



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

비쭈기나무 가지로부터 향산화,  
미백 및 주름개선 활성 성분 규명



濟州大學校 大學院

化學科

김정은

2011年 2月

# 비쭈기나무 가지로부터 향산화, 미백 및 주름개선 활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

金 弼 浪

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

金弼浪의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

濟州大學校 大學院

2011年 2月

Identification of Constituents with  
Anti-oxidative, Whitening and Anti-wrinkle  
Properties from *Cleyera japonica* Thunb.

Jung Eun Kim  
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2011. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman, .....

Dissertation Committee, .....

Dissertation Committee, .....

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목차

List of Tables .....	iii
List of Figures .....	iii
List of Abbreviations .....	vii
Abstract .....	viii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 시약 및 기기 .....	6
2. 재료 .....	7
3. 추출, 분획 및 분리 .....	8
3-1. 비쭈기나무 가지의 추출 및 분획 .....	8
3-2. Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리 .....	9
4. 활성 실험 .....	11
4-1. ESR을 이용한 항산화 활성 실험 .....	11
4-1-1. DPPH radical scavenging activity test .....	11
4-1-2. Hydroxyl radical scavenging activity test .....	12
4-2. Tyrosinase inhibition activity test .....	13
4-3. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 .....	13
4-3-1. 세포 배양 .....	13
4-3-2. Melanogenesis 저해효과 측정 실험 .....	14
4-3-3. 세포독성 평가 실험 .....	14
4-4. Elastase inhibition activity test .....	15
III. 결과 및 고찰 .....	16
1. 화합물의 구조 결정 .....	16

1-1. Compound 1, 2, 3의 구조 동정 .....	16
1-2. Compound 4, 5, 6의 구조 동정 .....	19
1-3. Compound 7의 구조 동정 .....	24
1-4. Compound 8의 구조 동정 .....	29
1-5. Compound 9의 구조 동정 .....	32
1-6. Compound 10, 11의 구조 동정 .....	35
1-7. Compound 12의 구조 동정 .....	39
2. ESR을 이용한 항산화 활성 실험 결과 .....	42
2-1. DPPH radical scavenging activity .....	42
2-1-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical scavenging activity .....	42
2-1-2. 분리된 화합물의 DPPH radical scavenging activity .....	44
2-2. Hydroxyl radical scavenging activity .....	46
2-2-1. 추출물 및 분획물의 hydroxyl radical scavenging activity .....	46
2-2-2. 분리된 화합물의 hydroxyl radical scavenging activity .....	48
3. Tyrosinase inhibition activity .....	50
3-1. 추출물 및 분획물의 tyrosinase inhibition activity .....	50
3-2. 분리된 화합물의 tyrosinase inhibition activity .....	50
4. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 결과 .....	52
5. Elastase inhibition activity .....	53
5-1. 추출물 및 분획물의 elastase inhibition activity .....	53
5-2. 분리된 화합물의 elastase inhibition activity .....	54
IV. 요약 및 결론 .....	56
V. 참고문헌 .....	58

## List of Tables

Talbe 1. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds 1-3 .....	17
Talbe 2. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds 4-6 .....	20
Talbe 3. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound 7 .....	25
Talbe 4. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound 8 .....	30
Talbe 5. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound 9 .....	33
Table 6. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds 10 and 11 .....	36
Talbe 7. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound 12 .....	40

## List of Figures

Figure 1. Structures of anti-oxidants .....	2
Figure 2. Structures of whitening ingredients .....	3
Figure 3. Structures of anti-wrinkle ingredients .....	4
Figure 4. Picture of <i>Cleyera japonica</i> Thunb. ....	7
Figure 5. Procedure of extraction and solvent fractionation from <i>C. japonica</i> .....	8
Figure 6. Isolation procedure of compounds from <i>C. japonica</i> .....	10
Figure 7. Chemical structures of compounds 1-3 .....	16
Figure 8. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 2 .....	18
Figure 9. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 2 .....	18
Figure 10. Chemical structures of compounds 4-6 .....	19
Figure 11. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 4 .....	21
Figure 12. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 4 .....	21
Figure 13. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 5 .....	22

Figure 14. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 5 .....	22
Figure 15. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 6 .....	23
Figure 16. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 6 .....	23
Figure 17. Chemical structure of compound 7 .....	24
Figure 18. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 7 .....	26
Figure 19. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 7 .....	26
Figure 20. DEPT( $135^\circ$ ) NMR spectrum of compound 7 .....	27
Figure 21. $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY NMR spectrum of compound 7 .....	27
Figure 22. HMQC NMR spectrum of compound 7 .....	28
Figure 23. HMBC NMR spectrum of compound 7 .....	28
Figure 24. Chemical structure of compound 8 .....	29
Figure 25. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 8 .....	31
Figure 26. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 8 .....	31
Figure 27. Chemical structure of compound 9 .....	32
Figure 28. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 9 .....	34
Figure 29. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 9 .....	34
Figure 30. Chemical structures of compounds 10 and 11 .....	35
Figure 31. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 10 .....	37
Figure 32. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 10 .....	37
Figure 33. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 11 .....	38
Figure 34. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 11 .....	38
Figure 35. Chemical structure of compound 12 .....	39
Figure 36. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 12 .....	41
Figure 37. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 12 .....	41
Figure 38. ESR spectrum of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions .....	42
Figure 39. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions .....	43
Figure 40. $\text{SC}_{50}$ value of DPPH radical scavenging activities of extract	



and solvent fractions .....	43
Figure 41. ESR spectrum of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds .....	44
Figure 42. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds ..	45
Figure 43. SC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds .....	45
Figure 44. ESR spectrum of hydroxyl radical scavenging activities of extract and solvent fractions .....	46
Figure 45. Hydroxyl radical scavenging activities of extract and solvent fractions .....	47
Figure 46. SC <sub>50</sub> value of hydroxyl radical scavenging activities of extract and solvent fractions .....	47
Figure 47. ESR spectrum of hydroxyl radical scavenging activities of isolated compounds .....	48
Figure 48. Hydroxyl radical scavenging activities of isolated compounds .....	49
Figure 49. SC <sub>50</sub> value of hydroxyl radical scavenging activities of isolated compounds .....	49
Figure 50. Tyrosinase inhibition activities of extract and solvent fractions .....	50
Figure 51. Tyrosinase inhibition activity of compound <b>11</b> .....	51
Figure 52. IC <sub>50</sub> value of tyrosinase inhibition activities of compound <b>11</b> .....	51
Figure 53. Effects of extract and solvent fractions on melanin contents and cytotoxicity .....	52
Figure 54. Effects of extract and <i>n</i> -Hex, <i>n</i> -BuOH, H <sub>2</sub> O fractions on melanin contents and cytotoxicity .....	53
Figure 55. Elastase inhibition activities of extract and solvent fractions .....	54

Figure 56. Elastase inhibition activity of compound 12 ..... 55

Figure 57. IC<sub>50</sub> value of elastase inhibition activity of compound 12 .. 55



## List of Abbreviations

<i>C. japonica</i>	<i>Cleyera japonica</i> Thunb.
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
Hex	<i>n</i> -hexane
EtOAc	Ethyl acetate
BuOH	<i>n</i> -butanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
V	VLC subfraction
Fr.	Fraction
CC	Column chromatography
TLC	Thin layer chromatography
SC <sub>50</sub>	Scavenging concentration of 50%
IC <sub>50</sub>	Inhibition concentration of 50%
ESR	Electron spin resonance
NMR	Nuclear magnetic resonance
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
COSY	Correlation spectroscopy
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
2D	Two-dimensional
J	Coupling constant (Hz)
s	Singlet
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
m	Multiplet
int	Integration

## ABSTRACT

Phytochemical investigation of the ethanol extract from *Cleyera japonica* Thunb. stem resulted in the isolation of twelve constituents: catechin (1), catechin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (2), *epi*-catechin (3), taxifolin (4), taxifolin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (5), taxifolin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (6), proanthocyanidin A-1 (7), 3,5,7-trihydroxylchromone 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (8), aviculin (9), 3,3'-di-*O*-methylellagic acid (10), 3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (11) and betulinic acid (12). The structures of these compounds were confirmed by comparing their spectroscopic data to those in the literature. As far as we know, all of the compounds 1-12 were isolated for the first time from this plant.

In order to study the skin-related properties for the isolated compounds, bioactivity screenings on anti-oxidation, anti-tyrosinase, anti-melanogenesis in B16F10 melanoma cells and anti-elastase were conducted.

For the anti-oxidation tests, the compound 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 showed strong DPPH radical scavenging activities with SC<sub>50</sub> of 5.02  $\mu$ g/mL, 10.00  $\mu$ g/mL, 6.64  $\mu$ g/mL, 6.25  $\mu$ g/mL, 13.22  $\mu$ g/mL, 8.59  $\mu$ g/mL and 5.38  $\mu$ g/mL respectively, whose activities were comparable to a positive control vitamin C (SC<sub>50</sub> 4.05  $\mu$ g/mL). In addition, compound 1, 3, 4 and 7 showed strong hydroxyl radical scavenging activities with SC<sub>50</sub> of 614.91  $\mu$ g/mL, 625.42  $\mu$ g/mL, 395.81  $\mu$ g/mL and 173.87  $\mu$ g/mL respectively, whose activities were comparable to a positive control vitamin C (SC<sub>50</sub> 151.40  $\mu$ g/mL).

On the tyrosinase inhibition studies, the compound 11 (IC<sub>50</sub> 36.33  $\mu$ g/mL) showed stronger activity than arbutin (IC<sub>50</sub> 67.20  $\mu$ g/mL), a positive

control. Moreover, when tested in B16F10 melanoma cells, extract and *n*-butanol fraction inhibited the cellular melanogenesis as effectively as arbutin.

On the elastase inhibition studies, the compound **12** (IC<sub>50</sub> 17.96 µg/mL) showed stronger activity than oleanolic acid (IC<sub>50</sub> 29.62 µg/mL), a positive control.

Based on these results, *C. japonica* stem extract could be potentially applicable as anti-oxiant and/or cosmeceutical ingredient.



## I. 서론

인간의 노화 요인에는 여러 가지가 있지만, 인체 내의 다양한 질병과 더불어 활성산소가 노화 원인물질로 밝혀져 활성산소를 제거하기 위한 기능성 식품과 기능성 화장품 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>1)</sup>

생체 내에서 생성되는 다양한 활성산소는 세포 생체막의 구성물질인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 생체기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발하는 요인으로 만성기관지염, 천식 등의 기관지 질환, 위궤양 등의 소화기 질환, 국소빈혈, 동맥경화, 고혈압 등의 심장질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머병 등의 뇌 및 신경질환, 아토피성 피부염 및 여러 가지 암 등의 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 이러한 활성산소를 제거하기 위한 항산화제에는 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl gallate(PG) 등과 같은 합성 항산화제, tocopherol류, flavonoids, 탄닌류, ascorbic acid, carotenoids, glutathione, 아미노산 등과 같은 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소가 있다(Figure 1). 그런데 합성 항산화제인 BHT와 BHA 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 지금까지 널리 사용되어 왔으나, 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성 등의 문제가 제기되어 허용대상 식품이나 사용량이 엄격히 제한되고 있다.<sup>3,4)</sup> 또한 tocopherol과 ascorbic acid 같은 천연 항산화제는 안전성은 높지만 단독으로는 산화 연쇄반응 저지 능력이 낮고 가격이 비싼 단점이 있다.<sup>5)</sup> 이러한 이유로 최근에는 천연물로부터 보다 안전하고 경제적이며 효과가 뛰어난 항산화제를 분리 이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 식물유래 물질로 식물의 2차 대사산물은 자유라디칼과 활성산소의 생성을 억제하거나 제거하여 산화를 방지하기 때문에 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있다. 이 화합물은 하나 또는 둘 이상의 히드록시기로 치환된 방향족환을 가지고 있으며 자연에 대략 8000여종이 존재하며 항산화성, 항암성 등의 기능성을 가지고 있다.<sup>3)</sup> 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거

및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로 많이 활용되고 있다.<sup>6)</sup>

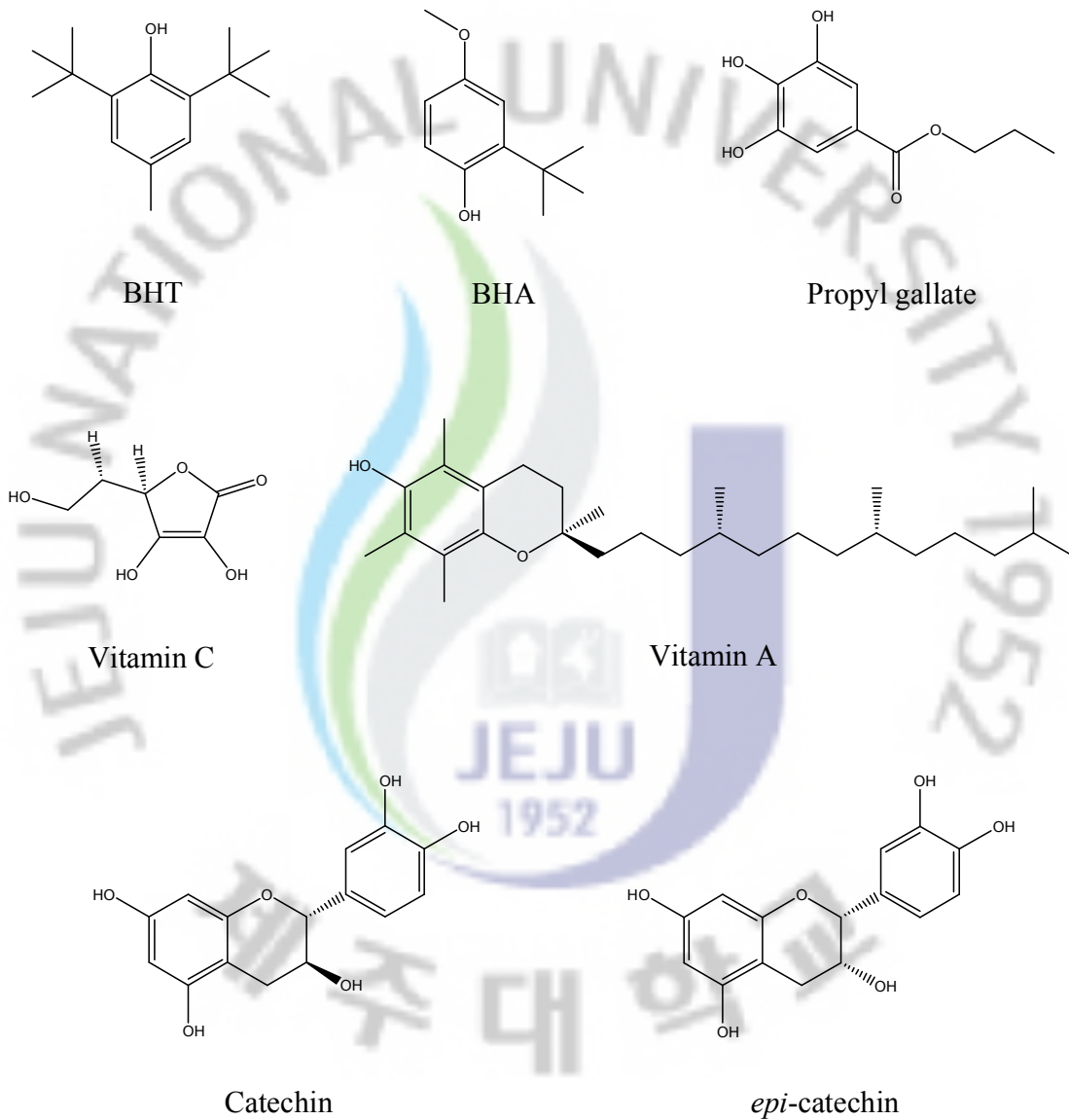


Figure 1. Structures of anti-oxidants.

Melanin은 생물체에 널리 분포되어 있는 색소로 인체에서는 표피층에 있는 melanocyte에서 합성된다. 이러한 melanin의 생합성 과정에 작용하는 주요 효소가 tyrosinase이다. Tyrosinase는 polyphenol oxidase의 일종이며 구리를 함유한 효소로써 색소 세포에서 tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)으로 변환하고 효소적 산화 반응에 의한 단계를 거쳐 dopaquinone, dopachrome으로 변환하여 melanin을 생합성한다. 세포 내 melanin이 과잉 생산되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소 침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하며<sup>2)</sup> 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup>

피부미백을 위해서는 tyrosine의 산화를 촉매하는 tyrosinase의 작용을 억제하는 물질(예, arbutin, kojic acid, 상백피 추출물, 닥나무 추출물, 감초 추출물), DOPA의 산화를 억제하는 물질(예, ascorbic acid), 각질세포를 벗겨내어 melanin 색소를 제거하는 물질(예, AHA), melanin 세포 자체를 사멸시키는 물질(예, hydroquinone), 자외선을 차단하는 물질(예, TiO<sub>2</sub>) 등이 사용되고 있다 (Figure 2).<sup>8)</sup> 그러나 arbutin, kojic acid, ascorbic acid, hydroquinone 등은 안전성과 경제성 등의 문제로 사용이 제한되고 있으므로 최근 화장품 업계에서는 안전성을 고려하여 천연소재로부터 미백 효과가 강화된 기능성 화장품에 대한 요구가 높아지고 있다.<sup>9)</sup>

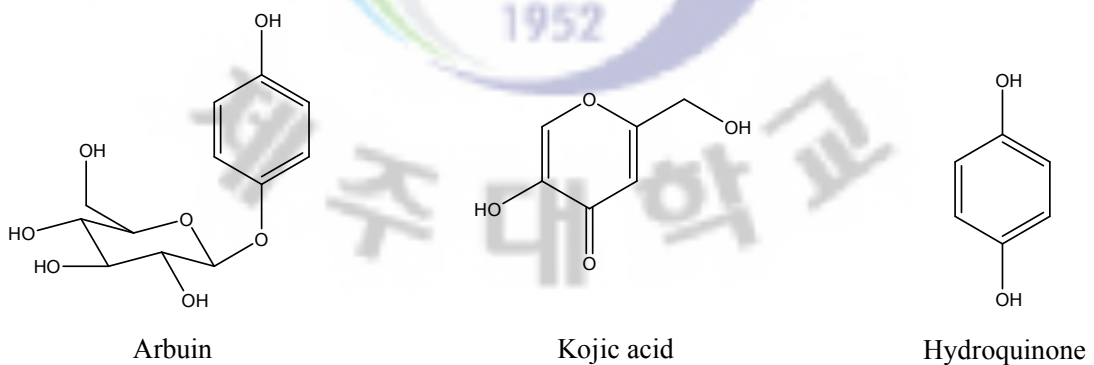


Figure 2. Structures of whitening ingredients.



한편, 피부노화 현상은 여러 가지 구조적, 기능적 변화를 보이는데 내외적인 여러 가지 스트레스는 피부의 탄력성과 윤택성을 감소시키고, 주름이 생기게 하는 등 피부노화 현상을 촉진한다. 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부 노화가 발생한다.

Elastase는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해할 수 있는 효소로서 채장 추출물에서 처음 발견되었으며 미생물, 고등식물 등에서도 발견되었다. Elastase는 피부 탄력성에 관련된 elastin을 분해시켜 collagen과 이루어진 피부의 진피 조직의 그물망 구조 결합을 끊어 주름 생성의 주원인 효소로 알려져 있다. 그러므로 피부 노화의 주원인 중의 하나인 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부 노화를 억제할 수 있다.<sup>10)</sup>

현재까지 알려진 주름 개선 물질로는 retinoic acid와 retinol의 효과가 입증되어 있고<sup>11)</sup> dehydroepiandrosterone(DHEA), oleanolic acid, ursolic acid, 빈랑자 추출물 등이 있다(Figure 3).

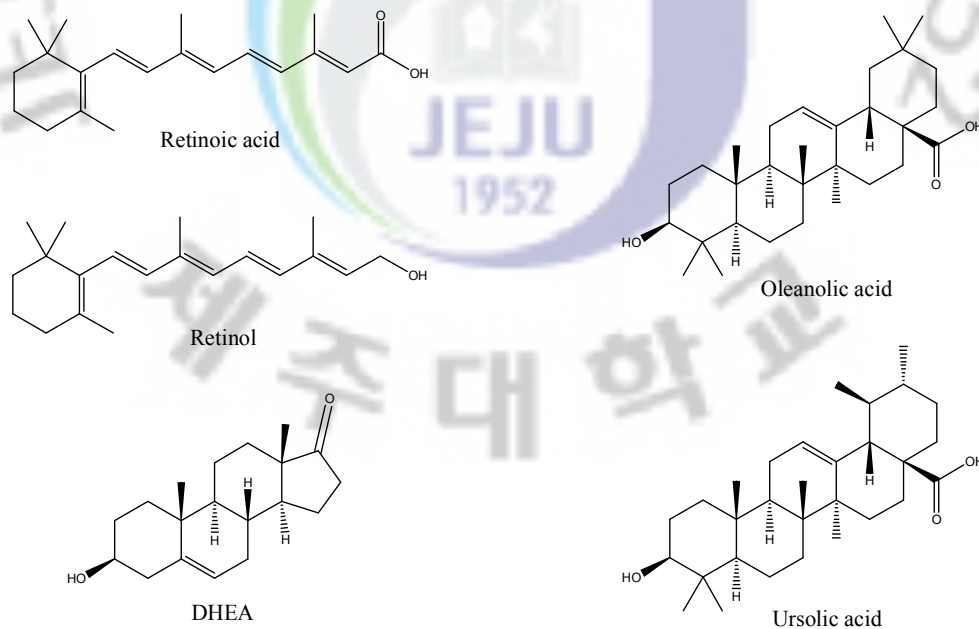


Figure 3. Structures of anti-wrinkle ingredients.

비쭈기나무(*Cleyera japonica* Thunb.)는 빗죽이나무라고도 하며 차나무과 (*Theaceae*)에 속하는 식물로 원산지가 한국이다. 해안지대의 섬에서 자라고 한국(남쪽), 일본, 타이완에 분포한다. 높이 10m에 이르는 상록소교목으로 작은가지는 녹색이고 털이 없다. 잎은 어긋나고 긴 타원형이며 가장자리가 밋밋하고 두 겹다. 열매는 둥글고 길이 8~10mm이며 10월에 검은색으로 익는다. 관상용, 건축재, 기구재, 목재 등으로 이용되며 일본에서는 잎이 달린 가지를 신전에 바친다.

현재까지 비쭈기나무에서 분리 보고된 활성성분은 없으며, 이에 본 연구에서는 비쭈기나무 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 비쭈기나무 가지로부터 분리된 화합물들의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화 활성 및 피부미백, 주름개선 효과를 검색하여 천연 향산화제 및 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Jusei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography(VLC)에는 silica gel(0.002-0.025 mm, Sigma), normal-phase column chromatography(CC)에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck)이 사용되었다. Gel filtration chromatography(GFC)에는 Sephadex™ LH-20(0.1-0.025 mm)을 사용하였다. 분리 과정에서 사용된 thin layer chromatography(TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp(254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다.

항산화 활성 검색에 사용된 ESR(electron spin resonance spectrometer)은 JES-FA200(JEOL)을 사용하였으며, tyrosinase 및 Elastase 저해 활성 검색에 사용된 UV-visible spectrophotometer(ELISA reader)는 Thermo Electron-labsystems Multiskan EX를 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400(FT-NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR 측정 용매는 CIL의 NMR 전용 용매로 CD<sub>3</sub>OD, pyridine-*d*<sub>5</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>를 사용하였다.

## 2. 재료

실험에 사용된 비쭈기나무 가지(시료번호 : 124)는 2009년 9월에 제주 한라수목원에서 채집하였다. 채집한 비쭈기나무 가지는 실온 및 음지에서 완전히 자연 건조 하였으며, 분쇄하여 사용하였다(Figure 4).



Figure 4. Picture of *Cleyera japonica* Thunb.

### 3. 추출, 분획 및 분리

#### 3-1. 비쭈기나무 가지의 추출 및 분획

건조된 비쭈기나무 가지 1.14 kg을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 22.8 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 116.6 g을 얻었다. 추출물 14.2 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다(Figure 5).

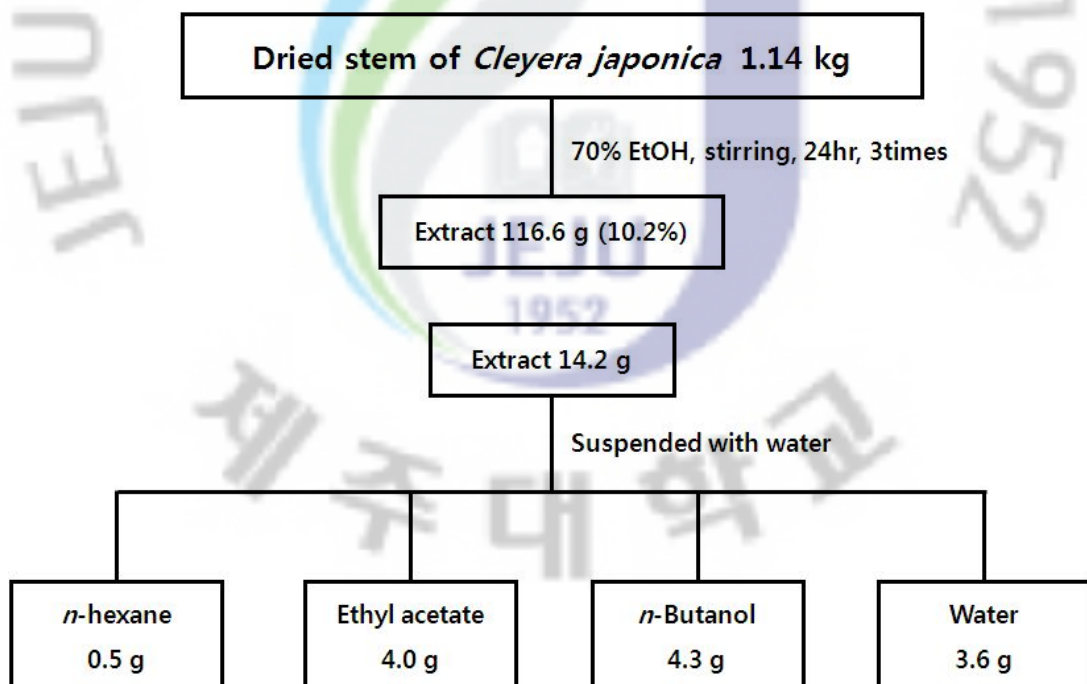


Figure 5. Procedure of extraction and solvent fractionation from *C. japonica*.

### 3-2. Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 3.92 g을 분획하기 위하여 vacuum liquid chromatography(VLC)를 수행하였다. Hex-EtOAc (0~100%), EtOAc-MeOH(0~50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출한 후, 각 fraction을 TLC를 확인하여 spot 패턴이 비슷한 것들을 모아 총 18개의 fraction을 얻었다(Fr. V1~18).

VLC fraction들 중 Fr. V2(30% EtOAc in Hex) 153.6 mg은 하얀색 가루 형태로 compound 12로 확인되었다.

또한 Fr. V5(50~65% EtOAc in Hex) 107.4 mg을 메탄올을 사용해 재결정하여 compound 10(5.8 mg)을 얻었다.

Fr. V6(70~85% EtOAc in Hex) 138.7 mg은 silica gel 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1)을 수행하여 compound 4(5.9 mg)를 얻었다. 또한 compound 1과 3가 4:1 정도의 비율로 섞여있는 fraction 55.9 mg을 얻었지만, 이들은 현재 널리 알려진 화합물이므로 더 이상의 분리는 진행하지 않았다.

그리고 Fr. V7(90~95% EtOAc in Hex) 144.5 mg을 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=2.5:1)을 수행하여 앞서 분리하였던 compound 1(2.3 mg), compound 3(2.6 mg), compound 4(3.0 mg)를 더 분리하였으며, compound 7(11.5 mg)도 얻었다.

Fr. V8(100% EtOAc) 306.3 mg은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=3:1)을 수행하여 compound 5(16.3 mg)와 compound 6(39.2 mg)를 얻었다.

Fr. V9(5% MeOH in EtOAc) 520.9 mg 또한 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=3:1)을 수행하여 compound 5(264.5 mg)를 더 얻었다.

Fr. V10(10% MeOH in EtOAc) 953.1 mg은 silica gel 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:EtOAc:MeOH=2:2:1)을 진행하여 5개의 fraction(Fr. V10-1~5)으로 나눈 후, Fr. V10-2 356.0 mg을 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=3:1)을 수행하여 compound 5(191.9 mg)를 더 얻었으며, compound 2(11.9 mg), compound 11(13.0 mg)도 얻었다.

또한 Fr. V11(15% MeOH in EtOAc) 313.3 mg을 Sephadex LH-20 컬럼

(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=3:1)을 수행하여 compound 2(9.6 mg), compound 5(80.5 mg)를 더 분리하였고, Fr. V12(20% MeOH in EtOAc) 279.5 mg을 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1)을 수행하여 compound 5(9.4 mg)를 더 얻었으며, compound 8(6.5 mg)과 compound 9(11.4 mg)을 분리하였다(Figure 6).

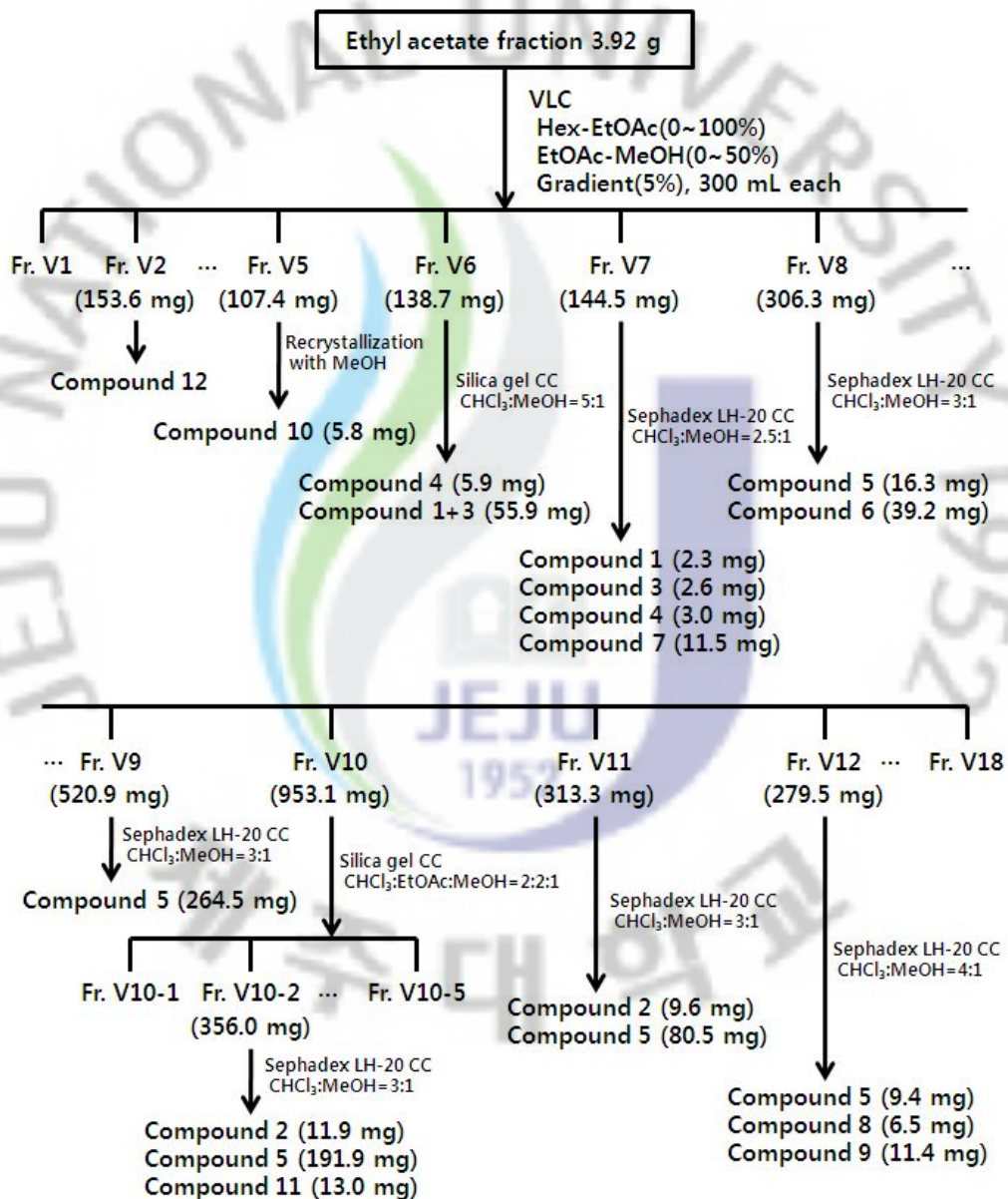


Figure 6. Isolation procedure of compounds from *C. japonica*.

#### 4. 활성 실험

##### 4-1. ESR을 이용한 항산화 활성 실험

###### 4-1-1. DPPH radical scavenging activity test

0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, in methanol), 그리고 각 시료들을 농도별로 준비한다.

본 실험에서는 sample 용액 10  $\mu$ L와 DPPH 용액 90  $\mu$ L를 실온에서 2분 동안 반응시킨 후, ESR을 이용해 남아있는 라디칼의 양을 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 ESR signal을 적분하여 계산하였으며, sample 대신 용매를 넣은 control의 라디칼 양을 100%로 하여 sample을 첨가했을 때 남아있는 라디칼 양을 %로 나타내었다. 이를 바탕으로 라디칼 소거율이 50%일 때의 시료의 농도(SC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

###### \* ESR spectroscopy conditions

- Frequency : 9.4375 GHz
- Magnetic field : 337 mT
- Power : 1 mW
- Modulation width : 0.8 mT
- Amplitude : 500
- Sweep width : 10 mT
- Scan time : 0.5 min
- Time constant : 0.03 sec



#### 4-1-2. Hydroxyl radical scavenging activity test

10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(in potassium phosphate buffer, pH 7.4), 10 mM FeSO<sub>4</sub>(in water), 0.3 M 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide(DMPO, in potassium phosphate buffer, pH 7.4), 그리고 각 시료들을 농도별로 준비한다.

본 실험에서는 sample 10 μL, DMPO 30 μL, FeSO<sub>4</sub> 30 μL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μL를 넣고 실온에서 2분 30초 동안 반응시킨 후, ESR을 이용해 남아있는 라디칼의 양을 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 ESR signal을 적분하여 계산하였으며, sample 대신 용매를 넣은 control의 라디칼 양을 100%로 하여 sample을 첨가했을 때 남아있는 라디칼 양을 %로 나타내었다. 이를 바탕으로 라디칼 소거율이 50%일 때의 시료의 농도(SC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

##### \* ESR spectroscopy conditions

- Frequency : 9.4354 GHz
- Magnetic field : 337 mT
- Power : 1 mW
- Modulation width : 0.2 mT
- Amplitude : 200
- Sweep width : 10 mT
- Scan time : 0.5 min
- Time constant : 0.03 sec

#### 4-2. Tyrosinase inhibition activity test

0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8), 2 mM L-tyrosine, 2500 unit of tyrosinase, 그리고 각 시료들을 농도별로 준비한다.

본 실험에서는 96 well plate에 buffer 105  $\mu$ L, L-tyrosine 70  $\mu$ L, tyrosinase 5  $\mu$ L, 그리고 시료용액 20  $\mu$ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 이를 바탕으로 tyrosinase의 활성을 50% 저해시키는데 필요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

대조군으로는 arbutin을 사용하였다.

Tyrosinase inhibition activity (%)

$$= [ 1 - (Ab_{S_{sample}} - Ab_{S_{blank}}) / Ab_{S_{control}} ] \times 100$$

Ab<sub>S<sub>sample</sub></sub> : 시료 반응용액의 흡광도

Ab<sub>S<sub>blank</sub></sub> : 시료만의 흡광도

Ab<sub>S<sub>control</sub></sub> : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

#### 4-3. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험

##### 4-3-1. 세포 배양

Murine B16F10 melanoma cell은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% antibiotic-antimycotic과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DEME 배지(GIBCO, Gard Island, NY, USA)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

#### 4-3-2. Melanogenesis 저해효과 측정 실험

비쭈기나무 가지 추출물 및 분획물에 대한 세포내에서의 미백효과를 측정하기 위하여 B16F10 melanoma cell을 이용하여 melanogenesis 저해효과를 측정하였다.

6 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/mL로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. D-phosphate buffered saline(D-PBS)으로 세척한 후 1 µM α-MSH를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 동안 배양 후 배지를 제거하고 D-PBS buffer로 세척한 후, 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 1M NaOH 500 µL를 첨가하고 55°C에서 2시간 방치하여 세포내의 melanin을 얻었다. 이를 96 well plate로 옮긴 후 ELISA reader를 이용해 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군으로는 arbutin을 사용하였다.

#### 4-3-3. 세포독성 평가 실험

MTT assay는 B16F10 melanoma cell을 6 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양 후, 1 µM α-MSH와 sample을 농도별로 동시에 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 동안 배양 후 500 µg/mL 농도로 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 ELISA reader를 이용해 580 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4-4. Elastase inhibition activity test

돼지췌장 elastase(Porcine pancreatic elastase, PPE)는 기질로 *N*-succ(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide(SANA)와 함께 분광광도법을 사용한 방법으로 실시되었다.

0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0), 0.1 mg/mL elastase, 기질로 12.5 mM SANA, 그리고 각 시료들을 농도별로 준비한다.

본 실험에서는 96 well plate에 buffer 165  $\mu$ L, SANA 5  $\mu$ L, elastase 10  $\mu$ L, 그리고 시료용액 20  $\mu$ L를 넣고 25°C에서 15분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 이를 바탕으로 elastase의 활성을 50% 저해시키는데 필요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

대조군으로는 oleanolic acid를 사용하였다.

Elastase inhibition activity (%)

$$= [ 1 - (Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{blank}}) / (Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{c-blank}}) ] \times 100$$

Abs<sub>sample</sub> : 시료 반응용액의 흡광도

Abs<sub>blank</sub> : 시료만의 흡광도

Abs<sub>control</sub> : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs<sub>c-blank</sub> : 시료와 elastase를 첨가하지 않은 용액의 흡광도

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 화합물의 구조 결정

##### 1-1. Compound 1, 2, 3의 구조 동정

Compound 1과 3는 현재 널리 알려진 화합물로서, 문헌<sup>12)</sup>을 통해 compound 1은 catechin, compound 3는 *epi*-catechin으로 확인되었다.

또한 compound 2는 <sup>1</sup>H NMR과 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼을 통해, catechin 피크 외에도  $\delta_H$  3 ~ 4의 피크들과  $\delta_H$  1.25 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz),  $\delta_C$  18.1의 메틸기 피크, 그리고  $\delta_H$  4.29 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 anomer proton,  $\delta_C$  102.3의 anomer carbon 피크로 보아 catechin에 rhamnose가 결합되어 있을 것이라 예상하였으며, 이 역시 문헌<sup>13, 14)</sup>과 대조하여 compound 2는 catechin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside임을 확인하였다(Figures 7-9, Table 1).

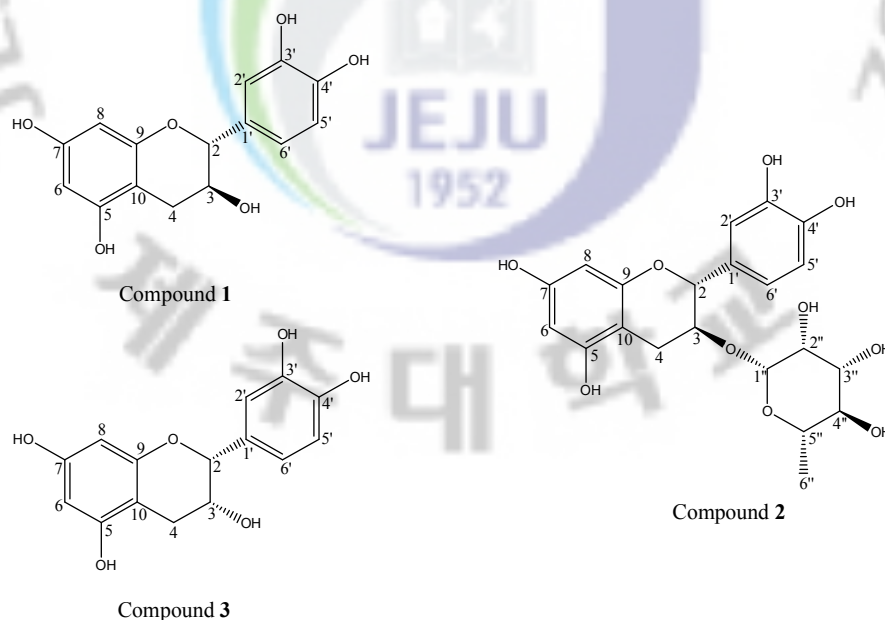


Figure 7. Chemical structures of compounds 1-3.

Talbe 1. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **1-3** (400 and 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

No.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>		Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.56 (1H, d, 7.6)	83.0	4.62 (1H, d, 8.0)	81.3	4.82 (1H, s)	80.0
3	3.97 (1H, m)	69.0	3.93 (1H, m)	76.1	4.18 (1H, m)	67.6
4	2.85 (1H, dd, 5.3, 16.0) 2.50 (1H, dd, 8.2, 16.0)	28.7	2.88 (1H, dd, 5.5, 16.0) 2.64 (1H, dd, 8.5, 16.0)	28.1	2.86 (1H, dd, 4.6, 16.7) 2.73 (1H, dd, 2.8, 16.7)	29.4
5		157.8		157.7		158.2
6	5.92 (1H, d, 2.3)	96.4	5.94 (1H, d, 2.3)	96.5	5.94 (1H, d, 2.3)	96.5
7		157.1		157.0		157.8
8	5.85 (1H, d, 2.3)	95.6	5.86 (1H, d, 2.3)	95.6	5.91 (1H, d, 2.3)	96.0
9		158.0		158.1		157.5
10		100.9		100.8		100.2
1'		132.3		132.1		132.4
2'	6.83 (1H, d, 1.8)	115.4	6.84 (1H, d, 1.8)	115.2	6.97 (1H, d, 2.1)	115.2
3'		146.4		146.4		146.1
4'		146.5		146.5		145.9
5'	6.76 (1H, d, 8.2)	116.2	6.77 (1H, d, 8.0)	116.2	6.80 (1H, dd, 2.1, 8.0)	116.0
6'	6.71 (1H, dd, 1.8, 8.2)	120.2	6.72 (1H, dd, 1.8, 8.0)	120.0	6.76 (1H, d, 8.0)	119.5
1''			4.29 (1H, d, 1.4)	102.3		
2''			3.51 (1H, dd, 1.8, 3.2)	72.1		
3''			3.57 (1H, dd, 3.2, 9.4)	72.4		
4''			under the MeOH	74.1		
5''			3.68 (1H, m)	70.5		
6''			1.25 (3H, d, 6.2)	18.1		



Figure 8.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

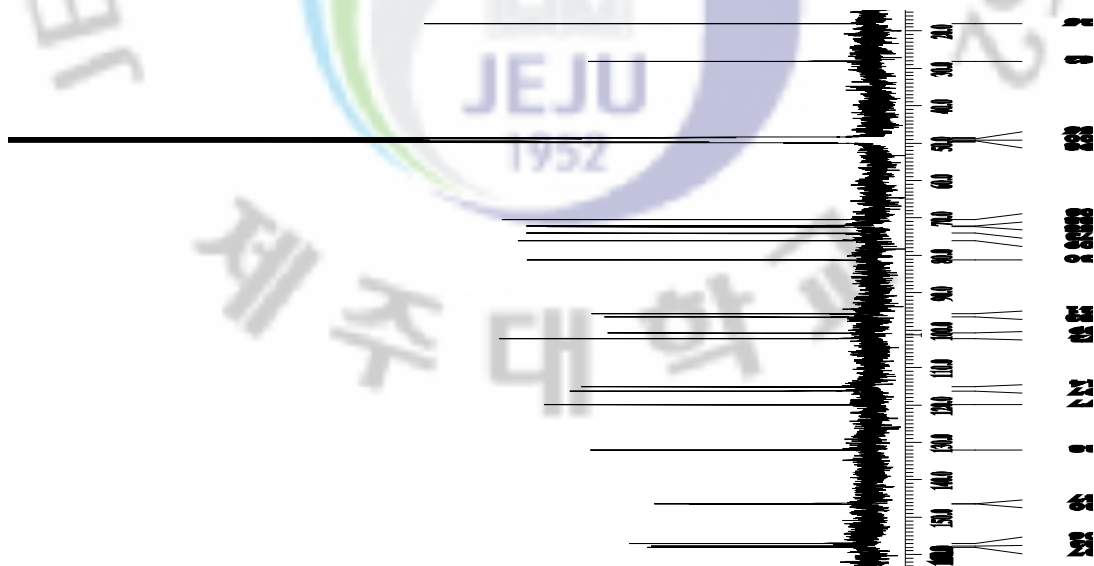


Figure 9.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

## 1-2. Compound 4, 5, 6의 구조 동정

Compound 4는 문헌<sup>15)</sup>을 통하여 taxifolin으로 확인되었으며, compound 5, 6는  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 통해, taxifolin 피크 외에도  $\delta_{\text{H}}$  3 ~ 4의 피크들로 보아 taxifolin에 당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. 그 중 compound 5는  $\delta_{\text{H}}$  3.84 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz)의 anomer proton 피크와  $\delta_{\text{C}}$  102.4의 anomer carbon 피크, 그리고  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 carbon 피크가 총 20개인 것으로 보아, taxifolin에 5탄당인 arabinose나 xylose가 결합되어 있을 것이라 예측되었으며, 문헌<sup>16)</sup>을 통해 이 화합물이 taxifolin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside임을 확인하였다. 또한 compound 6는  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  18.0의 메틸기 피크, 그리고  $\delta_{\text{H}}$  4.05 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz)의 anomer proton,  $\delta_{\text{C}}$  102.3의 anomer carbon 피크로 보아 taxifolin에 결합되어 있는 당이 rhamnose일 것이라 예상하였으며, 이 역시 문헌<sup>17)</sup>을 통해 이 화합물이 astilbin이라 불리는 taxifolin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside임을 확인하였다 (Figures 10-16, Table 2).

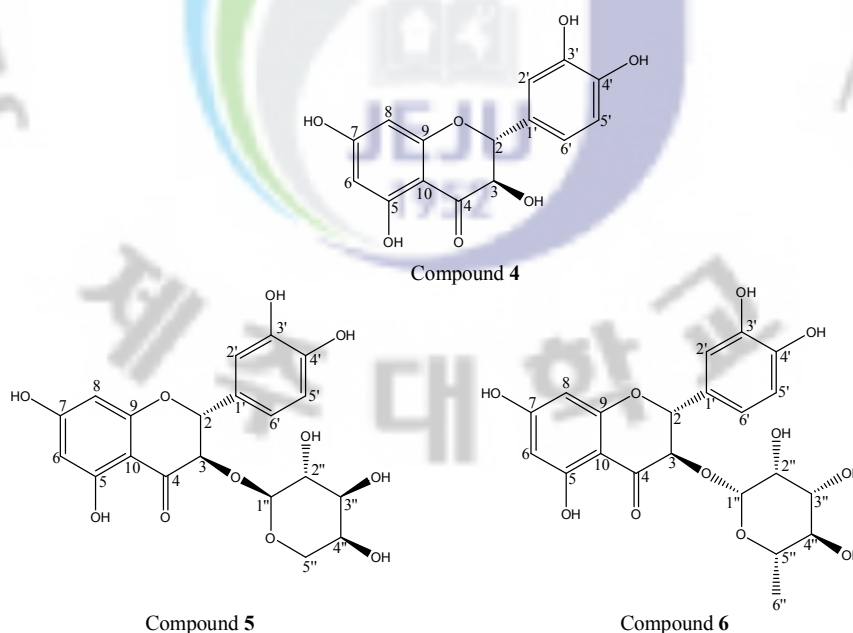


Figure 10. Chemical structures of compounds 4-6.



Talbe 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **4–6** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

No.	Compound <b>4</b>		Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.91 (1H, d, 11.5)	85.3	5.13 (1H, d, 10.5)	83.9	5.07 (1H, d, 10.5)	84.1
3	4.50 (1H, d, 11.5)	73.8	4.80 (1H, d, 10.5)	76.4	4.57 (1H, d, 10.5)	78.7
4		198.6		196.1		196.1
5		168.9		165.6		165.7
6	5.92 (1H, d, 2.1)	97.4	5.92 (1H, d, 2.1)	97.6	5.92 (1H, d, 2.1)	97.6
7		165.5		169.6		169.0
8	5.88 (1H, d, 2.1)	96.4	5.90 (1H, d, 2.1)	96.7	5.90 (1H, d, 2.1)	96.5
9		164.7		164.4		164.2
10		102.0		101.5		102.6
1'		130.0		129.1		129.3
2'	6.96 (1H, d, 1.8)	116.0	6.97 (1H, d, 2.1)	115.8	6.96 (1H, d, 1.8)	115.6
3'		147.3		146.7		146.7
4'		146.5		147.6		147.5
5'	6.80 (1H, d, 8.0)	116.2	6.79 (1H, d, 8.2)	116.4	6.81 (1H, d, 8.2)	116.4
6'	6.85 (1H, dd, 1.8, 8.0)	121.0	6.85 (1H, dd, 2.1, 8.2)	120.9	6.84 (1H, dd, 1.8, 8.2)	120.6
1''			3.84 (1H, d, 3.9)	102.4	4.05 (1H, d, 1.4)	102.3
2''			3.59 (1H, dd, 3.9, 6.0)	73.2	under the MeOH	71.9
3''			3.55 (1H, dd, 3.2, 6.0)	66.9	3.54 (1H, dd, 1.6, 3.2)	72.3
4''			3.80 (1H, m)	71.2	3.66 (1H, dd, 3.2, 9.6)	73.9
5''			3.92 (1H, dd, 7.6, 11.7) 3.38 (1H, dd, 3.7, 11.7)	63.5	4.25 (1H, m)	70.6
6''					1.19 (3H, d, 6.2)	18.0

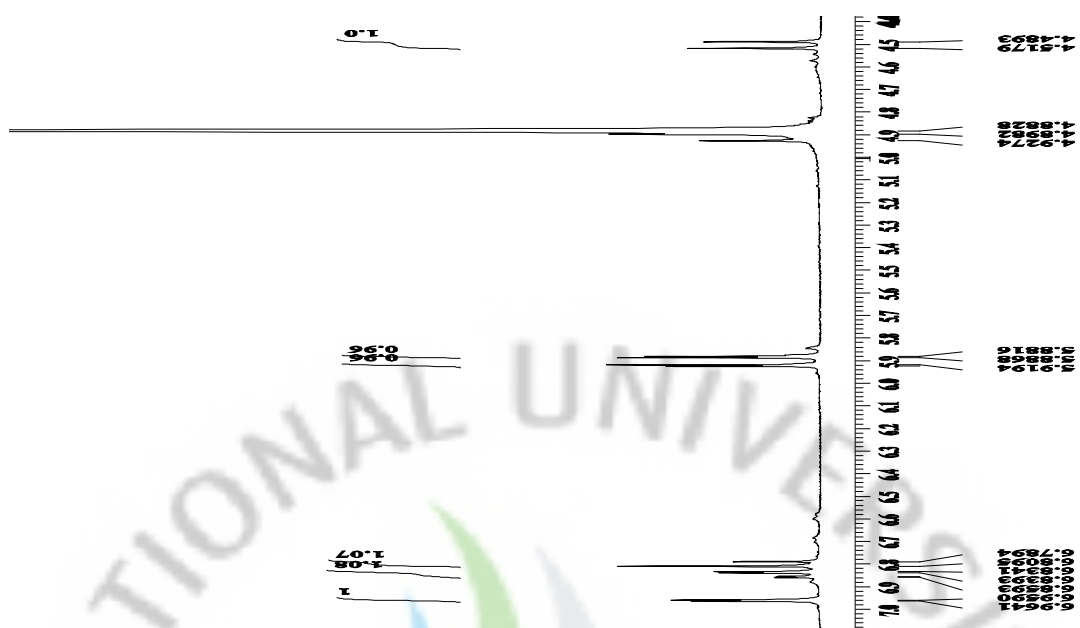


Figure 11.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

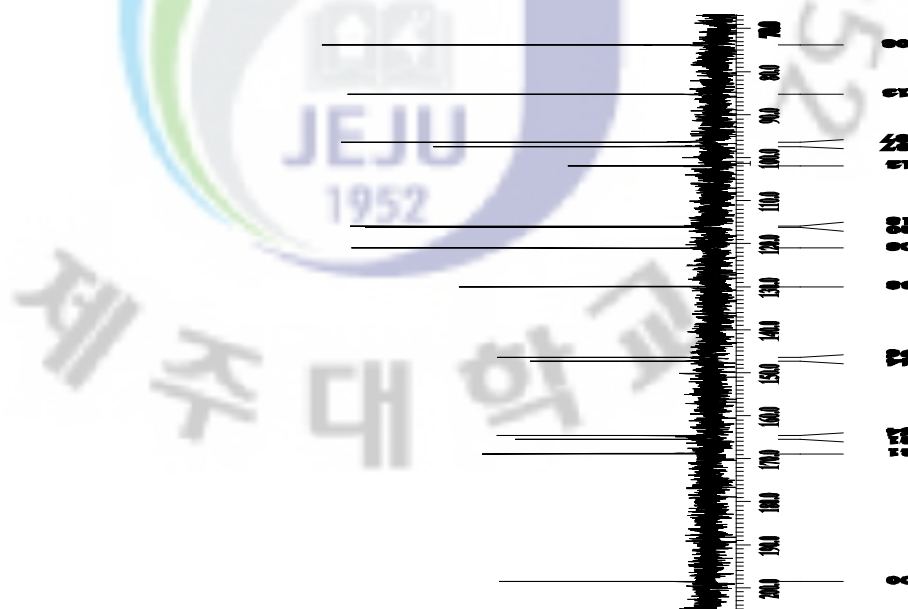


Figure 12.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

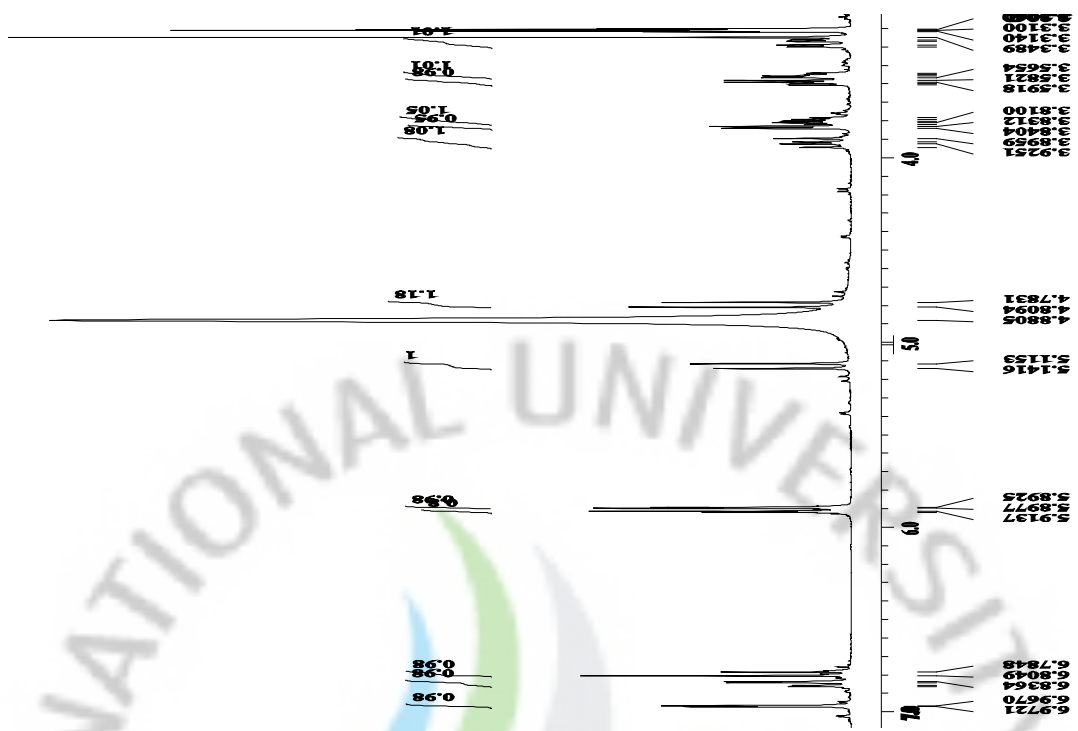


Figure 13.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

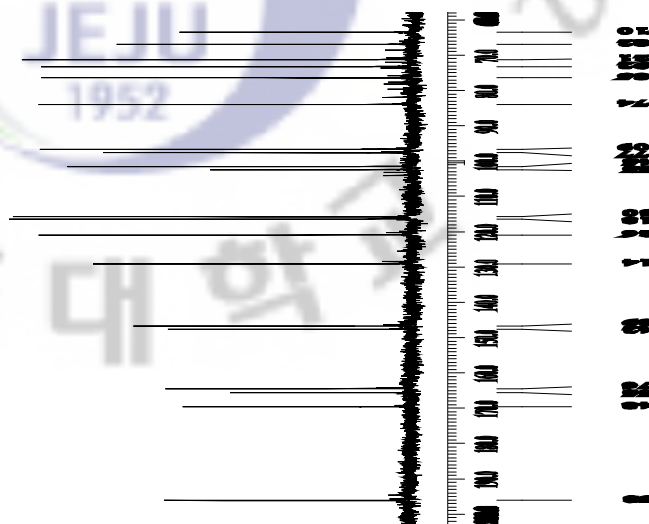


Figure 14.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

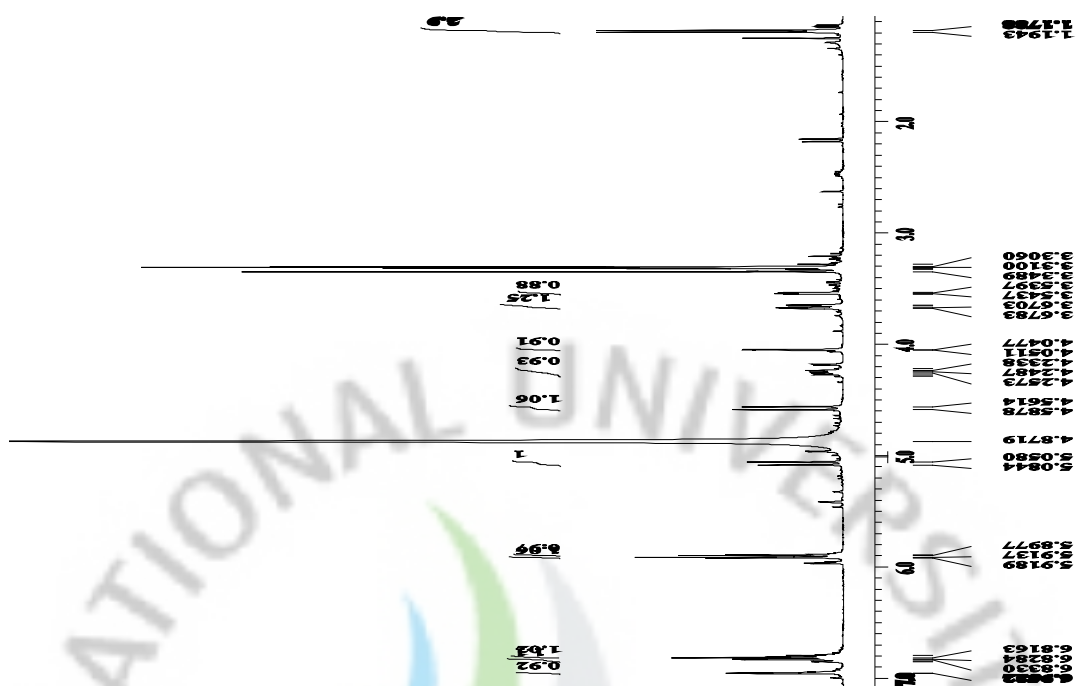


Figure 15.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **6** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



Figure 16.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **6** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

### 1-3. Compound 7의 구조 동정

Compound 7은  $^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 전형적인 catechin과 *epi*-catechin 피크들이 관찰되었다. 그 중 catechin 구조에서 2번 위치에서 나타나는 피크인  $\delta_{\text{C}}$  80 근처의 피크가 하나만 나타나고,  $\delta_{\text{C}}$  100.5의 피크가 나온 것으로 보아, 혼합물 상태가 아닌 두 화합물이 2번 위치로 서로 결합을 하고 있는 형태일 것이라 예상하였으며, 좀 더 자세히 결합 위치를 확인하기 위해 DEPT(135°) NMR과 2D(COSY, HMQC, HMBC) NMR을 측정하였다.

DEPT(135°) NMR을 통해  $\delta_{\text{C}}$  29.4의 피크는 3차 carbon,  $\delta_{\text{C}}$  100.5와  $\delta_{\text{C}}$  104.2의 피크는 4차 carbon으로 확인되었다.

또한  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서  $\delta_{\text{H}}$  4.07 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz)과  $\delta_{\text{H}}$  4.23 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz)의 피크, *meta* coupling을 하는 aromatic proton인  $\delta_{\text{H}}$  5.96 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz)과  $\delta_{\text{H}}$  6.07 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz)의 피크, 그리고 singlet의 aromatic proton인  $\delta_{\text{H}}$  6.09 (1H, s)의 피크가 관찰되었다.

이상을 바탕으로 종합하여 볼 때 이 화합물은 A 타입의 proanthocyanidin일 것이라 예상되었으며, HMBC correlation을 통해 최종적으로 proanthocyanidin A-1이라 불리는 *epi*-catechin-(2 $\beta$ →O→7, 4 $\beta$ →8)-catechin으로 확인 되었고 문헌<sup>18)</sup>의 NMR 데이터와도 일치함을 확인하였다(Figures 17-23, Table 3).

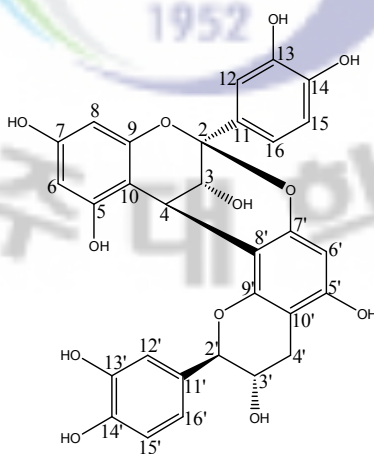


Figure 17. Chemical structure of compound 7.

Talbe 3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **7** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

No.	Compound <b>7</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		100.5
3	4.07 (1H, d, 3.4)	68.0
4	4.23 (1H, d, 3.4)	29.4
5		156.9
6	5.96 (1H, d, 2.3)	98.3
7		158.3
8	6.07 (1H, d, 2.3)	96.7
9		154.4
10		106.9
11		132.4
12	7.13 (1H, d, 2.1)	115.8
13		146.9
14		145.8
15	6.81 (1H, overlapped)	116.5
16	7.02 (1H, dd, 2.1, 8.2)	120.0
2'	4.73 (1H, d, 7.8)	84.7
3'	4.15 (1H, m)	68.3
4'	2.57 (1H, dd, 8.5, 16.5) 2.94 (1H, dd, 5.5, 16.5)	29.2
5'		156.3
6'	6.09 (1H, s)	96.7
7'		152.4
8'		104.2
9'		151.6
10'		103.3
11'		130.7
12'	6.92 (1H, d, 2.0)	115.9
13'		146.9
14'		146.5
15'	6.81 (1H, overlapped)	115.8
16'	6.81 (1H, overlapped)	120.8



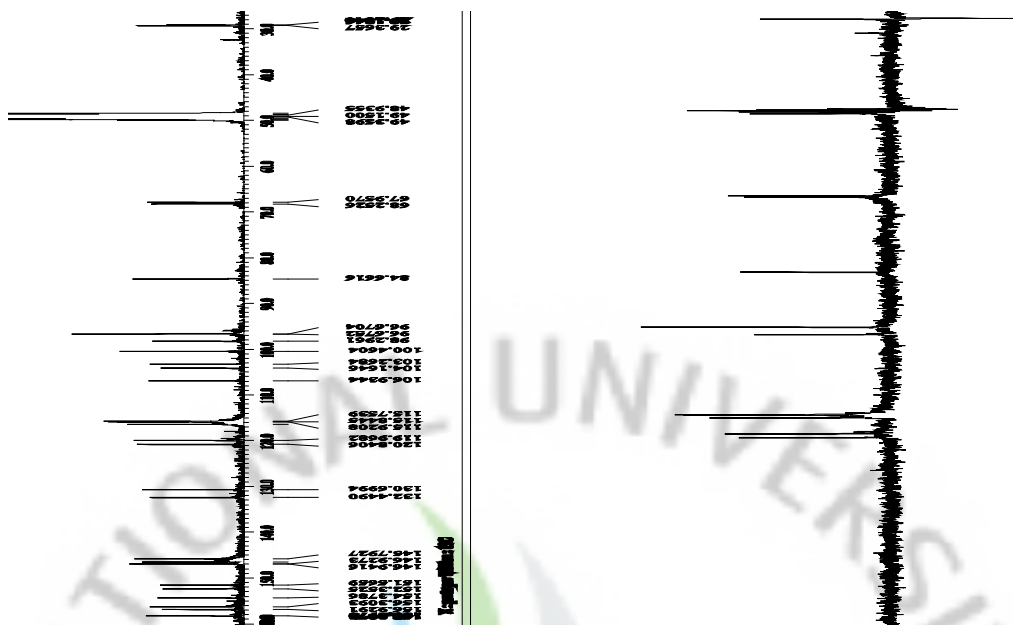


Figure 20. DEPT(135°) NMR spectrum of compound 7 (CD<sub>3</sub>OD).

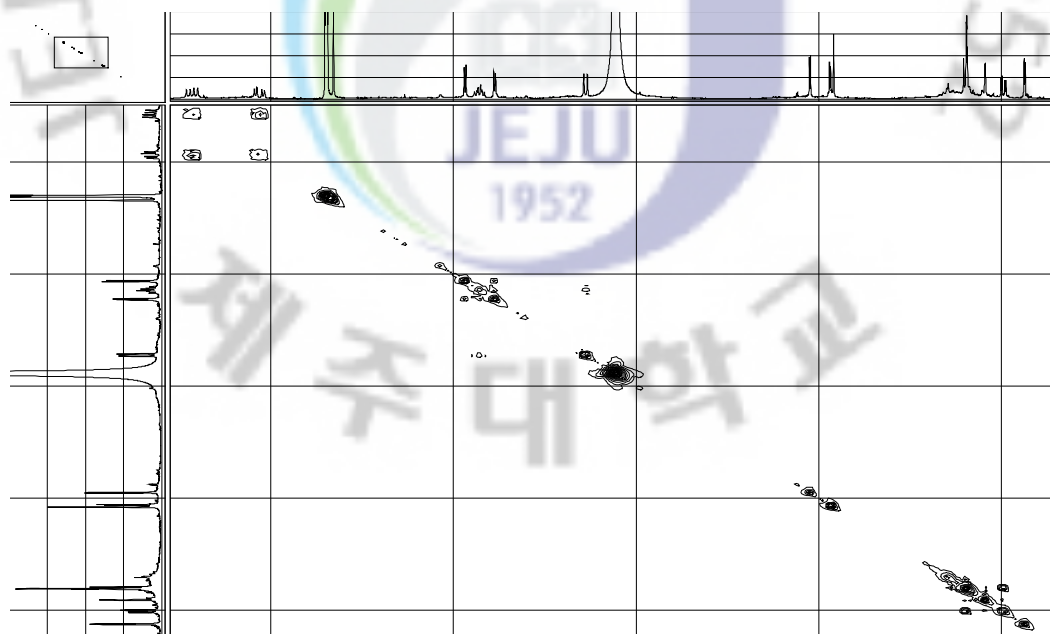


Figure 21. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR spectrum of compound 7 (CD<sub>3</sub>OD).



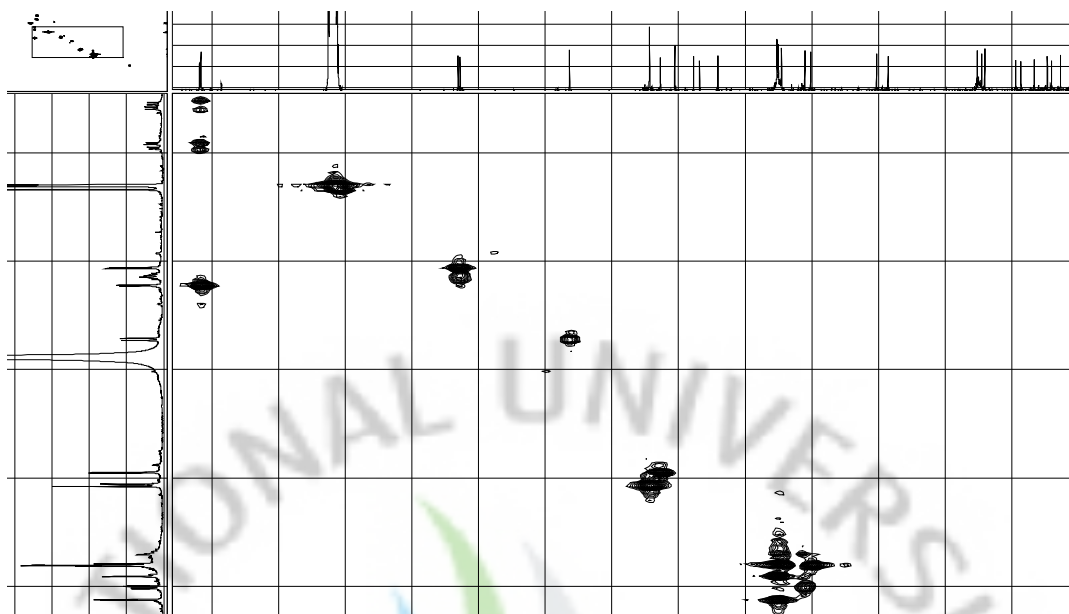


Figure 22. HMQC NMR spectrum of compound 7 (CD<sub>3</sub>OD).

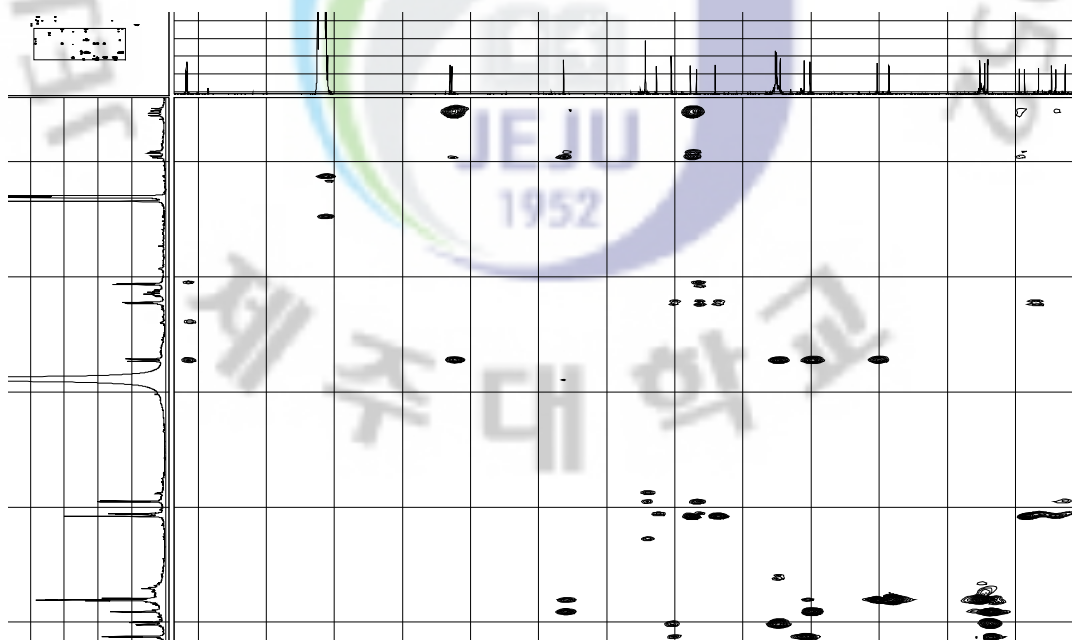


Figure 23. HMBC NMR spectrum of compound 7 (CD<sub>3</sub>OD).

#### 1-4. Compound 8의 구조 동정

Compound 8은  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서  $\delta_{\text{H}}$  6.21 (1H, d,  $J = 2.1$ ),  $\delta_{\text{H}}$  6.33 (1H, d,  $J = 2.1$ )의 피크로 보아 *meta* coupling을 하는 두 개의 aromatic proton이 있음을 알 수 있었으며  $\delta_{\text{H}}$  8.14 (1H, s)의 deshielding 된 singlet 피크도 관측되었다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3 ~ 4 사이의 피크들로 보아 당이 결합되어 있을 것이라 예상되었다.

$^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서는 총 14개의 carbon 피크가 관찰되었으며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  65 ~ 75 사이 4개의 피크와  $\delta_{\text{C}}$  104.6의 anomer carbon으로 예측되는 피크로 보아 5탄당인 arabinose나 xolose가 결합되어 있는 구조일 것이라 예상할 수 있었다. 이들 5개의 당 피크를 제외하면,  $\delta_{\text{C}}$  178.7의 carbonyl group을 포함하는 9개의 피크는 플라보노이드인 quercetin에 B-ring이 없는 구조로 보여지며, 3번 위치에 당이 결합되어 있을 것이라 예측하여, 문헌<sup>19)</sup>과 대조한 결과 이 화합물은 3,5,7-trihydroxylchromone 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside임을 확인하였다(Figures 24-26, Table 4).

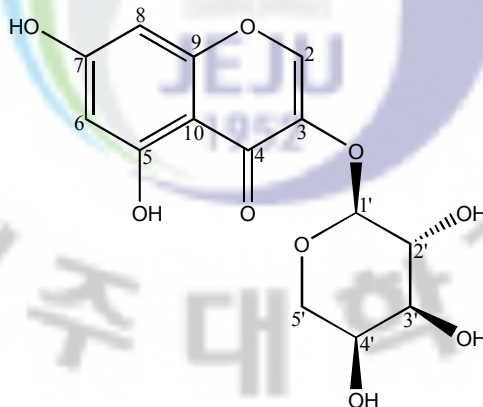


Figure 24. Chemical structure of compound 8.

Talbe 4.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **8** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

No.	Compound <b>8</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	8.14 (1H, s)	147.9
3		141.2
4		178.7
5		163.5
6	6.21 (1H, d, 2.1)	100.3
7		166.5
8	6.33 (1H, d, 2.1)	95.1
9		159.5
10		106.4
1'	4.74 (1H, d, 6.9)	104.6
2'	3.83 (1H, dd, 6.9, 8,9)	72.2
3'	3.62~3.69 (1H, overlapped)	73.8
4'	3.86 (1H, m)	69.4
5'	3.62~3.69 (1H, overlapped)	67.3
	3.95 (1H, dd, 3.2, 12.4)	



Figure 25.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

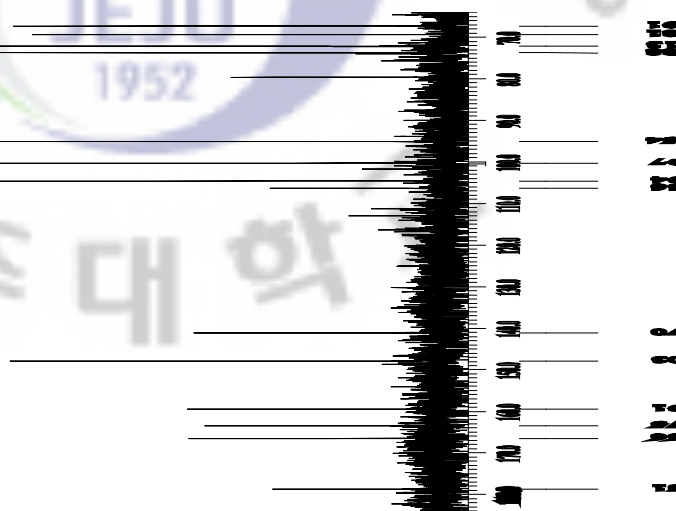


Figure 26.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

## 1-5. Compound 9의 구조 동정

Compound 9은  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서  $\delta_{\text{H}}$  6.16 (1H, s),  $\delta_{\text{H}}$  6.76 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 그리고  $\delta_{\text{H}}$  6.64 ~ 6.67 (3H, overlapped)에 해당하는 5개의 aromatic proton이 관측되었다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.79 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  3.81 (3H, s)의 피크로 보아 2개의 methoxyl group이 있을 것이라 예측되며,  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (3H, d,  $J = 6.4$ )의 메틸기 피크와  $\delta_{\text{H}}$  4.58 (1H, d,  $J = 1.4$ )의 anomer proton 피크,  $\delta_{\text{H}}$  3 ~ 4의 피크들로 보아, rhamnose가 결합되어 있을 것이라 예상되었다.

그리고  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 총 26개의 carbon 피크가 관찰되었으며, DEPT(135°) NMR을 통해,  $\delta_{\text{C}}$  33.7, 65.5, 68.0의 피크는 2차 carbon,  $\delta_{\text{C}}$  39.6 과  $\delta_{\text{C}}$  45.3의 피크는 3차 carbon임을 확인하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  129 ~ 150에 해당하는 7개의 피크는 DEPT(135°) NMR을 통해 4차 carbon임을 확인하였으며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  145.4, 146.2, 147.3, 149.3의 피크는 deshielding 된 것으로 보아 전기 음성도가 큰 산소와 인접한 carbon으로 methoxyl group이나 hydroxyl group이 치환되어 있을 것이라 예상하였다.

이들 데이터를 바탕으로 문헌<sup>20)</sup>과 대조하여 compound 9는 리그난 계열의 화합물인 aviculin이라 불리는 (+)-isolariciresinol 9'-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside임을 확인하였다(Figures 27-29, Table 5).

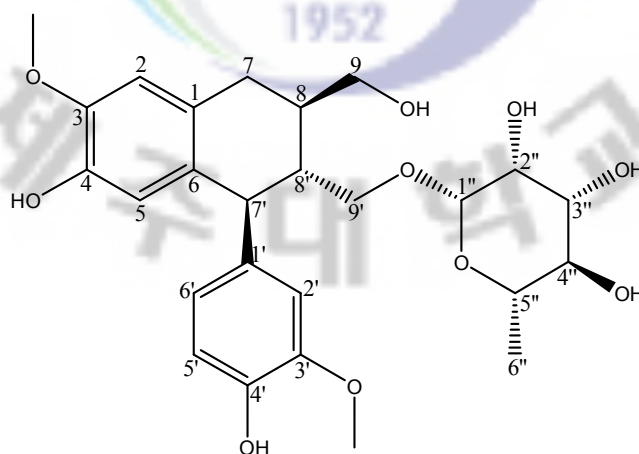


Figure 27. Chemical structure of compound 9.

Talbe 5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **9** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

No.	Compound <b>9</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		129.0
2	6.64 ~ 6.67 (1H, overlapped)	112.6
3		147.3
3-OCH <sub>3</sub>	3.81 (3H, s)	56.6
4		145.4
5	6.16 (1H, s)	116.2
6		134.4
7	2.83 (2H, d, 7.3)	33.7
8	1.96 (1H, m)	39.6
9	3.36 ~ 3.89 (overlapped)	65.5
1'		138.2
2'	6.64 ~ 6.67 (1H, overlapped)	113.9
3'		149.3
3'-OCH <sub>3</sub>	3.79 (3H, s)	56.5
4'		146.2
5'	6.76 (1H, d, 8.0)	117.3
6'	6.64 ~ 6.67 (1H, overlapped)	123.6
7'	3.36 ~ 3.89 (overlapped)	48.6
8'	1.88 (1H, m)	45.3
9'	3.36 ~ 3.89 (overlapped)	68.0
1''	4.58 (1H, d, 1.4)	102.4
2''	3.36 ~ 3.89 (overlapped)	72.5
3''	3.36 ~ 3.89 (overlapped)	72.8
4''	3.36 ~ 3.89 (overlapped)	74.0
5''	3.36 ~ 3.89 (overlapped)	70.1
6''	1.19 (3H, d, 6.4)	18.0

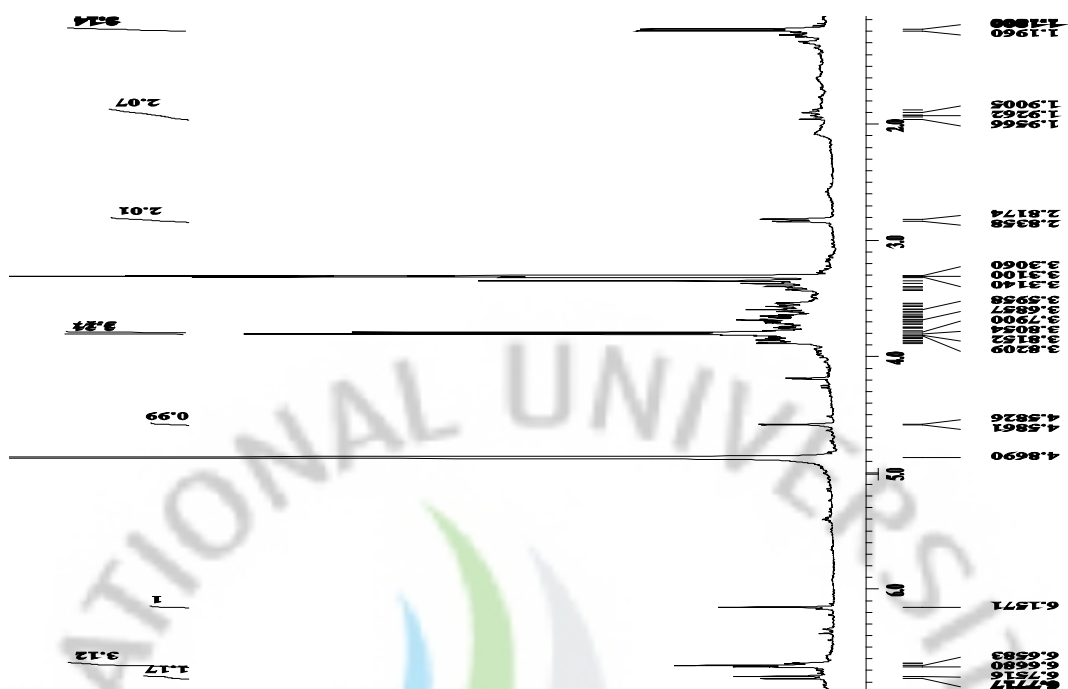


Figure 28.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **9** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



Figure 29.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **9** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

1-6. Compound 10, 11의 구조 동정

Compound 10은 문헌<sup>21)</sup>을 통해 3,3'-di-*O*-methylellagic acid로 확인되었고, compound 11 또한 문헌<sup>22)</sup>과 대조하여 3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-β-D-xylopyranoside로 확인되었다(Figures 30-34, Table 6).

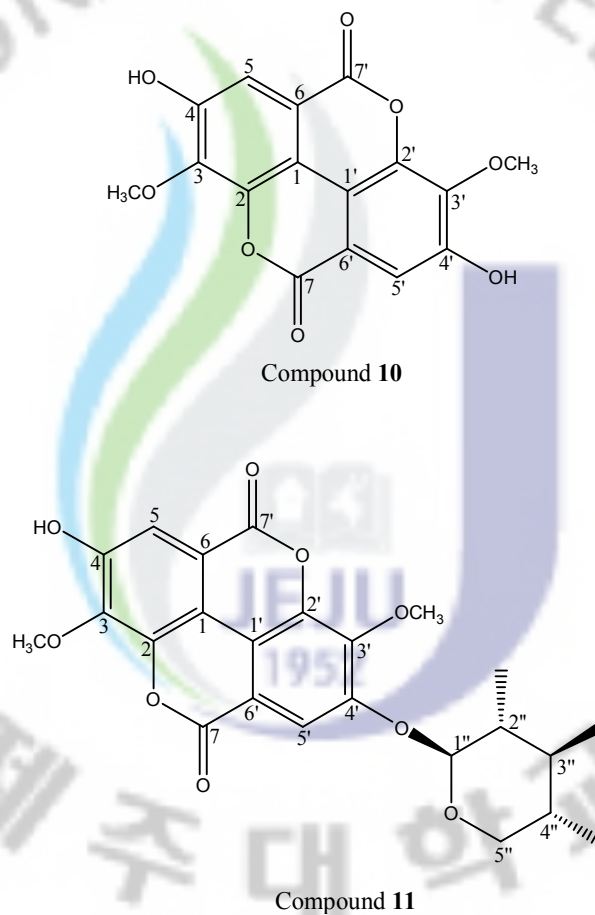


Figure 30. Chemical structures of compounds 10 and 11.



Table 6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **10** and **11** (400 and 100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

No.	Compound <b>10</b>		Compound <b>11</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		111.6		111.8
2		141.1		141.7
3		140.2		140.3
3-OCH <sub>3</sub>	4.04 (3H, s)	60.9	4.04 (3H, s)	60.9
4		152.2		153.5
5	7.50 (1H, s)	111.4	7.52 (1H, s)	111.8
6		112.0		112.8
7		158.4		158.5
1'		111.6		114.4
2'		141.1		140.9
3'		140.2		141.9
3'-OCH <sub>3</sub>	4.04 (3H, s)	60.9	4.07 (3H, s)	61.6
4'		152.2		151.1
5'	7.50 (1H, s)	111.4	7.75 (1H, s)	111.9
6'		112.0		111.9
7'		158.4		158.5
1''			5.16 (1H, d, 7.3)	101.8
2''				73.1
3''				76.1
4''				69.3
5''				65.8

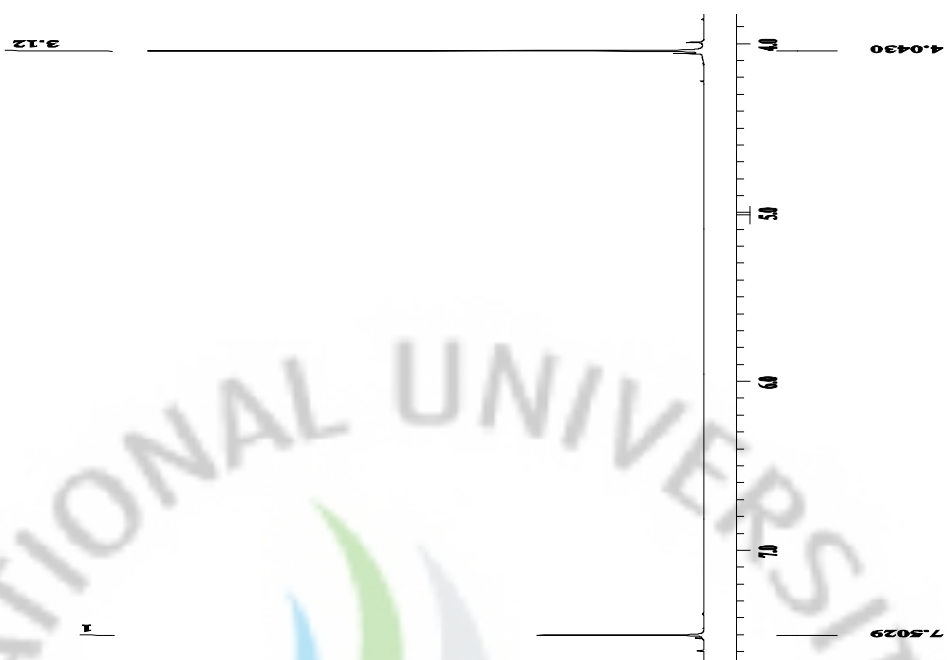


Figure 31.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 10 ( $\text{DMSO}-d_6$ ).

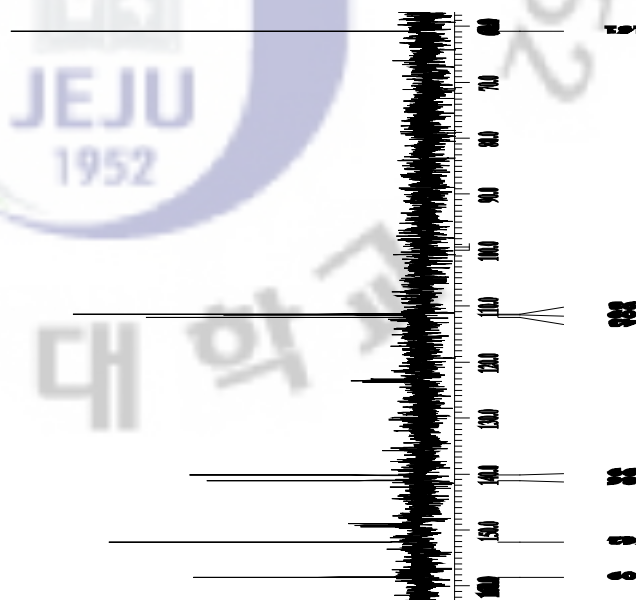


Figure 32.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 10 ( $\text{DMSO}-d_6$ ).



### 1-7. Compound 12의 구조 동정

Compound 12는  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 30개의 carbon 피크와  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서 6개의 메틸기의 단일피크를 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal 을 바탕으로 triterpene으로 예측하였다.

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서는 carboxylic acid( $\delta_{\text{C}}$  179.2), vinyl carbon(4차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  151.7, 2차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  110.3), 산소에 인접한 위치의 methine( $\delta_{\text{C}}$  78.4)의 특성 피크가 관찰되었다. 이들을 바탕으로 화합물 5는 betulinic acid 임을 예측하였으며, 문헌<sup>23)</sup>과 대조하여 확인하였다(Figures 35-37, Table 7).

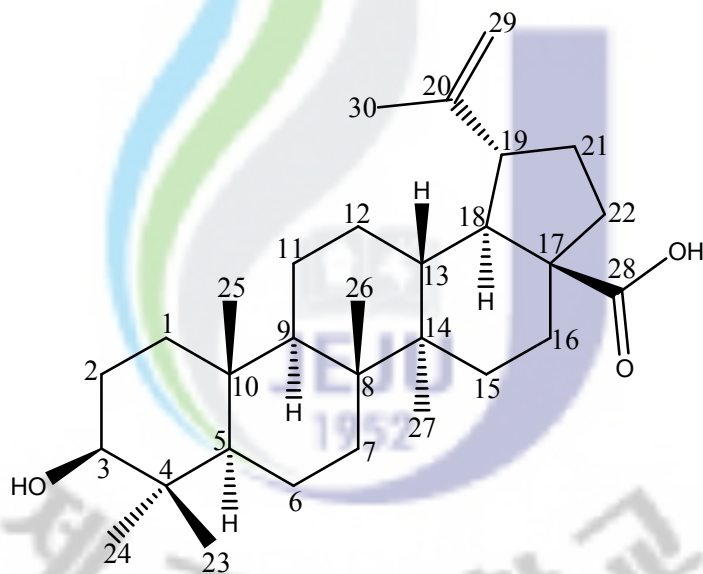


Figure 35. Chemical structure of compound 12.

Talbe 7.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **12** (400 and 100 MHz, pyridine- $d_5$ ).

No.	Compound <b>12</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		39.6
2		28.6
3	3.48 (1H, t, 7.6)	78.4
4		39.9
5		56.2
6		19.1
7		35.1
8		41.4
9		51.2
10		37.8
11		21.5
12		26.4
13	2.75 (1H, m)	38.9
14		43.2
15		30.6
16	2.65 (1H, m)	33.2
17		17.0
18		50.0
19	3.56 (1H, m)	48.1
20		151.7
21	2.26 (1H, overlapped)	31.5
22	2.26 (1H, overlapped)	37.9
23	1.24 (3H, s)	29.0
24	1.03 (3H, s)	16.7
25	0.83 (3H, s)	16.7
26	1.07 (3H, s)	16.8
27	1.08 (3H, s)	15.2
28		179.2
29	4.79 (1H, s)	110.3
	4.97 (1H, s)	
30	1.81 (3H, s)	19.8

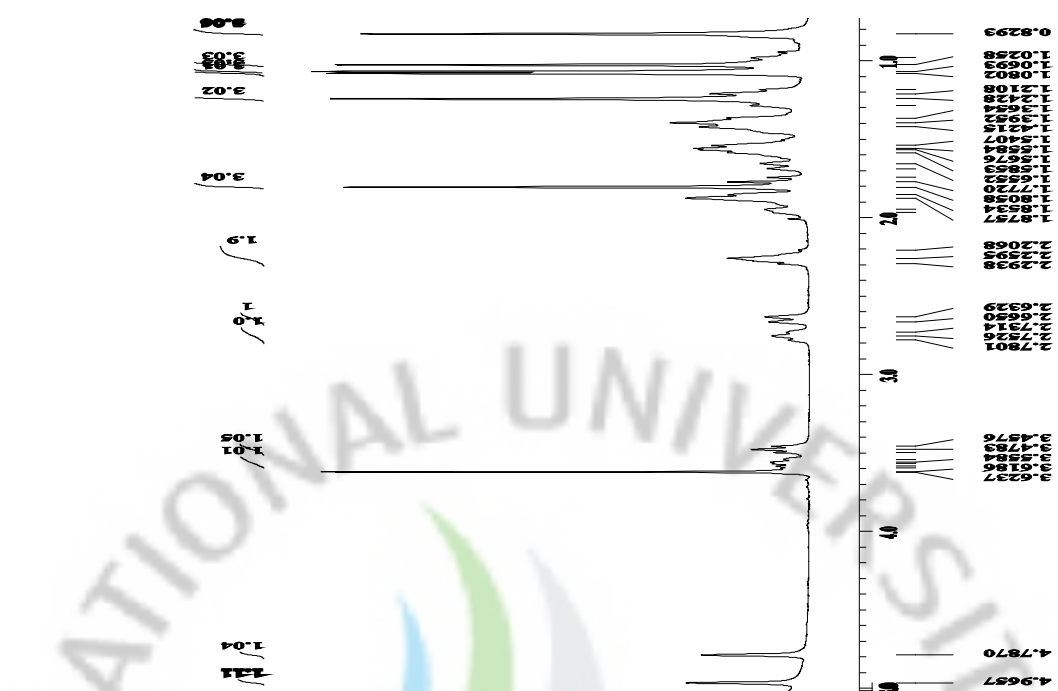


Figure 36.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 12 (pyridine- $d_5$ ).



Figure 37.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 12 (pyridine- $d_5$ ).

## 2. ESR을 이용한 항산화 활성 실험 결과

### 2-1. DPPH radical scavenging activity

#### 2-1-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical scavenging activity

비쭈기나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 그 중 100 µg/mL 농도에서 활성이 없었던 *n*-Hex fraction을 제외하고, 추출물과 나머지 분획물에 대하여 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 µg/mL의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여, SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 그 결과 SC<sub>50</sub> 값이 추출물의 경우 13.63 µg/mL, EtOAc fraction 13.99 µg/mL, *n*-BuOH fraction 10.36 µg/mL로 대조군인 vitamin C(4.63 µg/mL) 보다는 떨어지지만, 이들 역시 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 38-40).

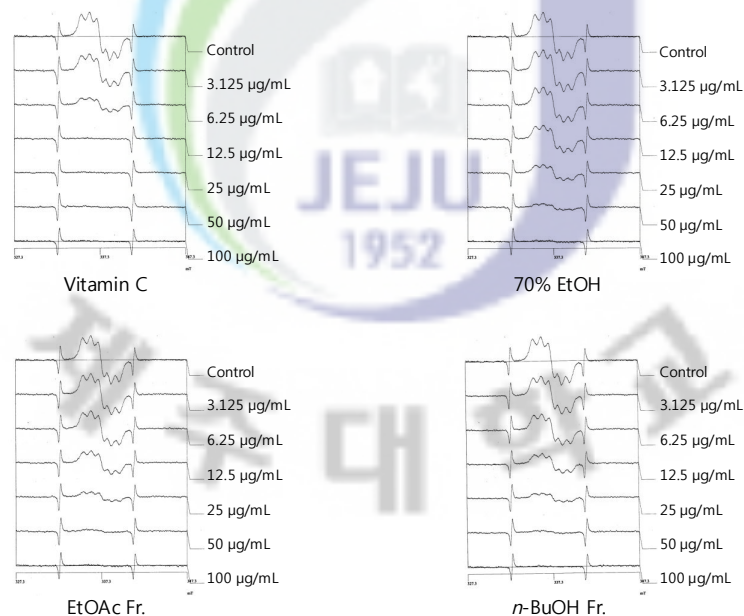


Figure 38. ESR spectrum of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions.

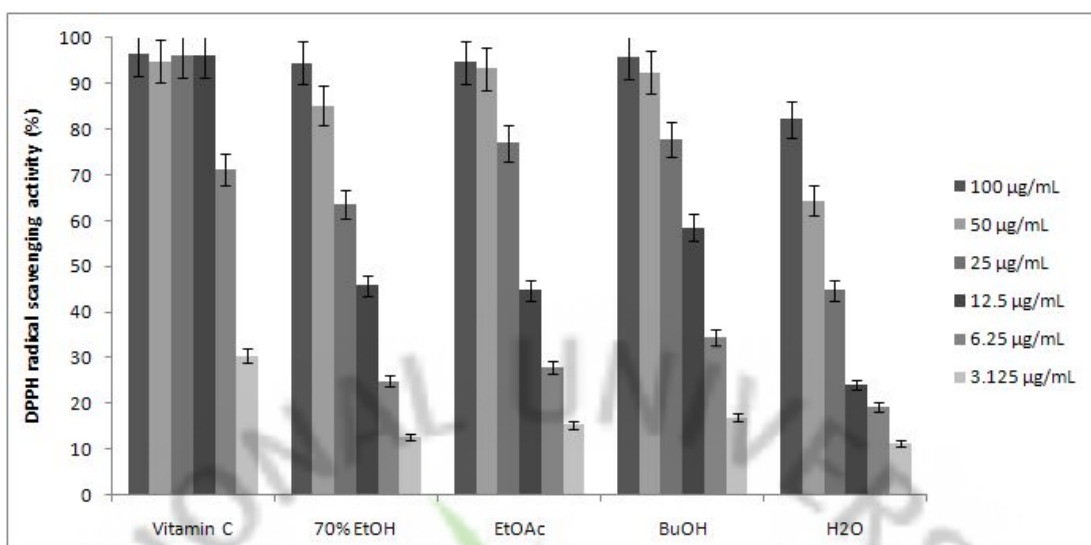


Figure 39. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions.

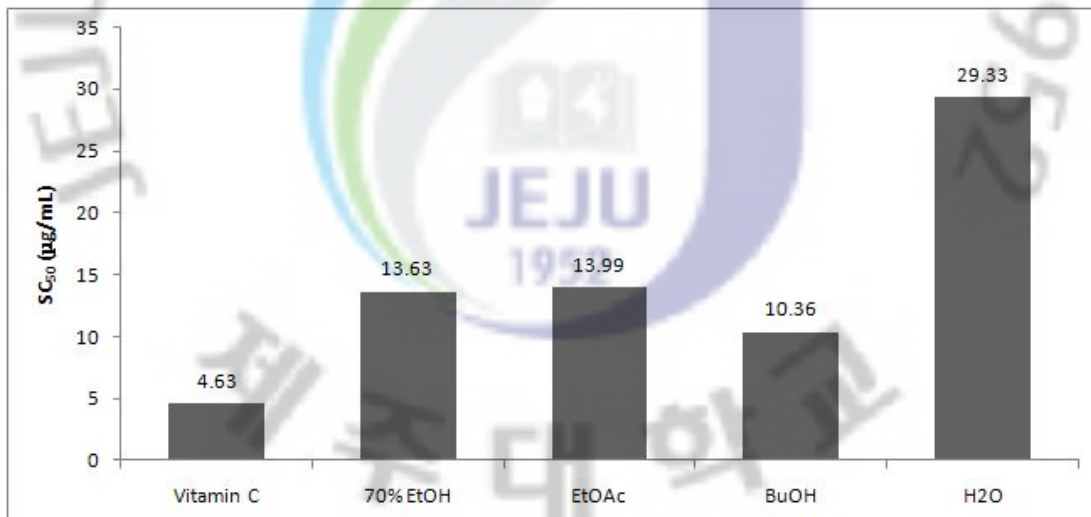


Figure 40. SC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions.



## 2-1-2. 분리된 화합물의 DPPH radical scavenging activity

비쭈기나무 가지로부터 분리된 compound들의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 그 중 활성이 있는 compound들에 대해서만 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여,  $SC_{50}$  값을 계산하였다. 그 결과 플라보노이드인 compound 1, 3, 4, 7의  $SC_{50}$  값이 각각 5.02, 6.64, 6.25, 5.38  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C(4.05  $\mu\text{g/mL}$ )와 유사한 값으로 이들 compound들이 우수한 radical 소거 활성 능력을 가짐을 확인할 수 있었다. 또한 플라보노이드의 배당체인 compound 2, 5, 6의  $SC_{50}$  값은 각각 10.00, 13.22, 8.59  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C 보다는 떨어지지만, 이들 역시 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 41-43).

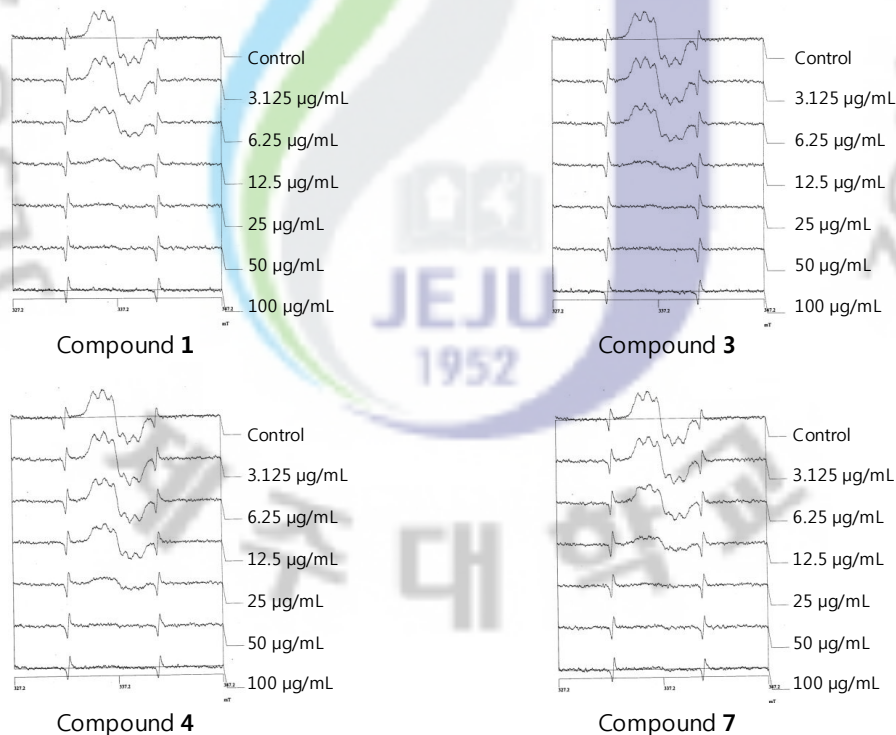


Figure 41. ESR spectrum of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds.

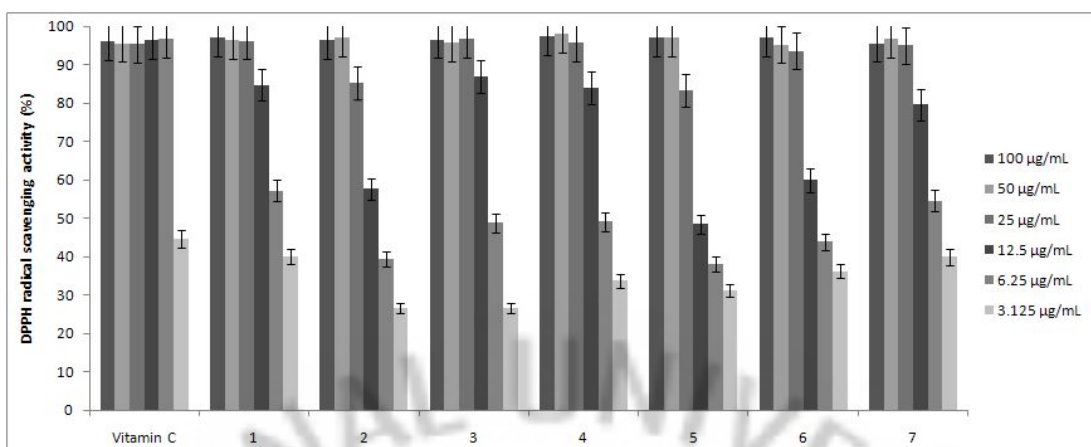


Figure 42. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds.

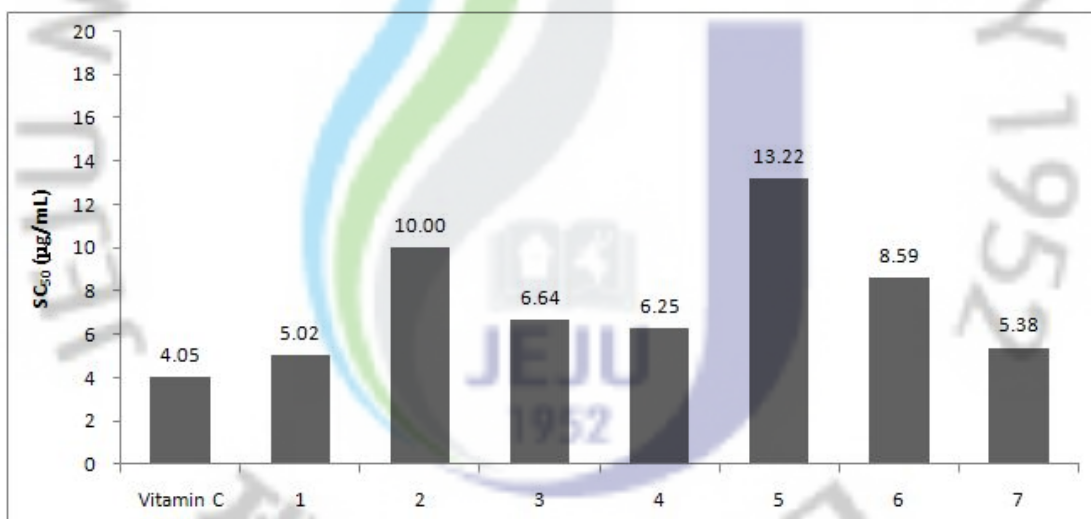


Figure 43. SC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities of isolated compounds.

## 2-2. Hydroxyl radical scavenging activity

### 2-2-1. 추출물 및 분획물의 hydroxyl radical scavenging activity

비쭈기나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 hydroxyl radical 소거 활성을 측정하였다. 그 중 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 활성이 없었던 *n*-Hex,  $\text{H}_2\text{O}$  fraction을 제외하고, 추출물과 EtOAc, *n*-BuOH fraction에 대하여 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여,  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다. 그 결과  $\text{SC}_{50}$  값이 추출물의 경우 442.54  $\mu\text{g/mL}$ , EtOAc fraction 262.41  $\mu\text{g/mL}$ , *n*-BuOH fraction 181.26  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C(153.60  $\mu\text{g/mL}$ ) 보다는 떨어지지만, 이들 역시 좋은 radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 44-46).

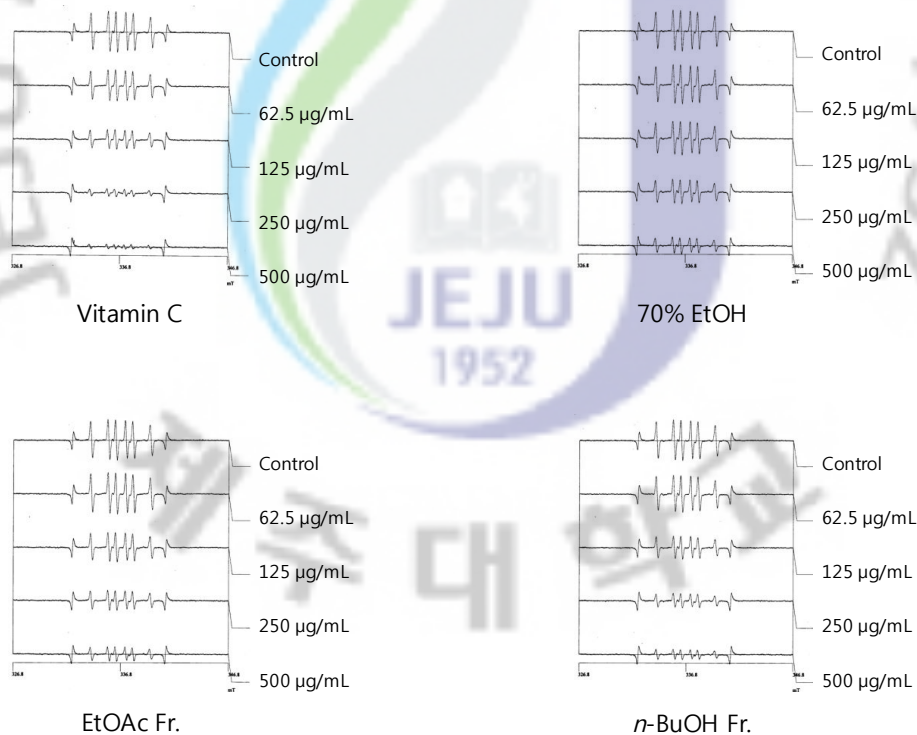


Figure 44. ESR spectrum of hydroxyl radical scavenging activities of extract and solvent fractions.

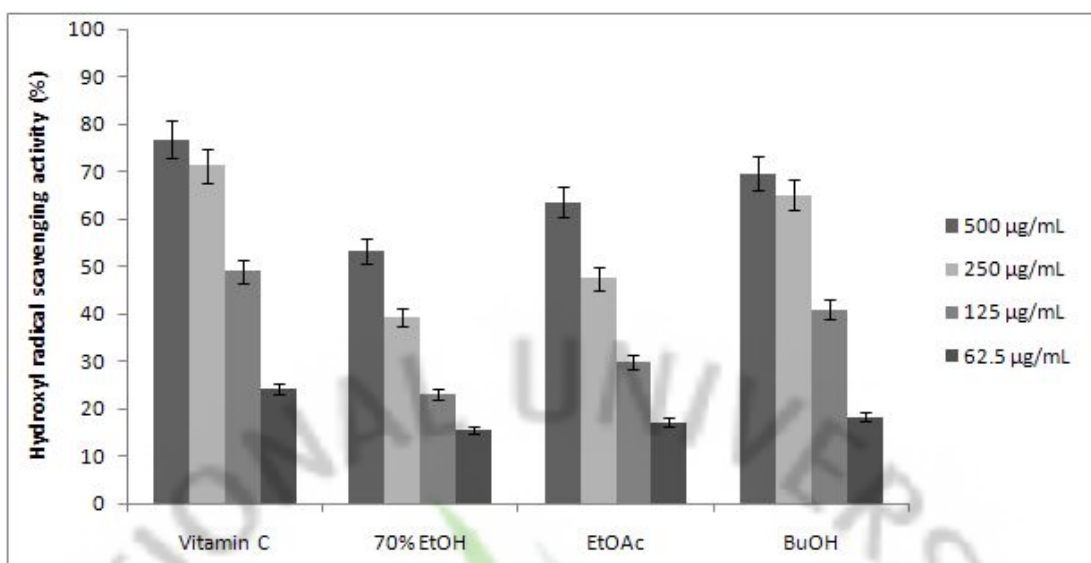


Figure 45. Hydroxyl radical scavenging activities of extract and solvent fractions.

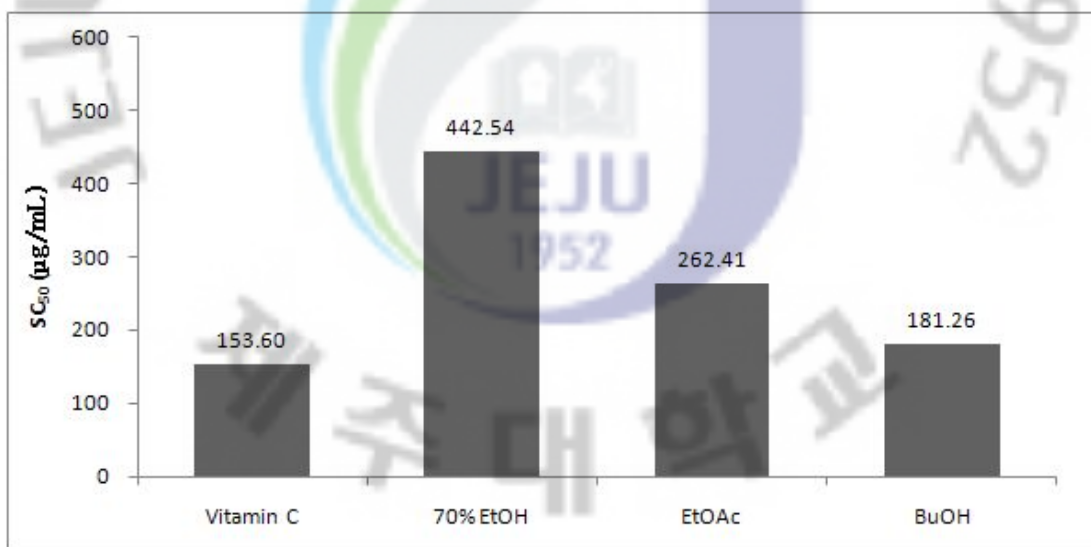


Figure 46. SC<sub>50</sub> value of hydroxyl radical scavenging activity of extract and solvent fractions.

## 2-2-2. 분리된 화합물의 hydroxyl radical scavenging activity

비쭈기나무 가지로부터 분리된 compound들의 hydroxyl radical 소거 활성을 측정하였다. 그 중 활성이 있는 compound들에 대해서만 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여,  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다. 그 결과 compound 7의  $\text{SC}_{50}$  값이 173.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인 vitamin C(151.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 유사한 매우 좋은 hydroxyl radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 compound 4의 경우는  $\text{SC}_{50}$  값이 395.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인 vitamin C 보다는 떨어지지만, 이 역시 좋은 활성을 보이는 것이며, compound 1과 3도 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 47-49).

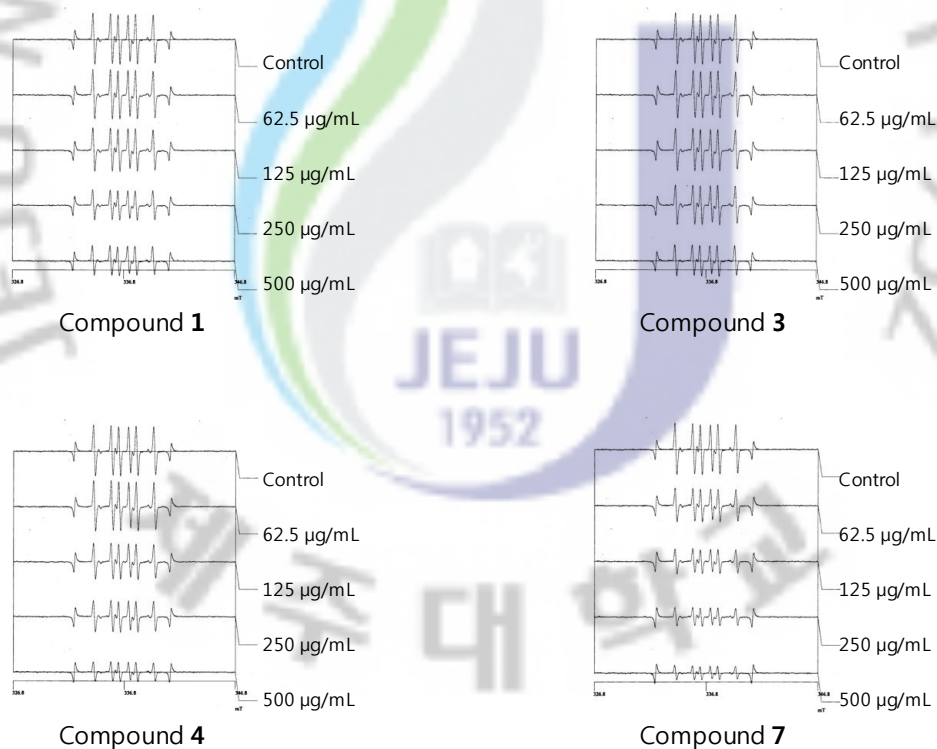


Figure 47. ESR spectrum of hydroxyl radical scavenging activities of isolated compounds.

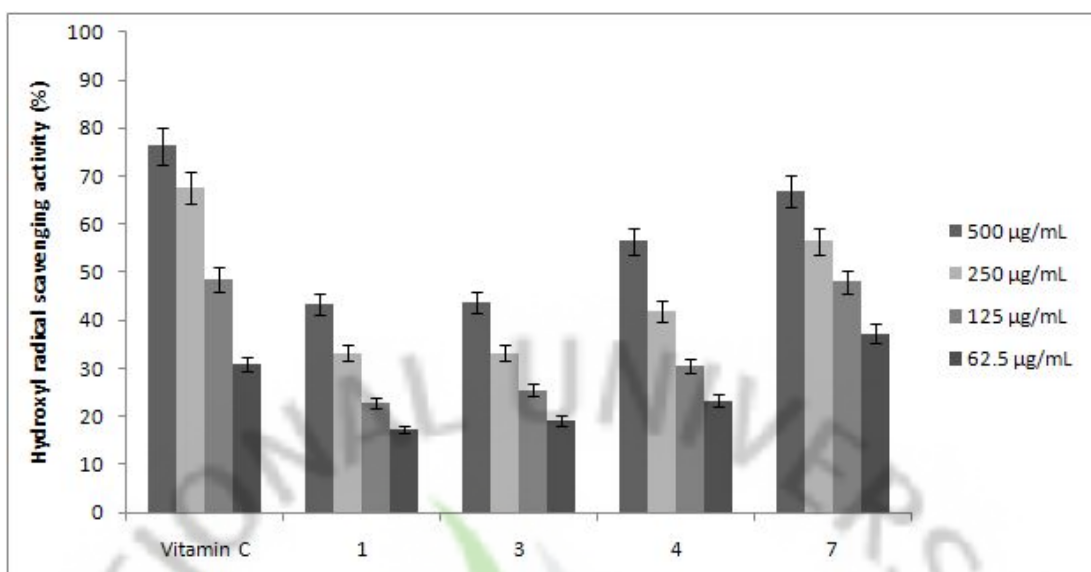


Figure 48. hydroxyl radical scavenging activities of isolated compounds.

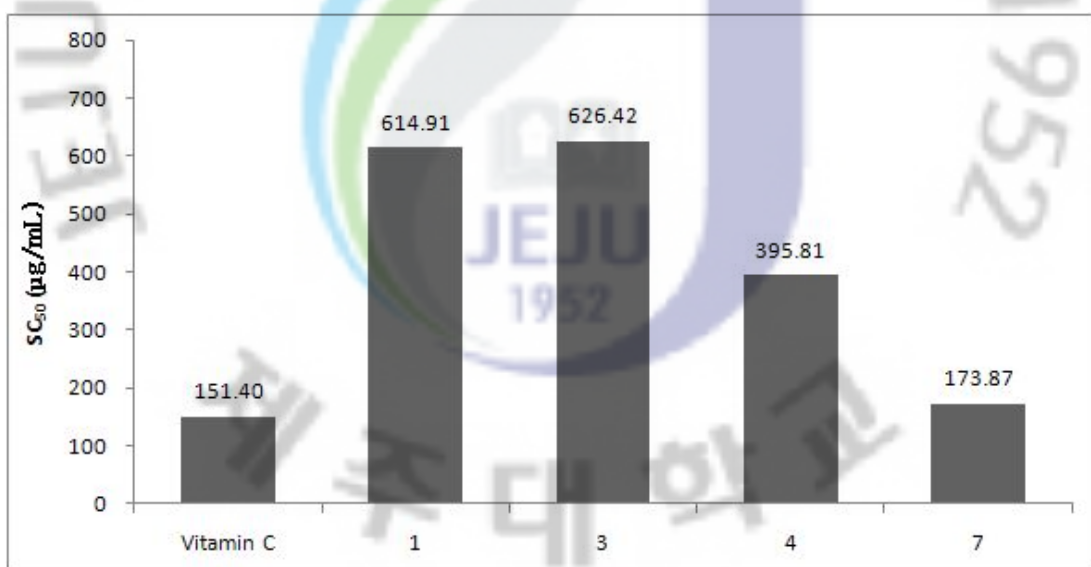


Figure 49. SC<sub>50</sub> value of hydroxyl radical scavenging activities of isolated compounds.

### 3. Tyrosinase inhibition activity

#### 3-1. 추출물 및 분획물의 tyrosinase inhibition activity

비쭈기나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 실험은 100, 50, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실시하였으며, 그 결과 추출물 및 분획물에서 tyrosinase 저해 활성이 약간 있음을 확인할 수 있었다(Figure 50).

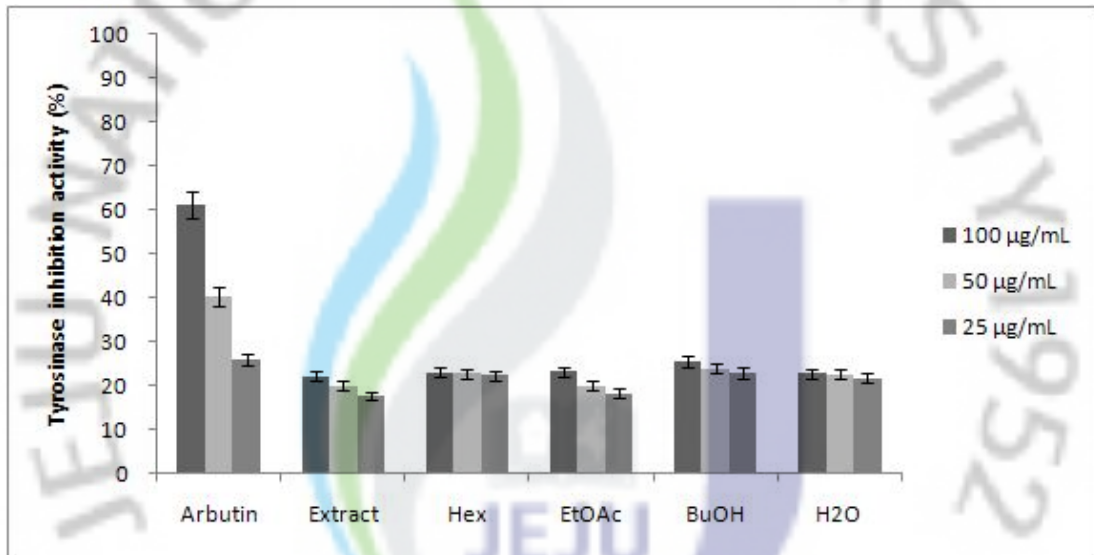


Figure 50. Tyrosinase inhibition activities of extract and solvent fractions.

#### 3-2. 분리된 화합물의 tyrosinase inhibition activity

비쭈기나무 가지로부터 분리된 compound들의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 중 활성이 있는 compound 11에 대해서만 100, 50, 25, 12.5, 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여,  $\text{IC}_{50}$  값을 계산하였다. 그 결과 compound 11의  $\text{IC}_{50}$  값이 36.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인

arbutin(67.20  $\mu\text{g/mL}$ ) 보다 더 좋은 tyrosinase 저해 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 51, 52).

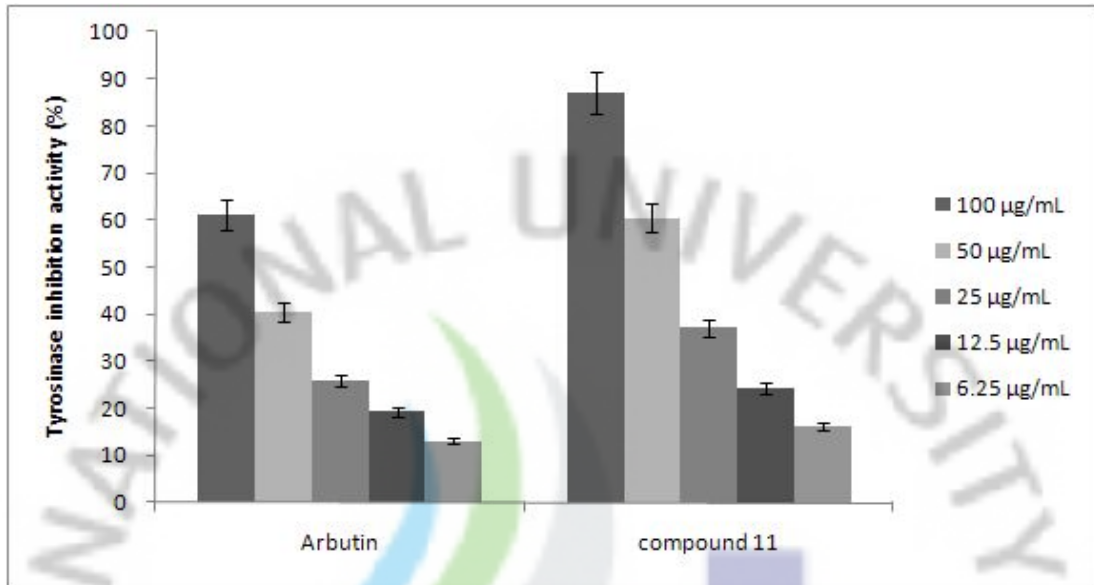


Figure 51. Tyrosinase inhibition activity of compound 11.

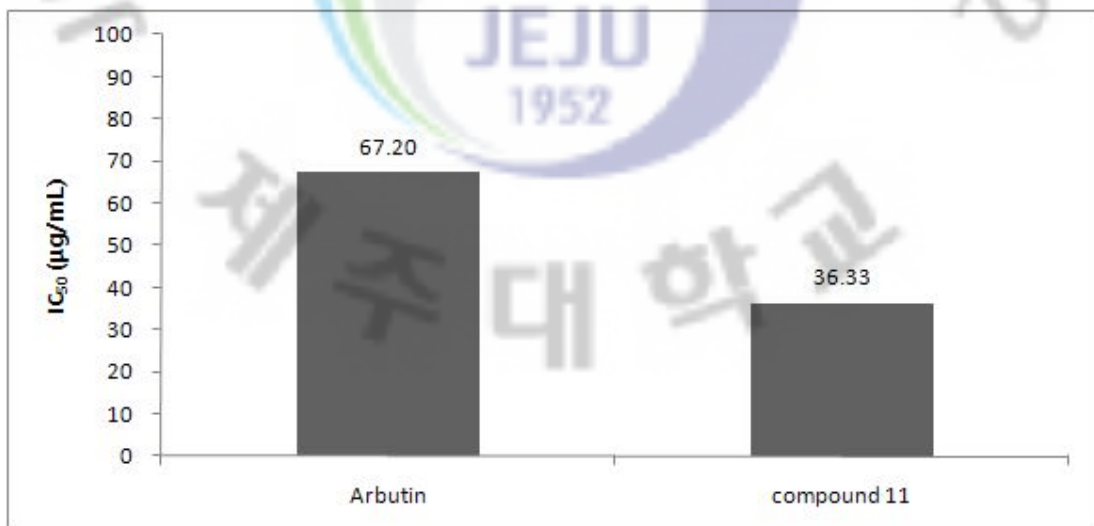


Figure 52.  $\text{IC}_{50}$  value of tyrosinase inhibition activity of compound 11.



#### 4. B16F10 melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험 결과

B16F10 melanoma cell을 이용하여 비쭈기나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대한 세포내에서의 미백효과를 측정하였다. 우선 sample을 100  $\mu$ g/mL의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 70% 에탄올 추출물에서 69.9%의 저해율을 보였으며, *n*-Hex fraction 75.7%, *n*-BuOH fraction 71.7%, H<sub>2</sub>O fraction 46.9%으로 대조군인 arbutin(18.7%) 보다 더 좋은 활성을 보였다. 그러나 *n*-Hex fraction의 경우는 cell에 대해 독성이 있었다 (Figure 53).

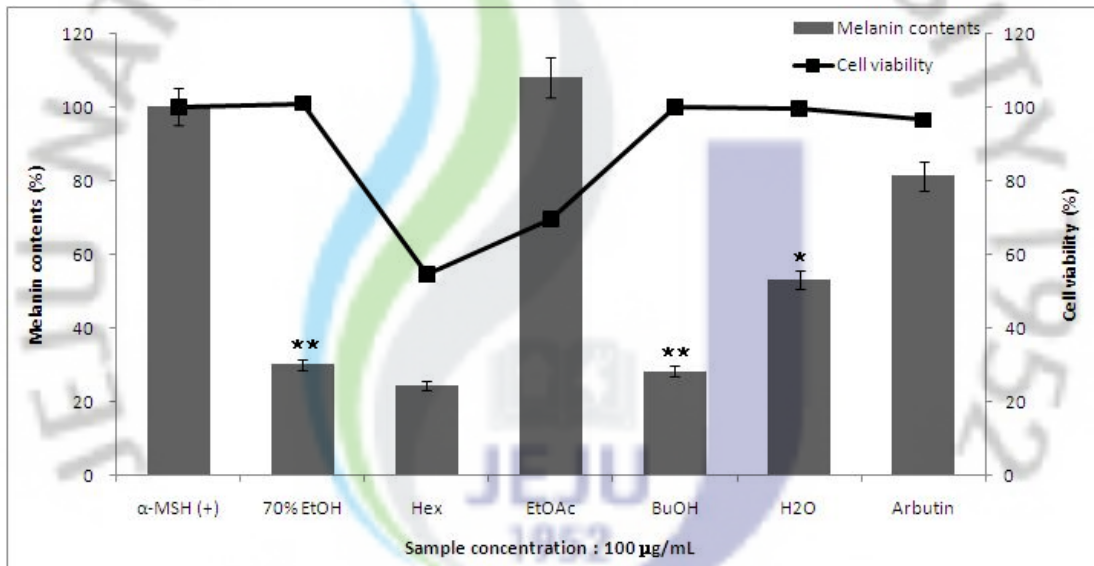


Figure 53. Effects of extract and solvent fractions on melanin contents and cytotoxicity.

위 결과를 바탕으로 100  $\mu$ g/mL 농도에서 활성이 있던 sample들에 대해 100, 50, 25  $\mu$ g/mL의 농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과 70% 에탄올 추출물과 *n*-BuOH fraction이 대조군인 arbutin 보다 더 좋은 활성을 보였으며, H<sub>2</sub>O

fraction 또한 대조군과 비슷한 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 *n*-Hex fraction의 경우는 활성이 있는 것처럼 보였지만 cell에 대해 독성이 있었다(Figure 54).

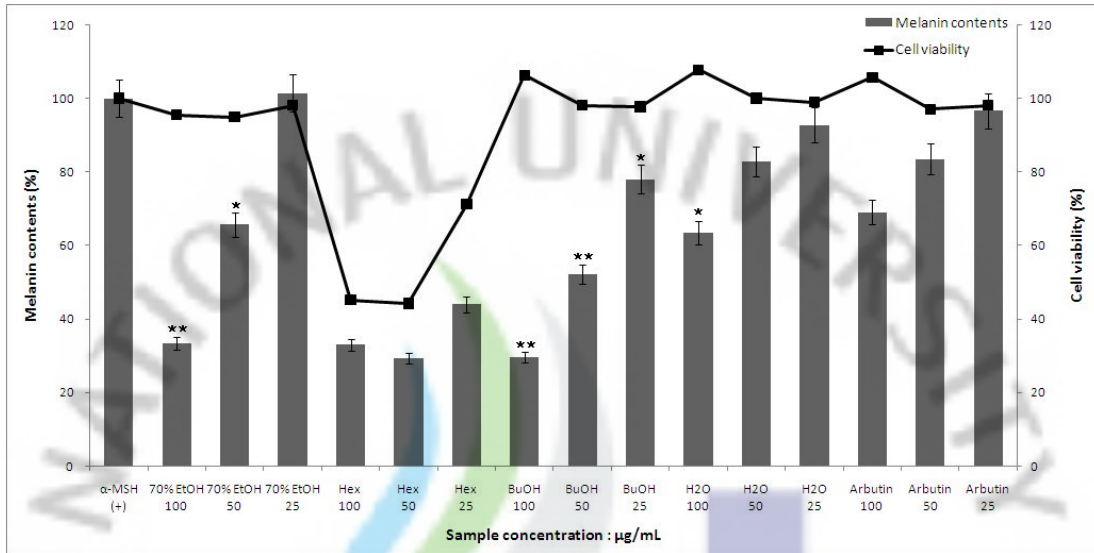


Figure 54. Effects of extract and *n*-Hex, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O fractions on melanin contents and cytotoxicity.

## 5. Elastase inhibition activity

### 5-1. 추출물 및 분획물의 elastase inhibition activity

비쭈기나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 elastase 저해 활성을 측정하였다. 실험은 100, 50, 25 µg/mL의 농도로 시료의 농도를 2배씩 풀히면서 실시하였으며, 그 결과 추출물 및 분획물에서 elastase 저해 활성이 약간 있음을 확인할 수 있었다(Figure 55).

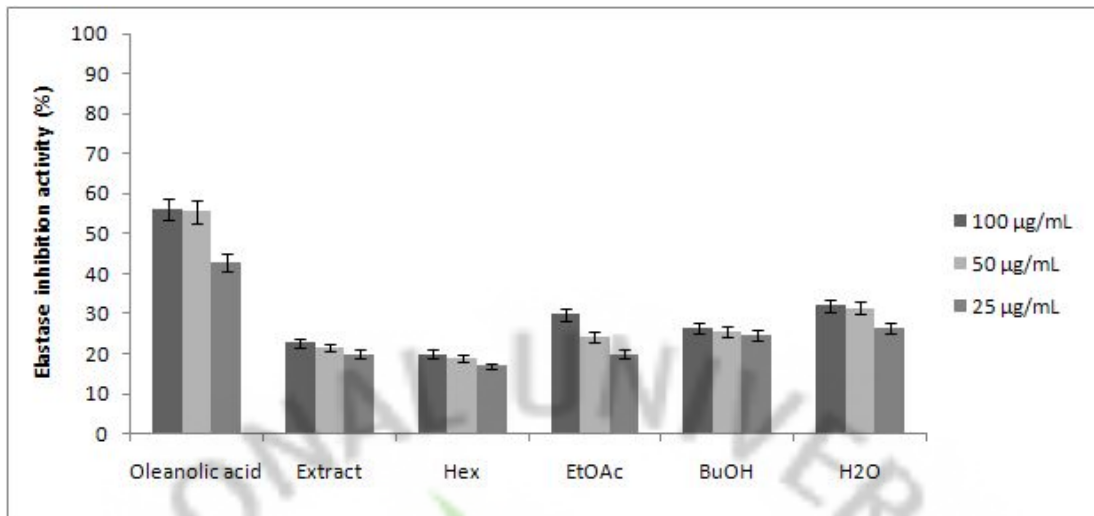


Figure 55. Elastase inhibition activities of extract and solvent fractions.

#### 5-2. 분리된 화합물의 elastase inhibition activity

비쭈기나무 가지로부터 분리된 compound들의 elastase 저해 활성을 측정하였다. 그 중 활성이 있는 compound 12에 대해서만 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 µg/mL의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여, IC<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 그 결과 compound 12의 IC<sub>50</sub> 값이 17.96 µg/mL로 대조군인 oleanolic acid(29.62 µg/mL) 보다 더 좋은 elastase 저해 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figures 56, 57).

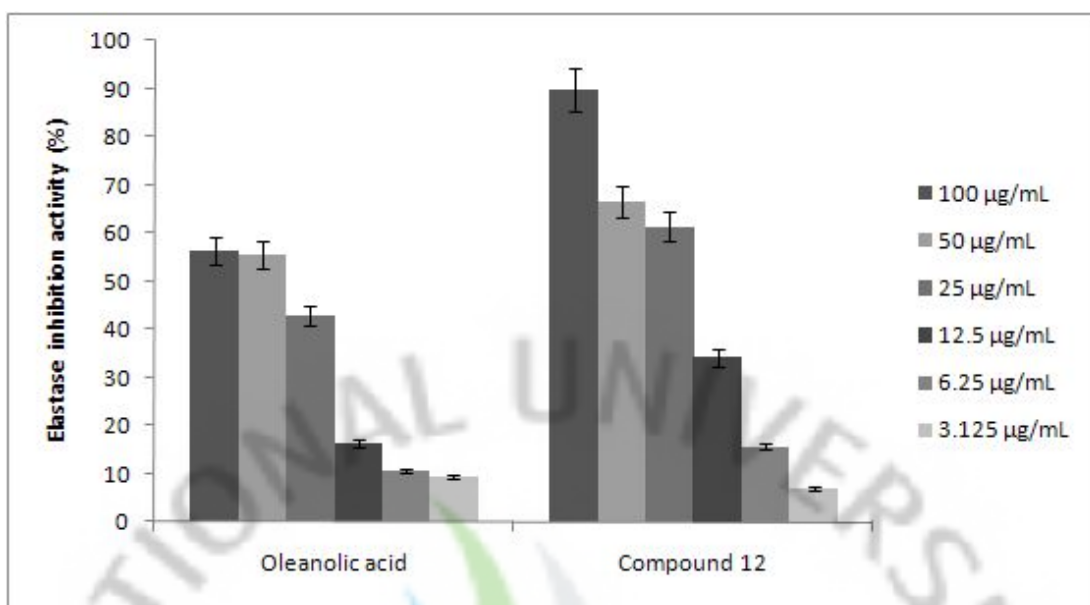


Figure 56. Elastase inhibition activity of compound 12.

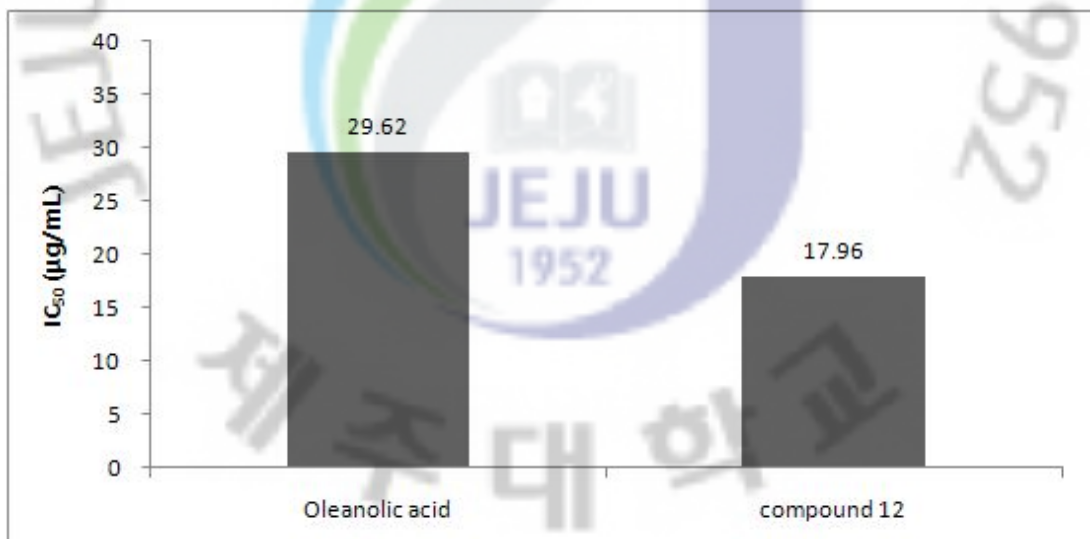


Figure 57.  $IC_{50}$  value of elastase inhibition activity of compound 12.

#### IV. 요약 및 결론

비쭈기나무(*Cleyera japonica* Thunb.) 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고, 화합물을 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물의 항산화 활성 및 피부미백, 주름개선 효과를 검색하여 천연 항산화제 및 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 하였다.

비쭈기나무 가지 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다. 이들 중 ethyl acetate fraction에 대해 vacuum liquid chromatography(VLC), Sephadex LH-20 및 silica gel column chromatography를 수행하여 1D, 2D NMR을 이용해 화합물의 구조를 확인하였고 문헌과 비교하여 총 12개의 화합물을 분리·동정 하였다.

분리된 화합물은 catechin(1), catechin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside(2), *epi*-catechin(3), taxifolin(4), taxifolin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside(5), taxifolin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside(6), proanthocyanidin A-1(7), 3,5,7-trihydroxylchromone 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside(8), aviculin(9), 3,3'-di-*O*-methylelagic acid(10), 3,3'-di-*O*-methylelagic acid 4'-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside(11), betulinic acid(12)로 확인되었다. 이들은 모두 비쭈기나무에서 처음으로 분리된 화합물이다.

항산화 활성 검색 결과 추출물, ethyl acetate 및 *n*-butanol fraction에서 좋은 DPPH radical과 hydroxyl radical 소거 활성을 보였다. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성 실험에서는 compound 1, 3, 4, 7의 SC<sub>50</sub> 값이 5.02  $\mu$ g/mL, 6.64  $\mu$ g/mL, 6.25  $\mu$ g/mL, 5.38  $\mu$ g/mL로 대조군인 vitamin C(4.05  $\mu$ g/mL)와 유사한 활성이 있음을 확인하였다. 또한 compound 2, 5, 6의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 10.00  $\mu$ g/mL, 13.22  $\mu$ g/mL, 8.59  $\mu$ g/mL로 이들 역시 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있었다. 그리고 hydroxyl radical 소거 활성 실험에서는 compound 1, 3, 4, 7의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 614.91  $\mu$ g/mL, 625.42  $\mu$ g/mL, 395.81  $\mu$ g/mL, 173.87  $\mu$ g/mL로 좋은 활성을 보였으며, 특히 compound 7은 대조군인 vitamin

C(151.40  $\mu\text{g/mL}$ )와 유사한 매우 좋은 hydroxyl radical 소거 활성이 있었다.

미백 활성 실험에서는 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해 활성은 거의 없었으나, 분리된 화합물 중 compound 11의  $\text{IC}_{50}$  값이 36.33  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 arbutin(67.20  $\mu\text{g/mL}$ ) 보다 더 좋은 활성이 있었다. 또한 B16F10 melanoma cell을 이용한 melnogenesis 저해효과 실험에서 추출물 및 *n*-butanol fraction 이 대조군인 arbutin 보다 더 좋은 활성을 보였다.

그리고 주름개선 효과를 보는 elastase 저해 활성 실험에서는 추출물 및 분획물의 활성은 거의 없었으나, 분리된 화합물 중 compound 12의  $\text{IC}_{50}$  값이 17.96  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 oleanolic acid(29.62  $\mu\text{g/mL}$ ) 보다 더 좋은 활성이 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 비쭈기나무 가지를 이용한 천연 향산화제 및 피부미백, 주름개선에 효과가 있는 천연 기능성 화장품 소재로의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

## V. 참고문헌

- 1) Sung-Hwan Kim and Il-Chool Kim; "Antioxidative Properties and Whitening Effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizoma*" *J East Asian Soc Dietary Life*, **2008**, 18(4), 618-623.
- 2) Sun-Ok Jee; "Antioxidant Activities and Whitening Effect of the Mulberry(*Morus alba L.*) Root Bark Extracts" *Korean J. Plant Res.*, **2009**, 22(2), 145-151.
- 3) 김미보, 현선희, 박재성, 강미애, 고영환, 임상빈; "제주 자생식물 고압용매 추출물의 통합적 항산화 능력" *한국식품영양과학회지*, **2008**, 37(11), 1491-1496.
- 4) 강미애, 김미보, 김지훈, 고영환, 임상빈; "식물 40종 고압용매 추출물의 통합적 항산화 능력 및 항균 활성" *한국식품영양과학회지*, **2010**, 39(9), 1249-1256.
- 5) Jeong Hyang Woo, So Lim Shin, Young Deug Chang, and Cheol Hee Lee; "Screening for Antioxidant Effects of Aerial Part Extracts Obtained from Sisten Compositae Species" *Folwer Res. J.*, **2009**, 17(4), 271-278.
- 6) 고영국; "제주산 재래감귤 과피와 종자 추출물의 항산화 활성 및 주요 플라보노이드 분포" *제주대학교 대학원*, **2009**, 석사학위논문.
- 7) Yinzhe Jin, So Young Ahn, Eun suk Hong, Guang Hua Li, Eun-Ki Kim, and Kyung Ho Raw; "Extraction of Whitenin Agents from Natural Plants and Whitening Effect" *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **2005**, 16(3), 348-353.

- 8) 하병조; "화장품학" 수문사, 1999
- 9) 김태혁, 유진균, 김정미, 백종미, 김현숙, 박정해, 최면; "정공피 추출물의 항산화 및 미백효과에 관한 연구" *한국식품영양과학회지*, 2010, 39(10), 1418-1424.
- 10) 유형은, Leaniza, 배영주, 이대형, 박종상, 곽한식, 김하근, 이종수; "각종 약용 식물로부터 노화 억제 관련 생리활성 물질의 탐색 및 추출 조건" *한국식품영양과학회지*, 2005, 34(8), 1136-1142.
- 11) 박시향, 홍유미, 최영준, 최진호, 김병관; "자외선 조사 무모취 피부조직에 도포한 애엽(Mugwort) 추출물의 주름개선 효과" *한국식품영양과학회지*, 2008, 37(9), 1136-11.
- 12) Teresita S. Martin, Hiroe Kiduzaki, Masashi Hisamoto, and Nobuji Nakatani; "Constituents of *Amomum tsao-ko* and Their Radical Scavenging and Antioxidant Activities" *JAOCS*, 2000, 77(6), 667-673.
- 13) Manfred Bonefeldt, Hilmar Friedricha and Herbert Kolodziej; "(+)-catechin 3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*" *Phytochemistry*, 1986, 25(5), 1205-1207.
- 14) Kanji Ishimarua, Gen-Ichiro Nonakaa and Itsuo Nishioka; "Flavan-3-ol and procyanidin glycosides from *quercus miyagii*" *Phytochemistry*, 1987, 26(4), 1167-1170.
- 15) Xiang Hua Han, Seong Su Hong, Ji Sang Hwang, Myung Koo Lee, Bang Yeon Hwang, and Jai Seup Ro; "Monoamine Oxidase Inhibitory Components from *Cayratia japonica*" *Arch Pharm Res*, 2007, 30(1), 13-17.



- 16) E. Chosson, A. Chaboud, A. J. Chulia and J. Raynaud; "Dihydroflavonol glycoside from *Rhododendron ferrugineum*" *Phytochemistry*, **1998**, 49(5), 1431-1433.
- 17) M.D. Lucas-Filbh, G.C. Silva, S.F. Cortes, T.R. Mares-Guia, V. Perpetua, Ferraz, C.P. Serra, F.C. Braga; "ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz" *Phytomedicine*, **2001**, 17, 383-387.
- 18) Hongxiang Lou, Yoshimitsu Yamazaki, Tsutomu Sasaki, Masaru Uchida, Hideoki Tanaka, Syuichi Oka; "A-type proanthocyanidins from peanut skins" *Phytochemistry*, **1999**, 51, 297-308.
- 19) Gang Chen, Hui Zi Jin, Xue Feng Li, Qi Zang, Yun Heng Shen, Shi Kai Yan, and Wei Dong Zhang; "A new Chromone Glycoside from *Rhododendron spinuliferum*" *Arch Pharm Res*, **2008**, 31(8), 970-972.
- 20) Hyoung Ja Kim, Eun-Rhan Woo, and Hokoon Park; "A Novel Lignan and Flavonoids from *Polygonum aviculare*" *Journal of Natural Products*, **1994**, 57(5), 581-586.
- 21) Grzegorz Pakulski and Jaromir Budzianowski; "Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from *in vitro* cultures" *Phytochemistry*, **1996**, 41(3), 775-778.
- 22) Xing-Cong Li, Hala N. Elsohly, Charles D. Hufford, and Alice M. Clark; "NMR assignments of ellagic acid derivatives" *Magn. Reson. Chem.*, **1999**, 37, 856-859.

23) Chen Peng, Geoffrey Bodenhausen, Shengxiang Qiu, Harry H. S. Fong, Norman R. Farnsworth, Shengang Yuan and Chongzhi Zheng; "Computer-Assisted Structure Elucidation: Application of CISOC-SES to the Resonance Assignment and Structure Generation of Betulinic Acid" *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, 36, 267-278.

