

최 종
연구보고서

낙엽송 잎 추출물을 이용한 천연 기능성
화장품 개발

Development of Natural Functional Cosmetics Using
Extracts of *Larix Kaempferi* Needles

연구기관
강원대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “낙엽송 잎 추출물을 이용한 천연 기능성 화장품 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 황 병 호

연 구 원 : 배 영 수

연 구 원 : 김 성 수

연 구 원 : 함 연 호

연 구 원 : 김 진 규

연 구 원 : 이 상 극

연 구 원 : 권 동 주

연 구 원 : 이 태 성

연 구 원 : 사 진 령

협동연구기관명 : 한국콜마(주)

협동연구책임자 : 김 치 봉

협 동 연 구 원 : 한 창 규

협 동 연 구 원 : 차 진 기

협 동 연 구 원 : 김 동 용

협 동 연 구 원 : 김 남 향

협 동 연 구 원 : 조 국 영

협 동 연 구 원 : 박 병 준

요 약 문

I. 제 목

낙엽송 잎 추출물을 이용한 천연 기능성 화장품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 의식주는 물론 모든 생활에 이르기까지 웰빙(well-being)이 적용되지 않는 곳이 없을 정도로 관심이 증대되어 천연자원을 이용한 제품들이 크게 각광을 받고 있다. 특히, 산림자원은 예로부터 약용으로 많이 사용되어 왔기 때문에 생물공학 기술을 이용한 기능성 제품 개발은 경쟁력 있는 산업으로 발전 할 수 있다. 지금도 이를 이용한 의약품, 건강보조식품, 향균 및 향료 등의 제품개발이 활발히 수행되고 있는 실정이다.

하지만 약용자원에서 신약개발 등과 같이 시간과 자금이 천문학적으로 투자되는 의약품 보다는 상대적으로 적은 비용과 시간으로도 세계적인 수준의 제품을 개발할 수 있는 가능성이 높다는 점에서 화장품으로의 개발은 자본이 빈약한 우리나라에서 매우 유망한 산업이 될 수 있을 것이다.

현재, 우리나라 화장품 분야의 연구개발 수준을 선진국과 비교해보면 제형분야가 가장 수준이 높은 반면에 소재분야가 상대적으로 취약한 것으로 보고된 바 있다. 따라서 외국 화장품과의 경쟁에서 우위를 선점할 수 있는 것은 새로운 천연 소재의 화장품 개발이 될 것으로 판단된다.

경제 성장에 따른 소득수준의 향상과 여성의 사회 활동 증가에 따라 국내 화장품 산업은 초고속 성장을 거듭해왔으며 보다 기능적이고 자연주의적 제품을 선호하는 소비자의 욕구에 부응하여 전문적이고, 고도의 기술을 요하는 첨단 산업으로 점차 자리매김하고 있어 원료수입 의존도가 높은 국내 화장품 산업의 여건상 고부가가치의 원료나 신소재를 활용한 새로운 천연 원료개발의 요구도 높아지고 있다. 최근 산림자원에 대한 다양한 약리적 효능에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나 그 연구 성과물이 산업화로 연계되지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 국내 주요 조림 수종으로 널리 식재되어 있으나 활용도가 극히 제한적인 낙엽송을 대상으로 잎의 추출성분을 분석하여 화학조성과 그 구조를 구명하고, 추출물을 이용한 기능성 화장품 개발을 위해 항산화, 항균, 미백, 주름개선 및 수렴효과 등의 생리활성 시험과 시제품에 대한 독성, 제형화 및 임상시험을 병행하여 제품의 안전성 등을 평가하여 천연 기능성 화장품을 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 낙엽송 잎의 이용한 기능성 화장품 개발을 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

1. 낙엽송 잎 추출성분의 구조분석 및 생리활성 시험

- 낙엽송 잎의 채취, 추출물 조제 및 추출성분 분석
 - 낙엽송 생엽을 에탄올로 추출하여 헥산용성, 클로로포름용성, 에틸아세테이트용성 및 수용성으로 순차적으로 분획
 - 칼럼크로마토그래피법 및 박층크로마토그래피법(TLC)으로 추출 분획물을 분리한 후 ^1H , ^{13}C , 2D-NMR 및 MS 분석 등을 통해 정확한 구조를 구명
- 낙엽송 생엽과 낙엽 추출물의 생리활성 비교 및 유용 추출성분의 지속적인 추출
 - 낙엽송 낙엽을 채취하여 생엽과 동일한 추출 분리과정을 수행하여 생엽과 낙엽의 추출성분을 비교 분석함
 - 분획물 및 단리된 화합물을 대상으로 항산화, 항균, 세포독성 및 항염증활성 등의 생리활성을 측정하고 활성이 우수한 추출분획 및 단리된 화합물은 지속적인 분리

2. 낙엽송 잎 추출물의 기능성 시험 및 상용화 연구

- 추출성분의 기초 생리활성 효능 검증
 - 추출분획 및 단리화합물을 대상으로 항산화 효능 시험(전자공여능, Superoxide dismutase(SOD) 유사활성), 항균, 미백(Tyrosinase 저해활성, MTT assay), 수

럼, 주름개선 및 보습시험 등의 기능성 화장품 개발을 위한 다양한 활성 시험을 수행

- 낙엽송 잎 추출물의 기능성 시험 및 우수한 추출물의 독성 및 임상시험
 - 낙엽송 낙엽 추출물에 대한 기초 활성 시험
 - 추출물의 독성시험 (국소독성시험) 및 추출물의 제형화 실험 (Skin Lotion, Milk Lotion, Essence, Cream 제형화 실험)
 - 제품의 임상시험 (미백효과, 주름개선효과, 보습효과 실험, 항균효과 실험)
- 낙엽송 잎 추출물을 이용한 기능성 화장품 제조
 - 시제품 제작을 위해 활성이 우수한 추출물의 대량 생산
 - 추출물 및 제품의 안정도 실험
 - 추출물 및 제품별 scale up 및 pilot test
 - 기능성 화장품의 시제품 제조 및 산업화, 상용화 방안 강구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

세부과제 1 : 낙엽송 잎 추출성분의 구조분석 및 생리활성 시험

낙엽송 잎 에탄올 추출물의 에틸아세테이트용성과 수용성 분획물로부터 flavonoid계 화합물인 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranoside, kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside, 2''-O-rhamnosylvitexin, laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside를 분리하였고, neolignan계 화합물인 cedrusin을 분리하여, ¹H, ¹³C-NMR, DEPT 및 2D-NMR (COSY, HETCOR · HMQC · HMBC)을 이용하여 구조를 규명한 후 FAB과 EI-MS 스펙트럼으로 분자량을 확인하였다. 생엽과 낙엽에서 공통으로 분리된 화합물은 (+)-catechin, (-)-epicatechin, 2''-O-rhamnosylvitexin으로 낙엽송 잎의 주요 구성성분으로 사료되며, 대부분의 화합물은 flavonoid 화합물로 생엽과 낙엽의 구성성분의 차이는 크지 않았다.

항산화활성 시험에서는 ethylacetate용성 분획이 가장 높은 활성을 나타내었으며 이 분획물에서 분리한 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin은 기준물질보다 더

우수한 결과를 나타냈다. 항여드름균에 대한 활성 시험에서는 생엽과 낙엽 ethylacetate용성 분획물이 우수한 활성을 나타내었으며 단리된 화합물 중에서는 (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin이 다른 화합물보다 더 높은 활성을 나타내었다. 또한, 생엽의 추출물과 낙엽 ethylacetate용성 분획에서 비듬균에 대한 높은 활성을 나타내었다.

항균활성 시험에서는 생엽 ethylacetate용성 분획물이 기준물질보다도 우수한 활성을 나타내었으며 이 결과는 항산화활성과 유사하였다. 항염증활성 시험에서는 대부분의 추출물 분획과 화합물들이 기준물질과 동등한 NO 생성 저해활성을 보였으며, 그 중 (+)-catechin, (+)-gallocatechin, kaempferol-3-O- β -L-arabinofuranoside는 90% 이상의 NO 생성 저해활성을 보여 항염증활성이 매우 우수한 것으로 나타났다. Tyrosinase의 저해 활성을 평가한 결과 추출물 분획들과 화합물들은 활성을 보이지 않아 멜라민 생합성을 억제하지는 못하는 것으로 생각된다. MTT assay법에 의한 세포독성 결과는 (+)-gallocatechin, kaempferol-3-O- β -L-arabinofuranoside, 낙엽 crude 분획에서 40~50% 정도의 독성을 보였을 뿐 큰 독성을 보이지 않았다.

세부과제 2 : 낙엽송 잎 추출물의 기능성 시험 및 상용화 연구

낙엽송 잎 추출물 항산화활성 시험은 전자공여능과 SOD 유사활성능을 평가하였다. 기준물질인 L-ascorbic acid를 사용하여 비교하였으며, 그 결과 전자공여능은 기준물질과 도유사한 65%의 활성을 나타냈고, SOD 유사활성 효능은 23.4%로 기준물질의 50%도 미치지 못하는 것으로 나타났다. 미백효능은 mushroom tyrosinase의 활성 저해율이 31.9%로 기준물질로 사용한 arbutin에 비하여 낮은 tyrosinase 저해 활성을 보여 피부미백 효능은 상대적으로 낮게 나타났다.

MTT assay에 의한 세포독성시험에서는 모든 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 항균효과는 농도에 따른 차이는 있겠지만 어느 정도의 항균효과가 있음을 확인할 수 있었다. 주름개선효과를 평가하기 위한 fibroblast activity test에서 콜라겐 합성은 추출물 농도의 증가에 따라 조금씩 증가됨을 확인할 수 있었으며, elastase activity inhibition test 역시 추출물 농도에 따라 엘라스타제 활성 저해능도 증가됨을 확인할 수 있었다. 자극성 test를 위한 인체 첩포 시험은 피 시험자 20명에게 첩포를 부착하여 추출물이 피부에 대한 자극여부를 판단한 결과 알려지 반응이나 기타 다른 자극은 관

찰되지 않았다.

추출물의 제형시험 후 안정도를 확인한 결과는 고온에서 변색 및 성상의 분리현상이 발견됨을 확인할 수 있었으며, 스킨로션과 크림의 경우는 제형 내 안정화제 함량을 조절하는 실험을 추가적으로 진행하여 제형의 안정도를 다시 확인하였다. 그 결과, 일정기간 동안 안정한 제형을 확보할 수 있었다. Pilot test는 스킨, 로션, 에센스, 크림에 대하여 Pilot 제조를 실시하였으며, 시제품 및 제품의 효능 평가용 제품을 제조하여 제품 효능 평가에 대한 추가 실험 및 품평을 실시하였다.

제품의 효능평가를 위해 36세에서 52세까지의 여성 21명의 눈가에 대조제품과 실험제품을 8주 동안 도포하여 주름개선효과와 보습효과를 측정하였다. Visiometer에 의한 화상분석을 통한 주름개선효능은 유의한 수준($p < 0.05$)의 차이가 발생하여 시험제품이 대조제품에 비하여 주름개선 효과가 있다는 것을 알 수 있었으며, 보습효과 결과 낙엽송 잎 추출물이 함유된 크림제형이 대조군에 비하여 7.6% 정도 높은 보습효과를 나타내었다.

이상의 결과 낙엽송 잎 추출물이 피부의 주름개선과 항균(여드름균, 비듬균)에 효능을 갖고 있으며 단리된 화합물에서는 항균 및 항염증 효능을 확인 할 수 있었다. 따라서 이러한 다기능 효능을 갖는 낙엽송 잎 추출물이 피부에 더욱 효과적으로 반응할 수 있는 추가적인 연구와 또 다른 기능성 시험이 필요할 것으로 사료된다. 또한, 본 연구를 통해 얻은 노하우를 이용하여 다른 산립자원에 대한 기초조사를 수행하여 효능이 우수한 새로운 원료 개발을 지속적으로 진행해 나가야 할 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Development of Natural Functional Cosmetics Using Extracts of
Larix Kaempferi Needles

II. Purpose and Necessity of the Research

Recently, many products using natural resources is very popular because Well Being is applied to all of items such as food, cloth and houses. For a long time, forest resources have been used for medicinal purposes, and the development of functional products using biotechnology has a great possibilities to develop competitive industries. This time, development of the products is intensively studying in medical supplies, healthy supplements, antifungal and materials for making perfume.

It needs lots of money and time to develop new medicines using medicinal resources. However, the development of toiletries will become a bright prospect industry through less investment rather than development of new medicines in Korea. Consequently, the development of natural functional cosmetics using natural resources will be a dominant position against foreign companies

Currently, it is reported that the section of hoof shapes in cosmetic is quite developed to compare with the advanced countries but the section of material is not developed in Korea.

Cosmetics industries are rapidly grown up because of the elevation of the income level and increase in society activity of women by economic growth. Therefore it has grown into the high technology industry to many customers' desire that prefer to functional and natural products. Environment of domestic cosmetics industries mainly depend on imported resources which is required the

development of natural resources using high profitability resources and advanced materials. However, many studies of medical function using forest resources are doing but it is not combined with industrialization.

This study used needles of *Larix Kaempferi* which were widely planted and rarely use for the development of functional cosmetics using the extracts.

III. Contents and Scope of the Research

1. Bioactivity and chemical constituents of the *Larix kaempferi* needles

- Green needles (4.8 kg) and fallen needles (8.5 kg) of *Larix kaempferi* were separately collected and extracted with EtOH.
- The extracts were evaporated under reduced vacuum pressure, concentrated the successively fractionated with a series of hexane, methylene chloride, ethylacetate and water on a separatory funnel to get some freeze dried powder.
- The extracts were isolated using column chromatography (Sephadex LH-20) and TLC(Thin Layer Chromatography)
- The structures of isolated compounds were characterized by ^1H , ^{13}C , 2D-NMR and FAB, EI-MS spectrum.
- Bioactive test(antioxidative antifungal, cytotoxicity and antiinflamotory test) of the isolated compounds and the extracts.

2. Biological activity and commercialization of the *Larix Kaempferi* needles extracts.

- Tests of basic bio-activity efficacy
 - For the development of functional cosmetics, activity tests such as antioxidative, antifungal, whitening, astringent, moisture-containing effect and improvement in wrinkle activity tests.

- Basic activity test in extracts of *Larix Kaempferi* needles
 - Experimentations of toxicity and extracts
 - Clinical demonstration of products

- Production of functional cosmetics using extracts of *Larix Kaempferi* needles
 - Stability test of the extracts and products
 - Scale up and pilot test in the extracts
 - Scale up and pilot test in the products
 - Prototype production of functional cosmetics

IV. Results of Research and Suggestion for Application

(+)-Catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, isorhamnetin-3-O- β -D-glucoopyranoside and kaempferol-3-O- β -D-glucoopyranoside were isolated from the ethylacetate soluble fraction of the green needles and 2''-O-rhamnosylvitexin was separated from water soluble fraction of the green needles of *Larix kaempferi*.

(+)-catechin, (-)-epicatechin, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside, laricitrin-3-O- β -D-glucoopyranoside, quercetin-3-O- β -D-glucoopyranoside and cedrusin were purified from the ethylacetate soluble fraction of the fallen needles and (+)-catechin, (-)-epicatechin, and 2''-O-rhamnosylvitexin were isolated from the water soluble fraction of the fallen needles of *Larix kaempferi*.

Six compounds were isolated from the green needles and eight compounds were isolated from the fallen needles. However, there were no big differences in the chemical constituents between green and fallen needles. All of the isolated compounds were flavonoids besides one neolignan compound, cedrusin.

(+)-catechin, (-)-epicatechin and 2''-O-rhamnosylvitexin were isolated from both green and fallen needles and this fact suggests that these constituents may be major constituents of *Larix kaempferi*. needles.

Ethylacetate soluble fractions of the green and fallen needles indicated higher antioxidative, antiacne bacteria and antimicrobial (*pityrosporum ovale*) activities than the other fractions and flavan-3-ols such as (+)-catechin, (-)-epicatechin and (+)-gallocatechin indicated higher antioxidative activities than the other compounds including controls. Flavonol glycosides such as quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside and laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside also showed high antioxidative activities.

In the anti-inflammatory test, most of the fractions and isolated compounds showed the similar inhibitory potency for NO (Nitric oxide) production to the control, particularly for (+)-catechin, (+)-gallocatechin and kaempferol-3-O-β-D-L-arabinofuranoside, which could inhibit more than 90% of the NO production implying excellent anti-inflammatory activity.

In the whitening test, the extractives indicated low inhibitory potency for tyrosinase compared with control which indicated that they had weak whitening ability. In the anti-toxicity and dermal irritation tests, MTT assay results indicated that no toxicity appear at all concentration.

Human test showed that the product showed the decreasing of wrinkle during eight weeks and moisture-containing effect.

Extracts and isolated compounds of *Larix Kaempferi* needles showed good antioxidative activity and anti-wrinkle effect. Also, some of the isolated compounds had anti-inflammatory activity. Thus, it is considered that further reaction effect tests on the *Larix Kaempferi* needles indicating such excellent functional activities should be carried out urgently. Also, using the know-hows obtained from this

study, basic investigation on other forestry resources and continuing development of new materials with superior function are necessary.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of researches	14
Chapter 2. Trend of foreign and domestic on researches	18
Chapter 3. Content of result of researches	22
Section 1. Bioactivity and chemical constituents of the <i>Larix kaempferri</i> needles	22
1. Introduction	22
2. Materials and methods	23
3. Results and discussion	38
4. Conclusions	105
Section 2. Biological activity and study on commercialization of the <i>Larix Kaempferi</i> needles extracts.	107
1. Biological activity test of <i>Larix Kaempferi</i> needles extracts	107
2. Pilot manufacture and stabilization of the extracts	121
3. The efficacy valuation of products	128
Chapter 4. The achievement of the goal and contribution to related field	167
Chapter 5. Plan for utilization of the results from the research	170
Chapter 6. Information of foreign scientific technology obtained from the research	171
Chapter 7. Reference	174

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절 낙엽송 잎 추출성분의 구조분석 및 생리활성 시험	22
1. 서론	22
2. 재료 및 방법	23
3. 결과 및 고찰	38
4. 결론	105
제 2 절 낙엽송 잎 추출물의 기능성 시험 및 상용화 연구	107
1. 낙엽송 잎 추출물에 대한 효능실험	107
2. 추출물의 제형안정화 및 Pilot 제조 실험	121
3. 제품의 효능 평가	128
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	147
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	150
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	151
제 7 장 참고문헌	154

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

우리나라는 산림면적이 65% 이상으로 풍부한 산림자원을 보유하고 있으며 침엽수와 활엽수의 비율이 서로 비슷한 구성을 나타내고 있으나 수목의 약리적·기능적 이용에는 대부분 활엽수가 이용되며 침엽수의 이용은 매우 제한적이다. 일반적으로 우리나라 침엽수림의 대부분은 소나무나 잣나무 및 낙엽송 등으로 구성되어 있다. 침엽수 잎은 페놀성 화합물의 함유량이 높아 항산화, 항균효능이 우수하고 원료 공급이 용이하기 때문에 활성이 우수한 추출물 분획과 화합물을 기능성 화장품의 원료로 활용이 가능하다. 특히 낙엽송은 국내 주요 조림 수종으로 해발 1,250m 이하의 해변을 제외한 중부이남지방에 많이 식재되어 있고, 다른 수종에 비하여 토양 수분에 대한 요구도가 적고 내후성이 강해 생장이 빨라 30년생 일 경우 ha 당 259m³ 목재를 생산하게 된다. 낙엽송 목재의 용도는 건축, 토목, 합판용재로 많이 사용되었으나, 현재는 그 쓰임새가 적다. 빨리 자란 탓에 목재의 질이 떨어지고 나무를 처음 조림할 때 뺨뺨이 심어 곧게 자라도록 해주고 중간 나무를 솎아 내는 간벌을 해야 하는데 그렇지 않아 최근에는 전봇대, 철도침목, 나무젓가락 등 그 용도가 한정적이다. 따라서 낙엽송의 효율적 이용과 농·산촌 소득증대를 위한 방안으로 낙엽송 잎의 추출성분을 분리하여 화학조성과 그 구조를 밝히고, 기능성 화장품에 응용하기 위한 생리활성 시험을 평가하여 기능성 화장품을 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

최근 자연 지향적이고 환경친화적인 소비추세에 따라 화장품에 들어가는 유효성분도 화학물질뿐만 아니라 식물 또는 동물유래의 천연물이 그 유용성을 기반으로 하여 여러 가지 형태로 화장품에 배합되어 사용되고 있다. 특히, 자연주의의 바람을 타고 생약을 포함한 식물성 원료에서 해양원료에 이르기까지, 다양한 천연소재를 이용한 화장품의 개발이 이루어져 천연물을 이용한 기능성 화장품 전성시대가 도래하고 있다.

또한, 선진국에서는 유기합성 제품의 안전성에 대한 문제로 산림자원을 비롯한 천연 식물로부터 의약품, 건강보조식품, 향균 및 향충제, 방향제 등의 제품이 개발되고 있다. 천연물로부터 신약개발 등과 같이 시간과 자금이 천문학적으로 투자되는 의약품 산업보다는 기능성 화장품은 적은 비용과 시간으로도 세계적인 수준의 제품을 개발할 수 있는 가능성이 있는 고부가가치 산업이며, 생활수준의 향상과 노령화사회의 가속화로 기능성 화장품 시장의 성장성과 고부가가치 창출 면에서 상당히 긍정적인 첨단 미래형 산업이라 할 수 있다. 전반적으로 우리나라의 화장품분야 기술수준은 제형분야가 가장 수준이 높고, 소재분야가 가장 취약한 것으로 분석되었으며, 선진국과 3~5년의 격차가 있으나. 산학연정이 공동으로 신규 기능성 화장품용 소재개발에 주력하고 있어 충분히 격차를 해소하고 국제경쟁력을 가질 수 있을 것이다. 최근 소비자는 화장품이 단순히 컨셉 차원이나 일시적인 개선보다는 잔주름의 감소, 가시적인 피부 미백효과 등 적극적이고 실질적인 효능을 요구하고 있어 기능성 물질의 체계적인 성분 연구와 다양한 임상실험에 대한 data를 필요로 하며, 활성 물질의 규명과 목적 설계에 의한 물질개발, 천연물(산림자원) 등으로부터 효능이 뛰어난 소재 개발과 이들 정보의 database 구축 등 소재의 효능 및 안전성 평가 등이 필요하다.

낙엽송은 과거에 산림자원 보호를 위한 주요 조림용 나무로 식재되었으나 용도는 극히 미비하여 경제적가치가 적어지고 있어 이를 이용한 기능성 화장품 개발은 자원 재활용 측면에서 새롭게 각광을 받을 수 있으며, 특히 수목의 잎을 이용함으로써 원료 수급의 안정성 확보와 수입 원료를 대체할 수 있는 장점을 가지고 있다. 산림자원 추출물에 대한 연구 성과를 생명공학이나 시장규모가 비교적 큰 화장품 산업과 연계함으로써 산업체 및 농·산촌에 많은 파급효과를 가져올 수 있다. 또한, 국내산 침엽수 자원의 화학적 이용 가능성과 그 중요성을 일깨워줄 수 있으며, 산림의 체계적이고 효율적인 이용에 기여할 수 있어, 기타 식물자원들의 이용성에 선두적인 자원 재활용의 모델화로 제시될 수 있을 것이다.

기능성 화장품 개발은 새로운 수요창출과 시장 형성이 기대되는 성장산업으로 육성이 가능하며 국내에 자원이 풍부한 낙엽송 잎의 원료 선정은 금후 산림자원을 이용한 연구에 많은 관심을 증대시킬 수 있다.

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년도 (2002년)	1. 연구재료의 채취, 조제 및 추출성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 낙엽송 잎, 낙엽을 유기용매(에탄올) 추출 ○ 에탄올 추출물을 농축한 후, 클로로포름용성, 헥산용성, 에틸아세테이트용성 및 수용성으로 순차 추출 ○ 칼럼크로마토그래피법으로 추출물 분리 ○ 박층크로마토그래피(TLC)로 분리물질 확인 ○ 단리물질의 구조분석 <ul style="list-style-type: none"> - ^1H, ^{13}C 및 2D-NMR 및 MS 분석 등
	2. 추출성분의 기초 생리활성 효능 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출분획 및 단리화합물을 대상으로 기능성 화장품 개발을 위한 다양한 활성 시험을 수행 ○ 항산화 효능 시험 <ul style="list-style-type: none"> 1) 전자공여능 측정 2) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정 ○ 추출물의 항균효과 (여드름 원인균에 집중하여 항균활성을 측정) <ul style="list-style-type: none"> 1) Disc plate method ○ 추출물의 미백효과 <ul style="list-style-type: none"> 1) Tyrosinase 저해활성 측정 2) MTT assay ○ 추출물의 수렴효과 Bovine hemoglobin과의 단백질 응고작용을 이용한 화학적 수렴작용을 측정

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2003년)	1. 생재 생엽, 및 낙엽 추출물의 생리활성 비교 및 유용 추출성분의 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> ○ 낙엽송의 낙엽을 채취하여 1차년도와 동일한 과정을 수행하여 생엽과 낙엽의 추출성분 비교 분석 ○ 1차년도에서 활성이 우수한 추출분획 및 단리된 화합물을 대량 생산
	2. 낙엽송 낙엽 추출물의 기능성 시험 3. 우수한 추출물의 독성, 임상시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 낙엽송 낙엽, 추출물에 대한 기초 활성 시험 ○ 추출물의 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> 1) 국소독성시험(피부자극시험) ○ 추출물의 제형화 시험 <ul style="list-style-type: none"> 1) Skin Lotion, Milk Lotion, Essence, Cream 제형화 시험 ○ 제품의 임상시험 <ul style="list-style-type: none"> 1) 미백효과 시험 2) 주름개선효과 시험 3) 보습효과 시험 4) 항균효과 시험
3 차 년도 (2004년)	낙엽송 잎 추출물을 이용한 기능성 화장품 제조	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시제품 제작을 위해 활성이 우수한 추출물의 대량 생산 ○ 단리 화합물을 대상으로 추가적인 기능성 시험 ○ 추출물 및 제품의 안정도 시험 <ul style="list-style-type: none"> 1) 각 온도별로 추출물 및 제품의 기간별 안정도 측정 ○ 추출물 및 제품별 scale up test 및 pilot test <ul style="list-style-type: none"> 1) 안정화된 추출물 및 제품별 scale up 및 pilot test 실시 ○ 기능성 화장품의 시제품 제조 <ul style="list-style-type: none"> 1) 안정화된 추출물 및 제품의 양산화를 위한 체제 구축 ○ 산업화, 상용화 방안 강구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

삶의 질이 높아지면서 건강에 대한 인식과 관심에 높아짐에 따라 의식주는 물론 모든 생활에 이르기까지 웰빙(well-being)이 적용되지 않는 곳이 없을 정도로 관심이 증대되어 천연자원을 이용한 제품들이 크게 각광을 받고 있다. 최근의 천연물 연구는 분류학적 특징과 화학적 구성 성분을 밝히는 분석적 연구 단계를 뛰어넘은 상태이다. 천연물의 생물학적 다양성과 화학적 특성을 연계시켜 활성 성분을 규명함으로써 새로운 기능성 소재를 발굴하여 의약품이나 기능성 식품, 기능성 화장품 등을 개발하는 단계에 도달해 있다.

국내 화장품 시장에서 기능성 화장품은 2005년 상반기 전년대비 49%의 높은 성장률을 보이며 화장품 시장에서의 중요성이 날로 커지고 있는 실정이다. 반면 원료·소재 등에 대한 연구개발은 상대적으로 미흡한 실정이다.

최근 식약청이 발표한 자료에 따르면 기능성 화장품 승인 현황은 2001년 477종, 2002년 775종, 2003년 1,017종, 2004년 1,298종이 승인되었으며 2005년 상반기에도 이미 9백28종이 승인을 받는 등 전년대비 47%의 급격한 성장률을 보이고 있는 것으로 나타났다. 기능별로 분류하면, 자외선 차단이 1,790종, 미백 화장품 1,789종으로 가장 많았으며 다음으로 주름개선이 707종, 복합제제가 209종으로 나타나 기능성 화장품법이 발효된 이후 총 4,495품목이 승인됐다. 분류별 개발동향을 살펴보면, 기능성 미백 화장품의 경우 미생물 유래 화장품 소재, 약용식물 유래 화장품 소재, 약용식물 유래 신규 소재, 미생물 유래 신규 소재 등의 연구에 집중되고 있는 것으로 나타났으며, 기능성 노화방지 화장품의 경우는 표피세포의 분화 재생을 조절하는 항노화 소재, 세포의 매트릭스(ECM) 성분을 조절하는 항노화 소재, 활성산소(ROS) 소거물질을 이용한 항노화 소재 등의 개발이 활발한 것으로 조사됐다. 기능성 자외선 차단용 화장품은 자외선 흡수제, 자외선 산란제, 피막 형성제 등으로 압축되고 있다.

화장품에 천연물을 직접 이용한 것은 1973년 태평양이 인삼을 주원료로 한 진생상미라는 제품을 선보인 것이 원조라 할 수 있다. 그 후 산삼, 홍삼, 감초, 녹두, 흑두, 한란, 단풍잎, 대나무, 닥나무, 주목(朱木), 굴나무, 오가피, 야자수, 생강, 영지버섯, 녹

차, 꽃잎, 우엉, 뽕나무 등 다양한 식물자원으로부터 효능 성분을 추출하여 화장품 개발에 적극적으로 활용하고 있으며, 끊임없이 소재개발이 이루어지고 있다. 국내 천연물을 응용한 화장품 소재 및 제품 개발은 가급적 화학적 원료를 배제하고, 순수한 생약 성분을 함유하여 인체기관의 기능과 기(氣)·혈(血)의 순환을 촉진시키는 피부공학 개념으로 연구개발의 초점이 모아지고 있다.

태평양은 97년 경희대 한의대와 공동 연구를 통해 6년 근 인삼과 옥죽, 작약, 연자육, 백합, 자황 등 5가지 한약재를 달여 설화수를 출시한 바 있으며, 미백에 뛰어난 닥나무 추출물을 함유한 제품, 한란을 원료로 한 향수, 티트리 추출물인 멜라레우카알터니폴리아라는 천연성분원료로 만들어 피부 상처 부위를 깨끗하게 가꿔주는 제품을 개발했다.

LG생활건강은 속수자라는 식물에서 추출하여 분리한 피토클리어 EL-1이라는 미백 성분을 개발하였으며, 최근에는 당귀, 녹용, 산수유, 사향초, 오가피, 천문동 등의 보습과 항염, 항균효과 뛰어난 원료들을 사용하여 제품을 출시했다.

나드리 화장품은 9가지 필수 아미노산을 비롯하여 마그네슘, 칼슘 등 각종 영양분이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 대나무 추출수를 이용하여 상품을 개발하였는데, 이 제품은 수분 공급을 위해 대나무 추출물과 유산균 발효액 나노솜 성분을 사용했다. 또한 항암효과로 널리 알려진 상황버섯을 이용하여 피부면역 및 노화예방, 미백 기능이 있는 제품과 주름개선 기능성 화장품을 개발하였다.

CJ 엔프라니는 최근 주목(朱木)에서 추출한 원료로 고농축 항산화 물질을 독자적으로 개발하였으며, 이밖에도 여러 기업체에서 솔잎 추출물, 표고버섯 추출물, 녹차추출물 등을 원료로 사용하여 제품을 개발하였으며, 해양심층수, 콜라겐, 캐비아(caviar), 해양추출물, 온천수 성분 등을 이용하는 등 화장품 원료 개발의 범위를 확대해 나가고 있다. 최근에는 비단 화장품업계뿐만 아니라 한의원, 바이오벤처기업, 제약회사를 중심으로도 천연물을 이용한 화장품 개발에 적극적으로 나서고 있어 기능성 화장품 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

국내에 출원된 천연물소재 기능성 화장품에 관한 연도별 특허 추이를 살펴보면, 1980년까지는 해마다 10건 이내의 미미한 출원 양상을 보이다가 1999년에 26건, 2000년에 38건, 2001년 43건으로 해마다 특허출원의 증가세가 두드러짐을 알 수 있다. 이는 국내 화장품법의 제정과 더불어 기능성 화장품에 대한 법제화가 본격적으로 논의되면서 90년대 후반부에 특허출원이 크게 증가한 것으로 보인다. 국내의 주요 출원인

은 태평양이 15건으로 가장 많았고, 코리아나 화장품 7건, LG화학 6건의 순으로 나타나 국내 굴지의 화장품업체를 중심으로 한 특허출원 및 기술개발 활동이 활발히 이루어지고 있음을 알 수 있다. 또한 화장품업체이외에도 천연물을 이용한 기능성 화장품 개발이 개인에 의한 연구 활동으로도 일부 이루어지고 있는 것으로 나타났다.

제 2 절 국외 기술개발 현황

동서양을 막론하고 천연물 유래 기능성 화장품의 소재는 고대로부터 화장에 가장 널리 이용되었던 식물추출액이 가장 많이 이용되고 있으며, 유럽, 미국, 일본 등의 선진국에서는 광우병의 발병으로 동물유래의 화장품 소재들이 대부분 식물유래의 소재로 급격히 대체되었다. 최근에 실시된 규제완화 조치에 의해 일부 배합이 금지된 성분을 제외하고는 배합된 전성분을 표시하면 자유롭게 모든 소재들을 사용할 수 있게 됨에 따라 천연물유래의 화장품 원료개발에 박차를 가하게 되었다. 뉴욕타임즈와 뉴트리션 비즈니스 저널 등의 자료에 의하면, 천연 식물을 주성분으로 한 미국의 화장품 및 피부관리제품 시장은 2002년 말 현재 연매출 45억 달러 규모로 커짐으로써 지난 5년간 평균 10%가 넘는 고속성장을 기록하고 있다. 최근 미국, 유럽, 일본 등을 중심으로 먹을 수 있는 화장품이 개발 되었다. 이것은 기존의 화장품들과는 달리 피부노화의 억제에 영양적 측면에서 접근하고 있는데, 일본 가네보다 시세이도 같은 대형 회사에서는 뷰티푸드라는 이름의 브랜드를 선보이고 있다. 야채나 과일을 위주로 하는 미용식, 녹차나 허브차 등의 미용 차에서 그 원형을 찾아볼 수 있는 신개념의 먹는 화장품은 콜라겐, 포도씨추출물, 석류추출물, 실크펩타이드, 베타카로틴 등의 천연물질을 사용해 식용이 가능하도록 하면서도 항산화제나 기타 유효성분의 체내흡수를 촉진시켜 그 작용을 원활하게 하는 특징을 가지고 있다. 식물 이외에도 해양으로부터 많은 생리활성물질을 찾아내고 있는데, 미국의 스크립스 해양연구소에서는 해양생물로부터 여러 가지 유용물질을 분리하여 주목을 모으고 있으며, 프랑스의 CODIF사에서는 홍조류, 녹조류, 갈조류로부터 피부의 노화, 민감피부, 주름방지 등의 기능을 가진 20여 종 이상의 해조 추출물을 상품화 하고 있다. 한편, 일본의 한 지자체에서는 1996년부터 심층수를 이용한 화장품 개발에 착수하여 1999년부터 세계에서 처음으로 심층수를 이용한 화장품을 생산하여 상당한 매출을 올리고 있는 것으로 알려져 있다.

기능성 화장품의 국가별 특허출원동향을 보면, 일본이 전체의 과반수이상을 차지하

는 가장 높은 출원비율을 보이고, 미국, 유럽, 한국의 순으로 나타나 기능성 화장품에 대한 일본의 선도적인 기술역량을 짐작할 수 있다. 미국이나 유럽은 1990년대 중반에 특허출원이 활발하다가 2000년대 들어 약간 감소하는 추이를 보이고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 낙엽송 잎 추출성분의 구조분석 및 생리활성 시험

1. 서 론

낙엽송(*Larix kaempferi* Carr.)은 소나무과(Pinaceae) 잎갈나무속(*Larix*)에 속하는 낙엽 침엽교목이다. 소나무과는 북반구 전역에 10속 250종이 분포하는 큰 구과 식물 속으로 우리나라에는 6속 25종이 있다. 잎갈나무의 속명 *Larix*는 ‘풍부하다’는 뜻의 켈트어 ‘라르(lar)’에서 유래되었는데 수지가 많기 때문에 생긴 이름이라고 한다. 잎갈나무속은 10종이 북반구 한대에 분포하며 우리나라에는 잎갈나무(*Larix gemlini* var. *principis-ruprechtii* Pilger.)와 낙엽송(*Larix kaempferi* Carr.) 2종이 있다. 잎갈나무는 만주지역, 중국, 러시아에 분포하고 우리나라는 금강산 이북부터 자라고 백두산에 울창한 원시림을 형성하고 있는 나무 가운데 하나인데 남쪽에는 어디에서도 자생하지 않는다(김, 1996; 이, 1997).

낙엽송은 일본 원산으로 1904년에 도입되었으며 중부 이남에 대량으로 식재되어 있는 우리나라 주요 조림수종의 하나이다. 높이 30~35m, 지름 1m까지 성장하며, 수피는 암갈색으로 세로로 찢어지고 긴 인편으로 되어 떨어지며 커다란 옆가지는 옆으로 퍼지며 때로는 아래로 처지기도 한다. 잎은 밝은 녹색이고 선형으로서 편평하며 길이 2~3cm, 너비 1~1.2mm로 뒷면에 5개의 기공조선(氣孔條線)이 있으며 표면에도 불완전한 것이 있고 40~50개가 짧은 가지에 모여난다. 강한 양수로서 생장이 빠르고 산 북부 이하의 토양수분이 충분한 비옥지가 적지이다. 목재는 건축재, 펄프재 등에 쓰이고 수피에서는 테르펜유를 채취하고 잎과 함께 민간에서는 발모(發毛), 치통(齒痛), 통경(痛經) 등에 약용으로 사용된다(김, 1996; 조 등, 2003).

낙엽송 추출성분에 관한 국내·외 연구현황은 Miki 등(1979, 1980)은 내수피에서 4개의 glycerol 유도체와 4개의 dihydrobenzofuran 유도체 및 3개의 phenylpropanol 배당체를 단리하였고, 심재부에서 3개의 새로운 lignan계 화합물인 guaiacylglycerol-β-guaiacylglycerol ether, leptolepisol D, leptolepisol E 등을 보고한바 있으며, Tanaka 등(1997)은 앞에서 diterpene 화합물 10개와 sesquiterpene 화합물 2개 및 새로운

diterpene acid 화합물인 methyl abieta-8,11,13,15-tetraen-18-oic acid, methyl 16-nor-15-oxodehydroabietic acid, 12,15-dihydroxydehydro abietic acid 등 3개의 화합물을 단리하여 보고하는 등 주로 일본에서 활발하게 연구가 진행되었다. 국내의 연구로는 Choi(1985)는 낙엽송 추출물로부터 taxifolin, β -sitosterol, isopimaric acid을 단리하였으며, Kim 등(1997)은 잎에서 (+)-catechin, (-)-epicatechin, kaempferol-3-O-arabinofuranoside, kaempferol-3-O-arabinopyranoside 및 낙엽송 추출성분 중 보고되지 않은 2''-O-rhamnosylvitexin을 단리하였다. 또한 Hwang 등(1998)은 낙엽송 추출물로부터 새로운 diterpene 화합물인 6-acetoxymanool or 13-hydroxy-8(17), 14-labdienyl-6-acetate로 명명하고 항균활성을 검정하였으며, 최근 Yoon 등(2000)은 *L. leptolepis* 심재부에서 taxifolin, quercetin, aromadendrin을 단리하여, 항산화활성을 보고한 바 있다.

국내 침엽수림은 총 산림면적의 42%인 2,667,000ha(산림청, 2001)로 많은 부분을 차지하고 있고, 본 연구의 공시재료인 낙엽송은 1995년부터 1997년까지 총 조림면적의 12~14%인 2,811ha 정도(산림청, 1998)를 차지하며 잣나무에 이어 두 번째로 많이 조림되어 있는 수종이다. 잎은 채취가 용이하고 낙엽수이므로 매년 새로운 잎이 생성되기 때문에 대량 확보가 가능하여 다른 약용수목에 비해 원료수급이 용이하고 추출물의 여러 가지 생리활성 효능이 인정되면 산업화가 용이한 장점이 있다.

따라서 본 연구는 낙엽송 잎을 이용한 천연 기능성 화장품을 개발하기 위한 연구의 일환으로 생엽과 낙엽의 추출성분을 분리하고 화학구조를 결정하여 구성성분의 차이점을 분석하고자 하였으며, 각 추출물 분획과 단리된 화합물에 대한 생리활성 시험으로 항산화활성, 항균활성, 세포독성, 항염증활성 및 tyrosinase 저해활성 등의 검정을 통해 추출성분의 화학적 기초 자료를 제공하고 이를 토대로 기능성 화장품 산업 및 약리적으로 응용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

낙엽송의 생엽은 2002년 4월과 8월, 낙엽은 2001년 12월과 2002년 11월에 강원도 홍천군 봉명리에 위치한 강원대학교 연습림에서 채취하여 실험실에서 2주 이상 건조

시킨 후 분쇄기를 이용, 분말로 제조하여 추출용 시료로 사용하였다.

나. 추출물의 조제

건조된 생엽과 낙엽 분말을 추출하기 위한 추출용매로 95% EtOH 용액을 사용하여 20ℓ 유리용기에 생엽 4.6kg, 낙엽 4.6kg와 3.9kg을 넣고 3일간 침지하여 추출하였다. 추출액은 여과하여 감압농축기 (rotary vacuum evaporator)로 40℃ 이하에서 농축하여 유기용매를 모두 제거하였으며 충분한 추출물의 양을 얻기 위하여 이와 같은 과정을 3회 반복하였다.

다. 추출물의 분리

농축된 추출용액은 Fig. 1과 같이 분획깔때기로 hexane용성, methylene chloride용성, ethylacetate용성 및 수용성으로 순차적하여 분획하고 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 농축된 각 분획물은 냉동시킨 후 동결건조하여 분말상으로 조제하였다. 동결건조된 각 분획물의 양은 생엽의 경우 crude 12.1g, hexane용성 53.3g, methylene chloride용성 30.1g, ethylacetate용성 24.9g, 수용성 189.7g, 고형분 105.1g, 낙엽의 경우 crude 20.3g, hexane용성 12.3g, methylene chloride용성 3.0g, ethylacetate용성 44.4g, 수용성 340.1g, 고형분 425.9g을 얻었다.

라. 칼럼크로마토그래피 (Column Chromatography)

혼합물로부터 순수한 단일화합물을 얻기 위해 ethylacetate용성과 수용성 분획에 대한 칼럼크로마토그래피를 실시하였으며 유리칼럼은 직경 4.5cm, 3cm, 1.5cm 및 1cm, 길이 60cm인 유리칼럼을 사용하였다. 충전물질로는 Sephadex LH-20을 사용하였으며 용리용매는 H₂O, methanol-H₂O (3:1, 1:1, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, v/v), ethanol-hexane (2:1, 3:1, 4:1, 4:3, v/v) 혼합액을 사용하였다. 칼럼으로부터 떨어지는 용출액은 fraction collector (Gilson FC 204)를 이용하여 순차적으로 시험관에 일정량을 받았으며 칼럼이 모두 용출되어 나와 무색에 가까워지면 acetone-H₂O (1:1, v/v) 혼합액을 사용하여 칼럼을 세척하였다.

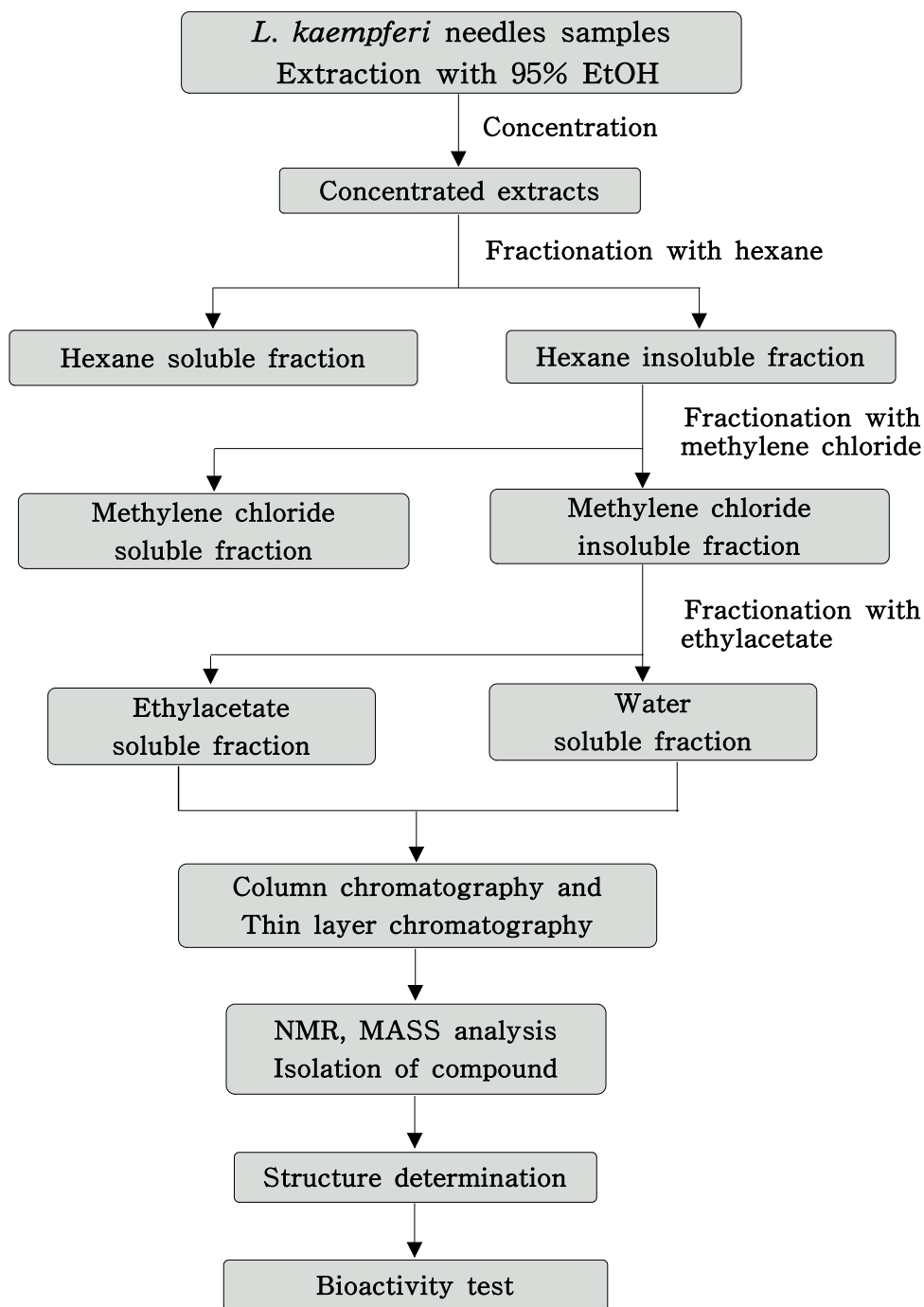


Fig. 1. Sample purification scheme.

1) 낙엽송 생엽

낙엽송 생엽 ethylacetate용성 화합물 19.1g을 MeOH-H₂O (3:1, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용해 칼럼크로마토그래피를 실시하여 5개의 부분으로 분리하였으며 KLE로 표기하였다. 농축 후 동결건조 된 양은 KLE 1 5.4g, KLE 2 4.6g, KLE 3 4.8g, KLE 4 2.0g, KLE 5 1.2g이었으며 KLE 3 부분을 MeOH-H₂O (1:1, 1:5, 1:6, v/v)와 EtOH-Hexane (2:1, 3:1, v/v)을 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 KLE 3343에서 화합물 3 ((+)-gallocatechin, 46mg), KLE 33232에서 화합물 2 ((-)-epicatechin, 60mg), KLE 33233 과 KLE 33233C에서 화합물 1 ((+)-catechin, 341mg), KLE 3221222에서 화합물 5 (isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside, 13mg), KLE 3221223에서 화합물 7 (kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside, 13mg)을 얻었다.

또한, 생엽 수용성 화합물 50.0g, 45.8g 및 54.7g을 각각 MeOH-H₂O (1:1, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하여 각각 6개, 6개, 3개의 부분으로 분리하였으며 KLW, KLWII, KLWIII로 표기하였다. KLW 3, KLW 4, KLWII 2, KLWIII 2 부분을 MeOH-H₂O (1:3, 1:4, 1:5 1:6, v/v)를 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼크로마토그래피를 실시하고 TLC상에서 노란색으로 반응하는 화합물만을 모아 KLW YG로 표기하였다. KLW YG 3 부분을 MeOH-H₂O (1:5, 1:9, v/v)와 EtOH-Hexane (2:1, 3:1, v/v)과 H₂O를 용리용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 KLW YG 3222에서 화합물 4 (2''-O-rhamnosylvitexin, 66mg)을 얻을 수 있었다.

2) 낙엽송 낙엽

낙엽 ethylacetate용성 화합물 27.2g을 MeOH-H₂O (1:1, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용해 칼럼크로마토그래피를 실시하여 4개의 부분으로 분리하여 KDLE로 표기하였다. 농축 후 동결건조 된 양은 KDLE 1 7.6g, KDLE 2 10.8g, KDLE 3 3.1g, KDLE 4 2.3g이었으며 KDLE 2와 KDLE 3 부분을 MeOH-H₂O (1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, v/v)와 EtOH-Hexane (2:1, 3:1, 4:1, 4:3, v/v)을 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 KDLE 334에서 화합물 2 ((-)-epicatechin 44mg), KDLE 335에서 화합물 1 ((+)-catechin, 86mg), KDLE 32262에서 화합물 6 (kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranoside, 19mg), KDLE 23523에서 화합물 11 (cedrusin, 28mg), KDLE

322523에서 화합물 8 (kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside, 66mg), KDLE 2353253wa에서 화합물 9 (laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside, 8mg), KDLE 2353253wb에서 화합물 10 (quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, 173mg)을 얻었다. 또한, 낙엽 수용성 화합물 29.0g을 MeOH-H₂O (1:1, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용해 칼럼크로마토그래피를 실시하여 5개의 부분으로 분리하였으며 KDLH로 표기하였다. 농축 후 동결건조 된 양은 KDLH 1 19.6g, KDLH 2 355mg, KDLH 3 1.2g, KDLH 4 930mg, KDLH 5 4.2g이었으며 KDLH 3과 KDLH 4 부분을 MeOH-H₂O(1:3, 1:5, 1:8, 1:9, v/v)와 EtOH-Hexane (2:1, v/v)을 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼 크로마토그래피를 실시한 결과 KDLH 433에서 화합물 2 ((-)-epicatechin, 13mg), KDLH 443에서 화합물 1 ((+)-catechin, 41mg), KDLH 32222와 32223에서 화합물 4 (2''-O-rhamnosylvitexin, 71mg)을 얻었다.

마. 박층크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography)

셀룰로오스 박층크로마토그래피는 칼럼크로마토그래피를 수행한 후 화합물들의 순수 여부를 확인하기 위해 실시하였다. TLC는 Merk사의 DC-Plastilfolien cellulose F 셀룰로오스판을 사용하였으며 혼합물의 분리단계에서는 1차원 TLC를 실시하였고, 화합물의 단리여부를 확인하기 위해 2차원 TLC를 실시하였다. 전개용매로는 TBA(*t*-butanol-acetic acid-water (3:1:1, solvent A)와 6% acetic acid (solvent B)를 사용하였다. TLC 상에 전개된 화합물은 UV램프(254nm, 354nm)로 관찰하였으며 발색제로 vanillin-HCl-EtOH (4.8g:12ml:480ml)와 1% FeCl₃-EtOH 용액을 전개된 TLC 판에 분무하고 가열 건조하여 반응하는 화합물 고유의 색을 관찰하였다.

2차원 박층크로마토그래피 (2D-TLC)는 단리화합물의 순도를 확인하기 위하여 solvent A와 solvent B를 순차적으로 직각으로 교차하여 전개하여 실시하였으며 화학적 이동값(R_f)은 다음과 같은 식을 사용하여 구하였다.

$$\text{화학적 이동값}(R_f) = \frac{\text{화합물의 이동거리}(cm)}{\text{전개용매의 이동거리}(cm)}$$

바. 단리화합물의 구조분석

1) 핵자기공명 분광분석 (Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy)

NMR 분석을 위해 강원대학교 공동실험실습관의 Bruker Avance DPX 400MHz NMR spectrometer를 이용하였으며 분석용매로는 MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆를 사용하였다. 1차원 NMR 스펙트럼은 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 DEPT 스펙트럼을 측정하였으며 보다 정확한 구조를 결정하기 위해 COSY, HETCOR, HMBC 등의 2차원 NMR 스펙트럼을 분석하여 단리화합물의 구조를 결정하였다.

2) 질량분석 (Mass Spectroscopy)

단리된 화합물의 분자량을 측정하기 위하여 강원대학교 공동실험실습관의 Micromass Autospec M363 질량분석기를 사용하였으며 Electron Ionization (EI) Mass spectrometer와 Fast Atom Bombardment (FAB) Mass spectrometer를 이용하여 분석을 실시하였다.

사. 단리화합물의 구조결정

1) 화합물 1 ((+)-Catechin)

화합물 1은 갈색의 분말 또는 흰색의 결정으로 생엽 ethylacetate용성, 낙엽 ethylacetate용성 및 수용성에서 단리되었으며 생엽에서는 341mg, 낙엽에서는 127mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 진한 적색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.67 (solvent A)과 0.41 (solvent B)이었다.

화합물1의 ¹H-NMR 과 ¹³C-NMR data는 다음과 같다.

¹H-NMR (400MHz, δ , CD₃OD) : 2.50 (1H, *dd*, *J*=8.2Hz and *J*=16.1Hz, H-4ax), 2.84 (1H, *dd*, *J*=5.5Hz and *J*=16.1Hz, H-4eq), 3.98 (1H, *m*, H-3), 4.56 (1H, *d*, *J*=7.5Hz, H-2), 5.85 (1H, *d*, *J*=2.2Hz, H-6), 5.92 (1H, *d*, *J*=2.3Hz, H-8), 6.71 (1H, *dd*, *J*=1.9Hz and *J*=8.1Hz, H-6'), 6.76 (1H, *d*, *J*=8.1Hz, H-5'), 6.83 (1H, *d*, *J*=1.8Hz, H-2').

¹³C-NMR (100MHz, δ , CD₃OD) : 28.55 (C-4), 68.84 (C-3), 82.88 (C-2), 95.53 (C-8), 96.32 (C-6), 100.85 (C-10), 115.28 (C-2'), 116.12 (C-5'), 120.08 (C-6'), 132.24

(C-1'), 146.26 (C-3'), 146.28 (C-4'), 156.95 (C-9), 157.61 (C-5), 157.86 (C-7).

2) 화합물 2 ((-)-Epicatechin)

화합물 2는 갈색의 분말로 생엽 ethylacetate용성, 낙엽 ethylacetate용성 및 수용성에서 단리되었으며 생엽에서는 60mg, 낙엽에서는 57mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 적색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.47 (solvent A)과 0.32 (solvent B)이었다.

화합물2의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) : 2.73 (1H, *dd*, $J=2.8\text{Hz}$ and $J=16.8\text{Hz}$, H-4ax), 2.86 (1H, *dd*, $J=4.6\text{Hz}$ and $J=16.8\text{Hz}$, H-4eq), 4.17 (1H, *br s*, H-3), 4.81 (1H, *s*, H-2), 5.92 (1H, *d*, $J=2.2\text{Hz}$, H-6), 5.94 (1H, *d*, $J=2.2\text{Hz}$, H-8), 6.78 (2H, *m*, H-5',6'), 6.97 (1H, *d*, $J=1.7\text{Hz}$, H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD) : 29.31 (C-4), 67.54 (C-3), 79.93 (C-2), 95.93 (C-8), 96.43 (C-6), 100.11 (C-10), 115.37 (C-2'), 115.93 (C-5'), 119.43 (C-6'), 132.33 (C-1'), 145.83 (C-3'), 145.99 (C-4'), 157.41 (C-9), 157.72 (C-5), 158.05 (C-7).

3) 화합물 3 ((+)-Gallocatechin)

화합물 3은 갈색의 분말로 생엽 ethylacetate용성에서 46mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 적색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.43 (solvent A)과 0.40 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7$ 306, Found m/z 307 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

화합물3의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) : 2.50 (1H, *dd*, $J=7.8\text{Hz}$ and $J=16.2\text{Hz}$, H-4ax), 2.80 (1H, *dd*, $J=5.3\text{Hz}$ and $J=16.1\text{Hz}$, H-4eq), 3.97 (1H, *m*, H-3), 4.52 (1H, *d*, $J=7.2\text{Hz}$, H-2), 5.85 (1H, *d*, $J=2.3\text{Hz}$, H-6), 5.92 (1H, *d*, $J=2.3\text{Hz}$, H-8), 6.40 (2H, *s*, H-2',6').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD) : 28.14 (C-4), 68.80 (C-3), 82.90 (C-2), 95.54 (C-8), 96.29 (C-6), 100.75 (C-10), 107.22 (C-2',6'), 131.60 (C-1'), 134.04 (C-4'), 146.89 (C-3',5'), 156.88 (C-9), 157.64 (C-5), 157.86 (C-7).

4) 화합물 4 (2''-O-rhamnosylvitexin)

화합물 4는 노란색의 분말로 생엽 수용성과 낙엽 수용성에서 단리되었으며 생엽에서는 66mg, 낙엽에서는 71mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 밝은 노란색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.81 (solvent A)과 0.53 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{27}H_{30}O_{14}$ 578, Found m/z 579 $[M+H]^+$.

화합물 4의 1H -NMR 과 ^{13}C -NMR data는 다음과 같다.

1H -NMR (400MHz, δ , CD_3OD) : 0.64 (3H, *d*, $J=6.2$ Hz, H-6'''(CH₃)), 3.0~4.26 (10H, *m*, sugar proton), 5.02 (1H, *d*, $J=9.9$ Hz, H-1''(glc)), 5.09 (1H, *d*, $J=1.2$ Hz, H-1'''(rham)), 6.28 (1H, *s*, H-6), 6.61 (1H, *s*, H-3), 6.94 (2H, *d*, $J=8.7$ Hz, H-3',5'), 7.99 (2H, *d*, $J=8.6$ Hz, H-2',6').

^{13}C -NMR (100MHz, δ , CD_3OD) : 18.01 (C-6'''), 63.06 (C-6''), 69.99 (C-5'''), 72.18 (C-4'',2'',4'''), 73.56 (C-3'''), 73.74 (C-1''), 78.16 (C-2''), 81.65 (C-3''), 82.91 (C-5''), 99.87 (C-6), 102.57 (C-1'''), 103.67 (C-3), 105.00 (C-10), 105.74 (C-8), 117.03 (C-3',5'), 123.61 (C-1'), 130.18 (C-2',6'), 157.98 (C-9), 162.82 (C-4',5), 164.30 (C-7), 166.77 (C-2) 184.21 (C-4).

5) 화합물 5 (Isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside)

화합물 5는 노란색의 분말로 생엽 ethylacetate용성에서 13mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 노란색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.80 (solvent A)과 0.21 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{22}H_{22}O_{12}$ 478, Found m/z 501 $[M+Na]^+$.

화합물 5의 1H -NMR 과 ^{13}C -NMR data는 다음과 같다.

1H -NMR (400MHz, δ , CD_3OD) : 3.45~3.93 (5H, *m*, H-2'',3'',4'',5'',6''), 3.94 (3H, *s*, -OCH₃), 5.37 (1H, *d*, $J=7.3$ Hz, H-1''), 6.17 (1H, *d*, $J=1.9$ Hz, H-6), 6.36 (1H, *d*, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.90 (1H, *d*, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.59 (1H, *dd*, $J=1.9$ Hz and $J=8.4$ Hz, H-6'), 7.92 (1H, *d*, $J=1.9$ Hz, H-2').

^{13}C -NMR (100MHz, δ , CD_3OD) : 56.79 (-OCH₃), 62.55 (C-6''), 71.50 (C-4''), 75.94 (C-2''), 78.12 (C-5''), 78.57 (C-3''), 95.13 (C-8), 100.44 (C-6), 103.79 (C-1''), 105.37 (C-10), 114.35 (C-2'), 116.03 (C-5'), 123.13 (C-1'), 123.84 (C-6'), 135.31 (C-3),

148.45 (C-4'), 150.91 (C-3'), 158.50 (C-9), 158.63 (C-2), 163.04 (C-5), 167.62 (C-7), 179.27 (C-4).

6) 화합물 6 (Kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside)

화합물 6은 갈색의 분말로 낙엽 ethylacetate용성에서 19mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 노란색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.85 (solvent A)와 0.19 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{20}H_{18}O_{10}$ 418, Found m/z 441 $[M+Na]^+$.

화합물 6의 1H -NMR 과 ^{13}C -NMR data는 다음과 같다.

1H -NMR (400MHz, δ , CD_3OD) : 3.49 (2H, *d*, $J=4.36Hz$, H-5''), 3.81 (1H, *m*, H-3''), 3.91 (1H, *m*, H-2''), 4.33 (1H, *d*, $J=2.7Hz$, H-4''), 5.48 (1H, *s*, H-1''), 6.20 (1H, *d*, $J=2.0Hz$, H-6), 6.40 (1H, *d*, $J=2.0Hz$, H-8), 6.92 (2H, *d*, $J=8.8Hz$, H-3',5'), 7.95 (2H, *d*, $J=8.8Hz$, H-2',6').

^{13}C -NMR (100MHz, δ , CD_3OD) : 62.55 (C-5''), 78.66 (C-3''), 83.38 (C-2''), 88.04 (C-4''), 94.08 (C-8), 99.92 (C-6), 103.52 (C-10), 109.67 (C-1''), 116.55 (C-3',5'), 122.81 (C-1'), 132.06 (C-2',6'), 134.95 (C-3), 158.59 (C-2), 159.41 (C-9), 161.59 (C-4'), 163.10 (C-5), 166.04 (C-7), 179.95 (C-4).

7) 화합물 7 (Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside)

화합물 7은 노란색의 분말로 생엽 ethylacetate용성에서 13mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 노란색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.77 (solvent A)과 0.22 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{21}H_{20}O_{11}$ 448, Found m/z 471 $[M+Na]^+$.

화합물 7의 1H -NMR 과 ^{13}C -NMR data는 다음과 같다.

1H -NMR (400MHz, δ , CD_3OD) : 3.21~3.69 (5H, *m*, H-2'',3'',4'',5'',6''), 5.22 (1H, *d*, $J=7.3Hz$, H-1''), 6.19 (1H, *d*, $J=1.7Hz$, H-6), 6.38 (1H, *d*, $J=1.7Hz$, H-8), 6.88 (2H, *d*, $J=8.8Hz$, H-3',5'), 8.05 (2H, *d*, $J=8.8Hz$, H-2',6').

^{13}C -NMR (100MHz, δ , CD_3OD) : 62.64 (C-6''), 71.37 (C-4''), 75.75 (C-2''), 78.08 (C-5''), 78.45 (C-3''), 95.01 (C-8), 100.26 (C-6), 104.22 (C-1''), 105.51 (C-10), 116.21 (C-3',5'), 122.82 (C-1'), 132.32 (C-2',6'), 135.48 (C-3), 158.62 (C-2), 159.03 (C-9),

161.65 (C-4'), 163.07 (C-5), 167.00 (C-7), 179.45 (C-4).

8) 화합물 8 (Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside)

화합물 8은 노란색의 분말로 낙엽 ethylacetate용성에서 66mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 노란색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.83 (solvent A)과 0.48 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{21}H_{20}O_{10}$, 432, Found m/z 433 $[M+H]^+$.

화합물 8의 1H -NMR 과 ^{13}C -NMR data는 다음과 같다.

1H -NMR (400MHz, δ , CD_3OD) : 0.93 (3H, *d*, $J=4.4$ Hz, H- CH_3 (rha)), 3.43~4.23 (4H, *m*, H-2'',3'',4'',5''), 5.38 (1H, *s*, H-1''), 6.19 (1H, *s*, H-6), 6.37 (1H, *s*, H-8), 6.93 (2H, *d*, $J=8.5$ Hz, H-3',5'), 7.75 (2H, *d*, $J=8.6$ Hz, H-2',6').

^{13}C -NMR (100MHz, δ , CD_3OD) : 17.69 (C-Me), 71.95 (C-5''), 72.06 (C-3''), 72.14 (C-2''), 73.22 (C-4''), 94.79 (C-8), 99.85 (C-6), 103.52 (C-1''), 105.95 (C-10), 116.54 (C-3',5'), 122.65 (C-1'), 131.94 (C-2',6'), 136.24 (C-3), 158.54 (C-2), 159.29 (C-9), 161.58 (C-4'), 163.21 (C-5), 165.86 (C-7), 179.62 (C-4).

9) 화합물 9 (Laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside)

화합물 9는 갈색의 분말로 낙엽 ethylacetate용성에서 8mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 노란색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.49 (solvent A)와 0.11 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{22}H_{22}O_{13}$ 494, Found m/z 517 $[M+Na]^+$.

화합물 9의 1H -NMR 과 ^{13}C -NMR data는 다음과 같다.

1H -NMR (400MHz, δ , CD_3OD) : 3.46~3.95 (5H, *m*, H-2'',3'',4'',5'',6'') 3.92 (3H, *s*, -OCH₃), 5.40 (1H, *d*, $J=7.3$ Hz, H-1''), 6.20 (1H, *d*, $J=1.9$ Hz, H-6), 6.39 (1H, *d*, $J=1.8$ Hz, H-8), 7.29 (1H, *d*, $J=1.9$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, *d*, $J=1.9$ Hz, H-2').

^{13}C -NMR (100MHz, δ , CD_3OD) : 57.04 (-OCH₃), 62.56 (C-6''), 71.44 (C-4''), 75.94 (C-2''), 78.14 (C-5''), 78.56 (C-3''), 94.74 (C-8), 99.94 (C-6), 103.73 (C-1''), 105.75 (C-10), 106.82 (C-2'), 111.11 (C-6'), 121.99 (C-1'), 135.58 (C-3), 138.79 (C-4'), 146.27 (C-5'), 149.04 (C-3'), 158.48 (C-2), 158.73 (C-9), 163.12 (C-5), 166.15 (C-7), 179.45 (C-4).

10) 화합물 10 (Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside)

화합물 10은 노란색의 분말로 낙엽 ethylacetate용성에서 173mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 노란색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.59 (solvent A)와 0.19 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for C₂₁H₂₀O₁₂ 464, Found m/z 465 [M+H]⁺.

화합물 10의 ¹H-NMR 과 ¹³C-NMR data는 다음과 같다.

¹H-NMR (400MHz, δ, CD₃OD) : 3.36~3.72 (6H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 5.25 (1H, *d*, *J*=7.4Hz, H-1''), 6.19 (1H, *s*, H-6), 6.38 (1H, *s*, H-8), 6.87 (1H, *d*, *J*=8.4Hz, H-5'), 7.58 (1H, *d*, *J*=8.4Hz, H-6'), 7.72 (1H, *s*, H-2').

¹³C-NMR (100MHz, δ, CD₃OD) : 62.56 (C-6''), 71.22 (C-4''), 75.75 (C-2''), 78.13 (C-5''), 78.39 (C-3''), 94.76 (C-8), 99.91 (C-6), 104.36 (C-1''), 105.70 (C-10), 116.03 (C-2'), 117.61 (C-5'), 123.08 (C-1'), 123.24 (C-6'), 135.65 (C-3), 145.90 (C-3'), 149.86 (C-4'), 158.45 (C-2), 159.03 (C-9), 163.02 (C-5), 165.99 (C-7), 179.49 (C-4).

11) 화합물 11 (Cedrusin)

화합물 11은 갈색의 점액질로 낙엽 ethylacetate용성에서 28mg을 단리하였다.

셀룰로오스 2D-TLC상에서는 무색으로 반응하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며, 이때 R_f 값은 0.96 (solvent A)과 0.72 (solvent B)이었다.

EI-MS : Calculated for C₁₉H₂₂O₆ 346, Found m/z 346[M]⁺.

화합물 11의 ¹H-NMR 과 ¹³C-NMR data는 다음과 같다.

¹H-NMR (400MHz, δ, CD₃OD) : 1.79 (2H, *m*, H-β'), 2.56 (2H, *t*, *J*=7.6Hz, H-α'), 3.44 (1H, *m*, H-β), 3.56 (2H, *t*, *J*=6.5Hz, H-r'), 3.75 (2H, *m*, H-r), 3.81 (3H, *s*, -OCH₃), 5.49 (1H, *d*, *J*=6.1Hz, H-α), 6.57 (1H, *br s*, H-2'), 6.60 (1H, *br s*, H-6'), 6.76 (1H, *d*, *J*=8.1Hz, H-5), 6.84 (1H, *dd*, *J*=1.7Hz and *J*=8.1Hz, H-6), 6.98 (1H, *d*, *J*=1.7Hz, H-2).

¹³C-NMR (100MHz, δ, CD₃OD) : 32.75 (C-α'), 35.82 (C-β'), 55.76 (C-β), 56.40 (-OCH₃), 62.35 (C-r'), 65.16 (C-r), 88.72 (C-α), 110.56 (C-2), 116.12 (C-5), 116.70 (C-6'), 117.03 (C-2'), 119.71 (C-6), 129.83 (C-5'), 135.13 (C-1), 136.75 (C-1'), 141.88 (C-3'), 146.52 (C-4'), 147.36 (C-4), 149.07 (C-3).

아. 항산화활성 시험 (DPPH radical 소거법)

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 이용한 free radical 소거능 활성을 검정하기 위하여 강원대학교 바이오산업공학부의 UV-visible spectrophotometer (UVISON 922 Kontron Co.)를 사용하여 항산화 실험을 실시하였다. 생엽과 낙엽 추출물 분획들과 분리된 화합물들을 methanol에 1000ppm의 농도로 희석하고 methanol 4ml가 들어있는 다섯 개의 시험관에 각각 0, 10, 20, 40, 80 μ l씩 순차적으로 넣은 다음 0.15mM DPPH 1ml를 첨가 후 상온에서 약 30분간 반응시킨 뒤 517nm에서 흡광도 감소를 측정하였다.

항산화 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(μ g)를 검체의 농도(IC₅₀)로 나타내었다. 항산화력은 기존의 합성항산화제인 BHT와 천연항산화제인 α -tocopherol과 비교하면서 각각의 추출물 분획 및 화합물의 IC₅₀을 구하여 항산화력이 우수한 물질을 탐색하고자 하였다.

IC₅₀값은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$Y = aX + b$$

X=투여량 (μ g)

Y=흡광도값=(1/2) \times (무첨가구의 값)

Table 1. UV absorbance of each fraction of the green needles and fallen needles extracts by different concentration

Fraction		Concentration(ppm)				
		0	2.5	5	10	20
Green needles	Hexane sol. fr.	0.2810	0.2434	0.1764	0.1317	0.0689
	CH ₂ Cl ₂ sol. fr.	0.3122	0.2680	0.2636	0.2571	0.2094
	EtOAc sol. fr.	0.3057	0.2319	0.1915	0.1356	0.0193
	H ₂ O sol. fr.	0.2865	0.2551	0.2357	0.1581	0.0740
	Crude extractive	0.3057	0.2400	0.1835	0.1433	0.0908
Fallen needles	Hexane sol. fr.	0.2628	0.2390	0.2063	0.1452	0.1071
	CH ₂ Cl ₂ sol. fr.	0.2750	0.2963	0.2844	0.2769	0.2747
	EtOAc sol. fr.	0.2757	0.2339	0.2146	0.1649	0.0726
	H ₂ O sol. fr.	0.2905	0.2732	0.2263	0.1729	0.1557
	Crude extractive	0.2619	0.2198	0.2034	0.1494	0.1286

Table 2. UV absorbance of the isolated compounds by concentration

Compound	Concentration(ppm)				
	0	2.5	5	10	20
(+)-Catechin	0.2842	0.0809	0.0264	0.0262	0.0255
(-)-Epicatechin	0.3300	0.1430	0.0199	0.0182	0.0211
(+)-Gallocatechin	0.3347	0.1571	0.0204	0.0178	0.0197
2''-O-rhamnosylvitexin	0.3338	0.3344	0.3116	0.2781	0.2253
Isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside	0.3396	0.3410	0.3395	0.3139	0.2814
Kaempferol-3-O-arabinofuranoside	0.2885	0.2479	0.2227	0.1192	0.0528
Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	0.3298	0.3848	0.3739	0.3235	0.2758
Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside	0.3043	0.2851	0.2710	0.2464	0.2130
Laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside	0.4307	0.2680	0.1071	0.0666	0.0652
Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside	0.2871	0.1294	0.0561	0.0566	0.0554
Cedrusin	0.4072	0.3609	0.3146	0.2200	0.1592

자. 항균활성 시험

1) 항여드름균 활성 측정 시험

10% DMSO에 stock되어 -70°C 에 보관되어 있는 균주 (한국 생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받은 *Propionibacterium acnes* KCTC 3314 (ATCC 6919))를 백금이를 이용하여 agar plate에 streaking하여 균주 활성화를 위해 37°C 에서 72시간 배양한다. 생성된 colony 하나를 백금이를 이용하여 broth배지 (Reinforced-clostridial broth (Merck, Germany))에 접종하고 37°C 에서 200rpm으로 60시간동안 shaking incubator에서 전배양 하고, 멸균 면봉을 이용하여 균 현탁액을 충분히 흡수하게 한 후, tube 벽에 여액을 짜내고 agar plate에 균일하게 도말하여 준다.

Agar 배지 (Reinforced-clostridial agar (Merck, Germany))에 균을 도말하여 5분간 정치하고, 멸균된 8mm paper disk를 올려놓은 후, 단리된 화합물과 각각의 분획물들을 100% DMSO에 용해하여 0.05% 농도로 제조하여 disk에 $50\mu\text{l}$ 씩 loading한다. 10분간 정치하여 시료가 모두 배지에 확산되어 흡수된 후, 균의 성장 최적온도인 37°C 에서 72시간동안 혐기성 배양한다. 양성 대조군으로 erythromycin (Sigma.)을 이용하여 0.125, 0.25, $0.5\mu\text{g}/\text{disk}$ 로 처리하여 시험하고, 균의 성장억제환의 직경을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

2) 항비듬균 활성 측정 시험

10% DMSO에 stock되어 -70°C 에 보관되어 있는 균주 (한국 생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받은 *Malassezia furfur* KCTC7546 (ATCC12078))를 백금이를 이용하여 agar plate에 streaking하여 균주 활성화를 위해 37°C 에서 48시간 배양한다. 생성된 colony 하나를 백금이를 이용하여 broth배지 (Sabouraud-2% Dextrose broth (Merck, Germany))에 접종하고 37°C 에서 200rpm으로 48시간동안 shaking incubator에서 전배양 하고, 멸균 면봉을 이용하여 균 현탁액을 충분히 흡수하게 한 후, tube 벽에 여액을 짜내고 agar plate에 균일하게 도말하여 준다.

Agar 배지 (Sabouraud-4% Dextrose agar (Merck, Germany))에 균을 도말하여 5분간 정치하고,, 멸균된 8mm paper disk를 올려놓은 후, 단리된 화합물과 각각의 분획물들을 100% DMSO에 용해하여 0.05% 농도로 제조하여 disk에 $50\mu\text{l}$ 씩 loading한다. 10분간 정치하여 시료가 모두 배지에 확산되어 흡수된 후, 균의 성장 최적온도인 3

7°C에서 48시간동안 배양한다. 양성 대조군으로 ketoconazole (Sigma.)을 이용하여 100, 500 μ g/disk로 처리하여 시험하고, 균의 성장억제환의 직경을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

차. 세포독성 시험

정상피부 세포인 HaCaT (Immortalized Human Keratinocyte) 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 에서 24시간 배양한 후, 96 well plate에 well당 1×10^5 /ml의 HaCaT 세포가 들어 있는 세포 부유액 100 μ l를 넣어 주고 24시간 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 배지를 90 μ l씩 첨가한다. 혈청이 포함되지 않은 배지로 희석한 시료들을 최종 농도 0.005, 0.01, 0.02%가 되도록 처리 후 24시간 배양한다.

배양 후 PBS buffer에 5mg/ml의 농도로 녹여져 있는 MTT 시약을 각 well에 첨가 (최종농도 1mg/ml)하고, 4시간 동안 항온기에서 반응시킨 후, MTT 시약이 함유된 배지를 제거한다. 각 well에 100 μ l acid iso-propanol (0.04N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570nm에서 흡광값을 측정하였다.

카. 합염증 활성시험

쥐유래의 Raw 264.7 (Mouse Macrophage) 세포를 10% FBS (fetal bovine serum), penicillin (100 μ g/ml), streptomycin (100 μ g/ml)이 포함된 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium)를 이용하여 5% CO₂, 37°C 항온기에서 배양한 후, 6 well plate에 well당 1×10^6 /ml 세포가 들어있는 세포 부유액 1ml씩을 넣어주고 24시간 추가 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고, 혈청이 포함되지 않은 배지를 90 μ l씩 첨가한다. 혈청이 포함되지 않은 배지로 희석한 시료들을 최종 농도 0.005, 0.01%가 되도록 처리 후 LPS (Lipopolysaccharide) 100ng/ml이 되도록 처리하여 준다. 양성 대조군 L-NMMA (N^G-monomethyl-L-arginin)는 50 μ M이 되도록 처리하여 주고 같은 조건으로 실험을 수행하였다. 20시간 추가 배양 후 배지를 이용하여 NO assay를 수행한다. NO assay는 96 well plate에 세포배양액 50 μ l와 Griess 시약 50 μ l를 혼합하여 10

분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광값을 측정하였다.

타. Tyrosinase 활성 저해능 시험

1ml의 큐벳에 Kpi buffer, tyrosinase (tyrosinase from mushroom) (80U/ml), 100% DMSO에 용해한 시료(최종 농도 0.01%)를 순서대로 넣는다. 최종적으로 DOPA (200uM)를 첨가하여 총 부피 1ml을 맞춘다. 빠른 시간 내에 큐벳내의 시료가 모두 반응하도록 해주고 480nm에서 흡광도를 측정하였다.

이 과정을 동일한 시간 내 (180sec)에 수행하여 kinetic course로 반응 속도를 측정한다. blank는 Kpi buffer만 넣고 흡광도를 측정하며, control로써 시료 용매제인 DMSO를 첨가하여 측정한다. 효소 반응 초기 시간 내의 반응 속도를 구하여 각 시료 별로 효소 활성 억제능을 확인 하였다.

3. 결과 및 고찰

낙엽송 생엽과 낙엽을 EtOH 용액으로 추출하고 hexane용성, methylene chloride용성, ethylacetate용성 및 수용성으로 분획한 후 동결건조하였고, 추출물의 수율은 Table 3과 같다.

수목에 낙엽이 지는 원인은 잎의 입자루와 가지가 붙어있는 부분에 이층 (離層, absciss layer)이라는 특별한 조직이 생겨 세포들이 떨어지거나 세포들이 파괴되어 잎이 떨어진다. 낙엽이 지는 시기가 되면 대부분의 잎 속의 양분은 줄기 등으로 이동하여 엽록소의 분해가 지속적으로 이루어진다. 낙엽을 분석하면 칼슘, 규소 등의 불용성의 물질이 많이 축적되어 있는데 이것은 낙엽에 의하여 식물은 불필요한 회분을 체외로 배출하기 때문이다. 그러한 이유로 hexane용성 분획과 methylene chloride용성 분획의 생엽과 낙엽의 수율을 비교해 보면 낙엽 수율이 현저하게 낮은 것을 알 수 있고, 고형분의 수율은 낙엽이 생엽보다 높은 것을 알 수 있었다.

낙엽송 잎의 전체 수율은 낙엽 (10.0%)이 생엽 (9.0%)보다 조금 높게 나타났다.

Table 3. Extraction yields of *Larix kaempferi* needles

(unit : %)

Sample	Crude extraction	Hexane soluble fraction	Methylene chloride soluble fraction	Ethylacetate soluble fraction	Water soluble fraction	Solid state fraction	Total yield
Green needles	0.2	1.2	0.8	0.5	4.1	2.3	9.0
Fallen needles	0.2	0.1	>0.0	0.5	4.0	5.2	10.0

가. 단리화합물의 구조분석

1) (+)-Catechin, 3',4',5,7-tetrahydroxyflavan-3-ol (화합물 1)

Fig. 2에서 보는 바와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 5.85ppm과 5.92ppm에서 두 개의 doublet은 H-6과 H-8의 피크로서 J 값이 2.2Hz와 2.3Hz인 것으로 보아 *meta coupling*이 되어있음을 알 수 있고 Fig. 3의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-6과 C-8은 각각 96.32ppm과 95.53ppm에서 나타나며 수산기가 결합되어 있는 C-5, 7, 9는 157.61ppm, 157.86ppm 그리고 156.95ppm에서 나타나는데 이것은 phloroglucinol A환의 전형적인 피크를 보여주고 있는 것이다. Quaternary 탄소인 C-10은 다른 탄소의 피크보다 작게 100.85ppm에서 나타나고 있다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 2.50ppm에서 나타나는 double doublet은 H-4의 axial 수소로서 vicinal 수소인 H-3의 의해서 8.2Hz의 J 값과 geminal 수소인 H-4의 equatorial 수소에 의해 16.1Hz의 J 값을 나타내며 2.84ppm의 double doublet은 H-4의 equatorial 수소로서 geminal 수소인 H-4의 axial 수소에 의해 16.1Hz의 J 값과 vicinal 수소인 H-3의 의해서 5.5Hz의 J 값을 나타내고 있다. 3.98ppm은 H-3의 수소로서 인접한 H-2, H-4ax 그리고 H-4eq에 의해서 multiplet으로 나타나고 있으며 H-2는 H-3의 수소에 의해서 4.56ppm에서 J 값이 7.5 Hz인 doublet 피크를 보이고 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 28.55ppm의 피크는 C-4에 carbonyl기가 치환되어 있지 않은 flavan-3-ol의 전형적인 피크이며 C-3과 C-2는 68.84ppm과 82.88ppm에 나타나는데 이는 flavan류 화합물의 heterocyclic C환의 특징적인 피크 형태이다.

한편, B환의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-2'은 H-6'과 *meta coupling*으로 6.83ppm에서 J 값이 1.8Hz인 doublet 피크로 나타나고 있으며 H-5'은 6.76ppm H-6'과 *ortho*

*coupling*으로 J 값이 8.1Hz인 doublet 피크를 보여주고 있고, 6.71ppm에서 나타나는 double doublet은 H-6'의 피크로 인접한 H-2'과 *meta coupling*, H-5'과 *ortho coupling*으로 J 값은 1.9Hz와 8.1Hz이다. B환의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 수산기가 결합되어 있지 않은 C-2', 5', 6' 피크들은 115.28ppm, 116.12ppm, 120.08ppm에서 나타나며 C-3'과, 4' 피크들은 수산기가 결합되어 있어 146.26ppm과 146.28ppm에서 downfield되어 나타나고 있는데, 이것은 이 화합물의 B환이 catechol 형태를 가지고 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과 Ham 등(1997)는 *Taxus cuspidata*의 잎으로부터 단리한 화합물의 NMR값과 정확히 일치하고 있으며, Sa 등(2002)은 *Rosa davurica*의 뿌리로부터 (+)-catechin을 단리하여 NMR값과 DPPH radical 소거법을 이용한 항산화활성 및 *Rosa davurica*의 부위별 (+)-catechin 함량을 보고한바 있다.

(+)-catechin은 지혈(hemostatic), 지사(antidiarrheal), 항궤양(antiulcer)등의 약리효과가 있으며 간장 질환(hepatic disorders) 치료제 등으로 사용되고 있다(장, 2003).

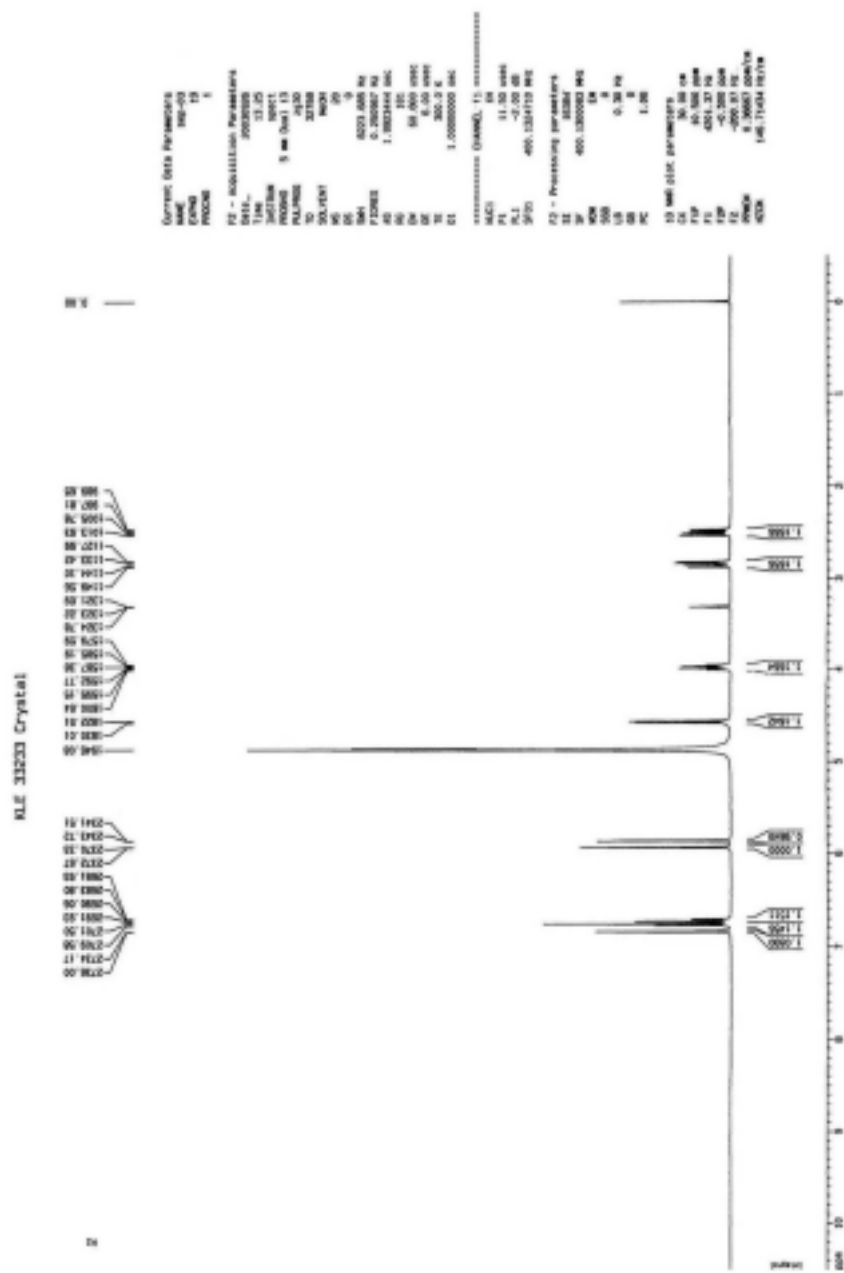


Fig. 2. ¹H-NMR spectrum of (+)-catechin.

KLE 33213 Crystall

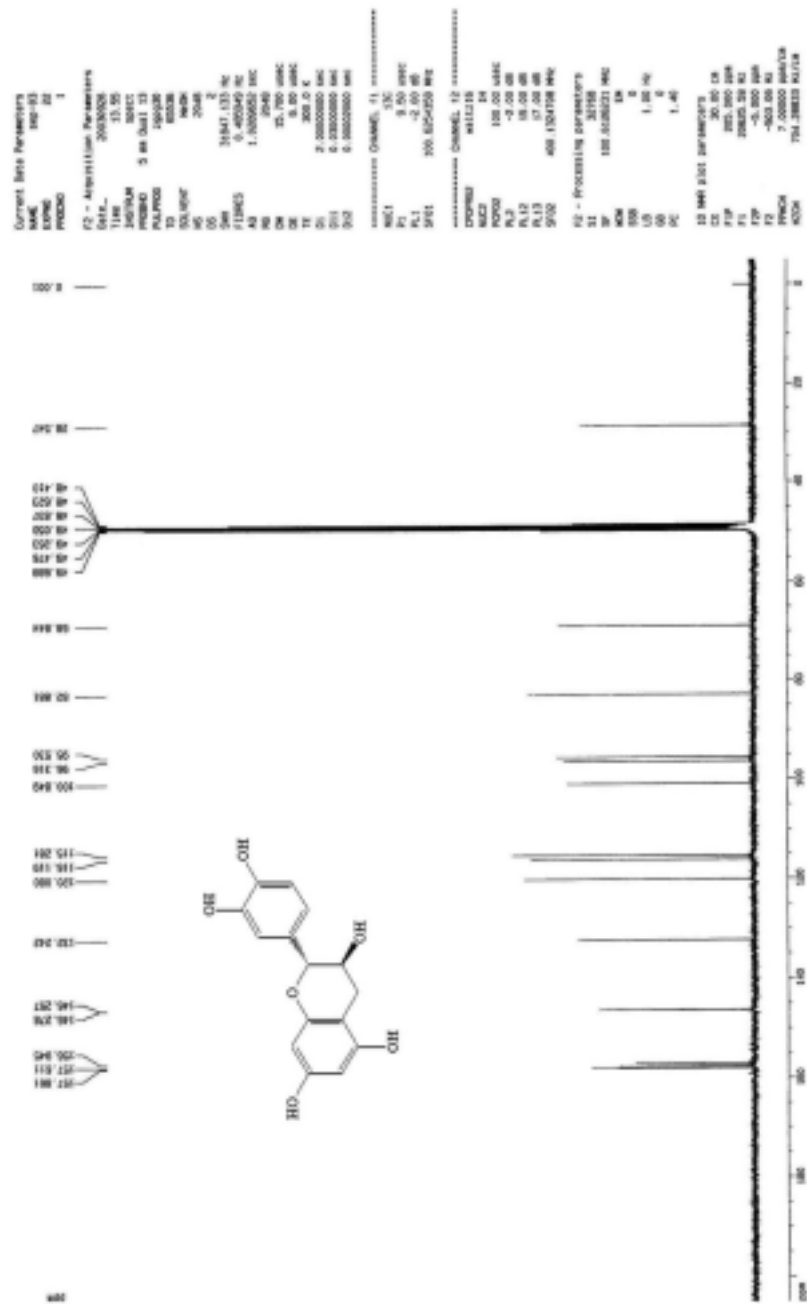


Fig. 3. ^{13}C -NMR spectrum of (+)-catechin.

2) (-)-Epicatechin, 3',4',5,7-tetrahydroxyflavan-3-ol (화합물 2)

Fig. 4에서 보는 바와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 (+)-catechin과 거의 유사한 형태의 피크를 보이고 있으나 C환의 입체배위 차이에 의해 약간 다른 피크를 나타내고 있다. 4.81ppm과 4.17ppm은 heterocyclic C환의 H-2, 3의 피크로 각각 singlet으로 나타나고, H-4의 axial 수소는 2.73ppm에서 2.8Hz와 16.8Hz의 J 값을 보이며 equatorial 수소는 2.86ppm에서 4.6Hz와 16.7Hz의 J 값을 갖는 double doublet 피크를 보이고 있다.

Fig. 5의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 (+)-catechin에 비해 C-2와 C-3은 2.95ppm, 1.30ppm upfield되어 79.93ppm, 67.54ppm에서 피크가 나타나며 C-4는 0.76ppm downfield되어 29.31ppm에서 피크가 나타나는 차이를 보이고 있다. 이것은 C-3위의 수산기가 밑으로 내려가 있어 H-2와 H-3이 *cis*형태를 이루고 있기 때문이다. 이는 H-2와 H-3이 *trans*형태를 이루고 있는 (+)-catechin과 가장 잘 구분이 되는 피크이다 (이, 2003).

한편, A환의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 5.92ppm과 5.94ppm에서 J 값이 각각 2.2Hz인 doublet은 H-6과 H-8의 피크이며, $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼의 96.43ppm과 95.93ppm은 C-6과 C-8의 피크로 전형적인 phloroglucinol A환의 피크를 보이고 있다. catechol B환의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 6.78ppm의 multiplet은 H-5', 6'의 피크이며 H-2'은 6.97ppm에서 J 값이 1.7Hz인 doublet으로 나타나며 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 (+)-catechin과 동일한 피크를 나타내었다. 또한, catechol B환은 앞서 설명한 화합물 1과 동일한 구조로 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 6.78ppm은 H-5', 6'이 겹쳐서 multiplet으로 나타나고 있으며 H-2'은 H-6'과 *meta coupling*으로 6.97ppm에서 J 값이 1.8Hz인 doublet 피크로 나타나고, $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-2', 5', 6' 피크들은 115.37ppm, 115.93ppm, 119.43ppm에서 나타나며 수산기가 결합되어 있는 C-3'과 C-4'는 downfield되어 145.83ppm과 145.99ppm에서 나타나고 있다.

이상의 결과 Lee 등(1997)이 *Lindera obtusiloba*의 수피로부터 단리한 화합물과 Kim과 Bae(2001)가 *Torreya nucifera*의 잎으로부터 단리한 화합물의 NMR값과 정확히 일치하고 있어 (-)-epicatechin으로 구조를 결정하였으며 약리효과로는 항염증(anti-inflammatory), 간친화 활성(hepatotronic activity) 및 독성(toxic)이 있다(장, 2003).

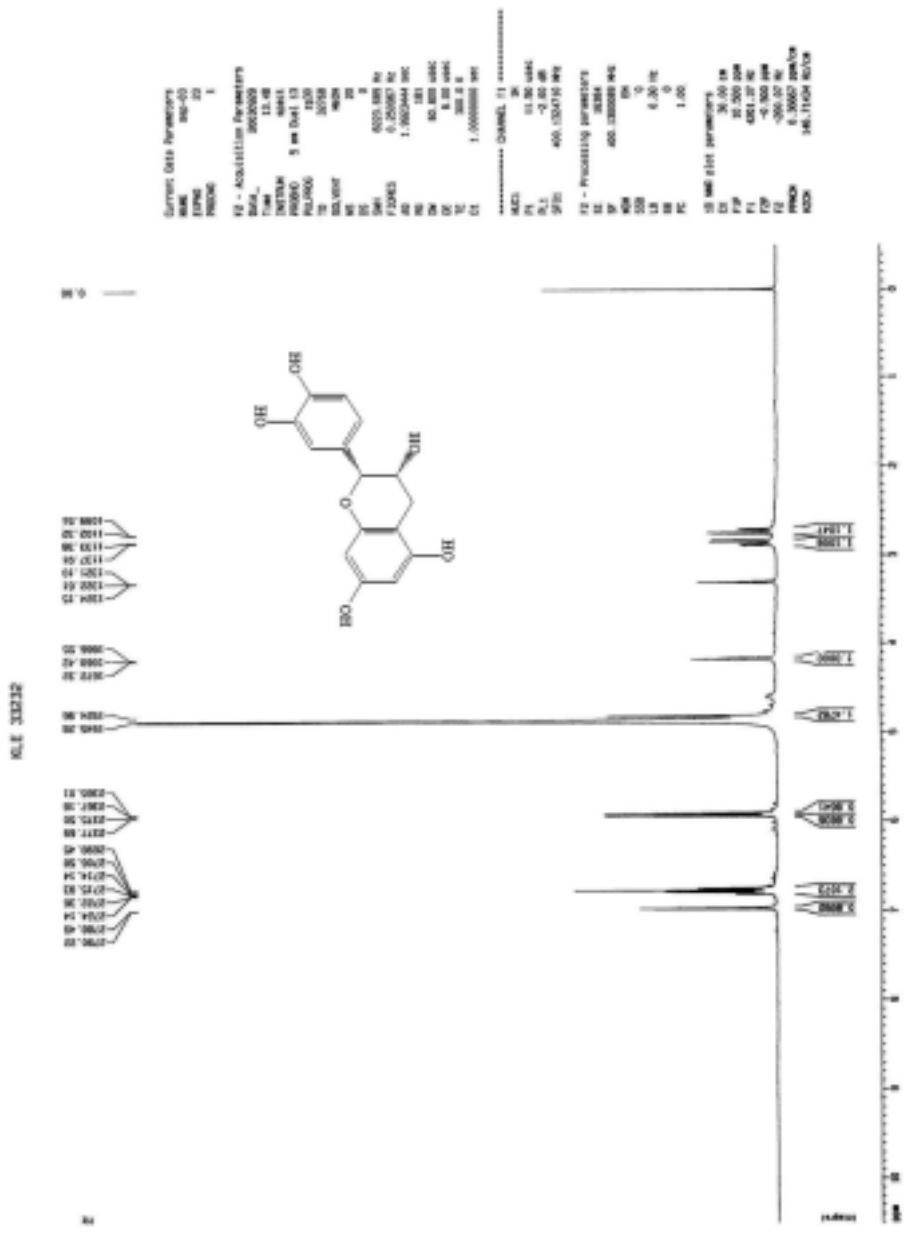


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of (-)-epicatechin.

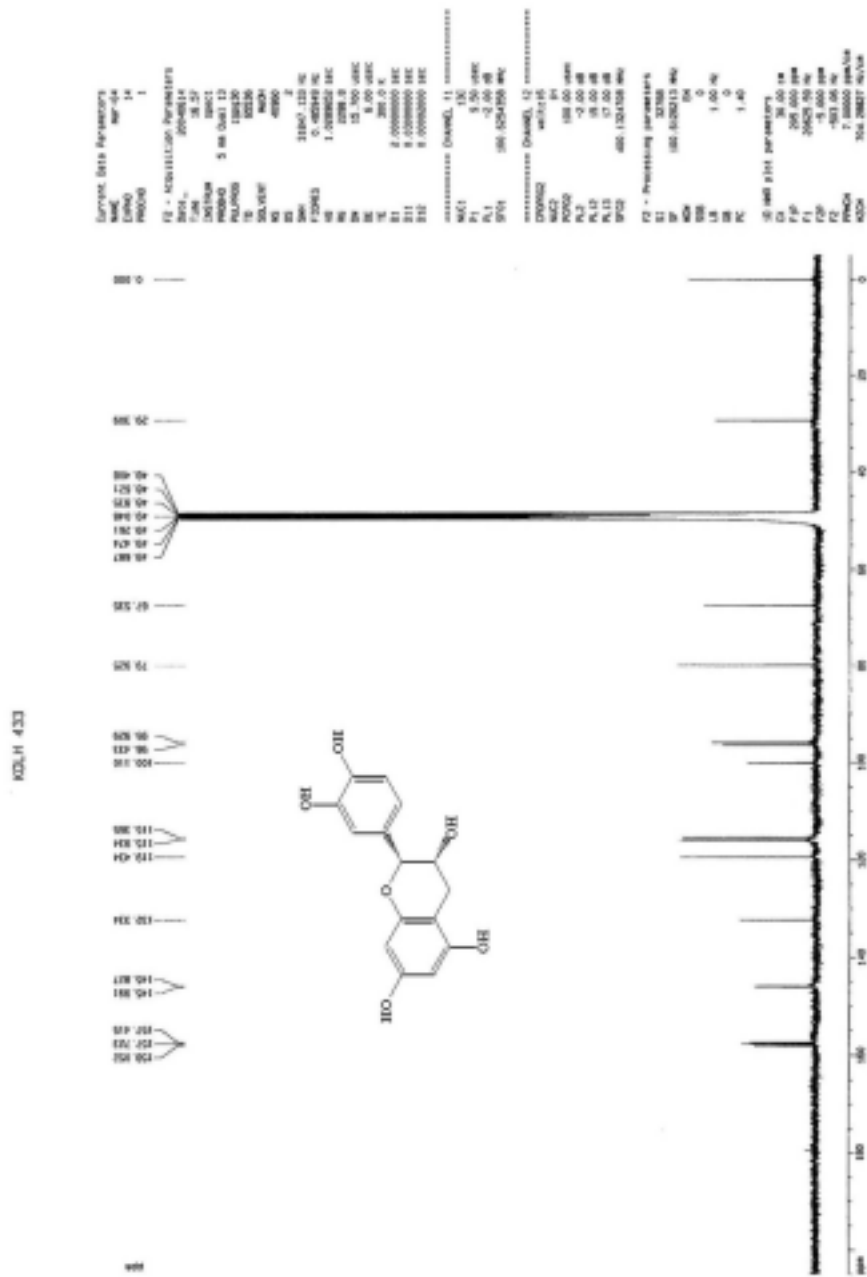


Fig. 5. ^{13}C -NMR spectrum of (-)-epicatechin.

3) (+)-Gallocatechin, 3',4',5',5,7-pentahydroxyflavan-3-ol (화합물 3)

Fig. 6에서 보는 바와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 6.43ppm의 singlet은 H-2'과 H-6'의 피크로 적분값을 보면 두 개의 수소를 나타내고 있는데, 이것은 C-3', 4', 5'에 수산기가 결합되어 있는 pyrogallol환으로 서로 대칭되어 있다는 증거이다. Fig. 7의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 107.22ppm과 146.89ppm의 피크들은 각각 대칭을 이루고 있는 C-2', 6'과 C-3', 5'을 나타내는 것으로 다른 탄소들보다 크게 나타나고 있으며 C-4'의 피크는 134.04ppm에서 나타나고 있다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 5.85ppm과 5.92ppm의 두 개의 doublet과 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서의 96.29ppm과 95.54ppm의 피크들은 A환의 6번과 8번의 수소와 탄소의 피크들로서 phloroglucinol A환의 특징적인 피크 형태를 갖고 있음을 알 수 있다.

또한, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-4의 axial과 equatorial 수소는 2.50ppm과 2.80ppm에서 각각 double doublet 피크로 나타나며 3.97ppm의 multiplet과 4.52ppm의 doublet 피크들은 H-3과 H-2를 나타낸다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 82.90ppm, 68.80ppm, 28.14ppm의 세 개의 피크들은 heterocyclic C환의 C-2, 3, 4에 해당하는 것으로 (+)-catechin의 C환과 거의 동일한 형태의 스펙트럼을 나타내므로 flavan-3-ol 구조임을 알 수 있다.

이상의 결과들은 Foo 등(1997)이 *Lotus Pedunculatus*로부터 단리한 화합물과 Choi 등(1998)이 *Cornus walteri*의 수피에서 단리한 화합물의 NMR값과 정확히 일치하고 있으며, Kim과 Bae(2001)는 *Torreya nucifera*의 잎으로부터 (+)-gallocatechin과 이성질체인 (-)-epigallocatechin을 단리하여 NMR값의 차이를 보고한바 있다.

Fig. 8의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 307로 이 화합물의 분자량 306과 일치하여 (+)-gallocatechin으로 구조를 결정하였다.

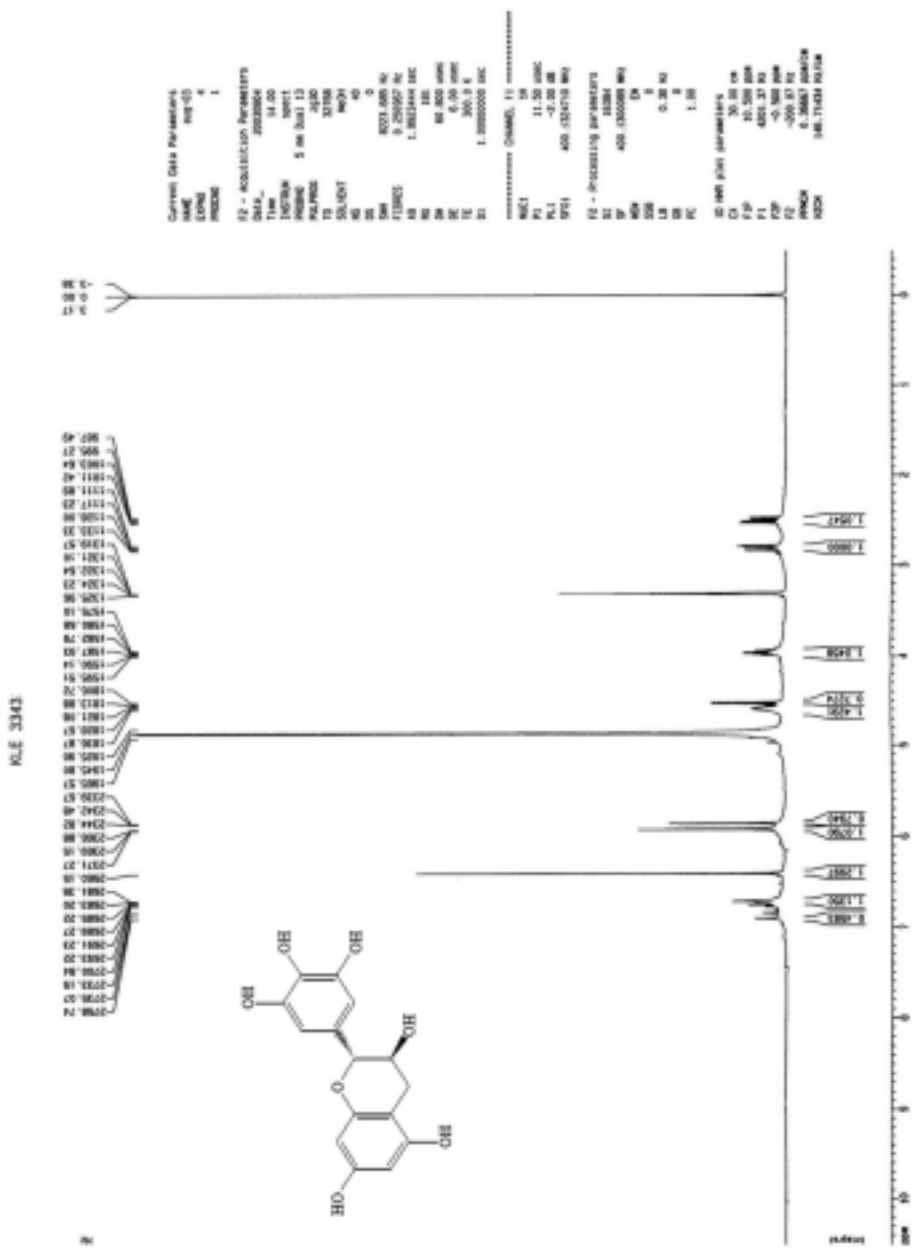


Fig. 6. ¹H-NMR spectrum of (+)-gallocatechin.

KLE 3343

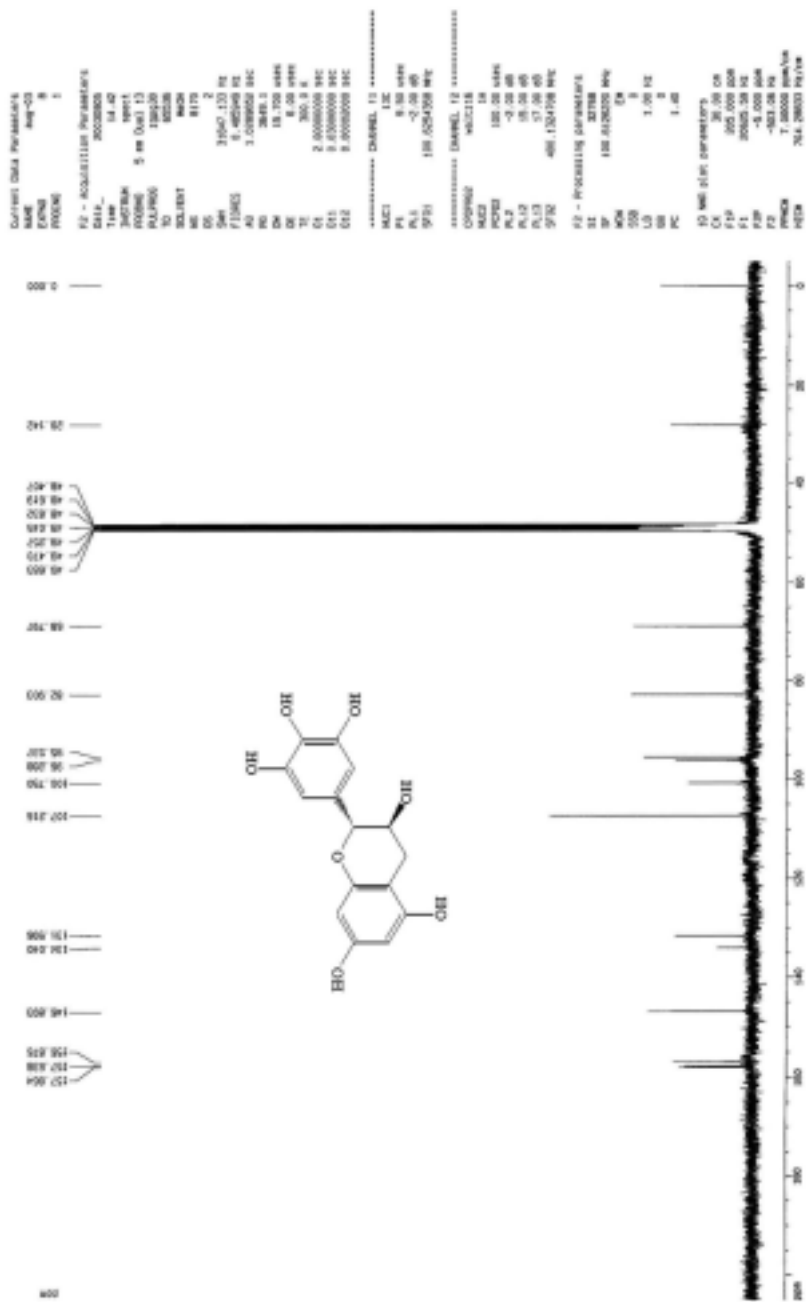


Fig. 7. ¹³C-NMR spectrum of (+)-gallocatechin.

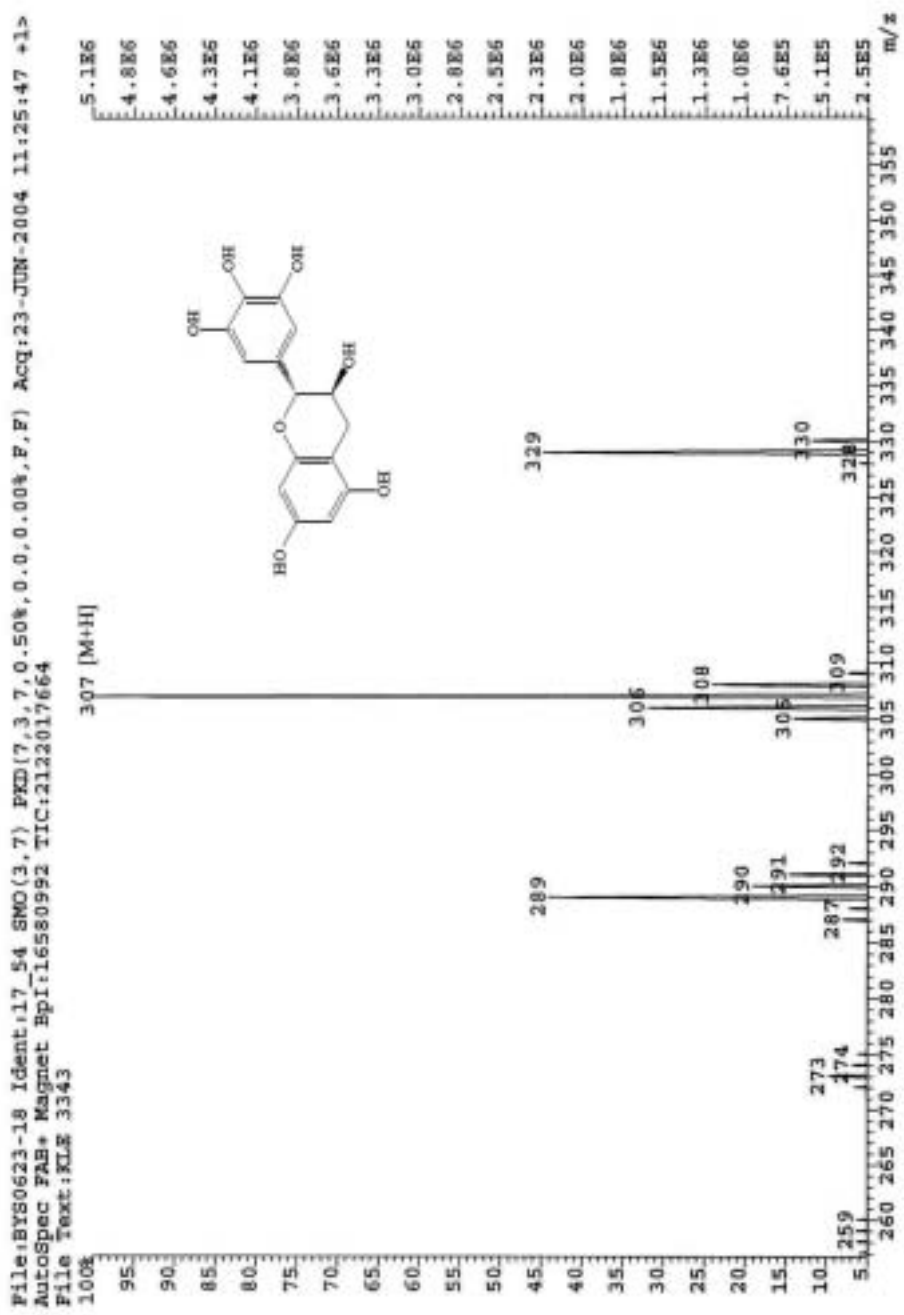


Fig. 8. FAB-MS spectrum of (+)-gallocatechin.

4) 2''-O-rhamnosylvitexin, apigenin-8-C-rhamnosyl-(1'''→2'')-glucoside (화합물 4)

Fig. 9에서 보는 바와 같이 B환은 페놀환으로 ¹H-NMR 스펙트럼에서 H-2', 6'과 H-3', 5'는 서로 *ortho coupling*되어 *J*값이 각각 8.6Hz와 8.7Hz로 7.99ppm과 6.94ppm에서 doublet 피크로 나타나고 있고 적분값을 보아 두 개의 수소임을 알 수 있다. Fig. 10의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 130.18ppm과 117.03ppm은 C-2', 6'과 C-3', 5'에 해당하는 것으로 다른 탄소의 피크보다 크게 나타나고 있으며 수산기가 결합되어 있는 C-4'는 downfield되어 162.82ppm에서 나타나는 것으로 보아 B환이 서로 대칭되는 구조를 가지는 페놀환임을 알 수 있다.

또한, ¹H-NMR 스펙트럼의 6.61ppm에서 나타나는 singlet 피크는 H-3이며, ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-2와 C-3이 166.77ppm과 103.67ppm에서 나타나는 것으로 보아 이중결합이고 C-3이 치환되어 있지 않음을 알 수 있으며 carbonyl 탄소인 C-4는 184.21ppm에서 피크를 보이고 있다. 이것은 flavone C환의 특징적인 피크이며 Roh 등(2000) *Melampyrum roseum*에서 단리한 apigenin C환의 NMR값과 일치하고 있다.

한편, A환의 ¹H-NMR 스펙트럼에서 H-6은 인접한 수소가 없기 때문에 6.28ppm에서 singlet 피크로 나타나고, ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-6은 99.87ppm에서 피크를 보이는 반면 C-8은 Owen 등(2003)이 보고한 apigenin의 그것보다 약 11ppm downfield되어 105.74ppm에서 나타난 것으로 보아 glucose C-1''과 aglycone C-8이 결합을 하고 있음을 알 수 있었으며 C-5와 C-7은 162.82ppm과 164.30ppm에서 피크를 나타내고 있다.

Markham(1992)은 flavonoid C-glycoside의 경우 sugar와 C-C 결합을 하고 있는 탄소의 화학적 이동값은 10ppm downfield되지만 주위에 다른 탄소들의 화학적 이동값에는 영향을 미치지 않는다고 보고한바 있다.

¹H-NMR 스펙트럼에서 5.02ppm의 피크는 C-8에 결합되어 있는 glucose의 H-1''에 해당되는 것으로 glucose의 다른 수소들에 비해 downfield되어 doublet으로 나타나고 *J*값이 9.9Hz인 것으로 보아 β-D-glucose임을 알 수 있고, rhamnose의 H-1'''은 5.09ppm에서 doublet으로 나타나는데 *J*값이 1.2Hz인 것으로 보아 α-L-rhamnose임을 알 수 있다. 나머지 glucose와 rhamnose의 수소들은 3.00~4.26ppm 사이에서 복잡한 형태의 피크를 보이고 있으며 0.64ppm에서 rhamnose의 methyl기 수소가 전형적인 피크를 보여 주고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼의 73.67ppm에서 C-glycoside의 특징적인 anomeric 탄소인 C-1''의 피크가 나타나며 C-2''은 Lew 등(1998)이 *Kylinga brevifolia*에서 단리한

vitexin의 C-2"보다 약 8ppm downfield되어 78.16ppm에서 나타나고, rhamnose의 C-1"'은 102.57ppm에서 나타나는 것을 보아 α -L-rhamnoside (1 \rightarrow 2) β -D-glucoside의 구조임을 알 수 있다. 또한, 63.06ppm, 69.99ppm, 72.18ppm, 73.56ppm, 81.65ppm, 82.91ppm에서 나타나는 피크는 glucose와 rhamnose 나머지 탄소들인 각각 C-6", C-5"', C-4"', 2"', 4"', C-3"', C-3"', C-5"에 해당하는 것이며 18.01ppm에서 methyl기의 전형적인 피크를 보이고 있다.

이상의 결과 Kim 등(1997)이 *Larix leptolepis*의 잎에서 단리한 화합물의 NMR값과 정확히 일치하고 있으며 Kassem 등(2000)이 단리한 luteolin-4'-O-neohesperidoside의 glucose와 rhamnose의 NMR값과도 비교 분석하여 2"-O-rhamnosylvitexin으로 구조를 결정하였으며 Fig. 11의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 $[M+H]^+$ m/z 579로 이 화합물의 분자량 578과 일치하였다.

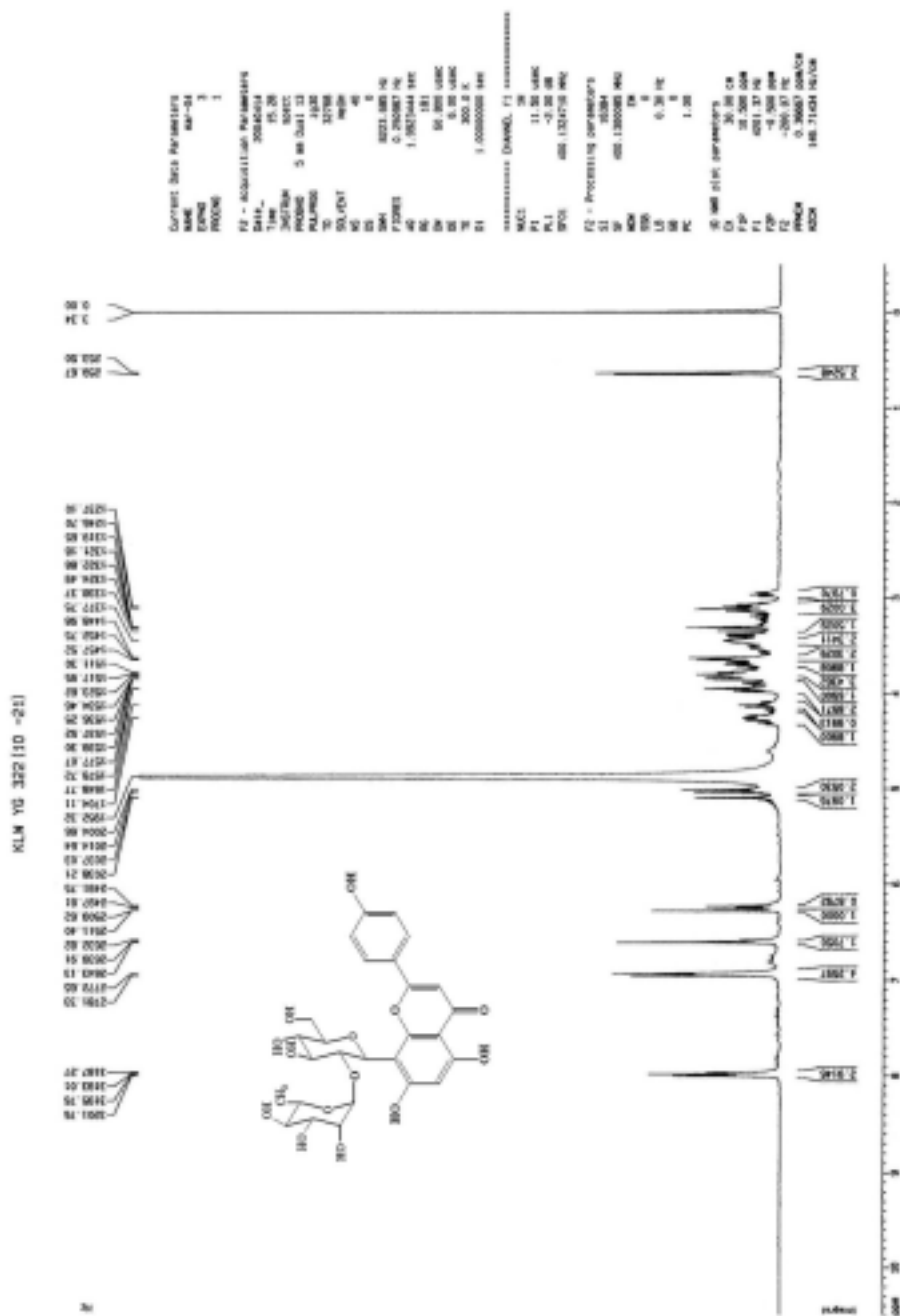
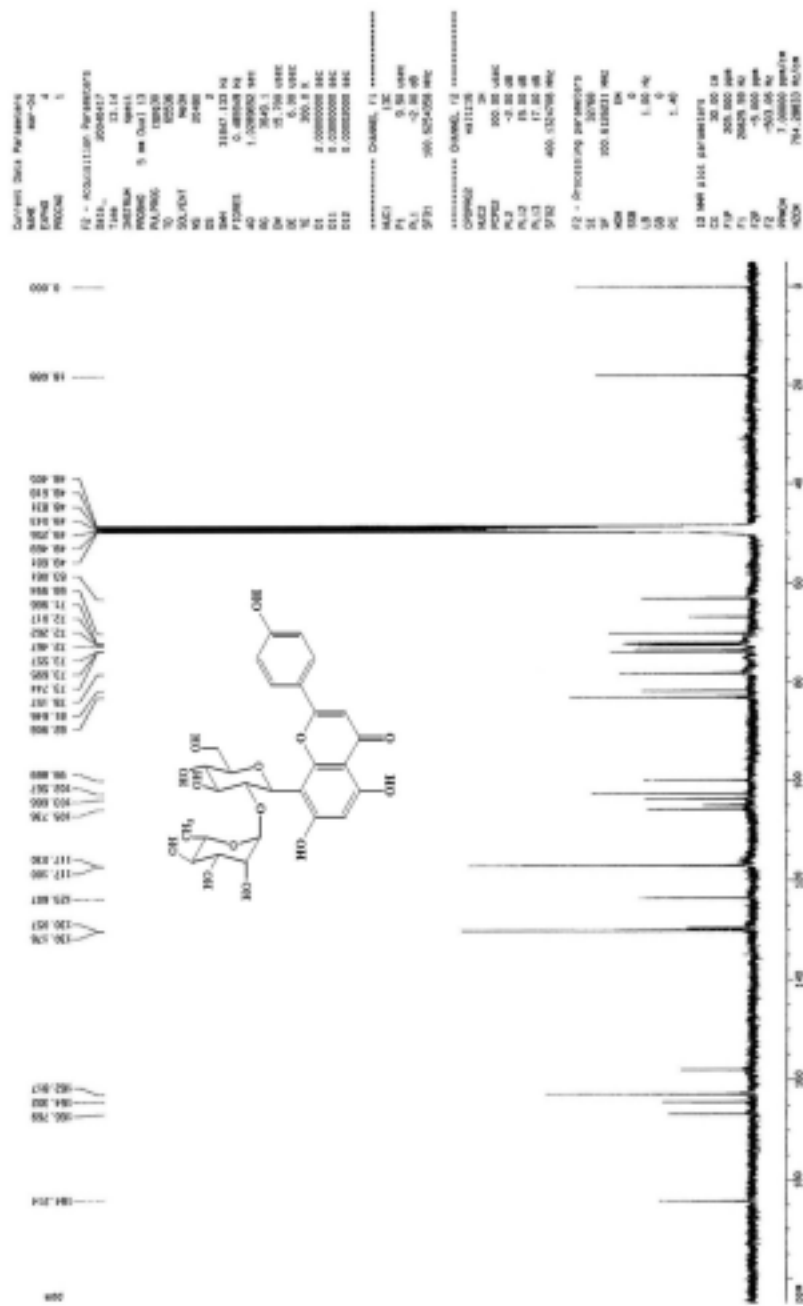


Fig. 9. ¹H-NMR spectrum of 2''-O-rhamnosylvitexin.

KLM YG 322 (10 - 21)



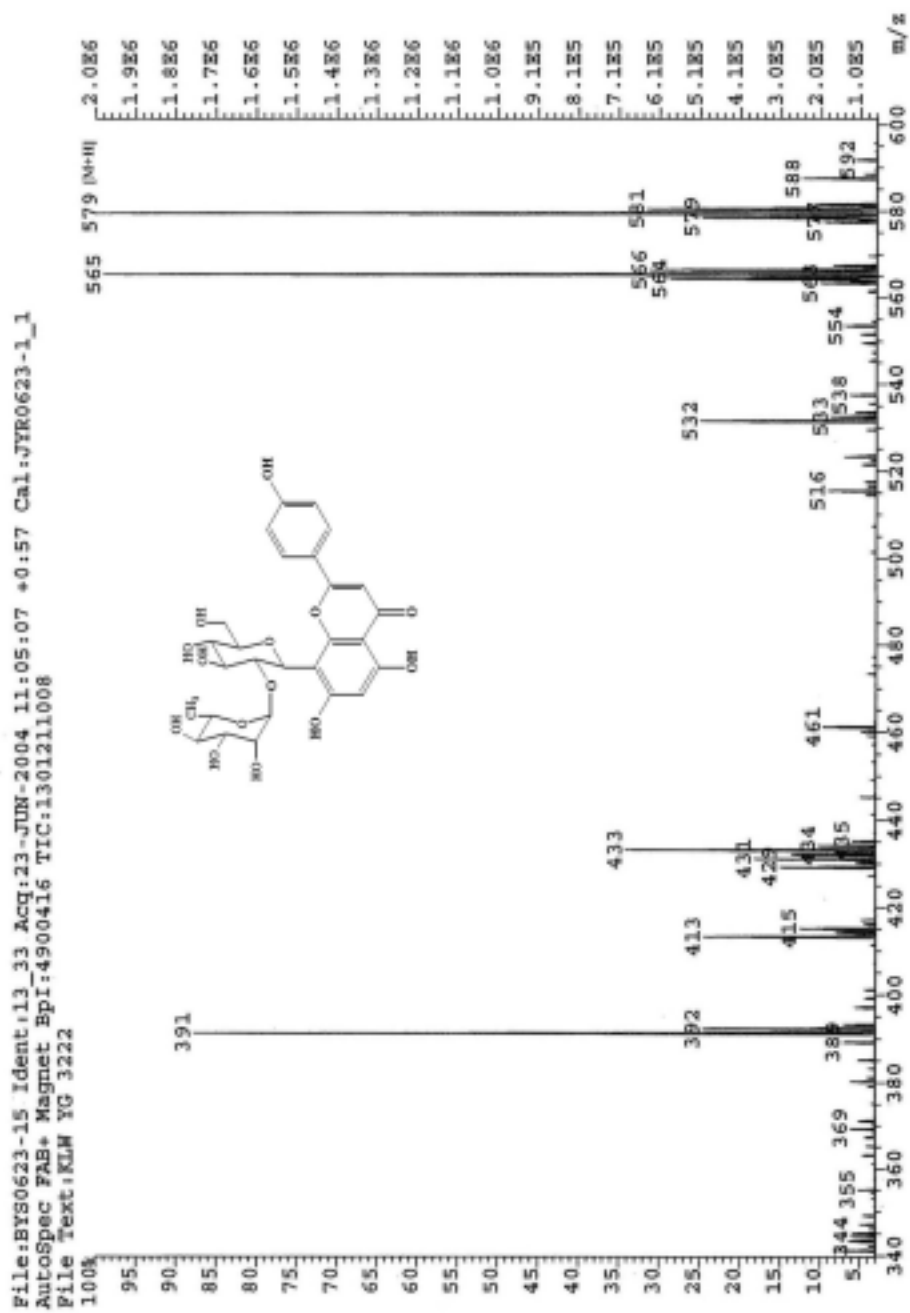


Fig. 11. FAB-MS spectrum of 2''-O-rhamnosylvitexin.

5) Isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside (화합물 5)

Fig. 12에서 보는 바와 같이 ¹H-NMR 스펙트럼의 3.94ppm에서 singlet은 methoxyl기의 피크로 정확히 3개의 수소를 갖는 적분값을 보여주고 있으며, A환의 H-6과 H-8은 서로 *meta coupling*되어 6.17ppm과 6.36ppm에서 doublet 피크로 나타나고 있다. Fig. 13의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 56.79ppm의 피크는 methoxyl기의 특징적인 피크이며, C-6과 C-8은 100.44ppm과 95.13ppm에서 나타나고 C-5와 C-7의 피크는 163.04ppm과 167.62ppm에서 나타나고 있는 것으로 보아 phloroglucinol A환임을 알 수 있다. 또한, C-2와 C-3이 158.63ppm과 135.31ppm에서 나타나고 있는데 Harbone과 Mabry(1992)가 보고한 isorhamnetin의 C-2보다 약 10ppm downfield된 것으로 보아 glucose가 C-3에 결합하고 있다는 것을 알 수 있다. flavone의 C-2, 3에 비해서도 C-2는 약 8ppm upfield되었고 C-3은 약 32ppm downfield되어 나타는 차이를 보이며 carbonyl 탄소인 C-4는 C-2, 3의 이중결합과 C-3이 치환되어 있어 flavone의 그것보다 약 5ppm upfield되어 179.29ppm에서 나타나는 차이를 보이고 있다. carbonyl 탄소의 화학적 이동값은 flavonoid의 기본골격에 따라서 다르기 때문에 기본골격의 결정을 도움을 주고 있다.

Agrawal(1989)은 flavanone은 187.9~198.3ppm에서 나타나며, flavanonol은 188.3~198.7ppm에서, flavone은 176.0ppm~183.7ppm에서 나타나고, flavonol은 175.9~179.8ppm에서 나타난다고 보고하였다.

¹H-NMR 스펙트럼에서 5.37ppm의 doublet 피크는 C-3에 결합하고 있는 glucose의 H-1"으로 *J*값이 7.3Hz인 것으로 보아 β-D-glucose임을 알 수 있으며 나머지 glucose의 수소들은 3.21~3.69ppm에서 전형적인 피크를 보이고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 glucose의 C-1"은 aglycone과 결합을 하고 있어 downfield되어 103.79ppm에서 피크가 나타나며 C-2", 3", 4", 5", 6"은 75.94ppm, 78.57ppm, 71.50ppm, 78.12ppm, 62.55ppm에서 glucose의 탄소들의 전형적인 피크가 나타나고 있다.

B환의 ¹H-NMR 스펙트럼에서 H-2'은 H-6'과 *meta coupling*되어 7.92ppm에서 doublet 피크로 나타나며, H-5'은 H-6'과 *ortho coupling*되어 6.90ppm에서 doublet 피크로 *J*값은 각각 1.9Hz와 8.3Hz로 나타나고 있다. H-6'은 H-2'과 *meta coupling*되고, H-5'과 *ortho coupling*되어 7.59ppm에서 2.0Hz와 8.5Hz의 *J*값을 갖는 double doublet 피크를 보여주고 있고, quercetin B환과 비교해 보면 H-3'에 methoxyl기가 결합하고 있어 H-2'이 화합물 10의 그것보다 0.2ppm downfield되어 나타나고 H-5'과

H-6'은 동일한 화학적 이동값을 보였다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 수산기가 결합 하고 있지 않은 C-2', 5'은 quercetin의 그것보다 각각 1.68ppm과 1.58ppm upfield되어 114.35ppm, 116.03ppm에서 나타나고 있으며 C-6'은 0.6ppm downfield되어 123.84ppm에서 나타나는 차이를 보이고 있다. methoxy기가 결합하고 있는 C-3'은 수산기가 결합하고 있는 quercetin의 C-3'보다 5.01ppm downfield되어 150.91ppm에서 나타나며 C-4'는 1.41ppm upfield되어 148.45ppm에서 나타나는 차이를 보이고 있다. 이것은 Kang 등(1990)이 *Ginkgo biloba*의 잎에서 단리한 isorhamnetin-3-O-rutinoside의 aglycone NMR값과 정확히 일치하고 있으며, Lawrence 등(2003)이 *Warburgia stuhlmannii*의 잎에서 단리한 isorhamnetin 배당체 화합물과 Agrawal(1989)이 보고한 화합물과도 일치하였다.

Fig. 14의 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Coherence) 스펙트럼에서 methoxy기 수소들은 C-3', 4'과 *coupling*을 하고 있으며, glucose H-1''수소가 C-3과 상관피크가 나타나는 것으로 보아 결합위치를 확인할 수 있었고, H-2'은 C-9, 1', 3', 4'과 H-6'은 C-3, 3', 4'과 H-6은 C-5, 7, 8, 10 및 H-8은 C-6, 7, 9, 10과 상관피크를 나타내는 등 수소와 탄소가 *long range coupling*을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 화합물 5는 isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside로 구조를 결정하였으며 Fig. 15의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 501로 이 화합물의 분자량 478과 일치하고 있다.

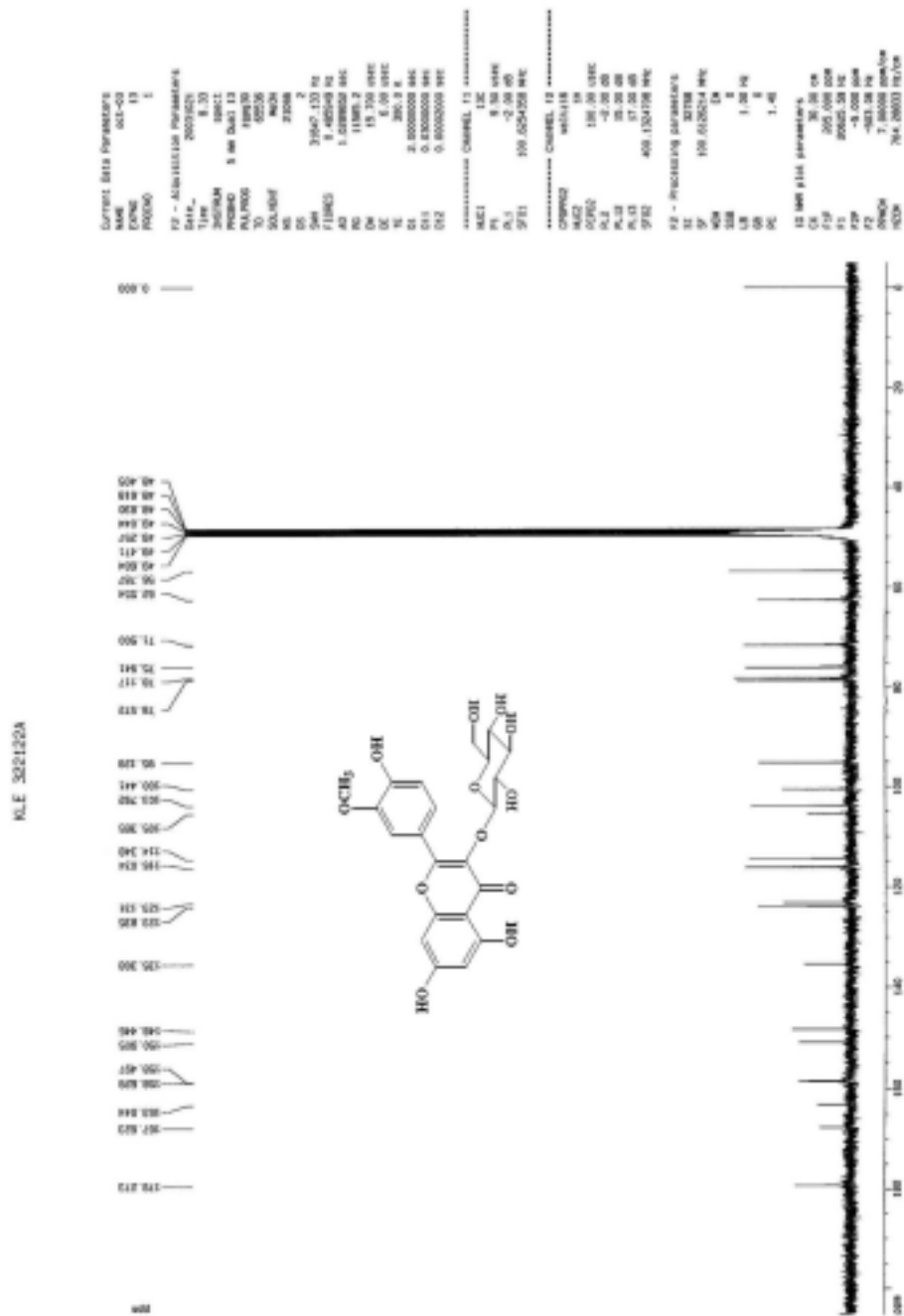


Fig. 13. ^{13}C -NMR spectrum of isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside.

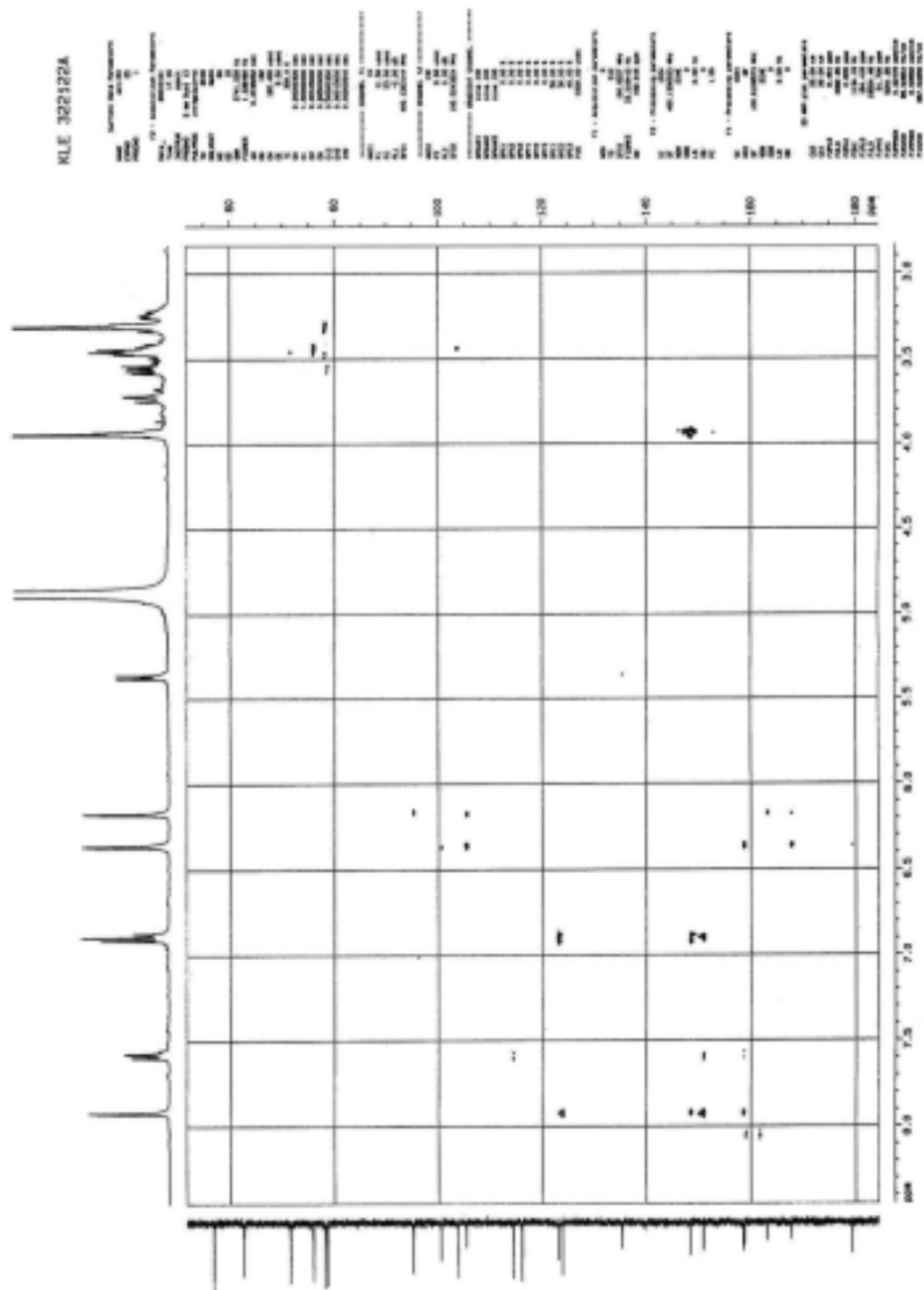


Fig. 14. HMBC spectrum of isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside.

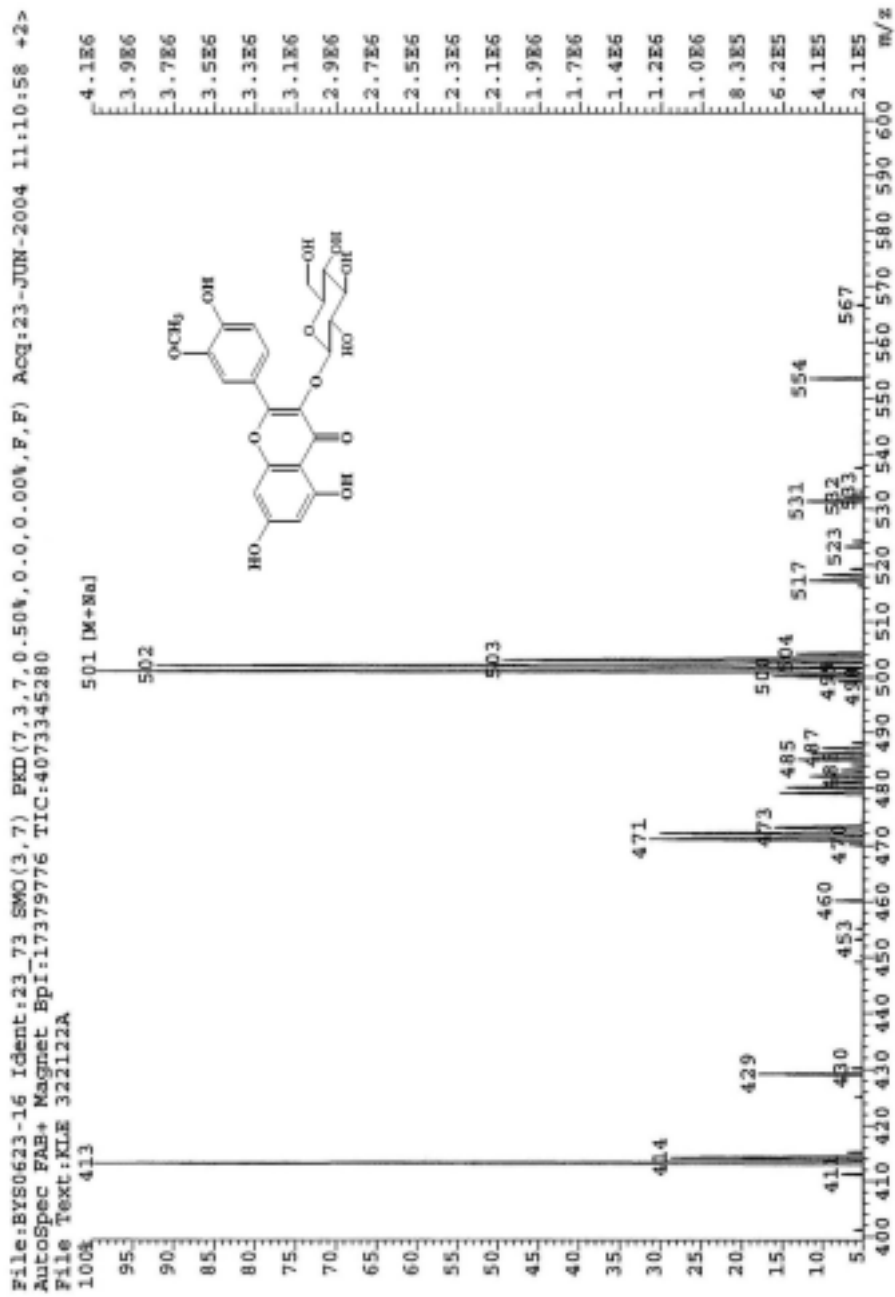


Fig. 15. FAB-MS spectrum of isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside.

6) Kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside (화합물 6)

Fig. 16에서 보는 바와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 6.20ppm과 6.40ppm에서 각각 2.0Hz의 J 값을 갖는 doublet은 A환의 H-6과 H-8의 피크이며 이에 대한 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 Fig. 17에서처럼 C-6과 C-8이 99.92ppm과 94.08ppm에서 나타나고 수산기가 결합되어 있는 C-5, 7, 9는 163.10ppm, 166.04ppm, 159.41ppm에서 나타나는데 이것은 phloroglucinol A환의 전형적인 NMR값을 보여주고 있는 것이다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 7.95ppm과 6.92ppm에서 나타나는 doublet은 H-2', 6'과 H-3', 5'의 피크로서 서로 *ortho coupling*되어 J 값이 8.8Hz로 동일하게 나타나고 있고 적분값으로도 한 개의 피크가 두 개의 수소를 나타내고 있다는 것을 알 수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-2, 6과 C-3, 5는 132.06ppm과 116.55ppm에서 다른 탄소의 피크보다 큰 피크로 나타나고 있고 C-4'는 161.59ppm에서 나타나고 있는 것으로 보아 페놀환임을 알 수 있다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 C환의 H-3의 피크가 나타나지 않는 것으로 보아 flavonol 화합물임을 알 수 있으며, $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-2와 C-3은 158.59ppm과 134.95ppm에서 나타나는데 이는 Agrawal(1989)이 보고한 kaempferol의 C-2 보다 약 10ppm downfield된 것이며 C-3 보다 약 4ppm upfield된 것으로서 glucose가 C-3에 결합되어 있다는 것을 알 수 있으며 carbonyl 탄소인 C-4는 179.29ppm에서 나타나고 있다.

한편, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 5.48ppm에서 singlet 피크는 anomeric 수소인 arabinofuranose의 H-1"의 피크이며 3.91ppm과 3.81ppm의 multiplet과 4.33ppm과 3.49ppm의 doublet은 H-2", 3", 4", 5"의 피크이다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 anomeric 탄소인 C-1"은 결합을 하고 있는 영향에 의해 downfield되어 109.67ppm에서 나타나며 나머지 arabinofuranose의 C-2, 3, 4, 5의 피크는 83.38ppm, 78.66ppm, 88.04ppm, 62.55ppm에서 나타나고 있으며 Agrawal(1989)과 Markham (1992) 및 Guo 등(1998)이 보고한 α -L-arabinofuranoside와 일치했다.

이상의 결과는 Kim 등(1997)이 *Larix leptolepis*의 잎에서 단리한 화합물의 NMR 값과 정확히 일치하고 있으며 Han 등(2001)이 보고한 여러 가지 kaempferol 배당체 화합물들과 동일한 NMR 값을 나타내었으며 Harbone과 Mabry(1982) 그리고 Agrawal(1989)이 보고한 화합물의 NMR 값과도 정확히 일치하였다.

Fig. 18의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 분자량 분석은 $[\text{M}+\text{Na}]^+m/z$

441로 이 화합물의 분자량 418과 일치하여 kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside로 구조를 결정하였다.

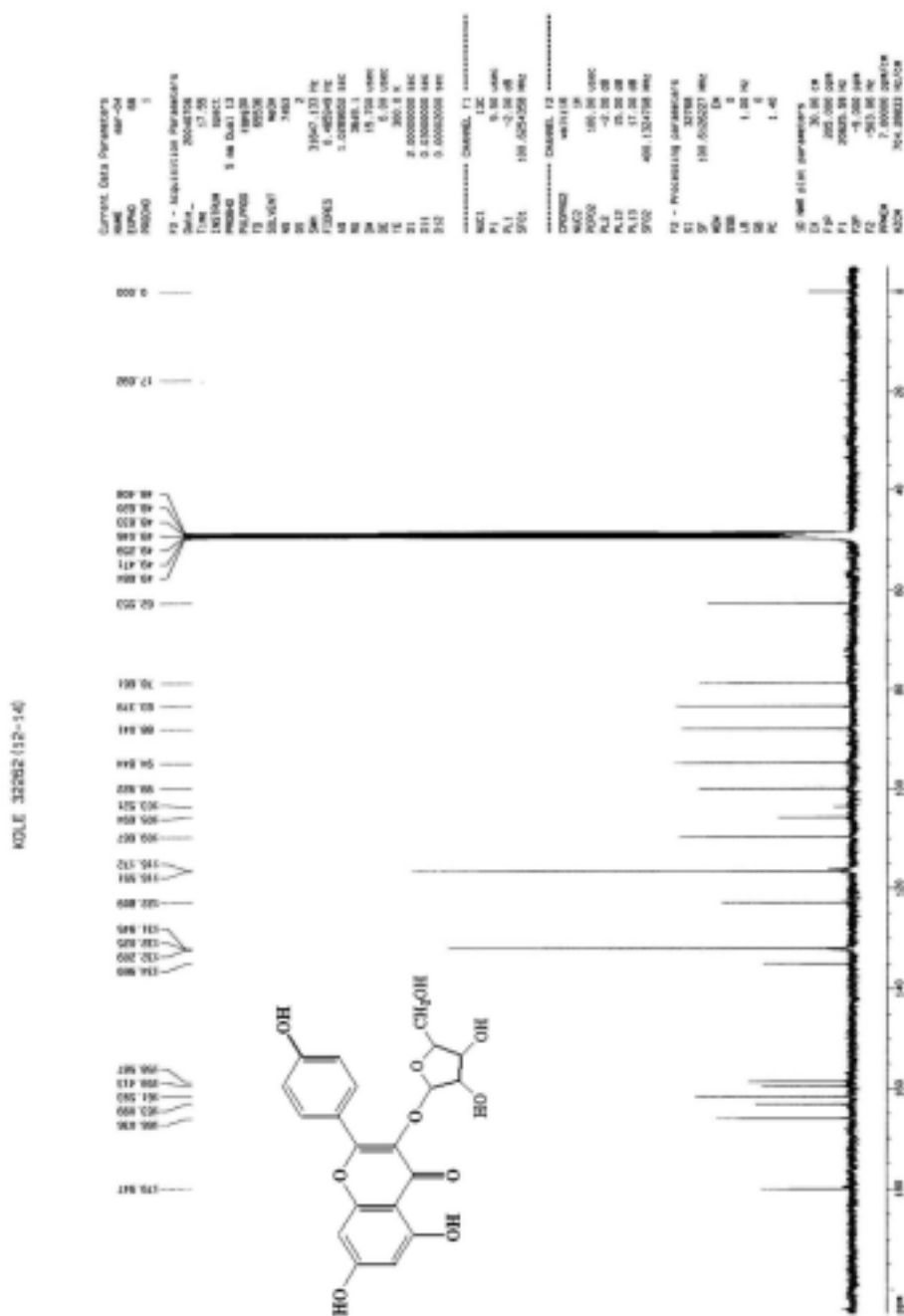


Fig. 17. ^{13}C -NMR spectrum of kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside.

7) Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (화합물 7)

Fig. 19에서 보는 바와 같이 ¹H-NMR 스펙트럼에서 6.88ppm과 8.05ppm의 두 개의 피크는 H-3', 5'과 H-2', 6'에 해당하는 것으로 두 피크의 *J*값이 8.8Hz로 같은 것으로 보아 *ortho coupling*되어 있다는 것을 알 수 있고 적분값은 두 개의 수소를 나타내고 있으며, Fig. 20의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-2', 6'과 C-3', 5'는 132.32ppm과 116.21ppm에서 다른 탄소들의 피크보다 크게 나타나는 것으로 B환은 서로 대칭 구조를 이루고 있는 페놀환임을 알 수 있다.

¹H-NMR 스펙트럼에서 6.19ppm과 6.38ppm의 피크들은 H-6과 H-8에 해당되며 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-6과 C-8은 각각 100.26ppm과 95.01ppm에서 나타나며 수산기가 결합되어 있는 C-5와 C-7은 163.07ppm과 167.00ppm에서 나타남으로써 전형적인 phloroglucinol A환으로 구성되어 있음을 알 수 있다.

한편, ¹H-NMR 스펙트럼에서 5.22ppm의 doublet 피크는 C-3에 결합되어 있는 glucose의 H-1"의 피크로서 *J*값이 7.3Hz인 것으로 보아 β-D-glucose임을 알 수 있었고 나머지 glucose의 수소들은 3.21~3.69ppm에서 전형적인 피크를 나타내고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-1"은 104.22ppm에서 downfield되어 나타나며 75.75ppm, 78.45ppm, 71.37ppm, 78.08ppm, 62.64ppm의 피크는 나머지 glucose의 C-2", 3", 4", 5", 6"에 해당하는 것으로 전형적인 형태를 보이고 있다. 또한, C-2와 C-3은 158.62ppm과 135.48ppm에서 피크가 나타나고 있는데 C-2가 Agrawal(1989)이 보고한 kaempferol의 그것보다 10ppm정도 downfield된 것으로 보아 C-3위치에 glucose가 결합하고 있다는 것을 알 수 있었으며 carbonyl 탄소인 C-4는 179.45ppm에서 특징적인 피크로 나타나고 있다. 이상의 결과는 Lee (2003)가 보고한 화합물과 동일한 NMR값을 보이고 있으므로 화합물 7은 kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside로 구조를 결정하였으며 Fig. 21의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 [M+Na]⁺ m/z 471로 이 화합물의 분자량 448과 일치하고 있다.

kaempferol은 항염증(antiinflammatory)과 이뇨(duretic) 등의 약리효과가 있으며 kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside는 면역증강(immunostimulant) 활성이 있다(장, 2003).

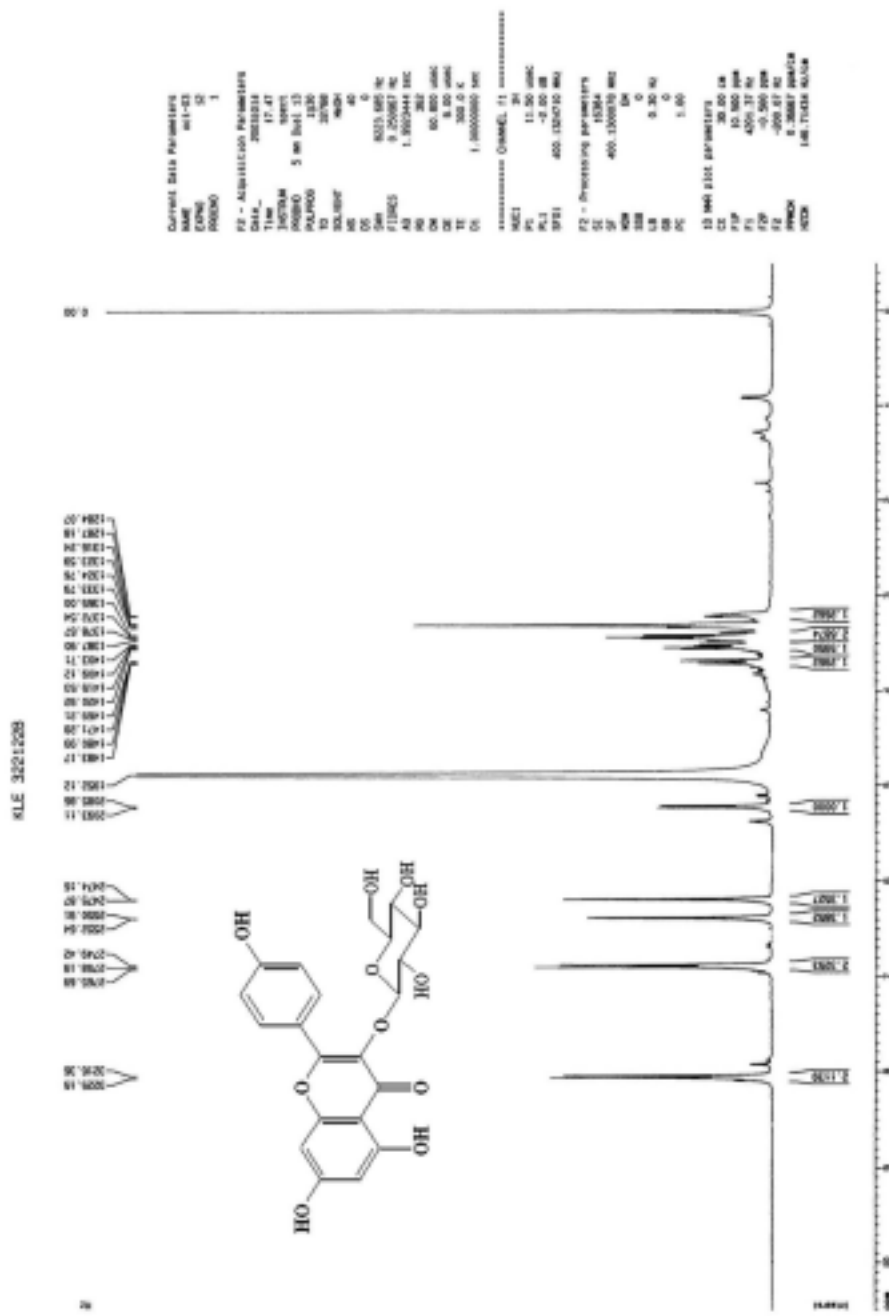


Fig. 19. ¹H-NMR spectrum of kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside.

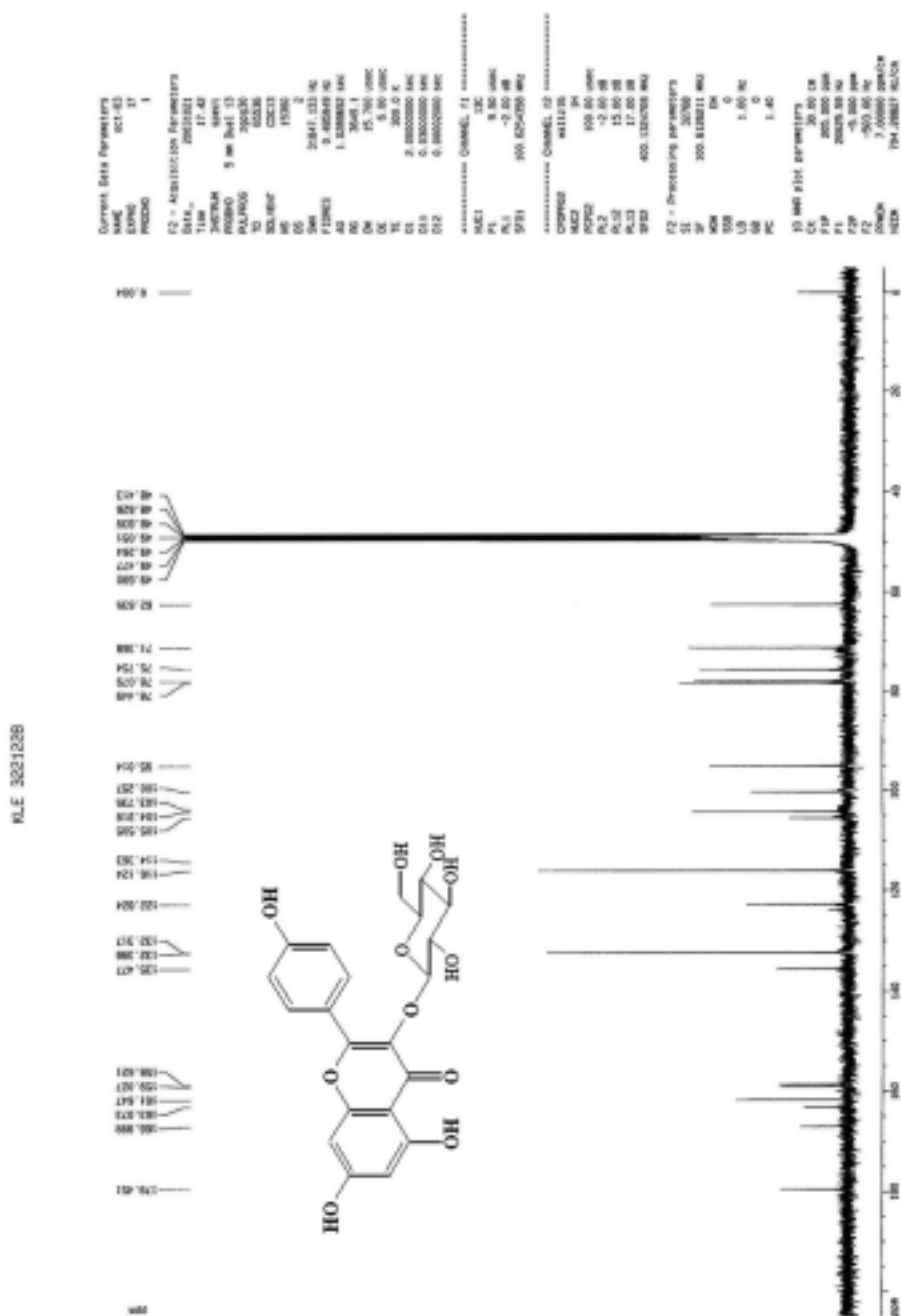


Fig. 20. ^{13}C -NMR spectrum of kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside.

8) Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (화합물 8)

Fig. 22에서 보는 바와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 6.19ppm과 6.37ppm은 H-6과 H-8에 해당하는 것으로 singlet 피크로 나타나고 H-3', 5'과 H-2', 6'은 서로 *ortho coupling*되어 J 값은 각각 8.5Hz와 8.6Hz의 doublet 피크로 나타나며 적분값은 한 개의 피크가 두 개의 수소임을 보이고 있다. Fig. 23에서 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼의 94.79ppm과 99.85ppm은 C-8과 C-6의 피크이며 수산기가 결합되어 있는 C-5와 C-7은 163.21ppm과 165.86ppm에서 나타나고 있다. B환의 C-3', 5'과 C-2', 6'은 116.54ppm과 131.94ppm에서 다른 탄소들의 피크보다 크게 나타나고 있으며 C-4'은 수산기가 결합되어 있어 downfield되어 161.58ppm에서 피크를 보이고 있는데, 이것으로 보아 phloroglucinol A환과 페놀환으로 이루어져 있음을 알 수 있다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 5.38ppm의 singlet 피크는 C-3에 결합하고 있는 rhamnose의 anomeric 수소인 H-1"으로 singlet인 것으로 보아 α -L-rhamnose인 것을 알 수 있으며 나머지 rhamnose의 H-2", 3", 4", 5"은 3.43~4.23ppm에서 특징적인 피크를 보이고 있으며 rhamnose의 methyl기 3개의 수소는 0.93ppm에서 전형적인 피크를 나타내고 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 rhamnose C-1"은 aglycone의 C-3과 결합을 하고 있어 rhamnose의 나머지 탄소들보다 downfield되어 103.52ppm에서 나타나고 C-2", 3", 4", 5"은 72.14ppm, 72.06ppm, 73.22ppm, 71.95ppm에 나타나고 있고 methyl기 탄소는 17.69ppm에서 전형적인 피크를 보이고 있는데 이것은 Agrawal(1989)이 보고한 rhamnose의 NMR값과 동일하게 나타나고 있다. 또한, 158.54ppm과 136.24ppm의 피크는 C-2와 C-3에 해당하는 것으로 C-2가 kaempferol의 그것보다 약 10ppm downfield된 것으로 보아 C-3에 rhamnose가 결합하고 있다는 것을 알 수 있었으며 carbonyl 탄소인 C-4는 C-2, 3이 이중결합이고 C-3에 결합한 rhamnose의 영향으로 179.62ppm에서 나타나고 있다. 이상은 Kazuma 등(2003)과 Han 등(2001)이 단리한 kaempferol 배당체 화합물과 동일한 NMR값을 보이고 있어 화합물 8은 kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside로 구조를 결정하였다.

Fig. 24의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 433으로 이 화합물의 분자량 432와 일치하고 있다.

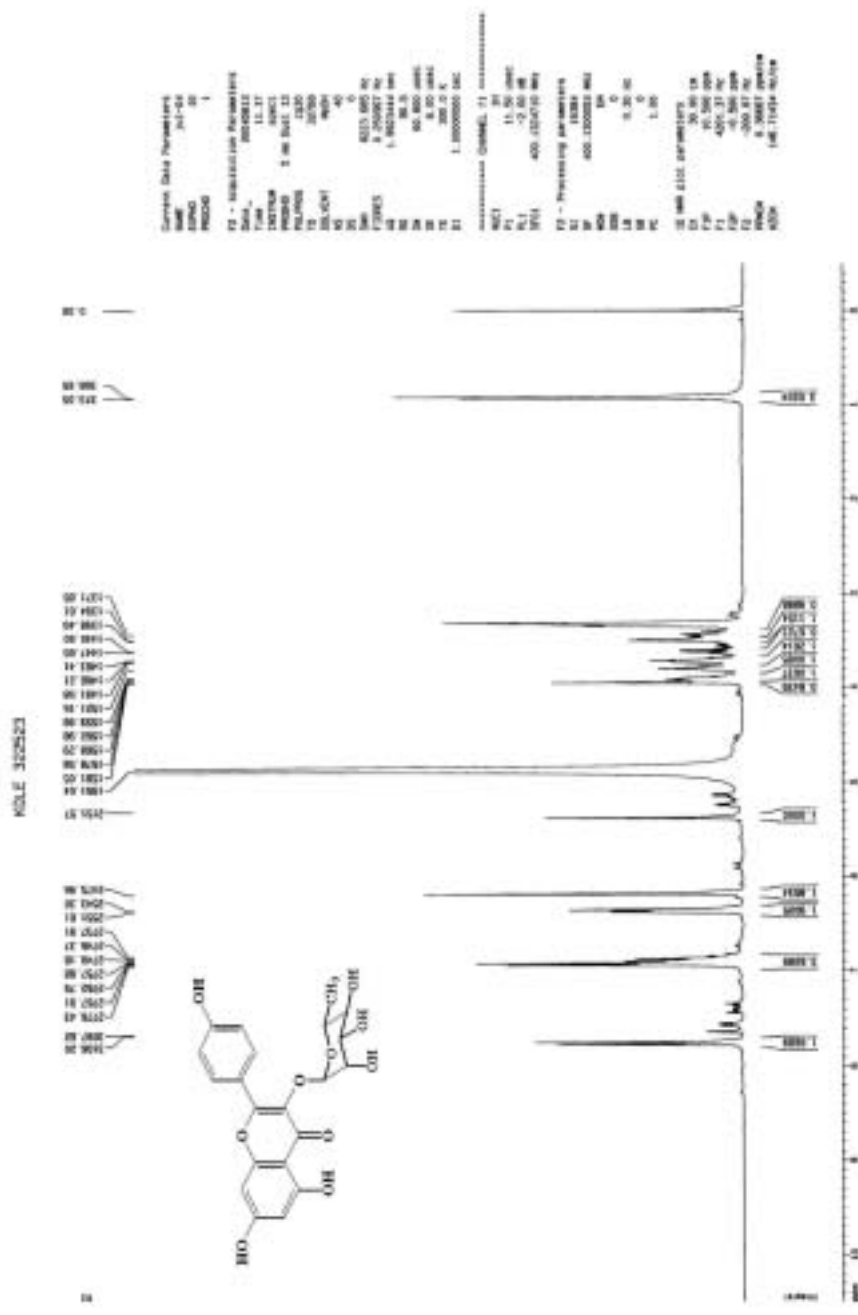


Fig. 22. ¹H-NMR spectrum of kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside.

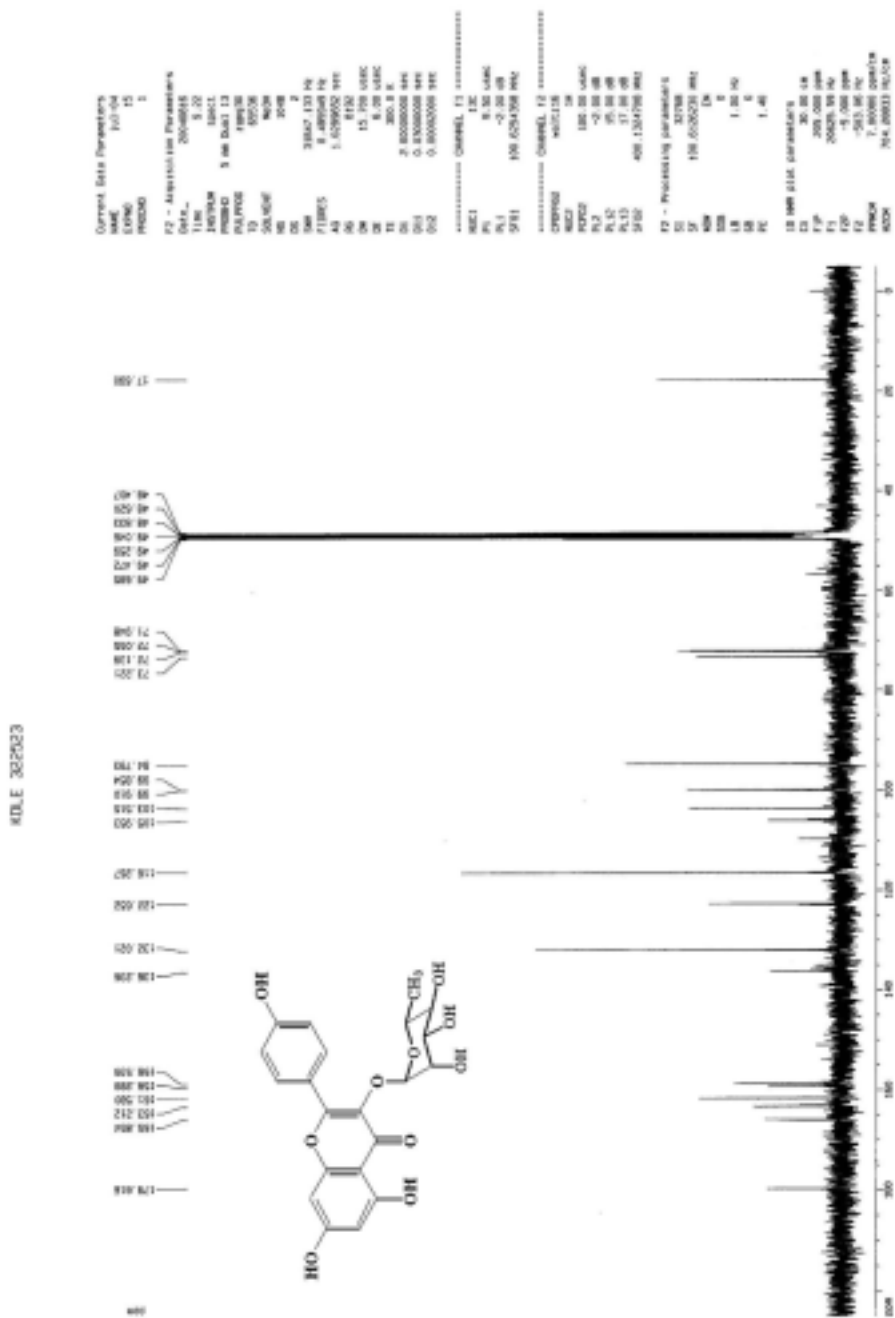


Fig. 23. ^{13}C -NMR spectrum of kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside.

9) Laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside (화합물 9)

Fig. 25에서 보는 바와 같이 ¹H-NMR 스펙트럼에서 H-6과 H-8은 서로 *meta coupling*되어 각각 1.9Hz와 1.8Hz의 *J*값을 가지는 doublet으로 6.20ppm과 6.39ppm에서 나타나고 있다. Fig. 26에서 ¹³C-NMR 스펙트럼의 99.94ppm과 94.74ppm은 C-6과 C-8의 피크이며 수산기가 결합되어 있는 C-5와 C-7은 163.12ppm과 166.15ppm에서 피크가 나타나는 것으로 보아 phloroglucinol A환임을 알 수 있다. 또한, C-2와 C-3은 이중결합으로 158.48ppm과 135.58ppm에서 피크가 나타나는데, C-2가 Ham(2000)이 보고한 myricetin의 그것보다 약 11ppm downfield되고 C-3이 약 1ppm upfield된 것으로 보아 C-3에 glucose가 결합하고 있다는 것을 알 수 있다. carbonyl 탄소인 C-2, 3이 이중결합이고 C-3에 glucose가 결합을 하고 있는 영향으로 myricetin의 그것보다 약 3ppm downfield되어 179.45ppm에서 피크를 보이고 있다. 이것은 Kang 등(1990)이 *Ginkgo biloba*의 앞에서 단리한 laricitrin 배당체의 C환과 일치하고 있다.

¹H-NMR 스펙트럼에서 수소 세 개의 적분값을 보이는 3.92ppm의 singlet 피크는 methoxyl기 전형적인 특징이다. glucose의 H-1"은 5.40ppm에서 나타나는데 *J*값이 7.3 Hz인 것으로 보아 β-D-glucose임을 알 수 있으며 glucose의 나머지 수소인 H-2", 3", 4", 5", 6"은 3.46~3.95ppm에서 특징적인 피크를 보이고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 aglycone과 결합을 하고 있는 glucose의 C-1"은 103.73ppm에서 피크를 보이고 있으며 glucose의 나머지 탄소들인 C-2", 3", 4", 5", 6"은 75.94ppm, 78.56ppm, 71.44ppm, 78.14ppm, 62.56ppm에서 특징적인 피크를 나타내고 methoxyl기 탄소는 57.04ppm에서 전형적인 피크를 보이고 있다.

한편, pyrogallol B환은 C-3'에 methoxyl기가 결합하고 있는 비대칭 구조로 Ham(2000)이 보고한 myricetin의 pyrogallol B환과는 다른 형태의 피크를 보이고 있다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 H-2'과 H-6'은 서로 *meta coupling*되어 7.53ppm과 7.29ppm에서 *J*값이 1.9Hz로 동일한 doublet 피크로 나타나고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-2'과 C-3'은 Kazuma 등(2003)이 *Clitoria ternatea* 꽃잎에서 분리한 myricetin 배당체 화합물의 C-2'보다 약 4ppm upfield되어 나타나고 C-3'보다 약 3ppm downfield되어 106.82ppm과 149.04ppm에서 피크가 나타나는 것으로 보아 methoxyl기가 결합하고 있다는 것을 알 수 있으며 C-4', 5', 6'은 138.79ppm, 146.27ppm, 111.11ppm에서 피크가 나타난다. 이상은 Slimstad 등(1995)이 보고한 화합물과 정확히 일치하고 있고, Hussein 등(2003)이 *Eugenia edulis*에서 분리한

myricetin-3,5,3'-trimethyl ether B환의 NMR값과 일치하고 있다. Harbone과 Mabry (1982)는 *Larix*, *Cedrus*속 및 다른 속에서도 동일한 화합물을 분리하였다고 보고한바 있다.

Fig. 27의 HMQC(Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence) 스펙트럼은 탄소에 직접결합하고 있는 수소와의 연관성을 볼 수 있는 2차원 스펙트럼으로 H-1", 6, 8, 2',6'이 C-1", 6, 8, 2', 6'에 정확하게 결합하고 있음을 알 수 있었으며, Fig. 28의 HMBC 스펙트럼으로 수소와 탄소의 *long range coupling*을 관찰할 수 있었다.

따라서 화합물 9는 laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside로 구조를 결정하였으며 Fig. 29의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 $[M+Na]^+$ m/z 517로 이 화합물의 분자량 494와 일치하고 있다.

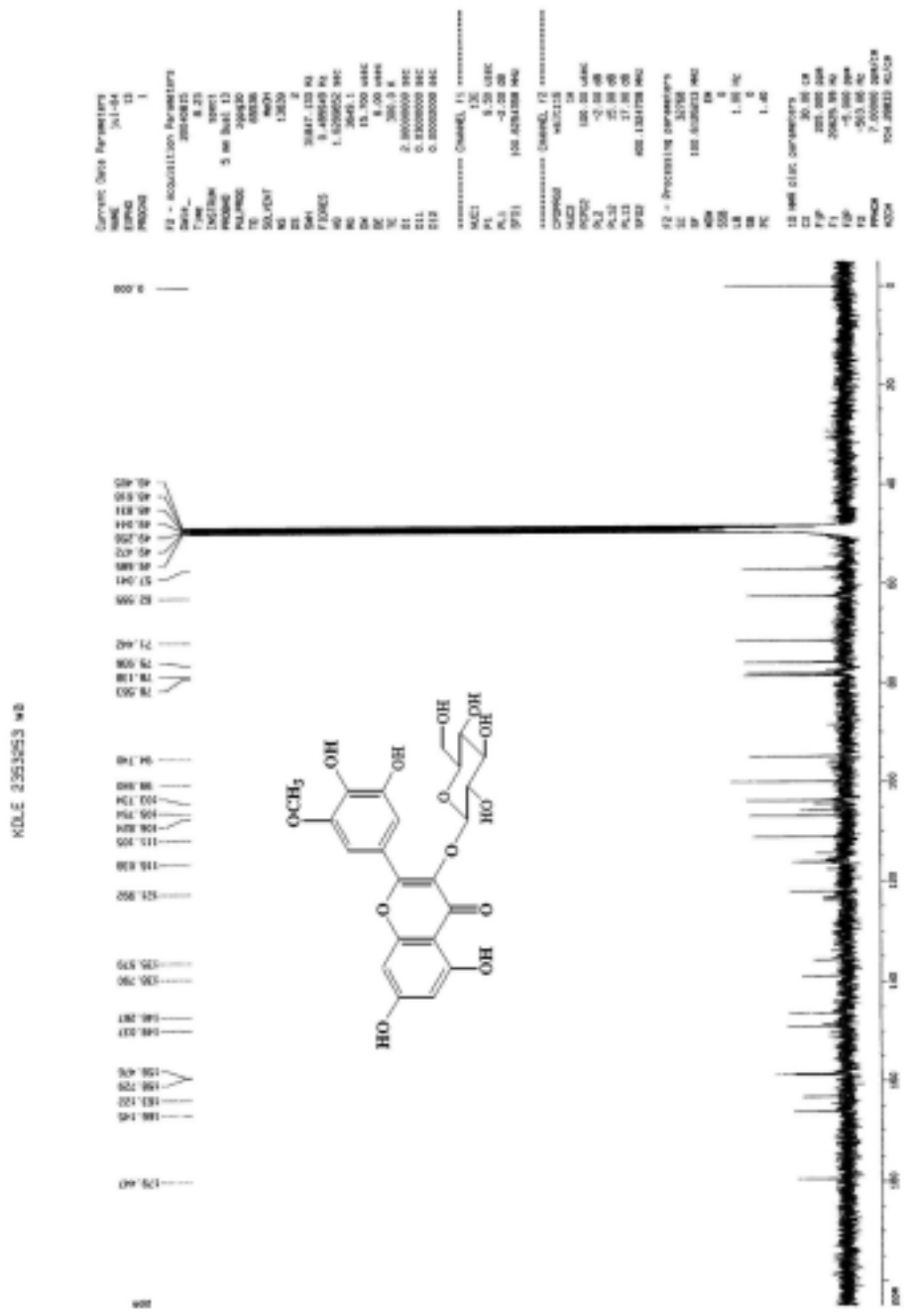


Fig. 26. ^{13}C -NMR spectrum of laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside.

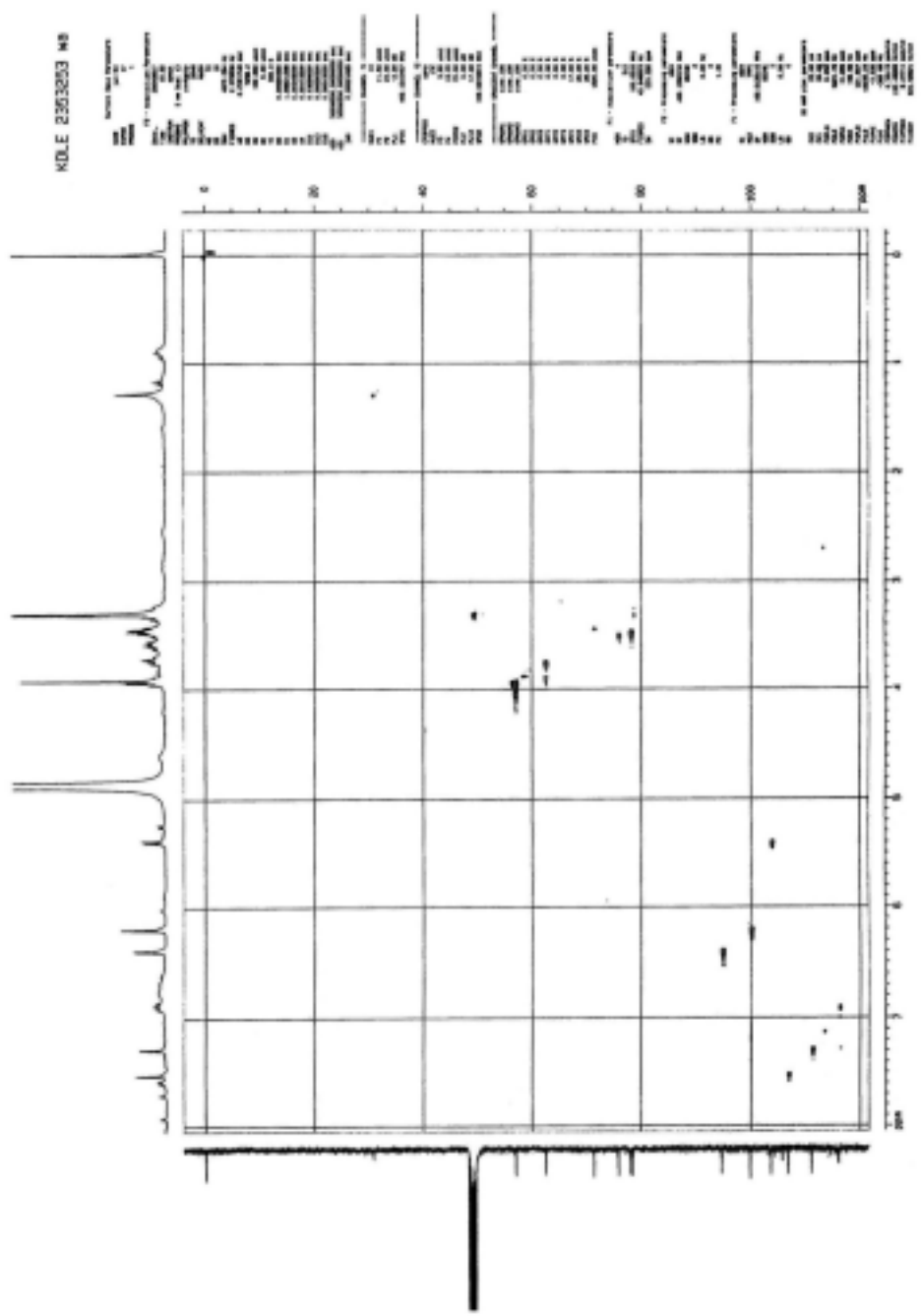


Fig. 27. HMQC spectrum of laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside.

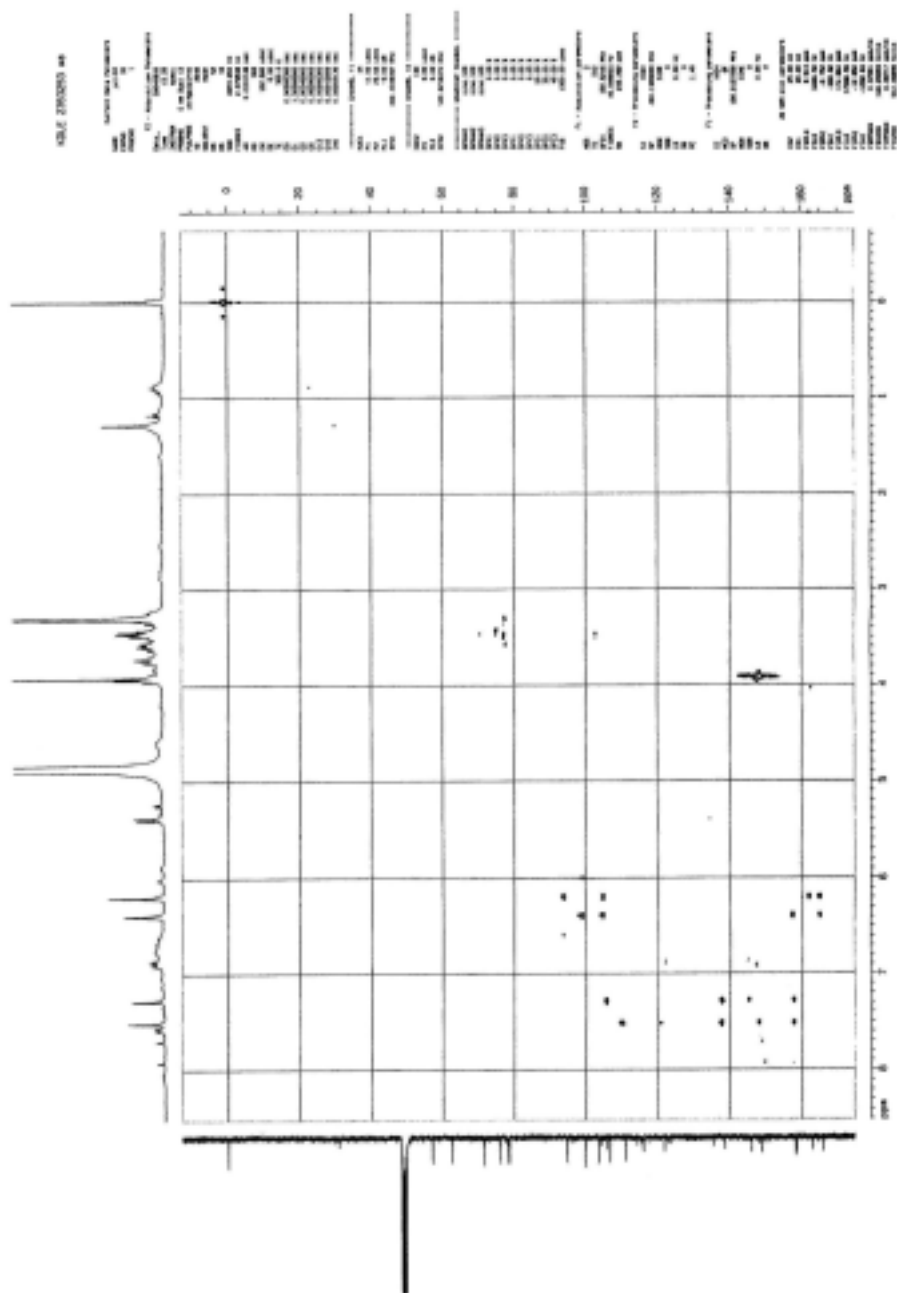


Fig. 28. HMBC spectrum of laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside.

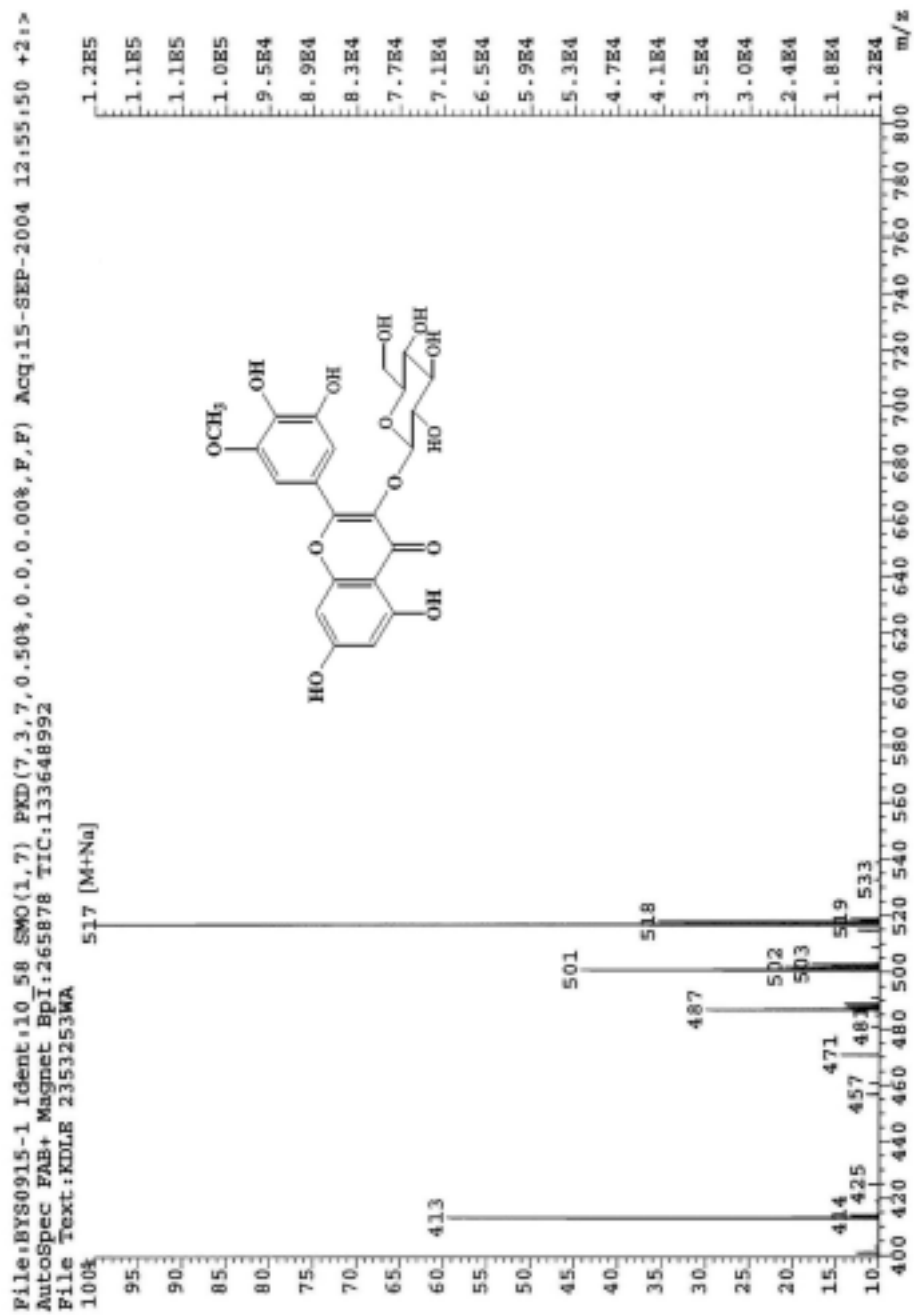


Fig. 29. FAB-MS spectrum of laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside.

10) Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (화합물 10)

Fig. 30에서 보는 바와 같이 ¹H-NMR 스펙트럼에서 catechol B환의 H-2'은 H-6'과 *meta coupling*되어 doublet으로 나타나야 하지만 7.72ppm에서 singlet 피크로 나타나고 있고, H-5'과 H-6'은 서로 *ortho coupling*되어 *J*값이 8.4Hz로 동일하며 각각 6.87ppm과 7.58ppm에서 doublet 피크로 나타나고 있다. Fig. 31의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 수산기가 결합되어 있지 않은 C-2', 5', 6'은 116.03ppm, 117.61ppm, 123.24ppm에서 피크를 보이고 수산기가 결합되어 있는 C-3', 4'은 크게 downfield되어 145.90ppm과 149.86ppm에서 나타나고 있다. ¹H-NMR 피크들이 앞서 설명한 catechol B환의 피크보다는 덜 갈라져 나타났지만 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼의 화학적 이동값으로 보아 catechol B환임을 충분히 알 수 있다.

또한, ¹H-NMR 스펙트럼의 6.19ppm과 6.38ppm에서 나타나는 피크는 H-6과 H-8로 서로 *meta coupling*이 일어나지 않아 singlet의 피크를 보이고 있으며, ¹³C-NMR 스펙트럼의 94.76ppm과 99.01ppm은 C-8과 C-6의 피크이며 163.02ppm과 165.99ppm은 C-5와 C-7의 피크로 이것은 phloroglucinol A환의 전형적인 피크를 보여주고 있는 것이다.

¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-2와 C-3은 158.45ppm과 135.65ppm에서 나타나는 것으로 보아 이중결합을 가지고 있고 C-3이 치환되어 있으며 C-2가 Yoon 등(2003)이 *Larix leptolepis* 심재부에서 단리한 quercetin의 그것보다 13ppm정도 downfield된 것으로 보아 C-3에 glucose가 결합을 하고 있다는 것을 알 수 있다. carbonyl 탄소인 C-4는 인접한 C-2, 3이 이중결합이고 C-3에 glucose가 결합한 영향으로 인하여 179.49ppm에서 나타나고 있다.

한편, ¹H-NMR 스펙트럼에서 5.25ppm의 doublet 피크는 C-3에 결합되어 있는 glucose의 H-1"으로 *J*값이 7.4Hz인 것으로 보아 β-D-glucose결합임을 알 수 있으며 3.36~3.72ppm에서 나머지 glucose의 수소들은 전형적인 형태로 나타나고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 aglycone과 결합을 하고 있는 glucose의 C-1"은 downfield되어 104.36ppm에서 나타나고 C-2", 3", 4", 5", 6"은 75.75ppm, 78.39ppm, 71.22ppm, 78.13ppm, 62.56ppm에서 전형적인 형태를 보이고 있다.

이상의 결과는 Kazuma 등(2003)과 Lee (2003)가 단리한 quercetin 배당체 화합물의 NMR값과 비교 분석하고 Kim 등(2004)이 *Eucommia ulmoides*의 잎에서 단리한 화합물과 동일한 NMR값을 보이고 있다.

따라서 화합물 10은 quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside로 구조를 결정하였으며 Fig. 32의 FAB-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 $[M+H]^+$ m/z 465로 이 화합물의 분자량 464와 일치하고 있다.

화합물 10의 aglycone인 quercetin은 항산화(antioxidant), 항암(anticarcinogenic), 항종양(antitumour) 및 항HIV(anti-Human Immunodeficiency Virus) 등의 활성이 있다(장, 2003).

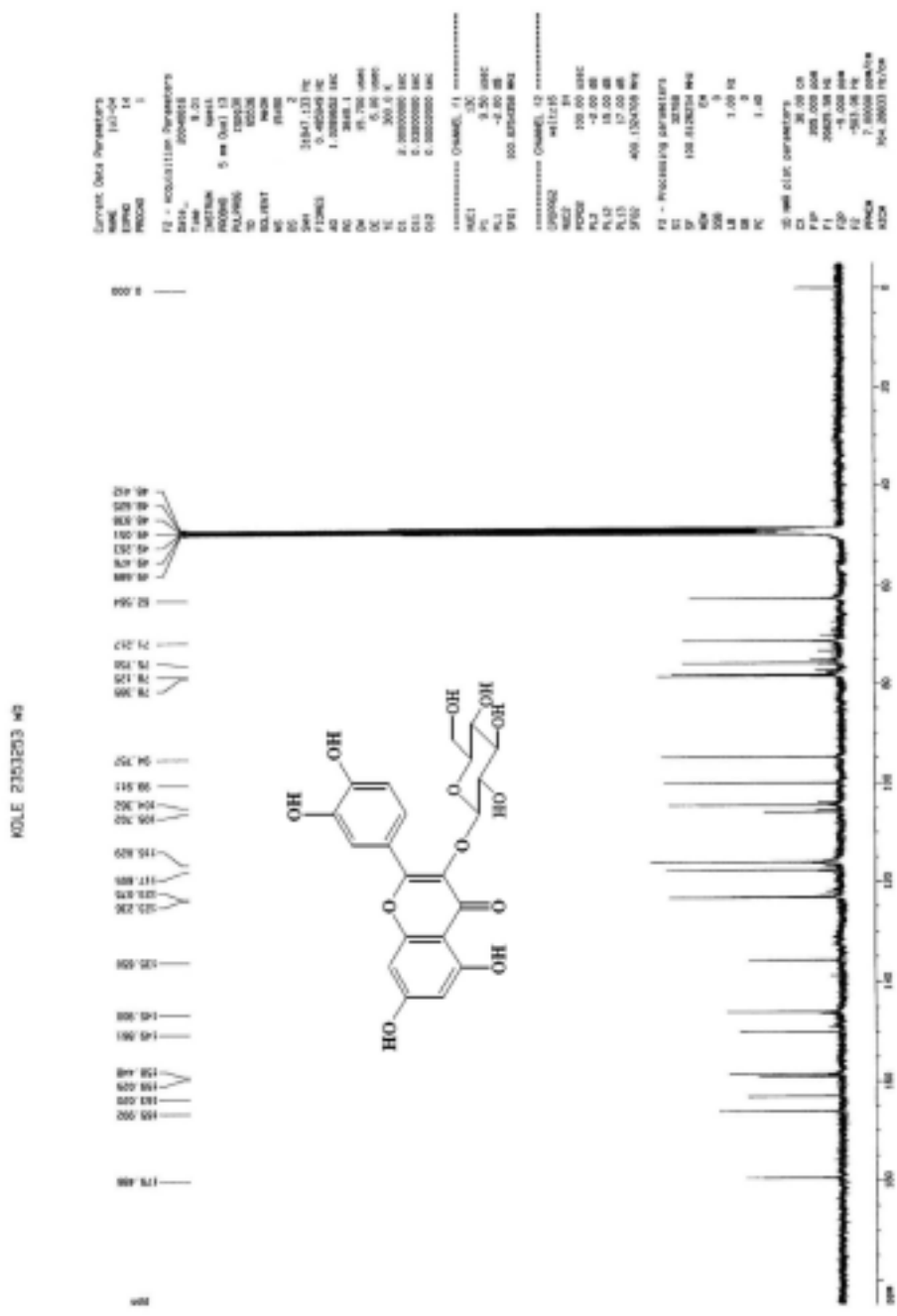


Fig. 31. ¹³C-NMR spectrum of quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside.

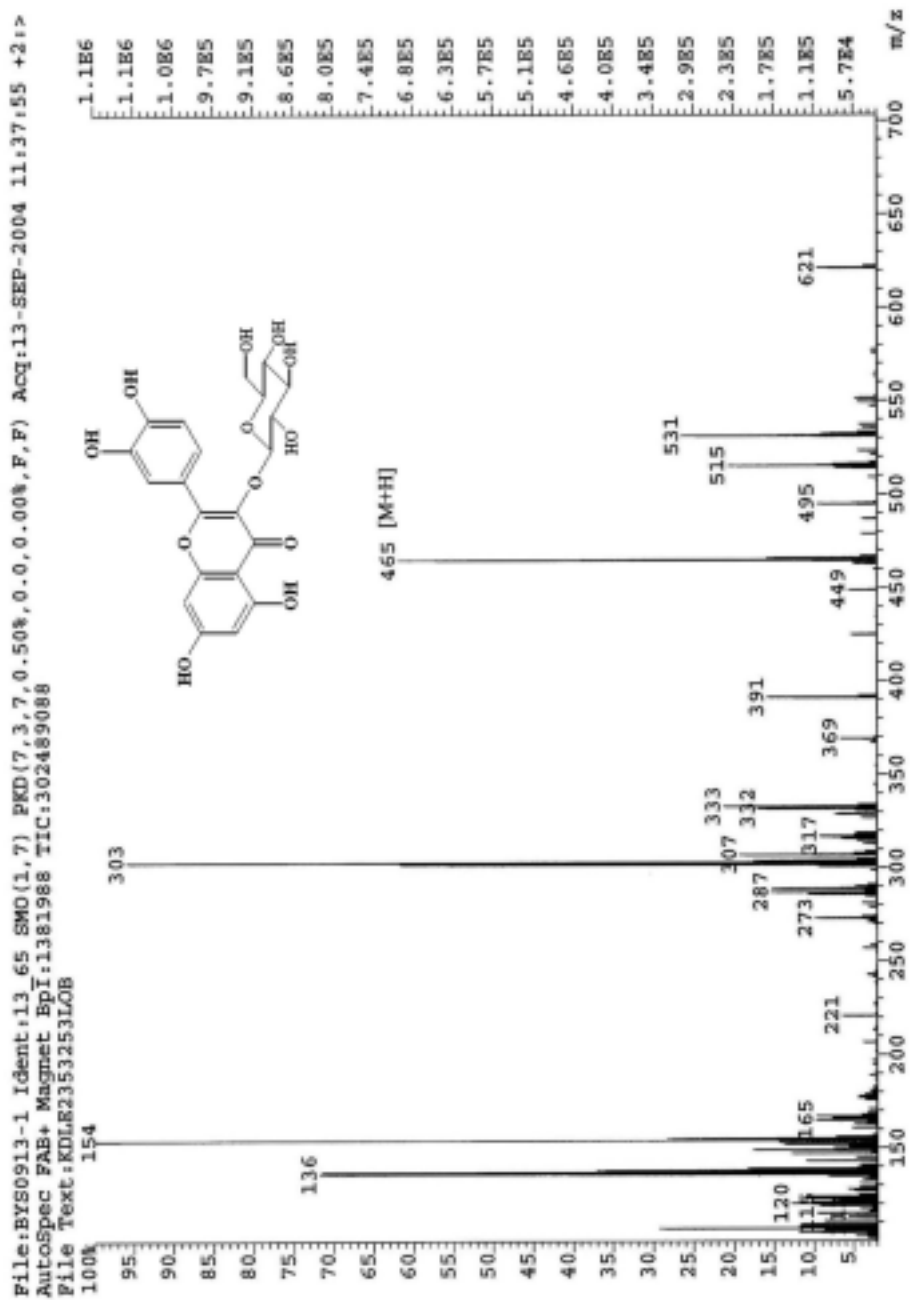


Fig. 32. FAB-MS spectrum of quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside.

11) Cedrusin (화합물 11)

Fig. 33에서 보는 바와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-2는 H-6과 *meta coupling* 되고 H-5는 H-6과 *ortho coupling*되어 J 값은 각각 1.7Hz와 8.1Hz로 6.98ppm과 6.76ppm에서 doublet 피크로 나타나며 H-6은 H-5와 *ortho coupling*되고 H-2와 *meta coupling*되어 8.1Hz와 1.7Hz의 두 개의 J 값을 갖는 double doublet 피크가 나타나는 것으로 보아 catechol환임을 알 수 있다. H-a는 인접한 H-b의 영향으로 5.49ppm에서 doublet 피크로 나타났으며, 3.44ppm과 3.75ppm에서의 multiplet 피크는 H-b와 C-r의 두 개의 수소에 해당하는 것이고 3.81ppm에서 적분값이 세 개의 수소인 피크는 C-4에 결합하고 있는 methoxyl기 수소들의 특징적인 피크이다. H-2'와 H-6'은 broad한 singlet 피크로 각각 6.57ppm과 6.60ppm에서 나타나고 있다. Fig. 34의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-3은 (+)-catechin의 B환과 비교하여 3ppm정도 downfield되어 149.07ppm에서 피크가 나타나고 C-2는 4.5ppm정도 upfield되어 110.56ppm에서 피크가 나타난 것으로 보아 methoxyl기가 C-3에 결합하고 있다는 것을 알 수 있으며 C-5와 6은 116.12ppm과 119.71ppm에서 피크를 보이고, 수산기와 결합되어 있는 C-4와 dihydrobenzofuran과 결합을 하고 있는 C-1은 downfield되어 147.36ppm과 135.13ppm에서 피크를 보이고 있고, methoxyl기 탄소는 56.40ppm에서 전형적인 피크를 나타낸다. 이것은 앞서 설명한 화합물 5의 B환과도 거의 동일한 NMR 값을 보이고 있다. 또한, dihydrobenzofuran의 C-a와 C-b는 88.72ppm과 55.76ppm에서 피크를 보이며 이중결합인 C-4'과 C-5'은 146.52ppm과 129.83ppm에서 나타나고 수산기가 결합되어 있는 C-3'은 141.88ppm에서 나타났다. 이것은 Miki (1979)가 *Larix leptolepis* 외수피에서 분리한 dihydrobenzofuran 유도체 화합물의 NMR값과 일치하였다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 methylene 탄소인 C-b'의 두 개의 수소는 C-a'의 두 개의 수소와 C-r'의 두 개의 수소의 영향으로 1.79ppm에서 multiplet 나타나며 C-a'의 두 개의 수소는 C-b'의 두 개의 수소의 영향으로 2.56ppm에서 triplet 피크로 J 값은 7.6 Hz이었고 C-r'의 두 개의 수소는 C-b'의 두 개의 수소의 영향과 수산기의 영향으로 downfield되어 3.56ppm에서 triplet 피크를 보이며 J 값은 6.5Hz이다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-r와 C-r'은 65.16ppm과 62.35ppm에서 피크를 보이며 C-a'와 C-b'은 methylene 탄소에 32.75ppm과 35.82ppm에서 특징적인 피크를 보이고 있다.

Fig. 35의 COSY(CORrelation Spectroscopy) 스펙트럼은 서로 인접하여 스핀-스핀 결합을 이루는 수소와 수소 사이의 연관성을 나타내는 2차원 스펙트럼으로 H-a'과

H- β' , H- β' 과 H- r' , H- α 와 H- β , H- β 와 H- r' , H-2'과 H-6', H-2와 H-6 및 H-5와 H-6이 서로 스핀-스핀 결합을 하고 있음을 나타내고 있으며, Fig. 36의 HETCOR 스펙트럼으로 탄소와 결합하고 있는 수소를 확인하였고, Fig. 37의 HMBC 스펙트럼으로 수소와 탄소의 *long range coupling*을 관찰하여 각 수소와 탄소의 상관관계를 비교하여 구조를 규명하였다. DEPT(Distortionless Enhanced Polarization Transfer) 스펙트럼은 CH, CH₂ 및 CH₃의 탄소를 별개의 스펙트럼에 찍어내고 모든 형태의 탄소를 보여주는 ¹³C-NMR 스펙트럼과 함께 제시하게 된다. Fig. 38의 DEPT 스펙트럼에서 129.83~149.07ppm 사이의 피크들이 quaternary 탄소임을 알 수 있었으며, C- α' , β' , r' , r 은 methylene 탄소임을 알 수 있었다.

이상의 결과는 Agrawal 등(1980, 1982)이 *Cedrus deodara*에서 단리한 neolignan 계 화합물인 cedrusin의 NMR값과 정확히 일치하고 있으며 Takehara 등(1979)이 *Larix leptolepis* 변재부에서 단리한 dihydrobenzofuran 유도체 화합물의 NMR값과 비교 분석하여 구조를 결정하였으며, Fig. 39의 EI-MS 스펙트럼에서 보는 바와 같이 [M]⁺ m/z 346으로 이 화합물의 분자량 346과 일치하였다.

K0LE 235023 (26-361)

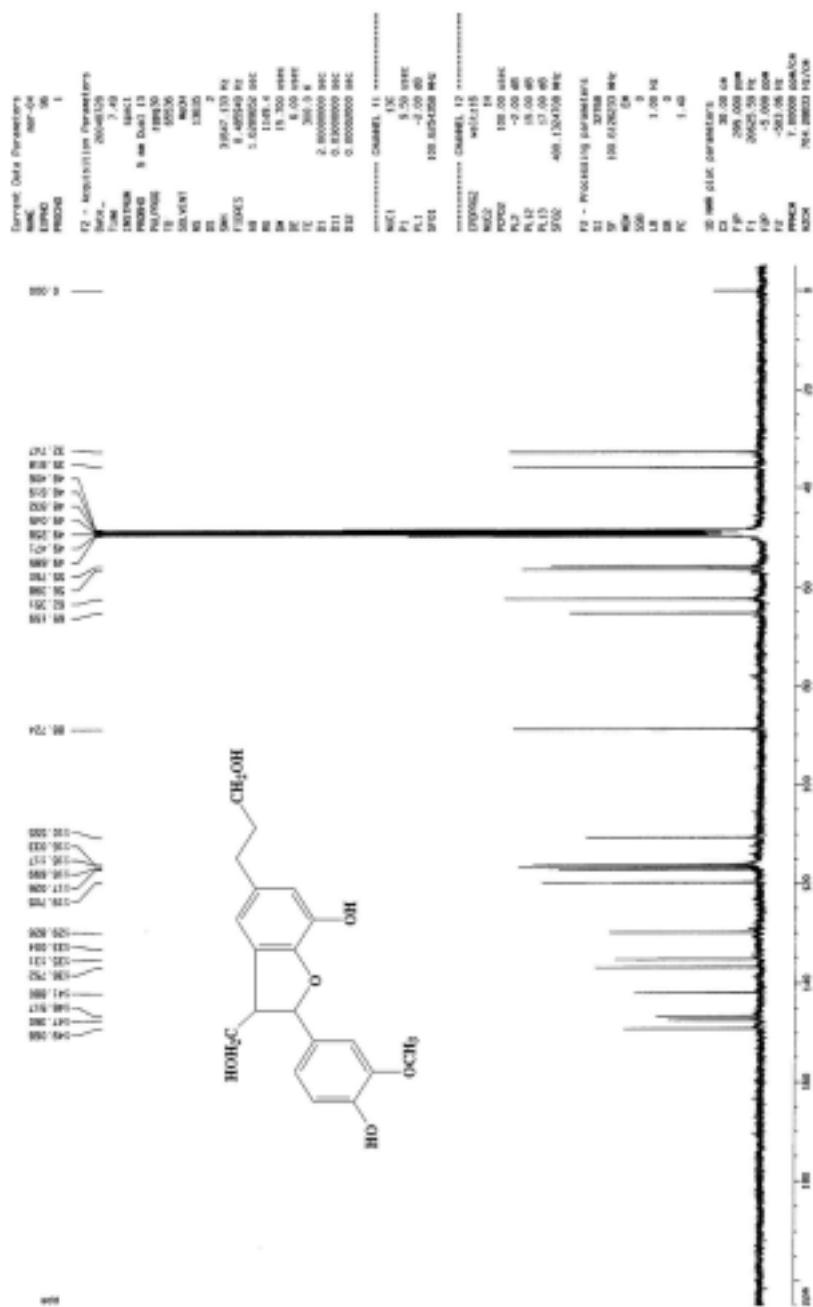


Fig. 34. ¹³C-NMR spectrum of cedrusin.

KOLE 23023 (26-30)

Current Data Parameters
 NAME: KOLE 23023
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 DATE_: 20040820
 TIME: 01.32
 PROBHD: 5 mm QNP 13
 PULPROG: zgpg30
 TD: 65536
 SFO: 500.136099
 AQ: 10.0000000
 F2 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 500.136099
 DS: 4
 AS: 0.000000
 SFO: 500.136099
 AQ: 10.0000000
 F1 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 500.136099
 DS: 4
 AS: 0.000000
 SFO: 500.136099
 AQ: 10.0000000
 F2 - Acquisition Parameters
 DATE_: 20040820
 TIME: 01.32
 PROBHD: 5 mm QNP 13
 PULPROG: zgpg30
 TD: 65536
 SFO: 500.136099
 AQ: 10.0000000
 F2 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 500.136099
 DS: 4
 AS: 0.000000
 SFO: 500.136099
 AQ: 10.0000000
 F1 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 500.136099
 DS: 4
 AS: 0.000000
 SFO: 500.136099
 AQ: 10.0000000

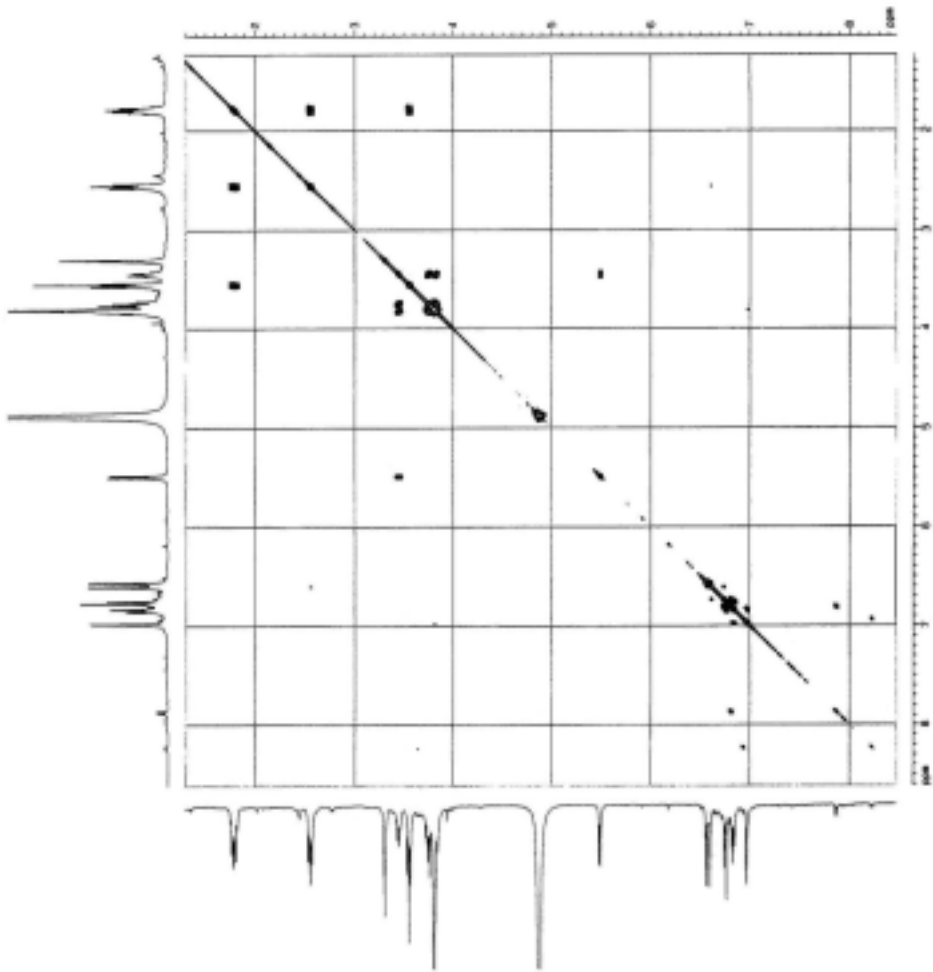


Fig. 35. COSY spectrum of cedrusin.

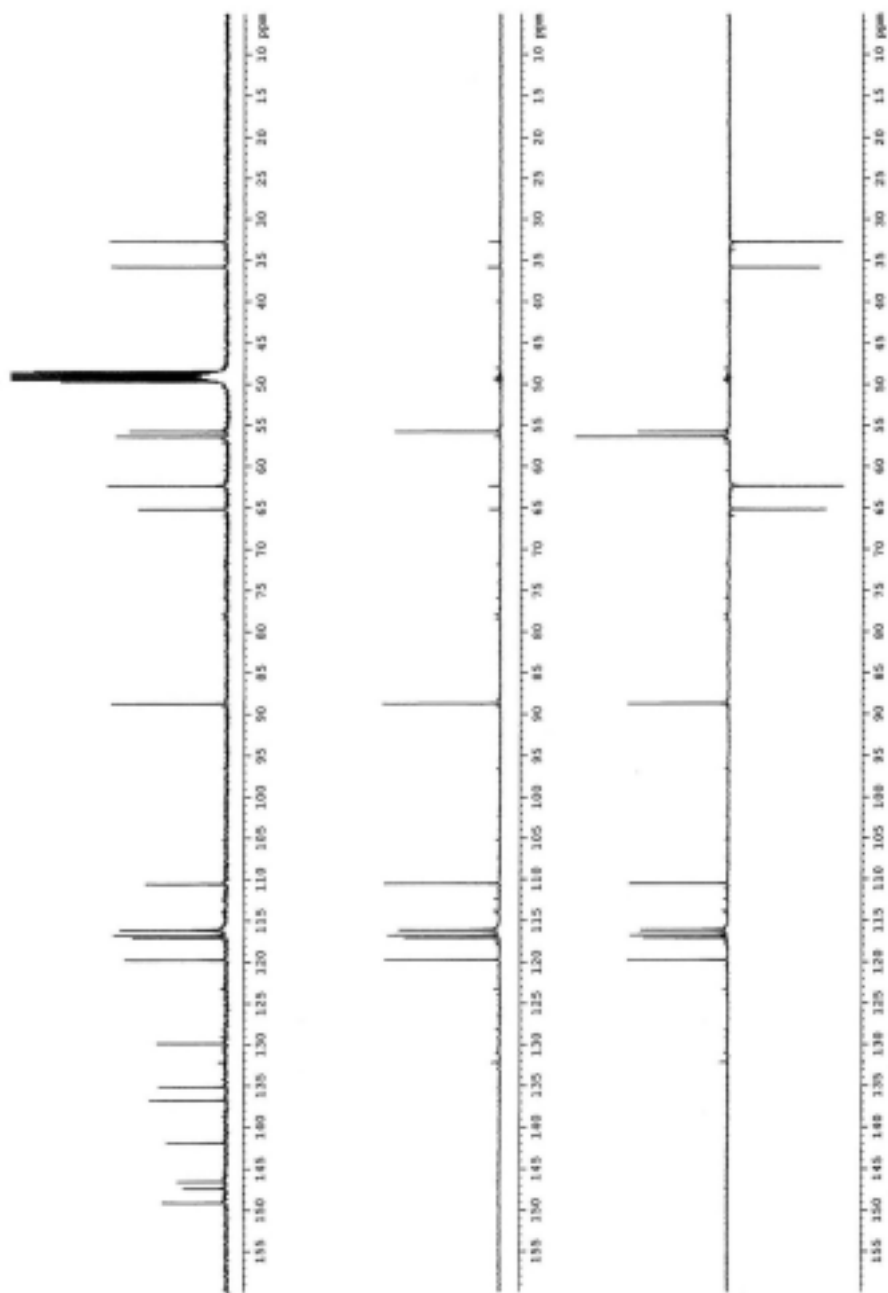


Fig. 38. DEPT spectrum of cedrusin.

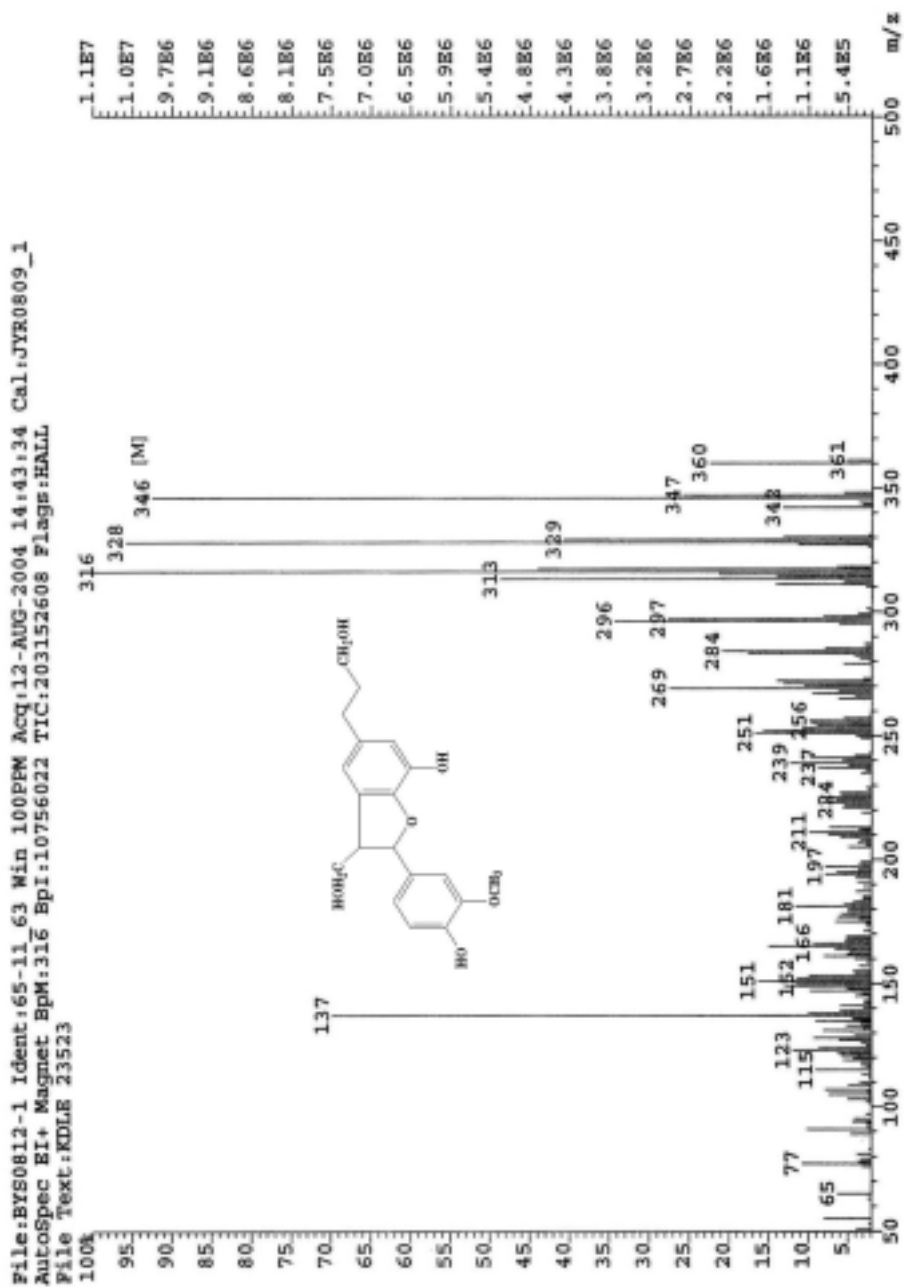


Fig. 39. EI-MS spectrum of cedrusin.

나. 항산화활성 평가

Table 4에서 보는 바와 같이 각 추출물 분획들은 기준물질보다 낮은 항산화 활성이 나타났다. 생엽과 낙엽 추출물 분획 모두 ethylacetate용성 분획이 항산화 활성이 높게 나타났고, methylene chloride용성 분획은 활성이 없는 것으로 나타났다. 추출물 분획 중 생엽 ethylacetate용성 분획의 IC₅₀ 값이 37 μ g로 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다. Fig. 39에서 농도가 증가할수록 생엽 ethylacetate용성 분획의 radical 소거능이 증가하는 것을 알 수 있으며 20ppm에서 100%에 가까운 radical 소거능을 나타냈다.

Table 4. IC₅₀ values of antioxidative activities of each extract fraction

	Fractions	IC ₅₀ (μ g)
Control	BHT	14 μ g
	α -tocopherol	12 μ g
Green needles	Hexane soluble fraction	45 μ g
	Methylene chloride soluble fraction	>100 μ g
	Ethyl acetate soluble fraction	37 μ g
	Water soluble fraction	52 μ g
	Crude extractive	45 μ g
Fallen needles	Hexane soluble fraction	60 μ g
	Methylene chloride soluble fraction	>100 μ g
	Ethyl acetate soluble fraction	51 μ g
	Water soluble fraction	77 μ g
	Crude extractive	68 μ g

Table 5와 Fig. 40에서 보는 바와 같이 낙엽송 생엽과 낙엽에서 분리된 화합물들에 대한 항산화 실험을 실시한 결과 flavan-3-ol 화합물인 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin은 기준물질보다 우수한 항산화 활성을 가지고 있는 것을 알 수 있으며, flavonol 배당체 화합물인 quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside와 laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside도 우수한 항산화 효과를 나타냈다. 나머지 화합물들은 IC₅₀값이 100 μ g이상이므로 항산화 활성이 높지 않았다.

Table 5. IC₅₀ values of antioxidative activities of isolated compounds

Compounds		IC ₅₀ (μg)
Control	BHT	14 μg
	α -tocopherol	12 μg
Isolated compounds	(+)-Catechin	6 μg
	(-)-Epicatechin	10 μg
	(+)-Gallocatechin	11 μg
	2''-O-rhamnosylvitexin	>100 μg
	Isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside	>100 μg
	Kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside	64 μg
	Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside	>100 μg
	Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside	>100 μg
	Laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside	22 μg
	Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside	17 μg
	Cedrusin	58 μg

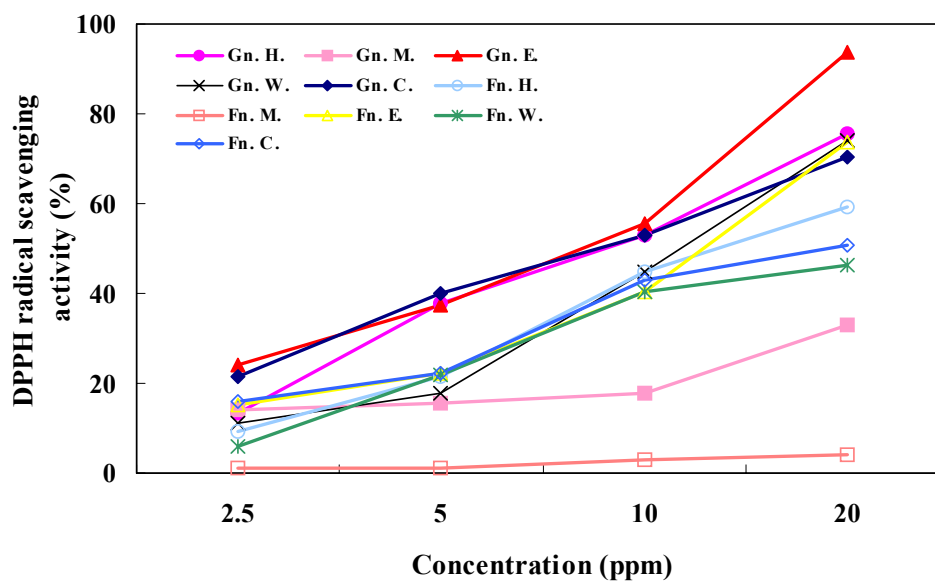


Fig. 40. DPPH radical scavenging activities of each extract fraction by different concentration. (Gn.: Green needles, Fn.: Fallen needles, H.: Hexane, M.: Methylene chloride, E.: Ethylacetate, W.: Water, C.: Crude extractive)

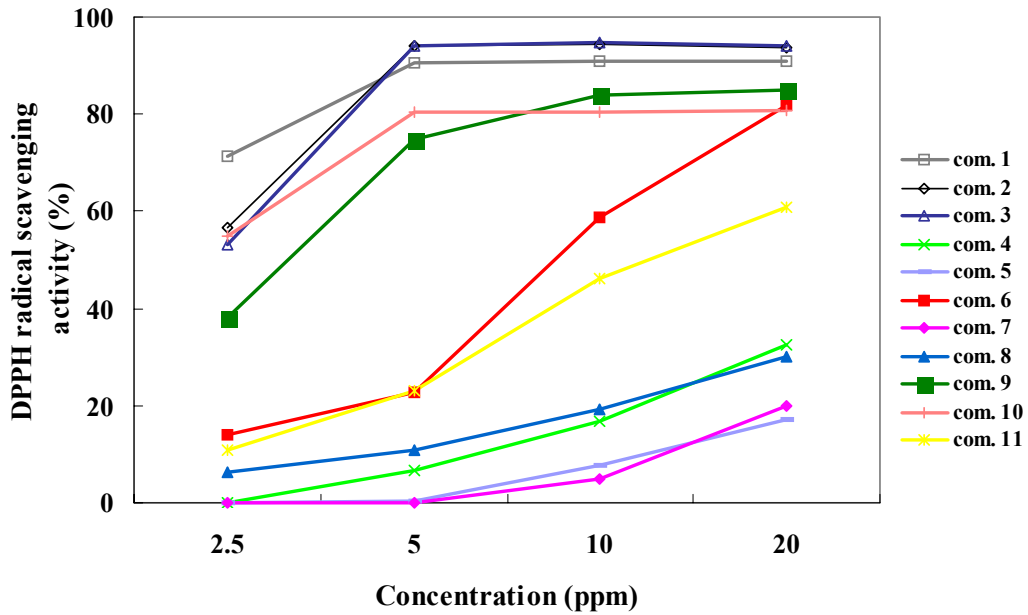


Fig. 41. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds by different concentration.

다. 항균활성 평가

1) 항여드름균 활성 평가

낙엽송 추출물의 각 분획들과 단리된 화합물들을 멸균된 paper disk에 500ppm의 농도로 50 μ l/disk를 흡착시켜 배지에서 72시간 배양 후 형성된 저해 부위의 크기를 측정한 결과는 Table 7과 같다. 생엽 ethylacetate 용성 분획, 수용성 분획, (-)-epicatechin 및 (+)-gallocatechin에서 항여드름 활성을 보였으며 그 중 생엽 ethylacetate 용성 분획의 경우 저해 부위의 크기가 15mm로 가장 좋은 활성을 나타냈다. (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin의 경우 항여드름 활성이 있으나 매우 약한 것으로 시간이 경과 될수록 다시 균이 성장하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 6. Anti-*Propioni bacterium acne* positive control

	Concentration (ug/disk)	Inhibition zone (mm)
Erythromycin	0.5	34
	0.25	31
	0.125	22

Table 7. Inhibition zone (mm) of Anti-*propioni bacterium acne* of each extract fraction and isolated compounds

	Samples	Inhibition zone (mm)
Fractions	Green needles Crude extractive	-
	Green needles EtOAc soluble fr.	15
	Green needles H ₂ O soluble fr.	13
	Fallen needles Crude extractive	-
	Fallen needles EtOAc soluble fr.	-
	Fallen needles H ₂ O soluble fr.	-
Isolated compounds	(+)-Catechin (1)	-
	(-)-Epicatechin (2)	10
	(+)-Gallocatechin (3)	11
	2''-O-rhamnosylvitexin (4)	-
	Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (8)	-
	Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (10)	-

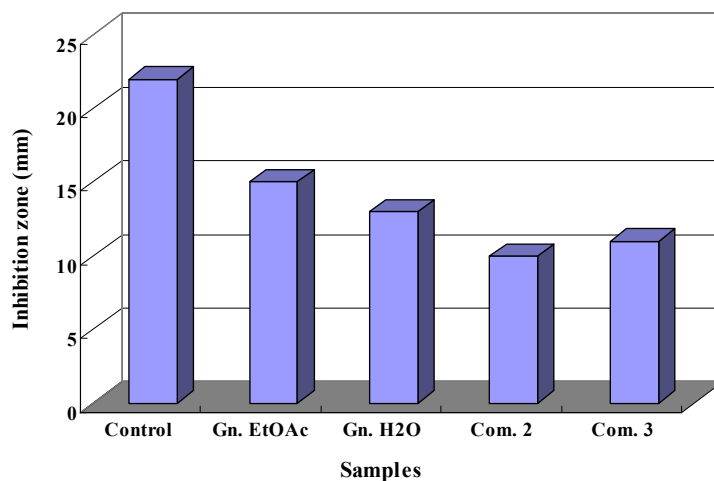


Fig. 42. Inhibition zone (mm) of Anti-*propioni bacterium acne* of each extract fraction and isolated compounds. (Gn : Green needles)

2) 항비듬균 활성 평가

낙엽송 추출물의 각 분획들과 단리된 화합물들을 멸균된 paper disk에 500ppm의 농도로 50 μ l/disk를 흡착시켜 배지에서 48시간 배양 후 형성된 저해 부위의 크기를 측정한 결과는 Table 9와 같다. 생엽 crude, ethylacetate 용성 분획, 수용성 분획과 낙엽 ethylacetate 용성 분획에서 비듬균의 성장을 억제하는 효능이 있는 것으로 나타났으나 단리된 화합물에서는 항비듬 활성이 나타나지 않았다. 가장 좋은 활성을 나타낸 생엽 ethylacetate 용성 분획의 경우 양성대조군으로 사용한 ketoconazole 100ug/disk의 비듬균 저해 부위의 크기인 13mm보다 더 넓은 16mm로 비듬균 성장을 억제하는 효능이 우수하였다.

Table 8. Anti-*Malassezia furfur* positive control

	Concentration (ug/disk)	Inhibition zone (mm)
Ketoconazole	500	20
	100	13

Table 9. Inhibition zone (mm) of Anti-*Malassezia furfur* of each extract fraction and isolated compounds

	Samples	Inhibition zone (mm)
Fractions	Green needles Crude extractive	11
	Green needles EtOAC soluble fr.	16
	Green needles H ₂ O soluble fr.	14
	Fallen needles Crude extractive	-
	Fallen needles EtOAC soluble fr.	14
	Fallen needles H ₂ O soluble fr.	-
Isolated compounds	(+)-Catechin (1)	-
	(-)-Epicatechin (2)	-
	(+)-Gallocatechin (3)	-
	2''-O-rhamnosylvitexin (4)	-
	Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (8)	-
Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (10)	-	

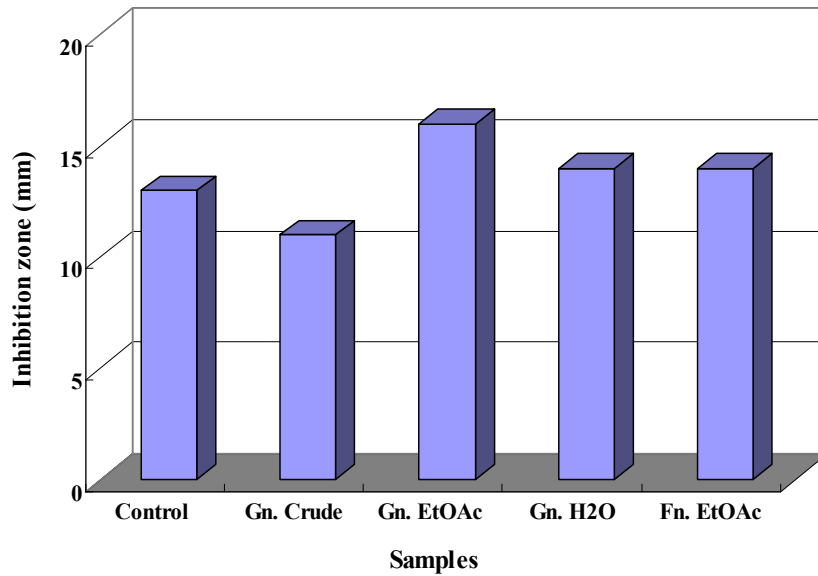


Fig. 43. Inhibition zone (mm) of Anti-*Malassezia furfur* of each extract fraction and isolated compounds. (Gn : Green needles, Fn : Fallen needles)

라. 세포독성 평가

낙엽송 각 추출물 분획들과 단리된 화합물에 대하여 정상피부 세포인 HaCaT 세포주에 대한 세포독성은 MTT assay로 측정하였으며 결과는 Table 10과 같다. 각 추출물 분획들의 세포독성 실험 결과 대부분 분획들의 세포생존율은 60% 이상으로 큰 세포독성을 나타내지 않았으나, 낙엽 crude 분획이 200ppm 농도에서 세포생존율이 54%로 나타났다. 단리된 화합물에 대한 세포독성 결과 (+)-galocatechin(3), kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside(6)에서 50% 정도의 세포독성을 나타냈으며, 나머지 화합물은 세포생존율이 70% 이상 세포독성을 보이지 않았다.

Table 10. % Cell viability of each extract fraction and isolated compounds

(unit : % of control)

Samples	Concentration (ppm)			
	50	100	200	
Fractions	Green needles Crude extractive	70.0	70.8	63.7
	Green needles EtOAc soluble fr.	92.8	61.7	66.7
	Green needles H ₂ O soluble fr.	80.3	65.5	61.0
	Fallen needles Crude extractive	73.8	70.2	54.8
	Fallen needles EtOAc soluble fr.	93.7	87.6	63.5
	Fallen needles H ₂ O soluble fr.	80.2	78.4	60.9
Isolated compounds	(+)-Catechin (1)	96.0	85.0	74.1
	(-)-Epicatechin (2)	86.4	80.8	77.3
	(+)-Gallocatechin (3)	84.2	83.7	57.6
	2''-O-rhamnosylvitexin (4)	75.0	71.0	66.9
	Isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside (5)	95.9	89.5	66.0
	Kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside (6)	92.4	75.6	55.1
	Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (7)	85.1	78.8	76.2
	Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (8)	120.6	93.8	82.7
	Laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside (9)	88.4	85.1	83.4
	Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (10)	97.5	93.3	73.8

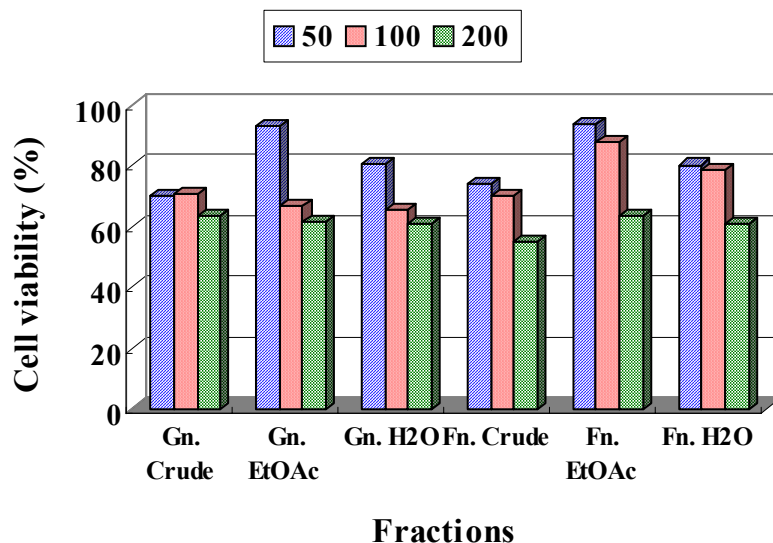


Fig. 44. % Cell viability of each extract fraction. (Gn : Green needles, Fn : Fallen needles)

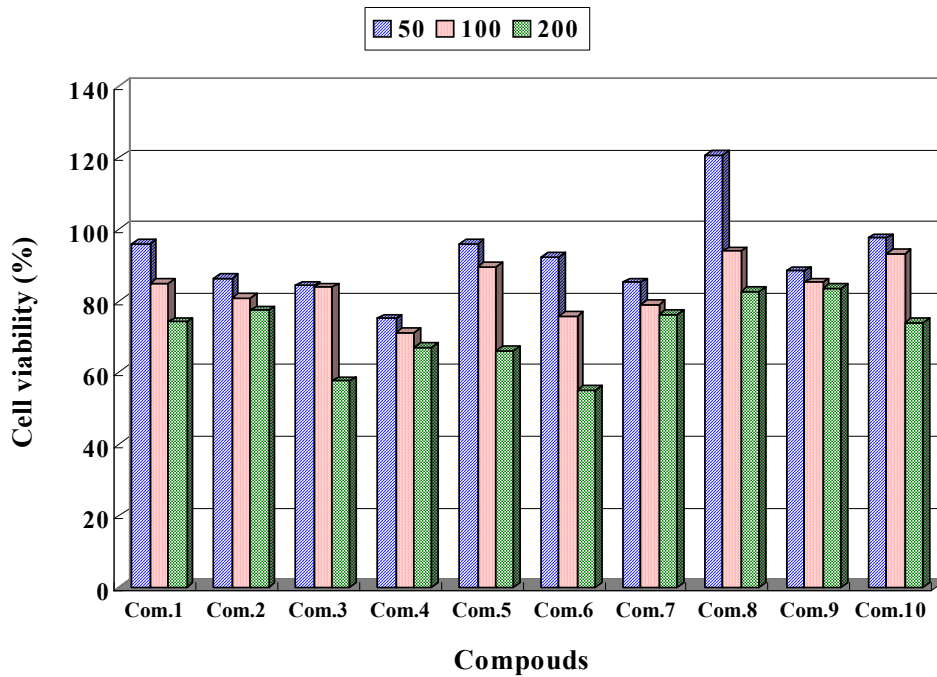


Fig. 45. % Cell viability of isolated compounds.

마. 항염증활성 평가

LPS에 의해 활성화 된 Raw 264.7 세포에 각 추출물 분획들과 단리된 화합물을 처리하여 20시간 배양 후 Griess 시약을 사용하여 NO 생성 저해율을 측정하였다. 시료 용매제인 DMSO 100ppm에서도 30%의 NO 생성을 저해하는 것을 알 수 있었으며, 낙엽수용성 분획을 제외한 모든 시료에서 DMSO 자체의 NO 생성 저해율보다는 높은 저해율을 나타냈다. 낙엽수용성 분획을 제외한 kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside, 생엽 crude, 낙엽 crude 분획은 100ppm 농도에서 NO 저해제로 알려진 L-NMMA와 동등한 NO 저해율을 갖고 있음을 알 수 있었다. 단리된 화합물 중 (+)-catechin, (+)-gallocatechin, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside는 100ppm에서 90%이상의 높은 NO 저해율을 보여 항염증활성이 우수한 것으로 나타났으며, 각 추출물 분획들 보다는 단리된 화합물들이 NO 저해율이 높게 나타나 항염증 활성이 우수하다는 것을 알 수 있었다.

Table 11. NO inhibition ratio (%) of each extract fraction and isolated compounds
(unit : %)

Samples	Concentration (ppm)		
	50	100	
DMSO (for use solvent)			
Fractions	Green needles Crude extractive	34.4	66.8
	Green needles EtOAc soluble fr.	45.6	59.6
	Green needles H ₂ O soluble fr.	55.9	56.2
	Fallen needles Crude extractive	17.0	66.2
	Fallen needles EtOAc soluble fr.	44.3	71.7
	Fallen needles H ₂ O soluble fr.	8.1	21.9
Isolated compounds	(+)-Catechin (1)	56.9	90.0
	(-)-Epicatechin (2)	64.0	78.7
	(+)-Gallocatechin (3)	76.5	99.8
	2''-O-rhamnosylvitexin (4)	48.3	57.1
	Isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside (5)	38.4	52.6
	Kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside (6)	96.0	104.2
	Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (7)	12.6	34.1
	Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (8)	39.5	67.2
	Laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside (9)	53.0	87.4
	Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (10)	43.9	72.7

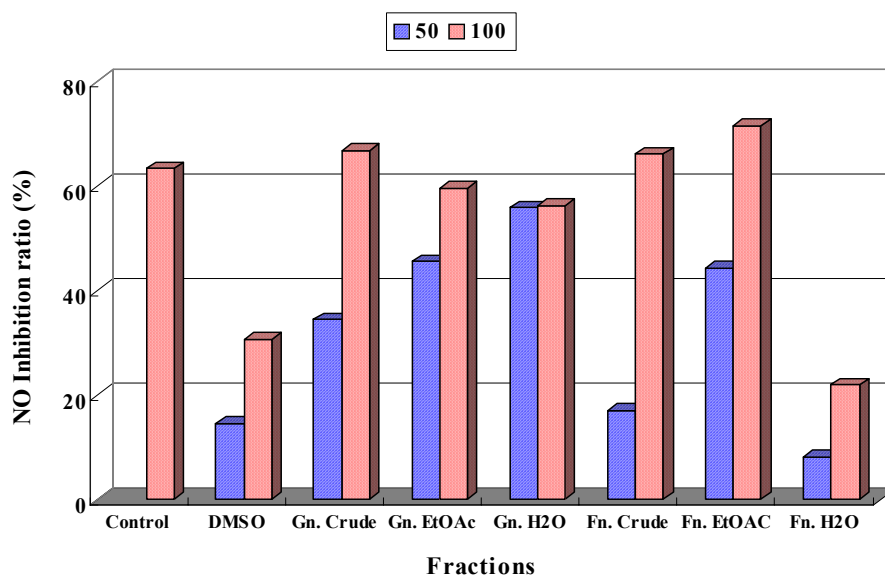


Fig. 46 NO inhibition ratio (%) of each extract fraction (Gn : Green needles, Fn : Fallen needles).

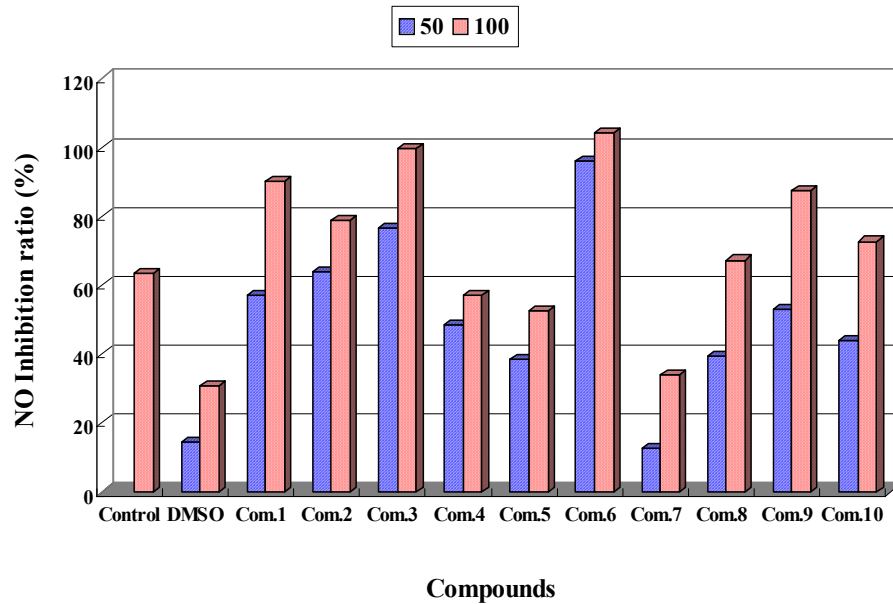


Fig. 47. NO inhibition ratio (%) of isolated compounds.

바. Tyrosinase 활성 저해능 평가

Melamine 형성 효소인 tyrosinase에 작용해 멜라닌 생성을 억제하고, 피부에서 활성산소종 생성을 억제하는 효과를 검증하고 위하여 각 추출물 분획들과 단리된 화합물에 대한 tyrosinase에 대한 활성을 측정하였고, tyrosinase 활성 억제가 좋은 kojic acid를 양성 대조구로 사용하였다. 대조구인 kojic acid는 5ppm의 농도에서 tyrosinase를 95% 저해하는 활성을 보였으나 각 추출물 분획들과 단리된 화합물은 100ppm에서 tyrosinase를 저해하는 활성이 나타나지 않는 것으로 보아 효능이 없다고 생각된다.

Table 12. Tyrosinase inhibition ratio (%) of positive control

	Concentration (ppm)	Inhibition ratio (%)
Kojic acid	2.5	77
	5	95

Table 13. Tyrosinase inhibition ratio (%) of each extract fraction and isolated compounds

(unit : %)

Samples	Concentration (ppm)	100
Fractions	Green needles Crude extractive	-
	Green needles EtOAC soluble fr.	-
	Green needles H ₂ O soluble fr.	-
	Fallen needles Crude extractive	-
	Fallen needles EtOAC soluble fr.	-
	Fallen needles H ₂ O soluble fr.	-
Isolated compounds	(+)-Catechin (1)	-
	(-)-Epicatechin (2)	-
	(+)-Gallocatechin (3)	-
	2''-O-rhamnosylvitexin (4)	-
	Isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside (5)	-
	Kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranoside (6)	-
	Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (7)	-
	Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside (8)	-
	Laricitrin-3-O-β-D-glucopyranoside (9)	-
	Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (10)	-

4. 결 론

낙엽송의 생엽(4.6kg)과 낙엽(8.5kg)을 각각 채취하여 95% EtOH 용액으로 추출하고 농축된 추출용액은 분획갈때기로 hexane, methylene chloride, ethylacetate 및 수용성으로 순차 추출하여 동결건조하였다. 혼합물로부터 순수한 화합물을 분리하기 위하여 ethylacetate용성과 수용성 분획에 대하여 Sephadex LH-20으로 충전한 컬럼크로마토그래피를 반복적으로 실시하였으며, 단리된 화합물의 구조는 ¹H, ¹³C-NMR, 2D-NMR (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HETCOR · HMQC · HMBC) 및 FAB, EI-MS 스펙트럼으로 구조를 규명하였다. 생엽에서는 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside 및 2''-O-rhamnosylvitexin 등 6개의 화합물을 단리하였으며, 낙엽에서는 (+)-catechin,

(-)-epicatechin, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamno pyranoside, laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, cedrusin 및 2''-O-rhamnosylvitexin 등 8개의 화합물을 단리하였다. 생엽과 낙엽에서 공통으로 단리된 화합물은 (+)-catechin, (-)-epicatechin, 2''-O-rhamnosylvitexin으로 낙엽송 잎의 주요 구성성분으로 사료되며, 대부분의 화합물은 flavonoid 화합물로 생엽과 낙엽의 구성성분의 차이는 크지 않았다.

항산화실험 결과 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallicocatechin이 기준물질보다 우수한 항산화활성을 보였으며, 배당체 화합물인 quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside 와 laricitrin-3-O- β -D-glucopyranoside도 항산화활성을 나타냈다. 추출물 분획에서 ethylacetate용성 분획이 가장 좋은 활성을 보였는데 이는 항산화활성이 우수한 화합물들이 ethylacetate용성 분획에 많이 함유되어 있기 때문이라고 사료된다. 여드름균에 대한 항균활성 결과 (-)-epicatechin, (+)-gallicocatechin, 생엽과 낙엽 ethylacetate용성 분획에서 항여드름균 활성을 보였으며, 비듬균에 대한 활성은 생엽 crude, ethylacetate, 수용성 분획과 낙엽 ethylacetate용성 분획에서 비듬균에 대한 항균활성을 나타냈다. 이 중 생엽 ethylacetate용성 분획은 기준물질보다도 우수한 활성을 나타내어 항산화활성 결과와 유사한 결과를 보였다. MTT assay 세포독성 결과 (+)-gallicocatechin, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside, 낙엽 crude 분획에서 40~50% 정도의 독성을 보였을 뿐 큰 독성을 보이지 않았다. 항염증활성 결과 대부분의 추출물 분획과 화합물들이 기준물질과 동등한 NO 생성 저해활성을 보였으며, 그 중 (+)-catechin, (+)-gallicocatechin, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranoside는 90% 이상의 NO 생성 저해 활성을 보여 항염증활성이 매우 우수한 것으로 나타났다. Melamine 형성 효소인 tyrosinase의 저해활성을 평가한 결과 추출물 분획들과 화합물들은 활성을 보이지 않아 melamine 생합성을 억제하지는 못하는 것으로 사료된다.

제 2 절 낙엽송 잎 추출물의 기능성 시험 및 상용화 연구

1. 낙엽송 잎 추출물에 대한 효능 실험

가. 항산화 효과 실험

1) 실험재료

가) 낙엽송 잎

본 실험에서 추출에 사용한 낙엽송 잎은 강원대학교 임산공학과로부터 제공받았으며 이 중 건조된 상태의 낙엽송 잎을 이용하여 추출용 시료로 사용하였다. 추출공정은 건조된 낙엽송 잎 0.1kg에 70% EtOH (v/v) 2 kg를 넣고 교반하며 25℃에서 3일간 추출한 후 용매를 회수한 뒤 다시 2차에 걸쳐 동일공정으로 추출을 진행하여 추출용액을 얻었다. 이를 0.45 μ m membrane filter(Life science Super R-450, Pall corporation)로 여과한 뒤, 37℃, 40torr의 조건으로 감압 농축한 뒤 동결건조의 과정을 거쳐 낙엽송 잎 추출 파우더를 얻었으며, 이를 냉동보존하며 각각의 실험 시료로 사용하였다.

나) 시약 및 기기

본 실험에서의 항산화능 검토를 위한 시약으로서 DPPH(1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), Pyrogallol, TRIZMA(tris(hydroxymethyl)amino-methane)등을 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 그 이외 시약은 특급 시약을 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 UV/Vis spectrophotometer(JASCO, Japan)을 사용하였다.

2) 항산화 효과 실험

가) 전자공여능 측정

추출물의 전자공여능(electron donating abilities: EDA)은 Blois의 방법에 준하여 측정하였다. 각 시료용액 2.0 ml에 2×10^{-4} M의 DPPH(1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 1.0 ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기준물질로는 10ppm농도의 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{Sabs - Babs}{Cabs} \right) \times 100$$

Sabs : 시료용액 첨가구의 흡광도

Babs : DPPH 대신 정제수를 사용한 시료용액 첨가구의 흡광도

Cabs : 시료용액 무첨가구의 흡광도

나) SOD 유사활성능 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 각 시료용액 0.2 ml에 Tris-HCl Buffer (50 mM TRIZMA, 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고, 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기준물질로는 100ppm 농도의 L-ascorbic acid를 사용하였으며 SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성 (\%)} = \left(1 - \frac{Sabs - Babs}{Cabs} \right) \times 100$$

Sabs : 시료용액 첨가구의 흡광도

Babs : Pyrogallol 대신 완충용액을 사용한 시료용액 첨가구의 흡광도

Cabs : 시료용액 무첨가구의 흡광도

3) 결과

가) 전자공여능

수소공여능 측정에 사용되는 DPPH는 안정한 형태로 존재하는 free radical로서 그것의 비공유전자로 인하여 517nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며 전자 또는 수소를 받으면 517nm 부근에서 흡광도가 감소한다. 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거활성이 있다고 기대할 수 있으며, 인체 내에서 활성라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. 낙엽송 추출물은 각 농도별로 조제하여 전자공여능을 측정하였다. 낙엽송 추출물의 전자공여능 측정결과 Fig. 1.과 같이 10 ppm이상에서 약

60%이상의 전자공여능을 나타내어 약 65%의 전자공여능을 나타낸 기준물질인 10ppm L-ascorbic acid와 유사한 결과를 나타내었다.

나) SOD유사활성능

SOD는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical(O_2^-)과 반응하여 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 생성하는 효소로서, 산소를 이용하는 모든 생물체에 존재하여 생체 내에서 활성산소종에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다. 체내의 산화적 손상으로부터 세포를 방어하는데 중요한 역할을 하는 SOD의 유사활성을 살펴본 결과 Fig. 2와 같이 1000 ppm에서 24.3%의 유사활성을 나타내었으나 기준물질인 100ppm 농도의 L-ascorbic acid의 유사활성인 50%에는 미치지 못하였다.

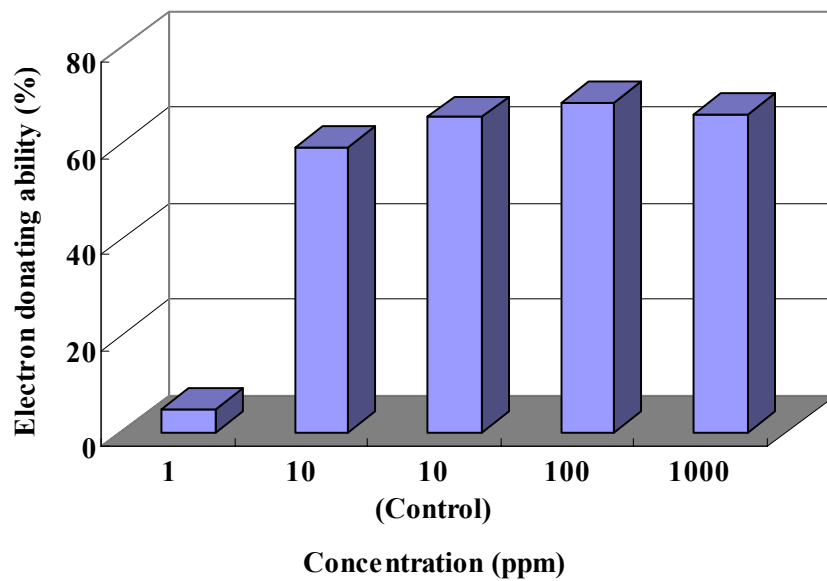


Fig. 1 . 낙엽송 추출물의 전자공여능.

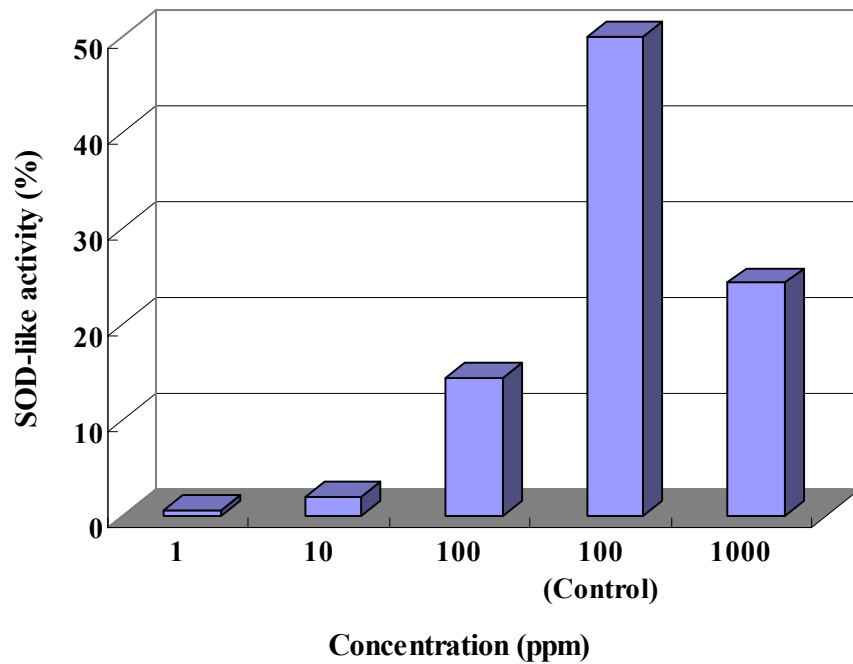


Fig. 2 . 낙엽송 추출물의 SOD 유사활성.

나. 미백효과 실험

1) 실험 재료

가) 낙엽송

실험에 사용된 낙엽송 EtOH 추출물은 항산화 효과 실험 시 사용되었던 것과 동일한 시료를 사용하였다.

나) 시약 및 기기

미백관련 실험으로서 tyrosinase 및 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine), arbutin은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였으며, B16F10 멜라노마 배양을 위한 시약으로서 RPMI1640 medium에 10% Fetal bovine serum, 1% Penicillin /streptomycin을 첨가한 것으로 Gibco BRL Co.에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 UV/Vis spectrophotometer(JASCO, Japan), Rotary centrifuge(Hitachi, Japan), Microscope(Olympus, Japan), CO2 incubator(Hanbaek Scientific Co., Korea), pH meter(Orion Research, Inc. U.S.A), Autoclave(Hanbaek Scientific Co., Korea), ELISA reader(Bio Rad, Japan) 등을 사용하여 측정하였다.

2) 미백효과 실험

가) Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi등의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 반응구는 0.175 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 ml에 L-DOPA(L-dihydroxyphenylalanine, 10 mM)을 녹인 기질액 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 unit/ml) 0.2 ml 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 저해율을 구하였다. 시험결과의 비교를 위해 양성대조구로 100ppm 농도의 arbutin을 사용하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{Sabs - Babs}{Cabs} \right) \times 100$$

Sabs : 시료용액 첨가구의 흡광도

Babs : 효소 대신 완충용액을 사용한 시료용액 첨가구의 흡광도

Cabs : 시료용액 무첨가구의 흡광도

나) 세포배양

본 실험에 이용한 B16F10(melanoma)은 Korean Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하였다. 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1%를 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하여 사용하였다.

다) MTT assay에 의한 적정 접종 세포수 및 세포독성 측정

B16F10(melanoma)의 적정 접종 세포수 측정을 위한 지수기의 적정 세포수 측정은 96 well plate에 5×10⁴의 세포를 분주한 후 세포밀도를 1/2로 희석하면서 접종한

후 37°C, 5% CO₂ 하에서 4일간 배양한 후 흡광도를 측정하였다. 적정 세포수를 결정한 후 세포독성 측정을 하였다.

낙엽송의 B16F10(melanoma)에 대한 세포독성 측정은 Carmichael 등의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 암세포 주를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되게 0.18 ml 분주하였다. 24시간 후, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양하였고 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ l를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:EtOH (1:1) 150 μ l를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포주의 성장억제효과를 측정하였다.

라) 세포내 멜라닌 생성량 측정

RPMI1640으로 배양된 B16F10 흑색종세포주를 100mm culture dish에 2×10⁵개의 농도로 넣어 놓은 다음, 24시간 배양 후 낙엽송 추출물을 최종농도 1, 10, 100, 1000 ppm이 되게 처리하였다. 세포를 72시간 배양 후 인산완충액 (pH7.4)으로 세척하고 0.25M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10⁶ 세포 당 1ml의 5% TCA로 처리 교반하였다. 2500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 멜라닌을 인산완충액으로 세척한 뒤 에테르와 에탄올을 1:3 비율로 하여 2회 원심분리 한 후 에테르 1 ml로 세척 건조시켰다. 건조된 멜라닌에 1 N NaOH를 가하여 56°C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 470nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생성량 측정 결과를 비교하기 위해 양성대조구로 100ppm 농도의 arbutin을 사용하였다.

3) 결과

가) Mushroom tyrosinase 활성 저해효과

낙엽송에 의한 Mushroom tyrosinase의 활성 저해를 확인해 본 결과 Fig. 3과 같이 1000 ppm에서 31.9%의 저해효과를 확인할 수 있었다. 그러나 대조구로 사용된 arbutin에 비하여 낮은 tyrosinase 저해 활성을 보임을 알 수 있었다.

나) MTT assay에 의한 적정 접종세포수 및 세포독성능

B16F10(melanoma)의 최적의 세포수는 Fig. 4와 같이 0.6~08의 흡광도 범위인

1.6×10^3 의 세포수로 결정하였으며, 1.6×10^3 세포수로 접종하여 세포 독성을 측정
결과 Fig. 5와 같이 모든 농도에서 독성을 나타내지 않았다.

다) B16F10(melanoma)의 멜라닌 생합성 저해능

Melanin 생합성을 억제하는 효과에 대하여 대조구와 유의차를 나타내지 않아
효과를 확인할 수 없었다. 또한 양성대조구의 arbutin(85%의 저해율)과 비교하였을
경우 현저한 효과의 차이를 확인할 수 있었다. 따라서, 낙엽송 추출물의 경우, 피부
미백에는 그다지 좋은 효과를 나타내지 않음을 알 수 있었다.

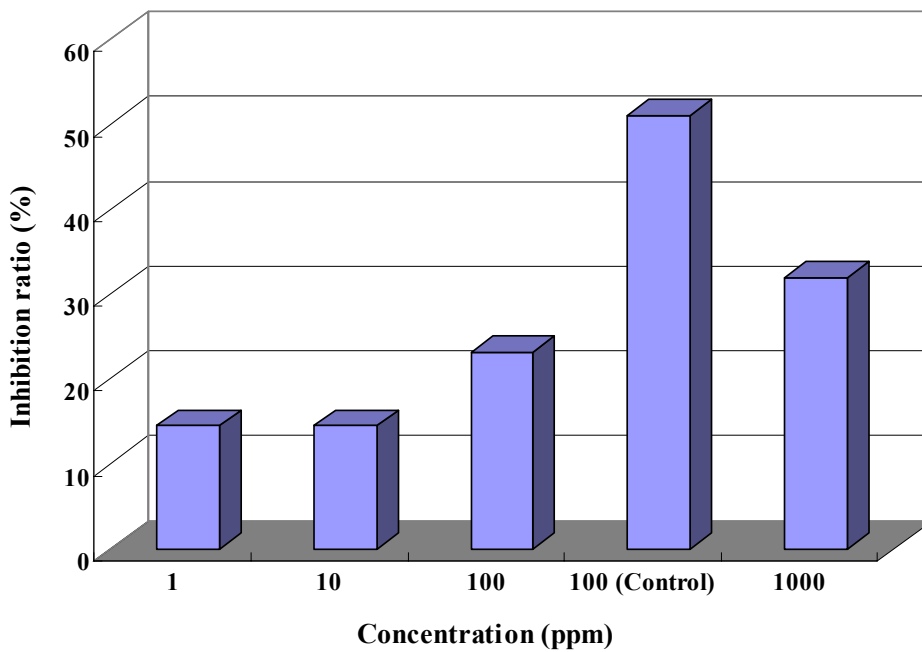


Fig. 3. 낙엽송 추출물의 tyrosinase 저해능.

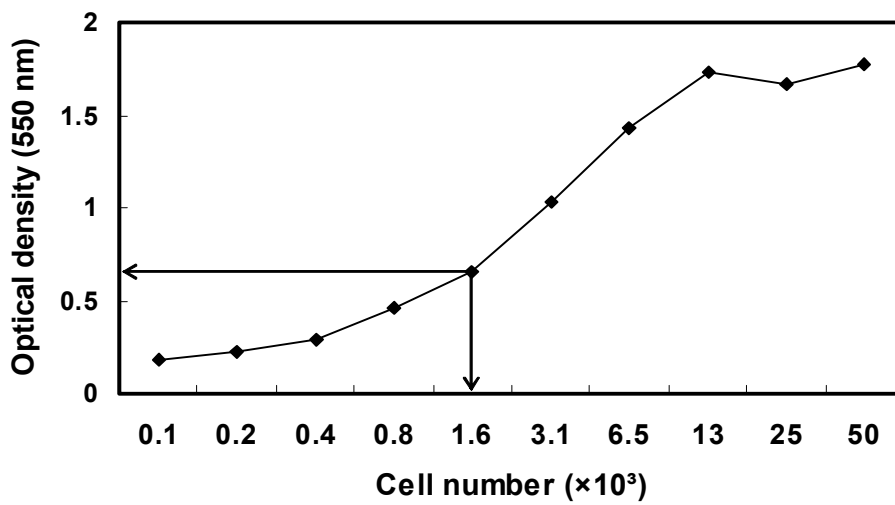


Fig. 4. B16F10(melanoma)의 세포 적정 농도.

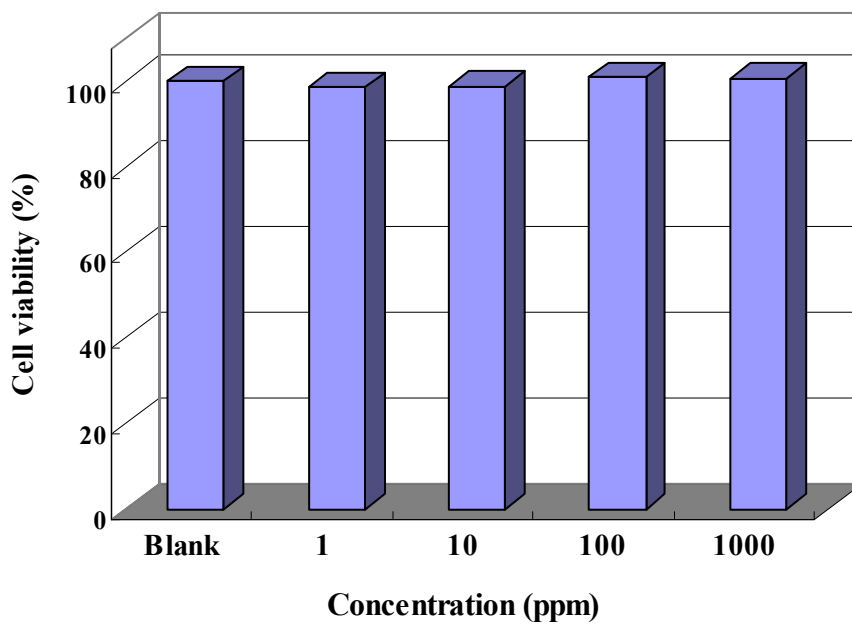


Fig. 5. 낙엽송 추출물의 B16F10(melanoma) 세포 내 멜라닌 생성억제효과.

다. 항균효과 실험

1) 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 호기성균인 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, 혐기성 균인 *Propionibacterium acne*를 사용하였다. Slant에 배양된 균주 1 백금이를 취해 10ml broth 생육배지에 접종하고, 30~35℃에서 18~24시간씩 2회에 걸쳐 계대 배양하여 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각의 생육배지로 멸균된 배지(agar 1.8%)를 petri dish에 15ml씩 분주하여 응고시키고, 각종 시험균액 0.1ml을 실온에서 건조시킨 plate 표면에 멸균된 면봉을 사용하여 도말하였다.

2) 항균효과 실험

가) 호기성균에 대한 항균력

추출물의 항균력 검색은 한천배지확산법(disk plate method)으로 측정하였다. 즉, 각각의 시료용액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 제균하고, 멸균된 filter paper disk에 50 μ l/disk가 되도록 흡수시켜 각 균주의 적정배양온도에서 18~24시간 배양하여 disk 주위의 생육저지환(clear zone)을 측정하여 항균활성을 측정하였다.

나) 혐기성 균에 대한 항균력

여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes*를 한국세포주은행으로부터 구입하여 BHI&BA 배지에 접종시켜 천자배양하여 종균으로 사용하였고, 혐기적 Jar-system을 이용하여 혐기적인 조건에서 한천배지확산법(disk plate method)으로 추출물에 대한 항균활성을 검색하였다. 추출물의 항균력 검색은 각각의 시료용액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 제균하고, 멸균된 filter paper disk에 50 μ l/disk가 되도록 흡수시켜 각 균주의 적정배양온도에서 4~7일간 배양하여 disk 주위의 생육저지환(clear zone)을 측정하여 항균활성을 측정하였다.

다) *E. coli*에 대한 최소저해농도(MIC) 측정 시험

추출물의 항균효과 실험을 disk diffusion법을 이용하여 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration ; MIC)로 측정하였다. *E. coli*균 농도는 멸균된 배지로 희석하여 흡광도 660nm에서 0.5로 일정하게 하고, 멸균된 nutrient agar petri dish에 접종

원을 50 μ l씩 도말하고, petri dish 중앙에 직경 8mm인 paper disk를 올려놓고 실험하였다. 추출물은 에탄올에 0.5%, 1%, 5% 혼합한 혼합액을 각 disk당 10 μ l로 disk 위를 골고루 적신 후 30 $^{\circ}$ C, 72시간 배양한다. 배양 후 disk 주변에 형성된 clear zone의 크기를 측정하여 항균효과를 측정하였다.

3) 결과

가) 추출물의 항균효과

실험에서는 호기성 균 3종과 혐기성 균 1종을 사용하였는데, *E. coli*를 제외한 여드름 생성균에 대해서는 항균효과가 거의 나타나지 않았다. 이 결과에 따라 항균효과 시험을 여드름 생성균에서 일반적인 항균효과 시험 균만으로 추가시험을 하여 추출물의 항균효과를 검토하였다. 추출물 농도별 *E. coli*에 대한 항균효과는 disk diffusion 법으로 측정하였으며 추출물은 에탄올에 0.5%, 1%, 5% 혼합한 혼합액을 사용하였다. Blank로는 95% 에탄올을 사용하였으며 그 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 실험결과 농도에 따른 차이는 있지만 어느 정도의 항균효과가 있음을 확인할 수 있었다.

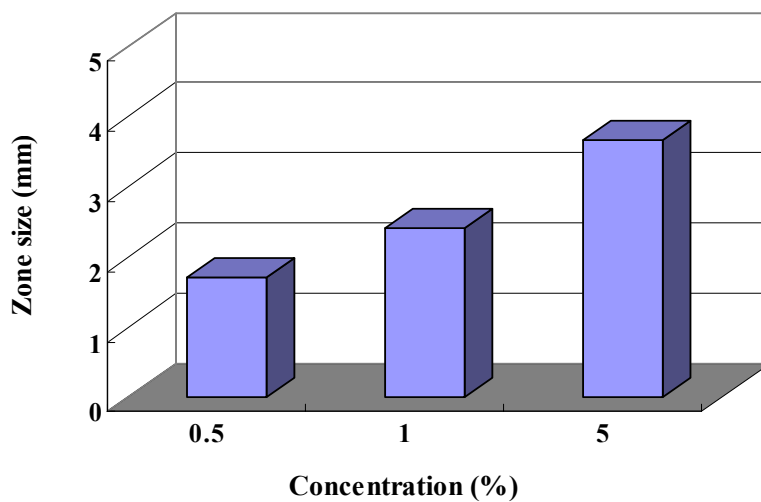


Fig. 6. 추출물 농도별 항균효과 시험

라. 주름개선 효과

1) 실험 재료

가) 낙엽송

실험에 사용된 낙엽송 추출물은 항산화 효과 실험 시 사용되었던 것과 동일한 시료를 사용하였다.

나) 시약 및 기기

주름개선효과 관련 실험으로서 Collagen assay kit는 Biocolor Ltd에서 구입하여 사용하였으며, Elastase(Type 3), N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 또한 Fibroblast 배양을 위한 시약으로서 Minimum Essential Medium Eagle에 5% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였으며 각기 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 Rotary centrifuge(Hitachi, Japan), Microscope(Olympus, Japan), CO₂ incubator(Hanbaek Scientific Co., Korea), ELISA reader(Bio Rad, Japan) 등을 사용하여 측정하였다.

2) 주름개선효과 실험

가) Fibroblast activity test를 통한 *in vitro* 주름개선 효과 측정

이 실험은 fibroblast 활성에 의하여 콜라겐 생성을 변화시켜 주름개선효과가 있는지 여부를 확인하는 시험이다. 이 실험에는 신생아 피부에서 분리한 정상사람의 섬유아세포 (Normal human fibroblast ; NHF)를 사용하였다. 시험방법은 6개의 well을 가진 plate에 동일한 수의 NHF를 24시간 배양한 후 시료를 5 μ M내지 10 μ M로 처리한 후 24시간에서 48시간 배양하였다. 콜라겐의 양은 collagen assay kit를 이용하여 흡광도 540nm에서 값을 측정하여 합성된 콜라겐 양을 계산하였고, 그 값은 단백질 양으로 보정하였다.

나) Elastase activity inhibition test

Elastase 활성 저해실험은 사람의 백혈구 엘라스타제 대신 porcine pancreatic

elastase(PPE)를 이용하여 억제율에 대한 시험을 하였다. PPE가 기질인 N-Succ-(Ala)₃- μ -nitroanilide를 분해하면 μ -nitroanylnine을 만드는데 이것이 노란색으로 발색하게 한다. 이 발색 정도를 흡광도로 측정하여 PPE 저해율을 계산하였다. 추출물에 대한 PPE 저해율을 측정하기 위하여 효소와 반응억제제를 37℃, 15분 pre-incubation 시킨 후 기질을 투입하고 다시 37℃, 20분 반응시킨다. 이를 각각의 시료에 투입하여 1분 간격으로 반응시키고, 20분 후 400nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{PPE-inhibiting activity (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

A : 저해제 무첨가군의 흡광도

B : 저해제 첨가군의 흡광도

3) 결과

가) Fibroblast activity test

추출물의 콜라겐 합성율을 확인할 수 있는 섬유아세포 증식효과를 통하여 주름개선효과를 시험하였다. 이는 섬유아세포 증식효과에 따른 피부 상태의 변화 즉, 주름개선 효과를 *in vitro*상에서 알아보기 위한 것이다. 시험결과 콜라겐 합성은 추출물 농도의 증가에 따라 조금씩 증가됨을 확인할 수 있었으며 Fig. 7에 그 결과를 나타내었다.

나) Elastase activity inhibition test

Fig. 8은 각질층의 엘라스틴을 분해하는 효소인 엘라스타제 활성을 저해하는 효과를 시험한 결과이다. 추출물의 엘라스타제 활성 저해능을 시험하여 피부 탄력에 효과가 있는지를 *in vitro* 방법으로 측정한 결과로써, 실험결과 추출물 농도에 따라 엘라스타제 활성 저해능도 증가됨을 확인할 수 있었다.

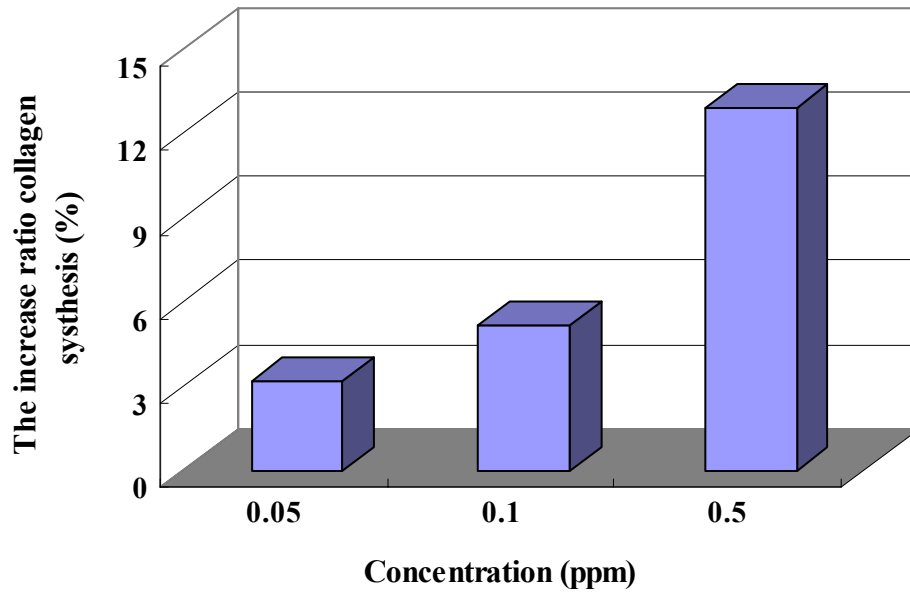


Fig. 7. 추출물 농도별 collagen 합성을

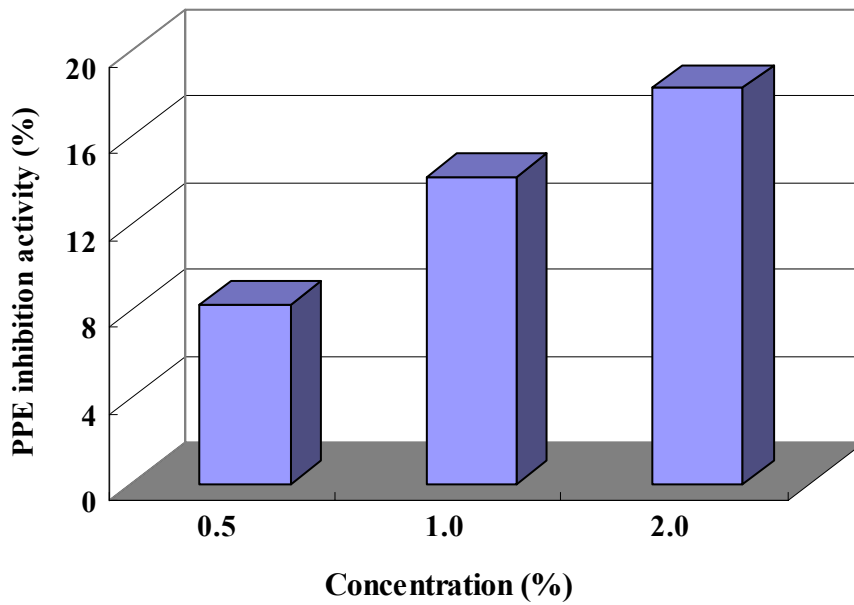


Fig. 8. 추출물 농도별 PPE 저해율

마. 자극성 TEST

1) 인체 첩포 시험

추출물이 인체에 자극이 있는지 여부를 확인하기 위하여 인체 첩포실험을 통하여 피부 자극 여부를 확인하였다. 우선 8mm fin chamber에 disk를 얹은 후 시험 추출물은 0.015ml 씩 하여 실험을 하였다. Micropore tape가 부착된 첩포를 시험참가자의 전박부에 24시간 동안 부착하고, 첩포 제거 1시간 안정 후 자극여부를 판독하였고, 2차 첩포시험은 48시간 부착한 후 제거하여 판독을 하였다. 피부자극 판정기준은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. 피부자극 판정 기준

반 응 정 도	판 정 기 준
-	반응 없음
±	미세한 홍반 생성
+	약한 홍반, 부종 및 구진 생성
++	홍반, 구진 및 수포 생성
+++	대수포 생성

2) 결과

피 시험자 20명의 전박부에 시행한 추출물 인체 첩포시험의 결과, 추출물에 대한 알려지 반응이나 기타 다른 자극은 관찰되지 않았으며, Table 2에 그 결과를 나타내었다.

Table 2. 인체 첩포시험 결과

자극정도	24 hrs					48 hrs				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
반응결과 (명)	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0

2. 추출물의 제형안정화 및 Pilot 제조 실험

가. 안정화 실험

1) 추출물별 안정화 check

추출물 원료를 농도별(0.01, 0.05, 0.1, 0.5%(w/w)), 온도별(5℃, 25℃, 40℃, 50℃, Cycle)로 일정기간 안정도 실험을 실시하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 실험결과 추출물 원료는 고온조건에서 시간이 지남에 따라 성상의 변화가 가속화됨을 확인할 수 있었다. 따라서 추출물 농도를 0.1%(w/w)로 하여 이에 안정화제 A, B, C를 각각 첨가하거나 혼합하여 안정성을 재실험 하였다(Table 4). 이 결과를 바탕으로 추출물 0.1%에 안정화제 A와 B를 혼합하여 원료 제형화 실험을 진행하였다.

2) 제형 안정도 실험

추출물 원료 안정화 실험을 통하여 추출물의 함량 0.1%에 안정화제 A와 B를 첨가한 원료에 대한 제형실험 및 제형 내의 안정도 실험을 하였다. 제형 내 안정도 실험은 우선 원료의 안정화 실험조건과 유사한 스킨로션을 비롯하여 밀크로션, 에센스, 크림제형으로 진행하였으며, 각 온도별(5℃, 25℃, 40℃, 50℃, cycle)로 일정기간 성상의 변화를 확인하였다.

또한 안정도 실험에서 진행하였던 각 제형의 처방은 Table 5~8에서 각각 나타내었다. 제형실험 후 일정기간의 안정도를 확인한 결과, 고온에서 변색 및 성상의 분리현상이 발견됨을 확인할 수 있었다. 스킨로션과 크림의 경우는 제형 내 안정화제(유화제, 향산화제 등) 함량을 조절하는 실험을 추가적으로 진행하여 제형의 안정도를 다시 확인하였다. 그 결과, 일정기간 동안 안정한 제형을 확보할 수 있었다(Table 9).

Table 3. 추출물 원료의 조건별 안정화 실험

농도(%)	온도	성상	1일	1주일	1개월	2개월	3개월
0.01	5℃	pH	5.60	5.65	5.67	5.70	5.68
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.60	5.65	5.70	5.72	5.80
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	pH	5.60	5.68	5.67	5.80	6.05
		성상	양호	양호	양호	미변색	변색
50℃	pH	5.60	5.86	6.12	-	-	
	성상	양호	양호	변색	-	-	
CYCLE	pH	5.60	5.63	5.73	5.82	5.85	
성상	양호	양호	양호	양호	미변색	미변색	
0.05	5℃	pH	5.52	5.50	5.55	5.70	5.71
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.52	5.58	5.70	5.87	5.94
		성상	양호	양호	양호	양호	미변색
	40℃	pH	5.52	5.61	5.93	6.18	6.31
		성상	양호	양호	미변색	변색	변색
50℃	pH	5.52	5.81	6.08	-	-	
	성상	양호	양호	변색	-	-	
CYCLE	pH	5.52	5.60	5.69	5.90	5.95	
성상	양호	양호	양호	양호	미변색	미변색	
0.1	5℃	pH	5.25	5.55	5.57	5.64	5.67
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.25	5.56	5.52	5.69	5.74
		성상	양호	양호	양호	미변색	미변색
	40℃	pH	5.25	5.51	5.77	5.80	6.05
		성상	양호	양호	미변색	변색	변색
50℃	pH	5.25	5.91	6.04	-	-	
	성상	양호	미변색	변색	-	-	
CYCLE	pH	5.25	5.54	5.57	5.76	6.35	
성상	양호	양호	양호	양호	미변색	변색	
0.5	5℃	pH	5.52	5.53	5.50	5.62	5.60
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.52	5.52	5.63	5.68	5.91
		성상	양호	양호	양호	양호	미변색
	40℃	pH	5.52	5.65	5.75	6.12	6.07
		성상	양호	양호	미변색	변색	변색
50℃	pH	5.52	5.81	6.32	-	-	
	성상	양호	미변색	변색	-	-	
CYCLE	pH	5.52	5.60	5.71	5.95	6.09	
성상	양호	양호	양호	미변색	변색	변색	

Table 4. 안정화제에 따른 원료의 안정화 실험

	온도	성상	1일	1주일	1개월	2개월	3개월
안정화제 A	5℃	pH	5.00	4.98	4.98	4.96	4.97
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.00	5.00	4.99	4.95	4.96
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	pH	5.00	5.00	4.97	4.94	4.89
		성상	양호	양호	양호	양호	미변색
	50℃	pH	5.00	4.99	4.96	4.90	-
		성상	양호	양호	양호	양호	미변색
CYCLE	pH	5.00	4.98	4.99	4.93	4.89	
	성상	양호	양호	양호	양호	미변색	
안정화제 B	5℃	pH	5.55	5.58	5.60	5.62	5.61
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.55	5.57	5.58	5.61	5.61
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	pH	5.55	5.57	5.63	5.71	5.74
		성상	양호	양호	양호	미변색	변색
	50℃	pH	5.55	5.58	5.70	5.72	5.74
		성상	양호	양호	변색	변색	변색
CYCLE	pH	5.55	5.60	5.63	5.63	5.62	
	성상	양호	양호	양호	양호	미변색	
안정화제 C	5℃	pH	5.58	5.55	5.57	5.60	5.58
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.58	5.56	5.52	5.69	5.74
		성상	양호	양호	양호	미변색	미변색
	40℃	pH	5.58	5.59	5.77	5.88	6.05
		성상	양호	미변색	변색	변색	변색
	50℃	pH	5.58	5.81	6.00	-	-
		성상	양호	변색	변색	-	-
CYCLE	pH	5.58	5.54	5.57	5.61	5.73	
	성상	양호	양호	양호	미변색	변색	
안정화제 A+B	5℃	pH	5.10	5.11	5.15	5.14	5.17
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.10	5.13	5.16	5.17	5.23
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	pH	5.10	5.16	5.24	5.41	5.50
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	50℃	pH	5.10	5.23	5.46	5.68	5.88
		성상	양호	양호	양호	미변색	미변색
CYCLE	pH	5.10	5.18	5.24	5.33	5.38	
	성상	양호	양호	양호	양호	양호	

Table 5. 유연화장수 (스킨 로션)

성 분	함량 (중량 %)
낙엽송 추출물	0.1
폴리옥시에칠렌경화피마자유	0.5
글리신	3.0
디포타슘글리시리제이트	0.1
1,3-부틸렌 글리콜	3.0
소듐히아루로네이트	0.1
에탄올	5.0
항산화제	0.1
트리에탄올아민	0.1
EDTA-2Na	0.1
방부제	적량
정제수	잔량

Table 6. 영양화장수(밀크 로션)

성 분	함량 (중량 %)
낙엽송 추출물	0.1
글리세린	7.0
소르비탄스테아레이트, 슈크로오즈코코에이트	2.0
미네랄 오일	4.0
트리옥타노인	1.0
스테아릭에씨드	1.0
글리세릴 스테아레이트	0.5
소르비탄모노스테아레이트	1.0
디메치콘	0.5
항산화제	0.3
트리에탄올아민	0.1
카보머	0.2
EDTA-2Na	0.1
방부제	적량
정제수	잔량

Table 7. 에센스

성 분	함량 (중량 %)
낙엽송 추출물	0.1
글리세린	5.0
1,3-부틸렌 글리콜	2.0
폴리에틸렌 글리콜	2.0
카보머	1.0
소듐히아루로네이트	0.1
글리신	3.0
폴리아크릴아마이드	2.0
히드록시에틸셀룰로오스	0.2
에탄올	3.0
폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
향산화제	0.3
트리에탄올아민	0.1
EDTA-2Na	0.1
방부제	적량
정제수	잔량

Table 8. 크림

성 분	함량 (중량 %)
낙엽송 추출물	0.1
1,3-부틸렌글리콜	3.0
글리세린	3.0
하이드로제네이티드, 레시친	1.0
옥틸도데카놀	3.0
트리옥타노인	2.0
스테아릭에씨드	1.5
세토스테아릴알콜	2.0
폴리솔베이트 60	1.5
소르비탄세스퀴올레이트	2.0
디메치콘	3.0
향산화제	0.3
산탄검	0.2
트리에탄올아민	0.1
EDTA-2Na	0.1
방부제	적량
정제수	잔량

Table 9. 제형별 안정도 실험

제형	온도	성 상				
		1일	1주일	1개월	2개월	3개월
스킨로션	5℃	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	양호	양호	양호	양호	양호
	50℃	양호	양호	양호	양호	양호
	CYCLE	양호	양호	양호	양호	양호
밀크로션	5℃	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	양호	양호	양호	양호	양호
	50℃	양호	양호	양호	양호	미변색
	CYCLE	양호	양호	양호	양호	양호
에센스	5℃	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	양호	양호	양호	양호	양호
	50℃	양호	양호	양호	미변색	미변색
	CYCLE	양호	양호	양호	양호	양호
크림	5℃	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	양호	양호	양호	양호	미변색
	50℃	양호	양호	양호	미변색	미변색
	CYCLE	양호	양호	양호	양호	양호

나. Pilot 제조 실험

1) Pilot TEST

제형 안정도 실험을 통하여 확보한 안정한 제형 처방을 바탕으로 Pilot 제조를 실시하였다. 제조는 스킨, 로션, 에센스, 크림에 대하여 각각 실시하였으며 제조 설비는 한국콜마(주) 내 CGMP 생산설비를 이용하였다. 또한 이를 이용하여 시제품 및 제품의 효능 평가용 제품을 제조하여 제품 효능 평가에 대한 추가 실험 및 품평을 실시하였다(시제품 4종).



Fig. 9. 스킨 로션과 크림 시제품 사진



Fig. 10. 밀크 로션과 에센스 시제품 사진

3. 제품의 효능 평가

가. 피시험자 선정 및 제품 적용

피부 내 주름개선 효과를 측정하기 위해 Visiometer를 이용하여 추출물 0.1%를 함유한 크림제형의 주름개선 효과를 측정하였으며 전문가의 육안관정을 통해 실험 결과를 보정하였다. 실험은 총 지원자 중 자체 선정기준에 의해 본 실험에 적합하다고 판정된 36세에서 52세까지의 여성 21에게 이루어졌으며 각각 11명, 10명의 두 그룹(A, B)으로 나누고 A 그룹에는 오른쪽 눈가에 실험제품을, 왼쪽 눈가에 대조제품을 도포하였으며, B 그룹에는 오른쪽 눈가에 대조제품을, 왼쪽 눈가에 실험제품을 도포하였다. 도포는 하루에 2회 적정량을 피시험자가 바르도록 유도하였다.

시험기간은 총 8주로 2005년 3월 23일부터 5월 18일까지 진행하였다. 피시험자는 시험기간 중 총 4회(시험 시작 전, 4주 경과, 6주 경과, 8주 경과) 피부상태를 측정하였으며 시험기간 내 시험결과에 영향을 줄 수 있는 아이크림, 영양크림, 에센스, 기타 노화방지용 화장품의 사용 등을 금지하였으며, 팩이나 피부 마사지 등도 금지하였다.

나. 사용감 설문 평가

첫 방문 시, 제품 사용 4주, 6주, 8주 후에 각각 피시험자를 대상으로 대조제품과 시험제품의 일반적인 평가(사용감), 효능성(주름개선) 평가(변화 없음(no change:0), 경미(mild:1), 양호(good:2), 현저(excellent:3)), 화장품 적합성 평가, 안전성 평가, 제품에 대한 호감도 등을 설문 조사하였다. 설문은 방문 시(첫 방문, 제품사용 4주, 6주, 8주)마다 작성하였다.

다. 주름 효과 측정

1) 주름개선 효과 실험

가) Image analyzer 분석을 통한 피부주름 평가

피시험자의 방문시 지정된 눈가 부위에서 모사판을 제작하여 이를 측정하였다. 측정장비로는 Visiometer(Skin-Visiometer SV600, Courage-Khazaka, Germany)를 사용

하였으며 측정된 결과 역시 기기 자체 software를 이용하여 분석하였다. 분석 원리는 인공 광원에서 방출된 빛이 실리콘 재질을 투과하면서 생기는 빛의 Intensity를 Lambert&Beer's Law에 의해 분석하여 피부주름 개선정도를 측정한다.

나) 화상 사진

전문가에 의한 육안 판정과 더불어 화상사진을 통하여 육안 판정 결과의 보조적인 방법으로 화상사진을 촬영하였다. 주름 촬영용 안면 고정장비세트 및 조명세트와 고해상도 디지털 카메라(Olympus, Japan)를 이용하여 실내조명의 밝기가 동일한 조건에서 화상사진을 촬영하였다. 표준화를 위하여 사진촬영은 동일 연구자가 시행하였으며 특수 제작된 장비를 통하여 촬영 조건을 고정하여 측정하였다.

라. 통계분석 방법

육안평가는 independent t-test를 통해 대조제품과 시험제품 간의 유의성 여부를 가설평균 차 5% ($p < 0.05$)로 확인하였다. Visiometer를 이용한 주름 parameter인 대조제품과 시험제품의 R1, R2, R3, R4, R5에 대한 각각의 $\Delta R1$, $\Delta R2$, $\Delta R3$, $\Delta R4$, $\Delta R5$ 값을 independent t-test를 통해 대조제품과 시험제품 간의 유의성 여부를 가설평균 차 5% ($p < 0.05$)로 확인하였다. 피시험자에 의한 주관적 설문평가 중 주름개선에 대한 효능 평가는 independent t-test를 통해 대조제품과 시험제품 간의 유의성 여부를 가설평균 차 5% ($p < 0.05$)로 확인하였다. 또한 대조제품과 시험제품의 사용감 및 피부개선(부드러움, 매끄러움, 밝고 생기 있음, 촉촉함, 탄력감, 피부표면변화, 피부주름개선효과, 피부주름 개선 시기)에 대한 평가는 기술통계학(Descriptive statistics)적 방법을 이용하였다. 이 모든 통계를 위한 분석프로그램은 SPSS version 10.0 software를 이용하였다.

마. 결과

1) 사용감 설문 평가 결과

사용 기간별(4주, 6주, 8주) 사용감에 대한 설문 조사를 실시하였으며 결과는 8주 사용 시의 대조제품과 실험제품 간의 사용감 조사를 Table 10, Table 11로 나타내었

다.

Table 10. 사용감 8주차 설문(대조제품)

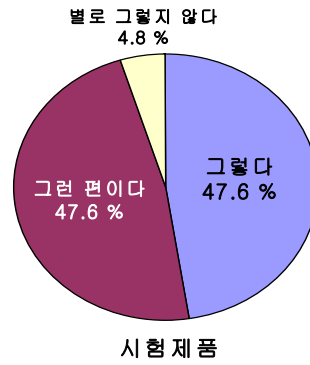
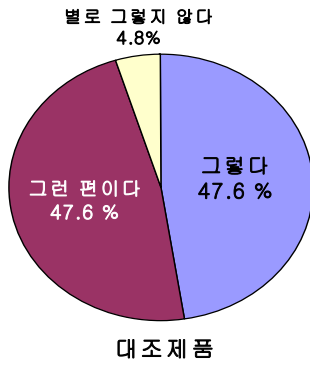
대조제품 (오른쪽 눈가)									
피시 험자	부드러 움	매끄러 움	윤기	밝고 생기 있음	촉촉함	탄력감	피부 표면 변화	피부 주름 개선 효과	피부 주름 개선 시기
1	2	2	2	3	2	3	3	2	2
2	1	1	1	1	1	2	2	3	3
3	1	1	1	1	1	2	1	3	1
4	2	2	3	3	2	3	3	2	3
5	2	2	2	2	2	2	3	2	4
6	1	1	2	1	1	2	2	2	3
7	1	1	2	2	2	2	2	2	3
8	2	2	2	2	2	1	2	2	4
9	1	2	3	3	2	3	2	3	2
10	2	2	3	3	2	3	3	2	4
11	1	1	2	3	2	2	2	2	4
대조제품 (오른쪽 눈가)									
피시 험자	부드러 움	매끄러 움	윤기	밝고 생기 있음	촉촉함	탄력감	피부 표면 변화	피부 주름 개선 효과	피부 주름 개선 시기
12	1	1	1	1	1	1	1	3	2
13	2	2	3	3	1	4	4	1	-
14	1	1	1	1	1	1	1	3	2
15	1	1	1	1	1	1	1	3	2
16	3	3	3	3	2	3	3	2	3
17	1	1	2	2	1	1	2	2	3
18	2	2	2	2	1	2	1	3	3
19	2	1	2	2	1	2	2	2	3
20	2	2	3	3	2	3	3	2	4
21	2	2	2	2	1	1	1	3	4

Table 11. 사용감 8주차 설문(시험제품)

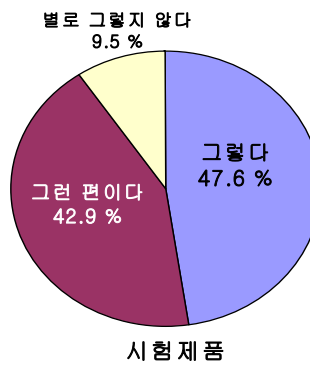
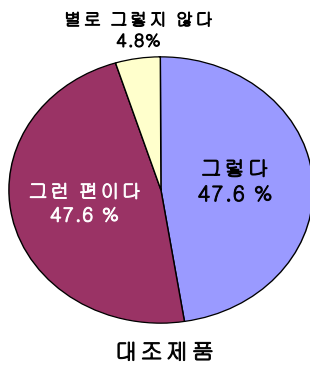
피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)							피부표면 변화	피부 주름 개선 효과	피부 주름 개선 시기
	부드러 움	매끄러 움	윤기	밝고 생기 있음	촉촉함	탄력감				
1	2	2	2	3	2	3	3	2	2	
2	1	1	1	1	1	2	2	3	3	
3	1	1	1	1	1	2	1	3	1	
4	2	2	3	3	2	3	3	2	3	
5	2	2	2	2	2	2	3	2	4	
6	1	1	2	1	1	2	2	2	3	
7	1	1	2	2	2	2	2	2	3	
8	2	2	2	2	2	1	2	3	4	
9	1	2	3	3	2	3	2	3	2	
10	2	3	2	3	2	3	3	2	4	
11	1	1	2	3	2	2	2	2	4	
피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)							피부표면 변화	피부 주름 개선 효과	피부 주름 개선 시기
	부드러 움	매끄러 움	윤기	밝고 생기 있음	촉촉함	탄력감				
12	1	1	1	1	1	1	1	3	2	
13	2	2	3	3	1	4	4	1	-	
14	2	2	2	2	2	2	2	3	2	
15	1	1	1	1	1	1	1	3	2	
16	3	3	3	3	2	3	3	2	3	
17	1	1	1	2	1	1	2	2	3	
18	1	1	2	2	1	2	1	2	2	
19	2	1	2	2	1	2	2	2	4	
20	2	2	3	3	2	3	3	2	4	
21	2	2	2	2	1	1	1	3	4	

8주차 피시험자의 사용감 설문 조사를 바탕으로 한 결과는 다음과 같다.

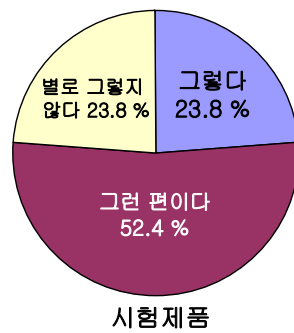
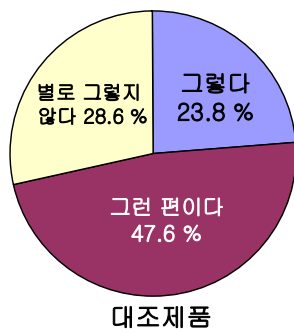
질문 1. 피부가 부드러워졌습니까?



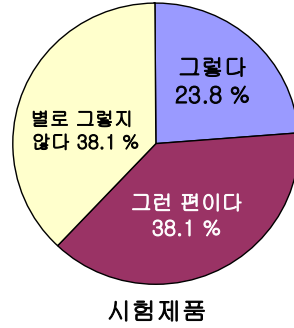
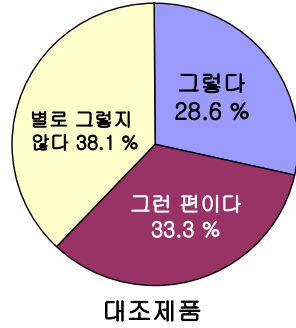
질문 2. 피부가 매끄러워 졌습니까?



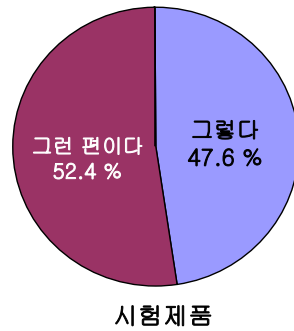
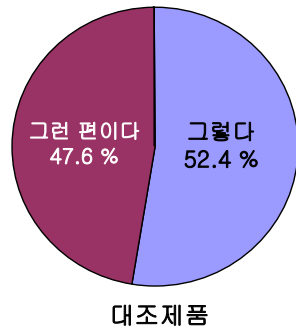
질문 3. 피부 윤기가 증가하였습니까?



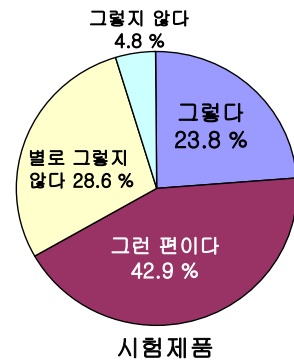
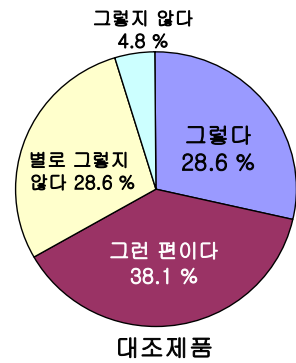
질문 4. 얼굴을 밝고 생기 있게 해줍니까?



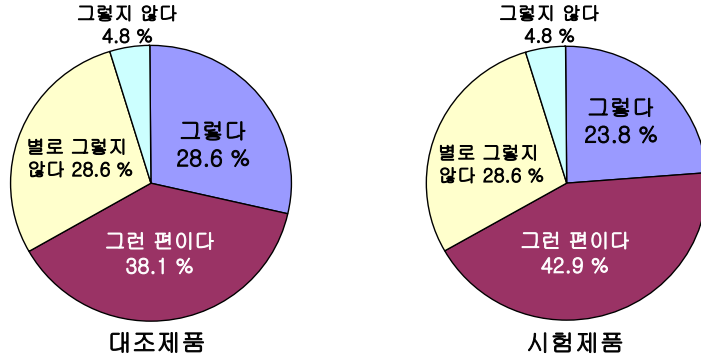
질문 5. 피부가 축축해 지셨습니까?



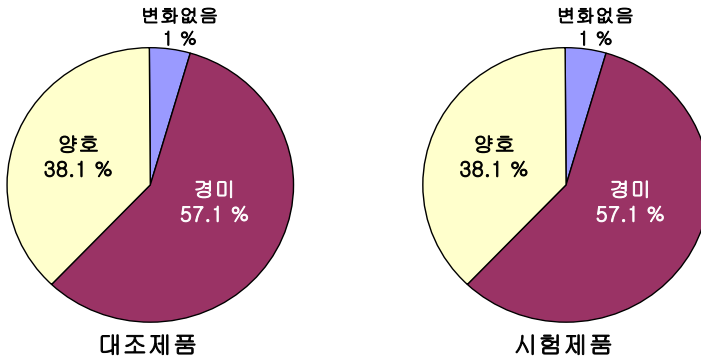
질문 6. 피부 탄력감에 대한 변화는 느끼셨습니까?



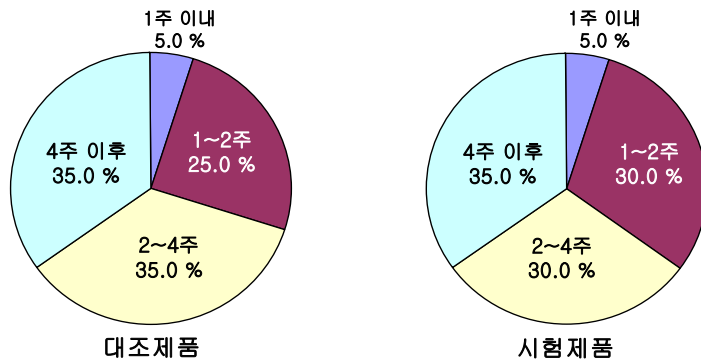
질문 7. 피부 표면에 대한 변화를 느끼셨습니까?



질문 8. 피부 주름에 대한 효과는 느끼셨습니까?



질문 9. 피부 주름에 대한 효과를 처음 느낀 시기는?



실제적으로 비전문가인 피시험자가 시험기간 내 사용하였을 경우 주관적인 판단에 근거하여 설문에 답하였기 때문에 대조제품과 시험제품 간의 효과의 차이를 정확히

판단하기에 무리가 있다고 판단하였다.

2) 화상사진 분석

피시험자 대한 화상분석 결과를 Fig. 11~31에 나타내었다. 또한 화상분석을 위해 전문가의 도움을 받아 이를 바탕으로 분석결과를 해석하였다.

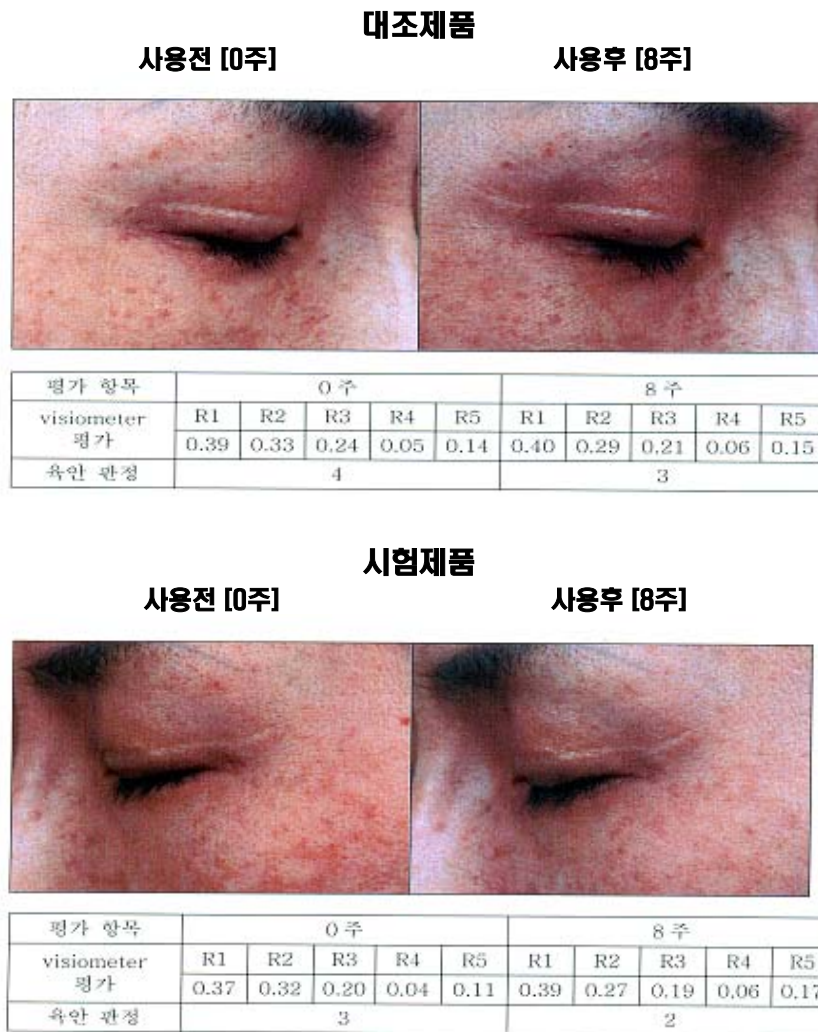
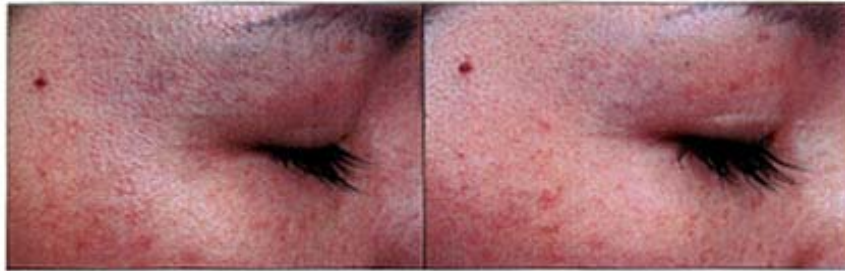


Fig. 11. 피시험자 1의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.42	0.24	0.18	0.07	0.20	0.35	0.24	0.17	0.05	0.17
육안 관찰	3					2				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.50	0.33	0.19	0.07	0.20	0.41	0.23	0.18	0.08	0.22
육안 관찰	3					2				

Fig. 12. 피시험자 2의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.34	0.25	0.18	0.05	0.13	0.43	0.28	0.20	0.07	0.19
육안 판정	4					4				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.41	0.29	0.20	0.05	0.17	0.46	0.28	0.19	0.08	0.21
육안 판정	4					4				

Fig. 13. 피시험자 3의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.42	0.34	0.22	0.05	0.16	0.47	0.30	0.21	0.08	0.20
육안 판정	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.50	0.27	0.19	0.10	0.24	0.42	0.30	0.21	0.06	0.17
육안 판정	4					3				

Fig. 14. 피시험자 4의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.40	0.29	0.20	0.06	0.14	0.35	0.31	0.21	0.04	0.10
육안 판정	4					4				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



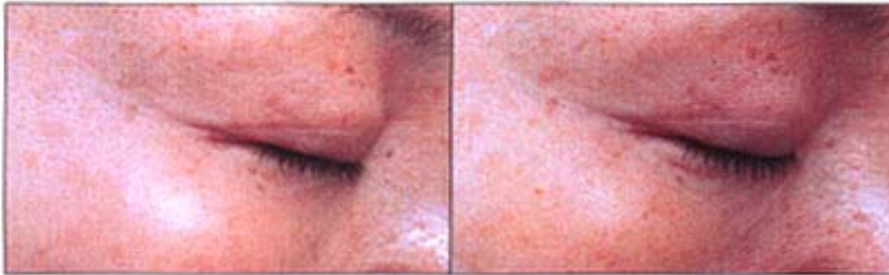
평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.47	0.27	0.20	0.08	0.21	0.33	0.26	0.18	0.04	0.13
육안 판정	4					3				

Fig. 15. 피시험자 5의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.50	0.32	0.23	0.08	0.23	0.50	0.30	0.21	0.08	0.25
육안 관찰	4					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.49	0.30	0.21	0.08	0.27	0.37	0.24	0.17	0.06	0.17
육안 관찰	4					3				

Fig. 16. 피시험자 6의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.37	0.30	0.21	0.05	0.14	0.40	0.27	0.20	0.06	0.20
육안 판정	4					4				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.48	0.32	0.20	0.07	0.21	0.39	0.29	0.20	0.05	0.15
육안 판정	4					3				

Fig. 17. 피시험자 7의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.54	0.30	0.20	0.10	0.27	0.54	0.31	0.20	0.09	0.28
육안 관찰	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.38	0.30	0.20	0.05	0.16	0.36	0.26	0.19	0.06	0.16
육안 관찰	3					3				

Fig. 18. 피시험자 8의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.40	0.27	0.19	0.06	0.17	0.36	0.27	0.20	0.05	0.16
육안 판정	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



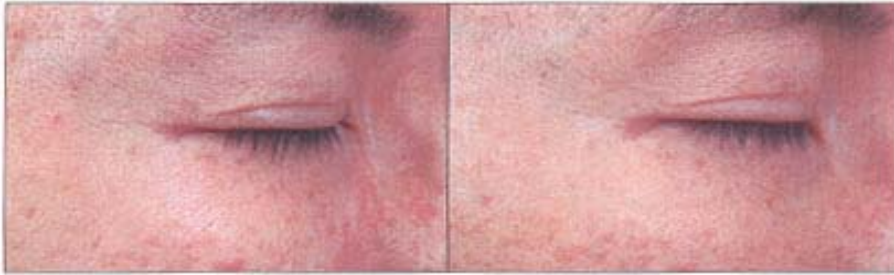
평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.45	0.28	0.21	0.07	0.21	0.51	0.28	0.20	0.10	0.27
육안 판정	3					3				

Fig. 19. 피시험자 9의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.53	0.30	0.21	0.13	0.24	0.49	0.31	0.21	0.07	0.23
육안 관찰	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.41	0.32	0.22	0.06	0.18	0.31	0.26	0.18	0.04	0.12
육안 관찰	3					2				

Fig. 20. 피시험자 10의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.38	0.29	0.21	0.05	0.17	0.38	0.28	0.19	0.05	0.15
육안 판정	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.47	0.37	0.22	0.06	0.25	0.33	0.23	0.17	0.04	0.15
육안 판정	3					3				

Fig. 21. 피시험자 11의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.55	0.37	0.21	0.08	0.21	0.39	0.23	0.16	0.07	0.18
육안 판정	5					5				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.49	0.34	0.22	0.07	0.21	0.44	0.26	0.18	0.07	0.22
육안 판정	5					4				

Fig. 22. 피시험자 12의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]

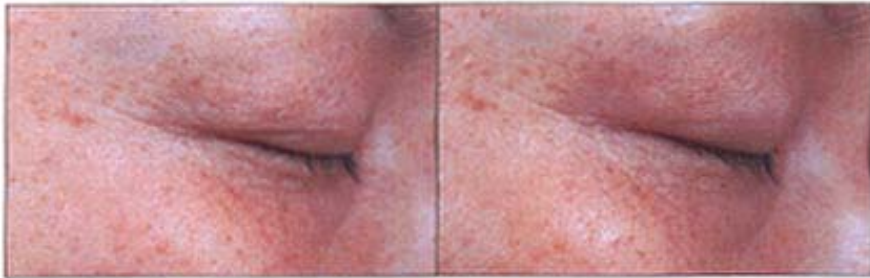


평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.61	0.28	0.20	0.12	0.30	0.43	0.24	0.17	0.08	0.22
육안 관찰	4					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.33	0.25	0.18	0.05	0.14	0.30	0.22	0.17	0.05	0.14
육안 관찰	4					3				

Fig. 23. 피시험자 13의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.45	0.27	0.19	0.08	0.22	0.44	0.26	0.19	0.07	0.22
육안 판정	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.48	0.27	0.20	0.09	0.25	0.48	0.26	0.18	0.08	0.21
육안 판정	3					3				

Fig. 24. 피시험자 14의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.51	0.31	0.20	0.09	0.24	0.47	0.30	0.21	0.08	0.20
육안 관정	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.41	0.21	0.16	0.07	0.22	0.29	0.24	0.15	0.03	0.10
육안 관정	4					3				

Fig. 25. 피시험자 15의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.41	0.33	0.24	0.06	0.15	0.57	0.34	0.25	0.09	0.27
육안 판정	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.55	0.34	0.25	0.10	0.27	0.53	0.34	0.23	0.08	0.24
육안 판정	3					2				

Fig. 26. 피시험자 16의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.22	0.19	0.14	0.03	0.09	0.33	0.24	0.17	0.05	0.14
육안 관찰	4					4				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.45	0.27	0.16	0.09	0.15	0.34	0.18	0.14	0.07	0.14
육안 관찰	4					3				

Fig. 27. 피시험자 17의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.37	0.25	0.17	0.05	0.17	0.37	0.23	0.17	0.06	0.19
육안 판정	4					4				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
visiometer 평가	0.54	0.28	0.19	0.12	0.29	0.52	0.27	0.20	0.12	0.29
육안 판정	4					3				

Fig. 28. 피시험자 18의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.36	0.23	0.16	0.06	0.19	0.26	0.22	0.16	0.03	0.11
육안 관찰	3					2				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



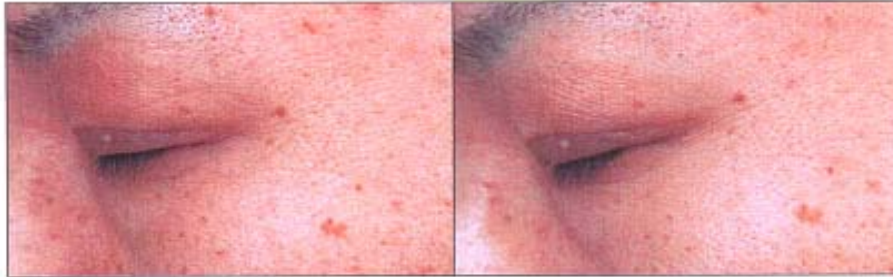
평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.55	0.25	0.18	0.12	0.27	0.34	0.23	0.17	0.06	0.18
육안 관찰	3					2				

Fig. 29. 피시험자 19의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.41	0.31	0.22	0.07	0.18	0.35	0.27	0.21	0.05	0.15
육안 관찰	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.42	0.31	0.24	0.06	0.19	0.40	0.28	0.21	0.06	0.19
육안 관찰	3					3				

Fig. 30. 피시험자 20의 화상분석 사진.

대조제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.40	0.28	0.19	0.05	0.19	0.42	0.27	0.20	0.06	0.22
육안 관찰	3					3				

시험제품

사용전 [0주]

사용후 [8주]



평가 항목	0 주					8 주				
visiometer 평가	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
	0.48	0.30	0.18	0.09	0.18	0.40	0.22	0.17	0.08	0.19
육안 관찰	3					3				

Fig. 31. 피시험자 21의 화상분석 사진.

가) Visiometer에 의한 화상분석

피시험자에 대한 제품 사용 전과 제품 사용 4주, 6주, 8주 후 모사판 화상분석 결과는 Table 12, Table 13, Table 14, Table 15에 각각 나타내었다. 또한 제품 사용 기간 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상분석 변화 결과에 대하여는 Table 16, Table 17, Table 18에 나타내었으며 이에 따른 변화 결과를 주수별로 정리하면 Fig. 32, Fig. 33, Fig. 34와 같다. Table 18과 Fig. 34의 시험 8주 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상분석 변화에 대한 통계분석 결과 R3에서 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$)의 차이가 발생함을 확인하였기 때문에 시험제품이 대조제품에 비하여 주름개선 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 여기서 R3값은 Average Roughness를 의미하며 즉 평균적으로 주름의 깊이에 관련된 직접적인 Parameter이므로 R3값이 통계적으로 유의하게 측정되었다는 것은 개선 효과 차이가 있다는 것을 의미하였다.

Table 12. 제품 사용 전 모사판 화상분석 결과

피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)					시험제품 (왼쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	0.39	0.33	0.24	0.05	0.14	0.37	0.32	0.20	0.04	0.11
2	0.42	0.24	0.18	0.07	0.20	0.50	0.33	0.19	0.07	0.20
3	0.34	0.25	0.18	0.05	0.13	0.41	0.29	0.20	0.05	0.17
4	0.42	0.34	0.22	0.05	0.16	0.50	0.27	0.19	0.10	0.24
5	0.40	0.29	0.20	0.06	0.14	0.47	0.27	0.20	0.08	0.21
6	0.50	0.32	0.23	0.08	0.23	0.49	0.30	0.21	0.08	0.27
7	0.37	0.30	0.21	0.05	0.14	0.48	0.32	0.20	0.07	0.21
8	0.54	0.30	0.20	0.10	0.27	0.38	0.30	0.20	0.05	0.16
9	0.40	0.27	0.19	0.06	0.17	0.45	0.28	0.21	0.07	0.21
10	0.53	0.30	0.21	0.13	0.24	0.41	0.32	0.22	0.06	0.18
11	0.38	0.29	0.21	0.05	0.17	0.47	0.37	0.22	0.06	0.25
피시험자	대조제품 (왼쪽 눈가)					시험제품 (오른쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
12	0.55	0.37	0.21	0.08	0.21	0.49	0.34	0.22	0.07	0.21
13	0.61	0.28	0.20	0.12	0.30	0.33	0.25	0.18	0.05	0.14
14	0.45	0.27	0.19	0.08	0.22	0.48	0.27	0.20	0.09	0.25
15	0.51	0.31	0.20	0.09	0.24	0.41	0.21	0.16	0.07	0.22
16	0.41	0.33	0.24	0.06	0.15	0.55	0.34	0.25	0.10	0.27
17	0.22	0.19	0.14	0.03	0.09	0.45	0.27	0.16	0.09	0.15
18	0.37	0.25	0.17	0.05	0.17	0.54	0.28	0.19	0.12	0.29
19	0.36	0.23	0.16	0.06	0.19	0.55	0.25	0.18	0.12	0.27
20	0.41	0.31	0.22	0.07	0.18	0.42	0.31	0.24	0.06	0.19
21	0.40	0.28	0.19	0.05	0.19	0.48	0.30	0.18	0.09	0.18
평균	0.43	0.29	0.20	0.07	0.19	0.46	0.29	0.20	0.08	0.21
표준편차	0.09	0.04	0.02	0.02	0.05	0.06	0.04	0.02	0.02	0.05

Table 13. 제품 사용 4주 후 모사관 화상분석 결과

피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)					시험제품 (왼쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	0.44	0.30	0.22	0.07	0.20	0.30	0.22	0.16	0.04	0.13
2	0.36	0.30	0.21	0.04	0.14	0.40	0.28	0.19	0.05	0.18
3	0.39	0.26	0.18	0.08	0.17	0.49	0.29	0.22	0.08	0.24
4	0.54	0.36	0.23	0.07	0.23	0.41	0.26	0.19	0.06	0.17
5	0.40	0.33	0.21	0.06	0.13	0.56	0.32	0.22	0.11	0.24
6	0.40	0.26	0.19	0.06	0.18	0.46	0.25	0.18	0.09	0.27
7	0.38	0.29	0.19	0.05	0.15	0.41	0.30	0.20	0.05	0.17
8	0.51	0.27	0.19	0.10	0.26	0.40	0.24	0.18	0.07	0.20
9	0.44	0.26	0.20	0.08	0.23	0.47	0.29	0.22	0.08	0.24
10	0.53	0.30	0.22	0.10	0.25	0.43	0.28	0.20	0.07	0.19
11	0.45	0.35	0.22	0.06	0.18	0.35	0.28	0.20	0.04	0.13
피시험자	대조제품 (왼쪽 눈가)					시험제품 (오른쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
12	0.56	0.27	0.20	0.11	0.30	0.43	0.27	0.19	0.06	0.21
13	0.50	0.25	0.18	0.10	0.27	0.37	0.27	0.19	0.05	0.16
14	0.44	0.24	0.18	0.08	0.25	0.36	0.22	0.16	0.06	0.19
15	0.40	0.28	0.20	0.06	0.18	0.49	0.25	0.18	0.09	0.25
16	0.37	0.29	0.21	0.05	0.16	0.51	0.31	0.22	0.08	0.24
17	0.31	0.26	0.17	0.04	0.11	0.40	0.24	0.17	0.07	0.19
18	0.34	0.25	0.16	0.04	0.14	0.44	0.24	0.18	0.08	0.26
19	0.35	0.24	0.18	0.05	0.18	0.33	0.24	0.17	0.05	0.16
20	0.50	0.29	0.21	0.09	0.25	0.40	0.29	0.21	0.06	0.18
21	0.34	0.27	0.18	0.05	0.16	0.44	0.25	0.17	0.08	0.21
평균	0.43	0.28	0.20	0.07	0.20	0.42	0.27	0.19	0.07	0.20
표준편차	0.07	0.03	0.02	0.02	0.05	0.06	0.03	0.02	0.02	0.04

Table 14. 제품 사용 6주 후 모사관 화상분석 결과

피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)					시험제품 (왼쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	0.40	0.26	0.19	0.06	0.18	0.44	0.32	0.21	0.06	0.17
2	0.34	0.24	0.17	0.06	0.14	0.44	0.28	0.19	0.07	0.19
3	0.33	0.28	0.20	0.04	0.11	0.30	0.25	0.19	0.04	0.12
4	0.50	0.30	0.21	0.10	0.20	0.41	0.26	0.18	0.07	0.16
5	0.49	0.34	0.21	0.08	0.16	0.45	0.30	0.19	0.08	0.17
6	0.48	0.25	0.25	0.09	0.25	0.44	0.24	0.18	0.08	0.22
7	0.34	0.27	0.27	0.04	0.13	0.35	0.26	0.19	0.05	0.15
8	0.60	0.30	0.30	0.13	0.29	0.43	0.34	0.23	0.06	0.16
9	0.43	0.32	0.32	0.06	0.18	0.49	0.28	0.20	0.08	0.23
10	0.46	0.30	0.30	0.07	0.24	0.33	0.26	0.19	0.04	0.14
11	0.56	0.31	0.31	0.10	0.26	0.33	0.23	0.17	0.05	0.16
피시험자	대조제품 (왼쪽 눈가)					시험제품 (오른쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
12	0.43	0.27	0.18	0.08	0.18	0.42	0.27	0.18	0.06	0.21
13	0.55	0.28	0.20	0.11	0.28	0.32	0.23	0.16	0.04	0.15
14	0.34	0.21	0.15	0.06	0.18	0.41	0.22	0.16	0.09	0.20
15	0.47	0.31	0.20	0.08	0.20	0.38	0.25	0.17	0.06	0.20
16	0.35	0.25	0.19	0.06	0.14	0.46	0.30	0.22	0.07	0.19
17	0.26	0.19	0.14	0.03	0.11	0.41	0.30	0.20	0.07	0.14
18	0.55	0.30	0.22	0.10	0.27	0.38	0.30	0.21	0.04	0.15
19	0.45	0.33	0.23	0.07	0.17	0.41	0.23	0.16	0.08	0.21
20	0.62	0.41	0.27	0.10	0.27	0.43	0.30	0.23	0.06	0.19
21	0.33	0.28	0.18	0.04	0.14	0.42	0.27	0.18	0.08	0.18
평균	0.44	0.29	0.20	0.07	0.19	0.40	0.27	0.19	0.06	0.18
표준편차	0.10	0.05	0.03	0.03	0.06	0.05	0.03	0.02	0.02	0.03

Table 15. 제품 사용 8주 후 모사관 화상분석 결과

피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)					시험제품 (왼쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	0.40	0.29	0.21	0.06	0.15	0.39	0.27	0.19	0.06	0.17
2	0.35	0.24	0.17	0.05	0.17	0.41	0.23	0.18	0.08	0.22
3	0.43	0.28	0.20	0.07	0.19	0.46	0.28	0.19	0.08	0.21
4	0.47	0.30	0.21	0.08	0.20	0.42	0.30	0.21	0.06	0.17
5	0.35	0.31	0.21	0.04	0.10	0.33	0.26	0.18	0.04	0.13
6	0.50	0.30	0.21	0.08	0.25	0.37	0.24	0.17	0.06	0.17
7	0.40	0.27	0.20	0.06	0.20	0.39	0.29	0.20	0.05	0.15
8	0.54	0.31	0.20	0.09	0.28	0.36	0.26	0.19	0.06	0.16
9	0.36	0.27	0.20	0.05	0.16	0.51	0.28	0.20	0.10	0.27
10	0.49	0.31	0.21	0.07	0.23	0.31	0.26	0.18	0.04	0.12
11	0.38	0.28	0.19	0.05	0.15	0.33	0.23	0.17	0.04	0.15
피시험자	대조제품 (왼쪽 눈가)					시험제품 (오른쪽 눈가)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
12	0.39	0.23	0.16	0.07	0.18	0.44	0.26	0.18	0.07	0.22
13	0.43	0.24	0.17	0.08	0.22	0.30	0.22	0.17	0.05	0.14
14	0.44	0.26	0.19	0.07	0.22	0.48	0.26	0.18	0.08	0.21
15	0.47	0.30	0.21	0.08	0.20	0.29	0.24	0.15	0.03	0.10
16	0.57	0.34	0.25	0.09	0.27	0.53	0.34	0.23	0.08	0.24
17	0.33	0.24	0.17	0.05	0.14	0.34	0.18	0.14	0.07	0.14
18	0.37	0.23	0.17	0.06	0.19	0.52	0.27	0.20	0.12	0.29
19	0.26	0.22	0.16	0.03	0.11	0.34	0.23	0.17	0.06	0.18
20	0.35	0.27	0.21	0.05	0.15	0.40	0.28	0.21	0.06	0.19
21	0.42	0.27	0.20	0.06	0.22	0.40	0.22	0.17	0.08	0.19
평균	0.41	0.27	0.20	0.06	0.19	0.40	0.26	0.18	0.07	0.18
표준편차	0.07	0.03	0.02	0.02	0.05	0.07	0.03	0.02	0.02	0.05

Table 16. 제품 사용 4주 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상분석 변화 결과

피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)					시험제품 (왼쪽 눈가)				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
1	0.05	-0.03	-0.02	0.02	0.06	-0.07	-0.10	-0.04	0.00	0.02
2	-0.06	0.06	0.03	-0.03	-0.06	-0.10	-0.05	0.00	-0.02	-0.02
3	0.05	0.01	0.00	0.03	0.04	0.08	0.00	0.02	0.03	0.07
4	0.12	0.02	0.01	0.02	0.07	-0.09	-0.01	0.00	-0.04	-0.07
5	0.00	0.04	0.01	0.00	-0.01	0.09	0.05	0.02	0.03	0.03
6	-0.10	-0.06	-0.04	-0.02	-0.05	-0.03	-0.05	-0.03	0.01	0.00
7	0.01	-0.01	-0.02	0.00	0.01	-0.07	-0.02	0.00	-0.02	-0.04
8	-0.03	-0.03	-0.01	0.00	-0.01	0.02	-0.06	-0.02	0.02	0.04
9	0.04	-0.01	0.01	0.02	0.06	0.02	0.01	0.01	0.01	0.03
10	0.00	0.00	0.01	-0.03	0.01	0.02	-0.04	-0.02	0.01	0.01
11	0.07	0.06	0.01	0.01	0.01	-0.12	-0.09	-0.02	-0.02	-0.12
피시험자	대조제품 (왼쪽 눈가)					시험제품 (오른쪽 눈가)				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
12	0.01	-0.10	-0.01	0.03	0.09	-0.06	-0.07	-0.03	-0.01	0.00
13	-0.11	-0.03	-0.02	-0.02	-0.03	0.04	0.02	0.01	0.00	0.02
14	-0.01	-0.03	-0.01	0.00	0.03	-0.12	-0.05	-0.04	-0.03	-0.06
15	-0.11	-0.03	0.00	-0.03	-0.06	0.08	0.04	0.02	0.02	0.03
16	-0.04	-0.04	-0.03	-0.01	0.01	-0.04	-0.03	-0.03	-0.02	-0.03
17	0.09	0.07	0.03	0.01	0.02	-0.05	-0.03	0.01	-0.02	0.04
18	-0.03	0.00	-0.01	-0.01	-0.03	-0.01	-0.04	-0.01	-0.04	-0.03
19	-0.01	0.01	0.02	-0.01	-0.01	-0.22	-0.01	-0.01	-0.07	-0.11
20	0.09	-0.02	-0.01	0.02	0.07	-0.02	-0.02	-0.03	0.00	-0.01
21	-0.06	-0.01	-0.01	0.00	-0.03	-0.04	-0.05	-0.01	-0.01	0.03
평균	-0.001	-0.006	-0.003	0.000	0.009	-0.037	-0.029	-0.010	-0.008	-0.008
표준편차	0.066	0.041	0.018	0.019	0.044	0.078	0.039	0.020	0.025	0.050
			$\Delta R1$		$\Delta R2$		$\Delta R3$		$\Delta R4$	
p value			0.116		0.077		0.267		0.249	

$\Delta Ri = 4\text{주 } Ri - 0\text{주 } Ri$ ($i = 1 \sim 5$)

Table 17. 제품 사용 6주 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상분석 변화 결과

피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)					시험제품 (왼쪽 눈가)				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
1	0.01	-0.07	-0.05	0.01	0.04	0.07	0.00	0.01	0.02	0.06
2	-0.08	0.00	-0.01	-0.01	-0.06	-0.06	-0.05	0.00	0.00	-0.01
3	-0.01	0.03	0.02	-0.01	-0.02	-0.11	-0.04	-0.01	-0.01	-0.05
4	0.08	-0.04	-0.01	0.05	0.04	-0.09	-0.01	-0.01	-0.03	-0.08
5	0.09	0.05	0.01	0.02	0.02	-0.02	0.03	-0.01	0.00	-0.04
6	-0.02	-0.07	-0.05	0.01	0.02	-0.05	-0.06	-0.03	0.00	-0.05
7	-0.03	-0.03	-0.02	-0.01	-0.01	-0.13	-0.06	-0.01	-0.02	-0.06
8	0.06	0.00	0.02	0.03	0.02	0.05	0.04	0.03	0.01	0.00
9	0.03	0.05	0.03	0.00	0.01	0.04	0.00	-0.01	0.01	0.02
10	-0.07	0.00	0.00	-0.06	0.00	-0.08	-0.06	-0.03	-0.02	-0.04
11	0.18	0.02	0.00	0.05	0.09	-0.14	-0.14	-0.05	-0.01	-0.09
피시험자	대조제품 (왼쪽 눈가)					시험제품 (오른쪽 눈가)				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
12	-0.12	-0.10	-0.03	0.00	-0.03	-0.07	-0.07	-0.04	-0.01	0.00
13	-0.06	0.00	0.00	-0.01	-0.02	-0.01	-0.02	-0.02	-0.01	0.01
14	-0.11	-0.06	-0.04	-0.02	-0.04	-0.07	-0.05	-0.04	0.00	-0.05
15	-0.04	0.00	0.00	-0.01	-0.04	-0.03	0.04	0.01	-0.01	-0.02
16	-0.06	-0.08	-0.05	0.00	-0.01	-0.09	-0.04	-0.03	-0.03	-0.08
17	0.04	0.00	0.00	0.00	0.02	-0.04	0.03	0.04	-0.02	-0.01
18	0.18	0.05	0.05	0.05	0.10	-0.16	0.02	0.02	-0.08	-0.14
19	0.09	0.10	0.07	0.01	-0.02	-0.14	-0.02	-0.02	-0.04	-0.06
20	0.21	0.10	0.05	0.03	0.09	0.01	-0.01	-0.01	0.00	0.00
21	-0.07	0.00	-0.01	-0.01	-0.05	-0.06	-0.03	0.00	-0.01	0.00
평균	0.014	-0.002	-0.001	0.006	0.007	-0.056	-0.024	-0.010	-0.012	-0.033
표준편차	0.097	0.055	0.033	0.026	0.046	0.064	0.044	0.023	0.021	0.045
			$\Delta R1$		$\Delta R2$		$\Delta R3$		$\Delta R4$	
p value			0.008		0.172		0.315		0.019	

$\Delta Ri = 6\text{주 } Ri - 0\text{주 } Ri$ ($i = 1 \sim 5$)

Table 18. 제품 사용 8주 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상분석 변화 결과

피시험자	대조제품 (오른쪽 눈가)					시험제품 (왼쪽 눈가)				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
1	0.01	-0.04	-0.03	0.01	0.01	0.02	-0.05	-0.01	0.02	0.06
2	-0.07	0.00	-0.01	-0.02	-0.03	-0.09	-0.10	-0.01	0.01	0.02
3	0.09	0.03	0.02	0.02	0.06	0.05	-0.01	-0.01	0.03	0.04
4	0.05	-0.04	-0.01	0.03	0.04	-0.08	0.03	0.02	-0.04	-0.07
5	-0.05	0.02	0.01	-0.02	-0.04	-0.14	-0.01	-0.02	-0.04	-0.08
6	0.00	-0.02	-0.02	0.00	0.02	-0.12	-0.06	-0.04	-0.02	-0.01
7	0.03	-0.03	-0.01	0.01	0.06	-0.09	-0.03	0.00	-0.02	-0.06
8	0.00	0.01	0.00	-0.01	0.01	-0.02	-0.04	-0.01	0.01	0.00
9	-0.04	0.00	0.01	-0.01	-0.01	0.06	0.00	-0.01	0.03	0.06
10	-0.04	0.01	0.00	-0.06	-0.01	-0.10	-0.06	-0.04	-0.02	-0.06
11	0.00	-0.01	-0.02	0.00	-0.02	-0.14	-0.14	-0.05	-0.02	-0.01
피시험자	대조제품 (왼쪽 눈가)					시험제품 (오른쪽 눈가)				
	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
12	-0.16	-0.14	-0.05	-0.01	-0.03	-0.08	-0.04	0.00	0.01	-0.08
13	-0.18	-0.04	-0.03	-0.04	-0.08	-0.03	-0.01	0.00	0.00	-0.03
14	-0.01	-0.01	0.00	-0.01	0.00	-0.01	-0.02	-0.01	-0.04	-0.01
15	-0.04	-0.01	0.01	-0.01	-0.04	0.03	-0.01	-0.04	-0.12	0.03
16	0.16	0.01	0.01	0.03	0.12	0.00	-0.02	-0.02	-0.03	0.00
17	0.11	0.05	0.03	0.02	0.05	-0.09	-0.02	-0.02	-0.01	-0.09
18	0.00	-0.02	0.00	0.01	0.02	-0.01	0.01	0.00	0.00	-0.01
19	-0.10	-0.01	0.00	-0.03	-0.08	0.02	-0.01	-0.06	-0.09	-0.02
20	-0.06	-0.04	-0.01	-0.02	-0.03	-0.03	-0.03	0.00	0.00	-0.03
21	0.02	-0.01	0.01	0.01	0.03	-0.08	-0.01	-0.01	0.01	-0.08
평균	-0.013	-0.014	-0.004	-0.005	0.002	-0.062	-0.038	-0.016	-0.010	-0.027
표준편차	0.081	0.038	0.019	0.023	0.048	0.068	0.043	0.017	0.024	0.054
			$\Delta R1$		$\Delta R2$		$\Delta R3$		$\Delta R4$	
p value			0.039		0.064		0.036		0.428	

$\Delta Ri=8$ 주 $Ri \sim 0$ 주, Ri ($i = 1 \sim 5$)

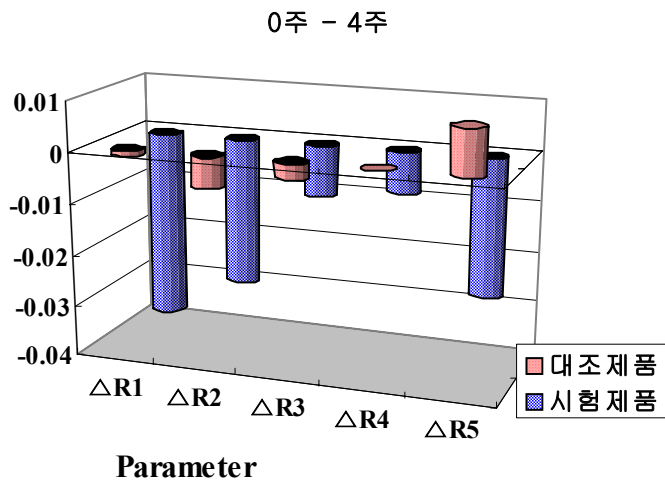


Fig. 32. 제품 사용 4주 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상분석 변화 결과.

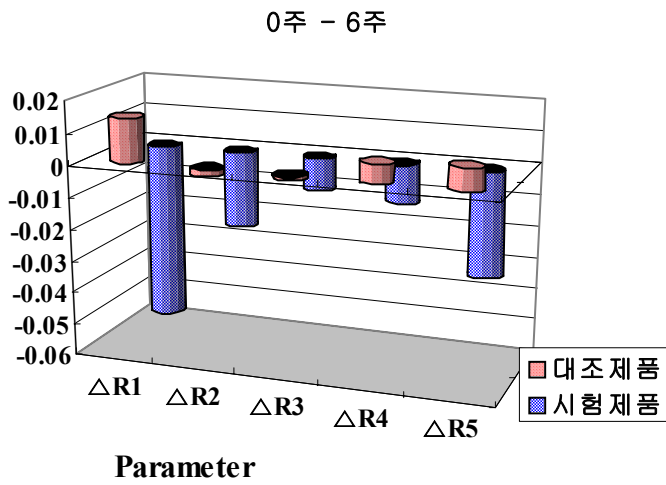


Fig. 33. 제품 사용 6주 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상분석 변화 결과.

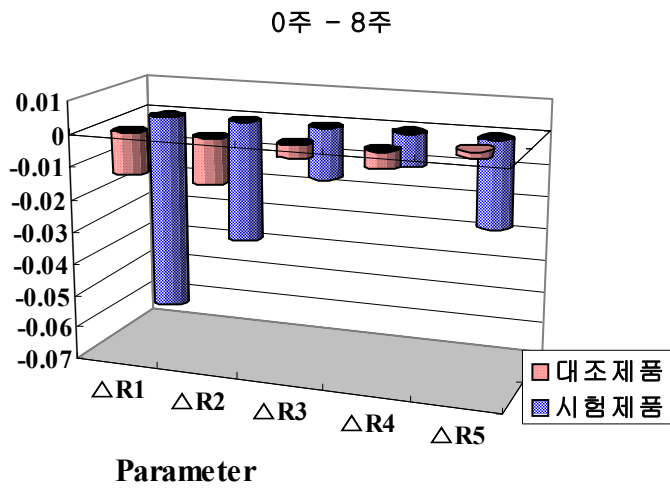


Fig. 34. 제품 사용 8주 후 대조제품과 시험제품간의 모사관 화상분석 변화 결과.

바. 보습

1) 보습효과 시험

피부 보습 효과는 보습효과 측정장비인 Corneometer CM825를 이용하여 추출물 0.05%를 함유한 크림제형의 보습력을 측정하였다.

2) 보습효과

시료 처리 전 보습력은 69.38이고, 시료처리 1시간 후 대조군은 153.18, 실험군은 166.12로 각각 54.7%, 58.2% 증가하였다. 시간이 지남에 따라 보습력은 많이 낮아졌으며, 시료처리 6시간 경과 후 실험군의 보습력은 27.0% 대조군은 19.4% 증가되어 추출물을 함유한 크림제형이 대조군에 비하여 7.6% 정도 높은 보습효과를 나타내었다.

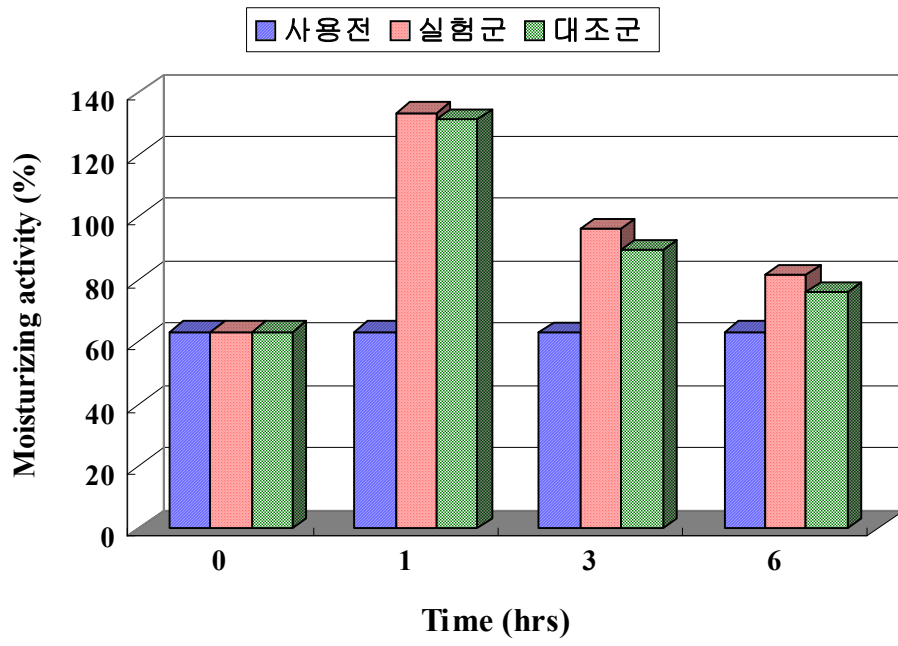


Fig. 35. 대조제품과 시험제품의 보습효과.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 국내에 많이 조립되어 있으나 그 활용가치가 미비한 낙엽송 잎을 대상으로 추출성분을 분석하고 다양한 생리활성 시험을 수행하여 제품의 안정도 평가를 통해 기능성 화장품을 개발하는 것이 최종목표이다. 이를 위해 3년 동안 연차별 연구를 추진하여 당초 연구 개발 최종 목표달성은 이루어진 것으로 평가된다. 각 단계별 연구 목표 및 달성정도는 다음과 같다.

1차년도에서의 연구 목표는 낙엽송 잎 등의 추출성분을 분석하고 기초 생리활성 효능을 검증하는 것으로 2002년 10월과 2003년 4월 낙엽송을 별채하여 생엽과 낙엽을 채취하여 에탄올(95%)로 추출한 후 클로로포름, 헥산, 에틸아세테이트 용성 및 수용성으로 각각 순차 추출하였다. 먼저 생엽 추출물의 에틸아세테이트용성과 수용성 분획물을 칼럼크로마토그래피와 박층크로마토그래피법으로 분리 정제하여 ^1H 와 ^{13}C -NMR 등의 스펙트럼 분석하여 구조를 분석하였다. 그 결과 생엽 에틸아세테이트용성 분획물에서 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, kaempferol-3-O-arabinofuranoside를 단리하였으며 수용성 분획물에서 2"-O-rhamnosylvitexin을 단리한 후 FAB-MS로 분자량을 확인하였다. 또한, 추출물 및 단리된 화합물을 대상으로 유해산소에 의한 피부세포의 산화를 발생시키는 라디칼 소거활성을 갖는 항산화 활성 시험을 수행한 결과 생엽이 낙엽보다 전체적으로 높은 활성을 보였으며 특히, 생엽 추출물중에서는 에틸아세테이트용성 분획물이 다른 분획물보다 우수한 활성을 나타내었고 단리된 화합물 중에서는 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin 등의 flavan-3-ol계 화합물이 대조구인 BHT와 α -tocopherol 보다도 더 우수한 활성을 나타내었다.

생엽 추출물을 대상으로 호기성균과 혐기성균에 대한 항균시험, 미백효능, 세포독성 시험, 수렴효능에 대한 기능성 시험을 수행하였다. 생엽의 에틸아세테이트용성 화합물에서 여드름균에 대한 효능이 있었으며 미백효능은 낮은 것으로 나타났다.

2 차년도 연구목표에서는 지속적 유용 추출성분의 분리 정제와 기능성 시험, 독성 및 임상시험 검정으로 전년도와 동일한 분리, 정제과정을 수행하여 생엽과 낙엽으로

부터 flavan계 화합물외에 flavonoid 배당체 화합물인 kaempferol-3-O-arabinofuranoside, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-glucoside, laricitrin-3-O-glucoside, lignan계 화합물인 cedrusin 등을 분리하여 COSY, HETCOR, HMBC 등의 2D-NMR 스펙트럼을 비교하여 정확한 당의 위치를 규명하였다. 배당체 화합물 중에서는 quercetin 3-O-glucoside 화합물이 높은 항산화 활성을 나타내었다.

기능성 시험에서는 항균, 인체자극이 있는지 여부를 확인하기 위한 인체침포시험, 제형화시험(원료 안정화 시험, 제형 안정도 시험), 주름개선효능, 보습효능 등의 다양한 기능성 시험을 수행하였다. 그 결과 알러지 반응이나 기타 다른 자극은 관찰되지 않았으며 콜라겐 합성율과 각질층의 엘라스틴을 분해하는 효소인 엘라스타제 활성을 저해능은 추출물 농도에 따라 증가하여 추출물이 주름개선효능이 있음을 알 수 있었다. 피부보습효능은 대조군에 대하여 5.5% 정도 높은 효능을 나타내었다. 또한, 추가적인 항균 시험에서 낙엽송 생엽 에틸아세테이트용성 추출물이 항여드름균과 항비듬균 효능이 가장 우수하였으며 분리된 화합물은 (-)-epicatechin과 (+)-gallocatechin이 높은 활성을 나타내었다. 또한, 항염증 효능에서도 우수한 활성을 나타내었다. 따라서 낙엽송 잎 추출물은 주름개선 및 염증 치료의 복합적 기능성 화장품으로의 개발 가능성이 높았다. 이러한 연구결과는 학회발표(3건)과 논문투고(1건) 하였으며 기능성 시험에 대한 결과는 발표할 예정이며, 분리, 정제 기술 및 생리활성 분석 인력 석사 1명을 배출하였다.

3차년도에서는 낙엽송 잎 추출물을 이용한 기능성 화장품을 제조하는 것으로 추출물의 양을 많이 얻기 위하여 분리정제 과정을 지속적으로 수행하였으며 피시험자 20명의 전박부에 추출물의 자극성을 test하여 인체에 대한 알러지나 자극성에 대한 평가를 실시하였다.

또한 추출물의 제형 안정화를 체크하기 위해서 농도별, 온도별로 일정기간 실험을 실시하여 최적의 추출물 농도를 얻어 안정화제를 첨가하여 원료 제형화 시험을 진행하였다. 그 결과 일정기간 동안, 안정한 제형을 확보 할 수 있었다. 제형 안정도 시험결과를 바탕으로 Pilot 제조를 실시하여 제품 효능 평가에 대한 추가 시험을 실시하였다. 피부보습 효능은 추출물 0.05%를 함유한 크림제형의 보습력을 측정한 결과 대조군에 비하여 7.6% 정도 높은 보습효능을 나타내었다. 상기의 결과 등을 토대로 스

킨, 로션, 에센스, 크림 등의 시제품을 제작하였다.

최근의 화장품 개발의 경향은 원료의 이용이 한약재, 초본류, 과실류에 한정되어 개발이 이루어지고 있는 실정이고 단순히 첨가제로의 홍보 이상을 벗어나지 못하고 있어 본 과제를 통해 얻은 구조 동정으로 소비자에 대한 신뢰감을 높임으로서 비교우위를 선점할 수 있을 것이다. 연간 1,300억원에 달하는 천연 원료의 대부분을 수입에 의존하고 있는 현실에서 낙엽송 잎과 같이 원료수급이 용이한 재료를 사용하기 때문에 다른 천연자원에 비해서도 경제성이 클 것이다.

산림자원 추출물에 대한 산업체와의 연계가 다른 분야에 비해 상대적으로 미비하였으나 본 연구를 통하여 산림자원의 활용 가능성을 제시하여 관심을 증대시키고 시장 규모가 비교적 큰 화장품 산업과 연계하여 낙엽송뿐만 아니라 다른 자원의 기초조사를 지속적으로 수행하고자 한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

화장품 산업은 건강(Health)과 미(Beauty)라는 이중의 기준을 가지고 있는 산업으로서 현재는 그동안 치우쳐왔던 미적 기준에 차차 그 기능과 안전성이 더해지고 있는 실정이다. 따라서 기존의 많은 인공적인 합성화합물들로 채워져 있으며 그 동안 수행된 많은 연구 결과에서 알 수 있듯이 기존의 합성 화합물인 ascorbic acid, arbutin, kojic acid, retinoid 등의 기능성 물질들은 사용상의 안전성 및 안정성의 문제점을 갖고 있기 때문에 천연자원에서 그 대체 물질들을 찾으려는 연구는 더욱더 진행되어 갈 것이다. 이런 천연물에 대한 기대와 관심 속에서 국내에 사용되지 않고 버려져 있는 산림자원을 사용하여 이의 기능적인 측면과 산업적인 측면을 밝혀내어 이를 이용한다는 것은 상당히 고무적이라 할 수 있다.

본 연구개발에서는 낙엽송 잎 추출물의 생리활성에 대한 효능을 화장품과 직접적으로 관련된 시험을 적용하였으나 활용도의 극대화를 위해서는 낙엽송 잎 조추출물 뿐만 아니라 단리된 화합물에 대해서 항암, 항균 등의 활성시험을 추가적으로 검토해야 할 것이다.

또한, 낙엽송 외에도 다른 수종을 선택하여 기초 기능성을 분석하고 한 가지 수종 외에도 다른 수종들을 혼합하여 멀티 기능성을 갖는 화장품 개발을 지속적으로 수행하여 새로운 소재개발을 하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

멜라닌 생성을 억제하는 것은 멜라닌 생성에 관여하는 효소인 타이로시나제(Tyrosinase)의 활성부위의 필수요소인 Cu를 제어하거나 타이로시나제 관련단백질 I(TRP-1) 및 II(TRP-2)의 필수요소인 Fe를 제어하여 효소활성을 불활성화시키거나 멜라닌 생성 중간체의 생성을 억제하는 물질을 개발하는 것으로, 상지(Mulberrin) 추출물, 닥나무(Kazinol F) 추출물, 반하 추출물 등이 개발되어 제품에 이용되고 있으며, 상황버섯 등에서 유효성분을 추출하여 원료로 개발하는 연구가 진행되고 있다.

멜라노사이트 세포를 활성화하는 인자들은 엔도세린(Endothelin-1), 멜라니사이트자극호르몬(α -MSH), 일산화질소, 히스타민(Histamine), 피리미딘 다이머(pTpT) 등을 포함한 십여종에 달하며, 현재 멜라노사이트 활성화를 유도하는 정보전달물질들의 활성을 저해하는 성분들이 식물 추출물에서 다수 발견되고 있다.

최근 인간 유전체 연구과 완성단계에 도달함에 따라 피부미백 메카니즘에서 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 타이로시나제 유전자의 프로모토 영역을 제어하여 타이로시나제 단백질의 합성을 제어할 수 있는 저해제나 타이로시나제의 mRNA를 불활성화하는 저해제 등 유전자레벨에서의 연구결과를 활용한 미백제의 개발이 진행되고 있다.

미국과 일본에서는 AHA(α -Hydroxy acid)가 주름을 개선시키는데 응용되고 있는데, 이는 약제의 화학적인 작용에 의해 얇게 피부의 각질을 벗겨냄으로써 신생조직으로 피부를 새롭게 구성하여 피부주름을 개선하는 방법이다. 현재 AHA와 함께 AHA의 일종인 글리콜산, 페놀, 트리클로로아세트산 등이 사용되고 있으나 안전성 측면에서 전문가의 조치가 필요하다.

살구씨에서 얻어진 DADA(Diisopropylamine dichloroacetate), 합성식물호르몬(싸이토카인의 일종)의 일종인 카이네틴(Kinetin), 생약을 포함한 식물체에 광범위하게 분포되어 있는 우루솔산(Ursolic acid), 생체의 필수 미량성분인 규산, 동식물 또는 미생물에 널리 분포되어 있는 당지질의 일종인 스펅고신(Sphingosine) 유도체, 합성물질인 NMS(n-methyl-L-serine), 보호소 Q10, 미생물에 의해 생산되는 메발로놀락톤

(Mevalonolactone) 등이 피부주름 개선제로서 관심을 끌고 있다.

현재 자외선 차단제로 등록되어 있는 것은 대부분 자외선 흡수제인데 벤조페논계, 계피산계, 살리실산계, PABA(Para-aminobenzoic acid)계 등과 같은 유기화합물 계통이다. 스틸벤 유도체, Benzitriazol substituted polyorganosiloxane 등 사용성과 피부 안전성을 향상시킨 새로운 자외선 흡수물질의 개발이 연구되고 있다.

미국의 화장품 업체들은 화장품과 화장품 원료에 대하여 시판전에 FDA에 허가를 얻지 않아도 된다. 다만 화장품에 사용되는 Red #3, Yello #5 등과 같은 칼라 첨가물과 CFR(Code of Federal Regulations) XXI 항의 Part 250.250과 700.1에서 700.23 사이에 언급된 Hexachlorophene, Mercury compounds 등의 몇가지 금지된 물질에 대해서만 규제하고 있다. 또한 미국 향장협회(Cosmetic Toiletry and Fragrance Association)에서는 화장품 첨가물에 대한 전문가 패널을 운영하고 있는데 이 전문가 패널에서는 안전하지 못하거나 발암 가능성이 있는 Chloroacetanide, p-Hydroxyanisole, Pyrocatechol 등의 몇가지 첨가물을 사용하지 말 것을 권고하고 있다. 결론적으로 미국 FDA에서는 우리나라의 기능성 화장품에 해당하는 코스메슈티칼스의 제품들이 시장에서 유통되고 있는 사실을 인식하고 있으면서도 이 용어를 공식적으로는 인정하고 있지 않다.

미국 화장품 시장은 2000년 기준 29,955백만 달러 규모로써 지난 10년간 CAGR은 4.4%대의 성장을 하였다. 기능성 화장품의 수요는 2000년에 2,965백만달러로 전체 화장품시장에서 차지하는 비중이 9.9% 정도였다. 이것은 1990년의 5%대에서 10년동안 약 2배의 점유율 증가를 보인 것으로 중년을 포함하는 노령인구의 증가와 경제적 호황에 따른 소득증가가 중요한 요인으로 작용하였다. 기능성 화장품의 제품 구성면에서는 Skin Care 61%, Hair Care 15%, Professional 6%, Other 18%의 순이었다. 노화 방지피부보호용 기능성 화장품은 Allergan, Avon Products, Beiersdorf, Dstee Lauder, Johnson & Johnson, Kao, L'Oreal, Procter & Gamble, Revlon & Unilever 등 10개의 두국적 기업을 포함하여 20여개의 업체가 있으며, 대조적으로 발모제는 Merck 와 Pharmacia 등 2개 업체만이 경쟁하고 있다.

일본 화장품 시장은 불황에 의한 경기회복이 진해되지 않은 채, 주요 품목인 스킨케어와 메이크업 시장이 1999년 이후 감소한 영향으로 3년 연속 감소하였다. 그러나, 헤

어케어, 헤어메이크업 부문에서는 헤어컬러의 대폭적인 신장으로 전체 감소폭을 최소화하는 긍정적 요인으로 작용했다. 시장이 침체상태인 요인으로서, 소비자들의 구매력 감소이외에 제품의 저가격화가 진행 중에 있고, 특히 목욕용품계의 세정제품을 중심으로 가격하락이 지속되고 있는 상황을 들 수 있다.

2001년 이후의 상황은 가격 하락요구가 여전히 강하고, 또한 시장 전체에서 화제가 되는 히트 상품도 없어, 어려운 상황이 계속 되었다. 일본의 기능성 화장품 시장의 구분은 우리나라에 비해 광범위하게 분류되고 있다. 그 중 우리나라의 기능성 화장품의 범위와 유사한 개념인 미백, 주름방지, UV 차단기능의 화장품 시장은 309,590백만엔 규모로 미백, 주름방지 부문이 전체시장의 80% 이상을 차지하고 있다. Skin Care는 Cleansing 목욕용품계의 셀프제품을 사용하더라도 Whitening/Antianging 기능을 부가한 스케셜 케어에 대해서는 비싼 가격의 제품을 구입하여 분리사용을 중시한 상품을 선택하는 경향이 강해지고 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Agrawal, P. K., 1989, Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier.
2. Agrawal, P. K., S. K. Agarwal and R. P. Rastogi, 1980, A new neolignan and other phenolic constituents from *Cedrus deodara*, *phytochemistry*, Vol. 19, No. 6, pp. 1260~1261.
3. Agrawal, P. K., S. K. Agarwal and R. P. Rastogi, 1982, Two lignans from *Cedrus deodara*, *phytochemistry*, Vol. 21, No. 6, pp. 1459~1461.
4. Blois, M.S., 1958, Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.*, Vol. 26, pp. 1199~1200.
5. Buege, J. A. and Aust, S. D., 1978, Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol.*, Vol. 105. pp. 302.
6. Carter, P., 1971, Spectrophotometric determination of serum iron at the sub microgram level with a new reagent(ferrozine). *Anal. Biochem.*, Vol. 40. pp. 450.
7. Charmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F, Minna, J.D. and Michell, J. B., 1987, Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, *assissement of chemosensitivity testing. Cancer Res.*, Vol. 47, pp. 936.
8. Choi, W. H., W. Y. Park, B. Y. Hwang, G. J. Oh, S. J. Kang, K. S. Lee and J. S. Ro, 1998, Phenolic Compounds from the Stem Bark of *Cornus walteri* Wanger, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 29, No. 3, pp. 217~224.
9. Das, B., M. Takhi, M. S. Kumar, K. V. N. S. Srinivas and J. S. Yadav, 1993,

- Stereochemistry of 4-Aryl-2-Butanols from Himalayan *Taxus baccata*, *Phytochemistry*, Vol. 33, No. 3, pp. 697~699.
10. Foo, L. Y., Y. Lu, W. C. McNabb, G. Waghorn and M. J. Ulyatt, 1997, Proanthocyanidins from *Lotus Pedunculatus*, *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 8, pp. 1689~1696.
 11. Guo, J., D. L. Yu, L. Xu, M. Zhu and S. L. Yang, 1998, Flavonol Glycosides from *Lysimachia congestiflora*, *Phytochemistry*, Vol. 48, No. 8, pp 1445~1447.
 12. Gutteridge, J. M. C., 1984, Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobabaturic acid reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.*, Vol. 224, pp. 761.
 13. Ham, Y. H., W. G. Park, S. S. Han and Y. S. Bae, 1997, Flavonoid Glycosides from Needles of *Taxus cuspidata*(Taxaceae), *Mokchaekonghak*, vol. 25, No. 2, pp. 45~51.
 14. Han Y., Nishibe S., Noguchi Y. and Jin Z., 2001, Flavonol glycosides from the stems of *Trigonella foenum-graecum*, *Phytochemistry*, Vol. 58, No. 4, pp 577~580.
 15. Harbone J. B. and T. J. Mabry, 1982, The flavonoids: advance in research, Chapman and Hall Ltd.
 16. Hussein, S. A. M., A. N. M. Hashem, M. A. Seliem, U. Lindequist and M. A. M. Nawwar, 2003, Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*, *Phytochemistry*, Vol. 64, No. 4, pp. 883~889.
 17. Kang, S. S., J. S. Kim, W. J. Kwak and K. H. Kim, 1990, Flavonoids from the

- Leaves of *Ginkgo biloba*, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 21. No. 2, pp. 111~120.
18. Kassem, M., S. A. Mosharrafa, N. A. M. Saleh and S. M. Abdel-Wahab, 2000, Two new flavonoids from *Retama raetam*, *Fitoterapia*, Vol. 71, pp. 649~654.
 19. Kato, H., Lee, Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F., 1987, Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 51, pp. 1333.
 20. Kazuma, K., N. Noda and M. Suzuki, 2002, Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*, *Phytochemistry*, Vol. 62, No. 2, pp. 229~237.
 21. Kim, E. J., S. W. Jung, K. P. Choi and S. S. Ham, 1998, Cytotoxic Effect the Pine needle extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 30, No. 1, pp. 213~217.
 22. Kim, H. K., Y. E. Kim, J. R. Do, Y. C. Lee and B. Y. Lee, 1995, Antioxidatives Activity and Physiological Activity of Some Korean Medicinal Plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 27, No. 1, pp. 80~85.
 23. Kim, H. Y., B. H. Moon, H. J. Lee and D. H. Choi, 2004, Flavonol glyco sides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 93, pp. 227~230.
 24. Kim, J. K. and Y. S. Bae, 2001, Extractives from the Needles of *Torreya*, *Mokchaekonghak*, vol. 29, No. 4, pp. 53~59.
 25. Kim, J. K., W. G. Park and Y. S. Bae, 1997, Flavonoid Glycosides from Needles of *Larix leptolepis*(Pinaceae), *Mokchaekonghak*, vol. 25, No. 2, pp. 81~87.

26. Kwon, Y. M., J. H. Lee and M. W. Lee, 2002, Phenolic Compounds from Barks of *Ulmus macrocarpa* and Its Antioxidative Activities, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 33, No. 4, pp. 404~410.
27. Lawrence, O., A. Manguro, I. Ugi, R. Hermann and P. Lemmen, 2003, Flavonol and drimane-types sesquiterpene glycosides of *Warburgia stuhlmannii* leaves, *Phytochemistry*, Vol. 63, No. 4, pp. 497~502.
28. Lee, S. H., S. Y. Kim, J. J. Kim, T. S. Jang and S. R. Chung, 1999, The Isolation of the Inhibitory Constituents on Melanin Polymer Formation from the Leaves of *Cercis chinensis*, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 30, No. 4, pp. 397~403.
29. Lew, J. H., J. H. Kwak, K. R. Lee and O. P. Zee, 1998, Flavonoids from *Kylinga brevifolia* var. *leiolepsis*, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 29, No. 2, pp. 71~74.
30. Lim, D. K., U. Choi and D. H. Shin, 1996, Antioxidant Activity of Ethanol from Korean Medicinal Plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 28, No. 1, pp. 83~89.
31. Marklund, S. and Marklund, G., 1974, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 47, pp. 468~474.
32. Markham, K. R., 1992, Techniques of Flavonoid Identification, Academic press.
33. Miki, K. and T. sasaya, 1979, Glycerol Derivatives in the inner Bark of *Larix leptolepis* Gord, *Mokuzai Gakkaishi*, Vol. 25, No. 5, pp. 361~366.

34. Miki, K. and T. sasaya, 1979, Dihydrobenzofuran Derivatives in the inner Bark of *Larix leptolepis* Gord, *Mokuzai Gakkaishi*, Vol. 25, No. 6, pp. 437~441.
35. Miki, K., K. Ito and T. sasaya, 1979, Lignans from Heartwood of inner Bark of *Larix leptolepis* Gord, *Mokuzai Gakkaishi*, Vol. 25, No. 10, pp. 665~670.
36. Miki, K. and T. sasaya, 1980, Lignans from Heartwood of *Larix leptolepis* Gord, *Mokuzai Gakkaishi*, Vol. 26, No. 9, pp. 633~636.
37. Niemann, G. J., 1969, Phenolic glucosides from needles of *Larix laricina*, *Phytochemistry*, Vol. 8, No. 10, pp. 2101~2103.
38. Niemann, G. J. and R. Bekooy, 1971, Flavonoid constituents from *Larix* needles, *Phytochemistry*, Vol. 10, No. 4, pp. 893.
39. Niemann, G. J., 1973, Phenolic glucosides from needles of *Larix leptolepis*, *Phytochemistry*, Vol. 12, No. 3, pp. 723~724.
40. Niemann, G. J., 1973, Flavonoids from needles of *Larix leptolepis*, *Phytochemistry*, Vol. 12, No. 8, pp. 2056.
41. Niemann, G. J., 1975, Main flavonoids in needles of *Larix decidua* A, *Phytochemistry*, Vol. 14, No. 5~6, pp. 1436~1437.
42. Niemann, G. J., 1975, Acylated flavonol glycosides from *Larix* needles, *Phytochemistry*, Vol. 14, No. 5~6, pp. 1437~1438.
43. Ohtsy, H., R. Tanaka, T. Michida, T. Shingu and S. Matsunaga, 1998, Tetracyclic Triterpenes and other Constituents from the Leaves and Bark of *Larix kaempferi*, *Phytochemistry*, Vol. 49, No. 6, pp. 1761~1768.

44. Owen, R. W., R. Haubner, W. Mier, A. Giacosa, W. E. Hull, B. Spiegelhalder and H. Bartsch, 2003, Isolation, Structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 41, pp. 703~717.
45. Roh., J. H., H. I. Moon and O. P. Zee, 2000, Phytochemical Constituents from *Melampyrum roseum* var. *hirsutum* Beauv, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 31, No. 2, pp. 157~162.
46. Sa, J. H., I. C. Shin, K. J. Jeong, T. H. Shim, H. S. Oh, S. K. Park, E. H. Cheung, S. N. Kim, G. G. Kim, D. S. Choi, Y. S. Kwon and C. M. Kim, 2002, Catechin Content and Antioxidative Effect from *Rosa davurica* Pall, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 33, No. 3, pp. 177~181.
47. Shi, Q. W., F. Sauriol, O. Mamer and L. O. Zamir, 2003, New Minor Taxanes Analogues from the Needles of *Taxus canadensis*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 11, pp. 293~303.
48. Slimestad, R., Q. M. Andersen and G. W. Francis, 1994, Ampelopsin 7-Glucoside and other Dihydroflavonol 7-Glucoside from Needles of *Picea abies*, *Phytochemistry*, Vol. 35, No. 2, pp. 550~552.
49. Slimestad, R., Q. M. Andersen, G. W. Francis, A. Marston and K. Hostett mann, 1995, Syringetin 3-O-(6''-acetyl)- β -glucopyranoside and other Flavonols from Needles of Norway spruce, *Picea abies*, *Phytochemistry*, Vol. 40, No. 5, pp. 1537~1542.
50. Sikic, B. I., Mimnaugh, E. G., Litter, C. L. and Gram, T. E., 1977, The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and

hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. and Biophys.*, Vol. 179, pp. 663.

51. Tanaka, R., H. Ohtsu and S. Matsunaga, 1997, Abietane Diterpene acids and other Constituents from the Leaves of *Larix kaempferi*, *Phytochemistry*, Vol. 46, No. 6, pp. 1051~1057.
52. Takehara, T. and T. sasaya, 1979, Lignans from Sapwood of *Larix leptolepis* Gord, *Mokuzai Gakkaishi*, Vol. 25, No. 7, pp. 516~517.
53. Takehara, T. and T. sasaya, 1979, Dihydrobenzofuran Derivatives from Sapwood of *Larix leptolepis* Gord, *Mokuzai Gakkaishi*, Vol. 25, No. 10, pp. 660~664.
54. Wagner, H., 1979, Phenolic Compounds in Plants of Pharmaceutical Interest, *in Recent Advance in Phytochemistry, Biochemistry of Plant Phenolics*, Vol. 12. pp. 589~616.
55. Webby, R. F. and M. R. Boase, 1999, Peonidin 3-*O*-neohesperidosie and other flavonoids from *Cyclamen persicum* petals, *Phytochemistry*, Vol. 52, No. 5, pp. 939~941.
56. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N., 1986, *Planta Medica*, 3981, pp. 517.
57. Yang, J. K., B. K. Kang, T. H. Kim, S. C. Hong, W. T. Seo and M. S. Choi, 2002, Efficient Extraction Methods and Analysis of Essential Oil from Softwood Leaves, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 17, No. 4, pp. 357~364.
58. Yoon, S. Y., H. J. Lee, S. S. Lee, D. H. Choi and K. H. Paik, 2000, Studies on Biological Activity of Wood Extractives(V)-Identification of Flavonoids from the Heartwood of *Larix leptolepis* and Their Antioxidative Activities-, *Mokchaekonghak*, vol. 28, No. 3, pp. 78~84.

59. 고은지, 기능성 화장품 전성시대, LG주간경제, 2003. 4. 16.
60. 강삼식, 손건호, 2000, 천연물성분 구조결정법, 서울대학교 출판부, pp. 525~740.
61. 김진규, 1999, 아까시나무의 抽出成分, 강원대학교 석사학위논문.
62. 김태욱, 1996, 한국의 수목, 교학사, pp. 21~22.
63. 김태정, 1996, 한국의 자원식물 I, pp. 46.
64. 김창민 외 27명, 2003, 천연물화학, 영림사, pp. 269~280.
65. 박상희, 2002, 천연물 추출 화장품 특허동향, 보건산업기술동향, pp. 72~75.
66. 산림청, 1998, 임업통계요람, pp. 48.
67. 산림청, 2001, 임업통계연보, pp. 36.
68. 손은수, 2003, 천연물유래 화장품소재의 개발 동향, 기술동향분석보고서, 한국과학기술정보연구원.
69. 이유미, 1997, 우리가 정말 알아야 할 우리 나무 백 가지, 현암사, pp. 320~323.
70. 이상극, 2003, 國內産 主要 針葉樹 잎의 抽出成分, 강원대학교 박사학위논문.
71. 이상필 외 2명, 2002, 기능성 화장품, 심층정보분석보고서, 한국과학기술정보연구원.
72. 이홍금, 해양으로부터 기능성 화장품 소재 개발동향, 보건산업기술동향, 2001.
73. 장일식, 2003, 동양의학과학대전, 학술편수관.

74. 조병목, 이종윤, 윤병호, 황병호, 1987, 목재화학, 영남대학출판부.
75. 조재명 외 12명, 2003, 원색 약용·식용 수목도설, 유성사, pp. 10~11.
76. 최형주, 1985, 落葉松 抽出物の 單離, 강원대학교 석사학위논문.
77. 보건산업진흥원, “미래 보건산업 기술예측(2001-2025)”, 2001. 5.
78. 함연호, 2000, 사시나무屬과 버드나무屬 主要 樹種 樹皮의 抽出成分에 關한 研究, 강원대학교 박사학위논문.
79. 화장품원료기준, 식품의약품안전청, 2000.
80. 化粧品原料と油脂 2002, 油脂, 55(8), pp. 18-21.
81. 小島弘之, 天然物の保濕劑への應用, フレグランスジャーナル, 臨時増刊 no.17, pp.112-115, 2000.
82. 最新化粧品の植物化學-植物性成分の機能と化粧品への應用 フレグランスジャーナル, 臨時増刊 no.16, pp.1-195, 1999.
83. 小島弘之, 天然物の保濕劑への應用, 化學工業, 47(6), pp.463-468, 1996.
84. 中尾洋一 등, 海洋天然物の研究開發と化粧品への應用 フレグランスジャーナル, 臨時増刊 27(4), pp. 17-93, 1999.