



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

새우나무 잎 추출물로부터  
항산화 및 항균 활성

濟州大學校 大學院

化 學 科

강 상 훈

2011年 8月

새우나무 잎 추출물로부터  
항산화 및 항균 활성

指導教授 李 璿 柱

姜 尙 勳

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 8月

姜尙勳의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

濟州大學校 大學院

2011年 8月

Antioxidantive And Antibacterial Effects of  
Extract from *Ostrya japonica* Leaves.

Sang-Hoon Kang  
(Supervised by Professor Sunjoo Lee)

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

2011. 8.

This thesis has been examined and approved.

Commitee 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	v
Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시약 및 기기	4
2. 재료	4
3. 추출, 분획 및 분리	5
3-1. 새우나무 잎의 추출 및 분획	5
3-2. Compound 1의 분리과정	6
3-3. Compound 2의 분리과정	6
3-4. Compound 3의 분리과정	7
4. 활성 검색	9
4-1. DPPH radical scavenging test	9
4-2. Antibacterial test	11
5. 총 폴리페놀 화합물의 함량 분석	12
III. 결과 및 고찰	13
1. 새우나무 잎에서 분리된 화합물의 구조 결정	13
1-1. Compound 1의 구조 해석	13
1-2. Compound 2의 구조 해석	15
1-3. Compound 3의 구조 해석	19
2. DPPH radical scavenging activity	27



2-1. 새우나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 .....	27
2-2. 새우나무 잎으로부터 분리된 화합물의 활성 .....	29
3. Antibacterial test .....	31
3-1. 새우나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 .....	31
4. 총 폴리페놀 화합물의 함량 분석 .....	32
IV. 요약 및 결론 .....	34
V. 참고문헌 .....	35

## LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Procedure of solvent fractionation for ethanol extract of <i>Ostrya japonica</i> Leaves. ....	5
Scheme 2. Isolation of compound <b>1</b> .....	6
Scheme 3. Isolation of compound <b>2</b> .....	7
Scheme 4. Isolation of compound <b>3</b> .....	8

## LIST OF TABLES

Table 1. NMR spectroscopic data <sup>a</sup> for compound <b>1</b> .....	14
Table 2. NMR spectroscopic data <sup>a</sup> for compound <b>2</b> .....	18
Table 3. NMR spectroscopic data <sup>a</sup> for compound <b>3</b> .....	25

## LIST OF FIGURES

Figure 1. Photograph of <i>Ostrya japonica</i> .....	2
Figure 2. Scavenge of the DPPH radical by phenol .....	10
Figure 3. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	13
Figure 4. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	14
Figure 5. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	16
Figure 6. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	17
Figure 7. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	20
Figure 8. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	21
Figure 9. 135° DEPT-NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	22
Figure 10. HMQC NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	23
Figure 11. HMBC NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	24
Figure 12. Chemical structure of compound <b>1</b> , <b>2</b> and <b>3</b> .....	26
Figure 13. DPPH radical scavenging activities of solvent extracts obtained	

from <i>Ostrya japonica</i> Leaves .....	28
Figure 14. DPPH radical scavenging activities of solvent layers obtained from <i>Ostrya japonica</i> Leaves .....	28
Figure 15. RC <sub>50</sub> value of DPPH radical scavenging activities for compound <b>2</b> and <b>3</b> .....	29
Figure 16. Antibacterial Test Result of solvent extract and layers obtained from <i>Ostrya japonica</i> Leaves .....	31
Figure 17. Polyphenol contents of solvent extracts obtained from <i>Ostrya</i> <i>japonica</i> Leaves .....	32
Figure 18. Polyphenol contents of solvent layers obtained from <i>Ostrya</i> <i>japonica</i> Leaves .....	33



## List of Abbreviations

MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
V	VLC subfraction
Vit. C	Vitamin C
Fr.	Fraction
CC	Column chromatography
TLC	Thin layer chromatography
NMR	Nuclear magnetic resonance
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
J	Coupling constant (Hz)
s	Singlet
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
m	Multiplet
int	Integration
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

## Abstract

*Ostrya japonica* (Betulaceae) tree distributed in the southern region of Korea. In our continuing efforts to find biologically active compounds from plants in Jeju Island, we became interested in the extract of *Ostrya japonica* leaves. Repeated column chromatography of chloroform and ethyl acetate soluble fractions in the ethanol extract led to the isolation three compounds, such as 4-hydroxybenzaldehyde (1), quercitrin (2), carpinontriol B (3). All of these compounds were isolated for the first time from *Ostrya japonica*. In addition, activities of the extract and isolated compounds were monitored.

These structures of isolated compounds 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.

The results of the anti-oxidation activity test, indicated that the two compounds, quercitrin (2) and carpinontriol B (3), showed DPPH radical scavenging activity with  $RC_{50}$  of 13.12, 58.16  $\mu\text{g/mL}$  respectively (vitamin C,  $RC_{50}$  : 8.80  $\mu\text{g/mL}$ ).

Anti-bacterial effects against six kinds of microorganisms(gram positive-*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Subtilis*, gram negative-*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*) were measured by paper disc method.

Test results showed that good anti-bacterial activity in ethyl acetate layer and butanol layer.

In conclusion, several phytochemicals *Ostrya japonica* showed biological activities such as inhibition of anti bacterial and DPPH radical scavenging activities, suggesting that these might provide the leads for anti-bacterial or anti-oxidant cosmeceutical ingredient.

## I. 서론

21세기에 접어들면서 인류의 문명과 생활수준이 급속하게 발전하게 됨에 따라 삶을 영위할 수 있는 장수에 대한 욕구가 증가되고 있다. 인류의 건강에 대한 인식이 갈수록 고조되고 질병 방지와 노화 억제 등 생리적 효능에 대한 관심이 높아짐에 따라 항산화 효과와 항균활성을 나타내는 활성성분에 관심이 집중되고 있다.<sup>1)</sup>

생체 내에서 에너지 생산을 위한 산화과정 중에 상당량의 활성산소들이 생성되며, 이들 활성산소는 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되지만 순간적으로 활성산소가 다량으로 발생되거나 만성적으로 활성산소가 발생되어 항산화방어계와의 균형이 깨지면 각종 질환의 원인이 된다.<sup>2)</sup>

유해산소로 알려져 있는 활성산소인 superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ) 등은 가장 안정한 형태인 삼중항산소(triplet oxygen,  $^3O_2$ )가 환원되면서 생성되어지며, 이러한 활성산소는 반응성이 매우 강하여 이들에 의하여 야기되는 free radical 반응은 세포구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 비선택적, 비가역 반응에 의하여 파괴한다.<sup>3)</sup> 따라서, 이러한 활성 산소종을 제거할 수 있는 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 지금까지 개발되어 사용되고 있는 합성 항산화제로는 BHT(butylated hydroxy toluene), BHA(butylated hydroxy anisole), TBHQ(Tertiary butylhydroquinone) 등이 탁월한 효과와 경제성 때문에 이용되고 있으나 발암 및 독성과 같은 안정성에 논란이 있어 소비자의 기피현상이 증가하고 있으며<sup>4)</sup> 이에 따라 근래에는 천연물로부터 항산화 효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다.

천연물에서 추출한 무독성 자연 항산화제 연구가 활발한데 식물체도 인체처럼 자외선 산화나 자동산화로부터 보호하기 위해 자체적으로 polyphenol 계통의 천연물질 flavonoid와 산성 페놀화합물 등이 항산화성, 항균성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리활성 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀지면서 큰 관심을 모으고 있다.

새우나무는(*Ostrya japonica*)는 우리나라 남부 산 중턱 이하의 산골짜기에 나는 낙엽 교목으로 키 20 m, 지름 70 cm이며 수피는 갈색 또는 회갈색을 띠고 비늘처럼 쌓여 있는 것이 특징이다. 잎은 호생하며 난형 또는 난상 타원형으로 길이가 5~13 cm이고 폭은 3~5 cm이다. 측맥이 9~13쌍이며 가장자리에 겹톱니가 있고 양면에 곧게 선 잔 털이 있다<sup>5)</sup>(Figure 1).



Figure 1. Photograph of *Ostrya japonica*.

새우나무 추출물에는 catechin, Quercetin, chlorogenic acid, caffeic acid, protocatechuic acid 등의 폴리페놀 성분들이 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 현재까지 항산화 및 주름 억제 활성이 보고되어 있다.<sup>6-11)</sup>

본 연구에서는 제주도에 자생하는 새우나무 잎을 에탄올로 추출하고 n-hexane, Chloroform, Ethyl acetate, butanol을 이용하여 분획한 후 Column chromatography를 실시하여 화합물을 분리 정제하였다. 또한, 얻어진 결과물들에 대하여 HPLC 분석 및 NMR을 통한 구조분석을 실시하였고, 항산화 및 항균 활성을 측정하여 천연항산화제 및 천연 항균화제로서의 가능성을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

실험에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 社 제품을 사용하였다. Column packing material은 silica gel 60(0.040-0.063 mm, Merck Co.), Sephadex<sup>TM</sup> LH-20(Amersham Biosciences USA) 및 Celite(규조토)를 사용하였다. 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 사용하였으며, TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp(254, 365 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조 시켰다. Visualizing agent는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액과 Anisaldehyde 발색 시약을 사용하였다.

시료의 흡광도를 측정하기 위해 사용한 기기는 UV spectrometer로써, Biochrom Libra s22(cambridge Inc., England)를 이용하였다.

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>OD를 사용하였다.

### 2. 재료

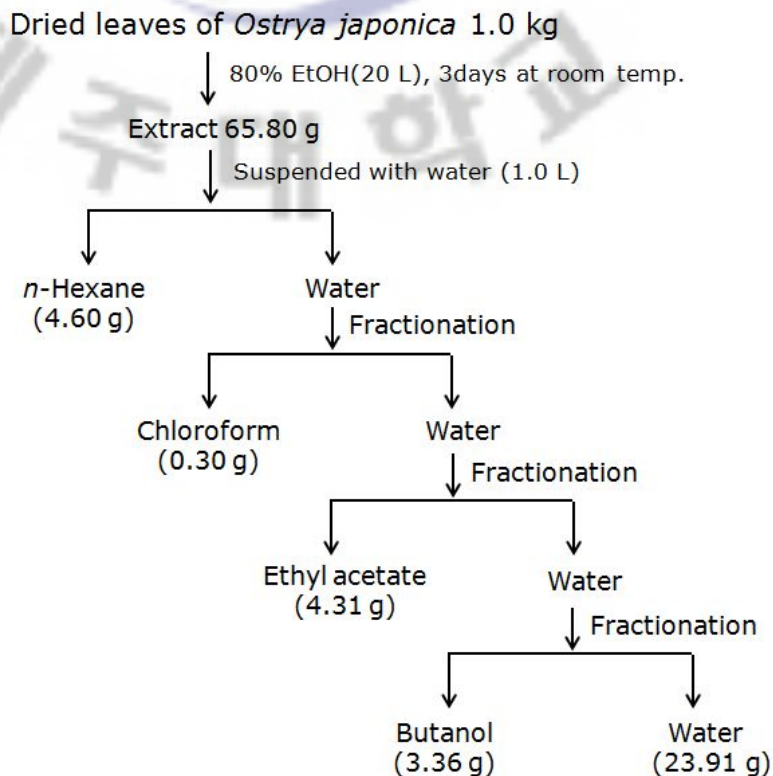
실험에 사용한 새우나무 잎은 2009년에 채집하였으며 시료의 동정은 채집하였던 제주 한라수목원에서 이루어졌다. 채집한 새우나무는 잎과 가지를 분리하여 실온에서 자연 건조시킨 후, 분쇄하여 사용하였으며 본 연구에서는 잎 부분만 사용하였다.

### 3. 추출, 분획 및 분리

#### 3-1. 새우나무 잎 추출 및 분획

건조된 새우나무 잎 1.0 kg을 80% ethanol 20 L 에 침적하여, 실온에서 3일 동안 침출 시켰다. 침출 시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 여과하여 얻어진 여액은 40°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 80% ethanol 추출물 65.80 g을 얻었다.

얻어진 80% ethanol 추출물을 H<sub>2</sub>O 1 L 에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water fraction을 각각 4.60, 0.30, 4.31, 3.36, 23.91 g을 얻었다(Scheme 1).

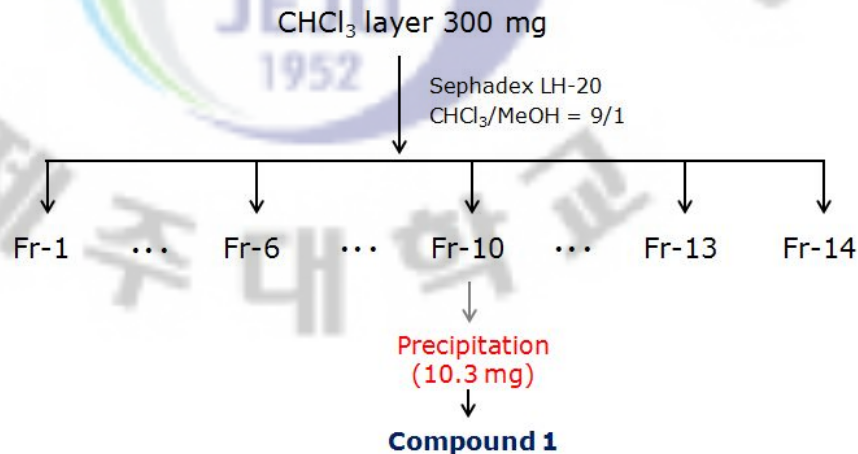


Scheme 1. Procedure of solvent fractionation for ethanol extract of *Ostrya japonica* Leaves.

### 3-2. Compound 1의 분리과정

새우나무 잎 추출물로 분획을 실시하여 얻은 chloroform fraction 0.30 g을 Sephadex LH-20으로 충전된 컬럼에 loading하여 column chromatography를 실시하였다.

컬럼 이동상과 TLC 이동상으로는 chloroform과 methanol을 9:1로 혼합하여 사용하였으며, TLC를 통하여 spot을 확인 후, 총 14개의 fraction으로 나누었다. 그 중 fr. 10에서 methanol에만 녹는 침전물이 생겨 자연 여과법으로 여과한 후에 10.3 mg의 Compound 1을 얻었다(Scheme 2).



Scheme 2. Isolation of compound 1

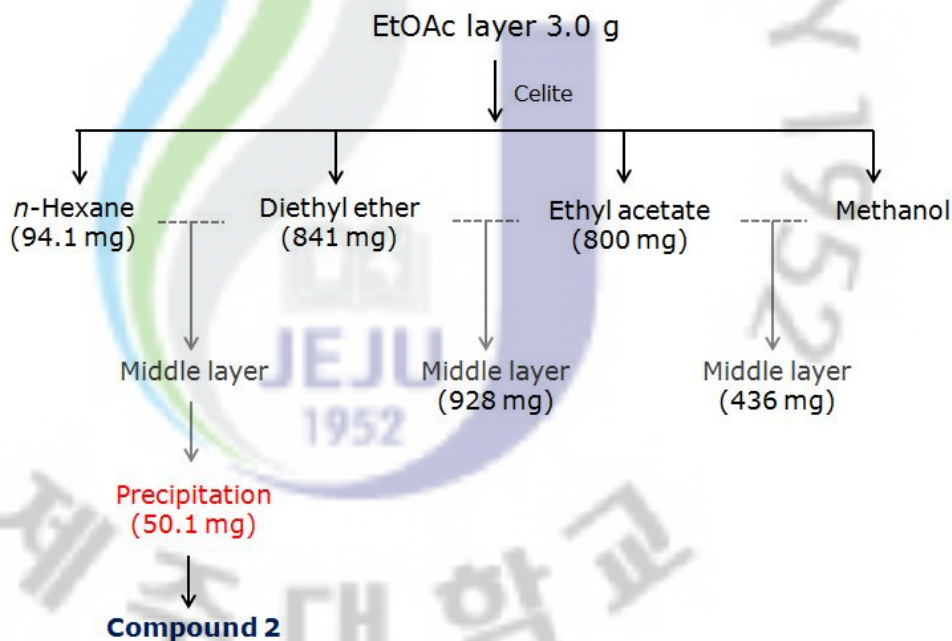
### 3-3. Compound 2의 분리과정

새우나무 잎 추출물로 분획을 실시하여 얻은 ethyl acetate fraction 3.00 g을 메탄올에 녹여 celite과 함께 섞어 샘플이 celite를 흡착이 잘 되도록 하였다.

column은 celite로 먼저 충진을 하고 그 위에 흡착시켜 놓은 샘플을 충전하였고 이동상은 *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate methanol을 이용하였다. 여기서 *n*-hexane과 diethyl ether의 중간층에서 비이커 바닥에 하얀색을 띠



는 결정이 생겨 침전물만 따로 여과하였다. 여과된 침전물은 *n*-hexane과 chloroform에 녹지 않아 methanol에 녹였고, 농축을 실시하였으며 50.1 mg의 compound 2를 얻었다(Scheme 3).



Scheme 3. Isolation of compound 2

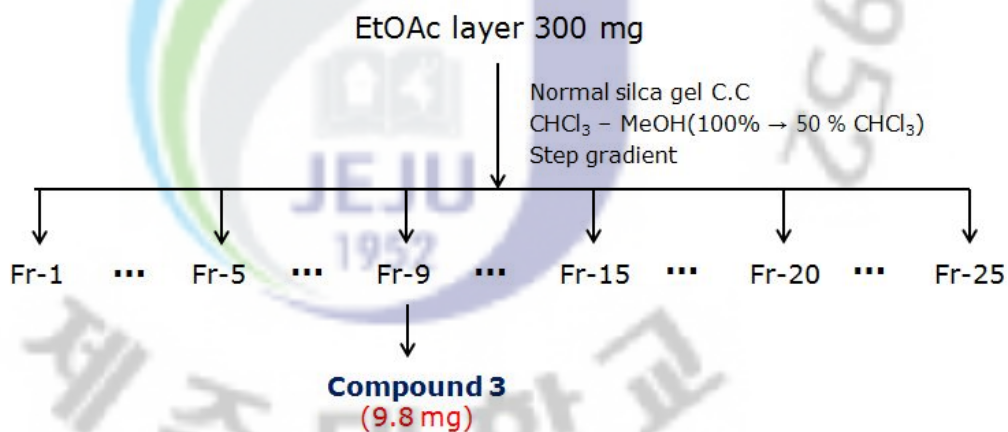
#### 3-4. Compound 3의 분리과정

새우나무 잎 추출물로 분획을 실시하여 얻은 ethyl acetate fraction 0.30 g을 normal silica gel로 충전된 column에 loading하여 column chromatography를 실시하였다. 이동상은 chloroform과 methanol을 사용하였으며 100% chloroform에서 50% chloroform 까지 5% 씩 methanol의 양을 늘리는 step gradient 방법을 하였다. 이동상은 step 마다 400 mL 씩 제조하여 사용하였고 40 mL 씩 삼각 플라스크에 받아 총 25개의 fraction을 받았다.

25개의 fraction을 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 기기를 이용하여 분석하였으며 컬럼은 Universil (4.6 × 150 mm), 유속은 min 당

1.0 mL을 흘렸으며, injection volume은 10  $\mu$ L, 파장은 254 nm에서 측정하였다. 이동상 조건은 증류수(A-Distilled water)와 메탄올(B)을 이용하여 40분 동안 20% B 용매에서 80% B 용매가 되도록 gradient 하여 측정하였다.

HPLC 결과를 통해 fraction 9에서 깨끗한 chromatogram을 확인하였고, NMR을 측정을 통하여 단일 물질임을 확인할 수 있었으며, 이를 Compound 3(9.8 mg)이라 하였다(Scheme 4).



Scheme 4. Isolation of compound 3

#### 4. 활성 검색

##### 4-1. 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 ~ 525 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 다음과 같이 실행하였다.

먼저 시료를 1 mg/mL의 농도가 되도록 70% 에탄올을 이용하여 녹이고, DPPH 시약은 0.2 mM 농도가 되도록 100% 에탄올과 DMSO를 이용하여 제조 하되, 이 때의 흡광도가 0.97에서 0.99가 되도록 맞춘다.

맞춰진 DPPH 용액 0.5 mL와 시료의 최종농도가 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL이 되도록 70% 에탄올 첨가하여 섞은 후 상온에서 10분간 반응시킨다. UV/Vis 분광광도계를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거작용(%)을 구한다. 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료의 농도 (RC<sub>50</sub>)를 계산하였다. 계산식은 아래와 같으며 이때 대조군으로는 vitamin C(L-ascorbic acid)를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = 1 - \frac{\text{DPPH와 시료반응액의 흡광도} - \text{시료 자체의 흡광도}}{\text{DPPH의 흡광도}} \times 100$$

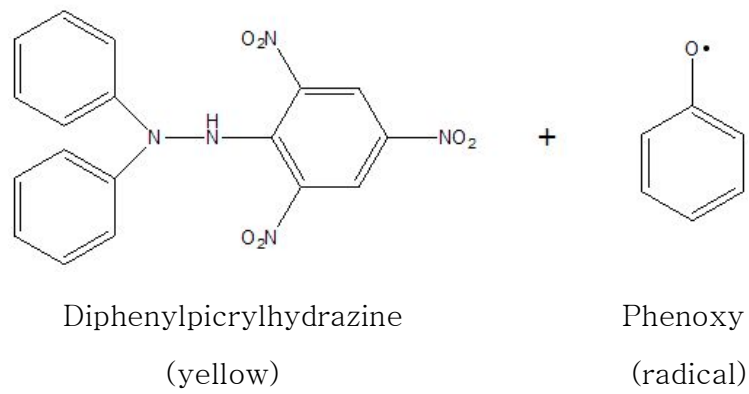
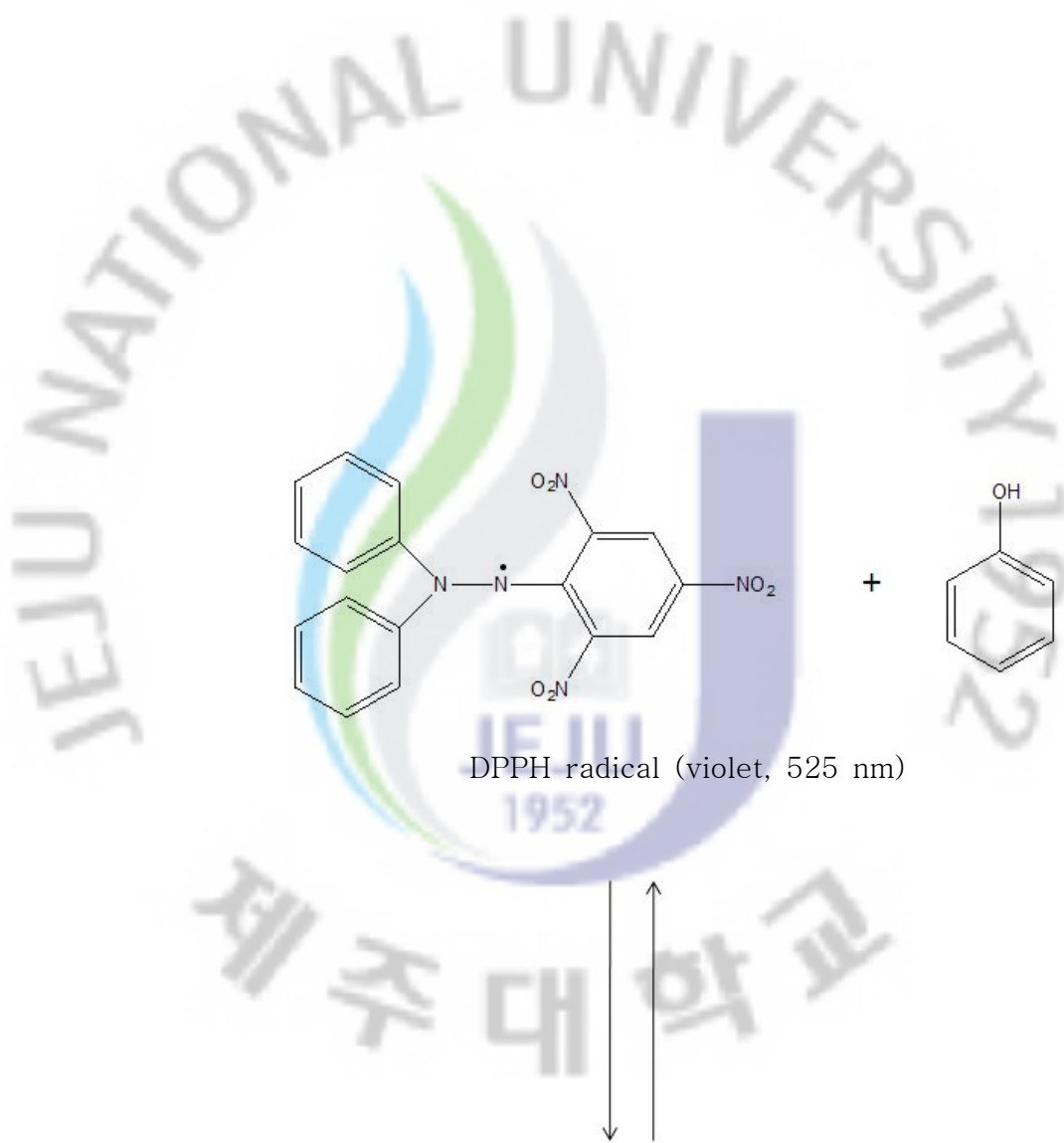


Figure 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol

#### 4-2. Antibacterial Test

새우나무 잎의 80% 추출물과 n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, water 분획층에 대하여 항균력을 스크리닝 하였다.

실험 방법은 paper disc 방법(한천 확산법)으로 그람양성균으로 *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 을 사용하였고 그람음성균으로는 *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* 을 하였으며 대조균으로 ampicillin을 사용하였다.

먼저 Mueller Hinton Agar(MHA) 준비하는데 오염여부를 확인하여 실험 전에 물기제거를 위하여 37°C incubator 에서 30분 정도 처리 하였다. 또한 균주(gram-positive / gram-negative)와 top agar를 혼합하는데 plate 당 5 mL 정도면 충분하여 top agar가 준비되면 50~60°C에서 균주와 혼합한 후에 MHA plate에 넣고 굳혔다.

disc(8 mm)에 항생물질 및 대조균을 처리하기 위하여 은박지를 깔고 그 위에 필요한 양만큼의 disc를 멸균한 핀셋으로 집어 올려놓은 후 disc에 축축이 적을 정도로 (보통 20 µL) standard(ampicillin), control(PBS), sample를 처리한 후 20~30분 정도 건조하였다. disc를 심기 위하여 마찬가지로 멸균된 핀셋으로 샘플이 처리된 disc를 집어서 균이 들어가 있는 plate 위에 살포시 올려놓고 35°C에서 24시간 배양하고 plate는 뒤집어서 배양하여 관찰하였다.

*Streptococcus pyogenes* : 연쇄상구균과(連鎖狀球菌科 Streptococcaceae)에 속하는 타원형 세균의 한 속(屬)이며 화농연쇄상구균이라 불린다. 병원성균으로 성홍열을 일으킨다.

*Streptococcus mutans* : 연쇄상구균과(連鎖狀球菌科 Streptococcaceae)에 속하며 병원성균으로 충치를 일으킨다.

*Staphylococcus aureus* : 구균과(球菌科 Micrococcaceae)에 속하는 구형 세균의 한 속으로써, 일반적으로 포동송이처럼 모이는 성질을 가진 모든 세포를 말하며 황색포도상구균이라 불린다. 또한 비운동성이며 산소가 필요하지 않은 통성 혐기성균으로 식중독의 가장 일반적인 원인 가운데 하나이다.

*Enterobacter aerogenes* : 사람을 포함한 동물의 장관(腸管)에서 흔히 볼 수

있는 미생물로써, 통성혐기성균으로 산소가 없어도 되고, 포자를 형성하지 않으며 젖당을 발효시켜 산과 가스를 발생시키는 간균이다.

*Escherichia coli* : 에세리키아속(一屬 *Escherichia*)에 속하는 간균으로 사람 또는 다른 동물의 장내에서 서식하는 장내세균 중 대부분을 차지하는 균종이다. 인돌 시험과 메틸레드 시험이 양성, 보기스 프로스카우어(Voges Proskauer) 시험과 구연산(시트르산) 이용시험에서는 음성을 보이는 것이 특징이다.

## 5. 총 폴리페놀 화합물의 함량 분석

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법을 약간 변형하여 실시하였다<sup>19)</sup>. 먼저 tannic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 tannic acid 1 mg을 50% methanol 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 최종농도가 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL이 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료 추출물을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수 1.8 mL를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 0.2 mL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고, 증류수 1.4 mL를 가하여 total volume이 4 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 화합물 함량을 환산하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 새우나무 잎에서 분리된 화합물 구조 결정.

##### 1-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.77(2H, d,  $J= 8.5$ )와  $\delta$  6.91(2H, d,  $J= 8.5$ )은 각각 2H 분의 doublet signal과 이보다 deshielding 된  $\delta$  9.76의 singlet signal을 관찰할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 deshielding는 aldehyde에 기인하는 carbon signal이 관찰되었고,  $\delta$  165.3에서 산소가 결합된  $sp^2$  carbon signal 및  $\delta$  133.5, 130.4, 117.0에서 나타나는 signal이 관찰되었으므로 문헌에 보고된 data와 비교한 결과<sup>12-14)</sup> *p*-hydroxybenzaldehyde로 동정하였다(Figure 3, 4)

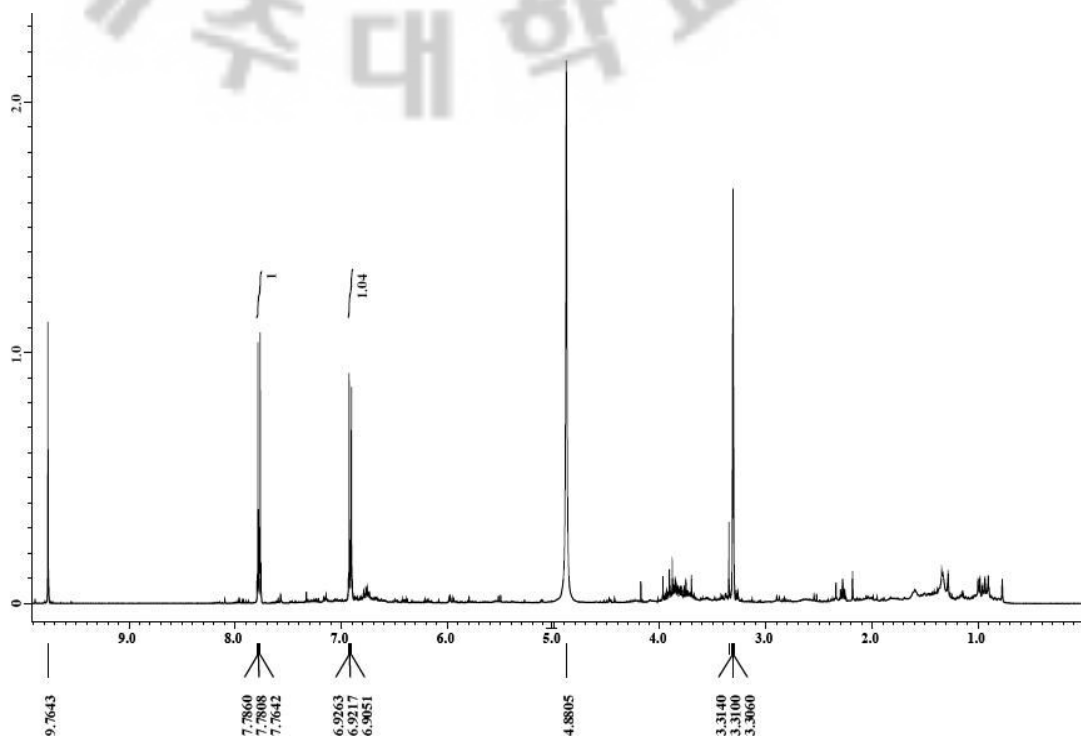


Figure 3.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$



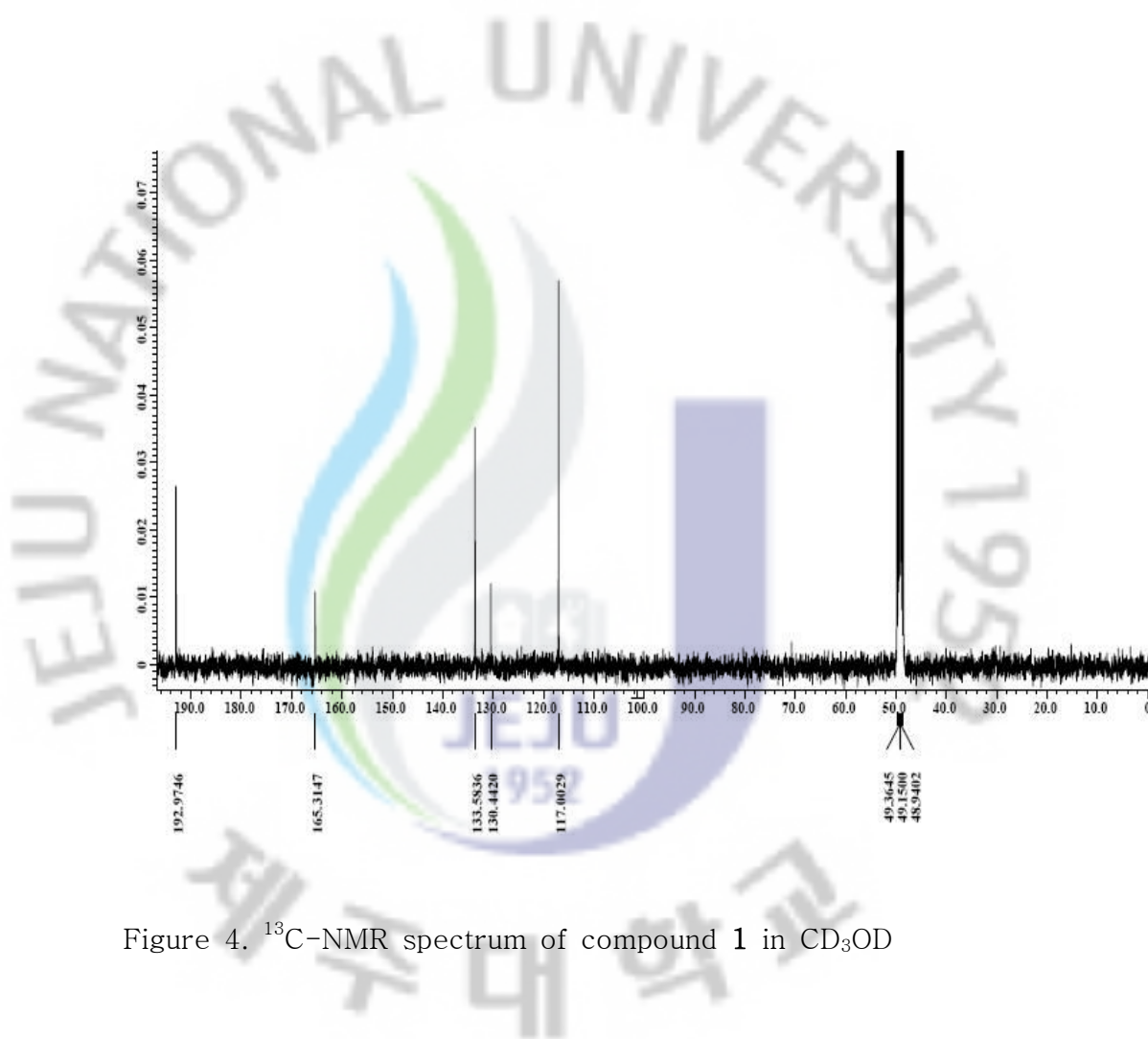


Figure 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Table 1. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compound 1 (400 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	compound 1	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		130.4
2	7.77 (2H, <i>d</i> , 8.5)	133.5
3	6.91 (2H, <i>d</i> , 8.5)	117.0
4		165.3
5		117.0
6		133.5
7	9.76 (1H, <i>s</i> )	192.9

<sup>a</sup>  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded in  $\text{CD}_3\text{OD}$  solution at 400 and 100 MHz, respectively.

## 1-2. Compound 2의 구조해석

compound 2는  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에 의해 21개의 탄소로 구성된 화합물임을 알 수 있었으며  $\delta$  179.7에서 carbonyl기를 포함하여 15개의  $sp^2$  탄소( $\delta$  165.9~94.8) signal들이 관찰되어 compound 2는 flavonoid를 함유한 화합물일 것이라고 예상하였다.

$^1\text{H}$ -NMR spectrum에서는  $\delta$  7.33,  $\delta$  7.30,  $\delta$  6.90,  $\delta$  6.36,  $\delta$  6.19의 signal들이  $sp^2$  수소임을 예상할 수 있었으며 이들의 coupling constant( $J$ )을 통하여 두 개의 meta coupling( $J=2.0, 2.1$ )과 한 개의 ortho coupling( $J=8.2$ )이 관찰되었다. 따라서 compound 2는 quercetin(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)을 함유하는 화합물일 것이라 예상을 하였다.

또한,  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서는  $\delta$  5.35~3.70에서 관찰되는 signal 및 0.94에서 관찰된 3H의 signal,  $\delta$  5.35의 anomeric proton signal(1H,  $d$ )의 존재로부터 1분자의 당이 함유된 화합물임을 알 수 있었고 문헌에 보고된 data와 비교한 결과<sup>15-17)</sup> quercetrin(quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside)임을 확인할 수 있었다(Figure 5, 6).

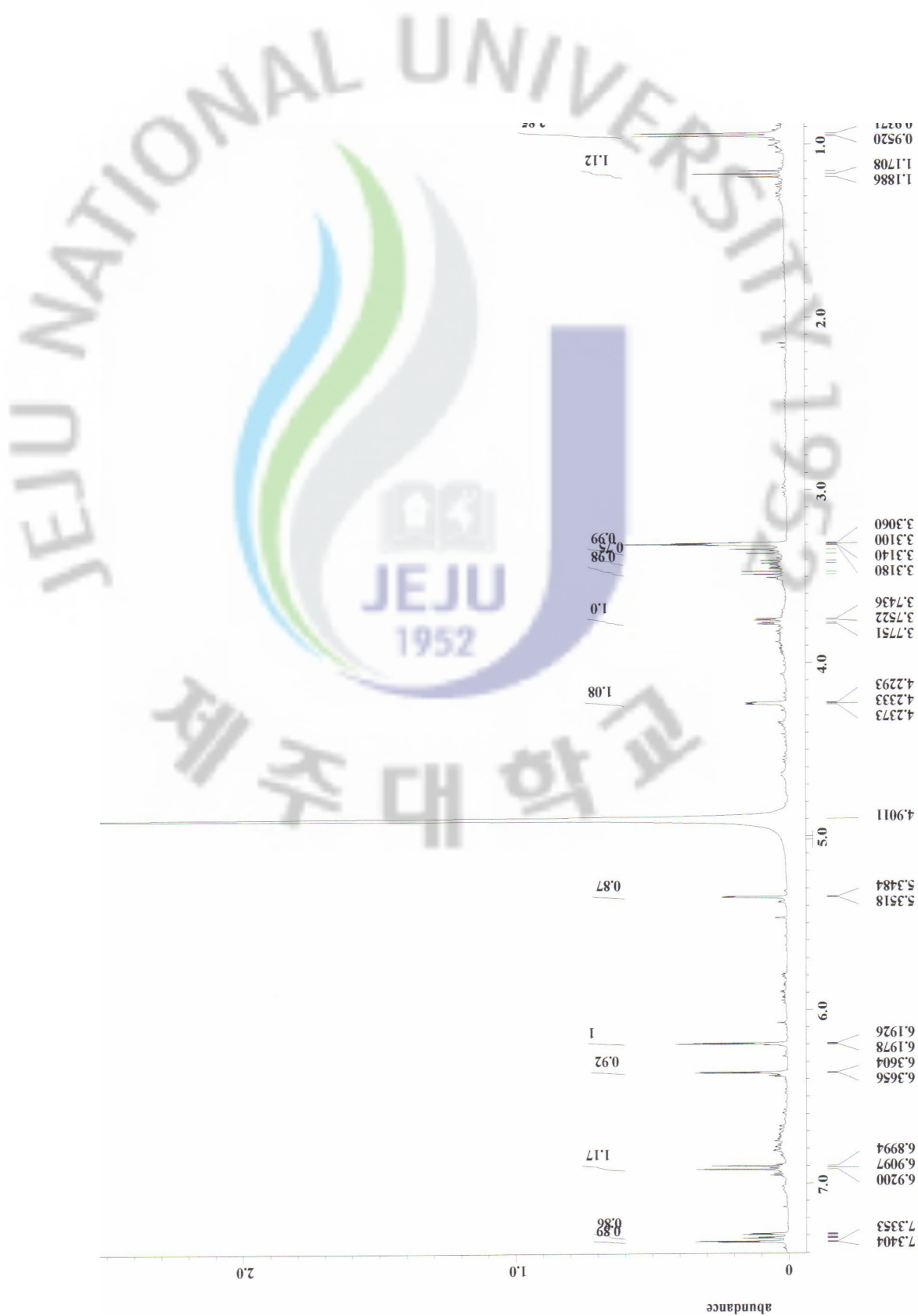


Figure 5.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

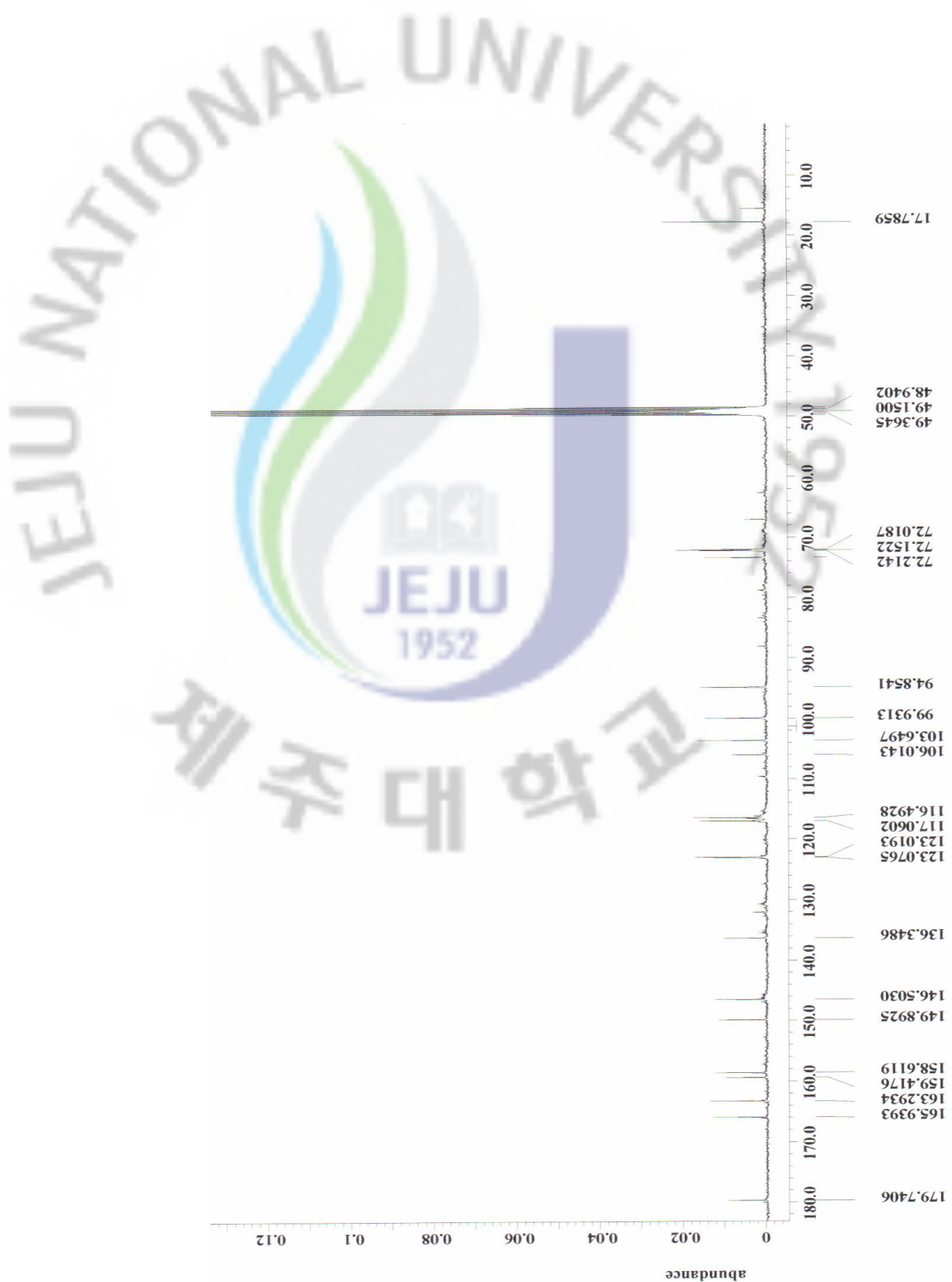


Figure 6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Table 2. NMR spectroscopic data<sup>a</sup> for compound **2** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD)

No.	compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		
2		159.4
3		136.3
4		179.7
5		163.2
6	6.19 (1H, <i>d</i> , 2.1)	99.9
7		165.9
8	6.36 (1H, <i>d</i> , 2.1)	94.8
9		158.6
10		106.0
1'		123.1
2'	7.33 (1H, <i>d</i> , 2.0)	117.0
3'		146.5
4'		149.8
5'	6.90 (1H, <i>d</i> , 8.2)	116.4
6'	7.30 (1H, <i>dd</i> , 2.0, 8.2)	123.0
1''	5.35 (1H, <i>d</i> , 1.4)	103.6
2''	4.23 (1H, <i>dd</i> , 1.6, 3.2)	72.2
3''	3.70 (1H, <i>dd</i> , 3.2, 9.4)	72.1
4''	3.14 (1H, <i>m</i> )	73.3
5''	3.03 (1H, <i>m</i> )	72.0
6''	0.94 (3H, <i>d</i> , 6.0)	17.7

<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 100 MHz, respectively.

### 1-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum을 통하여,  $\delta$  7.07 (1H, *dd*, 2.1, 8.2Hz),  $\delta$  6.99(1H, *dd*, 2.1, 8.2Hz),  $\delta$  6.80(1H, *d*, 8.2Hz),  $\delta$  6.76(1H, *d*, 8.2Hz),  $\delta$  6.63(1H, *d*, 1.8Hz),  $\delta$  6.33(1H, *d*, 1.8Hz)의 signal들은  $sp^2$  수소임을 예상할 수 있으며 이들의 coupling constant(*J*)을 통하여 aromatic ring의 수소들 간의 meta coupling과 ortho coupling이 각각 2개씩 관찰되었다. 또한  $\delta$  4.71, 4.21, 3.81에서는 aliphatic 수소에 전기음성도 큰 산소가 결합되어 있음을 예상할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 총 19개의 탄소가 결합되어 있음을 확인 할 수 있었으며 DEPT 135°를 통하여 4차 탄소가 6개, 3차 탄소가 10개, 2차 탄소가 3개로 이루어져 있음을 확인하였다.

$\delta$  215.8은 특징적인 signal로 화합물 내에 ketone이 결합되어 있고  $\delta$  153.0~117.0의 signal들은  $sp^2$  탄소로써, 그 중  $\delta$  152.1과 153.0의 signal은 aromatic ring에 hydroxy기가 결합되어 있음을 예상할 수 있었다. 또한  $\delta$  78.8, 69.9, 68.7에서는 전기음성도가 큰 산소가 결합되어 있고  $\delta$  37.7, 37.2, 25.3은 aliphatic 한 탄소가 결합되어 있는 것으로 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum을 보면 비슷한 signal을 보이는 두 개의 탄소들을 확인할 수 있는데 ( $\delta$  153.0 & 152.1,  $\delta$  135.2 & 135.1,  $\delta$  130.8 & 130.8,  $\delta$  127.6 & 126.7,  $\delta$  117.0 & 117.0) 이들은 앞서 측정한  $^1\text{H-NMR}$  spectrum data와 함께 참고하면 서로 비슷한 환경의 benzen ring이 서로 결합되어 서로 결합되어 있음을 유추할 수 있다.

대략적인 구조분석을 좀 더 확실하게 하기 위하여 2D NMR인 HMQC와 HMBC를 측정하였다. 그 결과 부분 구조들의 long range correlation을 확인할 수 있었으며 결과적으로 두 개의 benzen ring에 3개의 hydroxy group과 aliphatic 한 탄소가 연결된 구조로 diarylheptanoids 계열의 화합물로써, 문헌에 보고된 data와 비교한 결과<sup>18)</sup> 2002년에 신물질로 보고 된 Carpinontriol B임을 확인할 수 있었다(Figure 7-11).



Figure 7.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$



Figure 8.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$





Figure 9. DEPT-NMR spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD

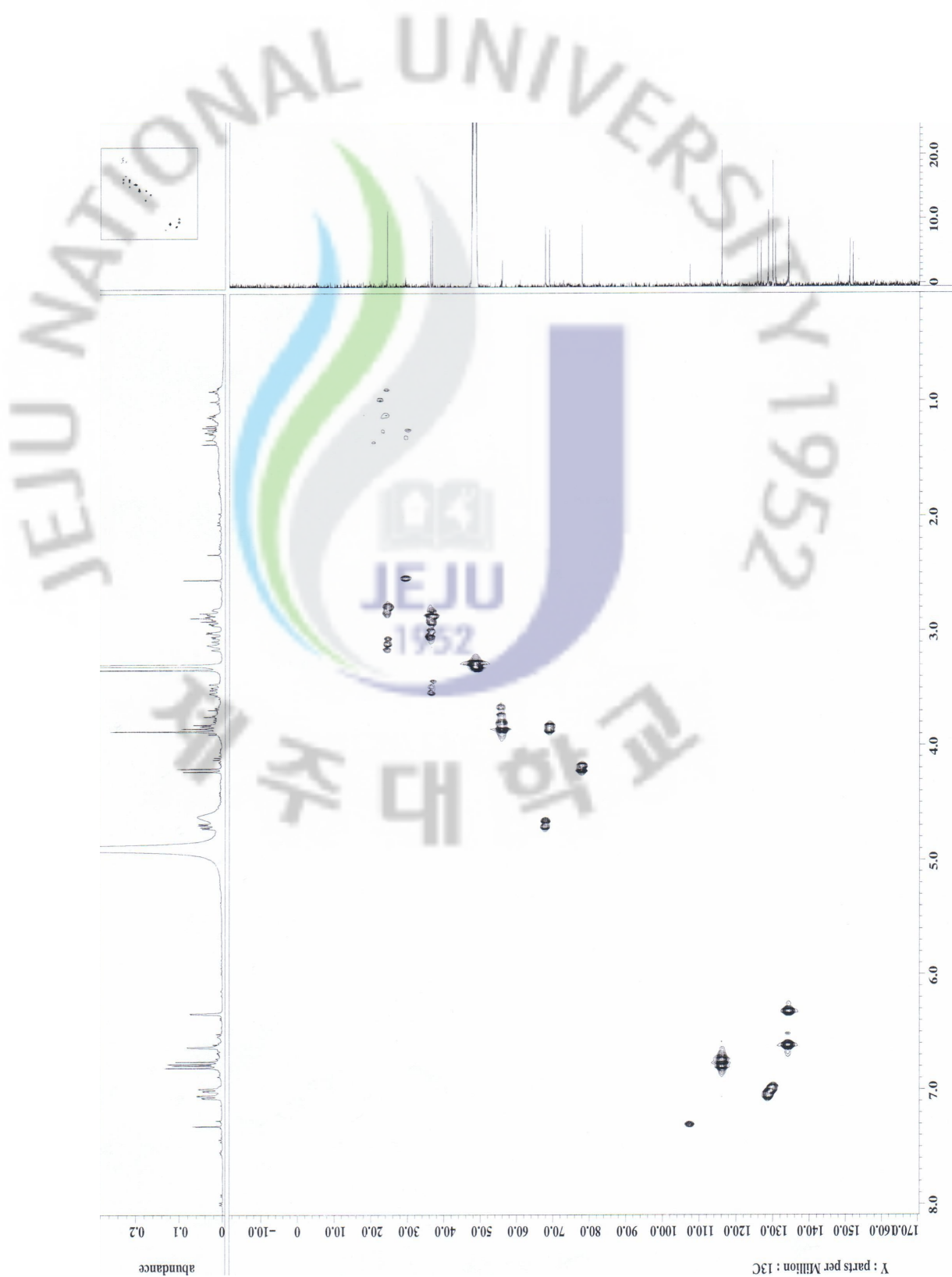


Figure 10. HMQC NMR spectrum of compound **3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

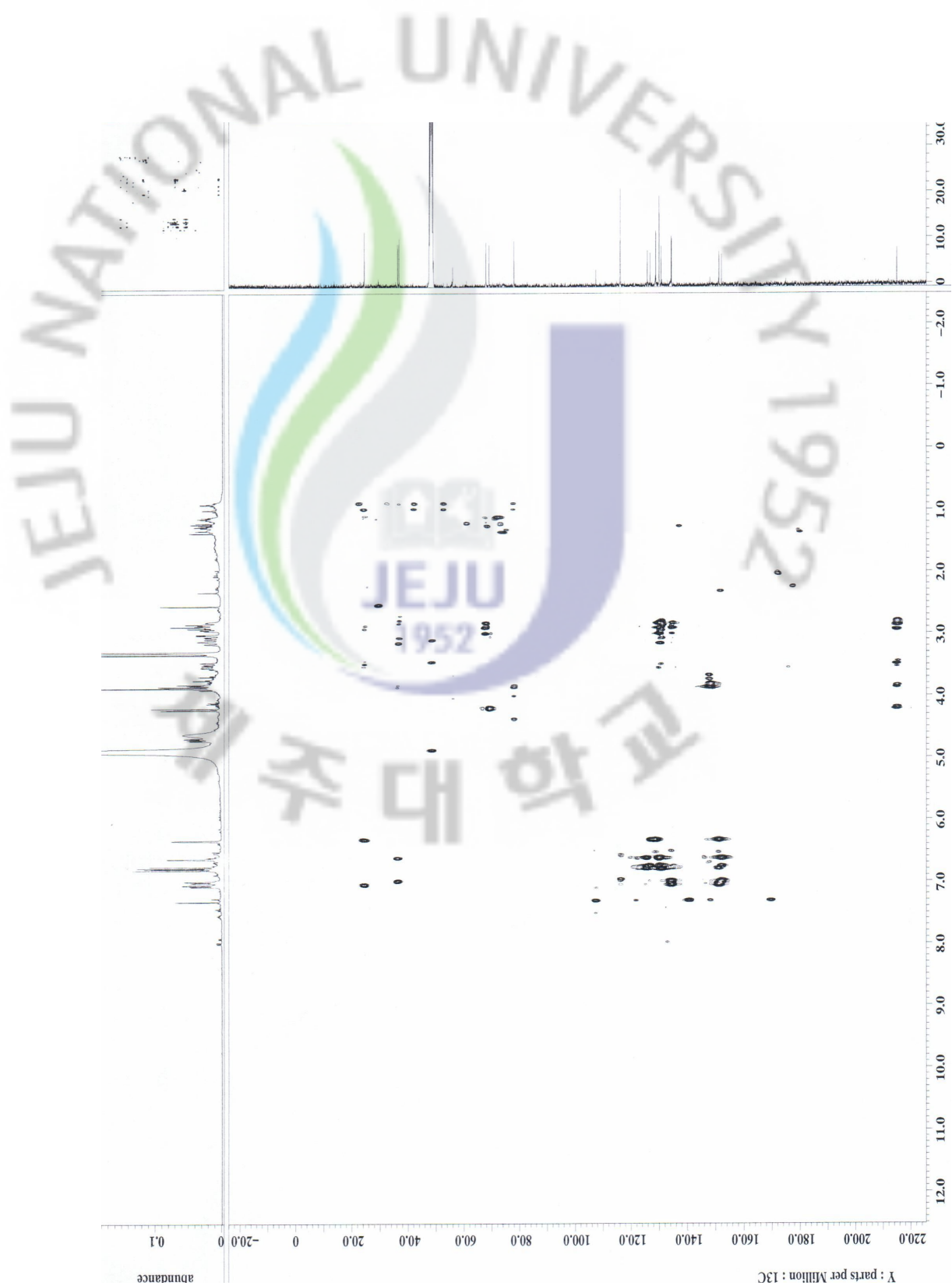


Figure 11. HMBC NMR spectrum of compound **3** in CD<sub>3</sub>OD

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

No.	compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, multi, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1		131.5
2	6.99 (1H, <i>dd</i> , 2.1, 8.2)	130.8
3		153.0
4	6.76 (1H, <i>d</i> , 8.2)	117.0
5		130.8
6		127.6
7-H <sub>a</sub>	2.88 ( <i>m</i> )	37.2
7-H <sub>b</sub>	3.03 (1H, <i>dd</i> , 4.3, 15.9)	
8	4.71 (1H, <i>dd</i> , 4.3, 11.7)	68.7
9	3.81 (1H, <i>d</i> , 10.1)	69.9
10	3.03 (1H, <i>d</i> , 4.2)	78.8
11		215.8
12-H <sub>a</sub>	2.92 ( <i>m</i> )	
12-H <sub>b</sub>	3.50 (1H, <i>ddd</i> , 4.2, 12.7, 20.0)	37.7
13-H <sub>a</sub>	2.81 ( <i>m</i> )	25.3
13-H <sub>b</sub>	3.14 (1H, <i>dd</i> , 12.7, 16.5)	
14		126.7
15	7.07 (1H, <i>dd</i> , 2.1, 8.2)	129.6
16	6.80 (1H, <i>d</i> , 8.2)	117.0
17		152.1
18	6.33 (1H, <i>d</i> , 1.8)	135.2
19	6.33 (1H, <i>d</i> , 1.8)	135.1

<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 100 MHz, respectively.

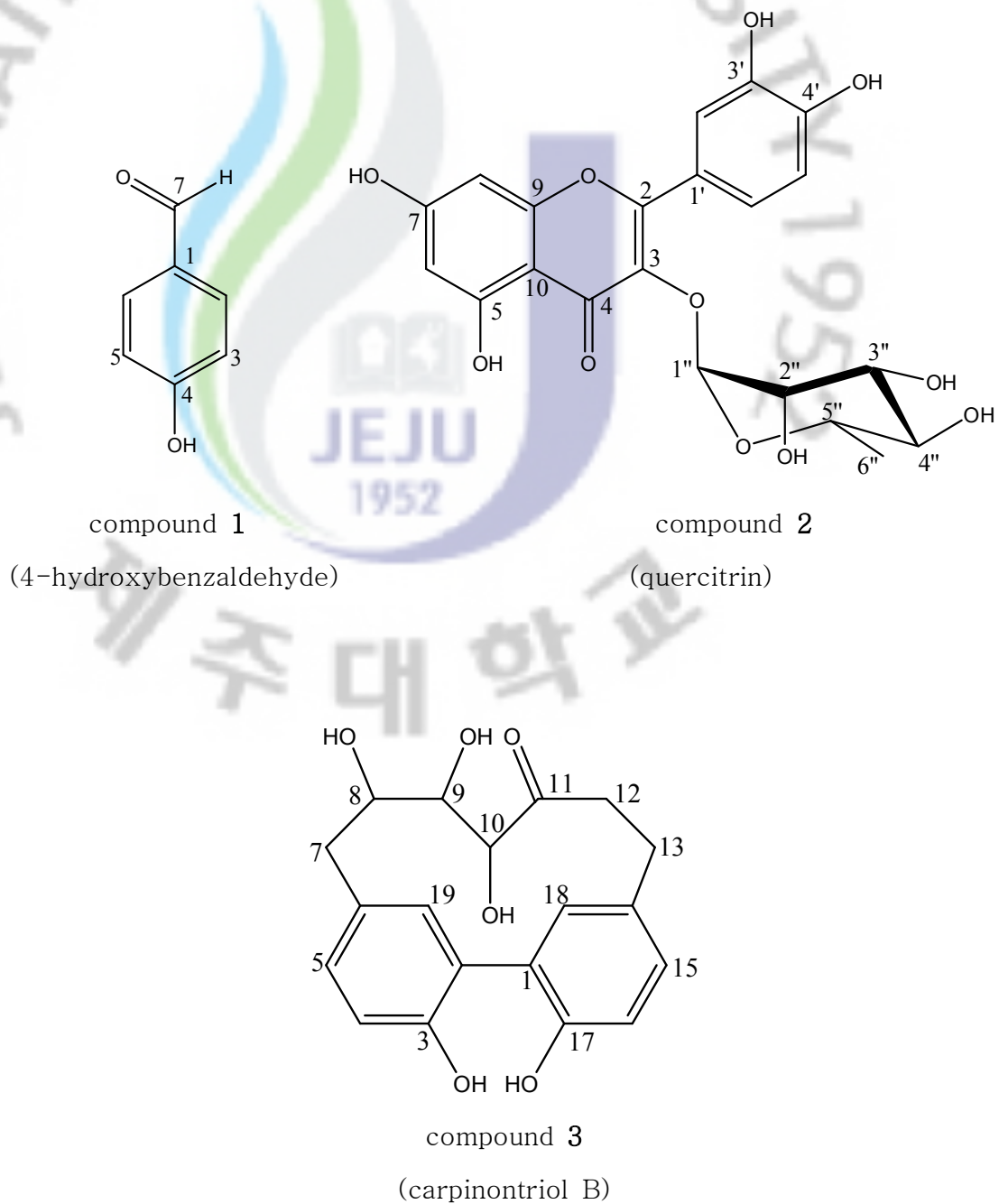


Figure 13. Chemical structure of compound 1, 2 and 3

## 2. DPPH radical scavenging test

DPPH는 질소를 중심으로 그 자체가 매우 안정한 라디칼 구조의 화합물로서, 시료에 의하여 환원되어 라디칼이 소거되면 특유의 보라색이 없어지면서 515 ~ 525 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. 새우나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 결과

새우나무 잎의 추출 실험에 앞서 효과적인 추출방법을 선택하기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 0, 20, 40, 60, 80, 100%의 에탄올을 용매로 하여 20배 추출 실험을 실시하여 얻어진 결과물의  $RC_{50}$ 을 살펴보면, 40% 에탄올 추출물이 30.98  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 좋은 활성을 보였으며, 20%, 60% 추출물에서도 36.52  $\mu\text{g/mL}$ , 36.09  $\mu\text{g/mL}$ 의 값으로 좋은 라디칼 소거능력을 보였다. 또한 80% 에탄올 추출물은 63.46  $\mu\text{g/mL}$ 의 활성을 보였다.

추출물에 대한 활성 data를 참고하여 실험에 용이 하다고 여겨지는 80% 에탄올 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol으로 분획을 실시하였으며 그 결과물에 대한 항산화 실험을 진행하였다. 그 결과 ethyl acetate 분획층에서 27.69  $\mu\text{g/mL}$ , butanol 분획층에서는 21.81  $\mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$ 의 값을 보였으며 이는 positive control인 vitamin C의  $RC_{50}$  값(8.80  $\mu\text{g/mL}$ )와 비교하였을 때 좋은 활성을 보인다고 판단할 수 있다(Figure 13-14).

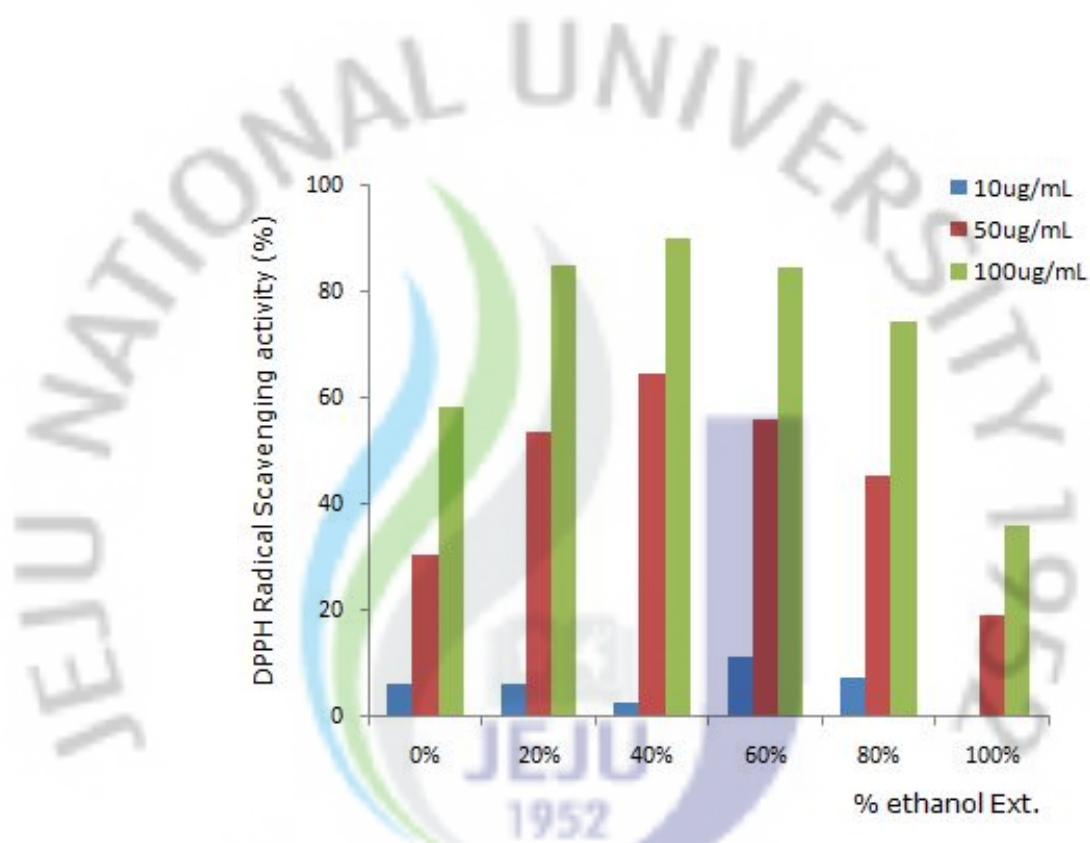


Figure 13. DPPH radical scavenging activities of solvent extracts obtained from *Ostrya japonica* Leaves

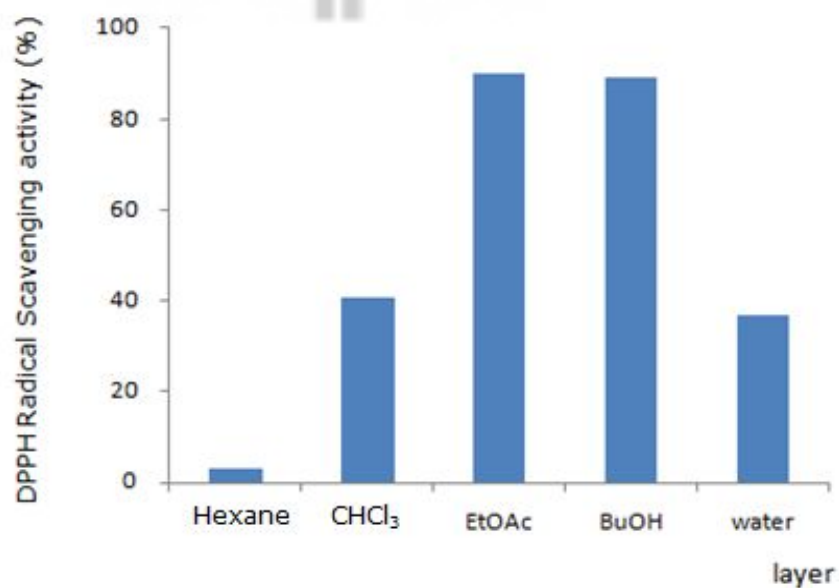


Figure 14. DPPH radical scavenging activities(%) of solvent layers obtained from *Ostrya japonica* Leaves.

## 2-2. 새우나무 잎으로부터 분리된 화합물의 활성 결과

Chloroform과 ethyl acetate 분획층에서 분리된 compounds 1-3에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. compound 2은 positive control인 vitamin C의  $RC_{50}$  값(8.80  $\mu\text{g/mL}$ )와 비교하였을 때 13.12  $\mu\text{g/mL}$ 으로써, 아주 좋은 활성을 보임을 확인할 수 있었다. 또한 compound 3은 58.16  $\mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$  값을 보였으며 compound 1은 농도가 100  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 43.64%의 라디칼 소거 능력을 보였다(Figure 15).

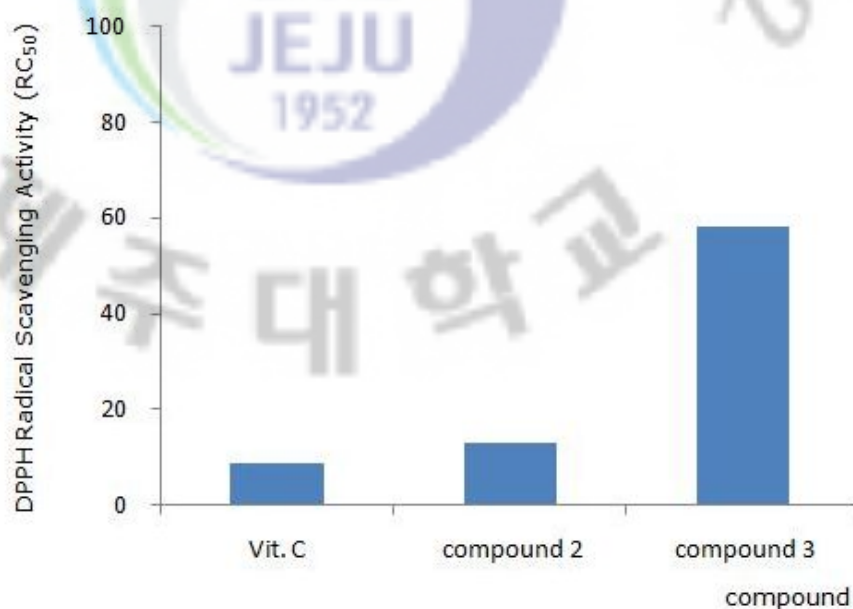


Figure 15.  $RC_{50}$  value of DPPH radical scavenging activities for compound 2 and 3.

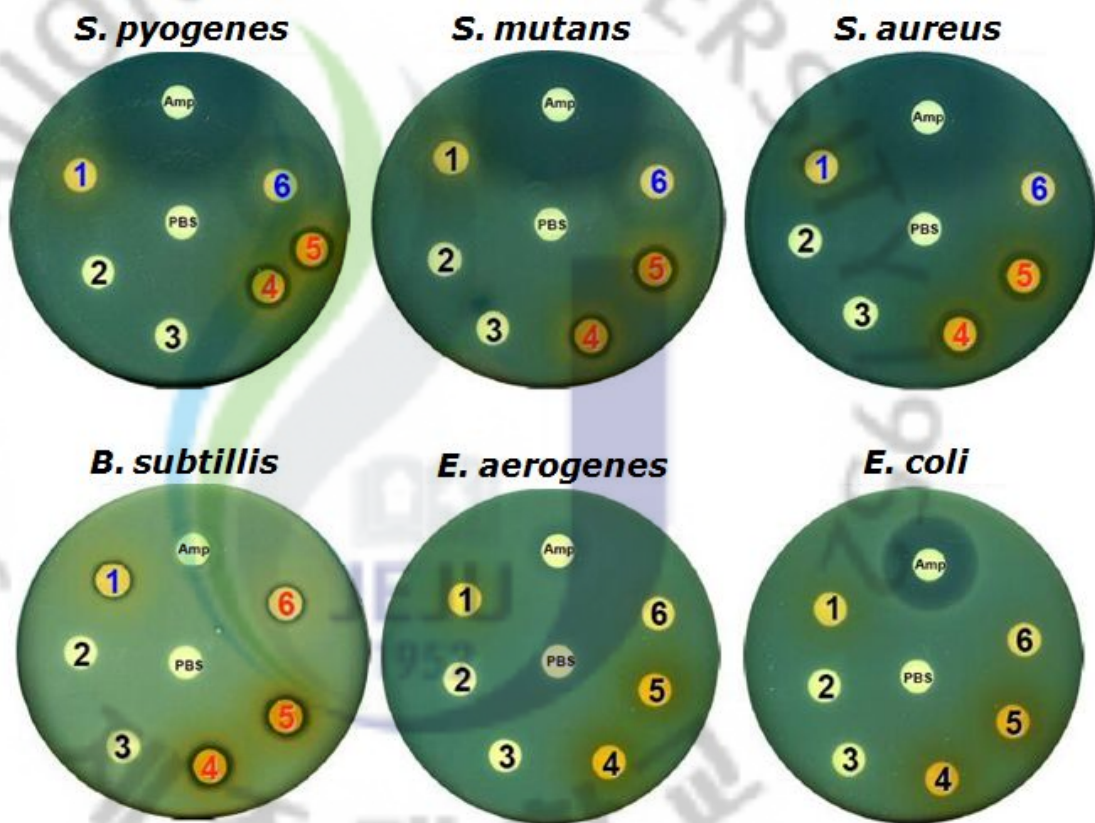


### 3. Antibacterial test

새우나무 잎의 80% 추출물과 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 분획층에 대하여 항균 실험을 실시하였으며, 이 때 사용한 균주는 그람 양성균인 *streptococcus pyogenes* (KTCT 3096), *streptococcus mutans* (KTCT 3065), *staphylococcus aureus* (KTCT 1916), *bacillus subtilis* (KTCT 1021), 와 그람 음성균인 *enterobacter aerogenes* (KTCT 2190), *escherichia coli* (KTCT 1682) 이다.

#### 3-1. 새우나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 결과

항균 활성 실험 결과 대조균인 ampicillin에 비교하였을 때, *B. subtilis*, 균에 대해서는 80% 에탄올 추출물, ethyl acetate, butanol 및 water 분획층에서 항균활성이 있는 것으로 관찰되며, 나머지 그람양성균인 *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. aureus* 균주들에 대해서는 ethyl acetate, butanol에서 어느 정도 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 두 개의 그람음성균에 대해서는 뚜렷한 활성은 관찰 되지 않았다.



1: 80% EtOH ext.      2: *n*-hexane layer      3: chloroform layer  
 4: ethyl acetate layer      5: butanol layer      6: water layer

Figure 16. Antibacterial Test Result of solvent extract and layers obtained from *Ostrya japonica* Leaves.

#### 4 총 폴리페놀 함량 분석

새우나무 잎 % 별 에탄올 추출물에 대한 항산화 결과와 80% 에탄올 추출물을 분획하여 얻어진 분획 결과물들에 대한 폴리페놀 함량 분석 결과 calibration curve control 인 tannic acid을 통하여 0, 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올 추출물 각각 11.13%, 15.68%, 17.33%, 16.82%, 15.52%, 7.59%을 보이며 20~80% 까지 비슷한 함량을 보임을 확인 할 수 있었다. 또한 분획 결과물에 대한 폴리페놀 함량 결과에서는 chloroform, Ethyl acetate, butanol 분획층에서 각각 12.87, 26.81, 21.73%로 그 중 ethyl acetate에서 가장 높은 함량을 보였다. 이는 폴리페놀의 함량이 높을수록 DPPH radical 소거 능력도 대체적으로 높은 경향을 보임을 알수 있다.

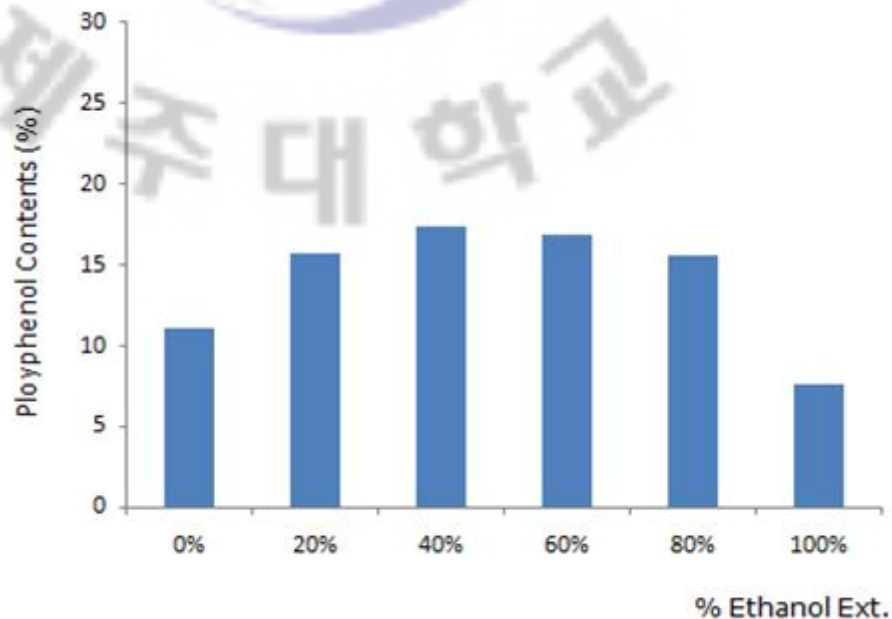


Figure 17. Polyphenol contents of solvent extract and layers obtained from *Ostrya japonica* Leaves

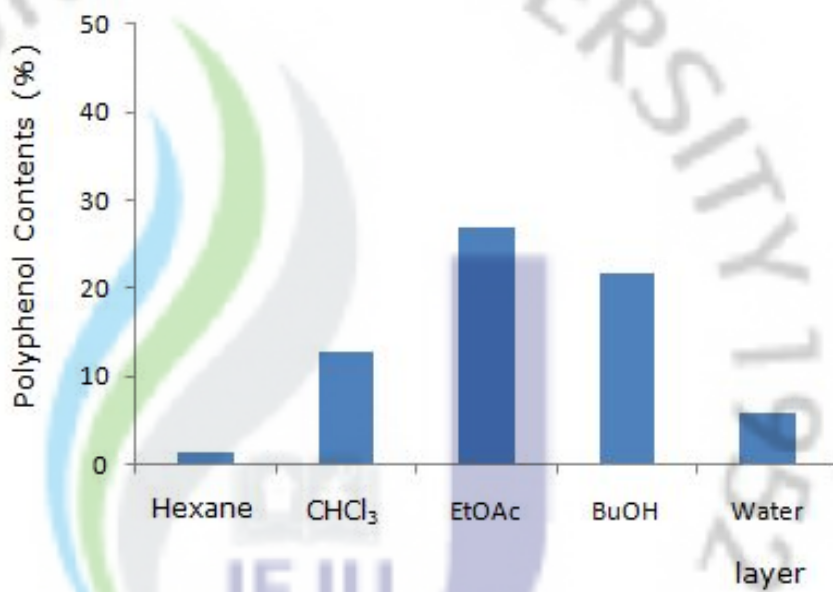


Figure 18. Polyphenol contents of solvent layers and layers obtained from *Ostrya japonica* Leaves

#### IV. 요약 및 결론

제주에 자생하고 있는 새우나무 잎의 80% 에탄올 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water로 용매 분획을 하고 chloroform과 ethyl acetate 분획에 대하여 cetlite, normal silica gel chromatography를 실시하였다.

분리된 분획들을 NMR(1D, 2D-NMR) 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 새우나무 잎에서 4-hydroxy benzaldehyde, quercitrin, carpinontriol B를 분리하였음을 확인하였다.

또한, % 별 에탄올 추출물, 분획 결과물, column chromatography를 통하여 분리 물질에 대하여 DPPH radical scavenging test, Antibacterial test 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

DPPH radical scavenging test 결과, % 별 에탄올 추출물 중 40% 에탄올 추출물이 30.98  $\mu\text{g/mL}$ ( $\text{RC}_{50}$ )로 가장 좋은 활성을 보였으며, 분획물에서는 ethyl acetate 분획층이 27.69  $\mu\text{g/mL}$ , butanol 분획층에서는 21.81  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{RC}_{50}$ 의 값으로 아주 좋은 활성을 보였다.

분리된 화합물에서는 4-hydroxy benzaldehyde, quercitrin, carpinontriol B에서는 quercitrin은 positive control인 vitamin C의  $\text{RC}_{50}$  값(8.80  $\mu\text{g/mL}$ )와 비교하였을 때 13.12  $\mu\text{g/mL}$ 으로써, 아주 좋은 활성을 보였고, carpinontriol B은 58.16  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{RC}_{50}$  값을 보였으며 4-hydroxy benzaldehyde은 농도가 100  $\mu\text{g/mL}$ 일 때 43.64%의 라디칼 소거 능력을 보였다.

항균활성 실험 결과 대조군인 ampicillic과 비교하였을 때 ethyl acetate 및 butanol에서 좋은 활성을 보임을 확인 할 수 있었다.

폴리페놀함량 결과에서는 20, 40, 60, 80% 에탄올 추출물에서 비슷한 폴리페놀 함량(15~17%)을 보였으며, 분획 결과물에서는 ethyl acetate와 butanol 분획층에서는 각각 26.81, 21.73%의 함량을 보이며 이는 항산화 실험결과와 비교하였을 때 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화 결과 역시 좋은 활성을 보임을 확인할 수 있었다.

## V. 참고문헌

- 1) Fukujawa, K, and Takaishi Y., Antioxidans, *J. Act. Oxyg. Free Rad.* 1-55, 1990
- 2) Aruoma OI. Free radical, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am Oil Chem Soc.* 75: 199-212. 1998
- 3) 문제학, 박근형; 차의 기능성 성분과 생리활성. 한국차학회지, 1, 177-193. 1995
- 4) Branen, A.L.: Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 59-63. 1975
- 5) Lee YN. New flora of Korea Vol. I. Kyohak Publishing Co. Seoul. Korea. pp. 218 2007
- 6) Kim MB. Characteriatics of pressurized liquid extracts from natural plants in Jeju. MS thesis. Cheju National University. Jeju. 2008
- 7) Huang MT; Smart RC; Wong CQ; Conney AH, Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-*O*-tertradecanoylphenol-13-acetate. *Cancer Res.* 48 5941-5946 1988
- 8) Boots AW; Haenen GR; Bast A. Health effects of quercetin from antioxidants to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585 325-337 2008

9) An LJ; Guan S; Shi GF; Bao YM; Duan YL; Jiang B. Protocatechuic acid from *Alpinia Oxyphylla* against MP+ -induced neurotoxicity in PC12 cells *Food Chem. Toxicol* 44 436-443 2006

10) Guan S; Bao YM; Jiang B; An LJ. Protective effect of Protocatechuic acid from *Alpinia Oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Eur. J. Pharmacol.* 538 72-79 2006

11) Tseng TH; Kao TW; Chu CY; Chou FP; Lin WL; Wang CJ. Induction of apoptosis by *Hibiscus proocicatechuic* acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biol. Chem.* 274 2232-2242 2000

12) 안인파; 권지웅; 권태오; 정완태; 이혜숙; 김윤철. 애기땅빈대의 화학적 성분, 생약학회지, 38 291-295 2007

13) 이가영; 장대식; 이윤미; 김영숙; 김진숙. 산수유 씨의 최종당사화물 생성저해 활성 성분, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51 316-320 2008

14) 최소영; 권용수; 김창민. 권삼의 성분, 생약학회지 31 426-429 2000

15) 조정용. 헛개나무 잎에 함유된 활성물질의 분리 및 구조해석, 전남대학교 대학원 2002

16) 김정자. 메밀 지상부 DPPH 라디칼 소거작용과 ACE 저해효과 및 활성 플라보노이드 화합물의 분리 동정, 순천대학교 대학원 2004

17) 김미보; 현선희; 박재성; 강미애; 고영환; 임상빈. 제주 자생식물 고압용매 추출물의 통합적 항산화 능력, *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37 1491-1496

2008

18) Ji Sun Lee; Hyoung Ja Kim; Hokoon Park; Yong Sup Lee. New Diarylheptanoids from the Stems of *Carpinus Cordata*, *Journal of Natural Products*. 65 1367-1370 2002

19) 장현주. 제주도 자생 식물들의 항산화 활성 검색, 제주대학교 교육대학원. 2007