zhizhou He, Anjiang Zhang, Lisheng Ding, Xinxiang Lei, Jianzhang Sun, Lixue Zhang. "Chemical composition of the green alga *Codium Divaricatum* Holmes", *Fitoterapia* **2010**, *81*, 1125 - 1128.
- 25) Junji Kimura and Noritsugu Maki, "New Loliolide Derivatives from the Brown Alga *Undaria pinnatifida*", *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 57-58.
- 26) Zhao-hui Yan, Zhu-zhen Han, Xian-qing Hu, Qing-xin Liu, Wei-dong Zhang, Run-hui Liu, and Hui-liang Li, "Chemical constituent of *Euonymus alatus*" *Chemistry of Natural Compounds*, **2013**, *49*(2), 340-342.
- 27) Lee. J. I.; Kim, S. M. "Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extract" *J. Kor. Soc.*, **2009**, *38*(3), 264-27