



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

좁은잎천선과로부터 항산화 및  
티로시나아제 저해 활성성분 연구



濟州大學校 大學院

化學科

朴成桓

2011年 2月

# 좁은잎천선과로부터 항산화 및 티로시나아제 저해 활성성분 연구

指導教授 李 南 昊

朴 成 桓

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

朴成桓의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

濟州大學校 大學院

2011年 2月

Identification of Compounds with  
Anti-Oxidative and Anti-tyrosinase Activities  
from *Ficus erecta* var. *sieboldii* King

Sung-Hwan Park  
(Supervised by professor Nam Ho Lee)

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

2011. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman, .....

Dissertation Committee, .....

Dissertation Committee, .....

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

List of Schemes	iii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
List of Abbreviations	vii
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	9
1. 시약 및 기기	9
2. 재료	10
3. 추출, 분획 및 분리	11
3-1. 좁은잎천선과 가지의 추출 및 분획	11
3-2. EtOAc 분획물의 VLC 과정	12
3-3. Compound 1의 분리과정	13
3-3. Compound 2의 분리과정	13
3-4. Compound 3과 compound 4의 분리과정	13
3-5. Compound 5와 compound 6의 분리과정	14
3-6. Compound 7과 compound 8의 분리과정	14
4. 추출, 분획 및 분리	17
4-1. 좁은잎천선과 잎의 추출 및 분획	17
4-2. EtOAc 분획물의 VLC 과정	18
4-3. Compound 9의 분리과정	18
4-4. Compound 10과 Compound 11의 분리과정	18
4-5. Compound 12와 Compound 13의 분리과정	18
5. 활성 실험	20
5-1. DPPH radical scavenging test	20

5-2. Tyrosinase inhibition test .....	22
5-3. 반응 속도 결정 실험 .....	23
III. 결과 및 고찰 .....	24
1. 좁은잎천선과 가지에서 분리된 화합물의 구조 결정 .....	24
1-1. Compound 1과 compound 2의 구조 해석 .....	24
1-2. Compound 3의 구조 해석 .....	29
1-3. Compound 4의 구조 해석 .....	33
1-4. Compound 5과 compound 6 구조 해석 .....	36
1-5. Compound 7과 compound 8의 구조 해석 .....	40
1-6. Compound 9과 compound 10의 구조 해석 .....	44
1-7. Compound 11의 구조 해석 .....	48
1-8. Compound 12의 구조 해석 .....	51
1-9. Compound 13의 구조 해석 .....	54
2. DPPH radical scavenging activity .....	57
2-1. 좁은잎천선과 가지 추출물의 항산화 활성 .....	57
2-2. 좁은잎천선과 가지에서 분리된 화합물의 항산화 활성 .....	58
2-3. 좁은잎천선과 잎 추출물의 항산화 활성 .....	59
2-4. 좁은잎천선과 잎에서 분리된 화합물의 항산화 활성 .....	60
3. Tyrosinase inhibition activity .....	62
3-1. 좁은잎천선과 가지 추출물의 Tyrosinase 저해활성 .....	62
3-2. 좁은잎천선과 가지에서 분리된 화합물의 Tyrosinase 저해활성 .....	63
4. Compound 2와 compound 8의 효소 저해 작용 측정 .....	65
5. Compound 2와 compound 8의 구조활성관계 .....	67
IV. 요약 및 결론 .....	67
V. 참고문헌 .....	69

## LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Procedure of first solvent fractionation from <i>F. erecta</i> branch .....	11
Scheme 2. Procedure of second solvent fractionation from <i>F. erecta</i> branch .....	12
Scheme 3. Isolation of compounds 1 and 7-8 .....	15
Scheme 4. Isolation of compound 2 .....	15
Scheme 5. Isolation of compounds 3-6 .....	16
Scheme 6. Procedure of solvent fractionation from <i>F. erecta</i> leaves ..	17
Scheme 7. Isolation of compounds 9-13 .....	19

## LIST OF TABLES

Table 1. The antioxidant agents .....	3
Table 2. The whitig agents currently being used .....	6
Table 3. NMR spectral assignments for compounds 1 and 2 .....	26
Table 4. NMR spectral assignments for compound 3 .....	30
Table 5. NMR spectral assignments for compound 4 .....	34
Table 6. NMR spectral assignments for compounds 5 and 6 .....	37
Table 7. NMR spectral assignments for compounds 7 and 8 .....	41
Table 8. NMR spectral assignments for compounds 9 and 10 .....	45
Table 9. NMR spectral assignments for compound 11 .....	49
Table 10. NMR spectral assignments for compound 12 .....	52
Table 11. NMR spectral assignments for compound 13 .....	55
Table 12. Results of Compound 2 and compound 8 for $k_m$ and $V_{max}$ .....	66

## LIST OF FIGURES

Figure 1. The antioxidant defense mechanism against oxidative damage caused by free radical .....	2
Figure 2. Structures of Antioxidants agents .....	4
Figure 3. Structures of Whitening ingredients .....	7
Figure 4. Photograph of <i>Ficus erecta</i> var. sieboldii King .....	10
Figure 5. Scavenging of the DPPH radical by phenol .....	21
Figure 6. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	27
Figure 7. <sup>13</sup> C-NMR & 135° DEPT-NMR spectra of compound <b>1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	27
Figure 8. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	28
Figure 9. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD + CDCl <sub>3</sub> .....	28
Figure 10. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	31
Figure 11. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	31
Figure 12. 135° DEPT-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	32
Figure 13. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>4</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	35
Figure 14. <sup>13</sup> C-NMR & 135° DEPT-NMR spectra of compound <b>4</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	35
Figure 15. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	38
Figure 16. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	38
Figure 17. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>6</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	39
Figure 18. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>6</b> in CD <sub>3</sub> OD+ CDCl <sub>3</sub> .....	39
Figure 19. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>7</b> in DMSO-d <sub>6</sub> .....	42
Figure 20. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>7</b> in DMSO-d <sub>6</sub> .....	42
Figure 21. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>8</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	43
Figure 22. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>8</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	43
Figure 23. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>9</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	46
Figure 24. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>9</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	46



Figure 25. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>10</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	47
Figure 26. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>10</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	47
Figure 27. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>11</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	50
Figure 28. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>11</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	50
Figure 29. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>12</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	53
Figure 30. <sup>13</sup> C-NMR & 135° DEPT-NMR spectra of compound <b>12</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	53
Figure 31. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>13</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	56
Figure 32. <sup>13</sup> C-NMR & DEPT-NMR spectra of compound <b>13</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	56
Figure 33. DPPH radical scavenging activities of extracts from <i>F. erecta</i> branch .....	57
Figure 34. C <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities of EtOAc fr from <i>F. erecta</i> branch .....	58
Figure 35. RC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for compound <b>6</b> .....	58
Figure 36. DPPH radical scavenging activities for extracts from <i>F. erecta</i> Leaves .....	59
Figure 37. RC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for EtOAc fr from <i>F. erecta</i> Leaves .....	59
Figure 38. DPPH radical scavenging activities of compounds <b>9-12</b> .....	60
Figure 39. RC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for compounds <b>9-10</b> .....	61
Figure 40. Tyrosinase inhibition activities for extracts from <i>F. erecta</i> branch .....	62
Figure 41. IC <sub>50</sub> value of tyrosinase inhibition activities for EtOAc fr from <i>F. erecta</i> branch .....	63
Figure 42. Tyrosinase inhibition activities for compounds <b>1-8</b> .....	63
Figure 43. IC <sub>50</sub> value of tyrosinase inhibition activities for compounds	

2 and 8 .....	64
Figure 44. Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and L-tyrosine from Compound <b>2</b> .....	66
Figure 45. Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and L-tyrosine from compound <b>8</b> .....	66
Figure 46. Structure activity relationship of compounds <b>2</b> and <b>8</b> .....	67



## List of Abbreviations

<i>F. erecta</i>	<i>Ficus erecta</i> var. <i>sieboldii</i> King
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
Hex	<i>n</i> -hexane
EtOAc	Ethyl acetate
BuOH	<i>n</i> -butanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
V	VLC subfraction
Vit. C	Vitamin C
Fr.	Fraction
CC	Column chromatography
Cpd	Compound
TLC	Thin layer chromatography
RC <sub>50</sub>	Reduction concentration of 50%
IC <sub>50</sub>	Inhibition concentration of 50%
NMR	Nuclear magnetic resonance
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
J	Coupling constant (Hz)
s	Singlet
d	Doublet
t	Triplet
dd	Doublet of doublet
m	Multiplet
int	Integration

## Abstract

*Ficus erecta* var. *sieboldii* KING (Moraceae) is a deciduous tree distributed in the southern region of Korea. This plant has been used as a folk medicine for the treatment of arthritis. In our continuing efforts to find biologically active compounds from plants in Jeju Island, we became interested in the extract of *F. erecta* branch and leaves. Repeated column chromatography of ethyl acetate soluble fractions in the extract led to the isolation thirteen compounds such as  $\beta$ -sitosterol (1), *p*-hydroxybenzoic acid (2), ethyl linoleate (3),  $\alpha$ -amyrin acetate (4), vanillic acid (5), syringic acid (6), methyl vanillate (7), methyl *p*-hydroxybenzoate (8), catechin (9), afzelechin (10), monoolein (11), oleic acid (12), lutein (13). All of these compounds were isolated for the first time from *F. erecta*. In addition, the extract and isolated compounds to anti-oxidative and anti-tyrosinase activity test were conducted.

For the anti-oxidation activity test, the three compounds syringic acid (6), catechin (9), afzelechin (10) showed DPPH radical scavenging activity with  $RC_{50}$  of 8.22, 10.3, 39.4  $\mu\text{g/mL}$  respectively (vitamin C,  $RC_{50}$  : 7.24  $\mu\text{g/mL}$ ).

On the tyrosinase inhibition activity test, *p*-hydroxybenzoic acid (2) and methyl *p*-hydroxybenzoate (8) showed inhibition activities with  $IC_{50}$  135.4  $\mu\text{g/mL}$  and 99.9  $\mu\text{g/mL}$  respectively (arbutin,  $IC_{50}$  : 87.4  $\mu\text{g/mL}$ ).

The inhibition kinetics, analyzed by Lineweaver-Burk plots, indicated *p*-hydroxybenzoic acid (2) and methyl *p*-hydroxybenzoate (8) to be competitive inhibitors of tyrosinase when L-tyrosine was used as a substrate. These structures were elucidated on the basis spectroscopic data from 1D and/or 2D NMR studies as well as by comparison of the data with the literature values.

## I. 서론

노화(aging)란 세월이 흘러감에 따라 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 심하게 퇴화현상이 일어나는 것을 말한다. 각 신체의 노화 중에서 피부노화는 크게 2종류로 나눌 수 있다. 첫째는 내인성 피부노화로서 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화현상을 말하며, 두 번째는 광노화 및 외인성 피부노화로서 햇빛에 지속적으로 노출되어 생기는 피부손상을 말한다.

피부는 외부환경에 항상 노출되어 있으므로 노화에 따른 피부 변화는 많은 부분이 외부인자들의 영향에 의한 것이라고 할 수 있다. 특히 외부인자 중 자외선과 더불어 호흡을 통해 생성되는 활성산소(free radicals)는 피부노화에 가장 중요한 원인으로 간주되고 있다.<sup>1)</sup>

모든 생물체는 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 유해산소로 불리는 활성산소(superoxide radicals, hydroperoxy radicals, organic peroxide radicals, singlet oxygen, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals)들을 생산하고 있다. 더불어 생체 내에는 이들에 대한 방어기구로서 SOD(super oxide dismutase), catalase, peroxidase 등의 항산화 효소와 함께 Vitamin E, vitamin C, vitamin A, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화 물질이 존재하여 스스로 보호하고 있다(Figure 1).

그러나 이와 같은 생체방어기에 이상이 초래되거나 각종 물리적 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 발생 된다.

또한 인간을 비롯한 모든 생명체들은 생존과 활동에 필요한 에너지를 공급받기 위해 필연적으로 음식으로부터 탄수화물과 지방의 대사에 의존하게 된다. 이러한 영양소들이 에너지를 생산하기 위해서는 산소의 공급이 필수적이며, 이때 공급된 산소는 세포내 미토콘드리아의 대사과정에 이용되고, 그 중 약 2% 정도가 우리 몸에 해가 되는 불안정한 산소화합물인 유해산소 또는 활성산소라고 부르는 자유 라디칼(free radical)로 변하게 된다. 이러한 자유 라디칼의 대부분은 큰 반응성을 갖고 있는 불안정한 분자나 화합물로 존재하며, 대기오염, 담배, UV, 화학성분, 전리방사선 등에 의해 생성된다.

이러한 자유 라디칼은 인체의 다양한 조직에 산화적 손상을 입히며, 더 나아가 암, 고혈압, 심장병, 동맥경화와 같은 만성질환을 일으키는 요인으로 작용한다. 따라서 이러한 산화적 스트레스가 노화를 비롯한 각종 질환을 일으키는 중요한 원인이 입증됨으로써 활성산소 소거활성을 갖는 항산화성 생체 기능 물질의 노화억제 및 질환의 치료제로서 가능성이 크게 부각되고 있어, 산화적 스트레스에 의한 노화 및 각종 질병의 치료제 기능을 지닐 수 있는 새로운 항산화성 생체기능물질 개발이 요구되고 있다.<sup>2)</sup>

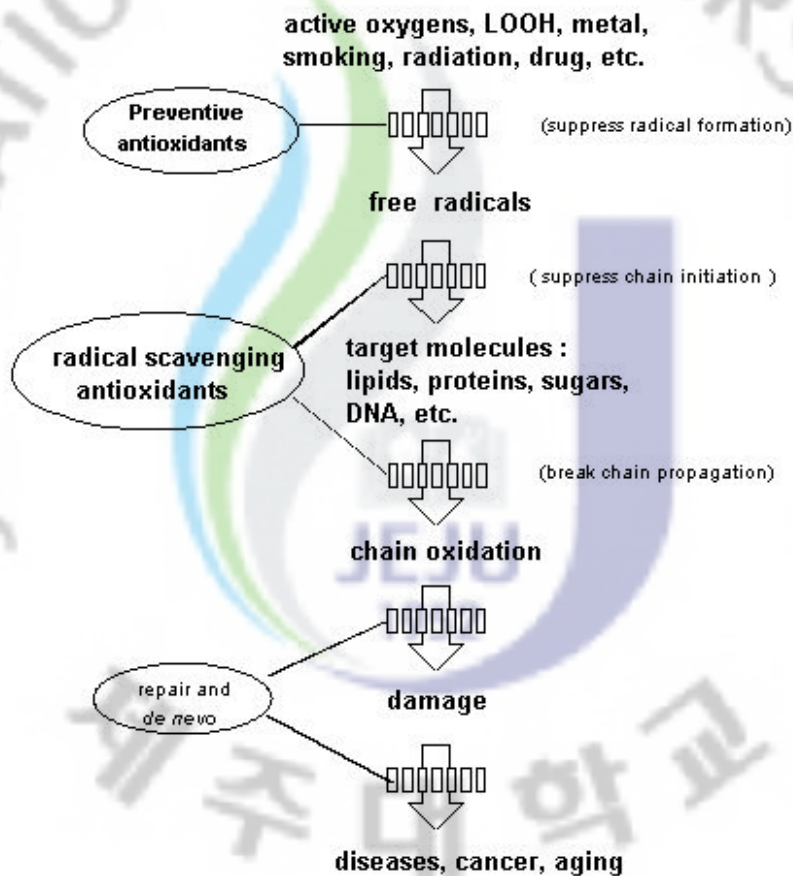
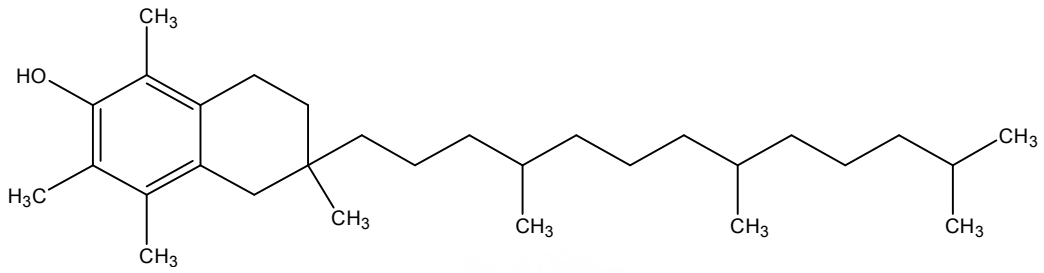


Figure 1. The antioxidant defense mechanism against oxidative damage caused by free radical.

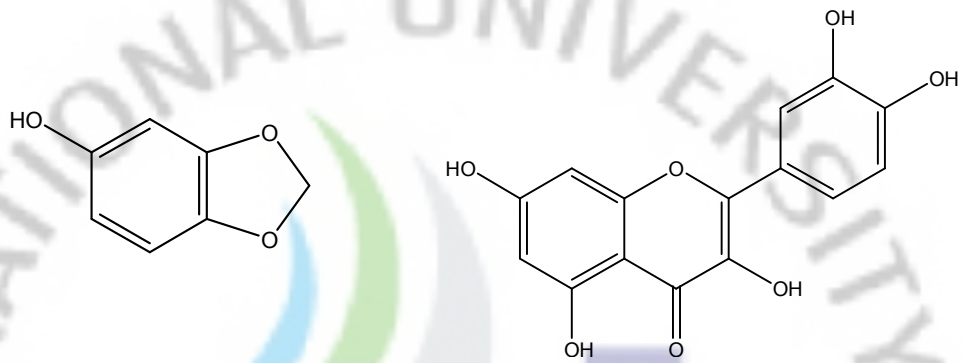
대표적인 항산화제 중 가장 많이 이용되는 화합물은 vitamin C 유도체와 BHA(butylated hydroxy anisol)와 BHT(butylated hydroxy tolyene) 등과 같은 합성화합물이며, 항산화제의 작용특성을 Table 1과 구조를 Figure 2 에 나타내었다. 일반적으로 페놀계 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHA와 BHT는 그 효과와 경제성 그리고 안정성 때문에 많이 사용되어 왔지만, 최근 합성 식품 첨가물의 일반적인 기피 현상뿐만 아니라 과량 섭취 시 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성 작용을 일으키는 것으로 알려지면서, 이들이 갖는 여러 가지 기능을 대체할 수 있는 천연 물질의 개발이 더욱 필요시 되고 있다. 이러한 이유로 보다 안전한 천연물로부터 폴리페놀 화합물과 같은 유효한 활성을 나타내는 항산화제를 찾기 위한 많은 연구들이 수행되고 있다.

Table 1. The antioxidant agents.

Compounds	항산화작용
Tocopherol, Sesamol, Quercetin, Garlic acid, BHA, BHT, TBHQ	Free radical inhibitor
Amino acid, Hydroxy acid	Metal inactivator
Citric acid, L-ascorbic acid	Synergist

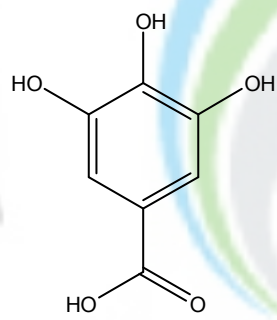


$\alpha$ -Tocopherol

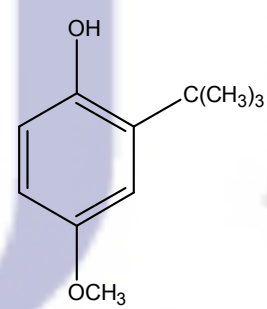


Sesamol

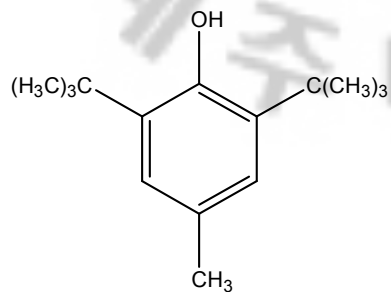
Quercetin



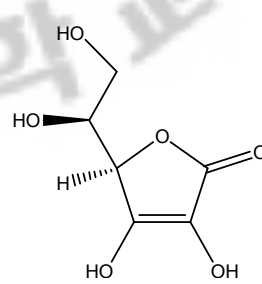
Gallic acid



BHA



BHT



Vitamin C



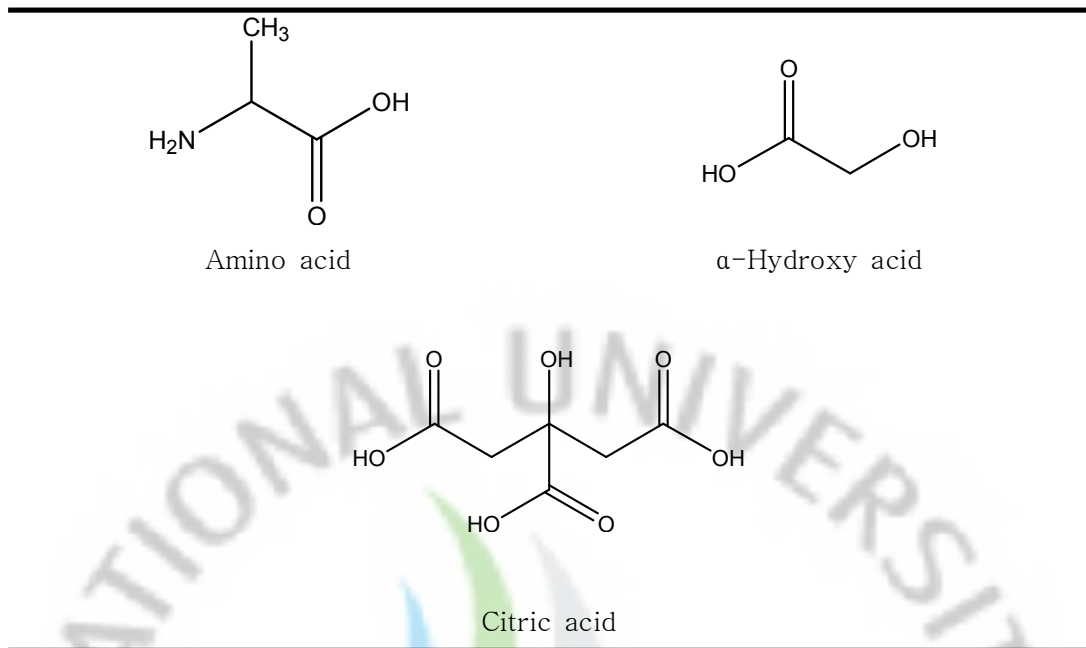


Figure 2. Structures of Antioxidants agents.

또한 지속적으로 햇빛에 노출된 피부는 자외선에 대항하는 기능으로 멜라닌색소를 합성하여 피부를 보호하는 작용을 한다. 반면에 멜라닌이 과잉생산하게 되면, 피부에 기미, 주근깨, 피부염증후의 피부흑화, 노인성색소반점 등으로 인한 피부의 과색소 침착은, 당사자에게 미용상의 불편뿐만 아니라 정신적으로 부정적인 영향을 미쳐 사회생활에 불편을 초래하기도 한다.

멜라닌의 색소침착은 인체의 병리적 문제의 원인이 되기도 하지만, 앞에서 언급한 것 처럼 미용적인 측면의 문제로 인식되고 있다. 따라서 멜라닌 형성 억제에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 멜라닌 생합성 저해제는 의약품, 화장품 식품 등에서 피부질환 치료제, 식품갈변방지제, 피부미백제 등에 적용되고 있다.<sup>3)</sup>

과도한 색소침착을 개선하기 위해 의약품으로써, hydroquinone, sulfure, azelaic acid 등이 사용되고 있으나, hydroquinone 이외에는 뚜렷한 임상적 치료 효과를 보기엔 부족한 면이 있다. Hydroquinone은 tyrosinase enzyme inhibition IC<sub>50</sub>(75 $\mu$ g/mL) 농도에서 melanocyte에 독성이 심하다.

초기의 미백제는 멜라닌 색소생성과정의 첫 단계인 티로시나제에 의한 티로신

의 산화 억제 기능에 초점이 맞추어져 있었기 때문에, in vitro에서 티로시나제 활성 억제제를 선별하는 것이 중요한 미백제 개발수단이였다. 특히 사용된 티로시나제는 버섯에서 유래한 것으로, 사람의 것과는 유사성에 있어서 많은 차이가 있으나, 이 과정에서 찾아낸 알부틴, 코직산, 비타민 C 등이 현재까지도 폭넓게 사용되고 있고 있으며, 미백제 종류와 작용기전을 Table 2와 구조를 Figure 4에 나타내었다.<sup>4)</sup>

Table 2. The whitening agents currently being used.<sup>5)</sup>

Compounds	작용 기전
Tretinoin	Enhance Epidermal Cell turnover
Vitamin C & its derivatives	Interfere with pigment production at various oxidative steps
Linoleic acid	Tyrosinase degradation
Arbutin, Kojic acid, Hydroquinone, Azelaic acid	Tyrosinase inhibition

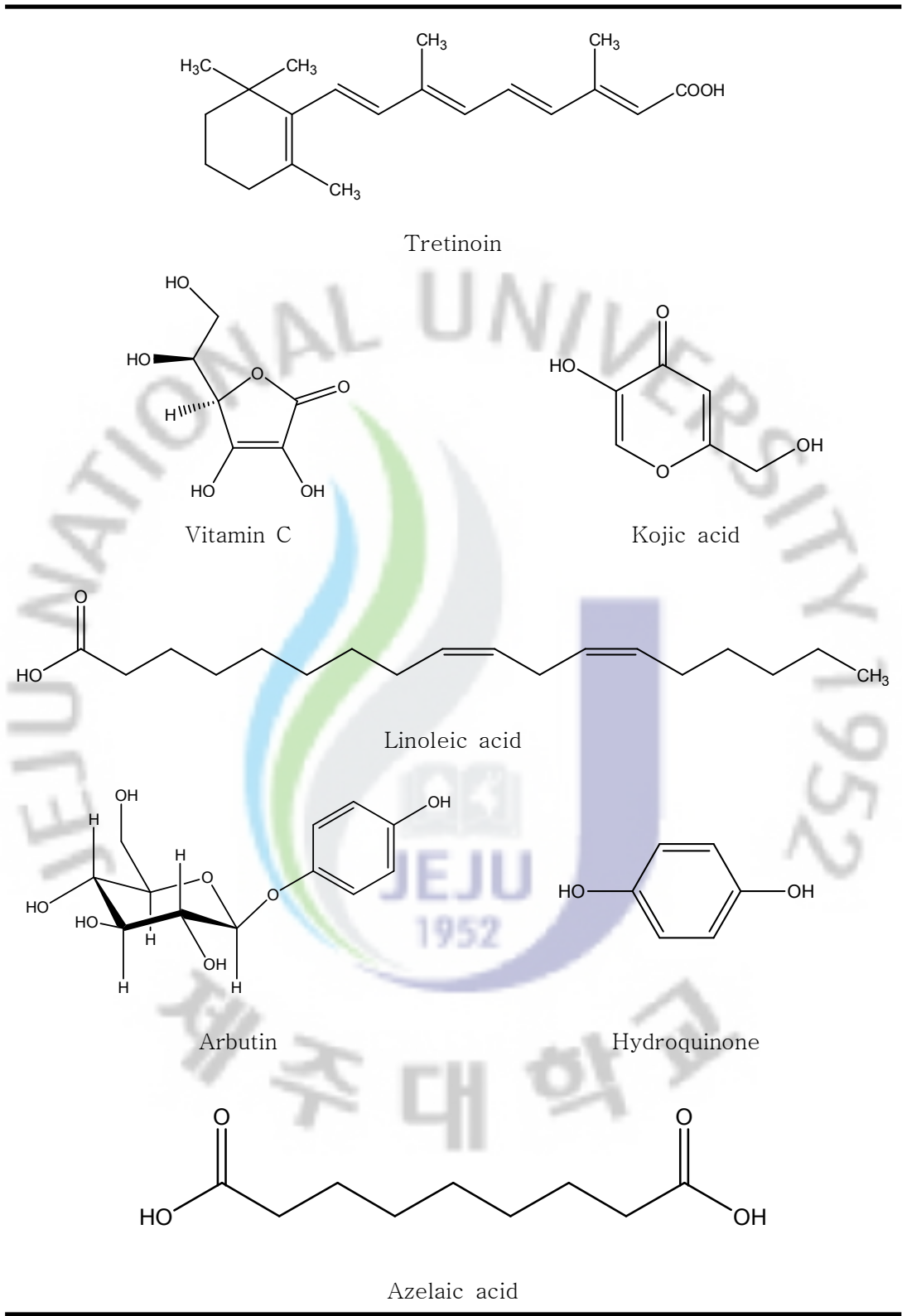


Figure 3. Structures of Whitnig ingredients.

좁은잎천선과(*Ficus erecta* var. *sieboldii* King)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 식물로 젓꼭지나무, 가는잎천선과 등의 이명을 가지며, 원산지는 제주도 자생식물로 분포지역은 한국(제주·전남)·일본·타이완 등으로 한국에서는 남쪽 해안 지대와 섬에서 백양산까지 자생한다. 제주도에서는 해발 400 m 이하에 자라는 높이가 2-4m 정도로 자라는 낙엽 관목이다. 수피는 평활하며 가지는 회백색고 털이 없으며, 잎은 호생하며 피침형이고, 길이 3.5-20 cm로서 가장자리가 밋밋하나 맥아에 톱니가 있으며 양면에 털이 없으나 표면에 털이 약간 있는 것도 있고 엽맥이 뚜렷하게 돌출하며 엽병은 길이 1-3 cm이다. 또한 열매는 은화과로 9-10월에 흑자색으로 성숙한다. 화낭이 자라서 열매로 되며 익으면 식용한다. 꽃은 개화기가 5-6월로 2가화이며, 엽액에서 1개의 화경이 자라고 끝에 3개의 포가 있으며 그 위에 둥근 화낭이 있다. 화낭은 지름이 15 mm내외로서 그 안에 많은 꽃이 들어있다.

좁은잎천선과는 주로 식용이나 관상용으로 이용하는데, 과실(열매)은 우내장이라 하며 완하, 운장의 효능. 치질을 치료목적으로 사용되어 왔으며, 뿌리는 우내장근이라 하여 건비, 익기, 활혈, 거풍의 효능을 보이며, 류머티즘을 치료하는데 사용되고 있다. 또한 경엽(줄기, 잎)은 우내시라 하여, 해독의 효능과 류머티성 관절염, 중기, 사지산언, 타박상등을 치료하는데 이용하고 있다.

본 연구에서는 좁은잎천선과에서 유효성분을 분리 동정하고 antioxidant와 tyrosinase inhibition activity test를 실시하여 항산화 효과를 가지며 미백효과를 갖는 물질을 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck Co. 및 Jusei Co.의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography에는 silica gel(0.0020-0.025 mm, Sigma Co.), normal-phase silica gel column chromatography에는 silica gel 60(0.040-0.063 mm, Merck Co.)이 사용되었다. 분리 과정에서 사용된 TLC(Thin layer chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silicagel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp(254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조 시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25 % NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다.

항산화 활성, 미백 활성 검색에 사용된 UV/Vis spectrophotometer는 Thermo Electron Corporation사의 Multiskan Ex(ELISA reader)를 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT-NMR system, JEOL Co.)과 JNM-ECX 400(FT-NMR system, JEOL Co.)을, NMR 측정 용매는 CIL, Inc.의 NMR 전용 용매로 CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>를 사용하였다.

## 2. 재료

실험에 사용한 좁은잎천선과(시료번호 : 224) 잎, 가지는 2009년 2월과 2010년 6월에 채집하였으며 시료의 동정은 채집하였던 제주 한라수목원에서 이루어졌다. 채집한 좁은잎 천선과 잎, 가지는 분리하여 실온에서 자연 건조시킨 후, 분쇄하여 사용하였다(Figure 4).



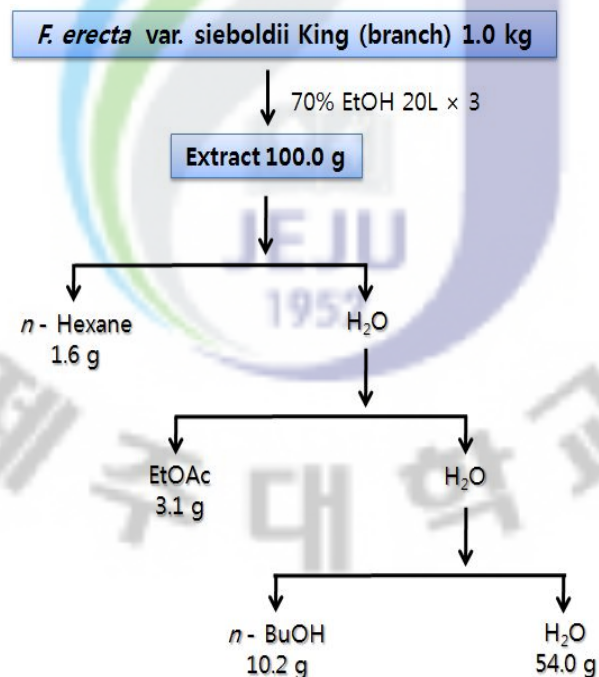
Figure 4. Photograph of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King.

### 3. 추출, 분획 및 분리

#### 3-1. 좁은잎천선과 가지의 추출 및 분획

건조된 좁은잎천선과 가지 1.0 kg을 70% ethanol 20 L 에 침적하여, 실온에서 3일 동안 침출 시켰다. 침출 시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 3회 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% ethanol 추출물 100 g을 얻었다.

얻어진 70 % ethanol 추출물을 H<sub>2</sub>O 1 L 에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O fraction을 얻었다(scheme 1). 또한 2차로 채집한 좁은잎천선과 가지 527.0 g을 같은 방법으로 추출하여 분획을 실시하였다(scheme 2).



Scheme 1. Procedure of first solvent fractionation from *F. erecta* branch

***F. erecta* var. *sieboldii* King (branch) 527.0 g**

↓ 70% EtOH 20L × 3

**Extract 45.2 g**

*n*-Hexane  
2.7 g

H<sub>2</sub>O

EtOAc  
2.3 g

H<sub>2</sub>O

*n*-BuOH  
5.2 g

H<sub>2</sub>O  
25.2 g

Scheme 2. Procedure of first solvent fractionation from *F. erecta* branch.



### 3-2. VLC를 이용한 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중에서 EtOAc층(1.6 g)을 1차 VLC(10 x 5 cm, silica gel, 20~40 mash)에서 Hex→EtOAc→MeOH을 사용하여, 각 용매의 배합비를 5, 10%씩 증감하여 극성을 높이는 순으로 용액을 제조한 뒤 stepwise 용출방법을 사용하였다. 이 결과로 24개의 분획을 얻었다.

또한 2차, 3차 VLC(10 x 5 cm, silica-gel, 20~40 mash)에서 Hex→EtOAc→MeOH을 사용하여, 각 용매의 배합비를 증감하여 마찬가지로 각각 16개의 분획을 얻었다.

### 3-3. Compound 1의 분리과정

1차 VLC에서 F.5 분획물을 용해도 차이에 의해 2개의 fraction으로 나누었으며, 이때 MeOH에 녹지 않는 부분에서 compound 1(14.6mg)을 얻었다. 또한 3차 VLC에서 분획물 F.4(158.0 mg)을 normal phase silicagel로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(Hex/EtOAc=2:1)로 전개시켜 9개의 fraction을 얻었으며, 그 중 F.4-Fr.2에서 9.8 mg 추가적으로 얻었다 (Scheme 3).

### 3-4. Compound 2의 분리과정

2차 VLC에서 분획물 F.5(56.3 mg)을 normal phase silicagel로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=8:1)로 전개시켜 5개의 fraction을 얻었으며, 그 중 F.5-Fr.5에서 compound 2(9.7 mg)을 얻었다(Scheme 4).

### 3-5. Compound 3과 compound 4의 분리과정

3차 VLC에서 분획물 F.2에서 compound 3(23.1 mg)을 얻었으며, 분획물 F.3(94.4 mg)을 용해도 차이에 의해 2개의 fraction으로 나누었으며, 이때 MeOH에 녹지 않는 부분에서 compound 4(9.6 mg)를 얻었다(Scheme 5).

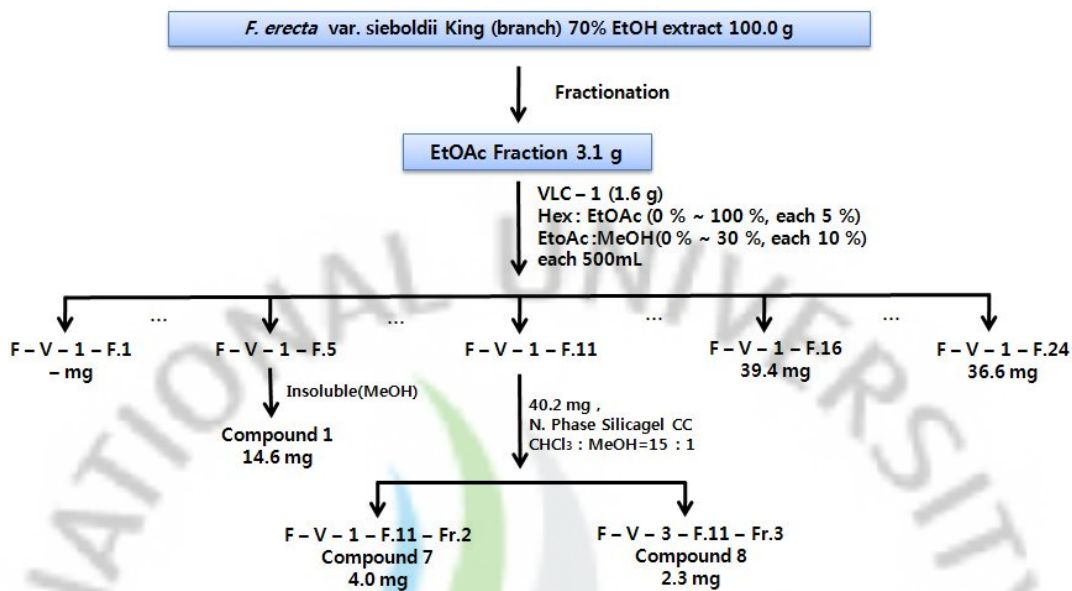
### 3-6. Compound 5과 compound 6의 분리과정

3차 VLC에서 분획물 F.6(85.5 mg)을 normal silica gel CC를 하여 전개용매 (Hex/EtOAc=2:1)로 전개시켜 총 6개의 fraction을 얻었고, 그 중 F.6-Fr.4에서 compound 5(13.6 mg)을 얻었다.

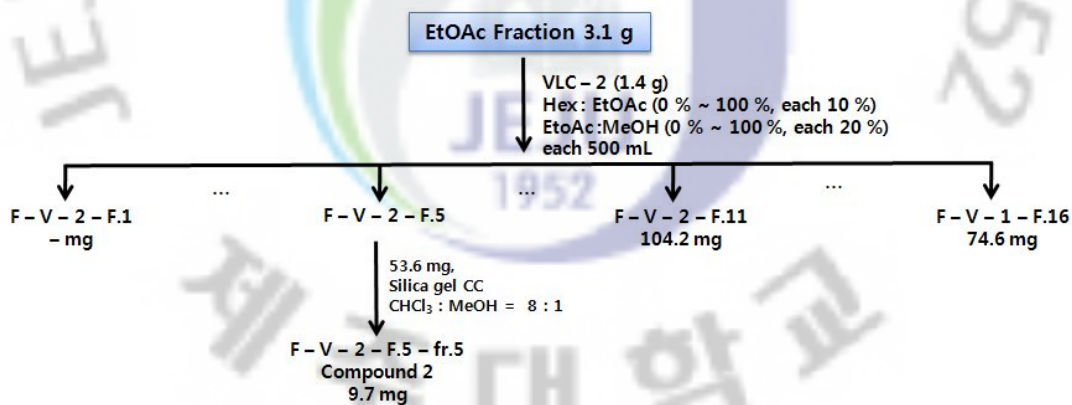
마찬가지로 같은 VLC에서 분획물 F.8(68.8mg)을 normal silica gel CC를 하여 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=5:1)로 전개시켜 7개의 fraction을 얻었고, 그 중 F.8-Fr.6에서 compound 6(4.8 mg)을 얻었다(Scheme 5).

### 3-7. Compound 7과 compound 8의 분리과정

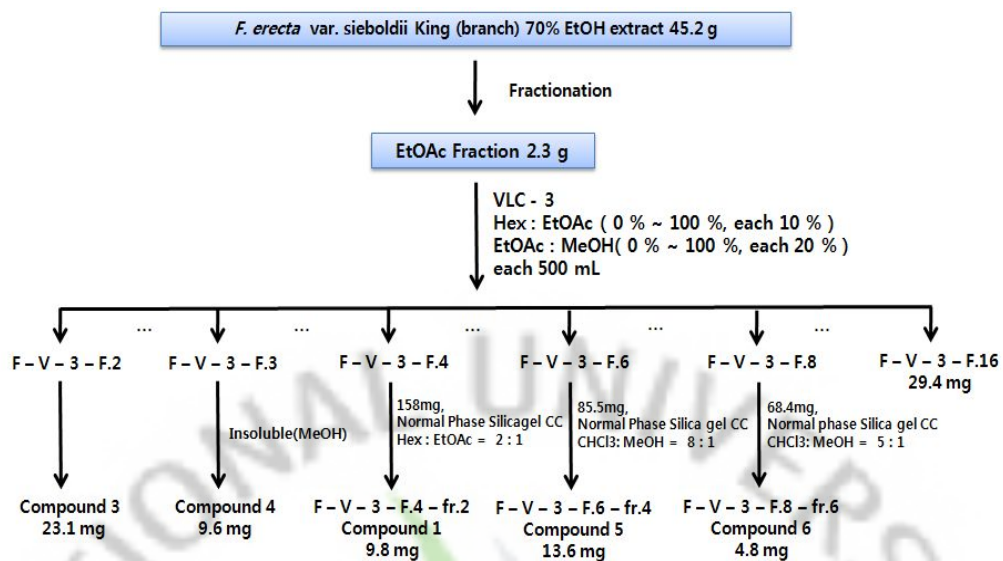
1차 VLC에서 분획물 F.11(40.2mg)을 normal phase silica gel로 충전된 glass column에 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=15:1)로 전개시켜 5개의 fraction을 얻었으며, 그 중 F.11-Fr.2에서 compound 7(4.0 mg)과 F.11-Fr.3에서 compound 8(2.3 mg)을 각각 얻었다(Scheme 3).



Scheme 3. Isolation of compounds 1 and 7-8.



Scheme 4. Isolation of compound 2.



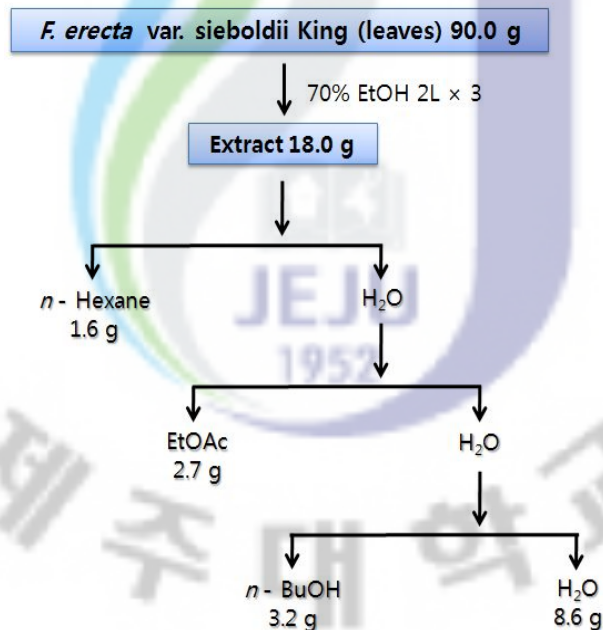
Scheme 5. Isolation of compounds 3-6.

#### 4. 추출, 분획 및 분리

##### 4-1. 좁은잎천선과 잎의 추출 및 분획

건조된 좁은잎천선과 90.0 g을 70% ethanol 2 L 에 침적하여, 실온에서 3일 동안 침출 시켰다. 침출 시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 3회 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 수욕상에서 rotary vacuum evaporator 로 농축하여 70% ethanol 추출물 100 g을 얻었다.

얻어진 70% ethanol 추출물을 H<sub>2</sub>O 1 L 에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O fraction을 얻었다(scheme 6).



Scheme 6. Procedure of solvent fractionation from *F. erecta* leaves.

#### 4-2. VLC를 이용한 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 EtOAc분획층(2.7 g)을 좁은잎천선과 가지와 같은 방법으로 VLC(10 x 5 cm, silica gel, 20~40 mash)에서 Hex→EtOAc→MeOH을 사용하여, 각 용매의 배합비를 10%씩 증감하여 극성을 높이는 순으로 용액을 제조한 뒤 stepwise 용출방법을 사용하였다. 이 결과로 17개의 분획을 얻었다.

#### 4-3. Compound 9의 분리과정

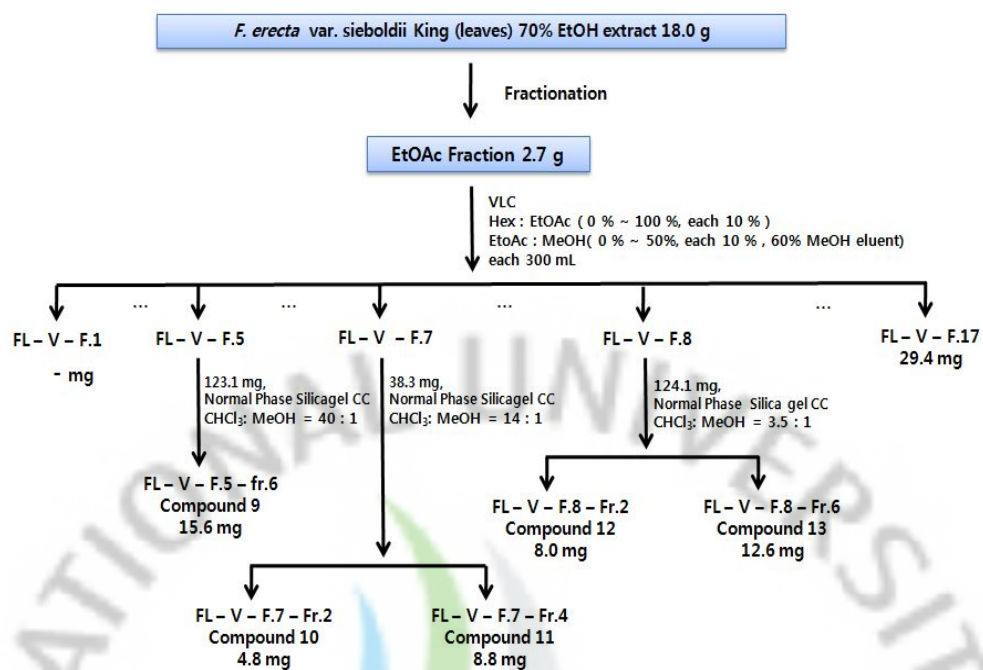
VLC에서 분획물 F.5(123.1 mg)을 normal phase silica gel로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=40:1)로 전개시켜 7개의 fraction을 얻었으며, 그 중 F.5-Fr.6에서 15.6 mg 추가적으로 얻었다(Scheme 7).

#### 4-4. Compound 10과 compound 11의 분리과정

또한 VLC에서 분획물 F.7(38.3 mg)을 normal phase silica gel로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=14:1)로 전개시켜 5개의 fraction을 얻었으며, 그 중 F.7-Fr.2과 F.7-Fr.4에서 각각 compound 10(4.8 mg), compound 11(8.8 mg)을 얻었다(Scheme 7).

#### 4-5. Compound 12와 compound 13의 분리과정

VLC에서 분획물 F.8(124.1 mg)을 normal phase silica gel로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=3.5:1)로 전개시켜 7개의 fraction을 얻었으며, 그 중 F.8-Fr.2과 F.7-Fr.6에서 각각 compound 12(8.0 mg), compound 13(12.6 mg)을 얻었다(Scheme 7).



Scheme 7. Isolation of compounds 9–13.

## 5. 활성 검색

### 5-1. DPPH radical scavenging test

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색방법으로 특히 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 방법이다. 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 515 ~ 517 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해 주는 전자 공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색이 점점 없어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다.

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois방법<sup>6)</sup>을 응용하여 다음과 같이 실행하였다.

먼저 시료를 2 mg/mL 의 농도로 DMSO-*d*<sub>6</sub> 또는 DMSO-*d*<sub>6</sub>와 50 % EtOH을 용매로 하여 녹인다. DPPH 시약은 2 mM이 되도록 녹여준 뒤 이를 가지고 희석액을 만든다. 희석액은 총 50 mL를 만들 때 95 % EtOH 50 mL를 넣어 흡광도가 0.94에서 0.97이 되도록 맞추어 사용하였다. 맞춰진 DPPH 용액 0.180 mL에 농도가 각각 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL 이 되도록 희석한 시료를 0.02 mL를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 UV/Vis 분광광도계를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거작용(%)을 구한다. 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료의 농도 (RC<sub>50</sub>)를 계산하였다. 이때 사용된 대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

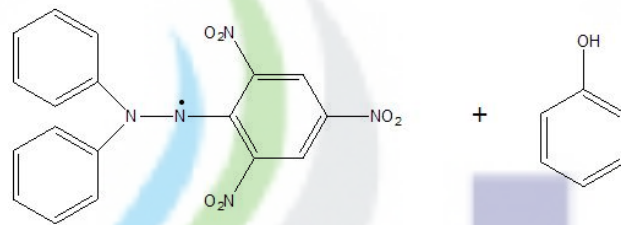


$$\text{Scavenging effect (\%)} = 1 - \frac{B - C}{A} \times 100$$

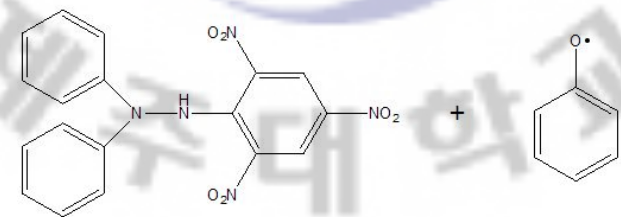
A : DPPH의 흡광도

B : DPPH와 시료반응액의 흡광도

C : 시료 자체의 흡광도



DPPH radical (violet, 525 nm)



Diphenylpicrylhydrazine  
(yellow)

Phenoxy  
(radical)

Figure 5. Scavenging of the DPPH radical by phenol

## 5-2. Tyrosinase inhibition test

Tyrosine은 효소인 tyrosinase에 의하여 멜라닌 생성의 전구체가 되는 DOPA와 dopaquinone으로 대사된다. 따라서 tyrosinase의 억제제는 피부의 멜라닌 색소의 조절을 통하여 피부 미백 효과를 기대할 수 있다.

Tyrosinase inhibition tests는 DOPA chrome법<sup>4)</sup>을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 사용하였고, 사용된 기질로써 L-tyrosine(L-3[Hydroxyphenyl]alanine)을 사용하였다.

실험방법은 buffer 0.106 mL(pH 6.8), sample 0.02 mL(2 mg/mL), L-tyrosine(0.3 mg/mL) 0.07 mL, mushroom tyrosinase( 1250 units/mL) 0.1 mL을 넣고, 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 492 nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료는 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL의 농도로 각각 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC<sub>50</sub> 을 구하였다. 이때 사용된 대조군으로는 arbutin (2 mg/mL)을 사용 하였다.

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

A : sample 대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

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

C : 효소를 첨가하여 반응한 후의 sample의 흡광도

D : 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 sample의 흡광도

### 5-3. 반응 속도 결정 실험

Compound 2와 compound 8을 갖고 반응 속도를 결정하기 위하여 기질의 농도 및 compound 2와 compound 8의 농도를 변화시키면서 tyrosinase 저해 활성 검색 실험을 실시하였다<sup>7)</sup>. 기질인 tyrosine의 농도는 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 0.6 mM로 변화시켰고, 저해제인 compound 2과 compound 8의 농도를 0  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 변화시키면서 측정 하였다. 효소 및 완충용액의 양은 tyrosinase 저해활성 측정방법과 동일하게 실시 하였다.



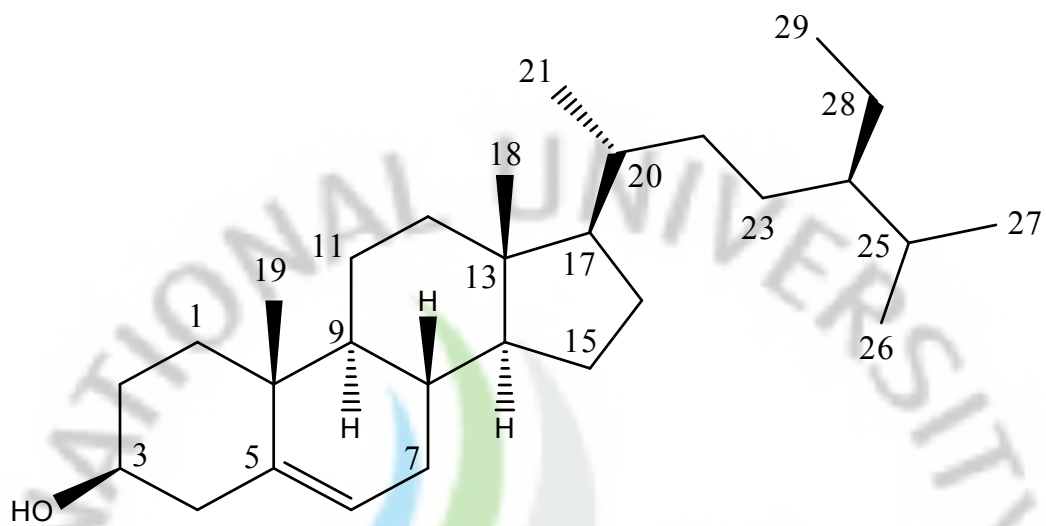
### III. 결과 및 고찰

#### 1. 좁은잎천선과 가지에서 분리된 화합물 구조 결정.

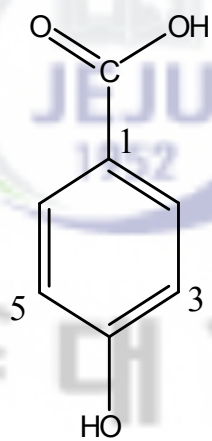
##### 1-1. Compound 1과 compound 2의 구조해석

Compound 1은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  5.35(1H, d,  $J = 5.27$ )은  $sp^2$  혼성을 갖는 olefin구조의 proton이 관찰되었고,  $\delta$  3.53(1H, m)의 signal은 산소와 인접한 위치의 methine의 proton피크로 예측하였다. 또한,  $\delta$  2.28(2H, m)와  $\delta$  2.00(2H, m)의 signal은 methylene의 proton으로 예측하였으며, 6개의 메틸기의 signal인  $\delta$  1.01(3H, s), 0.92(3H, d,  $J = 6.64$ ), 0.88 ~ 0.77(9H, m), 0.68(3H, s)가 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ 과 DEPT-NMR spectrum에서  $\delta$  140.9와  $\delta$  122.0은 각각 4차탄소와 CH signal임을 알 수 있었고,  $\delta$  72.0의 signal은 산소에 인접한 위치의 methine의 특성피크로 예측 할 수 있었다. 이러한 자료를 바탕으로 문헌<sup>8)</sup>과 비교하여  $\beta$ -sitosteol로 동정하였다.(Figure 6, 7)

Compound 2는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 두 개의 피크인  $\delta$  7.84 (1H, d,  $J = 8.7$ ) 및  $\delta$  6.78 (1H, d,  $J = 8.9$ )이 관찰 되었으며, coupling constant 값으로 보아 두 피크는 benzen ring에서 *ortho*-coupling을 하는 proton으로 예측되었고,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  170.9의 signal로 보아 carbonyl기의 탄소가 존재할 것이라 예상하였으며, 2개의 methine 탄소인  $\delta$  132.9,  $\delta$  115.9가 관찰되었다. 따라서 Compound 2를 문헌<sup>9)</sup>과 비교하여 *p*-hydroxybenzoic acid로 동정하였다.(Figure 8, 9)



Compound 1



Compound 2

Table 3. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **1** and **2** (400 MHz CDCl<sub>3</sub> and CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>OD + CDCl<sub>3</sub>)

No.	compound <b>1</b>		compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		37.4		123.7
2		32.1	7.84 (1H, d, 8.7)	132.9
3	3.53 (1H, m)	72.0	6.78 (1H, d, 8.9)	115.9
4		42.5		162.9
5		140.9	6.78 (1H, d, 8.9)	115.9
6	5.35 (1H, d, 5.27)	122.0	7.84 (1H, d, 8.7)	132.9
7		32.0		170.9
8		31.8		
9		50.3		
10		36.7		
11		21.3		
12		39.9		
13		42.5		
14		56.9		
15		24.5		
16		28.5		
17		56.2		
18	0.68 (3H, s)	12.1		
19	1.01 (3H, s)	20.1		
20		36.3		
21	0.92 (3H, d, 6.64)	19.0		
22		34.1		
23		26.1		
24		46.0		
25		29.2		
26	0.87 ~ 0.78 (9H, m)	19.6		
27	0.87 ~ 0.78 (9H, m)	19.2		
28		23.2		
29	0.87 ~ 0.78 (9H, m)	12.2		

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

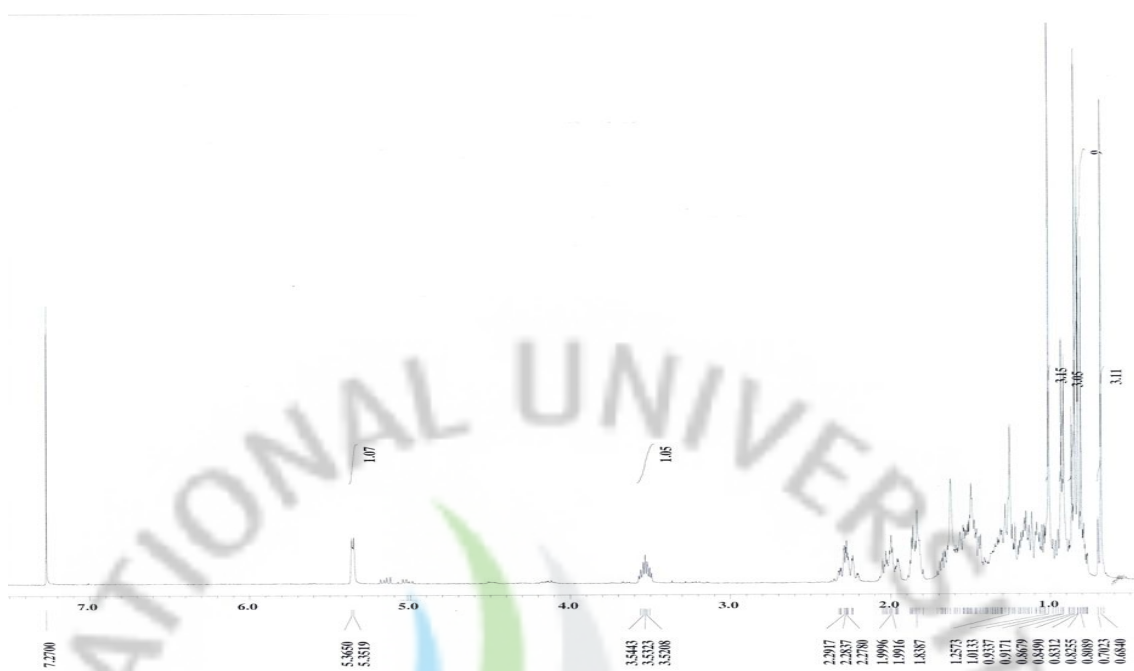


Figure 6.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$

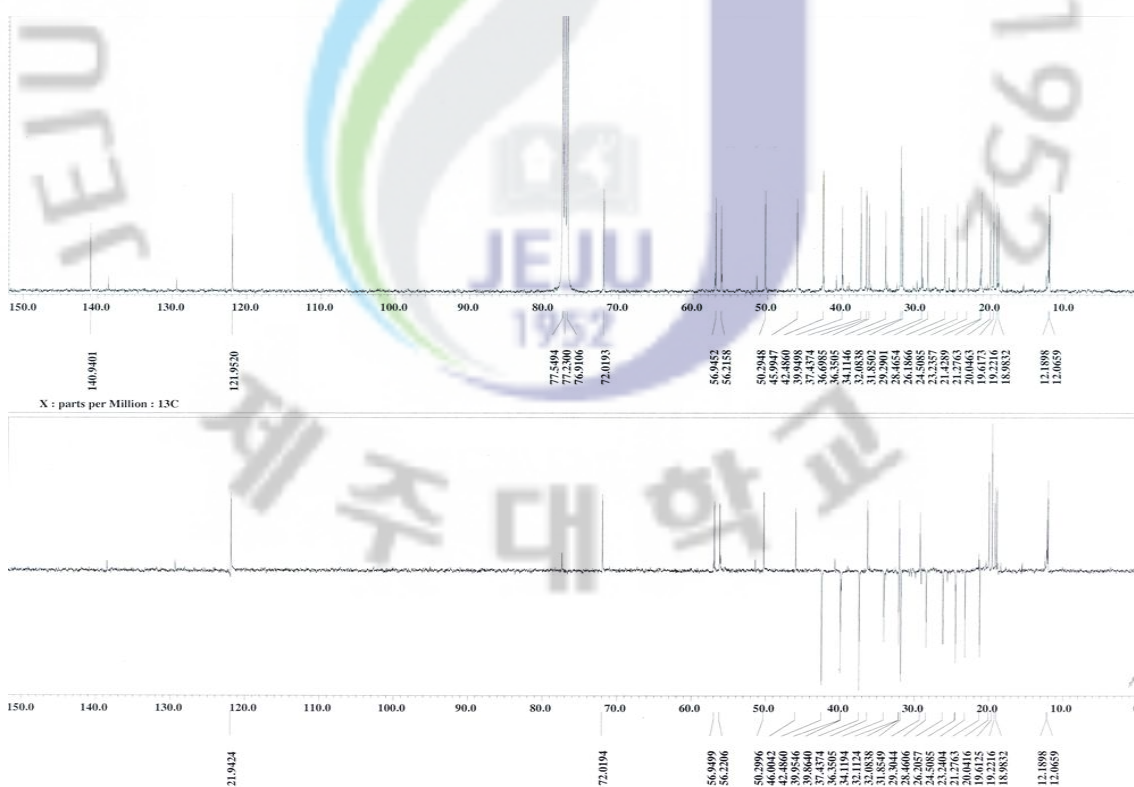


Figure 7.  $^{13}\text{C}$ -NMR &  $135^\circ$  DEPT-NMR spectra of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$

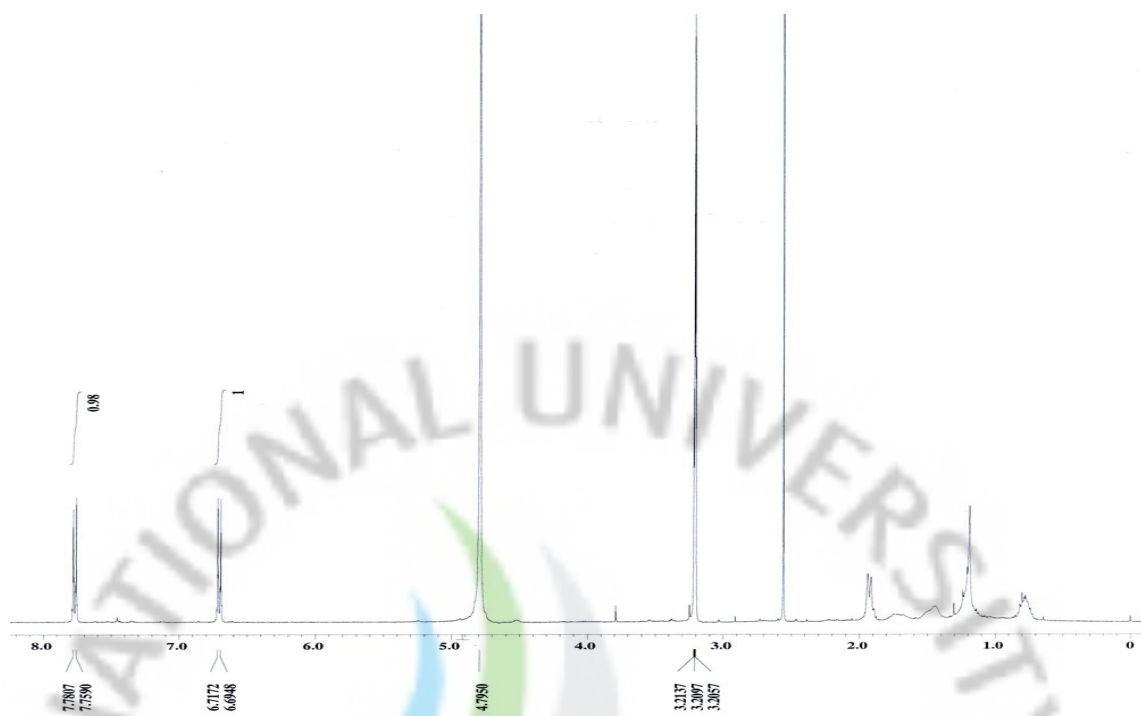


Figure 8.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

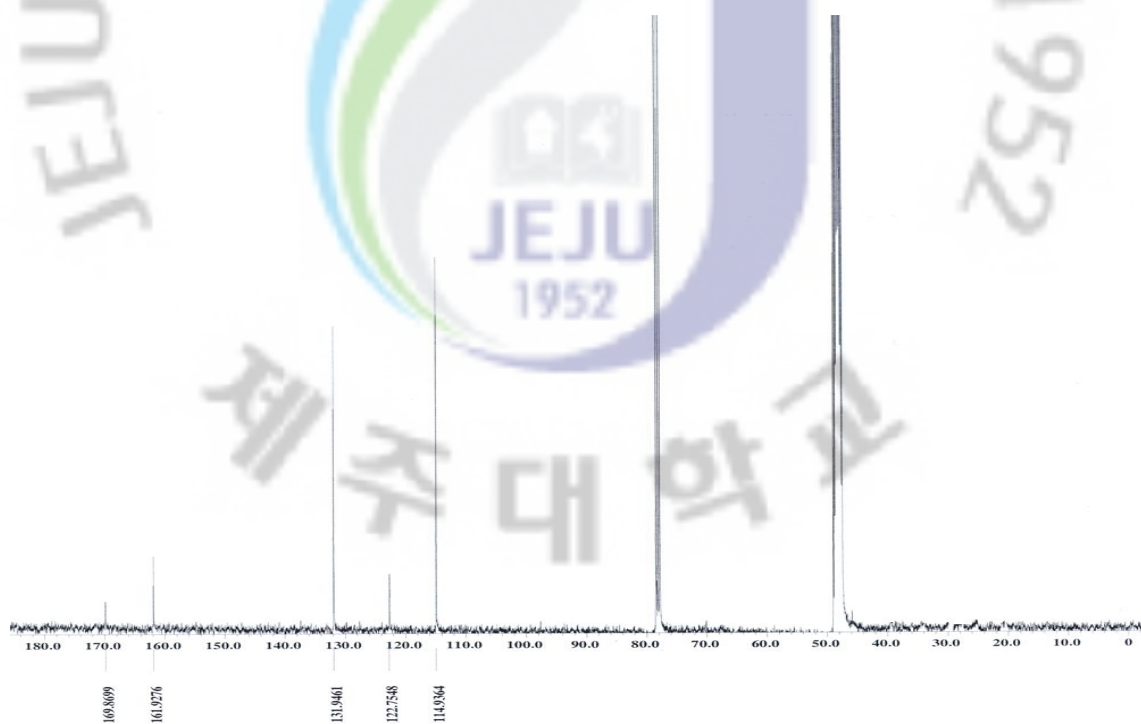


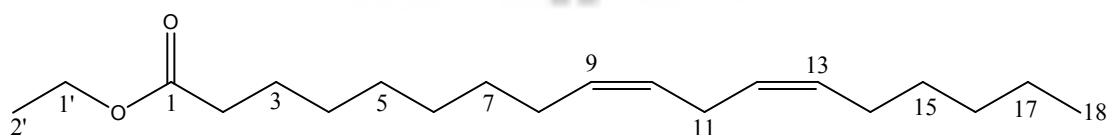
Figure 9.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$



## 1-2. Compound 3의 구조해석

Compound 3은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 20개의 탄소 피크와  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  4.12(2H, m)의 피크를 갖는 1개의 ethoxy기 포함하여  $\delta$  0.89(3H, t), 0.90 ~ 1.64 (20H, m)에서 multiplet으로 나타나는 것으로 보아 methyl 기와 aliphatic hydrocarbonds에 있는 methylene 기가 있음을 예측 할 수 있었으며,  $\delta$  2.05 (4H, m)에서 4개의 proton이 multiplet으로 나타나는 것으로 보아 탄소-탄소 이중결합 옆에 methylene기가 있음을 예측하였다. 또한  $\delta$  2.29(2H, t,  $J = 7.56, 7.32$ )에서 2개의 proton이 triplet으로 나타나는 것으로 보아  $\text{R}-\text{CH}_2^*-\text{CH}_2$  의 형태로 결합되어 있다는 것을 예측 할 수 있었다.  $\delta$  2.77(2H, m)에서 관찰되는 2개의 proton과 multiplet으로 나타나는 것으로 보아  $=\text{CH}-\text{CH}_2^*-\text{CH}=\text{}$  의 형태를 갖는 olefin탄소의 proton임을 예측하였으며,  $\delta$  5.36(4H, m)에서 2개의 proton이 multiplet으로 나타나는 것으로 보아 methine기가 있음을 예측 할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  174.1의 signal은 carboxylic acid임을 알 수 있었으며,  $\delta$  60.4는 ethyl기의 탄소임을 예측 할 수 있었다. DEPT-NMR spectrum에서 olefin 탄소의 4개의 signal인  $\delta$  130.1, 130.3, 128.2, 128.1은 이중결합의 3차 탄소인 CH임을 알 수 있었으며,  $\delta$  34.6 ~ 22.8의 12개의 피크는 2차 탄소인 methylene기가 있음을 확인 할 수 있었다. 또한  $\delta$  14.5와  $\delta$  14.3의 피크는 methyl기가 2개 있음을 확인하였다. 이상의 자료를 종합해 볼때 기본골격 18:2의 구조를 갖는 지방산임을 예측하였으며, 문헌<sup>10)</sup>과 비교하여 compound 3을 ethyl cis,cis-9,12-octadecadienoate, 즉, ethyl linoleate로 동정하였다.

(Figure 10, 11, 12)



Compound 3

Table 4. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compound **3** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD and CDCl<sub>3</sub>)

No.	compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		174.1
2	2.29 (2H, t, 7.56, 7.32)	34.6
3	1.64 (2H, m)	25.2
4	1.28 ~ 1.19 (14H, m)	27.4
5	1.28 ~ 1.19 (14H, m)	29.3
6	1.28 ~ 1.19 (14H, m)	29.8
7	1.28 ~ 1.19 (14H, m)	29.9
8	2.05 (4H, m)	27.4
9	5.36 (4H, m)	130.3
10	5.36 (4H, m)	128.1
11	2.77 (2H, m)	25.8
12	5.36 (4H, m)	128.2
13	5.36 (4H, m)	130.1
14	2.05 (4H, m)	41.5
15	1.28 ~ 1.19 (14H, m)	29.6
16	1.28 ~ 1.19 (14H, m)	31.7
17	1.28 ~ 1.19 (14H, m)	22.8
18	0.80 (3H, m)	14.3
1'	4.12 (2H, m)	60.4
2'		14.4

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

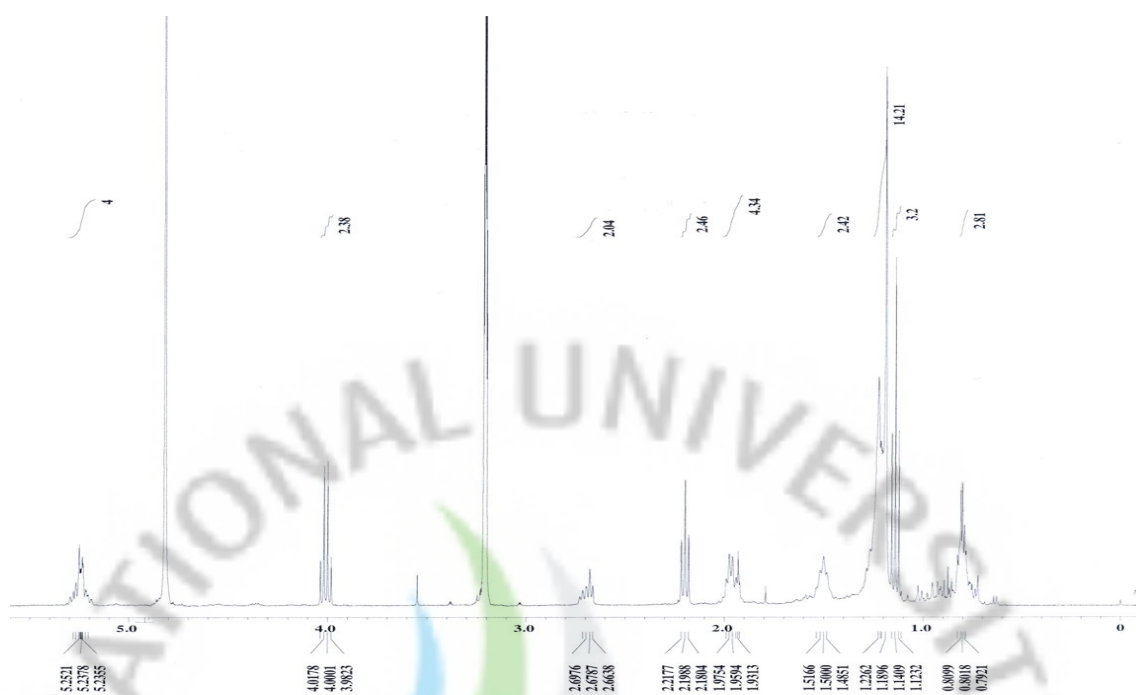


Figure 10.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

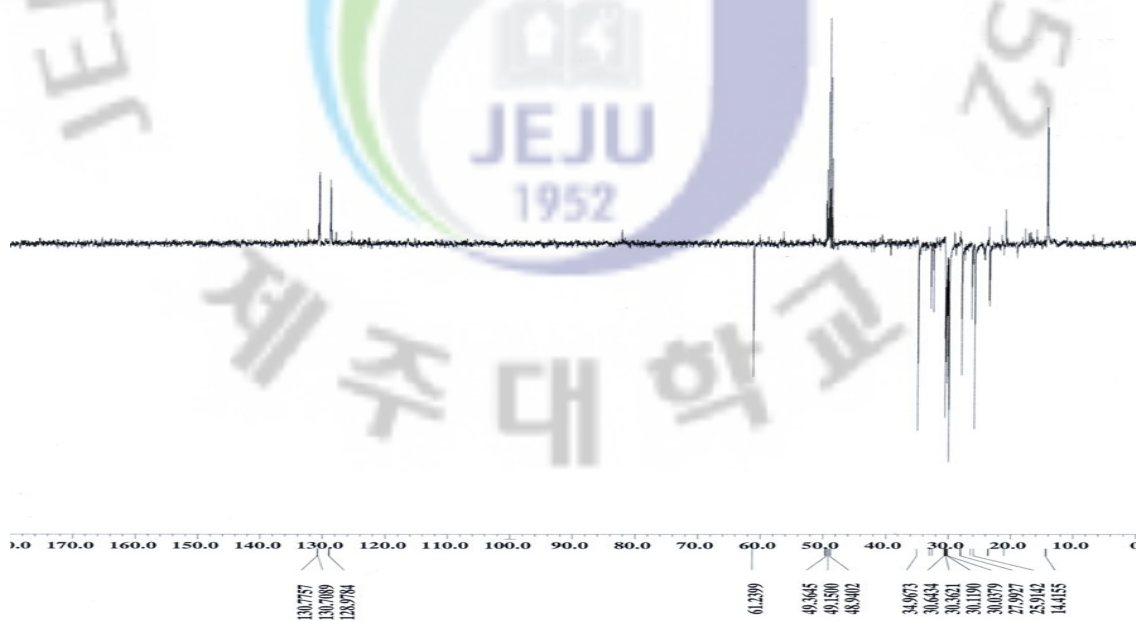


Figure 11.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

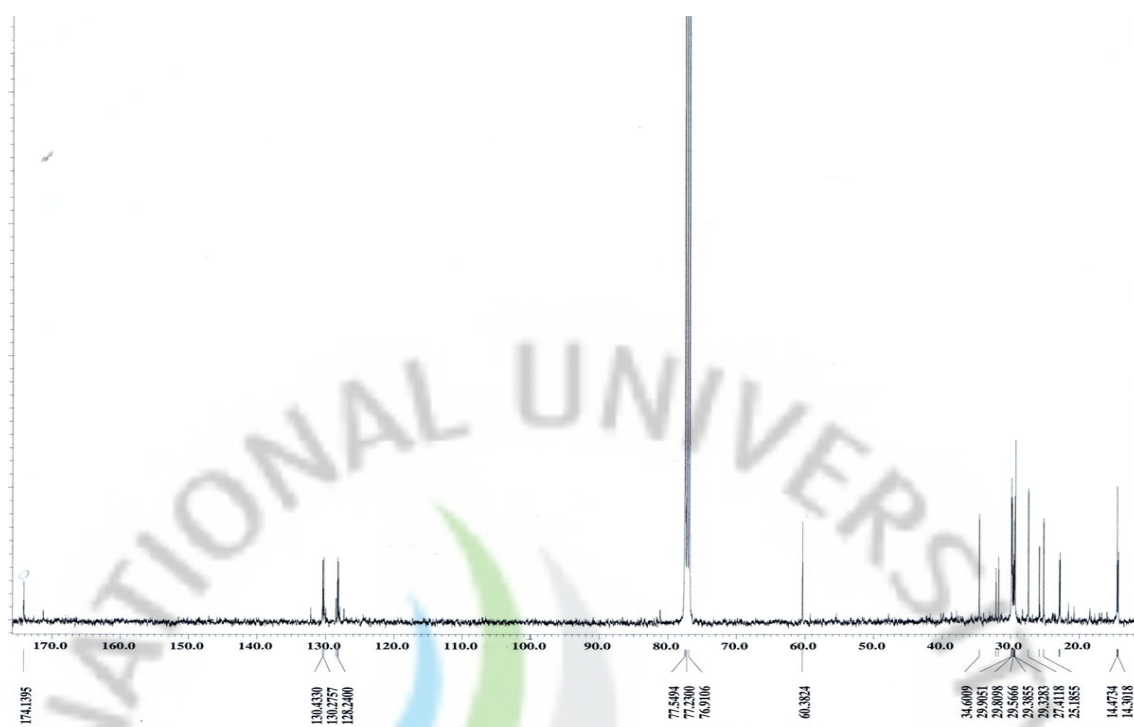


Figure 12.  $^{135}\text{DEPT-NMR}$  spectrum of compound **3** in  $\text{CDCl}_3$



Table 5. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compound **4** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)

No.	compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		38.6
2		23.8
3	4.51 (1H, m)	81.1
4		37.9
5		55.4
6		18.4
7		33.0
8		40.2
9		47.8
10		37.0
11		23.6
12	5.13 (1H, m)	124.5
13		139.8
14		42.2
15		26.8
16		29.9
17		34.0
18		59.2
19		39.8
20		39.8
21		31.4
22		41.7
23	0.80 (3H, s)	28.3
24	1.01 (3H, s)	17.0
25	0.98 (3H, s)	15.9
26	0.90 ~ 0.84 (12H, m)	17.1
27	1.07 (3H, s)	23.4
28	0.90 ~ 0.84 (12H, m)	29.0
29	0.90 ~ 0.84 (12H, m)	17.7
30		21.6
1'		171.3
2'	2.06 (3H, s)	21.5

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

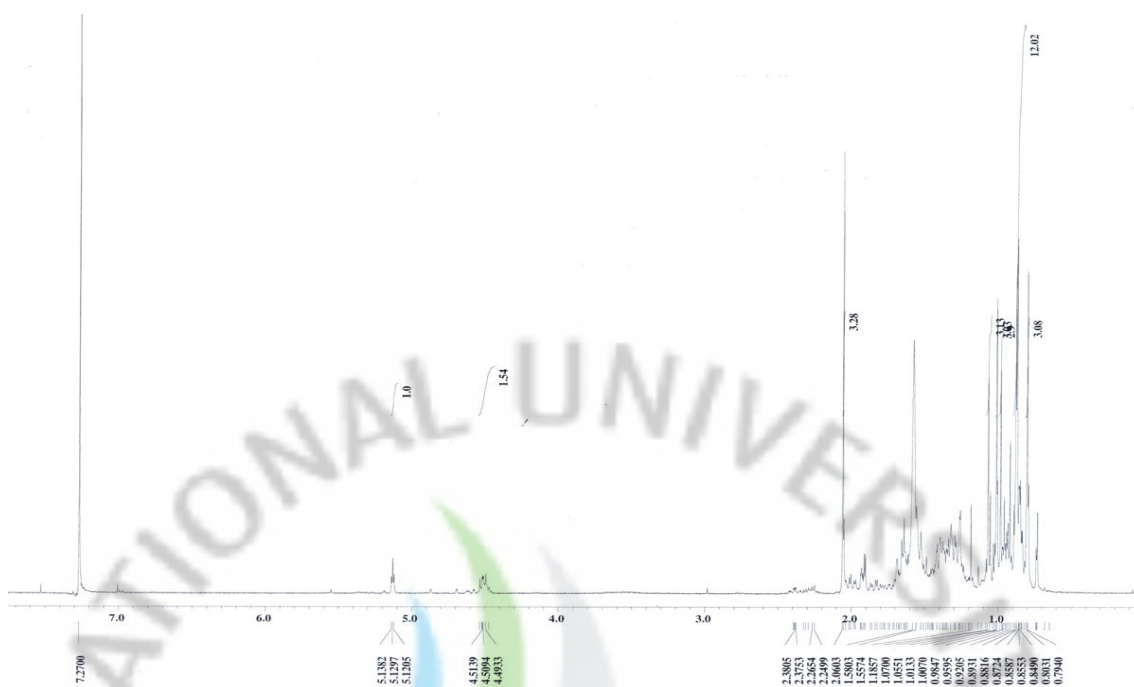


Figure 13.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$

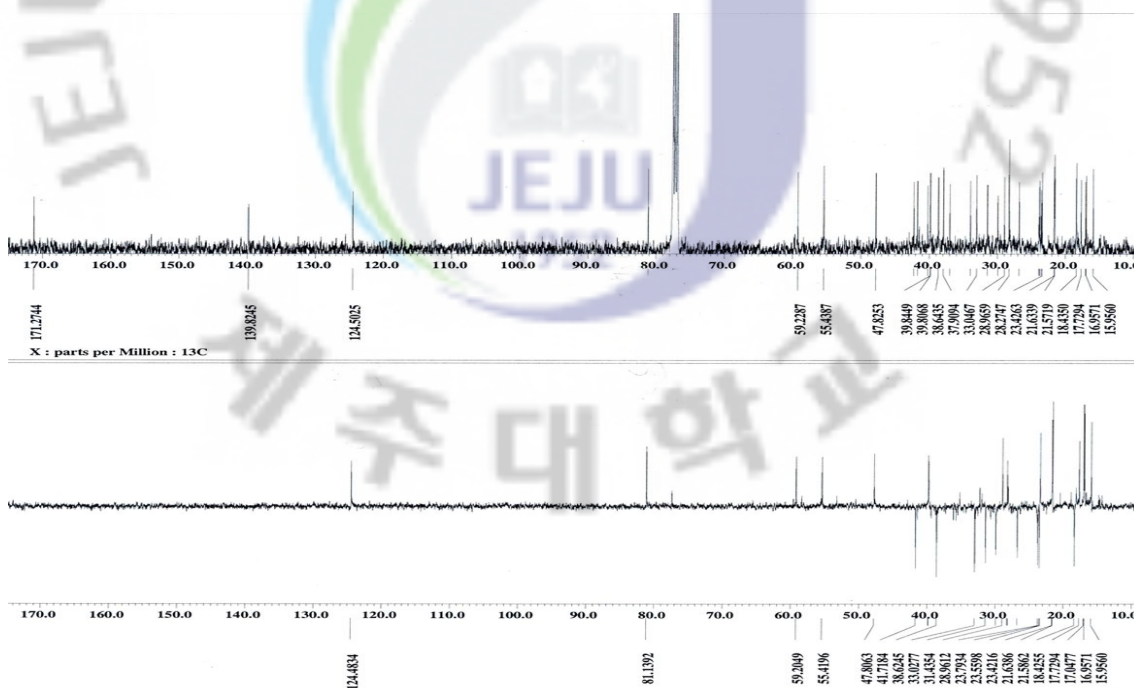
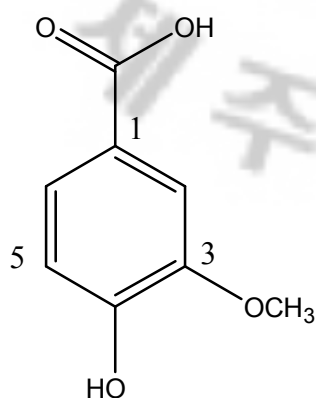


Figure 14.  $^{13}\text{C}$ -NMR &  $135^\circ$  DEPT-NMR spectra of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$

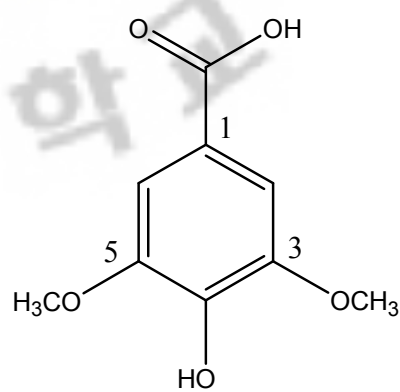
#### 1-4. Compound 5과 compound 6의 구조해석

Compound 5의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.47 (1H, d,  $J = 1.60$ ), 7.47 (1H, dd,  $J = 2.06, 7.33$ ), 6.76 (1H, d,  $J = 8.70$ )의 피크는 *ortho, meta*-coupling 하는 것으로 보아 서로 인접해있는 proton으로 benzen ring를 갖는 구조로 예측되었으며,  $\delta$  3.81 (3H, s)의 피크는 3개의 proton이 singlet을 나타내는 것으로 보아 methoxy기로 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  170.6의 피크는 carbonyl기의 탄소로 예측되었고,  $\delta$  147.4 및  $\delta$  152.3의 피크가 deshielding 된 것으로 보아 산소가 인접하여 결합된 탄소로 예상되었다. 이상의 자료를 종합해 볼 때  $^1\text{H}, ^{13}\text{C-NMR}$  data를 문헌<sup>14)</sup>과 비교한 결과 compound 5는 vanillic acid로 동정하였다. (Figure 15, 16)

Compound 6에 대한  $^1\text{H-NMR}$  spectrum과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 살펴보면,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.28 (1H, s)가 관찰되어 benzen ring를 갖는 구조로 예측되었고,  $\delta$  3.85(3H, s)의 signal은 6개의 proton이 singlet으로 나타나는 것으로 보아 methoxy기가 2개 있는 것으로 예측되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  172.8의 carboxyl기의 탄소 signal이 관찰되었으며, methoxy기의 탄소 signal인  $\delta$  55.0가 관찰되었다. 또한, methine 탄소인  $\delta$  106.1이 관찰되었다. 이러한 정보를 바탕으로 문헌<sup>15,16,17)</sup>과 비교한 결과 compound 6는 syringic acid로 동정하였다. (Figure 17, 18)



Compound 5



Compound 6



Table 6. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **5** and **6** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD and CD<sub>3</sub>OD+CDCl<sub>3</sub> )

No.	compound 5		compound 6	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		125.1		122.9
2	7.47(1H, d, 1.60)	115.6	7.28 (1H, s)	106.1
3		152.3		146.6
4		148.5		138.6
5	6.76 (1H, d, 8.70)	113.6		146.6
6	7.47(1H, dd, 7.33, 2.06)	123.8	7.28 (1H, s)	106.1
7		170.6		172.8
OCH <sub>3</sub>	3.81(3H, s)	56.2	3.78 (3H, s)	55.0

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

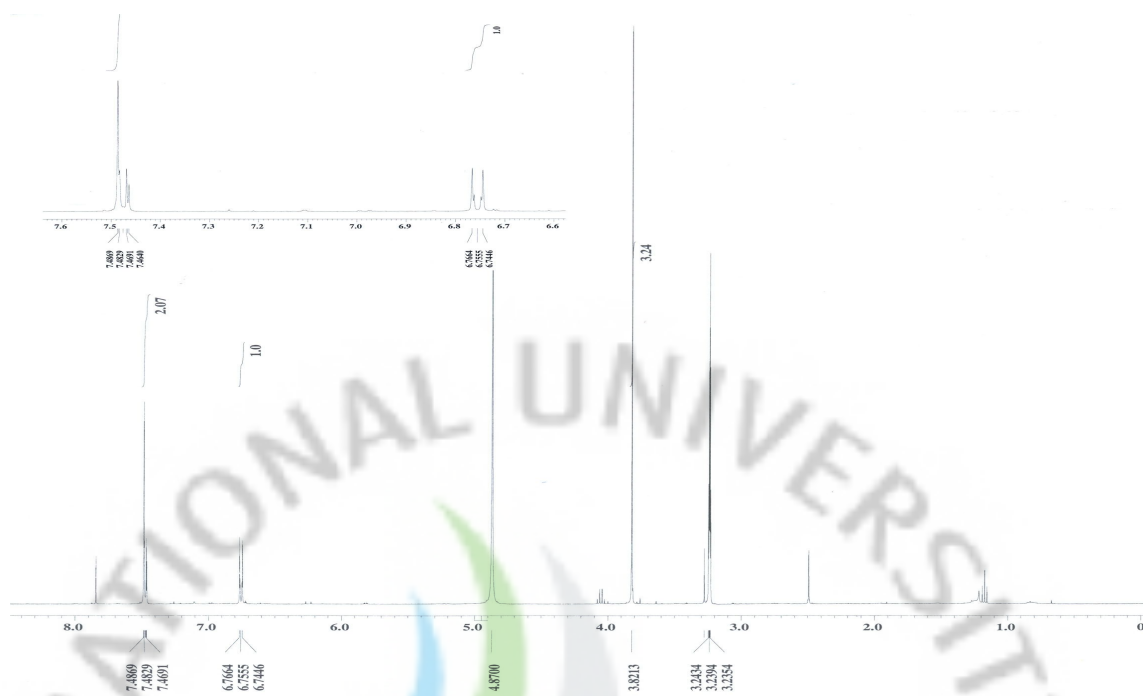


Figure 15.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

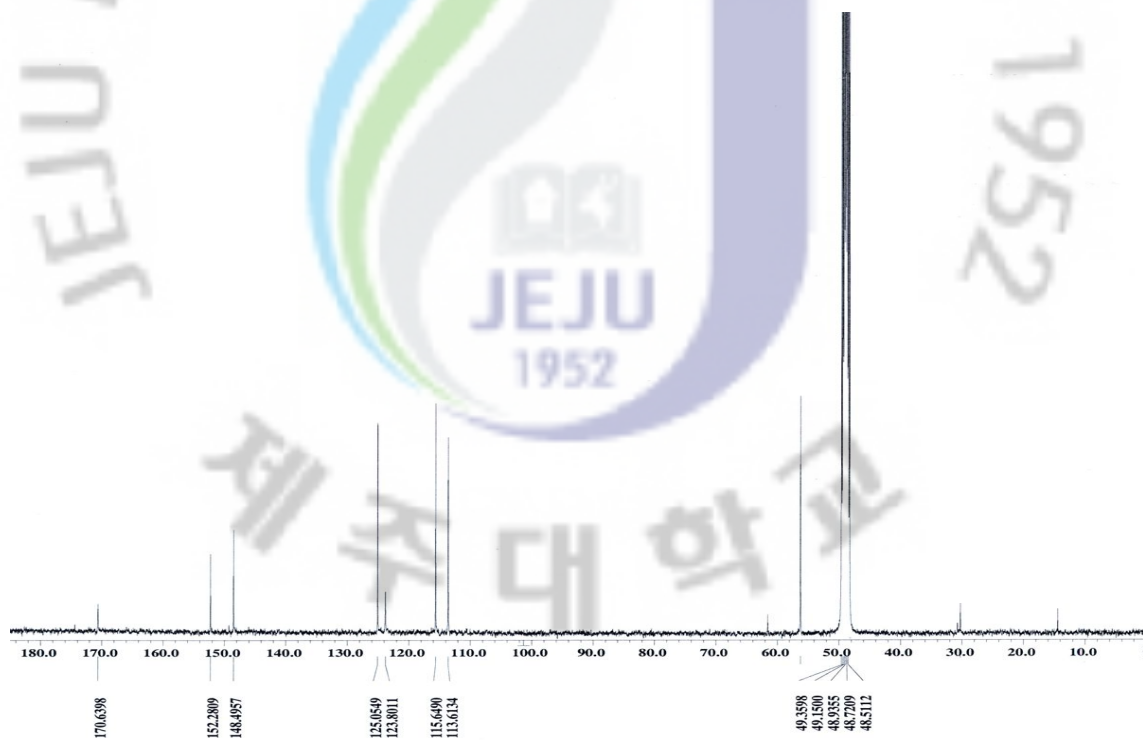


Figure 16.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound 5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

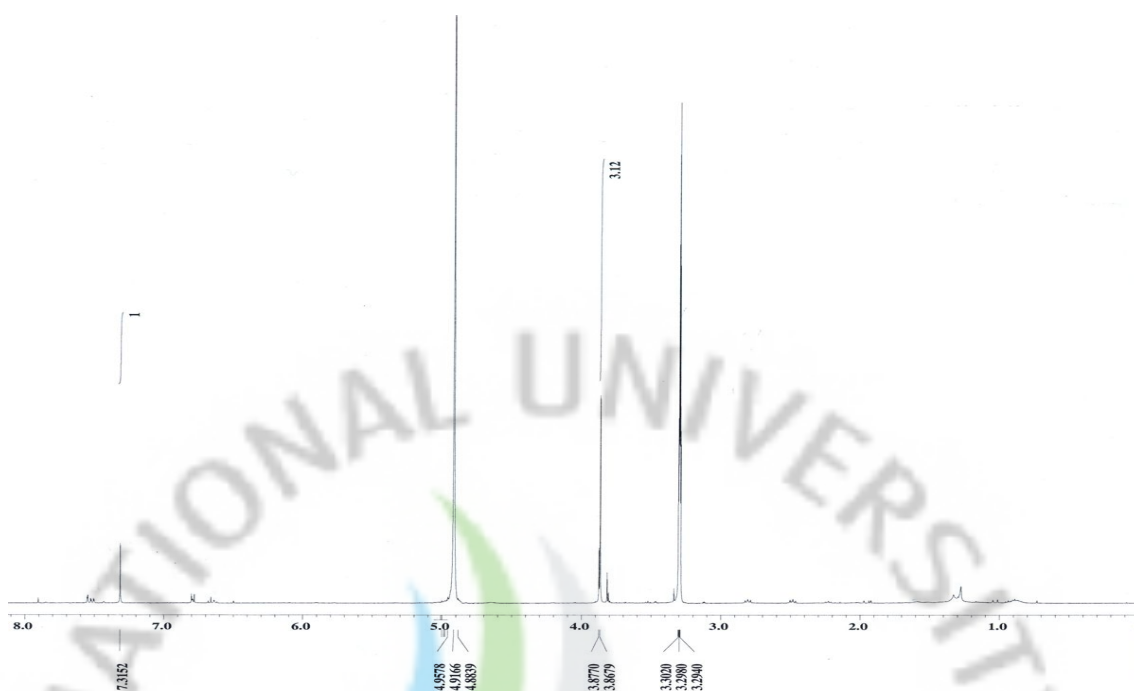


Figure 17.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **6** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

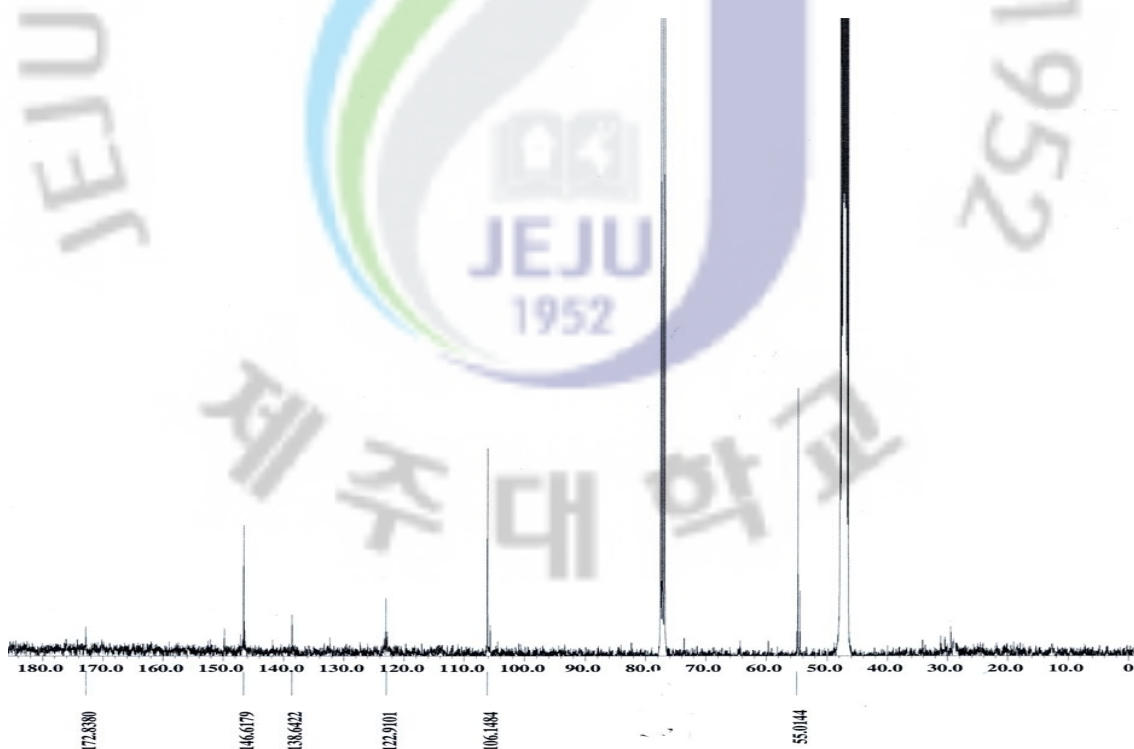


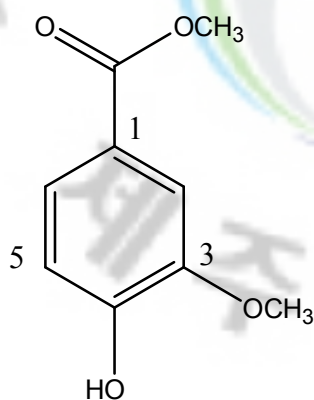
Figure 18.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **6** in  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$

### 1-5. Compound 7과 compound 8의 구조해석

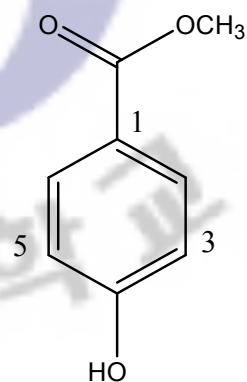
Compound 7에 대한  $^1\text{H-NMR}$  spectrum을 살펴보면,  $\delta$  3.80 (3H,s), 3.78(3H,s)에서 2개의 methoxy기가 관찰되었으며 한 탄소 중심으로 *ortho*, *meta*-coupling된 이중선 피크인  $\delta$  7.45(1H, d,  $J = 1.83$ ), 7.41(1H, dd,  $J = 1.83, 8.24$ ), 6.84(1H, d,  $J = 8.24$ )가 관찰되어 benzen ring를 갖는 화합물구조로 예측되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 2개의 methoxy기인  $\delta$  55.6, 51.7 탄소 피크가 관찰되었으며,  $\delta$  166.1는 carbonyl기의 carbon signal로 예측되었다. 또한 3개의 methine 탄소인  $\delta$  119.8, 115.3, 112.4가 관찰 되었다. 이러한 결과로 문헌<sup>18)</sup>과 비교한 결과 compound 7은 methyl vanillate로 동정되었다.

(Figure 19, 20)

Compound 8에 대한  $^1\text{H-NMR}$  spectrum과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 볼 때 benzen고리에 작용기가 결합된 형태로 compound 2의  $^1\text{H-NMR}$  &  $^{13}\text{C-NMR}$ 의 signal 값이 유사하였으나,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  3.89 (3H, s)의 methoxy기의 proton이 관찰되어, 문헌<sup>19)</sup>과 비교한 결과 compound 8은 Methyl *p*-hydroxybenzoate로 동정하였다. (Figure 21, 22)



Compound 7



Compound 8

Table 7. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **7** and **8** (400 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub> and CDCl<sub>3</sub> )

No.	compound <b>7</b>		compound <b>8</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		123.5		122.8
2	7.45 (1H, d, 1.83)	115.3	7.96(2H, d, 8.47)	132.1
3		147.5	7.96(2H, d, 8.47)	115.4
4		152.3		160.1
5	6.84 (1H, d, 8.24)	112.4	6.87(2H, d, 8.70)	115.4
6	7.41 (1H, dd, 8.24, 1.83)	119.8	6.87(2H, d, 8.70)	132.1
7		166.1		167.1
OCH <sub>3</sub>	3.80 (3H, s)	55.6	3.90 (3H, s)	52.1
OCH <sub>3</sub>	3.78 (3H, s)	51.7		

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub> and CDCl<sub>3</sub> solution at 400 and 100 MHz, respectively.

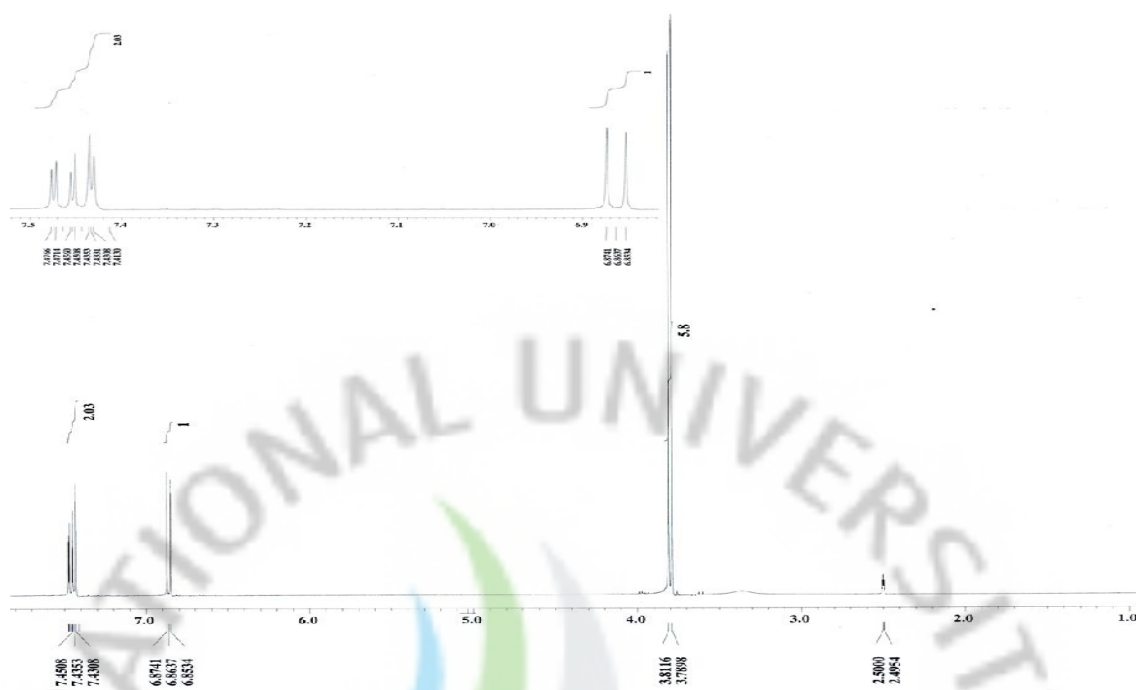


Figure 19.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{DMSO}-d_6$

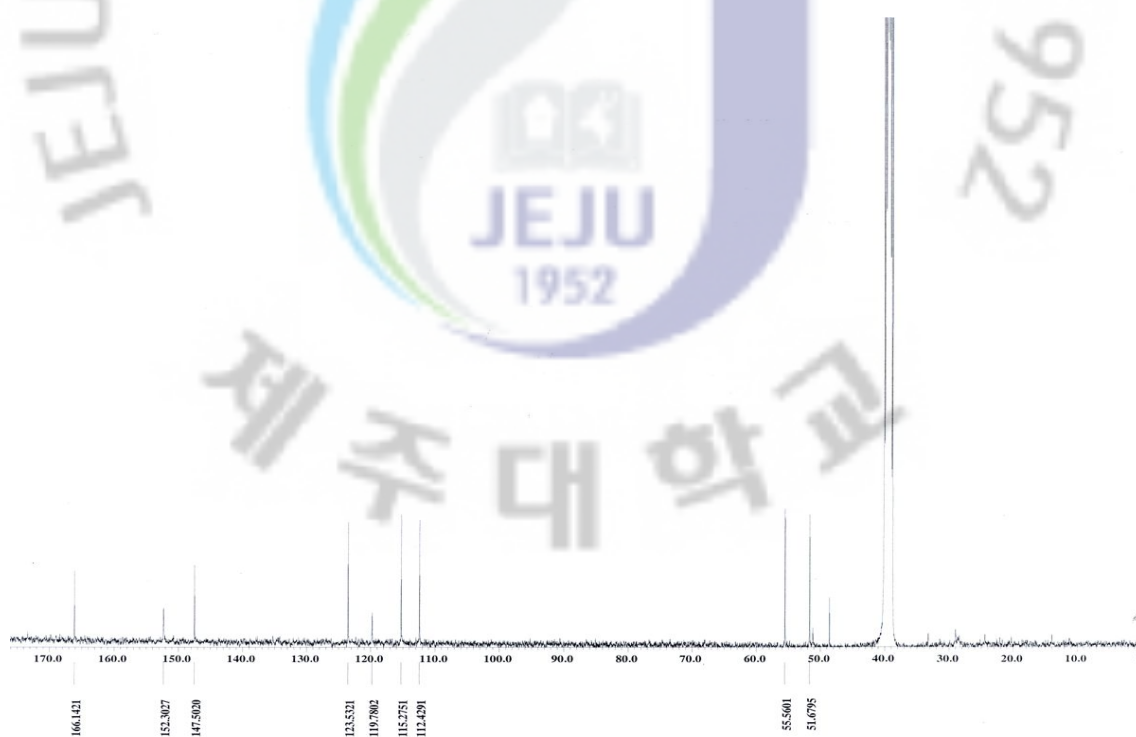


Figure 20.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{DMSO}-d_6$

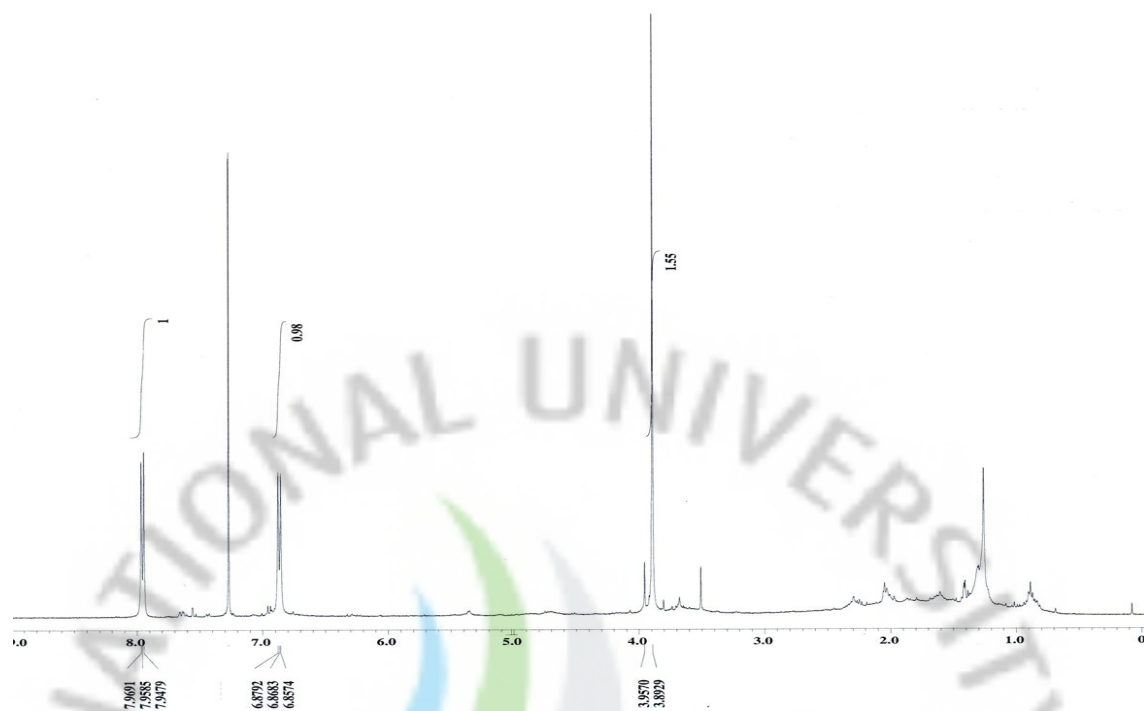


Figure 21.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **8** in  $\text{CDCl}_3$

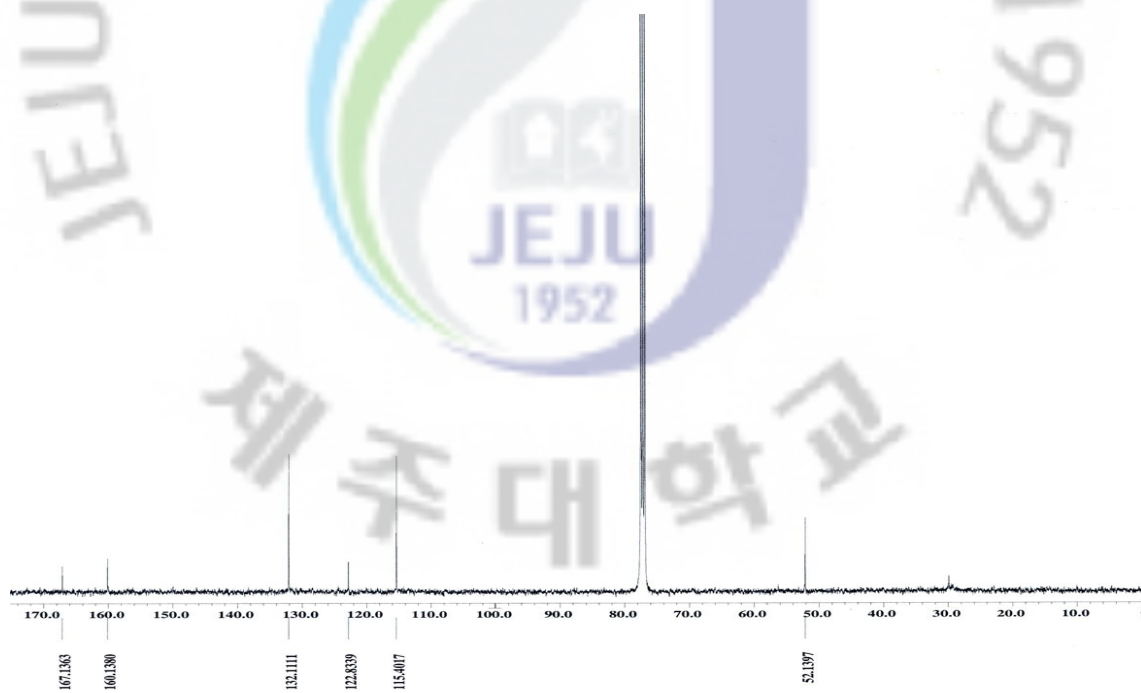
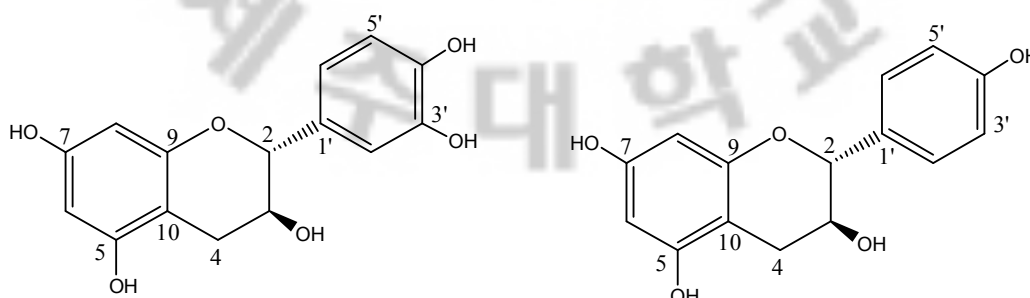


Figure 22.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **8** in  $\text{CDCl}_3$

## 1-6. Compound 9과 compound 10의 구조해석

Compound 9의 구조를 확인하기 위해  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  100~160 영역의 carbon signal과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  5.81~ 6.80에서의 signal에 의해 aromatic ring이 있음을 알 수 있었으며 (Figure. 8, 9), 1개의 methylene 수소가 관측되었다. 또한 2개는 *ortho* coupling, 3개는 *meta* coupling을 하는 것으로 관측되었으며,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것으로 보아 이는 전형적인 flavonoid로 예측되었다. 이러한 자료를 바탕으로 문헌<sup>20)</sup>과 비교한 결과 compound 9는 (+)-catechin으로 동정하였다(Figure 23, 24).

Compound 10에서  $^1\text{H-NMR}$  spectrum과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum은 compound 9의 signal과 유사하게 관찰되었으나,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 compound 9는  $\delta$  5.81~ 6.80의 aromatic ring signal이 관찰되는 것에 비해 compound 10에서는  $\delta$  7.21(2H, d,  $J = 8.74$ )과  $\delta$  6.79(2H, d,  $J = 8.72$ )의 *ortho*-coupling과  $\delta$  5.92(1H, d,  $J = 2.28$ )과 5.84(1H, d,  $J = 2.28$ )의 *meta*-coupling을 하는 것이 관찰 되었다. Compound 9번과 동일하게  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 15개의 탄소 signal이 관찰되었으나,  $\delta$  157.1 ~ 158.5에서 4개의 탄소 signal과  $\delta$  131.6, 129.8의 탄소 signal이 관찰되었다. 이러한 자료를 종합하여 문헌<sup>21)</sup>과 비교한 결과 (+)-afzelechin으로 동정하였다(Figure 25, 26).



Compound 9

Compound 10



Table 8. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compounds **9** and **10** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD)

No.	compound 9		compound 10	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	4.52 (1H, d, 7.3)	83.0	4.58 (1H, d, 7.8)	83.0
3	3.94 (1H, m)	69.0	3.97 (1H, m)	69.0
4	2.85 (1H, dd, 16.1, 5.3) 2.50 (1H, dd, 16.1, 8.2)	28.7	2.87 (1H, dd, 16.1, 5.5) 2.50 (1H, dd, 16.0, 8.5)	29.1
5		157.7		157.7
6	5.82 (1H, d, 2.3)	96.4	5.84 (1H, d, 2.3)	95.6
7		157.1		158.0
8	5.89 (1H, d, 2.3)	95.6	5.92 (1H, d, 2.3)	96.4
9		158.0		157.1
10		101.0		101.0
1'		132.4		131.6
2'	6.80 (1H, d, 2.0)	115.4	7.22 (2H, d, 8.7)	129.8
3'		146.4	6.79 (2H, d, 8.7)	116.2
4'		146.4		158.5
5'	6.72 (1H, d, 8.0)	116.2	6.79 (2H, d, 8.7)	116.2
6'	6.67 (1H, dd, 8.0, 2.0)	120.2	7.22 (2H, d, 8.2)	129.8

<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 100 MHz, respectively.

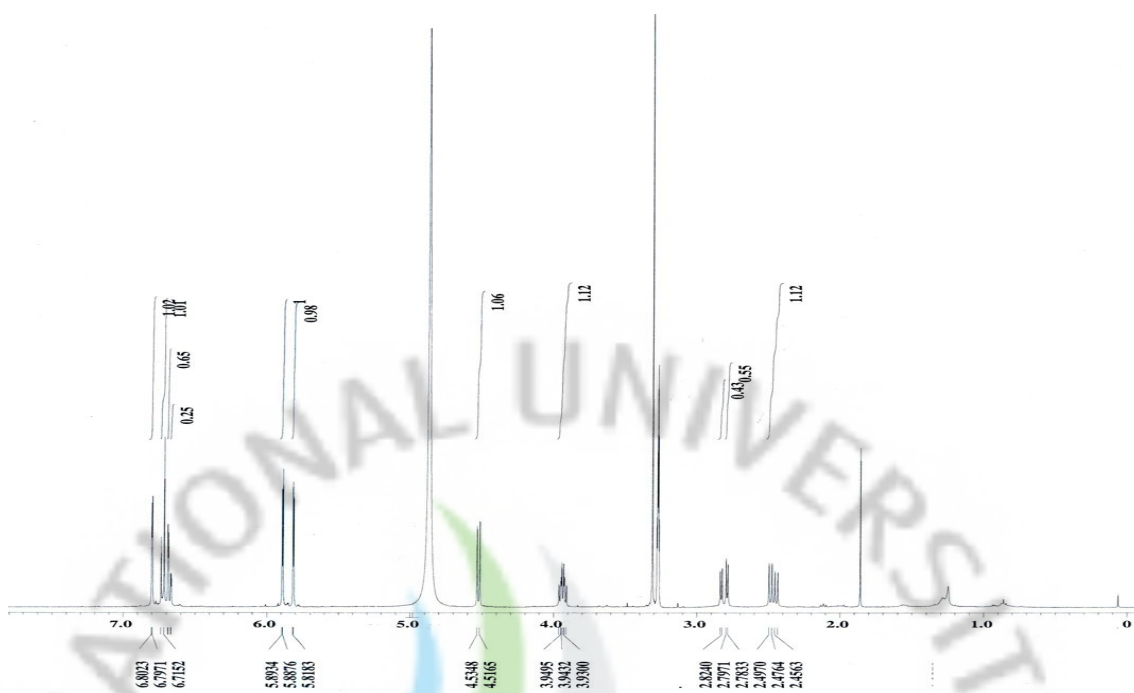


Figure 23.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 9 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

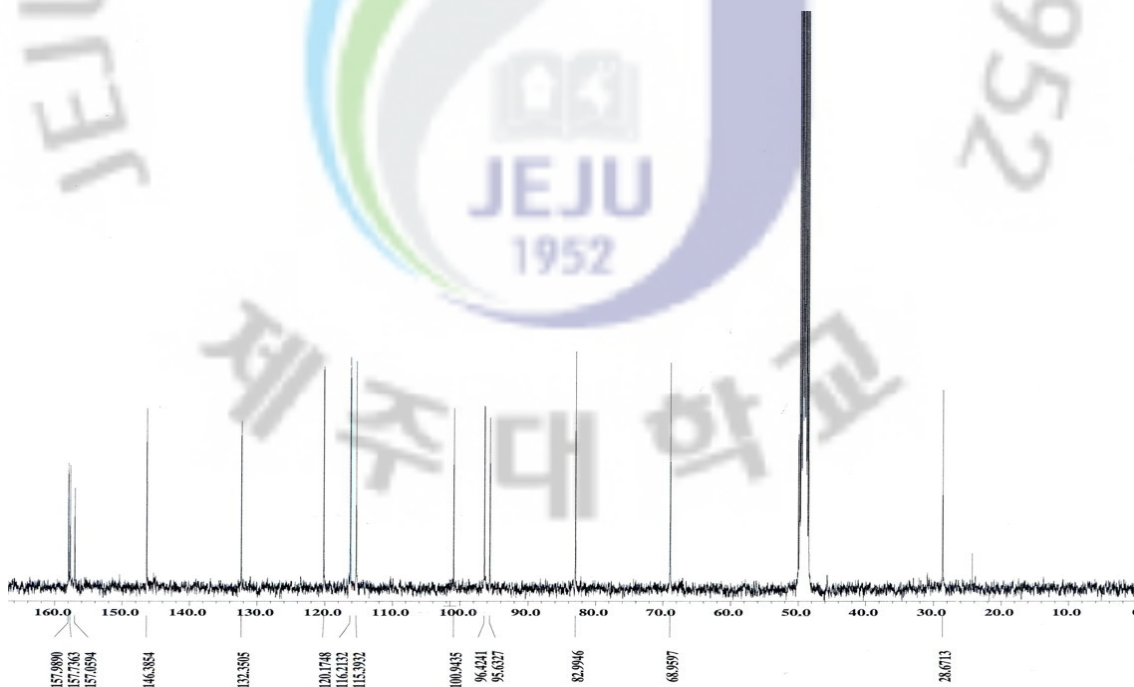


Figure 24.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 9 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

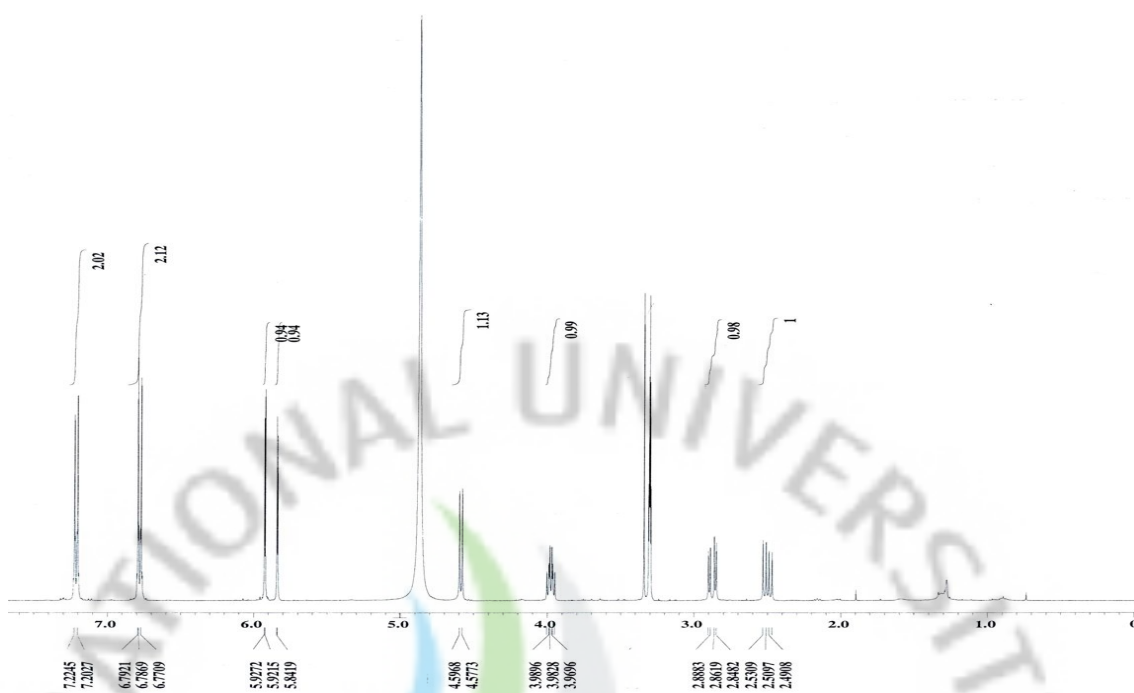


Figure 25.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 10 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

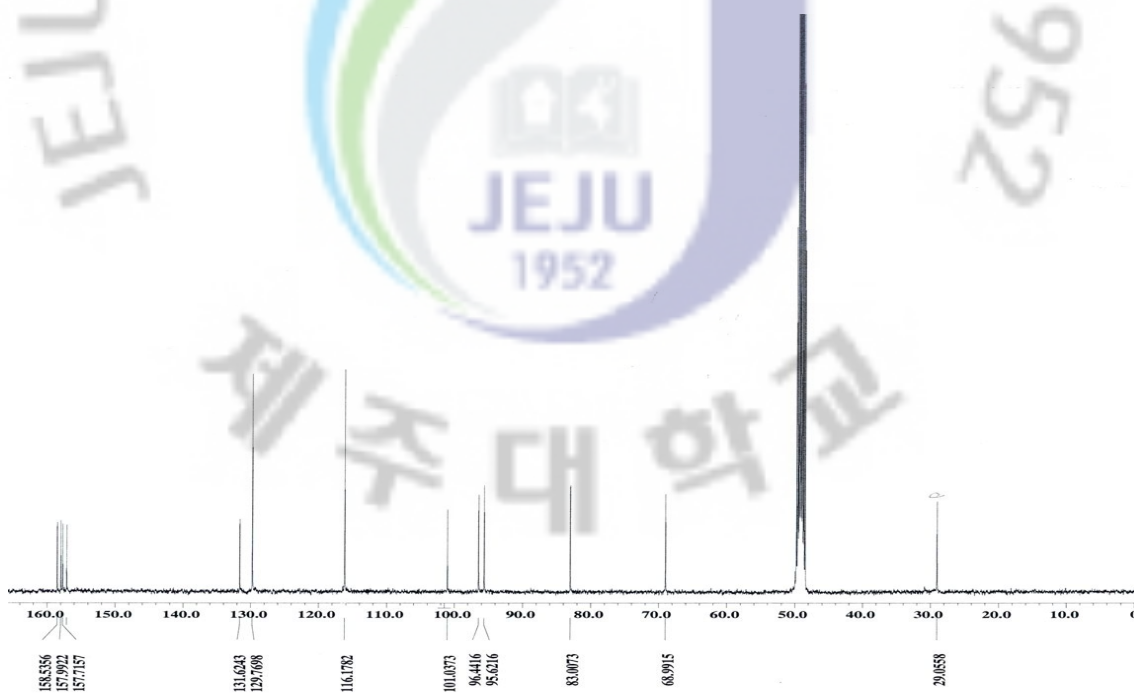


Figure 26.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 10 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

### 1-7. Compound 11의 구조해석

Compound 11는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 2개의 methylene피크  $\delta$  3.61(1H, dd) , 3.71(1H, dd) 3.94(1H, m), 4.18(2H, m)가 관찰 되었고,  $\delta$  5.37(4H, m)의 signal에서 4개의 proton과 multiplet으로 나타나는 olefin의 proton signal이 관찰되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 21개의 탄소 signal이 관찰되었고,  $\delta$  174.6에서 carbonyl기의 탄소가 관측되었다.  $\delta$  130.5, 130.3, 128.5, 128.1에서 4개의 올레핀 탄소가 관찰되었으며,  $\delta$  70.5에서 methine 탄소가 관찰되었다. 그리고,  $\delta$  65.4, 63.5에서 deshielding 된 것으로 보아 산소원자가 결합된 methylene 탄소원자로 예측되었다. 이러한 자료를 바탕으로 compound 11를 문헌<sup>22,23)</sup>과 비교한 결과 2,3-dihydroxypropyl 9Z,12Z-octadecadienoate 즉, monoolein으로 동정하였다(Figure 27, 28).

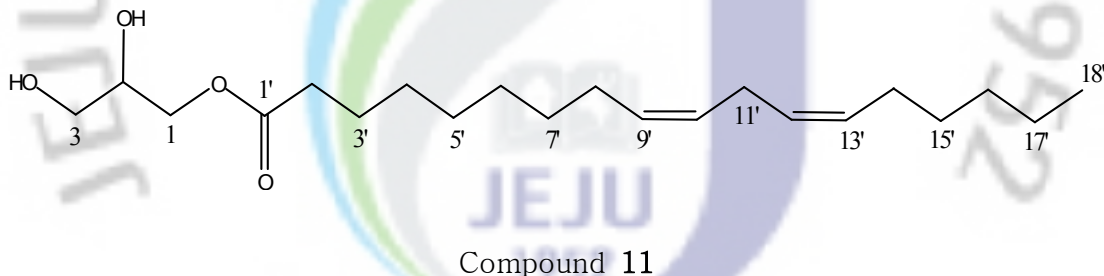


Table 9. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compound 11 (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)

No.	compound 11	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	4.19 (2H, m)	65.4
2	3.94 (1H, m)	70.5
3	3.67 (1H, dd, <i>J</i> = 13.4, 3.9)	63.5
	3.58 (1H, dd, <i>J</i> = 11.5, 5.7)	
1'		174.6
2'	2.36 (2H, t, 7.6)	34.4
3'	1.63 (2H, m)	25.1
4'	1.35 ~ 1.24 (14H, m)	29.3
5'	1.35 ~ 1.24 (14H, m)	29.6
6'	1.35 ~ 1.24 (14H, m)	29.9
7'	1.35 ~ 1.24 (14H, m)	29.8
8'	2.06 (4H, m)	27.4
9'	5.37 (4H, m)	130.5
10'	5.37 (4H, m)	130.2
11'	2.80 (2H, m)	25.8
12'	5.37 (4H, m)	128.3
13'	5.37 (4H, m)	128.1
14'	2.06 (4H, m)	27.4
15'	1.35 ~ 1.24 (14H, m)	29.3
16'	1.35 ~ 1.24 (14H, m)	32.1
17'	1.35 ~ 1.24 (14H, m)	22.9
18'	0.89 (3H, m)	14.3

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

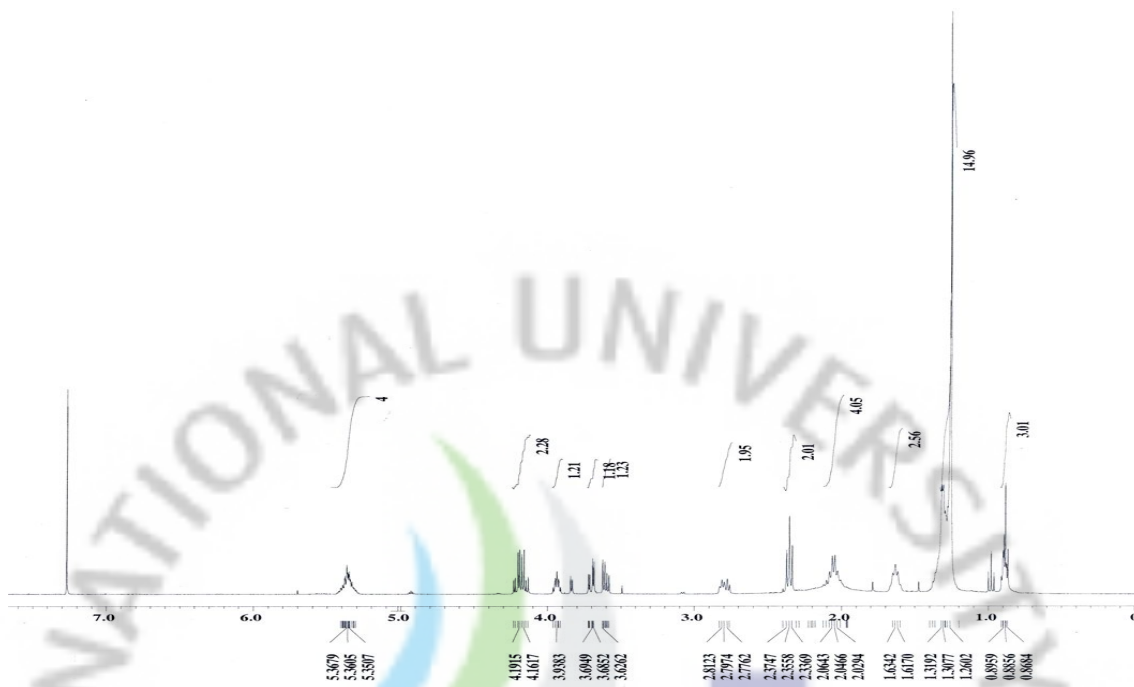


Figure 27.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **11** in  $\text{CDCl}_3$

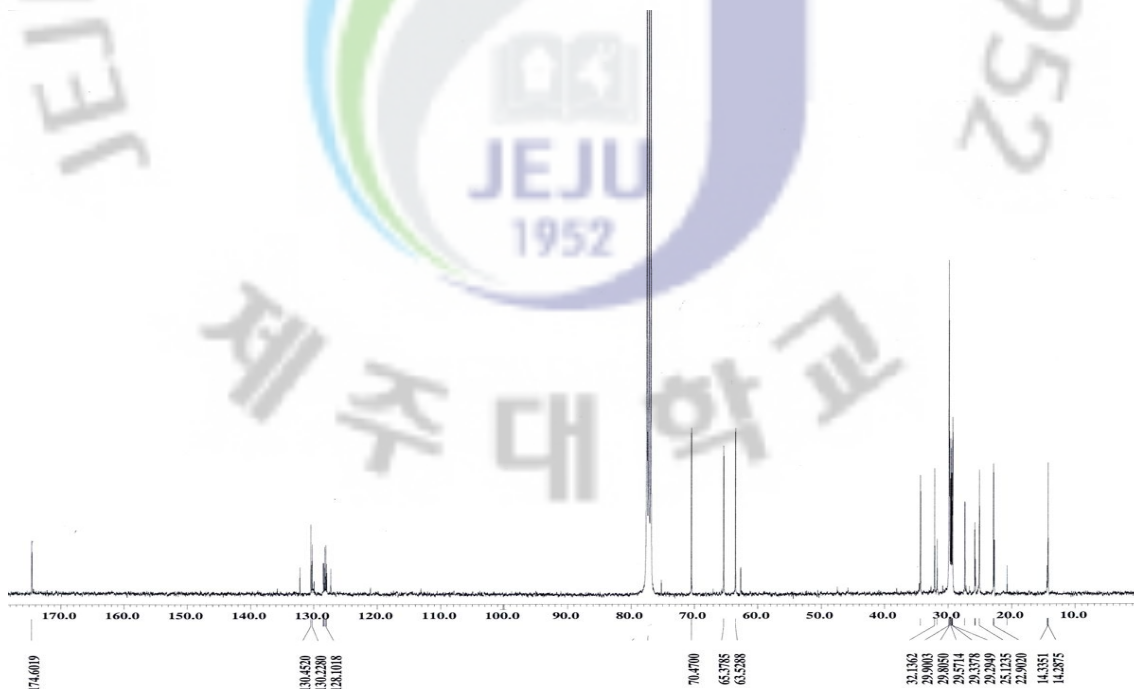
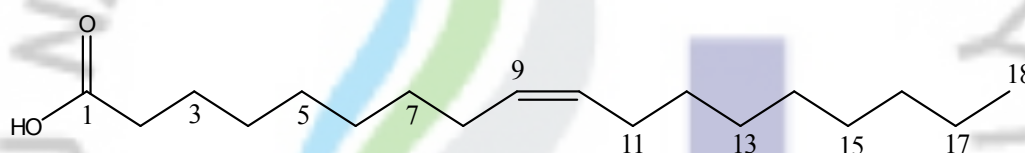


Figure 28.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **11** in  $\text{CDCl}_3$

#### 1-8. Compound 12의 구조해석

Compound 12은  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C}$  및 DEPT-NMR spectrum을 측정한 결과,  $^1\text{H-NMR}$  spectrometer에서  $\delta$  5.37(2H, m)은 2개의 proton과 multiplet으로 olefin구조의 proton이 관찰되었고,  $\delta$  2.35(2H, t,  $J = 7.33, 14.88$ )에서 allylic 형태의 proton이 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$  및 DEPT-NMR spectrum에서 에스터기에서 carbonyl기의  $\delta$  179.9의 탄소 signal이 관측되었고,  $\delta$  130.3, 130.1은 olefin구조의 3차 탄소로 CH임을 알 수 있었다. 이러한 자료를 바탕으로 문헌<sup>4,24</sup>)과 비교한 결과 oleic acid로 동정하였다(Figure 29, 30).



Compound 12

Table 10. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compound **12** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)

No.	compound 12	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		179.9
2	2.35 (2H, t, 7.4)	34.3
3	1.62 (2H, m)	24.9
4	1.31 (20H, m)	29.3
5	1.31 (20H, m)	29.4
6	1.31 (20H, m)	29.5
7	1.31 (20H, m)	29.9
8	2.07 (2H, m)	27.4
9	5.38 (2H, m)	130.1
10	5.38 (2H, m)	130.3
11	2.07 (2H, m)	27.4
12	1.31 (20H, m)	29.9
13	1.31 (20H, m)	29.7
14	1.31 (20H, m)	29.8
15	1.31 (20H, m)	29.6
16	1.31 (20H, m)	32.1
17	1.31 (20H, m)	22.8
18	0.87 (3H, m)	14.2

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



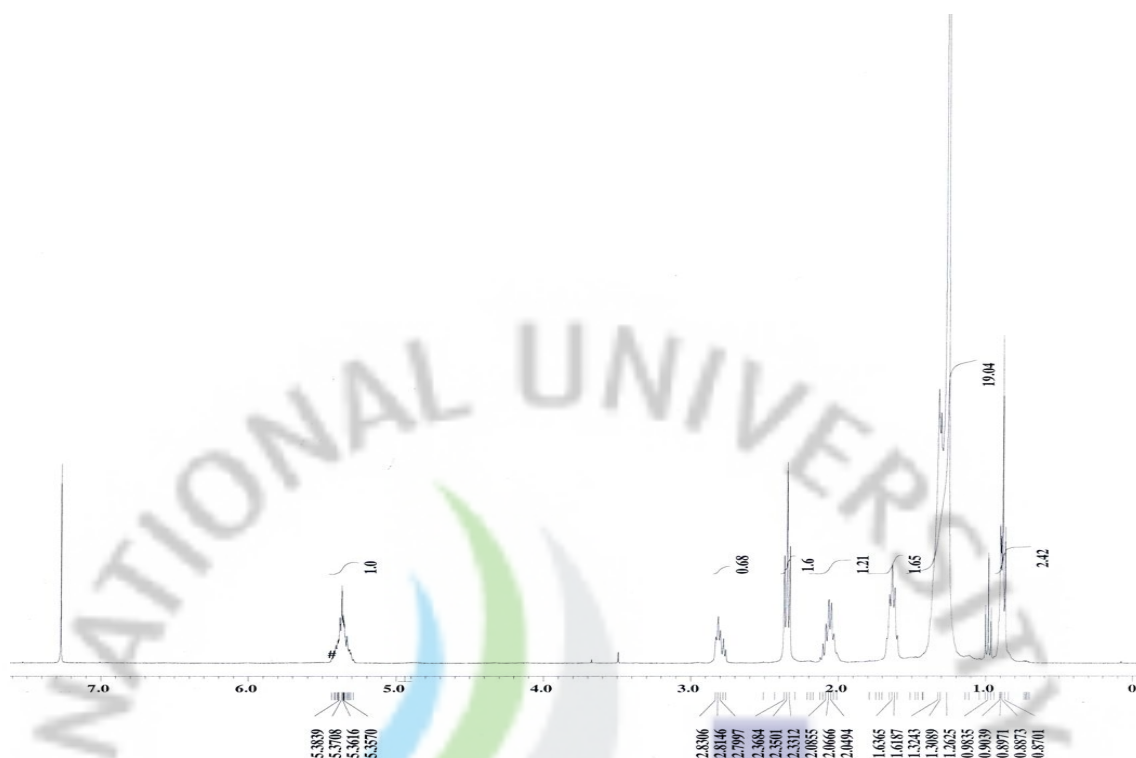


Figure 29.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **12** in  $\text{CDCl}_3$

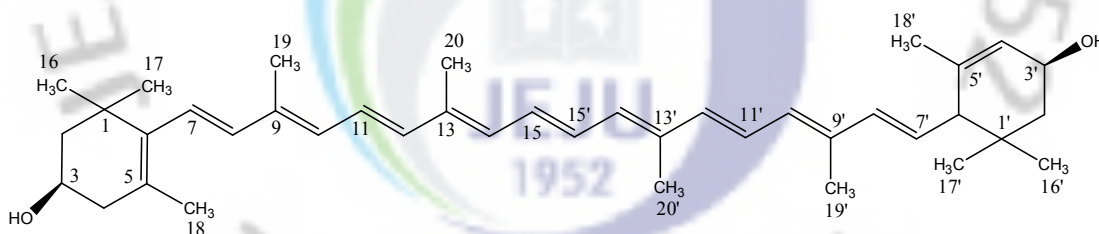


Figure 30.  $^{13}\text{C}$ -NMR &  $135^\circ$  DEPT-NMR spectra of compound **12** in  $\text{CDCl}_3$

## 1-9. Compound 13의 구조해석

Compound 13를  $^1\text{H-NMR}$  spectrum을 측정한 결과  $\delta$  6.65 ~ 5.45사이의 olefin group으로 예상되는 signal과  $\delta$  4.26(brs), 4.01(m)의 signal은 산소가 인접하여 결합된 methine에서 proton으로 예측하였고,  $\delta$  1.97 ~ 0.86사이에서 singlet인 10개의 메틸기 proton signal이 관찰되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 40개의 탄소가 관찰되었고,  $\delta$  138.7 ~ 124.7 사이에서 double bond구조를 갖는 탄소 signal이 22개 관찰되었다. 또한  $\delta$  66.2와  $\delta$  65.3의 signal은 산소가 인접하여 deshielding된 methine 탄소 signal로 예측되었고,  $\delta$  30.5 ~ 13.0사이의 피크는 메틸기의 탄소 signal로 예측하였다. 이러한 자료를 바탕으로 문헌<sup>25,26,27</sup>과 비교한 결과 compound 13은 (all-*trans*)-lutein으로 동정하였다.

(Figure 31, 32)



Compound 13

Table 11. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compound **13** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)

Compound <b>13</b>					
No.	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	No.	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		37.3	1'		34.3
2	1.48 (1H, m) 1.78 (1H, m)	48.6	2'	1.36 (1H, m) 1.84 (1H, m)	44.9
3	4.02 (1H, m)	65.3	3'	4.02 (1H, m)	66.2
4	2.05 (1H, m) 2.36 (1H, m)	42.8	4'	5.55 (1H, s)	124.7
5		126.4	5'		138.2
6		138.0	6'	2.42 (1H, d, 8.5)	55.2
7	6.15 (3H, m)	125.8	7'	5.43 (1H, m)	128.9
8	6.15 (3H, m)	138.7	8'	6.15 (3H, m)	137.9
9		135.9	9'		135.3
10	6.15 (3H, m)	131.5	10'	6.15 (3H, m)	131.0
11	6.63 (3H, m)	125.1	11'	6.63 (3H, m)	125.0
12	6.36 (1H, d, 14.9)	137.8	12'	6.36 (1H, d, 14.9)	137.8
13		136.6	13'		136.7
14	6.26 (1H, d, 9.8)	132.8	14'	6.26 (1H, d, 9.8)	132.8
15	6.63 (3H, m)	130.3	15'	6.63 (3H, m)	130.3
16	1.08 (3H, s)	30.4	16'	1.00 (3H, s)	24.5
17	1.08 (3H, s)	28.9	17'	0.85 (3H, s)	29.7
18	1.74 (3H, s)	21.8	18'	1.65 (3H, s)	23.1
19	1.97 (3H, s)	13.0	19'	1.92 (3H, s)	13.3
20	1.97 (3H, s)	13.0	20'	1.97 (3H, s)	13.0

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

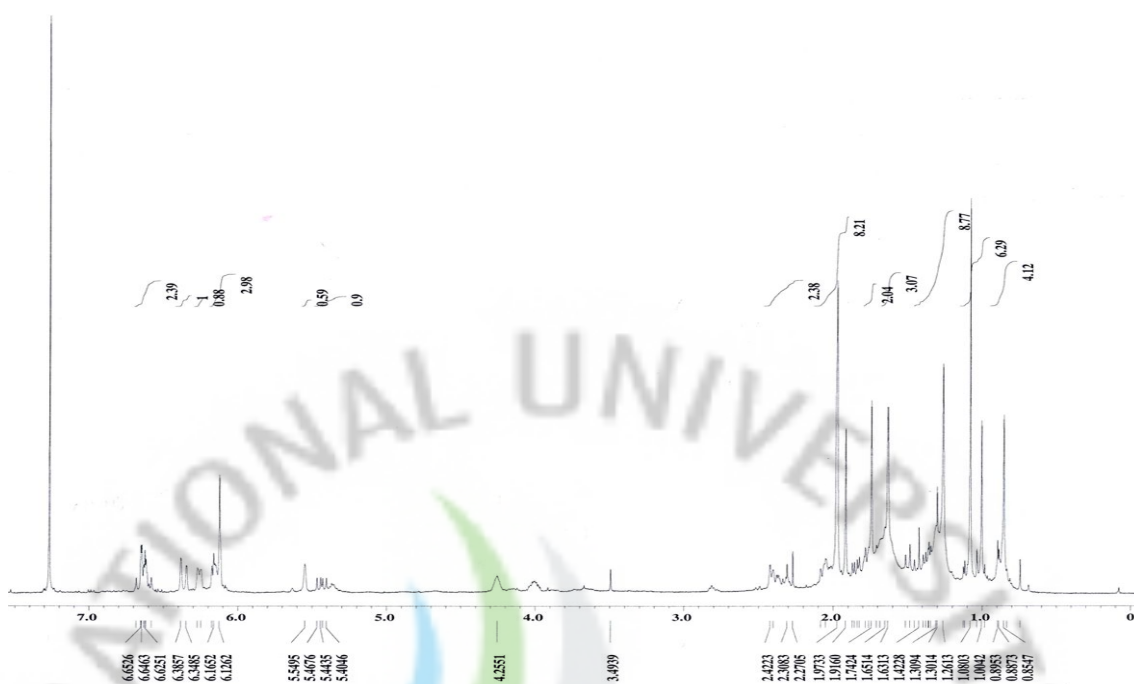


Figure 31.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **13** in  $\text{CDCl}_3$

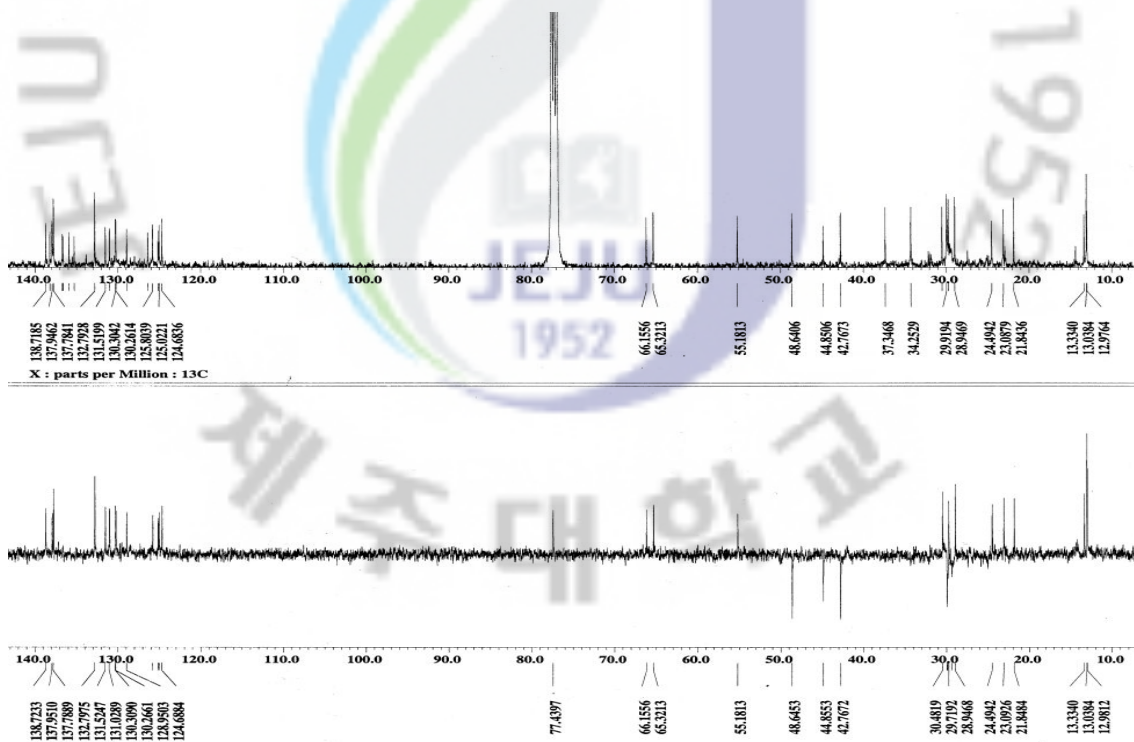


Figure 32.  $^{13}\text{C}$ -NMR &  $135^\circ$  DEPT-spectra of compound **13** in  $\text{CDCl}_3$

## 2. DPPH radical scavenging test

DPPH는 질소를 중심으로 그 자체가 매우 안정한 라디칼 구조의 화합물로서, 시료에 의하여 환원되어 라디칼이 소거되면 특유의 보라색이 없어지면서 515 ~ 517 nm에서 보이던 흡수파장이 사라지게 된다. 본 실험에서는 농도별로 DPPH radical 소거활성을 측정하여  $RC_{50}$  값으로 표현하였다.  $RC_{50}$  값이 작을수록 활성이 좋음을 의미한다.

### 2-1. 좁은잎천선과 가지 추출물의 활성 결과

좁은잎천선과 가지의 70% ethanol추출물 및 분획물을 갖고 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 시료의 농도가 100  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 70% EtOH 추출물은 8.9%, Hex fr. 13.9%, EtOAc fr. 91.0%, BuOH fr. 23.5%,  $\text{H}_2\text{O}$  fr. 8.0%의 소거활성을 보였으며  $RC_{50}$ 을 측정하기 위해 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , 3.13  $\mu\text{g/mL}$ , 1.56  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 소거활성을 실시하였다 (Figure 33). 그 결과 EtOAc fr. 에서만 27.6  $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 비타민 C의  $RC_{50}$ 인 7.24  $\mu\text{g/mL}$ 에 가깝지는 않지만 좋은 radical 소거능을 보임을 확인할 수 있었다(Figure 34).

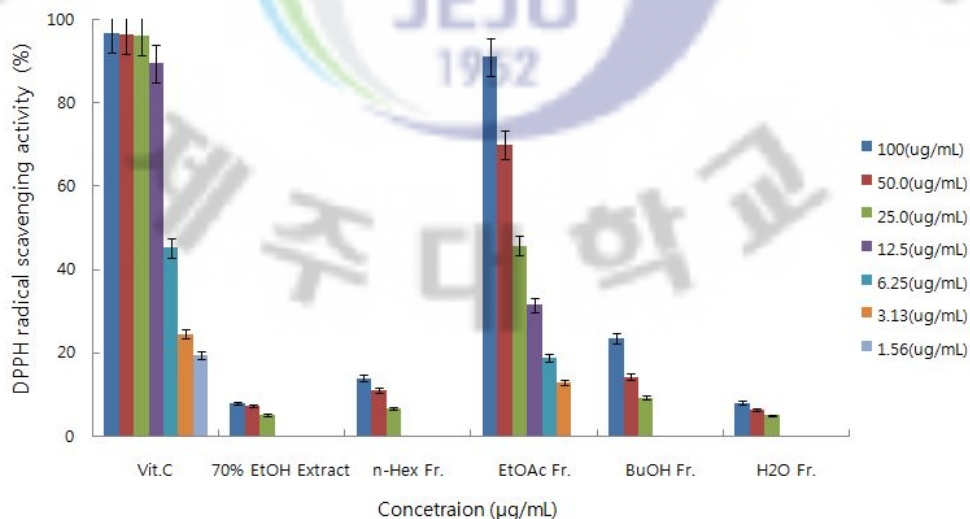


Figure 33. DPPH radical scavenging activities of extracts from *F. erecta* branch.

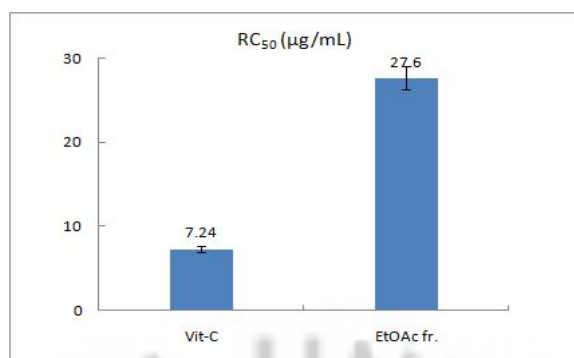


Figure 34. RC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities of EtOAc fr. from *F. erecta* branch.

## 2-2. 좁은잎천선과 가지로부터 분리된 화합물의 활성 결과

EtOAc fr. 에서 분리된 compounds 1-8을 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. Compound 8을 제외한 나머지 1-7은 활성을 가지고 있지 않은 것으로 확인되었고, 좋은 라디칼 소거능력을 보이는 compound 8의 RC<sub>50</sub>을 측정하기 위해 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.13 µg/mL 의 농도별로 소거활성을 실시하였다. 그 결과 compound 8는 RC<sub>50</sub>값이 8.22 µg/mL로 대조군인 비타민 C와 유사한 RC<sub>50</sub>값을 가지며, 우수한 radical 소거활성을 가짐을 확인 하였다 (Figure 35).

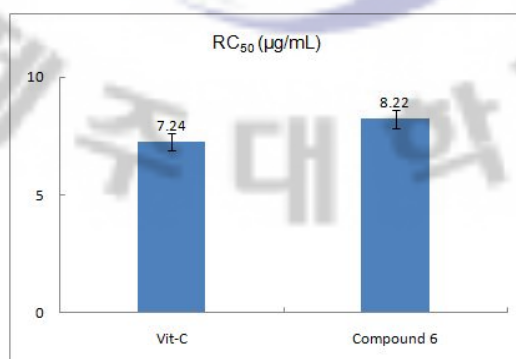


Figure 35. RC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for compound 6.

### 2-3. 좁은잎천선과 잎 추출물의 활성 결과

좁은잎천선과 잎의 70% EtOH 추출물 및 분획물을 가지고 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 시료의 농도가 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 Hex fr. 과  $\text{H}_2\text{O}$  fr. 은 소거활성을 보이지 않았으며, 나머지 70% EtOH추출물에서 64.7%, EtOAc fr. 90.3%, BuOH fr. 44.1%의 소거활성을 보였다.  $\text{RC}_{50}$  을 구하여 비교한 결과 (Figure 36), EtOAc fr. 에서 26.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인 비타민 C의  $\text{RC}_{50}$ 인 7.48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 가깝지는 않지만 다른 분획층보다 좋은 radical 소거능을 보임을 확인할 수 있었다(Figure 37).

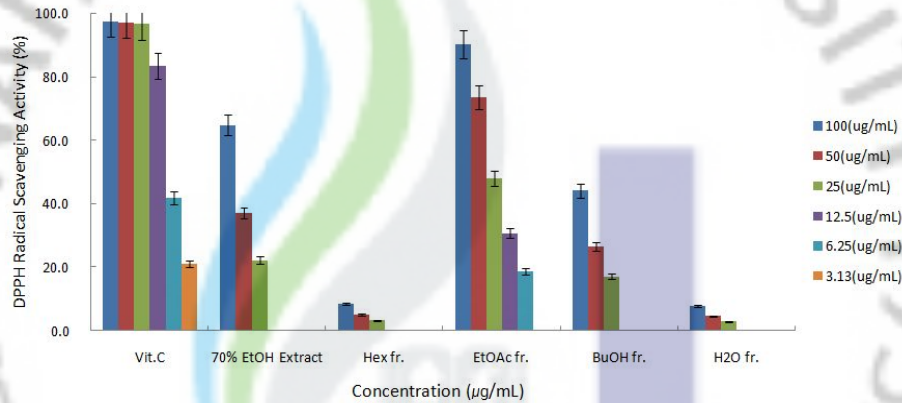


Figure 36. DPPH radical scavenging activities for extracts from *F. erecta* Leaves.

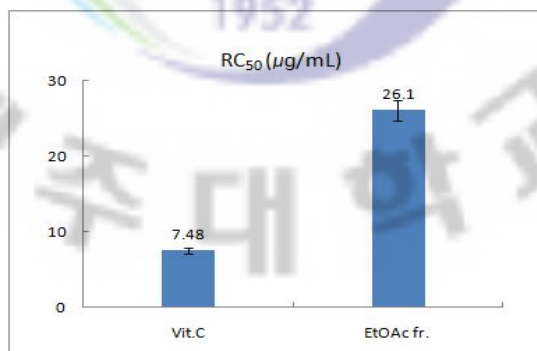


Figure 37.  $\text{RC}_{50}$  value of DPPH radical scavenging activities for EtOAc fr. from *F. erecta* Leaves.

#### 2-4. 좁은잎천선과 잎으로부터 분리된 화합물의 활성 결과

EtOAc fr. 에서 분리된 compounds 9-13의 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 시료의 농도가 100  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 compound 9와 compound 10은 92.7%와 69.6%의 소거활성을 보였으며, 나머지 compound 11, 12, 13은 소거활성을 가지고 있지 않은 것으로 확인되었고, 좋은 라디칼 소거능력을 보이는 compound 9와 compound 10의  $\text{RC}_{50}$ 을 측정하기 위해 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , 3.13  $\mu\text{g/mL}$  의 농도별로 소거활성을 실시하였다(Figure 38). 그 결과 compound 9와 compound 10은  $\text{RC}_{50}$ 값이 각각 10.3  $\mu\text{g/mL}$ , 39.4  $\mu\text{g/mL}$ 로 compound 9인 경우 비타민 C와 유사한  $\text{RC}_{50}$ 값 (7.23  $\mu\text{g/mL}$ )을 가지며, compound 10은 다소 낮은 radical 소거활성을 가짐을 확인 하였다(Figure 39).

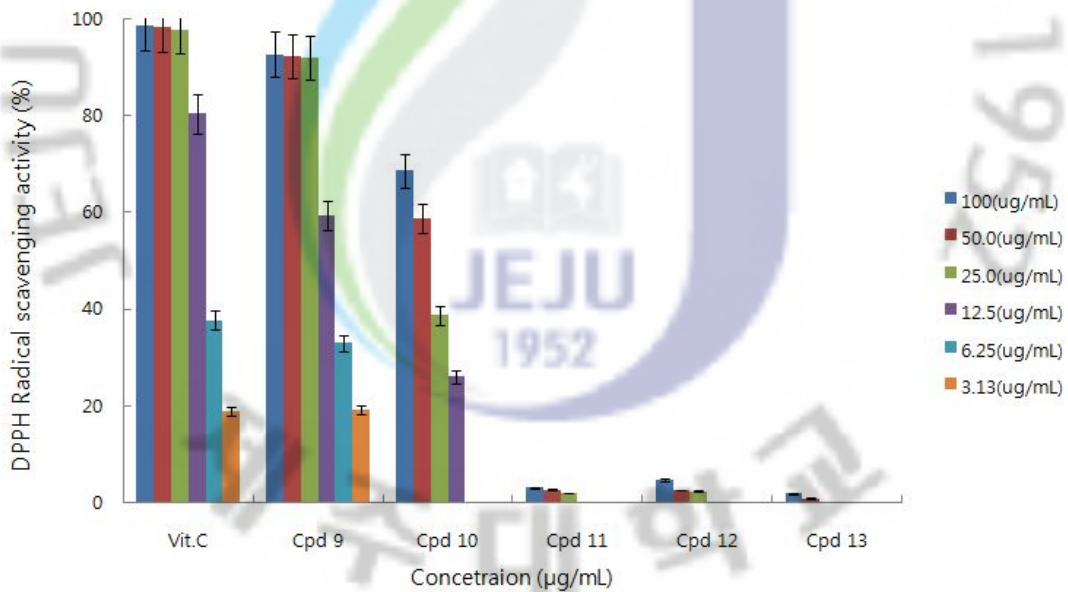


Figure 38. DPPH radical scavenging activities for compounds 9-12.



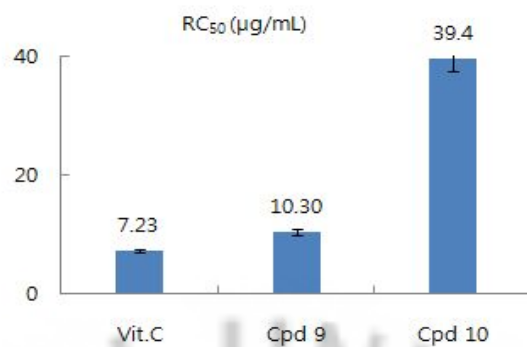


Figure 39. RC<sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for compounds 9-10.



### 3. Tyrosinase inhibition test

추출물 및 분획물들과 분리된 화합물들에 대한 tyrosinase 저해 활성은 mushroom tyrosinase를 이용하여 DOPA chrome법을 응용하여 측정하였다. 실험방법은 buffer 0.106 mL(pH 6.8), sample 0.02 mL(2 mg/mL), L-tyrosine(0.3 mg/mL) 0.07 mL, mushroom tyrosinase(1250 units/mL) 0.1 mL을 넣고, 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 492 nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

#### 3-1. 좁은잎천선과 가지 추출물의 활성 결과

좁은잎천선과 가지의 70% EtOH 추출물 및 분획물을 가지고 Tyrosinase 저해 활성 실험을 실시하였다. 100 µg/mL의 농도에서 EtOAc fr. 에서만 57.2%의 저해율을 보였으며, 대조군인 arbutin 54.5% 보다 좋은 저해율을 갖는 것을 확인하였다(Figure 40). EtOAc fr. 의 IC<sub>50</sub>값을 측정하기 위해 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL 의 농도별로 저해활성을 측정하였다. EtOAc fr. 의 IC<sub>50</sub>값이 75.5 µg/mL로 대조군인 arbutin의 IC<sub>50</sub>값인 87.3 µg/mL 보다 좋은 저해 효과를 보임을 알 수 있었다(Figure. 41).

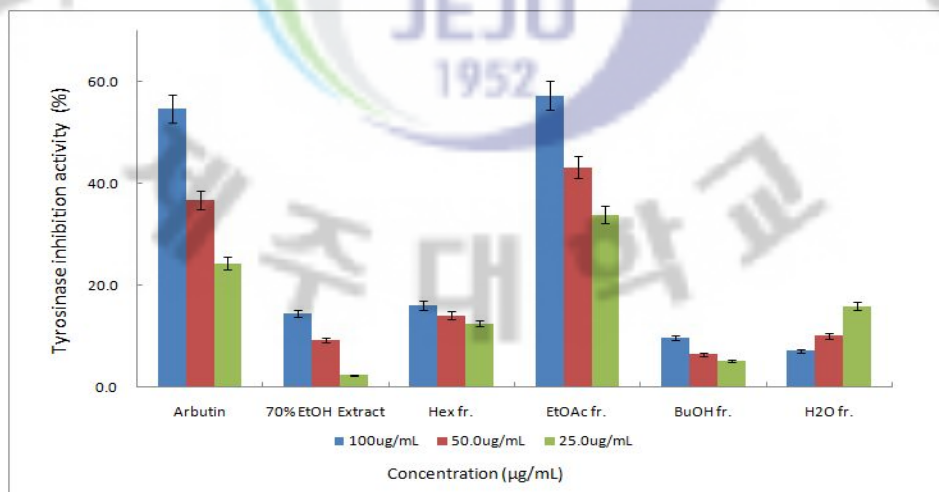


Figure 40. Tyrosinase inhibition activities for extracts from *F. erecta* branch.

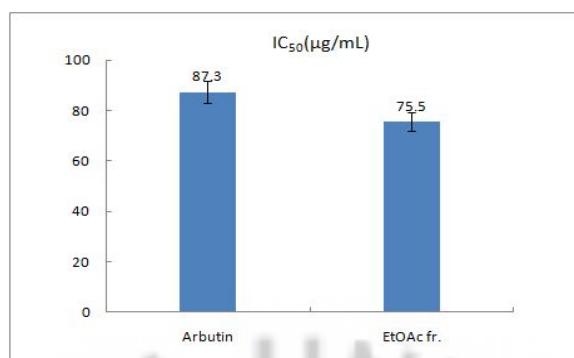


Figure 41. IC<sub>50</sub> value of Tyrosinase inhibition activities for EtOAc fr. from *F. erecta* branch.

### 3-2. 좁은잎천선과 가지로부터 분리된 화합물의 활성 결과

EtOAc fr. 에서 분리된 compounds 1-8의 tyrosinase 저해 활성 실험을 실시하였다. Compound 2과 8을 제외한 나머지는 저해 효과가 거의 없는 것으로 확인 되었으며, compound 1과 3 그리고 4인 경우 저해 효과가 없었다(Figure 42). Compound 2의 경우 IC<sub>50</sub>값의 농도가 135.4 µg/mL로 대조군인 arbutin보다는 낮은 활성을 보였으며, Compound 8의 경우 99.9 µg/mL로 arbutin의 IC<sub>50</sub>값인 87.4 µg/mL와 유사한 저해 활성을 가짐을 알 수 있었다(Figure 43).

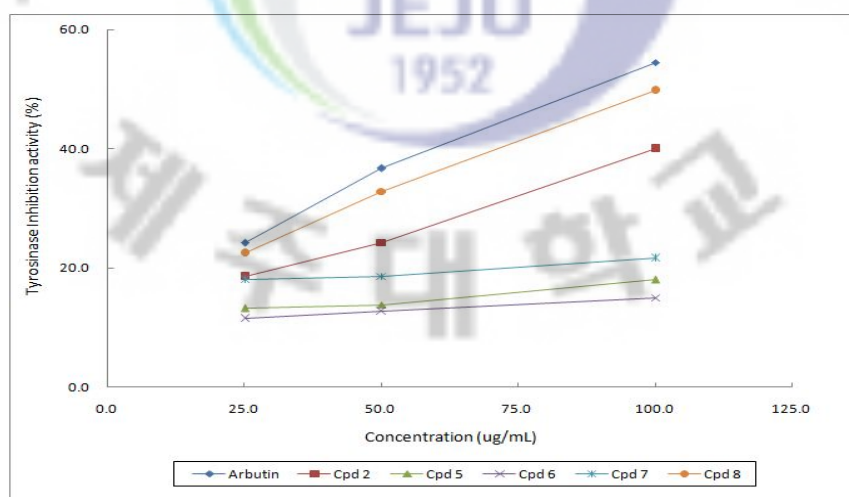


Figure 42. Tyrosinase inhibition activities for compounds 1-8.

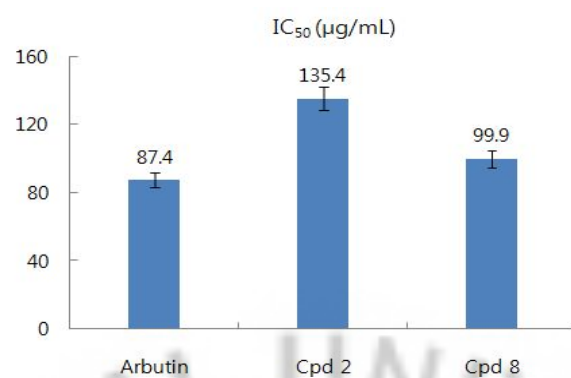


Figure 43. IC<sub>50</sub> value of Tyrosinase inhibition activities for compounds 2 and 8.



#### 4. Compound 2와 compound 8의 효소 저해 작용 측정

Compound 2와 Compound 8을 농도와 기질인 L-tyrosine의 농도를 변화시키면서 흡광도를 측정하였고, 얻어진 결과를 이용하여 시간에 대한 흡광도 값인 속도( $v$ )를 계산하였다. L-tyrosine의 농도를 x축으로 하고, 속도를 y축으로 하여 얻어진 그래프를 각각 Figure 44, 45에 나타내었으며, L-tyrosine의 농도가 증가함에 따라 compound 2와 compound 8의 속도도 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있다. 또한 compound 2와 compound 8의 농도가 증가할수록 속도가 감소하고 있음을 확인 할 수 있다. 이는 기질과 효소와 작용을 하고 속도가 느려짐을 의미하고 그 과정에 compound 2와 compound 8이 작용하고 있음을 예상할 수 있다.

Compound 2와 Compound 8이 기질과 효소가 반응하는 과정에서 경쟁적으로 저해하는지 확인하기 위하여 Lineweaver-Burk 이중 역수 함수 그래프를 각각 구하였고, Table 12의 x축과 y축의 값을 각각 역수를 취하여 값을 구하여 직선을 얻었다. 그리고 compound 2의 경우 기질인 L-tyrosine사이에서 서로 경쟁적으로 저해한다는 것이 밝혀진 바 있다.<sup>28,29)</sup>

일반적인 효소 반응을 보면, 기질 S(tyrosin)와 저해제 I(Compound 2, 8)는 마찬가지로 효소의 같은 자리에 가역적(reversibly)으로 결합한다. 따라서, S-결합과 I-결합은 서로 배타적인 경쟁적 과정이다. 이 조건으로부터 S와 I가 효소의 같은 자리에 결합하므로, 이들 S와 I가 많은 부분 구조적인 유사성을 가질 것을 예상할 수 있다. 또한  $V_{max}$ 가 I에 의해 영향을 받지 않아, 모든 직선들이 공통의 y축절편을 가진다. 또한 이 기준은 두 물질이 같은 자리에 결합한다는 가장 좋은 실험적인 증거가 되는 것이며, 이 때의 경쟁저해제는 기질과 구조적으로 유사하다고 할 수 있다.<sup>4,30)</sup>

Table 12. Results of compound 2 and compound 8 for  $k_m$  and  $V_{max}$ .

Compound 2			Compound 8		
Concetraion(ug/mL)	$K_m$	$V_{max}$	Concetraion(ug/mL)	$K_m$	$V_{max}$
100	0.90	0.048	100	0.71	0.050
50	0.58		50	0.44	
25	0.51		25	0.35	
0	0.38		0	0.29	

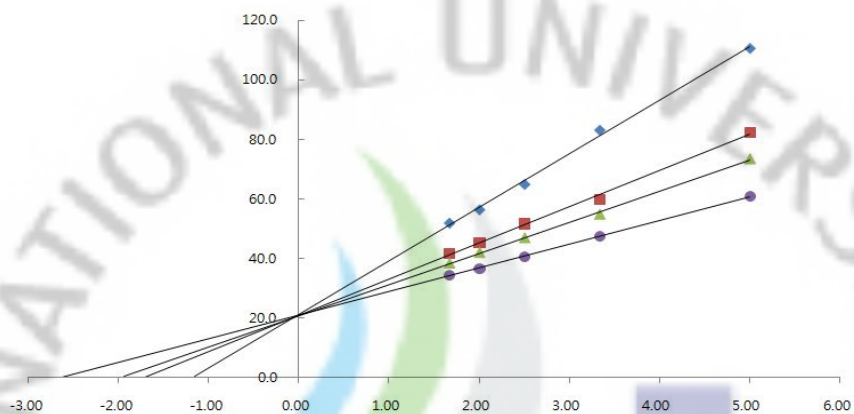


Figure 44. Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and L-tyrosin without (●) and with Compound 2 (▲) 25  $\mu\text{g/mL}$ , (■) 50  $\mu\text{g/mL}$ , (◆) 100  $\mu\text{g/mL}$ .

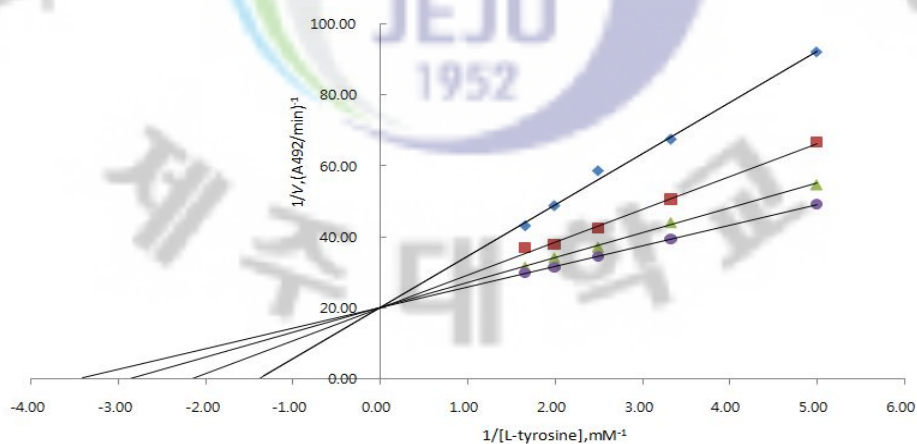


Figure 45. Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and L-tyrosine without (●) and with Compound 8 (▲) 25  $\mu\text{g/mL}$ , (■) 50  $\mu\text{g/mL}$ , (◆) 100  $\mu\text{g/mL}$ .

## 5. Compound 2와 compound 8의 구조활성관계

Tyrosinase 억제활성실험에서 compound 2와 compound 8은 대조군으로 사용한 arbutin과 비교했을 때 유사한 활성을 보였다. 이러한 결과는 멜라닌의 형성에 있어서 compound 2와 compound 8이 기질인 L-tyrosine과 구조적으로 연관되어 있을 것으로 추측되며 효소저해작용 실험에서 기질인 L-tyrosine과 경쟁적으로 저해한다는 것을 알 수 있었다. 구조 차이로 인한 활성 관계에서 compound 2와 compound 8 및 L-tyrosine보면, phenolic 구조에 치환기가 각각 다른 것을 볼 수 있으며, compound 2에서 카르보닐기에 -OH기가 결합되어 있는 형태이다. compound 8은 compound 2와 마찬가지로 카르보닐기를 갖지만 -OCH<sub>3</sub>기가 결합되어 있다. 이런 차이로 인하여 IC<sub>50</sub> 값은 각각 135.4  $\mu$ g/mL, 99.9  $\mu$ g/mL의 결과를 보이는 것을 알 수 있었으며, -OCH<sub>3</sub>기가 -OH기 보다 tyrosinase 활성에 억제효과가 크다는 것을 알 수 있다. 그리고 더 나아가 화합물의 구조와 미백 효과의 측면에서 연구되어야 할 사항이라고 여겨진다.

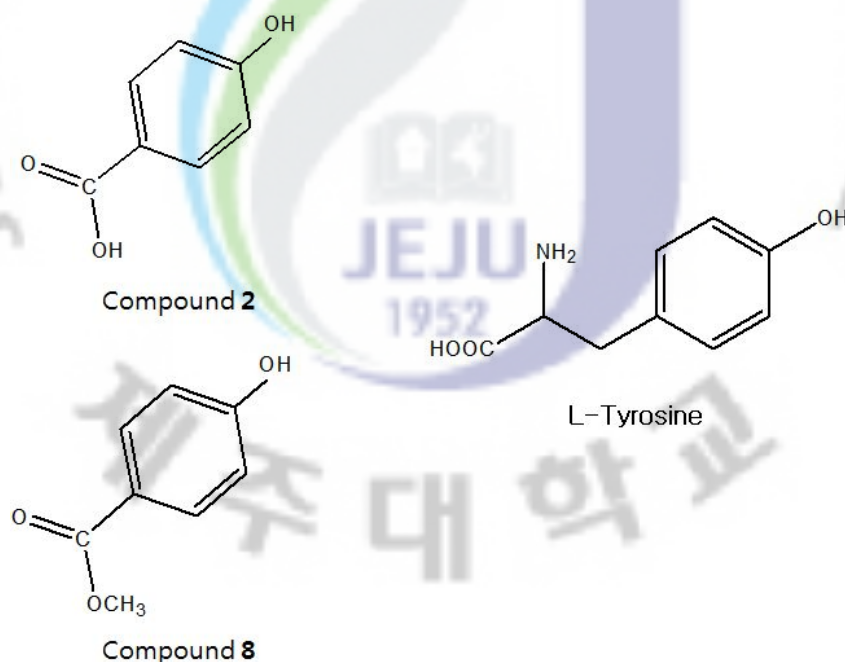


Figure 46. Structure activity relationship of compounds 2 and 8.

#### IV. 요약 및 결론

제주에 자생하고 있는 좁은잎천선과에 대한 연구를 검색한 결과 이 나무에 대한 연구가 진행된 것이 없어 잎과 가지로부터 생리활성 성분을 분리·동정하고, 생리활성 검색을 통해 유효성분의 유·무를 알아보하고자 본 연구를 진행하게 되었다.

좁은잎천선과 나무 잎과 가지는 70% EtOH 추출용매에서 얻어진 추출물을 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법 따라 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 순으로 용매분획을 하여 분획물을 얻었다. 이들 중 좁은잎천선과 가지에 대하여 DPPH radical 소거활성과 tyrosinase 저해 활성을 모두 보이는 EtOAc fr. 과 좁은잎천선과 잎에 대하여 DPPH radical 소거활성을 보이는 EtOAc fr. 을 각각 vacuum liquid chromatography(VLC), normal silica gel column chromatography를 실시하여 분리된 분획들을 1D, 2D NMR기기를 통하여 확인하였고 문헌들과 비교한 결과 좁은잎천선과 가지에서는 총 8개의 화합물인  $\beta$ -sitosterol, *p*-hydroxybenzoic acid, ethyl linoleate,  $\alpha$ -amyrin acetate, vanillic acid, syringic acid, methyl vanillate, methyl *p*-hydroxybenzoate을 분리하였다. 또한 좁은잎천선과 잎에서는 catechin, afzelechin, monoolein, oleic acid, lutein을 분리 하였고, 총 5개 화합물을 얻었다. 이렇게 분리된 화합물들은 좁은잎천선과에서 처음 분리되었으며, triterpenes 2종류, unsaturated fatty acids 3종류, phenols 5종류, flavonoids 2종류, carotenoid 1종류로 총 13개의 화합물을 분리하였다.

그리고, 이 식물의 생리활성을 알아보하고자 DPPH radical 소거활성실험과 Tyrosinase 저해 활성실험을 좁은잎천선과 잎, 가지의 추출물과 분획물 및 분리된 화합물에 대하여 각각 실험을 실시하였다.

우선 좁은잎천선과 가지에 대한 DPPH radical 소거활성의 결과를 보면 분획물에서 EtOAc fr. (RC<sub>50</sub> = 27.6  $\mu$ g/mL)만 라디칼 소거 활성을 보였다. 분리된 화합물인 경우는 syringic acid(RC<sub>50</sub> = 8.22  $\mu$ g/mL)에서 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 대조군으로 쓰인 vitamin C(RC<sub>50</sub> = 7.24  $\mu$ g/mL)와 유사한 소거활성을 나타내었다.



좁은잎천선과 잎에 대한 DPPH radical 소거활성의 결과를 보면 EtOAc fr. ( $RC_{50} = 26.1 \mu\text{g/mL}$ )에서 가장 활성이 좋았으며, 70% EtOH 추출물( $RC_{50} = 73.8 \mu\text{g/mL}$ )과 *n*-BuOH( $RC_{50} = 111.6 \mu\text{g/mL}$ )에서는 라디칼 소거활성이 우수하지는 않지만 활성을 나타내었다. 분리된 화합물인 경우 catechin( $RC_{50} = 10.3 \mu\text{g/mL}$ )과 afzelechin( $RC_{50} = 39.4 \mu\text{g/mL}$ )에서 라디칼 소거활성이 우수하게 나타났다으며, catechin의 경우 대조군인 비타민 C( $RC_{50} = 7.23 \mu\text{g/mL}$ )와 비슷한 활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

Tyrosinase 저해 활성 실험의 결과에서 좁은잎천선과 가지의 분획물 중 EtOAc fr. ( $IC_{50} = 75.5 \mu\text{g/mL}$ )에서 대조군으로 쓰인 arbutin( $IC_{50} = 87.3 \mu\text{g/mL}$ )보다 우수한 저해 활성을 보이는 것을 알 수 있었으며, 분리된 *p*-hydroxybenzoic acid( $IC_{50} = 135.4 \mu\text{g/mL}$ )와 methyl *p*-hydroxybenzoate( $IC_{50} = 99.9 \mu\text{g/mL}$ )에서 저해활성을 보였다. Methyl *p*-hydroxybenzoate의 경우 대조군인 arbutin( $IC_{50} = 87.3 \mu\text{g/mL}$ )과 비슷한 저해활성이 갖는 것을 확인할 수 있었다.

Tyrosinase 저해 활성을 보인 *p*-hydroxybenzoic acid와 methyl *p*-hydroxybenzoate를 Linweaver-burk plot를 이용하여 효소 저해 작용을 측정된 결과 2개의 화합물 모두 기질로 사용한 L-tyrosine과 경쟁적으로 저해 활성을 보이는 것으로 나타났다.

이상 생리활성 검색 결과 좁은잎천선과 가지에서 분리한 syringic acid와 잎에서 분리한 catechin이 DPPH radical 소거 능력이 우수한 것을 알 수 있었으며, tyrosinase 저해 활성실험에서 좁은잎천선과 가지 분획물인 EtOAc fr. 이 강력한 저해활성을 갖는 것으로 확인 되었고, 분리화합물인 경우 *p*-hydroxybenzoic acid와 methyl *p*-hydroxybenzoate가 저해 활성을 보이는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 실험결과를 바탕으로 좁은잎천선과 잎과 가지를 이용한 항산화제 및 미백제 소재 개발 가능성을 기대 할 수 있을 것이라고 예상된다.

## V. 참고문헌

- 1) 김주희, 병솔꽃나무 가지로 부터 엘라스타제 저해 활성 및 DPPH 라디칼 소거 활성 성분 분리, 제주대학교 대학원 석사학위 논문, 2010
- 2) 고희철, 진굴, 제주조릿대 및 미역쇠 성분동정 및 생리활성 연구, 제주대학교 대학원 박사학위논문, 2010
- 3) 김은철, 안소영, 홍은숙, 이광화, 김은기, 노경호, 천연물에 포함된 미백성분의 추출 및 미백효과, 2005, *J. Korean Ind. Eng. Chem*, 16, 348-353
- 4) 김정미, 솔비나무, 감태 등의 제주식물들로 부터 기능성화장품 소재 개발 연구, 제주대학교 대학원 박사학위논문, 2010
- 5) 정진호, 피부노화 방지 치료제 기술동향, 서울대학교 의과대학 피부과학교실, 2004, 33
- 6) Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*. 1958, 181, 1199-1200
- 7) Young, M.H.; Sang, W.C.; Suhee, S.; Hyojin, L.; Hongsook, S.; Hae, Y.C. 4-(6-Hydroxy-2-naphtyl)-1,3-Bezendiol: Apotent, New tyrosinase inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, 30, 1711-1715
- 8) M. Rowshanul Habib.; Fajana Nikkon.; Matiar Rahman. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from Methanolic Extract of Root Bark of *Calotropis gigantea*(Linn). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10, 4174-4176

- 9) Seunguk Paik.; Gi hong Kim.; Jae Sung Park. A Symbiotic Bacterium *Photorhabdus luminescence* as a Rich Source of Cinnamic acid and Its Analogue. *J. Ind. Eng. Chem.* **2005**, *11*, 475-477
- 10) Sung Ran Huh.; Young Soo Kim.; Eun Sun Jung.; Deok Hoon Park. Melanogenesis Inhibitory Effect of Fatty Acid Alkyl Esters Isolated from *Oxalis triangularis*. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 1242-1245
- 11) Ya Ching Shen.; Li Tang Wang. New Triterpenoid Fatty Acid Esters from the Small Twigs of *Viburnum odoratissimum*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **2003**, *50*, 297-302
- 12) Dang Thi Lan Huong.; Jong Seong kang.; Young Ho Kim. Monoamine Oxidase Inhibitors from *Aquilariaagallocha*. *Natural Product Sciences.* **2002**, *8*, 30-33
- 13) Sisay Feleke.; Abeba Brehane. Triterpene compounds from the Latex of *Ficus Sur I*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2005**, *19*, 307-310
- 14) Teresita S, Martin.; Hiroe Kikuzaki. Constituents of *Amomum tsao-ko* and their Radical Scavenging and Antioxidant Activities. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **2000**, *77*, 667-673
- 15) Sheng Ming Pan.; Hsiou Yu Ding.; Wen Liang Chang. Phenols from the Aerial Parts of *Leonurus sibiricus*. *The Chinese Phamaceutical Journal*, **2006**, *58*, 35-40
- 16) Sevil Oksuz.; Ayhan Ulubelen.; Asli Barla. Terpenoids and Aromatic Compounds from *Euphorbia heteradena*. *Turk J Chem.* **2002**, *26*, 457-463

- 17) Hahime Ono.; Yasumasa Kuwahara.; Ritsuo Nishida. Hydroxybenzoic acid Derivatives in a Nonohost Rutaceous plant, *Orixa japonica*, Deter both oviposition and Larval feeding in a rutaceae-feeding swallowtail butterfly, *papilio xuthus* L. *Journal of Chemical Ecology*, **2004**, *30*, 287-301
- 18) Song Yan.; CHEN Guang tong.; SUN Bo hang. Chemical constituents of water-soluble part of *mentha spicata* L. *Journal of Shenyang Phamaceutical University*, **2008**, *25*, 705-707
- 19) Sang Hyun Lim.; Hee Yun Kim.; Kyung Hee Kim. Isolation of Herbicidal Compound Methyl-p-Hydroxybenzoate from *Epimedium koreanum* Nakai. *Kor. J. Weed Sci.* **2007**, *27*, 235-240
- 20) Ju Hee Kim.; Nam Ho Lee. Compounds with elastase inhibition and free radical scavenging activities from *Callistemon lanceolats*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2009**, *3*, 914-920
- 21) Junichi Saijyo.; Yousuke Suzuki.; Yoshiharu Okuno.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from *Bergenia ligulata*. *Journal of Oleo Science*, **2008**, *57*, 431-435
- 22) Emi Okuyama.; Tetsuya Hasegawa.; Takamitsu Matsushita. Analgesic Components of Saposhnikovia Root(*Saposhnikovia divaricata*). *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 154-160
- 23) Leslie J. Harrison.; Guat Lee Sia.; Keng Yeow Sim.; Hugh T.W. Tan. A Ferulic acid ester of sucrose and other constituents of *Bhesa paniculata*. *Phytochemistry*, **1995**, *38*, 1497-1500

24) Gerhard Knothe James A. Kenar. Determination of the fatty acid profile by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **2004**, *106*, 88-96

25) Duilio Arigoni.; Wolfgang Eisenreich.; Christoph Latzel. Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1999**, *96*, 1309-1314

26) Nasim Sultana.; Nam Ho Lee. A New Alkene Glycoside from the Leaves of *Sasa quepaertensis* Nakai. *Bull. Korean Chem. Soc*, **2010**, *31*, 1088-1090

27) 황영선, 녹색자엽 검정콩 함유 기능성 색소의 분리 및 분석, 강원대학교 산업대학원 석사학위논문, **2009**

28) Qing Xi Chen.; Kang Kang Song.; King qiu.; Xiao Dan Liu. Inhibitory Effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids. *Food Chemistry*, **2005**, *91*, 269-274

29) Yan Shi.; Qing Xi Chen.; Qin Wang.; Kang Kang Song.; Ling Qiu. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase, *Food Chemistry*, **2005**, *92*, 707-712

30) 류태형. Principles of biochemistry. 자유아카데미. **1980**, 386-396

## 감사의 글

대학교학부를 졸업하고 대학원 석사생활의 일들이 어제 일처럼 생생하기만 합니다. 벌써 대학원생활을 마무리짓는 논문을 쓰게 되었습니다. 우선 대학원 석사 과정을 무사히 마칠 수 있도록 세심한 배려와 가르침을 주신 이남호 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 그리고, 논문심사를 위해 바쁘시면서도 부족한 논문을 세심하게 다듬어 주신 김원형교수님, 이선주교수님께 감사의 말씀 전하고자 합니다. 또한 부족하지만 항상 저를 따뜻하게 감싸주신 정덕상 교수님, 변종철교수님, 김덕수교수님, 강창희 교수님께에도 다시한번 감사의 말씀 올립니다.

실험실생활과 논문이 나오기 까지 많은 도움과 사랑을 주신 백종석선생님, 이지아선생님, 윤진석선생님, 오태헌선생님, 김정미선생님, 김상숙선생님께에도 고마움을 올립니다. 먼저 졸업하고 취직하여 열심히 일하는 영민이누나, 미연이누나, 려경이누나, 실험실에서 말 안 듣지만 잘 따라준 하나, 성천, 정환이 등 연구실 선·후배 모든 분께 고마운 마음 전합니다.

또한 석사입학동기인 행범이형, 용수형, 유미, 정은, 혜림이에게 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 아울러 대학원생활을 하면서 많은 도움을 주신 한충훈선생님, 희철이형, 경범이형 그리고 동고동락했던 내 친구인 은성이, 호균이, 성현이, 동호, 성훈이 등 모든 친구들에게 감사의 마음전합니다.

논문이 나올 수 있도록 많은 배려를 해주신 (주)휴림 백순옥대표이사님 그리고, 조주현차장님 정말 감사합니다.

마지막으로 논문이 나오기 까지 고통을 함께 참아내고, 무한한 사랑을 주신 부모님, 여진누나, 소영이누나, 은지누나, 영신이에게 모든 결실을 바칩니다.