



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

아그배나무 (*Malus sieboldii*)
가지로부터 향산화 · 항염 및 항균
활성 성분 규명

濟州大學校 大學院

化 學 科

梁 仁 禎

2013年 2月

아그배나무 (*Malus sieboldii*)
가지로부터 향산화 · 항염 및 항균
활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

梁 仁 禎

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

梁仁禎의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2013年 2月

Identification of Anti-oxidative,
Anti-inflammatory and Anti-bacterial
Constituents from *Malus sieboldii* Branches

In Jeong Yang
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2013. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



목 차

List of Tables	iv
List of Figures	v
List of Abbreviations	viii
ABSTRACT	ix
I. 서론	1
1. 천연물의 이용과 현황	1
2. 활성산소와 항산화제	2
3. 항염 및 항균 활성	4
II. 시약 및 기기	8
III. 연구과제 : ‘아그배나무 가지’의 유효 성분 분리 및 활성검색	9
1. 재료	9
2. 시료의 추출 및 유효성분 분리	11
2-1. 아그배나무 가지의 추출 및 분획	11
2-2. 에틸아세테이트 분획의 활성 성분 분리(제 1차)	12
2-2-1. VLC에 의한 분획과정	12
2-2-2. VLC 분획물에서 화합물 1, 3 분리과정	12
2-2-3. VLC 분획물에서 화합물 4, 5, 7 분리과정	13
2-2-4. VLC 분획물에서 화합물 2, 6, 8, 9 분리과정	14
2-3. 아그배나무 가지의 추출 및 분획(제 2차)	15
2-4. 헥산 분획의 활성 성분 분리	16
2-4-1. 재분획 및 VLC에 의한 분획과정	16
2-4-2. VLC 분획물에서 화합물 1, 10, 11, 12 분리과정	16
3. HPLC 분석	18
4. 활성 검색	19
4-1. 항산화 실험	19
4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정	19

4-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정	19
4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험	20
4-1-4. ABTS ⁺ radical 소거 활성 실험	22
4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험	22
4-2-1. 세포 배양	22
4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가	22
4-2-3. 세포독성 평가	22
4-2-4. 염증매개인자인 TNF- α , IL-6, IL- β 정량	23
4-2-5. Western blotting	23
4-3. 항균활성 평가	25
4-3-1. Paper disc diffusion method	25
IV. 결과 및 고찰	26
1. 화합물의 구조 동정	26
1-1. 화합물 1 구조 동정	26
1-2. 화합물 2 구조 동정	26
1-3. 화합물 3 구조 동정	31
1-4. 화합물 4 구조 동정	34
1-5. 화합물 5의 구조 동정	39
1-6. 화합물 6의 구조 동정	40
1-7. 화합물 7의 구조 동정	45
1-8. 화합물 8의 구조 동정	45
1-9. 화합물 9의 구조 동정	50
1-10. 화합물 10의 구조 동정	53
1-11. 화합물 11의 구조 동정	56
1-12. 화합물 12의 구조 동정	59
2. HPLC 분석 결과	62
3. 항산화 활성 실험 결과	65
3-1. 총 폴리페놀함량	65
3-2. 총 플라보노이드 함량	66

3-3. DPPH radical 소거 활성	67
3-3-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성	67
3-3-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성	68
3-4. ABTS ⁺ radical 소거 활성	70
3-4-1. 추출물 및 분획물의 ABTS ⁺ radical 소거 활성	70
3-4-2. 분리된 화합물의 ABTS ⁺ radical 소거 활성	71
4. 항염 활성 실험 결과	73
4-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성	73
4-2. 에틸아세테이트 층의 농도별 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성	74
4-3. 헥산 층의 농도별 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성	75
4-4. 분리된 화합물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성	76
4-5. 화합물 8, 9의 농도별 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성	77
4-6. 에틸아세테이트 층의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 생성 억제	79
4-7. 화합물 8의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 생성 억제	80
4-8. 화합물 9의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 생성 억제	81
4-9. 에틸아세테이트 층의 western blotting	82
4-10. 화합물 8, 9의 western blotting	83
5. 항균 활성 실험 결과	84
5-1. 추출물 및 분획물의 항균 활성 평가	84
IV. 요약 및 결론	85
V. 참고문헌	88

List of Tables

Table 1. Gradient elution condition for HPLC separation	18
Table 2. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 1 and 2	28
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 3	32
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 4	35
Table 5. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 5 and 6	42
Table 6. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 7 and 8	47
Table 7. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 9	51
Table 8. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 10	54
Table 9. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 11	57
Table 10. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 12	60
Table 11. DPPH radical scavenging activities (SC ₅₀) of solvent fractions	67
Table 12. DPPH radical scavenging activities (SC ₅₀) of isolated compounds	69
Table 13. ABTS radical scavenging activities (SC ₅₀) of solvent fractions	70
Table 14. ABTS radical scavenging activities (SC ₅₀) of isolated compounds	72
Table 15. Antibacterial activity of solvent fractions from <i>M. sieboldii</i> ..	84
Table 16. Antibacterial activity of solvent fractions from <i>M. sieboldii</i> ..	84

List of Figures

Figure 1. Oxidative and anti-oxidative systems in the cells	3
Figure 2. Structures of anti-oxidants	3
Figure 3. Anti-inflammatory reaction	6
Figure 4. Structures of antibiotics	7
Figure 5. Picture of <i>Malus sieboldii</i>	10
Figure 6. Procedure of extraction and solvent fraction from <i>M. sieboldii</i>	11
Figure 7. Procedure of isolation of compounds 1, 3	12
Figure 8. Procedure of isolation of compounds 4, 5, 7	13
Figure 9. Procedure of isolation of compounds 2, 6, 8	14
Figure 10. Procedure of extraction and solvent fraction from <i>M. sieboldii</i>	15
Figure 11. Procedure of isolation of compounds 1, 10, 11, 12	17
Figure 12. Paper disc diffusion method	25
Figure 13. Chemical structure of compound 1	27
Figure 14. Chemical structure of compound 2	27
Figure 15. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 1	29
Figure 16. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 1	29
Figure 17. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 2	30
Figure 18. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 2	30
Figure 19. Chemical structure of compound 3	32
Figure 20. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 3	33
Figure 21. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 3	33
Figure 22. Chemical structure of compound 4	35
Figure 23. ¹ H NMR spectrum of isolated compound 4	36
Figure 24. ¹³ C NMR spectrum of isolated compound 4	36
Figure 25. ¹ H- ¹ H COSY NMR spectrum of isolated compound 4	37

Figure 26. HMQC NMR spectrum of isolated compound 4	37
Figure 27. HMBC NMR spectrum of isolated compound 4	38
Figure 28. Chemical structure of compound 5	41
Figure 29. Chemical structure of compound 6	41
Figure 30. ^1H NMR spectrum of isolated compound 5	43
Figure 31. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 5	43
Figure 32. ^1H NMR spectrum of isolated compound 6	44
Figure 33. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 6	44
Figure 34. Chemical structure of compound 7	46
Figure 35. Chemical structure of compound 8	46
Figure 36. ^1H NMR spectrum of isolated compound 7	48
Figure 37. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 7	48
Figure 38. ^1H NMR spectrum of isolated compound 8	49
Figure 39. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 8	49
Figure 40. Chemical structure of compound 9	51
Figure 41. ^1H NMR spectrum of isolated compound 9	52
Figure 42. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 9	52
Figure 43. Chemical structure of compound 10	54
Figure 44. ^1H NMR spectrum of isolated compound 10	55
Figure 45. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 10	55
Figure 46. Chemical structure of compound 11	56
Figure 47. ^1H NMR spectrum of isolated compound 11	58
Figure 48. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 11	58
Figure 49. Chemical structure of compound 12	59
Figure 50. ^1H NMR spectrum of isolated compound 12	61
Figure 51. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 12	61
Figure 52. HPLC chromatograms of EtOAc fraction and compounds	62
Figure 53. Calibration curve for quantification of total phenolics	65
Figure 54. Total polyphenolic compounds of solvent fractions	65

Figure 55. Calibration curve for quantification of total flavonoids	66
Figure 56. Total flavonoids of extract and solvent fractions	66
Figure 57. DPPH radical scavenging activities of solvent fractions	67
Figure 58. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds ..	68
Figure 59. ABTS radical scavenging activities of solvent fractions	70
Figure 60. ABTS radical scavenging activities of isolated compounds ..	71
Figure 61. NO production inhibitory activities of solvent fractions	73
Figure 62. Cytotoxicities of solvent fractions	73
Figure 63. NO production inhibitory activities of EtOAc fraction	74
Figure 64. Cytotoxicities of EtOAc fraction	74
Figure 65. NO production inhibitory activities of <i>n</i> -Hex fraction	75
Figure 66. Cytotoxicities of <i>n</i> -Hex fraction	75
Figure 67. NO production inhibitory activities of isolated compounds ..	76
Figure 68. Cytotoxicities of isolated compounds	76
Figure 69. NO production inhibitory activity and cytotoxicity of compound 8	77
Figure 70. NO production inhibitory activity and cytotoxicity of compound 9	78
Figure 71. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6 and IL-1 β by EtOAc fraction.	79
Figure 72. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 8	80
Figure 73. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 9	81
Figure 74. Result of western blotting on EtOAc fraction	82
Figure 75. Result of western blotting on compound 8	83
Figure 76. Result of western blotting on compound 9	83

List of Abbreviations

2D	Two-dimensional
CC	Column chromatography
COSY	Correlation spectroscopy
cpd	Compound
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESR	Electron spin resonance
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Fr.	Fraction
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
int	Integration
J	Coupling constant (Hz)
m	Multiplet
<i>M. sieboldii</i>	<i>Malus sieboldii</i>
MeOH	Methanol
MTT	3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
TLC	Thin layer chromatography
V	VLC subfraction

ABSTRACT

Anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial activities were examined on the extract from *Malus sieboldii* branches. In addition, their active constituents were isolated and identified. This study was designed to evaluate the extract of *M. sieboldii* as the potential ingredient in functional cosmetics.

The extract was prepared from the branches of *M. sieboldii* with 70% aqueous ethanol. The ethanol extract was partitioned successively into *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc) *n*-butanol, and H₂O. The extract and fractions were subjected to total phenolic contents, total flavonoid contents tests, DPPH and ABTS⁺ radical scavenging studies. The total phenolic contents for the EtOAc fraction were estimated as 45.3 mg (GAE/100 mg). In addition, the total flavonoid contents were measured as 98.0 mg (quercetin/100 mg) for the EtOAc fraction. And very strong DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities were observed for the EtOAc fraction. On the screening of anti-inflammatory activities, the EtOAc fraction showed the considerable inhibition on the production of nitric oxide for the RAW 264.7 cell without any cell toxicity. Also on the screening of anti-bacterial activities, the *n*-hexane fraction showed the considerable inhibition for *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*.

The identification of the active constituents were conducted with the EtOAc and *n*-hexane fractions. Repeated column chromatography on normal-phased silica gel and Sephadex LH-20 resulted in the isolation of twelve compounds, β -sitosterol (1), daucosterol (2), *epi*-catechin (3), 3-*O*- α -L-arabinofuranoyl-8-methoxyquercetin (4), phlorizin (5),

3-hydroxyphlorizin (6), avicularin (7), quercetin-4'-O- β -D-glucopyranoside (8), chrysin-7-O- β -D-glucopyranoside (9), ethyl linoleate (10), taraxerol (11), and lupeol (12). All of the compounds were isolated for the first time from this plant. The elucidation of the chemical structures of the compounds 1-12 were accomplished using spectroscopic data including 1D and 2D NMR spectra, and by the comparison of their data to the literature values.

The isolated compounds were also subjected to the above biological tests. The compounds 3 (SC₅₀ 24.23 μ M), 4 (SC₅₀ 54.71 μ M), 6 (SC₅₀ 72.39 μ M) and 7 (SC₅₀ 39.69 μ M) showed good DPPH radical scavenging activities compared to ascorbic acid (SC₅₀ 54.22 μ M) as a positive control. The compounds 3 (SC₅₀ 5.09 μ M), 4 (SC₅₀ 7.02 μ M), 6 (SC₅₀ 9.46 μ M), 7 (SC₅₀ 6.84 μ M) and 8 (SC₅₀ 11.19 μ M) showed very good ABTS⁺ radical scavenging activities compared to ascorbic acid (SC₅₀ 13.36 μ M) as a positive control.

On the screening of anti-inflammatory activities, the compounds 8 and 9 showed the considerable inhibition on the production of nitric oxide for the RAW 264.7 cell without any cell toxicity. And Compounds 8 and 9 dose-dependently inhibited the expressions of inflammatory mediators. Also the protein levels of inducible nitric oxide synthase(iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cell were also quantified by western blotting method respectively.

Based on the above experimental results, it is suggested that the extract from *Malus sieboldii* branches could be potentially applicable in the cosmetical and/or pharmaceutical industries, especially as anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-bacterial ingredients.

I. 서론

1. 천연물의 이용과 현황

우리 인체는 외부 환경과 밀접하게 접하고 있어 환경오염, 유해물질, 스트레스, 불규칙한 생활습관 등에 의해 피부는 쉽게 민감하게 반응한다. 이러한 외부환경에 의해 노출된 피부에서는 산소가 과잉 생산되어 바로 활성산소가 생성되는데, 이 활성산소는 생체조직을 공격하고 세포를 손상시키는 등 불안정한 상태의 유해산소이다. 활성산소가 체내에 과도하게 발생하면 세포를 손상시켜 몸속을 녹슬게 하여 여러 가지 질병과 노화뿐만 아니라 염증을 일으키게 된다. 이 염증화된 조직은 피부의 생리학적 메커니즘에 의해 단백질이나 유전자 물질 등을 파괴하여 피부 트러블뿐만 아니라 아토피 피부염, 피부 노화 등을 일으키는 주요 원인이 되고 있다.¹⁾ 또한 의학의 진보 및 사회, 경제, 문화의 발달로 인간의 평균 수명을 100세 혹은 그 이상까지 기대할 수 있는 현 시대에 성별과 나이를 불문하고 더 젊고 건강하게 살아갈 수 있을지에 대한 관심이 증가하고 있다. 이러한 사회적 트렌드를 반영하듯 식생활, 미용, 의학 등 다양한 분야에서 항노화(Anti-aging)에 대한 이슈화가 되고 있을 뿐만 아니라 좀 더 순하고 피부에 자극이 없는 제품에 대한 소비자의 수요가 증가하고 있기 때문에 자연주의 컨셉이 강화되고 있다.²⁾

최근 BT 분야의 천연물 이용은 생리활성 물질인 3차 기능성분 물질이 건강관리, 다이어트나 미용 혹은 각종 질병예방효과를 기대하여 많이 이용되고 있다. 이와 같은 천연물들은 오랜 기간 생약을 비롯한 기능성식품 및 기능성화장품 분야에서 첨단 BT 기술의 발전과 함께 크게 부상되어, 거대한 산업분야로 성장하고 있다.³⁾

제주도는 1,950 m의 한라산의 영향으로 저지대에는 아열대성 식물과 난대성 식물 그리고 고산지대에는 한대성식물 혹은 고산식물이 서식하고 있는 식물 중 다양성의 보고이다. 국내 자생식물 4,000여종의 절반이 넘는 약 2,100종이 자라

고 있는 것으로 보고되고 있으며, 제주도 연안은 온대와 아열대 생물종이 함께 서식하는 공간으로 국내 해양생물종의 50%이상(2,000 여종)이 제주 해역에 서식하고 있다.⁴⁾

따라서 이러한 제주도는 천연자원으로부터 천연 화장품 원료의 탐색할 수 있는 최적의 선택받은 지역이라 할 수 있다.

2. 활성산소와 항산화제

산소는 생명유지를 위한 여러 대사반응에 필수요소이고, 인체 내 독극물질 해독을 위해서도 필요하지만 산소가 인체에 유익한 것만은 아니어서 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 광화학반응 등 각종 공해물질, 물리 화학적, 환경적 요인에 의해 수퍼옥사이드 라디칼(super oxide radical, $\cdot O_2^-$), 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical, $HO \cdot$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 일중항산소(singlet oxygen, 1O_2)와 같은 반응성이 매우 큰 프리 라디칼로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성이 있다. 산소는 환원과정에서 세포성분과 세포의 기질에 손상을 주는 인자인 $HO \cdot$ 와 1O_2 를 계속 생성하여 생체막의 필수 구성분인 불포화지방산의 탄소사슬을 공격하여 미크로솜(microsome), 미토콘드리아(mitochondria), 리조솜(lysosome) 막을 손상시키고, 과산화물은 DNA와 RNA에 작용하여 생화학적 변화를 초래해서 질병과 노화 촉진 및 발암물질로 작용한다(Figure 1).⁵⁾

이러한 활성산소를 제거하기 위한 항산화제에는 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl gallate(PG) 등과 같은 합성 항산화제, tocopherol류, flavonoids류, 탄닌류, ascorbic acid, carotenoids, glutathione, 아미노산 등과 같은 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소가 있다(Figure 2). 그런데 합성 항산화제인 BHT와 BHA 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 지금까지 널리 사용되어 왔으나, 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성 등의 문제가 제기되어 허용대상 식품이나 사용량이 엄격히 제한되고 있다. 또한 tocopherol과 ascorbic acid 같은 천연 항산화제는 안전성은 높지만 단독으로는

산화 연쇄반응 저지 능력이 낮고 가격이 비싼 단점이 있다. 이러한 이유로 최근에는 천연물로부터 보다 안전하고 경제적이며 효과가 뛰어난 항산화제를 분리 이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 식물유래 물질로 식물의 2차 대사산물은 자유라디칼과 활성산소의 생성을 억제하거나 제거하여 산화를 방지하기 때문에 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.^{6,7)}

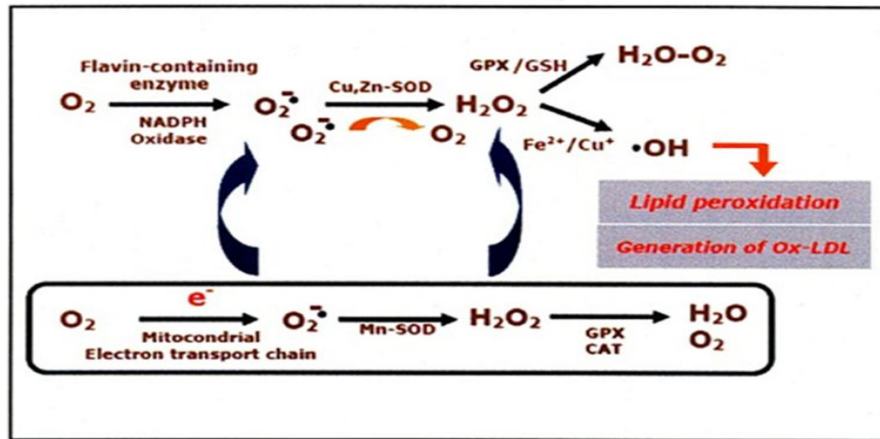


Figure 1. Oxidative and anti-oxidative systems in the cells

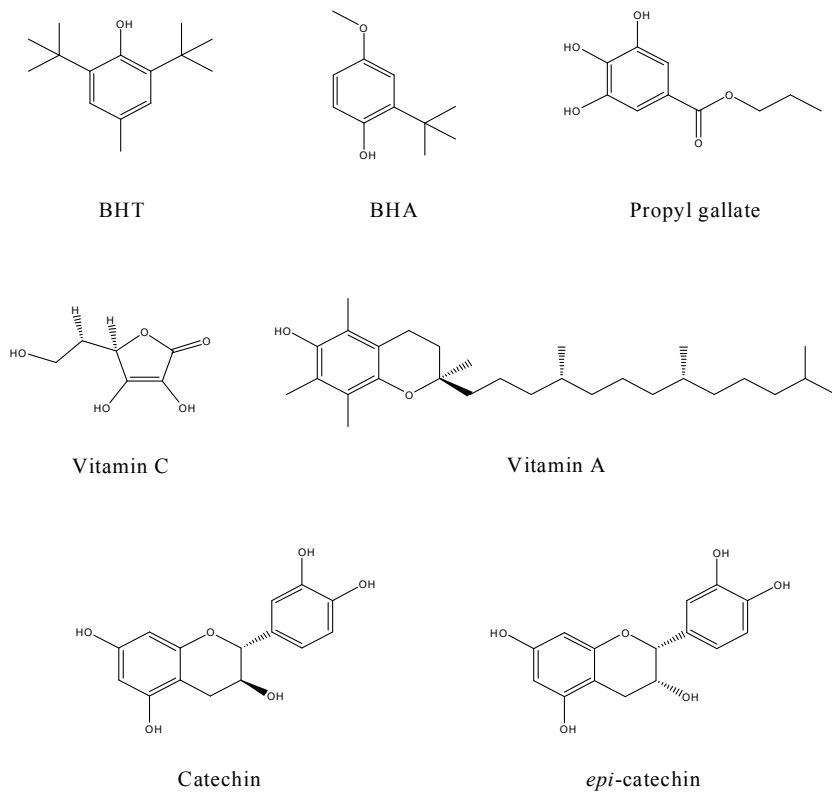


Figure 2. Structures of anti-oxidants.

3. 항염 및 항균 활성

염증반응은 상처나 감염, 또는 자가면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서, 염증발생 시 염증부위에 면역세포들이 침투되고 이들 세포들에 의해 여러 종류의 화학물질 및 cytokine를 생산 분비하여 생체방어 및 염증반응을 일으킨다.⁸⁾

대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다. 이 물질들에 의한 생체방어과정에서 염증이 유발하기에 염증분야에서는 이 물질들을 일명 염증매개물질이라 하기도 한다. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW264.7과 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다. 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성된다.⁹⁾

일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.⁹⁾

또한 염증을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다. 피부상재균 중 여드름 유발에 관여하는 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* 등을 들 수 있다. 여드름은 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 이는 주로 사춘기 나이의 사람에게서 발생하는데 이는 사춘기 나이에 분비되기 시작하는

안드로겐이라는 남성호르몬 때문인데, 안드로겐은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 각화를 일으킨다. 피지의 분비 증가와 표피 각화로 모낭-피지선에서 피지가 정체되어 모낭이 막힘에 따라 모낭내부가 *Propionbacterium acnes*를 비롯한 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다. 동시에 *Staphylococcus epidermidis*와 같은 다른 세균들이 모낭주위에 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다. 여드름 발생의 병리 조직학적인 기전은 *P. acnes*의 효소, 사이토카인 및 보체와 중성구, 손상된 각질형성세포에서 분비된 cytokine등이 염증을 일으키는데 관여하는 것으로 알려져 있으나, 아직 정확한 기전에 대해서는 알려진 바 없다. 따라서 피부염증이나 여드름의 치료 및 예방을 위해서 원인균에 대한 항균 작용을 하는 약제가 일반적으로 사용되고 있다.¹⁰⁾

*P. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 사용되고 있다. Triclosan, benzoyl peroxide, azelaic acid, retinoid, tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin 등의 항생제가 사용되고 있다(Figure 4). 그러나 benzoyl peroxide와 retinoid는 피부건조증이나 과민증을 유발하고, tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin은 항생제에 대한 내성 발생으로 인하여 지속적인 사용이 어렵고 간독성이 심하며, 칸디다증과 같은 기회 감염증이 나타날 수도 있다는 부작용이 있다.

따라서, 이런 문제점을 해결하는 안전성이 확보된 천연물을 이용한 항균효과가 있으면서 부작용이 없는 여드름 치료제를 개발하려고 노력중이며, 근래 염증분야 연구에서는 염증매개물질 생산 분비를 억제하는 천연소염물질을 찾는데 초점이 맞추어져 있는데 그 이유는 cortisol 합성세제와 같은 기존 소염제가 부작용이 많기 때문이다¹¹⁾(Figure 3).

본 연구에서는 제주자생과 식물 중 아그배나무에서 유효 성분을 분리하여 동정하고, 아그배나무 추출물과 유효 성분의 우수한 활성을 확인하고자 하였다.

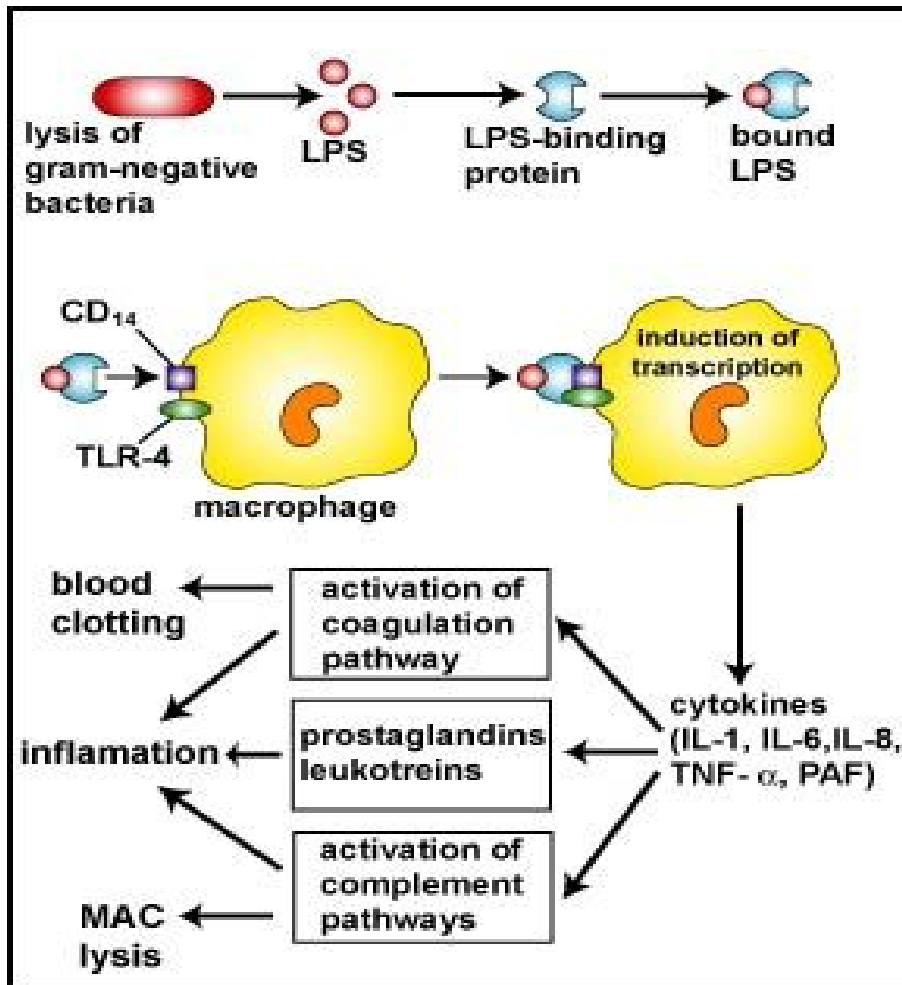
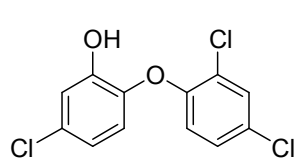
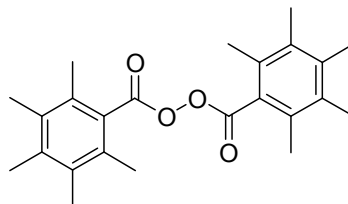


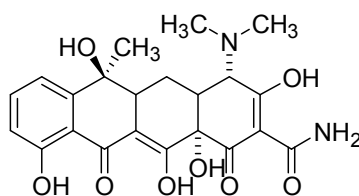
Figure 3. Anti-inflammatory reaction



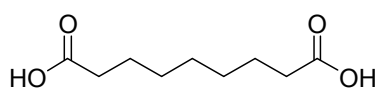
Triclosan



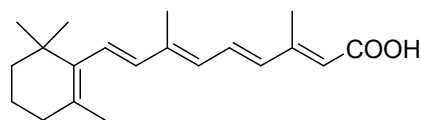
Benzyl peroxide



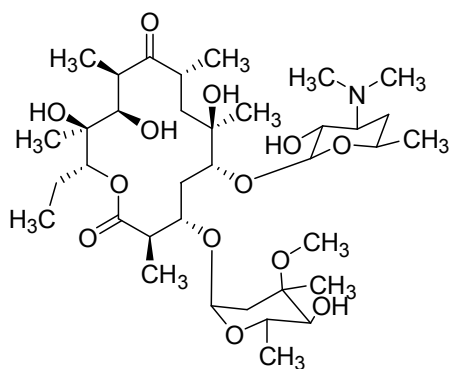
Tetracyclin



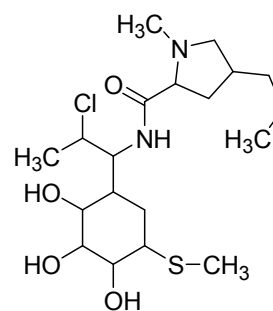
Azelaic acid



Tretinoin



Erythromycin



Clindamycin

Figure 4. Structures of antibiotics

II. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merk, Junsei의 제품을 사용하였다. VLC(Vacuum Liquid Chromatography)에는 순상 silica gel(2-25 μm , Sigma Co.)이 사용되었고, normal-phased silica gel column chromatography에는 silica gel(95-110 μm , Sigma Co.)이 사용되었다. 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20(0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merk Co.)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV/Vis Lamp(254 nm)를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액 (3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH), 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

추출물 유효성분 분석에 사용된 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 e2695 Separations module(Waters, USA)을 사용하였으며, 이동상에 사용된 용매는 Merck의 제품을 사용하였다.

구조 분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM ECX-400(JEOL Co. 400 MHz)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 Merk의 NMR 전용용매로서, CD₃OD, CDCl₃, pyridine-*d*₅을 사용하였다.

추출물과 분획물, 분리된 화합물의 생리활성 연구에서 흡광도 측정에는 SunriseTM(Tecan Co.) 이나 UV/Vis spectrophotometer는 Thermo Electron Corporation사의 Multiskan Ex(ELISA reader)를 필요에 따라 사용하였다.

Ⅲ. 연구과제

: ‘아그배나무 가지’ 의 유효 성분 분리 및 활성 검색

1. 재료

아그배나무 (*Malus sieboldii*)는 쌍떡잎 식물 장미과(Rosaceae)의 낙엽활엽 관목이다. 열매의 모양이 작은 배를 연상한다 하여 아기배나무란 의미가 아그배 나무가 되었다고 한다. 황해도 이남 및 제주도에 자생하며 해발 400-1,200 m의 숲 가장자리에 자라나 1,500 m 이상에서도 드물게 자란다. 잎은 타원형으로 예저이고 길이 3-5 cm이며 가장자리에 톱니가 있다. 3-5갈래로 약간 갈라지는 수도 있다. 양 면에 털이 있다가 나중에 윗면의 털은 없어지며 뒷면의 맥 위에는 털이 남아 있다. 꽃은 5월에 피고 가지 끝에 4-5송이가 붙고 산형화서이다. 연분홍색 또는 흰색으로 지름 2.5-3 cm이다. 꽃자루의 길이는 3 cm가량 되고 털이 있으며 꽃받침에는 연한 털이 있다. 꽃잎은 타원상 난형으로 길이 17-18 mm이고 밑부분이 짧게 뾰족해진다. 열매는 이과로서 둥글고 지름 6-8 mm이며 적색 또는 황홍색으로 10월에 익는다. 종자는 타원형으로 길이 4 mm가량 된다. 열매는 변조, 갈증, 당뇨병의 갈증, 열에 의한 기침, 담열로 인한 경련발작 등의 약용으로 쓰이며, 관상용으로도 사용된다(Figure 5).

아그배나무에 대해서는 추출물 단위에서 항산화활성이 보고되었으나¹²⁾, 더 이상의 생리활성 연구가 진행되지 않았고 아직 유효 활성성분의 분리가 진행되지 않아 이 연구를 시작하게 되었다.

본 연구에서는 제주에서 자생하고 있는 아그배나무의 가지에서 다양한 분리과정을 통해 활성물질을 탐색 및 분리·동정하였다.



Figure 5. Picture of *Malus sieboldii*

2. 시료의 추출 및 유효성분 분리

2-1. 아그배나무 가지의 추출 및 분획(제 1차)

제주도 한라수목원에서 자생하는 아그배 나무(시료번호 : 317)를 2010년 11월 22일에 채집하여 부위별로 세분시킨 후 음지에서 자연건조 시켰다. 세분한 가지를 잘게 분쇄하여 얻은 시료 1 kg을 70% EtOH 20 L에 침적하고 실온에서 24시간 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통해 여액을 취했다. 이 과정에서 남은 잔사는 다시 70% EtOH을 이용해 동일한 조건으로 2회 반복 추출하였다. 감압여과 장치를 통해 추출된 여액을 감압 농축하여 아그배 나무의 70% EtOH 추출물 총 147.4 g을 얻었다. 이 중 30.0 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 분획을 실시 하였는데 각 용매마다 1 L씩 3번 반복 실시하여 *n*-Hex fraction, EtOAc fraction, *n*-BuOH fraction 및 H₂O fraction 총 4개의 용매분획층을 얻었다(Figure 6).

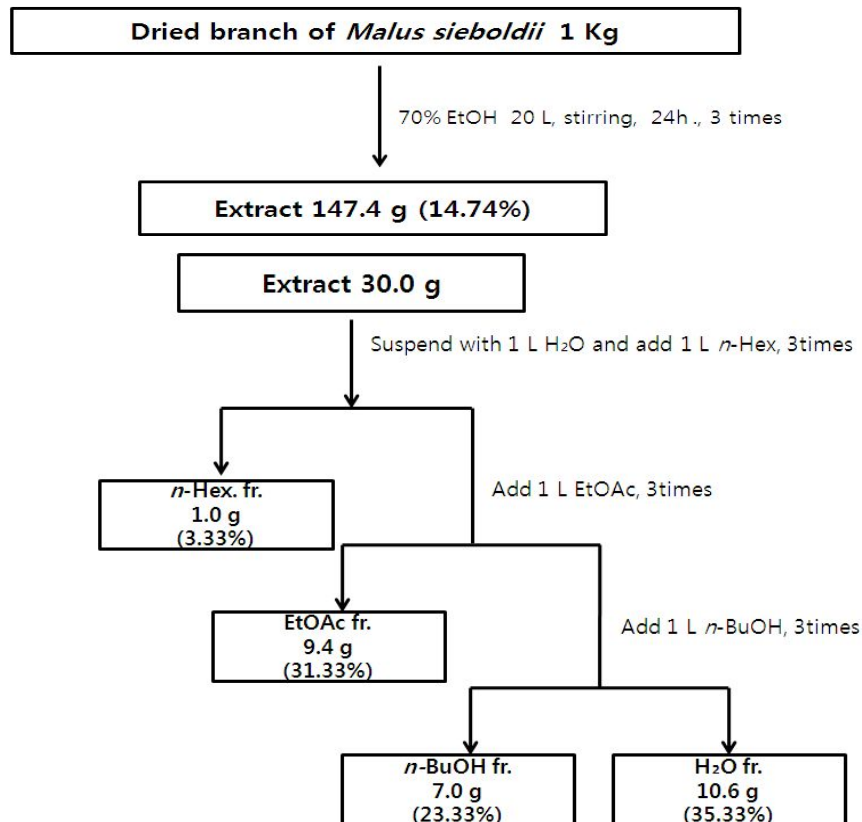


Figure 6. Procedure of extraction and solvent fraction from *M. sieboldii*

2-2. 에틸아세테이트 분획의 활성 성분 분리

2-2-1. VLC에 의한 분획과정

용매분획 하여 얻어진 EtOAc fraction 4.5 g을 VLC용 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 감압분획을 실시하였다. 사용된 용출액은 *n*-hex/EtOAc(0~100%), EtOAc/MeOH(0~100%) gradient 용매(300 mL) 조건을 이용하였다. 이 과정에서 총 37개의 분획물을 얻었다(Fr.v1 ~ Fr.v37).

2-2-2. VLC 분획물에서 화합물 1, 3 분리과정

2-2에서 얻어진 37개의 분획물 중 분획물 Fr.v6(8.1 mg)을 감압농축한 후 MeOH을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial 바닥에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 MeOH로 여러 차례 재결정하여 compound 1(3 mg)을 얻었다. 그리고 Fr.v15(104.0 mg)을 CHCl₃/MeOH = 3/1의 용매조건으로 순상 silica gel CC을 사용하여 분획하였고, 그 중 분획물 Fr.v15-5에서 compound 3(18.8 mg)을 얻었다. VLC fraction 중 Fr.v16(146.4 mg), Fr.v17(23.1 mg), Fr.v18(17.8 mg)은 TLC 확인 결과 Fr.v15-5와 패턴이 비슷하여 각각 NMR 확인 결과 compound 3로 확인하였다. 이는 현재 널리 알려진 화합물이므로 더 이상의 정제 분리는 진행하지 않았다(Figure 7).

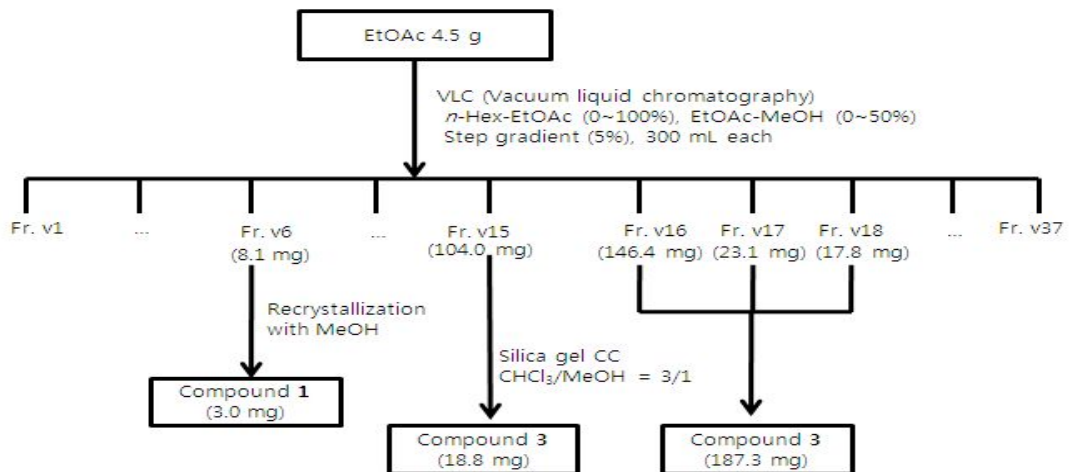


Figure 7. Procedure of isolation of compounds 1, 3

2-2-3. VLC 분획물에서 화합물 4, 5, 7 분리과정

또한 Fr.v23(1044 mg) 중 일부만 덜어, Fr.v23-M2(507.9 mg)을 $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{MeOH} = 2/2/1$ 의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 분획하였다. 그 중 분획물 Fr.v23-M2-4에서 compound 4(24.0mg)을 얻었다. 그리고 분획물 중 TLC 확인 결과 Fr.v23-M2-7과 Fr.v23-M2-8의 패턴이 비슷하여 이를 합쳐 (29.4 mg)을 $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/2/1/0.2$ 의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 분획하였다. Fr.v23-M2-7&8-1에서 compound 5(8.9 mg)를, Fr.v23-M2-7&8-3에서 compound 7(1.2 mg)를 얻었다. 나머지 남아있는 양, Fr.v23-M3(308.2 mg)을 $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{MeOH} = 2/2/1 \sim 2/4/1$ gradient의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 분획하였다. 분획물 중 Fr.v23-M3-10에서 compound 4(18.0 mg)을 더 얻었으며, Fr.v23-M3-11(97.2 mg)와 Fr.v23-M3-12(46.8 mg)을 각각 다시 한 번 $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/1/1/0.2$ 의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 분획하여 Fr.v23-M3-11-4에서 compound 5(42.1 mg), Fr.v23-M3-12-1에서 compound 7(1.9 mg)을 더 얻었다(Figure 8).

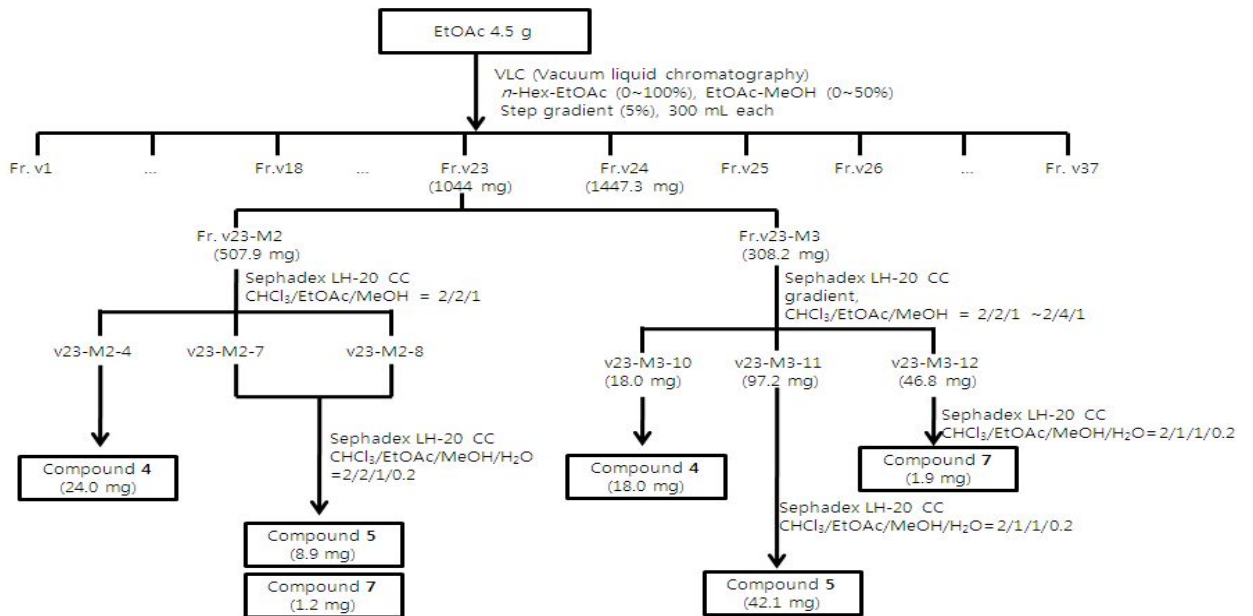


Figure 8. Procedure of isolation of compounds 4, 5, 7

2-2-4. VLC 분획물에서 화합물 2, 6, 8, 9 분리과정

Fr.v24(1447.3 mg)을 MeOH을 사용해 재결정하여 compound 9(77.1mg)을 얻었으며, MeOH에 녹는 Fr.v24-M(1299.7 mg)을 CHCl₃/MeOH = 100/0 ~ 50/50 gradient의 용매 조건으로 VLC용 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 감압분획을 실시하여 7개의 분획물을 얻었다(Fr.v24-M-1 ~ Fr.v24-M-7).

Fr.v24-M-2(33.2 mg)을 감압농축한 후 MeOH을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial 바닥에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 MeOH로 여러 차례 재결정하여 compound 2(4 mg)을 얻었다. 그리고 Fr.v24-M-5을 각각 MeOH/H₂O = 1/1 용매에 녹인 후 CHCl₃을 소량 첨가 후 하루 간 방치에 두었더니, 노란색 알갱이가 생성되었다. 이를 같은 방법으로 여러 차례 재결정하여 compound 8(104.2 mg)을 얻었다. 같은 방법으로 분획물 Fr.v24-M-4(783.4 mg)을 용해도 차이에 의해 분리하여 MeOH에 용해되는 분획물 Fr.v24-M-4-1(362.1 mg)을 CHCl₃/EtOAc/MeOH/H₂O = 1.5/3/1/0.2의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 분획하였다. 그 중 분획물 Fr.v24-M-4-1-4 와 Fr.v24-M-4-1-5에서 compound 6(42.0 mg)을 얻었다(Figure 9).

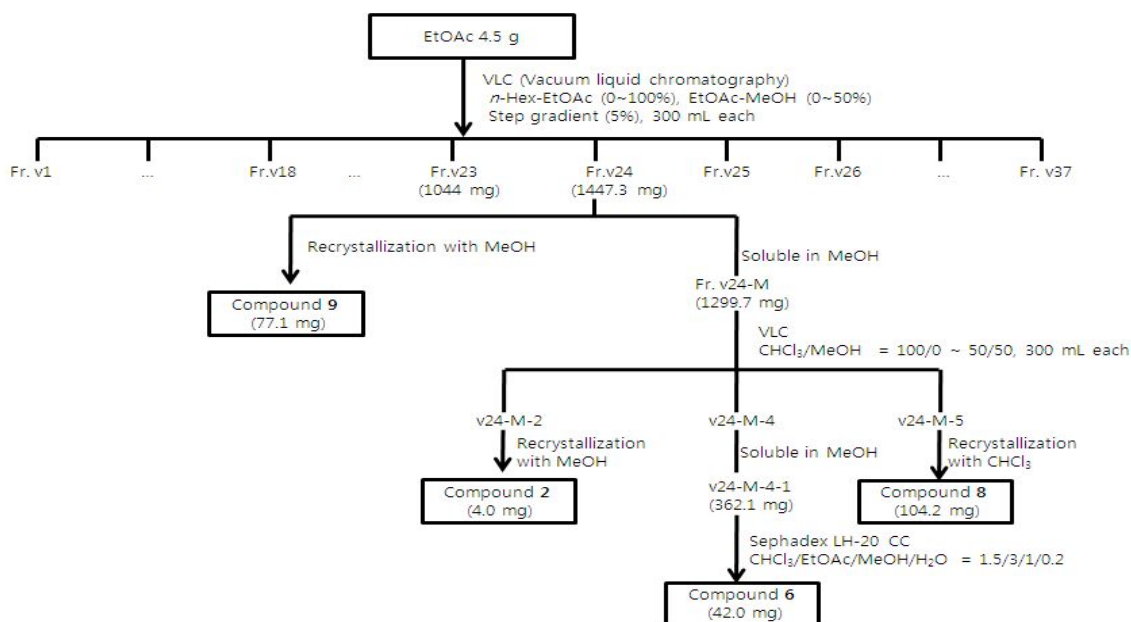


Figure 9. Procedure of isolation of compounds 2, 6, 8, 9

2-3. 아그배나무 가지의 추출 및 분획(제 2차)

2-1에서 얻은 아그배나무 가지의 70% EtOH 추출물 중 2-1의 용매분획 제 1차에서 사용하지 않고 남은 추출물(70% EtOH 117.4 g 중 30.1 g 사용)을 사용하여 1차와 같은 방법으로 2차 용매분획을 실시하였다. 따라서 2차에서도 1차와 같이 *n*-Hex fraction, EtOAc fraction, *n*-BuOH fraction 및 H₂O fraction 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다(Figure 10).

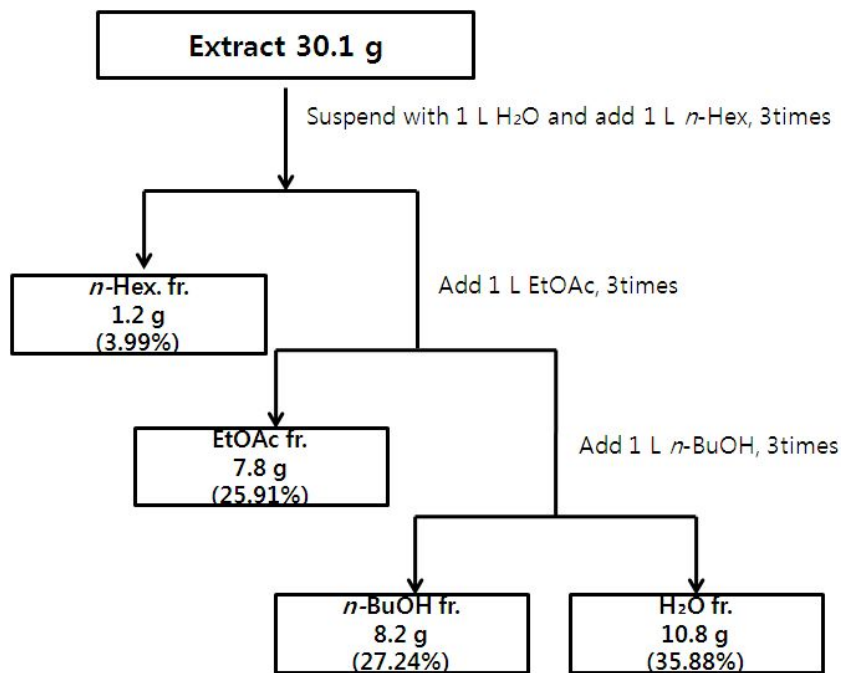


Figure 10. Procedure of extraction and solvent fraction from *M. sieboldii*

2-4. 헥산 분획의 활성 성분 분리

2-4-1. 재분획 및 VLC에 의한 분획과정

2-1과 2-3에서 용매분획 하여 얻어진 *n*-Hex fraction 2.2 g을 EtOH에 녹인 후, 원심분리기를 이용하여 2개의 층으로 나뉘었다. 그 중 EtOH에 녹는 층 1.2 mg을 VLC용 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 감압분획을 실시하였다. 사용된 용출액은 *n*-Hex/EtOAc(0 ~ 100%) gradient 용매(300 mL) 조건을 이용하였다. 이 과정에서 총 12개의 분획물을 얻었다(Fr.v1 ~ Fr.v12).

2-4-2. VLC 분획물에서 화합물 1, 10, 11, 12 분리과정

2-3-1에서 얻어진 12개의 분획물 중 분획물 Fr.v3(104.8 mg)을 감압농축한 후 EtOAc을 첨가하였을 때 녹는 층(71.5 mg)을 *n*-Hex/EtOAc = 13/1의 용매조건으로 순상 silica gell CC을 사용하여 분획하였고, 그 중 분획물 Fr.v3-2-4에서 compound 10(10.9 mg)을 얻었다. 그리고 Fr.v4(101.1 mg)을 마찬가지로 감압농축한 후 EtOAc을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial 바닥에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 EtOAc로 여러 차례 재결정하여 compound 11(15.6 mg)을 얻었다. 또한 EtOAc에 녹는 층(85.5 mg)을 *n*-Hex/EtOAc = 3/1용매조건으로 순상 silica gell CC을 사용하여 분획하였고, 분리한 compound를 좀 더 정제하기 위해 *n*-Hex/EtOAc = 9/1용매조건으로 순상 silica gell CC을 사용하여 Fr.v4-2-4에서 compound 12(19.7 mg)을 얻었다.

TLC 확인 결과 패턴이 비슷한 Fr.v5, Fr.v6, Fr.v7은 합쳐서(133.4 mg) *n*-Hex/EtOAc = 3/1용매조건으로 순상 silica gell CC을 사용하여 분획하였고, 이를 좀 더 정제하기 위해 CHCl₃/MeOH = 20/1의 용매조건으로 순상 silica gell CC을 사용하여 Fr.v5,6,7-1-2와 Fr.v5,6,7-1-3에서 compound 1(22.0 mg)를 분리하였으며 Fr.v5,6,7-1-4에서 compound 10(12.1 mg)를 더 얻었다(Figure 11).

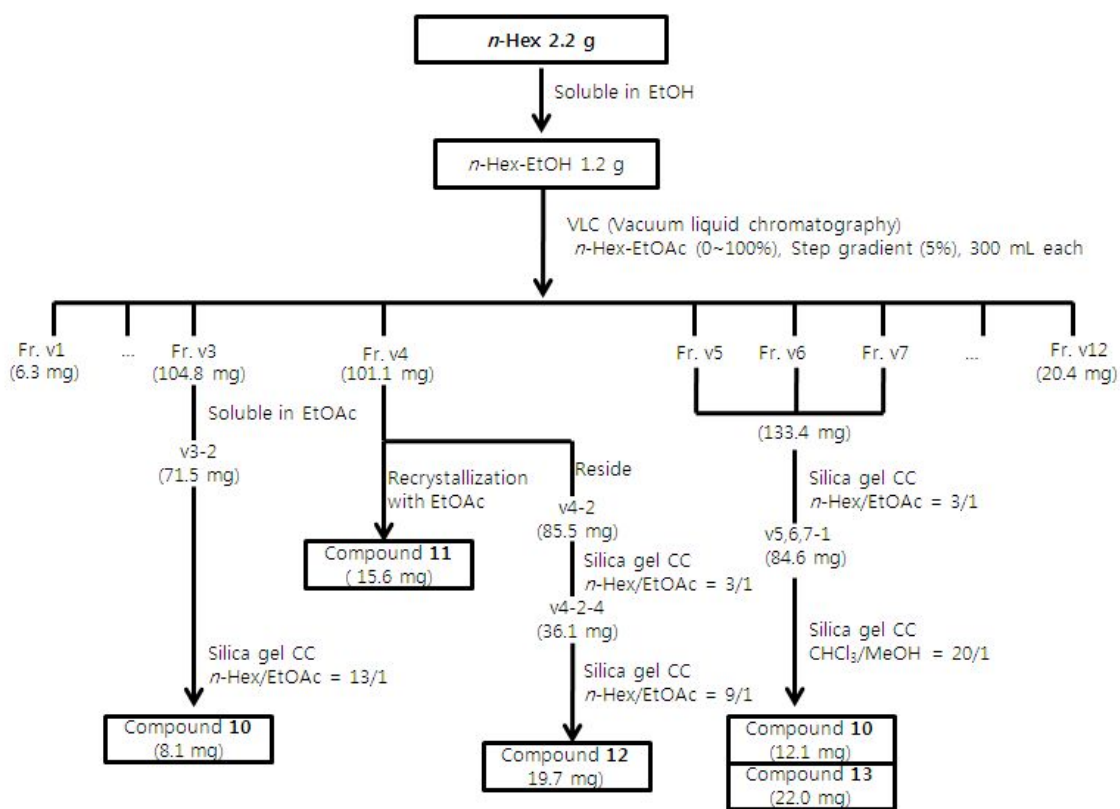


Figure 11. Procedure of isolation of compounds 1, 10, 11, 12

3. HPLC 분석

EtOAc fraction의 화합물들에 대한 정성 분석을 HPLC로 수행하였다. EtOAc fraction 및 화합물들을 2 mg/mL로 녹인 후 0.22 μ m PVDF filter(mellipore)를 이용하여 여과한 후 이 여액을 분석하였다. 각 성분 분석에는 HPLC(Waters Co., e2695 Separations module, USA)를 이용하였고, YMC-Pack Pro C₁₈ RS 컬럼(250 \times 4.6 mm, S-5 μ m, 8 nm), UV-Visible Detector(Waters 2489, USA)를 사용하였다. 주입 부피 10 μ L, 컬럼 온도 40 $^{\circ}$ C, 용리액은 각각 acetonitrile / 0.1% acetic acid를 사용하여 기울기 용리시켰고, 0.6 mL/min 유속으로 43분 동안 분석하였다. 파장은 280 nm 검출하였다(Table 1).

데이터 분석 S/W는 Waters의 Empower System을 이용하였다.

Table 1. Gradient elution condition for HPLC separation

Time (min)	Flow (mL/min)	0.1% acetic acid (%)	Acetonitrile (%)
0	0.6	90	10
5	0.6	75	25
30	0.6	60	40
35	0.6	0	100
43	0.6	90	10

4. 활성실험

4-1. 항산화 활성 실험

4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법¹³⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO:EtOH=1:1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL이 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 µL를 micro tube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합하고, 증류수 700 µL를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 화합물 함량을 환산하였다.

4-1-2. 총 플라보노이드 함량 측정

총 flavonoids 함량은 Davis법¹⁴⁾을 변형하여 실시하였다. 각 시료들을 1 mg/mL로 용매에 녹인 다음, micro tube에 시료 용액 15 µL와 ethylene glycol 150 µL를 첨가하여 혼합한 후 다시 0.1 N NaOH 15 µL를 넣고 37°C 항온조에서 1시간동안 반응 후 UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 quercetin을 이용하여 작성하고 이로부터 총 flavonoid 함량을 구하였다.

4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radical은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine(DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되어 515 nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다.

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 법¹⁵⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다 : 96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 0.2 mM DPPH(in EtOH) 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA Reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

A_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 515 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-1-4. ABTS radical cation 소거 활성 실험

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 total antioxidant activity(TAC)의 측정방법 중의 한 가지로 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 특징적인 청록색을 띠는 $ABTS^+$ radical이 형성되는 것을 이용한 방법이다. 이 청록색의 $ABTS^+$ radical은 산화될 수 있는 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 그와 반응한 물질의 산화가 일어나게 되어 흡광도의 감소가 일어나게 되면 항산화 능력을 측정할 수 있다.

ABTS radical cation 소거 활성은 Re & Pellegrin등의 방법¹⁶⁾을 응용하였고, 실험 방법은 다음과 같다: ABTS radical cation을 만들기 위하여 7.0 mM ABTS(in D.W) 용액과 2.45 mM potassium persulfate(in D.W) 용액을 1:1로 혼합하여 16시간동안 암소에서 반응시킨다. 반응 시킨 ABTS 용액과 ethanol을 1:60으로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.002 가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 ABTS 용액 180 μ L를 혼합하여 15분간 암소에서 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC_{50})를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$A_{control}$: 700 nm에서 ABTS의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 sample과 ABTS 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

4-2-1. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell을 한국 세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% Penicillin-streptomycin(Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Grand Island, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Gibco, Grand Island, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양을 실시하였다.

4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가

24 well plate에 RAW 264.7 cell을 3.0×10^5 cell/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약(1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid)을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 암실에서 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO₂)를 serial dilution하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다.

4-2-3. 세포독성 평가

세포 독성은 MTT assay를 이용하여 실험하였다. 생존하면서 대사가 왕성한 세포는, 세포 내 mitochondria의 탈 수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색인 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

를 환원시켜 자주색을 띠는 불용성 formazan을 형성 한다.

RAW 264.7 cell을 24 well plate에 3.0×10^5 cell/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후, 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 500 µg/mL 농도로 MTT를 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 완전히 제거하였다. 여기에 DMSO를 넣어 formazan을 완전히 용해 시킨 후, 이를 96 well palte에 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

4-2-4. 염증매개인자인 TNF- α , IL-6, IL- β 정량

24 well plate에 RAW 264.7 cell을 3.0×10^5 cell/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, 시료를 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배지를 원심분리하여 얻어진 상층액을 이용하여 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 를 정량하였다. 정량은 mouse IL-6 ELISA kit(BD biosciences, USA)를 이용하였다.

4-2-5. Western blotting

시료를 첨가하여 배양이 끝난 RAW 264.7 cell을 수집하여 2~3회 PBS(phosphate buffered saline)로 깨끗하게 washing한 뒤, 100µL의 lysis buffer를 첨가하여 30분간 lysis 시켰다. Lysis후 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다.

30µg의 lysate를 8 ~ 12% mini gel SDS-PAGE로 전기영동한 후 이를 Tansfer stack(iBlot™)을 이용해 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Invitrogen)으로 7분간 transfer하였다. 단백질이 transfer된

membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween 20 + TBS) 용액을 사용하여 상온에서 2시간, 4℃에서 overnight 하였다. 항체로는 anti-rabbit NOS2(Santa cruz biotechnology INC.)를 1:1000으로 anti-rabbit COX-2(Santa cruz biotechnology INC.)를 1:100으로 TTBS 용액과 희석하여 상온에서 4시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Cell signaling technology INC.)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 Opti-4CN Substrate Kit(Bio-Rad)를 이용하여 검출하였다.

4-3. 항균활성 평가

4-3-1. paper disc diffusion test

시료의 항균활성을 측정하기 위해 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 paper disc법으로 생육 억제율을 측정하였다. *P. acnes*는 0.8%를 포함하는 GAM 배지에 *P. acnes* 0.5 MacFarland로 넣어 한천 1.5%를 포함하는 GAM 배지위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려에서 37℃, 48시간동안 혐기 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환을 측정하였다.

*S. epidermidis*는 한천 0.8%를 포함하는 TSA 배지 8 mL에 *S. epidermidis* 0.5 MacFarland로 넣어 한천 1.5%를 포함하는 TSA 배지위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려 37℃에서 24시간 동안 배양하여 디스크 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다 (Figure 12).

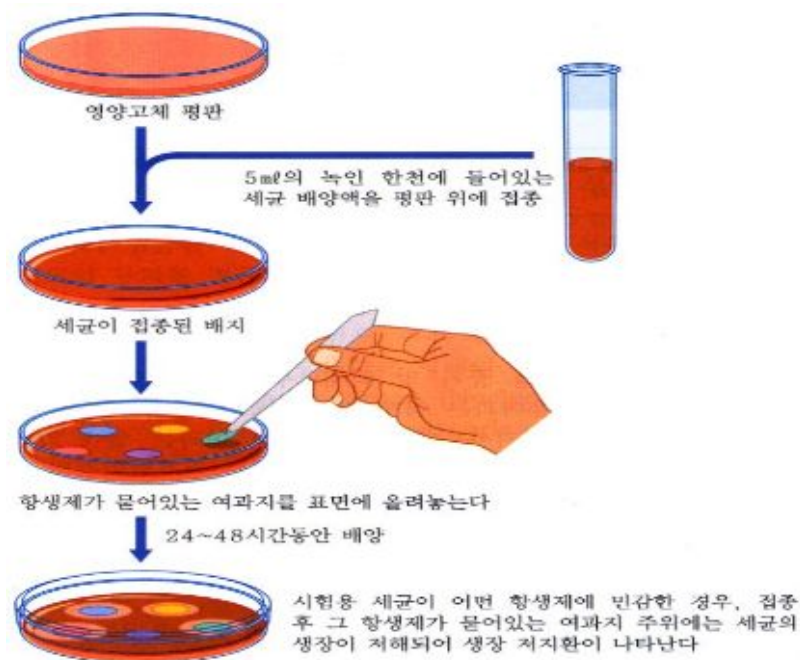


Figure 12. Paper disc diffusion method

IV. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 동정

1-1. 화합물 1 구조 동정

Compound 1의 구조는 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz), ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H -NMR spectrum 분석 결과 대부분의 signal은 δ 0.68 ~ 2.37에 분포하였으며 이는 포화 탄화수소의 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다. 이 중 δ 0.68(3H, s), 1.01(3H, s)에서 2개의 singlet, δ 0.82(3H, d, $J = 7.1$ Hz), 0.84(3H, d, $J = 7.1$ Hz), 0.93(3H, d, $J = 6.6$ Hz)에서 3개의 doublet, δ 0.85(3H, t, $J = 7.1, 7.6$ Hz)에서 1개의 triplet으로 총 6개의 methyl proton signal을 확인하였다. δ 3.55(1H, m)의 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있는 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였으며, δ 5.36(1H, d, $J = 5.3$ Hz)의 signal은 불포화된 sp^2 혼성의 수소로 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 마찬가지로, 대부분의 signal이 δ 12.0 ~ 57.0에 분포하였으며 이는 ^1H NMR spectrum에서 예상하였던 포화된 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. δ 72.0에서 나타나는 signal은 ^1H NMR spectrum에서 예상하였던 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding 된 탄소를 확인하였고, δ 121.9, δ 140.9의 signal은 불포화된 sp^2 혼성 탄소를 확인하였다. 이를 바탕으로 compound 1은 문헌¹⁷⁾과 비교하여 대부분의 식물에 함유되어 있는 sterol인 β -sitosterol로 동정하였다(Figure13).

1-2. 화합물 2 구조 동정

Compound 2의 구조는 ^1H NMR(pyridine- d_5 , 400MHz), ^{13}C NMR(pyridine- d_5 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H 와 ^{13}C NMR data를 분석한 결과, β -sitosterol과 유사한 경향을 나타내었다. ^1H NMR spectrum 분석

결과 δ 3.92 ~ 5.08의 signal을 통하여 당이 결합되었을 것이라 예상하였으며, 그 중 δ 5.08(1H, d, $J = 7.6$ Hz)의 anomeric proton의 coupling constant 값을 통하여 β 형의 glucose가 결합하였을 것이라 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 δ 103.1, 78.9, 78.5, 75.8, 72.2, 63.3의 6개의 signal을 통해 앞서 예상하였던 1개의 β -glucose가 있음을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 compound 2은 문헌¹⁸⁾과 비교하여 sterol 배당체인 β -sitosterol-3- O - β -D-glucopyranoside 즉, daucosterol로 동정하였다 (Figure14).

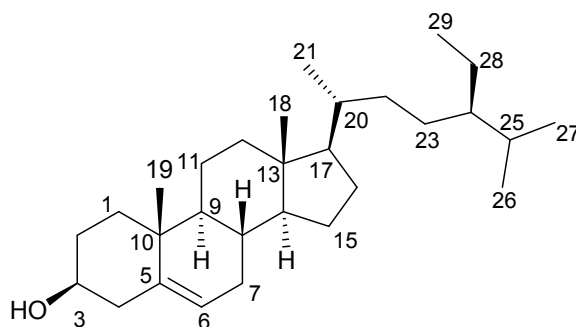


Figure 13. Chemical structure of compound 1

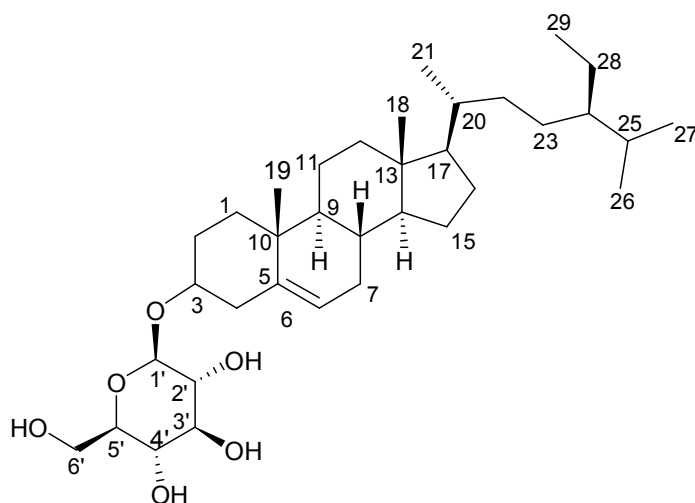


Figure 14. Chemical structure of compound 2

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **1** and **2**

No.	Compound 1		No.	Compound 2	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}		δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1		37.4	1		37.9
2		29.9	2		30.7
3	3.55(1H, m)	72.0	3	3.65(1H, m)	79.1
4		42.5	4		39.8
5		140.9	5		141.5
6	5.36(1H, d, 5.3)	121.9	6	5.37(1H, d, 4.1)	123.8
7		32.1	7		32.6
8		31.8	8		32.5
9		50.3	9		50.8
10		36.7	10		37.4
11		21.2	11		21.7
12		39.9	12		40.4
13		42.5	13		42.9
14		56.9	14		57.3
15		24.5	15		25.0
16		28.4	16		29.0
17		56.2	17		56.7
18	0.68(3H, s)	12.0	18	0.68(3H, s)	12.4
19	1.01(3H, s)	20.0	19	0.96(3H, s)	19.7
20		36.3	20		36.8
21	0.93(3H, d, 6.6)	18.9	21	1.00(3H, d, 5.5)	19.5
22		34.1	22		34.7
23		26.2	23		26.8
24		46.0	24		46.5
25		29.3	25		30.0
26	0.84(3H, d, 7.1)	19.6	26	0.89(6H, t, 7.6, 8.0)	20.4
27	0.82(3H, d, 7.1)	19.2	27		19.9
28		23.2	28		23.8
29	0.85(3H, t, 7.6, 7.1)	12.1	29	0.88(3H, t, 7.6, 8.0)	12.6
			1'	5.08(1H, d, 7.6)	103.1
			2'		75.8
			3'	3.92~4.60	78.9
			4'	(6H, overlapped)	72.2
			5'		78.5
			6'		63.3

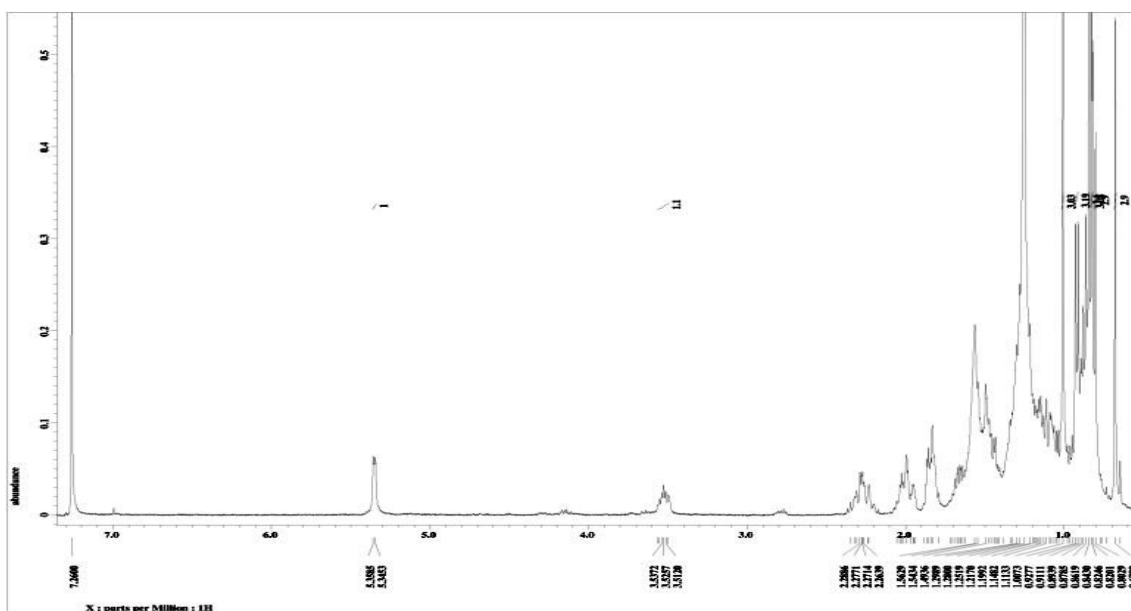


Figure 15. ^1H NMR spectrum of isolated compound 1

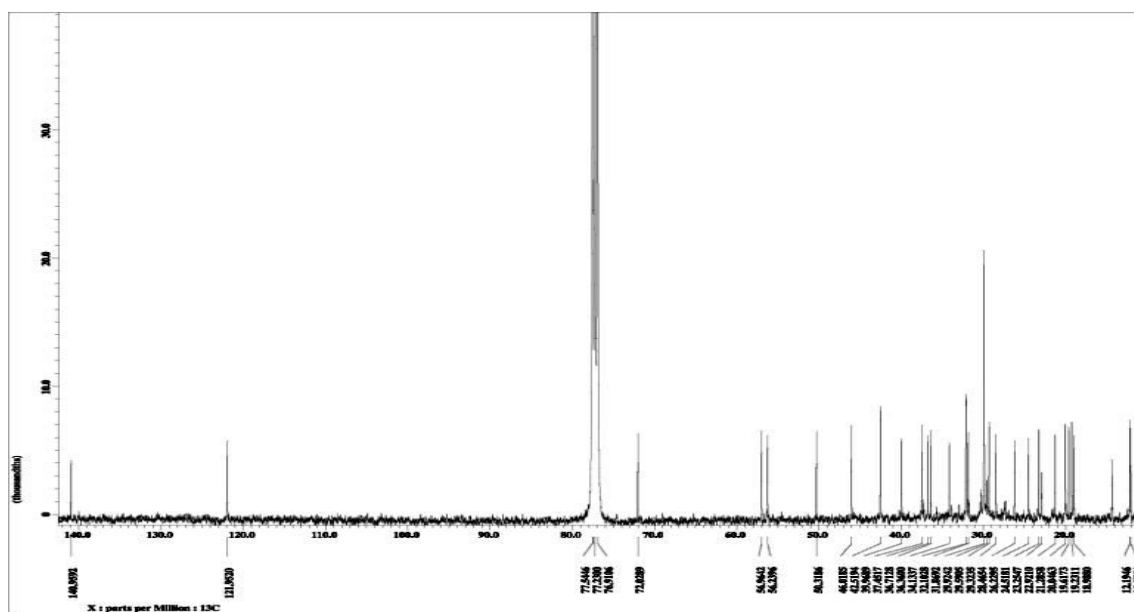


Figure 16. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 1

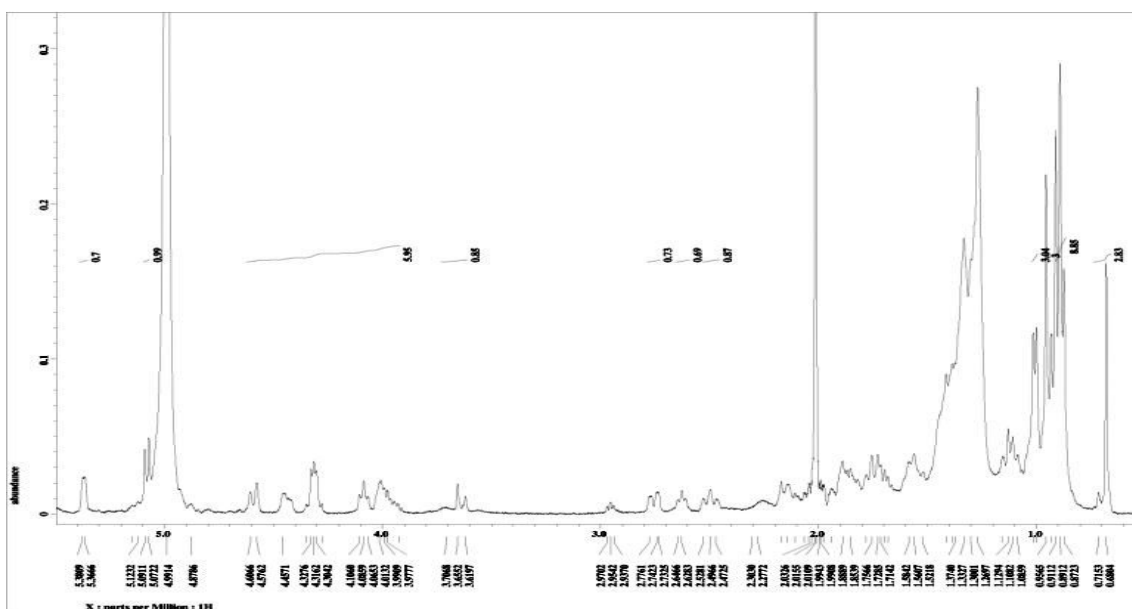


Figure 17. ^1H NMR spectrum of isolated compound 2

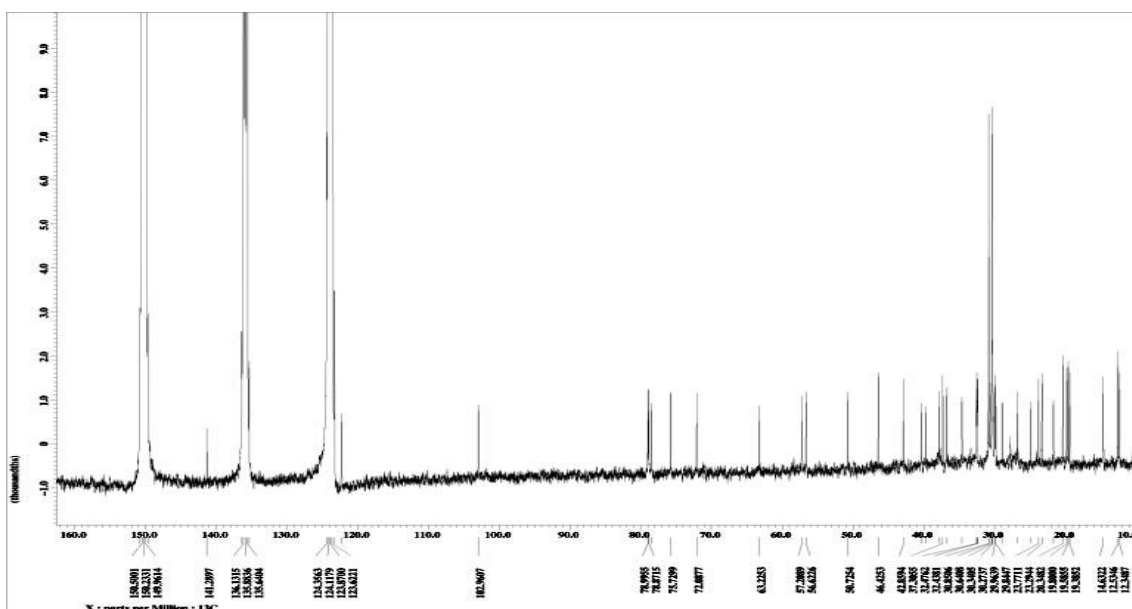


Figure 18. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 2

1-3. 화합물 3 구조 동정

Compound 3의 구조는 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz), ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 6.75(1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.80(1H, dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz), 6.97(1H, d, $J = 1.8$ Hz)의 signal은 방향족 고리의 수소임을 예상하였다. 또한 coupling constant 값을 보아 각각 방향족 고리의 *ortho*, *meta* 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다. δ 5.91(1H, d, $J = 2.3$ Hz), 5.94(1H, d, $J = 2.3$ Hz)의 signal도 방향족 고리의 수소임을 예상하였으며, *meta* 위치에서 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다. δ 4.17(1H, m), 4.81(1H, s)의 signal은 전기음성도가 큰 원소에 인접한 sp^3 탄소에 결합되어 있는 수소로 예상하였고, δ 2.73(1H, dd, $J = 2.8, 16.7$ Hz), 2.86(1H, dd, $J = 4.6, 16.7$) signal은 sp^3 혼성에 의한 수소이고, 서로 coupling 하고 있음을 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum 분석 결과 탄소의 개수가 총 15개 이상임을 알 수 있었다. δ 29.4 ~ 79.9의 signal은 포화된 sp^3 혼성의 탄소이거나 전기음성도가 큰 원소가 인접한 포화된 sp^3 혼성의 탄소를 예상하였고, δ 96.0 ~ 158.1의 signal은 불포화된 sp^2 탄소 혹은 방향족 고리의 탄소를 예상하였다. 예상한 부분 구조를 기본으로 문헌¹⁹⁾과 대조하여 구조 동정하였고, 그 결과 compound 3은 *epi*-catechin으로 동정하였다.(Figure 19)

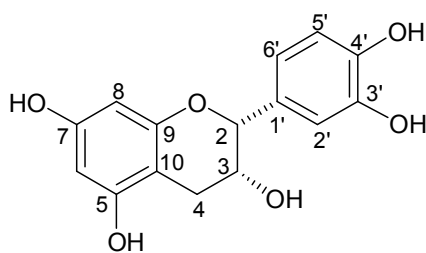


Figure 19. Chemical structure of compound **3**

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3**

No.	Compound 3	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
2	4.81(1H, s)	79.9
3	4.17(1H, m)	67.6
4	2.73(1H, dd, 2.8, 16.7)	29.4
	2.86(1H, dd, 4.6, 16.7)	
5		158.1
6	5.94(1H, d, 2.3)	96.0
7		157.7
8	5.91(1H, d, 2.3)	96.4
9		157.7
10		100.1
1'		132.4
2'	6.97(1H, d, 1.8)	115.4
3'		146.0
4'		145.8
5'	6.80(1H, dd, 1.8, 8.2)	116.0
6'	6.75(1H, d, 8.2)	119.5

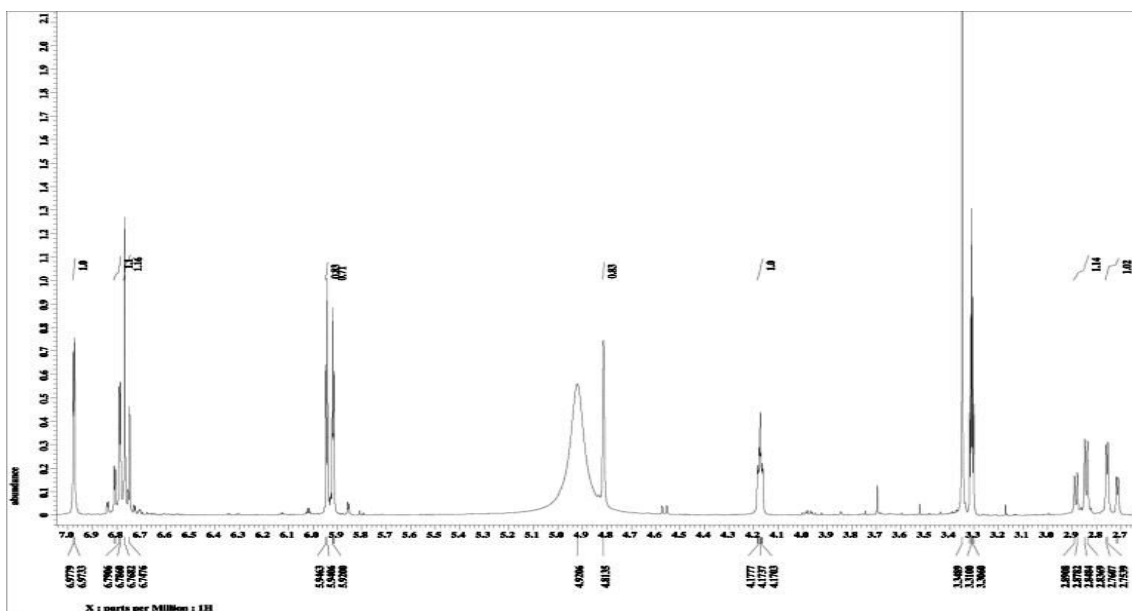


Figure 20. ^1H NMR spectrum of isolated compound 3

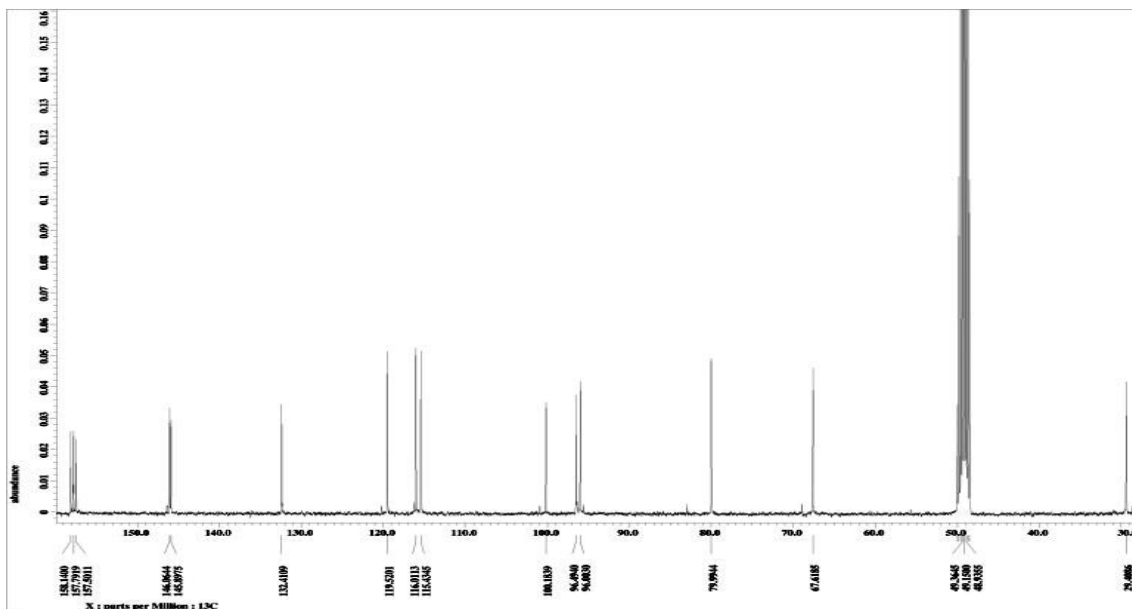


Figure 21. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 3

1-4. 화합물 4 구조 동정

Compound 4의 구조는 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz), ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 6.94(1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.56(1H, d, $J = 2.1, 8.3$ Hz), 7.59(1H, d, $J = 2.1$ Hz)의 signal은 방향족 고리의 수소로, 적분 값과 짝지음 상수 값을 통하여 *ortho*, *meta* 위치에서 coupling을 하고 있음을 예상할 수 있었다. δ 6.23(1H, s)은 불포화된 sp^2 수소 혹은 방향족 고리의 수소로 예상하였다. δ 3.88 (3H, s)의 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있는 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였으며, δ 5.48(1H, d, $J = 3.0$ Hz) 및 δ 3.52 ~ 4.34 부근의 복잡한 signal로부터 당이 하나 치환된 구조일 것이라 예상하였으며, anomeric proton의 coupling constants 값을 통해 당이 α 형으로 존재할 것이라 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 탄소의 개수가 총 21개 이상임을 알 수 있었고, DEPT-135를 통해 4차 탄소가 11개, methine기가 8개, methylene기가 1개, methyl기가 1개임을 확인하였다. δ 180.0의 signal은 carboxyl 탄소를 예상되며, δ 105.1 ~ 160.3의 signal은 ^1H NMR data에서 예상하였던 불포화된 sp^2 탄소 혹은 방향족 고리의 탄소들로 이 중 δ 146.5 ~ 160.3의 signal은 전기음성도가 큰 hydroxyl기가 결합되어 있을 것으로 예상하였다. δ 62.0의 signal은 ^1H NMR data에서 예상하였던 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있는 sp^3 혼성화에 관여하는 탄소를 예상하였으며, δ 109.6의 anomeric carbon peak와 δ 62.6 ~ 88.2의 4개의 signal을 통해 5탄당인 arabinose가 결합되어 있을 것이라 예상하였다. ^1H 과 ^{13}C NMR data를 비교한 결과, quercetin에 8번 위치에 methoxyl기가 결합되어 있고, 3번에 위치에 arabinofuranose가 결합되어 있는 화합물로 예상되었으며, 예상한 구조의 정확한 구조 동정을 위해 2D NMR data를 분석하였다. ^1H - ^1H COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling하고 있는 수소를 확인하였고(Figure 25), HMQC를 통해서도 탄소에 직접 결합되어 있는 수소를(Figure 26), HMBC를 통해서도 각 탄소에 대해 long-range 결합을 하는 수소를 확인하였다(Figure 27). 이러한 결과를 바탕으로 문헌²⁰⁾과 비교한 결과 compound 4은 3-O- α -L-arabinofuranoyl-8-methoxyquercetin으로 동

정하였으며 (Figure 22), 현재까지 이 화합물의 NMR data는 proton data만 알려져 있는 것으로, 본 논문에서 carbon NMR data는 처음 밝힌다.

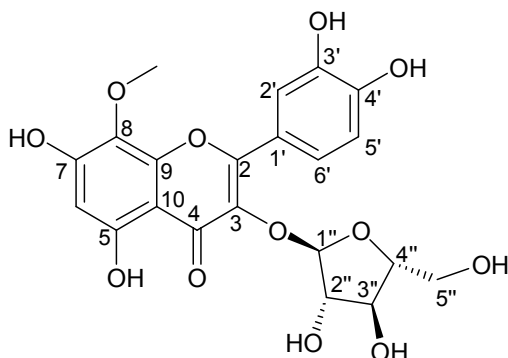


Figure 22. Chemical structure of compound 4

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 4

No.	Compound 4	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
2		159.0
3		134.9
4		180.0
5		160.3
6	6.23(1H, s)	100.7
7		158.1
8		129.5
9		150.6
10		105.1
11	3.88(3H, s)	62.0
1'		123.3
2'	7.59(1H, d, 2.1)	116.8
3'		146.5
4'		150.1
5'	6.94(1H, d, 8.3)	116.6
6'	7.56(1H, dd, 2.1, 8.3)	123.1
1''	5.48(1H, d, 3.0)	109.6
2''	4.34(1H, dd, 0.9, 3.0)	83.3
3''	3.89~3.92(2H, overlapped)	78.8
4''		88.2
5''	3.52(2H, m)	62.6

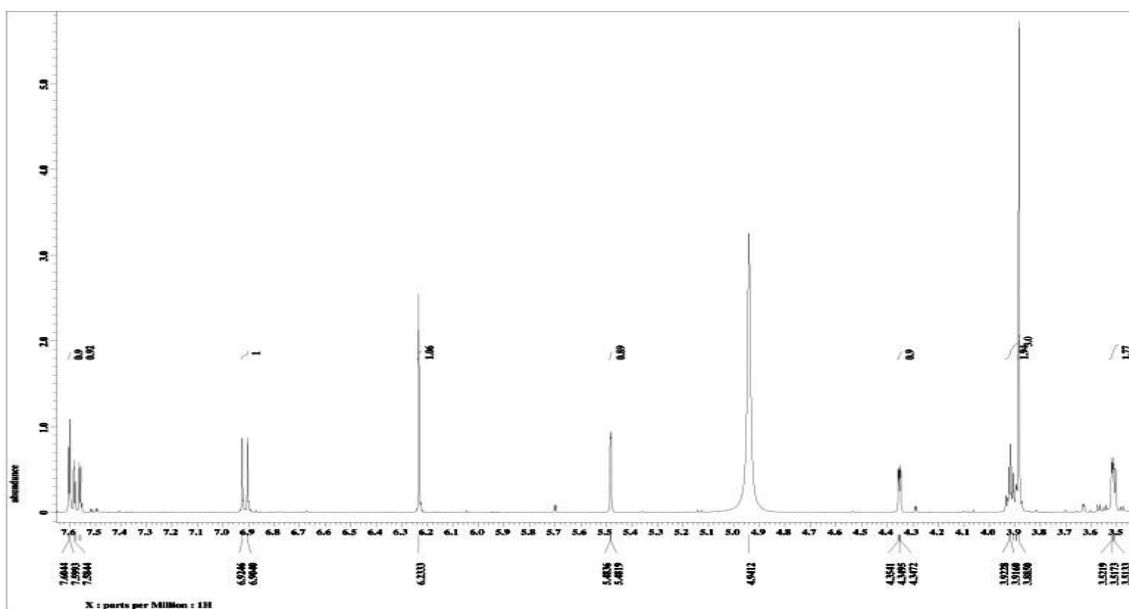


Figure 23. ^1H NMR spectrum of isolated compound 4

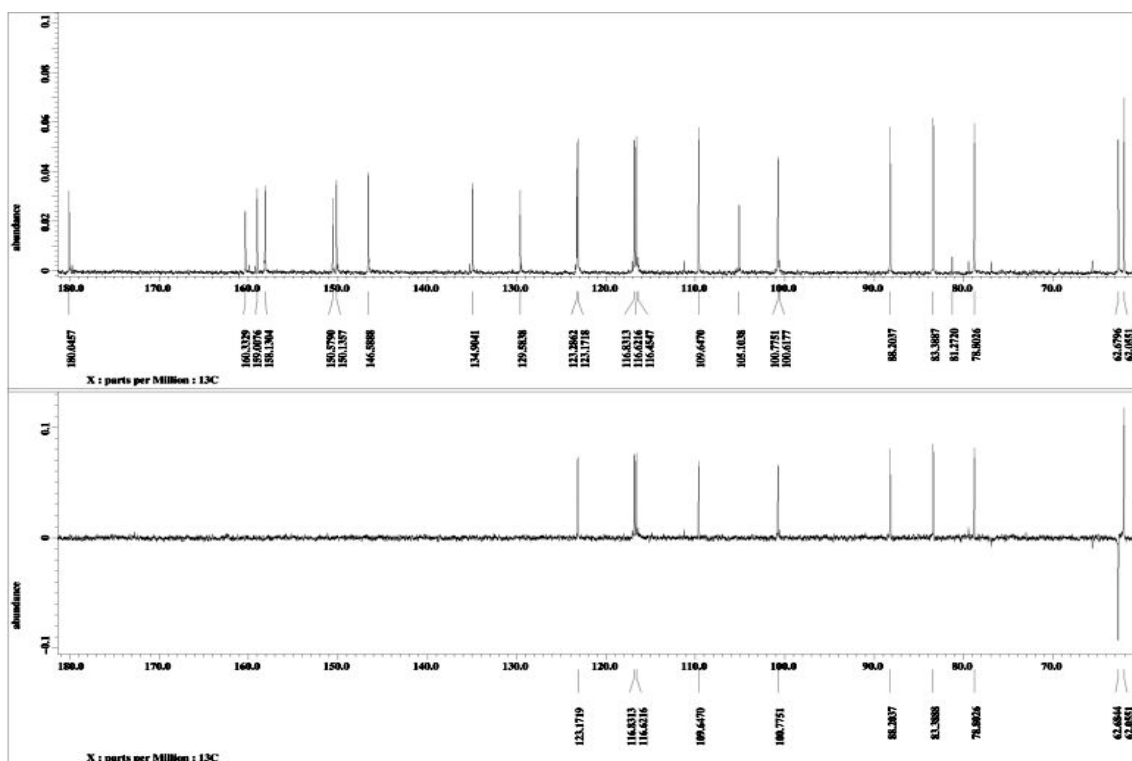


Figure 24. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 4

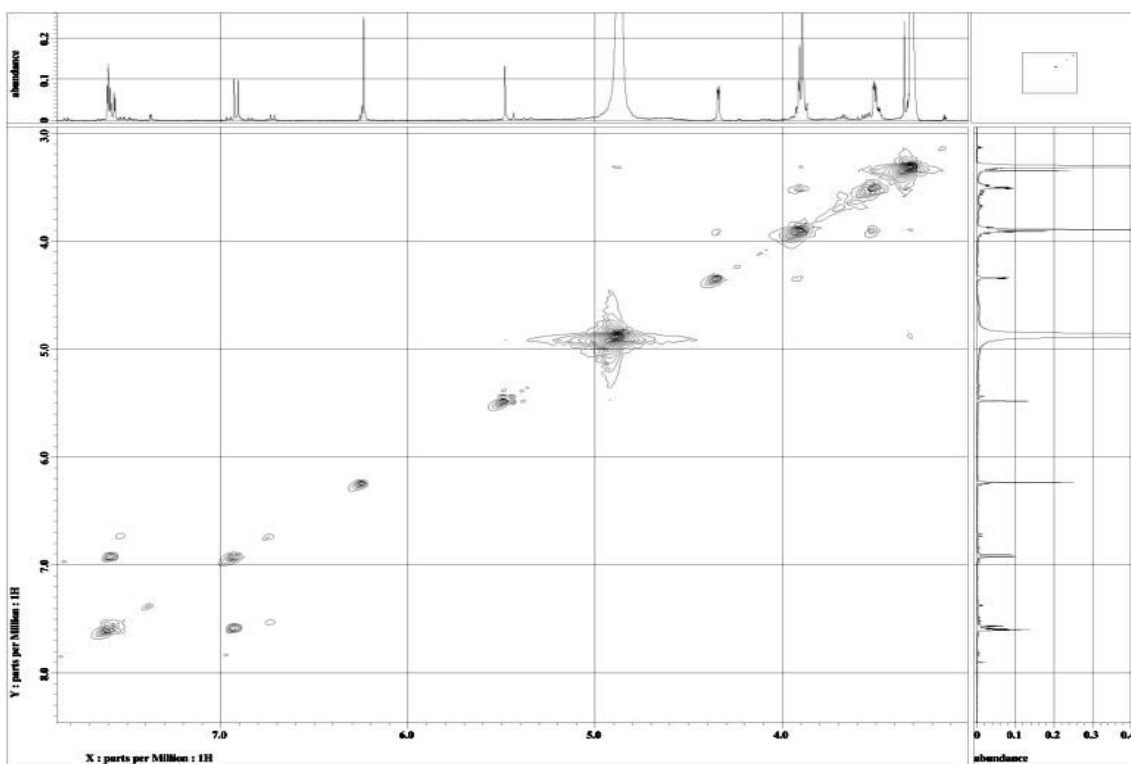


Figure 25. ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of isolated compound 4

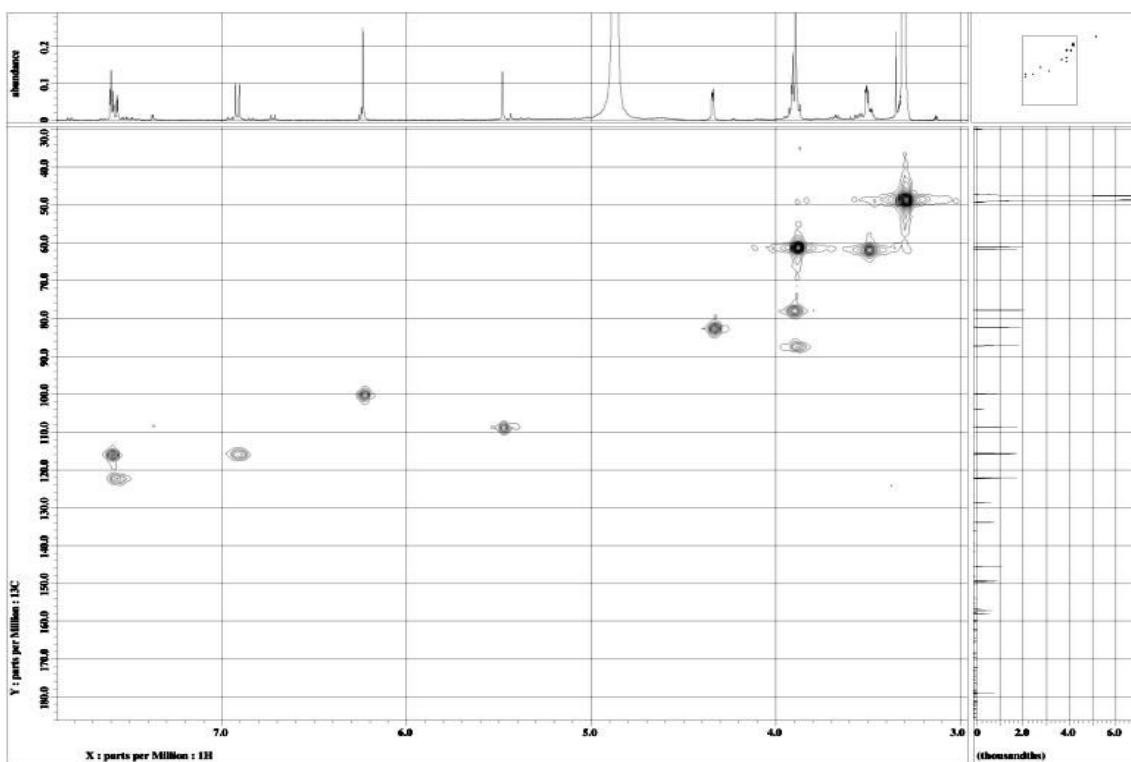


Figure 26. HMQC NMR spectrum of isolated compound 4

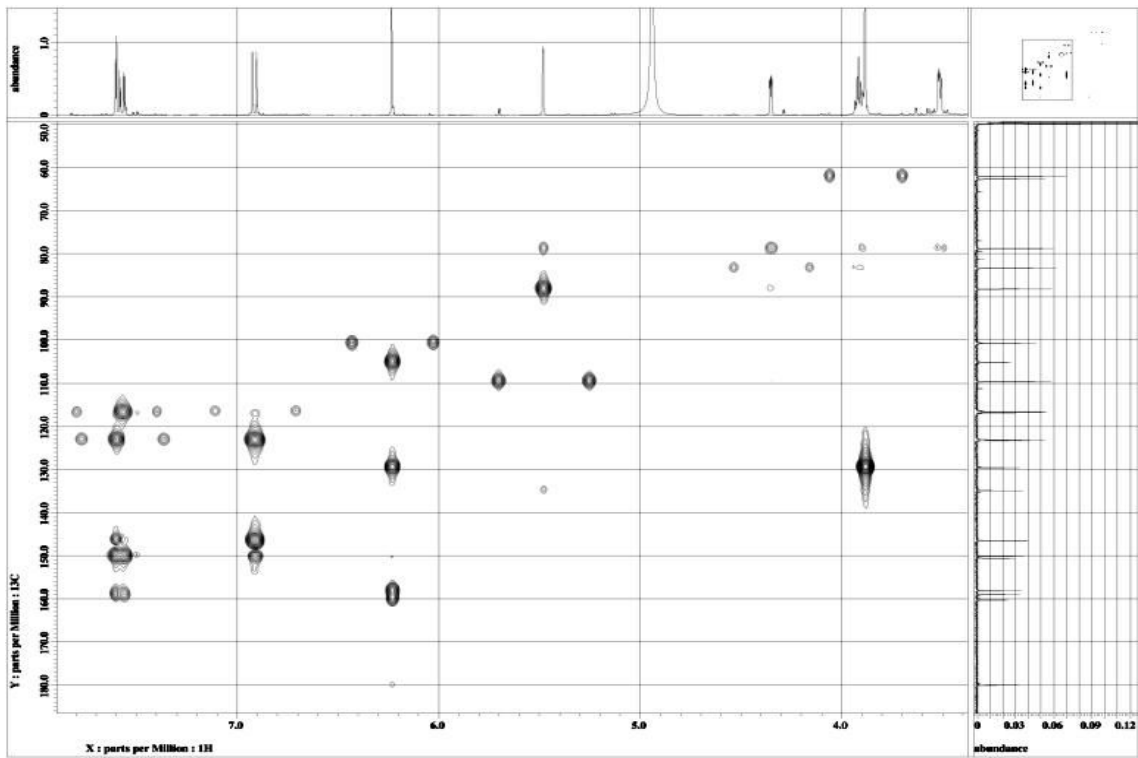


Figure 27. HMBC NMR spectrum of isolated compound 4

1-5. 화합물 5 구조 동정

Compound 5의 구조는 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz), ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 6.52(2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.90(1H, d, $J = 8.5$ Hz)의 signal은 방향족 고리의 수소로, 적분 값과 짝지음 상수 값을 통하여 *ortho*위치에서 coupling을 하는 대칭구조임을 예상할 수 있었다. δ 5.79(1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.02(1H, d, $J = 2.3$ Hz)의 signal은 불포화된 sp^2 수소 혹은 방향족 고리의 수소로 예상하였다. δ 2.71(2H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.56(1H, dd, $J = 5.3, 12.0$), 3.73(1H, m)의 signal은 methine 구조의 수소로 예상하였다. δ 4.87(1H, d, $J = 7.3$ Hz) 및 δ 3.23 ~ 3.31 부근의 복잡한 signal로부터 glucose가 하나 치환된 구조일 것이라 예상되었으며, anomeric proton peak의 coupling constants 값으로부터 β 형의 glucose가 존재할 것이라 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 탄소의 개수가 총 21개 이상임을 알 수 있었다. δ 206.6의 signal은 carboxyl 탄소로 예상되며, δ 95.7 ~ 166.3의 signal은 ^1H NMR data에서 예상하였던 불포화된 sp^2 탄소 혹은 방향족 고리의 탄소들로 이 중 δ 156.4, 162.4, 166.3의 signal은 전기음성도가 큰 hydroxyl기가 결합되어 있을 것으로 예상하였다. δ 30.9, 48.7의 signal은 ^1H NMR data에서 예상하였던 methine 구조의 탄소로 예상하였으며, δ 102.1의 anomer carbon의 signal로 앞서 ^1H NMR data에서 예상하였던 β 형의 glucose가 결합되어 있을 것이라 예상되었다. 예상한 부분 구조를 기본으로 문헌²¹⁾과 대조하여 구조 동정하였고, 그 결과 compound 5은 dihydrochalcone 골격구조에 4번, 4'번, 6'번 위치에 hydroxyl기가 치환되고, 2'번 위치에 β 형의 glucose가 결합된 phloretin-2'-*O*- β -D-glucopyranose으로 동정하였다. 이는 관용명으로 phlorizin이라 부른다 (Figure 28).

1-6. 화합물 6 구조 동정

Compound 6의 구조는 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz), ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H 과 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 compound 5와 유사한 구조의 화합물일 것이라 예상하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 6.56(1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz), 6.62(1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.69(1H, d, $J = 2.0$ Hz)의 signal은 방향족 고리의 수소로, 적분 값과 짝지음 상수 값을 통하여 *ortho*, *meta*위치에서 coupling을 하는 대칭구조임을 예상할 수 있었다. δ 5.95(1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.17(1H, d, $J = 2.1$ Hz)의 signal은 불포화된 sp^2 수소 혹은 방향족 고리의 수소로 예상하였다. δ 2.82 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 3.44(2H, m)의 signal은 methine 구조의 수소로 예상하였다. δ 5.04(1H, d, $J = 7.3$ Hz) 및 δ 3.24 ~ 3.33 부근의 복잡한 signal로부터 glucose가 하나 치환된 구조일 것이라 예상되었으며, anomeric proton peak의 coupling constants 값으로부터 β 형의 glucose가 존재할 것이라 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 탄소의 개수가 총 21개 이상임을 알 수 있었다. δ 206.6의 signal은 carboxyl 탄소를 예상되며, δ 95.5 ~ 167.7의 signal은 ^1H NMR data에서 예상하였던 불포화된 sp^2 탄소 혹은 방향족 고리의 탄소들로 이 중 δ 162.4, 166.2, 167.7의 signal은 전기음성도가 큰 hydroxyl기가 결합되어 있을 것으로 예상하였다. δ 31.2, 48.5의 signal은 ^1H NMR data에서 예상하였던 methine 구조의 탄소를 예상하였으며, δ 102.1의 anomer carbon의 signal로 앞서 ^1H NMR data에서 예상하였던 β 형의 glucose가 결합되어 있을 것이라 예상되었다. 예상한 부분 구조를 기본으로 문헌²²⁾과 대조하여 구조 동정하였고, 그 결과 compound 6은 phlorizin 구조의 3번 위치에 hydroxyl기가 결합된 3-hydroxyphlorizin으로 동정하였다.(Figure 29)

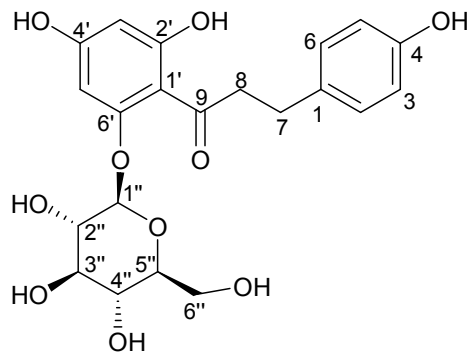


Figure 28. Chemical structure of compound 5

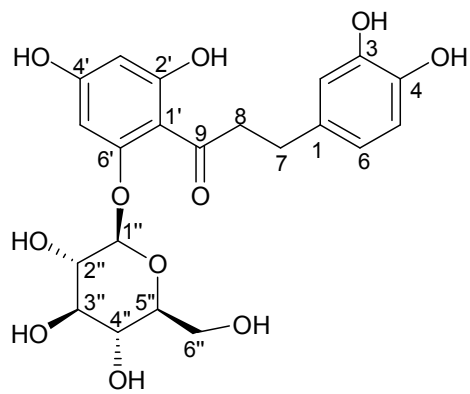


Figure 29. Chemical structure of compound 6

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **5** and **6**

No.	Compound 5		No.	Compound 6	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}		δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1		134.0	1		134.8
2	6.90(1H, d, 8.5)	130.5	2	6.69(1H, d, 2.0)	116.4
3	6.52(1H, d, 8.5)	116.2	3		144.3
4		156.4	4		146.1
5	6.52(1H, d, 8.5)	116.2	5	6.62(1H, d, 8.0)	116.7
6	6.90(1H, d, 8.5)	130.5	6	6.56(1H, dd, 2.0, 8.0)	120.8
7	2.71(2H, t, 7.6)	30.9	7	2.82(2H, t, 7.2)	31.2
8	3.56(1H, dd, 5.3, 12.0) 3.73(1H, m)	48.7	8	3.44(2H, m)	48.5
9		206.6	9		206.6
1'		106.8	1'		106.8
2'		162.4	2'		162.4
3'	6.02(1H, d, 2.3)	95.7	3'	6.17(1H, d, 2.1)	95.5
4'		166.3	4'		167.7
5'	5.79(1H, d, 2.3)	98.5	5'	5.95(1H, d, 2.1)	98.5
6'		167.7	6'		166.2
1''	5.03(1H, d, 7.3)	102.1	1''	5.05(1H, d, 7.3)	102.1
2''		74.8	2''		74.8
3''		78.6	3''	3.24~3.33	78.5
4''	3.23~3.31	71.2	4''	(4H, overlapped)	71.9
5''	(6H, overlapped)	78.5	5''		78.6
6''		62.5	6''	3.57(1H, dd, 5.3, 9.5) 3.91(1H, dd, 2.0, 9.5)	62.5

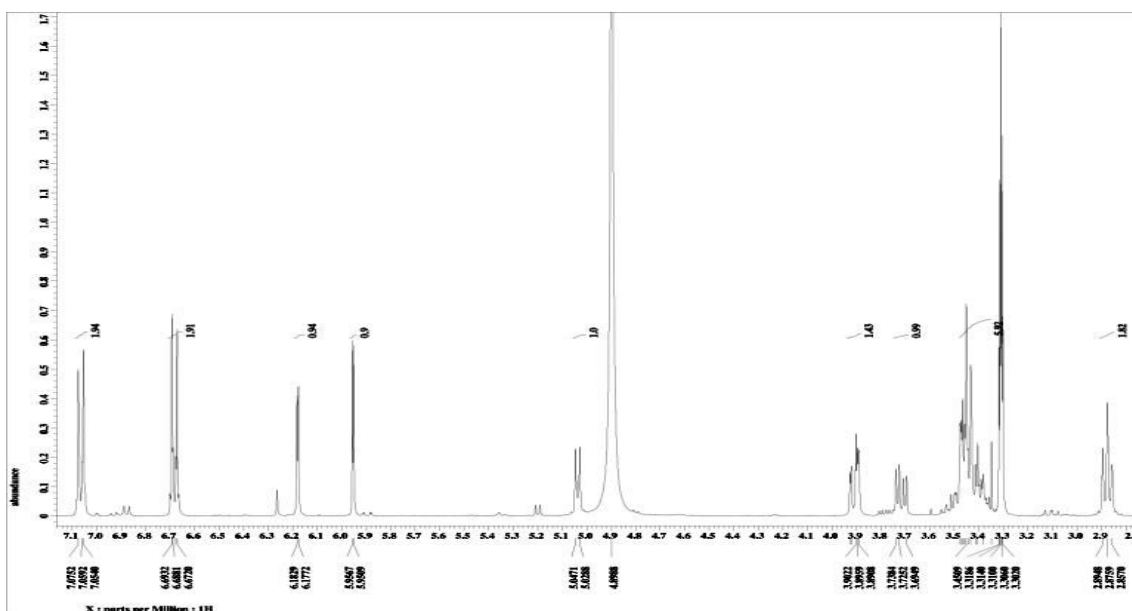


Figure 30. ^1H NMR spectrum of isolated compound 5

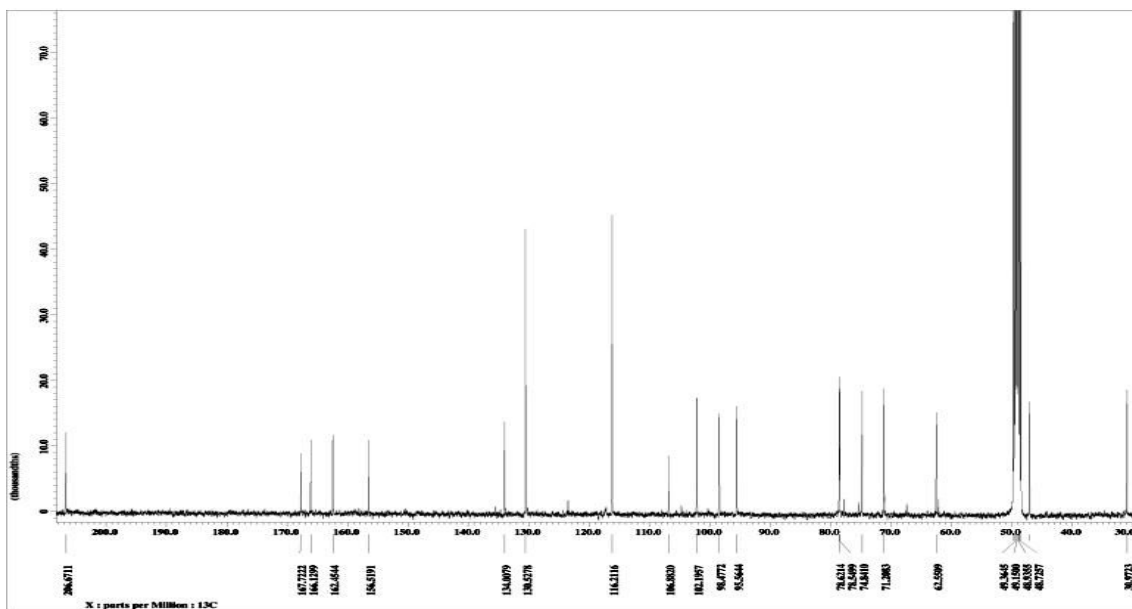


Figure 31. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 5

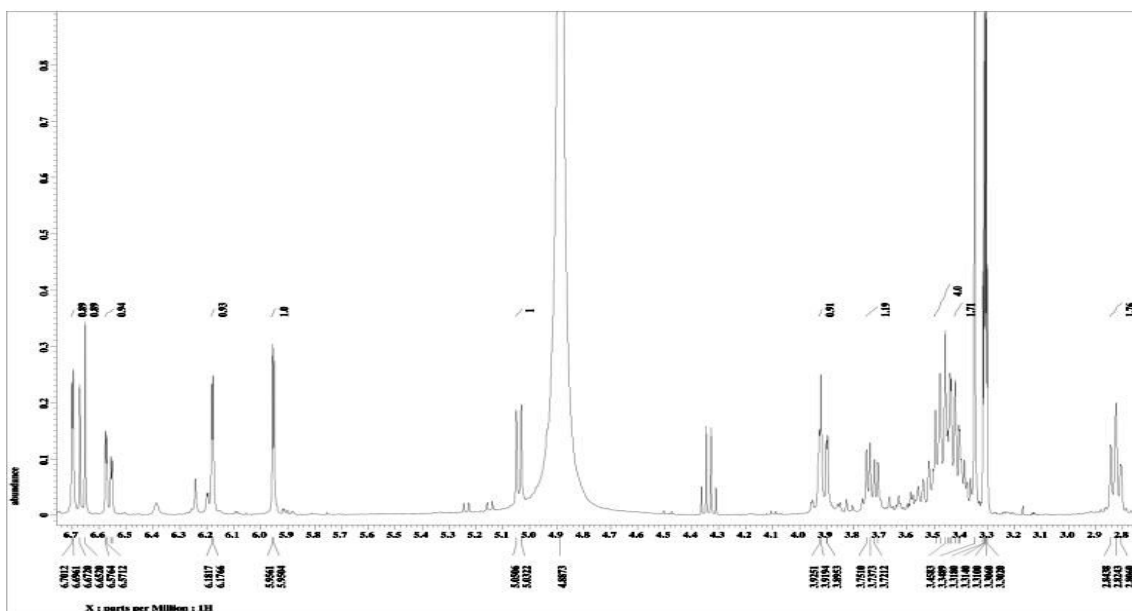


Figure 32. ^1H NMR spectrum of isolated compound 6

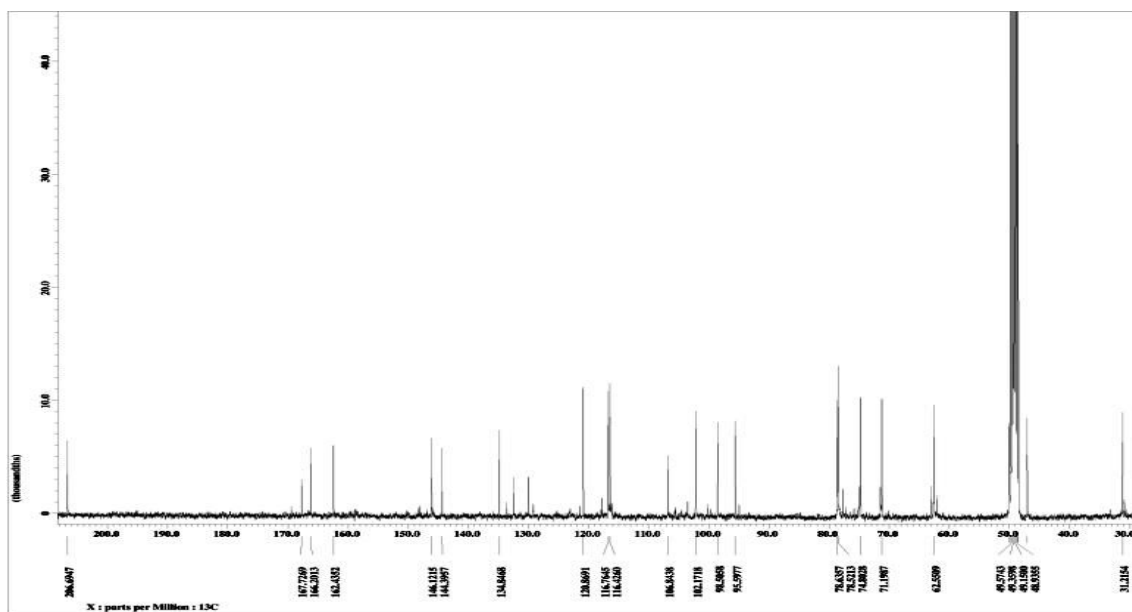


Figure 33. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 6

1-7. 화합물 7 구조 동정

Compound 7의 구조는 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz), ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H 과 ^{13}C NMR spectrum에서 전형적인 quercetin의 peak들이 관찰되었다. 그 중 ^1H NMR spectrum 분석결과 δ 5.45(1H, d, $J = 3.0$)의 anomeric proton peak와 coupling constants 값으로부터 α 형의 arabinose가 존재할 것이라 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석결과 δ 109.5의 anomeric carbon peak와 δ 62.6 ~ 88.1의 5개의 signal로부터 5탄당의 α 형의 arabinose가 결합된 구조일 것이라 예상되었다. 이를 문헌²³⁾과 비교해 본 결과 compound 7는 quercetin-3-O- α -arabinofuranoside으로 동정하였으며, 이는 관용명으로 avicularin 이라 부른다(Figure 34).

1-8. 화합물 8 구조 동정

Compound 8의 구조는 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz), ^{13}C NMR(pyridine- d_5 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H 과 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 compound 7와 마찬가지로 전형적인 quercetin의 peak들이 관찰되었다. 그 중 ^1H NMR spectrum에서 δ 4.91(1H, d, $J = 7.3$)의 anomeric proton peak와 coupling constants 값으로부터 β 형의 glucose가 존재할 것이라 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ 109.5의 anomeric carbon peak와 δ 62.8 ~ 79.0의 6개의 signal로부터 6탄당의 β 형의 glucose가 결합된 구조일 것이라 예상되었다. 이를 문헌²⁴⁾과 비교해 본 결과 compound 8는 quercetin-4'-O- β -D-glucopyranoside로 동정하였다(Figure 35).

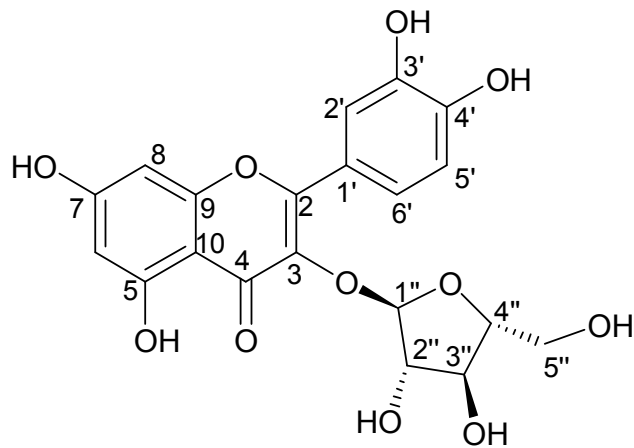


Figure 34. Chemical structure of compound 7

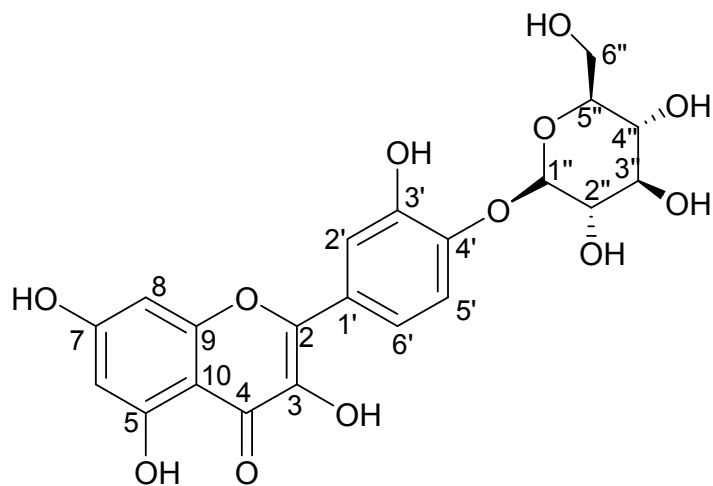


Figure 35. Chemical structure of compound 8

Table 6. ¹H and ¹³C NMR data of compounds **7** and **8**

No.	Compound 7		No.	Compound 8	
	δ_{H} (int, mult, <i>J</i> Hz)	δ_{C}		δ_{H} (int, mult, <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2		158.8	2		149.4
3		134.8	3		139.1
4		179.9	4		178.0
5		163.1	5		162.9
6	6.17(1H, d, 2.1)	100.5	6	6.14(1H, d, 1.8)	99.8
7		167.8	7		166.2
8	6.35(1H, d, 2.1)	95.2	8	6.31(1H, d, 1.8)	94.9
9		159.2	9		158.0
10		105.2	10		105.0
1'		123.0	1'		128.0
2'	7.52(1H, d, 2.1)	116.8	2'	7.70(1H, d, 2.0)	117.7
3'		146.5	3'		148.6
4'		150.1	4'		147.2
5'	6.89(1H, d, 8.3)	116.5	5'	7.23(1H, d, 8.7)	118.3
6'	7.48(1H, dd, 2.1, 8.3)	123.2	6'	7.62(1H, dd, 2.0, 8.7)	120.8
1''	5.45(1H, d, 3.0)	109.5	1''	4.91(1H, dd, 7.3)	104.0
2''	4.32(1H, dd, 0.9, 3.0)	83.4	2''		75.4
3''	3.86~3.91	78.8	3''	3.45~3.57	79.0
4''	(2H, overlapped)	88.1	4''	(4H, overlapped)	71.6
5''	3.50(2H, m)	62.6	5''		79.7
				3.76	
			6''	(1H, dd, 5.1, 12.0)	62.8
				3.94	
				(1H, dd, 1.8, 12.0)	

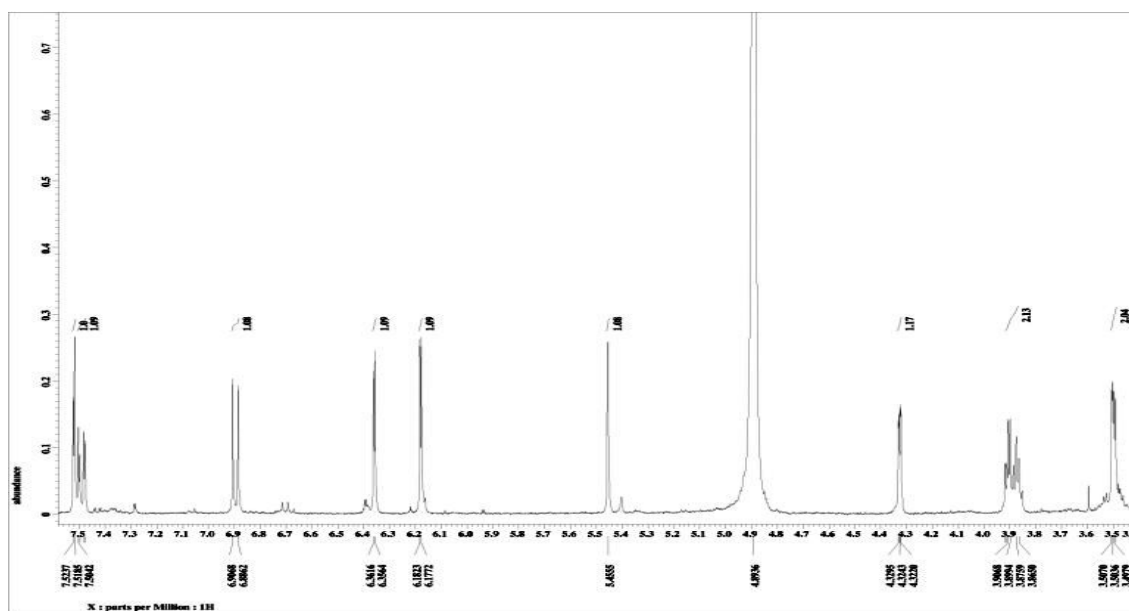


Figure 36. ^1H NMR spectrum of isolated compound 7

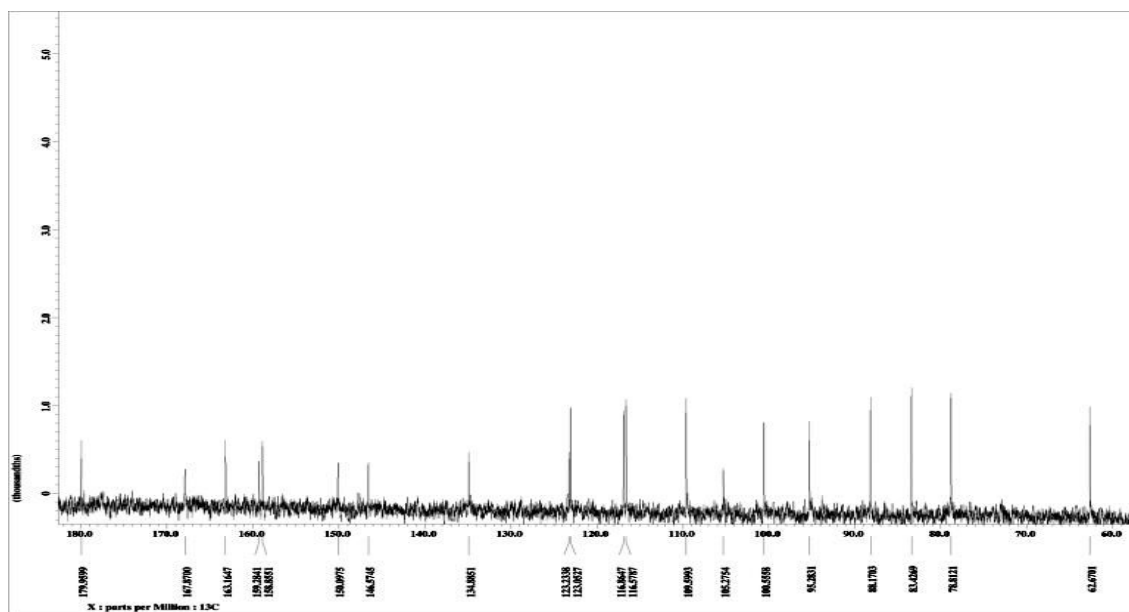


Figure 37. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 7

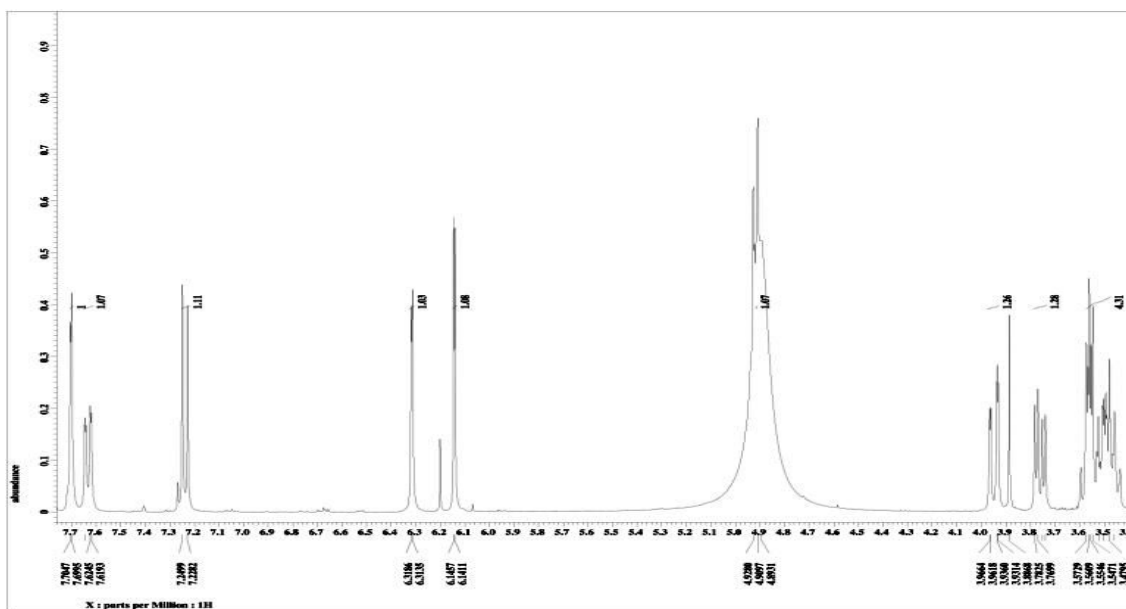


Figure 38. ^1H NMR spectrum of isolated compound 8

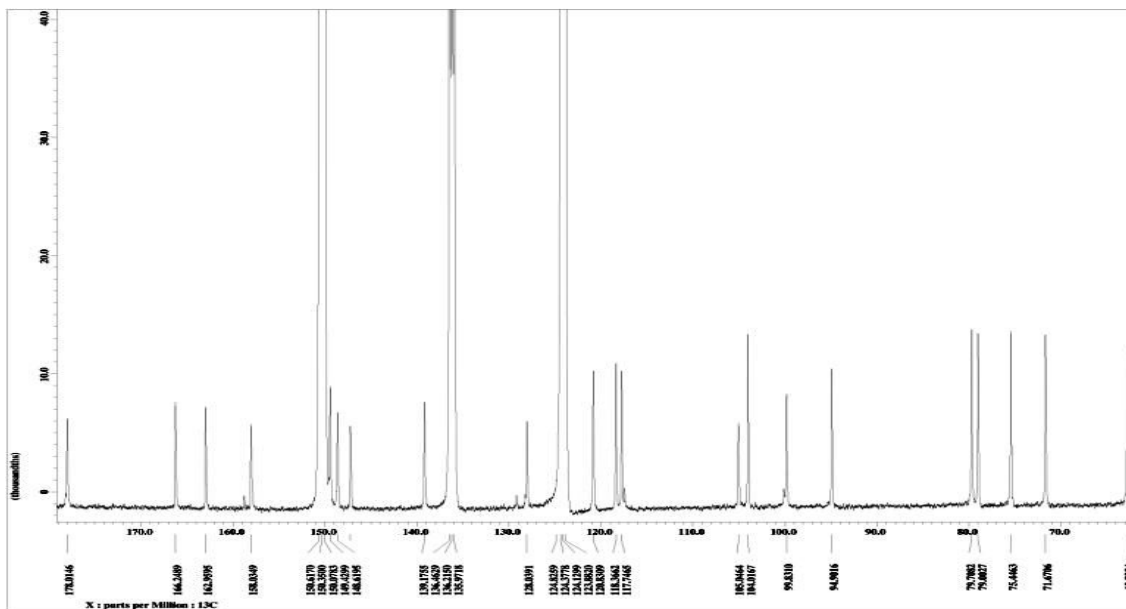


Figure 39. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 8

1-9. 화합물 9 구조 동정

Compound 9의 구조는 ^1H NMR(pyridine- d_5 , 400MHz), ^{13}C NMR(pyridine- d_5 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 δ 6.87 ~ 7.89의 signal은 불포화된 sp^2 수소 혹은 방향족 고리의 수소로 예상되었으며, 그 중 δ 7.44(2H, dd, $J = 7.3, 7.6$ Hz), 7.51(1H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.89(2H, brd, $J = 7.3$ Hz)의 signal은 적분 값과 짝지음 상수 값을 통하여 *ortho* 위치에서 coupling을 하고 있음을 예상할 수 있었다. δ 5.88(1H, d, $J = 7.3$ Hz) 및 δ 3.52 ~ 4.34 부근의 복잡한 signal로부터 β 형의 glucose가 치환된 구조일 것이라 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum 분석 결과 탄소의 개수가 총 21개 이상임을 알 수 있었으며, DEPT-135를 통해 4차 탄소가 7개, methine기가 13개, methylene기가 1개임을 확인하였다. δ 180.0의 signal은 carboxyl 탄소를 예상되며, δ 101.1 ~ 164.5의 signal은 ^1H NMR data에서 예상하였던 불포화된 sp^2 탄소 혹은 방향족 고리의 탄소들로 이 중 δ 162.7, 164.4의 signal은 전기음성도가 큰 hydroxyl기가 결합되어 있을 것으로 예상하였다. δ 101.9의 anomeric carbon peak로 앞서 ^1H NMR data에서 예상하였던 β 형의 glucose가 있을 것이라 확인할 수 있었으며, 문헌²⁵⁾과 비교한 결과 chrysin 골격구조의 7번 위치에 당이 결합된 chrysin-7-*O*- β -D-glucopyranoside으로 동정하였다(Figure 40).

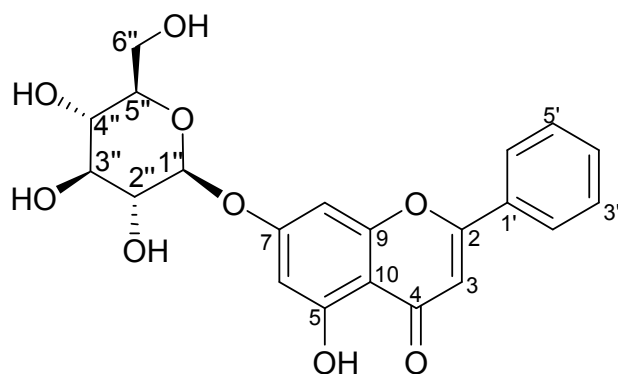


Figure 40. Chemical structure of compound 9

Table 7. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 9

No.	Compound 9	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
2		164.5
3	7.13(1H, s)	106.5
4		183.1
5		162.7
6	7.01(1H, brs)	101.1
7		164.4
8	6.87(1H, brs)	95.6
9		158.2
10		106.9
1'		131.7
2'	7.89(1H, brd, 7.3)	127.0
3'	7.44(1H, dd, 7.3, 7.6)	129.6
4'	7.51(1H, t, 7.3)	132.4
5'	7.44(1H, dd, 7.3, 7.6)	129.6
6'	7.89(1H, brd, 7.3)	127.0
1''	5.88(1H, d, 7.3)	101.9
2''	4.25(1H, m)	75.0
3''	4.38(2H, t, 8.5)	78.6
4''		71.3
5''	4.36~4.40(1H, overlapped)	79.4
6''	4.43(1H, dd, 6.3, 12.0)	62.5
	4.60(1H, dd, 1.8, 12.0)	

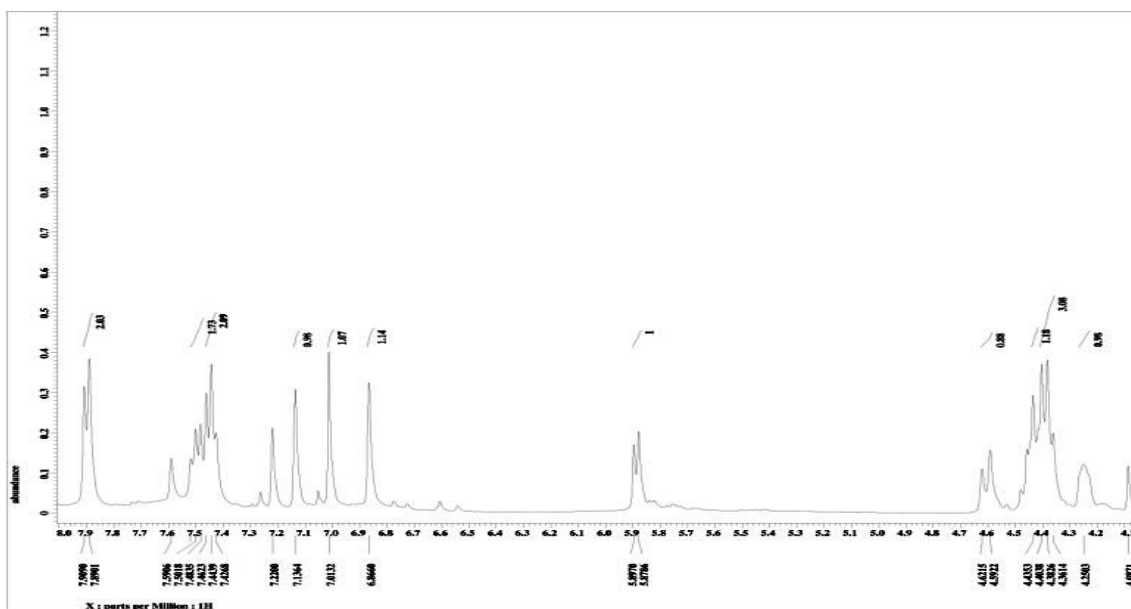


Figure 41. ^1H NMR spectrum of isolated compound 9

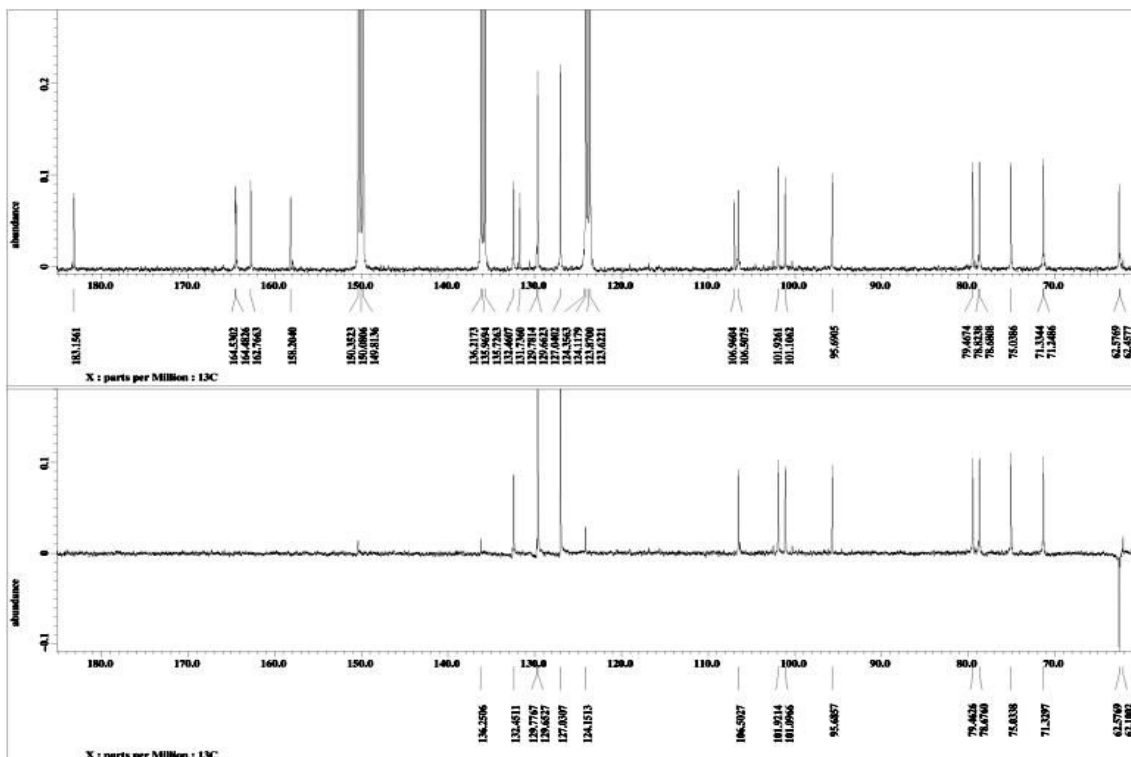


Figure 42. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 9

1-10. 화합물 10 구조 동정

Compound 10의 구조는 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz), ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 대부분의 signal이 δ 0.87 ~ 2.77에 분포하였으며, 이는 포화 탄화수소의 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다. δ 4.13(2H, m)의 signal은 전기음성도가 큰 치환기가 결합되어 있을 것이라 예상되었고, δ 5.30 ~ 5.41(2H, m)의 복잡한 signal은 sp^2 혼성화에 관여하는 수소라 예상하였다. ^{13}C NMR data에서도 마찬가지로 대부분의 signal이 δ 14.2 ~ 34.6에 분포하였으며 이는 포화된 sp^3 혼성 탄소로 예상하였으며, δ 128.1, 128.2, 130.2, 130.4의 signal은 불포화된 sp^2 혼성 탄소로 예상하였다. 비교적 난해한 ^1H NMR data로 인해 ^{13}C NMR data에 의존하여 문헌²⁶⁾과의 대조과정을 거쳐 compound 10을 ethyl linoleate로 동정하였다(Figure 43).

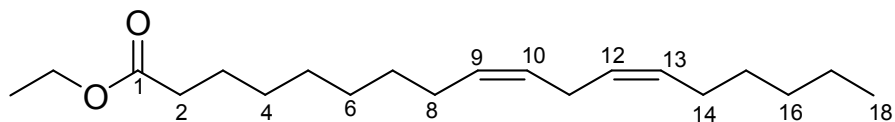


Figure 43. Chemical structure of compound 10

Table 8. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 10

No.	Compound 10	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1		174.1
2	2.28(2H, t, 7.5)	34.6
3		25.1
4		27.4
5		29.3
6		29.6
7		29.8
8		29.4
9	5.30 ~ 5.41(2H, m)	130.2
10		128.1
11	2.77 (2H, t, 7.0)	25.8
12	5.30 ~ 5.41(2H, m)	128.2
13		130.4
14	2.03	29.6
15		29.4
16		32.1
17		22.8
18	0.87(3H, t, 6.5)	14.2
-OCH ₂ -	4.13(2H, m)	60.4
-CH ₃		14.4

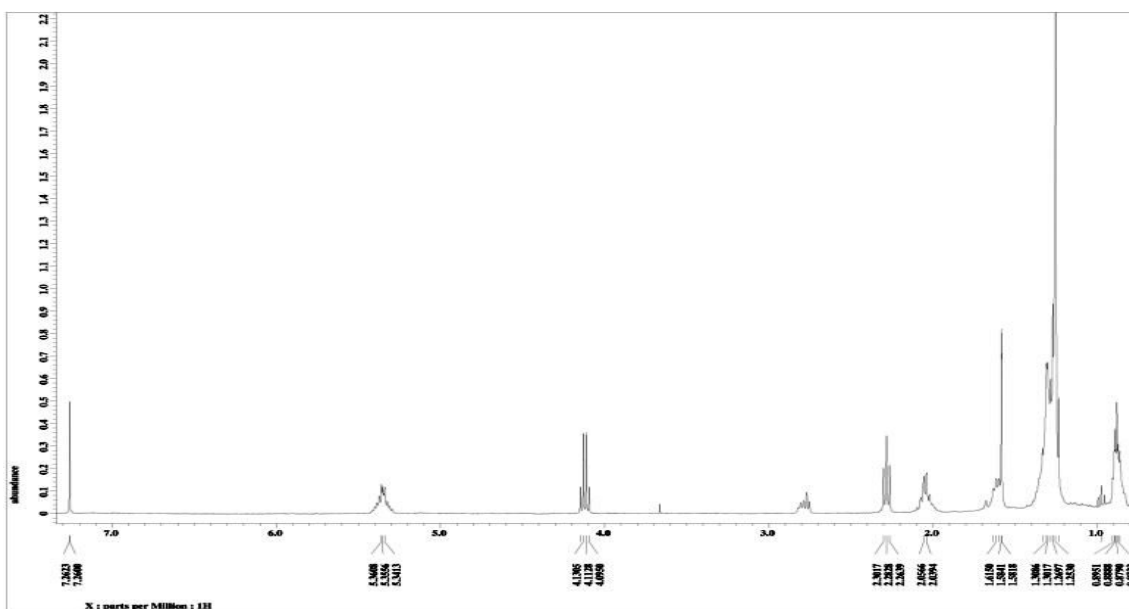


Figure 44. ^1H NMR spectrum of isolated compound 10

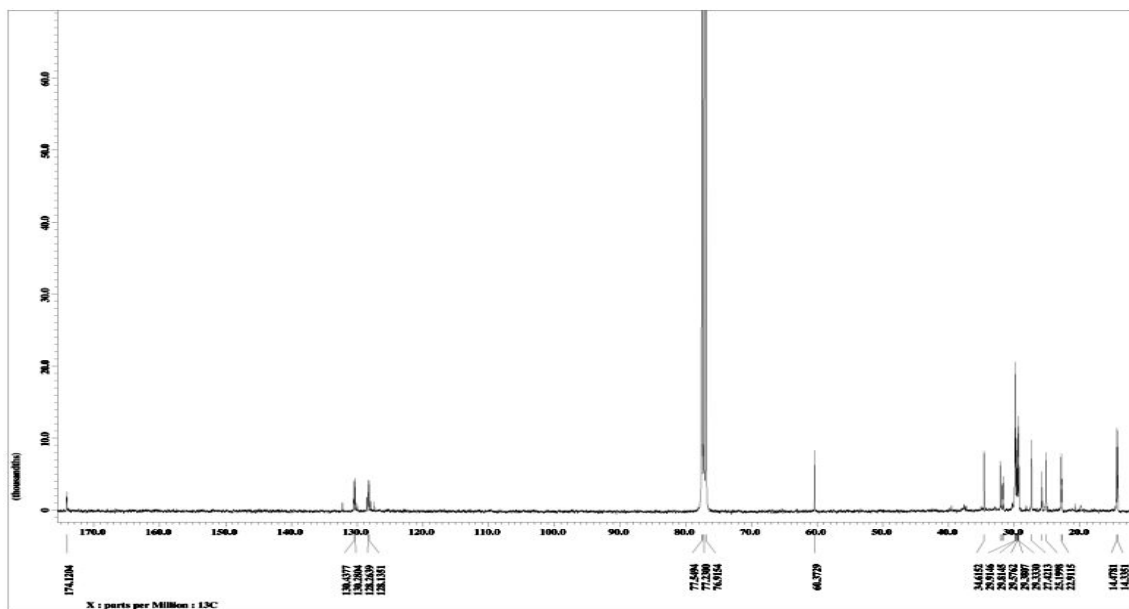


Figure 45. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 10

1-11. 화합물 11 구조 동정

Compound 11의 구조는 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz), ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 대부분의 signal은 δ 0.80 ~ 1.56에 분포하였으며 이는 포화 탄화수소의 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다. δ 3.17(1H, dd, $J = 4.4, 11.2$)의 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있는 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다. 또한 δ 5.51(1H, dd, $J = 3.6, 7.6$)의 signal은 sp^2 혼성의 수소로 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 마찬가지로, 대부분의 signal이 δ 15.6 ~ 55.7에 분포하였으며 이는 ^1H NMR spectrum에서 예상하였던 포화된 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. δ 79.2에서 나타나는 signal은 ^1H NMR spectrum에서 예상하였던 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 탄소로 확인하였고, 한 개의 hydroxyl가 있지 않을까 예상하였다. δ 117.1, 158.3의 signal은 불포화된 sp^2 혼성 탄소로 확인하였다. 비교적 난해한 ^1H NMR data로 인해 ^{13}C NMR data에 의존하여 문헌²⁷⁾과 비교하여 compound 11는 triterpene류의 Taraxerol로 동정하였다(Figure 46).

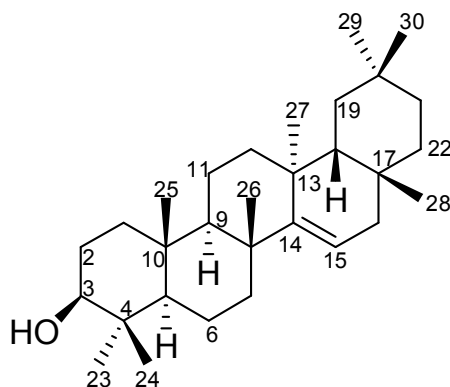


Figure 46. Chemical structure of compound 11

Table 9. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **11**

No.	Compound 11	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1		38.2
2	1.91(1H, dd, 2.7, 14.4)	27.3
	2.03(1H, dd, 3.2, 12.5)	
3	3.17(1H, dd, $J = 4.4, 11.2$)	79.2
4		38.9
5		55.7
6		19.0
7		35.3
8		39.1
9		48.9
10		38.0
11		17.7
12		36.0
13		37.9
14		158.3
15	5.51(1H, dd, $J = 3.6, 7.6$)	117.1
16		36.8
17		37.7
18		49.5
19		41.5
20		29.0
21		33.9
22		33.3
23	0.92(3H, s)	28.2
24	0.81(3H, s)	15.6
25	0.80(3H, s)	15.7
26	1.08(3H, s)	30.1
27	1.56(3H, s)	26.1
28	0.97(3H, s)	30.0
29	0.90(3H, s)	33.5
30	0.94(3H, s)	21.5

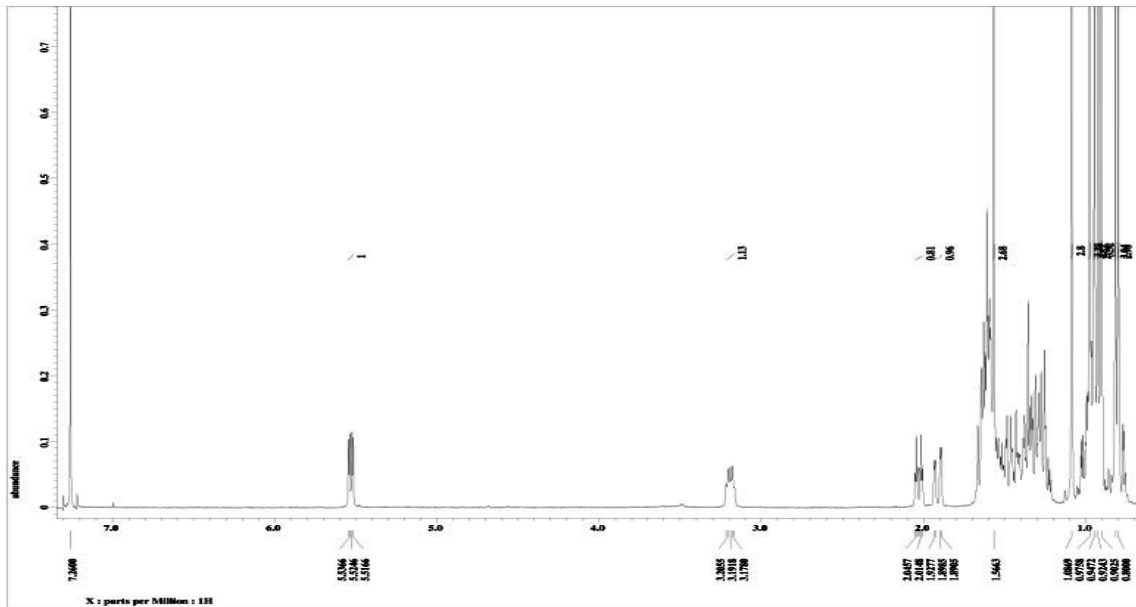


Figure 47. ^1H NMR spectrum of isolated compound 11

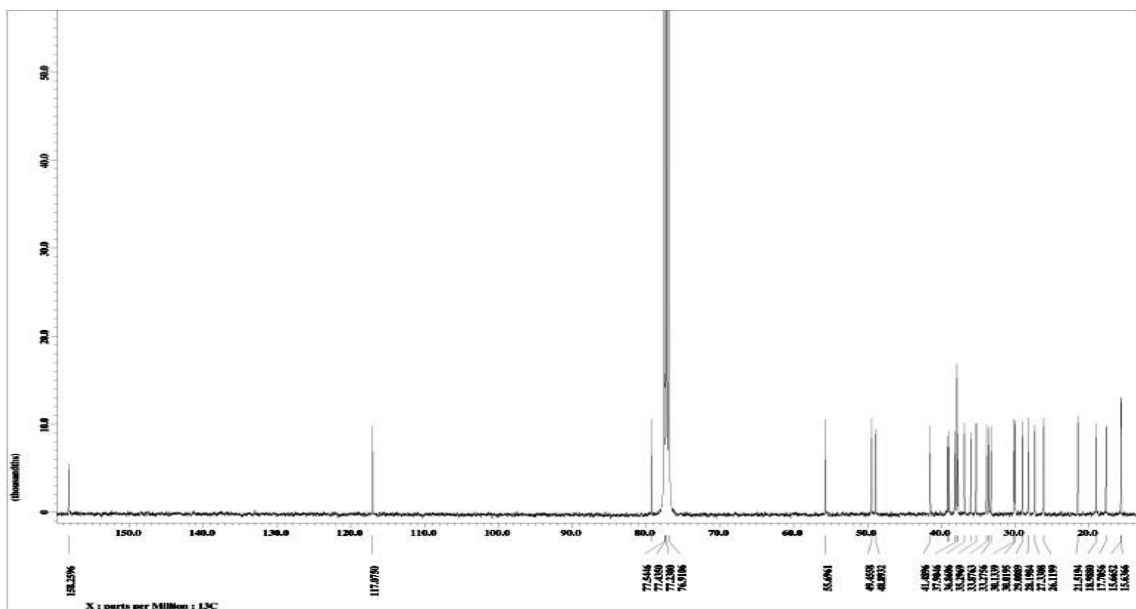


Figure 48. ^{13}C NMR spectrum of isolated compound 11

1-12. 화합물 12 구조 동정

Compound **12**의 구조는 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz), ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz)을 통하여 확인하였다. ^1H NMR spectrum 분석 결과 대부분의 signal은 δ 0.78 ~ 1.02에 분포하였으며 이는 포화 탄화수소의 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다. δ 1.67(3H, s)의 signal은 sp^2 혼성 탄소 옆에 붙어 있는 methyl기임을 예상할 수 있었으며, δ 2.36(1H, dt, 5.8, 11.0), 3.19(1H, dd, 4.7, 11.5)의 signal은 전기음성도가 큰 원소가 인접해 있는 sp^3 혼성화에 관여하는 수소로 예상하였다. 또한 δ 4.56(1H, dd, 1.1, 2.4), 4.68(1H, d, 2.5)의 signal은 sp^2 혼성의 수소로 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum 분석 결과 마찬가지로, 대부분의 signal이 δ 14.7 ~ 55.5에 분포하였으며 이는 ^1H NMR spectrum에서 예상하였던 포화된 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. δ 48.2, 79.2에서 나타나는 signal은 ^1H NMR spectrum에서 예상하였던 전기음성도가 큰 원소가 인접하여 deshielding된 탄소를 확인하였고, 적어도 하나 이상의 hydroxyl가 있지 않을까 예상하였다. δ 109.5, 151.1의 signal은 불포화된 sp^2 혼성 탄소로 확인하였다. 비교적 난해한 ^1H NMR data로 인해 ^{13}C NMR data에 의존하여 문헌²⁸⁾과 비교하여 compound **12**는 triterpene류의 lupeol로 동정하였다(Figure 49).

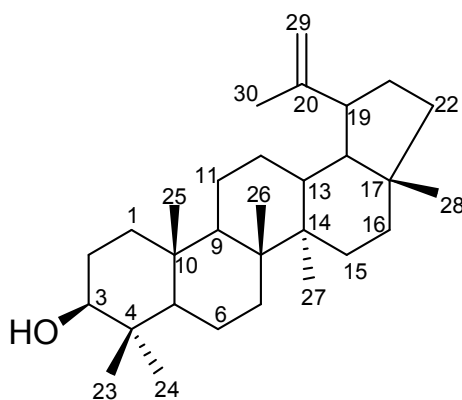


Figure 49. Chemical structure of compound **12**

Table 10. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **12**

No.	Compound 12	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
1		40.2
2		25.3
3	3.19(1H, dd, 4.7, 11.5)	79.2
4		38.9
5		55.5
6		18.5
7		34.5
8		41.0
9		50.6
10		37.3
11		21.1
12		27.6
13		38.2
14		43.0
15		28.2
16		35.8
17		43.2
18		48.5
19	2.36(1H, dt, 5.8, 11.0)	48.2
20		151.1
21		30.0
22		39.0
23	0.96(3H, s)	27.7
24	0.75(3H, s)	15.5
25	0.82(3H, s)	16.3
26	1.02(3H, s)	16.1
27	0.94(3H, s)	14.7
28	0.78(3H, s)	18.2
29	4.56(1H, dd, 1.1, 2.4) 4.68(1H, d, 2.5)	109.5
30	1.67(3H, s)	19.5

2. HPLC 분석 결과

역상 컬럼(C₁₈)을 이용하여 아그배나무 EtOAc fraction 및 분리한 화합물의 피크를 확인하였다. HPLC 크로마토그램 결과를 보면 EtOAc fraction의 피크 중에서 머무름 시간이 가장 짧은 피크는 compound 3, 그 다음 차례대로 compound 6, 4, 7으로 확인할 수 있었다. 그 다음 나타난 피크의 높이가 상대적으로 높게 나타났는데 이는 compound 5와 8이 비슷한 시간대에 나타나 겹쳐 나타난 것으로 확인하였다. 마지막으로 머무름 시간이 가장 긴 피크는 compound 9로 확인되었다(Figure 52). Figure 52에 나타난 각각의 스펙트럼은 EtOAc fraction에 분리된 화합물 3-9를 각각 첨가하여 얻은 크로마토그램을 나타낸 것이다.

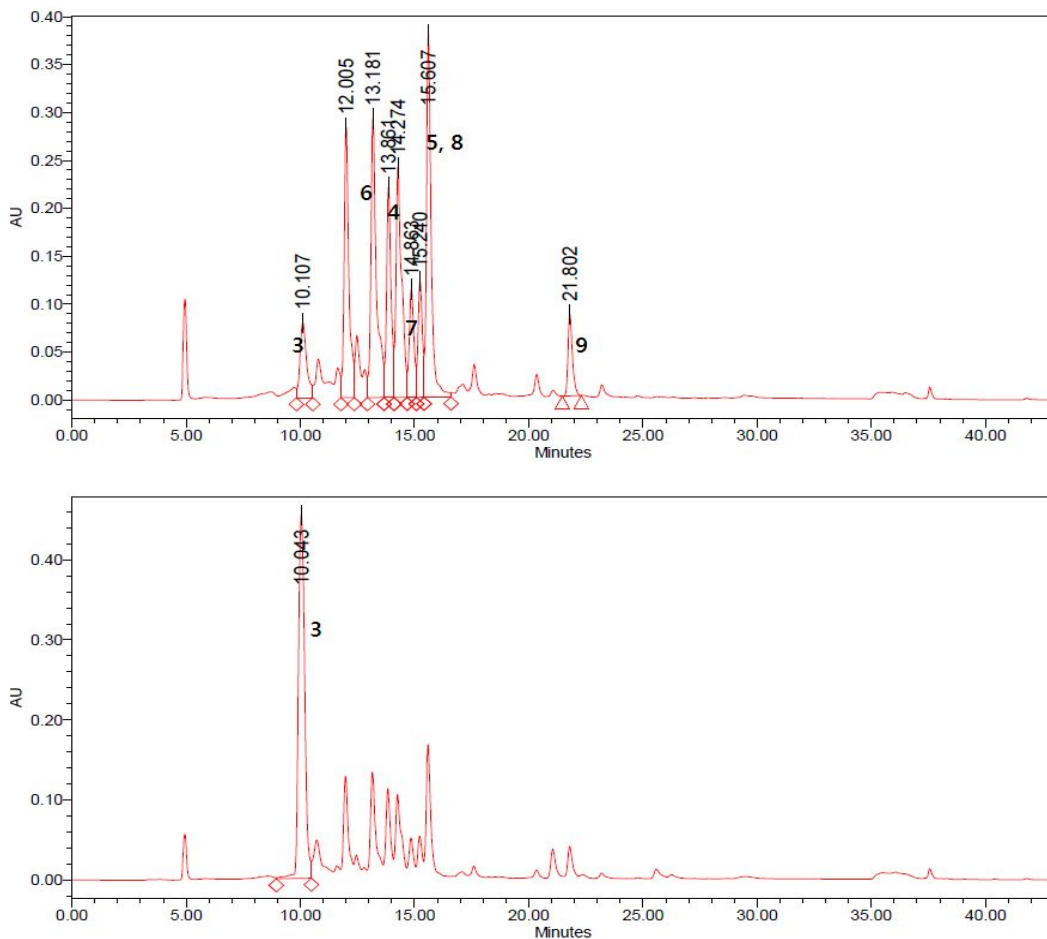


Figure 52. HPLC chromatograms of EtOAc fraction and compounds

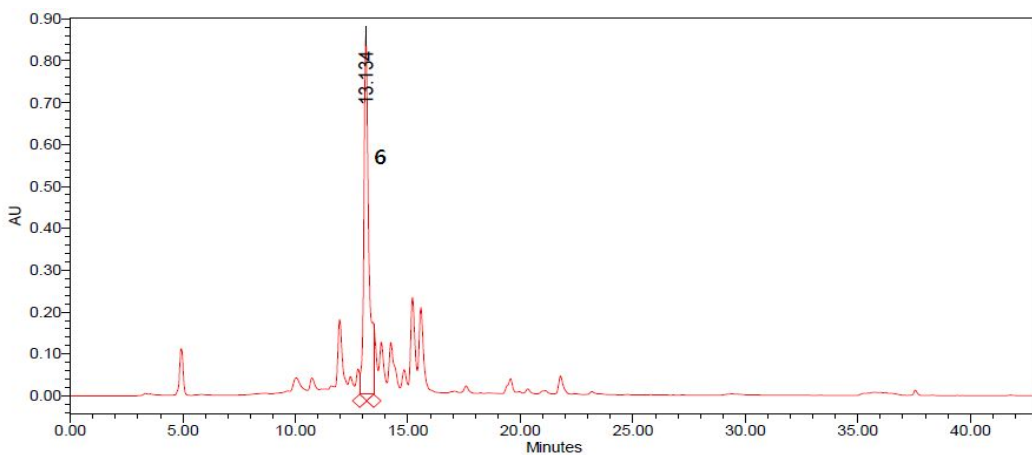
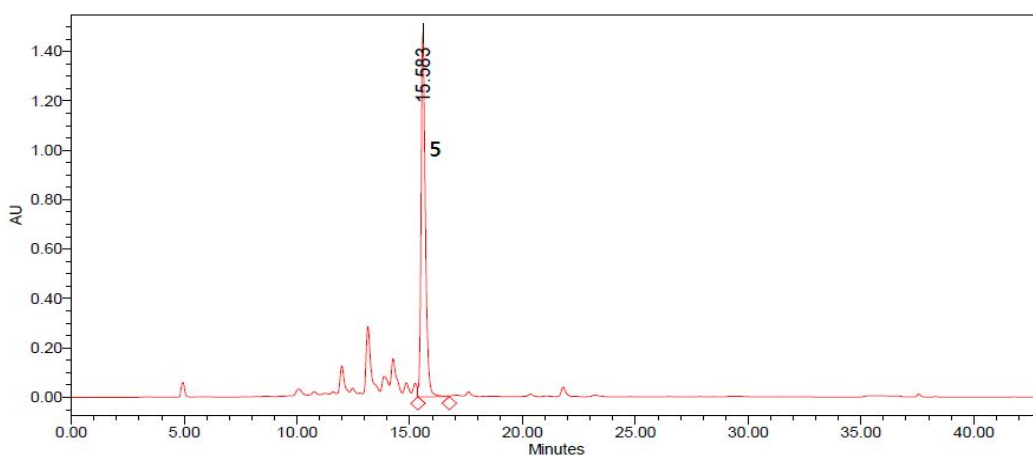
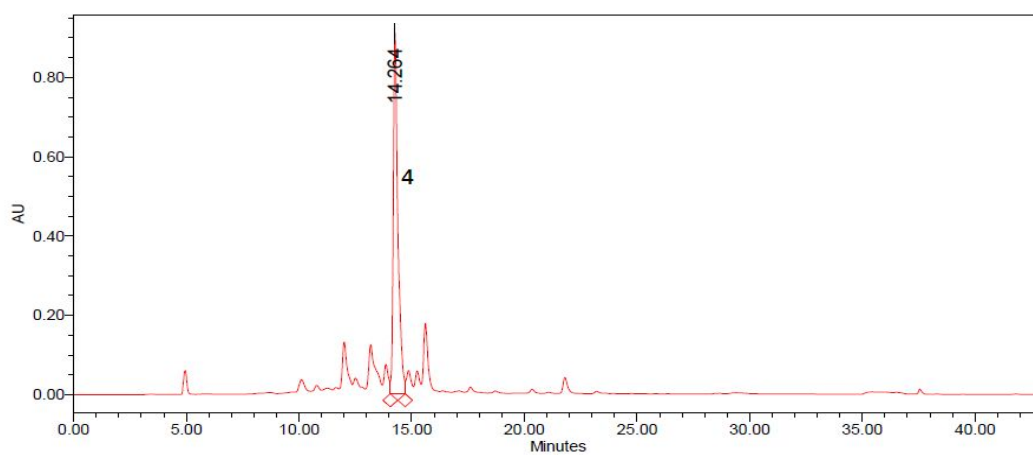


Figure 52. HPLC chromatograms of EtOAc fraction and compounds(continued)

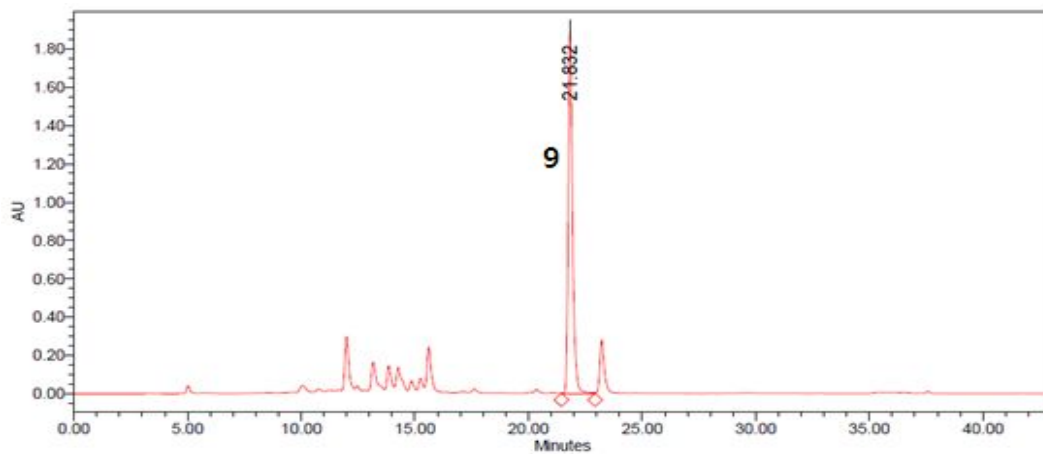
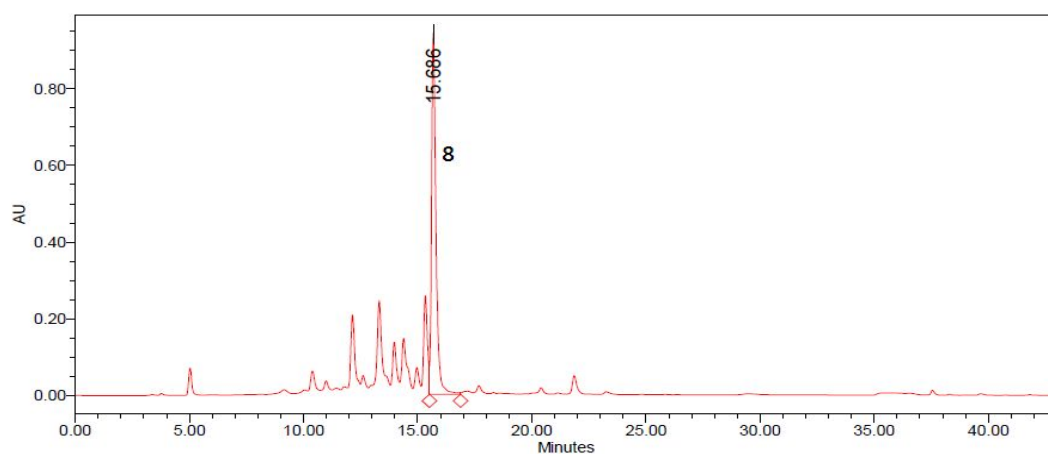
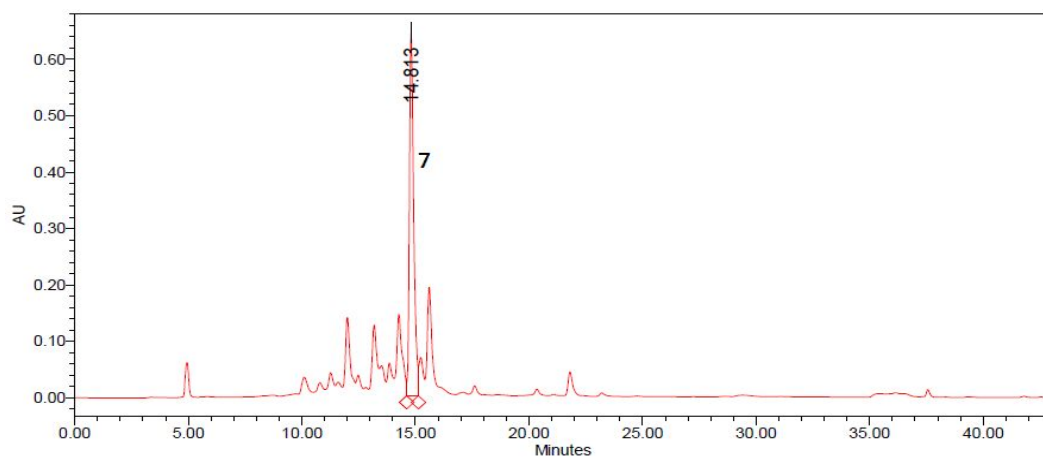


Figure 52. HPLC chromatograms of EtOAc fraction and compounds(continued)

3. 항산화 활성 실험 결과

3-1. 총 폴리페놀함량

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 53)을 작성하여 아그배나무 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 100 mg 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; Gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서 19.1 mg GAE/100 mg, 분획물 중 EtOAc 및 *n*-BuOH fraction에서 각각 45.3, 36.7 mg GAE/100 mg으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 54). 이는 다른 항산화 실험결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.

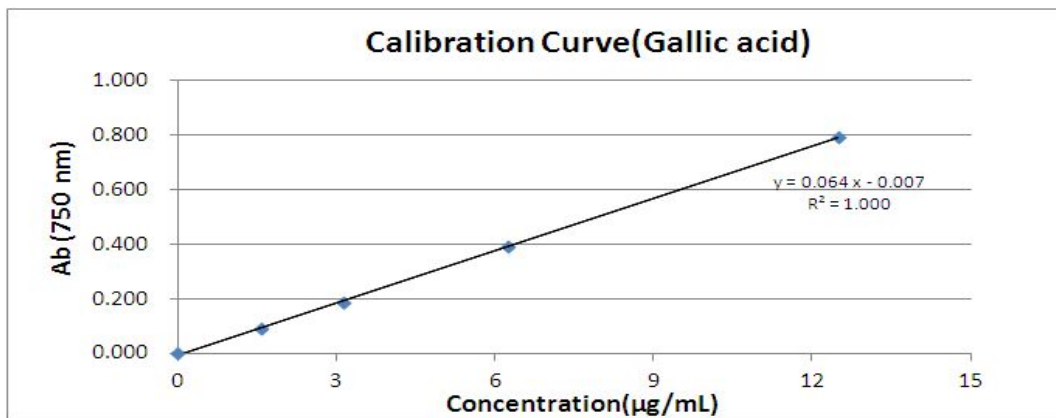


Figure 53. Calibration curve for quantification of total phenolics.

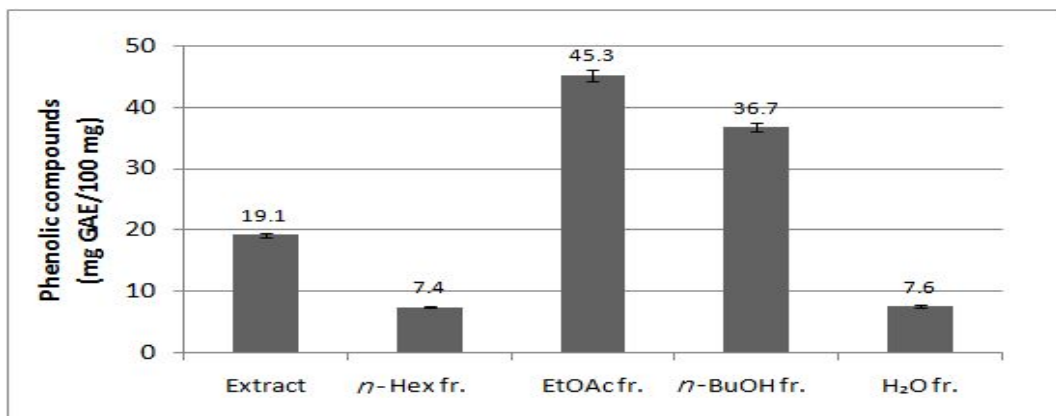


Figure 54. Total polyphenolic compounds of solvent fractions.

3-2. 총 플라보노이드 함량

Quercetin 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 55)을 작성하여 아그배나무 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물 중량 100 mg 당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다. 실험결과 분획물 중 EtOAc fraction에서 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타냈으며, 그 값을 보았을 때 98.0 mg quercetin/100 mg으로 EtOAc fraction은 거의 다 플라보노이드 계열의 화합물이 있을 것이라 예상되었다(Figure 56).

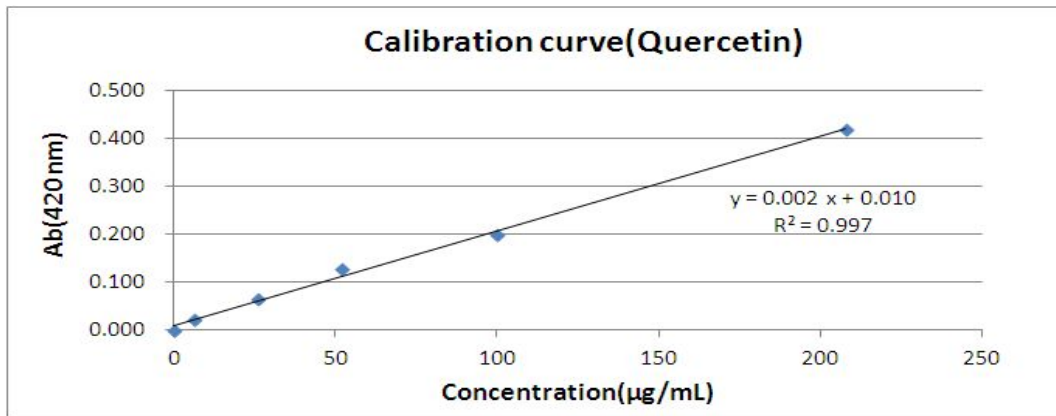


Figure 55. Calibration curve for quantification of total flavonoids.

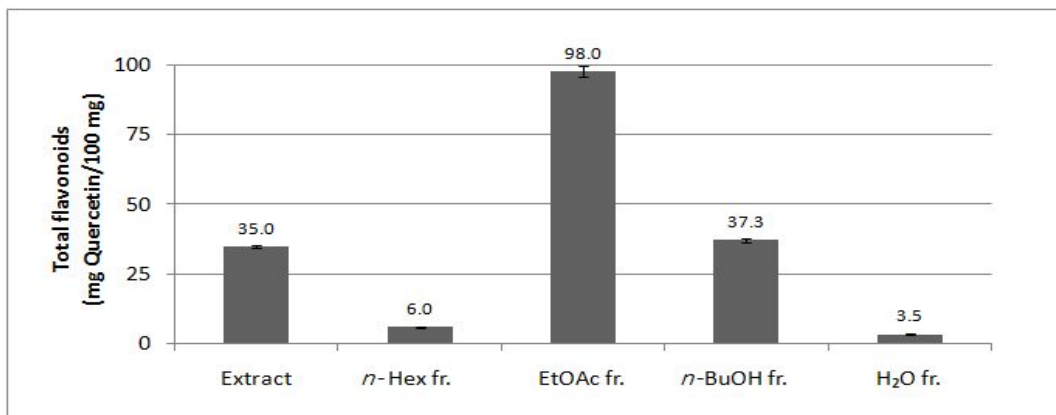


Figure 56. Total flavonoids of solvent fractions.

3-3. DPPH radical 소거 활성

3-3-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성

아그배나무 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 분획물들에 대하여 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여, SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과 SC_{50} 값이 EtOAc fraction 19.63 $\mu\text{g/mL}$, *n*-BuOH fraction 18.32 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C(7.11 $\mu\text{g/mL}$)보다는 떨어지지만, 이들 역시 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다.(Figure 57 및 Table 11)

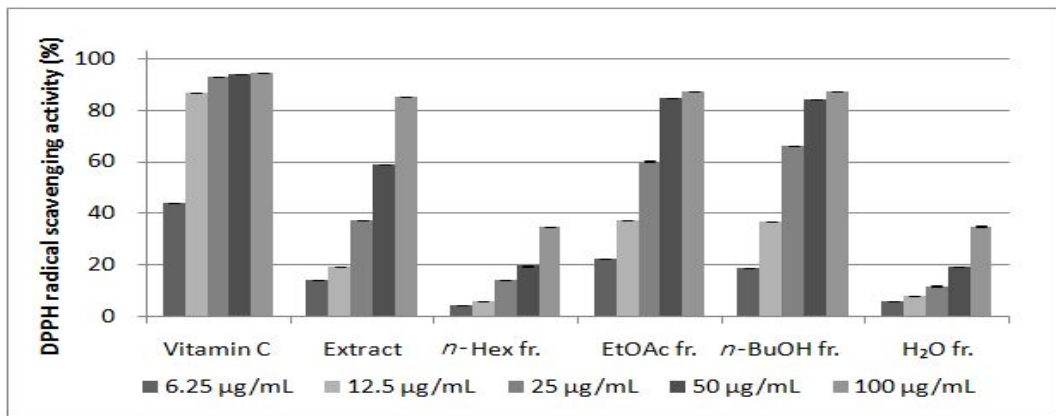


Figure 57. DPPH radical scavenging activities of solvent fractions.

Table 11. DPPH radical scavenging activities(SC_{50}) of solvent fractions.

	SC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extract	40.32
<i>n</i> -Hex	>100
EtOAc	19.63
<i>n</i> -BuOH	18.32
H ₂ O	>100
Vitamin C	7.11

3-3-2. 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성 실험 결과

위의 결과로부터 DPPH radical 소거 활성이 있었던 EtOAc fraction로부터 분리된 compound들에 대해 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. Compound 2번을 제외한 모든 compound에 대해 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μ g/mL의 농도로 실험을 실시하여, SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과 플라보노이드인 compound 3, 4, 6, 7의 SC₅₀값이 각각 15.73, 25.39, 32.75, 17.23 μ g/mL이었다. 이를 μ M로 환산 계산해본 결과 compound 3, 4는 각각 54.23, 54.71 μ M로 대조군인 vitamin C(54.22 μ M)만큼 좋은 DPPH radical 소거 활성을 보였고, compound 6은 72.39 μ M 대조군 vitamin C(54.22 μ M)만큼은 아니지만 이 또한 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었으며 마지막으로 compound 7은 39.69 μ M로 대조군인 vitamin C(54.22 μ M)보다 훨씬 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figure 58 및 Table 12).

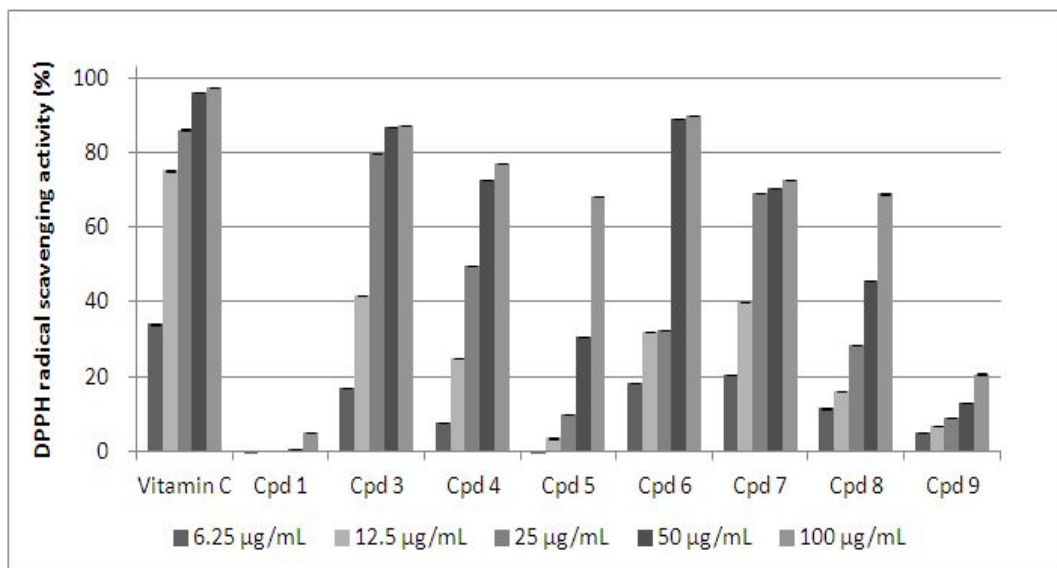


Figure 58. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds.

Table 12. DPPH radical scavenging activities(SC₅₀) of isolated compounds.

Compound NO.	Compound name	SC ₅₀ (μg/mL)	SC ₅₀ (μM)
1	β-sitosterol	>100	>241.32
2	daucosterol	–	–
3	<i>epi</i> -catechin	15.73	54.23
4	3- <i>O</i> -α-L-arabinofuranoyl- -8-methoxyquercetin	25.39	54.71
5	phlorizin	75.74	173.67
6	3-hydroxyphlorizin	32.75	72.39
7	quercetin-3- <i>O</i> -α- -arabinofuranoside	17.23	39.69
8	quercetin-4'- <i>O</i> -β-D- -glucopyranoside	58.89	126.90
9	chrysin-7- <i>O</i> -β-D- -glucopyranoside	>100	>240.32
Positive control	Vitamin C	8.68	54.22

3-4. ABTS⁺ radical 소거 활성

3-4-1. 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성

아그배나무 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 분획물들에 대하여 25, 12.5, 6.25, 3.125 µg/mL의 농도로 시료의 농도를 2배씩 묽히면서 실험을 실시하여, SC₅₀ 값을 계산하였다. 그 중 vitamin C와 EtOAc fraction의 좀 더 정확한 SC₅₀ 값을 구하기 위해 농도를 1.5625 µg/mL까지 낮춰 재실험 한 결과 SC₅₀ 값이 EtOAc fraction은 2.38 µg/mL 로 대조군인 vitamin C(2.14 µg/mL)만큼 아주 좋은 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 추출물과 *n*-BuOH fraction의 SC₅₀ 값이 각각 4.865, 4.32 µg/mL로 vitamin C보다는 떨어지지만, 이들 역시 좋은 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figure 59 및 Table 13).

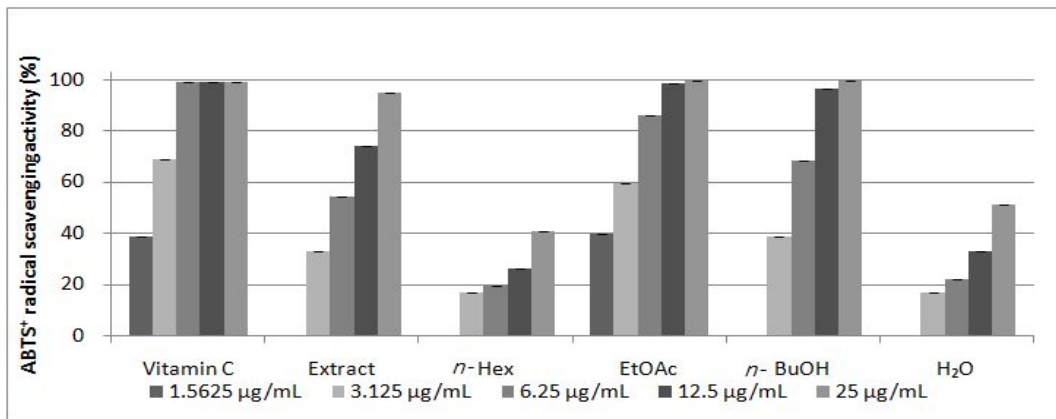


Figure 59. ABTS⁺ radical scavenging activities of solvent fractions.

Table 13. ABTS⁺ radical scavenging activities(SC₅₀) of solvent fractions.

	SC ₅₀ (µg/mL)
Extract	4.87
<i>n</i> -Hex	37.23
EtOAc	2.38
<i>n</i> -BuOH	4.32
H ₂ O	23.76
Vitamin C	2.14

3-4-2. 분리된 화합물의 ABTS⁺ radical 소거 활성

위의 결과로부터 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있었던 EtOAc fraction로부터 분리된 compound들에 대해 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. Compound 2번을 제외한 모든 compound에 대해 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여, SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과 플라보노이드인 compound 3, 4, 5, 6, 7, 8의 SC₅₀값이 각각 1.48, 3.26, 1.73, 4.28, 2.97, 5.19 µg/mL이었다. 이를 µM로 환산 계산해본 결과 compound 3, 4, 5, 6, 7, 8 각각 5.09, 7.02, 3.96, 9.46, 6.84, 11.19 µM로 모두 대조군인 vitamin C(13.36 µM)보다 아주 좋은 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다. (Figure 60 및 Table 14).

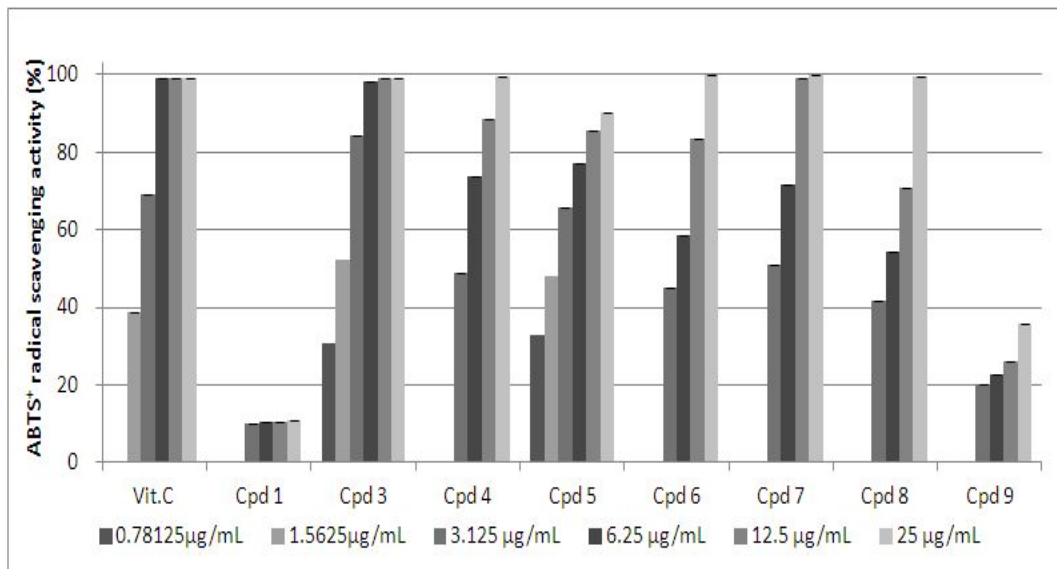


Figure 60. ABTS⁺ radical scavenging activities of isolated compounds.

Table 14. ABTS⁺ radical scavenging activities(SC₅₀) of isolated compounds.

Compound NO.	Compound name	SC ₅₀ (μg/mL)	SC ₅₀ (μM)
1	β-sitosterol	>100	>241.32
2	daucosterol	–	–
3	<i>epi</i> -catechin	1.48	5.09
4	3- <i>O</i> -α-L-arabinofuranoyl- -8-methoxyquercetin	3.26	7.02
5	phlorizin	1.73	3.96
6	3-hydroxyphlorizin	4.28	9.46
7	quercetin-3- <i>O</i> -α- -arabinofuranoside	2.97	6.84
8	quercetin-4'- <i>O</i> -β-D- -glucopyranoside	5.19	11.19
9	chrysin-7- <i>O</i> -β-D- -glucopyranoside	54.07	129.95
Positive control	Vitamin C	2.14	13.36

4. 항염 활성 실험 결과

4-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성

RAW 264.7 cell을 이용하여 아그배나무 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대한 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포 독성 평가 실험을 진행하였다. 우선 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, 70% EtOH 추출물에서 13.98 µM로, 45.97%가 감소하였으며 *n*-Hex 및 EtOAc fraction에서 각각 14.22, 12.33 µM로, 42.03, 52.35%가 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 61). 세포 독성 평가 결과 *n*-Hex fraction은 cell에 대해 약간의 독성이 있는 것을 확인하였다.(Figures 62).

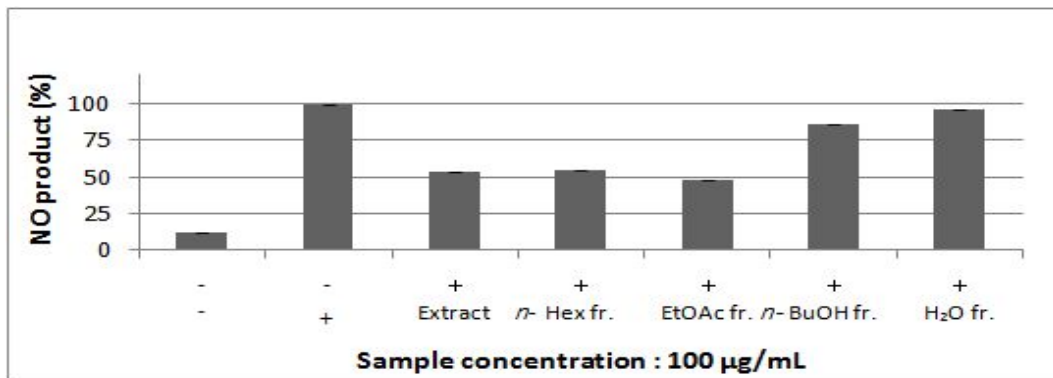


Figure 61. NO production inhibitory activities of solvent fractions.

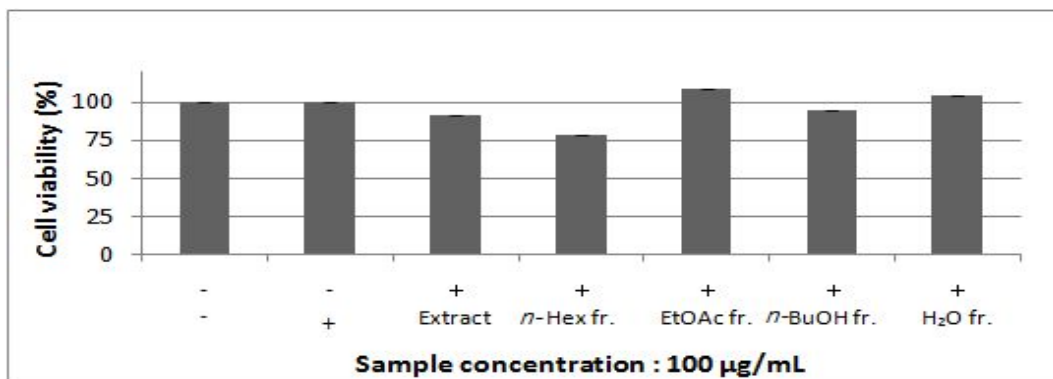


Figure 62. Cytotoxicities of solvent fractions.

4-2. 에틸아세테이트 층의 농도별 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성

위 결과를 바탕으로 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 세포 독성이 없으면서 활성이 있었던 EtOAc fraction에 대해 300, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 더 진행하였다(Figures 63, 64). 그 결과 모든 농도에서 세포 독성없이 농도 의존적으로 NO 생성량을 감소시키는 것을 확인하였다.

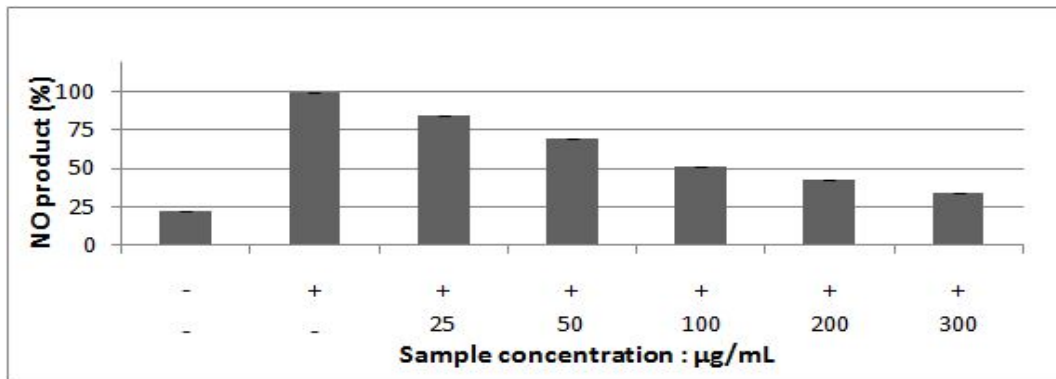


Figure 63. NO production inhibitory activities of EtOAc fraction.

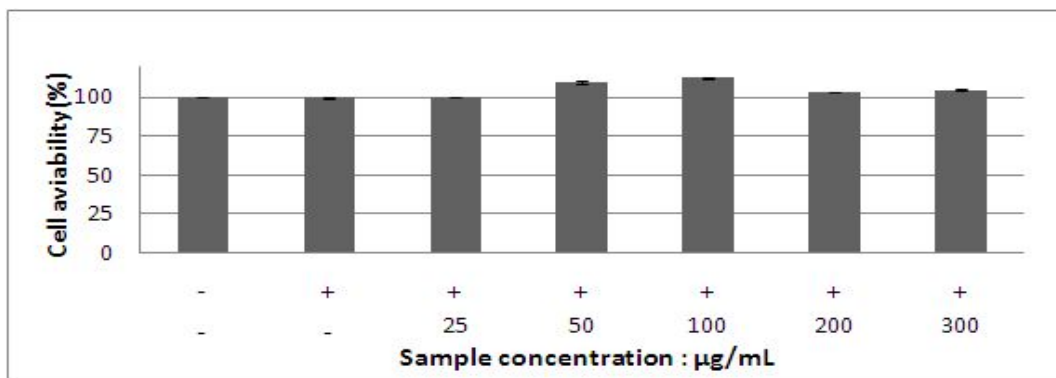


Figure 64. Cytotoxicities of EtOAc fraction.

4-3. 헥산 층의 농도별 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성

위 결과를 바탕으로 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약간의 세포 독성이 있지만 활성이 보였던 *n*-Hex fraction에 대해 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 더 진행하였다(Figures 65, 66). 그 결과 모든 농도에서 농도 의존적으로 NO 생성량을 감소시키는 것을 확인하였는데 이는 cell에 대한 독성때문인 것으로 확인되었다.

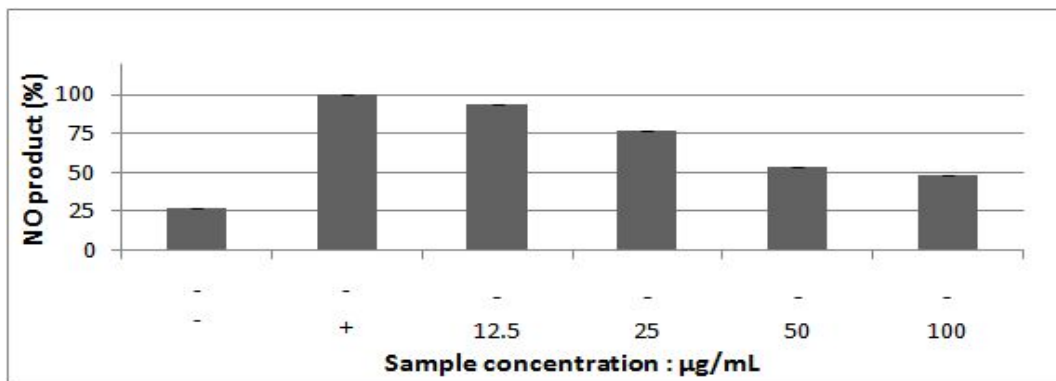


Figure 65. NO production inhibitory activities of *n*-Hex fraction.

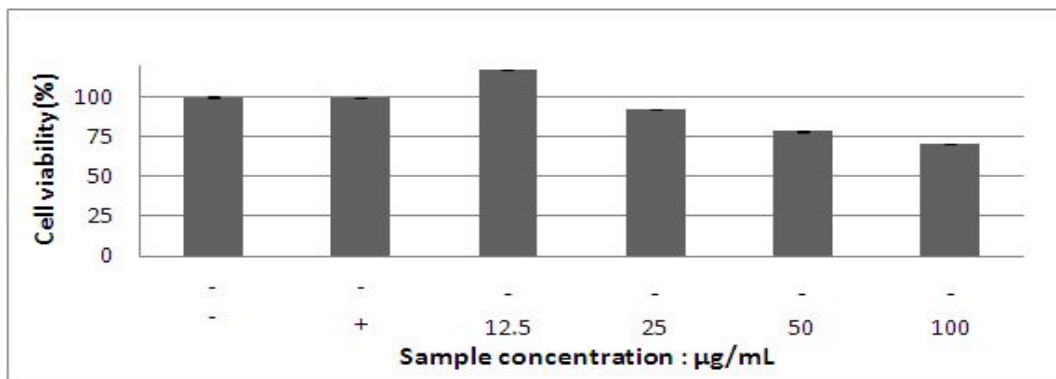


Figure 66. Cytotoxicities of *n*-Hex fraction.

4-4. 분리된 화합물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성

RAW 264.7 cell을 이용하여 분리된 모든 compound에 대한 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포 독성 평가 실험을 진행하였다. 우선 각각의 compound 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, compound 1, 7, 8, 9 에서 15.24, 19.43, 21.01, 17.29 µM로, 50.22, 36.52, 31.36, 43.49%가 감소하였다(Figure 66). 세포 독성 평가 결과 모든 compound들은 cell에 대해 독성이 없는 것으로 확인되었다(Figure 68).

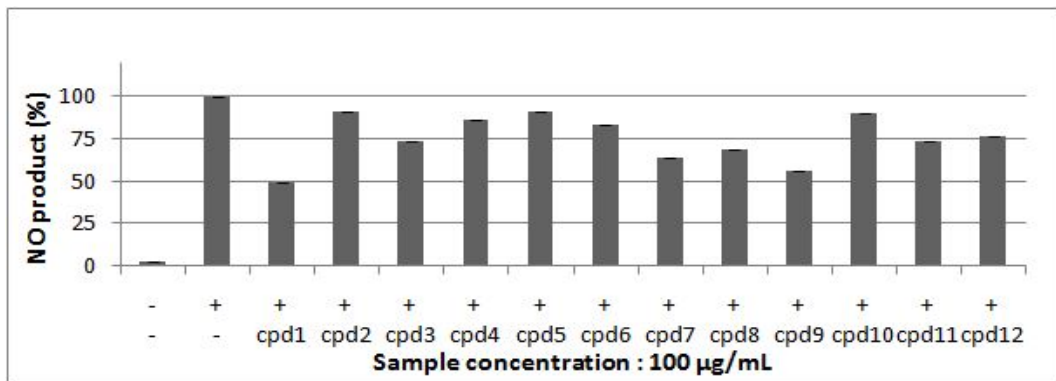


Figure 67. NO production inhibitory activities of isolated compounds.

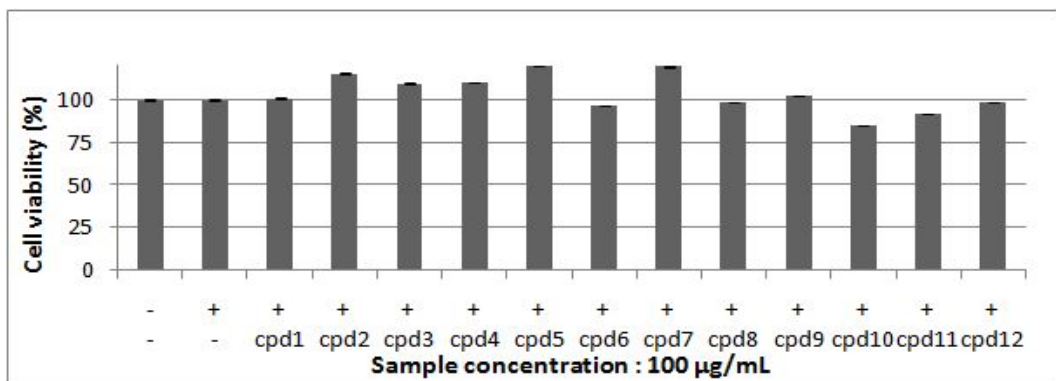


Figure 68. Cytotoxicities of isolated compounds

4-5. 화합물 8, 9의 농도별 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성

분리된 compound들 중에 문헌과 비교하여 아직 항염 활성 및 세포 독성에 대해 보고되지 않은 compound 8, 9에 대하여 농도별로 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포 독성을 측정하였다. 실험결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, compound 8, 9 모두 거의 세포 독성이 없었으며, 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figures 69, 70).

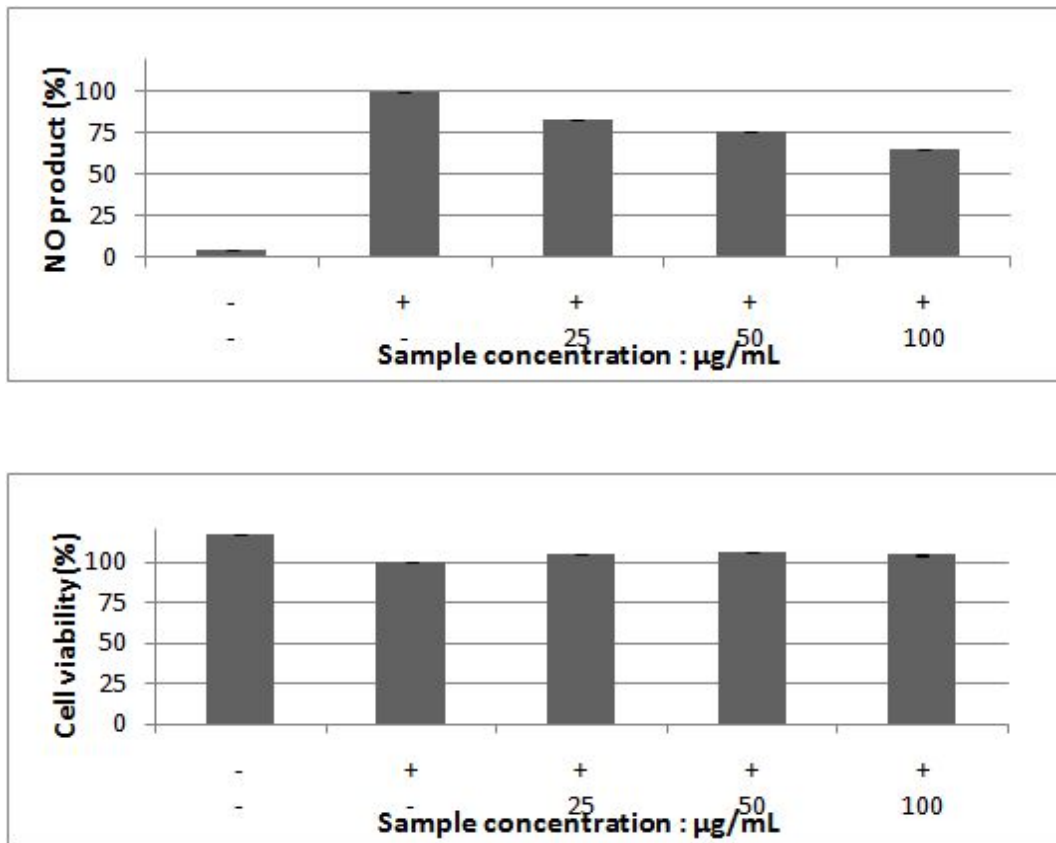


Figure 69. NO production inhibitory activity and cytotoxicity of Compound 8

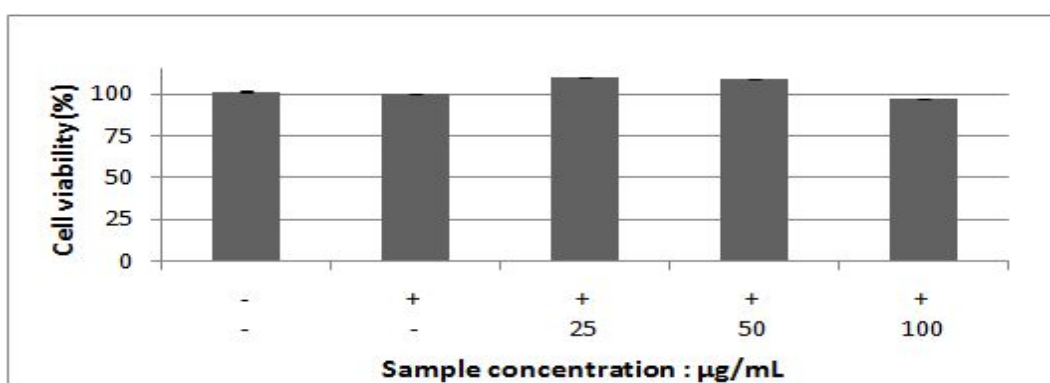
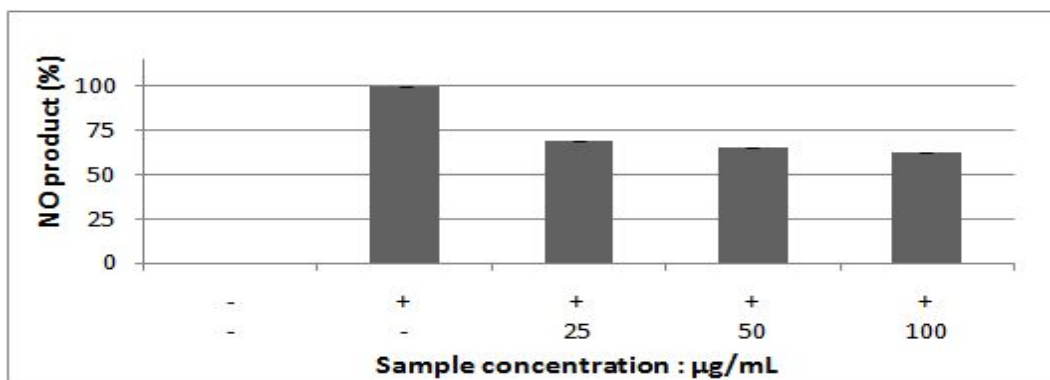


Figure 70. NO production inhibitory activity and cytotoxicity of Compound 9

4-6. 에틸아세테이트 층의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 생성 억제

염증성 cytokine으로 알려진 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 는 초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용한다. EtOAc fraction의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 양을 측정한 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 농도 의존적으로 IL-6와 IL-1 β 모두 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 71).

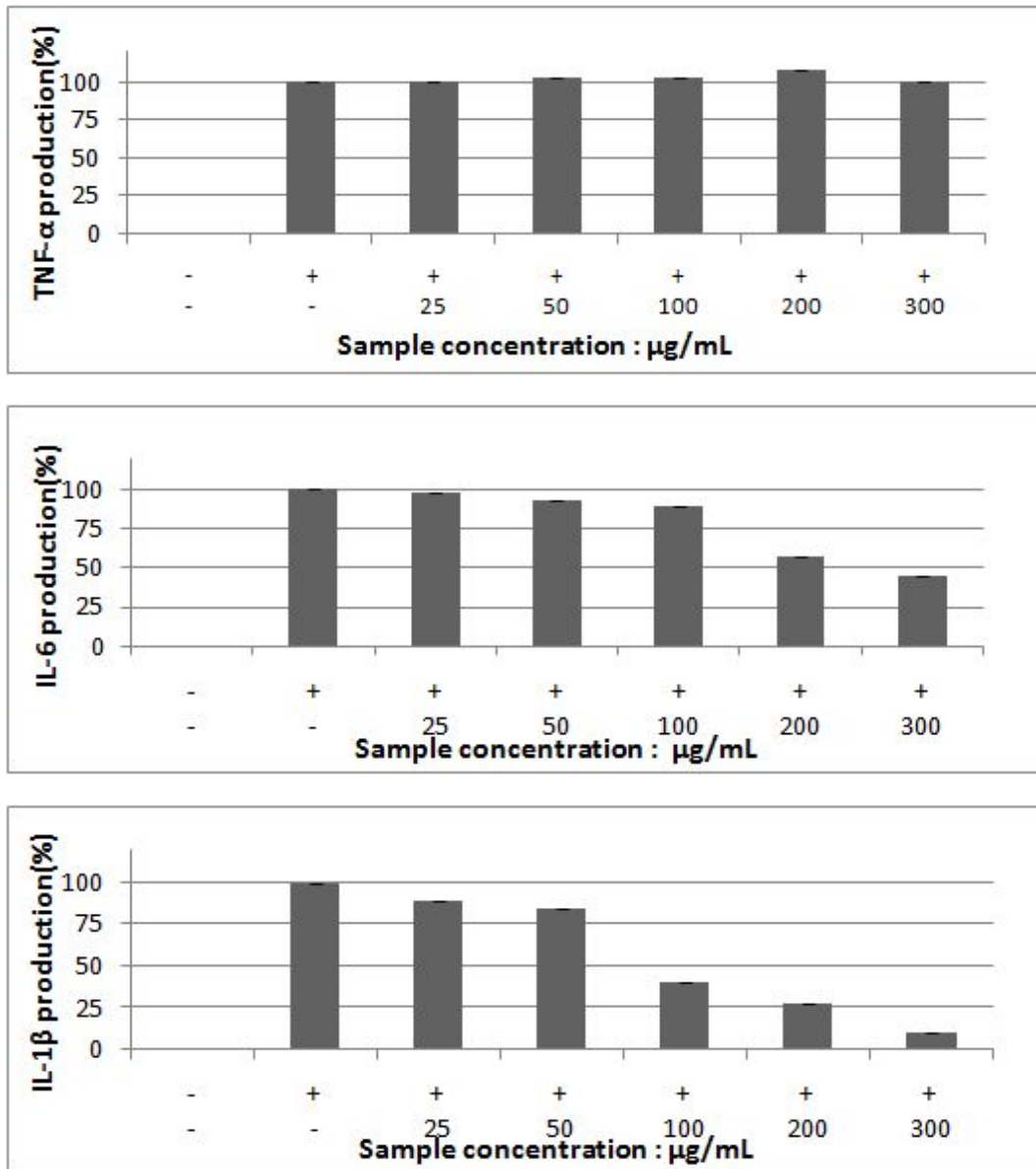


Figure 71. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by EtOAc fraction.

4-7. 화합물 8의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 생성 억제

마찬가지로 compound 8의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 양을 측정한 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 농도 의존적으로 IL-1 β 의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 72).

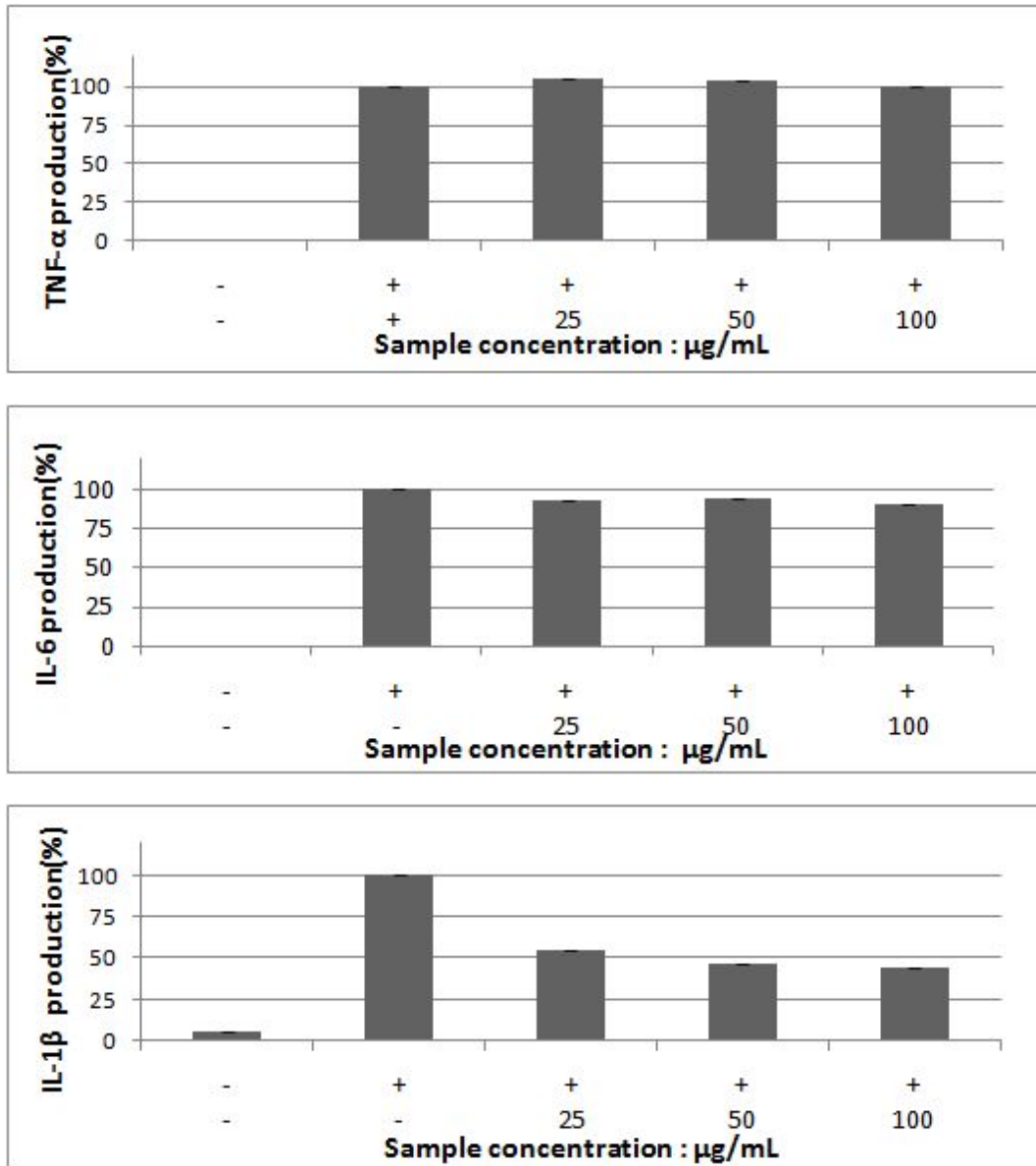


Figure 72. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 8.

4-8. 화합물 9의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 생성 억제

마찬가지로 compound 9의 TNF- α 및 IL-6, IL-1 β 양을 측정한 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 농도 의존적으로 IL-6 및 IL-1 β 의 생성이 약간씩 모두 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 73).

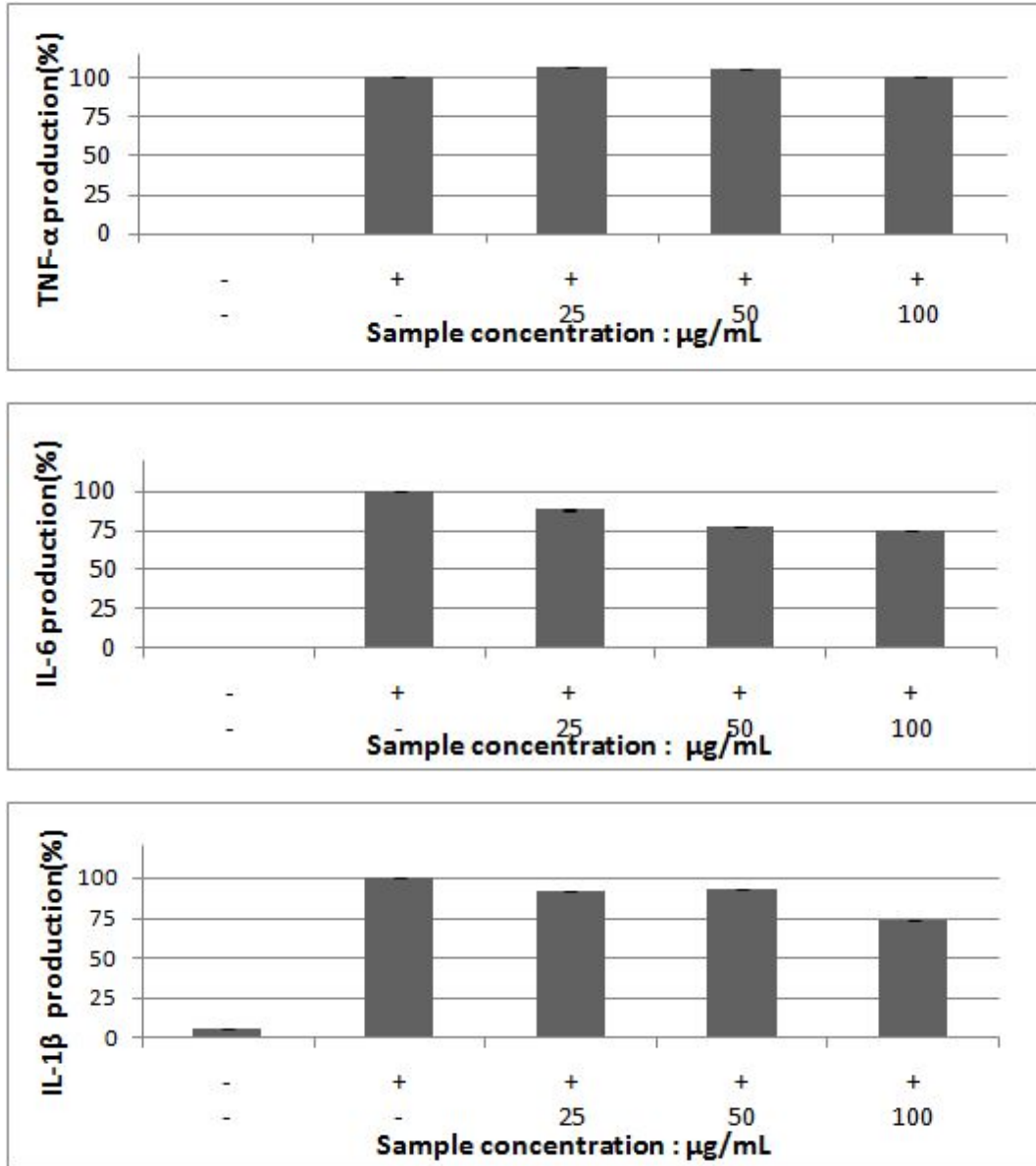


Figure 73. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6, IL-1 β by compound 9.

4-9. 에틸아세테이트 층의 western blotting

염증성 cytokine으로 알려진 IL-6 및 IL-1 β 는 초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용한다. 이런 cytokine을 조절하는 인자는 iNOS 및 COX-2가 대표적이다. EtOAc fraction의 iNOS 및 COX-2의 발현양을 측정한 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 농도 의존적으로 iNOS의 발현양이 확실히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Figure 74).

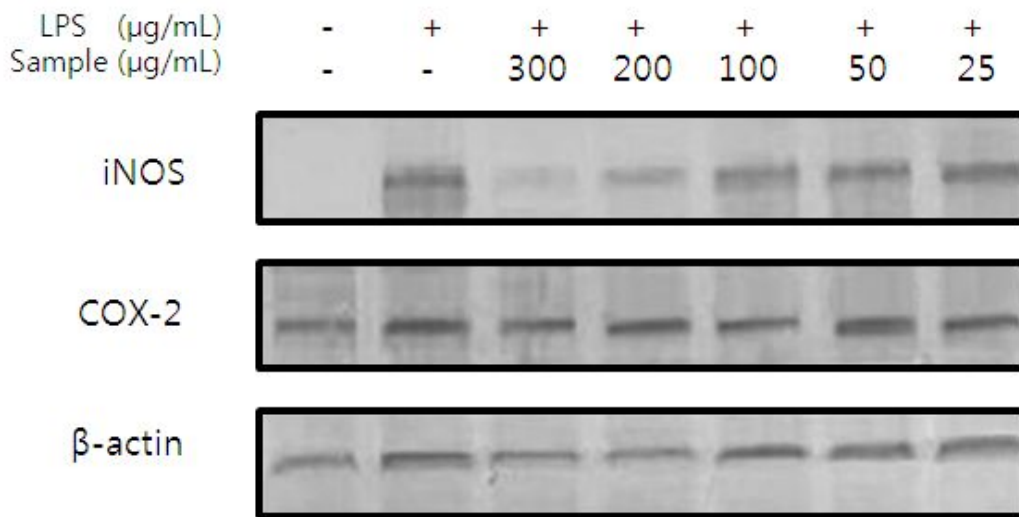


Figure 74. Result of western blotting on EtOAc fraction

4-10. 화합물 8, 9의 western blotting

마찬가지로 compound 8, 9의 iNOS와 COX-2 발현양을 측정한 결과, compound 8은 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 농도 의존적으로 COX-2의 발현이 저해되는 것을 확인할 수 있었고, compound 9는 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 iNOS의 생성이 저해되는 것을 확인할 수 있었다.(Figures 75, 76).

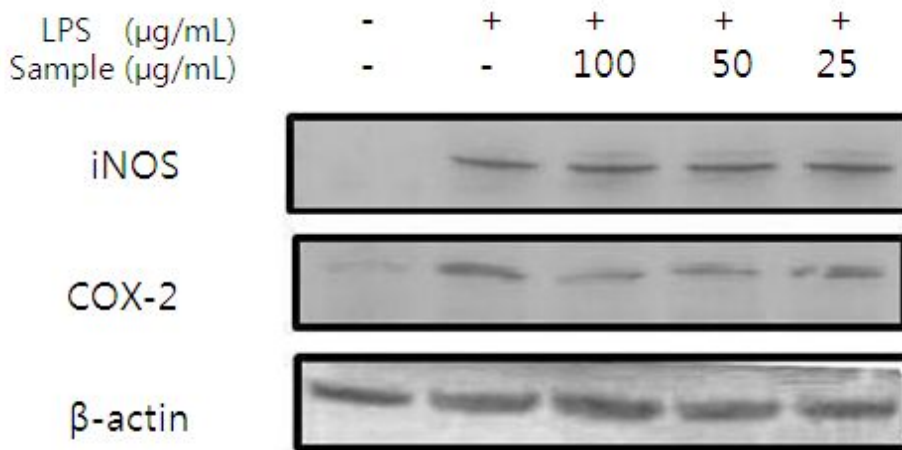


Figure 75. Result of western blotting on compound 8

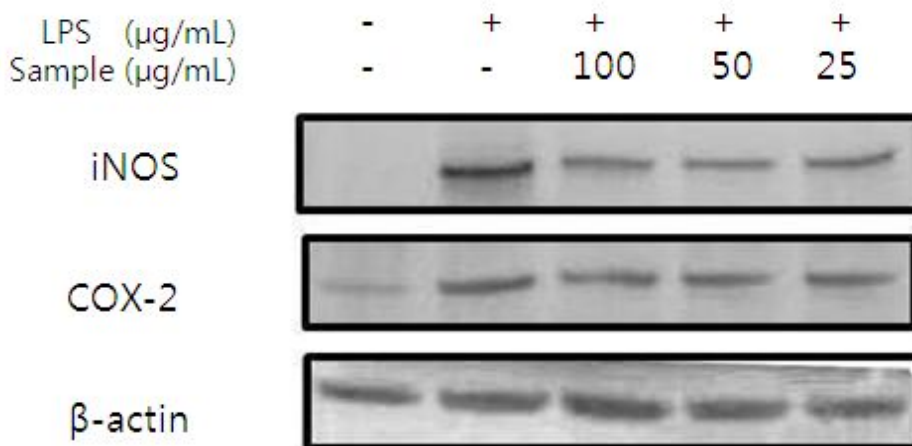


Figure 76. Result of western blotting on compound 9

5. 항균 활성 실험 결과

5-1. 추출물 및 분획물의 항균 활성 평가

아그배나무 가지 추출물 및 분획물의 항균 활성 측정을 위해 피부 상재균인 *P. acnes* 및 *S. epidermidis*을 사용하였다. 아그배나무 가지 분획물 중 *n*-Hex 분획물은 *P. acnes* 및 *S. epidermidis*의 paper disc diffusion test 직경값이 각각 12-13 mm, 13-15mm로 대조균인 erythromycin과 비교하였을 때, 대조균만큼 아주 좋은 활성이 있다는 것을 확인하였다(Tables 15, 16).

Table 15. Antibacterial activity of solvent fractions from *M. sieboldii*

	Sample					Positive control
	70% EtOH	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	Erythromycin
	clear zone(mm)					
<i>P. acnes</i> CCARM 0081	-	12	-	-	-	18
<i>P. acnes</i> CCARM 9009	-	13	-	-	-	17
<i>P. acnes</i> CCARM 9010	-	12	-	-	-	17

Table 16. Antibacterial activity of solvent fractions from *M. sieboldii*

	Sample					Positive control
	70% EtOH	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	Erythromycin
	clear zone(mm)					
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	10	13	-	12	-	21
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3710	-	15	-	10	-	-
<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	-	14	-	10	-	19

IV. 요약 및 결론

본 논문은 제주도에 자생하는 식물을 이용하여 천연 항산화성분과 기능성화장품 소재 개발 가능성을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 소재개발에 대한 연구는 제주 자생식물 중 아그배나무의 가지부분을 이용하여 화합물을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 항산화와 기능성화장품으로 활용 가능한 생리활성을 검색하는 것으로 진행되었다.

아그배나무(가지) 70% EtOH 추출물을 *n*-hexane층, EtOAc(Ethyl acetate)층, *n*-butanol층 및 H₂O층으로 용매분획하고, 분획물에 대하여 항산화 실험(DPPH radical scavenging test), 항염 및 항균 활성 실험을 실시하였다. 그 결과 항산화 실험에서는 *n*-hexane층, H₂O층을 제외한 모든 층에서 좋은 활성을 보였다. 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 측정 실험 결과, EtOAc 분획층에서 시료 100mg 당 총 폴리페놀(45.3 mg GAE/100 mg) 및 플라보노이드(98.0 mg quercetin/100 mg)함량으로 가장 높았다. 또한 항염 활성 실험 결과도 EtOAc 분획층에서 가장 좋은 활성을 보였다. 항균 활성 실험 결과 *n*-hexane 분획층에서 뛰어난 항균 활성을 보였다. 따라서 활성 실험 결과 가장 좋은 활성을 보인 EtOAc 분획층과 *n*-hexane 분획층을 가지고 VLC(Vacuum Liquid Chromatography), Sephadex LH-20 chromatography, normal-phased silica gel chromatography를 사용하여 화합물들을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR을 이용하여 확인하였고, 그 자료를 토대로 문헌과 비교한 결과, 총 12개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 β -sitosterol (1), daucosterol (2), *epi*-catechin (3), 3-*O*- α -L-arabinofuranoyl-8-methoxyquercetin (4), phlorizin (5), 3-hydroxyphlorizin (6), avicularin (7), quercetin-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (8), chrysin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (9), ethyl linoleate (10), taraxerol (11), lupeol (12)으로 확인되었다. 그 중 화합물 4(3-*O*- α -L-arabinofuranoyl-8-methoxyquercetin)은 1D, 2D NMR data

를 통해 flavonoid 계열의 화합물로 예상하였고, 신규화합물은 아니나 ^{13}C NMR data는 본 논문에서 처음 밝힌다.

따라서 총 12개의 분리 화합물에 대해 항산화 실험(DPPH radical scavenging test, ABTS⁺ radical scavenging test), 항염 및 항균 활성 실험을 수행하였다. 그 결과 DPPH radical 소거 활성 실험에서는 vitamin C(ascorbic acid, $\text{SC}_{50} = 54.22 \mu\text{M}$)와 비교했을 때, 화합물 3, 4, 6, 7의 SC_{50} 값이 각각 54.23, 54.71, 72.39, 39.69 μM 로 대조군인 vitamin C만큼의 우수한 항산화 활성이 있음을 알 수 있었다. 또한 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험에서는 vitamin C(ascorbic acid, $\text{SC}_{50} = 13.36 \mu\text{M}$)와 비교했을 때, 화합물 3, 4, 6, 7의 SC_{50} 값이 각각 5.09, 7.02, 3.96, 9.46, 6.84, 11.19 μM 로 모두 대조군인 vitamin C보다 아주 좋은 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

항염 활성 실험 결과 NO 생성량을 비교하였을 때, 화합물 1, 7, 8, 9 에서 15.24, 19.43, 21.01, 17.29 μM 로, 50.22, 36.52, 31.36, 43.49%가 감소하였으며 이는 세포 독성 없이 좋은 활성이 나타남을 확인할 수 있었다. 이 중 아직 항염 활성 및 세포 독성에 대해 보고되지 않은 화합물 8, 9에 대하여 농도별로 처리한 결과 세포 독성없이 농도의존적으로 NO 생성량이 줄어듦을 확인하였다. EtOAc 분획층에 대해 농도별로 처리한 결과 염증성 cytokine인 IL-6 및 IL-1 β 역시 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, western blotting 실험결과 iNOS 및 COX-2 또한 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 화합물 8, 9에 대해서도 농도별로 처리한 결과 화합물 8은 염증성 cytokine인 IL-1 β 역시 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, western blotting 실험결과 COX-2 또한 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 화합물 9는 염증성 cytokine인 IL-6 및 IL-1 β 모두 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, western blotting 실험결과 iNOS 또한 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

항균 실험 결과는 대조군인 erythromycin와 비교하였을 때, 대조군만큼

n-Hexane 분획물에서 아주 좋은 활성이 있다는 것을 확인하였다. 그러나 분리된 화합물에 대해선 향균 활성을 확인할 순 없었다. 그러나 *n*-Hexane 분획물 중 좋은 향균 활성을 갖는 물질이 있다고 사료됨으로써 앞으로 향균 성분으로 효능을 가진 화합물들이 지속적으로 분리, 동정되어지고 있으므로 계속적으로 연구할 가치가 있다고 여겨진다.

본 연구의 실험결과를 바탕으로 아그배나무(가지)를 이용한 천연 향산화성분과 향염 및 향균 성분 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 1) 공개특허, “한약재 복합 추출물을 포함하는 항염, 항산화 및 미백, 항균효과를 지닌 기능성 화장품 조성물”, 2009.
- 2) KHIDI, “국내외 항노화 스킨케어 시장 동향”, 2012.
- 3) 박무현 외, “천연물을 이용한 기능성 물질 개발과 이용”
- 4) 이남호, “기능성 화장품소재 개발을 위한 천연물 화학적 접근”, 정밀화학, 2011년, 봄호, 22-29.
- 5) Shin, Choon-Hea, “Studies on the Antioxidative Character in the Ethyl Acetate Extraction of *Rumex crispus*”, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 2001년, 16(6), 592-602.
- 6) Doh, E. S.; Chang, J. P.; Kil, K. J.; Choi, M. S.; Yang, J. K.; Yun, C. W.; Jeong, S. M.; Jung, Y. H.; Lee, G. H., “Antioxidative Activity and Cytotoxicity of Fermented *Allium victorialis* L. Extract” *Korean J. Plant Res.*, 2011, 24(1), 30-39.
- 7) Kang, M. A.; Kim, M. B.; Kim, J. H.; Ko, Y. H.; Lim, S. B., “Integral Antioxidative Capacity and Antimicrobial Activity of Pressurized Liquid Extracts from 40 Selected Plant Species” *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2010, 39(9), 1249-1256.
- 8) Park, Yu-Hwa; Lim, Sang Hyun; Ham, Hun Ju; Kim, Hee Yeon; Jeong, Haet Nim; Kim Kyung Hee; and Kim Songmun, “Isolation of

Anti-inflammatory Active Substance β -Sitosterol from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Stem” , *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **2010**, 39(7), 980–985.

9) Yoon, Weon-Jong; Lee, Jung-A; Kim, Kil-Nam; Kim Ji-Young and Park, Soo-Yeong, “In vitro Anti-inflammatory Activity of the *Artemisia fukudo* Extracts in Murine Macrophage RAW264.7 Cells” , *Korean J. Food Sci. Technol.*, **2007**, 39(4), 464–469.

10) Kim, Jin-Man; Oh, Han-cheol; Song, Seong-pil; Kim, Nam-kwen; Hwang, Chung-Yeon, “Study on the Anti-microbial Activity, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Several Herb-Extract” , *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **2006**, 20(1), 103~114.

11) Lee, Mu Hong; Jeong, Jae Hyun; Jeong, Myeong Soo; Chang, Sung Ho and Erk Her, “Anti-inflammatory Function of the Sophora japonica Extract Rutin: The Inhibitory Effect of Rutin of Korean Sophora japonica on the Productions of NO and TNF-alpha from Mouse Peritoneal Macrophages” , *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **2010**, 18(2), 105–112.

12) Hyun, Sun-Hee; Jung, Sung-Keun; Jwa, Mi-Kyung; Song, Chang-Khil; Kim, Ji-Hun; and Lim, Sangbin, “Screening of Antioxidants and Cosmeceuticals from Natural Plant Resources in Jeju Island” , *Korean J Food Sci. Technol.*, **2007**, 39(2), 200–208

13) Folin, O.; Denis, W., “A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine” *J. Biol. Chem.*, **1915**, 22, 305–308.

- 14) Davis, F. B.; Middleton, E.; Davis, P. J.; Blas, S. D., “Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity” *Cell Calcium*, **1983**, *4*, 71–81.
- 15) Blois, M. S., “Antioxidant determination by the use of a stable free radical” *Nature*, **1958**, *181*, 1199–1200.
- 16) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A. Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay” *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, *26*, 1231–1237.
- 17) Habib, M. Rowshanul; Nikkon, Fajana; Rahman, Matiar; “Isolation of stigmasterol and β -Sitosterol from Methanolic Extract of Root Bark of *Calotropis gigantea*(Linn)” *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2007**, *10*, 4174–4176
- 18) Lee, Sang hyun; Kim, Kyoung Soon; Jang Ji Myun; Park Youmie; and Kim, Bak-Kwang, “Phytochemical constituents from the Herba of *Artemisia apiacea*” , *Arch Pharm Res*, **2002**, *25*(3), 285–288.
- 19) Qudsia Kanwal; Ishtiaq Hussain; Hamid Latif Siddiqui; Arshad Javaid, “Antimicrobial activity screening of isolated flavonoids from *Azadirachta indica* leaves” , *J. Serb. Chem. Soc.*, **2011**, *76*(3), 375–384.
- 20) Orietta Servettaz; Colombo, M. Laura; Maria de Bernardi; Elena Uberti; Giovanni Vidari; Paola Vita-Finzi, “Flavonol Glycosides From *Dryas Octopetala*” , *J. Natural products*, **1984** *47*(5), 809–814.

- 21) Petra Hilt; Andreas Schieber; Caner Yildirim; Gabi Arnold; Iris Klaiber; Jurgen Conrad; Uwe Beifuss; Reinhold Carle, "Detection of Phloricizin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS.MS and NMR Spectroscopy", *J.Agric.Food Chem.*, **2003**, 51, 2896-2899
- 22) Lu, Yinrong; Foo, L. Yeap, "Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace", *Food Chemistry*, **1997**, 59(2),187-194.
- 23) Kim, Sang Min; Kang Kyungsu; Jho, Cun Hye; Jung, Yu-Jin; Nho, Chu Won; Um, Byung-Hun; Cheol-Ho, "Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by *tert*-Butyl Hydroperoxide" *Phytotherapy research*, **2011**, 25, 1011-1017.
- 24) Torgils Fossen; Atle T. Pedersen; Qyvind M. Andersen, "Flavonoids from Red Onion(*Allium Cepa*)", *phytochemistry*, **1998**, 47(2), 281-285.
- 25) Olivia R. Pereira; Silva M. S. Artur; Maria R. M. Domingues; Susana M. Cardoso, "Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*", *Food Chemistry*, **2012**, 131, 652-659.
- 26) Huh, Sungran; Kim, Young-Soo; Jung, Cunsun; Lim, Jihee; Jung, Kwang Sun Jung; Kim, Myeong-Ok; Lee, Jongsung; Park, Deokhoon, "Melanogenesis Inhibitory Effect of Fatty Acid Alkyl Esters Isolated from *Oxalis triangularis*", *Biol. Pharm. Bull.*, **2010**, 33(7), 1242-1245.

27) Tareq Shahidullah Fakir; Sohrab, Md. Hossain; Uddin Chowhdury A. M. Sarwar; Afroz Farhana; Al-Mansur, M.; Hasan M. Choudhury, "Phytochemical Studies on the Leaves of Xylia dolabriformis" , *J. Pharm. Sci.*, **2009**, 8(2), 171-172.

28) Ahmed Yunus; Sohrab, Md. Hossain; Al-Reza, M. Sharif; Tareq Shahidulla Faqir; Hasan M. Choudhury; Sattat, M. A. " Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of Sapium baccatum", *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, 48, 549-552.