



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

억새뿌리·갯기름나물의
생리활성물질 동정 및 표준화연구



濟州大學校 大學院

化 學 科

李 禎 娥

2011年 2月

억새뿌리·갯기름나물의 생리활성물질 동정 및 표준화연구

指導教授 鄭 惠 商

李 禎 娥

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

李禎娥의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2011年 2月

Identification and Standardization of bioactive compounds
from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* and
Peucedanum japonicum Thunberg

Jung-A Lee

(Supervised by professor Duk-Sang Jung)

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

2011. 2.

This dissertation has been examined and approved.

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	iv
List of Figures	vi
ABSTRACT	xi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 재료	8
1-1. 억새	8
1-2. 갯기름나물	10
2. 시약 및 기기	13
2-1. 추출 및 분리과정	13
2-2. 세포배양 및 활성측정	13
3. 추출 및 성분 분리	14
3-1. 억새뿌리의 추출 및 성분 분리	14
3-2. 갯기름나물의 추출 및 성분 분리	18
4. 활성 검색	22
4-1. DPPH radical scavenging test	22
4-2. Tyrosinase inhibition test	22
4-3. Melanin 생합성 저해율 측정	23
4-4. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정	24
4-5. Nitric Oxide 저해 활성 측정	24
5. 분리된 성분들에 대한 분석 방법의 표준화	25
5-1. 표준액과 검액의 제조	25
5-2. HPLC 분석	25
5-3. 분석방법의 검증	26

5-4. 분리된 성분의 최적 추출 조건 확립 및 표준화된 전처리 방법 확립	27
6. 표준화된 분석 방법의 적용 및 최적 추출 조건의 확립	28
6-1. 표준화된 분석 방법의 적용	28
6-2. 최적 추출 조건의 확립	29
6-3. 표준화된 전처리 방법 및 분석 방법을 이용한 시료의 분석	30
III. 결과 및 고찰	31
1. 화합물의 구조 결정	31
1-1. 익새뿌리에서 분리된 화합물의 구조 결정	31
1-2. 갯기름나물에서 분리된 화합물의 구조 결정	43
2. 활성 결과	55
2-1. 항산화 실험 결과	55
2-2. Tyrosinase 저해활성 결과	60
2-3. Melanin 생합성 저해율 측정 결과	65
2-4. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과	71
2-5. Nitric Oxide 저해활성 측정 결과	73
3. 익새뿌리에 함유된 Methyl 4-hydroxy cinnamate의 분석 방법 표준화	76
3-1. HPLC 분석조건	76
3-2. 분석법의 검증 (validation)	76
4. 갯기름나물에 함유된 Peucedanol의 분석 방법 표준화	82
4-1. HPLC 분석조건	82
4-2. 분석법의 검증 (validation)	82
5. 표준화된 분석 방법의 적용 및 최적 추출 조건의 확립	88
5-1. 익새 뿌리 중 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 분석 방법 적용	88
5-2. 갯기름나물 중 Peucedanol의 최적 추출 조건의 확립	92
5-3. 표준화된 전처리 방법 및 분석 방법을 이용한 시료의 분석	100

6. 분리된 화합물의 기능성 분류	103
6-1. 억새뿌리 중 Methyl 4-hydroxy cinnamate성분의 기능성 분류 ·	103
6-2. 갯기름나물 중 Peucedanol 성분의 기능성 분류	109
IV. 요약 및 결론	116
V. 참고문헌	118



List of Tables

Table 1. NMR spectroscopic data for compound 1 (in CD ₃ OD)	32
Table 2. NMR spectroscopic data for compound 2 (in CD ₃ OD)	38
Table 3. NMR spectroscopic data for compound 3 (in CD ₃ OD)	44
Table 4. NMR spectroscopic data for compound 4 (in CD ₃ OD)	50
Table 5. DPPH radical scavenging effects (RC ₅₀) of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	55
Table 6. DPPH radical scavenging effects (RC ₅₀) of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	58
Table 7. Tyrosinase inhibitory activity (IC ₅₀) of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	60
Table 8. Tyrosinase inhibitory activity (IC ₅₀) of compound 1 and 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	62
Table 9. Tyrosinase inhibitory activity (IC ₅₀) of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	63
Table 10. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	66
Table 11. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 1 and 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	67
Table 12. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	69
Table 13. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 3 and 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	70
Table 14. Operating conditions of HPLC for determination of Methyl 4-hydroxy cinnamate	76

Table 15. Concentration of Methyl 4-hydroxy cinnamate analyzed in 5 different concentrations for intra-day precision	79
Table 16. Concentration of Methyl 4-hydroxy cinnamate analyzed in 5 different concentrations for inter-day precision	80
Table 17. Calculated concentration of Methyl 4-hydroxy cinnamate analyzed in 3 different concentrations for accuracy	81
Table 18. Operation conditions of HPLC for determination of Peucedanol	82
Table 19. Concentration of Peucedanol analyzed in 5 different concentrations for intra-day precision	85
Table 20. Concentration of Peucedanol analyzed in 5 different concentrations for inter-day precision	86
Table 21. Calculated concentration of Peucedanol analyzed in 3 different concentrations for accuracy	87
Table 22. Extraction efficiency of Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens by extraction times	91
Table 23. Extraction efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction solvents	92
Table 24. Extraction efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction Acetone percentage	94
Table 25. Extraction efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction Ethanol percentage	96
Table 26. Extraction efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction times	98
Table 27. Extraction efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction parts and concentration of <i>Angelica dahurica</i> extracts ..	100

List of Figures

Figure 1. Photograph of Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	9
Figure 2. Photograph of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	12
Figure 3. Procedure of extraction and various fraction from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	15
Figure 4. Isolation of the compound 1 and compound 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	17
Figure 5. Procedure of extraction and various fraction from <i>Peucedanum</i> <i>japonicum</i> Thunberg	19
Figure 6. Isolation of the compound 3 and compound 4 from <i>Peucedanum</i> <i>japonicum</i> Thunberg	21
Figure 7. Methyl 4-hydroxy cinnamate	32
Figure 8. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 from Roots of <i>Miscanthus</i> <i>sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	33
Figure 9. ¹³ C-NMR and DEPT spectrum of compound 1 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	34
Figure 10. HMQC spectrum of compound 1 from Roots of <i>Miscanthus</i> <i>sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	35
Figure 11. HMBC spectrum of compound 1 from Roots of <i>Miscanthus</i> <i>sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	36
Figure 12. 4-hydroxybenzaldehyde	38
Figure 13. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 from Roots of <i>Miscanthus</i> <i>sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	39
Figure 14. ¹³ C-NMR and DEPT spectrum of compound 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	40

Figure 15. HMQC spectrum of compound 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	41
Figure 16. HMBC spectrum of compound 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	42
Figure 17. 4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol	44
Figure 18. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	45
Figure 19. ¹³ C-NMR and DEPT spectrum of compound 3 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	46
Figure 20. HMQC spectrum of compound 3 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	47
Figure 21. HMQC spectrum of compound 3 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	48
Figure 22. 7-hydroxy-6-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-2H-chromen-2-one	50
Figure 23. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	51
Figure 24. ¹³ C-NMR and DEPT spectrum of compound 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	52
Figure 25. HMQC spectrum of compound 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	53
Figure 26. HMBC spectrum of compound 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	54
Figure 27. DPPH radical scavenging effects of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	56
Figure 28. DPPH radical scavenging effects of compound 1 and 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	57
Figure 29. DPPH radical scavenging effects of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	58

Figure 30. DPPH radical scavenging effects of compound 3 and 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	59
Figure 31. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	61
Figure 32. Tyrosinase inhibitory activity of compound 1 and 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	62
Figure 33. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from <i>Peucedanum</i> <i>japonicum</i> Thunberg	64
Figure 34. Tyrosinase inhibitory activity of compound 3 and 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	65
Figure 35. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	66
Figure 36. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 1 and 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	68
Figure 37. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	69
Figure 38. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 3 and 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	71
Figure 39. Cell viability using B16F10 melanoma of several extracts, compound 1 and 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens	72
Figure 40. Cell viability using B16F10 melanoma of several extracts, compound 3 and 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	73
Figure 41. The inhibitory effects of several extracts, compound 1 and 2 from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. purpurascens on NO production in RAW264.7 cells	74
Figure 42. The inhibitory effects of several extracts, compound 3 and 4 from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg on NO production in RAW264.7 cells	75

Figure 43. HPLC chromatogram of Methyl 4-hydroxy cinnamate, Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i> extract	77
Figure 44. Calibration curve of Methyl 4-hydroxy cinnamate	78
Figure 45. HPLC chromatogram of Peucedanol, <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg extract	83
Figure 46. Calibration curve of Peucedanol	84
Figure 47. Chromatogram of several solvent extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	89
Figure 48. Chromatogram from top parts of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	90
Figure 49. Extraction efficiency of Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i> by extraction times	91
Figure 50. Extraction yield efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction solvents	93
Figure 51. Extraction concentration efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction solvents	93
Figure 52. Extraction concentration efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction Acetone percentage	95
Figure 53. Extraction yield efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction Acetone percentage	95
Figure 54. Extraction concentration efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction Ethanol percentage	97
Figure 55. Extraction yield efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction Ethanol percentage	97
Figure 56. Extraction concentration efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction times	99
Figure 57. Extraction yield efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction times	99

Figure 58. Extraction concentration efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction parts and concentration of <i>Angelica dahurica</i> extracts	101
Figure 59. Extraction yield efficiency of <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by extraction parts and concentration of <i>Angelica dahurica</i> extracts	102
Figure 60. DPPH radical scavenging effects of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	104
Figure 61. DPPH radical scavenging effects of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i> by extraction times	105
Figure 62. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	106
Figure 63. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i> by extraction times	107
Figure 64. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	108
Figure 65. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Roots of <i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i> by extraction times	109
Figure 66. DPPH radical scavenging effects of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	110
Figure 67. DPPH radical scavenging effects of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by peucedanol concentration	111
Figure 68. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	112
Figure 69. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by peucedanol concentration	113
Figure 70. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	114
Figure 71. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg by peucedanol concentration	115

ABSTRACT

The Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* have been used for acidemia and respiratory disease.

The roots of *Peucedanum japonicum* Thunberg have been used for hypertension, diuresis, suppression and menorrhagia.

In this Study, I performed measurement of antioxidative activity, Whitening effect, anti-inflammatory activity and quantitative standardization from the Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* and *Peucedanum japonicum* Thunberg.

70% MeOH extracts of the Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* and *Peucedanum japonicum* Thunberg was fractionated by n-Hexane, Methylenechloride (MC), Ethyl acetate (EA) n-Butanol and Water, with five fractions, scavenging activity of DPPH radicals, test of inhibition on tyrosinase, test of inhibition on melanin synthesis by using B16F10 melanoma cell and test of inhibition on NO production by using 264.7 RAW cell were screened to determine antioxidant activity, whitening activity and anti-inflammatory activity. As a result, 70% MeOH extracts, MC and EA fractions of the Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* showed to have good qualified activities. And 70% MeOH extracts and EA fraction of *Peucedanum japonicum* Thunberg showed to have good qualified activities.

Based on this result, components were isolated by activity guided fractionation.

In MC fraction of the Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*, two compounds were isolated and elucidated as Methyl 4-hydroxy cinnamate (compound 1) and 4-hydroxybenzaldehyde (compound 2) by physicochemical data spectroscopic methods.

In EA fraction of *Peucedanum japonicum* Thunberg, two compounds were

4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol (compound 3) and 7-hydroxy-6-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-2H-chromen-2-one (Peucedanol, compound 4) by physicochemical data spectroscopic methods.

To investigate the melanogenesis inhibitory effects of these compounds, the melanin level and tyrosinase activity were examined in B16F10 melanoma cell. Compound 1 inhibited both tyrosinase activity and melanin synthesis compared with positive control arbutin.

Quantitative analysis methods were developed by HPLC. Validation for verification of HPLC methods was carried out to check to specificity, linearity, intra-day precision, inter-day precision and accuracy by ICH guideline. At the same time, quantitative HPLC methods were established to measure content of each standard compound on extracts.

These result suggest that methyl 4-hydroxycinnamate from the Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* might be a potent inhibitor against melanogenesis and these compounds could be further developed as skin whitening cosmeceuticals.

I. 서론

1. 연구배경

지구 환경은 점점 악화되고 있으며 특히 오존층 파괴는 자외선 조사량의 증가를 초래하여 결국 인체 피부에 다양한 해를 끼치고 있다¹⁾. 뿐만 아니라 경제활동의 확대에 따른 개인 소득의 증가로 삶의 질 향상을 추구하게 되었고 야외 활동이 과거에 비해 급속도로 증가하여 기미, 주근깨 등 멜라닌 색소의 침착에 기인한 피부 흑화 현상이 증가하는 추세이다²⁾. 최근에는 아름다움의 중요한 기본이 되는 피부색에 대한 관심이 높아지고 있는데, 피부색은 멜라닌이나 카로틴과 같은 색소 성분과 혈관 분포, 각질층의 두께 등에 의해서 결정되며 이중 가장 중요한 역할을 하는 멜라닌 생성에 이상이 발생하면 기미나 주근깨 등과 같은 과색소 침착증이 나타난다³⁾. 피부의 색소 침착은 표피의 기저층에 있는 색소세포에 의해서 생성되는 멜라닌이 그 원인으로 멜라닌 생성을 억제하는 천연 식물유래 성분의 미백효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

색소침착에 의한 피부색의 변화는 과도한 자외선 노출, 공해, 스트레스, 흡연 등의 다양한 원인에 의해 발생하며 주로 피부 조직 내 멜라닌 세포가 과도하게 형성되어 발생한다. 피부의 광노화 및 공해가 피부에 미치는 영향에 대한 인식이 확산되면서 보습, 영양 공급 및 피부 미화 차원을 넘어 피부 주름 형성 완화 및 개선, 미백효과, 자외선 차단 효과 및 공해 물질에 대한 방어 등의 기능을 가지는 기능성 화장품 제품에 대한 요구가 대두되고 있으며, 실제로 이러한 기능성 제품의 개발 및 출시가 점차 활성화 되고 있는 상황이다. 한국, 일본, 중국과 같은 동양 여성들은 하얀 피부에 대한 선호 때문에 화장을 통한 피부색 및 색소 침착 개선에 대한 욕구가 상당히 높은 편이다. 최근의 산업사회의 가속화 및 전반적인 문화 수준의 향상에 따라化粧료를 사용하고 있는 소비자들의 미에 대한 욕구는 더욱 증진되고 있는 실정이다⁴⁾.

최근 생약을 비롯한 생약제제의 수요 증가와 함께 생약의 효능과 안전성 확립을 위하여, 생약의 약효성분이나 특이성분을 지표물질로 한 정확한 정량분석에

의한 품질평가법의 확립이 필수 사항으로 대두되고 있다⁵⁾.

생약재의 품질관리 및 안전성 확보로 국민건강을 보호하기 위해서는 대한약전이나 생약규격집에 등재된 의약품만이라도 정품으로서의 품질이 보증된 의약품이 사용되어지는 것이 바람직하다. 하지만 시중에 유통되고 있는 대부분의 생약은 중국에서 수입하여 사용하고 있는 실정이며, 중국의 경우 지역적으로나 시장 규모가 방대하여 정품 이외에 형태가 유사하거나 위약의 경우가 허다하다. 또한, 각 나라마다 약전이나 생약규격집에 등재된 의약품의 기원이 조금씩 다르게 설정되어 생약명은 같지만 전혀 다른 품목이 유통될 수 있으며, 이로 인한 심각한 부작용이 우려된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 약전이나 생약규격집에 설정된 생약의 기준물질을 분리하고, 이것을 표준으로 하여 정량분석법에 의한 표준화된 품질 규격의 설정이 중요하다.

2. 생리활성에 대한 이론적 배경

2-1. 항산화

노화(senescence)란 태어나서 일정 기간 성숙한 단계가 피크에 달 한 후, 나이가 들면서 생리적, 물리적 기능이 점차 저하되는 과정을 말하며, 대부분 10대 후반이나 20대 초반부터는 노화가 시작된다고 보는 것이 일반적이다. 따라서 노화방지 화장품을 광의로 보면, 인간의 노화를 일시 중지시키거나 또는 지연시킬 수 있는 화장품을 뜻한다고 하겠다. 이와 같은 측면에서 노화방지 화장품 개발을 위한 연구의 목표는 주로 표피세포의 분화재생, 세포외 기질(ECM) 응용과 활성산소(ROS) 제어 분야이다⁶⁾.

활성산소는 세포의 구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 비선택적, 비가역적으로 파괴작용을 함으로써 세포 노화를 촉진하고 있다. 생체 내에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 자외선, 방사선, 화학반응, 대사 과정을 통하여 생성되어 DNA 분절, 지질 과산화, 단백질의 비활성화 등을 통하여 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심-혈관 질환, 신부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 질병의 발

생과정에 관여하는 활성 산소 종으로는 superoxide anion, hydroxy radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등이 있다. 이들 활성산소는 생체 대사과정에서 생성되어 세포막지방질을 과산화시키고 세포막투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발시킨다고 보고되어 있으며, 이러한 활성산소 종들을 소거시킬 수 있는 역할을 할 수 있는 물질로서 페놀화합물, 카로티노이드, 유기산 및 스테로이드성 알칼로이드 화합물 등이 연구되어 있다.¹⁰⁾ 산업화로 인해 발생하는 다양한 공해물질에 노출되는 것을 피할 수 없는 현대인의 환경조건에서는 각종 활성산소 종이 체내에 축적될 기회가 많을 뿐 아니라, 생체 내 활성산소 종의 반응은 생체조직의 노화나 악성종양을 비롯한 성인병 발병의 원인이 되고 있다. 항산화 물질은 지방 및 지방을 함유한 식품의 산화를 억제해 줄 뿐만 아니라 생체 내에서 생성되는 활성산소 및 활성산소에 의해 유도되는 지질과산화 반응을 억제하는 생리활성 물질로써 크게 각광을 받고 있다.^{11,12)}

특히 우리 인체는 호흡작용을 통해 대기 중에 21%나 존재하는 산소를 전자수용체로 하여 에너지를 획득하고 있다. 이러한 호흡작용을 통해 사용되는 산소의 1-3%가 활성산소로 전환되기 때문에 끊임없이 ROS의 공격을 받고 있다. 따라서 항산화 물질의 개발은 의약품뿐만이 아니라 항노화 화장품 소재로 유용하게 응용될 것이다¹³⁾.

2-2. 미백활성

멜라닌은 동·식물과 미생물계에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 천연색소로 표피 기저층에 존재하는 melanocyte 내의 melanosome에서 합성된다¹⁴⁾. 멜라닌은 노란색과 빨간색을 나타내는 pheomelanin과 갈색과 검은색을 나타내는 eumelanin의 두 가지 종류로 체내에서 합성되며 피부, 머리카락, 눈동자 등에 분포되어 있다^{15,16)}. 멜라닌은 tyrosinase (monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine: oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1) 효소의 연속적 산화반응으로 생합성되며, tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정의 key enzyme으로 넓은 범위의 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리 함유효소이다¹⁷⁾.

Tyrosine은 멜라닌 세포내에서 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPAquinone으로 산

화되며 DOPAchrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,5-quinone이 되고, 그 후 indole-5,6-quinone으로 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다^{18,19)}. 종래 이 반응의 율속단계는 tyrosinase가 촉매하는 단계로서, 그 후의 반응은 자동산화에 의해 진행된다고 생각되고 있다. Tyrosinase는 상기한 바와 같이 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosinase hydroxylase로, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 key enzyme으로 작용한다²⁰⁾. 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부 내에서의 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해 할 수 있으므로, 피부 미백제 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제시험은 유용한 평가법으로 인정되고 있으며 광범위하게 응용되고 있다.

약용식물로부터 미백활성 소재를 탐색하고자 하는 연구는 국내의 많은 연구자들에 의해서 진행되고 있다. 그 결과 ellagic acid 및 flavonoid 계열의 화합물 이외에도 cinnamaldehyde, p-hydroxybenzoic acid, p-anicic acid 등도 활성이 있음이 확인되고 있다²¹⁾. 이들 화합물들은 tyrosinase 저해활성 뿐만 아니라 온화한 자외선 흡수효과와 함께 항산화 활성 등이 강하여 종합적으로 미백활성을 나타낼 것으로 판단된다. 천연 미백제 개발을 위해 최근까지 다양한 식물들이 연구되어 왔는데 그 중 tyrosinase 저해활성이 있는 것으로 알려진 것으로는 상백피²²⁾, 오배자²³⁾, 감초²⁴⁾, 녹차²⁵⁾, 석이²⁶⁾, 치자 열매²⁷⁾ 등이 보고되어있으며 일부는 제품에 사용되고 있다. 또한 최근에는 백출 (Atractylodis rhizoma)로부터 selin란 물질을 분리하여 미백화장품 개발에 성공한 예가 있다.

2-3. 항염증

Nitric oxide (nitrogen monoxide, NO)는 매우 작고 지용성이 큰 자유 라디칼 기체로서 biological membrane barriers를 통해 근접한 세포의 intracellular compartments에 급속히 확산되지만, 상대적으로 불안정하여 반감기가 2~5초 정도로 매우 짧은 편이다. NO는 감염균이나 종양 세포의 증식을 억제하거나 죽이는 등 주로 대식 세포의 활성화에 의해 매개되는 숙주의 방어 기작에 관여하고

또한 신경계 및 순환계의 생리적 전달에 중요한 조절자로서 작용하고 있음이 밝혀졌다²⁸⁾.

생체 내에서 일어나는 NO의 화학 반응은 peroxyntirite의 형성으로 라디칼 상태의 NO가 superoxide (O_2^-)와 반응하여 peroxyntirite ($ONOO^-$)를 형성하여 강력한 산화제로 작용하거나²⁹⁾, superoxide 또는 산소분자가 존재하지 않는 상황에서 단백질의 cysteine 잔기와 반응하여 nitrosothiol 기를 형성하여 세포 내 효소나 전사 조절인자들의 disulfide bridge의 형성과 해체를 변화시킴으로써 단백질의 3차 구조에 영향을 미칠 수 있게 한다³⁰⁾. 간단한 화학구조인 NO가 세포내 신호 조절인자로서 작용할 수 있는 이유 중 하나로는 이들이 강력한 라디칼로써 세포 내 다양한 화학반응을 유도 할 수 있다는 점이다. 그리고 이러한 화학 반응들이 생물학적 기능과 밀접하게 맞물려 생물학적인 NO의 효과로 나타난다³¹⁾.

Nitric oxide synthase (NOS)는 물리화학적 성질에 따라 Type I, II, III등 3 종류의 동종 효소로 분류된다. 즉 Type I (neuronal NOS, nNOS)과 Type III (endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS (constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II인 inducible NOS (iNOS)가 있다³²⁾. 이러한 NOS에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 NO가 형성된다.³³⁾ 자극에 의해 유도된 iNOS인 경우 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하게 되고, 생성된 NO는 매우 작으면서도 반응성이 있고 전기적으로 중성이기 때문에 합성된 곳에서 곧바로 확산되어 사망으로 퍼져 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.^{34,35)} 이처럼, 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 돌연변이유발, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.³⁶⁾ 그러므로 NO생성 저해제는 폐혈성 쇼크, 당뇨, 동맥경화 등의 만성질환 치료제로의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 이런 질병에 대한 치료제를 개발할 목적으로, 최근에는 천연물로부터 NO생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다.³⁷⁾

3. 표준화에 대한 이론적 배경

기능성분이라 함은 성분 자체가 기능성을 나타내고, 이러한 성분이 일정수준 이상으로 함유된 원료가 기능성을 나타냄이 확인될 때 기능성분이라고 말할 수 있다. 기능성분은 기능성 원료의 기능성을 일정하게 유지함을 확인할 수 있기 때문에 표준화를 위하여 기능성분으로 설정하는 것은 매우 이상적인 것이라 할 수 있다. 그러나 천연물의 조성은 수많은 화학물질로 이루어져 있고 이러한 화학물질 조성간의 유사성과 상호작용 등을 통해서 기능성을 보이는 경우가 있다. 이러한 복잡한 화학조성물질인 천연물에서 기능성분을 탐색하고 단일물질로 분리하는 것은 그리 쉬운 일은 아니기 때문에 지표성분으로 설정할 수 있다.

따라서 지표성분은 원재료를 대표하고 제조공정을 특징짓는 단일물질의 함량으로 설정하는 경우도 있지만 때에 따라서는 확인시험, 분광광도계를 이용한 유사물질들의 총 함량, 효소역가 시험 등으로 설정하기도 한다. 천연물에 함유된 기능성분 또는 지표성분을 선택하는데 있어서는 다음과 같은 특징을 고려할 수 있을 것이다.

- 특이성 : 원재료 또는 제조방법에 따라 특이적으로 존재하는 물질이 차별적인 함량차이를 갖는 성분
- 대표성 : 문헌조사 및 in vivo, in vitro 등의 실험을 통하여 추출물의 기능을 대표하는 성분 또는 추출물의 기능을 대표할 정도는 아니지만 추출물 중의 함량차이나 존재 유·무 등에 따라 추출물의 기능에 관여하는 성분
- 안정성 : 분리된 단일성분이 열, 빛, 습도 등의 일반적인 보관조건에서 안정성이 높은 성분
- 용이성 : 분리된 단일성분이 HPLC, GC, UV 등과 같은 범용화된 분석기기를 이용하는 방법, 상업적 표준물질의 사용가능 여부, 분석 비용 등을 고려하여 쉽게 이용이 가능한 성분³⁸⁾

4. 본 연구의 목표

본 연구는 제주도에서 자생하는 억새와 갯기름나물로부터 항산화 또는 미백활성을 갖는 물질을 분리하고, 이들 유효성분의 생리활성을 검정하며, 유효성분지표의 정량·정성 분석방법을 구축하고자 하였다.

- 억새뿌리의 경우 활성 물질의 분리나 활성에 대한 자료가 부족한 편이다. 그러므로 억새로부터 활성을 갖는 물질을 분리하고자 하였으며, 여기서 분리한 물질의 구조분석하고, 이 물질이 항산화 혹은 미백활성에 있어 기능성분 또는 지표성분으로서 활용할 수 있는지 확인하는 데 있다.
- 갯기름나물에 대한 연구는 활발히 진행되어 있는 편이나 미백활성에 대한 기능성 연구는 부족한 편이다. 그러므로 갯기름나물의 미백활성을 실험하였으며, 여기서 분리된 물질에 대해 구조분석을 하고, 이 물질이 항산화 또는 미백활성에 있어 기능성분 또는 지표성분으로서 활용할 수 있는지 확인해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1-1. 억새

억새(*Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*)는 산과 들에서 자란다. 높이 1~2m로, 뿌리줄기는 모여 나고 굽으며 원기둥 모양이다. 잎은 줄 모양이며 길이 40~70cm, 나비 1~2cm이다. 끝이 갈수록 뾰족해지고 가장자리는 까칠까칠하다. 맥은 여러 개인데, 가운데 맥은 희고 굵다. 밑동은 긴 잎집으로 되어 있으며 털이 없거나 긴 털이 난다. 뒷면은 연한 녹색 또는 흰빛을 띠고 잎혀는 흰색 막질(膜質:얇은 종이처럼 반투명한 상태)이며 길이 1~2mm이다. 꽃은 9월에 줄기 끝에 부채꼴이나 산방꽃차례로 달리며 작은 이삭이 촘촘히 달린다. 꽃차례 길이는 10~30cm이고 가운데 축은 꽃차례 길이의 절반 정도이다. 길이 4.5~6mm의 작은 이삭은 노란빛을 띠며 바소 모양에 길고 짧은 자루로 된 것이 쌍으로 달린다. 밑동의 털은 연한 자줏빛을 띠고 길이 7~12mm이다. 제1 포영(苞穎:작은 이삭 밑에 난 1쌍의 포)은 윗부분에 잔털이 나고 5~7개의 맥이 있으며 제2 포영은 3개의 맥이 있다. 끝이 2갈래로 갈라진 호영(護穎:화본과 식물 꽃의 맨 밑을 받치고 있는 조각)에서 길이 8~15mm의 까끄라기가 나온다. 내영(內穎:화본과 식물의 꽃을 감싸는 포 중 안쪽에 있는 것)은 길이 약 1.5mm로서 작으며 수술은 3개이다. 뿌리 땅근이라고도 하며 약으로 쓰고 줄기와 잎은 가축사료나 지분을 덮는데 사용되었다. 한국(전지역)·일본·중국 등지에 분포한다.

추출 실험에 사용한 억새는 2008년 5월 아라동 제주대학교 부근에서 채집하였다. 분석 실험에 사용한 억새는 2010년 10월 아라동 제주대학교 부근에서 채집하였다. 채집한 억새는 뿌리만 분리하여 깨끗하게 세척 후 실온에서 완전히 자연 건조 시켜 사용하였다(Figure 1).



Figure 1. Photograph of Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

1-2. 갯기름나물 (*Peucedanum japonicum* Thunberg)

갯기름나물 (*Peucedanum japonicum* Thunberg)은 미역방풍, 목단방풍, 산방풍, 목방풍, 식방풍 이라고 부르기도 하며, 잎은 나물로 먹고 뿌리는 약으로 쓰인다. 갯기름나물은 다년생 초본으로 높이 60 cm 정도로 자라며, 중, 남부 해안지대 산지의 바위틈이나 풀밭에서 자생한다. 줄기는 곧게 자라고 끝부분에 짧은 털이 있으나, 그 밖의 부분은 평활하며, 뿌리는 굵으나 목부분에 섬유가 있다. 잎은 어긋나고 잎자루가 길지만 회록색으로서 백분을 칠한 것 같으며, 질은 두텁고 2-3회 깃모양의 겹잎이다. 작은 잎은 도란형으로서 두꺼우나 흔히 3개로 갈라지고 불규칙하나 깊은 치아상의 톱니가 있으며 윗부분의 잎은 퇴화되거나 엽초가 커지지 않는다. 꽃은 6-8월 가지 끝과 줄기 끝에 겹산형화서로 10-20개의 작은 꽃자루 끝에 20-30개씩 백색꽃이 달린다. 총포는 없으나 작은 총포는 5-10개로서 삼각형 또는 피침형이다. 열매는 타원형의 분과로써 잔털이 있으나, 뒷면의 능선이 실처럼 가늘며 합생면에 8개의 유관이 있다³⁹⁻⁴¹⁾.

한편, *Peucedanum japonicum*의 성분 연구로는 Heta 등⁴²⁾이 1968년에 peucedanol, hamaudol, bergaptan을 분리하였고, 1991년에는 Chang 등⁴³⁾이 cytotoxic pyranocoumarin인 (+)-trans-khellactone와 (+)-trans-4'-acetyl-3'-tigloylkhellactone를 분리하였다. 그 후, 1992년에 Yasumasa 등⁴⁴⁾이 angular 타입의 dihydropyranocoumarins인 peujaponisin과 (-)-visnadin 등을 분리보고 하였으며, Chang 등⁴⁵⁾이 cytotoxic pyranocoumarin인 (-)-cis-khellactone을 분리 동정하였다. 1993년에 들어서는 Yasumasa 등⁴⁶⁾이 angular 타입의 dihydropyrano-coumarins인 peujaponisinol A and B를 분리하였고, 1994년에 Ikeshiro 등⁴⁷⁾이 coumarin glycoside인 peujaponiside (peucedanol 7-O-β-D-apiofuranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside)를 분리 보고하였다. 1996년 되어서는 Chen 등⁴⁸⁾이 khellactone esters인 (-)-trans-3'-acetyl-4'-seneciolykhellactone, (+-)-cis-3'-acetyl-4'-tigloylkhellactone, (+-)-cis-4'-tigloylkhellactone, (+)-trans-4'-tigloyl-khellactone을 분리 보고하였고, 1998년에 Hsiao 등⁴⁹⁾이 3'4'-diisovalerykhellactone diester를 분리 동정하였다. 이 후 1999년에 Choi 등⁵⁰⁾이 praeruptorin A, xanthotoxin, psoralen, isopimpinellin을 분리 보고하였고, 2004년에 Masashi

Hisamoto 등⁵¹⁾이 (3S)-O-D-glucopyranosyl-6-[3-oxo-(2S)-butenyliidenyl]-1,1,5-trimethylcyclohexan(5R)-ol과 phenylpropanoid glucosides인 3-(2-O-D-glucopyranosyl-4-hydroxyphenyl)propanoic acid, methyl 3-(2-O-D-glucopyranosyl-4-hydroxyphenyl)propanoate를 분리 보고하였으며, 2005년 Zheng 등⁵²⁾이 coumarin 타입의 psoralen, scopoletin과 sterol인 daucosterol 그리고 aliphatic alcohol인 galactitol을 분리 동정하였다.

Peucedanum japonicum의 활성 연구로는 1991년 Takeuchi 등⁵³⁾이 phenylcoumarin 성분의 Ca^{2+} blocker 작용과 papaverine 유사 활성에 대해 보고하였고, 1992년 Jong 등⁵⁴⁾이 cis-khellactonediester의 혈액응고억제 활성을 보고하였으며, 1996년 Chen 등이 혈소판 응집 억제 효과에 대해서 보고하였다. 1998년 Aida 등⁵⁵⁾이 갯기름나물에서 분리한 khellactone의 항경련 작용 및 기관지 천식에 효과가 있음을 발표하였고, 1999년 Huong 등⁵⁶⁾이 coumarin 성분의 monoamine oxidase의 억제 활성을, 2002년 Lee 등⁵⁷⁾이 pyrocoumarin 성분의 nitric oxide와 cyclic GMP pathway에 의해 매개되는 혈압강하 작용에 대해서 보고하였다. 2003년 Hisamoto 등⁵⁸⁾이 Peucedanum japonicum 잎의 항산화 활성 효과를 연구하였고, 2004년 Lee 등⁵⁹⁾이 coumarin 성분의 항당뇨 활성을, 2004년 Moorioka 등⁶⁰⁾이 colon carcinogenesis의 예방효과를, 2005년 Zheng 등⁶¹⁾이 scopoletin의 항염 활성에 대한 연구를 발표하였다.

추출 실험에 사용한 갯기름나물은 2008년 7월 애월 해안도로에서 채집하였다. 분석 실험에 사용한 갯기름 나물은 2010년 7월 애월 해안도로에서 채집하였다. 채집한 갯기름나물 전초를 깨끗하게 세척 후 실온에서 완전히 자연 건조 시켜 사용하였다(Figure 2).



Figure 2. Photograph of *Peucedanum japonicum* Thunberg.

2. 시약 및 기기

2-1. 추출 및 분리과정

본 실험에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck Co., Fisher Co., Hyman Co.의 제품을 사용하였다. Normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60 (230-400mesh ASTM, Merck)이 사용되었고, Sephadex column chromatography에는 Sephadex LH-20(0.1-0.025 nm)이 사용되었다. 분리과정에서 사용된 TLC (Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. 구조분석에 이용되는 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400 (FT NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 NMR 전용 Merck Co.의 CD₃OD과 CDCl₃를 사용하였다.

2-2. 세포배양 및 활성측정

항산화 활성 측정 시 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 Sigma-Aldrich사 (USA)에서 구입하여 사용하였다. Tyrosinase 억제활성 실험에서 쓰인 L-tyrosine은 Sigma-Aldrich(USA)사의 시약을 사용하였다.

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin(GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, USA)배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

마우스 멜라노마 세포인 B16F10 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin(GIBCO, USA)이 포함된

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, USA)배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

활성 검색을 확인하기 위한 ELISA reader는 Multiskan EX (355-01R-09, Thermo Electron Co.)를 사용하였다.

2-3. 표준화

표준화에 사용된 용매는 Fisher Co.에 HPLC 급 Methanol을 사용하였다. 샘플 제조시 사용된 Filter는 PVDF Syringe filter (13 mm, 0.45 µm, Whatman)를 사용하였다. HPLC (High Performance Liquid Chromatograph)는 Waters 2690 XE (M996 PhotoDiode Array detector, Waters Co.)를 이용하였다. 측정시 컬럼은 Shimadzu사의 SHIM-PACK (VP-005, 150 × 4.6 mm)을 사용하였다.

3. 추출 및 성분 분리

3-1. 익새뿌리의 추출 및 성분 분리

3-1-1. 시료의 추출 및 성분 분리

제주시 아라동에서 자생하는 익새뿌리를 채집한 후 시료를 음지에서 음건하여 분쇄 추출하였다. 추출은 건조무게의 20배량의 80%(v/v) 메탄올에 침지하였고, 3개월 방치 후 상층액을 취한 다음 잔사에 20배량의 용매를 넣어 재추출하였다. 추출된 용매는 whatman 여과지 (No.2)를 이용하여 여과 하고, 여과액은 감압 농축기를 이용하여 40°C에서 농축하였다. 감압 농축된 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별깔대기를 이용해 각각 1 L 씩 *n*-Hexane 층, Dichloromethane (MC) 층, Ethyl acetate (EtOAc) 층, *n*-Butanol (*n*-BuOH) 층 및 물 층 5개의 용매분획층을 얻었다(Figure 3).

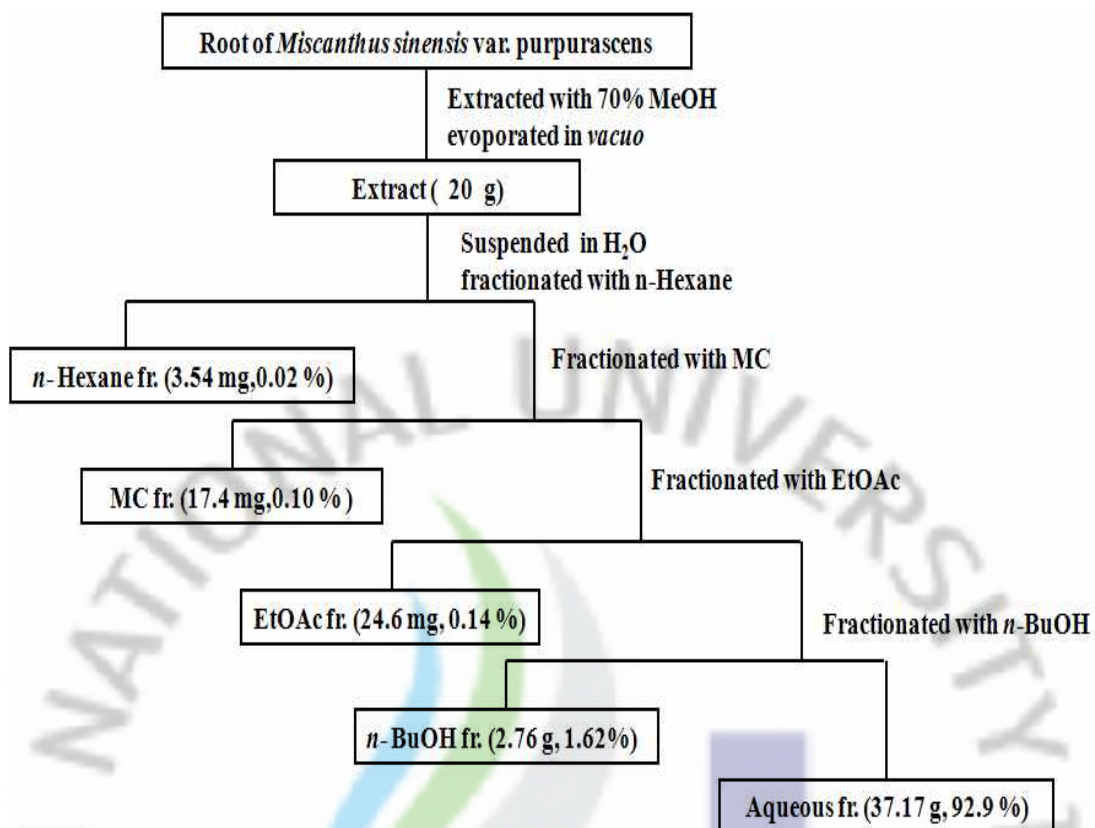


Figure. 3 Procedure of extraction and various fraction from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

3-1-2. Normal-phase column chromatography에 의한 분리과정

용매 분획하여 얻어진 각 분획 층들 중에서 Dichloromethane 분획층(932 mg)을 normal-phase column chromatography에서 MC/MeOH (14/1)의 전개용매로 전개시켜 7개의 분획층을 얻었다.

3-1-3. compound 1의 분리과정

2-2에서 얻어진 분획 중 Fr. 2 (72.6 mg)를 Sephadex LH-20에서 MC/MeOH (7/3)의 전개용매로 전개시켜 4개의 분획층을 얻었고, 그 중 Fr. 2-3에서 Compound 1(11.5 mg)을 얻었다.

3-1-4. compound 2의 분리과정

2-2에서 얻어진 분획 중 Fr. 3 (100.0 mg)을 Sephadex LH-20에서 MC/MeOH (7/3)의 전개용매로 전개시켜 3개의 분획층을 얻었고, 그 중 Fr. 3-3에서 Compound 2(2.1 mg)를 얻었다(Figure 4).

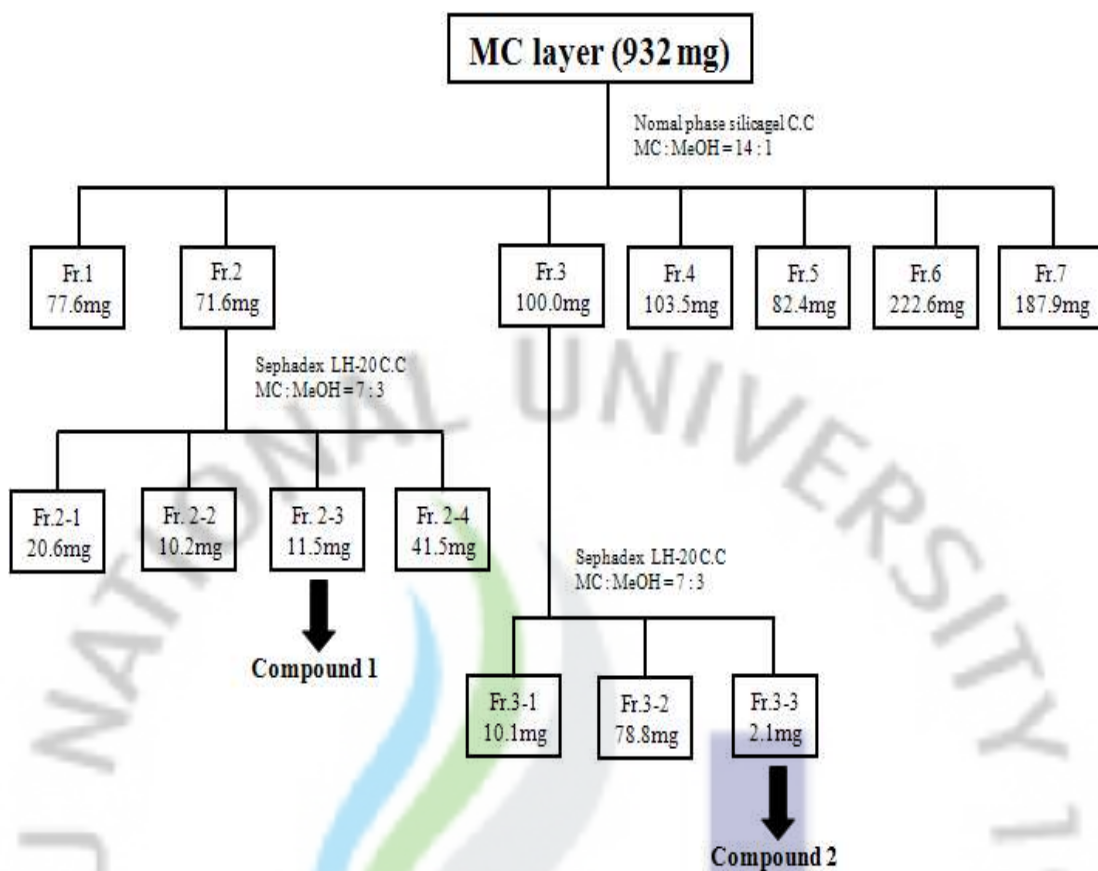


Figure 4. Isolation of the compound 1 and compound 2 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

3-2. 갯기름나물의 추출 및 성분 분리

3-2-1. 추출 및 용매분획

통풍이 잘되는 곳에서 음건된 시료를 세절 분쇄하여 추출하였다. 추출은 건조무게의 20배량의 80%(v/v) 메탄올에 침지하였고, 3개월 방치 후 상층액을 취한 다음 잔사에 20배량의 용매를 넣어 재추출하였다. 추출된 용매는 whatman 여과지(No.2)를 이용하여 여과하고, 여과액은 감압 농축기를 이용하여 40℃에서 농축하였다. 감압 농축된 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별깔대기를 이용해 각각 1 L 씩 *n*-Hexane 층, Dichloromethane (MC) 층, Ethyl acetate (EtOAc) 층, *n*-Butanol (*n*-BuOH) 층 및 물 층 5개의 용매분획층을 얻었다 (Figure 5).

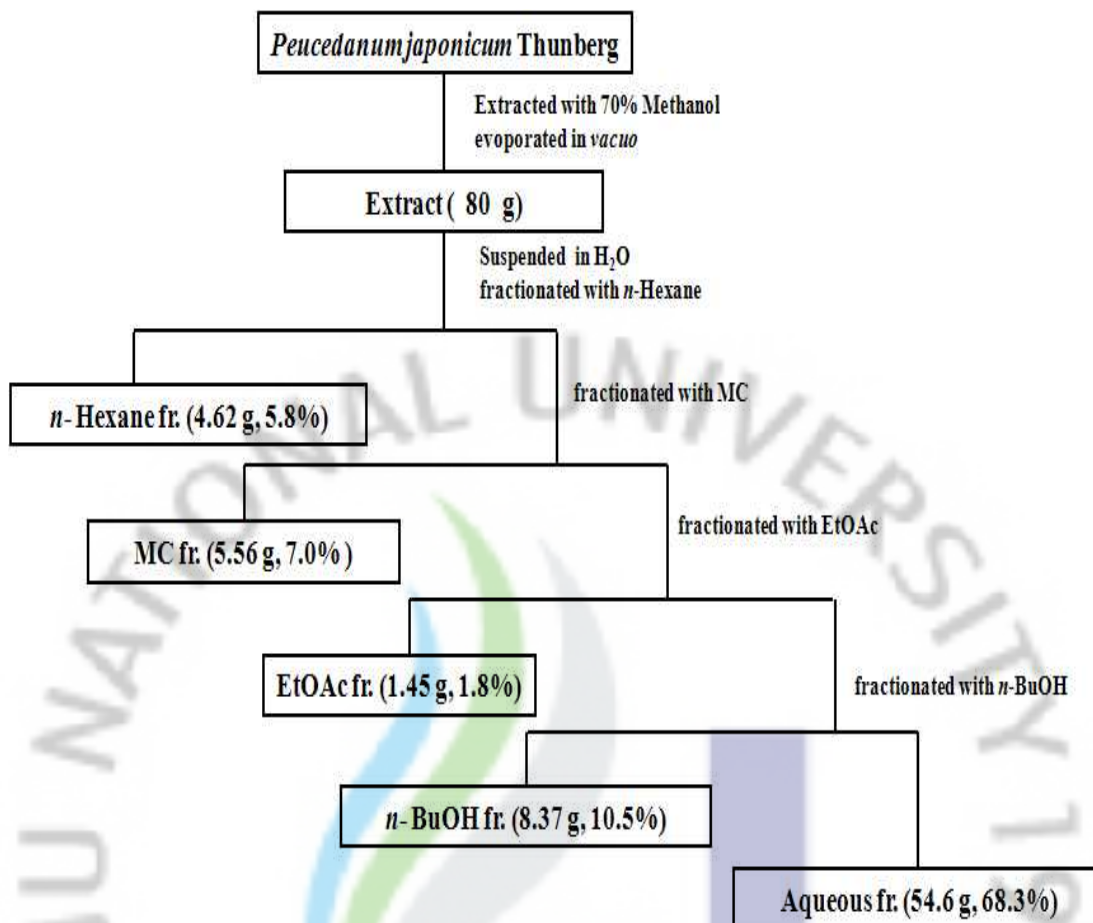


Figure 5. Procedure of extraction and various fraction from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

3-2-2. Normal-phase column chromatography에 의한 분리과정

용매 분획하여 얻어진 각 분획 층들 중에서 Ethyl acetate 분획층 (1.266 g)을 normal-phase column chromatography에서 MC/MeOH/H₂O (11/2/0.1)의 전개용매로 전개시켜 10개의 분획층을 얻었다. 이 중 Fr. 2를 다시 normal-phase C.C에서 MC/EtOAc/MeOH (12/6/1.5)의 전개용매로 전개시켜 6개의 분획을 얻었다.

3-2-3. compound 3의 분리과정

2-2에서 얻어진 분획 중 Fr. 2-2 (24.6 mg)를 Sephadex LH-20에서 MC/MeOH (6/4)의 전개용매로 전개시켜 5개의 분획층을 얻었고, 그 중 Fr. 2-2-4에서 Compound 3(4.0 mg)을 얻었다.

3-2-4. compound 4의 분리과정

2-2에서 얻어진 분획 중 Fr. 2-4 (40.7 mg)를 Sephadex LH-20에서 MC/MeOH (6/4)의 전개용매로 전개시켜 6개의 분획층을 얻었고, 그 중 Fr. 2-4-5에서 Compound 4(4.1 mg)를 얻었다(Figure 6).

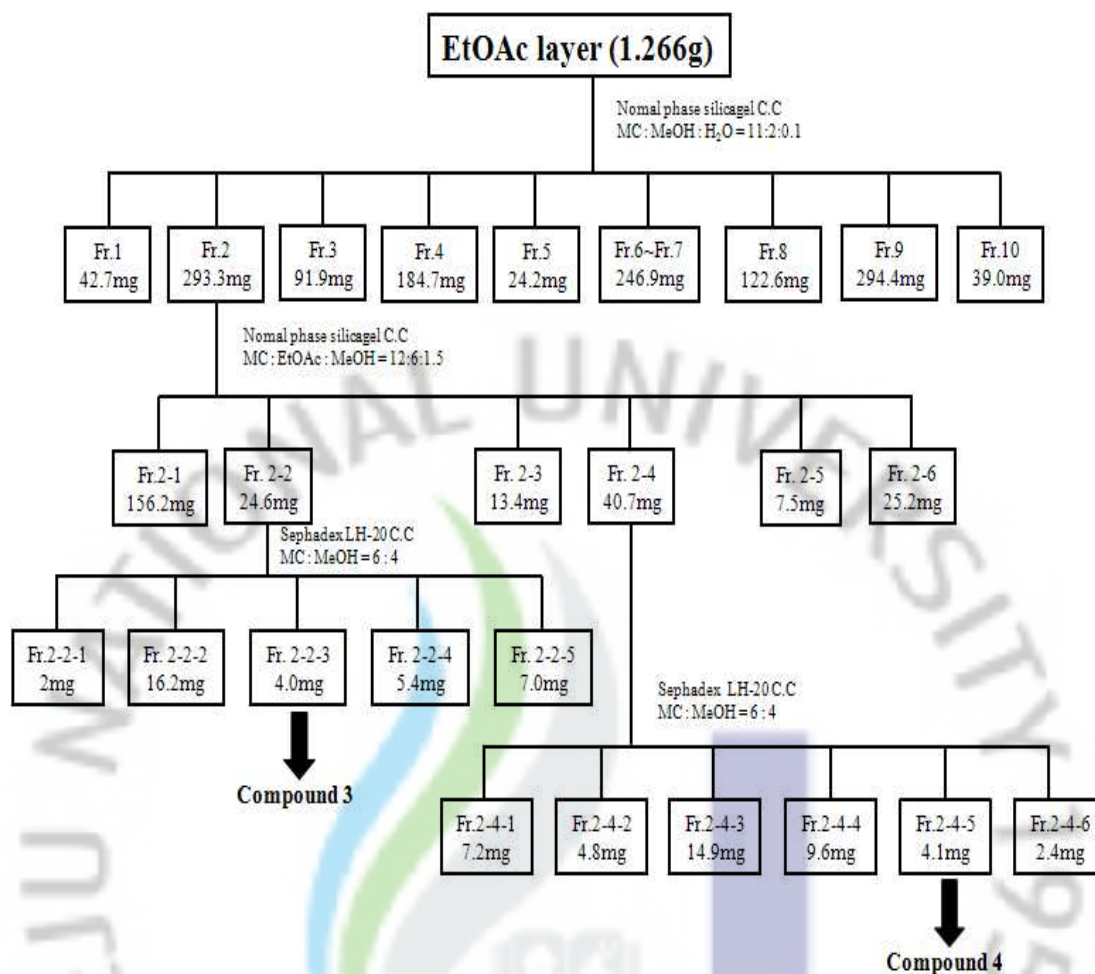


Figure. 6. Isolation of the compound 3 and compound 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

4. 활성 검색

4-1. DPPH radical scavenging test

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 화합물 내 질소 중심의 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정화된 구조의 라디칼로 존재한다. 이러한 DPPH는 517 nm에서 최대 흡수를 나타내며, 환원되면 517 nm에서 흡수가 없어진다. 따라서 DPPH의 환원정도는 환원제의 환원력에 달려있다고 할 수 있다.

DPPH에 의한 자유라디칼 소거활성은 Yoshida et al. (1989) 등의 방법을 변형하여 실시하였다⁶²⁾. 각 추출물의 DPPH radical 소거 활성 측정은 methanol에 녹인 여러 농도의 시료 각각을 96well plate에 100 μ l씩 분주하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이 때 DPPH 라디칼 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였으며, 라디칼 소거활성 정도가 50% 감소할 때 시료의 농도를 나타내는 RC₅₀값으로 효과를 표시하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 Ascorbic acid (Vitamin C)를 사용하였다.

$$\text{DPPH Inhibition Rate (\%)} = [A - (B - C) / A] \times 100$$

A : absorbance of not adding samples

B : absorbance of adding samples

C : absorbance of samples

4-2. Tyrosinase inhibition test

Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정 단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성억제 효과 정도를 *in vitro*에서 확인함으로써 미백 성분의 함유 정도를 검색할 수 있다^{63,64)}.

Tyrosine에서 멜라닌을 형성하는 일련의 산화 반응에서 Tyrosinase는 처음 Tyrosine이 dopa로 산화되는 과정과 다음 단계인 dopa가 dopaquinone으로 산화

되는 두 단계의 반응을 촉진한다. 효소의 활성도 측정은 Tyrosinase inhibition test는 DOPA chrome법⁶⁵⁾을 응용하여 기질인 L-tyrosine이 Tyrosinase에 의해 갈변 생성물인 DOPACHrome으로 변환하는 것을 490 nm에서 측정하였다.

0.1 M Phosphate buffer(pH6.5) 240 μ L와 시료액 20 μ L 그리고 25 μ L의 tyrosinase (EC 1.14.18.1) 10 μ L (1700 units/mL)를 순서대로 넣는다. 이 용액에 30 μ L의 L-Tyrosine 수용액(1.5 mM)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 70분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 Tyrosinase의 활성을 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 농도 (inhibition concentration, IC₅₀, μ g/mL)로 표시하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 Arbutin을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition rate(\%)} = [(C-D)-(A-B)]/(C-D) \times 100$$

A : Abs of experimental group

B : Abs of blank of experimental group

C : Abs of control group

D : Abs of blank of control group

4-3. Melanin 생합성 저해율 측정

B16 세포는 DMEM 배지를 사용하여 24 well plate에 1 \times 10⁵ cells/mL로 seeding 하고나서 24시간 후 시료를 처리 및 α -MSH(0.2 mM)의 농도로 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 항온기에서 3일간 배양하였다.

3일 후 배지를 제거하고 PBS로 세척 후, 세포를 수확하여 1 N NaOH를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 450 nm에서 ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교하였다.

4-4. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

B16 세포를 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate에 1.5×10^5 cells/mL로 seeding한 후, 시료를 처리하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 하루 동안 배양하였다. 다음 날부터 시료가 들어있는 새 배지로 3일간 매일 교환하고 하루 동안 더 배양한 후, plate의 배지를 제거한 다음에 MTT(40 mg/mL) 시약을 처리(0.1 mg)하여 형성된 formazan을 DMSO에 녹인 후 540 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례하며 다음과 같이 나타낸다.

$(\text{mean optical density in test well}) / (\text{mean optical density in control well}) \times 100$

4-5. Nitric Oxide 저해 활성 측정

RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 NO의 양은 Griess 시약으로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절된 후 24well에 접종하고, 실험물질과 LPS(1 µg/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO²⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상정액 100 µL와 Griess 시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphthylethylene -diamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 µL를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 값을 sodium nitrite (NaNO₂)를 표준으로 하여 비교하였다.

5. 분리된 성분들에 대한 분석 방법의 표준화

5-1. 표준액과 검액의 제조

5-1-1. HPLC 분석을 위한 표준액의 제조

각각의 표준품을 MeOH 이나 50% MeOH에 녹여 농도를 1.0 mg/ml로 만들었다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 각각 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 시료를 만들고, 15초간 vortexing 한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

5-1-2. 검액 제조

검체는 각각의 시료를 80% MeOH 용액에 50 mg/ml, 30 mg/ml의 농도로 녹이고, 15초간 vortexing 한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다.

5-2. HPLC 분석

5-2-1. 억제뿌리의 분석 조건

억제뿌리는 지표물질을 Methyl 4-hydroxy cinnamate로 선정하여 분석조건을 검토하였다. 컬럼은 Shimadzu사의 SHIM-PACK (VP-005, 150 \times 4.6 mm)을 사용하였고, 검출기는 UV 311.9 nm, 이동상으로는 5% 초산이 첨가된 메탄올과 물을, 유속은 1 mL/min를 사용하여 실험하였다.

5-2-2. 갯기름나물의 분석 조건

갯기름 나물은 지표물질을 Peucedanol로 선정하여 분석 조건을 검토하였다. 컬럼은 Shimadzu사의 SHIM-PACK (VP-005, 150 × 4.6 mm)을 사용하였고, 검출기는 UV 311.9 nm, 이동상으로는 5% 초산이 첨가된 메탄올과 물을, 유속은 1 ml/min를 사용하여 실험하였다.

5-3. 분석 방법의 검증 (Validation)

HPLC 분석법이 어느 정도의 신뢰도와 재현성을 갖는지 검증하기 위해서 ICH (International Conference on Harmonization) 가이드라인에 의한 분석법을 수행하였다⁶⁶⁾.

5-3-1. 특이성 (Specificity)

불순물, 분해산물, 기질물과 같이 예상할 수 없는 구성성분의 존재 하에서 분석물질을 확실하게 분석하는 능력으로, 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는 것에 의해 특이성을 확인하였다.

5-3-2. 직선성 (Linearity)

각 표준액에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의하여 5개의 농도 (12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml) 별로 피크 면적 비를 구하여 표준품 농도 (X축)와 피크 면적비 (Y축)에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선성의 상관계수를 구하여 확인하였다.

5-3-3. 일내 정밀도 (Intra-day Precision)

일정농도의 표준액의 일내 변동을 알아보기 위해 설정한 5가지 농도를 5개씩 반복하여 측정된 결과를 피크면적비의 변이계수(%)로 검토하였다.

5-3-4. 일간 정밀도 (Inter-day Precision)

일정농도의 표준액의 일간 변동을 알아보기 위해 설정한 5가지 농도를 하루에 1회씩 3일간 반복하여 측정된 결과를 피크면적비의 변이계수(%)로 검토하였다.

5-3-5. 정확성 (Accuracy)

표준액 3개 농도를 각 3회 주입하여 얻은 결과를 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차정도(회수율, %)로서 정확성을 평가하였다.

$$\text{회수율 (Recovery, \%)} = \text{측정농도/이론농도} \times 100$$

5-4. 분리된 성분의 최적 추출 조건 확립 및 표준화된 전처리 방법 확립

분석 방법의 검증을 통하여 확립된 HPLC 조건에 의해 각각의 검액을 분석하여 검량선에 대비하여 각각의 함량을 산출한다.

분리된 성분의 최적 추출 조건 확립 및 표준화된 전처리 방법을 확립하기 위하여 각각 식물들의 지표성분에 대하여 확립된 HPLC 분석 조건을 사용하여 표준액 및 검액을 각각 5회씩 분석한 후, 검량선에 대비하여 원료들의 지표성분의 함량을 산출하였다.

5-4-1. 검체의 추출

각각의 채집된 식물을 음지에서 음건하여 분쇄한 건조분말을 각각의 용매에 침적하고 실온에서 1시간동안 교반하여 침출시켜 추출하였다. 추출된 용매는 whatman 여과지 (No.2)를 이용하여 여과하고, 여과액은 감압 농축기를 이용하여 40℃에서 농축하였다.

5-4-2. 추출 용매에 따른 지표성분의 정량

추출 용매에 따른 지표성분의 함량 변화를 확인해 보기 위하여, 추출용매로 가장 많이 사용되는 Acetone, Methanol, Ethanol을 이용해 추출하였고 이에 따른 수득률 및 지표성분의 함량을 산출하였다.

5-4-3. 추출 용매의 조성에 따른 지표성분의 정량

추출 용매의 조성에 따른 지표성분의 함량 변화를 확인해 보기 위하여, 3.1에서 실험한 용매들 중 지표성분의 함량이 가장 높은 용매를 이용하여 10~100% 까지 용매의 조성을 변화시켜 추출한 후, 수득률 및 지표성분의 함량을 산출하였다.

5-4-4. 추출시간에 따른 지표성분의 정량

추출 시간에 따른 지표성분의 함량 변화를 확인해 보기 위하여, 1, 3, 6, 24, 48 시간마다 추출한 후, 수득률 및 지표성분의 함량을 산출하였다.

6. 표준화된 분석 방법의 적용 및 최적 추출 조건의 확립

6-1. 표준화된 분석 방법의 적용

분석 방법의 검증을 통하여 확립된 HPLC 조건에 의해 각각의 추출액을 분석하여 검량선에 대비하여 각각의 함량을 산출하였다.

분리된 성분들에 대한 표준화된 분석 방법을 적용하기 위해 각각 식물들의 지표성분에 대하여 확립된 HPLC 분석 조건을 사용하여 표준액 및 검액을 각각 5회씩 분석한 후, 검량선에 대비하여 원료들의 지표성분의 함량을 산출하였다.

6-1-1. 시료의 추출

각각의 채집된 식물을 음지에서 음건하여 분쇄한 건조분말을 각각의 용매에 침적하고 실온에서 1시간동안 교반하여 침출시켜 추출하였다. 추출된 용매는 whatman 여과지 (No.2)를 이용하여 여과하고, 여과액은 감압 농축기를 이용하여 40℃에서 농축하였다.

6-1-2. 추출물의 분석

각각의 추출물을 80% MeOH 용액에 50 mg/mL의 농도로 녹이고, 15초간 vortexing 한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 각각의 분석 방법에 맞춰 분석하였다.

6-2. 최적 추출 조건의 확립

6-2-1. 추출 용매에 따른 지표성분의 정량

추출 용매에 따른 지표성분의 함량 변화를 확인해 보기 위하여, 추출 용매로 가장 많이 사용되는 Acetone, Methanol, Ethanol을 이용해 추출하였고 이에 따른 수득률 및 지표성분의 함량을 산출하였다.

6-2-2. 추출 용매의 조성에 따른 지표성분의 정량

추출 용매의 조성에 따른 지표성분의 함량 변화를 확인 해 보기 위하여, 5-2-1에서 실험한 용매들 중 지표성분의 함량이 가장 높은 용매를 이용하여 10~100% 까지 용매의 조성을 변화시켜 추출한 후, 수득률 및 지표성분의 함량을 산출하였다.

6-2-3. 추출 시간에 따른 지표성분의 정량

추출 시간에 따른 지표성분의 함량 변화를 확인해 보기 위하여, 1, 3, 6, 24, 48 시간마다 추출한 후, 수득률 및 지표성분의 함량을 산출하였다.

6-3. 표준화된 전처리 방법 및 분석 방법을 이용한 시료의 분석

6-3-1. 추출물 중 Peucedanol의 정량

앞에서 확립된 전처리 방법 및 분석 방법을 이용하여 갯기름나물의 지상부, 꽃, 뿌리를 부위별로 추출해 Peucedanol 성분을 정량 하였다. 검체는 각각의 시료를 80% MeOH 용액에 50 mg/ml의 농도로 녹이고, 15초간 vortexing 한 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다. 또한, 미나리과에 속하는 식물인 구릿대(*Angelica dahurica*)를 같은 방법으로 추출하여 Peucedanol 성분에 대한 정량을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. 엑새뿌리에서 분리된 화합물의 구조 결정

1-1-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, HMBC를 통하여 확인하였다.

^1H NMR을 통하여 확인한 결과 δ 7.4 (1H, d, $J=8.7$)과 δ 6.7 (1H, d, $J=8.7$)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음을 예상하였고, coupling constant를 통해 방향족 고리의 수소가 para 위치에 커플링 하고 있다고 예측하였으며, δ 7.6 (1H, d $J=15.9$)과 δ 7.6 (1H, d $J=15.9$)의 coupling constant는 trans olefin을 가지고 있음을 예상할 수 있었다. δ 3.6 (3H, s)의 수소는 methoxy기가 존재하고 있음을 예측할 수 있었다.

^{13}C NMR을 통해서도 탄소의 총 개수가 7개 이상임을 예상 하였다. DEPT (135°)를 통해 2차 탄소는 없고, 3개의 peak가 4차 탄소임을 확인하였고, 2차탄소는 없고 5개의 3차 혹은 1차 탄소를 확인할 수 있었다. HMQC의 결과와 비교하여 δ 131.3과 δ 117.0의 탄소와 결합하고 있는 수소가 방향족 고리의 수소와 일치하고 있음을 통해 이 두 피크는 para coupling 하고 있는 방향족 고리의 탄소일 것이라고 예측할 수 있었다. 그리고 δ 169.9에서 Carbonyl기의 탄소가 있다고 예상하였고, δ 146.7과 δ 115.0은 ^1H NMR에서 예측한 olefin의 탄소가 Carbonyl기에 결합하고 있을 것이라고 예측할 수 있었다.

마지막으로 HMBC 데이터를 통해 위에서 예측했던 olefin 탄소와 Carbonyl기 탄소의 위치를 확인하였고, 문헌에서 제시된 데이터⁶⁷⁾와 비교한 결과 Compound 1은 Methyl 4-hydroxy cinnamate로 동정되었다.

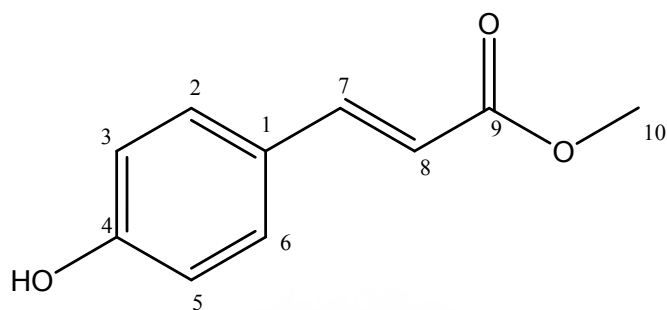
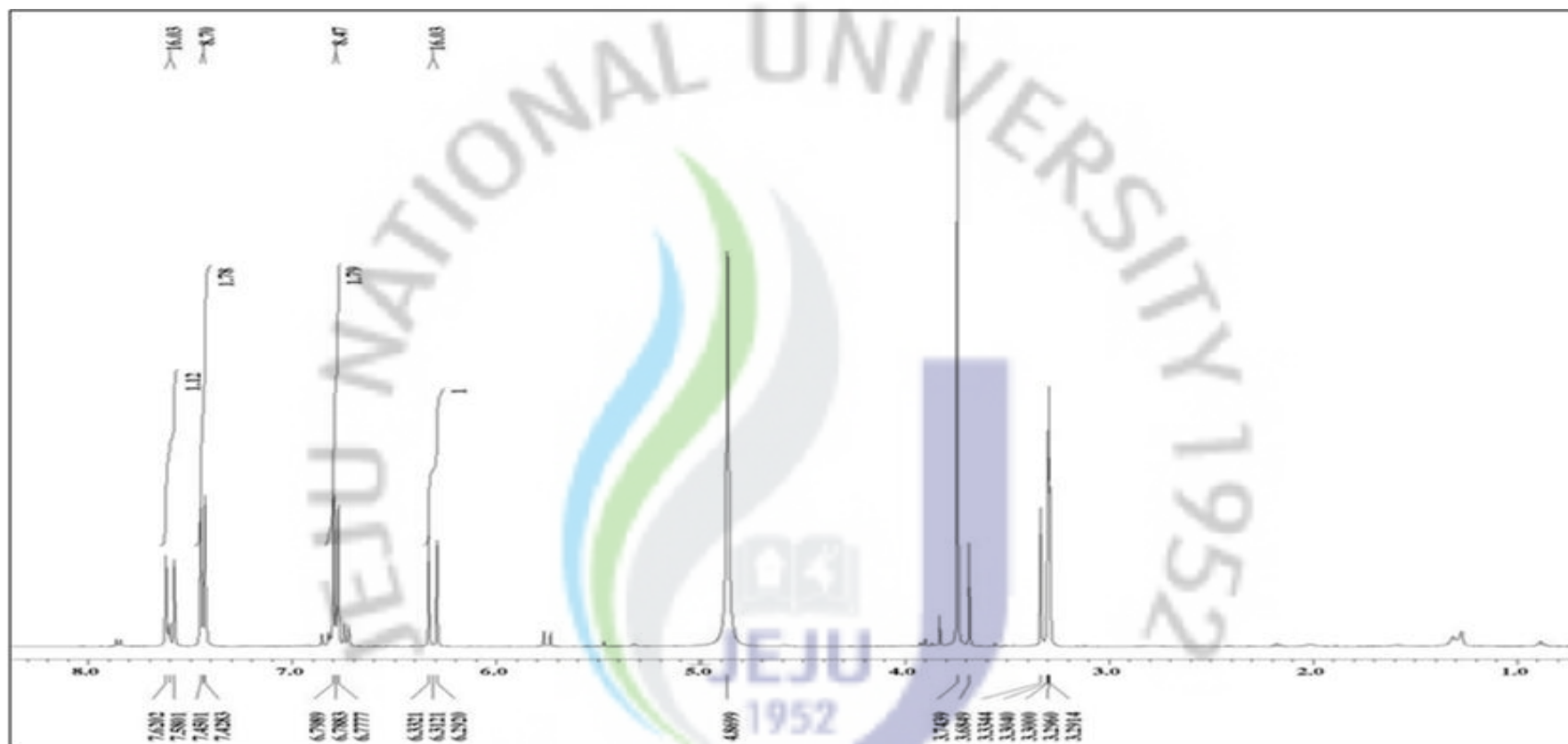


Figure 7. Methyl 4-hydroxy cinnamate

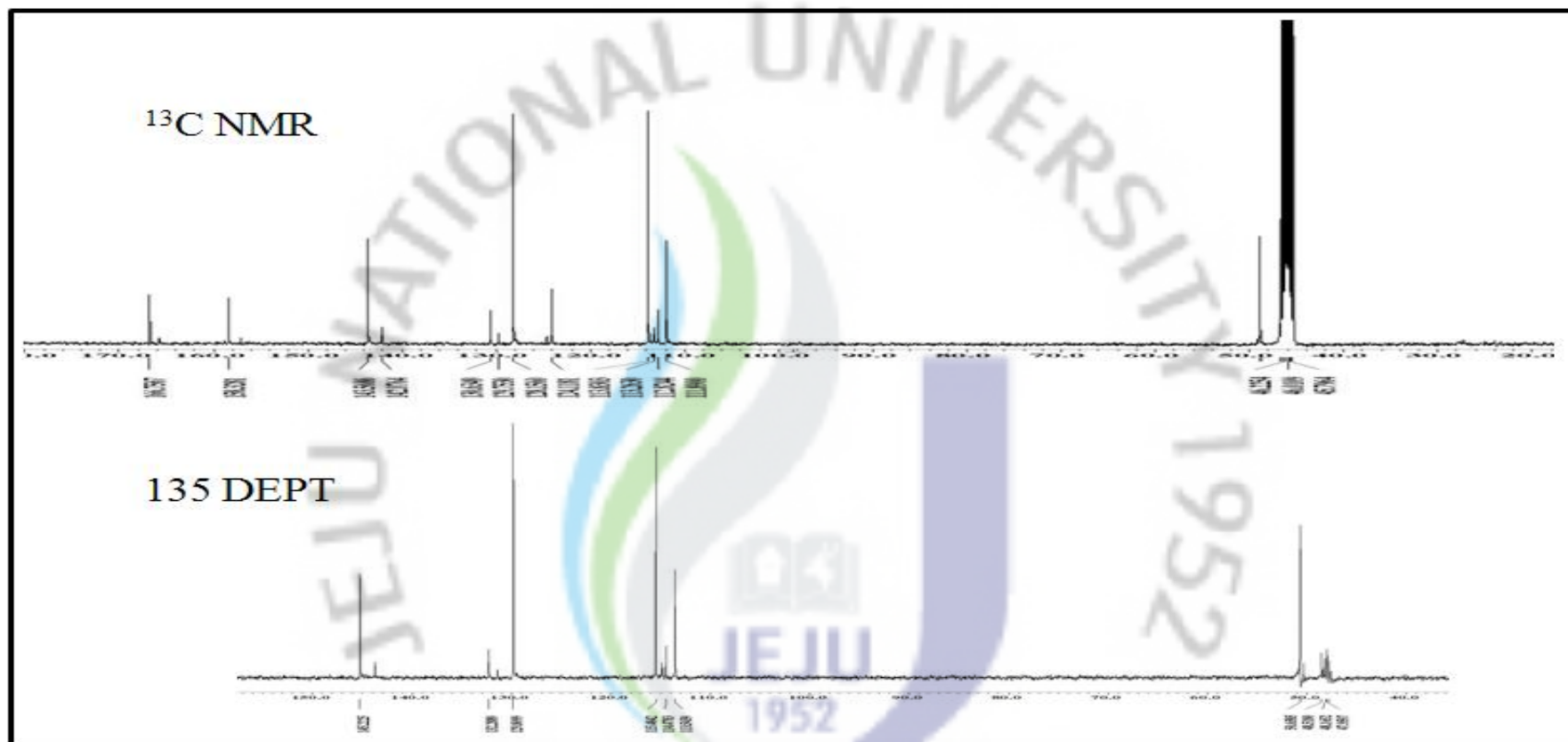
Table 1. NMR spectroscopic data for Compound 1 (in CD₃OD).

Position	Compound 1			
	$\delta^{13}\text{C}$	Dept	$\delta^1\text{H}$ (int, mult, J in Hz)	HMBC
1	127.2	C		C-3, C-8
2	131.3	CH	7.4 (1H, d, $J=8.7$)	C-4
3	117.0	CH	6.7 (1H, d, $J=8.7$)	C-1
4	161.5	C		C-2
5	117.0	CH	6.7 (1H, d, $J=8.7$)	
6	131.3	CH	7.4 (1H, d, $J=8.7$)	
7	146.7	CH	7.6 (1H, d, $J=15.9$)	C-2, C-9
8	115.0	CH	6.3 (1H, d, $J=15.9$)	C-1
9	169.9	C		C-7, C-10
10	49.4	CH ₃	3.6 (3H, s)	C-9



¹H NMR : 400 MHz in CD₃OD

Figure 8. ¹H-NMR spectrum of compound 1 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.



^{13}C NMR : 100 MHz in CD_3OD

Figure 9. ^{13}C NMR and DEPT spectrum of compound 1 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

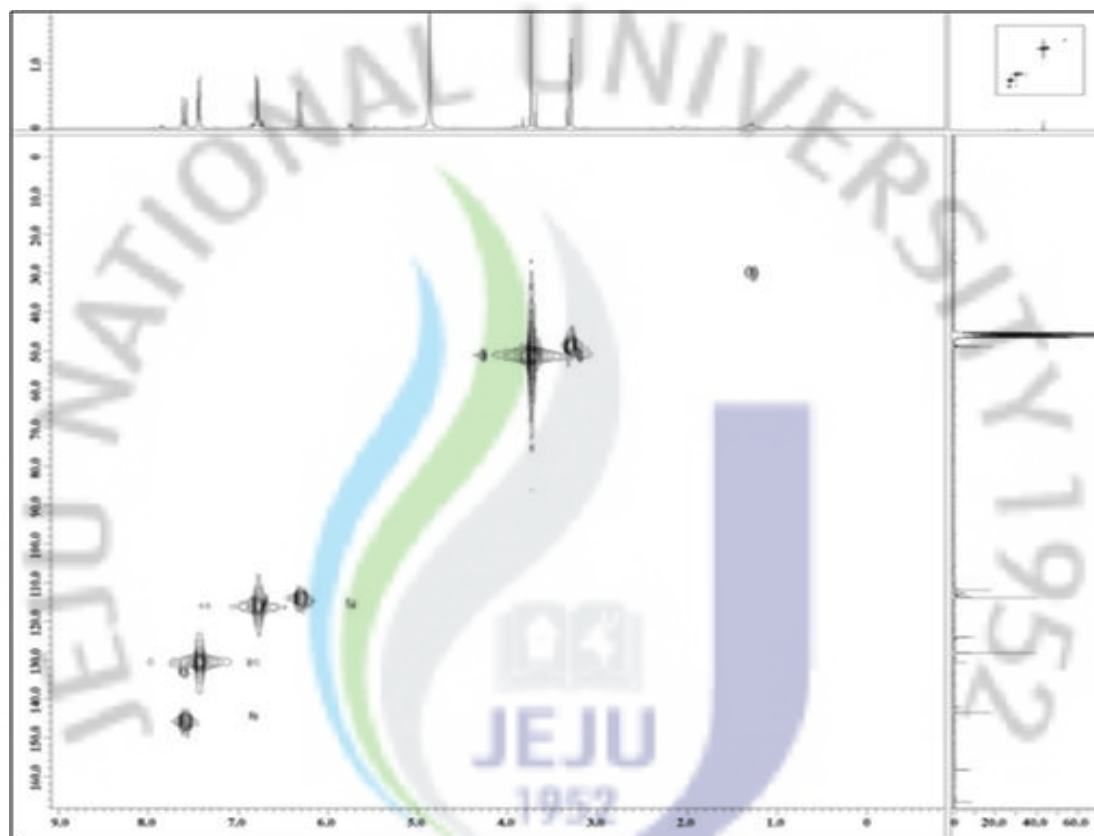


Figure 10. HMQC spectrum of compound 1 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

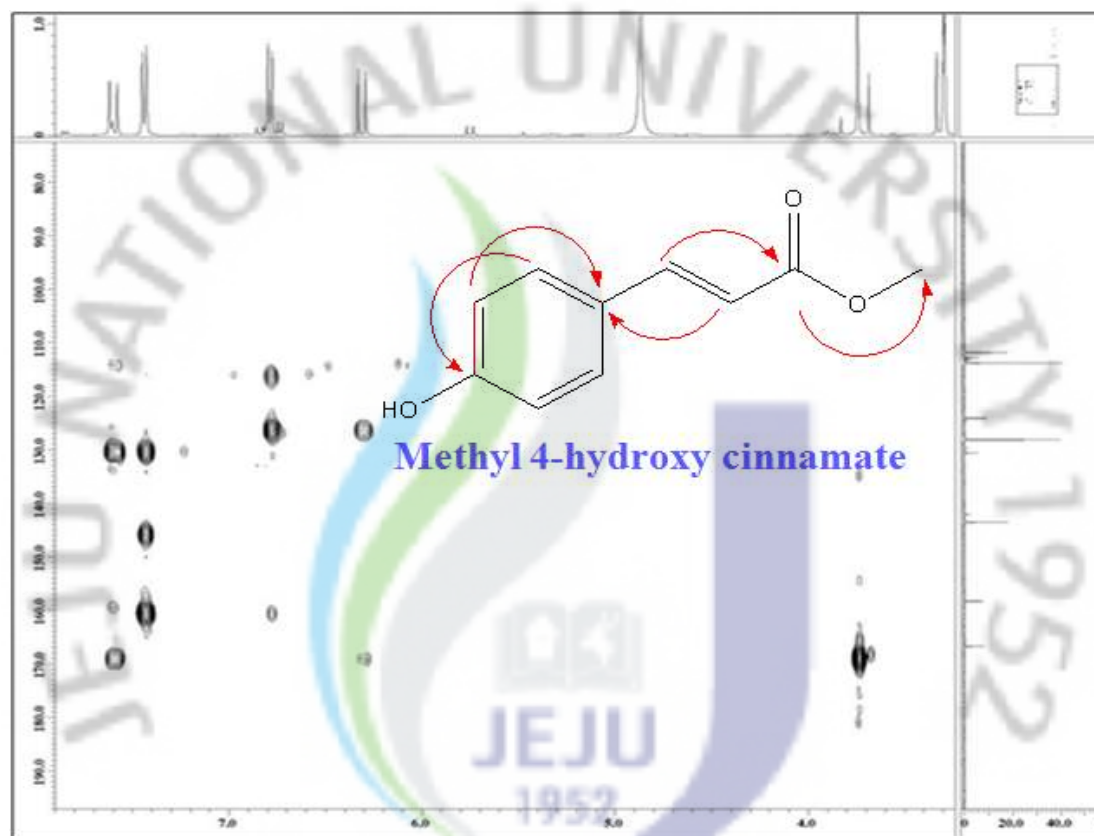


Figure 11. HMBC spectrum of compound 1 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

1-1-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, HMBC를 통하여 확인하였다.

^1H NMR을 통하여 확인한 결과 δ 7.7 (2H, d, $J=8.0$)와 δ 6.9 (2H, d, $J=8.2$)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음을 예상하였고, coupling constant를 통해 방향족 고리의 수소가 para 위치에 커플링하고 있다고 예측할 수 있다. δ 9.75 (1H, s)로 보아 Carbonyl기에 인접한 수소일 것이라고 예측하였다.

^{13}C NMR을 통해서 탄소의 총 개수가 5개 이상임을 예상하였다. DEPT(135°)를 통해 2개의 peak가 4차 탄소임을 확인할 수 있었고 2차 탄소는 없고, 나머지는 1차 혹은 3차 탄소임을 알 수 있었다. δ 192.0 위치의 peak로 보아 Carbonyl기의 탄소임을 예측하였으며, δ 164.5 위치의 4차 탄소는 para 커플링하고 있는 위치 중 한 위치는 -OH기가 결합되어 있을 것이라고 예측할 수 있었다.

이상의 결과들을 HMBC 데이터로 조합하고, 문헌에서 제시한 데이터⁶⁸⁾와 비교한 결과 Compound 2는 4-hydroxybenzaldehyde으로 동정되었다.

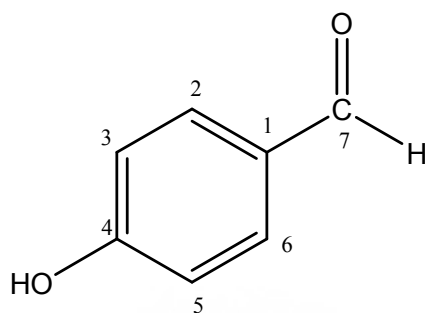
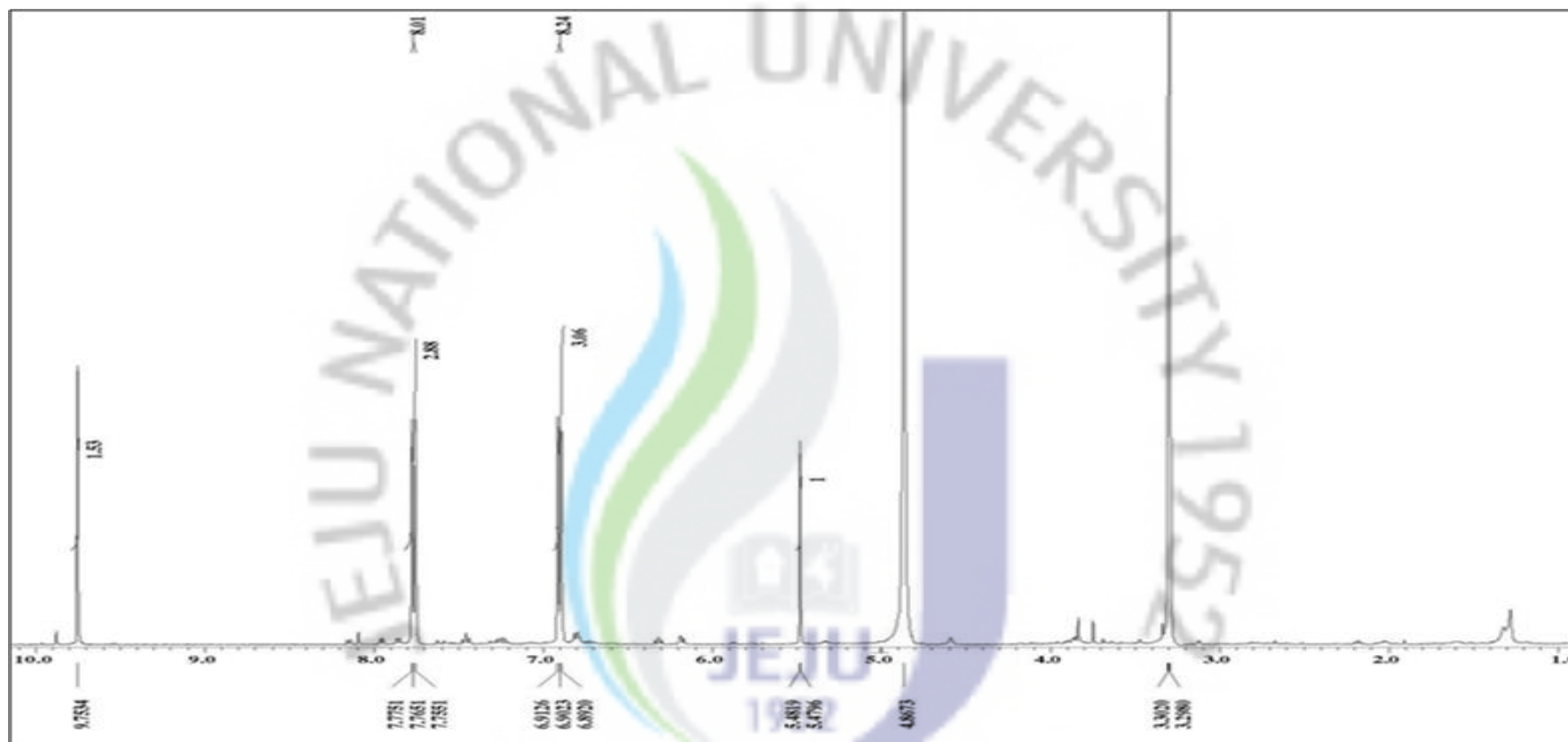


Figure 12. 4-hydroxybenzaldehyde

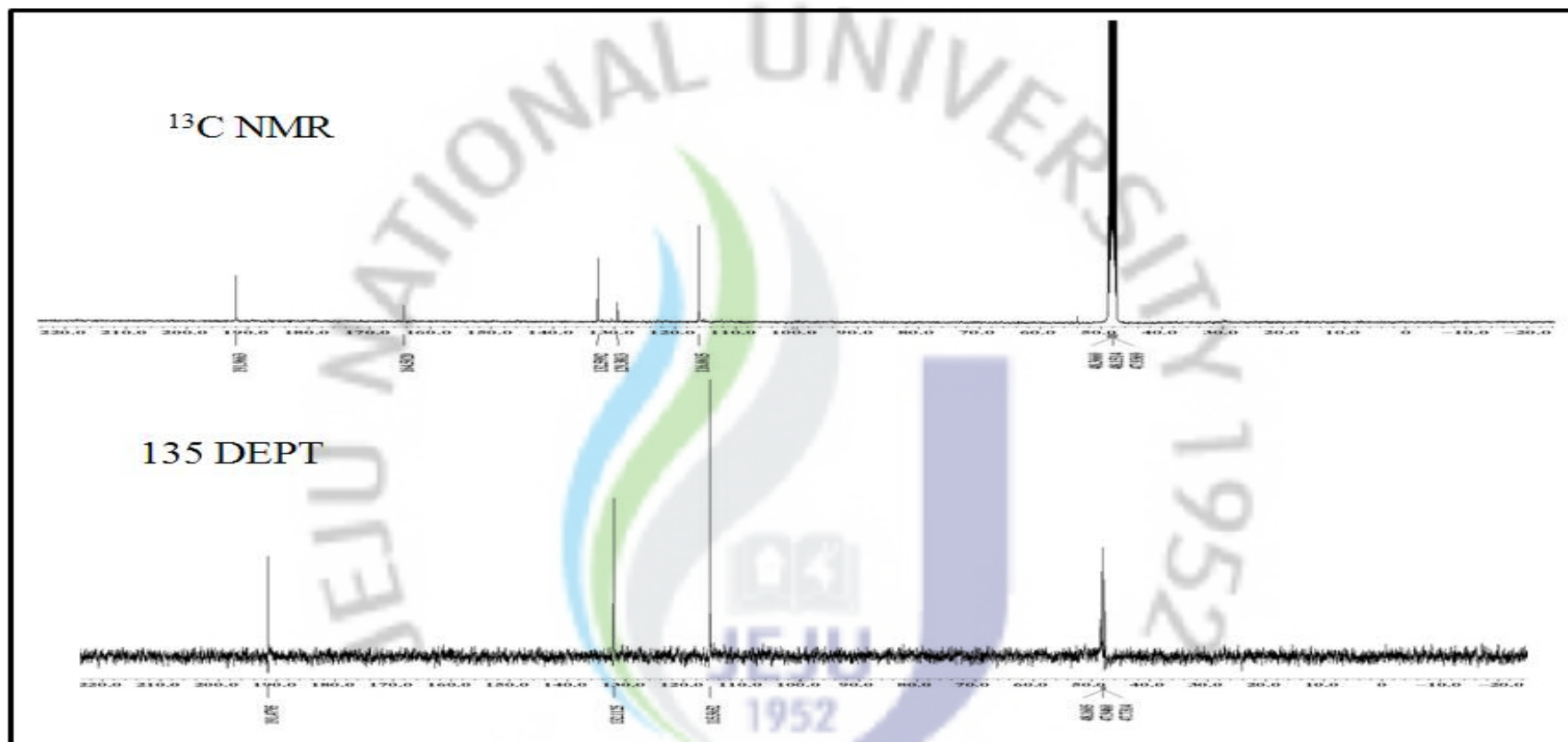
Table 2. NMR spectroscopic data for Compound 2 (in CD₃OD).

Compound 2				
Position	$\delta^{13}\text{C}$	Dept	$\delta^1\text{H}$ (int, mult, J in Hz)	HMBC(H→C)
1	129.4	C		
2	132.6	CH	7.7 (1H, d, $J=8.0$)	C-4, C-7
3	116.1	CH	6.9 (1H, d, $J=8.2$)	C-7
4	164.5	C		
5	116.1	CH	6.9 (1H, d, $J=8.2$)	C-7
6	132.6	CH	7.7 (1H, d, $J=8.0$)	C-4, C-7
7	192.0	CH	9.75 (1H, s)	C-1



¹H NMR : 400 MHz in CD₃OD

Figure 13. ¹H-NMR spectrum of compound 2 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.



^{13}C NMR : 100 MHz in CD_3OD

Figure 14. ^{13}C NMR and DEPT spectrum of compound 2 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

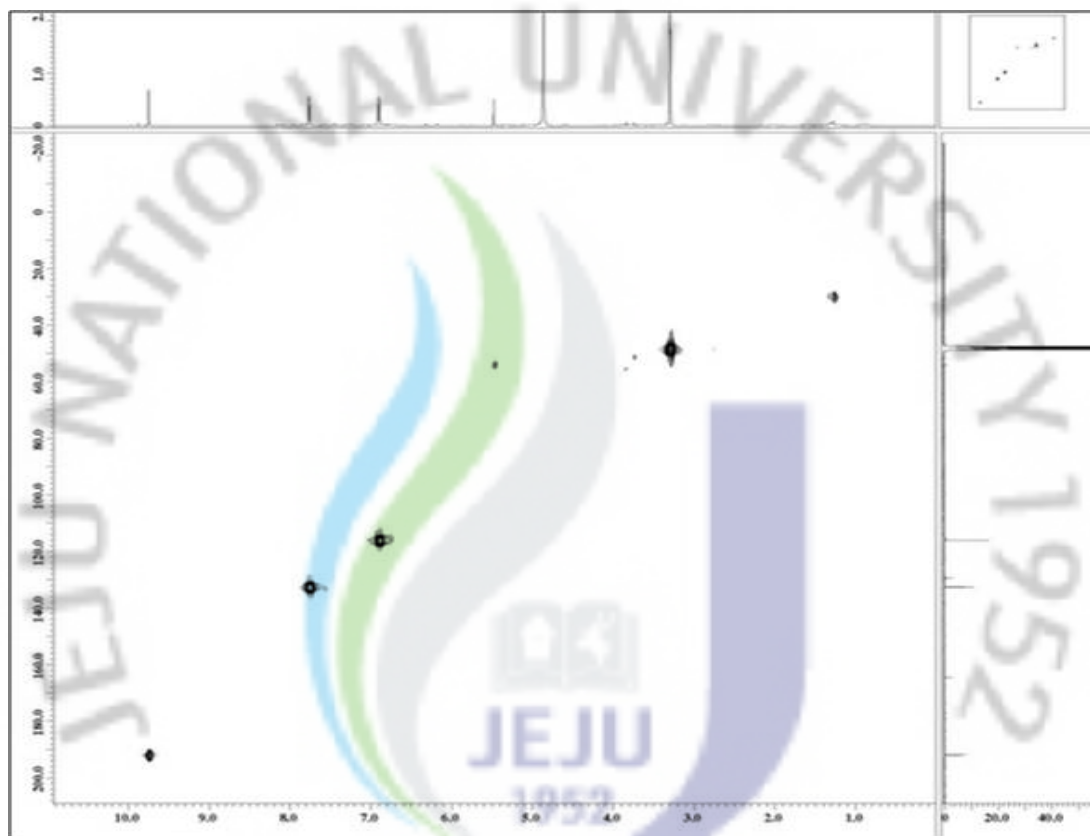


Figure 15. HMQC spectrum of compound 2 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

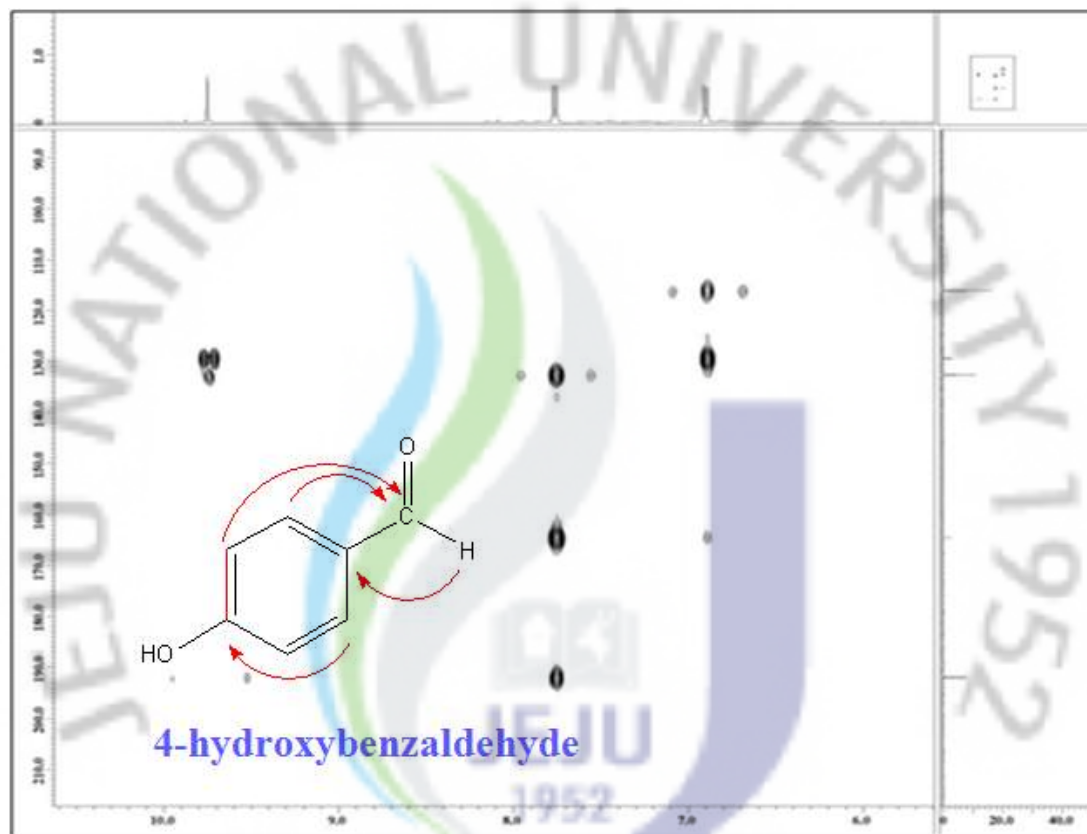


Figure 16. HMBC spectrum of compound 2 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

1-2. 갯기름나무에서 분리된 화합물의 구조 결정

1-2-1. Compound 3의 구조해석

Compound 3의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, HMBC를 통하여 확인하였다.

^1H NMR을 통하여 확인한 결과 δ 7.1 (1H, d, $J=8.2$)과 δ 6.7 (1H, d, $J=8.4$)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음을 예상하였고, coupling constant를 통해 방향족 고리의 수소가 para 위치에 커플링하고 있다는 것을 예측할 수 있었다. δ 3.1 (1H, s)의 peak를 통해 methoxy기가 존재할 것이라고 예상하였고, ^{13}C data와 HMQC data를 비교하여 methoxy기의 존재를 확인하였다.

^{13}C NMR을 통해서는 탄소의 총 개수가 6개 이상임을 예상하였다. DEPT (135°)를 통해 2차 탄소 1개와 2개의 4차 탄소를 확인하였고, 나머지는 3차 혹은 1차 탄소임을 확인 할 수 있었다.

HMBC data를 이용하여 methoxy기의 위치와 CH_2 의 위치를 확인하고 이러한 위치의 확인을 통하여 para 위치의 다른 탄소는 δ 158.5의 값을 가지는 것을 통해 hydroxy기가 연결되어 있다고 예측할 수 있었다.

이상의 기기분석과 문헌에서 제시한 데이터⁶⁹⁾와 비교한 결과 Compound 3은 4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol으로 동정되었다.

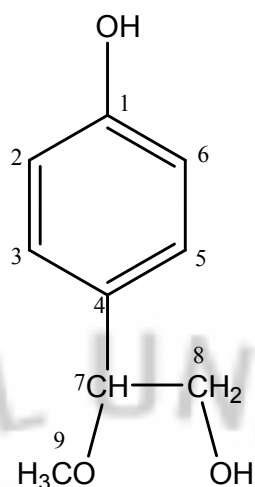
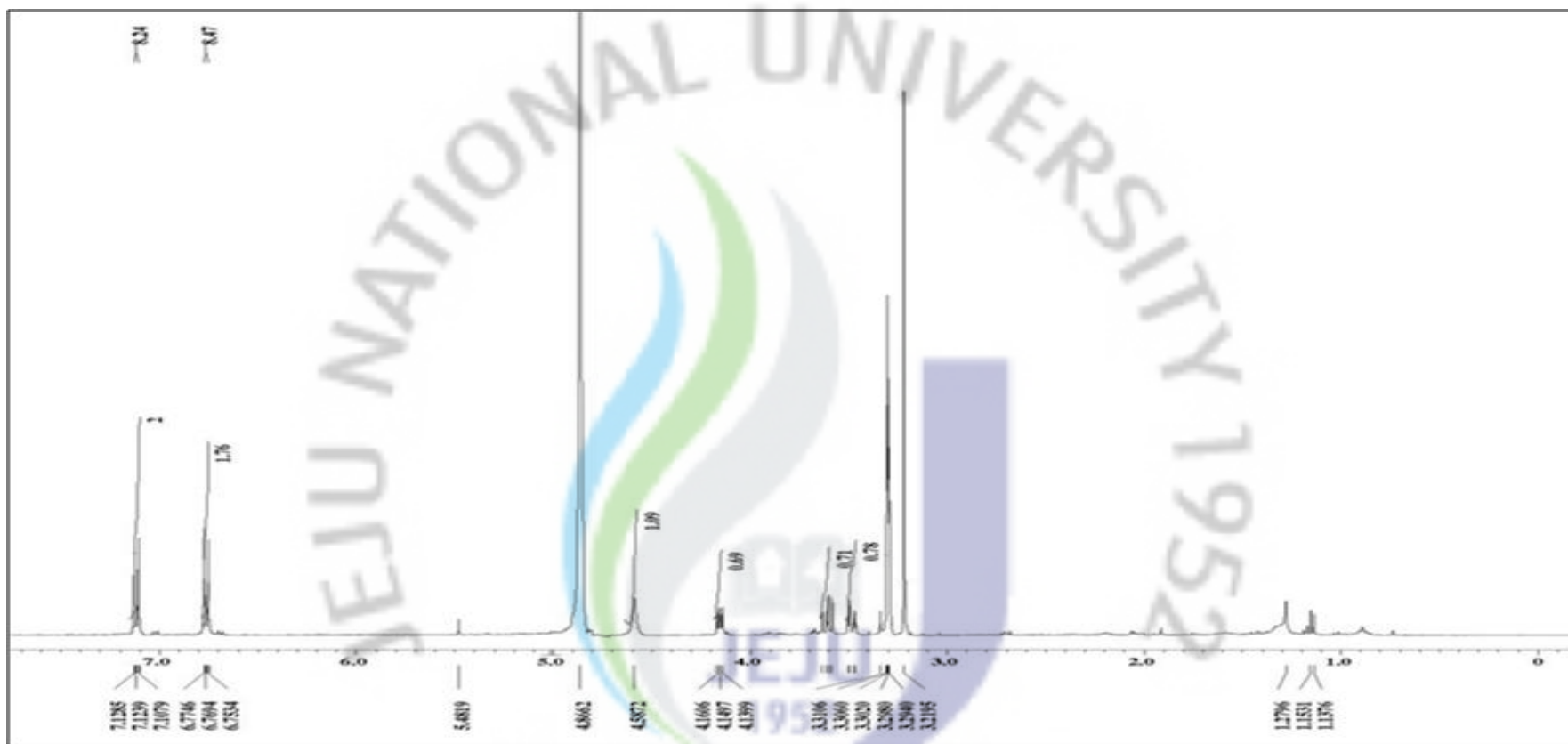


Figure 17. 4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol

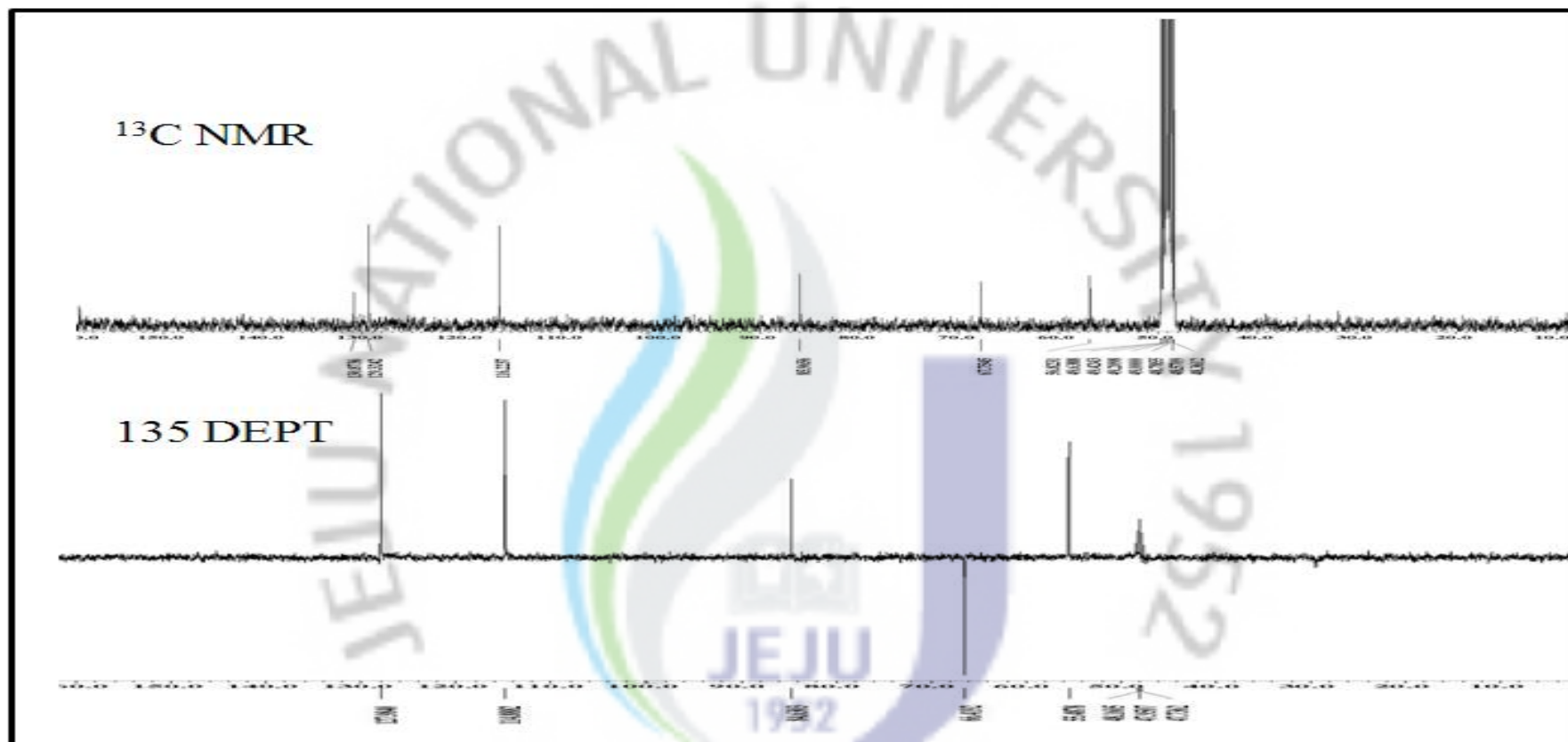
Table 3. NMR spectroscopic data for Compound 3 (in CD₃OD).

Position	Compound 3			
	$\delta^{13}\text{C}$	Dept	$\delta^1\text{H}$ (int, mult, J in Hz)	HMBC
1	158.5	C		
2	116.3	CH	6.7 (1H, d, $J=8.4$)	
3	129.4	CH	7.1 (1H, d, $J=8.2$)	C-7
4	131.0	C		
5	129.4	CH	7.1 (1H, d, 8.2)	C-7
6	116.3	CH	6.7 (1H, d, 8.4)	
7	86.1	CH	4.1 (1H, m)	C-3, C-5, C-8, C-9
8	67.9	CH ₂	3.6 (1H, m)	C-7
			3.3 (1H, m)	
9	56.9	CH ₃	3.1 (3H, s)	C-7



$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz in CD_3OD

Figure 18. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 3 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.



^{13}C NMR : 100 MHz in CD_3OD

Figure 19. ^{13}C NMR and DEPT spectrum of compound 3 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

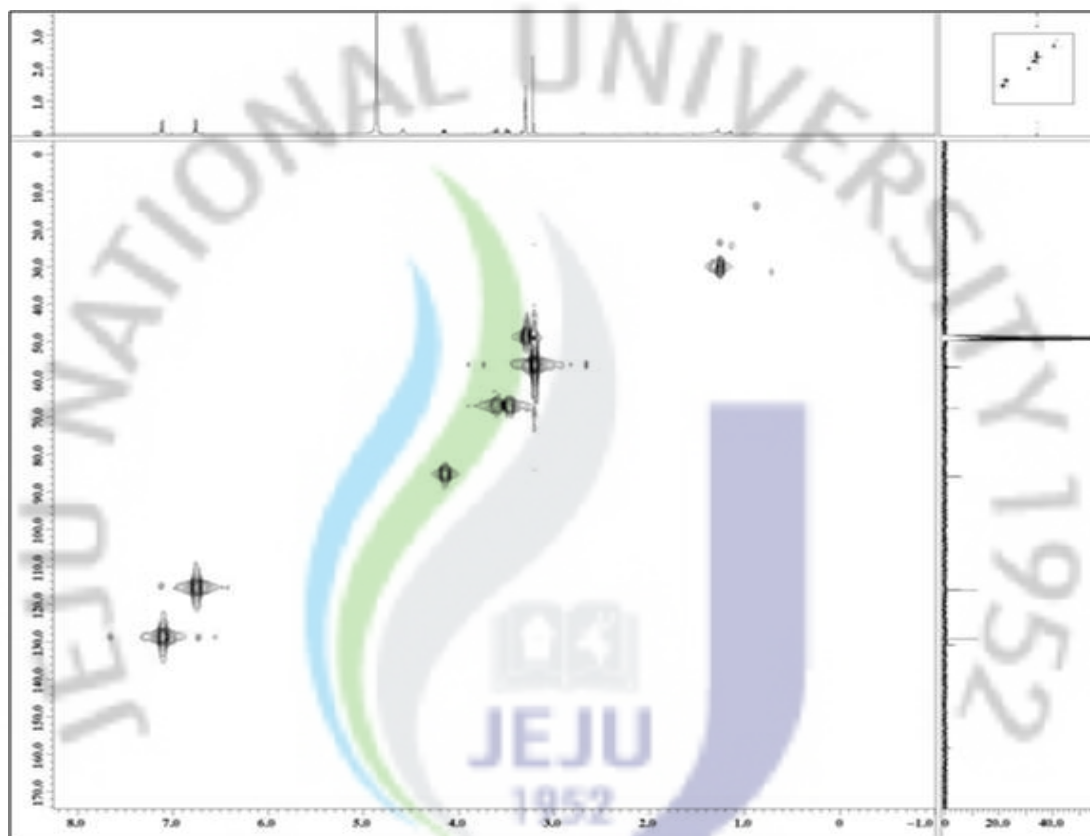


Figure 20. HMQC spectrum of compound 3 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

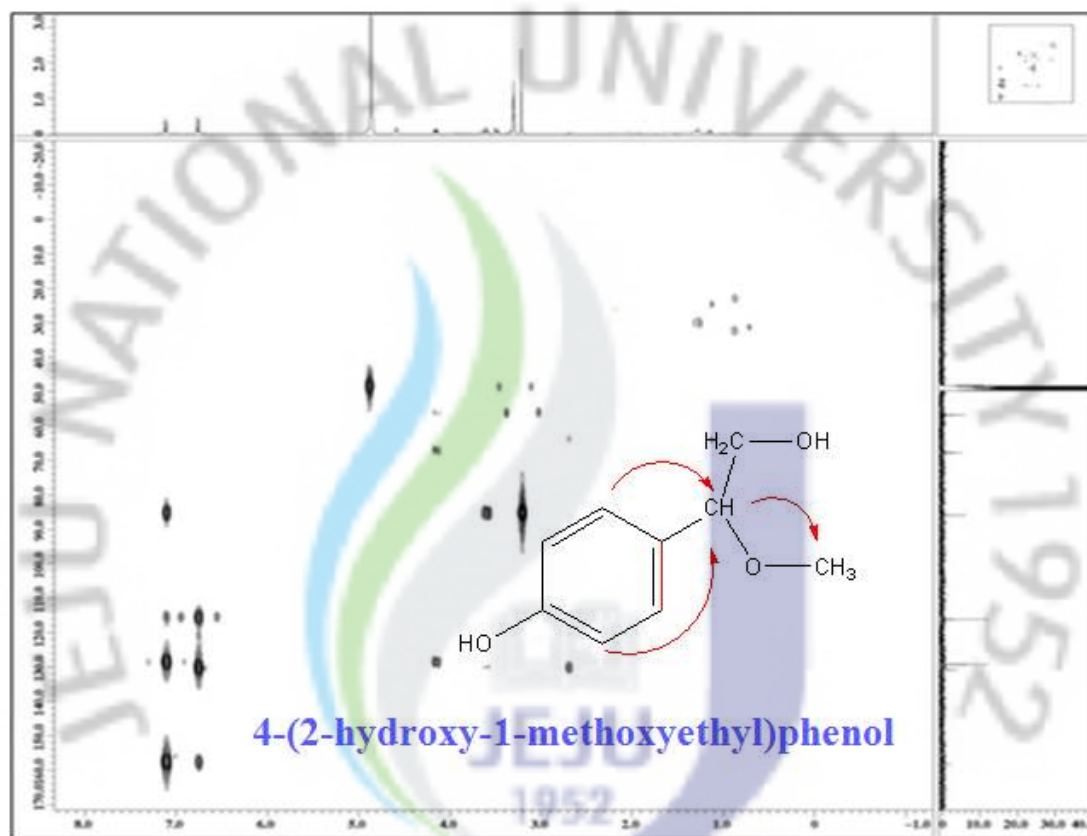


Figure 21. HMBC spectrum of compound 3 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

1-2-2. Compound 4의 구조해석

Compound 4의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, HMBC를 통하여 확인하였다.

^1H NMR을 통하여 확인한 결과 δ 7.4 (1H, s)과 δ 6.7 (1H, s)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음을 예상하였고, δ 6.2 (1H, d, $J=9.5$)과 δ 7.8 (1H, d, $J=9.4$)의 peak는 coumarin핵의 olefinic proton일 것이라고 예측할 수 있었다. δ 1.26 (3H, s)과 δ 1.25 (3H, s)의 signal은 germinal methyl의 proton으로 예측되어 방향족의 위치가 치환되어 있는 terpenoid coumarin이라고 추정할 수 있었다.

^{13}C NMR을 통해서도 탄소의 총 개수가 14개 이상임을 예상하였다. DEPT (135°)를 통해 2차 탄소 1개와 6개의 4차 탄소를 확인하였고, 나머지는 3차 혹은 1차 탄소임을 확인할 수 있었다. 특히 앞의 proton data에서 확인한 바와 같이 δ 25.8 ppm과 δ 25.3에서 germinal methyl의 carbon을 확인할 수 있었다.

HMBC data를 통하여 탄소와 수소의 위치를 확인할 수 있었고, HMBC data를 통해 각각의 위치를 결정할 수 있었다.

문헌에서 제시한 데이터⁷⁰⁾와 비교한 결과 Compound 4는 Peucedanol (7-hydroxy -6-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-2H-chromen-2one)으로 동정되었다.

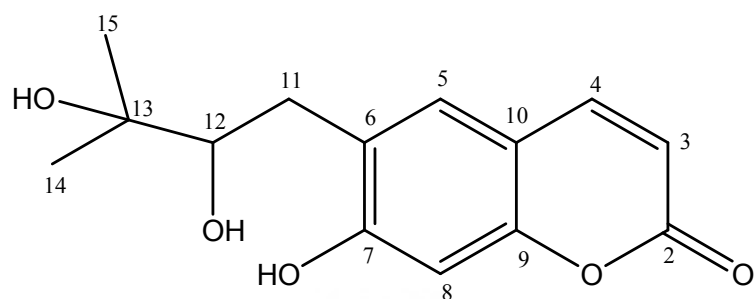
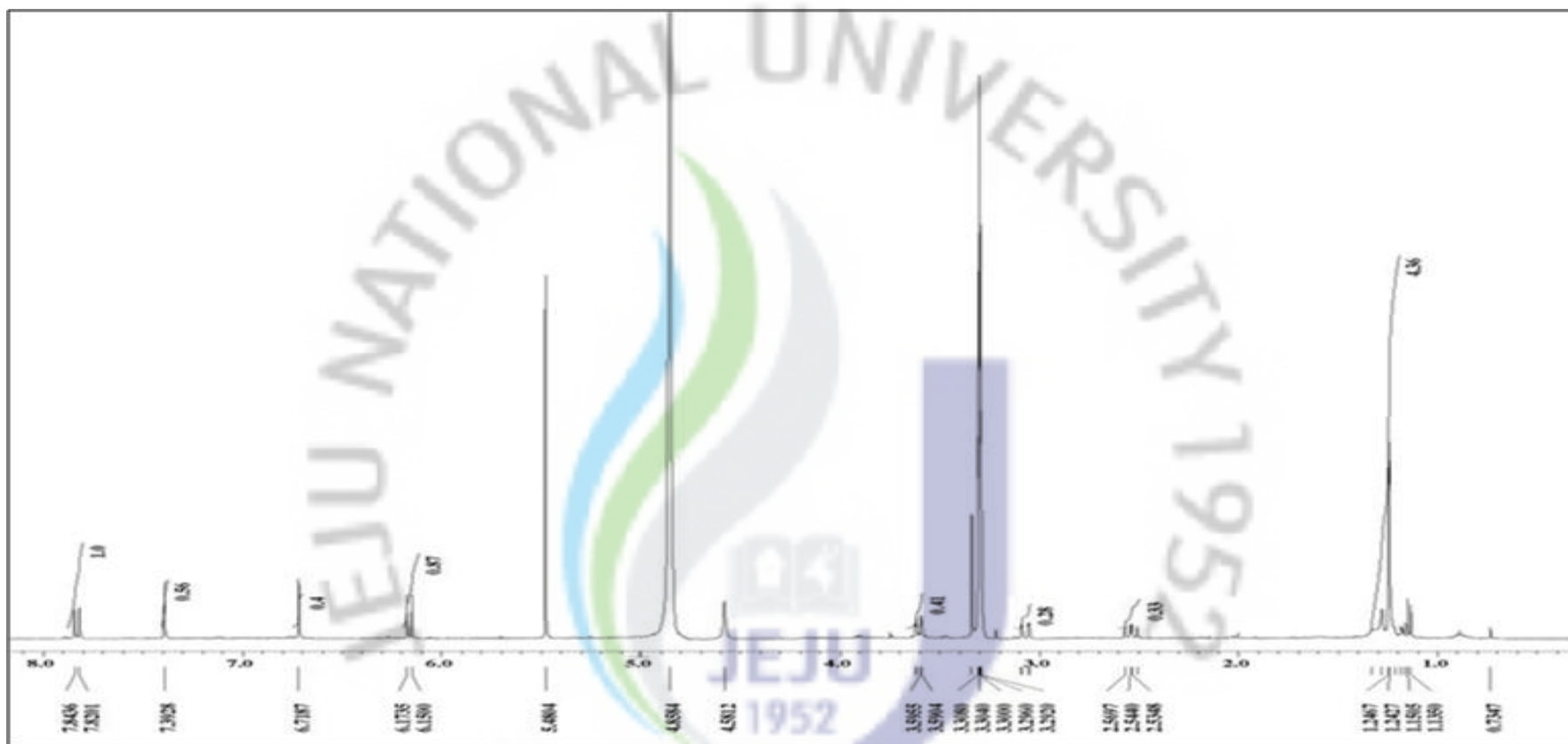


Figure 22. 7-hydroxy-6-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-2H-chromen-2-one

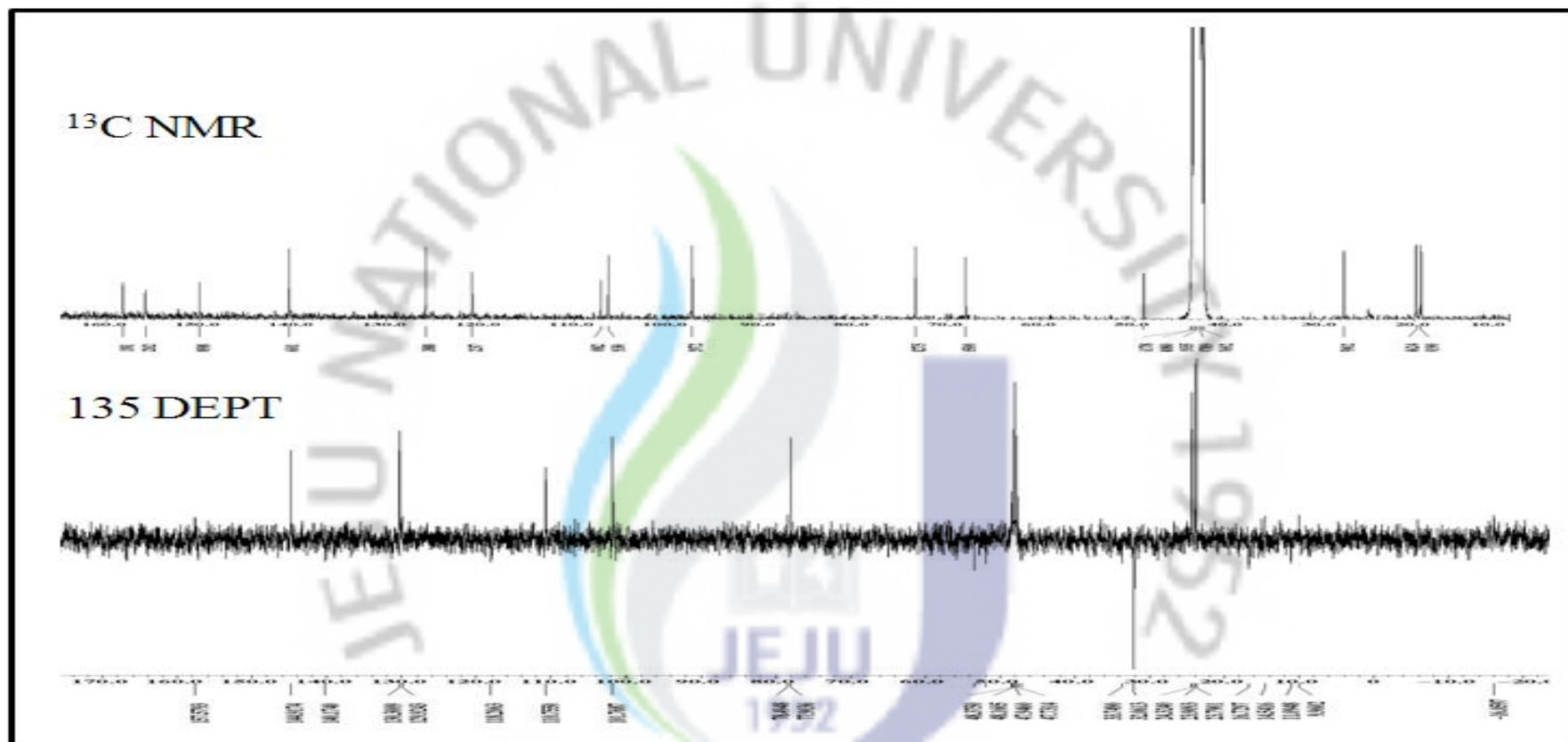
Table 4. NMR spectroscopic data for Compound 4 (in CD₃OD).

Position	Compound 4		
	$\delta^{13}\text{C}$	Dept	$\delta^1\text{H}$ (int, mult, J in Hz)
2	164.1	C	
3	113.0	CH	6.2 (1H, d, $J=9.5$)
4	146.4	CH	7.8 (1H, d, $J=9.4$)
5	131.7	CH	7.4 (1H, s)
6	126.7	C	
7	161.5	C	
8	103.2	CH	6.7 (1H, s)
9	155.9	C	
10	112.2	C	
11	33.5	CH ₂	3.1 (1H, dd, $J=1.5, 14.1$) 2.5 (1H, dd, $J=10.4, 14.1$)
12	79.3	CH	3.6 (1H, dd, $J=1.5, 10.4$)
13	74.0	C	
14	25.8	CH ₃	1.26 (3H, s)
15	25.2	CH ₃	1.25 (3H, s)



$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz in CD_3OD

Figure 23. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.



^{13}C NMR : 100 MHz in CD_3OD

Figure 24. ^{13}C NMR and DEPT spectrum of compound 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

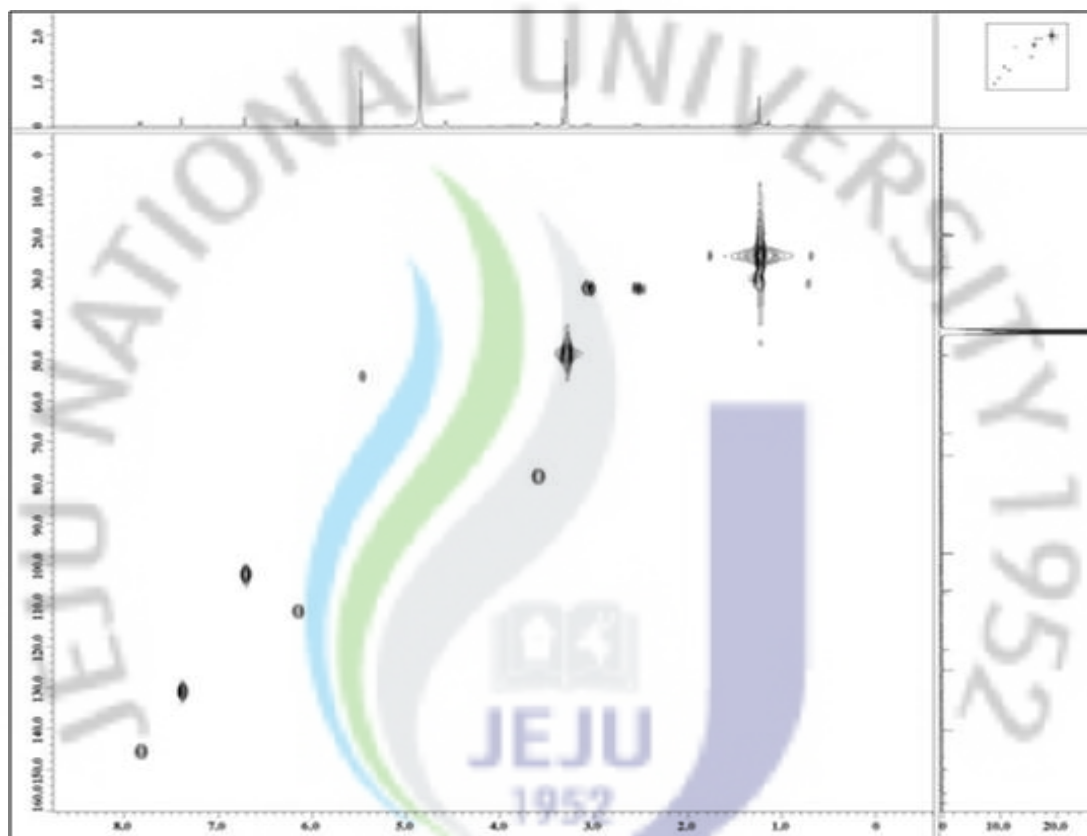


Figure 25. HMQC spectrum of compound 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

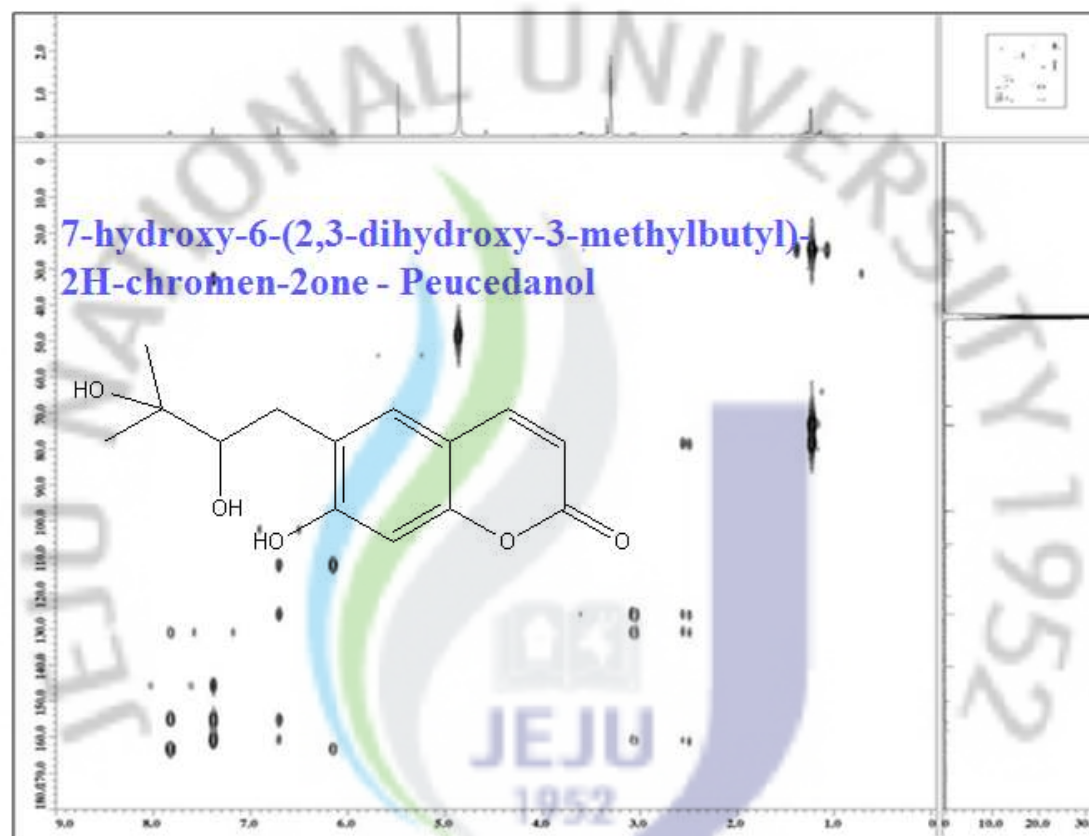


Figure 26. HMBC spectrum of compound 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

2. 활성 결과

2-1. 항산화 실험 결과

2-1-1. 억새뿌리 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 결과

억새뿌리 80% Methanol 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 확인해 본 결과, Vitamin C ($RC_{50} = 3.2 \mu\text{g/mL}$)와 비교하여, 추출물은 $152.6 \mu\text{g/mL}$ 로 낮은 값을 나타내는 데 반해 MC 분획층과 EA 분획층은 각각 $52.2 \mu\text{g/mL}$ 과 $31.6 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 수준의 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 5, Figure 27).

Table 5. DPPH radical scavenging effects (RC_{50}) of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

	Vitmin C	Extract	<i>n</i> -Hexane	MC	EA	<i>n</i> -BuOH
RC_{50}	3.2	152.6	N/D	52.2	31.6	74.6
S.D	1.2	3.2	N/D	0.2	0.4	1.4

RC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

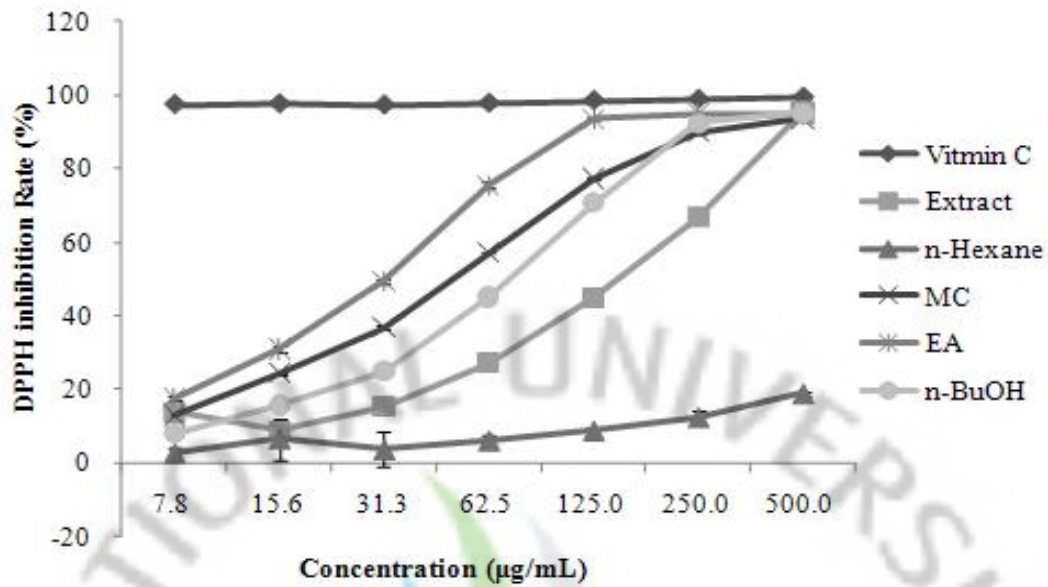


Figure 27. DPPH radical scavenging effects of several extracts from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-1-2. 엑세뿌리에서 분리된 물질의 DPPH 라디칼 소거활성 결과

엑세 뿌리에서 분리된 물질인 Com1 (Methyl 4-hydroxy cinnamate)과 Com2 (4-Hydroxybenzaldehyde)의 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 확인해 본 결과, Vitamin C ($RC_{50} = 3.2 \mu\text{g/mL}$)와 비교하여, 두 물질 모두 RC_{50} 값이 $500 \mu\text{g/mL}$ 보다 높은 수치로 확인되었다(Figure 28).

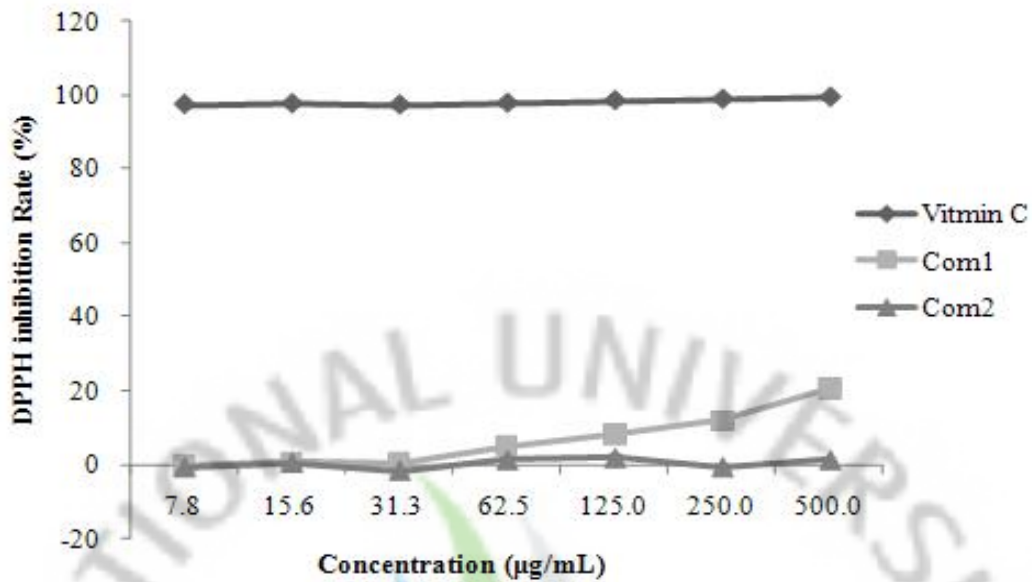


Figure 28. DPPH radical scavenging effects of compound 1 and 2 from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-1-3. 갯기름나물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 결과

갯기름나물 80% Methanol 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성 결과를 확인 해 본 결과, Vitamin C ($RC_{50} = 5.1 \mu\text{g/mL}$)와 비교하여, 추출물은 $435.5 \mu\text{g/mL}$ 로 낮은 값을 나타내는 데 반해 EA 분획층은 $37.0 \mu\text{g/mL}$ 으로 좋은 활성을 나타냈으며, n-BuOH 분획층도 $113.2 \mu\text{g/mL}$ 으로 추출물에 비해서는 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 6, Figure 29).

Table 6. DPPH radical scavenging effects (RC₅₀) of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

	Vitmin C	Extract	<i>n</i> -Hexane	MC	EA	<i>n</i> -BuOH
RC ₅₀	5.1	435.5	N/D	N/D	37.0	113.2
S.D	0.0	3.2	-	-	1.0	0.9

RC₅₀ values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

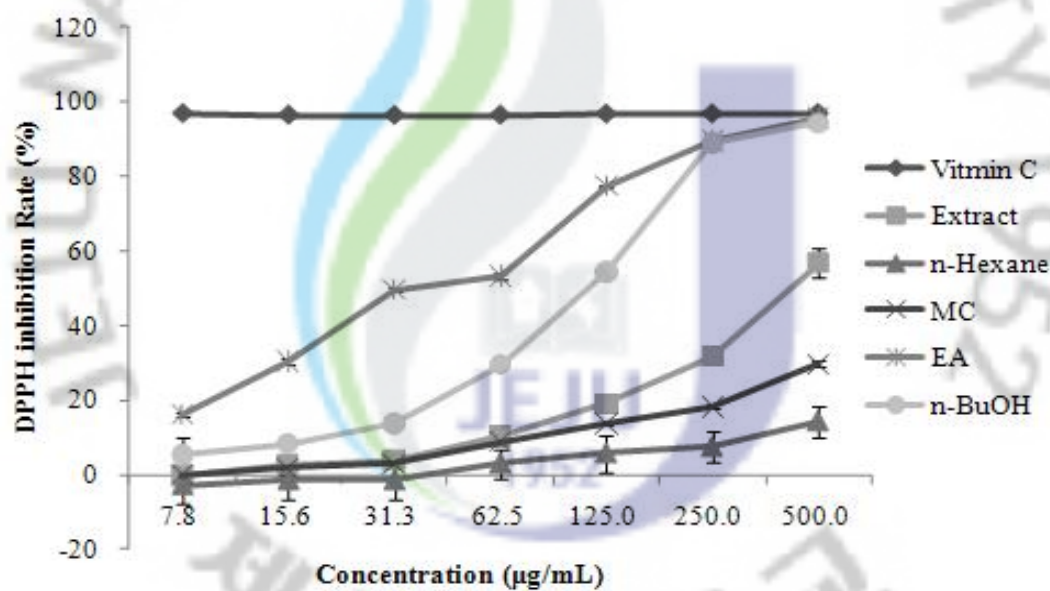


Figure 29. DPPH radical scavenging effects of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-1-4. 갯기름나물에서 분리된 물질의 DPPH 라디칼 소거활성 결과

갯기름나물에서 분리된 물질인 Com3 (4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol)과 Com4 (Peucedanol)의 DPPH 라디칼 소거활성 결과를 확인해 본 결과, Vitamin C ($RC_{50} = 5.1 \mu\text{g/mL}$)와 비교하여, 두 물질 모두 RC_{50} 값이 $500 \mu\text{g/mL}$ 보다 높은 수치로 확인되었다(Figure 30).

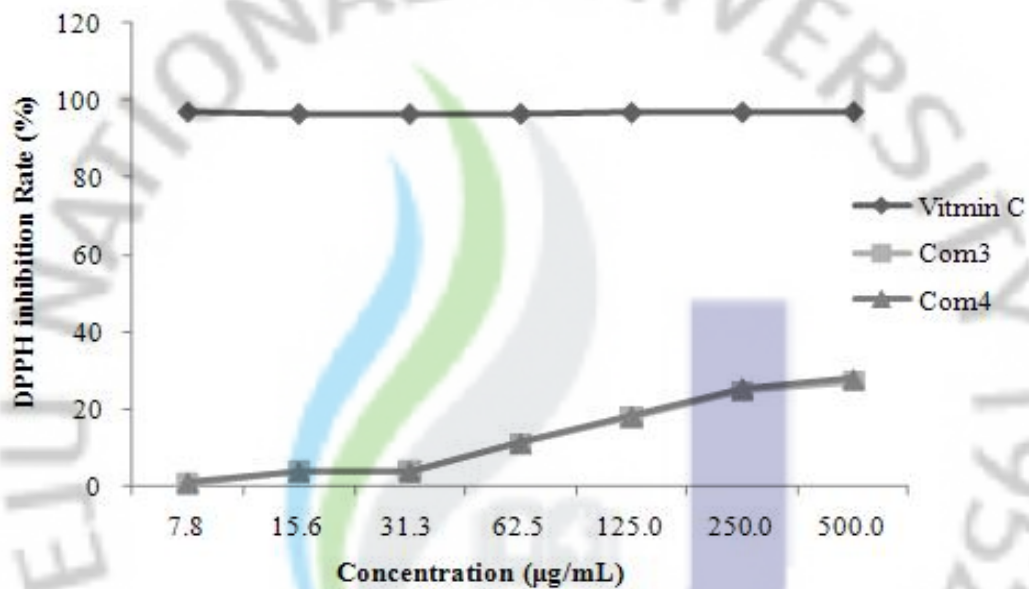


Figure 30. DPPH radical scavenging effects of compound 3 and 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-2. Tyrosinase 저해활성 결과

2-2-1. 역새뿌리 추출물의 Tyrosinase 저해활성 결과

역새뿌리 80% Methanol 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 Tyrosinase 저해활성 결과를 확인해 본 결과, Arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)과 비교하여, 추출물은 $90.0 \mu\text{g/mL}$ 의 활성을 나타냈으며, MC 분획층과 EA 분획층은 각각 $36.2 \mu\text{g/mL}$ 와 $31.5 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 수준의 Tyrosinase 저해활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 7, Figure 31).

Table 7. Tyrosinase inhibitory activity (IC_{50}) of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

	Arbutin	Extract	<i>n</i> -Hexane	MC	EA	<i>n</i> -BuOH
IC_{50}	8.9	90.0	N/D	36.2	31.5	119.9
S.D	0.2	5.1	-	2.2	5.9	21.1

IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

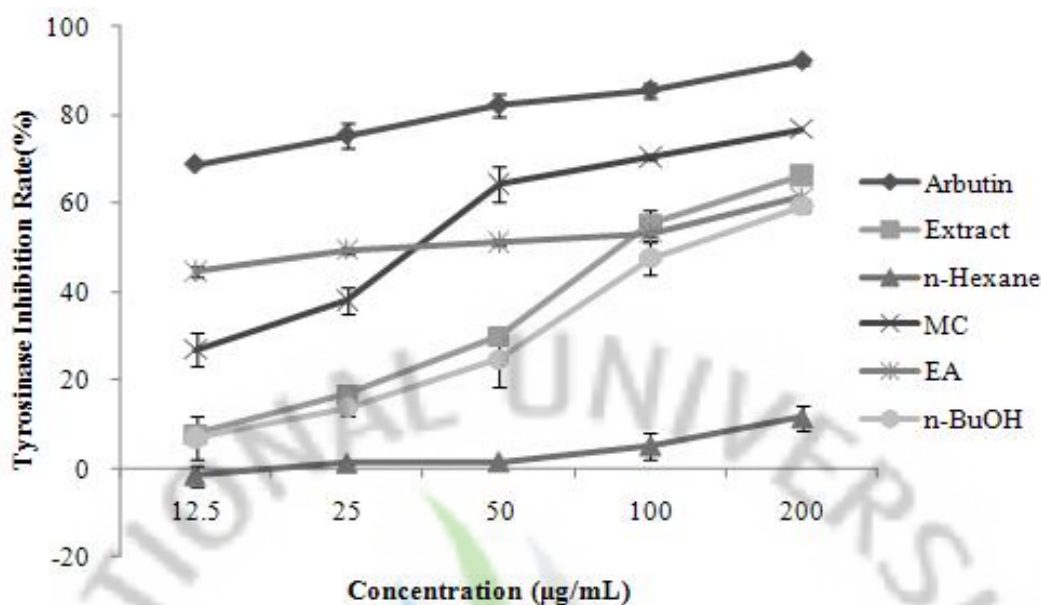


Figure 31. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-2-2. 엑세뿌리에서 분리된 물질의 Tyrosinase 저해활성 결과

엑세뿌리에서 분리된 물질인 Com1 (Methyl 4-hydroxy cinnamate)과 Com2 (4-Hydroxybenzaldehyde)의 Tyrosinase 저해활성 결과를 확인해 본 결과, Arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)과 비교하여, IC_{50} 값이 각각 $39.9 \mu\text{g/mL}$ 와 $21.1 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 수준의 Tyrosinase 저해활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. (Table 8, Figure 32).

Table 8. Tyrosinase inhibitory activity (IC_{50}) of compound 1 and 2 from Roots of *Miscanthus sinensis* var. purpurascens.

	Arbutin	Com1	Com2
IC_{50}	8.9	39.9	21.1
S.D	0.2	0.6	1.6

IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments.

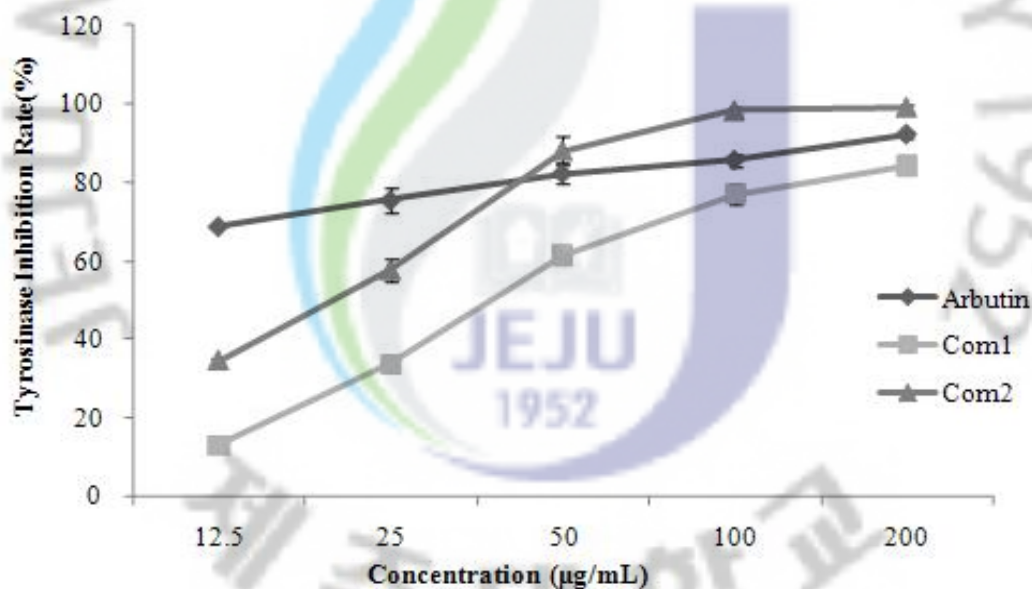


Figure 32. Tyrosinase inhibitory activity of compound 1 and 2 from Roots of *Miscanthus sinensis* var. purpurascens. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-2-3. 갯기름나물 추출물의 Tyrosinase 저해활성 결과

갯기름나물 80% Methanol 추출물과 각각의 용매분획물에 대한 Tyrosinase 저해활성 결과를 확인해 본 결과, Arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)과 비교하여, 추출물은 $90.3 \mu\text{g/mL}$ 의 활성을 나타냈으며, EA 분획층은 $59.1 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 수준의 Tyrosinase 저해활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 9, Figure 33).

Table 9. Tyrosinase inhibitory activity (IC_{50}) of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg

	Arbutin	Extract	<i>n</i> -Hexane	MC	EA	<i>n</i> -BuOH
IC_{50}	8.9	90.3	N/D	N/D	59.1	172.0
S.D	0.2	4.4	-	-	2.3	10.1

IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

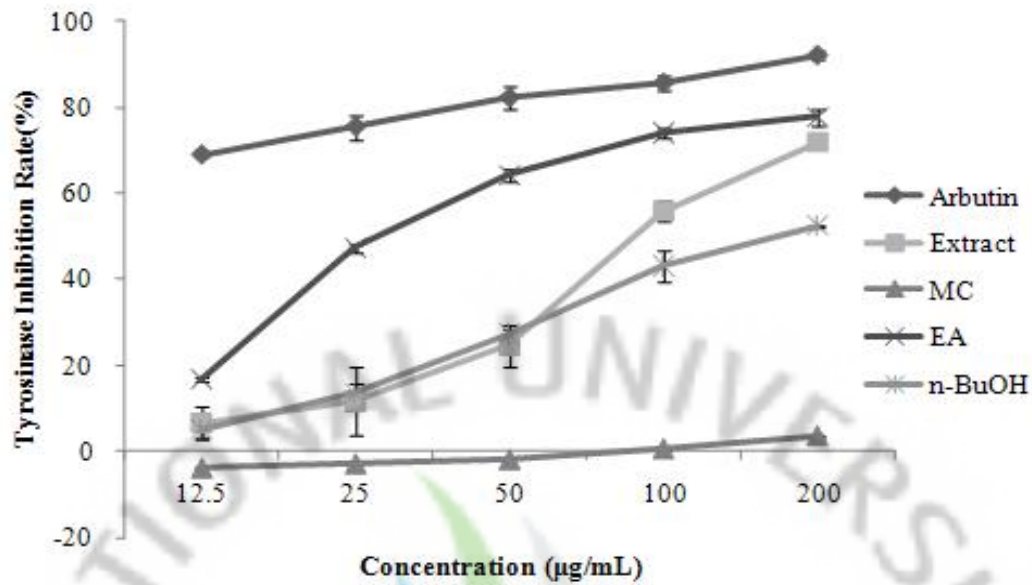


Figure 33. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-2-4. 갯기름나물에서 분리된 물질의 Tyrosinase 저해활성 결과

갯기름나물에서 분리된 물질인 Com3 (4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol)과 Com4 (Peucedanol)의 Tyrosinase 저해활성 결과를 확인해 본 결과, Arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)과 비교하여, 두 물질 모두 IC_{50} 값이 $200 \mu\text{g/mL}$ 보다 높은 수치로 확인되었다(Figure 34).

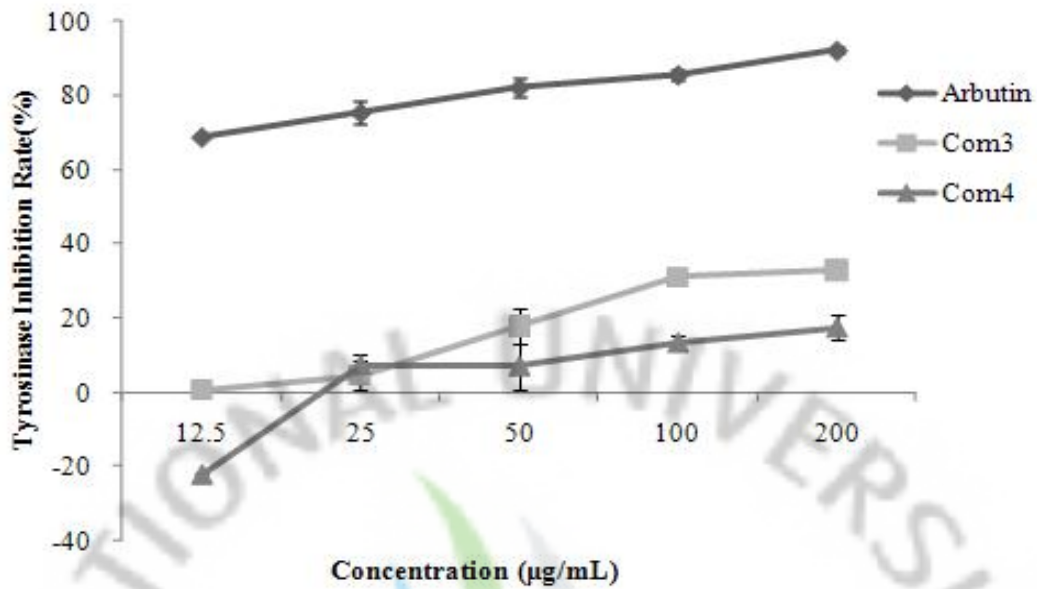


Figure 34. Tyrosinase inhibitory activity of compound 3 and 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

2-3. Melanin 생합성 저해율 측정 결과

2-3-1. 억새뿌리 추출물의 Melanin 생합성 저해율 측정 결과

억새뿌리 80% Methanol 추출물과 MC 분획물에 대한 Melanin 생합성 저해율 결과를 확인해 본 결과, MC 분획층의 멜라닌 생성량이 저농도로 갈수록 생성량이 크게 증가하기는 했지만 100 µg/mL의 농도에서 56.9%로 Arbutin의 69.3%보다 적게 생성되고 있음을 확인할 수 있었다(Table 10, Figure 35).

Table 10. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative Melanin Amount (%)		
	Arbutin	Extract	MC
25	94.8	126.9	106.5
50	74.9	119.2	107.5
100	69.3	111.7	56.9
200	67.3	96.6	29.4

The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

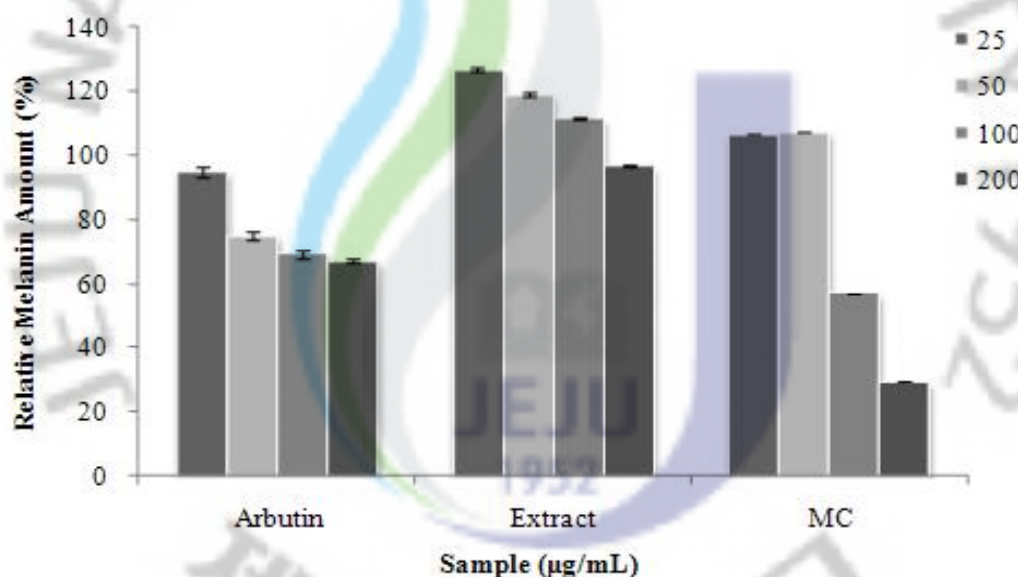


Figure 35. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. B16F10 cells were cultured for 96 h inducing melanogenesis. When 24 passed, fresh media and samples were exchanged only on the first day and cultured for the 3 days. Results were means \pm S.D. from 3 separate experiments.

2-3-2. 역새뿌리에서 분리된 물질의 Melanin 생합성 저해율 측정 결과

역새뿌리에서 분리된 물질인 Com1 (Methyl 4-hydroxy cinnamate)과 Com2 (4-Hydroxybenzaldehyde)의 Melanin 생합성 저해율을 확인해 본 결과, 100 μ g/mL 의 농도에서 Arbutin은 69.3%인데 반해, Com1인 Methyl 4-hydroxy cinnamate는 49.1%로 확인 되었으며, 농도별로 확인해 본 결과 모든 농도에서 Methyl 4-hydroxy cinnamate가 Arbutin 보다 Melanin 합성을 더 저해하는 것으로 확인 되었다(Table 11, Figure36).

Table 11. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 1 and 2 from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

Concentration (μ g/mL)	Relative Melanin Amount (%)		
	Arbutin	Com1	Com2
25	94.8	73.5	124.6
50	74.9	59.7	120.6
100	69.3	49.1	116.2
200	67.3	37.7	115.6

The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

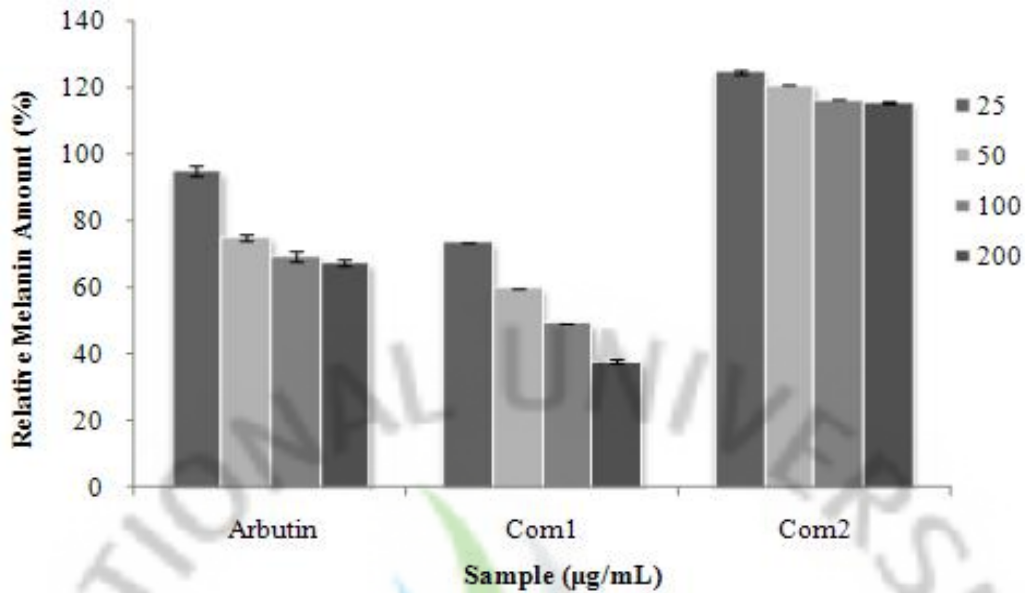


Figure 36. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 1 and 2 from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. B16F10 cells were cultured for 96 h inducing melanogenesis. When 24 passed, fresh media and samples were exchanged only on the first day and cultured for the 3 days. Results were means \pm S.D. from 3 separate experiments.

2-3-3. 갯기름나물 추출물의 Melanin 생합성 저해율 측정 결과

갯기름나물 80% Methanol 추출물과 EA 분획물에 대한 Melanin 생합성 저해율을 확인 해 본 결과, 100 µg/mL 의 농도에서 Arbutin은 69.3%인데 반해, 80% Methanol 추출물과 EA 분획물은 각각 68.6%와 36.1%로 멜라닌 생성량이 모든 농도에서 Arbutin과 비슷하거나 Arbutin 보다 더 적게 생성되는 것으로 확인되었다(Table 12, Figure 37).

Table 12. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative Melanin Amount (%)		
	Arbutin	Extract	EA
25	94.8	89.9	70.6
50	74.9	87.4	49.8
100	69.3	68.6	36.1
200	67.3	45.2	27.6

The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

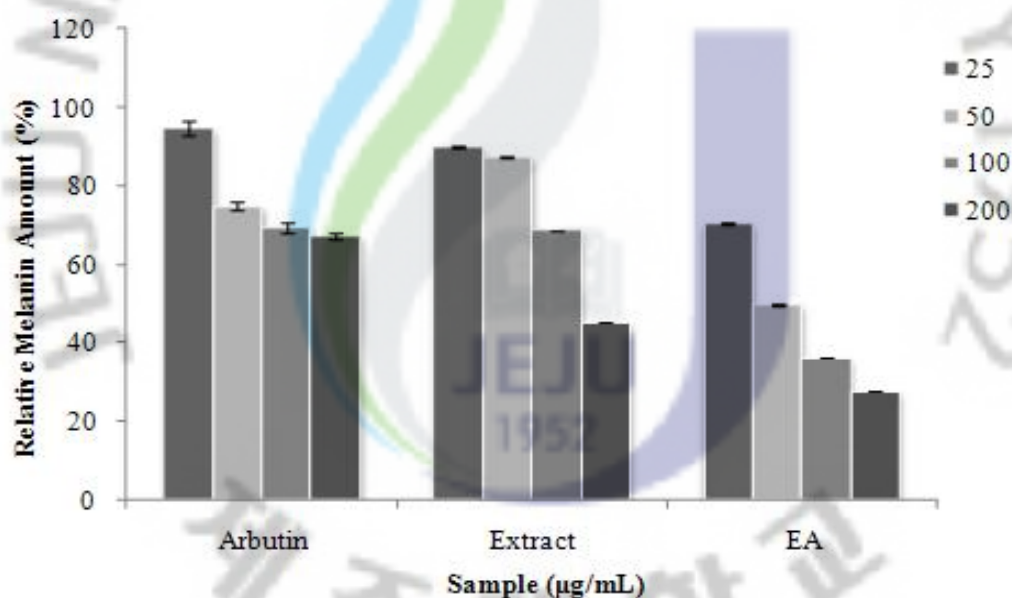


Figure 37. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg. B16F10 cells were cultured for 96 h inducing melanogenesis. When 24 passed, fresh media and samples were exchanged only on the first day and cultured for the 3 days. Results were means \pm S.D. from 3 separate experiments.

2-3-4. 갯기름나물에서 분리된 물질의 Melanin 생합성 저해율 측정 결과

갯기름나물에서 분리된 물질인 Com3 (4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol)과 Com4 (Peucedanol)에 대한 Melanin 생합성 저해율을 확인해 본 결과, 100 μ g/mL 의 농도에서 Arbutin은 69.3%인데 반해, com3인 4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol 이 98.8%로 나타나는 것으로 확인되었다(Table 13, Figure 38).

Table 13. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 3 and 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg.

Concentration (μ g/mL)	Relative Melanin Amount (%)		
	Arbutin	Com3	Com4
25	94.8	114.3	121.2
50	74.9	111.0	119.7
100	69.3	98.8	116.4
200	67.3	76.6	114.6

The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

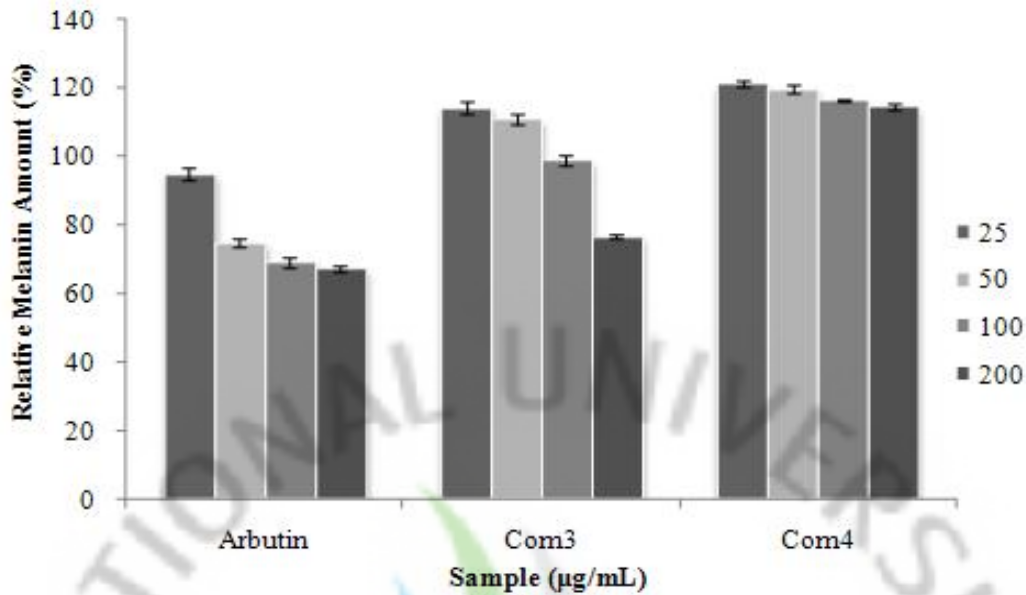


Figure 38. Inhibitory activity of melanin synthesis of compound 3 and 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg. B16F10 cells were cultured for 96 h inducing melanogenesis. When 24 passed, fresh media and samples were exchanged only on the first day and cultured for the 3 days. Results were means \pm S.D. from 3 separate experiments.

2-4. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과

2-4-1. 억새뿌리 추출물과 분리된 물질의 세포 생존율 측정 결과

Melanin 생합성 저해율 측정 결과와 함께 이들 melanoma 세포에 대한 억새뿌리 추출물 및 분리된 물질의 독성을 확인해 보기 위하여 B16세포에 시료를 처리한 후 MTT를 이용해 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 확인해 보았다. Arbutin과 비교하여 보았을 때 추출물 및 분리된 물질들은 Arbutin의 세포 생존률과 비슷하거나 더 높은 것으로 확인되었다(Figure 39).

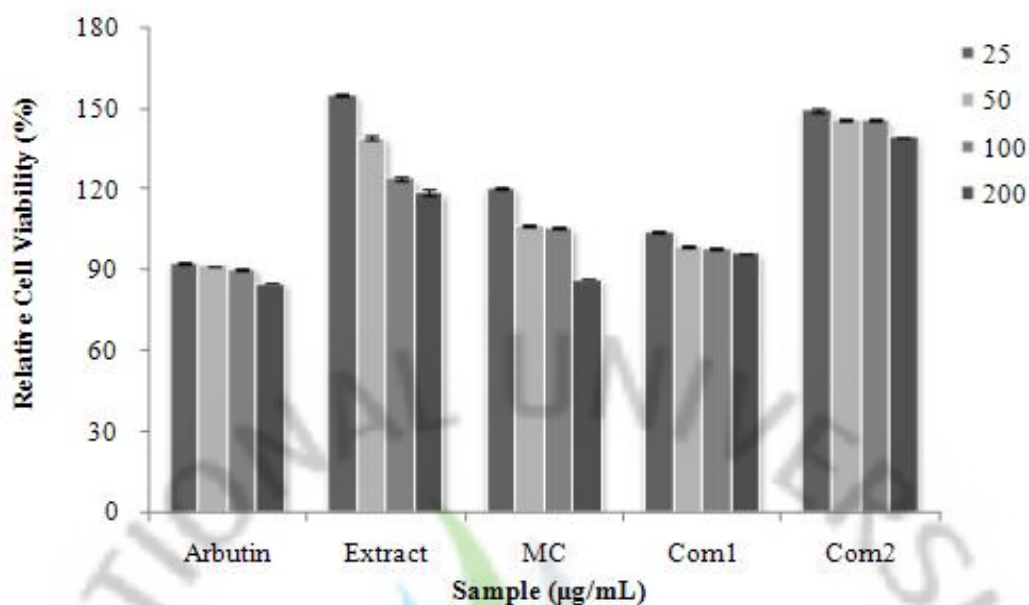


Figure 39. Cell viability using B16F10 melanoma of several extracts, compound 1 and 2 from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. Cytotoxicity was determined by MTT. Results were means \pm S.D. from 3 separate experiments.

2-4-2. 갯기름나물 추출물과 분리된 물질의 세포 생존율 측정 결과

Melanin 생합성 저해율 측정 결과와 함께 이들 melanoma 세포에 대한 갯기름나물 추출물 및 분리된 물질의 독성을 확인 해 보기 위하여 B16세포에 샘플을 처리 한 후 MTT를 이용해 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 확인 해 보았다. Arbutin과 비교하여 보았을 때 추출물 및 분리된 물질들은 Arbutin의 세포 생존율과 비슷하거나 더 높은 것으로 확인되었다(Figure 40).

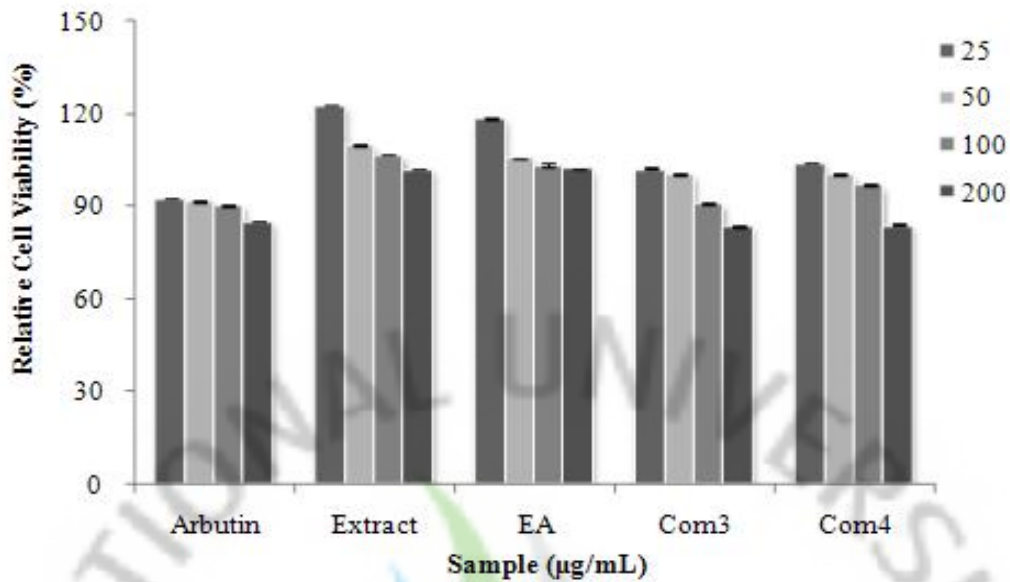


Figure 40. Cell viability using B16F10 melanoma of several extracts, compound 3 and 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg. Cytotoxicity was determined by MTT. Results were means \pm S.D. from 3 separate experiments.

2-5. Nitric Oxide 저해활성 측정 결과

2-5-1. 억새뿌리 추출물과 분리된 물질의 Nitric Oxide 저해활성 측정 결과

억새뿌리 80% Methanol 추출물과 MC 분획물 그리고 억새뿌리에서 분리된 Com1 (Methyl 4-hydroxy cinnamate)과 Com2 (4-Hydroxybenzaldehyde)에 대한 Nitric oxide(NO) 저해 활성을 확인해 본 결과 50 µg/mL의 농도에서 80% Methanol 추출물과 Com 2(4-Hydroxybenzaldehyde)에서 각각 2.8%와 22.5%로 매우 좋은 저해활성을 나타내는 것으로 확인되었다(Figure 41).

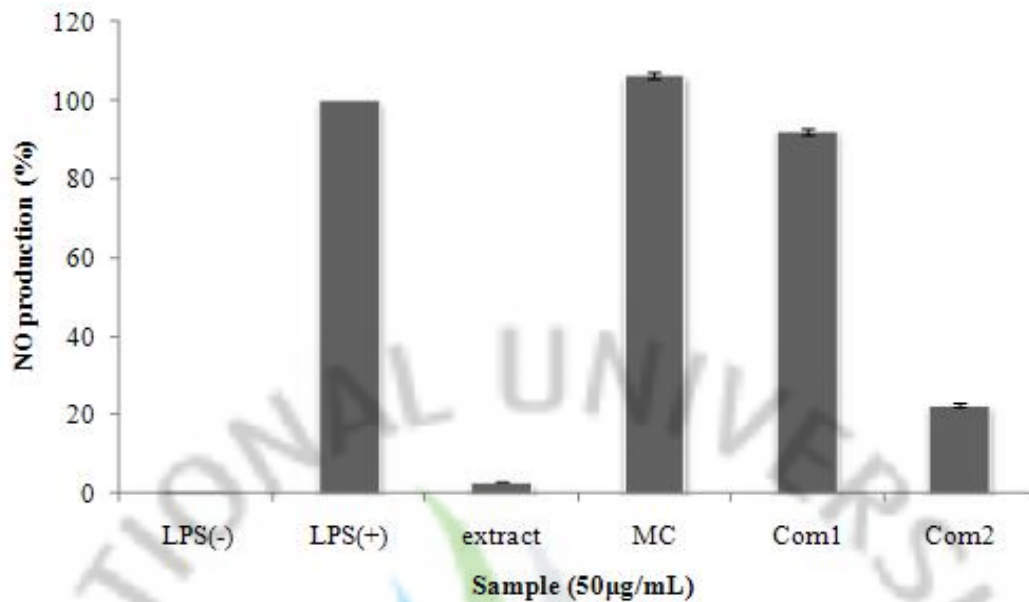


Figure 41 The Inhibitory effects of several extracts, compound 1 and 2 from Root of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* on NO production in RAW264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 µg/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated samples for 24 h. The data were represented by means \pm S.D. in triplicate experiments.

2-5-2. 갯기름나물 추출물과 분리된 물질의 Nitric Oxide 저해활성 측정 결과

갯기름나물 80% Methanol 추출물과 EA 분획물 그리고 갯기름나물에서 분리된 Com3 (4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol)과 Com4 (Peucedanol)에 대한 Nitric oxide(NO) 저해활성을 확인해 본 결과 50 µg/mL의 농도에서 LPS를 처리한 대조군에 비해 전체적으로 활성이 좋게 나왔으며, 특히, 80% Methanol 추출물에서 25.4%, 그리고 Com3 (4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol)과 Com4 (Peucedanol)에서 각각 35.3%와 13.5%로 매우 좋은저해 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(Figure 42).

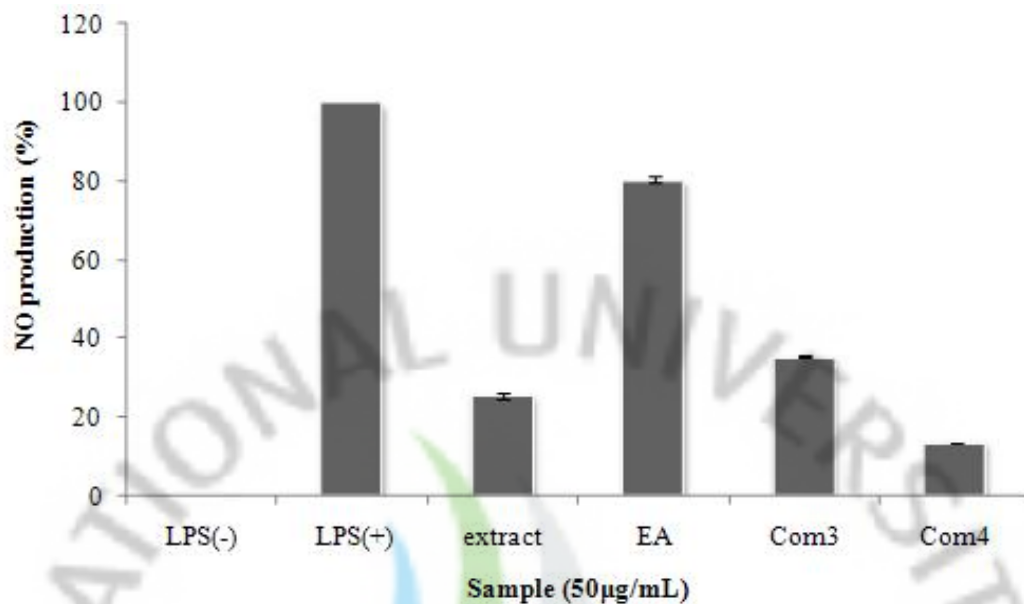


Figure 42 The Inhibitory effects of several extracts, compound 3 and 4 from *Peucedanum japonicum* Thunberg on NO production in RAW264.7 cells. One group of RAW 264.7 cells (1.0×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 µg/mL), while several other RAW 264.7 cells were stimulated with LPS plus the indicated samples for 24 h. The data were represented by means \pm S.D. in triplicate experiments.

3. 엑세뿌리에 함유된 Methyl 4-hydroxy cinnamate의 분석 방법 표준화

3-1. HPLC 분석 조건

검액 및 표준액의 분석을 위하여 SHIM-PACK (VP-005, 150 × 4.6) 컬럼과, UV 310. nm 파장, 5% 초산이 첨가된 메탄올과 물의 이동상, 1 ml/min의 유속에 서 엑세뿌리의 지표성분인 Methyl 4-hydroxy cinnamate의 분석 조건을 검토한 결과를 표에 나타내었다. 이 조건은 추출물에서 다른 피크의 간섭없이 지표성분의 피크가 분리되어 분리능이 우수한 것으로 판단되었다(Table 14).

Table 14. Operating conditions of HPLC for determination of Methyl 4-hydroxy cinnamate.

Gradient profile	Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile Phase	
			A (Water)	B (Methanol)
	0:00	1.0	55	45
	18:00	1.0	55	45
	20:00	1.0	0	100
	30:00	1.0	0	100

3-2. 분석법의 검증 (validation)

Methyl 4-hydroxy cinnamate를 지표성분으로 하여 검증하여 본 연구에서 사용한 HPLC의 정확도를 검증하였다.

3-2-1. 특이성

Table 14에 확립된 HPLC 조건으로 분석한 지표물질과 추출물의 크로마토그램은 Figure 43과 같았다. Methyl 4-hydroxy cinnamate의 피크유지시간은 12.3분대이

고, 추출물에서도 12.4분대로 Methyl 4-hydroxy cinnamate가 다른 성분들과 명
확히 분리되었고 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인하였다.

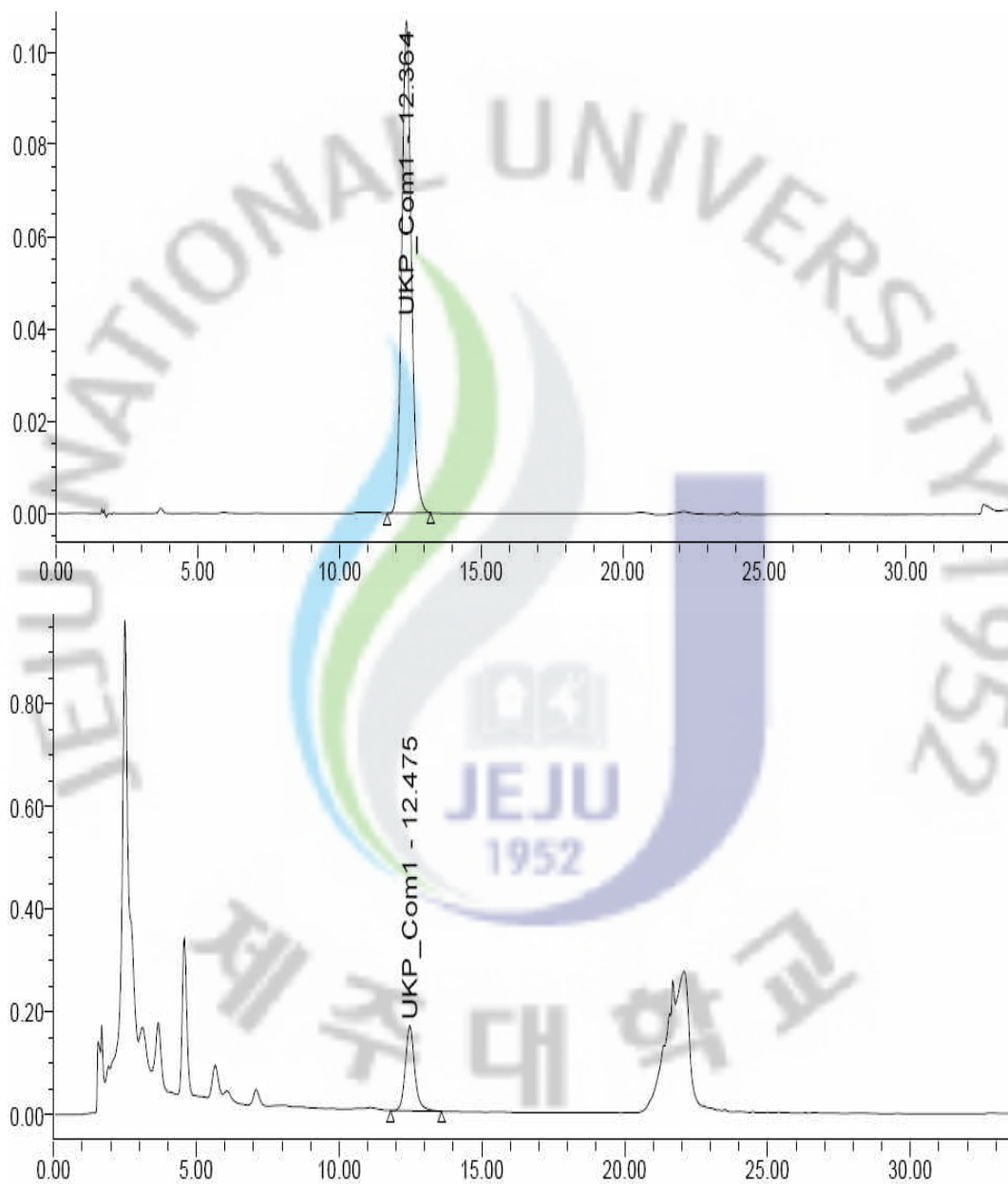


Figure 43. HPLC chromatogram of Methyl 4-hydroxy cinnamate, Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* extract.

3-2-2. 직선성

지표물질인 Methyl 4-hydroxy cinnamate의 농도를 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml 로 제조한 후 농도별로 보정된 HPLC 조건으로 분석을 실시하고자 Calibration을 실시하였다. 그 결과 x축은 농도, y축은 피크면적으로 검량선을 작성하였는데, 직선성(r^2)이 0.999991인 상관관계를 나타내어 분석의 신뢰성을 확보할 수 있었다(Figure 44).

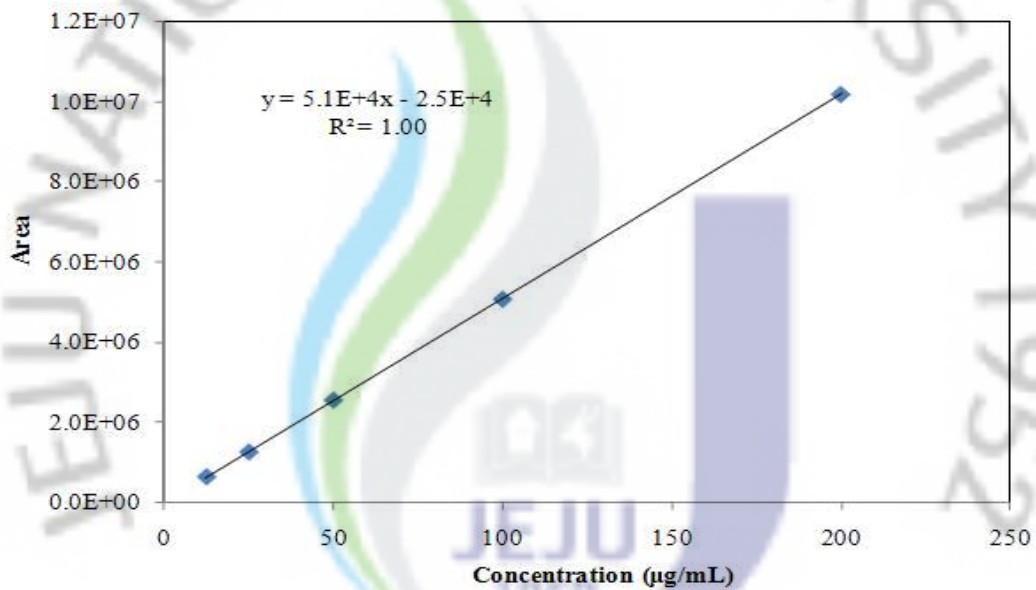


Fig 44. Calibration curve of Methyl 4-hydroxy cinnamate.

3-2-3. 일내정밀도 (Intra-day precision)

12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 표준액을 5회 측정하여 피크의 면적을 구하고, Figure 44에 나타난 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 일내 정밀도는 0.36~1.81%로 양호하였으며 Table 15에 나타내었다.

Table 15. Concentration of Methyl 4-hydroxy cinnamate analyzed in 5 different concentrations for intra-day precision.

Measurements	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	12.5	25	50	100	200
1	11.6	24.0	48.3	100.0	200.4
2	11.7	23.9	49.2	98.7	199.1
3	11.6	23.9	48.7	100.0	200.1
4	11.2	24.0	48.5	99.1	200.0
5	11.7	23.8	48.5	97.4	198.4
Mean	11.6	23.9	48.6	99.0	199.6
S.D	0.21	0.10	0.36	1.08	0.86
Intra-day precision(%)	1.81	0.36	0.75	1.09	0.43

3-2-4. 일간정밀도 (Inter-day precision)

일간정밀도를 측정한 동일한 농도의 표준액을 1일 1회 3일간 반복 측정하여 농도에 따른 피크의 면적을 구하고, Figure 44에 나타난 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 일간정밀도는 0.37~0.76%로 양호하였으며 Table 16에 나타내었다.

Table 16. Concentration of Methyl 4-hydroxy cinnamate analyzed in 5 different concentrations for inter-day precision.

Measurements	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	12.5	25	50	100	200
1st day	11.7	23.9	49.2	98.7	199.1
2nd day	11.5	23.8	48.7	98.2	198.6
3rd day	11.6	24.0	48.5	99.1	200.0
Mean	11.6	23.9	48.8	98.7	199.3
S.D	0.07	0.12	0.37	0.43	0.74
Inter-day precision(%)	0.59	0.52	0.76	0.43	0.37

3-2-5. 정확도

12.5, 50, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 표준액을 각각 3회 측정하여 Figure 44에 나타난 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 정확도의 평균은 각각의 농도에서 92.8~99.6%로 양호하였으며, Table 17에 나타내었다.

Table 17. Calculated concentration of Methyl 4-hydroxy cinnamate analyzed in 3 different concentrations for accuracy.

Measurements	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	12.5	50	200
1	11.7	49.2	199.1
2	11.5	48.7	198.6
3	11.6	48.5	200.0
Mean	11.6	48.8	199.3
Accuarcy(%)	92.8	97.6	99.6

4. 갯기름나물에 함유된 Peucedanol의 분석 방법 표준화

4-1. HPLC 분석 조건

추출액 및 표준액은 UV 311.9 nm 파장, 5% 초산이 첨가된 메탄올과 물의 이동상, 1 ml/min의 유속에서 갯기름나물의 지표성분인 Peucedanol (7-hydroxy-6-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-2H-chromen-2one)을 분석하였으며, 분석 조건을 검토한 결과를 표에 나타내었다. 이 조건은 추출물에서 다른 피크의 간섭없이 지표성분의 피크가 분리되어 분리능이 우수한 것으로 판단되었다(Table 18).

Table 18. Operating conditions of HPLC for determination of Peucedanol.

Gradient profile	Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile Phase	
			A (Water)	B (Methanol)
	0:00	1.0	70	30
	10:00	1.0	70	30
	20:00	1.0	50	50
	30:00	1.0	0	100
	40:00	1.0	0	100

4-2 분석법의 검증 (Validation)

Peucedanol을 지표성분으로 하여 검증하였다.

4-2-1. 특이성

Table 18에 확립된 HPLC 조건으로 분석한 지표물질과 추출물의 크로마토그램은 Figure 45 와 같았다. Peucedanol의 피크유지시간은 19.6분대이고, 추출물에서도 19.8분대로 Peucedanol이 다른 성분들과 명확히 분리되었고 다른 물질과의 간섭이 없음이 확인되었다.

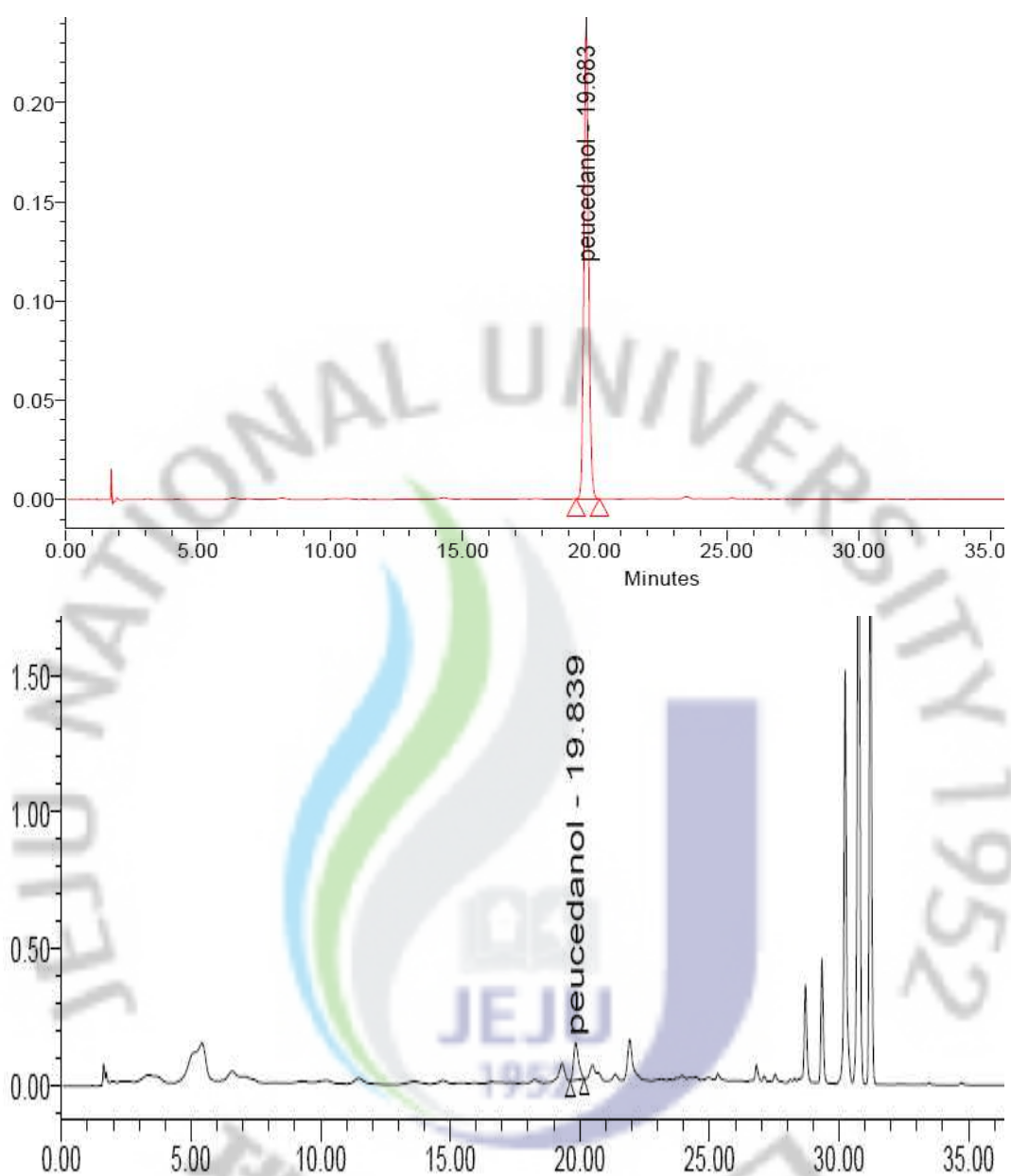


Figure 45. HPLC chromatogram of Peucedanol, *Peucedanum japonicum* Thunberg extract.

4-2-2. 직선성

지표물질인 Peucedanol의 농도를 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 제조한 후 농도별로 보정된 HPLC 조건으로 실시하고자 Calibrations을 실시하였다. 그 결과 x축은 농도, y축은 피크면적으로 검량선을 작성하였는데, 직선성(r^2)이 0.99997인 상관관계를 나타내어 분석의 신뢰성을 확보할 수 있었다. (Figure 46)

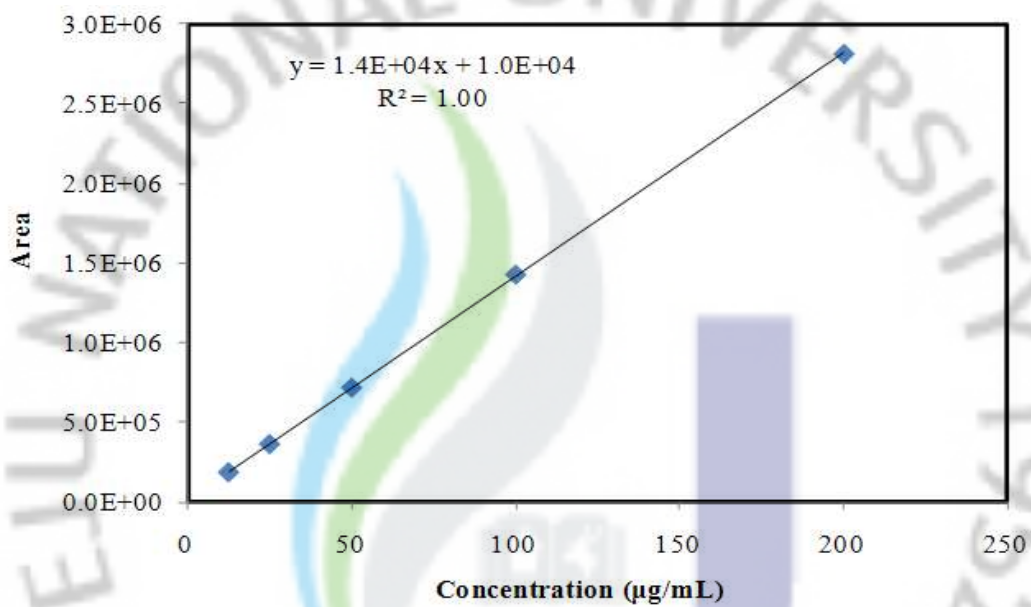


Fig 46. Calibration curve of Peucedanol.

4-2-3. 일내정밀도 (Intra-day precision)

12.5, 25, 50, 100 µg/ml 농도의 표준액을 5회 측정하여 피크의 면적을 구하고, Figure 46에 나타난 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 일내 정밀도는 0.31~0.80%로 양호하였으며 Table 19에 나타내었다.

Table 19. Concentration of Peucedanol analyzed in 5 different concentrations for intra-day precision.

Measurements	Concentration (µg/ml)				
	12.5	25	50	100	200
1	12.2	24.9	50.5	101.3	199.1
2	12.2	24.7	50.6	100.8	197.3
3	12.1	24.4	50.4	100.3	197.3
4	12.1	24.7	50.4	100.9	198.1
5	12.1	24.5	50.2	100.4	198.8
Mean	12.2	24.6	50.4	100.7	198.1
S.D	0.05	0.20	0.15	0.40	0.83
Intra-day precision(%)	0.38	0.80	0.31	0.40	0.42

4-2-4. 일간정밀도 (Inter-day precision)

일내정밀도를 측정한 동일한 농도의 표준액을 1일 1회 3일간 반복 측정하여 농도에 따른 피크의 면적을 구하고, Figure 46에 나타난 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 일간정밀도는 0.09~0.89%로 양호하였으며 Table 20에 나타내었다.

Table 20. Concentration of Peucedanol analyzed in 5 different concentrations for inter-day precision.

Measurements	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	12.5	25	50	100	200
1st day	12.2	24.5	50.4	101.4	199.9
2nd day	12.4	24.8	50.2	100.6	199.5
3rd day	12.2	24.8	50.1	100.7	199.6
Mean	12.3	24.7	50.2	100.9	199.7
S.D	0.11	0.17	0.13	0.43	0.17
Inter-day precision(%)	0.89	0.70	0.27	0.43	0.09

4-2-5. 정확도

12.5, 50, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 표준액을 각각 3회 측정하여 Figure 46에 나타난 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하였다. 이로부터 구한 정확도의 평균은 각각의 농도에서 98.1~100.4%로 양호하였으며, Table 21에 나타내었다.

Table 21. Calculated concentration of Peucedanol analyzed in 3 different concentrations for accuracy.

Measurements	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	12.5	50	200
1	12.2	50.4	199.9
2	12.4	50.2	199.5
3	12.2	50.1	199.6
Mean	12.3	50.2	199.7
Accuarcy(%)	98.1	100.4	99.8

5. 표준화된 분석 방법의 적용 및 최적 추출 조건의 확립

5-1. 역사뿌리 중 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 분석 방법 적용

5-1-1. 추출용매 종류별 지표성분의 분석

추출용매의 종류에 따른 추출효율을 측정하기 위해 2010년 10월 역사뿌리를 다시 채집하여 건조한 후 MeOH, EtOH 및 Acetone으로 추출하였다. 그 결과 이전에 추출물에서 확인되었던 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 나타나지 않았다(Figure 47).



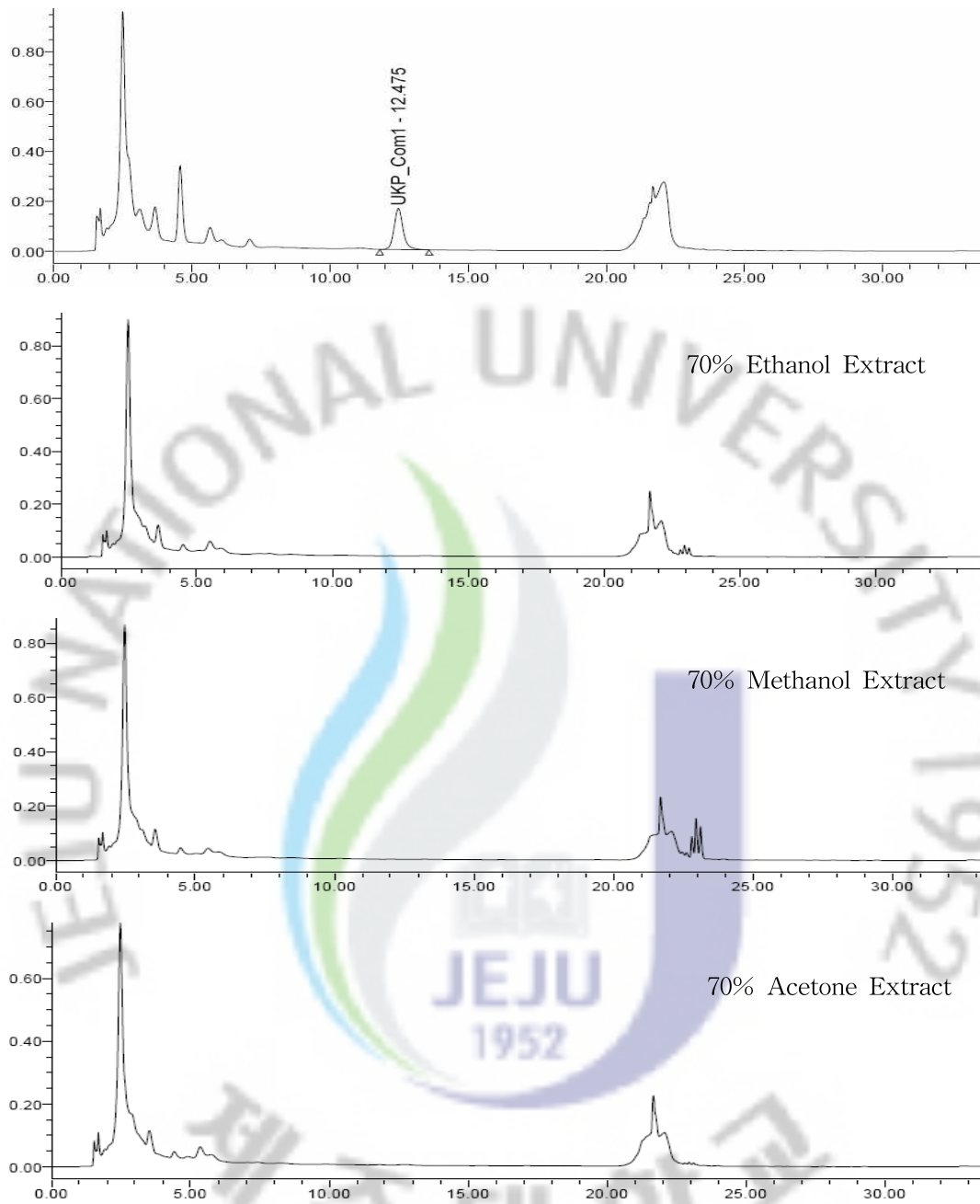


Figure 47. Chromatogram of several solvent extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

5-1-2. 억새지상부의 지표성분 분석

억새뿌리에서 확인 되지 않은 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 억새의 지상부에 존재하는지를 확인해 보기 위하여 억새지상부를 70% Methanol로 추출하여 분석해 보았다. 그 결과, 억새 지상부에서도 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분은 나타나지 않았다(Figure 48).

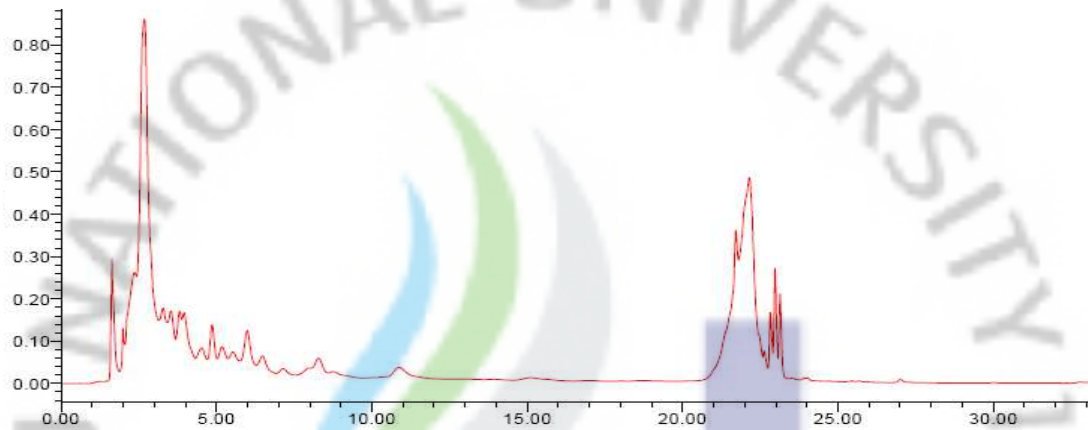


Figure 48. Chromatogram from top parts of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*.

5-1-3. 억새뿌리에서 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 정량

억새뿌리를 70% Methanol 로 5일간 추출해서 분석해 본 결과 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 이에 따라 억새뿌리의 성분 분리 시 이용했던 추출물과 5일간 추출한 추출물 중 Methyl 4-hydroxy cinnamate에 대한 정량을 해 보았다. 그 결과 5일간 추출한 추출물에 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 확인되었다. 3개월 동안 추출한 추출물 (69.3 $\mu\text{g/ml}$) 보다는 적은 양이지만 억새뿌리에 Methyl 4-hydroxy cinnamate 가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 성분 분리 시 이용했던 추출물의 경우 원물의 채집 시기가 5월이었고, 분석 시 이용했던 추출물은 원물

의 채집시기가 10월이기 때문에 정확한 성분 비교가 되지는 않으므로, 같은 시기에 채집하여 분석해야 할 것으로 생각된다. 또한 추출 시간에 따라 성분이 변하여 함량에 차이가 생기는 것인지에 대한 연구도 필요할 것으로 보인다(Table 22, Figure 49).

Table 22. Extraction efficiency of Roots of *Miscanthus sinensis* var. purpurascens by extraction times.

Extract	Concentration					Mean	S.D	CV (%)
	1st	2nd	3rd	4th	5th			
Extract (3 month)	67.8	69.5	70.2	69.6	69.5	69.3	0.9	1.29
Extract (5 day)	7.4	7.5	7.4	7.4	7.7	7.5	0.1	1.98

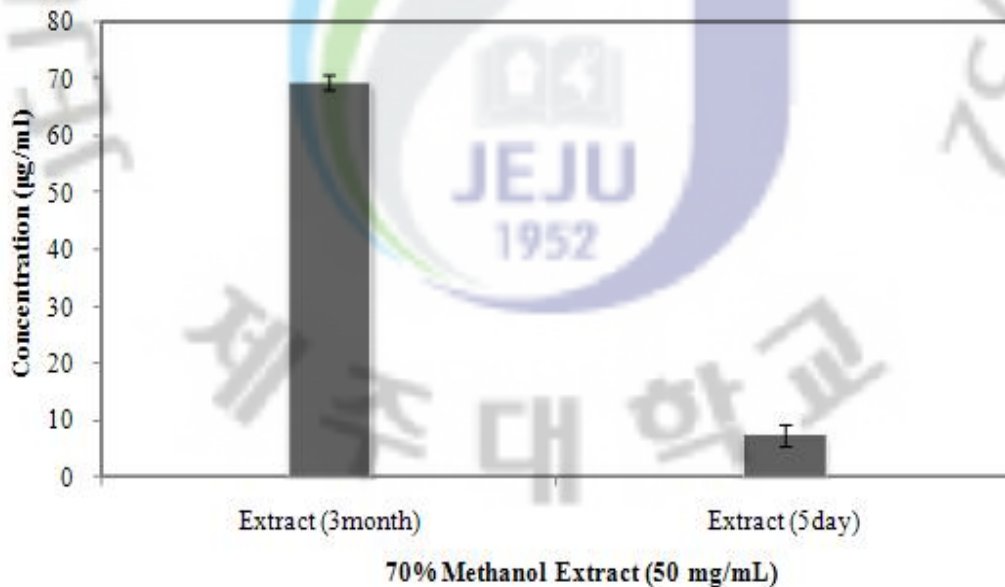


Figure 49. Extraction efficiency of Roots of *Miscanthus sinensis* var. purpurascens by extraction times. The data expressed as means \pm S.D. of five determinations.

5-2. 갯기름나물 중 Peucedanol의 최적 추출 조건의 확립

5-2-1. 추출용매에 따른 지표성분의 정량

추출용매의 종류에 따른 추출효율을 측정하기 위해 MeOH, EtOH 및 Acetone 으로 추출하였고, 물질의 분석법 검증 시 사용되었던 방법을 이용하여, 5회 반복 측정하였다. 억새뿌리 추출용매에 따른 추출물의 수득률을 확인해 본 결과 Acetone 추출물이 가장 높게 나타나는 것이 확인되었다(Table 23, Figure 50). 추출물 중 Peucedanol의 함량을 확인해 본 결과 Acetone 추출물에서 138.8 μ g/mL로 가장 추출 효율이 높은 것을 알 수 있었다(Table 23, Figure 51).

Table 23. Extraction efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction solvents.

No.	Solvent (50 mg/ml)		
	80% Acetone	80% Methanol	80% Ethanol
1st	142.9	127.4	123.2
2nd	142.1	131.3	124.5
3rd	138.2	130.4	119.4
4th	137.5	129.7	123.1
5th	133.6	132.0	124.5
Mean	138.8	130.1	122.9
S.D	3.8	3.8	2.1
CV(%)	2.73	2.73	1.69
Yield(%)	19.12	15.01	15.07

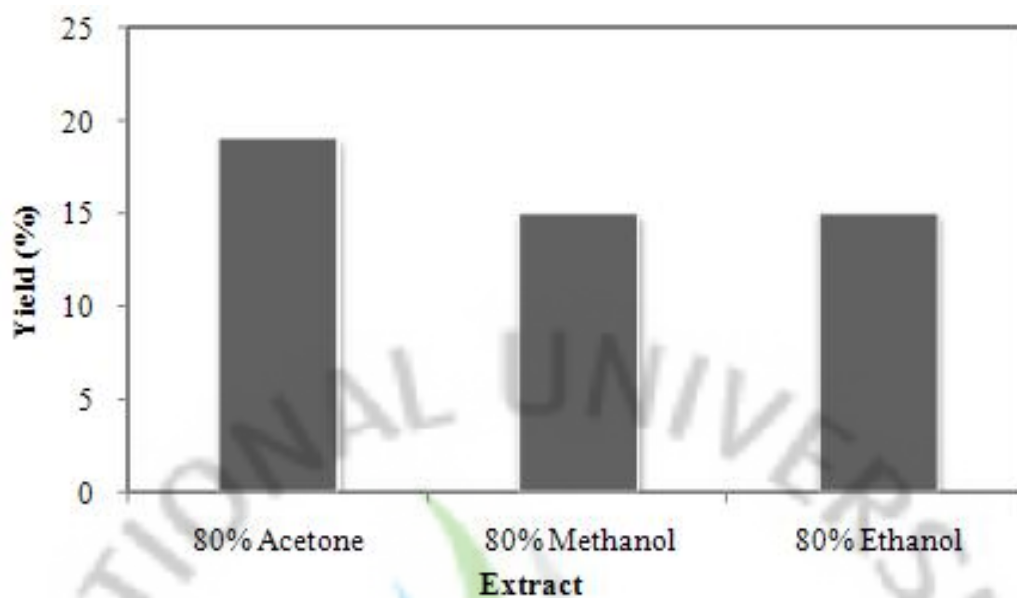


Figure 50. Extraction yield efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction solvents.

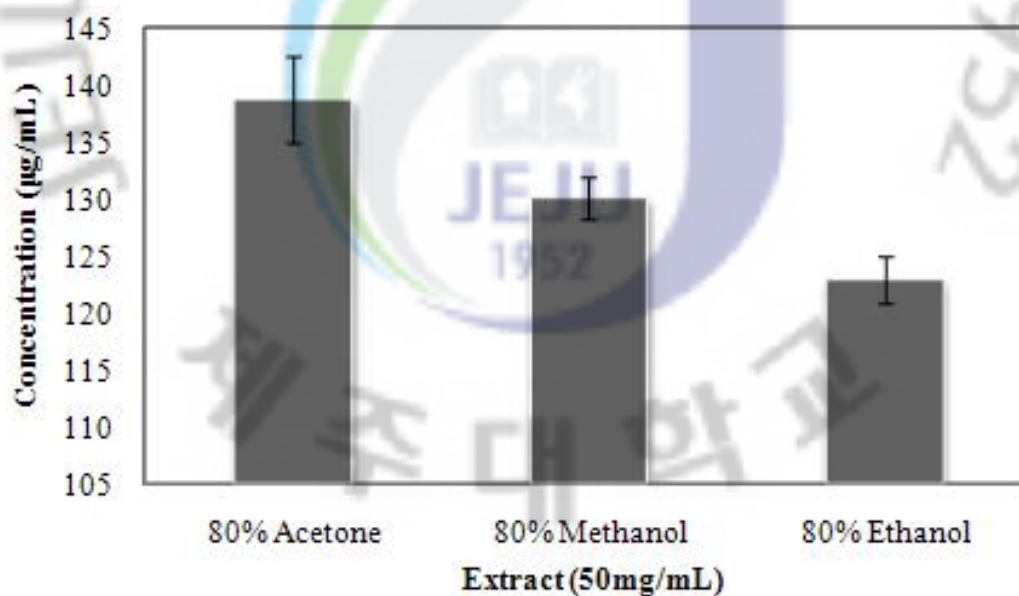


Figure 51. Extraction concentration efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction solvents. The data expressed as means \pm S.D. of five determinations.

5-2-2. 추출용매의 조성에 따른 지표성분의 정량

용매별 추출 결과에 따라 수득률 및 성분함량이 가장 높았던 아세톤과 가장 낮았던 에탄올에 대해서 용매의 농도에 따른 성분의 함량을 비교해 보기 위해 물질의 분석법 검증 시 사용되었던 방법을 이용하여, 5회 반복 측정하였다. 그 결과 아세톤 추출물은 70%와 90% 조건에서 각각 145.0 µg/mL와 147.6 µg/mL로 높게 나오는 것을 알 수 있었으며, 수득률과 비교하여 70% 아세톤 추출물로 추출했을 때 가장 높게 추출되는 것을 알 수 있었다(Table 24, Figure 52, 53). 에탄올 추출물의 경우 30% 조건에서 138.9 µg/mL으로 가장 높게 추출되었다(Table 25, Figure 54, 55). 그러나 수득률과 비교하였을 때, 갯기름나물 중 Peucedanol을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 방법은 70% 아세톤의 조성이라고 판단되었다.

Table 24. Extraction efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction Acetone percentage.

%Acetone	Concentration					Mean	S.D	CV (%)	Yield (%)
	1st	2nd	3rd	4th	5th				
10%	99.3	99.3	98.7	98.9	98.4	98.9	0.4	0.40	20.74
20%	122.4	113.6	116.5	117.5	116.6	117.3	3.2	2.72	17.75
30%	102.4	103.6	103.5	102.9	103.6	103.2	0.6	0.54	19.71
40%	123.7	116.1	121.2	117.4	121.9	120.0	3.2	2.65	20.05
50%	126.9	125.8	124.6	125.2	123.1	125.1	1.4	1.13	19.12
60%	132.7	125.9	128.5	133.0	123.0	128.6	4.3	3.37	17.85
70%	145.6	144.6	145.7	144.6	144.5	145.0	0.6	0.41	15.93
80%	142.9	142.1	138.2	137.5	133.6	138.8	3.8	2.73	15.65
90%	149.2	146.6	150.6	144.7	147.3	147.6	2.3	1.55	12.25
100%	104.5	94.5	101.7	98.2	104.6	100.7	4.3	4.31	2.10

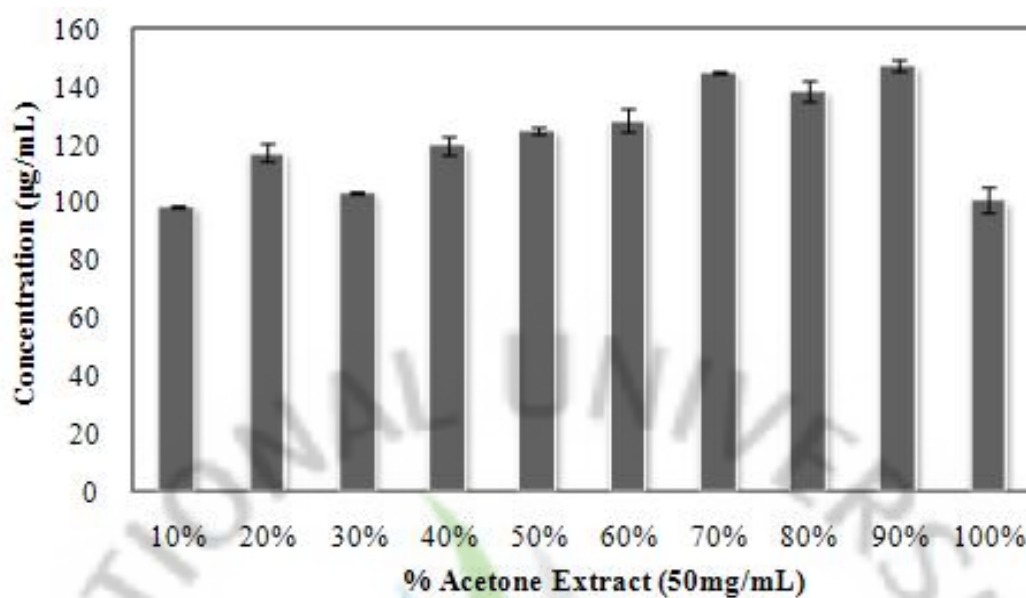


Figure 52. Extraction concentration efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction Acetone percentage. The data expressed as means \pm S.D. of five determinations.

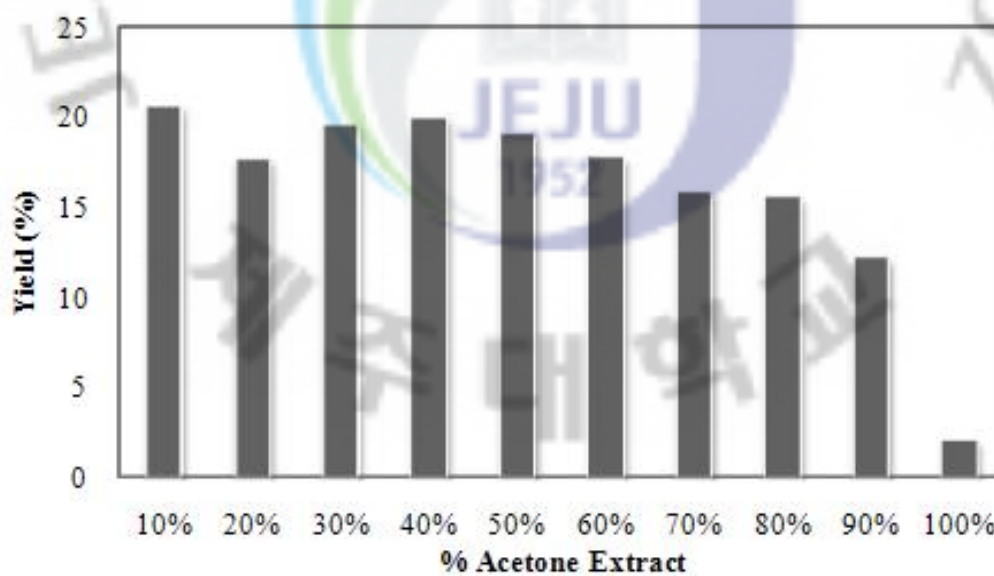


Figure 53. Extraction yield efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction Acetone percentage.

Table 25. Extraction efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction Ethanol percentage.

%Ethanol	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)					Mean	S.D	CV (%)	Yield (%)
	1st	2nd	3rd	4th	5th				
10%	81.5	80.8	79.5	77.9	78.6	79.7	1.5	1.87	20.25
20%	101.7	103.2	101.2	103.1	101.7	102.2	0.9	0.89	20.29
30%	138.4	139.4	137.9	137.8	140.7	138.9	1.2	0.87	13.60
40%	106.3	105.8	107.0	101.0	101.7	104.4	2.8	2.66	18.19
50%	108.9	106.0	106.8	107.3	109.0	107.6	1.3	1.22	16.93
60%	105.6	104.3	103.7	105.9	110.1	105.9	2.5	2.39	18.41
70%	124.6	125.2	126.1	123.4	121.6	124.2	1.7	1.39	15.07
80%	123.2	124.5	119.4	123.1	124.5	122.9	2.1	1.69	13.14
90%	118.4	116.7	120.0	119.1	117.6	118.3	1.3	1.08	2.31
100%	117.6	121.2	120.6	122.3	123.3	121.0	2.2	1.79	8.17

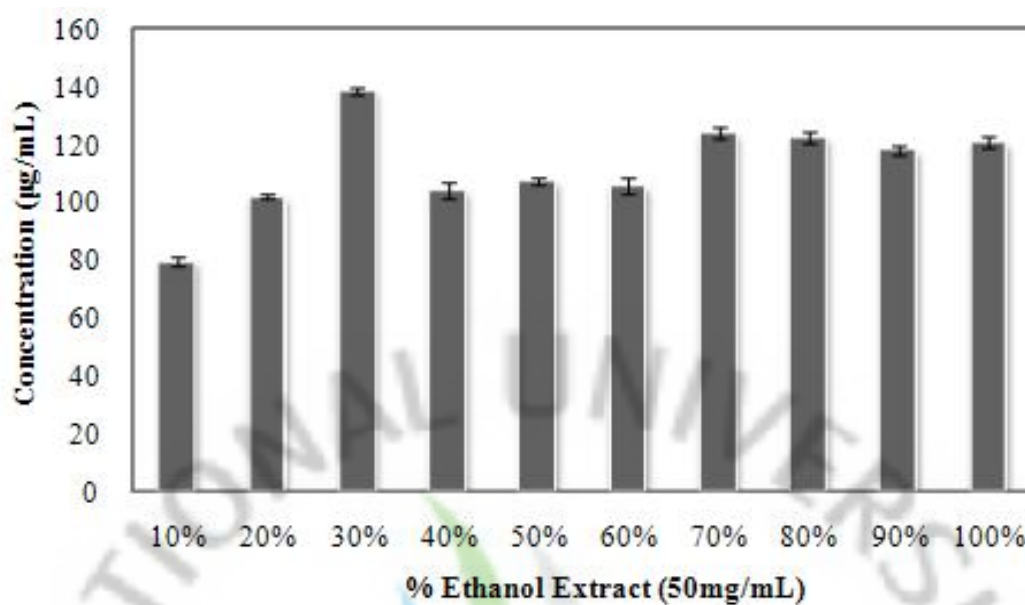


Figure 54. Extraction concentration efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction Ethanol percentage. The data expressed as means \pm S.D. of five determinations.

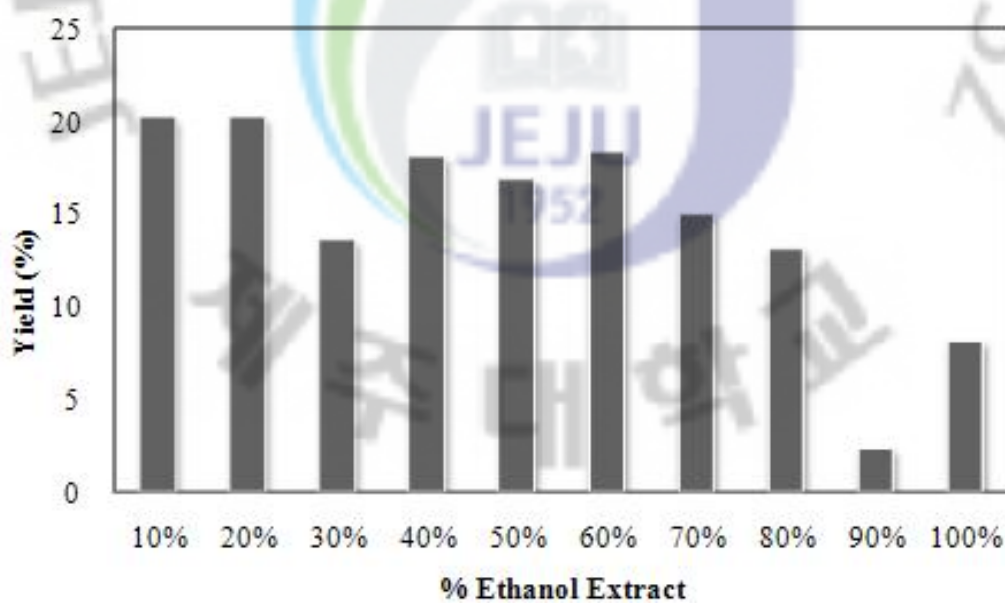


Figure 55. Extraction yield efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction Ethanol percentage.

5-2-3. 추출시간에 따른 지표성분의 정량

추출시간에 따른 갯기름나물 중 Peucedanol 성분의 함량을 비교해 보았다. 용매 조성별 실험 결과, 함량이 가장 높았던 70% Acetone 의 조성으로 시간을 다르게 하여 추출하였다. 1, 3, 6, 24, 48시간 마다 추출하였으며, 성분의 함량을 비교해 보기 위해 물질의 분석법 검증 시 사용되었던 방법을 이용하여, 5회 반복 측정하였다. 그 결과 수득물에 있어서는 24시간 추출했을 때 가장 좋은 것으로 나타났으나, Peucedanol 성분의 함량은 1시간 추출 시 가장 좋게 나타났다. 추출시간을 길게 줄수록 추출의 수율은 좋아지지만, 추출물 중 Peucedanol의 함량은 오히려 감소하는 것으로 보아 갯기름나물 중 Peucedanol 성분의 함량을 가장 높게 얻기 위해서는 1시간 추출하는 것이 적당하다고 판단되었다(Table 26, Figure 56, 57).

Table 26. Extraction efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction times.

Time	Concentration (µg/ml)					Mean	S.D	CV (%)	Yield (%)
	1st	2nd	3rd	4th	5th				
1hr	145.6	144.6	145.7	144.6	144.5	145.0	0.6	0.41	15.93
3hr	140.3	135.8	136.3	139.2	139.5	138.2	2.0	1.47	16.31
6hr	127.5	118.2	122.7	125.9	126.0	124.1	3.7	2.99	20.33
24hr	83.8	88.3	87.4	89.3	89.9	87.7	2.4	2.75	17.72
48hr	79.5	77.2	74.5	72.8	75.0	75.8	2.6	3.43	18.69

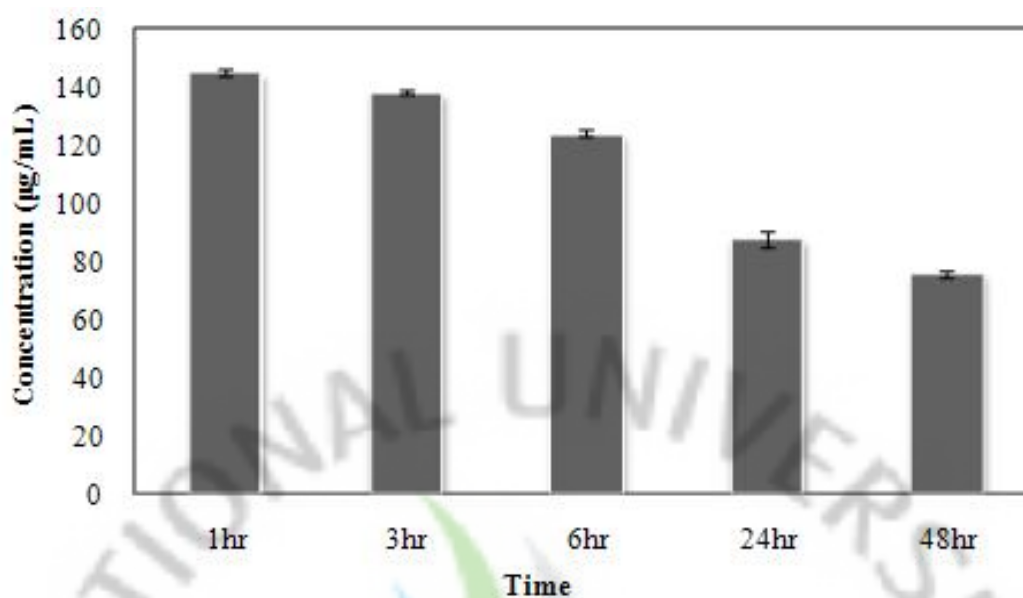


Figure 56. Extraction concentration efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction times. The data expressed as means \pm S.D. of five determinations.

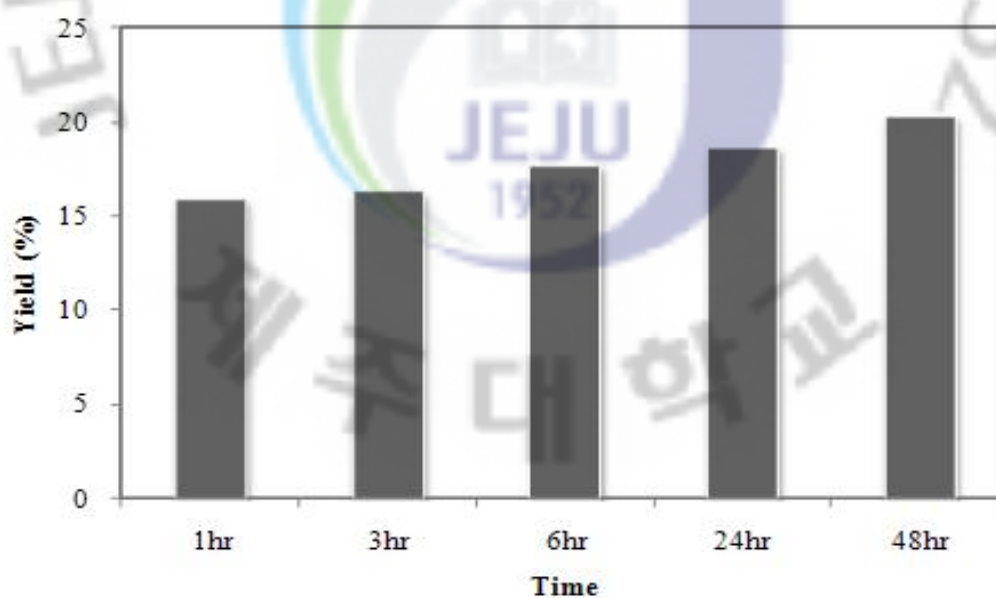


Figure 57. Extraction yield efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction times.

5-3. 표준화된 전처리 방법 및 분석 방법을 이용한 시료의 분석

5-3-1. 표준화된 전처리 방법 및 분석 방법을 이용한 Peucedanol의 정량

앞에서 연구된 최적 추출조건 및 분석방법을 이용하여 갯기름나물의 뿌리, 지상부, 꽃에 대한 Peucedanol 성분의 정량 결과, 갯기름나물의 꽃에서 574.0 µg/mL로 가장 높은 함량을 나타내는 것이 확인되었다. 뿌리에서도 341.2 µg/mL으로 지상부에서 함유하고 있는 145.0 µg/mL보다 높은 함량을 나타내고 있음이 확인되었다. 그리고 갯기름나물과 같은 미나리과에 속하는 구릿대의 Peucedanol 성분을 정량해 본 결과, 45.6 µg/mL로 갯기름나물보다 매우 낮은 함량을 가지고 있는 것이 확인되었다(Table 27, Figure 58, 59).

Table 27. Extraction efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction parts and concentration of *Angelica dahurica* extracts

Measurements	Concentration (µg/ml)			<i>Angelica dahurica</i>
	root part	top part	flower part	
1st	338.1	145.6	567.3	44.1
2nd	338.1	144.6	571.7	44.8
3rd	334.0	145.7	569.3	51.8
4th	350.1	144.6	574.9	42.5
5th	346.0	144.5	587.0	45.0
Mean	341.2	145.0	574.0	45.6
S.D	6.6	0.6	7.8	3.6
Inter-day precision (%)	1.93	0.41	1.35	7.85
Yield (%)	16.09	15.93	25.01	16.50

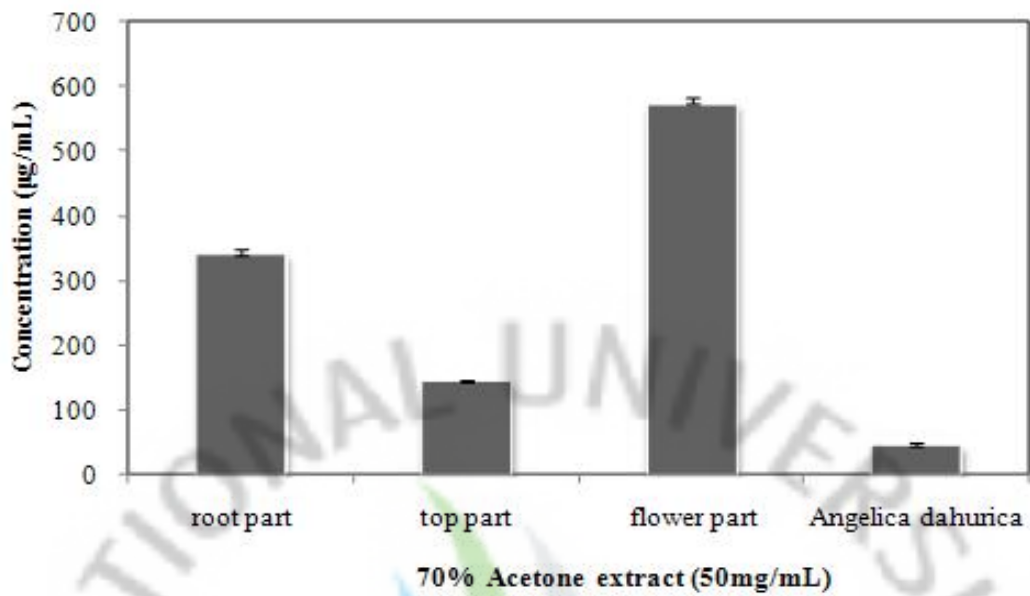


Figure 58. Extraction concentration efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction parts and concentration of *Angelica dahurica* extracts. The data expressed as means \pm S.D. of five determinations.

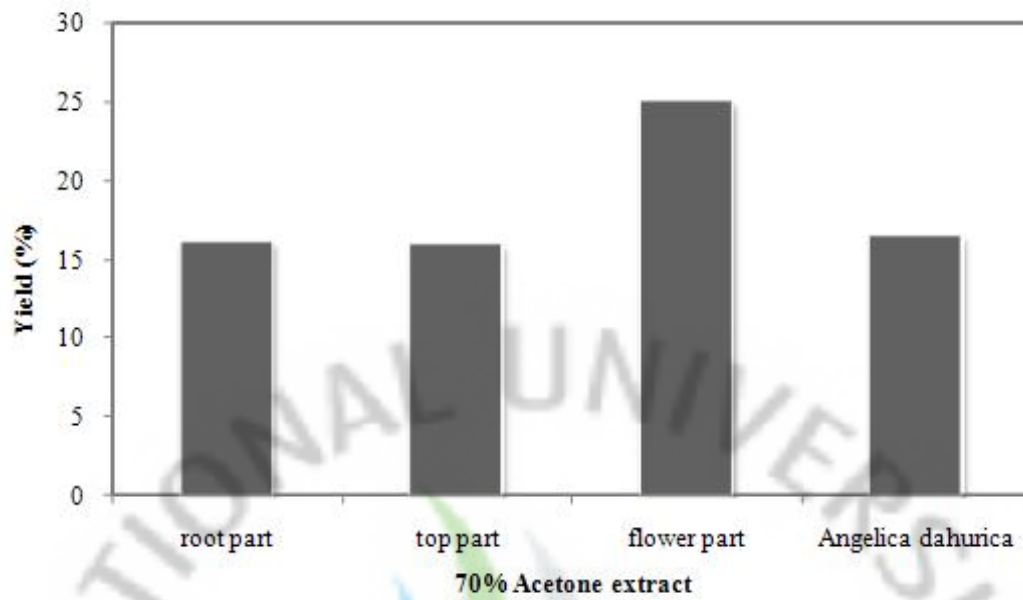


Figure 59. Extraction yield efficiency of *Peucedanum japonicum* Thunberg by extraction parts and concentration of *Angelica dahurica* extracts.

6. 분리된 화합물의 기능성 분류

기능성 원료에 있어 가장 중요한 부분은 개발하고자 하는 원료로부터 기능성분 또는 지표성분을 찾아내고 이들의 기준규격을 설정하는 것이다. 추출물의 효능이 추출물로부터 분리된 기능성분의 효능에 의존한다면 이들의 함량을 기준으로 하여 표준화된 추출물을 제조하여 제품개발 및 품질관리를 위해 이상적인 경우이다. 그러나 소수의 단일성분에 의존하지 않고, 다수의 성분 또는 이들 성분들의 복합적인 작용에 의해 효능을 나타내는 경우에는 추출물을 대표할 수 있는 성분의 선정이 필요하다.

이에 따라, 엑새뿌리에서 분리하여 표준화 조건을 검색한 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분과 갯기름나물에서 분리하여 표준화 조건을 검색한 Peucedanol 성분이 항산화와 미백에 있어 기능성분 혹은 지표성분으로서의 선정이 가능한지, 활성검색 결과와 비교하여 확인해 보았다.

6-1. 엑새뿌리 중 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 기능성 분류

6-1-1. 항산화 효과와 Methyl 4-hydroxy cinnamate의 기능성 연구

Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 엑새뿌리 추출물에서 항산화 활성에 있어서 기능성분 혹은 지표성분으로서의 선정이 가능한지 알아보기 위하여 추출물과 분획물 그리고 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 항산화 활성을 Vitamin C의 활성과 비교해 보았다. 그 결과 MC 분획의 활성은 RC_{50} 값이 52.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 비교적 높은 억제활성을 갖고 있지만, Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 20%로 매우 낮은 억제 활성을 갖고 있어서 이 물질을 기능성분으로 선정할 수는 없다고 생각되어진다.

지표성분으로서의 가능성을 확인해 보기 위해 앞서 표준화에서 확인한 바와 같이 3개월 동안 추출하여 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분을 포함하고 있는 추출물과 1시간 추출하여 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분을 포함하고 있지 않은 추출물의 활성을 비교해 보았다. 그 결과 성분을 포함하고 있는 추출물과 포

함하지 않는 추출물의 RC_{50} 값은 각각 152.6 $\mu\text{g/mL}$ 과 104.7 $\mu\text{g/mL}$ 으로 성분을 함유하지 않는 추출물의 항산화 활성이 오히려 높음이 확인되었다. 이상의 결과로 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분은 항산화 활성의 지표성분으로서도 선정될 수 없음이 확인되었다(Figure 60, 61).

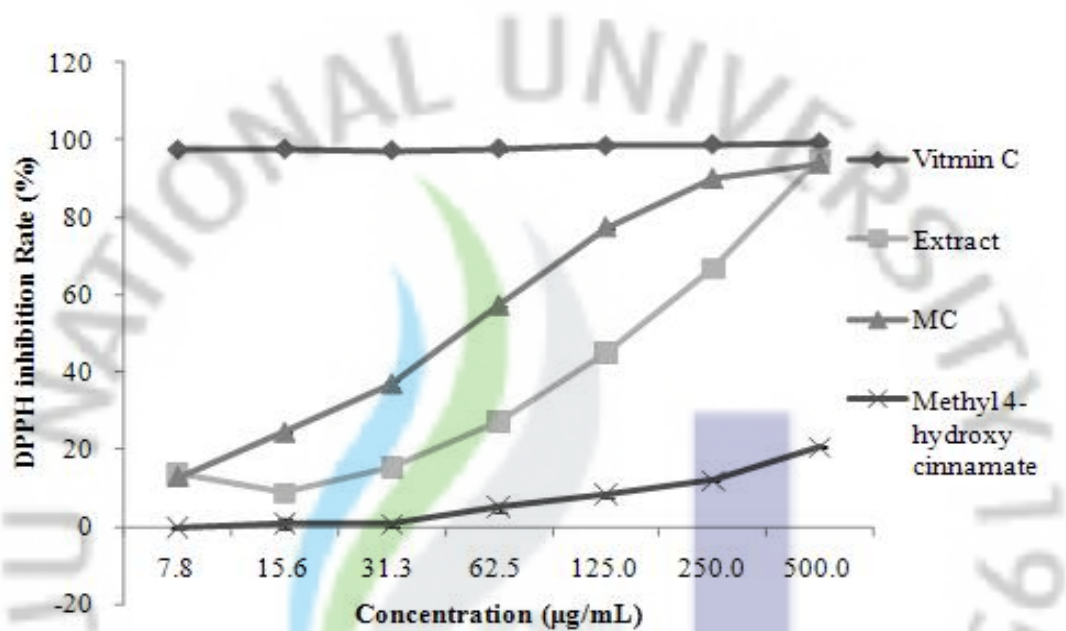


Figure 60. DPPH radical scavenging effects of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

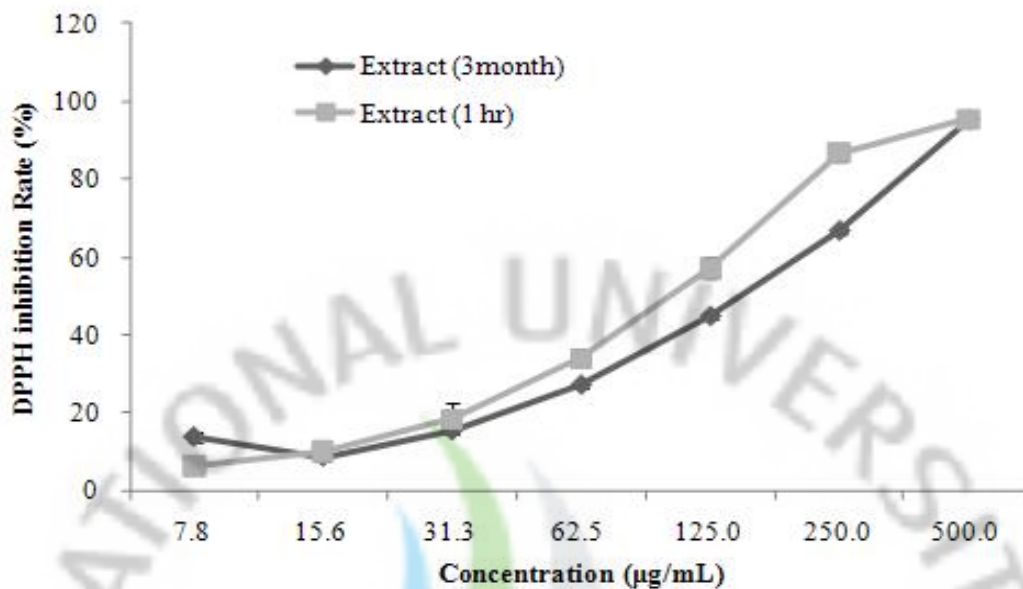


Figure 61. DPPH radical scavenging effects of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* by extraction times. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

6-1-2. Tyrosinase 저해활성과 Methyl 4-hydroxy cinnamate의 기능성 연구

Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 억새뿌리 추출물에서 미백활성에 있어서 기능성분 혹은 지표성분으로서의 선정이 가능한지 알아보기 위하여 추출물과 분획물 그리고 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 Tyrosinase 저해활성을 통하여 Arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)의 활성과 비교해 보았다.

Tyrosinase 활성을 확인 해 본 결과 MC 분획과 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 IC_{50} 값이 각각 $36.2 \mu\text{g/mL}$ 와 $39.9 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 억제활성을 갖고 있어서 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 기능성 물질로서 가능성이 있다고 판단되었다. 이에 따라 이 성분의 존재 여부에 따라 활성에도 차이가 있는지 알아보기 위하여 앞서 표준화에서 확인한 바와 같이 3개월 동안 추출하여 Methyl

4-hydroxy cinnamate 성분을 포함하고 있는 추출물과 1시간 추출하여 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분을 포함하고 있지 않은 추출물의 활성을 비교해 보았다. 그 결과 성분을 포함하고 있는 추출물의 IC₅₀ 값은 90.0 µg/mL으로 비교적 높은 활성을 갖고 있는 것과 비교하여 성분을 포함하지 않는 추출물의 경우는 IC₅₀값이 200 µg/mL보다 높음이 확인되었다. 이에 따라 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분은 억새뿌리의 Tyrosinase 효소활성의 기능성분으로 가능성이 있다고 생각되어진다(Figure 62, 63).

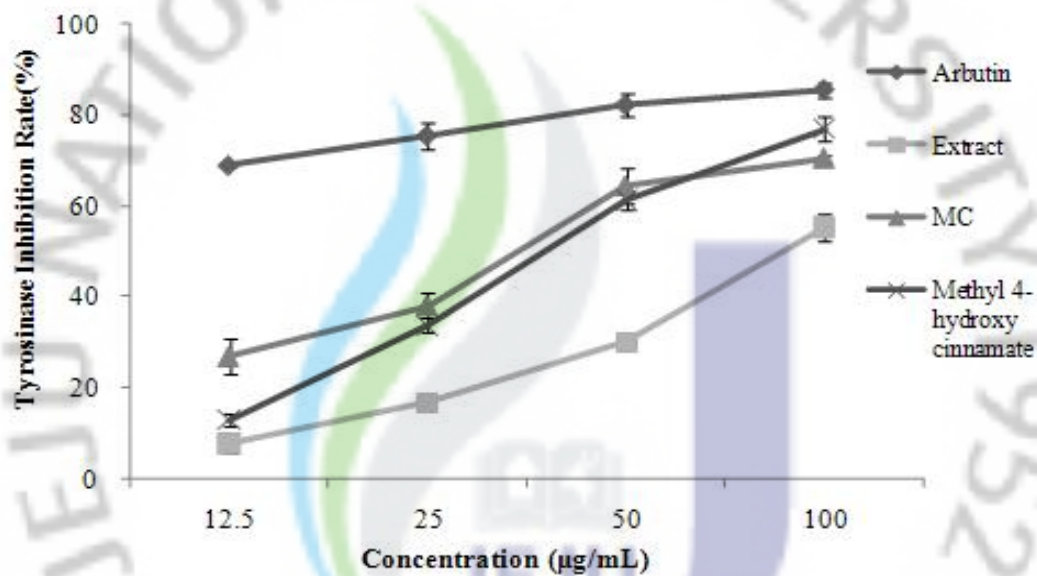


Figure 62. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

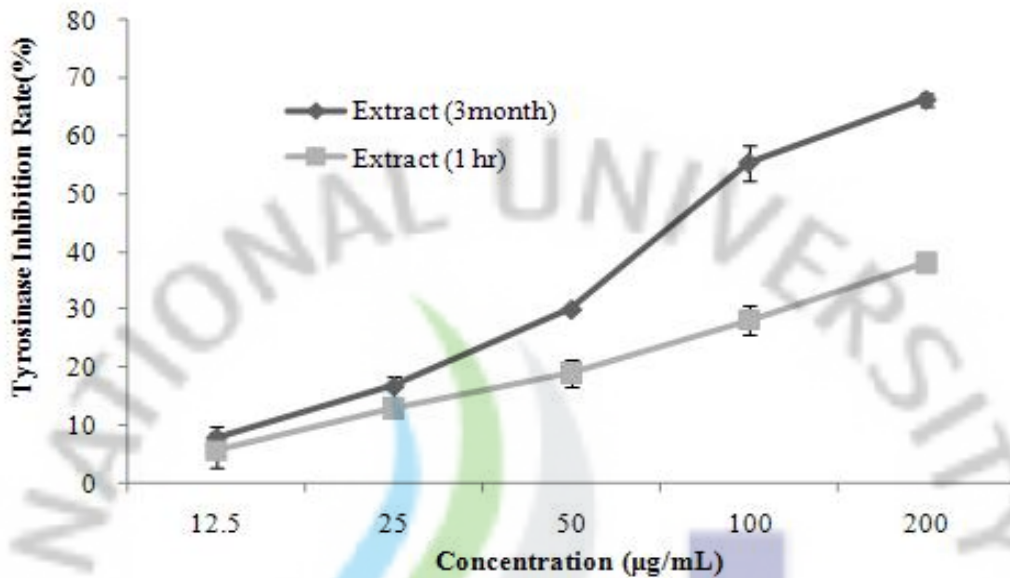


Figure 63. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* by extraction times. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

6-1-3. Melanin 생합성 저해율과 Methyl 4-hydroxy cinnamate의 기능성 연구

Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 억새뿌리 추출물에서 미백활성에 있어서 기능성분 혹은 지표성분으로서의 선정이 가능한지 알아보기 위하여 추출물과 분획물 그리고 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 Melanin 생합성 저해활성을 통하여 Arbutin의 활성과 비교해 보았다.

Melanin 생합성 저해활성을 확인해 본 결과 100 µg/mL의 농도에서 MC 분획과 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분의 Melanin 생합성 저해율이 각각 56.9%와 49.1%로 Arbutin의 69.3%보다 더 좋은 활성을 갖는 것으로 나타났다. 이에 따라

Melanin 생합성 저해활성에 있어서도 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 기능성 물질로서 가능성이 있다고 판단되었다. 이에 따라 이 성분의 존재 여부에 따라 활성에도 차이가 있는지 알아보기 위하여 앞서 표준화에서 확인한 바와 같이 3개월 동안 추출하여 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분을 포함하고 있는 추출물과 1시간 추출하여 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분을 포함하고 있지 않은 추출물의 활성을 비교해 보았다. 그 결과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 성분을 포함하고 있는 추출물과 포함하지 않는 추출물의 활성이 각각 111.7%와 115.4%로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 보면 Tyrosinase 억제활성과 Melanin 생합성 저해활성의 결과에 의해 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분은 역새뿌리의 미백활성의 기능성분 혹은 지표성분으로 가능성이 있다고 생각되어진다(Figure 64, 65)

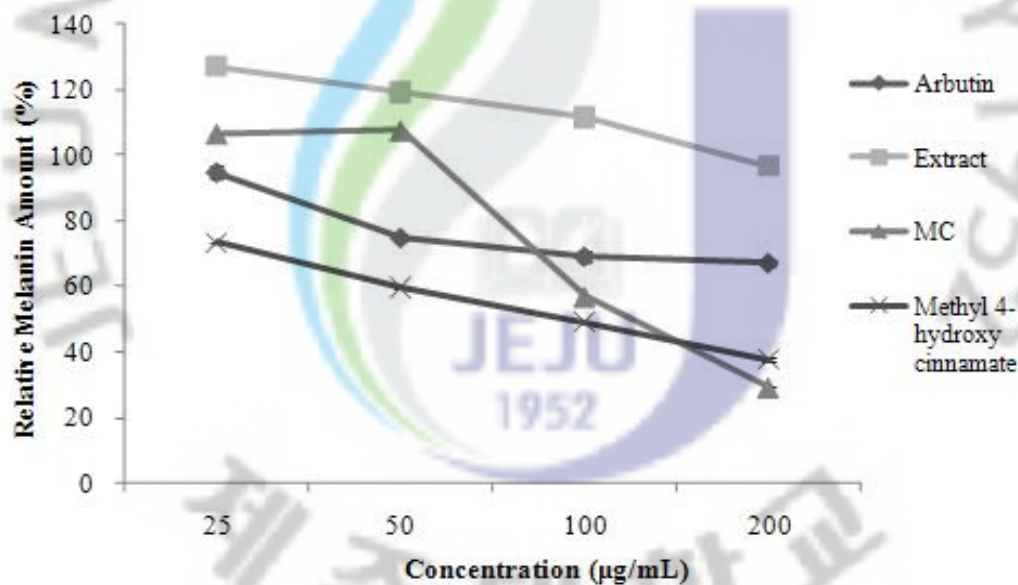


Figure 64. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

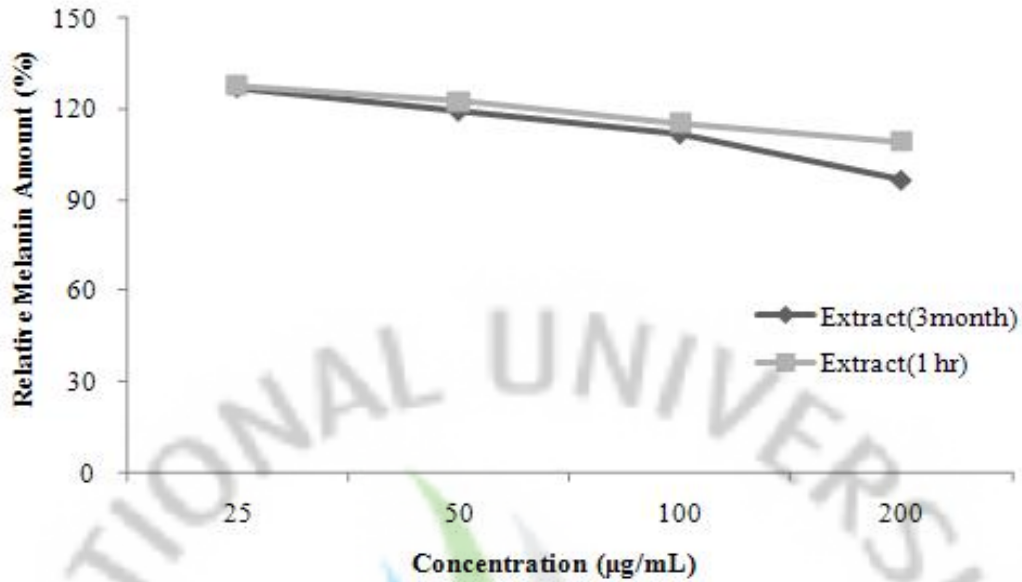


Figure 65. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from Roots of *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* by extraction times. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

6-2. 갯기름나물 중 Peucedanol 성분의 기능성 분류

6-2-1. 항산화 효과와 Peucedanol의 기능성 연구

Peucedanol 성분이 갯기름나물 추출물에서 항산화 활성에 있어서 기능성분 혹은 지표성분으로서의 선정이 가능한지 알아보기 위하여 추출물과 분획물 그리고 Peucedanol 성분의 항산화 활성을 Vitamin C ($RC_{50} = 5.1 \mu\text{g/mL}$)의 활성과 비교해 보았다. 그 결과 EA 분획의 활성은 RC_{50} 값이 $37.0 \mu\text{g/mL}$ 로 비교적 높은 억제활성을 갖고 있지만, Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분은 $500 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 27.7%로 매우 낮은 억제활성을 갖고 있어서 이 물질을 기능성분으로 선정할 수는 없다고 생각되어진다.

지표성분으로서의 가능성을 확인해 보기 위해 앞서 표준화의 결과에서 Peucedanol 성분의 함량이 높은 70% Acetone 추출물(145 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 성분의 함량이 낮은 10% Acetone 추출물(98.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 항산화 활성을 비교해 보았다. 그 결과 70% Acetone 추출물의 RC_{50} 값은 276.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 10% Acetone 추출물의 472.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 활성이 좋은 것으로 나타났다. 이상의 결과로 갯기릅나무 추출물 중의 Peucedanol 성분은 항산화 활성의 지표성분으로서 가능성이 있음이 확인되었다(Figure 66, 67).

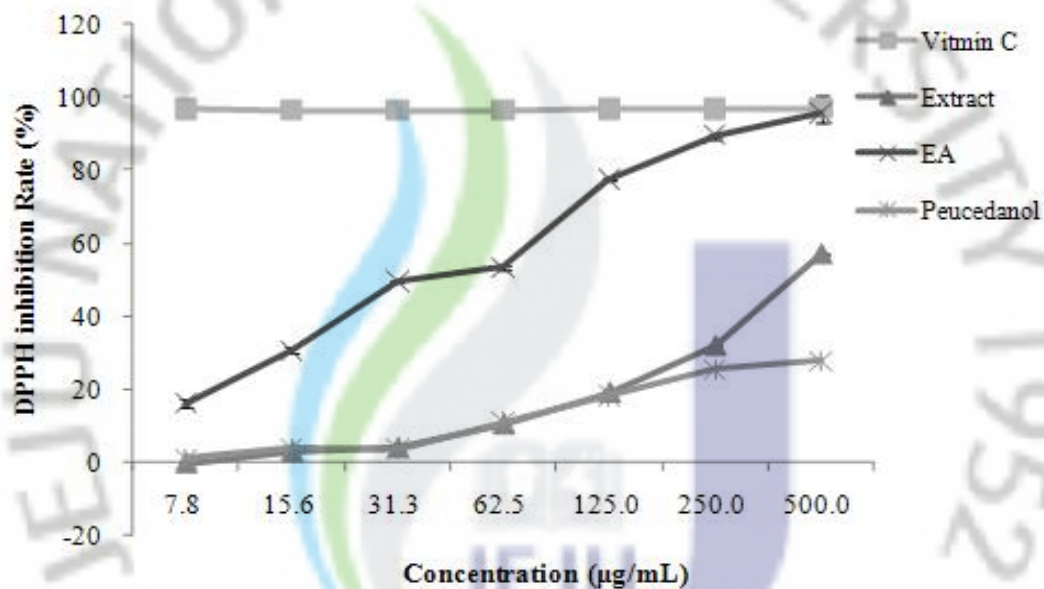


Figure 66. DPPH radical scavenging effects of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

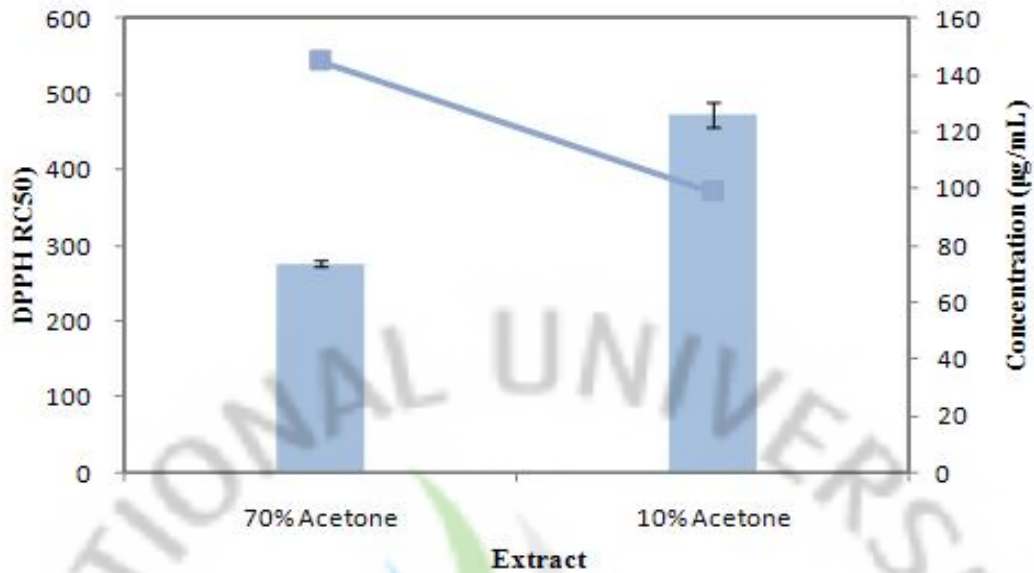


Figure 67. DPPH radical scavenging effects of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg by peucedanol concentration. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

6-2-2. Tyrosinase 저해활성과 Peucedanol의 기능성 연구

Peucedanol 성분이 갯기름나물 추출물에서 미백활성에 있어서 기능성분 혹은 지표성분으로서의 선정이 가능한지 알아보기 위하여 추출물과 분획물 그리고 Peucedanol 성분의 Tyrosinase 저해활성을 통하여 Arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)의 활성과 비교해 보았다. 그 결과 EA 분획의 활성은 IC_{50} 값이 $59.1 \mu\text{g/mL}$ 로 비교적 높은 억제활성을 갖고 있지만, Peucedanol 성분은 $200 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 17.4%로 매우 낮은 억제활성을 갖고 있어서 이 물질을 기능성분으로 선정할 수는 없다고 생각되어진다.

지표성분으로서의 가능성을 확인해 보기 위해 앞서 표준화의 결과에서 Peucedanol 성분의 함량이 높은 70% Acetone 추출물($145 \mu\text{g/mL}$)과 성분의 함량이 낮은 10% Acetone 추출물($98.9 \mu\text{g/mL}$)의 Tyrosinase 억제활성을 비교해

보았다. 그 결과 70% Acetone 추출물의 IC₅₀ 값은 29.7 µg/mL으로 10% Acetone 추출물이 200 µg/mL농도에서도 43.7%의 억제효과를 나타내는 것과 비교해서 활성이 좋은 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 갯기름나물 추출물 중의 Peucedanol 성분은 단일 물질만으로는 Tyrosinase 효소활성의 기능성분으로 사용할 수는 없지만 지표성분으로서 가능성이 있음이 확인되었다(Figure 68, 69).

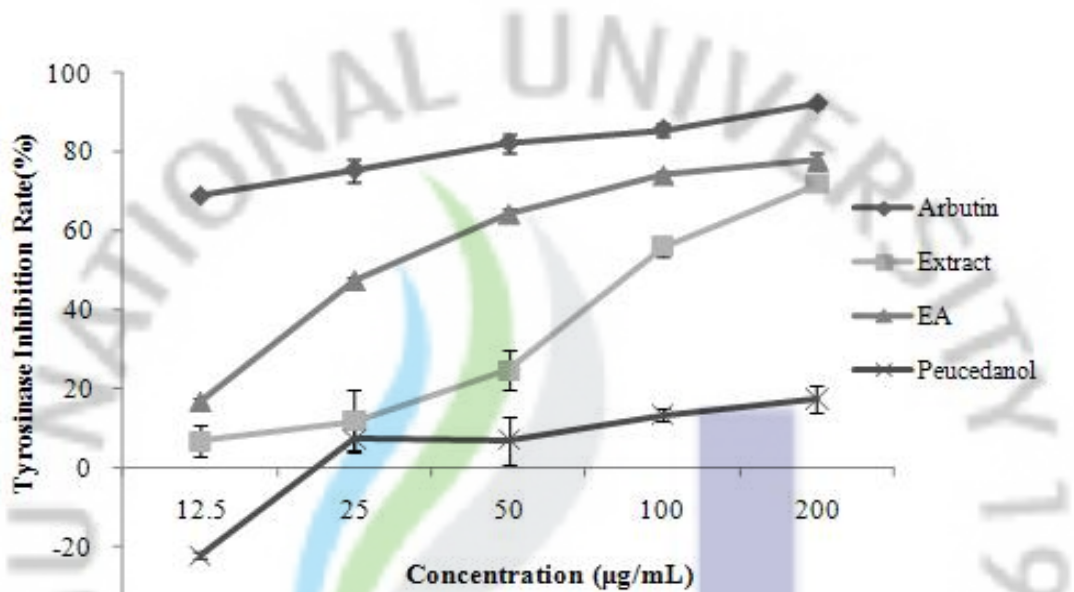


Figure 68. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

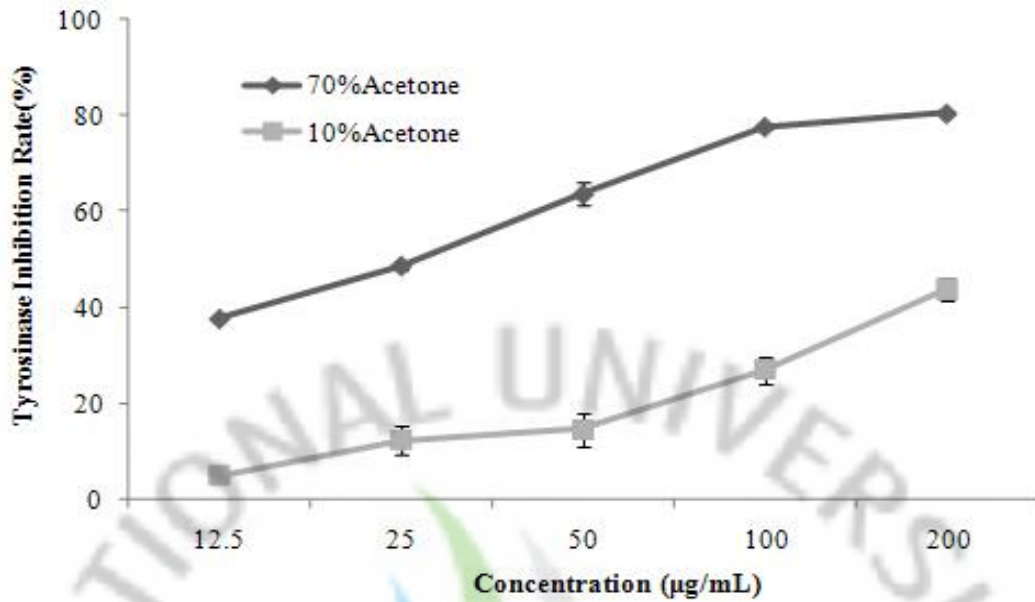


Figure 69. Tyrosinase inhibitory activity of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg by peucedanol concentration. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

6-2-3. Melanin 생합성 저해율과 Peucedanol의 기능성 연구

Peucedanol 성분이 갯기름나물 추출물에서 미백활성에 있어서 기능성분 혹은 지표성분으로서의 선정이 가능한지 알아보기 위하여 추출물과 분획물 그리고 Peucedanol 성분의 Melanin 생합성 저해활성을 통하여 Arbutin의 활성과 비교해 보았다.

Melanin 생합성 저해활성을 확인해 본 결과 100 µg/mL의 농도에서 Arbutin의 69.3%와 비교하였을 때 EA 분획은 36.1%로 Arbutin 보다 더 좋은 활성을 나타냈지만, Peucedanol 성분의 경우는 116.4%로 매우 낮은 억제활성을 나타내고 있음을 확인하였다. 이 결과는 Tyrosinase의 결과와 마찬가지로 Peucedanol 성분이 기능성 성분으로는 적합하지 않으나 지표성분으로서의 가능성을 갖고 있다고 생

각되어진다.

이에 따라 지표성분으로서의 가능성을 확인해 보기 위해 앞서 표준화의 결과에서 Peucedanol 성분의 함량이 높은 70% Acetone 추출물(145 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 성분의 함량이 낮은 10% Acetone 추출물(98.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 활성을 비교해 보았다. 그 결과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 70% Acetone 추출물과 10% Acetone 추출물의 억제효과는 각각 68.6%와 110.4%로 70% Acetone 추출물의 억제활성이 더 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 보면 Tyrosinase 억제활성과 Melanin 생합성 저해 활성의 결과에 의해 Peucedanol 성분은 갯기름나물 미백활성의 기능성분으로는 가능성이 없지만 지표성분으로 가능성이 있다고 확인되었다(Figure 70, 71).

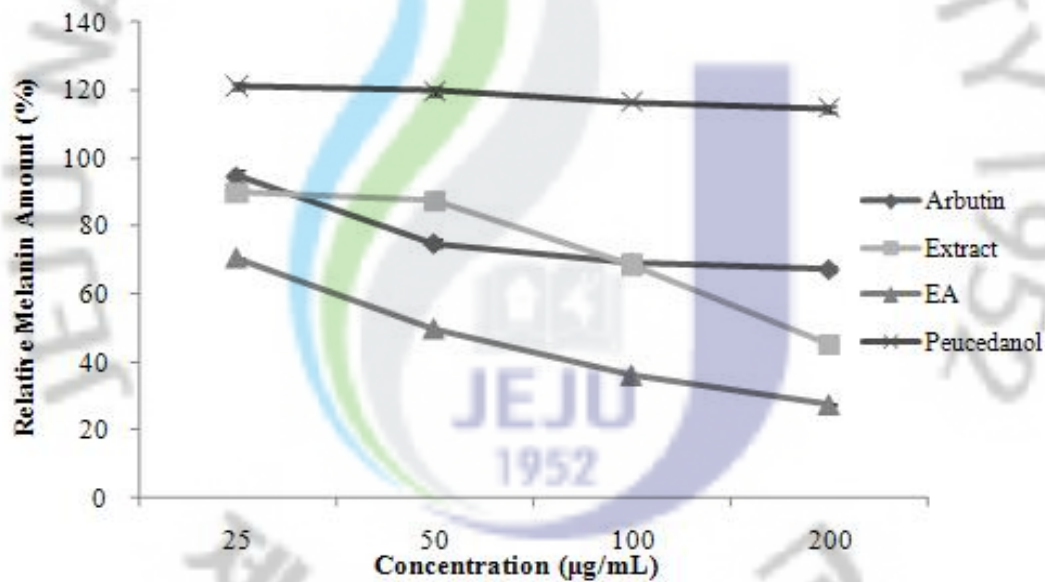


Figure 70. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

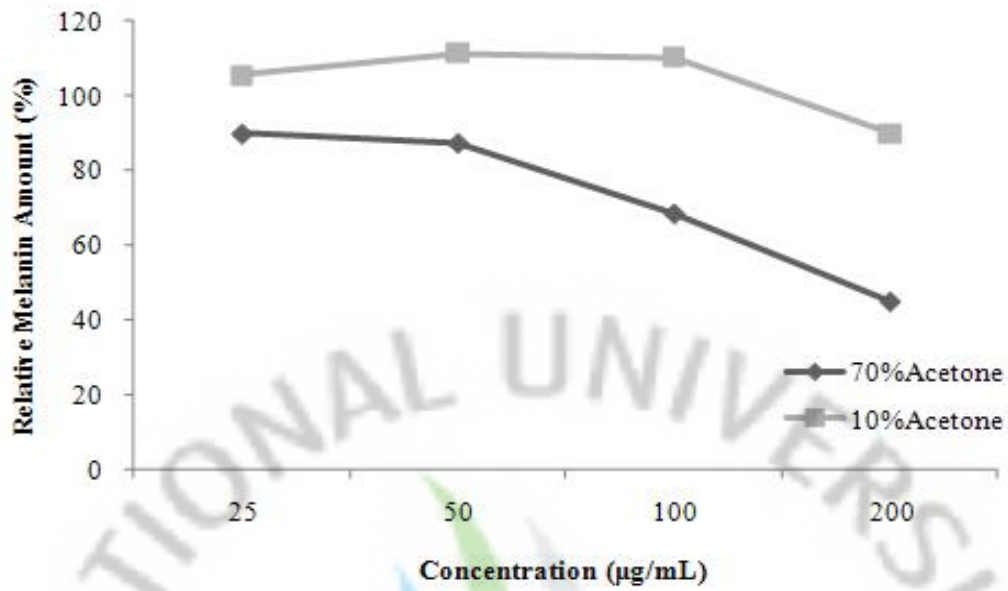


Figure 71. Inhibitory activity of melanin synthesis of several extracts from *Peucedanum japonicum* Thunberg by peucedanol concentration. The data expressed as means \pm S.D. of three determinations.

IV. 요약 및 결론

제주도내에 자생하고 있는 억새뿌리와 갯기름나물을 이용해 기능성 물질을 분리하고, 분리된 물질을 이용하여 표준화를 진행하였다.

- 1) 억새뿌리를 이용하여 기능성 물질인 Methyl 4-hydroxy cinnamate과 4-Hydroxybenzaldehyde를 분리하였다. 이 두 물질은 억새에서는 아직 보고되지 않은 물질로 항산화에서는 활성이 나타나지 않았지만 Tyrosinase 억제활성에서는 arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)과 비교해 각각 $39.9 \mu\text{g/mL}$ 와 $21.1 \mu\text{g/mL}$ 로 arbutin 보다는 낮지만 좋은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, Melanin 생합성 저해효과를 확인해 본 결과 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 arbutin은 69.3%의 저해율을 갖는 것과 비교해 두 물질은 각각 49.1%와 116.2%를 나타냄으로써 Methyl 4-hydroxy cinnamate는 arbutin 보다 더 좋은 활성을 갖는 것으로 확인되었다.
- 2) 갯기름나물을 이용하여 기능성 물질인 4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol과 Peucedanol (7-hydroxy-6-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-2H-chromen-2-one)을 분리하였다. Peucedanol은 갯기름나물의 대표적인 물질로 이미 여러 차례 보고된 물질이고, 4-(2-hydroxy-1-methoxyethyl)phenol은 갯기름나물에서는 처음 분리된 물질로 확인되었다. 갯기름나물의 활성에 대해서는 많이 보고가 되어져 있기는 하지만 미백활성에 대해서는 보고가 되어 있지 않았다. 이에 따라 미백활성에 대한 갯기름나물의 활성을 확인해 본 결과 갯기름나물은 미백활성을 갖는 것으로 확인되었다. Tyrosinase 저해활성의 경우 arbutin ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{g/mL}$)과 비교해 추출물과 EA 분획층은 각각 90.3과 59.1로 높은 수준의 저해활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Melanin 생합성 저해효과를 확인해 본 결과 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 arbutin은 69.3%의 저해율을 갖는 것과 비교해 추출물과 EA 분획물에서는 각각 68.6%와 36.1%로 Arbutin 보다 더 좋은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그러나 분리된 물

질들은 활성이 거의 나타나지는 않았다.

- 3) 역새뿌리 중 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분을 이용해 표준화를 진행 하였으며, 이에 따라 분석의 최적 조건을 확립하였다. 그러나 추출시간에 따라 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 나타나는 것으로 확인되어 이 부분에 대해서는 좀 더 연구를 진행해야 할 것으로 판단되어진다. 표준화 결과와 활성 결과를 이용하여 Methyl 4-hydroxy cinnamate 성분이 역새뿌리의 지표물질 혹은 기능성 물질로서 사용 가능성이 있는지 확인해 본 결과, 항산화에서는 지표물질로, 미백활성에서는 기능성 또는 지표물질로 가능성이 있음이 확인되었다.
- 4) 갯기름나물 중 Peucedanol 성분을 이용해 표준화를 진행하였으며, 이에 따라 분석의 최적 조건을 확립하였다. 이렇게 확립된 분석조건을 이용하여 용매별, 시간별 최적 추출 조건을 확립하여 갯기름나물 중 Peucedanol의 최적 추출 조건 및 분석 조건이 확립되어졌다. 표준화 결과와 활성 결과를 이용하여 Peucedanol 성분이 갯기름나물의 지표물질 혹은 기능성 물질로서 사용 가능성이 있는지 확인해 본 결과, 미백활성의 지표물질로 가능성이 있음이 확인되었다.
- 5) 갯기름나물의 부위별 추출물 중 Peucedanol의 성분 함량 확인 결과, 갯기름나물의 꽃에서 함량이 매우 높게 나타남이 확인되었고, 이에 따라 갯기름나물의 꽃을 이용한 화장품 개발의 가능성도 있음이 확인되었다. 또한, 갯기름나물과 구릿대 추출물 중 Peucedanol 성분의 함량을 확인함으로써, Peucedanol 성분이 갯기름나물의 유사 종을 확인하는데 지표로 이용될 수 있을 것이라 생각되어진다.

V. 참고 문헌

1. 박영인 외 4명 (1995) “미백작용 물질의 탐색 및 이용기술”, “미생물을 이용한 정밀화학 소재의 탐색 및 이용기술’ 과제 최종보고서.
2. Gilcherst, B. A., Zhai, S., Eller, M. S., Yarosh, D. B. and Yaa, R. M. (1993) "Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation.", *J. Invest. Dermatol.*, Vol. 101, No. 666
3. Iwata, M., Corn, T., Iwata, S., Evertte, M. and Fuller, B. B. (1990) "The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins." , *J. Invest Dermatol.*, Vol. 195, 9.
4. 황지현 (2004) 미백성 물질의 합성 및 멜라노마 세포를 이용한 미백효과 연구, 충남대학교
5. Oh, H. C., Kim, D. H., Cho, J. H. and Kim, Y. C. (2004) Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 421-424
6. Masato Suzuki (2004) Technology of evidence based cosmetics, *CMC Technical Library*
7. Kensler, T. W., Trush, M. A. (1984) Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ. Mutagen.* (4):593-616
8. Richter, C. (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging. *FEBS Lett.* 241(1-2):1-5.
9. Cerutti, P.A (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 344(8926):862-863
10. Gung, G. T. Ju, I. O, Choi, J. s, Hong, J. S. (2000) The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32(4):928-935
11. Fukuzawa, K., Takaishi, Y. (1990) Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free Rad.*

1:55-61

12. Frei, B. (1994) Novezymatic antioxidant defense systems. In Natural antioxidants in human health and disease, Briviba, K. and Sies, H.(eds), *Academic press*, London, pp107-120
13. 유익동 (2005) 기능성화장품 신소재 개발 연구동향, 보건산업기술동향, 52-62.
14. Seo SY. (2001) Screening of tyrosinase inhibitors from oriental herbs. *Korean J Plant Res* 14: 32-37.
15. Wakamatsu K, Shosuke I. (2002) Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res* 15: 174-183
16. Chin JE, Kim KC. (2005) Effects of chestnut bark extracts on tyrosinase gene expression. *Korean J Sanitation* 20: 10-16
17. Solominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Rhysiol Rev* 84: 1155-1228.
18. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mamals. *J. Invest. Dermatol.*, 75, 122-127
19. Pave, I S, Muskiet, F.A. (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma : a preliminary report. *Cancer Detect Prev.*, 6, 311-316
20. Hearing, V.J., Jimenez, M. (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.*, 19, 1141-1147
21. Masao Takahashi (2000) Development of advanced cosmetics, CMC Technical Library
22. Seok, C. H., Won. I., Kim, J. H., Kim. J. B., Kim, J. H., Heo, M. Y. and Kim, H. P. (1996) Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II). Inhibitory activities of tyrosinase and DOPA autooxidation. *International J. Cosmetic Science.* 22: 193-200
23. Kim, H. J., Sapers G. M. and Choi, S. W. (1998) Isolation and

- identification or tyrosinase inhibitor from *Galla rhois*. *Food Sci. & Biotech.* 7:56-59
24. Lee, J. S., Kim, J. A., Cho, S. H., Son, A. R., Jang, T. S., So, M. S., Chung, S. R., and Lee, S. H. (2003) Tyrosinase inhibitor isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Kor. J. Phamacogn.* 45(1) 33-39
 25. No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T. and Jung, H. Y. (1999) Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences*, 65(21) : 241-246
 26. Park, Y. H. and Chang, S. K. (1997) Screening of inhibitory effect of edible mushrooms on tyrosinase and isolation of active component. *J. Fd Hyg. Safety.* 12: 195-199
 27. Kwak, J. H., Kim, Y. H. Chang, H. R., Park, C. W., and Han, Y. H. (2004) Inhibitory Effect of Gardenia Fruit Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis. *Korean J. Biotechnol. Cioeng.* 19(6): 437-440
 28. Bredt, DS and SH Snyder (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63: 175-195
 29. Reiter, CD, RJ Teng and JS (2000) Beckman superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem* 275: 32460-35466
 30. Shinyashiki, M, KT Chiang, CH Switzer, EB Gralla, JS Valentine, DJ Thiele and JM Fukuto (2000) The interaction of nitric oxide(NO) with the yeast transcription factor Acel:a model system for NO-protein thiol interactions with implications to metal metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2491-2496
 31. 맹옥희, 김용찬, 김영상, 백상기, 이혜영 (2002) Nitric oxide(NO)의 조절과 기능; 대식세포주에서 NO에 의해 상향 조절되는 유전자의 분석, *Bulletin of Biotechnology CNU.* vol.8, No2, 1-9
 32. Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051

33. Knowles, R. G. and Mocada, S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS*. 17,399
34. Scott, M. G. and Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 20
35. Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y. and Ryu. J. H. (1998) Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* 42, 5.
36. Cerutti, P.A (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 344(8926):862-863
37. 노태철, 최희철, 김보연, 김영호, 안종석, 김영국, 이현성 (1999) 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 Nitric Oxide 생성 저해활성, *Kor, J, Pharmacogn.* 30(4):413-416
38. 식품의약품 안전청 (2008) 건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서
39. 대한 약전 제 8개정 대한 약전의 한약(생약) 규격집
40. 생약교재편찬위원회 (2006) 생약학, 동명사, p 137
41. 한국한의학연구원 (1999) 한약재 관능검사기준 연구(한약제도감편), 보건복지부, 서울, p 88-89
42. Heta Y., Katsumi N. (1968) 일본약합잡지 88, 513-520
43. Chang, Y. D., Shang, K.W. and Yang, C. W. (1991) Cytotoxic pyranocoumarins from the aerial parts of *Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry*, 30(8), 2812-2814,
44. Yasumasa I., Izumi M. and Yutaka T. (1992) Dihydropyranocoumarins from roots of *Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry*, 31(12), 4303-4306
45. Chang, Y. D., Shang, K. W. and Yang C. W. (1992) Cytotoxic pyranocoumarins from roots of *Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry*, 31(5), 1829-1830
46. Yasumasa I., Izumi M. and Yutaka T. (1993) Dihydropyranocoumarins from *Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry*, 33(6), 1543-1545
47. Ikeshiro, Y., Mase, I. and Tomita, Y. (1994) Coumarins glycosides from

- Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry* 35(5), 1339-1391
48. Chen, I. S., Chang, C. T., Sheen, W. S., Teng, C. M., Tsai, I. L., Duh, C. Y., Ko, F. N. (1996) Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from formosan *Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry* 41(2), 525-530
49. Hsiao, G., Ko, F. N., Jong, T. T., Teng, C. M. (1998) Antiplatelet action of 3',4'-diisovalerylhellactone diester purified from *Peucedanum japonicum* Thunb, *Biol Pharm Bull* 21(7), 688-92
50. Choi, H. C., Rho, T. C., Kim, B. Y., Ko, H. R., Oh, W. K., Seong, C. K., Mheen, T. I., Ahn, J. S., Lee, H. S. (1999) Inhibition of Nitric Oxide Production by Coumarins from *Peucedanum Japonicum* in LPS-Activated RAW 264.7 cell, *Kor. J. Pharmacogn*, 30(2), 99-104,
51. Masashi H., Hiroe K., and Nobuji N. (2004) Constituents of the Leaves of *Peucedanum japonicum* Thunb. and Their Biological Activity, *J. Agric Food Chem*, 52(3), 445-5
52. Zheng, M. S., Jin, W. Y., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., bae, K. H., Kang, S. S. (2005) The Constituents Isolated from *Peucedanum japonicum* Thunb. and their Cyclooxygenase (COX) Inhibitory Activity, *Kor. J. Medicinal Crop Sci*, 13(2), 75-79
53. Takeuchi N, Kasama T, Aida Y, Oki J, Maruyama I, Watanabe K, Tobinaga S. (1991) Pharmacological activities of the prenylcoumarins, developed from folk usage as a medicine of *Peucedanum japonicum* THUNB, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 39(6), 1415-1421.
54. Jong, T. T., Hwang, H. C., Jean, M. Y., Wu, T. S., Teng, C. M. (1992) An antiplatelet aggregation principle and X-ray structural analysis of cis-khellactone diester from *Peucedanum japonicum*, *J Nat Prod*, 55(10), 1396-1401
55. Aida Y., Kasama T., Takeuchi N., Chiba M., Tobinaga S. (1998) Pharmacological activities of khellactones, compounds isolated from *Peucedanum japonicum* THUNB. and *Peucedanum praeruptorium* DUNN,

Exp Clin Pharmacol, 20(4), 343-351

56. Huong, D. T., Choi, H. C., Rho, T. C., Lee, H. S., Lee, M. K., Kim, Y. H. (1999) Inhibitory activity of monoamine oxidase by coumarins from *Peucedanum japonicum*, *Arch Pharm Res*, 22(3), 324-326
57. Lee, J. W., Roh, T. C., Roh, M. C., Kim, Y. K., Lee, H. S. (2002) Mechanisms of relaxant action of a pyranocoumarin from *Peucedanum japonicum* in isolated rat thoracic aorta, *Planta Med*, 68(10), 891-895
58. Hisamoto M., Kikuzaki H., Ohigashi H., Nakatani N. (2003) Antioxidant compounds from the leaves of *Peucedanum japonicum* thunb, *J Agric Food Chem*, 51(18), 5255-5261
59. Lee, S. O., Choi, S. Z., Lee, J. H., Chung, S. H., Park, S. H., Kang, H. C., Yang, E. Y., Cho, H. J., Lee, K. R. (2004) Antidiabetic coumarin and cyclitol compounds from *Peucedanum japonicum*, *Arch Pharm Res*, 27(12), 1207-1210
60. Morioka T., Suzui M., Nabandith V., Inamine M., Aniya Y., Nakayama T., Ichiba T., Mori H., Yoshimi N. (2004) The modifying effect of *Peucedanum japonicum*, a herb in the Ryukyu Islands, on azoxymethane-induced colon preneoplastic lesions in male F344 rats, *Cancer Lett*, 205(2), 133-41
61. Zheng, M. S., Jin, W. Y., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., bae, K. H., Kang, S. S. (2005) The Constituents Isolated from *Peucedanum japonicum* Thunb. and their Cyclooxygenase (COX) Inhibitory Activity, *Kor. J. Medicinal Crop Sci*, 13(2), 75-79
62. Tagashira, M. and Ohtake, Y. (1998) A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *M elissa officinalis*. *Planta M ed.*, 64, 555
63. Kaxuhisa M., Minoru F. Arbutin (1996) Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276 : 765-769.
64. Kyung Tae Kim, Jin Cuk Kim (2004) Anti-melanogenesis Effect of

- Phenolic Compound Isolated from *Gastrodia elata*, 30 : 33-38
65. Gurfinger (1981)T. J. Am. Oil Chem. Soc. 58, 966.
66. 의약품평가부 (2004) 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인. 식품의약품안전청, 5-12
67. 윤정혜 (2007) Whitening activity of phenolic compounds from *phragmitis rhizoma* 중앙대학교
68. Chang Ho Kwon, Nam Doo Hong, Nam Jae Kim, Young Yun Kong and Soon Wook Chang (1988) Studies on the Constituents of *Bambusae Caulis in Taeniam Kor.* J. Pharmacogn. 19(3) : 188~192
69. Tetsuko Matsumura, Toru Ishikawa, Junichi Kitajima (2002) Water-soluble constituents of caraway: aromatic compound, aromatic compound glucoside and glucides, *Phytochemistry*. 61, 455-459
70. Kuk Hyun Shin, Sam Sik Kang and Hyung-Joon Chi (1992) Analysis of the Coumarin Constituents in *Peucedanii Radix*, *Kor. J. Pharmacogn.* 23(1) 20-23