



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

등수국 줄기 추출물의 항산화, 항염
및 미백 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

朴 志 勳

2019年 2月



등수국 줄기 추출물의 항산화, 항염 및 미백 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

朴 志 勳

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2018年 12月

朴志勳의 理學 博士學位 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

2018年 12月

Anti-oxidative, Anti-inflammatory and
Whitening Constituents from Extract of
Hydrangea etiolaris Stems

Ji Hun Park
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2018. 12.

This dissertation has been examined and approved.

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

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	iv
List of Figures	v
List of Abbreviations	viii
Abstract	x
I. 서론	1
1. 천연물	1
2. 항산화	2
3. 항염	3
4. 미백	4
II. 재료 및 방법	5
1. 시약 및 기기	5
2. 재료	6
3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리	7
1) 등수국 줄기의 추출 및 용매 분획	7
2) <i>n</i> -Hexane 분획물의 활성 성분 분리	8
(1) VLC에 의한 분리과정	8
3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	9
(1) VLC에 의한 분리과정	9
(2) MPLC에 의한 분리과정	10
4. 항산화 활성 평가	11
1) 총 폴리페놀 함량 측정	11
2) 총 플라보노이드 함량 측정	12
3) DPPH radical 소거 활성 측정	13

4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	13
5. 항염 활성 평가	15
1) RAW264.7 세포 배양	15
2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	15
4) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	16
5) Western blot analysis	17
6. 미백 활성 평가	18
1) B16F10 melanoma 세포 배양	18
2) Melanin 생성 억제 활성	18
3) 세포 독성 평가(MTT assay)	19
III. 결과 및 고찰	20
1. 분리된 화합물의 구조 분석	20
1) Compound 1의 구조 동정	20
1) Compound 2, 3의 구조 동정	23
2) Compound 4, 5의 구조 동정	28
3) Compound 6, 7의 구조 동정	31
4) Compound 8의 구조 동정	36
2. 항산화 활성 실험 결과	41
1) 등수국 줄기 추출물 및 분획물의 활성 실험	41
(1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정	41
(2) DPPH radical 소거 활성	43
(3) ABTS ⁺ radical 소거 활성	44
2) 분리된 화합물들의 활성 실험 결과활성	45
(2) DPPH radical 소거 활성	45
(3) ABTS ⁺ radical 소거 활성	46
2) 항염 활성 실험 결과	47
(1) Nitric oxide 생성 억제 활성	47
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성 억제 활성	50

(3) iNOS 단백질 발현 억제 활성	52
3) 미백 활성 실험 결과	53
(1) Melanogenesis 억제 활성 평가	53
(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성	56
IV. 요약 및 결론	57
V. 참고 문헌	59

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1	21
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 2 and 3	25
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 4 and 5	29
Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 6 and 7	33
Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 8	38
Table 6. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	43
Table 7. SC_{50} values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	44
Table 8. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activity for the compounds 6-8	45
Table 9. SC_{50} values of ABTS ⁺ radical scavenging activity for the compounds 6-8	46

List of Figures

Figure 1. Picture of <i>Hydrangea petiolaris</i>	6
Figure 2. Extraction and solvent fractionation of <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	7
Figure 3. Isolation of compounds from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	8
Figure 4. Isolation of compounds from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	9
Figure 5. Isolation of compounds from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	10
Figure 6. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents	11
Figure 7. Calibration curve of standard quercetin for quantification of total flavonoid contents	12
Figure 8. Chemical structure of compound 1	20
Figure 9. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	22
Figure 10. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	22
Figure 11. Chemical structures of compounds 2 and 3.	24
Figure 12. ¹ H NMR spectrum of compound 2	26
Figure 13. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	26
Figure 14. ¹ H NMR spectrum of compound 3	27
Figure 15. ¹³ C NMR spectrum of compound 3	27
Figure 16. Chemical structures of compounds 4 and 5	28
Figure 17. ¹ H NMR spectrum of compounds 4 and 5	30
Figure 18. ¹³ C NMR spectrum of compounds 4 and 5	30
Figure 19. Chemical structures of compounds 6 and 7	32
Figure 20. ¹ H NMR spectrum of compound 6	34
Figure 21. ¹ H NMR spectrum of compound 7	34
Figure 22. ¹ H NMR spectrum of compound 6	35
Figure 23. ¹³ C NMR spectrum of compound 7	35
Figure 24. Chemical structures of compound 8	37

Figure 25. ^1H NMR spectrum of compound 8	39
Figure 26. ^{13}C and DEPT (135°) NMR spectra of compound 8	39
Figure 27. HMQC NMR spectrum of compound 8	40
Figure 28. HMBC NMR spectrum of compound 8	40
Figure 29. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	41
Figure 30. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	42
Figure 31. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	43
Figure 32. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems	44
Figure 33. DPPH radical scavenging activity of the compound 6-8	45
Figure 34. ABTS ⁺ radical scavenging activity of the compound 6-8	46
Figure 35. Effects of extract and solvent layers from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	48
Figure 36. Effects of <i>n</i> -Hex and EtOAc layers from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	49
Figure 37. Effects of <i>n</i> -Hex and EtOAc layers from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems on PGE ₂ , TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells	51
Figure 38. Effects of EtOAc layer from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems on levels of iNOS protein in LPS-induced RAW264.7 cells	52
Figure 39. Effects of extract and solvent layers from <i>Hydrangea petiolaris</i> stems on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 melanoma cells	54

Figuer 40. Effects of n-Hex layers from *Hydrangea petiolaris* stems on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 melanoma cells 55

Intracellular tyrosinase activity of n-Hex layer from *Hydrangea petiolaris* stems in α -MSH induced B16F10 melanoma cells 56

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BHT	Butylhydroxytoluene
CC	Column chromatography
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i>
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
Fr.	Fraction
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalent
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
int.	Integration
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MP	MPLC subfraction

MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ROS	Reactive oxygen species
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
t	Triplet
TLC	Thin layer chromatography
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
V	VLC subfraction
VLC	Vacuum liquid chromatography
2D	Two-dimensional

Abstract

In this study, we investigated anti-oxidative, anti-inflammatory and whitening constituents from *Hydrangea petiolaris* stems. Phytochemical investigation of the extract from *H.* stems resulted in isolation of eight constituents; methyl linoleate (1), β -sitosterol (2), daucosterol (3), oleanolic acid (4), ursolic acid (5), catechin (6), *epi*-catechin (7) and lyoniside (8).

The chemical structures of isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values. On the anti-oxidation tests, the compounds 6 (SC₅₀ 36.5 μ M), 7 (SC₅₀ 73.1 μ M) and 8 (SC₅₀ 61.7) exhibited potent DPPH radical scavenging activity compared to positive control (ascorbic acid, SC₅₀ 51.6 μ M). Also, compounds 6 (SC₅₀ 19.9 μ M) and 8 (SC₅₀ 24.9 μ M) showed stronger ABTS⁺ radical scavenging activities than positive control (ascorbic acid, SC₅₀ 36.2 μ M).

For the anti-inflammation studies using RAW264.7 macrophage, *n*-Hex and EtOAc layers inhibited the production of NO effectively without causing cell toxicity. In addition, *n*-Hex and EtOAc layers reduced expression of iNOS protein and production of PGE₂ and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β).

B16F10 melanoma cells were used for whitening activity studies. As a result, *n*-Hex layer inhibited the melanogenesis and intracellular tyrosinase effectively without causing cell toxicity.

Based on these results, it was suggested that extract and isolated compounds from *H. petiolaris* stems could be potentially applicable as pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

I. 서론

1. 천연물

식물은 다양한 화학 물질을 만들어 낸다. 탄수화물, 단백질, 지질 등 식물 내의 세포에 직접 관여하여 식물의 생장에 큰 영향을 주는 1차 대사산물(primary metabolite)과 동물, 곤충, 병원균 등 다양한 외부의 위협 요소로부터 보호하거나 다른 식물 혹은 동물과의 상호작용을 위해 생성하는 화학 물질인 2차 대사산물(secondary metabolite)을 만들어 낸다. 식물유래 2차 대사산물은 phytochemical이라고도 하며 플라보노이드(flavonoid), 탄닌(tannin), 테페노이드(terpenoid), 알칼로이드(alkaloid) 등 현재까지 약 2만 5천종 이상이 있을 것으로 추정하고 있다.¹ 플라보노이드는 15개의 탄소가 C₆-C₃-C₆ 형태의 기본골격으로 하는 물질이며 두 개의 페닐기(phenyl group)와 한 개의 헤테로고리(heterocyclic)를 가지고 있다. 플라보노이드는 헤테로고리의 산화 정도에 따라 flavone, isoflavone, flavonol, flavanone 등으로 분류되며 항산화, 항염, 항진균 등 다양한 생리 활성을 나타낸다. 테페노이드는 이소프렌(isoprene)을 기본 단위로 하는 물질이며 탄소의 개수에 따라 모노터펜(monoterpene, C₁₀), 다이터펜(diterpene, C₂₀), 트라이터펜(triterpene, C₃₀) 등으로 나뉜다. 테페노이드 물질들은 주로 항염, 항암, 면역강화 등에 생리 활성을 나타내는 중요한 물질로 알려져 있다.² 이렇듯 phytochemical이 다양한 생리 활성을 나타낸다는 중요성이 알려지며 이와 관련한 연구가 활발히 진행되고 있고 이에 따라 기능성 phytochemical을 함유하는 식물 추출물이 식품, 화장품 및 의약품 등에 사용 가능한 천연 소재 개발에서 중요시되고 있다.

2. 항산화

우리 몸에 들어온 산소는 체내에서 2~3% 정도가 활성산소가 되며 면역, 근육 재생 등에 관여하는 꼭 필요한 물질이다. 하지만 이러한 활성산소가 지나치게 많아지면 우리 몸에 매우 해로운 물질이 된다. 현대의학에서는 활성산소가 노화 및 질병의 90% 이상을 일으키는 원인으로 보고 있다. 사람은 산소를 이용해 호흡하는데 대부분 산소는 호흡의 결과로 안정한 상태의 물이 되지만 체내에 들어온 산소 중 물로 환원되지 않은 일부가 불안정하고 높은 에너지를 갖고 있는 상태인 radical 성질을 가지게 된다. 이들은 주위로부터 전자 하나를 더 얻어 안정된 상태로 되려는 성질이 있기 때문에 신체의 다른 분자들과 쉽게 산화 반응을 일으켜 세포와 조직이 손상을 입게 된다. 이러한 활성 산소는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)이라고도 하며 superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($\bullet OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroperoxyl radical ($HO_2\bullet$) 및 singlet oxygen (1O_2) 등이 있다. 이와 같은 ROS로부터 우리 몸을 보호하고 안정한 상태로 변환시키기 위해 인체 내에서는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) 등 항산화 효소가 존재한다. 그러나 과량으로 생성된 활성 산소를 제거하기에는 체내에서 생성된 항산화 효소만으로는 부족하다. 이에 따라 외인성 항산화제가 필요로 하게 되며 외인성 항산화제는 천연 항산화제와 합성 항산화제로 나뉘게 된다. 천연 항산화제에는 flavonoid, ascorbic acid, carotenoid 등이 있으며 합성 항산화제에는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) 등이 있다. 이 중 합성 항산화제의 경우, 높은 열을 가했을 시 불안정하거나 다량으로 투여됐을 때 기형 및 발암 발생의 원인으로 작용할 수 있다는 보고가 있다.³ 따라서 체내 생리 활성에 좋은 효과를 나타내면서 부작용이 없는 안전한 천연 항산화제에 대해 연구가 필요로 하다.

3. 항염

염증이란 내부 또는 외부의 자극으로 인해 조직이 손상되었을 때 박테리아 및 바이러스 같은 물질들이 체내에 유입되어 일어나는 방어적 반응의 증상이다. 박테리아와 같은 세균이 신체 조직 내로 침투하면 세균 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 대식세포는 자극을 받게 되면서 활성화된다. 활성화된 대식세포는 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), 그리고 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 전염증성(pro-inflammatory) cytokine을 생성한다. 생성된 전염증성 cytokine은 현재 12가지 이상 규명되었고 그 중에서 TNF- α 및 IL-6 등을 중심으로 알려져 있으며⁴ 이러한 전염증성 cytokine의 과잉 생산에 의한 염증 반응이 지속될 때 점막 손상을 촉진하고 관절염, 동맥경화와 같은 염증성 질환을 일으킨다.⁵ 또한, 활성화된 대식세포에서는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 같은 효소의 발현을 통해 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 다양한 염증매개 분자들을 생성한다.⁶ NO는 NO synthase (NOS) 효소에 의해 L-arginine으로부터 합성되는 물질이며 세포 내 신경전달물질 운반, 항상성 유지 및 세포독성 등에 관련된 신호전달자이지만 과잉 생산될 경우 세포손상 및 염증반응을 일으킨다. 또한, COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 세포 사멸을 억제하는 기능을 가지고 있지만 과다하게 생성될 경우 발열, 부종, 혈관 확장 등을 매개하는 물질이다.⁷ 이와 같이 염증은 인체를 지키려하는 면역반응에 따른 증상이지만 전염증성 인자 및 염증매개 분자들이 과잉 생성 되면 보호해야 할 인체를 보호하지 못하고 역으로 유해한 방향으로 진행된다. 그러므로 면역계와 염증반응에 미치는 인자들을 효과적으로 조절할 수 있는 방법이 필요하다.

4. 미백

멜라닌(melanin)은 동·식물에 널리 분포하는 페놀류의 생체 고분자 물질이다. 멜라닌은 물과 대부분의 유기 용매에는 잘 녹지 않으며, 화학적으로 비활성을 띠는 물질이다. 일반적으로 어두운 색에 가깝고 단백질의 복합체이며 사람의 피부 색을 이루는 가장 중요한 인자이다. 멜라닌은 자외선 등에 의한 피부의 노화나 광선각화증을 억제하여 피부를 보호하는 이로운 기능을 가지고 있지만 과잉 생성될 경우 피부 색소 침착에 의해 기미, 주근깨 등을 형성한다. 이러한 멜라닌은 유멜라닌(eumelanin)과 페오멜라닌(pheomelanin)으로 나뉘는데 유멜라닌은 갈색 유멜라닌과 흑색 유멜라닌 2종류가 있다. 페오멜라닌은 붉은 빛을 띠고 자외선에 노출되면 발암물질로 변한다.^{8,9}

멜라닌의 합성은 멜라닌세포(melanocyte)에 의해 이루어진다. 합성 과정은 tyrosinase에 의해 tyrosine이 활성화되고, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)와 DOPAquinone을 거치는 연속적인 산화 반응에 의해 멜라닌을 생성하게 된다.¹⁰ 생성된 멜라닌은 멜라닌세포에 있는 나뭇가지처럼 생긴 수지상 돌기로 인해 표피세포로 전달되고 표피세포의 각화과정을 통해 피부 상층으로 이동하여 색소 침착 등을 일으키게 된다. 이로 인해 천연 소재를 이용하여 멜라닌 합성 저해를 통한 미백 효과를 내는 연구들이 각광받고 있다.

본 연구에서는 제주에서 자생하는 등수국(*Hydrangea petiolaris*) 줄기 추출물과 분획물을 이용해 화장품 및 의약품으로써의 가능성을 보기위해 활성 실험을 진행하고, 분리된 화합물의 구조 동정 및 활성을 통해 등수국 줄기가 천연 소재로써의 가능성을 확인해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 OCI의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co.)을 사용하였고 medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co.)에는 KP-C18-HS (Biotage Co.) 컬럼을 사용하였다. Silica gel chromatography에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck Co.)을 사용하였고, gel filtration chromatography에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. 분리 과정에 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (silica gel 60 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 사용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-5% H₂SO₄를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물들의 구조 분석을 하기 위하여 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.)를 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CD₃OD, CDCl₃ 및 C₅D₅N₅를 사용하였다. HPLC 분석에는 HPLC (Waters Co)를 이용하였으며 사용된 컬럼은 Kromasil® C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)이고 검출기는 UV-Visible Detector (Waters, USA, PDA 285 nm)를 사용하였다.

2. 재료

본 연구에 사용된 등수국(*Hydrangea petiolaris*)은 범의귀과(Saxifragaceae) 식물로 잎의 테두리는 작은 톱니모양이고 수피는 갈색이다. 꽃은 하얀색이고 3~4개의 꽃잎이 달려있다. 등수국은 덩굴성 식물로 가지에서 공기뿌리가 발생하여 바위나 다른 나무에 붙어 20 m 가량 자라는 것으로 보고되어 있다. 또한 등수국은 햇빛이 자라는데 큰 영향을 주지 않아 방향에 상관없이 건물에 심어 지 피식물로 쓰이기에 적합하다. 국내에서 등수국은 남부지방의 섬 및 울릉도에 자생하고 있으며 특히 제주도의 큰바리메, 작은바리메, 원당봉, 천아오름 등 여러 곳에서 자생하는 것으로 알려져 있다.¹¹

수국류는 전 세계에 23여종이 알려져 있으며 주로 건조하여 차로 이용해 왔고 생리 활성에는 면역억제작용, 피부미백효과, 항비만 등이 보고되어 있다.¹² 분리된 화합물에는 phyllo dulcin, hydrangenol, kaempferol, quercetin 등의 유효 성분이 알려져 있다.^{13,14} 하지만 아직 등수국에서 유효한 생리 활성이나 유효 성분 에 대한 분리가 보고되어 있지 않아 본 연구에서는 등수국의 줄기를 이용하여 추출물 및 분획물을 이용하여 생리 활성을 알아보고 그에 따른 유효한 성분을 분리 및 구조 동정 하였다.

실험에 사용한 등수국 줄기(시료번호 : 488)는 2018년 1월에 제주생물자원(주) 으로부터 구입하였다. 구입한 등수국 줄기는 동결 건조기에서 건조시킨 뒤 분쇄 하여 사용하였다(Figure 1).



Figure 1. Picture of *Hydrangea petiolaris*

3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 등수국 줄기의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄한 등수국 줄기 1.9 kg을 70%(v/v) EtOH 38.0 L에 넣은 뒤 교반기를 이용해 상온에서 24시간동안 추출을 진행하였다. 추출한 시료를 감압 여과 장치와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과하고 남은 잔여물들을 같은 방법으로 추출 및 여과를 2회 더 반복 진행하였다. 얻은 여액은 37-40 °C의 수욕 상태에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 164.0 g을 얻었다. 얻은 70% EtOH 추출물 20.0 g을 증류수 1 L에 현탁시킨 뒤 분별 깔때기를 이용해 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH을 낮은 극성 순서부터 순차적으로 사용해 각 용매에 대해 분획물을 얻었다. 각 용매에 대해 3회 반복 했으며 이와 같은 방법으로 총 157.0 g의 추출물을 용매 분획하였다 (Figure 2).

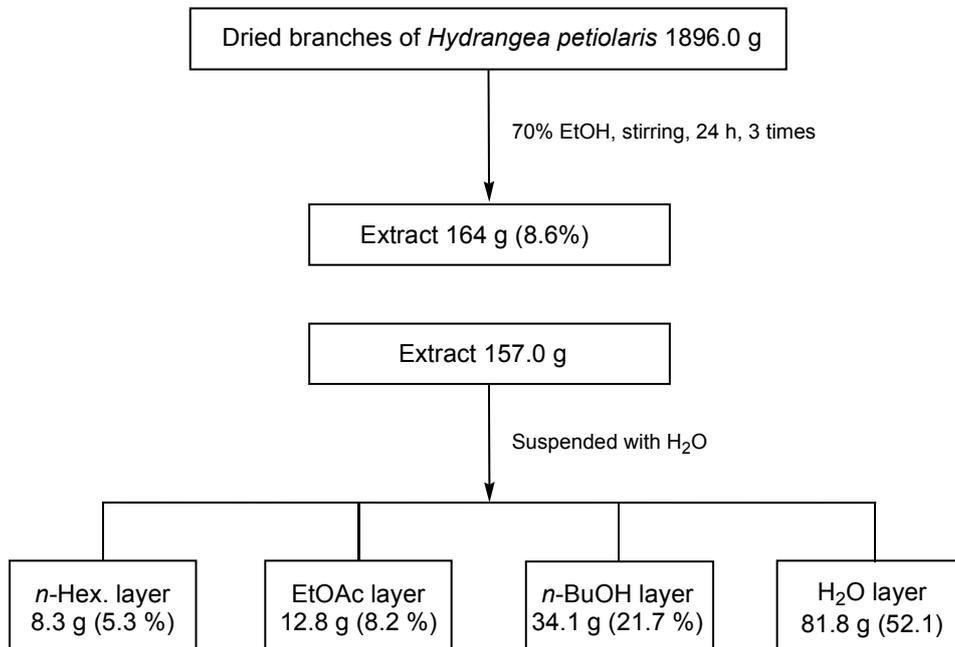


Figure 2. Extraction and solvent fractionation of *Hydrangea petiolaris* stems.

2) *n*-Hexane 분획물의 활성 성분 분리

n-Hex 분획물 5.0 g을 극성 크기별로 나누기 위해 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 VLC를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-50%)가 될 때 까지 높였으며 그 후 100% EtOAc와 100% MeOH를 각 300 mL씩 용출하여 총 13개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-13).

얻은 VLC fraction들 중 Fr. V7 (499.9 mg)을 *n*-Hex-EtOAc (5:1)의 용매조건으로 silica gel column chromatography를 수행하여 compound 1 (178.3 mg)과 compound 2 (93.6 mg)을 얻었다(Figure 3).

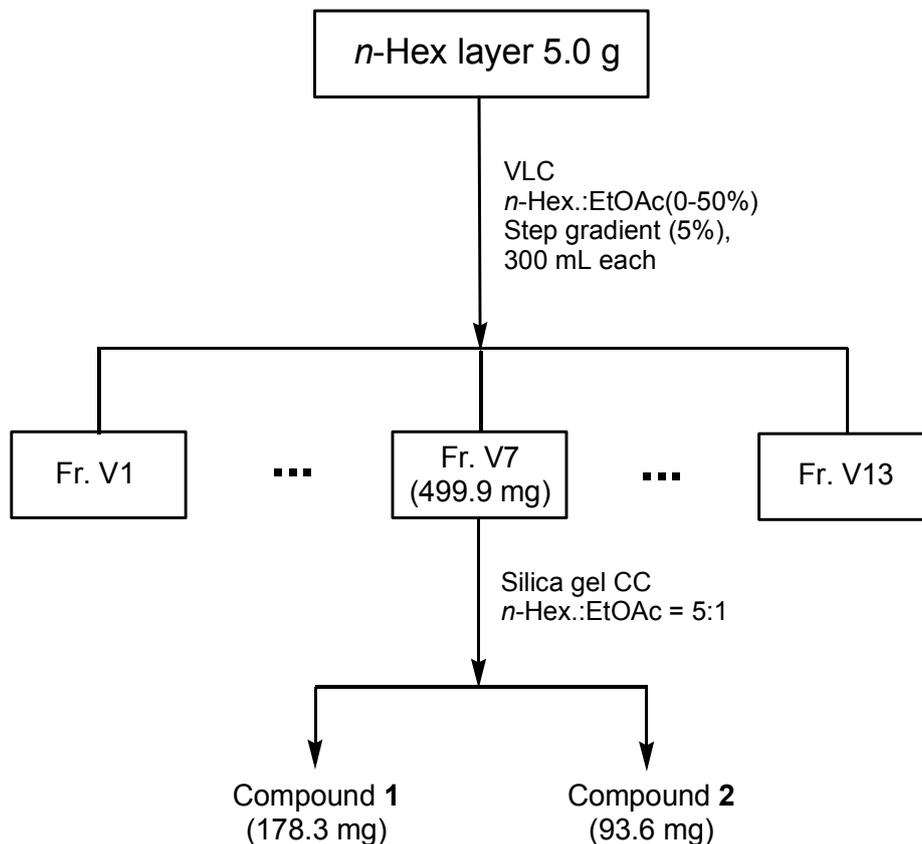


Figure 3. Isolation of compounds from *Hydrangea petiolaris* stems.

3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

(1) VLC를 이용한 분리과정

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성 크기별로 나누기 위해 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 VLC를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (0-50%)가 될 때 까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 각각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-32). 얻은 VLC fraction들 중 Fr. V9 (207.5 mg)를 CHCl₃-MeOH (20:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 4와 compound 5가 혼합(42.1 mg)된 형태로 분리하였다.

Fr. V22-23 (599.0 mg)을 H₂O-MeOH (1:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 6 (16.0 mg)과 compound 7 (15.0 mg)을 얻었다.

Fr. V25 (463.5 mg)를 MeOH로 재결정하여 compound 3 (18 mg)을 얻었다 (Figure 4).

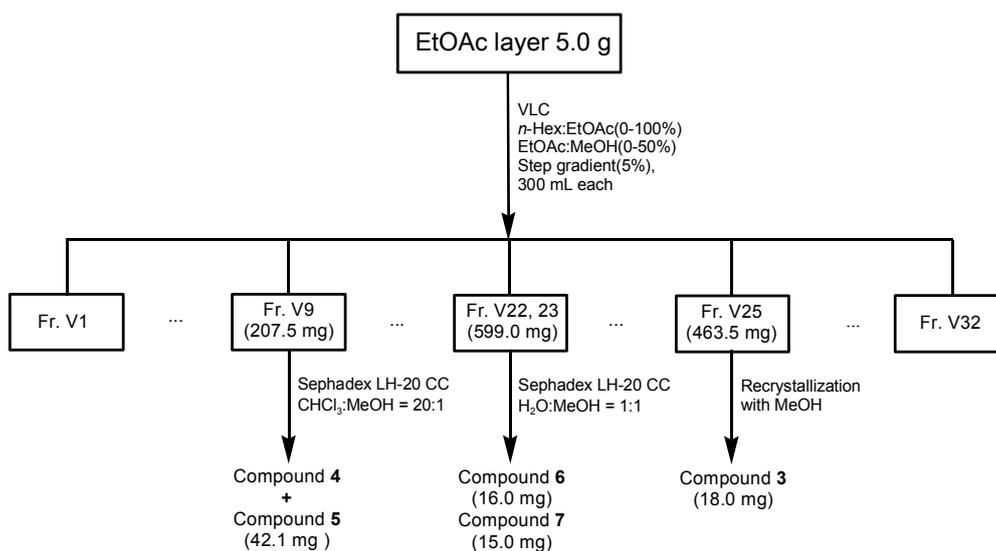


Figure 4. Isolation of compounds from *Hydrangea petiolaris* stems.

(2) MPLC를 이용한 분리과정

EtOAc 분획물 4.0 g을 극성 크기별로 나누기 위해 MPLC를 수행하였다. EtOAc 분획물 4.0 g을 MeOH 6 mL에 녹인 뒤 KP-C18-HS column에 주입하였다. Gradient법으로 MeOH:H₂O (10-100%, 110 min), MeOH (100%, 20 min)의 용매 조건을 사용하여 유속은 15 mL/min으로 한 뒤 각각 40 mL씩 용출시켜 총 48개의 fraction을 얻었다(MP1-48).

MPLC fraction들 중 Fr. MP 14-17 (253.9 mg)을 H₂O:MeOH (1:1)의 용매 조건으로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행해서 compound 8 (17 mg)을 얻었다.(Figure 5)

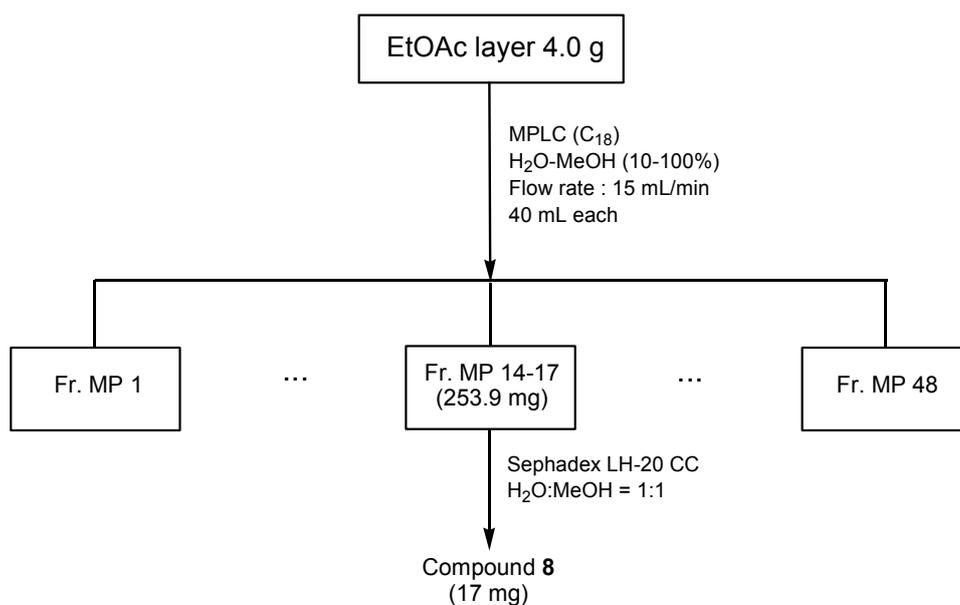


Figure 5. Isolation of compounds from *Hydrangea petiolaris* stems.

4. 항산화 활성 평가

1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법¹⁵을 응용하여 진행하였으며, 표준물질로 gallic acid를 사용하였다. Gallic acid를 DMSO:EtOH=1:1 용액을 사용하여 1 mg/mL로 제조 후 two-fold-dilution법으로 31.25-1000 µg/mL가 되도록 희석하고 각 시료들은 10 mg/mL 농도로 용매에 녹여 준비하였다. 준비한 Gallic acid 및 시료 100 µL를 microtube에 취하고 증류수 900 µL를 넣어 희석시켰다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 첨가하여 혼합한 다음 상온에서 3분간 반응시켰다. 그 다음 7%(w/v) Na₂CO₃ 용액 200 µL를 첨가한 후 증류수를 총 부피(total volume)가 2 mL 되도록 가한 뒤 혼합하였다. 이를 상온에서 1시간동안 반응시킨 후, 96 well plate에 200 µL씩 옮겨 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선법(Standard calibration curve method)을 통해 구하였으며, 표준검정곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다(Figure 6).

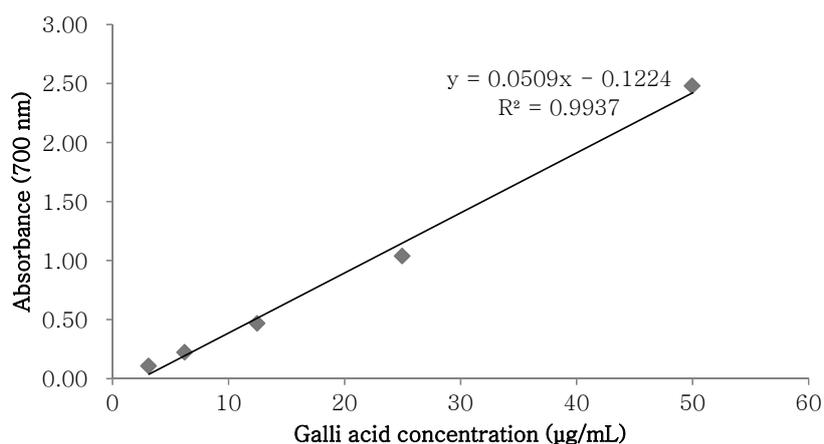


Figure 6. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis법¹⁶을 응용하여 진행하였다. 표준물질로 quercetin를 사용하였으며 quercetin과 각 시료들은 총 폴리페놀 함량 측정과 같은 방법으로 제조 및 희석하여 준비하였다. Quercetin과 시료 15 μL 를 96 well plate에 취하고 여기에 ethylene glycol 150 μL 를 가한 뒤 0.1 N NaOH 15 μL 를 첨가하여 혼합한다. 이를 상온에서 1시간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 시료의 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선법(Standard calibration curve method)을 통해 구하였으며, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 7).

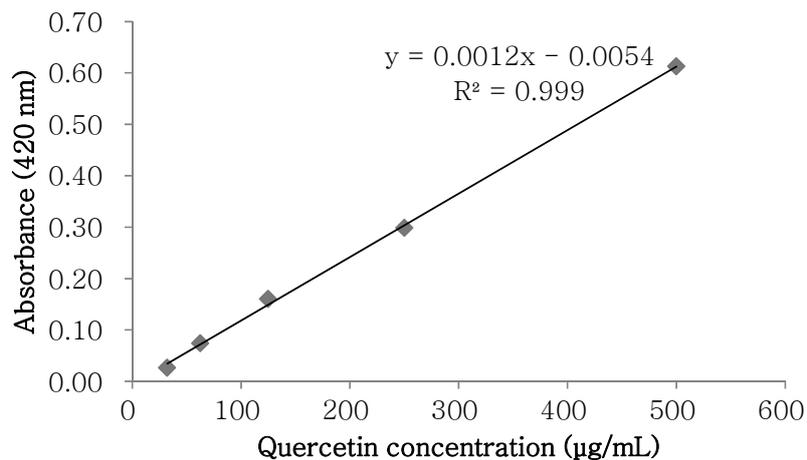


Figure 7. Calibration curve of standard quercetin for quantification of total flavonoid contents.

3) DPPH radical 소거 활성 측정

각 시료들의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical에 대한 수소 공여능을 측정하기 위해 본 실험은 Blois 등의 방법¹⁷을 응용하여 실시하였다. 96 well plate에 시료 20 μ L를 취한 뒤 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L를 가하고 상온에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정 하였고 대조군(positive control)으로는 L-ascorbic acid와 BHT를 사용하였다. Radical 소거 활성 정도를 백분율로 나타내기 위해 다음과 같은 식으로 계산하였다. 또한, 백분율이 50%일 때 시료의 농도를 SC₅₀도 구하였다.

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

Abs_{control} : DPPH 용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료와 DPPH를 혼합한 용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료의 흡광도

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS⁺ radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법¹⁸을 응용하여 실시하였다. DPPH와 비슷한 실험이지만 DPPH radical 소거 활성이 친수성의 활성 물질을 측정한다면 ABTS⁺는 친수성(hydrophilic)과 친지질성(lipophilic)의 활성 물질을 측정할 수 있다.¹¹¹ ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 상온 및 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. 이 용액을 EtOH로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 \pm 0.02가 되도록 한 다음 실험에 사용하였다. 시료 20 μ L에 희석한 ABTS⁺ 용액 180 μ L를 가하여 상온에서 20분 동안 반응시키고

microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (positive control)으로는 L-ascorbic acid와 BHT를 사용하였다. 또한, Radical 소거 활성 정도를 백분율로 나타내기 위해 다음과 같은 식으로 계산하였고 백분율이 50%일 때 시료의 농도인 SC₅₀를 구하였다.

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

Abs_{control} : ABTS⁺ radical 용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료와 ABTS⁺를 혼합한 용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료의 흡광도

5. 항염 활성 평가

1) RAW264.7 cell 배양

RAW264.7 cell은 쥐의 대식세포(murine macrophage cell line)이며 american type cell culture (ATCC)로부터 분양받았다. 배양은 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양하였다.

2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW264.7 cell을 24 well plate에 2.0×10^5 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 18시간 배양하였다. 그 다음 0.1 µg/mL의 LPS를 포함한 배지로 교환한 후, 각각 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 생성된 NO의 양을 측정하기 위해서 세포 배양 상등액 100 µL를 96 well plate에 취하고 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응물은 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO는 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였으며, 표준물질로는 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용했으며, 생성된 NO의 양은 NaNO₂의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선법을 통해 정량하였다. 정량한 값은 백분율로 나타내었으며, 표준검정곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다. 또한 백분율이 50%일 때 시료의 농도인 SC₅₀도 구하였다. 이 때, 양성 대조군은 2-amino-4-picoline (10 µM)을 사용하였다.

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

4) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

60 mm petri dish에 RAW264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 0.1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후, 각각 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 얻어진 세포 배양 상등액에서 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성량은 각각 PGE₂, TNF-α, IL-6 및 IL-1β enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였다. 각각의 표준물질 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선을 통해 정량되어 백분율로 나타냈다.

5) Western blot analysis

60 mm petri dish에 2.0×10^5 cells/dish로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 0.1 µg/mL의 LPS가 포함 된 배지로 교환한 후, 각각 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포 상등액을 제거하여 PBS로 세척한 후, lysis buffer (1 × RIPA)를 이용하여 4°C조건에서 overnight시켜 lysis 시켰다. 그 이후 단백질을 원심분리(8000 rpm, 4°C, 20 min)하여 단백질의 상등액만 분리하여 실험에 사용하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 Bradford 시약을 사용하여 표준검정곡선을 작성하여 정량하였다. 정량된 단백질 20 µg을 8-12% SDS-polyacrylamide에 전기영동한 후 이를 transfer stack을 이용해 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 7분간 transfer 하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 5% skim milk를 함유한 TTBS (0.1% Tween 20, tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2시간 blocking 시킨 후, TTBS로 5회 세척하였다. 그 후 membrane을 각각의 1차 항체들과 반응을 시켰으며, 1차 항체 반응은 anti-rabbit NOS2 (Santa Cruz)을 1:1000, β-actin antibody clone AC-74 (Sigma)을 1:20000로 희석하여 사용하였고, 4°C 조건에서 overnight 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 TTBS로 5회 세척한 후, HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 된 2차 항체(Santa Cruz)를 iNOS 1:5000, β-actin 1:20000 으로 희석한 후 상온에서 1시간 반응시킨 뒤, TTBS로 5회 세척하였다. 단백질은 WEST-ZOL (Western blot detection system, Intron) 용액을 사용하여 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT)을 이용하여 각각의 단백질 발현정도를 분석하였다.

6. 미백 활성 평가

1) B16F10 melanoma 세포 배양

Murine B16F10 melanoma cell은 ATCC로부터 분양 받아 10% FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 함유된 DEME 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2) Melanogenesis 억제 활성

6 well plate에 5×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1 N NaOH 300 µL를 첨가하여 55°C에서 1시간 반응시켜 세포 내의 멜라닌을 녹여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 melasolv (20 µM)를 사용하였다.

3) 세포 독성 평가(MTT assay)

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 RAW264.7 및 B16F10 cell을 well plate에 실험 조건에 맞게 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에 전배양한 후, LPS (0.1 µg/mL) 또는 α-MSH (100 nM)와 시료를 농도별로 처리한 후 배양하였다. 이후 MTT를 500 µg/mL 농도로 배지에 첨가하여 배양 조건에서 3시간 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 그 다음 살아있는 세포와 MTT가 반응하여 생성된 보라색 formazan 침전물을 DMSO를 이용하여 용해시키고 이를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 세포 생존률(cell viability)은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

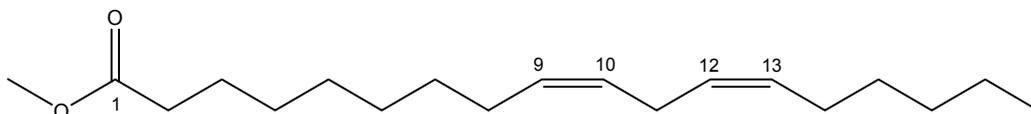
Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

III. 결과 및 고찰

1. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 174.6 피크를 통해 carbonyl group를 가지고 있으며 δ_{C} 130.4, 130.3, 128.3, 128.1 및 δ_{H} 5.28-5.39 (4H, m)의 피크를 통하여 이중결합을 2개 가지고 있을 것으로 예상하였다. δ_{H} 3.65 (3H, s) 및 δ_{C} 51.7 피크를 통해 한 개의 methoxy group이 있음을 예상하였고 δ_{H} 0.89 (3H, t, 6.9) 피크와 δ_{C} 14.3 피크를 통해 methyl group이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌을¹⁹ 통해 이중결합이 2개 있는 불포화 지방산 골격에 methoxy group이 1개 결합되어 있는 methyl linoleate로 확인되었다(Figure 8-10, Table 1).



Compound 1

Figure 8. Chemical structure of compound 1.

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

No.	Compound 1 (CDCl_3)	
	δH (Int., multi., J Hz)	δC
1		174.6
2	2.29 (2H, t, 7.3)	34.3
3	1.63–1.59 (2H, m)	25.2
4	1.30–1.23 (2H, m)	29.3
5	1.30–1.23 (2H, m)	29.4
6	1.30–1.23 (2H, m)	29.8
7	1.30–1.23 (2H, m)	29.9
8	2.07–2.01 (2H, m)	27.4
9	5.39–5.29 (1H, m)	130.3
10	5.39–5.29 (1H, m)	128.1
11	2.76 (2H, t, 6.6)	25.8
12	5.39–5.29 (1H, m)	128.3
13	5.39–5.29 (1H, m)	130.4
14	2.07–2.01 (2H, m)	27.4
15	1.30–1.23 (2H, m)	29.6
16	1.30–1.23 (2H, m)	31.7
17	1.30–1.23 (2H, m)	22.8
18	0.88 (3H, t, 6.9)	14.3
$-\text{OCH}_3$	3.66 (3H, s)	51.7

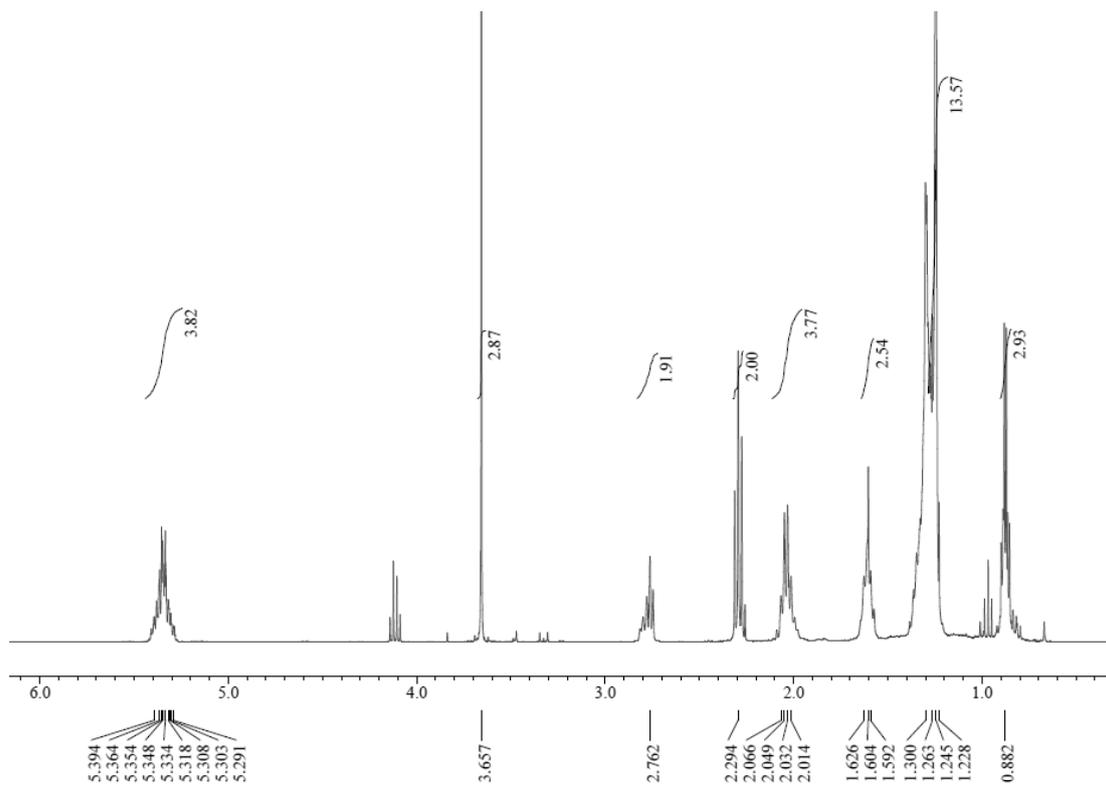


Figure 9. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (CDCl_3).

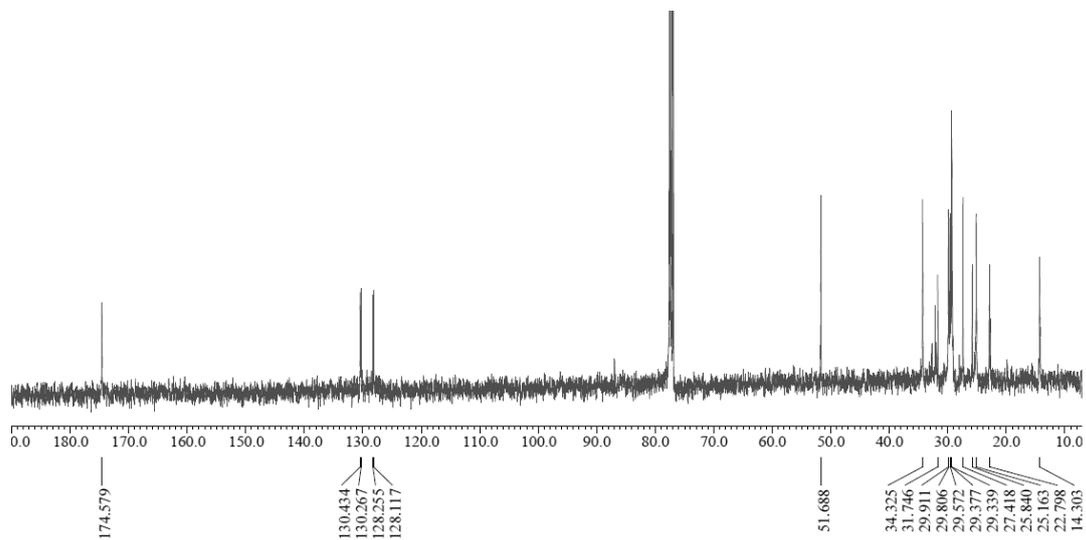
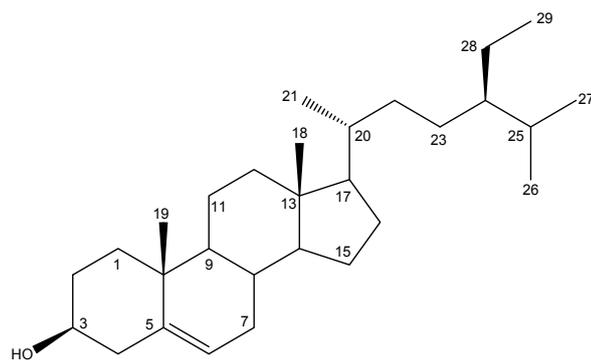


Figure 10. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (CDCl_3).

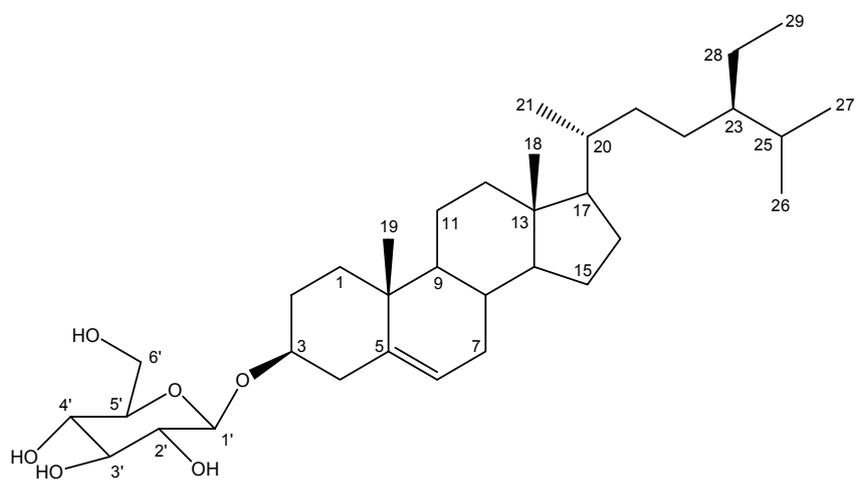
2) Compound 2 및 3의 구조 동정

Compound 2는 ^1H NMR spectrum에서 6개의 methyl group을 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal과 ^{13}C NMR spectrum에서 29개의 carbon 피크를 통해 sterol 구조를 가진 화합물로 예상하였다. 그 중 δ_{C} 122.0와 141.0 피크를 통해 분자내에 이중결합이 1개 있음을 예상하였고 δ_{C} 72.0 피크는 다른 sp^3 혼성 carbon 피크 보다 δ_{C} 값이 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 치환기가 결합해 있음을 예상 할 수 있다. 이를 바탕으로 문헌을²⁰ 통해 compound 2는 β -sitosterol로 확인되었다(Figure 11-13, Table 2).

Compound 3은 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 compound 2과 유사한 구조이나 δ_{H} 4.01-5.08 및 δ_{C} 63.4-79.0, 103.1의 6개의 피크를 통해 compound 2에 6탄당이 결합되어 있는 화합물로 예상하였다. 또한, anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 5.08 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크를 통해 β -form의 당을 예상하였고 이를 바탕으로 문헌을²¹ 통해 compound 3은 daucosterol로 확인되었다.(Figure 11, 14, 15, Table 2).



Compound 2



Compound 3

Figure 11. Chemical structures of compounds 2 and 3.

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

No.	Compound 2 (CDCl_3)		Compound 3 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		37.5		37.8
2		31.9		32.5
3	3.53 (1H, m)	72.0	4.09 (1H, m)	79.0
4		42.5		40.3
5		141.0		141.4
6	5.36 (1H, d, 5.0)	122.0	5.38 (1H, m)	122.5
7		32.1		30.6
8		32.1		32.4
9		50.3		50.7
10		36.7		37.3
11		21.3		21.6
12		40.0		39.7
13		42.5		42.8
14		57.0		57.2
15		26.3		24.8
16		28.5		28.9
17		56.3		56.6
18		36.7	0.68 (3H, s)	12.7
19	0.93 (3H, s)	19.2	0.95 (1H, s)	19.8
20		34.2		36.8
21		24.5	1.01 (3H, d, 6.4)	19.4
22		46.0		34.6
23		23.3		26.7
24	0.86 (3H, s)	12.2		46.4
25		29.3		29.8
26	0.84 (3H, s)	20.1	0.90 (3H, d, 8.2)	20.3
27	0.82 (3H, s)	19.6	0.88 (3H, d, 8.2)	19.6
28	0.69 (3H, s)	19.0		23.7
29	1.01 (3H, s)	12.1	0.91 (3H, t, 7.8)	12.5
1'			5.08 (1H, d, 7.8)	103.1
2'			4.09 (1H, t, 8.0)	75.9
3'			4.23 (1H, m)	79.1
4'			4.23 (1H, m)	72.2
5'			4.01 (1H, m)	78.6
6'			α 4.44 (1H, dd, 11.7, 5.2)	63.4
			β 4.59 (1H, dd, 11.6, 2.1)	

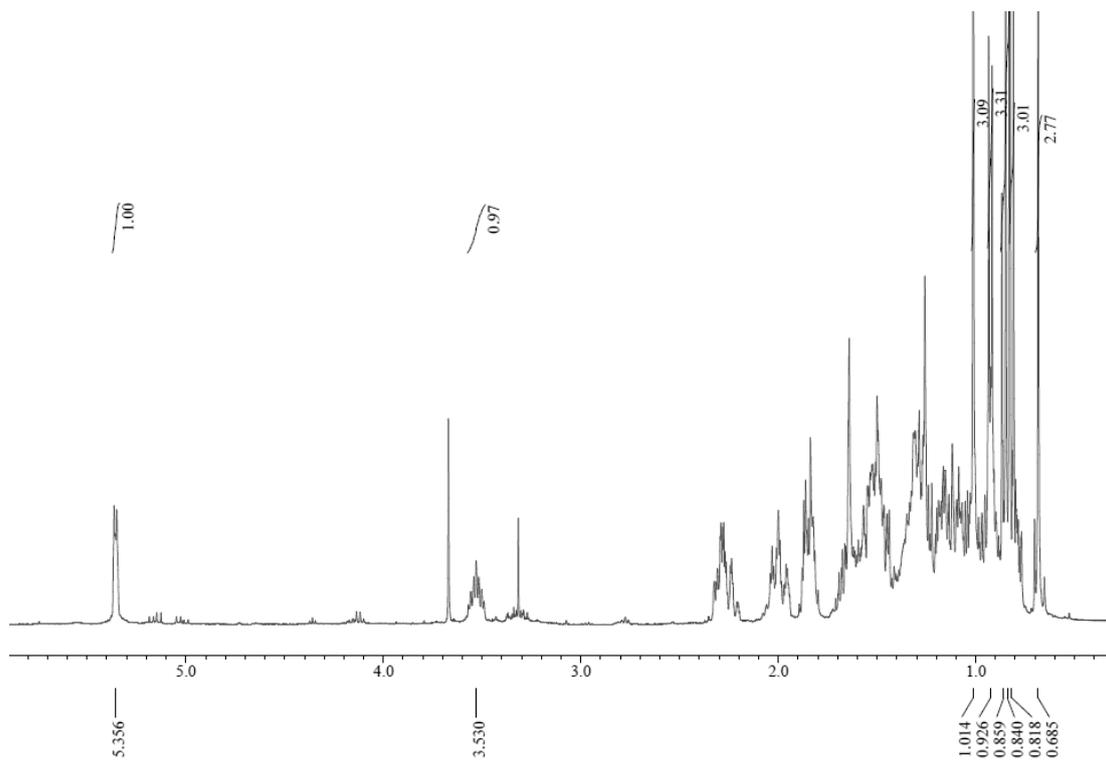


Figure 12. ^1H NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

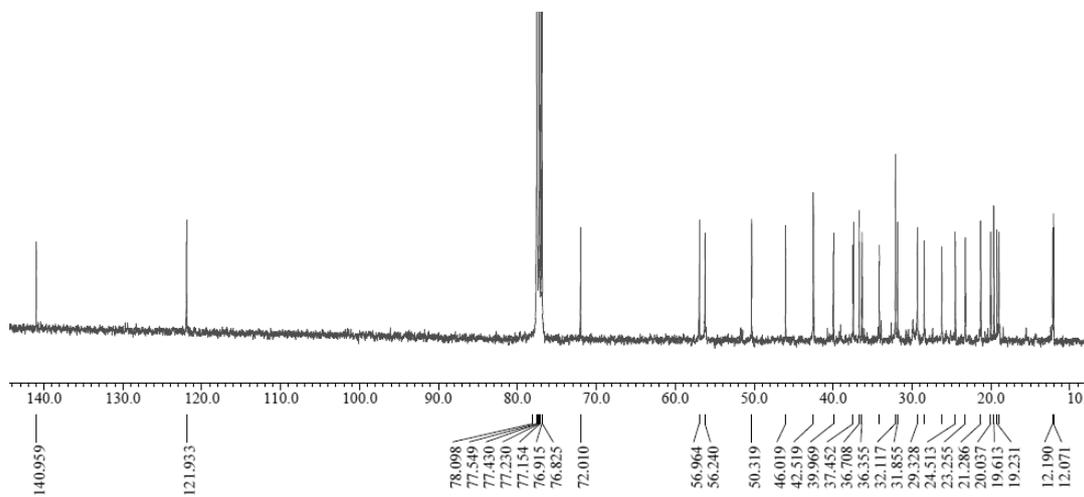


Figure 13. ^{13}C NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

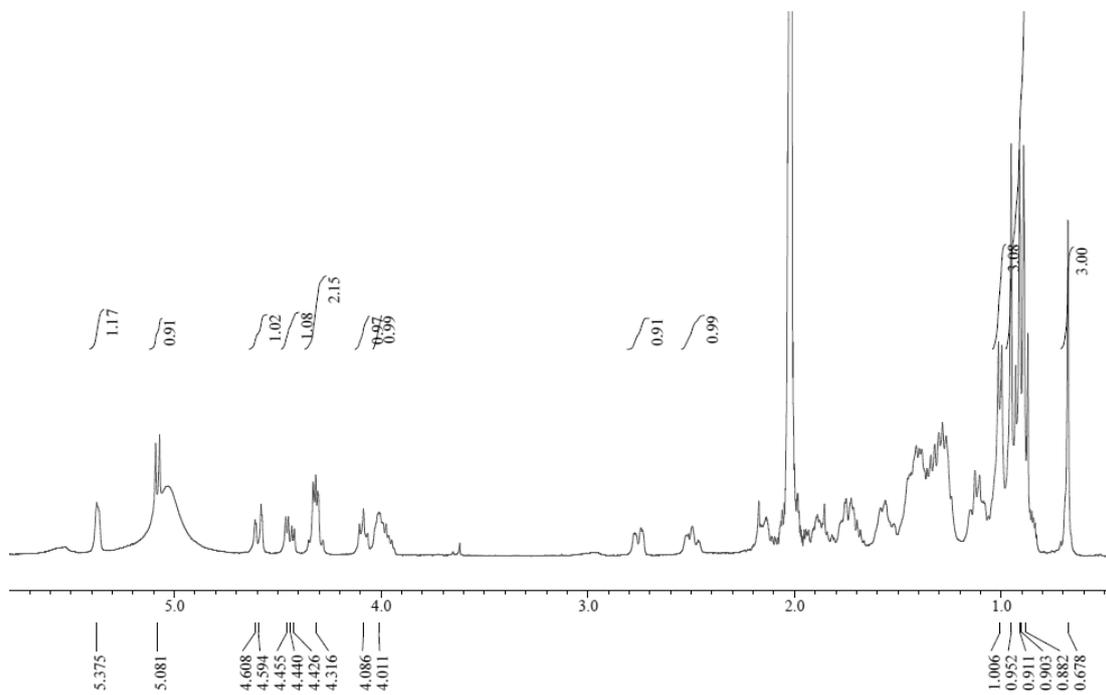


Figure 14. ^1H NMR spectrum of compound **3** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

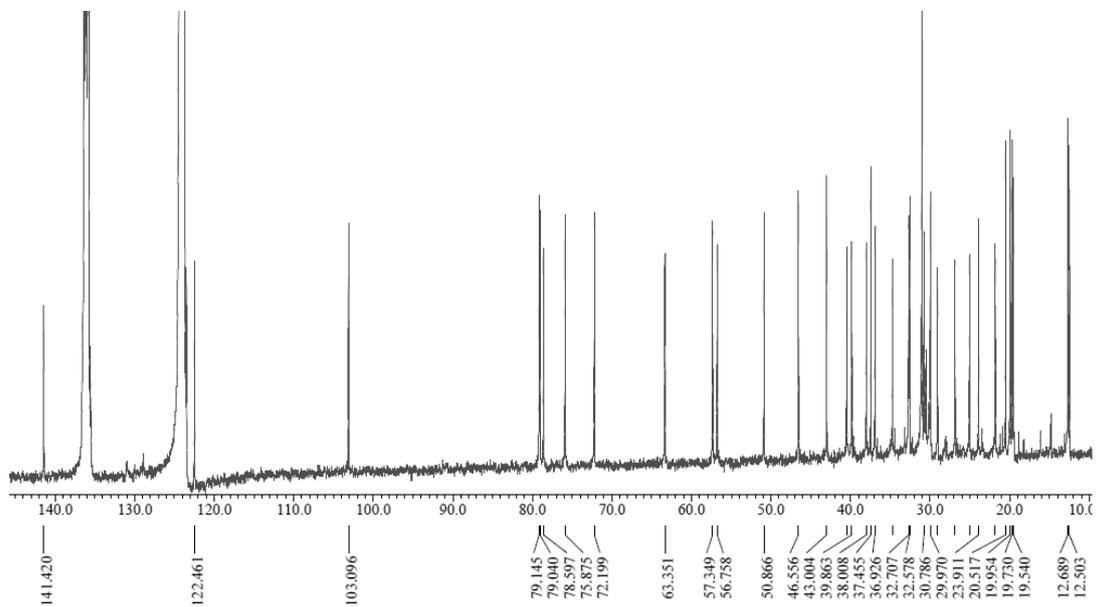
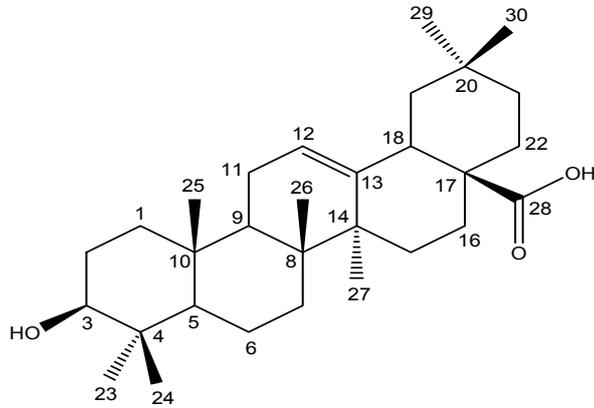


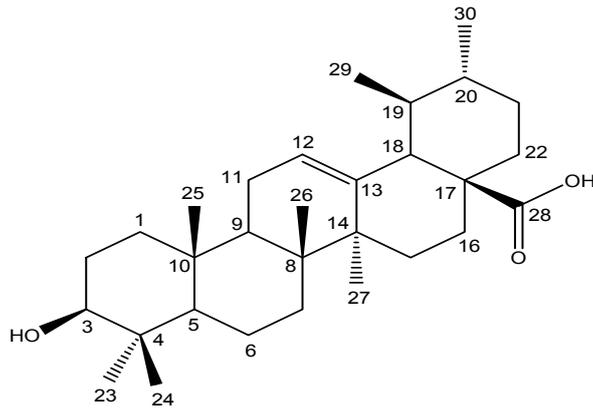
Figure 15. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

3) Compound 4 및 5의 구조 동정

Compound 4와 5는 혼합된 형태로 분리가 되었으며 ^{13}C NMR spectrum에서 총 60개의 carbon 피크가 관찰된 것으로 보아 triterpenoid가 2개 있을 것이라 예상하였다. 문헌를 통해^{22,23} compound 4와 5는 oleanolic acid 및 ursolic acid로 확인되었다(Figure 16-18, Table 3).



Compound 4



Compound 5

Figure 16. Chemical structures of compounds 4 and 5.

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **4** and **5** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 4 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)		Compound 5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		39.3		39.5
2		28.5		28.5
3	3.47 (1H, dd, 10.3, 6.0)	78.4	3.47 (1H, dd, 10.0, 6.0)	78.5
4		39.8		40.1
5		56.2		56.2
6		19.2		19.2
7		33.7		34.0
8		40.1		40.3
9		48.5		48.4
10		37.8		37.8
11		24.1		24.0
12	5.52 (1H, s)	122.9	5.51 (1H, s)	125.9
13		145.2		139.8
14		42.6		42.9
15		28.7	2.36 (1H, td, 13.5, 4.6)	29.1
16		24.1		25.3
17		47.1		48.4
18	3.33 (1H, dd, 13.7, 4.1)	42.4	2.66 (1H, d, 11.5)	53.9
19		46.9		39.9
20		31.4		39.8
21		34.6		31.5
22		33.6		37.7
23	1.27 (3H, s)	29.2	1.25 (3H, s)	29.2
24	1.05 (3H, s)	16.9	1.05 (3H, s)	17.0
25	0.91 (3H, s)	15.9	0.87 (3H, s)	16.1
26	1.00 (3H, s)	17.8	1.08 (3H, s)	17.8
27	1.31 (3H, s)	26.6	1.21 (3H, s)	24.3
28		180.8		180.3
29	0.97 (3H, s)	33.7	1.02 (3H, d, 4.1)	17.9
30	1.05 (3H, s)	24.1	0.98 (3H, d, 4.1)	21.8

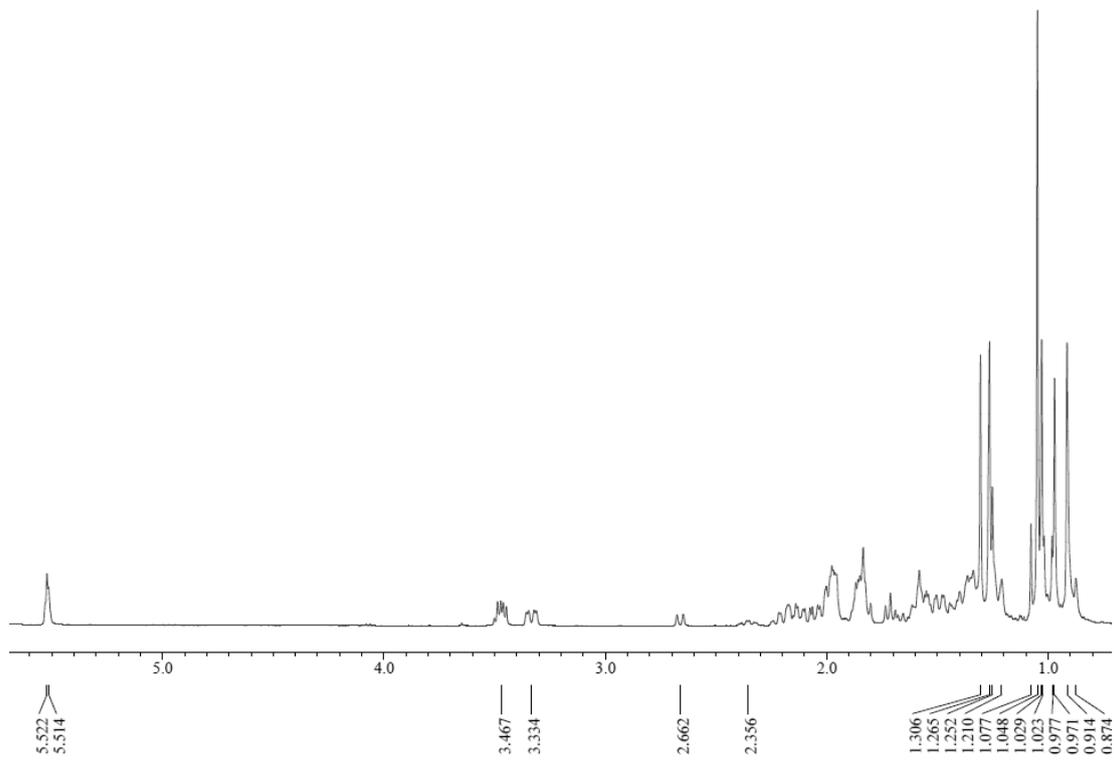


Figure 17. ^1H NMR spectrum of compounds **4** and **5** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

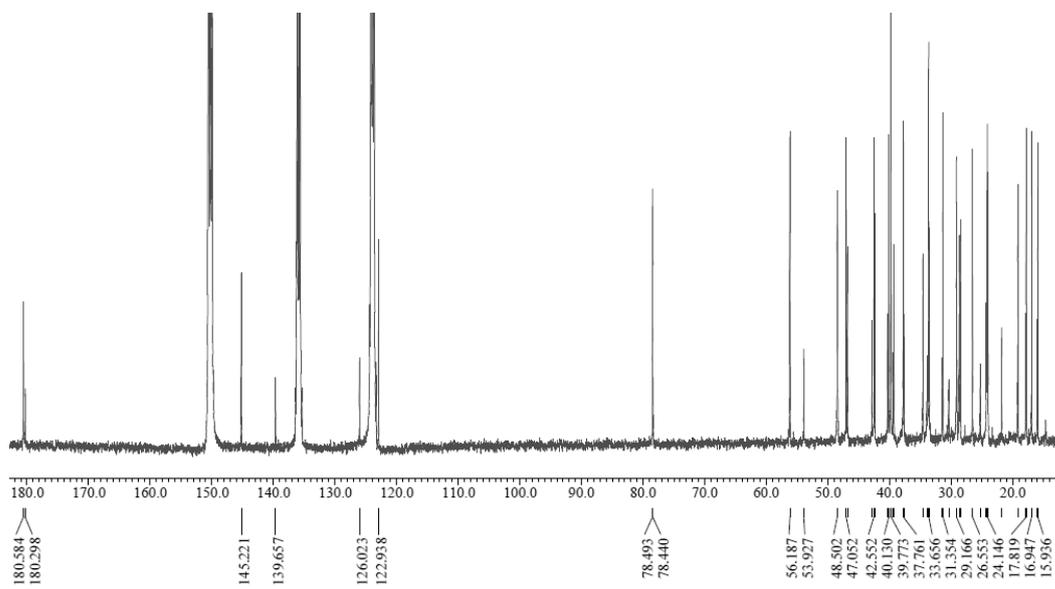
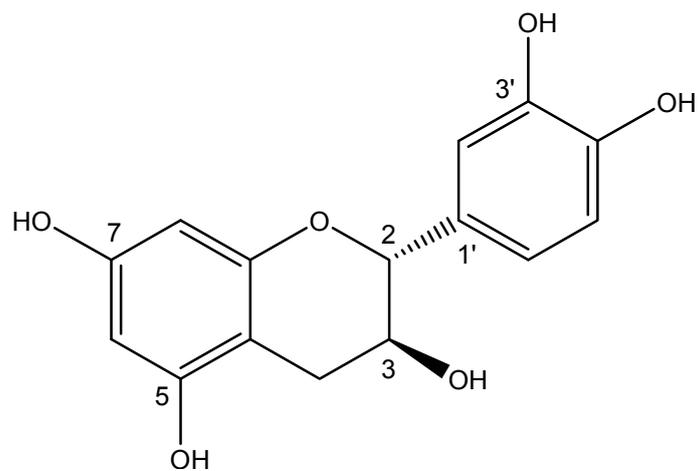


Figure 18. ^{13}C NMR spectrum of compounds **4** and **5** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

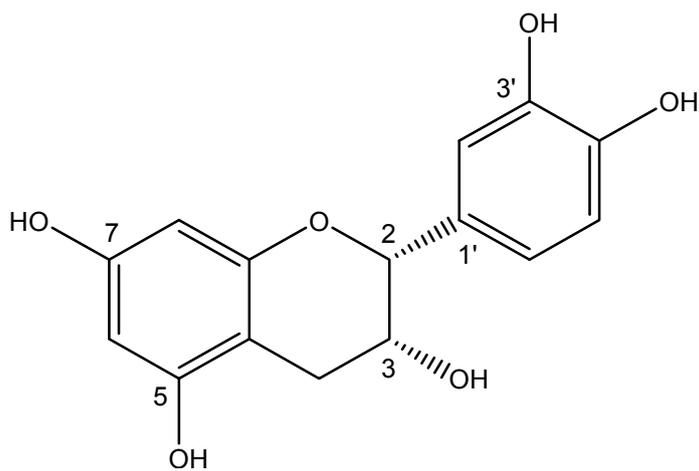
4) Compound 6 및 7의 구조 동정

Compound 6은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 15개의 carbon 피크가 관찰된 것을 보아 flavonoid 계열의 화합물로 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.84 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) 및 6.72 (1H, dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-와 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상할 수 있으며 δ_{H} 5.93 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 및 5.86 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. δ_{H} 2.85 (1H, dd $J = 5.5, 16.0$ Hz) 및 2.50 (1H, dd, $J = 8.2, 16.0$ Hz) 피크는 sp^3 혼성을 가지며 coupling constant 값을 통하여 한 개의 carbon에 화학적 환경이 서로 다른 2개의 proton이 있는 것으로 예상할 수 있었다. 이를 바탕으로 문헌과²⁴ 비교하여 compound 6은 catechin으로 확인하였다(Figure 19-21, Table 4).

Compound 7은 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 compound 6과 매우 유사한 화합물이라 예상하였고 그 중 δ_{H} 4.82 (1H, s) 피크를 통해 flavonoid의 2번 위치의 입체 구조가 다를 것이라 예상하였다. 이들 데이터를 통해 문헌과²⁴ 비교하여 compound 7은 compound 6의 입체이성질체인 *epi*-catechin으로 확인하였다(Figure 19, 22, 23, Table 4).



Compound 6



Compound 7

Figure 19. Chemical structures of compounds 6 and 7.

Table 4. ¹H and ¹³C NMR data of compounds **6** and **7** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 6 (CD ₃ OD)		Compound 7 (CD ₃ OD)	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2	4.56 (1H, d, 7.3)	82.9	4.82 (1H, s)	80.0
3	3.96–3.99 (1H, m)	68.8	4.17–4.19 (1H, m)	67.6
4	2.50 (1H, dd, 8.2, 16.0)	28.6	2.73 (1H, dd, 2.8, 16.9)	29.4
	2.85 (1H, dd, 5.5, 16.0)		2.86 (1H, dd, 4.6, 16.9)	
5		157.6		157.8
6	5.86 (1H, d, 2.3)	96.3	5.91 (1H, d, 2.3)	96.5
7		157.9		158.2
8	5.93 (1H, d, 2.3)	95.5	5.94 (1H, d, 2.3)	96.0
9		157.0		157.5
10		100.9		100.2
1'		132.2		132.4
2'	6.84 (1H, d, 1.8)	115.3	6.97 (1H, d, 1.8)	115.5
3'		146.3		145.9
4'		146.4		146.1
5'	6.76 (1H, d, 8.2)	116.1	6.76 (1H, d, 8.2)	116.0
6'	6.72 (1H, dd, 1.8, 8.2)	120.1	6.80 (1H, dd, 1.8, 8.5)	119.5

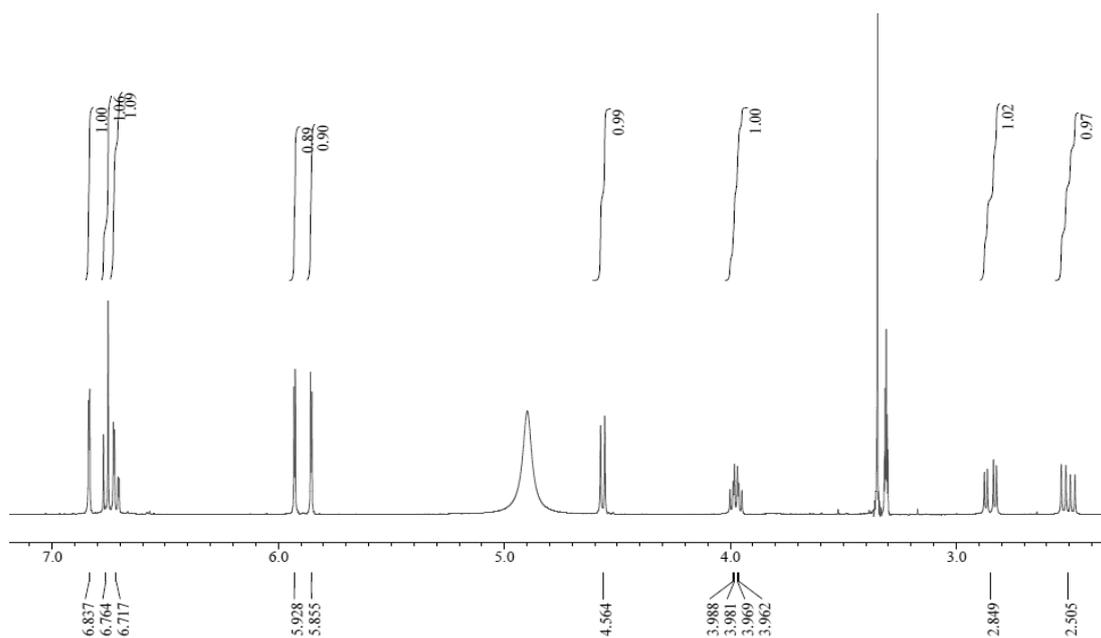


Figure 20. ^1H NMR spectrum of compound **6** (CD_3OD).

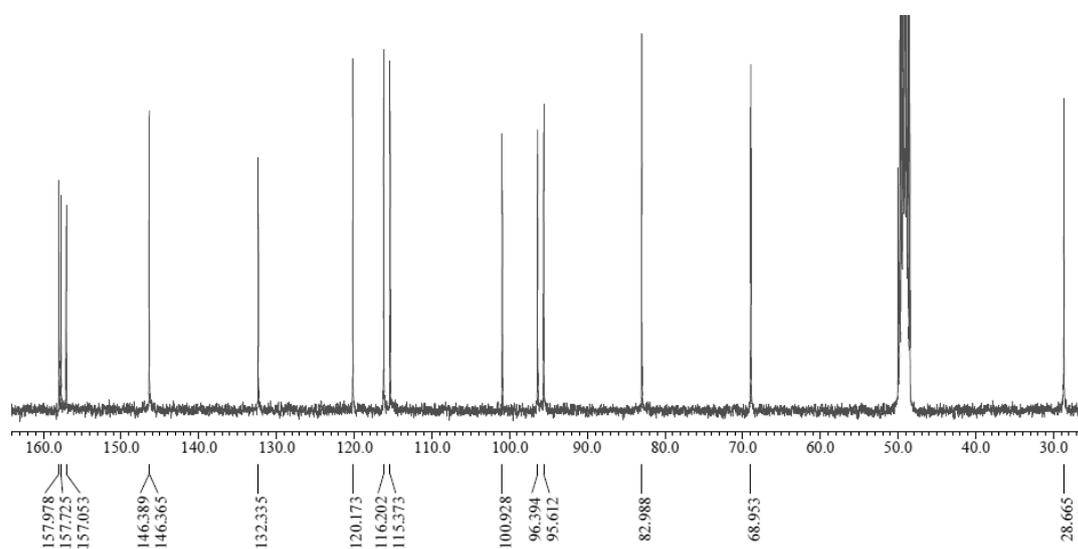


Figure 21. ^{13}C NMR spectrum of compound **7** (CD_3OD).

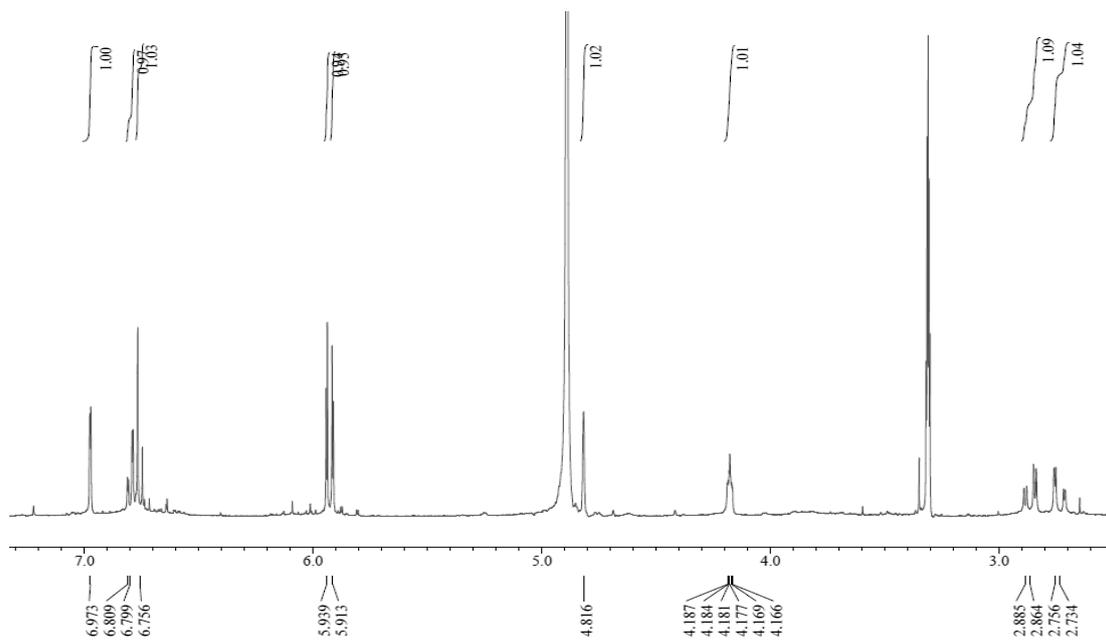


Figure 22. ^1H NMR spectrum of compound **6** (CD_3OD).

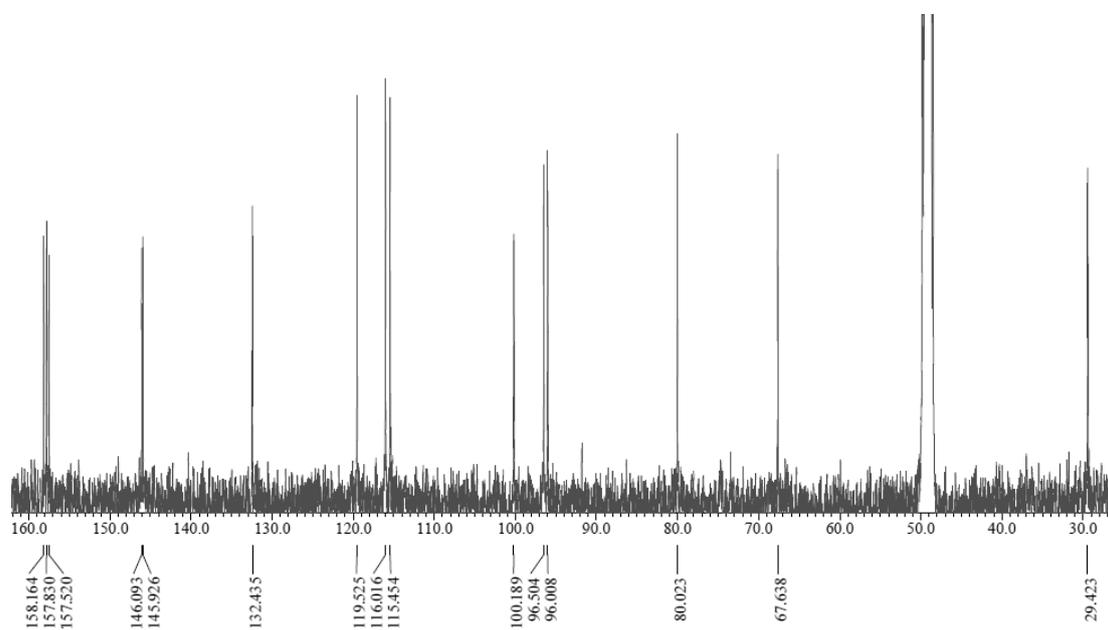


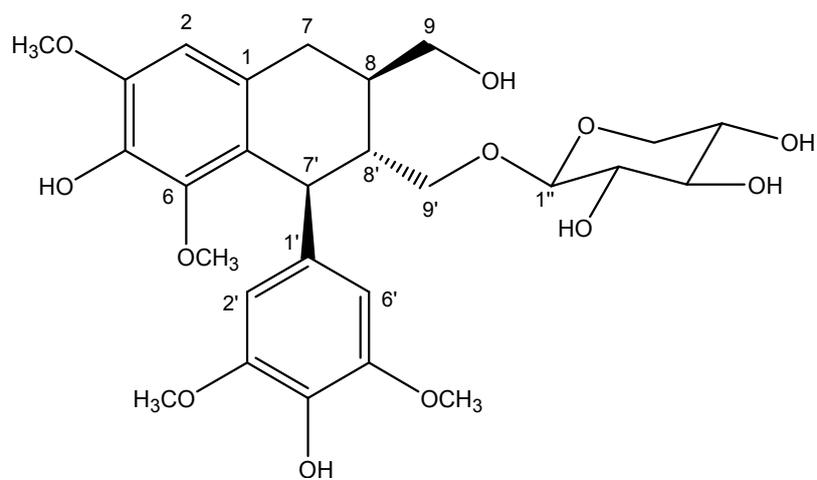
Figure 23. ^{13}C NMR spectrum of compound **7** (CD_3OD).

5) Compound 8의 구조 동정

Compound 8은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.57 (1H, s), 6.43 (2H, s)에 해당하는 대칭인 두 개의 피크를 포함하여 세 개의 aromatic proton이 관측되었다. 또한, δ_{H} 3.85 (3H, s), 3.74 (6H, s), 3.33 (3H, s)의 피크로 보아 대칭인 두 개의 methoxy group을 포함하여 총 4개의 methoxy group이 결합되어 있는 구조를 예상하였다. δ_{H} 4.22 (1H, d, 7.3) 및 δ_{H} 3.14-3.84 (5H)의 피크를 통해 β -form의 당이 결합되어 있을 것이라 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 3개의 피크를 포함하여 총 24개의 피크가 관찰되었고 DEPT (135°) NMR을 통해 δ_{C} 71.0, 67.1, 66.1, 34.1의 피크는 2차 carbon, δ_{C} 46.9, 43.2, 40.6의 피크는 3차 carbon임을 확인하였다. 또한, δ_{C} 126.5-141.9에 해당하는 9개의 피크는 4차 carbon임을 확인하였으며 그 중 149.1, 148.7, 147.7, 139.6, 139.1의 피크는 deshielding 된 것으로 보아 전기 음성도가 큰 산소와 인접한 carbon으로 methoxy group 이나 hydroxy group이 치환 되어 있을 것이라 예상할 수 있다.

이들 데이터를 바탕으로 문헌을 통해²⁵ compound 8은 대칭인 1개의 aromatic ring을 포함하는 lignan 계열의 화합물인 lyoniside (lyoniresinol-9'-O- β -D-xylopyranoside)로 확인하였다(Figure 26-29, Table 5).



Compound 8

Figure 24. Chemical structures of compound 8.

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **8** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 8 (CD_3OD)	
	δ_{H} (int. multi., J Hz)	δ_{C}
1		130.2
2	6.57 (1H, s)	107.9
3		147.7
4		139.0
5		148.7
6		126.5
7	2.65 (1H, dd, 11.5, 15.1)	34.1
	2.72 (1H, dd, 5.0, 15.3)	
8	1.71 (1H, m)	40.6
9	3.65 (1H, dd, 4.1, 11.0)	66.1
	3.55 (1H, dd, 6.4, 10.5)	
1'		139.6
2'	6.43 (1H, s)	107.0
3'		149.1
4'		134.5
5'		149.1
6'	6.43 (1H, s)	107.0
7'	4.38 (1H, d, 6.4)	43.2
8'	2.05 (1H, m)	46.9
9'	3.80–3.84 (1H, m)	71.0
	3.40–3.52 (1H, m)	
1''	4.22 (1H, d, 7.3)	105.7
2''	3.14–3.25 (1H, m)	75.1
3''	3.40–3.52 (1H, m)	78.2
4''	3.40–3.52 (1H, m)	71.4
5''	3.80–3.84 (1H, m)	67.1
	3.14–3.25 (1H, m)	
3-OCH ₃	3.85 (3H, s)	60.1
5-OCH ₃	3.33 (3H, s)	56.7
2'-OCH ₃	3.74 (3H, s)	56.9
6'-OCH ₃	3.74 (3H, s)	56.9

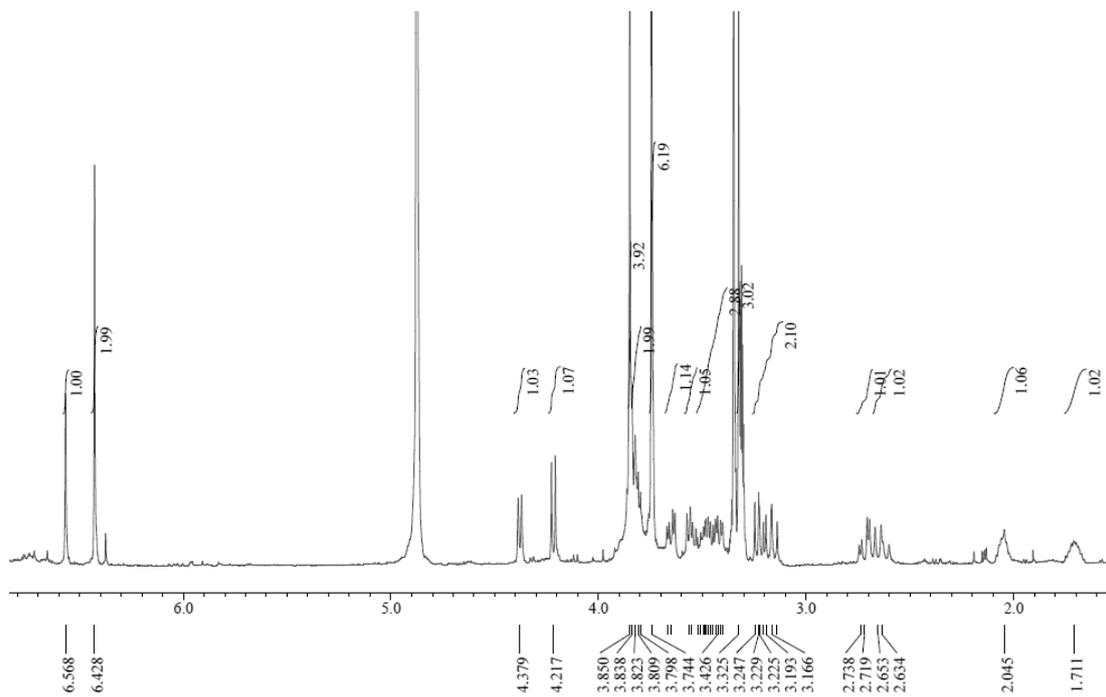


Figure 25. ^1H NMR spectrum of compound **8** (CD_3OD).

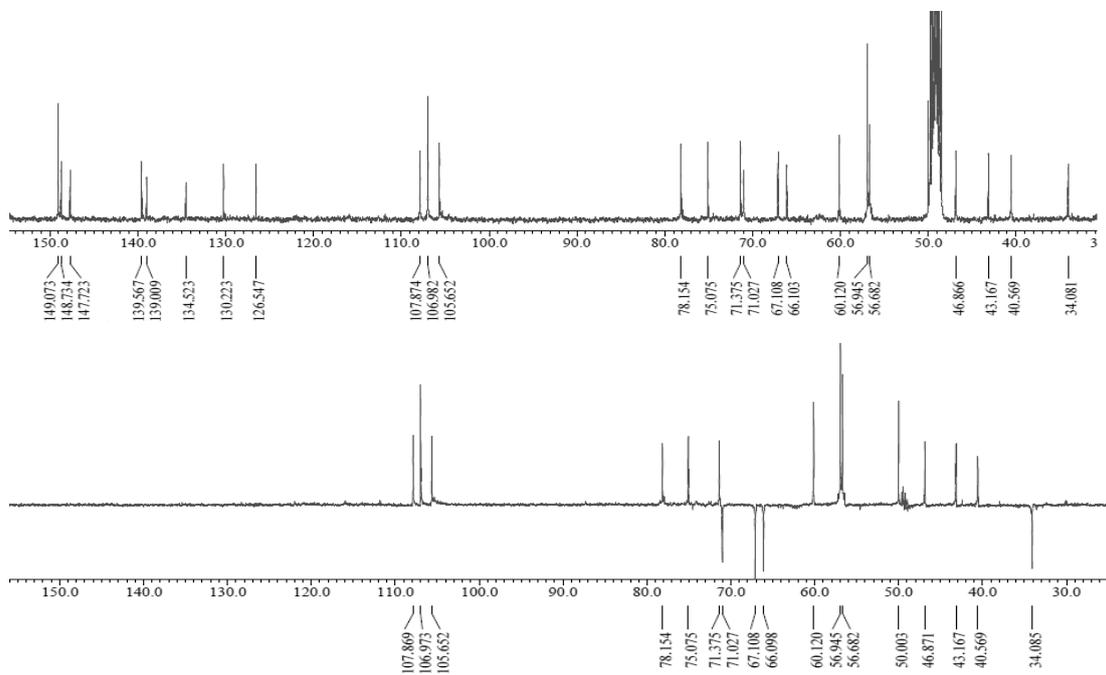


Figure 26. ^{13}C and DEPT (135°) NMR spectra of compound **8** (CD_3OD).

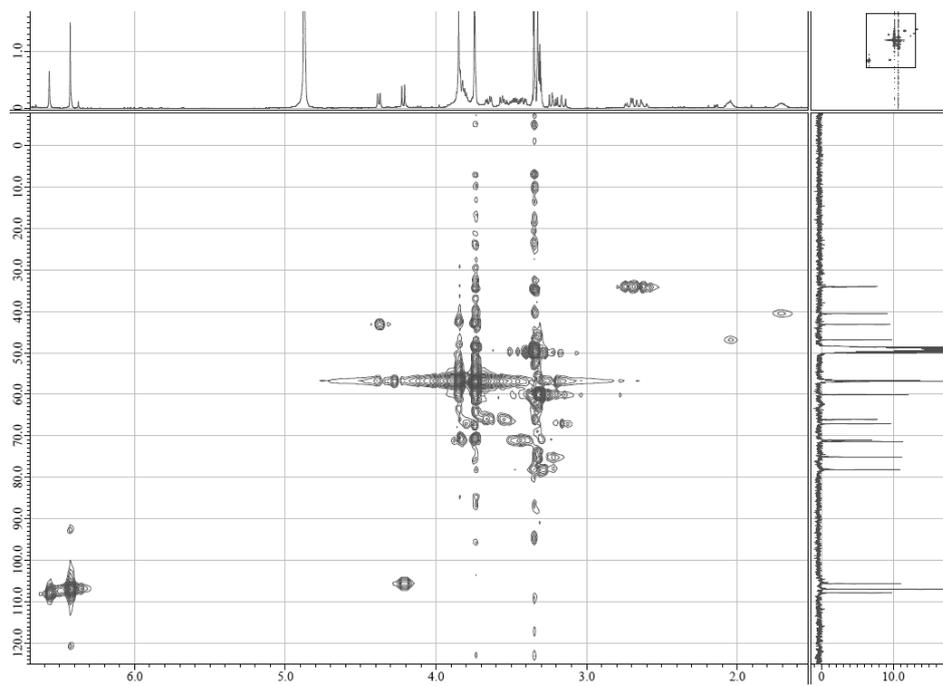


Figure 27. HMQC NMR spectrum of compound **8** (CD₃OD).

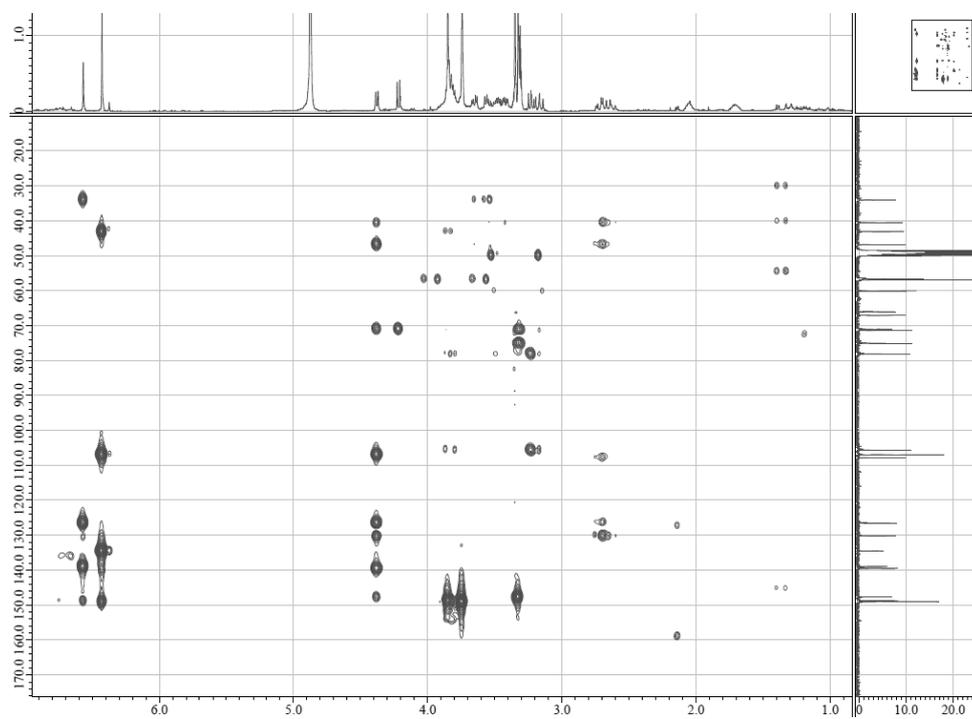


Figure 28. HMBC NMR spectrum of compound **8** (CD₃OD).

2. 항산화 활성 실험 결과

1) 등수국 줄기 추출물 및 분획물의 활성 실험

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀은 gallic acid를 표준물질로 한 표준검정곡선을 이용하여 등수국 줄기의 추출물 및 분획물에 함유되어있는 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 측정된 값은 각 시료의 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 61.5, 69.9±1.3, 69.6±1.0 mg/g GAE로 다른 분획물들에 비해 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와 연관이 있을 것으로 예상하였다(Figure 30).

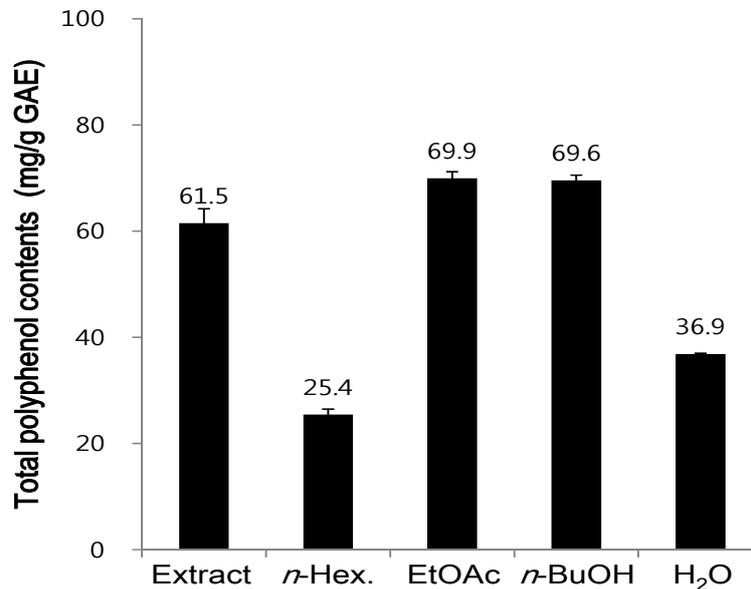


Figure 29. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *Hydrangea petiolaris* stems. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드는 quercetin을 표준물질로 한 표준검정곡선을 이용하여 등수국 줄기의 추출물 및 분획물에 함유되어있는 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 측정된 값은 각 시료의 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산해서 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물에서 91.1 ± 5.5 mg/g QE로 추출물 및 다른 분획물들에 비해 가장 많은 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 31).

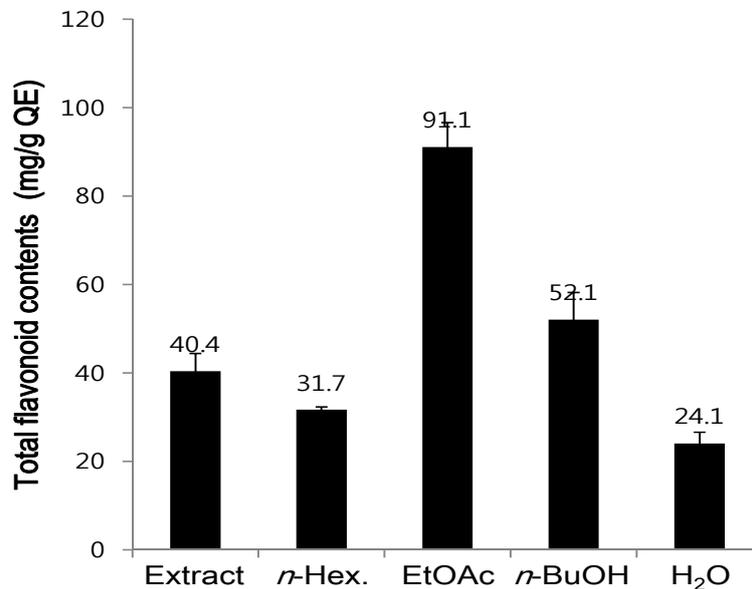


Figure 30. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *Hydrangea petiolaris* stems. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

등수국 줄기 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 6.25-100 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물, EtOAc 및 n-BuOH 분획물에서 SC₅₀ 값이 각각 79.0, 36.3, 28.8 µg/mL로 다른 분획물들에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 32). 이는 총 폴리페놀 함량 측정 결과와 유사한 경향을 나타낸 것으로 보아 DPPH radical 소거 활성은 플라보노이드 보다 폴리페놀에 의한 영향을 더 받는 것으로 판단된다.

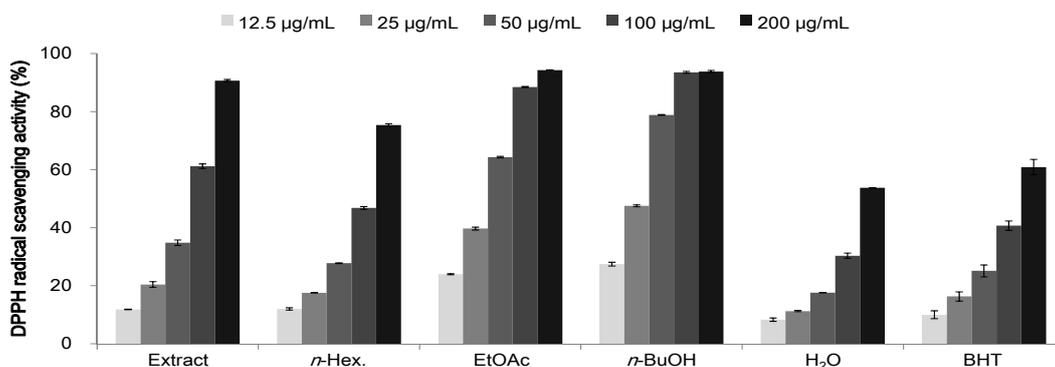


Figure 31. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from *Hydrangea petiolaris* stems. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 6. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *Hydrangea petiolaris* stems.

	Extract	n-Hex	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	79.0	106.7	36.3	28.8	183.4	122.8

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

등수국 줄기 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 6.25–100 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀값을 계산하였다. 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀값이 각각 13.4, 12.7 µg/mL로 추출물 및 다른 분획물들에 비해 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성이 나타났다(Figure 33, Table 7).

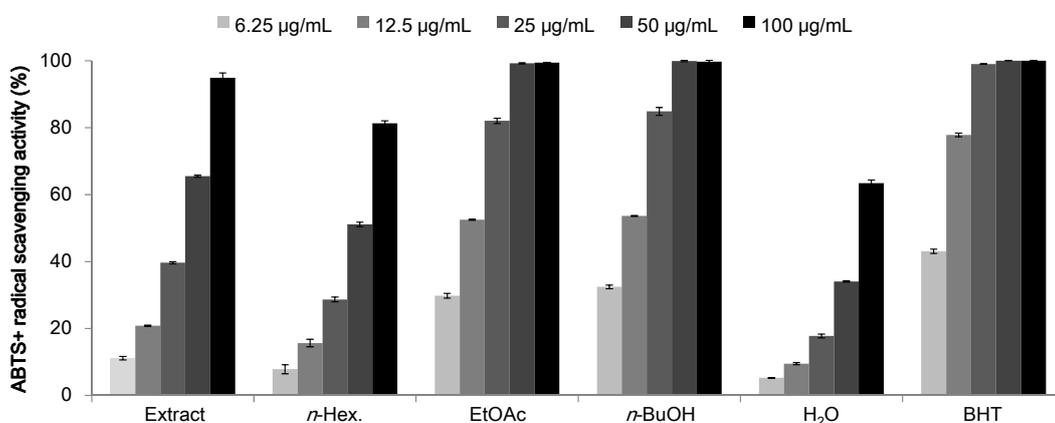


Figure 32. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from *Hydrangea petiolaris* stems. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 7. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *Hydrangea petiolaris* stems.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	36.2	56.1	13.4	12.7	77.4	7.8

2) 분리된 화합물의 활성 실험 결과

(1) DPPH radical 소거 활성 측정

등수국 줄기로부터 분리된 화합물에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 시료의 농도는 6.25-100.0 μM 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC_{50} 값을 계산하였다. 실험 결과, compound 6-8의 SC_{50} 값이 63.5, 73.1, 77.1 μM 로 DPPH radical 소거 활성이 있는 것을 확인하였다(Figure 34, Table 8).

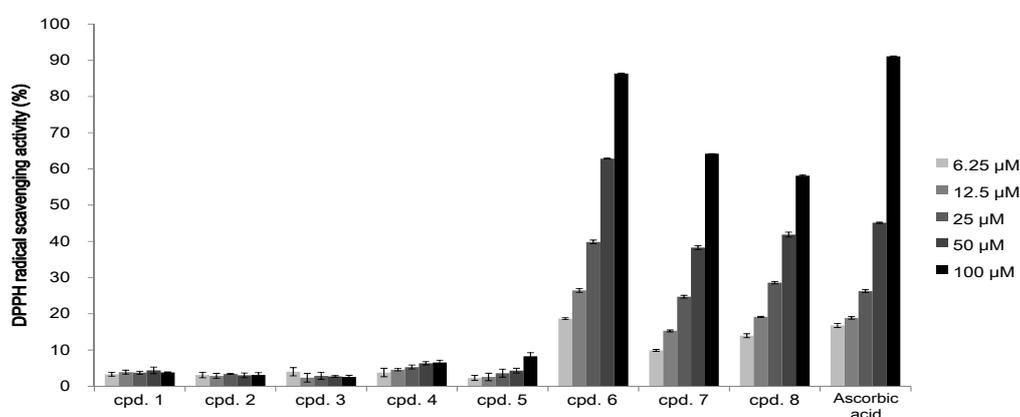


Figure 33. DPPH radical scavenging activity of the compound 6-8. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 8. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activity for the compound 6-8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	Ascorbic acid
SC_{50} (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	36.5	73.1	61.7	51.6

(methyl linoleate 1; β -sitosterol 2; daucosterol 3; oleanolic acid 4; ursolic acid 5; catechin 6; *epi*-catechin 7; lyoniside 8)

(2) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

등수국 줄기로부터 분리된 화합물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거활성을 측정하였다. 시료의 농도는 6.25-100.0 μM의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, compound 6-8의 SC₅₀ 값이 19.9, 42.0, 24.9 μM로 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있는 것을 확인하였다(Figure 35, Table 9).

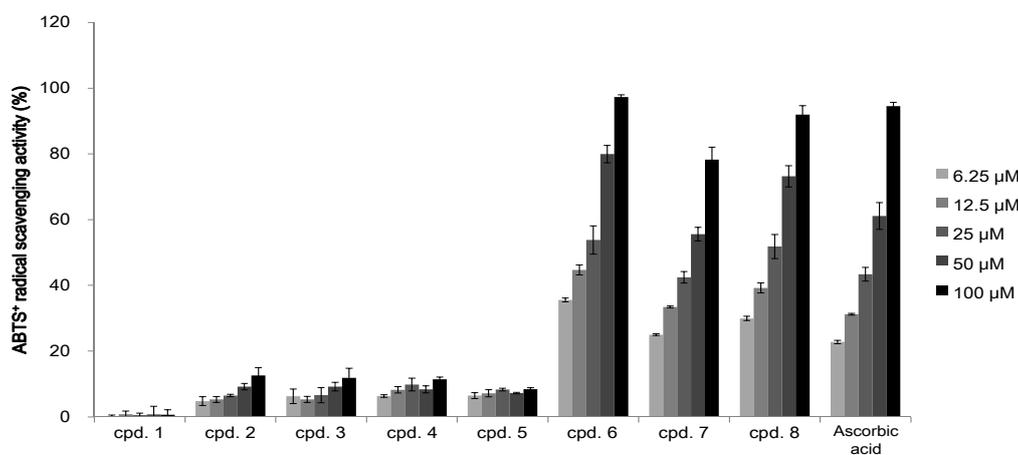


Figure 34. ABTS⁺ radical scavenging activity of the compound 6-8. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 9. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activity for the compound 6-8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	Ascorbic acid
SC ₅₀ (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	19.9	42.0	24.9	36.2

(methyl linoleate 1; β-sitosterol 2; daucosterol 3; oleanolic acid 4; ursolic acid 5; catechin 6; *epi*-catechin 7; lyoniside 8)

2) 항염 활성 실험 결과

(1) Nitric Oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW264.7 cell을 이용하여 등수국 줄기의 추출물 및 분획물에 대해 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성 (MTT assay)을 확인하였다. 먼저, 추출물 및 각 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 NO 생성을 현저히 저해했지만 세포 독성이 나타나 세포 독성이 없는 범위에서 추가 실험을 진행하였다. 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 12.5–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, IC_{50} 값은 각각 31.0, 36.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Figure 36, 37).

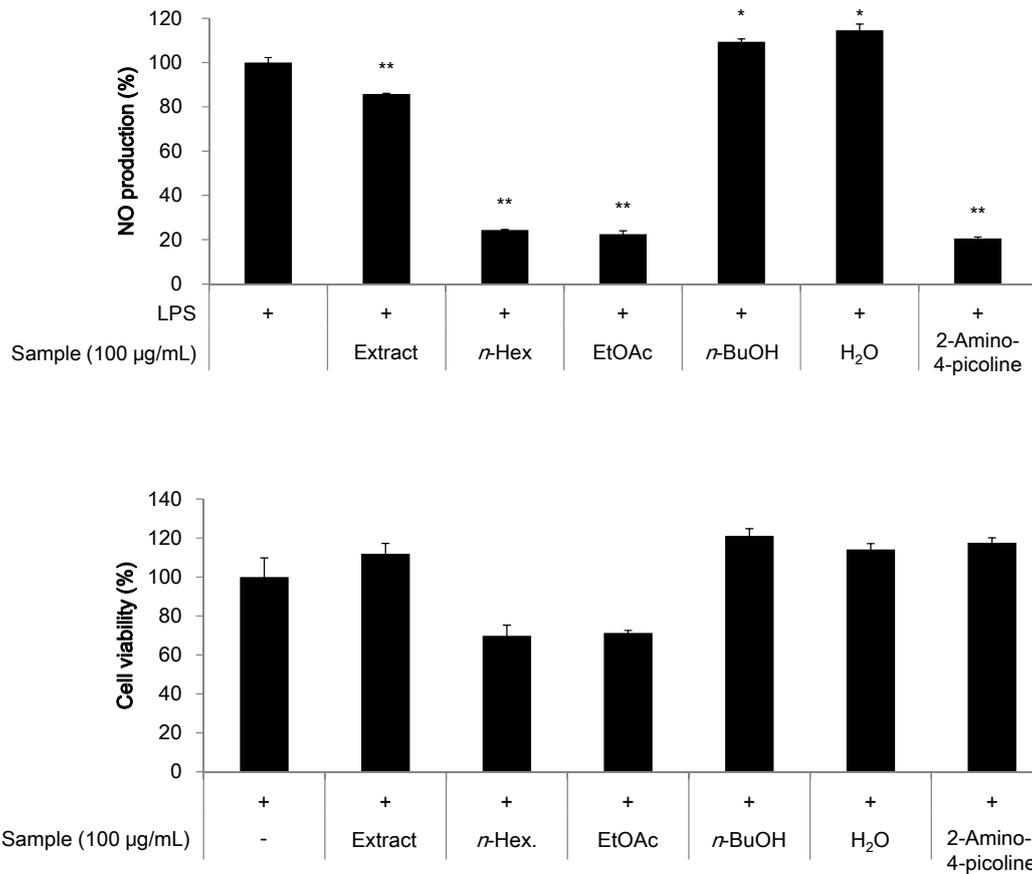


Figure 35. Effects of extract and solvent layers from *Hydrangea petiolaris* stems on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *Hydrangea petiolaris* stems and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. *p < 0.05; **p < 0.01

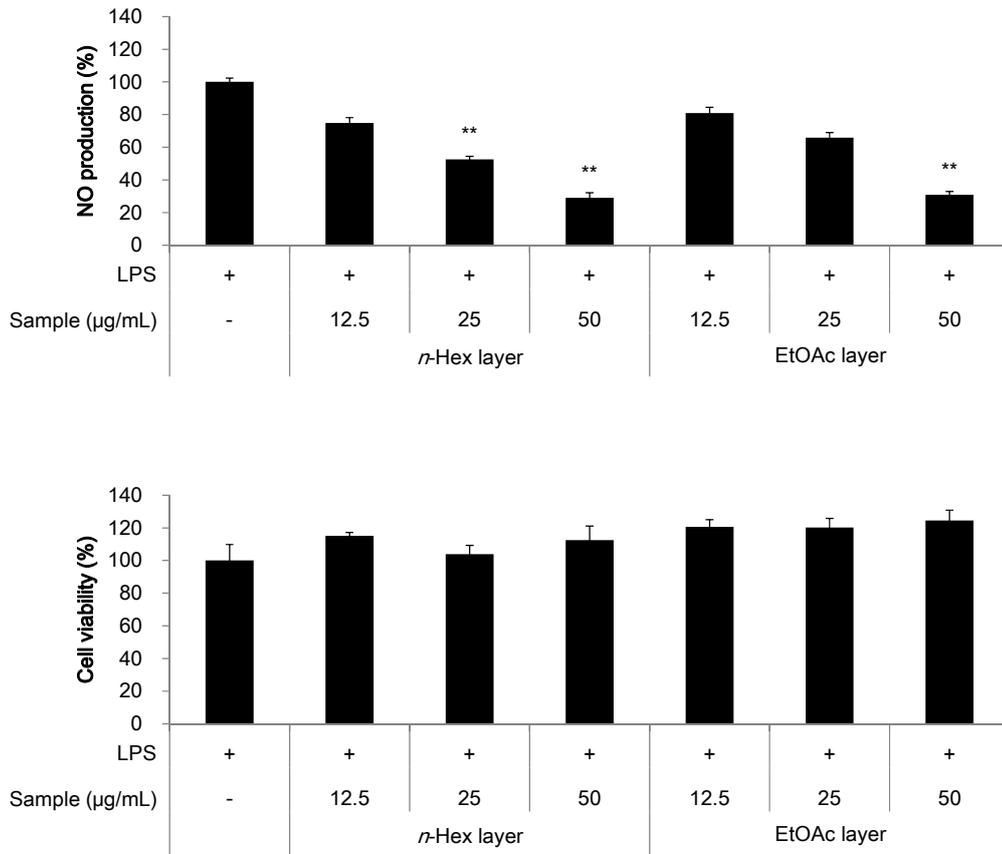
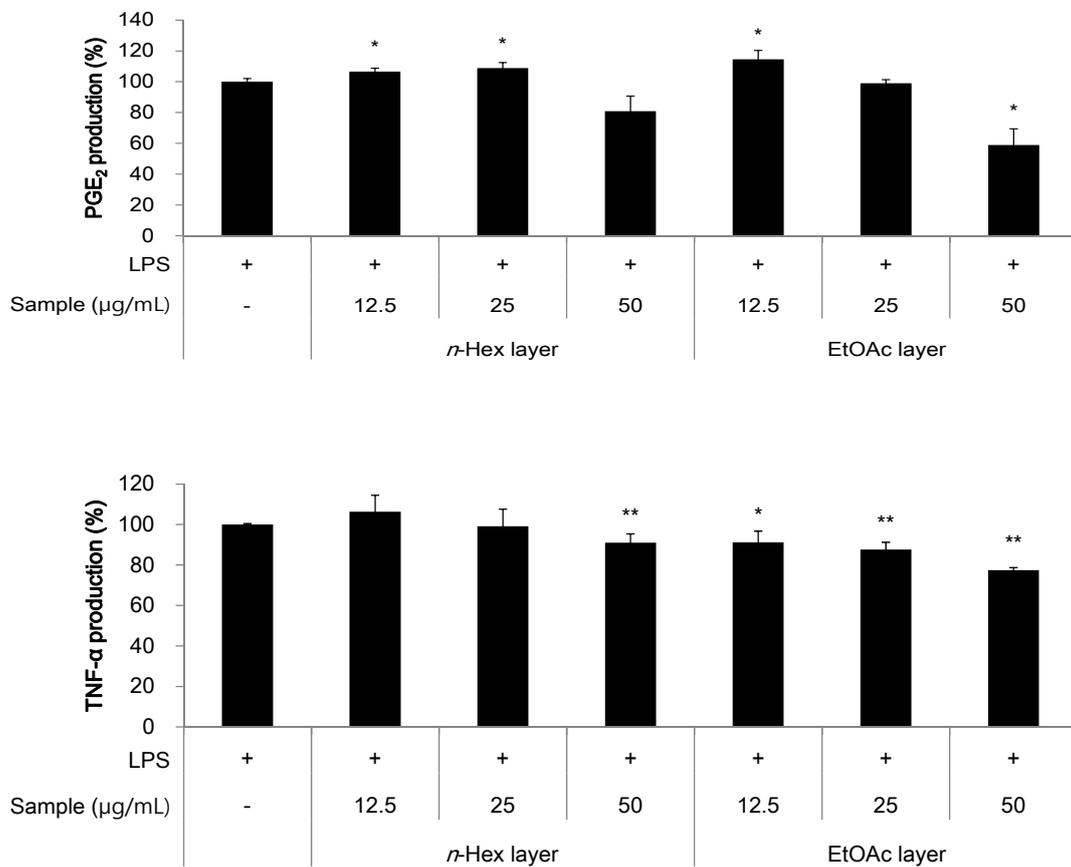


Figure 36. Effects of *n*-Hex and EtOAc layers from *Hydrangea petiolaris* stems on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc layers from *Hydrangea petiolaris* stems for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. *p < 0.05; **p < 0.01

(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 활성

NO 생성 억제 효과를 보인 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6)에 대한 억제 활성을 sandwich ELISA kit를 이용해 측정하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물 50 µg/mL 농도에서 PGE₂ 및 IL-1β를 각각 약 19%, 22%를 저해했으며, EtOAc 분획물 50 µg/mL 농도에서는 PGE₂, TNF-α 및 IL-1β를 각각 약 41%, 23%, 35%를 저해했다(Figure 38).



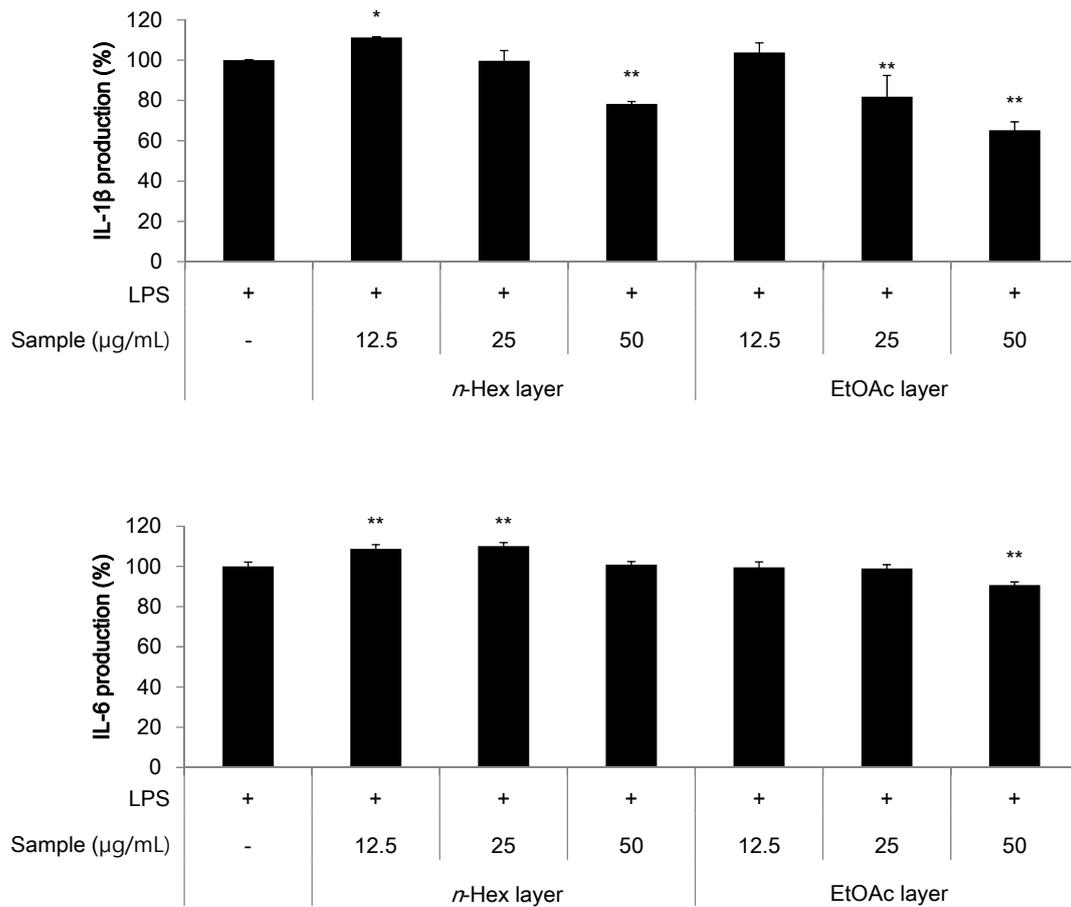


Figure 37. Effects of *n*-Hex and EtOAc layers from *Hydrangea petiolaris* stems on PGE₂, TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc layers from *Hydrangea petiolaris* stems for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. *p < 0.05; **p < 0.01

(3) iNOS 단백질 발현 억제 활성

등수국 줄기 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 NO 생성과 관련된 단백질 효소인 iNOS 발현을 저해하는지 확인하기 위해 western blot analysis를 진행하였다. 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 NO 생성 억제와 유사한 경향으로 iNOS 단백질 발현을 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다(Figure 39).

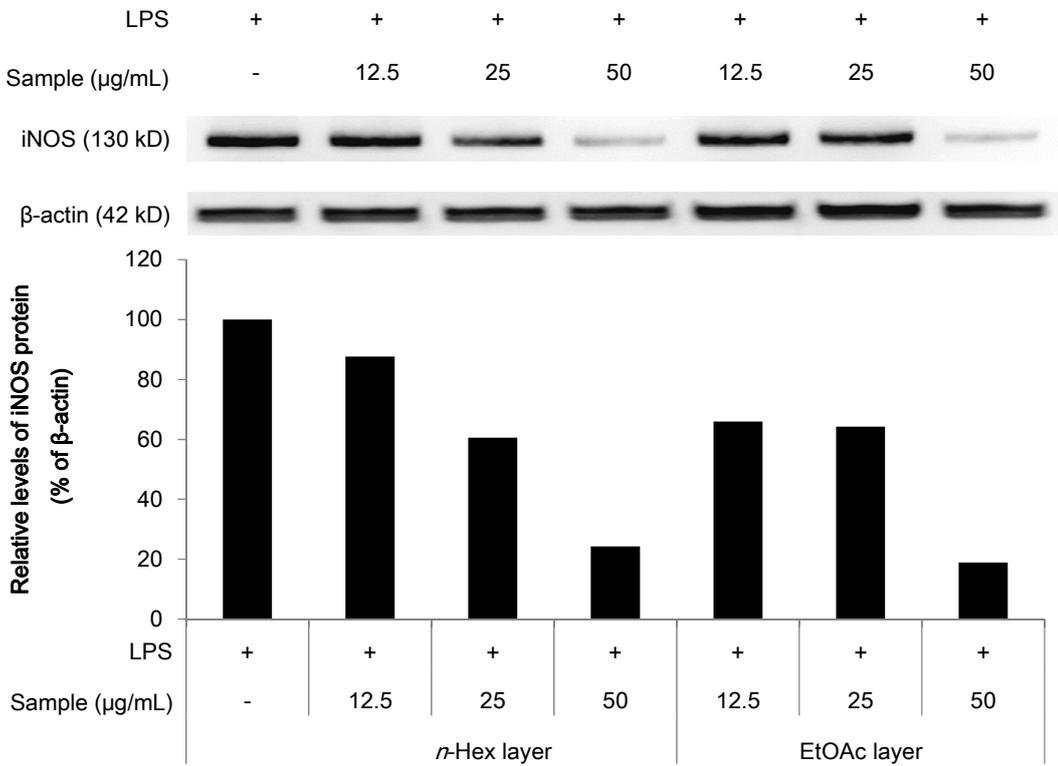


Figure 38. Effects of EtOAc layer from *Hydrangea petiolaris* stems on levels of iNOS protein in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc layers from *Hydrangea petiolaris* stems for 24 h. Whole cell lysates (20 µg) were prepared and the protein was subjected to 10% SDS-PAGE; expression of iNOS and β-actin were determined by western blotting. β-actin served as a loading control.

3) 미백 활성 실험 결과

(1) Melanogenesis 억제 활성

B16F10 melanoma cell을 이용하여 등수국 줄기의 추출물 및 분획물에 대해 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포 독성 (MTT assay)을 확인하였다. 먼저, 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 멜라닌 생성을 현저히 저해했지만 세포 독성이 나타나 세포 독성이 없는 범위에서 추가 실험을 진행하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물이 10-40 µg/mL 농도에서 세포 독성 없이 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 40, 41).

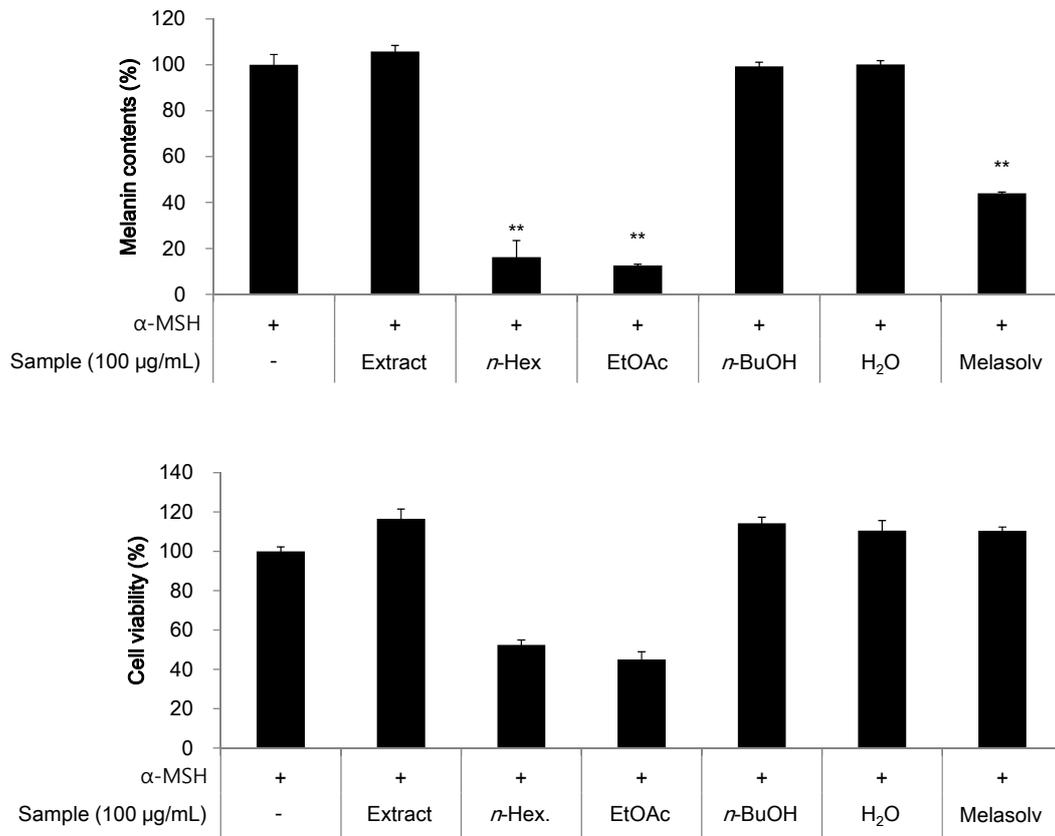
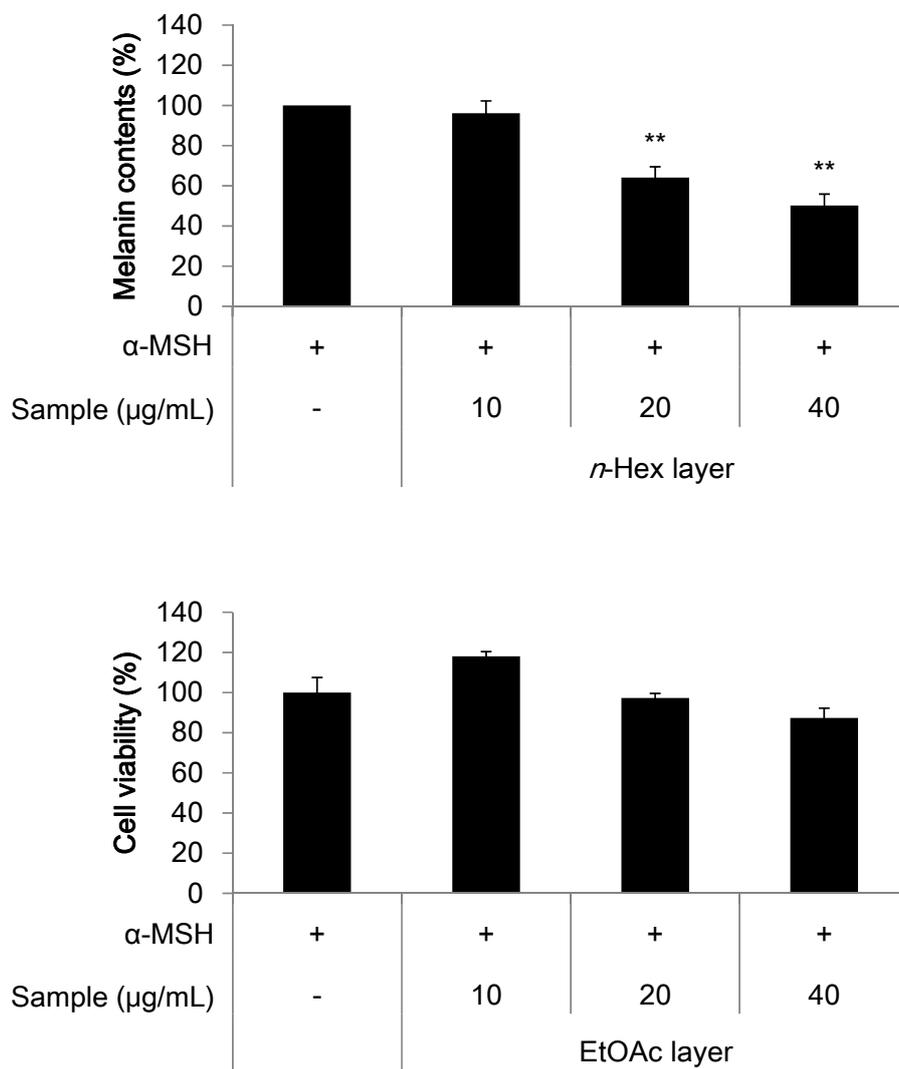


Figure 39. Effects of extract and solvent layers from *Hydrangea petiolaris* stems on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated with 100 μ M of α -MSH only, or with α -MSH plus *Hydrangea petiolaris* stems and melasolv (positive control, 20 μ M) for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



Figuer 40. Effects of n-Hex layers from *Hydrangea petiolaris* stems on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated with 100 μ M of α -MSH only, or with α -MSH plus *Hydrangea petiolaris* stems for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. *p < 0.05; **p < 0.01

(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성

세포 독성 없이 멜라닌 생성을 억제한 *n*-Hex 분획물의 농도 10-40 $\mu\text{g/mL}$ 에 대하여 세포 내 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물이 멜라닌 생성 억제와 유사한 경향으로 세포 내 tyrosinase의 활성을 농도의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다(Figure 41).

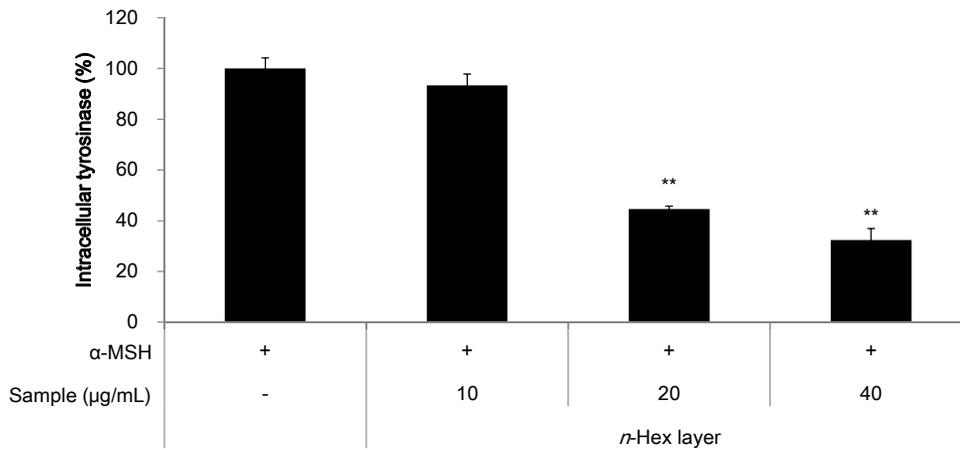


Figure 41. Intracellular tyrosinase activity of *n*-Hex layer from *Hydrangea petiolaris* stems in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

IV. 요약 및 결론

수국과(*Hydrangea*)에 속하는 식물들은 주로 관상용으로 사용되어 왔으나 근래에는 수국의 잎, 줄기 및 뿌리를 생약으로 이용하여 그 약리 효능이 주목되고 있다.²⁶ 수국의 종류는 아시아 및 북아메리카를 포함하여 약 40여 종이 있고 국내에는 산수국, 바위수국, 감차수국 등이 있다. 국내에서 상업적으로 이용 가능한 수국은 수국차라 불리는 감차수국(*Hydrangea serrata seringe* var. *thunbergii sugimoto*)이 주를 이루며 이러한 수국과 식물들의 주요 성분으로는 thunberginol, phyllo dulcin, hydrangenol과 같은 isocoumarin 계열과 rutin, kaempferol, quercetin 등이 포함된 flavonoid가 있는데 이러한 물질들은 감미, 항균, 항암, 항알레르기, 항산화 등 다양한 생리 활성을 가지고 있다.^{27,28}

이에 따라 국내에 자생하고 다양한 효능을 나타내면서 상업적으로도 활용 가치가 있는 천연 소재를 찾기 위해 수국과의 한 종류인 등수국(*Hydrangea petiolaris*)을 이용하여 연구를 진행하였다.

본 연구에 사용된 등수국은 효능 및 성분에 대한 선행 연구가 되어 있지 않아 등수국의 줄기를 이용하여 추출 및 용매 분획하였으며, 추출물 및 분획물을 이용하여 피부 관련 효능 검색 및 이들의 유효 성분을 분리·동정하였다. 분리된 VLC, MPLC 및 open column chromatography를 이용해 진행하였고 분리된 화합물은 ¹H, ¹³C NMR 및 문헌을 통해 구조를 확인하였다. 그 결과, 등수국 줄기로부터 methyl linoleate (1), β-sitosterol (2), daucosterol (3), oleanolic acid (4), ursolic acid (5), catechin (6), *epi*-catechin (7), lyoniside (8)을 분리하였다. 이 화합물들은 각각 불포화 지방산, 스테로이드, 트리테페노이드 및 폴리페놀 계열에 속하며 미백, 항염, 항암, 항균 및 항산화 등 다양한 효과들을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구를 통해 등수국 줄기에서 분리된 화합물들은 항염, 항산화 및 미백 효과가 있는 것이 확인되었고, 추가적인 연구를 통해 다양한 효능 및 유효 성분을 확인할 수 있을 것이라 판단된다.

DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험을 통하여 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물 및 분리된 화합물에서 우수한 항산화 효과가 있는 것을 확인하

였다. 보고에 따르면 폴리페놀 화합물이 항산화 효과가 우수하고 이는 폴리페놀의 페닐기(phenyl group)에 결합한 hydroxy group(-OH)에 의해 라디칼과 반응하여 전자를 잃어도 페닐기의 공명 구조로 인해 전자 비편재화 되어 안정한 구조를 유지할 수 있기 때문이다. 이는 등수국 줄기로부터 분리된 catechin, *epi*-catechin, lyoniside가 폴리페놀에 속하며 그로 인해 등수국 줄기 추출물 및 EtOAc 분획물에서 항산화 효과와 관련이 있는 것으로 보인다.

RAW264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험을 통해 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 NO, PGE₂ 및 전염증성 cytokine (IL-1 β , TNF- α) 생성을 억제하는 것을 확인하였으며 iNOS 단백질 발현도 저해하는 것으로 확인하였다. 이는 분리된 화합물들 중 β -sitosterol 및 daucosterol이 스테로이드 계열의 물질이며 스테로이드 화합물은 항염 효과 및 면역조절 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.^{29,30} 또한, 리그난 화합물은 항염 및 항산화에 대한 효능이 알려져 있고 리그난 계열에 속하는 lyoniside도 문헌을 통해 항염 활성이 있는 것으로 확인되었다.³¹ 이로 인해 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 항염 활성은 이들 화합물들의 영향이 있을 것으로 판단된다.

B16F10 melanoma 세포를 이용한 미백 활성 실험에서는 *n*-Hex 분획물이 멜라닌 생성 및 세포 내 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 확인하였다. 불포화 지방산 화합물은 미백 효과가 우수하여 단일 혹은 혼합된 형태의 오일 성분으로 사용하고 있다고 알려져 있다.³² *n*-Hex 분획물로부터 분리된 methyl linoleate 역시 불포화 지방산인 성분으로 tyrosinase, TRP-1, MITF 등 멜라닌 생합성과 관련된 다양한 작용 기전들의 발현을 저해하는 것으로 보고되어 있다.³³

본 연구 결과를 바탕으로 등수국 줄기 추출물 및 분획물에서 항산화, 항염 및 미백에 대한 효능을 확인하였다. 따라서 등수국을 이용하여 지피식물로서의 관상용뿐만 아니라 다양한 효능을 이용한 건강기능식품, 화장품 및 의약품 등 상업적으로 쓰일 수 있는 천연 소재로 활용이 가능할 것이라 사료된다.

V. 참고문헌

1. 김은아, 식물생리활성영양소와 미용기능식품, 식품과학과 산업 **2007**, 12월호.
2. Na H. S.; Kim J. Y.; Yun S. H.; Park H. J.; Choi G. C.; Yang S. I.; Lee J. H.; Cho J. Y. Phytochemical contents of agricultural products cultivated by region, *Korean J Food Preserv* **2013**, *20(4)*, 451-458.
3. Kim M. B.; Hyun S. H.; Park J. S.; Kang M. A.; Ko Y. H.; Lim S. B. 제주 자생식물 고압 용매 추출물의 통합적 항산화 능력, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2008**, *37(11)*, 1497-1496.
4. Meydani, S. N. 1990. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions, *Nutr. Rev.* **1990**, *48*, 361-369.
5. Ljung, T.; Lundberg, S.; Varsanyi, M.; Johansson, C.; Schmidt, P. T.; Herulf, M.; Lundberg, J. O.; Hellstrom, P. M. Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus nonresponders. *World J. Gastroenterol* **2006**, *12*, 3386-3392
6. Kim Y. S.; Lee S. J.; Hwang J. W.; Kim E. H.; Park P. J.; Jeong J. H. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2012**, *4*, 1205-1210.
7. 강현우, 팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성, *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **2012**, *41(8)*, 1072-1078.
8. Brown D. A. Skin pigmentation enhancers, *J. Photochem. Photobiol, B. Biol.* **2001**, *63*, 148-161.
9. Cabanes J.; Chazarra S.; Garxia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol* **1994**, *46*, 982-985.
10. Kim K. Y.; Lee N. K.; 멜라닌 생성과 제어에 영향을 미치는 한방추출물 연구 동향, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol* **2014**, *12(4)*, 453-461.
11. Cho J. S.; Jeong J. H.; Kim S. Y.; Lee J. Y.; Lee. C. H. 등수국의 종자발아에 미치는 몇 가지 요인, *Korean J. Plant Res.* **2014**, *27(5)*, 534-539.

12. Kim D. H.; Park H. J.; Jung J. W.; Lee S. H. Effect of the Extract of *Hydrangea Dulcis Folium* on Alcohol-induced Psychiatric Deficits, *Journal of Life Science* **2017**, *27(3)*, 355–360.
13. Matsuda, H.; Shimoda, H.; Yamahara, J.; Yoshikawa. M. Effects of Phyllo dulcin, Hydrangenol, and their 8-O-Glucosides, and Thunberginols A and F from *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. thunbergii MAKINO on Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction in Rats, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1999**, *22(8)*, 870–872.
14. Murakami N.; Mostaqul H. M.; Tamura S.; Itagak S.; Horiib T.; Kobayashi M. New Anti-Malarial Flavonol Glycoside from *Hydrangeae Dulcis Folium*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 2445–2447.
15. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* **1981**, *58*, 966–968.
16. 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 Ca²⁺-ATPase activity, *Cell Calcium* **1983**, *4*, 71–81.
17. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200.
18. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* **1999**, *26*, 1231–1237.
19. Huh S. R.; Kim Y. S.; Jung E. S.; Lim J. H.; Jung K. S.; Kim M. O. et al. Melanogenesis Inhibitory Effect of Fatty Acid Alkyl Esters Isolated from *Oxalis triangularis*, *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33(7)*, 1242–1245.
20. Venkata, S. P. C.; Prakash, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*, *International Current pharmaceutical journal* **2012**, *1*, 239–242.
21. Mohammad, A. E.; Mahdi, M. F. Inactivation of PI3K/Akt pathway and upregulation of PTEN gene are involved in daucosterol, isolated from *Salvia sahendica*, induced apoptosis in human breast adenocarcinoma cells, *South African Journal of Botany* **2014**, *93*, 37–47.
22. Werner, S.; Nebojsa, S.; Robert, W.; Robert, S.; Olaf, K. Complete assignments of ¹H

- and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives, *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 636-638.
23. Woo K. W.; Han J. Y.; Choi S. U.; Kim K. H.; Lee K. R. Triterpenes from *Perilla frutescens* var. *acuta* and Their Cytotoxic Activity, *Natural Product Sciences* **2014**, *20(2)*, 71-75.
24. 한정환, 비양나무 가지의 향산화, 미백, 항염 활성 성분 연구. *제주대학교* **2014**, 석사학위논문
25. Hoang Thi Le; Do Thi Ha; Chau Thi Anh Minh; Tae Hoon Kim; Phan Van Kiem; Nguyen Duy Thuan; MinKyun Na. Constituents from the Stem Barks of *Canarium bengalense* with Cytoprotective Activity against Hydrogen Peroxide-induced Hepatotoxicity, *Arch Pharm Res.* **2012**, *35(1)*, 87-92.
26. 안덕균, 원색한국본초도감, *교학사* **1998**, 855.
27. 서울대학교, 국내 자생 범의귀과 식물로부터 유용자원 개발 및 보전에 관한 연구, *농림부* **2003**, 4.
28. Feng, W.; Zhang, Y.; Zheng X.; Wang Y. Study on Chemical Constituents of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Seringe, *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* **2011**, *46(8)*, 576-579.
29. Park Y. H.; Lim S. H.; Ham H. J.; Kim H. Y.; 정햇님; 김경희; 김성문. 비타민나무 (*Hippophae rhamnoides* L.) 줄기로부터 항염 활성물질 β -Sitosterol의 분리, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2010**, *39(7)*, 980-985
30. Zhang, J. Q.; Wang, Y.; Li Y. H.; Lai W. Y.; Li H. L.; Duan J. A.; Pei L. X.; Two New Natural Products from the Fruits of *Alpinia oxyphylla* with Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Activated RAW264.7 Macrophage Cells, *Arch Pharm Res.* **2012**, *35(12)*, 2143-2146
- 31 Woo K. W.; Seong T. K.; Lee H. M.; Jang J. H; Lee K. H.; Cho H. W. et al. Quantitative Analysis and Anti-inflammatory of Lyoniside from the *Pourthiaea villosa* var. *brunnea*, *Kor. J. Pharmacogn.* **2016**, *47(1)*, 12~17
32. Chang M. Y.; Park S. K.; Kwak T. J.; Park H. K.; Lee C. K.; Lee H. S et al. Effects of the Mixture of Vitamin C, Vitamin E, Pycnogenol and Evening Primrose Oil on the

UV-Induced Pigmentation and Wrinkle Reductions in Human Skin, *Korean J Nutr* **2009**, *42(6)*, 516-522

33. Ko G. A.; Shrestha, S.; Kim Cho S.; *Sageretia thea* fruit extracts rich in methyl linoleate and methyl linolenate downregulate melanogenesis via the Akt/GSK3 β signaling pathway, *Nutrition Research and Practice* **2018**, *12(1)*, 3-12