creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2024년 02월
석사학위논문

모노테르펜을 함유한 비자나무(*Torreya nucifera*) 유기용매 추출물의 항산화, 항염증 및 신경보호 효과

조선대학교 산업기술창업대학원

미용향장학과

김 준 건

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

모노테르펜을 함유한 비자나무(*Torreya nucifera*) 유기용매 추출물의 항산화, 항염증 및 신경보호 효과

Antioxidant, anti-inflammatory and neuro-protective effects of *Torreya nucifera* organic solvent extract containing monoterpene

2024년 02월 23일

조선대학교 산업기술창업대학원

미용향장학과

김 준 건

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

모노테르펜을 함유한 비자나무(*Torreya nucifera*) 유기용매 추출물의 항산화, 항염증 및 신경보호 효과

지 도 교 수 신 현 재

이 논문을 미용향장학 석사학위신청 논문으로 제출함

2 0 2 3 년 1 0 월

조 선 대 학 교 산 업 기 술 창 업 대 학 원

미 용 향 장 학 과

김 준 건

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김준건의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 이중헌 (인)

위 원 조선대학교 교 수 최문희 (인)

위 원 조선대학교 교 수 신현재 (인)

2023년 11월

조선대학교 산업기술창업대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table of Contents

List of Abbreviations ····· V

List of Tables ····· VI

List of Figures ····· VII

ABSTRACT ····· VI

제 1장 서론 ····· 1

제 1절 연구의 배경 ····· 1

1. 식물원료의 활용 ····· 4

2. 비자나무(*Torreya nucifera*) ····· 6

3. 모노테르펜(Monoterpene) ····· 10

4. 리모넨(Limonene) ····· 16

5. 항산화(Anti-oxidant) ····· 21

6. 항염증(Anti-inflammation) ····· 31

7. 신경보호(Neuroprotection) ····· 36

제 2절 연구 동향 및 목적 ····· 39

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2장 문헌 검토 ····· 41

제 1절 비자나무(*Torreya nucifera*)에 대한 리뷰 ····· 41

1. 비자나무(*Torreya nucifera*)의 성분 및 화합물 ····· 41

2. 비자나무(*Torreya nucifera*)의 생리활성 ····· 42

제 3장 재료 및 방법 ····· 47

제 1절 실험 재료 및 시약 ····· 47

제 2절 비자나무 잎의 추출 방법 ····· 48

제 3절 항산화 활성 분석(Anti-oxidant activity assay) ····· 50

1. DPPH 자유 라디컬 소거능 분석(DPPH free radical scavenging assay) ····· 50

2. ABTS 양이온 라디컬 소거능 분석(ABTS cation radical scavenging assay) ····· 51

제 4절 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정(Determination of total polyphenol and flavonoid contents) ····· 52

1. 총 폴리페놀 함량 측정(Determination of total polyphnol contents) ····· 52

2. 총 플라보노이드 함량 측정(Determination of total flavonoid contents) ····· 53

제 5절 항염증 활성 분석(Anti-inflammation activity assay) 54

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. 세포 배양 ····· 54

2. 세포 독성 실험(MTT assay) ····· 55

3. 산화질소 분석(Nitric oxide assay) ····· 56

제 6절 신경보호 활성 분석(Neuroprotection activity assay) 57

1. 아세틸콜린 분해효소 억제 분석(Acetylcholine esterase inhibition assay) ····· 57

제 7절 향기 물질 분석(Aroma substances analysis) ····· 58

1. Gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) analysis 58

제 4장 결과 및 고찰 ····· 59

제 1절 비자나무 잎 추출물의 수율(Yield of *Torreya nucifera* leaves extract) ····· 59

제 2절 항산화 활성 분석(Anti-oxidant activity assay) ····· 61

1. DPPH 자유 라디컬 소거능 분석(DPPH free radical scavenging assay) ····· 61

2. ABTS 양이온 라디컬 소거능 분석(ABTS cation radical scavenging assay) ····· 64

제 3절 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정(Determination of total polyphenol and flavonoid contents) ····· 67

1. 총 폴리페놀 함량 측정(Determination of total polyphnol contents) ····· 67

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 총 플라보노이드 함량 측정(Determination of total flavonoid contents) ····· 69

제 4절 항염 활성 분석(Anti-inflammation activity assay) ·· 71

1. 세포 독성 실험(MTT assay) ····· 71

2. 산화질소 분석(Nitric oxide assay) ····· 73

제 5절 신경보호 활성 분석(Neuroprotection activity assay) 75

1. 아세틸콜린 분해효소 억제 분석(Acetylcholine esterase inhibition assay) ····· 75

제 6절 향기 물질 분석(Aroma substances analysis) ····· 78

1. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis ·· 78

제 5장 결론 및 제언 ····· 82

참고문헌 ····· 84

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Abbreviations

ABTS ABTS cation radical scavenging assay

Aβ amyloid-β

ACh acetylcholine

AChE Acetylcholine esterase

AD Alzheimer's disease

DPPH DPPH free radical scavenging assay

EtOH Ethanol

GC-MS Gas chromatography-mass spectrometry

IC50 Half maximal inhibitory concentration

LE limonene-1,2-epoxide

LPS Lipopolysaccharide

MeCl Methylene chloride

MeOH Methanl

P450 cytochrome P450

ROS Reactive oxygen species

SFE Supercritical fluid extraction

SOD Superoxide Dismutase

TPC Total polyphenol contents

TFC Total flavonoid contents

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table 1. Taxonomical Hierarchy of *Torreya nucifera* ····· 8

Table 2. Limonenes aromatic substances ····· 20

Table 3. Research on *Torreya nucifera* leaves, branches and fruits, seeds ····· 46

Table 4. Yield of *Torreya nucifera* L. extract ····· 60

Table 5. IC50 values of DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) free radical scavenging activities of *Torreya nucifera* L. extract ····· 63

Table 6. IC50 values of ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging activities of *Torreya nucifera* L. extract ····· 66

Table 7. Total polyphenol contents of *Torreya nucifera* L. extract ····· 68

Table 8. Total flavonoid contents of *Torreya nucifera* L. extract ····· 70

Table 9. IC50 values of Acetylcholine esterase inhibition activities of *Torreya nucifera* L. extract ····· 77

Table 10. Identified substances from the oil extracts of *Torreya nucifera* ····· 80

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Figure 1. Development of cosmetics using *Torreya nucifera* L. ····· 3

Figure 2. Domestic distribution of *Torreya nucifera.* ····· 9

Figure 3. Various chemical structures of monoterpenes. ····· 13

Figure 4. Absorption and excretion route of monoterpenes. ····· 14

Figure 5. Conversion of limonene into derivatives. ····· 19

Figure 6. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) free radical scavenging mechanism. · 25

Figure 7. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging mechanism. ····· 26

Figure 8. Type of polyphenols. ····· 27

Figure 9. TPC(total polyphenol contents) measure mechanism. ····· 28

Figure 10. Type of flavonoids. ····· 29

Figure 11. TFC(total flavonoid contents) measure mechanism. ····· 30

Figure 12. MTT assay mechanism. ····· 34

Figure 13. NO assay mechanism. ····· 35

Figure 14. Correlation between oxidative stress, inflammation and AD. ····· 38

Figure 15. *Torreya nucifera* L. extraction method. ····· 49

Figure 16. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) free radical scavenging activities of Torreya nucifera L. extract.($p<0.05$) ····· 62

Figure 17. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging activities of Torreya nucifera L. extract.($p<0.05$) ····· 65

Figure 18. Cell viability of RAW264.7 cells of *Torreya nucifera* L. SFE extracts.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

RAW264.7 cells were treated with *Torreya nucifera* L. SFE extracts (25-100 μg/mL) for 24 h.($p<0.05$) ····· 72

Figure 19. Nitric oxide production of *Torreya nucifera* L. SFE extracts. RAW 264.7 cells were treated with LPS alone (1 μg/mL), or with LPS (1 μg/mL) and *Torreya nucifera* L. SFE extracts. (25-50 μg/mL) for 48 h.($p<0.05$) ····· 74

Figure 20. Acetylcholine esterase inhibition activities of Torreya nucifera L. extract.($p<0.05$) ····· 76

Figure 21. GC-MS chromatogram of *Torreya nucifera* L. extracts. ····· 79

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects of *Torreya nucifera* organic solvent extract containing monoterpene

Jun-geon Kim

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

Department of Beauty and Cosmetology,

Graduate School of Industrial Technology and Entrepreneurship,

Chosun University

Torreya nucifera leaves have excellent antioxidant effects, high flavonoid and polyphenol content, and have anti-inflammatory and cognitive function improvement effects. Monoterpenes are aromatic substances that are common and widely distributed in natural plants and have been widely used in complementary and integrative therapies and alternative medicine since ancient times. In particular, monoterpenes such as limonene and pinene have excellent antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory effects. Monoterpenes penetrate the body through the skin and nasal passages, travel to the blood vessels, circulate throughout the body, and affect the human body. In this study, the antioxidant, anti-inflammatory, and cognitive function improvement effects of *Torreya nucifera* leaves extract were confirmed using supercritical extraction and an organic solvent in which terpene-based aromatic substances are relatively highly dissolved among solvents for producing plant extracts.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 1장 서론

제 1절 연구의 배경

현대 사회는 빠르게 변화하고 있으며, 날이 갈수록 그 변화의 속도에 가속도가 붙고 있다. 끊임없이 변화하는 세상에 적응하기 위해 끊임없는 자기 계발과 발전이 요구되는 시대이며, 이에 수반되는 스트레스와 질병 또한 만연해있다.

스트레스는 필연적으로 수면의 질 저하, 호르몬 변화 등을 유발하는데 이러한 환경이 지속되면 뇌 신경에 미세한 염증이 발생하게 된다. 지속적인 염증 반응은 조직의 손상 및 발열 등의 증상을 유도한다[1]. 이와 같은 조직 손상으로 인한 반응으로 머리에 안개가 낀 것처럼 멍한 느낌이 지속되는 브레인 포그(brain fog)가 있다. 브레인 포그는 정신적 예리함과 인지력 저하, 집중력 저하, 멀티태스킹 능력 저하, 단기 및 장기 기억 상실 등을 포함하는 일련의 증상으로[2], 집중력 감소와 기억력 저하, 피로감, 우울 등의 증상을 동반하며 계속 방치하면 치매 발병 위험 또한 높아진다.

스트레스를 받으면 필연적으로 증가하는 산화 스트레스도 조직 손상, 염증을 일으키는데 이와 같은 산화 스트레스, 염증 반응, 신경 손상 등은 결과적으로 인지기능의 손상을 불러오기 때문에 이를 막기 위해서는 스트레스와 염증 관리 등이 필요하다.

다양한 스트레스에 노출된 현대인들의 건강과 힐링에 관심이 높아지고 있으며 이를 생활 속에서 해소하고자 하는 욕구도 높아지고 있다[3]. 이런 스트레스와 질병에 노출되어있는 현대인들에겐 간편하고 간단하게 일상생활에서 심신의 건강을 챙길수 있는 방법이 필요하며, 이런 사회적 배경에 따르면 간략한 방법으로 심신의 건강과 신경보호에 도움을 줄 수 있는 물질이나 방법론이 요구된다.

일상생활에서 심신의 건강을 챙길수 있는 방법으로 명상, 운동, 산책 등이 있지만 그중에서도 일상생활과 밀접한 관계를 지닌 화장품의 활용이 효과적일 수 있다. 근래 이어져 온 연구들에 의하면 화장품을 바르고 향수를 뿌리거나 하는 행위, 화장품을 사용하며 느끼는 만족감 등에 의해 노인의 치매 행동의 감소 되는 경향이 있다고 보고된 바 있다. 또한 레몬, 장미 등의 특정 향기를 맡으면 스트레스가 완화되고 일시적으로 집중력이나 기억력이 상승한다는 연구 결과가 있는데[4, 5], 특

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

정 향을 맡음으로써 집중, 기억력이 일시적으로 상승하는 것은 피부와 비강 등을 통해 체내로 침투한 향 분자가 뇌와 혈관 등을 돌며 몸에 직접적으로 영향을 미치기 때문으로 사료 된다.

이와 같은 향기를 활용하는 향수나 방향 제품 일부 또한 화장품에 속한다. 기초 화장품이나 자외선 차단제 등 그 밖의 다양한 화장품에서도 제품 이미지 구축과 사용감 개선 등을 위해 향기를 활용하는 경우가 많아 향기를 포함한 화장품의 활용이 일상생활의 스트레스 해소와 심신 건강에 대한 유용한 케어방법 중 하나가 될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 피부가 중추신경계와 직접적으로 연결되어 있어 살아있는 감각 수용 기관으로 볼 수 있다는 연구 결과가 있는데[6], 이를 뉴로코스메틱이라고 부른다. 화장품을 바르거나 하는 행위로 치매 행동이 감소하는 경우가 바로 이 피부와 감각신경 사이의 상호관계, 뉴로코스메틱과 연관이 있을 것으로 사료 된다.

따라서 본 연구에서는 화장품의 소재로 주로 이용되는 천연물, 그중에서도 식물 자원을 활용하고자 한다. 특히 비자나무는 피부와 비강을 통해 흡수되어 집중력과 기억력, 항산화 등 각종 생리활성에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있는 모노테르펜 리모넨을 다량 함유한 것으로 알려진 바 있다. 이런 특성을 활용하여 비자나무 잎의 항산화와 항염증, 신경보호 효과를 검증하고 활성 성분을 분석하기 위해 본 실험을 진행하였다. 본 연구의 목적은 모노테르펜이 함유된 비자나무 잎의 항산화, 항염증, 신경보호, 그러니까 항치매 효능에 대해 검증하고 이를 이용하여 치매를 완화할 수 있는 방향 제품을 개발하는 것이다(Figure 1).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

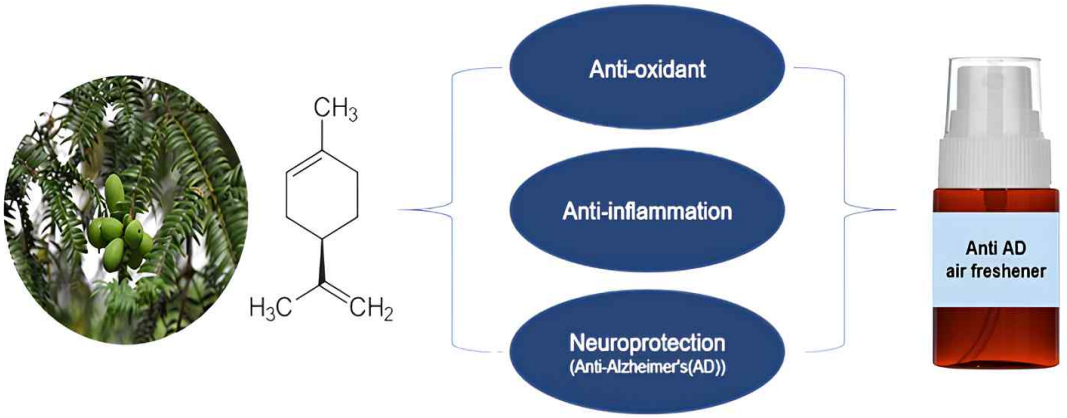

Figure 1. Development of cosmetics using *Torreya nucifera* L.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. 식물 원료의 활용

식물에는 항산화, 항염증, 항비만, 신경보호, 간 기능 개선, 피부 연화, 피부 보습 등 다양한 분야에 뛰어난 효능을 보이는 활성 화합물들이 많이 함유되어있어 예로부터 화장품과 약재 등의 원료로 사용되어왔다[7, 8]. 약용 식물에서 발견되는 활성 화합물은 식물의 자연적인 대사에 의해 생성되는 물질이며 많은 인간 질병과 기능 개선에 효과적이다. 의약품 개발을 위한 식물 화학 물질의 평가는 최근 수십 년 동안 광범위하게 이루어졌지만 이러한 식물 중 극소수만이 철저한 과학적 검사를 받았다. 따라서 이들 식물과 화합물의 생리활성에 대한 심도 있는 연구가 필요하다. 오늘날에도 역사적으로 사용된 식물과 식물에서 파생된 성분 중 일부는 여전히 약리학적으로 중요하게 활용되고 있으며, 현재 시판 중인 약재 중에서도 식물에서 추출한 성분을 주원료로 사용하는 경우가 많다. 진통제로 분류되는 아스피린이 대표적이며, 아스피린은 버드나무 껍질에서 추출한 살리실산을 이용해 만든 약으로 유명하다.

식물의 특정 성분만을 분리해서 사용하기도 하지만 식물의 활성 화합물이 그대로 함유되어있는 추출물을 온전히 제품에 활용하기도 한다. 화장품이 그 대표적인 예시인데 화장품은 피부에 문지르거나, 붓거나, 뿌리거나, 뿌리거나, 주사하거나, 그 밖의 다양한 방식과 인체를 청결, 미화하여 매력을 증진 시키거나 외모를 변화시키기 위한 목적으로 사용된다. 그중에서 식물 원료로 만든 화장품은 피부 기능에 영향을 미치고 피부와 모발에 영양분을 공급하는 다양한 식물 유래의 파이토 케미컬(phyto chemical)을 사용하여 제조된 제품이다[9].

화장품 시장에서는 이러한 식물 원료로 연꽃부터 시작하여 대나무, 히비스커스, 인삼 등 셀 수 없이 다양한 식물들을 사용하고 있으며, 원료 사용의 목적으로 보습과 피부 탄력보다는 제품 이미지 구축과 사용감 증진을 위해 특정 향료나 에센셜 오일을 첨가하기도 한다. 에센셜 오일은 식물 화합물의 중요하고 효과적인 성분 중 하나로, 효과적인 냄새와 향을 지닌 유용성 성분이다. 물과 증기 증류를 통해 분리하고 용매 추출과 효소적 가수분해를 통해 제조된다[10]. 에센셜 오일의 주요 성분인 모노테르펜 계열 물질은 관련 연구에 의하면 다양한 경로로 체내에 흡수되었을 때 긴장 완화, 면역 반응 조절을 통한 염증 감소 등 직접적으로 인체에 유효한 생리활성을 보이는 것으로 보고된 바 있다[10, 11]. 그 밖에도 이러한 식물의 활성 화합물 성분은 피부 탄력 개선, 콜라겐 분해 방지, 항산화 특성을 통한 자외선 차단,

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

주름 완화를 통한 피부 노화 지연 등 다양한 기능을 가지고있다[12].

화장품의 역할은 일반적으로 단순히 피부를 부드럽게 하거나 수분과 영양을 공급하는 것에 그치지만 피부와 모발의 아름다움은 건강, 일상생활, 일상 활동, 환경 및 유지 관리의 영향을 받는다[13]. 이는 피부, 모발 건강을 위한 활동이 단순 화장품을 바르는 것뿐만 아니라 그 밖의 좋은 향기를 맡음으로써 스트레스를 줄여준다거나 이를 통한 신경보호 효과를 통해 통증을 줄이는 등 심신의 건강을 케어 하는 데까지 확장될 수 있음을 의미한다. 따라서 일상생활과 밀접한 연관이 있는 화장품을 적절하게 사용하고 활용한다면 미용 증진 효과와 함께 심신의 건강, 인지기능의 손상까지도 예방할 수 있을 것으로 사료 된다.

그런 점에서 단순 피부 탄력, 주름뿐만 아니라 신경보호, 항산화, 항염증, 간 기능 개선과 긴장 완화 등의 영역까지 효과를 나타내는 식물 화합물의 성분을 이용한 화장품은 일상생활에서의 심신 건강에 굉장히 유효한 토탈케어의 수단이 될 수 있다. 지금까지는 식물 연구를 통해 화장품에 1차원적으로 피부와 직접 연관된 보습, 미백, 주름 개선 등의 성분만을 주로 확인하고 활용하였다. 앞으로는 본 연구와 같은 연구를 기반으로 식물의 효과적인 성분, 특히 향기 물질 모노테르펜과 같은 것들을 활용하여 미용뿐만 아니라 현대인들의 심신 건강을 케어 하는 제품을 개발할 수 있을 것으로 사료 된다.

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2. 비자나무(*Torreya nucifera)*

비자나무(*Torreya nucifera*)는 상록 겉씨식물이며, 대한민국 남부에 주로 자생하는 침엽수 소나무 강의 난대수종이다(Table 1). 척박하고 건조한 곳을 매우 싫어하며, 내음성이 강하지만 생장은 아주 느린 편으로, 주로 전라남도, 경상남도, 제주도 등지에 자생한다(Figure 1). 높이 25 m, 지름 2 m 정도까지 자라며, 줄기는 가지가 사방으로 퍼지고 껍질은 회색빛을 띠는 갈색이다. 잎은 끝이 뾰족하고 깃털처럼 양쪽으로 배열한다. 잎의 크기는 길이 25 mm, 폭 3 mm이고 털이 없으며 표면은 짙은 녹색, 뒷면은 갈색이지만 가운데 굵은 맥과 가장자리는 녹색이다. 암수딴그루이며, 생식기관은 4~5월에 작년에 생성된 가지에서 성숙한다. 수꽃은 길이 10 mm 정도의 계란 모양의 형태로 2년 지의 잎겨드랑이에 달린다. 암꽃은 새 가지 밑부분의 잎겨드랑이 한 군데에 2~3개씩 달리는데 5~6개의 녹색 포로 싸인 불규칙한 난형이며, 길이 6 mm 정도이다. 생잎과 가지에서 로즈마리, 자몽과 비슷한 약간은 톡 쏘는 것 같으면서도 산뜻하고 상쾌한 향기가 난다.

열매는 이듬해 가을에 익는데, 아몬드 같이 생겼다. 4월에 꽃이 펴서 가을에 익은 열매를 따서 껍질을 벗겨 버리고 햇볕에 말리며 그 열매를 비자(榧子)라고 한다. 종자는 거꾸로 선 달걀 모양으로, 녹색의 얇은 가종피로 싸여 있는 핵과상이며, 이듬해 9~10월에 녹색 타원형으로 익는다. 종자 표면의 부속물이 벌어지면 속에서 다갈색 종자가 나온다. 목재는 장기판, 바둑판을 만들며, 조각재, 의장재 등으로 이용한다. 잎과 가지는 구충 효과가 있어 모기향으로 쓰며, 종자에서 기름을 얻는다. 약용 식물로 구충, 급체, 마른기침, 가래, 여성 질환, 변비, 강장제, 탈모, 관절염, 치질, 부기에 효과가 있으며, 식용으로는 씨가 떫으면서도 고소해 술안주 등으로 먹기도 하나 독성이 있어 주의해야 하며 옛날에는 회충, 촌충 등의 구충제로 쓰였다.

비자에는 팔미트산(palmitic acid), 올레인산(oleic acid), 스테아르산(stearic acid) 등의 지방유와 타닌(tannin), 정유, 다당류 등이 포함된 것으로 확인된 바 있다[14]. 비자 열매의 연구로 한의서에 기재된 효능에 근거하여 구충 및 살충 효과에 중점을 둔 연구와 비자의 생리활성 물질을 분석하고 다양한 플라보노이드와 폴리페놀 성분을 중심으로 항산화 효과를 규명하는 연구들이 진행되었고, 이러한 비자의 항산화 효능을 응용하여 화장품 원료 등의 기능성 소재로 산업화도 되었다[7].

Torreya nucifera Siebold et Zucc 오일은 주로 리모넨, 델타-3-카렌(δ-3-carene) 및

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

알파-피넨(α-pinene)으로 구성되어 있으며, 디노프로스톤(prostaglandin E2, PGE2) 생산에 상당한 억제 효과를 가지는 고리형 산소화효소-2 선택적 억제제이다[15]. 디노프로스톤은 진통 촉진제이고 고리형 산소화효소-2는 염증과 통증을 유발하는 물질 형성을 촉진하는 효소로, 종양세포 성장을 촉진할 수도 있다. 비자나무 오일이 갖는 고리형 산소화효소-2 억제 효과는 비자나무 오일의 주성분인 리모넨의 효능과도 같으며, 그 밖에도 비자나무는 항암, 항염증 및 항산화 활성이 있다고 보고된 바 있다[13]. 비자나무는 높은 항균 및 항염증 효과를 가지고 있어 주로 에센스, 젤, 마스크, 바디 미스트 등의 화장품의 원료로 사용되며, 특유의 산뜻하고 상쾌한 향기가 있어 디퓨저, 캔들 등의 제품 소재로도 활용되고 있다.

다만 비자나무 소재의 활용으로는 예로부터 잎, 가지, 열매 중 주로 열매가 구충 효과를 지닌 것으로 알려져 있었으며, 급체, 가래 등 다양한 용도의 약용식재로 활용되어왔다. 근래 코로나바이러스(COVID-19)의 급속한 전파로 항바이러스에 관한 소재 연구가 활발히 진행되기 전까지 비자나무에 관한 연구는 주로 열매와 관련된 항산화, 항균, 항기생충(구충) 등의 연구가 대부분이었으며, 잎과 가지에 관한 연구는 다소 부족한 상황이다. 현재 코로나바이러스의 전파 이후로 잎과 가지에 관한 연구 또한 이루어지고 있으나 대부분 식물 자원의 기본적인 항산화, 항염증, 성분 분석 보다는 항바이러스 효과에 초점이 맞춰져 있다. 그러므로 본 연구가 비자나무와 모노테르펜 관련 후속 연구에 참고자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Taxonomical hierarchy of *Torreya nucifera*

Phylum	*Pinophyta*
Class	*Pinopsida*
Order	*Taxales*
Family	*Taxaceae*
Genus	*Torreya*
Species	*nucifera*

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

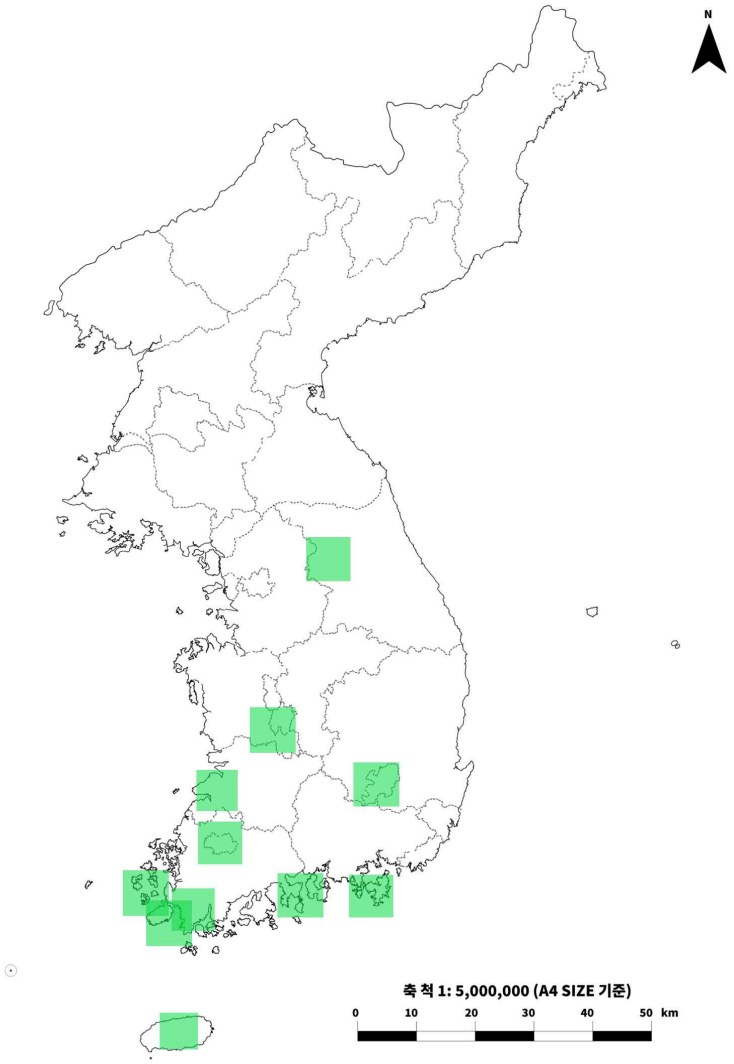

Figure 2. Domestic distribution of *Torreya nucifera*.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 모노테르펜(Monoterpene)

구조적으로 모노테르펜은 비 고리 또는 고리 구조로 구성된 두 개의 이소프렌 단위로 구성되며 산소작용화 된 형태(monoterpenoid)로 발견될 수 있어 다양한 화학 구조를 생성한다[16](Figure 3). 아이소펜테닐피로인산(isopentenyl pyrophosphate, IPP) 및 다이메틸알릴피로인산(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)으로부터 살아있는 유기체에서 생합성된 광범위한 천연 화합물 그룹으로 구성되며, 이는 차례로 메발로네이트(mevalonate) 또는 비메발로네이트(non mevalonate) 경로에 의해 생성된다[17]. 모노테르펜은 종을 가리지 않고 광범위한 식물들에서 매우 흔하게 발견할 수 있으며, 가볍고 휘발성이 높아 향이 잘 느껴지고 향의 강도 조절이 자유로워 주로 향수나 디퓨저, 캔들 등 방향 효과를 내는 제품에 향료로 활용된다. 모노테르펜은 또한 식물을 증류함으로써 얻어지는 에센셜 오일의 주요 성분이다. 에센셜 오일의 성분은 대부분 모노테르펜과 세스퀴테르펜으로 구성되어 있으며 매우 다양한 화학적 구성이 특징이다[18]. 에센셜 오일을 통한 아로마 테라피는 고대로부터 꾸준히 이어져 온 치료법으로, 피부 도포, 흡입, 구강 섭취 및 마사지 등 다양한 방법으로 적용할 수 있다[19].

또한 막연하게 치유 효과가 있다고 전해지던 과거와는 달리 현재는 아로마 테라피에 주로 사용되는 각종 에센셜 오일과 식물에 함유된 화합물의 항산화, 항염증, 항비만, 항당뇨 등에 대한 여러 가지 시험관 및 생체 내 생물학적 특성이 보고되었으며, 효과와 작용 기전이 연구되어 객관적이고 구체적인 데이터로 효능이 검증되었다[20-22]. 이는 항균 및 항산화와 같은 다양한 생물학적 활성으로 인해 방향 화합물뿐만 아니라 활성 분자로도 유용할 수 있음을 보여준다. 또한 향기에 의한 치유법은 대체의학의 하나로 심리, 신체적 건강을 개선하거나 유지하는데 탁월한 효과가 있다고 알려졌으며, 질병의 증상 완화, 심신 이완, 스트레스 반응감소 및 면역기능 증진 효과가 있어 통증을 완화 시키는 보완통합요법으로 주목받고 있다[23].

에센셜 오일에 대한 연구와 함께 에센셜 오일을 구성하는 다양한 모노테르펜 계열 물질들에 관한 연구 또한 진행되어 에센셜 오일뿐만 아니라 리모넨, 피넨 등의 모노테르펜 개별 물질이 나타내는 항산화, 항염증, 신경보호, 항균 등의 효과에 관한 연구도 활발하게 이루어지고 있다[10, 11]. 비교적 잘 알려진 모노테르펜으로는 레몬, 오렌지 등의 감귤류 과실 껍질에서 90% 이상의 비중을 차지하며 오렌지 특유의 향을 띄는 리모넨과 소나무 같은 침엽수 종과 로즈마리 등에서 주로 발견되

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

며 톡 쏘는 상쾌한 향을 띄는 피넨 등이 있다. 특히 피넨의 경우 흔히 피톤치드라고 칭하는 향기를 구성하는 주요 성분으로, 피톤치드의 구성성분은 대부분 모노테르펜으로 이루어져 있다.

모노테르펜은 구강 섭취, 피부 도포, 주사, 흡입 등을 통해 인체에 흡수되며, 빠르게 흡수되고 배출 또한 용이하다(Figure 4). 모노테르펜은 즉각적인 효과를 나타내는 만큼 효과가 일시적이기 때문에 자극에 대한 노출이 중단되었을 경우 그 영향도 빠르게 사라진다. 이런 즉각적이고 일시적인 효과는 개개인의 편차에 따라 간혹 발견되는 특정 자극이나 물질에 대한 알러지 등의 부정적인 반응에도 비교적 안전함을 의미할 수 있으며, 방향 물질을 통한 신체 활성화의 안전성과 유용성을 내포한다. 모노테르펜은 특히 휘발성이 높아 비강을 통해 공기와 함께 흡입되기가 쉬운데 항산화, 항염증 등의 효과를 가지고 있어 방향 물질의 흡수를 통한 신체 활성화를 일으키게 된다. 다음은 비강을 통한 모노테르펜 흡수 과정을 서술하였다.

향기는 여러 가지 경로를 통해서 체내로 들어오며, 그 경로에는 비강을 통한 뇌로의 침투와 피부, 폐 호흡을 통한 체내 혈관으로의 침투가 있다. 결과적으로 모노테르펜은 위 경로로 체내에 흡수되어 전신의 혈관을 돌면서 생리활성 효과를 나타내게 된다.

무언가 냄새를 맡는다는 것은 공기 중에 포함된 특정 화학 물질을 흡입한다는 것이며, 비강으로 흡입된 향 분자는 후각 상피의 미세한 털인 섬모를 자극하고 섬모에 존재하는 후각수용체와 결합하여 G단백질을 활성화한다. 그 결과 신호전달 물질 사이클릭 AMP(cyclic AMP, cAMP)의 양이 증가, 세포 외부로부터 양이온이 유입되며 세포 내외부의 전위차로 인해 흥분된 후신경세포에서 전기 신호가 발생한다. 이 전기 신호는 섬모와 연결된 가지돌기를 통해 후세포, 후신경의 후각망울(olfactory bulb)로 전달되고, 후각망울로 전달된 전기 신호는 다시 후각망울의 사구체(glomerulus), 후각망울 내 승모세포(mitral cell)와 방상세포(tufted cell), 전후신경핵으로 전달된다. 이후 후삭(olfactory tract)을 거쳐 전유공질(anterior perforated substance), 외측후각선조(lateral olfactory stria)를 타고 뇌 깊은 곳까지 도달한 후각 자극은 후결절(olfactory tubercle), 이상피질(pyriform cortex), 편도체(amygdala), 내후각피질(entorhinal Cortex)등을 자극한다.

그중에서도 편도체는 감정, 학습, 기억 등과 연관된 변연계의 시상(thalamus), 안

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

와전두피질(orbitofrontal cortex), 시상하부(hypothalamus)에 영향을 미치기 때문에 정서적 반응을 촉발할 수 있고, 시상하부의 자율신경을 자극하여 다양한 장기의 기능에 영향을 미치는 등의 현상이 나타날 수 있다[24]. 내후각피질은 감정과 기분을 조율하는 변연계의 해마체(hippocampal formation)를 자극하며, 특정 향을 맡음으로써 기분이 전환된다거나 어떤 장면이 연상되는 것을 이와 같은 신호전달 체계로 설명할 수 있다.

또한 모노테르펜은 폐로 흡입되는 공기 안에도 포함되어 있으며, 이 물질들은 비강 - 기도 – 폐 – 폐포 – 모세혈관을 통해 혈관으로 이동하여 전신을 돌게 된다. 인간의 후각수용체는 표피 세포나 피부 기저층에도 존재하며, 이 수용체는 모노테르펜에 의해 활성화되면 세포 증식을 자극하고 세포 내 사이클릭 AMP 의존 경로의 활성화와 세포 외 신호 조절 키나아제의 인산화를 유도하여 혈액 순환을 촉진하여 생리적 효과를 생성한다[24]. 이처럼 비강과 피부를 통해 모세혈관에 도달한 모노테르펜은 혈관을 통해 전신을 순환하게 된다.

일반적으로 모노테르펜의 추출 방법으로는 유기용매(organic solvent) 추출법과 초임계유체 추출법(supercritical fluid extraction, SFE) 등이 사용된다. 유기용매는 유기물질로 이루어진 다른 물질을 녹이는 물질을 말하며, 유상의 물질로써 물에 잘 녹지 않고 높은 휘발성과 세정력, 특이한 냄새를 가지는 것이 특징이다. 일반적으로 많이 사용되는 유기용매로는 메탄올(methanol, MeOH), 메틸렌 클로라이드(methylene chloride, MeCl), 헥세인(n-Hexane) 등이 있다. 메탄올은 메틸기와 하이드록실기가 공유 결합한 형태를 하고 있으며, 유기용매 식물조직체에서 생리 활성 물질의 추출에 가장 많이 사용하는 용매이다. 다양한 성분의 추출에 용이하고, 추출 후 분리, 정제 시 편리하다는 특징이 있다. 메틸렌 클로라이드는 다양한 유기 화합물을 녹일 수 있어 유기 화학 반응에서 용매로 많이 쓰이며 지방, 기름, 그리스 및 여러 중합체의 추출에 효과적인 용매이다. 헥세인은 강한 휘발성을 가진 유기용매로, 향료, 유지추출용의 용제로 자주 이용된다.

초임계유체 추출이란 온도와 압력이 액체와 기체의 임계점(supercritical point)을 넘어 액체와 기체를 구분할 수 없는 상태가 된 유체를 이용한 추출법이다. 초임계유체는 임계점을 넘어섰기 때문에 분자의 열운동이 격렬하며, 상변화를 동반하지 않고도 밀도를 이상기체에 가까운 희박한 상태로부터 액체에 가까운 고밀도 상태까지 연속적으로 변화시키는 것이 가능하다. 액체에 상당하는 용해력과 기체에 상

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

당하는 확산성이란 독특한 성질을 지니고 있으며, 공정 대상물이 열변성을 일으킬 염려가 적기 때문에 오일 및 향료 추출에 적합하다. 초임계 이산화탄소를 이용하는 추출공정은 인체에 무해 할 뿐 아니라 불연성이고 화학적으로 안정하다. 초임계 유체기술은 상용화된 유기용매를 대체할 수 있는 무독성이고 친환경, 저에너지 용매를 사용하는 기술이다[25].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

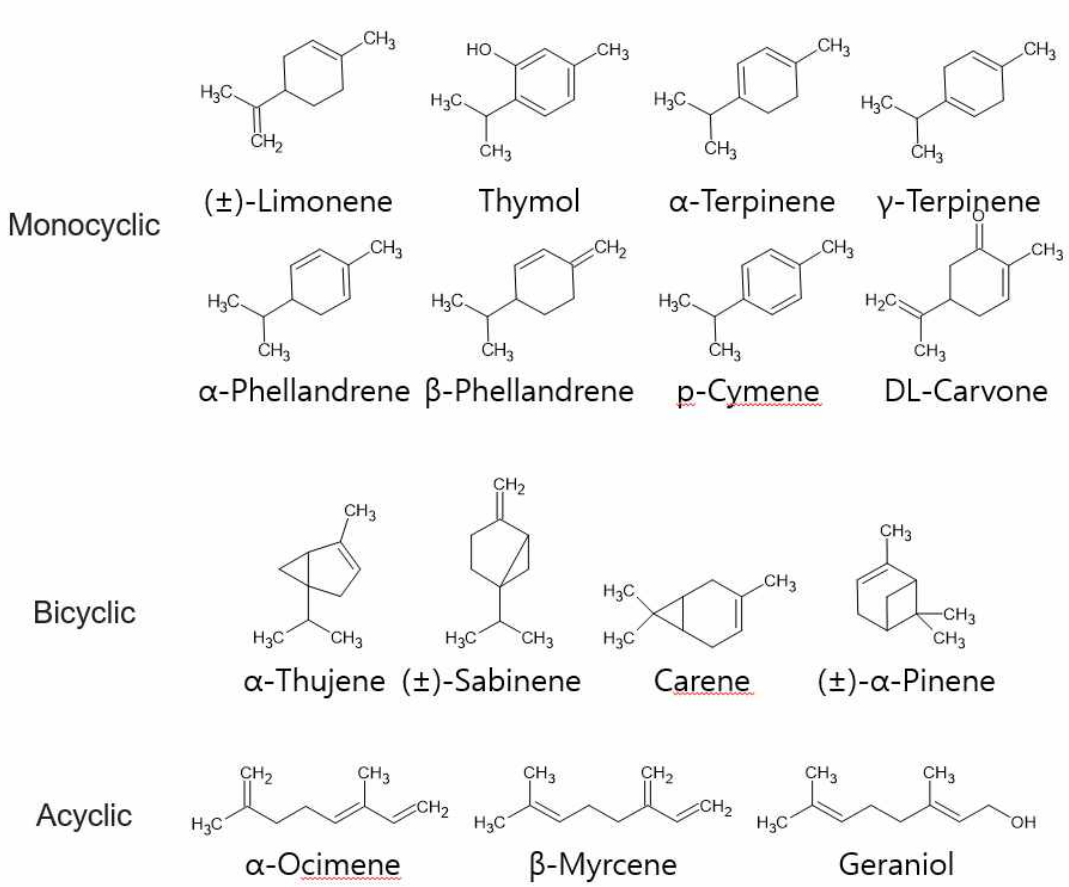

Figure 3. Various chemical structures of monoterpenes.

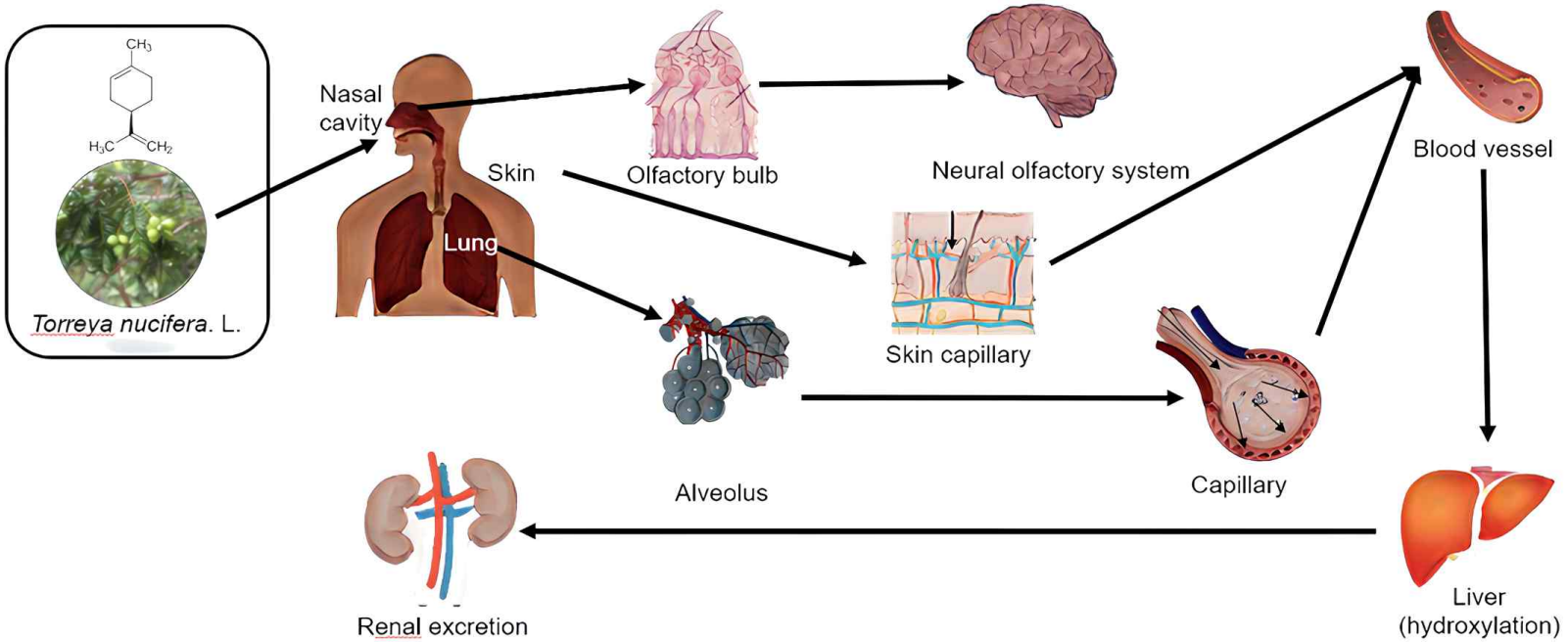

Figure 4. Absorption and excretion route of monoterpenes.

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

4. 리모넨(Limonene)

모노테르펜 물질에 속하는 리모넨은 다양한 식물에서 생성되며 유기 탄화수소(C_5H_8) 그룹인 순환 모노테르펜으로, 무색투명한 액체 형태의 지방족 탄화수소이다. 리모넨은 오렌지와 같은 냄새가 나는 방향 물질로, 주로 레몬, 오렌지, 자몽 등의 시트러스 류 껍질에 주로 존재한다[26]. 리모넨은 범용성이 높고 항산화, 항염증, 신경보호, 항비만, 항동맥경화, 항당뇨, 진통 등의 다양한 분야에서 강력한 효과를 나타낸다[27-29].

리모넨은 항산화 활성을 통해 세포의 손상을 막고 도파민, 세로토닌, 감마-아미노부티르산(ɣ-aminobutyric acid, GABA)와 같은 신경 전달 물질과 종양괴사인자-α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α), 인터류킨-1(interleukin-1, IL-1), 인터류킨-6(interleukin-6, IL-6) 등의 다양한 사이토카인, 그리고 핵인자 카파비(nuclear factor kappa B, NF-κB), 미토겐활성화단백질키나아제(mitogen-activated protein kinase, MAPK), 고리형 산소화효소-2와 같은 활성 염증 매개체를 조절하여 염증과 통증을 줄이고 신경을 보호하며, 불안, 긴장, 우울 및 수면의 질 또한 개선한다고 보고된 바 있다[30-35]. 또한 음식 섭취, 에너지 대사, 학습 및 기억, 신경 발생 및 신경보호에 관여하는 시르투인-1(silent mating type information regulation 2 homolog-1, sirtuin-1)의 상향 조절을 통해 염증 매개체의 활동을 억제함으로써 신경을 보호한다는 연구 결과가 있으며[36], 치매를 유발하는 인자 중의 하나로 알려진 아세틸콜린 분해효소(acetylcholine esterase, AChE) 및 부티릴콜린 분해효소(butyrylcholine esterase, BChE)에 대한 억제 활성을 나타냈다고 보고된 바가 있다[31]. 결과적으로 리모넨은 항산화와 면역 반응 조절을 통해 신경을 보호하고 진정, 긴장 이완 및 인지능력 손상 억제 등의 효과를 나타낼 수 있다[30-35].

리모넨은 또한 각 결합 부위의 산화 반응 등을 통해 리모넨-1,2-에폭사이드(limonene-1,2-epoxide, LE), 페릴릴알코올(perillyl alcohol), 카르본(carvone), 알파-테르피네올(α-terpineol) 등 다양한 유도체를 생성하는데(Figure 5, Table 2), 리모넨으로부터 생성된 유도체들은 항산화, 항염증, 항기생충 등의 다양한 생리활성을 나타낸다[37, 38].

리모넨은 사이토크롬 P450(cytochrome P450, P450)에 의해 에폭시화된다[39]. P450은 간에 존재하는 산화 효소로, 리모넨이 체내에 들어왔을 때 이를 배출하는 과정

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

에서 P450에 의해 LE가 생성된다. 에폭시화를 통해 형성된 LE는 신선하고 깨끗한 시트러스 향을 내는 것으로 알려져 있으며, 항산화, 항염증, 항불안, 통증 완화 효과를 나타낸다[40].

페릴릴알코올은 리모넨과 대장균 균주를 이용하여 생성되는 산화물이다[41]. 리날룰(linalool), 테르피네올(terpineol)과 유사한 향기를 내는 것으로 알려져 있으며, 항암, 항염증, 항산화, 항균 효과가 있다[42, 43].

알파-테르피네올은 라일락과 같은 향을 지닌 것으로 알려져 있다[44]. 항산화, 항암, 항경련, 항궤양, 항고혈압, 통증 완화, 항염증, 항균 화합물로서 광범위한 생물학적 효능을 나타내는 것으로 보고된 바 있다[45, 46].

카르본은 리모넨이 산화되어 생성되는 방향 물질로 스피어민트(spearmint)와 캐러웨이 씨(caraway seed)의 주성분이다. 항균, 항진균, 항기생충, 항뉴라미니다제, 항산화, 항염증 및 항암 활성 등 다양한 분야에서 효과를 나타낸다[47].

리모넨은 이런 리모넨류 방향 물질의 근간이 되면서 넓은 방면에 뛰어난 효과를 보이는 물질이다. 비교적 효과와 안전성이 검증된 물질이기도 하여서 다른 리모넨류 방향 물질들과의 비교연구가 활발하게 진행되었다. 현재 각각 유럽연합과 식품의약품안전처에 의해 알레르기 유발 물질로 지정되어 있어 피부에 직접 도포 하거나 감귤류에 대한 알레르기가 있을 시 사용에 주의가 필요하지만, 그 외에 세포 독성 실험 등에서는 대체로 안전한 모습을 보인다[48]. 설치류에서 심각한 유리질 비말 신독성, 간독성 및 신경독성이 보고 되었으나 이는 수컷 쥐에게만 해당하며 인간에게는 유효하지 않다[49].

또한 국제향료협회(international fragrance assosiation, IFRA)에서 발표하는 표준에 의하면 향기 제품 등에 함유된 적정 기준 내로 사용한다면 인체에 해롭지 않은 수준이라 보고 있다[50]. 그 밖의 미국의 식품의약국(food and drug administration, FDA) 등 각국의 검사 기관에서도 사용량 기준을 지킨다면 안전한 것으로 보고 있다.

리모넨은 자연 유래 성분으로, 거울상 이성질체이기 때문에 회전 편광 현상을 보이며 우회전성을 띄는 d-리모넨과 좌회전성을 띄는 l-리모넨, 그리고 이 두 가지 이성질체의 혼합물인 라세믹(racemic) 화합물 dl-리모넨이 있다. 그중에서도 d-리모넨은 주로 식품 향료 및 향수 등 향장 산업의 향료 제제로 주로 사용되며, 강한 세정

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

력을 가지고 있어 세제 원료로도 사용된다. 그 밖에도 일부 의약품의 제약 재료, 식물성 살충제, 3D 프린팅 및 음료 생산에서 효과적인 용매로 사용된다. 침엽수에서도 자주 관찰되는 l-리모넨은 향료 및 화장품과 솔벤트, 습윤제로 사용되며 수지 생산, 곤충 기피제, 동물 기피제 등으로 사용된다. 침엽수에서는 주로 l-리모넨이 관찰되나, 기존 비자나무 연구들에 의하면 dl-리모넨도 종종 관찰되기 때문에 본 연구에서는 d-리모넨과 l-리모넨, dl-리모넨을 모두 상정하여 연구를 진행하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

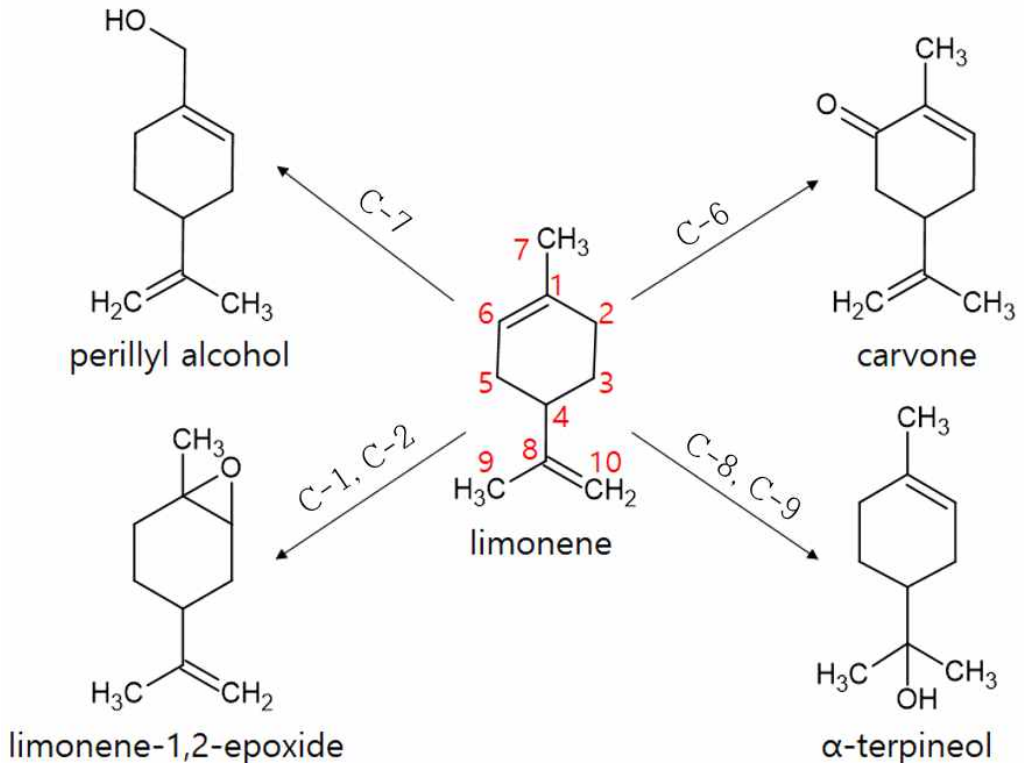

Figure 5. Conversion of limonene into derivatives[51].

Table 2. Limonenes aromatic substances

Substance	CAS No.	Molecular formula	Other names for this substance	Natural distribution
limonene	138-86-3	$C_{10}H_{16}$	1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene DL-limonene (±)-limonene (±)-α-limonene	lime, berry, dill, mint, herb, wood, vegetable, flower, moss and etc
limonene-1,2-epoxide	203719-54-4	$C_{10}H_{16}O$	limonene-1,2-epoxide (4R)-limonene-1,2-epoxide (4R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane	lemon, Hanrabong, salary and etc
perillyl alcohol	536-59-4	$C_{10}H_{16}O$	perilla alcohol perillol isocarveol	mints, cherries, citreous fruits, lavender, sage, peppermint, lemongrass, cranberries, perilla, wild bergamot, gingergrass, savin, caraway, celery seed, spearmint, thyme, rosemary[29, 30].
α-terpineol	98-55-5	$C_{10}H_{18}O$	alpha-terpineol terpineol 2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol	coriander, cannabis, cypress, cardamom, cajeput, pine, Melaleuca, orange, neroli, turpentine, star anise, marjoram, clary sage, petitgrain[42, 43].
carvone	99-49-0	$C_{10}H_{14}O$	2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-2-enone karvon 1-carvone	myrrh, spearmint, caraway seed, dill, coriander[44],

*CAS No. : Chemical Abstract Service Register Number

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

5. 항산화(Anti-oxidant)

항산화 활성은 수소원자이동(hydrogen atom transfer, HAT), 단전자전송(single electron transfer, SET), 환원력, 금속 킬레이트화 등 다양한 메커니즘을 사용하여 분석할 수 있으며, 분석의 방법에는 DPPH free radical scavenging assay(DPPH), ABTS cation radical scavenging assay(ABTS), oxygen radical absorbance capacity(ORAC) assay, superoxide dismutase(SOD) assay, and ferric reducing antioxidant potential(FRAP) assay 등이 있다[52, 53]. 항산화 물질로 대표되는 폴리페놀, 플라보노이드 정량 분석법으로는 총 폴리페놀 분석(total polyphenol contents)과 총 플라보노이드 분석(total flavonoid contens)이 있다.

DPPH, ABTS 항산화능 측정 방법은 기본적으로 산화-환원 반응을 토대로 시약과 샘플을 반응시켜 색이 변하는 정도에 따라 항산화능을 측정하는 실험이다. 항산화 물질이란 화학적으로 활성인 산소 분자나 다른 화학 물질, 특히 자유 라디칼(free radical)이라고 불리는 화학 물질들로부터 세포와 조직을 보호하는 역할을 하는 화학 물질이다. 자유 라디칼은 외부 궤도에 하나의 전자가 있는 원자 또는 분자로, 산소, 질소 및 황의 세 가지 요소에서 파생되는데, 가장 대표적인 자유 라디칼이 산소에서 파생되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이다. 활성 산소종에는 superoxide (O2·−), hydroxyl (HO·), peroxyl (ROO·), alkoxyl (RO·), nitric oxide (NO·) 등이 있는데 이들은 반응성이 매우 높고 근처 세포의 분자를 빠르게 공격하여 손상을 유발한다[54].

호흡 과정에서 일어나는 생물학적 연소는 필연적으로 산화-환원 반응의 매개체가 되는 활성 산소종을 생성한다. 산화-환원은 전자가 한 종에서 다른 종으로 전달되는, 생명체의 필수 대사 반응으로, 이 반응을 통해 생성된 활성 산소종은 정상적인 세포 기능과 세포 간 신호 교환에 중요한 역할을 한다. 다만 과도한 활성 산소종은 단백질, 지질 및 DNA에 누적된 손상을 가져와 산화 스트레스를 초래한다. 산화 스트레스는 인간의 노화와 세포 손상, 염증 및 다양한 질병의 원인이 되며, 산화 스트레스로 인한 DNA 복제 오류가 누적되면 암이 발생하기도 한다[55]. 따라서 항산화와 산화 사이의 균형은 건강한 생물학적 시스템의 유지에 매우 중요하다.

자유 라디칼은 분자의 최외각에 홀전자(비공유 전자)를 가짐으로 인해 반응성이 매우 높아져 주변 세포를 공격하게 되는데, 공격받아 산화된 세포는 장벽이 파열,

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

손상된다. 자유 라디칼은 생물학적 시스템에서 필연적으로 생성되고 외부적으로도 발생하며 돌연변이 유발, 발암, 심혈관 장애 및 노화와 같은 다양한 퇴행성 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다[56].

항산화 물질은 불안정한 상태의 자유 라디칼에 전자 혹은 수소를 공여해 중화시키거나 산화 과정을 억제하여 세포 손상을 예방한다. 또한 산화 스트레스로 인한 질병 발생을 줄일 수 있으며, 노화를 지연시키는 데 도움을 준다. 항산화 물질은 자연 물질, 화장품, 식품, 의약품 등 다양한 분야에서 연구되며, 건강 증진 및 질병 예방에 중요한 역할을 한다.

DPPH free radical scavenging assay에서 사용되는 DPPH 라디칼은 비교적 안정적으로 자유 라디칼 상태를 유지하는 유기 질소 라디칼(organic nitrogen radicals) 종으로, 분자가 이량체화(dimerization) 되지 않도록 전체적으로 분자에 대한 예비 전자의 비편재화(delocalization)가 되어있는 것이 특징이다[54]. 또한 ABTS 시약처럼 자유 라디칼 생성을 위한 대기 시간이 필요하지 않아 시약 제조 직후 실험에 사용할 수 있다. DPPH는 전자 또는 수소 공여체로 작용하는 항산화 화합물의 능력을 측정하고 물질의 항산화 활성을 평가하는 데 널리 사용되는 방법으로, DPPH 라디칼의 화학반응은 517 nm에서 최대 흡광값을 가진다. DPPH 내 자유 라디칼이 항산화 물질로부터 전자, 혹은 수소를 공여받으면 시약의 색이 보라색에서 노란색으로 변하게 된다(Figure 6).

ABTS radical scavenging capacity assay는 항산화제와 반응하기 전에 라디칼이 안정적인 형태로 직접 생성되는 과정이 필요하며, 과황산칼륨(Potassium persulfate, $K_2S_2O_8$)에 의해 ABTS·+ 라디칼 양이온으로 산화된다. 산화된 ABTS·+ 라디칼 양이온은 항산화 화합물에 의해 환원되며, 이 산화된 라디칼을 환원시키는 능력의 정도를 항산화능의 척도로 사용한다. ABTS·+는 친유성 화합물과 친수성 화합물 모두에 적용할 수 있다. ABTS·+ 라디칼은 DPPH 라디칼보다 반응성이 더 크며, 수소원자 이동을 포함하는 DPPH 라디칼과의 반응과 달리 ABTS·+ 라디칼과의 반응은 수소원자이동과 단전자전송을 모두 포함한다. 산화된 ABTS·+ 라디칼의 화학반응은 730 nm에서 최대 흡광 값을 가진다. ABTS·+ 내 라디칼이 항산화 물질로부터 전자, 혹은 수소를 공여받으면 시약의 색이 청록색에서 투명에 가까운 색으로 변하게 된다 (Figure 7).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

총 폴리페놀 분석은 화합물에 함유된 폴리페놀의 함량을 정량하기 위한 분석법이다. 폴리페놀은 매우 다양한 화학 구조를 지닌 2차 식물 대사산물로, 500개 이상의 폴리페놀이 일반적인 식품 및 음료로부터 확인되었다[57]. 일반적으로 폴리페놀은 방향족 고리(aromatic ring)에 여러 개의 수산기(-OH) 그룹을 가진 구조를 갖는다. 천연 폴리페놀은 활성 산소종에 대한 소거 특성과 단백질에 대한 착화 특성을 가진 귀중한 화합물로, 이러한 능력으로 인해 염증이나 암과 같은 다양한 질병의 치료뿐만 아니라 노화 방지 목적의 화장품 제제나 기능 식품 응용 분야에도 사용된다[58]. 폴리페놀은 또한 에이즈(AIDS), 심장 질환, 궤양 형성, 박테리아 감염, 돌연변이 유발 및 신경 장애와 같은 질병에서 약물로 사용할 수 있는 잠재적인 후보로 밝혀졌다.

폴리페놀은 여러 개의 수산기 즉, 결합에 참여하지 않은 전자들을 가지고 있어 높은 전자 공여능을 지니고 있다. 높은 전자 공여능은 필연적으로 산화 스트레스를 유발하는 활성산소에 전자를 공여하여 안정화하는 역할을 하며, 이를 통해 생물학적 시스템에서 활성산소를 효과적으로 억제할 수 있다. 폴리페놀은 함유된 페놀 고리의 수와 이러한 고리를 서로 결합하는 구조적 요소에 따라 여러 종류로 나뉜다[59](Figure 8).

폴리페놀은 페놀 시약인 Folin-Ciocalteu reagent가 탄산나트륨(Sodium Carbonate, Na_2CO_3)과 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 청색으로 발색하는 것을 원리로 함량을 측정한다. 탄산 나트륨은 염기성에서 반응이 일어나는 페놀 시약의 반응을 촉진하는 역할은 한다. Folin-Ciocalteu reagent의 화학반응은 750 nm에서 최대 흡광값을 가지며, 시약과 반응한 폴리페놀 화합물은 함량이 높을수록 노란색에서 짙은 암청색으로 변하게 된다(Figure 9).

총 플라보노이드 분석은 화합물에 함유된 플라보노이드의 함량을 정량하기 위한 분석법이다. 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 C6~C3~C6 배열의 15개의 탄소 원자로 구성된 저분자량 화합물로, 2개의 방향족 고리 A와 B로 구성되며 헤테로고리(heterocyclic ring) C 형태의 3개의 탄소 다리로 연결된다. 플라보노이드는 가장 흔하게 발견되는 식물 화학 물질로 자외선, 곰팡이, 기생충, 초식동물, 병원체 및 산화적 세포 손상으로부터 식물을 보호한다. 플라보노이드는 다시 여러 가지 하위 분류로 나뉘는데(Figure 10), 그중 플라본과 플라보놀이 가장 구조적으로 다양하고 널리 발생한다. 플라보노이드는 높은 산화-환원 전위능을 가지고 있어 특히 중요한

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

항산화제이며, 이런 특징으로 인해 환원제, 수소 공여체 등의 역할을 할 수 있다. 플라보노이드를 정기적으로 섭취하면 암 및 심장병과 같은 질병의 발병률을 감소시킬 수 있다.

플라보노이드는 실험에 사용되는 시약인 염화 알루미늄(Aluminium chloride, $AlCl_3$)과 초산칼륨(potassium acetate, CH_3COOK)과의 반응을 통해 플라보노이드 화합물이 노란색으로 발색하는 것을 원리로 함량을 측정한다. 플라보노이드 화합물의 화학반응은 415 nm에서 최대 흡광값을 가지며, 시약과 반응한 플라보노이드 화합물은 함량이 높을수록 투명에서 짙은 노란색으로 변하게 된다(Figure 11).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

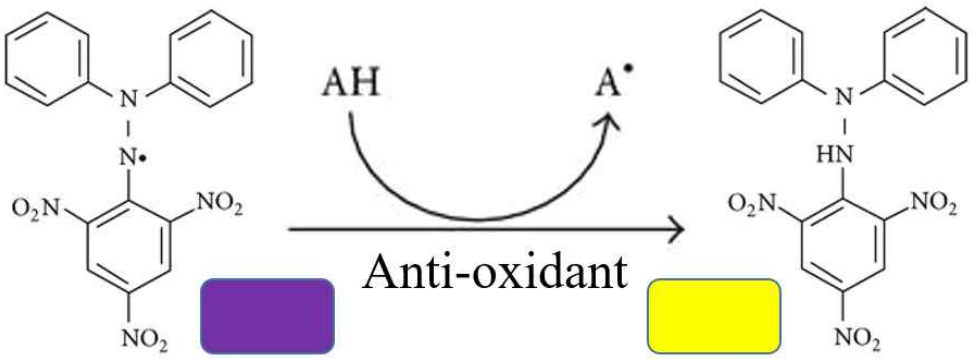

Figure 6. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) free radical scavenging mechanism.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

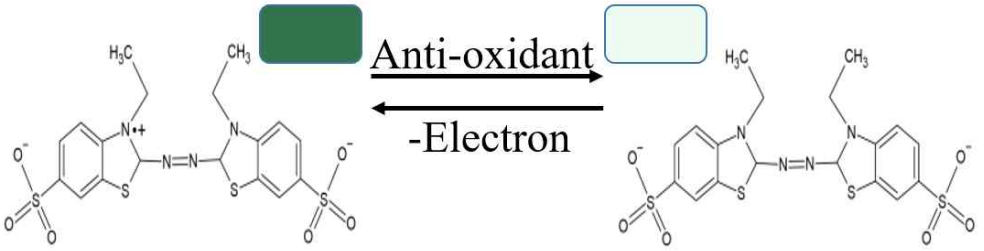

Figure 7. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging mechanism.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

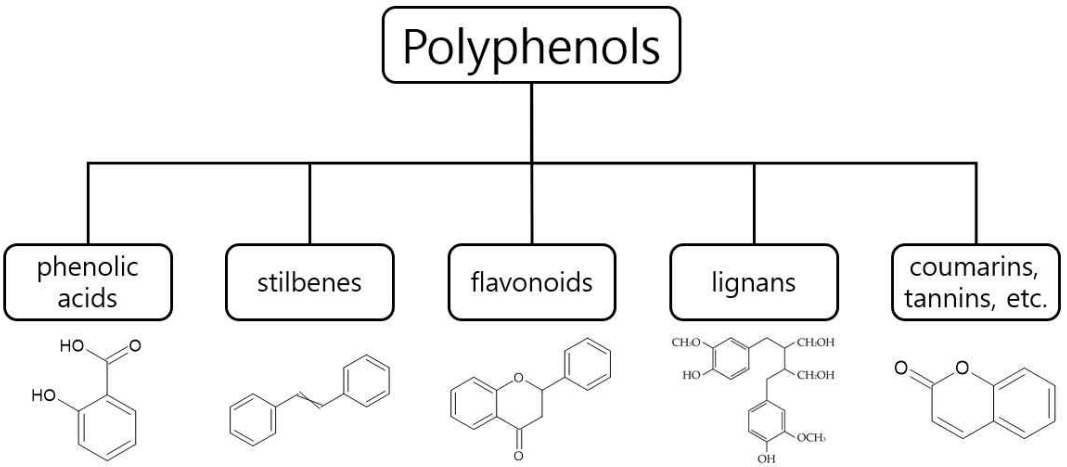

Figure 8. Type of polyphenols.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

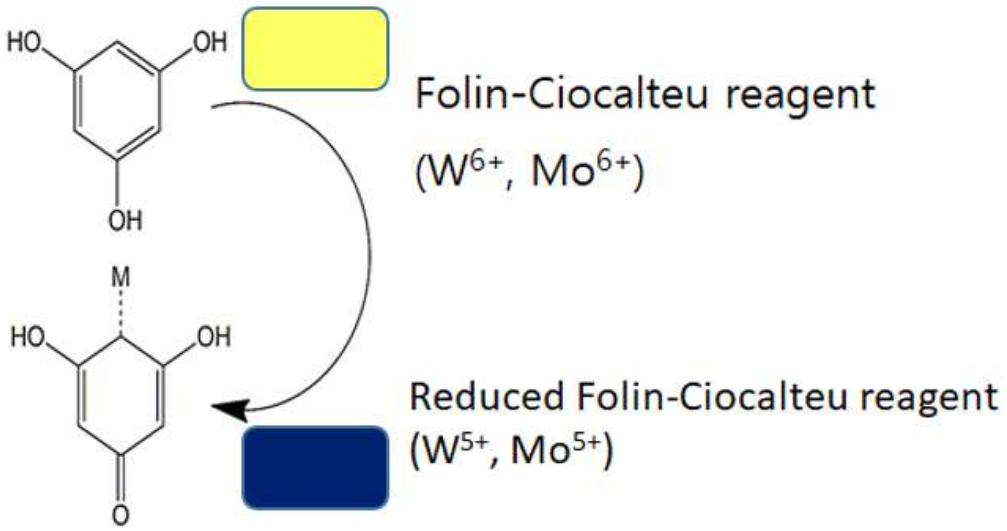

Figure 9. TPC(total polyphenol contents) measure mechanism.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

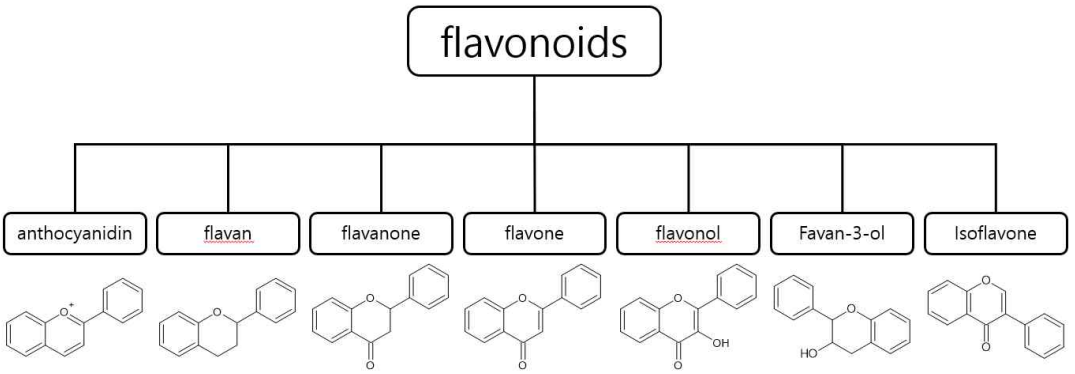

Figure 10. Type of flavonoids.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

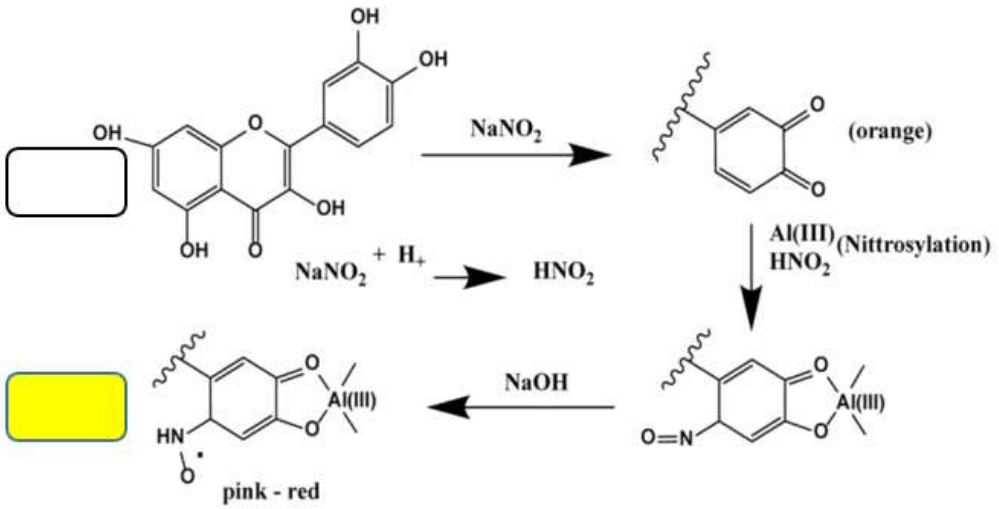

Figure 11. TFC(total flavonoid contents) measure mechanism.

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

6. 항염증(Anti-inflammation)

염증은 면역 반응에 의해 일어나는 병원체, 자극제 또는 손상된 세포와 같은 공격적인 물질에 대한 유기체가 취하는 보호 조치로, 혈관 조직의 복잡한 생물학적 반응이다. 하지만 염증 반응이 비정상적으로 지속되거나 면역 반응과 연계되는 염증에 의해 사이토카인(cytokine) 폭풍으로 잘 알려진 과도한 염증 반응이 일어나게 되면 오히려 세포 조직에 손상을 일으켜 다양한 질병을 유발하고 심할 경우 사망에 이를 수 있기 때문에 적절한 염증 반응의 조절이 필요하다.

염증은 급성과 만성으로 분류되며 국소 혈관계, 면역계 및 손상된 조직에서 발견되는 일련의 생화학적 사건들과 연관이 있다. 급성 염증은 초기 반응이며 혈액에서 손상된 조직으로 혈장 및 호중구 및 대식세포와 같은 선천 면역체계 세포의 이동이 증가하는 것이 특징이다. 만성 염증은 염증 반응 부위에 존재하는 세포 유형의 점진적인 변화와 관련이 있으며 손상된 조직의 파괴와 치유가 동시에 일어나는 것이 특징이다[60]. 염증의 표준 징후는 혈류 증가, 세포 대사 증가, 혈관 확장, 수용성 매개체 방출, 체액 유출 및 세포 유입으로 표현되며, 활성화된 대식세포와 혈관 내피세포는 내피세포의 수용체에 결합하는 종양 괴사 인자 및 인터류킨-1과 같은 염증성 사이토카인을 방출하여 접착 분자 E의 생성을 상향 조절하여 염증 반응을 유지한다[61].

염증 반응은 매우 복잡하고 다양한 경로로 자극되는 생리활성 반응으로, 일반적으로 외부의 자극으로 발생하지만, 산화 스트레스나 오작동으로 발생하기도 한다. 이 반응은 주로 조직 상주 대식세포에 의존하며 기초 항상성 상태와 전형적인 염증 반응 사이의 중간 상태이다[62]. 활성 산소종에 의한 전사 인자 및 염증 유발 유전자의 활성화는 염증의 시작을 초래한다. 염증에 의해 면역 세포는 다양한 다른 면역 세포를 산화 스트레스가 발생한 부위로 모집하기 위해 다양한 사이토카인과 케모카인을 분비한다. 염증 부위에서 면역 세포에 의한 향상된 활성 산소종 생성은 추가적인 산화 스트레스와 조직 손상 및 염증을 유발한다.

외부 침입이 아닌 산화 스트레스에 의한 염증은 단핵구, 대식세포, 림프구, 과립구 및 혈장 세포 등의 면역 세포가 혈관 벽으로 침윤되거나 면역 세포의 조직 내 유출 및 이들 세포에 의한 활성 산소종 방출로 인해 조직 손상을 초래하는 병리학적 상태이다. 과립구는 주로 NADPH(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 산

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

화효소 2를 통해 활성 산소종을 생성하며, 이 활성은 촉매 서브유닛 gp91phox(NOX2)를 통해 매개된다. 자연적으로, 또는 효소에 의해 생성된 산소(O_2-)는 과산화수소(H_2O_2)로 변형된다. 과산화수소는 효소인 골수세포형과산화효소(Myeloperoxidase, MPO)에 의해 수산기 라디칼(·OH) 또는 차아염소산(HOCl)과 같은 반응성이 높은 다른 라디칼을 유발한다. 이 두 라디칼은 다양한 단백질 등을 산화시키는 것 외에도 조직 손상을 일으킬 수 있다[63].

염증 세포에 의해 생성된 활성 산소종은 염증 증폭으로 이어지는 경로를 자극한다. 활성 산소종에 의해 유도된 단백질 인산화효소 C(protein kinase C, PKC), C-Jun-N-terminal kinases(JNK) 및 p38 미토겐 단백질 인산화효소(mitogen activated protein kinase, MAPK)와 같은 인산화효소의 활성화는 전사 인자의 생성을 촉진하여 전염증성 사이토카인과 케모카인의 생성을 촉발한다. 이러한 사이토카인과 케모카인은 다시 활성 산소종을 생성하도록 확립된 각각의 혈소판 유래 성장 인자 수용체, 혈관 내피 성장 인자 수용체, 표피 성장 인자 수용체 등에 결합한다[64]. 결과적으로 더 많은 활성 산소종이 생성되고 산화 스트레스가 증가한다.

활성 산소종은 종양괴사인자-α, 인터류킨-1, 인터류킨-6 및 단핵세포 화학주성 단백질-1/2(monocyte chemotactic protein-1/2, MCP-1/2), 대식세포 염증단백질-1/2(macrophage inflammatory protein-1/2, MIP-1/2)와 같은 케모카인의 생성을 촉진한다. 또한 전사 인자 핵인자 카파비를 통해 플라스미노겐활성화인자억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), 대식세포 이동저해인자(macrophage migration inhibitory factor, MMIF), 유도성산화질소합성요소(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 기질금속단백질분해효소-2/9(matrix metalloproteinase-2/9, MMP-2/9)의 발현을 유도한다[65].

그중 유도성산화질소합성요소는 산화질소(Nitric oxide, NO)를 생성하는 3가지 효소의 일종으로 대식세포에서 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS) 자극에 급격하게 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다[66]. 유도성산화질소합성요소는 염증 반응에서 전염증 매개체의 발현에 조절 역할을 하며, 유도성산화질소합성요소의 억제는 항염증 작용과 밀접한 연관이 있다.

염증은 또한 뇌 신경과도 밀접한 연관이 있는데, 염증 반응은 뇌 조직의 염증과 손상을 초래하며, 역으로 사이토카인 생산이 염증 반사를 통한 신경 입력에 제어되

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

기도 한다. 전기적 또는 약리학적 방법으로 콜린성 항염증 경로를 자극하여 AChE를 억제하면 중추 무스카린 수용체 매개, 미주신경 및 니코틴성 아세틸콜린 수용체 알파7(nicotinic acetylcholine receptor α7, α7nAChR) 의존 메커니즘을 통해 종양괴사인자 및 기타 전염증성 사이토카인의 전신 수준이 크게 억제된다[67].

항염증 실험은 이러한 염증 반응을 억제하거나 감소시키는 효과를 연구하고 측정하기 위한 실험으로, 신약 개발, 의학 연구, 식품 및 자연물의 염증 억제 효과 평가 등 다양한 분야에서 중요하게 활용된다. 특히, 산화질소는 염증과 관련된 생리학적 과정에서 중요한 역할을 하는 분자 중 하나로, 혈관 확장, 면역 반응, 뉴런 전달 등 다양한 생리학적 기능을 조절한다. 그러나 과도한 산화질소 생성은 과도한 염증 반응을 촉진시키고 조직 손상을 일으킬 수 있으므로, 산화질소의 수준을 조절하는 것이 중요하다.

항염증 실험은 일반적으로 세포 독성 실험(MTT assay)와 산화질소 측정(NO assay) 두 가지로 진행된다. 세포 독성 실험은 세포 독성을 확인하는 실험으로, 살아있는 세포는 미토콘드리아 환원 효소(mitochondrial reductase)를 방출한다. 미토콘드리아 환원 효소가 MTT 시약과 반응하게 되면 시약 중심부의 고리가 효소에 의해 끊어지면서 포르마잔(formazan)이 형성되어 시약의 색이 보라색으로 변하게 된다(Figure 12). 이를 이용해 배양한 세포에 시험 물질을 처리하고 MTT 시약을 가하여 색 변화를 관찰함으로써 시험 물질에서 세포가 얼마나 살아남았는지 확인할 수 있다.

산화질소 측정은 대식세포의 활성을 측정하는 방법으로, 세포 내에 존재하는 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO)의 양을 정량하는 실험이다. 주로 사용되는 세포는 수컷 쥐의 대식세포에서 기원한 Raw 264.7이며, NO는 대식세포가 분비하는 강력한 세포 독성물질로 염증을 유발하는 활성 산소종의 일종이다. 배양된 세포에 지질다당류를 가하여 산화질소 생성을 유도한 후, 시험 물질을 처리한다. 산화질소 측정에서 생성된 질산화물의 양은 그리스 시약(Griess reagent)을 사용하여 간접적으로 측정할 수 있는데, 이를 통해 시험 물질이 얼마나 효과적으로 질산화물을 억제할 수 있는지를 측정할 수 있다(Figure 13).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

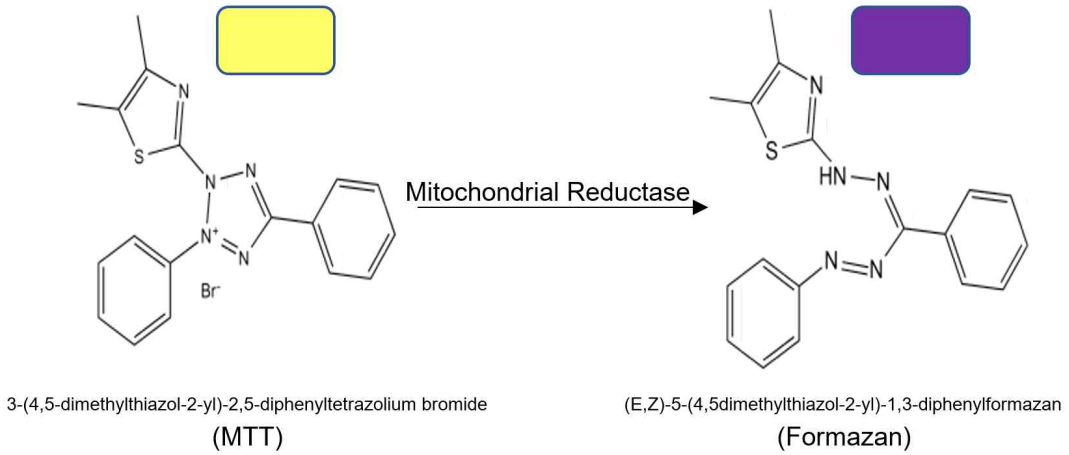

Figure 12. MTT assay mechanism.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

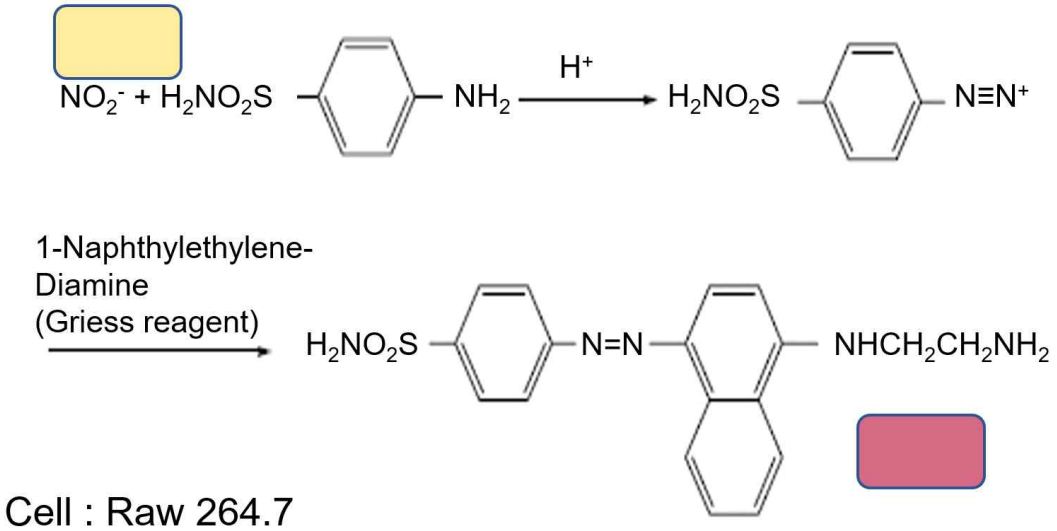

Figure 13. NO assay mechanism.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. 신경보호(Neuroprotection)

AChE란 중추신경계에서 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)을 아세트산과 콜린으로 분해하는 효소를 일컫는다. 체내의 대표적인 신경전달 물질 중 하나인 ACh는 콜린성 신경계에 주로 분포하는 기억 메커니즘의 핵심 요소 중 하나로, 아세틸콜린 합성효소(choline acetyltransferase, ChAT)의 작용을 받아 아세틸 보효소 A(acetyl CoA)와 콜린(choline)이 합성됨으로써 만들어진다. 신체가 항상성을 유지하여 적절한 수준으로 ACh를 분해한다면 이상이 없지만, 과도하게 AChE가 생성되어 농도가 증가하면 뇌 신경세포의 ACh이 과도하게 분해되어 기억 및 인지기능 장애가 유발될 수 있다[68]. 다만 비정상적으로 ACh이 발현되면 동공 축소, 서맥, 다한, 폐부종 등의 증상이 나타날 수 있기 때문에 적절한 조절이 필요하다.

AChE는 알츠하이머(AD)의 중요한 두 가지 병원성 인자 중 하나로, 다른 하나인 아밀로이드-베타(amyloid-β, Aβ)와도 밀접한 연관이 있다. 알츠하이머는 진행성 기억 상실, 언어 능력 저하 및 기타 인지 장애, 심각한 행동 이상을 특징으로 한다. 알츠하이머 환자의 뇌는 콜린성 뉴런의 손실과 학습, 기억에 관여하는 해마, 기저전뇌, 피질 등 특정 부위의 시냅스 수가 감소하는 것이 특징이다. 알츠하이머 환자의 뇌에서는 AChE의 활성이 증가하고, 이는 ACh의 감소로 이어진다. AChE와 Aβ는 상호보완적으로 서로를 증가시키며, AChE의 이러한 특성은 Aβ와 효소의 주변적 음이온 위치(peripheral anionic site, PAS) 사이의 상호작용에서 비롯된다[69]. 상호작용을 통해 증가한 AChE와 Aβ는 복합체를 형성하고 응집체보다 독성이 강한 AChE-Aβ 복합체는 세포에 대한 독성 효과를 더욱 증가시켜 AD를 악화시킨다[70]. AChE는 활성 산소종과 밀접한 연관이 있다. 활성 산소종은 염증 및 산화 스트레스를 유발하며, 유발된 염증과 산화 스트레스는 신체 조직에 손상을 주고 다시 활성 산소종을 증가시킨다. 증가한 활성 산소종에 의해 늘어난 산화 스트레스는 뇌 조직의 염증과 손상을 유발하며, Aβ를 증가시킨다. Aβ의 증가는 산화 스트레스에 의해 매개되어 AChE의 증가로 이어지며(Figure 14), 과도한 ACh의 분해는 치매를 유발한다. 이때 비타민 E와 같은 산화질소 억제제가 AChE 활성을 억제함으로써 아세틸콜린 시냅스 수준의 유지에 중요한 역할을 한다[71].

AChE는 염증과도 연관이 있는데, 전기적 또는 약리학적 방법으로 콜린성 항염증 경로를 자극하여 AChE를 억제하면 중추 무스카린 수용체 매개, 미주신경 및 니코

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

틴성 아세틸콜린 수용체 알파7 의존 메커니즘을 통해 종양괴사인자 및 기타 전염증성 사이토카인의 전신 수준이 크게 억제된다. 항산화, 항염증 효과가 있는 화합물은 AChE의 활성을 억제할 수 있고, 화합물에 의해 억제된 AChE로 인해 염증 반응이 줄어들게 된다. 따라서 항산화, 항염증 효과를 통해 AChE를 억제 함으로써 ACh 분해와 Aβ 축적 완화 및 추가적인 염증 완화 효과를 볼 수 있을 것으로 예상되며, 이를 통해 기억 및 인지기능의 손상을 완화하고 AD를 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

AChE를 억제하는 물질로는 현재 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galantamine)이 주로 사용되고 있다. 이러한 항 AD 약물을 장기간 사용하면 두통, 변비, 혼돈, 현기증, 메스꺼움, 구토, 식욕 부진, 배변 빈도 증가 등의 부작용이 발생할 수 있으며, 이는 환자의 삶의 질에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 앞서 언급한 부작용을 일으키지 않는 알츠하이머 치료를 위한 효과적인 치료 접근법이 필요하다. 따라서 천연자원에서 활성 화합물을 스크리닝하고 식별하는 것이 이상적인 접근 방식이며, 생강, 울금, 강황 등의 천연물과 에센셜 오일, 그리고 리모넨, 피넨, 카렌 등의 모노테르펜 성분들의 효과가 보고된 바 있다[72-74].

본 연구에서는 천연자원인 비자나무 잎을 이용하여 AChE에 영향을 미치는 활성산소종에 대한 실험으로 항산화 실험, 염증에 대한 실험으로 항염증 실험, 치매의 주요 원인 물질 중 하나인 AChE의 억제에 대한 실험을 진행하였다.

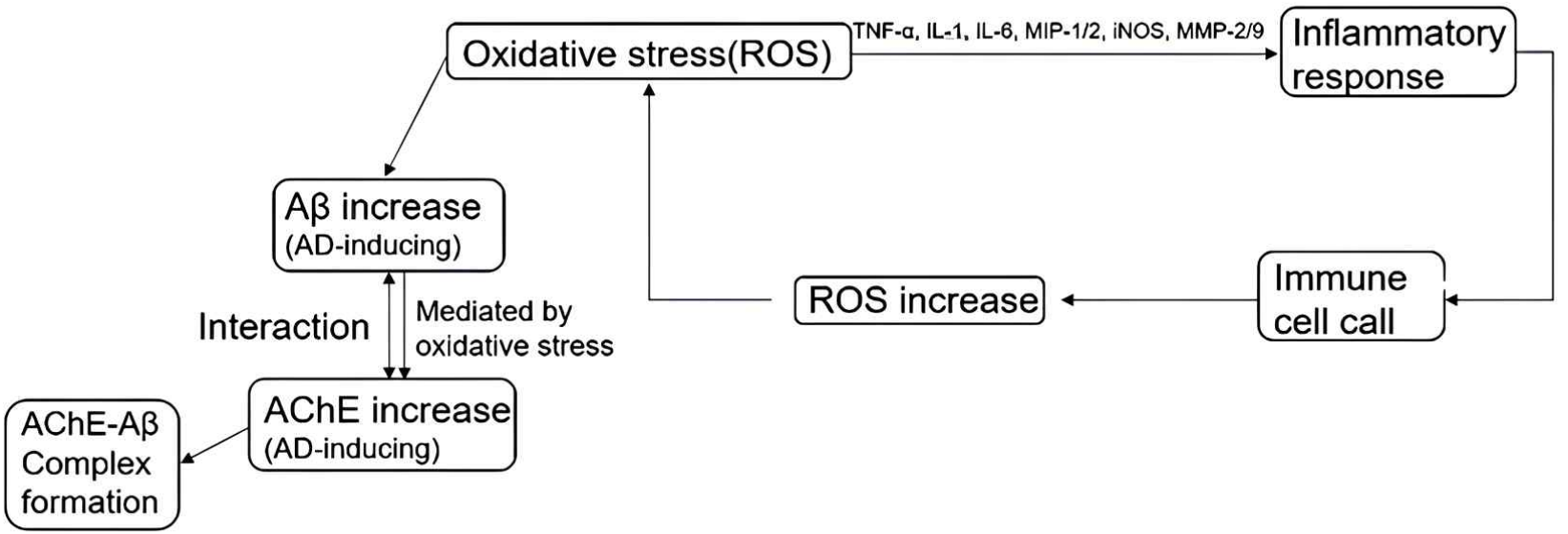

Figure 14. Correlation between oxidative stress, inflammation and AD.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2절 연구 동향 및 목적

다양한 스트레스에 노출된 현대인들의 건강과 힐링에 관심이 높아지면서 일상생활에 적용이 가능한 스트레스 관리법에 대한 필요성이 대두되었다. 이를 위한 방법으로는 명상, 운동, 산책 등이 있지만 그중에서도 식물 원료를 주성분으로 한 화장품의 활용이 효과적일 수 있다. 식물에는 항산화, 항염증, 항비만, 신경보호, 간 기능 개선, 피부 연화, 피부 보습 등 다양한 분야에 뛰어난 효능을 보이는 활성 화합물들이 많이 함유되어있어 예로부터 화장품과 약재 등의 원료로 사용되어왔다. 또한 화장품 중에는 향기를 주된 요소로 하는 향수 등이 포함되는데, 향수에 주로 사용되는 향료로써 식물로부터 추출한 각종 에센셜 오일은 긴장 이완, 스트레스 완화 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

근래 에센셜 오일에 대한 과학적 연구가 많이 진행되었고, 이에 따라 에센셜 오일을 구성하는 세부 성분, 모노테르펜에 관한 연구 또한 활발하게 진행되고 있다. 모노테르펜은 일반적으로 항산화, 항염증, 항기생충, 항균 등의 다양한 생리활성을 보여 암과 질병 치료, 신체의 항상성 유지 등에 도움을 줄 것으로 기대되는 유망한 물질군이다. 모노테르펜을 이용한 의약품, 화장품 등의 여러 가지 소재 개발 적용에 관한 연구 또한 활발히 진행되고 있다.

다만 현재까지 모노테르펜 계열 물질에 초점을 맞춰 진행된 국내 연구가 많지 않으며, 아직 연구되지 않은 국내 자생 천연물 소재 또한 많다. 특히 본 연구에 사용된 비자나무는 대한민국 남부에 주로 서식하는 침엽수 난대수종으로, 모노테르펜 성분 중 리모넨을 과량 함유한 것으로 알려져 있다. 비자나무는 잎과 가지보다 씨앗과 열매의 연구가 많이 진행되었으며, 그중에서도 잎의 모노테르펜 성분에 초점을 맞춘 신경보호 효과에 관한 연구가 없어 본 연구를 진행하게 되었다.

활성 산소종 억제를 통한 항산화와 염증 반응의 억제 사이에는 긴밀한 상관관계가 있는 것으로 확인되었다. 적절한 수준의 활성 산소종은 인체 내부에서의 신호전달을 돕고 여러 외부 침입 병원체와 반응하여 이를 불활성 시키는 역할 등을 하여 인체에 유익한 부분이 있으나, 활성 산소종이 과도하게 분비되면 세포 손상 및 염증 반응이 일어나 장기적으로는 각종 질병을 유발한다. 활성 산소종으로부터 발생하는 산화적 손상을 억제하기 위해서는 주사, 섭취, 흡수, 흡입 등의 여러 가지 경로를 통해 항산화 물질을 체내로 받아들여야 한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

염증 반응은 외부 자극에 대응하는 신체의 자연스러운 보호 반응이나, 과도한 염증은 세포 손상 및 활성 산소종 발생을 유발하여 장기적으로 각종 질병을 유발한다. 이는 신체의 항상성을 깨뜨리고 더 큰 질병을 유발할 뿐만 아니라 Aβ의 축적과 AChE의 생성 및 Aβ와 AChE의 상호보완적 생성 증가를 촉진하고 인지기능에 손상을 일으킨다.

현재 AChE의 억제제로 사용되고 있는 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galantamine)은 모두 매우 강력한 효과를 보이지만 그만큼 부작용도 다양한 것으로 알려져 있으므로 이에 대한 대안이 필요한 상황이며, 부작용을 최소화하며 적절한 효과를 얻기 위해서는 뛰어난 생리활성을 보이는 천연물에 관한 연구가 불가피할 것으로 보인다.

그러므로 본 연구에서는 항산화와 항염증을 통한 AChE의 억제와 이들 간의 상관관계. 항산화, 항염증, AChE 억제능을 가진 모노테르펜이 다량 함유된 비자나무 잎 유기용매 추출물의 항산화, 항염증, AChE 억제능 실험을 통해 비자나무 잎의 생리활성 효과를 검증하고 비자나무 잎 유기용매 추출물의 신약 및 화장품 후보 성분으로서의 잠재성을 확인하는 것을 목적으로 한다. 본 연구는 관련 분야의 후속 연구에 참고자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2장 문헌 검토

제 1절 비자나무(*Torreya nucifera*)에 대한 리뷰

1. 비자나무(*Torreya nucifera*)의 성분 및 화합물

비자나무 에센셜 오일의 주요 성분으로 테르페노이드(terpenoid)에 해당하는 모노테르펜 (63.7%), 세스퀴테르핀(sesquiterpenes) (30.7%), 디테르펜(diterpenes) (1.02%)이 확인된 바 있으며, 그중 가장 높은 비중을 차지하는 모노테르펜의 주요 성분으로 dl-리모넨 (30.1%), 델타-3-카렌 (15.37%), 알파-피넨 (11.5%), 감마-카디넨(δ-cardinene) (6.87%)이 보고된 바 있다[75].

비자나무가 74.2%를 차지하는 장성군 백양사 사찰림 비자나무 임분의 대기 중 천연휘발성유기화합물(Natural Volatile Organic Compounds, NVOCs) 측정 결과 리모넨과 피넨이 주요 성분이었다. 측정은 미니 펌프 포집과 플럭스 포집 두 가지 방법으로 진행되었는데, 미니 펌프 포집 결과 리모넨이 가장 적게는 7월에 20.6%, 가장 많게는 4월에 70.2%가 측정되었다. 피넨은 가장 적게는 4월에 24.6%, 가장 많게는 7월에 66.4%가 검출되었으며, 리모넨이 많이 검출되면 피넨이 적게 검출되고 피넨이 많이 검출되면 리모넨이 적게 검출되는 것이 특징이다. 리모넨과 피넨의 합은 73.2%~94.8% 사이로 나타나는 것으로 확인되었다.

플럭스 포집 결과 리모넨이 가장 적게는 10월에 15%, 가장 많게는 5월에 49%가 측정되었다. 피넨은 가장 적게는 5월에 32.3%, 가장 많게는 10월에 75.6%가 검출되었으며, 리모넨과 피넨의 합은 75%~90.6% 사이로 나타나는 것이 보고된 바 있다[76].

폴리페놀에 해당하는 성분으로는 (+)-카테킨((+)-catechin), (-)-에피카테킨((-)-epicatechin), (+)-갈로카테킨((+)-gallocatechin), (-)-에피갈로카테킨((-)-epigallocatechin), 3'-O-methyl-(+)-catechin, 3'-O-methyl-(+)-epicatechin, 프로토카테츄산(protocatechuic acid)이 확인된 바 있다[77].

그 밖에 비자나무 잎에서 디테르펜으로써 18-옥소페루기놀(18-Oxoferruginol), 18-디메톡시페루기놀(18-dimethoxyferruginol) 등이 확인, 분리된 바 있다[78, 79].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 비자나무(*Torreya nucifera*)의 생리활성

비자나무의 생리 활성으로는 주로 열매에 관한 연구가 진행되어있으며, 항균, 뇌신경보호, 항산화, 항염증, 항당뇨, 항기생충, 항노화 등의 효능이 있다고 보고된 바 있다[80]. 잎과 가지에 관한 연구는 비교적 최근 코로나바이러스의 발생 이후로 항바이러스 물질에 관한 관심이 높아지면서 조금씩 진행되었다. 이런 특수성으로 인해 비자나무 잎, 가지에 관한 연구는 일반적으로 기본적인 항산화, 항염증, 물질분석 등의 연구가 주로 진행되는 기타 천연 식물과는 달리 추출물에서 항바이러스에 효과가 있다고 알려진 바이플라보노이드(biflavonoid), 디테르페노이드(diterpenoids) 등의 특정 물질을 분리하고 그 물질의 효능을 확인하는 연구에 치중된, 다소 상이한 모습을 보인다(Table 3).

항바이러스에 관한 비자나무 잎, 가지의 연구로는 코로나바이러스 치료약 개발의 주요 목표 중 하나인 SARS-CoV $3CL^{pro}$에 대한 억제 실험과, 장염을 유발하는 것으로 알려진 로타바이러스(rotavirus) 억제능에 대한 실험이 있다. 연구 결과에 따르면 비자나무 잎 에탄올 추출물에서 분리된 8개의 디테르페노이드와 4개의 바이플라보노이드 중 바이플라보노이드에 해당하는 아멘토플라본(amentoflavone)의 SARS-CoV $3CL^{pro}$ 억제 활성이 반수최대억제농도(half maximal inhibitory concentration, IC50)값 8.3 μM로 가장 강력했다. 비플라본의 기본 구조-활성 관계를 확립하기 위해 대조군으로 세 가지 추가 정통 플라본 아피게닌(apigenin), 루테올린(luteolin), 퀘르세틴(quercetin)을 테스트했고, 아피게닌, 루테올린, 퀘르세틴은 각각 280.8, 20.2 및 23.8 μM의 IC50 값으로 $3CL^{pro}$ 활성을 억제하는 것이 확인되었다[81].

또한 비자나무 잎에서 분리된 아비에탄 디테르페노이드(abietane diterpenoids) 2종을 이용하여 감염 후 치료 분석을 진행한 결과 18-hydroxyferruginol 및 18-oxoferruginol의 IC50값은 bovine G8P에서 각각 24.7 μM 및 23.2 μM, porcine G5P에서 각각 21.1 μM 및 22.6 μM으로 확인되었다[82]. 바이러스가 복제되는 동안 두 화합물은 6시간 동안의 초기 단계보다 18시간 동안의 후기 단계에서 바이러스 RNA 합성을 더 강력하게 억제하는 것으로 나타났으며, VP6과 같은 바이러스 단백질의 합성을 억제했다.

항균 연구로는 비자나무 잎 에센셜 오일이 황색포도상구균(Staphylococcus aureus, 12214), 표피포도상구균(Staphylococcus epidermidis, 40411), 스크렙토코쿠스 무탄

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(Streptococcus mutans, 40105), 대장균(Escherichia coli, 41300), 페니실리움 시트리늄(Penicillium citrinum, 11663), 검정곰팡이(Aspergillus niger, 32318) 6종의 균주 중 황색포도상구균에서 15.26mm, 표피포도상구군에서 15.48mm의 높은 활성 효과를 보였다[80].

항산화 실험으로는 비자나무 잎, 가지의 헥세인과 클로로포름:메탄올(2:1) 추출물 중 가지 클로로포름:메탄올(2:1) 추출물의 IC50 값이 ABTS 577.11 μg/mL, DPPH 387.44 μg/mL로 가장 높게 확인되었다[83].

뇌 신경보호에 대한 연구로는 비자나무 껍질 메탄올 추출물에서 분리된 악티게닌((-)-Arctigenin), 트락실라제닌((-)-traxillagenin), 4'-디메틸트락실라제닌((-)-4'-demethyltraxillagenin), 아르크티인(arctiin), 트락실라사이드(traxillaside) 5개의 리그난(lignan) 및 글리코사이드(glycosides)의 글루타메이트(glutamate) 유발 독성에 대한 신경보호 활성이 확인되었다. 이 물질들은 모두 0.01 μM~10.0 μM 범위의 농도에서 신경보호 활성을 보였으며, 악티게닌의 1 μM 에서의 활성이 72.9%로 가장 좋았다[84].

항염증에 관한 연구로는 비자나무 잎 70% 에탄올 추출물의 효능이 평가되었다. 비자나무 잎 70% 에탄올 추출물은 50, 100, 200 μg/mL 농도에서 높은 세포 독성을 개선하였으며, 산화질소와 유도형 산화질소 생성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 및 고리형 산소화효소-2의 발현을 유의하게 억제하였다. 또한 염증성 사이토카인 종양괴사인자-알파, 인터류킨-1베타, 인터류킨-6, 인터류킨-8의 발현을 유의하게 억제하였으며, 특히 인터류킨-6, 인터류킨-8의 경우 가장 고농도인 200 μg/mL에서 정상 세포 수준으로 감소하였다. 이후 진행된 웨스턴 블롯(western blot)에서 인산화된 카파비 억제 유전자-알파(Inhibitor κB-α, IκB-α) 및 핵인자 카파비의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였으며 인산화가 억제되고 비자나무 추출물의 처리 농도가 높아짐에 따라 카파비 억제 유전자-알파의 농도가 증가하는 경향을 보였다. 결론적으로, 비자나무 추출물은 핵인자 카파비 신호 전달 경로를 차단함으로써 다양한 염증 매개 인자의 발현을 효과적으로 하향 조절할 수 있으며, 이를 통해 항염증 활성을 유도하는 것으로 확인된다[85].

비자나무 열매 열수 추출물의 신경보호 효과 연구에서 C6 세포주에 비자열매 열수 추출물을 다양한 농도로 처리한 결과 총 글루타치온(glutathione) 함량이 비자 열

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

수 추출물의 농도에 의존적으로 상승하는 것을 확인하였으며, 이는 비자열매 열수 추출물이 뇌 신경세포의 항산화 성분 함량을 증가시키는 효과가 있다는 것을 시사한다. 이러한 결과를 바탕으로, 동일한 농도에서 다양한 산화 스트레스에 의한 뇌 신경세포 손상에 대한 비자 열수 추출물의 보호 효과를 확인하였다. 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP), 로테논(Rotenone)은 비자 열수 추출물을 0.031 ㎎/㎖ 농도로 함께 처리하면 생존율이 증가했으며, 0.063 ㎎/㎖ 농도의 비자 열수 추출물은 과산화수소 및 단일 염기 다형성으로 유발된 산화 손상에 대한 효과적인 보호를 나타냈다[86].

비자나무 열매 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 연구에서 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 항산화능이 좋은 것이 확인되었다. 세포 독성 시험 결과 각각 무처리군 대비 0.5 ug/mL에서 103.30%, 1 ug/mL에서 104.25%, 5 ug/mL에서 102.56%, 10 ug/mL에서 99.17%의 양호한 세포 생존율을 나타냈다[120]. 또 다른 연구에서는 비자나무 열매 환류수추출물(WE), 환류에탄올추출물(EE) 및 고압열수추출물(HWE)의 항산화능을 비교하였으며, HWE가 플라보노이드 176.34 mg/g, 폴리페놀 112.95 mg/g으로 함량이 가장 높았다. 전자공여능 또한 0.1 mg/mL 농도에서 고압열수추출물이 가장 높았으며, SOD 유사 활성 값 33.58%, 2.0 mg/mL 농도에서 잔틴산화효소(xanthine oxidase) 저해율 89.29%로 고압열수추출물이 가장 뛰어난 항산화능을 보였다[87].

항노화 연구에서 비자나무 유박 추출물은 농도가 증가함에 따라 피부 탄력을 감소시키는 최종당산화물(advanced glycation end products, AGEs)과 콜라겐 간의 교차결합을 48.6%, 80.3%, 91.6%, 93.7% 감소시켰으며, 엘라스틴(elastin)을 분해하는 엘라스타아제(elastase) 활동을 농도에 따라 억제하는 효과가 있다. 추출물은 5, 10, 20 및 50 μg/mL 농도에서 각각 6.4%, 20.3%, 38.3%, 86.1%의 엘라스타아제 활동을 억제했다[88].

항당뇨 연구에서 비자나무 씨앗, 열매 추출물을 이용하여 당뇨 관련 지표물질 알파-글루코시데이즈(α-glucosidase) 및 단백질-티로신 인산가수분해효소 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)에 대한 억제 실험을 진행하였고, 비자나무 씨앗 추출물이 열매 추출물보다 각각 14.5배와 4.35배 높은 억제 활성을 나타냈다[89].

비자나무 과피 추출물의 항기생충 효과를 확인하기 위해 네 가지 마우스 실험을

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

설계하였다. 체외에서 100마리의 선모충 L1 유충(*Trichinella spiralis* L1 larvae)를 분리하고 비자나무 과피 추출물 10 mg/mL로 처리하여 기생충 구충 효과를 확인하였으며, 추출물 처리 16시간 후 L1 유충의 사망이 관찰되었다. 이때 L1 유충의 형태를 현미경으로 확인하고 기생충 구충 효과를 확인하기 위해 주름과 줄무늬가 있는 건강한 유충과 추출물 처리된 L1 유충의 형태를 스캔 전자 현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)으로 분석, 비교하였다. 스캔 전자 현미경 검사 결과, 건강한 L1 유충은 줄무늬와 주름이 나타났지만, 추출물 처리된 L1 유충에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다. 추출물로 사전 처리한 *T. spiralis* 감염 마우스는 대조군에 비해 L1 유충 감염이 현저히 감소한 것으로 나타났다. 추출물의 처리는 *T. spiralis* 감염에 대한 예방 및 치료 효과를 제공하였으며, 기생충에 대한 구충제로써 자연 물질은 부작용이 적고 더 효과적인 치료제로 개발될 가능성이 있다[90].

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Research on *Torreya nucifera* leaves, branches and fruits, seeds

Subject	Method	Assay	Result	Ref.
leave, brunch	essential oil and ethanol extract	6 strains Paper Disc method	anti-bacterial	80
	isolated biflavonoid from ethanol extract	fluorescence resonance energy transfer analysis.	anti-viral SARS-CoV $3CL^{pro}$ inhibition	81
	abietane diterpenoids isolated from *Torreya nucifera*	Inhibition of rotavirus viral RNA synthesis and viral protein	anti-viral	82
	chloroform:methanol(2:1), hexane extract	DPPH, ABTS	anti-oxidant	83
	isolated Lignans from methanol extract	MTT, LDH	neuroprotect	84
	70% ethanol extract	NO, cytokines inhibirion	anti-imflammatory	85
fruit, seed	essential oil and ethanol extract	6 strains Paper Disc method	anti-bacterial	80
	hot water extract	ez-cytox	neuroprotect	14
	hot water, ethanol extract	DPPH	anti-oxidant	86
	water, 70% ethanol, hot water extract	Xanthine oxidase inhibition, nitrite scavenging, DPPH, SOD	anti-oxidant anti-imflammatory	87
	70% ethanol extract	Anti-glycation assay, Anti-elastase activity assay, DPPH, ABTS	anti-oxidant, anti-elastase, anti-glycation activity	88
	methanol, hot water extract	Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity, Xanthine oxidase inhibitory activity, Tyrosinase inhibitory activity, DPPH	anti-diabetic	89
	After methanol extraction, dry the residue and dissolve in hot water.	Trichinella Spiralis parasiticide	anti-parasite	90

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3장 재료 및 방법

제 1절 실험 재료 및 시약

본 연구에 사용된 비자나무 잎은 2023년도 5월 경에 장흥에서 채취되었으며, 건조하여 보관 후 분쇄하여 사용하였다. 본 연구에서 추출에 사용한 ethanol, methanol은 대정화금(Korea), sodium phosphate dibasic, metylene chloride, hexane은 OCI(Korea), 그 밖의 carbon dioxide(CO2), PBS, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), potassium persulfate, gallic acid, quercetin, eugenol, limonene, folin-ciocalteus phenol regent, sodium carbonate, aluminum chloride($AlCl_3$), potassium acetate(CH_3COOK), acetylcholine esterase, acetylchiocholine iodide, hydrochloric acid(HCl), sodium dodecylsulfate, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), DMEM, Griess reagent, lipopilysaccharide (E. coil, 0127: B8)은 sigma-aldrich(USA)사의 시약을 사용하였다. 항염활성 실험을 위한 동물세포인 Raw 264.7 세포주는 american type culture collection (ATCC, USA)으로부터 분양받았다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2절 비자나무 잎의 추출 방법

비자나무 잎의 소수성 물질인 향기 물질을 추출하기 위하여 유기용매 침지 추출법과 초임계유체 추출법을 사용하였다(Figure 15). 유기용매 침지 추출은 비자나무 잎 100g을 각각 MeOH, MeCl, Hexabe 1L에 넣고 3일 동안 침지 후 여과, 감압 농축하여 샘플을 제조하였다. 초임계유체 추출은 비자나무 잎 400g을 추출 장비에 넣고 압력 400bar, 온도 50℃, 추출 시간 240min 조건에서 추출한 후 추출과정에서 기기의 추출관에 묻은 잔여 추출물을 에탄올(etahnol, EtOH)로 녹여 추출물과 함께 여과, 감압 농축하여 샘플을 제조하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

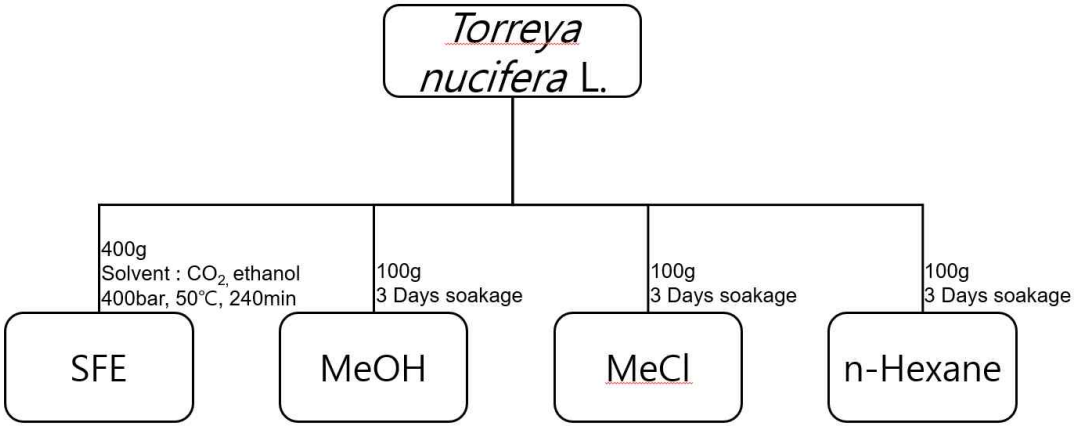

Figure 15. *Torreya nucifera* L. extraction method.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3절 항산화 활성 분석(Anti-oxidant activity assay)

1. DPPH 자유 라디컬 소거능 분석(DPPH free radical scavenging assay)

DPPH 자유 라디컬 거능 측정은 Blois의 방법을 변형하여 실시하였다[91]. DPPH 시약은 MeOH로 희석하여 1 mM 농도로 제조하였다. 그 후 시약의 흡광값을 측정하여 적정 농도인 0.2 mM로 다시 희석하여 사용하였다.

순서대로 에펜도르프 튜브(eppendorf tube)에 각 농도 별 시료를 200 μL, 0.2 mM DPPH 용액을 800 μL 가하여 볼텍싱 하고 암실에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물은 96 well plate에 각 200 μL로 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 흡광도 517 nm 파장에서 측정하였다. 양성 대조군(positive control)은 갈산(gallic acid)를 사용하였으며, 모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였다. 라디컬 소거능은 다음과 같은 식에 따라 계산하여 백분율로 나타내었다. 각 시료의 라디컬 소거능 활성도가 50%일 때의 시료 농도(IC50)를 구하였다.

Radical scavenging activity (%) = (Abscontrol − Abssample) / Abscontrol × 100

Abscontrol : 517 nm에서 시료 제작에 사용된 용매와 DPPH 시약의 흡광도

Abssample : 517 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2. ABTS 양이온 라디컬 소거능 분석(ABTS cation radical scavenging assay)

ABTS 양이온 라디칼 소거능 측정은 Re 등의 방법을 변형하여 실시하였다[92]. 시약을 증류수로 7 mM이 되도록 제조한 후 2.45 mM potassium persulfate와 1:1 비율로 혼합, 암실에서 24시간 동안 반응시켜서 충분히 ABTS 양이온 라디컬(ABTS cation radical)을 형성시켰다. 그 후 증류수로 희석한 1x PBS를 이용해 0.9~1 사이의 흡광도가 나오도록 희석하여 사용하였다.

에펜도르프 튜브에 각 농도 별 시료를 200 μL, 10배 희석한 ABTS+ 용액을 1,000 μL 가하여 볼텍싱 하고 암실에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물을 96 well plate에 각 200 μL로 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 흡광도 730 nm 파장에서 측정하였다. 양성 대조군(positive control)은 퀘르세틴(quercetin)을 사용하였으며, 모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였다. 라디컬 소거능은 다음과 같은 식에 따라 계산하여 백분율로 나타내었다. 각 시료의 라디컬 소거능 활성도가 50%일 때의 시료 농도(IC50)를 구하였다.

Radical scavenging activity (%) = (Abscontrol − Abssample) / Abscontrol × 100

Abscontrol : 730 nm에서 시료 제작에 사용된 용매와 ABTS 시약의 흡광도

Abssample : 730 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4절 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정 (Determination of total polyphenol and flavonoid contents)

1. 총 폴리페놀 함량 측정(Determination of total polyphnol contents)

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu 방법을 참고하여 실시하였다[93]. 폴리페놀 정량을 위한 표준 검정 곡선(standard calibration curve) 산출을 위해 갈산을 표준물질로 사용하였다. 에펜도르프 튜브에 순서대로 각 농도별 갈산 표준 용액 500 μL, 0.2 M Folin-Ciocalteu's phenol 시약 500 μL, 2% sodium carbonate 수용액(w/v) 500 μL를 혼합하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물은 96 well plate에 각 200 μL로 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 흡광도 750 nm 파장에서 측정하였다.

시료는 0.5 mg/mL 농도의 시료 500 μL, 0.2 M Folin-Ciocalteu's phenol 시약 500 μL, 2% sodium carbonate 수용액(w/v) 500 μL를 혼합하여 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 마찬가지로 흡광도 750 nm 파장에서 측정하였다.

모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였으며, 측정값은 표준 검정 곡선에 대입해 시료 1 g 당 함유한 갈산의 양으로 환산하였으며 표준 검정 곡선의 R^2 값은 0.99 이상이었다.

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2. 총 플라보노이드 함량 측정(Determination of total flavonoid contents)

총 플라보노이드 함량 측정은 Park 등의 방법을 변형하여 실시하였다[94]. 플라보노이드 정량을 위한 표준 검정 곡선(standard calibration curve) 산출을 위해 퀘르세틴을 표준물질로 사용하였다. 순서대로 농도별 퀘르세틴 표준 용액 500 µL, MeOH 1.5 mL, 10% 염화 알루미늄(aluminium chloride) 100 µL, 1 M 초산칼륨(potassium acetate) 100 µL, 증류수 2.8 mL를 혼합하여 상온에서 40분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물은 96 well plate에 각 200 µL로 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 흡광도 415 nm 파장에서 측정하였다.

시료는 0.5 mg/mL 농도의 시료 500 µL, MeOH 1.5 mL, 10% 염화 알루미늄 100 µL, 1 M 초산칼륨 100 µL, 증류수 2.8 mL를 혼합하여 상온에서 40분 동안 반응시킨 후 마찬가지로 흡광도 415 nm 파장에서 측정하였다.

모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였으며, 측정값은 표준 검정 곡선에 대입하여 시료 1 g 당 함유한 퀘르세틴의 양으로 환산하였으며 표준 검정 곡선의 R^2 값은 0.99 이상이었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 5절 항염증 활성 분석(Anti-inflammation activity assay)

1. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264.7 대식세포는 한국세포주은행에서 분양받았다. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지에 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 스트렙토마이신/페니실린(streptomycin/penicillin)을 첨가하여 5% CO_2, 37℃ 상태에서 배양하였으며, 세포가 바닥 면적의 90%까지 자란 상태에서 계대배양 하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 세포 독성 실험(MTT assay)

RAW 264.7 대식세포주를 96 well plate에 각각 1 × 10 4 cells/well을 분주 후, 24시간 동안 배양하였다. 농도별로 시료를 처리하여 24시간 배양한 후 배양이 완료된 세포에 2 mg/mL MTT stock 용액을 배양 배지 부피의 1/10 이 되게 첨가하여 37℃ 온도에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후 배양 상등액을 제거한 다음 각각의 well에 DMSO 300 μL를 첨가해 세포에서 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해 시켜 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 산화질소 분석(Nitric oxide assay)

AW 264.7 대식세포주를 1 × 10 4 cells/well의 농도로 12 wellplate에 분주 후, 24 시간 동안 배양하여 시료를 농도별로 처리하고 1시간 후 LPS 1 μg/mL 처리 후 24 시간 배양하고 배양이 완료된 세포 배양 상등액을 100 μL를 취하여 96 wellplate에 옮겼다. griess reagent (1% sulfanilamide in 5%phosphoric acid and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylene-diamine(dihydrochloride in distilled water) 100 μL를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. NO의 안정된 최종산물인 nitrite를 NO생성의 indicator로 사용하여 Park 등이 제시한 방법[95]에 따라 측정하였다.

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 6절 신경보호 활성 분석(Neuroprotection activity assay)

1. 아세틸콜린 분해효소 억제 분석(Acetylcholine esterase inhibition assay)

AChE 억제활성 측정은 Ellman의 방법을 변형하여 실시하였다[96]. 시약 제조와 실험을 위해 제2인산나트륨(sodium phosphate dibasic)을 사용하여 0.1 M 인산나트륨 완충액(sodium phosphate buffer(pH 8.0))을 제조하였다. 제조한 버퍼를 이용하여 시료를 각 농도별로, AChE를 1U/mL가 되도록 희석하였다. 기질로 사용한 아세틸티오콜린 아이오다이드(acetylthiocholine iodide)는 10 mM, 발색시약으로 사용한 DTNB(5,5´-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))는 2.5 mM이 되도록 제조하여 사용하였다.

96 well plate에 순서대로 0.1 M 인산나트륨 완충액 40uL, 2.5mM DTNB 40uL, 1U/mL AChE 20uL, 각 농도별 시료 60uL를 가하여 37도에서 10분간 반응시킨 후 10 mM 아세틸티오콜린 요오드 40uL를 혼합하여 다시 37도에서 10분간 반응시켰다. 그 후 1% 황산도데실나트륨(sodium dodecylsulfate, SDS) 60uL를 넣어 반응을 정지시키고 Biotek Synergy HT multi-detection microplate reader 장비를 활용하여 흡광도 405 nm 파장에서 측정하였다.

양성 대조군(positive control)은 타크린 하이드로클로라이드(tacrine hydrochloride)를 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였다. AChE 억제능은 다음과 같은 식에 따라 계산하여 백분율로 나타내었다. 각 시료의 AChE 억제능 활성도가 50%일 때의 시료 농도(IC50)를 구하였다.

$$\text{Acetylcholine esterase inhibition activity (\%)} = A2 - (A1 - A3) / A2 \times 100$$

A1 : 시약과 효소, 기질, 발색시약, 버퍼를 모두 반응시킨 반응액의 흡광도

A2 : 시약 없이 효소, 기질, 발색시약, 버퍼를 반응시킨 반응액의 흡광도

A3 : 효소 없이 시약과 기질, 발색시약, 버퍼를 반응시킨 반응액의 흡광도

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 7절 향기 물질 분석(Aroma substances analysis)

1. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis

비자나무 잎 유기용매 추출물의 향기 성분을 분석하고자 이전에 보고된 방법을 변형하여 분석을 진행하였다[83]. 분석 장비는 GCMS-Qp2010 ultra gas chromatograph mass spectrometer(Shimadzu Europa GmbH, Japan)를 사용하였고, Agilent HP-5MS 실리카 모세관 column(30 mm l. x 0.25 mm i.d., 0.25 um)을 사용하였다. 전자 이온화(EI) 조건에서 이온화를 진행하였다. GC oven은 캐리어 가스로 헬륨(Helium, HE)을 사용하였고, 60-200℃에서 2℃/min의 조건 및 1mL/min의 flow rate로 분석하였다. 스캔 된 모든 질량 스펙트럼은 데이터 시스템 라이브러리(NIST 2017)와 비교되었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4장 결과 및 고찰

제 1절 비자나무 잎 추출물의 수율(Yield of *Torreya nucifera* leaves extract)

비자나무 잎을 3가지 용매(MeOH, MeCl, Hexane)와 초임계유체 추출법을 이용하여 각각 추출한 결과 MeOH 추출물의 수율이 가장 높은 것으로 확인되었다. MeOH 추출물은 가장 수율이 낮은 SFE 추출물에 비해 5배 가량 높은 수율을 보였으며, 두번째로는 MeCl 추출물이 SFE 추출물보다 2배 가량 높은 수율을, Hexane 추출물은 SFE 추출물과 유사한 수율을 나타내는 것이 확인되었다(Table 4). 기존의 연구에서도 유기용매 추출물의 수율이 SFE 추출물보다 높은 수율을 보이는 것이 확인되었으며[97], 유기용매를 이용한 타 식물 연구에서도 MeOH 추출물이 가장 높은 수율을 나타내는 것이 확인되었다[98]. 이는 넓은 범위의 물질을 다량으로 녹여내는 MeOH의 특징과 특정 물질을 표적 삼아 추출하기에 적합한 방법인 SFE의 특징에 따른 차이로 추측된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Yield of *Torreya nucifera* L. extract

Sample	Weight	Yield
MeOH	14.25	14.25%
MeCl	6.291	6.29%
Hexane	3.72	3.72%
SFE	11.759	2.94%

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

제 2절 항산화 활성 분석(Anti-oxidant activity assay)

1. DPPH 자유 라디컬 소거능 분석(DPPH free radical scavenging assay)

비자나무 잎 추출물 4종에 대하여 DPPH 자유 라디컬 소거 활성(DPPH free radical 소거 활성)을 측정하였다. 표준물질을 제외한 시료의 농도는 100-3000 μg/mL의 농도로 진행하였으며, 각 추출물에 대한 IC50 값을 계산하였다. 각 추출물별 라디컬 소거 활성은 MeOH, MeCl, n-hexane, SFE 순으로 나타났으며, MeOH 추출물의 IC50 값은 1045.41 μg/mL 로 추출물 중 가장 높은 라디컬 소거활성을 나타내었다 (Figure 16, Table 5). 비자나무 잎의 SFE, MeCl 추출물을 이용한 연구는 기존에 진행된 바가 없었으며, 유기용매 추출물을 이용한 실험 결과 유기용매 중 MeOH 추출물의 활성이 IC50값 687.12 μg/mL로 가장 높은 것으로 확인되었다[83]. 이는 넓은 범위의 물질을 녹여내는 MeOH의 특징으로 인해 DPPH free radical scavenging assay에 유효한 성분이 다량 녹아 나온 것으로 추측된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

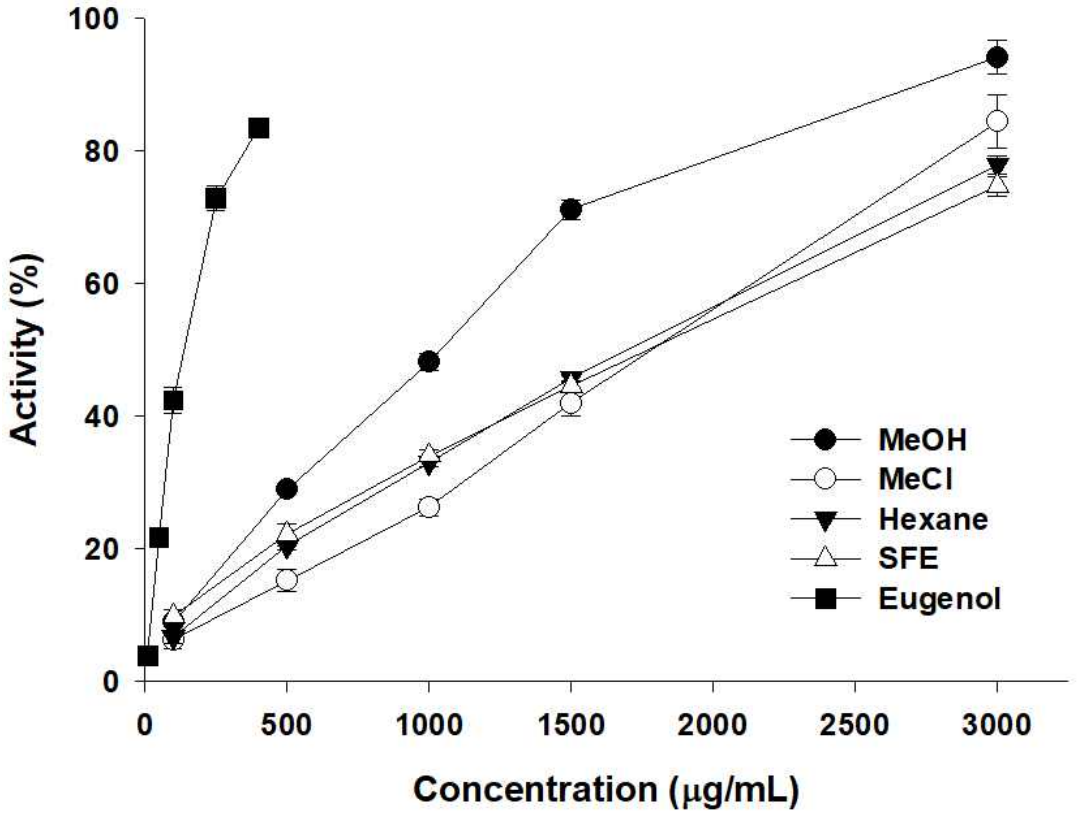

Figure 16. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) free radical scavenging activities of *Torreya nucifera* L. extract.($p<0.05$)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. IC50 values of DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) free radical scavenging activities of *Torreya nucifera* L. extract

No.	Sample	DPPH (μg/mL)
1	MeOH	1045.41 ± 9.49
2	MeCl	1768.31± 75.82
3	Hexane	1770.47± 19.97
4	SFE	1801.71± 23.57
5	Eugenol	187.52 ± 3.5

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. ABTS 양이온 라디컬 소거능 분석(ABTS cation radical scavenging assay)

비자나무 잎 추출물 4종에 대하여 ABTS 양이온 라디컬 소거 활성(ABTS cation radical 소거 활성)을 측정하였다. 표준물질을 제외한 시료의 농도는 100-750 μg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대한 IC50값을 계산하였다. 각 추출물별 항산화 활성은 SFE, MeOH, MeCl, n-hexane 순으로 나타났으며, SFE의 IC50값은 196.48 μg/mL로 우수한 ABTS cation radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 17, Table 6). 기존의 연구에서는 유기용매 추출물을 이용한 실험 결과 DPPH와 마찬가지로 MeOH 추출물의 활성이 IC50값 595.23 μg/mL로 가장 높은 것으로 확인되었다[83]. 이는 역시 넓은 범위의 물질을 녹여내는 MeOH의 특징이 원인으로 추측된다. SFE 추출물은 DPPH와 ABTS의 실험 데이터가 일관성을 가지는 유기용매 3종과 달리 DPPH에서 가장 낮은 활성을, ABTS에서는 가장 높은 활성을 보였다. 이로 미루어보아 기존 유기용매 3종과는 다른 물질이 SFE 추출물의 높은 ABTS 항산화능에 영향을 미치고 있을 것으로 사료 된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

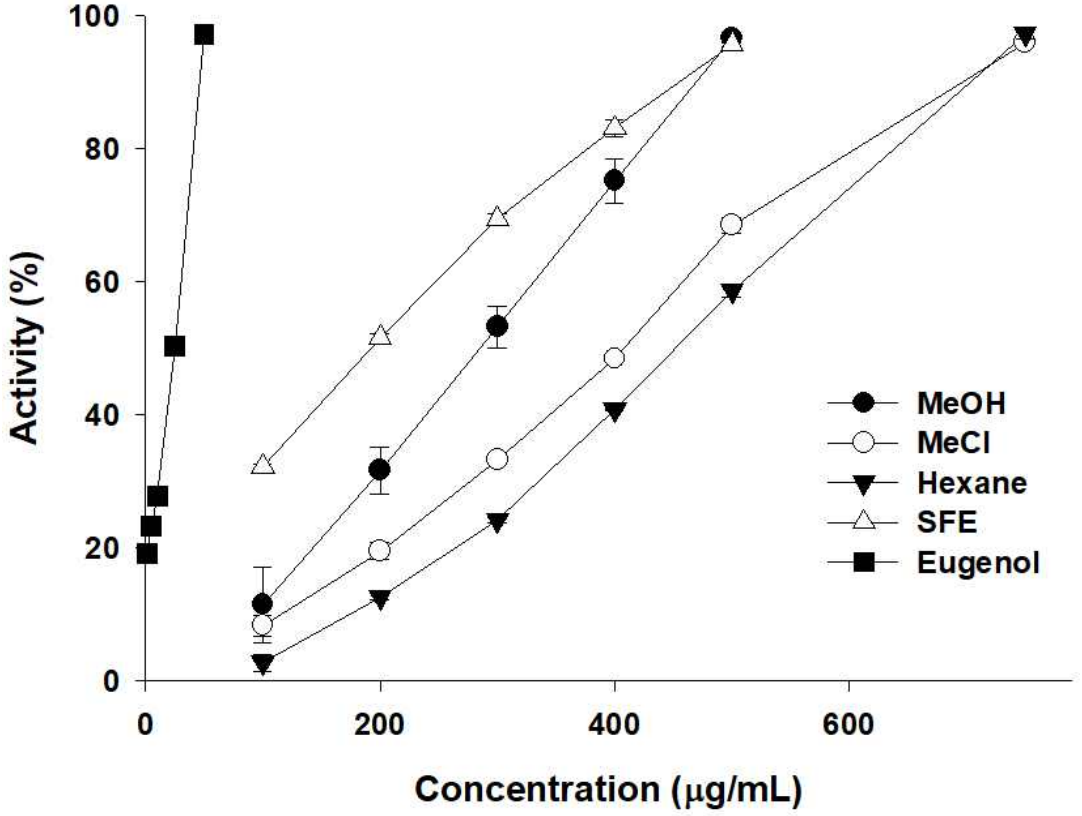

Figure 17. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging activities of *Torreya nucifera* L. extract.($p<0.05$)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. IC50 values of ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) cation radical scavenging activities of *Torreya nucifera* L. extract

No.	Sample	ABTS (μg/mL)
1	MeOH	282.11 ± 14.29
2	MeCl	405.8 ± 4.55
3	Hexane	446.09 ± 1.54
4	SFE	196.48 ± 2.52
5	Eugenol	22.28 ± 0.19

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3절 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정 (Determination of total polyphenol and flavonoid contents)

1. 총 폴리페놀 함량 측정(Determination of total polyphnol contents)

갈산을 표준물질로 사용하여 표준 검정 곡선을 작성하고 비자나무 잎 추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 각 추출물의 총 폴리페놀 함량은 1 g 당 함유한 갈산의 양(gallic acid equivalent, GAE)으로 환산하여 나타내었다. 측정 결과 n-hexane 추출물이 가장 많은 폴리페놀 함량 (50.93 ± 0.84 GAE mg/g) 을 나타내었다(Table 7). 비자나무 잎의 SFE, MeCl 추출물을 이용한 연구는 기존에 진행된 바가 없었으며, 유기용매 추출물을 이용한 실험 결과 hexane보다 MeOH 추출물이 더 높은 polyphenol 함량을 보인 것으로 확인되었다[83]. 이는 추출 용량 등의 상세 추출 조건이 다소 다른 것이 원인으로 추측된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Total polyphenol contents of *Torreya nucifera* L. extract

No.	Sample	TPC (GAE mg/g)
1	MeOH	44.07 ± 1
2	MeCl	45.59± 0.74
3	Hexane	50.93± 0.84
4	SFE	38.44± 1.25

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 총 플라보노이드 함량 측정(Determination of total flavonoid contents)

퀘르세틴을 표준물질로 사용하여 표준 검정 곡선을 작성하고 비자나무 잎 추출물에 함유된 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 각 추출물의 총 플라보노이드 함량은 1 g 당 함유한 퀘르세틴의 양(quercetin equivalent, QUE)로 환산하여 나타내었다. 측정 결과 MeCl 추출물이 가장 많은 플라보노이드 함량 (112.86 ± 7.43 QUE mg/g) 을 나타내었다(Table 8). 기존 연구에서 유기용매 추출물을 이용한 실험 결과 hexane보다 MeOH 추출물이 더 높은 flavonoid 함량을 보인 것으로 확인되었다[83]. 이는 역시 추출 용량 등의 상세 추출 조건이 다소 다른 것이 원인으로 추측된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Total flavonoid contents of *Torreya nucifera* L. extract

No.	Sample	TFC (QUE mg/g)
1	MeOH	65.49 ± 10.67
2	MeCl	112.86± 7.43
3	Hexane	94.26± 3.58
4	SFE	71.42± 0.31

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4절 항염증 활성 분석(Anti-inflammation activity assay)

1. 세포 독성 실험(MTT assay)

비자나무 잎 SFE 추출물의 세포 독성을 측정하기 위해 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL 농도 범위에서 세포 독성을 측정하였다. 실험 결과 24시간 경과 후 50 μg/mL 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았다(Figure 18). 기존 연구에서 비자-초두구 혼합 추출물이 10 μg/mL 농도 범위까지 세포 독성이 없는 것이 확인되었다[86]. 본 연구의 비자나무 잎 SFE 추출물은 기존 연구의 비자-초두구 추출물보다 세포 독성이 없어 더 안전한 양상을 보이며, 세포 독성의 정도에 차이가 있는 것은 실험 재료와 추출 방법의 상이함이 원인으로 추측된다. 따라서 본 실험에서 사용한 비자나무 잎 SFE 추출물은 세포 독성이 확인되지 않아 화장품 산업에 적용할 수 있을 것으로 사료 된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

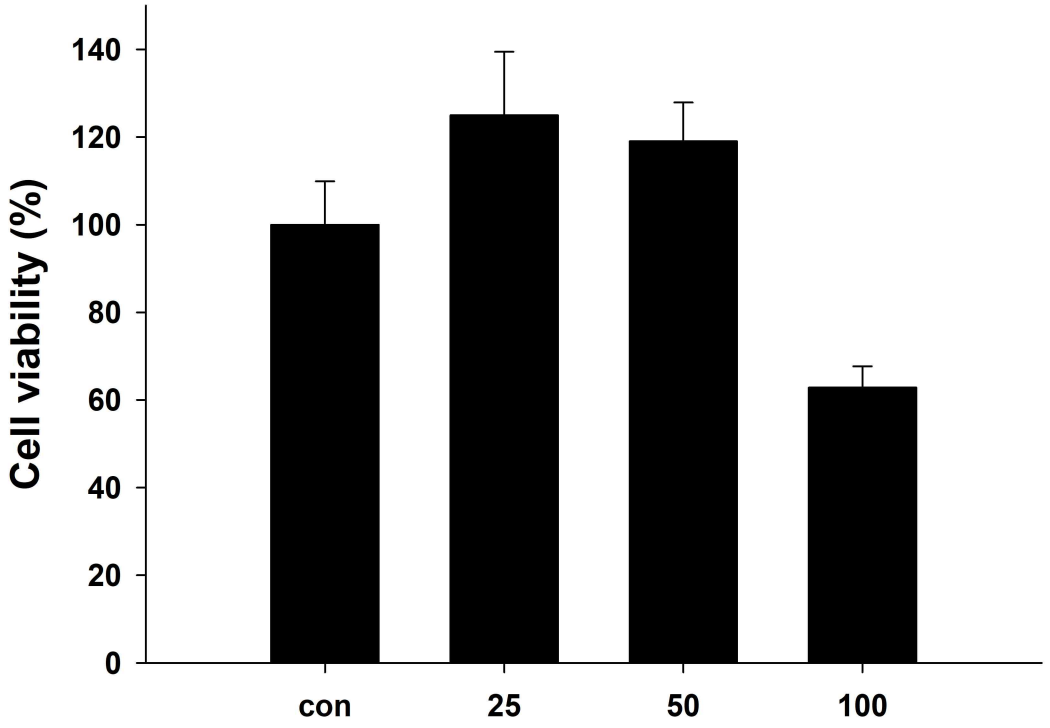

Figure 18. Cell viability of RAW264.7 cells of *Torreya nucifera* L. SFE extracts. RAW264.7 cells were treated with *Torreya nucifera* L. SFE extracts (25-100 μg/mL) for 24 h.($p<0.05$)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 산화질소 분석(Nitric oxide assay)

비자나무 잎 SFE 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위해 NO assay를 실시하였다. 사용한 세포주는 RAW 264.7 대식세포주이며, LPS (1 μg/mL)를 단독 그리고 SFE 방법으로 추출한 비자나무 추출물을 이용하여 실험을 진행하였다. 이때 비자나무 추출물은 MTT assay에서 50 μg/mL까지 독성이 없는 양상을 나타냈으며, 이런 결과를 바탕으로 본 실험에서는 세포 생존율에 안전한 50 μg/mL 범위 내에서 각각 25 μg/mL, 50 μg/mL의 농도로 24시간 배양한 후 LPS를 처리하여 실험을 진행하였다(Figure 19). 그 결과, LPS를 처리한 군은 LPS 무처리군에 비해 높은 염증 생성량을 보였으며, 비자나무 SFE 추출물을 처리한 실험군은 약 10%~40% 정도 염증 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 기존의 연구에서는 비자나무 에센셜 오일이 0.1 μg/mL에서 90% 가까이 nitric oxide를 억제하는 것이 확인되었으나[75], 해당 연구는 본 연구와 세포 배양의 농도부터 그 외 여러 조건이 달라 SFE 추출물과 에센셜 오일의 활성 정도의 차이를 명확하게 밝히기 위해서는 같은 조건의 실험이 필요할 것으로 사료 된다. 다만 뛰어난 NO 억제능을 보인 에센셜 오일의 주요 구성성분이 모노테르펜, 세스퀴테르펜이라는 점에서 낮은 농도에서도 효과적으로 nitric oxide를 억제하는 비자나무 잎 SFE 추출물의 활성 성분 또한 테르펜류 물질로 추측된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

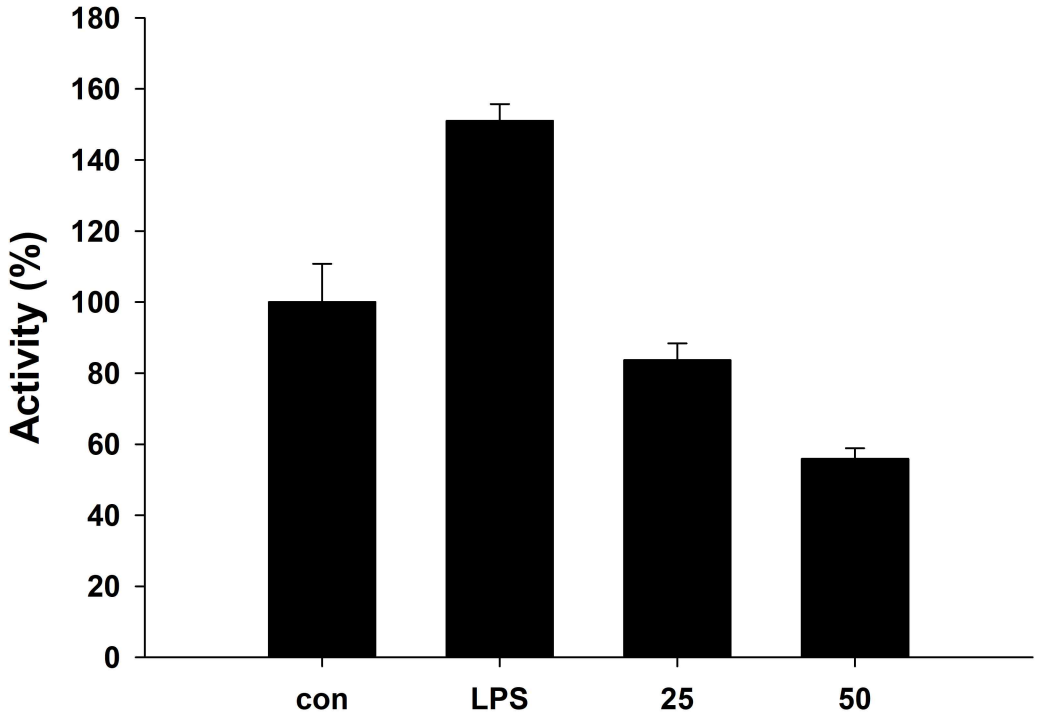

Figure 19. Nitric oxide production of *Torreya nucifera* L. SFE extracts. RAW 264.7 cells were treated with LPS alone (1 μg/mL), or with LPS (1 μg/mL) and *Torreya nucifera* L. SFE extracts. (25-50 μg/mL) for 24 h.($p<0.05$)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 5절 신경보호 활성 분석(Neuroprotection activity assay)

1. 아세틸콜린 분해효소 억제 분석(Acetylcholine esterase inhibition assay)

비자나무 잎 추출물 4종에 대하여 AChE 억제 활성을 측정하였다. 표준물질을 제외한 시료의 농도는 100-5000 μg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대한 IC50값을 계산하였다. 각 추출물별 AChE 억제 활성은 SFE, MeOH, n-Hexane, MeCl 순으로 높은 것으로 나타났으며, SFE의 IC50값은 1152.89 μg/mL로 확인되었다(Figure 20, Table 9).

기존 연구 결과에 따르면 에센셜 오일 류가 콜린 분해효소를 효과적으로 억제하는 경향이 있다[99]. 이러한 효과는 에센셜 오일의 주요 구성 물질인 모노테르펜의 영향 때문으로 추측된다. 특히, 비자나무에서 다량 발견되는 향기 성분 리모넨은 두 연구에서 각각 586.3 μg/mL과 225.9 μg/mL의 높은 활성을 나타냈다[99, 100]. 비자나무 잎 유기용매, SFE 추출물은 향기 물질의 추출에 적합한 방법으로, 다량의 테르펜 물질이 함유된 것으로 예상되며, 이 테르펜 물질들이 AChE 억제 활성에 영향을 미친 것으로 사료 된다.

다만 기존 연구들과 본 연구의 AChE 억제능 실험은 실험 시약부터 완충액의 pH, 반응 시간 등의 여러 분석 조건에서 차이가 있었다. 그렇기 때문에 도출되는 데이터가 다소 상이할 수 있으므로, 더 정확한 분석을 위해서는 동일한 실험 조건에서 실험을 반복할 필요가 있다. 또한 리모넨이 다량으로 추출되는 유기용매 추출물과 SFE 추출물 간의 활성 차이를 고려할 때, 정확한 평가를 위해 구체적인 물질 분석이 필요하다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

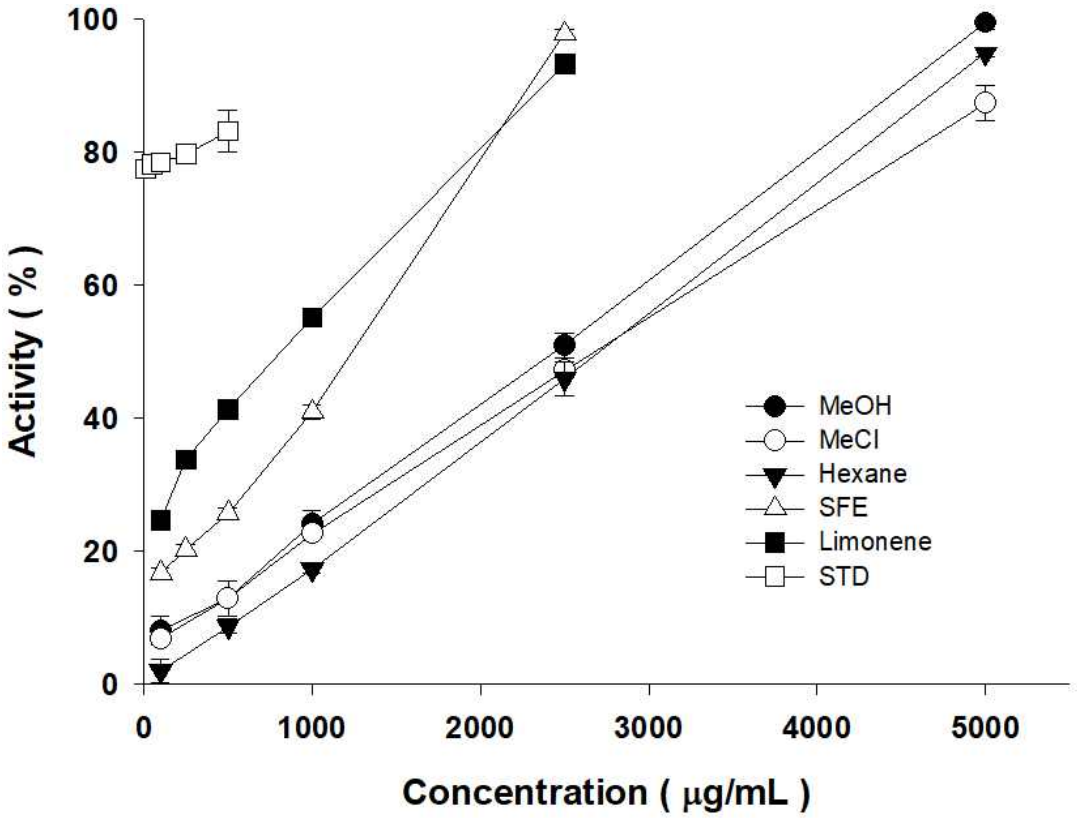

Figure 20. Acetylcholine esterase inhibition activities of *Torreya nucifera* L. extract.($p<0.05$)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 9. IC50 values of Acetylcholine esterase inhibition activities of *Torreya nucifera* L. extract

No.	Sample	AChEinhibition (μg/mL)
1	MeOH	2398.88 ± 30.41
2	MeCl	2710.19± 61.82
3	Hexane	2667.33± 45.08
4	SFE	1152.89± 18.16
5	Limonene	883.34± 7.89
6	STD (Tacrine hydrochloride)	1.27 ± 0.15

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 6절 향기 물질 분석(Aroma substances analysis)

1. Gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) analysis

비자나무 잎 유기용매, SFE 추출물에 함유된 활성 성분을 확인하기 위하여 GC/MS 분석을 진행하였다(Figure 21, Table 10). 유기용매, SFE 추출물에서 총 36가지 성분이 확인되었다. MeOH, MeCl, Hexane 추출물에서 모두 ferruginol이 27~55% 사이로 가장 많이 함유된 것으로 확인되었고, SFE 추출물에서는 candinol이 17.34%로 가장 많이 함유된 것이 확인되었다. 비자나무 MeOH 추출물에서는 8개의 성분이 확인되었고, MeCl 추출물은 10개, Hexane 추출물은 15개, SFE 추출물은 11개의 성분이 확인되었다. 모든 추출물에서 공통으로 확인되는 성분은 candinol이 있었으며, 추출물 간의 성분들이 대체로 서로 다른 양상을 보였다. 특히 유기용매 추출물에서는 모두 ferruginol이 27~55%로 가장 높은 함량을 보인 것에 반해 SFE 추출물에서는 전혀 확인되지 않았다. SFE 추출물은 유기용매 추출물들과는 다르게 isopulegol, gleenol, Z,Z-2,5-Pentadecadien-1-ol, 2-Methylnonane, Cyclododecanol 등의 성분이 함유된 것으로 확인되었다. 이는 비자나무 잎의 주성분으로 리모넨, α-피넨이 주로 확인되던 기존의 연구와는 상이한 것으로[75, 97, 101], 추출 방법의 차이 혹은 짙은 색의 시료는 분석이 어려운 GC-MS 기기의 특성으로 인해 불가피하게 너무 낮은 농도로 진행한 분석이 원인으로 추측된다.

본 연구의 항산화, AChE 억제능 실험 결과 SFE 추출물의 활성이 가장 좋았으며, MeOH 추출물의 활성이 두 번째로 좋았다. MeCl, Hexane 추출물은 유사한 활성을 나타내었고, 비교적 활성이 낮은 MeCl, Hexane 추출물보다 활성이 높았던 SFE 추출물의 성분들이 항산화, AChE 억제에 유효한 것으로 추측된다. 특히 SFE 추출물에만 있는 isopulegol, gleenol, Z,Z-2,5-Pentadecadien-1-ol, Decanal 등의 성분들이 높은 AChE 억제능에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그 중에서도 SFE 추출물에서만 발견되는 isopulegol은 비자나무 잎에 관한 기존 연구에서 검출된 적이 없는 모노테르펜 계열 성분으로 높은 항염증, 통증 완화 등 신경보호 관련 생리활성을 보이는 것으로 알려져 있다[102-104]. 또한 AChE 억제에 유효한 모노테르펜의 특성상 본 연구에서 비자나무 SFE 추출물의 AChE 억제능은 isopulegol의 영향을 받은 것으로 사료된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

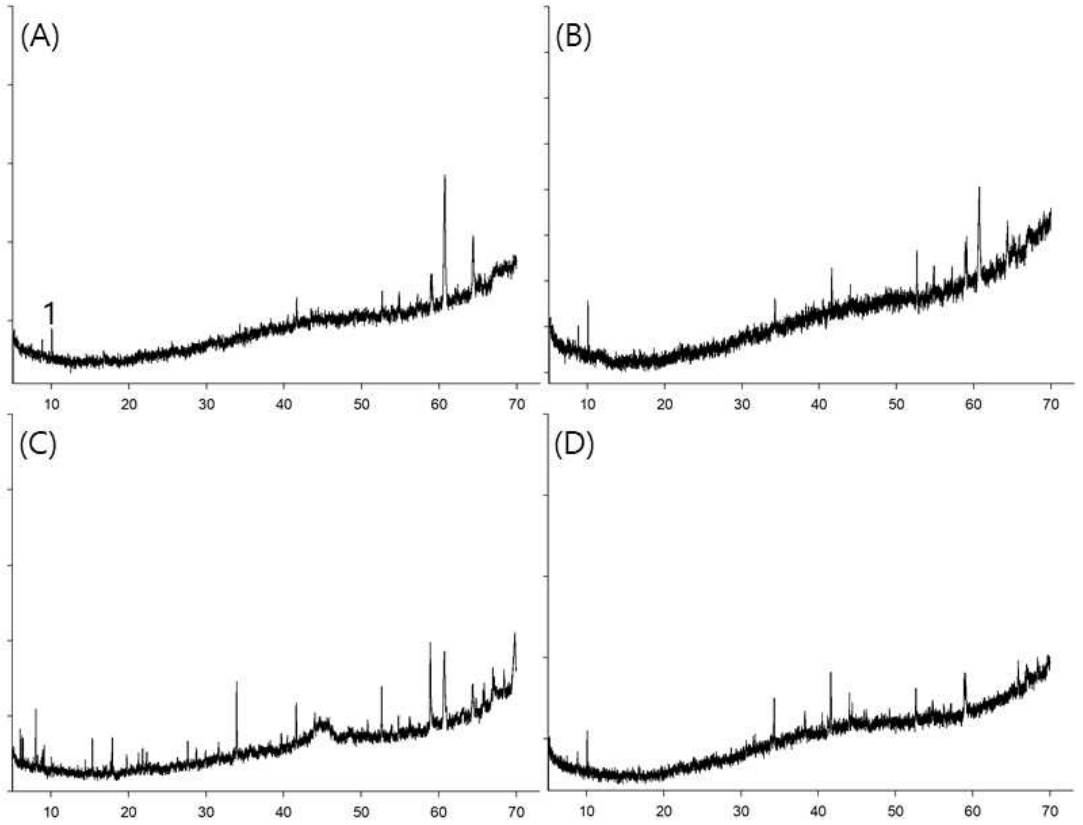

Figure 21. GC/MS chromatogram of extracts of *T. nucifera* extracts. (A) MeOH; (B) MeCl; (C) Hexane; (D) SFE.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 10. Identified substances from the oil extracts of *Torreya nucifera*

Compound	Fomula	Composition (%)			
		MeOH	MeCl	Hexane	SFE
Terpenes and terpenoids					
isopulegol	$C_{10}H_{18}O$	-	-	-	9.12
alpha-Cubebene	$C_{15}H_{24}$	-	3.74	-	10.96
Bicyclo[4.1.0]-3-heptene, 2-isopropenyl-5-iso-	$C_{15}H_{24}$	2.83	-	-	-
propyl-7,7-dimethyl- gleenol	$C_{15}H_{26}O$	-	-	-	7.17
Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	4.72	8.21	6.54	17.34
	$C_{15}H_{28}O$	-	-	-	7.59
Ferruginol	$C_{20}H_{30}O$	54.58	36.18	27.33	-
Abieta-8,11,13-trien-18-ol	$C_{20}H_{30}O$	-	16.84	-	-
Dehydroabietinol	$C_{20}H_{30}O$	16.47	-	-	-
Phytol	$C_{20}H_{40}O$	-	7.25	-	-
Phytyl acetate	$C_{22}H_{42}O_2$	-	-	8.2	-
Non-terpene organic compounds					
1,3,5-Triazine-2,4-diamine, 6-bromo-N,N'-diethyl-	$C_7H_{12}BrN_5$	-	-	-	3.24
Carbitol acetate	$C_8H_{16}O_4$	-	-	3.11	-
1,3-Diacetylbenzene	$C_{10}H_{10}O_2$	-	-	2.7	-
Decanal	$C_{10}H_{20}O$	-	-	-	7.15
2-Methylnonane	$C_{10}H_{22}$	-	-	2.53	-
9,9-Dimethoxybicyclo[3.3.1] nona-2,4-dione	$C_{11}H_{16}O_4$	-	5.45	-	-
1,2-Epoxyundecane	$C_{11}H_{22}O$	-	5.66	-	-
2-Methyldecane	$C_{11}H_{24}$	-	6.02	-	-
Undecane	$C_{11}H_{24}$	4.08	-	-	-
2,6-Dimethylnonane	$C_{11}H_{24}$	-	-	2.1	-
Carbonic acid, allyl 2-eth- ylhexyl ester	$C_{12}H_{22}O_3$	4.47	-	-	-
Cyclododecanol	$C_{12}H_{24}O$	-	-	-	9.38
3,7-Dimethyldecane	$C_{12}H_{26}$	-	-	5.51	-
Dodecane	$C_{12}H_{26}$	-	-	-	7.94
Tridecane	$C_{13}H_{28}$	-	-	7.1	-
1,3-Di-tert-butylbenzene	$C_{14}H_{22}$	-	-	5.31	-

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2,4-Di-tert-butylphenol	$C_{14}H_{22}O$	-	-	9.64	-
Oxalic acid, 6-ethyloct-3-yl ethyl ester	$C_{14}H_{26}O_4$	-	-	2.45	-
Palmitic Acid	$C_{16}H_{32}O_2$	-	-	15.11	-
Dioctyl ether	$C_{16}H_{34}O$	-	7.42	-	-
Sulfurous acid, pentadecyl 2-propyl ester	$C_{18}H_{38}O_3S$	-	-	2.37	-
Tris(tert-butyldimethylsily-loxy)arsane	$C_{18}H_{45}AsO_3Si_3$	-	3.23	-	-
2-Hydroxyhexadecyl buta-noate	$C_{20}H_{40}O_3$	-	-	-	8.03
1,1'-Bicyclopentyl, 2-hex-adecyl-	$C_{26}H_{50}$	4.52	-	-	-
l-(+)-Ascorbic acid 2,6-di-hexadecanoate	$C_{38}H_{68}O_8$	8.33	-	-	-

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 5장 결론 및 제언

본 연구의 목적은 모노테르펜을 함유한 비자나무 잎 추출물을 이용하여 치매에 유효한 방향 제품 등의 화장품을 개발하는 것으로, 항산화능 측정을 위한 실험 결과 DPPH 자유 라디칼 소거 분석에서 MeOH 추출물이 IC50값 1045.41 μg/mL로 가장 높은 활성을 나타냈다. ABTS 양이온 라디칼 소거 분석에서는 SFE 추출물이 IC50값 196.48 μg/mL로 가장 높은 활성을 나타냈다. 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하기 위한 실험 결과 TPC에서는 Hexane 추출물이 50.93 GAE mg/g으로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타냈고, TFC에서는 MeCl 추출물이 112.86 QUE mg/g으로 총 플라보노이드 함량이 가장 높았다. 비자나무 잎 SFE 추출물은 항염증 효능을 측정하기 위한 실험에서 50 μg/mL까지 세포 독성이 없는 것이 확인되었고, 25 μg/mL의 농도에서 효과적으로 NO를 억제하는 것이 검증되었다. 치매를 유발하는 주요 물질 중 하나인 AChE를 억제하는 실험에서는 비자나무 SFE 추출물의 IC50 값이 1152.89 μg/mL로 가장 높은 활성을 나타냈다. 비자나무 잎 추출물의 물질 구성을 분석하기 위한 GC-MS 분석 결과 총 36가지 성분을 확인하였고, SFE 추출물을 제외한 유기용매 추출물의 주성분이 디테르펜에 속하는 Ferruginol인 것이 확인되었다. 반면 가장 높은 AChE 억제능을 보였던 SFE 추출물에는 Ferruginol이 검출되지 않았으며, 주성분은 Cadinol, alpha-Cubebene, Cyclododecanol, Isopulegol으로 확인되었다.

결과적으로 비자나무 잎 추출물은 항산화, 항염증, 인지기능 저해 억제 생리활성을 나타냈다. 특히 ABTS 항산화능과 AChE 억제능 실험 결과가 유사한 양상을 보였으며, 가장 항산화능이 좋았던 SFE 추출물은 세포 독성 실험에서 농도 의존적으로 세포 독성이 없는 모습을 보였고, 낮은 농도에서도 효과적으로 염증 유발인자인 NO를 억제하는 모습이 확인되었다. 따라서 비자나무 잎 SFE 추출물은 농도 의존적으로 세포에 안전하게 적용되며, 염증 억제에 효과적인 것으로 사료 된다. AChE 억제능 실험에서는 AChE의 신체 내 대사 및 작용 원리에 따라 항산화능과 항염증에 대한 생리 활성이 AChE 억제능에 영향을 미친 것으로 추측된다. 이와 같은 비자나무 잎 추출물의 각종 생리활성에 대한 활성 물질을 확인하기 위해 물질 분석을 진행한 결과 비자나무 잎 SFE 추출물에서 기존의 비자나무 연구에서는 확인된 바 없는 isolpulegol이 확인되었다. isopulegol은 뛰어난 항염증, 통증 완화, 신경보호

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

효과를 나타내는 모노테르페노이드로, isopulegol의 생리활성이 비자나무 잎 SFE 추출물의 AChE 억제능에 영향을 미치는 것으로 사료 된다. 따라서 비자나무 잎의 뛰어난 항산화 효과와 항염증, AChE 억제 효과는 비자나무 잎의 생리활성을 활용한 방향 제품 개발에 유효할 것으로 예상되며, 인체에 직접 닿는 화장품 개발에도 유효할 것으로 추측된다. 특히 본 연구를 토대로 비강과 피부를 통해 흡수되는 모노테르펜의 특성을 활용한 화장품, 방향 제품을 개발한다면 인지기능 저해를 효과적으로 억제하는 제품을 만들 수 있을 것으로 사료 된다.

다만 본 연구에서 물질 분석을 진행하였으나 GC-MS 분석 장비의 특성상 시료가 가진 색이 너무 진할 경우 정확한 분석이 어렵다는 문제가 있었다. 본 연구의 비자나무 추출물은 모두 시료의 색이 매우 진하여 불가피하게 낮은 농도로 정성 분석만을 진행하였다. 이를 보완하기 위해서는 시료의 색을 투명하게 조정할 수 있는 추출 방법을 설정하고 정량 분석을 진행할 필요가 있다. 또한 본 연구에서는 일반적인 항산화 실험과 시험관 내 실험만을 진행하였기 때문에 비자나무 잎 추출물의 본격적인 제품화를 위해서는 생체 내 실험, 인체 적용 시험을 통한 용법 및 용량과 체내에 흡수된 비자나무 잎 추출물이 어떤 물질로 변화하는지, 임산부 등 특정 물질에 예민한 집단을 대상으로 한 비자나무 잎 추출물의 안전성 등에 관한 후속 연구가 필요하다. 또한 기존의 비자나무 잎 연구에서는 확인된바 없는 새로운 성분 isopulegol에 대한 생리활성, 안전성 등의 후속 연구가 필요할 것으로 보이며, 이러한 후속 연구를 통해 새롭게 확인된 isopulegol을 포함한 비자나무 잎 추출물의 효능과 안전성을 더욱 심층적으로 이해할 수 있을 것으로 사료 된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. Oh, H. K. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Atractylodes japonica* according to extract methods. *J. Korean Appl. Sci. Technol.*, 38(6), 1543-1552.

2. Theoharides, T. C., Stewart, J. M., Hatziagelaki, E., & Kolaitis, G. (2015). Brain "fog," inflammation and obesity: key aspects of neuropsychiatric disorders improved by luteolin. *Front. Neurosci.*, 9, 225.

3. Kim, B., Yu, A. H., Cho, U. D., Ha, E. Y. & Cho, K. S. (2021). The development of the service design elements for smart shelter applying the double diamond model. *J. Ind. Des. Stud.*, 15(2), 41-51.

4. Nuiden, N., Siripornpanich, V., Sayorwan, W., Foto, T. G., Palanuvej, C. & Ruangrungsi, N. (2022). The effects of *Litsea cubeba* essential oil inhalation on brain wave activity. *Indian J. Tradit. Knowl.*, 21(4).

5. Silva-Correa, C. R., Campos-Reyna, J. L., Villarreal-La Torre, V. E., Calderón-Peña, A. A., Sagástegui-Guarniz, W. A., Guerrero-Espino, L. M., ... & Hilario-Vargas, J. (2021). Potential neuroprotective activity of essential oils in memory and learning impairment. *Pharmacogn. J.*, 13(5).

6. Pincelli, C. & Bonté, F. (2003). The 'beauty'of skin neurobiology. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2(3-4), 195-198.

7. Choi, C. H., Lee, S. I., Yim, S. H. & Jung, H. W. (2019). Study on the improvement effect of antibacterial and allergic contact dermatitis on *Torreyae semen* extracts. *J. Physiol. Pathol. Korean Med.*, 33(6), 341-348.

8. Jung, G. H., Kim, S. H., Woo, J. S., Yoo, E. S., Lee, J. H., Han, S. H., Jung, S. H., Kim, S. M., Kim, E. G., Shin, M. J., Cho, H. M. & Jung, J. Y. (2021). Apoptosis induction by *Dendropanax morbiferus* leaves extract in human breast cancer cells SK-BR-3 through MAPK pathway. *J. Life Sci.*, 31(9), 827-833.

9. Larsson, S. C., Bergkvist, L., Näslund, I., Rutegård, J. & Wolk, A. (2007). Vitamin A, retinol, and carotenoids and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 85(2), 497-503.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

10. Ghori, S. S., Ahmed, M. I., Arifuddin, M. & Khateeb, M. S. (2016). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of formulation containing camphor, menthol and thymol. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8, 271-274.

11. Eddin, L. B., Jha, N. K., Meeran, M. N., Kesari, K. K., Beiram, R. & Ojha, S. (2021). Neuroprotective potential of limonene and limonene containing natural products. *Molecules*, 26(15), 4535.

12. Rousseaux, C. G. & Schachter, H. (2003). Regulatory issues concerning the safety, efficacy and quality of herbal remedies. *Birth Defects Res. B: Dev. Reprod. Toxicol.*, 68(6), 505-510.

13. Kim, S. H., Park, J. G., Hong, Y. D., Kim, E., Baik, K. S., Yoon, D. H., ... & Cho, J. Y. (2016). Src/Syk/IRAK1-targeted anti-inflammatory action of *Torreya nucifera* butanol fraction in lipopolysaccharide-activated RAW264. 7 cells. *J. Ethnopharmacol.*, 188, 167-176.

14. Lee, S. I., Choi, C. H., Kim, J. S., Lim, S. S. & Jung, H. W. (2017). The antioxidant activities and neuroprotective effects of hot water extracts from *Torreyae Semen*. *Korea J. Herbol.*, 32(6), 41-48.

15. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.

16. Kabir, A., Cacciagrano, F., Tartaglia, A., Lipsi, M., Ulusoy, H. I. & Locatelli, M. (2020). Analysis of monoterpenes and monoterpenoids. *Recent Adv. Nat. Prod. Anal.,* 274-286.

17. Worland, A. M., Czajka, J. J., Li, Y., Wang, Y., Tang, Y. J. & Su, W. W. (2020). Biosynthesis of terpene compounds using the non-model yeast *Yarrowia lipolytica*: grand challenges and a few perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 64, 134-140.

18. Paulino, B. N., Silva, G. N., Araujo, F. F., Neri-Numa, I. A., Pastore, G. M., Bicas, J. L. & Molina, G. (2022). Beyond natural aromas: the bioactive and technological potential of monoterpenes. *Trends Food Sci. Technol.*, 128, 188-201.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

19. Kim, M. E., Jun, J. H. & Hur, M. H. (2019). Effects of aromatherapy on sleep quality: a systematic review and meta-analysis. *J. Korean Acad. Nurs.*, 49(6), 655-676.

20. Caputo, L., Capozzolo, F., Amato, G., De Feo, V., Fratianni, F., Vivenzio, G. & Nazzaro, F. (2022). Chemical composition, antibiofilm, cytotoxic, and anti-acetylcholinesterase activities of *Myrtus communis* L. leaves essential oil. *BMC Complement. Med. Ther.*, 22(1), 1-16.

21. Pandur, E., Micalizzi, G., Mondello, L., Horváth, A., Sipos, K. & Horváth, G. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils prepared at different plant phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-activated THP-1 macrophages. *Antioxidants*, 11(7), 1330.

22. Quan, N. V., Anh, L. H., Lam, V. Q., Takami, A., Teschke, R., Khanh, T. D. & Xuan, T. D. (2022). Anti-diabetes, anti-gout, and anti-leukemia properties of essential oils from natural spices *Clausena indica*, *Zanthoxylum rhetsa*, and *Michelia tonkinensis*. *Molecules*, 27(3), 774.

23. Park, Y. S. & Lee, M. K. (2019). Meta-analysis of the effects of lavender aromatherapy on pain. *J. Korea Acad. Ind. Coop. Soc.*, 20(5), 300-310.

24. Liang, J., Zhang, Y., Chi, P., Liu, H., Jing, Z., Cao, H., ... & Kong, D. (2022). Essential oils: chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy-a review. *Pharmacol. Res. Mod. Chin. Med.*, 100210.

25. Gupta, A., Jeyakumar, E. & Lawrence, R. (2021). Journey of limonene as an antimicrobial agent. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 15(3).

26. Kim, G. C. (2012). Supercritical fluid extraction technology for food industry. *Food Ind. Nutr.*, 17(1), 17-24.

27. Bigdeli, Y., Asle-Rousta, M. & Rahnema, M. (2019). Effects of limonene on chronic restraint stress-induced memory impairment and anxiety in male rats. *Neurophysiology*, 51(2), 107-113.

28. Terzo, S., Calvi, P., Nuzzo, D., Picone, P., Allegra, M., Mulè, F. & Amato, A. (2023). Long-term ingestion of sicilian black bee chestnut honey and/or d-limonene

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

counteracts brain damage induced by high fat-diet in obese mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(4), 3467.

29. Rehman, M. U., Tahir, M., Khan, A. Q., Khan, R., Oday-O-Hamiza, Lateef, A., ... & Sultana, S. (2014). D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NFκB in kidneys of Wistar rats. *Exp. Biol. Med.*, 239(4), 465-476.

30. Song, Y., Seo, S., Lamichhane, S., Seo, J., Hong, J. T., Cha, H. J., & Yun, J. (2021). Limonene has anti-anxiety activity via adenosine A2A receptor-mediated regulation of dopaminergic and GABAergic neuronal function in the striatum. *Phytomedicine*, 83, 153474.

31. Piccialli, I., Tedeschi, V., Caputo, L., Amato, G., De Martino, L., De Feo, V., ... & Pannaccione, A. (2021). The antioxidant activity of limonene counteracts neurotoxicity triggered byaβ1-42 oligomers in primary cortical neurons. *Antioxidants.*, 10(6), 937.

32. Lorigooini, Z., Boroujeni, S. N., Sayyadi-Shahraki, M., Rahimi-Madiseh, M., Bijad, E. & Amini-Khoei, H. (2021). Limonene through attenuation of neuroinflammation and nitrite level exerts antidepressant-like effect on mouse model of maternal separation stress. *Behav. Neurol.*, 2021.

33. de Souza, M. C., Vieira, A. J., Beserra, F. P., Pellizzon, C. H., Nóbrega, R. H. & Rozza, A. L. (2019). Gastroprotective effect of limonene in rats: influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine.*, 53, 37-42.

34. Piccinelli, A. C., Morato, P. N., dos Santos Barbosa, M., Croda, J., Sampson, J., Kong, X., ... & Kassuya, C. A. L. (2017). Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1 β and protein expression in spinal cord of mice. *Life Sci.*, 174, 28-34.

35. Yu, L., Yan, J. & Sun, Z. (2017). D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. *Mol. Med. Rep.*, 15(4), 2339-2346.

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

36. Han, X., Qi, H. & Niu, J. (2023). L-limonene reduces aortic artery atherosclerosis by inhibiting oxidative stress/inflammatory responses in diabetic rats fed high-fat diet. *Chin. J. Physiol.*, 66(3), 129.

37. Beik, A., Najafipour, H., Joukar, S., Rajabi, S., Iranpour, M., & Kordestani, Z. (2021). Perillyl alcohol suppresses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats via anti-remodeling, anti-oxidant, and anti-inflammatory effects. *Clin. Exp. Hypertens.*, 43(3), 270-280.

38. Zhao, M., & Du, J. (2020). Anti-inflammatory and protective effects of d-carvone on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice. *J. King Saud Univ. Sci.*, 32(2), 1592-1596.

39. de Almeida, A. A. C., Silva, R. O., Nicolau, L. A. D., de Brito, T. V., de Sousa, D. P., Barbosa, A. L. D. R., ... & Ferreira, P. M. P. (2017). Physio-pharmacological investigations about the anti-inflammatory and antinociceptive efficacy of (+)-limonene epoxide. *Inflammation.*, 40, 511-522.

40. de Almeida, A. A. C., de Carvalho, R. B. F., Silva, O. A., de Sousa, D. P. & de Freitas, R. M. (2014). Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 118, 69-78.

41. Figueiredo, R. D. A., Ortega, A. C., Gonzalez Maldonado, L. A., CASTRO, R. D. D., Ávila-Campos, M. J., Rossa Junior, C. & AQUINO, S. G. D. (2020). Perillyl alcohol has antibacterial effects and reduces ROS production in macrophages. *J. Appl. Oral Sci.*, 28.

42. Chen, T. C., Da Fonseca, C. O. & Schönthal, A. H. (2018). Intranasal perillyl alcohol for glioma therapy: molecular mechanisms and clinical development. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(12), 3905.

43. Chen, T. C., Da Fonseca, C. O. & Schönthal, A. H. (2015). Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. *Am. J. Cancer Res.*, 5(5), 1580.

44. Chen, Y., Zhang, L. L., Wang, W. & Wang, G. (2023). Recent updates on bio-

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

active properties of α-terpineol. *J. Essent. Oil Res.*, 35(3), 274-288.

45. Vieira, G., Cavalli, J., Gonçalves, E. C., Braga, S. F., Ferreira, R. S., Santos, A. R., ... & Dutra, R. C. (2020). Antidepressant-like effect of terpineol in an inflammatory model of depression: involvement of the cannabinoid system and D2 dopamine receptor. *Biomolecules*, 10(5), 792.

46. Khaleel, C., Tabanca, N. & Buchbauer, G. (2018). α-Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chem.*, 16(1), 349-361.

47. Bouyahya, A., Mechchate, H., Benali, T., Ghchime, R., Charfi, S., Balahbib, A., ... & Omari, N. E. (2021). Health benefits and pharmacological properties of carvone. *Biomolecules*, 11(12), 1803.

48. Mohammed, M. S. O., Babeanu, N., Cornea, C. P. & Radu, N. (2022). Limenene-a biomolecule with potential applications in regenerative medicine. *Sci. Bull. F. Biotechnol.*, 26(2).

49. Ravichandran, C., Badgujar, P. C., Gundev, P. & Upadhyay, A. (2018). Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food Chem. Toxicol.*, 120, 668-680.

50. Api, A. M., Belsito, D., Botelho, D., Bruze, M., Burton Jr, G. A., Buschmann, J., ... & Tokura, Y. (2022). RIFM fragrance ingredient safety assessment, dl-limonene (racemic), CAS Registry Number 138-86-3. *Food Chem. Toxicol.*, 161, 112764.

51. Michalak, M. (2018). Aromatherapy and methods of applying essential oils. *Arch. Physiother. Glob. Res.*, 22(2), 25-31.

52. Rosa, A. C., Corsi, D., Cavi, N., Bruni, N., & Dosio, F. (2021). Superoxide dismutase administration: a review of proposed human uses. *Molecules*, 26(7), 1844.

53. Shahidi, F. & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods*, 18, 757-781.

54. Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch. Toxicol.*, 94(3), 651-715.

55. Jin, S. G., Meng, Y., Johnson, J., Szabó, P. E. & Pfeifer, G. P. (2022).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Concordance of hydrogen peroxide–induced 8-oxo-guanine patterns with two cancer mutation signatures of upper GI tract tumors. *Sci. Adv.*, 8(22), eabn3815.

56. Kedare, S. B. & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.*, 48, 412-422.

57. Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., ... & Scalbert, A. (2010). Phenol-explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, 2010, bap024.

58. Munin, A. & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics,* 3(4), 793-829.

59. Ignat, I., Volf, I. & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, 126(4), 1821-1835.

60. Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. & Girardin, S. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation. *Clin. Exp. Immunol.*, 147(2), 227-235.

61. de Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N. & de Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227-1254.

62. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.

63. Chatterjee, S. (2016). Oxidative stress, inflammation, and disease. *Oxidative Stress Biomater.,* 35-58. Academic Press.

64. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 9(6), 669-676.

65. Ye, J. (2009). Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes.*, 33(1), 54-66.

66. Hiransai, P., Ratanachaiyavong, S., Itharat, A., Graidist, P., Ruengrairatanaroj, P. & Purintrapiban, J. (2010). Dioscorealide B suppresses LPS-induced nitric oxide production and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages: the in-

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

hibition of NF-κB and ERK1/2 activation. *J. Cell. Biochem.*, 109(5), 1057-1063.

67. Pavlov, V. A., Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Puerta, M., Ochani, K., ... & Tracey, K. J. (2009). Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav. Immun.*, 23(1), 41-45.

68. Jeong, H. R., Kim, H. J., Gu, S. Y., Go, M. J., Lee, H. L., Kim, M. J., ... & Heo, H. J. (2021). Antioxidant activity and neuroprotective effect of ethyl acetate fraction of *Lonicera japonica* on H2O2-induced oxidative stress. *Korean J. Food Preserv.*, 28(7), 968-979.

69. De Ferrari, G. V., Canales, M. A., Shin, I., Weiner, L. M., Silman, I. & Inestrosa, N. C. (2001). A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β-peptide fibril formation. *Biochemistry*, 40(35), 10447-10457.

70. Liu, C., Hou, W., Li, S. & Tsao, R. (2020). Extraction and isolation of acetylcholinesterase inhibitors from *Citrus limon* peel using an *in vitro* method. *J. sep. sci.*, 43(8), 1531-1543.

71. Melo, J. B., Agostinho, P. & Oliveira, C. R. (2003). Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci. Res.*, 45(1), 117-127.

72. Chen, S. X., Yang, K., Xiang, J. Y., Raymond Kwaku, O., Han, J. X., Zhu, X. A., ... & Xu, M. (2020). Comparison of chemical compositions of the Pepper EOs from different cultivars and their AChE inhibitory activity. *Nat. Prod. Commun.*, 15(11), 1934578X20971469.

73. Jung, Y. S., Park, S. J., Park, J. H., Jhee, K. H., Lee, I. S. & Yang, S. A. (2012). Effects of ethanol extracts from *Zingiber officinale* Rosc., *Curcuma longa* L., and *Curcuma aromatica* Salisb. on acetylcholinesterase and antioxidant activities as well as GABA contents. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 41(10), 1395-1401.

74. Boiangiu, R. S., Brinza, I., Hancianu, M., Erdogan Orhan, I., Eren, G., Gündüz, E., ... & Cioanca, O. (2020). Cognitive facilitation and antioxidant effects of an essential

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

oil mix on scopolamine-induced amnesia in rats: molecular modeling of *in vitro* and *in vivo* approaches. *Molecules*, 25(7), 1519.

75. Yoon, W. J., Kim, S. S., Oh, T. H., Lee, N. H. & Hyun, C. G. (2009). *Torreya nucifera* essential oil inhibits skin pathogen growth and lipopolysaccharide-induced inflammatory effects. *Int. J. Pharmacol.*, 5(1), 37-43.

76. Kim, A. R., Yang, C. E., Heo, Y. N., Kim, K. S., Park, J. S., Km, E. I., An, K. W. & Kim, M. H. (2018). The NVOCs retention volume and characterization of chemical compositions from *Torreya nucifera* stand in temple forest of Baekyang Mt.1. *Korean J. For. Econ.*, 25(1), 25-37.

77. Kim, J. K. & Bae, Y. S. (2001). Extractives from the needles of *Torreya*. *J. Korean Wood Sci. Technol.*, 29(4), 53-59.

78. Harrison, L. J. & Asakawa, Y. (1987). 18-Oxoferruginol from the leaf of *Torreya nucifera*. *Phytochemistry*, 26(4), 1211-1212.

79. Lee, W. S., Kim, J. R., Han, J. M., Jang, K. C., Sok, D. E. & Jeong, T. S. (2006). Antioxidant activities of abietane diterpenoids isolated from *Torreya nucifera* leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 54(15), 5369-5374.

80. Ko, H. J., Sohn, S. M., Kim, W. S., Lee, N. H. & Suh, I. S. (2008). Antimicrobial activity of *Torreya nucifera* extract. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.*, 267-267.

81. Ryu, Y. B., Jeong, H. J., Kim, J. H., Kim, Y. M., Park, J. Y., Kim, D., ... & Lee, W. S. (2010). Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CLpro inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, 18(22), 7940-7947.

82. Park, J. S., Bae, J., Jung, J., Kim, J. S. & Park, S. J. (2023). *In vitro* antiviral activity of abietane diterpenoids isolated from *Torreya nucifera* against rotavirus infection. *Acta Virol.*, 67, 11630.

83. Kim, S. M. & Choi, M. H. (2022). Identification of hydrophobic substances and bioactivity of *Torreya nucifera* leaves and branches. *J. Adv. Eng. Technol.*, 15(2), 79-84.

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

84. Jang, Y. P., Kim, S. R. & Kim, Y. C. (2001). Neuroprotective dibenzylbutyrolactone lignans of *Torreya nucifera*. *Planta med.*, 67(05), 470-472

85. Hong, H. H., Park, T. J., Lee, Y. J., Choi, B. M. & Kim, S. Y. (2023). Anti-inflammatory effects of biorenovated *Torreya nucifera* extract in RAW264.7 cells induced by *Cutibacterium acnes*. *J. Appl. Biol. Chem.*, 66(0), 213-220.

86. Soh, S. Y. & Chun, Y. J. (2020). Cosmeceutical properties of extracts of *Torreya nucifera* and *Alpinia henryi* and formulation characteristics of mask pack containing extracts of these. *J. Korea Acad. Ind. Coop. Soc.*, 21(8), 36-43.

87. Jeon, H. S., Lee, Y. S. & Kim, N. W. (2009). The antioxidative activities of *Torreya nucifera* seed extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 38(1), 1-8.

88. Son, D. H., Kim, M. K., Park, D. H. & Jung, E. S. (2019). Effect of defatted *Torreya nucifera* seed extract on the cross-linking of advanced glycation end products to collagen. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 45(1), 19-25.

89. Kim, J. W., Kim, D. S., Lee, H., Park, B., Yu, S. N., Hwang, Y. L., ... & Ahn, S. C. (2022). Characterization of antidiabetic compounds from extract of *Torreya nucifera*. *J. Life Sci.*, 32(1), 1-10.

90. Jeong, M. J., Kang, S. A., Yu, S. N., Ahn, S. C., Miyoshi, S. I., Kim, H. S. & Yu, H. S. (2023). Extract of *Torreya nucifera* pericarps exhibits a parasiticidal effect on the nematode parasite, *Trichinella spiralis*. *J. Med. Food*, 26(9), 624-630.

91. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature,* 181 (4617), 1199-1200.

92. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. &Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, (9-10), 1231-1237.

93. Ainsworth, E. A. &Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc., 2* (4), 875-877.

94. Park, Y. K., Koo, M. H., Ikegaki, M. &Contado, J. O. S. E. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Brazil. *Arg. Biol. Tecnol.*, 97-106.

95. Park, H. J., Han, E. S., Park, D. K., Lee, C. & Lee, K. W. (2010). An extract of *Phellinus linteus* grown on germinated brown riceinhibits inflammation markers in RAW 264.7 macrophages bysuppressing inflammatory cytokines, chemokines, and mediatorsand upregulating antioxidant activity. *J. Med. Food* 13: 1468-1477.

96. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V. & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7(2), 88-95.

97. Niu, L., Bao, J., Zhao, L. & Zhang, Y. (2011). Odor properties and volatile compounds analysis of *Torreya grandis* aril extracts. *J. Essent. Oil Res.*, 23(4), 1-6.

98. Sariwati, A., Fitri, I., Purnomo, A. S. & Fatmawati, S. (2019). Phytochemical, antibacterial, and antioxidant activities of *Anthurium hookerii* leaves extracts. *HAYATI J. Biosci.*, 26(3), 101-101.

99. Abdelgaleil, S. A., Mohamed, M. I., Badawy, M. E. & El-arami, S. A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J. Chem. Ecol.*, 35, 518-525.

100. Aazza, S., Lyoussi, B. & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16(9), 7672-7690.

101. Oh, H. J., Ahn, H. M., So, K. H., Kim, S. S., Yun, P. Y., Jeon, G. L. & Riu, K. Z. (2007). Chemical and antimicrobial properties of essential oils from three coniferous trees *Abies koreana*, *Cryptomeria japonica*, and *Torreya nucifera*. *J. Appl. Biol. Chem.*, 50(3), 164-169.

102. Ramos, A. G. B., Menezes, I. R. A. D., da Silva, M. S. A., Torres Pessoa, R., de Lacerda Neto, L. J., Rocha Santos Passos, F., ... &Quintans-Júnior, L. J. (2020). Antiedematogenic and anti-inflammatory activity of the monoterpene isopulegol and its β-cyclodextrin (β-CD) inclusion complex in animal inflammation models. *Foods*

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

, 9 (5), 630.

103. Velu, P. (2020). TNF-α regulated inflammatory pathway by Isopulegol in human lung adenocarcinoma (A549) cells through ROS generation. *Aust. J. Sci. Technol.*, 4 , 348-352.

104. Barbosa, A. G. R., da Silva, L. Y. S., Pessoa, R. T., de Lacerda Neto, L. J., da Costa, R. H. S., Martins, A. O. P. B. B., ... &de Menezes, I. R. A. (2023). Screening of the action mechanisms involved in the antinociceptive effect of isopulegol and its complex in cyclodextrin using acute nociception models in mice. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, 6 , 100383