



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

2011년 8월

석사학위 논문

산수유 열매 추출물 분리  
및 생리활성 연구

조선대학교 대학원

생물학과

강주연

산수유 열매 추출물 분리  
및 생리활성 연구

Study of bioactive compounds from the  
extracts of *Cornus officinalis* fruit

2011 년 8 월 25 일

조 선 대 학 교 대 학 원

생 물 학 과

강 주 연

# 산수유 열매 추출물 분리 및 생리활성 연구

지도교수 최 영 복

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2011년 4월

조선대학교 대학원

생물학

# 강주연의 석사학위논문을 인준함

위원장    조선대학교 교수    이 준 식    印

위    원    조선대학교 교수    이 현 화    印

위    원    조선대학교 교수    최 영 복    印

2011 년 5 월

조선대학교 대학원

# 목 차

표 목차	iii
도 목차	iv
ABSTRACT	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 실험	4
1. 실험재료	4
2. 시약 및 기기	4
3. 실험 방법	5
3-1. 산수유 열매 추출물의 조제	5
3-2. 산수유 열매 추출물의 항산화 활성분석	5
3-2-1. DPPH radical 소거능 분석	5
3-2-2. Polyphenol 함량 분석	6
3-2-3. SOD 유사활성 분석	6
3-2-4. CAT 활성 분석	7
3-3. 산수유 열매 추출물로부터 생리활성물질 분리 구조분석	8
3-3-1. EtOH 추출물의 조제 및 용매 분획물 조제	8
3-3-2. EtOAc 분획물의 Silica gel column chromatography	10
3-3-3. 활성분획물의 Sephadex LH-20 Column chromatography	10
3-3-4. Compound의 HPLC profile 분석	10
3-3-5. HPLC에 의한 활성물질 분리, 정제	12
- Compound 1의 분리	12
- Compound 2의 분리	12
- Compound 3의 분리	12
- Compound 4의 분리	14
- Compound 5의 분리	14

III. 결과 및 고찰	14
1. 산수유 추출물의 DPPH radical 소거능	14
2. Polyphenol 함량, SOD 유사활성 및 CAT 활성 및	15
3. 용매 분획별 DPPH radical 소거능	18
4. Compound의 DPPH radical 소거능	21
5. HPLC profile of compound	23
6. Compound 구조결정	28
6-1. Compound 1의 구조	28
6-2. Compound 2의 구조	32
6-3. Compound 3의 구조	35
6-4. Compound 4의 구조	39
6-5. Compound 5의 구조	44
IV. 결 론	48
참고문헌	49
감사의 글	57

## 표 목 차

Table 1. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from <i>Cornus officinalis</i> . . . . .	16
Table 2. CAT, SOD activity and Total polyphenol content of ethanol extract from <i>Cornus officinalis</i> . . . . .	17
Table 3. DPPH radical scavenging activity of <i>Cornus officinalis</i> extracts by various organic solvents 20 . . . . .	20
Table 4. DPPH radical scavenging activity of compounds in <i>Cornusofficinalis</i> extracts . . . . .	22



# 도 목 차

Figure 1. The fruit of <i>Cornus officinalis</i> Sieb . . . . .	1
Figure 2. Extraction and fractionation procedures . . . . .	9
Figure 3. Isolation of compounds from EtOAc fraction in <i>Cornus officinalis</i> . . . . .	11
Figure 4. DPPH radical scavenging activity of <i>Cornus officinalis</i> extracts by various organic solvents . . . . .	19
Figure 5. HPLC profile of compound 1 . . . . .	24
Figure 6. HPLC profile of compound 2 & 3 . . . . .	25
Figure 7. HPLC profile of compound 4 . . . . .	26
Figure 8. HPLC profile of compound 5 . . . . .	27
Figure 9. <sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, Acetone-d <sub>6</sub> ) and <sup>13</sup> C-NMR (125 MHz, Acetone-d <sub>6</sub> ) spectrum of compound 1 . . . . .	29
Figure 10. Structure of Loganin (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid; loganic acid) . . . . .	30
Figure 11. <sup>1</sup> H-NMR (500MHz, CD <sub>3</sub> OD) and <sup>13</sup> C-NMR (125MHz, CD <sub>3</sub> OD) spectrum of compound 2 . . . . .	33
Figure 12. Structure of (7S)-O-Methylmorrisonide . . . . .	34

Figure 13. $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{CDCl}_2$ ) and $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum of compo und 3 . . . . .	36
Figure 14. Structure of (7R)-O-Methylmorroneiside . . . . .	37
Figure 15. $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) and $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum of compo und 4 . . . . .	41
Figure 16. Structure of Cornuside (7-galloylsecologanol) . . . . .	42
Figure 17. $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) and $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum of compo und 5 . . . . .	45
Figure 18. Structure of Gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid) . . . . .	46

# Abstract

## Study of bioactive compounds from the extracts of *Cornus officinalis* fruits

Kang, Ju-Yeon

Advisor: Prof. Choi, Young-Bok, Ph.D

Department of Biology,

Graduate School of Chosun University

*Cornus officinalis* (*C. officinalis*) Sieb. et Zucc. Cornaceae, which is commonly called Japanese cornel, is widely distributed in China and Korea. The fruit without the seed, is called sanshuyu and has been used for at least 2,000 years in Chinese herbal medicine. The total iridoid glycoside content of *C. officinalis*, including loganin, murroneoside and other minor constituents, possesses a number of pharmacological activities such as mitigating the vascular complications of diabetes, depressing immunity, rheumatoid arthritis, cerebral ischemic reperfusion injury through multiple action mechanisms, and against diabetic metabolism. It is used principally to reduce unusually active secretions, including copious sweating and excessive urine. It is known that *C. officinalis* hot water extract has an antibacterial action, anti-histamine, and anti-acetylcholine activity in the small intestine of the guinea pig.

This study was carried out to investigate biological activities of *C. officinalis* fruits. Fruit extracts were prepared by ethanol extraction method and then fractionated with hexane, ethylacetate (EtOAc), butanol (BuOH) extract to get active compounds. The antioxidant activities of extracts were assayed by total polyphenolics content, DPPH radical scavenging, superoxide dismutase (SOD)-like, and catalase (CAT) activities. The DPPH radical scavenging activity of the fruits extracts showed a considerable  $RC_{50}$  value, 234.51 (ethanol extract), 140.60 (hexane extract), 25.60 (EtOAc extract), 110.0 (BuOH extract), 500.00 (water extract)  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ , respectively. Ethylacetate extract showed higher activity than that of BHT standard antioxidant ( $RC_{50}$  101.00  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ). The total SOD-like enzyme activity was found to be 17.80 U/mg and CAT activity was 13.90 U/mg and the contents of total polyphenolics was 27.17 mg/kg. Moreover, five compounds were isolated from EtOAc fraction of *Cornus officinalis* fruits and they were identified with gallic acid, cornuside, (7S)-O-methyl murrone, and (7R)-O-methylmurrone, loganin, which have antioxidant activity. These results suggested that *C. officinalis* fruits would be an alternative antioxidant source, based on natural plant resources.

# 1. 서론

산수유나무는 층층나무과 (Cornaceae)에 속하는 3m가량의 낙엽교목으로서 잎은 마주나며 난상 타원형 또는 난형이고 길이 4-12cm로서 밑은 둥글고 끝은 날카롭고 뒷면 맥액 (脈腋)에 갈색 밀모가 나며 측맥 (側脈)은 4-7쌍이다. 꽃은 황색으로 3-4월에 피며 산형화서(傘形花序)로서 20-30개의 꽃이 달리고 꽃잎은 피침상 삼각형이다 (Kim 2011). 근연 식물로는 산딸나무 (*C. kousa*), 층층나무 (*C. controversa*)등이 있으며, 일본, 중국 및 우리나라 중남부 일대에서 자생한다. 주로 남부 지방에서 재배되고있으며, 전라남도 구례군 산동면과 경기도 이천시 백사면 일원, 경상북도 의성군 등에서 특산품으로 매년 출하하고 있다. 한약재 산수유는 산수유 나무에서 가을에 성숙하는 붉은색 열매의 씨를 제거한 과육을 산수유 (Corni Fructus)라 하며, 이른 봄에 노란 꽃이 피어 춘황금화라고도 하며, 가을에 빨간 열매를 맺기 때문에 가을 산호라는 이름으로 불린다 (Kim 2005). 산수유는 한국, 중국, 일본 등 동양에서는 중요한 한약재로 사용되어왔다. 산수유 (*Cornus officinalis*)는 약용 식물로 그 맛은 시고 성질은 약간 따뜻하여 불감증, 좌골신경통, 야간 발한증, 현기증, 간질환, 신장질환, 간경화, 신경에 좋고, 이뇨작용, 혈압강하작용, 단백질의 소화를 돕는 작용, 항암 및 항균작용 등이 있다고 동의학에서는 보고하였다 (Lee *et al* ., 2008).



Figure. 1 The fruit of *Cornus officinalis* Sieb

산수유의 성분으로는 loganin, morroniside와 같은 iridoid 배당체와 sweroside와 같은 secoiridoid 배당체, ursolic acid, oleanolic acid등의 triterpenoid류, gallic acid, malic acid, tartaric acid 등이 있고, tannin류인 tellimagrandin 1, tellimagrandin 2, isoterchebin (cornus tannin 1), 1,2,3-tri-O-galloyl  $\beta$ -glucose, 1,2,6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose와 gemin D, cornusiin A, B, C 및 2,3-di-O-galloyl-D-glucose, D, E와 F, 1,7-di-O-galloyl-D-sedoheptullose 를 함유하고 있다 (Guilian *et al.* ., 2000).

식물은 생리활성 물질로 페놀성 화합물을 대부분 가지고 있고 일반적으로 수용성이며 플라보노이드류가 주를 이룬다 (Azuma *et al.* ., 1999). 항산화 효과를 측정하는 방법에는 POV (peroxide value), AV (acid value), COV (caronyl value), IV (irodin value)를 구하는 방법과 DPPH의 환원성을 이용하여 구하는 방법 등이 있다 (Bindoli 1997). SOD율 (Superoxide dismutase) 유사활성 실험은 SOD가 superoxide radical에 의한 자동 산화를 억제하는 정도를 *in vitro* 로 측정하는 실험이다. SOD 유사활성 pyrogallol은 물에 존재하는 superoxide radical에 의해 자동산화가 일어나 갈색물질을 형성하는데 이를 분광광도계로 분석하고, superoxide 포착활성이 있는 물질이 존재시 pyrogallol의 산화속도가 낮아지는 원리를 이용하여 superoxide 포착활성을 간접적으로 측정할 수 있다 (Colr, 1974 and Haumann, 1990). DPPH는 질소를 중심으로 안정된 라디칼 구조를 하고 있는데, 515~517nm에서 최대 흡수를 나타내다가 환원이 되어 radical을 소실하게 되면 측정 파장대에서 흡수가 없어지게 되므로 시료의 환원력 크기, 라디칼 제거활성은 대조구의 흡광도 값과 비교하여 백분율로 나타낸다.

산수유의 생리활성 연구로는 흰쥐의 항당뇨 (Yamahara, 1981 and Park, 1995), 항염증작용 (Dai *et al.* ., 1992), 부종억제작용 (Won *et al.* ., 1996), 항산화능에 관한 연구 (Kim *et al.* ., 2004), 산수유에 함유된 항암물질의 정제 및 특성 (Kim *et al.* ., 2004), 산수유열매의 화학 성분과 건조에 따른 과육분리의 특성 (Lee *et al.* ., 1992),

산수유, 황기, 감초 추출물의 생리활성 (Park *et al* ., 2008), 산수유 씨의 최종당화산물 생성저해활성분 (Lee *et al* ., 2008), 산수유의 유리자유기에 의한 간손상 보호 효과 및 기전에 대한 연구 (Ha *et al* ., 2008), 산수유 클로로포름 추출물과 분획물의 암세포주에 대한 세포독성 (Yang *et al* ., 2004), 항균 및 항산화성 (Peng *et al* ., 1998)등이 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 전라남도 구례군의 특산식물인 산수유 열매를 재료로 하여 추출물을 조제한 후, 항산화활성을 분석하기 위하여 DPPH radical 소거능과 폴리페놀 함량 분석, SOD-유사활성, CAT 효소활성을 분석하고 이와 관련된 활성물질을 분리하여 검증하므로써 산수유 열매의 식의약소재로서의 이용성 증대를 도모하고자 하였다.

## II. 재료 및 실험

### 1. 실험재료

본 실험에 이용된 산수유 열매는 2010년도에 전라남도 구례군 재배농가에서 수확하여 씨를 제거한 열매과육을 구입하여 사용하였으며, 표본은 조선대학교 약학대학 표본실에 보관 하였다.

### 2. 시약 및 기기

항산화활성 분석용 시약은 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, D-9132, sigma), BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol, B1378, sigma), Vitamin C (Ascorbic acid A5960, sigma), DMSO (Dimethyl sulfoxide, D5879, sigma) 를 사용하였으며, 추출 및 분획용 시약과 물질분리용 Silica gel (Merck, 63-200 $\mu$ m particle size)은 1급을 사용하였고, TLC chromatography를 위하여 TLC plate (silica gel 60 F254, Merck, Korea) 를 사용하였다.

분석용 기기는 HPLC (Gilson, Korea), RP-C18 column (10 $\times$  250mm, 5 $\mu$ m particle size, RS Tech Optima Pak C18 colum, Korea), UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), microplate reader (Moecular Devices, USA), NMR (KBSI, Gwangju Center, Korea) 등을 사용하였다.



### 3. 실험 방법

#### 3-1. 산수유 열매 추출물의 조제

건조된 산수유 열매 100 g에 50 % EtOH 500 mL를 첨가하여 초음파 추출기로 3시간 3회 추출하였다. 여과 후 감압농축한 다음, 건조기 (50℃)에서 추출물을 건조시킨 시키고, 증류수로 추출물을 현탁하여 동결건조 (Ishin Freeze Dryer)하여 조추출물 25 g을 얻었다.

#### 3-2. 산수유 열매 추출물의 항산화 활성 분석

##### 3-2-1. DPPH radical 소거능 분석

항산화활성 검색은 DPPH법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 Blois의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.  $1 \times 10^{-4}$ M DPPH와 농도별 추출물을 각각 100  $\mu$ l씩 취하여 혼합한 30분간 암 상태에서 방치한 후 잔존 radical 농도를 ELISA Reader (Bio-RAD, USA)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성 (Scavenging activity)으로 표시하며,  $RC_{50}$ 은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양 ( $\mu$ g)으로 나타낸다. 대조군으로는 항산화 물질로 잘 알려진 BHT (butylated hydroxytoluene)와 Vitamin C (ascorbic acid)를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = 1 - (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100$$

Ac : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광

As : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

### 3-2-2. Polyphenol 함량 분석

polyphenol은 산화를 방지하는 작용, 즉 항산화 기능을 갖는 물질로 생체 내에서 항산화제로 작용함으로써 항암효과, 피부노화방지 등에 효과가 있다 ( Kim *et al* ., 2007). 총 폴리페놀함량은 Folin-Denis법을 약간 변형하여 측정하였다. 산수유 열매로부터 분리된 추출물 0.1 g에 methanol 10 ml을 가하여 70°C에서 30분 동안 추출한 후 1mg/ml로 만들어서 사용하였다. 검액 50  $\mu$ l에 증류수 650  $\mu$ l를 넣은 후 Folin-Denis reagent를 50  $\mu$ l 가하여 3분동안 실온에서 반응시킨 후 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액을 100  $\mu$ l을 첨가하고, 최종 볼륨을 1 mL로 맞추기 위해 증류수 150  $\mu$ l을 넣어 잘 혼합시켰다. 37°C water bath에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하며, 표준곡선은 tannic acid (Sigma Co., USA)의 농도를 0~500  $\mu$ g/mL 이 되도록 하고 이로부터 총 페놀함량을 구하였다.

### 3-2-3. SOD-유사활성 분석

각각의 생체시료를 extraction buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.0; 1% Triton X-100; 1% PVP-40)에 1:4의 비율로 혼합한 후 균질화 시키고 12000 rpm에서 20분동안 원심분리한 다음 상층액을 취하여 항산화 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 albumin을 표준물질로 사용하여 BCA protein assay 방법에 따라 측정하였다. SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich (1971)의 방법을 응용하여 측정하였다. 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA, 0.1mM Xanthine, 0.025 mM nitroblue tetrazolium (NBT), 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 10분간 반응한 후 Xanthine oxidase (3.3 $\times$ 10<sup>-6</sup> mM)를 참가하여 반응을 측정하였다. SOD 활성 측정은 550 nm에 30초 단위로 5분간 흡광도를 측정하였다.

### 3-2-4. CAT 활성분석

catalase는 생체내의 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 한산화계 효소로 항산화효소  $H_2O_2$ 를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. 항산화효소 (antioxidative enzyme)가 풍부한 음식을 섭취하는 것은 암이나 심장병 등의 발병가능성을 줄여준다고 생각되어왔으며 항산화효소가 신체의 노화현상을 지연시킨다는 연구보고도 있다 (Lee *et al* ., 2006). 이러한 항산화효소가 풍부한 보충제로는 알파 토코페롤 ( $\alpha$ -tocopherol)과 같은 지용성 비타민 E, 베타 카로틴 ( $\beta$ -carotene), 수용성 비타민 C, 셀레늄 (Se), 녹차, 클로렐라, 녹황색 야채 등이 있다고 한다. 그 중에서도 비타민 E는 세포막과 관련이 많기 때문에 인간에게 있어서 가장 중요한 지용성 항산화제 (antioxidant)로 알려져 있다 (Hong *et al* ., 2005). 비타민 C는 수용성 과산화 radical을 제거하고 또 환원된 비타민 E를 재생시키는 역할도 한다. Catalase 활성은 Aebi (1984) 방법에 의하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 10 mM  $H_2O_2$  와 효소액을 가하였다. 240 nm에서 2분간의 흡광도 변화를 관찰하고 1분동안에 1  $\mu$ M의  $H_2O_2$ 를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

### 3-3. 산수유 열매 추출물로부터 생리활성물질 분리, 구조분석

#### 3-3-1. EtAc 추출물의 조제 및 용매분획물 조제

산수유 열매 과육 900 g을 50 % Ethyl Alcohol (2 l)을 용매로 사용하고 Digital Heating Mantle를 이용하여 80°C상에서 3시간 가열하여 2회 추출한 다음 그 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 총 추출물 307.5 g을 얻었다. 총 추출물을 증류수 1.7 l 에 현탁시킨후 이로부터 용매극성에 따라 순차적으로 동량의 hexane 1.7 l 씩 3회 분획하고 hexane층은 다시 감압 농축하여 이와같은 방법(Fig. 2)으로 EtOAc, BuOH에 대하여 3회 반복하여 분획물을 조제하였다.

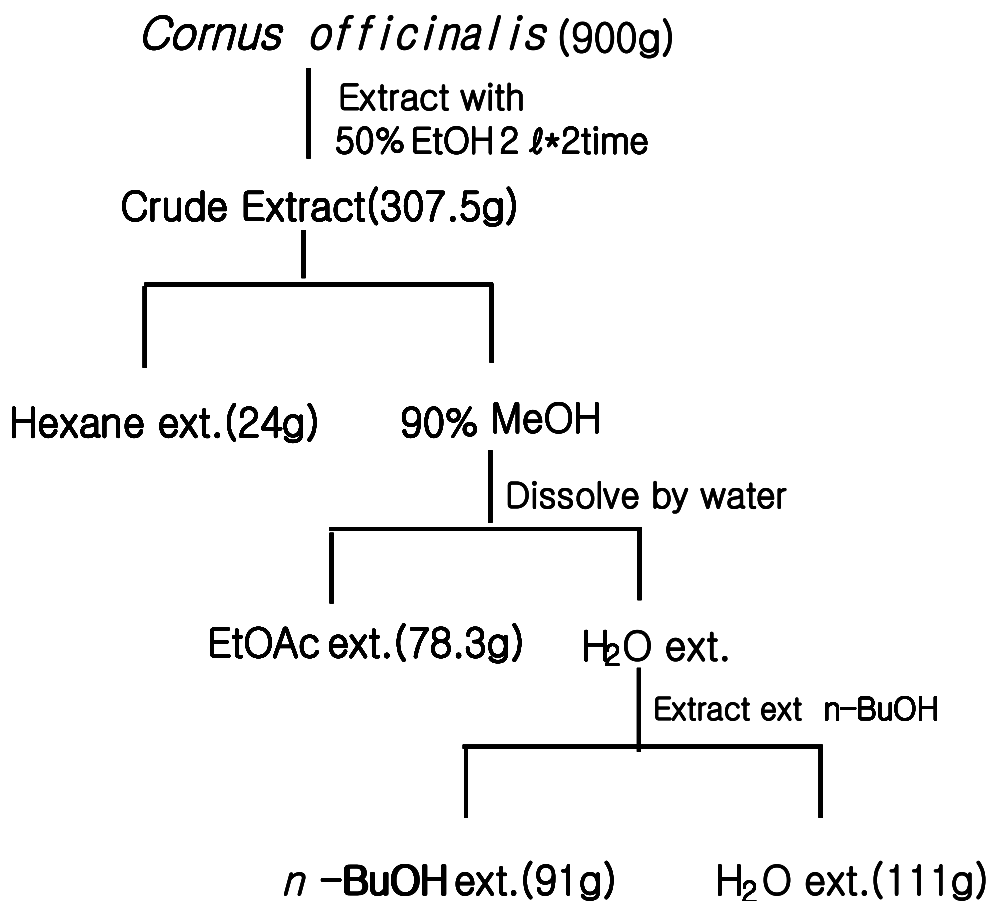


Figure 2. Extraction and fractionation procedures

### 3-3-2. EtOAc 분획물의 Silica column chromatography

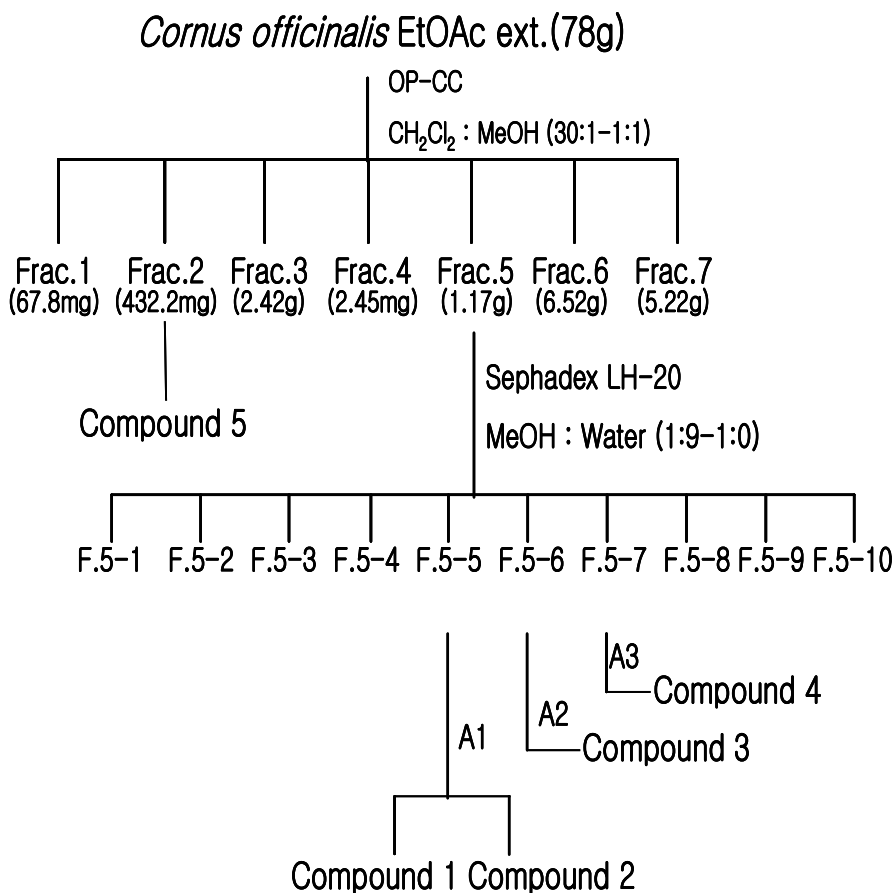
추출물 EtOAc 분획 (78.3g)에 대해  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  용매를 이용하여 Silica gel column chromatography (30:1 ~ 0:1)를 실시하여 모두 7개의 소 분획을 얻었다 (Fig. 3).

### 3-3-3. 활성분획물의 Sephadex LH-20 column chromatography

EtOAc 분획으로부터 분리된 7개의 Fraction들에 대하여 항산화 활성을 분석한 결과, 활성이 가장 높게 나타난 Fraction 5를 Sephadex LH-20 Column chromatography를 이용하여  $\text{MeOH}:\text{Water}$  (1:9 ~ 1:0)의 조건으로 10 % ~ 100 %까지 10개의 분획을 얻었다.

### 3-3-4. Compound의 HPLC profile 분석

7개의 분획물 중 활성이 가장 높은 분획물 2를 HPLC system, RP-C18 (20 × 250mm, 4  $\mu\text{m}$  MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$ +0.1% Formic acid)을 이용하여 Compound 5를 분리하였다. 분획물 5는 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 얻은 50 % 분획을 HPLC system을 이용하여 Compound 1을 분리하였고, 60 %에서는 Compound 2와 Compound 3, 70 %에서는 Compound 4를 얻을 수 있었다.



A : Gilson HPLC system, RP-C18(20× 250mm, 4 $\mu$ m MeCN/H<sub>2</sub>O+0.1% Formic acid)  
 A1 ; MeCN:Water 5:5    A2 ; MeCN:Water 6:4    A3 ; MeCN:Water 7:3

Figure 3. Isolation of compounds from EtOAc fraction in *Cornus officinalis*

### 3-3-5. HPLC에 의한 활성물질 분리, 정제

#### - Compound 1의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 시행하였다. 이후 10% ~ 100%까지 10가지 분획물 중 분리되어진 50% 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (33:67)로 HPLC를 이용하여 compound 1을 얻었다.

#### - Compound 2의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column을 시행하였다. 이후 10% ~ 100%까지 10가지 분획물을 얻어 분리되어진 50% 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (35:65)로 HPLC를 compound 2를 얻었다.

#### - Compound 3의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column을 시행하였다. 이후 10% ~ 100%까지 10가지 분획물을 얻어 분리되어진 50% 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (35:65)로 HPLC를 compound 3를 얻었다.



#### - Compound 4의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column을 시행하였다. 이후 10 % ~ 100 %까지 10가지 분획물을 얻어 분리되어진 50 % 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (43:57)로 HPLC를 compound 4를 얻었다.

#### - Compound 5의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 2번 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (9:92)로 HPLC를 이용하여 compound 5를 얻었다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 산수유 추출물의 DPPH radical 소거능

한국의 자원식물중 하나인 산수유의 항산화 효과를 조사하기 위하여 안정한 유리 라디칼로 알려져 있는 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 산수유 열매와 꽃의 전자 공여능을 측정하였다. 산수유 열매의 에탄올 추출물에 대한 DPPH 라디칼에 대한 소거활성 효과 ( $RC_{50}$ )는 대조군으로 사용되어진 vitamin C의 6.8 ug/ml, BHT의 101 ug/ml 보다는 다소 높은 농도를 나타냈지만 산수유 꽃 추출물 보다는 우수한 라디칼 소거 효과가 있는 것으로 사료된다. 그리고 꽃 추출물은 거의 효과가 없는 것으로 나타났다 (Table 1).

Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 ( $IC_{50}$ )는 ascorbic acid는 9  $\mu$ g/ml이었으며, 산수유는 200  $\mu$ g/ml의 농도에서 유사한 DPPH radical 소거 활성을 나타냈다고 보고된 (Chang *et al.* , 2005) 반면 본 실험에서는 화합물의 농도 ( $RC_{50}$ )가 243.5 ug/ml로 더 높은 항산화 활성을 보였다.

## 2. Polyphenol 함량, SOD 유사활성 및 CAT 활성

산수유의 SOD와 CAT의 항산화 효소 활성 능력을 측정하고자 열매와 꽃을 공시 재료로 하여 그 활성을 측정하였다. 생약으로 가장 많이 사용하고 있는 열매의 SOD 활성도를 조사한 결과 17.8 (U/mg protein)로 나타났으며 꽃 (7.3 U/mg protein)과 비교하여 높은 활성을 나타내었다.

CAT은 생체내의 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소로 APX와 함께 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. 산수유에서 CAT 활성은 열매에서 가장 높게 나타났으며, 꽃은 5.9 U/mg protein인 반면 열매에서는 13.9 U/mg protein로 나타났다 (Table 2). 이는 SOD와 비슷한 양상을 보였으며, 열매가 꽃 시료에 비해 약 2배의 높은 활성을 나타내었다. 폴리페놀 함량을 분석한 결과 산수유 열매에서는 27.17 ug/ml, 꽃에서는 11.4 ug/ml로 조사되었다. 산수유 열매가 꽃 추출물에 비하여 2배가량 높은 폴리페놀을 함유하고 있었으며, 이는 항산화 효소 측정과 유사한 결과를 나타내었다.

산수유 열수추출물의 총 페놀화합물 함량은 2.79 mg/100g, 플라보노이드 함량은 1.81 mg/100g으로 본 연구의 에탄올 추출물이 더 많은 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 관찰하였으며 (Ju *et al* ., 2006). 본 연구의 산수유 에탄올 추출물이 플라보노이드를 더 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다 .

산수유 추출물의 총 페놀 함량 분석 결과 90°C의 추출물이 5.5 ± 0.0 g/100 g GAE으로 가장 함량이 높았고, 그 다음으로 50°C (4.6 ± 0.0 g/100g GAE), 25°C (4.2 ± 0.0 g/100 g GAE) 추출물 순으로 페놀 함량이 많았다. 이는 추출 온도가 높아질수록 총 페놀 함량이 증가하는 것을 보여준다 (Park *et al* ., 2011). 한편, 다른 연구에 따르면 40°C에서 추출한 산수유의 총 페놀 함량은 32.3 ± 0.1 mg/g으로 (Kim *et al* ., 2003) 본 실험에서는 추출 방법이 다르며 온도의 차이에 따라 결과에 차이가 있는 것으로 사료된다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Cornus officinalis*.

DPPH radical scavenging activity		
Sample	Part of use	RC <sub>50</sub> <sup>‡</sup> (ug/mL)
<i>Cornus officinalis</i> .	Flower	≥ 800
	Fruit	234.51 ± 2.8
Vitamin C		6.8 ± 1.3
BHT		101 ± 0.9

<sup>‡</sup>Extract concentrations, which show 50% DPPH radical scavenging activity, were determined by interpolation.

Table 2. CAT, SOD activity and Total polyphenol content of ethanol extract from *Cornus officinalis*

Sample	CAT activity (U/mg)	SOD activity (U/mg)	Total phenol (ug/ml)
<i>Cornus officinalis</i>			
Flower	5.9 ± 0.6	7.3 ± 0.4	11.4 ± 0.9
Fruit	13.9 ± 1.2	17.8 ± 1.2	27.17 ± 1.3

### 3. 용매 분획물의 DPPH radical 소거능

4종의 용매 추출물을 농도별 (15.5~500 ug/ml)로 DPPH radical 소거능을 분석한 결과 (fig. 2), 모든 농도범위에서 ethyl acetate 추출물의 활성이 우수하게 나타났으며, hexane층과 BuOH층은 유사한 활성을 보였고, 물층이 가장 낮은 소거능을 보였다. 용매별로 라디칼 소거능 ( $IC_{50}$ ) 값으로 비교해보면 ethyl acetate 분획층에서 25.6 ug/ml으로 가장 높은 소거능을 보여주었으며, BuOH (100 ug/ml), Hexane (140.6 ug/ml), Water (500 ug/ml)의 순으로 나타났다 (Table 3).

Bonilla 등의 실험에서 붉은 포도의 용매 분획물의 소거능을 조사한 결과 물 추출물보다 ethyl acetate 추출물에서 자유 공여능 소거활성이 높았으며, 추출물의 성분이 대부분 flavonoid 계 물질로 분석되었다고 보고하였다 (Kim *et al.* , 2005). 따라서 산수유 열매에서도 flavonoid 관련 물질이 풍부할 것으로 사료된다.

산수유 에탄올 추출물은 200 ppm 농도까지는 합성 항산화제인 BHT (64.3%)와 비슷한 전자공여능을 나타냈으며, 300 ppm 이상의 농도에서는 BHT (73.4%)보다 높은 항산화 활성을 보였다 (Jeon *et al.* , 2008). 산수유 메탄올 추출물은 1000 ppm의 농도에서 67%의 전자공여능을 나타내었다. 그리고  $IC_{50}$  값은 154 ppm으로 산수유 메탄올 추출물의  $IC_{50}$  값인 189.3 ppm보다 낮아 본 실험의 에탄올 추출물이 더 높은 항산화 활성을 보였다(Kim *et al.* , 2004).

용매별로 분획하여 얻어진 산수유 추출물 1 mg의 free radical 소거능을 DPPH에 대한 전자공여능으로 측정 결과 에탄올 추출물과 물 추출물이 520nm에서 각각 0.12 및 0.11dml 흡광도를 보여 높은 라디칼 소거능을 보였다. 한편, hexane, chloroform, ethylacetate 추출물은 각각 0.62, 0.71, 0.65의 흡광도를 나타내 대조군 (0.94)과 유의적인 차이는 있었으나 그다지 높은 라디칼 소거능을 나타내지 못하였다고 보고에 (Ha 1997) 따른 항산화 효과의 차이가 있는데 이는 식물의 생산, 지역별, 사용한 용매에 의한 유용성분이 다르고 실험에 사용한 추출물의 양이 다르기 때문이라고 사료된다.

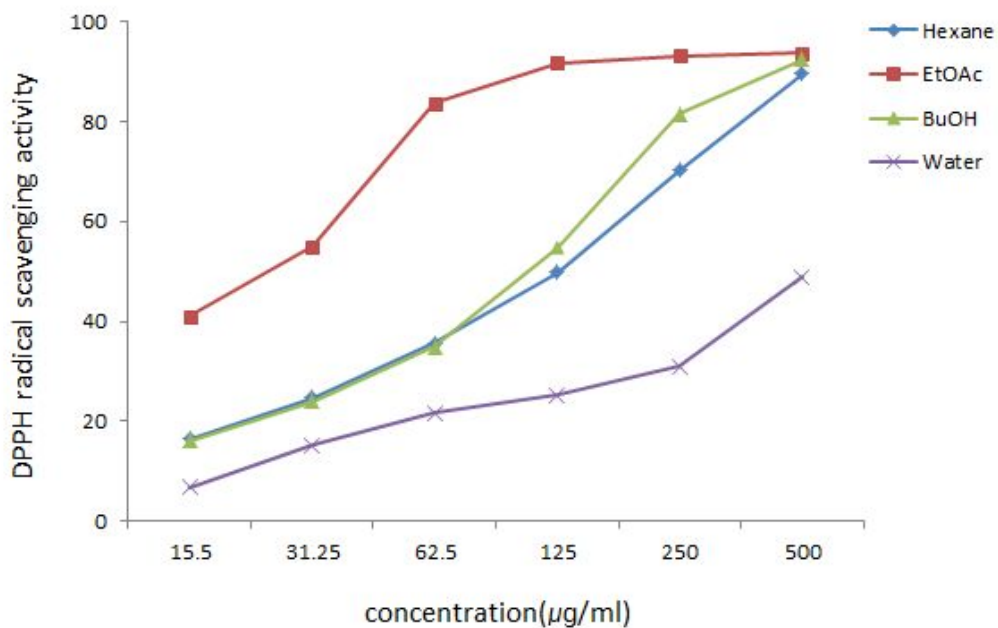


Figure 4. DPPH radical scavenging activity of *Cornus officinalis* extracts by various organic solvents.

Table 3. DPPH radical scavenging activity of *Cornus officinalis* extracts by various organic solvents.

DPPH radical scavenging activity		
Solvent	Treat	RC <sub>50</sub> <sup>‡</sup> (ug/mL)
Hexane	Crude	140.6 ± 2.2
EtOAc	Crude	25.6 ± 3.4
BuOH	Crude	110 ± 3.2
Water	Crude	500 ± 5.1
control	Vitamin C	6.8 ± 1.3
	BHT	101 ± 0.9

<sup>‡</sup>Extract concentrations, which show 50% DPPH radical scavenging activity, were determined by interpolation.



#### 4. Compound 의 DPPH radical 소거능

산수유 열매 4가지 용매 추출물 중 가장 높은 DPPH 소거 활성을 지닌 ethyl acetate 층을 구조 분석한 결과 총 5가지의 물질을 동정하였다. 동정된 물질의 항산화 효과를 비교 분석하기 위해 DPPH radical 소거능을 조사하였다 (Table 4).

분석한 결과, gallic acid (15.63 ug/ml), cornuside (33.82 ug/ml), (7R)-O-Methyl morroniside (250 ug/ml), (7S)-O-Methyl morroniside (250 ug/ml), 그리고 loganin (308 ug/ml)의 순으로 나타났으나 gallic acid와 cornuside 가 가장 높은 활성을 나타냈는데 대조군으로 사용된 합성 비타민인 BHT의 소거능에 비교하여 월등히 높은 항산화 활성을 보여주었다.

항암제로 쓰이는 cisplatin 의 세포 독성에 gallic acid가 SOD 유사 활성을 증가시키고, 세포생존율도 증가시켰다. 또한 항산화 효과도 vitamin E와 거의 같게 나타났다고 보고 하였는데 이는 본 실험결과와도 일치하였다 (Lim 2009).

DPPH-radical scavenging activity를 측정하기 위하여 80 uM과 120 uM의 농도로 gallic acid가 포함된 시료를 분석한 결과 80uM의 gallic acid의 처리에서는 활성이 22.2% ( $p < 0.05$ )로 나타난 반면, 120 uM의 gallic acid 처리에서는 57.6% ( $p < 0.01$ )로 나타났다. 특히, 120 uM의 gallic acid의 활성은 비교군으로 사용한 30 uM의 vitaminE 활성인 58.8% ( $p < 0.01$ )와 거의 유사한 것으로 나타났다고 보고하였다 (Seo *et al* ., 2009).

산수유 열매의 기능성 소재로서의 개발 가능성을 탐색하기 위해 현재 많은 연구가 진행되고 있고 본 실험에서도 산수유 열매 추출물로부터 항산화 효능이 뛰어난 성분들을 분리 정제하였다. 이들을 재료로 하는 건강기능성 식품 및 신약제의 개발을 위해 각 물질들의 생리 및 약리 활성에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of compounds in *Cornus officinalis* extracts

DPPH radical scavenging activity	
Fraction	RC <sub>50</sub> <sup>‡</sup> (ug/mL)
Loganin	308 ± 2.1
(7S)-O-Methyl morroniside	278 ± 1.9
(7R)-O-Methyl morroniside	250 ± 3.2
cornuside	33.82 ± 1.4
gallic acid	15.63 ± 0.9
control	
Vitamin C	6.8 ± 1.3
BHT	101 ± 0.9

<sup>‡</sup>Extract concentrations, which show 50% DPPH radical scavenging activity, were determined by interpolation.

## 5. HPLC profile of Compounds

HPLC, RP-C18 (20 × 250mm, 4 $\mu$ m)의 컬럼과 UV 254nm파장, 2 ml/min의 유속에서 Compound 1은 ACN:Water의 33:67로 이동상을 이용한 gradient system에서 분석 조건을 검토한 결과 Total lunning time 53분에서 19분대에 피크가 분리된 것을 관찰 하였다 (Figure 5). Compound 2와3은 ACN:Water의 35:65로 Total lunning time 45분에서 각각 Compound 2번과 3번 피크가 26분과 27분대에 분리된 것을 관찰 할 수 있다 (Figure6). Compound 4는 MeOH:Water의 43:57로 Total lunning time 50분에서 29분대에 피크가 분리된 것을 관찰 하였다 (Figure 7).

Compound 5는 ACN:Water의 9:92로 Total lunning time 32분에서 13분대에 피크가 분리된 것을 관찰 하였다 (Figure 8).

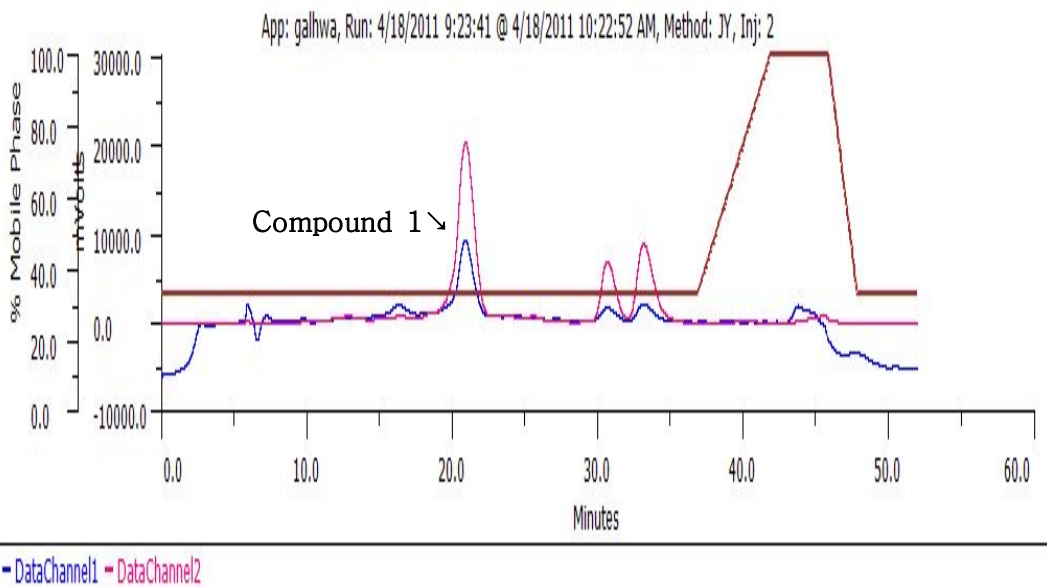


Figure 5. HPLC profile of compound 1

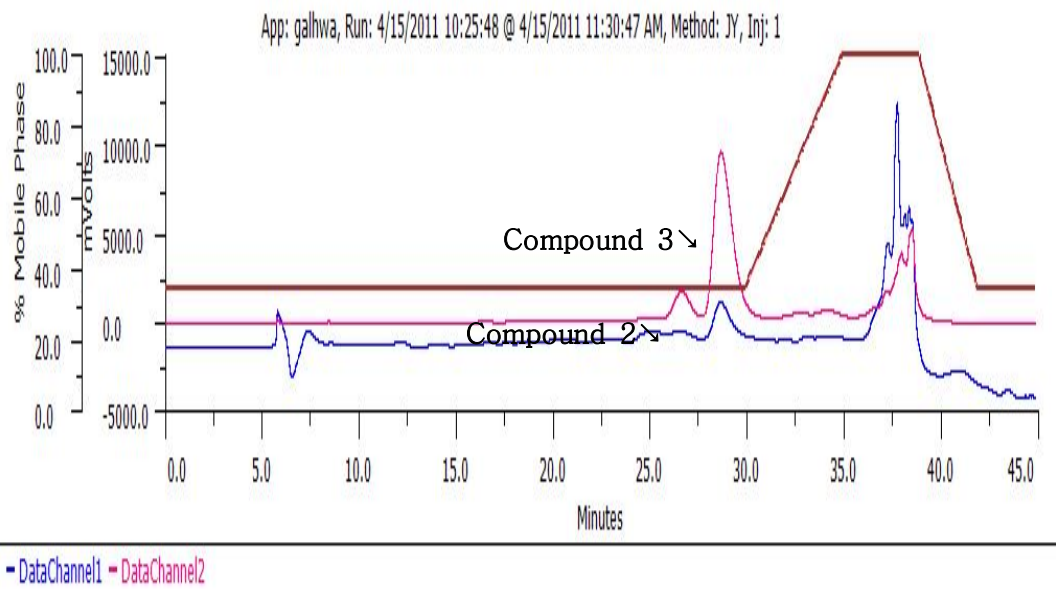


Figure 6. HPLC profile of compound 2 & 3

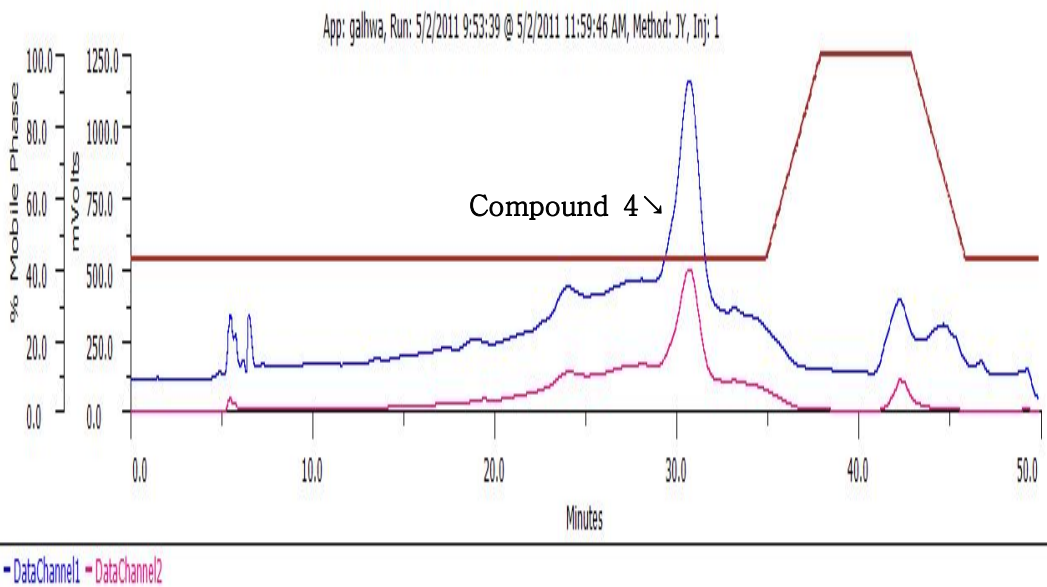


Figure 7. HPLC profile of compound 4

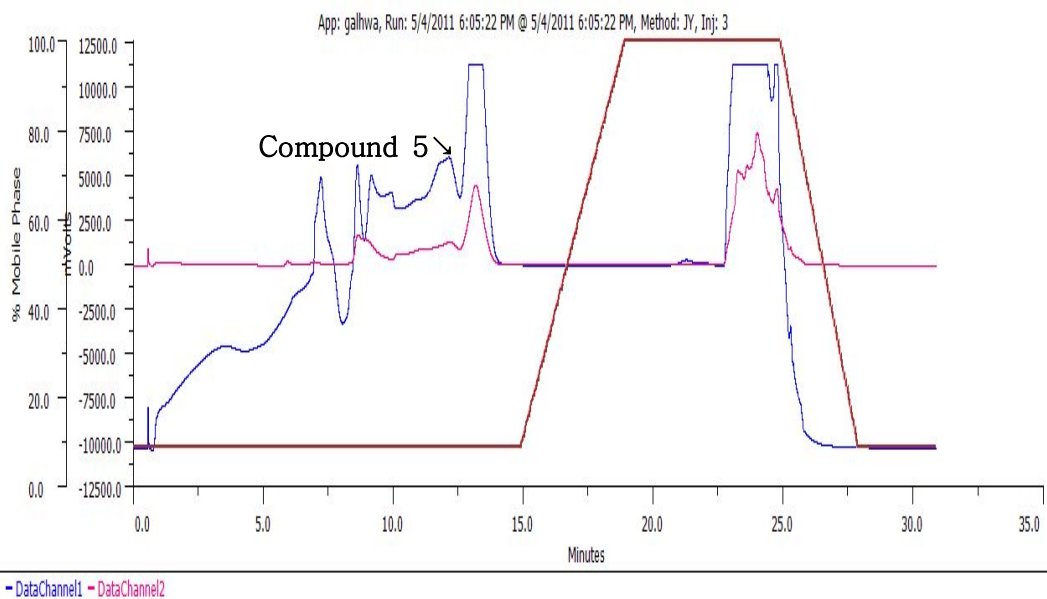


Figure 8. HPLC profile of compound 5

## 6. Compound 구조 결정

### 6-1. Compound 1의 구조

#### Loganin(3,4,5-Trihydroxybenzoic acid; loganic acid)

$^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.42 (1H, s)에서 특징적인 iridoid 골격의 H-3 peak 를 확인하였고,  $\delta$  3.70 (3H, s) 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum의  $\delta$  52.4를 통해 C-11의 carboxyl 탄소가 methyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었다. 또한  $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서  $\delta$  4.67 (1H, d,  $J = 8.0\text{Hz}$ )과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum의 glucose signal  $\delta$  100.8, 79.3, 78.8, 72.3, 63.5로부터 glucose 배당체임을 알 수 있었다 (Fig.9). 이상의 결과 문헌치와 비교하여 Loganin으로 동정하였다 (Fig. 10) (Prasada *et al.*, 2000).

$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ , White amorphous powder, m.p ( $^{\circ}\text{C}$ ) 235-240,  $[\alpha]_D -83$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ). FABMS  $m/z$  413  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3460, 3300, 1710, 1650, 1430

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, Acetone- $d_6$ ) :  $\delta$  1.12 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-10), 1.65 (1H, m, H-6 ). 1.90 (1H, m, H-8), 2.06 (1H, m, H-6 $_{ax}$  ), 2.25 (1H, m, H-9), 3.15 (1H, m, H-5), 3.20-3.42 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.68 (1H, dd,  $J = 11.0, 5.2$  Hz, H-6' a), 3.70 (3H, s,  $\text{OCH}_3$  ), 3.93 (1H, dd,  $J = 11.0, 5.2\text{Hz}$ , H-6' b), 4.06 (1H, t,  $J = 4.8$  Hz, H-7), 4.67 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1' ), 5.30 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz, H-1), 7.42(1H, s, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz, Acetone- $d_6$ ) :  $\delta$  170.3 (C-11), 152.9 (C-3), 114.8 (C-4), 100.8 (C-1'), 98.5 (C-1), 79.3 (C-5'), 78.8 (C-3'), 75.8 (C-7), 75.5 (C-2'), 72.3 (C-4'), 63.5 (C-6'), 52.4 ( $\text{OCH}_3$  ), 47.3 (C-9), 41.6 (C-6), 40.7 (C-8), 32.9 (C-5), 14.2 (C-10)



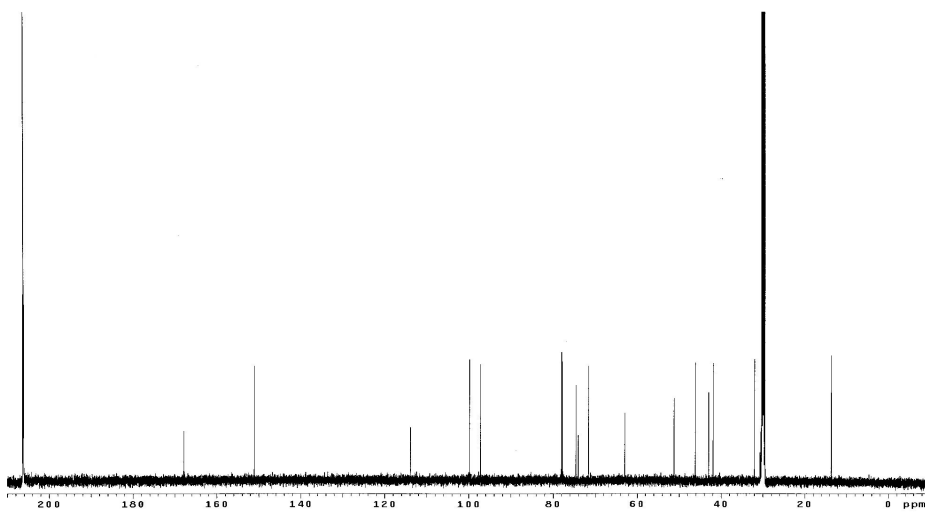
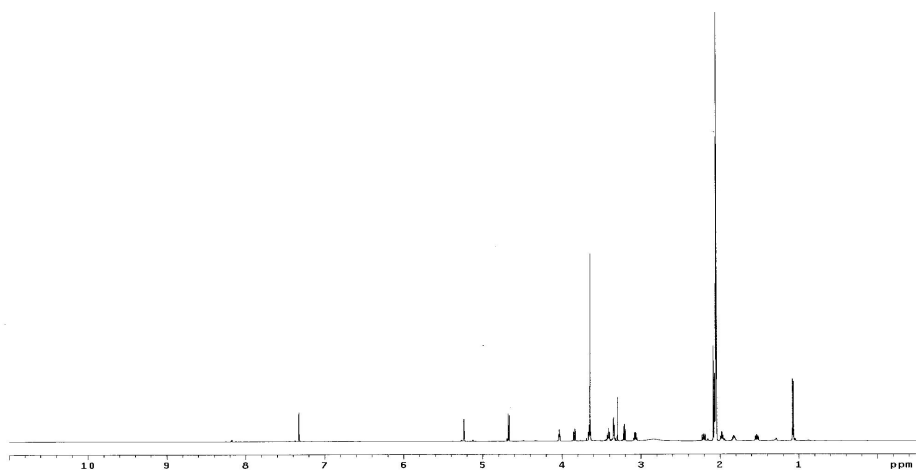


Figure 9.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, Acetone- $d_6$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, Acetone- $d_6$ ) spectrum of compound 1

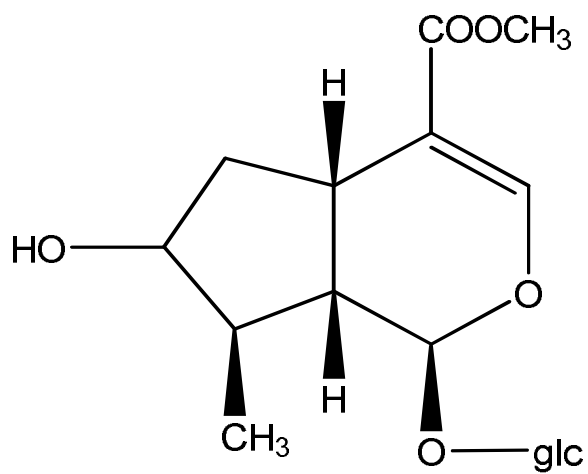


Figure 10. Structure of Loganin(3,4,5-Trihydroxybenzoic acid; loganic acid)

Loganin은 iridoid glycoside 화합물로서, 주로 *Flos Ionicerae*, 산수유 열매, *Strychnos nux vomica*에 존재하며, 면역조절 기능과 항염활성, 항쇼크 효과 등이 있다고 보고 되었다 (Mathad *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1999, Guo *et al.*, 2001). 최근에 loganin이 마우스에서 scopolamine로 유도된 기억 impairment를 유의적으로 향상시킬 뿐만아니라 reverse 시키며, hippocampus와 frontal cortex에서 acetylcholinesterase 활성을 저해한다고 하였으며 (Kwon *et al.*, 2009), 신경세포인 SH-SY5Y에서 JNK와 p38, ERK 1/2 MAPKs의 인산화를 억제하므로써 과산화수소로 유도된 apoptosis로부터 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다 (Kwon *et al.*, 2011). 또한 loganin은 마우스 실험에서 hepatic injury와 비정상적인 대사상태와 연관된 diabetic complications와 산화적 스트레스에 의해 유도된 염증에 대하여 보호효과가 있다고 보고되었으며 (Yamabe *et al.*, 2010) loganin을 마우스 조골세포에 처리했을 때 세포분화 표지인자인 alkaline phosphatase의 활성을 증가시키며, 콜라겐 type I과 osteocalcin 함량을 증가시키는 것으로 나타났다 (Li *et al.*, 2010). 이상과 같이 다양한 생리적 활성을 가지고 있는 산수유의 loganin은 전임상, 임상단계의 실험을 통하여 안전성이 입증된다면 향후 의약신소재로서의 가치가 있을 것으로 사료된다.

## 6-2. Compound 2의 구조

### (7S)-O-Methylmorroneiside

$^1\text{H-NMR}$  spectrum 및  $^{13}\text{C-NMR}$  Spectrum에서 morroneiside와 유사한 특징을 보였으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  3.59 (3H,s)의 methoxyl group이 C-7에 치환되어 있음을 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  4.65 (1H, d,  $J=2.8\text{Hz}$  H-7)와 1.42 (1H, td,  $J=12.0, 3.6\text{ Hz}$ , H-6<sub>ax</sub>), 1.82 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.4\text{ Hz}$ , H-6<sub>eq</sub>)을 문헌치와 비교하여 7S임을 확인하였다 (Fig. 11). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 (7S)-O-Methylmorroneiside로 동정하였다 (Fig. 12) (Zhang *et al.*, 2009).

$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ , Yellowish oil, m.p ( $^{\circ}\text{C}$ ) 103-104, FABMS  $m/z$  443  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  
IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3395, 2939, 1705, 1638, 1077

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.25 (3H, d,  $J = 6.8\text{ Hz}$ , H-10), 1.42 (1H, td,  $J = 12.0, 3.6\text{ Hz}$ , H-6<sub>ax</sub>), 1.72 (1H, m, H-9), 1.82 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.4\text{ Hz}$ , H-6<sub>eq</sub>), 2.95 (1H, dt,  $J = 12.4, 4.4\text{ Hz}$  H-5), 3.25 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.10-3.30 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.59 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.79 (1H, m, H-6'), 4.19 (1H, m, H-8), 4.65 (1H, d,  $J = 2.8\text{ Hz}$ , H-7), 4.70 (1H, d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , H-1'), 5.80 (1H, d,  $J = 9.2\text{ Hz}$ , H-1, d,  $J = 9.2\text{ Hz}$ , H-1), 7.41 (1H, s, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  167.3 (C-11), 153.0 (C-3), 110.2 (C-4), 98.7 (C-7), 98.1 (C-1'), 94.2 (C-1), 77.2 (C-5'), 76.6 (C-3'), 73.7 (C-3'), 70.3 (C-4'), 64.9 (C-8), 61.4 (C-6'), 53.6 (7- $\text{OCH}_3$ ), 50.3 (11- $\text{OCH}_3$ ), 39.0 (C-9), 32.4 (C-6), 26.6 (C-5), 18.2 (C-10)

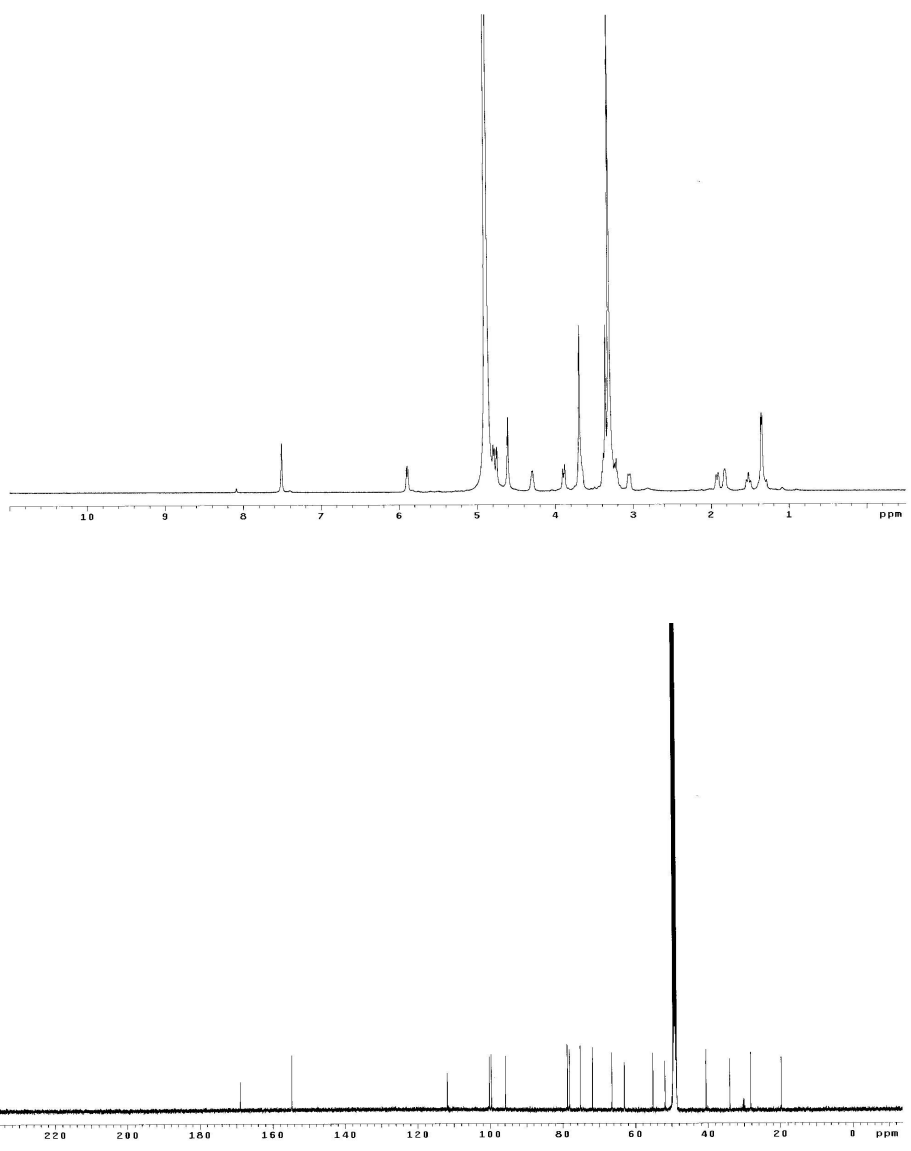


Figure 11.  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum of compound 2

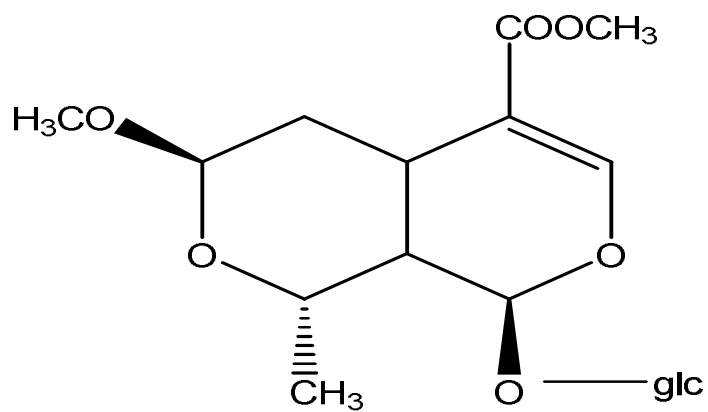


Figure 12. Structure of (7S)-0-Methylmorrisonide

### 6-3. Compound 3의 구조

#### (7R)-O-Methylmorroneiside

$^1\text{H-NMR}$  spectrum 및  $^{13}\text{C-NMR}$  Spectrum에서 morroneiside와 유사한 특징을 보였으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  3.59 (3H,s)의 methoxyl group이 C-7에 치환되어 있음을 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  4.65 (1H, d,  $J=8.5\text{Hz}$  H-7)와 1.07 (1H, td,  $J=13.1\text{ Hz}$ , H-6<sub>ax</sub>), 1.91 (1H, dd,  $J=11.5\text{ Hz}$ , H-6<sub>eq</sub>)을 문헌치와 비교하여 7R임을 확인하였다 (Fig. 13). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 (7R)-O-Methylmorroneiside로 동정하였다 (Fig. 14) (Wang *et al.*, 2008).

$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ , Yellowish oil, m.p ( $^{\circ}\text{C}$ ) 144-145, FABMS  $m/z$  443  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 443  
IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3396, 2923, 1702, 1640, 1407

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.07 (1H, q,  $J=13.1\text{ Hz}$ , H-6<sub>ax</sub>), 1.31 (1H, d,  $J=7.0\text{ Hz}$ , H-10), 1.70 (1H, m, H-9), 1.91 (1H, d,  $J=11.5\text{ Hz}$ , H-6<sub>ax</sub>), 2.73 (1H, dt,  $J=13.0, 4.0\text{ Hz}$  H-5), 3.10-3.30 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.40 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.60 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.79 (1H, d,  $J=11.0\text{ Hz}$ , H-6'), 3.86 (1H, d,  $J=5.0\text{ Hz}$ , H-8), 4.40 (1H, d,  $J=8.5\text{ Hz}$ , H-7), 4.70 (1H, d,  $J=8.0\text{ Hz}$ , H-1'), 5.70 (1H, d,  $J=9.0\text{ Hz}$ , H-1), 7.41 (1H, s, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  169.4 (C-11), 153.3 (C-3), 111.5 (C-4), 105.5 (C-7), 100.7 (C-1'), 96.5 (C-1), 73.9 (C-5'), 78.8 (C-3'), 75.9 (C-2'), 75.0 (C-4'), 72.5 (C-8), 63.7 (C-6'), 57.7 (7- $\text{OCH}_3$ ), 52.6 (11- $\text{OCH}_3$ ), 41.0 (C-9), 36.5 (C-6), 32.5 (C-5), 20.5 (C-10)

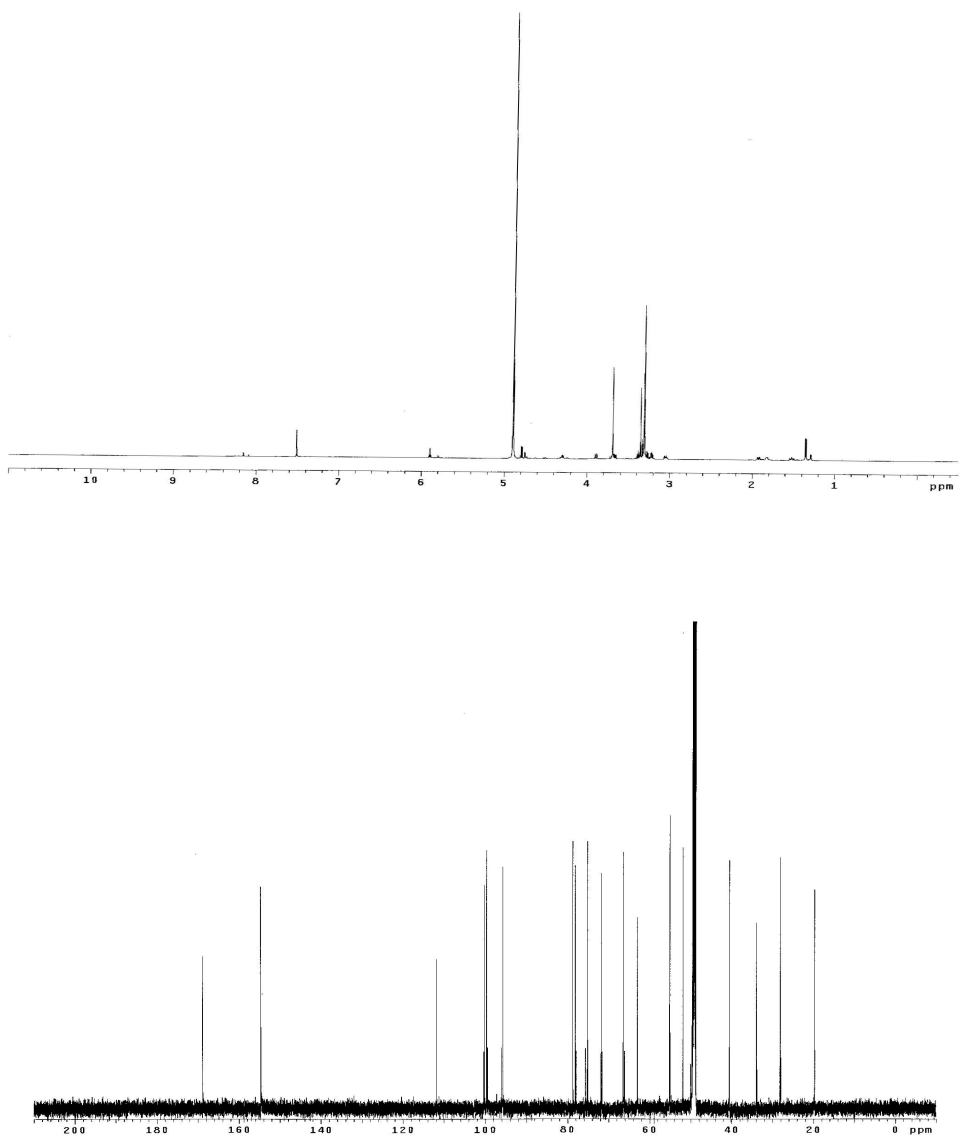


Figure 13.  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_2$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum of compound 3



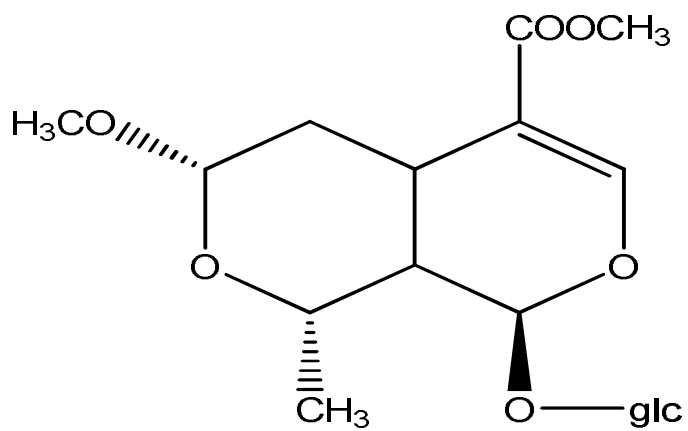


Figure 14. Structure of (7R)-0-Methylmorroneiside

Carbocyclic iridoid glycoside로 알려진 morroniside는 iridoid 중 주요한 활성물질로 cornaceae, caprifoliaceae, sarraceniaceae, hydrangeaceae와 같은 식물에 많이 존재하는데 특히 산수유에 함유되어 있는 주된 활성성분이며 가장 풍부한 iridoid glycoside류에 속한다. 이 화합물은 항산화활성,  $\alpha$ -glucosidase 저해능, 항염증 활성을 나타내며, 대장암세포에 대하여도 상당한 억제능을 보이는 것으로 보고 되었다 (Zhirui *et al.*, 2011).

Morroniside는 1형과 2형 당뇨에서 hepatic injury 및 renal injury를 보호하며, 지질과 염증반응을 통하여 간과 신장에 유익한 역할을 하는 것으로 보고 되었으며 loganin과 마찬가지로 morroniside를 마우스 조골세포에 처리했을 때 세포분화 표지인자인 alkaline phosphatase의 활성을 증가시키며, 콜라겐 type I과 osteocalcin 함량을 증가시키는 것으로 나타났다 (Li *et al.*, 2010).

## 6-4. Compound 4의 구조

### Cornuside (7-galloylsecologanol)

$^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.39 (1H, s)에서 특징적인 iridoid 골격의 H-3 peak를 확인하였고,  $\delta$  4.62 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1')의 anomeric protone과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum의 glucose signal로부터 glucose 배당체임을 알 수 있었다. 또한  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.03 (2H, s, H-2', 6')의 galloyl moiety와  $\delta$  1.91 (1H, dq,  $J = 14.0, 6.5$  Hz, H-6a), 2.00 (1H, dq,  $J = 14.0, 7.0$  Hz, H-6b), 4.16 (2H, m, H-7)의  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  system을 확인할 수 있었다 (Fig. 15). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 cornuside로 동정하였다 (Fig. 16) (YASUHIKO *et al.*, 2007).

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$  White amorphous powder,  $[\alpha]_D -9^\circ$  (MeOH), FABMS  $m/z$  565  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3394, 1693, 1624, 1315, 1240, 1076

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  1.91 (1H, dq,  $J = 14.0, 6.5$  Hz, H-6a), 2.00 (1H, dq,  $J = 14.0, 7.0$  Hz, H-6b), 2.58 (1H, dt,  $J = 8.5, 6.5$  Hz, H-9), 2.86 (1H, q,  $J = 6.5, 4.9$  Hz, H-5), 3.10 (1H, dd,  $J = 9.0, 8.0$  Hz, H-2''), 3.17 (1H, dd,  $J = 9.5, 9.0$  Hz, H-4''), 3.24 (1H, overlapped by the solvent signal, H-5''), 3.29 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-3''), 3.52 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3.58 (1H, dd,  $J = 12.0, 6.0$  Hz, H-6'', a), 3.81 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.0$  Hz, H-6'', b), 4.16 (2H, m, H-7), 4.62 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1'), 5.17 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz, H-10), 5.20 (1H, d,  $J = 17.5$  Hz, H-10), 5.48 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-1), 5.72 (1H, ddd,  $J = 17.5, 10.5, 8.5$  Hz, H-8), 7.03 (2H, s, H-2', 6'), 7.39 (1H, s, H-3)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  31.0 (C-6), 32.4 (C-5), 46.1 (C-9), 52.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 63.5 (C-6''), 65.1 (C-7), 72.3 (C-4'), 75.4(C-2''), 78.7 (C-3''), 79.1 (C-5''), 98.4 (C-1), 100.9(C-1''), 110.9 (C-2', 6'), 112.2 (C-4), 120.4 (C-10), 112.4 (C-1'), 136, 4 (C-8), 140.5 (C-4'), 147.2 (C-3', 5'), 154.5 (C-3), 169.2 (C-7'), 170.0 ( $\text{C}=\text{O}$   $\text{H}_3$ )

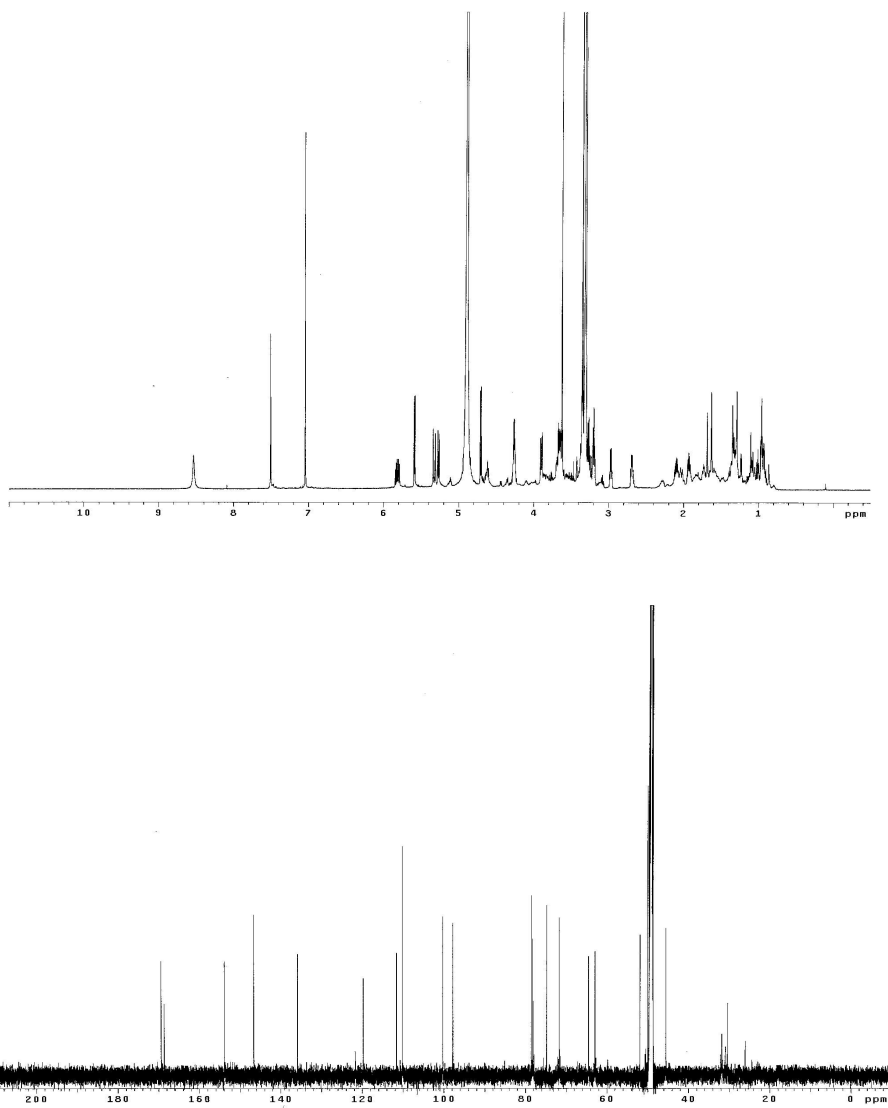


Figure 15.  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum of compound 4

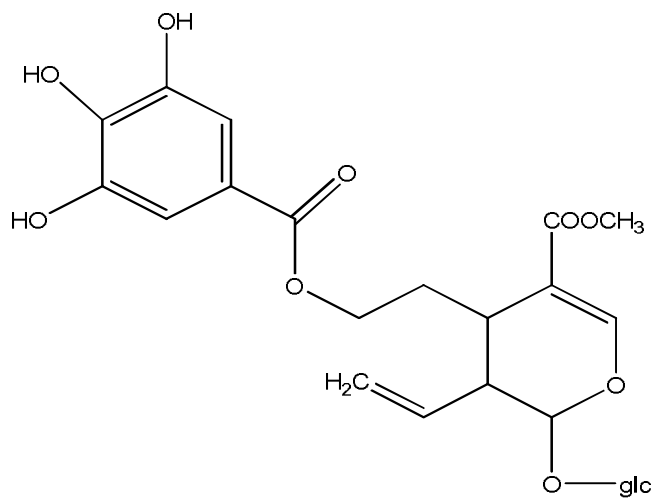


Figure 16. Structure of Cornuside (7-galloylsecologanol)

Cornuside는 secoiridoid glucoside 또는 bisiridoid glucoside 화합물로서, 인체 endothelial cell에서 씨도카인으로 유도된 전염증 (proinflammatory)과 접착분자들의 발현을 억제하며, oxygen-glucose deprivation에 의해 유도된 장애로부터 쥐의 cortical cell를 보호하며, 마우스 대식세포에서 LPS로 유도된 NO 생성을 저해한다고 보고 되었다 (Kang *et al.*, 2007).

## 6-5. Compound 5의 구조

### Gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid)

$^1\text{H-NMR}$  spectrum의  $\delta$  7.11 (2H, s, galloyl-H)에서 singlet의 peak만을 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 모두 5개의 peak가 관찰되었으며  $\delta$  146.4 (C-3,5),  $\delta$  110.6 (C-2,6)은 각각 2개의 탄소에 해당하는 integral을 보이므로 대칭구조의 aromatic 화합물임을 확인하였다. 그리고  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  168.6에서 carboxyl group을 확인하였고,  $\delta$  146.4 (C-3,5)과  $\delta$  139.2 (C-4)에서 3개의 oxygenated aromatic carbon의 존재를 확인하였다 (Fig. 17). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 gallic acid로 동정하였다 (Fig. 18) (Sharma *et al.*, 1998).

$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ , White amorphous powder, m.p ( $^\circ\text{C}$ ) 258-265, EIMS  $m/z$  170  $[\text{M}]^+$  IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3392, 1687, 1616, 1427, 1330

$^1\text{H-NMR}$  (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  7.11 (2H, s, galloyl-H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  110.6 (C-2, 6), 122.3 (C-1), 139.2 (C-4), 146.4 (C-3, 5), 168.6 (C=O)



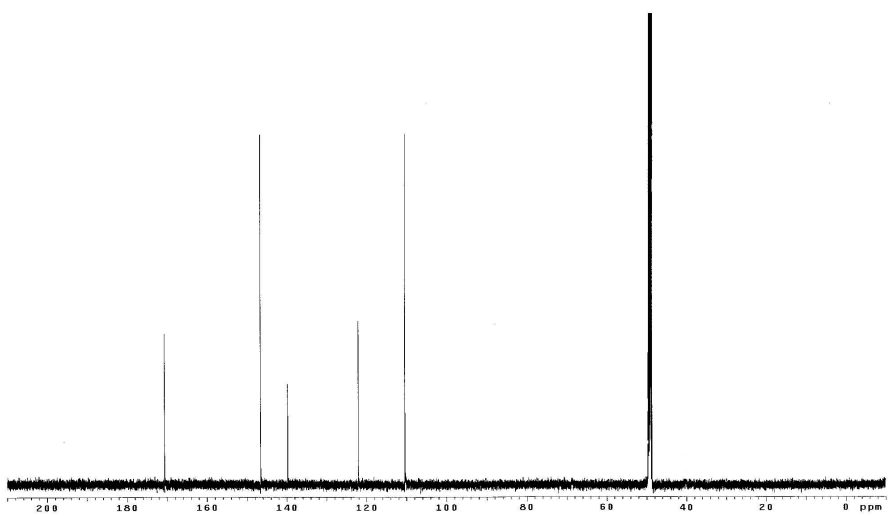
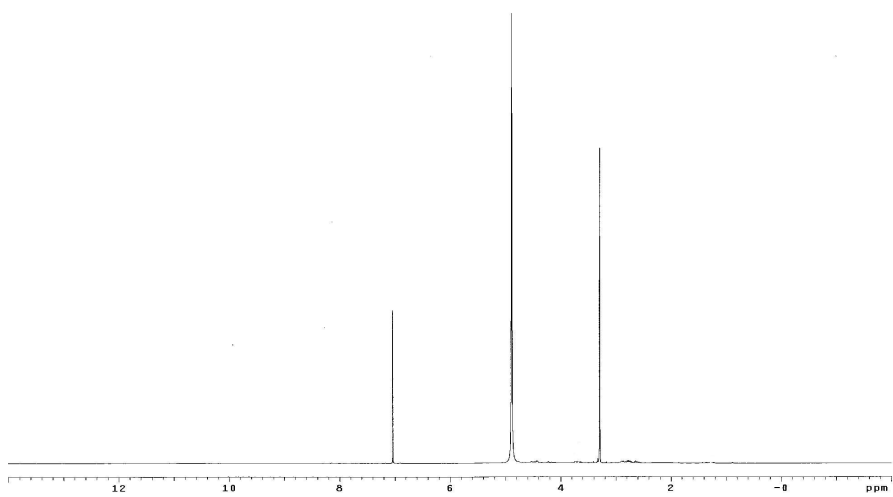


Figure 17.  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum of compound 5

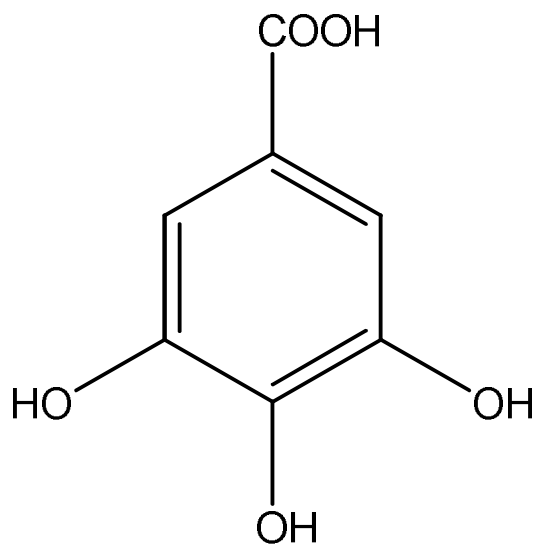


Figure 18. Structure of Gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid)

녹차와 산수유, 오미자, 산사자, 오배자, 커피, 머루 등 다양한 식물체들에 많이 함유되어 있는 폴리페놀계 성분인 gallic acid (GA; 3,4,5-trihydroxyl-benzoic acid)는 분자량이 작은 화합물로 인체에 매우 잘 흡수되어진다. 이 화합물은 매우 다양한 생리활성을 가지고 있는데 항산화와 항균, 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있다고 알려져 있다. 특히 전립선암, 폐암, 위암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 식도암에 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 강한 항돌연변이 효과가 있고 비만세포로부터 히스타민 방출을 농도의존적으로 억제한다. 그 밖에도 GA에 의해 유도된 apoptosis는 활성산소종 (ROS)으로부터 유도된 산화적 스트레스와 미토콘드리아의 기능장애, 세포내 칼슘이온 농도와 관련이 있는 것으로 밝혀졌으며, 최근에는 GA가 과산화수소로 인한 손상으로부터 피부 멜라닌세포를 보호하는 효과가 있음이 보고 되었다 (Jeong *et al* ., 2009).

## IV. 결 론

총총나무과에 속하는 산수유는 중국과 한국에 널리 분포되어 있으며, 종자를 제거한 과육은 山茱萸라는 한약재로 오래전부터 이용되어 왔다.

본 연구는 산수유 열매 추출물의 생리활성 중 항산화활성을 평가하기 위하여 총 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거능, SOD 유사활성 및 CAT 효소활성으로 분석하였다. 열매 추출물은 에탄올로 조제한 다음, 항산화 활성 분석 결과 DPPH radical 소거능은  $RC_{50}$  이 234.51 ug/ml 폴리페놀 함량 27.17 ug/mL SOD 유사활성 17.8 U/ng CAT 활성 13.9 U/mg 으로 나타났다.

활성화합물을 분리하기 위하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매 분획물을 조제하였다. 조제후 분획별로 항산화활성을 평가하기 위해 분석 결과 열매 추출물의 DPPH radical 소거능은  $RC_{50}$ 값이 헥산층이 140.60 ug/mL, 에틸아세테이트 층이 25.60 ug/mL, 부탄올 층이 110.00 ug/mL, 물층이 500.00 ug/mL으로 나타났으며, 이 용매분획물들 중 소거능이 가장 우수한 에틸아세테이트 층은 항산화 표준물질인 BHT 보다 강한 활성을 보였다.

이상과 같은 실험결과로 항산화능이 우수한 에틸아세테이트 층으로부터 5종의 활성화합물인 gallic acid, cornuside, (7S)-0-methylmorroneiside, (7R)-0-methylmorroneiside, loganin을 분리하여 NMR 분석을 통하여 구조를 결정하였다. 이상과 같은 실험 결과로 산수유 열매 추출물이 식물성 항산화 소재자원으로서 그 가치가 충분하다는 것을 실험적으로 검증하였다.

## 참고문헌

- Azuma. K., Nakayama. M., Koshika. M., Ippoushi. K., Yamaguchi. Y., Kohata. K., Yamaguchi .Y., Ito .H., Higashio .H. (1999 ) Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius*. L .J .Agric. Food Chem., 47,3963-3966 .
- Bindoli. A., L. Caqvallini, Siliprandi. (1977) Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat mitochondria and microsomes : *Biochem . Phamacology*, 26,2405-2409 .
- Chung, U. S., Oh, Y. Y., Seo, Y.M ., (2009) A Study on the Protective Effect of Gallic Acid in Cultured Human Skin Melanoma Cells Damaged by Hydrogen Peroxide. *J. Kor. Soc. People Plants Environ.*, 12(6),65-71
- Colr. M. M. (1974) Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and their mode of action : *JAOCS.*, 51,321-325 .
- Chang, M.S., Oh, M.S.,Kim, D.R., Sung, E.J.,Park, S.K. (2005) Antioxidant Effects of *Corni Fructus* in GC-1 Cell. *Korean J. Oriental physiology & Pathology*. 19(6),541-1545
- Dai. Y., Hang. B., Huang. Z. (1992) Inhibition of *Corni fructus* on experimental Inflammation. *Chung Kuo Chung Yao Ts Chih*, 17,307

- Haumann .B .F. (1990) Antiodants Firms seeking products. natural .
- Guilian. T., Zhang. T., Yang. F., Ito, Y. (2000) Saparation of Gallic Acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high Speed Counter Current Chroma togra phy. J. Chromatogr, A. 886,309
- Hong, J.J., Ahn, T.H. (2005) Changes in Total Flavonoid and Total Polyphenol Con tents of Leafy Vegetables(Spinach, Chard and Whorled Mallow) by Blanc hing Time. KOREA J. FOOD COOKERY SCI. 21(2),190-194
- Ha, H.C., Kim, H.S., Ryu, B.H. (2000) Antioxidative Effect of Ethanol Extract Obtained from Rooibos Tea(*Aspalathys linearis*) and It's Applocation of Food. KOREA J. FOOD & NUTR., 13(1), 13-20
- Ha, K.T., Kim, Y.M., Kim, C.H., Choi, D.Y., Kim,J.K. (2008) Study on the Protect ive Effect of Corni Fructus Against Free Radical Mediated Liver Damag e. Korean J. Oriental Physiology & Pathology, 22(1),82~88
- Jeon, Y.H., Kim, M.H., Kim, M.R. (2008) Antioxidative, Antimutagenic, and Cytoto xic Activities of Ethanol Extracts from *Cornus officianalis*. J. Kore an Soc. Food Sci. Nutr., 37(1),1-7
- Ju, J.C., Shin, J.H., Lee, S.J., Cho, H.S., Sung, N.J. (2006) Antioxidative acti vity of hot water extracts from medicinal plants. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 35,7-14.

- Jeong, H.J., Park, S.B., Kim, H.K., Kim, A.N. (2007) Total Polyphenol Content and Antioxidative Activity of Wild Grape (*Vitis coignetiae*) Extracts Depending on Ethanol Concentrations. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 36(12), 1491-1496
- Kim, T.H. (2011) Protective effects of *Cornus officinalis* on ketoconazole-induced oxidative stress in testicular damage male rats. Kyungsoong University, 24-25
- Kim, E.Y., Baik, I.H., Kim, J.H., Kim, S.R., Rhyu, M.R. (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plant. Korean J. Food Sci. Technol., 36, 333-338
- Kim, B.H., Park, K.W., KIM, J.Y., Yang, G.H., Cho, Y.S., Yee, S.T., Seo, K.I. (2004) Purification and characterization of anticarcinogenic compound from *Corni ufructs*. KOREAN J. FOOD Sci. Technol., 36, 1001-1007
- Kim, E.Y., Baik, I.H., Kim, J.H., Kim, S.R., Rhyu, M.R. (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol, 36, 333-338
- Kim, O.K. (2005) Antidiabetic and Antioxidative Effects of *Corni fructus* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J. of Korean Oil Chemists' Soc., 22 (2), 157-167

- Kwon, S.H., Kim, H.C., Lee, S.Y., Jang, C.G. (2009) Loganin improves learning and memory impairments induced by scopolamine in mice. *European Journal of Pharmacology*, 619,44-49
- Kwon, S.H., Kim, J.A., Hong, S.I., Jung, Y.H., Kim, H.C., Lee, S.Y., Jang, C.G. (2011) Loganin protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting phosphorylation of JNK, p38, and ERK 1/2 MAPKs in SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*, 58,533-541
- KANG, D.H., MOON, M.K., LEE, A.S., KWON, T.O., KIM, J.S., LEE, H.S. (2007) Cornuside Suppresses Cytokine-Induced Proinflammatory and Adhesion Molecules in the Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(9),1796-1799
- Lee, G.Y., Jang, D.S., Lee, Y.M., Kim, Y.S., Kim, J.S. (2008) Constituents of the seeds of *Cornus officinalis* with Inhibitory Activity on the Formation of Advanced Glycation End Products (AGEs). *J. KOEAN Soc. Appl. Biol. Chem.*, 51(4),316-320
- Lee, Y.C., Kim, Y.E., Lee, B.Y., Kim, C.J. (1992) Chemical compositions of *Cornifrutus* and separating properties of its flesh by drying. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, 24,447-450
- Lee, M.Y., Kim, Y.K. (2006) Effect of Light and Cadmium on the Activity and Isozyme Pattern of Catalase from Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 49(4),287-292



- Li. M., Wang. W., Wang. P., Yang. k., Sun. H., Wang, X.(2010) The Pharmacological Effects of Morroniside and Loganin Isolated from Liuweid ihuang Wan, on MC3T3-E1 Cells. *Molecules*, 15,7403-7414
- Lee, S.J., Kim, E.H., Lee, H.J. (2008) Development of Rice Wines Using *Cornus officinalis* and *Scutellaria baicalensis* by Antioxidant Activity Tests. *KOREAN J.FOOD SCI. TECHNOL.*, 40,21-30
- Lim, Y.M. (2009) Study on the Antioxidant Effect of Gallic Acid on Cultured Fibroblast Damage by Anticancer Drug, Cisplatin. Wonkwang University
- Kim, N. Y., Kim, Y.K., Bae, K. J., Choi, J. H. (2005) Free Radical Scavenging Effect and Extraction Condition of Ethanol Extracts and Fraction of Wild Grape Seed(*Vitis coignetiea*) : *J .Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34(6),755-758
- Park, C.S., Kim, D.H., Kim, M.L. (2008) Biological Activities of Extracts from *Corni fructus*, *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza uralensis*. *Kor. J. Herbology*, 23(1),93-101
- Prasada. D., Juyalb. V., Singha. R., Singhc. V., Panta. G., Rawata. M.S. (2000) A new secoiridoid glycoside from *Lonicera Angustifolia*. *Fitoterapia*, 71,420

- Park, E.J., Lee, M.H., Kim, J.M. (2011) Antioxidant and Antigenotoxic Effects of Sansuyu Fruit (*Corni fructus*) Extracted with Water at Different Temperatures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 40(2), 149-155
- Park, Y. K., Whang, W. K., Kim, H. I. (1995) The Antidiabetic Effects of Extract from *Cornus officinalis* Seed. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.*, 9, 5
- Peng, Q., Wei, Z., Lue, B. (1998) Medical Plants Research *Corni Fructus* Attenuates Oxidative Stress in Macrophages and Endothelial Cells. *AM. J. Chinese Med*, 26, 291
- Sharma, O. P., Bhat, T. K., Singh, B. (1998) Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *J. Chromatograph. A.*, 822, 167
- Seo, C.J., Yi, S.M., Ko, Y.W. (2007) The effect of antioxidant supplement on the activity of SOD, CAT and MDA in high intensity aerobic exercise. *J. Korean Sport Res.*, 18(2), 21-31
- Won, D.H., Cho, J.H., Kim, H.S., Ko, J.H., Lee, J., Park, S.A., Lee, H.J., Yook, C.S., Kim, I.H., Won, B.P. (1996) Studies on the Analysis of *Corni fructus* and Its Preparation. *The Annual Report KDFA*, 1, 197

- Wang. W., Huang. W., Li. L., Ai. H., Sun. F., Liu. C., An. Y. (2008) Morroniside Prevents Peroxide-induced Apoptosis by Induction of Endogenous Glutathione in Human Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*,28,293-305
- Yu, H.H., Seo, S.J., Hur, J.M., Park, R.K., So, H.S., Jeon, B.H., You, Y.O. (2006) Protective Effect of Ursolic Acid from *Corni fructus* on the Hydrogen Peroxide-induced Damage of HEI-OC1 Auditory Cell. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 20(6),1524-1529
- Yang, H.O., Choi, W.H., Kim, Y.H., Baek, S.H., Chun, H.J. (2004) Cytotoxicity Effects of Fraction and Chloroform Extracts from *Cornis fructus* on Cancer Cell Lines. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 18(5),1343-1344
- Yamahara. J., H. Mibu., T. Sawada., H. Fujimura., S. Takino. (1981) Antidiabetic Principles of *corni fructus* Experimental Diabetes Induced by Streptozotocin. *Yakugaku Zasshi*, 101, 86
- Yamabe. N., Noh, J.S., Park, C.H., Kang, K.S., Naotoshi. S., Takashi. T., Takako, Y. (2010) Evaluation of loganin, iridoid glycoside from *Corni Fructus*, on hepatic and renal glucolipototoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. *European Journal of Pharmacology*, 648,179-187
- YASUHIKO. N., JUNKO. E., TOMIHISA. O. (2007) The inhibitory effect of the components of *Cornus officinalis* on melanogenesis. *J. Cosmet. Sci.*, 58,505-517

Young, M., Chung, S.S., Oh, Y.Y. (2009) A Study on the Protective Effect of Gallic Acid in Cultured Human Skin Melanoma Cells Damaged by Hydrogen Peroxide. J. Kor. Soc. People Plants Environ., 12(6),65-71

ZHANG. Y. E, Hu. L, Jun. L. H, Ping. L. (2009) Chemical Constituents from the Fruit of *Cornus officinalis* :Chinese Journal of Natural medicines , 7 (5),365-367

Zhirui. L ., Zhu. Z., Zhang. H., Tan. G., Chen. X., Chai.Y., (2011) Qualitative and quantitative analysis of Fructus Corni using ultrasound assisted microwave axtraction and high performance liquid chromatograhly coupled with diode array UV detection and time-of-flight mass spectrometry. Journalof Pharmaceutial and Biomedical Analysis, 55,557-562

## 감사의 글

대학원을 입학한지 벌써 2년째 드디어 졸업논문을 쓰게 됐습니다. 논문을 쓰기까지 많은 도움을 주시고 저를 아껴주시며 따뜻한 정으로 인도해주신 지도교수님 최영복교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 2년동안 좋은 말씀 많이 해주시고 힘들때면 위로해 주시며 논문 수정에 있어서 많이 신경써주신 이현과 교수님께 감사드립니다.

아울러 성심으로 심사하여주시고 많은 조언을 해주신 이준식 교수님께 감사드립니다.

대학원을 들어와 실험조교일을 하면서 같이 실험을 할 수 있도록 방향을 제시해 주시며 무한한 도움을 주신 이숙영 교수님께 감사드립니다. 시간에 구애받지 않고 실험할 수 있도록 도와준 행정조교 정영교에게도 고마운 마음을 전합니다.

그리고 실험에 대해서 모를 때면 항상 친절하게 가르쳐 주며 도와준 장은숙 언니와 최다인에게 고마운 마음을 전합니다. 이 논문을 쓰기까지 정말 많은 도움을 주시고 바쁘실텐데 항상 웃는 얼굴로 가르쳐 주시며 인도해주신 강후원 선생님께 정말 감사의 말씀을 드립니다. 또한 힘들고 지칠때 항상 옆에서 있어주고 걱정해준 정영용에게 고마운 마음을 전합니다. 마지막으로 부족한 처를 대학원 2년동안 편하게 공부하고 잘 생활 할 수 있도록 지켜주시고 묵묵히 힘이 되주신 부모님께 정말 감사드립니다

저작물 이용 허락서					
학 과	생물학과	학 번	20097478	과 정	석사
성 명	한글 강 주 연	한문 姜 周 延		영문 Kang Ju Yeon	
주 소	광주 광역시 서구 금호동 호반5차 508동 1801호				
연락처	e-mail : juyouni1222@hanmail.net				
논문제목	한글 산수유 열매 추출물 분리 및 생리활성 연구				
	영문 Study of bioactive compounds from the <i>Cornus officinalis</i> fruit extract				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 -  조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함</li> <li>2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함(다만, 저작물의 내용변경은 금지함)</li> <li>3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함</li> <li>4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함</li> <li>5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함</li> <li>6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음</li> <li>7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함</li> </ol> <p style="text-align: center;"><b>동의여부 : 동의( o )    반대(    )</b></p> <p style="text-align: center;">2011 년 6 월 10 일</p> <p style="text-align: center;">저작자 :    강 주 연 (인)</p> <p style="text-align: center;"><b>조선대학교 총장 귀하</b></p>					