



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

생달나무 잎 추출물의 항산화, 항염 및
항균 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

金 昭 嬉

2020年 8月

생달나무 잎 추출물의 항산화, 항염 및
항균 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

金 昭 嬉

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 6月

金昭嬉의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 玄 昌 久 
委 員 尹 景 燮 
委 員 李 南 昊 

濟州大學校 大學院

2020年 6月

Anti-oxidative, Anti-inflammatory and
Anti-bacterial Constituents from the Extract of
Cinnamomum yabunikkei Leaves

So Hee Kim

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2020. 6.

This thesis has been examined and approved.

CHANG-GU HYUN

Kyung - Sup Yoon

Nam Ho Lee

06/18/20

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



목 차

List of Tables	iv
List of Figures	v
List of Abbreviations	vii
Abstract	ix
I. 서론	1
1. 향산화	2
2. 항염	4
3. 항균	5
4. 생달나무(<i>Cinnamomum yabunikkei</i>)	7
II. 재료 및 방법	8
1. 시약 및 기기	8
2. 재료	9
3. 생달나무 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	10
1) 생달나무 잎의 추출 및 용매 분획	10
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	11
(1) MPLC에 의한 분리과정	11
(2) VLC에 의한 분리과정	12
4. 생리 활성 평가	14
1) 향산화	14
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	14
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	15
(3) DPPH radical 소거 활성	16
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	17
2) 항염	18

(1) RAW264.7 cell 배양	18
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	18
(3) Western blot analysis	18
(4) 전염증성 cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 생성 억제 활성	19
3) 세포 독성 평가	20
4) 항균	21
(1) 균주 배양	21
(2) Paper disc diffusion method	21
(3) MIC (minimum inhibitory concentration)	22
(4) MBC (minimum bactericidal concentration)	22
5. 통계 처리	22
III. 결과 및 고찰	23
1. 분리된 화합물의 구조 분석	23
1) Compound 1	23
2) Compound 2	26
3) Compounds 3-5	29
2. 생달나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	35
1) 항산화	35
(1) 총 폴리페놀 함량	35
(2) 총 플라보노이드 함량	36
(3) DPPH radical 소거 활성	37
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	38
2) 항염	39
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	39
(2) Western blot analysis	42
(3) 전염증성 cytokines (IL-1 β , TNF- α) 생성 억제 활성	44
3) 항균	46
(1) Paper disc diffusion method	46

(2) MIC 및 MBC	47
3. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	49
1) 항염	49
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	49
(2) Western blot analysis	52
(3) 전염증성 cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 생성 억제 활성	53
 IV. 요약 및 결론	 55
 V. 참고문헌	 57

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1	24
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 2	27
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 3-5	31
Table 4. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> leaves.	37
Table 5. SC_{50} values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> leaves.	38
Table 6. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> leaves.	46
Table 7. MIC and MBC values of <i>C. yabunikkei</i> leaves on <i>S. epidermidis</i> . ..	48
Table 8. MIC and MBC values of <i>C. yabunikkei</i> leaves on <i>C. acnes</i>	48

List of Figures

Figure 1. Anti-oxidative system inside human body.	3
Figure 2. Chemical structures of anti-oxidants.	3
Figure 3. Pictures of <i>Cinnamomum yabunikkei</i>	9
Figure 4. Extraction and solvent fractionation of <i>C. yabunikkei</i> leaves.	10
Figure 5. Isolation of compounds from <i>C. yabunikkei</i> leaves. (MPLC)	11
Figure 6. Isolation of compounds from <i>C. yabunikkei</i> leaves. (VLC)	13
Figure 7. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total polyphenol contents.	14
Figure 8. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.	15
Figure 9. Chemical structure of compound 1	23
Figure 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃	25
Figure 11. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃	25
Figure 12. Chemical structure of compound 2	26
Figure 13. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	28
Figure 14. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	28
Figure 15. Chemical structures of compounds 3-5	30
Figure 16. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	32
Figure 17. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	32
Figure 18. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	33
Figure 19. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	33
Figure 20. ¹ H-NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD	34
Figure 21. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD	34
Figure 22. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> leaves.	35
Figure 23. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>C.</i>	

<i>yabunikkei</i> leaves.	36
Figure 24. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> leaves.	37
Figure 25. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> leaves.	38
Figure 26. Effects of extract and solvent fractions from <i>C. yabunikkei</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells.	40
Figure 27. Effect of EtOAc fraction from <i>C. yabunikkei</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells.	41
Figure 28. Effect of EtOAc fraction from <i>C. yabunikkei</i> leaves on levels of iNOS protein expression in LPS-induced RAW264.7 cells.	43
Figure 29. Effects of EtOAc fraction from <i>C. yabunikkei</i> leaves on IL-1 β and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells.	45
Figure 30. Effects of isolated compounds 1-5 from <i>C. yabunikkei</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. ..	50
Figure 31. Effect of isolated compound 1 from <i>C. yabunikkei</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells.	51
Figure 32. Effect of isolated compound 1 from <i>C. yabunikkei</i> leaves on levels of iNOS protein expression in LPS-induced RAW264.7 cells.	52
Figure 33. Effects of isolated compound 1 from <i>C. yabunikkei</i> leaves on IL-6, IL-1 β and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. ...	53

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BHA	butylated hydroxyanisole
BHT	butylated hydroxytoluene
brs	broad singlet
CC	column chromatography
CDCl ₃	chloroform- <i>d</i>
CHCl ₃	chloroform
d	doublet
dd	doublet of doublet
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl acetate
FBS	fetal bovine serum
Fr.	fraction
GAE	gallic acid equivalent
GAM	gifu anaerobic medium
H ₂ O	water
IC ₅₀	inhibition concentration of 50%
IL-1 β	interleukin 1-beta
IL-6	interleukin-6
iNOS	inducible nitric oxide synthase
int.	integration
<i>J</i>	coupling constant (Hz)
LPS	lipopolysaccharide
MeOH	methanol
MP	MPLC subfraction

MPLC	medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium 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
QE	quercetin equivalent
ROS	reactive oxygen species
s	singlet
SC ₅₀	scavenging concentration of 50%
TBS	tris-buffered saline
TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TSB	tryptic soy broth
V	VLC subfraction
VLC	vacuum liquid chromatography

Abstract

In this study, we investigated identification of anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial constituents from *Cinnamomum yabunikkei* leaves. Five phytochemicals were isolated from the extract of *C. yabunikkei* leaves; (4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone (**1**), methoxy-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)ethanediol (**2**), afzelin (**3**), nicotiflorine (**4**) and narcissin (**5**). 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. As far as we know, compounds **1-5** were isolated for the first time from this plant. On the anti-oxidative tests, the ethyl acetate (EtOAc) fraction showed potent free radical scavenging activities.

In the anti-inflammatory tests using RAW264.7 cells, the EtOAc fraction inhibited the production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. In addition, the EtOAc fraction reduced expression of iNOS protein and production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α). Also compound **1**, **3**, **4** and **5** inhibited the production of NO effectively without causing cell toxicity. Furthermore, compound **1** reduced expression of iNOS protein and exhibited potent inhibitory activities of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α).

Upon the anti-bacterial tests using *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) and *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9010), EtOAc fraction showed strong activities.

Based on these results, it was suggested that the extract and isolated compounds from *C. yabunikkei* leaves could be potentially applicable as natural source for pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

I. 서론

최근 생활 환경의 변화로 인해 불규칙한 생활과 대기오염, 화학물질 등과 같은 물리적, 화학적인 외부 자극에 노출되는 빈도가 높아지게 되었으며 이러한 자극들은 현대인들의 정신적, 신체적 스트레스를 유발한다. 이는 피부에 염증이나 뾰루지, 노화 등을 유발하는 원인이 되고 있으며 생활 수준이 향상됨에 따라 이러한 피부 트러블 및 질병 예방에 대한 현대인들의 관심이 높아지고 있다.^{1,2}

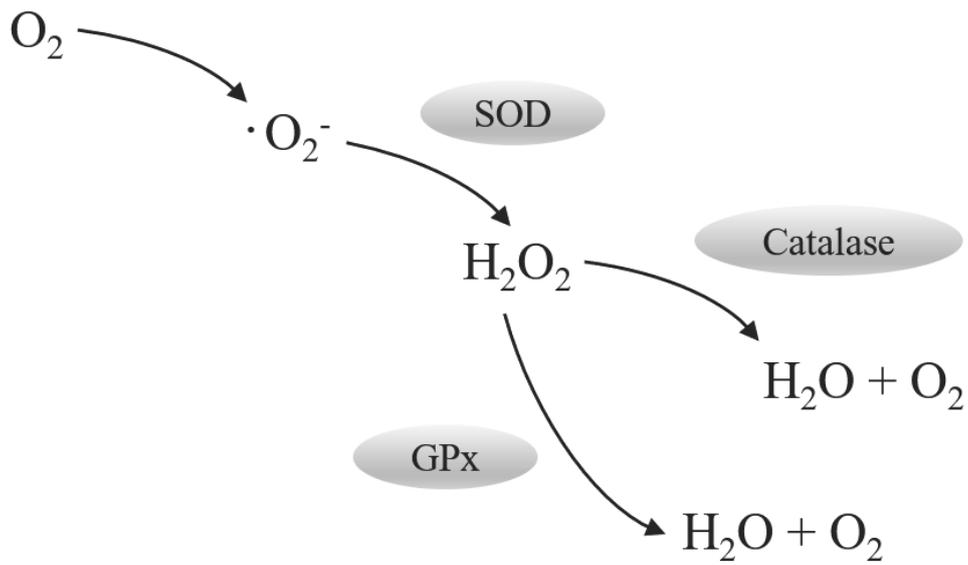
식품 및 화장품에 대한 소비자들의 인식은 과거와 달리 상품의 외관과 가격 뿐 아니라 상품의 안전성도 중요시하기 때문에 화장품의 경우 피부 문제를 일으키는 것으로 알려져 있는 계면활성제, 방부제, 인공향료 등이 함유된 제품을 기피하는 현상이 일어나고 있다. 이에 따라 친환경적인 제품에 대한 소비자의 선호도가 증가하고 소비자들이 제품의 원재료 성분을 자세히 알아보고 구매를 하는 추세가 이어지고 있다. 천연물은 광합성 과정에서 발생하는 활성산소에 대항하는 많은 생리 활성 성분들이 존재하고 있으며 이들에 대한 항산화, 항염, 항균 등에 관한 효능이 알려져 있다. 과학적으로 입증된 활성에 대한 신뢰를 바탕으로 소비자들의 천연 유래 제품에 대한 선호도가 높아지면서 천연물로부터 유효성분을 추출, 정제하여 효능을 검증하는 소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.²⁻⁴

피부는 인체 기관 중 외부환경에 가장 많이 노출되어 있으며 물리적, 화학적 자극으로부터 신체를 보호하는 물리적 장벽으로서 항상성을 유지하고 인체 내 독소들을 배출하기도 한다. 표피가 화학물질이나 자외선 등의 환경적 스트레스에 지속적으로 노출되면 이러한 몸의 대사가 정상적으로 기능하지 못하고 피부의 노화나 다양한 피부 질환 및 염증 반응을 일으킨다.⁵ 현재까지 피부 질환의 치료 방법으로 통상 수분 유지나 피부 염증 증상을 낮춰주는 스테로이드제와 항히스타민제 등의 약물 처방 등이 사용되고 있다. 이는 일시적인 증상 완화를 주지만 장기간 사용 시 물리적으로는 색소 침착, 피부 위축, 알레르기 등을 일으키고 신체적으로는 불면, 불안, 식욕감퇴 등의 다양한 문제들을 유발한다고 알려져 있어 부작용이 없는 천연 유래의 피부질환 완화제가 필요한 시점이다.⁶

1. 항산화

산소는 인간의 생존에 꼭 필요하지만 생체 내에서 정상적인 대사과정을 통해 사용되는 산소 중 1~3%는 유해한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다. 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항산소($^3\text{O}_2$)가 환원되어 생성되며 인체에 손상을 미치는 대표적인 활성산소 종에는 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) 등이 있다. 이와 같은 유해 활성산소는 대부분 free radical이며 불안정한 상태의 활성산소는 짝 지어지지 않은 전자쌍을 채워서 안정화하려는 성질을 가지고 있기 때문에 주변 물질과 끊임없이 연쇄적으로 반응하여 결합하고자 한다. 따라서 적당량의 활성산소는 여러 병원체와 반응하고 결합하여 불활성화 시키기 때문에 좋은 역할을 하지만 체내에 활성산소가 과다하게 분비하게 되면 생명유지에 필요한 단백질, 지방, 탄수화물 등의 필수 물질들도 무차별적으로 공격을 가하기 때문에 제 기능을 발휘하지 못하게 된다. 결국 과도한 활성산소 생성은 신체에 악영향을 끼쳐 각종 질병과 노화를 유발하는 주범이 되고 있다.^{7,8}

이러한 산화적 손상을 억제하기 위해 생체에는 활성산소 종을 제거하는 자기방어 기구로서 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase 등의 효소적 기전이 존재하며 이를 통해 free radical을 소거하면서 체내의 항상성을 유지시켜준다. 비효소적인 기전으로는 천연 항산화제로 α -tocopherol, β -carotene, L-ascorbic acid, flavonoid 등이 있으며, 합성 항산화제로는 phenol계의 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 등이 개발되어 이용되고 있다. 하지만 합성 항산화제의 경우 50mg/kg/day 이상을 사람이 섭취할 경우 생체효소 및 지방의 변화로 인해 암 등의 질병이 유발된다고 보고되어 있다. 이에 따라 천연 항산화제의 개발이 활발히 진행되어 여러 물질들이 보고되어 있지만 효력이나 경제적인 측면에서 BHT, BHA와 같은 합성 항산화제를 능가하지 못하는 실정이다. 이로 인해 경제적이면서 효력이 탁월하고 보다 안전한 천연 항산화제에 대한 연구가 요구되고 있다.^{7,8}



SOD : superoxide dismutase

GPx : glutathione peroxidase

Figure 1. Anti-oxidative system inside human body.

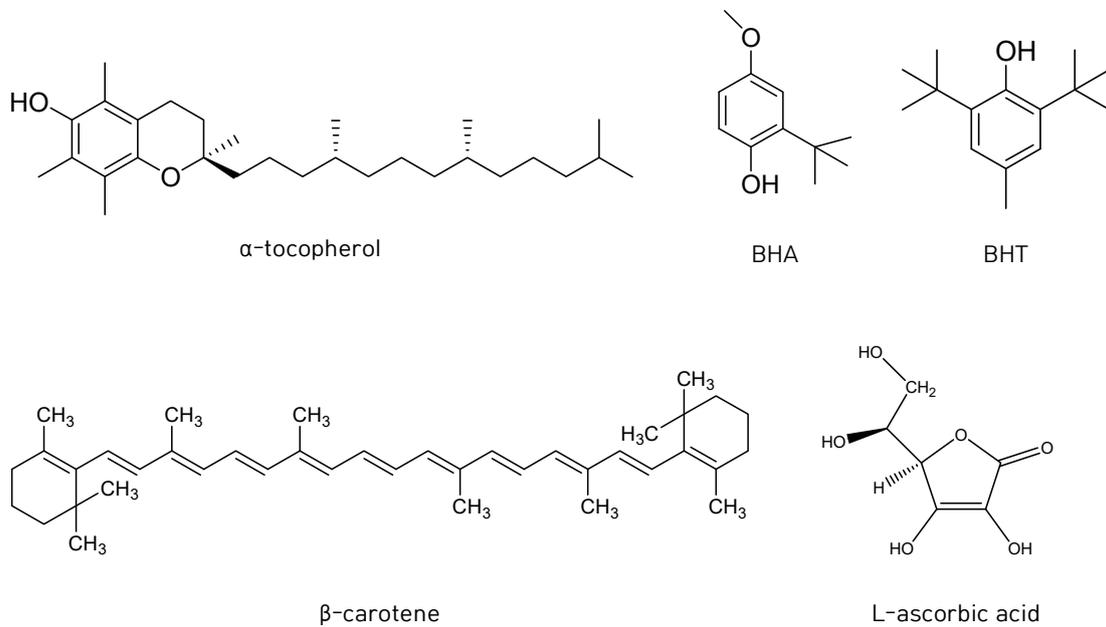


Figure 2. Chemical structures of anti-oxidants.

2. 항염

염증반응은 면역세포 중 하나인 대식세포가 세균 감염 등의 외부 자극이나 생체 내 대사산물과 같은 내부 자극에 의한 조직 손상에 대응하기 위해 일어나는 정상적인 방어 기전이다. 하지만 지속적이고 과도한 염증반응은 오히려 조직의 손상, 다발성 경화증 류머티즘과 같은 자가면역질환 등을 일으키는 것으로 알려져 있어 염증반응을 제어하고 적정 수준을 유지하는 것이 매우 중요하다.^{9,10}

대식세포가 인체 내 독소로 알려진 lipopolysaccharide (LPS)의 자극을 받으면 염증 반응이 일어나면서 nitric oxide (NO)와 interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 전염증성 사이토카인의 다량 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다. 체내 염증 과정에서의 nitric oxide는 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생합성되며 NOS는 물리 화학적 성상에 따라 Type I, II 및 III의 3 종류 동종 효소로 나누어진다. Type I (neuronal NOS, nNOS)과 Type III(endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 항상 존재하기 때문에 지속적 NOS(constitutive NOS)로 분류되며 Type II는 inducible NOS (iNOS)로, 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아와 같은 외부 자극들에 노출된 경우에만 발현된다.¹¹

일반적으로 nitric oxide는 체내 방어 기능, 신호전달 기능뿐만 아니라 세균을 죽이는 등의 항균 역할도 하지만 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 과도한 NO는 염증 매개 물질의 생합성을 촉진하여 염증을 악화시키는 것으로 알려져 있다. 전염증성 cytokine인 IL-6는 조직 손상과 감염에 대한 숙주의 반응에 있어서 중요한 역할을 하며 IL-1 β 는 만성염증 유발 매개인자로 염증 관련 종양형성에 관여한다. TNF- α 는 종양괴사인자로, 종양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나 대식세포를 자극하여 염증반응을 촉진시킨다. 이로 인해 nitric oxide 생성 및 전염증성 cytokine의 발현을 조절하는 물질은 염증성 질환을 예방할 수 있는 가능성이 있다고 알려져 있다. 현재까지 주로 사용하는 항염증제는 대부분 스테로이드 및 비스테로이드성이며 이와 같은 항염증제들은 장기간 사용 시 부작용 발생의 위험이 커 이를 대체하기 위한 천연물 유래의 염증질환 예방 및 치료제의 개발이 활발히 이루어지고 있다.^{10,12-14}

3. 항균

대표적인 피부질환인 여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 만성 염증성 질환이다. 여드름의 발생 원인은 명확하게 규명되지 않았으며 피로와 스트레스, 유전적인 요인, 호르몬 불균형, 과도한 피지 분비, 피지선의 과각질화, 피부 상재균의 증식 등과 같은 여러 가지 요인들이 복합적인 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 청소년기에는 androgen이라는 남성호르몬의 분비가 활발해지면서 피지선을 자극하고 피지 분비를 촉진시킨다. 이때 모공이 좁아지든지 막히면서 분비된 피지가 모공 밖으로 배출되지 못하면 모공 내로 역류하거나 모공을 막아서 세균의 번식이 일어나게 되며 이는 피부의 염증 및 과각질화를 일으켜 여드름의 원인이 된다.¹⁶

일반적으로 건강한 피부는 유익균과 유해균이 8 : 2의 비율로 약산성을 이루어 균형을 유지하고 땀으로 분비되는 면역 항체와 결합하여 피부의 방어 기능을 높여준다. 하지만 피부의 혐기성 상재균 중 하나인 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)는 지방 친화성인 여드름균으로 모낭에서 성장하여 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)을 형성하고 유리지방산인 linoleic acid를 분해하면서 피부의 면역력을 저하시키게 되고 결국 염증 반응을 가속화하여 여드름을 악화시킨다.^{14,15} 호기성 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)의 경우 염증의 1차적인 원인은 아니지만 염증 발생 부위를 확장시키면서 모낭 주위의 여드름을 악화시키고 여드름 합병증을 유발한다. 또한 여드름 병변에서 염증 반응은 주로 cytokine에 의해 매개되는데 대표적으로 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 등의 전염증성 cytokine이 분비되어 여드름 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{15,17-19}

현재 여드름 치료 방법으로는 염증 유발의 주된 역할을 하는 *C. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들의 증식 억제와 염증 치료를 위해 주로 항생제가 사용되고 있다. 흔히 알려진 항생제로는 benzoyl peroxide, retinoid, azelaic acid, clindamycin, erythromycin, tetracycline 등이 있으나 과다 사용 시 많은 부작용들을 일으키는 것으로 알려져 있다. Benzoyl peroxide, retinoid는 피부 자극감, 피부 건조증, 접촉성 피부염 등을 유발하고 clindamycin, erythromycin, tetracycline의 경우 항생제 내성 발생으로 인해 지속적인 사용이 어려우며 장기

간 복용 시 간 독성이 심하여 간 조직의 손상을 일으킬 수 있다. 여드름 치료에는 약물 이외에 물리적인 치료법도 있으나 이 같은 경우 고비용이라는 단점이 있다. 따라서 이러한 합성 물질들을 대체하기 위하여 여드름 피부에 효과적이고 부작용을 최소화할 수 있는 천연물로부터의 유용물질 탐색을 위한 연구가 요구되고 있으며 천연 향균물질에 대한 관심도 급증하고 있는 추세이다.^{15,17,18}

4. 생달나무(*Cinnamomum yabunikkei*)

생달나무(*Cinnamomum yabunikkei*)는 녹나무과(lauraceae)에 속하는 나무로 산지에서 자라며 내음성이 강하고 습기가 많은 낮은 저지대 경사지에 잘 자란다. 높이는 15 m 정도에 달하고, 잎은 어긋나고 길이 6~15 cm의 긴 타원 모양으로 양 끝이 뾰족하고 가장자리가 밋밋하며 3개의 맥이 있다. 잎 표면은 광택이 있고 뒷면은 분처럼 흰색을 띤다. 한국, 중국 남부 및 중부, 대만, 일본 등에 분포해 있으며 한반도에서는 전라남도 및 제주도에 분포해 있다.

과거에는 *Cinnamomum japonicum* Siebold 이라는 학명을 사용하였으나 일본의 식물학자 오바(H. Ohba)에 의해 2006년 현재의 학명으로 새로이 기재되었다. 종속명 *yabunikkei*는 생달나무의 일본어명 '야부니케이(ヤブニッケイ)'를 라틴어화한 것이다.

생달나무 껍질(bark) 열수 추출물과 에탄올 추출물에 대해서는 항염 효능이 알려져 있고 cinnamic acid, cinnamaldehyde 등의 유효 성분 연구가 보고되어 있다.²⁰ 생달나무 에센셜 오일(essential oil)에 대해서는 미백 효능과 균주 *Malassezia furfur* (*M. furfur*)에서의 항균 효과가 보고되어 있다.²¹ 그러나 아직까지 생달나무 잎(leaves)을 대상으로 한 유효 성분 연구는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 제주 자생 식물인 생달나무(*Cinnamomum yabunikkei*) 잎 추출물과 용매 분획물의 다양한 생리 활성을 탐색하고, 유효 성분의 분리 및 구조 동정을 통해 안전한 의약품, 건강기능식품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 활성 성분 분리에 사용된 용매들은 Merck, OCI 및 대정화금의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co.), medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co.)에는 KP-C18-HS (Biotage Co.) 컬럼을 사용하였고, gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. 분리 과정에 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck co.)를 사용하였으며 TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나 발색 시약에 침적시킨 후 heat gun을 사용하여 건조시켰다. 발색 시약으로는 KMnO₄ 수용액 (3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 anisaldehyde (1% anisaldehyde-5% H₂SO₄)를 사용하였다.

활성 성분 구조 분석을 위해 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance) spectrometer는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CDCl₃, CD₃OD를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 시료인 생달나무(*Cinnamomum yabunikkei*) 잎 (시료번호 : 483)은 제주시 한경면 청수리에서 2017년 8월에 채집한 것을 제주생물자원(주)로부터 구입하였으며, 구입한 생달나무 잎은 동결 건조기에서 건조한 후 분쇄하여 사용하였다(Figure 3).



Figure 3. Pictures of *Cinnamomum yabunikkei*.

3. 생달나무 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 생달나무 잎의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 생달나무 잎 500.0 g을 70%(v/v) EtOH 10.0 L에 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻은 여액은 37~40°C의 수욕 상태에서 회전 진공 농축기 (rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 122.0 g을 얻었다. 이 중 추출물 112.0 g을 증류수에 현탁시키고 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), water (H₂O) fraction을 얻었다(Figure 4).

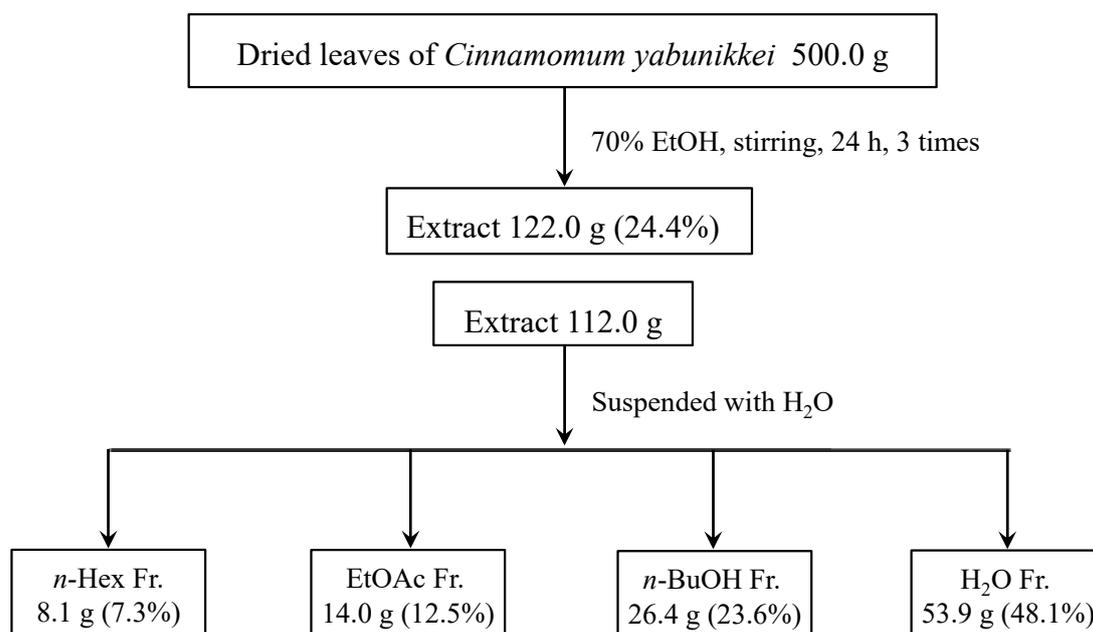


Figure 4. Extraction and solvent fractionation of *C. yabunikkei* leaves.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

(1) MPLC에 의한 분리과정

용매 분획층들 중 EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 MPLC (medium pressure liquid chromatography)를 수행하였다. EtOAc 분획물 5.0 g을 MeOH 5 mL에 녹이고 기울기 용리법을 이용해 H₂O:MeOH (10-100% MeOH, 100 min), MeOH (100%, 20 min)의 용매 조건으로 극성 비율을 순차적으로 낮추면서 각각 40 mL씩 용출시켜 총 48개의 fraction을 얻었다 (Fr. MP1-MP48).

MPLC fraction들 중 Fr. MP18 (170.0 mg)은 CHCl₃:MeOH=10:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 2 (16.5 mg)을 얻었으며, Fr. MP19 (160.1 mg)는 CHCl₃:MeOH=15:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 2 (1.1 mg)와 compound 1 (12.6 mg)을 분리하였다(Figure 5).

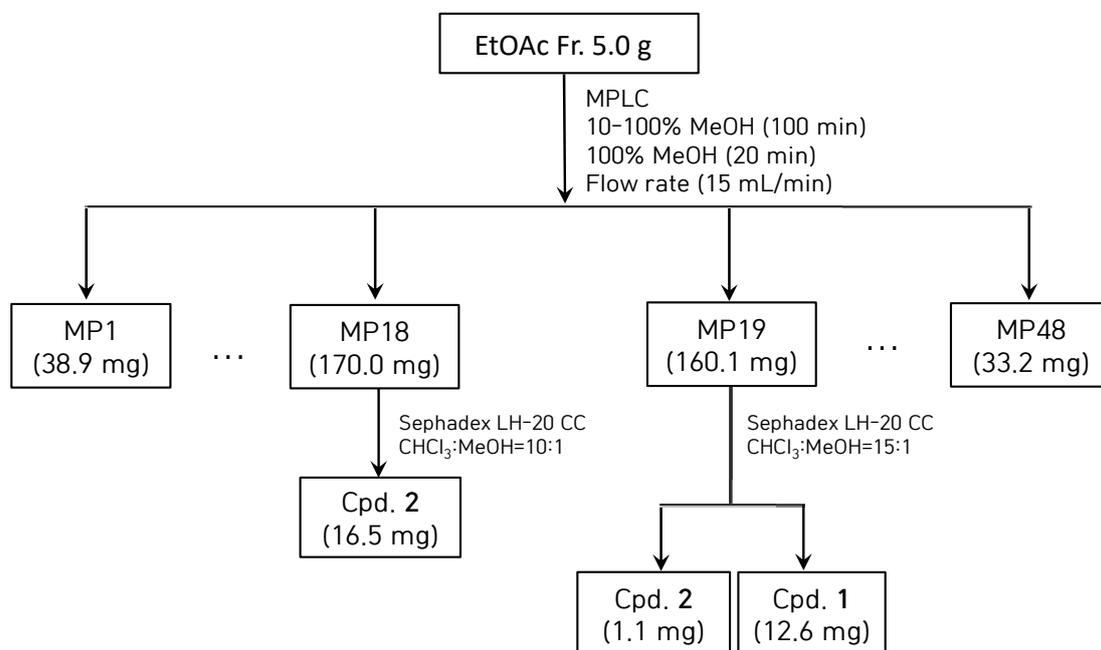


Figure 5. Isolation of compounds from *C. yabunikkei* leaves. (MPLC)

(2) VLC에 의한 분리과정

용매 분획층들 중 ethyl acetate 분획물 5.4 g을 극성 크기별로 세분화하기 위하여 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. 용매의 극성을 5%씩 높이는 방법으로 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (0-50%)을 각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-V32).

VLC fraction들 중 Fr. V8 (111.7 mg)을 CHCl₃:MeOH=40:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 Fr. V8-3 (50.8 mg)을 얻었고 이를 같은 용매 조건으로 재분리하여 compound 1 (9.7 mg)을 얻었다. Fr. V23 (496.8 mg)은 H₂O:MeOH=1:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 3 (8.5 mg)을 분리하였다. Fr. V25 (527.0 mg)는 H₂O:MeOH=1:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 4 (7.7 mg)를 얻었다. Fr. V26 (500.0 mg)은 H₂O:MeOH=1:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 4 (14.2 mg)와 compound 5 (4.1 mg)를 분리하였다(Figure 6).

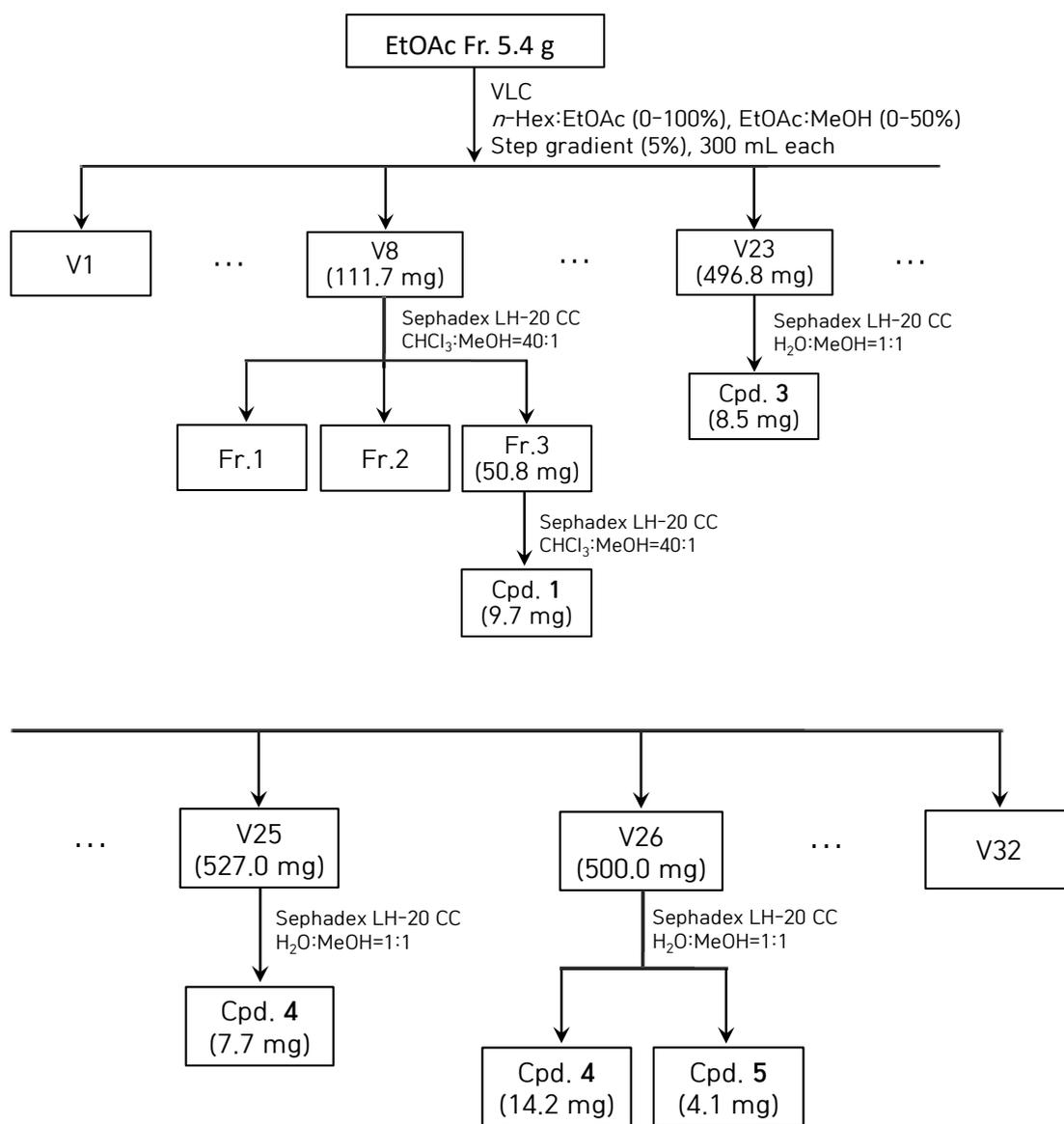


Figure 6. Isolation of compounds from *C. yabunikkei* leaves. (VLC)

4. 생리 활성 평가

1) 항산화

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법²²을 응용하여 실시하였다. 정량을 위한 표준 검정 곡선(standard calibration curve)에는 gallic acid를 표준물질로 사용하였다. 1 mg/mL 농도의 시료와 농도별로 희석한 gallic acid 표준 용액을 100 μ L 씩 취한 후 증류수 900 μ L를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 첨가하여 상온에서 3분간 반응시키고, 7%(w/v) Na_2CO_3 용액 200 μ L를 가하여 혼합한 후 증류수 700 μ L를 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 96 well plate에 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정값을 표준 검정 곡선에 대입하여 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양으로 환산하였다. 표준 검정 곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다 (Figure 7).

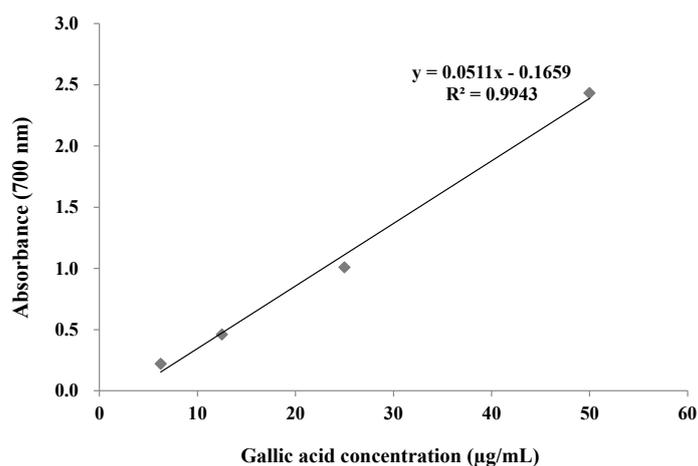


Figure 7. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total polyphenol contents.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법²³을 응용하여 실시하였으며 표준물질로 quercetin을 사용하였다. 96 well plate에 표준물질과 시료를 15 μ L씩 분주하고 ethylene glycol 150 μ L와 0.1 N NaOH 15 μ L를 첨가하여 총 180 μ L가 되도록 혼합하였다. 이를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료의 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준 검정 곡선 (standard calibration curve)을 통해 구하였으며 표준 검정 곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 8).

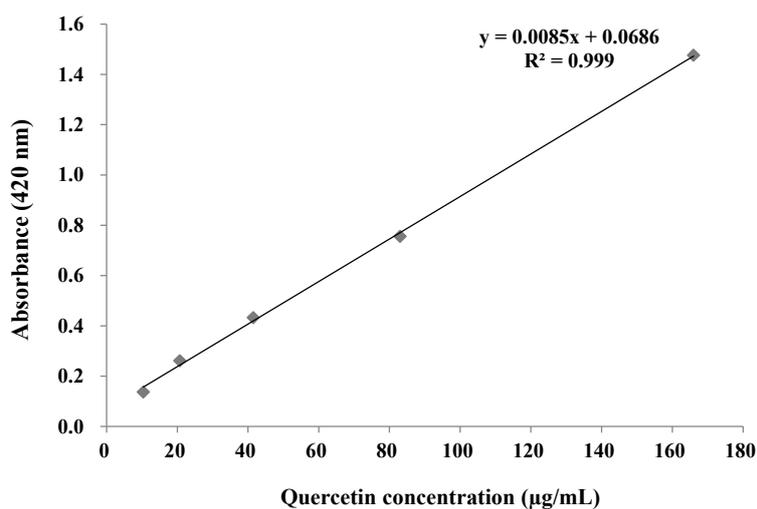


Figure 8. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.

(3) DPPH radical 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법²⁴을 응용하여 실시하였다. DPPH 시약은 DMSO를 사용하여 20 mM 농도로 녹이고 이를 EtOH을 사용하여 0.2 mM로 희석한 뒤 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료를 각각 20 μ L씩 넣고 0.2 mM DPPH 용액을 180 μ L씩 가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고 radical 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며 양성 대조군 (positive control)은 BHT를 사용하였다.

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

Abs_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

Abs_{sample} : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

AbS_{blank} : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 양이온 radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법²⁵을 응용하여 실시하였다. ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해 7.4 mM ABTS 용액과 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 상온 및 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. ABTS⁺ 용액은 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.02가 되도록 ethanol로 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료를 농도별로 각각 20 µL씩 가한 후 희석한 ABTS⁺ 용액 180 µL을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)을 구하였다. 양성 대조군(positive control)은 BHT를 사용하였으며 radical 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 %로 계산하였다.

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

Ab_{Scontrol} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

Ab_{Ssample} : 700 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

Ab_{Sblank} : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

2) 항염

(1) RAW264.7 cell 배양

마우스 대식세포 계열(Murine macrophage cell line)인 RAW264.7은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고 2일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 생성된 nitric oxide의 양을 측정하기 위해 96 well plate에 세포 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였으며 sodium nitrite (NaNO₂)을 사용하여 표준 검정 곡선을 작성하고 비교하였다. 표준 검정 곡선의 r² 값은 0.99 이상이었으며 양성대조군(positive control)으로는 2-amino-4-picoline (10 µM)을 사용하였다.

(3) Western blot analysis

60 mm petri dish에 RAW264.7 cell을 9.0×10^5 cells/dish로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포 상등액을 제거하여 cold PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer (1 × RIPA)를

이용하여 4°C 조건에서 overnight 시켜 lysis 시켰다. 이를 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 20 min)하여 단백질의 상등액만을 실험에 사용하였으며 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 한 Pierce™ BCA Protein Assay Kit를 사용하였다. BSA의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 표준 검정 곡선을 작성하고 정량하였으며 표준 검정 곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

정량한 단백질 20 µg을 NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (1.5 mm × 10 well)에 loading 하여 전기영동한 뒤 Transfer stack을 이용해 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 7분간 transfer 하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 5% skim milk를 함유한 TTBS (0.1% Tween 20, tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2시간 동안 blocking 시킨 후 TTBS로 3회 세척하였다. 이후 membrane을 각각의 1차 항체들과 반응시키기 위해 β -actin antibody clone AC-74 (Sigma)를 1:10000으로, anti-rabbit NOS2 (Santa Cruz)를 1:1000으로 희석한 뒤 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 TTBS로 5회 세척하고 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 2차 항체(Santa Cruz)를 1:2000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 TTBS로 5회 세척하였다. 단백질은 WEST-NOVA 2.0 (Cyanagen) 용액을 사용하여 ECL 기질과 반응시킨 후 Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

(4) 전염증성 cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액의 전염증성 cytokine 생성량을 각각 IL-6 (invitrogen, USA), IL-1 β (R&D Systems, USA), TNF- α (BD Biosciences) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였다. 측정값은 각각의 표준물질에 대한 표준 검정 곡선을 통해 정량하여 백분율로 나타내었으며 표준 검정 곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

3) 세포 독성 평가

세포 독성 평가는 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 이용하였다. 24 well plate에 RAW264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 각각 sample을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT 시약을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 후 이를 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

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

Ab_{Scontrol} : 시료를 첨가하지 않은 반응 용액의 흡광도

Ab_{Ssample} : 시료 반응 용액의 흡광도

4) 항균

(1) 균주배양

피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) 3종 CCARM 3709, CCARM 3710, CCARM 3711과 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) 4종 CCARM 0081, CCARM 9009, CCARM 9010, CCARM 9089를 항생제 내성 균주 은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *S. epidermidis*는 배양 배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37℃, 호기성 조건에서 24시간마다 계대 배양하였고, *C. acnes*는 배양 배지를 GAM (gifu anaerobic medium)으로 하여 37℃, 혐기 상태로 48시간마다 계대 배양하였다.

(2) Paper disc diffusion method

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 paper disc diffusion 법을 실시하여 각 균주에 대한 생육 저지환을 확인하였다. *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)를 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 0.8% agar를 포함하는 TSB 배지에 넣어 1.5% agar를 포함하는 고체 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37℃에서 24시간 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다. *C. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 0.8% agar를 포함하는 GAM 배지에 넣어 1.5% agar를 포함하는 고체 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37℃에서 48시간 혐기 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다. 양성 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

(3) MIC (minimum inhibitory concentration)

최소 억제 농도 (MIC)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소 농도로 미생물에 대한 MIC 값이 낮을수록 시료 물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고 할 수 있다. MIC 측정은 액체 배지 희석법을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 two-fold-dilution 법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽힌 배지 100 μ L와 2.0×10^5 CFU/mL로 조절한 균 100 μ L를 넣어주었다. *S. epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *C. acnes*는 37°C에서 48시간 혐기 조건하에서 배양하여 균의 증식이 나타나지 않는 최소 농도를 확인하였다.

(4) MBC (minimum bactericidal concentration)

MIC는 균의 최소 억제 농도로서 균이 모두 사멸했음을 의미하는 것이 아니므로 균의 최소 사멸 농도 (MBC)를 확인하기 위해 MIC 값 이상의 시료 배양액을 고체 배지에 희석 도달하여 배양한 후 colony의 형성 여부를 확인하여 균이 전혀 자라지 않은 농도를 MBC 값으로 하였다. MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 사용해 시료 배양액을 찍어내어 1.5% agar를 포함하는 고체배지에 도달한 후 *S. epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *C. acnes*는 37°C에서 48시간 혐기 조건하에서 배양하여 colony가 형성되지 않는 최소 농도를 확인하였다.

5. 통계 처리

본 연구에서 진행한 모든 실험은 동일 조건 하에서 3회 반복 실시하였으며 모든 통계 분석은 Excel software (version 2019, Microsoft Corp., Washington, USA)를 사용하여 student's t-test를 실시하여 평가하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계적 검정 후 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미 있다고 판단하였다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1

Compound 1의 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, 총 10개의 carbon 피크를 확인하였으며 그중 δ_{C} 200.4 피크는 chemical shift 값을 통해 carbonyl기의 carbon으로 예상하였다. δ_{C} 143.1, 137.4의 피크를 통해 하나의 이중결합이 있을 것으로 예상하였고, δ_{C} 64.4 피크는 전기음성도가 큰 치환기가 붙은 carbon임을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.95 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), δ_{H} 1.02 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), δ_{H} 1.78 (3H, brs)의 피크는 적분 값을 통해 methyl group이 3개 있을 것이라 예상하였고, 그중 δ_{H} 0.95 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), δ_{H} 1.02 (3H, d, $J = 6.4$ Hz) 2개의 피크는 coupling constant 값을 통해 서로 coupling 하고 있음을 알 수 있었다. δ_{H} 2.42 (1H, dd, $J = 12.4, 16.5$ Hz) 및 δ_{H} 2.51 (1H, dd, $J = 4.1, 16.5$ Hz) 피크는 coupling constant 값을 통해 하나의 carbon에 화학적 환경이 서로 다른 2개의 proton으로 예상하였다. 이들을 종합하여 문헌²⁶과 비교한 결과 compound 1은 (4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone으로 확인하였다(Figure 9-11, Table 1).

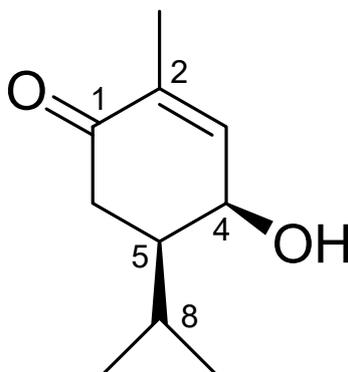


Figure 9. Chemical structure of compound 1

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

No.	Compound 1	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		200.4
2		137.4
3	6.75 (1H, dd, 1.4, 5.5)	143.1
4	4.40 (1H, dd, 3.2, 5.5)	64.4
5	1.62 (1H, m)	46.1
6	2.51 (1H, dd, 4.1, 16.5)	37.1
	2.42 (1H, dd, 12.4, 16.5)	
7	1.78 (3H, brs)	15.8
8	1.75 (1H, m)	28.7
9	0.95 (3H, d, 6.4)	20.6
10	1.02 (3H, d, 6.4)	20.5

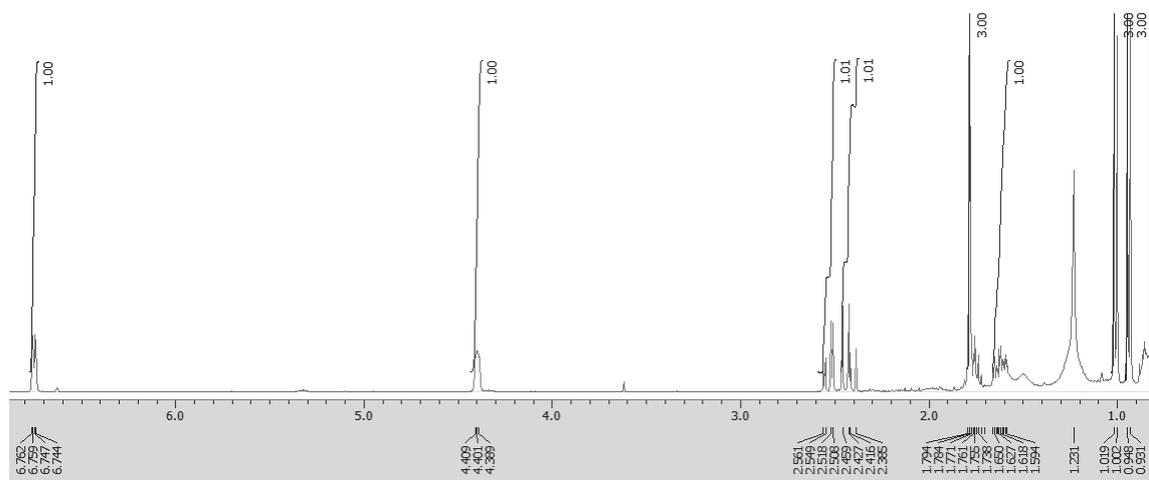


Figure 10. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

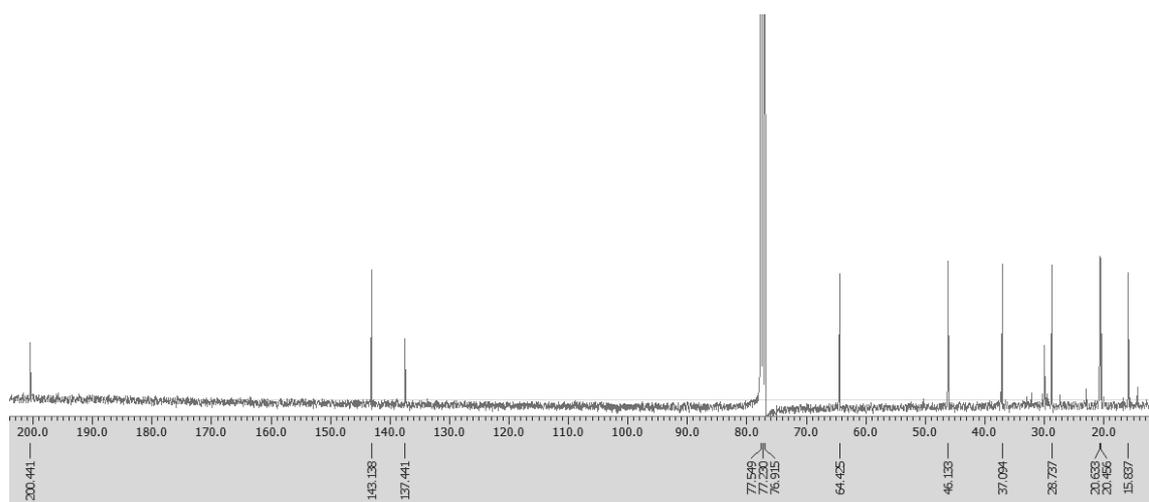


Figure 11. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

2) Compound 2

Compound 2는 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, 총 8개의 carbon 피크를 확인하였으며 그중 δ_{C} 55.7 및 δ_{C} 56.9의 피크와 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 3.85 (9H, overlapped) 피크의 적분 값 및 chemical shift 값이 deshielding 된 것으로 보아 methoxy group이 3개 있음을 예상하였다. δ_{H} 6.66 (2H, s)의 피크는 적분 값을 통해 aromatic ring의 대칭 구조 proton임을 예상하였고, δ_{H} 4.27 (1H, dd, $J = 6.9, 9.2$ Hz) 및 δ_{H} 3.88 (1H, dd, $J = 3.7, 9.2$ Hz)의 피크는 적분 값과 coupling constant 값을 통하여 δ_{C} 72.9 carbon에 화학적 환경이 서로 다른 2개의 proton으로 예상하였다. 이들 데이터를 종합하여 문헌²⁷과 비교한 결과, compound 2는 methoxy-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)ethanediol로 확인하였다(Figure 12-14, Table 2).

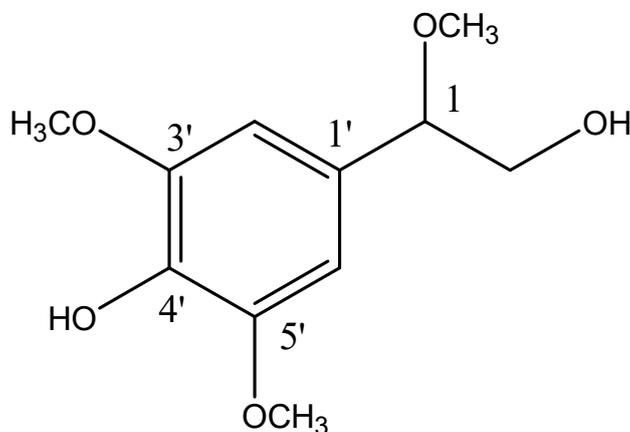


Figure 12. Chemical structure of compound 2

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

No.	Compound 2	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1	4.72 (1H, m)	87.8
2	4.27 (1H, dd, 6.9, 9.2)	72.9
	3.88 (1H, dd, 3.7, 9.2)	
		133.3
2', 6'	6.66 (2H, s)	104.6
3', 5'		149.5
4'		136.3
1-OCH ₃	3.85 (3H, overlapped)	55.7
3', 5'-OCH ₃	3.85 (6H, overlapped)	56.9

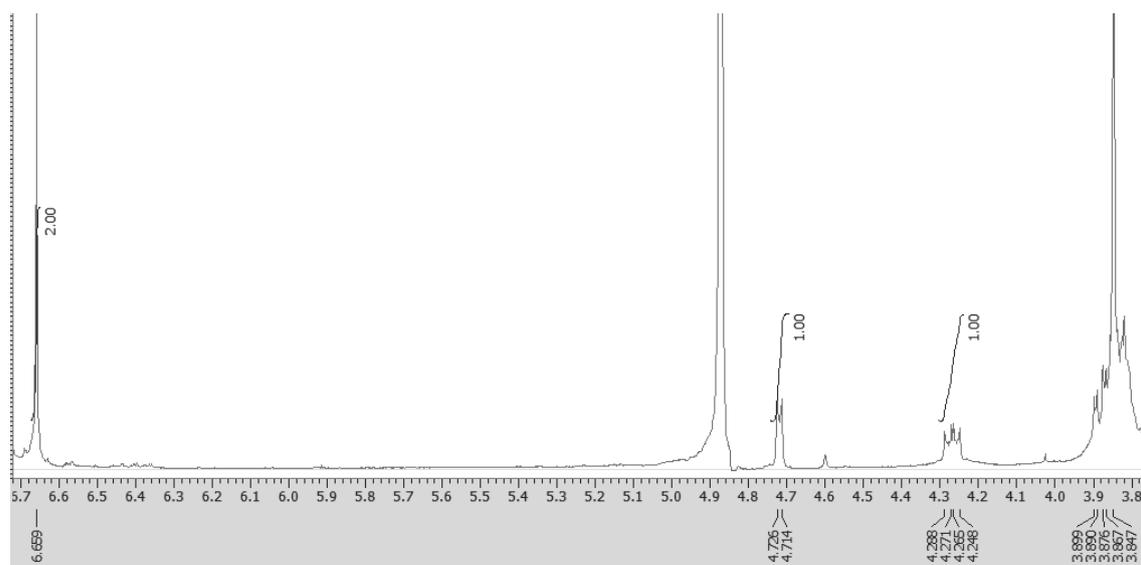


Figure 13. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD

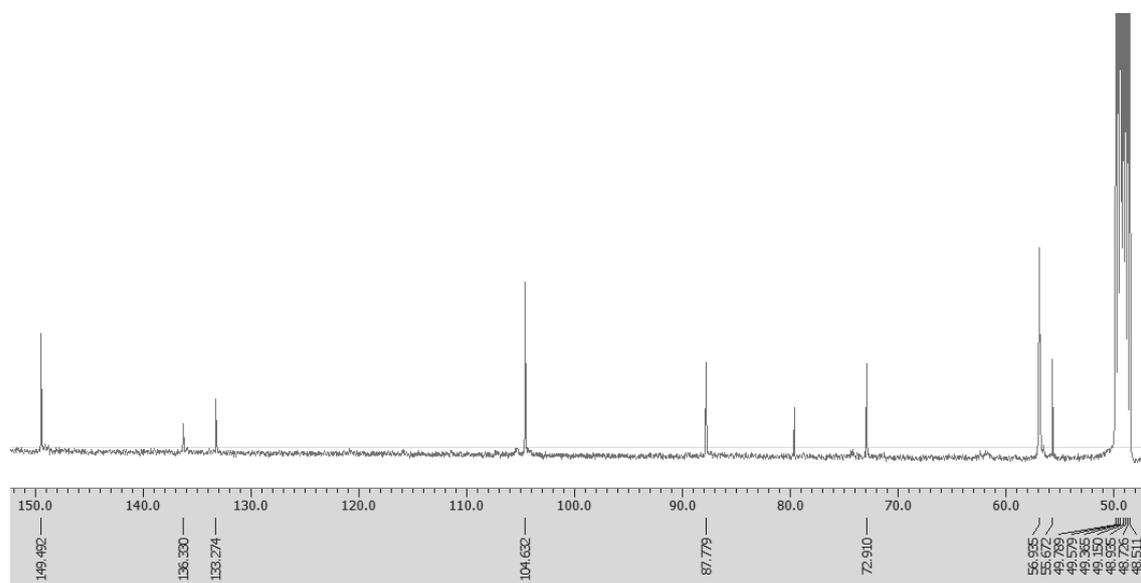


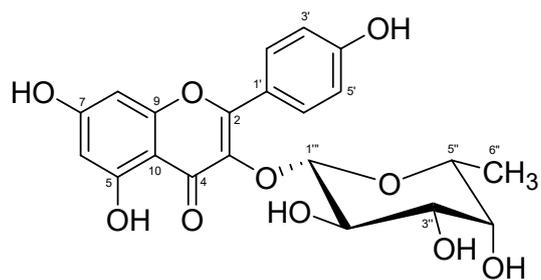
Figure 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD

3) Compounds 3-5

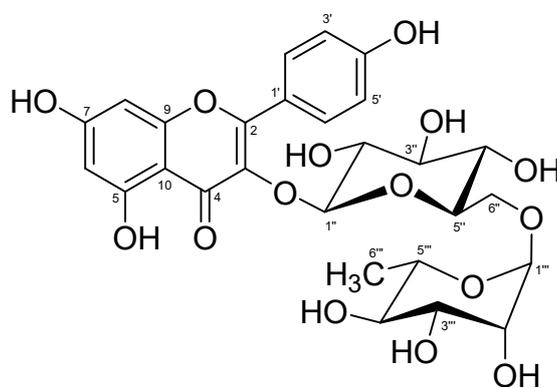
Compound 3은 ^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 2개의 carbon을 포함하여 총 19개의 carbon 피크가 관찰되었으며 δ_{H} 3.28-4.11 및 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 5.26 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)의 피크를 통해 B ring이 대칭인 flavonoid에 α -form의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. δ_{H} 0.81 (3H, d, $J = 5.5$ Hz) 피크의 적분 값을 통해 methyl group임을 예상하였고, flavonoid에 결합된 육탄당이 rhamnopyranoside일 것으로 예상하였다. δ_{H} 7.65 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), δ_{H} 6.82 (1H, d, $J = 8.7$ Hz)의 피크는 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic proton으로 예상하였으며 δ_{H} 6.06 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), δ_{H} 6.23 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)의 피크는 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic proton으로 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁸을 통하여 compound 3는 afzelin (kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside)으로 확인되었다(Figure 15-17, Table 3).

Compound 4는 ^{13}C NMR spectrum을 통해 compound 3과 유사한 구조에 육탄당이 한 개 더 결합되어 있을 것이라 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 4.40 (1H, d, $J = 1.4$ Hz) 및 δ_{H} 4.98 (1H, d, $J = 7.3$ Hz)에 해당하는 당의 anomeric proton의 coupling constant 값을 통해 두 개의 당이 α -form 및 β -form임을 예상하였고, 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁹을 통하여 compound 4는 nicotiflorine (kaempferol-3-*O*-rutinoside)으로 확인되었다(Figure 15, 18-19, Table 3).

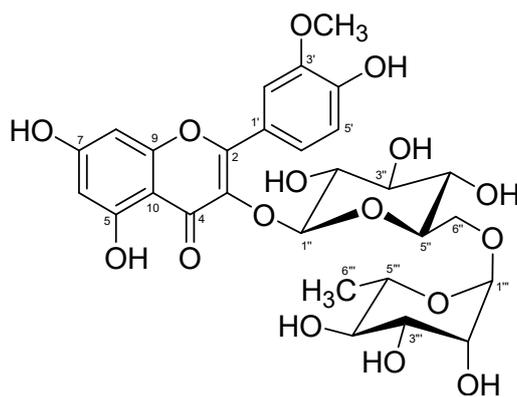
Compound 5는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 3.84 (3H, s) 및 ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 56.9의 피크를 통해 compound 4에 methoxy group이 한 개 치환되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.84 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), δ_{H} 7.52 (1H, dd, $J = 1.8, 8.7$ Hz) 및 δ_{H} 6.80 (1H, d, $J = 8.7$ Hz)의 피크는 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하고 있는 flavonoid B ring의 aromatic proton으로 예상하였고 이를 통해 methoxy group이 3' 위치에 치환되어 있음을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌³⁰을 통하여 compound 5는 narcissin (isorhamnetic-3-*O*-rutinoside)으로 확인되었다(Figure 15, 20-21, Table 3).



Compound 3



Compound 4



Compound 5

Figure 15. Chemical structures of compounds 3-5

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **3-5** (400 and 100 MHz, CD_3OD)

No.	Compound 3		Compound 4		Compound 5	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		158.8		158.8		158.8
3		136.2		135.6		135.5
4		179.6		179.3		179.3
5		163.3		163.1		163.1
6	6.06 (1H, d, 2.3)	100.5	6.06 (1H, d, 2.3)	100.6	6.27 (1H, d, 1.8)	100.6
7		167.6		167.8		166.9
8	6.23 (1H, d, 2.3)	95.3	6.25 (1H, d, 2.3)	95.4	6.07 (1H, d, 1.8)	95.4
9		159.2		159.3		158.8
10		105.6		105.3		105.4
1'		122.8		122.9		123.1
2'	7.65 (1H, d, 8.7)	132.0	7.94 (1H, d, 9.2)	132.5	7.84 (1H, d, 1.8)	114.6
3'	6.82 (1H, d, 8.7)	116.7	6.77 (1H, d, 9.2)	116.3		151.1
4'		161.8		161.7		148.5
5'	6.82 (1H, d, 8.7)	116.7	6.77 (1H, d, 9.2)	116.3	6.80 (1H, d, 8.7)	116.3
6'	7.65 (1H, d, 8.7)	132.0	7.94 (1H, d, 9.2)	132.5	7.52 (1H, dd, 1.8, 8.7)	124.1
1''	5.26 (1H, d, 1.8)	103.6	4.98 (1H, d, 7.3)	104.9	5.10 (1H, d, 7.8)	104.7
2''	4.11 (1H, dd, 1.4, 3.2)	72.1		75.9		76.1
3''	3.60 (1H, dd, 3.2, 8.9)	72.3	3.22-3.83 (6H, sugar H)	77.3	3.20-3.80 (6H, sugar H)	78.3
4''	3.28-3.48 (2H, m)	72.2		71.6		72.2
5''		73.3		78.3		77.5
6''	0.81 (3H, d, 5.5)	17.8		68.7		68.7
1'''			4.40 (1H, d, 1.4)	102.6	4.42 (1H, d, 1.4)	102.7
2'''				72.2		71.7
3'''			3.83-3.22 (4H, sugar H)	72.4	3.80-3.20 (4H, sugar H)	72.4
4'''				74.0		74.0
5'''				69.9		69.9
6'''			1.01 (3H, d, 6.0)	18.1	1.00 (3H, d, 6.4)	18.0
3'-OCH ₃					3.84 (3H, s)	56.9

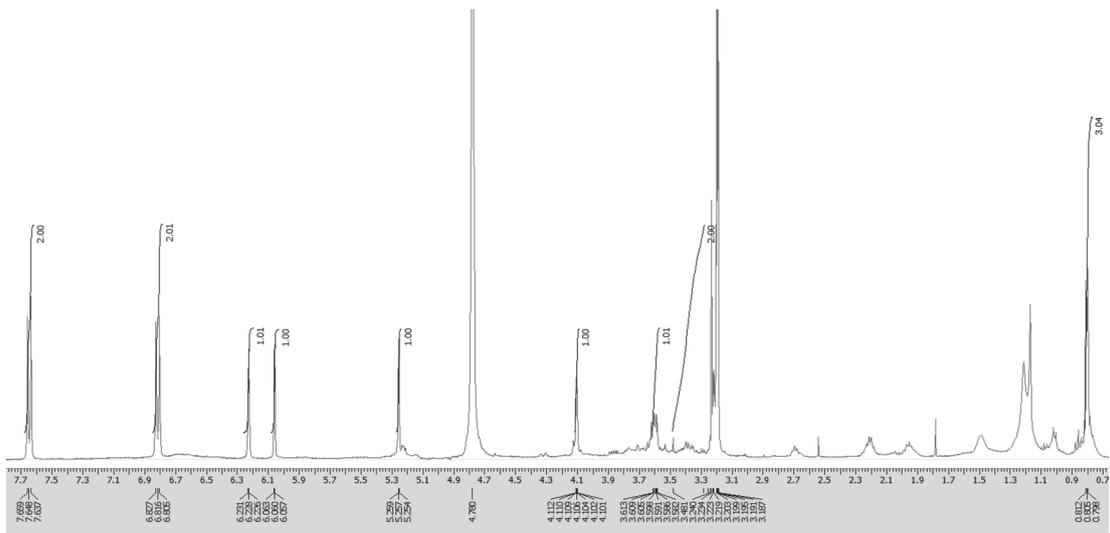


Figure 16. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

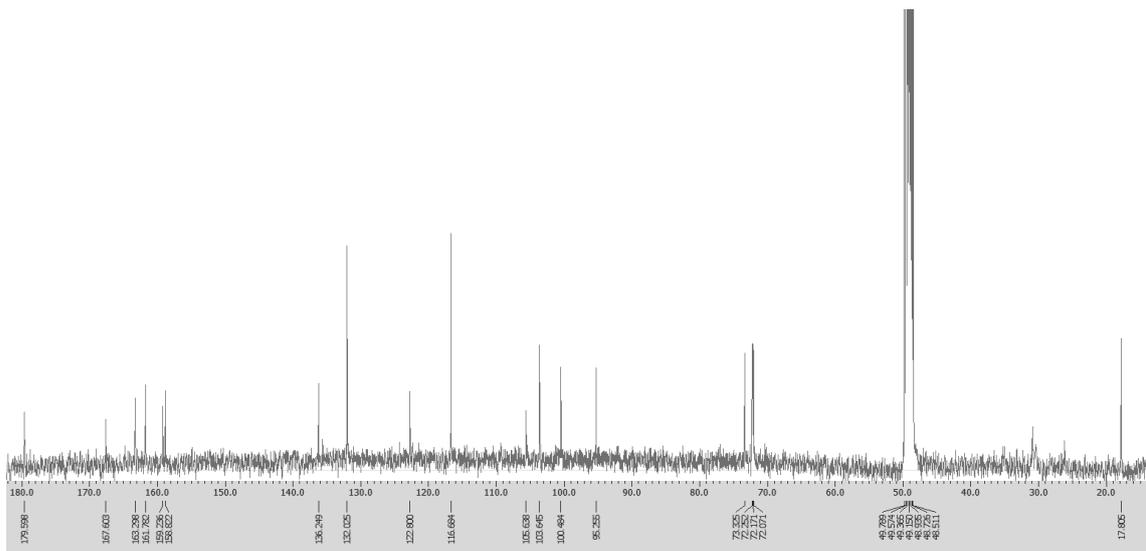


Figure 17. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

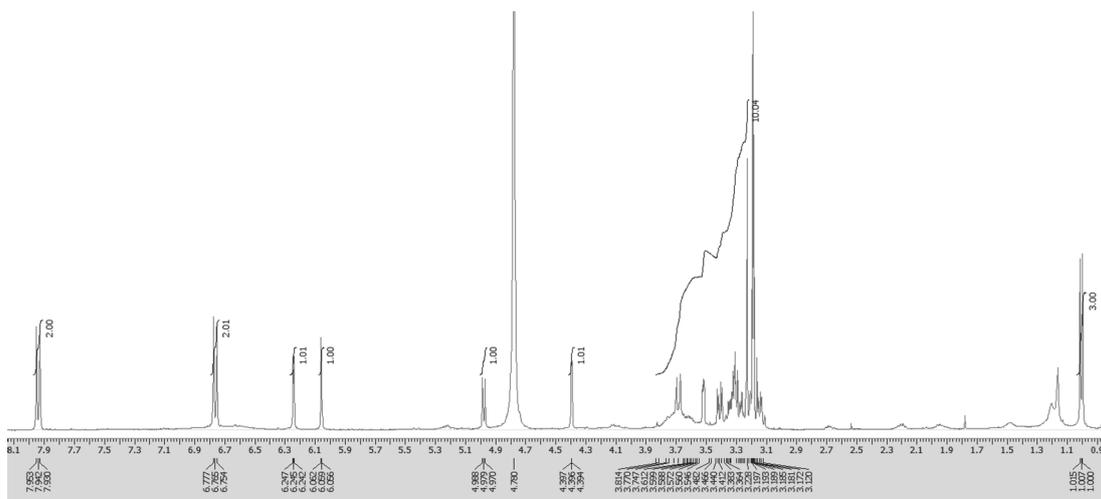


Figure 18. ^1H -NMR spectrum of compound **4** in CD_3OD

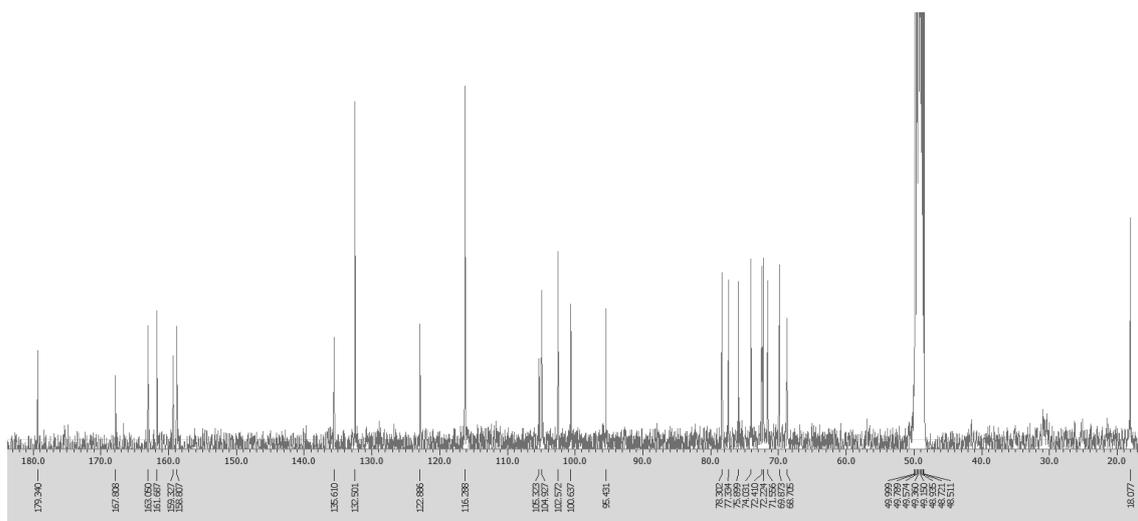


Figure 19. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** in CD_3OD

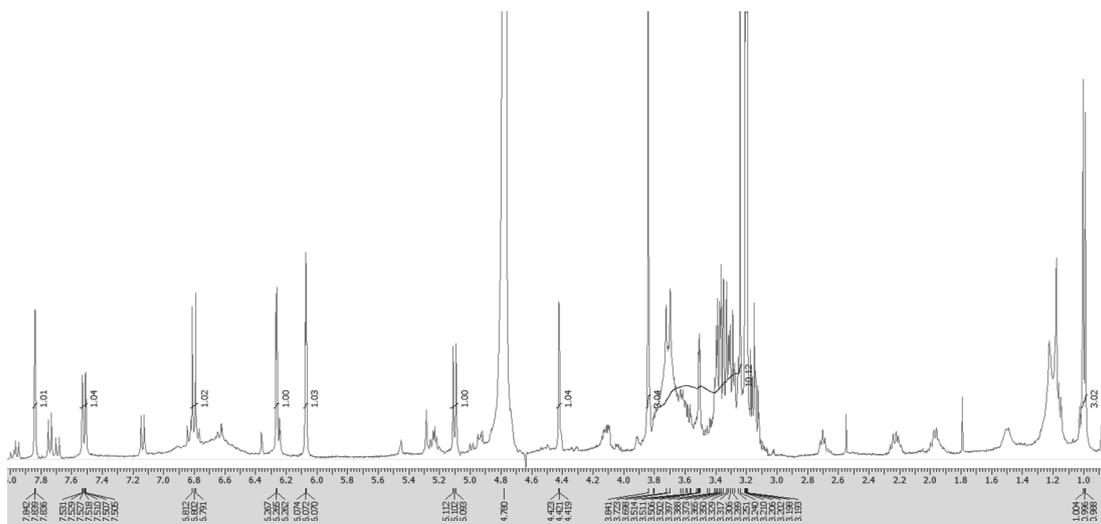


Figure 20. ^1H -NMR spectrum of compound **5** in CD_3OD

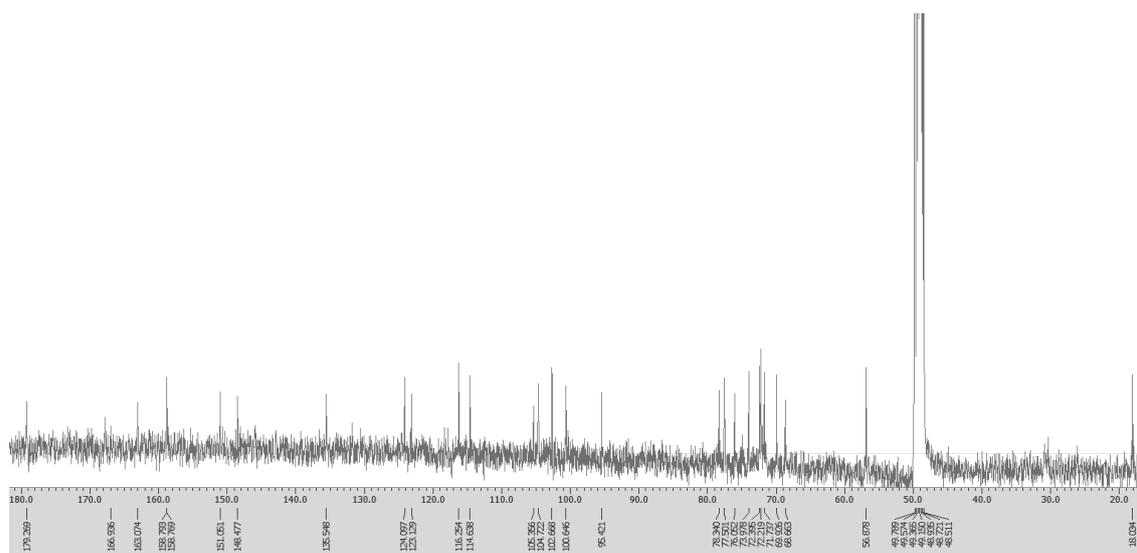


Figure 21. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5** in CD_3OD

2. 생달나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항산화

(1) 총 폴리페놀 함량

Gallic acid를 표준물질로 사용하여 표준 검정 곡선을 작성하고 생달나무 잎 추출물 및 분획물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량은 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었으며 실험 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 폴리페놀(61.7 mg/g GAE) 함량을 나타내었다(Figure 22).

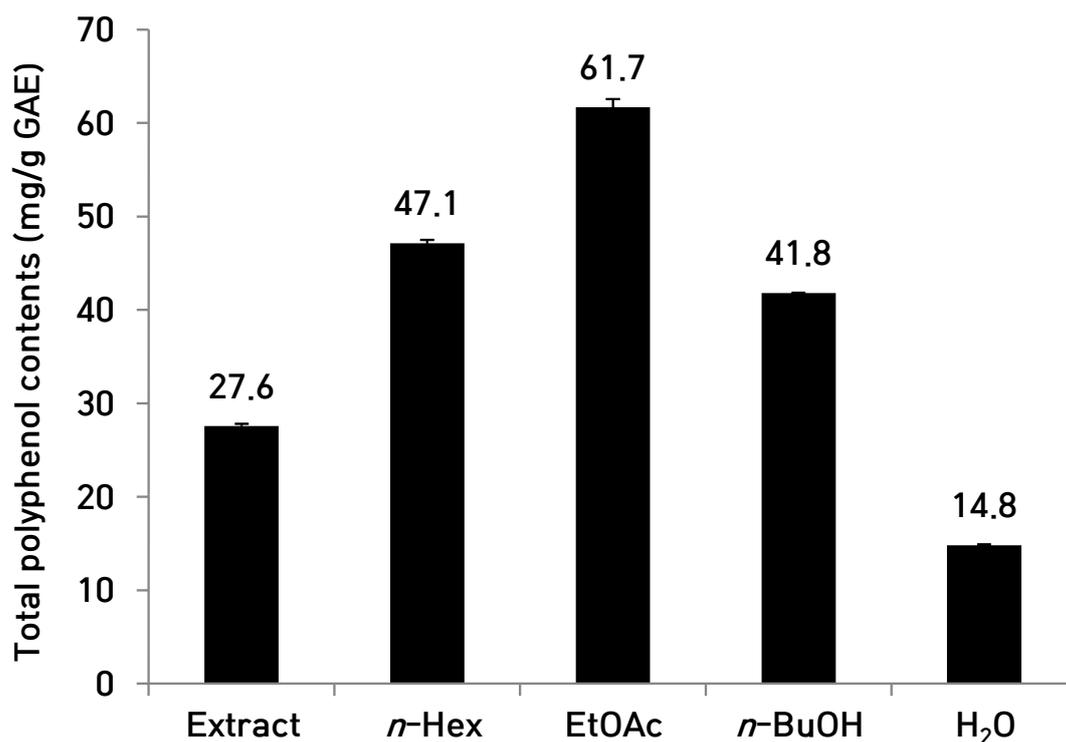


Figure 22. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin의 표준 검정 곡선을 이용하여 생달 나무 잎 추출물 및 분획물 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 플라보노이드(51.0 mg/g QE) 함량을 나타내었다(Figure 23).

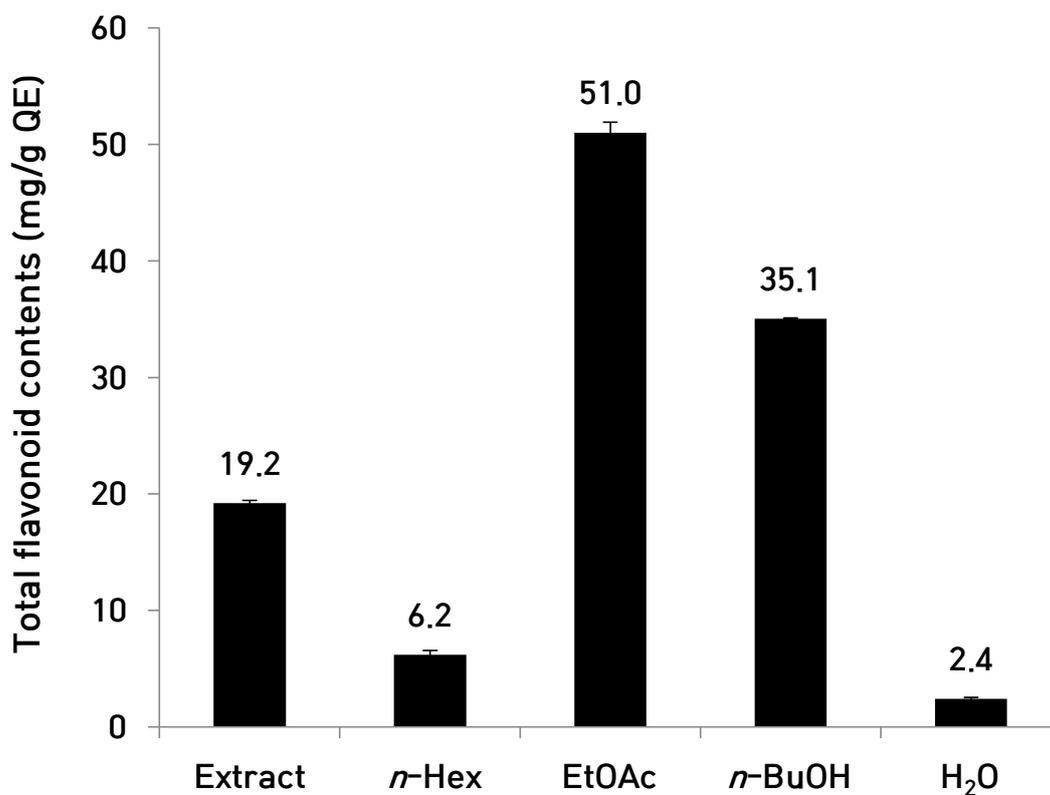


Figure 23. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

생달나무 잎 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료의 농도는 25-400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC_{50} 값을 계산하였다. 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC_{50} 값이 각각 112.1, 219.0 $\mu\text{g/mL}$ 로, 대조군인 BHT (SC_{50} : 267.2 $\mu\text{g/mL}$)보다 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 24, Table 4).

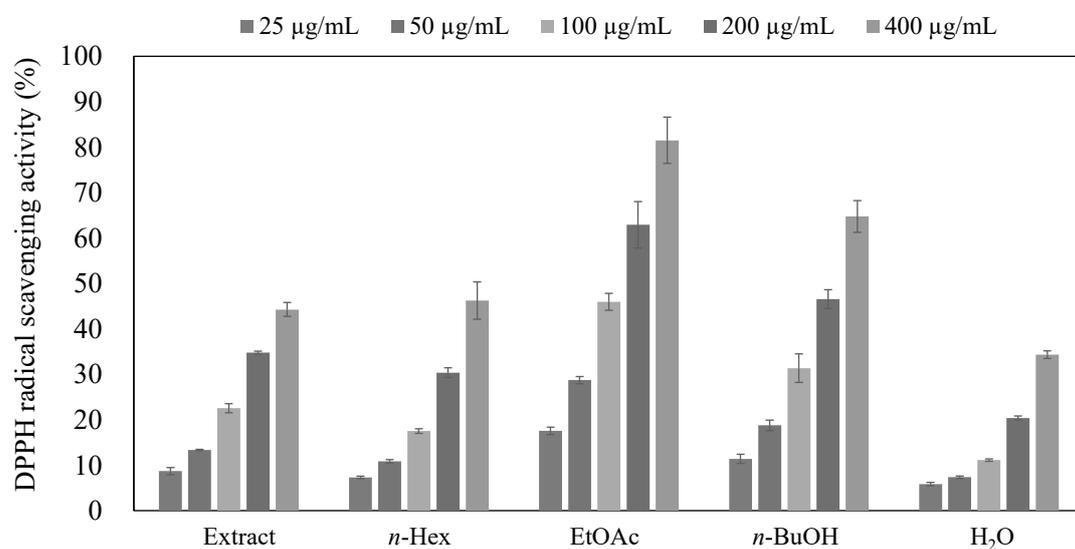


Figure 24. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 4. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	>400	>400	112.1	219.0	>400	267.2

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

생달나무 잎 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 시료의 농도는 25-400 µg/mL의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, EtOAc 분획물의 SC₅₀ 값이 26.0 µg/mL로 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 25, Tabel 5).

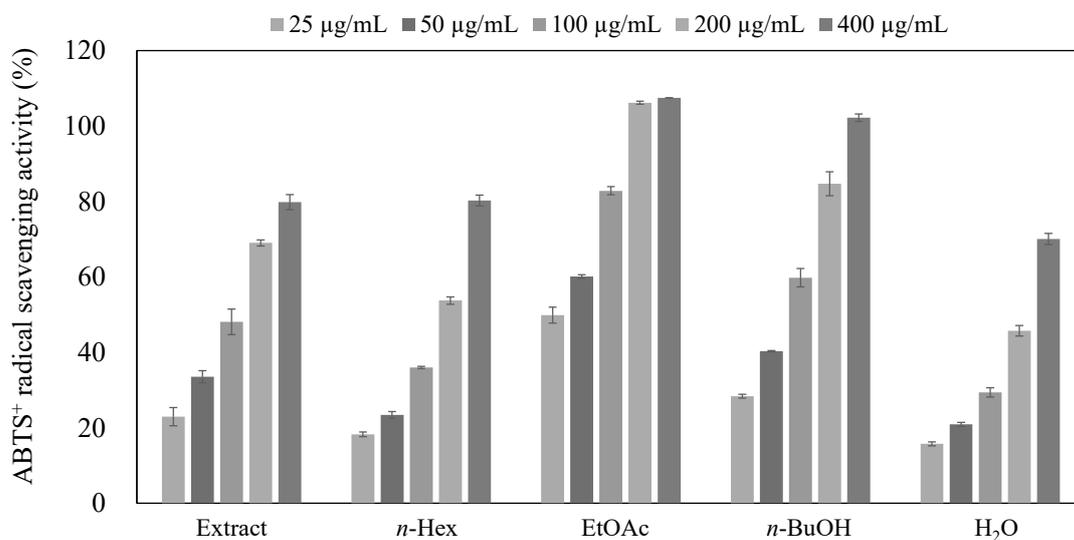


Figure 25. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 5. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves.

	Extract	n-Hex	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	115.7	178.5	26.0	75.6	248.4	8.4

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

생달나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 nitric oxide 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 70% EtOH 추출물 및 각 용매 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행한 결과, 70% EtOH 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 nitric oxide 생성 억제 활성을 보였으며 그중 EtOAc 분획물에서는 세포 독성이 나타났다(Figure 25). 이에 따라 EtOAc 분획물의 농도를 20, 40, 60, 80 µg/mL로 하여 추가 실험을 진행한 결과, 생달나무 잎 EtOAc 분획물은 80 µg/mL 이하의 농도에서 세포 독성 없이 nitric oxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, IC₅₀ 값은 28.2 µg/mL으로 확인되었다(Figure 26, 27).

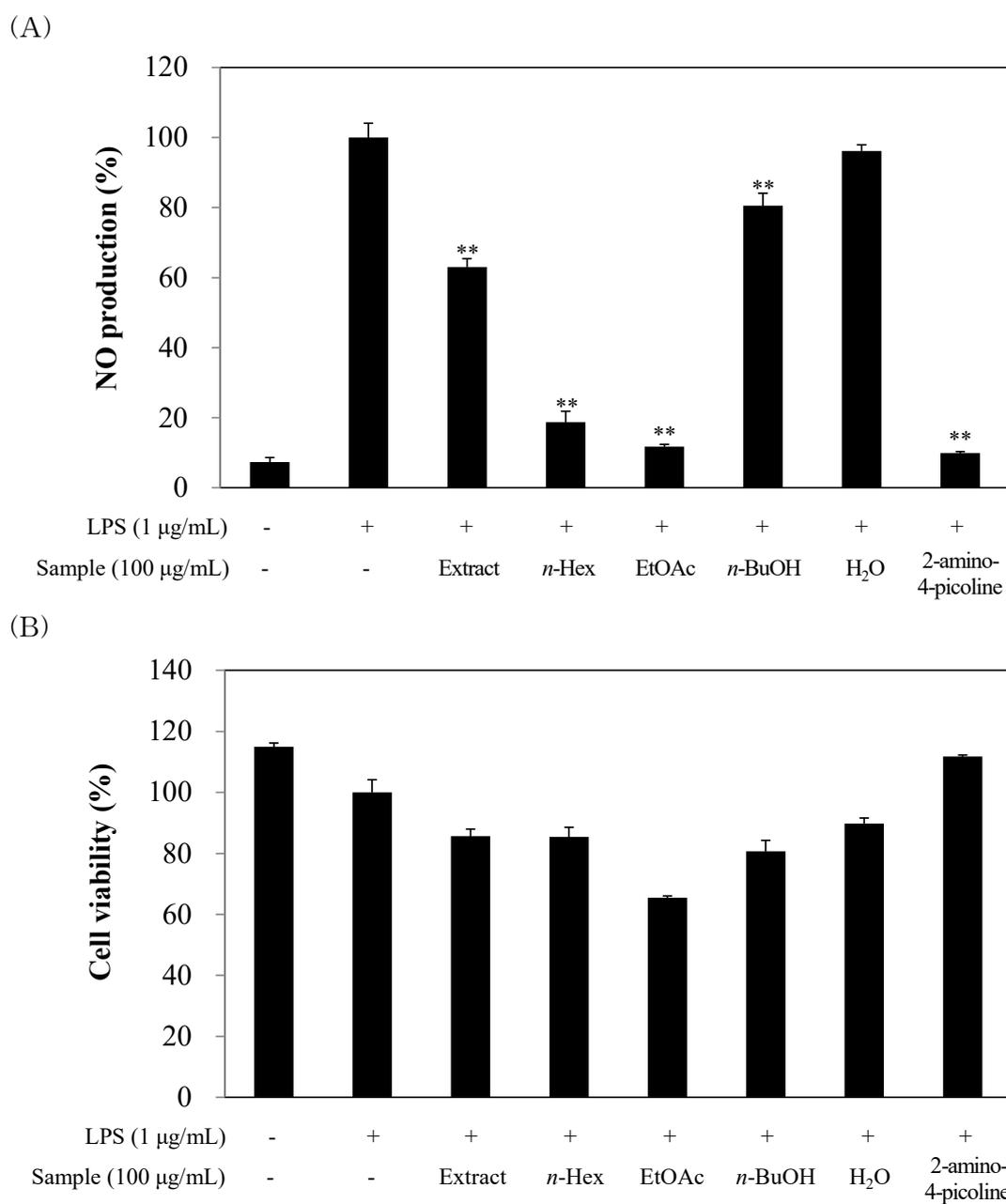
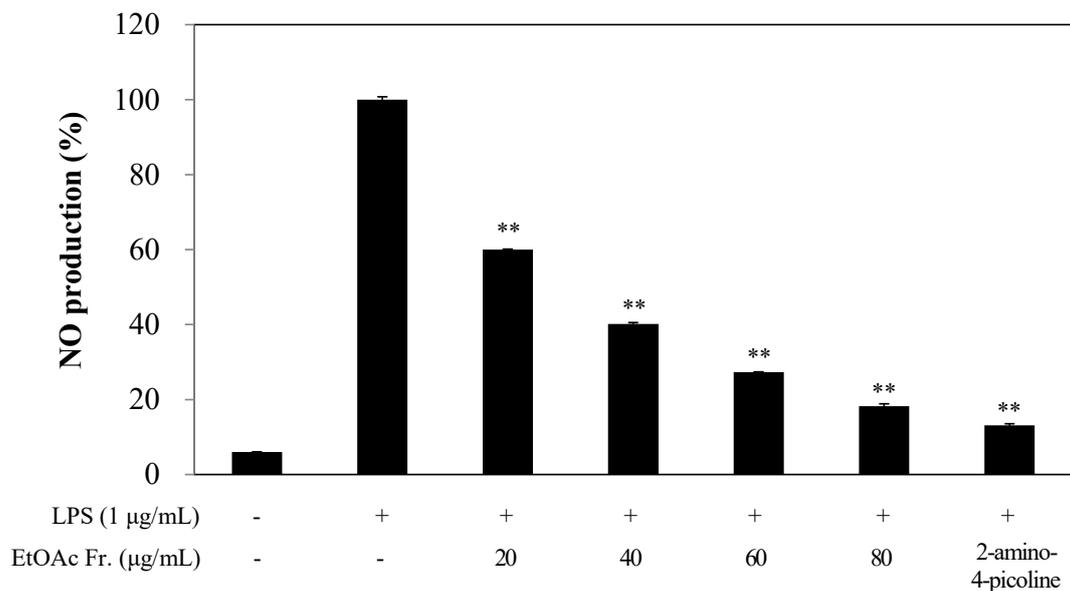


Figure 26. Effects of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves on NO production (A) and cell viability (B) in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(A)



(B)

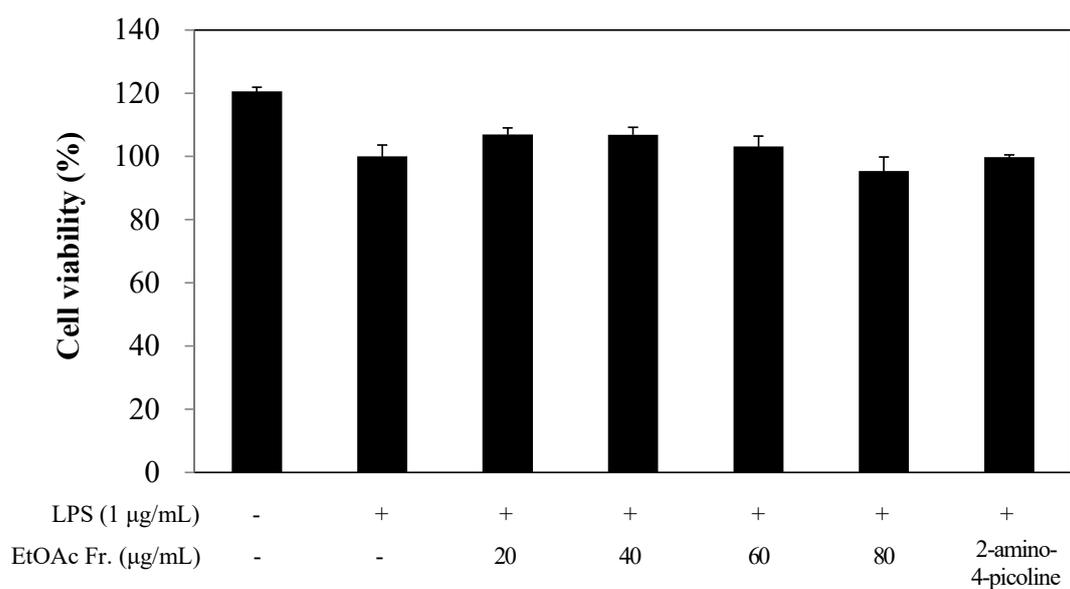


Figure 27. Effect of EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves on NO production (A) and cell viability (B) in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) Western blot analysis

Nitric oxide (NO)는 inducible NOS (iNOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며 이들의 생성에 관여하는 효소를 조절하는 것은 항염증 반응에 관여할 수 있음을 시사한다. 앞선 실험에서 효과적인 NO 생성 억제 효과를 보인 EtOAc 분획물이 iNOS 단백질 발현 조절에 영향을 주는지 확인하기 위해 western blot analysis를 실시하였다. Sample은 세포 독성이 나타나지 않은 농도 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 이용하여 실험을 진행하였고 실험 결과, EtOAc 분획물이 iNOS 단백질 효소의 발현을 농도의존적으로 억제한다는 것을 확인하였다(Figure 28).

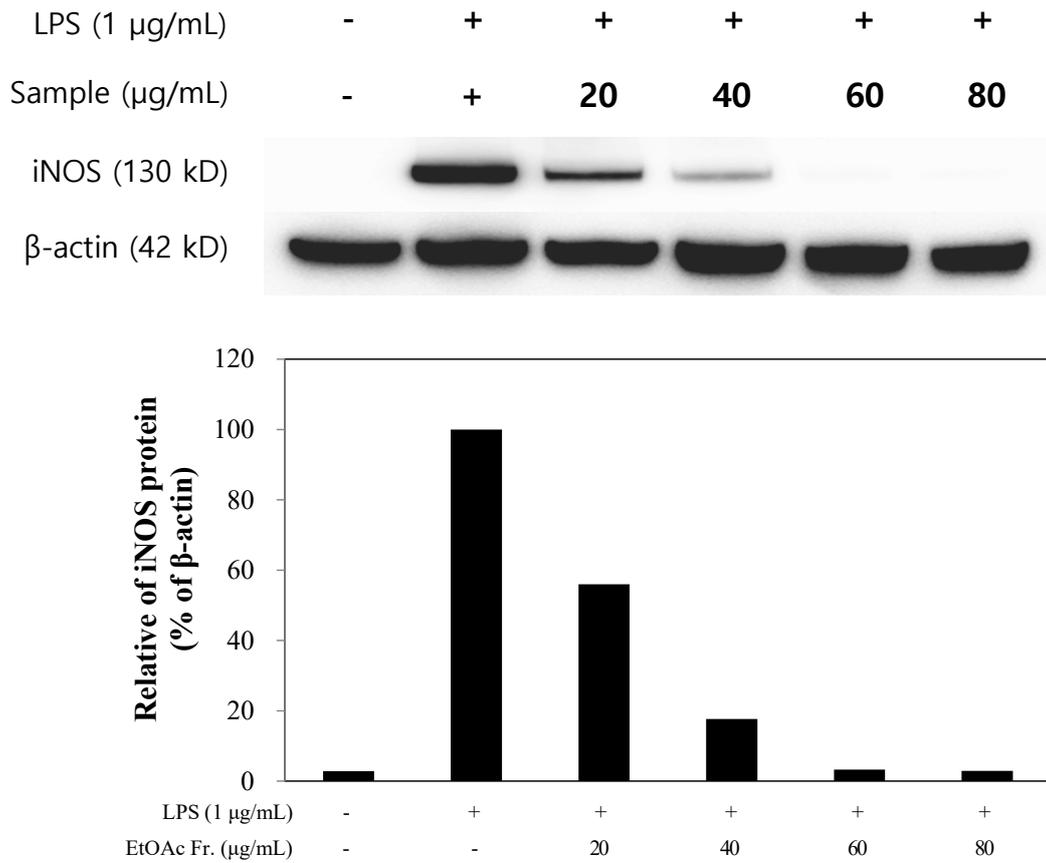
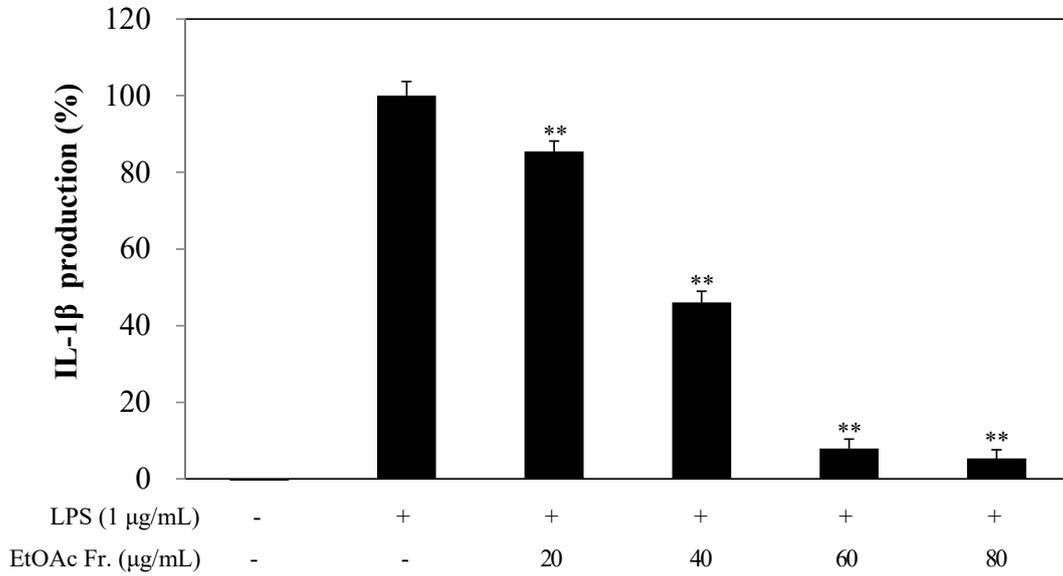


Figure 28. Effect of EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves on levels of iNOS protein expression in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The iNOS protein levels in each sample was normalized to the quantity of β -actin.

(3) 전염증성 cytokines (IL-1 β , TNF- α) 생성 억제 활성화

생달나무 잎 EtOAc 분획물의 추가적인 항염 활성화 기전을 연구하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 전염증성 cytokines (IL-1 β , TNF- α) 억제 활성을 측정하였다. 세포 독성이 나타나지 않은 농도 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 이용하여 실험을 진행한 결과, 생달나무 잎 EtOAc 분획물이 IL-1 β 및 TNF- α 의 생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 29).

(A)



(B)

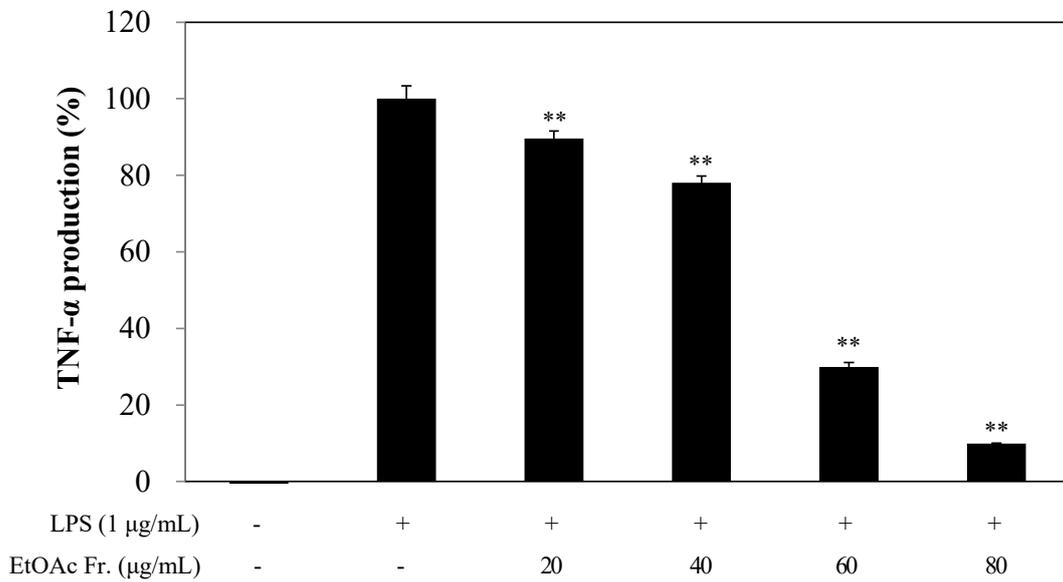


Figure 29. Effects of EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves on IL-1 β (A) and TNF- α (B) production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are

represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

3) 평균

(1) Paper disc diffusion method

생달나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* 3종 (CCARM 3709, 3710, 3711)과 여드름균인 *Cutibacterium acnes* 4종 (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)을 실험에 사용하였고 positive control은 erythromycin을 사용하였다. 실험 결과, *n*-Hex 분획물이 모든 균주에 대한 생육저지환을 생성하는 것을 확인하였으며, 70% EtOH 추출물과 EtOAc 분획물은 *C. acnes* (CCARM 9009)을 제외한 모든 균주에 대해 생육억제 활성을 나타내었다(Table 6).

Table 6. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves.

	Clear zone (mm)							
	<i>S. epidermidis</i>			<i>C. acnes</i>				
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089	
Extract	10	9.5	10	9.5	N.A.	9.5	9	
<i>n</i> -Hex	12	10	9.5	9	8.5	9	8.5	
EtOAc	15	11	12	20	N.A.	9.5	9	
<i>n</i> -BuOH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
H ₂ O	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
positive control	34	N.A.	30	54	N.A.	N.A.	57	

Sample : 6 mg

Positive control : Erythromycin(+) (60 μ g)

Disc size : 8 mm \times 1.5 mm

N.A. : No Activity

(2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통해 항균 활성을 확인한 추출물 및 용매 분획물에 대해 추가적으로 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 시료 10 mg/mL를 two-fold-dilution법으로 농도를 두 배씩 희석하면서 실시하였다.

실험 결과, *S. epidermidis* 경우 70% EtOH 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고, 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 이용해 MBC를 확인하였다. 그 결과 70% EtOH 추출물 및 EtOAc 분획물에서 *S. epidermidis* 3종에 대한 MBC 값을 모두 확인할 수 있었으며, *n*-Hex 분획물의 경우 CCARM 3709를 제외한 균주에서 MBC 값을 확인할 수 있었다 (Table 7).

*C. acnes*의 경우 70% EtOH 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고 그 이상의 농도의 균을 이용하여 MBC를 확인한 결과, 70% EtOH 추출물의 경우 CCARM 9010에 대한 MBC 값을 확인할 수 있었다. *n*-Hex 분획물은 CCARM 9009를 제외한 모든 균주에서 MBC 값을 확인하였으며, EtOAc 분획물은 CCARM 0081, 9010에 대한 MBC 값을 확인할 수 있었다 (Table 8).

Table 7. MIC and MBC values of *C. yabunikkei* leaves on *S. epidermidis*.

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

Unit : µg/mL

Table 8. MIC and MBC values of *C. yabunikkei* leaves on *C. acnes*.

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

Unit : µg/mL

3. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

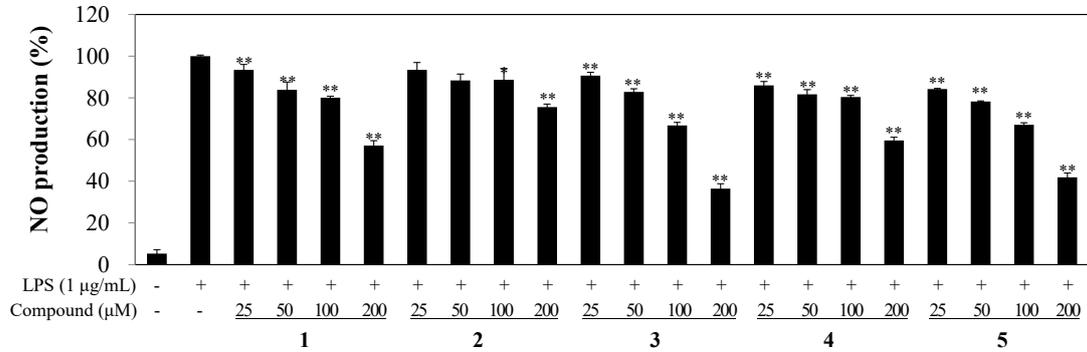
1) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

RAW264.7 cell을 이용하여 생달나무 잎에서 분리된 화합물들에 대한 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 각 화합물들을 25, 50, 100, 200 μM 의 농도로 실험을 진행한 결과, compound **1**, **3**, **4**, **5**가 세포 독성 없이 NO 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였고, 이 중 compound **3**, **4**, **5**는 문헌을 통해 항염 활성 기전이 보고되어 있음을 확인하여 추가적인 기전 연구는 진행하지 않았다(Figure 30).³¹⁻³³

항염 기전이 알려지지 않은 compound **1**에 대하여 50, 100, 200, 400 μM 농도로 추가적인 실험을 진행한 결과, compound **1**은 400 μM 농도 이하에서 세포 독성 없이 NO 생성을 효과적으로 저해시켰으며, IC_{50} 값은 137.0 μM 로 확인되었다(Figure 31).

(A)



(B)

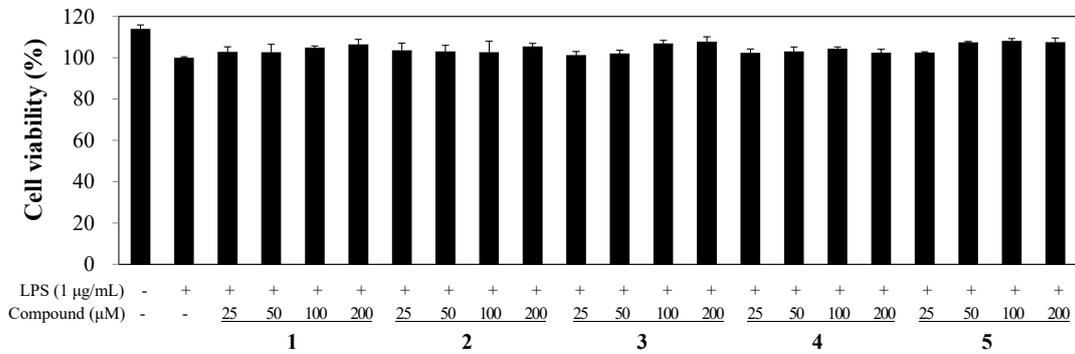
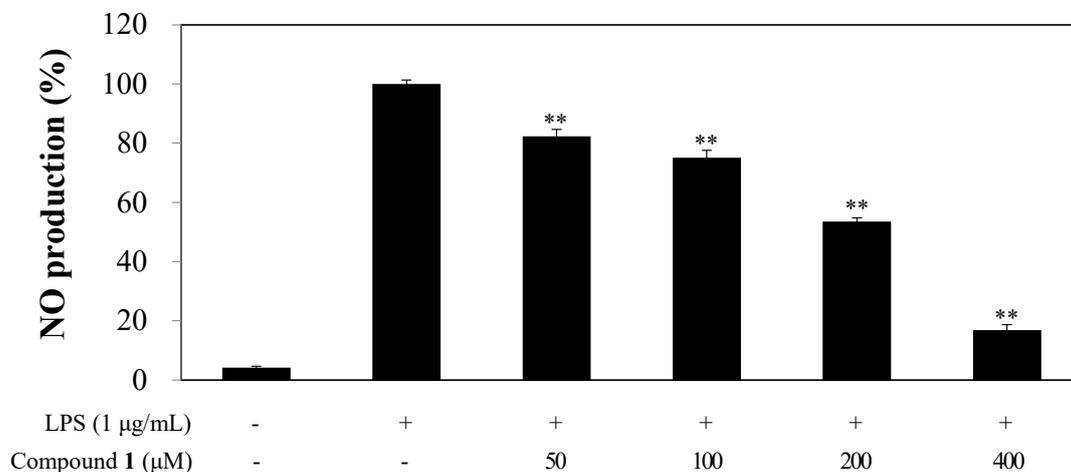


Figure 30. Effects of isolated compounds 1-5 from *C. yabunikkei* leaves on NO production (A) and cell viability (B) in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1-5 from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(A)



(B)

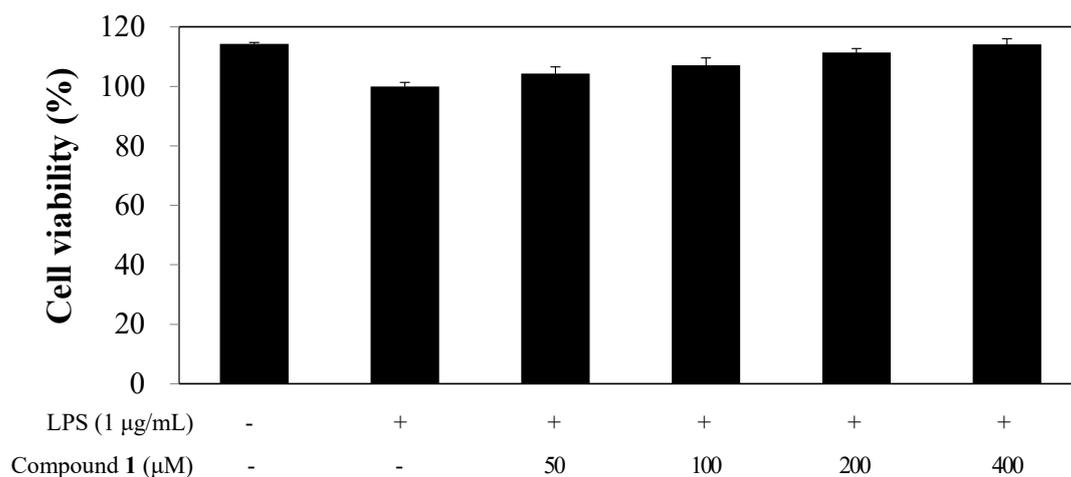


Figure 31. Effect of isolated compound **1** from *C. yabunikkei* leaves on NO production (A) and cell viability (B) in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound **1** from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The data are represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) Western blot analysis

생달나무 잎으로부터 분리된 화합물들 중 항염 활성 기전 연구가 되어 있지 않은 compound 1에 대하여 RAW264.7 cell을 이용하여 western blot analysis를 실시하였다. 실험 결과, compound 1은 농도 100 μM 이상에서 iNOS 단백질 효소의 발현을 농도 의존적으로 저해한다는 것을 확인하였다(Figure 32).

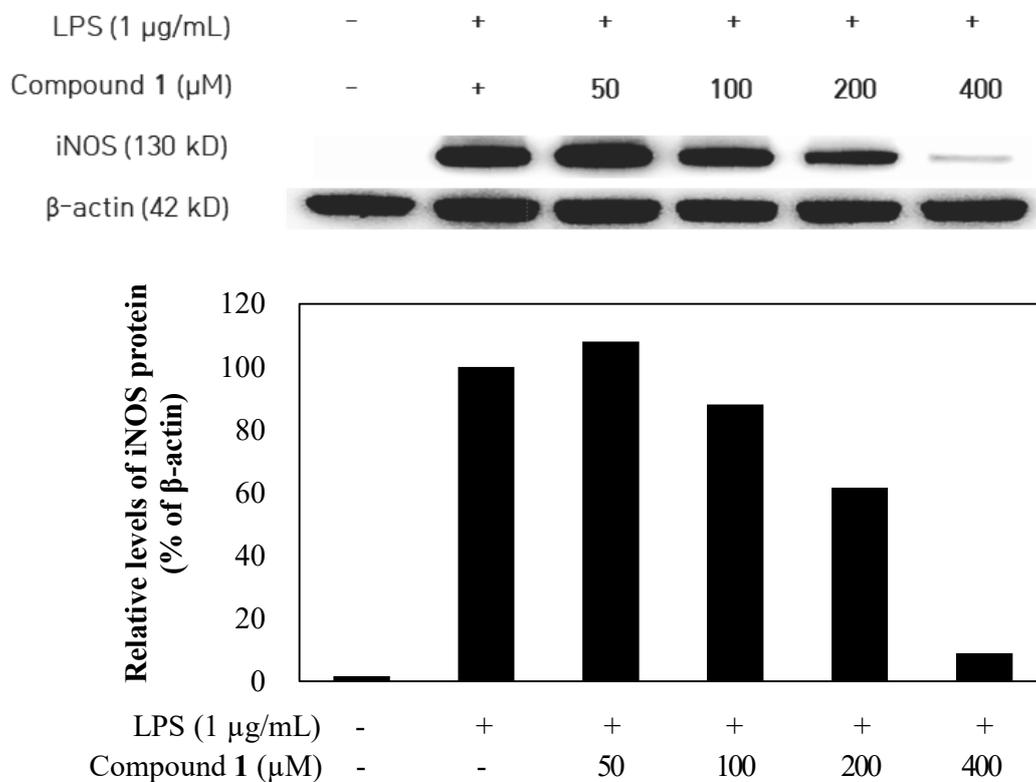
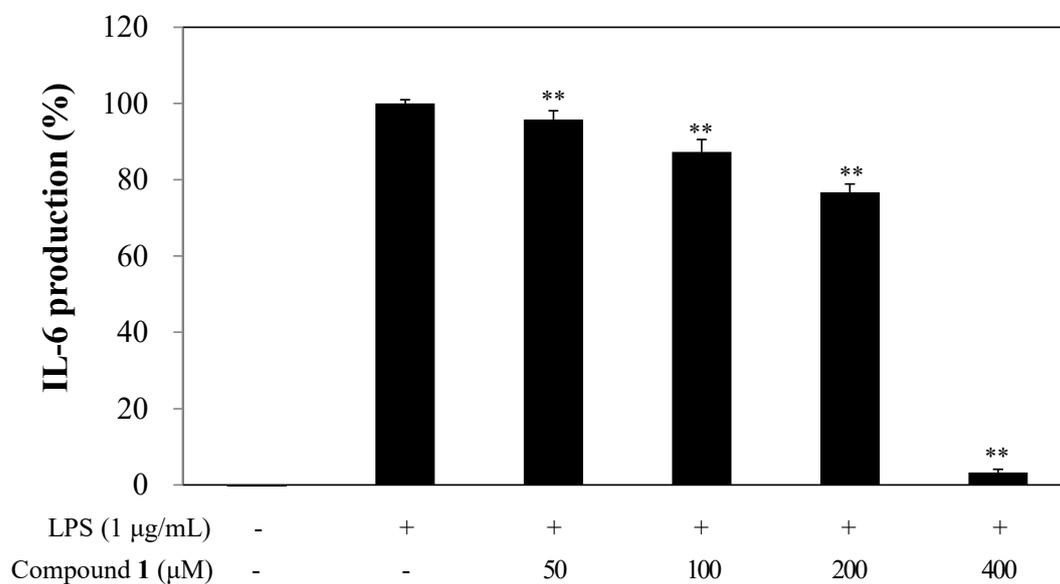


Figure 32. Effect of isolated compound 1 from *C. yabunikkei* leaves on levels of iNOS protein expression in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS only, or with LPS plus compound 1 from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The iNOS protein levels in each sample was normalized to the quantity of β -actin.

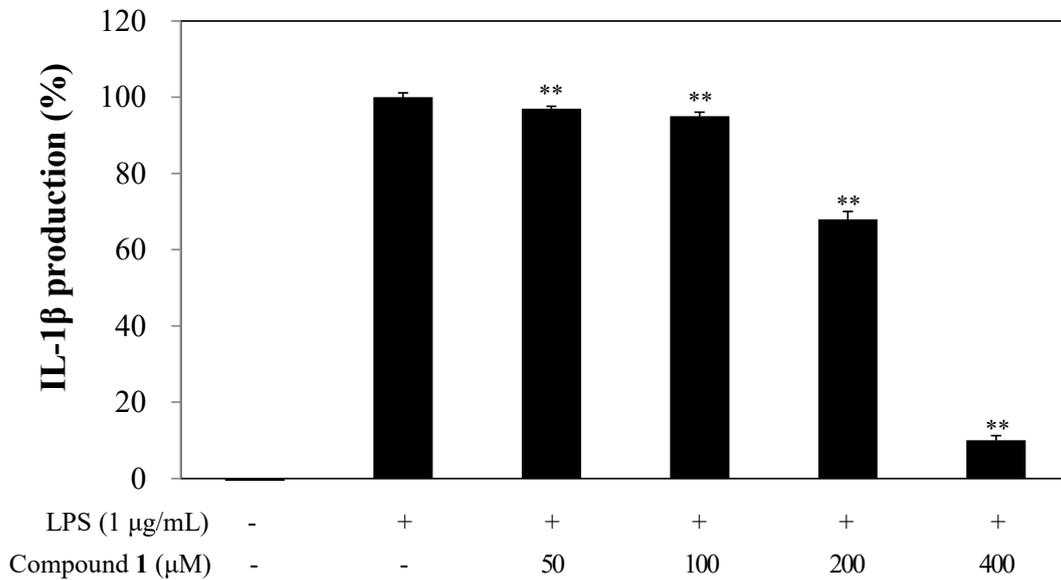
(3) 전염증성 cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 생성 억제 활성

NO 생성 억제 및 iNOS 단백질의 발현을 효과적으로 저해시킨 compound 1에 대하여 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 전염증성 cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 생성 억제 활성을 확인하였다. 실험 결과, compound 1은 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 생성을 효과적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 33).

(A)



(B)



(C)

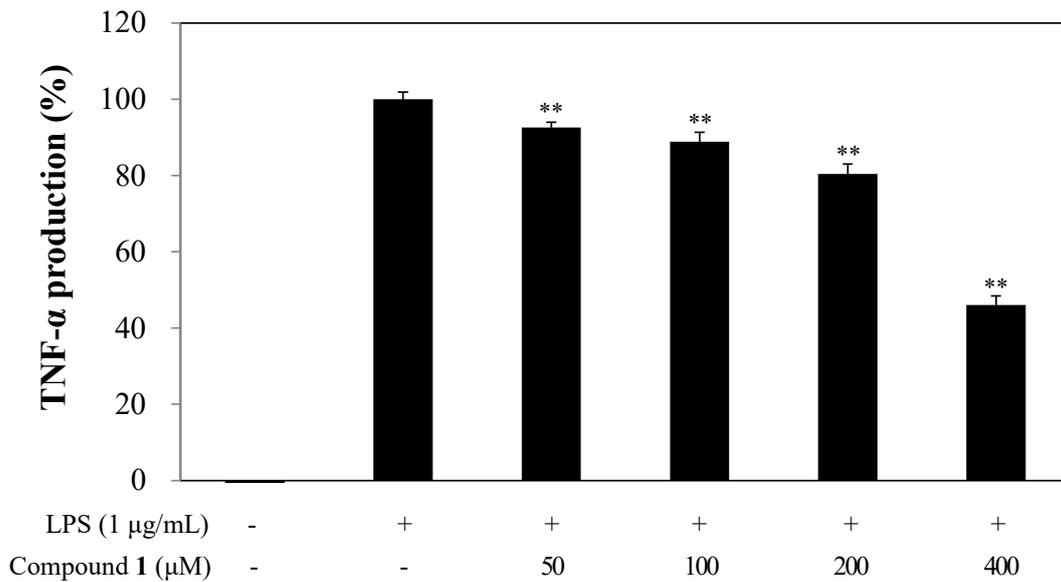


Figure 33. Effects of isolated compound 1 from *C. yabunikkei* leaves on IL-6 (A), IL-1 β (B) and TNF- α (C) production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

IV. 요약 및 결론

본 연구는 생달나무 잎의 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대하여 다양한 생리 활성을 확인하고 단일 물질 분리 및 구조 동정을 통한 성분 연구를 진행하여 의약품, 건강기능식품 및 화장품 관련 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

생달나무 잎 70% EtOH 추출물을 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 및 water fraction을 얻었다. 이들 중 EtOAc fraction에 대하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC), vacuum liquid chromatography (VLC) 및 Sephadex LH-20 column chromatography (CC)를 수행하여 단일 물질을 분리하고 ^1H , ^{13}C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 동정하였다. 분리한 화합물들은 (4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone (**1**), methoxy-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)ethanediol (**2**), afzelin (**3**), nicotiflorine (**4**), narcissin (**5**)으로 확인되었으며 이들은 모두 생달나무 잎에서 처음으로 분리된 화합물이다.

생달나무 잎의 항산화 실험 결과, EtOAc 분획물에서 총 폴리페놀 함량(61.7 mg/g GAE)과 총 플라보노이드 함량(51.0 mg/g QE)이 가장 높게 나타났으며, DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험에서 EtOAc 분획물은 대조군인 BHT 보다 우수하거나 유사한 radical 소거 활성을 나타내었다. 분리된 화합물에 대한 항산화 효능 실험 결과, compound **1**, **2**는 항산화 효능이 나타나지 않았고 compound **3**, **4**, **5**는 문헌을 통해 항산화 효능이 있음을 확인하였다.³⁴⁻³⁶

항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었고, iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. 또한 전염증성 cytokines 생성 억제 활성 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물은 IL-1 β 및 TNF- α 의 생성을 효과적으로 억제하였다. 분리된 화합물 대한 항염 활성 실험에서는 compound **1**, **3**, **4**, **5**가 세포독성 없이 NO 생성을 효과적으로 억제시켰으며, 이 중 항염 기전이 알려지지 않은 compound **1**에 대하여 추가적인 항염

기전 연구를 진행하였다. 그 결과 compound 1은 농도 100 μ M 이상의 농도에서 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 저해시켰으며, 전염증성 cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 생성을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

항균 활성 실험을 측정하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 한천 확산 법 (paper disc diffusion method)을 통한 생육저지환 (clear zone), 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험 결과, EtOAc 분획물은 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *C. acnes* (CCARM 0081, 9010)에 대한 항균 활성이 우수함을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 생달나무 잎은 항산화, 항염 및 항균 효과를 갖는 의약품, 건강기능식품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로서 개발 가능할 것이라 사료된다.

V. 참고문헌

1. 이남호; 양인정; 김상숙; 오태현. 아그베나무 가지 추출물, 분획물 또는 화합물을 포함하는 화장료 조성물. 대한민국 공개특허(공개번호 1020140019537), 2014.
2. Jang, Y. A. Anti-inflammatory and whitening effects of ginseng complex as a cosmetic material. *Journal of Oil & Applied Science* 2018, 35(2), 325-335.
3. 오승한. 식품화장품의 품질경쟁 유인과 소비자선택권 보장을 위한 표시규제 개선 방향. *규제연구* 2014, 23(1), 3-60.
4. 김보람; 유은주. 화장품 소재로서 줄풀뿌리 추출물의 생리활성 연구. *Journal of Beauty Industry* 2016, 10(2), 5-14.
5. Lee, E. K.; Jung, S. H. Anti-inflammatory and Anti-oxidant effect of Natural Herbs Mixture in RAW264.7 Cell Line. *한국미용학회지* 2018, 24(1), 42-50.
6. Choi, D. H.; Kim, M. R.; Kim, M. Y.; Kim, H. H.; Park, S. Y.; Hwang, H. S. Studies on Antioxidant, Anti-inflammatory and Whitening Effects of Oriental Herbal Extracts (Mix) including *Eucommiae cortex*. *대한화장품학회지* 2019, 45(1), 37-47.
7. Hah, D. S.; Kim, C. H.; Kim, G. S.; Kim, E. G.; Kim, J. S. Antioxidative effects of traditional medicinal plants on lipid. *Korean J Vet Res* 2005, 45(3), 341-350.

8. Seo, J. E.; Hwang, E. S.; Kim, G. H. Antioxidative and Differentiation Effects of *Artemisia capillaris* T. Extract on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage of MC3T3-E1 Osteoblast Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2011**, *40*, 1532-1536.
9. Willoughby, D. A. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **1975**, *34*, 471-478.
10. Kim, M. J.; Bae, N. Y.; Kim, K. B. W. R.; Park, J. H.; Park, S. H.; Choi, J. S.; Ahn, D. H. Anti-Inflammatory Effect of *Grateloupia imbricata* Holmes Ethanol Extract on LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2016**, *45*(2), 181-187.
11. Kim, R. G.; Shin, K. M.; Chun, S. K.; Ji, S. Y.; Seo, S. H.; Park, H. J.; Choi, J. O.; Lee, K. T. *In vitro* Antiinflammatory Activity of the Essential Oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells. *Yakhak Hoeji* **2002**, *46*(5), 343-347.
12. Kim, M. H.; Kim, J. H.; Lee, Y. K.; Kim, W. S.; Kim, H. K. Anti-inflammatory Effects and Its Mechanisms of NANA (N-Acylneuraminic Acid) Isolated from Glycomacropeptide. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **2011**, *29*(2), 17-23.
13. Park, S. B.; Song, H. M.; Kim, H. N.; Park, G. H.; Son, H. J.; Um, Y.; Park, J. A.; Jeong, J. B. Anti-Inflammatory Effect of Biji (Soybean curd residue) on LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. *Korean J. Plant Res.* **2018**, *31*(2), 117-123.
14. 정숙희. Safety in Human skin cell line and Anti-inflammatory effects of

Sandalwood Essential Oil. *남부대학교* 2011, 박사학위논문.

15. Ko, M. O.; Kang, H. J.; Hwang, J. H.; Yang, K. W. Screening of the Antibacterial Effects by Ethanol Extracts from Natural Plant in Jeju against *Propionibacterium acnes*. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 2018, 44(1), 59-66.
16. Kim, Y. D.; Kim, Y. M.; Mo, E. K. Antibacterial, Antioxidant, and Antiaging Effects of the Ethanol Extract of *Dolnamul* (*Sedum sarmentosum*) and the Production of the Oil in Water Cream. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 2017, 43(3), 211-221.
17. Kang, M. S.; Oh, H. J.; Lee, H. C.; Oh, J. S. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Inhibiting the Proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology and Virology* 2009, 39(1), 11-19.
18. Choil, J. Y.; Song, S. Y.; Lee, H. H. Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of Corni Fructus Ethanol Extract in *Propionibacterium acnes*. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 2015, 13(5), 623-630.
19. Nayere, A.; Tooba, G.; Roya, Y.; Mohammad, R. V. M.; Mohammad-Reza, S.; Zuhair, M. H.; Zohre, K.; Jaleddin, S.; Soghrat, F. Association between Acne and Serum Pro-inflammatory Cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-12 and RANTES) in Mustard Gas-Exposed Patients: Sardasht-Iran Cohort Study. *Arch Iran Med.* 2017, 20(2), 86-91.
20. Kim, M. S.; Kim, J. Y. Intestinal anti-inflammatory effects of cinnamon extracts in a coculture model of intestinal epithelial Caco-2 cells and

RAW264.7 macrophages. *Appl Biol Chem* **2017**, *60*(5), 553-561.

21. Lin, C. C.; Yang, C. H.; Wu, P. S.; Kwan, C. C.; Chen Y. S. Antimicrobial, anti-tyrosinase and antioxidant activities of aqueous aromatic extracts from forty-eight selected herbs. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, *5*(26), 6203-6209.
22. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* **1987**, *58*, 966-968.
23. 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.
24. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
25. 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.
26. Estelle, D.; Alain, J.; Erik, D.; Christian, C.; Alessandro, C.; Eric, F. Comparative analysis of three Australian finger lime (*Citrus australasica*) cultivars: Identification of unique citrus chemotypes and new volatile molecules. *Phytochemistry* **2015**, *109*, 111-124.
27. Qi, S. H.; Huang, L. S.; He, F.; Zhang, S.; Dong, J. D. Phytochemical and chemotaxonomic investigation of seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers (Hydrocharitaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2012**,

43, 128-131.

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. Djalma, M. D. O.; Ezequias, P. S.; Yule, R. F. N.; Betania, B. C. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. *Rev. bras. farmacogn.* **2013**, *23*(4), 614-620.
30. Kim, D. K. Superoxide Quenching Activity of Phenolic Compounds from the Whole Plant of *Galium verum* var. *asiaticum*. *Natural Product Sciences* **2011**, *17*(4), 261-266.
31. Kim, S. K.; Kim, H. J.; Choi, S. E.; Park, K. H.; Choi, H. K.; Lee, M. W. Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (COX-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg. *Arch Pharm Res* **2008**, *31*(4), 424-428.
32. Zhao, J.; Zhang, S.; You, S.; Liu, T.; Xu, F.; Ji, T.; Gu, Z. Hepatoprotective Effects of Nicotiflorin from *Nymphaea candida* against Concanavalin A-Induced and D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*(3), 587.
33. Atay, İ.; İltter, A. Z.; Bağatur, Y.; Telci, D.; Gören, A. C.; Kırmızıbekmez, H.; Yeşilada, E. Isolation of anti-inflammatory compounds from *Sambucus ebulus* leaves through in vitro activity-guided fractionation. *Planta Med* **2015**, *81*, 69.

34. 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.
35. Abreu, P. M.; Braham, H.; Jannet, H. B.; Mighri, Z.; Matthew, S. Antioxidant compounds from *Ebenus pinnata*. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 32-34.
36. Novaes, P.; Torres, P. B.; Cornu, T. A.; de Carvalho Lopes, J.; Ferreira, M. J. P.; dos Santos, D. Y. A. C. Comparing antioxidant activities of flavonols from *Annona coriacea* by four approaches. *South African Journal of Botany* **2019**, *123*, 253-258.