



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](#)

博士學位論文

새덕이나무 추출물의 활성성분 및  
제주자생식물 에센셜 오일의  
항균, 항염 활성 규명



濟州大學校 大學院

化學科

金相淑

2011年 2月

새덕이나무 추출물의 활성성분 및  
제주자생식물 에센셜 오일의  
항균, 항염 활성 규명

指導教授 李南昊

金相淑

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

金相淑의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

濟州大學校 大學院

2011年 2月

Identification of Active Constituents from  
*Neolitsea aciculata* and Antibacterial,  
Antiinflammatory Activities of Jeju Plants  
Essential Oils

Sang Suk Kim  
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of Doctor of Philosophy

2011. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman, .....  
Dissertation Committee, .....  
Dissertation Committee, .....  
Dissertation Committee, .....  
Dissertation Committee, .....

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

## List of Abbreviations

<i>N. aciculata</i>	<i>Neolitsea aciculata</i>	Ext.	extract
v	VLC subfraction	MeOH	methanol
np	normal-phase,	EtOH	ethanol
se	sephadex LH-20,	<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
Fr.	fraction	EtOAc	ethyl acetate
CC	column chromatography	DMSO	dimethylsulfoxide
TLC	Thin Layer Chromatography	DPPH	1,1-dimethyl-2-picrylhydrazyl
SC <sub>50</sub>	Scavenging concentration of 50%	Vit. C	vitamin C
IC <sub>50</sub>	Inhibition concentration of 50%	NMR	Nuclear resonance Magnetic Resonance

## ABSTRACT

Bioassay-guided investigation of the stems and leaves of *Neolitsea aciculata* led to the isolation of 16 compounds: methyl linoleate (**1**), kaempferol 3-*O*-rhamnose-7-*O*-glucopyranoside (**2**), catechin (**3**), epicatechin (**4**), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-(2'',3''-E-di-*p*-coumaroyl)-rhamnoside (**5**), 2''-*p*-coumaroylafzelin (**6**), feruloyl tyramine (**7**), aralia cerebroside (**8**),  $\beta$ -sitosterol (**9**), daucosterol (**10**), oleic acid (**11**), trilaurin (**12**), blumenol A (**13**), afzelin (**14**), quercitrin (**15**), 1,2-dilinolenoylglycerol-3-*O*-galactopyranosyl-glycerol (**16**). Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic studies as well as by comparison with available data in the literature. Among these compounds, compound **15** showed significant DPPH free radical scavenging activity and SC<sub>50</sub> was 21.7 ug/mL. Compound **5**, **6**, and **8** showed significant tyrosinase inhibition activities and IC<sub>50</sub> was 49.11 ug/mL, 46.76 ug/mL, and 31.74 ug/mL, respectively. Compound **5**, **6**, **7**, and **14** showed significant tyrosinase inhibition activities and IC<sub>50</sub> was 26.2 ug/mL, 77.3 ug/mL, 62.4 ug/mL, and 56.8 ug/mL, respectively.

In this study, the chemical compositions of 9 kind of Jeju plant essential oils were analyzed and their biological activities are tested. The chemical composition of the volatile constituents from Jeju plants were determined by GC and GC/MS spectrometric analysis with the aid of Wiley Library and RI indice searches. The major constituents were identified as 1-dodecen-3-yne (12.5%) from *Neolitsea aciculata* leaves, bornyl acetate (30.35%) from *Abies koreana* leaves, nerolidol (26.93%) from *Lindera erythrocarpa* leaves, dl-limonene (30.10%) from *Torreya nucifera* leaves, eucalyptol (21.8%) from *Illicium anisatum* leaves, kaurene (17.2%) from *Cryptomeria japonica* leaves,  $\beta$ -pinene (66.07%) from *Peucedanum japonicum* leaves, dehydroelsholtzia (82.46%) from *Elsholtzia*

*splendens* leaves, and *p*-cymene (50.41%) from *Thymus quinquecostatus* leaves. To evaluate the *in-vitro* anti-acne activities, they were tested against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, which are involved in acne evolution. *N. aciculata*, *A. koreana*, *L. erythrocarpa*, *T. nucifera*, *C. japonica*, *P. japonicum*, and *T. quinquecostatus* oils exhibited antibacterial activity against both *P. acnes* and *S. epidermidis*. The cytotoxicity effects of the nine oils were determined by colormetric MTT assays using normal human fibroblasts and human keratinocytes cells. In addition, they reduced LPS-induced secretion of interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in THP-1, an indication of anti-inflammatory effects. Therefore, based on these results, we suggest that *N. aciculata*, *A. koreana*, *L. erythrocarpa*, *T. nucifera*, *C. japonica*, *P. japonicum*, , *E. splendens* and *T. quinquecostatus* essential oils are attractive acne-mitigating candidates for topical application.

## 목 차

ABSTRACT .....	i
목 차 .....	iii
LIST OF TABLES .....	vii
LIST OF FIGURES .....	ix
LIST OF SCHEMES .....	xiii
I. 서 론 .....	1
1. 천연물의 이용 .....	1
2. 에센셜오일 .....	5
3. 여드름 .....	9
4. 항염 활성 .....	13
II. 과제 1: 새덕이나무 추출물로부터 활성성분 규명 .....	15
1. 재료 .....	15
2. 실험방법 .....	16
2-1. 시약 및 기기 .....	16
2-2. 새덕이나무의 추출물 및 용매 분획 .....	17
2-3. 활성 검색 .....	18
2-3-1. Tyrosinase inhbition 활성 검색 .....	18
2-3-2. DPPH radical scavenging 활성 검색 .....	19
2-3-3. Elastase inhibition 활성 검색t .....	20
2-3-4. 세포 배양 .....	21
2-3-5. 멜라닌 합성 저해효과 측정 실험 .....	21
2-3-6. Immunoblotting .....	22
2-3-7. 세포독성 평가 .....	23
2-3-8. 통계분석 .....	23



2-4. 활성성분의 분리과정 .....	24
2-4-1. Compound 1, 2의 분리과정 .....	24
2-4-2. Compound 3, 4, 5, 6, 7의 분리과정 .....	25
2-4-3. Compound 8의 분리과정 .....	26
2-4-4. Compound 9, 10, 11, 12의 분리과정 .....	27
2-4-5. Compound 13, 14, 15, 16의 분리과정 .....	28
3. 결과 .....	29
3-1. 새덕이나무 가지 추출물 및 용매 분획물들의 활성 .....	29
3-1-1. Tyrosinase inhibition 활성 검색 .....	29
3-1-2. DPPH radical scavenging 활성 검색 .....	31
3-1-3. Elastase inhibition 활성 검색 .....	32
3-1-4. B16(F10)에서의 미백활성 측정 .....	33
3-1-5. B16(F10)에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 MITF의 저해 활성 .....	35
3-1-6. Human normal fibroblast cell에서의 세포 독성 .....	36
3-2. 새덕이나무 가지에서 분리된 compounds .....	37
3-2-1. Compound 1, 2의 구조동정 .....	37
3-2-2. Compound 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12의 구조동정 .....	39
3-3. 새덕이나무 잎 추출물 및 용매 분획물들의 활성 .....	50
3-3-1. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과 .....	50
3-3-2. Elastase inhibition 활성 검색 결과 .....	51
3-3-3. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과 .....	52
3-4. Compound 13, 14, 15, 16의 구조동정 .....	53
3-5. 화합물들의 활성 결과 .....	58
3-5-1. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과 .....	58
3-5-2. Tyrosinase inhibition 활성검색 결과 .....	59
3-5-3. Elastase inhibition 활성 검색 결과 .....	60
4. 결론 .....	61

Ⅲ. 과제 2: 제주자생식물 에센셜 오일의 항균, 항염활성 규명 .....	62
1. 실험방법 .....	62
1-1. 정유추출 및 수율 .....	62
1-2. GC-MS 성분 분석 .....	63
1-3. Paper disc diffusion method .....	64
1-4. Minimum inhibitory concentration(MIC) .....	65
1-5. 세포배양 .....	65
1-6. 세포독성 평가 .....	65
1-7. THP-1 세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-8 생성 억제 측정 .....	66
1-8. 통계분석 .....	66
2. 결과 .....	67
2-1. 새덕이나무 .....	67
2-1-1. 새덕이나무 특징 .....	67
2-1-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	68
2-1-3. 에센셜 오일의 항균 활성 .....	70
2-1-4. 에센셜 오일의 항산화 활성 .....	73
2-1-5. 에센셜 오일의 항염 활성 .....	74
2-1-6. 에센셜 오일의 세포 독성 .....	76
2-2. 구상나무 .....	77
2-2-1. 구상나무의 특징 .....	77
2-2-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	78
2-2-3. 에센셜 오일의 항균 활성 .....	80
2-3. 비목나무 .....	83
2-3-1. 비목나무의 특징 .....	83
2-3-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	84
2-3-3. 에센셜 오일의 항균 활성 .....	86
2-4. 비자나무 .....	87
2-4-1. 비자나무의 특징 .....	87

2-4-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	88
2-4-3. 에센셜 오일의 항균 활성 .....	91
2-5. 붓순나무 .....	92
2-5-1. 붓순나무의 특징 .....	92
2-5-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	93
2-5-3. 에센셜 오일의 항산화 활성 .....	95
2-5-4. 에센셜 오일의 엘라스테이즈 저해 활성 .....	96
2-5-5. 에센셜 오일의 세포 독성 .....	97
2-6. 삼나무 .....	98
2-6-1. 삼나무의 특징 .....	98
2-6-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	99
2-6-3. 에센셜 오일의 항균 활성 .....	101
2-7. 갯기름나무 .....	102
2-7-1. 갯기름나무의 특징 .....	102
2-7-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	103
2-7-3. 에센셜 오일의 항균 활성 .....	104
2-8. 꽃향유 .....	105
2-8-1. 꽃향유의 특징 .....	105
2-8-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	106
2-8-3. 에센셜 오일의 항염 활성 .....	107
2-9. 백리향 .....	109
2-9-1. 백리향의 특징 .....	109
2-9-2. 에센셜 오일의 화학 조성 .....	110
2-9-3. 에센셜 오일의 항균 활성 .....	111
2-9-4. 에센셜 오일의 항염 활성 .....	112
2-9-5. 에센셜 오일의 세포 독성 .....	113
3. 결론 .....	114
IV. 참고문헌 .....	116

## LIST OF TABLES

Table 1. 1998년이후 전세계 주요시장에서 발매된 천연물 관련 시약 .....	3
Table 2. 국내 제약업계 천연 의약 생산 및 개발 현황 .....	4
Table 3. 에센셜 오일의 효능 및 주의 사항 .....	7
Table 4. NMR spectroscopic data for compound 1 .....	37
Table 5. NMR spectroscopic data for compound 2 .....	38
Table 6. NMR spectroscopic data for compound 3 and 4 .....	39
Table 7. NMR spectroscopic data for compound 5 .....	40
Table 8. NMR spectroscopic data for compound 6 .....	41
Table 9. NMR spectroscopic data for compound 7 .....	42
Table 10. NMR spectroscopic data for compound 8 .....	43
Table 11. NMR spectroscopic data for compound 9 and 10 .....	44
Table 12. NMR spectroscopic data for compound 11 .....	45
Table 13. NMR spectroscopic data for compound 12 .....	46
Table 14. NMR spectroscopic data for compound 13 .....	53
Table 15. NMR spectroscopic data for compound 14 .....	54
Table 16. NMR spectroscopic data for compound 15 .....	55
Table 17. NMR spectroscopic data for compound 16 .....	56
Table 18. Chemical composition of <i>N. aciculata</i> essential oil .....	69
Table 19. Antimicrobial activity of the essential oil from <i>N. aciculata</i> ....	70
Table 20. Antimicrobial activity of plants .....	72
Table 21. Chemical composition of <i>A. koreana</i> essential oil .....	78
Table 22. Antimicrobial activity of the essential oil from <i>A. koreana</i> .....	81
Table 23. MIC value of <i>A. koreana</i> essential oil's major components .....	82
Table 24. Chemical composition of <i>L. erythrocarpa</i> essential oil .....	84
Table 25. Antimicrobial activity of the essential oil from <i>L. erythrocarpa</i>	

Table 26. The chemical class distribution of the essential oil component of <i>T. nucifera</i> .....	88
Table 27. Chemical composition of <i>T. nucifera</i> essential oils .....	89
Table 28. Antimicrobial activity of the essential oil from <i>T. nucifera</i> .....	91
Table 29. Chemical composition of <i>I. religiosum</i> essential oils .....	93
Table 30. Chemical composition of <i>C. japonica</i> essential oils .....	99
Table 31. Antimicrobial activity of the essential oil from <i>C. japonica</i> ....	101
Table 32. Chemical composition of <i>P. japonicum</i> essential oils .....	103
Table 33. Antimicrobial activity of the essential oil from <i>P. japonicum</i> ..	104
Table 34. Chemical composition of <i>E. splendens</i> essential oils .....	106
Table 35. Chemical composition of <i>T. quinquecostatus</i> essential oils ....	110
Table 36. Antibacterial activity of TEO against <i>P. acnes</i> and <i>P. granulosum</i> by disk diffusion method .....	111
Table 37. Summary of major chemical constituents of plants essential oils	114

## LIST OF FIGURES

Figure 1. 에센셜 오일의 종류 .....	5
Figure 2. 여드름의 진행 단계 .....	9
Figure 3. <i>Propionibacterium acnes</i> and <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	10
Figure 4. <i>M. furfur</i> and <i>C. albicans</i> .....	11
Figure 5. 여드름 치료에 사용되는 화합물 .....	12
Figure 6. MTT 분석 방법 .....	23
Figure 7. Melanin biosynthesis pathway .....	29
Figure 8. Tyrosinase inhibition activities for extract and fractions from <i>N. aciculata</i> branch .....	30
Figure 9. DPPH radical scavenging activities for extract and fractions from <i>N. aciculata</i> branch .....	31
Figure 10. Elastase inhibition activities for extract and fractions from <i>N. aciculata</i> branch .....	32
Figure 11. Effects of <i>N. aciculata</i> BuOH fraction on melanin contents and cytotoxicity .....	34
Figure 12. Inhibitory effect of NAB on tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, and $\beta$ -actin protein in $\alpha$ -MSH stimulated B16(F10) murine melanoma cells .....	35
Figure 13. Effects of NAB on cytotoxicity in cultured human normal fibroblast cell .....	36
Figure 14. Structure of isolated compounds from <i>N. aciculata</i> branch .....	47
Figure 15. Tyrosinase inhibition activities for extracts and fractions from <i>N. aciculata</i> .....	50
Figure 16. Elastase inhibition activities for extracts and fractions from <i>N. aciculata</i> .....	51
Figure 17. DPPH radical scavenging activities for extracts and fractions from <i>N. aciculata</i> .....	52



Figure 18. Structures of isolated compounds from <i>N. aciculata</i> leaves	57
Figure 19. DPPH radical scavenging activities for isolated compounds from <i>N. aciculata</i>	58
Figure 20. Tyrosinase inhibition activities for isolated compounds from <i>N. aciculata</i>	59
Figure 21. Elastase inhibition activities for isolated compounds from <i>N. aciculata</i>	60
Figure 22. 연구에 사용된 식물 목록	62
Figure 23. Paper disc diffusion and minimum inhibitory concentration test	64
Figure 24. Major constituents of the essential oil from <i>N. aciculata</i>	68
Figure 25. DPPH radical scavenging activity for essential oil from <i>N. aciculata</i>	73
Figure 26. Inhibition of <i>P. acnes</i> -induced secretion of proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$ and IL-8 by of <i>N. aciculata</i> essential oil	75
Figure 27. Cytotoxicity of <i>N. aciculata</i> essential oil against THP-1 and HaCaT cells	76
Figure 28. Major constituents of the essential oil from <i>A. koreana</i>	79
Figure 29. Major constituents of the essential oil from <i>L. erythrocarpa</i>	85
Figure 30. Major constituents of the essential oil from <i>T. nucifera</i>	90
Figure 31. Major constituents of the essential oil from <i>I. religiosum</i>	94
Figure 32. Results of DPPH radical scavenging test for essential oil from <i>I. religiosum</i>	95
Figure 33. Results of elastase inhibition test for essential oil from <i>I. religiosum</i>	96
Figure 34. Cell viability of (A) human normal fibroblast and (B) human keratinocyte HaCaT treated with <i>I. religiosum</i>	97
Figure 35. Major constituents of the essential oil from <i>C. japonica</i>	100
Figure 36. Major constituents of the essential oil from <i>P. japonicum</i>	103
Figure 37. Major constituents of the essential oil from <i>E. splendens</i>	106

Figure 38. *E. splendens* inhibited *P. acnes*-induced secretion of proinflammatory cytokine such as TNF- $\alpha$ (A) and IL-8(B) ..... 107

Figure 39. Cytotoxicity of *E. splendens* against human normal fibroblast ..... 108

Figure 40. Major constituents of the essential oil from *T. quinquecostatus* ..... 110

Figure 41. Dose-dependent effect of TEO treatment on *P. acnes*-induced IL-8 release ..... 112

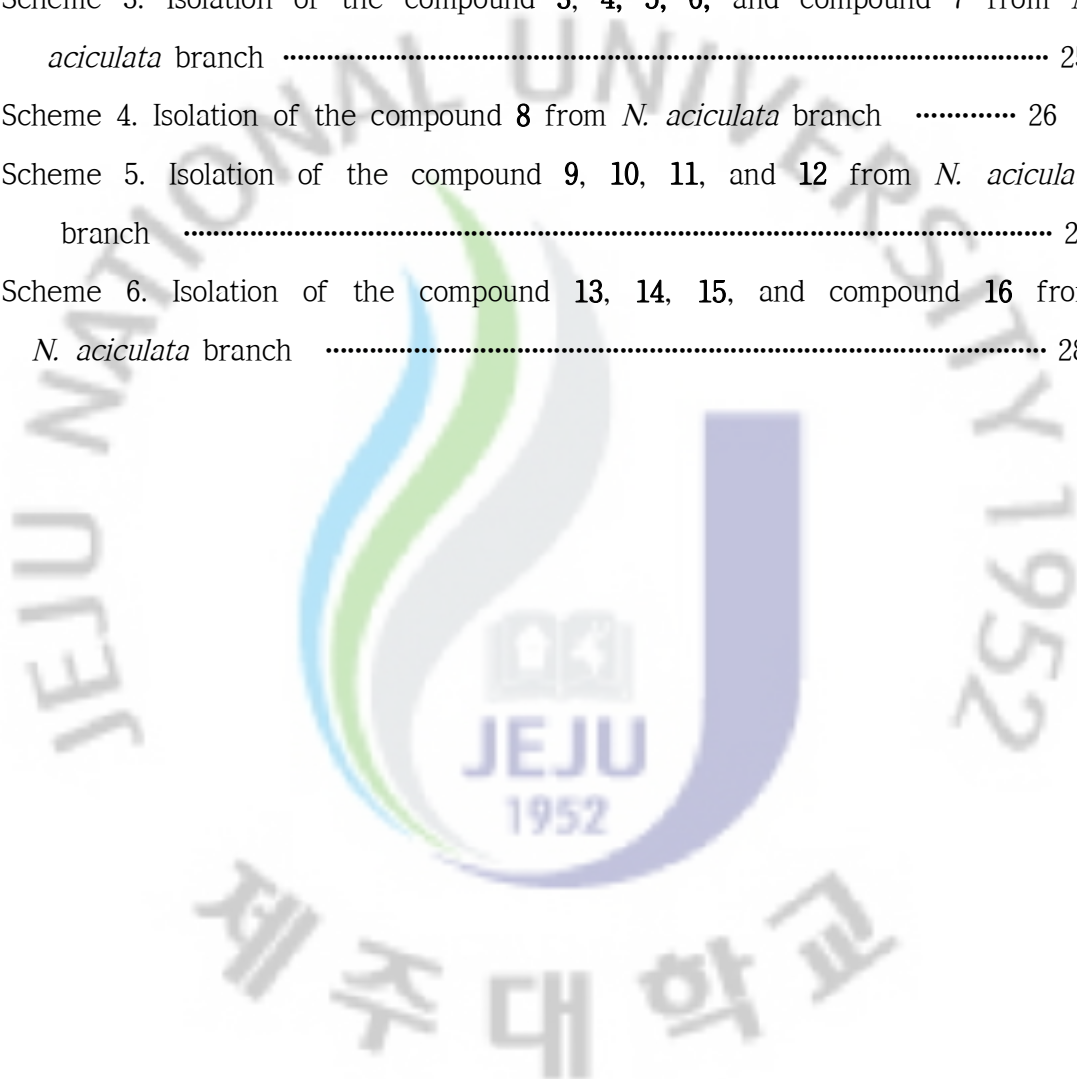
Figure 42. Cytotoxicity of TEO against human cell lines ..... 113





## LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Procedure of extraction and various fractions from <i>N. aciculata</i> .....	17
Scheme 2. Isolation of the compound 1 and compound 2 from <i>N. aciculata</i> branch	24
Scheme 3. Isolation of the compound 3, 4, 5, 6, and compound 7 from <i>N. aciculata</i> branch .....	25
Scheme 4. Isolation of the compound 8 from <i>N. aciculata</i> branch .....	26
Scheme 5. Isolation of the compound 9, 10, 11, and 12 from <i>N. aciculata</i> branch .....	27
Scheme 6. Isolation of the compound 13, 14, 15, and compound 16 from <i>N. aciculata</i> branch .....	28



# I. 서론

## 1. 천연물의 이용

■ 최근 천연물을 이용하여 인간의 삶을 건강하고 아름답게 만들고자 하는 노력은 아주 먼 옛날부터 시도되어 왔다. 특히 질병을 치료하거나 건강을 유지하기 위한 수단으로 가장 많이 응용되어 왔으며, 그것의 임상효과는 동서양의 의학교서에 많이 기록되어 있다.

■ 미국, 일본 등에서는 오래전부터, 환경에 대한 부작용이 적은 천연물에서 기능성 생리활성물질을 개발하고자 다양한 연구를 수행해 왔다. 천연물 특히 동양의학에서 사용되는 한약재로부터 신물질을 개발하려는 시도가 많아지는 것은, 안전성과 친환경적 요구가 높아짐에 따라 나타나는 현상이라 할 수 있다.<sup>1,2</sup>

■ 천연물로부터 그 기능성과 화학구조의 구명, 생물활성의 탐색, 효과적인 생산 및 재료의 이용기술의 연구는 18세기말부터 본격적으로 시작되었으며, 스웨덴의 약사 Scheele가 포도에서 tartaric acid, 레몬에서 citric acid, 사과에서 malic acid, 우유에서 lactic acid, 요(尿)에서 uric acid 등을 분리한 것이 천연물 화학의 과학적 연구의 시초라 볼 수 있다.

■ 19세기 들어 독일의 약사 Serturmer에 의해 아편에서 morphine<sup>3</sup>이 분리된 이래 많은 alkaloid, terpenoid, 배당체등이 분리되고 그 화학 구조가 결정 되었다.

■ 20세기 초 헝가리의 유기화학자 Pregl에 의해 미량원소분석이 발명됨에 따라 소량의 원료로 천연 유기화합물의 연구가 가능하게 되었으며, 소련의 식물학자 Tswet에 의해 column chromatography법이 개발되어 미량 유사물질 분리가 용이하게 되어서 많은 생리활성물질이 발견됨으로써 천연물의 중요성이 인식되어 천연물화학이 성립되었다.

■ 과학기술발전에 따른 생활수준의 향상과 의료기술의 발달로 인류의 수명은 급격히 연장되어 심장, 암, 당뇨, 정신질환 등 만성 또는 난치성질환으로 사망률은 계속 증가하고 있는 실정이며, 특히 현재 50여종의 항암제가 개발되어 암치료에 있어서 많은 기대를 하고 있으나 대개가 강한 독성을 보이고 있다. 그러므로 보다 부작용이 적으면서도 좋은 효과를 갖는 항암치료제를 개발하는 것이 절실히 요구되는 실정이다.

■ 만성질환에 대한 예방적 개념 도입으로 약물 처방이 치료형에서 예방형으로 변화됨에 따라, 전통 의약인 천연물로부터 항암성분의 탐색과 개발에 눈을 돌리게 되었다. 그 결과 많은 실적이 축적되어 실용화에 이르고 있으며, 이들 천연물 유래의 항암성분을 선도화합물(lead compound)로 하여 새로운 계열의 항암제 개발이 이루어지고 있다(Table 1).

■ 한방 천연약재의 경우 우리나라는 전통 의약분야이므로 외국과 비교하여 상대적 우위를 확보하고 있어, 국제경쟁력확보가 가능한 분야이다. 그리고 천연물신약 연구 개발 사업은 최소의 투자로 최대의 성과를 얻을 수 있는 투자효율성이 매우 높은 분야이므로 국가의 첨단 기술 산업으로 발전시켜야 할 분야이다 (Table 2).

■ 천연물은 대부분 식물, 동물, 미생물의 2차대사산물과 1차 대사산물의 일부 (polysaccharide 등)와 광물로 이루어져 있으며, 이러한 천연물의 기능성이 확인되면 천연물의약으로, 고기능성식품으로, 천연물 화장품 및 천연 살충제등의 고부가가치의 상품으로 활용된다.

■ 천연 기능성 물질의 생산 산업(Natural products Industry)은 고도의 기술을 바탕으로 고부가가치의 소량 다품목의 제품개발이 가능할 뿐만 아니라, 신물질과 신용도에 대한 산업재산권을 획득하여 높은 가치를 지속적으로 창출할 수 있어, 이미 선진각국에서는 이 분야의 연구개발에 역점을 두고 있고, 각종 천연물의 제품화와 산업화에 역량을 집중하고 있는 추세이다.<sup>4,5</sup>

Table 1. 1998년 이후 전세계 주요시장에서 발매된 천연물 관련 신약

발매년도	일반명(상품명)	Lead compound	유래	적응증
1998	Orlistat (Xenical)	Lipstatin	반합성	항비만
1998	Cefoselis (Wincel)	Cephalosporin	천연물	항박테리아
1999	Dalfopristin & quinupristin (70:30 혼합물) (Synercid)	Streptogramin B & streptogramin A	반합성	항박테리아
1999	Valrubicin (Valstar)	Doxorubicin 144	천연물	항종양
1999	Colforsin daropate (Adele, Adehl)	Forskolin	반합성	강심제
2000	Arteether (Artemotil)	Artemisinin 40	반합성	항말라리아
2001	Ertapenem (Invanz)	Thienamycin	천연물	항박테리아
2001	Caspofungin (Cancidas)	Pneumocandin B	반합성	항진균제
2001	Telithromycin (Ketek)	Erythromycin 19	반합성	항박테리아
2001	Pimecrolimus (Elidel)	Asoomycin	반합성	아토피성피부염
2002	Galantamine (Reminyl)	Galantamine	천연물	알츠하이머
2002	Amrubicin hydrochloride (Calsed)	Doxorubicin	천연물	항종양제
2002	Micafungin (Funguard)	FR901379	반합성	항진균제
2002	Biapenem (Omegacin)	Thienamycin	천연물	항박테리아
2002	Nitisinone (Orfadin)	Leptospermone	천연물	anti-tyrosinaemia
2003	Miglistat (Zavesca)	1-Deoxynojirimycin	반합성	type1 Gaucher disease
2003	Mycophenolate sodium (Myfortic)	Mycophenolic acid	천연물	면역억제제
2003	Rosuvastatin (Crestor)	Mevastatin	천연물	고지혈증
2003	Pitavastatin (Livalo)	Mevastatin	천연물	고지혈증
2003	Daptomycin (Cubicin)	Daptomycin	천연물	항박테리아
2004	Overolimus (Certican)	Sirolimus 91	반합성	면역억제제

자료: Nat. Prod. Rep. (2005), 22:162-195

Table 2. 국내 제약업계 천연 의약 생산 및 개발 현황

제약회사연구소	상품/개발명	대상질환	주요성분	개발단계
광동제약	편지환	간염	사향, 우황, 전칠 등	시판
유한양행	유한골접산	골절	당귀, 속단, 천궁 등	시판
동아제약	스티렌캡셀	급만성위염	애엽추출물	시판
SK제약	조인스정	관절염	위령신, 팔루근, 하고초 등	시판
CJ	SS크림	조루증	철수, 인삼, 당귀 등	시판
구주제약	이퍼톡신주	관절염	봉독성분	신약승인
삼천당제약	SCD-UKG(을간강캡셀)	간염	백회사설초, 강황, 호장근, 산두근 등	임상시험
삼천당제약	SCD-DKY(동용강당령)	당뇨병	동충하초, 마황, 서홍화, 황기 등	임상시험
한국신약	아스망정	기관지질환	신이추출물	임상시험
SBP	SB31주사제	항암제	백두옹추출물	임상시험
씨이제닉	알치마176	치매	당귀추출물	임상시험
한국외과학연구소	천보204	발기부전	구기자, 토사자, 오미자, 복분자, 산수유, 홍삼 등	권임상시험

자료: 보건산업기술동향, 2005.



## 2. 에센셜 오일

■ 정유는 식물의 특성에 따라 꽃, 잎, 줄기, 열매, 뿌리 등 각기 다른 부위로 부터 추출이 가능하다. 그 중 오렌지나무의 경우에는 열매 껍질에서는 달콤한 스위트 오렌지 오일이, 오렌지 꽃에서는 쓴맛의 네롤리 오일이 나오며, 나무의 잔가지에서는 페티그레인 오일이 생산되어 식물의 다양한 부위에서 각기 얼마나 다른 오일을 얻을 수 있음을 잘 보여주고 있다(Fig. 1).



Figure 1. 에센셜 오일의 종류

■ 이러한 다양한 에센셜 오일들이 공통적으로 가지고 있는 여러 가지 의학적 효과들 중에서 특히 살균, 방부효과는 인체와 일상 환경에 필요성이 부각되어 현대인들의 많은 관심을 가지고 있다. 특히 페놀류(phenol)가 풍부한 thyme, clove, cinnamon과 알코올(alcohol)이 풍부한 lavender, geranium, tea tree, 그리고 테르펜(terpene)이 풍부한 needle 오일인 pine, juniper, 감귤의 lemon, orange 오일들이 대표적인 예이다.<sup>6,7</sup>

■ 에센셜 오일이 갖는 물리적인 특성인 강한 휘발성은 공기중으로 쉽게 증발하여 자신이 갖고 있는 산소분자를 공기중으로 방출하면서 오존과 음이온을 형성하여 세균, 바이러스, 및 곰팡이 등이 서식할 수 없는 깨끗한 환경을 만들어 준다. 휘발성 냄새 입자가 코와 폐를 통해 유입되게 되면 정신적, 육체적으로도 영향을 미치게 된다.<sup>8</sup>

■ 현재에는 의약품, 화장품, 식품, 및 종교행사 등 여러 방면에 걸쳐 우리의 생활과 밀접한 관련을 가지고 있으며<sup>9</sup> 에센셜 오일의 부패 방지 효과는 19세기에 들어와 Chamberland에 의해 처음으로 증명 되었고, 20세기 초부터는 연구가 더욱 활발하게 진행되어, Cavel의 실험으로 35개의 오일에 대한 미생물 살균 효과를 측정하였다.<sup>10</sup> 그 결과 thyme이 우수한 효과를 보였고 sweet orange, peppermint가 다음이었다. 이러한 살균효과는 phenol보다 수배 더 강력하며, 균 종류에 따라 선별적으로 강력한 효과를 보인다.

■ 지금까지 알려진 200여 가지의 정유는 각각의 화학적 구조와 그 약리 특성이 다른데, 그중 티트리의 주성분인 terpineol-4-ol, 1,8-cineol, cymene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinene 등은 강력한 항균력과 피부 보습 효과를 갖고 있으며,<sup>11</sup> 라벤더는 candida 질염, 화농성 염증균, 치아 우식증, 요로 감염균에 대하여 항균 작용이 나타났다.<sup>12</sup> 또한 허브 추출물인 오레가노(greek oregano), 파출리(patcjouli), 로즈마리(rosemary), 유칼립투스(eucalyptus), 타임(thyme)은 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*에 대하여 항균효과를 나타냈다.<sup>13</sup> 이러한 특성은 항생제 남용으로 인해 문제가 되고 있는 오늘날의 감염병에

좋은 해결책을 제시해줄 수 있을 것이다(Table 3).

■ 이처럼 정유의 기능적이고 긍정적인 측면의 연구로서 면역성 증가, 신경계 안정 효과, 항암효과, 노화억제 및 피부병균에 대한 항균력 등의 약리적 특징이 실험적 증거와 함께 보고됨에 따라 천연 정유를 산업적으로 응용할 수 있는 범위가 증가하게 되었다. 또한 식품 및 화장품 업계에서는 천연 향신료, 천연방부제, 및 감미료가 갖는 항균 작용과 항산화 활성에 관한 연구에 관심이 집중되면서 다양한 균주에 광범위하게 효과를 나타내는 천연 항균제와 항산화제로서 식물성 정유를 이용하려는 시도가 이루어지고 있으며 식물성 천연 정유는 본래 향미 기능 외에 부가가치가 상승되고 있다.

Table 3. 에센셜 오일의 효능 및 주의사항

구분	효능 및 주의사항
라벤다	불면증, 심신안정, 소독·살균, 항염 (목욕: 스트레스, 긴장 완화, 숙면)
바질	머리를 맑게 해줌, 두통, 신경과민, 불면증, 학습능력향상, 구내염 (마사지:생리불순)(미용:항균-여드름치료)
타임	방부, 살균, 곰팡이 방지, 소독력 우수. 항균, 소화촉진, 위장기능 강화, 신경안정, 빈혈, 악몽을 꿀 때. 저혈압환자
로즈마리	기억력 강화, 두통, 편두통, 피로해소, 류마티스, 빈혈, 생리통, 처진피부 (미용: 수렴, 노화방지, 헤어토닉)
히솅	폐기능 강화, 호흡기 질환, 위와 장의 강장, 구풍, 거담, (기관지염, 감기), 히스테리, 류마티스
제라늄	긴장, 두려움 완화, 우울증, 기분상승, 스트레스 방지, 여성호르몬 조절, 피부세포 재생
자스민	자신감 부족, 걱정이 많을 때, 불감증, 무기력증, 우울증, 출산후 휴유증, 생리통, 호르몬 균형, 자궁강장(소량씩 사용한다.)(미용: 피부탄력)
로즈	여성질환(생리불순, 생리전 증후군, 폐경기 장애) 스트레스, 의욕저하, 불면증, 자궁강장제, 호르몬균형, 혈액순환 (미용: 건성, 민감, 노화, 거친피부) (로즈+페퍼민트 목욕법-숙취, 두통해소)
유칼립투스	정신자극, 알레르기 비염, 열, 감기, 목감기, 인후염, 부비강염, 천식, 호흡기 장애, 항균효과



페퍼민트	신경통, 신경쇠약, 두통, 편두통, 근육통, 순환기 장애(정맥류, 치질) 내장불순물 제거, 설사, 변비, 입냄새, 멀미, 감기, 코막힘
네롤리	고혈압, 가슴 두근거림, 우울증, 쇼크, 정신적 혼란, 신경성 통증, 불안, 공포, 현기증, 긴장완화, 혈액순환 (미용: 세포재생, 노화피부)
사이프러스	저혈압, 혈액순환, 정맥류, 치질, 생리불순, 백일해, 천식, 야뇨증, 군살제거, 호르몬 불균형, 난소기능 이상
티트리	박테리아, 바이러스, 곰팡이 제거, 종기, 발진 해소, 화상, 비듬, 감염증, 무좀, 전반적 피부과 영역에 효능
샌달우드	깊은 이완, 안정작용, 불안, 긴장해소, 우울증 (미용: 피부균형, 항염증, 건성피부, 노화방지, 주름)
시더우드	살균, 호흡기 정화기능, 비뇨기 감염, 심신안정, 이완, 스트레스, 긴장, 피부수렴, 여드름, 피부염, 가려움증, 가래제거, 비듬, 탈모 예방
파인	탈취, 이뇨, 소염, 진통, 혈액순환 촉진, 면역, 폐·기관지 질환 치료, 정서적 허약, 누적된 정신치료, 강력한 살균, 거담, 후두염등 호흡기 질환
레몬	지혈, 피부세정효과, 살균, 소독, 피부수렴, 해열작용, 발열, 빈혈, 지성모발, 기미, 주름, 여드름, 각질제거, 티눈, 사마귀, 당뇨병 완화, 두통해소
레몬 그라스	소화촉진, 가스제거, 위통완화, 모공관리, 여드름, 지성모발, 무좀, 향균, 근육통, 식욕부진, 위장염, 탈취, 발냄새
버가못	소화촉진, 식욕부진 해소, 우울증, 감염증, 염증, 산통, 위통, 식욕 상실증, 폐결핵
캐모마일	어린이, 노약자가 사용하기 좋은 오일. 강력한 항염증, 피부염증, 결막염, 감염증, 상처, 화상, 종기, 신경안정, 피로회복, 갱년기 장애, 여드름, 습진, 민감피부, 거친피부, 알레르기 피부
펜넬	딸꾹질, 기침, 기관지염, 콧물, 소독, 해독, 산모의 젖 분비, 식욕 자극, 거담효과, 소화촉진, 항 박테리아 (마사지나 목욕법으로는 쓰이지 않는다.)
프랑킨센스	요도염증, 자궁질환, 임신, 출산(부인과 질환), 자궁강장제, 심리불안, 강박관념, 호흡기, 공기발향에 많이 쓰인다(명상용으로)
그레이프후르츠	부종제거, 비만, 셀룰라이트 지방 분해, 비만증에 좋다. 우울증, 항균작용(여드름에 많이 쓰임)
마조람	안정, 진통, 동맥혈관 확장제, 기침, 독감, 후두염, 불면증, 신경성 긴장, 신경쇠약, 류마티스, 화상, 박테리아 염증, 혈액순화, 수족냉증

### 3. 여드름

■ 여드름은 안면, 상흉부, 배부 및 상지에 폐쇄성 또는 개방성 면포, 구진, 농포, 낭종, 결절 등 다양한 피부병변을 나타내는 모낭피지선의 염증성 질환으로 사춘기와 젊은 연령층에 가장 흔히 발생하는 질환이다.<sup>14</sup> 하지만 현재 환경 오염과 잘못된 식습관 등 주위환경의 영향으로 많은 피부질환 환자들이 생기고 있고, 전체 국민 중 청소년기의 90%, 성인 여성의 50%가 여드름으로 일시적 또는 비교적 장기간 고통을 받는 것으로 알려지고 있다.

여드름의 진행단계



Figure 2. 여드름의 진행 단계

■ 여드름의 병인에 관여하는 주요 요인으로는 피지의 과다 형성, 비정상적인 모낭각화증, *Propionibacterium acnes*의 증식 및 염증 등이 있으며,<sup>15</sup> 그 외 호르몬이나 면역학적 요소가 관여할 수 있다(Fig. 2). 특히 모낭 내에 정체된 피지는 모낭을 막아 공기의 순환을 차단하게 되어 모낭내부에는 모낭내부에 상주하는 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다. 이렇게 생성된 면포는 미생물의 생활환경을 조성하여 *P. acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pityrosporum ovale* 등이 성장하게 된다. 이들은 지방 친화성 미생물이며, *S. epidermidis*는 호기성이어서 외모낭 또는 모낭의 중간에서 성장하고 *P. acnes*는 혐기성이므로 모낭의 안쪽에서 성장하게 된다<sup>16</sup>(Fig. 3).

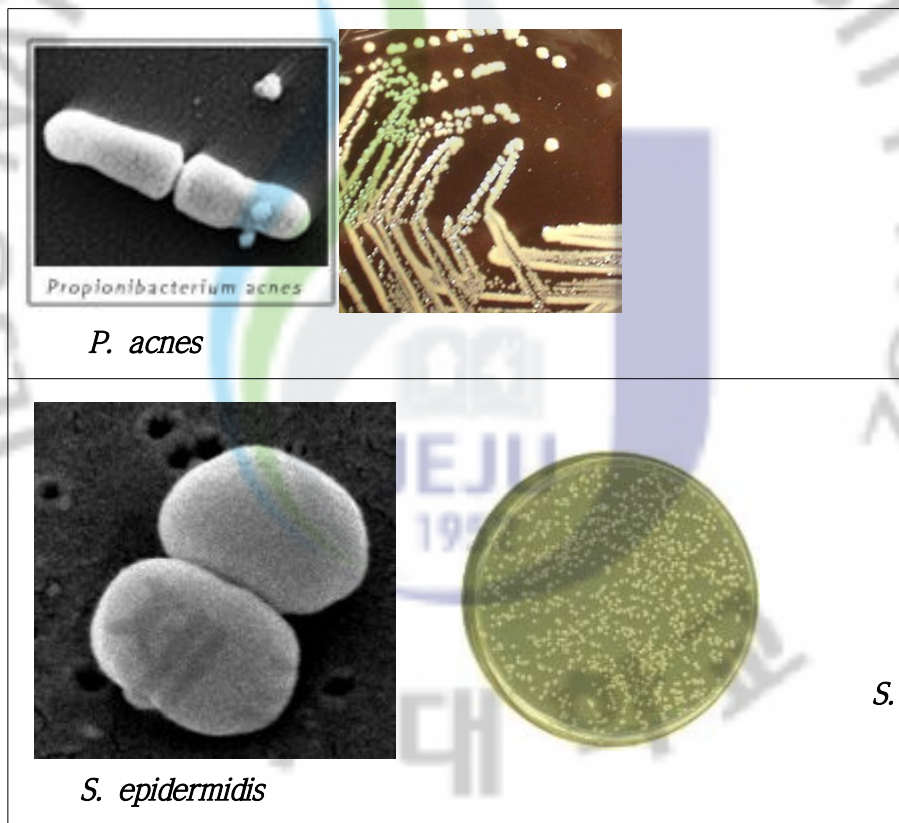
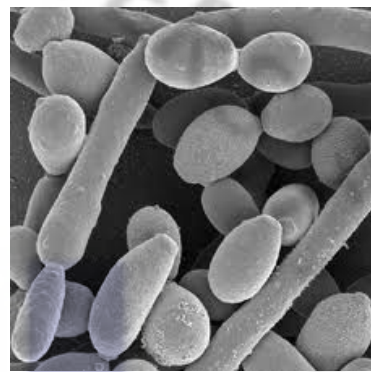


Figure 3. *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*.

■ *Malassazia* 모낭염의 원인균인 *Malassazia*는 병원성이 낮은 친지방성의 이형성(dimorphic) 진균으로, 정상 피부 모낭주위에서 발견된다. *Malassazia* 모낭염이 안면에서도 관찰될 수 있고, 심상성 여드름과도 혼재되어 발생될 수 있다. 여드름 발생의 병리 조직학적인 기전은 *P. acnes*의 효소, 사이토카인 및 보체와 중성구, 손상된 각질형성 세포에서 분비되는 사이토카인 등이 염증을 일으키는데 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>17</sup>(Fig. 4).



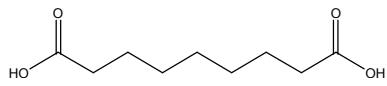
*M. furfur*



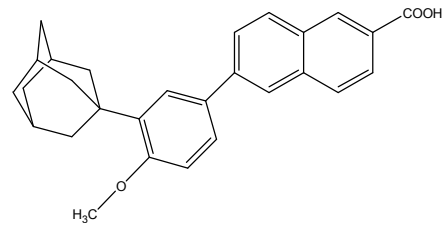
*C. albicans*

Figure 4. *M. furfur* and *C. albicans*

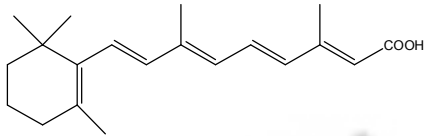
■ *P. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 염증반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름 치료에는 항생제가 사용되고 있다. Triclosan, benzyl peroxide, azelaic acid, retinoid, tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin 등의 항생제가 사용되고 있으나, 부작용이 알려져 있다(Fig. 5). Benzyl peroxide와 retinoid는 피부건조증이나 과민증을 유발하고, tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin은 항생제에 대한 내성 발생으로 인하여 지속적인 사용이 어렵고 간독성이 심하며, 칸디다증과 같은 기회감염증이 나타날 수 있다. 또한 triclosan의 경우 빛에 노출되었을 때 환경호르몬으로 바뀌어 심각한 환경오염을 일으킬 수 있다. 따라서 많은 연구자들이 항균효과가 있으면서 부작용이 없는 여드름 치료제를 개발하려고 노력 중이다.



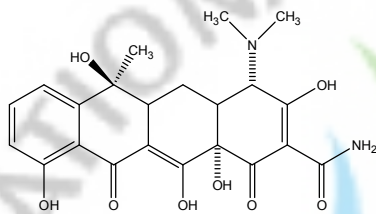
Azelaic acid



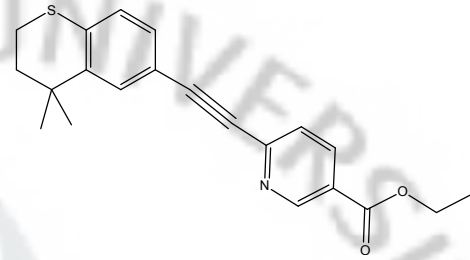
Adapalene



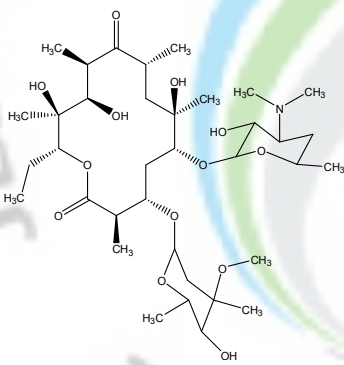
Tretinoin



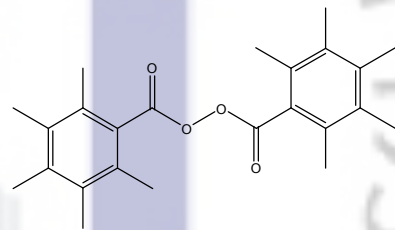
Tetracyclin



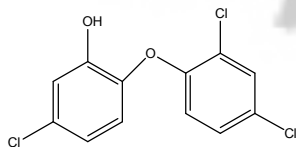
Tazarotene



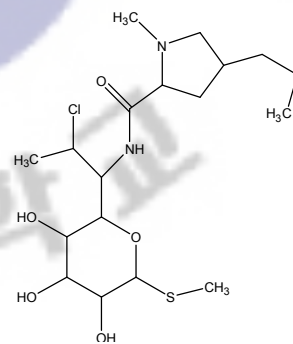
Erythromycin



Benzyl peroxide



Triclosan



Clindamycin

Fig. 5. 여드름 치료에 사용되는 화합물



#### 4. 항염 활성화

■ 염증 반응은 생체나 조직에 물리적인 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성화 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대 되면서 염증을 유발한다. 또한 지속적인 염증 반응은 점막 손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 일으킨다.

■ 대식세포는 선천 면역뿐만 아니라 획득 면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다. 내독소로 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, macrophage 또는 monocyte cell에서 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

■ 이러한 염증 매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인하여 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다. 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성된다.<sup>18</sup> 이중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경 독성, 및 혈관 확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다.

■ 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증 상태에서 iNOS에 의해 과잉 생산된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>19</sup> 이와같이 염증 반응에 밀접하게 관련되어 있는 염증 매개체들의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다.

■ 제주도는 한라산과 중산간, 습지 및 해안지대로 이루어져 있으며, 생물의 북방과 남방 한계의 교차점으로 약 7,800여종 이상의 육상 및 해양 생물자원이 서식하고 있어서 생물자원의 보고라고 할 수 있다. 특히 338종의 약용식물을 포함하여 총 1,990여종의 자생식물이 서식하고 있다. 특히 풍부한 자원을 보유하고 있고, 청정한 환경이 어우러진 자연환경을 갖춘 제주도는 다양한 효능을 갖춘 천연 원료를 개발할 수 있는 좋은 조건을 갖추고 있다.

■ 본 연구에서는 제주자생식물 중 새덕이나마(*Neolitsea aciculata*)에서 유효 성분을 분리하여 동정하고, 새덕이나마 추출물과 유효 성분의 우수한 활성을 확인하고자 하였다. 또한 제주자생식물들 중 구상나무, 비목나무, 비자나무, 붓순나무, 삼나무, 새덕이나마, 갯기름나무, 꽃향유, 및 백리향의 에센셜 오일을 추출하여 항균, 항염 등의 활성이 있는 에센셜 오일을 이용한 천연 원료를 개발하고자 하였다.

## II. 과제 1 : 새덕이나무 추출물로부터 활성성분 규명

### 1. 재료

새덕이나무는 2008년 5월 한라수목원에서 채집되었고 채집된 새덕이나무는 가지와 잎으로 분류하여 부위별로 추출하였다(시료번호 #68). 새덕이나무의 학명은 *Neolitsea aciculata*이며 녹나무과(Lauraceae)로 주로 제주도에 분포한다.

새덕이나무로부터 분리된 compounds는 1983년 Hiroshi Nozaki 등<sup>20</sup>에 의해 분리된 neoliacine, 1992년 Kouya Yano 등<sup>21,22</sup>에 의해서 분리된 4- $\alpha$ -methylsterols 과 triperpene류가 있으며, 1993년 Daisuke Takaoka 등<sup>23,24</sup>이 sesquiterpene인 aciculatalactone과 neoliacinolide A, B, 그리고 C를 분리하였다.

새덕이나무 잎의 추출물이 자궁경부암 세포인 Hella cell에 세포독성이 있어 항암활성을 보이는 것으로 알려져 있고, 새덕이나무 잎에서 분리한 화합물 중 neoliacine이 항암활성을 갖는 것으로 알려져 있다.





## 2. 실험 방법

### 2-1. 시약 및 기기

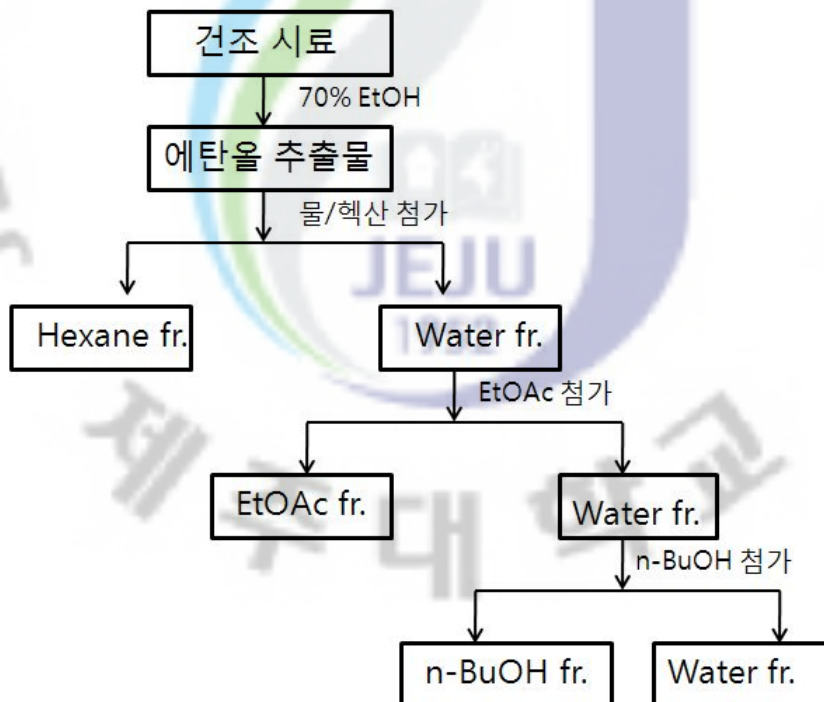
시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Junsei의 제품을 사용하였다. Normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(0.04-0.06 mm, Merck Co.), Silica gel(0.063-0.200 mm, Merck Co.)이 사용되었고, reversed-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel RP-18(230-400 mesh, Merck Co.)이 사용되었다. 분리과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminum sheet(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp(254 nm)와 visualizing agent(KMnO<sub>4</sub> 수용액)를 사용하여 확인하였다.

생리활성 검색에는 Eliser reader (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, VT)를 사용하여 값을 측정하였다.

구조분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL Co.)을 이용하였고, 측정시 용매는 Merck의 NMR 전용용매로 CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, pyridine-*d*<sub>5</sub>를 사용하였다.

## 2-2. 새덕이나마의 추출 및 용매 분획

새덕이나마의 추출을 위해 통풍이 잘되는 곳에서 음건된 시료를 쇠절 분쇄하여 추출에 사용하였다. 추출은 건조무게 (1 kg)의 20배정도의 70%(v/v) 합수에탄올에 침지하였고, 두 번 반복하여 추출하였다. 추출된 용매는 whatman 여과지를 이용하여 여과한 후 감압 농축기를 이용하여 40℃에서 농축하였다. 추출물(70 g) 중 50 g을 용매 분획 방법에 의해 hexane, ethyl acetate, butanol, 물을 이용하여 차례대로 분획한 후 각각의 분획물을 5.0 g, 8.0 g, 9.4 g, 16.8 g을 얻어 이 중 butanol 분획물을 compound 분리에 사용하였다. 두 번째 추출물은 음건된 시료 500 g의 건조된 시료를 추출하여 추출물 47.6 g을 얻었고 47.6 g 중 30 g을 hexane(2.5 g), ethyl acetate(4.8 g), butanol(6.8 g), 물(14.8 g) 용매 분획하여 분획물을 얻은 후 이 중 ethyl acetate 분획물을 사용하여 compound 분리에 사용하였다(scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and various fractions from *N. aciculata*.

## 2-3. 활성 검색

### 2-3-1. Tyrosinase Inhibition 활성 검색

Tyrosine은 효소인 tyrosinase에 의하여 멜라닌 생성의 전구체가 되는 DOPA와 dopaquinone으로 대사된다. 따라서 tyrosinase의 억제는 피부의 멜라닌 색소의 조절을 통하여 피부 미백 효과를 기대할 수 있다. 추출물 및 분획물들과 분리된 compounds에 대한 tyrosinase 저해 활성은 mushroom tyrosinase를 이용한 DOPA chrome법을 응용하여 측정하였다.<sup>25</sup> Buffer는 0.1 M phosphate buffer (pH6.8)을 사용하였고, 기질은 2 mM L-tyrosine을 사용하였다. 다양한 농도의 시료와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8), 2 mM tyrosine, 2500 unit의 tyrosinase을 섞어 37°C에서 10분간 반응 후 480 nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 저해 활성은 흡광도가 50% 감소 할 때 나타나는 시료의 농도 (IC<sub>50</sub>)로 표시 하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 arbutin를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \{(A-B)(C-D)/(A-B)\} \times 100$$

A: sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

B: sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하지 않은 상태로 반응한 후의 흡광도

C: 효소를 첨가하여 반응한 후의 sample의 흡광도

D: 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 sample의 흡광도

### 2-3-2. DPPH radical scavenging 활성 검색

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하여 추출물의 라디칼 소거 효과로 항산화 활성을 측정하였다. DPPH는 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색방법으로 특히 phenol과 aromatic amine의 항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 방법이다. 일종의 염료인 DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 520 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 되면서 흡수띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색은 점점 없어지게 되고, 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 육안으로 확인할 수 있다. 이렇게 감소하는 흡광도 값을 측정함으로써 radical의 소거 활성을 알 수 있다.

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법<sup>26</sup>을 이용하여 사용하였고, 실험은 다음과 같이 실행하였다. 에탄올에 DPPH를 0.2 mM을 조제한 후, 다양한 농도의 시료 활성 측정하였다. 준비된 0.2 mM DPPH와 시료를 섞고 실온에서 10분간 방치한 후 UV/Vis 분광광도계를 사용하여 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. DPPH의 흡광도가 50% 감소 할 때 나타나는 시료의 농도 (SC<sub>50</sub>)로 표시 하였으며, 각 시료는 3회 반복실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect(\%)} = \{1 - (B - C/A)\} \times 100$$

A: DPPH 흡광도

B: DPPH와 시료 반응액의 흡광도

C: 시료자체의 흡광도

### 2-3-3. Elastase inhibition 활성 검색

Elastase inhibition 활성 검색은 James<sup>27</sup>법을 사용하였다. 엘라스타아제 (porcine pancreatic elastase; PPE, sigma, Type IV)에 의해 합성된 기질인 N-Suc-(Ala)<sub>3</sub>-nitroanilide의 가수분해에 근거한 실험법으로 405 nm에서 *p*-nitroaniline의 방출량을 엘라스타아제의 활성값으로 하였다. 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)에 0.2 mM N-Suc-(Ala)<sub>3</sub>-nitroanilide, 다양한 농도의 시료를 섞고 0.104 unit elastase 넣어 25 °C에서 10 분간 반응 시킨 후 *p*-nitroaniline의 생성량을 405 nm에서 측정 하였다. Elastase 저해율은 50 % 감소 할 때 나타나는 시료의 농도 (IC<sub>50</sub>)로 표시 하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 oleanolic acid를 사용하였다.

$$\text{Elastase inhibiton (\%)} = \{(A-B)(C-D)/(A-B)\} \times 100$$

- A: sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도
- B: sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하지 않은 상태로 반응한 후의 흡광도
- C: 효소를 첨가하여 반응한 후의 sample의 흡광도
- D: 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 sample의 흡광도

#### 2-3-4. 세포 배양

Murine B16(F10) melanoma cell, human fibroblast cell인 CCD-986sk와 keratinocyte cell인 HaCaT cell은 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

#### 2-3-5. 멜라닌 합성 저해 효과 측정 실험

추출물과 compound에 대한 세포내에서의 미백효과를 측정하기 위하여 B16(F10) melanoma 세포를 이용하여 melanogenesis 저해 효과를 측정하였다. 6 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml이 되도록 세포를 분주하고, 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24 h 배양 후 배지를 제거하였다. phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH를 포함하는 배지로 교환 후 sample을 농도별로 각각 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 동안 배양 후 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척한 후 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 1M NaOH 500  $\mu$ l를 첨가하고 55°C에서 2시간 방치하여 세포내의 melanin을 얻었다. 이는 microplate reader기로 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 알부틴(arbutin)을 사용하였다.



### 2-3-6. Immunoblotting

배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 1 mL의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시켰다. Cell lysis 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다.

20~30  $\mu$ g의 lysate를 8~12% mini gel SDS-PAGE로 전기영동한 후 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다.

단백질이 transfer 된 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액을 사용하여 상온에서 2시간 동안 실시하였다. 항체로는 anti-mouse tyrosinase (1:1000), anti-mouse TRP-1 (1:1000), anti-mouse TRP-2 (1:1000, 및 anti-mouse MITF (1:1000)를 TTBS 용액으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

### 2-3-7. 세포독성 평가

세포독성 평가는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide) 분석 방법을 사용하였다. 24-well plate에  $5 \times 10^4$  cell/mL B16(F10) melanoma cell, Human fibroblast cell인 CCD-986sk를 24시간 배양 후, 시료를 농도별로 처리하였다. Sample을 여러 농도별로 처리한 후 2일간 배양 후 500  $\mu$ g/ml의 MTT를 well 당 20 $\mu$ l를 첨가하였다. MTT 시약을 처리하여 5시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하고, DMSO (dimethylsulfoxid)를 처리하여 formazan을 녹여 낸 후 570 nm 에서 흡광도 값을 측정한다.

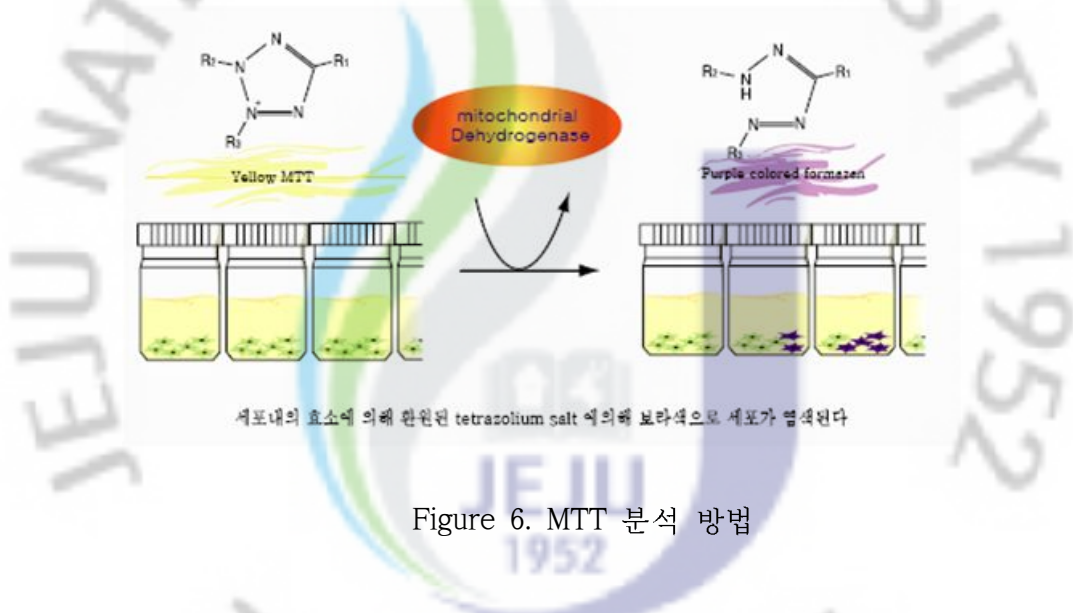


Figure 6. MTT 분석 방법

### 2-3-8. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치  $\pm$  표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% ( $p < 0.05$ )에서 통계적 유의차를 평가하였다.

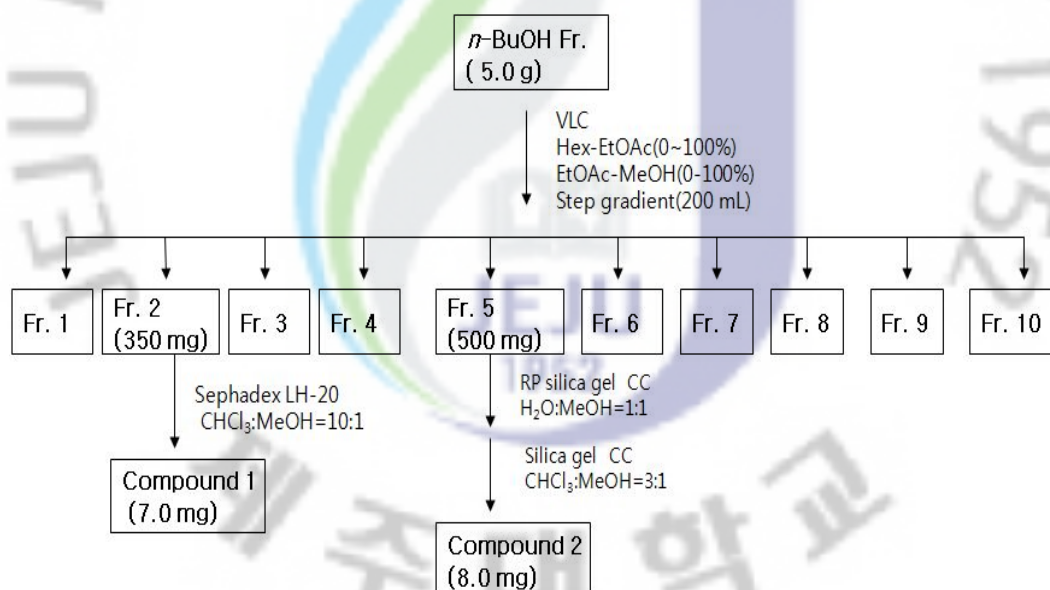


## 2-4. 활성성분의 분리과정

### 2-4-1. 새덕이나무 가지의 *n*-Butanol 분획물에서 compound 1, 2의 분리과정

*n*-Butanol 분획물을 분리하기 위해 butanol 분획물 5.0 g을 순상 실리카겔 컬럼을 사용하여 step gradient를 수행하였다. Step gradient는 Hex/EtOAc(0-100%), EtOAc/MeOH(0-100%) 조건으로 수행하여 총 10개의 분획층을 얻었다. 그 중 fr. 2를 다시 순상 실리카겔 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=10:1)을 이용하여 5개의 분획으로 나누었고 그중 fr-2-2에서 compound 1(5.0 mg)을 분리하였다.

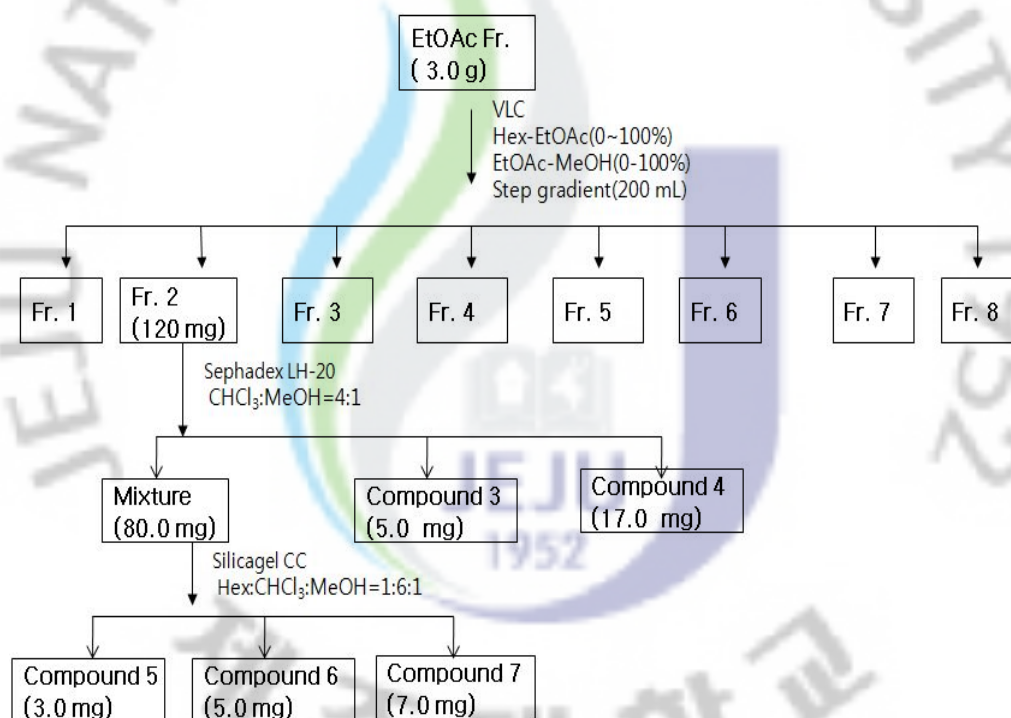
Compound 2(8.0 mg)는 fr. 5(0.5 g)을 역상 실리카겔을 H<sub>2</sub>O:MeOH=1:1 조건으로 수행하여 4개의 분획을 얻을 수 있었고 그 중 fr. 5-3을 순상 실리카겔(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=3:1) 컬럼을 사용하여 얻을 수 있었다(scheme 2).



Scheme 2. Isolation of the compound 1 and compound 2 from *N. aciculata* branch.

2-4-2. 새덕이나무 가지의 ethyl acetate 분획물에서 compound 3, 4, 5, 6, 및 7의 분리과정

Ethyl acetate 분획물 3.0 g을 가지고 순상 실리카겔 컬럼을 충전 시켜 gradient 용매(Hex/EtOAc(0-100%), EtOAc/MeOH(0-100%)) 조건을 이용하여 총 8개의 분획층을 얻었다. 이 중 fr. 2(120 mg)를 sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1) 컬럼을 수행하여 compound 3과 compound 4를 분리하였다. Fr. 2의 mixture 부분은 순상 실리카겔(Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH=1:6:1)을 수행하여 compound 5, 6, 7을 분리하였다(scheme 3).

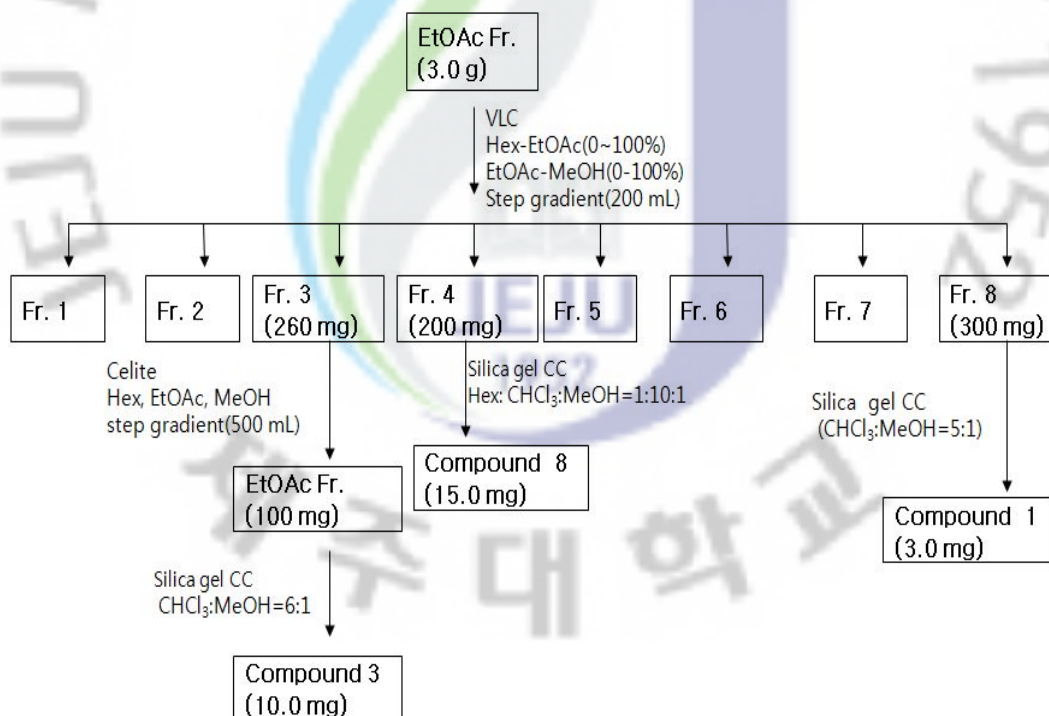


Scheme 3. Isolation of the compound 3, 4, 5, 6, and 7 from *N. aciculata* branch.

2-4-3. 새덕이나무 가지의 ethyl acetate분획물에서 compound 8의 분리과정

Ethyl acetate 분획물 3.0 g을 순상 실리카겔 컬럼을 충전 시켜 gradient 용매 (Hex/EtOAc(0-100%), EtOAc/MeOH(0-100%)) 조건을 이용하여 총 8개의 분획층을 얻었다. 이 중 fr. 3(2.6 g)은 celite 컬럼을 수행하였다. 용리액으로는 Hexane, ethyl acetate, MeOH을 순차적으로 통과시켜 얻은 분획물 중 ethyl acetate fraction(1.0 g)을 순상 실리카겔 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=6:1)을 수행하여 compound 3을 분리하였다.

Ethyl acetate 분획물 3.0 g을 가지고 순상 실리카겔 컬럼을 충전 시켜 gradient 용매 (Hex/EtOAc(0-100%), EtOAc/MeOH(0-100%)) 조건을 이용하여 얻은 분획층 중 fr. 4(2.0 g)을 이용하여 순상 실리카겔(Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH=1:10:1) 컬럼을 수행하여 compound 8을 분리하였다(scheme 4).

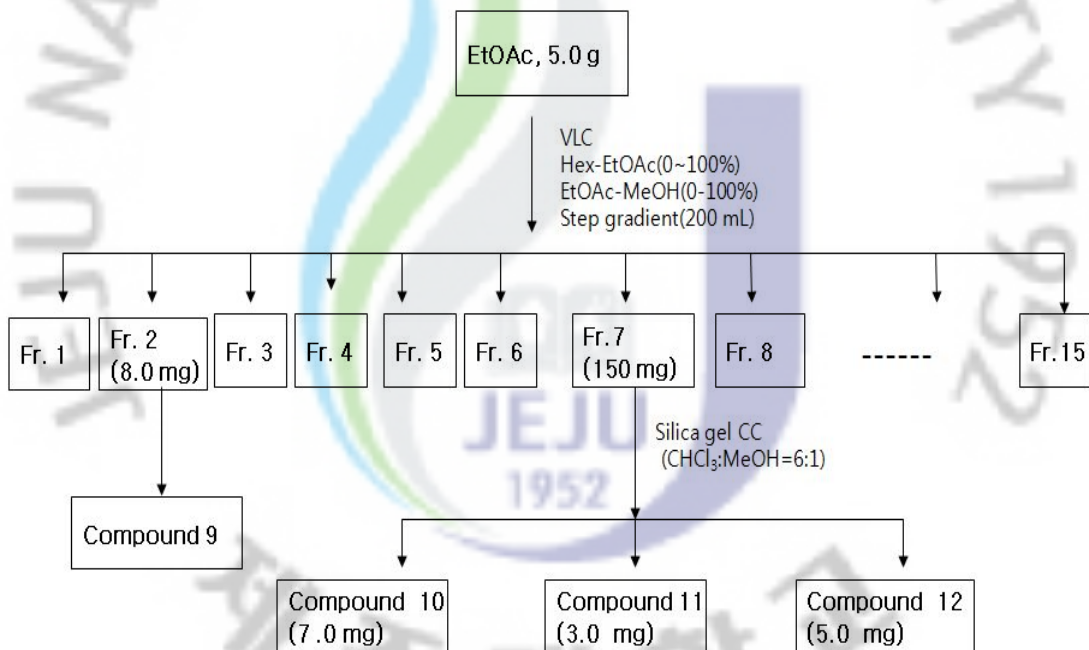


Scheme 4. Isolation of the compound 8 from *N. aciculata* branch.

2-4-4. 새덕이나무 가지의 ethyl acetate 분획물에서 compound 9, 10, 11, 및 12의 분리과정

Ethyl acetate 분획물 5.0 g을 gradient 용매 (Hex/EtOAc(0-100%), EtOAc/MeOH(0-100%)) 조건을 이용하여 순상 실리카겔 컬럼을 수행하여 총 15개의 분획물을 얻었다. 이 중 fr. 2(10.0 mg)에서 compound 9를 분리하였다.

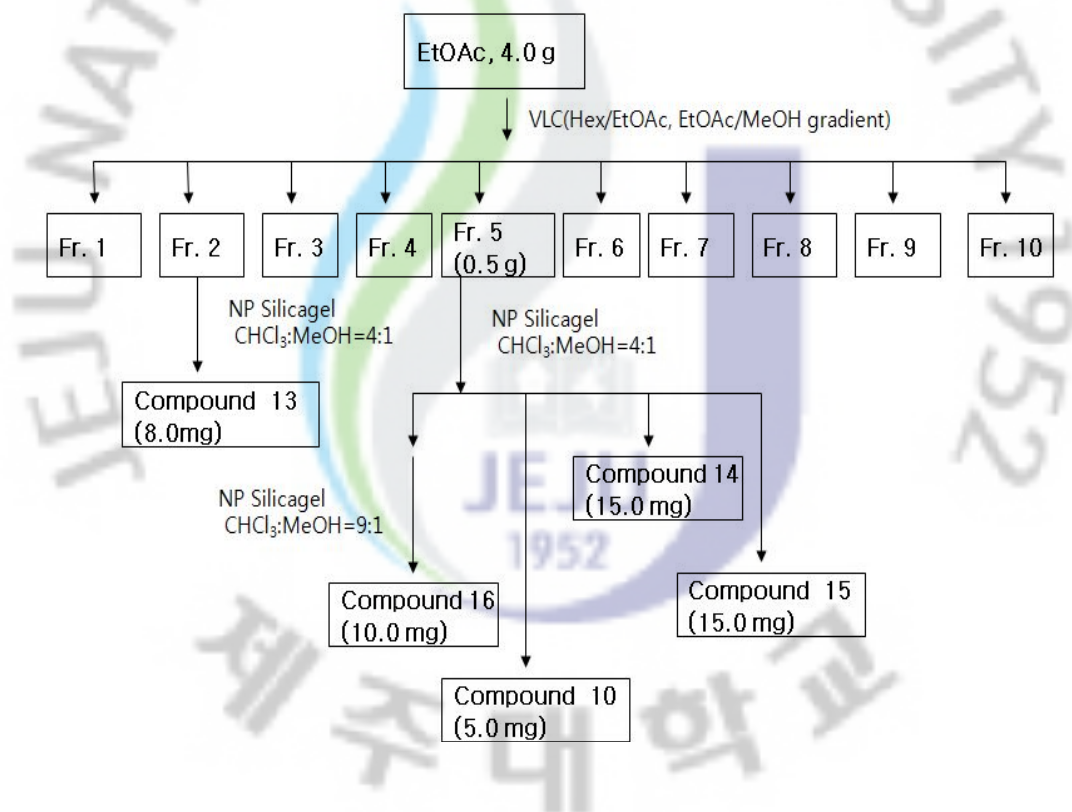
위에서 얻어진 15개의 분획물 중 fr. 7(150 mg)를 순상 실리카겔 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=6:1) 컬럼을 수행하여 compound 10, 11, 12를 분리하였다.(scheme 5).



Scheme 5. Isolation of the compound 9, 10, 11 and 12 from *N. aciculata* branch

2-4-5. 새덕이나무 잎의 ethyl acetate 분획물에서 compound 13, 14, 15, 및 16의 분리과정

Ethyl acetate 분획물 4.0 g을 gradient 용매(Hex/EtOAc(0-100%), EtOAc/MeOH(0-100%)) 조건을 이용하여 순상 실리카겔 컬럼을 수행하여 총 10개의 분획층을 얻었다. 이 중 fr. 2(0.1 g)를 순상 실리카겔(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1) 컬럼을 수행하여 compound 13을 분리하였다. Fr. 5(0.5 g)를 순상 실리카겔 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1)컬럼을 수행하여 compound 14와 15를 분리하였고, mixture 부분을 다시 순상 실리카겔(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=9:1)을 수행하여 compound 16을 분리하였다(scheme 6).



Scheme 6. Isolation of the compound 13, 14, 15 and 16 from *N. aciculata* leaves

### 3. 결과

#### 3-1. 새덕이나무 가지 추출물 및 용매 분획물들의 활성

##### 3-1-1. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과

미백 효능을 나타내는 성분들은 주로 생체내의 멜라닌 생합성 경로 중 일부 과정을 억제하는 작용기전을 가지고 있다. 이 합성 경로 중 가장 중요한 과정은 tyrosinase가 관여하는 초기 과정이며, 대부분의 미백성분들이 tyrosinase의 활성을 억제하여 피부 내 멜라닌 생성을 줄여주며, 이는 피부 미백 효과를 가져오게 된다<sup>28,29</sup>(Fig. 7). 미백화장품의 효력평가 방법으로 가장 많이 쓰이는 tyrosinase 활성 저해실험으로 새덕이 나무 가지 추출물과 분획물들의 미백 활성을 측정하고자 하였다.

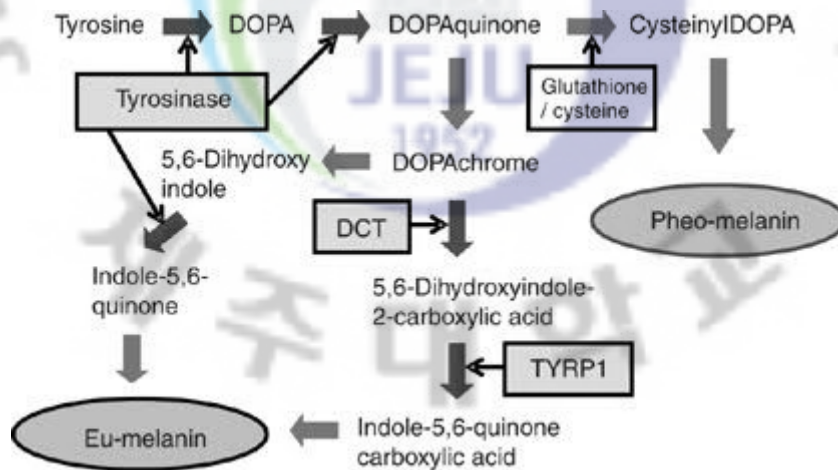


Figure 7. Melanin biosynthesis pathway



새덕이나무 가지의 70% metanol 추출물 및 분획물에 대하여 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 70% methanol 추출물, butanol 분획물 및 물 분획물에서 tyrosinase 저해 활성을 보였으며, ethyl acetate와 hexane 분획물은 tyrosinase 저해 활성을 보이지 않았다. 70% methanol 추출물에서는 tyrosinase 저해 활성 ( $IC_{50}$  1,100  $\mu\text{g/mL}$ )이 그리 높지 않았으나 butanol 분획물에서는  $IC_{50}$  값이 160  $\mu\text{g/mL}$ 로 좋은 활성을 보였다(Fig. 8).

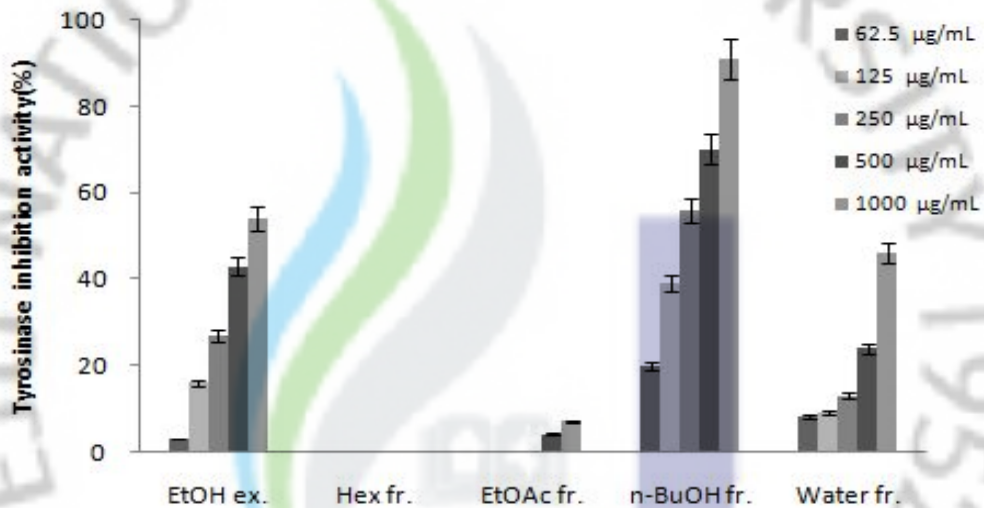


Figure 8. Tyrosinase inhibition activities of extract and fractions from *N. aciculata*. Data are expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiments



### 3-1-2. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과

새덕이나무 가지의 70% metanol 추출물 및 각각의 분획물에 대하여 DPPH radical scavenging 활성을 측정하였다. 그 결과 물 분획물(SC<sub>50</sub> µg/mL)과 hexane 분획물(SC<sub>50</sub> 161 µg/mL)을 제외한 70% methanol 추출물(SC<sub>50</sub> 20.55 µg/mL), ethyl acetate 분획물(SC<sub>50</sub> 14 µg/mL), butanol 분획물(SC<sub>50</sub> 12.7 µg/mL)에서 높은 DPPH radical scavenging 활성을 보였다(Fig. 9).

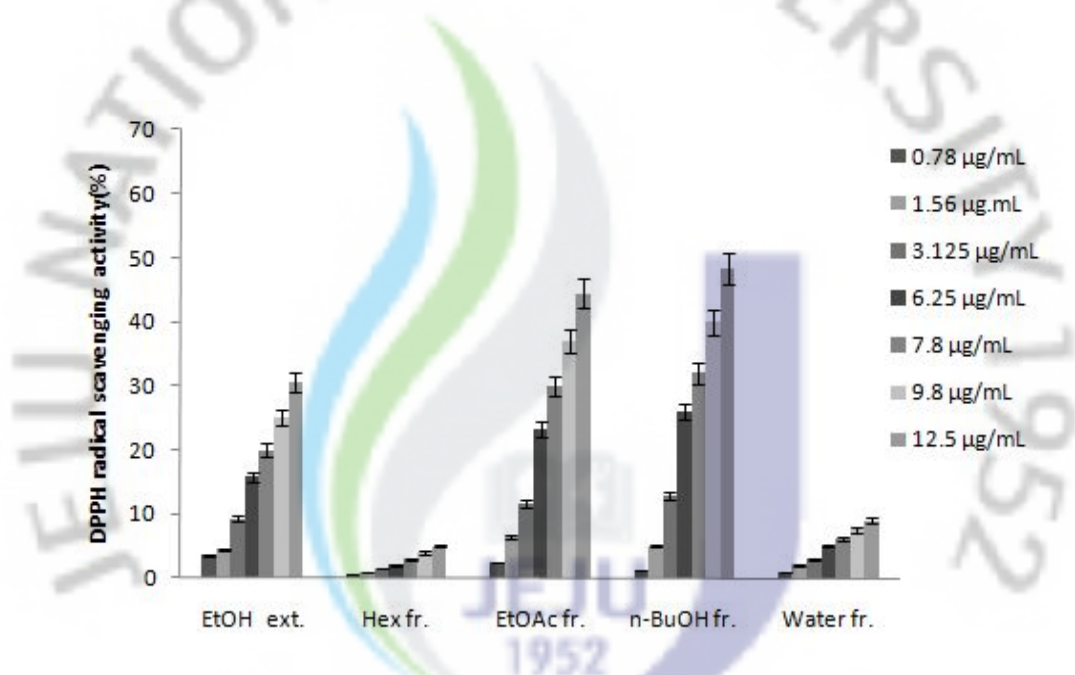


Figure 9. DPPH radical scavenging activities of extract and fractions from *N. aciculata*. Data are expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiments

### 3-1-3. Elastase inhibition activity

새덕이나무 가지의 70% methanol 추출물 및 분획물에 대하여 elastase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 70% methanol 추출물(IC<sub>50</sub> 87.17 µg/mL)과 ethyl acetate 분획물(IC<sub>50</sub> 119 µg/mL)에서 좋은 활성을 보였으며, 나머지 hexane 분획물(IC<sub>50</sub> 475.8 µg/mL), butanol 분획물(IC<sub>50</sub> 195 µg/mL), 물 분획물(IC<sub>50</sub> 208 µg/mL)에서도 elastase 저해 활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 10).

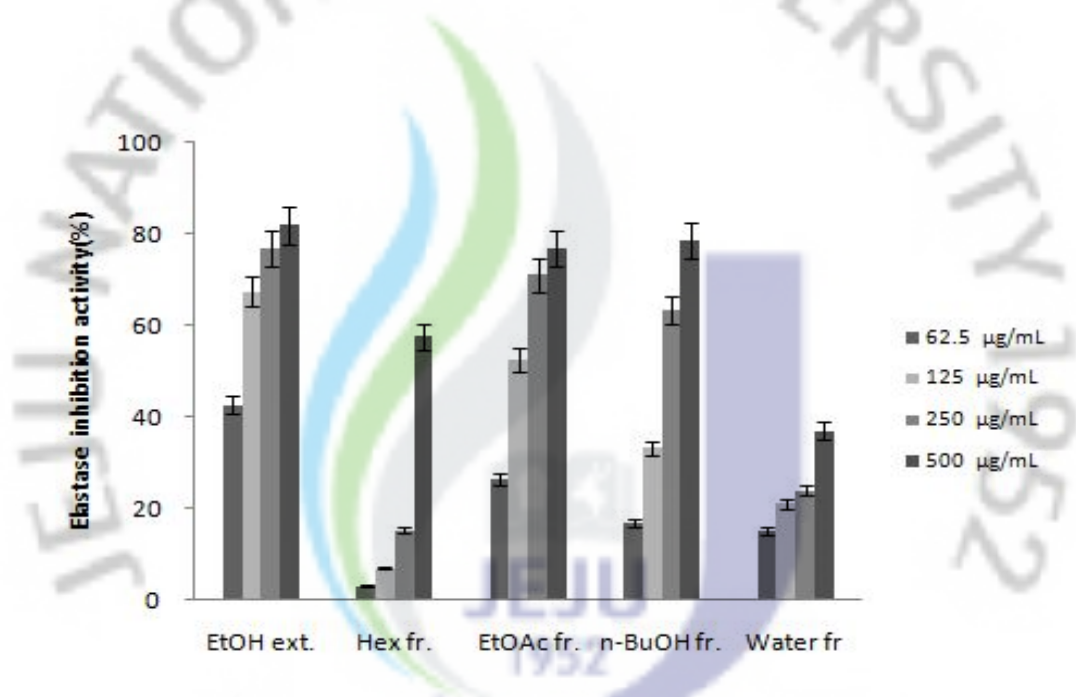


Figure 10. Elastase inhibition activities of extract and fractions from *N. aciculata*. Data are expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiments

#### 3-1-4. B16(F10) melanoma cell에서 butanol 분획물의 미백 활성 측정

표피의 기저층에 존재하는 melanin은 인간의 피부색을 결정짓는데 가장 중요한 역할을 하며, 멜라닌 세포(melanocyte) 내의 특수한 형태의 갈색 세포내 소기관인 melanosome에서 합성된다. 멜라닌 합성은 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1(TRP-1), tyrosinase-related protein-2(TRP-2), cyclic adenosine

monophosphate(cAMP) 유도 물질인 adrenocorticotrophic hormone(ACTH), forskolin과  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone(MSH)등에 의해서 조절된다.<sup>30,31</sup> 멜라닌의 합성은 아미노산의 일종인 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 대사가 진행되면서 melanin이 합성된다. 따라서 melanin 생성의 주요 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 세포내에서의 발현을 억제하여 melanin의 합성을 저해할 수 있다.<sup>32</sup>

앞의 연구에서 mushroom tyrosinase inhibition 측정에서 높은 활성을 보이는 butanol 분획물을 농도별로 처리하여 B16(F10) melanoma cell에서의 melanin 합성량을 측정하였다. 측정한 결과 Fig. 10에 나타난것 처럼 농도 의존적으로 butanol 분획물 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 50%와 80%의 melanin 합성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지는 세포 독성을 보이지 않았고, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 15% 정도의 세포 독성을 보였다. 본 실험으로 butanol 분획물이 세포 독성 없이 melanin 합성을 저해 하는 것을 확인할 수 있었다.

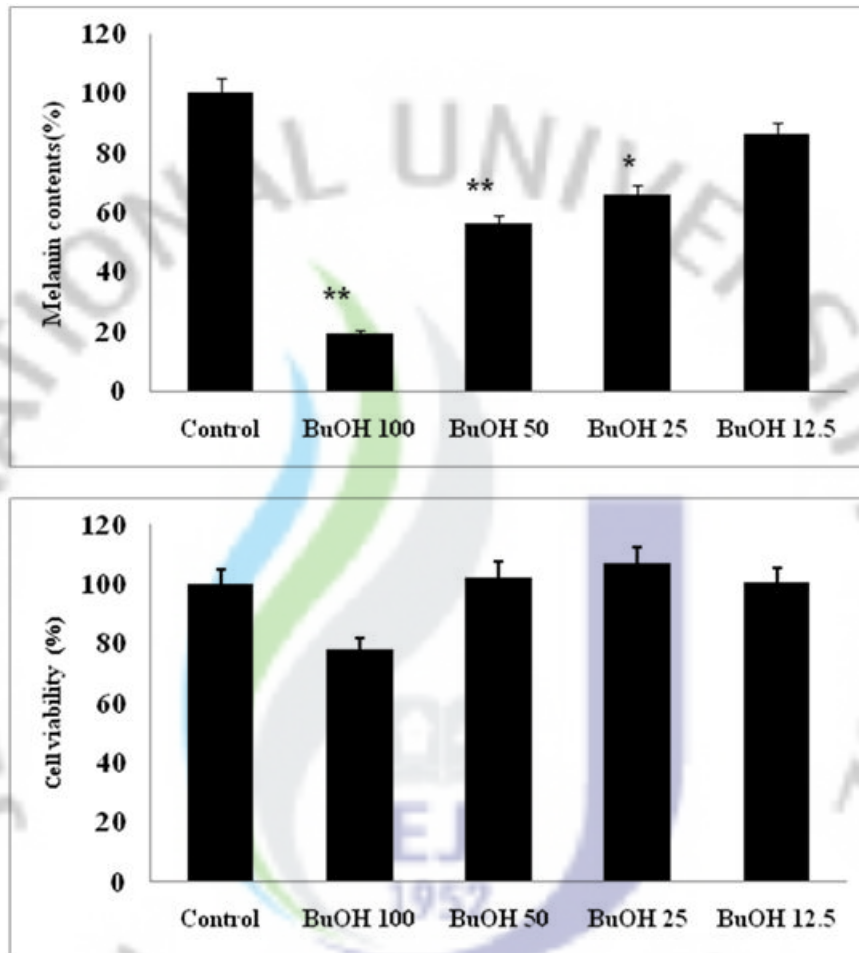


Figure 11. Effects of NAB on melanin contents and cytotoxicity. After incubation of B16(F10) murine melanoma cells with various concentrations of NAB for 72 h, melanin contents and cytotoxicity are determined. Data are expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiments.

3-1-5. B16(F10) melanoma cell에서 butanol 분획물의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 MITF의 저해 활성

Melanin 합성 저해 활성을 보이는 butanol 분획물을 melanin 합성 관련 단백질들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. Western blotting을 수행한 결과 melanin 합성에 관련된 효소인 tyrosinase, TRP-2와 멜라닌색소세포 활성화 체계인 MITF(Microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다. butanol 분획물은 melanin 합성에 관련된 단백질의 발현을 억제함으로써 melanin 합성을 저해하는 것으로 여겨진다(Fig. 12).

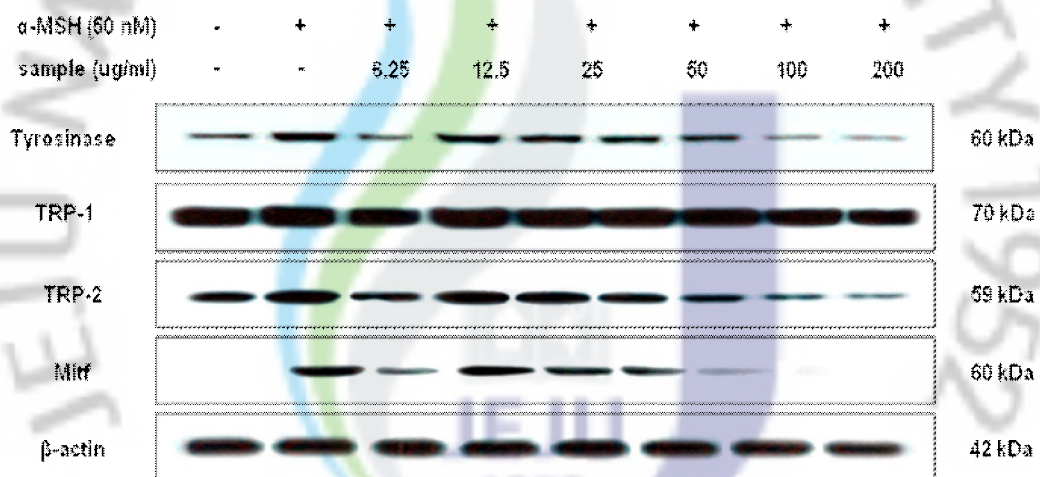


Figure 12. Inhibitory effect of NAB on tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF and  $\beta$ -actin protein expression in  $\alpha$ -MSH stimulated B16(F10) murine melanoma cells. Cells were treated with 50 nM  $\alpha$ -MSH in presence or absence of NAB at the indicated concentrations for 72 h,  $\beta$ -actin was served as a loading control, MSH-: negative control without  $\alpha$ -MSH, MSH+: positive control with 50nM  $\alpha$ -MSH.

### 3-1-6. Human normal fibroblast cell에서 butanol 분획물의 세포 독성

Butanol 분획물의 세포 독성 확인하기 위해 human normal fibroblast cell에 butanol 분획물을 농도별로 처리하였다. 처리한 결과 100 ug/mL에서 약 15% 정도의 세포 독성을 보이고 50  $\mu$ g/mL 농도 이하에서는 human skin cell인 CCD 986 sk에서 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 13). 강한 미백활성을 보이며 세포 독성이 없는 새덕이나무 butanol 분획물은 기능성 화장품의 소재로 사용이 가능하리라 여겨진다.

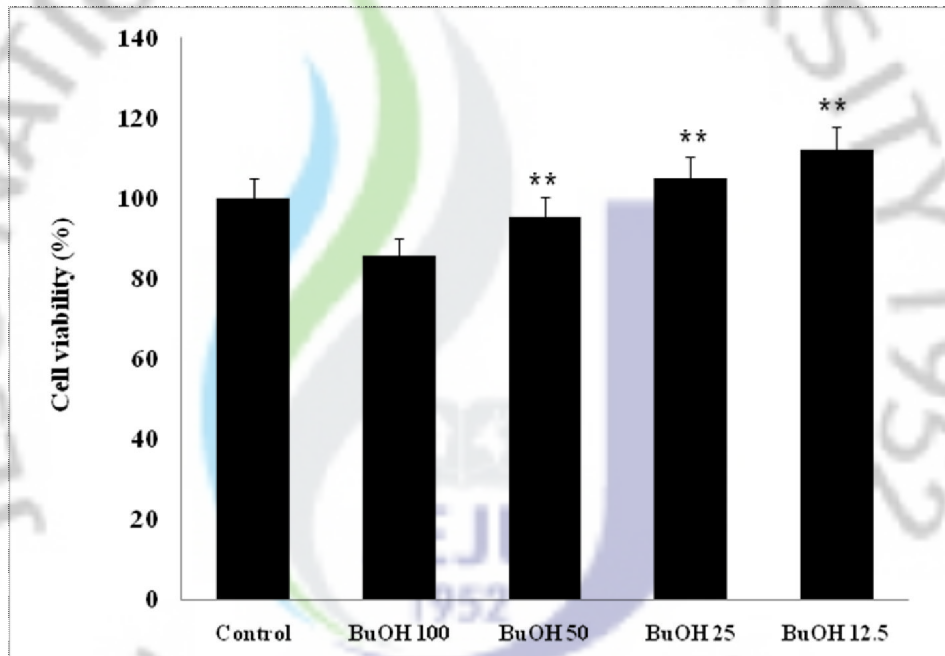


Figure 13. Effects of NAB on cytotoxicity in cultured human normal fibroblast cell. Cytotoxicity was determined using the MTT method. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments.



3-2. 새덕이나무 가지 추출물에서 분리된 compounds.

새덕이나무 가지 추출물을 column chromatography로 분리, 정제하여 12개의 compound를 분리하였다. 분리된 compounds는 1D, 2D NMR을 이용하여 화합물을 예측하였고, 문헌과 대조하여 동정하였다(Table 4-13).

3-2-1. 새덕이나무 가지의 *n*-BuOH 분획물에서 분리된 compound 1과 2의 구조 동정

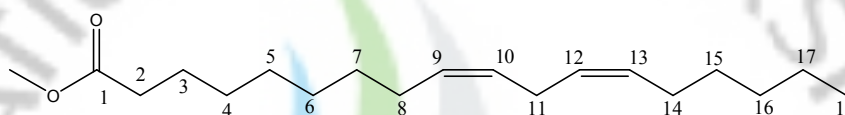


Table 4. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound 1 (Methyl linoleate<sup>33)</sup>

position	$\delta_c$
1	174.2
2	34.1
3	25.6
4, 5, 6	29.2
7	29.7
8	27.2
9	130.0
10	128.0
11	25.6
12	127.9
13	130.2
14	27.2
15	29.3
16	31.5
17	22.7
18	14.1
-O-CH <sub>3</sub>	51.4

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively.

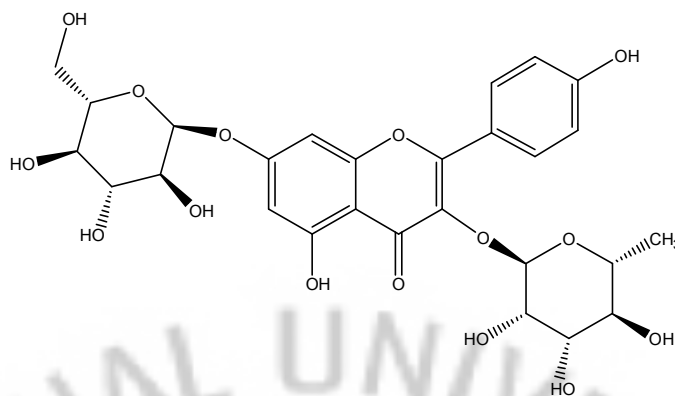


Table 5. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound 2  
(Kaempferol-3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucopyranoside<sup>34)</sup>

position	$\delta_c$	position	$\delta_c$
2	158.7	1''	100.5
3	136.0	2''	75.2
4	179.5	3''	76.8
5	159.3	4''	70.2
6	102.8	5''	77.3
7	163.3	6''	62.1
8	95.2	1'''	100.3
9	163.0	2'''	72.2
10	105.4	3'''	72.0
		4'''	73.4
1'	123.1	5'''	71.8
2'	116.5	6'''	17.8
3'	146.1		
4'	150.0		
5'	117.8		
6'	123.2		

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively

3-2-2. 새덕이 나무 가지의 Ethyl acetate 분획물에서 분리된 compound 3~12의 구조 동정

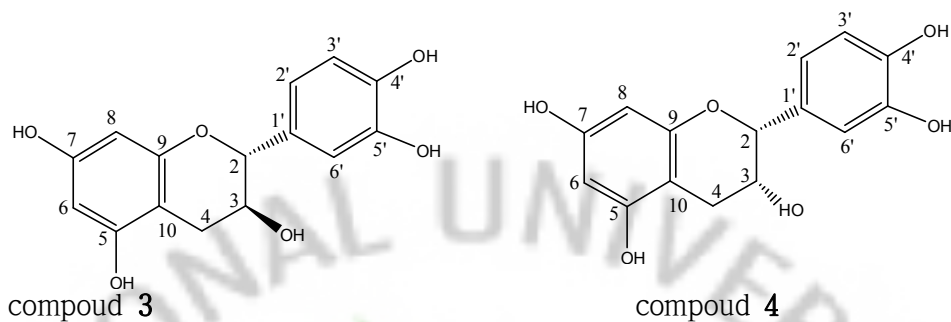


Table 6. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound 3((+)-catechin)<sup>35</sup> and compound 4((-)-epicatechin)<sup>36</sup>

position	(+)-catechin	(-)-epicatechin
2	83.0	80.0
3	68.9	67.6
4	28.6	29.4
5	157.9	158.1
6	96.5	96.5
7	157.7	157.8
8	95.6	96.0
9	157.0	157.5
10	100.9	100.2
1'	132.3	132.4
2'	115.3	115.4
3'	116.3	145.9
4'	46.4	146.1
5'	144.5	116.0
6'	120.1	119.5

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively.

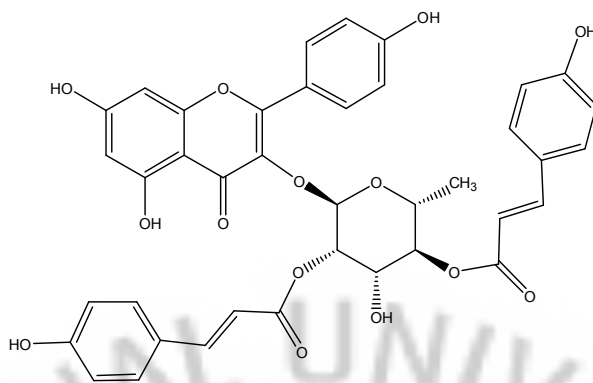


Table 7. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound 5  
(Kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-(2'',3''-E-di-*p*-coumaroyl)-rhamnoside)<sup>37</sup>

position	$\delta_c$	position	$\delta_c$
2	159.5	1''	100.1
3	134.1	2''	68.5
4	179.4	3''	74.6
5	163.3	4''	70.0
6	99.2	5''	73.2
7	166.0	6''	17.8
8	94.9	1''', 1'''	168.6, 168.2
9	158.7	2''', 2'''	115.0, 114.7
10	106.0	3''', 3'''	147.6, 147.0
1'	122.5	4''', 4'''	127.6, 127.2
2'	132.0	5''', 5'''	131.5
3'	116.1	6''', 6'''	116.9, 116.8
4'	160.2	7''', 7'''	161.9, 161.4
5'	116.1	8''', 8'''	116.9, 116.8
6'	132.0	9''', 9'''	131.5

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively

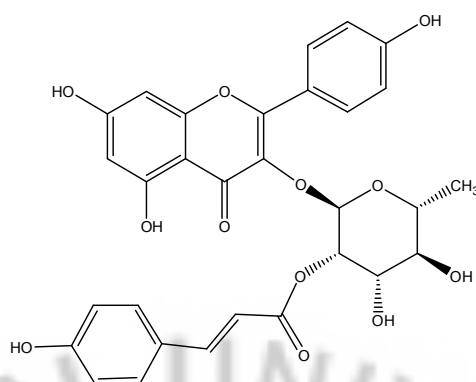


Table 8. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **6**(2''-*p*-coumaroylafzelin)<sup>38</sup>

position	$\delta_c$	position	$\delta_c$
2	158.9	1''	100.6
3	135.0	2''	68.6
4	179.4	3''	72.7
5	163.3	4''	69.8
6	100.7	5''	71.7
7	167.0	6''	17.8
8	95.4	1'''	127.3
9	159.3	2'''	132.1
10	105.5	3'''	117.0
		4'''	162.0
1'	122.5	5'''	117.0
2'	131.5	6'''	132.1
3'	116.8	7'''	147.6
4'	161.6	8'''	114.8
5'	116.8	9'''	170.1
6'	131.5		

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively

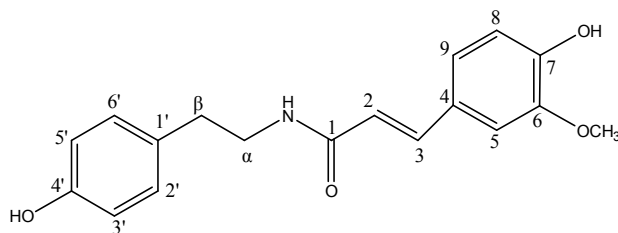


Table 9. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound 7(Feruloyl tyramine)<sup>39</sup>

position	$\delta_c$
1	169.0
2	118.6
3	142.0
4	128.1
5	111.4
6	149.0
7	149.5
8	116.4
9	123.1
1'	131.1
2'	130.7
3'	116.2
4'	156.6
5'	116.2
6'	130.7
$\alpha$	42.4
$\beta$	35.7
OCH <sub>3</sub>	56.4

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively



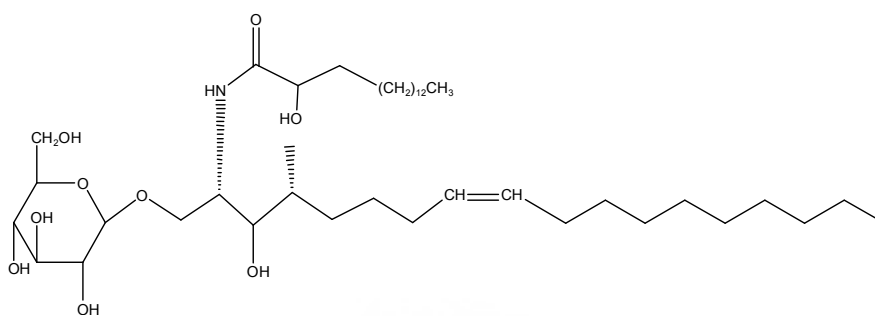
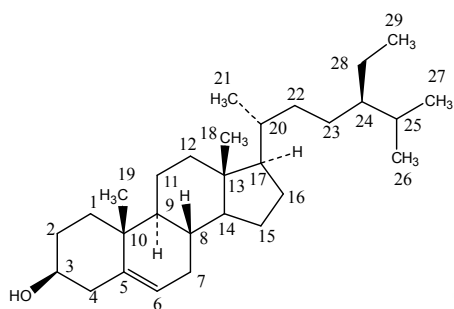


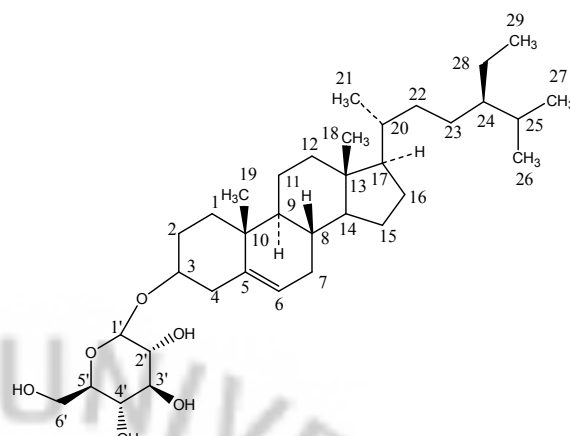
Table 10. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **8**(Aralia cerebroside)<sup>40</sup>

position	$\delta_c$	position	$\delta_c$
1	70	1'	176.1
2	51.5	2'	72.6
3	75.7	3'	36.0
4	72.6	4'	26.3
5	25.9	5'	29.9-30.4
6	29.9-30.4	6',7',8',9',10'	29.9-30.4
7	32.5	11'.12',13'14'	29.9-30.4
8	131.0	15'	32.5
9	130.0	16'	23.3
10	33.3	1''	104.9
11	29.9-30.4	2''	75.1
12	29.9-30.4	3''	78.1
13	29.9-30.4	4''	71.7
14	29.9-30.4	5''	78.3
15	29.9-30.4	6''	62.9
16	32.5		
17	23.3		
18	14.6		

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively



compound **9**



compound **10**

Table 11. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **9**( $\beta$ -sitosterol)<sup>41</sup> and compound **10**(Daucosterol)<sup>42</sup>

position	$\beta$ -sitosterol	Daucosterol	position	$\beta$ -sitosterol	Daucosterol
1	37.2	37.6	19	19.3	20.0
2	31.6	30.0	20	36.1	36.6
3	71.8	79.5	21	18.9	19.6
4	42.2	40.2	22	33.9	34.4
5	141	140.8	23	26.0	26.5
6	121.7	122.4	24	45.7	46.3
7	31.9	32.3	25	29.3	29.6
8	31.9	32.3	26	18.8	19.3
9	50.1	50.7	27	19.7	19.1
10	36.5	40.2	28	23.0	23.5
11	21.0	21.5	29	11.8	12.2
12	39.7	39.1	1'		101.6
13	42.2	42.7	2'		74.1
14	56.7	57.2	3'		77.7
15	24.3	24.7	4'		70.7
16	28.2	28.6	5'		77.0
17	56.0	56.5	6'		62.2
18	11.9	12.1			

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively

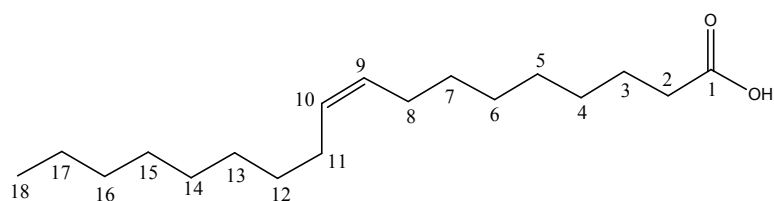


Table 12. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **11**(Oleic acid)<sup>43</sup>

position	$\delta_c$
1	180
2	34.3
3	24.8
4	29.2
5	29.3
6	29.4
7	29.9
8	27.4
9	129.9
10	130.2
11	27.3
12	30
13	29.6
14	29.8
15	29.5
16	32.1
17	22.9
18	14.3

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively

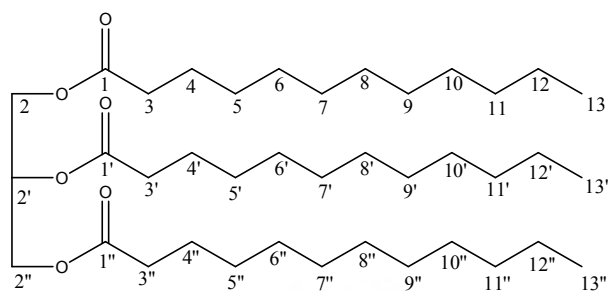
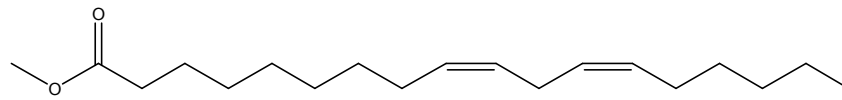


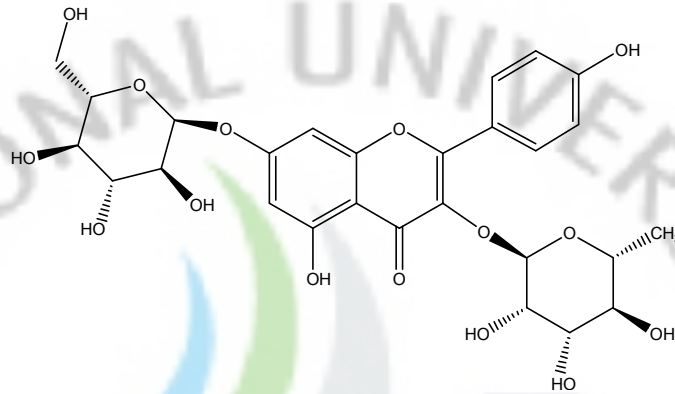
Table 13. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **12**(Trilaurin)<sup>44</sup>

position	$\delta_c$
1, 1''	173.2
2, 2''	62.15
1'	172.8
2'	68.98
3, 3''	34.10
3'	34.25
4, 4', 4''	29.94
5, 5', 5''	29.18
6, 6', 6''	29.38
7, 7', 7''	29.53
8, 8', 8''	29.68
9, 9', 9''	29.68
10, 10', 10''	29.53
11, 11', 11''	31.97
12, 12', 12''	22.73
13, 13', 13''	14.11

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively



Methyl linoleate(1)



Kaempferol-3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucopyranoside (2)

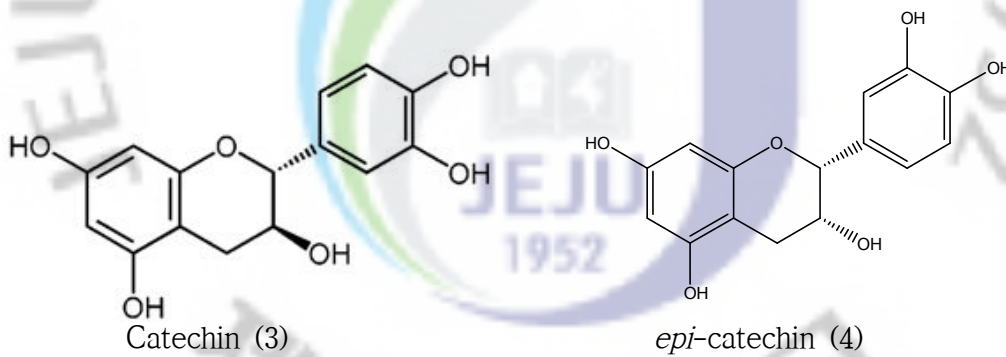
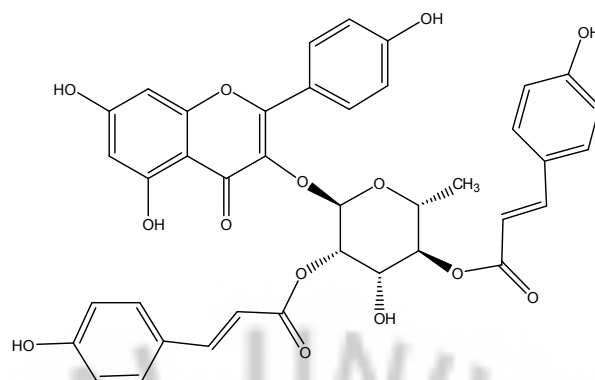
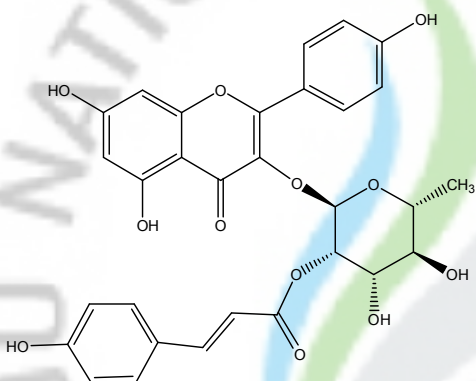


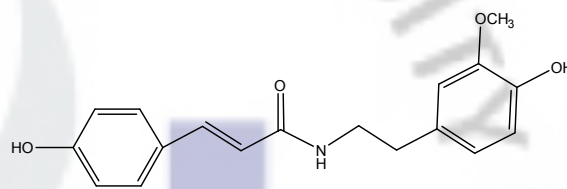
Figure 14. Structure of isolated compounds from *N. aciculata* branch.



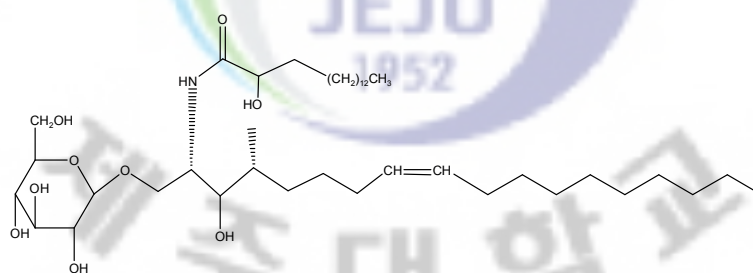
Kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-(2'',3''-E-di-*p*-coumaroyl)-rhamnoside (5)



2''-*p*-coumaroylfazelin(6)



Feruloyl tyramine(7)



Aralia cerebroside(8)

Figure 14. Structure of isolated compounds from *N. aciculata* branch.



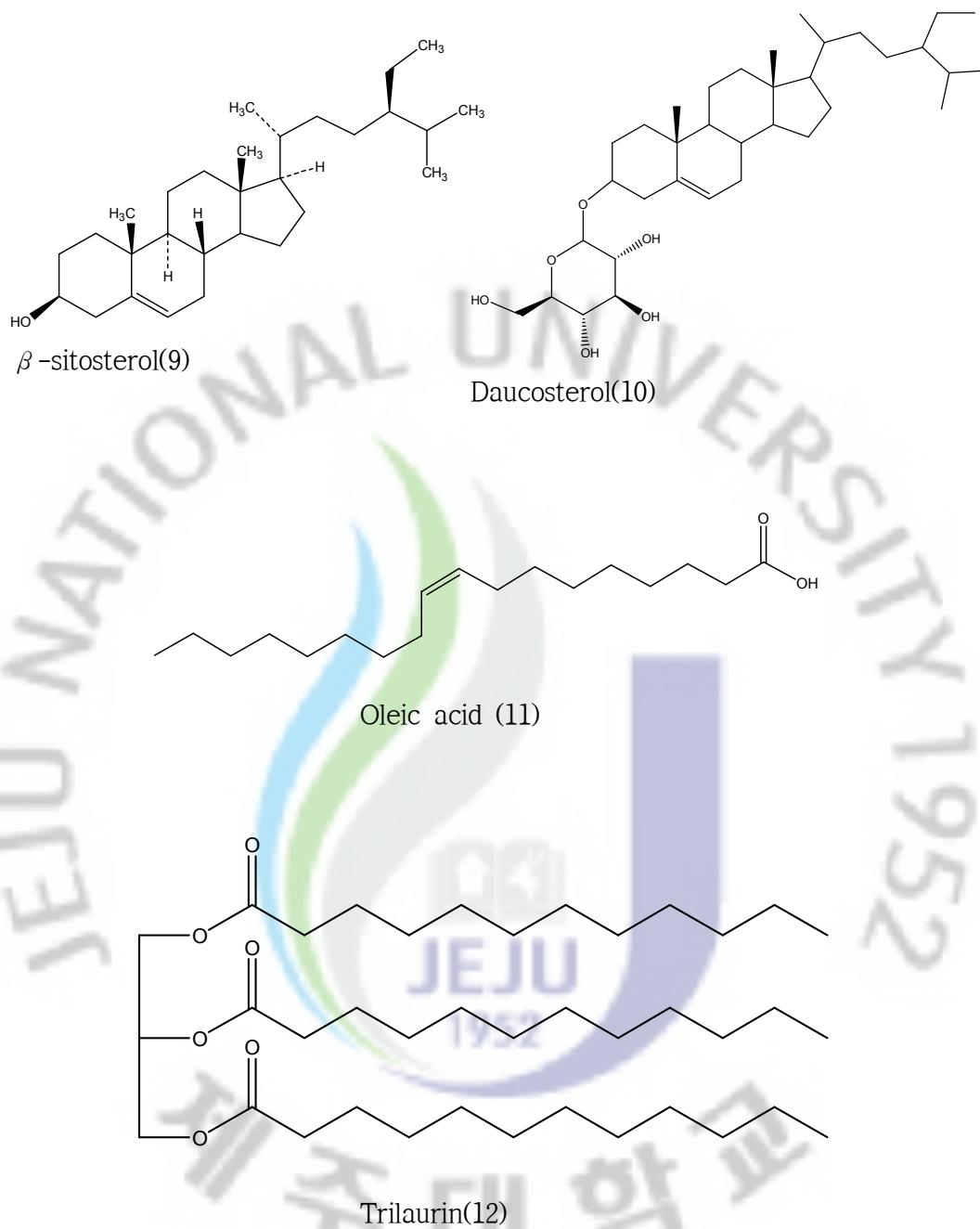


Figure 14. Structure of isolated compounds from *N. aciculata* branch.

### 3-3. 새덕이나무 잎 추출물 및 용매 분획물들의 활성

#### 3-3-1. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과

새덕이나무 잎의 70% metanol 추출물 및 분획물에 대하여 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 추출물 및 분획물 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 10% 미만의 tyrosinase inhibition 활성을 보여 새덕이나무 잎 추출물 및 분획물에서는 mushroom tyrosinase inhibition 활성이 거의 없는 것으로 보인다.

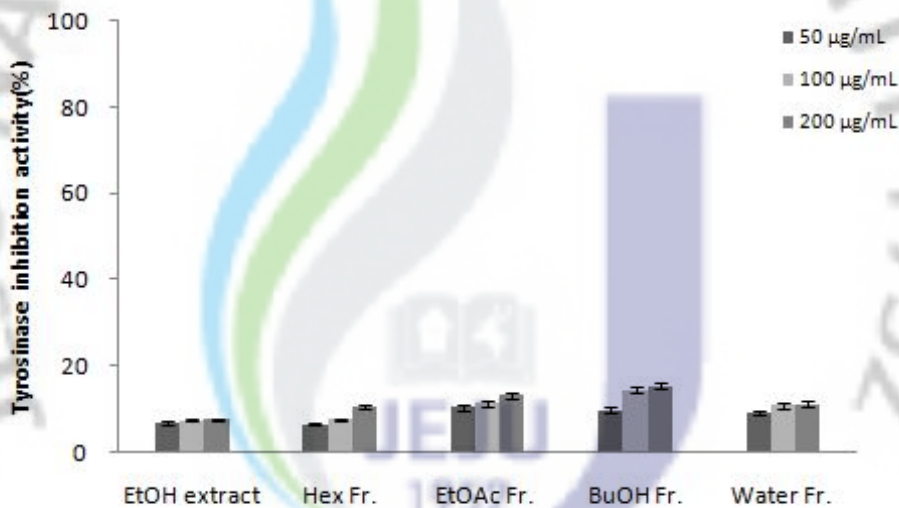


Figure 15. Tyrosinase inhibition activities of extract and fractions from *N. aciculata*. Data are expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiments

### 3-3-2. Elastase inhibition 활성 검색 결과

새덕이나무 잎의 70% metanol 추출물 및 분획물에 대하여 elastase inhibition 활성을 측정하였다. 그 결과 ethanol 추출물, hexane 분획물과 물층 분획물에서는 elastase inhibition 활성을 거의 확인할 수 없었고, ethyl acetate 분획물(IC<sub>50</sub> 389 µg/mL)과 butanol 분획물(IC<sub>50</sub> 590 µg/mL)에서 낮은 elastase 저해 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 16).

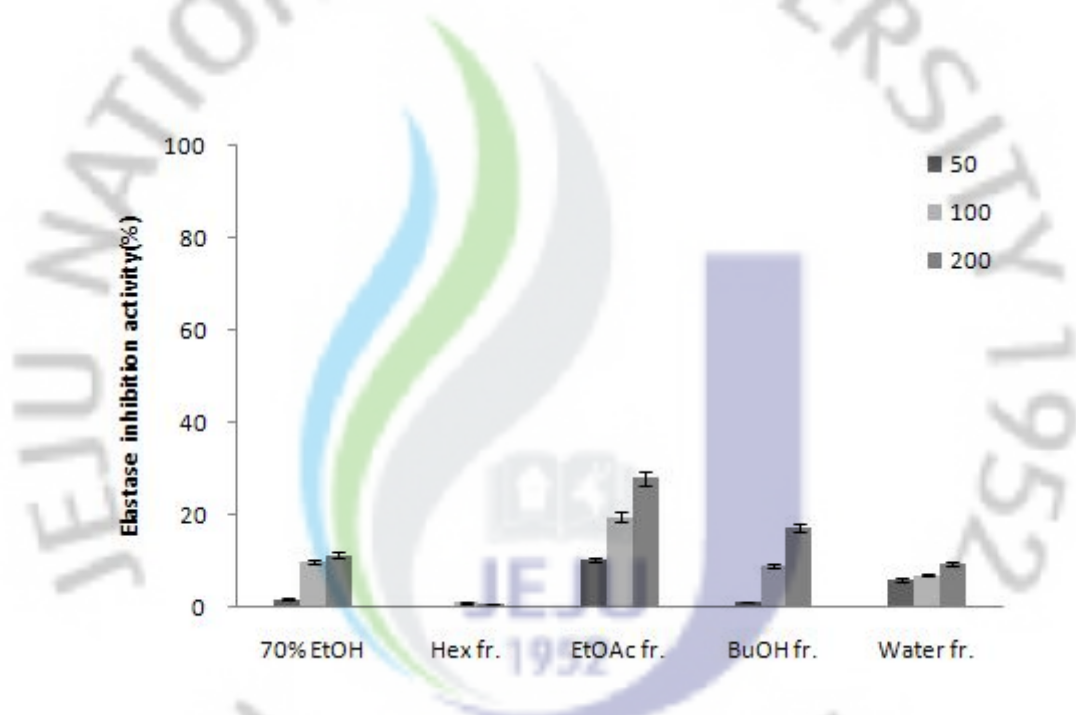


Figure 16. Elastase inhibition activities of extract and fractions from *N. aciculata*. Data are expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiments.

### 3-3-3. DPPH radical scavenging 활성 검색 결과

새덕이나무 잎의 70% metanol 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical scavenging 활성을 측정하였다. 그 결과 hexane 분획물(SC<sub>50</sub> 593 µg/mL)과 물층 분획물(SC<sub>50</sub> 182.2 µg/mL)을 제외한 ethanol 추출물(SC<sub>50</sub> 52.7 µg/mL), ethyl acetate 분획물(SC<sub>50</sub> 27.8 µg/mL), butanol 분획물(SC<sub>50</sub> 31.1 µg/mL)에서는 높은 DPPH radical scavenging 활성을 보였다(Fig. 17).

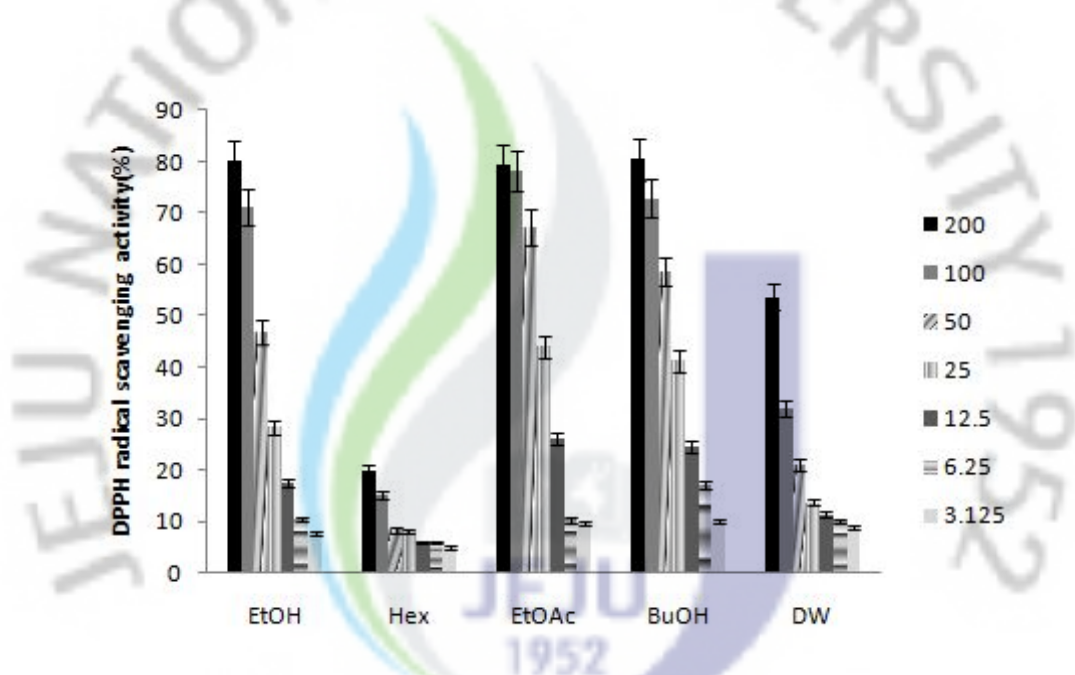


Figure 17. DPPH radical scavenging activities for extract and fractions from *N. aciculata*. Data are expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiment

3-4. 새덕이 나무 잎의 ethyl acetate 분획물에서 분리된 compound **13**, **14**, **15**, 및 **16**의 구조 동정

Column chromatography를 이용하여 compound **13**, **14**, **15**, 및 **16**을 분리 하였다. 분리된 compounds는 1D, 2D NMR을 이용하여 화합물을 예측하였고, 문헌과 대조하여 동정하였다(Table 14-17).

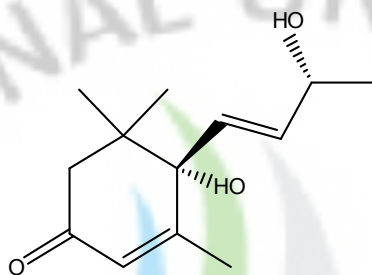


Table 14. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **13**(Blumenol A)<sup>45</sup>

position	$\delta_c$
1	42.6
2	51.0
3	201.4
4	127.3
5	167.6
6	80.1
7	137.1
8	130.1
9	68.6
10	23.6
11	23.9
12	24.6
13	19.7

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively

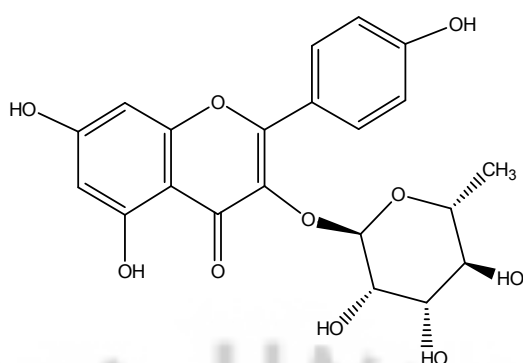


Table 15. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **14**

(Kaempferol 3-*O*-rhamnoside)<sup>46</sup>

position	$\delta_c$	position	$\delta_c$
2	158.5	1''	103.5
3	136.3	2''	72.2
4	179.6	3''	72.1
5	163.1	4''	73.3
6	99.9	5''	72.0
7	165.8	6''	17.8
8	94.9		
9	159.2		
10	106.0		
1'	122.7		
2'	132.0		
3'	116.6		
4'	161.5		
5'	116.6		
6'	132.0		

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively



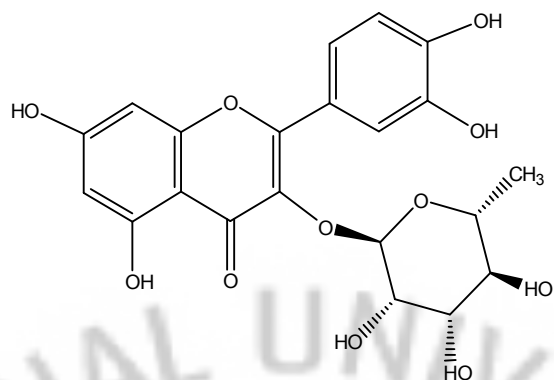


Table 16. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **15**

(Quercetin 3-*O*-rhamnoside)<sup>47</sup>

position	$\delta_c$	position	$\delta_c$
2	159.4	1''	94.8
3	136.3	2''	72.2
4	179.7	3''	72.1
5	158.6	4''	73.4
6	103.6	5''	72.0
7	165.9	6''	17.8
8	99.9		
9	163.2		
10	106.0		
1'	123.1		
2'	116.5		
3'	146.4		
4'	149.8		
5'	117.1		
6'	123.0		

<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively

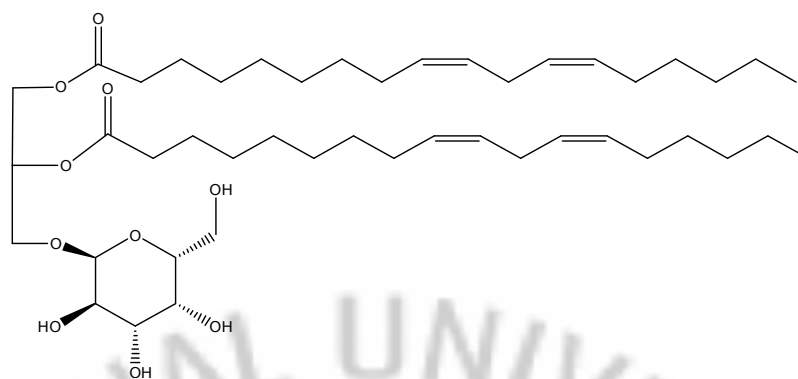
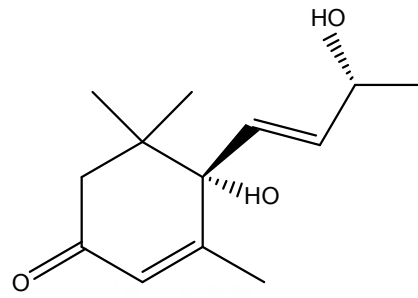


Table 17. NMR spectroscopic data<sup>a)</sup> for compound **16**

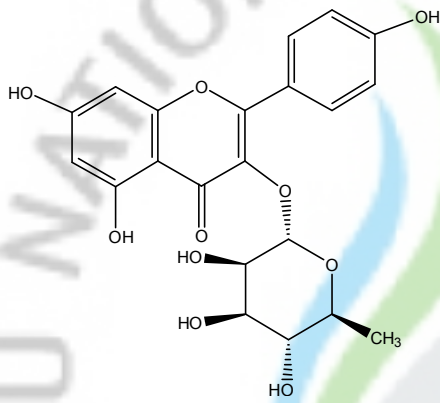
(1,2-*O*-dilinoeoylglycerol-3-*O*-galactopyranosyl-glycerol)<sup>48</sup>

position	$\delta_c$	position	$\delta_c$
1	175	13, 13'	129
1'	174.8	14, 14'	132.8
2	63.2	15, 15'	28.3
2'	70.4	16, 16'	30.5
3	35.3	17, 17'	33.32
3'	35.1	18, 18'	14.8
4, 4'	26.7	1''	105.5
5, 5'	30.3	2''	72.5
6, 6'	30.6	3''	73.6
7, 7', 8, 8'	30.9	4''	71.9
9, 9'	28.3	5''	76.9
10, 10'	131.2	6''	62.6
11, 11'	129.4		
12, 12'	26.1		

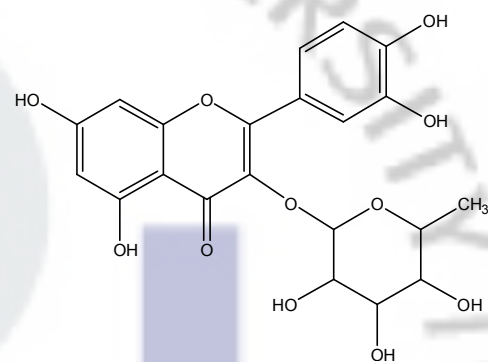
<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at 400 and 100MHz, respectively



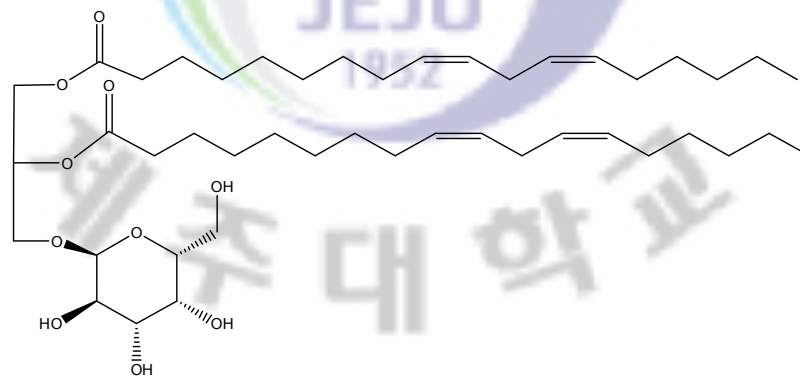
Blumenol A(13)



Kaempferol 3-*O*-rhamnose (14)



Quercetin 3-*O*-rhamnose (15)



1,2-dilinolenoylglycerol-3-*O*-galactopyranosyl-glycerol(16)

Figure 18. Structure of isolated compounds from *N. aciculata* leaves.

### 3-5. 화합물들의 활성 결과

#### 3-5-1. DPPH radical scavenging 활성 검색

새덕이나무로부터 분리, 동정한 16개의 화합물 중 8개(compound 2, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16)에 대한 DPPH radical scavenging activity를 측정된 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 이 화합물들 중 compound 2(SC<sub>50</sub> 55 µg/mL), 7(SC<sub>50</sub> 251 µg/mL), 14(SC<sub>50</sub> 304.5 µg/mL), 15(SC<sub>50</sub> 21.7 µg/mL)에서 DPPH radical scavenging 활성을 보였으며, compound 15인 quercitrin이 SC<sub>50</sub>이 21.7 µg/mL로 우수한 활성을 보였다.

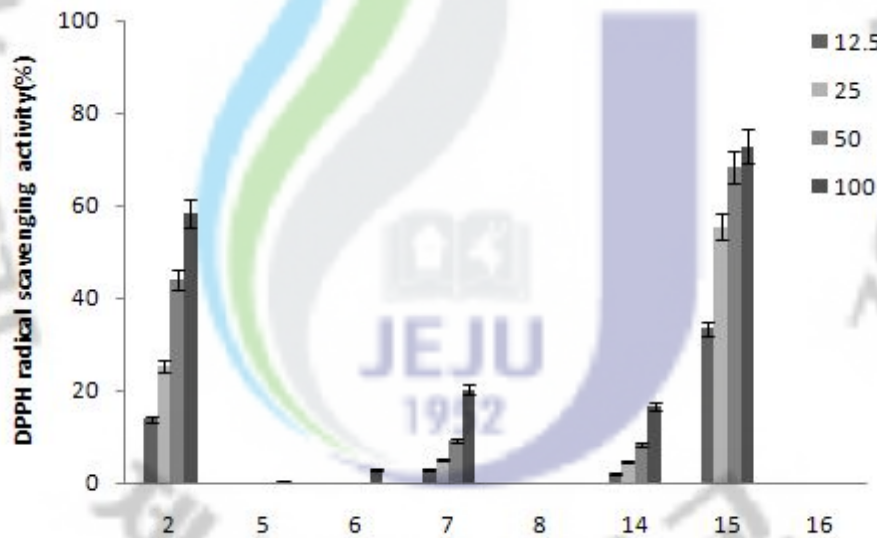


Figure 19. DPPH radical scavenging activities for isolated compounds from *N. aciculata*.

### 3-5-2. Tyrosinase inhibition 활성 검색 결과

새덕이나무에서 분리된 화합물 8개의 tyrosinase inhibition 활성을 측정한 결과 compound 5, 6, 8이 tyrosinase inhibition 활성을 보였으며, compound 5(IC<sub>50</sub>: 49.11 µg/mL), 6(IC<sub>50</sub>: 45.76 µg/mL), 8(IC<sub>50</sub>: 31.74 µg/mL)의 활성은 대조군으로 사용한 arbutin(IC<sub>50</sub>: 88 µg/mL) 보다도 우수한 활성을 보였다(Fig. 20).

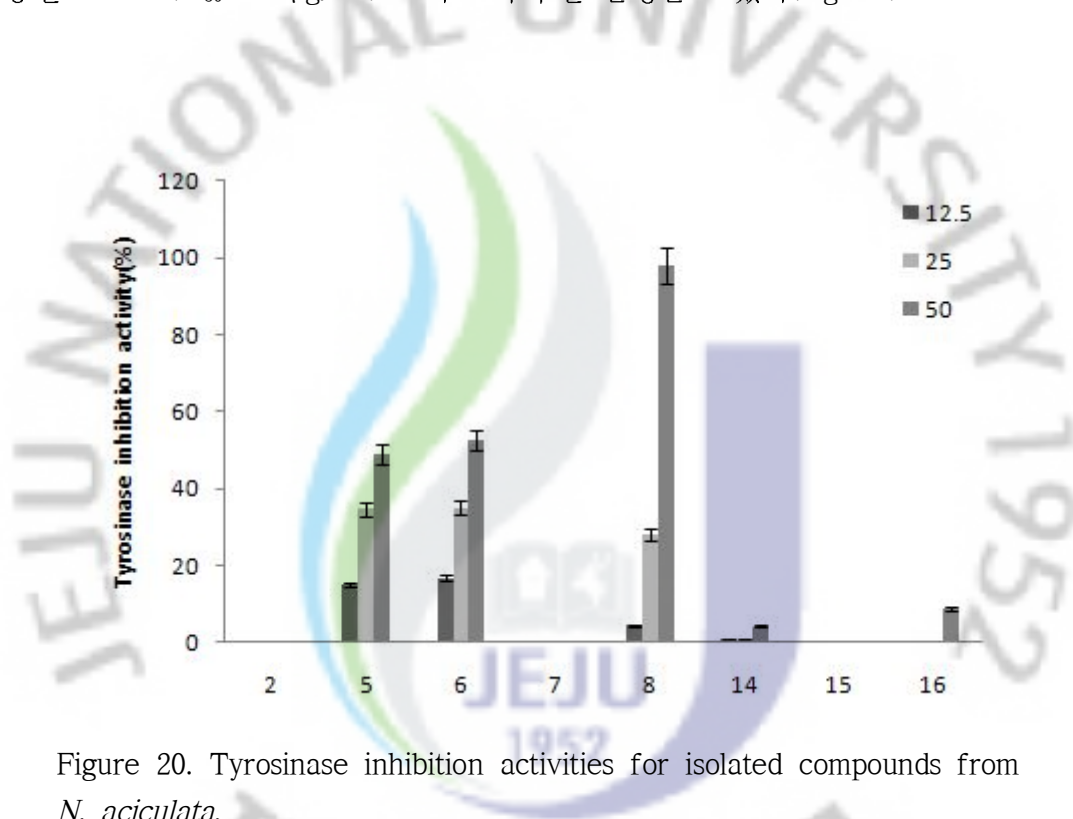


Figure 20. Tyrosinase inhibition activities for isolated compounds from *N. aciculata*.

### 3-5-3. Elastase inhibition activity

새덕이 나무에서 분리된 화합물 8개의 elastase inhibition 활성을 측정한 결과 compound 2, 5, 6, 7, 16, 17, 18이 elastase inhibition 활성을 보였으며, compound 2(IC<sub>50</sub>: 188 µg/mL), 5(IC<sub>50</sub>: 26.2 µg/mL), 6(IC<sub>50</sub>: 77.3 µg/mL), 7(IC<sub>50</sub>: 62.4 µg/mL), 14(IC<sub>50</sub>: 56.8 µg/mL), 15(IC<sub>50</sub>: 187.4 µg/mL), 16(IC<sub>50</sub>: 140.3 µg/mL)의 활성은 대조군으로 사용한 oleanolic acid(IC<sub>50</sub>: 9.3 µg/mL) 보다는 낮게 나타났다. (Fig. 21).

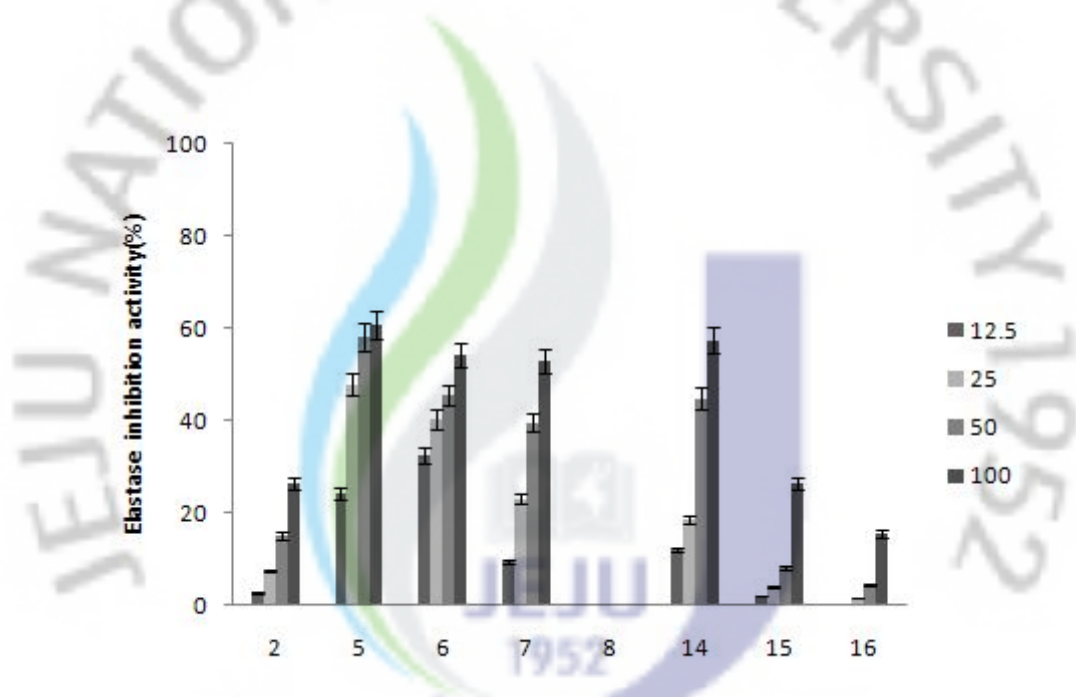


Figure 21. Elastase inhibition activities for compounds from *N. aciculata*.



#### 4. 결론

새덕이나무로부터 18개의 화합물, 즉 methyl linoleate(1), kaempferol-3-*O*-rhamnose-7-*O*-glucopyranoside(2), catechin(3), *epi*-catechin(4), kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-(2'',3''-*E*-di-*p*-coumaroyl)-rhamnose(5), 2''-*p*-coumaroylafzelin(6), feruloyl tyramine(7), aralia cerebroside(8),  $\beta$ -sitosterol(9), daucosterol (10), oleic acid(11), trilaurin(12), blumenol A(13), kaempferol 3-*O*-rhamnose(14), quercetin 3-*O*-rhamnose(15), 1,2-dilinolenoylglycerol-3-*O*-galactopyranosyl-glycerol(16)을 분리하였고 이 화합물들은 새덕이나무에서는 처음 분리된 화합물들이다.

새덕이나무로 부터 분리된 화합물들에 대하여 tyrosinase inhibition 활성, DPPH radical scavenging 활성, elastase inhibition 활성을 검색한 결과 DPPH radical scavenging 활성 검색에서는 quercetin 3-*O*-rhamnose(15)이 SC<sub>50</sub> 값이 21.7  $\mu$ g/mL로 우수한 활성을 보이며, elastase inhibition 활성 검색에서는 kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-(2'',3''-*E*-di-*p*-coumaroyl)rhamnoside(5), 2''-*p*-coumaroylafzelin(6), feruloyl tyramine(7) 그리고 kaempferol 3-*O*-rhamnose(14)이 IC<sub>50</sub>값이 각각 26.2  $\mu$ g/mL, 77.3  $\mu$ g/mL, 62.4  $\mu$ g/mL, 56.8  $\mu$ g/mL로 우수한 활성을 보였으며 tyrosinase inhibition 활성 검색에서는 *epi*-catechin(4), kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-(2'',3''-*E*-di-*p*-coumaroyl)-rhamnoside(5), 2''-*p*-coumaroylafzelin(6)이 IC<sub>50</sub> 값이 각각 49.11  $\mu$ g/mL, 46.76  $\mu$ g/mL, 31.74  $\mu$ g/mL로 arbutin(88  $\mu$ g/mL) 보다도 우수한 활성을 보였다. tyrosinase inhibition 활성이 우수한 화합물에 대해 B16(F10) melanoma cell을 이용한 melanin 합성량을 측정한 결과 B16(F10) melanoma cell에서의 melanin의 합성에는 영향을 주지 않았다.

그러나 새덕이나무 butanol 분획물의 경우 B16(F10) melanoma cell에서 세포 독성 없이 melanin의 합성을 저해하는 것을 확인하였고, 효능을 가진 화합물들이 지속적으로 분리, 동정되어지고 있으므로 계속적으로 연구할 가치가 있다고 여겨진다.

### III. 과제 2 : 제주자생식물 에센셜 오일의 향균, 항염활성 규명

#### 1. 실험방법

##### 1-1. 정유추출 및 수율

제주도에 자생식물은 구상나무, 비목나무, 비자나무, 붓순나무, 삼나무, 새덕이나무, 갯기름나무, 꽃향유, 백리향을 사용하였고, 이들 시료를 음건하여 분쇄하였다. 분쇄한 시료를 증류정유추출장치를 사용하여 3시간 동안 추출한 후 추출된 에센셜 오일은 갈색병에 담아 4℃ 보관하여 실험에 사용하였다.



새덕이나무



구상나무



비목나무



비자나무



붓순나무



삼나무



갯기름나무



꽃향유



백리향

Figure 22. 연구에 이용된 식물 목록

## 1-2. GC-MS 분석

정유분석은 gas chromatography spectrometry detector(GC-MSD)에 의하여 분석하였다. Hewlett-Packard 6890N GC/MSD에 의해 분석하였다. Column은 DB-1HT (0.1  $\mu\text{m}$   $\times$  30 m  $\times$  0.32 mm), carrier gas는 He을 사용하여 유속 1.5 ml/min으로 하였다. 검출기 온도는 270 $^{\circ}\text{C}$ , temperature program은 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 유지하였고, 100 $^{\circ}\text{C}$ 까지 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 승온시켰다. 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 유지하였고, 230 $^{\circ}\text{C}$ 까지 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 승온 시킨 후 230 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 유지하였다.

Instruments	Conditions
GC/MSD	Hewlett Packard 6890N seriesII/HP 5975 MSD
Column	DB-1HT (0.1 $\mu\text{m}$ $\times$ 30 m $\times$ 0.32 mm(ID))
Injection temp.	230 $^{\circ}\text{C}$
Injection volumn	1 $\mu\text{l}$
Oven temperature	40 $^{\circ}\text{C}$ (5min) $\rightarrow$ 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 100 $^{\circ}\text{C}$ (5min) $\rightarrow$ 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 230 $^{\circ}\text{C}$ (5min)
Carrier gas flow	1.5 mL/min(He)
Ionization voltage	70 eV
Spectrum library	Wiley
Monitoring mode	Selected ion monitoring(SIM) mode

### 1-3. Paper disc diffusion method

에센셜 오일의 항균활성을 측정하기 위해 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis*, *Malassazia furfur*, 및 *Candida albicans*에 대하여 paper disc법으로 생육 억제율을 측정하였다. *P. acnes*는 한천 0.7%를 포함하는 GAM 배지 8 ml에 *P. acnes*를 0.5 MacFarland로 넣어 한천 1.5%를 포함하는 GAM 배지에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려 37°C에서 48 시간 혐기 배양한 다음 디스크 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

*S. epidermis*는 TSA 배지에서 37°C에서 24h 동안 배양하여 형성된 원형 발육 저지환을 측정하였다. *M. furfur*는 1% 올리브 오일을 포함하는 YM 배지를 사용하였고, *C. albicans*는 YM 배지를 사용하여 30°C에서 24h 동안 호기성 배양하여 형성된 원형 발육 저지환을 측정하였다.

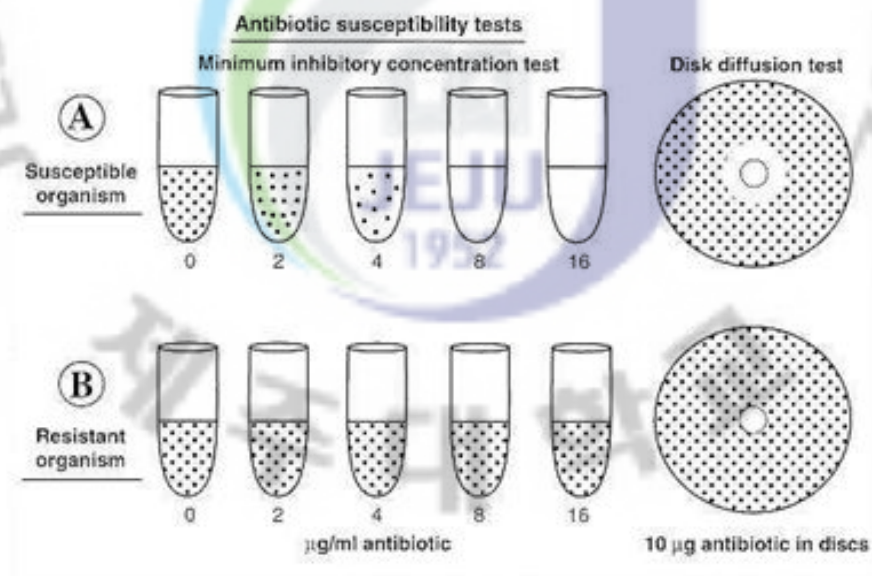


Figure 23. Paper disc diffusion and minimum inhibitory concentration tests.

#### 1-4. Minimum Inhibitory Concentration(MIC)

최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)측정은 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 사용하였다. *P. acnes*, *S. epidermidis*, *M. furfur*, 및 *C. albicans*는 각각의 배양배지와 조건에서 배양한 후 균 현탁액을 농도가 약  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL로 희석하여, 최종농도가  $10^5$  CFU/mL이 되도록 조절하였다. 다양한 농도의 시료를 처리하고 각각 균주의 생육적온에서 배양 후, 균 증식이 나타나지 않는 최소농도를 MIC로 정하였다.

#### 1-5. 세포 배양

대식세포 계열 (Human monocyte cell line)인 THP-1은 한국세포주은행으로 부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 RPMI1640 배지 (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

각질 세포인 HaCaT cell은 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지 (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

#### 1-6. 세포독성 평가

세포독성 평가는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 분석 방법을 사용하였다. 96-well plate에  $5 \times 10^4$  cell/mL THP-1, HaCaT, Human fibroblast cell인 CCD-986sk를 24시간 배양 후, 시료를 농도별로 처리하였다. Sample을 여러 농도별로 처리한 후 24h 배양 후 500  $\mu$ g/mL의 MTT를 well 당 20 $\mu$ l를 첨가하였다. MTT 시약을 처리하여 5시간 동안 37°C에서 배양하고, DMSO (dimethylsulfoxid)를 처리하여 formazan을 녹여낸 후 570 nm에서 흡광도 값을 측정한다.



#### 1-7. Human monocytic THP-1 세포주에서 TNF- $\alpha$ , IL-8 생성 억제정도 측정

Human monocytic THP-1 세포( $1 \times 10^5$  cells/mL)는 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 RPMI 1640(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

24 well plate에서  $1 \times 10^5$  cell/mL의 THP-1 cell을 24시간 배양 후, *P. acnes*를 100  $\mu$ g/mL로 처리하여 cytokine 생성을 자극하고 동시에 시료를 농도별로 처리하였다. 24시간 동안 동일 조건에서 배양한 다음 세포를 제거하고 상등액의 TNF- $\alpha$ 와 IL-8양을 ELISA 방법으로 정량하였다.

#### 1-8. 통계분석


모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치  $\pm$  표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% ( $p < 0.05$ )에서 통계적 유의차를 평가하였다.



## 2. 결과

### 2-1. 새덕이 나무

#### 2-1-1. 새덕이 나무 특징

	
식물명	새덕이나무
학명	<i>Neolitsea aciculata</i>
과명	녹나무과, Lauraceae
이명	흰새덕이라고도 하며, 제주도 방명으로 신사데기, 사데기라고도 한다.
특징	녹나무과로 주로 제주도에 분포한다. 상록교목으로 잎은 호생이지만 가지 끝에서는 총생하며 도란상 긴 타원형이다. 남사면에서는 해발 900m, 북사면에서는 해발 500m 까지 분포하며 집 주위에도 심는 상록교목. 위미의 방풍림, 일본과 류큐에 분포.

## 2-1-2. 새덕이나마 에센셜 오일의 화학 조성

새덕이나마 에센셜 오일은 수율 0.11%로 얻었고, 에센셜 오일의 화학조성을 분석한 결과 에센셜 오일의 약 95%의 성분을 확인할 수 있었다. 새덕이나마 에센셜 오일의 화학 성분 중 주요성분은 1-dodecen-3-yne(12.5%), calarene(11.5%), elemol(9.5%),  $\alpha$ -cadinol(7.5%),  $\gamma$ -eudesmol(6.9%),  $\alpha$ -eudesmol(5.0%),  $\beta$ -elemene(5.0%)임을 확인할 수 있었다(Table 20).

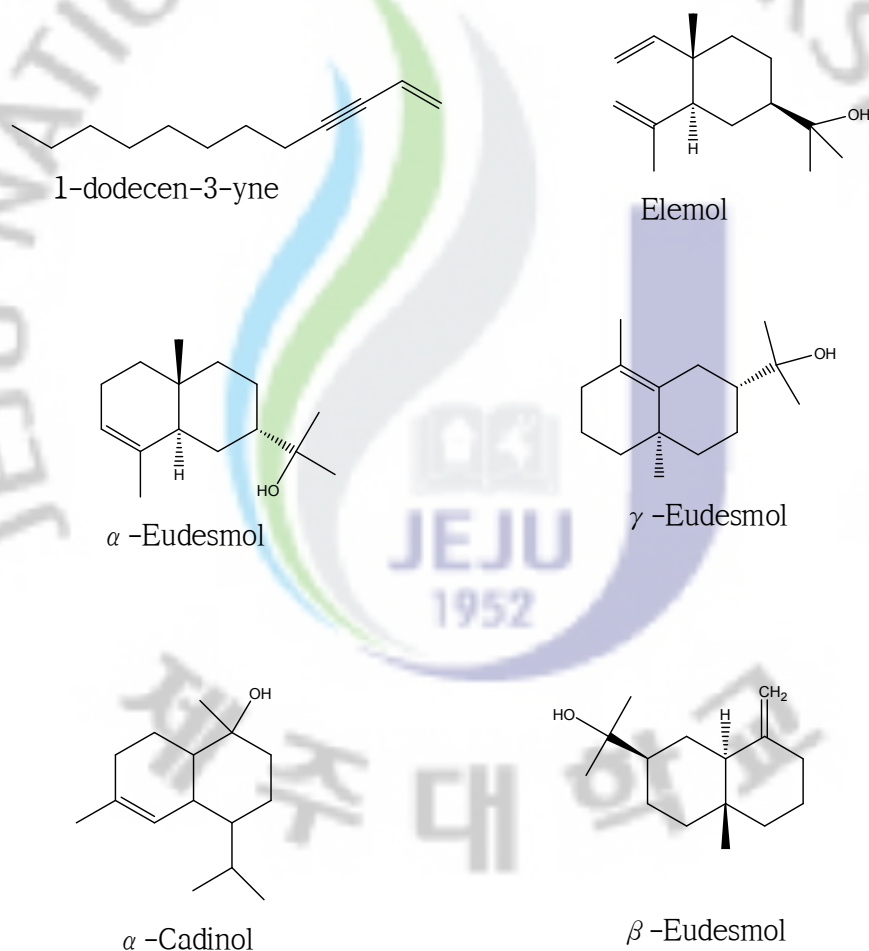


Figure 24. Major constituents of the essential oil from *N. aciculata*

Table 18. Chemical composition (%) of *N. aciculata* essential oil

RT(min)	RI	Constituents	Peak area(%)
8.77	1046.0	1,8-cineol	0.2
9.74	1056.0	<i>trans</i> - $\alpha$ -ocimene	0.4
10.27	1061.4	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimene	0.8
12.96	1089.3	linalool D	0.3
27.59	1315.5	$\alpha$ -terpinene	0.4
29.63	1348.7	$\alpha$ -copaene	0.4
30.69	1366.0	$\beta$ -elemene	5.0
31.49	1379.1	$\alpha$ -gurjunene	0.2
31.73	1383.0	caryophyllene	2.4
32.89	1411.5	alloaromadendrene	0.7
33.62	1413.0	$\alpha$ -humulene	0.7
35.43	1440.4	$\beta$ -selinene	4.8
36.15	1451.4	$\alpha$ -selinene	1.3
36.29	1453.6	$\alpha$ -amorphene	0.8
36.92	1463.2	$\alpha$ -muurolene	0.9
37.46	1471.4	$\gamma$ -cadinene	1.8
37.83	1477.0	<i>cis</i> -calamenene	0.6
38.49	1487.2	$\delta$ -cadinene	4.2
38.72	1490.6	valencene	1.0
38.95	1494.1	calacorene	1.4
39.33	1499.8	$\gamma$ -amorphene	1.1
39.97	1507.0	elemol	9.5
41.27	1521.3	caryophyllene oxide	3.1
41.76	1526.7	(-)-globulol	0.8
41.98	1529.1	nerolidol	1.2
42.12	1530.6	veridiflorol	2.0
42.70	1537.1	ledol	1.1
43.29	1543.6	$\gamma$ -gurjunene	0.5
43.43	1545.2	$\delta$ -selinene	0.7
44.03	1551.7	ledene	0.2
44.33	1555.1	$\gamma$ -eudesmol	6.9
44.52	1557.1	$\beta$ -guaiene	0.4
44.78	1560.0	calarene	11.5
44.94	1561.8	$\alpha$ -cubebene	1.8
45.05	1563.0	$\alpha$ -eudesmol	5.0
45.24	1565.1	$\alpha$ -cadinol	7.5
45.75	1570.8	ledene	0.9
46.08	1574.4	1-Dodecen-3-yne	12.5
total			95.0

### 2-1-3. 새덕이나무 에센셜 오일의 항균 활성

새덕이나무 에센셜 오일의 항균 활성 측정을 위해 피부상재균인 *P. acnes*, *S. epidermidis*, *M. furfur*, 및 *C. albicans*을 사용하였다. 새덕이나무 에센셜 오일은 *M. furfur*를 제외한 *P. acnes*와 *S. epidermidis*, *C. albicans*의 MIC 값이 0.08  $\mu$ L/mL, 0.16  $\mu$ L/mL, 1.25  $\mu$ L/mL로 좋은 항균활성을 보였다. 특히 *P. acnes*에 대해서는 erythromycin 보다도 좋은 항균활성을 보였으며, erythromycin이 항균활성을 보이지 않는 *C. albicans*에 대해서도 강한 항균활성을 보여 우수한 항균활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 항생제 내성 균주들에서도 강한 항균활성을 보였다(Table 19).

Table 19. Antimicrobial activity of the essential oil from *N. aciculata*

Strains	Drug-resistant patterns of skin pathogens (MIC; $\mu$ g/mL)	NAE		Erythromycin	
		Inhibition zones (mm)	MIC values ( $\mu$ L/mL)	Inhibition zones (mm)	MIC values ( $\mu$ L/mL)
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible	11	0.16	21	< 0.125
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin(>32) Clindamycin(>16) Chloramphenicol(64)	11	10.0	nd	nd
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline (>32)	10	40.0	19	< 0.125
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	Susceptible	16	0.08	30	0.125
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	Clindamycin (64)	12	40.0	nd	nd
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	Clindamycin (64)	15	40.0	nd	nd
<i>M. furfur</i> KCCM 12679	Susceptible	nd	-	nd	nd
<i>C. albicans</i> KCCM 11282	Susceptible	9	1.25	nd	nd

■ 현재 가장 많이 사용되고 있는 에센셜 오일로는 라벤더, 티트리, 페퍼민트 등이 있다. 라벤더 오일은 정서적으로는 심신안정과 불면증해소, 스트레스 해소, 두통등을 없애주며 피부적으로는 피부세포재생, 피부트러블 완화, 상처치료, 아토피나 여드름, 화상 등에 효과가 있다.

■ 티트리는 살균작용이 뛰어난 오일로 제2차 세계대전때는 전쟁중에 위급한 환자의 상처에 직접 티트리 에센셜 오일을 발라서 치료했다고 한다. 그만큼 상처를 아물게 하며 세균이 작용을 못하도록 해준다. 향이 그리 좋은 편은 아니지만, 여드름 피부나, 무좀, 주부습진, 아토피 등의 용도에 라벤더와 주로 섞어 사용하면 좋다고 알려져 있다.

■ 페퍼민트는 멘톨이 많이 함유된 오일로 시원하고 정신을 각성시키며, 집중력을 강화 시켜준다. 스트레스 해소와, 통증을 완화시켜주기 때문에 국소부위에 통증이 있을 시 한방울 정도 발라도 되고, 딸국질이 심할 경우는 페퍼민트 오일을 그냥 맡기만 해도 증상이 해소된다고 한다.

■ 위의 세가지 에센셜 오일, 티트리, 라벤더, 페퍼민트의 항균활성을 측정 한 결과 티트리, 라벤더, 페퍼민트 오일에서도 강한 항균활성을 확인할 수 있었고 특히 내성 균주에서도 높은 항균활성을 보였다. 세 오일의 강한 항균활성을 새덕이나루 에센셜 오일과 비교했을 때 *P. acnes* CCARM 0081와 *S. epidermidis* CCARM 3709에서는 더 좋은 항균활성을 보였다(Table 20).

Table 20. Antibacterial activity of plants

strains	Drug-resistant pattern of skin pathogens (MIC;ug/mL)	Erythromycin		라벤더		페퍼민트		티트리	
		clear zones (mm)	MIC values ( $\mu\text{l/mL}$ )	clear zones (mm)	MIC values ( $\mu\text{l/mL}$ )	clear zones (mm)	MIC values ( $\mu\text{l/mL}$ )	clear zones (mm)	MIC values ( $\mu\text{l/mL}$ )
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible	21	<0.125	13	1	17	0.125	17	0.125
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin(>32) Clindamycin(>16) Chloramphenicol(64)	nd	nd	11	0.125	12	0.5	10	1
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline(>32)	19	<0.125	9	1	12	0.5	9	1
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	Susceptible	30	0.125	16	0.25	18	0.25	17	0.25
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	Clindamycin(64)	nd	nd	9	1.25	11	0.625	12	0.25
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	Clindamycin(64)	nd	nd	18	0.25	24	0.06	24	0.25



#### 2-1-4. 새덕이나무 에센셜 오일의 항산화 활성

DPPH assay를 이용하여 새덕이나무 에센셜 오일의 항산화 활성을 측정한 결과를 Fig. 25에 나타내었다. 새덕이나무 에센셜 오일은 농도 의존적으로 DPPH radical scavenging 활성을 보였으며, SC<sub>50</sub> 값은 21.5 ug/mL로 새덕이나무 에센셜 오일 25 ug/mL에서의 항산화 활성을 보여 Vit. C. 6.25 ug/mL의 항산화 활성과 유사한 것으로 우수한 항산화 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

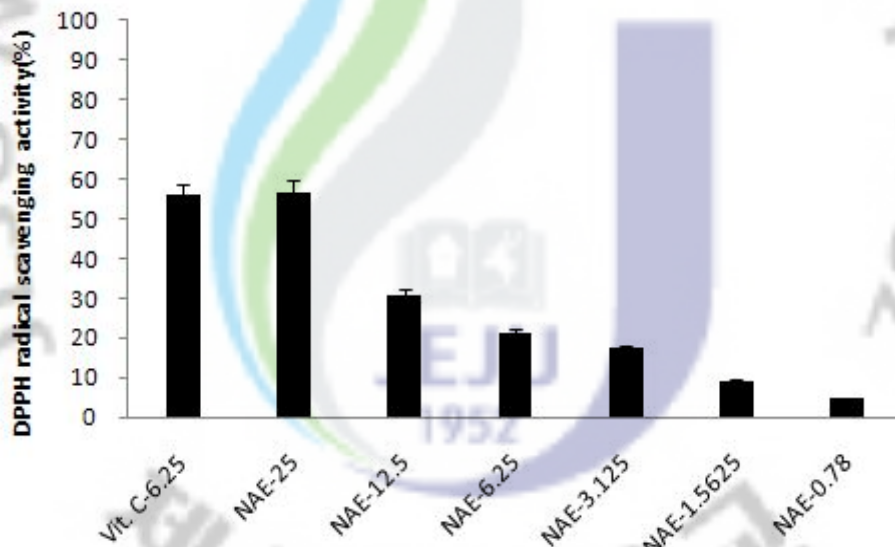


Figure 25. DPPH radical scavenging activity for essential oil from *N. aciculata*. Data expressed as a percentage of control and are mean  $\pm$  SEM of triplicated experiments.

#### 2-1-5. 새덕이나무 에센셜 오일의 항염 활성

■ NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역 반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 농도에 따라 세포 기능 유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포 독성을 일으키기도 한다. NO를 생산하는 NOS는 세포내에 존재하여 calcium이나 calmodulin에 의존적인 형태인 constitutive NOS(cNOS)와 calcium에 비의존적인 대식세포나 혈관내피세포가 활성화 되거나 LPS와 같은 세균의 내독소나 여러 가지 cytokine에 의해 유도되는 형태인 iNOS의 형태가 있다. LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며 이에 의한 세포 독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 염증반응 조직과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가된다고 알려져 있다.

■ 에센셜 오일들에 대한 항염 활성은 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성량과 염증성 cytokine으로 알려진 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 생성량을 측정하였다. 또한 항균활성이 우수한 에센셜 오일의 경우 *P. acnes*로 염증을 유발하고 이를 억제하는 정도를 측정하여 여드름 균 *P. acnes*에 의해 유발되는 염증의 억제를 확인할 수 있었다.

■ 새덕이나무 에센셜 오일은 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에 강한 항균활성을 보여 *P. acnes*에 의해 유발되는 염증의 억제 활성을 측정하였다. 항염활성 측정에는 Human monocyte cell인 THP-1 cell을 사용하였다. THP-1에서 염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 억제활성을 측정한 결과 0.125 ul/mL의 새덕이 나무 에센셜 오일을 처리했을 때 Fig. 26에서 보이는 것처럼 TNF- $\alpha$ 와 IL-8가 80% 이상 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 27에서 보이는 것처럼 human fibroblaste cell(CCD-986sk)와 human keratinocyte cell인 HaCaT 세포에서 독성을 보이지 않으므로 여드름균에 의해 유발되는 염증에 좋은 효과를 보일 것으로 기대된다(Fig. 27).

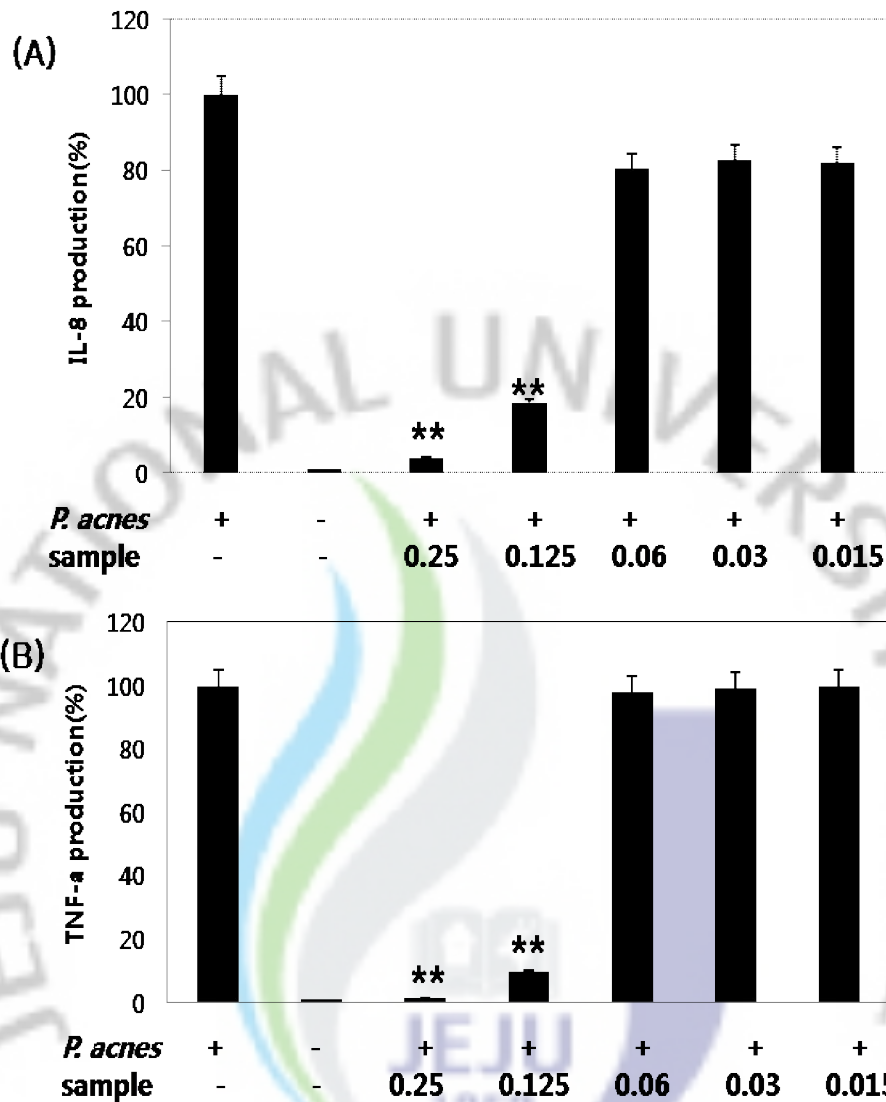


Figure 26. Inhibition of *P. acnes*-induced secretion of proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  (A) and IL-8 (B) by of *N. aciculata* essential oil. THP-1 cells were stimulated with or without *P. acnes* and the supernatants were harvested for IL-8 or TNF- $\alpha$  measurements after 48h. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05vs.*P.acnes* alone.(+); treatment of heat-killed *P.acnes*,(-); no treatment of heat-killed *P.acnes*.

2-1-6. 새덕이나무 에센셜 오일의 세포 독성

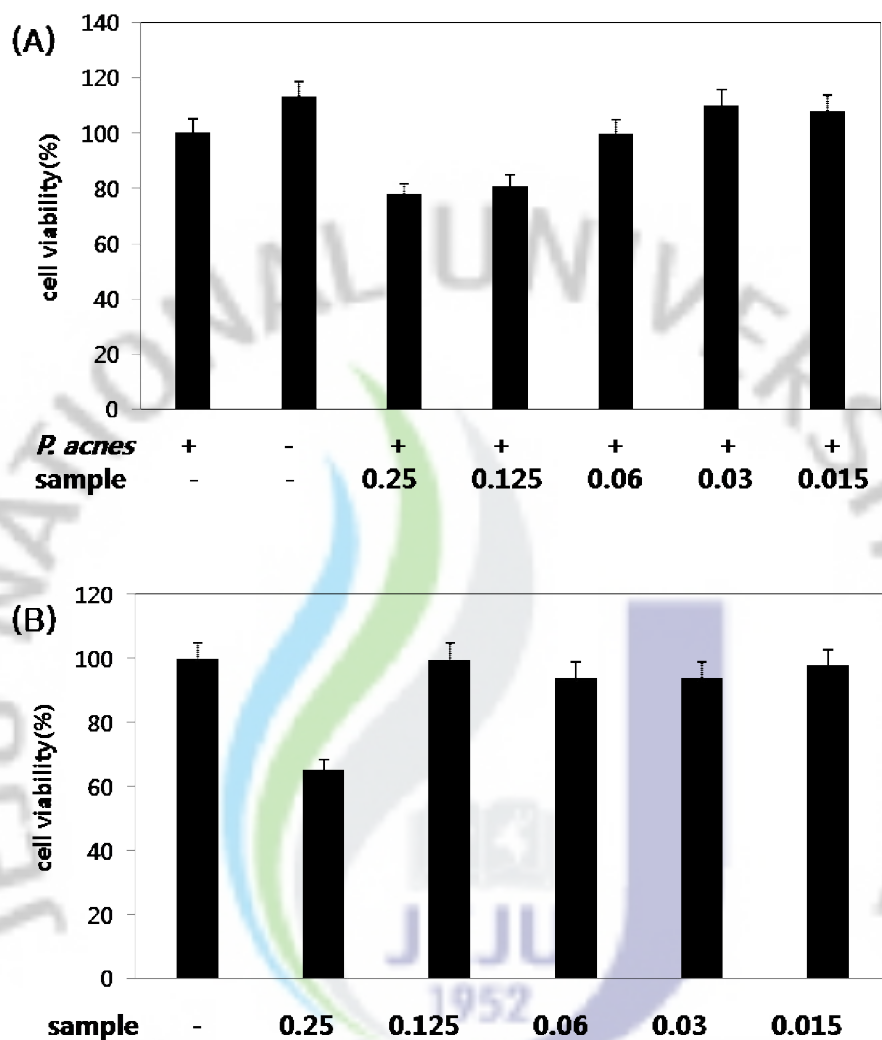


Figure 27. Cytotoxicity of *N. aciculata* essential oil against THP-1 (A) and HaCaT (B) cells. THP-1 cells were cultured in 6-well plates for 24 hr, followed by treatment with *P. acnes* (100 ug/mL) in the presence of various concentrations (0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 ul/mL) of NAE. HaCaT cells were cultured in 24-well plates for 24 hr in the presence of various concentrations (0.015, 0.03, 0.06, 0.13, 0.25 ul/mL) of NAE. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

## 2-2. 구상나무

### 2-2-1. 구상나무의 특징

	
식물명	구상나무
학명	<i>Abies koreana</i>
과명	소나무과, Pinaceae
이명	<p>제주백회, 조선냉삼, 백회 라고도 하며 제주방명으로 구상낭, 구상남이라고도 한다.</p> <p>이름의 유래는 열매의 가시가 바늘 모양으로 되어 있기 때문에 '쿠살(성계)랑'이란 이름이 '쿠상낭'을 거쳐 '구상나무'로 변하였다는 설이 있다.</p>
특징	<p>소나무과에 속하는 상록교목으로 전세계에서 우리나라의 제주도, 지리산 노고단 임결령, 전라북도 덕유산 등지에서만 사는 한국 특산종이다. 최근 anti-tumor와 기억력 증진 효과 같은 의학적 효능들이 알려지고 있다.</p>

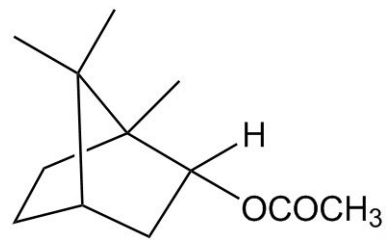
## 2-2-2. 구상나무 에센셜 오일의 화학 조성

구상나무 에센셜 오일의 화학 조성을 분석한 결과 에센셜 오일의 약 86%, 19 종류의 compounds를 확인할 수 있었다. 구상나무 에센셜 오일의 주성분은 Bornyl acetate(30.35%), Limonene(18.95%),  $\alpha$ -pinene(8.10%), camphene(7.39%)임을 확인할 수 있었다(Table 21).

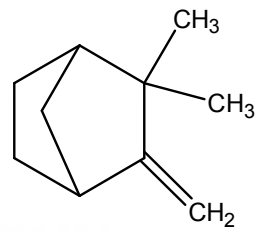
Table 21. Chemical composition of the essential oils from *A. koreana*

RT	RI	Components	Peak area
4.885	908.0	tricyclene	0.78
5.348	919.2	$\alpha$ -pinene	8.10
5.723	928.2	camphene	7.39
6.714	952.2	$\beta$ -pinene	1.06
7.783	978.0	$\beta$ -myrcene	0.87
8.405	993.1	$\delta$ -carene	0.87
9.546	1015.0	limonene	18.95
14.608	1103.4	limonene oxide	0.51
16.459	1132.5	Borneol	1.96
20.304	1193.0	2-norbornanol	1.28
24.524	1259.4	bornyl acetate	30.35
31.448	1371.0	isolongifolene	0.74
35.987	1440.9	$\gamma$ -selinene	2.21
36.296	1445.4	$\delta$ -selinene	1.12
37.453	1462.6	alloaromadendrene	2.45
37.998	1470.6	7-epi- $\alpha$ -selinene	0.62
38.747	1481.7	1- $\beta$ -bisabolene	0.89
41.865	1535.3	caryophyllene oxide	1.39
45.368	1601.5	$\alpha$ -elemene	3.51

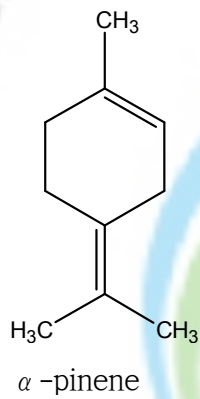




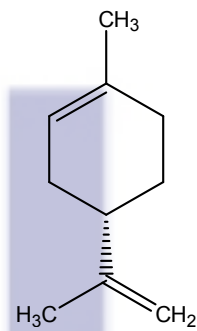
Bornyl Acetate



Camphene



$\alpha$ -pinene



Limonene

Figure 28. Major constituents of the essential oil from *A. koreana*

### 2-2-3. 구상나무 에센셜 오일의 항균 활성

각 시료에서 얻어진 시료들의 에센셜 오일은 GC/MS로 그 화학 조성을 분석한 후 에센셜 오일의 활성 중 항균활성을 알아보려고 하였다. 본 연구에서는 구상나무, 비목나무, 비자나무, 붓순나무, 삼나무, 새덕이나무, 갯기름나무, 꽃향유, 백리향의 에센셜 오일을 여드름의 원인균으로 알려진 *P. acnes*와 *S. epidermidis*,와 항생제 clindamycin에 내성을 갖고 있는 *P. acnes* CCARM9009, *P. acnes* CCARM9010와 erythromycin, clindamycin, chloramphenicol에 내성을 갖고 있는 *S. epidermidis* CCARM 3710, tetracyclin에 내성을 보이는 *S. epidermidis* CCARM 3711의 내성 균주를 사용하여 강한 항균활성을 보이는 에센셜 오일을 알아보려고 하였다.

이미 많은 에센셜 오일들이 가지고 있는 활성은 살균, 방부 효과로 산업적으로도 많이 사용되고 있다. 에센셜 오일들의 항균활성은 항생제를 사용함으로써 생기는 내성균주들에 대한 문제를 해결할 수 있어 주목을 받고 있으며, 에센셜 오일의 항균 활성 외에 항염 활성은 그 필요성을 더욱 높여 줄 수 있을 것이다.

구상나무는 최근 Jeong 등<sup>27</sup>에 의해서 항균활성이 알려졌다. Jeong 등에 의하면 구상나무 에센셜 오일은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *methicillin-susceptible S. aureus*, *methicillin-resistance S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *Shigella flexneri*에 항균활성을 갖는 것으로 알려졌다, 본 연구에서는 여드름 관련 미생물로 알려진 *P. acnes* 와 *S. epidermidis*에 대한 항균활성을 확인하였다. 확인한 결과 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에 대해 항균활성을 보일뿐만 아니라 항생제 내성 균주인 *P. acnes* CCARM 9009, 9010, *S. epidermidis* CCARM 3710, 3711에서도 강한 항균활성을 보였다(Table 22).

Table 22. Antimicrobial activity of the essential oils from *A. koreana*

Strains	Drug-resistant patterns of skin pathogens (MIC; $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibition zones (mm)		MIC values ( $\mu\text{L/mL}$ )
		3.3 $\mu\text{l}$ / disc	6.6 $\mu\text{l}$ /disc	
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible	8	13	0.625
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin (>32), Clindamycin (>16), Chloramphenicol (64)	11	15	0.312
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline (>32)	10	13	5.000
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	Susceptible	15	18	0.312
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	Clindamycin (64)	18	22	0.312
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	Clindamycin (64)	18	19	0.625

Determination of the inhibitory effect of AKE on test bacteria was done by the agar diffusion method. Skin pathogens were grown at 37 ° C for 24 h or 48 hr (for *Propionibacterium* sp.) in each media. Culture suspensions were adjusted by comparing against 4 McFarland. The wells ( $\Phi$  7.0 mm) were made and the essential oil, diluted in ethanol to the test concentration, was added to wells (20  $\mu\text{l}$ ). The same volume of ethanol (20  $\mu\text{l}$ ) was used as a control. For determination of MIC, microdilution broth susceptibility assay was used.

구상나무가 갖는 우수한 항균 활성 성분을 확인하기 위해 구상나무 에센셜 오일의 주요 성분인 bornyl acetate, camphene, limonene,  $\alpha$ -pinene에 대한 항균활성을 측정하였다. 그 결과 table 23에서와 같이 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에서 우수한 항균 활성을 보였으며 특히 camphene과 limonene은 내성 균주에서도 우수한 항균 활성을 보였다. 구상나무 에센셜 오일의 주성분인 bornyl acetate, camphene, limonene,  $\alpha$ -pinene이 우수한 항균활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.


Table 23. MIC values of *A. koreana* essential oil's the major components

strains	Drug-resistant pattern of skin pathogens (MIC:ug/mL)	MIC values ( $\mu$ l/mL)			
		Bornyl acetate	Camphene	Limonen	$\alpha$ -pinene
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible	<0.300	0.5	0.5	0.5
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin(>32) Clindamycin(>16) Chloramphenicol(64)	0.300	>4.00	>4.00	1.00
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline(>32)	>10.00	10.00	10.00	4.00
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	Susceptible	5.00	<0.156	<0.625	0.500
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	Clindamycin(64)	20.00	>20.00	>20.00	10.00
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	Clindamycin(64)	20.00	<0.156	<0.625	0.125

Skin pathogens were grown at 37°C for 24 hr or 48 hr(for *P. acnes* sp.) in each media. Culture suspension were adjusted by comparing against 0.5 MacFarland standard. For determination of MIC, the microdilution broth susceptibility assay was used.

## 2-3. 비목나무

### 2-3-1. 비목나무의 특징

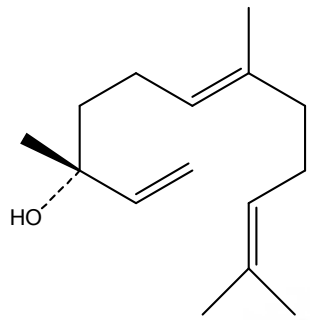
	
식물명	비목나무
학명	<i>Lindera erythrocarpa</i>
과명	녹나무과, Lauraceae
이명	보안목이라고도 하며 제주방명으로 베염부기, 베염푸기, 베염폐기, 벤폐기라고 불린다.
특징	녹나무과에 속하는 낙엽활엽교목. 나무껍질은 황백색이다. 추운 지방과 공해가 있는 곳에서는 생장이 어려우며 바닷가에서 잘 자란다. 우리나라 중부 이남, 일본, 중국에 분포한다. 건조된 열매는 특이한 방향과 쓴맛을 가지고 있어 일본에서는 위장약과 신경통 진정제로 사용하고 있다.

## 2-3-2. 비목나무 에센셜 오일의 화학 조성

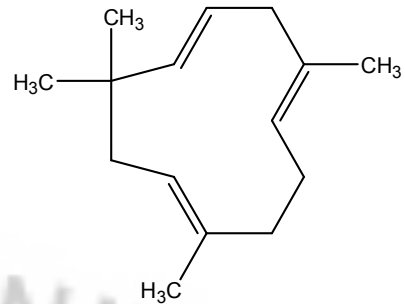
비목나무 에센셜 오일의 성분을 분석한 결과 에센셜 오일의 약 92%, 32종의 화학 조성을 분석하였고, 주요성분으로 nerolidol(26.93%),  $\beta$ -caryophyllene(13.24%), cinnamate(8.54%),  $\alpha$ -humulene(8.48%), geranyl acetate(7.82%),  $\alpha$ -farnesene(6.20%)를 확인할 수 있었다(Table 24).

Table 24. Chemical composition (%) of *L. erythrocarpa* essential oil

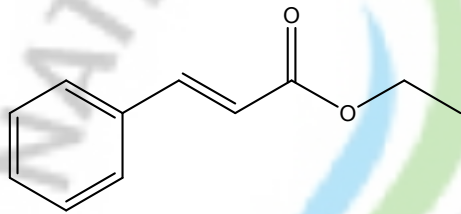
RT (min)	RI	Constituents	Peak area (%)
5.103	917.6	$\alpha$ -pinene	3.48
5.472	926.7	camphene	1.99
6.497	952.0	$\beta$ -pinene	1.01
7.543	977.7	camphene	0.19
7.824	984.7	$\alpha$ -phellandrene	0.13
8.601	1002.7	cymene	0.28
8.854	1007.2	$\beta$ -phellandrene	0.42
9.042	1010.5	limonene	0.34
9.846	1024.7	cis- $\beta$ -ocimene	0.42
10.375	1034.0	trans- $\beta$ -ocimene	0.45
13.063	1081.5	$\beta$ -linalool	0.72
23.865	1254.3	bornyl acetate	2.53
27.999	1320.2	$\alpha$ -terpinene	0.22
28.878	1334.6	methyl cinnamate	8.54
29.781	1349.3	$\alpha$ -copaene	0.68
30.625	1363.1	geranyl acetate	7.82
30.801	1365.9	$\beta$ -elemene	0.34
31.941	1384.5	$\beta$ -Caryophyllene	13.24
32.591	1395.1	Germacrene D	0.18
33.533	1409.8	$\alpha$ -guaiene	0.17
33.803	1413.9	$\alpha$ -humulene	8.48
34.161	1419.4	Alloaromadendrene	0.20
35.384	1438.1	Germacrene D	1.43
36.321	1452.4	$\alpha$ -selinene	0.61
37.775	1474.5	$\alpha$ -farnesene	6.20
38.656	1488.0	$\delta$ -cadinene	1.18
41.416	1534.8	caryophyllene oxide	1.53
42.275	1550.0	nerolidol	26.93
44.870	1595.7	$\delta$ -cadinene	0.90
45.013	1598.3	aromandendrene	0.54
45.300	1605.6	$\alpha$ -cadinol	0.70



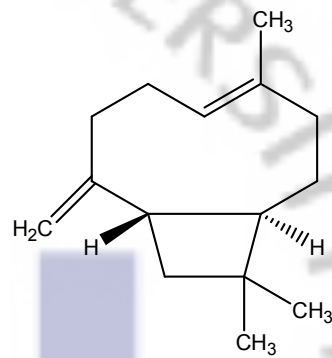
Nerolidol



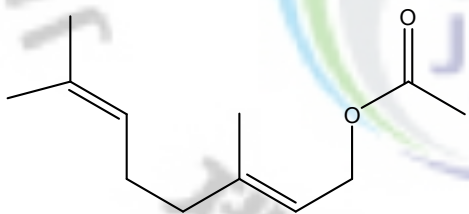
$\alpha$ -Humulene



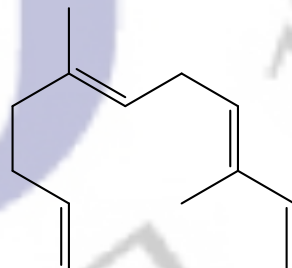
Cinnamate



$\beta$ -Caryophyllene



Geranyl acetate



$\alpha$ -farnesene

Figure 29. Major constituents of the essential oil from *L. erythrocarpa*



### 2-3-3. 비목나무 에센셜 오일의 항균 활성


비목나무 에센셜 오일은 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에서 MIC 값이 0.15  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 의 항균활성을 보였으며, clindamycin 내성 균주인 *P. acnes*에 대해서는 MIC 값이 0.31  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 아주 우수한 항균 활성을 보였다. 비목나무 에센셜 오일은 지루성 피부염을 일으키는 효모균인 *M. furur*와 곰팡이의 일종으로 구강 및 생식기에 염증을 일으키는 *C. albicans*에 대해서도 높은 항균활성을 보였다(Table 25).

Table 25. Antimicrobial activity of the essential oil from *L. erythrocarpa*

Strains	Drug-resistant patterns of skin pathogens (MIC; $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Inhibition zones (mm)	MIC values ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible	1.5	0.15
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin (>32), Clindamycin (>16), Chloramphenicol (64)	1.4	2.5
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline (>32)	1.2	20
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	Susceptible	1.6	0.15
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	Clindamycin (64)	1.6	0.15
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	Clindamycin (64)	1.5	0.3
<i>M. furfur</i> KCCM 12679	-	1.1	5.0
<i>C. albicans</i> KCCM 11282	-	2.0	5.0

## 2-4. 비자나무

### 2-4-1. 비자나무의 특징

	
식물명	비자나무
학명	<i>Torreya nucifera</i>
과명	주목과, Taxaceae
이명	<p>제주 방명으로 비조남(낭),비지낭 이라고한다.</p> <p>이름의 유래는 고려가 조선으로 바뀐후 1430년대에는 비자 나무 열매와 조록나무 목재등을 별공 즉 특산물로 바쳐졌다. 조선 세종 3년(1420)과 예종 1년(1468)에도 제주도에 생산되는 비자는 쓰임새가 귀중하다 하였다. 영조 39년 (1762)에는 제주도에서 바치는 비자나무 판자때문에 백성들의 폐해가 심하므로 일시 중지 시켰다는 기록도 있다.</p>
특징	<p>주목과로 남부지방, 제주도에 분포되어 있다.</p> <p>내공해성은 강하고 내염성은 아주 강하다.</p> <p>식용(열매-촌충 구제용),가구재, 장식재, 바둑판의 제조용(목재), 약용(수피,열매:潤肺止咳,殺蟲), 정원수, 공원수 열매는 촌충 구제용으로 쓰인다.</p>

## 2-4-2. 비자나무 에센셜 오일의 화학 조성

비자나무에서 증류정유추출법으로 추출된 에센셜오일의 수율은 0.1%이고 이를 GC/MS로 분석한 결과 에센셜 오일의 약 95%의 성분을 분석하였다. 그 중 주요성분으로 dl-limonene(30.1%),  $\delta$ -3-carene(15.37%),  $\alpha$ -pinene(11.5%),  $\delta$ -cardinene(6.87%)를 확인할 수 있었다(Table 26). 분석된 에센셜 오일의 구성성분들의 monoterpene, sesquiterpene, diterpene, others 네 가지로 나뉘어지며(Table 27), 비자나무 에센셜 오일의 구성성분 중 63.7%가 monoterpene류임을 확인할 수 있었다. 그 중 주요 성분인 dl-limonene이 30.1%를 차지하고 있었다.

Table 26. The chemical class distribution of the essential oil components of *T. nucifera*

Compound class	Area (%)	Number of compounds
Monoterpenes	63.7	10
Sesquiterpenes	30.7	17
Diterpenes	1.02	1
Others	0.38	4

Table 27. Chemical composition (%) of *T. nucifera* essential oils

Retention Time (min)	Constituent	Peak area (%)
3.371	$\alpha$ -Pinene	11.50
3.498	Camphene	1.24
4.143	cis-Ocimene	0.70
5.014	$\beta$ -Myrcene	1.61
5.663	$\delta$ -3-Carene	15.37
6.394	dl-Limonene	30.10
6.823	$\beta$ -Phellandrene	0.12
7.543	$\alpha$ -Terpinolene	2.42
8.125	1-Octyne	0.12
9.268	$\alpha$ -Terpineol	0.14
10.132	4-Chlorocetylacetate	0.10
10.823	4-Methyl-bicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-one	0.15
11.778	$\alpha$ -Terpinene	0.48
11.920	$\alpha$ -Cubebene	0.28
12.403	Valencene	0.15
12.754	trans-caryophyllene	2.22
12.875	$\beta$ -Cubebene	0.75
12.974	$\gamma$ -Elemene	0.27
13.16	$\alpha$ -Humulene	1.79
13.456	$\beta$ -Farnesene	3.22
13.55	Germacrene D	3.89
13.643	$\beta$ -Cubebene	1.19
13.719	Germacrene B	1.11
13.796	$\alpha$ -Muurolene	1.10
13.906	$\alpha$ -amorphene	0.47
14.158	$\delta$ -Cardinene	6.87
14.367	$\gamma$ -Elemene	0.36
15.365	$\alpha$ -Copaene	3.09
15.859	$\alpha$ -Bisabolol	3.62
16.210	(E)-Farnesol	0.32
21.398	Ferruginol	1.02

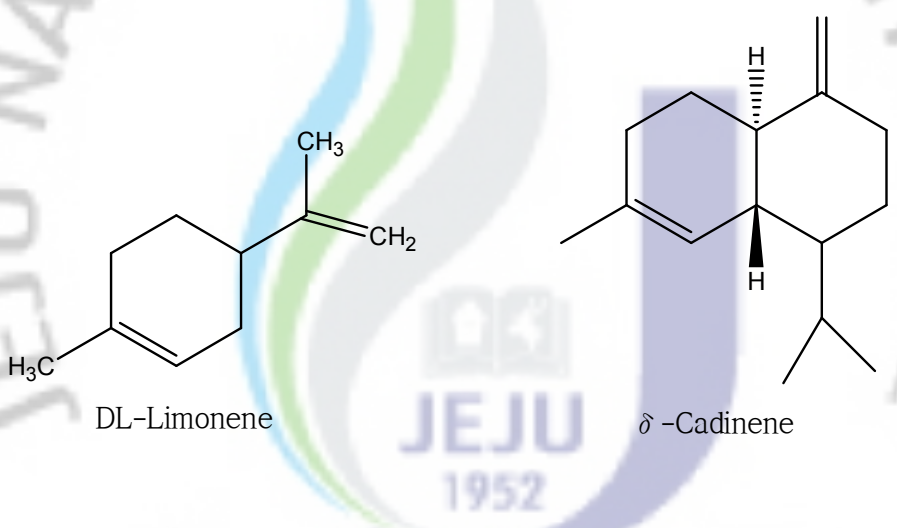
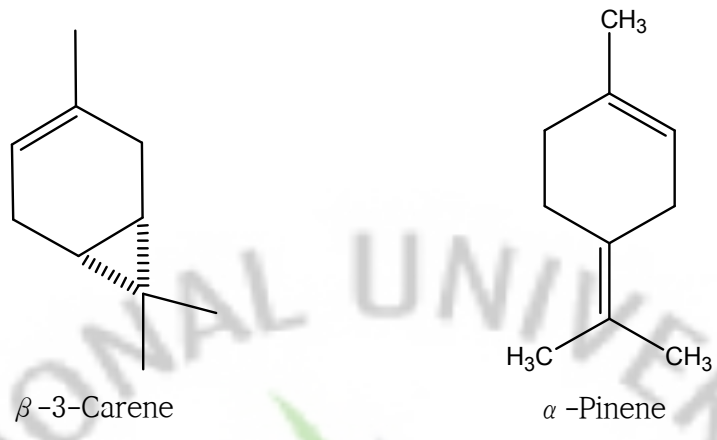


Figure 30. Major constituents of the essential oil from *T. nucifera*

### 2-4-3. 비자나무 에센셜 오일의 항균 활성


비자나무 에센셜 오일은 여드름 유발 미생물로 알려진 *P. acnes*, *P. granulosum*, *S. epidermidis*에 항균활성을 보였으며 MIC 값은 각각 20.0  $\mu\text{L/mL}$ , 20.0  $\mu\text{L/mL}$ , 5.0  $\mu\text{L/mL}$  의 활성을 보였다. 또한 *M. furfur*와 *C. albicans*에 대해서도 2.5  $\mu\text{L/mL}$ 과 10.0  $\mu\text{L/mL}$ 의 MIC 값을 갖는 것으로 보아 비자나무 에센셜 오일도 강한 항균활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Table 28). 또한 *P. acnes*에 항균활성을 보이므로 *P. acnes*에 의해서 유발되는 염증 저해 활성을 보일 것으로 예상하고 있다.

Table 28. Antimicrobial activity of the essential oils from *T. nucifera*

Skin pathogens	Inhibition zones (mm)	MIC values ( $\mu\text{L/mL}$ )
<i>Propionibacterium acnes</i>	9	20
<i>Propionibacterium granulosum</i>	9	20
<i>Malassezia furfur</i>	12	2.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	5
<i>Candida albicans</i>	11	10

## 2-5. 붓순나무

### 2-5-1. 붓순나무 특징

	
식물명	붓순나무
학명	<i>Illicium anisatum</i>
과명	붓순나무과, Illiciaceae
이명	가시목이라고도 불리며, 제주방명으로는 팔각낭 이라고 한다. 이름의 유래는 새싹이 돌아나는 모양이 붓처럼 생겨서 붓순나무라고 하며, 제주 방명으로 '팔각낭'이라고도 하는데 열매의 바람개비 모양이 8개의 모서리로 이루어졌다고 보는 데서 붙여진 이름이다.
특징	남쪽의 해발 200m 이하의 계곡 및 산기슭 수풀 속의 습윤한 땅에서 나는 상록소교목으로 제주도, 진도, 완도에 분포한다 약용(잎, 가지, 씨, 열매-건위, 구충, 生肌), 향료용(열매), 불전에 바치는 꽃, 관상용(정원수), 기구

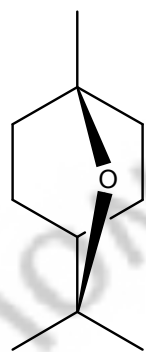


## 2-5-2. 붓순나무 에센셜 오일의 화학 조성

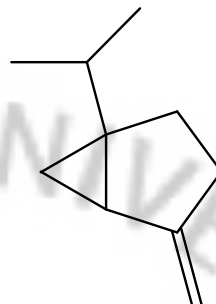
붓순나무 에센셜 오일은 수율 0.24%로 얻을 수 있었고 에센셜 오일의 약 86%의 성분을 확인하였다. 붓순나무 에센셜 오일의 주요 성분은 eucalyptol(21.8%), sabinene(5.3%),  $\alpha$ -terpinenyl acetate(4.9%)임을 확인하였다(Table 29).

Table 29. Identified components in the essential oil of *I. religiosum*

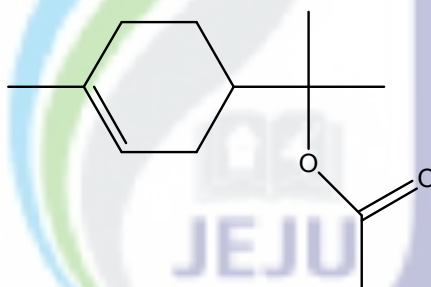
RT	RI	Constituent	Peak area (%)
2.142	782.7	toluene	1.15
5.293	916.8	$\alpha$ -pinene	1.77
6.720	950.7	sabinene	5.33
7.777	975.9	$\beta$ -myrcene	0.64
8.692	997.7	$\alpha$ -terpinene	1.25
9.284	1008.6	eucalyptol	21.78
9.369	1010.1	limonene	1.10
10.895	1036.6	$\gamma$ -terpinene	1.95
12.493	1064.3	$\alpha$ -terpinolene	0.57
13.455	1081.0	$\beta$ -linalool	2.56
17.307	1143.3	terpene-4-ol	1.90
18.134	1156.2	$\alpha$ -terpineol	1.02
23.703	1243.7	safrol	2.72
28.170	1314.5	eugenol	0.80
28.446	1318.9	$\alpha$ -terpinenyl acetate	4.87
30.121	1345.9	$\alpha$ -copaene	0.54
32.247	1380.2	$\beta$ -caryophyllene	1.71
35.800	1433.6	germacrene D	1.72
36.819	1448.3	bicyclogermacrene	0.52
38.104	1466.9	$\alpha$ -amorphene	0.76
39.199	1482.7	$\delta$ -cadinene	2.21
42.547	1542.7	diethyl phthalate	1.29
43.336	1558.3	methoxyeugenol <sup>a</sup>	0.53
45.198	1595.2	$\tau$ -muurolol	1.76
45.638	1605.9	$\alpha$ -cadinol	2.16
48.387	1687.4	methoxyeugenol <sup>a</sup>	1.13
51.560	1813.0	methoxyeugenol <sup>a</sup>	2.69
54.226	1936.3	isopimaradiene	3.23
54.948	1972.9	kaurene	4.54



Eucalyptol



Sabinene



$\alpha$ -Terpinenyl acetate

Figure 31. Major constituents of the essential oil from *I. religiosum*

### 2-5-3. 붓순나무 에센셜 오일의 항산화 활성

DPPH assay를 이용하여 붓순나무 에센셜 오일의 항산화 활성을 측정한 결과 Fig. 32에 나타난 것처럼 SC<sub>50</sub> 값이 1.5 µg/mL로 높은 항산화 활성을 보였다. 붓순나무 에센셜 오일의 높은 항산화 활성은 붓순나무 에센셜 오일의 주요 성분인 eucalyptol, sabinene,  $\alpha$ -terpinenyl acetate, kaurene, isopimaradiene, safrol,  $\beta$ -linalool에 의한 것으로 예상되며, 주요성분들이 함께 존재함으로 시너지 효과를 보이는 것으로 여겨진다(Fig. 32).

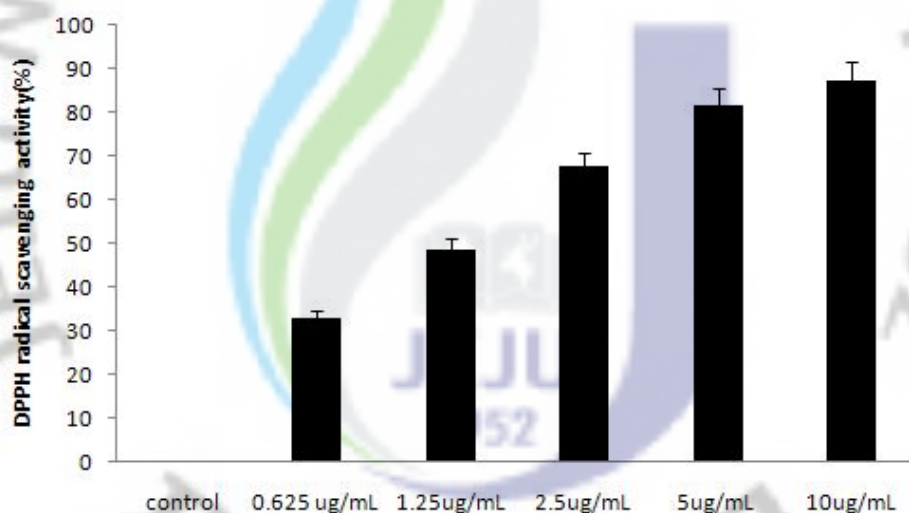


Figure 32. DPPH radical scavenging activity for essential oil from *I. religiosum*

#### 2-5-4. 붓순나무 에센셜 오일의 elastase 억제 활성

붓순나무 에센셜 오일의 elastase 억제 활성을 측정한 결과 2.5 ug/mL에서 약 50%의 elastase를 억제하는 것을 볼 수 있었고, IC<sub>50</sub> 값은 2.88 ug/mL로 확인할 수 있었다(Fig. 33).

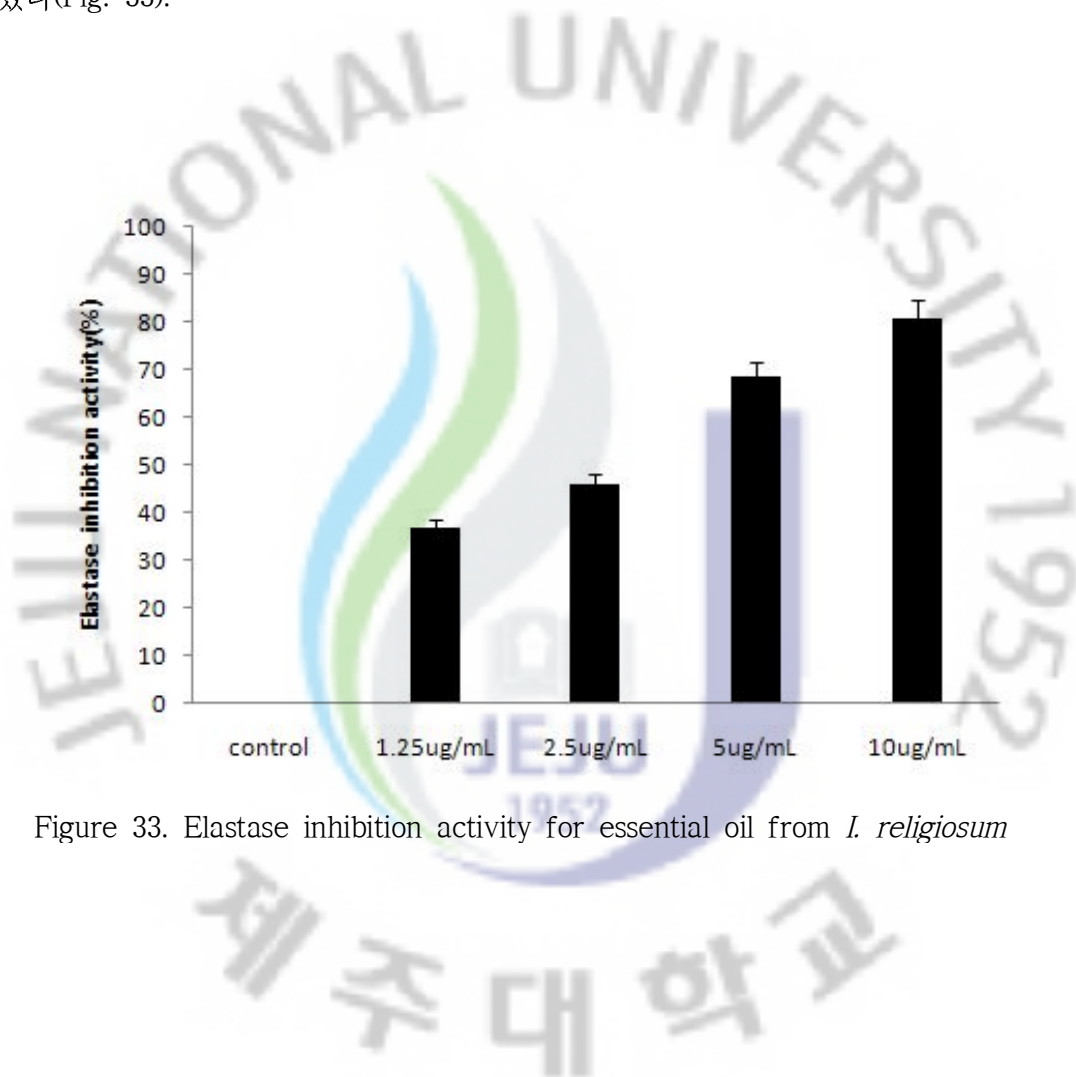
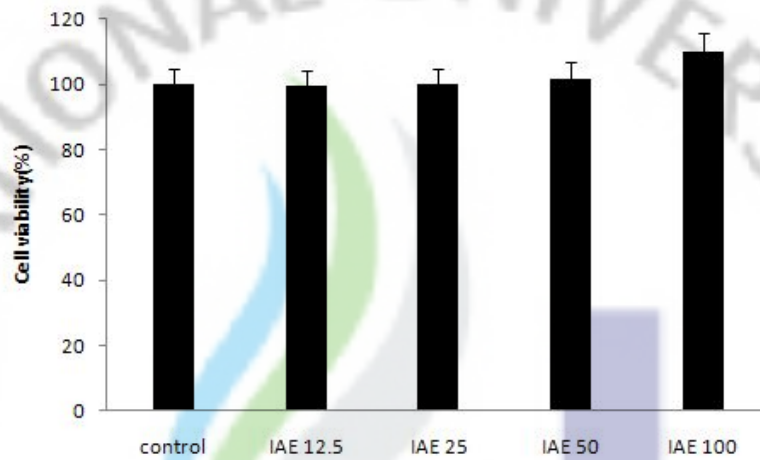


Figure 33. Elastase inhibition activity for essential oil from *I. religiosum*

### 2-5-5. 붓순나무 에센셜 오일의 세포 독성

DPPH radical scavenging 활성과 elastase inhibition 활성을 보이는 붓순나무 에센셜 오일의 세포독성의 결과를 Fig. 34에 나타내었다. Human normal fibroblast cell과 human keratinocyte cell에 대한 세포독성을 확인한 결과 100 ug/mL까지 거의 독성을 보이지 않았다.

(A)



(B)

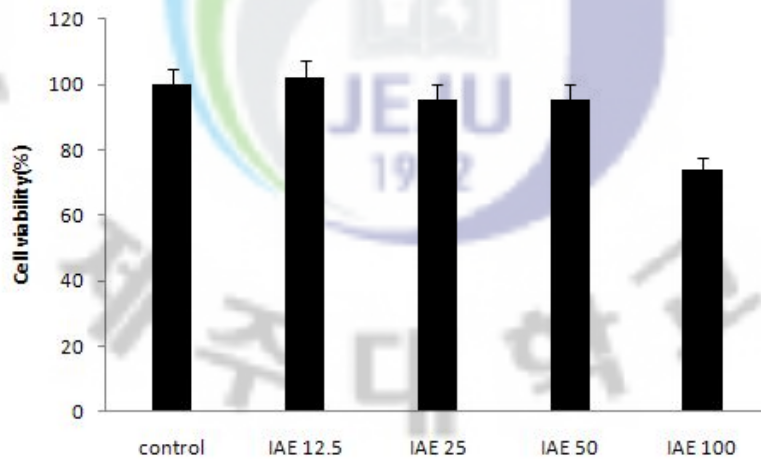



Figure 34. Cell viabilities of (A) human normal fibroblast and (B) human keratinocyte cell HaCaT treat with *I. religiosum*(IAE)

## 2-6. 삼나무

### 2-6-1. 삼나무 특징

	
식물명	삼나무
학명	<i>Cryptomeria japonica</i>
과명	낙우송과, Taxodiaceae
이명	숙대나무라고도 하며 제주 방명으로 숙대낭이라고도 한다.
특징	낙우송과로 주로 남부지방에 분포한다. 1924년에 수입되어 전남, 경남이남의 주요 조림수종으로 많이 심고 있으며 제주도에서는 방풍림으로도 심는다. 선창을 치료하고 풍습에 의한 독창, 각기, 심부창통, 요도염에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.



## 2-6-2. 삼나무 에센셜오일의 화학 조성

삼나무의 경우 수율 0.6%로 에센셜 오일이 추출되었고 24 종류의 성분을 확인할 수 있었다. 삼나무 에센셜 오일의 주요성분으로 kaurene(17.20%), elemol(10.88%),  $\gamma$ -eudesmol(9.41%), sabinene(8.86%),  $\alpha$ -eudesmol(5.26%),  $\beta$ -eudesmol(5.13%)을 확인할 수 있었다(Table 30).

Table 30. Chemical composition of the essential oils from *C.japonica*

RT	RI	Components	Peak areas
5.321	918.7	$\alpha$ -pinene	3.48
5.662	926.9	caphene	0.50
6.792	954.3	sabinene	8.86
7.805	978.8	$\beta$ -myrcene	1.17
8.422	993.8	$\delta$ -3-carene	1.73
8.703	1000.4	$\alpha$ -terpinene	0.97
9.315	1011.1	limonene	1.22
10.907	1039.0	$\gamma$ -terpinene	1.92
12.504	1067.0	$\alpha$ -terpinolene	1.13
17.412	1147.6	terpene-4-ol	4.10
32.754	1392.4	widdrene	2.56
35.767	1437.5	Germacrene D	1.48
36.770	1452.3	$\beta$ -himachalene	0.66
37.508	1463.2	$\alpha$ -muurolene	0.52
39.237	1488.7	$\delta$ -cadinene	3.31
40.978	1518.3	elemol	10.88
42.713	1550.9	$\alpha$ -cedrol	0.99
43.925	1573.7	10-epi- $\gamma$ -eudesmol	0.93
44.900	1592.0	$\gamma$ -eudesmol	9.41
45.319	1599.9	$\beta$ -eudesmol	5.13
45.589	1607.8	$\alpha$ -eudesmol	5.26
45.754	1612.8	$\alpha$ -cadinol	2.20
45.941	1618.3	lendene	3.80
55.047	1978.3	kaurene	17.20

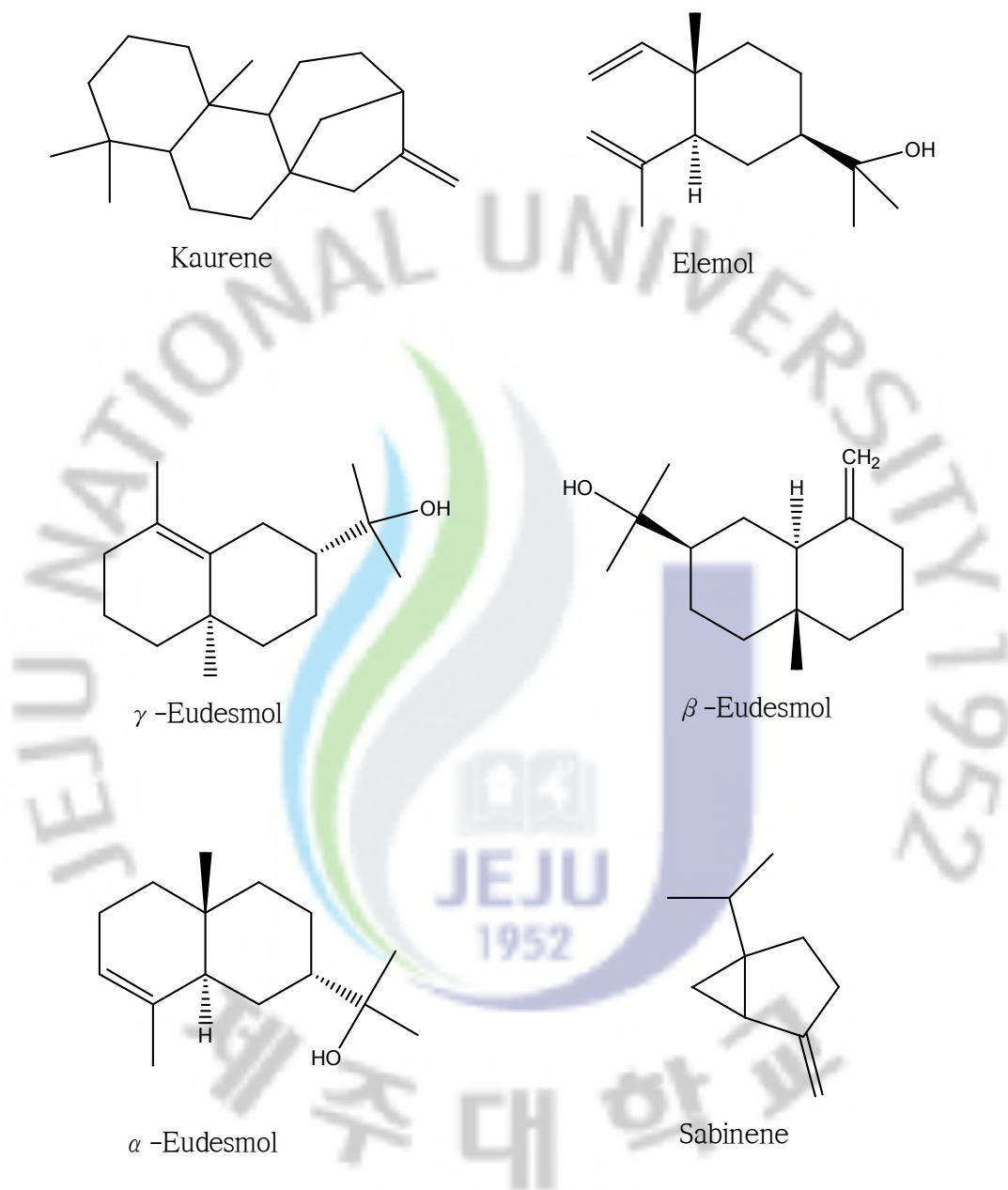


Figure 35. Major constituents of the essential oil from *C. japonica*

### 2-6-3. 삼나무 에센셜 오일의 항균 활성

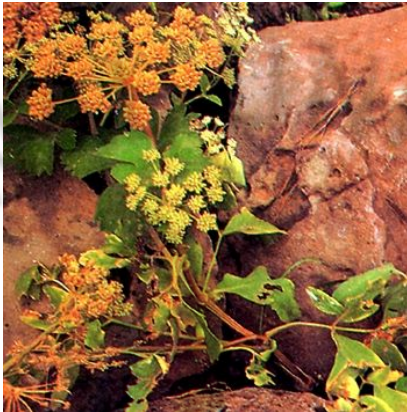
삼나무 에센셜 오일은 본 연구에서 사용한 에센셜 오일 중 가장 좋은 항균활성을 보였으며 현재 판매되고 있는 에센셜 오일 중 항균활성이 높은 것으로 알려진 peppermint oil 보다도 좋은 항균활성을 보였다(Table 31). 특히 내성균주인 *S. epidermidis* CCARM 3710과 *P. acnes* CCARM 9009에서도 높은 항균활성을 보여 이후 여드름 치료제의 오랜 사용으로 생기는 부작용인 내성 균주에 의해 유발된 여드름 치료에 좋은 치료제로 사용이 가능할 것으로 여겨진다.

Table 31. Antimicrobial activity of the essential oils from *C. japonica*

Strains	Drug resistance patterns of skin pathogens (MIC; $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Inhibition zones (mm)		MIC values ( $\mu\text{l}/\text{mL}$ )
		3.3 $\mu\text{l}/\text{disk}$	6.6 $\mu\text{l}/\text{disk}$	
<i>S. epidermidis</i> SK4	Susceptible	8	9	0.156
<i>S. epidermidis</i> SK 9	Erythromycin (>32), Clindamycin (>16), Chloramphenicol (64)	8	9	0.156
<i>S. epidermidis</i> SK19	Tetracycline (>32)	8	9	10.00
<i>P. acnes</i> ATCC 3314	Susceptible	12	13	0.156
<i>P. acnes</i> SKA 4	Clindamycin (64)	12	12	0.625
<i>P. acnes</i> SKA 7	Clindamycin (64)	11	13	0.312

## 2-7. 갯기름 나물

### 2-7-1. 갯기름 나물 특징

	
식물명	갯기름 나물
학명	<i>Peucedanum japonicum</i>
과명	산형과, Umbelliferae
이명	개기름 나물이라고도 하며, 제주 방명으로는 방풍이라고 한다.
특징	산형과로 제주도, 울릉도, 남부, 중부 지방의 바닷가 바위틈에 분포하며 잎자루가 길고 뿌리가 굵으며 목 부분에 섬유가 있다. 여러해살이 풀로 연한부분은 식용으로 사용하고 열매, 뿌리는 풍사, 골통, 정력, 중독, 대하증 등에 효과가 있다. 거담, 강심, 항진균 효과도 있다.

## 2-7-2. 갯기름나물 에센셜 오일의 화학 조성

갯기름나물 에센셜 오일을 GC/MS 분석한 결과 에센셜 오일 성분의 약 93%, 10 종류의 화학 성분을 분석하였고 주요성분으로  $\beta$ -pinene(66.07%),  $\alpha$ -pinene(24.68%)를 확인하였다(Table 32).

Table 32. Chemical composition (%) of *P. japonicum* essential oil

RT (min)	RI	Constituents	Peak area (%)
5.158	919.0	$\alpha$ -Pinene	24.68
5.477	926.8	Camphene	0.29
6.651	955.7	$\beta$ -Pinene	66.07
8.606	1002.7	Cymene	0.44
9.047	1010.5	Limonene	0.38
16.968	1145.2	Terpene-4-ol	0.08
23.865	1254.3	Bornyl acetate	0.09
29.781	1349.4	$\alpha$ -Copaene	0.13
30.795	1366.0	$\beta$ -Elemene	0.30
31.853	1383.3	$\beta$ -Caryophyllene	0.19

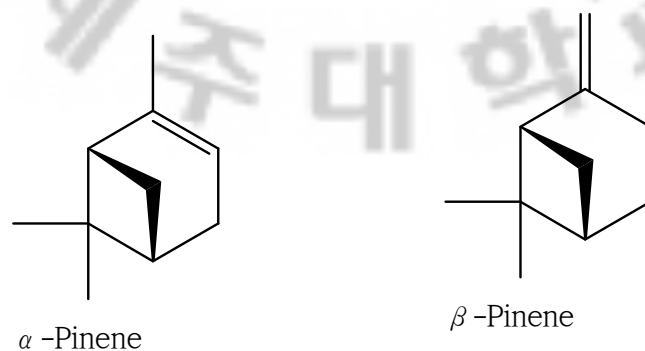


Figure 36. Major constituents of the essential oil from *P. japonicum*.

### 2-7-3. 갯기름나물 에센셜 오일의 항균 활성

갯기름나물 에센셜 오일에서는 특히 *S. epidermidis*(MIC: 0.13  $\mu$ l/mL) 에 대해 항균활성이 우수 하였으며, 이는 *S. epidermidis* 내성균주인 *S. epidermidis* CCARM 3710, 3711에 대해서도 높은 항균활성을 보였다 (MIC; 2.5  $\mu$ l/mL, 5.0  $\mu$ l/mL).

Table 33에서 보이는 것처럼 *S. epidermidis* 외에도 *P. acnes*, *M. furfur*, *C. albicans*에 대해서도 아주 우수한 항균활성을 보였다.

Table 33. Antimicrobial activity of the essential oil from *P. japonicum* (PJE)

Strains	Drug-resistant patterns of skin pathogens (MIC; $\mu$ g/mL)	Inhibition zones (mm)	MIC values ( $\mu$ L/mL)
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	Susceptible	1.4	0.13
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	Erythromycin (>32), Clindamycin (>16), Chloramphenicol (64)	1.5	2.50
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	Tetracycline (>32)	1.2	5.00
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	Susceptible	1.6	0.63
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	Clindamycin (64)	1.3	1.25
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	Clindamycin (64)	1.8	2.50
<i>M. furfur</i> KCCM 12679	-	1.1	5.00
<i>C. albicans</i> KCCM 11282	-	1.9	1.25



## 2-8. 꽃향유

### 2-8-1. 꽃향유 특징

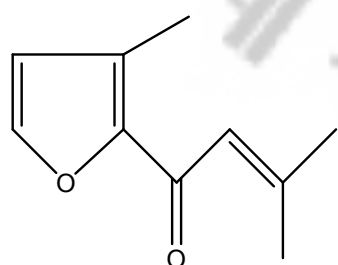
	
식물명	꽃향유
학명	<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai
과명	꿀풀과, Labiatae
이명	붉은 향유라고도 한다.
특징	꿀풀과로 중부이남에 분포한다. 약간 메마르고 건조한 자갈밭 등지에서 자라는 다년초이다. 제주도 해발 1,300 m이하의 양지쪽 풀밭에서 자라며, 발한, 이뇨, 수종 등에 효과가 있다.

## 2-8-2. 꽃향유 에센셜 오일의 화학 조성

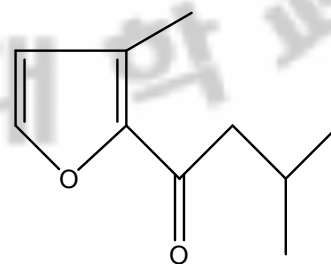
꽃향유 에센셜 오일을 GC/MS로 분석한 결과 에센셜 오일의 약 93%의 성분을 확인할 수 있었다. 분석된 93%의 성분중 Dehydroelsholtzia ketone(82.46%), elsholtzia ketone(5.96%)가 약 88%를 차지하고 있었다(Table 34).

Table 34. Chemical composition (%) of *E. splendens* essential oils

Retention Time (min)	Constituent	Peak area (%)
4.122	$\beta$ -Myrcene	0.16
9.639	Elsholtzia ketone	5.96
9.804	1-methyl-2(1H)-pyridinone	2.45
11.713	Dehydroelsholtzia ketone	82.46
12.406	$\alpha$ -Bourbonene	0.27
12.810	trans-Caryophyllene	0.60
13.204	$\alpha$ -Humulene	1.18
13.797	(E)-trans-bergamota-2,12-dien-14-ol	0.13
15.365	(E)-Farnesene	0.16



Dehydroelsholtzia ketone



Elsholtzia ketone

Figure 37. Major constituents of the essential oil from *E. splendens*

### 2-8-3. 꽃향유 에센셜 오일의 항염 활성

꽃향유 에센셜 오일은 *P. acnes*에서 MIC 값이 0.31  $\mu\text{L/mL}$ 로 좋은 항균활성을 보였지만 다른 항생제 내성 균주와 *S. epidermidis*에서는 항균활성을 확인할 수 없었다. *P. acnes*에서만 항균활성을 보이는 꽃향유 에센셜 오일을 *P. acnes*에 의해 유발되는 염증 저해 활성을 확인하기 위해 대식세포인 THP-1을 *P. acnes*로 염증을 유발하여 생성되는 사이토카인의 양을 측정하고자 하였다(Fig. 38).

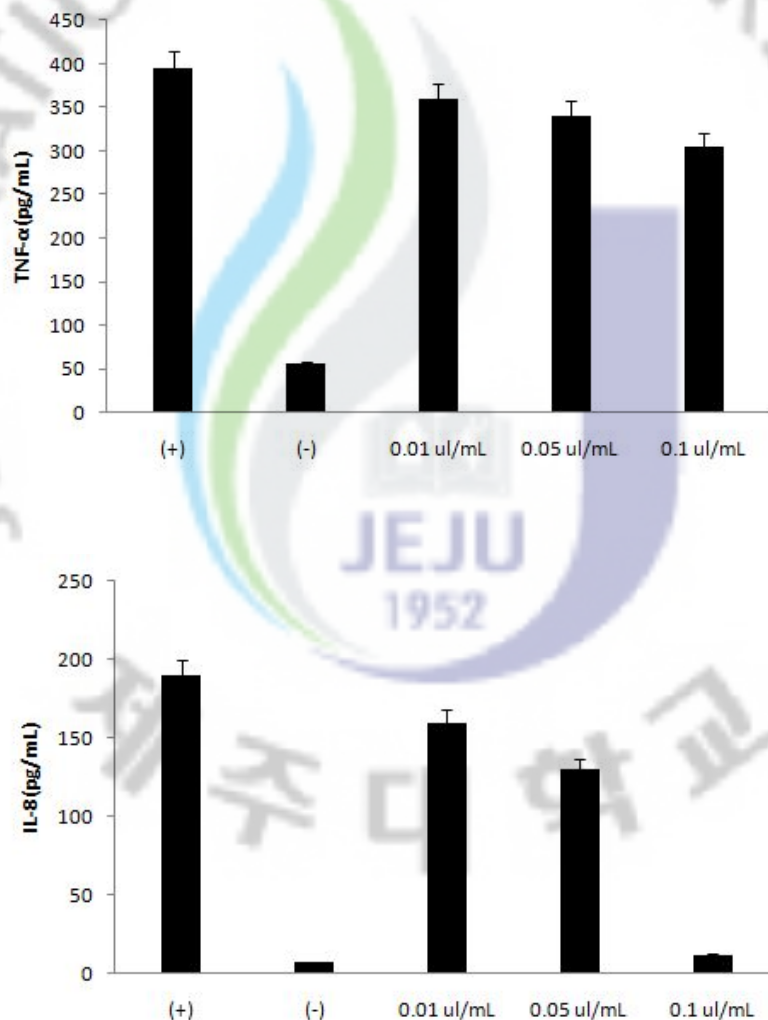


Figure 38. *E. splendens* inhibited *P. acnes*-induced secretion of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  (A) and IL-8 (B)

■ 꽃향유 에센셜 오일의 항염 활성을 측정한 결과 Fig. 38에서 처럼 꽃향유 에센셜 오일을 처리하였을 때 농도 의존적으로 사이토카인 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 급성 염증에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 IL-8의 양이 급속히 저해 되는 것을 확인할 수 있었다.

■ 하지만 좋은 항염 활성을 보여도 세포에 독성이 있으면 사용할 수 없으므로 우수한 항염 활성을 보이는 꽃향유 에센셜 오일의 세포 독성을 human fibroblast cell인 NHF cell에서 cytotoxicity를 확인하였다. 그 결과 우수한 항염 활성을 보이는 0.1 ul/mL 에서는 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 39).

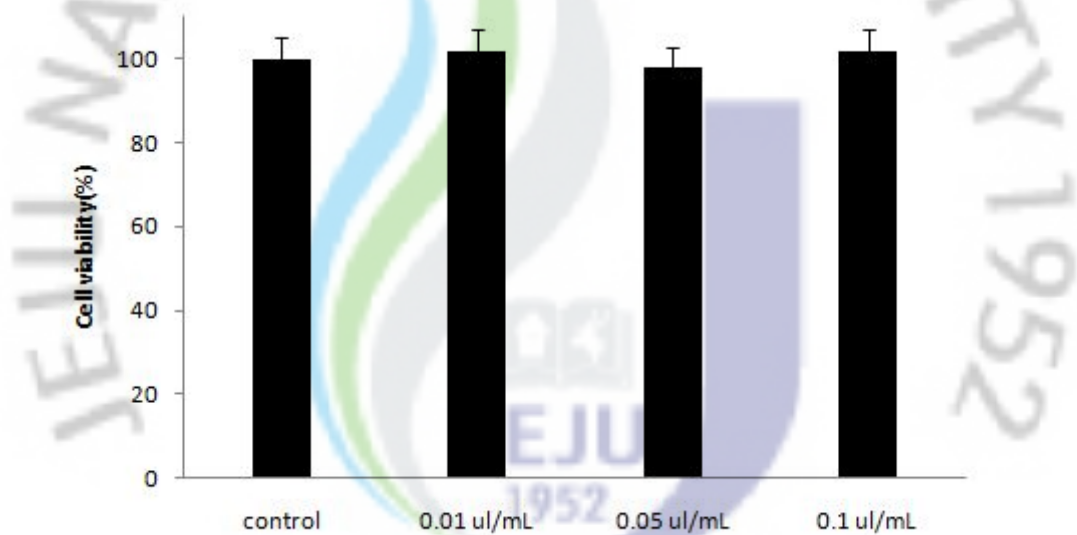



Figure 39. Cytotoxicity of *E. splendens* against human normal fibroblasts.

## 2-9. 백리향

### 2-9-1. 백리향 특징

	
식물명	백리향
학명	<i>Thymus quinquecostatus</i> Celak.
과명	꿀풀과, Labiatae
특징	<p>남부유럽 원산의 꿀풀과에 속하는 다년생 목본식물로 세계적으로 100여종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서는 백리향, 섬백리향 2종이 자생하며, 활혈, 해열, 기관지염, 하혈에 효과가 있다.</p> <p>흰색의꽃이 피는 것을 '흰백리향'이라고 하며 제주도산정 가까이 백리향과 같이 난다. 원줄기가 보다 굵고 지름 7-10mm이며 잎의 길이가 15 mm이고 꽃의 길이가 10mm인 것을 '섬백리향(var. <i>japonica</i> Hara)'이라고 한다.</p>

## 2-9-2. 백리향 에센셜 오일의 화학 조성

백리향 에센셜 오일의 약 98%의 성분을 분석 확인하였고 주요성분은 *p*-cymene-3-ol(50.41%), *p*-cymene-2-ol(24.06%), cymene(19.04%)을 확인하였다. 시료들의 주요성분은 Table 35에 나타내었다.

Table 35. Chemical composition (%) of *T. quinquecostatus* essential oil (TEO)

RT (min)	RI	Constituent	Peak area (%)
5.271	917.7	$\alpha$ -pinene	0.14
5.640	926.7	camphene	0.62
7.745	977.7	$\beta$ -myrcene	0.13
8.934	1004.7	cymene	19.04
9.276	1010.7	limonene	0.48
10.852	1038.3	$\gamma$ -terpinene	0.45
13.352	1082.1	$\beta$ -linalool	1.73
18.090	1158.5	$\alpha$ -terpineol*	0.36
18.316	1162.1	$\alpha$ -terpineol*	0.60
25.918	1281.2	<i>p</i> -cymen-3ol	50.41
26.270	1286.7	<i>p</i> -cymen-2ol	24.06
32.197	1383.3	$\beta$ -caryophyllene	0.21
41.805	1534.3	caryophyllene oxide	0.46
48.486	1694.3	ascabin	0.13

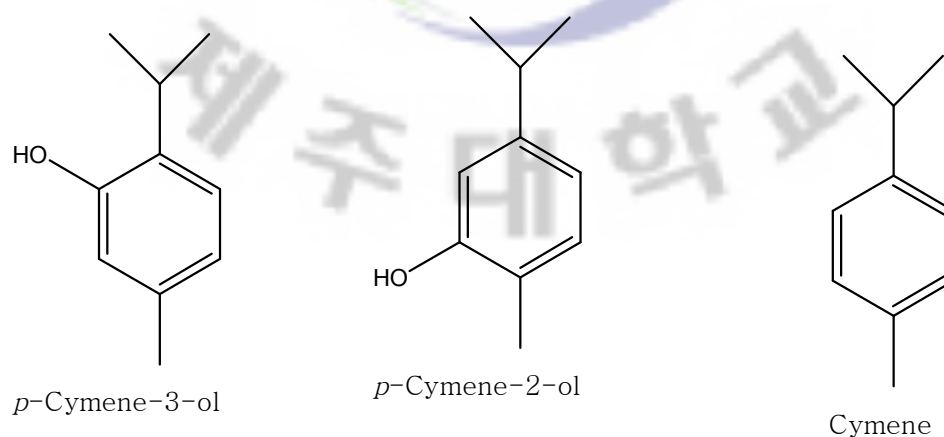


Figure 40. Major constituents of the essential oil from *T. quinquecostatus*



### 2-9-3. 백리향 에센셜 오일의 항균 활성

여드름 환자들에게서 일반적으로 가장 흔히 나타나는 여드름 균에는 *Propionibacterium* spp.으로 *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum* 세가지가 있다. 그 중 *P. acnes*와 *P. granulosum*에 대한 백리향 에센셜 오일의 항균활성을 측정한 결과 Table 36에서 나타난 것처럼 *P. acnes*와 *P. granulosum*에서 강한 항균활성을 보였으며 MIC 값이 0.4  $\mu\text{l}/\text{mL}$ 으로 높은 항균활성을 보였다.

Table 36. Antibacterial activity of TEO against *P. acnes* and *P. granulosum* by disk diffusion method

Skin Pathogens	Clear zone (mm)		
	10	15	20 <sup>a</sup>
<i>P. acnes</i>	24 <sup>b</sup>	30	35
<i>P. granulosum</i>	20	30	30

Discs containing 2  $\mu\text{g}/\text{disk}$  of erythromycin inhibited bacterial growth resembling to 10  $\mu\text{l}/\text{disk}$  of TEO.

<sup>a</sup> Amount of compounds ( $\mu\text{l}/\text{disk}$ ).

<sup>b</sup>  $P < 0.05$ , diameter of filter disk is 10 mm

#### 2-9-4. 백리향 에센셜 오일의 항염 활성

*P. acnes*에 강한 항균활성을 보이는 백리향 에센셜 오일의 항염 활성 측정을 위해 Human keratinocyte cell인 HaCaT를 사용하였다. 사람의 각질형성 세포인 HaCaT에 *P. acnes*로 염증을 유도하여 생산되는 염증성 사이토카인인 IL-8의 생성량을 측정하였다. *P. acnes*가 처리된 HaCaT cell에 다양한 농도의 백리향 에센셜 오일을 처리하였고 농도 의존적으로 IL-8의 양이 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 41). 약간의 세포 독성을 보이지만 10% 내외로 그 값이 낮아(Fig. 42) 이후 여드름 관련 항균, 염증 치료에 사용이 가능하리라 여겨진다.

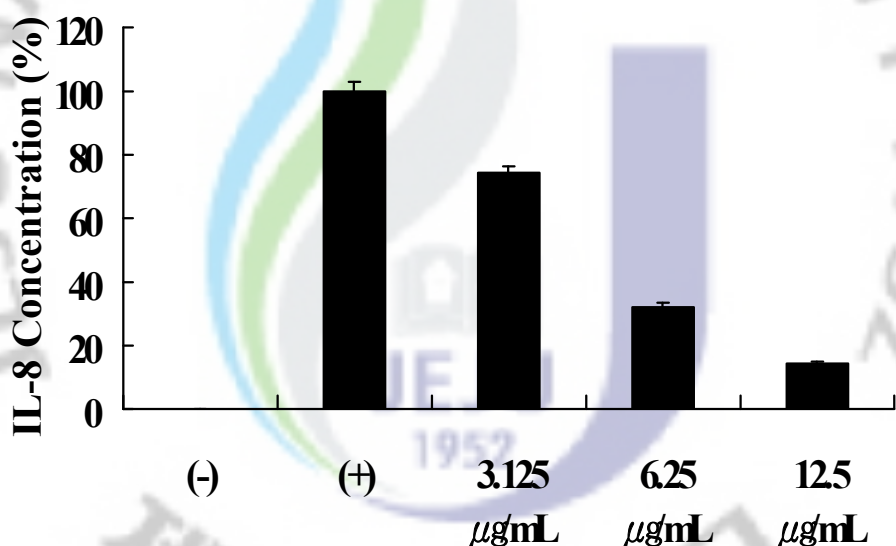


Figure 41. Dose-dependent effect of TEO treatment on *P. acnes*-induced IL-8 release. HaCaT cells were incubated with or without *P. acnes* for 48h and the supernatants were harvested for IL-8 measurements. IL-8 assays were performed protocols of BioSource (Camarillo,CA). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs . *P. acnes* alone. (+) ; treatment with *P. acnes*, (-) ; no treatment with *P. acnes*.

2-9-5. 백리향 에센셜 오일의 세포 독성

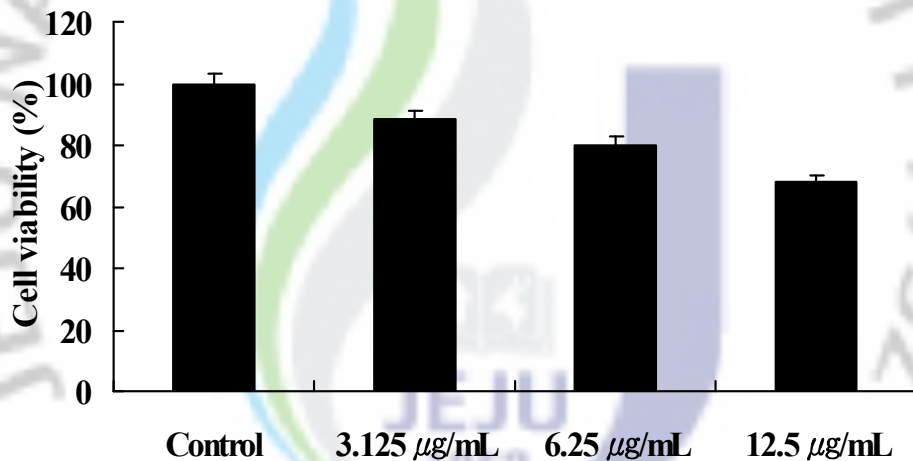
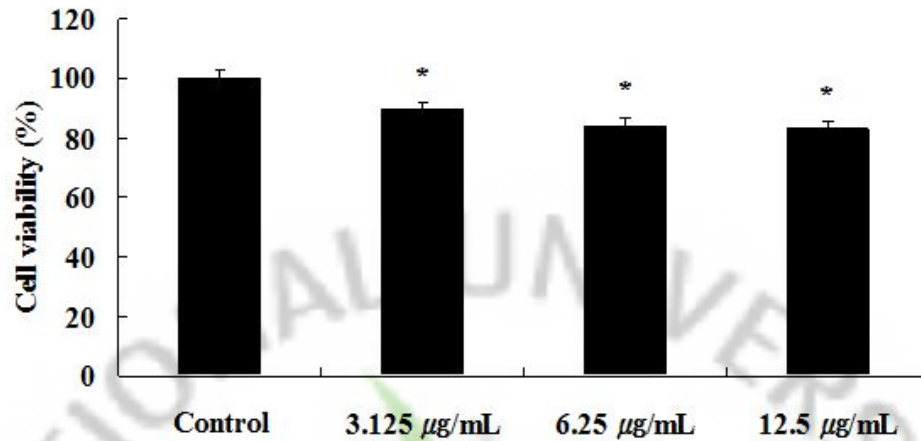


Figure 42. Cytotoxicity of TEO against human cell lines. HaCaT (A) and human dermal fibroblast (B) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (GIBCO Inc., Grand Island, NY) and 1% penicillin-streptomycin at 37° C in a humidified 95% air/5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 3. 결론

제주자생식물 9종의 에센셜 오일, 구상나무, 비목나무, 비자나무, 붓순나무, 삼나무, 새덕이 나무, 갯기름 나물, 꽃향유, 백리향의 주요 구성성분을 table 37에 나타내었다.

Table 37. Summary of major chemical constituents of plants essential oils

식물명	주요성분
구상나무	Bornyl acetate(30.35%), Limonene(18.95%), $\alpha$ -pinene(8.10%), camphene(7.39%)
비목나무	nerolidol(26.93%), $\beta$ -caryophyllene(13.24%), cinnamate(8.54%), $\alpha$ -humulene(8.48%), geranyl acetate(7.82%), $\alpha$ -farnesene(6.20%)
비자나무	dl-limonene(30.10%), $\delta$ -3-carene(15.37%), $\alpha$ -pinene(11.50%), $\delta$ -cardinene(6.87%)
붓순나무	eucalyptol(21.8%), sabinene(5.3%), $\alpha$ -terpinenyl acetate(4.9%)
삼나무	kaurene(17.20%), elemol(10.88%), $\gamma$ -eudesmol(9.41%), sabinene(8.86%), $\alpha$ -eudesmol(5.26%), $\beta$ -eudesmol(5.13%),
새덕이나무	1-dodecen-3-yne(12.5%), elemol(9.5%), $\alpha$ -cadinol(7.5%), $\gamma$ -eudesmol(6.9%), $\alpha$ -eudesmol(5.0%), $\beta$ -elemene(5.0%)
갯기름나물	$\beta$ -pinene(66.07%), $\alpha$ -pinene(24.68%)
꽃향유	dehydroelsholtzia ketone(82.46%), elsholtzia ketone(5.96%)
백리향	$\rho$ -cymen-3ol(50.41%), $\rho$ -cymen-2ol(24.06%), cymene(19.04%)

■ 9종의 에센셜 오일의 활성을 검색한 결과 에센셜 오일의 대부분은 여드름 관련 미생물인 *P. acnes*와 *S. epidermidis*에 강한 항균활성을 보였으며, 꽃향유를 제외한 8 종류의 에센셜 오일은 항생제 내성균에 대해서도 강한 항균활성을 보였다.

■ 또한 이들 에센셜 오일 중 비목나무<sup>49</sup>를 제외한 8 종류에 대해 항염 활성을 검색한 결과 갯기름나무<sup>50</sup>를 제외한 7종류에서 항염활성을 확인할 수 있었다. 그 중 구상나무,<sup>51</sup>비자나무,<sup>52</sup> 붓순나무,<sup>53</sup> 삼나무<sup>54</sup> 에센셜 오일을 RAW 264.7 cell을 이용하여 항염 활성을 확인한 결과 모두 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제 했으며 염증 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6의 생성을 세포 독성 없이 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

■ 새덕이나무,<sup>55</sup> 꽃향유<sup>56</sup> 에센셜 오일은 human monocyte cell인 THP-1에서 *P. acnes*에 의해 유도되어 생성되는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 생성을 세포 독성 없이 우수하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

■ 백리향<sup>57</sup> 에센셜 오일은 human keratinocyte cell인 HaCaT cell을 *P. acnes*로 염증을 유도하여 이에 생성되는 염증성 사이토카인인 IL-8의 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

■ 이처럼 제주도에 자생하는 식물에서 추출한 에센셜 오일에서는 여드름이나 피부염증을 유발하는 미생물들에 대해서 강한 항균활성과 항염 활성을 보였으며, 특히 여드름 관련 미생물 중 항생제 내성이 있는 미생물에 대해서 강한 항균활성을 보임으로 이는 이후 부작용 없는 내성이 생기지 않는 여드름 치료제로의 개발이 가능하리라 여겨진다.

#### IV 참고문헌

1. Cragg, G.M., D.J. Newman. **2008**. Detection, isolation and structural determination in Bioactive natural products. 2nd ed. CRC press. Boca Raton, F.L. p. 324.
2. Hsieh, Y.H., P.M., Kuo, S.C., Chien, L.F., Shyur and S.Y. Wang. **2007**. Effects of *Chamaecyparis formosensis* Matasumura extractives on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Phytomedicine*, 14:675-680
3. Jurnal, I. **2003**. Sertuner and Morphine - a historical vignette. *Schmerz*, 17:280-283
4. 김동한 외, **1999**. 청약화학, 동일출판사.
5. 특허청. **2003**. “천연물 의약 및 화장품 I, II”, 2003, 신기술동향보고서.
6. Lawrence, B.M., **2005**. Antimicrobial/Biological activity of essential oils. 1st Edn., Allured Publishing Corporation, Illinois, USA. ISBN-10:1-932633-13-8.
7. Lopes-Lutz, D., D.S. Alviano, C.S. Alviano, and P.P. Kolodziejczyk. **2008**. Screening of chemical composition, antimicrobial and antiooxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 69: 1732-1738.
8. 박지영, 김은의. **2000**. Effect of aroma essential oil on the skin care application. 한국아로마테라피협회지. pp. 74-81.
9. Clark, A.M. **1996**. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm. Res.* p 13

10. Alper, J. **1998**. Efforts to combat microbial resistance lags. *ASM news*. 64. pp 440-441
11. Blackwell, R. **1991**. An insight into aromatic oils lavender and tea tree. *Phytochemistry*. 2: 25-30
12. 조연희 외. 2000. 라벤더 정유 처리가 candida성 질염, 화농성염증균, 치아우식증, 요로감염증의 활성화에 미치는 영향. 서울여자대학교 원예학과. pp. 139-774.
13. Kim, K.Y., B.R., Yoon and Y.H. Lee. **2004**. A study on synerge effect of antimicrobial activity on aroma essential oil. *Journal of the Korean Society of Fashion & Beauty*. 2: 19-26.
14. Kim, H.Y. **1978**. Statistical study of acne vulgaris in Korean Adolescence. *Kor. J. Dermatol*. 16: 471-476.
15. Burton, J.L. and S. Shuster. **1971**. The relationship between seborrhea and acne vulgaris. *Br.J. Dermatol*. 84: 600-604.
16. Oprica, C., S. Lofma가, B. Lund, C. Edlund, L. Emtestam, and C.E. Nord. **2005**. Genetic basis of resistance in *Propionibacterium acnes* strains isolated from diverse types of infection in different European contries. *Anaerobe*, 11: 137-143.
17. Seong, J.M. N.Y. Park, and S.H. Lee. **2003**. Effect of Schizandra chinensis and Pine Needle on Growth of Pathogens related to acne. *Kor. J. Microbial. Biotechnol*. 31: 69-74.
18. Tsatsanis, C., A. Androulidaki, M. Venihaki, and A.N. Margioris. **2006**. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 38: 1654-1661.



19. Korhonen, R., A. Lahti, H. Kankaanranta, and E. Moilanen. **2005**. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug. Targets, Inflamm. Allergy*. 4: 471-479.
20. Nozaki, H., M. Hiroi, D. Takaoka, and M. Nakayama. **1983**. Neoliacine, a novel germacranolide sesquiterpene dilactone from *Neolitsea aciculata* Koidz.:X-ray crystal structure. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1107-1108.
21. Yano, K., T. Akihisa, T. Tamura, and T. Matsumoto. **1992**.  $3\alpha$ -hydroxy- $14\alpha$ -methyl- $\Delta^9(11)$ sterols from *Neolitsea aciculata*. *Phytochemistry*. 31: 2902-2904.
22. Yano, K., T. Akihisa, T. Tamura, and T. Matsumoto. **1992**. Four  $4\alpha$ -methylsterols and triterpene alcohols from *Neolitsea aciculata*. *Phytochemistry*. 31: 2093-2098.
23. Takaoka, D., H. Tani, H. Nozaki, and M. Nakayama. **1993**. Structures of germacranolide sesquiterpene dilactones from *Neolitsea aciculata*. *Natural Product Letters*. 3: 203-208.
24. Takaoka, D., H. Tani, H. Nozaki, and M. Nakayama. **1993**. Aciculatalactone, A new elemanolide sesquiterpenoid from *Neolitsea aciculata*. *Chemistry Letters*. 1467-1468.
25. Mason, H.S. and E.W., Peterson. **1965**. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*. 111: 134-146.
26. Blois, M.S. **1958**. Antioxidant determined by the use a stable free radical. *Nature*. 26: 1199-1200.
27. James, A.E.K., D.W. Timothy, and L. Gordon. **1996**. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*. 35: 9090.
28. Slominski A., J.T. Desmond, S. Shibahara, J. Wortsman, **2003**. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev.*, 84: 1155-1228.

29. Okombi S., D. Rival, S. Bonnet, A. Mariotte, E. Perrier, A. Boumendjel, **2006**. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 2252-2255.
30. Laskin J.D., L.A. Piccinin, **1986**. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma, *J. Biol. Chem.*, 261: 16626-16635.
31. Busca R., R. Ballotti, **2000**. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment Cell Res.*, 13: 60-69.
32. Okombi S., D. Rival, S. Bonnet, A. Mariotte, E., and Perrier, A. Boumendjel, **2006**. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 2252-2255.
33. Frankel, E.N., W.E. Neff, and D. Weisleder. **1990**. Determination of methyl linoleate hydroperoxides by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol.* 186: 380-387.
34. Kucukislamoglu, M., N. Yayli, H.B. Senturk, and H. Genc. **2000**. Flavonol glycosides from *Consolida armeniaca*. *Turk. J. Chem.* 24: 191-197.
35. 방면호, 송정춘, 이상양, 박남규, 백남인. 1999. 작약뿌리로부터 항산화 활성 물질의 분리. *한국농화학회지*. 42: 170-175.
36. 강인호, 차자현, 한정훈, 이성완, 김홍진, 권석형, 함인혜, 황보식, 황완균. 2005. 국산 산사나무 잎으로부터 항산화 활성물질의 분리. *생약학회지*. 36: 121
37. Fathy, M. Soliman, Afaf H. Shehata, Amal E. Khaleel, and Shahera M. Ezzat. **2002**. An acylated kaempferol glycoside from flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. dulce*. *Molecules*. 7: 245-251.

38. Nowak, R. **2003**. Separation and quantification of tiliroside from plant extracts by SPE/RP-HPLC. *Pharmaceutical Biology*. 41: 8
39. Cutilo, F., B. D'Abrosca, M. DellaGreca, C.D. Mario, A. Golino, L. Previtiera, and A. Zarrelli. **2003**. Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: effects on seeds germination and plant growth. *Phytochemistry*. 64: 1381-1387.
40. Kang, S.S. J.S. Kim, Y.N. Xu, and Y.H. Kim. **1999**. Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata*. *J. Nat. Prod.* 62: 1059-1060.
41. Kovganko, N.V., Zh. N. Kashkan, E.V. Borisov, and E.V. Batura. **1999**. <sup>13</sup>C NMR spectra of  $\beta$ -sitosterol derivatives with oxidized rings A and B. *Chemistry of Natural Compounds*. 35: 646-649.
42. Lee, D.Y., M.C. Song, J.S. Yoo, S.H. Kim, I.S. Chung, D.K. Kim, M.H. Park, B.M. Kwon, S.Y. Kim, and N.I. Baek. **2006**. Development of biologically active compounds from edible plant sources-XVII. Isolation of sterols from the fruits of *Cornus kousa* Burg. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 82-85.
43. Parks, J. S., D.P. Cistola, D.M. Small, and J.A. Hamilton. **1983**. Interactions of the carboxyl group of oleic acid with bovine serum albumin: A <sup>13</sup>C NMR study. *The Journal of Biological Chemistry*. 258: 9262-9269.
44. Gunstone, F.D. **1990**. <sup>13</sup>C-NMR spectra of some synthetic glycerol esters alone and as mixtures. *Chemistry and Physics of Lipids*. 56: 195-199.
45. De la Torre, M.C., M. Bruno, F. Piozzi, G. Savona, B. Rodriguez, N. Apostolides Arnold. **1990**. Terpenoids from *Salvia willeana* and *S. virgata*. *Phytochemistry*. 29: 668-670.

46. Chung, S.K., Y.C. Kim, Y. Takaya, K. Terashima, and M. Niwa. **2004**. Novel flavonol glycoside, 7-O- methyl mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and its antioxidant effect. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4664-4668.
47. Gohar, A., S.R. Gedara, and H.N. Baraka. **2009**. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua L.* seeds. *J. Med. Plant. Res.* 3: 424-428.
48. Janwitayanuchit, W., K. Suwanborirux, C. Patarapanich, S. Pummangura, V. Lipipun, and T. Vilaivan. **2003**. Synthesis and anti-herpes simplex viral activity of monoglycosyl diglyceride. *Phytochemistry.* 64: 1253-1264.
49. Kim, S.S., G. Song, T.H. Oh, K.N. Kim, E.J. Yang, J.Y. Kim, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2009**. Antimicrobial effect of *Lindera erythrocarpa* essential oil against antibiotic-resistant skin pathogens. *Journal of Pure & Applied Microbiology.* 3: 429-434.
50. Yang, E.J., S.S. Kim, T.H. Oh, G. song, K.N. Kim, J.Y. Kim, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2009**. *Peucedanum japonicum* and *Citrus unshiu* essential oils inhibit the growth of antibiotic-resistant skin pathogens. *Annals of Microbiology.* 59: 623-628.
51. Yoon, W.J., S.S. Kim, T.H. Oh, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2009**. *Abies koreana* essential oil inhibit drug-resistant skin pathgen growth and LPS-induced inflammatory effects of murine macrophage. *Lipids.* 44: 471-476.
52. Yoon, W.J., S.S. Kim, T.H. Oh, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2009**. *Torreya nucifera* essential oil inhibit skin pathgen growth and lipopolysaccharide-induced inflammatory effects. *International Journal of Pharmacology.* 5: 37-43.

53. Kim, J.Y., S.S. Kim, T.H. Oh, J.S. Baik, G.P. Song, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2009**. Chemical composition, antioxidant, anti-elastase, and anti-inflammatory activities of *Illicium anisatum* essential oil. *Acta. Pharm.* 59: 289-300.

54. Yoon, W.J., S.S. Kim, T.H. Oh, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2009**. *Cryptomeria japonica* essential oil inhibit the growth of drug-resistant skin pathogens and LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. *Polish Journal of Microbiology.* 58: 61-68.

55. Kim, S.S., C.G. Hyun, and N.H. Lee. **2010**. *Neolitsea aciculata* essential oil inhibit drug-resistant skin pathgen growth and *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory effects of human monocyte leukemia. *Natural Product Communications.* in submitted.

56. Kim, S.S., H.J. Oh, J.S. Baik, T.H. Oh, P.Y. Yun, C.S. Kim, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2008**. Chemical composition and biological activities of *Elsholtzia splendens* essential oil. *J. Appl. Biol. Chem.* 51: 69-72.

57. Oh, T.H., S.S. Kim, W.J. Yoon, J.Y. Kim, E.J. Yang, N.H. Lee, and C.G. Hyun. **2009**. Chemical composition and biological activities of Jeju *Tymus quiquecostatus* essential oils against *Propionibacterium* species inducing acne. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55: 63-68.

감사의 글



To all whom I loved.....