



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](#)

2022년 08월
석사학위논문

구실잣밤나무 (*Castanopsis
cuspidata* var. *sieboldii*) 잎
추출물의 생리 활성 평가 및
폴리페놀 화합물의 분리와
동정

조선대학교 대학원

화학공학과

김 나 인

구실잣밤나무 (*Castanopsis
cuspidata* var. *sieboldii*) 잎
추출물의 생리 활성 평가 및
폴리페놀 화합물의 분리와
동정

Evaluation of physiological activity of
Castanopsis cuspidata var. *sieboldii* leaves
extract and identification of polyphenol com-
pounds thereof

2022년 08월 26일

조선대학교 대학원

화학공학과

김 나 인

구실잣밤나무 (*Castanopsis
cuspidata* var. *sieboldii*) 잎
추출물의 생리 활성 평가 및
폴리페놀 화합물의 분리와
동정

지도교수 신 현 재

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2 0 2 2 년 0 4 월

조선대학교 대학원

화학공학과

김 나 인

김나인의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이재욱 (인) 

위 원 조선대학교 교수 이중현 (인) 

위 원 조선대학교 교수 신현재 (인) 

2 0 2 2 년 0 5 월

조선대학교 대학원

목 차

List of Tables	VIII
List of Figures	X
ABSTRACT	V
제 1 장 서론	1
제 1 절 연구의 배경	1
1. 천연화장품	1
2. 구실잣밤나무 (<i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldiis</i>)	2
3. 항산화 (Antioxidation)	4
4. 폴리페놀 (Polyphenols)	11
5. Dereplication	15
제 2 절 연구의 목적과 구성	21
제 2 장 재료 및 방법	23
제 1 절 실험 재료 및 시약	23
제 2 절 구실잣밤나무 잎의 추출 및 활성 성분 분리	24

1. 구실잣밤나무 잎의 추출 및 용매 분획	24
2. Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	26
제 3 절 구실잣밤나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 성분 분석	29
제 4 절 구실잣밤나무 잎 추출물 및 분획물의 항산화 활성 평가	31
1. DPPH free radical scavenging assay	31
2. ABTS cation radical scavenging assay	32
3. Total polyphenol contents (TPC)	33
4. Total flavonoid contents (TFC)	35
제 5 절 분리된 화합물의 동정 및 구조분석	37
1. HPLC-Mass/Mass spectrometry (LC-MS/MS)	37
2. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	39
 제 3 장 결과 및 고찰	 40
제 1 절 구실잣밤나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 성분 분석	40
제 2 절 구실잣밤나무 잎 추출물 및 분획물의 항산화 활 성 평가	45
1. DPPH free radical scavenging assay	45
2. ABTS cation radical scavenging assay	48

3. Total polyphenol contents (TPC)	51
4. Total flavonoid contents (TFC)	54
제 3 절 분리된 화합물의 동정 및 구조분석	57
1. LC-MS/MS 정량 분석 결과	57
2. NMR Spectral data	60
제 4 장 결론 및 제언	65
참고문헌	67

List of Tables

Table 1. Main advantages and disadvantages of MS and NMR based dereplication methods.	18
Table 2. Overview of 2D NMR metabolomics and dereplication utilities.	19
Table 3. Gradient method of high performance liquid chromatography (HPLC).	30
Table 4. Analysis conditions of HPLC-Mass/Mass(LC-MS/MS) spectrometry.	38
Table 5. Phenolic compounds identified in CSL quantified by UV-HPLC using diode array detection at 280nm. The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.	42
Table 6. Phenolic compounds identified in CSL-EA quantified by UV-HPLC using diode array detection at 280nm. The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.	44
Table 7. IC ₅₀ values of DPPH free radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. cuspidata</i> var. sieboldii leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.	47
Table 8. IC ₅₀ values of ABTS cation radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>C. cuspidata</i> var. sieboldii leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.	50

Table 9. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments. 53

Table 10. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments. 56

Table 11. ^1H NMR and ^{13}C NMR data of compound 1 (400 MHz and 100 MHz, DMSO- d_6). 62

List of Figures

Figure 1. Pictures of <i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i>	3
Figure 2. Anti-oxidative system inside human body.	5
Figure 3. Classification of antioxidants.	7
Figure 4. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging mechanism. ...	9
Figure 5. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging mechanism.	10
Figure 6. Polyphenol classification including phenolic acids, coumarins, flavonoids and their subgroups, stilbenes and lignans.	12
Figure 7. Flavonoid subclasses.	14
Figure 8. Tandem mass spectrometry based molecular network.	17
Figure 9. General workflow of dereplication guided isolation process in <i>C. cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i> leaves (CSL) extracts.	22
Figure 10. Extraction and liquid-liquid partition diagram of <i>C. cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i> leaves (CSL).	25
Figure 11. Isolation diagram of <i>C. cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i> leaves EtoAc fraction (CSL-EA).	27
Figure 12. Isolation diagram of Compound 1 from <i>C. cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i> leaves EtoAc fraction A (CSL-EA-Fr.A).	28
Figure 13. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total polyphenol contents.	34
Figure 14. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.	36

Figure 15. HPLC profile of the CSL and standard mixture using diode array detection at 280 nm. Numbers indicate the following : (1) nicotinic acid; (2) gallic acid; (3) catechin hydrate; (4) caffeic acid; (5) epigallocatechin gallate; (6) epicatechin; (7) ethyl gallate; (8) *p*-coumaric acid; (9) chlorogenic acid; (10) 4-hydroxycinnamic acid; (11) ferulic acid; (12) naringin; (13) protocatechuic acid ethyl ester; (14) rutin hydrate; (15) benzoic acid; (16) quercetin hydrate; (17) kaempferol; (18) biochanin A. 41

Figure 16. HPLC profile of the CSL-EA and standard mixture using diode array detection at 280 nm. Numbers indicate the following : (1) nicotinic acid; (2) gallic acid; (3) catechin hydrate; (4) caffeic acid; (5) epigallocatechin gallate; (6) epicatechin; (7) ethyl gallate; (8) *p*-coumaric acid; (9) chlorogenic acid; (10) 4-hydroxycinnamic acid; (11) ferulic acid; (12) naringin; (13) protocatechuic acid ethyl ester; (14) rutin hydrate; (15) benzoic acid; (16) quercetin hydrate; (17) kaempferol; (18) biochanin A. 43

Figure 17. DPPH free radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves. The results are the mean \pm S.D from three independent experiments. 46

Figure 18. ABTS cation radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves. The results are the mean \pm S.D from three independent experiments. 49

Figure 19. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). 52

Figure 20. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). 55

Figure 21. LC-MS/MS profile of the ethyl gallate. 58

Figure 22. LC-MS/MS profile of the compound 1. 59

Figure 23. Chemical structure of compound 1. 61

Figure 24. ^1H -NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d_6 63

Figure 25. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d_6 64

ABSTRACT

Evaluation of physiological activity of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* leaves extract and identification of polyphenol compounds thereof

Nain Kim.

Advisor: Prof. Hyun-Jae Shin, Ph.D.

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

Adequate amounts of reactive oxygen species(ROS) play a beneficial role in the human body by inactivating various pathogens. However, excessive secretion of ROS in the body causes intracellular damage and various diseases. In order to suppress oxidative damage caused by free radicals, cells must secrete enzymes that inhibit the accumulation of ROS or remove free radicals through antioxidants to maintain homeostasis in the body. Polyphenol compounds, which are representative antioxidants, provide health benefits by inducing reducing properties, acting as antioxidants and free radical scavengers. Accordingly, research on the development of various useful materials using natural products containing antioxidants is being actively conducted. *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* (CCS) is a warm-temperate species inhabiting the Korean Peninsula, Japan, China, and Taiwan, and has been traditionally used for medicinal purposes. Several researchers have confirmed that the bioactive components produced in the aerial parts of CCS have anti-inflammatory, antioxidant and whitening effects. However, isolation and identification studies of compounds centered on antioxidant activity in CCS leaves have not been investigated. In this study, 1.5 kg of CCS leaves (CSL) were extracted with 15L of 70% ethanol and used as a crude extract. CSL was divided into

five fractions using n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol and water, and the yields of each fraction were 13.03g, 5.27g, 51.22g, 44.74g, and 15.93g. Also, the antioxidant activity of sub-fraction was determined with DPPH free radical scavenging activity assay and ABTS cation radical scavenging activity assay. The antioxidant contents was confirmed by total polyphenol contents (TPC) and total flavonoid contents (TFC). Of these, the ethyl acetate fraction which has the highest antioxidant activity was separated and purified using medium liquid chromatogram (MPLC) equipped with a C18 column. Through the HPLC qualitative analysis, it was confirmed that CSL and CSL-EA contained various polyphenols. Finally the polyphenol compound 1 present in the highest antioxidant activity fraction was isolated. The chemical structure of compound 1 isolated from CSL-EA was described based on NMR and LC-MS/MS spectrum analysis. Based on these results, we suggest that extracts, fractions and compounds isolated from CSL provide promising antioxidant capabilities and suggest potential natural substances in pharmaceutical and cosmetic industries.

제1장 서론

제 1 절 연구의 배경

1. 천연화장품

전 세계 천연자원 및 환경 관련 시장은 기후변화, 식량부족 등의 이유로 인해 지속 가능한 해결책으로 다양한 분야의 연구개발과 투자가 진행되며 성장을 이끌어왔다. 바이오 시장에 대한 수요 증가에 따라 최근에는 바이오 연구 분야에서 생물정보학 소프트웨어의 개발 및 생리활성물질 발견을 위한 분석 도구들의 개발이 촉진되고 있다.

국내 바이오산업은 식품과 의약품 위주로 형성되어 있는데 이는 소득의 증가로 인한 건강과 웰빙에 대한 관심 및 기대수명 증가에 따라 건강한 노후 생활에 대한 중요도가 높아졌기 때문으로 보인다. 또한 일상 속 화학제품에 대한 안전성 논란도 끊임없이 이어지고 있어 바이오산업 소재로서의 천연물에 대한 가치 인식은 꾸준히 증가되고 있다. 동시에 천연화장품, 의약품, 건강 기능 식품 및 생물 유래 신소재 개발 등 다양한 분야에서 고부가가치 제품이 창출되고 있으며 주요한 생리활성 성분을 다량 함유하고 있는 천연물 유래 원료는 다양성이 증시되고 있는 미래 화장품 원료개발에 적합하다.

그동안 주로 식품으로 소비되던 녹차, 레몬, 식품 부산물로 취급되던 껌껍질 등도 소재화를 통해 천연화장품과 의약품으로 다변화하고 상대적으로 관심도가 떨어지던 국내 자생식물과 같은 새로운 소재화 수익 작물들이 등장하고 있다. 이 중 국내 대표적인 자생식물 중 하나인 난대성 수종은 사철 웅장한 경관을 이루어 관광자원으로써 주목받고 있으며, 또한 환경오염에 대한 내성이 강해 경제림 조성과 함께 약리작용 등의 특수기능이 밝혀지며 새로운 가치와 중요성이 인식 되고 있다. 난대성 수종은 남해안 및 한반도 중 가장 온난하고 연교차가 적은 지역에 주로 분포하고 있다[1]. 그 중 구실잣밤나무는 탄소저장 및 흡수량이 우수해 한반도 전 지역에 널리 분포되어 있으며 대표적인 난대성 수종 중 하나로 뽑힌다. 따라서 본 연구에서는 천연물 유래 기능성 화장품 신소재로서 구실잣밤나무를 선택하여 향산화 활성 검증과 그에 따른 활성 성분 분석 및 폴리페놀 화합물 동정을 실시하였다.

2. 구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*)

구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*)는 참나무과(Fagaceae), 모밀잣밤나무속(*Castanopsis*)에 속하는 상록활엽교목으로서 남해안, 한반도 그리고 일본, 중국, 대만 등에 분포되어 있다. 구실잣밤나무는 높이가 15m, 지름이 1m에 이르며, 나무껍질은 검은 회색이고 잎은 어긋나게 2줄로 배열하며 피침형, 도피침형 또는 장타원형으로 끝은 물결 모양의 톱니가 있는 것이 특징이다(Figure 1).

이전의 연구에 따르면 구실잣밤나무 추출물에서 galloyl shikimic acids[2], hydrolyzable tannins, terpenoids[3], Castanopsinins, ellagitannins[4], dehydrodiallic acid, cretannin, chesnatin, chestanin[5], galloyl ester triterpenoid, hexahydroxydiphenic acid conjugated triterpenoid[6] 를 함유하는 것으로 보고되었다. 또한 항산화, 항암, 항염증 및 항균 효과 등의 다양한 생물학적 활동을 가지고 있다[7-9].

그러나 아직까지 구실잣밤나무 잎(leaves)을 이용하여 항산화 활성을 중심으로 한 폴리페놀 화합물 분리 및 구조 동정 연구는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 구실잣밤나무 잎 추출물과 용매 분획물의 항산화 활성을 검증하고, 유효 성분의 분석 후 분획물들의 분리를 통해 최종적으로 단일 화합물의 구조 동정을 실시하여 안전한 기능성 화장품, 의약품 및 건강기능식품 관련 천연 소재로서 구실잣밤나무의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.



Figure 1. Pictures of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*.

3. 항산화(Antioxidation)

산소는 호흡 과정 중에 생체 내에 들어와 다양한 대사과정에 이용되며, 대사과정에서 이용되는 산소 중 1-3% 는 완전하게 환원되지 못하여 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변화 된다[10]. 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항산소 ($^3\text{O}_2$)가 환원되어 생성되며 체내에 손상을 미치는 대표적인 활성산소종에는 superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) 등이 있다. 이와 같은 유해 활성산소종은 대부분 자유 라디칼 (free radical) 형태로 존재하며, 짝지어지지 않은 전자쌍을 채워 안정화하려는 불안정한 구조적 특성 때문에 유기체에서 쉽게 free radical 반응을 일으킨다[11]. 따라서 적당량의 활성산소는 여러 병원체와 반응하여 불활성화 시키는 역할을 하여 인체에 유익한 역할을 하지만, 체내에 활성산소가 과도하게 분비하게 되면 세포 내의 지질 과산화, DNA, 지질, 단백질 등의 손상 등이 일어나게 되며 노화, 심혈관 질환, 발암 등의 각종 질병들을 유발 시킨다(Figure 2)[12-14].

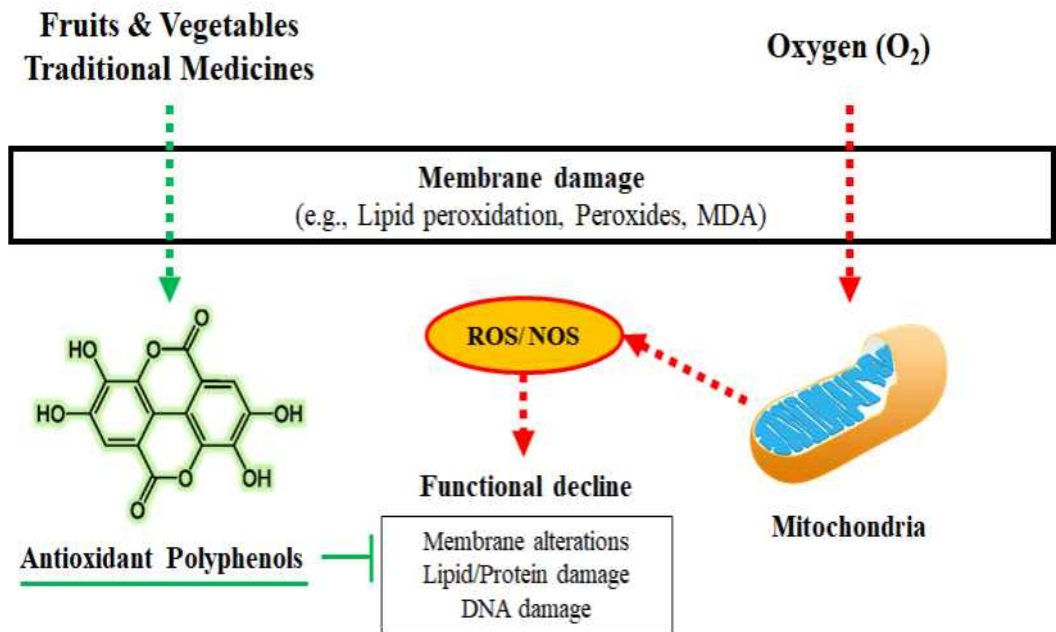


Figure 2. Anti-oxidative system inside human body.

활성산소로부터 발생하는 산화적 손상을 억제하기 위해 세포는 자체적으로 활성산소의 축적을 억제하는 효소를 분비하여 free radical을 소거하면서 체내의 항상성을 유지해야한다[15,16]. 이러한 체내의 효소적 항산화제로는 superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GRD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, uric acid, bilirubin 등으로 알려져 있다[17]. 하지만 체내의 효소는 산화적 손상에 대한 보호는 할 수 있으나 과도한 산화적 스트레스에 노출되어 있는 현대인의 산화적 손상을 완전히 제거하기에는 충분하지 않아 섭취가 가능한 비효소적 항산화제인 천연 항산화제 및 합성 항산화제의 필요가 증가하고 있다[18]. 천연 항산화제는 크게 polyphenol, terpenoid, vitamin 등 3가지 상태로 존재하는데, 이들은 구조적으로 conjugated double bond 혹은 aromatic ring을 가지며 electron donor의 역할을 한다[19,20]. 천연 항산화제인 polyphenol, carotenoids, terpenes, L-ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), arginine 등을 섭취 시 free radical의 생성을 억제하며 세포의 손상을 지연시킬 수 있다[21,22]. 또한, 합성 항산화제인 phenol계의 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 등은 우수한 효과와 저렴한 가격으로 인해 널리 사용되고 있다. 하지만 합성 항산화제의 경우 50mg/kg/day의 용량을 섭취할 경우 체내의 효소 및 지질변화로 인하여 발암 독성이 유발되어 복용 안정성에 대한 문제가 존재 한다[23]. 이에 따라 항산화 물질을 포함하고 있는 천연물을 이용한 여러 가지 유용한 소재개발 연구가 활발히 진행되고 있으며, 합성 항산화제를 대체할 경제적이며 효과가 우수한 천연 항산화제 개발에 대한 연구가 요구되고 있다(Figure 3)[24,25].

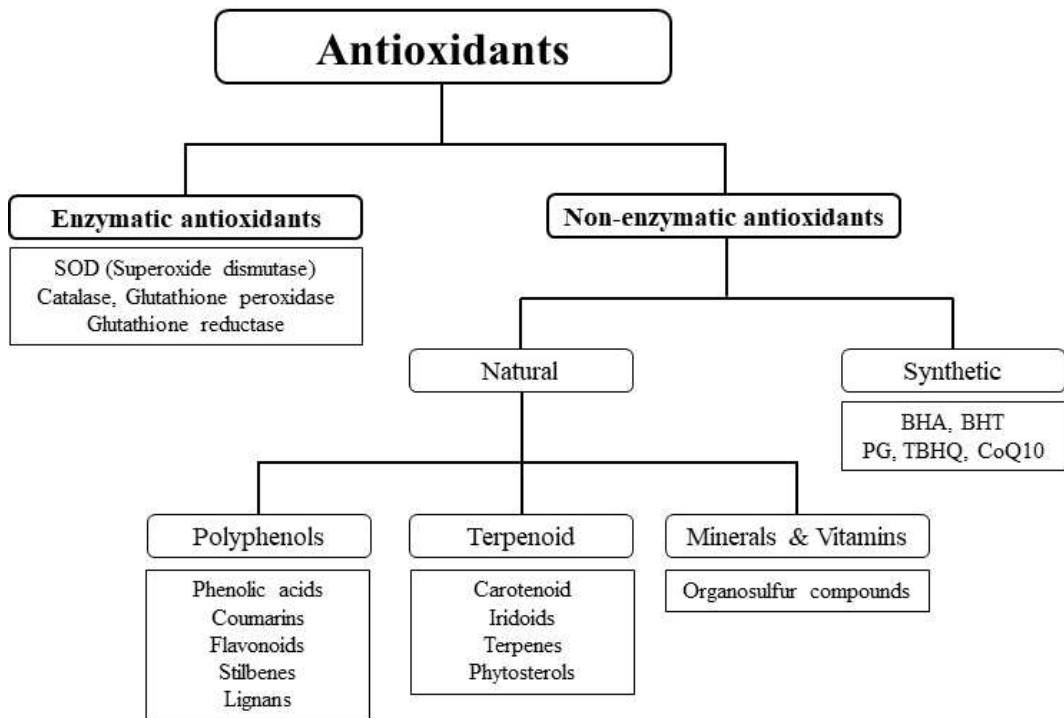


Figure 3. Classification of antioxidants.

항산화 능력을 측정하는 화학적 테스트는 주로 새로운 항산화 화합물 또는 최종 실제 제품, 부산물의 추출물에 대한 초기 평가에 사용된다. 항산화제의 활성을 평가하는 방법은 관련된 화학 반응에 따라 수소 원자 전달(HAT) 및 단일 전자 전달(SET) 반응 기반 방법의 두 가지 범주로 나뉜다[26].

수소 원자와 전자 전달을 포함한 혼합 테스트(HAT/SET)는 일반적으로 안정적인 발색단인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical 및 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical 제거를 기반으로 한다[27]. 이 시험법은 화학 반응을 기반으로 하며 UV-Vis 분광광도계의 특정 흡수 파장에서 분석용액의 변색을 항산화 활성의 지표로 활용한다.

DPPH free radical scavenging assay에 사용되는 DPPH는 분자 내 남은 전자가 de-localization된 상태로 존재하여 비교적 안정한 free radical로 알려져 있다[28]. 또한 DPPH radical은 유기 용매에만 용해되어 친유성 화합물의 항산화 능력을 측정할 수 있다. DPPH의 화학반응은 517nm에서 최대 흡광값을 가지며 분자 내 free radical이 항산화 물질로 부터 전자를 얻게 되면 보라색에서 노란색으로 색 변이가 발생된다 (Figure 4).

ABTS cation radical scavenging assay는 총 항산화 능력을 측정하는 데 사용되는 간단하고 편리한 방법으로, 시약에 사용되는 ABTS는 산화제에 의해 radical 양이온인 ABTS^{•+}로 산화되며 청록색으로 강하게 착색된다. 또한 ABTS radical은 물과 유기 용매에 용해되어 친수성 및 친유성 화합물의 항산화 능력을 측정할 수 있다 [29]. ABTS의 화학반응은 730nm에서 최대 흡광값을 가지며 radical 양이온이 항산화 물질로 부터 전자를 얻게 되면 청록색에서 투명한 색으로 색 변이가 발생된다 [30] (Figure 5).

본 연구에서는 UV-Vis 분광광도계를 이용한 DPPH free radical scavenging assay와 ABTS cation radical scavenging assay를 통해 항산화 활성 실험을 진행하였다.

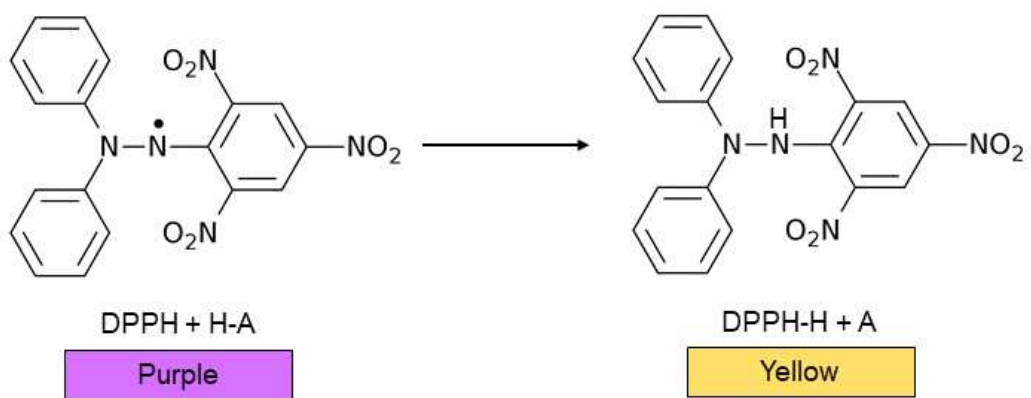


Figure 4. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging mechanism.

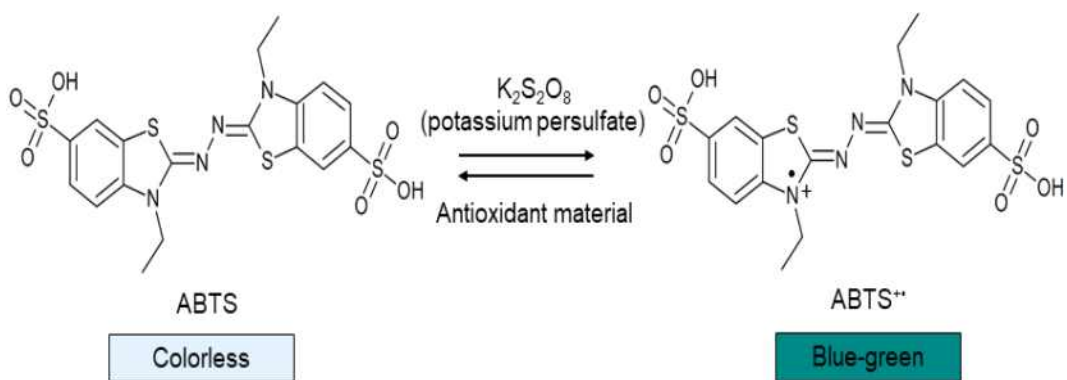


Figure 5. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging mechanism.

4. 폴리페놀 (Polyphenols)

전통적으로 많은 식물의 열매, 야채, 차, 유지 종자 및 향신료 등이 인간의 건강 관리를 위한 한약 제제로 사용되며, 이러한 의학적 용도는 식물계에서 가장 널리 퍼져있는 항산화, 항염, 항균 및 항암 특성을 갖는 것으로 입증된 주요 성분인 폴리페놀 화합물에 기인된다[31]. 또한, 폴리페놀은 고혈압, 고콜레스테롤, 당뇨병 관련 합병증 및 신경 또는 안구 손상 등의 치료에도 효과적인 약리 활성을 갖는다 [32-35]. 폴리페놀은 식물의 2차 대사 산물로서 소량 생산되는데 화장품 및 식품에서 폴리페놀 화합물은 분자 내에 전자가 풍부하여 탈 수소화가 일어나도 안정한 분자 구조를 가지며, 환원 특성을 유발하여 항산화제 및 자유 라디칼 제거제 역할을 하여 건강상의 이점을 제공한다[36]. 이러한 유익한 생물학적 특성으로 인해 폴리페놀 화합물의 기능적 특성에 대한 연구는 여러 분야에서 각광받고 있다.

폴리페놀 화합물은 하나 이상의 hydroxyl group(-OH)을 포함하는 방향족 고리를 제공하며, 그 구조는 단순한 페놀 분자에서 높은 분자량을 갖는 복잡한 고분자까지 다양하다[37]. 또한 폴리페놀 화합물은 종종 당 또는 유기산으로 에스테르화되어 식물에서 자연적으로 발생하는 8000개 이상의 구조를 가지며 복잡한 스펙트럼을 생성한다. 이러한 페놀 고리의 수와 이에 결합된 구조적 요소에 따라 폴리페놀은 phenolic acids, coumarins, flavonoids, stilbenes, lignans 과 같은 여러 그룹으로 분류된다[38](Figure 6).

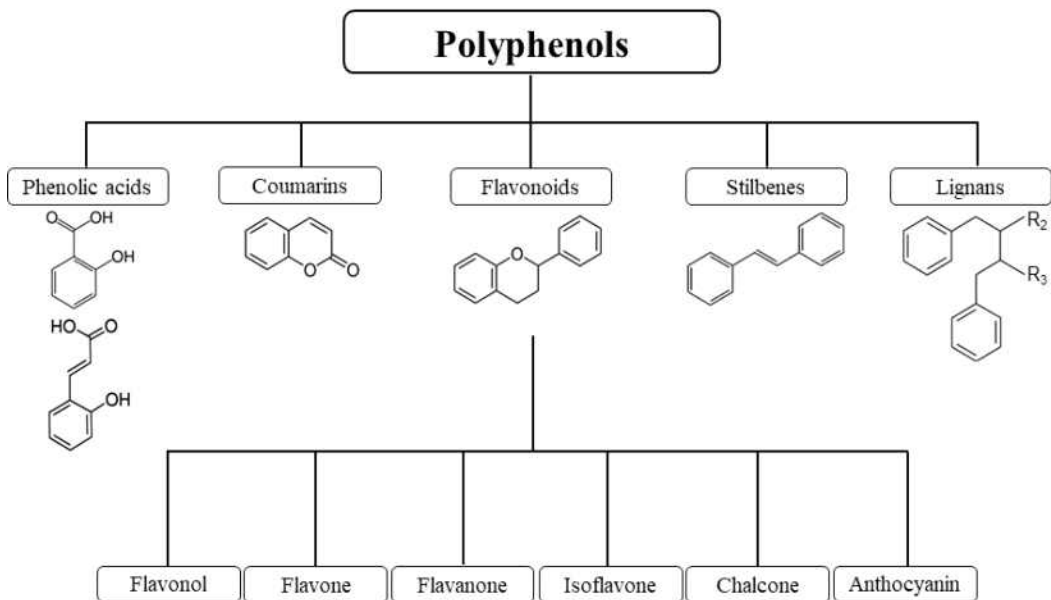


Figure 6. Polyphenol classification including phenolic acids, coumarins, flavonoids and their subgroups, stilbenes and lignans.

phenolic acid는 유기 carboxylic acid(-COOH) 기능과 페놀 고리를 포함하는 복합 방향족 산의 일종이다. hydroxybenzoic acids (C6-C1 backbone) 와 hydroxycinnamic acids (C6-C3 backbone)은 자연적으로 발생하는 phenolic acid의 2 가지 필수 형태이다. phenolic acids group에는 benzoic acids (gallic acid, vanillic acid, syringic acid), cinnamic acids (caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid) 뿐만 아니라 강황의 curcumin과 같은 복잡한 구조도 포함한다[39]. phenolic acid는 항산화, 항암 및 항비만 기능을 하며 이는 phenolic acids의 주요 구조인 방향족 고리, 불포화 치환 사슬 및 free hydroxyl group의 수와 위치에 기인한다[40-42].

coumarin은 자연계에 널리 분포되어 있는 2H-1-benzopyran-2-one 유도체로써 벤젠 고리와 α -pyrone의 융합 구조를 포함하는 매우 중요한 lactone의 큰 부류이다[43]. coumarin 유도체는 질병을 예방하고 치료하는 잠재적인 역할을 가지며, 항산화, 항염, 항균 등의 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다[44,45].

flavonoid group은 보통 식물에 함유 되어 있을 때 노란색을 띄며 태양의 자외선으로부터 보호하기 위해 자연적으로 만들어진 천연물질로서 대부분 수용성이다. flavonoid는 2개의 phenyl 고리와 1개의 heterocyclic 고리로 구성된 C6-C3-C6 phenylpropanoids 구조를 가진다. flavonoid는 구조식 중앙의 산소 고리의 탄소와 불포화도 및 산화 정도에 따라 6가지 형태인 flavonol, flavone, flavanone, isoflavone, chalcones, anthocyanidine 등으로 분류된다[46](Figure 7). flavonoid는 식물성 식품의 모든 페놀류 중 약 2/3를 차지하는 가장 흔한 페놀 화합물로서 이 중 flavonol과 flavone은 quercetin, kaempferol, hesperitin, naringenin 과 같은 항산화제를 포함한다[47]. flavonol과 flavone은 항산화, 항균, 항염, 항비만 등 생체 내에 유용한 역할을 한다 [48,49].

stilbene은 포도와 와인에 존재하는 방향족 탄화수소인 resveratrol과 같은 페놀화합물을 포함한다. stilbene의 구조는 Coumaroyl-Co A와 malony-Co A가 stilbene synthase 라는 효소에 의해 합성되어 3가지 형태인 trans-form, cis-form, piceid 로 존재하며 항산화 및 항암 활성을 가진다[50,51].

lignan은 2개의 monolignol 단위의 산화적 coupling 반응으로 형성된 화합물이다. 이러한 기본 단위는 식물에서 리그닌을 합성하는데 이용된다. lignan은 sesamin, sesaminol glucose, sesamolin 등이 있으며, 이 중 sesamin이 가장 많이 존재한다[52].

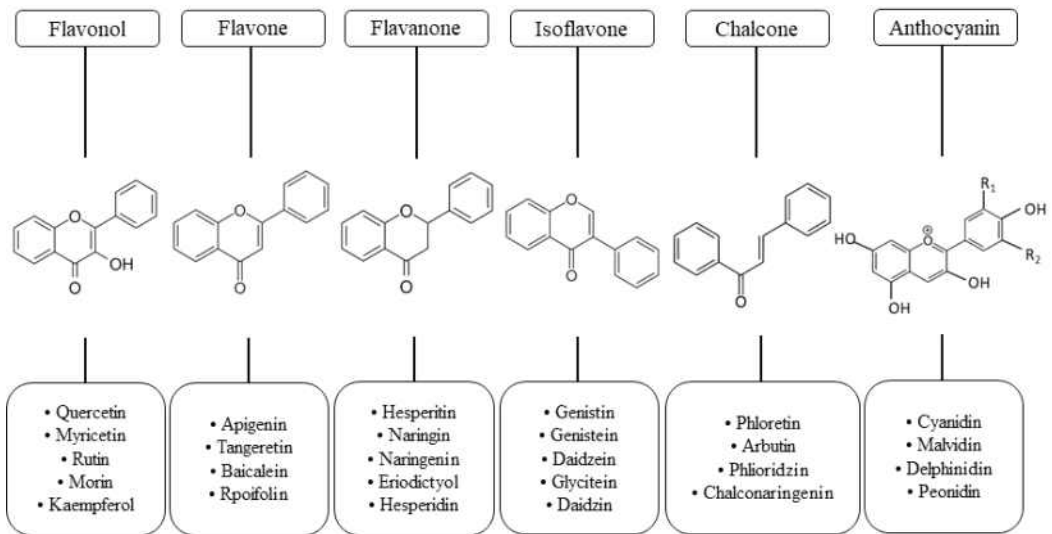


Figure 7. Flavonoid subclasses.

5. Dereplication

천연물에서 새로운 생리 활성 화합물 발견은 일반적으로 액체 크로마토그래피-질량 분석법 (LC-MS), 핵자기 공명 분광법 (NMR) 및 적외선 분광법 (IR)으로 얻은 천연물의 스펙트럼을 이전 연구 또는 분석 대상 화합물의 화학 구조에 대한 예측을 기반으로 해석된다[53-56]. 이 중 LC-MS 분석법과 NMR 분광법은 대사체 연구에서 가장 일반적인 기술이며 각각 장단점이 있다.

질량 분석법(MS)에서 구조 정보는 대사산물의 분자량과 tandem 질량 분석 기술 (MS/MS)에 의해 분자 이온의 크기와 조각화 패턴에 의해 분석 물질의 부분 구조를 높은 감도로 측정하며 분자의 구조에 대한 정보를 제공한다. 분자 이온의 단편화 패턴의 다양성은 분석물질의 부분 구조에 대한 추가 정보를 제공하며 이러한 MS 및 tandem MS data를 상업용 또는 자체 천연물 데이터베이스와 비교하여 chromatography peak의 구조적 식별을 진행한다[57].

질량 분석법과 달리 NMR 분광법은 정량적이며 높은 재현성 결과를 생성한다. NMR의 감도는 질량분석기의 감도보다 낮지만 NMR 데이터는 분자의 종류에 영향을 받지 않으며 cryo- 및 microprobe의 개발로 감도와 acquisition time이 향상되었다 [58]. 이러한 분석 장비 및 화합물 데이터베이스의 발전으로 인해 이 2가지 기술을 보완적으로 적용하는 것은 화학적 다양성이 풍부한 천연물의 분자 구조를 잠정적으로 결정하는 연구에 적합하다.

하지만 이러한 연구가 보편화되고 천연물에서 알려진 scaffold의 수가 증가함에 따라 연구 간에 중복 결과가 발생하며 연구의 비효율성과 자원과 시간의 낭비가 발생하였다[59]. 이에 대한 해결책으로 높은 생산성을 위해 연구자들은 'dereplication'에 주목하였다. dereplication 이란 '중복 제거'라는 의미로 연구의 효율성을 높이는 연구 전략이다. dereplication은 분리 과정 이전의 연구 초기 단계에서 crude 추출물에서 알려진 화합물과 잠재적으로 알려지지 않은 화합물의 식별을 가능하게 한다[60].

모체 질량을 기반으로 하는 LC-MS dereplication 은 데이터베이스에서 검색할 때 여러 분자식을 생성하기 때문에 한계가 존재한다. 이는 유사한 구조를 갖는 화합물은 MS/MS에 의해 유사한 패턴으로 단편화되는 경향이 있어 화합물 식별에 대한 효율성을 떨어트린다. 이러한 화학적 유사성에 대한 MS/MS 데이터를 보완하는 새

로운 dereplication 기술로 molecular networking이 개발되었다[61,62]. 이 개념은 처리량이 많은 open access 웹 기반 질량 분석으로 GNPS(Global Natural Product Social) 웹사이트 (<http://gnps.ucsd.edu>) 의 molecular networking 플랫폼을 핵심으로 통합되어 tandem MS data의 해독을 용이하게 한다. molecular networking을 사용하면 알려진 화합물의 식별과 알려지지 않은 새로운 화합물의 식별이 가능하며, 이온 단편화 패턴의 유사성을 비교하는 알고리즘을 사용하여 유사한 화학 구조를 가진 화합물의 대규모 데이터를 시각화하고 단편화 된 이온을 cluster로 그룹화 할 수 있다. 이러한 tandem MS 기반 molecular networking의 결과는 각 화학 성분의 관계와 분포를 나타낸다(Figure 8). 현재 molecular networking은 *Penicillium canescens*에서 *Penicanesones A-C*의 발견과 *Selaginella tamariscina* 에서 *selaginpulvilins M-T*의 발견과 같이 천연 공급원에서 새로운 생리 활성 화합물을 발견하는 데 성공적으로 사용되었다[63,64]. molecular networking의 수많은 장점에도 불구하고 MS 분석은 분석물 간의 가변 이온화 효율 및 이온 억제를 포함하여 몇 가지 고유한 한계를 가지고 있다[65-67]. 따라서 이러한 한계를 해결할 수 있는 보완적인 방법이 NMR dereplication 이다.

MS와 달리 NMR은 직접적인 구조 정보를 제공하는 검출 방법으로서 NMR dereplication은 구조적 유사성이 높은 이성질체와 화합물 간의 더 높은 구별 능력을 가지며 스핀 시스템 특징을 식별하고 unknown 화합물에 대한 핵심 구조 요소를 결정하는 능력이 탁월하다(Table 1). 그러나 ¹H NMR 기반 방법은 동일한 분자에서 파생된 신호를 쉽게 연관시킬 수 없으므로 unknown 구성 요소에 대한 식별이 제한된다. NMR 기반 dereplication의 장점은 복잡한 혼합물을 2차원 이상으로 분해하는 능력이다. 2D NMR 데이터는 알려진 화합물의 데이터베이스와 비교할 때 효과적인 식별을 제공하지만 참조 데이터의 가용성으로 인해 제한되는 경우가 많다[68-70]. 이러한 한계로 인해 2D NMR 데이터를 사용하여 혼합물의 식별을 하기 위한 여러 플랫폼이 개발되었다[71](Table 2).

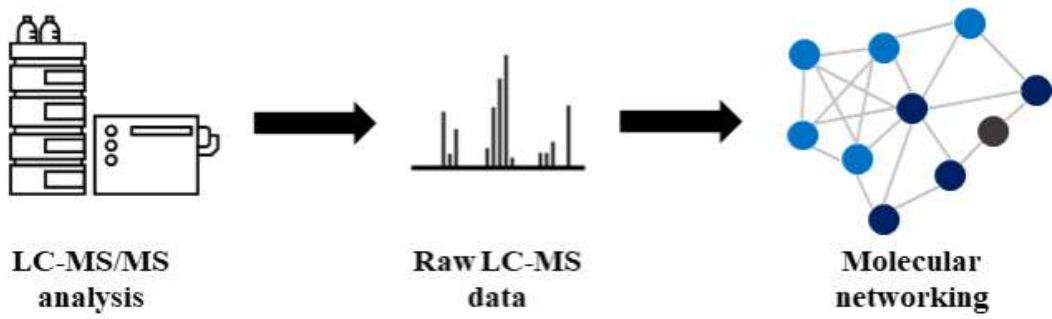


Figure 8. Tandem mass spectrometry based molecular network.

Table 1. Main advantages and disadvantages of MS and NMR based dereplication methods

LC-MS based dereplication	
Advantages	Disadvantages
<ul style="list-style-type: none"> · Higher sensitivity to the minor constituents in the dereplicated sample · Relatively short run time for data acquisition · Requires small sample amounts · Suitable for high-throughput screening 	<ul style="list-style-type: none"> · Potential for co-elution of compounds in complex samples. · Relies upon the ionization efficiency of compounds and interpretation of the resulting ion. · Limited differentiation between isomers. · High instrument-to-instrument variations. · Relies largely on in-house developed databases. · Provides limited structural information for unknown compounds.
NMR-based dereplication	
Advantages	Disadvantages
<ul style="list-style-type: none"> · Higher differentiation capacity between isomers and compounds with high structural similarity. · No instrument-to-instrument variations. · Non-destructive technique. · Ability to identify spin system features and determine core structural elements for unknown compounds. 	<ul style="list-style-type: none"> · Less sensitive to the minor constituents in the dereplicated sample. · Long run time for data acquisition and processing. · Requires higher sample concentration.

Table 2. Overview of 2D NMR Metabolomics and Dereplication Utilities

Analysis type	MetaboMiner	COLMAR	SMART 2.0	DEREP-NP	MADByTE
	targeted	targeted	targeted	targeted	untargeted
designed for mixtures	O	O	X	X	O
reference database	required	required	required	required	optional
metabolite type	1°	1°	2°	2°	2°
sample type	biofluids	biofluids	single compounds	single compounds	complex mixtures
batch comparison	X	X	X	X	O
bioactivity integration	X	X	X	X	O
multiple data integration	X	O	X	O	O
required solvent system	buffered D ₂ O	buffered D ₂ O/CDCl ₃	various	various	various

대표적인 예시로 SMART 2.0(Small Molecule Accurate Recognition Technology) 플랫폼(<http://smart.ucsd.edu>)은 HSQC 스펙트럼과 실험 및 계산된 대규모 라이브러리를 비교하기 위해 convolutional neural networks 기반 접근 방식을 사용하여 구조적으로 유사한 분자를 식별한다[72]. 이전 연구에서 SMART 2.0은 천연물에서 얻은 25,000 개의 HSQC 스펙트럼을 통해 구조분석 되었으며, 이 플랫폼은 화합물의 후보 구조를 제공하여 이전에 알려진 분자를 쉽게 식별 및 unknown 화합물에 대한 핵심 구조 정보를 제공하여 화합물을 특성화 하였다[73-74]. 천연물 연구에서 MS/MS는 초기 단계에서 사용되었으며, 최종적으로 NMR을 통해 분자 구조가 설명 되었기 때문에 MS/MS와 NMR 간의 결합 분석이 어려웠다. 최근 연구에서 두 분석을 함께 사용하여 *Iris lactea* var. *chinensis* 씨앗에서 14개의 stilbenoids를 annotation 하였으며 추가적인 분리 및 정제를 통해 Viral Neuraminidase 억제 효과를 가진 10개의 stilbenoids를 식별하여 생리 활성 화합물을 발견하는 데 성공적으로 사용되었다[75].

최근 Phytom 기반 NMR dereplication 플랫폼인 MADByTE(Metabolomics and Dereplication by Two-Dimensional Experiments)가 개발되었으며, 혼합물의 NMR 데이터를 기반으로 하여 대사산물의 종류를 annotation 하는 것이 가능해졌다. MADByTE의 핵심 기능은 개별 혼합물에서 spin 시스템 기능을 식별하여 샘플 간 spin 시스템 기능을 일치시키는 것이다. 또한 순수 화합물에서 생체 활성 성분의 분리를 위해 생체 활성이 높은 샘플과 관련된 기능의 우선순위를 지정하는 모듈이 포함되어 있다. 분석 파이프라인은 HSQC 스펙트럼과 TOCSY 스펙트럼의 coupling 정보와 통합 작동하여 각 샘플에 존재하는 개별 하위 구조를 정의하며 혼합물에서 분해 가능한 spin 시스템의 주석을 달 수 있다. 이러한 spin 시스템 기능은 각 혼합물의 화학적 구성을 설명하는 ^1H 및 ^{13}C 신호를 제공하며 이러한 spin 시스템 기능을 샘플 간 비교를 통해 샘플 간의 공통 기능을 식별하여 화학적 다양성에 대한 보기를 제공하고 천연물 연구에서 화합물 동정을 가속화한다. 또한 MADByTE는 NMR 데이터를 비교할 참조 라이브러리가 필요하지 않으며 이것은 구성 요소가 알려진 또는 새로운 천연물인지 여부에 관계없이 샘플 간의 화학적 유사성과 차이점을 평가하는 새로운 메커니즘을 제공한다. 참조 라이브러리를 사용할 수 있는 경우에는 알려진 화합물 그룹을 식별하는 선택적 dereplication이 포함되며 HSQC 및 TOCSY 스펙트럼을 획득하여 spin 시스템 기능 일치를 기반으로 분획의 그룹화가 가능하여 혼합물의 비표적 분석을 위한 플랫폼의 실행 가능성을 보여준다.

제 2 절 연구의 목적과 구성

적당량의 활성산소는 여러 병원체와 반응하여 불활성화 시키는 역할을 하여 인체에 유익한 역할을 하지만, 체내에 활성산소가 과도하게 분비하게 되면 세포내의 손상이 일어나 각종 질병들을 유발 시킨다. 활성산소로부터 발생하는 산화적 손상을 억제하기 위해 세포는 자체적으로 활성산소의 축적을 억제하는 효소를 분비하거나 항산화제를 섭취하여 free radical을 소거하면서 체내의 항상성을 유지 해야한다. 대표적인 항산화제인 폴리페놀 화합물은 체내에서 환원 특성을 유발하여 항산화제 및 자유 라디칼 제거제 역할을 하여 건강상의 이점을 제공한다. 이에 따라 항산화 물질을 포함하고 있는 천연물을 이용한 여러 가지 유용한 소재개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

이 연구의 목적은 항산화 활성이 뛰어난 새로운 생물 활성 화학 물질을 발견하는 것이다. 신약 및 화장품 후보 성분으로서 잠재성을 설명하는 표적 화합물로는 폴리페놀이 선정되었다. 본 연구에 사용된 구실잣밤나무는 참나무과 메밀잣밤나무속에 속하며 한반도 전 지역에 널리 분포되어 있어 대표적인 난대성 수종 중 하나로 뽑힌다. 이 식물의 잎에서 폴리페놀 화합물의 분리 및 동정이 실시되었으며 각 분획별 항산화 활성 비교 결과에 따라 화합물 분리 분석 과정에 UV-HPLC 가 적용되었다.

본 논문의 구성은 70% ethanol을 이용한 구실잣밤나무 잎 추출물에 대해 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, water를 이용하여 유기용매 별 분획 후에 각 분획물을 회전감압농축기 (N-1200B, EYELA, Japan)를 사용하여 농축하고 동결건조하여 실험용 시료 샘플을 만들어 사용하였다. 추출물 및 모든 분획물에 대해 항산화 활성 평가가 이루어졌으며 MPLC 및 TLC, HPLC를 이용하여 분획물의 분리를 진행하였다. 뛰어난 항산화 활성을 보이는 ethyl acetate 분획물에서 구체적인 분석 방법 개발을 통해 UV-HPLC를 이용하여 폴리페놀 화합물 함량을 정성분석 하였다. Ethyl acetate 분획물에서 최종적으로 분리된 compound 1은 LC-MS/MS에 기초하여 정량 분석한 후 구조분석을 위해 ¹H NMR 및 ¹³C NMR을 진행하였다. 각 Spectral data에 대해서 문헌과 비교하여 화합물의 구조 동정을 하였으며, 최종적으로 compound 1은 ester carbonyl group을 갖는 백색 분말 및 페놀 화합물로서 분리 되었다 (Figure 9).

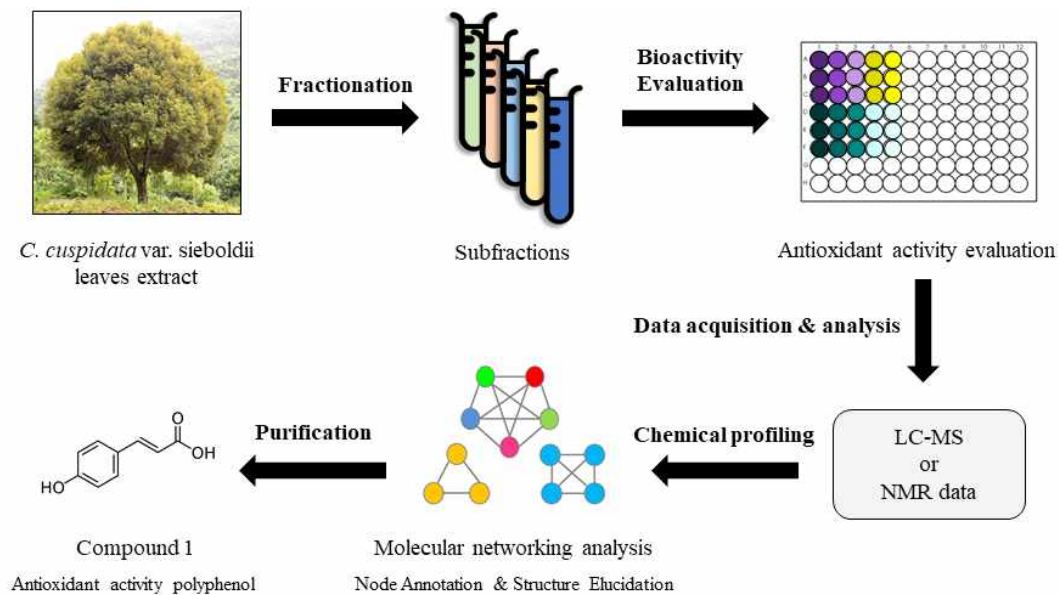


Figure 9. General workflow of dereplication guided isolation process in *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSLE) extracts.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 실험 재료 및 시약

본 연구에 사용된 구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*) 잎은 2020년도 4월경에 채취되었으며, 전라남도 완도수목원 (Wando, Korea)으로부터 공급받아 세척 후 열풍 건조하여 보관한 후에 분쇄하여 사용하였다. 본 연구에서 시료의 추출과 분획 및 활성 성분 분리에 사용된 용매들은 덕산약품 및 OCI의 제품을 사용하였다. HPLC 분석 및 LC-MS/MS 분석용 용매는 Fisher의 HPLC grade 전용 용매를 구입하여 사용하였다. 항산화 활성 평가 실험에 사용된 시약들은 Sigma aldrich에서 구입하여 사용하였다. 분리된 화합물의 구조 분석을 위해 사용된 NMR 측정 용매는 Sigma aldrich의 NMR 전용 용매로 Dimethyl sulfoxide-d₆(DMSO-d₆) 를 사용하였다.

제 2 절 구실잣밤나무 잎의 추출 및 활성 성분 분리

1. 구실잣밤나무 잎의 추출 및 용매 분획

구실잣밤나무 잎 추출물 및 용매 분획별 항산화 활성을 확인하기 위해 건조 후 분쇄된 구실잣밤나무 잎 1.5 kg을 70% EtOH (v/v) 15.0 L에 넣고 상온에서 2주간 침지 하여 추출하였다. 침지 시킨 시료는 감압 여과 장치와 Whatman No. 1을 이용해 여과한 후, 동일한 방법으로 분리한 잔사에 대하여 1회 반복 실시하였다. 여과 후 얻은 여액은 37℃~40℃에서 회전 감압 농축기 (rotary vacuum evaporator)를 이용하여 농축 후 동결건조하여 사용하였다. 70% EtOH 추출물 269.03g을 증류수에 현탁 시키고 분별 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (*n*-Hex), chloroform (Ch), ethyl acetate (EtoAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), water (H₂O) fraction을 각각 13.03g, 5.27g, 51.22g, 44.74g, 15.93g 얻었다. 각 분획은 위와 같은 방법으로 농축 후 동결건조하여 사용하였으며, 시료의 수율은 아래의 식에 의해 계산하였다(Figure 10).

$$\text{Yield (\%)} = (\text{동결 건조 후 시료의 무게(g)} / \text{추출 전 시료의 무게(g)}) \times 100$$

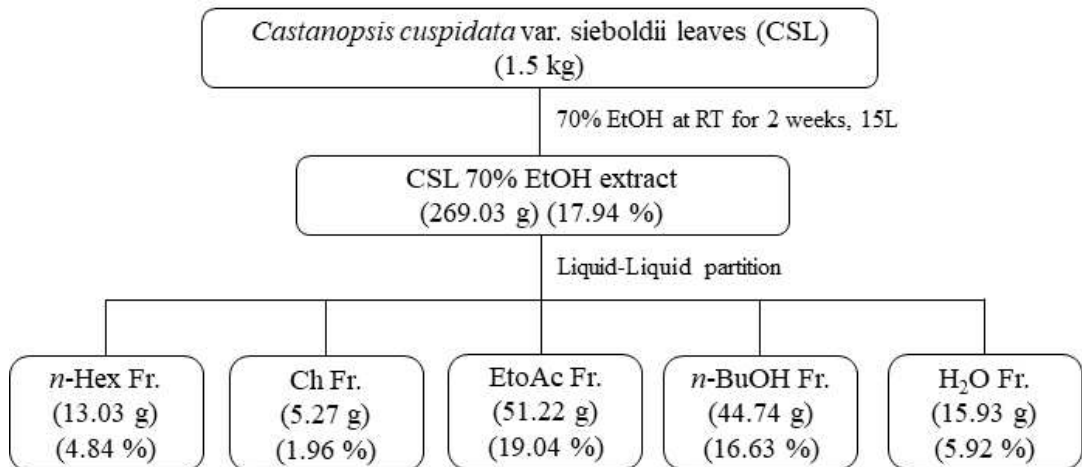


Figure 10. Extraction and liquid-liquid partition diagram of *C. cuspidata* var. sieboldii leaves (CSL).

2. Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획층들 중 EtOAc 분획물을 극성에 따라 순차적으로 분리하기 위해 MPLC (medium pressure liquid chromatography)를 실시하였다. EtOAc 분획물 20.22 g 을 MeOH 20 mL에 녹여 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후, ODS column을 이용하여 10 mL/min의 유속과 280nm의 흡광 값 조건에서 실험을 진행하였다. 용매 조건은 isocratic 조건으로 H₂O:MeOH (10-100% MeOH, 570 min), MeOH (100%, 20 min)의 용매 비율로 MeOH 비율을 5%씩 순차적으로 높이면서 분획하였다. 시간에 따라 용출되는 분획물은 test tube에 각각 300mL씩 용출시켜 총 19개의 fraction (MP.1-MP.19) 을 얻었다. TLC를 통해 각 분획 별 양상을 확인 후 항산화 활성에 따라 총 3개의 fraction (Fr.1-Fr.3)으로 분류하였으며, HPLC를 통해 정성분석을 한 후 gradient 조건으로 MPLC를 이용하여 연속적으로 분획물의 분리를 진행하였다 (Figure 11). MPLC fraction들 중 비슷한 양상과 높은 항산화 활성을 나타낸 분획들 (Fr.2, Fr.1-b, Fr.1-a-4)은 수합 하여 Fr.A로 칭하고 H₂O:MeOH (10-100% MeOH, 80 min), MeOH (100%, 20 min)의 용매 조건으로 MPLC 를 수행한 후 Prep-LC를 통해 Compound 1 (47 mg) 을 분리하였다(Figure 12).

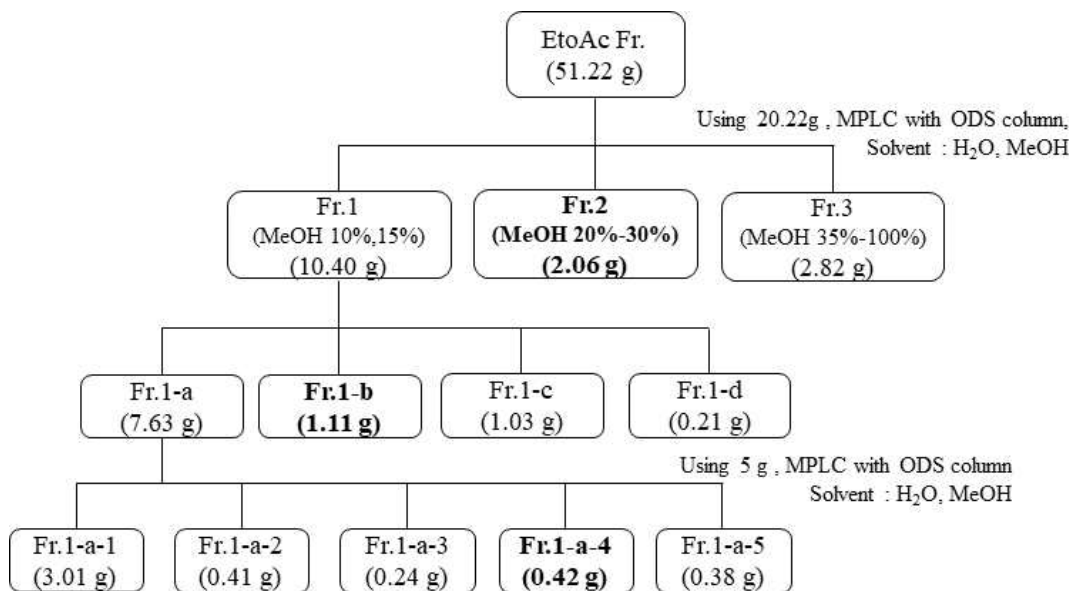


Figure 11. Isolation diagram of *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves EtoAc fraction (CSL-EA).

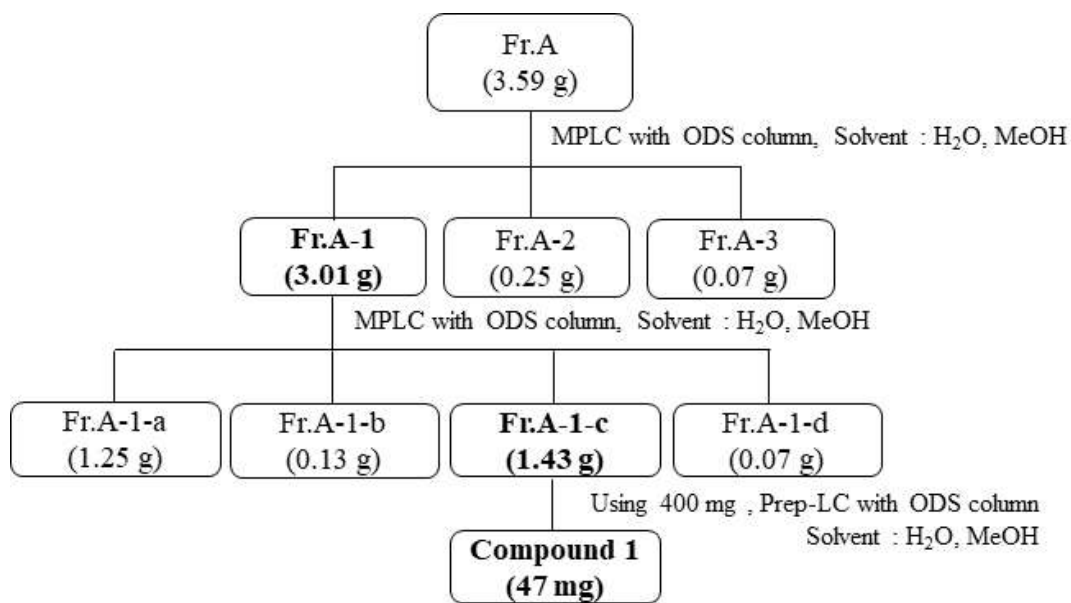


Figure 12. Isolation diagram of Compound 1 from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves EtoAc fraction A (CSL-EA-Fr.A).

제 3 절 구실잣밤나무 잎 추출물의 활성 성분 분석

1. High performance liquid chromatography (HPLC)

유효성분 분석을 위하여 18가지 폴리페놀 및 플라보노이드 표준물질 ((1) nicotinic acid; (2) gallic acid; (3) catechin hydrate; (4) caffeic acid; (5) epigallocatechin gallate; (6) epicatechin; (7) ethyl gallate; (8) *p*-coumaric acid; (9) chlorogenic acid; (10) 4-hydroxycinnamic acid; (11) ferulic acid; (12) naringin; (13) protocatechuic acid ethyl ester; (14) rutin hydrate; (15) benzoic acid; (16) quercetin hydrate; (17) kaempferol; (18) biochanin A)을 선정하여 실험을 진행하였으며, HPLC 분석조건은 다음과 같다. Column은 Shimpack GIS-ODS (C₁₈, 4.6×250 mm, 5.0 μm, Shimadzu Co., Japan), flow rate는 0.7 mL/min, Temperature 30°C, injection volume 10 μL, UV detector의 wavelength는 280 nm로 분석하였다. Mobile phase로는 0.1% Acetic acid in water (solvent A)와 0.1% Acetic acid in methanol (solvent B)를 사용하여 농도 구배 조건에서 분석하였다(Table 3). 분석에 사용한 모든 용액은 0.45 μm filter로 여과하여 사용하였다.

Table 3. Gradient method of high performance liquid chromatography (HPLC).

Time (min)	Mobile phase	
	A(%)	B(%)
0	90	10
5	90	10
15	60	40
45	40	60
55	20	80
60	0	100
65	0	100
70	90	10
75	90	10

제 4 절 구실잣밤나무 잎 추출물 및 분획물의 항산화 활성 평가

1. DPPH free radical scavenging assay

DPPH free radical 소거능 실험은 Blois의 방법을 변형하여 실시하였다[76]. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 시약은 MeOH를 사용하여 1 mM 농도로 제조하고 이를 0.5 mM 농도로 희석한 뒤 실험에 사용하였다. 각 농도 별 시료를 EP tube에 200 μ L 넣고 0.5 mM DPPH 용액을 800 μ L 가하여 vortexing 하고, 암실에서 15분간 반응시켰다. 이후 반응이 끝난 혼합물을 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군(positive control)은 gallic acid를 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. radical 소거능은 다음 식에 의해 계산하여 백분율로 나타내었으며 각 시료의 radical 소거능 백분율이 50%일 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100$$

Abs_{control} : 517 nm에서 DPPH 시약의 흡광도

Abs_{sample} : 517 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

2. ABTS cation radical scavenging assay

ABTS 양이온 radical 소거능 실험은 Re 등의 방법을 응용하여 실시하였다[77]. 14 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 시약은 증류수를 사용하여 7.0 mM 농도로 제조한 후, 2.45 mM potassium persulfate와 1:1 비율로 혼합한 후 암실에서 18시간 동안 반응시켜 ABTS cation radical을 형성하였다. ABTS+ 용액은 730 nm에서 흡광값이 0.90 ± 0.01 이 되도록 증류수로 희석하여 실험에 사용하였다. 각 농도 별 시료를 EP tube에 200 μ L 넣고 10배 희석한 ABTS+ 용액을 1,000 μ L 가하여 vortexing 하고, 암실에서 15분간 반응시켰다. 이후 반응이 끝난 혼합물을 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 730 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군(positive control)은 quercetin을 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. radical 소거능은 다음 식에 의해 계산하여 백분율로 나타내었으며 각 시료의 radical 소거능 백분율이 50%일 때의 시료 농도 (IC₅₀)를 구하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100$$

Abs_{control} : 730 nm에서 ABTS 시약의 흡광도

Abs_{sample} : 730 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

3. Total polyphenol contents (TPC)

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu 방법을 참고하여 실시하였다[78]. 폴리페놀 정량을 위한 표준 검정 곡선(standard calibration curve)은 gallic acid를 표준물질로 사용하였다. 농도별로 희석한 gallic acid 표준 용액과 1 mg/mL 농도의 시료를 500 μ L씩 취한 후 0.2 M Folin-Ciocalteu's phenol 시약 500 μ L, 2% sodium carbonate 수용액(w/v) 500 μ L를 추가로 혼합하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 반응이 끝난 혼합물을 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 표준 검정 곡선에 대입해 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양으로 환산하였으며 표준 검정 곡선의 R^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 13).

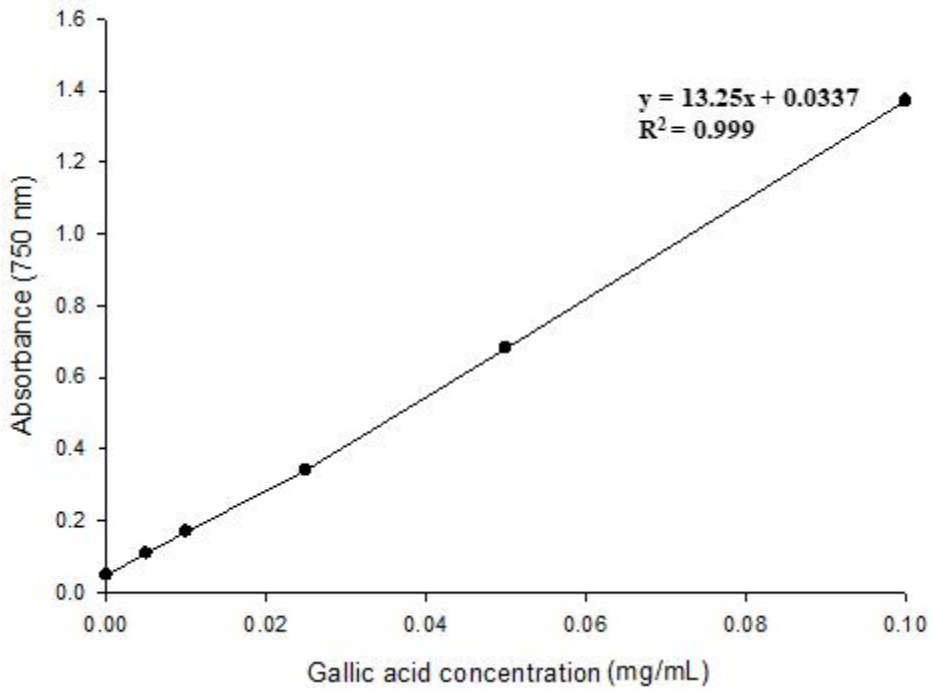


Figure 13. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total polyphenol contents.

4. Total flavonoid contents (TFC)

총 플라보노이드 함량 측정은 Park 등의 방법을 변형하여 실시하였다[79]. 플라보노이드 정량을 위한 표준 검정 곡선(standard calibration curve)은 quercetin을 표준물질로 사용하였다. 농도별로 희석한 quercetin 표준 용액과 1 mg/mL 농도의 시료를 500 μ L 씩 취한 후 methanol 1.5 mL, 10% aluminium chloride 100 μ L, 1M potassium acetate 100 μ L, 증류수 2.8 mL를 순서대로 혼합하여 상온에서 40분 동안 반응시켰다. 이후 반응이 끝난 혼합물을 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 415 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 표준 검정 곡선에 대입하여 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하였으며 표준 검정 곡선의 R^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 14).

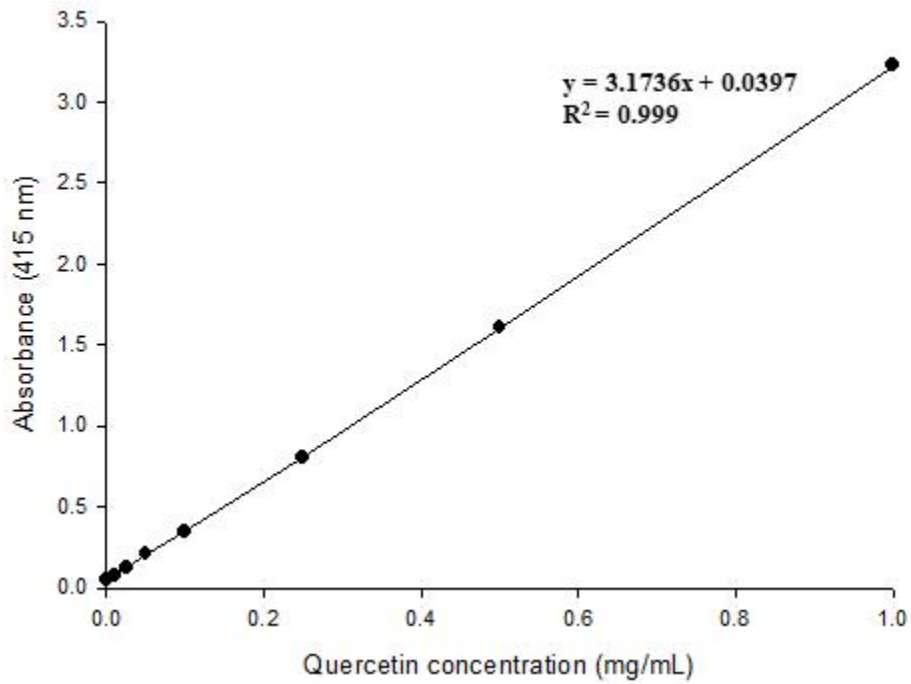


Figure 14. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.

제 5 절 분리된 화합물의 동정 및 구조분석

1. HPLC-Mass/Mass spectrometry (LC-MS/MS)

폴리페놀 표준물질과 분리된 화합물 간 비교 분석을 위하여 실험을 진행하였으며, 분석에 사용한 모든 용액은 증류수로 희석 후 0.45 μm filter로 여과하여 사용하였다. LC-MS/MS 분석기기는 AB SCIEX 4000 Q Trap LC/MS/MS System (Shimadzu LC 20A System)를 이용하였으며 Mobile phase로는 0.1% Formic acid in water (solvent A)와 0.1% Formic acid in acetonitrile (solvent B)를 사용하여 isocratic 조건 (35% B)에서 분석하였다. MS/MS의 조건은 Turbo Ion Spray 방식으로 Negative mode로 분석을 진행하였다 (Table 4).

Table 4. Analysis conditions of HPLC-Mass/Mass(LC-MS/MS) spectrometry.

Analysis condition	Explanation
LC system	Shimadzu LC 20A System
Column	Gemini 3 μm , C ₁₈ 110A (50 mm \times 2.0 mm)
Column temp	40°C
Injection volume	10 μL
Flow rate	0.25 ml/min
Mobile phase	0.1% Formic acid in water (solvent A)
Mass spectrometry	0.1% Formic acid in acetonitrile (solvent B)
Scan type	AB SCIEX 4000 Q Trap LC/MS/MS System
Source Temperature	MRM
Spray voltage	400°C
	-4000V (negative)

2. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

분리된 화합물의 구조 분석을 위해 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance) spectrometer는 AVANCE III HD 400 (FT-NMR system, 400 MHz, BRUKER)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 Sigma aldrich의 NMR 전용 용매로 Dimethyl sulfide-d₆(DMSO-d₆) 를 사용하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 구실잣밤나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 성분 분석

구실잣밤나무 잎 70% EtOH 추출물(CSL)의 HPLC 분석 결과는 18개의 폴리페놀 표준물질들 중 모든 표준물질을 포함하고 있음을 정성분석을 통해 확인하였다(Figure 15).

18개의 폴리페놀 표준물질들 중 epigallocatechin gallate (66.64 ± 0.25), *p*-coumaric acid (37.68 ± 0.01), catechin hydrate (29.48 ± 0.12), caffeic acid (16.62 ± 0.33)의 함량은 높은 값을 나타내며, CSL에 위 4가지 폴리페놀이 다량으로 함유되어 있음을 확인하였다(Table 5).

구실잣밤나무 잎 70% EtOH 추출물 EtOAc 분획(CSL-EA)의 HPLC 분석 결과는 18개의 폴리페놀 표준물질들 중 protocatechuic acid ethyl ester를 제외한 총 17개의 표준물질을 포함하고 있음을 정성분석을 통해 확인하였다(Figure 16).

18개의 폴리페놀 표준물질들 중 epigallocatechin gallate (275.63 ± 0.17), caffeic acid (61.24 ± 0.31), ethyl gallate (60.98 ± 0.46), *p*-coumaric acid (57.86 ± 0.14)의 함량은 높은 값을 나타내며, CSL-EA에 위 4가지 폴리페놀이 다량으로 함유되어 있음을 확인하였다(Table 6).

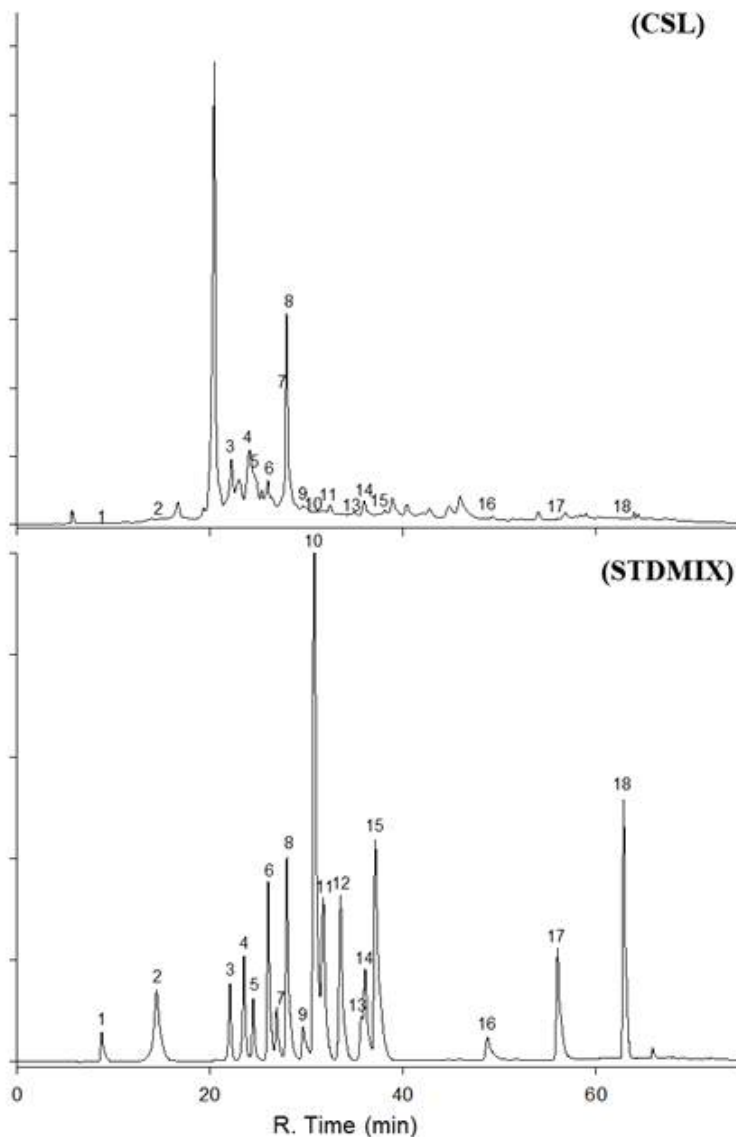


Figure 15. HPLC profile of the CSL and standard mixture using diode array detection at 280 nm. Numbers indicate the following : (1) nicotinic acid; (2) gallic acid; (3) catechin hydrate; (4) caffeic acid; (5) epigallocatechin gallate; (6) epicatechin; (7) ethyl gallate; (8) *p*-coumaric acid; (9) chlorogenic acid; (10) 4-hydroxycinnamic acid; (11) ferulic acid; (12) naringin; (13) protocatechuic acid ethyl ester; (14) rutin hydrate; (15) benzoic acid; (16) quercetin hydrate; (17) kaempferol; (18) biochanin A.

Table 5. Phenolic compounds identified in CSL quantified by UV-HPLC using diode array detection at 280 nm. The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.

(Unit : mg/g)		
No.	Standard	CSL
1	nicotinic acid	3.58 \pm 0.16
2	gallic acid	1.08 \pm 0.25
3	catechin hydrate	29.48 \pm 0.12
4	caffeic acid	16.62 \pm 0.33
5	epigallocatechin gallate	66.64 \pm 0.25
6	epicatechin	6.28 \pm 0.02
7	ethyl gallate	13.15 \pm 0.34
8	<i>p</i> -coumaric acid	37.68 \pm 0.01
9	chlorogenic acid	2.11 \pm 0.05
10	4-hydroxycinnamic acid	0.01 \pm 0.15
11	ferulic acid	0.24 \pm 0.09
12	naringin	0.12 \pm 0.01
13	protocatechuic acid ethyl ester	1.38 \pm 0.50
14	rutin hydrate	7.89 \pm 0.03
15	benzoic acid	0.92 \pm 0.31
16	quercetin hydrate	9.44 \pm 0.43
17	kaempferol	0.79 \pm 0.08
18	biochanin A	0.49 \pm 0.12
Total		197.91 \pm 0.02

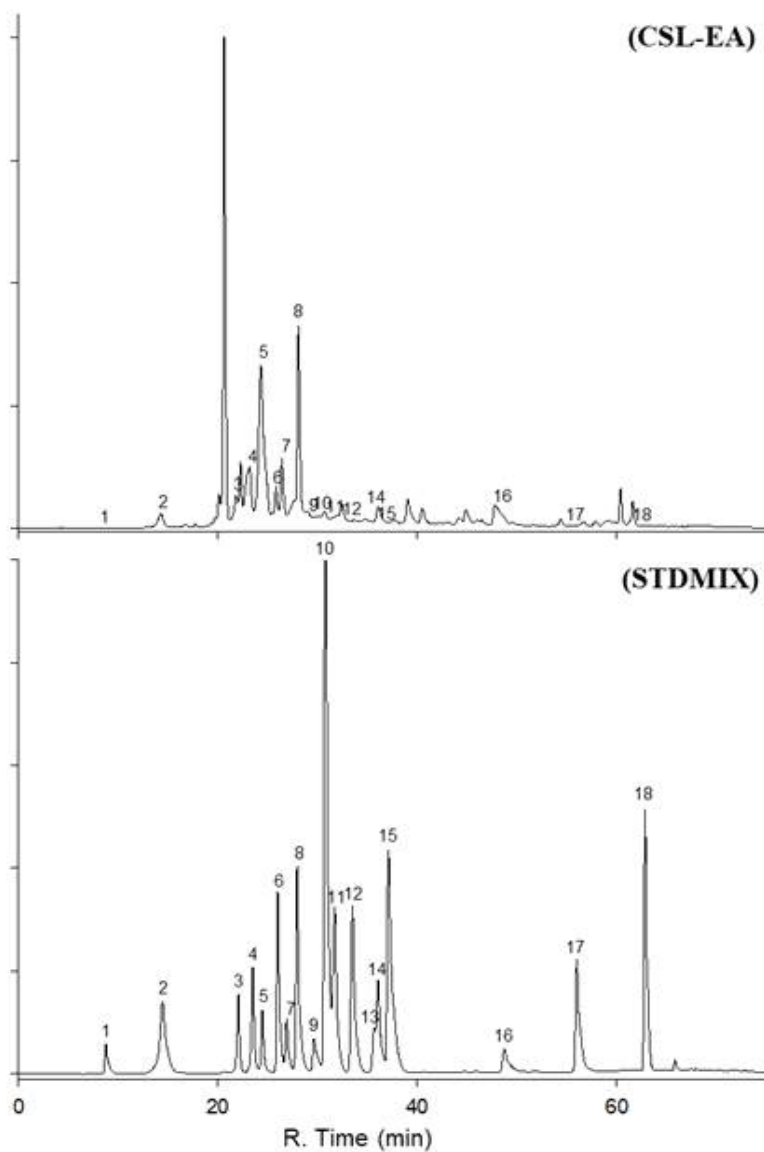


Figure 16. HPLC profile of the CSL-EA and standard mixture using diode array detection at 280 nm. Numbers indicate the following : (1) nicotinic acid; (2) gallic acid; (3) catechin hydrate; (4) caffeic acid; (5) epigallocatechin gallate; (6) epicatechin; (7) ethyl gallate; (8) *p*-coumaric acid; (9) chlorogenic acid; (10) 4-hydroxycinnamic acid; (11) ferulic acid; (12) naringin; (13) protocatechuic acid ethyl ester; (14) rutin hydrate; (15) benzoic acid; (16) quercetin hydrate; (17) kaempferol; (18) biochanin A.

Table 6. Phenolic compounds identified in CSL-EA quantified by UV-HPLC using diode array detection at 280 nm. The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.

No.	Standard	(Unit : mg/g)
		CSL-EA
1	nicotinic acid	1.00 \pm 0.44
2	gallic acid	9.20 \pm 0.15
3	catechin hydrate	41.14 \pm 0.20
4	caffeic acid	61.24 \pm 0.31
5	epigallocatechin gallate	275.63 \pm 0.17
6	epicatechin	12.55 \pm 0.17
7	ethyl gallate	60.98 \pm 0.46
8	<i>p</i> -coumaric acid	57.86 \pm 0.14
9	chlorogenic acid	2.83 \pm 0.51
10	4-hydroxycinnamic acid	0.63 \pm 0.07
11	ferulic acid	14.57 \pm 0.74
12	naringin	4.90 \pm 0.16
13	protocatechuic acid ethyl ester	-
14	rutin hydrate	17.69 \pm 0.04
15	benzoic acid	2.86 \pm 0.58
16	quercetin hydrate	18.94 \pm 0.82
17	kaempferol	2.72 \pm 0.55
18	biochanin A	0.12 \pm 0.07
Total		584.84 \pm 0.17

제 2 절 구실잣밤나무 잎 추출물 및 분획물의 항산화 활성 평가

1. DPPH free radical scavenging assay

구실잣밤나무 잎 70% EtOH 추출물(CSL) 및 각 용매 별 분획물에 대하여 DPPH free radical 소거 활성을 측정하였다. 표준물질을 제외한 시료의 농도는 25-1000 μ g/mL의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 IC₅₀값을 계산하였다. 각 분획별 DPPH free radical 소거 활성은 ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol, water, *n*-hexane 순으로 나타났으며, ethyl acetate 분획물의 IC₅₀ 값은 각각 87.58 μ g/mL 로 우수한 DPPH radical 소거활성을 나타내었다(Figure 17, Table 7).

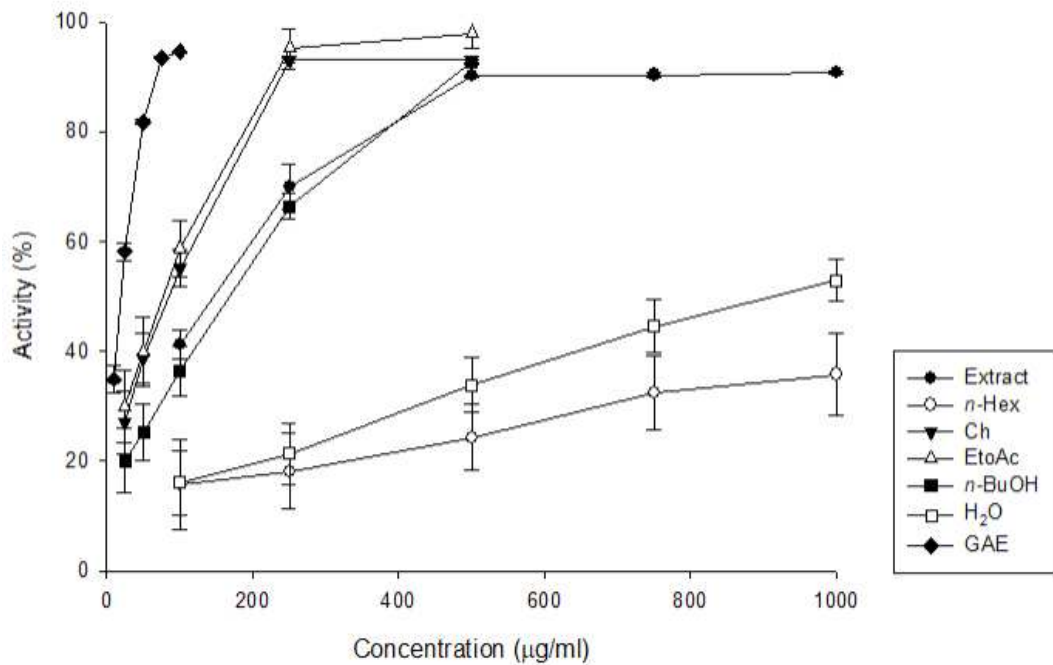


Figure 17. DPPH free radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.

Table 7. IC₅₀ values of DPPH free radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean ± S.D from three independent experiments.

No.	Sample	IC ₅₀ value (µg/mL)
1	Extract	138.21 ± 10.66
2	<i>n</i> -Hexane	>200
3	Chloroform	93.92 ± 1.96
4	Ethyl Acetate	87.58 ± 4.61
5	<i>n</i> -Butanol	169.18 ± 1.36
6	Water	>200
7	Gallic acid	22.73 ± 2.04

2. ABTS cation radical scavenging assay

구실잣밤나무 잎 70% EtOH 추출물(CSL) 및 각 용매 별 분획물에 대하여 ABTS cation radical 소거 활성을 측정하였다. 표준물질을 제외한 시료의 농도는 25-1000 μ g/mL의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 IC_{50} 값을 계산하였다. 각 분획별 항산화 활성은 ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol, water, *n*-hexane 순으로 나타났으며, ethyl acetate의 IC_{50} 값은 71.45 μ g/mL로 우수한 ABTS cation radical 소거활성을 나타내었다(Figure 18, Table 8).

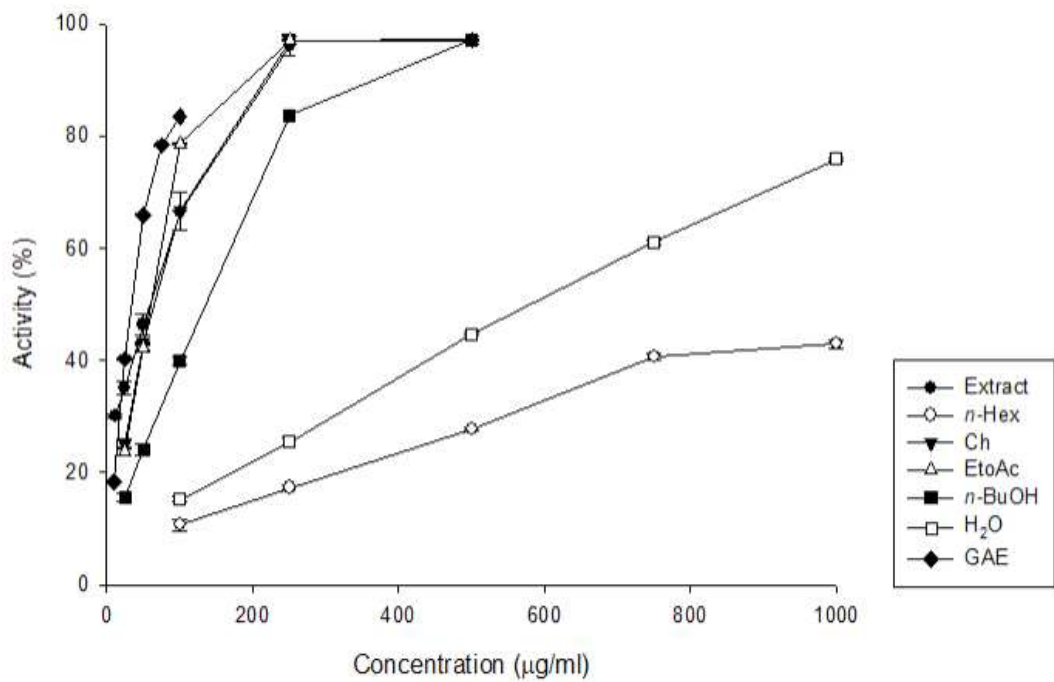


Figure 18. ABTS cation radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.

Table 8. IC₅₀ values of ABTS cation radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.

No.	Sample	IC ₅₀ value ($\mu\text{g/mL}$)
1	Extract	169.83 \pm 0.30
2	<i>n</i> -Hexane	>200
3	Chloroform	79.33 \pm 1.19
4	Ethyl Acetate	71.45 \pm 1.42
5	<i>n</i> -Butanol	136.71 \pm 1.69
6	Water	>200
7	Quercetin	22.73 \pm 2.04

3. Total polyphenol contents (TPC)

Gallic acid를 표준물질로 사용하여 표준 검정 곡선을 작성하고 구실잣밤나무 잎 추출물 및 용매 분획물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀 함량은 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(gallic acid equivalent (GAE))로 환산하여 나타내었다. 측정 결과는 Figure 19과 같으며, EtoAc 분획물이 가장 많은 폴리페놀 함량 (144.48 ± 5.82 GAE mg/g) 을 나타내었다(Table 9).

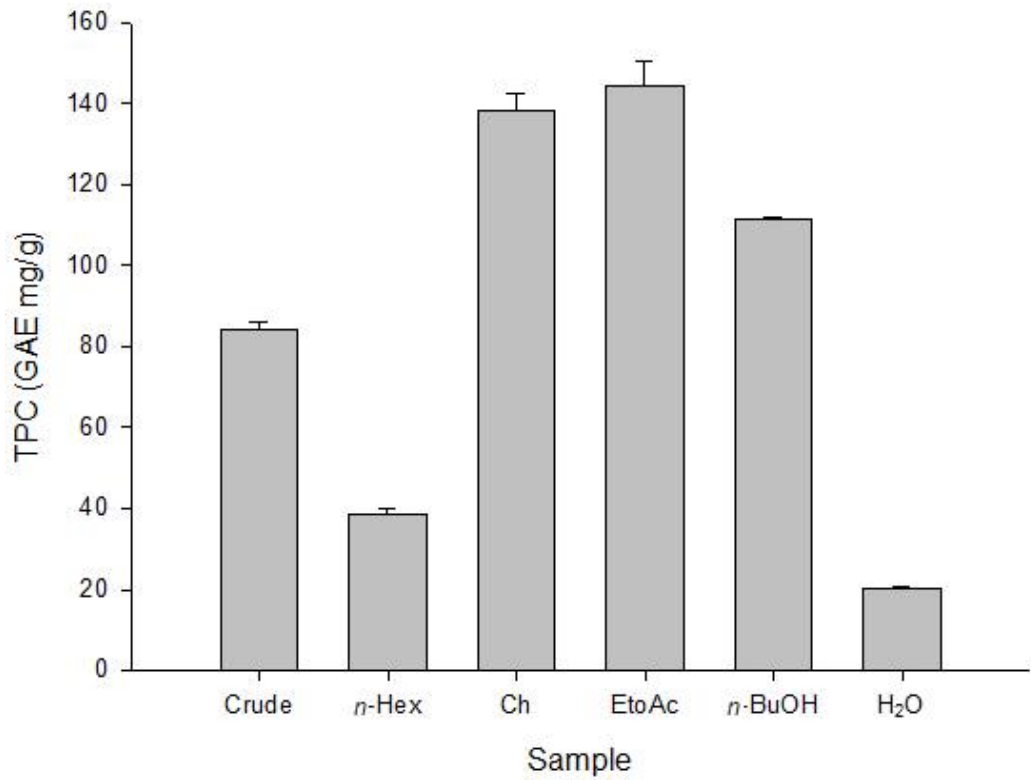


Figure 19. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL).

Table 9. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.

No.	Sample	TPC (GAE mg/g)
1	Extract	84.28 \pm 1.87
2	<i>n</i> -Hexane	38.59 \pm 1.25
3	Chloroform	138.21 \pm 4.25
4	Ethyl Acetate	144.48 \pm 5.82
5	<i>n</i> -Butanol	111.37 \pm 0.74
6	Water	20.17 \pm 0.33

4. Total flavonoid contents (TFC)

Quercetin을 표준물질로 사용하여 표준 검정 곡선을 작성하고 구실잣밤나무 잎 추출물 및 용매 분획물에 함유된 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량은 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양 (quercetin equivalent (QUE))로 환산하여 나타내었다. 측정 결과는 Figure 20와 같으며, EtoAc 분획물이 가장 많은 플라보노이드 함량 (37.79 ± 2.39 QUE mg/g) 을 나타내었다 (Table 10).

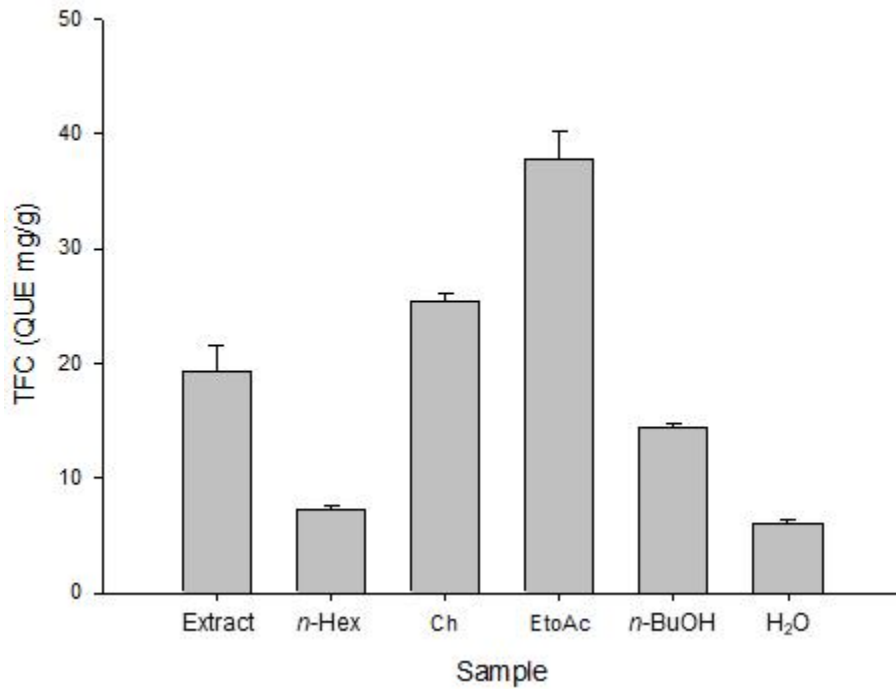


Figure 20. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL).

Table 10. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. cuspidata* var. *sieboldii* leaves (CSL). The results are the mean \pm S.D from three independent experiments.

No.	Sample	TFC (QUE mg/g)
1	Extract	19.34 \pm 2.19
2	<i>n</i> -Hexane	7.33 \pm 0.36
3	Chloroform	25.40 \pm 0.63
4	Ethyl Acetate	37.79 \pm 2.39
5	<i>n</i> -Butanol	14.47 \pm 0.36
6	Water	6.07 \pm 0.36

제 3 절 분리된 화합물의 동정 및 구조분석

1. LC-MS/MS 정량 분석 결과

구실잣밤나무 잎 EtoAc 분획물(CSL-EA)에서 분리된 화합물의 분자량 확인하고, ethyl gallate 와 비교 분석을 위하여 LC-MS/MS 정량 분석을 실시하였다. mass range를 20에서 200까지 분석 확인한 결과 ethyl gallate 의 분자량은 197 [M-H]-로 확인되었으며, compound 1의 분자량 또한 동일한 것으로 확인되었다. 또한 compound 1 으로부터 49, 64.8, 78, 79, 105.8, 124.2, 125, 197.8, 169.0의 product ion을 확인하였으며, 이러한 결과는 compound 1과 ethyl gallate가 동일한 화합물임을 나타낸다(Figure 21,22).

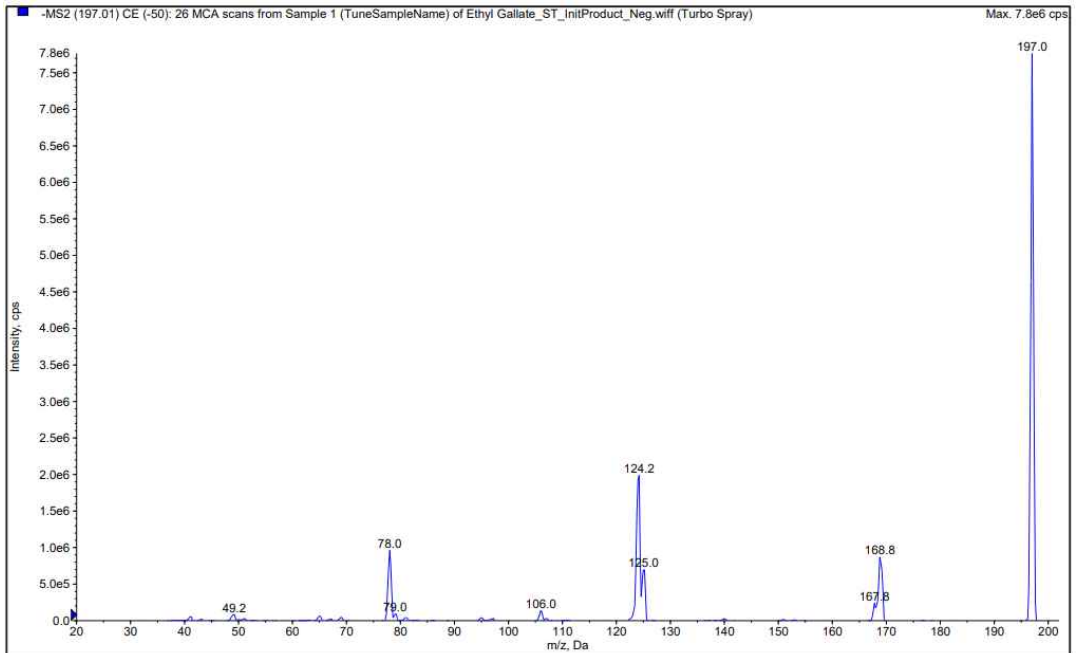


Figure 21. LC-MS/MS profile of the ethyl gallate.

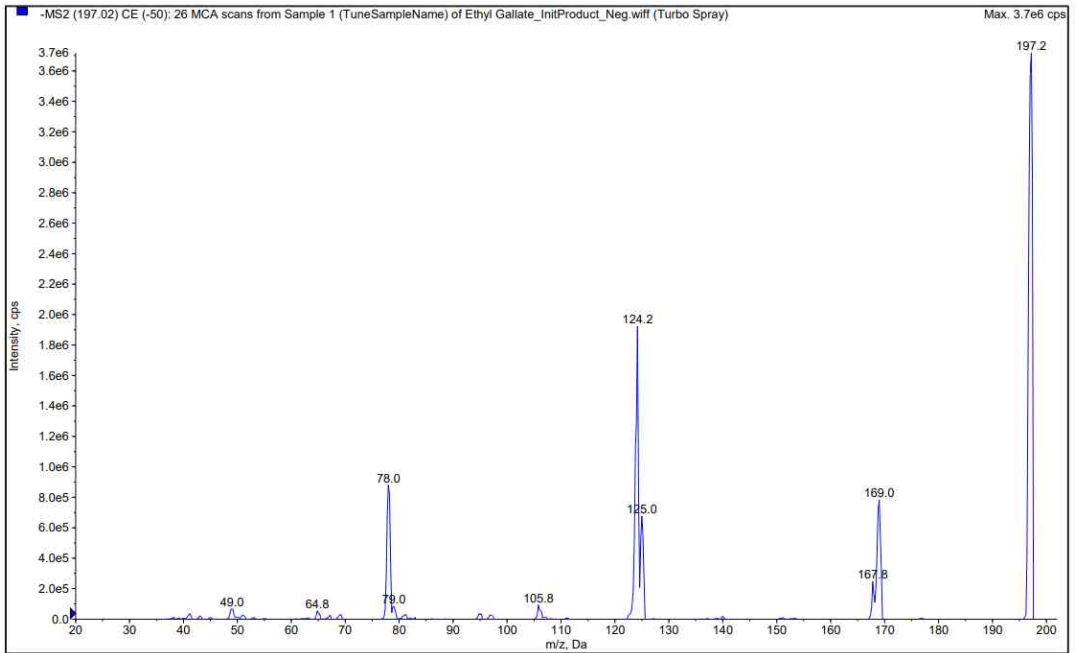


Figure 22. LC-MS/MS profile of the compound 1.

2. NMR Spectral data

compound 1은 ester carbonyl group을 갖는 백색 분말 및 페놀 화합물로서 분리되었다. compound 1의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 (DMSO- d_6 , 100 MHz) 분석 결과 총 7개의 신호를 포함하는 9개의 탄소 신호를 나타냈다. δ_c 166.31 (C-7)에서 하나의 ester기를 확인 할수 있었으며, δ_c 108.92 (C-2,6), δ_c 120.03 (C-1), δ_c 138.82 (C-4), δ_c 146.02 (C-3,5) 를 포함하는 방향족 고리를 확인 할수 있었다. δ_c 14.72 (C-9)에서 3'alkyl 기를 확인하였고, δ_c 60.48 (C-8)에서 ether 기를 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) 의 δ_H 6.88 (2H, singlet, H-2,6)에서 1개의 symmetry peak를 발견하였고, ethyl 기 δ_H 4.16 (2H, quartet, $J = 7.0\text{Hz}$, H-8), δ_H 1.22 (3H, triplet, $J = 7.0\text{Hz}$, H-9)에서 3,4,5-trisubstitued pattern의 존재를 나타내었다. 따라서 이들을 종합하여 문헌[80]과 비교한 결과 compound 1의 구조는 ethyl gallate로 확인되었다 (Figure 23-25, Table 11).

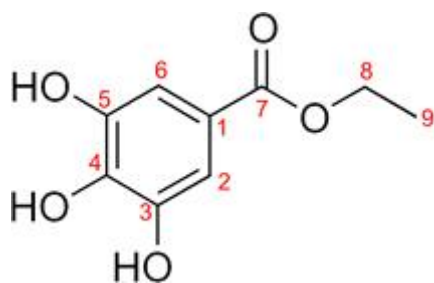


Figure 23. Chemical structure of compound 1.

Table 11. ^1H NMR and ^{13}C NMR data of compound 1 (400 MHz and 100 MHz, DMSO- d_6).

No.	compound 1	
	δ_{H}	δ_{C}
1	6.8791	166.31 (C-7)
	(2H, singlet, H-2,6)	
2	4.1597	146.02 (C-3,5)
	(2H, quartet, H-8)	
3	4.1413	138.82 (C-4)
4	4.1243	120.03 (C-1)
5	4.1063	108.92 (C-2,6)
6	1.2168	60.48 (C-8)
	(3H, triplet, H-9)	
7	1.1989	14.72 (C-9)
8	1.1813	

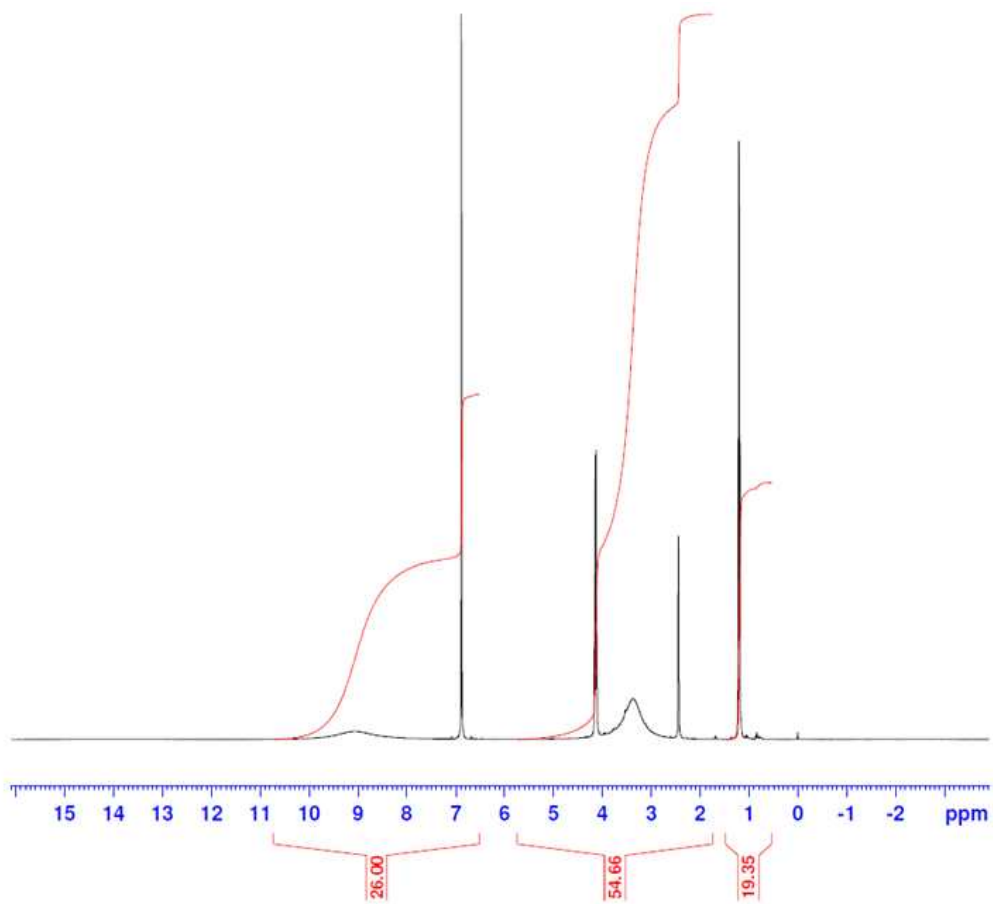


Figure 24. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 1 in DMSO-d_6 .

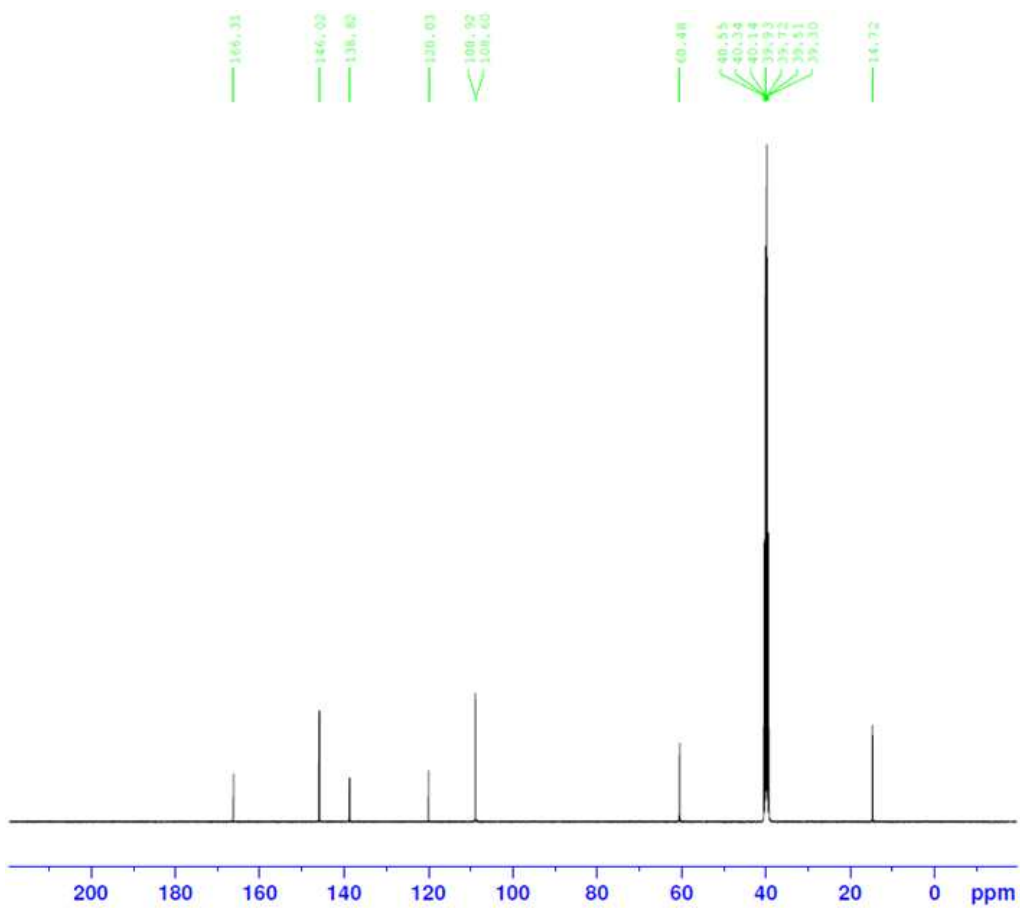


Figure 25. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in DMSO-d_6 .

제 4 장 결론 및 제언

구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidate* var. *sieboldii*)는 참나무과 메밀잣밤나무속에 속하며 한반도 전 지역에 널리 분포되어 있어 대표적인 난대성 수종 중 하나로 뽑힌다. 이전 연구결과에 따르면 구실잣밤나무는 항산화, 항암, 항염증 및 항균 효과 등의 다양한 약리작용을 가지고 있음이 확인되었다. 그러나 아직까지 구실잣밤나무 잎을 이용하여 항산화 활성을 중심으로 한 폴리페놀 화합물의 분리 및 구조 동정 연구는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 구실잣밤나무 잎 추출물과 용매 분획물의 항산화 활성을 검증하고, 유효 성분의 분석 후 분획물들의 분리를 통해 최종적으로 단일 화합물의 구조 동정을 실시하여 안전한 기능성 화장품, 의약품 및 건강기능식품 관련 천연 소재로서 구실잣밤나무의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

본 연구는 구실잣밤나무 잎 70% EtOH 추출물을 유기 용매를 이용하여 용매 분획을 진행한 후 DPPH free radical scavenging assay, ABTS cation radical scavenging assay, Total polyphenol contents (TPC), Total flavonoid contents (TFC) 등의 다양한 항산화 활성 평가를 통해 EtoAc 분획물이 가장 뛰어난 항산화 능력을 보임을 확인하였다. 특히 구실잣밤나무 잎의 용매 분획물의 TPC와 TFC 결과를 비교 한 결과, flavonoid 구조를 가지는 화합물보다 phenolic acid 구조를 가지는 화합물의 함량이 더 많음을 유추할 수 있었다.

또한 HPLC를 사용하여 구실잣밤나무 잎 70% EtOH 추출물과 EtoAc 분획물의 폴리페놀 물질 정성 분석을 진행 하였다. 분석에 사용된 폴리페놀 표준 물질은 총 18가지 ((1) nicotinic acid; (2) gallic acid; (3) catechin hydrate; (4) caffeic acid; (5) epigallocatechin gallate; (6) epicatechin; (7) ethyl gallate; (8) *p*-coumaric acid; (9) chlorogenic acid; (10) 4-hydroxycinnamic acid; (11) ferulic acid; (12) naringin; (13) protocatechuic acid ethyl ester; (14) rutin hydrate; (15) benzoic acid; (16) quercetin hydrate; (17) kaempferol; (18) biochanin A) 를 선정하여 실험을 진행하였다. 정성 분석 결과 70% EtoH 추출물은 18개의 폴리페놀 표준물질들 중 모든 표준물질을 포함하며, 그 중 epigallocatechin gallate (66.64 ± 0.25), *p*-coumaric acid (37.68 ± 0.01), catechin hydrate (29.48 ± 0.12), caffeic acid (16.62 ± 0.33) 의 함량은 높은 값을 나타내었다. 또한 EtOAc 분획물의 분석 결과는 18개의 폴리페놀 표준물질들 중 protocatechuic acid ethyl ester를 제외한 총 17개의 표준물질을 포함하고 있음을 확인하였

다. 그 중 epigallocatechin gallate (275.63 ± 0.17), caffeic acid (61.24 ± 0.31), ethyl gallate (60.98 ± 0.46), *p*-coumaric acid (57.86 ± 0.14) 의 함량은 높은 값을 나타내었다. HPLC 결과는 용매 분획을 통해 EtoAc 분획에서 phenolic acid 구조를 가지는 폴리페놀 화합물이 추출물에 비해 더 많이 검출됨을 확인할 수 있었다.

단일 화합물의 분리는 ABTS cation radical scavenging assay를 중심으로 MPLC를 이용하여 EtoAc 분획물에서 분리를 진행하였으며 최종적으로 분리된 compound 1은 ester carbonyl group을 갖는 백색 분말 및 페놀 화합물로서 분리되었다. 분리된 화합물의 동정 및 구조분석은 LC-MS/MS와 NMR spectrum을 통해 확인하였으며, 그 결과 compound 1이 ethyl gallate임을 확인하였다.

이러한 결과는 국내 난대성 수종 중 하나인 구실갯밤나무가 유망한 항산화 기능을 제공하고 제약 및 화장품 산업에서 잠재적인 천연 물질임을 시사한다. 또한 본 연구에서는 1D NMR을 이용하여 구조해석을 진행하였기 때문에 2D NMR을 이용한 NMR dereplication를 완료하지 못하였지만, 추후 지속적인 연구를 통해 추출물 및 분획물의 LC-MS/MS 분석을 통한 LC-MS dereplication 또는 2D NMR을 이용한 NMR dereplication를 진행한다면 보다 완전한 연구가 될 것으로 사료 된다.

References

- [1] 신현철, 윤준혁, 최수민, 이광수, 박용배, 진연주, 배은지, 한정지, 난대수종 바로 알기, 서울 : 국립산림과학원. (2015).
- [2] Nonaka, G., Ageta, M. and Nishioka, I. Tannins and related compounds XXV. A new class of gallotannins possessing a (-)-shikimic acid core from *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* NAKAI (1). Chem. Pharm. Bull. 33: 96-101. (1985).
- [3] Wang, Y. F., He, R. J., Li, D. P. and Huang, Y. L. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Castanopsis fargesii* Franch. Biochem. Syst. Ecol. 78: 113-115. (2018).
- [4] Ageta, M., Nonaka, G. and Nishioka, I. Tannins and related compounds. LXVII: Isolation and characterization of castanopsinins A-H, novel ellagitannins containing a triterpenoid glycoside core, from *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* NAKAI (3). Chem. Pharm. Bull. 36: 1646-1663. (1988).
- [5] Ageta, M., Ishimaru, K., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. Tannins and related compounds. LXIV: Six new phenol glucoside gallates from *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* NAKAI (2). Chem. Pharm. Bull. 36: 870-876. (1987).
- [6] Kim, H. W., Park, E. J., Cho, H. M., An, J. P., Chin, Y. W., Kim, J. W., Sung, S. H. and Oh, W. K. Glucose uptake-stimulating galloyl ester triterpenoids from *Castanopsis sieboldii*. J. Nat. Prod. 83: 3093-3101. (2020).
- [7] Kim, N., Choi, M. H. and Shin, H. J. Antioxidant activity of *Castanopsis cuspidate* var. *sieboldii* extracts. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. 10: 308. (2020).
- [8] Kim, J. Y., Kim, S. Y., Kwon, H. M., Kim, C. H., Lee, S. J., Park, S. C. and Kim, K. H. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity on chestnut, chestnut shell and leaves of *Castanea crenata* extracts. Korean Soc. Med. Crop Sci. 22: 8-16. (2014).
- [9] Moon, S. H., Song, C. K., Kim, T. K., Oh, D. E. and Kim, H. C. Antifungal activity on the water extracts of five fagaceae plants. Korean J. Org. Agric. 25: 295-310. (2017).

- [10] Lee, J., Kim, H. J., Jang, G. Y., Seo, K. H., Kim, M. R., Choi, Y. H. and Jung, J. W. Effect of *Leonurus japonicus* Houtt on Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice. *J Physiol Pathol Korean Med.* 34: 81-87 (2020).
- [11] Poljšak, B. and Dahmane, R. Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatology research and practice* (2012).
- [12] Smirnoff, N. and Cumbes, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4): 1057-1060. (1989).
- [13] Beckman, K. B. and Ames, B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2): 547-581. (1998).
- [14] Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5(1): 9-19. (2012).
- [15] Kato, Y., Nagao, A., Terao, J. and Osawa, T. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67(5): 1136-1139. (2003).
- [16] Scott B. C., Butler, J., Halliwell, B. and Aruoma, O. I. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radic Research Commun* 19(4): 241-253. (1993).
- [17] Li, S., Tan H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W. and Feng, Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 16(11): 26087-26124. (2015).
- [18] Kim, H. S. and Ham, J. S., Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour* 23(2): 186. (2003).
- [19] Lee, J., Koo, N. and Min, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 3(1): 21-33. (2004).
- [20] Lee, Y. and Im, E. Regulation of miRNAs by natural antioxidants in cardiovascular diseases: Focus on SIRT1 and eNOS. *Antioxidants* 10(3): 377 (2021).
- [21] Ashock, B. T. and Ali, R. The aging paradox: free radical theory of aging.

- Experimental Gerontology 34: 293-303. (1999).
- [22] Fang, Y. Z., Yang, S. and Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 18: 872-879. (2002).
- [23] Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. G. and Lee, I. S., Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. Korean Journal of Food Science and Technology, 37(2): 233-240. (2005).
- [24] Hah, D. S. Kim, C. H. Kim, G. S. Kim, E. G. and Kim, J. S., Antioxidative effects of traditional medicinal plants on lipid. Korean J Vet Res 45(3): 341-350. (2005).
- [25] Seo, J. E., Hwang, E. S. and Kim, G. H. Antioxidative and Differentiation Effects of *Artemisia capillaris* T. Extract on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage of MC3T3-E1 Osteoblast Cells. J Korean Soc Food SciNutr, 40: 1532-1536. (2011).
- [26] Prior, R. L. Wu, X. and Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J. Agric. Food Chem. 53: 4290-4302. (2005).
- [27] Munteanu, I. G. and Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. International Journal of Molecular Sciences, 22(7): 3380 (2021).
- [28] Allison, M. C., Howatson, A. G., Torrance, C. J., Lee, F. D. and Russell R. I. Gastrointestinal Damage Associated with the Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. N Engl J Med. 327: 1882-1883. (1992).
- [29] Cano, A. Acosta, M. and Arnao, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: Application to lipophilic vitamins. Redox Rep. 5: 365-370. (2000).
- [30] Ahn, G. Y. and Bae, S. H. Strategies for the safe use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Korean Med Assoc. 61(6): 367-75 (2018).
- [31] Tatullo, M., Simone, G. M., Tarullo, F., Irlandese, G., Vito, D. D., Marrelli, M., Santacroce, L., Cocco, T., Ballini A. and Scacco, S. Antioxidant and antitumor

- activity of a bioactive polyphenolic fraction isolated from the brewing process. *Scientific reports* 6(1): 1-7. (2016).
- [32] Kardum, N., Milovanović, B., Šavikin, K., Zdunić, G., Mutavdžin, S., Gligorijević, T., and Spasić, S. Beneficial effects of polyphenol-rich chokeberry juice consumption on blood pressure level and lipid status in hypertensive subjects. *Journal of medicinal food* 18(11): 1231-1238. (2015).
- [33] Hameed, A., Galli, M., Adamska-Patruno, E., Krętowski, A., and Ciborowski, M. Select polyphenol-rich berry consumption to defer or deter diabetes and diabetes-related complications. *Nutrients* 12(9): 2538. (2020).
- [34] Khalatbary, A. R. and Khademi, E. The green tea polyphenolic catechin epigallocatechin gallate and neuroprotection. *Nutritional neuroscience* 23(4): 281-294. (2020).
- [35] Bungau, S., Abdel-Daim, M. M., Tit, D. M., Ghanem, E., Sato, S., Maruyama-Inoue, M., Yamane, S. and Kadonosono, K. Health benefits of polyphenols and carotenoids in age-related eye diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity* (2019).
- [36] Dimitrios, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in food science & technology* 17(9): 505-512. (2006).
- [37] Vermerris, W. and Nicholson, R. *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media (2007).
- [38] D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. and Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita* 43(4): 348 (2007).
- [39] Hano, C. and Tungmunnithum, D. Plant polyphenols, more than just simple natural antioxidants: Oxidative stress, aging and age-related diseases. *Medicines* 7(5): 26 (2020).
- [40] Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P. and Büsselberg, D. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules* 10(2): 221 (2020).

- [41] Anantharaju, P. G. Gowda, P. C. Vimalambike, M. G. and Madhunapantula, S. V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr. J.* 15(1): 1-16. (2016).
- [42] Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M. and Ullah, M. O. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & metabolism*, 13(1): 1-13. (2016).
- [43] Alshibl, H. M., Al-Abdullah, E. S., Haiba, M. E., Alkahtani, H. M., Awad, G. E., Mahmoud, A. H., Ibrahim, B. M., Bari, A. and Villinger, A. Synthesis and evaluation of new coumarin derivatives as antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory agents. *Molecules* 25(14): 3251 (2020).
- [44] Pereira, T. M., Franco, D. P., Vitorio, F. and Kummerle, A. E. Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. *Curr. Top. Med. Chem.* 18: 124-148. (2018).
- [45] Kontogiorgis, C., Detsi, A. and Hadjipavlou-Litina, D. Coumarin-based drugs: a patent review (2008–present). *Expert opinion on therapeutic patents* 22(4): 437-454. (2012).
- [46] Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C. and Gaforio, J. J. Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies. *Antioxidants* 8(5): 137 (2019).
- [47] Sudjaroen, Y. Plant-derived phenolic antioxidants and cancer prevention. *Thai Cancer J* 29(9): 126-34 (2009).
- [48] Miranda, C. L., Stevens, J. F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M. L. and Buhler D. R. Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *Agricultural and food chemistry* 48(9): 3876-84. (2000).
- [49] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79: 727–747. (2004).

- [50] Chang, E. H., Jeong, S. M., Park, K. S. and Lim, B. S. Contents of phenolic compounds and trans-resveratrol in different parts of Korean new grape cultivars. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45(6): 708-713. (2013).
- [51] De Filippis, B., Ammazzalorso, A., Fantacuzzi, M., Giampietro, L., Maccallini, C., and Amoroso, R. Anticancer activity of stilbene-based derivatives. *ChemMedChem* 12(8): 558-570. (2017).
- [52] Kim, B. S The effects of Phragmitis rhizoma herbal-acupuncture solution on inflammation in human mast cells and human alveolar epithelial cell lines Phragmitis rhizoma's effects. *The Journal of Korean Medicine*. 35(4): 1-9. (2014).
- [53] Quirantes-Piné, R., Zurek, G., Barrajón-Catalán, E., Bäßmann, C., Micol, V., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC-ESI-QTOF-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 72: 121-126. (2013).
- [54] Kerns, E. H., Hill, S. E., Detlefsen, D. J., Volk, K. J., Long, B. H., Carboni, J. and Lee, M. S. Cellular uptake profile of paclitaxel using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 12(10): 620-624. (1998).
- [55] Breton, R. C. and Reynolds, W. F. Using NMR to identify and characterize natural products. *Natural product reports*, 30(4): 501-524. (2013).
- [56] Cozzolino, D. Near infrared spectroscopy in natural products analysis. *Planta medica* 75(7): 746-756. (2009).
- [57] Queiroz, M. M. F., Marti, G., Queiroz, E. F., Marcourt, L., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V. D. S., and Wolfender, J. L. LC-MS/MS quantitative determination of tetrapteryx mucronata alkaloids, a plant occasionally used in ayahuasca preparation. *Phytochemical Analysis* 26(3): 183-188. (2015).
- [58] Emwas, A. H. M. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. *Adv. Struct. Safe.*

- Stud. 161–193. (2015).
- [59] Pye, C. R., Bertin, M. J., Lokey, R. S., Gerwick, W. H. and Linington, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(22): 5601-5606. (2017).
- [60] Gaudêncio, S. P. and Pereira, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Natural product reports* 32(6): 779-810. (2015).
- [61] Quinn, R. A., Nothias, L., Vining, O., Meehan, M., Esquenazi, E. and Dorrestein, P. C. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* 38: 143-154. (2017).
- [62] Yang, J. Y., Sanchez, L. M., Rath, C. M., Liu, X., Boudreau, P. D., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., de Felicio, R. and Fenner, A. Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.* 76: 1686-1699. (2013).
- [63] Zang, Y., Gong, Y., Gong, J., Liu, J., Chen, C., Gu, L. and Zhang, Y. Fungal polyketides with three distinctive ring skeletons from the fungus *Penicillium canescens* uncovered by OSMAC and molecular networking strategies. *The Journal of Organic Chemistry* 85(7): 4973-4980. (2020).
- [64] Woo, S., Kang, K. B., Kim, J. and Sung, S. H. Molecular networking reveals the chemical diversity of selaginellin derivatives, natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *Selaginella tamariscina*. *Journal of natural products* 82(7): 1820-1830. (2019).
- [65] Annesley, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry* 49(7): 1041-1044. (2003).
- [66] Volmer, D. and Jessome, L. L. Ion suppression: a major concern in mass spectrometry. *LC GC North America* 24(5): 498-510. (2006).
- [67] Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. and Chavez-Eng, C. M. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Analytical chemistry* 70(5): 882-889. (1998).

- [68] Zani, C. L. and Carroll, A. R. Database for rapid dereplication of known natural products using data from MS and fast NMR experiments. *Journal of natural products* 80(6): 1758-1766. (2017).
- [69] Robinette, S. L., Zhang, F., Bruschweiler-Li, L. and Bruschweiler, R. Web server based complex mixture analysis by NMR. *Analytical chemistry* 80(10): 3606-3611. (2008).
- [70] McAlpine, J. B., Chen, S. N., Kutateladze, A., MacMillan, J. B., Appendino, G., Barison, A. and Pauli, G. F. The value of universally available raw NMR data for transparency, reproducibility, and integrity in natural product research. *Natural product reports* 36(1): 35-107. (2019).
- [71] Robinette, S. L., Bruschweiler, R., Schroeder, F. C. and Edison, A. S. NMR in metabolomics and natural products research: two sides of the same coin. *Accounts of Chemical Research* 45(2): 288-297. (2012).
- [72] Zhang, C., Idelbayev, Y., Roberts, N., Tao, Y., Nannapaneni, Y., Duggan, B. M., Min, J., Lin, E. C., Gerwick, E. C., Cottrell, G. W. and Gerwick, W. H. *Sci. Rep.* 7(1): 1-17. (2017).
- [73] Reher, R., Kim, H. W., Zhang, C., Mao, H. H., Wang, M., Nothias, L. F. and Gerwick, W. H. A convolutional neural network-based approach for the rapid annotation of molecularly diverse natural products. *Journal of the American Chemical Society* 142(9): 4114-4120. (2020).
- [74] Zhang, C., Idelbayev, Y., Roberts, N., Tao, Y., Nannapaneni, Y., Duggan, B. M. and Gerwick, W. H. Small molecule accurate recognition technology (SMART) to enhance natural products research. *Scientific reports* 7(1): 1-17. (2017).
- [75] Kim, H. W., Kim, S. S., Kang, K. B., Ryu, B., Park, E., Huh, J. and Chin, Y. W. Combined MS/MS-NMR annotation guided discovery of *Iris lactea* var. *chinensis* seed as a source of viral neuraminidase inhibitory polyphenols. *Molecules* 25(15): 3383. (2020).
- [76] Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*

181: 1199-1200. (1958).

- [77] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237. (1999).
- [78] Ainsworth, E. A. and Gillespie K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2: 875-877. (2007).
- [79] Park, Y. K., Koo, M. H., Ikegaki, M. and Contado J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. biol. Tecnol.* 40: 97-106. (1997).
- [80] Ooshiro, A., Hiradate, S., Kawano, S., Takushi, T., Fujii, Y., Natsume, M. and Abe, H. Identification and activity of ethyl gallate as an antimicrobial compound produced by *Geranium carolinianum*. *Weed Biology and Management* 9(2): 169-172. (2009).

감사의 글

학부와 석사과정을 실험실 내에서 생활하며 실험실의 모든 분들께 학문적인 것뿐만 아닌 배움을 많이 얻었습니다.

저에게 연구자로서의 시작을 열어주신 지도교수 신현재 교수님께 석사과정을 마무리 할 수 있도록 매번 다짐을 세겨주시고 학문적으로 많은 가르침과 기회들을 주셔서 항상 진심으로 감사드립니다. 교수님 덕분에 좋은 연구를 할 수 있었으며 항상 즐겁게 배울수 있었습니다. 또한 진심어린 격려를 해주셨던 이중헌 교수님, 이재욱 교수님, 이정수 교수님, 안성훈 교수님 모두 감사드립니다.

석사과정 동안 부족한 저에게 다방면으로 좋은 말씀들을 많이 해주시며 매번 유익한 가르침을 주신 최문희 박사님, 실험실 생활을 하며 실험과 그 외 많은 것들을 알려주시며 제게 도움을 주신 승화 언니, 랩장으로서 항상 자리를 지키며 많은 조언들을 해주신 다송이 언니께 매번 감사합니다.

본 논문이 완성되기까지 많은 도움을 주신 모든 분들과 사랑하는 가족들에게 진심으로 감사의 마음을 전하며, 더욱 정진하며 바른 모습으로 항상 성장하는 사람이 되도록 하겠습니다.

22년 05월 30일

김 나 인