



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](#)

제주백서향의  
성분학적 연구 및 생리활성 연구

지도교수 배 지 영

이 지 연

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2023년 6월

이지연의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 동 선 (인)

위 원 정 만 영 (인)

위 원 배 지 영 (인)

제주대학교 대학원



2023년 6월

Phytochemical analysis and biological  
activity of *Daphne jejudensis*

A Thesis submitted to the graduate school of  
Jeju National University in partial fulfillment of  
the requirements for the degree of Master of Science  
under the supervision of Ji Yeong Bae

The thesis for the degree of Master of Science  
by Lee Ji Yeon  
has been approved by the dissertation committee.

2023. 6

Chair \_\_\_\_\_

Member \_\_\_\_\_

Member \_\_\_\_\_

# 목 차

목차	i
List of Scheme	v
List of Tables	vi
List of Figures	vii
Abstract	viii
I. 서 론	1
II. 연구 1: 제주백서향의 성분학적 연구	5
1. 실험재료 및 방법	5
1) 식물재료	5
2) 시약 및 기기	10
2. 제주백서향의 주성분 분리	11
1) 추출 및 분획	11
2) daphnin의 분리	13
3) daphnetin의 분리	14
3. Liquid Chromatogram을 이용한 제주백서향의 성분 분석	17
1) 시료액의 제조	17
2) 표준액의 제조	17
3) HPLC-DAD를 이용한 성분패턴 분석	17
4) UHPLC-Q-ToF MS/MS를 이용한 성분패턴 분석	17
5) 소프트웨어	18
4. HPLC-DAD를 이용한 daphnin 및 daphnetin의 월별 정량	22
III. 연구 2: 제주백서향의 생리활성 연구	23
1. 실험 재료	23

1) 시약 및 기기 .....	23
<b>2. DPPH radical scavenging activity</b> .....	24
1) 시약의 제조 .....	24
2) 시료의 제조 .....	24
3) radical 소거능 측정 .....	25
<b>3. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity</b> .....	26
1) 시약의 제조 .....	26
2) 시료의 제조 .....	26
<b>4. Total flavonoid contents</b> .....	29
1) 시약의 제조 .....	29
2) 시료의 제조 .....	29
<b>5. Total phenolic contents</b> .....	31
1) 시약의 제조 .....	31
2) 시료의 제조 .....	31
3) total phenolic contents .....	31
<b>6. Ferric reducing antioxidant power</b> .....	33
1) 시약의 제조 .....	33
2) 시료의 제조 .....	33
3) ferric reducing antioxidant power .....	33
<b>IV. 결과 및 고찰</b> .....	35
<b>1. Liquid chromatography를 이용한 제주백서향의 성분패턴 분석</b>	
1) HPLC-DAD를 이용한 제주백서향의 성분패턴 분석 .....	35
2) UHPLC-Q-ToF MS/MS를 통한 제주백서향의 부위별 성분패턴 분석 .....	39
<b>2. HPLC-DAD를 통한 월별 제주백서향 잎 추출물에서의         주요 화합물 정량</b> .....	41
1) HPLC-DAD를 이용한 daphnin 정량 .....	41
2) HPLC-DAD를 이용한 daphnetin 정량 .....	44

3. 생리활성 평가.....	48
1) DPPH radical scavenging activity.....	48
2) ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activity.....	49
3) Total flavonoid contents.....	51
4) Total phenolic contents.....	52
5) Ferric reducing antioxidant power.....	53
V. 결론.....	61
VI. 참고문헌.....	63

## List of Schemes

<b>Scheme 1.</b> Fractionation from the leaf of <i>Daphne jejuensis</i> .....	12
<b>Scheme 2.</b> Isolation of main compounds from <i>D. jejuensis</i> fractions.....	16

## List of tables

<b>Table 1.</b> A list of <i>D. jejudoensis</i> plant parts from Jeju island of South Korea.....	6
<b>Table 2.</b> A list of <i>D. jejudoensis</i> leaves from Jeju island of South Korea.....	7
<b>Table 3.</b> Analysis conditions of PREP-LC.....	15
<b>Table 4.</b> A gradient elution method for HPLC-DAD.....	19
<b>Table 5.</b> A gradient elution method for UHPLC-Q-ToF MS/MS.....	20
<b>Table 6.</b> Analysis conditions for UHPLC-Q-ToF MS/MS.....	21
<b>Table 7.</b> HPLC calibration curve of daphnin in six concentration ranges.....	43
<b>Table 8.</b> HPLC calibration curve of daphnetin in seven concentration ranges.....	46
<b>Table 9.</b> Quantitative analysis of compound in <i>D. jejudoensis</i> leaf samples.....	47
<b>Table 10.</b> Radical scavenging activity of <i>D. jejudoensis</i> plant parts by DPPH and ABTS <sup>+</sup> .....	55
<b>Table 11.</b> Radical scavenging activity of <i>D. jejudoensis</i> seasonal leaf extract by DPPH and ABTS <sup>+</sup> .....	56
<b>Table 12.</b> Radical scavenging activity of <i>D. jejudoensis</i> fractions by DPPH and ABTS <sup>+</sup> .....	57
<b>Table 13.</b> Antioxidant activity of <i>D. jejudoensis</i> plant parts by TFC, TPC, FRAP assay.....	58
<b>Table 14.</b> Antioxidant activity of <i>D. jejudoensis</i> seasonal extracts by TFC, TPC, FRAP assay.....	59
<b>Table 15.</b> Antioxidant activity of <i>D. jejudoensis</i> fractions by TFC, TPC, FRAP assay.....	60

## List of Figures

<b>Figure 1.</b> Picture of <i>D. jejudonsis</i> plant parts.....	8
<b>Figure 2.</b> Morphological differences between <i>D. jejudoensis</i> (A) and <i>D. kiusiana</i> (B).....	9
<b>Figure 3.</b> Calibration curve of trolox as positive control radical scavenging activity.....	28
<b>Figure 4.</b> Calibration curve of quercetin for calculate total flavonoid contents.....	30
<b>Figure 5.</b> Calibration curve of gallic acid for calculate total phenolic contents.....	32
<b>Figure 6.</b> Calibration curve of trolox for calculate ferric reducing antioxidant power.....	34
<b>Figure 7.</b> Chromatogram of <i>D. jejudoensis</i> plant parts.....	36
<b>Figure 8.</b> Chromatogram of <i>D. jejudoensis</i> fractions.....	37
<b>Figure 9.</b> UV spectrum of unidentified peaks .....	38
<b>Figure 10.</b> UHPLC-Q-ToF MS/MS chromatogram of <i>D. jejudoensis</i> plant parts.....	40
<b>Figure 11.</b> Calibration curve of daphnin standard solution.....	42
<b>Figure 12.</b> Calibration curve of daphnetin standard solution.....	45

# 제주 백서향의 성분학적 연구 및 생리활성 연구

## 이 지 연

Department of Advanced Convergence Technology & Science

The Graduate School

Jeju National University

### Abstract

백서향속은 세계적으로 널리 분포하고 있고 다양한 약리학적 기능이 있기 때문에 오래전부터 민속의약적 소재로 이용되어왔다. 백서향속에서 발견할 수 있는 다양한 페놀화합물들로 인한 항류마티즘, 상처의 치유, 항염증, 항암, 항심혈관질환, 항비만 효과와 노화를 방지하는 효과가 있다. 제주백서향은 과거 백서향과 같은 종으로 분류되었으나 2013년 형태학적 차이가 인정되어 신종으로 분류되었다. 따라서 제주백서향에 대한 형태학적, 약리학적 연구가 부족한 실정이다. 이 연구에서는 제주백서향의 성분학적 연구 및 생리활성 연구를 진행하였다. 제주백서향의 잎 추출물에서 주요 화합물인 daphnin 과 daphnetin을 분리, 동정 하였으며 부위별 추출물의 성분을 UHPLC-Q-ToF MS/MS를 이용하여 잠정동정 하였다. 그 결과 모든 부위별 추출물에 주요 화합물인 daphnin과 daphnetin이 들어있음을 확인하였다. 제주백서향의 월별 잎 추출물에 대한 daphnin과 daphnetin을 정량 한 결과로 daphnin은 5월 추출물에서 가장 높은 함량을 보였고 daphnetin은 10월 추출물에 가장 높은 활성을 보였으며 두 주요 화합물 모두 12월에 공통적으로 가장 낮은 함량을 보였다. 제주백서향의 부위별 항산화를 실험 한 결과,

공통적으로 꽃봉오리에서 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 꽃봉오리 추출물의 daphnin 및 daphnetin 정량 결과가 가장 높게 나왔기 때문으로 사료된다. *D. jejuensis*의 식물 부위별 메탄올 추출물의 성분학적 분석과 생리학적 평가를 동시에 진행한 연구는 처음이다. 따라서 이 논문에서 설명한 실험 결과는 *D. jejuensis*의 약리학적 소재로서 가능성을 평가하는 것과 더불어 추후 연속될 연구의 방향을 잡는 데에 도움을 줄 수 있기 때문에 가치가 있다.

Phytochemical analysis and biological activity of  
*Daphne jejudensis*

Ji-yeon Lee

Department of Advanced Convergence Technology & Science

The Graduate School

Jeju National University

Abstract

*Daphne jejudensis* is a worldwide distributed plant belonging to the genus *Daphne*. Because of their various physiological benefits, *Daphne* species had been used as folk medicines in ancient times. Studies show that the *Daphne* species has anti-rheumatism, wound healing, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-carcinogenic, anti-diabetic, and anti-aging effects. It has been proven that phenolic compounds and coumarin derivatives are directly involved in its physiological activities.

*D. jejudensis* was classified as morphologically different from *Daphne kiusiana*, which was an accepted identity previously<sup>14</sup>. Therefore, more studies can determine its physiological and pharmacological potential in a proper way. In this study, we compared the antioxidant efficacy of each plant part and seasonal extract in leaf.

We found that it was the highest in flowers followed by buds, roots, leaves, and then in branches. At the seasonal extract, the highest in spring(May) followed by summer, fall, winter. In addition, to identify their chemical components, the leaves of *D. jejuensis* were extracted with 70% EtOH and different fractions were prepared. Based on the HPLC profile, Daphnetin and daphnin were separated from the ethyl acetate and water fraction respectively. The isolated compounds were identified through UV spectrum and UPLC-Q-ToF MS/MS.

From the extracts of flowers, buds, branches, roots, and leaves UPLC-Q-ToF-MS/MS was performed, and internal chemical substances in each plant part were tentative identified. With these findings, we can figure out the responsible metabolites for the biological effects, and new pharmaceutical interventions may be designed in the future.

## I. 서 론

백서향속 식물은 팔꽃나무과에서 가장 다양한 속 중 하나로, 90종 이상의 식물이 존재한다. 백서향속 식물은 대륙 전역에 분포하는데, 주로 동아시아에 널리 분포한다<sup>1</sup>. ‘Daphne’ 라는 이름은 월계수를 의미하는 고대 그리스어에서 파생되었으며 유럽과 영어권 국가에서 Daphne라고 불린다. *D. gnidium*은 중국 전통 의학에서 항암, 종양, 임질, 피부 질환, 타박상에 의한 통증 완화, 류머티즘, 고혈압, 말라리아 및 염증성 질환을 질병을 치료하는 민간의약적 소재로서 사용되었다<sup>2</sup>. 또한 *D. sericea*는 터키에서 민간의약적 소재로 이용되었는데, 백서향속 식물의 잎과 꽃은 치질약으로 사용하였고, 잎은 염색을 위한 재료로도 사용하였다는 기록이 있다<sup>3</sup>. *D. gnidium*, *D. sericea*은 중국과 터키 뿐만 아니라 아시아, 아프리카 및 유럽에서 민간의약소재로서 사용된다<sup>2,3</sup>.

*D. gnidium*, *D. sericea* 및 *D. genkwa*에서 발견된 생리활성을 띠는 내부화합물의 종류는 대표적으로 Phenolic compound와 coumarin 계열이다<sup>2,4</sup>. *D. kiusiana*에서 보고되는 phenolic compounds의 생리활성은 대표적으로 산화로 인한 신체 내 손상, 당뇨, 노화, 암, 심혈관 장애, 지질 및 세포손상을 억제하는 효과이다<sup>5</sup>.

*D. genkwa*에서 흔하게 존재하는 화합물인 coumarin 과 diterpenoid는 항염, anti-HIV, antifertility, neurotrophic, 그리고 콜레스테롤을 저해하는 약학활성이 있음이 연구되어왔다<sup>6</sup>. 특히 항암적인 측면에서 백서향속은 백혈병, 폐암종, 간암, 유방암, 흑색종, 섬유육종, 결장암, 유방암, 그리고 에이즈에 대한 항암효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>7</sup>.

*D. genkwa* 뿌리 추출물이 인간 유방암 유래세포인 MCF-7와 백서향 꽃 에탄올 추출물이 인간 유래 유방암세포인 MDA-MB-231와 뇌암 유래세포인 U87-MG 에서 세포독성 효과가 있었다는 연구 결과가 이러한 과학적 근거를 뒷받침한다<sup>7,8,9</sup>. 또한 담배연기로 유도된 만성폐쇄성 폐질환(COPD) 마우스 모델에서 *D. kiusiana*지상부 식물 추출물이 기관지 상피에서 분비되는 주요 단백질인 mucin 5AC를 감소시켜 COPD 증상을 완화하였다는 연구 결과<sup>10</sup>와 *D. jejuensis* 잎 추출물이 LPS로 유도된 치주질환 세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, iNOS와 COX-2 표현을 감소시켰다는 실험결과가 백서향속의 항염증 효과가 있다는 기존

논문의 주장을 뒷받침한다<sup>9</sup>.

2021년 *D. kiusiana* 추출물이 LPS로 유도된 뇌염증 세포인 BV-2 cell에서 NO 생성률과 염증성 사이토카인 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 및 IL-6이 mRNA 수준에서 발현이 억제되었음을 확인하였다<sup>11</sup>. 추가로, *D. kiusiana*에서 분리한 생리활성이 있는 화합물인 (-)-acutissimalignan이 *in vivo*와 *in vitro* 모두에서 뇌염증을 저해하는데에 효과가 있었다는 연구결과가 있어<sup>12</sup>, 백서향속 식물이 뇌질병 치료제로서의 가능성이 있음을 시사하였다.

제주백서향(*Daphne jejuensis* M. Kim)은 팔꽃나무과(Thymelaeaceae)의 백서향속 식물이다. 제주백서향은 과거 백서향(*Daphne kiusiana*)와 동일한 종으로 분류되었으나, 최근의 연구에서 제주백서향과 백서향의 형태학적 차이점이 인정되어 신종으로 분류되었다<sup>13</sup>.

제주백서향과 백서향은 모두 줄기에 털이 없고, 호생이며 잎은 모가 없는 특성을 가졌지만 둘의 차이점은 잎의 크기면에서 백서향 잎의 길이는 평균 7.3 cm 인 반면 제주백서향 잎의 길이는 평균 7.8 cm 로 보다 긴 형태를 가지며 잎의 넓이면에서 백서향은 평균 2.6 cm, 제주백서향은 평균 2.1 cm로, 제주백서향이 더 얇고 긴 형태의 잎 모양을 가지고 있다<sup>14</sup>. 잎의 형태면에서는 제주백서향은 타원상 피침형이지만 백서향은 도피침형으로, 확연한 차이가 있다. 꽃 부분에서 제주백서향과 백서향 모두 하얀색, 수술의 개수는 8개로 암술은 장타원형 자방으로 0.2-0.4 mm 범위 이내로 공통되지만, 백서향나무의 화탁통 길이는 7-15 mm 이며 털이 있는 반면에 제주백서향의 꽃은 화탁통 하부로 갈수록 녹색을 띠며 화탁통 길이는 12-14 mm이고 털이 없다는 차이점이 있다. 제주백서향과 백서향의 차이점은 꽃의 수술에서도 나타나는데, 수술대의 길이가 제주백서향은 평균 0.5 mm, 백서향은 평균 1 mm이다<sup>14</sup>.

제주백서향의 식물화학적 분석을 위하여 기존에 나와있는 백서향속 화합물 분석 문헌의 HPLC 분석조건<sup>15-16</sup>을 참고하여 분석한 결과 제주백서향의 주요 화합물은 daphnin과 daphnetin임을 알 수 있었다. 이는 백서향속 식물인 *D. odora*의 에탄올 추출물에서 daphnin이 주요 화합물로 동정되었다는 기존 문헌의 연구결과와 비슷한 경향을 보였다<sup>17</sup>. Daphnin은 화학식 C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>, 질량값 340.1 g/mol을 가지는 coumarin 계열의 화합물로<sup>18</sup>, 백서향속 식물에서 흔하게 발견된다. 또 다

른 주요 화합물은 daphnetin으로, daphnin과 마찬가지로 coumarin 계열의 화합물로 화학식은  $C_9H_6O_4$ , 질량값은 178.14 g/mol로, daphnin에서 당이 떨어진 형태를 가진다<sup>19</sup>.

사회와 과학이 발전하면서 생활 수준이 윤택해지는 반면 환경 오염, 스트레스 등 각종 질환에 노출된 환경적 요인이 많아짐에 따라 건강 관리에 대한 중요성이 대두되고 있다<sup>20</sup>. 생활 수준의 향상과 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라서 건강기능성 제품의 개발 또한 증가하고 있다. 영양 성분 보충, 체질 개선, 면역 증진, 신진대사 기능을 가진 건강기능성 제품이 개발되고 있지만, 고령화시대로 인간의 수명이 늘어남에 따라 노화를 늦추는 것에 대한 관심이 높아지면서 항산화 및 항노화에 도움이 되는 제품에 대한 관심이 집중되고 있다<sup>20, 21</sup>. 산화적 스트레스(Oxidative Stress)는 자유라디칼과 항산화체제의 균형이 맞지 않으면 세포와 조직에 손상을 유발한다<sup>20</sup>. 이는 단백질의 변형을 유발하기 때문에 세포막의 변성, DNA손상, 면역 조절 능력에 이상을 야기할 수 있고 노화를 촉진한다<sup>22</sup>. 활성산소는 미토콘드리아에서의 인산화 과정 및 염증 반응으로 인해 생성된다<sup>23</sup>. 산화적 스트레스에 의해 유발되는 대표적인 질환으로는 염증성 질환, 암, 비만, 신경퇴행성 질환이 있다<sup>24</sup>. 이러한 연구들이 산화 스트레스를 조절하는 것이 만성 질환을 관리하는데 중요한 요인임을 뒷받침하고 있다<sup>22-24</sup>.

*Daphne kiusiana*는 남부지방의 섬이나 해안가에 자생하는 백서향속 식물이다. 백서향의 메탄올 추출물은 항산화 효과가 특히 높기 때문에 산화적 스트레스로 유발되는 질병을 치료하기 위한 민간의약, 건강기능식품 및 약품의 소재로서 개발되었다<sup>25</sup>.

2021년 백서향 메탄올 추출물의 미용 기능적 가능성을 평가하기 위하여 주름 방지, 색소 침착을 제거하는 효능 및 항산화 연구에 대한 결과에서 positive control로 사용되는 L-ascorbic acid와 유사하거나 심지어 더 높은 항산화 능력과 우수한 주름 방지 및 색소 침착 제거 효능을 가짐이 밝혀져 항산화 및 미백 활성을 기반으로 한 미용적 측면에 대한 가능성을 제시한 연구결과와<sup>26</sup> *D. kiusiana*의 메탄올 추출물이 항산화 활성실험에서 주로 대조군으로 사용되는 L-ascorbic acid와 농도에 따라 항산화 활성이 유사하거나 높다는 연구결과가 백서향속 식물의 항산화제로서의 가치를 입증한다<sup>27</sup>. 따라서 본 연구의 의의는 제주

백서향의 부위별 추출물의 이화학적 분석을 통해 제주백서향의 내부화합물을 규명하고 제주백서향의 잠재적인 약리학적 가능성과 건강 기능을 향상시키기 위한 건강 보조 식품 및 미용을 향상시키기 위한 원료로서 가능성 또한 제시하기 위하여 수행되었다.

## II. 연구 1: 제주백서향의 성분학적 연구

### 1. 실험재료 및 방법

#### 1) 식물 재료

제주백서향 부위별 성분학적 연구에 사용된 *D. jejuensis*의 잎과 꽃, 가지, 뿌리, 꽃봉오리를 한국약용식물원으로부터 제공받았다 (Figure 1).

잎과 가지, 뿌리는 건조하여 4℃에서 보관한 후 실험에 사용하였다. 꽃과 꽃봉오리는 신선할 때 바로 추출하여 실험에 사용하였다. 채집한 식물의 채집한 장소와 부위는 Table 1과 같다.

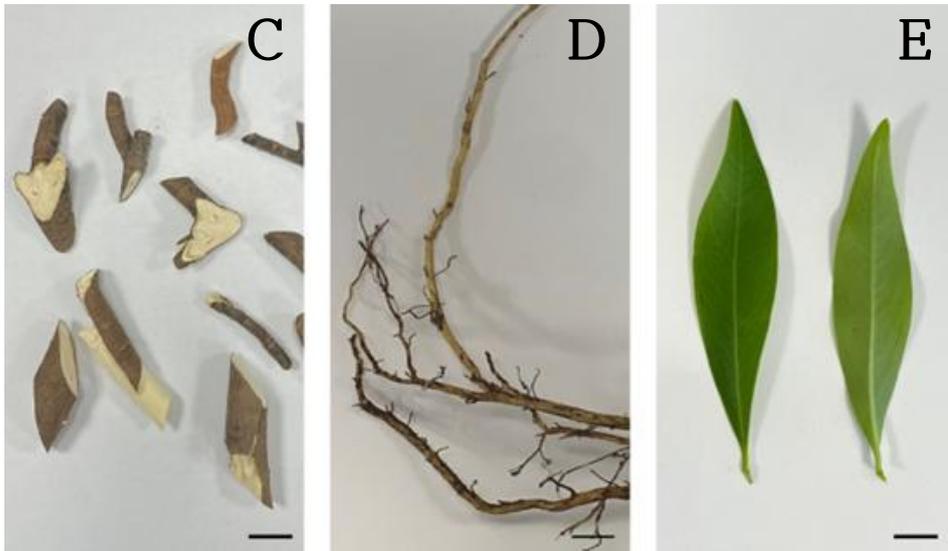
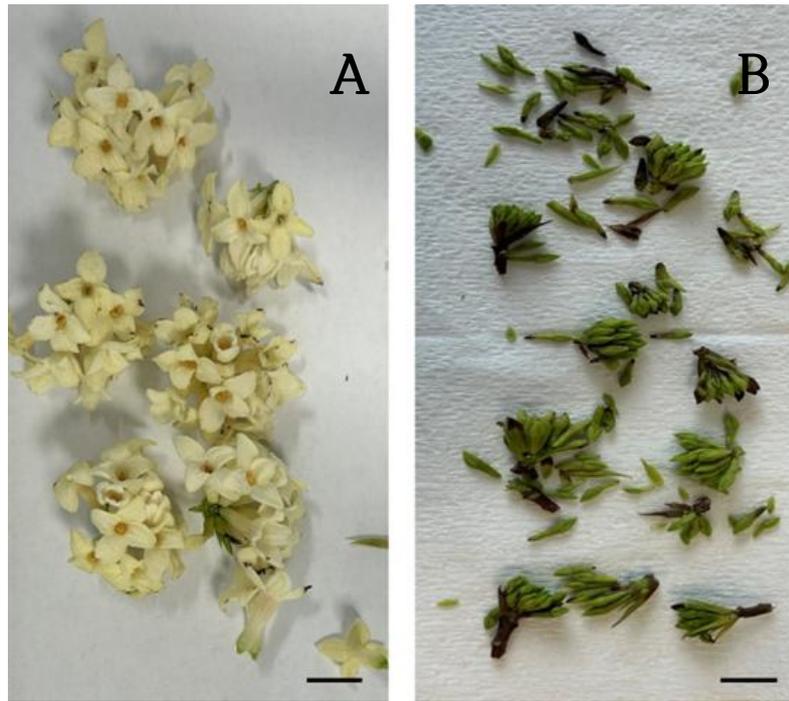
제주백서향 잎의 월별 식물화합물 정량을 위해 매달 한국약용식물원에서 제공받은 식물 재료에 대한 정보는 Table 2에 표기하였다. 제주백서향 월별 잎 식물 재료는 건조하여 4℃에서 보관 후 추출하기 직전 파우더 형태로 제작한 뒤 신선하게 추출하였다. 사용한 식물 재료는 약학대학 생약재 보관실 (Herbarium of the College of Pharmacy, Jeju National University)에 보관 중이다.

Table 1. A list of *D. jejuensis* plant part from Jeju island of South Korea

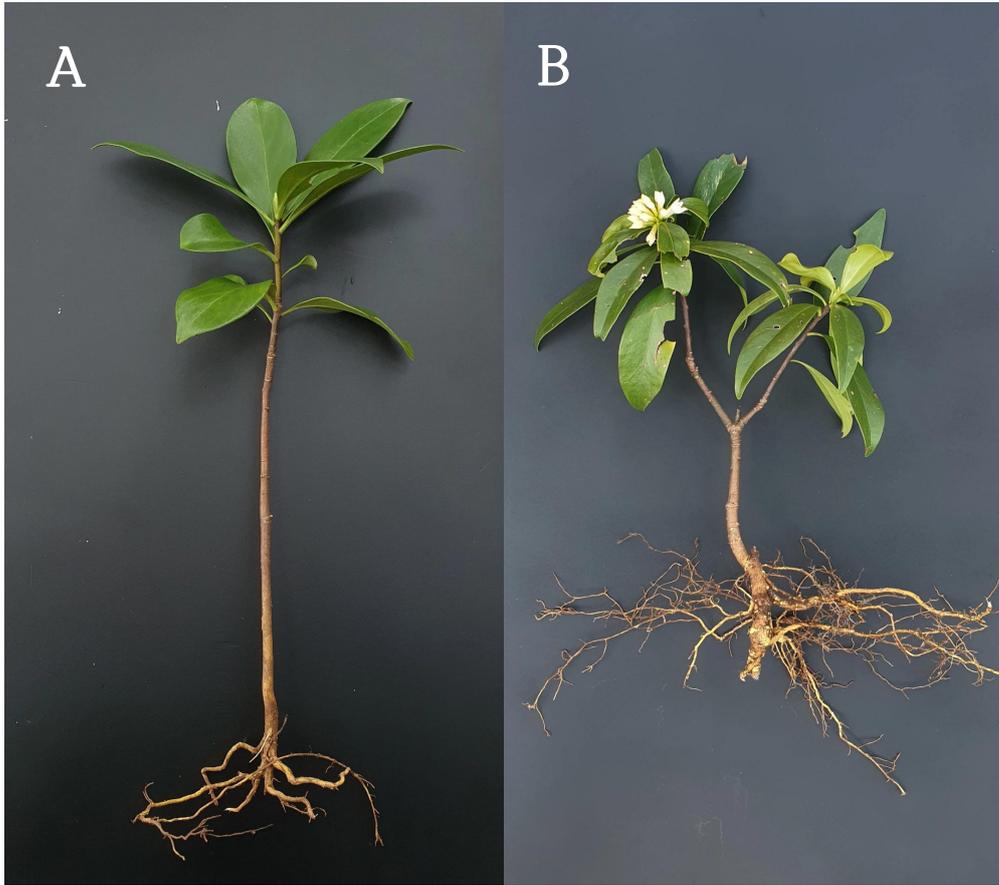
Code	Collection parts	Collection date
JNUP-2021-46	leaf	2021.07
JNUP-2021-03	flower	2021.02
JNUP-2021-274	branch	2021.07
JNUP-2021-275	root	2021.07
JNUP-2022-68	flower bud	2022.12

Table 2. A list of *D. jejuensis* leaf from Jeju island of South Korea

Code	Collection date
JNUP-2022-13	2022.04
JNUP-2022-14	2022.05
JNUP-2022-18	2022.06
JNUP-2022-19	2022.07
JNUP-2022-20	2022.08
JNUP-2022-26	2022.09
JNUP-2022-38	2022.10
JNUP-2022-61	2022.11
JNUP-2022-65	2022.12
JNUP-2023-05	2023.01
JNUP-2023-06	2023.02
JNUP-2023-17	2023.03



**Figure 1.** Picture of *D. jejuensis* plant parts; flower(A), flower bud(B), branch(C), root(D), and leaf(E). Scale bar represents 1 cm.



**Figure 2.** Morphological differences between *D. kiusiana* (A) and *D. jejuensis*. (B).

## 2. 시약 및 기기

### (1) 시약

성분학적 연구를 위한 식물의 추출에는 HPLC 용 메탄올(Fisher Scientific Korea. Ltd., Korea)과 70% 에탄올(Samchun chemicals, Korea)을 사용하였다. Liquid chromatogram 분석에 사용한 시약은 모두 HPLC grade 이상을 사용하였다. 사용된 용매는 물과 acetonitrile(Merck, EMD Co., Germany), Formic acid MS-grade(Optima, fisher Chemical Co, UK)이다.

### (2) 기기

HPLC: Agilent 1260 infinity series, Chemstation Software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

UHPLC-Q-ToF-MS/MS: Agilent 6500 series Q-ToF LC/MS series

Column: J'sphere ODS H80 (4.5 × 250 mm, 4 μm, S-8 nm, YMC, Tokyo, Japan) for HPLC; Agilent Zorbax SB-C18 (9.4 × 50mm, 5μm) for Prep-LC; Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD 1.8 μm, 2.1 × 100 mm (Agilent Technologies) for LC-Q-ToF

MPLC: Isolera (Biotage, NC, USA)

초음파추출기: POWERSONIC 520 (화신테크, KOREA)

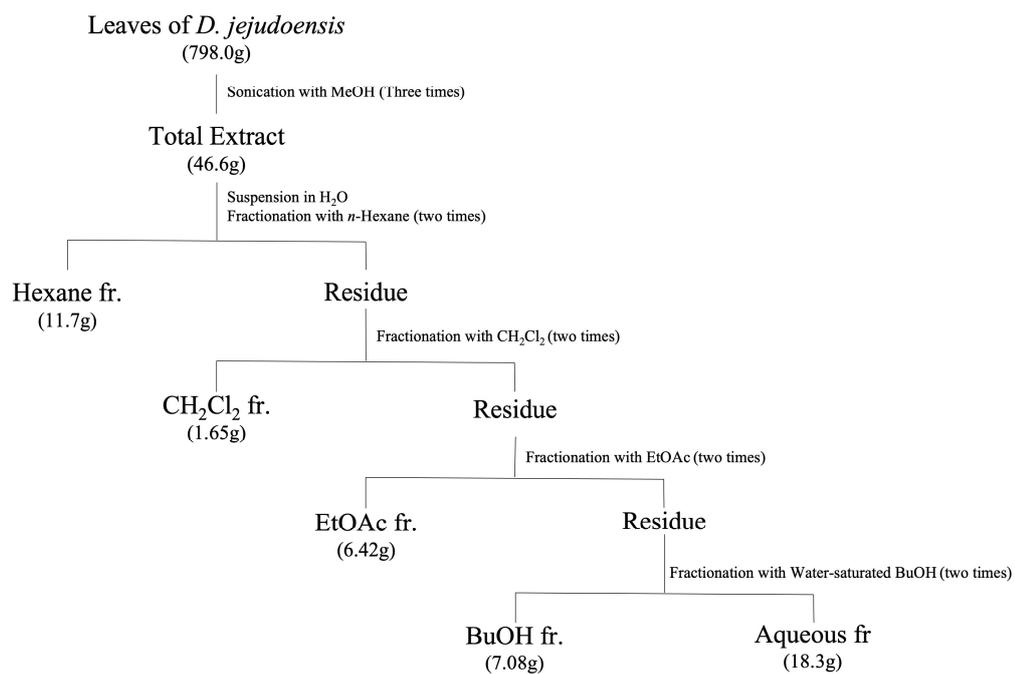
회전농축감압기: Rotary Evaporator Heating bath Hei-VAP (Heidolph, Germany)

## 2. 제주백서향의 주성분 분리

### 1) 추출 및 분획

건조된 백서향 잎(798.0 g)을 곱게 분쇄하여 메탄올로 90 분씩 3 회 초음파 추출하였다. 초음파 추출 중 수시로 가라앉은 식물 재료를 섞어 추출이 잘 되도록 하였다. 3 회 반복하여 추출된 백서향 잎은 하룻밤 동안 실온 보관 후 다음날 30 분 더 초음파 추출하여 따뜻할 때 여과하였다. 추출을 두 번 반복하여 이틀 동안 상등액을 수집하였다.

이를 감압농축하여 얻은 추출물(46.6g)을 물에 현탁시켜 *n*-Hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-butanol 의 순서로 분획을 실시하여 각각에 대한 분획물 hexane fr.(11.7g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fr.(1.65g), EtOAc Fr. (3.42g), *n*-BuOH fr.(7.08g), water fr.(22.9g)을 얻었다. 이와 같은 정보를 Scheme 1 에 표기하였다.



Scheme 1. Fractionation from the Leaf extract of *D. jejudoensis*

## 2) Daphnin의 분리

5개의 제주백서향 잎 분획물에 대하여 HPLC를 실시한 결과 water 분획과 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램에서 주요 피크가 존재하는 것을 확인하였다. Water 분획물로부터 주요성분을 분리하기 위해 Prep-LC를 이용하였다.

Water 분획물에 대하여 acetonitrile과 물을 전개용매로 Prep-HPLC를 실시하여 2개의 소분획물(A,B)을 얻었다(Scheme 2). Prep-HPLC의 시료액은 *D. jejuensis* water 분획을 50 mg/mL 농도로 HPLC용 MeOH에 희석 후 0.45  $\mu$ m PTFE syringe filter로 여과하여 준비하였다.

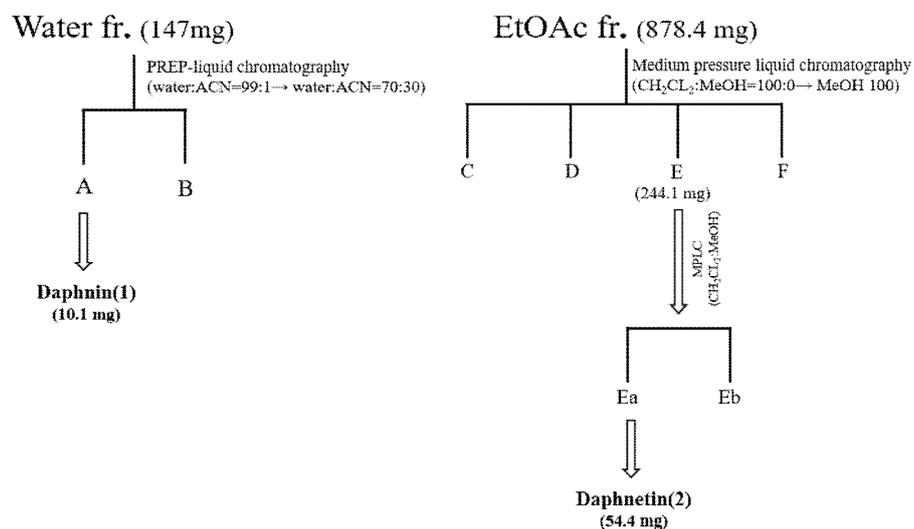
Prep-HPLC column은 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (9.4 × 50 mm, 5  $\mu$ m)을 사용하였고, 유속은 20 mL/min으로 유지하였으며 검출파장은 280 nm였다. 분리조건은 Table 3와 같다. Prep-HPLC를 실시하여 얻은 2개의 소분획물 중 얻어진 소분획물 A를 reference와의 HPLC 머무름시간, UV spectrum이 일치함으로 daphnin으로 동정하였다.

### 3) Daphnetin의 분리

EtOAc 분획물로부터 주요성분을 분리하기 위한 조건을 찾기 위해 다양한 용매 조건으로 Thin Layer Chromatogram(TLC)을 실시하였다. 사용된 용매조건은 Methylene Chloride : Methanol = 5 : 1, Chloroform : Methanol : Water = 7 : 3 : 0.5, Chloroform : Methanol : Water = 8 : 2 : 0.25, Chloroform : Ethyl Acetate : Methanol : Water = 8 : 15 : 4 : 1, Chloroform : Ethyl Acetate : Methanol : Water = 8 : 15 : 2 : 0.5, 그리고 Chloroform : Ethyl Acetate : Methanol : Water = 6 : 10 : 4 : 1 이다. 위의 여섯가지 용매조건 중 Chloroform : Ethyl Acetate : Methanol : Water = 6 : 10 : 4 : 1의 조건이 가장 분리하기 좋은 조건이었기 때문에 그와 비슷한 극성도를 가진 용매인  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 와 MeOH (90 : 10  $\rightarrow$  0 : 100)를 전개용매로 하여 Medium Pressure Liquid Chromatography(MPLC)를 실시하였다. 얻은 86개의 소분획물(fr.1-fr.86) 중 소분획물 fr.22-39에 대하여 동일한 분석조건으로 MPLC를 실시하여 2개의 소분획물인 Ea, Eb를 얻었다(Scheme 2). 얻어진 소분획물 Ea를 reference와의 HPLC 머무름시간, UV spectrum이 일치함으로 daphnetin으로 동정하였다.

Table 3. Analysis conditions of PREP-LC

Preparative Liquid chromatography system (Agilent 1260 infinity II)		
Pump	Agilent 1260 Prep Bin Pump	
Detector	Agilent 1260 UV Detector(280 nm)	
Column	Agilent Zorbax SB-C <sub>18</sub> (9.4 × 50 mm, 5 μm)	
Mobile phase	A: water B: acetonitrile	
Total run time	10 min	
Flow rate	20 mL/min	
Fraction collector	Agilent 1260 FC-PS G1364E	
Sampler	Agilent Prep Auto sampler G7157A	
Injection volume	30 μL	
Gradient profile	Time(min)	B(%)
	0	1
	2	95
	7	80
	10	70



**Scheme 2.** Isolation of main compounds from *D. jejuensis* fractions; compound 1 was isolated from water fraction by Prep-HPLC, compound 2 was isolated from EtOAc fraction by MPLC.

### 3. Liquid Chromatography를 이용한 제주백서향의 부위별 성분 분석

제주백서향 잎 분획물에서 각각 분리한 daphnin, daphnetin을 포함한 제주백서향 식물 부위별 추출물의 내부화합물을 동정하기 위해 HPLC 및 UHPLC-Q-ToF MS/MS를 실시하였다.

#### 1) 시료액의 제조

제주백서향의 각 분획물을 LC-MS grade methanol을 용매로 하여 1 mg/mL 농도로 제작한 후 0.2  $\mu$ m PTFE 시린지 필터로 여과하였다. 여과한 추출액을 LC 바이알에 담아 HPLC용 시료를 제조하고 이를 희석하여 UHPLC-Q-ToF MS/MS를 위한 시료액을 제조하였다.

#### 2) 표준액의 제조

제주백서향의 main compounds인 daphnin와 daphnetin을 구입하여 LC-MS Grade용 MeOH에 10  $\mu$ g/mL 농도로 제조하였다.

#### 3) HPLC-DAD를 이용한 성분패턴 분석

HPLC의 구동에는 고정상으로 J'sphere ODS H80 (250  $\times$  4.5 mm, 4  $\mu$ m, S-8 nm, YMC, Japan) Column을 사용하였으며, 이동상으로는 formic acid가 0.1% 함유된 3차 증류수를 A 용매로 하고, formic acid가 0.1% 함유된 acetonitrile을 B 용매로 하여 Table 4와 같은 기울기 조건으로 분석하였다. Diode Array Detector 검출파장은 280 nm, 컬럼온도는 25 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

#### 4) UHPLC-Q-ToF MS/MS를 이용한 성분패턴 분석

UHPLC의 구동에는 고정상으로 Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD 1.8  $\mu$ m 2.1  $\times$  100 mm Column(Agilent Technologies)을 사용하였으며, 이동상으로는 formic acid가 0.1% 함유된 3차 증류수를 A 용매로 하고, formic acid가 0.1% 함유된 acetonitrile을 B용매로 하여 Table 5와 같은 기울기 조건으로

분석하였다. 시료주입량은 2  $\mu$ L로 하였으며 유속은 0.3 mL/min으로 유지하였다. Mass range는  $m/z$  100-1100 으로 설정하였다. Parameter의 설정값은 gas temperature 300 $^{\circ}$ C, gas flow 8 L/min, nebulizer 40 psig, sheath gas temperature 350 $^{\circ}$ C, sheath gas flow 11 L/min으로 설정하였다. 이온 조건은 음이온 조건에서 분석하였다. scan source parameter는 Vcap 3500V, nozzle voltage 1000V, fragmentor 150, skimmer 65, collision energy 0으로 설정하였다. 이와 같은 정보를 Table 6에 표기하였다.

##### 5) 소프트웨어

Liquid chromatography를 분석하기 위한 소프트웨어는 각각 HPLC는 Lab adviser (Agilent Technologies), UHPLC-Q-ToF MS/MS는 MassHunter ver. 10.1 (Agilent Technologies)을 사용하였다.

Table 4. A gradient elution method for HPLC-DAD

Time	A(%)	B(%)
0	99	11
5	90	10
15	80	20
25	70	30
45	60	40
55	40	60
55.1	99	1
60	99	1

Solvent A: 0.1% formic acid in water, solvent B: 0.1% formic acid in acetonitrile.

Table 5. A gradient elution method for UHPLC-Q-ToF MS/MS

Time	A(%)	B(%)
0	95	5
4	40	60
7	2	98
10	2	98
15	95	5

Solvent A: 0.1% formic acid in water, solvent B: 0.1% formic acid in acetonitrile

Table 6. Analysis conditions for UHPLC-Q-ToF MS/MS

Instrument	Agilent 6500 series
Column	EclipsPlus C <sub>18</sub> RRHD 1.8 $\mu$ m(2.1 $\times$ 100 mm)
Flow rate	0.3 mL/min
Solvent system	A: water with 0.1% formic acid B: acetonitrile with 0.1% formic acid
Time table	A: 95% to 40% for 4 min, 40% to 2% for 3 min, 2% for 3 min, 2% to 95% for 5 min
Min Range ( <i>m/z</i> )	100
Mas Range ( <i>m/z</i> )	1100
Parameter	
Gas Temp ( $^{\circ}$ C)	300
Gas flow (L/min)	8
Nebulizer	40
Sheath Gas Temp	350
Sheath Gas Flow	11
Mode	Negative mode
Scan source Parameters	
Vcap	3500
Nozzle Voltage(V)	1000
Fragmentor	150
Skimmer1	65
Octopole RF Peak	750
Collision energy	0
Sample concentration	1 mg/mL in methanol
Injection volume	2 $\mu$ L

#### 4. HPLC-DAD를 이용한 daphnin 및 daphnetin의 월별 정량

제주백서향 잎에서 daphnin과 daphnetin의 월별 함량 변화를 관찰하기 위하여 매달 같은 지역에서 채집되어 공급받은 제주백서향 잎을 HPLC grade 메탄올을 이용하여 추출하였다. 정확하게 칭량한 1 g의 월별 제주백서향 잎 가루 부피의 3배만큼 HPLC grade 메탄올을 넣어 실온에서 90분간 초음파 추출 하였다. 추출한 상등액은 정확히 10 mL으로 맞추었다.

제작한 추출물은 HPLC를 이용하여 daphnin과 daphnetin의 월별 함량을 정량하였다. 분석 조건은 liquid chromatography를 이용한 제주백서향의 부위별 성분분석에 기입한 HPLC의 구동을 그대로 따랐다. daphnin의 calibration curve를 그리기 위하여 6개의 농도(1000  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 그리고 0.6  $\mu\text{g/mL}$ )로 제작하였고, daphnetin의 calibration curve를 구하기 위하여 7개의 농도(1000  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 그리고 10  $\mu\text{g/mL}$ )로 제작하였다. 검량선을 계산하기 위한 실험값은 세 번 반복 실시하여 구하였다.

### III. 연구 2: 제주백서향의 생리활성 연구

#### 1. 실험재료

##### 1) 시약 및 기기

###### (1) 시약

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(free radical) powder 95% (Thermo Fisher Science, Co., USA), Methanol(Samchun, Co, Korea.), BHT(2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)(Sigma, Co. USA), L-ascorbic acid(Sigma,Co.,USA.), Trolox(Aldrich, Co. USA), ABTS(2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt)(Aldrich, Co. USA), Hydrochloric acid(DEAJUNG, Korea), Iron(III) chloride(Aldrich, USA), Folin & Ciocalteu's phenol reagent(Aldrich, USA), Sodium Carbonate(TCI, Tokyo, Japan), Gallic acid hydrate(TCI, Tokyo, Japan), Aluminum chloride(Aldrich, USA), Potassium acetate(Aldrich, USA)

###### (2) 기기

Microplate reader(Tecan, Spark, ,Atria), centrifuge(Labogene, Korea)

## 2) DPPH radical scavenging activity

세포 대사활동에서 대사과정과 환경적인 스트레스 요인으로부터 자유라디칼이 생성되는데, 과생성된 자유라디칼은 생체 분자 구조를 손상시켜 세포 기능 장애를 유발하거나 세포를 사멸시킨다. 증가된 자유라디칼은 신체 내에서 산화 스트레스를 증가시키고 암, 노화, 심혈관 질환 및 만성 질환을 촉발하여 건강상의 문제를 야기하므로 과생성된 자유라디칼을 소거하는 것은 중요하다<sup>24</sup>. DPPH assay는 항산화능을 실험하는 대표적이고 간단한 방법으로, 실험 결과를 시각적으로 확인할 수 있기 때문에 직관적으로 결과를 알 수 있다는 장점이 있다. DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 화학적으로 안정된 자유라디칼을 가지고 있는 친수성 물질이다. DPPH는 보라색이지만 항산화 활성이 있는 물질과 반응하면 전자를 얻어 환원하여 고유의 보라색을 잃고 노란색을 띤다. 자유라디칼의 소거능은 517 nm에서 흡광도를 측정하여 수치화 할 수 있다<sup>27</sup>.

### (1) 시약의 제조

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(free radical)을 ethanol에 녹여 200  $\mu$ M 농도로 제작하였다. 초음파 처리하여 균질하게 제작한 DPPH 200  $\mu$ M 용액은 차광용기에 담아 4°C에서 보관하였다. 실험물질인 stock solution은 1 mg/mL의 농도로 만들어 연속 희석(100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 12.5  $\mu$ g/mL, 6.25  $\mu$ g/mL, 3.12  $\mu$ g/mL, 1.56  $\mu$ g/mL)하였다.

### (2) 시료의 제조

사용된 실험물질은 제주백서향의 식물 부위별 추출물인 꽃, 꽃봉오리, 가지, 뿌리, 잎 추출물이다. 표준물질인 L-Ascorbic acid(LAA)는 stock solution 농도를 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  로 연속 희석(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )하였으며 또 다른 표준물질인 butylated hydroxytoluene(BHT)는 초기농도를 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  로 하여 연속 희석(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )하였다. 각각 샘플의 흡광도 보정은 샘플과 동일한 비율의 methanol 과 DPPH reagent 를 섞어 계산하였다.

### (3) Radical 소거능 측정

200  $\mu\text{M}$  DPPH 용액과 연속 희석하여 준비한 샘플을 96 well plate 에 배치하여 암실에서 30 분간 정치시킨 후, microplate reader 로 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여  $\text{IC}_{50}$  값을 구하였다.

### 3) ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity

ABTS<sup>+</sup> assay 는 radical 소거능을 확인하는 대표적인 실험 중 하나로서, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid ; ABTS<sup>+</sup>)는 그 자체로 자유라디칼을 가지고 있지 않지만 potassium persulfate 와 반응하여 라디칼을 생성한다. 산화된 ABTS 는 ABTS<sup>+</sup>라디칼로 표기하며 이를 소거하는 능력을 측정하여 항산화 활성 측정에 활용된다. ABTS 시약은 potassium persulfate 와 반응하여 산화될 때 짙은 청록색을 띠는데, 항산화 능력이 높을수록 색이 탈색된다. ABTS<sup>+</sup> assay 는 친유성, 친수성 물질 모두 용해가 되기 때문에 다양한 실험물질의 항산화 측정에 이용된다. 본 실험은 P. Anath et al., (1999)<sup>28</sup> 의 방법을 참조<sup>28</sup>하여 항산화능을 보고자 하는 시료인 제주백서향 부위별 추출물과 radical 감소능이 있는 수용성 비타민 E 의 유사체인 trolox 를 비교군으로 사용하였다.

#### (1) 시약의 제조

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 10 mg 을 2.6 mL 의 2.45 mM potassium persulfate 용액에 녹여 최종 농도가 7 mM 가 되도록 하여 상온에 16 시간동안 차광하였다. 차광 보관한 ABTS solution 은 실험 전 734 nm 에서 흡광도가 0.7 이 나오는 농도로 Ethanol 을 이용하여 조절하였다.

#### (2) 시료의 제조

실험에 사용된 실험물질은 제주백서향의 식물 부위별 추출물인 꽃, 꽃봉오리, 가지, 뿌리, 잎 추출물이다. 대조군으로 사용한 standard 인 trolox 는 메탄올에 15 mM 로 제작한 후 연속 희석하여 흡광도를 측정하여 구한 검량선을 Figure 3 에 표기하였다. 희석한 농도는 200 µg/mL, 100

$\mu\text{g/mL}$ ,  $50 \mu\text{g/mL}$ ,  $25 \mu\text{g/mL}$ ,  $12.5 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.6 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.3 \mu\text{g/mL}$  그리고  $0 \mu\text{g/mL}$ (Blank)이다. 사용된 추출물의 농도는  $1000 \mu\text{g/mL}$ ,  $500 \mu\text{g/mL}$  으로 고정하였다.

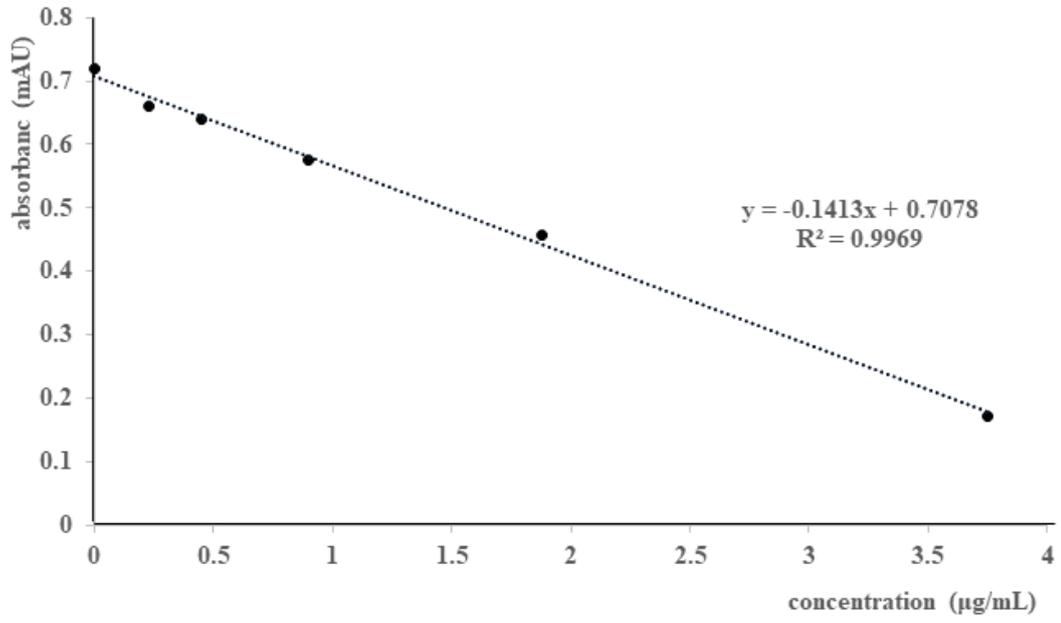


Figure 3. Calibration curve of trolox as positive control for ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity

#### 4) Total Flavonoid Contents assay

TFC(Total Flavonoid Contents) assay 는 항산화능을 가진 flavonoid 가 알칼리와 작용하면 황색으로 변화하는 원리를 이용하여 고안된 실험이다. 주로 이용되는 standard flavonoid 는 catechin, naringin 또는 quercetin 으로, 이 실험에서는 quercetin 을 이용하여 검량선을 그려 시료 당량 quercetin 함량을 계산하였다. 본 실험의 TFC assay 는 Yuan, Liu et al., (1996)<sup>29</sup>의 방법을 참고하여 실시하였다.

##### (1) 시약의 제조

사용한 quercetin 의 농도는 검량선을 그리기 위하여 다양한 농도로 제작하였다. 메탄올에 10 mg/mL 농도로 제작한 solution 을 stock 으로 하여 200  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 12.5  $\mu$ g/mL, 6.25  $\mu$ g/mL, 3.12  $\mu$ g/mL 로 serial dilution 하여 415 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용하여 그린 Quercetin 의 검량선을 Figure 4 에 나타내었다.

##### (2) 시료의 제조

사용된 실험물질은 제주백서향의 식물 부위별 추출물인 꽃, 꽃봉오리, 가지, 뿌리, 잎 추출물이다. 각 시료의 농도는 메탄올에 1000  $\mu$ g/mL 로 제작하였다.

##### (3) Total flavonoid contents

10%  $AlCl_3$  와 1 mol/L 농도의  $NaNO_2$  를 각각 20  $\mu$ L 를 넣고 300  $\mu$ L 의 95% ethanol, 560  $\mu$ L 의 3 차 증류수, 시료 100  $\mu$ L 를 넣어 총 1 mL 의 샘플을 제작하였다. 준비한 샘플은 30 분간 45°C 의 오븐(Jeio tech, Dry cabinet DC-11) 에서 반응시켰다. 배양한 각 샘플은 96-well plate 에 배치한 뒤 415 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 3 번 반복하여 진행하였다.

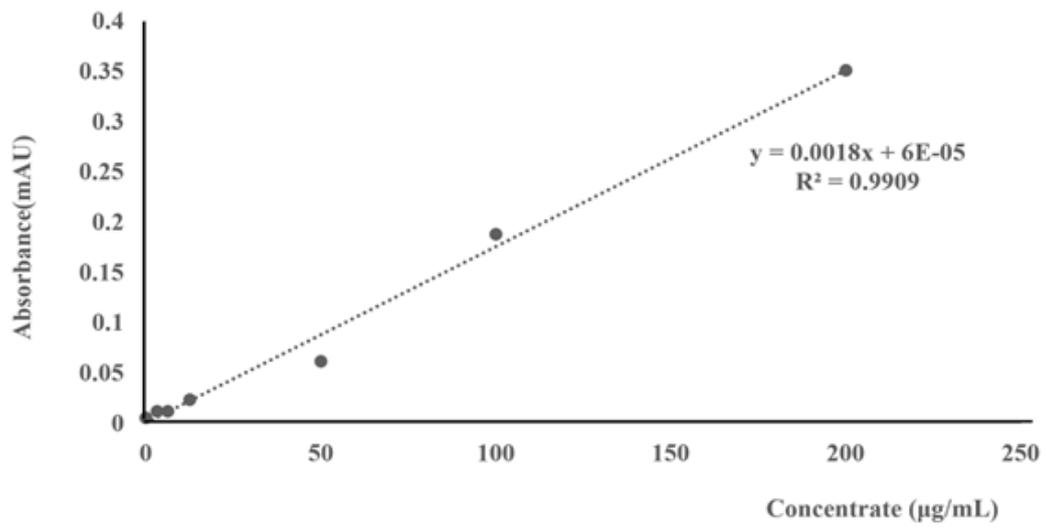


Figure 4. Calibration curve of quercetin for calculate total flavonoid contents.

## 5) Total Phenolic Contents assay

Total Phenolic Contents(TPC) assay는 phosphomolybdic acid와 phosphotungstic acid가 혼합되어있는 Folin-Ciocalteu's(F-C)시약을 이용하여 시료에 들어있는 총 페놀 함량을 분석하는 방법으로, 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어있는 이차 대사산물이다. 페놀성 화합물은 phenolic hydroxyl기를 가지는 특징이 있어 다른 화합물과 쉽게 반응하여 항산화 효과를 유도한다. 산화되어있는 F-C 시약은 환원력이 있는 phenolic compound와 반응하면 고유의 노란색을 잃고 청색을 띈다. 이 실험에서는 gallic acid를 standard로 사용하여 검량선을 그린 뒤 시료 당량 gallic acid 함량을 계산하였다. 본 실험의 TPC assay는 R. Alrahmany and A. Tsopmo, (2012)<sup>30</sup>의 분석법을 참고하여 진행하였다.

### (1) 시약의 제조

사용한 gallic acid의 농도는 검량선을 그리기 위하여 다양한 농도(200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , 3.12  $\mu\text{g/mL}$  및 0  $\mu\text{g/mL}$ )로 제작하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용하여 그린 gallic acid의 검량선을 Figure 5에 나타내었다.

### (2) 시료의 제조

사용된 실험재료는 제주백서향의 식물 부위별 추출물인 꽃, 꽃봉오리, 가지, 뿌리, 잎 추출물이다. 각 시료의 농도는 1000  $\mu\text{g/mL}$ 로 고정하였다.

### (3) Total Phenolic Contents assay

Microtube에 측정하고자 하는 시료 100  $\mu\text{L}$ 와 500  $\mu\text{L}$ 의 Folin-Ciocalteu's 시약을 넣고 400  $\mu\text{L}$ 의 sodium carbonate를 첨가하여 총 1 mL 부피로 샘플을 제작하였다. 2시간 동안 암실에 정치 하여 회색 양금이 가라앉는 것을 확인한 후에 원심분리기를 이용하여 상등액만 취하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 세 번 반복되었다.

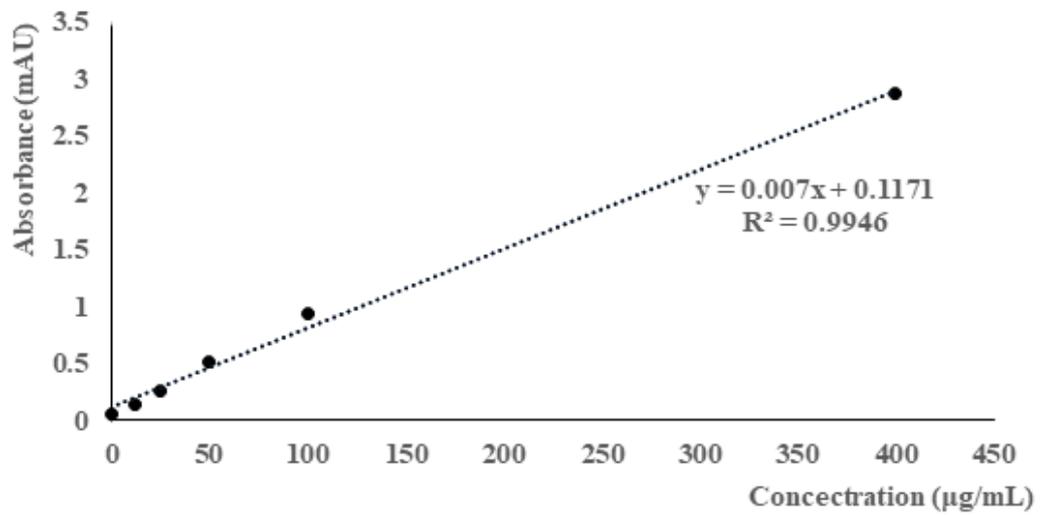


Figure 5. Calibration curve of gallic acid for calculate total phenolic contents

## 6) FRAP assay

FRAP(Ferric Reducing Antioxidant Power) assay는 colored Ferrous tripyridyltriazine complex에 의해 ferric ion이 ferrous로 전환되는 과정을 분석하는 방법이다. 낮은 pH에서 환원제에 의해 삼가 철인 tripyridyltriazine 복합체가 이가 철인 ferrous tripyridyltriazine (TPTZ)으로 환원되는 원리를 통해 분석할 수 있다. 삼가철이었을 때는 색을 띠지 않지만 환원이 되어 이가철로 환원되면서 청색을 띤다. 이 실험은 Li et al., (2007)<sup>31</sup>을 참조하여 진행하였다.

### (1) 시약의 제조

FRAP reagent는 pH를 3.6으로 조정된 300 mM sodium acetate (NaAc) 25 mL에 40 mM HCl에 10 mM TPTZ를 녹인 용액을 2.5 mL 첨가하고 20 mM FeCl<sub>3</sub> 용액 2.5 mL를 첨가하여 제작하였다. 모든 용액은 3차 증류수에 녹여 준비하였다. FRAP reagent는 실험 직전 신선하게 제작하였다.

### (2) 시료의 제조

실험에 사용된 실험물질은 제주백서향의 식물 부위별 추출물인 꽃, 꽃봉오리, 가지, 뿌리, 잎 추출물이다. 각 실험물질은 10 mg/mL를 stock으로 하여 1000 µg/mL로 희석하였다. 검량선을 그리기 위해 사용된 물질은 trolox이며 농도는 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL로 연속 희석하여 그린 검량선을 Figure 6에 표시하였다.

### (3) Ferric reducing antioxidant power

Microtube에 FRAP reagent 900 µg/mL와 100 µg/mL의 준비한 실험물질, FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O를 넣어 총 부피를 1 mL로 만들었다. 24시간 뒤 96-well plate에 배치하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

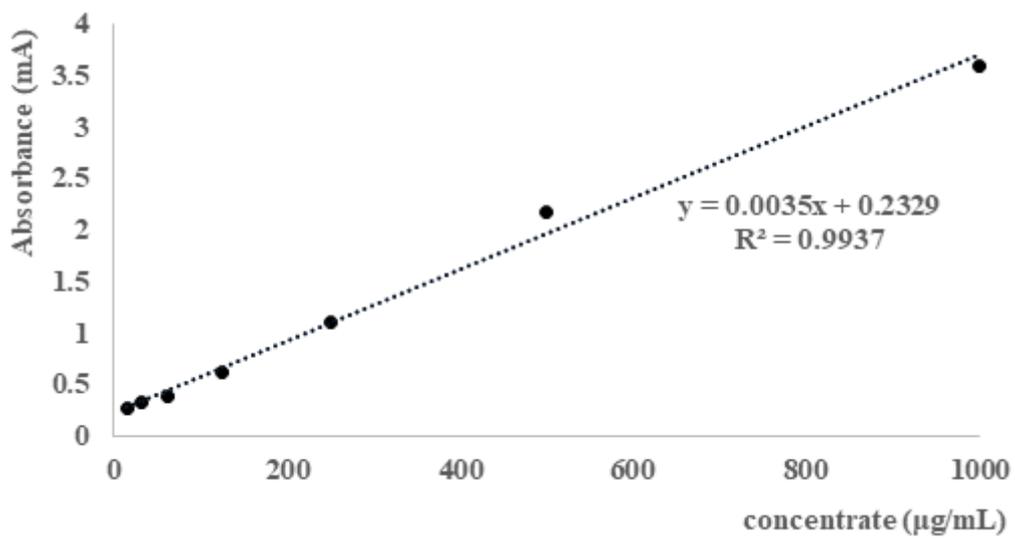


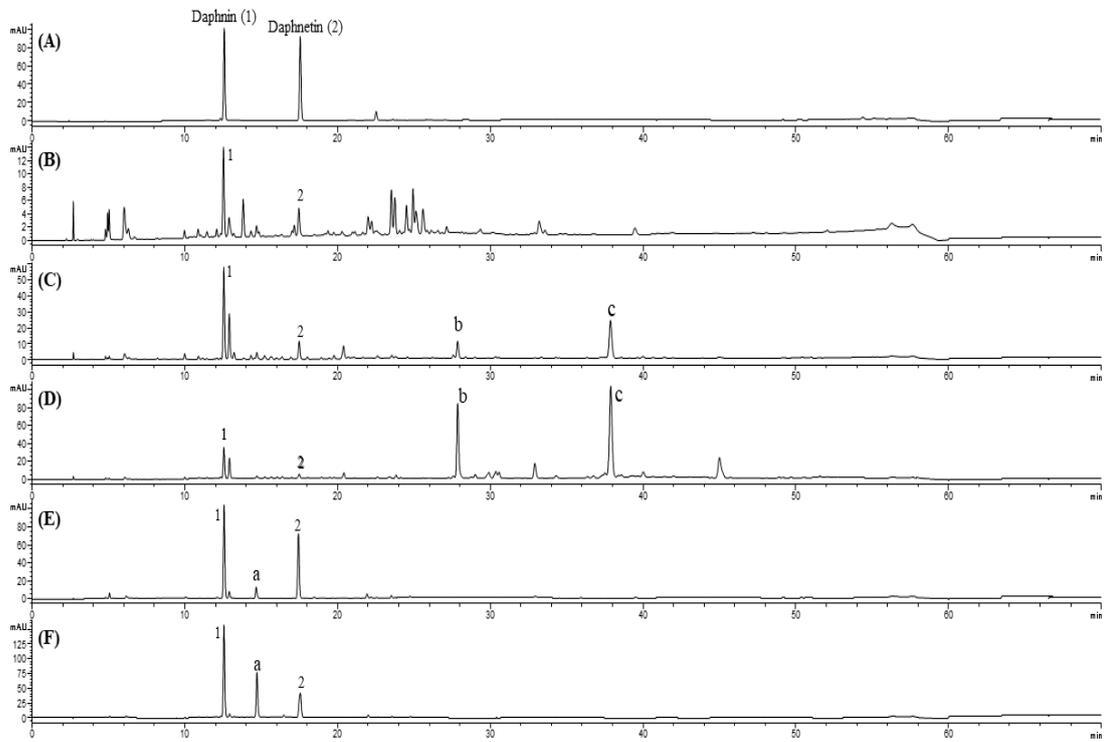
Figure 6. Calibration curve of trolox for calculate ferric reducing antioxidant power.

#### IV. 실험 결과 및 고찰

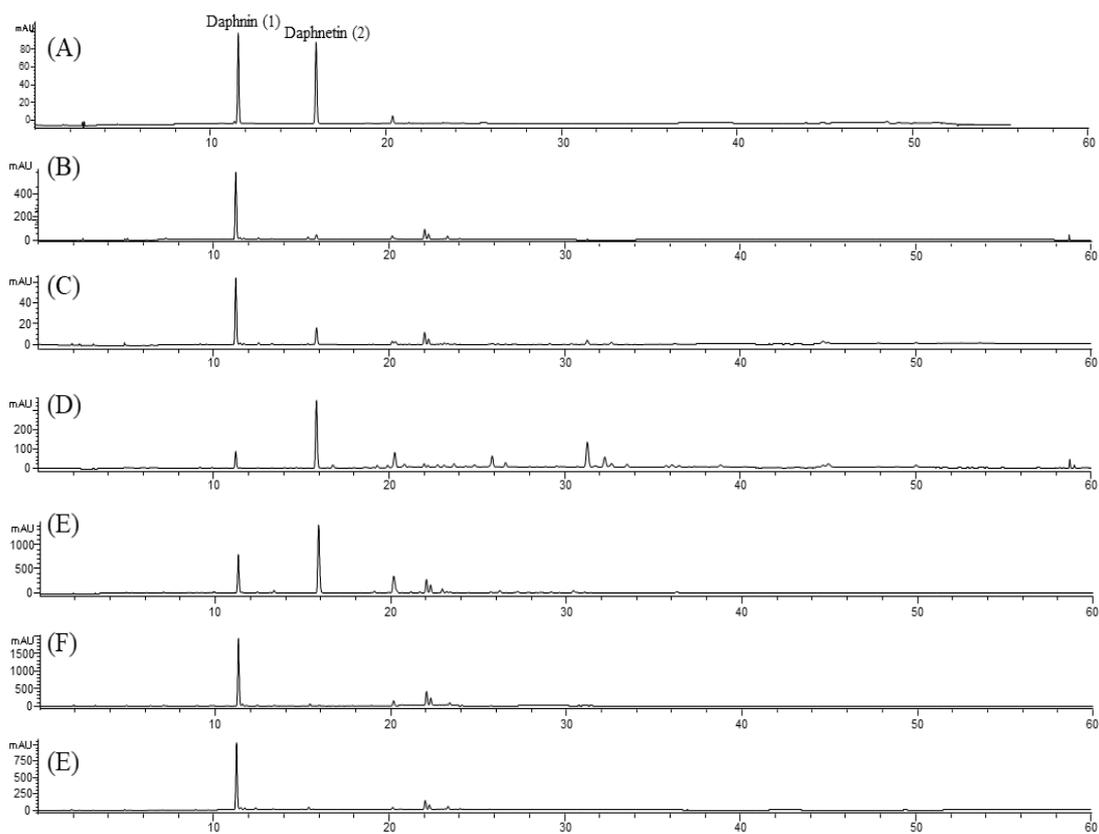
##### 1. Liquid chromatography를 이용한 제주백서향의 성분 분석

###### 1) HPLC-DAD를 이용한 성분패턴 분석

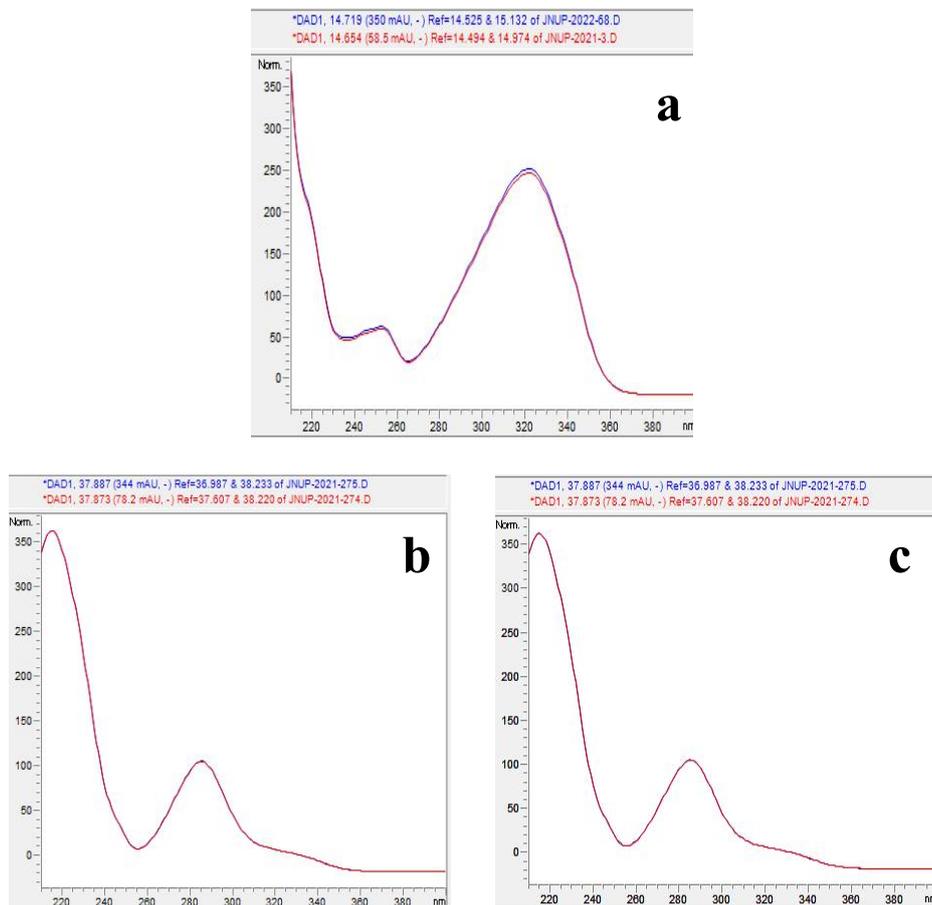
HPLC를 통한 제주백서향의 부위별 성분 패턴을 식물 부위별 추출물(Figure 7)과 제주백서향 잎 MeOH 추출물의 분획물(Figure 8)에 나타내었다. 식물 부위별 추출물은 유의하게 다른 프로파일을 보였다. 꽃과 꽃봉오리에서는 특징적으로 15분대 피크(a)가 나타났으며 UV spectrum 비교 결과 daphnetin과 유사한 coumarin계열의 배당체일 것이라는 정보를 얻을 수 있었고 가지와 뿌리에서는 26분대(b) 피크, 35분대 피크(c)가 특징적으로 나타났으며, 기존 문헌 보고와 UV spectrum 패턴으로 daphnodorin A와 C일 것으로 예상된다<sup>8</sup>. a, b, c 피크의 UV spectrum에 대한 정보를 Figure 9에 나타내었다



**Figure 7.** HPLC profiles of *D. jejuensis* plant parts extract in 280nm; standard mix 2(daphnin, daphnetin)(A), leaves extract(B), branch extract(C), root extract(D), flower extract(E) and flower bud extract(F).



**Figure 8.** HPLC profiles of *D. jejuensis* fractions at 280 nm; standard mix-2(A), hexane fraction(B), methylene chloride fraction(C), ethyl acetate fraction(D), butanol fraction(E), water fraction(F).



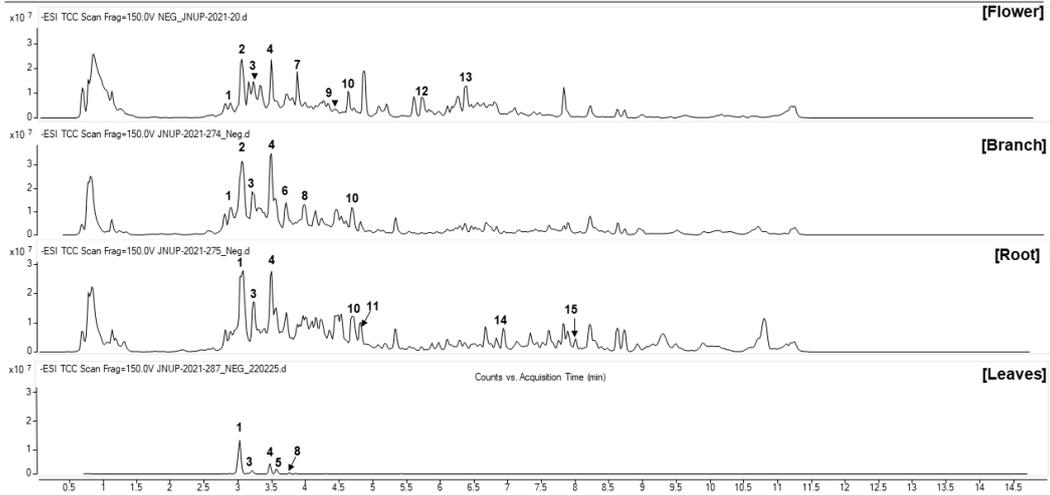
**Figure 9.** UV spectrum of unidentified peaks in HPLC. UV spectrum of flower and flower bud extract's common peak in 15 min(a). UV spectrum of branch and root extract's common peak in 26 min(b), 35 min(c).

## 2) UHPLC-Q-ToF MS/MS를 이용한 제주백서향의 부위별 성분패턴 분석

*Daphne* 속 식물에서 이미 알려진 화합물의 UHPLC-Q-ToF MS/MS mass 값을 기반으로 구축한 데이터베이스와 실제 얻은 데이터를 비교한 결과는 Figure 10에 표시하였다. 꽃 추출물에서 daphnetin 8-glucoside, daphnin, daphnetin, umbelliferone, daphnodorin C/A, apigenin, marinolic acid를 잠정적으로 동정할 수 있었고 가지 추출물에서 daphnetin 8-glucoside, daphnin, daphnetin, daphnolin, daphnodorin B/I, daphnodorin A/D 를, 뿌리 추출물에서 daphnin, daphnetin, daphnodorin A/C, daphnoretin, gnidicin, gnidilatidin을, 잎 추출물에서 daphnetin, rutin, daphnin, luteolin-7-glucoside, daphnolin을 잠정적으로 동정할 수 있었다.

이와 같은 결과는 백서향 부위별 추출물의 모든 HPLC 프로파일에서 daphnin과 daphnetin이 확인되었고, 각 부위별 추출물이 유의하게 다른 HPLC 프로파일을 보였다는 결과의 신뢰성을 뒷받침한다.

**Figure 10.** UHPLC-Q-ToF MS/MS chromatogram of *D. jejudensis* plant parts



**Figure 10.** UHPLC-Q-ToF-MS/MS profile of plant part extract of *D. jejudensis*; daphnetin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside(1), daphnin(2), rutin(3), daphnetin(4), luteolin-7-glucoside(5), daphnodorin B/I(6), umbelliferone(7), daphnolin(8), daphnodorin A/C(9), daphnodorin A/C(10), daphnoretin(11), marinolic acid(12), 3,4,5-Tri(2,3-dihydroxypropoxy)benzoic acid dodecyl ester(13), gnidicin(14), gnidil atidin(15).

## 2. HPLC-DAD를 통한 월별 제주백서향 잎 추출물에서의 주요 화합물 정량

### 1) HPLC-DAD를 이용한 daphnin정량

제주백서향 월별 잎 분석용 추출물의 daphnin의 함량을 계산하기 위하여 6개의 농도(1000  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 그리고 0.6  $\mu\text{g/mL}$ )에 대한 검량선을 구한 결과를 Figure 11에 나타내었다. daphnin 검량선은  $y = 0.8102x - 2.4681$  였고  $R^2$  값은 0.9977로 신뢰할 수 있는 수치를 보였다(Figure 11 및 Table 7). 모든 제주백서향 잎 월별 추출물의 daphnin 함량은 검량선 안의 범주에서 확인되었다.

제주백서향 잎 월별 daphnin의 함량은 5월 잎이 추출물  $636.8 \pm 2.33 \mu\text{g/g}$  Dried weight(DW) 로 가장 높았고 6월( $419.6 \pm 5.00 \mu\text{g/g DW}$ ), 8월( $317.8 \pm 2.08 \mu\text{g/g DW}$ ), 9월( $305.6 \pm 1.98 \mu\text{g/g DW}$ ), 11월( $284.0 \pm 0.41 \mu\text{g/g DW}$ ), 10월( $225.1 \pm 4.46 \mu\text{g/g DW}$ ), 2월( $185.5 \pm 3.40 \mu\text{g/DW}$ ), 4월( $160.8 \pm 3.06 \mu\text{g/g DW}$ ), 7월( $139.8 \pm 1.34 \mu\text{g/g DW}$ ), 1월( $133.0 \pm 2.46 \mu\text{g/g DW}$ ), 3월( $126.0 \pm 4.28 \mu\text{g/g DW}$ ) 그리고 12월( $70.2 \pm 2.53 \mu\text{g/g DW}$ ) 순으로 높게 나타났다(Table 9).

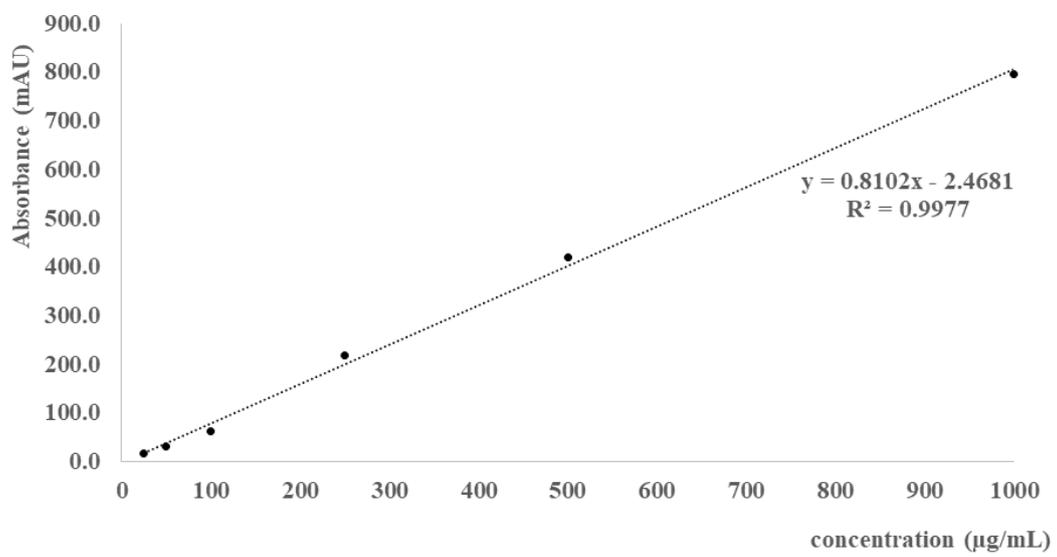


Figure 11. Calibration curve of daphnin standard solution

**Table 7.**

HPLC calibration curve of daphnin in six concentration ranges.

concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD(%)	calibration curve	$R^2$
25	0.8		
50	0.6		
100	1.1	$y =$	0.9977
250	2.0	0.8102x	
500	1.4	- 2.4681	
1000	0.2		

## 2) HPLC-DAD를 이용한 daphnetin정량

제주백서향 월별 잎 분석용 추출물의 daphnetin의 함량을 계산하기 위하여 7개의 농도(1000  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  그리고 10  $\mu\text{g/mL}$ )에 대한 검량선을 구한 결과를 Figure 12에 나타내었다. daphnetin 검량선은  $y = 1.6069x + 8.6374$  였고  $R^2$  값은 0.9998로 신뢰할 수 있는 수치를 보였다(Figure 12 및 Table 8).

모든 제주백서향 잎 월별 추출물의 daphnetin 함량은 검량선 안의 범주에서 확인되었다. 제주백서향 잎 월별 daphnetin의 함량은 10월 잎 추출물이  $143.1 \pm 5.67 \mu\text{g/g DW}$ 으로 가장 높았고 9월( $111.1 \pm 1.49 \mu\text{g/g DW}$ ), 3월( $101.2 \pm 4.46 \mu\text{g/g DW}$ ), 8월( $69.0 \pm 3.16 \mu\text{g/g DW}$ ), 2월( $62.2 \pm 6.13 \mu\text{g/g DW}$ ), 4월( $54.3 \pm 1.45 \mu\text{g/g DW}$ ), 5월( $50.8 \pm 5.27 \mu\text{g/g DW}$ ), 6월( $40.0 \pm 9.84 \mu\text{g/g DW}$ ), 11월( $32.9 \pm 1.07 \mu\text{g/g DW}$ ), 7월( $31.1 \pm 3.14 \mu\text{g/g DW}$ ), 1월( $8.2 \pm 0.72 \mu\text{g/g DW}$ ) 그리고 12월( $62.2 \pm 1.17 \mu\text{g/g DW}$ ) 순으로 높게 나타났다 (Table 9).

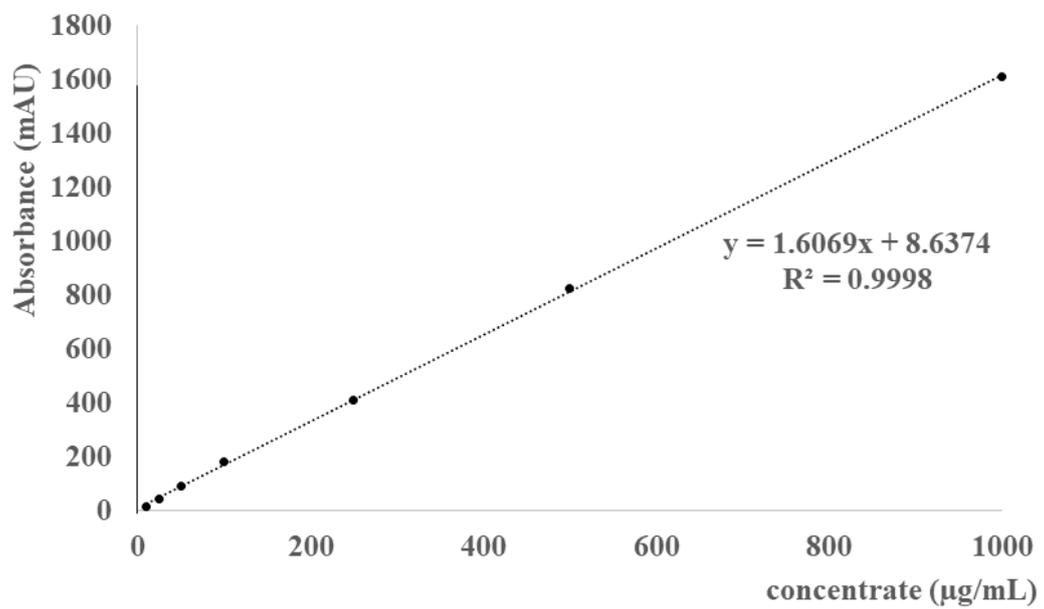


Figure 12. Calibration curve of daphnetin standard solution in seven concentration.

**Table 8.**

HPLC calibration curve of daphnetin in seven concentration ranges.

concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD(%)	calibration curve	$R^2$
10	6.7		
25	9.1		
50	8.3		
100	7.6	$y =$ $1.6069x$	0.9998
250	8.5	$+ 8.6374$	
500	6.5		
1000	7.6		

**Table 9.**

HPLC Quantitative analysis of main compounds in *D. jejuensis* monthly leaves sample.

Month	daphnin	daphnetin
	$\mu\text{g/g DW extract}$	$\mu\text{g/g DW extract}$
1	133.0 $\pm$ 2.46	8.2 $\pm$ 0.72
2	185.5 $\pm$ 3.40	62.2 $\pm$ 6.13
3	126.0 $\pm$ 4.28	101.2 $\pm$ 4.46
4	160.8 $\pm$ 3.06	54.3 $\pm$ 1.45
5	636.8 $\pm$ 2.33	50.8 $\pm$ 5.27
6	419.6 $\pm$ 5.00	40.0 $\pm$ 9.84
7	139.8 $\pm$ 1.34	31.1 $\pm$ 3.14
8	317.8 $\pm$ 2.08	69.0 $\pm$ 3.16
9	305.6 $\pm$ 1.98	111.1 $\pm$ 1.49
10	225.1 $\pm$ 4.46	143.1 $\pm$ 5.68
11	284.0 $\pm$ 0.41	32.9 $\pm$ 1.07
12	70.2 $\pm$ 2.53	62.2 $\pm$ 1.17

\*Data were expressed as amount g of compound in 1 g of dried leaf weight.

### 3. 생리활성 평가 : 항산화 효과

#### 1) DPPH radical scavenging activity

*D. jejuensis* 식물 추출물 부위별 항산화능력을 수치로 표현한 값을 table 10에, 계절별 잎 추출물의 항산화능력을 table 11에, 추출물 분획별 항산화능력을 Table 12에 각각 표현하였다. 식물 부위별 추출물의 DPPH radical scavenging activity 50% inhibition concentrate(IC<sub>50</sub>)값을 구한 결과는 항산화능이 높은 순서대로 꽃봉오리(32.3 ± 0.9 µg/mL), 꽃(47.3 ± 2.8 µg/mL), 가지(93.3 ± 1.9 µg/mL), 잎(144.8 ± 3.2 µg/mL) 그리고 뿌리(153.8 ± 1.3 µg/mL)이다. 표준물질로 사용한 BHT의 IC<sub>50</sub> 값은 51.0 ± 1.5 µg/mL, LAA의 IC<sub>50</sub> 값은 6.9 ± 2.2 µg/mL로 *D. jejuensis*의 꽃봉오리, 꽃은 positive control인 BHT보다 훨씬 높은 항산화능력을 가졌다.

계절별 제주백서향 잎 추출물의 항산화 활성 결과는 봄에 채집된 잎의 IC<sub>50</sub>이 7.81 ± 0.9 µg/mL 로 가장 높았고, 여름(13.4 ± 1.7 µg/mL), 가을(18.6 ± 2.3 µg/mL), 겨울(41.6 ± 0.3 µg/mL) 순으로 항산화능이 높았다.

*D. jejuensis*의 분획별 항산화능을 확인한 결과, hexane 분획에서는 유의미한 항산화능력을 확인할 수 없었지만 ethyl acetate 분획에서는 IC<sub>50</sub> 값이 7.8 ± 0.9 µg/mL로, 가장 높은 항산화능을 보였다. 그 뒤로는 methylene chloride 분획(39.5 ± 0.09 µg/mL), butanol 분획(127.7 ± 0.6 µg/mL) 그리고 water 분획(149.9 ± 0.1 µg/mL) 순으로 높은 항산화 활성을 보였다.

이전에 연구된 *D. sericea* 의 개화기 지상부 추출물의 DPPH radical scavenging activity의 IC<sub>50</sub>과 *D. jejuensis*의 IC<sub>50</sub>을 비교하였을 때, *D. sericea* 의 IC<sub>50</sub>값은 506.8 µg/mL, *D. jejuensis*의 IC<sub>50</sub> 값은 47.3 µg/mL으로 *D. jejuensis* 꽃 추출물이 *D. sericea*의 꽃 추출물보다 훨씬 높은 항산화능을 가진다는 것을 알 수 있었다<sup>1</sup>.

## 2) ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity

*D. jejuensis* 부위별 methanol 추출물의 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity 를 Table 10 에 나타내었다. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity 는 꽃 봉오리가  $635.0 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$  로 가장 높은 항산화능을 보였다. 그 뒤로, 꽃 ( $1135.0 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ ), 가지( $1531.4 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ ), 뿌리( $1540.0 \pm 22.2 \mu\text{g/mL}$ ), 잎( $2977.6 \pm 2.2 \mu\text{g/mL}$ ) 순으로 높은 항산화 활성을 보였다.

또한 제주백서향 잎을 계절별로 채집하여 항산화 활성을 본 결과는 table 11 에 나타내었다. DPPH 결과와 마찬가지로 봄에 채집된 잎 추출물이  $1.9692 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$  의 IC<sub>50</sub> 으로 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 그 뒤로는 여름 ( $2487.9 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$ ), 가을( $2591.5 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$ ), 겨울( $4901.4 \pm 2.2 \mu\text{g/mL}$ ) 순으로 높은 항산화능력을 보였다.

분획물별 항산화능을 측정한 결과, DPPH 의 결과와 마찬가지로 hexane 분획에서는 유의미한 결과를 도출하지 못하였다. Ethyl acetate 분획에서  $402.0 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$  의 IC<sub>50</sub> 값으로 가장 높은 항산화능을 보였고, methylene chloride 분획( $454.0 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ ), butanol 분획( $1135.0 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$ ), water 분획( $2063.0 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ )이 뒤를 따랐다. 이와 같은 정보를 table 12 에 나타내었다.

ABTS<sup>+</sup> 실험에서 *D. jejuensis* 의 부위별 추출물의 항산화능은 기존 연구된 *D. kiusiana* 부위별 Methanol 75% 추출물의 DPPH radical scavenging activity 가 잎, 뿌리, 가지 순으로 많았다는 기존의 연구 결과<sup>3</sup>와 *D. mucronate* Royle 의 methanol 잎 추출물에서  $75 \pm 0.55 \%$  의 항산화 능력을 가진다<sup>32</sup> 는 보고와는 다른 양상을 띤다. 또한 이 실험결과는 이전의 *D. kiusiana* 부위별 methanol 75% 추출물의 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity 가 잎, 뿌리, 가지 순으로 높았다는 연구 결과<sup>5</sup> 와 *D. mucronate* Royle 의 methanol 잎 추출물에서 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity 의 결과가 72% 였음을 밝힌 연구<sup>32</sup> 가 서로 비슷한 반면 *D. jejuensis* 의 메탄올 잎 추출물과는 다른 양상을 보였다. 또한 *D. sericea* 의 methanol 꽃 추출물의 ABTS<sup>+</sup>

radical scavenging  $IC_{50}$  값이 11.4  $\mu\text{g/mL}$  의 값으로 나온 것에 비해 *D. jejudonesis* 꽃 혹은 꽃봉오리 추출물의  $ABTS^+$  radical scavenging activity  $IC_{50}$  값이 각각 635.0  $\mu\text{g/mL}$ , 1134.9  $\mu\text{g/mL}$  값을 가져 기존의 연구와 상반된 결과를 나타냈다<sup>1</sup>. DPPH radical scavenging activity 와  $ABTS^+$  radical scavenging activity 는 실험물질 간의 수치 차이를 보였지만 같은 순서로 산화스트레스를 저해한다는 결과를 얻었다.

식물 부위별 추출물에서 두 실험 모두 제주백서향 꽃봉오리의 항산화능이 가장 높게 평가되었고, 계절별 추출물의 결과에서 또한 항산화능은 봄, 여름, 가을, 겨울 순서로 높은 저해능을 가진다는 결과를 얻었다.

제주백서향 분획물의 DPPH radical scavenging activity 및  $ABTS^+$  radical scavenging activity 항산화능을 측정한 결과 hexane 분획층에서는 두 실험 모두 유의미한 항산화능을 확인 할 수 없었다. 하지만 두 실험 모두 ethyl acetate 분획에서 제일 높은 항산화능을 보였으며 DPPH radical scavenging activity 에선 ethyl acetate 분획, water 분획, butanol 분획 순으로 항산화능이 높았고  $ABTS^+$  radical scavenging activity 에서 ethyl acetate 분획, butanol 분획, water 분획 순으로 항산화능이 높게 나타났다.

꽃봉오리와 봄에 채집된 잎 추출물 및 ethyl acetate 분획에서 높은 항산화능을 보였다. 이는 항산화능력을 가진 daphnin 의 함량이 높게 들어있는 정량 결과(Table 9) 와 비슷한 경향을 보인다. 따라서 daphnin 의 함량이 높을수록 항산화 효능 높은 결과값을 가진다고 판단할 수 있다.

### 3) Total flavonoid contents

Total flavonoid contents(TFC)의 결과값을 Table 13에 나타내었다. TFC는 꽃봉오리( $204.5 \pm 3.8$  mg QE/g DW), 꽃( $126.4 \pm 0.1$  mg QE/g DW), 잎( $68.1 \pm 1$  mg QE/g DW), 뿌리( $42.5 \pm 3.6$  mg QE/g DW), 그리고 가지( $22.2 \pm 2.8$  mg QE/g DW) 순으로 높았다.

계절별 제주백서향 잎 추출물의 항산화능을 평가한 결과, 제주백서향 잎은 여름에  $21.1 \pm 2.4$  mg QE/g DW로 가장 높았고 가을( $18.9 \pm 2.0$  mg QE/g DW), 겨울( $17.2 \pm 1.0$  mg QE/g DW), 봄( $14.8 \pm 2.2$  mg QE/g DW) 순으로 높은 것으로 나타났다.

분획별 항산화능 실험 결과로는 methylene chloride 분획에서  $387.7 \pm 0.01$  mg QE/g DW로 가장 높은 flavonoid 함량을 보였고 ethyl acetate 분획( $364.8 \pm 0.01$  mg QE/g DW), hexane 분획( $330.2 \pm 0.01$  mg QE/g DW), butanol 분획( $128.4 \pm 0.08$  mg QE/g DW), water 분획( $40.5 \pm 0.01$  mg QE/g DW)가 순서대로 높은 항산화능을 보였다.

*D. jejudoensis* 잎의 TFC은 *D. gnidium* 잎 추출물의 antioxidant activity를 확인한 Chaabane Fadwa, (2012)<sup>33</sup>의 값과 비슷한 값을 보였다. 또한 같은 농도의 *D. mucronata* 메탄올 잎 추출물에서 TFC가  $61 \pm 0.05$  mg/g QE DW의 값을 정량한 기존의 문헌<sup>33</sup>에 따라 *D. jejudoensis*의 잎이 다른 백서향속 식물들과 비슷한 수준의 total flavonoid contents를 가지고 있음을 알 수 있었다.

*D. sericea*와 *D. gnidioides*의 methanol 추출물의 TFC를 확인한 Tougur, T et al.(2018)<sup>34</sup>의 결과 *D. sericea*에서는  $121.3 \pm 19.7$  mg QE/g DW, *D. gnidioides*에서는  $244.5 \pm 19.5$  mg QE/g DW의 정량값을 가졌다는 결과와 비교하였을 때 *D. jejudoensis*의 methanol 추출물의 TFC 값이 월등히 높게 나왔다.

#### 4) Total phenolic contents(TPC)

*D. jejudoensis* 식물 부위별 추출물의 Total phenolic contents(TPC) 결과를 Table 13에 나타내었다. TPC는 꽃( $126.4 \pm 0.8$  mg GAE/g DW), 꽃봉오리( $117.5 \pm 0.9$  mg GAE/g DW), 뿌리( $109.8 \pm 1.7$  mg GAE/g DW), 가지( $83.0 \pm 0.8$  mg GAE/g DW), 그리고 잎( $63.6 \pm 1.6$  mg GAE/g DW) 순으로 높았다.

추출물 분획별 total phenolic contents 정량값은 Table 15에 나타내었다. 분획별 total phenolic contents는 hexane 분획에서  $76.8 \pm 0.8$  mg GAE/g DW이 가장 높은 값을 보였고 methylene chloride 분획( $65.7 \pm 1.0$  mg GAE/g DW), butanol 분획( $61.2 \pm 1.7$  mg GAE/g DW), ethyl acetate 분획( $46.8 \pm 0.8$  mg GAE/g DW), 그리고 water 분획( $33.3 \pm 1.7$  mg GAE/g DW) 순으로 높은 함량을 보였다.

Total phenolic contents는 *D. gnidium* 잎 추출물의 antioxidant activity를 확인한 기존 문헌<sup>32</sup>과 비슷한 gallic acid 당량을 보였다. 또한 *D. mucronata* 잎 추출물의 TPC가 61 mg/GAE g의 값을 보인 기존의 문헌과 비슷한 양상을 보였다<sup>33</sup>. 하지만 *D. kiusiana* 75% 메탄올의 부위별 추출물에서 잎( $43.59$  mg GAE/g DW), 뿌리( $36.94$  mg GAE/g DW), 줄기( $34.37$  mg GAE/g DW) 순으로 phenolic contents의 함량이 높았다는 연구결과와 상반되는 결과를 보인다<sup>3</sup>.

또한 최근 *D. sericea* 과 *D. gnidioides*의 phenolic contents에 대한 연구결과에서, *D. sericea*에선  $602.4$  mg GAE/g DW의 TPC 값을 가지고 *D. gnidioides*에선  $1219.3$  mg GAE/g DW를 가진다는 결과가 있다<sup>34</sup>.

## 5) Ferric reducing antioxidant power

*D. jejudoensis* 의 항산화능을 FRAP assay 로 확인한 결과, 잎( $957.0 \pm 0.3$  mg TE/g DW), 꽃봉오리( $948.1 \pm 0.9$  mg TE/g DW), 꽃( $919.0 \pm 1.0$  mg TE/g DW), 가지( $374.1 \pm 0.2$  mg TE/g DW), 그리고 뿌리( $291.0 \pm 0.6$  mg TE/g DW) 순으로 높은 항산화능을 보였다(Table 13). 계절별 항산화능 변화를 FRAP 으로 확인한 결과로는 봄(5 월)에 채집한 잎 추출물의 항산화 능력이  $489.6 \pm 0.04$  mg TE/g DW 로 가장 높게 나타났다. 봄 다음으로 여름( $415.0 \pm 0.09$  mg TE/g DW), 가을( $401.8 \pm 0.05$  mg TE/g DW), 겨울( $330.9 \pm 0.06$  mg TE/g DW) 순으로 높은 항산화능을 보였다.

분획별 항산화능을 확인한 결과, hexane 분획에서  $954.4 \pm 0.04$  mg TE/g DW 로 가장 높은 항산화능을 보였고 ethyl acetate( $937.8 \pm 0.05$  mg TE/g DW), butanol( $887.4 \pm 0.06$  mg TE/g DW), water( $562.4 \pm 0.01$  mg TE/g DW), methyl chloride( $169.9 \pm 0.09$  mg TE/g DW) 순으로 높은 항산화능을 보였다 (Table 15).

이는 *D. kiusiana* 의 메탄올 추출물의 Ferric reducing antioxidant power 가 ABTS<sup>+</sup> 및 DPPH radical scavenging activity 와 달리 유의하게 항산화능을 보이지 않았다는 기존의 연구<sup>3</sup> 와 차이가 있다.

*D. jejudoensis* 식물 부위별 추출물의 다섯가지 항산화능력 평가 실험에서 꽃봉오리 추출물이 가장 강한 항산화능을 보였고 계절별 추출물의 항산화능력 평가에서는 DPPH 와 ABTS, TPC, FRAP 에서는 봄에 채집한 잎의 추출물이 가장 높은 항산화능력을 보였지만 TFC 에서는 여름(7 월)에 채집한 추출물의 잎이 가장 높은 항산화능력을 보였다. 제주백서향 잎 추출물의 분획별 항산화능을 평가한 결과, DPPH 와 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity, TPC, FRAP 에서 ethyl acetate 가 공통적으로 가장 높은 항산화능을 보였으나 TFC 에서는 methyl chloride 분획이 가장 높은 값을 보였다.

*D. kiusiana* 의 추출용매 및 추출부위에 따른 항산화능력을 분석한 논문에서 Total phenolic contents 가 가장 높은 추출조건 및 부위인 75%

methanol 잎 추출물이 가장 높은 항산화능을 가진다는 결과를 통하여 항산화능은 TPC 와 가장 근접하다는 결론을 냈다<sup>5</sup>. 하지만 본 연구에서 *D. jejuensis* 의 부위별 항산화능을 다섯가지 항산화 실험을 통하여 분석한 결과, TPC 와 FRAP assay 에서는 gallic acid 및 Trolox 의 함량이 높은 꽃봉오리 추출물의 항산화 능력이 높은 결과를 보였지만 그 외 DPPH, ABTS, TFC assay 에서는 꽃 추출물의 항산화 능력이 높았다. 이와 같은 결과는 이전의 문헌에서 언급했던 추출 용매의 극성도에 따라 추출되는 식물화합물 계열 및 양이 달라지기 때문일 가능성<sup>3</sup> 과 추출방법의 영향일 가능성이 있다<sup>1,32,35</sup>.

**Table 10.**

Radical scavenging activity of *D. jejuensis* plant part by DPPH and ABTS<sup>+</sup>

	DPPH IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (μg/mL)
flower bud	32.3 ± 0.9	635.0 ± 3.4
flower	43.7 ± 2.8	1135.0 ± 1.6
branch	93.3 ± 1.9	1531.4 ± 0.8
root	153.8 ± 1.3	1540.0 ± 2.2
leaf	144.8 ± 3.2	2977.6 ± 2.2
LAA	6.9 ± 2.2	-
BHT	51.0 ± 1.5	-
Trolox	-	2.5 ± 0.1

<sup>1)</sup> DPPH 50% inhibition concentration. <sup>2)</sup> ABTS<sup>+</sup> 50% inhibition concentration

**Table 11.**

Radical scavenging activity of *D. jejuensis* seasonal leaf extracts by DPPH and ABTS<sup>+</sup>

	DPPH IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (µg/mL)
Spring(May)	7.81 ± 0.9	1969.2 ± 2.7
Summer(Jul)	13.4 ± 1.7	2487.9 ± 2.5
Fall(Oct)	18.6 ± 2.3	2591.5 ± 2.3
Winter(Feb)	41.6 ± 0.3	4901.4 ± 2.2
LAA	7.8 ± 0.9	-
BHT	70.6 ± 1.6	-
Trolox	-	70.6 ± 2.6

<sup>1)</sup> DPPH 50% inhibition concentration. <sup>2)</sup> ABTS<sup>+</sup> 50% inhibition concentration

**Table 12.**

Radical scavenging activity of *D. jejudensis* fractions by DPPH and ABTS<sup>+</sup>

	DPPH IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)	ABTS <sup>+</sup> IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (µg/mL)
HE fr.	10000>	10000>
MC fr.	39.5 ± 0.9	454.0 ± 0.9
EA fr.	7.9 ± 2.3	402.0 ± 0.5
BuOH fr.	127.5 ± 0.6	1135.0 ± 1.0
Water fr.	49.9 ± 0.1	2063.0 ± 0.8
LAA	7.3 ± 0.8	-
BHT	85.6 ± 2.6	-
Trolox	-	3.5 ± 0.2

<sup>1)</sup> DPPH 50% inhibition concentration. <sup>2)</sup> ABTS<sup>+</sup> 50% inhibition concentration. HE; hexane fraction, MC; methylene chloride fraction, EA; ethyl acetate fraction, BuOH; butanol fraction, Water; water fraction from *D. jejudensis* methanol extract of leaf.

**Table 13.**

Antioxidant activity of *D. jejudoensis* plant parts extract as determined by TFC, TPC, FRAP

Extract	mg QE/g DW <sup>1)</sup>	mg GAE/g DW <sup>2)</sup>	$\mu$ g TE/mL DW <sup>3)</sup>
	TFC	TPC	FRAP
flower bud	113.8 $\pm$ 13.4	65.7 $\pm$ 1.0	246.1 $\pm$ 0.8
flower	103.7 $\pm$ 1.7	76.8 $\pm$ 0.8	886.9 $\pm$ 0.8
branch	20.7 $\pm$ 0.4	46.8 $\pm$ 0.8	234.4 $\pm$ 0.4
root	9.1 $\pm$ 1.5	61.2 $\pm$ 1.7	190.2 $\pm$ 0.9
leaf	34.0 $\pm$ 5.7	33.3 $\pm$ 1.7	440.6 $\pm$ 0.5

<sup>1)</sup>mg QE/g DW is quercetin equivalent/mg Dried weight of extract. <sup>2)</sup>mg GAE/g DW is gallic acid equivalent/mg Dried weight of extract. <sup>3)</sup> $\mu$ g TE/mL DW is trolox equivalent/mL of extract. Data were represented as the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations.

**Table 14.**

Antioxidant activity of *D. jejudoensis* seasonal leaf extract as determined by TFC, TPC, FRAP

Extract	mg QE/g DW <sup>1)</sup>	mg GAE/g DW <sup>2)</sup>	μg TE/mL DW <sup>3)</sup>
	TFC	TPC	FRAP
Spring(May)	14.8 ± 2.2	114.3 ± 1.6	489.6 ± 0.04
Summer(Jul)	21.1 ± 2.4	70.7 ± 1.3	415.0 ± 0.09
Fall(Oct)	18.0 ± 2.0	84.7 ± 1.3	401.8 ± 0.05
Winter(Feb)	17.2 ± 1.0	57.6 ± 1.0	330.9 ± 0.06

<sup>1)</sup>mg QE/g DW is quercetin equivalent/mg Dried weight of extract. <sup>2)</sup>mg GAE/g DW is gallic acid equivalent/mg Dried weight of extract. <sup>3)</sup>μg TE/mL DW is trolox equivalent/mL of extract. Data were represented as the mean ± SD of triplicate determinations.

**Table 15.**

Antioxidant activity of *D. jejudensis* fractions extract as determined by TFC, TPC, FRAP.

Fraction	mg QE/g DW <sup>1)</sup>	mg GAE/g DW <sup>2)</sup>	μg TE/mL DW <sup>3)</sup>
	TFC	TPC	FRAP
HE	330.2 ± 0.01	76.8 ± 0.8	246.1 ± 0.8
MC	387.7 ± 0.01	65.7 ± 1.0	886.9 ± 0.8
EA	364.8 ± 0.01	46.8 ± 0.8	234.4 ± 0.4
BuOH	128.4 ± 0.08	61.2 ± 1.7	190.2 ± 0.9
Water	40.5 ± 0.01	33.3 ± 1.7	440.6 ± 0.5

<sup>1)</sup>mg QE/g DW is quercetin equivalent/mg Dried weight of extract. <sup>2)</sup>mg GAE/g DW is gallic acid equivalent/mg Dried weight of extract. <sup>3)</sup>μg TE/mL DW is trolox equivalent/mL of extract. Data were represented as the mean ± SD of triplicate determinations. HE; hexane fraction, MC; methylene chloride fraction, EA; ethyl acetate fraction, BuOH; butanol fraction, Water; water fraction from *D. jejudensis* methanol extract of leaf

## V. 결론

*D. jejuensis* 의 잎에서 분리한 daphnin 과 daphnetin 은 항암, 항염증 그리고 항산화에 도움을 주는 화합물로, 팔꽃나무과 백서향속 식물에서 분리 보고되었다. 메탄올 추출물의 다섯가지 분획층인 hexane, methyl chloride, ethyl acetate, butanol 그리고 water 분획 중 water 분획에서 daphnin 을, ethyl acetate 분획에서 daphnetin 을 분리하였다.

분리한 화합물은 표준품을 구매하여 HPLC 의 머무름 시간 및 UV spectrum 이 일치함을 확인하여 동정하였다. HPLC 를 이용하여 *D. jejuensis* 의 식물 부위별 추출물 프로파일을 확인한 결과, 식물 부위별로 유의하게 다른 프로파일 형태를 보였으나, 공통적으로 daphnin 과 daphnetin 이 주요 화합물임을 확인하였다.

*D. jejuensis* 의 daphnin 및 daphnetin 을 제외한 식물 부위별 식물화학적 분석을 위하여 UHPLC-Q-ToF-MS/MS 를 실시하였다. 꽃 추출물의 Q-ToF MS/MS 결과 daphnetin 8-O-D-glucopyranoside, daphnin, daphnetin, umbelliferone, daphnodorin A or C, apigenin, marinolic acid 를 잠정 동정할 수 있었고 가지 추출물에서 daphnetin 8-O-D-glucopyranoside, daphnin, daphnetin, daphnolin, daphnodorin B/I, daphnodorin A/C 를, 뿌리 추출물에서 daphnin, daphnetin, daphnodorin A/C, daphnoretin, gnidicin, gnidilatidin 을 잠정동정 하였다. 잎 추출물에서는 daphnin, daphnetin, rutin, luteolin 7-glucoside, daphnolin 을 잠정적으로 동정하였다.

제주백서향 잎의 월별 추출물로 주요 화합물인 daphnin 과 daphnetin 의 정량값을 계산한 결과, daphnin 은 5 월에서 가장 높은 함량을 보였다. 순서대로 5 월, 6 월, 8 월, 9 월, 11 월, 10 월, 7 월, 2 월, 4 월, 1 월, 3 월, 12 월 순으로 높은 daphnin 함량을 보였다.

Daphnetin 은 순서대로 10 월, 9 월, 3 월, 8 월, 2 월, 4 월, 5 월, 6 월, 11 월, 7 월, 1 월, 12 월 순으로 높은 함량을 보였다.

꽃과 꽃봉오리의 HPLC 결과는 모든 피크들의 머무름 시간이 동일하였으나 daphnodorin C/A 로 잠정적으로 동정된 peak 가 꽃봉오리에서

더 큰 면적값을 가졌다. 이는 꽃보다 높은 꽃봉오리 Total Flavonoid Contents 결과와 상관관계가 있다.

*D. jejuensis* 식물 부위별 추출물의 다섯가지 항산화능력 평가 실험에서 꽃봉오리 추출물이 가장 강한 항산화능을 보였고 계절별 추출물의 항산화능력 평가 DPPH 와 ABTS, TPC, FRAP 에서는 봄에 채집한 잎의 추출물이 가장 높은 항산화능력을 보였지만 TFC 에서는 여름(7월)에 채집한 추출물의 잎이 가장 높은 항산화능력을 보였다. 제주백서향 잎 추출물의 분획별 항산화능을 평가한 결과, DPPH 와 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity, TPC, FRAP 에서 ethyl acetate 분획이 공통적으로 가장 높은 항산화능을 보였으나 TFC 에서는 methylene chloride 분획이 가장 높은 값을 보였다.

이는 부위별 주요 화합물 정량에서 꽃봉오리 추출물과 봄(5월)에 채집한 잎 추출물의 daphnin 함량이 높았다는 결과와 상응한다. 따라서 daphnin 및 daphnetin 의 함량이 항산화능력과 긴밀한 관계가 있다는 이전 연구결과를 뒷받침 할 수 있다<sup>1</sup>.

*D. jejuensis* 는 형태학적 차이점이 인정되어 최근 신종으로 분류되었기 때문에 성분학적, 약리학적 평가가 부족한 실정이다. *D. jejuensis* 의 식물 부위별 메탄올 추출물의 성분학적 분석과 생리학적 평가를 동시에 진행한 연구는 처음이다. 따라서 이 논문에서 설명한 실험 결과는 *D. jejuensis* 의 약리학적 소재로서 가능성을 평가하는 것과 더불어 추후 연속될 연구의 방향을 잡는 데에 도움을 줄 수 있기 때문에 가치가 있다.

## 참 고 문 헌

1. Frezza C, Venditti A, De Vita D, Sciubba F, Tomai P, Franceschin M, et al. Phytochemical Analysis and Biological Activities of the Ethanolic Extract of *Daphne sericea* Vahl Flowering Aerial Parts Collected in Central Italy. *Biomolecules*. 2021;11(3):379.
2. Pan RR, Zhang CY, Li Y, Zhang BB, Zhao L, Ye Y, et al. Daphnane Diterpenoids from *Daphne genkwa* Inhibit PI3K/Akt/mTOR Signaling and Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *Journal of Natural Products*. 2020;83(4):1238-48.
3. Lee JH, Seo WT, Lim WJ, Cho KM. Phenolic contents and antioxidant activities from different tissues of Baekseohyang (*Daphne kiusiana*). *Food Science and Biotechnology*. 2011;20(3):695-702.
4. Lee MY, Park BY, Kwon OK, Yuk JE, Oh SR, Kim HS, et al. Anti-inflammatory activity of (-)-aptosimon isolated from *Daphne genkwa* in RAW264.7 cells. *International Immunopharmacol*. 2009;9(7-8):878-85.
5. Li S, Chou G, Hseu Y, Yang H, Kwan H, Yu Z. Isolation of anticancer constituents from flos genkwa (*Daphne genkwa* Sieb.et Zucc.) through bioassay-guided procedures. *Chemistry Central Journal*. 2013;7(1):159.
6. Du WJ, Yang XL, Song ZJ, Wang JY, Zhang WJ, He X, et al. Antitumor Activity of Total Flavonoids from *Daphne genkwa* in

Colorectal Cancer. *Phytotherapy Research*. 2016;30(2):323-30.

7. Can TH, Tufekci EF, Altunoglu YC, Baloglu MC, Llorent-Martínez EJ, Stefanucci A, et al. Chemical characterization, computational analysis and biological views on *Daphne gnidioides* Jaub. & Spach extracts: Can a new raw material be provided for biopharmaceutical applications? *Computational Biology Chemistry*. 2020;87:107273.
8. Ryu HW, Lee JW, Kim MO, Lee RW, Kang MJ, Kim SM, et al. Daphnodorin C isolated from the stems of *Daphne kiusiana* Miquel attenuates airway inflammation in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Phytomedicine*. 2022;96:153848.
9. Bae JY, Lee DS, Cho YK, Lee JY, Park JH, Lee SH. *Daphne jejudoensis* Attenuates LPS-Induced Inflammation by Inhibiting TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, and COX-2 Expression in Periodontal Ligament Cells. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(4).
10. Lee J-J, Oh S-H. A comparative morphological study of Thymelaeaceae in Korea. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 2017;47(3):207-21.
11. Bai Z, Liu J, Mi Y, Zhou D, Chen G, Liang D, et al. Acutissimalignan B from traditional herbal medicine *Daphne kiusiana* var. *atrocaulis* (Rehd.) F. Maekawa inhibits neuroinflammation via NF- $\kappa$ B Signaling pathway. *Phytomedicine*. 2021;84:153508.
12. Han BS, Minh NV, Choi HY, Byun JS, Kim WG. Daphnane and Phorbol Diterpenes, Anti-neuroinflammatory Compounds with Nurr1

Activation from the Roots and Stems of *Daphne genkwa*. Biological Pharmaceutical Bulletin. 2017;40(12):2205-11.

13. Nie YW, Li Y, Luo L, Zhang CY, Fan W, Gu WY, et al. Phytochemistry and Pharmacological Activities of the Diterpenoids from the Genus *Daphne*. Molecules. 2021;26(21).
14. Lee JS, Lee KH, So SK, Choi CH, Kim MY. A new species of *Daphne*(Thymelaeaceae): *D. jejuensis* M. Kim. Korean Journal of Plant Taxonomy. 2013;43(2):94-8.
15. Huyiligeqi, Dong X, Yang C, Xu G, Cao S, Fu J, et al. Chemical Constituents from *Daphne giraldii* Nitsche and Their Contents Simultaneous Determination by HPLC. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016;2016:9492368.
16. Zhang S, Zhang F, Li X, Dong W, Wen L, Wang S. Evaluation of *Daphne genkwa* diterpenes: fingerprint and quantitative analysis by high performance liquid chromatography. Phytochem Anal. 2007;18(2):91-7.
17. Otsuki K, Li W, Miura K, Asada Y, Huang L, Chen CH, et al. Isolation, Structural Elucidation, and Anti-HIV Activity of Daphnane Diterpenoids from *Daphne odora*. Journal of Natural Products. 2020;83(11):3270-7.
18. Tao Y, Su D, Li W, Cai B. Pharmacokinetic comparisons of six components from raw and vinegar-processed *Daphne genkwa* aqueous extracts following oral administration in rats by employing

- UHPLC-MS/MS approaches. *Journal Chromatography B: Analytical Technology Biomedical Life Science*. 2018;1079:34-40.
19. Javed M, Saleem A, Xaveria A, Akhtar MF. Daphnetin: A bioactive natural coumarin with diverse therapeutic potentials. *Front Pharmacol*. 2022;13:993562.
  20. Lu W, Shi Y, Wang R, Su D, Tang M, Liu Y, et al. Antioxidant Activity and Healthy Benefits of Natural Pigments in Fruits: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9).
  21. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120(4):483-95.
  22. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. 2020;94(3):651-715.
  23. Sahoo BM, Banik BK, Borah P, Jain A. Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. *Anticancer Agents Medical Chemistry*. 2022;22(2):215-22.
  24. Zheng D, Liu J, Piao H, Zhu Z, Wei R, Liu K. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1039241.
  25. Bai Z, Zhou D, Meng Q, Fang M, Chen G, Hou Y, et al. Characteristic biflavonoids from *Daphne kiusiana* var. *atrocaulis* (Rehd.) F. Maekawa. *Natural Product Research*. 2022:1-8.

26. Yang D, Xu JH, Shi RJ. Root extractive from *Daphne genkwa* benefits in wound healing of anal fistula through up-regulation of collagen genes in human skin fibroblasts. *Bioscience Reports*. 2017;37(2).
27. Baschieri A, Amorati R. Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity of Nanomaterials beyond DPPH(\*). A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(10).
28. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1999;26(9-10):1231-7.
29. Ganesh N. Sharma SKD, Nitin Sati, Jyotsana Sanadya. Anti-inflammatory Activity and Total Flavonoid Content of *Aegle marmelos* Seeds. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2011;3(3):214-8.
30. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D. (1998) Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117
31. Abeysinghe DC, Li X, Sun C, Zhang W, Zhou C, Chen K. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*. 2007;104(4):1338-44.
32. GOKHAN ZENGIN TA, ABDURRAHMAN AKTUMSEK, GOKALP OZMEN GULER and YAVUZ SELIM CAKMAK. A study on

antioxidant capacities and FATTY acid compositions of Two Daphne species from Turkey: new sources of antioxidants and essential fatty.

33. Alrahmany R, Tsopmo A. Role of carbohydrases on the release of reducing sugar, total phenolics and on antioxidant properties of oat bran. *Food Chemistry*. 2012;132(1):413-8.
34. Chaabane F, Boubaker J, Loussaif A, Neffati A, Kilani-Jaziri S, Ghedira K, et al. Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of *daphne gnidium* leaf extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12:153.
35. Moshiashvili G, Tabatadze N, Mshvildadze V. The genus Daphne: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Fitoterapia*. 2020;143:104540.