



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 및 보리밥나무 잎 추출물의
항산화, 항염, 미백 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

趙 星 美

2020年 2月

등수국 및 보리밥나무 잎 추출물의 항산화, 항염, 미백 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

趙 星 美

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2019年 12月

趙星美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

2019年 12月

Anti-oxidative, Anti-inflammatory and
Whitening Constituents from Leaves of
Hydrangea petiolaris and *Elaeagnus
macrophylla*

Seong Mi Cho
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2019. 12.

This dissertation has been examined and approved.

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

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	v
List of Figures	vi
List of Abbreviations	x
Abstract	xii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 시약 및 기기	5
2. 생리 활성 평가	6
1) 항산화	6
가. 총 폴리페놀 함량 측정	6
나. 총 플라보노이드 함량 측정	7
다. DPPH radical 소거 활성 측정	8
라. ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	9
마. 세포 보호 효과	10
(1) HaCaT 세포 배양	10
(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	10
2) 항염	11
가. RAW264.7 세포 배양	11
나. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	12
다. PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	12
라. Western blot analysis	12
3) 미백	14
가. B16F10 세포 배양	14

나. Melanogenesis 억제 활성 평가	14
다. Intracellular tyrosinase 저해활성 평가	14
라. tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 및 단백질 발현 억제 활성	15
4) 세포 독성 평가(MTT assay)	16
3. HPLC 함량 분석	17
Ⅲ. 연구 1 : 등수국 잎 추출물의 항산화, 항염 및 미백 활성 성분 연구	19
1. 재료	19
2. 등수국 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	20
1) 등수국 잎의 추출 및 용매 분획	20
2) <i>n</i> -hexane 분획물의 활성 성분 분리	21
3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	22
3. 분리된 화합물의 구조 분석	24
1) Compound 1의 구조 동정	24
2) Compound 2-4의 구조 동정	27
3) Compound 5의 구조 동정	33
4) Compound 6, 7의 구조 동정	36
5) Compound 8, 9의 구조 동정	40
6) Compound 10의 구조 동정	43
7) Compound 11, 12의 구조 동정	46
4. HPLC 함량 분석	49
5. 등수국 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	51
1) 항산화	51
가. 총 폴리페놀 함량 측정	51
나. 총 플라보노이드 함량 측정	52
다. DPPH radical 소거 활성 측정	53
라. ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	55
마. 세포 보호 효과	56
(1) 세포 독성 평가(MTT assay)	56

(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	57
2) 항염	59
가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	59
나. PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	63
다. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성	65
3) 미백	67
가. Melanogenesis 억제 활성 평가	67
나. Intracellular tyrosinase 억제 활성 평가	69
다. Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현 억제 활성 평가	71
6. 분리된 화합물들의 활성 실험 결과	74
1) 항산화	74
가. DPPH radical 소거 활성	74
나. ABTS ⁺ radical 소거 활성	75
다. 세포 보호 효과	76
(1) 세포 독성 평가(MTT assay)	76
(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	77
2) 항염	79
가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	79
7. 요약 및 결론	82

IV. 연구 2 : 보리밥나무 잎 추출물의 미백 활성 성분 연구

1. 재료	84
2. 보리밥나무 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	85
1) 보리밥나무 잎의 추출 및 용매 분획	85
2) <i>n</i> -hexane 분획물의 활성 성분 분리	86
3. 분리된 화합물의 구조 분석	87
1) Compound 1의 구조 동정	87
2) Compound 2의 구조 동정	90
3) Compound 3의 구조 동정	92

4) Compound 4, 5의 구조 동정	96
4. 보리밥나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	100
1) 미백	100
가. Melanogenesis 억제 활성 평가	100
5. 요약 및 결론	103
V. 종합 결론 및 고찰	104
VI. 참고 문헌	106

List of Tables

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors	18
Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis	18
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1	26
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 2-4	32
Table 5. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 5	35
Table 6. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 6 and 7	39
Table 7. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 8 and 9	42
Table 8. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 10	45
Table 9. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 11 and 12	48
Table 10. Contents of isolated compounds from by HPLC	50
Table 11. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves	53
Table 12. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves	54
Table 13. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activity for the compounds 1-4	74
Table 14. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activity for the compounds 1-4	75
Table 15. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1	89
Table 16. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 2	92
Table 17. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1 and 3	95
Table 18. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 4 and 5	99

List of Figures

Figure 1. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents	6
Figure 2. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents	7
Figure 3. Picture of <i>Hydrangea petiolaris</i>	19
Figure 4. Extraction and solvent fractionation of <i>H. petiolaris</i> leaves	20
Figure 5. Isolation of compounds from <i>H. petiolaris</i> leaves	21
Figure 6. Isolation of compounds from <i>H. petiolaris</i> leaves	23
Figure 7. Chemical structure of compound 1	24
Figure 8. ¹ H NMR spectrum of compound 1	25
Figure 9. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	25
Figure 10. Chemical structures of compound 2-4	28
Figure 11. ¹ H NMR spectrum of compound 2	29
Figure 12. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	29
Figure 13. ¹ H NMR spectrum of compound 3	30
Figure 14. ¹³ C NMR spectrum of compound 3	30
Figure 15. ¹ H NMR spectrum of compound 4	31
Figure 16. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	31
Figure 17. Chemical structure of compound 5	33
Figure 18. ¹ H NMR spectrum of compound 5	34
Figure 19. ¹³ C NMR spectrum of compound 5	34
Figure 20. Chemical structures of compound 6 and 7	36
Figure 21. ¹ H NMR spectrum of compound 6	37
Figure 22. ¹³ C NMR spectrum of compound 6	37
Figure 23. ¹ H NMR spectrum of compound 7	38
Figure 24. ¹³ C NMR spectrum of compound 7	38

Figure 25. Chemical structures of compound 8 and 9	40
Figure 26. ¹ H NMR spectrum of compound 8 and 9	41
Figure 27. ¹³ C NMR spectrum of compound 8 and 9	41
Figure 28. Chemical structure of compound 10	43
Figure 29. ¹ H NMR spectrum of compound 10	44
Figure 30. ¹³ C NMR spectrum of compound 10	44
Figure 31. Chemical structures of compound 11 and 12	46
Figure 32. ¹ H NMR spectrum of compound 11 and 12	47
Figure 33. ¹³ C NMR spectrum of compound 11 and 12	47
Figure 34. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract, EtOAc fraction ...	49
Figure 35. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves	51
Figure 36. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves	52
Figure 37. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves	53
Figure 38. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>H. petiolaris</i> leaves	54
Figure 39. Cell viability of extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves	55
Figure 40. Cell protective effects of <i>n</i> -Hex fraction from <i>H. petiolaris</i> leaves on HaCaT cells damaged by H ₂ O ₂	57
Figure 41. Cell protective effects of EtOAc fraction from <i>H. petiolaris</i> leaves on HaCaT cells damaged by H ₂ O ₂	59
Figure 42. Effects of extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	61
Figure 43. Effects of <i>n</i> -Hex and EtOAc fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7	

cells	62
Figure 44. Effects of <i>n</i> -Hex and EtOAc fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves on PGE ₂ , TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells	64
Figure 45. Effect of <i>n</i> -Hex and EtOAc fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves on levels of iNOS protein in LPS-induced RAW264.7 cells	66
Figure 46. Effects of extract and solvent fractions from <i>H. petiolaris</i> leaves on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 cells	68
Figure 47. Effects of <i>n</i> -Hex fraction from <i>H. petiolaris</i> leaves on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 cells	69
Figure 48. Intracellular tyrosinase activity of <i>n</i> -Hex fraction from <i>H. petiolaris</i> leaves in α -MSH induced B16F10 cells	70
Figure 49. Effects of <i>n</i> -Hex fraction from <i>H. petiolaris</i> leaves on levels of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in α -MSH induced B16F10 cells	73
Figure 50. DPPH radical scavenging activities of the compound 1-4	74
Figure 51. ABTS ⁺ radical scavenging activities of the compound 1-4	75
Figure 52. Effects of isolated compound 1-6 from <i>H. petiolaris</i> leaves ..	76
Figure 53. Cell protective effects of isolated compound 1 and 3 on HaCaT cells damaged by H ₂ O ₂	78
Figure 54. Effects of isolated compound 1-6 from <i>H. petiolaris</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	80
Figure 55. Effects of isolated compound 4, 6, 10 from <i>H. petiolaris</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	81
Figure 56. Picture of <i>Elaeagnus macrophylla</i> leaves	83
Figure 57. Extraction and solvent fractionation of <i>E. macrophylla</i> leaves	85

Figure 58. Isolation of compounds from <i>E. macrophylla</i> leaves	86
Figure 59. Chemical structure of compound 1	87
Figure 60. ¹ H NMR spectrum of compound 1	88
Figure 61. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	88
Figure 62. Chemical structure of compound 2	90
Figure 63. ¹ H NMR spectrum of compound 2	91
Figure 64. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	91
Figure 65. Chemical structure of compound 3	93
Figure 66. ¹ H NMR spectrum of compound 1 and 3	94
Figure 67. ¹³ C NMR spectrum of compound 1 and 3	94
Figure 68. Chemical structure of compound 4 and 5	96
Figure 69. ¹ H NMR spectrum of compound 4	97
Figure 70. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	97
Figure 71. ¹ H NMR spectrum of compound 4 and 5	98
Figure 72. ¹³ C NMR spectrum of compound 4 and 5	98
Figure 73. Effects of extract and solvent fractions from <i>E. macrophylla</i> leaves on melanin contents and cell viability in α-MSH induced B16F10 cells	101
Figure 74. Effects of <i>n</i> -Hex fraction from <i>E. macrophylla</i> leaves on melanin contents and cell viability in α-MSH induced B16F10 cells	102

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
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
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
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
int.	Integration
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-phenylalanine
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
PBS	Phosphate buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ROS	Reactive oxygen species
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
t	Triplet
TBS	Tris-buffered saline
TLC	Thin layer chromatography
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TRP-1	Tyrosinase related protein-1
TRP-2	Tyrosinase related protein-2
V	VLC subfraction
VLC	Vacuum liquid chromatography
2D	Two-dimensional

Abstract

In this study, we investigated anti-oxidative, anti-inflammatory and whitening constituents from leaves of *Hydrangea petiolaris* and *Elaeagnus macrophylla*. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values.

Twelve constituents were isolated from the extract of *Hydrangea petiolaris* leaves; *epi*-catechin (1), hyperin (2), quercitrin (3), afzelin (4), 1-*O-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (5), asiatic acid (6), corosolic acid (7), ethyl linoleate (8), ethyl linolenate (9), phytol (10), 1-linoleoyl glycerol (11) and 1-linolenoyl glycerol (12). On the anti-oxidative tests, the extract, EtOAc and *n*-BuOH fractions and compounds 1-4 showed potent free radical scavenging activities. Also, for the cellular protective effects on HaCaT keratinocytes damaged by H₂O₂, the *n*-Hex, EtOAc fractions and compound 1, 3 indicated protective effects against oxidative stress. In the anti-inflammatory tests using RAW 264.7 cells, the *n*-Hex and EtOAc fractions inhibited the production of NO without causing cell toxicity. In addition, the *n*-Hex and EtOAc fractions reduced expression of iNOS protein and production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β). For the anti-melanogenesis tests using B16F10 melanoma cells, the *n*-Hex fraction exhibited potent inhibitory activities of melanin formation without causing cell toxicity.

Five phytochemicals were isolated from the extract of *Elaeagnus macrophylla* leaves; methyl linolenate (1), α -tocopherol (2), β -sitosterol (3), α -amyrin (4), β -amyrin (5). In the anti-melanogenesis tests using B16F10 melanoma cells, the *n*-Hex fraction showed anti-melanogenesis activity without causing cell toxicity.

Based on these results, it was suggested that the extracts and isolated

compounds from *Hydrangea petiolaris* and *Elaeagnus macrophylla* leaves could be potentially applicable as natural source for pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

I. 서론

1. 천연물

천연물은 당, 지방, 단백질, 핵산과 같이 모든 생물에 존재하여 생명체의 기본대사에 관여하는 물질인 1차 대사물(primary metabolite)과 식물의 성장, 생식 등 생존에 필수적인 기능은 하지 않지만 환경에 적응하고 자기 스스로를 방어하기 위하여 생산하는 2차 대사물(secondary metabolite)로 나뉜다. 2차 대사물에는 플라보노이드(flavonoid), 탄닌(tannin), 알칼로이드(alkaloid), 테페노이드(terpenoid) 등이 있으며, 식물체마다 독특한 생리활성을 보유하고 있다.¹ 플라보노이드(flavonoid)는 C₆-C₃-C₆를 기본골격으로 하는 물질을 말하며, C₃환의 산화 정도에 따라 flavone, flavonol, isoflavone, flavanone, anthocyanidin 등으로 분류한다. 가장 일반적인 플라보노이드 화합물의 골격구조는 5번과 7번 위치에 -OH기를 가지고 있는 구조이며, -OH기에 당이 결합한 배당체 형태로 많이 존재한다. 이러한 플라보노이드 화합물은 항산화, 항염, 항균 등 다양한 생리 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.² 테페노이드는 이소프렌(isoprene)을 기본 단위로 하는 물질이며 탄소의 개수에 따라 모노터펜(monoterpene, C₁₀), 디터펜(diterpene, C₂₀), 트라이터펜(triterpene, C₃₀) 등으로 나뉜다. 테페노이드는 항염, 항암, 면역강화 등의 생리 활성을 나타내는 물질로 알려져 있다.³

천연물 연구 대상은 주로 2차 대사물에 치중되어 있지만, 1차 대사물이 소재개발에 이용되는 경우가 있으며, 그 대표적인 경우가 linolenic acid, tocopherol과 같은 불포화지방산류다. α-linolenic acid는 식물성 오일에 많이 함유되어 있는 성분으로 항염, 미백, 등의 활성이 알려져 있어 화장품 소재로 이용되고 있으며, γ-linolenic acid 또한 식물성 오일 등에 많이 함유되어 있는 성분으로, 아토피성 피부염을 비롯한 피부질환, 류마티스 관절염, 갱년기 증상, 심혈관계질환에 효능이 있어 건강기능식품, 의약품 및 화장품 등의 소재로 많이 이용되고 있다.^{4,5,6}

이렇게 천연물은 다양한 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품, 의약품 및 화장품 소재 개발에 활용되어 고부가가치 산업에 하나의 축을 이루고 있다.

2. 항산화

세포대사에 사용되는 전체 산소의 90-95%는 미토콘드리아에서 ATP를 만들어 내는 과정에서 소모되며, 이 중 1-2%는 활성산소로 전환된다.⁷ 적정량의 활성산소는 외부에서 침입한 박테리아나 바이러스를 파괴하는 면역반응에 쓰이고, 필요 이상으로 생성된 활성산소는 체내 항산화 시스템에 의해 제거된다. 하지만 노화, 스트레스, 질병, 자외선 등에 의해 활성산소의 생성속도와 제거속도 간의 균형이 깨지게 되면 체내 산화적 스트레스가 유발되어 과량의 활성산소가 생성 및 축적되게 된다. 이렇게 생성된 과량의 활성산소는 생체분자들과 빠르게 반응하여 단백질 변성, 지질과산화, DNA 손상 등을 일으키며 노화, 암, 염증의 진행을 촉진시키게 된다. 체내 지질과 활성산소가 반응하여 생긴 과산화지질이 혈관 내로 이동할 경우, 혈관을 파괴하고 말단세포로의 혈액을 차단하여 뇌졸중, 뇌출혈, 심근경색, 동맥경화 등을 일으키게 된다.⁸ 또한, 활성산소는 단백질 분해 효소인 MMPs(matrix metalloproteinases)의 발현을 유도시켜 탄력저하, 주름 생성에 관여하여 피부 노화를 촉진시킨다.

활성 산소는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)이라고도 불리며 superoxide radical ($\cdot O_2^-$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroperoxyl radical ($HO_2\cdot$) 및 singlet oxygen (1O_2) 등이 있다. 이러한 활성산소를 제거하기 위해 인체 내에는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) 등 효소적 항산화 물질과 glutathione 과 같은 비효소적 항산화 물질이 존재한다. 하지만 항산화 시스템의 균형이 깨졌을 경우에는 체내의 항산화 물질만으로는 부족하며 외부에서 항산화물질을 공급해야 한다. 항산화물질은 천연 항산화물질과 합성 항산화물질로 나뉘게 된다. 천연 항산화물질로는 식물로부터 분리한 flavonoid, alpha-tocopherol, ascorbic acid 등이 있으며 합성 항산화물질로는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) 등이 있다. 합성 항산화 물질은 높은 열을 가했을 시 불안정하거나 다량으로 투여됐을 때 기형 및 발암 발생의 원인으로 작용할 수 있다고 보고되어 있다.⁹ 이로 인해 보다 안전하면서 효과가 뛰어난 천연 항산화물질을 찾고자하는 많은 연구가 이루어지고 있다.

3. 항염

염증반응은 생체 내 항원침입이나 조직손상과 같은 응급상황이 발생하였을 때 림프구를 포함한 면역세포들에 의해 수행되는 일련의 생체보호반응이다. 그러나 염증반응이 과도하거나 지속적으로 나타나게 되면 주변조직의 손상과 더불어 생체기능에 이상을 가져와 질병의 상태를 악화시키거나 새로운 질병이 생기게 된다.¹⁰

염증반응에 관여하는 주요 세포인 대식세포(macrophage)는 체내에서 선천적으로 면역반응을 담당하는 세포로 알려져 있으며 동물 체내 모든 조직에 분포한다.¹¹ 박테리아와 같은 세균이 체내로 침투하면 세균 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 대식세포가 자극을 받아 활성화된다. 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 염증매개물질들을 분비한다.¹²

NO는 cytokine의 자극 또는 미생물의 침입으로 인해 세포가 활성화되어 생성되는 것으로, nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NOS는 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS) endothelial NOS (eNOS)와 같이 3종류가 존재하며, 이 중 iNOS가 염증반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. 이렇게 iNOS로부터 생성된 NO는 혈관 확장, 세포 내 항상성 유지, 항암 작용 등에 관여하는 신호전달자이지만, 과량으로 존재할 경우 만성염증, 퇴행성 뇌질환, 암의 진행 및 악화 등을 유발하게 된다.^{13,14}

이러한 염증매개물질과 염증 관련 효소의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로써 기능을 할 수 있으며, 부작용의 우려가 있는 합성 물질 대신 천연물 유래 소재를 찾으려는 노력이 지속되고 있다.

4. 미백

피부색은 표피에 존재하는 멜라닌(melanin), 진피의 혈관 속에 함유된 헤모글로빈(hemoglobin), 피하조직에 존재하는 β -카로틴(β -carotene)과 같은 색소에 의해 영향을 받는다. 그 중에서도 멜라닌 색소의 양과 분포에 의해 외관상의 피부색이 거의 결정된다.¹⁵ 멜라닌은 인체 피부에서 자외선이나 외부 유해인자들로부터 피부를 보호하는 중요한 역할을 하지만, 과잉 생성되어 피부에 축적될 경우 기미와 주근깨, 피부 반점 등을 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인한 세포의 사멸 및 피부암과 같은 질병을 초래할 수 있다.¹⁶

멜라닌 합성에 관여하는 효소로 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (DCT, TRP-2) 등이 있다. 이들 중 tyrosinase는 멜라닌 합성의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로써, tyrosinase을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA-quinone으로 산화시킨다. 이렇게 생성된 DOPA-quinone은 자발적 반응에 의하여 dopachrome으로 전환되며 이들은 TRP-2에 의해 축매되어 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환된다. DHICA는 TRP-1에 의해 축매되어 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화되어 최종적으로 멜라닌으로 합성된다.¹⁷ 따라서, tyrosinase, TRP-1, TRP-2를 저해하는 물질은 멜라닌 합성을 저해하여 피부 미백 기능을 할 수 있다.

대표적인 멜라닌 생성 억제 물질로는 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 arbutin, lactic acid, glucosamine, tunicamycin등이 개발되었으나, 피부자극성이나 안전성에 문제가 있어 사용량이 엄격히 제재되고 있다.¹⁸ 이로 인해 보다 안전하고 효과가 뛰어난 천연유래 미백제를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 제주에서 자생하는 등수국(*Hydrangea petiolaris*) 및 보리밥나무(*Elaeagnus macrophylla*) 추출물과 분획물의 다양한 생리 활성을 확인하고 유효 성분의 분리·동정을 통해 기능성 식품, 의약품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 단일 물질 분리에 사용된 용매들은 Merck, OCI 및 대정화금의 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 chromatography (GFC)에는 SephadexTM LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였으며, TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나 visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 anisaldehyde (1% anisaldehyde-5% H₂SO₄)를 사용하였다.

화합물의 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance spectrometer (NMR)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)사의 NMR 전용 용매인 CD₃OD, CDCl₃를 사용하였다. 분리된 화합물의 함량 분석에 사용된 high performance liquid chromatography (HPLC, Waters Co.)는 Shiseido column (CAPCELL PAK C₁₈, 250 × 4.6 mm, 5 μm) 컬럼을 사용하였고 검출기는 UV-Visible Detector (Waters co.)를 사용하였다.

2. 생리 활성 평가

1) 항산화

가. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법¹⁹을 응용하여 실시하였으며, 표준물질로 gallic acid를 사용하였다. 표준물질 및 시료 100 μ L에 증류수 900 μ L를 가하고 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 첨가하여 혼합하였다. 이를 상온에서 3분간 반응시킨 후, 7%(w/v) Na_2CO_3 용액 200 μ L를 첨가하여 총 부피가 2 mL가 되도록 증류수를 가한 뒤 혼합하였다. 이를 상온에서 1시간 반응시킨 후, 96 well plate에 200 μ L씩 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 r^2 값은 0.99 이상이었다 (Figure 1).

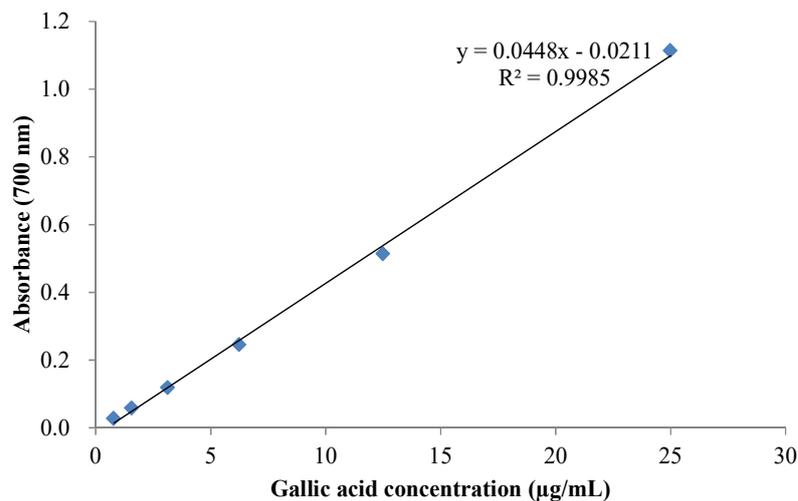


Figure 1. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents.

나. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법²⁰을 응용하여 실시하였으며, 표준물질로 quercetin을 사용하였다. 96 well plate에 표준물질과 시료 15 μ L를 취하고 ethylene glycol 150 μ L와 0.1 N NaOH 15 μ L를 첨가하여 혼합하였다. 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 2).

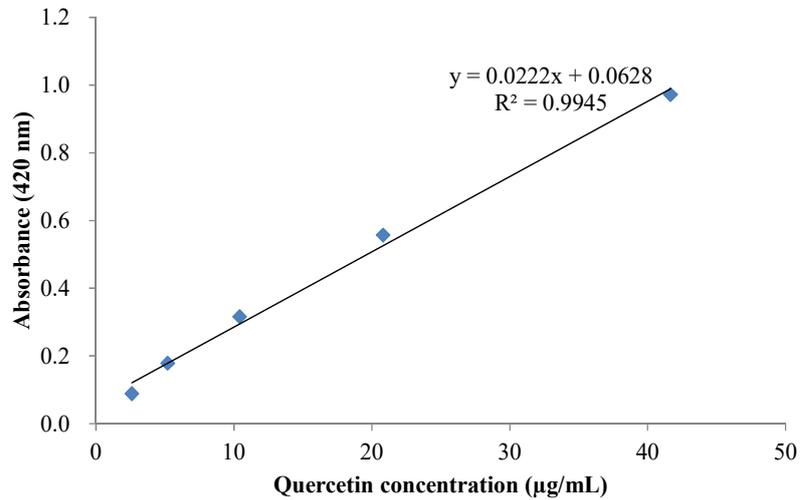


Figure 2. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.

다. DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법²¹⁾을 응용하여 실시하였다. 96 well plate에 시료 20 μ L와 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 20분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 BHT와 L-ascorbic acid를 사용하였으며 radical 소거율은 아래의 식에 대입하여 백분율로 나타내었고 각 시료의 radical 소거율이 50%일 때의 시료 농도인 SC₅₀값을 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} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

라. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) cation radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법²²을 응용하여 실시하였다. ABTS⁺ radical 용액은 7.0 mM ABTS와 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 상온 및 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. 이 용액을 흡광도가 0.78±0.02가 되도록 EtOH로 희석하여 실험에 사용하였으며, 대조군으로는 BHT와 L-ascorbic acid를 사용하였다. Radical 소거율은 아래의 식에 대입하여 백분율로 나타내었고 각 시료의 radical 소거율이 50%일 때의 시료 농도인 SC₅₀값을 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} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

마. 세포 보호 효과

(1) HaCaT 세포 배양

Immortalised human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 Korean Cell Line Bank (KLCB)로부터 분양 받아 실험에 사용하였으며, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% fetal bovin serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였고, 3일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

(2) 과산화수소(H₂O₂)로부터 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

HaCaT cell을 96 well plate에 5.0×10^3 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 전배양하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 제거하고 세포독성 평가로 결정된 농도의 과산화수소를 처리하여 배양하였다. 30분 후 과산화수소를 제거하고 dulbecco's phosphate buffered saline (1× DPBS)로 2회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 처리하고 배양조건 하에서 24시간 배양한 후 MTT assay로 세포 생존율(%)을 계산하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호효과를 확인하였다.

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

2) 항염

가. RAW264.7 cell 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양 받아 실험에 사용하였으며, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% fetal bovin serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였고, 2일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

나. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW264.7 cell을 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 18시간 전배양하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 1 µg/mL의 LPS를 포함한 배지로 교환한 후, 시료를 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 NO 생성량을 측정하기 위하여 96 well plate에 세포 배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1 % naphthylethylene-diamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응물은 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생성된 NO는 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 표준물질로는 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용하였고 생성된 NO의 양은 NaNO₂의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선법(Standard calibration curve method)을 통해 구하였으며, 표준검정곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다. 대조군(positive control)으로는 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

다. PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 60 mm petri dish에 6.0×10^5 cells/dish로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 18시간 전배양하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 1 µg/mL의 LPS를 포함한 배지로 교환한 후, 시료를 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 세포배양 상등액의 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성량을 각각 PGE₂ (R&D Systems, USA), TNF-α (Invitrogen, USA), IL-1β (R&D Systems, USA) 및 IL-6 (Invitrogen, USA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 측정하였으며, 각각의 표준물질에 대한 표준검정곡선을 통해 정량하여 백분율로 나타내었다. 또한, 표준검정곡선의 r² 값은 0.99 이상이 었다.

라. Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm petri dish에 6.0×10^5 cells/dish로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 18시간 전배양하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 1 µg/mL의 LPS를 포함한 배지로 교환한 후, 시료를 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤, lysis buffer (1 × RIPA)를 이용하여 4 °C 조건에서 overnight으로 lysis 시켰다. 이후 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 단백질의 상등액만 분리하여 실험에 사용하였다. 단백질은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 Bradford 시약을 사용하여 표준검정 곡선을 작성한 뒤 정량하였다. 정량한 단백질 20 µg을 8-12 % SDS-polyacrylamide에 전기영동한 후 transfer stack을 이용하여 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer하였다. Transfer된

membrane을 5% skim milk를 함유한 TTBS (0.1% Tween 20, tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 90분간 blocking 시킨 후, TTBS로 5분씩 3회 세척하였다. 세척한 membrane을 1차 항체와 반응시켰으며, 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:1000, Santa Cruz), β -actin antibody (1:20000, Sigma)를 이용하여 4 °C에서 overnight 시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS로 5분씩 5회 세척한 뒤, 2차 항체 (1:5000 또는 1:20000, Santa Cruze)와 1시간 반응시킨 뒤, TTBS로 5분씩 5회 세척하였다. 단백질은 WESTA NOVA 2.0 (Cyanagen) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

3) 미백

가. B16F10 melanoma 세포 배양

Murine B16F10 melanoma cell line은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양 받아 실험에 사용하였으며, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% fetal bovin serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였고, 3일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

나. Melanogenesis 억제 활성

B16F10 cell을 6 well plate에 9.0×10^4 cells/dish로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환한 후, 시료를 처리하여 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1 N NaOH를 가하여 55°C에서 1시간 반응시켜 세포 내의 멜라닌을 녹인 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 melasolv (20 µM)를 사용하였다.

다. Intracellular tyrosinase 저해 활성

B16F10 cell을 60 mm petri dish에 9.0×10^4 cells/dish로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전배양시킨 세포의 배지를 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 교환한 후, 시료를 처리하여 72시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤, lysis buffer (1 × RIPA)를 이용하여 4 °C 조건에서 overnight으로 lysis 시켰다. lysis 시킨 cell은 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 단백질 상등액만 분리하였다.

96 well plate에 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 8 mM

L-DOPA 160 μ L와 단백질 상등액 20 μ L를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C 조건에서 1-2시간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 Bradford 시약을 이용하여 표준검정곡선을 작성하여 정량한 뒤 보정하였다.

라. Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현 억제 활성화

B16F10 cell을 60 mm petri dish에 9.0×10^4 cells/dish로 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 100 nM α -MSH가 포함된 배지로 교환한 후, 시료를 처리하여 72시간 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, lysis buffer (1 \times RIPA)를 이용하여 4 $^{\circ}$ C 조건에서 overnight으로 lysis 시켰다. 이후 원심분리(10,000 rpm, 20 min, 4 $^{\circ}$ C)하여 단백질의 상등액만 분리하여 실험에 사용하였다. 단백질은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 Bradford 시약을 사용하여 표준검정곡선을 작성하여 정량하였다. 정량한 단백질 20 μ g을 8-12 % SDS-polyacrylamide에 전기영동한 후 transfer stack을 이용하여 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer하였다. Transfer된 membrane을 5% skim milk를 함유한 TTBS(0.1% Tween 20, tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 90분간 blocking 시킨 후, TTBS로 5분씩 3회 세척하였다. 세척한 membrane을 1차 항체와 반응시켰으며, 1차 항체 반응은 TRP-1 (1:1000, SantaCruz), TRP-2 (1:500, AssayBiotech), tyrosinase antibody (1:1000, SantaCruz), β -actin antibody (1:20000, Sigma)를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS 용액으로 5분씩 5회 세척한 뒤, 2차 항체 (1:2000, 1:5000 또는 1:20000, Santa Cruze)와 1시간 반응시킨 뒤, TTBS로 5분씩 5회 세척하였다. 단백질은 WESTA NOVA 2.0 (Cyanagen) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

마. 세포 독성 평가(MTT assay)

HaCaT cell, RAW264.7 cell 및 B16F10 cell을 각각 5.0×10^3 , 1.5×10^5 , 5.0×10^4 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 및 18시간씩 배양하였다. HaCaT cell은 FBS가 함유되지 않은 배지에, RAW264.7 cell은 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지에, B16F10 cell은 100 nM의 α-MSH가 포함된 배지에 시료를 처리하여 18시간 또는 24시간 배양하였다. 배양 후, 500 µg/mL 농도로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 첨가하여 37°C 조건에서 3시간 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물에 DMSO를 가하여 용해시키고 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래의 식에 대입하여 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

3. HPLC 함량분석

등수국 잎 추출물 및 분획물에서 분리한 화합물들의 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 정성분석에는 추출물 및 분획물들을 5 mg/mL로 녹인 후, 각각 compound 1, 3을 첨가하여 0.45 μ m PTFE filter를 이용하여 여과해서 나온 여액을 분석하였다. 화합물 정량 분석에는 분리된 compound 1, 3 표준용액을 사용하여 얻어진 피크의 면적 값을 가지고 각 화합물의 정량을 위한 표준검정곡선을 작성하였다. 각 표준물질들은 125, 250, 500, 1000 ppm의 농도로 제조하여 사용하였다.

각 분석에는 주입부피 10 μ L, 컬럼온도 40 $^{\circ}$ C, 용리액은 MeOH과 H₂O를 사용하여 다음과 같은 조건으로 용리시켰고, 1.0 mL/min의 유속으로 60분 동안 분석하였다(Table 1-2).

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control Factor	Conditions
Injection Volume	10 μ L
Column	Shiseido column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m)
Mobile phase	A: H ₂ O, B; MeOH
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Wavelength	277 nm
Detector	Waters 2998 PDA (Waters, USA)
Separation Module	Waters 2695 (Waters, USA)

Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O (%)	MeOH (%)
0	1.0	80	20
50	1.0	20	80
55	1.0	0	100
60	1.0	0	100

Ⅲ. 연구 1 : 등수국 잎 추출물의 항산화, 항염 및 미백 활성 성분 연구

1. 재료

등수국(*Hydrangea petiolaris*)은 범의귀과(Saxifragaceae)에 속하는 식물로 나무나 바위에 붙어 자라는 덩굴성 식물이다. 등수국은 가지에서 발생한 기근을 이용하여 바위 겉면이나 곰솔의 줄기 등에 착생하여 20 m 가량 자라는 것으로 알려져 있다. 또한, 한국이 원산지이며, 한국, 일본 등에 분포해 있고, 한국에서는 주로 울릉도, 제주도 등 남쪽 섬에 분포해 있다. 국내에서 등수국은 제주도의 원당봉, 큰녹고메, 천아오름 등에서 자생하고 있다.²³

등수국 줄기(stems) 추출물에 대해서는 항염, 미백 등의 효능이 알려져 있고 catechin, ursolic acid 등의 유효 성분 연구가 보고되어 있다.²⁴ 그러나 아직까지 등수국 잎(leaves)을 대상으로 한 유효 성분 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 등수국 잎 추출물과 용매 분획물을 이용하여 활성 검색을 수행하였고, 활성 실험 결과를 바탕으로 분리를 진행하여 유효성분을 분리·동정하였다.

실험에 사용한 등수국 잎(시료번호 : 487)은 2018년 1월 제주생물자원(주)로부터 구입하였으며, 구입한 등수국 잎은 동결 건조기에서 건조시킨 후 분쇄하여 사용하였다(Figure 3).



Figure 3. Picture of *Hydrangea petiolaris*.

2. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 등수국 잎의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 등수국 잎 120.0 g을 70%(v/v) EtOH 24.0 L에 침출시킨 후 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료를 감압 여과기와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과하고 남은 잔사에 대하여 동일한 조건으로 추출 및 여과를 2회 더 반복 진행하였다. 얻어진 여액은 37-40 °C의 수욕 상태에서 회전 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 추출물 38.5 g을 얻었다. 얻어진 추출물 중 15.0 g을 증류수 1.0 L에 현탁시키고 분별 깔때기를 이용해 낮은 극성 순으로 분획하여 *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)의 분획물을 얻었다. 이와 같은 방법으로 1회 더 반복 실시하여 추출물 총 30.0 g을 용매 분획하였다(Figure 4).

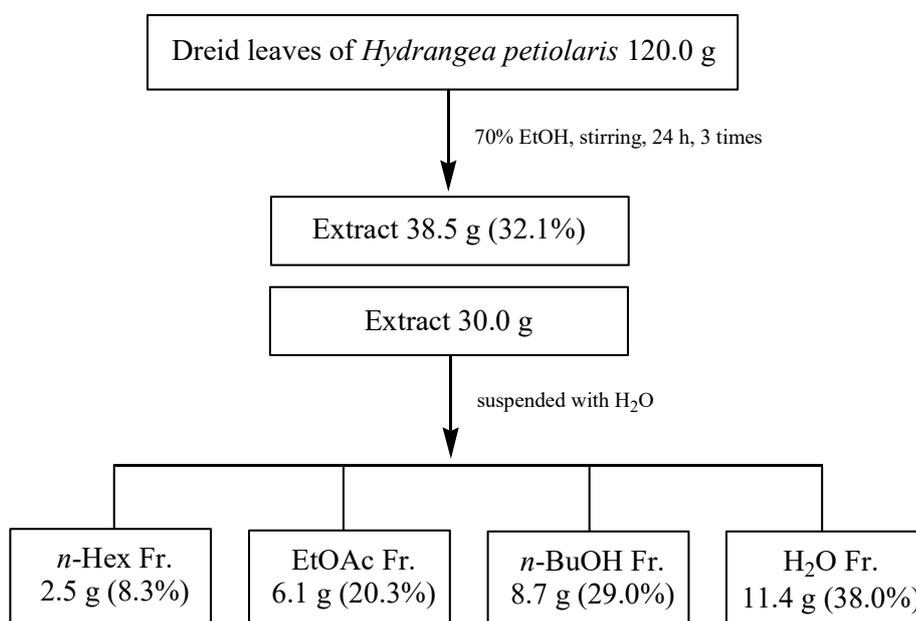


Figure 4. Extraction and solvent fractionation of *H. petiolaris* leaves.

2) *n*-Hexane 분획물의 활성 성분 분리

n-Hex 분획물 1.7 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 때까지 높였으며 그 후 100% EtOAc와 100% MeOH를 각 300 mL씩 용출하여 총 13개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-13).

VLC fraction 중 Fr. V4 (112.7 mg)는 compound 8과 compound 9가 혼합되어 있는 것으로 확인되었다. Fr. V5는 단일 화합물인 compound 10 (162.2 mg)으로 확인되었으며, Fr. V12 (72.3 mg)는 compound 11과 compound 12가 혼합되어 있는 것으로 확인되었다(Figure 5).

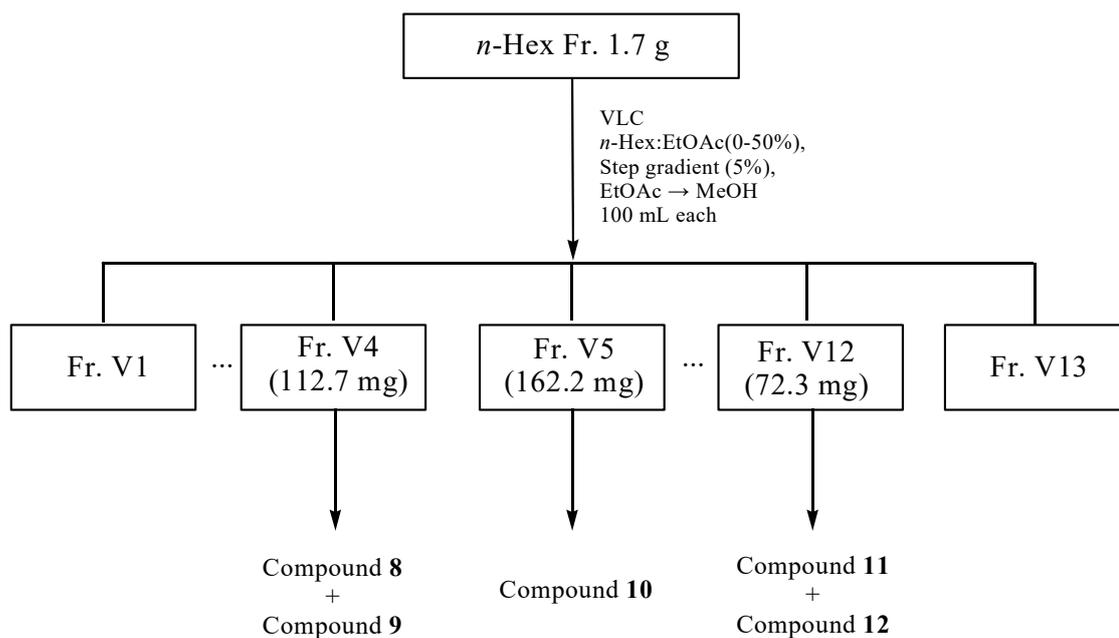


Figure 5. Isolation of compounds from *H. petiolaris* leaves.

3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위해 MPLC를 수행하였다. EtOAc 분획물 5.0 g을 MeOH 7.0 mL, DMSO 3.0 mL에 녹이고 0.45 μ m filter를 이용하여 여과한 후 KP-C18-HS column에 주입하였다. Gradient법을 이용해 MeOH:H₂O (10-50%, 100 min), MeOH:H₂O (50-100%, 20 min), MeOH (100%, 10 min)의 용매 조건을 사용하였으며, 15 mL/min의 유속으로 각각 40 mL씩 용출시켜 총 48개의 fraction을 얻었다(MP1-48).

MPLC fraction들 중 Fr. MP19는 compound **1** (64.5 mg)으로, Fr. MP27은 compound **2** (117.5 mg)로, Fr. MP36은 compound **3** (104.1 mg)으로, Fr. MP41은 compound **4** (100.7 mg)로, Fr. MP48은 compound **7** (31.4 mg)으로 확인되었다. 또한, Fr. MP12-15 (329.6 mg)은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=2.5:1)를 수행하여 compound **5** (5.1 mg)을 얻었고 Fr. MP46-47 (141.8 mg)은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=15:1)을 수행하여 compound **6** (5.0 mg)을 얻었다(Figure 6).

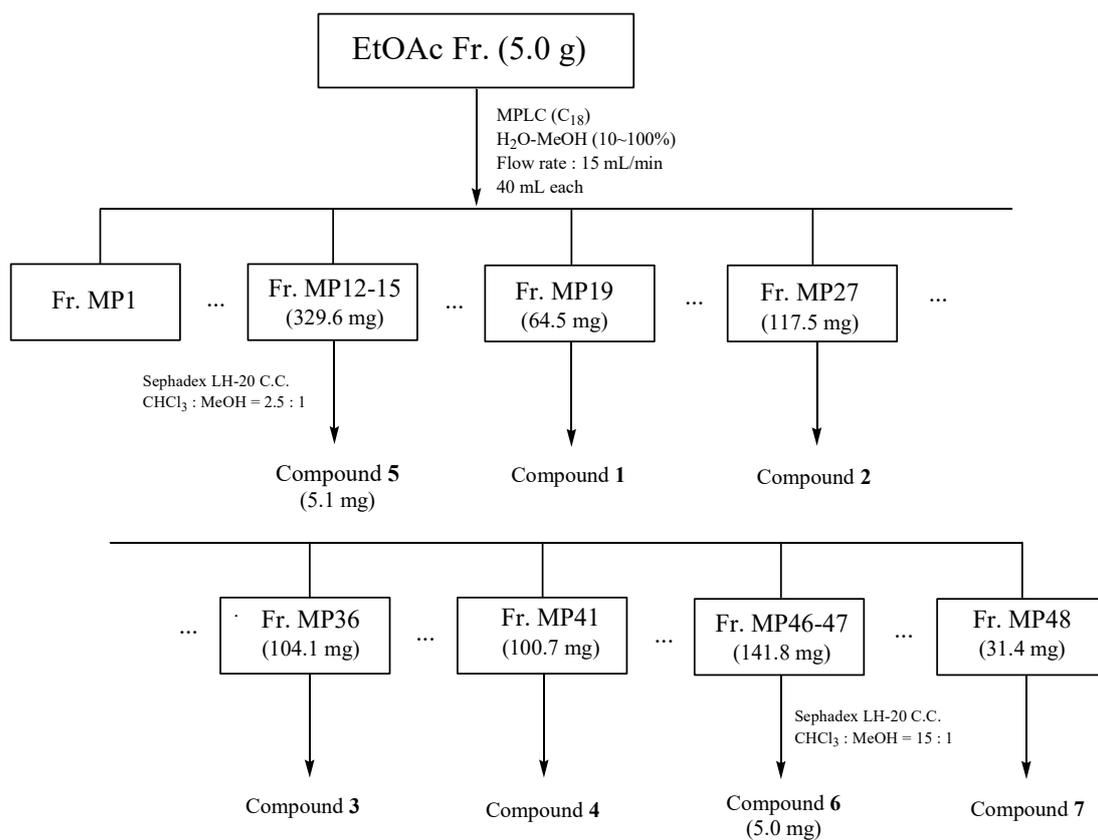
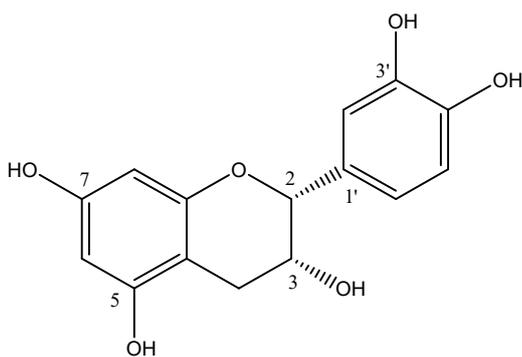


Figure 6. Isolation of compounds from *H. petiolaris* leaves.

3. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 15개의 carbon 피크가 관찰되었으며 이를 통해 flavonoid 골격의 화합물로 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.96 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.74 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) 및 6.78 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *ortho*-와 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있는 것으로 예상하였으며, δ_{H} 5.93 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 5.90 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있는 것으로 예상하였다. δ_{H} 2.85 (1H, dd, $J = 16.7, 4.6$ Hz) 및 δ_{H} 2.72 (1H, dd, $J = 16.7, 2.8$ Hz) 피크는 sp^3 혼성을 가지며, coupling constant 값을 통해 화학적 환경이 서로 다른 2개의 proton이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁵과 비교한 결과, compound 1은 *epi*-catechin으로 확인되었다(Figure 7-9, Table 3).



Compound 1

Figure 7. Chemical structure of compound 1.

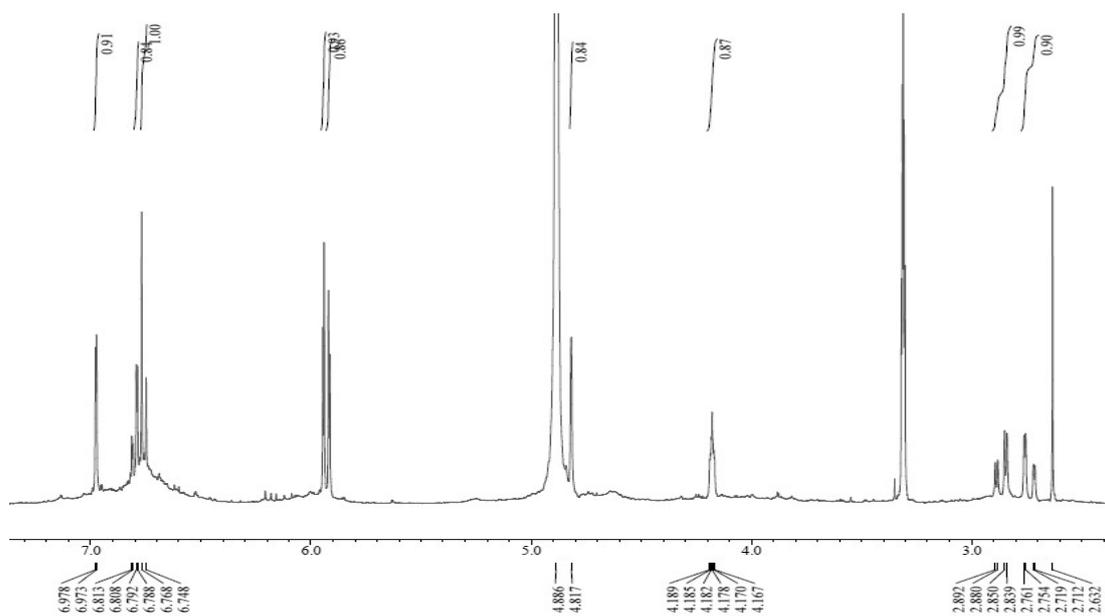


Figure 8. ^1H NMR spectrum of compound **1** (CD_3OD).

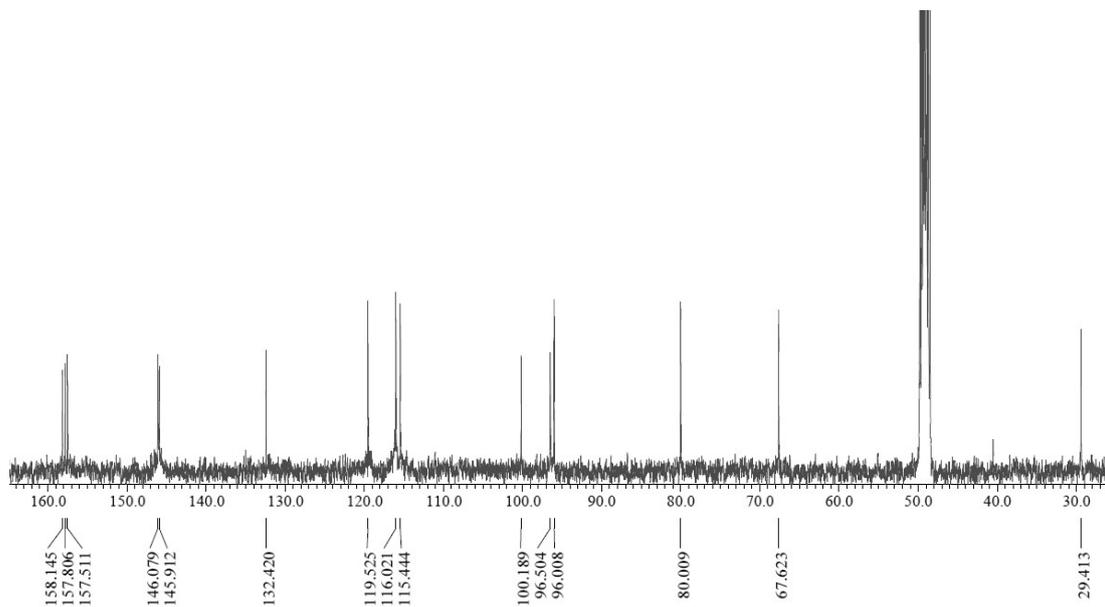


Figure 9. ^{13}C NMR spectrum of compound **1** (CD_3OD).

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

No.	Compound 1 (CD_3OD)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2	4.80 (1H, s)	79.9
3	4.16 (1H, m)	67.5
4	2.85 (1H, dd, 16.7, 4.6)	29.3
	2.72 (1H, dd, 16.7, 2.8)	
5		158.0
6	5.93 (1H, d, 2.3)	96.4
7		157.7
8	5.90 (1H, d, 2.3)	95.9
9		157.4
10		100.0
1'		132.3
2'	6.96 (1H, d, 1.8)	115.3
3'		145.9
4'		145.8
5'	6.74 (1H, d, 8.2)	115.9
6'	6.78 (1H, dd, 8.2, 1.8)	119.4

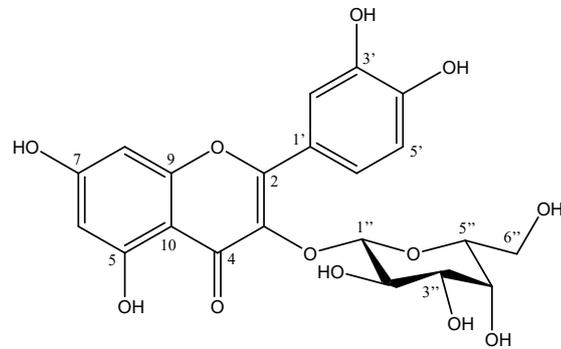
2) Compound 2-4의 구조 동정

Compound 2는 ^{13}C NMR spectrum에서 총 21개의 carbon 피크가 관찰되었으며, δ_{H} 3.48-3.86의 overlap 되어 있는 여러 개의 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 5.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)의 피크를 통해 flavonoid 골격에 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. δ_{H} 7.85 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 8.7$ Hz) 및 7.59 (1H, dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *ortho*-와 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있는 것으로 예상하였으며, δ_{H} 6.21 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.41 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있는 것으로 예상하였다. 또한, δ_{H} 3.48-3.86 피크와 δ_{C} 62.1-77.3, 105.5의 6개의 피크를 통해 flavonoid 골격에 6탄당이 결합되어 있는 것으로 예상하였으며, 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 5.18 (1H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 β -form의 galactopyranoside로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁶과 비교한 결과, compound 2는 hyperin (quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside)으로 확인되었다(Figure 10-12, Table 4).

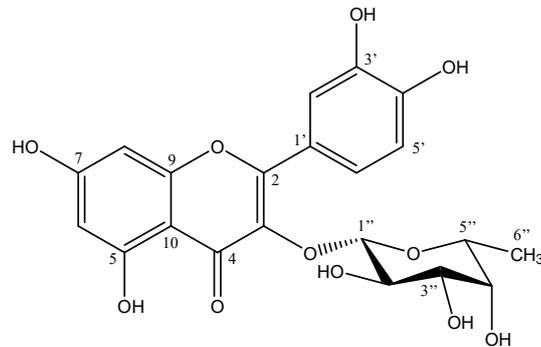
Compound 3은 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 compound 2와 유사한 구조로 예상하였으며, δ_{H} 0.94-5.35 피크와 δ_{C} 17.8-73.4, 103.7의 6개의 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 5.35 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 α -form의 rhamnopyranoside로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁷과 비교한 결과, compound 3은 quercitrin (quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside)으로 확인되었다(Figure 10,13,14, Table 4).

Compound 4는 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 compound 3과 유사한 구조로 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.77 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), δ_{H} 6.94 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크를 통해 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭 구조의 aromatic proton으로 예상하였다. 또한, δ_{H} 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), δ_{H} 6.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz) 피크를 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic proton이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁸과 비교한 결

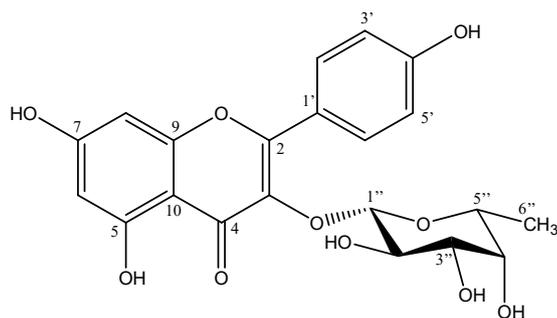
과, compound 4는 afzelin (kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside)으로 확인되었다(Figure 10,15,16, Table 4).



Compound 2



Compound 3



Compound 4

Figure 10. Chemical structure of compound 2-4.

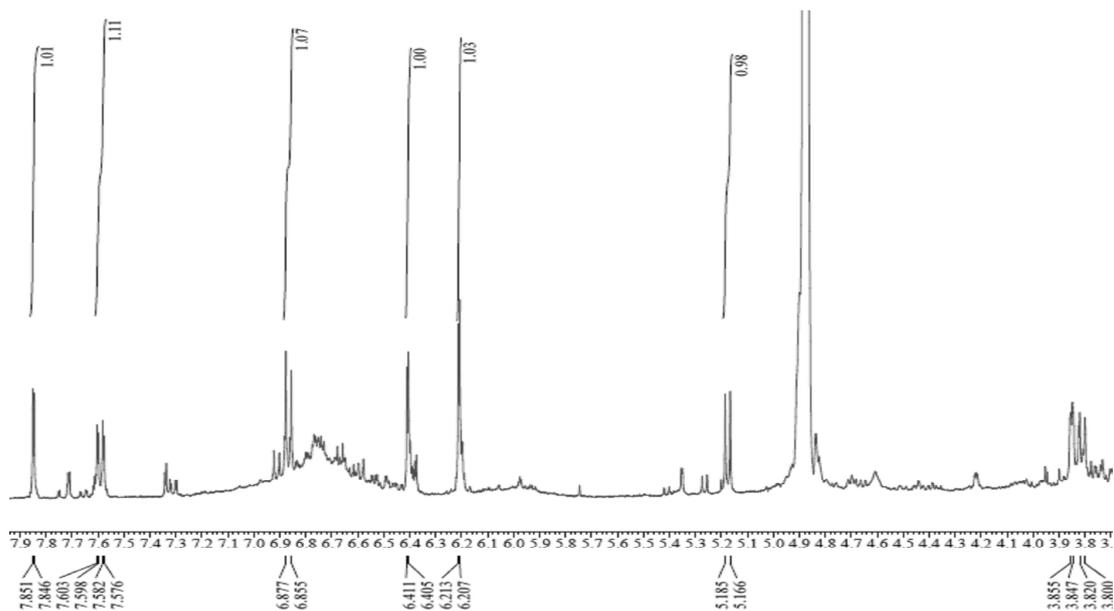


Figure 11. ^1H NMR spectrum of compound **2** (CD_3OD).

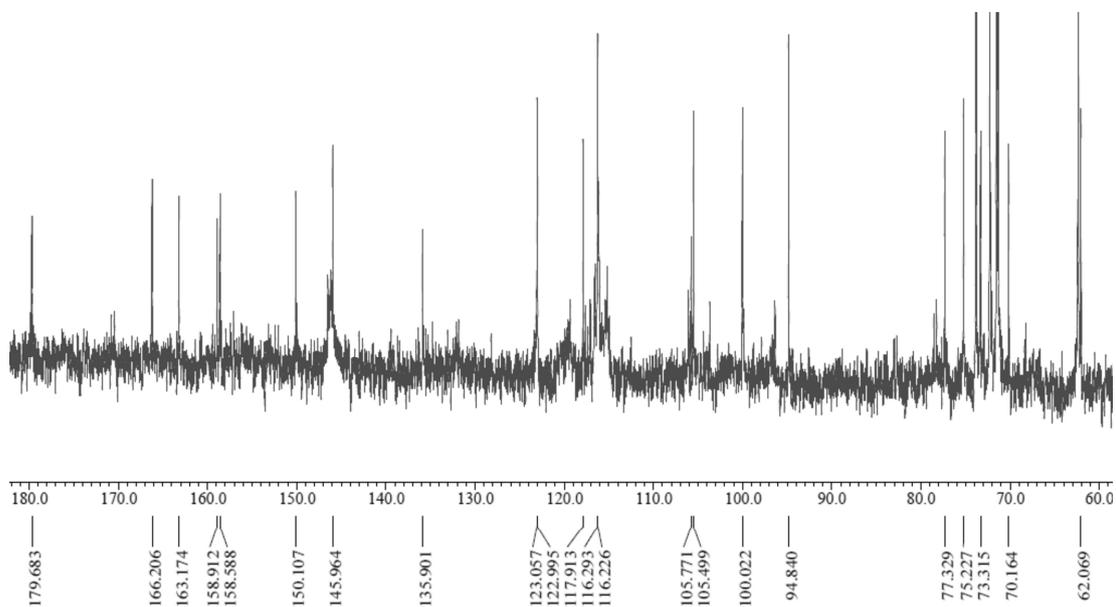


Figure 12. ^{13}C NMR spectrum of compound **2** (CD_3OD).

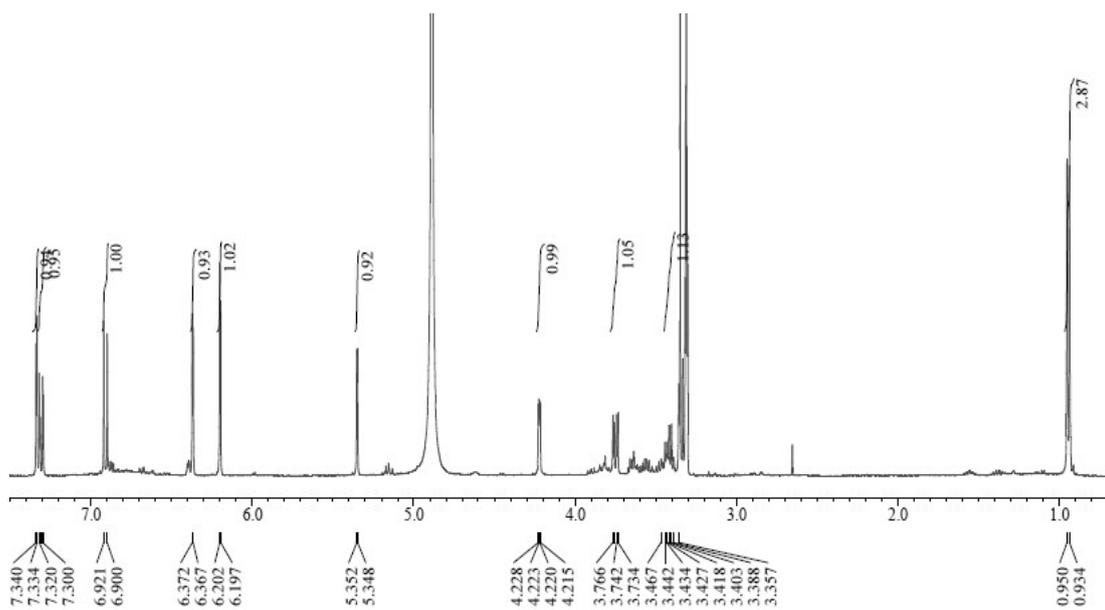


Figure 13. ^1H NMR spectrum of compound **3** (CD_3OD).

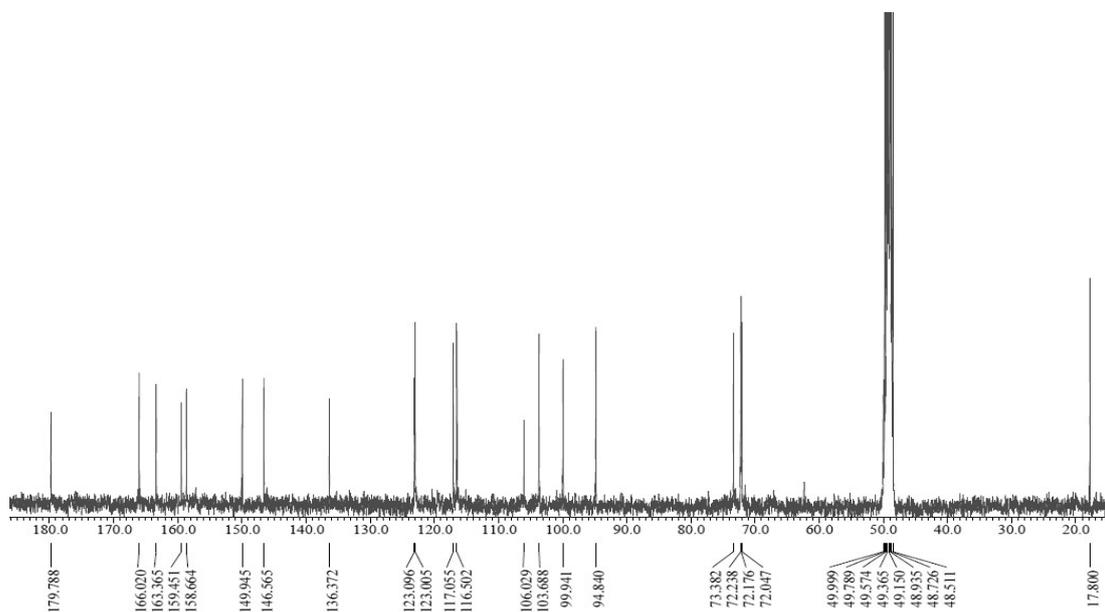


Figure 14. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** (CD_3OD).

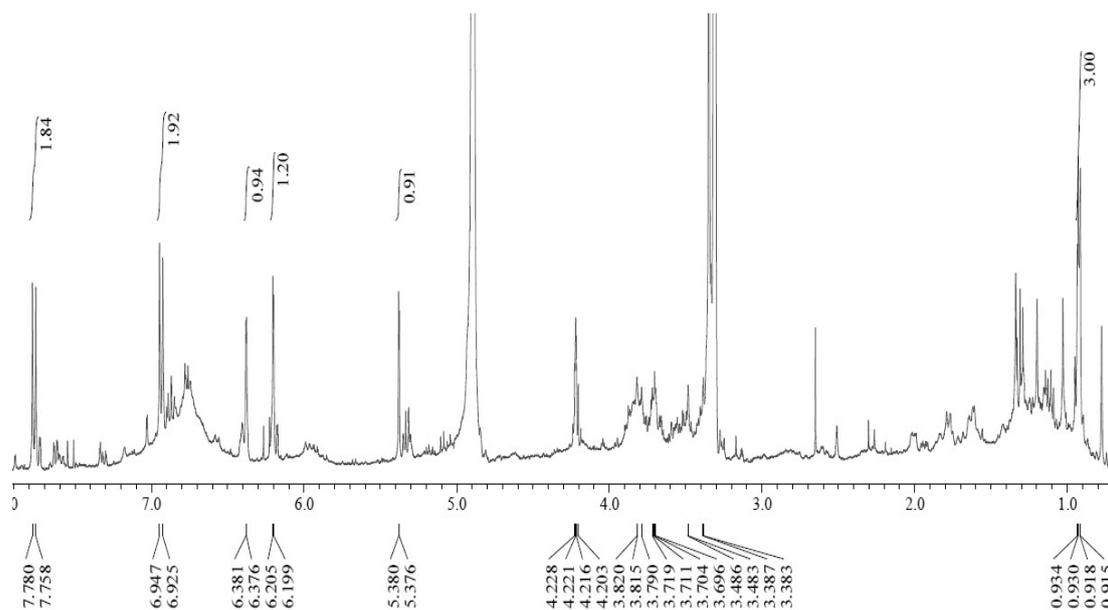


Figure 15. ^1H NMR spectrum of compound **4** (CD_3OD).

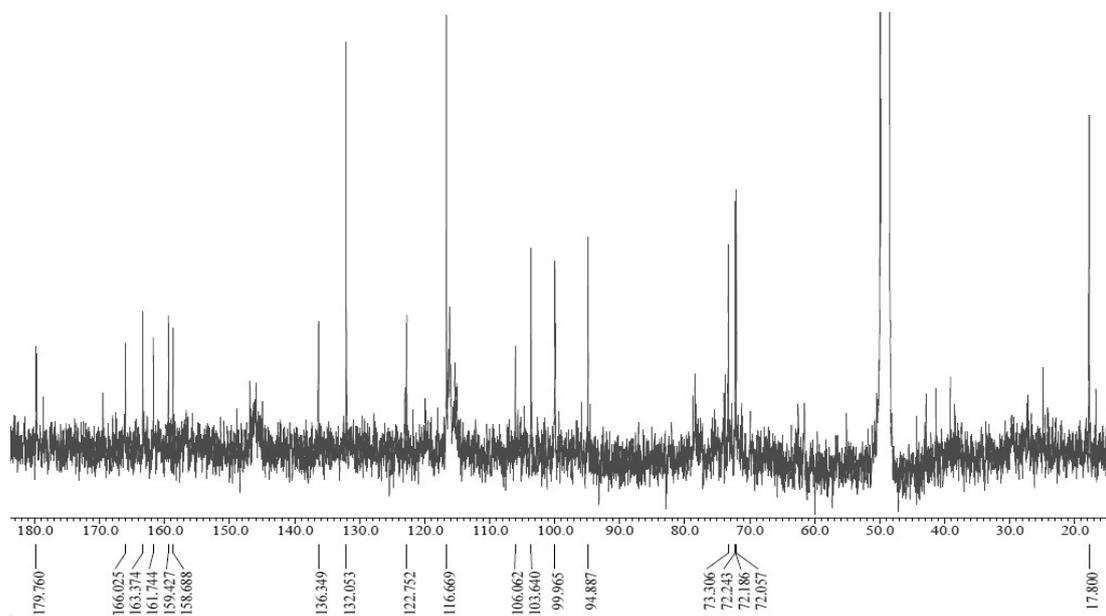


Figure 16. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** (CD_3OD).

Table 4. ¹H and ¹³C NMR data of compound **2-4** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 2 (CD ₃ OD)		Compound 3 (CD ₃ OD)		Compound 4 (CD ₃ OD)	
	$\delta_{\text{H}}(\text{int.}, \text{multi.}, J \text{ Hz})$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(\text{int.}, \text{multi.}, J \text{ Hz})$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}(\text{int.}, \text{multi.}, J \text{ Hz})$	δ_{C}
2		158.9		158.7		158.7
3		135.9		136.4		136.3
4		179.7		179.8		179.8
5		163.2		163.4		163.4
6	6.21 (1H, d, 2.3)	100.0	6.20 (1H, d, 1.8)	99.9	6.20 (1H, d, 2.0)	100.0
7		166.2		166.0		166.0
8	6.41 (1H, d, 2.3)	94.8	6.37 (1H, d, 1.8)	94.8	6.38 (1H, d, 2.0)	94.9
9		158.6		159.5		159.4
10		105.8		106.0		106.1
1'		123.1		123.0		122.8
2'	7.85 (1H, d, 2.0)	116.3	7.34 (1H, d, 2.3)	116.5	7.77 (1H, d, 8.7)	132.0
3'		146.0		146.6	6.94 (1H, d, 8.7)	116.7
4'		150.1		149.9		161.7
5'	6.87 (1H, d, 8.7)	117.9	6.91 (1H, d, 8.2)	117.1	6.94 (1H, d, 8.7)	116.7
6'	7.59 (1H, dd, 8.7, 2.0)	123.0	7.31 (1H, dd, 8.2, 2.3)	123.1	7.77 (1H, d, 8.7)	132.0
1''	5.18 (1H, d, 7.8)	105.5	5.35 (1H, d, 1.8)	103.7	5.38 (1H, d, 1.4)	103.7
2''	3.48-3.86 (m)	73.3	4.22 (1H, dd, 3.2, 1.8)	72.2	3.34 - 4.20 (m)	72.1
3''		75.2	3.75 (1H, dd, 9.4, 3.2)	72.1		72.3
4''		70.2	3.41 (1H, m)	73.4		73.3
5''		77.3	3.35 (1H, m)	72.0		72.2
6''		62.1	0.94 (3H, d, 6.4)	17.8	0.92 (3H, d, 6.0)	17.8

3) Compound 5의 구조 동정

Compound 5는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.82 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.49 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 적분값과 coupling constant 값을 통해 *ortho*-와 *meta*-coupling을 하고 있는 대칭 구조의 aromatic proton이 있는 것으로 예상하였다. 또한, δ_{C} 62.4-95.9의 피크와 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 5.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크의 coupling constant를 통해 β -form의 glucopyranoside가 결합되어 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁹과 비교한 결과, compound 5는 1-*O-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside으로 확인되었다(Figure 17-19, Table 5).

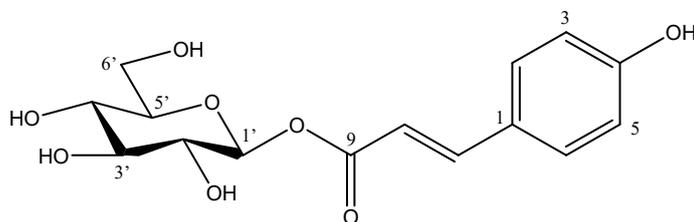


Figure 17. Chemical structure of compound 5.

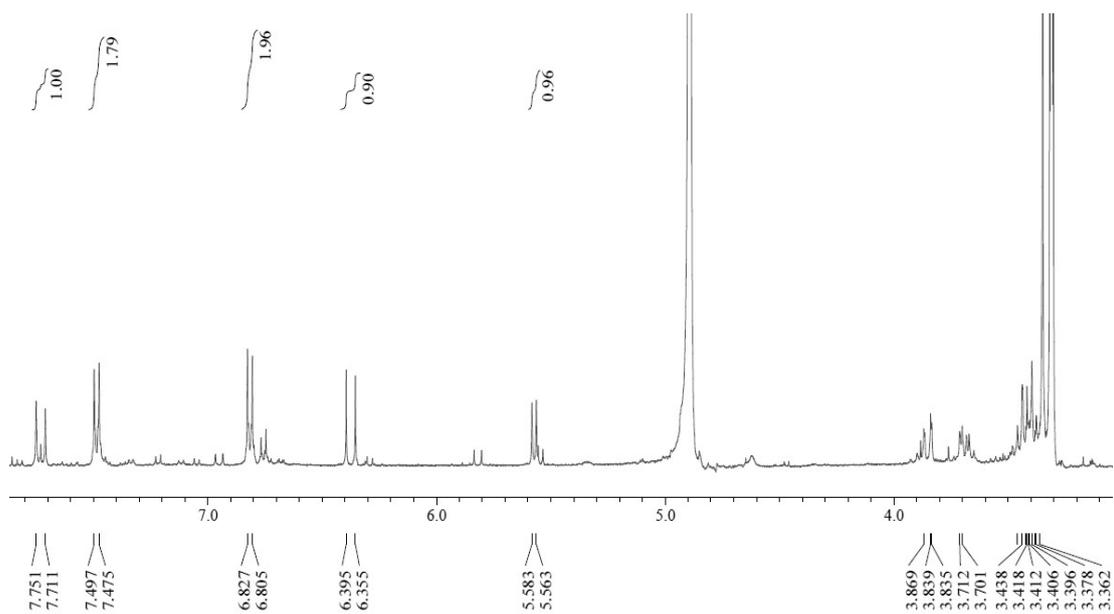


Figure 18. ^1H NMR spectrum of compound **5** (CD_3OD).

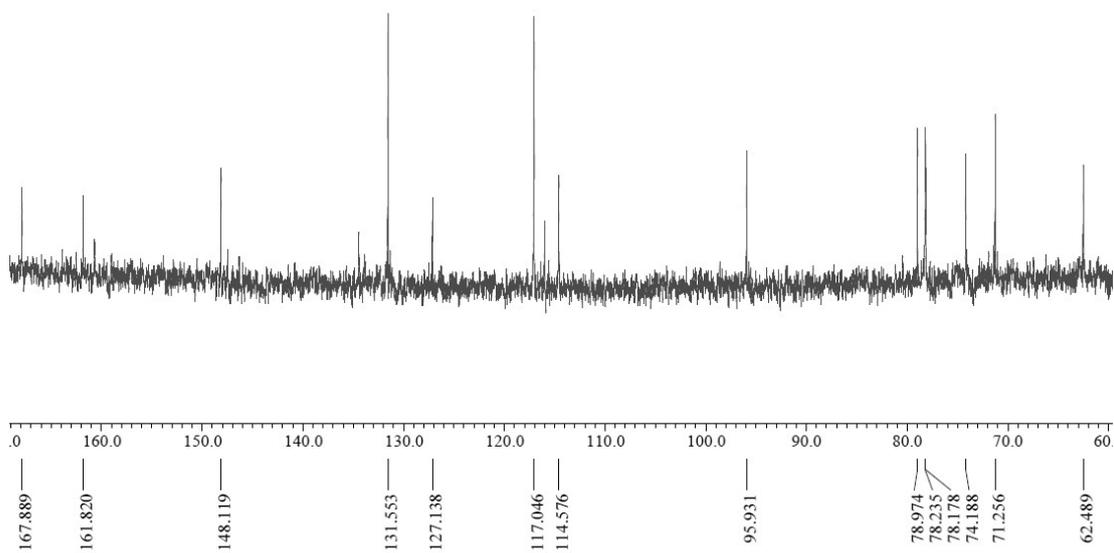


Figure 19. ^{13}C NMR spectrum of compound **5** (CD_3OD).

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

No.	Compound 5 (CD_3OD)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		127.1
2	7.49 (1H, d, 8.7)	131.6
3	6.82 (1H, d, 8.7)	117.0
4		161.8
5	6.82 (1H, d, 8.7)	117.0
6	7.49 (1H, d, 8.7)	131.6
7	7.73 (1H, d, 16.0)	148.1
8	6.38 (1H, d, 16.0)	114.6
9		167.9
1'	5.58 (1H, d, 7.8)	95.9
2'		74.2
3'		79.0
4'		71.3
5'		78.2
6'		62.4

4) Compound 6과 7의 구조 동정

Compound 6은 ^{13}C NMR spectrum에서 30개의 carbon 피크와 ^1H NMR spectrum에서 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 181.9 피크를 통해 한 개의 carbonyl group을 예상하였고, δ_{C} 140.0, 126.8 피크를 통해 한 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였으며, δ_{C} 78.3, 69.8, 66.4 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^3 혼성 carbon이 세 개 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³⁰과 비교한 결과, compound 6는 asiatic acid으로 확인되었다(Figure 20-22, Table 6).

compound 7은 compound 6과 ^1H 및 ^{13}C spectrum을 통해 유사한 구조로 예상하였고, δ_{C} 84.6, 69.6 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^3 혼성 carbon이 두 개 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³¹과 비교한 결과, compound 7는 corosolic acid으로 확인되었다(Figure 20, 23, 24, Table 6).

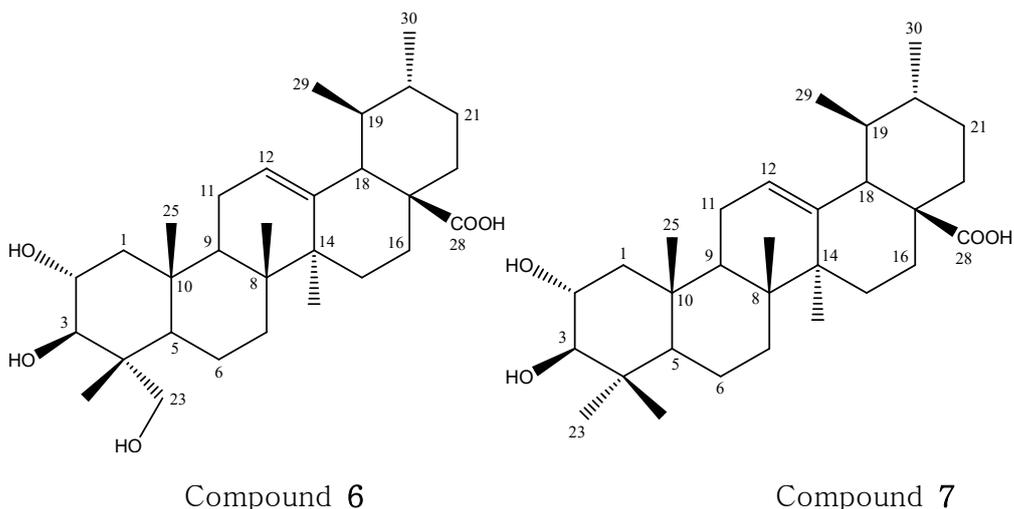


Figure 20. Chemical structure of compound 6 and 7.

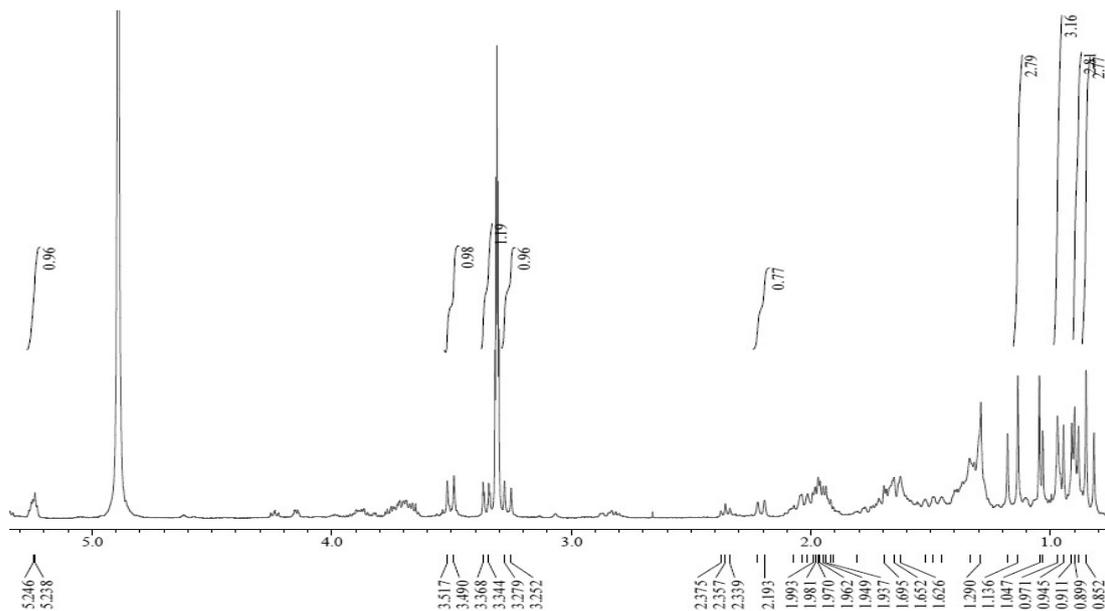


Figure 21. ^1H NMR spectrum of compound **6** (CD_3OD).

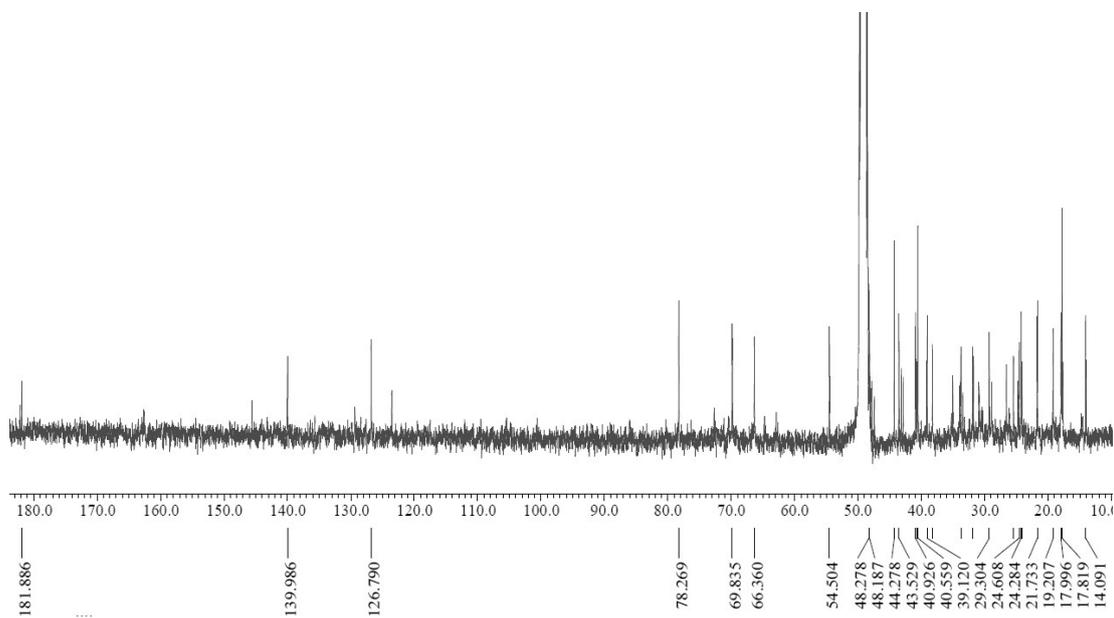


Figure 22. ^{13}C NMR spectrum of compound **6** (CD_3OD).

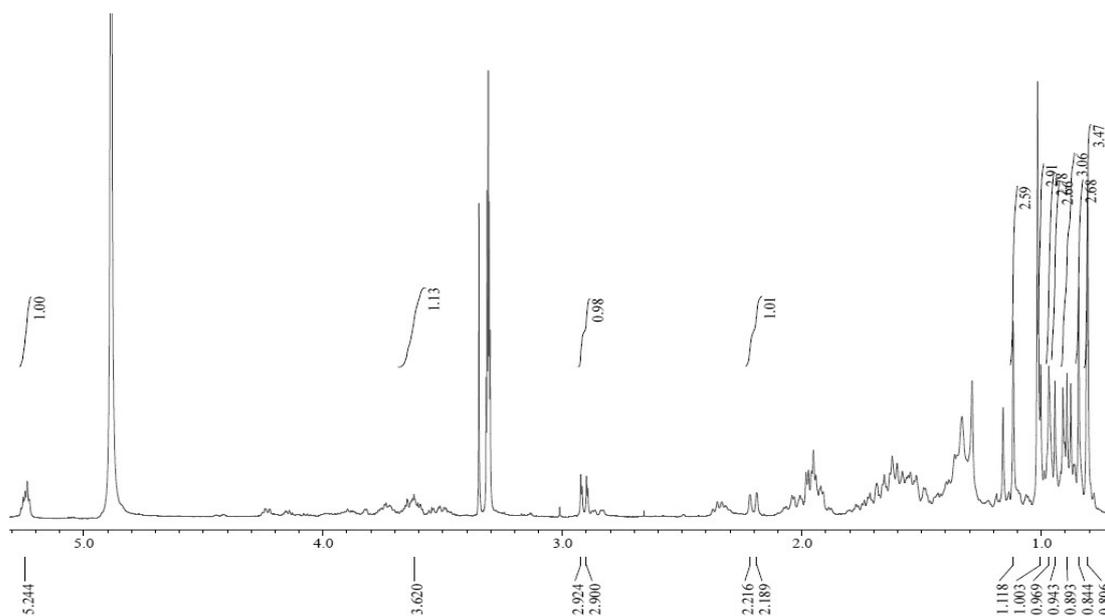


Figure 23. ^1H NMR spectrum of compound **7** (CD_3OD).

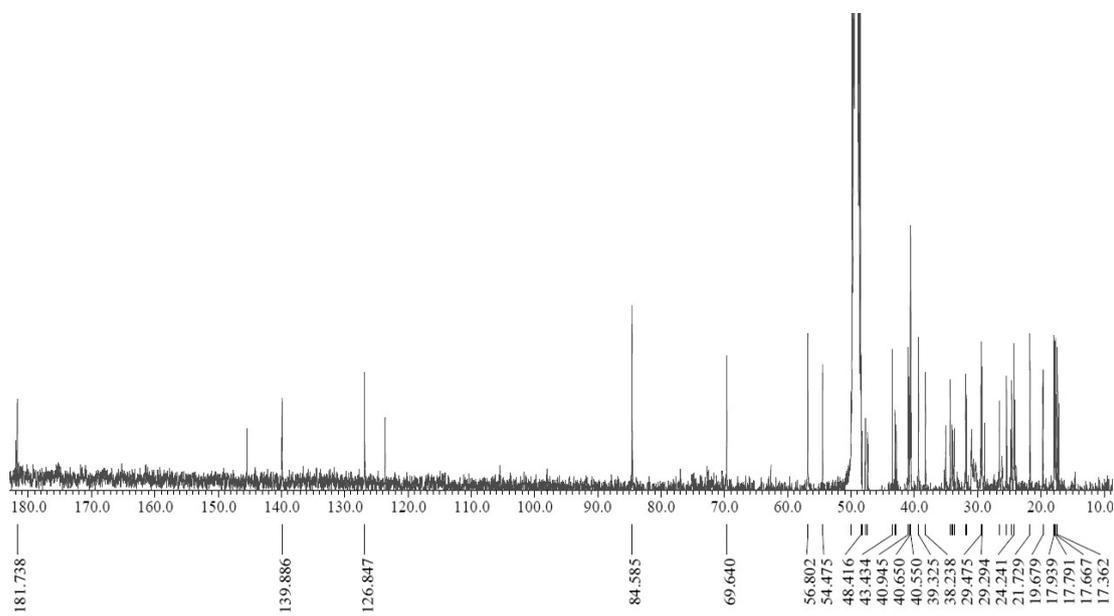


Figure 24. ^{13}C NMR spectrum of compound **7** (CD_3OD).

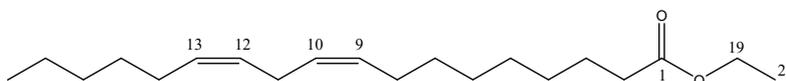
Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **6** and **7** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 6 (CD_3OD)		Compound 7 (CD_3OD)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		48.2		48.5
2		69.8	3.62 (1H, m)	69.6
3	3.35 (1H, d, 9.6)	78.3	2.90 (1H, d, 9.6)	84.6
4		44.3		40.6
5		48.2		56.8
6		19.2		19.7
7		33.8		34.3
8		40.9		40.9
9		48.3		48.4
10		39.1		39.3
11		24.3		24.2
12	5.25 (1H, m)	126.8	5.24 (1H, m)	126.8
13		140.0		139.9
14		43.5		43.4
15		29.3		29.2
16		25.5		25.4
17		48.3		48.4
18	2.21 (1H, d, 11.5)	54.5	2.20 (1H, d, 11.0)	54.5
19		40.6		40.5
20		40.7		40.5
21		31.9		31.9
22		38.3		38.2
23	3.27 (1H, d, 11.0) 3.50 (1H, d, 11.0)	66.4	1.02 (3H, s)	29.5
24	0.70 (3H, s)	14.1	0.94 (3H, s)	17.4
25		17.8	0.84 (3H, s)	17.9
26	0.85 (3H, s)	18.0	0.97 (3H, s)	17.8
27		24.6	1.11 (3H, s)	24.6
28		181.9		181.7
29	0.89 (3H, d, 6.4)	17.8	0.90 (3H, d, 6.4)	17.7
30	0.97 (3H, s)	21.7	0.89 (3H, d, 6.4)	21.7

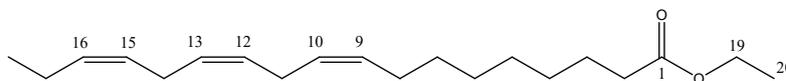
5) Compound 8, 9의 구조동정

Compound 8은 ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 174.2 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 있는 것으로 예상하였으며, δ_{C} 130.5, 130.4, 128.5, 128.4 피크를 통해 두 개의 이중결합 있는 것으로 예상하였다. 또한, δ_{H} 4.10 (2H, m) 피크와 δ_{C} 60.4 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였고, δ_{H} 1.21-1.23 (3H, m), δ_{C} 14.5 피크를 통해 한 개의 methyl group이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³²과 비교한 결과, compound 8은 ethyl linoleate(α -linoleic acid, ethyl ester)로 확인되었다(Figure 25-27, Table 7).

Compound 9는 compound 8과 유사한 구조로 예상하였으며, ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 132.2, 130.5, 128.5, 128.4, 127.9, 127.4 피크를 통해 세 개의 이중결합 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³²과 비교한 결과, compound 9는 ethyl linolenate(α -linolenic acid, ethyl ester)으로 확인되었다(Figure 25-27, Table 7).



Compound 8



Compound 9

Figure 25. Chemical structure of compound 8 and 9.

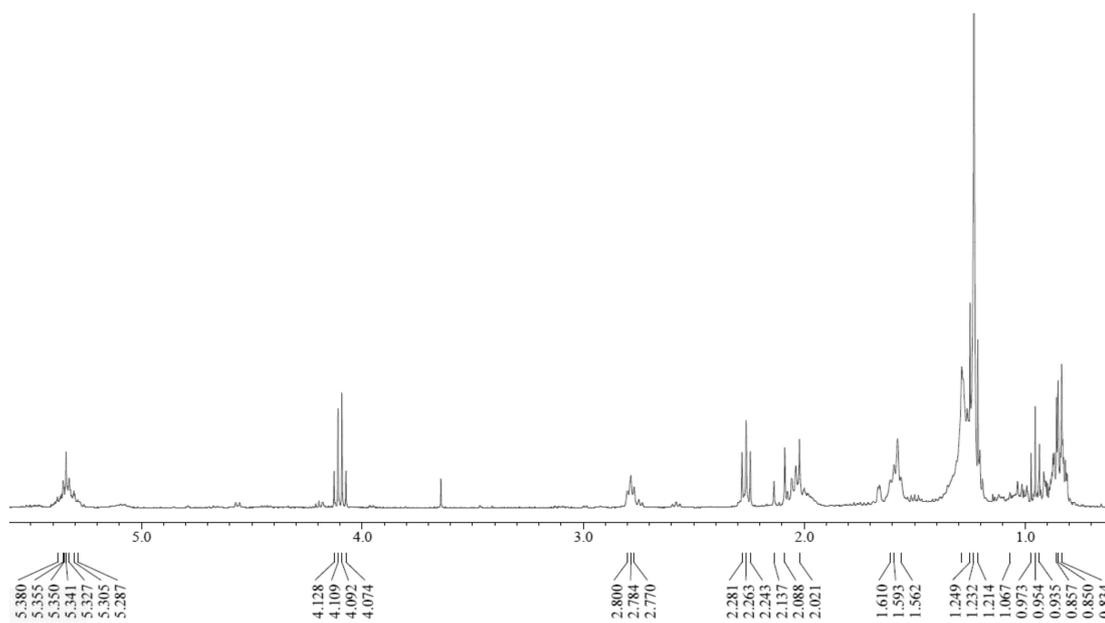


Figure 26. ^1H NMR spectrum of compound **8** and **9** (CDCl_3).

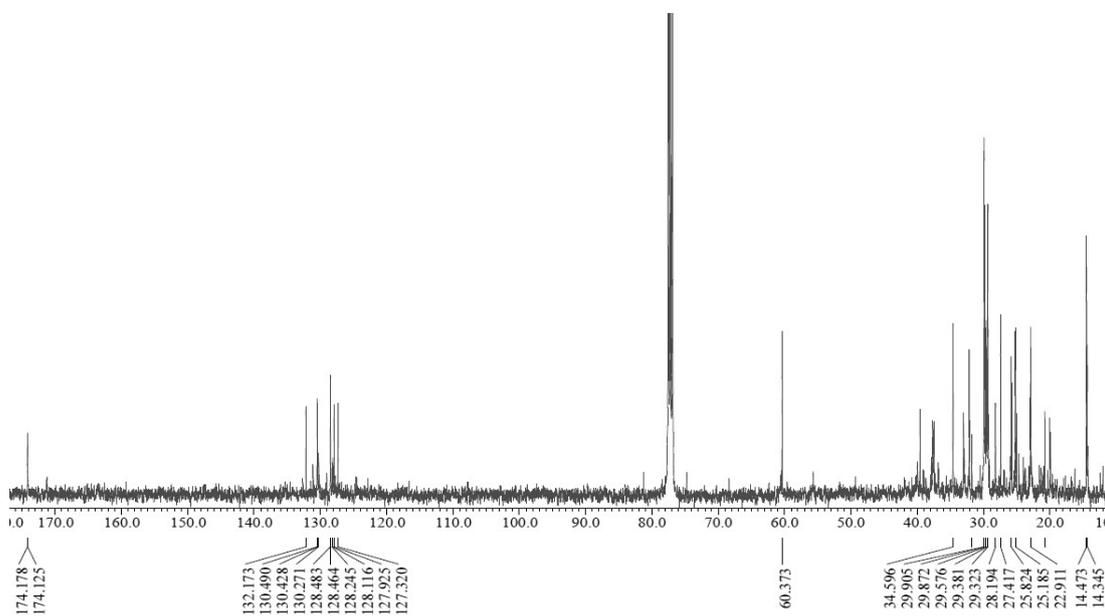


Figure 27. ^{13}C NMR spectrum of compound **8** and **9** (CDCl_3).

Table 7. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **8** and **9** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 8		Compound 9	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		174.2		174.2
2	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6
3	1.61-1.56 (2H, m)	25.2	1.61-1.56 (2H, m)	25.2
4		27.4		27.4
5		29.3		29.3
6		29.6		29.6
7		29.9		29.9
8	2.08-2.03 (2H, m)	27.4	2.08-2.03 (2H, m)	27.4
9	5.38-5.29 (1H, m)	130.4	5.38-5.29 (1H, m)	132.2-127.4
10	5.38-5.29 (1H, m)	128.4	5.38-5.29 (1H, m)	132.2-127.4
11	2.79 (2H, m)	25.8	2.79 (2H, m)	25.8
12	5.38-5.29 (1H, m)	128.5	5.38-5.29 (1H, m)	132.2-127.4
13	5.38-5.29 (1H, m)	130.5	5.38-5.29 (1H, m)	132.2-127.4
14	2.08-2.03 (2H, m)	27.4	2.08-2.03 (2H, m)	27.4
15		29.4	5.38-5.29 (1H, m)	132.2-127.4
16		31.8	5.38-5.29 (1H, m)	132.2-127.4
17		22.9		22.9
18	0.84 (3H, m, 8.7)	14.3	0.84 (3H, m, 8.7)	14.3
19	4.10 (2H, m)	60.4	4.10 (2H, m)	60.4
20	1.23-1.21 (3H, m)	14.5	1.23-1.21 (3H, m)	14.5

6) Compound 10의 구조동정

Compound 10은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개의 피크가 관찰되었으며, δ_{H} 5.39 (1H, m) 및 δ_{C} 140.6, 123.2 피크를 통해 한 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. δ_{H} 0.82-0.85 (15H, m)에서 다섯 개의 singlet 피크와 δ_{C} 22.8, 22.9, 19.9, 19.9, 16.4 피크를 통해 다섯 개의 methyl group이 있는 것으로 예상하였다. 또한, δ_{H} 4.13 (2H, t, $J = 7.8$) 피크와 δ_{C} 59.6 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³³과 비교한 결과, compound 10는 phytol으로 확인되었다 (Figure 28-30, Table 8).

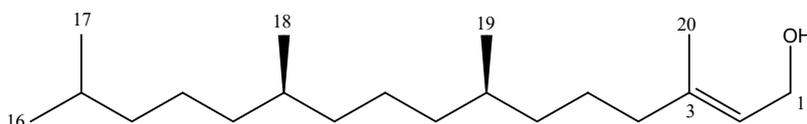


Figure 28. Chemical structure of compound 10.

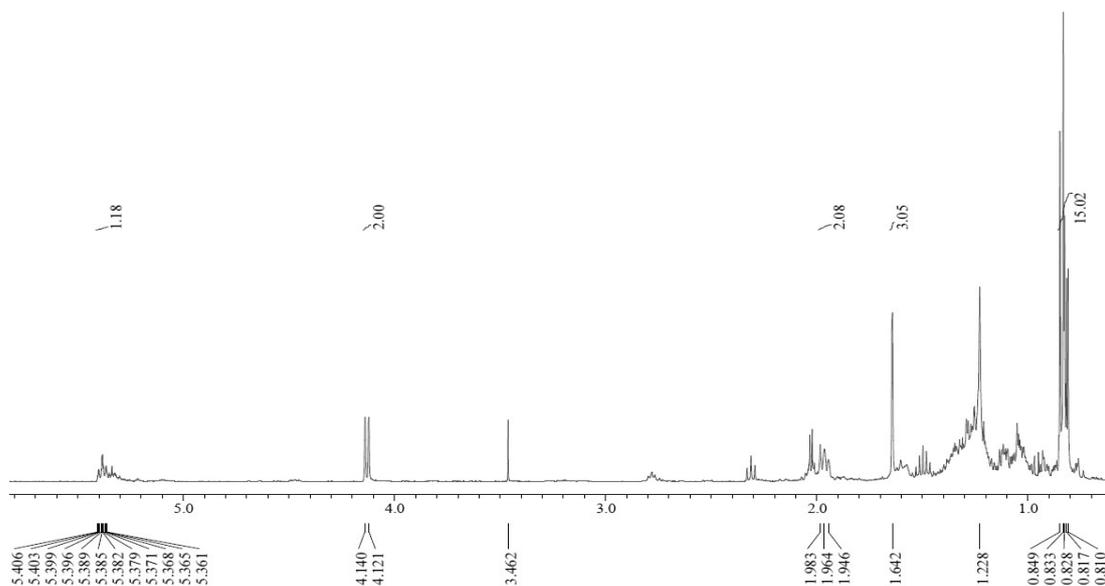


Figure 29. ^1H NMR spectrum of compound **10** (CDCl_3).

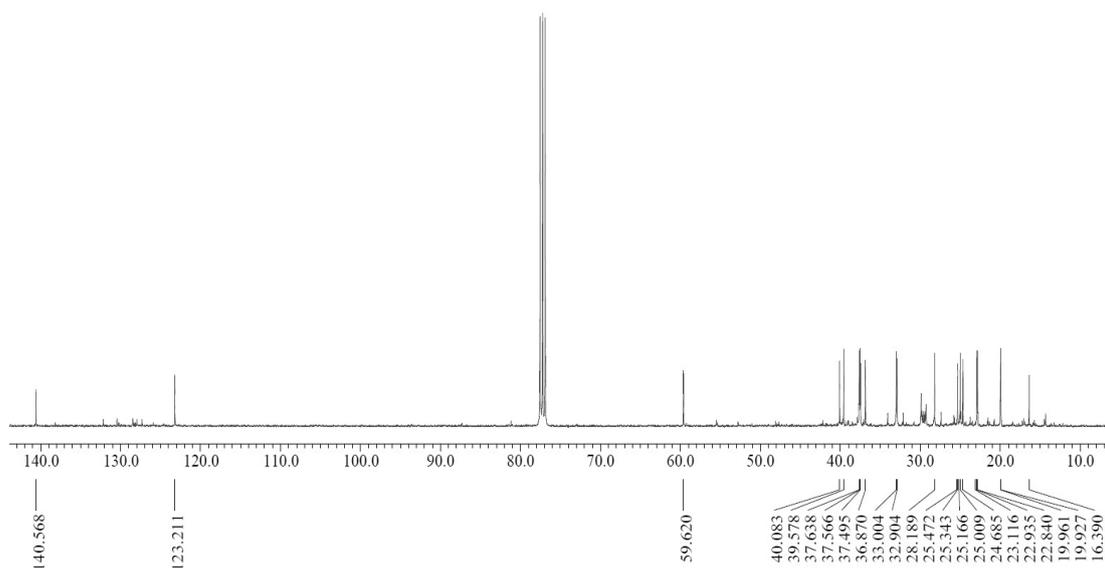


Figure 30. ^{13}C NMR spectrum of compound **10** (CDCl_3).

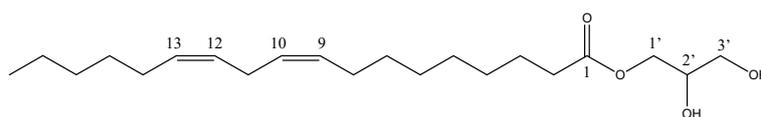
Table 8. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **10** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 10	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1	4.13 (2H, d, 7.8)	59.6
2	5.39 (1H, m)	123.2
3		140.6
4	1.96 (2H, t, 7.6)	39.6
5		25.3
6		36.9
7		32.9
8		37.6
9		24.7
10		37.6
11		33.0
12		37.5
13		25.0
14		40.1
15		28.2
16	0.81-0.85 (3H, overlapped)	22.8
17	0.81-0.85 (3H, overlapped)	22.9
18	0.81-0.85 (3H, overlapped)	20.0
19	0.81-0.85 (3H, overlapped)	19.9
20	0.81-0.85 (3H, overlapped)	16.4

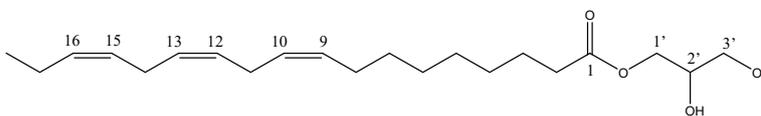
7) Compound 11, 12의 구조동정

Compound 11은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개의 피크가 관찰되었으며, 이 중 δ_{C} 175.6 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 있는 것으로 예상하였고, δ_{H} 5.34 (4H, m) 피크와 δ_{C} 131.1, 131.0, 129.3, 129.2 피크를 통해 두 개의 이중결합 있는 것으로 예상하였다. 또한, δ_{H} 4.15 (1H, dd, $J = 11.2, 4.6$), 4.06 (1H, dd, $J = 11.2, 6.2$), 3.82 (1H, m), 3.55 (2H, $J = \text{dd}, 5.5, 1.8$) 피크와 δ_{C} 66.6, 71.3, 64.2 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³⁴과 비교한 결과, compound 11은 1-linoleoyl glycerol로 확인되었다(Figure 31-33, Table 9).

Compound 12는 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 compound 11과 유사한 구조로 예상하였으며, 이 중 δ_{C} 132.8, 131.2, 129.3, 129.3, 129.0, 128.4 피크를 통해 세 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³⁴과 비교한 결과, compound 12는 1-linolenoyl glycerol로 확인되었다(Figure 31-33, Table 9).



Compound 11



Compound 12

Figure 31. Chemical structure of compound 11 and 12.

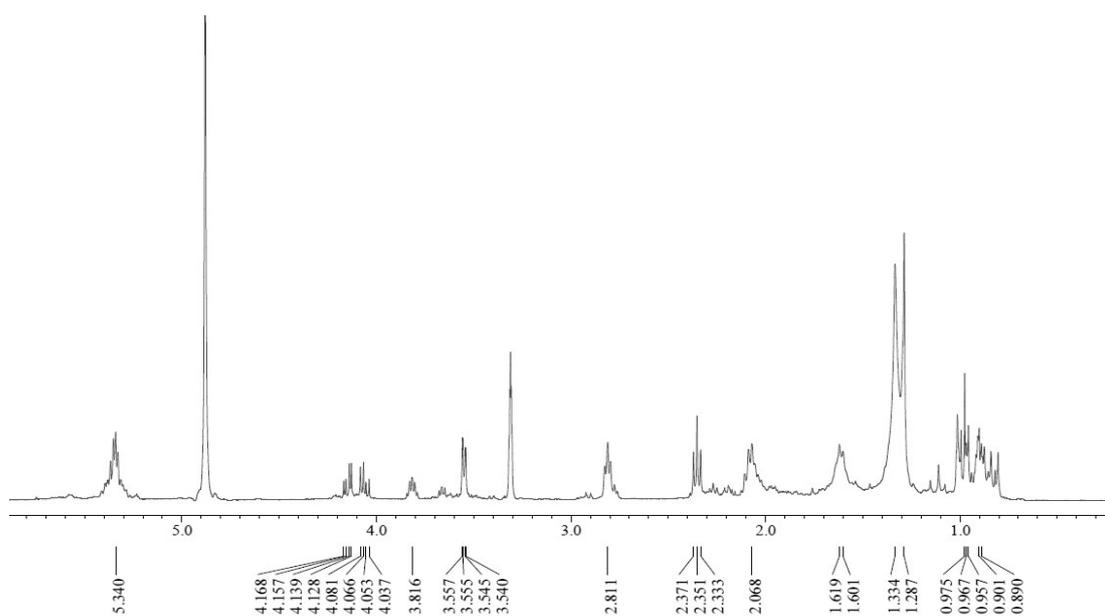


Figure 32. ^1H NMR spectrum of compound **11** and **12** (CDCl_3).

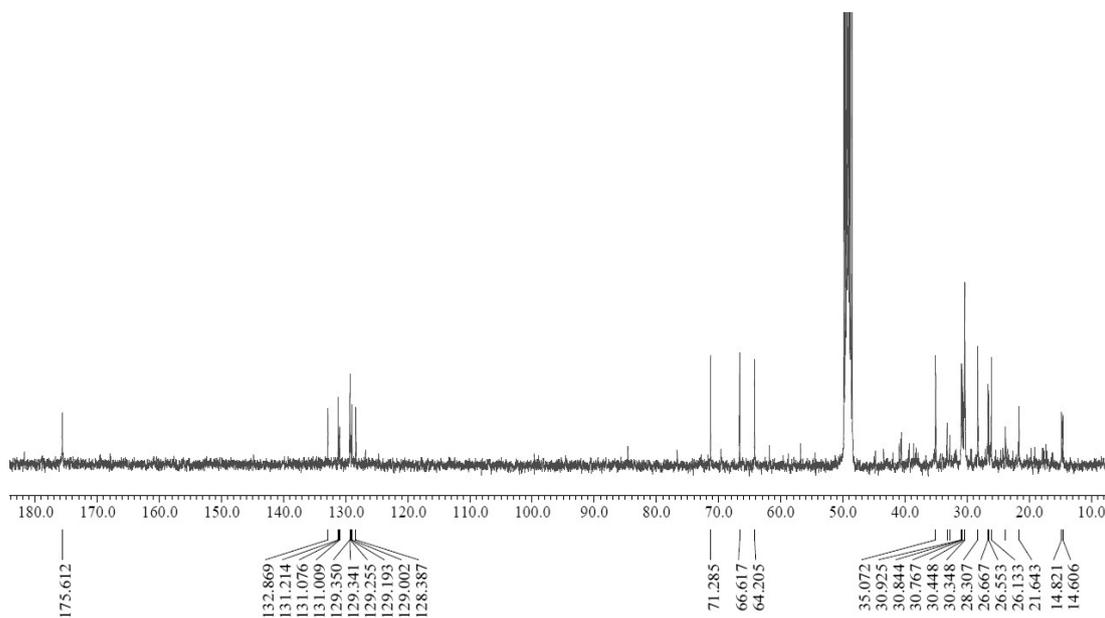


Figure 33. ^{13}C NMR spectrum of compound **11** and **12** (CDCl_3).

Table 9. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **11** and **12** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 11		Compound 12	
	δ_{H} (Int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (Int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		175.6		175.6
2		35.1	2.35 (2H, t, 7.6)	35.1
3		26.1		26.1
4		30.3		30.3
5		30.9		30.3
6		30.8		30.8
7		30.8		30.4
8	2.07 (2H, m)	26.6	2.07 (2H, m)	28.3
9	5.34 (1H, m)	131.1	5.34 (1H, m)	132.8
10	5.34 (1H, m)	129.3	5.34 (1H, m)	128.4
11	2.35 (2H, m)	23.9		26.6
12	5.34 (1H, m)	129.2	5.34 (1H, m)	129.3
13	5.34 (1H, m)	131.0	5.34 (1H, m)	129.3
14	2.07 (2H, m)	28.3	2.81 (2H, m)	26.7
15		30.3	5.34 (1H, m)	129.0
16		33.2	5.34 (1H, m)	131.2
17		23.8	2.07 (2H, m)	21.6
18	0.90 (3H, m)	14.6	0.97 (3H, t)	14.8
1'	4.15 (1H, dd, 11.2, 4.6)	66.6	4.15 (1H, dd, 11.5, 4.6)	66.6
	4.06 (1H, dd, 11.2, 6.2)		4.06 (1H, dd, 11.2, 6.2)	
2'	3.82 (1H, m)	71.3	3.82 (1H, m)	71.3
3'	3.55 (2H, dd, 5.5, 1.8)	64.2	3.55 (2H, dd, 5.5, 1.8)	64.2

4. HPLC 함량 분석

HPLC를 이용하여 등수국 잎 추출물, 분획물 및 분리한 화합물의 정성 및 정량 분석을 실시하였다. HPLC 분석 결과, 추출물 및 EtOAc 분획물 피크의 머무름 시간 중 10.7분은 compound 1로 23.5분은 compound 3으로 확인되었다. 또한 compound 1은 추출물에서 5.48 mg/g, EtOAc 분획물에서 32.36 mg/g의 함량이 확인되었으며, compound 3은 추출물에서 30.06 mg/g, EtOAc 분획물에서 178.57 mg/g의 함량이 확인되었다.

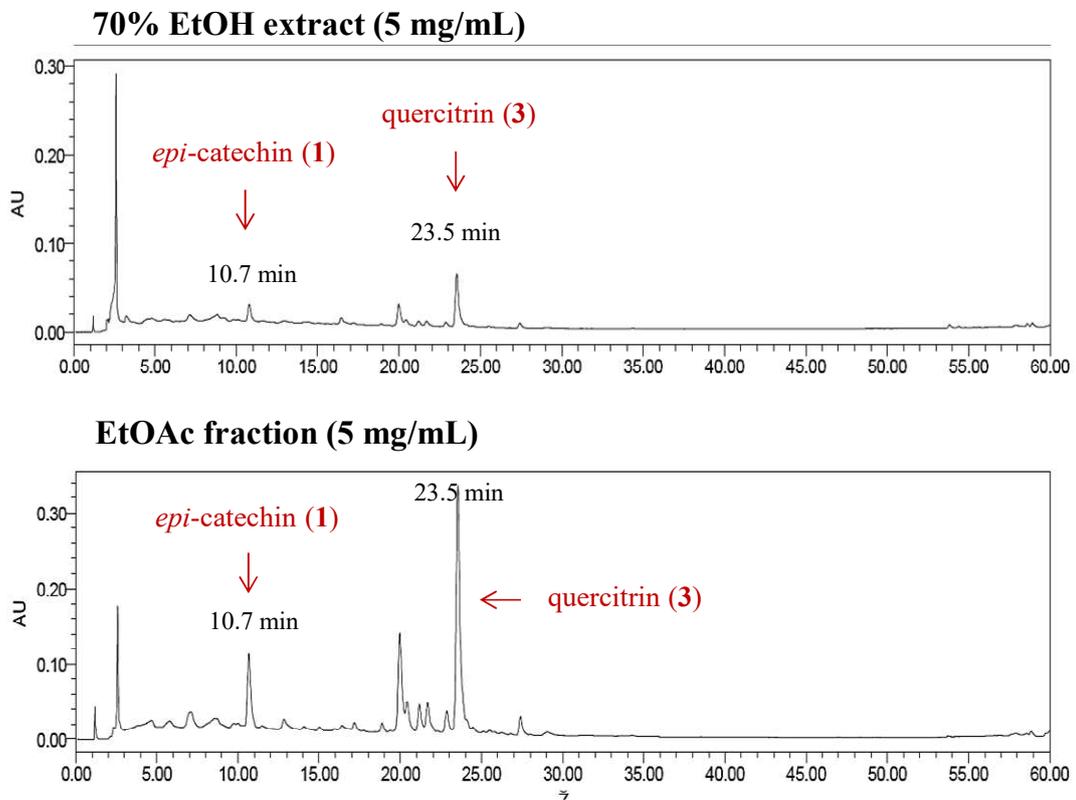


Figure 34. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract, EtOAc fraction.

Table 10. Contents of isolated compounds from *H. petiolaris* leaves by HPLC

	Compound 1	Compound 3
70% EtOH extract	5.48	30.06
EtOAc fraction	32.36	178.57

Unit: mg/g

5. 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항산화

가. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 표준물질 gallic acid의 표준검정곡선을 이용하여 등수국 있 추출물 및 용매 분획물 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물, EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 각 146.1 ± 0.6 mg, 194.8 ± 0.7 , 157.9 ± 0.2 mg/g GAE으로 다른 분획물에 비해 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 35).

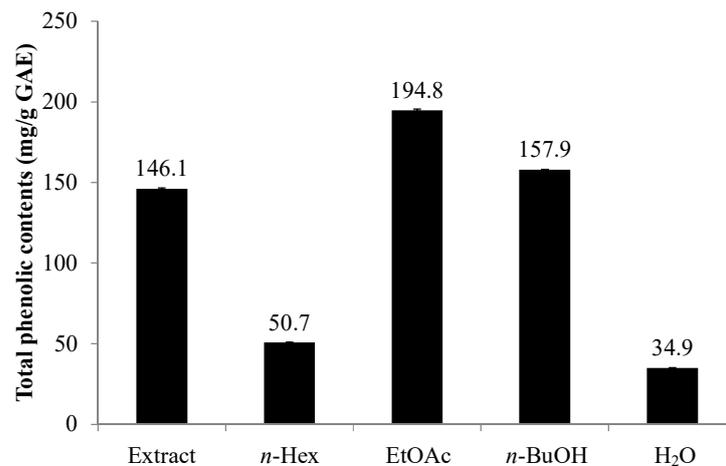


Figure 35. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

나. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin의 표준검정곡선을 이용하여 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물에서 88.4 ± 0.7 mg/g QE으로 다른 분획물에 비해 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 36).

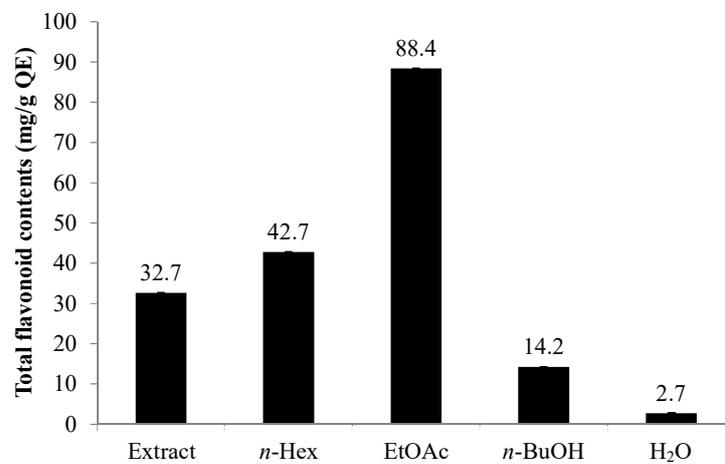


Figure 36. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

다. DPPH radical 소거 활성 측정

등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 3.13-100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀값이 각각 25.1 16.8 18.0 µg/mL로 다른 분획물에 비해 우수한 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 37, Table 11).

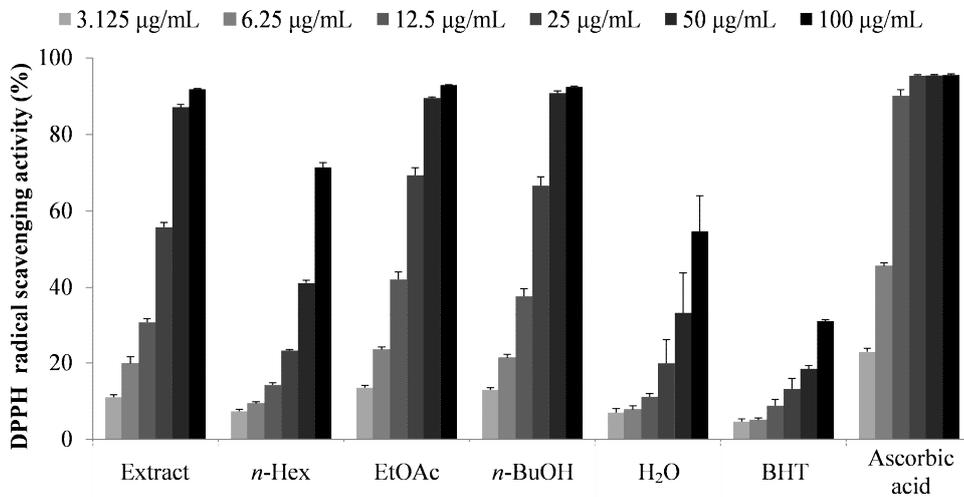


Figure 37. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 11. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT	Ascorbic acid
SC ₅₀ (µg/mL)	25.1	66.2	16.8	18.0	87.8	>100	6.9

라. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 각 시료들은 3.13-100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 실험 결과, 추출물, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀값이 각각 10.0, 7.1, 8.1 µg/mL로 대조군과 비슷한 ABTS⁺ radical 소거 활성이 나타났다(Figure 38, Table 12).

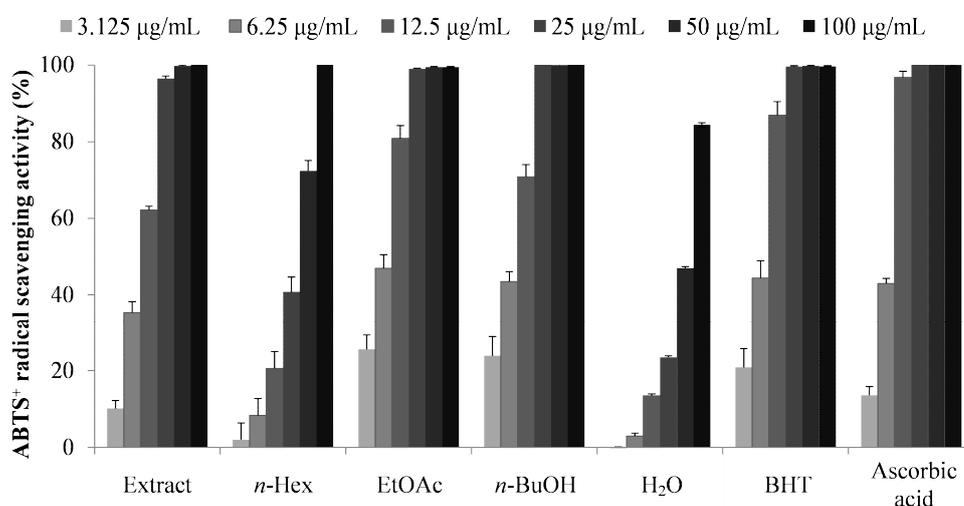


Figure 38. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 12. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT	Ascorbic acid
SC ₅₀ (µg/mL)	10.0	33.6	7.1	8.1	57.3	7.2	7.2

마. 세포 보호 효과

(1) 세포 독성 평가 (MTT assay)

HaCaT cell을 이용하여 등수국 잎의 추출물 및 용매 분획물에 대한 세포독성 및 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 시료의 농도를 정하기 위해 HaCaT cell에 대한 추출물 및 용매 분획물의 세포 독성을 확인하였다. 실험 결과, 추출물 및 분획물 중 *n*-Hex, EtOAc 분획물 5, 10 µg/mL을 처리했을 때 세포 생존율이 80% 이상으로 나타났다(Figure 39). 따라서 본 실험에서 사용될 *n*-Hex, EtOAc 분획물의 농도는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내는 농도인 10 µg/mL 이하로 설정하였다.

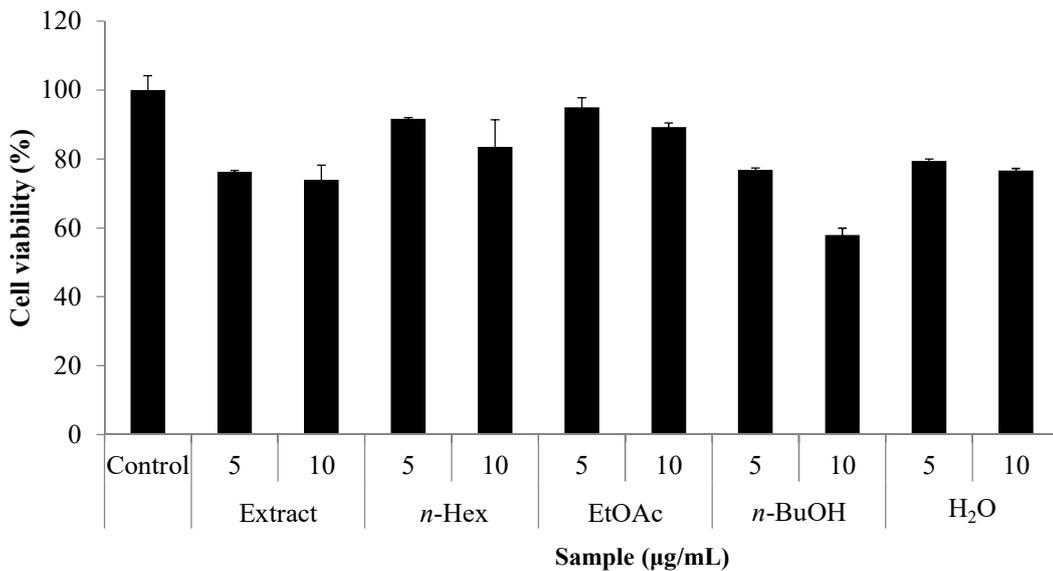


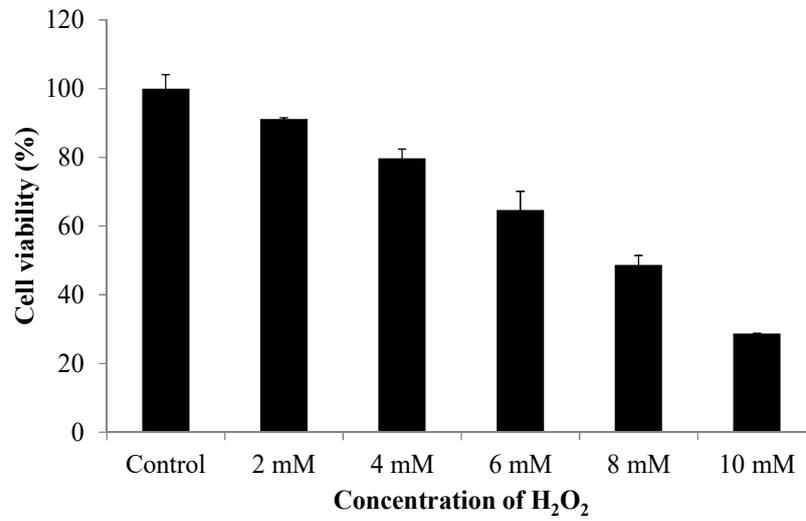
Figure 39. Cell viability of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

(2) 과산화수소 (H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

(가) *n*-Hex 분획물

등수국 잎 *n*-Hex 분획물에 대하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 과산화수소의 농도를 정하기 위하여 HaCaT cell에 대한 과산화수소의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 6 mM 농도에서 세포 생존율은 64.7%로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 6 mM의 과산화수소를 처리하여 손상된 세포에 2.5, 5, 10 µg/mL의 *n*-Hex 분획물을 처리하였다. 그 결과, 세포 생존율은 각각 69.9%, 71.5%, 79.6%로 나타났으며, 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 5.2%, 6.8%, 14.9%의 세포 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다(Figure 40).

(A)



(B)

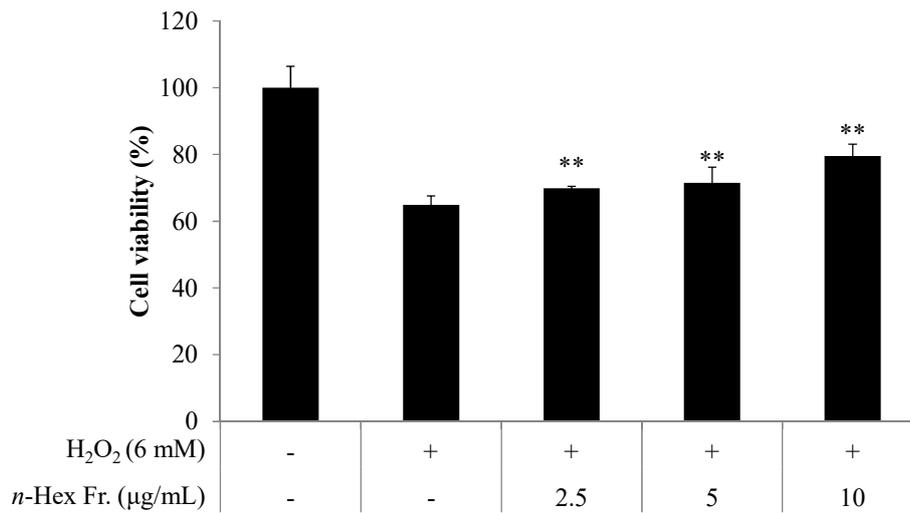
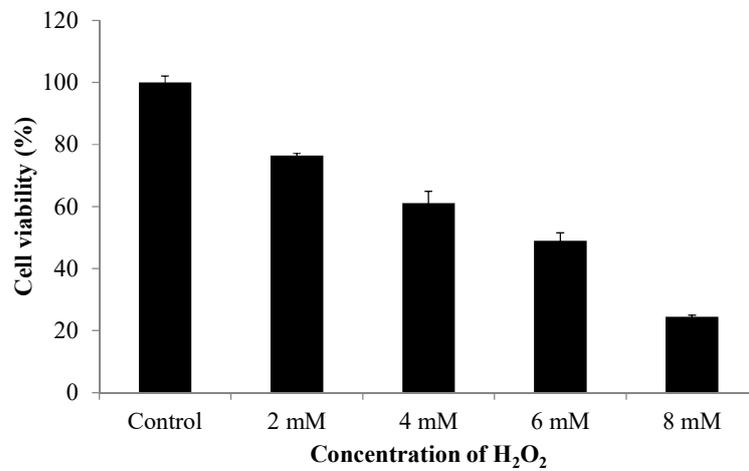


Figure 40. (A) Cell viability on HaCaT cells damaged by H₂O₂. (B) Cell protective effects *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves on HaCaT cells damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(나) EtOAc 분획물

등수국 및 EtOAc 분획물에 대하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 과산화수소의 농도를 정하기 위하여 HaCaT cell에 대한 과산화수소의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 4 mM 농도에서 세포 생존율은 61.2%로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 4 mM의 과산화수소를 처리하여 손상된 세포에 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EtOAc 분획물을 처리하였다. 그 결과, 세포 생존율은 각각 67.8%, 70.8%, 84.9%로 나타났으며, 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 2.8%, 5.8%, 19.9%의 세포 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다(Figure 41).

(A)



(B)

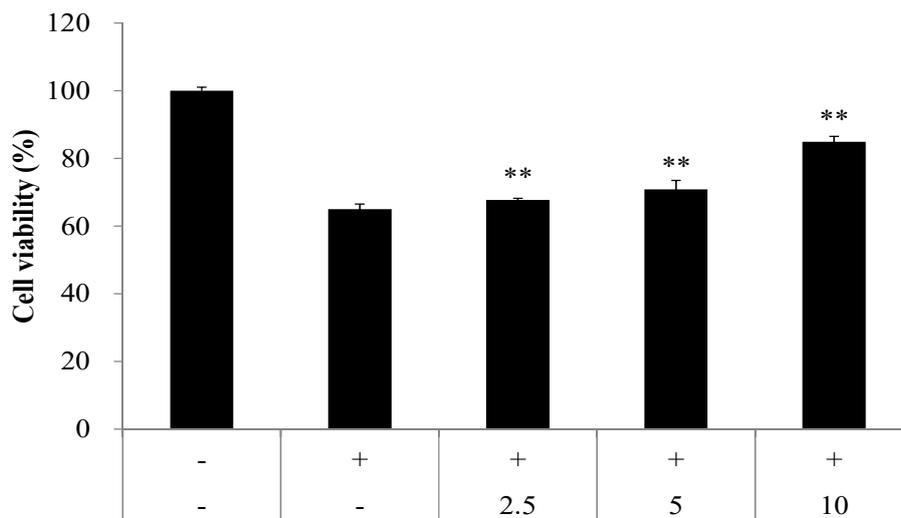


Figure 41. (A) Cell viability on HaCaT cells damaged by H₂O₂. (B) Cell protective effects of EtOAc fraction from *H. petiolaris* leaves on HaCaT cells damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2) 항염 활성 실험 결과

가. Nitric Oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW264.7 세포를 이용하여 등수국 잎의 추출물 및 용매 분획물에 대한 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 먼저, 추출물 및 용매 분획물에 대하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 NO 생성이 억제되었지만, *n*-Hex 분획물은 세포독성이 나타나 추가적인 농도에서 실험을 진행하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 이하에서, EtOAc 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 이하에서 세포 독성 없이 농도의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, IC_{50} 값은 각각 40.9, 95.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Figure 42, 43).

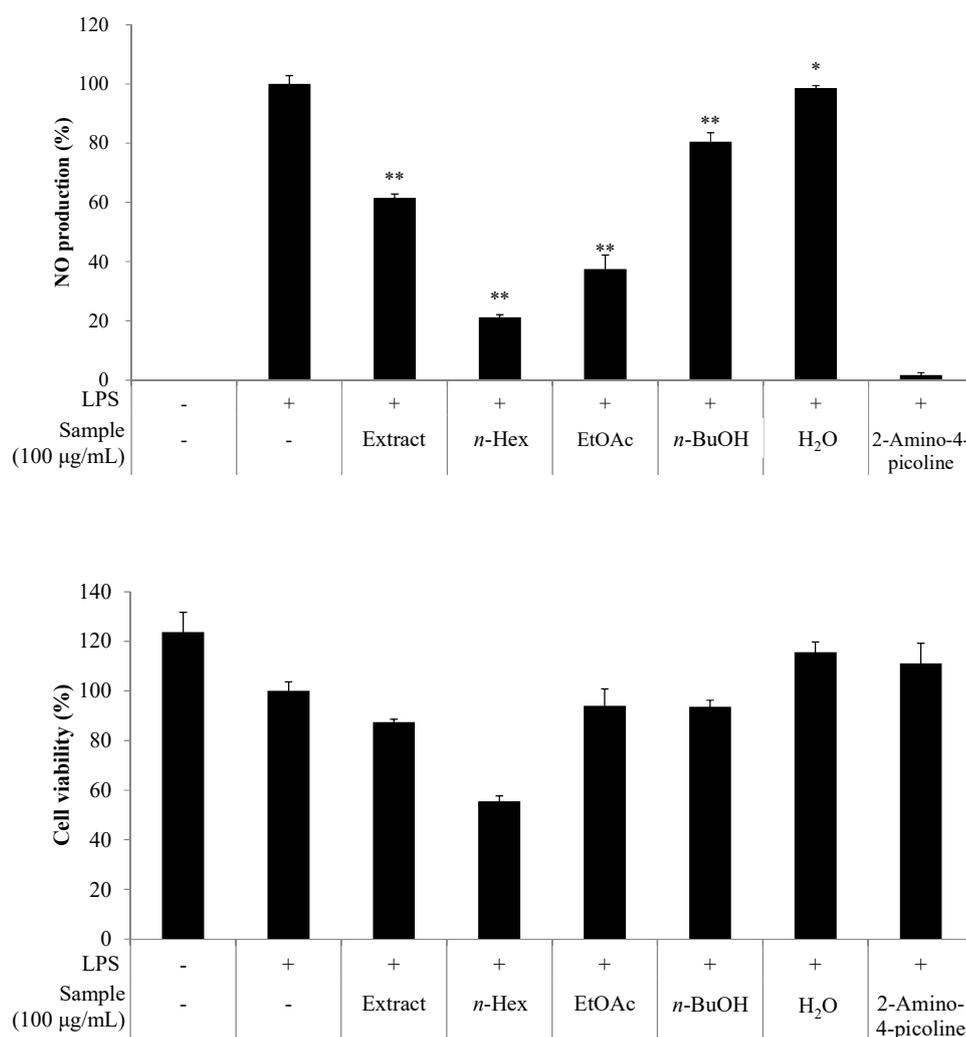


Figure 42. Effects of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus fractions from *H. petiolaris* leaves and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

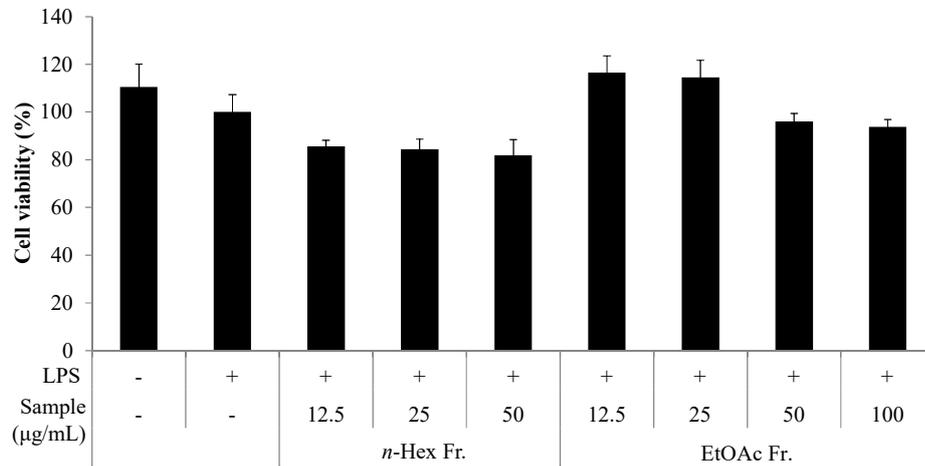
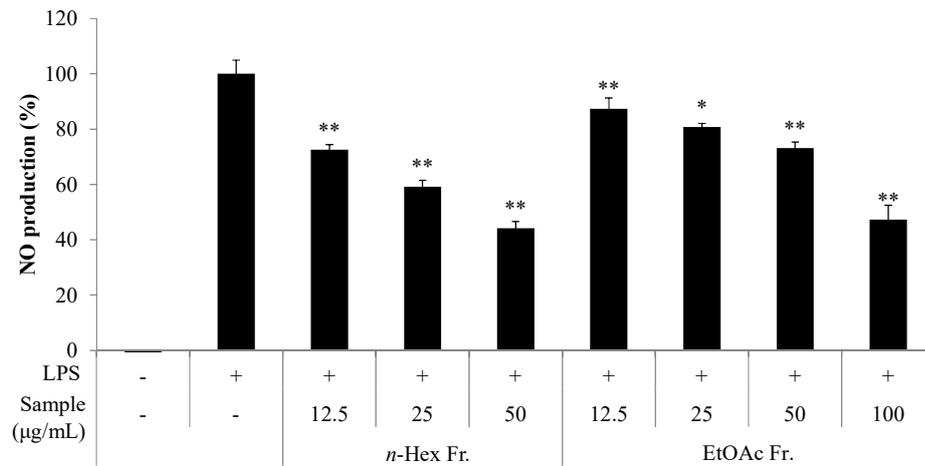
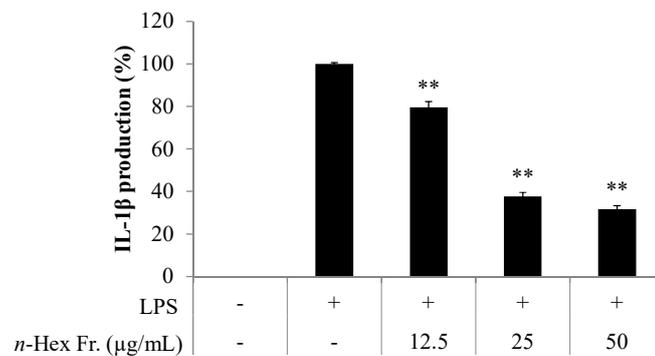
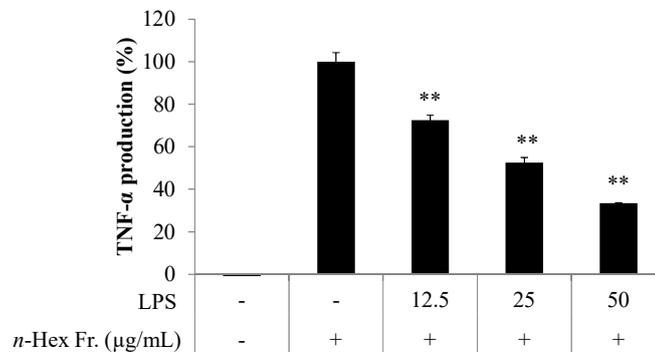


Figure 43. Effects of *n*-Hex and EtOAc fractions from *H. petiolaris* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fractions from *H. petiolaris* leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD 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 활성이 우수한 등수국 잎 EtOAc 분획물에 대해 추가적인 항염 활성 기전을 확인하기 위하여 ELISA kit를 이용하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 활성을 측정하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물은 TNF-α와 IL-1β 생성을, EtOAc 분획물은 IL-1β와 IL-6 생성을 농도의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다(Figure 44).

(A)



(B)

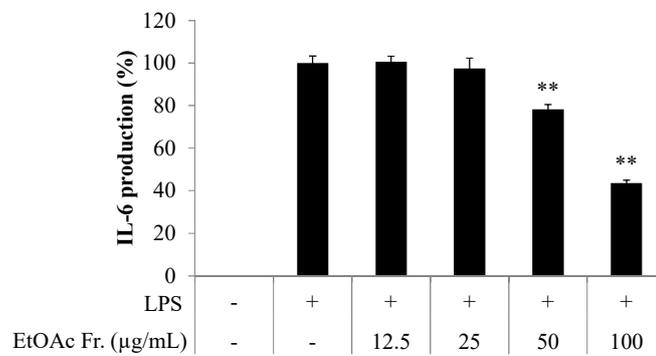
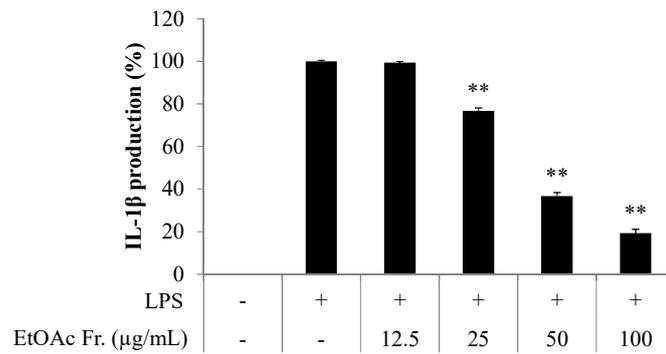
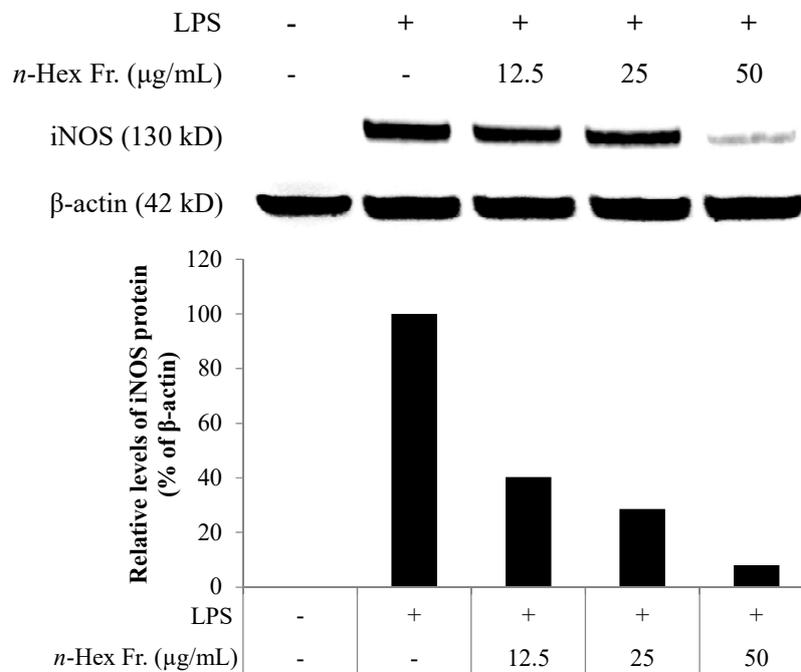


Figure 44. Effects of *n*-Hex (A) and EtOAc (B) fractions from *H. petiolaris* leaves on TNF- α , IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μ g/mL of LPS only, or with LPS plus *H. petiolaris* leaves for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

(3) iNOS 단백질 발현 억제 활성

등수국 잎 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 NO 생성 관련 단백질 효소인 iNOS의 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 western blot analysis를 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 NO 생성 억제와 유사한 경향으로 iNOS 단백질 발현을 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인하였다(Figure 45).

(A)



(B)

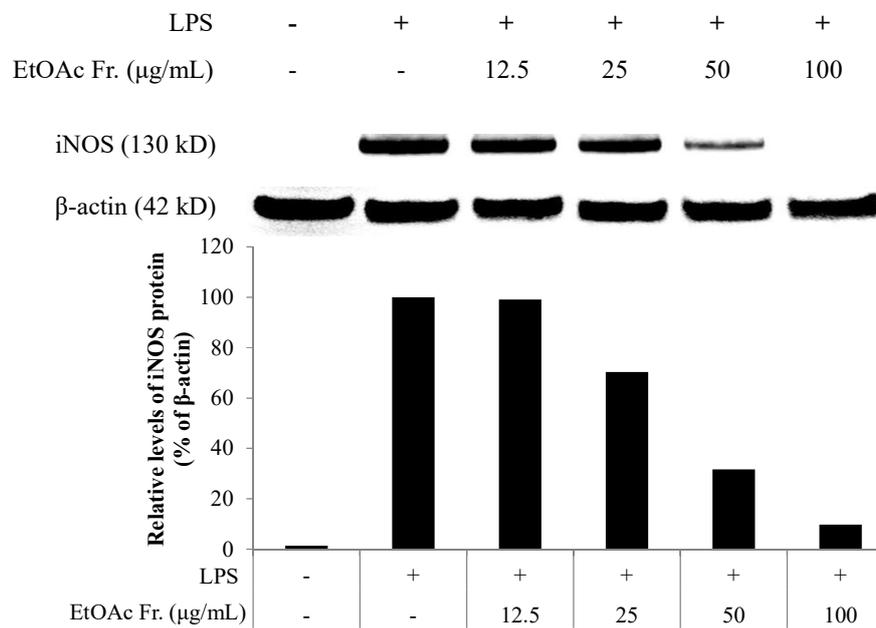


Figure 45. Effects of *n*-Hex (A) and EtOAc (B) fractions from *H. petiolaris* leaves on levels of iNOS protein in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μ g/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions from *H. petiolaris* leaves for 24 h. The iNOS protein levels in each sample was normalized to the quantity of β -actin.

3) 미백 활성 실험 결과

가. Melanogenesis 억제 활성 평가

B16F10 cell을 이용하여 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물에 대해 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 먼저, 추출물 및 용매 분획물에 대해 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 멜라닌 생성을 억제했지만 세포 독성이 나타나 세포 독성이 없는 범위에서 추가적인 실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 분획물이 40 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성 없이 농도의존적으로 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Figure 46, 47).

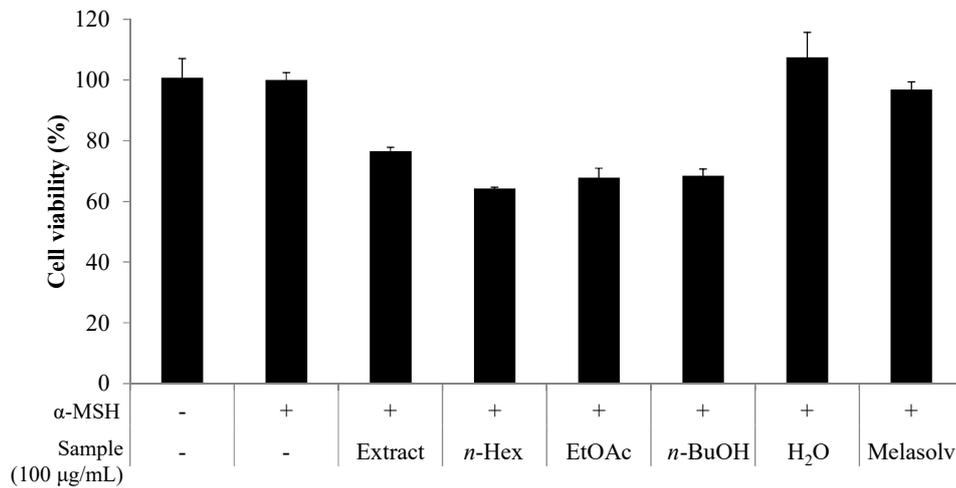
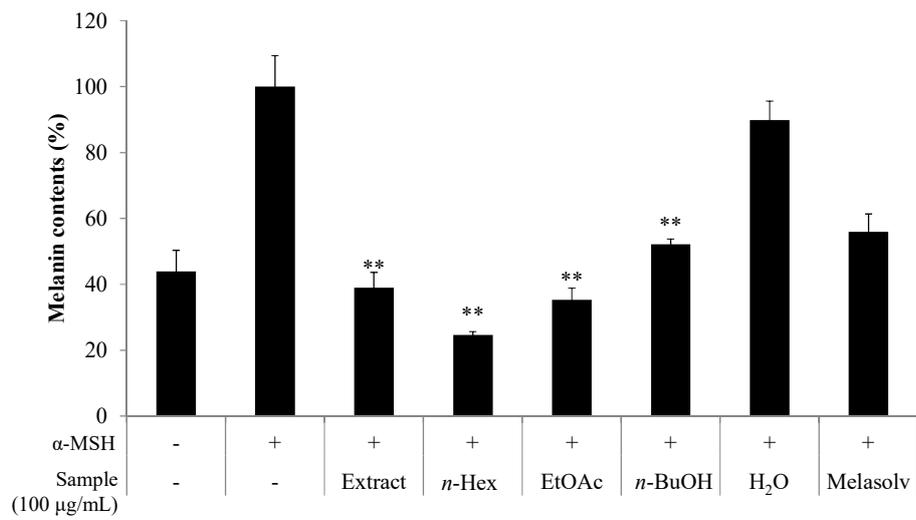


Figure 46. Effects of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* leaves on melanin contents and cell viability in α-MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α-MSH only, or with α-MSH plus fractions from *H. petiolaris* leaves and melasolv (positive control, 20 μM) for 72 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

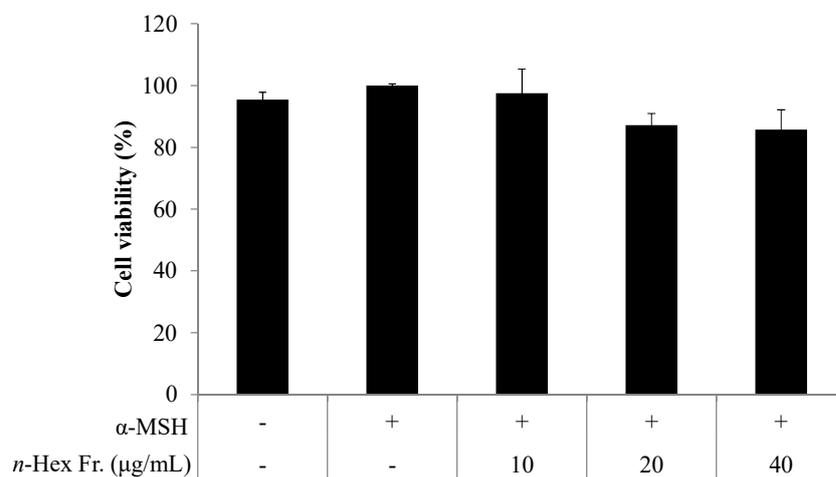
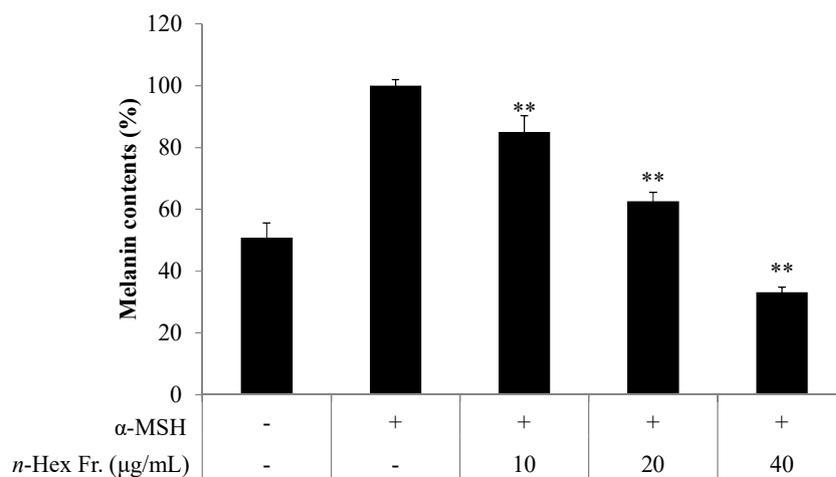


Figure 47. Effects of *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

나. Intracellular tyrosinase 억제 활성

세포 독성 없이 멜라닌 생성을 억제한 *n*-Hex 분획물의 농도 40 $\mu\text{g/mL}$ 이하에 대하여 세포 내 tyrosinase 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, *n*-Hex 분획물이 멜라닌 생성 억제와 유사한 경향으로 세포 내 tyrosinase 활성을 농도의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(Figure 48).

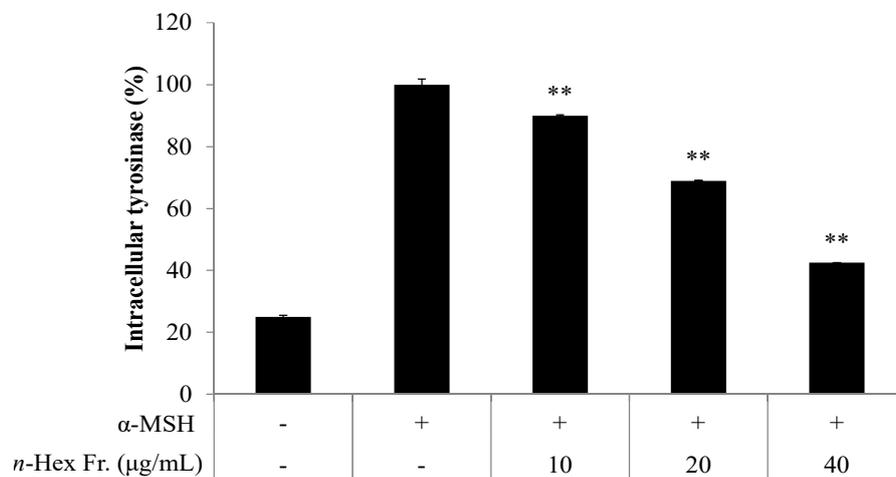
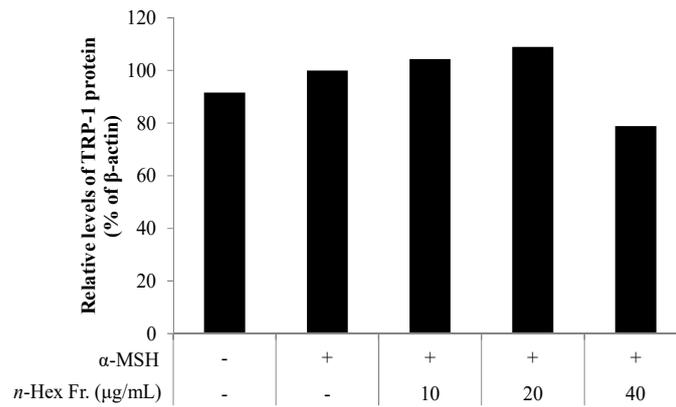
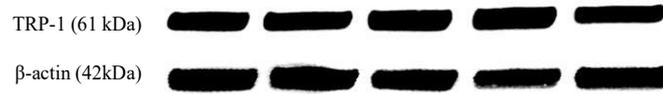
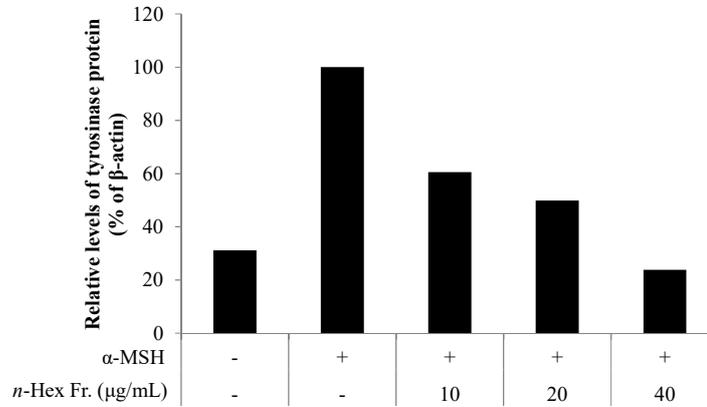
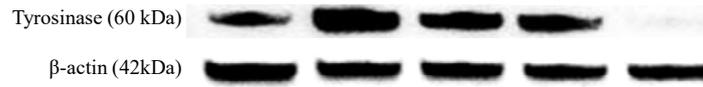


Figure 48. Intracellular tyrosinase activity of *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

다. Tyrosinase, TPR-1 및 TPR-2 단백질 발현 억제 활성

세포 독성 없이 멜라닌 생성을 억제한 *n*-Hex 분획물의 농도 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에 대하여 멜라닌 합성과 관련된 단백질인 tyrosinase, TPR-1 및 TPR-2 발현양을 western blot analysis을 통해 측정하였다. 그 결과, *n*-Hex 분획물이 TPR-2와 tyrosinase 단백질 발현을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 나타났으며, TPR-1 단백질은 농도에 따른 큰 변화가 관찰되지 않았다(Figure 49).



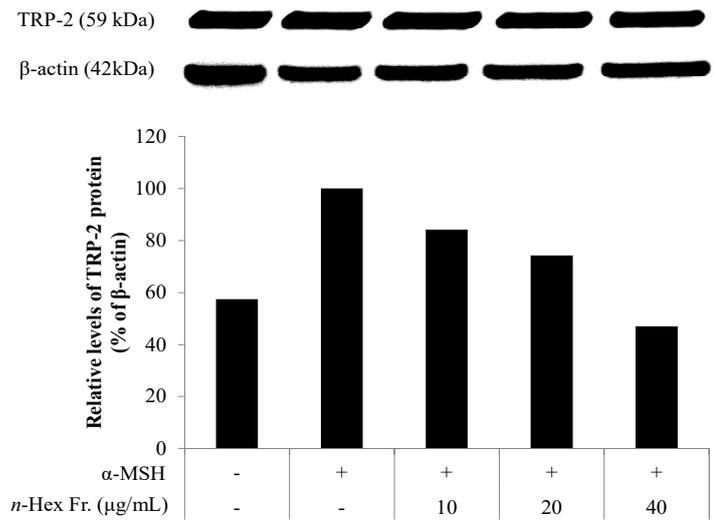


Figure 49. Effects of *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves on levels of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *n*-Hex fraction from *H. petiolaris* leaves for 72 h. The Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β -actin.

6. 분리된 화합물들의 활성 실험 결과

1) 항산화

(1) DPPH radical 소거 활성 측정

등수국 잎으로부터 분리된 화합물에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 각 시료들은 3.13-100 μM 의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 실험 결과, compound 1-4의 SC_{50} 값이 각각 45.9, 35.0, 51.6, 54.9 μM 로 DPPH radical 소거 활성이 나타났다(Figure 50, Table 13).

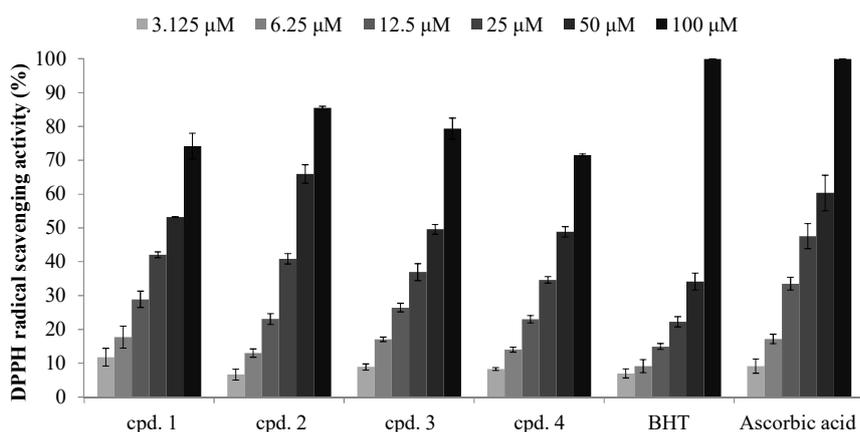


Figure 50. DPPH radical scavenging activities of the compound 1-4. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 13. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for the compound 1-4.

	cpd. 1	cpd. 2	cpd. 3	cpd. 4	BHT	Ascorbic acid
SC_{50} (μM)	45.9	35.0	51.6	54.9	62.1	31.2

(2) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

등수국 잎으로부터 분리된 화합물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거활성을 측정하였다. 각 시료들은 3.13-100 μM의 농도로 실험을 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 실험 결과, compound 1-4의 SC₅₀값이 각각 28.5, 15.1, 83.5 38.8 μM으로 ABTS⁺ radical 소거 활성이 나타났다(Figure 51, Table 14).

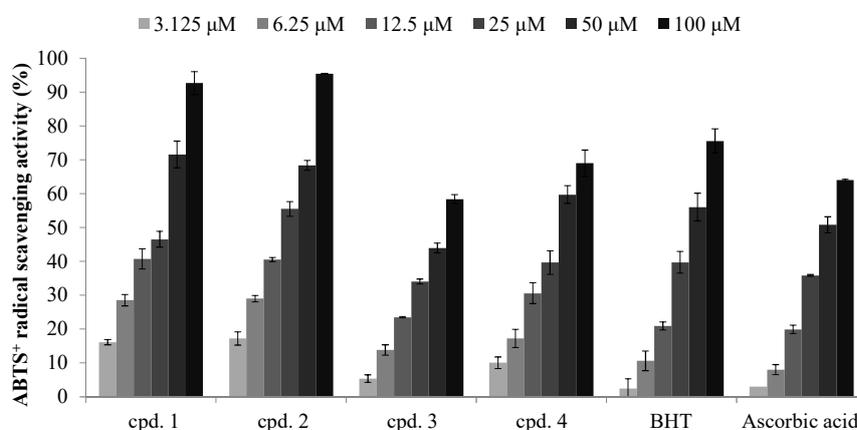


Figure 51. ABTS⁺ radical scavenging activities of the compound 1-4. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 14. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for the compound 1-4.

	cpd. 1	cpd. 2	cpd. 3	cpd. 4	BHT	Ascorbic acid
SC ₅₀ (μM)	28.5	15.1	83.5	38.8	43.1	48.7

다. 세포 보호 효과

(1) 세포 독성 평가 (MTT assay)

HaCaT cell을 이용하여 등수국 잎의 추출물 및 분획물에 대한 세포독성 및 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 시료의 농도를 정하기 위해 HaCaT cell에 대해 분리된 화합물의 세포 독성을 확인하였다. 실험 결과, compound 1, 3, 5는 50, 100 μM에서 세포 생존율이 80% 이상으로 나타났다. 따라서 본 실험에서 사용될 compound 1, 3, 5의 농도는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내는 농도인 50, 100 μM로 설정하였다(Figure 52).

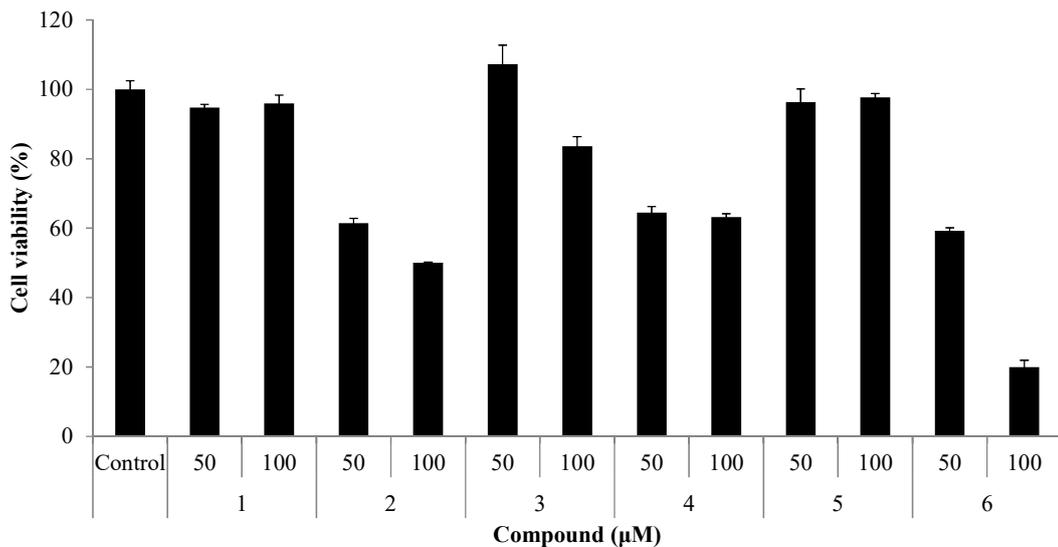
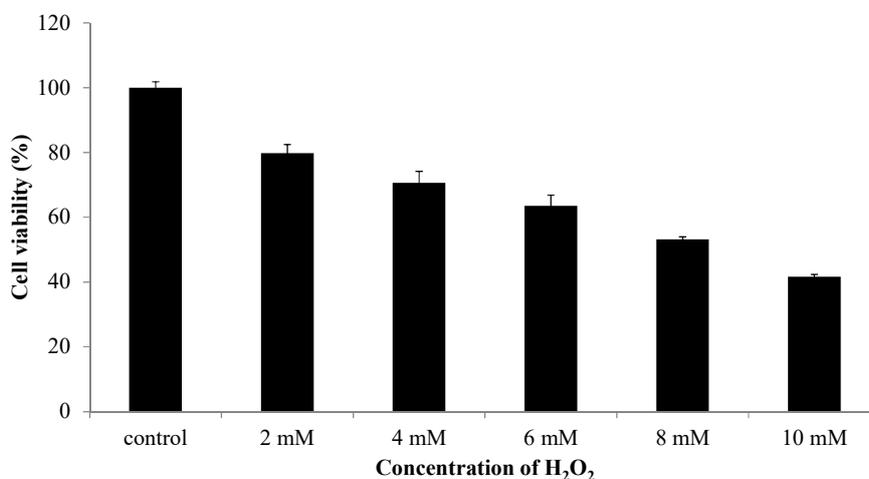


Figure 52. Effects of isolated compound 1-6 from *H. petiolaris* leaves. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

(2) 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

등수국 잎으로부터 분리된 화합물에 대하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 과산화수소의 농도를 정하기 위하여 HaCaT cell에 대한 과산화수소의 세포 독성을 확인한 결과, 6 mM 농도에서 세포 생존율은 63.5%로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 6 mM의 과산화수소를 처리하여 손상된 세포에 50, 100 μ M의 compound **1**, **3**을 처리하였다. 그 결과, compound **1**은 50 μ M, 100 μ M의 농도에서 104.3%, 136.2%로, compound **3**은 50 μ M, 100 μ M의 농도에서 78.6%, 84.7%로 나타났다. 따라서 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대하여 등수국 잎에서 분리된 화합물인 compound **1**은 50 μ M, 100 μ M의 농도에서 각각 40.8%, 72.7%의 세포 보호 효과가, compound **3**은 50 μ M, 100 μ M의 농도에서 각각 15.1%, 21.2%의 세포 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다(Figure 53).

(A)



(B)

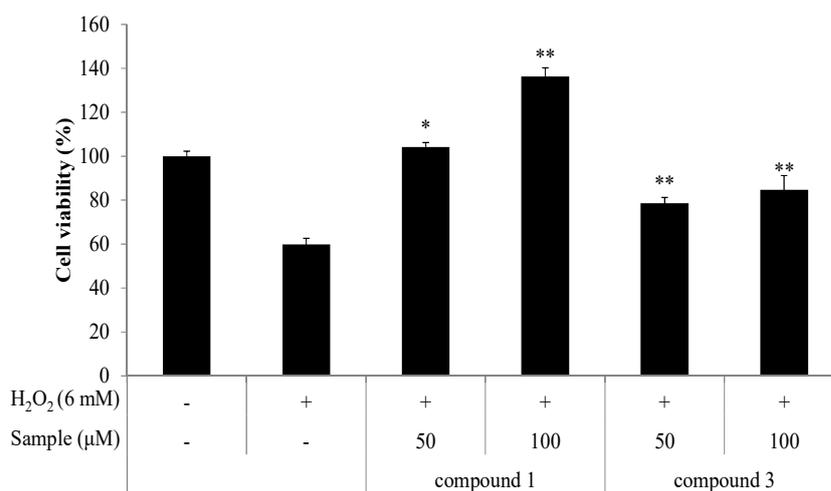


Figure 53. (A) Cell viability on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cells. (B) Cell protective effects of isolated compound **1** and **3** on HaCaT cells by damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

2) 항염

가. Nitric oxide 생성 억제 활성

RAW264.7 cell을 이용하여 등수국 앞에서 분리된 화합물에 대한 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 먼저, compound 1-6, 10에 대하여 200 μ M의 농도로 실험을 진행한 결과, compound 4, 6, 10이 세포 독성 없이 NO 생성을 억제한 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 compound 4, 6, 10에 대하여 추가적인 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, compound 4, 10는 200 μ M 농도 이하에서, compound 6은 100 μ M 농도 이하에서 세포독성 없이 농도의존적으로 NO 생성을 저해하는 것으로 나타났다. 또한, IC₅₀값은 각각 83.7, 106.0 98.6 μ M로 확인되었다(Figure 54, 55).

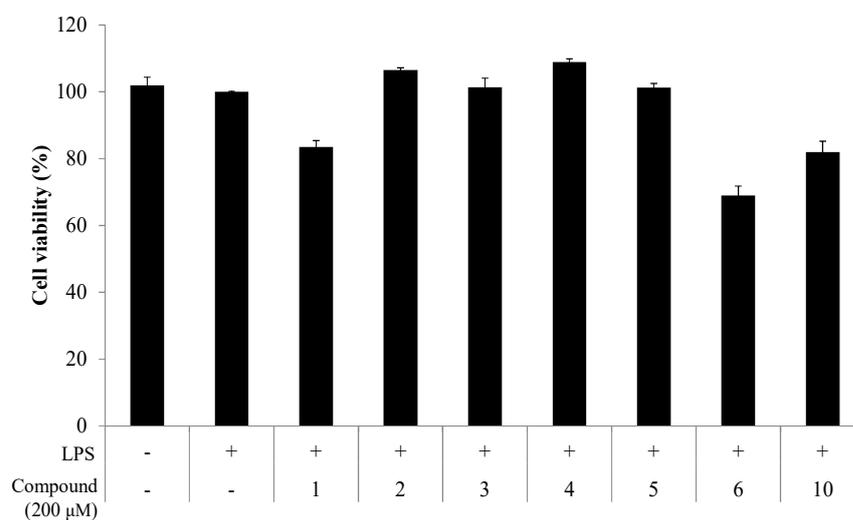
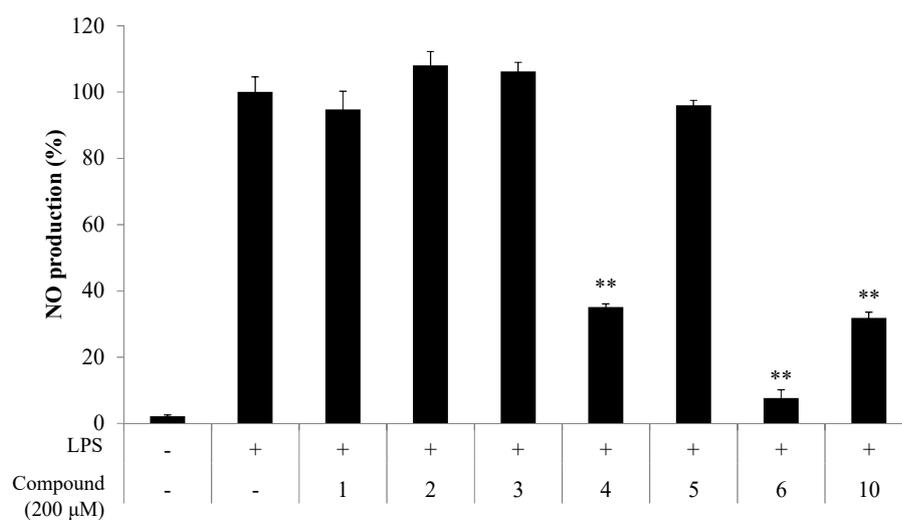


Figure 54. Effects of isolated compound 1-6 from *H. petiolaris* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound 1-6 from *H. petiolaris* leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

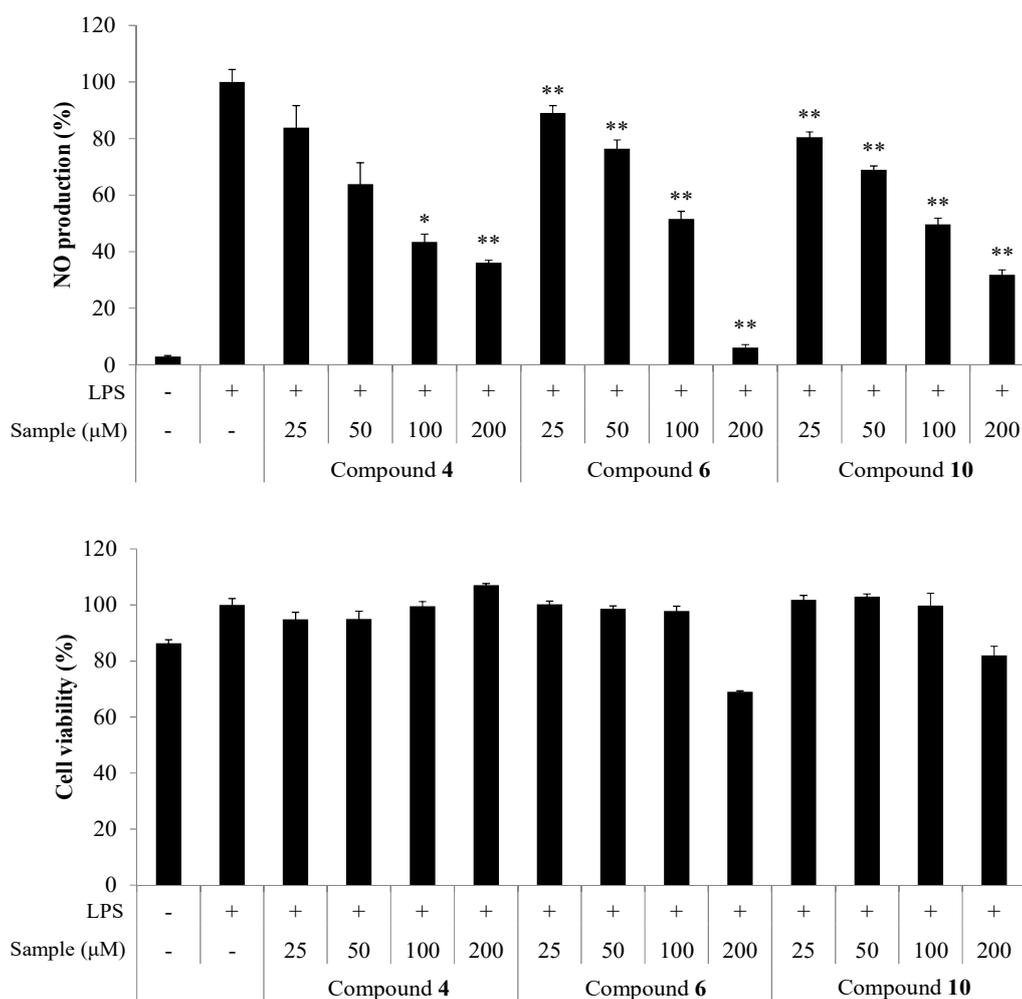


Figure 55. Effects of isolated compound 4, 6, 10 from *H. petiolaris* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus compound 4, 6, 10 from *H. petiolaris* leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

7. 요약 및 결론

현재까지 등수국 줄기에 대해서는 생리 활성 및 성분 연구가 보고 되어 있지만 등수국 잎에 대해서는 생리 활성 및 성분 연구가 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 등수국 잎을 이용하여 다양한 생리 활성을 확인하고 성분 연구를 진행하여 식품, 의약품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

등수국 잎 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 수득하였다. 얻어진 각 분획물 중 *n*-Hex 분획물은 VLC를 이용하여, EtOAc 분획물은 MPLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 단일물질을 분리하였다. 분리한 단일물질은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 12개의 화합물을 분리·동정하였으며, *epi*-catechin (1), hyperin (2), quercitrin (3), afzelin (4), 1-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (5), asiatic acid (6), corosolic acid (7), ethyl linoleate (8), ethyl linolenate (9), phytol (10), 1-linoleoyl glycerol (11), 1-linolenoyl glycerol (12)로 확인되었다.

등수국 잎에 대한 항산화 활성 실험 결과, 추출물 및 EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 분리된 화합물 중 compound 1-4에서 우수한 항산화 효과가 있는 것을 확인하였다. 또한, HaCaT 세포를 이용한 세포 항산화 실험으로 H₂O₂를 처리하여 유도된 세포 손상에 대해 세포 보호 효과를 확인한 결과, 세포 독성이 없는 10 μ g/mL 농도 이하에서 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 분리한 화합물 중에는 compound 1, 3이 세포 독성이 없는 100 μ M 농도 이하에서 세포 보호 효과가 나타났다.

RAW264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 NO 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, iNOS 단백질 발현 또한 억제하는 것을 확인하였다. 분리한 화합물 중 compound 1-6, 10에 대해 항염 활성 실험을 진행한 결과, compound 4, 6, 10이 세포 독성 없는 범위에서 NO 생성 억제 활성이 나타났다.

B16F10 세포를 이용한 미백 활성 실험 결과, *n*-Hex 분획물에서 농도의존적인 멜라닌 생성 억제 활성이 나타났다. 미백 기전과 관련된 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현양을 측정한 결과, *n*-Hex 분획물이 tyrosinase, TRP-2의 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. *n*-Hex 분획물로부터 분리된 ethyl linoleate, ethyl linolenate는 멜라닌 저해 활성이 우수할 뿐만 아니라, 멜라닌 생합성과 관련한 다양한 작용 기전들에도 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.³
2,35

이상의 연구 결과를 바탕으로 등수국 잎 추출물은 항산화, 항염, 미백 효과가 있는 식품, 의약품 및 화장품 관련 천연소재로서의 활용가능성이 있는 것을 확인하였다.

Ⅲ. 연구 2 : 보리밥나무 잎 추출물의 미백 활성 성분 연구

1. 재료

본 연구에 사용된 보리밥나무(*Elaeagnus macrophylla*)는 보리수나무과(*Elaeagnaceae*)에 속하는 상록 덩굴식물로 한국, 중국, 일본, 타이완 등에 분포한다. 한국에서는 대부분 남쪽 도서지방에 분포하며, 주로 해안 녹화용으로 쓰인다. 보리밥나무의 잎은 양면이 잎자루와 더불어 은백색 인모로 덮였다가 점차 없어진다. 꽃은 9~10월에 피고 잎겨드랑이에 몇 개씩 달리며, 꽃잎이 없다. 열매는 이듬해 3~4월에 적색으로 익고 식용이 가능하다.

보리수나무과는 전세계에 약 45종이 분포하며, 한국에는 6종이 분포하는 것으로 알려져 있다.³⁶ 이 중 보리수나무는 항염, 미백, 주름 개선 등의 효능이 보고되어 있으며,^{37,38} kaempferol-3-*O*- β -D-galactopyranoside-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, lupeol, daucosterol 등의 다양한 유효 성분들이 알려져 있다.^{39,40} 하지만, 보리밥나무는 항염, 항균, 항천식 활성 등만 보고되어 있고,^{41,42} 보리밥나무를 이용한 유효 성분 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 보리밥나무 잎을 이용하여 생리활성을 알아보고 그에 따른 성분 연구를 진행하였다.

실험에 사용한 보리밥나무 잎(시료번호 : 491)는 2019년 1월에 제주자원식물 연구소로부터 구입하였다. 구입한 보리밥나무 잎은 동결 건조기에서 건조시킨 후 분쇄하여 실험에 사용하였다(Figure 56).



Figure 56. Picture of *Elaeagnus macrophylla*.

2. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 보리밥나무 잎의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 보리밥나무 잎 600.0 g을 70%(v/v) EtOH 24.0 L에 침출시킨 후 교반기를 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출한 시료는 감압 여과기와 filter paper를 이용하여 여과하였으며, 여과하고 남은 잔사에 대하여 동일한 조건으로 추출 및 여과를 2회 더 반복 진행하였다. 얻어진 여액은 37-40℃의 수욕 상태에서 회전 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 추출물 118.4 g을 얻었다. 얻어진 추출물 중 15.0-20.0 g을 증류수 1.0 L에 현탁시키고 분별 깔때기를 이용해 낮은 극성 순으로 분획하여 *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)의 분획물을 수득하였다. 이와 같은 방법으로 6회 더 반복 실시하여 추출물 총 115.0 g을 용매 분획하였다(Figure 57).

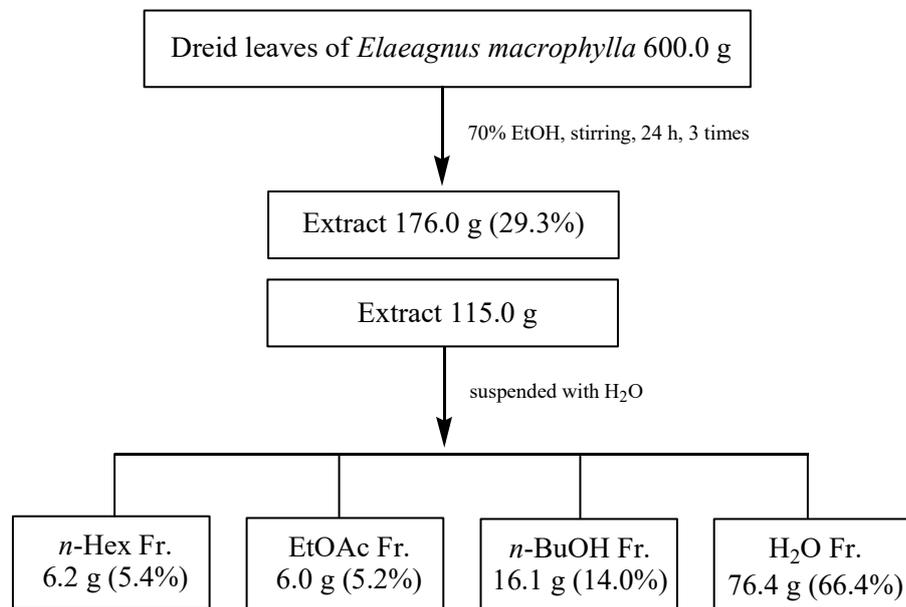


Figure 57. Extraction and solvent fractionation of *Elaeagnus macrophylla* leaves.

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 때까지 높였으며 그 후 100% EtOAc와 100% MeOH를 각 300 mL씩 용출하여 총 13개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-13).

VLC fraction들 중 Fr. V7 (524.0 mg)는 compound 1과 compound 3이 혼합된 형태로 확인되었다. Fr. V8-V12는 단일 화합물인 compound 1로 확인되었다. 또한, Fr. V4 (266.2 mg)은 Silica gel column chromatography (*n*-Hex:EtOAc=2.5:1)를 수행하여 compound 2 (36.3 mg)을 얻었고 Fr. V6 (577.8 mg)은 Silica gel column chromatography (CHCl₃)을 수행하여 compound 4 (10.0 mg)와 compound 4와 5가 혼합된 형태 (16.0 mg)를 얻었다(Figure 58).

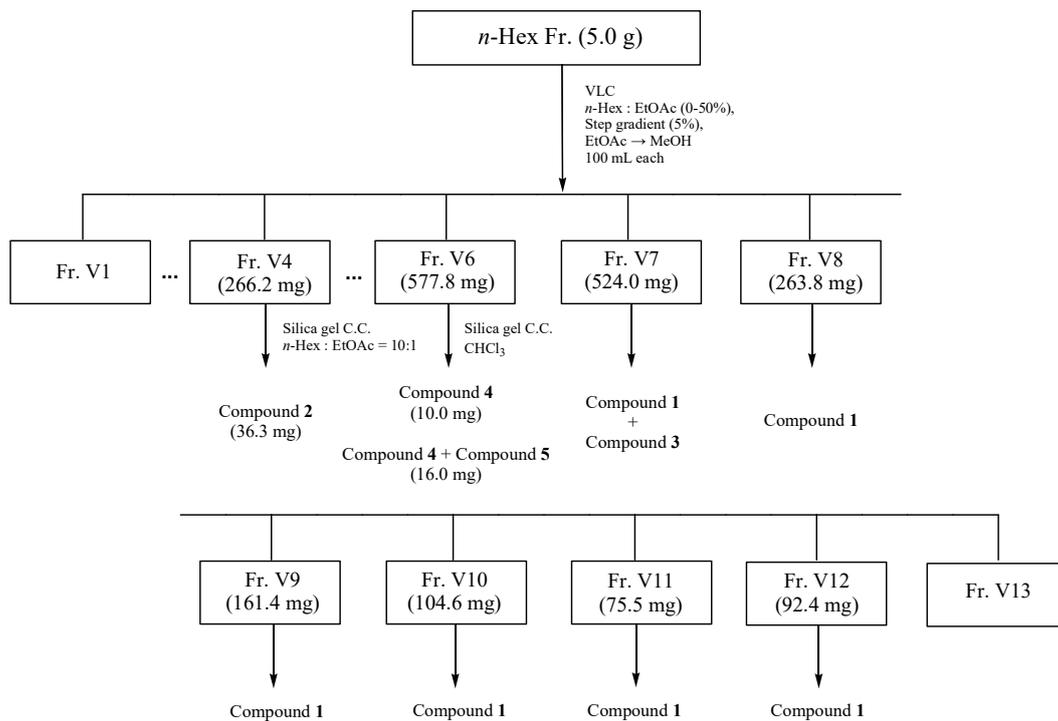
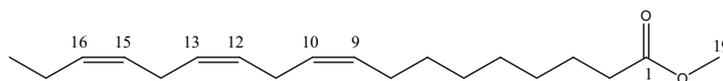


Figure 58. Isolation of compounds from *Elaeagnus macrophylla* leaves.

3. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 20개의 피크가 관찰되었으며, δ_{C} 174.4 피크를 통해 한 개의 carbonyl group이 있는 것으로 예상하였고, δ_{C} 131.9-127.1에서 6개의 피크와 δ_{H} 5.34 (6H, m)의 피크를 통하여 세 개의 이중결합이 있는 것으로 예상하였다. δ_{H} 3.64 (3H, s) 및 δ_{C} 51.7 피크를 통해 한 개의 methoxy group이 있는 것으로 예상하였고 δ_{H} 0.95 (3H, t, $J = 7.6$) 피크와 δ_{C} 14.5 피크를 통해 methyl group이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌³²과 비교한 결과, methyl linolenate(linolenic acid, methyl ester)로 확인되었다(Figure 59-61, Table 15).



Compound 1

Figure 59. Chemical structure of compound 1.

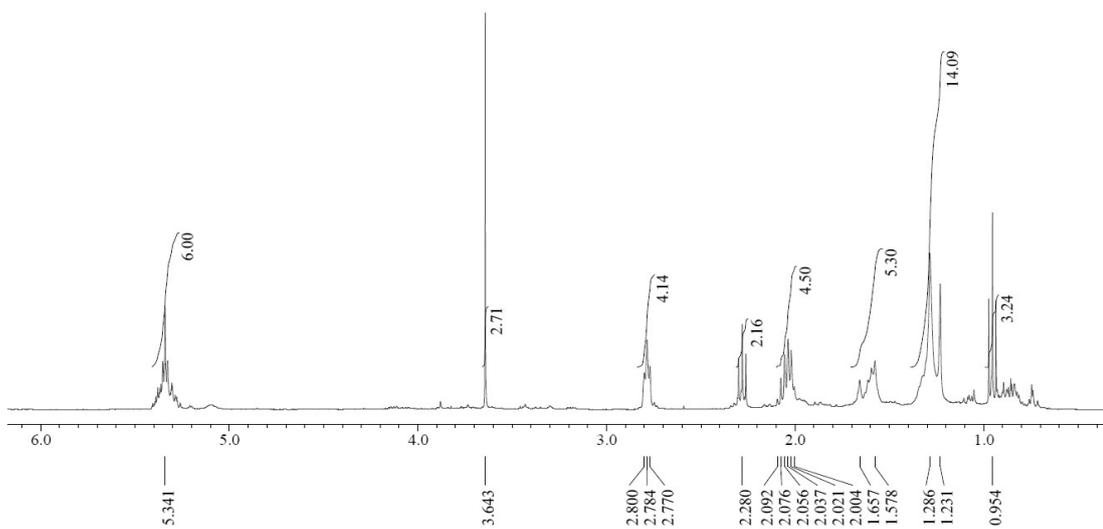


Figure 60. ^1H NMR spectrum of compound **1** (CDCl_3).

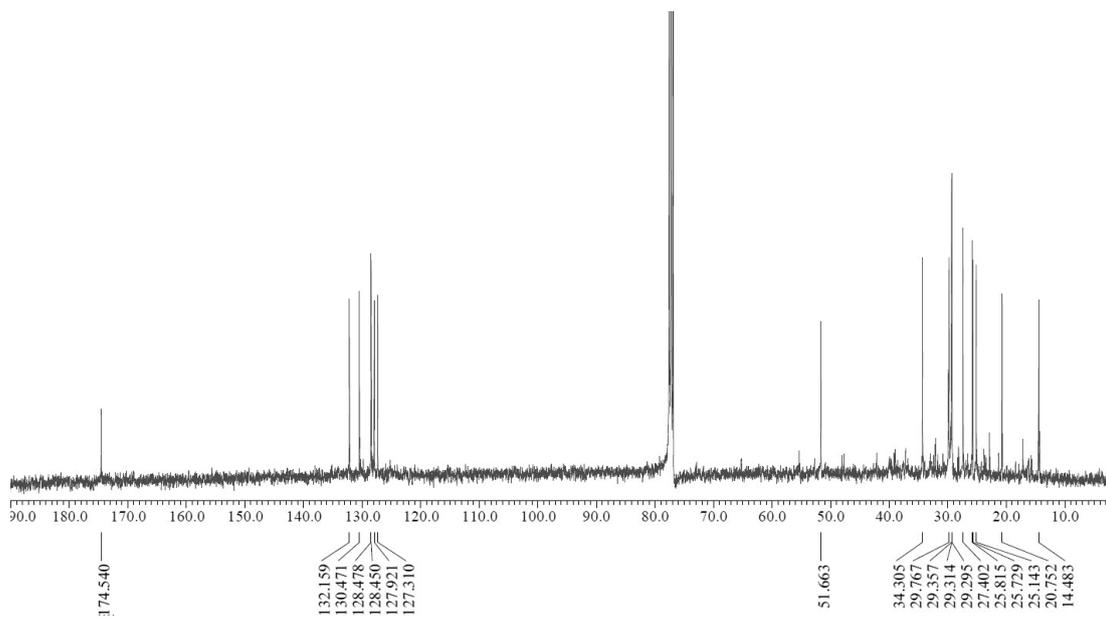


Figure 61. ^{13}C NMR spectrum of compound **1** (CDCl_3).

Table 15. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1** (400 and 100 MHz).

No.	Compound 1	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		174.5
2		34.3
3		25.1
4		29.8
5		29.4–29.3
6		29.4–29.3
7		29.4–29.3
8		27.4
9	5.34 (1H, m)	132.2–127.3
10	5.34 (1H, m)	132.2–127.3
11		25.7
12	5.34 (1H, m)	132.2–127.3
13	5.34 (1H, m)	132.2–127.3
14		25.8
15	5.34 (1H, m)	132.2–127.3
16	5.34 (1H, m)	132.2–127.3
17		20.8
18	0.95 (3H, t, 7.6)	14.5
19	3.64 (3H, s)	51.7

2) Compound 2의 구조 동정

Compound 2은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 29개의 carbon 피크가 관찰되었으며, δ_{C} 145.8, 144.7, 122.8, 121.2, 118.7, 117.6 피크를 통해 이중결합이 세 개 있는 것으로 예상하였다. 이 중 δ_{C} 145.8, 144.7 피크는 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^2 혼성 carbon으로 예상하였다. δ_{C} 74.8 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. 또한, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.82-0.85 (12H, m) 피크를 통해 4개의 methyl group이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁴³과 비교한 결과, compound 3은 α -tocopherol로 확인되었다(Figure 62-64, Table 16).

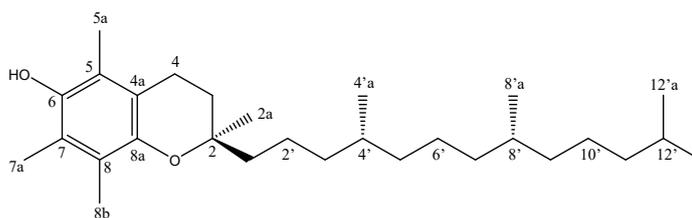


Figure 62. Chemical structure of compound 2.

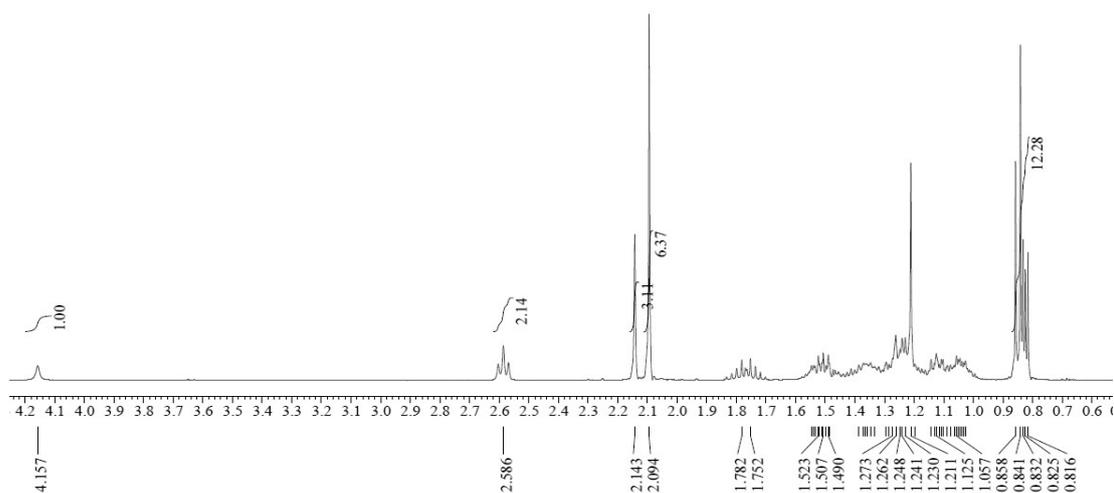


Figure 63. ^1H NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

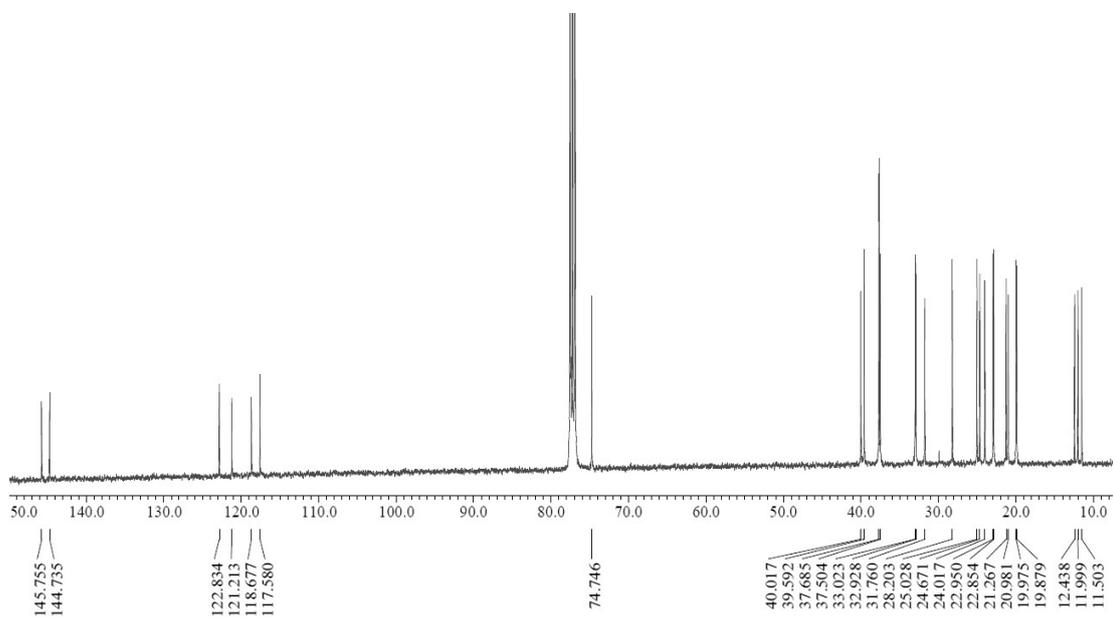


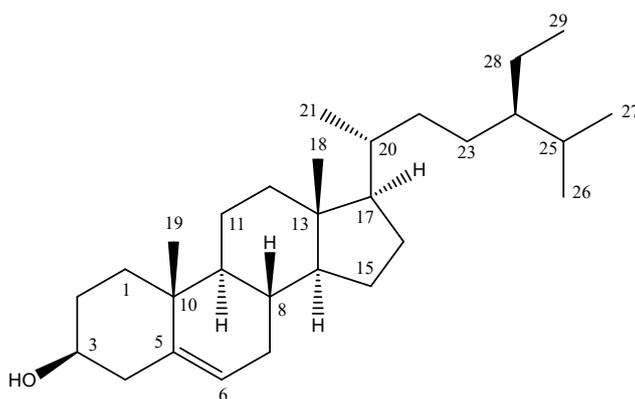
Figure 64. ^{13}C NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

Table 16. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz).

No.	α -tocopherol	
	$\delta_{\text{H}}(\text{int.}, \text{multi.}, J \text{ Hz})$	δ_{C}
2		74.8
2a		24.0
3		31.8
4	2.59 (2H, t, 6.9)	21.0
4a		117.6
5		118.7
5a	2.09 (3H, s)	11.5
6		144.7
7		121.2
7a	2.09 (3H, s)	12.4
8		122.8
8a		145.8
8b	2.14 (3H, s)	12.0
1'		40.0
2'		21.3
3'		37.7
4'		33.0
4'a	0.82-0.86 (3H, s)	19.9
4'		37.5
6'		24.7
7'		37.7
8'		32.9
8'a	0.82-0.86 (3H, s)	20.0
9'		37.5
10'		25.0
11'		39.6
12'		28.2
12'a	0.82-0.86 (3H, s)	22.9
13'	0.82-0.86 (3H, s)	23.0
-OH	4.16 (1H, s)	

3) Compound 3의 구조 동정

Compound 3은 compound 1과 혼합된 형태로 분리되었다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 122.0, 141.0 피크를 통해 이중결합이 한 개 있는 것으로 예상하였고 δ_{C} 72.0 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁴⁴과 비교한 결과, compound 2는 β -sitosterol로 확인되었다(Figure 65-67, Table 17).



Compound 3

Figure 65. Chemical structure of compound 3.

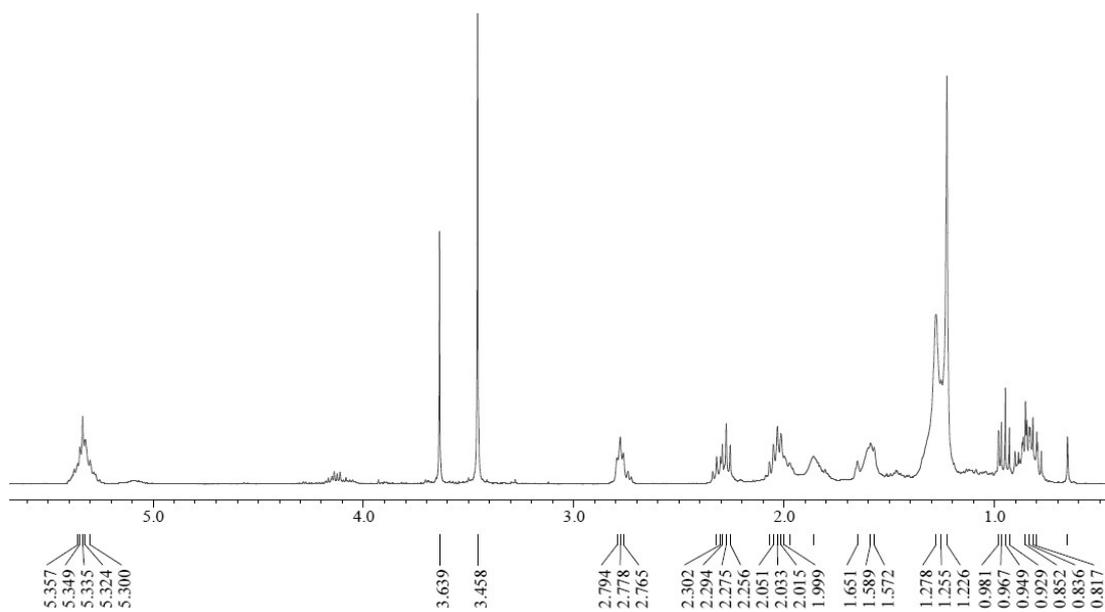


Figure 66. ^1H NMR spectrum of compound **1** and **3** (CDCl_3).

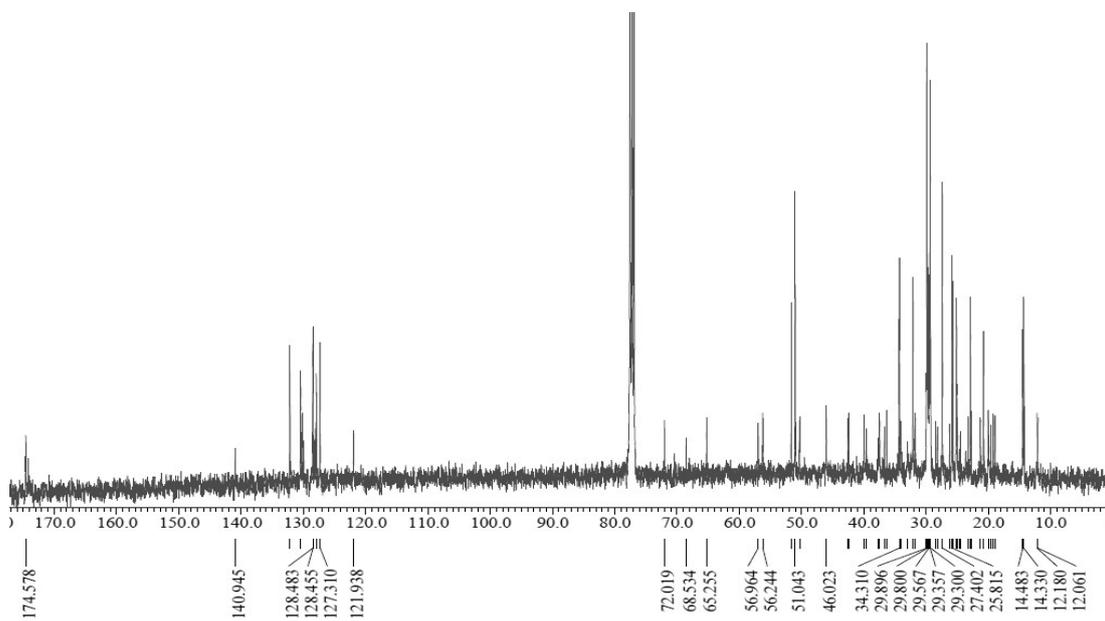


Figure 67. ^{13}C NMR spectrum of compound **1** and **3** (CDCl_3).

Table 17. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz).

No.	β -sitoserol	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		37.4
2		31.8
3		72.0
4		42.5
5		140.9
6	5.34 (m)	121.9
7		32.1
8		32.1
9		50.3
10		36.7
11		21.3
12		39.9
13		42.5
14		57.0
15		26.2
16		28.5
17		56.2
18		36.3
19	0.92 (d)	19.2
20		34.1
21		26.2
22		46.0
23		23.3
24	0.83 (m)	12.2
25		19.2
26	0.83 (d)	20.0
27	0.80 (d)	19.6
28	0.65 (s)	19.0
29	0.98 (s)	12.1

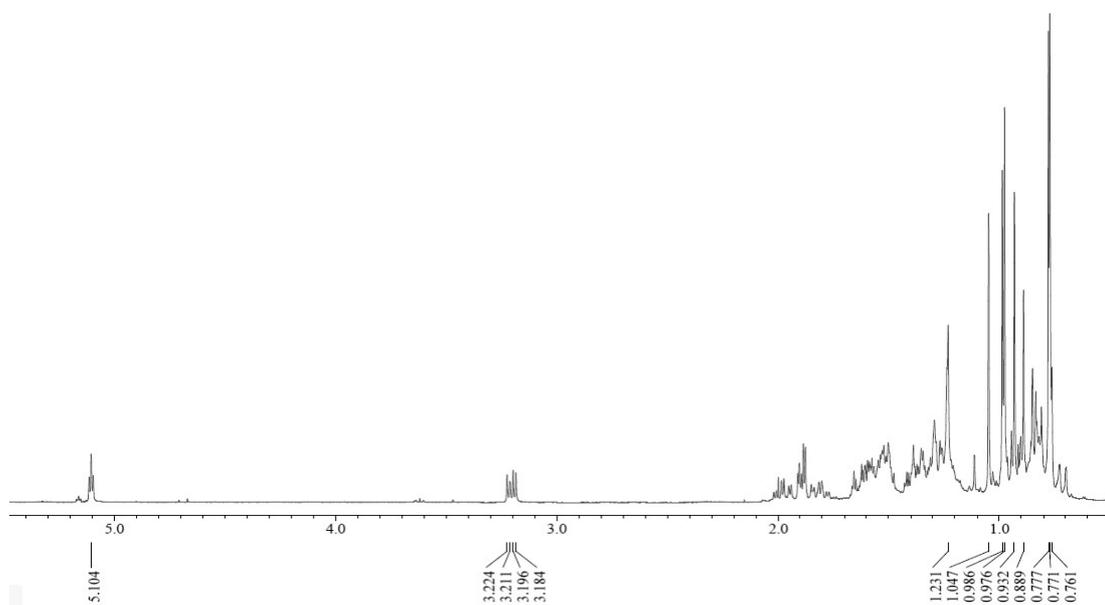


Figure 69. ^1H NMR spectrum of compound **4** (CDCl_3).

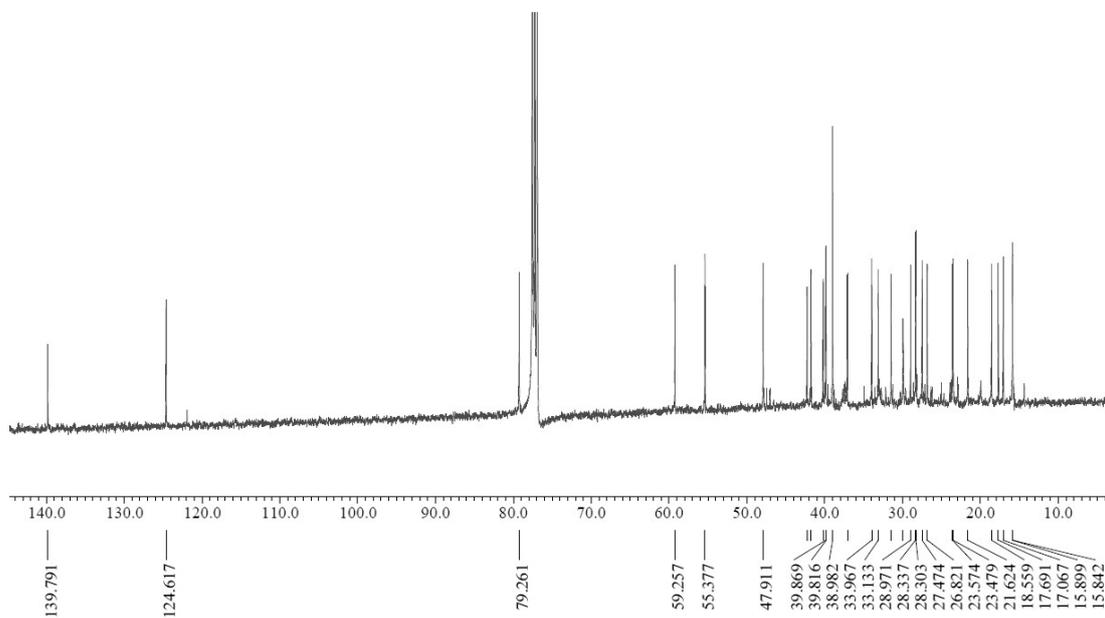


Figure 70. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** (CDCl_3).

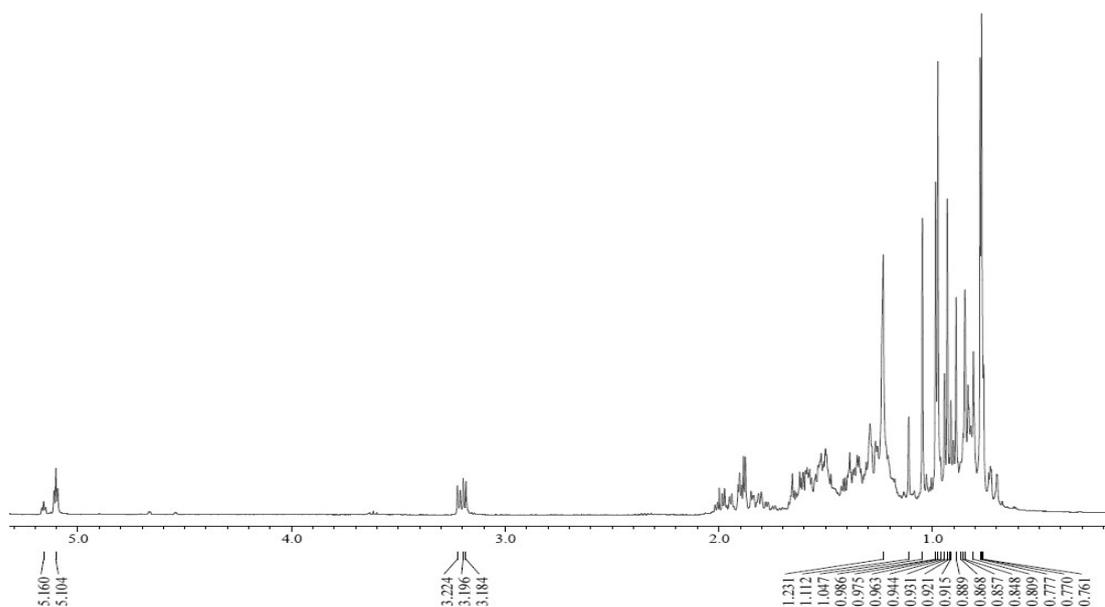


Figure 71. ^1H NMR spectrum of compound **4** and **5** (CDCl_3).

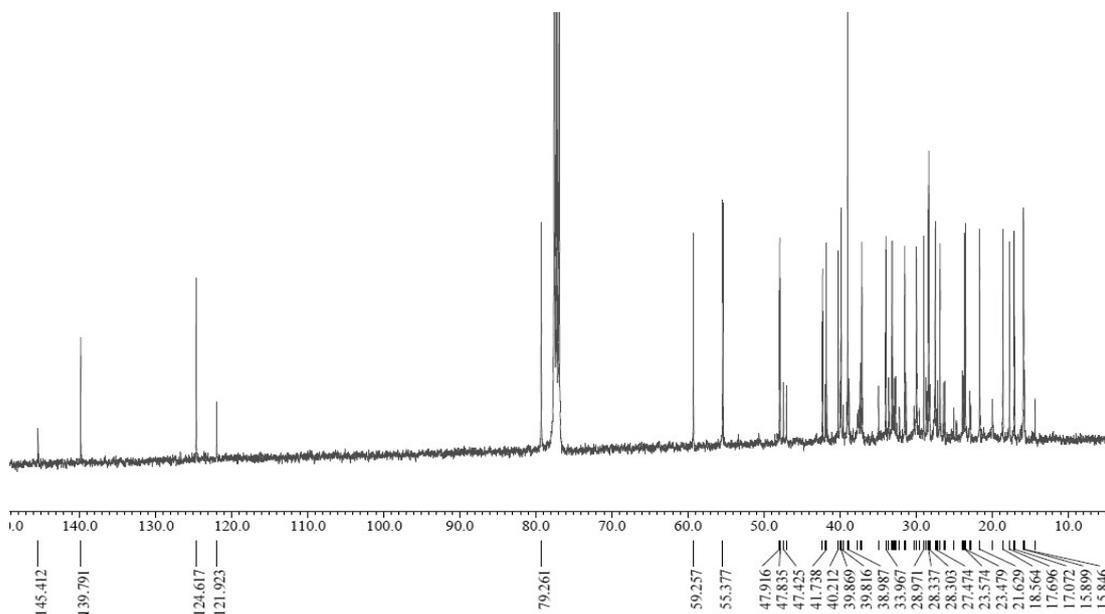


Figure 72. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** and **5** (CDCl_3).

Table 18. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **4** and **5** (400 and 100 MHz).

No.	α -amyrin		β -amyrin	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		38.8		38.7
2		27.5		27.2
3	3.20 (1H, dd, 11.0, 5.0)	79.3	3.20 (1H, dd, 4.4, 10.8)	79.3
4		38.8		38.5
5		55.4		55.1
6		18.6		18.6
7		33.1		32.4
8		40.2		39.8
9		47.9		47.6
10		37.1		36.9
11		23.6		23.6
12	5.10 (1H, t, 3.4)	124.6	5.16 (1H, t, 3.7)	121.7
13		139.8		145.2
14		42.3		41.7
15		26.8		26.2
16		28.3		26.1
17		34.0		32.6
18		59.3		47.2
19		39.8		46.8
20		39.9		31.0
21		31.5		34.6
22		41.7		37.2
23	1.00 (3H, s)	28.3		28.1
24		15.8		15.3
25	0.96 (3H, s)	15.9		15.3
26	1.01 (3H, s)	17.1		16.7
27	1.07 (3H, s)	23.5		25.7
28		28.3		28.5
29		17.7		33.8
30		21.6		23.7

4. 보리밥나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 미백

가. Melanogenesis 억제 활성 평가

B16F10 cell을 이용하여 보리밥나무 잎 추출물 및 분획물에 대해 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 먼저, 추출물 및 분획물 100 µg/mL 농도로 실험을 진행한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 멜라닌 생성을 억제했지만 세포 독성이 나타나 세포 독성이 없는 범위로 추가적인 실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 분획물이 40 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성 없이 농도의존적으로 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Figure 73,74).

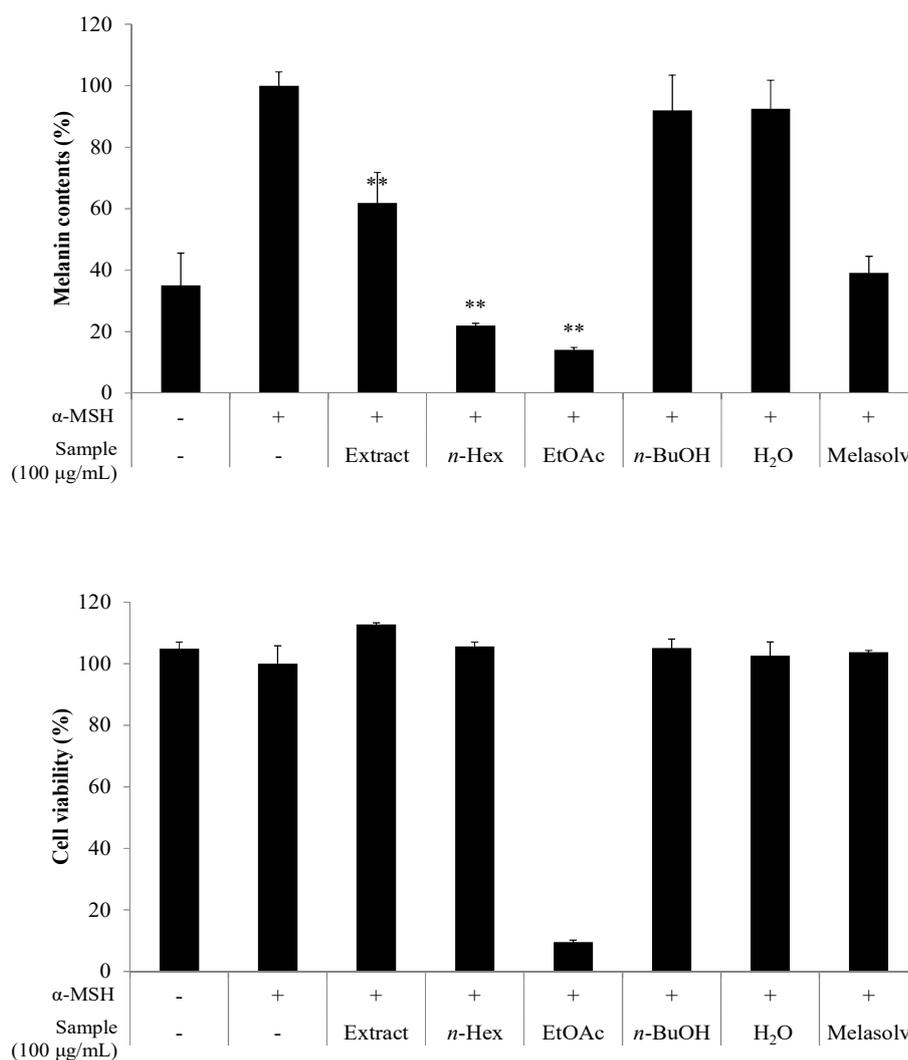


Figure 73. Effects of extract and solvent fractions from *E. macrophylla* leaves on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus fractions from *E. macrophylla* leaves and melasolv (positive control, 20 μ M) for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

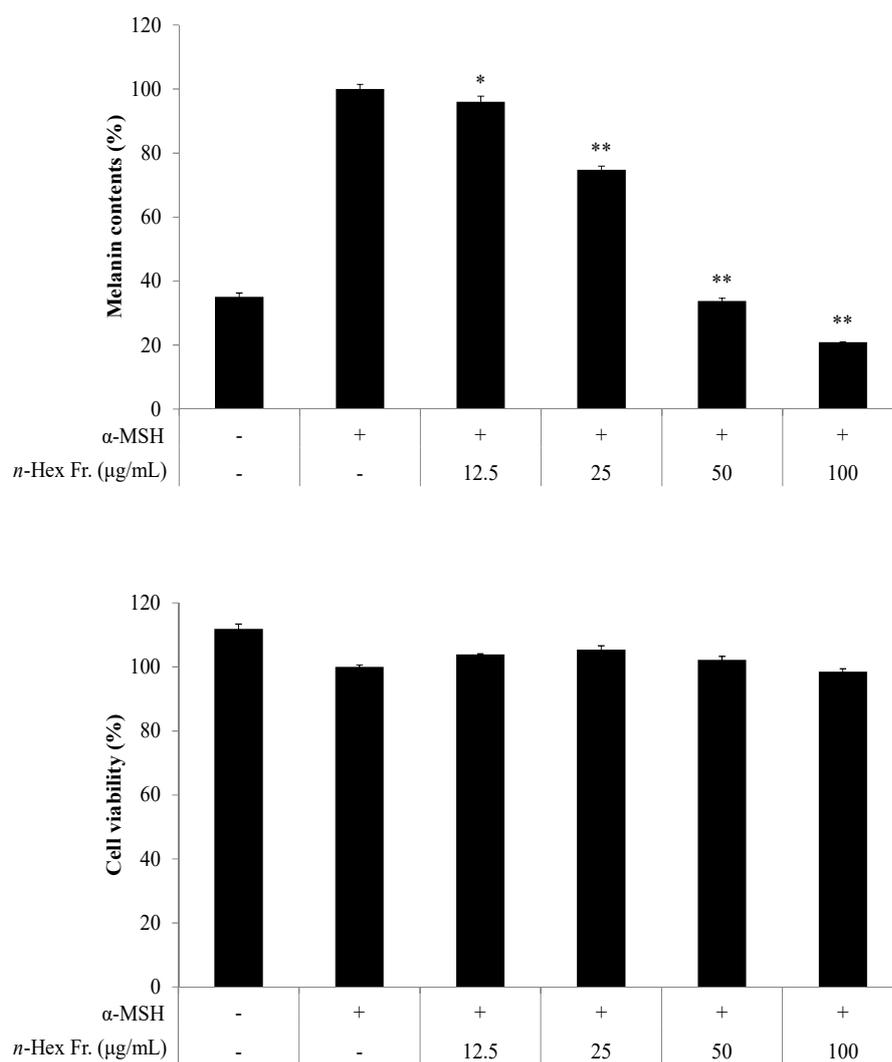


Figure 74. Effects of *n*-Hex fraction from *E. macrophylla* leaves on melanin contents and cell viability in α -MSH induced B16F10 cells. The cells were stimulated with 100 nM of α -MSH only, or with α -MSH plus *n*-Hex fraction from *E. macrophylla* leaves for 72 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

5. 요약 및 결론

현재까지 보리밥나무에 대해서 항염, 항균, 항천식 등의 생리 활성이 보고되어 있지만 유효 성분 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 보리밥나무 잎을 이용하여 다양한 생리 활성을 확인하고 성분 연구를 진행하여 식품 및 화장품 관련 천연 소재로써의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

보리밥나무 잎 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 수득하였다. 얻어진 각 분획물 중 *n*-Hex 분획물은 VLC와 Silica gel column chromatography를 이용하여 단일물질로 분리하였다. 분리한 단일물질은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 분리·동정하였으며, methyl linolenate (1), α-tocopherol (2), β-sitosterol (3), α-amyrin (4), β-amyrin (5)으로 확인되었다.

보리밥나무 잎에 대하여 B16F10 세포를 이용한 미백 활성 실험을 진행한 결과, *n*-Hex 분획물에서 세포독성 없는 범위에서 농도의존적인 멜라닌 생성 억제 활성이 나타났다. *n*-Hex 분획물 5.0 g 중 697.7 mg 이상 함유되어 있는 methyl linolenate는 *n*-Hex 분획물의 주성분으로 판단되며, methyl linolenate는 멜라닌 저해 활성이 뛰어날 뿐만 아니라, 멜라닌 생합성과 관련한 다양한 작용 기전들에도 효과가 우수한 것으로 보고되어 있다.^{32,63} 따라서 보리밥나무잎의 미백 활성은 methyl linolenate가 관여하는 것으로 판단된다. 또한, 보리밥나무 잎에서 분리된 α-tocopherol은 천연 vitamine E로 불리는 물질이며 항산화 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있고, β-sitosterol, α-amyrin, β-amyrin은 항염 활성이 우수한 것으로 보고되어있다.^{46,47,48,49}

이상의 연구 결과를 바탕으로 보리밥나무 잎 추출물은 미백 효과가 있는 식품 및 화장품 관련 천연소재로써의 활용가능성이 있는 것을 확인하였으며, 보리밥나무 잎에서 분리된 화합물 모두 기능성 식품 및 화장품 관련 천연소재로써의 활용가능성이 있는 것으로 판단된다.

V. 종합 결론 및 고찰

본 연구는 식품, 의약품 및 화장품 소재로 쓰이는 합성 물질들의 대체제로써 천연물 소재를 찾기 위해 등수국 잎과 보리밥나무 잎의 추출물과 용매 분획물에서 유효 성분을 분리·동정하고 항산화, 항염, 미백 활성을 검색하였다.

등수국 잎 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 수득하였다. 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성 실험 결과, 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였다. 세포를 이용한 항산화 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 과산화수소(H₂O₂)로 손상된 HaCaT keratinocyte에서 세포 보호 효과를 나타내었다. 또한, LPS로 자극된 RAW264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 세포 독성이 없는 범위에서 NO의 생성을 억제시키는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 항염 기전 연구를 수행하였으며, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 전염증성 cytokine(TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 생성과 iNOS 단백질 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. α -MSH로 자극된 B16F10 cell을 이용한 미백 활성 실험 결과, *n*-Hex 분획물이 세포 독성이 없는 범위에서 멜라닌 생성을 억제시키는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 기전 연구를 수행하여 *n*-Hex 분획물이 Tyrosinase, TRP-2의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다.

분리된 단일물질은 *epi*-catechin (1), hyperin (2), quercitrin (3), afzelin (4), 1-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (5), asiatic acid (6), corosolic acid (7), ethyl linoleate (8), ethyl linolenate (9), phytol (10), 1-linoleoyl glycerol (11), 1-linolenoyl glycerol (12)로 확인되었다.

등수국 잎에서 분리된 화합물 중 *epi*-catechin, hyperin, quercitrin, afzelin은 플라보노이드 화합물에 속하며 항산화^{50,51,52}, 항염^{53,54,55} 활성이 우수한 것으로 알려져 있다. asiatic acid, corosolic acid는 트리테페노이드 화합물에 속하며, 항염 활성이 알려져 있다.^{56,57} 또한, phytol, ethyl linoleate, ethyl linolenate, 1-linoleoyl glycerol, 1-linolenoyl glycerol은 항염, 미백 활성이 있는 것으로

알려져 있다.^{33,58,59,60,61}

보리밥나무 잎 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 수득하였다. 추출물 및 용매 분획물에 대해 α -MSH로 자극된 B16F10 cell을 이용한 미백 활성 실험 결과, *n*-Hex 분획물이 세포 독성이 없는 범위에서 멜라닌 생성을 억제시키는 것을 확인하였다.

분리된 단일물질은 methyl linolenate (1), α -tocopherol (2), β -sitosterol (3), α -amyrin (4), β -amyrin (5)로 확인되었다. 이 중 methyl linolenate는 *n*-Hex 분획물에서 다량으로 분리되었으며, 미백 활성이 우수한 것으로 보고되어 있다.^{32,62}

이상의 연구 결과를 바탕으로 등수국 잎과 보리밥나무 잎의 추출물 및 분리된 화합물은 기능성 식품, 의약품 및 화장품 관련 천연소재로써 활용 가능할 것이라 판단된다.

V. 참고문헌

1. 김영석, 쥐꼬리망초에 함유된 생리활성 아릴 나프탈렌 리그난류 천연물의 분리 및 구조분석 연구, 강릉원주대학교 2016, 석사학위논문.
2. 이남호, 천연물화학, 신일서적(주) 2014, 97-98, 125.
3. 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.
4. Ren, J. R.; Han, J. E.; Chung, S. H. In Vivo and In Vitro Anti-inflammatory Activities of α -linolenic Acid Isolated from *Actinidia Polygama* Fruits, *Arch Pharm Res* 2007, 30(6), 708-714.
5. Ando, H; Ryu, A; Hashimoto, A; Oka, M; Ichihashi, M (March 1998). "Linoleic acid and α -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin.". *Archives of Dermatological Research* 1998, 290(7), 375-381.
6. Kim, H. J.; Lee, K. S.; Lee, K. T. Synthesis and characterization of structured lipids from evening primrose sees oil and rice bran oil. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2010, 39, 1156-1164.
7. Bartz, R. R.; Piantadosi C. A. Clinical review: oxygen as a signaling molecule. *Crit Care* 2010, 14(5), 234.
8. 식품의약품안전처, 건강기능식품 기능성 평가 가이드 - (4) '항산화에 도움'편
9. Kim, M. B.; Hyun, S. H.; Park, J. S.; Kang, M. A.; Ko, Y. H.; Lim, S. B. 제주 자생식물 고압용매 추출물의 통합적 항산화 능력, *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008, 37(11), 1497-1496.

10. Rabson A.; Roitt, I. M.; Delves, P. J. Really Essential Medical Immunology. *Blackwell publishing Ltd.* **2005**, 1-14.
11. 고태나, 윤노리나무 가지 및 제주 흑무 추출물로부터 기능성 화장품 소재 개발 연구, 제주대학교 **2018**, *박사학위논문*.
12. 엄현숙, 물사과 가지, 풍란 캘러스 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구, 제주대학교 **2018**, *석사학위논문*.
13. Yang, H. M.; Lim, S. S.; Lee, Y. S.; Shin, H. K.; Oh, Y. S.; Kim, J. K. Comparison of the Anti-inflammatory Effects of the Extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*, *Korean J. Food Sci. Technol.* **2007**, 39(3), 342-347.
14. Lala P. K, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* **2001**, 149-156.
15. Hwang, S. H.; Yoo, D. S.; Shim, J. H. Whitening Effect of Banana Leaf Extract, *Kor. J. Soc. Cosmet. Sci.* **2016**, 42(1), 37-43.
16. Seo, H.; Seo, G. Y.; Ko, S. Z.; Park, Y. H. Inhibitory Effects of Ethanol Extracts from *Polygoni multiflori radix* and *Cynanchi wilfordii radix* on Melanogenesis in Melanoma Cells, *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **2011**, 40(8), 1086-1091.
17. Kim, T. H.; Kim J. M.; Baek, J. M.; Kim, T. W.; Kim, D. J.; Park, J. H.; Choe, M. Antioxidant and Whitening Effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb Water Extract, *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **2011**, 19(3) 177-184.
18. Park, S. N. Effects of Natural Products on Skin Cells, *Kor. J. Soc. Cosmet. Sci.* **1999**, 25(2), 77-127.
19. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* **1981**, 58,

- 966-968.
20. Davis, F. B.; Middleton, E.; Davis, P. J.; Blas, S. D. Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity, *Cell Calcium* **1983**, 4, 71-81.
 21. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, 181, 1199-1200.
 22. 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.
 23. Lim, D. O. Plant diversity and conservation in Oruem of Jeju City. *Korean J. Env. Eco.* **2012**, 26, 635-653.
 24. 박지훈, 등수국 줄기 추출물의 항산화, 항염 및 미백 활성 성분 연구, 제주대학교 **2019**, 석사학위논문.
 25. 이종택, 스타푸르트 가지 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구, 제주대학교 **2018**, 석사학위논문.
 26. Yang, M. H.; Kong, L. Y. Flavonols and flavonol glycosides from *Rhododendron irroratum*, *Chemistry of Natural Compounds* **2008**, 44, 98-99.
 27. Shen, G. H. Phytochemical Investigation of *Tiarella polyphylla*, *Arch Pharm* **2008**, 31(1), 10-16.
 28. Xu, G. H.; Ryoo, I. J.; Kim, Y. H.; Choo, S. J.; Yoo, I. D. Free Radical Scavenging and Antielastase Activities of Flavonoids from the Fruits of *Thuja orientalis*, *Arch Pharm Res* **2009**, 32(2), 275-282.

29. Ahn, B. T. Phenolic Compounds from Leaves of *Spiraea salicifolia*, *Kor. J. Pharmacogn.* **1996**, 27(3), 179.
30. Nguyen, H. T. P.; Nguyen; Thi, D. T.; Pham, T. M. H.; Tran, T. H. H.; Nguyen, X. C.; Nguyen, H. N.; Nguyen, V. T.; Chau, V. M. Secondary metabolites from *Dipterocarpus obtusifolius* TEIJSM. ex MIQ., *Vietnam journal of chemistry* **2015**, 53(2e), 137-141.
31. 김정은, 섬오갈피 열매, 참꽃나무 잎, 당근 지상부 및 구멍갈파래 추출물의 항염, 항균 활성 성분 연구, 제주대학교 **2016**, 박사학위논문.
32. HUH, S.; Kim, Y. S.; Jung, E. S.; Lim, J. H.; Jung, K. S.; Kim, M.O.; Lee, J. S.; Park, D. H. Melanogenesis Inhibitory Effect of Fatty acid Alkyl Esters Isolated from *Oxalis triangularis*, *Biol. Pharm. Bull* **2010**, 33(7), 1242-1245.
33. 김수영, 뽕잎피나무 잎으로부터 항염 및 주름개선 활성 성분 연구, 제주대학교 **2013**, 석사학위논문.
34. Lee, S. J.; Jang, H. J.; Kim, Y. S.; Oh, H. M.; Lee, S. Y.; Jung, K. S.; Kim, Y. H.; Lee, W. S.; Lee, S. W.; Rho, M. C. Inhibitory effects of IL-6-induced STAT3 activation of bio-active compounds derived from *Salvia plebiea* R.Br., *Process Biochemistry* 51 **2006**, 2222-2229.
35. Ko, G. A.; Kim Cho, S. M. Ethyl linoleate inhibits α -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway, *Korean J Physiol Pharmacol.* **2018**, 22(1), 53-61.
36. 두산백과 , “보리수나무과”, NAVER 지식백과,
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1102469&cid=40942&categoryId=32822>

37. Yang, E. J.; Yim, E. Y.; Song, G. P.; Kim, G. O.; Hyun, C. G. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophages by Jeju plant extracts, *Interdisc Toxicol.* **2009**, 2(4), 245–249.
38. Park, S. H.; Jhee, K. H.; Yang, S. A. Protective Effects of an Ethanol Extract of *Elaeagnus umbellata* Leaves on α -MSH-induced Melanin Production in B16-F0 Cells and UVB-induced Damage in CCD-986sk Cells. *Journal of Life Science* **2019**, 29(5), 555–563.
39. Paudel, S. B.; Park, J. Y.; Kim, N. H.; Choi, H. J.; Seo, E. K.; Woo, H. A.; Nam, J. W. Constituents of the leaves and twigs of *Elaeagnus umbellata* and their proliferative effects on human keratinocyte HaCaT cells, *Journal of fitoterapia* **2019**, 104–374.
40. Minhas, F. A.; Aziz, S.; Rehman, H. U.; Irshad, M.; Ahmed, M. N.; Yasin, K. A. Antiplasmodial activity of compounds isolated from *Elaeagnus umbellata*, *Journal of Medicinal Plants Research* **2013**, 6(7), 277–283.
41. Wenyu Wang, W.; Wang, C.; Yu, Y.; Liu, J. The Anti-inflammatory and Antiasthma Activities of the Extracts from the Leaves of *Elaeagnus macrophylla* Thunb. *Medicinal Plant* **2015**, 6(3/4), 28–33.
42. Liu, J.; You, B.; Jing, Y.; Yu, G.; Li, C. Study on the Antibacterial Activity of *Elaeagnus macrophylla* Thunb Leaf Extract, *Northern Horticulture* **2011**, 01.
43. 조진경, 고추(*Capsicum annuum* L.) 잎으로부터 이차대사산물의 분리 및 동정, 경희대학교 **2009**, 석사학위논문.
44. 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.
45. OHYAMA, K.; SUZUKI M.; MASUDA K.; YOSHIDA S.; MURANAKA T.; Chemical Phenotypes of the *hmg1* and *hmg2* Mutants of *Arabidopsis* Demonstrate the *In-planta* Role of HMG-CoA Reductase in Triterpene Biosynthesis, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 55(10), 1518-1521.
46. Garcia, M. D.; Saenz, M. T.; Gomez, M. A.; Fernandez, M. A. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytother Res.* **1999**, 13, 78-80.
47. Gupta, M. B., Nath, R.; Srivastava, N.; Shanker, K.; Kishor, K.; Bhargava, K. P. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. *Planta Med.* **1980**, 39(2), 157-163.
48. Michel, F. O.; Fabiana V. L.; Angela, M.; Rosendo A. Y.; Joao B. C. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene, *European Journal of Pharmacology* **2005**, 507, 253- 259.
49. Krishnan, K.; Mathew, L. E.; Vijayalakshmi, N. R.; Helen, A.; Anti-inflammatory potential of β -amyrin, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*, *Inflammopharmacol* **2014**, 22, 373-385.
50. Ko, R. K.; Kim, G. O.; Hyun, C. G.; Jung, D. S.; Lee, N. H. Compounds with Tyrosinase Inhibition, Elastase Inhibition and DPPH Radical Scavenging Activities from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc, *Phytother. Res.* **2011**, 25, 1451-1456.
51. Kalegari, M.; Miguel, M. D.; Philippsen, A. F.; Dias, J. F.; Zanin, S. M.

- W.; Lima, C. P.; Miguel, O. G.; Antibacterial, allelopathic and antioxidant activity of extracts and compounds from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2012**, 2(9), 61-66.
52. Hong, C. O.; Rhee, C. H.; Won, N. H.; Choi, H. D.; Lee, K. W.; Protective effect of 70% ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* Blume on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats, *Food and Chemical Toxicology* **2013**, 53, 214-220.
53. Vadapalli, J.; Vanam, A.; Motohashi, N. Gollapudi, R. Chronic Inflammation: Prospective Prevention and/or Control by the Regulation of Nuclear Factor Kappa B with Natural Products as Dietary Supplements *Journal of Community and Preventive Medicine* **2018**, 1(1), 1-12.
54. Lee, S.; Jung, S. H.; Lee, Y. S.; Yamada, M.; Kim, B. K.; Ohuchi, K.; Shin, K. H. Antiinflammatory Activity of Hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* Roots, *Arch Pharm Res* **2004**, 27(6), 628-632.
55. Kim, B. M.; Kim, E. S.; Lee, Y. H.; Yu, B. S.; Chai, K. Y. Antiinflammatory Effect of Bioactive Compounds from *Geranium nepalense* *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription* **2010**, 18(2), 241~249.
56. Yun, K. J.; Kim, J. Y.; Kim, J. B.; Lee, K. W.; Jeong S. Y.; Park. H. J.; Jung, H. J.; Cho, Y. W.; Yun, K.; Lee, K. T. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways **2007**, 8(3), 431-441.
57. Kim, S. J.; Cha, J. Y.; Lee, J. H.; Lee, J. Y.; Park, J. H.; Bae, J. H.;

- Song, D. K.; Im, S. S. Corosolic acid ameliorates acute inflammation through inhibition of IRAK-1 phosphorylation in macrophages, *BMB Rep* **2016**, 49(5), 276-281.
58. Ko, G. A.; Cho, Kim, S. M. Phytol suppresses melanogenesis through proteasomal degradation of MITF via the ROS-ERK signaling pathway, *Chemico-Biological Interactions* **2018**, 286, 132-140.
59. Wang, G.; Ji, Y.; Li, Z.; Han, X.; Guo, N.; Song, Q.; Quan, L.; Wang, T.; Han, W.; Pang, D.; Ouyang, H.; Tang, X. Nitro-oleic acid downregulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression via the p42/p44 MAPK and NFκB pathways, *Scientific reports* **2014**, 4, 4905.
60. Park, S. Y.; Seetharaman, R.; Ko, M. J.; Kim, D. Y.; Kim, T. H.; Yoon, M. K.; Kwak, J. H.; Lee, S. J.; Bae, Y. S.; Choi, Y. W. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells, *International Immunopharmacology* **2014**, 19, 253-261.
61. Qian, Z.; Wu, Z.; Huang, L.; Qiu, H.; Wang, L.; Li, L.; Yao, L.; Kang, K.; Qu, J.; Wu, Y.; Luo, J.; Liu, J. J.; Yang, Y.; Yang, W.; Gou, D. Mulberry fruit prevents LPS induced NF-κB/pERK/MAPK signals in macrophages and suppresses acute colitis and colorectal tumorigenesis in mice, *scientific reports* **2015**, 5, 17348.
62. Ko, G. A.; Shrestha, S.; Kim, Cho, S. *Sageretia thea* fruit extracts rich in methyl linoleate and methyl linolenate downregulate melanogenesis via the Akt/GSK3β signaling pathway, *Nutrition Research and Practice* **2018**, 12(1), 3-12.