



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

섬오가피나무 줄기로부터 항산화,
미백, 항염 및 항균 활성 성분 규명

濟州大學校 大學院

化 學 科

文 勝 利

2016年 2月

섬오가피나무 줄기로부터 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

文 勝 利

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 2月

文勝利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

2016年 2月

Identification of Anti-oxidative, Skin-whitening,
Anti-inflammatory and Anti-bacterial
Constituents from the Stems of
Acanthopanax koreanum

Seung Ri Mun
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2016. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	iv
List of Tables	iv
List of Figures	v
List of Abbreviations	vii
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 시약 및 기기	5
2. 재료	6
3. 추출, 분획 및 활성성분 분리실험	7
3-1. 섬오가피나무 줄기의 추출 및 분획실험	7
3-2. EtOAc 분획물의 활성성분 분리실험	8
3-2-1. MPLC에 의한 분획과정	8
3-2-2. VLC에 의한 분획과정	9
3-3. <i>n</i> -Hex 분획물의 활성성분 분리실험	10
3-3-1. VLC에 의한 분획과정	10
4. HPLC 분석실험	11
5. 항산화 활성실험	12
5-1. 총 폴리페놀 함량측정 실험	12
5-2. DPPH radical 소거활성 실험	12
6. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백활성 실험	13
6-1. 세포배양	13
6-2. Melanogenesis 저해활성 실험	13
6-3. MTT 세포독성 실험	14

7. RAW 264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염활성 실험	15
7-1. 세포배양	15
7-2. Nitric oxide (NO) 생성억제 활성실험	15
7-3. MTT 세포독성 실험	16
7-4. TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험	16
8. 항균활성 실험	17
8-1. 균주배양	17
8-2. Paper disc diffusion method	17
III. 결과 및 고찰	18
1. 화합물의 구조결정	18
1-1. Compound 1 및 compound 2의 구조해석	18
1-2. Compound 3 및 compound 4의 구조해석	23
1-3. Compound 5의 구조해석	28
1-4. Compound 6 및 compound 7의 구조해석	31
1-5. Compound 8의 구조해석	36
2. HPLC 분석실험 결과	39
3. 항산화 활성실험 결과	41
3-1. 총 폴리페놀 함량측정 실험	41
3-2. DPPH radical 소거활성 실험	42
3-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거활성 실험	42
3-2-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거활성 실험	43
4. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백활성 실험결과	44
4-1. Melanin contents 측정실험	44
4-1-1. 추출물 및 분획물의 melanin contents 측정 및 세포독성 실험	44
4-1-2. 분리된 화합물의 melanin contents 측정 및 세포독성 실험	46

4-2. Intracellular tyrosinase 저해활성 실험	48
4-2-1. <i>n</i> -Hex, EtOAc 분획물 및 화합물 6, 7, 8 의 intracellular tyrosinase 저해활성 실험	48
5. RAW 264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염활성 실험결과	49
5-1. Nitric oxide (NO) 생성억제 활성실험	49
5-1-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성억제 활성 및 세포독성 실험 ..	49
5-1-2. 분리된 화합물의 nitric oxide 생성억제 활성 및 세포독성 실험	51
5-2. TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험	53
5-2-1. <i>n</i> -Hex 및 EtOAc 분획물의 TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험	53
5-2-2. 화합물 2, 4, 6, 7 의 TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험	54
6. 항균활성 실험결과	55
6-1. Paper disc diffusion 실험	55
6-1-1. 추출물 및 분획물의 paper disc diffusion 실험	55
6-1-2. 분리된 화합물의 paper disc diffusion 실험	56
 IV. 요약 및 결론	 57
 V. 참고문헌	 59

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and fractionation from <i>A. koreanum</i>	7
Scheme 2. Procedure of isolation of compounds 1 , 2 and 3 from <i>A. koreanum</i>	8
Scheme 3. Procedure of isolation of compound 4 from <i>A. koreanum</i>	9
Scheme 4. Procedure of isolation of compounds 5 , 6 , 7 and 8 from <i>A. koreanum</i>	10

List of Tables

Table 1. Gradient elution condition for HPLC analysis	11
Table 2. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compounds 1 and 2	20
Table 3. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compounds 3 and 4	25
Table 4. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 5	29
Table 5. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compounds 6 and 7	33
Table 6. ¹ H and ¹³ C-NMR data of compound 8	37
Table 7. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activity of extract and solvent layers	42
Table 8. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activity of isolated compounds	43
Table 9. Anti-bacterial activity of extract and solvent layers from <i>A. koreanum</i> ..	55
Table 10. Anti-bacterial activity of isolated compounds from <i>A. koreanum</i>	56

List of Figures

Figure 1. Melanin synthesis pathway	2
Figure 2. Picture of <i>Acanthopanax koreanum</i>	6
Figure 3. Chemical structure of compound 1	19
Figure 4. Chemical structure of compound 2	19
Figure 5. ¹ H-NMR spectrum of compound 1	21
Figure 6. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1	21
Figure 7. ¹ H-NMR spectrum of compound 2	22
Figure 8. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2	22
Figure 9. Chemical structure of compound 3	24
Figure 10. Chemical structure of compound 4	24
Figure 11. ¹ H-NMR spectrum of compound 3	26
Figure 12. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3	26
Figure 13. ¹ H-NMR spectrum of compound 4	27
Figure 14. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4	27
Figure 15. Chemical structure of compound 5	28
Figure 16. ¹ H-NMR spectrum of compound 5	30
Figure 17. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5	30
Figure 18. Chemical structure of compound 6	32
Figure 19. Chemical structure of compound 7	32
Figure 20. ¹ H-NMR spectrum of compound 6	34
Figure 21. ¹³ C-NMR spectrum of compound 6	34
Figure 22. ¹ H-NMR spectrum of compound 7	35
Figure 23. ¹³ C-NMR spectrum of compound 7	35
Figure 24. Chemical structure of compound 8	36
Figure 25. ¹ H-NMR spectrum of compound 8	38
Figure 26. ¹³ C-NMR spectrum of compound 8	38

Figure 27. HPLC chromatogram of EtOAc layer	39
Figure 28. HPLC chromatogram of EtOAc layer and compound 1	39
Figure 29. HPLC chromatogram of EtOAc layer and compound 3	39
Figure 30. Calibration curve for quantification of 3,4-dihydroxybenzoic acid ..	40
Figure 31. Calibration curve for quantification of caffeic acid	40
Figure 32. Calibration curve for quantification of total polyphenolic compounds ·	41
Figure 33. Total polyphenol compounds of extract and solvent layers	41
Figure 34. DPPH radical scavenging activity of extract and solvent layers ..	42
Figure 35. DPPH radical scavenging activity of isolated compounds	43
Figure 36. Melanin contents and cell viability of extract and solvent layers ..	44
Figure 37. Melanin contents and cell viability of <i>n</i> -Hex, EtOAc layers	45
Figure 38. Melanin contents and cell viability of isolated compounds	46
Figure 39. Melanin contents and cell viability of compounds 6, 7 and 8	47
Figure 40. Intracellular tyrosinase activity of <i>n</i> -Hex, EtOAc layers and com- pounds 6, 7, 8	48
Figure 41. NO production and cell viability of extract and solvent layers ..	49
Figure 42. NO production and cell viability of <i>n</i> -Hex, EtOAc layers	50
Figure 43. NO production and cell viability of isolated compounds	51
Figure 44. NO production and cell viability of compounds 2, 4, 6 and 7	52
Figure 45. TNF- α and IL-6 production of <i>n</i> -Hex, EtOAc layers	53
Figure 46. TNF- α and IL-6 production of compounds 2, 4, 6 and 7	54

List of Abbreviations

<i>A. Koreanum</i>	<i>Acanthopanax koreanum</i>
BHA	Beta hydroxy acid
BHT	Butylated hydroxytoluene
CC	Column chromatography
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i>
CHCl ₃	Chloroform
CFU	Colony forming unit
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanine
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
Fr.	Fraction
GAE	Gallic acid equivalents
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthases
int	Integration
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LPS	Lipopolysaccharides
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MTT	Dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium salt
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ppm	Parts per million
s	Singlet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
t	Triplet
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
α -MSH	α -Melanocyte-stimulating hormone

Abstract

Identification of Anti-oxidative, Skin-whitening, Anti-inflammatory
and Anti-bacterial Constituents from the Stems of
Acanthopanax koreanum

Seung Ri Mun

Department of Chemistry, Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

In this study, anti-oxidative, whitening, anti-inflammatory and anti-bacterial activities were screened on the extracts from the stems of *Acanthopanax koreanum* and their active constituents were isolated and identified.

A. koreanum was investigated to identify the constituents possessing anti-oxidative, whitening, anti-inflammatory and anti-bacterial activities. The dried *A. koreanum* (1 kg) was extracted three times for 24 hours using 70 % EtOH. The obtained extract was successively partitioned into *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH and H₂O fractions.

On the anti-oxidative test, EtOAc fraction had good DPPH radical scavenging activity. Moreover, *n*-Hex and EtOAc fractions had potent whitening, anti-inflammatory and anti-bacterial activities.

Therefore, further phytochemical studies were conducted for the *n*-Hex and EtOAc fractions, which led to isolation of eight constituents such as 3,4-dihydroxybenzoic acid (**1**), 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**2**), caffeic acid (**3**), chlorogenic acid methyl ester (**4**), coriolic acid (**5**), 16 α -hydroxy-17-isovaleroyl-

oxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**6**), 16 α -hydro-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid (**7**) and kaurenoic acid (**8**). As far as we know, compounds **1-5** were isolated for the first time from this plant.

In order to study the skin-related properties for the isolated compounds, bioactivity screenings on anti-oxidative, whitening, anti-inflammatory and anti-bacterial tests were conducted.

On anti-oxidative test, the compounds **1, 2, 3** and **4** showed good DPPH radical scavenging activity. On the skin-whitening activities, the compounds **6, 7** and **8** inhibited the cellular melanogenesis and tyrosinase activities dose-dependently in α -MSH-stimulated B16F10 cells. In anti-inflammatory screenings, the compounds **2, 4, 6** and **7** significantly inhibited NO, TNF- α and IL-6 production dose-dependently in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. On the anti-bacterial activities, the compounds **2, 3, 5, 6** and **8** showed the moderate anti-bacterial activities against bacteria causing skin infection.

Based on these results, *A. koreanum* stem's *n*-Hex, EtOAc fractions and/or isolated compounds could be potentially applicable as cosmeceutical ingredients.

I. 서론

최근 BT 분야의 천연물 이용은 생리활성 물질인 3차 기능성분 물질이 건강관리, 다이어트나 미용 혹은 각종 질병 예방효과를 기대하여 많이 이용되고 있다. 이와 같은 천연물들은 오랜 기간 생약을 비롯한 기능성식품 및 기능성화장품 분야에서 첨단 BT 기술의 발전과 함께 크게 부상되어, 거대한 산업분야로 성장하고 있다.¹⁾ 제주도는 1,950 m의 한라산의 영향으로 저지대에는 아열대성 식물과 난대성 식물 그리고 고산지대에는 한대성 식물 혹은 고산 식물이 서식하고 있는 식물 종 다양성의 보고이다. 국내 자생식물 4,000 여종의 절반이 넘는 약 2,100 여종이 자라고 있는 것으로 보고되고 있으며, 제주도 연안은 온대와 아열대 생물종이 함께 서식하는 공간으로 국내 해양생물종의 50% 이상(약 2,000 여종)이 제주 해역에 서식하고 있다.²⁾ 따라서 이러한 제주도는 다양한 천연자원을 이용하여 기능성 소재 탐색 및 개발을 하기 위한 최적의 지역이라 할 수 있다.

산소는 생명유지를 위한 여러 대사반응에 필수요소이고, 인체 내 독극물질 해독을 위해서도 필요하지만 산소가 인체에 유익한 것만은 아니어서 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 광화학반응 등 각종 공해물질, 물리 화학적, 환경적 요인 등에 의해 수퍼옥사이드 라디칼, 하이드록시 라디칼, 과산화수소, 일중항산소와 같은 반응성이 매우 큰 프리 라디칼로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성이 있다.³⁾ 이러한 활성산소를 제거하기 위한 합성 항산화제인 BHT와 BHA 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 지금까지 널리 사용되어 왔으나 간 비대, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성 등의 문제가 제기되어 허용대상 식품이나 사용량이 엄격히 제한되고 있다. 또한 tocopherol과 ascorbic acid 같은 천연 항산화제는 안전성은 높지만 단독으로는 연쇄반응 저지 능력이 낮고 가격이 비싼 단점이 있다. 이러한 이유로 최근에는 천연물로부터 보다 안전하고 경제적이며 효과가 뛰어난 항산화제를 분리·이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 식물유래 물질로 식물의 2차 대사산물은 자유라디칼과 활성산소의 생성을 억제하거나 제거하여 산화를 방지하기 때문에 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.^{4,5)}

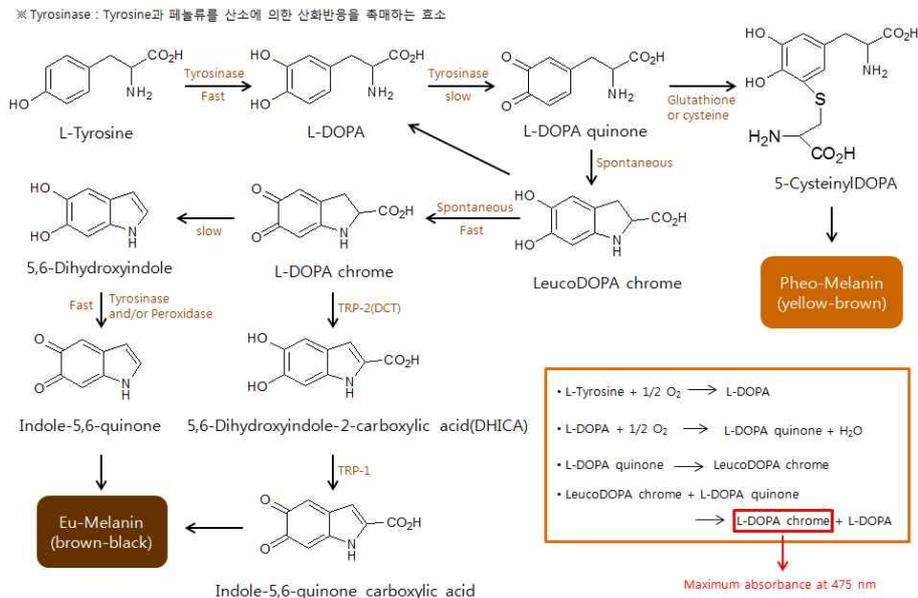


Figure 1. Melanin synthesis pathway

피부의 색은 멜라닌, 헤모글로빈, 카로틴의 3가지에 의해 결정되는데 이중 가장 중요한 역할을 하는 것이 멜라닌이다. 멜라닌세포는 표피의 기저층에서 흑갈색의 멜라닌을 생성하는 나뭇잎모양의 수지상세포이다. 멜라닌의 주요한 역할은 피부에서 발생하는 활성산소나 프리라디칼을 제거하고, 또 자외선의 투과를 막아 피부의 내부를 보호하는 것이다. 멜라닌을 만드는 출발물질은 인체에 정상적으로 존재하는 아미노산의 일종인 tyrosine이다. Tyrosine은 멜라닌 세포 내에서 tyrosinase라는 효소에 의해 산화되어 DOPA로 변하고, DOPA는 더욱 산화하여 DOPA quinone으로 바뀐다. DOPA quinone은 이후 자동 산화반응을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 eumelanin을 만들어낸다. 한편 DOPA quinone이 cysteine을 만나게 되면 cysteinyl DOPA가 만들어지고 그 결과 적갈색의 pheomelanin이 만들어진다 (Figure 1). 이후 생성된 멜라닌은 melanosome에 실려 각질형성세포로 전달된다.⁶⁾ 그러나 melanin이 과잉 생산이 되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하며 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 최근의 미백효과에 대한 연구는 피부 미백효과와 항산화작용, 피부노화방지를 포함하는 포괄적인 개념으로 진행되고 있다. 현재 알려져 있는 미백에 대한 연구는 자외선 차단 소재 연구, 멜라닌(melanin) 세포에 멜라닌의 합

성을 명령하는 신호전달 물질인 cytokine의 작용을 조절하는 연구, 유전자 발현억제, tyrosinase 작용억제, 활성산소 제거소재, 색소환원, 각질층 제거 촉진소재 연구 등의 여러 방법으로 진행되고 있다. 이중에서도 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌(melanin)의 초기 생성을 감소시키는 기전이 가장 많이 연구되고 있다.⁸⁾

염증반응은 상처나 감염, 또는 자가면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서 염증발생 시 염증부위에 면역세포들이 침투되고 이들 세포들은 여러 종류의 화학물질 및 cytokine을 생산 분비하여 생체방어 및 염증반응을 일으킨다.⁹⁾

내독소로 잘 알려진 LPS는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7과 같은 macrophage 또는 monocyte에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다. 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 PGE₂ 등의 염증인자가 iNOS 및 COX-2에 의해 형성된다. 일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한 염증을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다. 피부상재균 중 피부염증에 유발에 관여하는 *S. epidermidis*, *P. acnes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 등을 들 수 있다. *S. epidermidis*, *P. acnes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*와 같은 세균들은 피부에서 종기, 여드름, 중이염 등의 화농성 질환을 일으키는 원인균들이다. 이러한 균들이 염증반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 피부질환 치료에 다양한 항생제가 사용되고 있다. 현재 사용되고 있는 항생제 중에는 erythromycin, tetracycline, clindamycin, macrolide, azelaic acid, retinoid, benzoyl peroxide 등이 있지만 retinoid, benzoyl peroxide는 피부건조증이나 과민증을 유발하고, erythromycin, tetracycline, clindamycin, macrolide은 항생제에 대한 내성 발생으로 인하여 지속적인 사용이 어렵고 간독성이 심하며, 칸디다증과 같은 기회감염증이 나타날 수도 있다는 부작용이 있다. 따라서 이런 문제점을 해결하기 위해

안전성이 확보된 천연물을 이용하여 항균효과가 있으면서 부작용이 없는 피부염 증 치료제를 개발하려고 노력중이며, 근래 염증분야 연구에서는 염증매개물질 생산 분비를 억제하는 천연소염물질을 찾는데 초점이 맞추어져 있는데 그 이유는 cortisol 합성제제와 같은 기존 소염제가 부작용이 많기 때문이다.¹¹⁾

섬(탐라)오가피나무 [*Acanthopanax koreanum* Nakai]는 두릅나무과의 가지가 많은 낙엽성 관목으로 우리나라의 제주도, 중국의 푸젠 등지의 해변 산기슭에 주로 분포한다. 특히 제주도가 원자생지로 해안에서 해발 1,400 m에 이르기까지 제주도 전역에서 분포하며, 예로부터 민간요법으로 신경통, 관절염 등의 치료를 위한 약용식물로서 사용되어 왔다. 또한 재배 적지 폭이 넓고 속성수로서 경제적 수확 연수가 짧아 기능성 식품 및 의약품으로 개발할 가능성이 높은 제주도의 특산 자원 식물이다.¹²⁾ 섬오가피나무 줄기에 대해서는 현재까지 추출물 단위에서 항산화¹³⁾, 미백¹⁴⁾ 및 항염¹⁵⁾활성 등이 보고되었으나, 아직 이들 활성에 관련한 유효 활성성분의 분리가 진행되지 않아 이 연구를 시작하게 되었다. 본 연구에서는 제주도에서 자생하고 있는 섬오가피나무의 줄기로부터 다양한 분리과정을 통해 유효 활성물질을 탐색 및 분리·동정하였다. 또한 추출물, 분획물 및 분리된 화합물에 대하여 항산화, 미백, 항염 및 항균활성에 대한 연구를 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 분리 및 분석에 사용된 용매들은 Merck, Junsei의 제품을 사용하였다. VLC (vacuum liquid chromatography)에는 silica gel (2-25 μm , Sigma Co.)을 사용하였으며, 순상 칼럼 크로마토그래피에는 silica gel (95-110 μm , Merck Co.) 그리고 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20 (0.1-0.025 mm)을 사용하였다. 또한 분리를 위하여 MPLC (medium pressure liquid chromatography, KP-C₁₈-HS, Biotage Co.)를 사용하였다. 분리 과정에 사용된 TLC (thin-layer chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하여 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 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.)이나 Biochrom Libra S22 (Biochrom Co.)을 이용하였다.

구조분석에 이용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL)과 AVANCE III (FT-NMR, Bruker Co.)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 Merck의 NMR 전용용매로 CD₃OD, CDCl₃를 사용하였다.

HPLC 분석에는 HPLC (Waters Co. 600 Pump)를 이용하였고, 사용된 칼럼 및 검출기는 각각 INNO Column (250×4.6 mm, 5 μm) 및 UV-Visible Detector (Waters Co. 966 PDA 254.0 nm)이었다.

2. 재료

실험에 사용된 시료인 섬오가피나무[*Acanthopanax koreanum* Nakai] 줄기(시료번호 : 351)는 섬오가피나무를 직영농장에서 재배하여 가공·판매하는 제주도 소재의 식품가공업체인 「한라산오가피」를 통해 2013년 12월에 제주도 애월읍 고성리에서 채집하여 건조 및 분말화 된 상품을 구입하였다(Figure 2). 섬오가피나무의 학명에 대해서는 현재 *Acanthopanax koreanum*에서 *Eleutherococcus gracilistylus* 또는 *Eleutherococcus nodiflorus*로 바뀌어가고 있는 상황이지만 본 연구에서는 예전부터 오랫동안 주로 사용되어 온 *Acanthopanax koreanum*을 사용하기로 하였다.

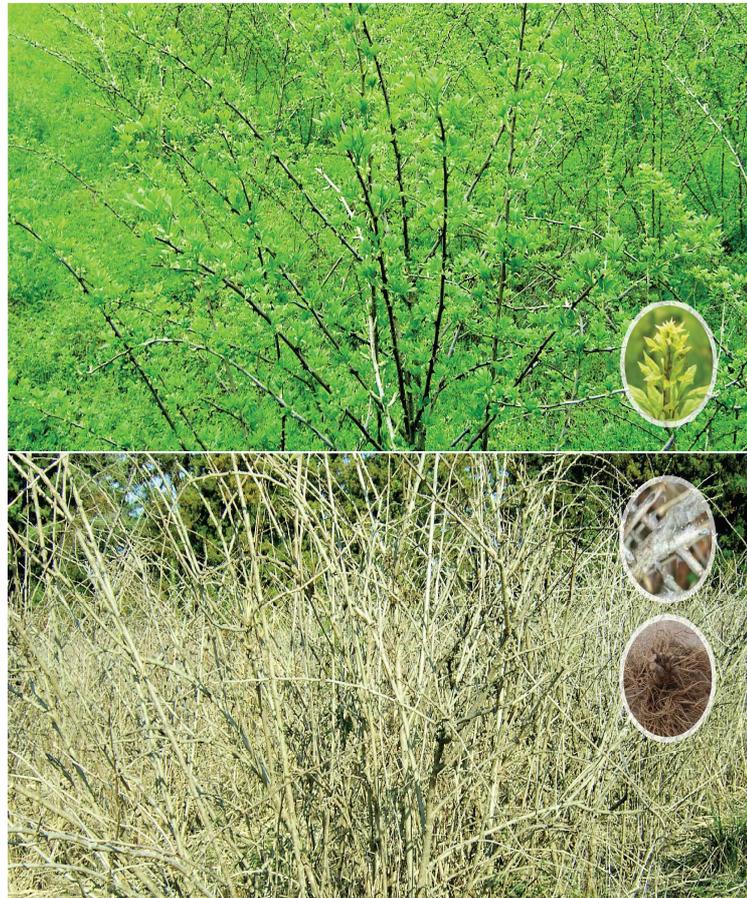
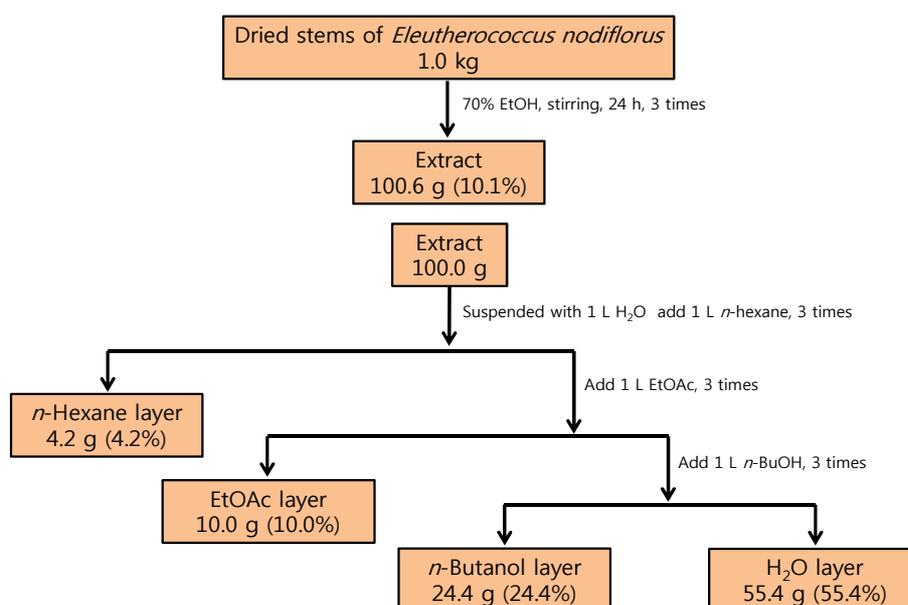


Figure 2. Picture of *Acanthopanax koreanum*

3. 추출, 분획 및 활성성분 분리실험

3-1. 섬오가피나무 줄기의 추출 및 분획실험

건조 및 분쇄 된 1 kg을 70%(v/v) EtOH 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 회전 농축기(rotary evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 100.6 g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, 및 H₂O 순서로 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and fractionation from *A. koreanum*

3-2. EtOAc 분획물의 활성성분 분리실험

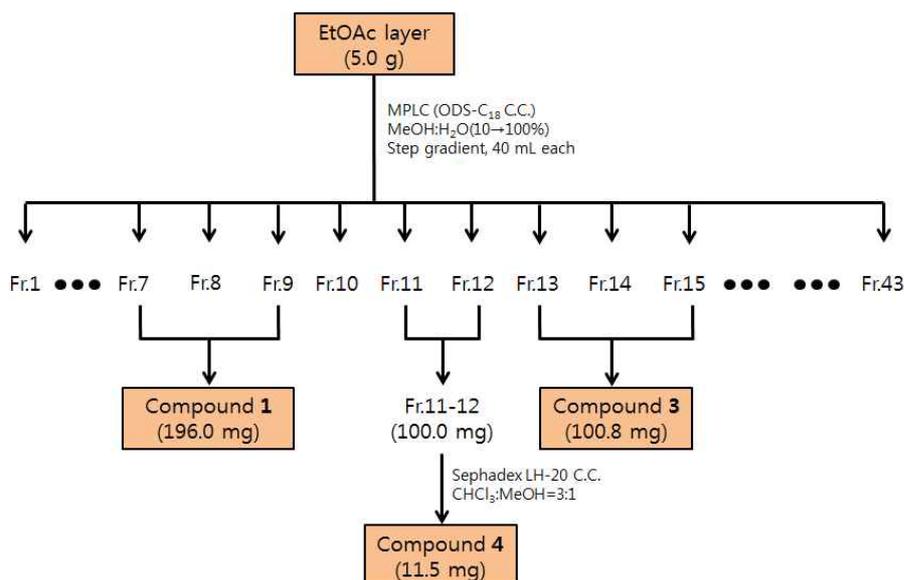
3-2-1. MPLC에 의한 분획과정

용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 MPLC (medium pressure liquid chromatography)를 수행하였다. EtOAc 분획물 5.0 g을 MeOH 8 mL에 녹이고 0.45 μ m PVDF filter를 이용해 여과한 후 주입하였으며 column은 역상 실리카겔 (C₁₈)을 사용하였다. 기울기 용리법을 이용해 MeOH:H₂O(10→90%, 80 min), MeOH(90→100%, 10 min)의 용매조건들로 극성 비율을 순차적으로 낮추면서 각각 40 mL씩 용출시켜 총 43개의 fraction을 얻었다.

MPLC fraction들 중 Fr.7-9로부터 compound 1(196.0 mg)을 얻었다.

MPLC fraction들 중 Fr.11-12(100 mg)을 CHCl₃ : MeOH = 3 : 1의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 2(11.5 mg)을 얻었다.

MPLC fraction들 중 Fr.13-15로부터 compound 3(100.8 mg)을 얻었다(Scheme 2).

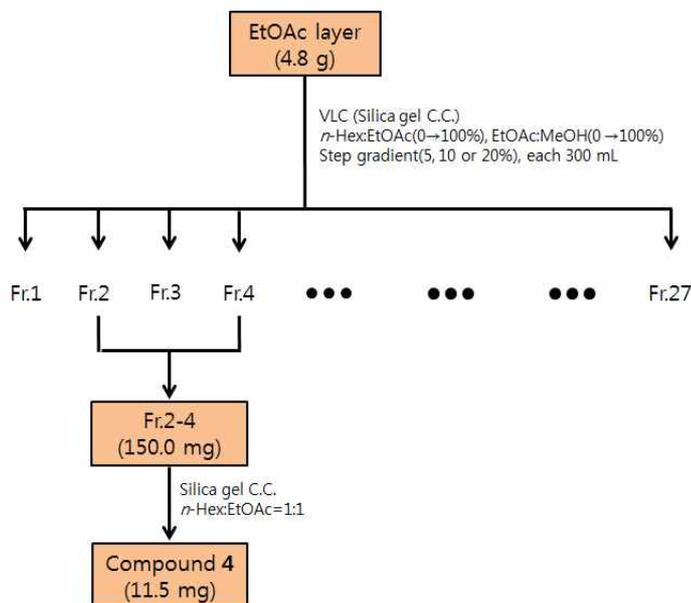


Scheme 2. Procedure of isolation of compounds 1, 2 and 3 from *A. koreanum*

3-2-2. VLC에 의한 분획과정

용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 EtOAc 분획물 4.8 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 VLC(vacuum liquid chromatography)용 normal phased silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 VLC를 수행하였다. 기울기 용리법을 이용해 *n*-Hex:EtOAc(0→100%), EtOAc:MeOH(90→100%)의 용매조건들로 극성 비율을 5, 10 or 20%씩 높이면서 각각 300 mL씩 용출시켜 총 27개의 fraction을 얻었다.

VLC fraction들 중 Fr.2-4(150.0 mg)을 *n*-Hex : EtOAc = 1 : 1의 용매조건으로 normal phased silica gel column chromatography를 수행하여 compound 4(11.5 mg)을 얻었다(Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of isolation of compound 4 from *A. koreanum*

3-3. *n*-Hex 분획물의 활성성분 분리실험

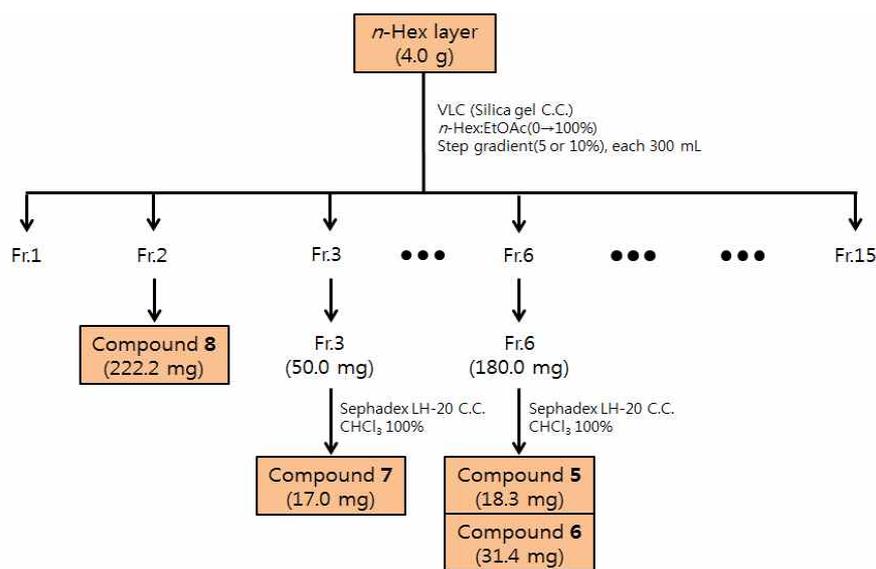
3-3-1. VLC에 의한 분획과정

용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 *n*-Hex 분획물 4.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 VLC (vacuum liquid chromatography)용 normal phased silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 VLC를 수행하였다. 기울기 용리법을 이용해 *n*-Hex:EtOAc(0→100%)의 용매조건들로 극성 비율을 5 or 10%씩 높이면서 각각 300 mL씩 용출시켜 총 15개의 fraction을 얻었다.

VLC fraction들 중 Fr.2으로부터 compound 8(222.2 mg)을 얻었다.

VLC fraction들 중 Fr.3(50.0 mg)을 CHCl₃ 100%의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 7(17.0 mg)을 얻었다.

VLC fraction들 중 Fr.6(180.0 mg)을 CHCl₃ 100%의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 5(18.3 mg) 및 compound 6(31.4 mg)을 얻었다(Scheme 4).



Scheme 4. Procedure of isolation of compounds 5, 6, 7 and 8 from *A. koreanum*

4. HPLC 분석실험

섬오가피나무 줄기 EtOAc 분획물에서 분리한 화합물 중 비교적 과량으로 존재하는 compound 1과 3에 대한 정성 및 정량분석을 HPLC로 수행하였다. 화합물의 정성분석에는 10 mg/mL로 녹인 EtOAc layer에 분리된 compound 1과 3을 각각 첨가한 후 0.45 µm PVDF filter를 이용해 여과하고 여액을 분석하여, compound 1과 3을 개별로 첨가했을 때 증가되는 피크를 가지고 화합물별 머무름 시간을 확인하였다. 화합물 정량분석에는 분리된 compound 1과 3에 각각 해당하는 3,4-dihydroxybenzoic acid (Cas:99-50-3, Sigma-aldrich Co.) 및 caffeic acid (Cas:331-39-5, Sigma-aldrich Co.) 표준용액을 사용하여, 얻어진 피크의 면적 값을 가지고 각 화합물의 정량을 위한 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선을 작성하기 위해 3,4-dihydroxybenzoic acid 및 caffeic acid 표준물질 각 1,000 mg을 1 L MeOH에 녹여 1,000 ppm으로 stock solution을 제조하고, 이를 25, 50, 100 및 200 ppm이 되도록 묽혀 검정곡선을 작성하였다.

준비된 샘플 10 µL씩을 30°C 칼럼 조건에서 분석하는데 HPLC (Waters Co. 600 Pump)를 이용하였고, 사용된 칼럼 및 검출기는 각각 INNO Column (250×4.6 mm, 5 µm) 및 UV-Visible Detector (Waters Co. 966 PDA 254.0 nm)이었다. 용리액은 acetonitrile/0.1% acetic acid을 사용하여 다음의 조건으로 기울기 용리시켰고, 1.0 mL/min의 유속으로 60분 동안 분석하였다(Table 1).

Table 1. Gradient elution condition for HPLC analysis

Time (min)	Flow (mL/min)	0.1% acetic acid (%)	Acetonitrile (%)
0	1.0	90	10
15	1.0	60	40
30	1.0	30	70
42	1.0	5	95
45	1.0	90	10

5. 항산화 활성실험

5-1. 총 폴리페놀 함량측정 실험

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Denis법¹⁶⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO : EtOH = 1 : 1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 묽혀 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) reader로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 µL를 microtube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3 분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합하고, 증류수 700 µL를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1 시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 화합물 함량을 환산하였다.

5-2. DPPH radical 소거활성 실험

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 방법¹⁷⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다. 96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 µL (in EtOH)와 0.2 mM DPPH (in EtOH) 용액 180 µL를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA Reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

소거율(%)을 다음의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 DPPH를 50% 저해할 때의 농도(SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 활성을 비교하기 위한 항산화제로는 vitamin C를 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

6. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백활성 실험

6-1. 세포배양

B16F10 murine melanoma cell은 한국세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, YY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

6-2. Melanogenesis 저해활성 실험

6 well plate에 5×10^4 cells/mL의 B16F10 cell을 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 24시간 전 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하였다. 그리고 100 nM의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환해 주고 sample을 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 PBS buffer로 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하고 이를 원심 분리시켜 상등액이 제거된 pellet만을 취한다. Pellet에 sonication buffer (6.7 mM sodium phosphate buffer containing 1% triton X-100 and 0.2 mM PMSF)를 넣어 sonication 해준 후 다시 원심분리를 시행하였다. 분리된 상등액은 L-DOPA와 반응시켜 ELISA reader 이용하여 475 nm에서 intracellular tyrosinase 저해 활성을 측

정하였고, pellet은 1 N NaOH를 첨가한 후 ELISA reader 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정해 melanin contents를 확인하였다. 이 때 활성을 비교하기 위한 미백제로는 melasolv(20 μ M)을 사용하였다.

6-3. MTT 세포독성 실험

6 well plate에 5×10^4 cells/mL의 B16F10 cell을 37°C, 5% CO₂ incubator 조건 하에서 24시간 전 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하였다. 그리고 100 nM의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환해 주고 sample을 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 이후 배양액에 500 μ g/mL 농도로 MTT시약을 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 후, 상등액을 완전히 제거하였다. Cell viability는 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 570 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정해 평가하였으며, 다음의 식에 의해 계산되었다.

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

A_{control} : 용매를 처리한 후 형성된 formazan의 흡광도

A_{sample} : sample을 처리한 후 형성된 formazan의 흡광도

7. RAW 264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염활성 실험

7-1. 세포배양

RAW 264.7 murine macrophage cell은 한국세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea) 으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS) 이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, YY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 2 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

7-2. Nitric oxide (NO) 생성억제 활성실험

24 well plate에 2×10^5 cells/mL의 RAW 264.7 cell을 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 그리고 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환해주고 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 을 사용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 96 well plate에서 세포배양액 100 µL와 Griess 시약 100 µL를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용하여 검정곡선을 작성한 후 비교하였다. 이때 활성을 비교하기 위한 항염증제로는 2-amino-4-picoline(10 µM)을 사용하였다.

7-3. MTT 세포독성 실험

24 well plate에 2×10^5 cells/mL의 RAW 264.7 cell을 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 그리고 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환해주고 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양액에 500 µg/mL 농도로 MTT시약을 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 후, 상등액을 완전히 제거하였다. Cell viability는 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 570 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정해 평가하였으며, 다음의 식에 의해 계산되었다.

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

A_{control} : 용매를 처리한 후 형성된 formazan의 흡광도

A_{sample} : sample을 처리한 후 형성된 formazan의 흡광도

7-4. TNF-α 및 IL-6 생성억제 활성실험

24 well plate에 2×10^5 cells/mL의 RAW 264.7 cell을 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 그리고 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환해주고 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 TNF-α 및 IL-6의 양은 세포배양액을 가지고 ELISA Kit (Life technologies Co. invitrogen)를 수행하여 450 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정해 정량한 후 비교하였다.

8. 항균활성 실험

8-1. 균주배양

Sample의 항균활성을 측정하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), *Propionibacterium acnes* (CCARM 9009, 9010, 0081), *Staphylococcus aureus* (KCCM 11335) 및 *Pseudomonas aeruginosa* (KCCM 11802) 총 8개의 균주를 한국 미생물보존 센터로부터 분양 받아 사용하였다. *S. epidermidis*, *S. aureus* 및 *P. aeruginosa*인 경우, 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 3계대 후 사용하였다. *P. acnes*인 경우, 배양배지를 GAM (gifu anaerobic medium) broth로 하여 3계대 후 사용하였다.

8-2. Paper disc diffusion method

Sample의 항균활성을 측정하기 위해 8개의 균주에 대하여 paper disc diffusion 법으로 생육 억제율을 측정하였다. *P. acnes* (CCARM 9009, 9010, 0081)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 1.5×10^6 CFU/mL로 맞춰준 후 0.8% 한천을 포함하는 GAM 배지에 넣어 1.5% 한천을 포함하는 GAM 배지 위에 부어 주었다. 이후 배지가 굳으면 sample이 처리된 직경 8 mm paper disc를 배지 위에 올려서 37°C, 48시간 동안 혐기 배양하였다. 배양 후 형성된 원형 발육 저지환(clear zone)의 직경 크기를 측정하였다. *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), *S. aureus* (KCCM 11335) 및 *P. aeruginosa* (KCCM 11802)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 1.5×10^6 CFU/mL로 맞춰준 후 0.8% 한천을 포함하는 TSB 배지에 넣어 1.5% 한천을 포함하는 TSB 배지 위에 부어 주었다. 이후 배지가 굳으면 sample이 처리된 직경 8 mm paper disc를 배지 위에 올려서 37°C, 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 형성된 원형 발육 저지환(clear zone)의 직경 크기를 측정하였다. 이때 비교하기 위한 활성물질로는 erythromycin(1 mg/mL)를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조결정

1-1. Compound 1 및 compound 2의 구조해석

Compound 1은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.74(1H, d, 1.9), 7.42(1H, dd, 8.1, 1.9) 및 6.79(1H, d, 8.1)의 signal은 *ortho*, *meta*-coupling 하는 benzene ring 수소로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 170.4의 signal은 carbonyl기로 예상하였고, δ 151.6과 146.1의 signal은 deshielding된 것으로 보아 $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 signal을 고려했을 때, 전기음성도가 큰 산소가 결합한 benzene ring 탄소로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁸⁾과 비교한 결과 compound 1은 3,4-dihydroxybenzoic acid로 동정하였다(Figure 3).

Compound 2는 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 분석해 본 결과 3,4-dihydroxybenzoic acid의 유도체로 예상하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.41(1H, dd, 8.4, 2.2), 7.40(1H, d, 2.2) 및 6.79(1H, d, 8.4)의 signal은 *ortho*, *meta*-coupling 하는 benzene ring 수소로 예상하였고, δ 3.82(3H, s)의 signal은 deshielding된 것과 적분 값을 통하여 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는 methoxyl 수소로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 169.0의 signal은 carbonyl기로 예상하였고, δ 152.0과 146.4의 signal은 deshielding된 것으로 보아 $^1\text{H-NMR}$ data를 고려했을 때 전기음성도가 큰 산소가 결합한 benzene ring 탄소로 예상하였다. 또한 δ 52.4의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁹⁾과 비교한 결과 compound 2는 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester로 동정하였다(Figure 4).

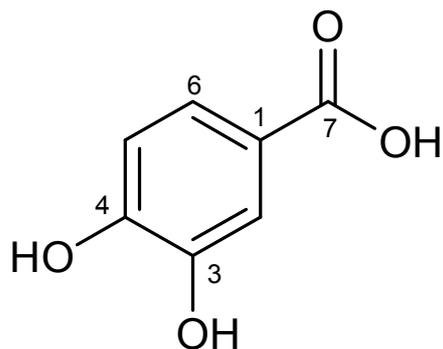


Figure 3. Chemical structure of compound 1

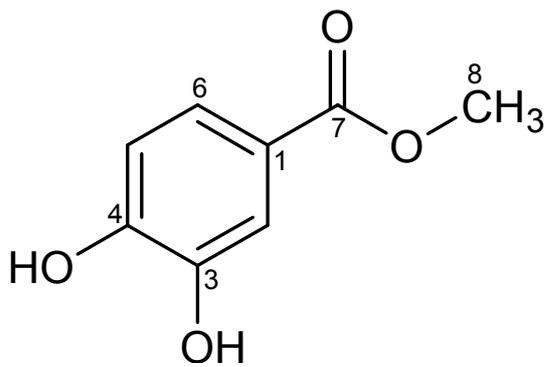


Figure 4. Chemical structure of compound 2

Table 2. ^1H and ^{13}C -NMR data of compounds **1** and **2** (400/100 and 500/125 MHz, in CD_3OD)

No.	Compound 1		Compound 2	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	123.1		122.6	
2	115.9	7.42(1H, d, 1.9)	116.0	7.40(1H, d, 2.2)
3	146.1		146.4	
4	151.6		152.0	
5	117.8	6.79(1H, d, 8.1)	117.5	6.79(1H, d, 8.4)
6	124.0	7.74(1H, dd, 8.1, 1.9)	123.7	7.41(1H, dd, 8.4, 2.2)
7	170.4		169.0	
8			52.4	3.82(3H, s)

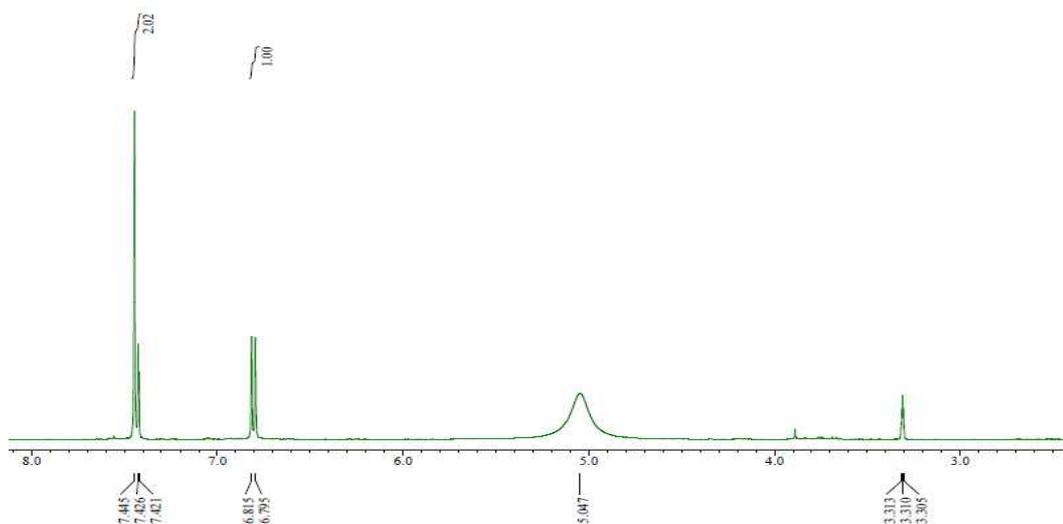


Figure 5. ^1H -NMR spectrum of compound **1** (in CD_3OD)

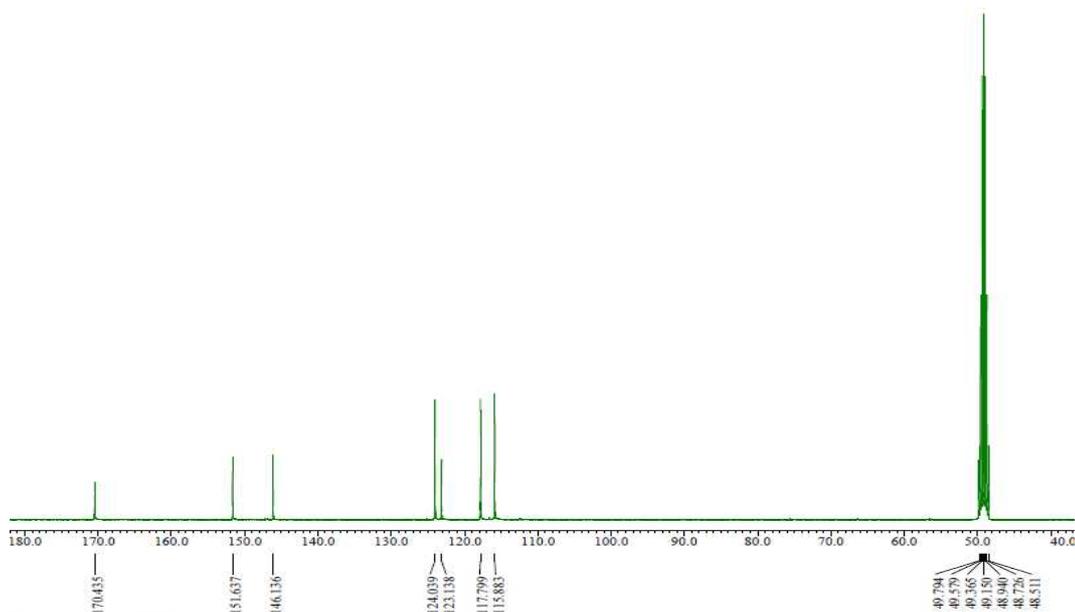


Figure 6. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** (in CD_3OD)

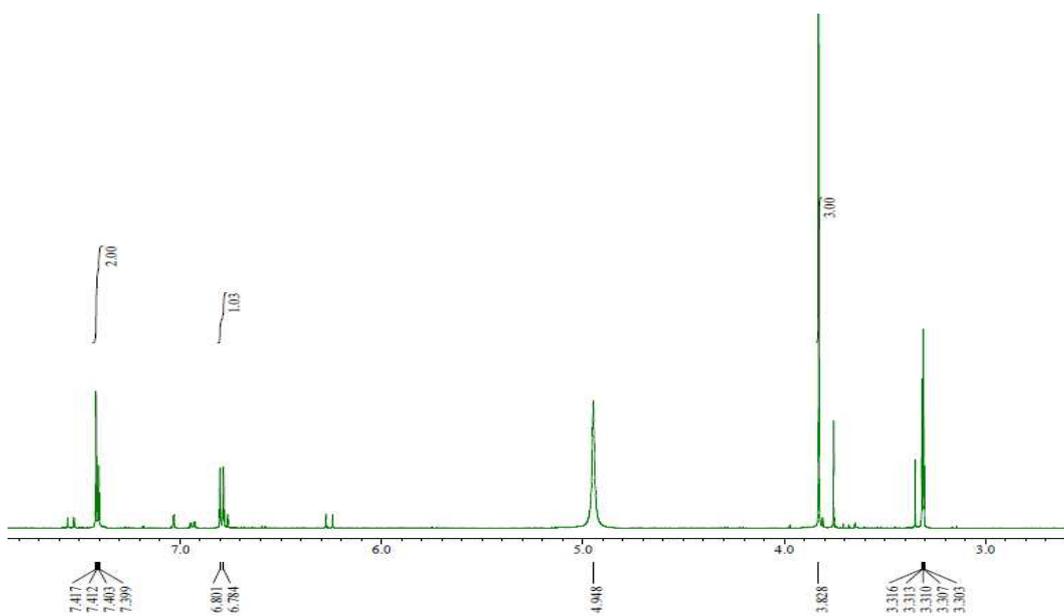


Figure 7. ^1H -NMR spectrum of compound **2** (in CD_3OD)

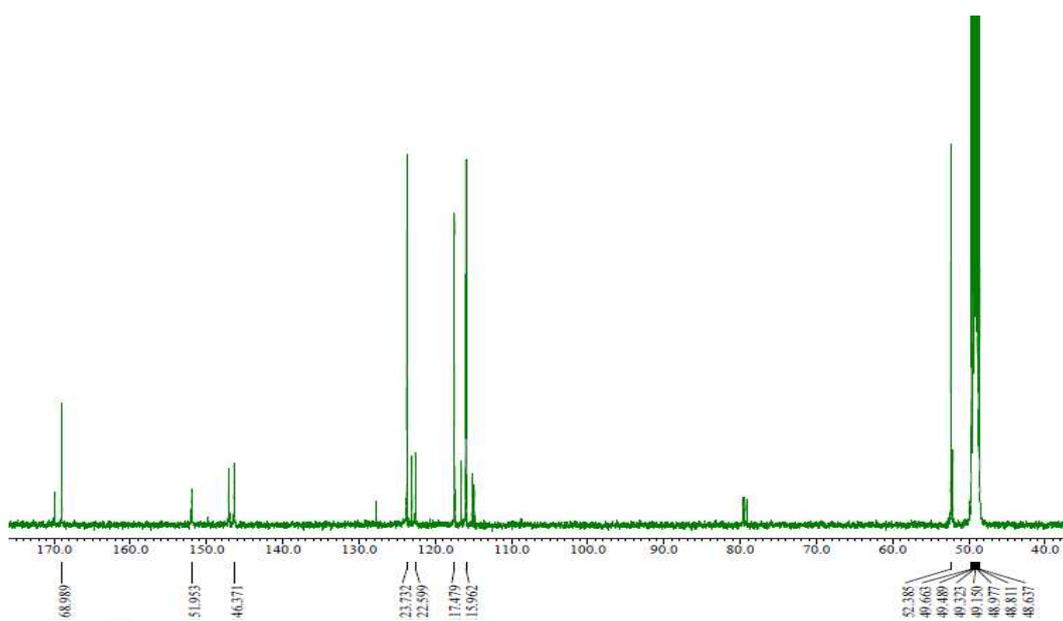


Figure 8. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** (in CD_3OD)

1-2. Compound 3 및 compound 4의 구조해석

Compound 3은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.04(1H, d, 1.8), 6.93(1H, dd, 8.2, 1.8) 및 6.78(1H, d, 8.2)의 signal은 *ortho*, *meta*-coupling 하는 benzene ring 수소로 예상하였다. 또한 δ 7.53(1H, d, 16.0)과 6.22(1H, d, 16.0)의 signal은 *trans*-olefin 수소로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 171.2의 signal은 carbonyl기로 예상하였고, δ 149.6, 147.2 및 146.9의 signal은 deshielding된 것으로 보아 $^1\text{H-NMR}$ data를 고려했을 때, 전기음성도가 큰 산소가 결합한 sp^2 혼성 탄소 및 α, β 불포화 carbonyl기의 β 위치 sp^2 혼성 탄소로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁸⁾과 비교한 결과 compound 3은 caffeic acid로 동정하였다 (Figure 9).

Compound 4은 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 분석해 본 결과 caffeic acid의 유도체로 예상하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.04(1H, d, 1.8), 6.95(1H, dd, 8.2, 1.8) 및 6.78(1H, d, 8.2)의 signal은 *ortho*, *meta*-coupling하는 benzene ring 수소로 예상하였고 δ 7.53(1H, d, 16.0)과 6.22(1H, d, 16.0)의 signal은 *trans*-olefin 수소로 예상하였다. 또한 δ 5.28(1H, m), 4.14(1H, m), 3.73(1H, dd, 7.3, 3.2) 및 3.69(3H, s)의 signal은 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며 sp^3 혼성에 관여하는 수소로 예상하였으며, 그 중 3.69(3H, s)의 signal은 적분 값을 통하여 methoxyl 수소로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 175.6, 168.4의 signal은 carbonyl기로 예상하였고 δ 149.8, 147.3 및 147.0의 signal은 deshielding된 것으로 보아 $^1\text{H-NMR}$ data를 고려했을 때, 전기음성도가 큰 산소가 결합한 sp^2 혼성 탄소 및 α, β 불포화 carbonyl기의 β 위치 sp^2 혼성 탄소로 예상하였다. 또한 δ 75.9, 72.7, 72.3, 70.4 및 53.1의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁰⁾과 비교한 결과 compound 4은 chlorogenic acid methyl ester로 동정하였다(Figure 10).

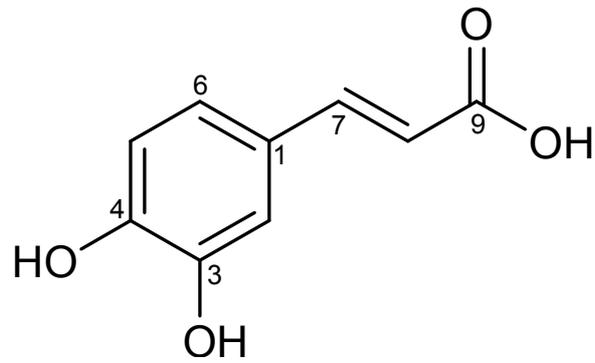


Figure 9. Chemical structure of compound 3

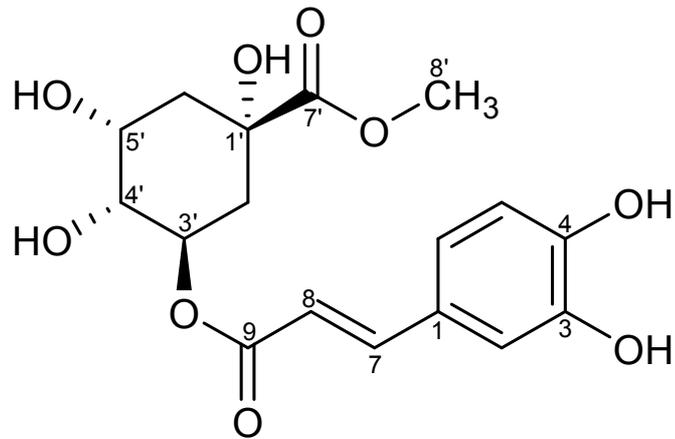


Figure 10. Chemical structure of compound 4

Table 3. ^1H and ^{13}C -NMR data of compounds **3** and **4** (400 and 100 MHz, in CD_3OD)

No.	Compound 3		Compound 4	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	127.9		127.8	
2	115.6	7.04(1H, d, 1.8)	115.2	7.04(1H, d, 1.8)
3	146.9		147.0	
4	149.6		149.8	
5	116.6	6.78(1H, d, 8.2)	116.7	6.78(1H, d, 8.2)
6	123.0	6.93(1H, dd, 8.2, 1.8)	123.1	6.95(1H, dd, 8.2, 1.8)
7	147.2	7.53(1H, d, 16.0)	147.3	7.53(1H, d, 16.0)
8	115.2	6.22(1H, d, 16.0)	115.2	6.22(1H, d, 16.0)
9	171.2		168.4	
1'			75.9	
2'			38.2	2.19(2H, m)
3'			70.4	4.14(1H, m)
4'			72.7	3.73(1H, dd, 7.3, 3.2)
5'			72.3	5.28(1H, m)
6'			37.9	2.19(2H, m)
7'			175.6	
8'			53.1	3.69(3H, s)

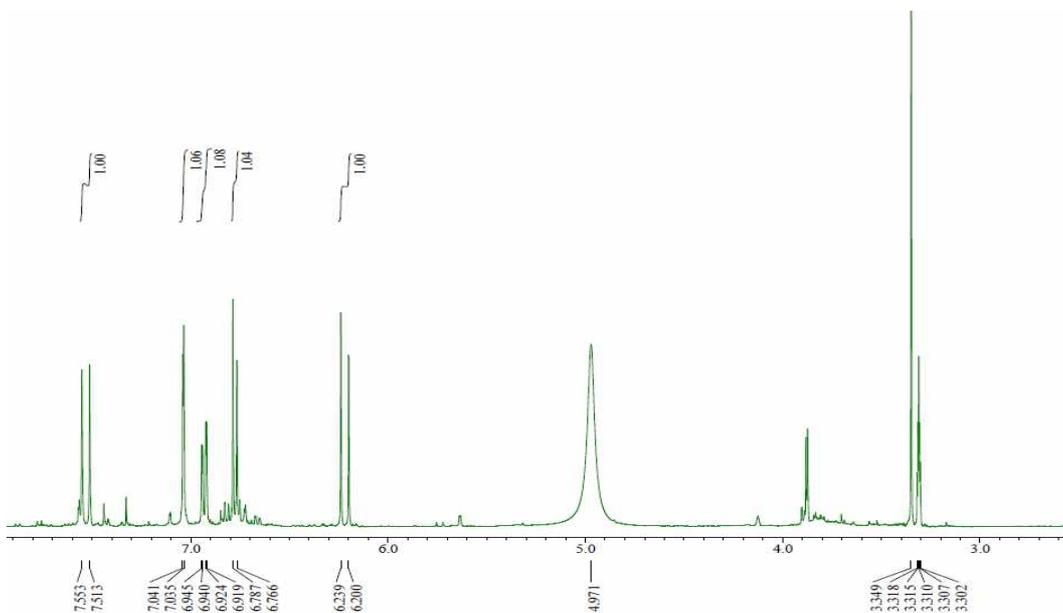


Figure 11. ^1H -NMR spectrum of compound **3** (in CD_3OD)

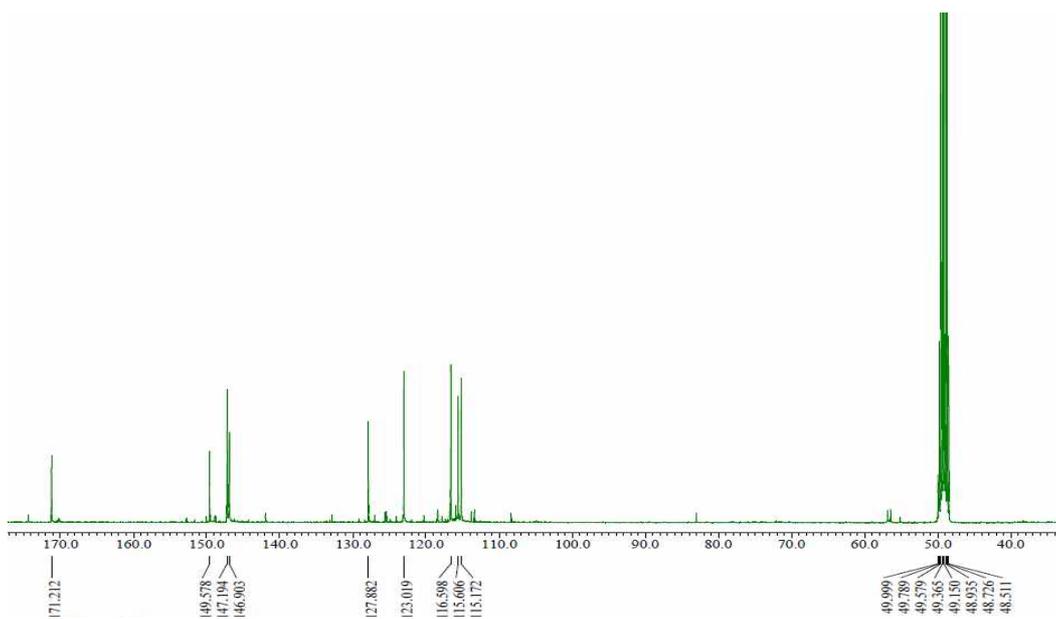


Figure 12. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** (in CD_3OD)

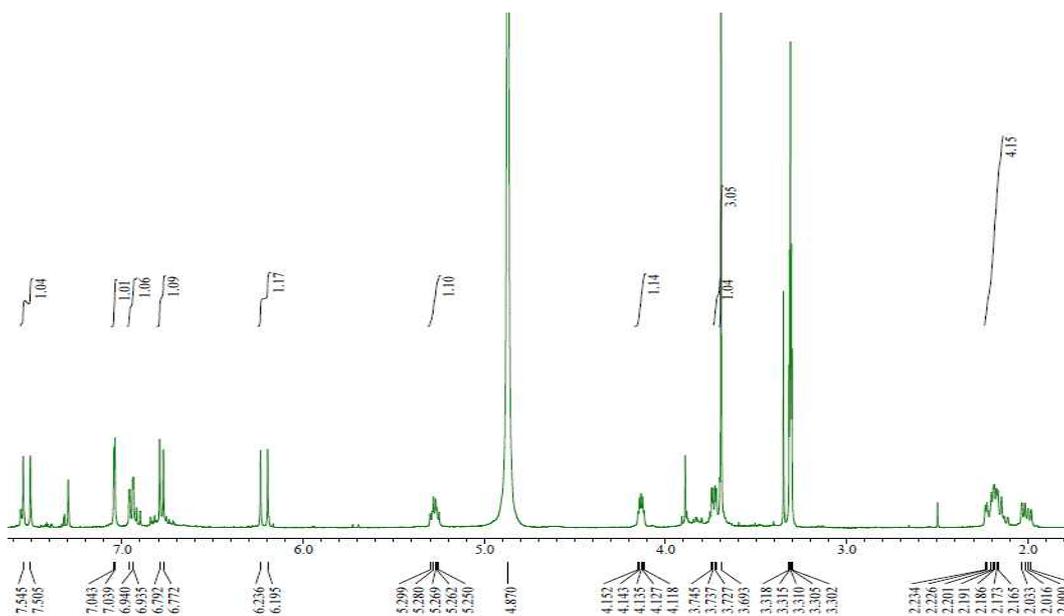


Figure 13. ^1H -NMR spectrum of compound **4** (in CD_3OD)

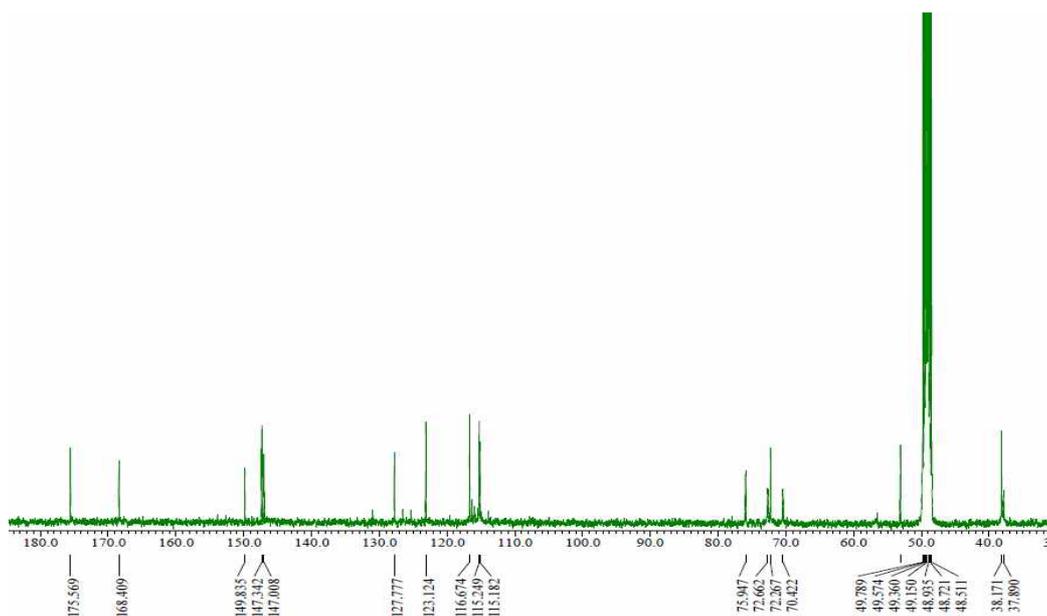


Figure 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** (in CD_3OD)

1-3. Compound 5의 구조해석

Compound 5의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 2.34(2H, t, 7.3), 2.17(2H, m), 1.63(2H, m), 1.54(2H, m) 및 1.26-1.38(2H, m)에 분포하는 다수의 signal은 methylene 수소로 예상하였고, δ 0.89(3H, t, 7.3)의 signal은 methyl 수소로 예상하였다. 또한 δ 4.18(1H, dd, 6.9, 12.8)의 signal은 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며, sp^3 혼성에 관여하는 수소로 예상하였다. 또한 δ 6.49(1H, dd, 11.0, 15.1), 5.98(1H, t, 11.0), 5.66(1H, dd, 15.1, 6.9) 및 5.44(1H, m)의 signal은 *cis*-olefin과 *trans*-olefin 수소로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 14.3-73.1에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의 sp^3 혼성 탄소로 예상하였으며, 그 중 δ 73.1의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 탄소로 예상하였고, δ 14.3의 signal은 $^1\text{H-NMR}$ data를 고려했을 때 methyl기로 예상하였다. 또한 δ 179.5의 signal은 carbonyl기로 예상하였으며 δ 135.9, 133.0, 128.0 및 126.0의 signal은 불포화 탄화수소의 olefin 탄소를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²¹⁾과 비교한 결과 compound 5은 13-hydroxy-9*Z*,11*E*-octadecadienoic acid 즉, coriolic acid로 동정하였다(Figure 15).

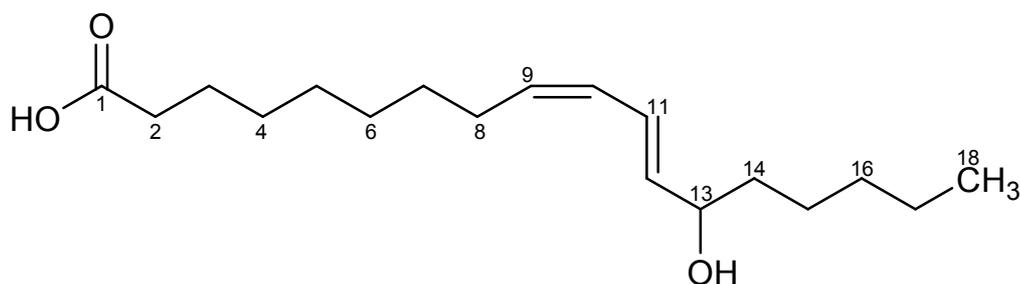


Figure 15. Chemical structure of compound 5

Table 4. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound **5** (400 and 100 MHz, in CDCl_3)

No.	Compound 5	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	179.5	
2	34.2	2.34(2H, t, 7.3)
3	24.8	1.63(2H, m)
4	29.1	1.26-1.38(2H, m)
5	29.1	1.26-1.38(2H, m)
6	29.0	1.26-1.38(2H, m)
7	29.5	1.26-1.38(2H, m)
8	27.8	2.17(2H, m)
9	133.0	5.44(1H, m)
10	128.0	5.98(1H, t, 11.0)
11	126.0	6.49(1H, dd, 11.0, 15.1)
12	135.9	5.66(1H, dd, 15.1, 6.9)
13	73.1	4.18(1H, dd, 6.9, 12.8)
14	37.4	1.54(2H, m)
15	25.3	1.26-1.38(2H, m)
16	32.0	1.26-1.38(2H, m)
17	22.8	1.26-1.38(2H, m)
18	14.3	0.89(3H, t, 7.3)

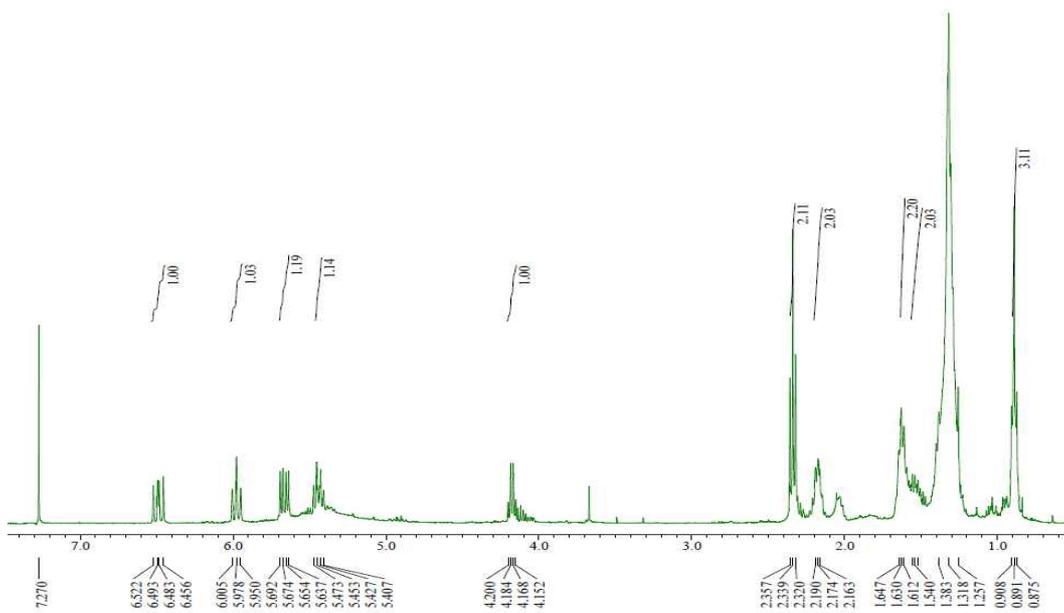


Figure 16. ^1H -NMR spectrum of compound **5** (in CDCl_3)

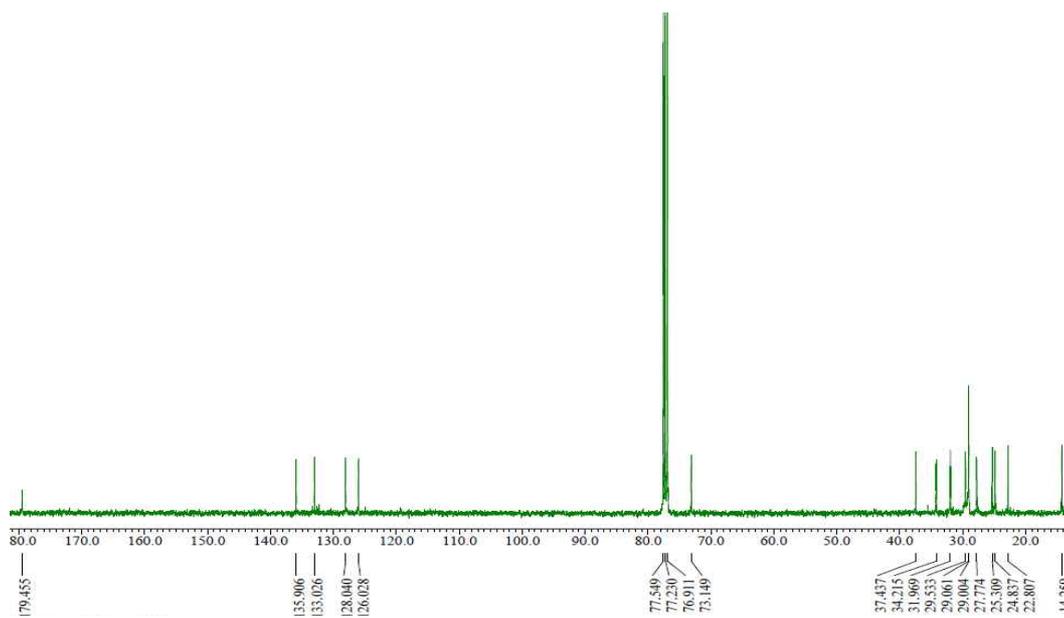


Figure 17. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5** (in CDCl_3)

1-4. Compound 6 및 compound 7의 구조해석

Compound 6의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 대부분의 signal이 δ 0.94-2.25에 분포하는 것을 통하여 포화 탄화수소의 sp^3 혼성에 관여하는 수소로 예상하였으며, 그 중 δ 1.23(3H, s), 0.96(3H, d, 6.4), 0.96(3H, d, 6.4) 및 0.94(3H, s)의 signal은 methyl 수소로 예상하였다. 또한 δ 4.24(1H, s), 4.23(1H, s)의 signal은 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 고려했을 때, deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있으며 sp^3 혼성에 관여하는 수소로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 15.7-80.4에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의 sp^3 혼성 탄소로 예상하였으며, 그 중 δ 80.4과 68.3의 signal은 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 탄소를 예상하였다. δ 184.1, 173.5의 signal은 carbonyl기로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²²⁾과 비교한 결과 compound 6은 16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid로 동정하였다(Figure 18).

Compound 7은 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 분석한 결과, 16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid와 전체적으로 유사한 경향을 나타내었다. 두 가지 화합물의 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 서로 비교하였을 때, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid의 δ 80.4 signal과 Compound 7의 δ 39.8 signal이 차이가 남을 알 수 있었다. 이를 통하여 16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid에서 전기음성도가 큰 산소와 결합한 sp^3 혼성 탄소 한 개가 compound 7에서는 수소와 결합한 sp^3 혼성 탄소 한 개로 치환되어 있는 형태임을 예상할 수 있었다. 이를 바탕으로 문헌²³⁾과 비교한 결과 compound 7은 16 α -hydro-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid로 동정하였다(Figure 19).

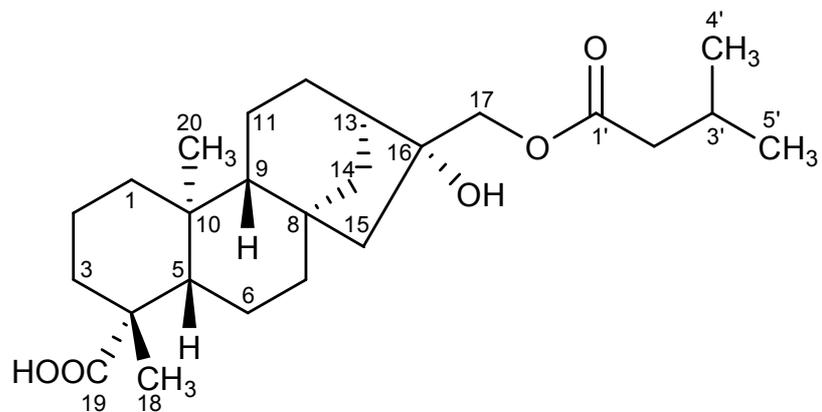


Figure 18. Chemical structure of compound 6

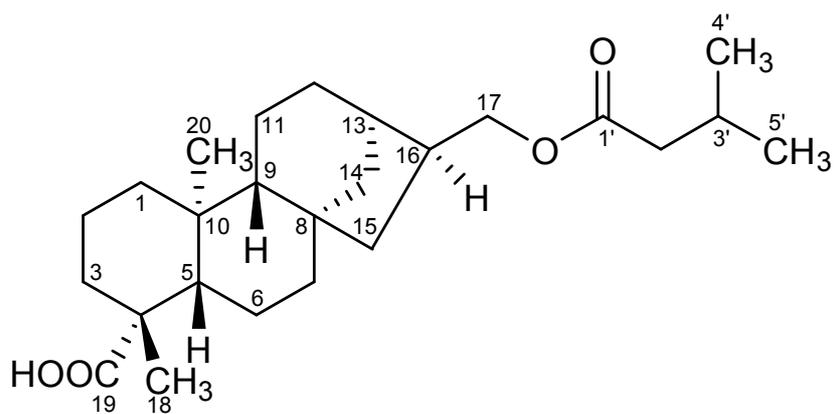


Figure 19. Chemical structure of compound 7

Table 5. ^1H and ^{13}C -NMR data of compounds **6** and **7** (400 and 100 MHz, in CDCl_3)

No.	Compound 6		Compound 7	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	40.7		41.0	
2	19.2		19.3	
3	37.9		38.1	
4	43.9		43.9	
5	56.9		57.2	
6	22.2		22.6	
7	41.9		41.8	
8	45.0		45.1	
9	55.8		55.5	
10	39.8		39.8	
11	18.6		19.0	
12	26.4		31.4	
13	46.1	2.09(1H, m)	38.8	2.09(1H, m)
14	37.2		37.4	
15	52.9		45.3	
16	80.4		39.8	
17	68.3	4.24(1H, s), 4.23(1H, s)	68.6	3.87(2H, d, 7.3)
18	29.1	1.23(3H, s)	29.2	1.24(3H, s)
19	184.1		183.6	
20	15.7	0.94(3H, s)	15.8	0.94(3H, s)
1'	173.5		173.7	
2'	43.6	2.25(2H, d, 6.9)	43.8	2.19(2H, d, 7.3)
3'	26.0		26.0	
4'	22.6	0.96(3H, d, 6.4)	22.6	0.96(3H, d, 6.4)
5'	22.6	0.96(3H, d, 6.4)	22.6	0.96(3H, d, 6.4)

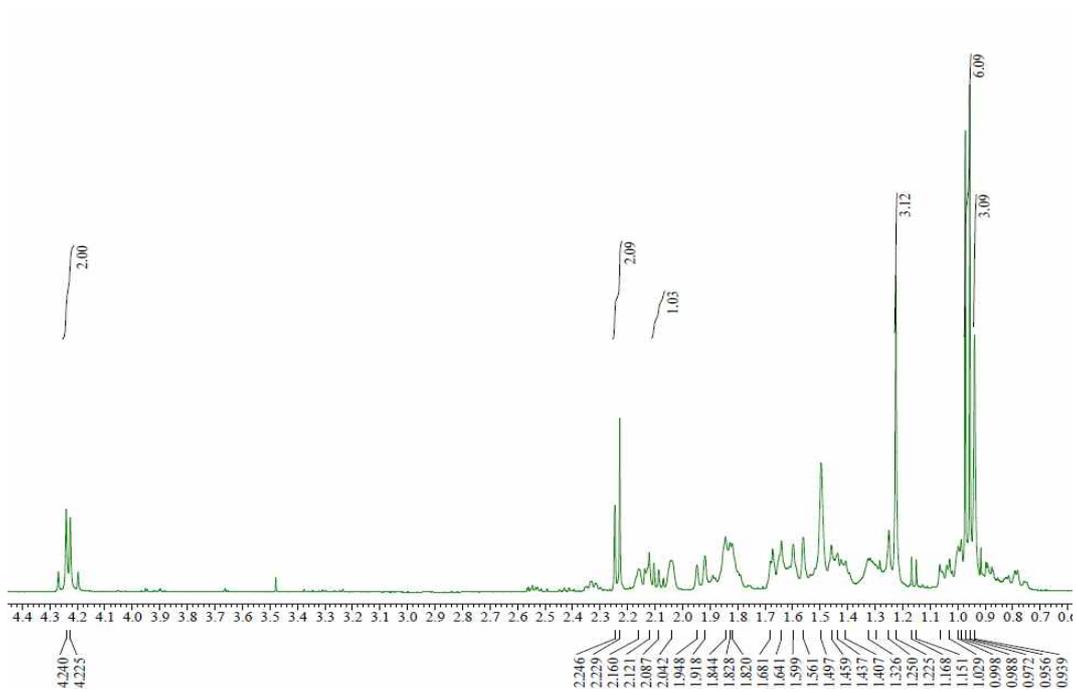


Figure 20. ^1H -NMR spectrum of compound **6** (in CDCl_3)

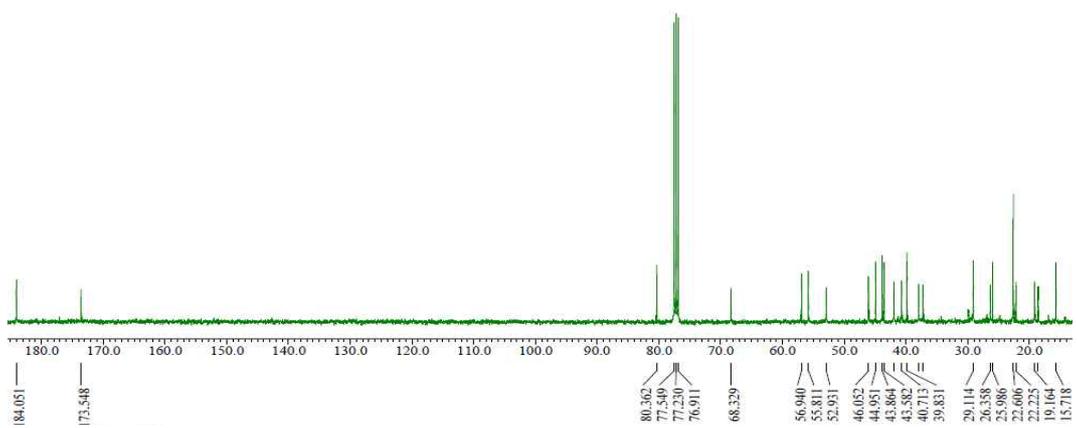


Figure 21. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** (in CDCl_3)

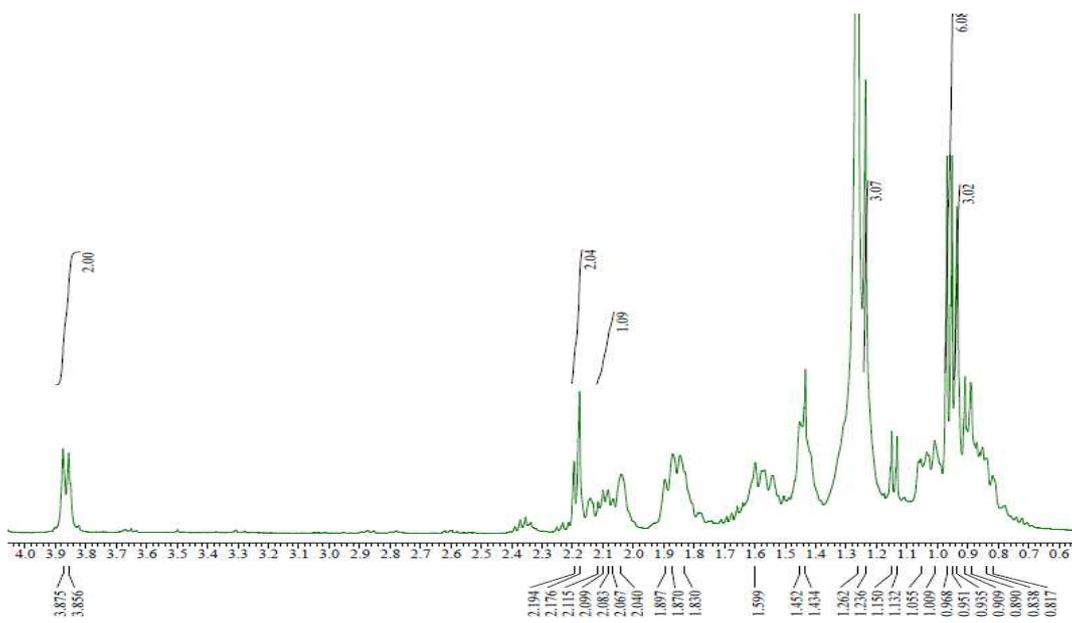


Figure 22. ^1H -NMR spectrum of compound **7** (in CDCl_3)

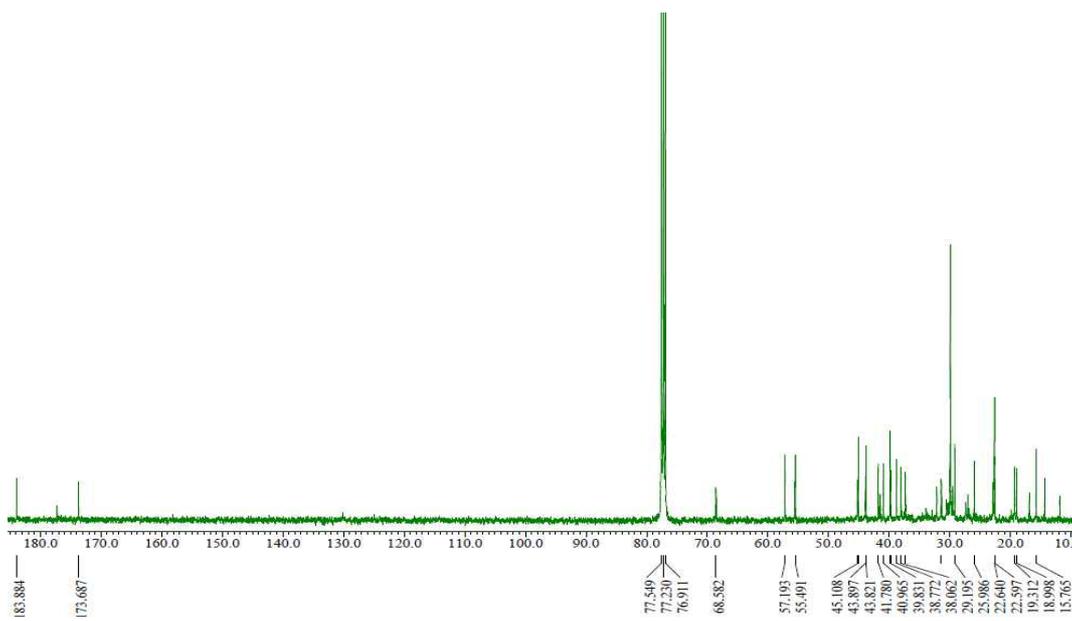


Figure 23. ^{13}C -NMR spectrum of compound **7** (in CDCl_3)

1-5. Compound 8의 구조해석

Compound 8의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 대부분의 signal이 δ 0.98-2.62에 분포하는 것을 통하여 포화 탄화수소의 sp^3 혼성에 관여하는 수소로 예상하였으며, 그 중 δ 1.19(3H,s)와 0.98(3H,s)의 signal은 methyl 수소로 예상하였다. δ 4.79(1H, brs), 4.73(1H, brs)의 signal은 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 고려했을 때, olefin의 geminal 수소로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 16.5-58.3에 분포하는 signal은 포화 탄화수소의 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. δ 156.4과 104.2의 signal은 $^1\text{H-NMR}$ data를 고려했을 때 한 쪽 방향이 열린 exo-olefin 탄소로 예상하였으며, δ 181.6의 signal은 carbonyl기로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁴⁾과 비교한 결과 compound 8은 kaurenoic acid로 동정하였다(Figure 24).

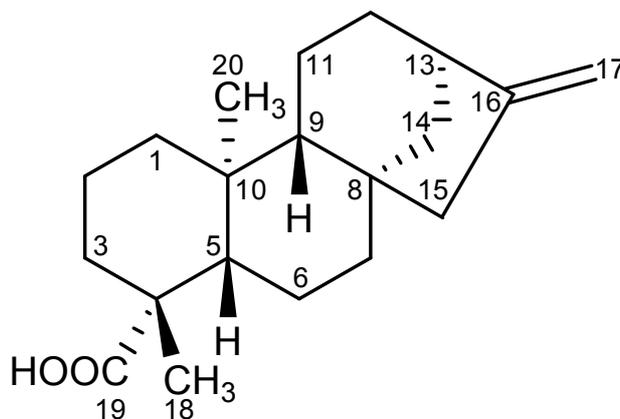


Figure 24. Chemical structure of compound 8

Table 6. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound **8** (400 and 100 MHz, in CD_3OD)

No.	Compound 8	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	42.1	
2	20.4	
3	39.3	
4	44.6	
5	58.3	
6	23.1	
7	42.1	
8	45.4	
9	56.5	
10	40.8	
11	19.6	
12	34.3	
13	45.2	2.62(1H, m)
14	40.9	
15	50.2	
16	156.4	
17	104.2	4.79(1H, brs), 4.73(1H, brs)
18	29.8	1.19(3H,s)
19	181.6	
20	16.5	0.98(3H,s)

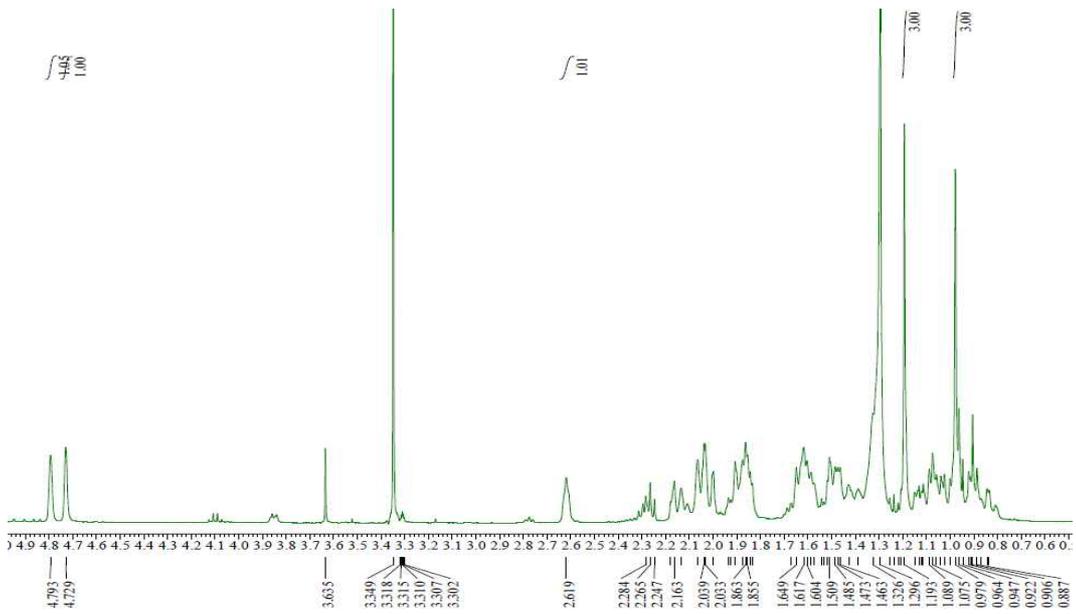


Figure 25. ^1H -NMR spectrum of compound **8** (in CD_3OD)

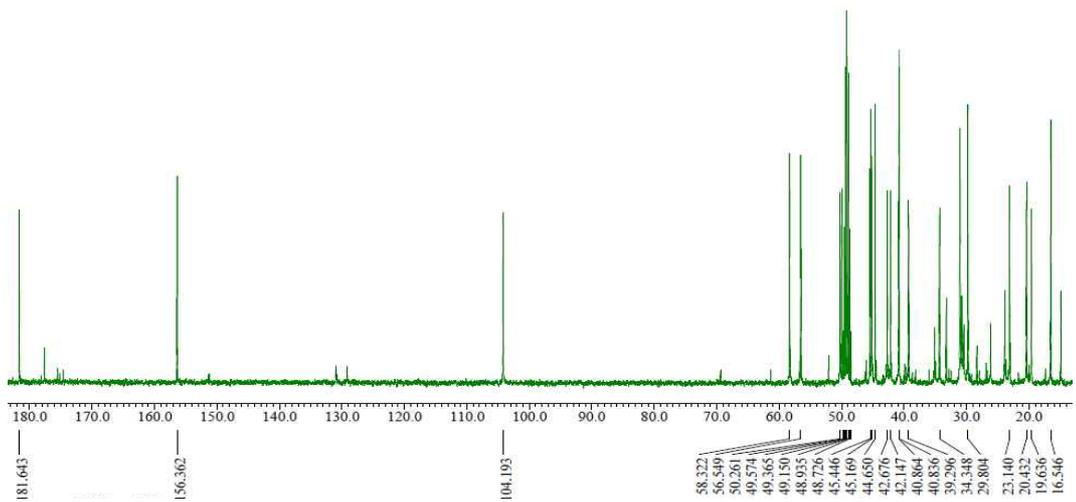


Figure 26. ^{13}C -NMR spectrum of compound **8** (in CD_3OD)

2. HPLC 분석실험 결과

역상 칼럼(C₁₈)을 이용하여 섬오가피나무 줄기 EtOAc 분획물에서 분리한 화합물 중 비교적 과량으로 존재하는 compounds **1**과 **3**에 대하여 정성 및 정량분석을 실시하였다. HPLC 정성분석 결과에서 EtOAc 분획물 피크의 머무름 시간 중 7 min은 compound **1**로, 18 min은 compound **3**으로 확인되었다. 다음에 나타난 각각의 크로마토그램은 EtOAc 분획물에, 분리된 compounds **1**과 **3**을 개별로 첨가하여 얻은 것이다(Figure 27-29).

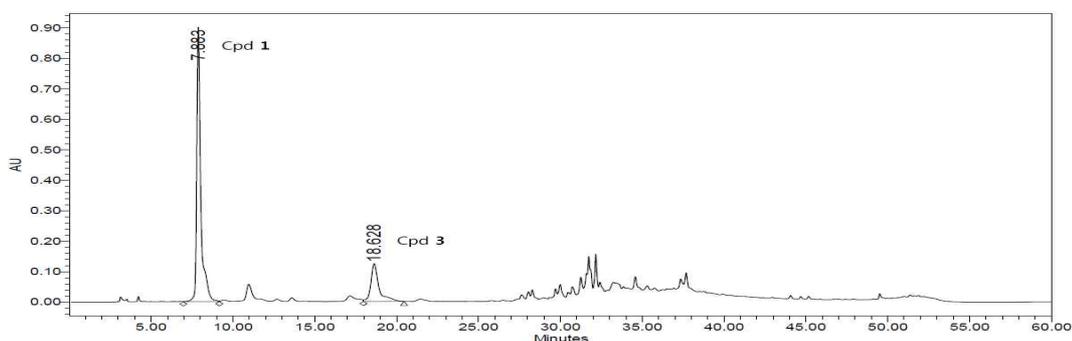


Figure 27. HPLC chromatogram of EtOAc layer

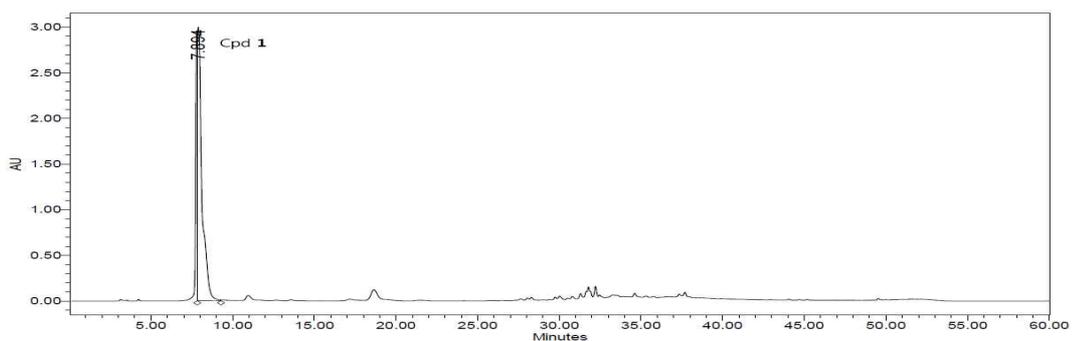


Figure 28. HPLC chromatogram of EtOAc layer and compound **1**

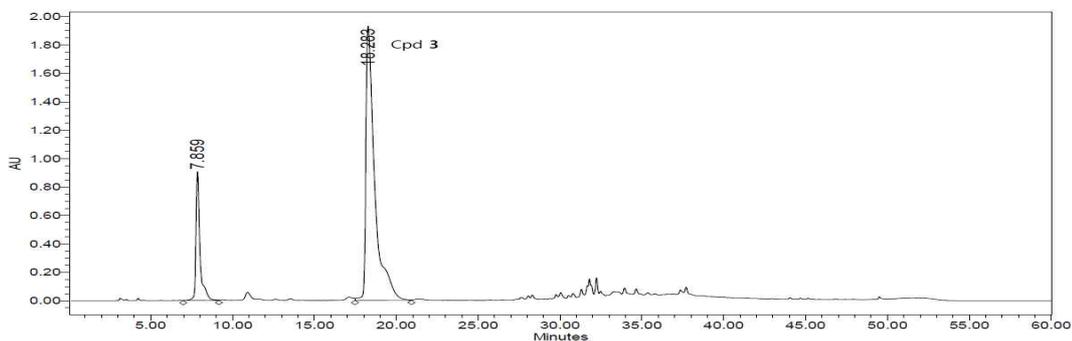


Figure 29. HPLC chromatogram of EtOAc layer and compound **3**

HPLC 정량분석 결과에서 3,4-dihydroxybenzoic acid 및 caffeic acid 표준용액을 사용한 검정곡선을 작성하여 외부표준법(external standard method)을 가지고 EtOAc 분획물에서 분리한 compounds 1과 3의 함량을 측정하였다(Figure 30-31). 그 결과, compounds 1과 3은 EtOAc 분획물에 각각 4.18% 및 2.30%의 함량으로 존재하는 것이 확인되었다.

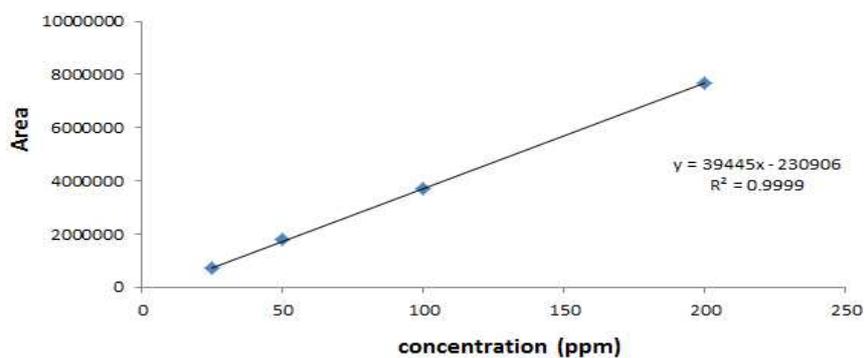


Figure 30. Calibration curve for quantification of 3,4-dihydroxybenzoic acid

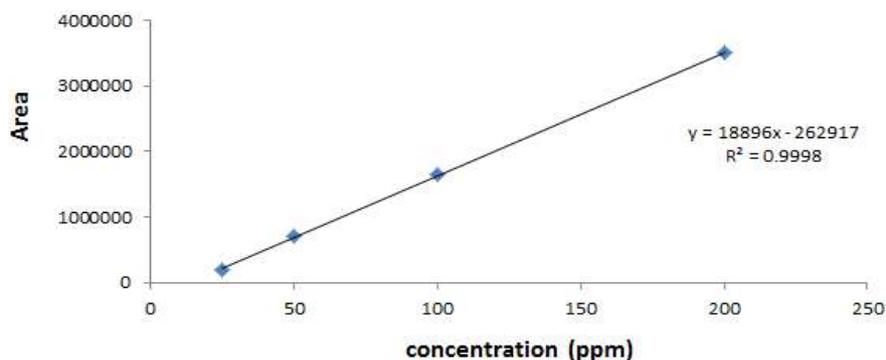


Figure 31. Calibration curve for quantification of caffeic acid

3. 항산화 활성실험 결과

3-1. 총 폴리페놀 함량측정 실험

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선을 작성하여 섬오가피나무 줄기 70% EtOH 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며(Figure 32), 추출물 및 분획물의 중량 100 mg당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 그 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서 각각 22.2, 15.9 mg GAE/100 mg으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 33). 이는 다른 항산화 활성 실험결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.

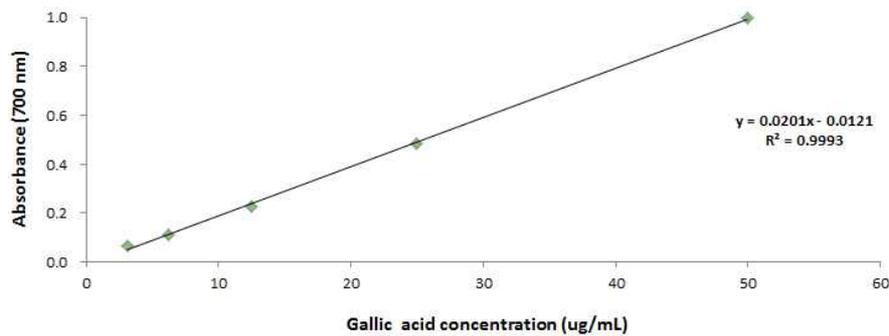


Figure 32. Calibration curve for quantification of total polyphenolic compounds

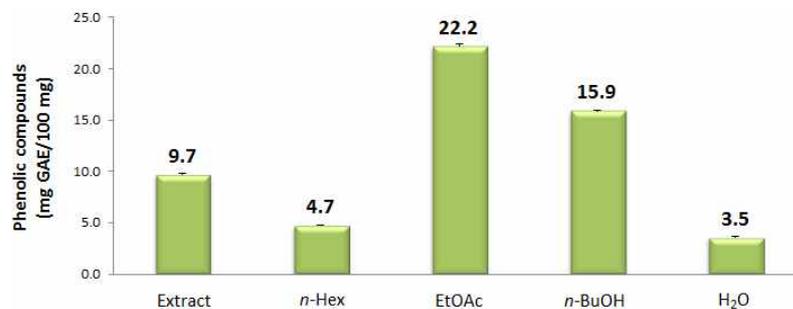


Figure 33. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers

3-2. DPPH radical 소거활성 실험

3-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거활성 실험

섬오가피나무 줄기 70% EtOH 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다(Figure 34). 추출물과 및 분획물에 대하여 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀값을 계산하였다(Table 7). 그 결과, DPPH SC₅₀값이 EtOAc 분획물에서 34.6 µg/mL로 비교적 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

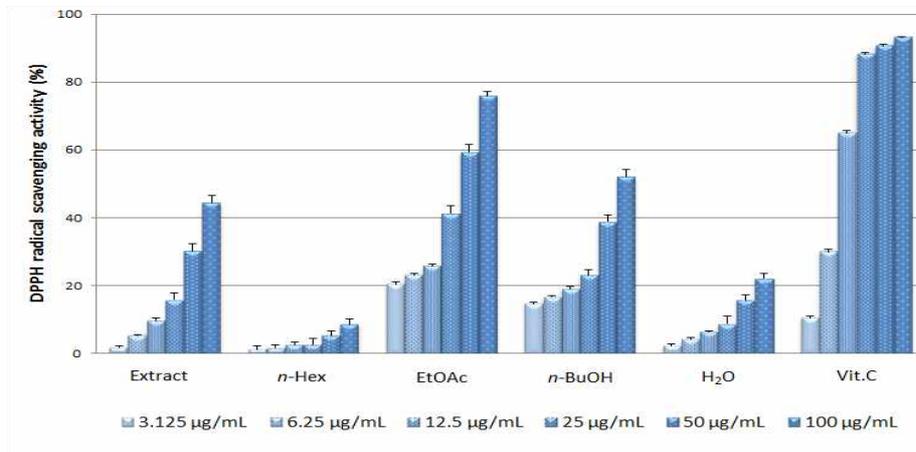


Figure 34. DPPH radical scavenging activity of extract and solvent layers

Table 7. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activity of extract and solvent layers

	SC ₅₀ (µg/mL)
Extract	>100
<i>n</i> -Hex	>100
EtOAc	34.6
<i>n</i> -BuOH	88.7
H ₂ O	>100
Vitamin C	9.1

3-2-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거활성 실험

섬오가피나무 줄기로부터 분리된 화합물에 대해 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다(Figure 35). 각각의 화합물에 대하여 25, 50, 100, 300, 500 μM 의 농도로 실험을 실시하여 SC_{50} 값을 계산하였다(Table 7). 그 결과, DPPH SC_{50} 값이 compounds 1, 2, 3, 4에서 각각 361.8, 275.8, 276.0, 165.8 μM 로 비교적 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

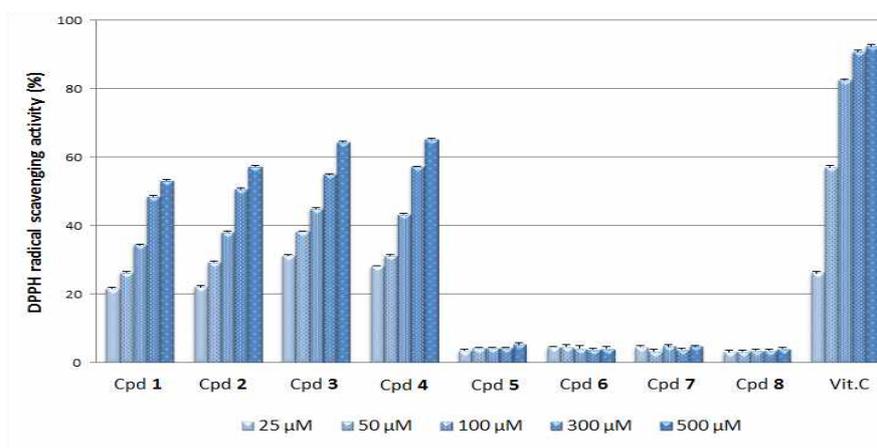


Figure 35. DPPH radical scavenging activity of isolated compounds

Table 8. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activity of isolated compounds

Compound No.	Compound name	SC_{50} (μM)
1	3,4-Dihydroxybenzoic acid	361.8
2	3,4-Dihydroxybenzoic acid methyl ester	275.8
3	Caffeic acid	276.0
4	Chlorogenic acid methyl ester	165.8
5	Coriolic acid	>100
6	16 α -Hydroxy-17-isovaleroyloxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	>100
7	16 α -Hydro-17-isovaleroyloxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	>100
8	Kaurenic acid	>100
	Vitamin C	44.6

4. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백활성 실험결과

4-1. Melanin contents 측정실험

4-1-1. 추출물 및 분획물의 melanin contents 측정 및 세포독성 실험

섬오가피나무 줄기 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대하여 100 µg/mL의 농도로 melanin contents를 확인한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 각각 79.7%, 63.7% 감소하는 것을 확인하였고 이 때, 세포독성이 나타나는 것을 알 수 있었다(Figure 36). 이를 통하여 melanin contents가 감소한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물을 가지고 추가적으로 농도를 낮추어 실험을 진행하였다.

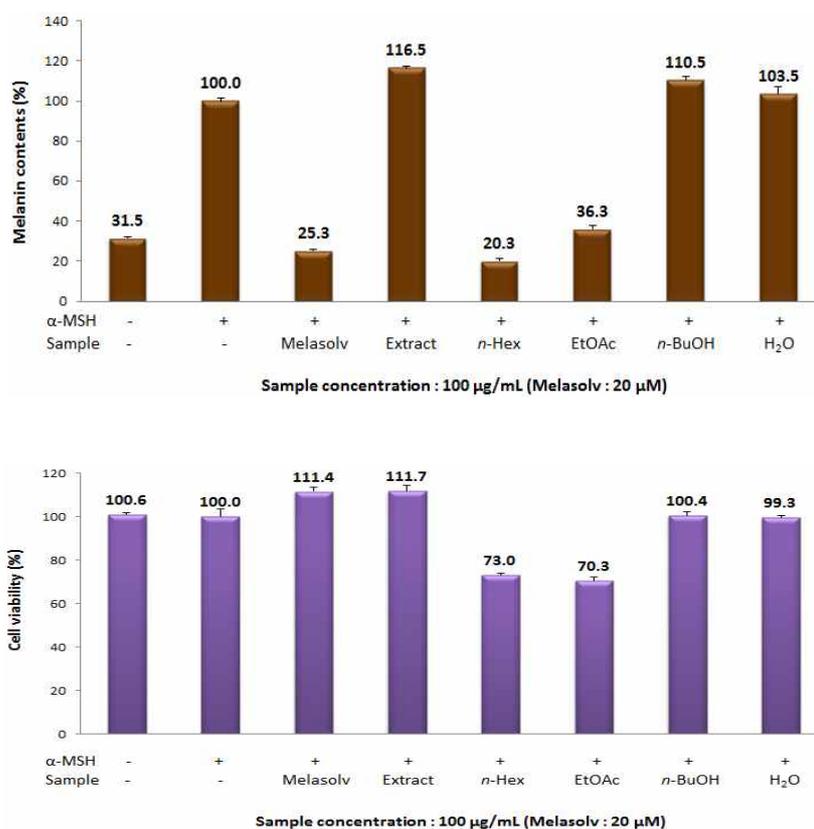


Figure 36. Melanin contents(위) and cell viability(아래) of extract and solvent layers

Melanin contents가 감소한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물을 가지고 추가적으로 농도를 낮추어 실험을 진행한 결과, sample 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하에서 큰 세포 독성 없이 농도가 증가함에 따라 melanin contents가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 37).

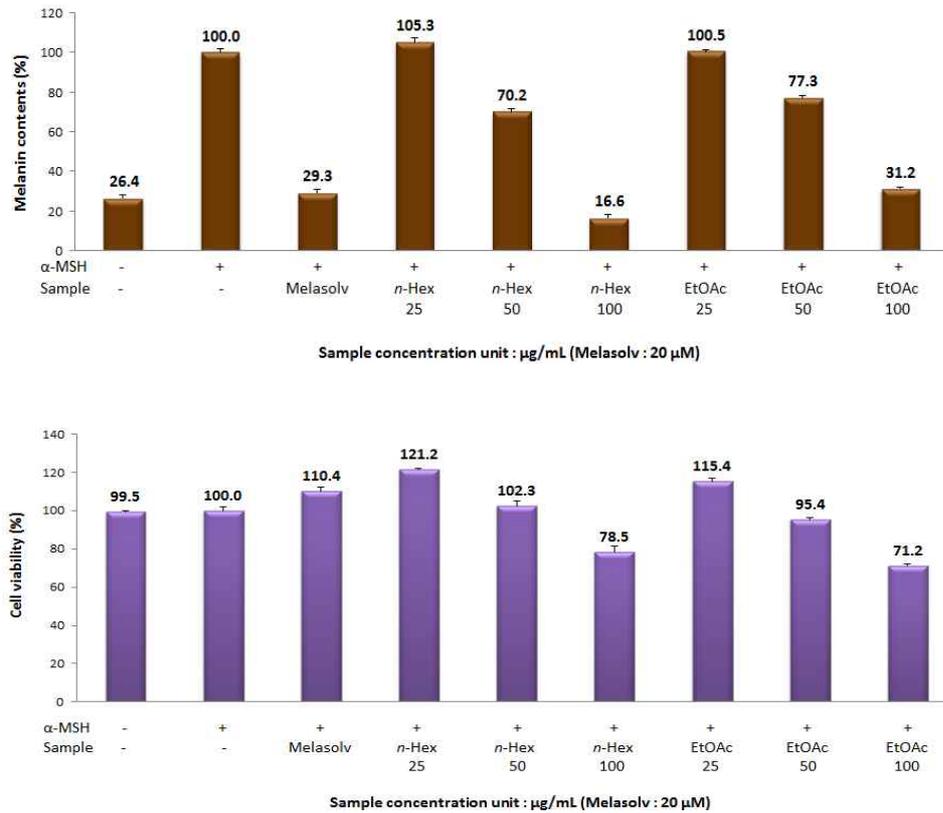


Figure 37. Melanin contents(위) and cell viability(아래) of *n*-Hex, EtOAc layers

4-1-2. 분리된 화합물의 melanin contents 측정 및 세포독성 실험

섬오가피나무 줄기로부터 분리한 화합물들의 melanin contents를 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 100 μ M의 농도로 melanin contents를 확인한 결과, compounds 6, 7, 8에서 큰 세포독성 없이 각각 73.7%, 52.6%, 42.7% 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 38). 이를 통하여 compounds 6, 7, 8을 가지고 추가적으로 농도를 낮추어 실험을 진행하였다.

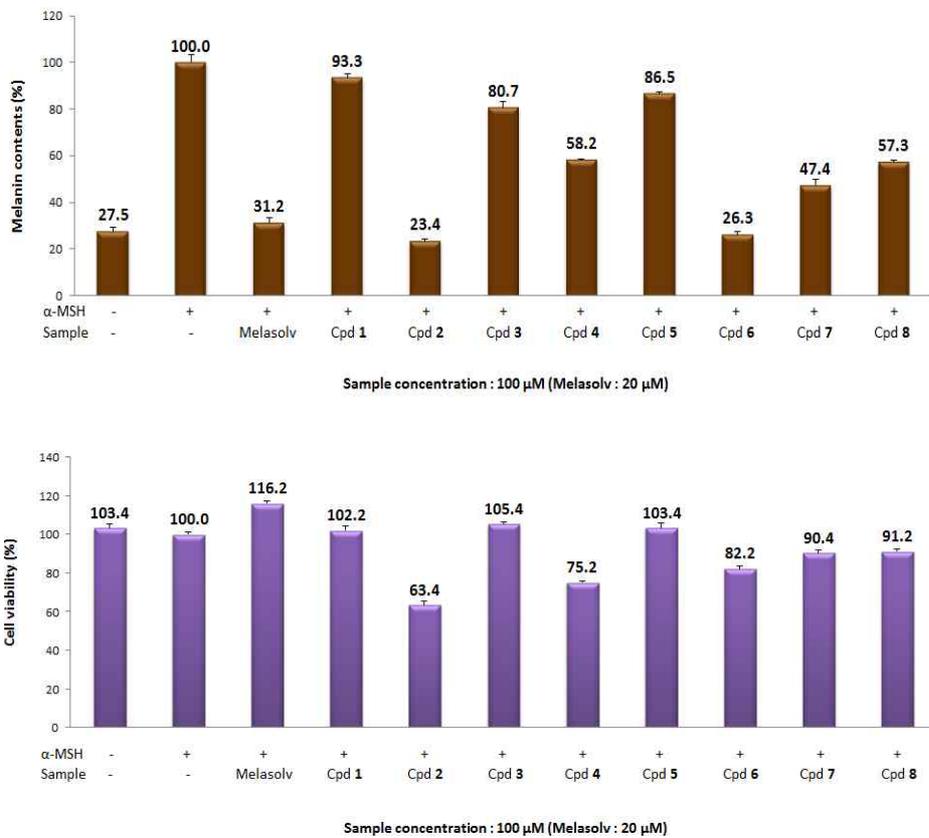


Figure 38. Melanin contents(위) and cell viability(아래) of isolated compounds

Compounds 6, 7, 8을 가지고 추가적으로 농도를 낮추어 실험을 진행한 결과, sample 농도 100 μ M 이하에서 큰 세포독성 없이 농도가 증가함에 따라 melanin contents가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 39).

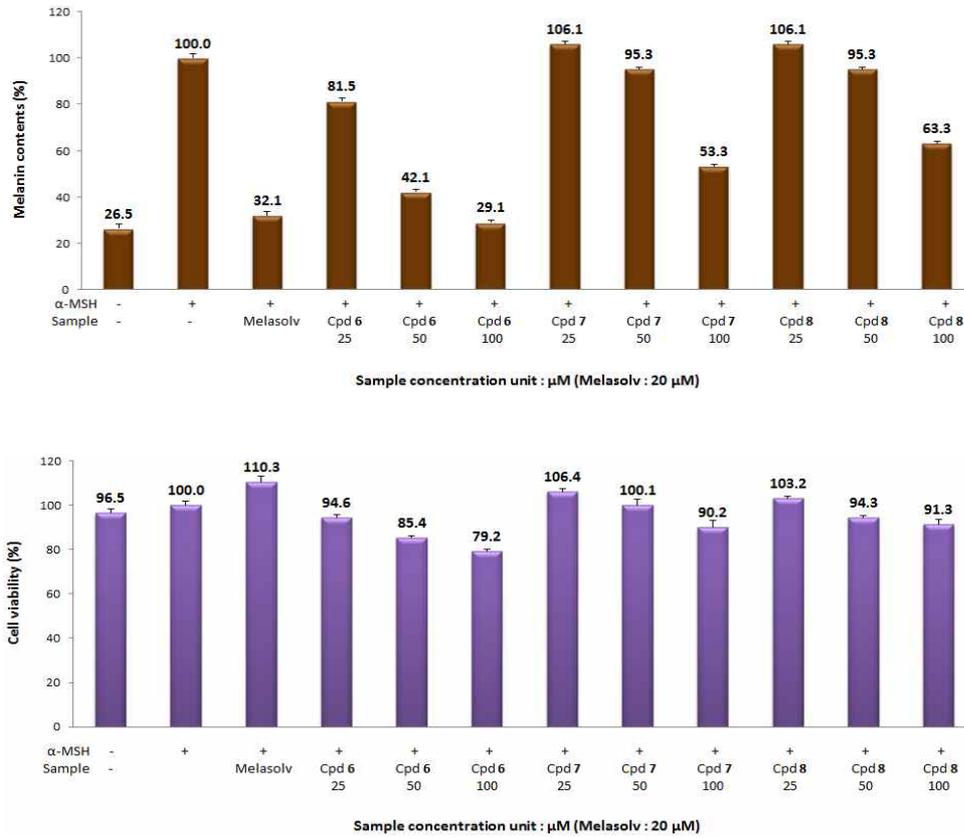


Figure 39. Melanin contents(위) and cell viability(아래) of compounds 6, 7 and 8

4-2. Intracellular tyrosinase 저해활성 실험

4-2-1. *n*-Hex, EtOAc 분획물 및 화합물 6, 7, 8의 intracellular tyrosinase 저해활성 실험

농도별로 melanin 생성억제 실험을 진행한 *n*-Hex, EtOAc 분획물 및 화합물 6, 7, 8에 대하여 intracellular tyrosinase 저해활성 실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex, EtOAc 분획물 및 compounds 6, 7, 8에서 농도가 높아질수록 intracellular tyrosinase 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 40).

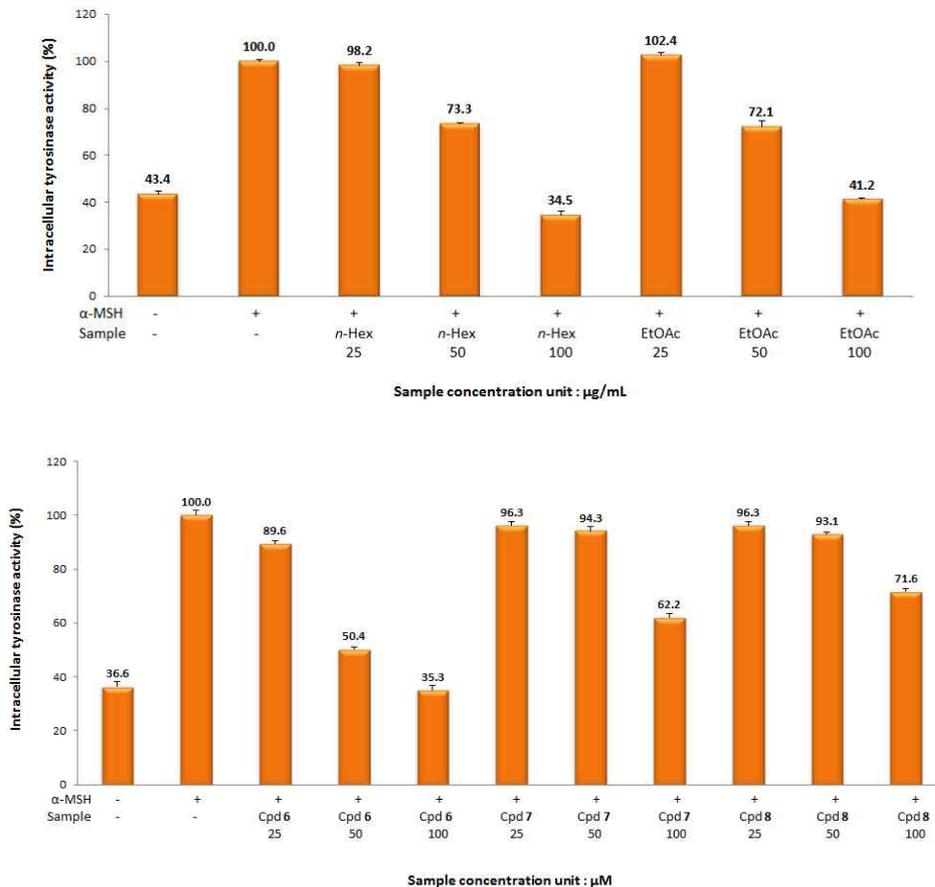


Figure 40. Intracellular tyrosinase activity of *n*-Hex, EtOAc layers(위) and compounds 6, 7, 8(아래)

5. RAW 264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염활성 실험결과

5-1. Nitric oxide (NO) 생성억제 활성실험

5-1-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성억제 활성 및 세포독성 실험

섬오가피나무 줄기 70 % EtOH 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL의 농도로 nitric oxide production을 확인한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 세포독성 없이 각각 89.2%, 87.7% 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 41). 이를 통하여 nitric oxide production이 감소한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물을 가지고 추가적으로 농도별로 실험을 진행하였다.

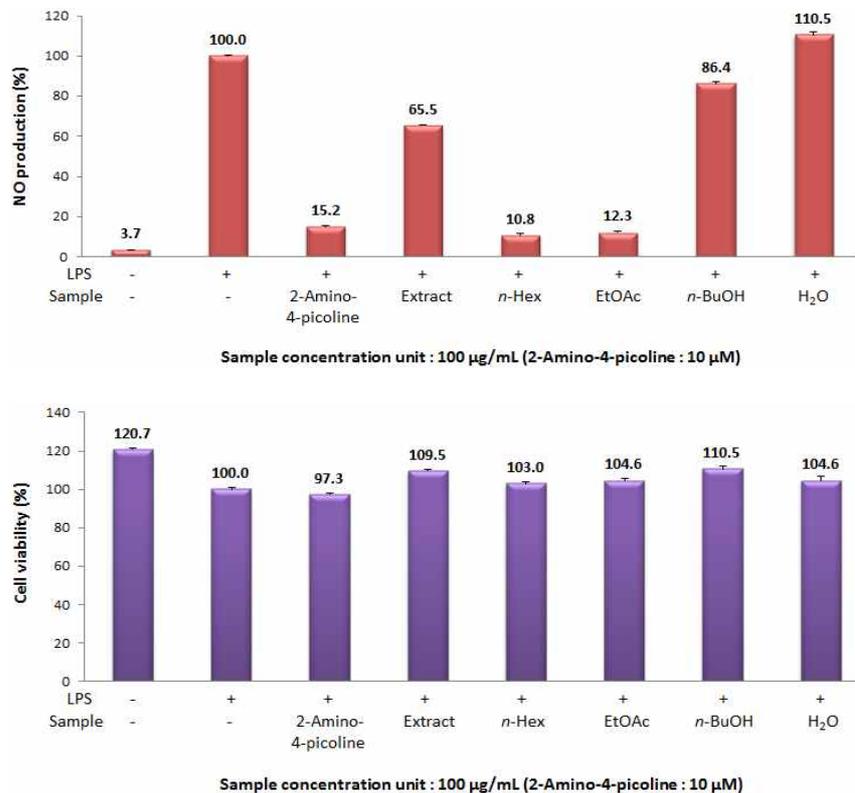


Figure 41. NO production(위) and cell viability(아래) of extract and solvent layers

Nitric oxide production이 감소한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물을 가지고 추가적으로 농도별로 실험을 진행한 결과, sample 농도 200 µg/mL 이하에서 세포독성 없이 농도가 높아짐에 따라 nitric oxide production이 매우 효과적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 42).

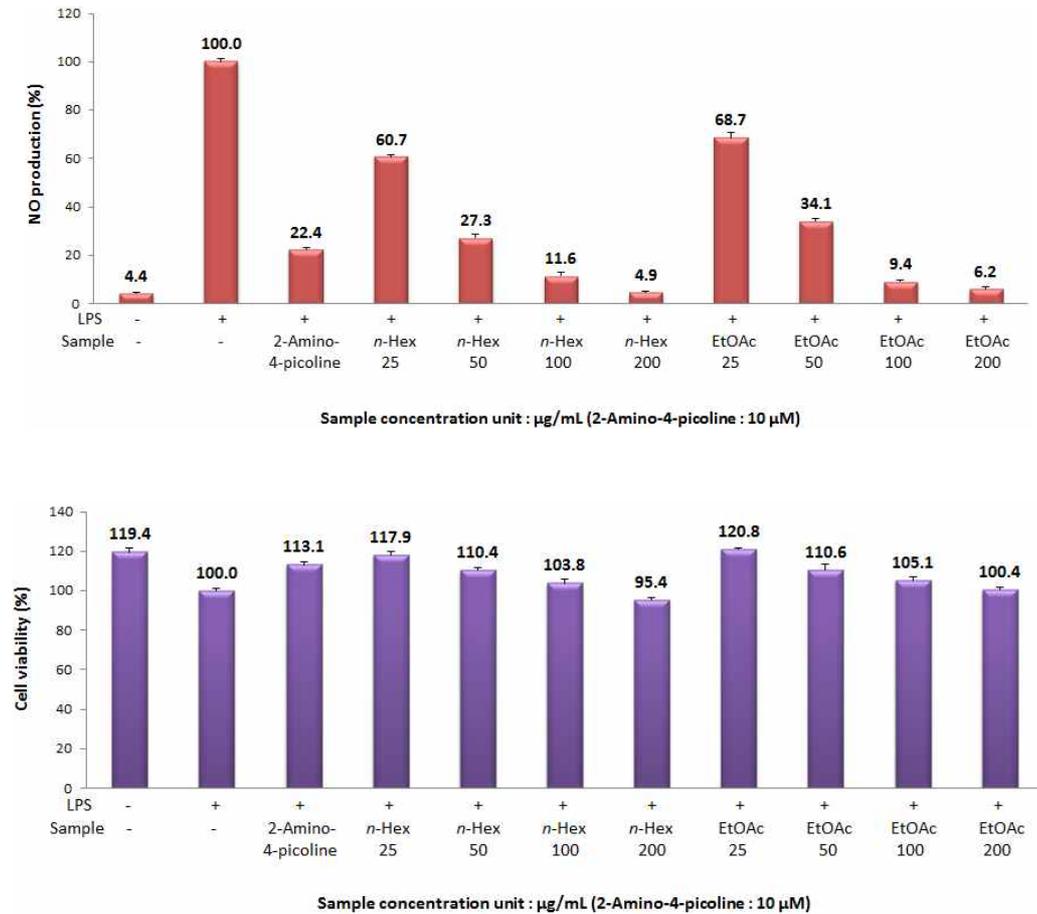


Figure 42. NO production(위) and cell viability(아래) of *n*-Hex, EtOAc layers

5-1-2. 분리된 화합물의 nitric oxide 생성억제 활성 및 세포독성 실험

섬오가피나무 줄기로부터 분리한 화합물들의 nitric oxide production을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 100 μ M의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 모든 화합물에서 세포독성 없이 nitric oxide production이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 43). 이 중 compounds 1²⁵⁾, 3²⁶⁾, 5²⁷⁾, 8²⁸⁾에 대해서는 항염 활성이 보고되어 있어 compounds 2, 4, 6, 7을 가지고 추가적으로 실험을 진행하였다.

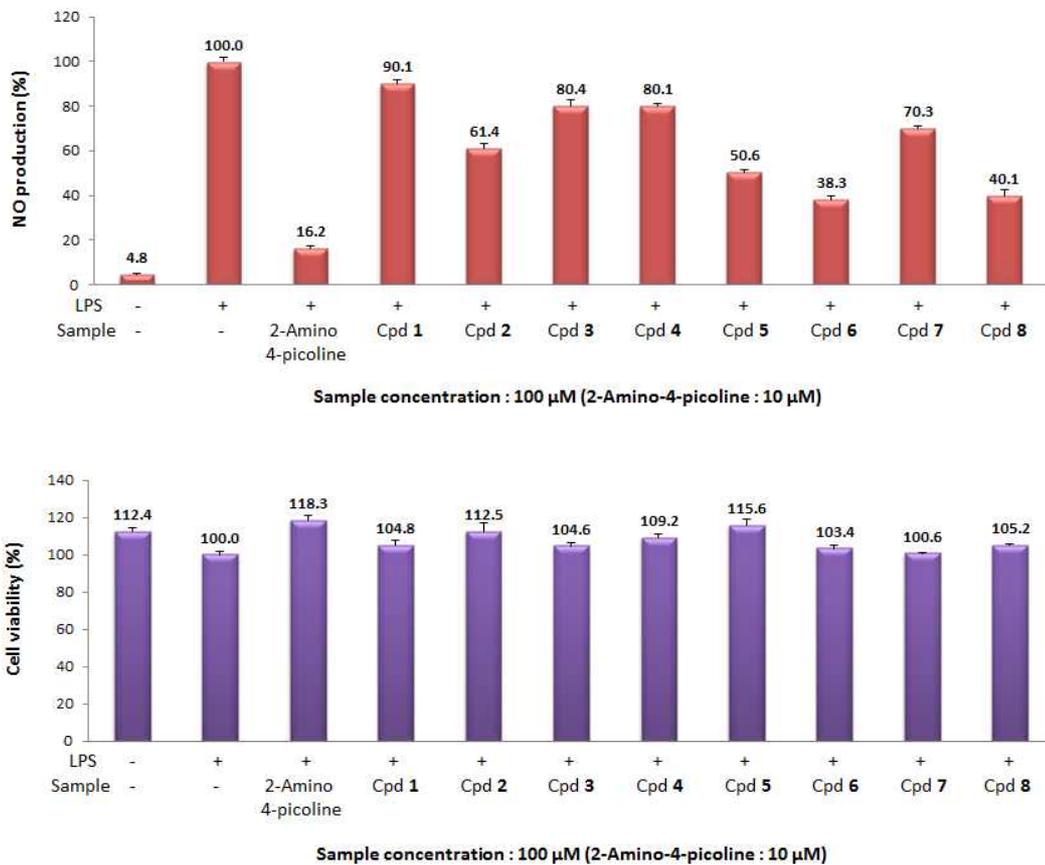


Figure 43. NO production(위) and cell viability(아래) of isolated compounds

항염활성이 보고되어 있지 않은 compounds 2, 4, 6, 7을 가지고 추가적으로 실험을 진행한 결과, sample 농도 100 μM 이하에서 큰 세포독성 없이 농도가 증가함에 따라 nitric oxide production이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 44).

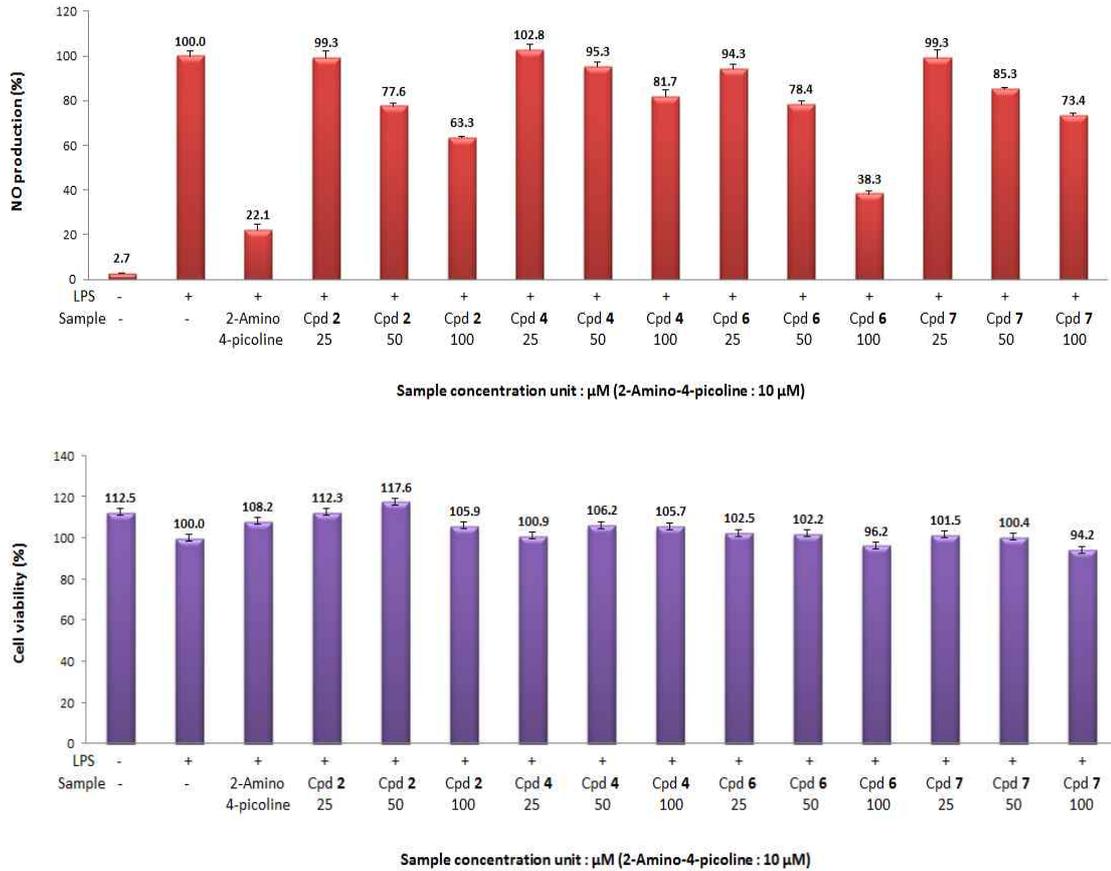


Figure 44. NO production(위) and cell viability(아래) of compounds 2, 4, 6 and 7

5-2. TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험

5-2-1. *n*-Hex과 EtOAc 분획물의 TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험

농도별로 nitric oxide 생성억제 실험을 진행한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대하여 세포독성이 없는 농도범위 내에서 TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 TNF- α production이 감소하지 않은 반면, IL-6 production은 농도가 증가함에 따라 매우 효과적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 45).

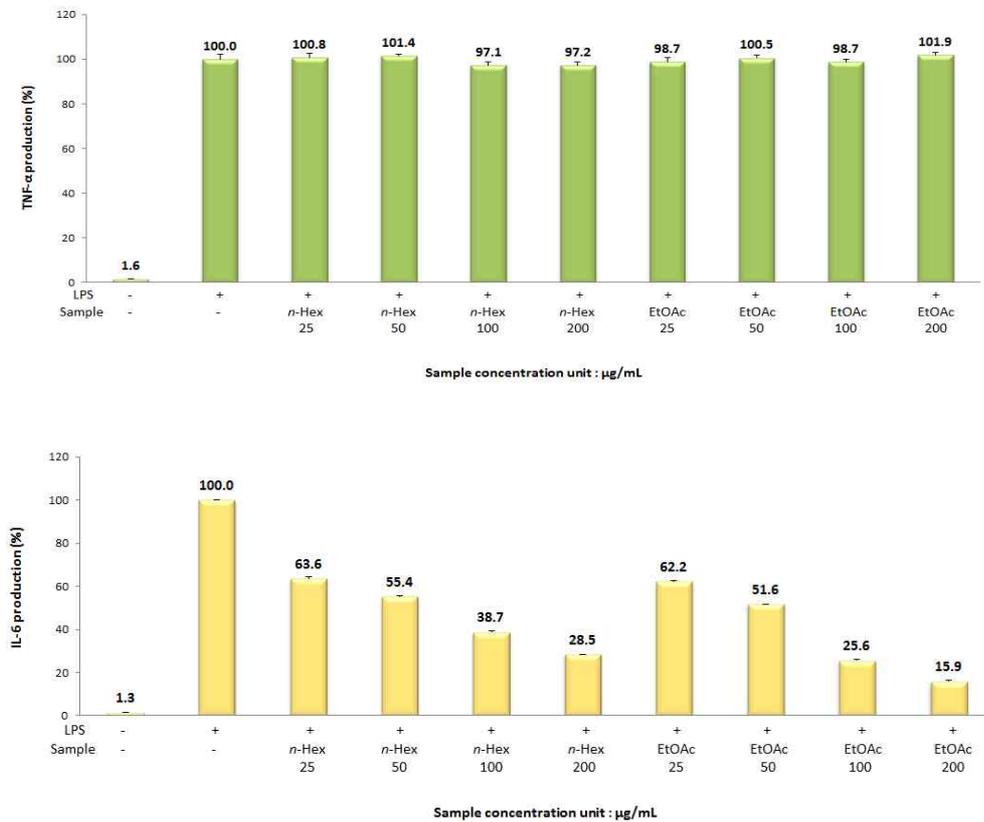


Figure 45. TNF- α (위) and IL-6(아래) production of *n*-Hex, EtOAc layers

5-2-2. 화합물 2, 4, 6, 7의 TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험

농도별로 nitric oxide 생성억제 실험을 진행한 화합물 2, 4, 6, 7에 대하여 세포독성이 없는 농도범위 내에서 TNF- α 및 IL-6 생성억제 활성실험을 진행하였다. 그 결과, compounds 2, 4, 6, 7에서 농도가 증가함에 따라 TNF- α production이 조금씩 감소하고 IL-6 production은 매우 효과적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 46).

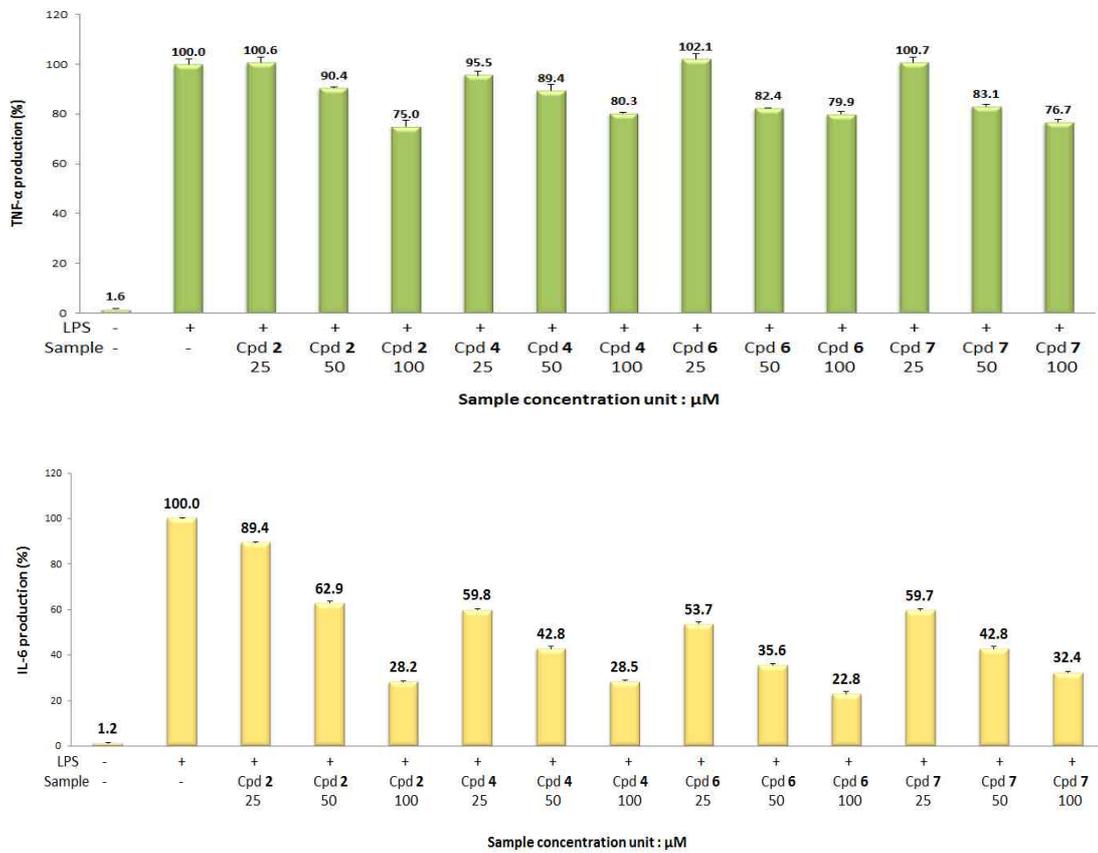


Figure 46. TNF- α (위) and IL-6(아래) production of compounds 2, 4, 6 and 7

6. 항균활성 실험결과

6-1. Paper disc diffusion 실험

6-1-1. 추출물 및 분획물의 paper disc diffusion 실험

섬오가피나무 줄기 70% EtOH 추출물 및 분획물의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711), *Propionibacterium acnes* (CCARM 9009, 9010, 0081), *Staphylococcus aureus* (KCCM 11335) 및 *Pseudomonas aeruginosa* (KCCM 11802)의 총 8개 균주를 사용하였다. 그 결과, 원형 발육 저지환(clear zone)의 직경 크기가 *n*-Hex 분획물에서 8개의 모든 균주, EtOAc 분획물에서 4개의 균주에 대하여 좋은 항균 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Table 9).

Table 9. Anti-bacterial activity of extract and solvent layers from *A. koreanum*

Bacterial density (1.5×10 ⁶ CFU/mL)	Sample (100 mg/mL)					Erythromycin (1 mg/mL)
	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	
	Clear zone (mm)					
<i>S. epidermidis</i> (CCARM 3709)	N.D.*	12	18	N.D.	N.D.	30
<i>S. epidermidis</i> (CCARM 3710)	N.D.	10	14	N.D.	N.D.	N.D.
<i>S. epidermidis</i> (CCARM 3711)	N.D.	9	10	N.D.	N.D.	26
<i>P. acnes</i> (CCARM 0081)	N.D.	10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>P. acnes</i> (CCARM 9009)	N.D.	12	12	N.D.	N.D.	30
<i>P. acnes</i> (CCARM 9010)	N.D.	10	N.D.	N.D.	N.D.	28
<i>S. aureus</i> (KCCM 11335)	N.D.	15	N.D.	N.D.	N.D.	28
<i>P. aeruginosa</i> (KCCM 11802)	N.D.	14	N.D.	N.D.	N.D.	30

(N.D.* : Not Detected)

(Paper disc 직경 : 8 mm)

6-1-2. 분리된 화합물의 paper disc diffusion 실험

분리된 화합물에 대한 paper disc diffusion 실험 결과, 원형 발육 저지환(clear zone)의 직경 크기가 compound 2에서 1개의 균주, compound 3에서 3개의 균주, compound 5에서 3개의 균주, compound 6에서 5개의 균주, compound 8에서 1개의 균주에 대하여 좋은 항균 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Table 10).

Table 10. Anti-bacterial activity of isolated compounds from *A. koreanum*

Bacterial density (1.5×10 ⁶ CFU/mL)	Sample (100 mM)								Erythromycin (1 mM)
	Cpd 1	Cpd 2	Cpd 3	Cpd 4	Cpd 5	Cpd 6	Cpd 7	Cpd 8	
	Clear zone (mm)								
<i>S. epidermidis</i> (CCARM 3709)	N.D.*	N.D.	14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	22
<i>S. epidermidis</i> (CCARM 3710)	N.D.	N.D.	10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>S. epidermidis</i> (CCARM 3711)	N.D.	N.D.	9	N.D.	N.D.	10	N.D.	N.D.	19
<i>P. acnes</i> (CCARM 0081)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9	12	N.D.	9	N.D.
<i>P. acnes</i> (CCARM 9009)	N.D.	12	N.D.	N.D.	9	14	N.D.	N.D.	24
<i>P. acnes</i> (CCARM 9010)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	22
<i>S. aureus</i> (KCCM 11335)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10	12	N.D.	N.D.	22
<i>P. aeruginosa</i> (KCCM 11802)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11	N.D.	N.D.	22

(N.D.* : Not Detected)

(Paper disc 직경 : 8 mm)

IV. 요약 및 결론

본 논문은 제주도에서 자생하고 있는 섬오가피나무(*Acanthopanax koreanum* Nakai)를 이용한 천연 항산화, 미백, 항염 및 항균활성 소재로서의 활용 가치를 높이고자 연구를 수행하였다. 소재 개발을 위한 연구방법으로는 제주도 자생의 섬오가피나무의 줄기 부분을 이용하여 추출물 및 분획물로부터 화합물을 분리·동정하고 이들의 항산화, 미백, 항염 및 항균활성을 검색하는 것으로 진행되었다.

섬오가피나무 줄기 70% EtOH 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 얻은 후, 추출물 및 분획물에 대하여 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성실험을 진행하였다.

항산화 활성실험 결과, 총 폴리페놀 함량 측정은 EtOAc 분획물에서 각각 22.2, 15.9 mg GAE/100 mg으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. DPPH radical 소거 활성 실험은 EtOAc 분획물에서 SC₅₀값이 34.6 µg/mL로 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

또한 미백, 항염 및 항균활성 실험결과 모두, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 좋은 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

이 같은 결과를 바탕으로 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물로부터 medium pressure liquid chromatography (MPLC), vacuum liquid chromatography (VLC), normal phased silica gel chromatography 및 Sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR을 이용하여 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 8개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 3,4-dihydroxybenzoic acid (1), 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester (2), caffeic acid (3), chlorogenic acid methyl ester (4), coriolic acid (5), 16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid (6), 16 α -hydro-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid (7), kaurenoic acid (8)로 확인되었다.

이렇게 분리된 화합물 중 비교적 과량으로 존재하는 compounds 1과 3에 대하여 HPLC 분석실험을 수행한 결과, HPLC 정성분석 실험에서 EtOAc 분획물 피크의 머무름 시간 중 7 min은 compound 1로, 18 min은 compound 3으로 확인되었다. 또한 HPLC 정량분석 실험에서 compounds 1과 3은 EtOAc 분획물에 각각 4.18% 및 2.30%의 함량으로 존재하는 것이 확인되었다.

분리된 compounds 1-8에 대하여 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성실험을 진행하였다.

항산화 활성실험 결과, DPPH SC_{50} 값이 compounds 1, 2, 3, 4에서 각각 361.8, 275.8, 276.0, 165.8 μ M로 비교적 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

미백활성 실험결과, 100 μ M의 compounds 6, 7, 8에서 큰 세포독성 없이 melanin 생성이 각각 73.7%, 52.6%, 42.7% 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 compounds 6, 7, 8을 가지고 100, 50, 25 μ M로 농도를 낮추어 추가실험을 진행한 결과, compounds 6, 7, 8은 intracellular tyrosinase 활성을 저해하면서 세포내 melanin 합성을 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

항염활성 실험결과, 100 μ M의 모든 화합물에서 세포독성 없이 nitric oxide 생성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이 중 항염활성이 보고되어 있지 않은 compounds 2, 4, 6, 7을 가지고 100, 50, 25 μ M로 농도를 낮추어 추가실험을 진행한 결과, compounds 2, 4, 6, 7은 TNF- α 및 IL-6 생성을 저해하면서 세포내 nitric oxide 합성을 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

항균활성 실험결과, 원형 발육 저지환(clear zone)의 직경 크기가 compound 2에서 1개의 균주, compound 3에서 3개의 균주, compound 5에서 3개의 균주, compound 6에서 5개의 균주, compound 8에서 1개의 균주에 대하여 좋은 항균 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 연구를 통하여 확인된 실험결과는 섬오가피나무 줄기에 대하여 화장품·의약품 관련한 천연 항산화, 미백, 항염 및 항균 소재로서의 활용 가치를 한층 높여줄 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

- 1) 박무현, 이상철, 신국현, “천연물을 이용한 기능성 물질 개발 및 이용”, 한국과학기술정보연구원, **2004**, 10-15.
- 2) 이남호, “기능성 화장품 소재 개발을 위한 천연물 화학적 접근”, *정밀화학*, **2011**, 109 (봄호), 22-29.
- 3) Shin, Choon-Hea, “Studies on the Antioxidative Character in the Ethyl Acetate Extraction of *Rumex crispus*”, *Korea J. Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 16(6), 592-602.
- 4) Doh, Eun-Soo; Chang, Jun-Pok; Kil, Ki-Jung; Choi, Myung-Suk; Yang, Jae-Kyung ;Yun, Chung-Weon; Jeong, Sun-Mi; Jung, Yun-Hae; Lee, Gun-Hee; “Antioxidative Activity and Cytotoxicity of Fermented *Allium victorialis* L. Extract”, *Korean Journal of Plant Res.*, **2011**, 24(1), 30-39.
- 5) Mi-Ae Kang, Mi-Bo Kim, Ji-Hun Kim, Young-Hwan Ko, Sang-Bin Lim, “Integral Antioxidative Capacity and Antimicrobial Activity of Pressurized Liquid Extracts from 40 Selected Plant Species”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **2010**, 39(9), 1249-1256.
- 6) 하병조, “기능성 화장품”, 신광출판사, **2001**, 67-69.
- 7) Yinzhe Jin, So Young Ahn, Eun suk Hong, Guang Hua Li, Eun-Ki Kim, Kyung Ho Raw, “Extraction of Whitenin Agents from Natural Plants and Whitening Effect” *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **2005**, 16(3), 348-353.
- 8) L, T. H.; Kim H. J.; Kim Y. B. “Depigmentation Activity of Barley, Unpolished Rice, Job’s-tear”, *대한안아비인후피부과학회지*, **2003**, 16(2), 57-78.
- 9) Yu-Hwa Park, Sang-Hyun Lim, Hun-Ju Ham, Hee-Yeon Kim, Haet-Nim Jeong, kyung-Hee Kim, Song-Mun Kim, “Isolation of Anti-inflammatory Active Substance β -Sitosterol from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Stem”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **2010**, 39(7), 980-985.

- 10) Yoon, Weon-Jong; Lee, Jung-A; Kim, Kil-Nam; Kim Ji-Young; Park, Soo-Yeong, “In vitro Anti-inflammatory Activity of the *Artemisia fukudo* Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells”, *Korean Soc. of Food Sci. Techn.*, **2007**, *39*(4), 464-469.
- 11) Mu-Hong Lee, Jae-Hyun Jeong, Myeong-Soo Jeong, Sung-Ho Chang, Erk Her, “Anti-inflammatory Function of the *Sophora japonica* Extract Rutin: The Inhibitory Effect of Rutin of Korean *Sophora japonica* on the Productions of NO and TNF-alpha from Mouse Peritoneal Macrophages”, **2010**, *18*(2), 105-112.
- 12) 고정삼, 양영택, 박재권, 이영재, “탐라오가피-재배와 이용 그리고 건강”, 제주문화, **2008**, 14-15.
- 13) 이상은, 손동욱, 윤여필, 이상윤, 이범중, 이상현, “산화적 스트레스에 대한 섬오가피 메탄올 추출물의 보호 효과”, *생약학회지*, **2006**, *37*(1), 16-20.
- 14) 남미희, 홍용덕, 노호식, 김연준, 신송석, 박영호, “효소처리 오가피 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물”, 공개특허, **2013**, 10-2013-0043889.
- 15) Jae-Ha Ryu, Hanna Ahn, Ji Yeon Kim, Young-Kyoon Kim, “Inhibitory Activity of Plant Extracts on Nitric Oxide Synthesis in LPS-Activated Macrophages”, *Phytother. Res.*, **2003**, *17*, 485-489.
- 16) Folin, O.; Denis, W., “A colorimetric method for determination of phenols (phenol derivatives) in urine” *J. Biol. Chem.*, **1915**, *22*, 305-308.
- 17) Blois, M. S., “Antioxidant determination by the use of a stable free radical” *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.
- 18) Rong Wei Teng, De Zu Wang, Yun Shan Wu, Yang Lu, Qi Tai Zheng, Chong Ren Yang, “NMR assignments and single-crystal X-ray diffraction analysis of deoxyloganic acid”, *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, *43*, 92-96.

- 19) Guoxiang Jiang, Sen Lin, Lingrong Wen, Yueming Jiang, Mouming Zhao, Feng Chen, K. Nagendra Prasad, Xuewu Duan, Bao Yang, "Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation", *Food Chemistry*, **2013**, *136*(2), 563-568.
- 20) Mei Zhang, Wan-Xue Liu, Meng-Fei Zheng, Qiao-Lin Xu, Fang-Hao Wan, Jing Wang, Ting Lei, Zhong-Yu Zhou, Jian-Wen Tan, "Bioactive Quinic Acid Derivatives from *Ageratina adenophora*", *Molecules*, **2013**, *18*, 14096-14104.
- 21) Tran Thi Hong Hanh, Dan Thi Thuy Hang, Chau Van Minh, Nguyen Tien Dat, "Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **2011**, 760-763.
- 22) Hyun Ah Jung, Eun Ju Lee, Ju Sun Kim, Sam Sik Kang, Je-Hyun Lee, Byung-Sun Min, Jae Sue Choi, "Cholinesterase and BACE1 Inhibitory Diterpenoids from *Aralia cordata*", *Arch Pharm Res*, **2009**, *32*(10), 1399-1408.
- 23) Xing Fu Cai, Guanghai Shen, Nguyen Tien Dat, Ok Hwa Kang, Young Mi Lee, Jung Joon Lee, Young Ho Kim, "Inhibitory Effect of Kaurane Type Diterpenoids from *Acanthopanax koreanum* on TNF- α Secretion from Trypsin-Stimulated HMC-1 Cells", *Arch Pharm Res*, **2003**, *26*(9), 731-734.
- 24) Zhi LI, Jonghwan Kim, Xiang-Qian LIU, Kyungtae Lee, Changsoo Yook, "Anticancer effects in vitro and chemical compositions of extracts of *Acanthopanax henryi*", *Journal of Acupuncture and Herbs*, **2014**, *1*, 49-54.
- 25) Li Zhang, Yong-Xian Cheng, Ai-Lin Liu, Hai-Di Wang, Ya-Ling Wang, Guan-Hua Du, "Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Influenza Properties of Components from *Chaenomeles speciosa*", *Molecules*, **2010**, *15*, 8507-8517.
- 26) Woo Seok Yang, Deok Jeong, Young-Su Yi, Jae Gwang Park, Hyohyun Seo, Sang Hyun Moh, Sungyoul Hong, Jae Youl Cho, "IRAK1/4-Targeted Anti-Inflammatory Action of Caffeic Acid", *Research Article*, **2013**, *2013*, 12.

- 27) Tran Thi Hong Hanh, Dan Thi Thuy Hang, Chau Van Minh, Nguyen Tien Dat, “Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*”, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **2011**, 760-763.
- 28) Ran Joo Choi, Eun Myoung Shin, Hyun Ah Jung, Jae Sue Choi, Yeong Shik Kim, “Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages”, *Phytomedicine*, **2011**, 18(8-9), 677-682.