



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

博士學位論文

섬오갈피 열매, 참꽃나무 잎,  
당근 지상부 및 구멍갈파래 추출물의  
항염, 항균 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

김 정 은

2016年 8月

섬오갈피 열매, 참꽃나무 잎,  
당근 지상부 및 구멍갈파래 추출물의  
항염, 항균 활성 성분 연구






指導教授 李南昊

김정은

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2016年 6月

김정은의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	李 璿 柱	
委 員	姜 昌 祿	
委 員	金 基 玉	
委 員	李 振 泰	
委 員	李 南 昊	

濟州大學校 大學院

2016年 6月

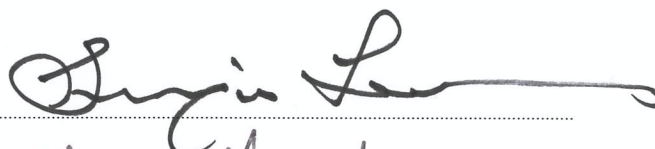
Anti-inflammatory and Anti-bacterial Constituents  
from *Acanthopanax koreanum* Fruits,  
*Rhododendron weyrichii* Leaves, *Daucus carota*  
var. *sativa* Aerial Parts and *Ulva pertusa*.

Jung Eun Kim  
(Supervised by professor Nam Ho Lee)

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

2016. 6.

This thesis has been examined and approved.



Chang Hee Kang

Grok 1st

JIN-TAE LEE

Nam Ho Lee

06/16

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



## 목차

List of Tables .....	v
List of Figures .....	vi
List of Abbreviations .....	x
Abstract .....	xii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	8
1. 시약 및 기기 .....	8
2. 피부관련 활성 실험 .....	9
1) 항염 .....	9
(1) RAW 264.7 세포 배양 .....	9
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	9
(3) PGE <sub>2</sub> , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 및 IL-6 생성 억제 활성 .....	9
(4) Western blot analysis .....	10
2) 세포독성 평가 - MTT assay .....	11
3) 항균 .....	11
(1) 균주 배양 .....	11
(2) Paper disc diffusion method .....	12
(3) MIC (minimum inhibitory concentration) .....	12
(4) MBC (minimum bactericidal concentration) .....	13
4) 미백 .....	13
(1) Tyrosinase inhibition activity test .....	13
(2) B16F10 melanoma 세포 배양 .....	14
(3) Melanin 생성 억제 활성 .....	14

(4) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	15
3. 통계분석 .....	15
Ⅲ. 연구 1 : 섬오갈피 열매 추출물의 항염, 항균 및 미백 활성 성분 연구 ..	16
1. 재료 .....	16
2. 섬오갈피 열매의 추출, 분획 및 분리 .....	18
1) 섬오갈피 열매의 추출 및 용매 분획 .....	18
2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리 .....	19
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	20
1) Compound 1의 구조 동정 .....	20
2) Compound 2, 3의 구조 동정 .....	23
3) Compound 4, 5의 구조 동정 .....	27
4. 섬오갈피 열매 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	31
1) 항염 활성 .....	31
2) 항균 활성 .....	34
(1) Paper disc diffusion .....	34
(2) MIC 및 MBC .....	35
3) Tyrosinase 저해 활성 .....	37
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	38
1) 항염 활성 .....	38
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 .....	38
(2) Compound 3의 항염 활성 기전 연구 .....	40
① NO 생성 및 iNOS 발현 억제 활성 .....	40
② PGE <sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현 억제 활성 .....	42
③ 전염증성 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성 .....	44
2) 항균 활성 .....	46
3) Tyrosinase 저해 활성 .....	48
6. 결론 및 고찰 .....	49

IV. 연구 2 : 참꽃나무 잎 추출물의 항염 및 항균 활성 성분 연구 .....	52
1. 재료 .....	52
2. 참꽃나무 잎의 추출, 분획 및 분리 .....	54
1) 참꽃나무 잎의 추출 및 용매 분획 .....	54
2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리 .....	55
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	57
1) Compound 1, 2, 3의 구조 동정 .....	57
2) Compound 4, 5의 구조 동정 .....	63
4. 참꽃나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	68
1) 항염 활성 .....	68
2) 항균 활성 .....	71
(1) Paper disc diffusion .....	71
(2) MIC 및 MBC .....	72
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	74
1) 항염 활성 .....	74
2) 항균 활성 .....	76
6. 결론 및 고찰 .....	78
V. 연구 3 : 당근 지상부 추출물의 항염 및 항균 활성 성분 연구 .....	80
1. 재료 .....	80
2. 당근 지상부의 추출, 분획 및 분리 .....	82
1) 당근 지상부의 추출 및 용매 분획 .....	82
2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리 .....	83
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	84
1) Compound 1, 2의 구조 동정 .....	84
2) Compound 3의 구조 동정 .....	89
4. 당근 지상부 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	92
1) 항염 활성 .....	92
2) 항균 활성 .....	95

(1) Paper disc diffusion .....	95
(2) MIC 및 MBC .....	96
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	98
1) 항염 활성 .....	98
2) 항균 활성 .....	100
6. 결론 및 고찰 .....	102
VI. 연구 4 : 구멍갈파래 추출물의 항염, 항균 및 미백 활성 성분 연구 .....	104
1. 재료 .....	104
2. 구멍갈파래의 추출, 분획 및 분리 .....	106
1) 구멍갈파래의 추출 및 용매 분획 .....	106
2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리 .....	107
3. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	109
1) Compound 1, 2의 구조 동정 .....	109
2) Compound 3, 4의 구조 동정 .....	113
3) Compound 5의 구조 동정 .....	117
4. 구멍갈파래 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	122
1) 항염 활성 .....	122
2) 항균 활성 .....	125
(1) Paper disc diffusion .....	125
(2) MIC 및 MBC .....	126
3) 미백 활성 .....	128
(1) 멜라닌 생성 억제 활성 .....	128
(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성 .....	131
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과 .....	132
1) 항염 활성 .....	132
2) 항균 활성 .....	134
6. 결론 및 고찰 .....	136



VII. 요약 및 결론 .....	138
VIII. 참고문헌 .....	140

## List of Tables

Talbe 1. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>1</b> .....	21
Talbe 2. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>2</b> and <b>3</b> .....	24
Talbe 3. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>4</b> and <b>5</b> .....	28
Talbe 4. Anti-bacterial activities of <i>A. koreanum</i> fruits .....	34
Talbe 5. MIC and MBC values of <i>A. koreanum</i> fruits .....	36
Table 6. $\text{IC}_{50}$ values of tyrosinase inhibition activities .....	37
Talbe 7. MIC and MBC values of isolated compounds <b>1-5</b> from <i>A. koreanum</i> fruits .....	47
Talbe 8. $\text{IC}_{50}$ values of tyrosinase inhibition activities .....	48
Talbe 9. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compounds <b>1-3</b> .....	59
Talbe 10. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>4</b> and <b>5</b> .....	65
Talbe 11. Anti-bacterial activities of <i>R. weyrichii</i> leaves .....	71
Talbe 12. MIC and MBC values of <i>R. weyrichii</i> leaves .....	73
Talbe 13. MIC and MBC values of isolated compounds <b>1-5</b> from <i>R. weyrichii</i> leaves .....	77
Talbe 14. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>1</b> and <b>2</b> .....	86
Talbe 15. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>3</b> .....	90
Talbe 16. Anti-bacterial activities of <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> aerial parts ..	95
Talbe 17. MIC and MBC values of <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> aerial parts ..	97

Talbe 18. MIC and MBC values of isolated compounds <b>1-3</b> from <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> aerial parts .....	101
Talbe 19. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>1</b> and <b>2</b> .....	110
Talbe 20. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>3</b> and <b>4</b> .....	114
Talbe 21. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of compound <b>5</b> .....	118
Talbe 22. Anti-bacterial activities of <i>U. pertusa</i> .....	125
Talbe 23. MIC and MBC values of <i>U. pertusa</i> .....	127
Talbe 24. MIC and MBC values of isolated compounds <b>1-5</b> from <i>U. pertusa</i> .....	135

## List of Figures

Figure 1. Chemical structures of anti-inflammatory agents .....	4
Figure 2. Picture of <i>Acanthopanax koreanum</i> fruits .....	16
Figure 3. Extraction and solvent fractionation of <i>A. koreanum</i> fruits ..	18
Figure 4. Isolation of compounds from <i>A. koreanum</i> fruits .....	19
Figure 5. Chemical structure of compound <b>1</b> .....	20
Figure 6. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	22
Figure 7. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	22
Figure 8. Chemical structures of compound <b>2</b> and <b>3</b> .....	23
Figure 9. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	25
Figure 10. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	25
Figure 11. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	26
Figure 12. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	26
Figure 13. Chemical structures of compound <b>4</b> and <b>5</b> .....	27

Figure 14. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	29
Figure 15. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	29
Figure 16. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	30
Figure 17. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	30
Figure 18. Effects of extract and solvent fractions from <i>A. koreanum</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	32
Figure 19. Effects of EtOAc fraction from <i>A. koreanum</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	33
Figure 20. Tyrosinase inhibition activities of <i>A. koreanum</i> fruits .....	37
Figure 21. Effects of isolated compounds <b>1-5</b> from <i>A. koreanum</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	39
Figure 22. Effects of isolated compound <b>3</b> from <i>A. koreanum</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	41
Figure 23. Effects of isolated compound <b>3</b> from <i>A. koreanum</i> on levels of iNOS protein in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	42
Figure 24. Effects of isolated compound <b>3</b> from <i>A. koreanum</i> on production of PGE <sub>2</sub> in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	43
Figure 25. Effects of isolated compound <b>3</b> from <i>A. koreanum</i> on levels of COX-2 protein in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	43
Figure 26. Effects of isolated compound <b>3</b> from <i>A. koreanum</i> on production of TNF-α, IL-1β and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	45
Figure 27. Tyrosinase inhibition activities of isolated compounds <b>1-5</b> from <i>A. koreanum</i> fruits .....	48
Figure 28. Pictures of <i>Rhododendron weyrichii</i> leaves .....	52
Figure 29. Extraction and solvent fractionation of <i>R. weyrichii</i> leaves ..	54
Figure 30. Isolation of compounds from <i>R. weyrichii</i> leaves .....	56
Figure 31. Chemical structures of compounds <b>1-3</b> .....	58
Figure 32. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	60

Figure 33. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 1 .....	60
Figure 34. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 2 .....	61
Figure 35. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 2 .....	61
Figure 36. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 3 .....	62
Figure 37. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 3 .....	62
Figure 38. Chemical structures of compound 4 and 5 .....	64
Figure 39. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 4 .....	66
Figure 40. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 4 .....	66
Figure 41. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 5 .....	67
Figure 42. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 5 .....	67
Figure 43. Effects of extract and solvent fractions from <i>R. weyrichii</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	69
Figure 44. Effects of EtOAc fraction from <i>R. weyrichii</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	70
Figure 45. Effects of isolated compounds 1-5 from <i>R. weyrichii</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	75
Figure 46. Pictures of <i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i> aerial parts .....	80
Figure 47. Extraction and solvent fractionation of <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> aerial parts .....	82
Figure 48. Isolation of compounds from <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> aerial parts .....	83
Figure 49. Chemical structures of compound 1 and 2 .....	85
Figure 50. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 1 .....	87
Figure 51. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 1 .....	87
Figure 52. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 2 .....	88
Figure 53. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 2 .....	88
Figure 54. Chemical structure of compound 3 .....	89
Figure 55. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 3 .....	91
Figure 56. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 3 .....	91

Figure 57. Effects of extract and solvent fractions from <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells ..	93
Figure 58. Effects of EtOAc fraction from <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	94
Figure 59. Effects of isolated compounds <b>1-3</b> from <i>D. carota</i> var. <i>sativa</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	99
Figure 60. Picture of <i>Ulva pertusa</i> .....	104
Figure 61. Extraction and solvent fractionation of <i>U. pertusa</i> .....	106
Figure 62. Isolation of compounds from <i>U. pertusa</i> .....	108
Figure 63. Chemical structures of compound <b>1</b> and <b>2</b> .....	109
Figure 64. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	111
Figure 65. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>1</b> .....	111
Figure 66. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	112
Figure 67. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>2</b> .....	112
Figure 68. Chemical structures of compound <b>3</b> and <b>4</b> .....	113
Figure 69. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	115
Figure 70. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>3</b> .....	115
Figure 71. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	116
Figure 72. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>4</b> .....	116
Figure 73. Chemical structure of compound <b>5</b> .....	117
Figure 74. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	119
Figure 75. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	119
Figure 76. DEPT (135°) NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	120
Figure 77. COSY NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	120
Figure 78. HMQC NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	121
Figure 79. HMBC NMR spectrum of compound <b>5</b> .....	121
Figure 80. Effects of extract and solvent fractions from <i>U. pertusa</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	123
Figure 81. Effects of EtOAc fraction from <i>U. pertusa</i> on NO production in	

LPS-induced RAW 264.7 cells .....	124
Figure 82. Effects of extract and solvent fractions from <i>U. pertusa</i> on melanin contents in $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells .....	129
Figure 83. Effects of EtOAc fraction from <i>U. pertusa</i> on melanin contents in $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells .....	130
Figure 84. Intracellular tyrosinase activity of EtOAc fraction from <i>U. pertusa</i> .....	131
Figure 85. Effects of isolated compounds 1-5 from <i>U.pertusa</i> on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells .....	133

## List of Abbreviations

<i>A. koreanum</i>	<i>Acanthopanax koreanum</i>
<i>R. weyrichii</i>	<i>Rhododendron weyrichii</i>
<i>D. carota</i>	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i>
<i>U. pertusa</i>	<i>Ulva pertusa</i> .
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
EtOAc	Ethyl acetate
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
V	VLC subfraction
MP	MPLC subfraction

Fr.	Fraction
CC	Column chromatography
TLC	Thin layer chromatography
IC <sub>50</sub>	Inhibition concentration of 50%
NMR	Nuclear magnetic resonance
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
COSY	Correlation spectroscopy
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
2D	Two-dimensional
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
s	Singlet
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
m	Multiplet
int	Integration

## Abstract

In this study, we investigated identification of skin-related bioactive constituents from *Acanthopanax koreanum* fruits, *Rhododendron weyrichii* leaves, *Daucus carota* var. *sativa* areal parts and *Ulva pertusa*. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values.

Five constituents were isolated from the ethanol extract of *A. koreanum* fruits; *ent*-kaurenoic acid (**1**), 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid (**2**), 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**3**), impressic acid (**4**) and 3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,23-trihydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (**5**). As far as we know, compound **3** was isolated for the first time from this plant. All of the compounds showed anti-inflammatory and anti-bacterial activities. On the tyrosinase inhibition studies, compound **1**, **3** and **5** showed stronger activities than arbutin, a positive control.

Five phytochemicals were isolated from the ethanol extract of *R. weyrichii* leaves; ursolic acid (**1**), corosolic acid (**2**), asiatic acid (**3**), astragalin (**4**) and isoquercetin (**5**). As far as we know, these compounds were isolated for the first time from this plant. Among the isolated compounds, compound **2** and **3** showed anti-inflammatory activities and compound **3** showed strong anti-bacterial activity.

From the ethanol extract of *Daucus carota* var. *sativa*, three bio-active constituents were isolated; diosmetin (**1**), diosmin (**2**) and cynaroside (**3**).



All of the compounds showed strong anti-inflammatory activities.

Phytochemical investigation of the ethanol extract from *U. pertusa* resulted in the isolation of five constituents; loliolide (1), *epi*-loliolide (2), dehydrovomifoliol (3), 3-hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one (4) and 4-hydroxy-2,3-dimethyl-2-nonen-4-olide (5). As far as we know, all of the compounds 1-5 were isolated for the first time from this seaweed. Among the isolated compounds, compound 1, 4 and 5 showed anti-inflammatory activities.

Based on these results, extract of *A. koreanum* fruits, *R. weyrichii* leaves, *D. carota* var. *sativa* areal parts and *U. pertusa* could be potentially applicable as cosmeceutical ingredients.

## I. 서론

인류는 예로부터 천연물을 질병치료를 위한 의약품으로 요긴하게 사용해 오고 있으며, 최근에는 의약품 원료로서 뿐만 아니라 천연물 화장품, 건강 기능성 식품으로의 개발도 다양하게 이루어지고 있다.<sup>1</sup> 또한 현대 사회는 경제 성장, 국민 소득의 증대, 가치관의 변화로 건강에 대한 관심이 점점 높아짐에 따라 각종 부작용을 유발하는 합성 식의약품을 지양하고 천연물에서 이를 대체할 수 있는 소재에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>2</sup>

최근 천연물을 중심으로 한 학문이 발전하면서 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성 물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 생리활성 물질은 매우 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치의 물질로서 수많은 종류가 인류에게 유용하게 이용되고 있으며, 새로운 물질들에 대한 연구개발이 지속적으로 이루어지고 있다.<sup>3</sup> 이러한 식물유래 유효성분에는 플라보노이드, 폴리페놀, 알칼로이드, 테페노이드 등 다양한 성분들이 존재하며 이들 성분은 인체 내로 흡수되어 항산화, 항염, 항암, 피부진정 등의 효능을 나타낸다. 천연물 유래 소재의 경우 화학공정이 배제되고 피부친화력이 강하기 때문에 안전하고 자연 친화적인 제품으로 인식되어 화장품 개발에 새로운 트렌드가 되고 있다.<sup>4</sup>

피부는 외부에서 유입되는 이물질로부터 인체를 보호하고, 피지와 땀의 분비, 약물과 화장품의 흡수, 촉각, 압각, 감각의 인지 기능이 있다. 그러나 이러한 피부는 생리적, 환경적 변화에 의해 여드름, 색소침착, 지루성 피부염, 아토피성 피부염, 비듬 등의 피부 이상 또는 질환이 발생한다.<sup>5</sup>

피부에서 염증은 매우 다양한 의미를 가진다. 아토피성 피부질환, 여드름성 피부질환, 광 민감성 피부질환 및 민감성 피부질환의 생리학적 기본 기전은 염증 반응의 과정을 거치며, 다양한 염증 현상에 의해 진피층을 파괴하는 효소들인 hyaluronidase, elastase, collagenase 등의 발현이 증가하여 피부의 노화 및 주

름형성에 직접적으로 영향을 준다. 다양한 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 이유와 반응조직의 차이에 상관 없이 거의 비슷한 변화를 보인다. 그러므로 공통적인 물질요인의 존재가 있을 것으로 추정하며 그 매개체로는 활성산소, 산화질소, prostaglandin (PG), 여러 사이토카인 등이 있다. 면역과 염증에 관련된 여러 사이토카인 중 interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 및 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 각종 염증 질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.<sup>6</sup>

체내의 염증반응은 상처나 세균 감염 등의 물리적, 화학적 자극이 일어날 때 손상 부위를 복구시키는 신체 방어 기전 중 하나이며, 자극이 가해지면 국소적으로 혈관 활성 물질들이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다.<sup>7</sup> 하지만 지속적인 염증반응은 오히려 점막 손상을 촉진시켜 결과적으로 통증, 부종, 발적, 발열 등 기능 장애를 유발하며, 관절염 및 암 등의 발병과 깊은 연관을 갖고 있다.<sup>8</sup>

대식세포(macrophage)는 염증 반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있으며, 자극에 노출되거나 면역세포들이 분비하는 사이토카인(cytokine) 등에 의해 활성화되며, 감염초기에 nitric oxide (NO)와 사이토카인을 생산하여 생체방어에 중요한 역할을 한다.<sup>9</sup>

그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 염증 매개성 사이토카인들의 분비를 촉진한다. 이러한 염증 매개 물질들의 형성은 arachidonic acid가 cyclooxygenase (COX)의 작용을 거쳐 leukotriene, thromboxane, prostaglandin 등으로 바뀌는 과정 및 NO의 대량 생성에 관여하게 되며, 숙주에 치명적 결과를 초래한다고 알려져 있다.<sup>10,11</sup>

염증반응 인자인 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다.<sup>12,13</sup> NO는 신경전달, 혈

관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 interferon- $\gamma$  또는 LPS에 의해 자극될 때 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되고 염증반응의 매개물질 역할을 하게 된다.<sup>14,15</sup> NO는 외부에서 침입한 bacteria, virus 및 암세포를 죽이는 역할을 하거나 NO 자체가 iNOS의 발현을 억제하여 면역 반응이 과도해지는 것을 억제하는 등 체내 방어와 면역반응을 조절하는 인자로서 작용한다.<sup>15</sup> 하지만 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.<sup>16</sup>

또 다른 주요 염증 매개인자인 COX는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 효소이며, COX-2는 growth factors, 사이토카인 및 LPS 등 다양한 자극에 의해서 대식세포나 단핵구 등의 세포에서 다량 발현되고 이로 인해 발생된 prostaglandin은 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 관여한다.<sup>17</sup>

종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ 는 그람 음성 박테리아와 다른 감염성 미생물에 대한 급성 염증반응의 주된 매개 인자이다. LPS에 의해 자극된 대식세포는 TNF- $\alpha$ 의 합성을 증가시킨다. 활성화된 TNF- $\alpha$ 는 natural killer (NK)세포 등의 면역관련 세포나 비만(mast)관련 세포들에서 유리되어 염증반응에 중요한 역할을 하고 많은 중증 감염 시 전신적 합병증의 원인이 된다.<sup>18</sup> TNF- $\alpha$ 의 생물학적 작용은 저농도에서 백혈구와 내피세포에 작용하여 급성염증을 유도한다. 중간 농도에서 염증의 전신적 반응을 매개하고 고농도에서는 패혈증(sepsis) 쇼크의 병리학적 이상으로 사망을 초래한다. 또한 TNF- $\alpha$ 는 prostaglandin의 합성을 증가시켜 열을 생성하고, thrombomodulin의 발현을 억제하여 혈관 막힘(vascular plugging)을 유발한다.<sup>19</sup>

항염증제는 피부 진정과 여드름, 아토피에 관련하여 피부 자극 완화를 목적으로 하는 화장품류에 많이 사용되고 있다.<sup>20</sup> 항염증제로 이용되고 있는 물질로 비스테로이드 계통의 benzydamine, indomethacin 등이 있으며 스테로이드 계통의

dexamethasone, hydrocortisone 등이 사용되고 있다.<sup>21,22</sup> 그러나 이러한 물질들은 화장품 원료로 사용할 수 없거나 사용량이 제한되어 있는 경우가 대부분이며, 특히 스테로이드 계통의 경우 피부위축, 불면, 불안 등의 부작용을 동반하고 있다. 따라서 피부에 안전성이 우수하고 부작용이 없는 천연 식물에서의 항염 효능을 갖는 물질에 대한 연구가 요구되고 있다.<sup>23</sup>

현재까지 알려진 식물기원 항염 활성 물질에는 섬오갈피 뿌리에서 다량 분리되는 acanthoic acid,<sup>24,25</sup> 적포도주에 다량 함유된 resveratrol,<sup>26,27</sup> 강황의 주성분인 curcumin<sup>28</sup> 및 목단피의 주요 성분인 paeonol<sup>29,30</sup> 등이 있다. 이들은 대부분 iNOS, COX-2의 발현 및 전염증성 사이토카인의 생성을 억제하는 기전을 통하여 항염증 작용을 나타낸다고 알려져 있다.

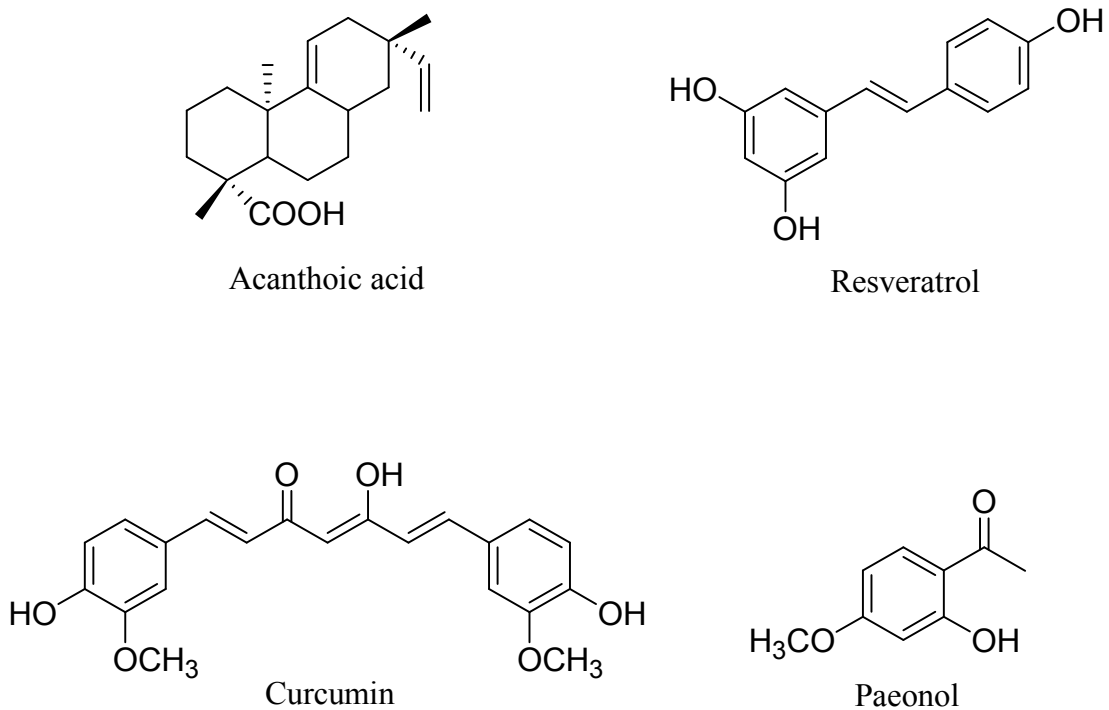


Figure 1. Chemical structures of anti-inflammatory agents.

여드름(acne vulgaris)은 가장 호발하는 피부 질환으로 그리스어로는 아크네(acne)라고 하고, 대부분 남성호르몬인 안드로젠(androgen)의 분비가 가장 현저하게 증가하는 사춘기에서 80%가 발생하며, 피지선이 많이 분포하는 얼굴, 가슴 등에 많이 나타난다. 25세 미만의 성인에서는 남성보다 여성이 많고, 초식을 많이 하는 동양인보다 육식의 비중이 높은 서양인에서 발생빈도가 높다고 알려져 있다.<sup>31,32</sup>

여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 피부질환으로, 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 사춘기 나이에 분비되기 시작하는 안드로젠은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 과각화를 일으키며, 이로 인해 피지의 분비 증가와 표피 과각화로 모낭-피지선에서 피지가 정체되어 모낭이 막힘에 따라 모낭내부가 *Propionibacterium acnes*를 비롯한 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다.<sup>33,34</sup> 동시에 *Staphylococcus epidermidis*와 같은 다른 세균들이 모낭주위에서 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다.<sup>35</sup>

여드름 원인균인 *P. acnes*는 피부 내에 존재하는 상재균으로 정상상태에서는 피부면역시스템에 의해 관용된다. 그러나 안드로젠의 과다 분비에 의한 피부지방 조성의 불균형 및 *P. acnes*의 증식으로 인하여 여드름과 같은 피부질환이 발생한다. 여드름 유발균인 *P. acnes*는 지방분해 효소와 화학주성인자를 분비하여 유리지방산을 만들고 백혈구가 모낭 주위에 모이게 하며, 이들이 모낭벽을 자극한 후, 파괴하여 모낭 내용물이 진피 내로 유출됨으로서 염증반응이 일어난다. 그러나 여드름은 반드시 염증반응을 수반하는 것이 아니며, 비염증성 여드름과 염증성 여드름으로 구분된다. 비염증성 여드름은 자가 치료가 되는 경우도 있으나 그 원인은 아직 밝혀져 있지 않다. 비염증성 여드름은 면포(comedo)와 같은 초기 여드름의 상태로 염증을 유발하지 않으며 반응관여 세포로는 각질세포와 피지세포, 반응매개 인자로는 사이토카인 중 IL-1 $\alpha$ 만이 관여되는 것으로 알려져 있다. 반면에 염증성 여드름은 구진(papule), 농포(pustule), 결절(nodule)이 속하며 염증을 동반한 여드름이다. 반응관여 세포로는 모든 면역반응에 필요한 세

포 및 사이토카인인 IL-1 $\alpha$ , IL-8, TNF- $\alpha$ 와 PGE<sub>2</sub>, NO 등 모든 반응매개 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>36</sup>

호기성균인 *S. epidermidis*는 외모낭이나 모낭의 중간에서 성장하며, 원발성 피부질환 및 여드름 증상의 속발성을 악화시키는 원인균이다. 점액(slime) 생성능이 항생제로부터 균체를 보호하고 숙주의 면역반응인 식균작용을 막으며 혈구응집능을 억제하고 숙주의 면역계를 손상한다고 알려져 있다.<sup>37</sup>

*P. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 주로 사용되고 있다.<sup>38</sup> 현재 여드름 치료제로 쓰이고 있는 약제로는 retinoid, benzoyl peroxide, clindamycin, erythromycin, triclosan 등과 같이 화장품 응용이 부적합한 의료용 항생제나 화학 합성품들이 대부분이며, 이들은 부작용이 알려져 있다. Retinoid는 각질을 제거하여 원활한 피지 배출을 유도하며 여드름 균의 증식을 억제하므로 면포성 여드름에 많이 사용되지만, 부작용으로 피부자극(skin irritation)이 보고되고 있다. 염증성 여드름에 효과적인 benzoyl peroxide와 일반 여드름과 농포성 여드름에 효과적인 clindamycin, erythromycin은 *P. acnes* 균주에 대한 유리지방산의 생성을 감소시키는 작용이 있어 사용되고 있으나, 항생제에 대한 내성 발생으로 인하여 지속적인 사용이 어렵고 간독성이 심하며, 칸디다증과 같은 기회감염증이 나타날 수 있다. 또한 triclosan의 경우 빛에 노출되었을 때 환경호르몬으로 바뀌어 심각한 환경오염을 일으킬 수 있다.<sup>37,38</sup> 따라서 여드름 피부에 효과적이고 피부에 안전하며 부작용을 최소화 할 수 있는 천연 항균물질에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이며, 많은 연구자들이 이러한 여드름 치료제를 개발하려고 노력 중이다.<sup>39</sup>

천연물을 이용한 천연 항균제의 개발은 무한한 가능성을 내재하고 있다고 볼 수 있으며, 단풍나무에서 분리된 ginnalin, 감귤류의 성분인 hesperidin, 황백이나 황련 등에서 분리된 berberine 등이 항균 효과가 있다고 보고되고 있다.<sup>40,41</sup>

제주도에는 한라산을 중심으로 약 2,000여종의 육상식물이 서식하고 있다. 이 중 제주의 고유특산종은 60여종으로 보고되고 있다. 제주도의 기후는 지리적 위치, 해발고도와 지세 등의 영향으로 아열대에서 아한대 기후대까지 수직분포를 보인다. 또 한라산의 지세가 정상부를 정점으로 동서방향으로 완만한 경사를 이루고 있기 때문에 남사면과 북사면의 기후대 분포도 다소 차이를 보인다. 이러한 환경적 요인으로 인하여 저지대의 난대성식물에서 고지대의 한대성 또는 고산식물에 이르기까지 식물의 분포가 명확하게 구분된다. 이러한 환경은 제주도의 식물자원의 다양성을 제공하고 있다.

또 제주도는 섬이라는 지리적 여건으로 연안에 다양한 해양식물 자원을 보유하고 있다. 특히 높은 해수 수온 등의 영향으로 우리나라 여타 연안 해역에서 볼 수 없는 아열대성의 남방계 해조류가 많이 서식하고 있다. 2000년까지 한국연안에서 보고된 753종의 해조류(녹조류 98종, 갈조류 166종, 홍조류 489종) 중에서 69%인 522종(녹조류 66종, 갈조류 114종, 홍조류 342종)이 제주도 연안에 생육하고 있다고 보고되고 있다. 이러한 제주의 육상 및 해양식물의 기능성을 규명하고 제주도가 지닌 청정 이미지를 연계한다면 고부가가치 화장품소재의 개발을 기대할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 제주 자생 식물인 섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*) 열매, 참꽃나무(*Rhododendron weyrichii*) 잎, 당근(*Daucus carota* var. *sativa*) 지상부 및 해조류인 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 추출물 및 용매 분획물의 다양한 피부 관련 활성을 검색하고 크로마토그래피, NMR 등을 이용하여 유효 성분의 화학구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 항염, 항균, 미백 활성을 확인하여 천연 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Jusei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma), normal-phase column chromatography (CC)에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck)이 사용되었다. Gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex<sup>TM</sup> LH-20 (0.1-0.025 mm)을 사용하였다. MPLC (medium pressure liquid chromatography, Biotage Co.)에는 KP-C18-HS (Biotage Co.) 컬럼을 사용하였다. 분리 과정에서 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다.

활성 검색을 위한 흡광도 측정에는 Sunrise<sup>TM</sup> (Tecan Co.)를 사용하였다. 구조 분석에 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 AVANCE III (FT-NMR system, Bruker Co.)를 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL의 NMR 전용 용매로 CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, pyridine-*d*<sub>5</sub>를 사용하였다.

## 2. 피부관련 활성 실험

### 1) 항염

#### (1) RAW 264.7 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 ATCC (American Type Cell Culture, USA)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO Inc., USA)가 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 2-3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

#### (2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

24 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 배양 후 배지를 제거하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 사용하여 정량하였다.

#### (3) PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성 억제 활성

24 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에

서 18시간 배양 후 배지를 제거하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 세포배양 상등액의 cytokine 생성 함량을 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의  $r^2$ 값은 0.99 이상이었다.

#### (4) Western blot analysis

60Φ dish에  $6 \times 10^5$  cells/dish로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 배양 후 배지를 제거하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, lysis buffer (1×RIPA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용해 4°C, overnight으로 lysis 시킨 후 원심분리(15000 rpm, 15 min, 4°C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다.

정량한 단백질을 8~12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 포함한 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2시간 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:1000, SantaCruze), COX-2 antibody (1:1000, BD), β-actin antibody clone AC-74 (1:20000, Sigma)를 이용하여 4°C에서 overnight 반응 시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS 용액으로 3회 세척 후, peroxidase-conjugated된 2차 항체(1:5000 또는 1:20000, SantaCruze)와 상온에서 1시간 반응 시킨 뒤, TTBS 용액으로 3회 세척하였다. 단백질은 WEST-ZOL (western blot detection system, iNtRON) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT,

Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

## 2) 세포독성 평가 - MTT assay

MTT assay는 RAW 264.7 및 B16F10 melanoma cell을 well plate에 실험 조건에 맞게 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 전배양 후, LPS 또는 α-MSH와 sample을 농도별로 동시에 처리하여 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여 37°C에서 3-4시간 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 ELISA reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 생존률은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

Cell viability (%)

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

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

Abs<sub>sample</sub> : 시료 반응용액의 흡광도

## 3) 항균

### (1) 균주 배양

표피포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 여드름균인 *Propionibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터

터 분양받아 사용하였다. *S. epidermidis*인 경우, 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37℃에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다. *P. acnes*인 경우, 배양배지를 GAM broth로 하여 37℃, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양하였다.

## (2) Paper disc diffusion method

시료의 항균활성을 측정하기 위해 paper disc diffusion method로 생육 억제율을 확인하였다.

*S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 TSB 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

*P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 GAM 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

## (3) MIC (minimum inhibitory concentration)

최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로, 미생물에 대한 MIC값이 낮으면 낮을수록 시료물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고 할 수 있다. MIC 측정은 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 사용하였다.

96 well plate에 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 시료를 포함하는 배지를 100  $\mu$ L 넣어준 후, 균 현탁액의 농도를  $2 \times 10^5$  CFU/mL가 되도록 조절하여 100  $\mu$ L씩 넣어준다. *S. epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *P. acnes*는 37°C, 혐기성 조건에서 48시간 배양하였다. 이후 균의 증식이 나타나지 않는 최소농도를 확인하였다.

#### (4) MBC (minimum bactericidal concentration)

MIC값이 낮다고 해서 그 농도에서 균이 모두 사멸한 것은 아니며, 시료의 영향으로 균의 성장을 방해하여 균이 자라지 않아 죽은 것처럼 보일 수 있기 때문에 최소사멸농도(MBC, minimum bactericidal concentration)는 MIC값이 나타난 그 이상의 농도의 시료 배양액들을 하드배지(1.5% agar)에 처리하여 colony를 형성하는지 확인하는 것이다.

먼저 하드배지(1.5% agar) plate를 준비하고 MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 이용하여 시료 배양액을 찍어내서 plate에 streaking을 하였다. *S. epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *P. acnes*는 37°C, 혐기성 조건에서 48시간 배양하여, colony가 형성되지 않는 최소농도를 확인하였다.

#### 4) 미백

##### (1) Tyrosinase inhibition activity test

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

본 실험에서는 96 well plate에 buffer 105  $\mu$ L, L-tyrosine 70  $\mu$ L, tyrosinase 5  $\mu$ L, 그리고 시료용액 20  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

대조군으로는 arbutin을 사용하였다.

Tyrosinase inhibition activity (%)

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

Abs<sub>sample</sub> : 시료 반응용액의 흡광도

Abs<sub>blank</sub> : 시료만의 흡광도

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

## (2) B16F10 melanoma 세포 배양

Murine B16F10 melanoma cell은 ATCC (American Type Cell Culture, USA)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO Inc., USA)가 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

## (3) Melanin 생성 억제 활성

6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 100 nM α-MSH를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 3일간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 1N NaOH 200 µL를 첨가하고 55°C에서

2시간 방치하여 세포내의 melanin을 녹여내어, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군으로는 melasolv를 사용하였다.

#### (4) Intracellular tyrosinase 저해 활성

6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 100 nM  $\alpha$ -MSH를 포함하는 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 3일간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 lysis buffer (1×RIPA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용해 4°C, overnight으로 lysis 시킨 후 원심분리(15000 rpm, 15 min, 4°C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다.

96 well plate에 농도를 맞춘 단백질 상등액과 25 mM L-DOPA, 67 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 넣어 37°C에서 1-2시간 반응 시킨 후, 480 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 통계분석

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 또한 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.



### Ⅲ. 연구 1 : 섬오갈피 열매 추출물의 항염, 항균 및 미백 활성 성분 연구

#### 1. 재료

실험에 사용된 유기농 섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*) 열매(시료번호 : 353)는 2013년 1월에 제주시 애월읍 소재 한라산오가피에서 건조 분말 제품으로 구매하여 사용하였다(Figure 2).



Figure 2. Picture of *Acanthopanax koreanum* fruits.

섬오갈피는 탐라오갈피라고도 불리며, 두릅나무과(Araliaceae)의 가지가 많은 낙엽성 관목으로 우리나라의 제주도, 중국의 푸젠 등지의 해변 산기슭에 주로 분포한다. 특히 제주도가 원자생지로 해안에서 해발 1,400 m에 이르기까지 제주도 전역에 분포하고, 예로부터 민간요법으로 신경통, 관절염 등의 치료를 위한 약용 식물로서 사용되어 왔다. 또한 재배 적지 폭이 넓고 속성수로서 경제적 수확 연수가 짧아 기능성 식품 및 의약품으로의 개발 가능성이 높은 제주도의 특산 자원 식물이다.<sup>42</sup> 제주도에서는 한때 감귤 대체 작목으로 섬오갈피가 권장돼 재배 농가가 급격히 늘어났으나, 수확 후 소비할 수 있는 관련 제품 등이 개발되지 않아 재배 농가들에 피해를 입히기도 했던 작물이다.

섬오갈피의 뿌리 추출물은 항염,<sup>24</sup> 항암,<sup>43</sup> 미백,<sup>44</sup> 간기능 개선<sup>45,46</sup> 등의 효능이 알려져 있으며, 이러한 효능을 나타내는 주성분은 뿌리에서 다량 분리되는 diterpene인 acanthoic acid<sup>25</sup>인 것으로 보고되어 있다. 또한 섬오갈피의 잎 추출물은 diterpene, triterpene, lignan, polyacetylene, phenylpropanoid 및 flavonoid 등이 함유되어 있다고 보고되어 있으며,<sup>47</sup> 특히 lupane-type triperpene이 잎의 주성분으로 이러한 화합물이 항염 효과가 우수한 것으로 알려져 있다.<sup>48,49</sup> 섬오갈피의 줄기 추출물은 항산화, 미백, 항염, 항균 등의 효능이 있으며, 줄기의 성분 또한 diterpene 및 phenol성 화합물이 대부분인 것으로 보고되어 있다.<sup>50</sup>

현재까지 밝혀진 섬오갈피 열매에 대한 생리활성 연구로는 과실주 생산 후 버려지는 찌꺼기 부산물을 유기용매로 추출하여 항염 효능을 확인한 것이 보고되어 있으나,<sup>51</sup> 이러한 효능이 어떠한 성분에 의해 나타나는지에 대한 연구는 알려져 있지 않다. 또한 항염 효능 외에는 섬오갈피 열매에 대한 생리활성 연구 및 성분 연구가 이루어지지 않고 있으므로, 본 연구에서는 섬오갈피 열매의 다양한 피부 관련 활성을 확인하고, 활성 성분을 찾고자 단일물질 분리 과정을 진행 하였다.

## 2. 섬오갈피 열매의 추출, 분획 및 분리

### 1) 섬오갈피 열매의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄 된 섬오갈피 열매 2.0 kg을 70% 에탄올 20 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 이하의 수욕상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 392.5 g을 얻었다.

추출물 20 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었으며, 이와 같은 방법으로 9회 더 반복 실시하여, 추출물 총 200 g을 용매 분획 하였다(Figure 3).

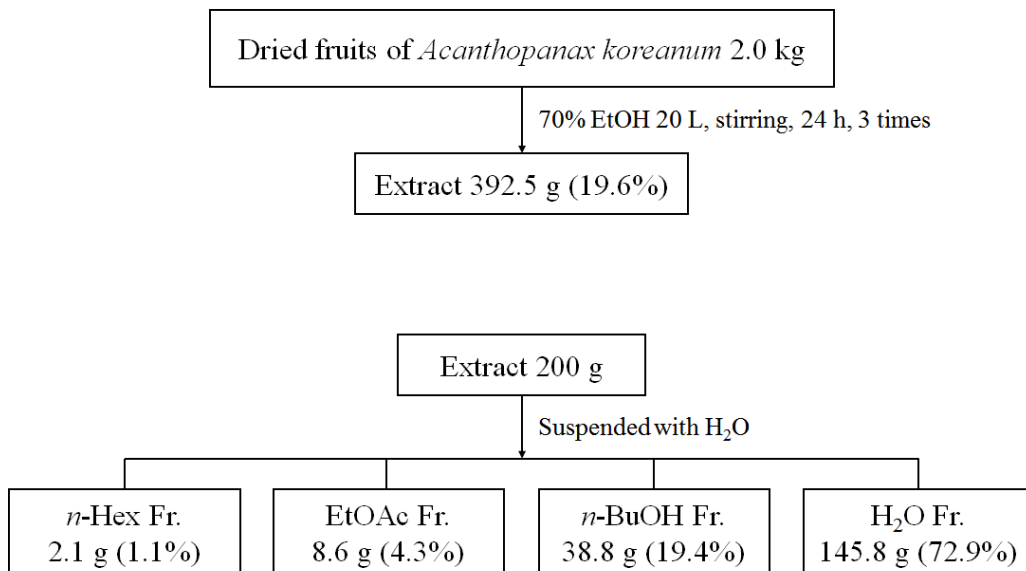


Figure 3. Extraction and solvent fractionation of *A. koreanum* fruits.

2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 분획하기 위하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. 컬럼은 역상 실리카겔(KP-C18-HS, 40+ M, Biotage Co.)을 사용하였으며, H<sub>2</sub>O-MeOH (10-100%)의 gradient 조건으로 용출하여 44개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-44).

MPLC fraction 중 Fr. MP35, 36 (470.6 mg)은 하얀색 가루 형태의 단일 화합물로 compound 3으로 확인되었으며, Fr. MP37 (173.2 mg), Fr. MP39 (145.3 mg) 및 Fr. MP43 (304.6 mg) 또한 단일 화합물로 각각 compound 4, 2 및 1로 확인되었다. 그리고 Fr. MP33 (390.5 mg)을 silica gel 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=10:1)을 수행하여 compound 5 (90.9 mg)를 분리하였으며, Fr. MP34 (455.5 mg) 또한 silica gel 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:EtOAc=1.5:1)을 수행하여 compound 5 (29.2 mg)를 더 분리하였다(Figure 4).

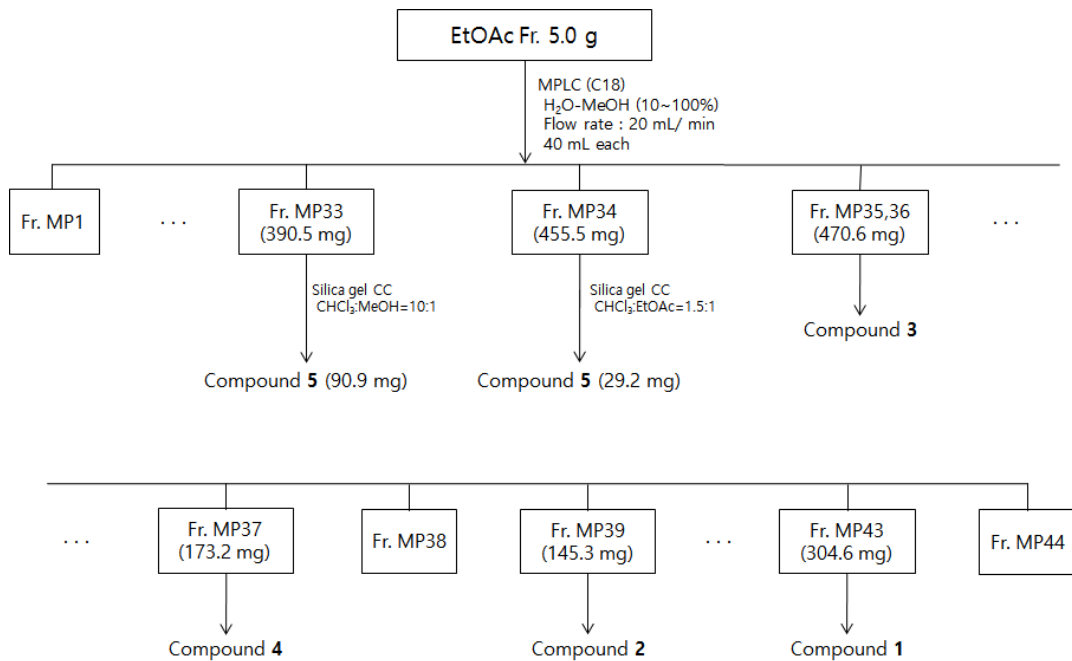


Figure 4. Isolation of compounds from *A. koreanum* fruits.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 20개의 carbon 피크와  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서 2개의 singlet인 methyl group을 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 diterpene으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서는 1개의 carbonyl group ( $\delta_{\text{C}}$  184.9) 및 vinyl carbon (4차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  156.1, 2차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  103.2)의 특성 피크가 관찰되었다. 이들을 바탕으로 compound 1은 문헌<sup>52</sup>을 통해 *ent*-kaurenoic acid임을 확인하였다(Figure 5-7, Table 1).

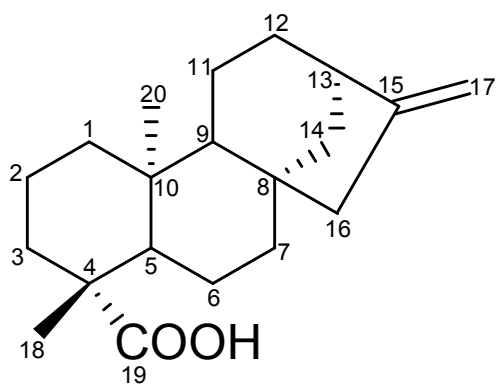


Figure 5. Chemical structure of compound 1.

Talbe 1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **1** (500 and 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>1</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		40.9
2		19.3
3		37.9
4		43.9
5		57.2
6		22.0
7		41.4
8		44.4
9		55.2
10		39.8
11		18.6
12		33.3
13	2.61 (1H, brs)	44.0
14		39.9
15		156.1
16		49.1
17	4.71 (1H, brs) 4.77 (1H, brs)	103.2
18	1.21 (3H, s)	29.2
19		184.9
20	0.93 (3H, s)	15.8

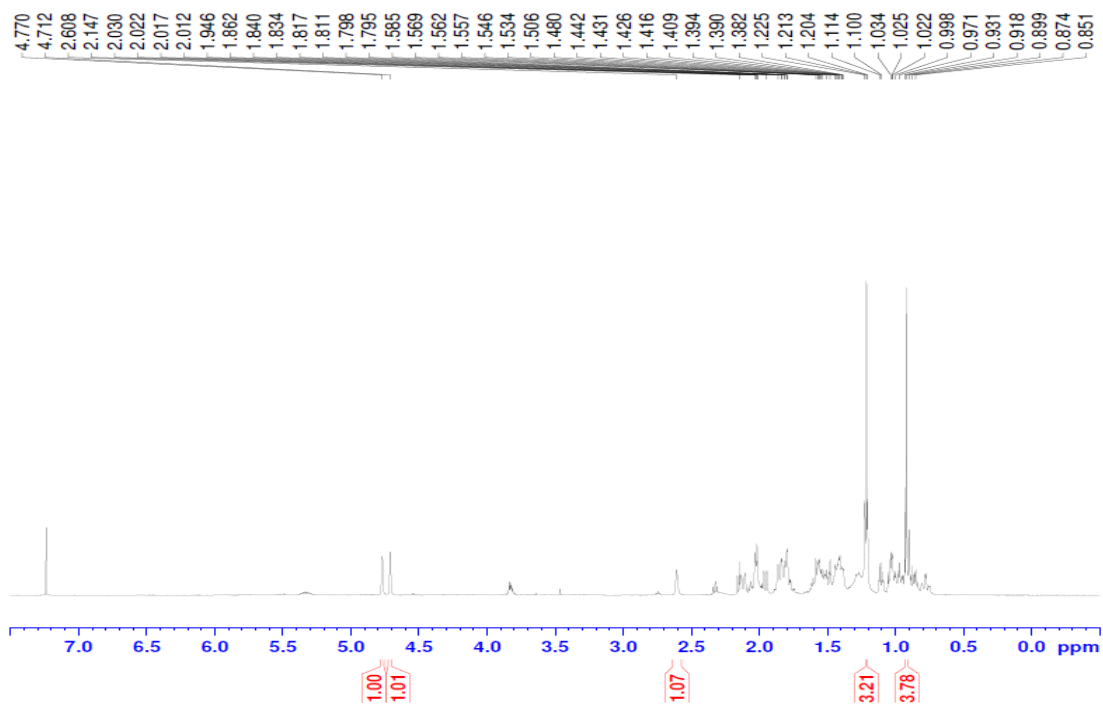


Figure 6.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **1** ( $\text{CDCl}_3$ ).

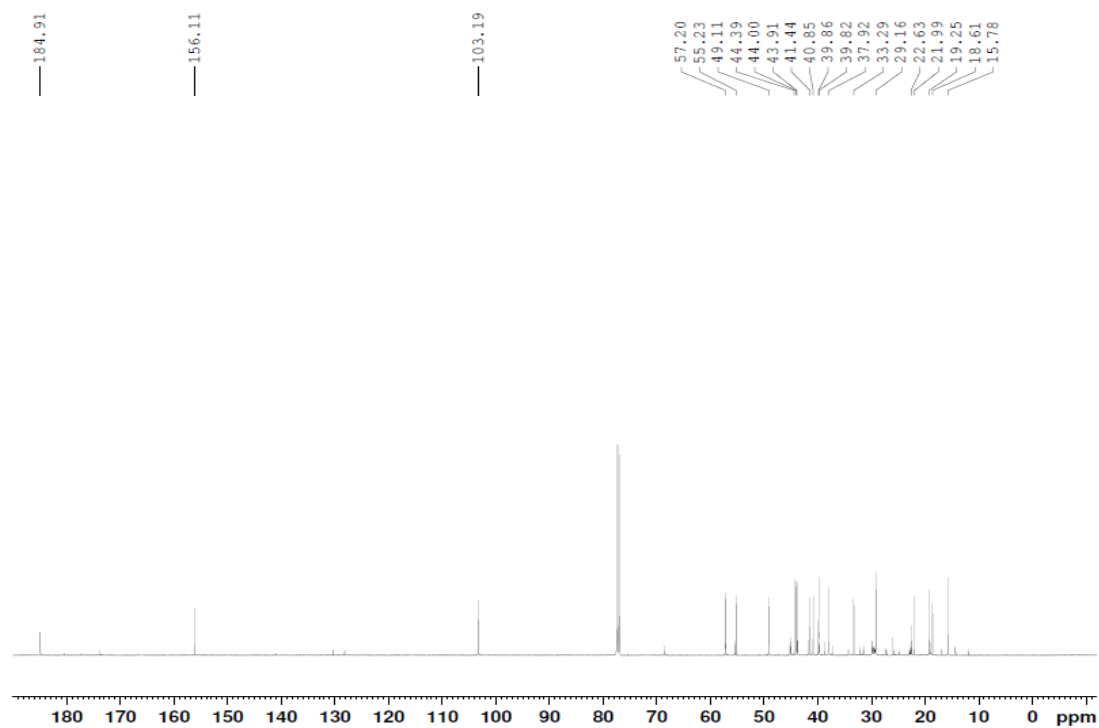


Figure 7.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **1** ( $\text{CDCl}_3$ ).

## 2) Compound 2, 3의 구조 동정

Compound 2는  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 30개의 carbon 피크와  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서 5개의 singlet인 methyl group을 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서는 2개의 carbonyl group ( $\delta_{\text{C}}$  179.3, 179.9), vinyl carbon (4차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  151.8, 2차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  110.5) 및 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의  $\text{sp}^3$  혼성 carbon ( $\delta_{\text{C}}$  73.4)의 특성 피크가 관찰되었다. 이들을 바탕으로 compound 2는 문헌<sup>53</sup>을 통해 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid임을 확인하였다 (Figure 8-10, Table 2).

또한 Compound 3은  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 compound 2에 해당하는 피크 외에 6개의 피크가 더 관찰되었으며,  $\delta_{\text{C}}$  63.9-79.0의 5개의 피크와 당의 anomeric carbon에 해당하는 피크인  $\delta_{\text{C}}$  102.5의 피크로 보아 compound 2에 glucose가 결합되어 있을 것이라 예상하였다. 그리고 anomeric proton 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  4.90 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz)의 coupling constant 값을 통해서 결합하고 있는 당은  $\beta$ -form의 glucopyranoside임을 예상할 수 있다. 이를 바탕으로 문헌<sup>54</sup>을 통해 compound 3은 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid 3- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside임을 확인하였다(Figure 8, 11, 12, Table 2).

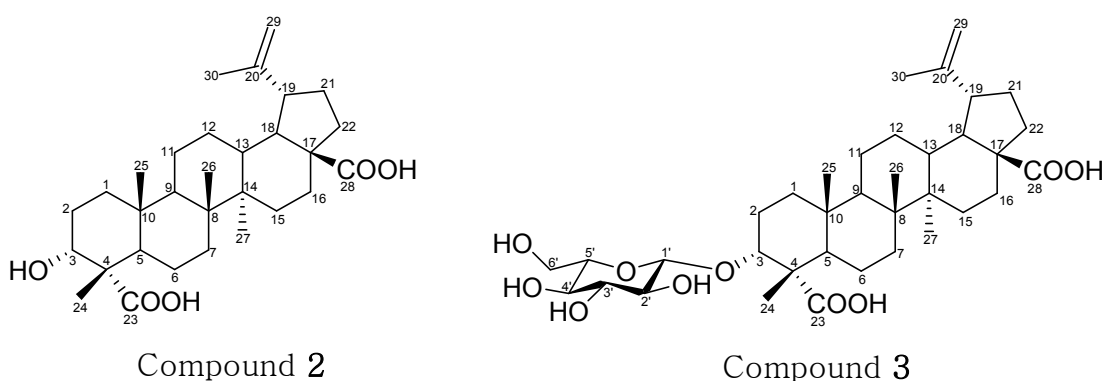


Figure 8. Chemical structures of compound 2 and 3.



Talbe 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **2** and **3** (500 and 125 MHz, pyridine- $d_5$ )

No.	Compound <b>2</b>		Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		33.2		33.3
2		26.7		22.0
3	4.32 (1H, brs)	73.4	4.32 (1H, brs)	80.3
4		52.4		52.0
5		45.3		45.7
6		21.5		22.2
7		35.2		34.9
8		42.2		42.1
9		51.4		51.1
10		37.9		37.7
11		22.3		21.4
12		26.5		26.3
13	2.73 (1H, m)	39.0		38.9
14		43.4		43.2
15		30.7		30.6
16		33.4		33.1
17		57.0		57.0
18		50.1		50.0
19	3.54 (1H, m)	48.2	3.52 (1H, m)	48.1
20		151.8		151.7
21		31.6		31.5
22		38.0		37.9
23		179.9		179.1
24	1.46 (3H, s)	18.4	1.43 (3H, s)	18.4
25	0.92 (3H, s)	17.2	0.89 (3H, s)	17.1
26	1.10 (3H, s)	17.2	1.08 (3H, s)	17.1
27	0.90 (3H, s)	15.2	0.76 (3H, s)	15.1
28		179.3		179.2
29	4.76 (1H, d, 1.0) 4.93 (1H, d, 1.0)	110.5	4.79 (1H, d, brs) 4.92 (1H, d, brs)	110.3
30	1.76 (3H, s)	19.8	1.77 (3H, s)	19.8
1'			4.90 (1H, d, 7.5)	102.5
2'			3.95~3.97	75.2
3'			3.95~3.97	79.0
4'			4.20 (1H, m)	72.8
5'			3.95~3.97	78.0
6'			4.01 (1H, m) 4.42 (1H, m)	63.9

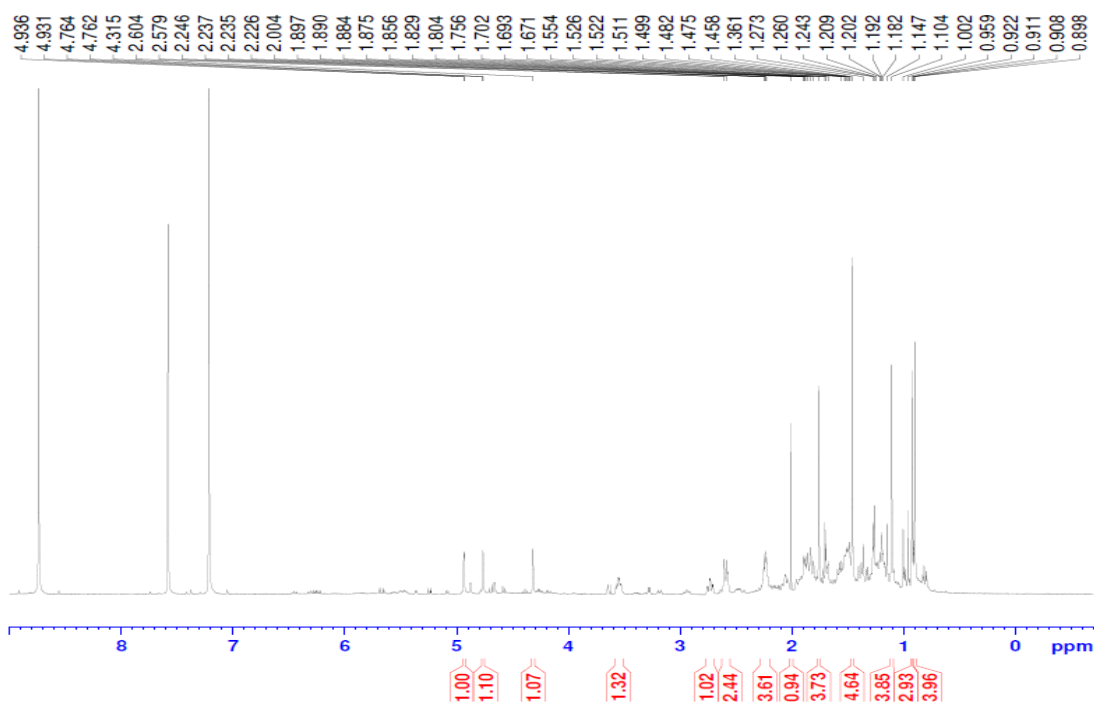


Figure 9.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2** (pyridine- $d_5$ ).

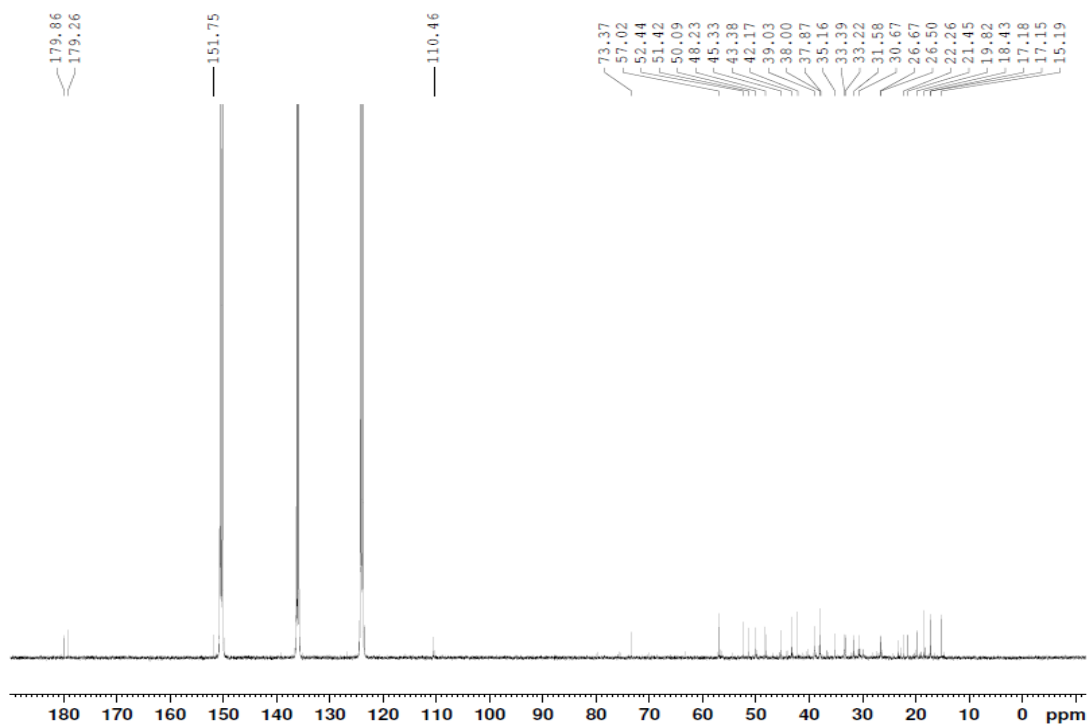


Figure 10.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2** (pyridine- $d_5$ ).

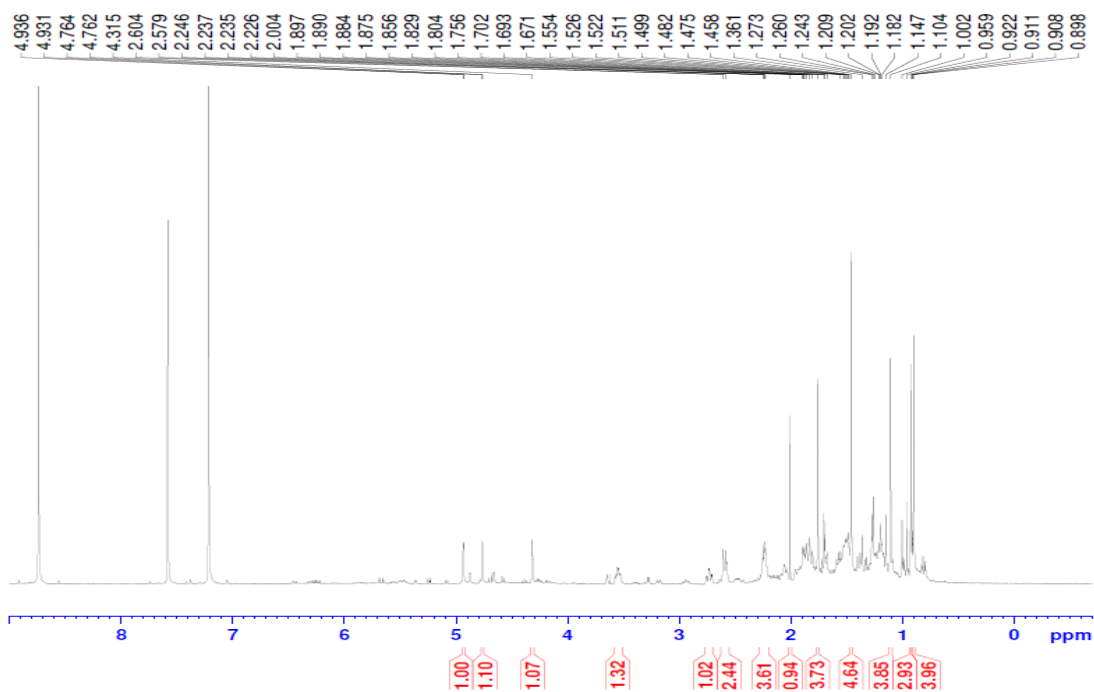


Figure 11.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **3** (pyridine- $d_5$ ).

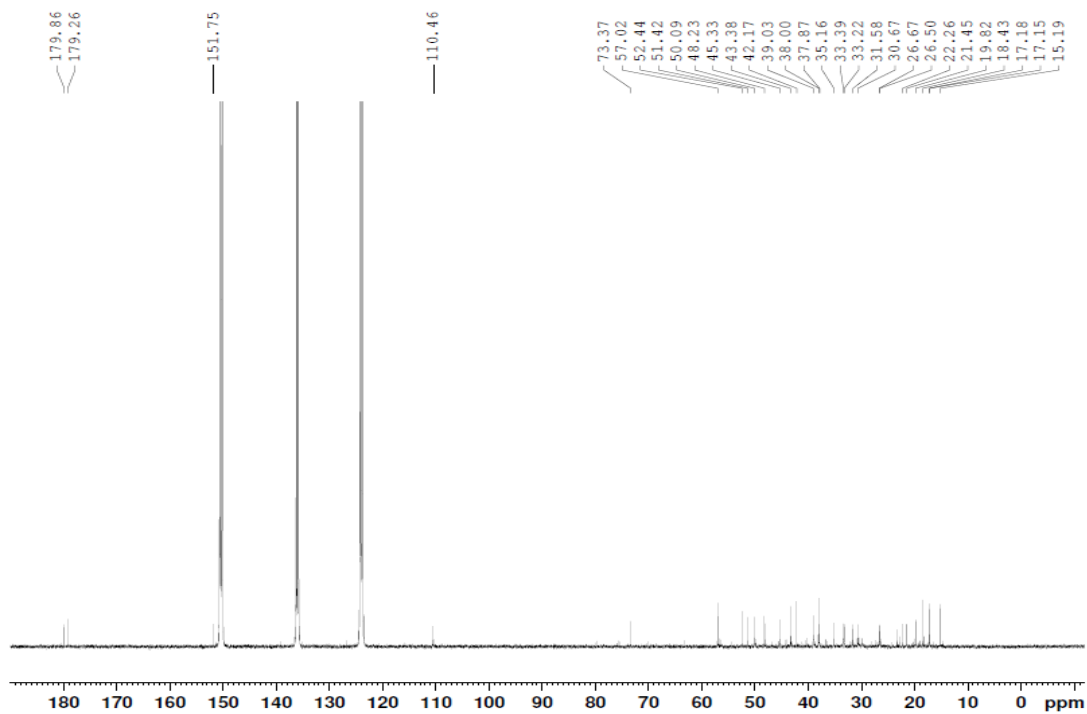


Figure 12.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **3** (pyridine- $d_5$ ).



Talbe 3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **4** and **5** (500 and 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>4</b>		Compound <b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		36.6		36.3
2		26.7		27.1
3	3.30 (1H, brs)	76.9	3.95 (1H, brs)	76.7
4		38.9		41.7
5		50.2		44.5
6		17.9		18.3
7		36.6		36.2
8		43.6		43.8
9		56.5		56.7
10		40.4		40.3
11	3.86 (1H, m)	71.2	3.95 (1H, m)	71.2
12		38.6		38.7
13		38.4		38.2
14		43.9		43.6
15		30.8		30.8
16		33.5		33.5
17		57.5		57.6
18		50.2		50.2
19		48.4	3.55 (1H, m)	48.5
20		151.6		151.7
21		31.9		31.9
22		38.1		38.5
23	0.86 (3H, s)	29.6	3.51 (1H, d, 11.0) 3.54 (1H, d, 11.0)	72.1
24	0.93 (3H, s)	23.1	0.73 (3H, s)	19.0
25	0.97 (3H, s)	19.3	1.30 (3H, s)	17.9
26	1.07 (3H, s)	17.1	1.18 (3H, s)	17.3
27	1.07 (3H, s)	15.1	1.06 (3H, s)	15.1
28		180.0		180.2
29	4.62 (1H, brs) 4.76 (1H, brs)	110.7	4.62 (1H, brs) 4.76 (1H, brs)	110.7
30	1.73 (3H, s)	19.8	1.71 (3H, s)	19.8

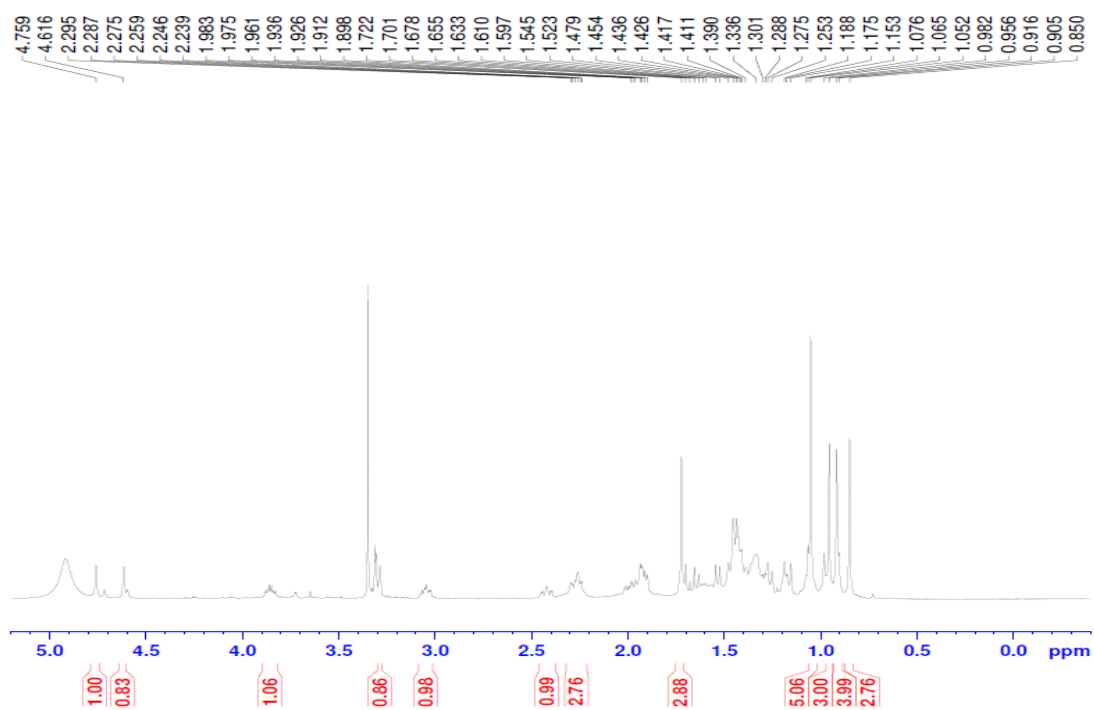


Figure 14.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

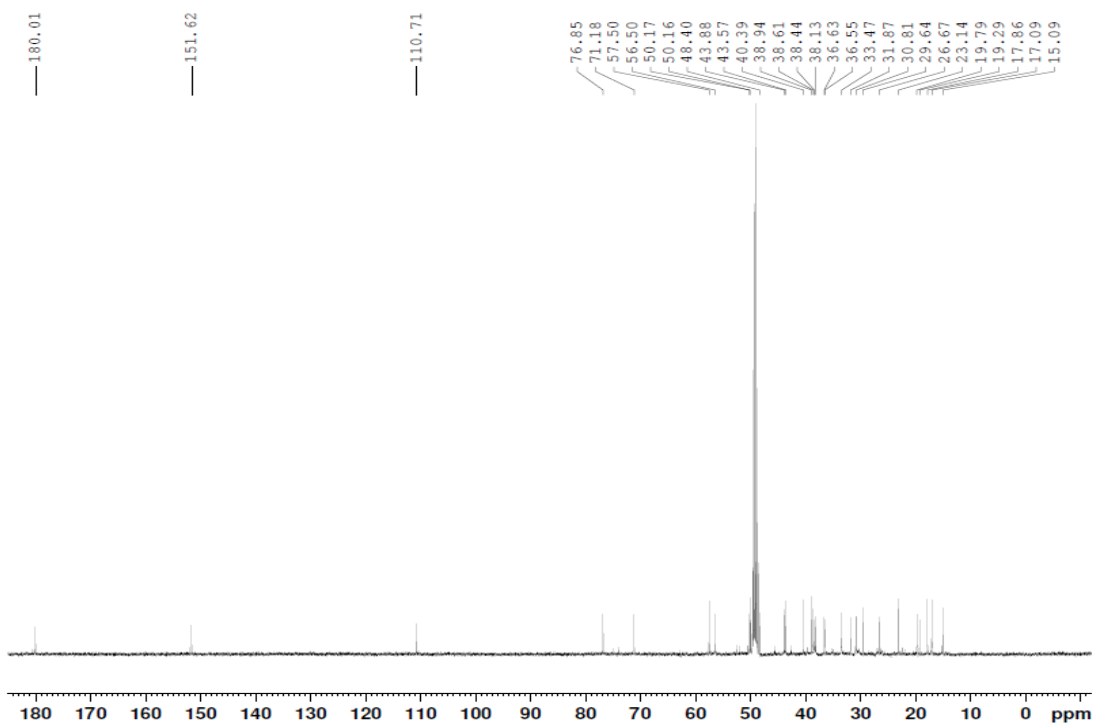


Figure 15.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

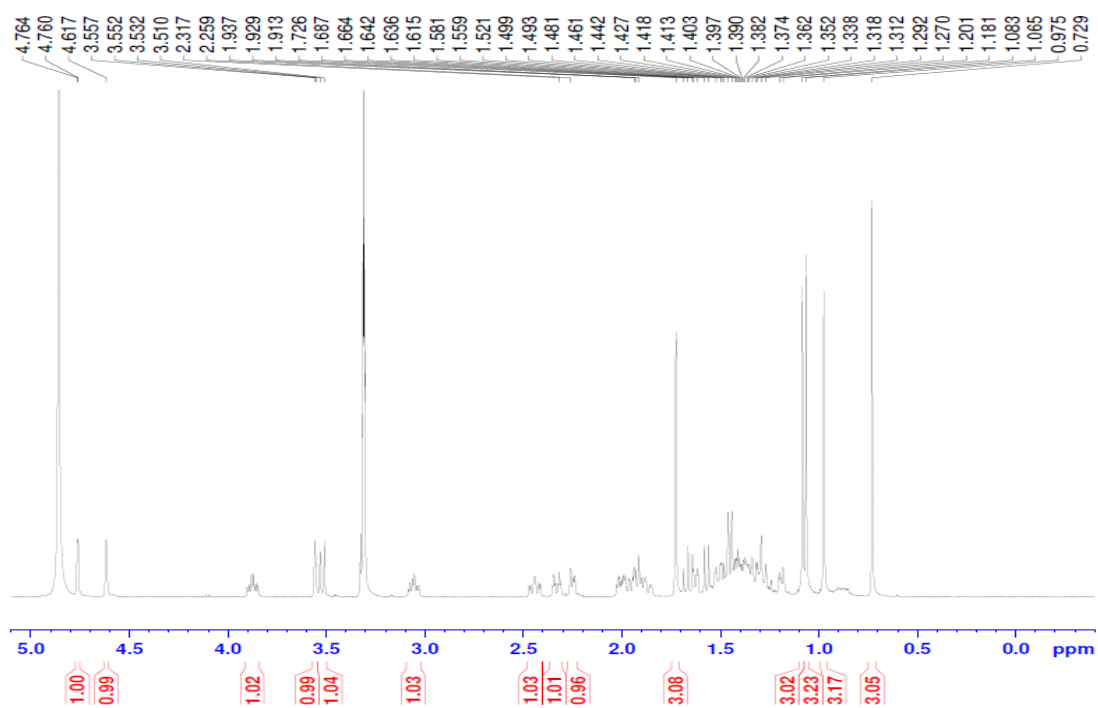


Figure 16.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

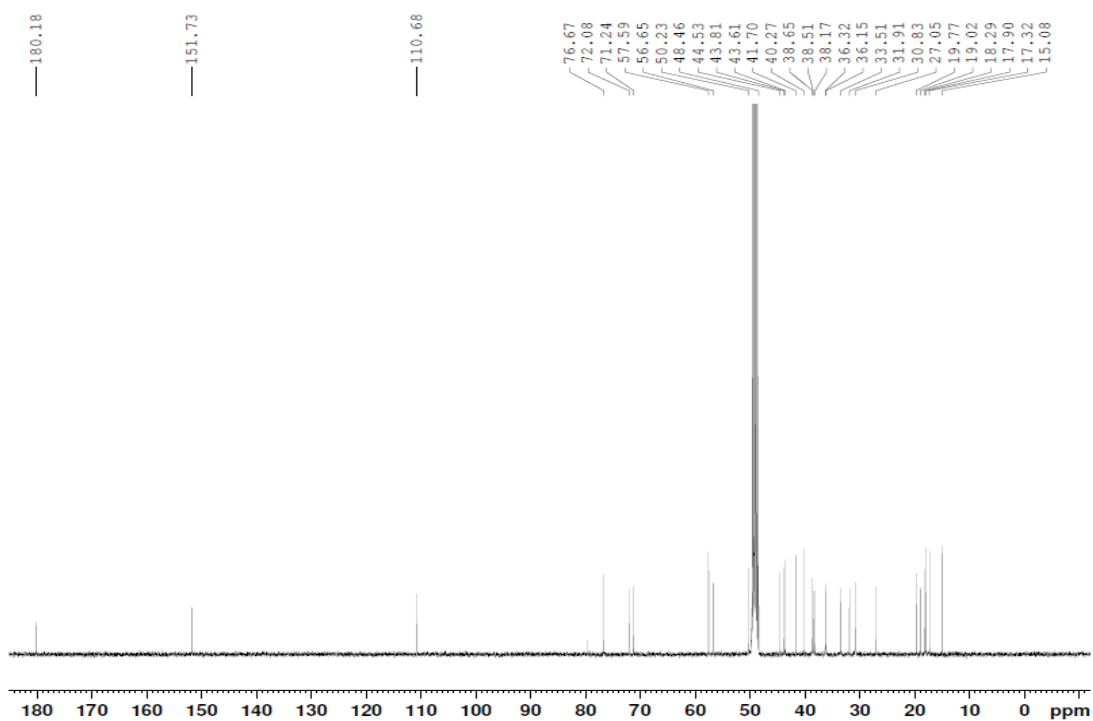


Figure 17.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

#### 4. 섬오갈피 열매 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항염 활성

섬오갈피 열매 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 우선 70% EtOH 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행 하였으며, 그 결과 섬오갈피 열매 70% EtOH 추출물에서 세포에 대한 독성 없이 11.4%의 NO 생성 억제 활성을 보였으며, 특히 EtOAc 분획물에서 세포에 대한 독성 없이 NO 생성을 91.9% 억제함을 확인 할 수 있었다. *n*-Hex 분획물의 경우, NO 생성률이 줄어드는 것처럼 보이나, 이는 세포에 대한 독성 때문이다(Figure 18).

세포에 대한 독성 없이 NO 생성 억제 활성이 우수했던 EtOAc 분획물에 대해 추가적으로 100, 50, 25, 12.5 µg/mL의 농도로 실험을 더 진행하였다. 그 결과 섬오갈피 열매 EtOAc 분획물은 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제함을 확인할 수 있었다(Figure 19).



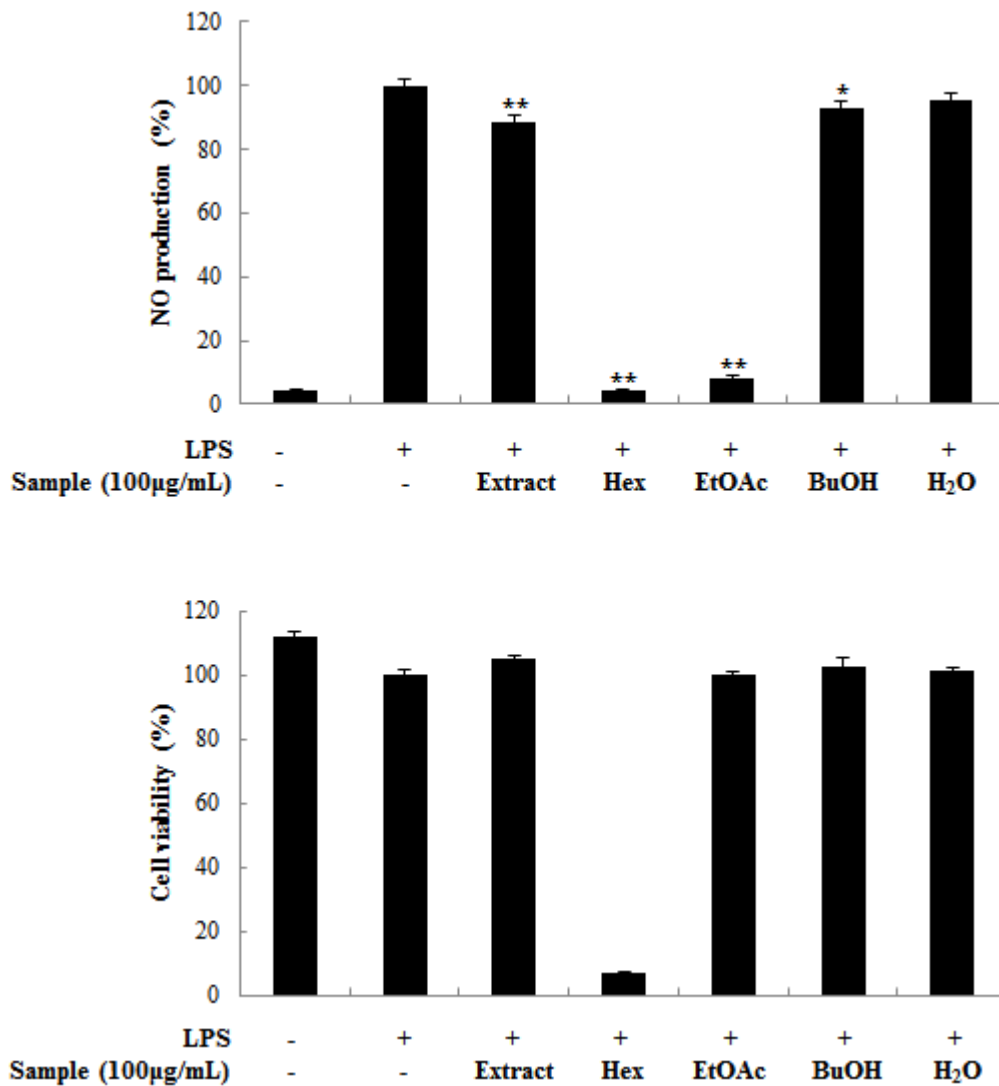


Figure 18. Effects of extract and solvent fractions from *A. koreanum* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *A. koreanum* extract and solvent fractions for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *A. koreanum*. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

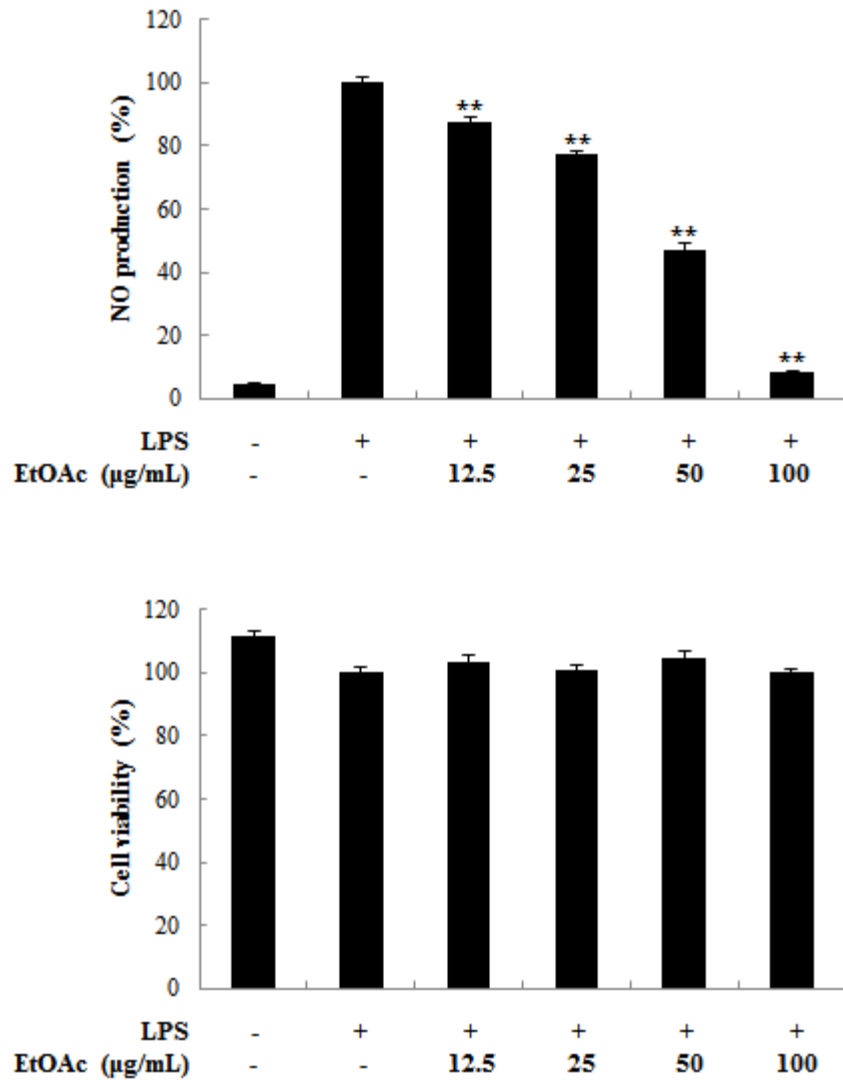


Figure 19. Effects of EtOAc fraction from *A. koreanum* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus *A. koreanum* EtOAc fraction for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of *A. koreanum* EtOAc fraction. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

2) 항균 활성

(1) Paper disc diffusion

섬오갈피 열매 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 섬오갈피 열매 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 있음을 확인하였다(Table 4).

Table 4. Anti-bacterial activities of *A. koreanum* fruits

	Clear zone (mm)						
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>			
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
Extract	13	11	12	12	10	10	9
<i>n</i> -Hex	17	14	10	18	15	16	11
EtOAc	14	13	12	15	16	16	10
<i>n</i> -BuOH	nd	nd	9	nd	nd	nd	nd
H <sub>2</sub> O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Erythromycin	22	nd	31	50	nd	nd	30

\* Sample : 100 µg/mL (20 µL)

\* Positive control : erythromycin (1 mg/mL, 20 µL)

\* Disc size : 8 mm

\* nd : not detected

## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion을 통해 항균 활성이 확인되었으므로, 섬오갈피 열매 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 추가적으로 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000 µg/mL로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0 µg/mL가 되도록 하였다. 그 결과 섬오갈피 열매 70% 에탄올 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 나타났으며, 특히 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710)와 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 균주에 대해 활성이 우수함을 확인 하였다(Table 5).

Table 5. MIC and MBC values of *A. koreanum* fruits

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
<i>n</i> -Hex	31.3	62.5	250	500	>1000	>1000	31.3	62.5	125	125	125	125	62.5	62.5
EtOAc	125	500	500	500	1000	1000	125	125	250	500	250	250	125	125
<i>n</i> -BuOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
H <sub>2</sub> O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration : µg/mL

### 3) Tyrosinase 저해 활성

섬오갈피 열매 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대한 미백 활성을 측정하기 위해 tyrosinase 저해 활성을 확인하였다. 실험은 500, 200, 100, 50, 25 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 그 결과 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 141.6, 358.4 µg/mL로 tyrosinase 저해 활성이 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 20, Table 6).

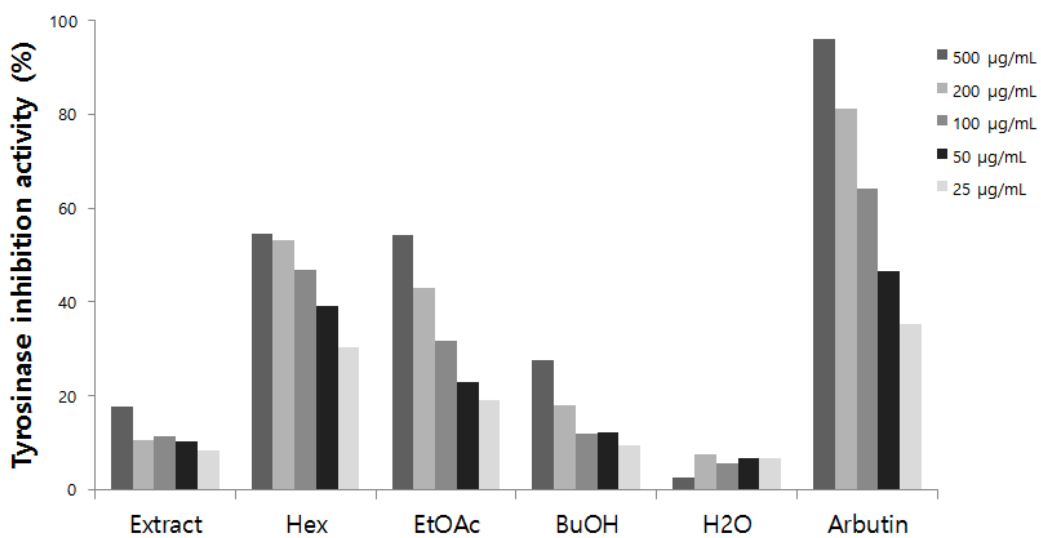


Figure 20. Tyrosinase inhibition activities of *A. koreanum* fruits.

Table 6. IC<sub>50</sub> values of tyrosinase inhibition activities

	Extract	Hex	EtOAc	BuOH	H2O	Arbutin
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	>500	141.6	358.4	>500	>500	52.1

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항염 활성

#### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

섬오갈피 열매에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 측정하였다. 실험은 각 화합물에 대해 100, 50, 25  $\mu$ M의 농도로 진행하였으며, 그 결과 compound 1-5 모두 세포에 대한 독성이 없는 농도 내에서 우수한 NO 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다(Figure 21).

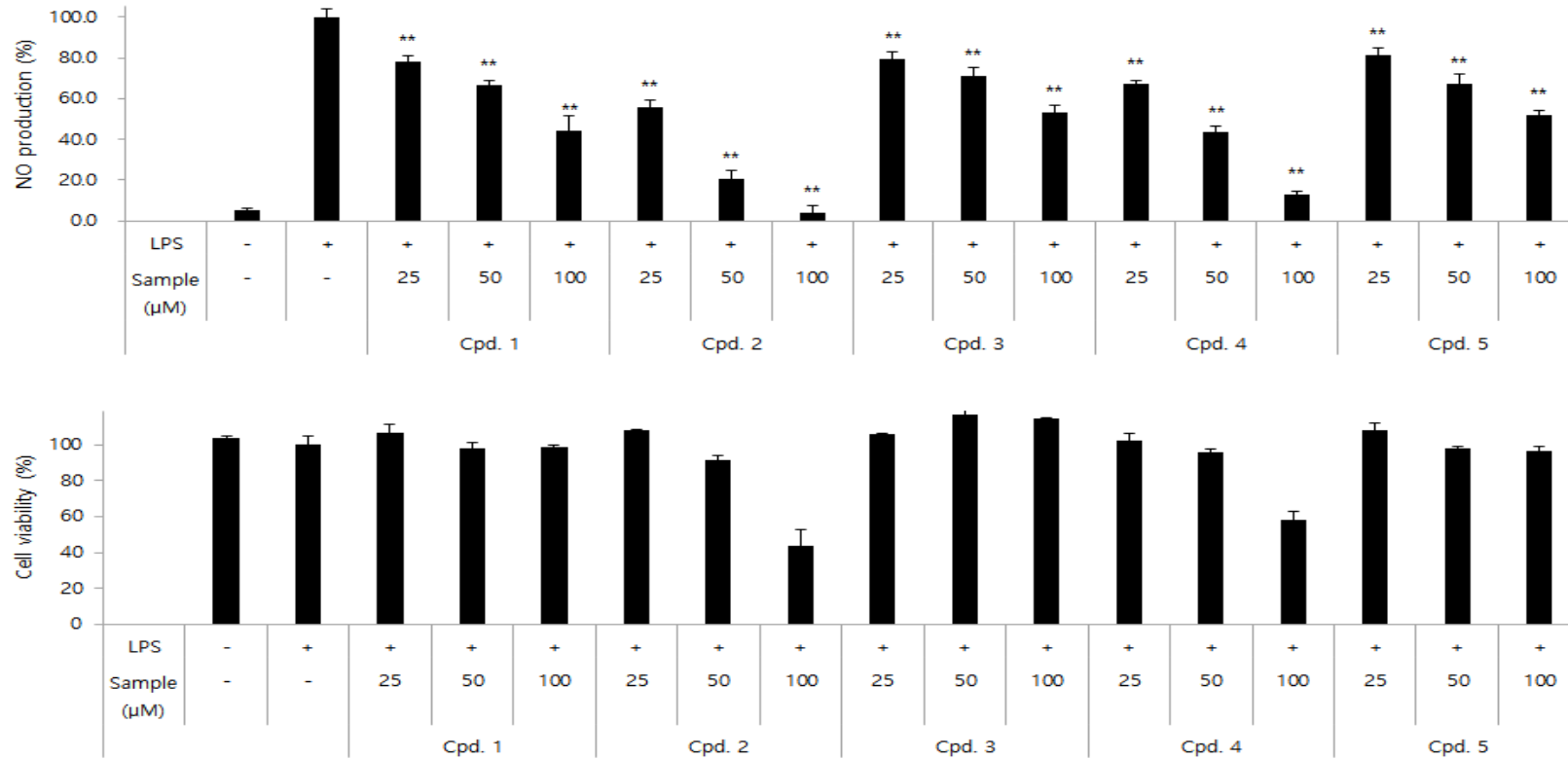


Figure 21. Effects of isolated compounds 1-5 from *A. koreanum* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1-5 for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of isolated compounds 1-5. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



## (2) Compound 3의 항염 활성 기전 연구

분리된 화합물 중 섬오갈피 열매의 주성분이며, 항염 활성 기전이 알려지지 않은 화합물인 compound 3에 대해 추가적으로 항염 활성 기전 연구를 진행하였다. 실험은 Western blot analysis를 통한 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현, 그리고 ELISA kit를 이용한 PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성을 측정하였다.

### ① NO 생성 및 iNOS 발현 억제 활성

섬오갈피 열매에서 분리된 화합물인 compound 3에 대한 항염 활성을 측정하기 위하여 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 실험 결과 compound 3은 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제 시키는 것을 확인할 수 있다. 또한 NO 생성에 관여하는 단백질인 iNOS의 발현을 Western blot analysis를 통해 확인하였으며, compound 3은 NO 생성이 억제되는 것과 같은 경향으로, iNOS 단백질의 발현 또한 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있다(Figure 22, 23).

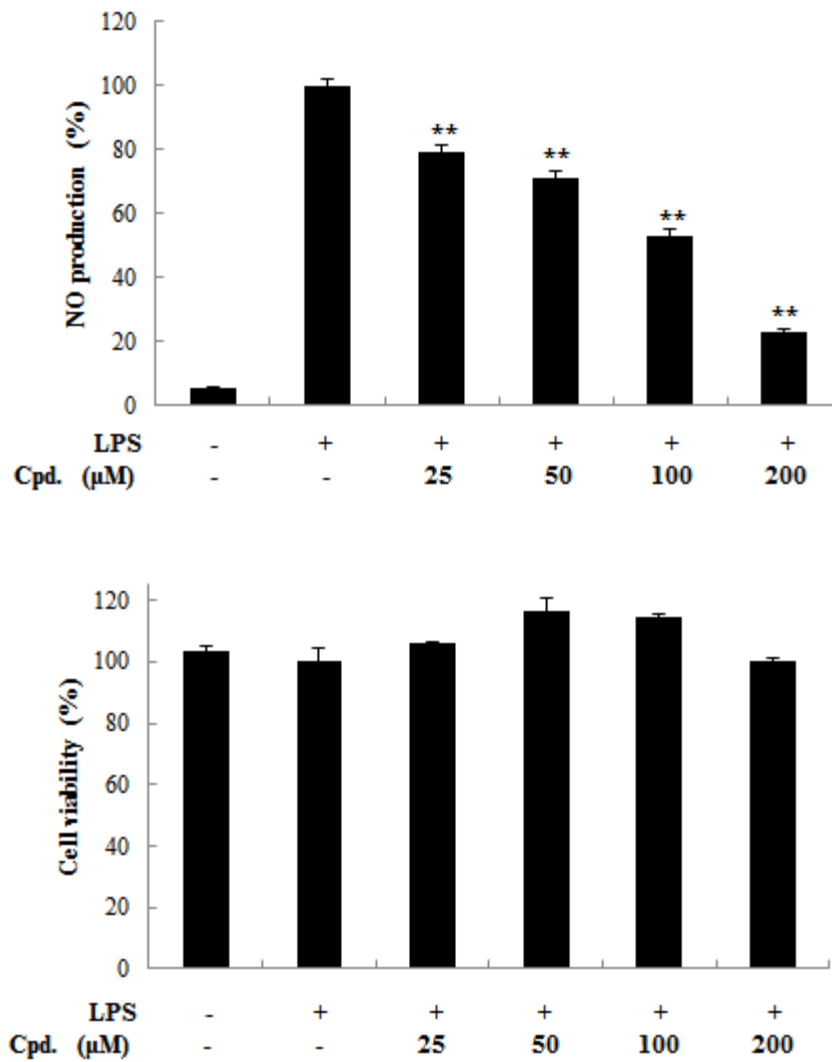


Figure 22. Effects of isolated compound **3** from *A. koreanum* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound **3** for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of isolated compound **3**. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

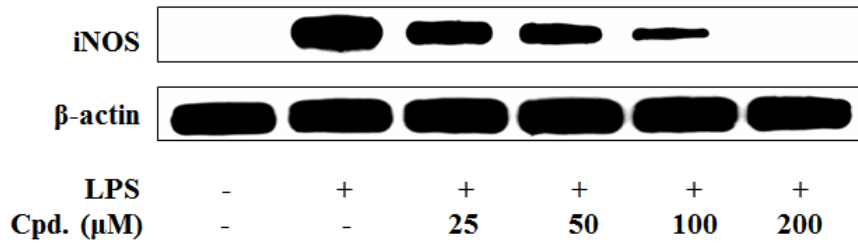


Figure 23. Effects of isolated compound **3** from *A. koreanum* on levels of iNOS protein in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus compound **3** for 24 h. Whole cell lysates (20 μg) were prepared and the protein was subjected to 10% SDS-PAGE; expression of iNOS and β-actin were determined by western blotting. β-actin served as a loading control.

## ② PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현 억제 활성

섬오갈피 열매에서 분리된 화합물인 compound **3**에 대해 추가적인 항염 활성을 연구하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성을 측정하였다. Sandwich ELISA kit 및 Western blot analysis를 통한 실험 결과 compound **3**은 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 단백질 발현 억제 기전에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다(Figure 24, 25).

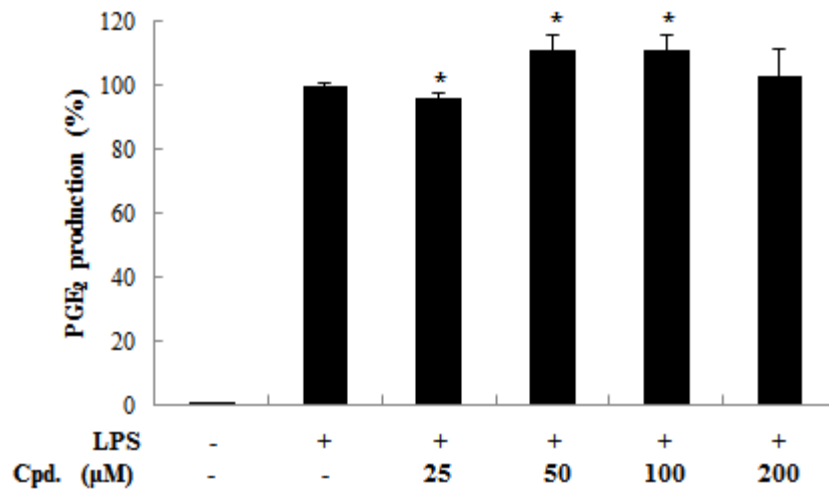


Figure 24. Effects of isolated compound **3** from *A. koreanum* on production of PGE<sub>2</sub> in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus compound **3** for 24 h. PGE<sub>2</sub> produced and released into the culture medium was assayed using the ELISA method. The data represent the mean ±SD of triplicate experiments. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01

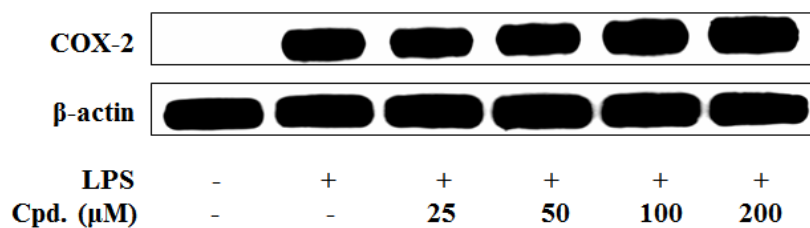


Figure 25. Effects of isolated compound **3** from *A. koreanum* on levels of COX-2 protein in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus compound **3** for 24 h. Whole cell lysates (20 μg) were prepared and the protein was subjected to 10% SDS-PAGE; expression of COX-2 and β-actin were determined by western blotting. β-actin served as a loading control.

③ 전염증성 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 생성 억제 활성

섬오갈피 열매에서 분리된 화합물인 compound **3**에 대해 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 전염증성 cytokine인 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  및 IL-6 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 실험 결과 compound **3**은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 것을 확인할 수 있다(Figure 26).

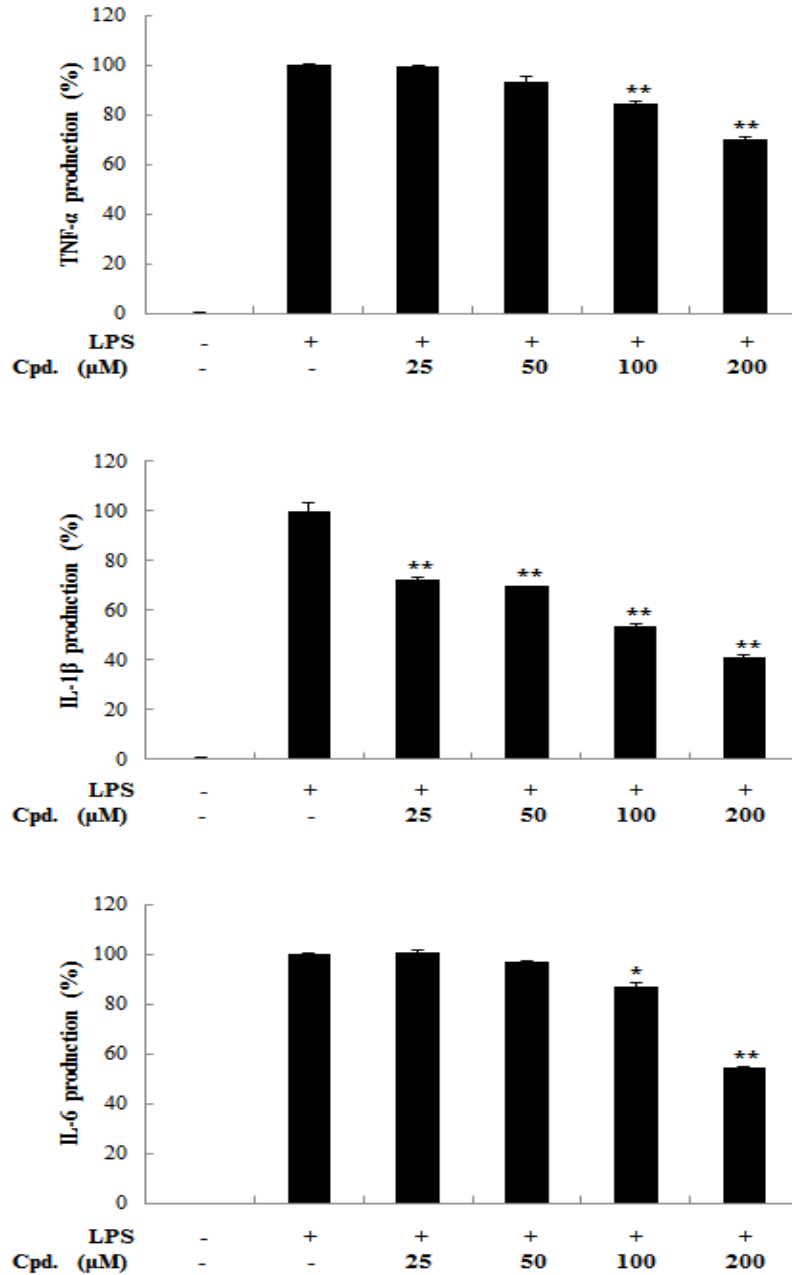


Figure 26. Effects of isolated compound **3** from *A. koreanum* on production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1  $\mu$ g/mL of LPS only, or with LPS plus compound **3** for 24 h. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 produced and released into the culture medium was assayed using the ELISA method. The data represent the mean  $\pm$ SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01

## 2) 항균 활성

섬오갈피 열매에서 분리된 화합물에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000  $\mu\text{M}$ 로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묶히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0  $\mu\text{M}$ 이 되도록 하였다. 그 결과 compound 1-5 모두 항균 활성이 나타났으며, 특히 compound 1 및 2의 항균 활성이 우수함을 확인 하였다(Table 7).

Table 7. MIC and MBC values of isolated compounds 1-5 from *A. koreanum* fruits

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>1</b>	62.5	62.5	500	500	>1000	>1000	125	125	500	500	250	250	>1000	>1000
<b>2</b>	125	500	250	250	250	500	250	500	500	500	500	500	500	500
<b>3</b>	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>4</b>	250	1000	500	500	500	1000	250	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>5</b>	500	>1000	1000	1000	500	>1000	250	250	500	500	500	1000	500	1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration :  $\mu\text{M}$



### 3) Tyrosinase 저해 활성

섬오갈피 열매로부터 분리된 화합물에 대한 미백 활성을 확인하기 위해 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 실험은 400, 200, 100, 50, 25  $\mu\text{M}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실시하였으며, 각각에 대해  $\text{IC}_{50}$  값을 계산하였다. 그 결과 compound 1, 3, 5의  $\text{IC}_{50}$  값이 각각 49.2, 132.8, 132.1  $\mu\text{M}$ 로 대조군인 arbutin (247.7  $\mu\text{M}$ ) 보다 더 좋은 tyrosinase 저해 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figure 27, Table 8).

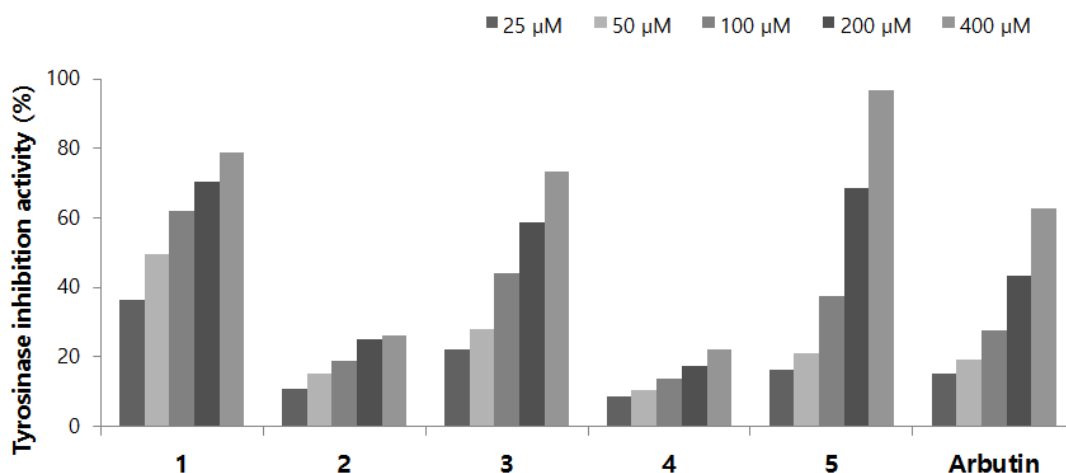


Figure 27. Tyrosinase inhibition activities of isolated compounds 1-5 from *A. koreanum* fruits.

Table 8.  $\text{IC}_{50}$  values of tyrosinase inhibition activities

	1	2	3	4	5	Arbutin
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	49.2	>400	132.8	>400	132.1	247.7

## 6. 결론 및 고찰

현재까지 섬오갈피의 뿌리, 줄기, 잎에 대해서는 다양한 생리활성 및 성분연구가 많이 보고되어 있지만, 열매에 대해서는 과실주 생산 후 버려지는 찌꺼기 부산물에 대한 항염 효과 외에는 알려진 활성이 없으며, 성분연구 또한 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 섬오갈피 열매 추출물 및 분획물의 다양한 피부 관련 활성을 검색하고, 섬오갈피 열매의 활성 성분을 확인하기 위해 추가적인 단일물질 분리 과정을 진행하여 화합물의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 피부 관련 활성도 확인하여 천연 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

섬오갈피 열매 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다. 이들 중 ethyl acetate fraction에 대해 medium pressure liquid chromatography (MPLC) 및 silica gel column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하고, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 분리, 동정하였다.

분리된 화합물은 *ent*-kaurenoic acid (1), 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid (2), 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (3), impressic acid (4), 3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,23-trihydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (5)로 확인 되었다. 분리된 화합물 중 compound 1, 2, 4, 5는 섬오갈피의 잎, 줄기, 뿌리 등의 다른 부위에서 분리 보고된 적이 있는 화합물이지만, 열매의 주성분인 compound 3은 섬오갈피에서 처음으로 분리되었다.

섬오갈피 열매의 성분도 잎의 성분들과 유사하게 lupane-type triterpenoid 종류의 화합물이 대부분이었으며, 특히 섬오갈피에서 처음으로 분리된 화합물인 compound 3은 ethyl acetate fraction 5 g 중 470.6 mg이 분리된 것으로 보아 열매의 주성분일 것으로 여겨진다. 또한 compound 3은 항암<sup>57</sup> 활성 외에는 알려진 생리활성이 없으며, 본 연구를 통해 우수한 항염 활성과 약간의 항균 활성이 있음을 확인하였다.

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용한 섬오갈피 열매의 항염 활성 실험 결과, 70% EtOH 추출물이 100 µg/mL의 농도에서 11.4%의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성을 보였으며, 특히 EtOAc 분획물은 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다. 그리고 섬오갈피 열매에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험에서도 세포에 대한 독성이 없는 범위 내에서 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해 시키는 것을 확인하였다. 분리된 화합물 중 compound 1, 2, 4, 5는 이미 항염 활성이 보고되어 있으며, NO 및 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등의 생성을 억제시키는 기전으로 항염 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다.<sup>48,49</sup>

그러나 열매의 주성분인 compound 3의 경우, 섬오갈피에서 처음으로 분리 되었으며, 항염 활성 외에는 연구된 바가 없으므로, 추가적인 항염 활성 기전 연구를 진행하였다. 그 결과, compound 3은 NO 생성을 억제시키는 것과 같은 경향으로 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 저해시키며, 또한 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다. 그러나 compound 3은 COX-2 단백질 발현 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제와 관련된 기전에는 영향을 미치지 않음을 본 연구를 통해 확인하였다.

또한 피부 관련 균주인 *S. epidermids* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 섬오갈피 열매의 항균 활성을 측정하였다. 한천확산법(paper disc diffusion method)을 통한 clear zone 확인 및 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC), 최소사멸 농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 확인하였으며, 그 결과 섬오갈피 열매 70% EtOH 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 있었으며, 특히 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 항균 활성이 우수하였다. 또한 섬오갈피 열매에서 분리된 화합물에 대한 MIC 및 MBC를 측정한 결과, 5개의 화합물 모두 항균 활성이 있었으며, 특히 compound 1 및 2의 항균 활성이 우수하였다.

섬오갈피 열매에 대한 tyrosinase 저해 활성 실험에서는 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 141.6 및 358.4 µg/mL로 활성이 있음을 확인하였다. 그리고 분리된 화합물에 대한 tyrosinase 저해 활성 실험 결과, compound 1, 3, 5의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 49.2, 132.8, 132.1 µM로 대조군인 arbutin (247.7 µM) 보

다 tyrosinase 저해 활성이 더 우수하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 섬오갈피 열매를 이용한 항염, 항균 및 미백 효과가 있는 천연 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

#### IV. 연구 2 : 참꽃나무 잎 추출물의 항염 및 항균 활성 성분 연구

##### 1. 재료

실험에 사용된 참꽃나무(*Rhododendron weyrichii*) 잎(시료번호 : 315)은 2014년 9월에 제주 사려니숲길에서 채집하였다. 채집한 참꽃나무 잎은 실온 및 음지에서 자연 건조 하였으며, 분쇄하여 사용하였다(Figure 28).



Figure 28. Pictures of *Rhododendron weyrichii* leaves.

참꽃나무는 제주어로 박달레낭이라고하며 진달래과(Ericaceae)에 속하는 식물이다. 제주 특산종으로 알려져 있으며, 우리나라에서는 제주도에만 자생하고 일본에도 분포한다고 알려져 있다. 진달래나 철쭉에 비해 꽃이 크고 높게 자라나 남성적인 느낌이 든다하여 참꽃나무라고 이름이 붙여졌다.

또한 참꽃나무는 제주의 꽃으로 지정되어 있는데, 그 이유는 잎이 가지 끝에 세 잎씩 운생한다 하여 ‘삼다, 삼무, 삼보, 삼려’를 나타내고, 세 잎과 다섯 꽃잎이 규칙적으로 뭉쳐나고 있어, ‘삼삼오오’ 제주도민들의 단결과 전진의 기풍을 상징한다고 해서 제주의 꽃으로 정해졌다고 한다.

현재까지 알려진 참꽃나무의 생리활성 연구로는 잎 추출물이 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제 시키는 기전으로 항염 활성이 있음이 보고되어 있다.<sup>58</sup> 그러나 이 외에는 참꽃나무의 활성 및 성분에 대한 연구가 이루어지지 않고 있으므로, 본 연구에서는 참꽃나무 잎 추출물 및 분획물의 다양한 피부 관련 활성을 검색하고, 활성 성분을 확인하기 위해 단일물질 분리 및 구조 동정을 진행하였다.

## 2. 참꽃나무 잎의 추출, 분획 및 분리

### 1) 참꽃나무 잎의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄 된 참꽃나무 잎 126.4 g을 70% 에탄올 3 L에 넣고 실온에서 24 시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 33.2 g을 얻었다.

추출물 10 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었으며, 이와 같은 방법으로 2회 더 반복 실시하여, 추출물 총 30 g을 용매 분획 하였다(Figure 29).

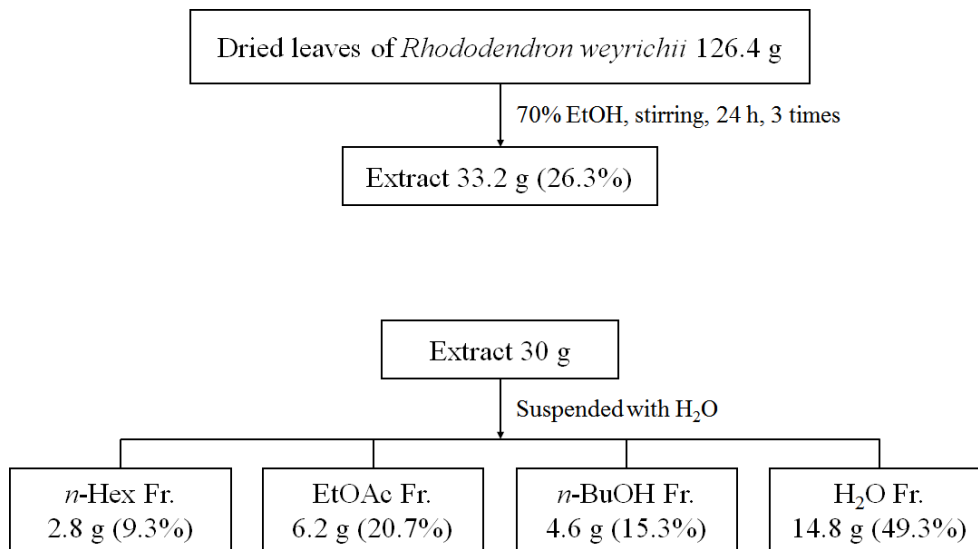


Figure 29. Extraction and solvent fractionation of *R. weyrichii* leaves.

## 2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층 중 ethyl acetate fraction 5.9 g을 분획하기 위하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. *n*-Hex-EtOAc (0-100%), EtOAc-MeOH (0-50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 200 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-32).

Fr. V11, 12 (50-55% EtOAc in *n*-Hex, 167.7 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=20:1)을 수행하여 compound 1 (125 mg)을 분리하였다.

Fr. V18, 19(85-90% EtOAc in *n*-Hex, 255.4 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=15:1)을 수행하여 compound 2 (5.9 mg)를 분리하였다.

Fr. V25 (20% MeOH in EtOAc, 502.5 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=12:1)을 수행하여 compound 2 (163.5 mg)와 compound 3 (54.5 mg)을 분리하였다.

Fr. V26 (25% MeOH in EtOAc, 1055.2 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=6:1)을 수행하여 12개의 fraction (Fr. V26-1-12)으로 나누었으며, 그 중 Fr. V26-11은 compound 4 (123.8 mg)로 확인 되었다. 또한 Fr. V26-5 (296.1 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=10:1)을 수행하여 compound 2 (45.9 mg)와 compound 3 (90.4 mg)을 더 분리하였다.

그리고 Fr. V27 (30% MeOH in EtOAc, 715.3 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1)을 수행하여 compound 5 (25.9 mg)를 분리하였다(Figure 30).



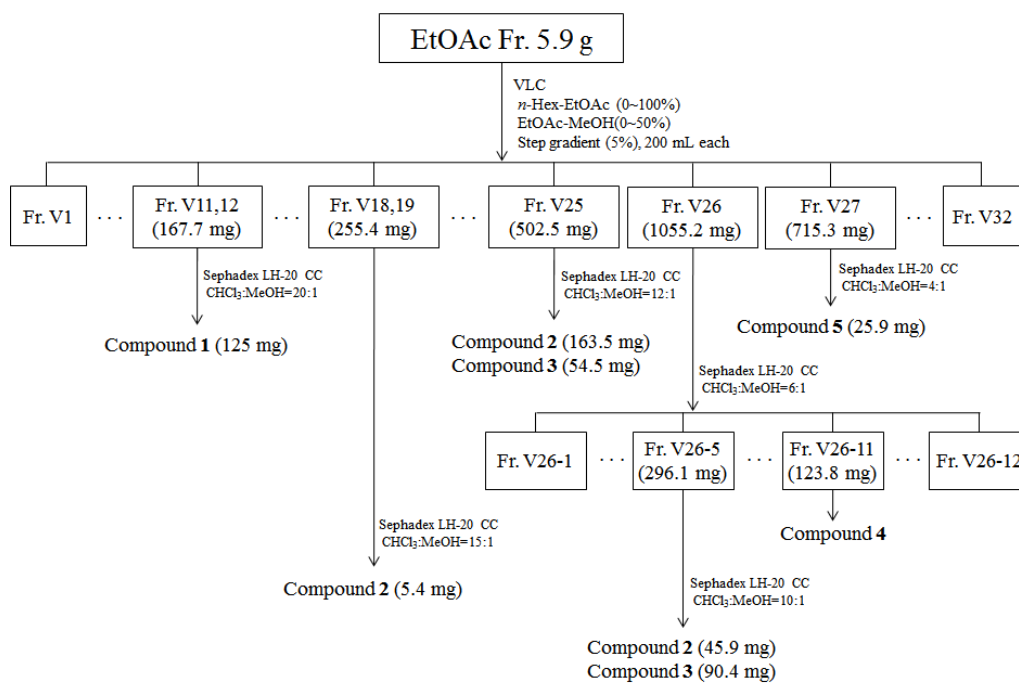


Figure 30. Isolation of compounds from *R. weyrichii* leaves.

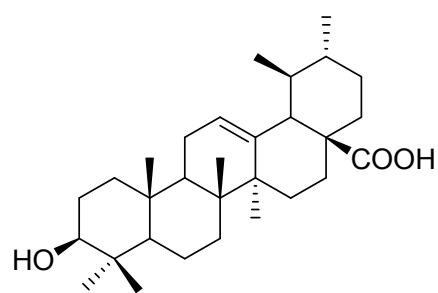
### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2, 3의 구조 동정

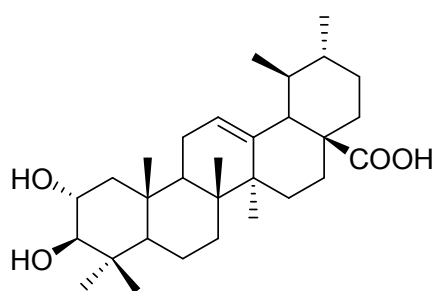
Compound 1은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 30개의 carbon 피크와  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서 7개의 singlet인 methyl group을 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서는 1개의 carbonyl group ( $\delta_{\text{C}}$  180.4), vinyl carbon (4차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  139.8, 3차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  126.1) 및 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의  $\text{sp}^3$  혼성 carbon ( $\delta_{\text{C}}$  78.6)의 특성 피크가 관찰되었다. 이들을 바탕으로 compound 1은 문헌<sup>59</sup>을 통해 ursolic acid (3 $\beta$ -hydroxyurs-12-en-28-oic acid)임을 확인하였다(Figure 31-33, Table 9).

또한 compound 2는 compound 1과 매우 유사한 구조이나,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 2개의  $\text{sp}^3$  혼성 carbon ( $\delta_{\text{C}}$  69.0, 84.3) 및  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  3.43 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz)과 4.13 (1H, m)의 피크로 보아 2번 및 3번 위치에 OH group이 결합되어 있음을 예상하였으며, 문헌<sup>60</sup>을 통해 corosolic acid (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid)로 확인되었다(Figure 31, 34, 35, Table 9).

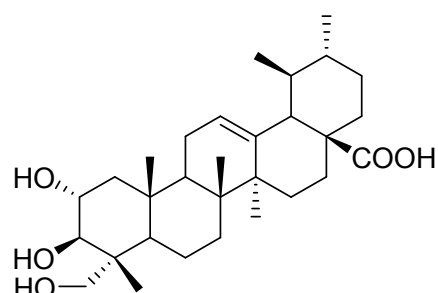
그리고 compound 3 또한 compound 1, 2와 유사한 구조이지만,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 3개의  $\text{sp}^3$  혼성 carbon ( $\delta_{\text{C}}$  66.8, 69.4, 78.6) 및  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  3.75 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz)와 4.25-4.28 (3H, overlapped)의 피크로 보아 2번, 3번 및 23번 위치에 OH group이 결합되어 있음을 예상하였으며, 문헌<sup>61</sup>을 통해 asiatic acid (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid)로 확인되었다(Figure 31, 36, 37, Table 9).



Compound 1



Compound 2



Compound 3

Figure 31. Chemical structures of compounds 1-3.

Talbe 9.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **1-3** (500 and 125 MHz, pyridine- $d_5$ )

No.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>		Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		39.5		48.5		48.4
2		28.6	4.13 (1H, m)	69.0	4.23-4.28 (overlapped)	69.4
3	3.28 (1H, dd, 6.0, 10.0)	78.6	3.43 (1H, d, 9.5)	84.3	4.23~4.28	78.6
4		40.0		40.3		44.2
5		56.3		56.4		48.3
6		19.2		19.3		
7		34.0		34.0		33.6
8		40.4		40.5		40.5
9		48.5		48.5		48.6
10		37.9		38.9		38.8
11		24.1		24.2		24.3
12	5.52 (1H, t, 3.5)	126.1	5.48 (1H, t, 3.5)	126.0	5.48 (brs)	126.1
13		139.8		139.7		139.8
14		43.0		43.0		43.0
15		29.2		29.1		29.1
16		25.4		25.4		25.4
17		48.5		48.5		48.5
18	2.66 (1H, d, 11.5)	54.0	2.65 (1H, d, 11.0)	54.0	2.63 (1H, d, 11.0)	54.0
19		39.9		39.9		39.9
20		39.9		39.9		39.9
21		31.5		31.5		31.5
22		37.7		37.9		38.0
23	1.25 (3H, s)	29.3	1.23 (3H, s)	29.8	3.75 (1H, d, 10.0) 4.23-4.28 (overlapped)	66.8
24	1.05 (3H, s)	17.1	1.07 (3H, s)	17.4	1.08 (3H, s)	15.0
25	0.90 (3H, s)	16.2	0.99 (3H, s)	18.2	1.07 (3H, s)	18.0
26	1.08 (3H, s)	17.9	1.10 (3H, s)	18.0	1.08 (3H, s)	18.0
27	1.27 (3H, s)	24.4	1.30 (3H, s)	24.4	1.15 (3H, s)	24.4
28		180.4		180.4		180.5
29	1.02 (3H, d, 6.0)	18	1.00 (3H, d, 6.0)	17.9	0.97 (3H, s)	18.0
30	0.97 (3H, d, 6.0)	21.9	0.96 (3H, d, 6.0)	21.9	0.92 (3H, s)	21.9

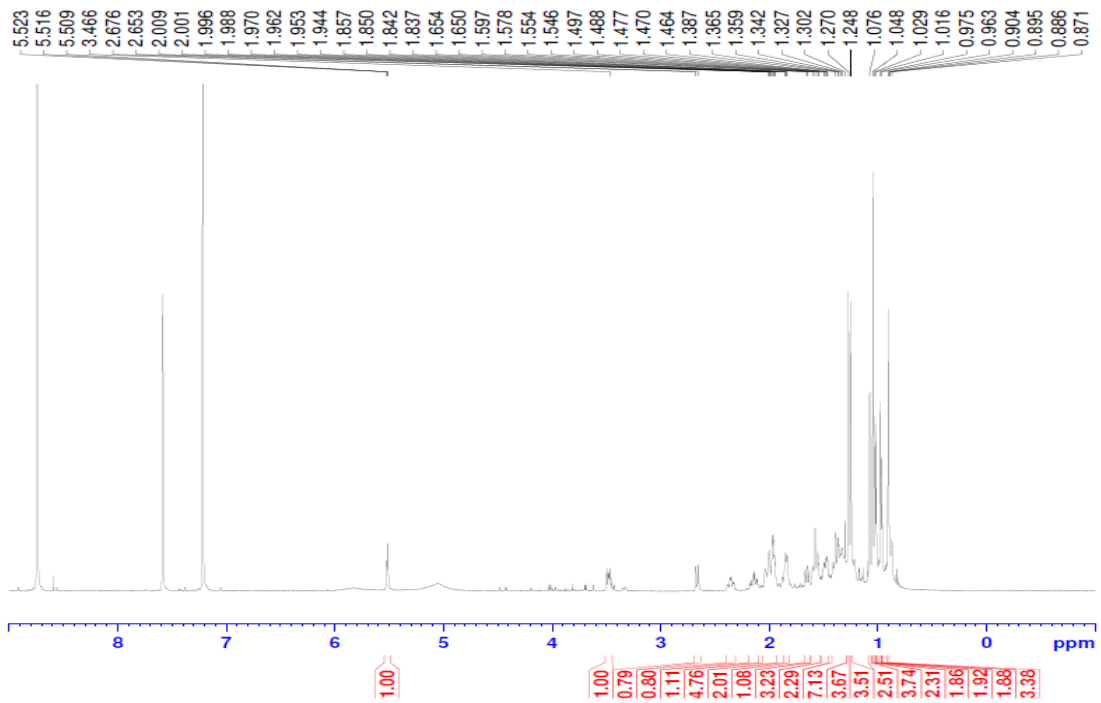


Figure 32.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **1** (pyridine- $d_5$ ).

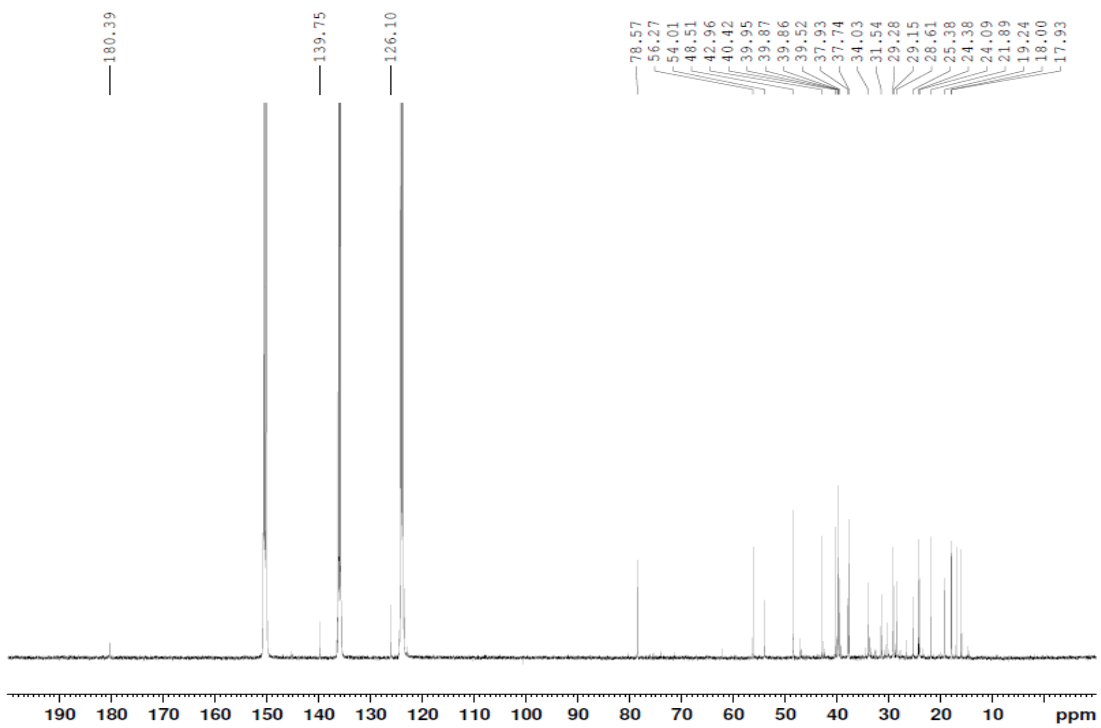


Figure 33.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **1** (pyridine- $d_5$ ).

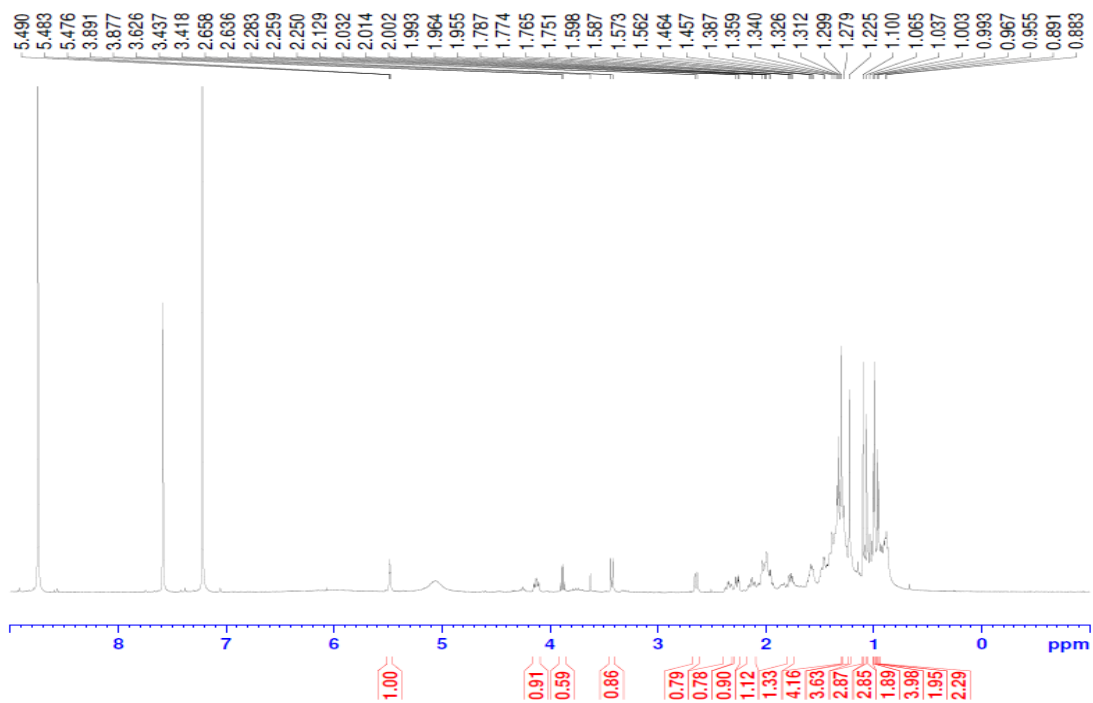


Figure 34.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2** (pyridine- $d_5$ ).

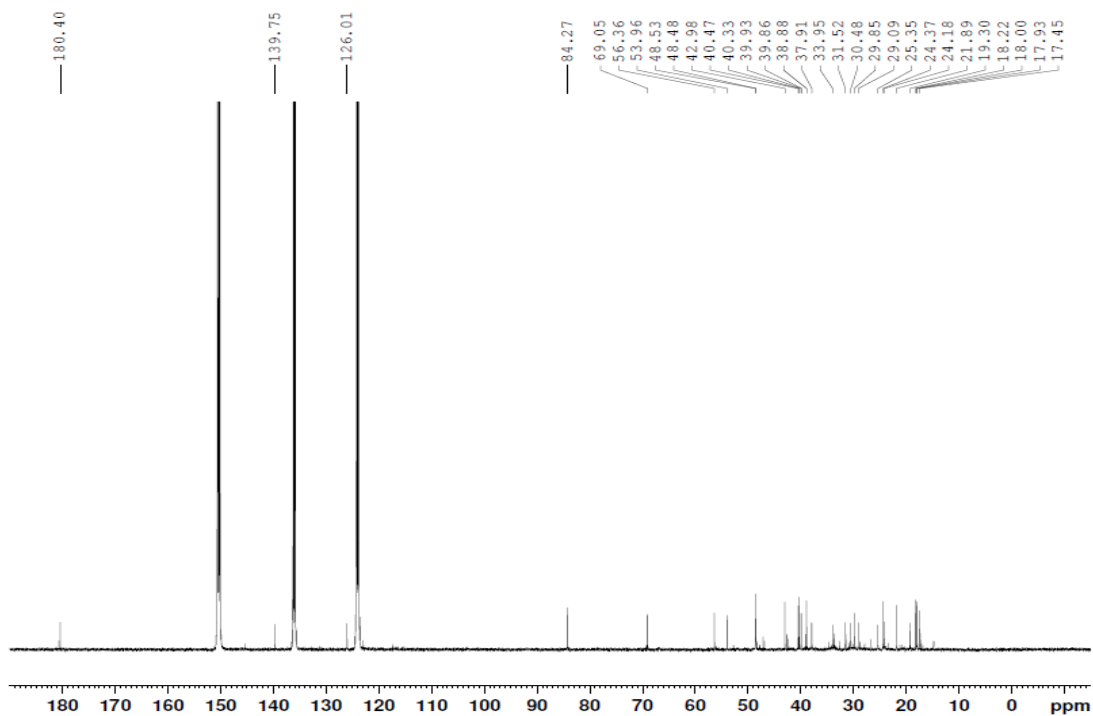


Figure 35.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2** (pyridine- $d_5$ ).

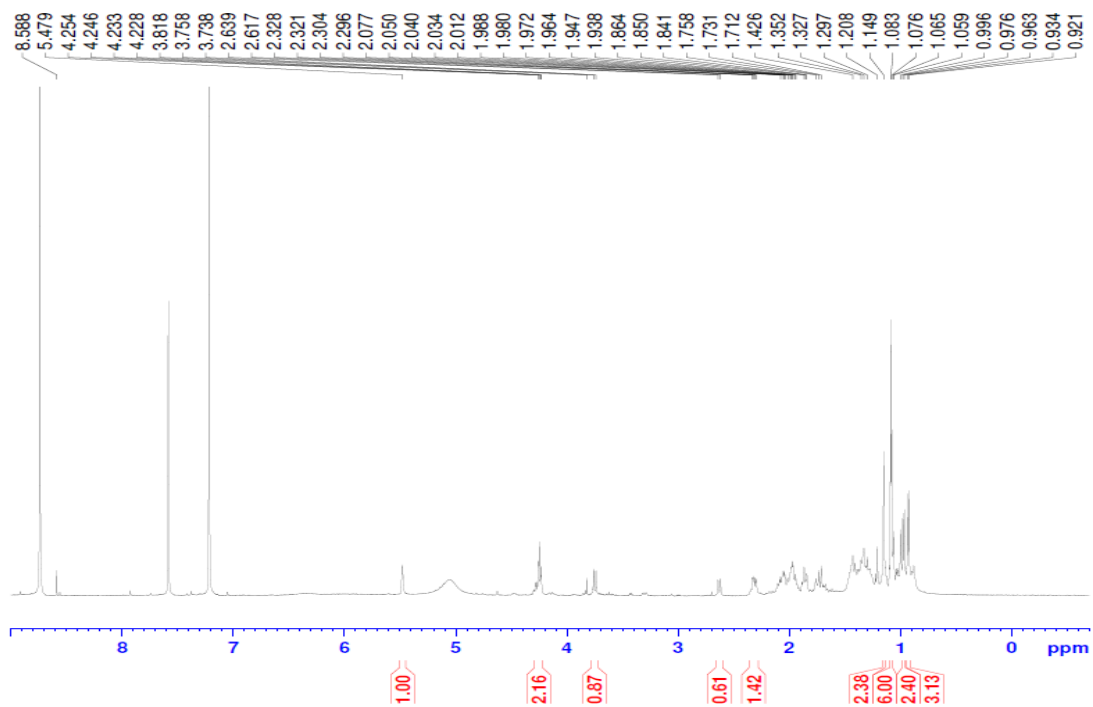


Figure 36.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **3** (pyridine- $d_5$ ).

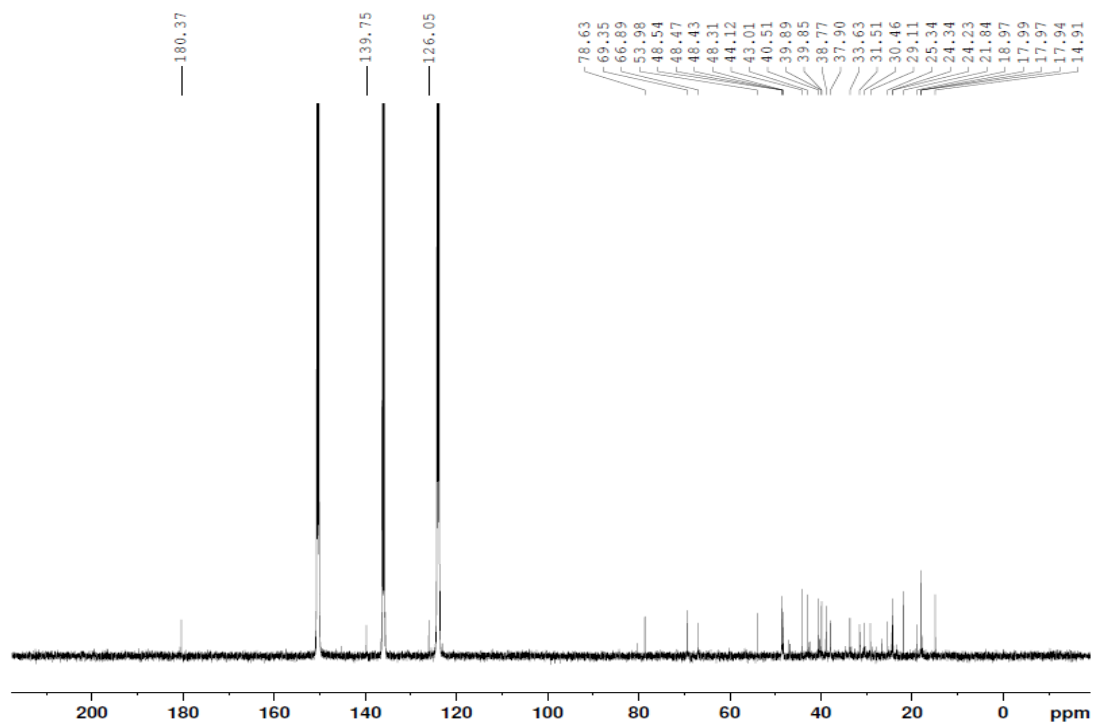


Figure 37.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **3** (pyridine- $d_5$ ).

## 2) Compound 4, 5의 구조 동정

Compound 4는  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 대칭인 2개의 carbon 피크를 포함하여 총 19개의 피크가 관찰되며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  62.8-78.9에 해당하는 5개의 피크와  $\delta_{\text{C}}$  104.1의 피크로 보아 6탄당을 포함하고 있는 배당체로 B ring이 대칭 구조인 flavonoid 골격으로 예상하였다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서 서로 *ortho*-coupling을 하는 대칭인 두 개의 aromatic proton ( $\delta_{\text{H}}$  6.93 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 8.09 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz)) 피크를 볼 수 있으며,  $\delta_{\text{H}}$  6.26 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz) 및 6.39 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)의 피크를 통해 flavonoid A ring에는 서로 *meta*-coupling을 하는 두 개의 aromatic proton이 있는 구조를 예상할 수 있다. 또한 당의 anomeric proton에 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  5.50 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz) 피크 및  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum을 종합하여 보았을 때, 결합되어 있는 당은  $\beta$ -form의 glucopyranoside일 것이라 예상하였다. 이를 바탕으로 compound 4는 문헌<sup>62</sup>을 통해 astragalín (kaempferol 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside)임을 확인하였다 (Figure 38-40, Table 10).

Compound 5는  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 분석 결과, compound 4와 유사한 구조이지만, flavonoid의 B ring이 대칭 구조가 아닌 산소와 같이 전기음성도가 큰 치환기가 2개일 것으로 예상되었다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.86 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7.58 (1H, dd,  $J = 2.5, 8.5$  Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  7.71 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz)의 피크를 통해 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하고 있는 3개의 aromatic proton을 확인할 수 있으며,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum과 종합하여 보면, flavonoid의 B ring에 3', 4' 위치에 -OH group이 치환되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. 이를 바탕으로 compound 5는 문헌<sup>63</sup>을 통해 isoquercetin (quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside)임을 확인 하였다(Figure 38, 41, 42, Table 10).



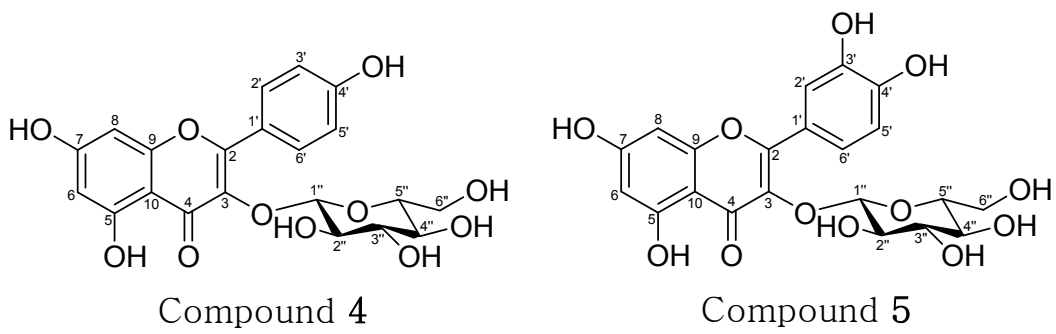


Figure 38. Chemical structures of compound 4 and 5.

Talbe 10. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound 4 and 5 (500 and 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

No.	Compound 4		Compound 5	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		158.4		159.1
3		135.5		135.7
4		179.5		179.6
5		163.3		163.2
6	6.26 (1H, d, 2.0)	100.0	6.19 (1H, d, 2.0)	100.0
7		166.2		166.1
8	6.39 (1H, d, 2.0)	95.0	6.38 (1H, d, 2.0)	94.8
9		158.7		158.6
10		105.8		105.8
1'		112.8		123.2
2'	8.09 (2H, d, 8.5)	132.5	7.71 (1H, d, 2.5)	117.7
3'	6.93 (2H, d, 8.5)	116.3		146.0
4'		161.8		150.0
5'	6.93 (2H, d, 8.5)	116.3	6.86 (1H, d, 8.5)	116.1
6'	8.09 (2H, d, 8.5)	132.5	7.58 (1H, dd, 2.5, 8.5)	123.3
1''	5.50 (1H, d, 7.5)	104.1	5.27 (1H, d, 8.0)	104.4
2''	3.33-3.82	76.0	3.21-3.86	75.9
3''	3.33-3.82	78.9	3.21-3.86	78.2
4''	3.33-3.82	71.6	3.21-3.86	71.3
5''	3.33-3.82	78.3	3.21-3.86	78.5
6''	3.33-3.82	62.8	3.21-3.86	62.7

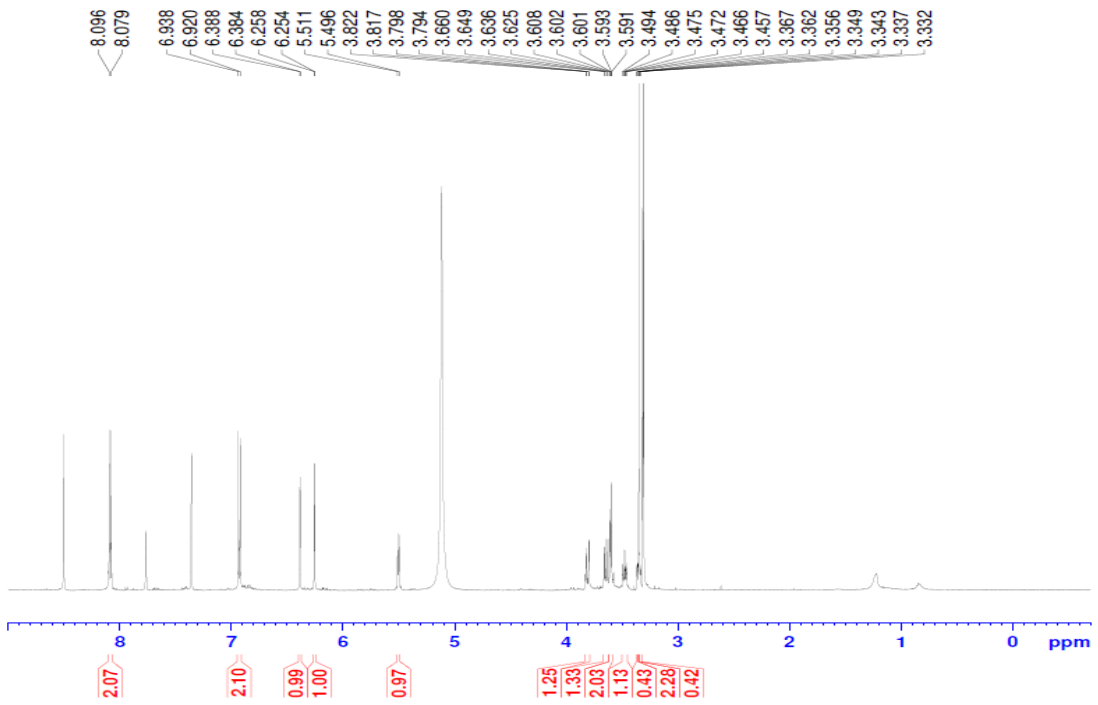


Figure 39.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **4** ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{pyridine-}d_5$ ).

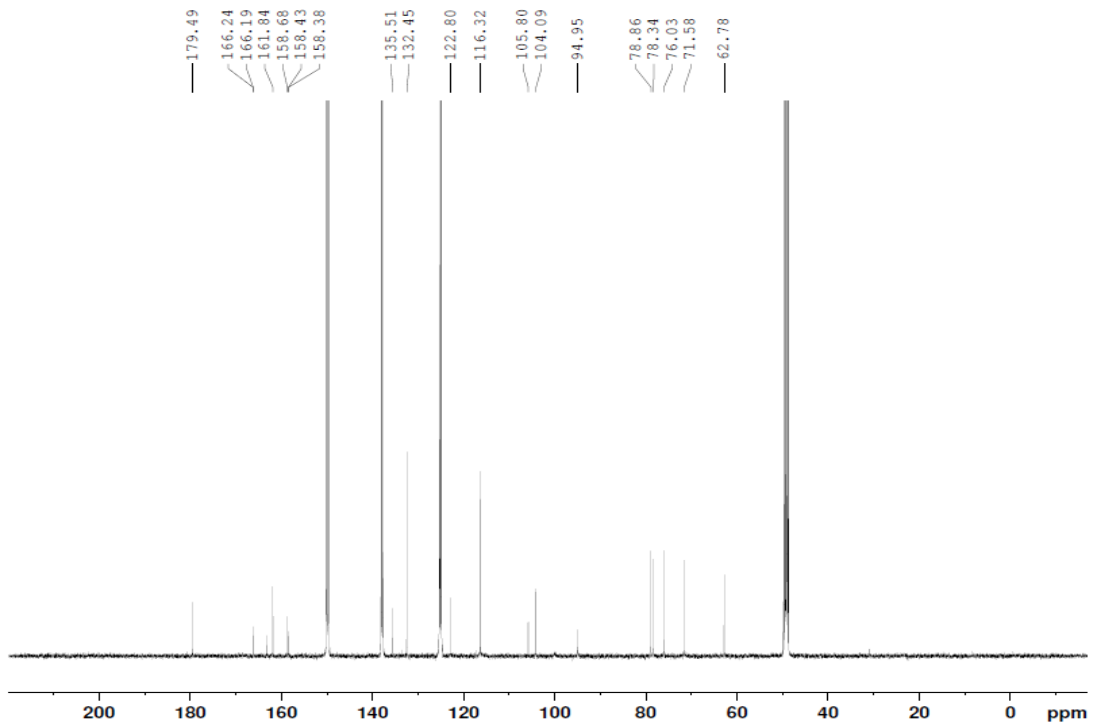


Figure 40.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **4** ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{pyridine-}d_5$ ).

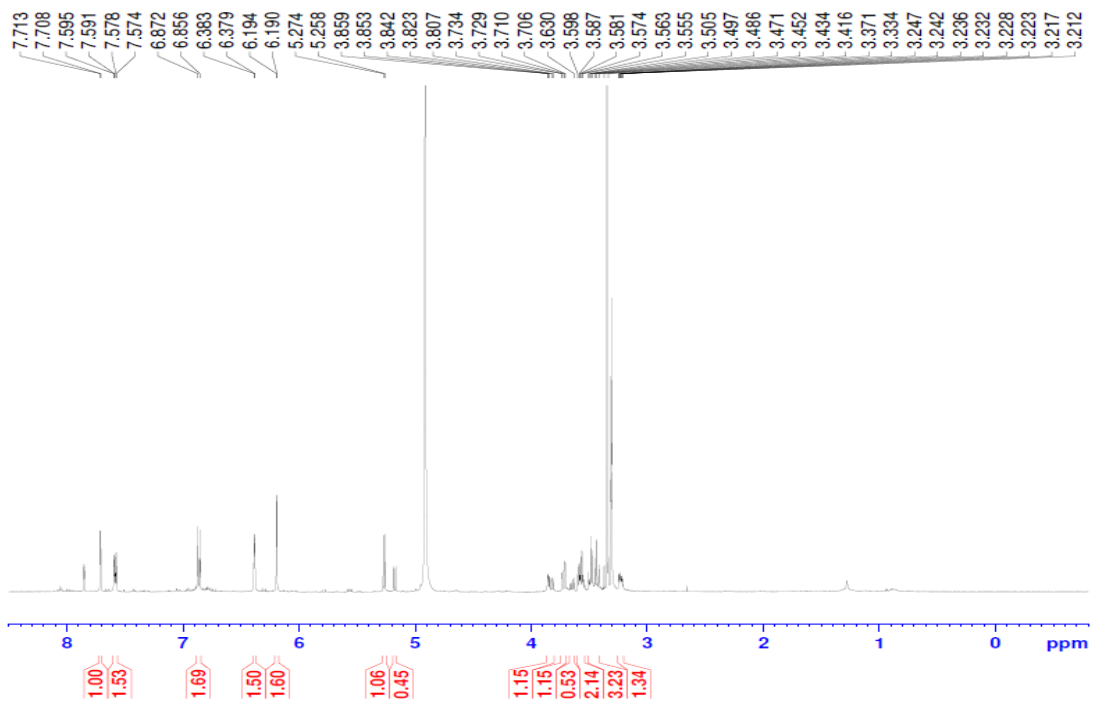


Figure 41.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

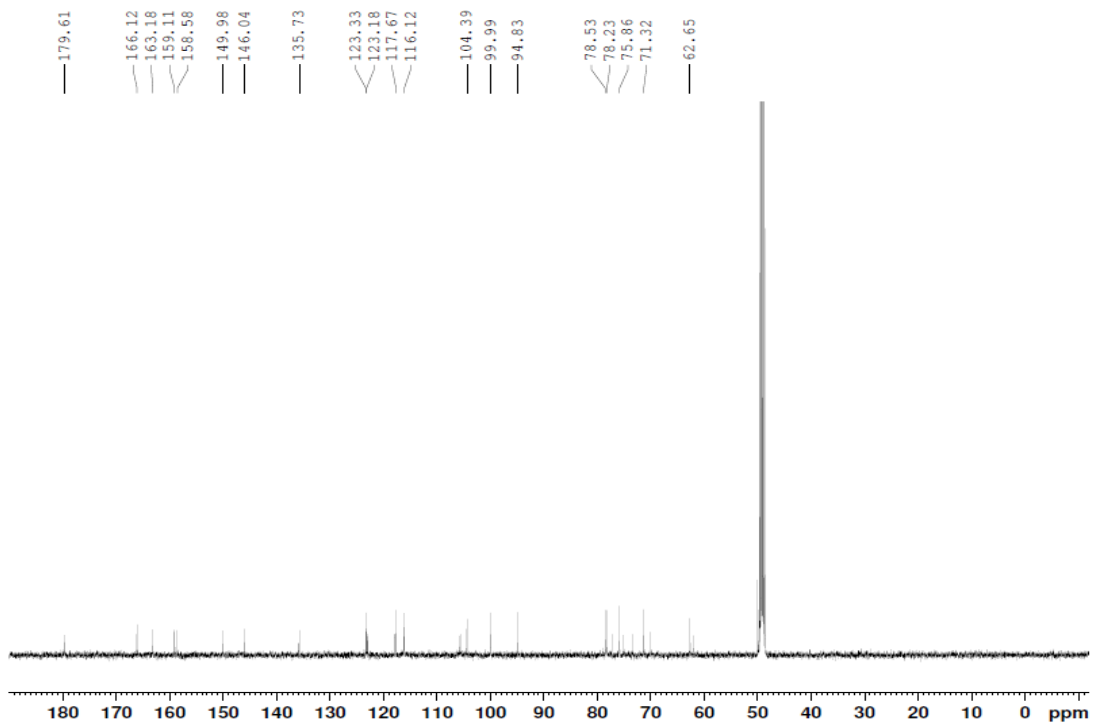


Figure 42.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **5** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

#### 4. 참꽃나무 잎 추출물 및 분획물의 항염 활성 실험 결과

##### 1) 항염 활성

참꽃나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위하여 RAW 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인 하였다. 우선 70% EtOH 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행 하였으며, 그 결과 참꽃나무 잎 70% EtOH 추출물에서 세포에 대한 독성 없이 33.6%의 NO 생성 억제 활성을 보였다(Figure 43). *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 경우, NO 생성률이 줄어들기는 하나, 세포에 대한 독성도 있으므로, 독성이 없는 범위 내에서 NO 생성률을 다시 확인 하였다. 그 결과, EtOAc 분획물은 40, 30, 20, 10 µg/mL의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제함을 확인 할 수 있었다(Figure 44).

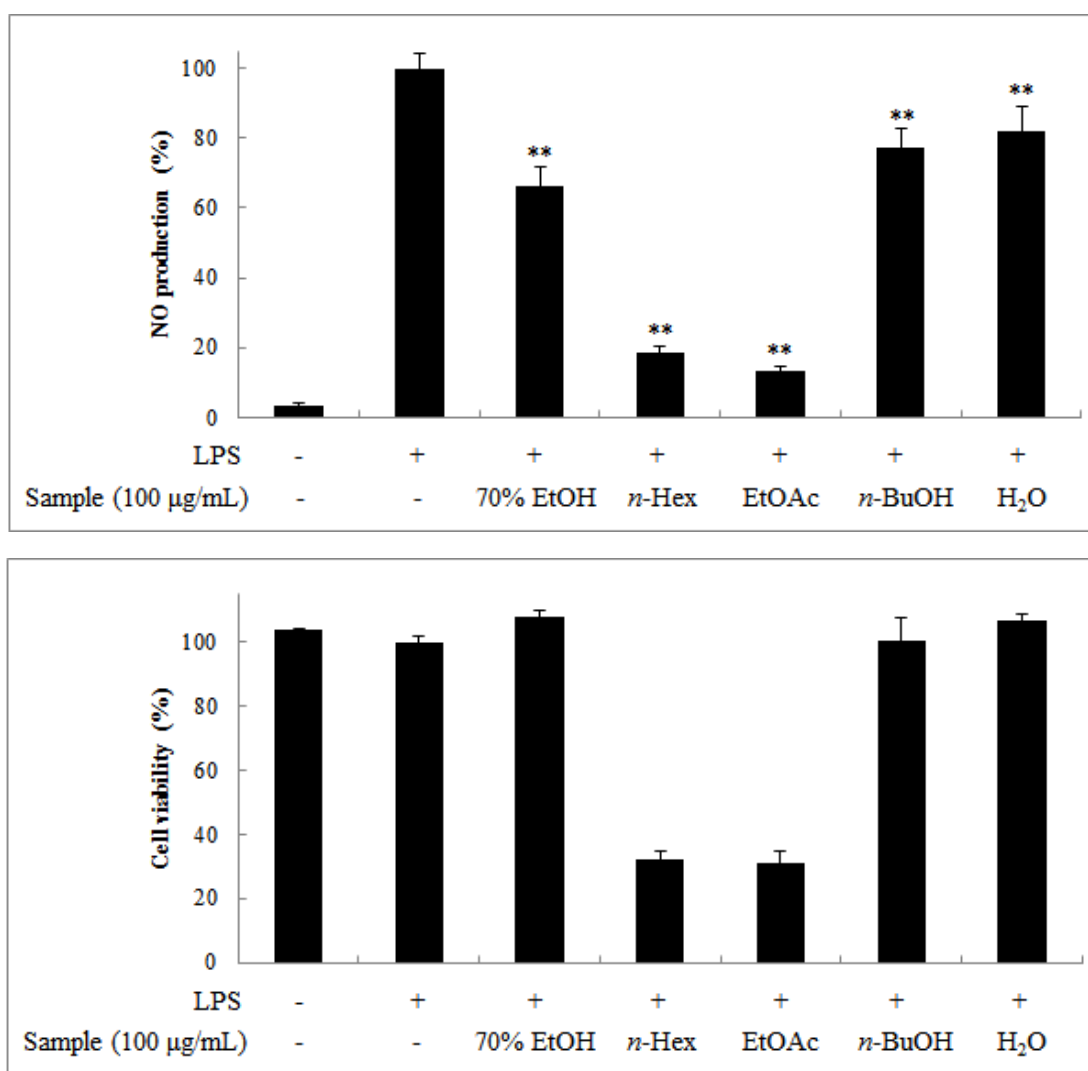


Figure 43. Effects of extract and solvent fractions from *R. weyrichii* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *R. weyrichii* extract and solvent fractions for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *R. weyrichii*. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

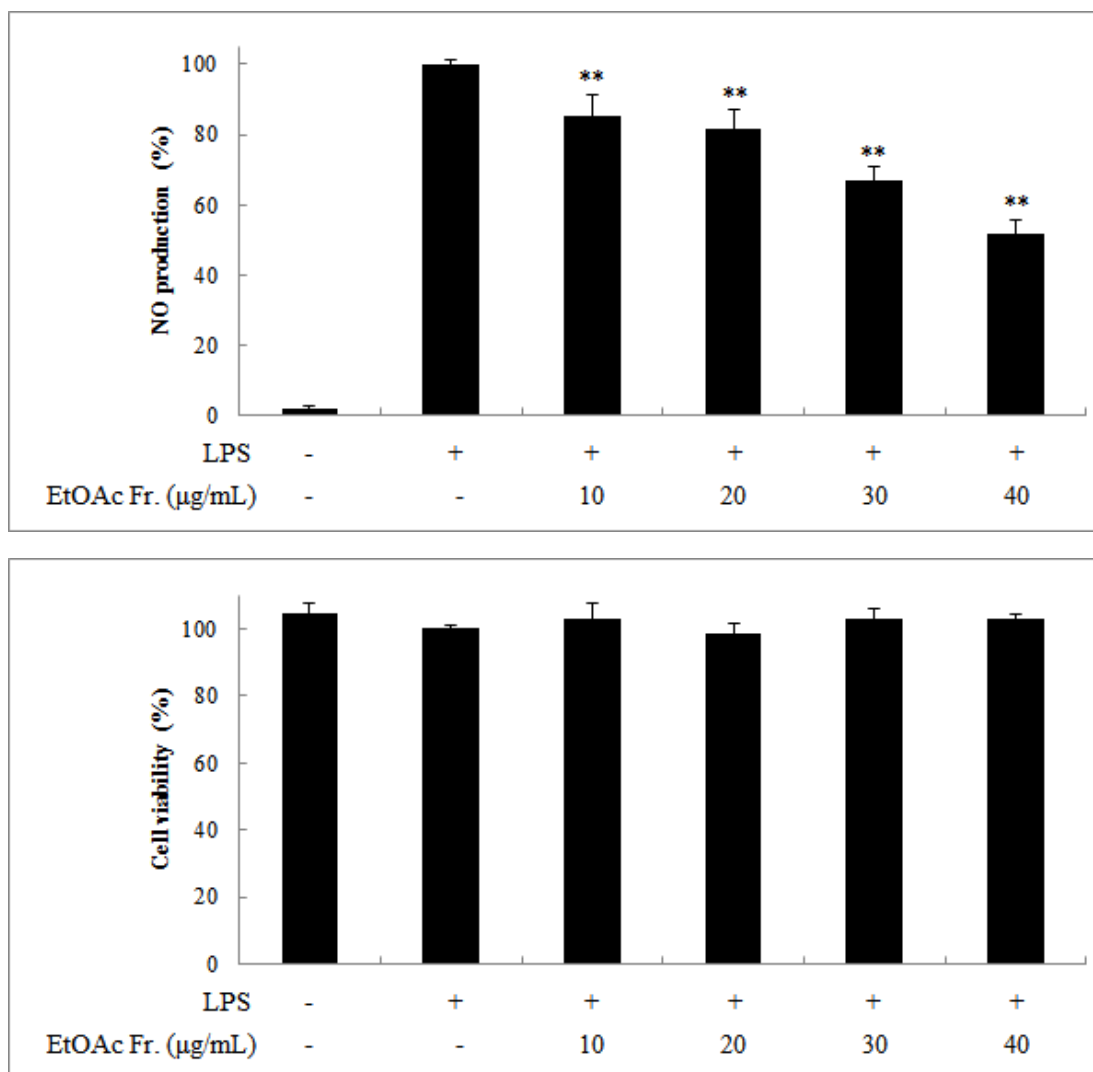


Figure 44. Effects of EtOAc fraction from *R. weyrichii* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of EtOAc fraction. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

2) 항균 활성

(1) Paper disc diffusion

참꽃나무 잎 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 참꽃나무 잎 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 있음을 확인하였다(Table 11).

Table 11. Anti-bacterial activities of *R. weyrichii* leaves

	Clear zone (mm)							
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>				
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089	
Extract	11	nd	9	10	nd	9	nd	
<i>n</i> -Hex	9	nd	nd	11	10	11	9	
EtOAc	12	11	9	12	11	12	10	
<i>n</i> -BuOH	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
H <sub>2</sub> O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Erythromycin	22	nd	31	50	nd	nd	30	

\* Sample : 100 µg/mL (20 µL)

\* Positive control : erythromycin (1 mg/mL, 20µL)

\* Disc size : 8 mm

\* nd : not detected



## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion을 통해 항균 활성이 확인되었으므로, 참꽃나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 추가적으로 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 하였다. 그 결과 70% 에탄올 추출물 및 EtOAc 분획물이 항균 활성이 있음을 확인하였다(Table 12).

Table 12. MIC and MBC values of *R. weyrichii* leaves

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000
<i>n</i> -Hex	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EtOAc	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	500	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000
<i>n</i> -BuOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
H <sub>2</sub> O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration : µg/mL

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항염 활성

참꽃나무 잎에서 분리된 화합물의 항염 활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell 을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 측정하였다. 실험 은 각 화합물에 대해 100, 50, 25  $\mu$ M의 농도로 진행하였으며, 그 결과 compound **2**와 **3**이 세포에 대한 독성이 없는 농도 내에서 NO 생성 억제 활성 이 있음을 확인 할 수 있었다(Figure 45).

NO 생성 억제 활성이 우수한 compound **3**의 경우는 문헌<sup>64</sup>을 통해 iNOS, COX-2 단백질의 발현 및 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등 전염증성 사이토카인 의 생성을 억제 시키는 기전으로 항염 활성이 있음이 보고되어 있으므로 추가적 인 기전 연구는 진행하지 않았다.

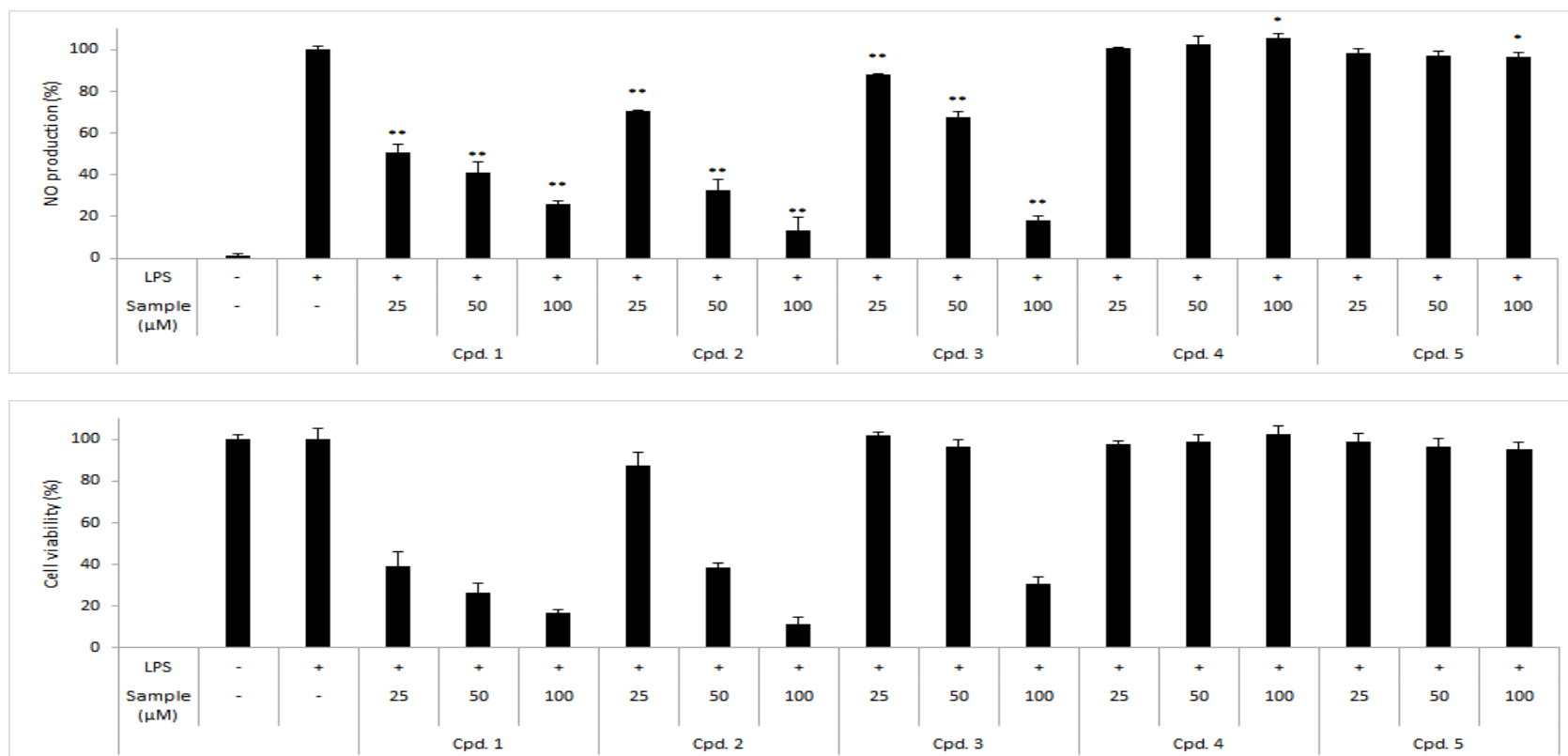


Figure 45. Effects of isolated compounds 1-5 from *R. weyrichii* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1-5 for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of isolated compounds 1-5. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 2) 항균 활성

참꽃나무 잎에서 분리된 화합물에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000  $\mu\text{M}$ 로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묶히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0  $\mu\text{M}$ 이 되도록 하였다. 그 결과 compound 3의 항균 활성이 우수함을 확인 하였다(Table 13).

Table 13. MIC and MBC values of isolated compounds **1-5** from *R. weyrichii* leaves

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>1</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000
<b>2</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	500	500	500	500	500	>1000	>1000
<b>3</b>	62.5	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	1000	1000
<b>4</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>5</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration :  $\mu\text{M}$

## 6. 결론 및 고찰

현재까지 참꽃나무에 대해서는 잎 추출물의 항염 활성 외에는 알려진 생리활성이 없으며, 활성 성분에 대한 연구 또한 보고되어 있지 않으므로 본 연구에서는 참꽃나무 잎 추출물 및 분획물의 다양한 피부 관련 활성을 검색하고, 참꽃나무 잎의 활성 성분을 확인하기 위해 추가적인 단일물질 분리 과정을 진행하여 화합물의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 피부 관련 활성을 확인하여 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

참꽃나무 잎 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다. 이들 중 ethyl acetate fraction에 대해 vacuum liquid chromatography (VLC), Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하고, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 분리, 동정하였다.

분리된 화합물은 ursolic acid (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3), astragaloside (4), isoquercetin (5)으로 확인되었다. 이들은 모두 참꽃나무에서 처음으로 분리된 화합물이다.

한편, 참꽃나무와 같은 진달래과에 속하며 *Rhododendron* 속 식물의 성분에 관한 연구로는 산철쭉(*R. yedoense* var. *poukhanense*)의 꽃으로부터 grayanotoxin I, III, IV 및 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihydroxylolean-12-ene, ursolic acid 등이 분리, 보고되어 있으며,<sup>65</sup> 진달래(*R. mucronulatum*)의 꽃으로부터 항산화 물질인 *p*-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 등 6종의 phenolic acid<sup>66</sup> 및 afzelin, ampelopsin, catechin, myricetin, myricitrin, quercetin, quercitrin 등 7종의 flavonoid가 분리, 보고되어 있다.<sup>67</sup> 또한 진달래의 뿌리 성분으로는 taxifolin, taxifolin 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, *epi*-catechin, procyanidin B-3 등 5종의 flavonoid가 분리, 보고되어 있으며, 이들 화합물은 항산화 및 항염 활성이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>68</sup>

본 연구를 통해, 참꽃나무 잎은 triterpenoid 및 flavonol 배당체가 주요 성분이었으며, 이는 진달래과 *Rhododendron* 속 식물의 주요 성분이 flavonoid 및 triterpenoid인 것과 비슷한 경향을 보인다. 그러나 이러한 성분들 중에서도 특히, 참꽃나무 잎은 ursane-type triterpenoid를 다량 함유하는 것으로 본 연구 결과 확인되었다.

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용한 참꽃나무 잎의 항염 활성 실험 결과, 70% EtOH 추출물이 100 µg/mL의 농도에서 33.6%의 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성을 보였으며, EtOAc 분획물은 40 µg/mL 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 활성이 있었다. 또한 참꽃나무 잎에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, compound 2와 3이 세포에 대한 독성이 없는 범위 내에서 NO의 생성을 억제시키는 활성을 보였다.

또한 참꽃나무 잎의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermids* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 한천확산법(paper disc diffusion method)을 통한 clear zone 및 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC), 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 확인하였다. 그 결과 참꽃나무 잎 70% EtOH 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 있었으며, 또한 분리된 화합물에 대한 MIC 및 MBC를 측정한 결과, compound 3의 항균 활성이 우수하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 참꽃나무 잎을 이용한 항염 및 항균 효과가 있는 천연 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.



## V. 연구 3 : 당근 지상부 추출물의 항염 및 항균 활성 성분 연구

### 1. 재료

실험에 사용된 유기농 당근(*Daucus carota* var. *sativa*) 지상부(시료번호 : 343)는 2014년 1월에 제주 서귀포시 표선면 소재 청초밭영농조합에서 채집하였다. 채집한 유기농 당근 지상부는 동결건조 후, 분쇄하여 사용하였다(Figure 46).



Figure 46. Pictures of *Daucus carota* var. *sativa* aerial parts.

당근은 미나리과(Apiaceae)의 식물이며, 아프가니스탄이 원산지이다. 유럽, 아시아, 북아프리카 등 전 세계에서 재배되고 있으며, 우리나라에는 16세기부터 재배하기 시작했다고 알려져 있다. 대부분 식용으로는 당근의 뿌리 부분을 먹지만, 연한 잎과 줄기는 셀러리와 미나리를 조합한 맛이 나므로 생식으로 먹거나 상추 등의 쌈과 곁들여 먹으면 좋다고 알려져 있다. 서양에서는 당근의 줄기와 잎도 함께 먹기 때문에 전체로 판매를 하지만, 우리나라에서는 당근의 줄기 부분을 사람들이 잘 먹지 않기 때문에 수확 후 대부분이 폐기된다.

당근의 효능은 여러 가지 널리 알려져 있지만, 대표적인 것 몇 가지를 들면 비타민A 보충, 면역력 증진, 간 보호 등이 있다. 또한 당근은 한방에서 이질, 백일해, 해수, 복부팽만, 홍역, 빈혈, 저혈압, 야맹증, 방광염에 효과가 있고 신장결석을 예방하기도 하며 구충제로도 사용한다.

현재까지 밝혀진 당근의 성분으로는 뿌리에  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -carotene, lycopene, phytofluene 등 다종의 carotenoid나 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, anthocyanidin, umbelliferone, 당, 지방유, 정유 등이 함유되어 있다고 보고되어 있다. 정유에는  $\alpha$ -pinene, camphene, myrcene,  $\alpha$ -phellandrene, bisabolene 등이 함유되어 있으며, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid 등도 함유되어 있다. 또한 당근의 잎에는 다종의 carotene, luteolin-7-glucoside 등이 함유되어 있으며, 종자에는 정유,  $\alpha$ -pinene, 1,8-cineol, geraniol, geraniol acetate, citronellol, citral, caryophyllene, carotol, daucol, *p*-cymene, asarone, bisabolene, flavonoid, 지방유 등이 함유되어 있다고 보고되어 있다.<sup>69</sup>

그러나 아직까지 당근의 지상부인 줄기나 잎에 대한 생리활성 및 성분 연구는 많이 진행되지 않았으며, 또한 수확 후 폐기되는 부분을 화장품 원료 등의 자원으로 활용이 가능한지 알아보려고 본 연구를 진행하게 되었다.

## 2. 당근 지상부의 추출, 분획 및 분리

### 1) 당근 지상부의 추출 및 용매 분획

동결건조 및 분쇄 된 당근 지상부 2.5 kg을 70% 에탄올 17 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 이하의 수욕상에서 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 812.2 g을 얻었다.

추출물 15-20 g을 증류수 1 L에 현탁 시키고, 분별 깔대기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었으며, 이와 같은 방법을 반복 실시하여, 추출물 총 173 g을 용매 분획 하였다(Figure 47).

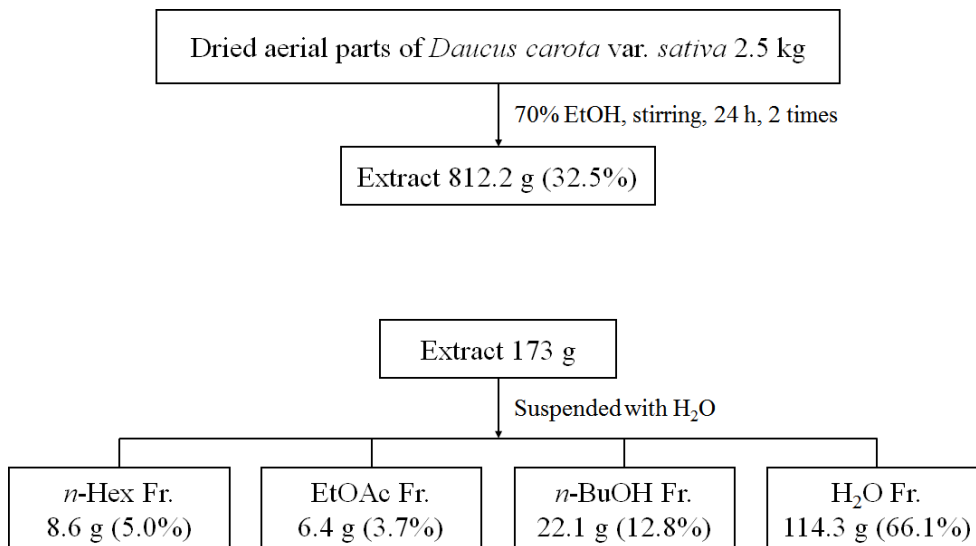


Figure 47. Extraction and solvent fractionation of *D. carota* var. *sativa* aerial parts.

## 2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 6.0 g을 분획하기 위하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. *n*-Hex-EtOAc (0~100%), EtOAc-MeOH (0~50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 30개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-30).

Fr. V12 (107.9 mg)는 메탄올을 사용해 재결정을 하여 compound 1 (8.4 mg)을 얻었다.

Fr. V25 (847.4 mg) 또한 메탄올을 사용해 재결정을 하여 compound 3 (304.7 mg)을 얻었다.

그리고 Fr. V26 (630.4 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=4:1)을 수행하여 compound 2 (40.2 mg)를 분리하였다(Figure 48).

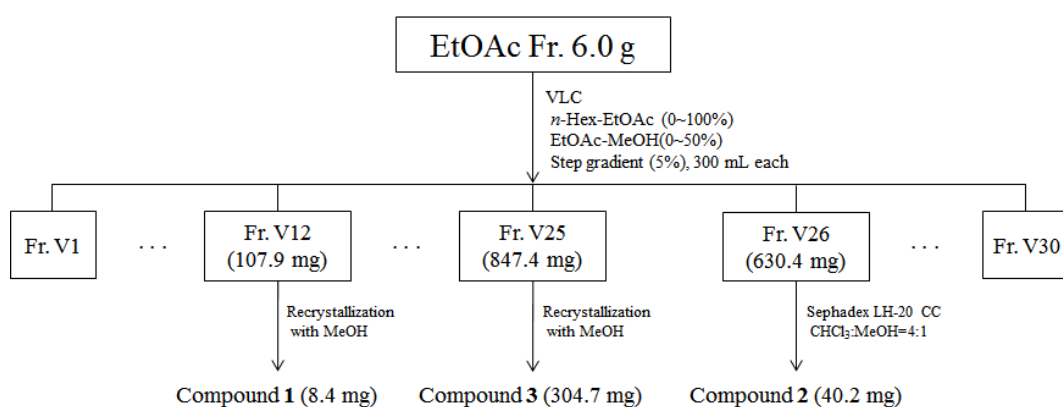


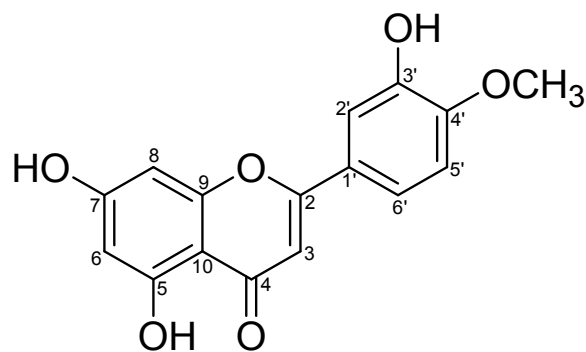
Figure 48. Isolation of compounds from *D. carota* var. *sativa* aerial parts.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

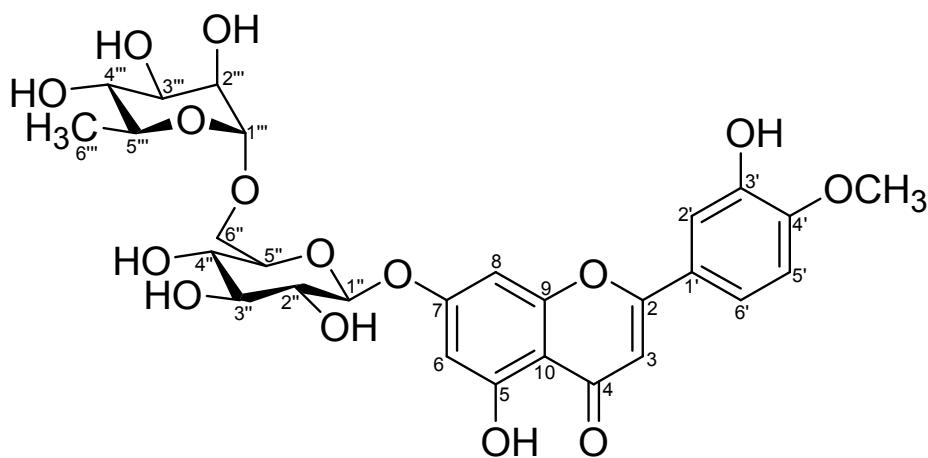
#### 1) Compound 1, 2의 구조 동정

Compound 1은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 16개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  56.6 및  $\delta_{\text{H}}$  3.84 (3H, s)의 피크를 통해 methoxy group이 분자 내에 존재하며, compound 1은 flavonoid 골격에 1개의 methoxy group이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.29 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.62 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz) 및 7.66 (1H, dd,  $J = 2.2, 8.5$  Hz)의 피크로 보아, flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton이 있으며,  $\delta_{\text{H}}$  6.77 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.87 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)의 피크로 보아 A ring에는 서로 *meta*-coupling을 하는 aromatic proton이 있음을 예상할 수 있다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  6.98 (1H, s)의 피크는  $\text{sp}^2$  혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton이며 singlet으로 나온 것으로 보아, flavonoid 골격의 3번 위치의 proton임을 예상 할 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌<sup>70</sup>을 통해 compound 1은 diosmetin (luteolin 4'-methyl ether)으로 확인 되었다(Figure 49-51, Table 14).

Compound 2는  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  3.49-4.05의 overlap 되어 있는 여러 개의 proton 피크와  $\delta_{\text{H}}$  4.72 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  5.00 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz)에 해당하는 당의 anomeric proton, 그리고  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 flavonoid와 methoxy group 외에 12개의 carbon 피크가 더 관찰되는 것으로 보아, compound 1 골격에 두 개의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상 하였다.  $\delta_{\text{H}}$  1.19 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz)와  $\delta_{\text{H}}$  4.72 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz) 피크의 coupling constant 및 적분값을 통해  $\alpha$ -form의 rhamnopyranoside를 예상하였고,  $\delta_{\text{H}}$  5.00 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해  $\beta$ -form의 glucopyranoside가 결합되어 있는 구조인 것을 예상 할 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌<sup>71</sup>을 통하여 compound 2는 diosmin (diosmetin 7-*O*-rutinoside)으로 확인 되었다(Figure 49, 52, 53, Table 14).



Compound 1



Compound 2

Figure 49. Chemical structures of compound 1 and 2.

Talbe 14. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound **1** and **2** (500 and 125 MHz)

No.	Compound <b>1</b> (pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> )		Compound <b>2</b> (CD <sub>3</sub> OD+ CDCl <sub>3</sub> )	
	δ <sub>H</sub> (int, mult, <i>J</i> Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (int, mult, <i>J</i> Hz)	δ <sub>C</sub>
2		166.4		164.3
3	6.98 (1H, s)	104.7	6.61 (1H, s)	104.4
4		183.2		183.8
5		163.7		162.7
6	6.77 (1H, d, 2.0)	100.5	6.51 (1H, d, 2.5)	100.9
7		165.0		166.4
8	6.87 (1H, d, 2.0)	95.4	6.71 (1H, d, 2.5)	96.3
9		159.1		158.5
10		105.6		107.0
1'		123.1		123.2
2'	7.62 (1H, d, 2.2)	110.8	7.41 (1H, d, 2.0)	116.7
3'		149.5		149.1
4'		152.9		151.9
5'	7.29 (1H, d, 8.5)	117.4	6.95 (1H, d, 8.5)	110.4
6'	7.66 (1H, dd, 2.2, 8.5)	121.8	7.49 (1H, dd, 2.0, 8.5)	121.8
OCH <sub>3</sub>	3.84 (3H, s)	56.5	3.96 (3H, s)	56.7
1''			5.00 (1H, d, 7.5)	101.3
2''			3.49-4.05	74.3
3''			3.49-4.05	77.5
4''			3.49-4.05	70.9
5''			3.49-4.05	76.9
6''			3.49-4.05	67.2
1'''			4.72 (1H, d, 1.5)	101.7
2'''			3.49-4.05	71.7
3'''			3.49-4.05	72.1
4'''			3.49-4.05	73.8
5'''			3.49-4.05	69.4
6'''			1.19 (3H, d, 6.0)	18.8

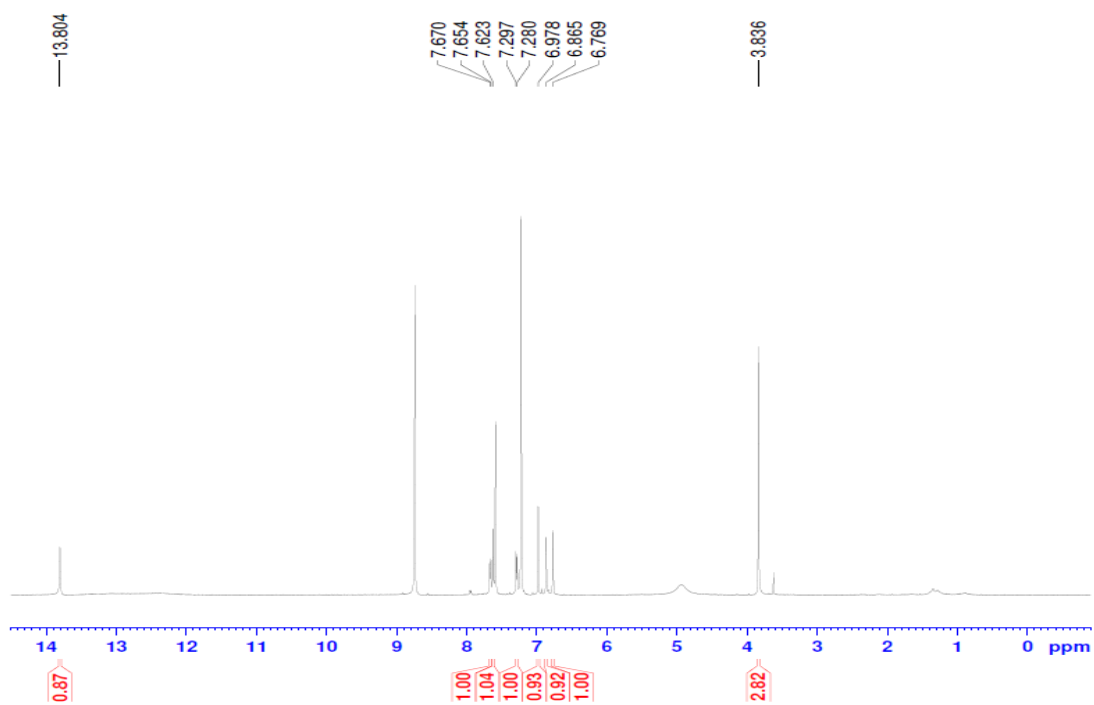


Figure 50.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **1** (pyridine- $d_5$ ).

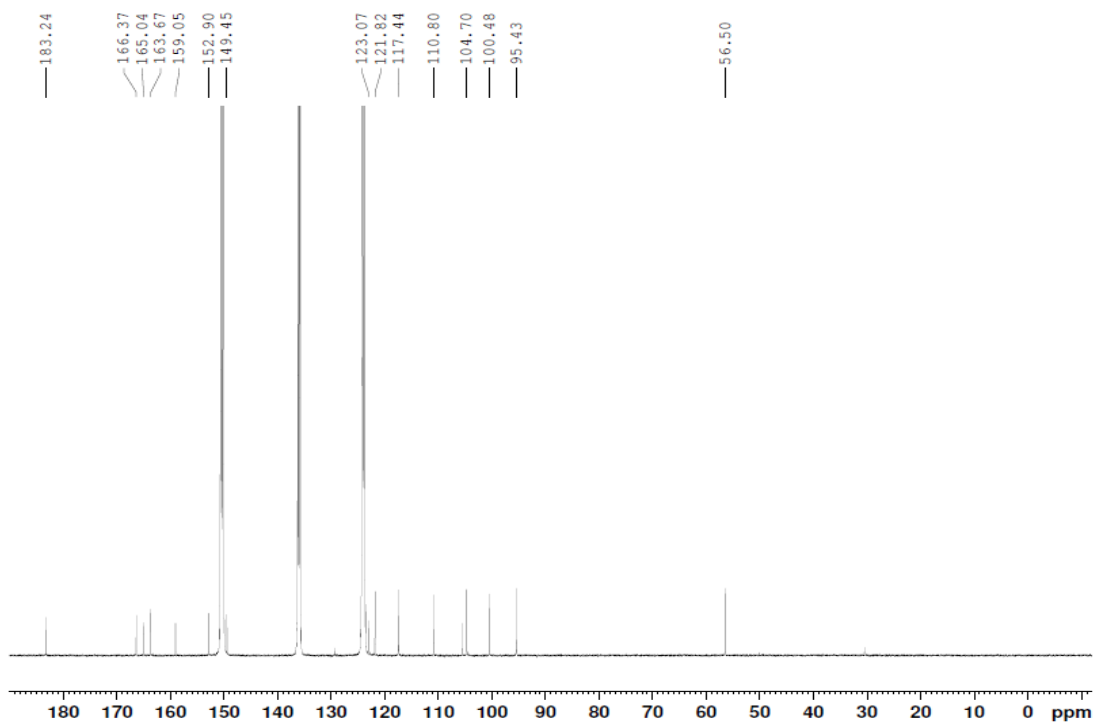


Figure 51.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **1** (pyridine- $d_5$ ).



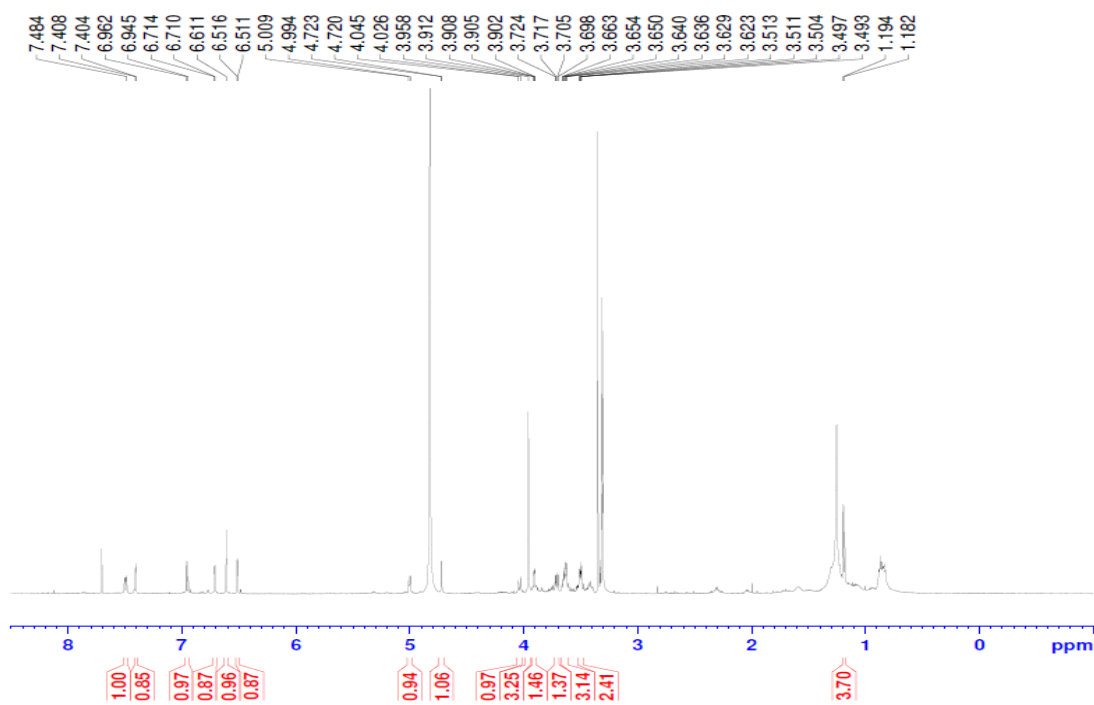


Figure 52.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2** ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$ ).

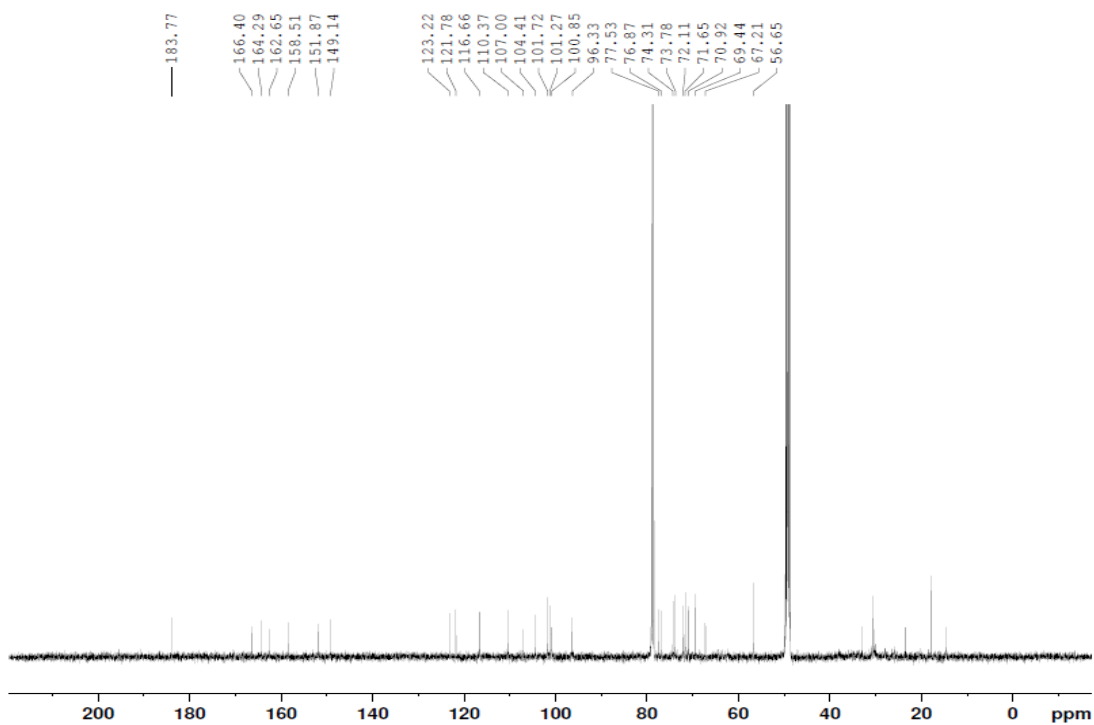


Figure 53.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2** ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$ ).

## 2) Compound 3의 구조 동정

Compound 3은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서 21개의 carbon 피크가 관찰되는 것으로 보아, flavonoid에 6탄당이 결합되어 있는 골격으로 예상하였다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.28 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.53 (1H, d,  $J = 2.0, 8.5$  Hz), 7.92 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)의 피크로 보아, flavonoid B ring에 서로 *meta*- 및 *ortho*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton이 있음을 예상 할 수 있으며,  $\delta_{\text{H}}$  6.87 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz) 및 7.02 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz)의 피크를 통해 A ring에는 서로 *meta*-coupling을 하는 2개의 aromatic proton이 있는 구조를 예상 할 수 있다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  183.3 피크를 통해 1개의 carbonyl group이 분자 내에 존재함을 알 수 있으며, 당의 anomeric proton인  $\delta_{\text{H}}$  5.86 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz) 피크의 coupling constant 값과  $\delta_{\text{C}}$  62.8-79.7의 5개의 피크 및 anomeric carbon인  $\delta_{\text{C}}$  101.1의 피크를 종합하여 보면, 결합되어 있는 당은  $\beta$ -form의 glucopyranoside임을 예상할 수 있다. 이를 바탕으로 문헌<sup>72</sup>을 통해 compound 3은 cynaroside (luteolin 7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside)임을 확인 하였다(Figure 54-56, Table 15).

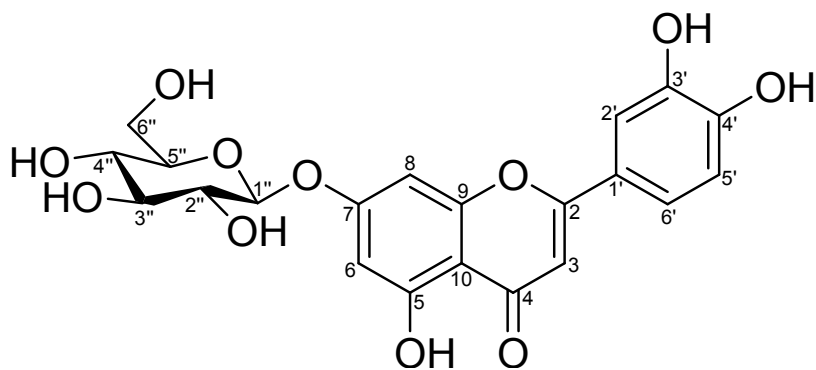


Figure 54. Chemical structure of compound 3.

Talbe 15.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **3** (500 and 125 MHz, pyridine- $d_5$ )

No.	Compound <b>3</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		165.7
3	6.97 (1H, s)	104.6
4		183.3
5		163.0
6	6.87 (1H, d, 2.0)	102.2
7		164.4
8	7.02 (1H, d, 2.0)	95.7
9		158.3
10		107.0
1'		123.1
2'	7.92 (1H, d, 2.0)	115.2
3'		148.3
4'		152.4
5'	7.28 (1H, d, 8.5)	117.3
6'	7.53 (1H, dd, 2.0, 8.5)	120.1
1''	5.86 (1H, d, 8.0)	101.1
2''		79.7
3''		75.3
4''		71.5
5''		79.0
6''		62.8

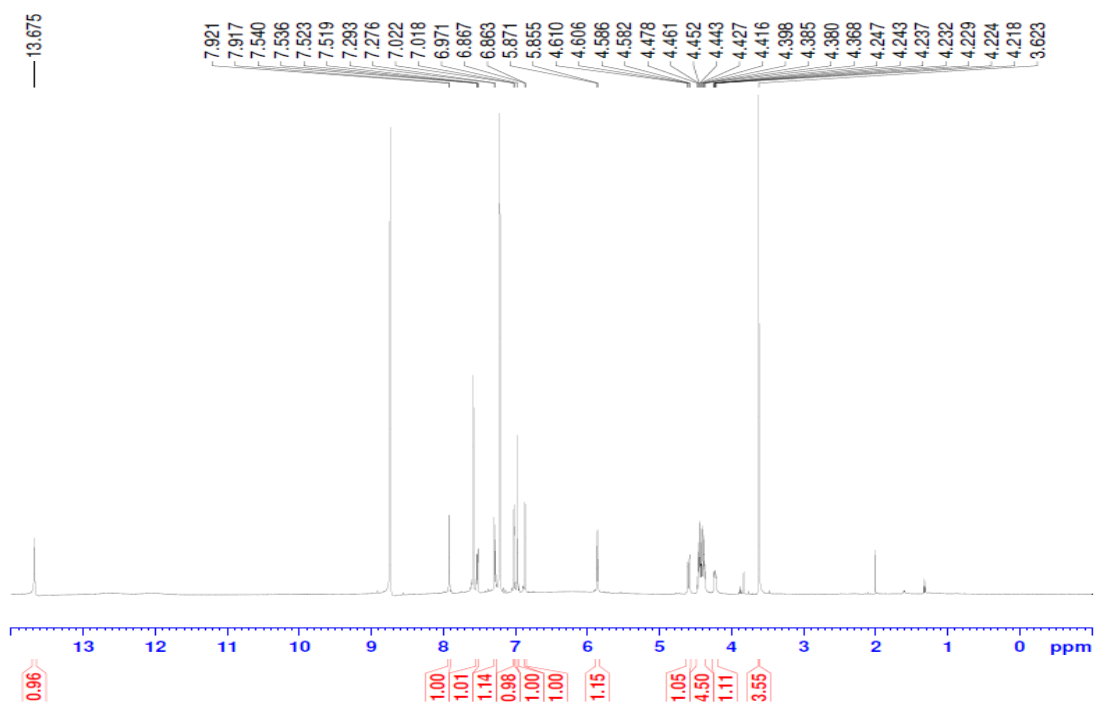


Figure 55.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **3** (pyridine- $d_5$ ).

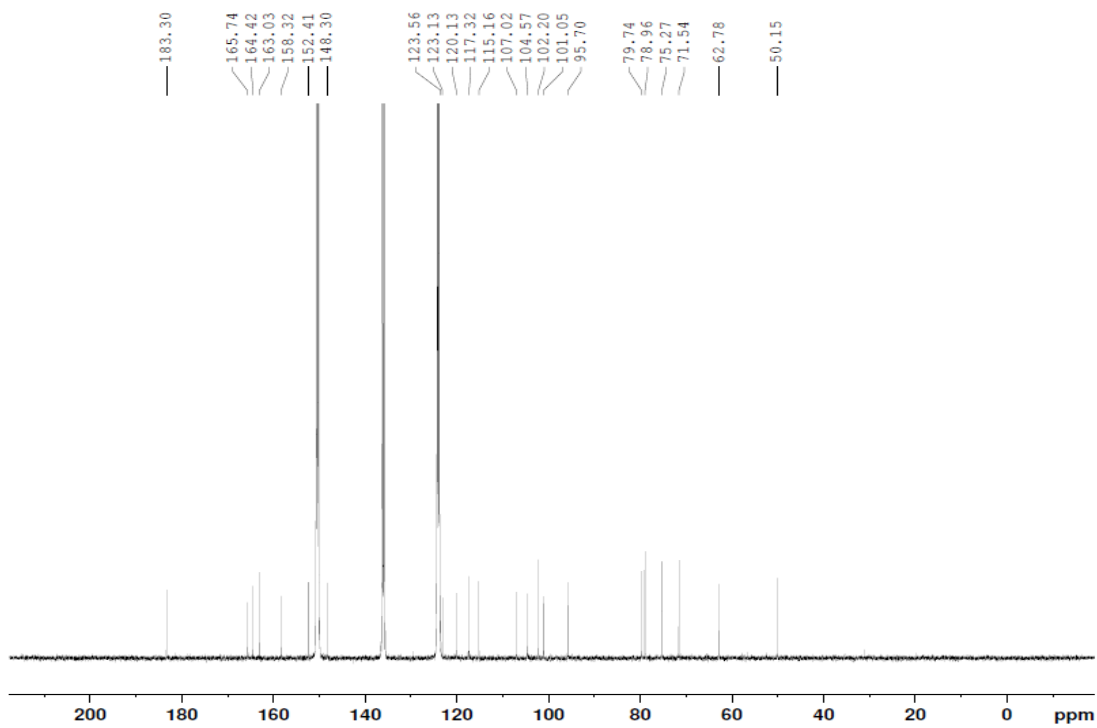


Figure 56.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **3** (pyridine- $d_5$ ).

#### 4. 당근 지상부 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항염 활성

당근 지상부 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위하여 RAW 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인 하였다. 우선 70% EtOH 추출물 및 각 분획물들을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행 하였으며, 그 결과 당근 지상부 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 NO 생성이 줄어들었으나, 이들은 100 µg/mL의 농도에서 세포에 대한 독성이 있었다(Figure 57).

따라서 독성이 없는 범위 내에서 NO 생성 억제 활성을 다시 확인하기 위하여 추가적으로 EtOAc 분획물에 대해 50, 25, 12.5, 6.25 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과 당근 지상부 EtOAc 분획물은 50 µg/mL 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제함을 확인 할 수 있었다(Figure 58).

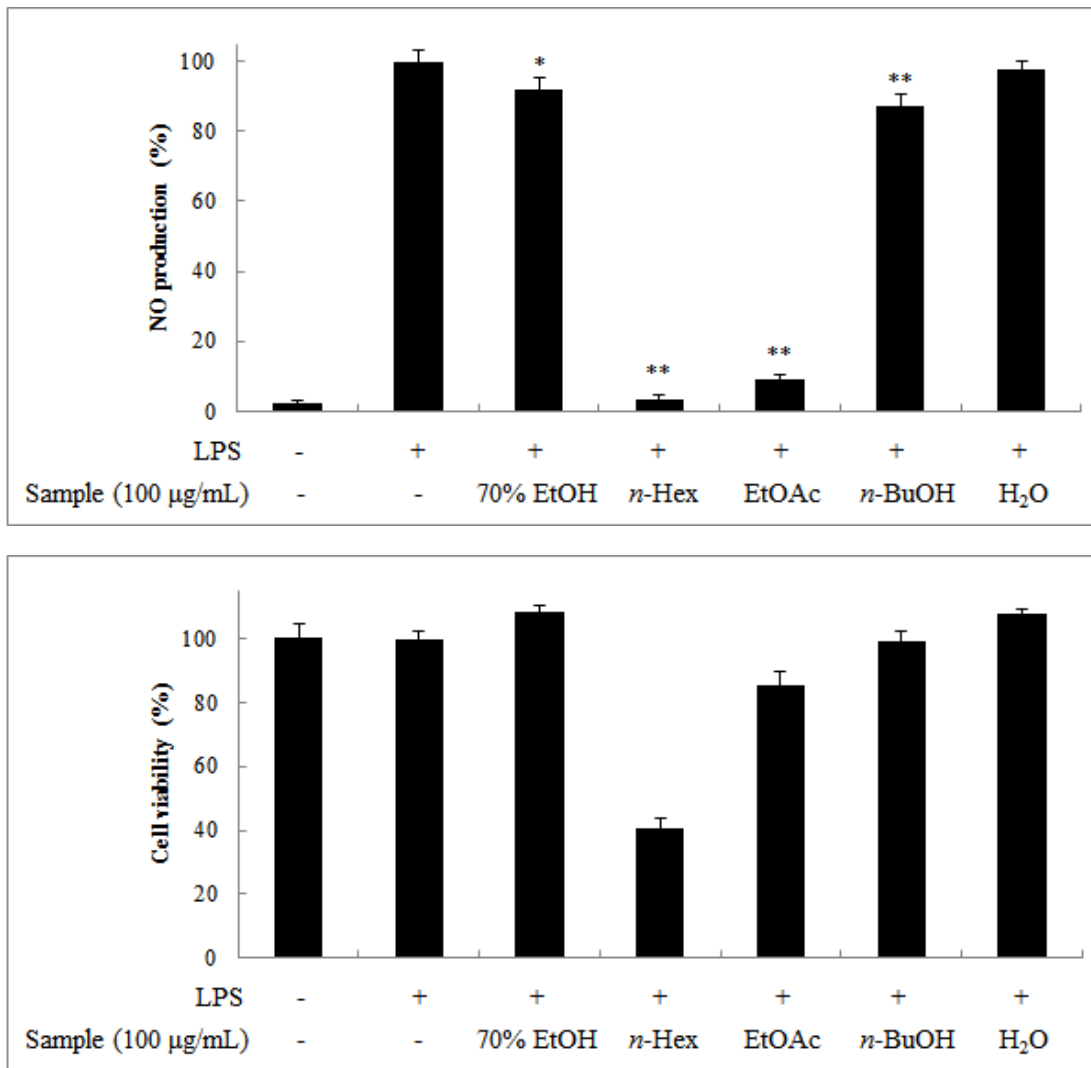


Figure 57. Effects of extract and solvent fractions from *D. carota* var. *sativa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *D. carota* var. *sativa* extract and solvent fractions for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *D. carota* var. *sativa*. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

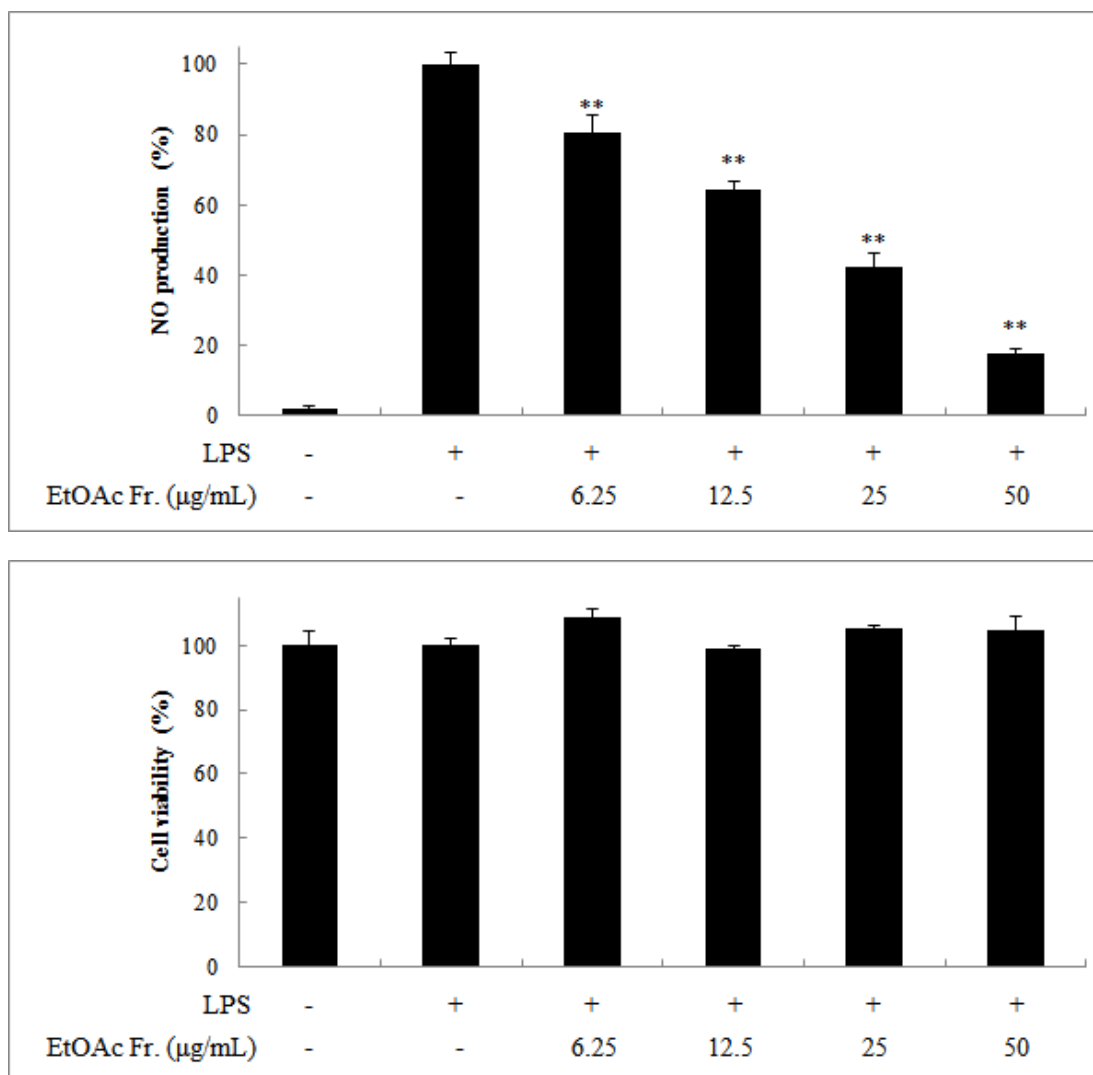


Figure 58. Effects of EtOAc fraction from *D. carota* var. *sativa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of EtOAc fraction. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 2) 항균 활성

### (1) Paper disc diffusion

당근 지상부 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 당근 지상부 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc 분획물에서 항균 활성이 있음을 확인하였다(Table 16).

Table 16. Anti-bacterial activities of *D. carota* var. *sativa* aerial parts

	Clear zone (mm)							
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>				
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089	
Extract	10	nd	nd	10	9	9	9	
<i>n</i> -Hex	16	10	11	17	14	16	11	
EtOAc	14	9	10	17	16	18	10	
<i>n</i> -BuOH	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
H <sub>2</sub> O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Erythromycin	22	nd	31	50	nd	nd	30	

\* Sample : 100 µg/mL (20 µL)

\* Positive control : erythromycin (1 mg/mL, 20 µL)

\* Disc size : 8 mm

\* nd : not detected



## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion을 통해 항균 활성이 확인 되었으므로, 당근 지상부 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 추가적으로 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000 µg/mL로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0 µg/mL가 되도록 하였다. 그 결과 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 *S. epidermidis* (CCARM 3709)와 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 균주에 대해 활성이 우수함을 확인 하였다(Table 17).

Table 17. MIC and MBC values of *D. carota* var. *sativa* aerial parts

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000
<i>n</i> -Hex	125	500	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000	500	1000	500	>1000
EtOAc	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	125	125	250	500	125	250	250	1000
<i>n</i> -BuOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
H <sub>2</sub> O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration : µg/mL

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항염 활성

당근 지상부에서 분리된 화합물의 항염 활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell 을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 측정하였다. 실험 은 각 화합물에 대해 200, 100, 50, 25  $\mu$ M의 농도로 진행하였으며, 그 결과 compound 1-3 모두 세포에 대한 독성 없이 NO 생성 억제 활성이 우수함을 확인하였다(Figure 59).

분리된 compound 1-3 모두 문헌을 통해 항염 활성이 보고되어 있으므로 추가 적인 기전 연구는 진행하지 않았다.<sup>73-75</sup>

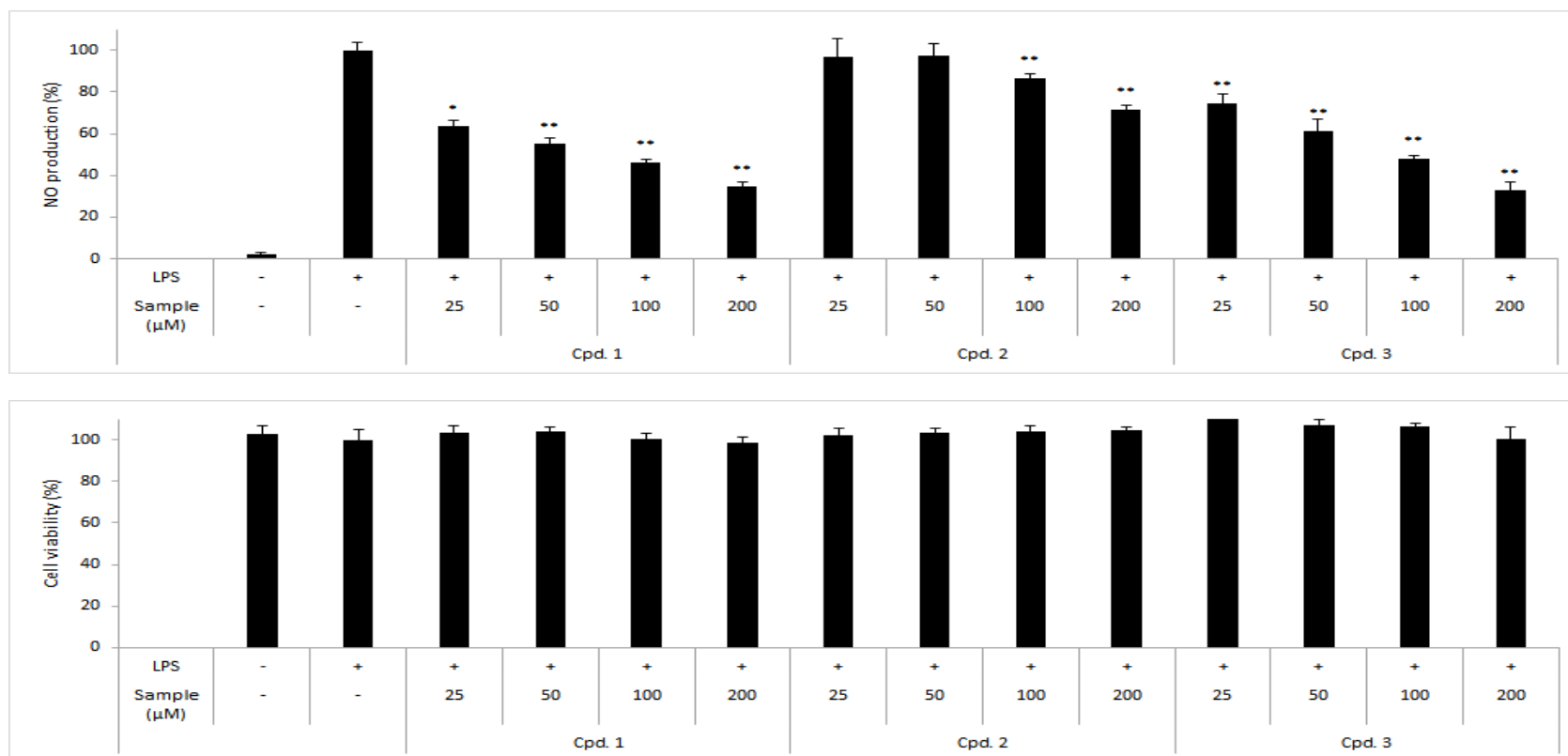


Figure 59. Effects of isolated compounds 1-3 from *D. carota* var. *sativa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1-3 for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of isolated compounds 1-3. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 2) 항균 활성

당근 지상부에서 분리된 화합물에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000  $\mu\text{M}$ 로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묶히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0  $\mu\text{M}$ 이 되도록 하였다. 그 결과 compound **3**이 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 균주에 대해 항균 활성이 우수함을 확인 하였다 (Table 18).

Table 18. MIC and MBC values of isolated compounds **1-3** from *D. carota* var. *sativa* aerial parts

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>1</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>2</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>3</b>	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	500	500	250	250	500	1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration :  $\mu\text{M}$

## 6. 결론 및 고찰

본 연구에서는 당근 지상부 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 다양한 피부 관련 활성을 검색하고, 활성 성분을 확인하기 위해 추가적인 단일물질 분리 과정을 진행하여 화합물의 구조를 확인하였다. 또한 분리된 화합물의 피부 관련 활성을 확인하여 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

당근 지상부 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다. 이들 중 ethyl acetate fraction에 대해 vacuum liquid chromatography (VLC), Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하고, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 3개의 화합물을 분리, 동정하였다. 분리된 화합물은 diosmetin (1), diosmin (2), cynaroside (3)로 확인되었다. 분리된 화합물 중 cynaroside (3)는 이미 당근에서 분리, 보고된 적이 있는 화합물로, 본 연구를 통해 당근 지상부에도 다량 함유된 주성분인 것으로 확인되었다.

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용한 당근 지상부의 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 50 µg/mL 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 활성이 있었다. 그리고 당근 지상부에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, compound 1-3 모두 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하는 활성이 있었다. 분리된 화합물 중 diosmin (2)은 치질, 혈관치료제 등으로 사용되고 있는 전문 의약품 성분이고, diosmetin (compound 1)은 NO 및 TNF-α의 생성 및 iNOS 단백질의 발현을 억제시키는 기전으로 항염 효과가 있으며,<sup>73</sup> cynaroside (3)는 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성 및 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 억제시키는 기전으로 항염 효과가 있음이 보고되어 있다.<sup>75</sup>

또한 당근 지상부의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 한천확산법(paper disc diffusion method)을 통한 clear zone 및 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC), 최소사

멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 확인하였다. 그 결과 당근 지상부 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 항균 활성이 있었으며, 특히 EtOAc 분획물이 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)에 대한 항균 활성이 우수함을 확인하였다. 또한 분리된 화합물에 대한 MIC 및 MBC를 측정한 결과, compound **3**이 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)에 대한 항균 활성이 우수하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 당근 지상부 추출물을 이용한 항염 및 항균 효과를 갖는 천연 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.



## VI. 연구 4 : 구멍갈파래 추출물의 항염, 항균 및 미백 활성 성분 연구

### 1. 재료

실험에 사용된 구멍갈파래(*Ulva pertusa*, 시료번호 : 462)는 2012년 9월에 제주도 구좌읍 하도리에서 채집하였다. 채집한 구멍갈파래는 실온 및 음지에서 자연 건조 하였으며, 분쇄하여 사용하였다(Figure 60).



Figure 60. Picture of *Ulva pertusa*.

구멍갈파래는 갈파래과(Ulvaceae)에 속하는 녹조류로, 북태평양 서안과 인도양에 분포하며, 제주 연안에도 많이 서식하고 있다. 제주도에 구멍갈파래가 급격히 늘어나기 시작한 건 2000년대 초부터이며, 서귀포시 성산읍 신양리, 오조리를 비롯해 제주시 구좌읍 하도리 등 조류 소통이 원활하지 않은 제주 동부지역 해안을 중심으로 매년 발생하면서 해안 경관을 해치고 있다. 수온 상승이 원인으로 추정되지만 정확한 발생 원인은 밝혀지지 않은 가운데 구멍갈파래 제거에만 매년 막대한 예산이 지출되고 있어, 제주 해안의 불청객 또는 골치 덩어리라는 오명을 뒤집어쓰고 있다.

갈파래의 주요 특성의 하나는 육상 식물과 달리 황산기를 포함하는 다당을 다량 함유하고 있으며, 이 산성 다당은 항종양, 항바이러스, 면역증강 및 혈액 항응고 작용 등 다양한 기능을 하는 것으로 보고되고 있다.<sup>76-78</sup>

구멍갈파래의 피부 관련 활성 연구로는 구멍갈파래에서 수용성 고분자를 추출한 후 산가수분해하여 D-glucuronic acid를 주성분으로 함유하는 가수분해 구멍갈파래 추출물의 주름개선 활성 등 항노화 소재에 대한 연구가 보고되어 있다.<sup>79</sup>

또한 구멍갈파래의 성분에 대한 연구로는 *cis-*, *trans-*,  $\gamma$ -asarone, *trans*-phytol, phytyl-stearate, phytyl-acetate, isophytol 및 4-hydroxybenzoic acid ethyl ester, vanillin 등의 페놀성 화합물, palmitic acid 등의 지방산, sterol, 아미노산 등이 보고되어 있다.<sup>80-82</sup>

그러나 이 외에는 구멍갈파래의 생리활성 연구 및 성분 연구가 많이 보고되지 않았으며, 매년 제주 해안의 경관을 해치고 환경 문제로 대두되는 구멍갈파래를 화장품 소재 등의 자원으로서의 활용이 가능한지 알아보하고자 본 연구를 진행하였다.

## 2. 구멍갈파래의 추출, 분획 및 분리

### 1) 구멍갈파래의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄 된 구멍갈파래 100 kg을 80% 에탄올에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 여액은 40℃ 이하의 수욕상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 80% 에탄올 추출물 5 kg을 얻었다.

추출물 50 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었으며, 이와 같은 방법으로 3 회 더 반복 실시하여, 추출물 총 200 g을 용매 분획 하였다(Figure 61).

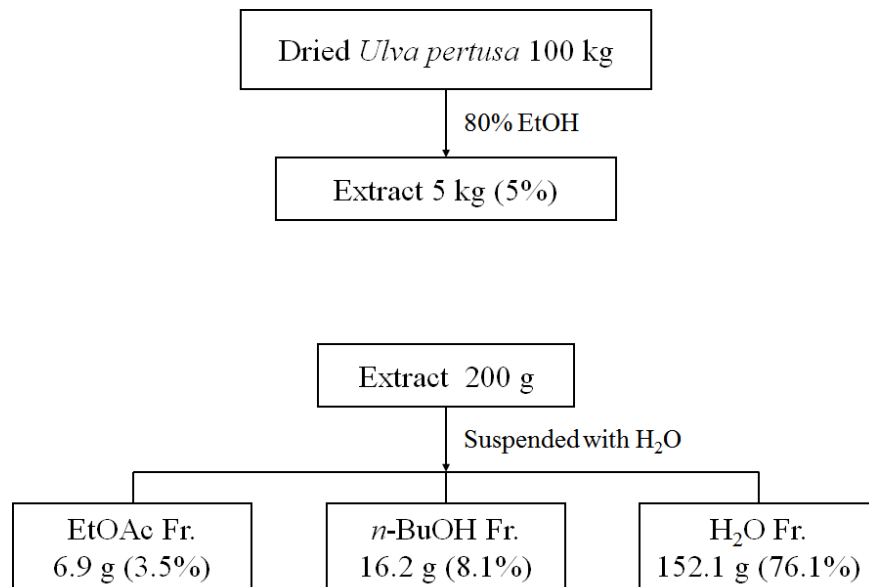


Figure 61. Extraction and solvent fractionation of *U. pertusa*.

## 2) Ethyl acetate fraction의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate fraction 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 분획하기 위하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. 컬럼은 역상 실리카겔(KP-C18-HS, 40+ M, Biotage Co.)을 사용하였으며, H<sub>2</sub>O-MeOH (10~100%)의 gradient 조건으로 용출하여 44개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1~49).

MPLC fraction 중 Fr. MP9-12 (157.3 mg)는 silica gel 컬럼 (*n*-Hex:EtOAc=1:2)을 수행하여 compound **1** (8.6 mg), compound **2** (24.8 mg) 및 compound **3** (21.4 mg)을 얻었다.

또한 Fr. MP14, 15 (129.1 mg)는 단일 화합물로 compound **1**으로 확인되었다.

Fr. MP17-20 (265.3 mg)은 silica gel 컬럼(*n*-Hex:EtOAc=1:1)을 수행하여 compound **4** (21.0 mg)를 얻었다.

그리고 Fr. MP23 (119.6 mg)을 silica gel 컬럼(*n*-Hex:EtOAc=1.5:1)을 수행하여 compound **5** (24.5 mg)를 분리하였다(Figure 62).

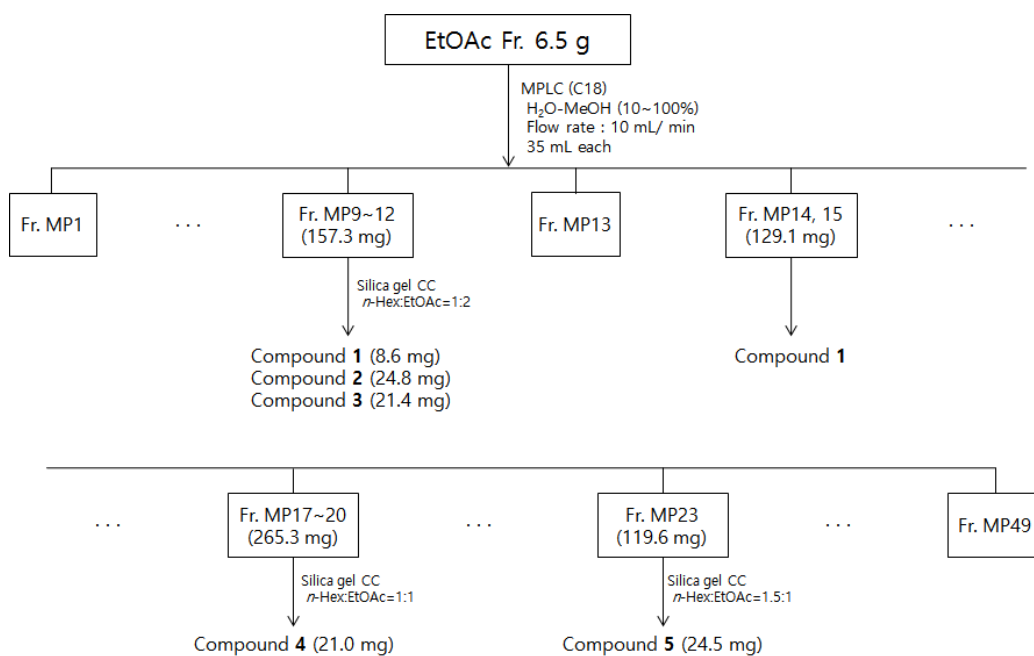


Figure 62. Isolation of compounds from *U. pertusa*.

### 3. 분리된 화합물의 구조 분석

#### 1) Compound 1, 2의 구조 동정

Compound 1은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  172.3의 carbonyl group과  $\delta_{\text{C}}$  113.0, 182.9의  $\text{sp}^2$  혼성을 갖는 vinyl carbon 및  $\delta_{\text{C}}$  26.7, 27.2, 30.9에 해당하는 3개의 methyl group이 관찰된다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  66.9 및 87.1의 두 개의 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소가 인접해 있는  $\text{sp}^3$  혼성 carbon이 분자 내 존재함을 예상 할 수 있다. 이들을 바탕으로 문헌<sup>83</sup>을 통해, compound 1은 loliolide로 확인 되었다(Figure 63-65, Table 19).

Compound 2는  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 분석 결과, compound 1의 입체 이성질체인 *epi*-loliolide로 문헌<sup>83</sup>을 통해 확인하였다(Figure 63, 66, 67, Table 19).

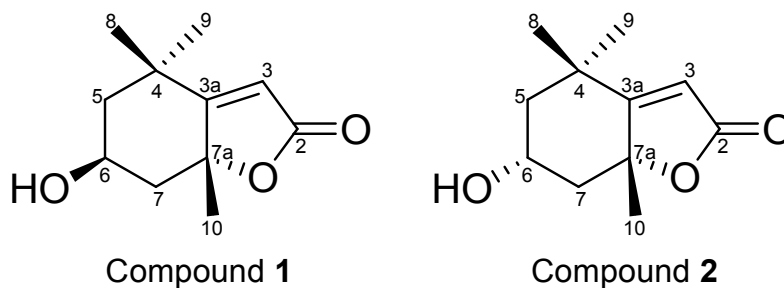


Figure 63. Chemical structures of compound 1 and 2.

Talbe 19. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound **1** and **2** (500 and 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

No.	Compound <b>1</b>		Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		172.3		171.9
3	5.66 (1H, s)	113.0	5.68 (1H, s)	113.3
4	4.29 (1H, m)	36.2	4.11 (1H, m)	35.3
5	1.96 (1H, dt, 14.5, 2.5) 1.49 (1H, dd, 14.5, 4.0)	47.4	2.01 (1H, m) 1.47 (1H, m)	49.9
6	4.29 (1H, m)	66.9		65.1
7	2.44 (1H, dt, 14.0, 2.5) 1.72 (1H, d, 4.0)	45.8	2.50 (1H, m) 1.30 (1H, m)	48.0
8	1.75 (3H, s)	30.9	1.55 (3H, s)	30.1
9	1.23 (3H, s)	26.7	1.23 (3H, s)	25.2
10	1.44 (3H, s)	27.2	1.28 (3H, s)	25.7
3a		182.9		181.2
7a		87.1		86.8

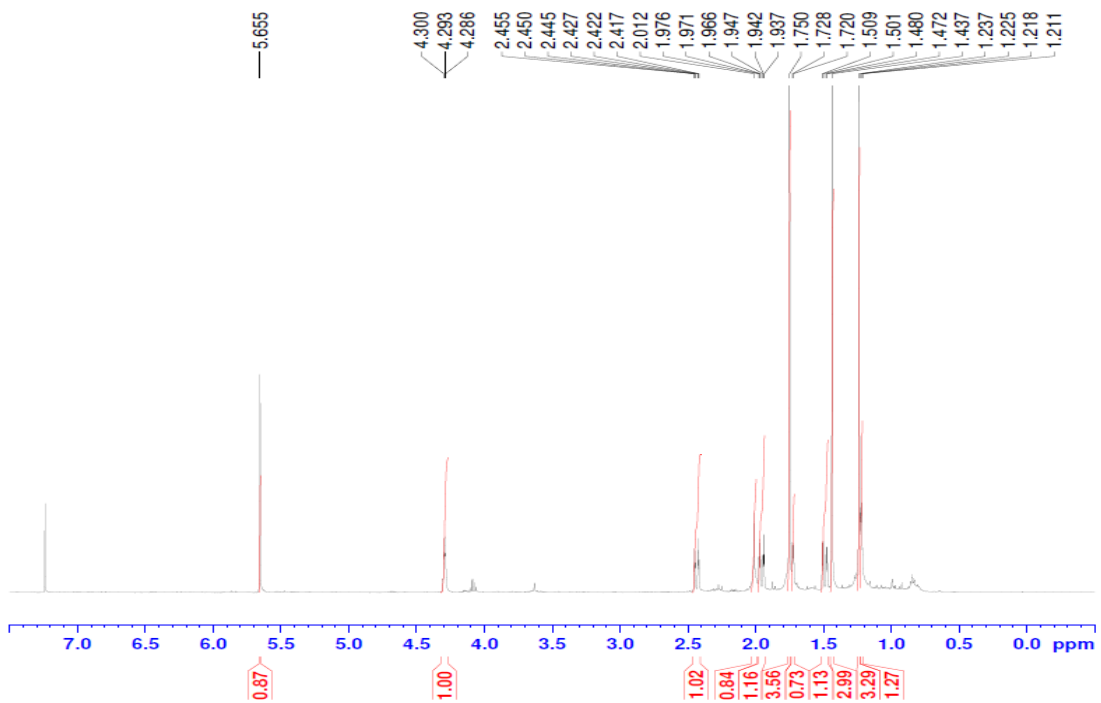


Figure 64.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **1** ( $\text{CDCl}_3$ ).

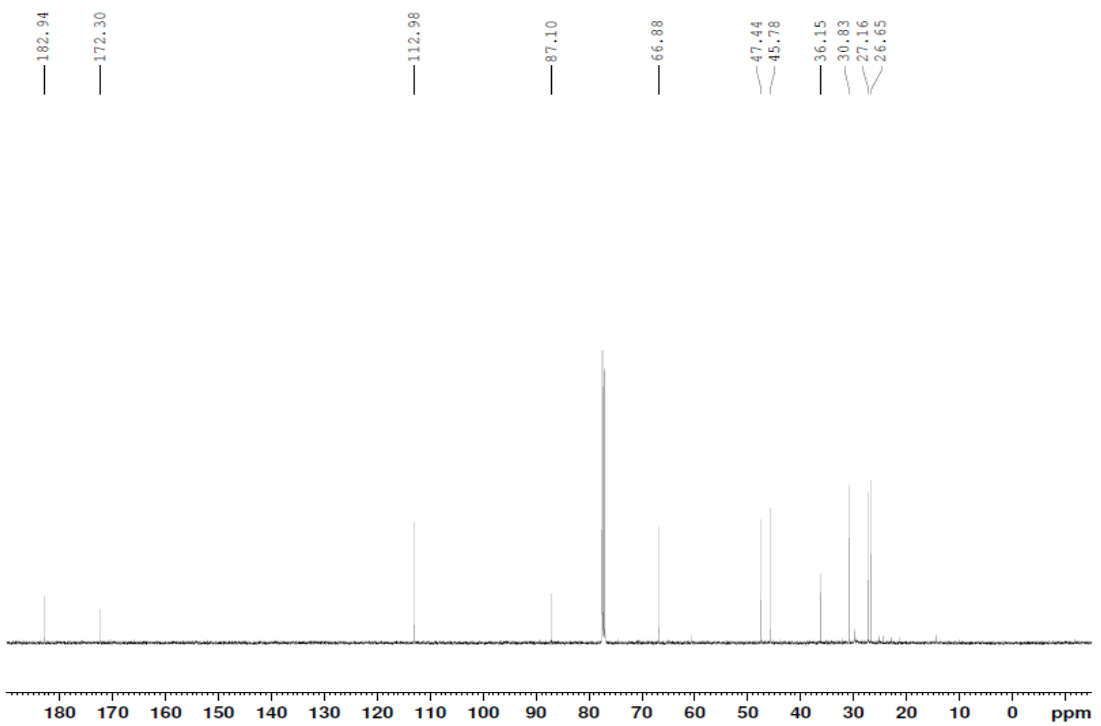


Figure 65.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **1** ( $\text{CDCl}_3$ ).



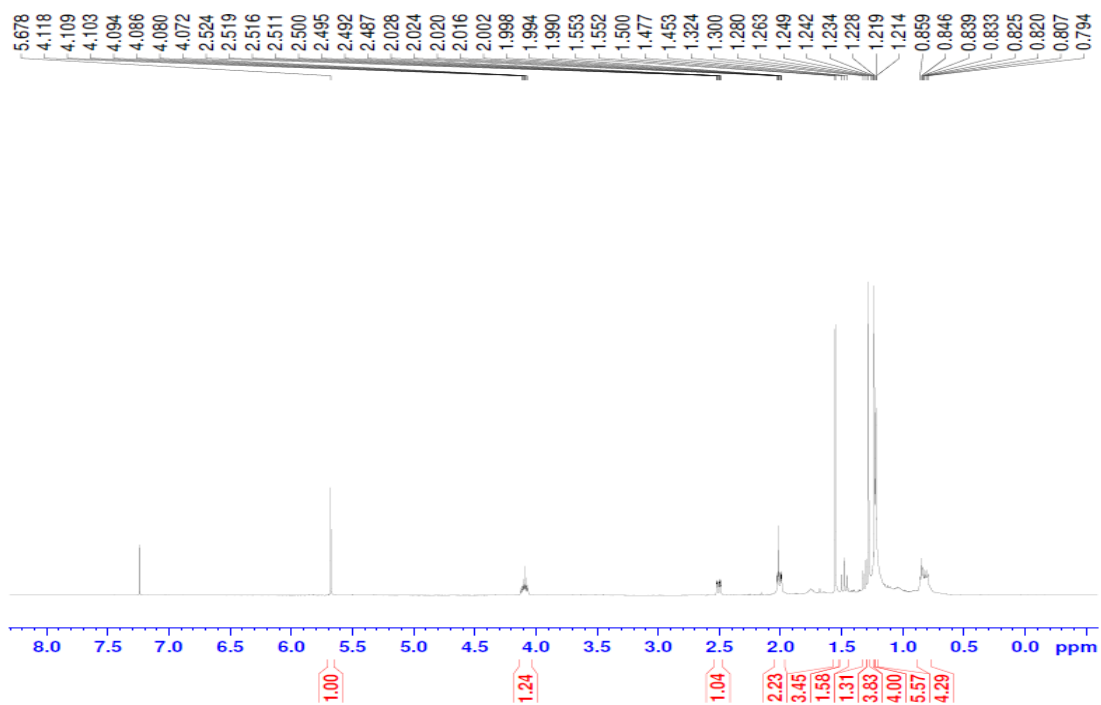


Figure 66.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2** ( $\text{CDCl}_3$ ).

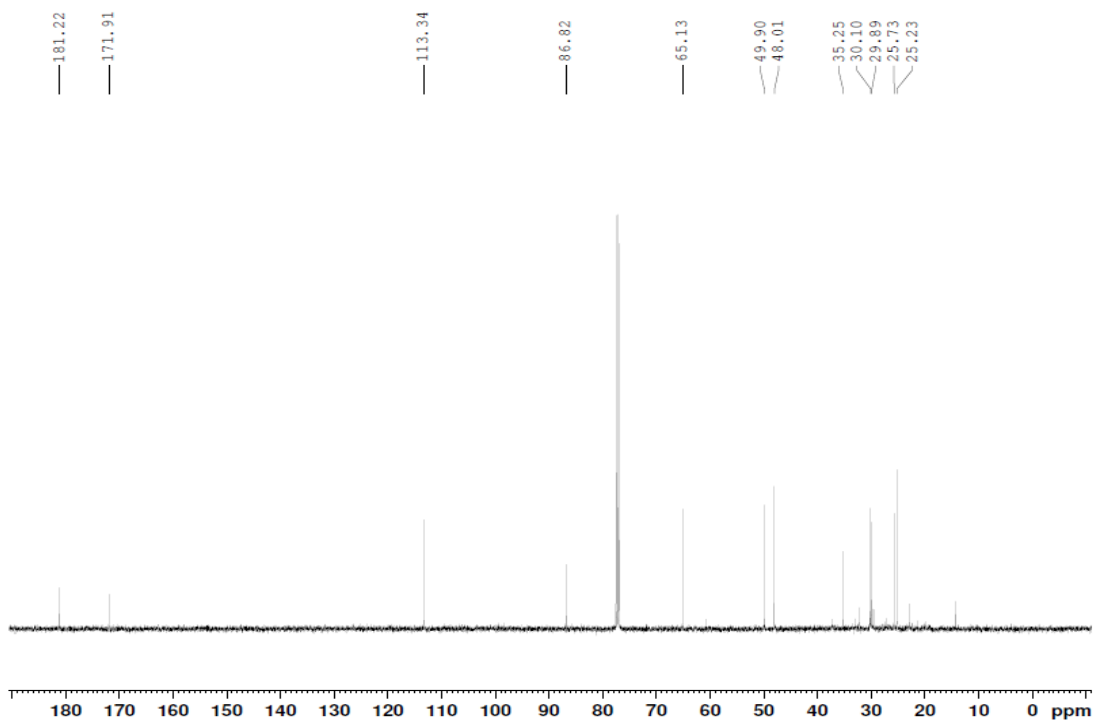


Figure 67.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2** ( $\text{CDCl}_3$ ).

## 2) Compound 3, 4의 구조 동정

Compound 3은  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum을 통해  $\delta_{\text{C}}$  197.4 및 197.7 피크에 해당하는 2개의 carbonyl group이 분자 내에 존재함을 예상할 수 있으며,  $\delta_{\text{C}}$  128.0, 130.6, 145.3, 160.7의 signal을 통해 2개의 이중결합이 있음을 예상할 수 있다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  18.9, 23.1, 25.5, 25.6의 피크를 통해 4개의 methyl group을 예상할 수 있고,  $\delta_{\text{C}}$  79.5의 피크는 전기음성도가 큰 산소와 인접해 있는  $\text{sp}^3$  혼성 carbon이며, 이들 데이터를 바탕으로 문헌<sup>84</sup>을 통해 compound 3은 dehydrovomifoliol로 확인되었다(Figure 68-70, Table 20).

compound 4는  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum을 통해 compound 3과 유사한 구조이지만, carbonyl group ( $\delta_{\text{C}}$  198.4)이 1개이며, 이들 데이터를 바탕으로 문헌<sup>85</sup>을 통해 3-hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one으로 확인 되었다(Figure 68, 71, 72, Table 20).

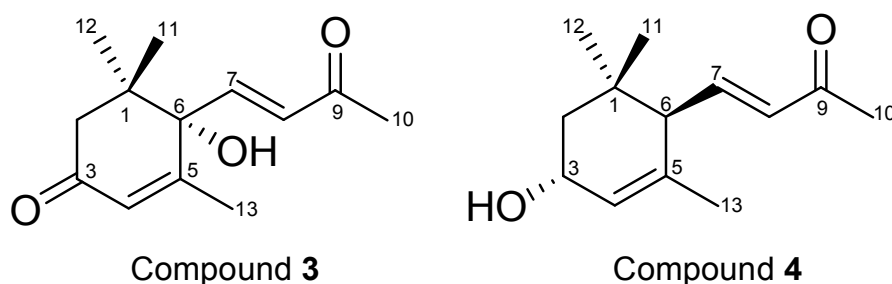


Figure 68. Chemical structures of compound 3 and 4.

Talbe 20. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound **3** and **4** (500 and 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

No.	Compound <b>3</b>		Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		41.6		34.1
2	2.34 (1H, d, 17.2) 2.51 (1H, d, 17.2)	49.8	1.38 (1H, dd, 13.5, 6.5) 1.82 (1H, dd, 13.5, 6.0)	44.0
3		197.3	4.24 (1H, m)	65.7
4	5.96 (1H, q, 1.4)	128.0	5.60 (1H, m)	126.0
5		160.7		135.7
6		79.5	2.48 (1H, d, 10.0)	54.4
7	6.84 (1H, d, 15.8)	145.3	6.51 (1H, dd, 15.5, 10.5)	147.4
8	6.47 (1H, d, 15.8)	130.6	6.08 (1H, d, 15.5)	133.8
9		197.7		198.4
10	2.31 (3H, s)	25.6	2.24 (3H, s)	27.4
11	1.03 (3H, s)	23.1	1.00 (3H, s)	29.5
12	1.11 (3H, s)	25.5	0.86 (3H, s)	24.9
13	1.89 (3H, d, 1.4)	18.9	1.60 (3H, d, 0.5)	22.9

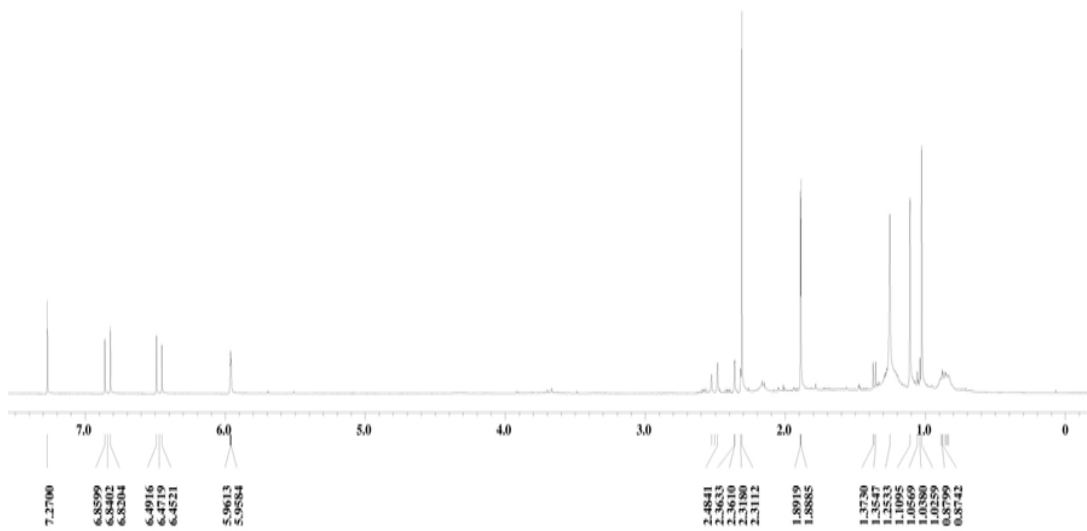


Figure 69.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **3** ( $\text{CDCl}_3$ ).

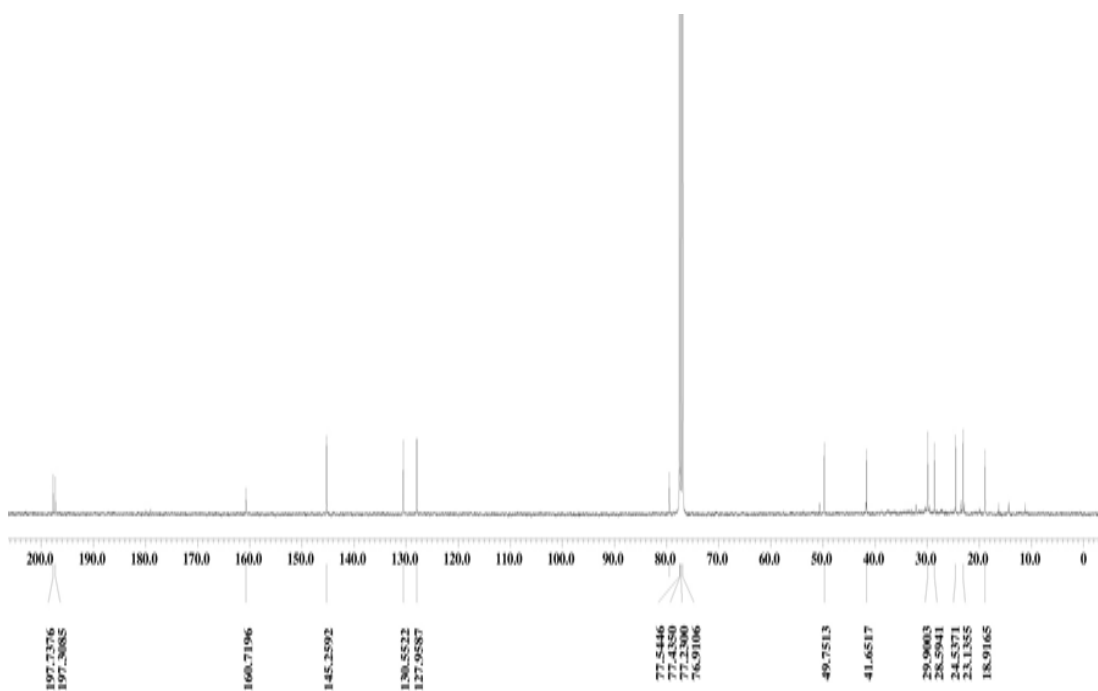


Figure 70.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **3** ( $\text{CDCl}_3$ ).

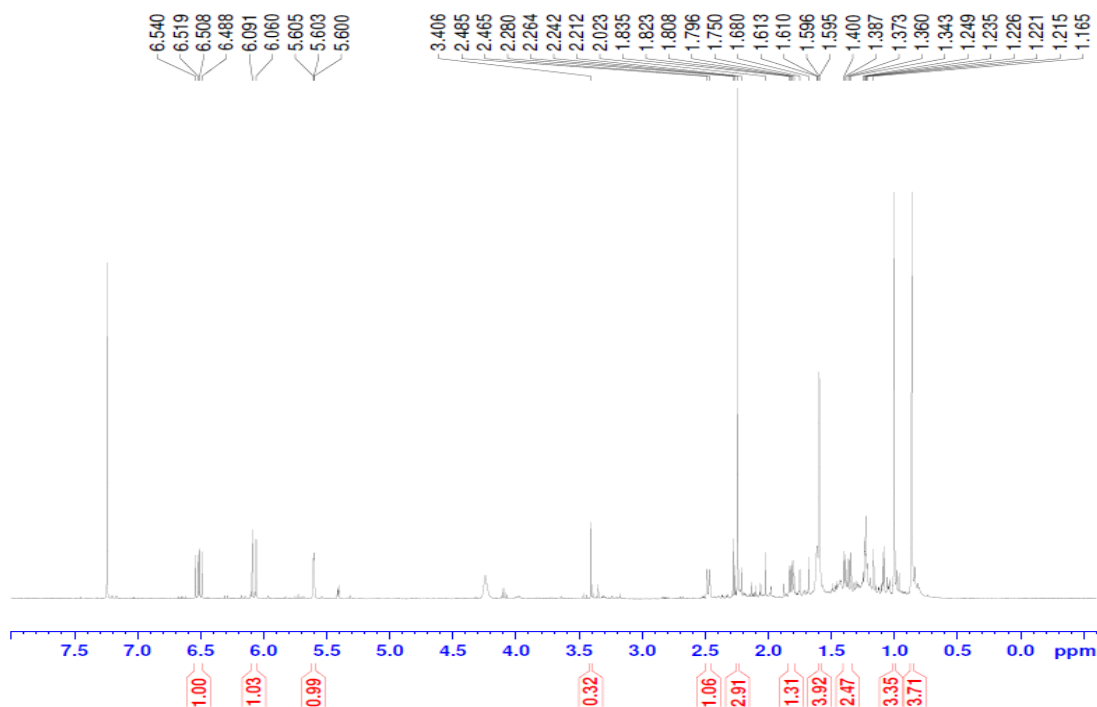


Figure 71.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **4** ( $\text{CDCl}_3$ ).

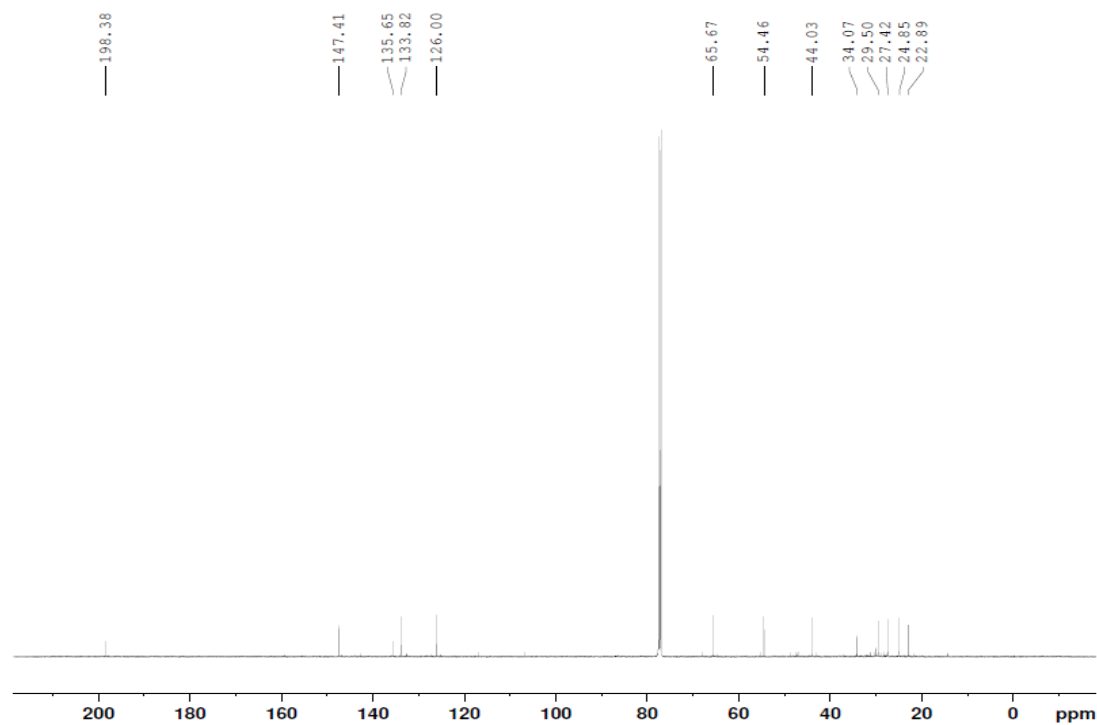


Figure 72.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **4** ( $\text{CDCl}_3$ ).

### 3) Compound 5의 구조 동정

Compound 5는  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum에서  $\delta_{\text{C}}$  172.5 피크에 해당하는 1개의 carbonyl group과 vinyl group ( $\delta_{\text{C}}$  125.4, 158.1) 및  $\delta_{\text{H}}$  0.85 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz), 1.78 (3H, d,  $J = 1.0$  Hz), 1.91 (3H, d,  $J = 1.0$  Hz)의 피크를 통해 3개의 methyl group을 포함하고 있는 구조를 예상할 수 있다.

부분 구조들의 연결관계 및 정확한 구조 동정을 위해 carbon의 차수를 알 수 있는 DEPT ( $135^\circ$ ) 및 2D NMR인 COSY, HMQC, HMBC를 측정하였다. HMQC를 통해 각각의 proton과 carbon 사이의 one bond 결합 위치를 확인 하였으며, HMBC 분석을 통해  $\delta_{\text{C}}$  8.7과 10.9인 두 개의 methyl group은 vinyl group의 4차 carbon인  $\delta_{\text{C}}$  125.4와 158.1에 해당하는 carbon에 결합되어 있음을 확인 하였다. 또한 산소를 포함하는 오각형 ring에 vinyl 및 carbonyl group을 포함하고 있는 부분구조를 예상하였고,  $\delta_{\text{C}}$  14.2-36.1의 5개의 피크는 열린 사슬의 *n*-pentyl group임을 확인 하였다. 그리고  $\delta_{\text{C}}$  107.3 피크인  $\text{sp}^3$  혼성 carbon은 전기음성도가 큰 산소와 같은 치환기가 붙어 있는 4차 carbon으로 이 위치에 *n*-pentyl group이 결합되어 있음을 HMBC를 통해 확인하였다. 이들 NMR data를 종합하여 전체 구조를 예상하였으며, 문헌<sup>86</sup>을 통해 compound 5는 4-hydroxy-2,3-dimethyl-2-nonen-4-olide임을 확인 하였다(Figure 73-79, Table 21).

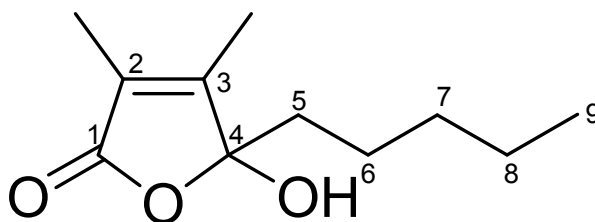


Figure 73. Chemical structure of compound 5.

Talbe 21.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **5** (500 and 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

No.	Compound <b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult, $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		172.5
2		158.1
3		125.4
4		107.3
5	1.72 (1H, m) 1.96 (1H, m)	36.1
6	1.13 (1H, m) 1.23 (1H, m)	22.8
7	1.21–1.25 (4H, m)	31.7
8	1.21–1.25 (4H, m)	22.6
9	0.85 (3H, t, 7.0)	14.2
2- $\text{CH}_3$	1.91 (3H, d, 1.0)	10.9
3- $\text{CH}_3$	1.78 (3H, d, 1.0)	8.7

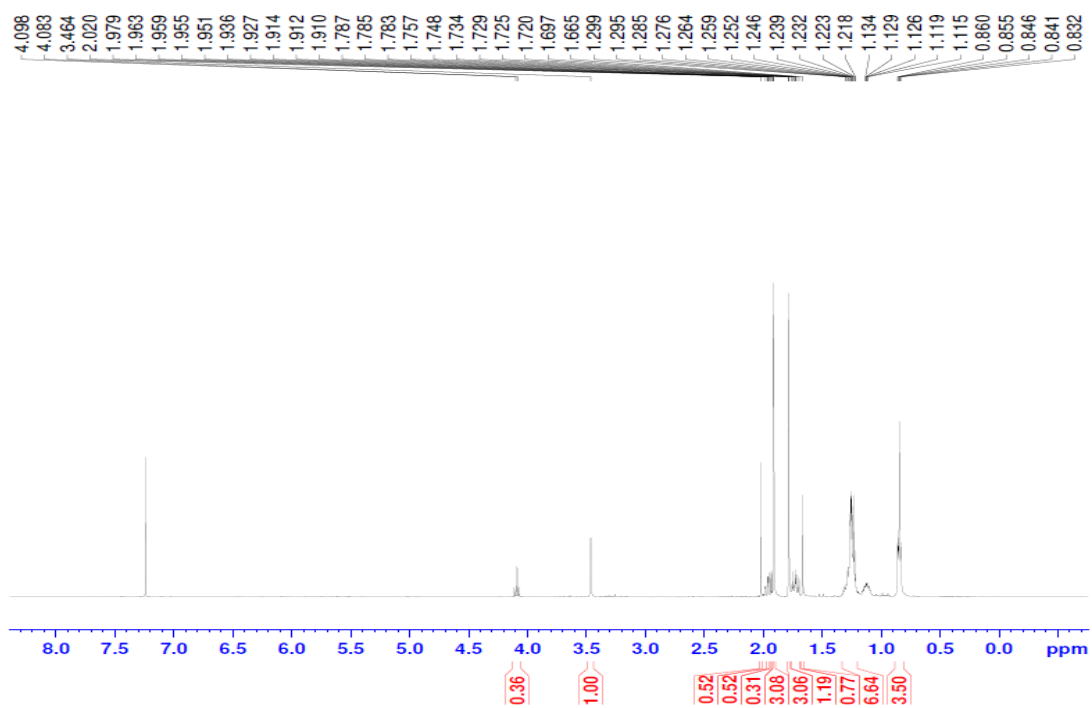


Figure 74.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **5** ( $\text{CDCl}_3$ ).

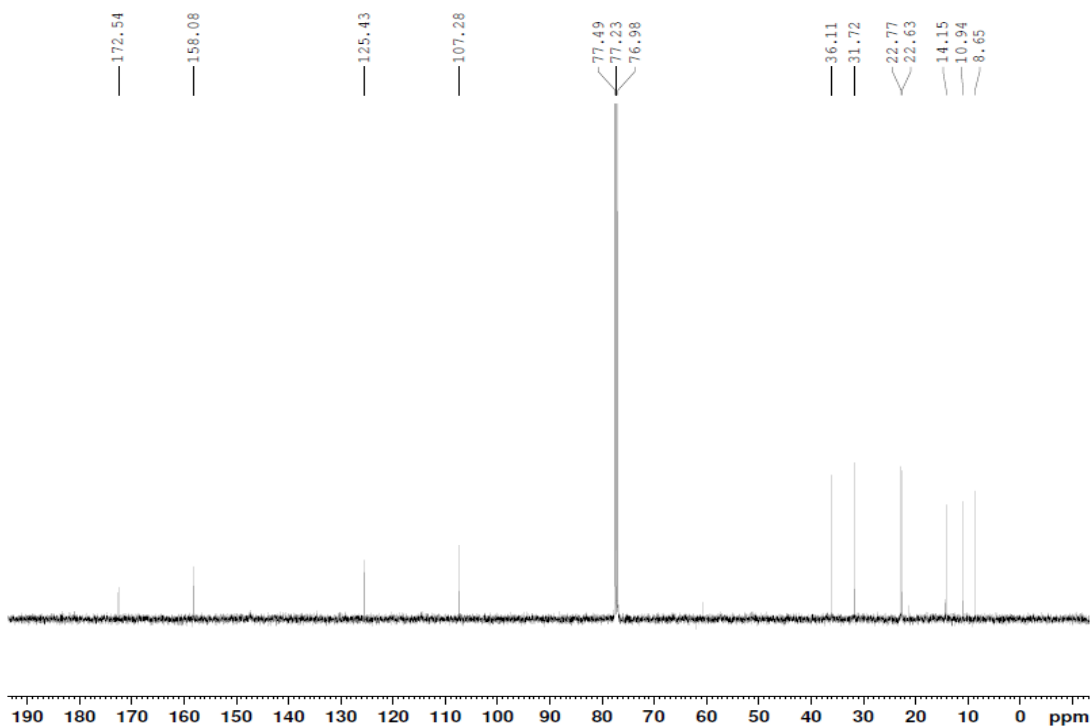


Figure 75.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **5** ( $\text{CDCl}_3$ ).



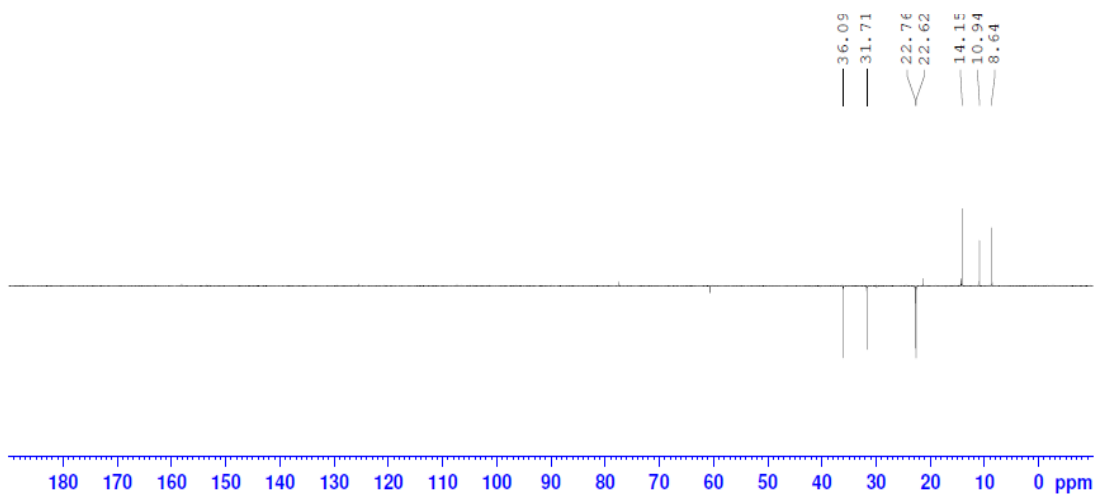


Figure 76. DEPT (135°) NMR spectrum of compound **5** (CDCl<sub>3</sub>).

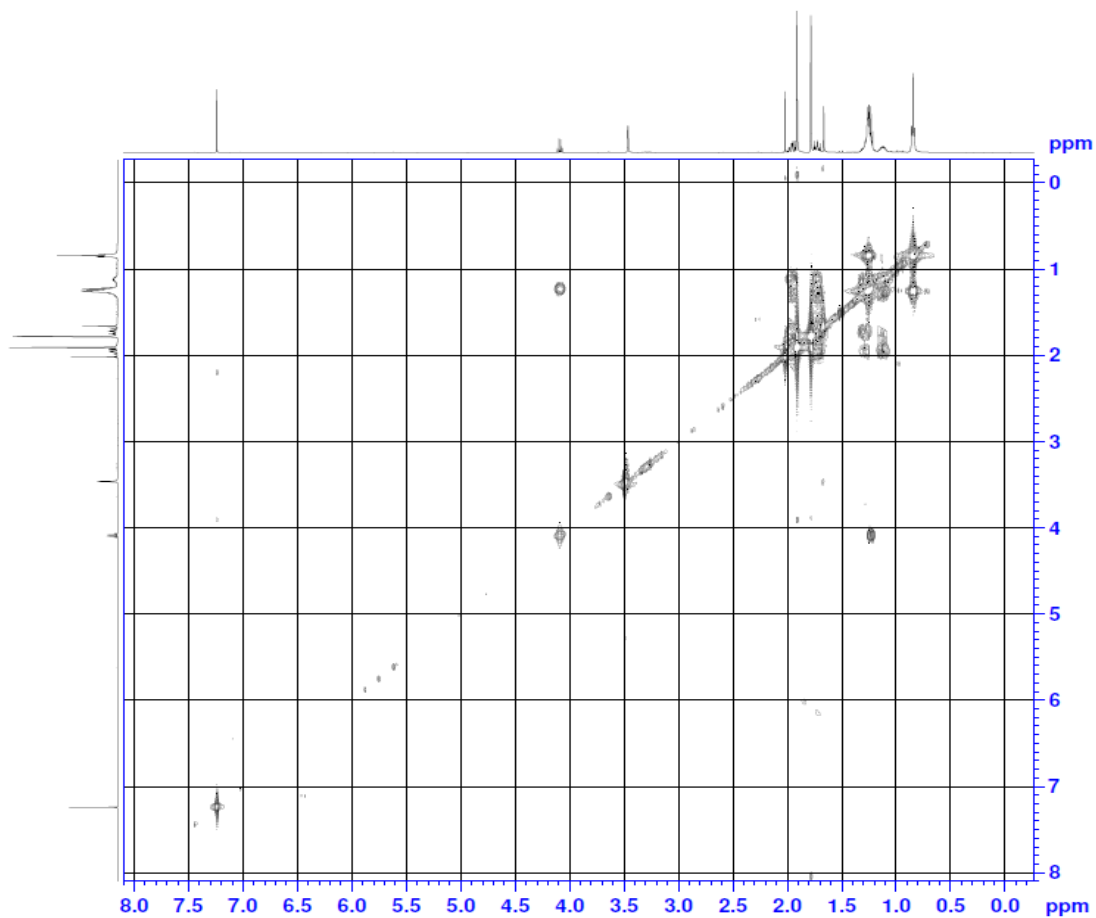


Figure 77. COSY NMR spectrum of compound **5** (CDCl<sub>3</sub>).

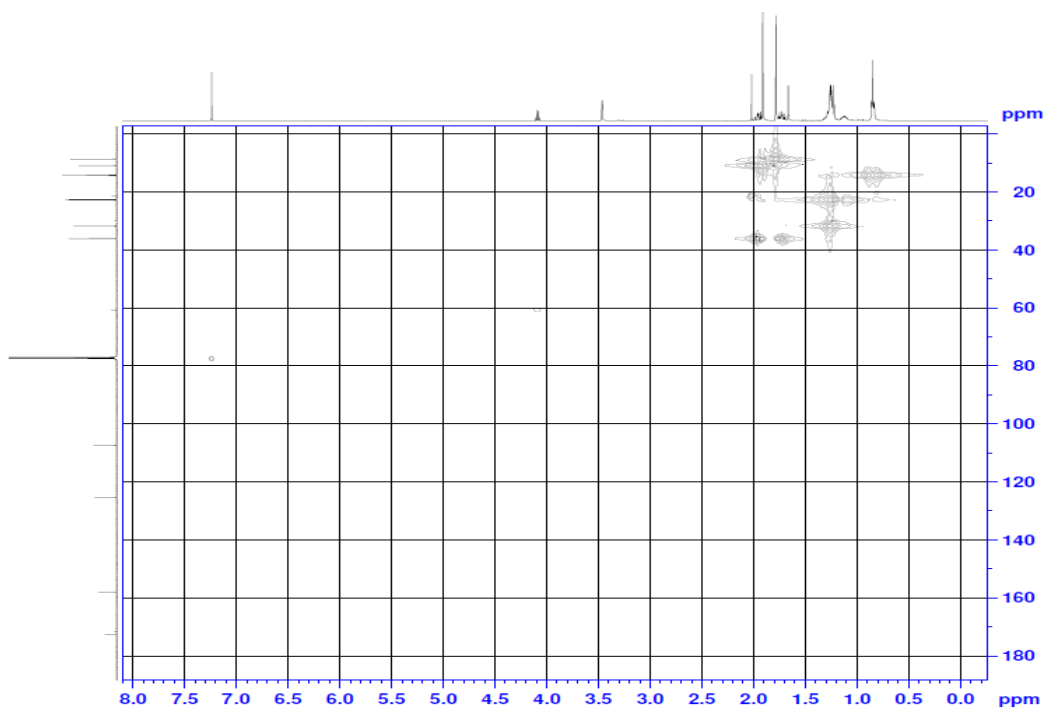


Figure 78. HMQC NMR spectrum of compound **5** (CDCl<sub>3</sub>).

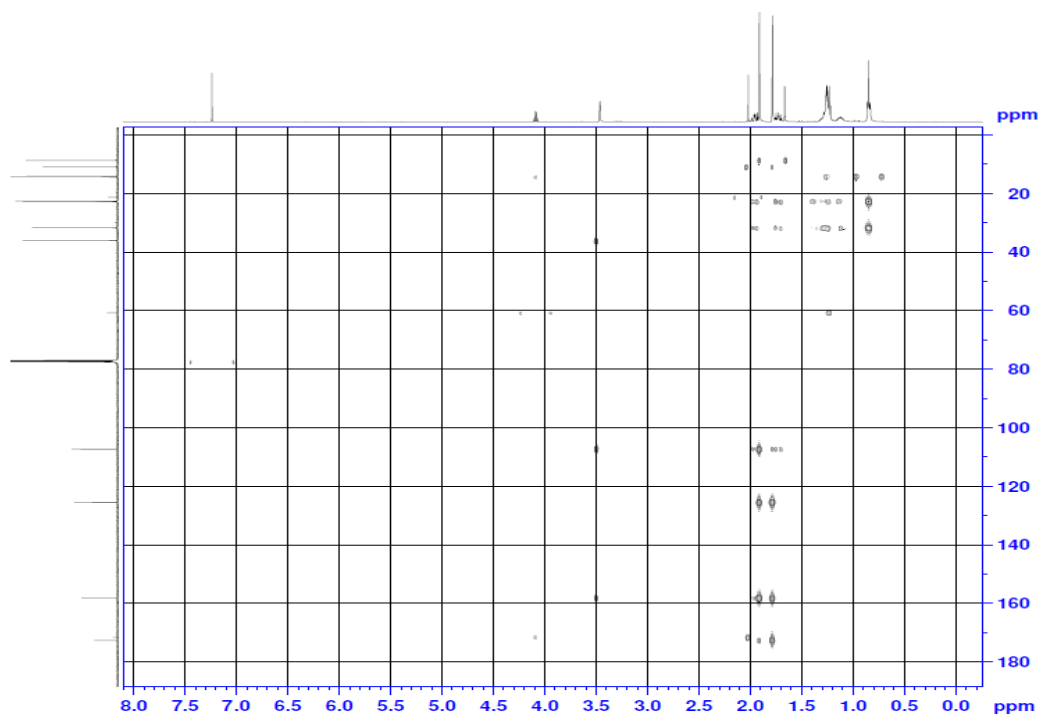


Figure 79. HMBC NMR spectrum of compound **5** (CDCl<sub>3</sub>).

#### 4. 구멍갈파래 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

##### 1) 항염 활성

구멍갈파래 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위하여 RAW 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인 하였다. 우선 80% EtOH 추출물 및 각 분획물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행 하였으며, 그 결과 구멍갈파래 EtOAc 분획물의 NO 생성이 줄어들었으나, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포에 대한 독성이 있었다(Figure 80).

따라서 독성이 없는 범위 내에서 NO 생성 억제 활성을 다시 확인하기 위하여 추가적으로 EtOAc 분획물에 대해 50, 25, 12.5, 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과 구멍갈파래 EtOAc 분획물은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제 시키는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 81).

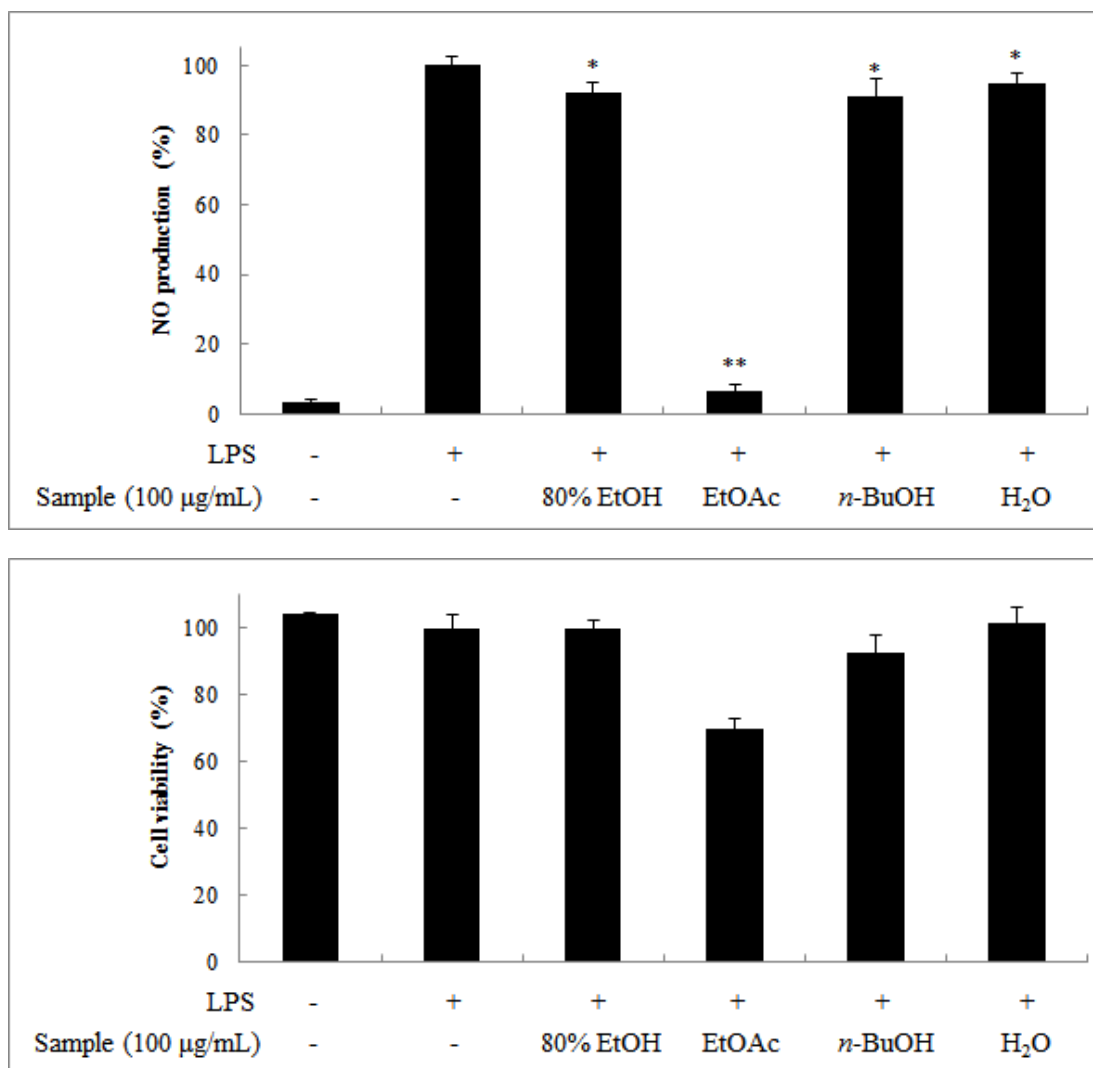


Figure 80. Effects of extract and solvent fractions from *U. pertusa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *U. pertusa* extract and solvent fractions for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *U. pertusa*. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

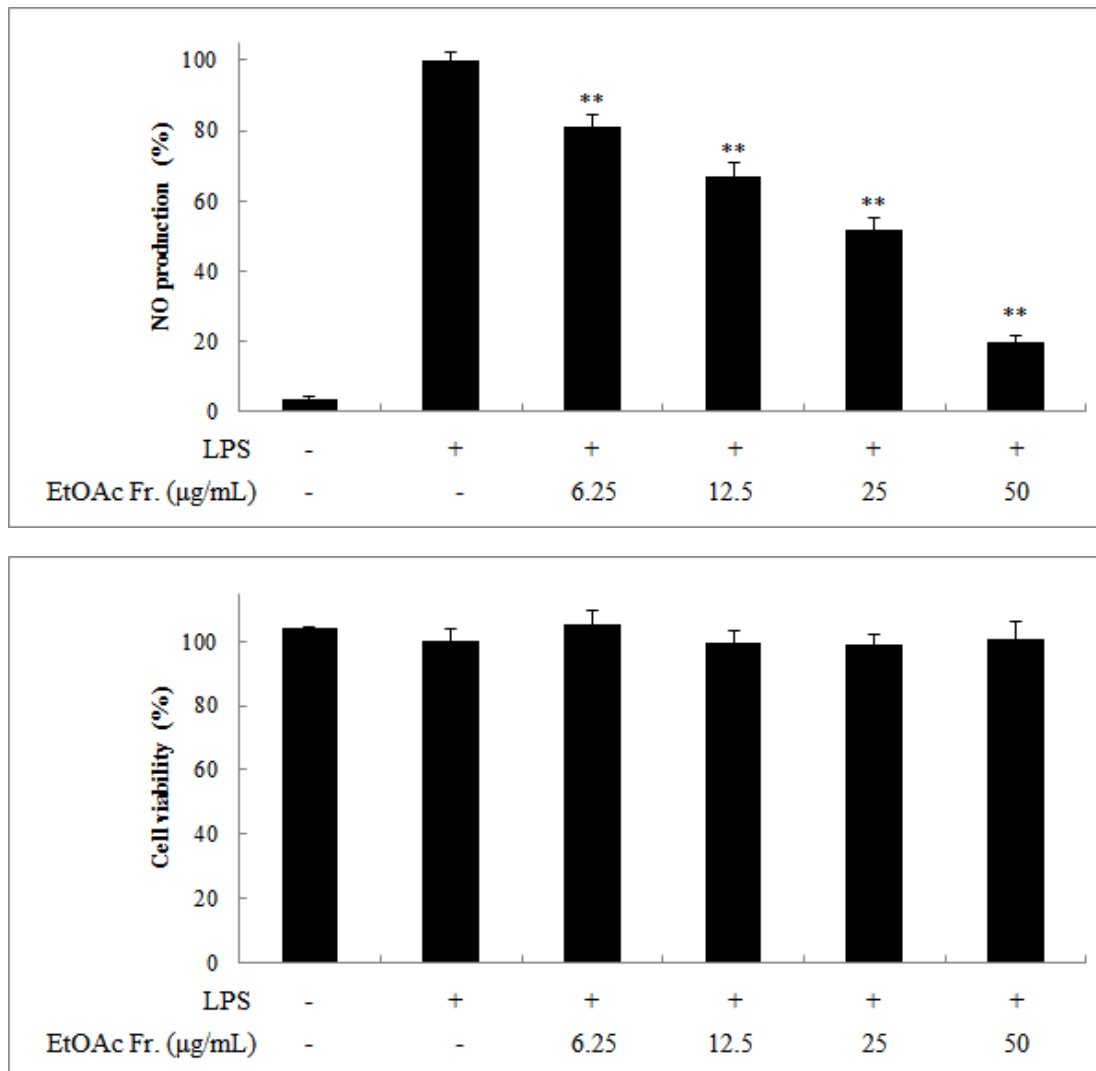


Figure 81. Effects of EtOAc fraction from *U. pertusa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of EtOAc fraction. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 2) 항균 활성

### (1) Paper disc diffusion

구멍갈파래 80% EtOH 추출물 및 분획물에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 구멍갈파래 EtOAc 분획물에서 항균 활성이 있음을 확인하였다(Table 22).

Table 22. Anti-bacterial activities of *U. pertusa*.

	Clear zone (mm)							
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>				
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089	
Extract	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
EtOAc	11	9	9	10	10	9	9	
<i>n</i> -BuOH	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
H <sub>2</sub> O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Erythromycin	22	nd	31	50	nd	nd	30	

\* Sample : 100 µg/mL (20 µL)

\* Positive control : erythromycin (1 mg/mL, 20 µL)

\* Disc size : 8 mm

\* nd : not detected

## (2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion을 통해 항균 활성이 확인되었으므로, 구멍갈파래 80% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 추가적으로 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000 µg/mL로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0 µg/mL가 되도록 하였다. 그 결과 구멍갈파래 EtOAc 분획물이 *S. epidermidis* (CCARM 3709)와 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 균주에 대해 활성이 우수함을 확인하였다(Table 23).

Table 23. MIC and MBC values of *U. pertusa*.

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EtOAc	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	1000	1000	1000	500	1000	250	1000
<i>n</i> -BuOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
H <sub>2</sub> O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration : µg/mL



### 3) 미백 활성

#### (1) 멜라닌 생성 억제 활성

구멍갈파래 추출물 및 용매 분획물의 미백 활성을 측정하기 위하여 B16F10 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인 하였다. 우선 80% EtOH 추출물 및 각 분획물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행 하였으며, 그 결과 구멍갈파래 EtOAc 분획물의 멜라닌 생성량이 줄어들었으나, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포에 대한 독성이 있었다(Figure 82).

따라서 독성이 없는 범위 내에서 멜라닌 생성 억제 활성을 다시 확인하기 위하여 추가적으로 EtOAc 분획물에 대해 60, 40, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과 구멍갈파래 EtOAc 분획물은 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 억제시키는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 83).

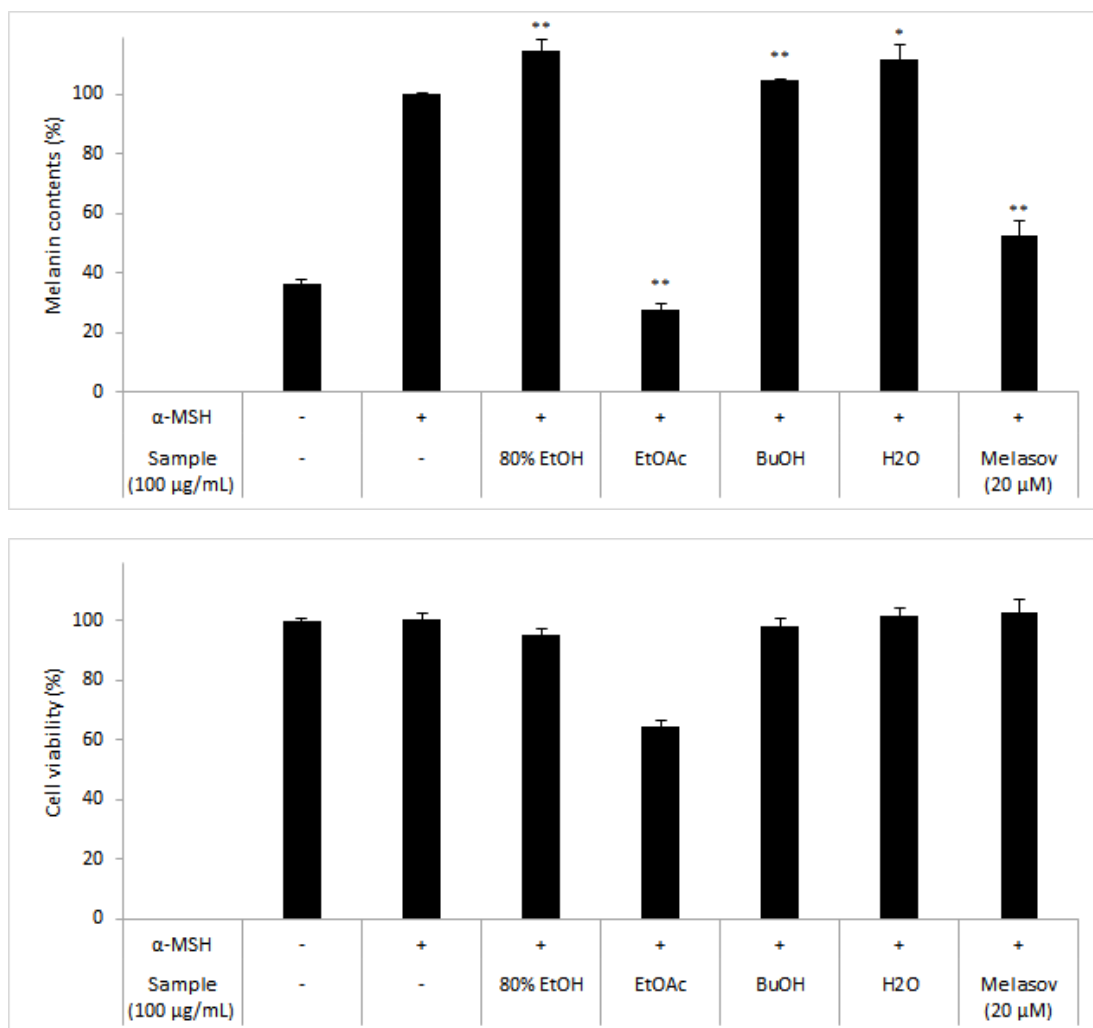


Figure 82. Effects of extract and solvent fractions from *U. pertusa* on melanin contents in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated with 100 nM of  $\alpha$ -MSH only, or with  $\alpha$ -MSH plus *U. pertusa* extract and solvent fractions for 72 h. Melanin contents were determined by the absorbance at 405 nm. Cell viability was determined after 72 h culture of cells stimulated with  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of *U. pertusa*. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

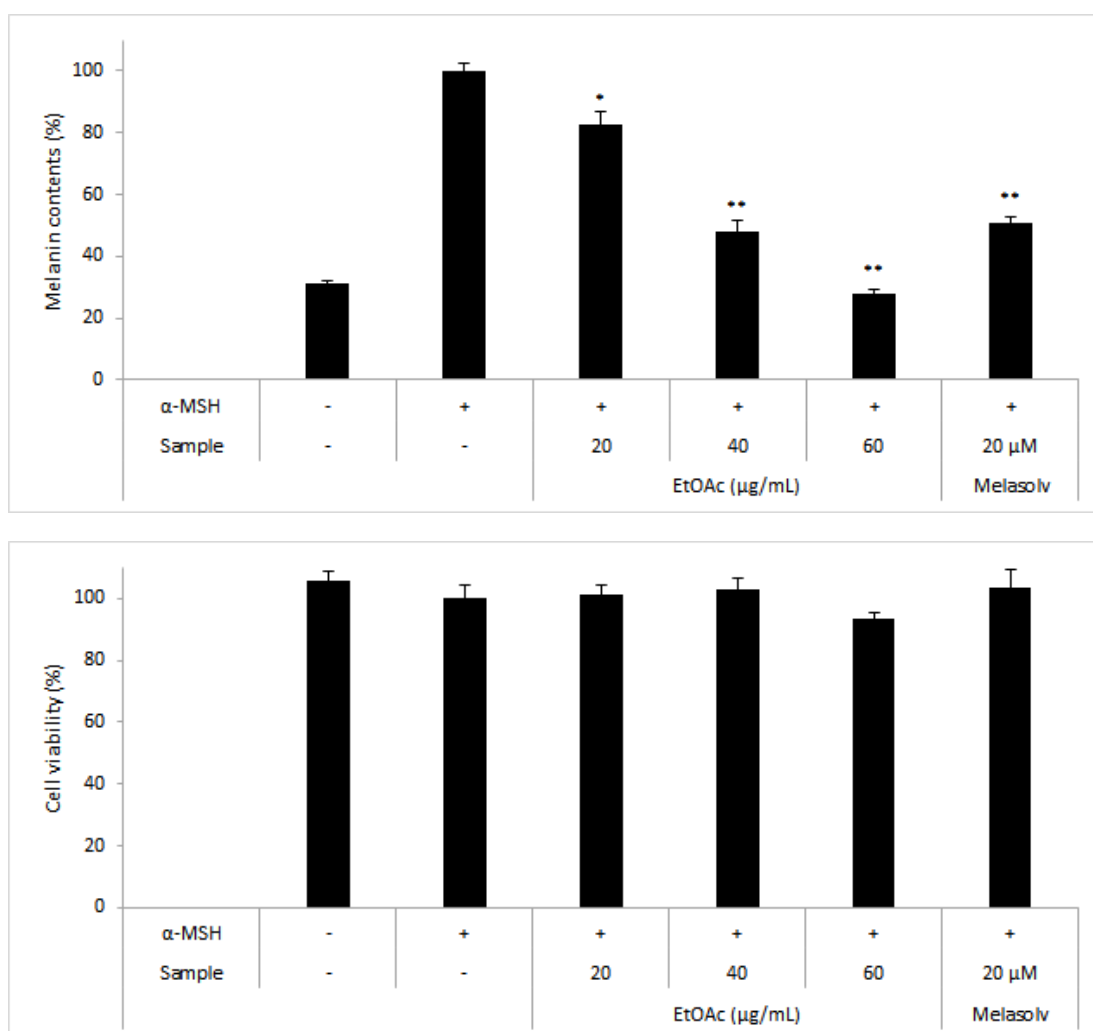


Figure 83. Effects of EtOAc fraction from *U. pertusa* on melanin contents in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated with 100 nM of  $\alpha$ -MSH only, or with  $\alpha$ -MSH plus EtOAc fraction for 72 h. Melanin contents were determined by the absorbance at 405 nm. Cell viability was determined after 72 h culture of cells stimulated with  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of EtOAc fraction. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

(2) Intracellular tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성 억제 활성이 있었던 구멍갈파래 EtOAc 분획물에 대해 B16F10 melanoma 세포 내의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 실험은 60, 40, 20  $\mu$ g/mL의 농도로 진행하였으며, 그 결과 EtOAc 분획물이 농도 의존적으로 세포 내 tyrosinase의 활성을 저해시키는 것을 확인하였다(Figure 84).

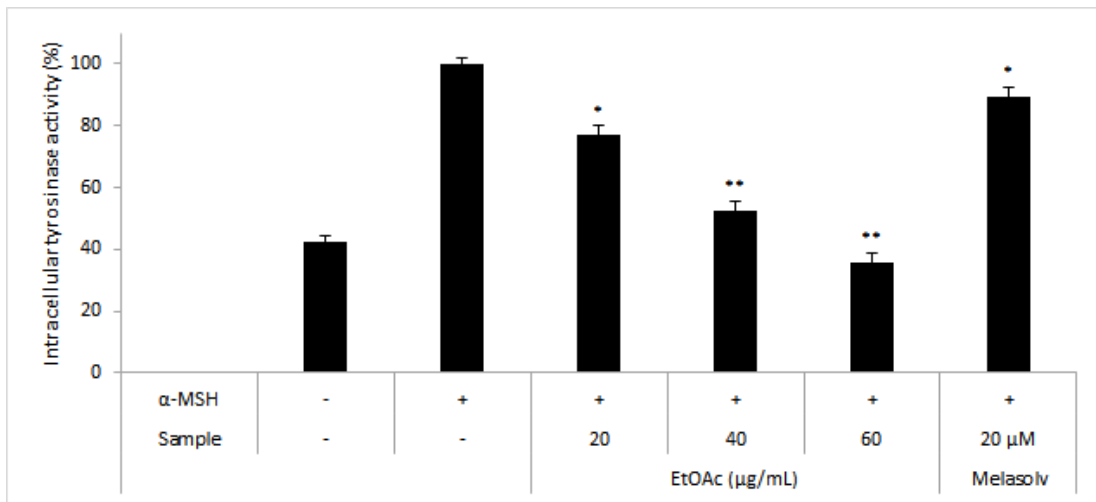


Figure 84. Intracellular tyrosinase activity of EtOAc fraction from *U. pertusa*.

## 5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### 1) 항염 활성

구멍갈파래에서 분리된 화합물의 항염 활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 cell 을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 측정하였다. 실험 은 각 화합물에 대해 200, 100, 50  $\mu$ M의 농도로 진행하였으며, 그 결과 compound 1, 4, 5가 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 저해 시킴을 확인하였다(Figure 85).

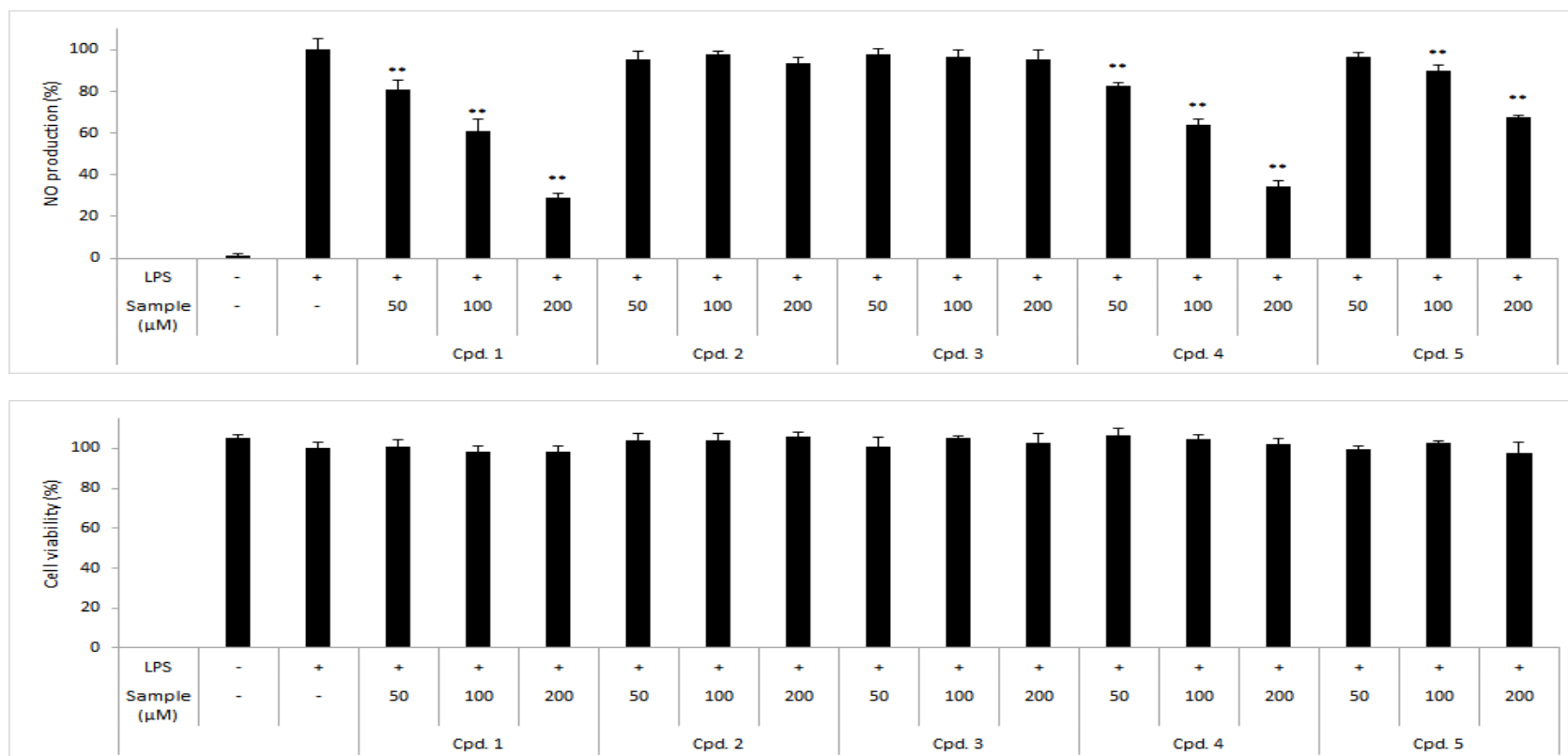


Figure 85. Effects of isolated compounds 1-5 from *U. pertusa* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1-5 for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of isolated compounds 1-5. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 2) 항균 활성

구멍갈파래에서 분리된 화합물에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 1000  $\mu\text{M}$ 로 하여 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 실시하여 가장 낮은 농도가 1.0  $\mu\text{M}$ 이 되도록 하였다. 그 결과 분리된 화합물 대부분의 항균 활성이 1000  $\mu\text{M}$  이하에서는 나타나지 않음을 확인하였다(Table 24).

Table 24. MIC and MBC values of isolated compounds **1-5** from *U. pertusa*.

	<i>S. epidermidis</i>						<i>P. acnes</i>							
	CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711		CCARM 0081		CCARM 9009		CCARM 9010		CCARM 9089	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>1</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>2</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>3</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>4</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>5</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Erythromycin	<1.0	<1.0	>1000	>1000	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>1000	>1000	>1000	>1000	<1.0	<1.0

\* Sample concentration :  $\mu\text{M}$



## 6. 결론 및 고찰

본 연구에서는 제주 연안에 많이 서식하는 해조류인 구멍갈파래 80% 에탄올 추출물 및 분획물의 다양한 피부 관련 활성을 검색하고, 활성 성분을 확인하기 위해 추가적인 단일물질 분리 과정을 진행하여 화합물의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 피부 관련 활성을 확인하여 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

구멍갈파래 80% 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다. 이들 중 ethyl acetate fraction에 대해 medium pressure liquid chromatography (MPLC) 및 silica gel column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하고, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 분리, 동정하였다. 분리된 화합물은 loliolide (1), *epi*-loliolide (2), dehydrovomifoliol (3), 3-hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one (4), 4-hydroxy-2,3-dimethyl-2-nonen-4-olide (5)로 확인되었다. 이들은 모두 구멍갈파래에서 처음으로 분리된 화합물이다.

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용한 구멍갈파래의 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 50 µg/mL 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다. 또한 구멍갈파래에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, compound 1, 4, 5가 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하는 활성이 있었다.

그리고 구멍갈파래의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermids* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 한천확산법(paper disc diffusion method)을 통한 clear zone 및 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC), 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 확인하였다. 그 결과 구멍갈파래 EtOAc 분획물이 항균 활성이 있었다.

또한 B16F10 melanoma cell을 이용하여 구멍갈파래의 미백 활성을 확인한 결과, EtOAc 분획물이 60 µg/mL 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 멜라닌

의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 활성이 있었다. 그리고 멜라닌 생성이 억제되는 경향과 마찬가지로 세포 내 tyrosinase의 활성도 농도 의존적으로 저해되었다. 구멍갈파래에서 분리된 화합물 중 *epi*-loliolide (2)는 문헌을 통해 B1610 melanoma cell에서 멜라닌의 생성을 억제시키는 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>87</sup> 따라서 이 화합물 때문에 구멍갈파래 ethyl acetate 분획물의 미백 활성이 우수한 것이라 여겨진다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 구멍갈파래를 이용한 항염, 항균 및 미백 효과를 갖는 천연 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

## VII. 요약 및 결론

본 연구는 제주 자생 식물인 섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*) 열매, 참꽃나무(*Rhododendron weyrichii*) 잎, 당근(*Daucus carota* var. *sativa*) 지상부 및 해조류인 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 추출물 및 분획물의 다양한 피부 관련 활성을 검색하고, 이들의 활성 성분을 확인하기 위해 크로마토그래피, NMR 등을 이용하여 화합물의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 항염, 항균, 미백 활성을 확인하여 천연 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

각각의 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 용매 분획물을 얻었으며, 이들 중 ethyl acetate (EtOAc) 분획물에 대해 medium pressure liquid chromatography (MPLC) 또는 vacuum liquid chromatography (VLC) 및 open column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하였고, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였다.

섬오갈피 열매 EtOAc 분획물은 항염, 항균, tyrosinase 저해 활성이 우수했으며, 이들 데이터를 바탕으로 단일물질 분리를 진행한 결과, 5개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 *ent*-kaurenoic acid (1), 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid (2), 3 $\alpha$ -hydroxylup-20(29)-en-23,28-dioic acid 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (3), impressic acid (4), 3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,23-trihydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (5)로 확인되었다. 분리된 화합물 중 compound 3은 섬오갈피에서 처음으로 분리된 화합물이다. 분리된 화합물 모두 항염 활성이 우수했으며, 기전 연구가 보고되지 않은 화합물인 compound 3에 대해 항염 활성 기전 연구를 수행한 결과, compound 3은 NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성 및 iNOS 단백질의 발현을 억제시키는 활성이 있음을 확인하였다. 또한 compound 1, 2는 항균 활성이 우수하였고, compound 1, 3, 5는 tyrosinase 저해 활성이

대조군인 arbutin 보다 우수하였다.

참꽃나무 잎 EtOAc 분획물은 항염 및 항균 활성이 있었으며, 참꽃나무 잎으로부터 5개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 ursolic acid (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3), astragalol (4), isoquercetin (5)으로 확인 되었다. 이들은 모두 참꽃나무에서 처음으로 분리된 화합물이다. 항염 활성 실험 결과, compound 2, 3이 세포에 대한 독성이 없는 범위 내에서 NO의 생성을 억제시키는 활성이 있었으며, 항균 활성 실험에서는 compound 3이 *S. epidermidis*와 *P. acnes* 균주에 대해 항균 활성이 우수하였다.

당근 지상부 EtOAc 분획물 또한 항염 및 항균 활성이 우수했으며, 당근 지상부로부터 3개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 diosmetin (1), diosmin (2), cynaroside (3)으로 확인되었고, 이들은 모두 항염 활성이 있었다. 또한 compound 3은 *P. acnes* 균주에 대해 항균 활성이 우수하였다.

구멍갈파래 EtOAc 분획물은 항염, 항균 및 미백 활성이 있었으며, 구멍갈파래로부터 5개의 화합물을 분리, 동정하였다. 분리된 화합물은 loliolide (1), *epi*-loliolide (2), dehydrovomifoliol (3), 3-hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one (4), 4-hydroxy-2,3-dimethyl-2-nonen-4-olide (5)로 확인되었으며, 이들은 모두 구멍갈파래에서 처음으로 분리된 화합물이다. 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, compound 1, 4, 5가 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제시키는 활성이 있었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 섬오갈피 열매, 참꽃나무 잎, 당근 지상부 및 구멍갈파래를 이용한 항염, 항균 또는 미백 효과를 갖는 천연 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

## VIII. 참고문헌

1. Kim, H. S.; Lee, H. Y.; Lee, J. N.; Joo, C. G.; Choe, T. B. The effects of antimicrobial properties of Manuka oil and improvement of acne. *J. Kor. Soc. Cosm.* **2011**, *17*, 245-256.
2. Kim, H. K.; Na, G. M.; Ye, S. H.; Han, H. S. Extraction characteristics and antioxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. *Korean J. Food Culture* **2004**, *19*, 484-490.
3. Lee, B. G.; Kim, J. H.; Ham, S. G.; Lee, C. E. Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. branch. *Korean J. Plant Res.* **2014**, *27*, 29-34.
4. Jang, Y. A.; Lee, J. T. The evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging of extract solvent and *Poria cocos* by parts. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **2015**, *13*, 377-383.
5. Lee, H. S.; Shin, M. S. Antimicrobial effects of *Luffa cylindrica* extract against 4 skin microorganisms. *J. Kor. Soc. Cosm.* **2015**, *21*, 471-476.
6. 한정. 무화과나무 줄기 추출물의 항염증 및 항산화 효과. 중앙대학교 **2011**, 석사학위논문.
7. Lee, S. T.; Jeong, Y. R.; Ha, M. H.; Kim, S. H.; Byun, M. W.; Jo, S. K. Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extract in

- mouse macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2000**, *29*, 342-348.
8. Ljung, T.; Lundberg, S.; Varsanyi, M.; Ohansson, C.; Schmidt, P. T.; Herulf, M. Rectal nitric oxide as biomaker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus non-responders. *World Gastroenterol.* **2006**, *12*, 3386-3392.
9. Jeong, J. B.; Hong, S. C.; Jeong, H. J.; Koo, J. S. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J. Plant Res.* **2012**, *25*, 299-307.
10. Kim, D. H.; Park, S. J.; Jung, J. Y.; Kim, S. C.; Byun, S. H. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyonhaedoktang in LPS-activated macrophage cells. *Korean J. Herbol.* **2009**, *24*, 39-47.
11. McDaniel, M. L.; Kwon, G.; Hill, J. R.; Marshall, C. A.; Corbett, J. A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1996**, *211*, 24-32.
12. Nathan, C.; Xie, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Bio. Chem.* **1994**, *269*, 13725-13728.
13. Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **2001**, *357*, 593-615.
14. Miyasaka, N.; Hirata, Y. Nitric oxide and asthmatic inflammation.

- Immunol. Today* **1995**, *16*, 128-130.
15. Guzik, T. J.; Korbust, R.; Adamek-guzik, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation, *J. Physiol Pharmacol.* **2003**, *54*, 469-487.
  16. Kim, R. G.; Shin, K. M.; Chun, S. K.; Ji, S. Y.; Seo, S. H.; Park, H. J.; Choi, J. W.; Lee, K. T. In vitro antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **2002**, *46*, 343-347.
  17. Bishop-Bailey, D.; Calatayud, S.; Warner, T. D.; Hla, T.; Mitchell, J. A. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J. Environ. Pathol. Tox. Oncol.* **2002**, *21*, 93-101.
  18. Nanes, M. S. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* **2003**, *321*, 1-15.
  19. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. Cellular and molecular immunology. *W. B. saunders* **2003**, *247*.
  20. Chauhan, A. S.; Negi, P. S.; Ramteke, R. S. Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 590-592.
  21. Leung, Y. F.; Tam, P. O.; Lee, W. S.; Lam, D. S.; Yam, H. F.; Fan, B. J.; Tham, C. C.; Chua, J. K.; Pang, C. P. The dual role of dexamethasone on anti-inflammation and outflow resistance demonstrated in cultured human trabecular meshwork cells. *Mol. Vis.*

- 2003, 59, 425-439.
22. Rocksén, D.; Lilliehook, B.; Larsson, R.; Johansson, T.; Bucht, A. Differential anti-inflammatory and anti oxidative effects of dexamethasone and *N*-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, *122*, 249-256.
23. Kim, N. K.; Kim, M. H.; Yoon, C. S.; Choi, S. W. Studies on the anti-inflammatory activity of *Paulownia coreana* Uyeki leaf extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **2006**, *32*, 241-247.
24. Kang, H. S.; Song, H. K.; Lee, J. J.; Pyun, K. H.; Choi, I. Effect of acanthoic acid on TNF- $\alpha$  gene express haptoglobin synthesis. *Mediators Inflamm.* **1998**, *7*, 257-259.
25. Lee, Y. S.; Lee, E. B.; Kim, Y. H. Some pharmacological activities of acanthoic acid isolated from *acanthopanax koreanum* root bark. *J. App. Pharm.* **2001**, *9*, 176-182.
26. Min, H. Y.; Park, E. J.; Lee, S. K.; Cho, Y. J. Effects of grape extracts on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in mouse macrophage cells. *Kor. J. Food. Sci. Tec.* **2003**, *35*, 132-137.
27. Martínez, J.; Moreno, J. J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 865-870.
28. Surh, Y. J.; Chun, K. S.; Cha, H. H.; Han, S. S.; Keum, Y. S.; Park, K.



- K.; Lee, S. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutation Research* **2001**, *480*, 243-268.
29. Kim, S. H.; Kim, S. A.; Park, M. K.; Park, Y. D.; Na, H. J.; Kim, H. M.; Shin, M. K.; Ahn, K. S. Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF- $\alpha$ . *International Immunopharmacol.* **2004**, *4*, 279-287.
30. Park, H. J.; Choi, M. Y. In vitro antiinflammatory activity of paeonol from the essential oil and its derivative methylpaeonol. *Kor. J. Pharm.* **2005**, *36*, 116-120.
31. Collier, C. N.; Harper, J. C.; Cafardi, J. A.; Cantrell, W. C.; Wang, W.; Foster, K. W.; Elewski, B. E. The prevalence of acne in adults 20 years and older. *J Am Acad Dermatol.* **2008**, *58*, 56-59.
32. Leyden J. J., New understandings of the pathogenesis of acne. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1995**. *32*. 15-25.
33. Harper, J. C. An update on the pathogenesis and management of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2004**, *51*, 36-38.
34. Thiboutot, D. M. Acne. An overview of clinical research findings. *Dermatol. Clin.* **1997**, *15*, 97-109.
35. Nishijima, S. Kurokawa, I.; Katoh, N.; Watanabe, K. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *propionibacterium*

- acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *J. Dermatol.* **2000**, *27*, 318-323.
36. Koreck, A.; Pivarcsi, A.; Dobozy, A.; Kemeny, L. The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *Dermatology* **2003**, *206*, 96-105.
37. 김현숙. 마누카 오일의 항균활성과 여드름 개선 효과. *건국대학교* **2011**, 석사학위논문.
38. Kang, M. S.; Oh, H. J.; Lee, H. C.; Oh, J. S. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology and Virology* **2009**, *39*, 11-19.
39. Choi, J. Y.; Song, S. Y.; Lee, H. H. Antibacterial and anti-inflammatory activity of *Corni fructus* ethanol extract in *Propionibacterium acnes*. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **2015**, *13*, 623-630.
40. 채영복; 김완주; 지옥표; 안미자; 노영주. 한국유용식물자원 연구총람. *한국화학연구소* **1988**.
41. 한순성; 김수영; 유일준. 한국산 천연약품 자원에 관한 연구(IV), hesperidin 유도체의 항균작용. *충북대학교* **1986**, 약학논문집.
42. 고정삼; 양영택; 박재권; 이영재. 탐라오가피- 재배와 이용 그리고 건강. *제주문화* **2008**.

43. Kim, K. N.; Ham, Y. M.; Moon, J. Y.; Kim, M. J.; Jung, Y. H.; Jeon, Y. J.; Lee, N. H.; Kang, N.; Yang, H. M.; Kim, D.; Hyun, C. G. Acanthoic acid induces cell apoptosis through activation of the p38 MAPK pathway in HL-60 human promyelocytic leukaemia. *Food Chemistry* **2012**, *135*, 2112–2117.
44. Yoon, W. J.; Ham, Y. M.; Yoon, H. S.; Lee, W. J.; Lee, N. H.; Hyun C. G. Acanthoic acid inhibits melanogenesis through tyrosinase downregulation and melanogenic gene expression in B16 melanoma cells. *Natural Product Communications* **2013**, *8*, 1359–1362.
45. Wu, Y. L.; Jiang, Y. Z.; Jin, X. J.; Lian, L. H.; Piao, J. Y.; Wan, Y.; Jin, H. R. Acanthoic acid, a diterpene in *Acanthopanax koreanum*, protects acetaminophen-induced hepatic toxicity in mice. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 475–479.
46. Nan, J. X.; Jin, X. J.; Lian, L. H.; Cai, X. F.; Jiang, Y. Z.; Jin, H. R.; Lee, J. J. A diterpenoid acanthoic acid from *Acanthopanax koreanum* protects against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 738–742.
47. Shin, K. H.; Lee, S. The chemistry of secondary products from *Acanthopanax* species and their pharmacological activities. *Nat. Prod. Sci.* **2002**, *8*, 111–126.
48. Kim, J. A.; Yang, S. Y.; Koo, J. E.; Kho, Y. S.; Kim, Y. H. Lupane-type triterpenoids from the steamed leaves of *Acanthopanax koreanum* and their inhibitory effects on the LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6703–6707.

49. Li, X. J.; Dai, L.; Li, Z.; Zhang, X. D.; Liu, X. Q.; Zou, Q, P.; Xie X. Anti-inflammatory activities of lupane-triterpenoids in vitro and their phytochemical fingerprinting from leaves of *acanthopanax gracilistylus*. *Nat. Prod. Sci.* **2015**, *21*, 104-110.
50. 문승리. 섬오가피나무 줄기로부터 향산화, 미백, 항염 및 항균 활성 성분 규명. *제주대학교* **2016**, 석사학위논문.
51. Yang, E. J.; Moon, J. Y.; Lee, J. S.; Koh, J. S.; Lee, N. H.; Hyun, C. G. *Acanthopanax koreanum* fruit waste inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 1-10.
52. Padla, E. P.; Solis, L. T.; Ragasa, C. Y. Antibacterial and antifungal properties of *ent*-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2012**, *10*, 408-414.
53. Chang, S. Y.; Yook, C. S.; Nohara, T. Tow new lupane-triterpene glycosides from leaves of *Acanthopanax koreanum*. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 163-165.
54. Wanas, A. S.; Matsunami, K.; Otsuka, H.; Desoukey, S. Y.; Fouad, M. A.; Kamel, M. S. Triterpene glycosides and glucosyl esters, and a triterpene from the leaves of *Schefflera actinophylla*. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1596-1601.
55. Cai, X. F.; Lee, I. S.; Shen, G.; Dat, N. T.; Lee, J. J.; Kim, Y. H.

- Triterpenoids from *Acanthopanax koreanum* root and their inhibitory activities on NFAT transcription. *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *27*, 825-828.
56. Ty, P. D.; Lischewski, M.; Phiet, H. V.; Preiss, A.; Sung, T. V.; Schmidt, J.; Adam, G. Two triterpenoid carboxylic acids from *Acanthopanax trifoliatum*. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2889-2891.
57. Liu, P.; Qu, Y.; Dou, D.; Kang, T.; Smith, D. Determination of anti-cancer constituents in *oplopanax horridus* and *oplopanax elatus*. *J. Chem. Soc. Pak.* **2012**, *34*, 419-423.
58. 현창구; 양은진; 송관필; 이육재; 서인수. 항염증성 조성물, 대한민국 공개특허(등록번호 1013261620000), **2013**.
59. Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. Spectral assignments and reference data. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 636-638.
60. Li, L. L.; Pu, J. X.; Xiao, W. L.; Sun, H. D. Triterpenes from *Isodon xerophilus*. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2012**, *10*, 307-310.
61. He, W. N.; Dai, J. G.; Ye, M.; Wu, L. J.; Guo, D. A. Microbial transformation of asiatic acid by *Alternaria longipes*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2010**, *12*, 760-764.
62. Lee, J. H.; Ku, C. H.; Baek, N. I.; Kim, S. H.; Park, H. W.; Kim, D. K. Phytochemical constituents from *Diodia teres*. *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *27*, 40-43.

63. Fernandez, J.; Reyes, R.; Ponce, H.; Oropeza, M.; VanCalsteren, M. R.; Jankowski, C.; Campos, M. G. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D<sub>4</sub>-induced contraction in guinea-pig airways. *European Journal of Pharmacology* **2005**, *522*, 108-115.
64. Yun, K. J.; Kim, J. Y.; Kim, J. B.; Lee, K. W.; Jeong, S. Y.; Park, H. J.; Jung, H. J.; Cho, Y. W.; Yun, K.; Lee, K. T. Inhibition of LPS-induced NO and PGE<sub>2</sub> production by asiatic acid via NF-κB inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *International Immunopharmacology* **2008**, *8*, 431-441.
65. Hong, Y. H.; Song, M. C.; Han, J. T.; Jang, T. O.; Lee, Y. H.; Kim, S. H.; Kim, S. A.; Park, M. H.; Baek, N. I. Isolation and identification of terpenoids from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*. *J. Korean Soc. Agrc. Chem. Biotechnol.* **2003**, *46*, 144-149.
66. Chung, T. Y.; Kim, M. A.; Jones, A. D. Antioxidative activity of phenolic acids isolated from Jindalrae flowers (*Rhododendron mucronulatum*). *Agrc. Chem. Biotechnol.* **1996**, *39*, 506-511.
67. Chung, T. Y.; Kim, M. A.; Jones, A. D. Antioxidative activity of flavonoids isolated from Jindalrae flowers (*Rhododendron mucronulatum*). *Agrc. Chem. Biotechnol.* **1996**, *39*, 320-326.
68. Choi, S. E.; Park, K. H.; Han, B. H.; Jeong, M. S.; Seo, S. J.; Lee, D. I.; Joo, S. S.; Lee, M. W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase

- and cyclooxygenase-2 expression by phenolic compounds from roots of *Rhododendron mucronulatum*. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1301-1305.
69. 고나영. 당근의 성분 연구. *서울대학교* **2006**, 석사학위논문.
70. Liu, Y.; Zhang, C.; Wei, S.; Cui, H.; Huang, H. Compounds from the subterranean part of Johnsongrass and their allelopathic potential. *Weed Biology and Management* **2011**, *11*, 160-166.
71. El-Domiaty, M. M.; Wink, M.; Aal, M. M. A.; Abou-Hashem, M. M.; Abd-Alla, R. H. Antihepatotoxic activity and chemical constituents of *Buddleja asiatica* Lour. *Z. Naturforsch.* **2009**, *64*, 11-19.
72. Shrestha, S.; Lee, D. Y.; Part, J. H.; Cho, J. G.; Seo, W. D.; Kang, H. C.; Jeon, Y. J.; Yeon, S. W.; Bang, M. H.; Baek, N. I. Flavonoid glycosides from the fruit of *Rhus parviflora* and inhibition of cyclin dependent kinases by hyperin. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2012**, *55*, 689-693.
73. Comalada, M.; Ballester, I.; Bailon, E.; Sierra, S.; Xaus, J.; Galvez, J.; Sanchez de Medina, F.; Zarzuelo, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology* **2006**, *72*, 1010-1021.
74. Manthey, J. A.; Guthrie, N.; Grohmann, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8*, 135-153.

75. Park, C. M.; Song, Y. S. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- $\kappa$ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutr. Res. Pract.* **2013**, *7*, 423-429.
76. Azuine, M. A.; Goswami, U. C.; Katal, J. J. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of carotenoids and dietary palm oil. *Nutr. Cancer* **1992**, *17*, 287-295.
77. Steinmetz, K. A.; Potter, J. D. Vegetable, fruit, and cancer II mechanism. *Cancer Causes Control* **1991**, *2*, 427-442.
78. Yoo, J. S.; Cheun, B. S.; Kim, N. G. Determination of Na<sup>+</sup> channel blocker in seaweeds. *J. Environ. Biol.* **2001**, *19*, 107-112.
79. 이동환. 노화 피부섬유아세포에서 가수분해된 구멍갈파래 추출물의 콜라겐 항상성 조절 효과. *충북대학교* **2014**, 석사학위논문.
80. Xu, J. H.; Lu, Q. H.; Zhao, Y. Studies on chemical constituents of green algae *Ulva pertusa*. *China Journal of Chinese Materia Medica* **2007**, *32*, 1536-1538.
81. Wang, C. Y.; Han, L.; Kang, K.; Shao, C. L.; Wei, Y. X.; Zheng, C. J.; Guan, H. S. Secondary metabolites from green algae *Ulva pertusa*. *Chemistry of Natural Compounds* **2010**, *46*, 828-830.
82. Okano, M.; Aratani, T. Constituents in marine algae-I Seasonal variation of sterol, hydrocarbon, fatty acid, and phytol fractions in *Ulva pertusa*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*



- 1979, 45, 389-393.
83. Ren, J.; Qin, J. J.; Cheng, X. R.; Yan, S. K.; Jin, H. Z.; Zhang, W. D. Five new sesquiterpene lactones from *Inula hupehensis*. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, 36, 1319-1325.
84. Hausler, M.; Montag, A. Isolation, identification and quantitative determination of the norisoprenoid (S)-(+)-dehydrovomifoliol in honey. *Z Lebensm Unters Forsch* **1989**, 189, 113-115.
85. Machida, K.; Kikuchi, M. Norisoprenoids from *Viburnum dilatatum*. *Phytochemistry* **1996**, 41, 1333-1336.
86. Chen, L.; Izumi, S.; Ito, D. I.; Iwaeda, T.; Utsumi, R.; Hirata, T. Secretion of allelochemicals from the cultured suspension cells of *Marchantia polymorpha*. *Chemistry Letters* **1996**, 3, 205-206.
87. Ko, R. K.; Kang, M. C.; Kim, S. S.; Oh, T. H.; Kim, G. O.; Hyun, C. G.; Hyun, J. W.; Lee, N. H. Anti-melanogenesis constituents from the seaweed *Dictyota coriacea*. *Natural Product Communications* **2013**, 8, 427-428.