



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

까마귀쪽나무(*Litsea japonica*)
종자로부터 항염 및 미백
활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

梁 守 卿

2015年 8月

까마귀쪽나무(*Litsea japonica*)

종자로부터 항염 및 미백

활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

梁 守 卿

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2015年 8月

梁守卿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

2015年 8月

Identification of Anti-inflammatory and
Whitening Constituents from
Litsea japonica Seed

Soo-kyung Yang
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2015. 8.

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 Figures	iii
List of Abbreviations	v
ABSTRACT	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 시약 및 기기	5
2. 재료	6
3. 추출, 분획 및 분리	7
4. 활성실험	11
4-1. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험	11
4-1-1. 세포배양	11
4-1-2. Nitric oxide 생성 억제 평가	11
4-1-3. 전염증성 cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성억제 활성 측정	11
4-1-4. 세포 독성 및 증식률 측정	12
4-1-4-1. LDH 분석	12
4-1-4-2. MTT 분석	13
4-2. B16F10 murin melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험	13
4-2-1. 세포배양	13
4-2-2. 멜라닌 합성 저해율 측정	13
4-2-3. 세포내 tyrosinase 생성 저해율 측정	14
4-2-4. 세포 독성 평가	14
III. 결과 및 고찰	14
1. 화합물의 구조 동정	15
1-1. Compounds 1, 2, 3, 4 구조 동정	15
1-2. Compound 5 구조 동정	20

1-3. Compound 7 구조 동정	26
1-4. Compound 6 구조 동정	31
2. 항염 활성 실험 결과	35
2-1. 까마귀쪽나무 종자 추출물의 NO 생성억제 활성측정	35
2-2. CH ₂ Cl ₂ layer의 NO 생성억제 활성측정	36
2-3. Compound 5의 NO 생성억제 활성측정	37
2-4. Compound 6의 NO 생성억제 활성측정	37
2-5. 까마귀쪽나무 종자 추출, 분획 및 분리 물질의 세포 생존율 측정	38
2-6. 까마귀쪽나무 종자 추출물과 CH ₂ Cl ₂ layer의 염증성 cytokine 생성 억제 평가	39
2-7. Compounds 5, 6의 염증성 cytokine 생성 억제 평가	41
3. 미백 활성 실험 결과	42
3-1. Compounds 5, 6의 세포내 tyrosinase 저해 활성 평가	42
3-2. Compounds 5, 6의 멜라닌 생성 억제 효과 평가	43
3-3. 세포 생존율 측정	44
IV. 요약 및 결론	46
V. 참고문헌	47

List of Figures

Figure 1. Picture of <i>L. japonica</i>	6
Figure 2. Scheme of fractionation process for the extract	8
Figure 3. Diagram of isolation process of compounds 1, 2, 3, 4 from <i>L. japonica</i>	9
Figure 4. Diagram of isolation process of compounds 5, 6, 7 from <i>L. japonica</i>	10
Figure 5. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 1	16
Figure 6. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 1	16
Figure 7. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 2	17
Figure 8. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 3	18
Figure 9. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 3	18
Figure 10. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 4	19
Figure 11. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 4	19
Figure 12. LC-MS spectrum of isolated compound 5	21
Figure 13. ¹ H-NMR spectrum of isolated compound 5	22
Figure 14. ¹³ C-NMR spectrum of isolated compound 5	22
Figure 15. DEPT-135 spectrum of isolated compound 5	23
Figure 16. HSQC spectrum of isolated compound 5	23
Figure 17. COSY spectrum of isolated compound 5	24
Figure 18. HMBC spectrum of isolated compound 5	25
Figure 19. Chemical structure of compound 5	26
Figure 20. LC-MS spectrum of isolated compound 7	27
Figure 21. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 7	28
Figure 22. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 7	28
Figure 23. DEPT-135 spectrum of isolated compound 7	29
Figure 24. Chemical structure of compound 7	30
Figure 25. LC-MS spectrum of isolated compound 6	32

Figure 26. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 6	33
Figure 27. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 6	33
Figure 28. Chemical structure of compound 6	34
Figure 29. Inhibitory effect of nitric oxide production on Extract in RAW 264.7 cells	35
Figure 30. Inhibitory effect of nitric oxide production on CH ₂ Cl ₂ layer in RAW 264.7 cells	36
Figure 31. Inhibitory effect of nitric oxide production on compound 5 in RAW 264.7 cells	37
Figure 32. Inhibitory effect of nitric oxide production on compound 6 in RAW 264.7 cells	38
Figure 33. Cytotoxicity of <i>L. japonica</i> on the viability of RAW 264.7 cells.	39
Figure 34. Inhibition of cytokine IL-6 of extract, CH ₂ Cl ₂ layer	40
Figure 35. Inhibition of cytokine TNF-α of extract, CH ₂ Cl ₂ layer	40
Figure 36. Inhibition of cytokine IL-1β of extract, CH ₂ Cl ₂ layer	40
Figure 37. Inhibition of cytokine TNF-α of compound 5, 6	41
Figure 38. Inhibition of cytokine IL-6 of compounds 5, 6	41
Figure 39. Inhibition of cytokine IL-1β of compounds 5, 6	42
Figure 40. Intracellular tyrosinase inhibition of compounds 5, 6	43
Figure 41. Melanin contents of compounds 5, 6	44
Figure 42. Cytotoxicities of extract, CH ₂ Cl ₂ layer and compounds 5, 6 in B16F10 murine melanoma cell	45

List of Abbreviations

CC	column chromatography
CH ₂ Cl ₂	methylene chloride
CD ₃ OD	methanol- <i>d</i> ₄
CDCl ₃	chloroform- <i>d</i>
COSY	correlation spectroscopy
DMEM	dulbeco's modified eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
d	doublet
dd	doublet of doublet
EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl acetate
Ext.	extract
Fr.	fraction
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
int	integration
<i>J</i>	coupling constant (Hz)
LDH	lactate dehydrogenase
<i>L. japonica</i>	<i>Litsea japonica</i>
LPS	lipopolysaccharide
m	multiplet
MeOH	methanol
MTT	dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	nitric oxide
np	normal-phase, normal-phase silica gel CC subfraction
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
PBS	phosphate buffer saline
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
s	singlet
TLC	thin layer chromatography
UV/VIS	ultraviolet/visible
V	VLC subfraction
VLC	vacuum liquid chromatography
1D	one-dimensional
2D	two-dimensional

ABSTRACT

Identification of Anti-inflammatory and Whitening Constituents from
Litsea japonica seed

Soo-Kyung Yang
Department of Chemistry Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

Litsea japonica, a evergreen plant growing in Jeju island, was investigated for anti-inflammatory and skin whitening activities. The dried *L. japonica* seeds were extracted for 72 hours with 100% methylene chloride. The obtained extract was successively partitioned into *n*-hexane (*n*-hex), methylene chloride (CH₂Cl₂), 20% MeOH layers. Repeated column chromatography on celite and normal-phase silica gel resulted in the isolation of seven compounds; glyceride (compound **1**, **2**, **3**, **4**), litsenolide B₁ (compound **5**), litsenolide A₁ (compound **6**), and litseakolide D₂ (compound **7**). In anti-inflammatory screenings, extract and CH₂Cl₂ layer, compounds **5** and **6** inhibited nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cell. Moreover, on screening of skin whitening activities, the compounds **5** and **6** showed considerable inhibition on the production of melanin contents in the B16F10 melanoma cell without showing cytotoxicity. This study demonstrated the potential of *Litsea japonica* seed extract as the novel ingredients in functional cosmetics.

I. 서론

최근 미(美)에 대한 관심이 높아지면서, 화장품 시장이 매년 급성장을 하고 있으며, 이러한 시장 성장은 화장품 기술의 비약적 발전에 기반을 두고 있다. 미용을 목적으로 하는 기존 접근도 확대되어가고 있고, 질병의 예방과 치료의 개념이 도입된 고기능성, 다기능성을 발휘하는 미백, 주름개선, 자외선 차단, 항염, 비만 등과 같은 기능성 화장품들 또한 최근 급속도로 성장하고 있다. 이러한 화장품 산업의 변화 발전에 맞추어 신소재와 신기술의 개발, 타 산업과 기술 융합을 통한 새로운 개념의 화장품들이 지속적으로 시장에 나타나고 있다.¹⁾

기능성 화장품은 막대한 시간과 자금이 투자되는 의약품보다 상대적으로 적은 비용과 시간을 투자하여 세계적으로 경쟁이 가능한 신제품 개발이 가능하고 시장 성장성과 고부가가치 창출에도 상당히 긍정적인 첨단 미래형 산업으로 인식되고 있다. 소비자들은 기능성화장품의 일시적 개선효과 보다는 가시적이고 지속적인 효과를 요구하고 있으나, 현재까지 개발된 국내의 기능성화장품들은 이를 충분히 만족시켜주지 못하고 있다. 이는 식약청에서 고시한 기능성화장품 원료 p 종류가 많지 않아 차별성에 한계가 있고, 화학적인 원료의 부작용들이 보고되고 있기 때문이다. 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 식물체 유래 천연물에서 기능성 화장품의 원료를 탐색하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.²⁾

염증(inflammation)은 상처나 감염, 또는 자가 면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서, 염증반응에서는 미소혈관의 확장, 혈액성분의 조직 간극으로의 유출, 백혈구의 염증 부위로의 유주 및 조직의 변성과 섬유화 등이 연쇄적으로 일어나게 된다. 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능 장애등의 다양한 증상이 나타난다.^{3,4)} 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그

러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다.⁵⁾

피부에서의 염증은 매우 다양한 의미를 가지는데, 아토피성, 여드름성, 광 민감성 피부질환 그리고 민감성 피부질환의 생리학적 기본 기전은 염증 반응의 과정을 거친다. 다양한 염증 현상에 의해 진피층을 파괴하는 효소인 hyaluronidase, lipoxygenase 등의 발현이 증가하여 피부의 노화 및 주름 형성에 직접적으로 영향을 준다. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 및 IL-2는 대식세포에서 생산되어 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되어있다.⁶⁾

대식세포(macrophage)는 동물 체내 모든 조직에 분포하여 인체 내에서 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로, 인체 면역체계에서 중요한 역할을 하는 백혈구이다. 또한, 염증반응 시에는 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다.^{7,8)}

Nitric oxide(NO)는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성이 조절 되는데, 포유류에서 NOS는 물리화학적 성상에 따라 inducible NOS(iNOS), neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS) 그리고 최근 밝혀진 mitochondrial NOS(mNOS)등 4가지의 동종 효소로 분류된다. 이 중 iNOS에 의한 NO의 생성이 절대적으로 중요한데, 대식세포가 lipopolysaccharide(LPS)나 interferon- γ (IFN- γ)에 의해서 자극을 받으면 iNOS가 발현되어 NO가 과잉 생산 되면 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화 시키는 것으로 알려져 있다.^{9,10)}

NO와 함께 대표적인 염증인자인 PGE₂는 발열과 통증에 주로 작용하는 매개체로서 면역반응과 염증반응에 관여한다. COX는 COX-1, COX-2와 같이 두 종류의 이성효소로 존재하며 서로 다른 유전자로부터 생성된다. COX-1은 거의 모든 조직에 내재적으로 존재하며, PG를 생성하여 생리적 기능을 유지시킨다. COX-2는 정상적인 상태에서는 발현되지 않고 LPS 또는 interleukin-1(IL-1)의 자극을 통해 발현된다. 발현된 COX-2는 염증매개체인 PGE₂를 생성하여 결과적으로 지

속적인 염증반응을 일으킨다.¹¹⁾

사람의 피부색은 환경, 인종, 성별 등의 요인과 표피에 존재하는 멜라닌 색소, 피하조직에 있는 카로틴 및 혈관 속에 함유된 산화-환원된 헤모글로빈 양과 멜라닌이 분해된 멜라노이드 등 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 이 중 가장 중요한 역할을 하는 것은 멜라닌으로 함량, 분포 등에 따라 색이 결정된다.¹²⁻¹⁴⁾ 멜라닌은 피부에서 발생하는 활성산소나 프리라디칼(free-radical)을 제거하고, 자외선의 투과를 막아 피부의 내부를 보호한다.¹⁵⁾ 멜라닌은 피부표피층의 멜라노사이트(melanocyte)라는 멜라닌형성세포 내의 멜라노솜(melanosome)에서 합성되는데, 타이로신(tyrosine)을 전구물질로 tyrosinase 효소에 의해 산화되어 DOPA(3,4-dihydroxy-phenylalanine) 또는 DOPA quinone으로 산화되어 중합반응에 의해 최종적으로 멜라닌이 생합성 된다.¹⁶⁾

멜라닌이 과생산 되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하며 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾

피부에서 색소의 침착방지는 여러 가지 관점으로 연구되고 있으며 그 중 멜라닌(melanin) 세포에 멜라닌의 합성을 명령하는 tyrosinase를 효과적으로 저해하는 생리활성 물질을 탐색하는 실험이 미백효과를 찾아내는데 있어 유용한 연구 방법으로 평가받고 있다.¹⁸⁾

현재 알려져 있는 tyrosinase를 저해하는 물질로는 천연물에서 얻어진 quercetin, glabridin, L-mimosine, kojic acid 등이 있으며, 합성 화합물 또는 천연물 화합물의 유도체인 captopril, topolone, geranyl gallate 등이 있다.¹⁹⁾ 기존 화장품 분야에서는 미백성분 으로서, kojic acid, arbutin 등과 같은 tyrosinase 효소 활성을 억제하는 물질과 hydroquinone, vitamin C가 사용되어 왔다.²⁰⁾ 그러나, 이런 물질 들은 불안정하여 분해나 착색, 이취, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 사용이 제한되고 있는 실정이다. 따라서 기존 미백제가 갖고 있는 여러 단점을 극복하고자 최근에는 피부에 안전한 천연물을 이용한 미백성분 개발에 많은 연구가

진행되고 있다.²¹⁾

까마귀쪽나무(*Litsea japonica*)는 녹나무과에 속하며, 한국의 제주도를 비롯한 일본 남부지방에 자생하고 있는 상록활엽소교목이다. 까마귀쪽나무(*Litsea japonica*)는 주로 해안가에 분포하고 있으며 바람이 많이 부는 제주도 해안가 등지에서는 방풍목으로 흔히 볼 수 있다. 잎은 녹색의 좁은 타원형이고 뒷면은 미세한 털이 뺨뺨이 자란다. 원뿔 모양의 꽃은 황백색이고 잎겨드랑이에서 자라며 자웅이 가화로 암나무와 수나무가 구분된다. 7월~10월 사이에 꽃이 피면 다음해 10월에 짙은 자주색 열매가 익지만 지역과 기후에 따라 6월경부터 익기도 한다.²²⁾ 까마귀쪽 나무의 화학적 구성에 대한 기존의 연구에서, 여러 종류의 essential oils, fatty acids, lactones, alkaloids 및 terpenoids가 발견되었다고 보고된 바가 있다.^{23,24)} Lactones이 종류로 알려진 hamabiwalactone A, hamabiwalactone B, akolactone B, litsealactone A 및 litsealactone B가 분리되었다.²⁵⁾ 또한, 잎으로부터 분리된 flavonoids 성분인 epicatechin, afzelin, quercitrin 및 tiliroside 의 anti-complement activity를 조사한 결과, tiliroside가 complement system에 대해 가장 강력한 억제작용을 나타냄이 보고되었다.²⁶⁾ 이처럼 까마귀쪽나무는 여러 성분이 분리되고 효능이 확인되었다. 그러나 까마귀쪽 나무 열매의 과육은 총 비중의 40% 정도에 그치며 나머지를 이루고 있는 종자에 대한 연구는 거의 이루어진바 없다.²⁷⁾

본 연구에서는 까마귀쪽나무 종자의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항염 및 미백 효과와 관련된 실험을 실시하였다. 그리고 종자에 함유된 활성성분을 분리하고 동정하였다. 궁극적으로 화장품 원료로서의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merk, Junsei의 제품을 사용하였다. Celite column chromatography에는 celite(4.0 darcy, 세라이트 코리아 주식회사)가 사용되었다. VLC(Vacuum Liquid Chromatography)에는 순상 silica gel(2-25 μm , Sigma Co.)이 사용되었고, 순상 silica gel column chromatography에는 silica gel(0.063-0.200 mm, Merck Co.)이 사용되었다. 분리 과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merk Co.)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV/Vis Lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 1% anisaldehyde($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Acetic acid}/\text{MeOH}=1/2/17$ 의 비율로 혼합한 후 200:1의 비율로 anisaldehyde 혼합)을 사용하였다. 구조 분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 AVANCE III 500(FT-NMR System, Bruker)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 Merk의 NMR 전용용매로서, CDCl_3 을 사용하였다. LC-MS(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)는 Thermo Scientific을 이용하였고, 컬럼은 Hypersil Gold(2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μm , C18)을 사용하였다.

2. 재료

본 연구에 사용된 시료는 서귀포시 해안가 일대에서 2014년 6~7월에 채집한 까마귀쪽나무 열매를 과육과 종자로 분리하여 동결건조 시킨 후, 분쇄하여 사용하였다.



Figure 1. Picture of *L. japonica*

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 까마귀쪽나무 종자의 추출 및 용매분획

까마귀쪽나무 종자를 동결건조 시켜 잘게 분쇄하여 얻은 시료 1 kg을 100% methylene chloride 20 L에 침적하고 실온에서 72시간 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통해 여액을 취했다. 이 과정에서 남은 잔사는 다시 100% CH₂Cl₂ (methylene chloride)를 이용해 동일한 조건으로 2회 반복 추출하였다. 감압여과 장치를 통해 추출된 여액을 감압 농축하여 까마귀쪽나무 종자의 100% CH₂Cl₂ 추출물 총 167 g을 얻었다. 이 중 135 g을 20% MeOH에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 분획을 실시하였는데, 각 용매마다 1L씩 3번 반복 실시하여 *n*-hexane층, CH₂Cl₂층, 20% MeOH층 총 3개의 용매분획층을 얻었다(Figure 2).

3-2. Methylene chloride fraction의 활성성분 분리

3-2-1. Celite Column에 의한 분획과정

용매분획 하여 얻어진 CH₂Cl₂ 분획층 4.50 g을 Celite Column을 *n*-hexane 용매로 시행하여 *n*-hexane 층 3.2 g을 얻었다(Figure 2).

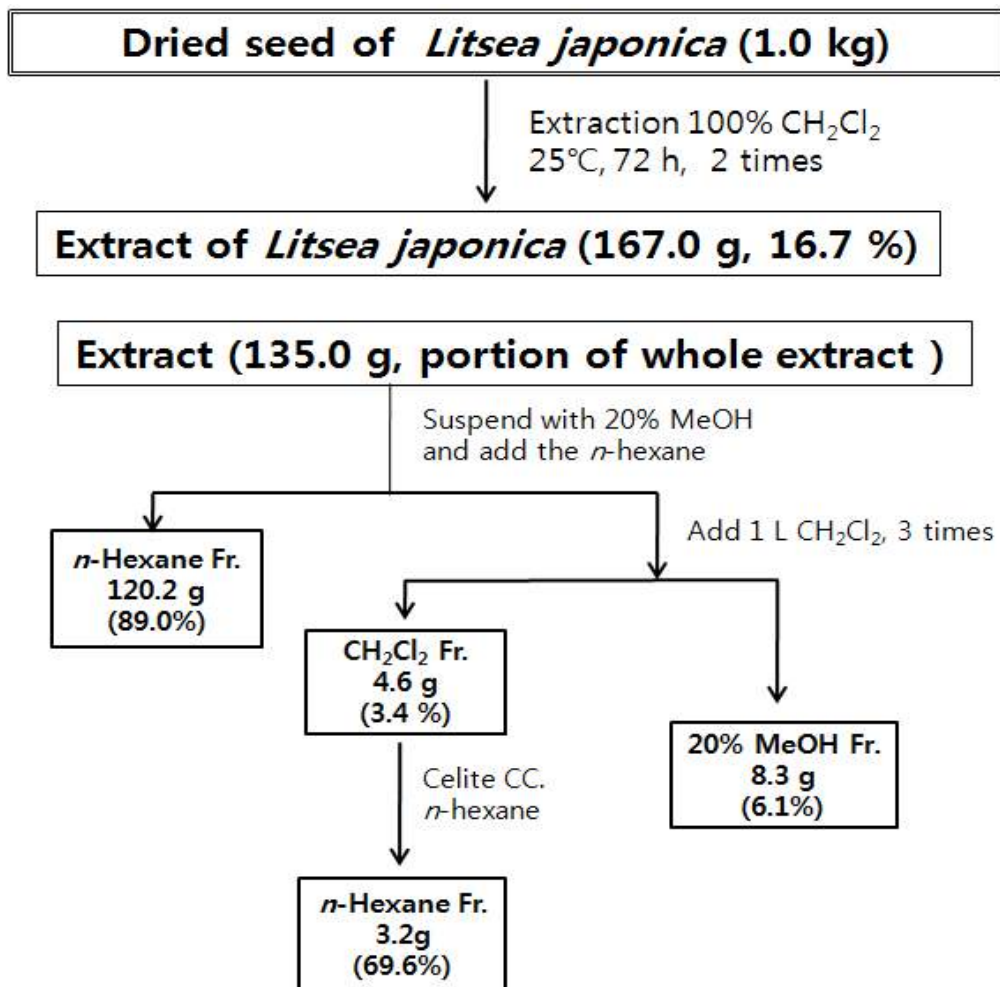


Figure 2. Scheme of fractionation process about extract

3-2-2. Compounds 1, 2, 3, 4 분리과정

Celite CC에서 얻어진 *n*-hexane fraction 3.2 g을 이용하여 감압 액체 크로마토그래피(VLC)를 실시하였다. 사용된 용출액은 *n*-Hex/CH₂Cl₂(0~100%), CH₂Cl₂/EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~100%) gradient 용매(300 mL) 조건을 이용하였다. 이 과정에서 총 20개의 분획물을 얻었다. 얻어진 20개의 분획물 중 분획물 V (386.5 mg)을 *n*-Hex/EtOAc/MeOH = 10/1/0.1의 용매조건으로 순상

silica gel CC을 수행하여 compound 1(11.3 mg), compound 2(11.6 mg), compound 3(65.8 mg)을 얻었다.

그리고 분획물 V 8(348.7 mg)을 *n*-Hex/EtOAc/MeOH = 6/1/0.1의 용매조건으로 순상 silica gel CC을 수행하여 compound 4(256.2 mg)을 얻었다(Figure 3).

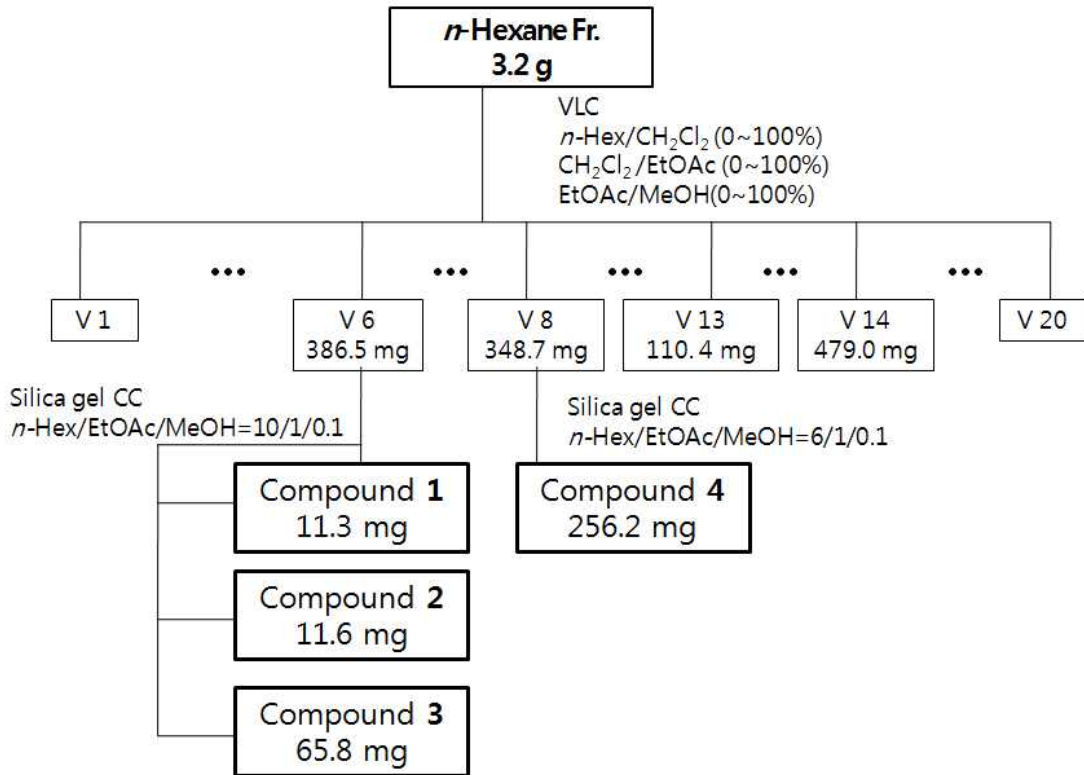


Figure 3. Diagram of isolation process of compounds 1, 2, 3, 4 from *L. japonica*

3-2-3. Compound 5, 6, 7 분리과정

감압 액체 크로마토그래피(VLC)에서 얻어진 20개의 fraction 중 V 13(110.4 mg)을 *n*-Hex/EtOAc/MeOH= 2.5/1/0.1의 용매조건으로 순상 silica gel CC을 수

행하여 compound 5(0.6 mg), compound 6(35.3 mg)을 얻었다.
 그리고 V 14(479.0 mg)을 *n*-Hex/EtOAc/MeOH= 7/3/0.1의 용매조건으로 순상 silica gel CC을 수행하여 compound 7(140.1 mg)을 얻었다(Figure 4).

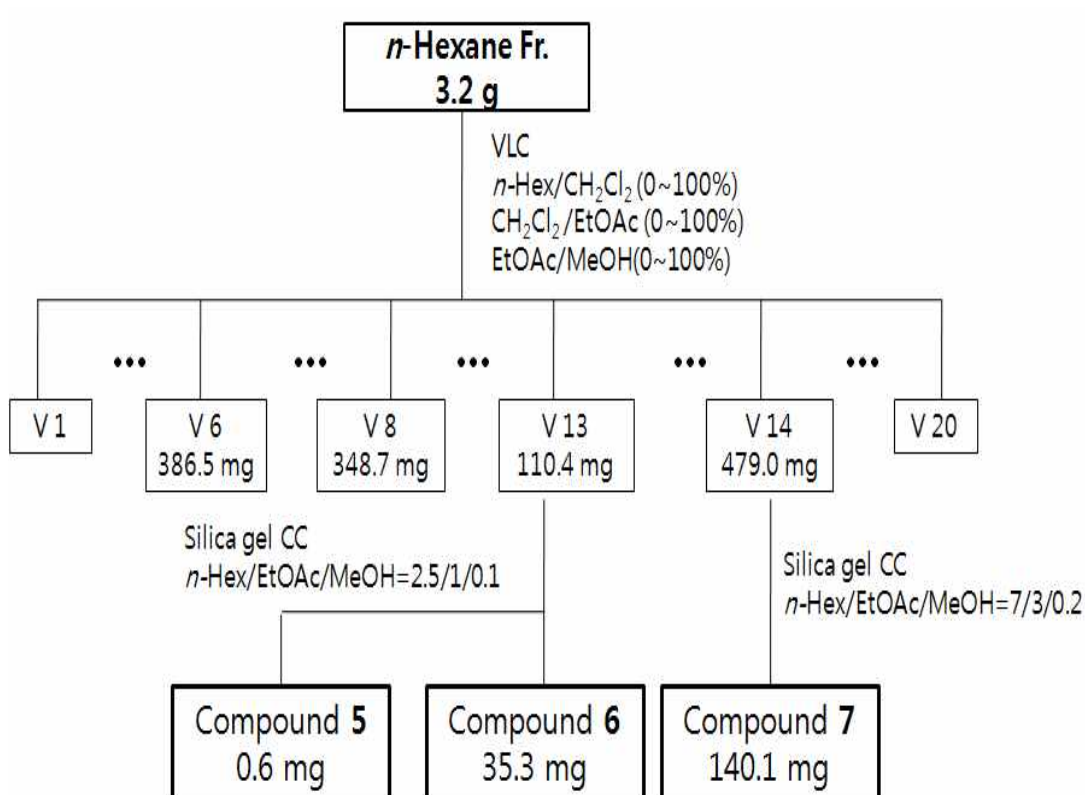


Figure 4. Diagram of isolation process of compound 5, 6, 7 from *L. japonica*

Compound 5, 6, 7은 LC-MS를 실시하였다. LC-MS의 샘플은 에탄올에 100 ppm, 20 ppm으로 희석하여 0.2 μ m 실린지필터로 여과하여 준비하였다. LC의 분석조건은 표 1과 같고 MS의 분석조건은 ESI positive로 이온화 하였으며 spray voltage는 5kV, capillary 온도는 275 $^{\circ}$ C, collision energy는 35 eV로 설정하였으며 컬럼은 Hypersil Gold을 사용하였다.

Table 1. LC 분석 조건

Time (min)	A% (0.1% formic acid/H ₂ O)	B% (MeOH)	Flow rate (μL/min)
0	50	50	200
1	50	50	200
2	30	70	200
5	0	100	200
7	0	100	200
8	50	50	200
12	50	50	200

4. 활성실험

4-1. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

4-1-1. 세포배양

한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입한 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 10% FBS(fetal bovine serum)과 1% penicillin-streptomycin(Gibco, USA)을 포함하는 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) high glucose medium 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고 3일에 한 번씩 계대배양을 실시하였다.

4-1-2. Nitric oxide 생성 억제 평가

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 그다음 시료와 LPS(1 μg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 96 well plate에서 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide,

0.1% (w/v) naphylethyldiamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였고 sodium nitrite(NaNO_2)를 standard로 사용하였다.

4-1-3. 전염증성 cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 24 well plate에 넣고 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/mL)로 조제된 시료 50 μL 와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 함유한 450 μL 의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (1,200 rpm, 3 min)하여 얻어진 상층액의 전염증성 cytokine 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관 (-20°C) 하였다. 전염증성 cytokine은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

4-1-4. 세포 독성 및 증식률 측정

4-1-4-1. LDH 분석

10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1.8×10^5 cells/mL로 넣고 18시간 배양 후 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit(Promega, WI, USA)를 이용하여 측정하였으며, 96 well plate에 원심분리하여 얻은 배양배지 50 μL 와 reconstituted substrate mix 50 μL 를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μL 의 stop solution을 넣고 microplate reader(Bid-TEK)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을

평가하였다.

4-1-4-1. MTT 분석

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.8×10^5 cells/mL로 96 well plate에 넣고 24시간 배양 후 시료를 처리하고 24시간 배양 하였다. 이후 MTT용액 50 μ L를 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 배양배지를 완전히 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)를 200 μ L를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후, microplate reader를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포생장률을 평가하였다.

4-2. B16F10 melanoma melanin cell을 이용한 미백 활성 실험

4-2-1. 세포배양

Mouse melanoma 세포인 B16F10 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin(Gibco, USA)와 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지(GIBCO, Grand Island, N:Y, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 4일에 한번씩 계대 배양을 시행하였다.

4-2-2. 멜라닌 합성 저해율 측정

B16F10 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1×10^5 cells/mL로 조절한 후 6 well plate에 접종하고, 18시간 배양 후 시료를 멜라닌 형성 자극제인 α -MSH (200 nM)와 동시에 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 plate의 배지를 제거하고 PBS를 이용하여 2번 세척하였다. 세척된 세포를 수확하여 1 N

NaOH를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4-2-3. 세포 내 tyrosinase 생성 저해율 측정

B16F10 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/mL로 접종하고, 18시간 배양 후 시료와 α -MSH (200 nM)를 동시에 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 plate의 배지를 제거 후 PBS를 이용하여 2번 세척하였고, 1% Triton x-100을 500 μ L 넣고 cell scraper로 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 -70 °C에서 급속 냉동시킨 후 해동시켰으며 이와 같은 방법을 3번 반복하여 세포막을 파괴하였다. 15000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 10 mM L-DOPA 0.2 mL와 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 mL를 첨가하여 37 °C에서 1시간 동안 반응시켰으며 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4-2-4. 세포 독성 평가

까마귀쪽나무 종자의 CH_2Cl_2 분획물과 분리한 화합물들이 B16F10 세포의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포독성을 평가하였다. B16F10 세포 2×10^4 cells/mL를 96 well plate에 접종하고, 18시간 배양 후 시료를 처리하여 3일 동안 37°C, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 여기에 phosphate buffer saline(PBS) 2 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 200 μ L를 첨가하고 동일한 배양 조건으로 4시간을 배양하였다. plate의 배양액을 제거하고 각 well에 DMSO 200 μ L를 가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 동정

1-1. Compound 1, 2, 3, 4의 구조 동정

Compound 1, 2, 3, 4의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR spectrum을 보면 전형적인 glyceride의 피크가 보인다.

^1H NMR spectrum을 보면 δ 5.2에서 δ 5.5를 통해 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 불포화지방산의 올레핀 수소가 있음을 예상 할 수 있다. 그리고 δ 4.1에서 4.3을 보면 glycerol 골격이 있음을 알 수 있다. δ 1.25와 δ 0.88피크를 보면 methylene의 중간 chain과 methyl group이 있음을 알 수 있다.

^{13}C NMR spectrum을 보면 δ 173.4 (Compound 3)을 통해 카보닐기가 있음을 알 수 있다. δ 10에서 δ 35 사이의 피크를 통해 지방족 탄소가 있음을 알 수 있고 δ 60에서 72 사이의 피크를 보면 backbone 카본임을 알 수 있다.

^1H NMR과 ^{13}C NMR를 토대로 문헌²⁸⁾을 조사한 결과 compounds 1, 2, 3, 4는 glyceride류임을 알 수 있다.

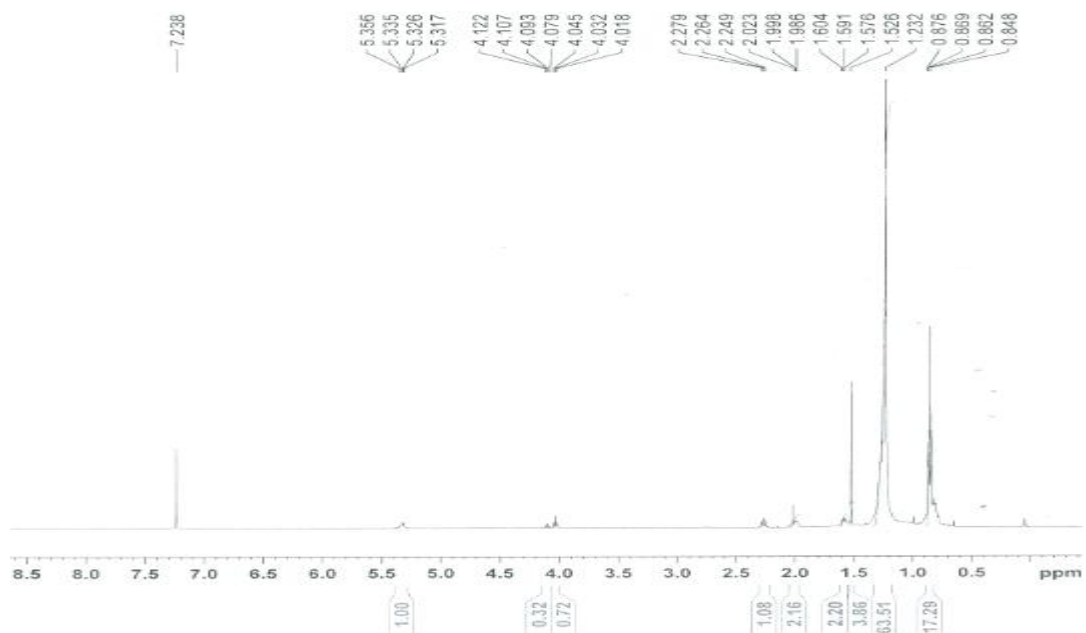


Figure 5. ^1H NMR spectrum of isolated compound **1**

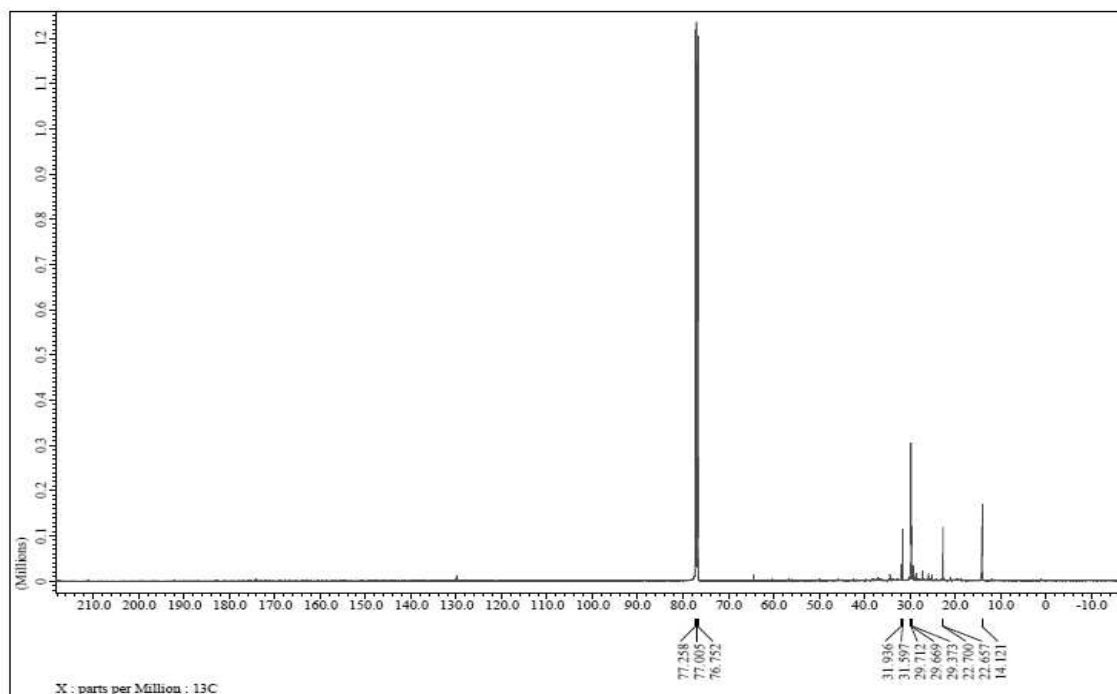


Figure 6. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound **1**

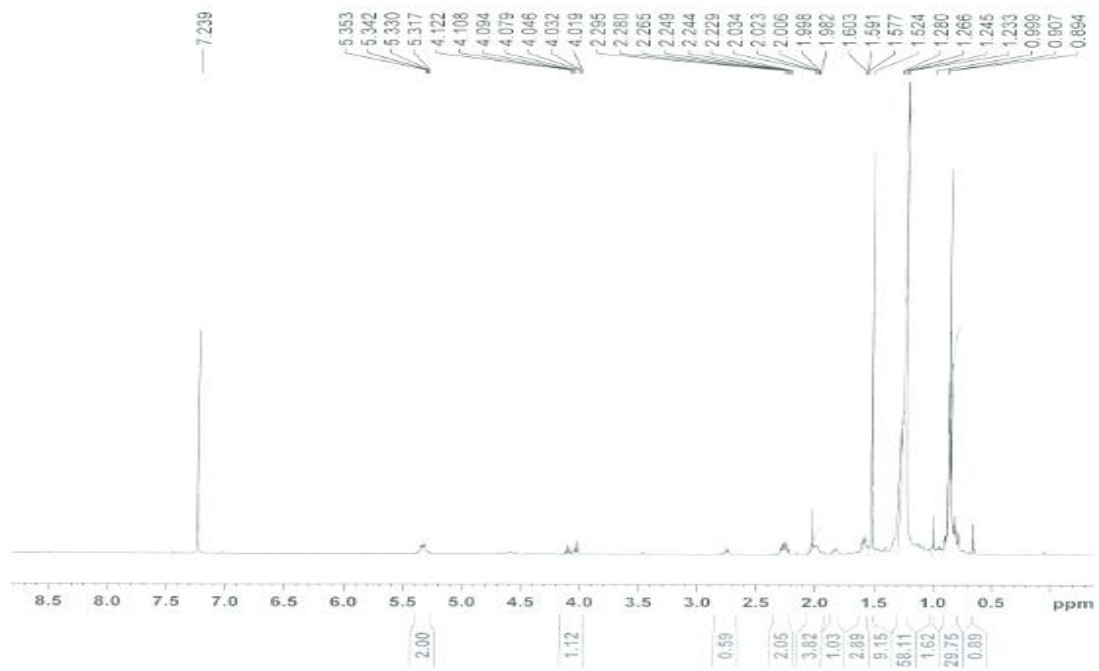


Figure 7. ^1H NMR spectrum of isolated compound **2**

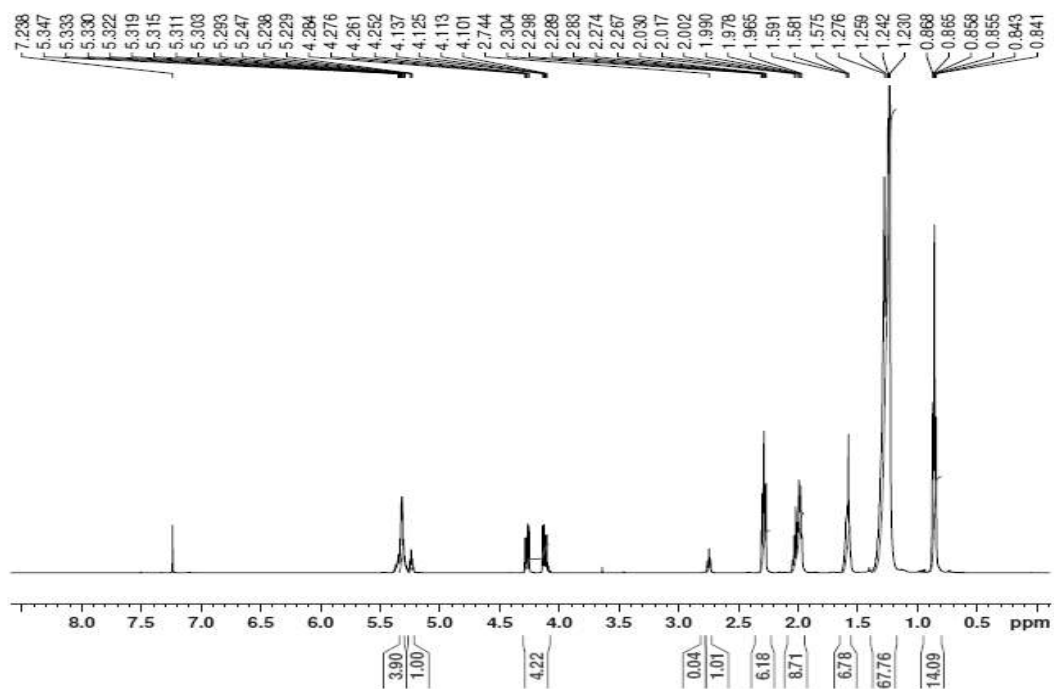


Figure 8. ^1H NMR spectrum of isolated compound **3**

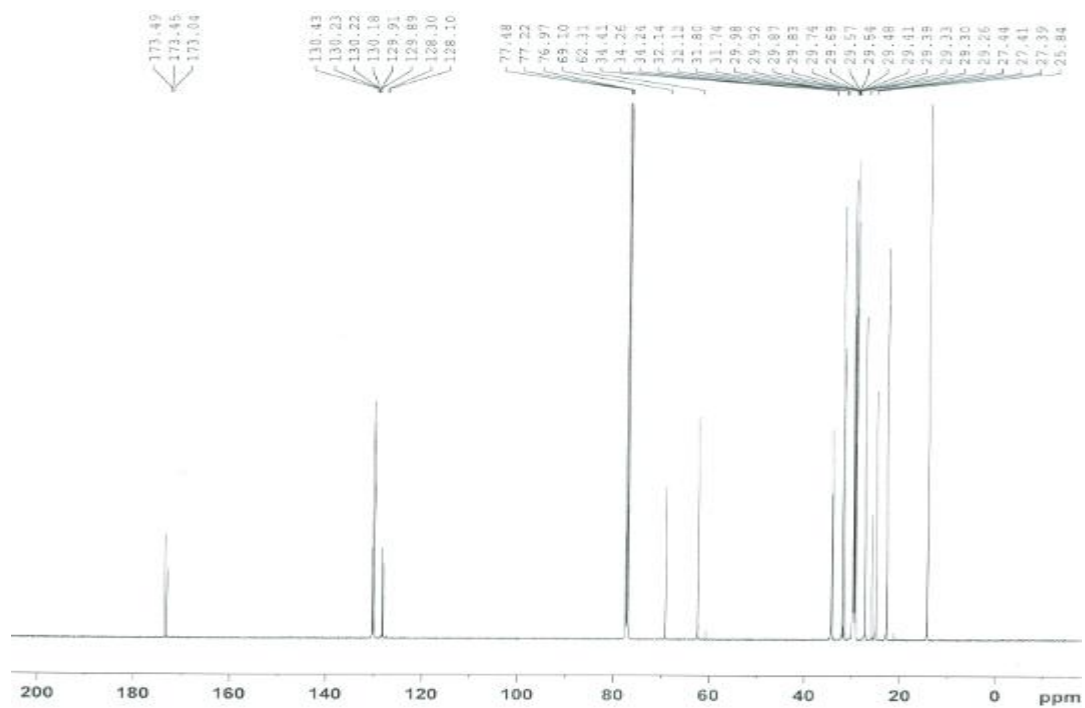


Figure 9. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound **3**

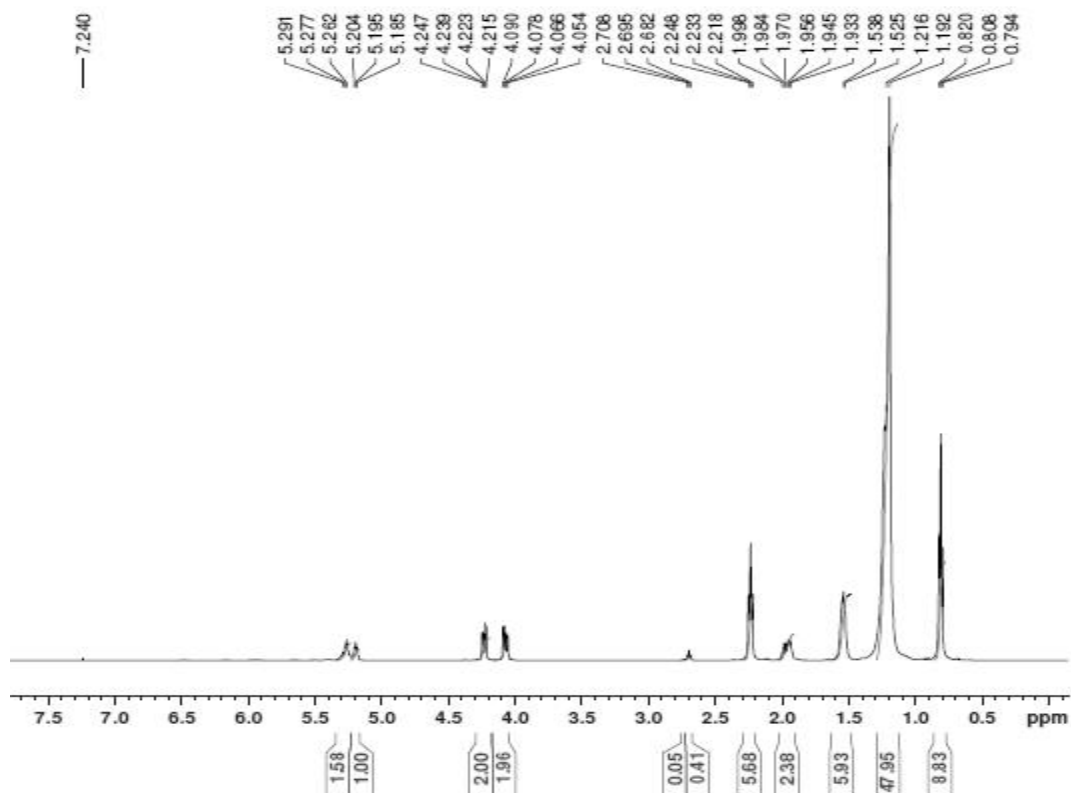


Figure 10. ^1H NMR spectrum of isolated compound 4

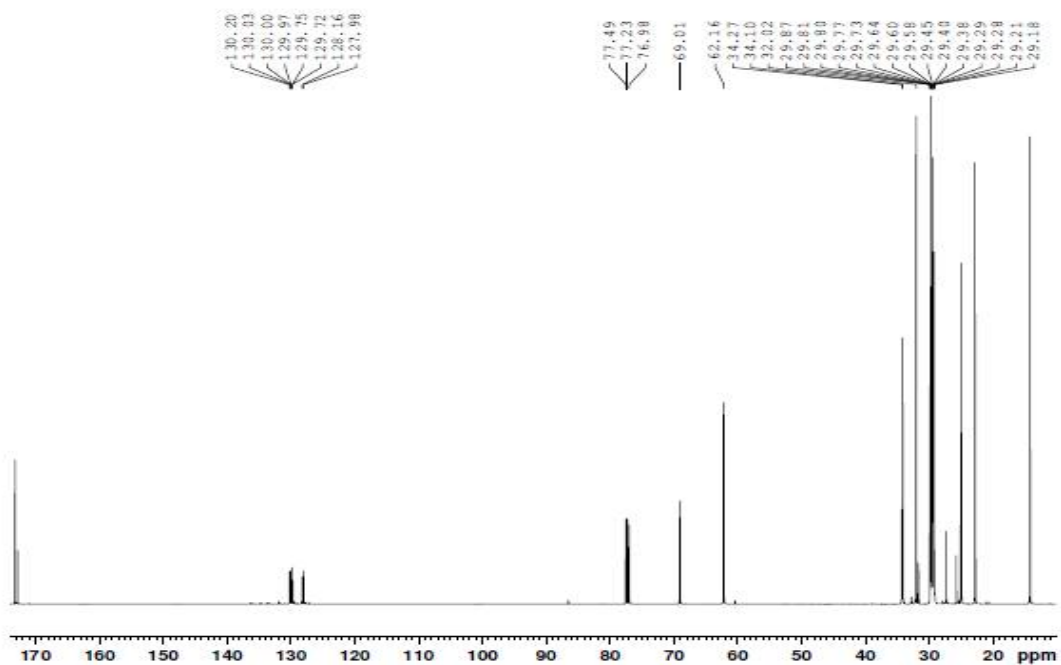


Figure 11. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 4

1-2 Compound 5의 구조 동정

Compound 5는 무색의 오일상의 물질로 분자량을 알기 위해 LC-MS를 실시하였다. LC-MS로 분석한 결과 5.6 분대에 피크가 나왔고, MS/MS를 통해 149.09, 204.76, 215.18, 261.06 m/z 에서 딸이온이 나왔으며, 279.14의 분자량을 확인하였다. 구조 동정을 하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 분석한 결과, δ 1.25-1.496(14H, m)의 signal을 통해 약 열 두 개의 사슬형의 methylene 수소 피크가 있음을 예상하였다. δ 6.52는 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 원소가 인접한 exocyclic double bond라고 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석결과, δ 168.2을 통해 카보닐기가 있음을 예상하였다. δ 28.6-29.5(t)을 통해 사슬형 피크가 있음을 확인하였다.

그리고 $^1\text{H-NMR}$ 상에서 δ 2.17(td, $J = 7.5, 2.5$)와 δ 1.92($J = 2.5$)의 coupling constant를 통해 두 피크가 서로 coupling 한다는 것을 예상 할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 을 통해 화합물이 17개 이상의 탄소로 이루어졌음을 예상하였고, DEPT-135를 통해 4차 탄소 3개, CH 4개, CH_2 9개, CH_3 1개로 이루어졌음을 확인하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 상에서 δ 68.2 의 CH 탄소 피크와 δ 85.0 위치의 4차 탄소 피크와 δ 18.6에 보이는 삼중결합의 α 위치의 탄소 피크를 확인하여 compound 5가 litsenolide의 기본적인 골격인 $\alpha\beta$ -unsaturated γ -lactone의 형태는 유지하고 terminal 부분이 $-\text{CH}\equiv\text{CH}$ 로 변형된 형태라는 것을 예상하였다,

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT-135를 통해 예상한 부분 구조의 정확한 구조 동정을 확인하기 위해 2D NMR을 분석하였다. HMQC를 통해 탄소에 직접 연결되어 있는 수소를, HMBC를 통해서 각 탄소에 대해 long-range 결합을 하고 있는 수소를 확인하였다. COSY를 통해서 인접한 수소에 대한 정보를 확인하였다. 각각의 기기분석 data를 기본으로 하여 문헌²⁹⁾을 검색한 결과 compound 5는 litsenolide B₁임을 확인하였다.

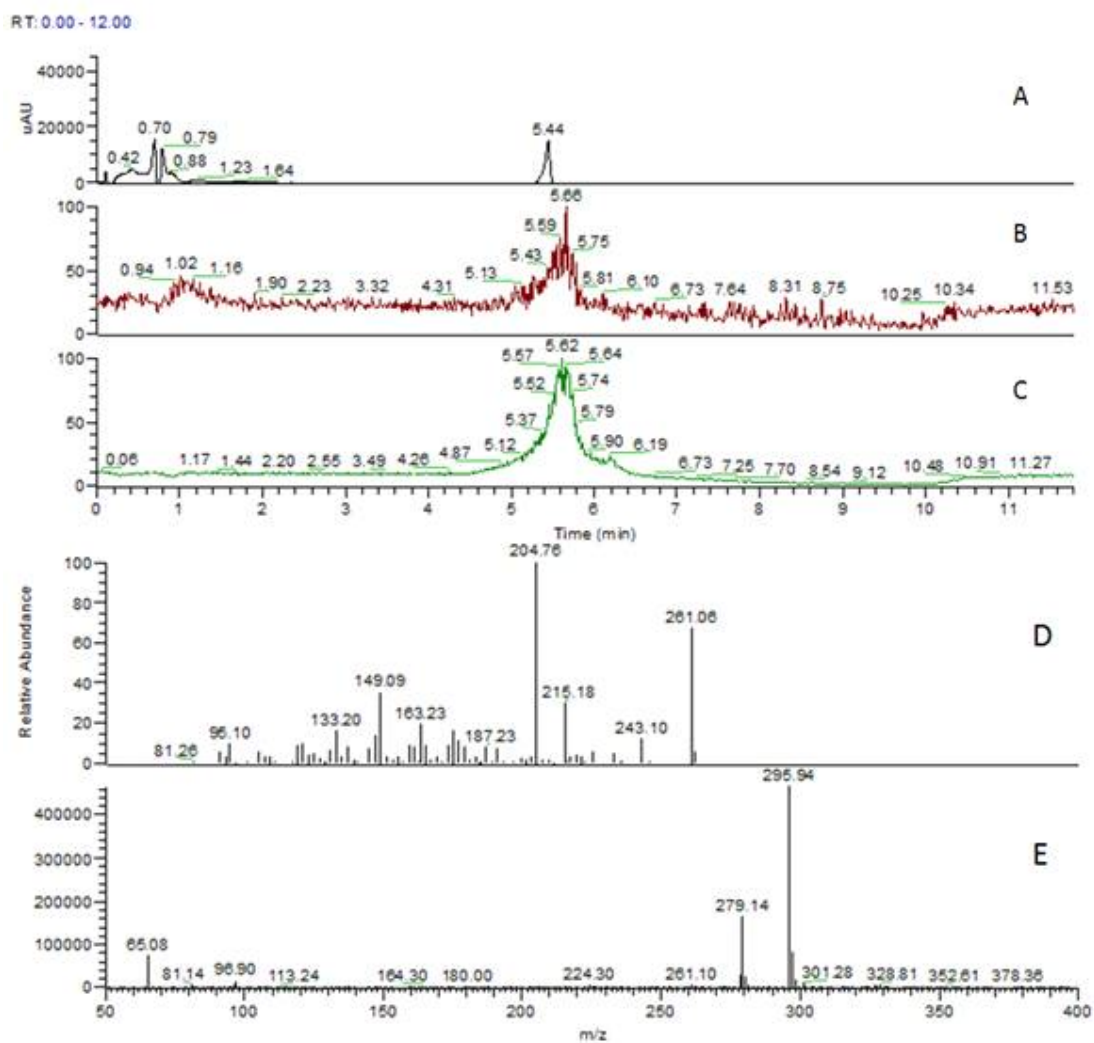


Figure 12. LC-MS spectrum of isolated compound 5

A: PDA chromatograph (200~600 nm)

B: Full mass IC (sort by $m/z = 279.0$)

C: $m/z = 279.0$ MS2 TIC

D: C₂ mass spectrum (RT= 6.08)

E: B₂ mass spectrum (RT= 5.64)

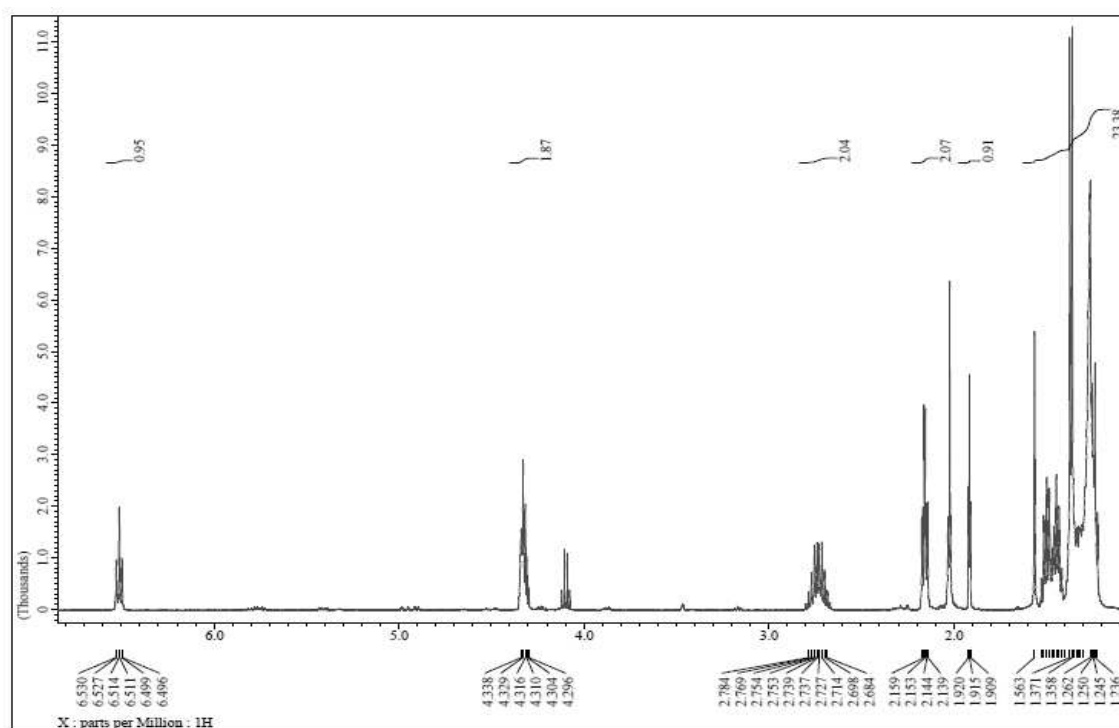


Figure 13. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of isolated compound 5

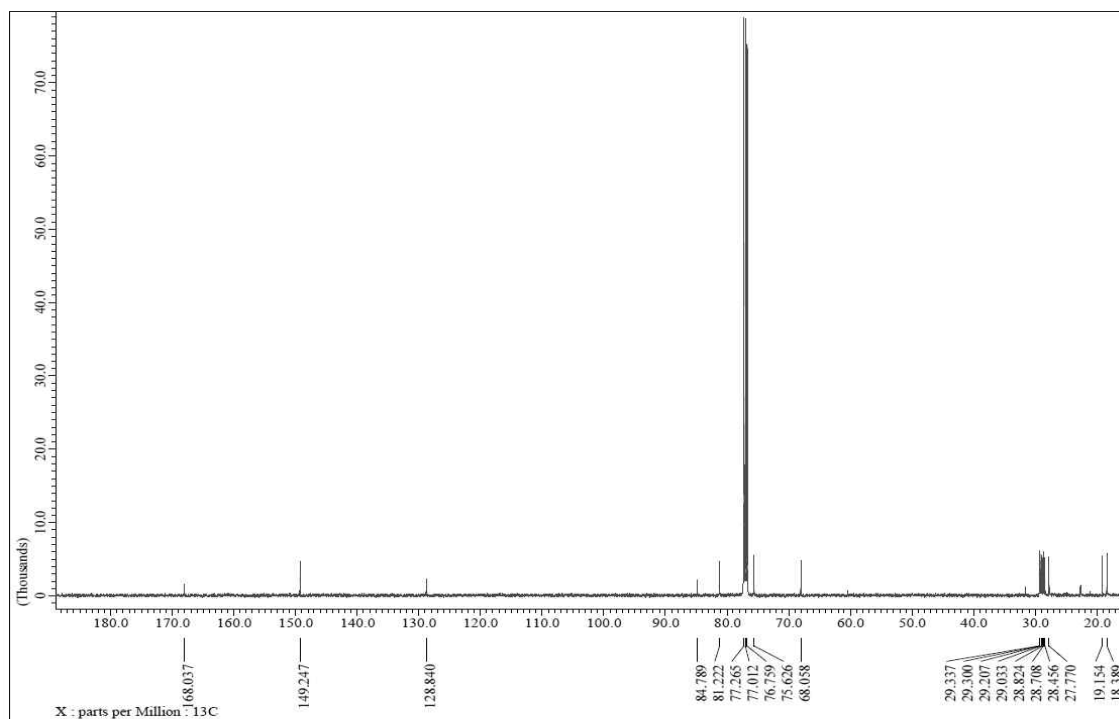


Figure 14. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of isolated compound 5

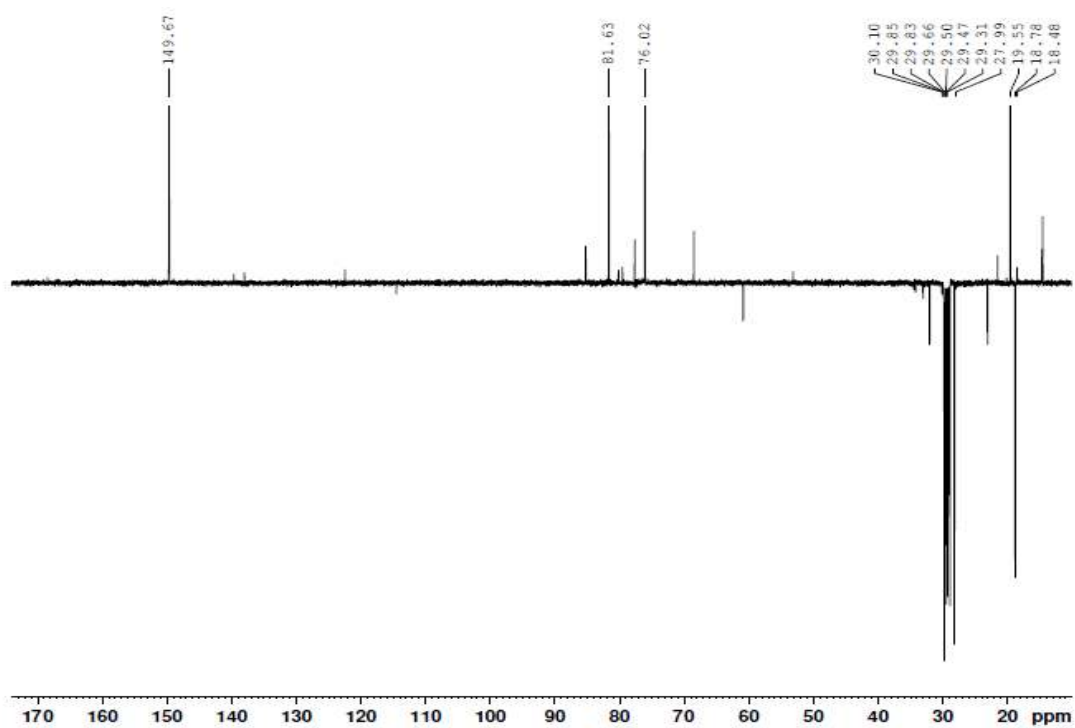


Figure 15. DEPT-135 spectrum of isolated compound 5

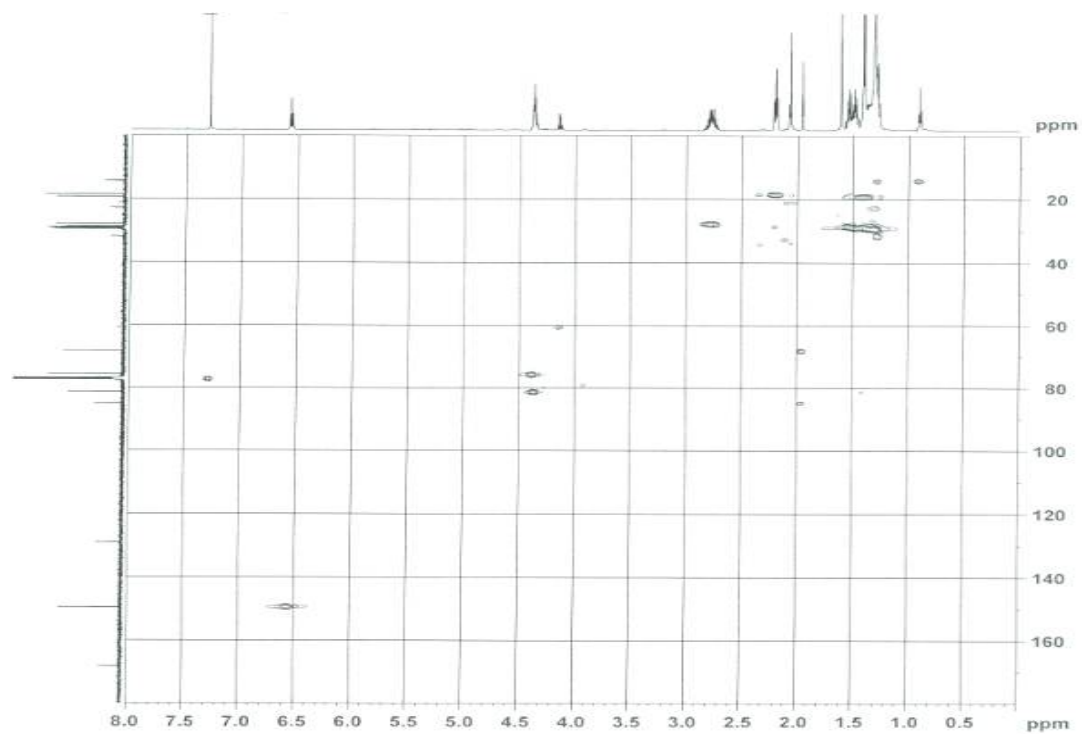


Figure 16. HSQC spectrum of isolated compound 5

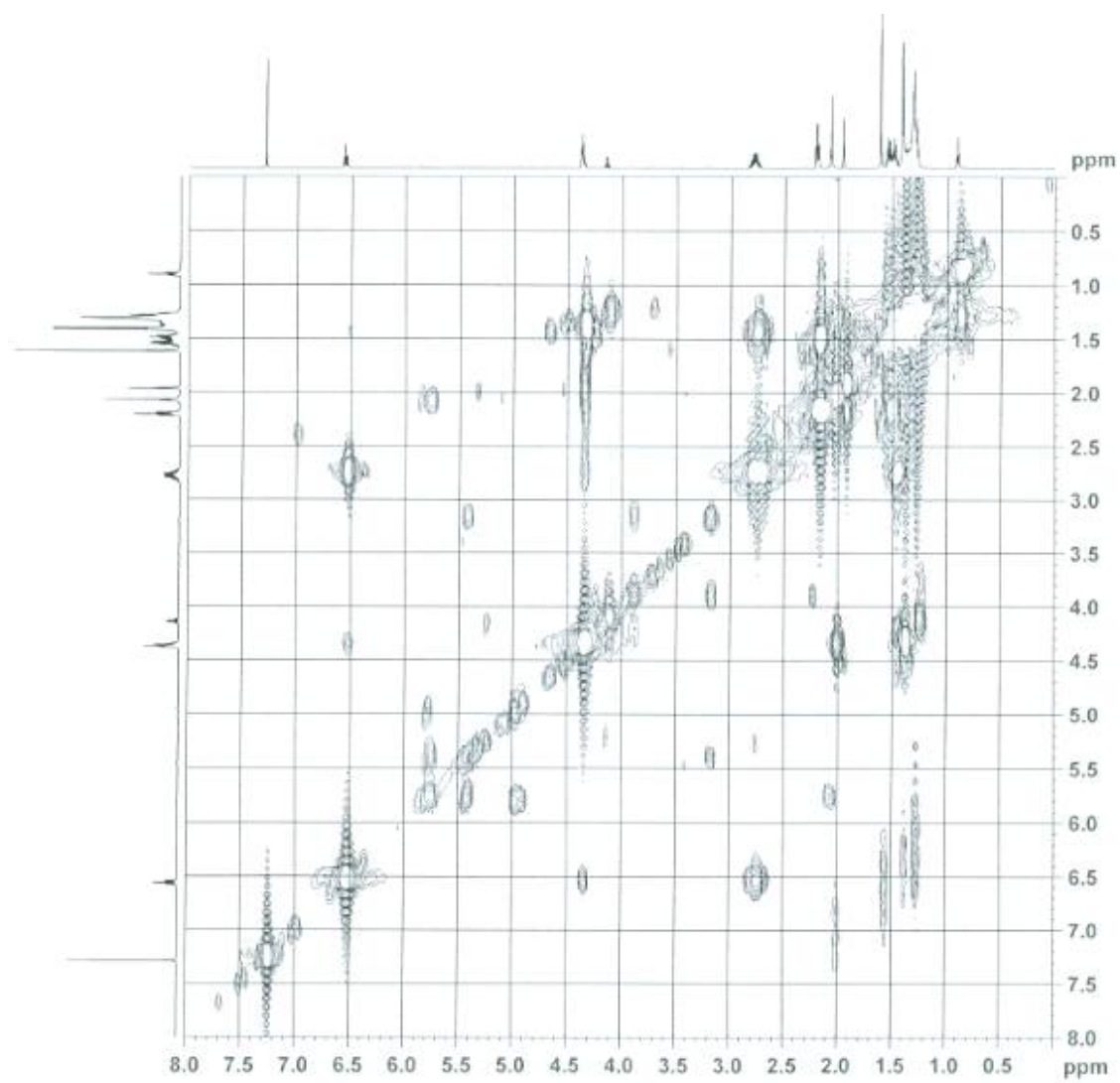


Figure 17. COSY spectrum of isolated compound 5

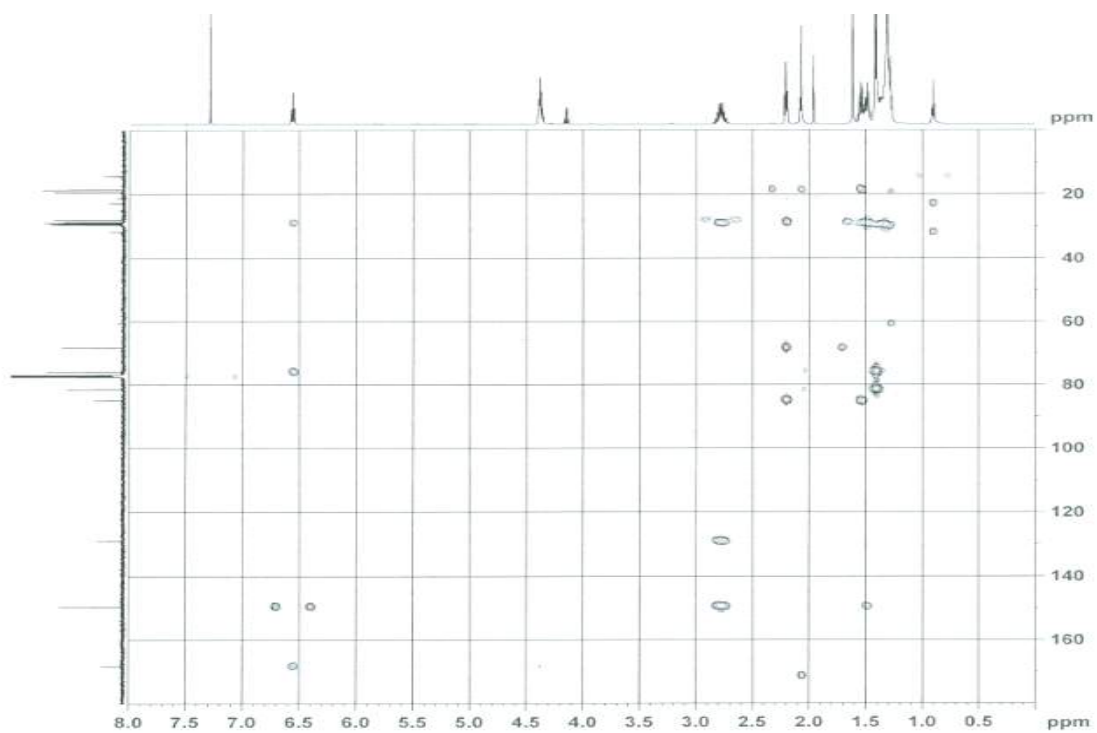


Figure 18. HMBC spectrum of isolated compound **5**

Table 2. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound **5**

Position	Compound 5 (^1H NMR : 500 MHz in CDCl_3 , ^{13}C NMR : 125 MHz in CDCl_3)	
	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	168.2	–
2	129.0	–
3	75.8	4.33(2H, qd, $J = 6.5, 3.5$)
4	81.4	
5	19.36	1.37(3H, d, $J = 6.5$)
6	149.4	6.53(H, td, $J = 7.5, 1.0$)
7	27.9	2.78(2H, m)
8-14	28.6-29.5	1.23-1.56(14H, m)
15	18.6	2.15(2H, td, $J = 7.0, 2.5$)
16	85.0	–
17	68.2	1.92(H, t, $J = 2.5$)

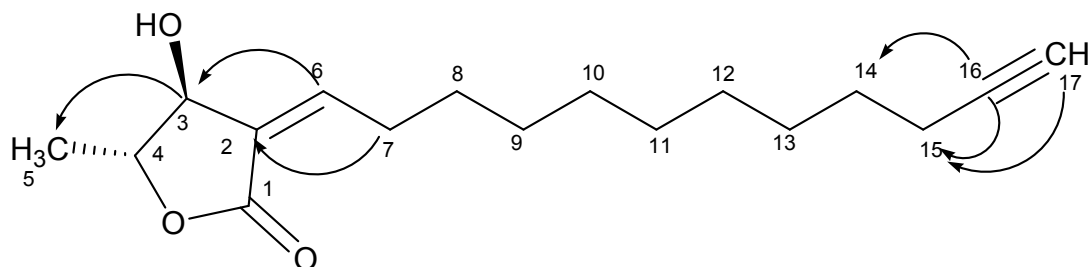


Figure 19. Chemical structure of compound 5

1-3. Compound 7의 구조 동정

Compound 7을 구조 동정 하기 위하여 LC-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 분석하였다. LC-MS에서 7.3분대에 피크가 나오고. MS/MS를 통해 174.9, 250.9 m/z 에서 딸이온이 나왔다. 최종적으로 분자량이 309.16임을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 보면 전체적인 NMR spectrum이 compound 5인 litsenolide B₁ 과 흡사한 형태를 보였다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 δ 5.80(ddt, $J = 17.0, 10.5, 6.5$)과 δ 4.98(ddt, $J = 17.0, 10.5, 2.0$), δ 4.91(ddt, $J = 17.0, 10.5, 2.0, 1.5$)의 coupling constant를 보아 서로 coupling 하는 것을 알 수 있다. 그리고 δ 5.82(ddt, $J = 17.0, 10.5, 6.5$)과 δ 4.98(ddt, $J = 17.0, 10.5, 2.0$)을 보아 이중결합이 terminal 부분에 있다는 것을 추정하였다. 또한, δ 6.96을 보아 exocyclic double bond에서 관찰되는 signal이라고 할 수 있다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 화합물의 탄소가 17개 이상임을 예상하였다. 그리고 δ

170.0을 통해 카보닐로 예상되며 그 값이 shielding 된 것으로 보아 ester 형태의 카보닐기 일 것으로 예상하였다.

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 분석하고 LC-MS의 정보를 바탕으로 문헌을 찾아 본 결과 compound 7이 litseakolide D₂ 임을 확인하였다.

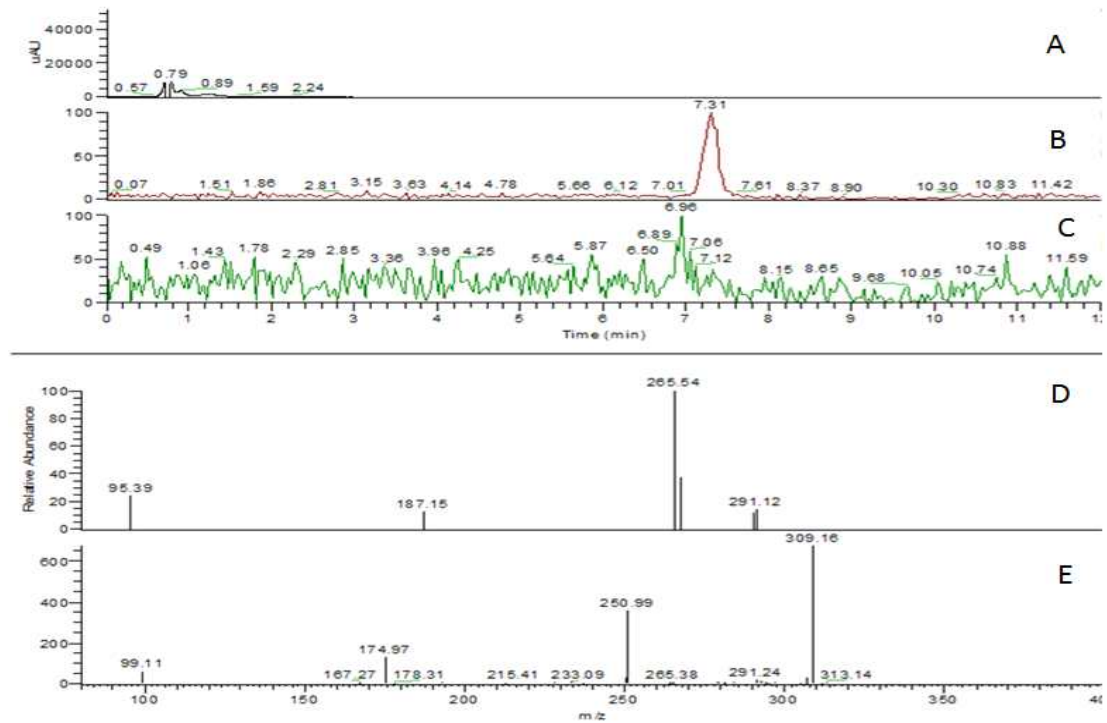


Figure 20. LC-MS spectrum of isolated compound 7

A: PDA chromatograph (200~600 nm)

B: MS2 IC (sort by $m/z = 326.0$)

C: MS3 TIC ($m/z = 279.0$)

D: C의 mass spectrum (RT= 7.35)

E: B의 mass spectrum (RT= 7.31)

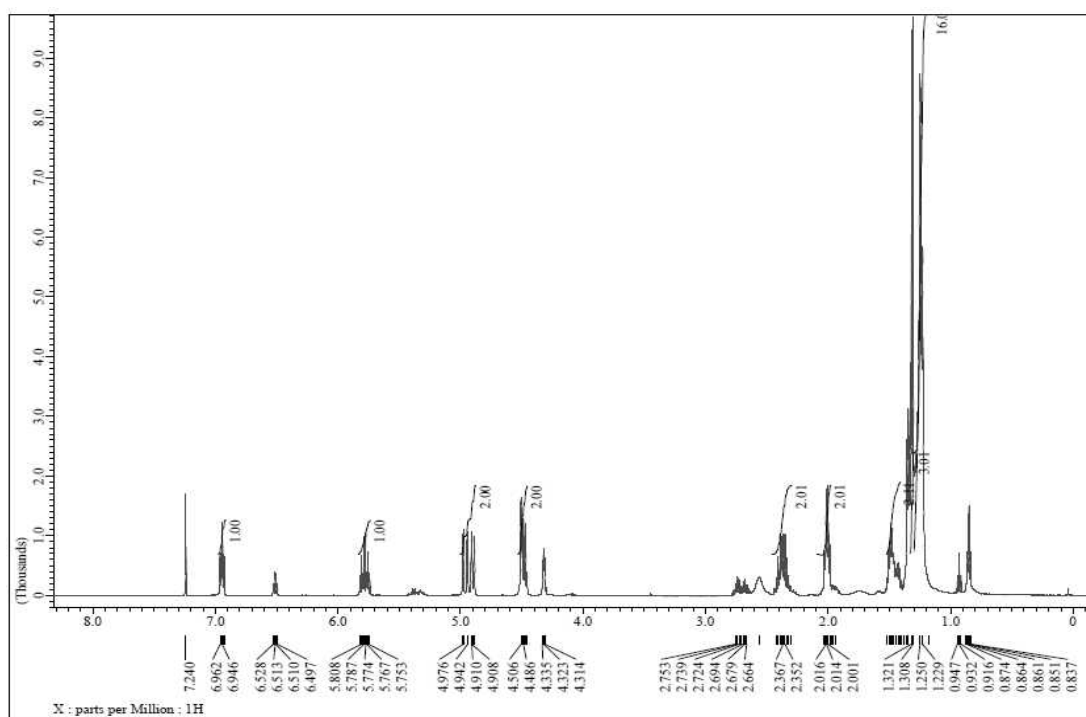


Figure 21. ^1H NMR spectrum of isolated compound 7

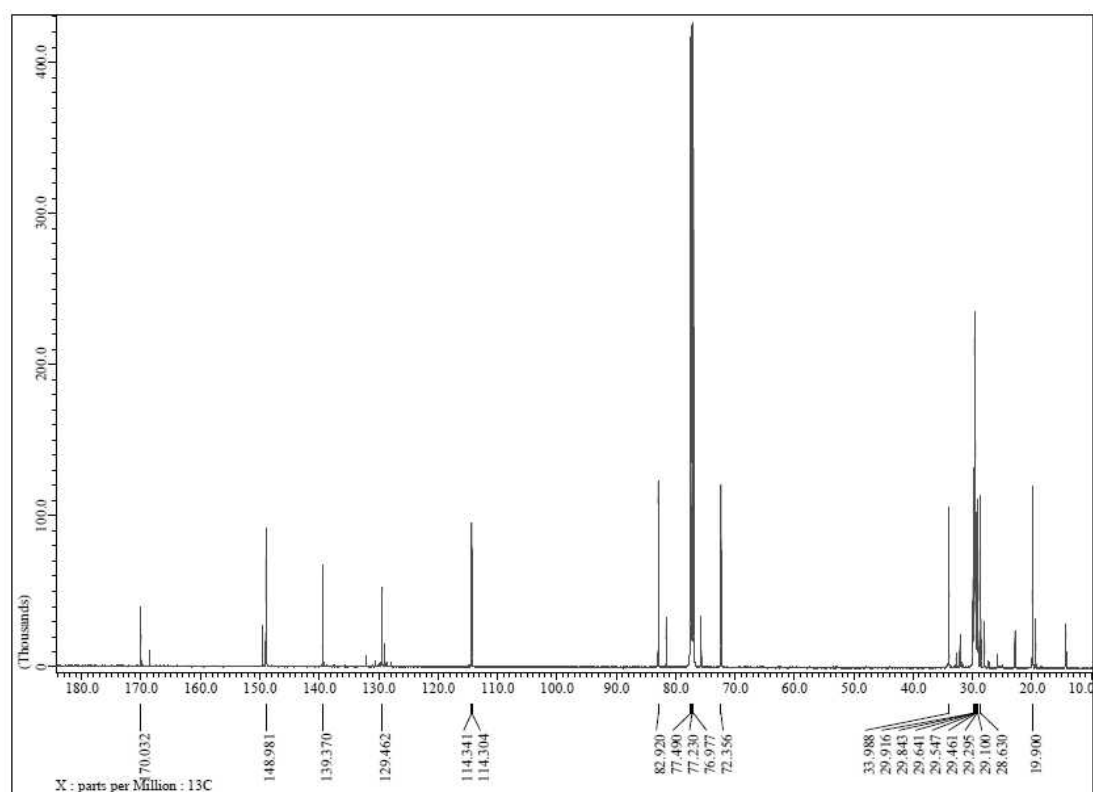


Figure 22. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 7

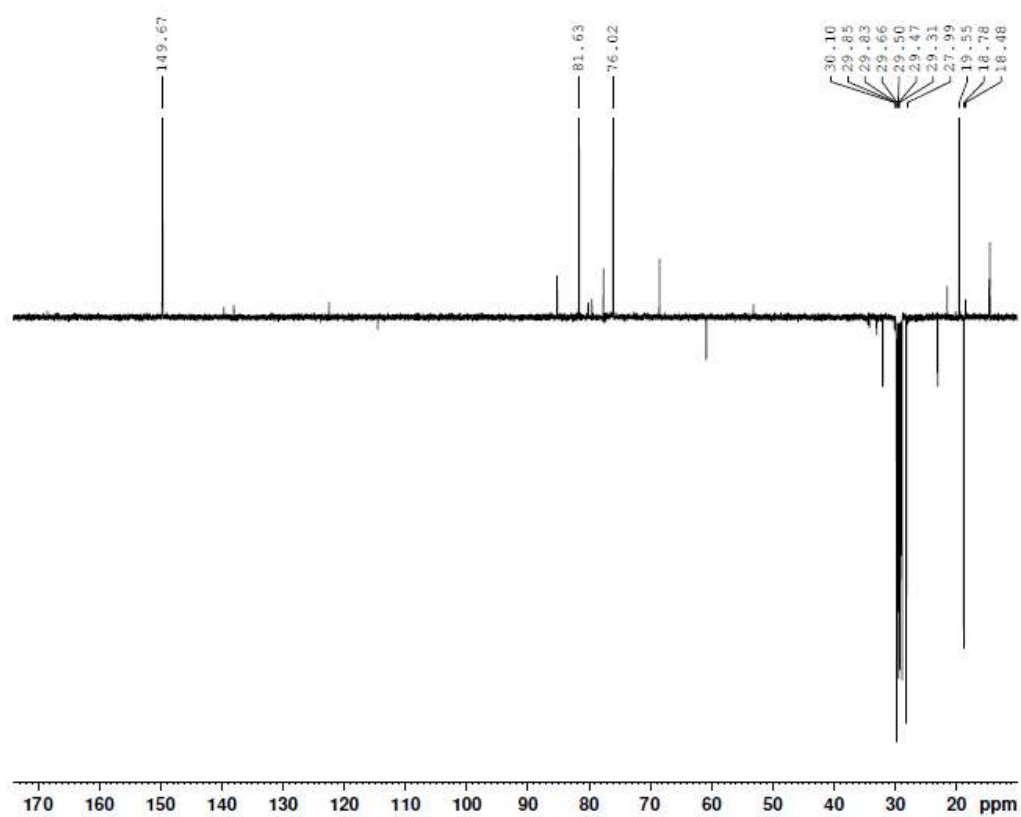


Figure 23. DEPT-135 spectrum of isolated compound **7**

Table 3. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound **7**

Position	Compound 7 (^1H NMR : 500 MHz in CDCl_3 , ^{13}C NMR : 125 MHz in CDCl_3)	
	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	170.0	-
2	129.4	-
3	75.7	4.5(br.s)
4	82.9	4.48(qd, $J = 6.5, 2.0$)
5	19.8	1.35(d, $J = 6.5$)
6	148.9	6.9(td, $J = 8.5, 1.5$)
7	29.8	2.32-2.42(m)
8	28.6	1.49-1.55(m)
9-16	29.1-29.6	1.25(br.s)
17	33.9	1.98-2.02(m)
18	139.3	5.82(ddt, $J = 17.0, 10.5, 6.5$)
19	114.3	4.98(ddt, $J = 17.0, 3.5, 2.0$)
		4.91(ddt, $J = 10.5, 2.0, 1.5$)
OH		1.99(br.s)

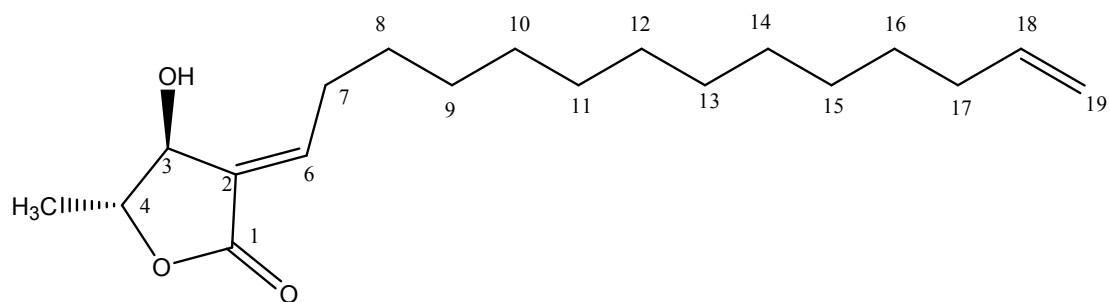


Figure 24. Chemical structure of compound **7**

1-4. Compound 6의 구조 동정

Compound 6을 구조 동정 하기 위하여 LC-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 분석하였다. LC-MS에서 6.6 분대에 피크가 나오고 MS/MS를 통해 165.1, 217.27, 263.17 m/z에서 딸이온이 나왔다. 최종적으로 분자량이 281.18임을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 보면 전체적인 NMR spectrum이 Compound 5 와 Compound 7과 매우 흡사한 형태를 보였다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum을 보면 δ 6.52을 보아 sp^2 혼성을 하고 있는 프로톤으로 예상하였고, δ 4.33의 피크로 보아 sp^3 혼성 함수이나 전기음성도가 큰 치환기가 옆에 있어 deshielding 된 것으로 보인다. δ 2.76 으로 보아 알릴기가 있음을 예상하였고, δ 1.22-1.24를 통해 탄화수소가 사슬형으로 있음을 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 보면 δ 168.6을 보면 카보닐로 예상되며 그 값이 shielding 된 것으로 보아 ester 형태의 카보닐 일 것으로 예상하였다. δ 149.5와 δ 139.3 의 signal을 통해 sp^2 혼성을 하고 있는 카본으로 올레핀 구조의 카본 signal 임을 예상하였다.

LC-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum과 앞서 구조 동정한 compound의 정보와 문헌³⁰⁾을 비교하여 compound 6은 litsenolide A₁임을 확인하였다.

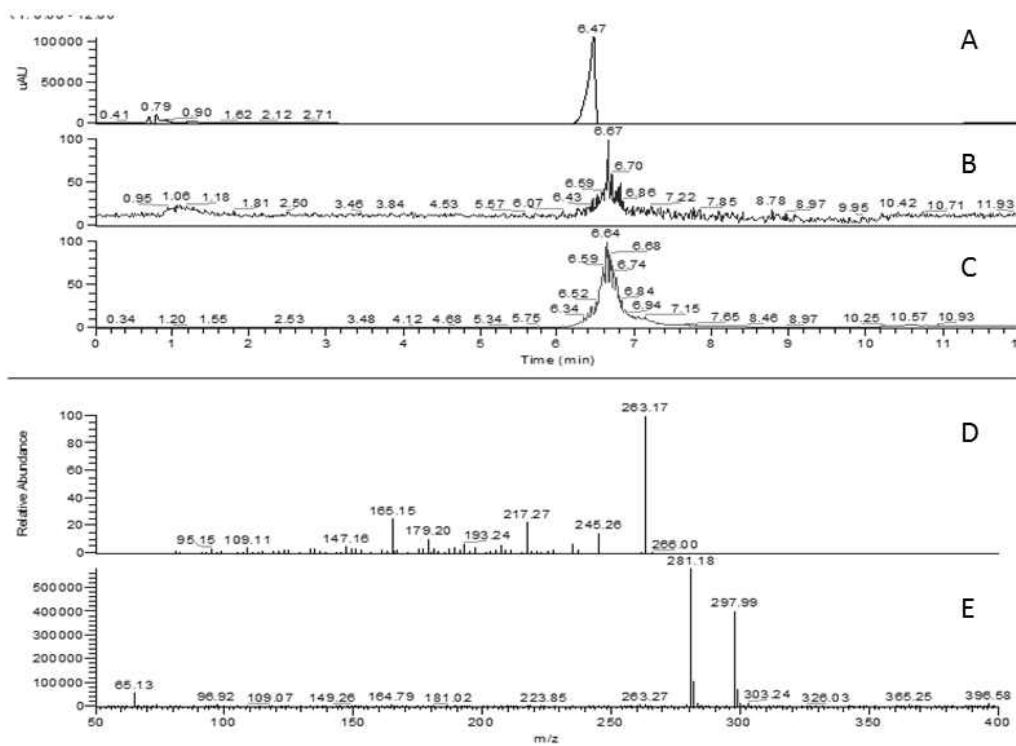


Figure 25. LC-MS spectrum of isolated compound 6

- A: PDA chromatograph (200~600 nm)
- B: Full mass IC (sort by $m/z=281.0$)
- C: $m/z=281.0$ MS2 TIC
- D: C-2 mass spectrum (RT= 6.64)
- E: B-2 mass spectrum (RT= 6.65)

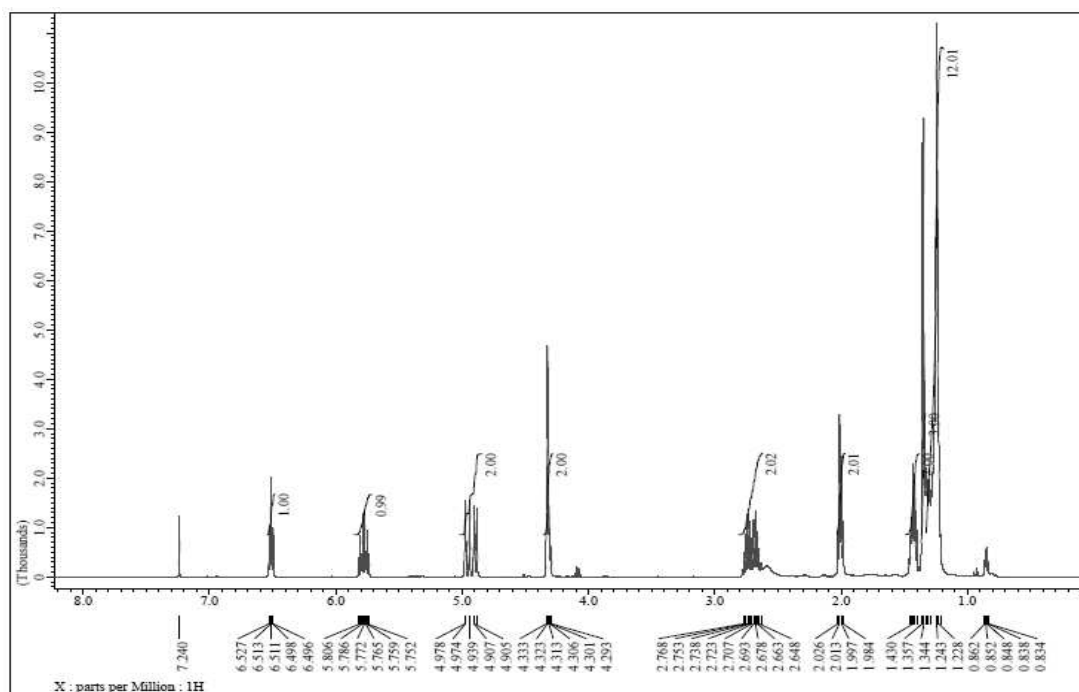


Figure 26. ^1H NMR spectrum of isolated compound **6**

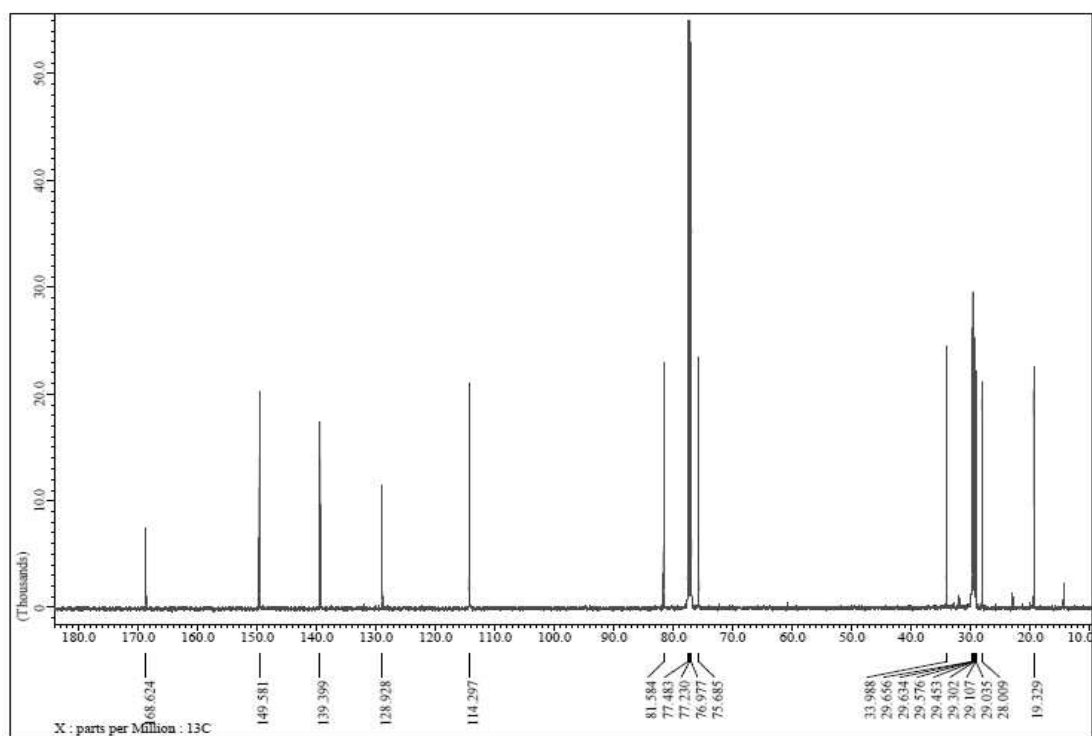


Figure 27. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound **6**

Table 3. ^1H NMR, ^{13}C NMR chemical shifts of compound **6**

Position	Compound 6 (^1H NMR : 500 MHz in CDCl_3 , ^{13}C NMR : 125 MHz in CDCl_3)	
	δ_{C}	δ_{H} (int, mult, J in Hz)
1	168.6	-
2	128.9	-
3	75.8	4.32(br)
4	81.5	
5	19.8	1.35(d, $J = 6.5$)
6	149.5	6.52(td, $J = 8.0, 1.0$)
7	29.6	2.76-2.64(m)
8	28.0	1.43(m)
9-14	29.6-29.0	1.22-1.24(12H)
15	33.9	2.02(2H, q)
16	139.3	5.81(ddt, $J = 17.0, 10.5, 6.5$)
17	114.2	4.98(ddt, $J = 12.5, 2.0$)
		4.90(ddt, $J = 10.0, 1.0$)
OH		1.99(br.s)

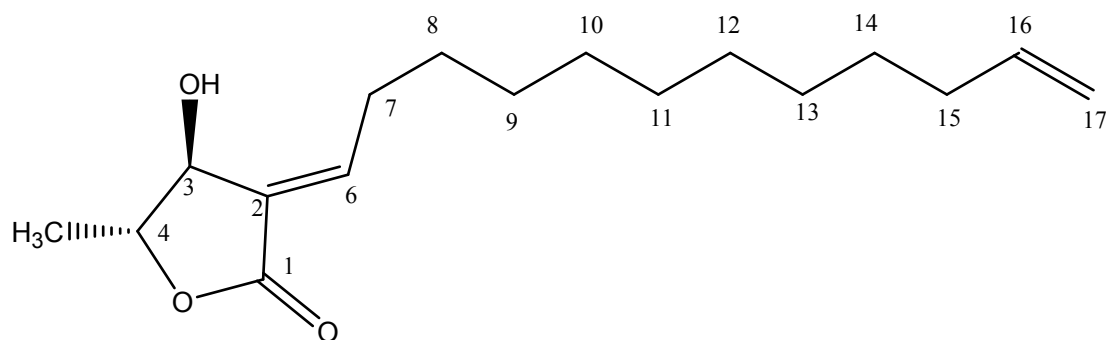


Figure 28. Chemical structure of compound **6**

2. 항염 활성 실험 결과

2-1. 까마귀쪽나무 종자 추출물의 NO 생성 억제 활성 측정

LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 *L. japonica* seed CH₂Cl₂ 추출물의 NO 생성 저해능을 확인하기 위하여 추출물 (5, 10, 20 µg/mL)과 LPS (1 µg/mL)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. *L. japonica* seed CH₂Cl₂ 추출물의 NO 생성 억제 활성을 측정한 결과, LPS 단독 처리군은 NO의 생성을 유도하였으며, 위와 같은 농도의 샘플을 같이 처리하였을 때, CH₂Cl₂ 추출물을 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 NO의 생성 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다(Figure 29).

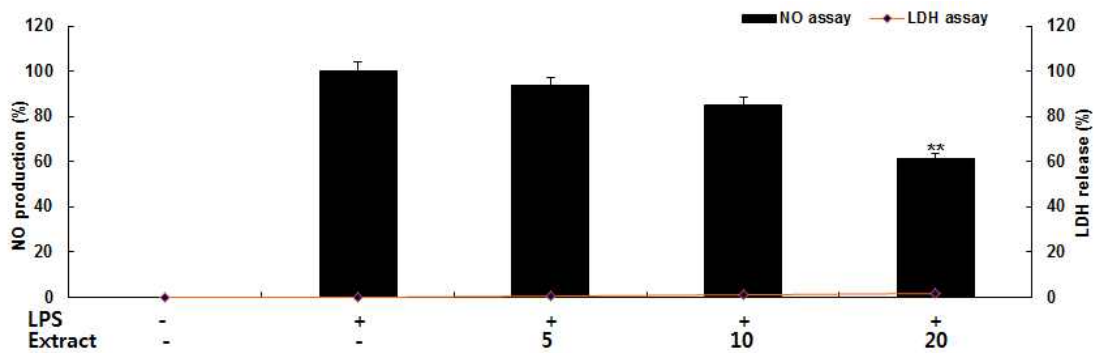


Figure 29. Inhibitory effect of nitric oxide production on Extract in RAW 264.7 cells

2-2. 까마귀쪽나무 종자 CH₂Cl₂ layer의 NO 생성 억제 활성 측정

LPS 로 유도된 Raw 264.7 cell에서 *L. japonica* seed CH₂Cl₂ 분획물의 NO 생성 저해능을 확인하기 위하여 CH₂Cl₂ 분획물 (5, 10, 20 µg/mL)와 LPS (1 µg/mL)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. *L. japonica* seed CH₂Cl₂ 분획물의 NO 생성 억제 활성을 측정한 결과, LPS 단독 처리군은 NO의 생성을 유도하였으며, 위와 같은 농도의 샘플을 같이 처리하였을 때, CH₂Cl₂ 분획물을 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 NO의 생성 억제 활성을 보이는 것을 확인 하였다(Figure 30).

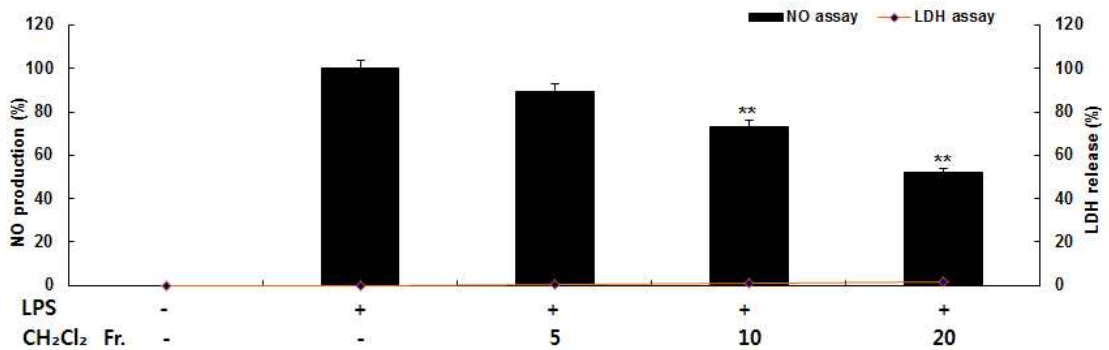


Figure 30. Inhibitory effect of nitric oxide production on CH₂Cl₂ layer in RAW 264.7 cells

2-3. Compound 5의 NO 생성 억제 활성 측정

LPS 로 유도된 Raw 264.7 cell에서 *L. japonica* seed에서 분리된 compound 5의 NO 생성 저해능을 확인하기 위하여 compound 5 (5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. Compound 5의 NO 생성 억제 활성을 측정한 결과, LPS 단독 처리군은 NO의 생성을 유도하였으며, 위와 같은 농도의 샘플을 같이 처리하였을 때, compound 5를 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 NO의 생성 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다(Figure 31).

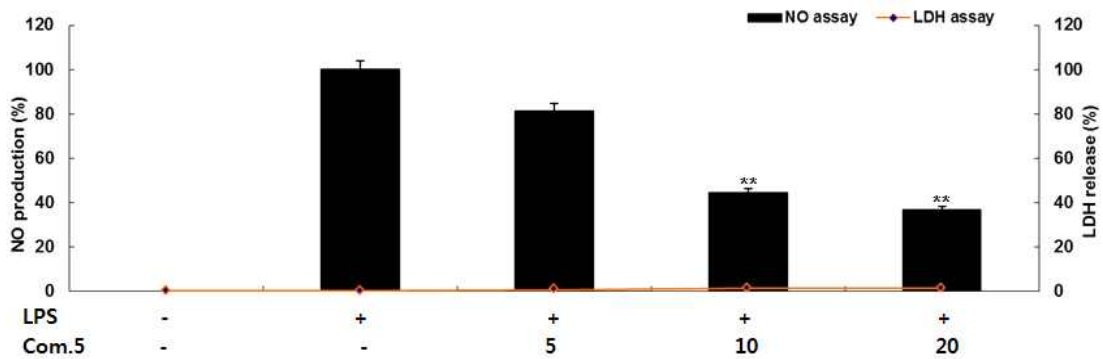


Figure 31. Inhibitory effect of nitric oxide production on compound 5 in RAW 264.7 cells

2-4. Compound 6의 NO 생성 억제 활성 측정

LPS 로 유도된 Raw 264.7 cell에서 *L. japonica* seed에서 분리된 compound 6의 NO 생성 저해능을 확인하기 위하여 compound 6 (5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. NO의 양은 Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. Compound 6의

NO 생성 억제 활성을 측정한 결과, LPS 단독 처리군은 NO의 생성을 유도하였으며, 위와 같은 농도의 샘플을 같이 처리하였을 때, compound 6을 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 NO의 생성 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다 (Figure 32).

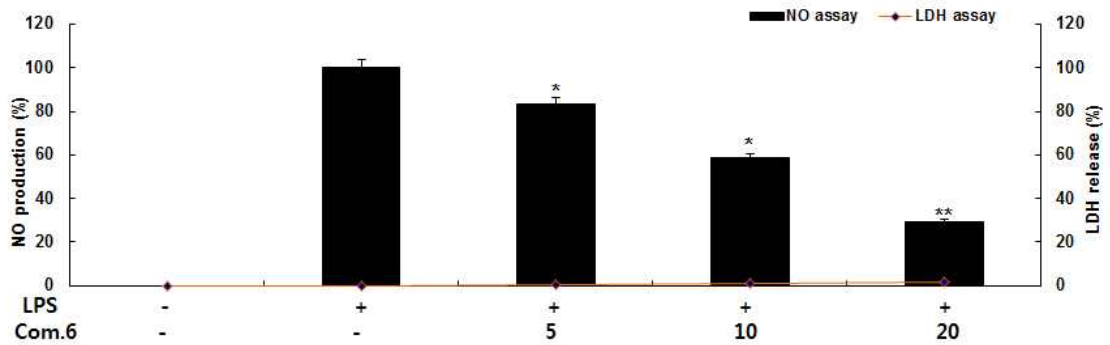


Figure 32. Inhibitory effect of nitric oxide production on Compound 6 in RAW 264.7 cells

2-5. 까마귀쪽나무 종자 추출, 분획 및 분리 물질의 세포 생존율 측정

RAW 264.7 cell에 Extract, CH₂Cl₂ layer, compounds 5, 6 (5, 10, 20 µg/mL) Sample을 처리하여 24시간 배양한 후 MTT분석을 통해서 세포 생존율을 확인하였다. Extract, CH₂Cl₂ layer, compounds 5, 6는 5, 10, 20 µg/mL의 농도에서 87~100%의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Figure 33).

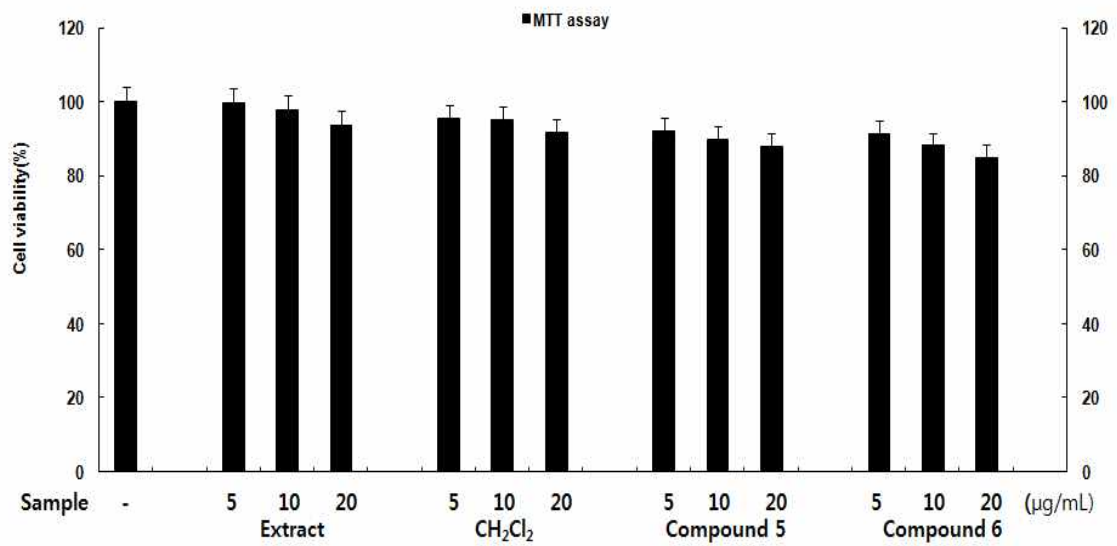


Figure 33. Cytotoxicity of *L. japonica* on the viability of RAW 264.7 cells

2-6. 까마귀쪽나무 종자 추출물과 CH₂Cl₂ layer의 염증성 cytokine 생성 억제 평가

RAW 264.7 cell에서 까마귀쪽나무 종자 추출물 및 CH₂Cl₂ layer가 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 발현에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. RAW 264.7 cell 에 LPS (1 μ g/mL)와 추출물 및 CH₂Cl₂ layer를 5, 10, 20 μ g/mL의 농도로 처리하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성 억제 활성을 확인한 결과 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Figure 34-36).

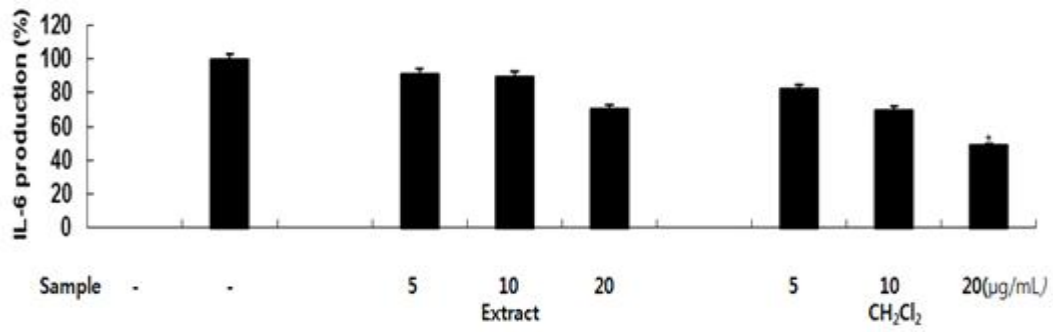


Figure 34. Inhibition of cytokine IL-6 of extract, CH₂Cl₂ layer

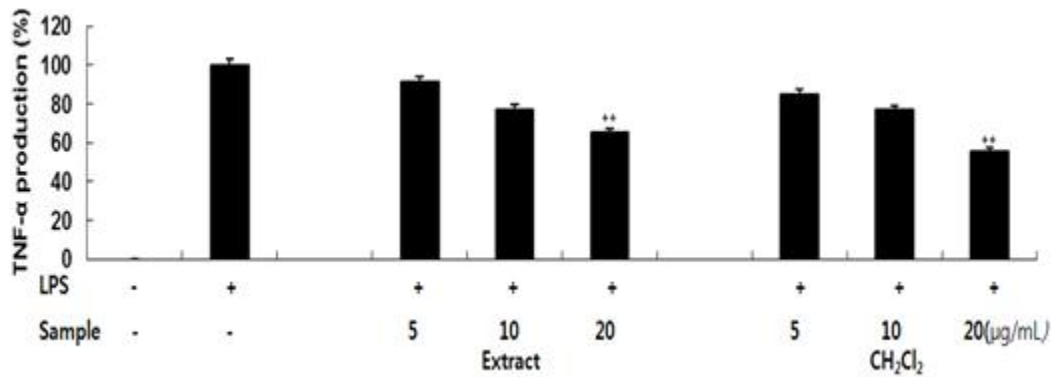


Figure 35. Inhibition of cytokine TNF-α of extract, CH₂Cl₂ layer

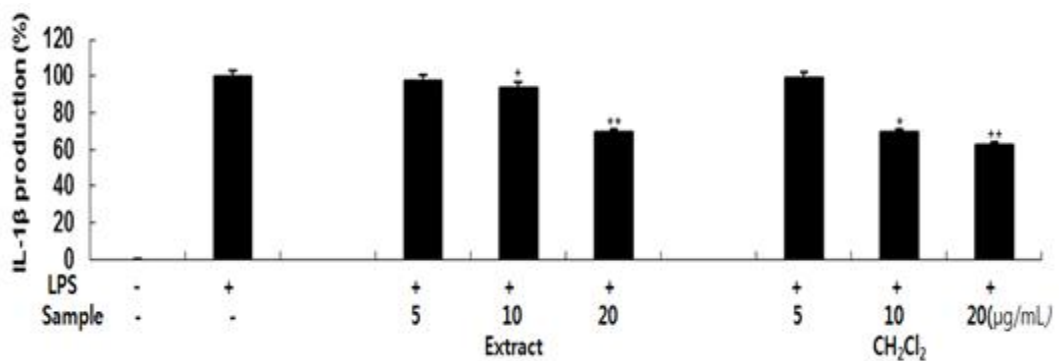


Figure 36. Inhibition of cytokine IL₁β of extract, CH₂Cl₂ layer

2-7. Compounds 5, 6의 염증성 cytokine 생성 억제 평가

RAW 264.7 cell에서 compounds 5, 6이 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 발현에 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. RAW 264.7 cell 에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 compounds 5, 6를 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성 억제 활성을 확인한 결과 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Figure 37-39).

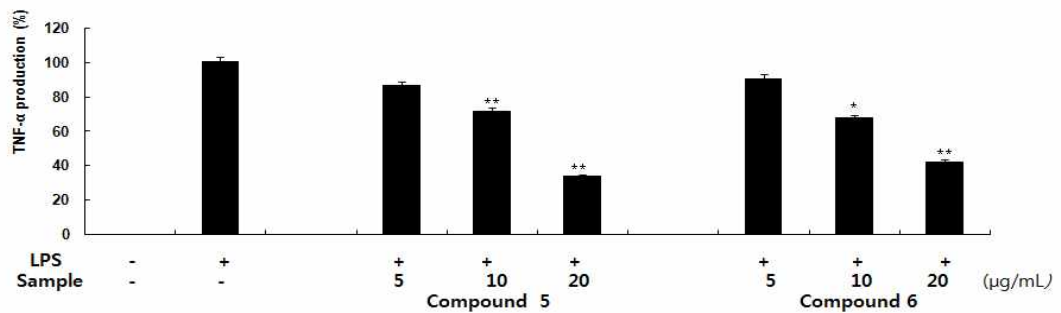


Figure 37. Inhibition of cytokine TNF- α of compounds 5, 6

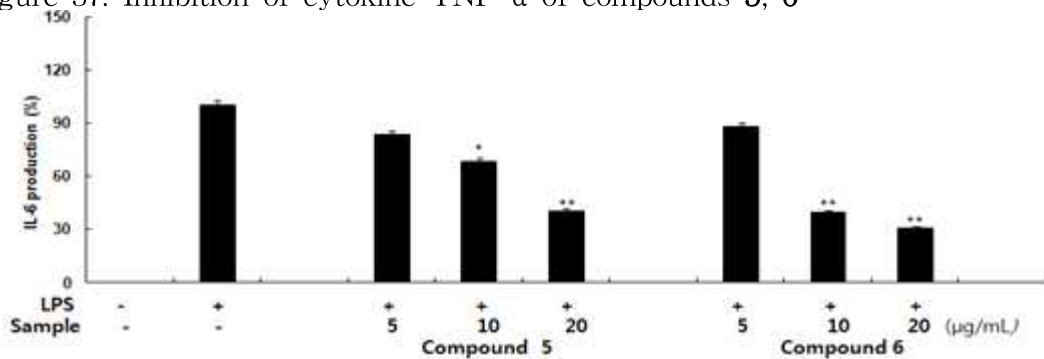


Figure 38. Inhibition of cytokine IL-6 of compounds 5, 6

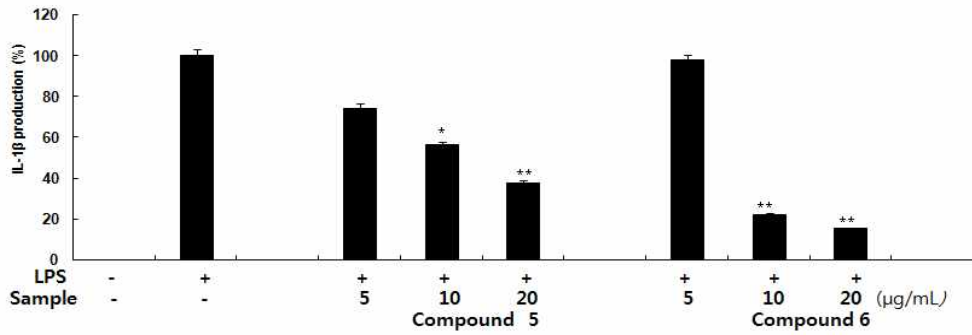


Figure 39. Inhibition of cytokine IL-1 β of compounds 5, 6

3. 미백 활성 실험 결과

3-1. Compounds 5, 6의 세포내 tyrosinase 저해 활성 평가

까마귀쪽나무 종자에서 분리된 compounds 5, 6가 멜라닌 합성에 주요한 조절적 작용을 하는 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16F10 cell에 α -MSH와 compounds 5, 6을 동시에 처리하여 세포 내 tyrosinase 활성을 확인하였다.

Compounds 5, 6의 세포 내 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과, α -MSH 단독 처리군은 tyrosinase의 생성을 유도하였으며, 위와 같은 농도의 샘플을 같이 처리하였을 때, compounds 5, 6을 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 tyrosinase를 저해 하는 것을 확인하였다(Figure 40).

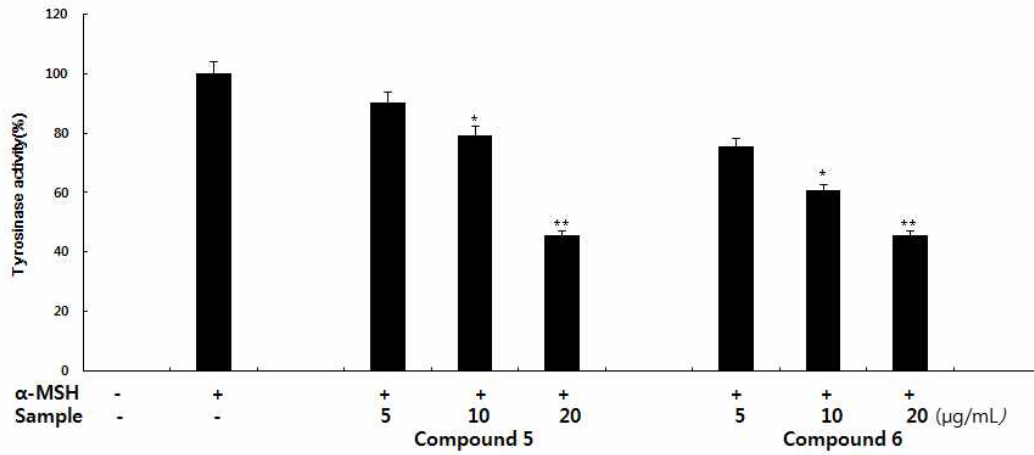


Figure 40. Intracellular tyrosinase inhibition of Compounds 5, 6

3-2. Compounds 5, 6의 멜라닌 생성 억제 효과 평가

Compounds 5, 6의 멜라닌 생성 억제 효과를 조사하기 위해 B16F10 cell에서 α-MSH가 멜라닌 형성을 유발하는 것으로 알려져 있으므로 B16F10 cell에 α-MSH와 compounds 5, 6을 동시에 처리하여 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다. compounds 5, 6의 멜라닌 생성 억제 활성을 측정한 결과, α-MSH 단독 처리군은 melanin의 생성을 유도하였으며, 위와 같은 농도의 샘플을 같이 처리하였을 때, Compound 5, 6을 처리한 실험군은 농도가 증가함에 따라 melanin의 생성을 저해 하는 것을 확인하였다(Figure 41).

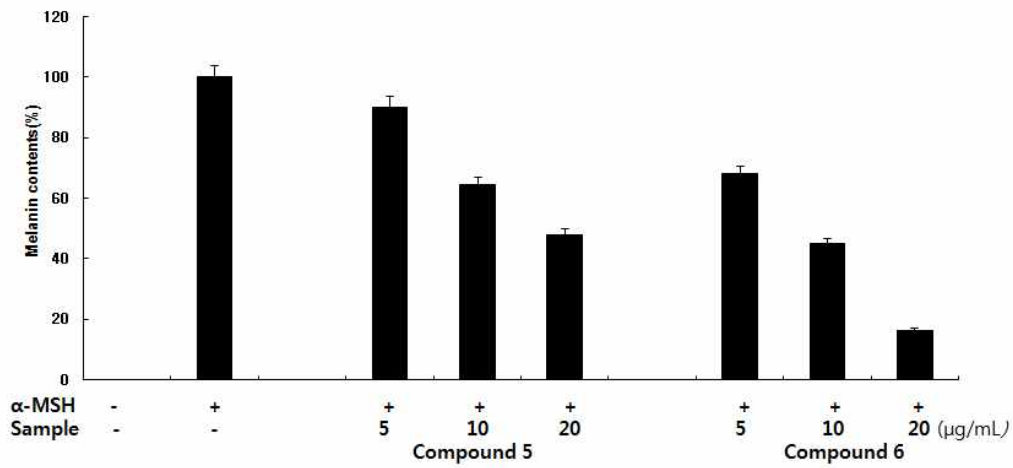


Figure 41. Melanin contents of compounds 5, 6

3-3. 세포 생존율 측정

B16F10 cell에 extract, CH₂Cl₂ layer, compound 5, 6 (5, 10, 20 µg/mL)의 Sample을 처리하여 24시간 배양한 후 MTT분석을 통해서 세포 생존율을 확인하였다. Extract, CH₂Cl₂ layer, compounds 5, 6는 5, 10, 20 µg/mL의 농도에서 90% 이상의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Figure 42).

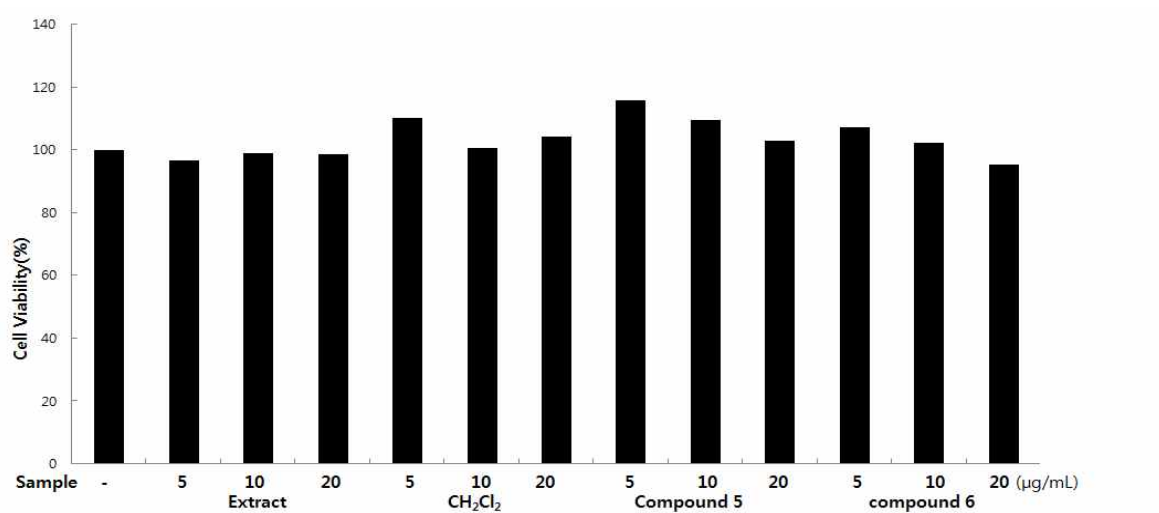


Figure 42. Cytotoxicities of extract, CH₂Cl₂ layer and compounds 5, 6 in B16F10 murine melanoma cell

IV. 요약 및 결론

제주도에 자생하는 식물을 이용하여 소재 개발 가능성을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 소재개발에 대한 연구는 제주 자생식물 중 까마귀쪽나무 종자를 이용하여 화합물을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 기능성화장품으로 활용 가능한 생리활성인 미백과 항염에 대한 검색을 하는 것으로 진행되었다.

까마귀쪽나무 종자의 100% methylene chloride 추출물을 *n*-hexane층, CH₂Cl₂층, 20% MeOH층으로 용매분획하고, CH₂Cl₂ 분획층을 가지고 celite column chromatography, VLC(Vacuum Liquid Chromatography), 순상 silica gel chromatography를 사용하여 화합물들을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR과 LC-MS를 이용하여 확인하였고, 그 자료를 토대로 문헌과 비교한 결과, glyceride류, litsenolide B₁, litsenolide A₁, litseakolide D₂로 확인되었다.

추출물과 분획물, litsenolide B₁, litsenolide A₁의 항염 활성 실험 결과는 NO의 생성량을 비교하여 측정하였는데, 추출물과 분획물, litsenolide B₁, litsenolide A₁에서 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 의존적으로 NO의 생성량을 저해시키는 것을 확인 할 수 있었다. 세포 독성 평가로는 LDH와 MTT를 실시하였는데 모두 독성이 없는 것으로 나타났다. 또한, cytokine 측정 실험에서도 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 양을 농도 의존적으로 저해시켰다.

추출물과 분획물 litsenolide B₁, litsenolide A₁의 미백 활성 실험 결과는 melanin 생성량을 비교하여 측정하였다. 용매만을 처리한 α -MSH(+)와 비교하였을 때 단일 화합물인 litsenolide B₁, litsenolide A₁에서는 농도 의존적으로 cell tyrosinase와 melanin contents의 양이 농도 의존적으로 감소되는 것을 알 수 있다. 세포 독성 평가로는 MTT를 실시하였는데 모두 세포 독성이 없음을 확인하였다.

본 연구의 실험결과를 바탕으로 까마귀쪽나무 종자를 이용한 항염 및 미백 활성을 갖는 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인 할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 1) 김도훈,; 이수진,; 이현석,; 오성근,; 강학회,; 김진웅 “최근 화장품 연구의 신소재 개발 연구”, *KCI News*, **2010**, *13(4)*, 11-21
- 2) Kim, Y. G.; Y. H. Lee; M. K. Kand; B. h. Lee; J. K. Yun; S. B. Kim; and C. J. Kim. “Preparation of functional cosmetics containing β -carotene derived from recombinant Escherichia coil and evaluation of anti-wrinkle efficacy by clinical testing” *Korean J. Microbiol. Biotechnol*, **2009**. *37*, 399-404
- 3) Park, Yu-Hwa; Lim, Sang Hyun,; Ham, Hun Ju,; Kim, Hee Yeon,; Jeong, Haet Nim,; Kim Kyung Hee,; and Kim Songmun “Isolation of Anti-inflammatory Active Substance β -Sitosterol from Seabuckthorn(Hippophae rhamnoides L.) Stem.”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **2010**, *39(7)*, 980-985
- 4) Storck, M.,; Schilling, M.,; Burkhardt, K.,; Prestel, R.,; Abendroth, D.,; Hammet, C. “Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion.” *Transpl. Int.* **1994**, *7*(suppl)
- 5) Willoughby, D. A.; Heberden, O “Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy.” *Ann. Rheum. Dis.*, **1975**, *34*, 471-478
- 6) Van, S, J.; Interleukin-6: an overview. *Annu Rev. Immunol*, **1998**, *8*, 253-278
- 7) Albina JE, “Reichner JS Nitric oxide in inflammation and immunity.” *New Horiz*, **1995**, *3*, 46-64
- 8) Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, “Osawa T. Cytolytic mechanisms of

activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-argininedependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages.“ *J. Immunol.*, **1990**, *144*, 1425-1431

9) 양은진, "RAW 264.7 cell에서 당유자(*C. grandis Osbeck*) 잎 추출물의 염증억제 효과." 제주대학교 대학원 석사학위 논문, 2009

10) Yoon, W. J.; Lee, J. A.; Kim, K. N.; Kim J. Y.; Park, S. Y. "In vitro Anti-inflammatory Activity of the *Artemisia fukudo* Extracts in Murine Macrophage RAW264.7 Cells" *Korean J . Food Sci. Technol.*, **2007**, *39(4)*, 464-469.

11) Seybold VS,;Jia YP,; and Abrahams LG."Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation" *Pain*, **2003**, *105*, 47-55.

12) Hearing V. J.; Ekel T. M. "Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation." *Biochem. J.* **1976**, *157*, 549-557

13) 하병조, "기능성 화장품", 신광출판사, **2001**, 67-69

14) 최두영,; 안소영,; 이승기,; 한정선,; 김은철,; 이향복,; 신정현,; 김은기,; 노경호 "홍경천에 포함된 미백성분의 분리 및 성능검사" *korean J . Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, *19(3)*, 169-173

15) 하병조, "기능성 화장품", 신광출판사, **2001**, 67-69

- 16) Vile G. F.; Tyrrell R. M. "UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen." *Free Radic Biol Med.* **1995**, 18(4), 721-730
- 17) 김정은, "비쭈기나무 잎으로부터 항산화 미백 및 주름개선 활성 성분 규명", 제주대학교대학원, 2011, 석사학위논문
- 18) Prota G., "Screening advances in the chemistry of melanogenesis in mammals." *J Invest Dermatol*, **1990**, 75, 122-128
- 19) 강유미, "뽕잎피나무 가지로부터 항산화 및 미백활성 성분 분리", 제주대학교 대학원, 2011, 석사학위논문
- 20) Yamakoshi J.; Otsuka F.; Sano A.; Tokutake S.; Saito M.; Kikuchi M.; Kubota Y. "Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds." *Pigm. Cell Res.* **2003**, 16, 629-638
- 21) 서은중, 홍은숙, 최민희, 김기선, 이성준, "더위지기 추출물의 항산화 및 미백 효과" *Korean. J. Food. SCI, Technol*, **2012**, 44(1), 89-93
- 22) Min B.S.; Lee S.Y.; Kim J.H.; Kwon O.K.; Park B.Y.; An R.B et al. "Lactones from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity." *J Nat Prod*, **2003**, 66, 1388-90
- 23) Tanaka H.; Nakamura T.; and Ichino K. "Butanolides from *Litsea japonica*." *Phytochemistry*, **1990**, 29, 857
- 24) Takeda, K.; Sakurawi, K.; Ishii, H. "Components of the Lauraceae

family-1. New lactonic compounds from *Litsea japonica*.” *Tetrahedron*. 1972, 28, 3757

25) Min, B. C. “Lactones from the leaves of the *Litsea japonica* and their anti-complement activity.” *J. Nat. Prod.* 2003, 66(10), 1388

26) Lee, S. Y.; Min, B. S.; Kim, J. H.; Lee, J.; Kim, T. J.; Kim, C. S.; Kim, Y. H.; Lee, H. K. “Flavonoids from the Leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity.” *Phytotherapy Research*, 2005, 19, 273

27) 송상목 “RAW 264.7 cell에서 까마귀쪽나무 (*Litsea japonica*) 종자 초임계 추출물의 염증 억제 효과, 제주대학교 대학원 석사학위, 2015

28) Carmen Salinero, Xesús Feás, J. Pedro Mansilla, Julio A. Seijas, M. Pilar Vázquez-Tato, Pilar Vela and María J. Sainz “¹H-Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Triacylglyceride Composition of Cold-Pressed Oil from *Camellia japonica*” *Molecules*, 2012, 17, 6716-6727

29) 김남이 “ 후박의 Nitric Oxide Synthase 유도 억제 활성 성분”, 숙명여자대학교 대학원 석사학위, 1997

30) Hak Cheol Kwon,; Nam In Baek,; Sang Un Choi,; and Kang Ro Lee “New Cytotoxic Butanolides from *Lindera obtusiloba* BLUME” *Chem. Pharm. Bull.* 2000, 48(5), 614-616

감사의 글

어느 덧 제가 대학원에 들어와 공부를 한지 2년여가 지나 드디어 석사학위 과정을 마치게 되었습니다. 타과에서 온 저를 석사과정 생으로 받아주시고 무사히 마칠 수 있게 보살펴 주신 지도교수님 이남호 교수님께 감사드립니다. 그리고 많은 가르침을 주신 강창희 교수님, 김덕수 교수님, 김용해 교수님, 김원형 교수님, 변종철 교수님, 이선주 교수님, 현창구 교수님 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

제가 대학원 생활에 잘 적응할 수 있게 도와주고 조언을 아끼지 않았던 유기실 힘방 선배님, 동기님, 후배님들 감사합니다.

학업과 연구소 일을 병행하는 것을 이해해주시고 많은 배려를 해주신 김창숙 소장님과 박수영 팀장님께 감사의 말씀 드립니다. 그리고 제가 대학원에 가는 것을 많이 두려워 할 때 용기와 조언을 주시고 포기하고 싶을 때도 많은 힘을 주었던 원종오빠 감사합니다. 저에게 많은 실험을 가르쳐주시고 졸업하기까지 많이 애써주신 영민언니 감사합니다. 언니 덕분에 끝마칠 수 있었어요. 동생처럼 걱정과 조언을 아끼지 않았던 영종오빠 감사합니다. 졸업 준비 하면서 나보다 고생하고 내 투정 받아주고 힘을 주었던 상목오빠 감사합니다. 떨어져 있어도 걱정해주던 인철 오빠 감사합니다. 많이 마음 써주셨던 연구소 식구들 대주쌤, 창식쌤, 경후오빠, 대경오빠, 우철오빠, 시택오빠, 선아언니 감사합니다. 선배로서 언니로서 많은 조언 해주었던 지현언니, 유미언니, 소현언니, 아림언니께 고마운 마음을 전합니다.

떨어져 있지만 항상 옆에 있는 것 같은 친구들 수진, 승희, 승혜. 많이 고맙고 보고 싶다는 말 전하고 싶습니다.

옆에서 묵묵히 응원해 주고 힘든 내색 하지 않던 명석 오빠 고맙습니다. 어머니 아버지, 바쁘다는 핑계로 자주 찾아뵙지 못했는데 이해해주셔서 감사합니다. 갑자기 철든 것 같은 우리 언니, 저를 많이 아껴주는 우리 형부, 착한 동생 봉준이에게도 감사의 말 전합니다. 마지막으로 엄마, 아빠! 부모님의 사랑과 걱정 덕분에 이만큼 할 수 있었습니다. 사랑하고 감사합니다. 사랑하는 부모님께 이 논문을 바치고 싶습니다.