



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

스타푸르트 가지 추출물의  
항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

李 宗 澤

2018年 2月

# 스타푸르트 가지 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

李 宗 澤

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2017年 12月

李宗澤의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

委 員 \_\_\_\_\_ ①

濟州大學校 大學院

2017年 12月

Anti-oxidative, Anti-inflammatory and  
Anti-bacterial Constituents from the  
Branches of *Averrhoa carambola* L.

Jong Taek Lee  
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2017. 12.

This thesis has been examined and approved.

.....  
.....  
.....

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

List of Tables .....	iv
List of Figures .....	v
List of Abbreviations .....	viii
Abstract .....	x
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 시약 및 기기 .....	6
2. 재료 .....	7
3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리 .....	8
1) 스타프루트 가지의 추출 및 용매 분획 .....	8
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리 .....	9
(1) VLC에 의한 분리과정 .....	9
(2) MPLC에 의한 분리과정 .....	10
3) <i>n</i> -BuOH 분획물의 활성 성분 분리 .....	11
4. HPLC analysis .....	12
5. 항산화 활성 평가 .....	14
1) 총 폴리페놀 함량 측정 .....	14
2) DPPH radical 소거 활성 측정 .....	15
3) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 측정 .....	15
6. 항염 활성 평가 .....	17
1) RAW264.7 cell 배양 .....	17
2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정 .....	17
3) 세포독성평가 (MTT assay) .....	18

3) IL-6 및 TNF- $\alpha$ 생성 억제 활성 측정 .....	18
4) Western blot analysis .....	19
7. 항균 활성 평가 .....	20
1) Paper disc diffusion method .....	20
2) MIC (minimum inhibitory concentration) .....	21
3) MBC (minimum bactericidal concentration) .....	22
III. 결과 및 고찰 .....	23
1. 분리된 화합물의 구조 분석 .....	23
1) Compound 1의 구조 동정 .....	23
2) Compound 2의 구조 동정 .....	26
3) Compound 3의 구조 동정 .....	29
4) Compound 4의 구조 동정 .....	36
2. HPLC analysis .....	43
3. 항산화 활성 실험 결과 .....	46
1) 스타푸르트 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	46
(1) 총 폴리페놀 함량 측정 .....	46
(2) DPPH radical 소거 활성 측정 .....	47
(3) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 측정 .....	48
2) 분리된 화합물의 활성 결과 .....	49
(1) DPPH radical 소거 활성 측정 .....	49
(2) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 측정 .....	50
4. 항염 활성 실험 결과 .....	51
1) 스타푸르트 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	51
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정 .....	51
(2) IL-6 및 TNF- $\alpha$ 생성 억제 활성 측정 .....	54
(3) Western blot analysis .....	55
2) 분리된 화합물의 활성 결과 .....	57
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정 .....	57

(2) Compound 3의 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 생성 억제 활성 측정 .....	60
(3) Compound 3의 western blot analysis .....	61
5. 항균 활성 실험 결과 .....	63
1) 스타푸르트 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과 .....	63
(1) Paper disc diffusion method .....	63
(2) MIC 및 MBC .....	67
IV. 요약 및 결론 .....	70
V. 참고문헌 .....	71

## List of Tables

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors .....	13
Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis .....	13
Table 3. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>1</b> (400 and 100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ...	24
Table 4. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>2</b> (500 MHz and 125 MHz, pyridine- $d_5$ ) .....	27
Table 5. Information of compound <b>3</b> .....	30
Table 6. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>3</b> (500 and 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	31
Table 7. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR data of compound <b>4</b> (400 and 100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	38
Table 8. Contents of isolated compounds by HPLC .....	45
Table 9. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches .....	47
Table 10. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS $^+$ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches .....	48
Table 11. $\text{SC}_{50}$ values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds <b>1-4</b> .....	49
Table 12. $\text{SC}_{50}$ values of ABTS $^+$ radical scavenging activities for isolated compounds <b>1-4</b> .....	50
Table 13. Anti-bacterial activity of extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches .....	66
Table 14. MIC and MBC value of <i>A. carambola</i> branches .....	69



## List of Figures

Figure 1. Antioxidative system inside human body. ....	2
Figure 2. LPS-induced inflammation pathway. ....	4
Figure 3. Chemical structures of carambolaside A-L from <i>Averrhoa carambola</i> fruits. ....	5
Figure 4. Picture of <i>A. carambola</i> . ....	7
Figure 5. Extraction and solvent fractionation of <i>A. carambola</i> branches. ....	8
Figure 6. Isolation of compounds from <i>A. carambola</i> branches. ....	9
Figure 7. Isolation of compounds from <i>A. carambola</i> branches. ....	10
Figure 8. Isolation of compounds from <i>A. carambola</i> branches. ....	11
Figure 9. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents. ....	14
Figure 10. Paper disc diffusion method. ....	21
Figure 11. Chemical structures of compound <b>1</b> . ....	24
Figure 12. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>1</b> (CD <sub>3</sub> OD). ....	25
Figure 13. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>1</b> (CD <sub>3</sub> OD). ....	25
Figure 14. Chemical structures of compound <b>2</b> . ....	26
Figure 15. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>2</b> (pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> ). ....	28
Figure 16. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>2</b> (pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub> ). ....	28
Figure 17. Chemical structures of compound <b>3</b> and carambolaside C. ...	30
Figure 18. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD). ....	32
Figure 19. <sup>13</sup> C and DEPT (135°) NMR spectra of compound <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD). ....	32
Figure 20. COSY NMR spectrum of compound <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD). ....	33
Figure 21. NOESY NMR spectrum of compound <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD). ....	33
Figure 22. HMQC NMR spectrum of compound <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD). ....	34

Figure 23.	HMBC NMR spectrum of compound <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD). .....	34
Figure 24.	HR-ESI-MS spectrum of isolated compound <b>3</b> . .....	35
Figure 25.	Chemical structure of compound <b>4</b> . .....	37
Figure 26.	<sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>4</b> (CD <sub>3</sub> OD). .....	40
Figure 27.	<sup>13</sup> C and DEPT (135°) spectra of compound <b>4</b> (CD <sub>3</sub> OD). .....	40
Figure 28.	COSY NMR spectrum of compound <b>4</b> (CD <sub>3</sub> OD). .....	41
Figure 29.	HMQC NMR spectrum of compound <b>4</b> (CD <sub>3</sub> OD). .....	41
Figure 30.	HMBC NMR spectrum of compound <b>4</b> (CD <sub>3</sub> OD). .....	42
Figure 31.	HPLC chromatogram of compounds <b>1</b> , <b>3</b> and <b>4</b> . .....	43
Figure 32.	HPLC chromatogram of 70% EtOH extract, EtOAc and n-BuOH fractions. ....	44
Figure 33.	Total phenolic contents of extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches. ....	46
Figure 34.	DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches. ....	47
Figure 35.	ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches. ....	48
Figure 36.	DPPH radical scavenging activities of isolated compounds <b>1-4</b> . ....	49
Figure 37.	ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of isolated compounds <b>1-4</b> . ....	50
Figure 38.	Effects of extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. ....	52
Figure 39.	Effects of EtOAc fraction from <i>A. carambola</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. .....	53
Figure 40.	Effects of EtOAc fraction from <i>A. carambola</i> branches on IL-6 and TNF-α production in LPS-induced RAW264.7 cells. ·	

.....	54
Figure 41. Effect of isolated EtOAc layer from <i>A. carambola</i> branches on levels of iNOS and COX-2 protein expression in RAW264.7 macrophage. ....	56
Figure 42. Effects of isolated compounds <b>1</b> , <b>3</b> and <b>4</b> on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. ....	58
Figure 43. Effects of isolated compound <b>3</b> on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. ....	59
Figure 44. Effects of compound <b>3</b> on IL-6 and TNF- $\alpha$ production in LPS-induced RAW264.7 cells. ....	60
Figure 45. Effect of isolated compound <b>3</b> on levels of iNOS and COX-2 protein expression in RAW264.7 macrophage. ....	62
Figure 46. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches on <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i> . ....	65
Figure 47. Result of MBC of extract and solvent fractions from <i>A. carambola</i> branches on <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i> . ....	68

## List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
BHT	<i>tert</i> -Butylhydroxytoluene
CC	Column chromatography
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform- <i>d</i>
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
COSY	Correlation spectroscopy
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
Fr.	Fraction
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalent
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
IC <sub>50</sub>	Inhibition concentration of 50%
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
int.	Integration
LB	Luria bertani
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol

MP	MPLC subfraction
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PMF	Polymethoxyflavonoid
ROS	Reactive oxygen species
s	Singlet
SC <sub>50</sub>	Scavenging concentration of 50%
TLC	Thin layer chromatography
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TSB	Tryptic soy broth
V	VLC subfraction
VLC	Vacuum liquid chromatography
2D	Two-dimensional

## Abstract

In order to develop bioactive ingredients from subtropical resources, we screened *Averrhoa carambola* branches collected in Jeju Island. The prepared 70% ethanol extract was successively partitioned into *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH and H<sub>2</sub>O fractions. Upon biological screenings, EtOAc and *n*-BuOH fractions exhibited potent anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial activities.

Phytochemical investigation of the extract from *A. carambola* branches resulted in isolation of four constituents; *epi*-catechin (**1**), daucosterol (**2**), phloretin 3'-*C*-(4-*O*-β-D-glucopyranosyl)-β-D-fucopyranosyl-6'-*O*-α-L-arabinofuranoside (**3**) and carambolaside J (**4**). The chemical structures of isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values. As far as we know, compounds **1** and **3** were isolated for the first time from this plant and compound **3** was identified as a novel compound in nature.

Quantitative analysis was performed by HPLC. The contents of compounds **1**, **3** and **4** were confirmed in extract (2.19 mg/g, 7.75 mg/g, 3.00 mg/g), EtOAc (35.18 mg/g, 4.61 mg/g, 4.85 mg/g) and *n*-BuOH (2.16 mg/g, 29.38 mg/g, 14.65 mg/g) fractions, respectively.

On the anti-oxidation tests, the compound **1** (SC<sub>50</sub> 38.7 μM) showed stronger DPPH radical scavenging activity than positive control (ascorbic acid, SC<sub>50</sub> 43.5 μM). Also, compounds **1** (SC<sub>50</sub> 12.0 μM), **3** (SC<sub>50</sub> 20.9 μM), and **4** (SC<sub>50</sub> 34.2 μM) exhibited potent ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities compared to ascorbic acid (SC<sub>50</sub> 31.8 μM). For the anti-inflammation studies using RAW264.7 cells, compounds **1**, **3** and **4** inhibited the production of NO effectively without causing cell toxicity. Furthermore, the compound **3** inhibited the generation of iNOS protein.

Based on these results, it was suggested that extract and isolated compounds from *A. carambola* branches could be potentially applicable as pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

## I. 서론

최근 산업의 발달과 생활환경의 개선에 의해 생활은 편해지고 있지만 우리의 인체는 그것에 따른 환경오염, 스트레스, 유해물질 등의 문제에 노출되어 있다. 특히 이러한 외부요인에 직접적인 접촉이 있는 피부의 경우, 피부 생리학적 메커니즘에 의해 단백질이나 유전자 물질 등이 파괴되어 피부트러블 뿐만 아니라 아토피 피부염, 피부노화 등이 발생되고 있는 실정이다.<sup>1</sup> 이러한 메커니즘에 깊이 관여를 하고 있는 것이 바로 활성산소이다.

불안정한 상태의 활성산소는 안정화 하려는 성질을 가지기 때문에 주변 물질과 반응 결합하려 하는 성향을 가지고 있다. 그 때문에 적정량의 활성산소는 세균과 바이러스 같은 병원체와 반응-결합하여 활동을 할 수 없게 만들어 주는 좋은 역할을 하지만, 이것이 너무 많아지면 우리 몸을 구성하면서 생명유지에 필요로 하는 단백질 지방 탄수화물 기타 필수물질들까지도 무차별로 공격을 당하기 때문에 제 기능을 발휘하지 못하게 된다. 결국 과잉 생성된 활성산소는 신체에 나쁜 스트레스로 작용하여 각종 질병과 노화를 유발하는 주범이 되고 있다.

활성산소는 우리 몸속에서 superoxide radical ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxy radical ( $\cdot\text{OH}$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) 및 그 외의 lipid hydroperoxide (ROOH), free radical ( $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ) 등의 반응성이 큰 산소화합물들을 말하며, 이러한 화합물들을 통틀어 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)이라고 한다.<sup>2</sup> 이러한 활성산소는 우리몸속의 산소가 세포내 미토콘드리아의 전자전달계 과정을 통하여 전자를 전달받아 free radical을 가진 superoxide radical( $\cdot\text{O}_2^-$ )이 되는 반응으로부터 생성이 되며, 우리 몸속의 항산화효소 (superoxide dismutase, SOD)와 반응을 하여 산소와 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )로 분해가 된다. 그리고 이렇게 생성된 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 없애기 위해 또 다른 항산화 효소인 catalase와 glutathione peroxidase (GPx)가 분비 되는데 이 효소들로 인해 물과 산소로 분해가 되어 활성산소를 제거 하게 된다(Figure 1).<sup>3</sup> 이러한 항산화 효소들은 신체의 나이가 많아질수록 생성량이 줄어들게 되며 이 때문에 자연적 노화가 발생하게 된다. 하



지만 담배, 식품첨가물, 대기오염, 자외선, 스트레스 등 여러 외부요인들로 인해 항산화효소의 생성이 더욱더 빠르게 감소하여 인체의 노화속도는 더욱더 빨라지고 있으며, 암, 뇌질환, 동맥경화, 피부손상, 치매, 심장질환 및 관절염 등의 다양한 질병이 유발된다.<sup>4</sup>

이러한 ROS로 인해 발생하는 피해를 줄이기 위해 합성항산화제들이 지금까지도 많이 사용되고 있지만 인체에 대한 안전성의 문제로  $\alpha$ -tocopherol, vitamin C, flavonoid, carotenoid 등과 같은 천연 항산화제에 관심이 모아지고 있다. 천연 항산화제는 합성항산화제에 비해 뛰어난 항산화효과와 안전하다는 장점을 가지고 있지만 그만큼 가격이 비싸다는 단점을 가지고 있다. 이로 인해 새롭고 안전하며 뛰어난 효과를 지닌 천연물 소재를 찾으려는 노력이 필요한 실정이다.<sup>5</sup>

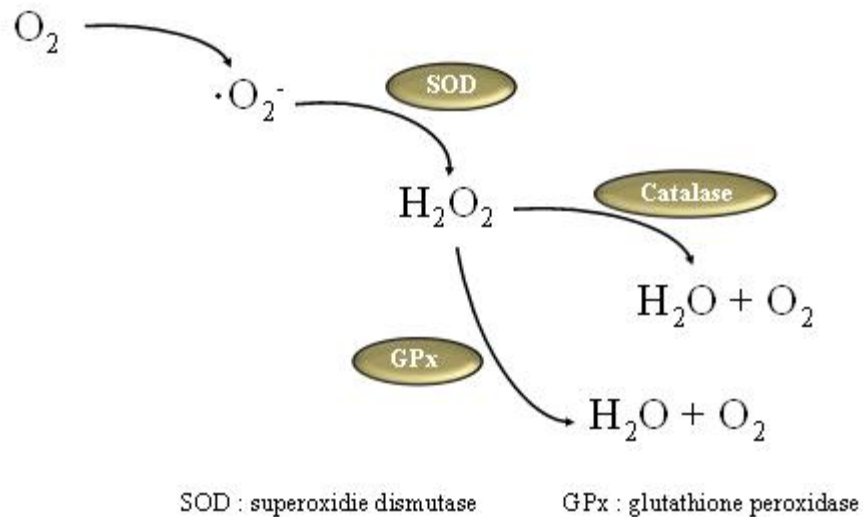


Figure 1. Antioxidative system inside human body.

염증반응은 상처나 감염 또는 자가면역기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서 체내의 세포가 인체를 보호하기 위하여 외부자극에 의한 피부손상에 대응하여 반응하는 현상을 말한다. 주로 조직상해, 반응, 회복 3단계 과정을 거치며 일어나게 되며, 이 과정 중 나타나는 염증매개물질들에 의해 반응이 진행된다. 하지만 이러한 면역반응이 지나치게 되면 염증성 장염이나 다발성 경화증 류머티즘과 같은 자가면역질환을 야기 할 수 있으므로, 적정수준의 면역반응을 제어하는 것이 매우 중요하다.<sup>6</sup>

염증반응의 시작은 내독소로 잘 알려진 LPS (Lipopolysaccharide)의 자극으로 인해 시작이 되며 이는 macrophage 또는 monocyte에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 와 같은 염증매개물질들을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 염증매개물질들의 형성은 NF-kB (nuclear factor-kappa B) 신호전달경로와 MAPK (mitogen activated protein kinase) 신호전달경로를 활성화 시켜 iNOS와 COX-2를 발현시킨다. 이에 연쇄반응으로 nitric oxide와 prostaglandin E<sub>2</sub>와 같은 염증인자형성과정으로 이어지면서 염증을 유발하게 된다(Figure 2).<sup>7</sup> 일반적인 nitric oxide의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성 부종 등의 염증반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup>

또한 염증을 일으키는 원인으로는 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인이 그 중 하나이다. 그중 피부 상재균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*는 피부내에 정상적으로 분포하는 호기성 피부 상재균으로 염증의 일차적 원인은 아니지만, 염증 발생부위를 더욱 확장 시켜 결국 여드름 등의 피부질환을 악화 시킨다.<sup>9</sup> 이러한 균들의 염증반응치료에 다양한 항생제가 쓰이고 있지만 기존에 사용되고 있는 염증성 여드름 치료에 사용되는 triclosan, benzyl peroxide, tetracyclin 등은 피부 건조증과 과민증을 유발하거나, 항생제 내성 발생으로 지속적인 사용이 어려운 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 따라서 이러한 문제점을 해소하기 위해 항균효과를 가지면서 부작용이 없는 천연소재 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다.

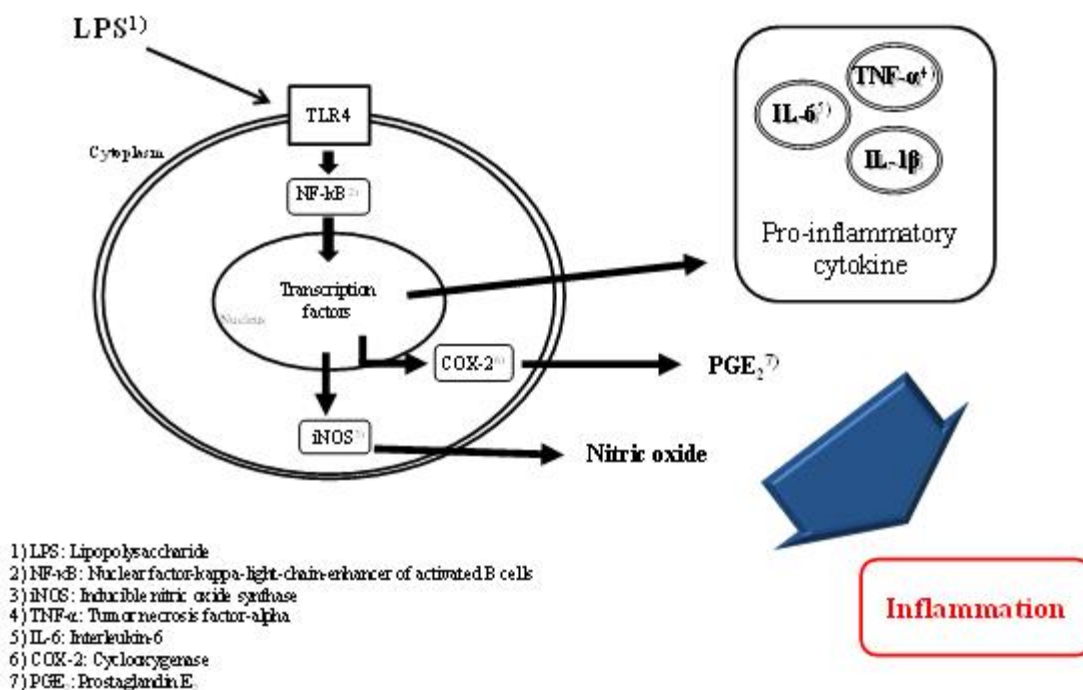


Figure 2. LPS-induced inflammation pathway.

본 연구에서 사용된 스타푸르트(star fruit)는 스리랑카 인도네시아 등을 원산지로 하여 주로 열대 지방에 분포하는 상록 활엽 관목으로, 서식지가 원래 열대지방인 만큼 우리나라에서는 많이 알려져 있지 않던 과일이었다. 하지만 산업이 발달함에 따라 한반도의 평균기온이 상승하는 동시에 온대의 기후환경을 가지고 있던 제주도가 아열대 기후대에 가까운 환경으로 변화하게 되면서,<sup>11-14</sup> 활발해진 아열대 작물에 대한 연구에 의해 인지도가 널리 퍼진 과일 중 하나이다. 주로 높이가 5~14m 정도로 자라며 잎은 둥근 타원 모양으로 열매는 10 cm 정도의 둥근 타원형의 모양을 가지고 있으며 세로로 3~6개 정도의 꽃이 모여 있다. 옆으로 자르면 별모양이 되기 때문에 ‘스타푸르트’라는 이름이 붙여졌으며, 다른 이름으로는 ‘카람볼라’, ‘별사과’, ‘오렘자’라고도 불린다. 열매에는 모과 같은 상큼한 향이 나며 탈수 상태의 갈증을 풀어주기 때문에 생과일을 그대로 즐기는 경우가 많고, 신맛이 강해 잼, 젤리, 주스 등으로도 이용하기도 한다.

스타푸르트 열매 추출물에 대해서는 항산화, 항염, 효과<sup>15</sup>가 있다고 보고가 되어

있으며, 앞에서는 항산화 활성<sup>16</sup>이 보고되어 있다. 하지만 아직까지 스타푸르트 가지에 대한 생리 활성 및 유효성분에 대한 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 스타푸르트(*Averrhoa carambola* L.) 가지 추출물 및 용매 분획물의 항산화, 항염, 항균 활성을 확인하여 기능성 식·의약품 및 화장품 관련 천연 소재로써 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

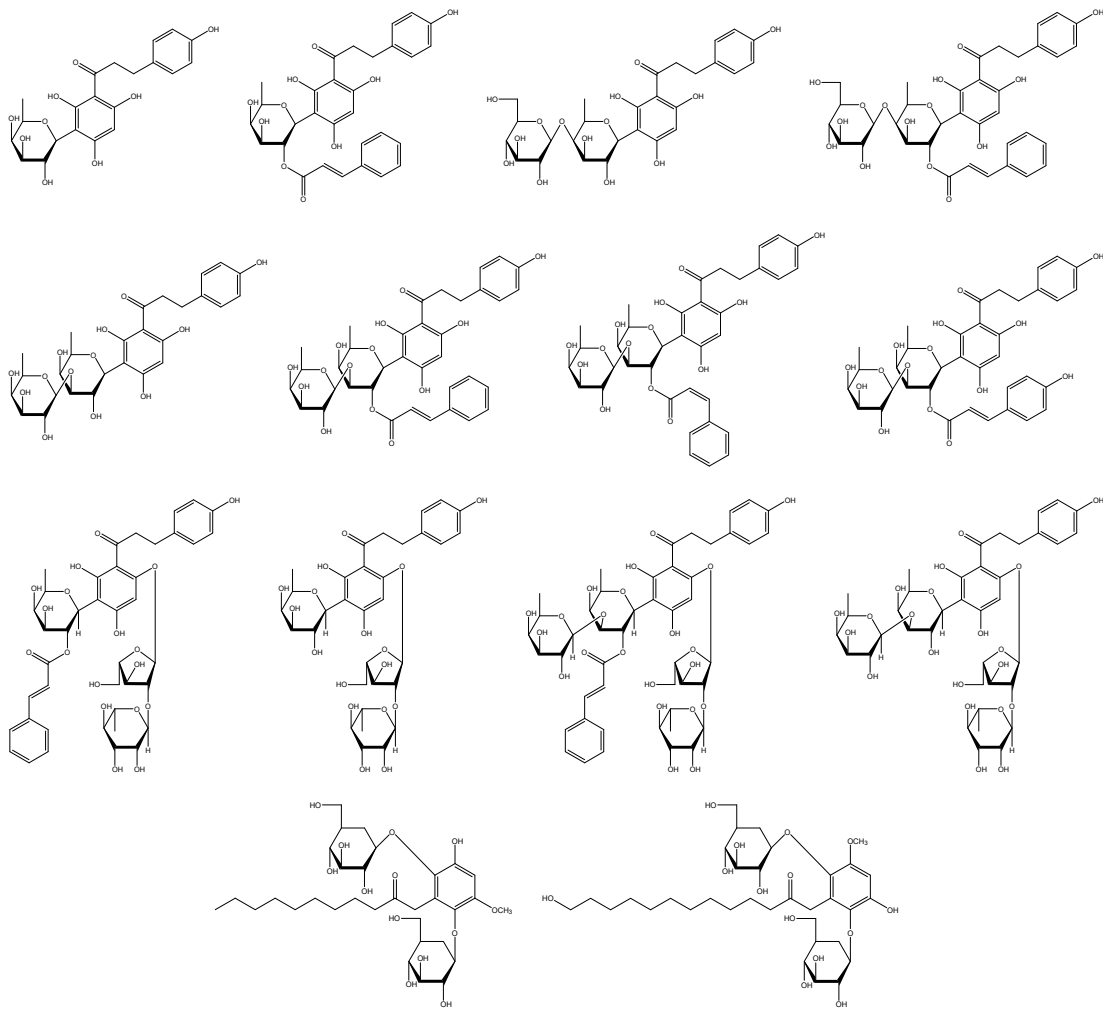


Figure 3. Chemical structures of carambolaside A-L from *Averrhoa carambola* fruits.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Junsei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co.)을 사용하였으며, medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co.)에는 KP-C18-HS (Biotage Co.) 컬럼을 사용하였다. Silica gel chromatography에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck Co.)을 사용하였고, gel filtration chromatography에는 Sephadex<sup>TM</sup> LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. 분리 과정에 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 사용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO<sub>4</sub> 수용액(3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 필요에 따라 사석에 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.) 혹은 AVANCE III (FT-NMR system, 500 MHz, Bruker Co.)를 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CD<sub>3</sub>OD, pyridine-*d*<sub>6</sub>를 사용하였다.

HPLC 분석에는 HPLC (Waters Co)를 이용하였고, 사용된 컬럼 및 검출기는 각각 Shimadzu Column (ODS, 250×4.6 mm, 5 μm) 및 UV-visible Detector (Waters, USA, PDA 285 nm)이었다.

## 2. 재료

실험에 사용된 시료인 스타푸르트(*Averrhoa carambola*) 가지(시료번호 : 475)는 2017년 1월에 제주도 오등동 소재 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구소에서 채집하여 사용하였다(Figure 3).



Figure 4. Pictures of *Averrhoa carambola*.

### 3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

#### 1) 스타프루트 가지의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 스타프루트 가지 1.34 kg을 70%(v/v) EtOH 26.8 L에 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 203.0 g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물 20 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었으며, 이와 같은 방법으로 8회 더 반복 실시하여, 추출물 총 178.8 g을 용매 분획하였다(Figure 4).

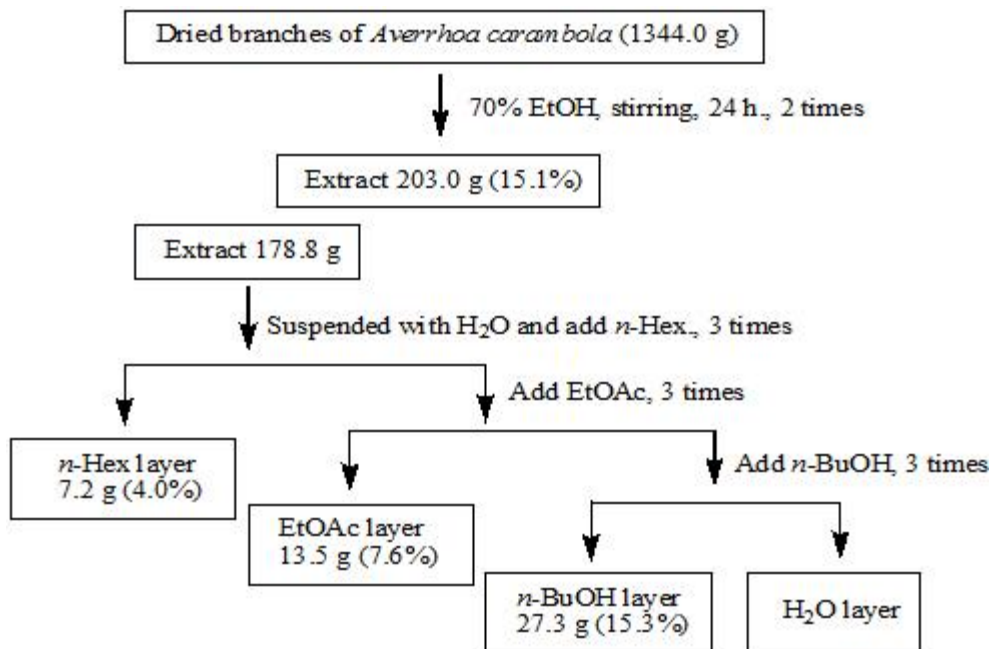


Figure 5. Extraction and solvent fractionation of *A. carambola* branches.

## 2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

### (1) VLC에 의한 분리과정

용매 분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate 분획물 5.0 g을 극성별로 세분화하기 위하여 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. 용매의 극성을 10%씩 높이는 방법으로 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (0-100%)을 각 300 mL씩 용출하여 총 17개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-17).

VLC fraction들 중 Fr. V12 (1517.7 mg)은 메탄올로 재결정하여 compound 2 (44.9 mg)을 얻었다(Figure 5).

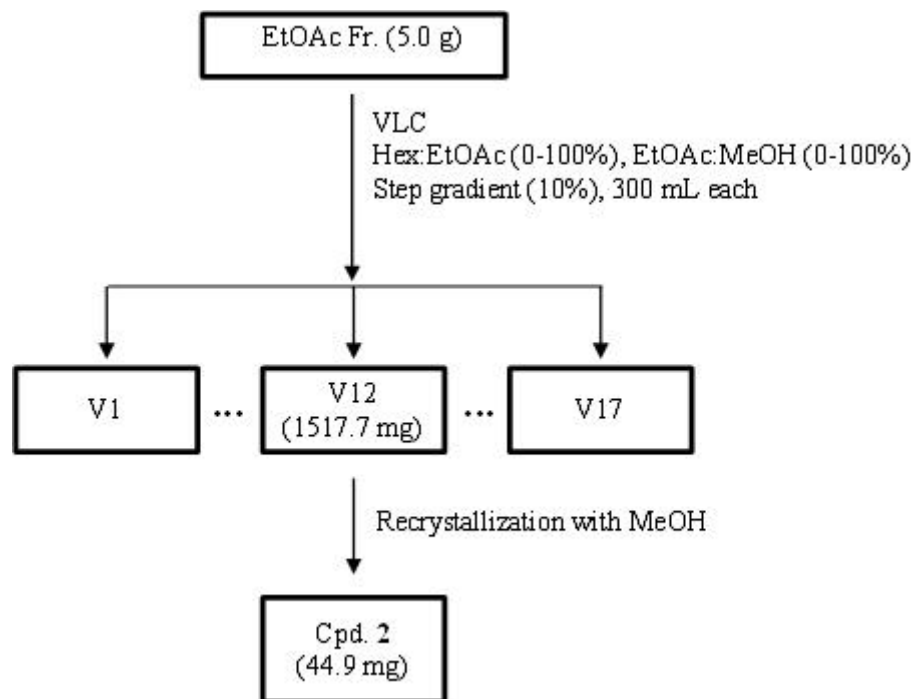


Figure 6. Isolation of compounds from *A. carambola* branches .



## (2) MPLC에 의한 분리과정

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 MPLC (medium pressure liquid chromatography)를 수행하였다. EtOAc 분획물 5.0 g을 MeOH 10 mL에 녹이고 0.20  $\mu\text{m}$  PTFE filter를 이용해 여과한 후 주입하였으며 column은 KP-C18-HS (Biotage Co.)을 사용하였다. 기울기 용리법을 이용해 MeOH:H<sub>2</sub>O (10-60% MeOH, 30 min), MeOH:H<sub>2</sub>O (60-80% MeOH, 80 min), MeOH:H<sub>2</sub>O (80-100% MeOH, 20 min), MeOH (100%, 20 min)의 용매조건들로 극성비율을 순차적으로 낮추면서 각각 35 mL씩 용출시켜 총 42개의 fraction을 얻었다(MP1-MP42).

MPLC fraction들 중 Fr. MP6 (252.6 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (3:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 1 (73.1 mg)을 얻었다(Figure 6).

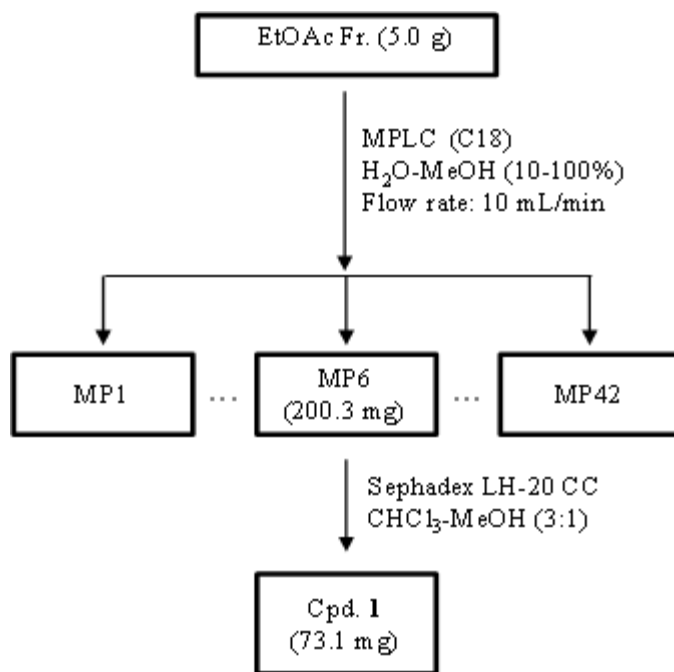


Figure 7. Isolation of compounds from *A. carambola* branches.

### 3) *n*-BuOH 분획물의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 *n*-BuOH 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 MPLC (medium pressure liquid chromatography)를 수행하였다. *n*-BuOH 분획물 5.0 g을 MeOH 10 mL에 녹이고 0.20 µm PTFE filter를 이용해 여과한 후 주입하였으며 column은 KP-C18-HS (Biotage Co.)을 사용하였다. 기울기 용리법을 이용해 MeOH:H<sub>2</sub>O (10-60% MeOH, 30 min), MeOH:H<sub>2</sub>O (60-80% MeOH, 80 min), MeOH:H<sub>2</sub>O (80-100% MeOH, 20 min), MeOH (100%, 20 min)의 용매조건들로 극성비율을 순차적으로 낮추면서 각각 35 mL씩 용출시켜 총 42개의 fraction을 얻었다 (BMP1-BMP42).

MPLC fraction들 중 Fr. BMP18 (131.4 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(3:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 3 (34.1 mg)을 얻었다.

Fr. BMP31-35 (131.4 mg)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (3:1)의 용매조건으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 compound 4 (12.8 mg)을 얻었다 (Figure 7).

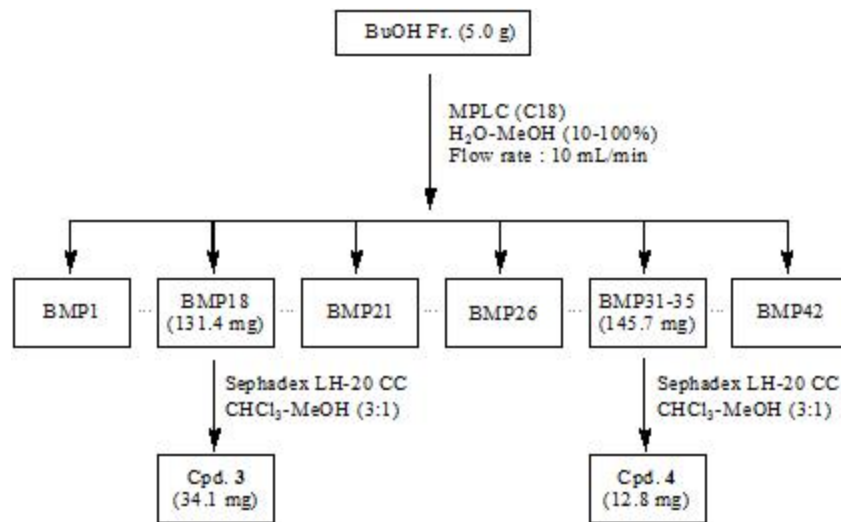


Figure 8. Isolation of compounds from *A. carambola* branches.

#### 4. HPLC analysis

스타프루트 가지 추출물 및 분획물에 대하여 분리한 화합물들의 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 정성분석에는 추출물 및 분획물들을 5 mg/mL로 녹인 후, 각각 compound 1, 3 및 4을 첨가하여 0.45  $\mu$ m PTFE filter를 이용해 여과해서 나온 여액을 분석하였다. 화합물 정량 분석에는 분리된 compound 1, 3 및 4 표준용액을 사용하여 얻어진 피크의 면적 값을 가지고 각 화합물의 정량을 위한 검정곡선을 작성하였다. 표준검정곡선을 작성하기 위해 각 표준물질들을 1000 ppm으로 녹여 stock을 제조하였고, 이를 125, 250, 500 ppm이 되도록 묽혀 검정곡선을 작성하였다.

각 분석에는 주입부피 10  $\mu$ L, 컬럼온도 40 $^{\circ}$ C, 용리액은 MeOH과 H<sub>2</sub>O를 사용하여 다음의 조건으로 용리 시켰고, 1.0 mL/min의 유속으로 60분 동안 분석하였다(Table 1-2).

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control Factor	Conditions
Injection Volume	10 $\mu$ L
Column	Shimadzu ODS (250 $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu$ m)
Mobile phase	A: H <sub>2</sub> O, B: MeOH
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Wavelength	285 nm
Detector	Waters 2998 PDA (Waters, USA)
Separation Module	Waters 2695 (Waters, USA)

Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)
0	1.0	80	20
50	1.0	20	80
55	1.0	0	100
60	1.0	0	100

## 5. 항산화 활성 평가

### 1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법<sup>17</sup>을 응용하여 실시하였다. 표준검정곡선은 gallic acid를 표준 물질로 하여 1 mg/mL의 농도로 제조한 후, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 희석하여 작성 하였으며, 표준검정곡선의  $r^2$ 값은 0.99 이상이다(Figure 8). 우선 각 1 mg/mL 농도의 시료용액들과 농도별로 희석한 gallic acid 표준 용액을 100 µL씩 취한 후, 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 첨가하여 상온에서 3분간 반응시키고, 7%(w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 200 µL를 가하여 혼합한 후 증류수 700 µL을 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며 이 흡광도로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

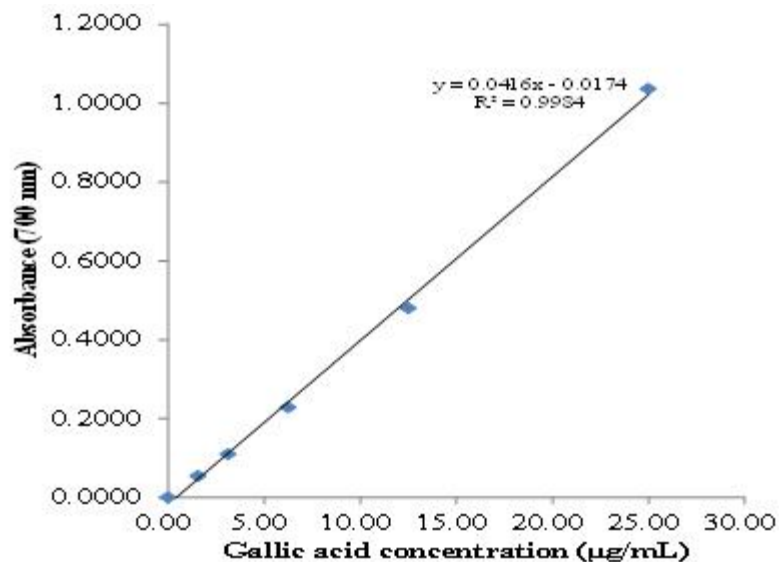


Figure 9. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents.

## 2) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법<sup>18</sup>을 응용하여 실시하였다. 우선 DPPH시액은 DMSO를 사용하여 20 mM 농도로 녹여준 뒤 이를 EtOH을 사용하여 0.2 mM로 희석하여 사용하였다. 우선 96 well plate에 시료를 각각 20  $\mu$ L씩 넣고 0.2 mM DPPH 용액 180  $\mu$ L씩을 가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 이 후 Microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고, radical 소거 활성은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다. 또한, 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도 (SC<sub>50</sub>)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며, 이 때 양성 대조군(positive control)으로는 BHT와 ascorbic acid를 사용하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

Abs<sub>control</sub> : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs<sub>sample</sub> : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs<sub>blank</sub> : 시료만의 흡광도

## 3) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정

ABTS<sup>+</sup>(aaa) radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법<sup>19</sup>을 응용하여 실시하였다. ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하기 위해, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 상온, 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS<sup>+</sup> radical을 형성시켰다. 이 용액을 ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 $\pm$ 0.02가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. 우선 96 well plate에 시료 20  $\mu$ L씩 가한 후 희석한 ABTS<sup>+</sup> 용액 180  $\mu$ L씩을 첨가하여 상온에서 15분 동

안 반응시켰다. 이 후 Microplate reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였고, radical 소거 활성은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다. 또한, 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC<sub>50</sub>)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며, 이때 양성 대조군 (positive control)으로는 BHT와 ascorbic acid를 사용하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= [1 - (Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{blank}}) / Abs_{\text{control}}] \times 100$$

Abs<sub>control</sub> : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs<sub>sample</sub> : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs<sub>blank</sub> : 시료만의 흡광도

## 6. 항염활성 평가

### 1) RAW264.7 cell 배양

마우스 대식세포 계열(Murine macrophage cell line)인 RAW264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA) 이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였으며, 2 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

### 2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후, 각각 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 생성된 nitric oxide의 양은 세포 상등액 100 µL와 Greiss 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였으며, sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 사용하여 표준 검정곡선을 작성하여 비교하였다. 표준검정곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99이상이었으며, 양성대조군(positive control)으로는 2-amino-4-picoline (10 µM)을 사용하였다.



### 3) 세포 독성 평가(MTT assay)

세포독성평가는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 이용하였다. 24 well plate에 RAW264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후, 각각 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT 시약을 첨가하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후, 상등액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 후, 이를 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존률은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Abs<sub>control</sub> : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs<sub>sample</sub> : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

### 4) IL-6 및 TNF-α 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후, 각각 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포 상등액을 취해 IL-6 및 TNF-α 전염증성 cytokine 생성 함량을 각각 측정하였다. IL-6 및 TNF-α 전염증성 cytokine 생성 함량은 TNF-α (Invitrogen), IL-6 (Invitrogen) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며 비교 하였다.<sup>20</sup>

## 5) Western blot analysis

60 mm petri dish에  $6.0 \times 10^5$  cells/dish로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후, 각각 sample을 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포상등액을 제거하여 PBS로 세척한 후, lysis buffer (1 × RIPA)를 이용하여 4°C 조건에서 overnight시켜 lysis 시켰다. 그 이후 단백질을 원심분리(15000 rpm, 4°C, 20 min)하여 단백질의 상등액만 분리하여 실험에 사용하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 bradford 시약을 사용하여 표준검정곡선을 작성하여 정량하였다.

정량된 단백질 20 µg을 8-12% SDS-polyacrylamide에 전기영동한 후 이를 Transfer stack을 이용해 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 7분간 transfer 하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 5% skim milk를 함유한 TTBS (0.1% Tween 20, tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2시간 blocking 시킨 후, TTBS로 5회 세척하였다. 그 후 membrane을 각각의 1차 항체들과 반응을 시켰으며, 그 1차 항체 반응은 anti-rabbit NOS2 (Santa Cruz)을 1:1000로, anti-mouse COX-2 (BD Biosciences)을 1:1000로, β-actin antibody clone AC-74 (Sigma)을 1:20000로 희석하여 사용하였고, 4°C 조건에서 overnight 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 TTBS로 5회 세척한 후, HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 2차 항체(Santa Cruz)를 COX-2 1:5000, INOS 1:5000, β-actin 1:20000 으로 희석한 후 상온에서 1시간 반응시킨 뒤, TTBS로 5회 세척하였다. 단백질은 WEST-ZOL (Western blot detection system, Intron) 용액을 사용하여 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.<sup>21</sup>

## 7. 항균활성 평가

### 1) 균주배양

피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)과 *Staphylococcus aureus* (CCARM 0027, 3708)을 항생제 내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양 받아 사용하였다. *S. aureus*인 경우, 배양배지를 LB (Luria bertani) 배지로 하였고 *S. epidermidis*는 배양배지를 TSB (Tryptic soy broth)로 하여 37℃, 호기성 조건 하에서 24시간 마다 계대 배양하였다.

### 2) Paper disc diffusion method

시료의 항균 활성을 측정하여 위해 paper disc diffusion 방법으로 생육 저지환을 확인하였다.<sup>22</sup> *S. aureus* (CCARM 0027, 3708)와 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)를 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 0.8% 한천을 포함하는 TSB, LB 배지에 넣어 1.5% 한천을 포함하는 고체 배지 위에 붓는다. 이후 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37℃ 조건 하에서 24시간 배양한 후, 형성된 원형 발육저지환의 크기를 측정하였다(Figure 9).

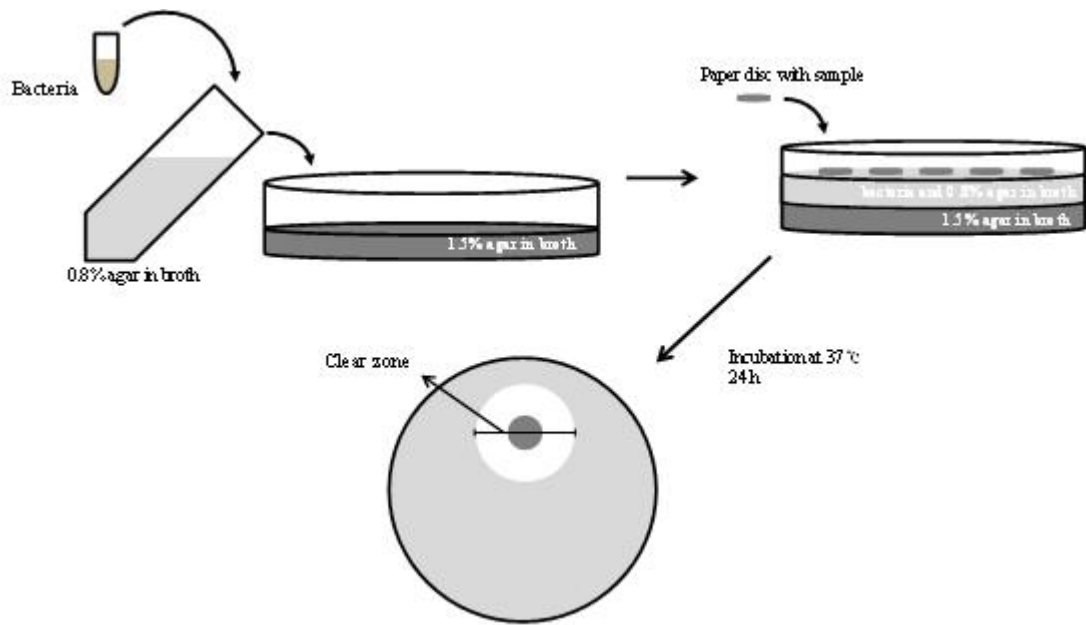


Figure 10. Paper disc diffusion method.

### 3) MIC (minimum inhibitory concentration)

최소억제농도(MIC)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로 미생물에 대한 MIC 값이 낮으면 낮을수록 시료물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고 할 수 있다. MIC 측정은 액체배지 희석법을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 배지로 희석한 시료 100  $\mu$ L와 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절 한 균 100  $\mu$ L를 넣어 37°C 조건 하에서 24시간 배양하여 균의 증식이 나타나지 않는 최소농도를 확인하였다.

#### 4) MBC (minimum bactericidal concentration)

MBC란 균이 완전히 죽은 최소사멸농도를 말한다. MIC 값이 나타난다고 해도 그 균은 모두 사멸한 것은 아니며 시료의 영향으로 균의 성장을 방해하여 균이 자라지 않아 죽은 것처럼 보일 수 있기 때문이다.

하드배지 plate를 준비하고 MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 사용해 시료배양액을 찍어내서 plate에 도말하였고, 이를 37℃조건 하에서 24시간 배양하여 colony가 형성되지 않는 최소농도를 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 분리된 화합물의 구조 분석

##### 1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석 결과, 총 15개의 carbon peak가 관찰되며, 이를 통해 전형적인 flavonoid 골격임을 예상 할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  6.98(1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 6.80 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.4$  Hz), 6.76(1H, d,  $J = 8.4$  Hz)의 peak의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  5.94 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz) 5.92 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz)의 peak의 coupling constant 값을 통하여 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring을 예상하였다.  $\delta_{\text{H}}$  2.86 (1H, dd,  $J = 16.6, 4.4$  Hz), 2.74 (1H, dd,  $J = 16.6, 2.8$  Hz)의 peak는  $sp^3$  혼성을 갖는 proton으로 coupling constant 값을 통하여 하나의 carbon에 화학적 환경이 서로 다른 2개의 proton으로 예상하였다. 이들을 종합하여, 문헌<sup>23</sup>과 비교하여 compound 1은 *epi*-catechin임을 확인하였다(Figure 10-12, Table 3).

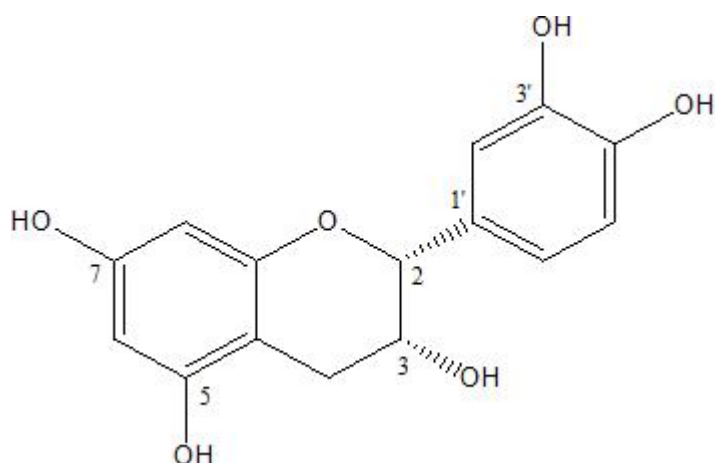


Figure 11. Chemical structure of compound **1**.

Table 3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **1** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>1</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	4.81 (1H, s)	80.0
3	4.17 (1H, m)	67.6
4	2.86 (1H, dd, 16.6, 4.4)	29.4
	2.74 (1H dd, 16.6, 2.8)	
5		158.1
6	5.94 (1H, d, 2.4)	96.5
7		157.8
8	5.92 (1H, d, 2.4)	96.0
9		157.5
10		100.2
1'		132.4
2'	6.98 (1H, d, 2.0)	115.4
3'		146.1
4'		145.9
5'	6.76 (1H, d, 8.4)	116.0
6'	6.80 (1H, dd, 8.4, 2.0)	119.5

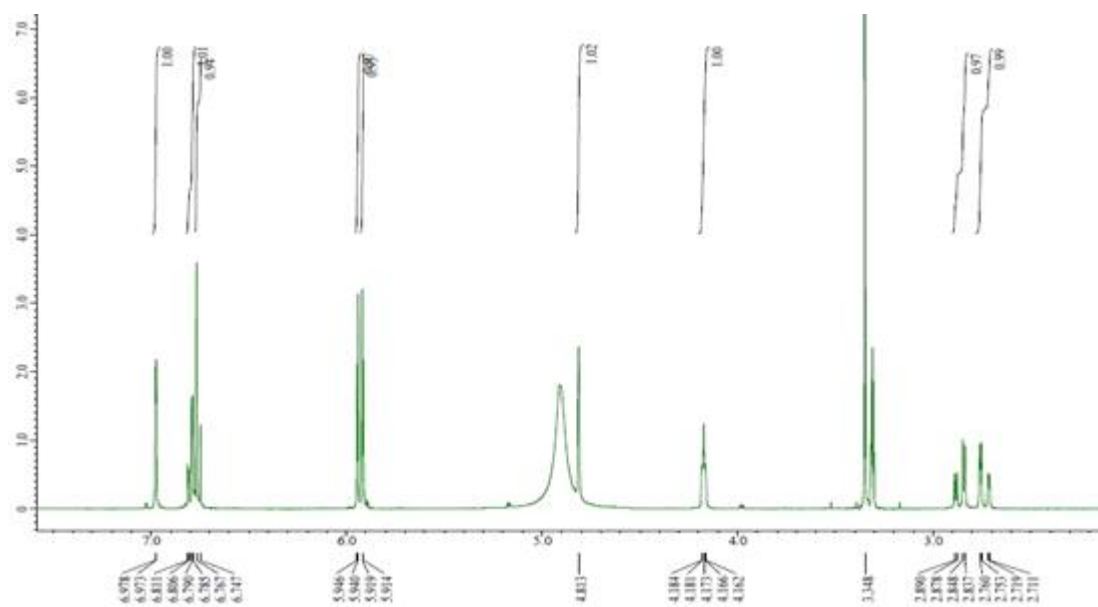


Figure 12.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

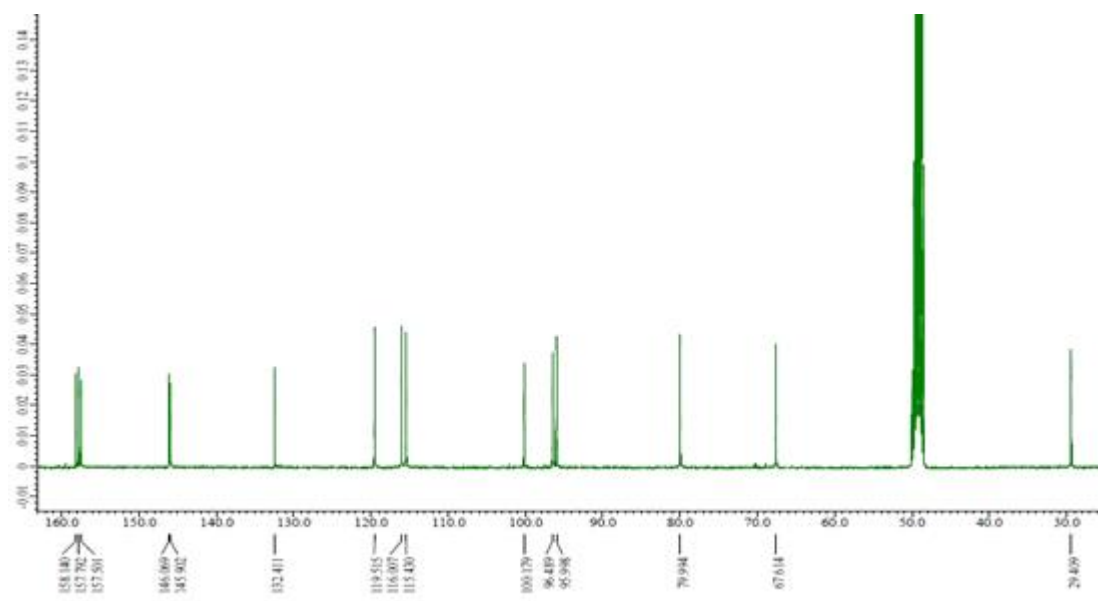


Figure 13.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



## 2) Compound 2의 구조 동정

Compound 2는  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  5.37 (1H, d,  $J = 4.5$  Hz)에 해당하는  $sp^2$  혼성을 갖는 proton이 관찰되며,  $\delta_{\text{H}}$  0.67 (3H, s), 0.88 (3H, t,  $J = 6.5$ ), 0.90 (3H, d,  $J = 7.0$ ), 0.91 (3H, d,  $J = 7.0$ ), 0.94 (3H, s), 1.00 (3H, d,  $J = 6.5$ ) peak들로부터 총 6개의 methyl기가 있음을 예상할 수 있다.  $\delta_{\text{H}}$  3.99~4.63의 overlap 되어 있는 여러 개의 peak와 당의 anomeric proton에 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  5.10 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz) peak를 통해 1개의 당이 치환된 구조임을 알 수 있었고, anomeric proton의 coupling constant 값을 통해 1개의 당이  $\beta$ 형으로 존재할 것이라 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석 결과, 총 35개의 carbon peak가 관찰되며,  $\delta_{\text{C}}$  141.3, 122.4 peak는  $sp^2$  혼성의 carbon으로 예상할 수 있었다.  $\delta_{\text{C}}$  103.0 peak의 anomeric carbon과  $\delta_{\text{C}}$  79.1, 79.0, 75.8, 72.1, 63.3의 5개 peak 및 NMR data와 종합하여 볼 때 결합 되어 있는 당은  $\beta$ -glucopyranoside임을 예상하였고, 이들 데이터를 바탕으로 문헌<sup>24</sup>을 통해 compound 2는 daucosterol, 즉  $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인되었다(Figure 13-15, Table 4).

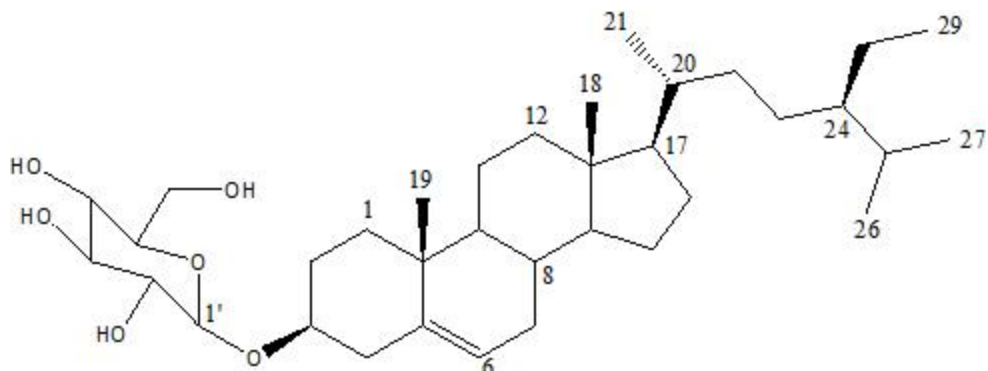


Figure 14. Chemical structure of compound 2.

Table 4.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **2** (500 MHz and 125 MHz, pyridine- $d_5$ )

No.	Compound <b>2</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		37.9
2		30.7
3	3.99 (1H, m)	78.5
4		39.8
5		141.3
6	5.37 (1H, d, 4.5)	122.4
7		32.5
8		32.7
9		50.8
10		37.4
11		21.8
12		40.4
13		42.9
14		57.3
15		25.0
16		29.0
17		56.7
18	0.67 (3H, s)	12.5
19	0.94 (3H, s)	19.9
20		36.9
21	1.00 (3H, d, 6.5)	19.7
22		34.7
23		26.8
24		46.5
25		29.9
26	0.91 (3H, d, 7.0)	20.0
27	0.90 (3H, d, 7.0)	19.5
28		23.8
29	0.88 (3H, t, 6.5)	12.6
1'	5.10 (1H, d, 8.0)	103.0
2'	3.99-4.63 (sugar H)	75.8
3'		79.1
4'		72.1
5'		79.0
6'		63.3

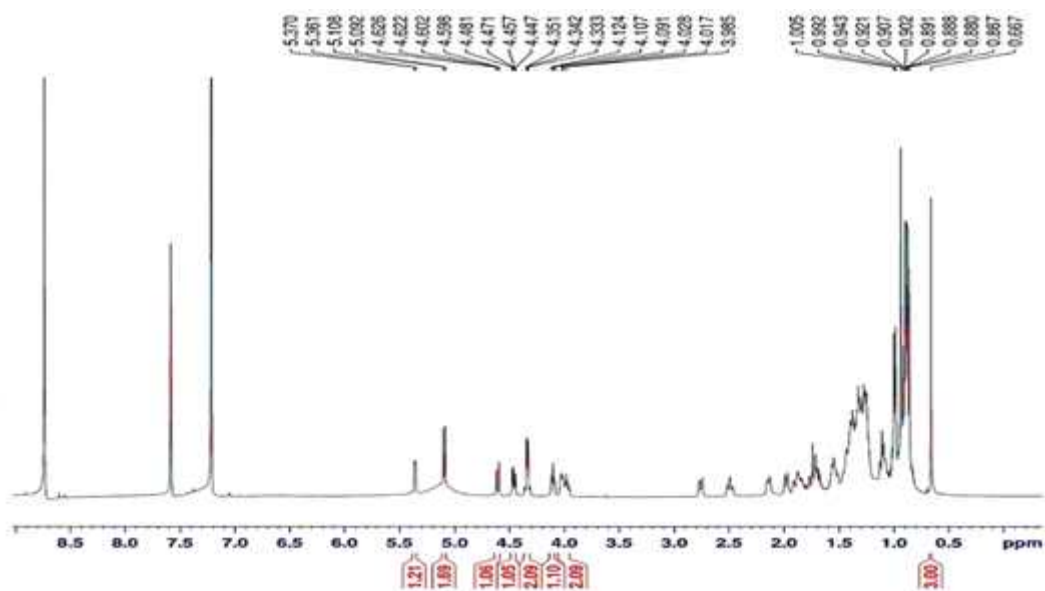


Figure 15.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **2** (pyridine- $d_5$ ).

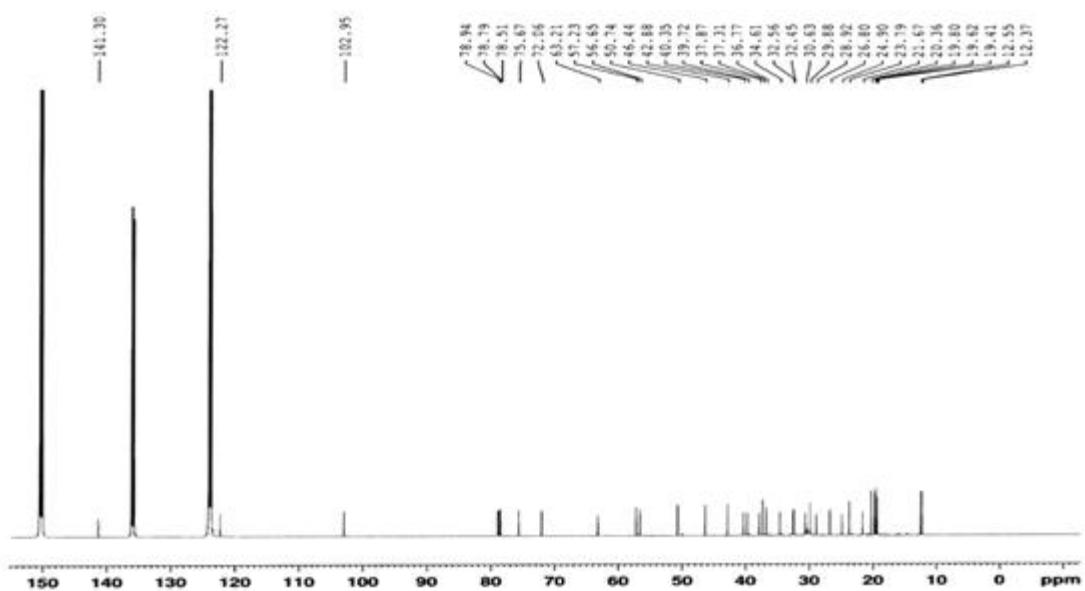


Figure 16.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **2** (pyridine- $d_5$ ).

### 3) Compound 3의 구조 동정

Compound 3의  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.06 (2H, d,  $J = 8.51$  Hz), 6.68 (2H, d,  $J = 8.51$  Hz) peak의 적분 값과 coupling constant 값을 통하여 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring을 예상할 수 있다.  $\delta_{\text{H}}$  6.23 (1H, s)의 peak는  $sp^2$  proton이며, 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.28-4.27의 overlap 되어 있는 여러 개의 proton 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  5.60 (1H, d,  $J = 1.60$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.84 (1H, d,  $J = 9.77$  Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  4.58 (1H, d,  $J = 7.57$  Hz)의 peak를 통해 3개의 당이 치환된 구조임을 알 수 있었고, coupling constant 값을 통해 당이 1개의  $\alpha$ 형, 2개의  $\beta$ 형으로 존재할 것이라 예상하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum 분석 결과, 대칭인 2개의 aromatic ring의 carbon을 종합하여 총 32개의 carbon peak가 관찰되며, 그 중  $\delta_{\text{C}}$  206.7의 peak를 통해 1개의 carbonyl group이 분자 내에 존재함을 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  62.8-87.5 까지의 당 peak를 정확하게 구분할 수 없어 2D NMR 분석을 진행하였다. COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling 하고 있는 proton을 분석하였고, HMQC NMR spectrum을 통해서 탄소에 직접 결합되어 있는 proton을, HMBC NMR을 통해서 각 탄소에 대해 long-range coupling을 하는 proton을, NOESY를 통하여 공간적으로 5 Å 이내의 가까운 거리에 있는 proton의 관계를 확인하였다.  $\delta_{\text{C}}$  108.5, 106.5, 76.3의 anomeric carbon peak와 13개의  $\delta_{\text{C}}$  62.8-87.5 peak, 17.8의 methyl기를 통해  $\beta$ -glucopyranoside와  $\beta$ -fucopyranoside,  $\alpha$ -arabinofuranose가 있는 것으로 예상 하였다. 이를 통해 compound 3은 phloretin을 모체로 하여 3' 위치에  $\beta$ -glucopyranoside와  $\beta$ -fucopyranoside가 결합되어있고, 6' 위치에  $\alpha$ -arabinofuranose가 결합되어 있는 것을 예상할 수 있었다.

또한, compound 3의 HR-ESI-MS 분석 결과  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  737.2260  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calc. 737.2269)으로 예상한 화합물의 분자량과 일치하는 것을 확인 하였다.

이러한 결과를 바탕으로 문헌과<sup>25-26</sup> 비교하여 종합하여 볼 때, compound 3은 phloretin  $3'-C-(4-O-\beta\text{-D-glucopyranosyl})-\beta\text{-D-fucopyranosyl}-6'-O-\alpha$

-L-arabinofuran oside으로 동정하였으며, 이 화합물은 자연계에서 처음으로 분리, 보고된 화합물이다.

compound **3**의 최대흡수파장은  $\lambda_{\max} = 287.7$  nm이며, 광학회절은  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = 110.1^{\circ}$  (c. 0.050, MeOH)이다. 기기를 통한 정보는 다음의 표와 같다(Figure 16-23, Table 5-6).

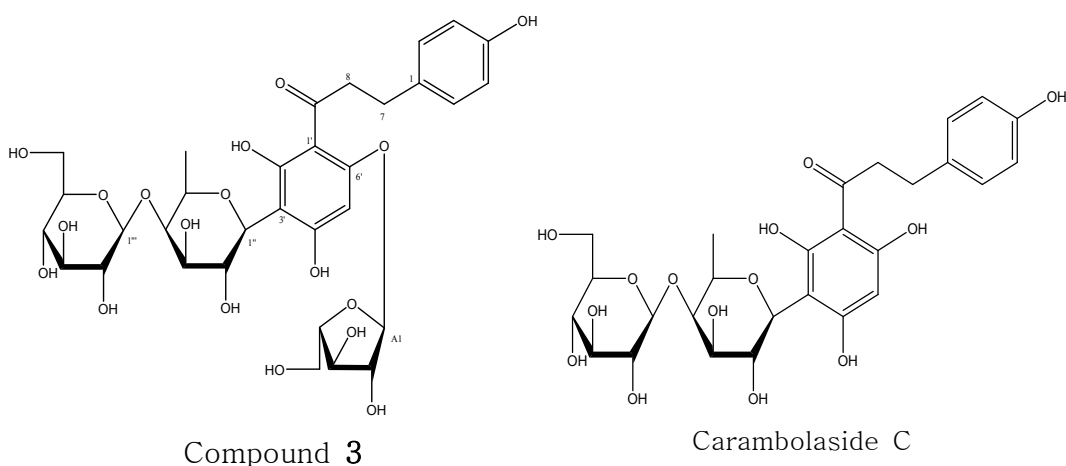


Figure 17. Chemical structures of compound **3** and carambolaside C.

Table 5. Information of compound **3**

Feature	Yellow powder
Molecular formular	$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{18}$
Molecular weight	714.7 g/mol
specific optical rotation	$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = 110.1^{\circ}$ (c. 0.050, MeOH)
$\lambda_{\max}$ in UV/vis range	287.8 nm
HR-ESI-MS	m/z $[\text{M} + \text{Na}]^{+}$ 737.2260 (calc. 737.2269)

Table 6. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compound **3** (500 and 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

No.	Compound <b>3</b>		Carambolaside C
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., <i>J</i> Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		133.9	133.9
2	7.06 (1H, d, 8.5)	130.6	130.3
3	6.68 (1H, d, 8.5)	116.2	116.1
4		156.5	156.4
5	6.68 (1H, d, 8.5)	116.2	116.1
6	7.06 (1H, d, 8.5)	130.6	130.3
7	2.90 (2H, t, 7.3)	30.8	31.3
8	3.45 (m)	47.2	47.5
	3.35 (m)		
9		206.7	206.7
1'		106.7	105.5
2'		165.7	164.5
3'		106.9	104.6
4'		164.6	164.4
5'	6.23 (1H, s)	96.1	96.1
6'		161.5	164.5
1''	4.84 (1H, d, 9.8)	76.3	76.5
2''	4.04 (m)	72.1	72.1
3''	3.65 (1H, dd, 9.5, 3.2)	76.9	76.7
4''	3.95 (1H, d, 2.8)	84.0	84.0
5''	3.77 (m)	76.1	76.0
6''	1.38 (3H, d, 6.3)	17.8	17.6
1'''	4.59 (1H, d, 7.6)	106.5	106.4
2'''	3.35 (m)	76.3	76.2
3'''	3.28 (m)	78.3	78.1
4'''	3.35 (m)	71.5	71.3
5'''	3.45 (m)	78.6	78.4
6'''	3.87 (1H, dd, 12.0, 2.2)	62.9	62.7
	3.71 (1H, 11.5, 5.7)		
A1	5.60 (1H, d, 1.6)	108.5	-
A2	4.27 (1H, dd, 3.5, 1.6)	83.5	-
A3	4.02 (m)	78.3	-
A4	4.07 (m)	87.5	-
A5	3.77 (1H, dd, 12.0, 3.2)	62.8	-
	3.68 (1H, dd, 12.0, 4.7)		



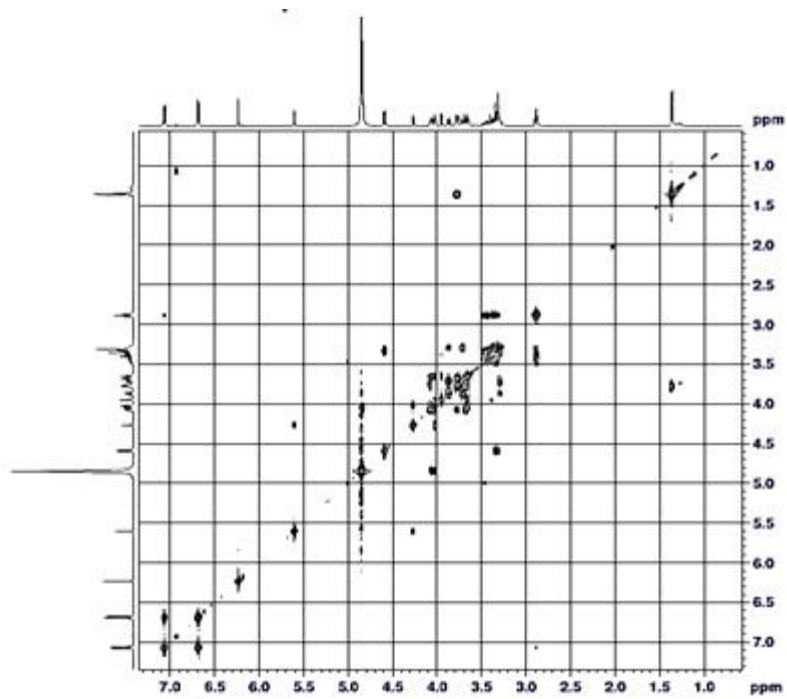


Figure 20. COSY NMR spectrum of compound **3** (CD<sub>3</sub>OD).

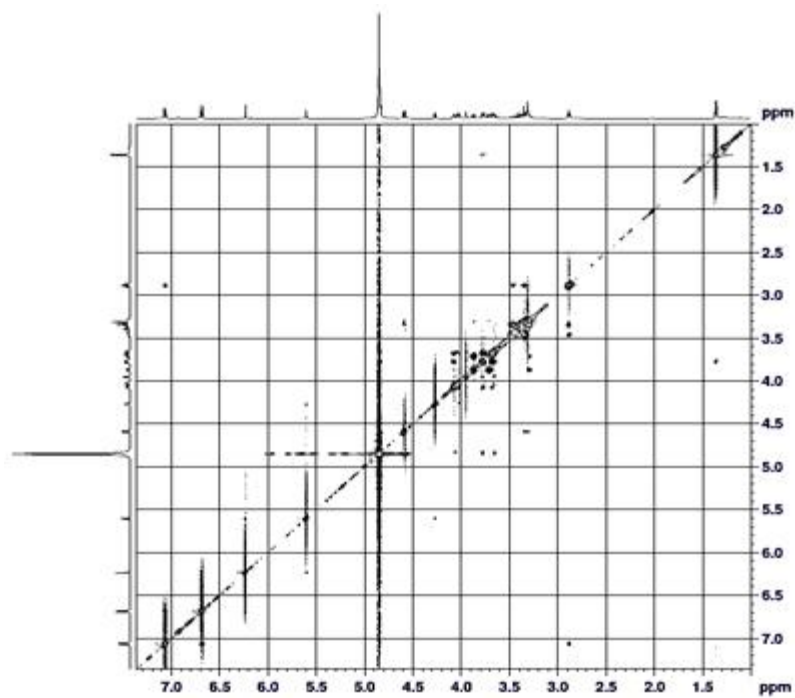


Figure 21. NOESY NMR spectrum of compound **3** (CD<sub>3</sub>OD).



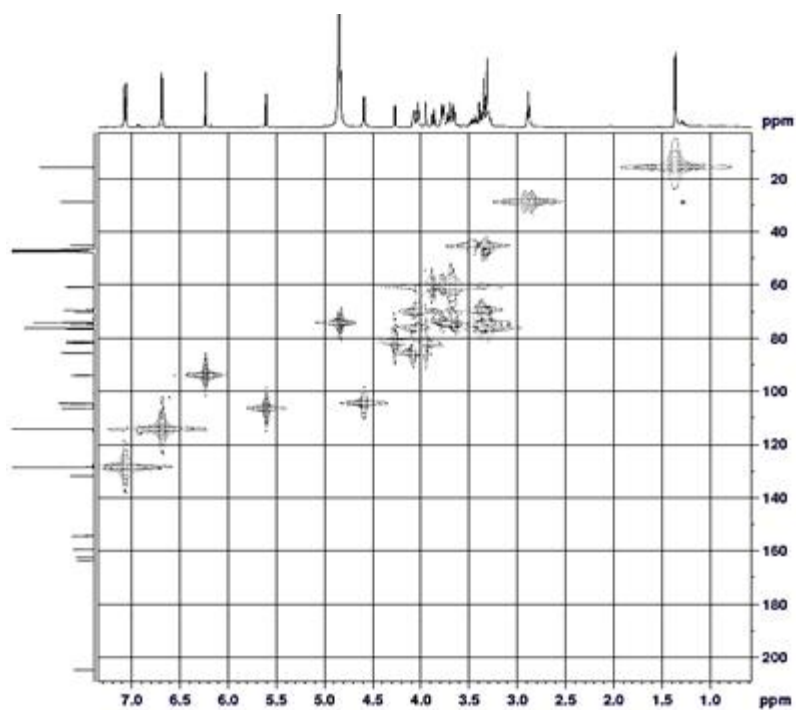


Figure 22. HMBC NMR spectrum of compound **3** (CD<sub>3</sub>OD).

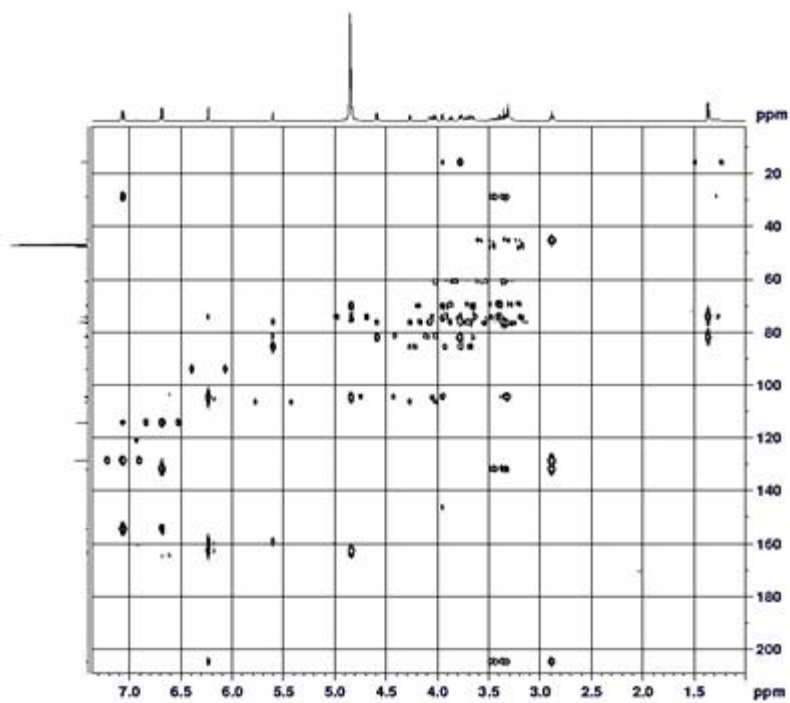
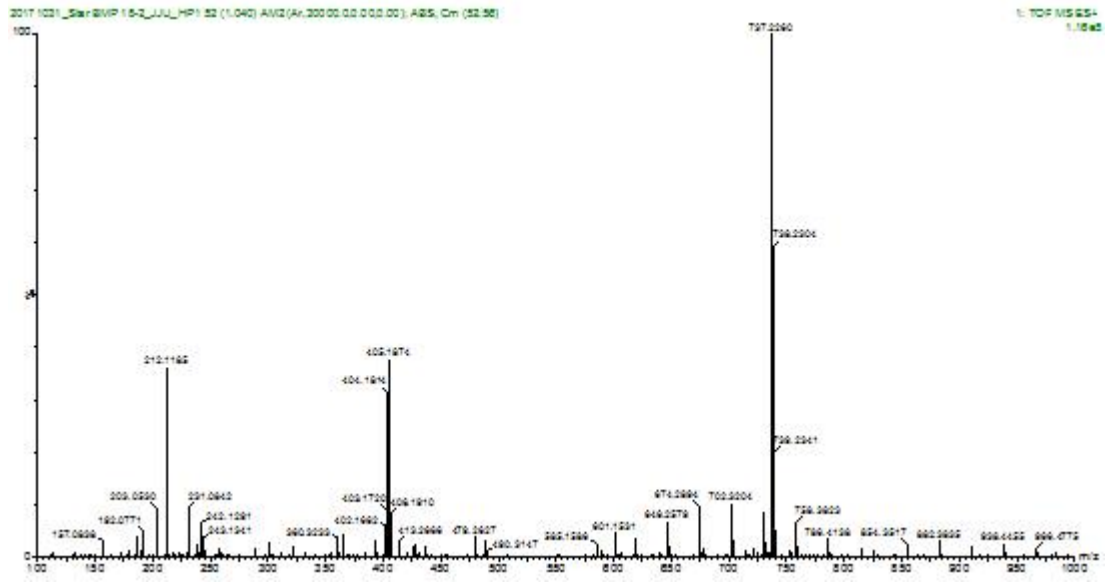


Figure 23. HMBC NMR spectrum of compound **3** (CD<sub>3</sub>OD).

Figure 24. HR-ESI-MS spectrum of compound **3**.



#### 4) Compound 4의 구조 동정

Compound 4의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석 결과,  $\delta_{\text{H}}$  7.51 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz), 6.27 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz)의 peak는 coupling constant 값을 통하여 *trans*-olefin 구조로 예상되며,  $\delta_{\text{H}}$  3.22-4.13의 overlap 되어 있는 여러 개의 proton 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  5.74 (1H, brs), 5.14 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz), 4.38 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz) 및 3.97 (1H, brs)의 peak를 통해 4개의 당이 치환된 구조임을 알 수 있었고, anomeric proton들의 coupling constant 값을 통해 당이 2개의  $\alpha$ 형, 2개의  $\beta$ 형으로 존재할 것이라 예상하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum 분석 결과, 대칭인 4개의 aromatic ring의 carbon을 포함하여 총 47개의 carbon peak가 관찰되며,  $\delta_{\text{C}}$  206.7 및 167.7의 peak를 통해 2개의 carbonyl group이 분자 내에 존재함을 예상하였다.  $\delta_{\text{C}}$  62.1-93.1 까지의 당 peak를 정확하게 구분할 수 없어 2D NMR 분석을 진행하였다. COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling 하고 있는 proton을 분석 하였고, HMQC NMR spectrum을 통해서도 탄소에 직접 결합되어 있는 proton을, HMBC NMR 를 통해서도 각 탄소에 대해 long-range coupling을 하는 proton을 확인하였다.

$\delta_{\text{C}}$  107.2, 106.8, 106.1, 74.0의 anomeric carbon peak와 19개의  $\delta_{\text{C}}$  62.1-93.1의 peak, 17.3, 17.0, 17.0의 methyl기를 통해  $\beta$ -fucopyranoside,  $\alpha$ -arabinofuranose,  $\alpha$ -rhamnopyranoside가 있는 것으로 예상 하였다. 이를 통해 compound 4는 phloretin을 모체로 하여 3' 위치에 2개의  $\beta$ -fucopyranoside가 결합되어 있고, 6' 위치에  $\alpha$ -arabinofuranose,  $\alpha$ -rhamnopyranoside가 결합되어 있는 것을 예상 할 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 문헌<sup>27</sup>과 비교한 결과 compound 4는 phloretin 3'-C-(2-O-*trans*-cinnamoyl-3-O- $\beta$ -D-fucopyranosyl)- $\alpha$ -D-fucopyranosyl-6'-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, 즉 carambolaside J로 확인하였다(Figure 24-29, Table 7).

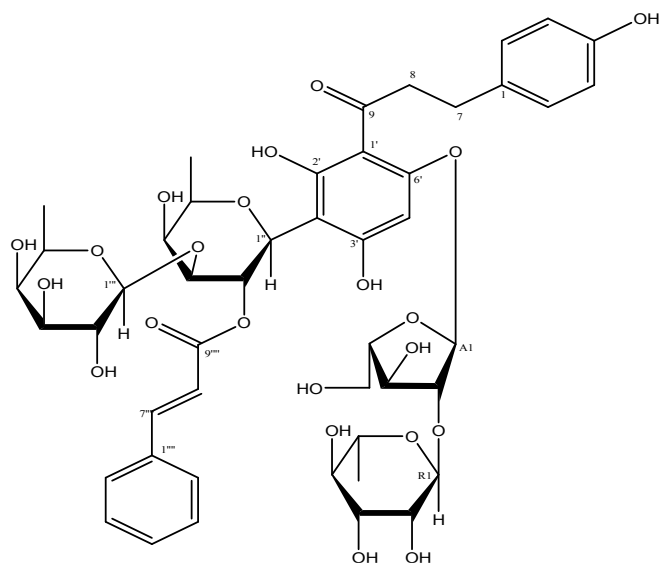


Figure 25. Chemical structure of compound 4.

Table 7.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **4** (400 and 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	Compound <b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (int., multi., $J$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		134.1
2	6.88 (1H, brs)	130.6
3	6.60 (1H, d, 7.6)	116.4
4		156.7
5	6.60 (1H, d, 7.6)	116.4
6	6.88 (1H, brs)	130.6
7	2.64/2.73 (1H, brs)	30.3
8	3.35/3.10 (2H, brs)	47.6
9		206.2
1'		105.3
2'		165.6
3'		105.3
4'		164.9
5'	6.17 (1H, s)	96.4
6'		161.9
1''	5.14 (1H, d, 9.2)	74.0
2''	5.74 (1H, brs)	71.9
3''	4.01 (1H, m)	82.6
4''	4.02 (1H, brs)	73.4
5''	3.90 (1H, m)	76.6
6''	1.34 (3H, d, 6.4)	17.3
1'''	4.38 (1H, d, 7.2)	106.1
2'''	3.48 (1H, dd, 7.4, 10.1)	72.4
3'''	3.38 (1H, dd, 10.1, 3.2)	74.8
4'''	3.56 (1H, d, 2.8)	73.0
5'''	3.62 (1H, m)	72.1
6'''	1.26 (3H, d, 6.4)	17.0
1''''		136.0
2''''	7.52 (1H, dd, 6.4, 2.0)	129.4
3''''	7.40 (1H, brs)	130.2

4'''	7.40 (1H, brs)	131.6
5'''	7.40 (1H, brs)	130.2
6'''	7.52 (1H, dd, 6.4, 2.0)	129.4
7'''	7.51 (1H, d, 16.0)	146.1
8'''	6.27 (1H, d, 16.0)	119.1
9'''		167.7
A1	5.74 (1H, brs)	107.2
A2	4.178 (1H, d, 4.0)	93.1
A3	4.11 (1H, dd, 7.6 4.6)	76.3
A4	3.95 (1H, m)	84.5
A5	3.63(1H, m)	62.1
	3.77 (1H, m)	
R1	3.97 (1H, brs)	105.8
R2	3.39 (1H, m)	72.9
R3	3.25 (1H, brd, 9.6)	72.3
R4	3.42 (1H, dd, 10.0, 8.2)	75.0
R5	2.90 (1H, brs)	71.9
R6	0.79 (3H, d, 4.8)	17.0

---

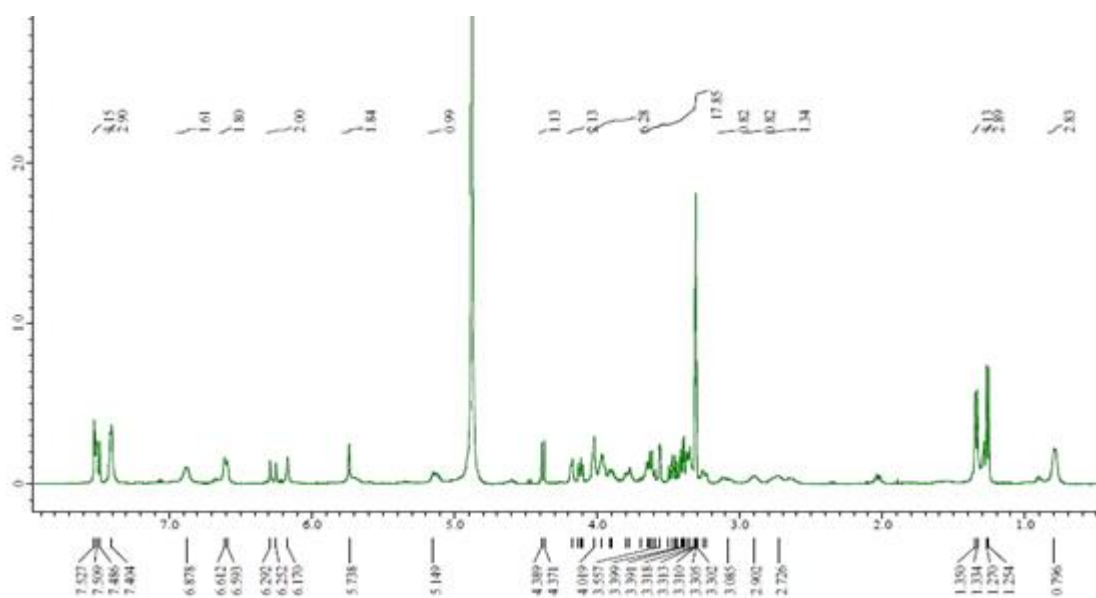


Figure 26.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

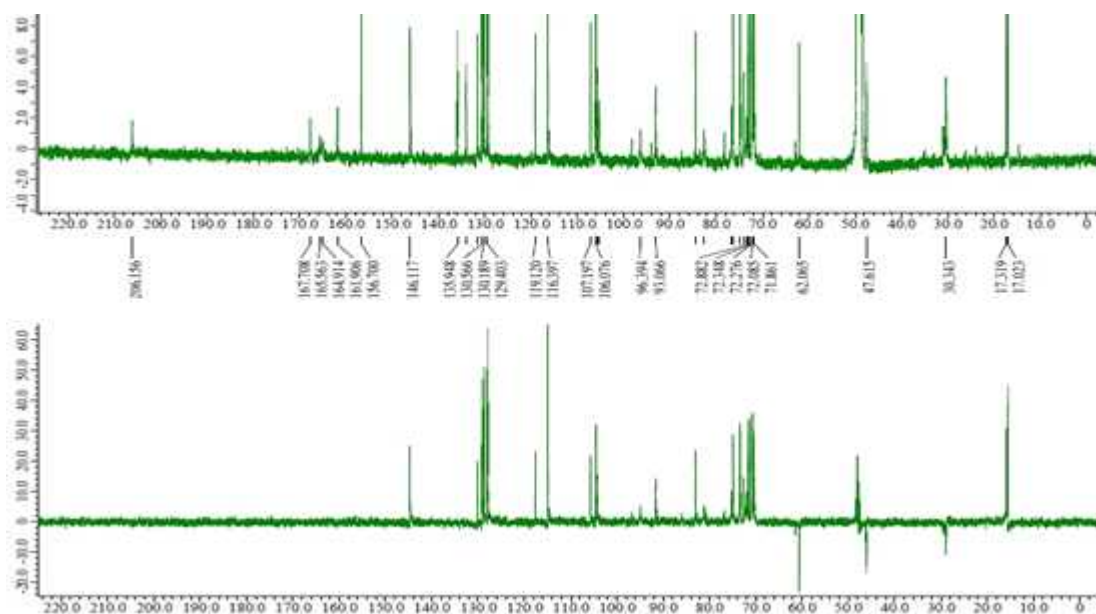


Figure 27.  $^{13}\text{C}$  and DEPT ( $135^\circ$ ) NMR spectra of compound **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

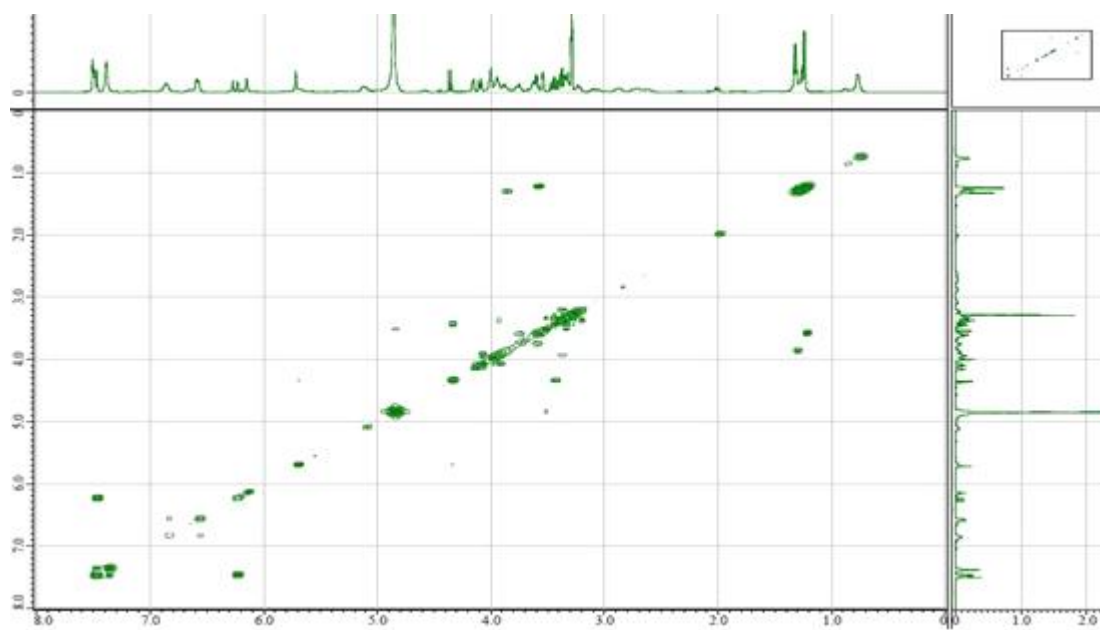


Figure 28. COSY NMR spectrum of compound **4** (CD<sub>3</sub>OD).

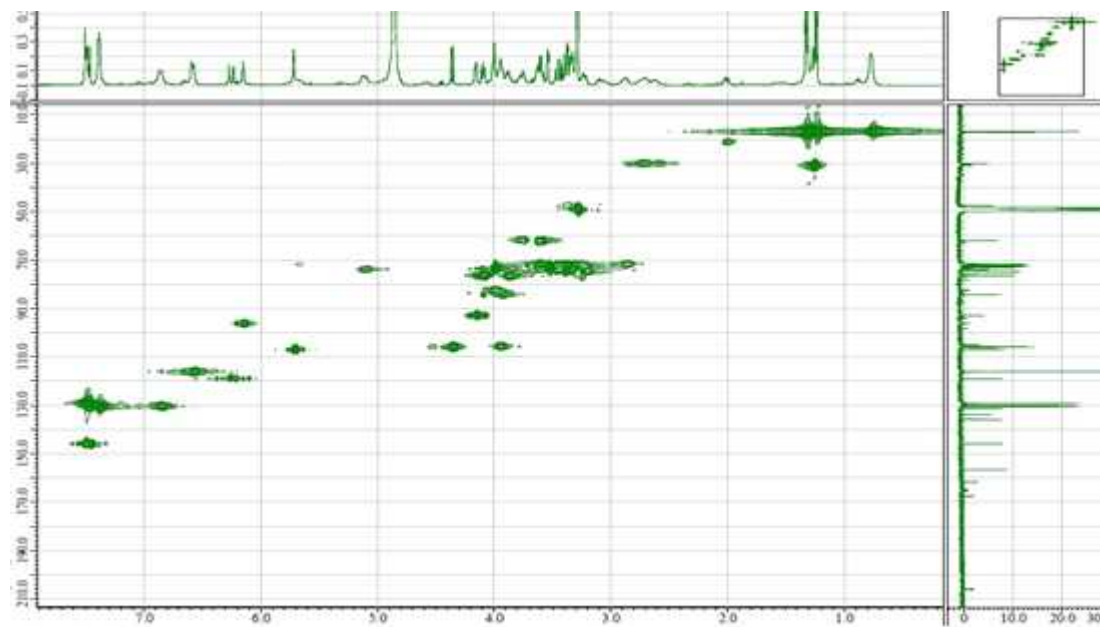


Figure 29. HMQC NMR spectrum of compound **4** (CD<sub>3</sub>OD).



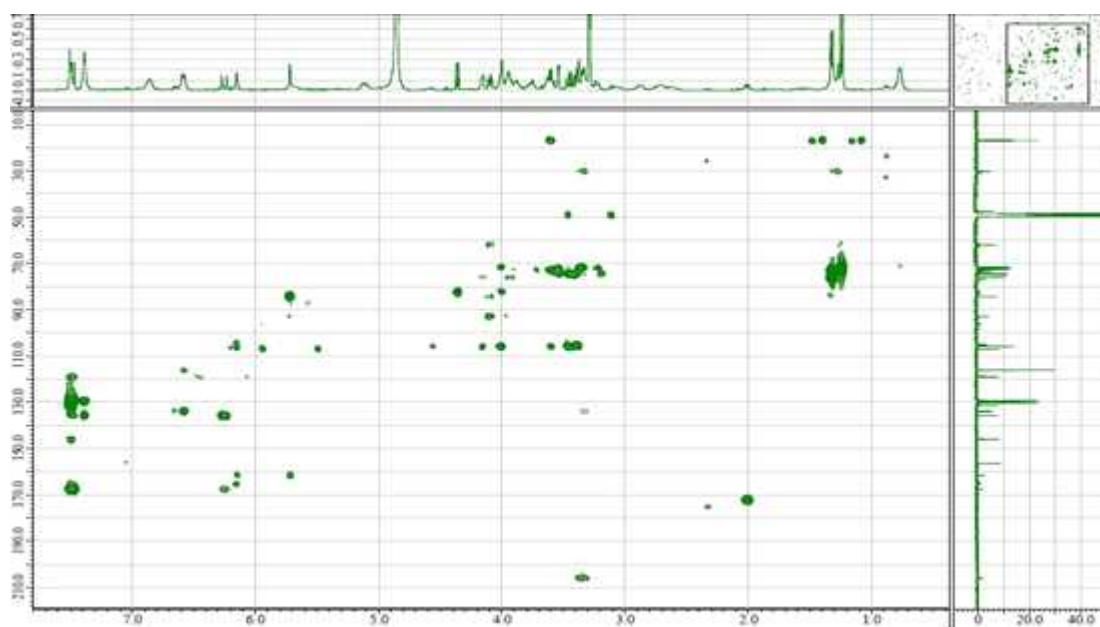


Figure 30. HMBC NMR spectrum of compound 4 (CD<sub>3</sub>OD).

## 2. HPLC analysis

HPLC를 이용하여 스타푸르트 가지 추출물, 분획물 및 분리한 화합물들의 피크를 확인하였다. HPLC 정성 분석결과에서 각 피크의 머무름 시간 중 compound 1이 12.386 min이 가장 짧았으며, 그 다음 차례대로 compound 3과 4를 확인할 수 있었다(Figure 30). Figure 31은 각 fraction 들의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

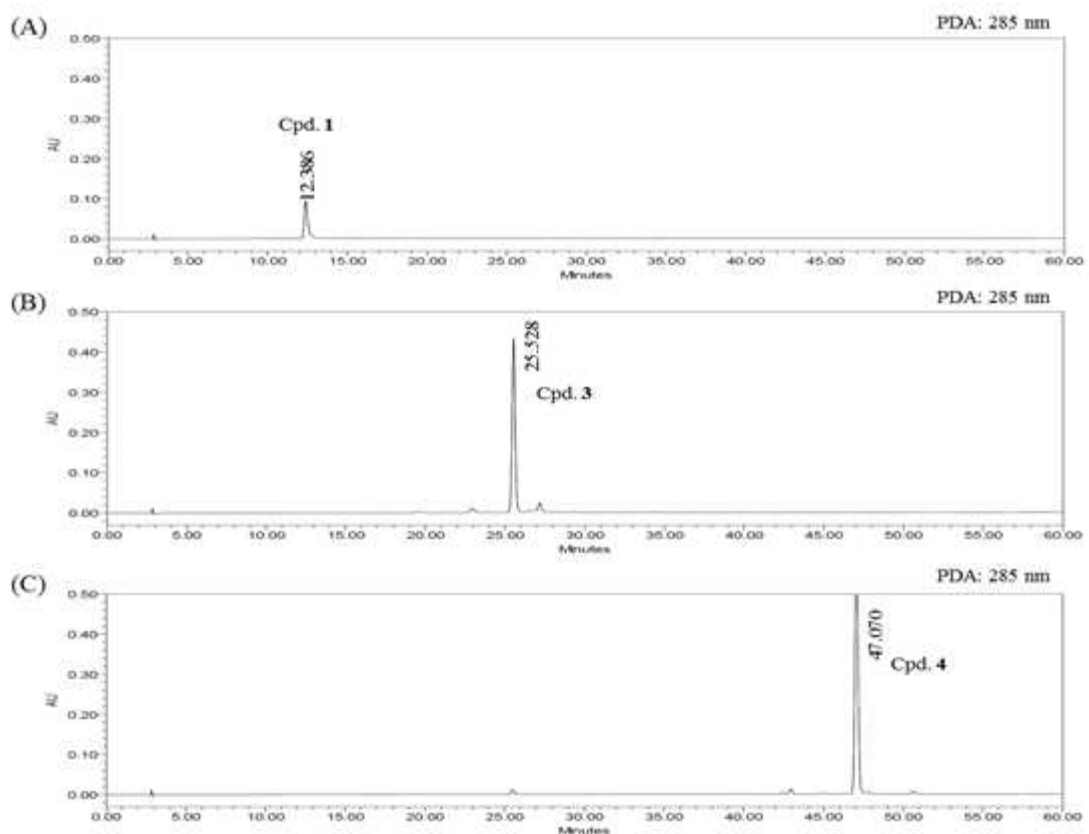


Figure 31. HPLC chromatogram of compounds 1, 3 and 4.

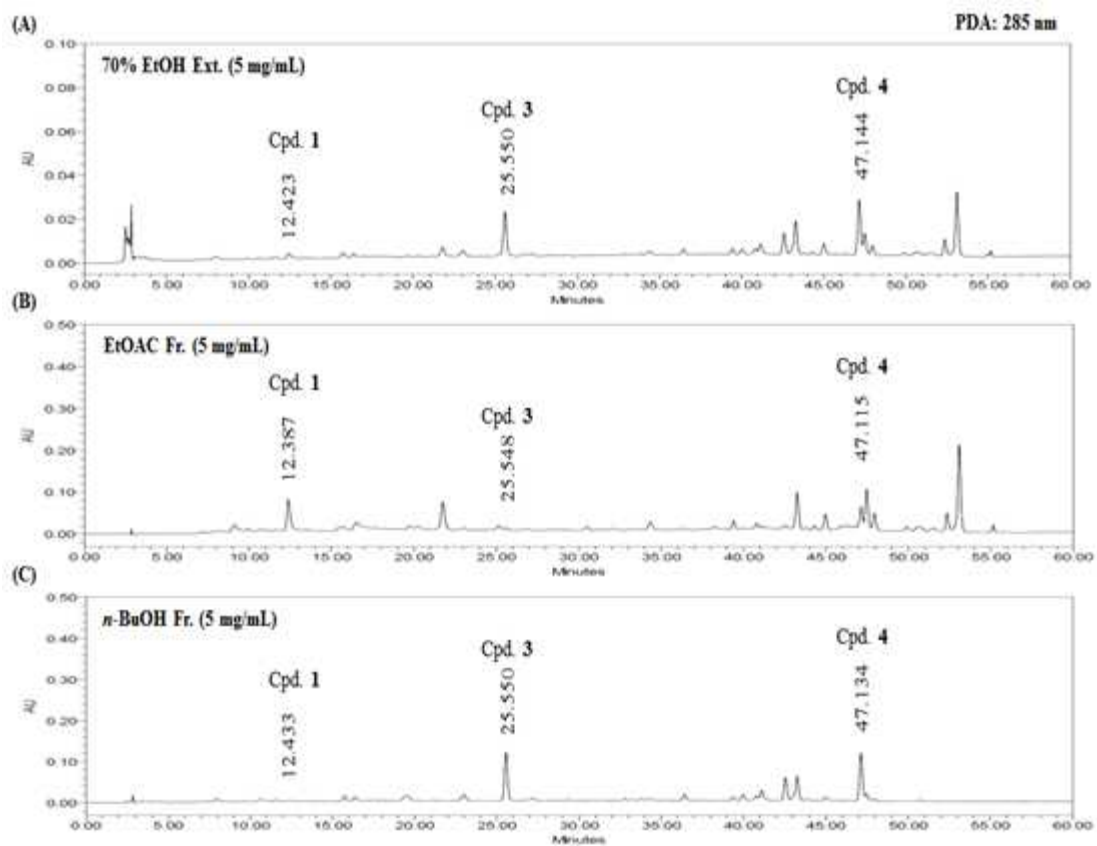


Figure 32. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract, EtOAc and *n*-BuOH fractions.

스타푸르트 가지 추출물 및 용매 분획물에서 화합물(1, 3 and 4)의 함량을 HPLC로 이용해 측정하였다(Table 8).<sup>28</sup> 그 결과 스타푸르트 가지의 추출물에서는 compound 1, 3 및 4 번이 각각 2.19, 7.75, 3.00 mg/g의 함량이 확인되었으며, EtOAc 분획물에서는 35.18, 4.85, 4.85 mg/g의 함량이 있다는 것으로 확인되었다. 또한 *n*-BuOH 분획물에서는 2.16, 29.38, 14.65 mg/g의 함량이 확인되었다.

Table 8. Contents of isolated compounds by HPLC

	Cpd. 1	Cpd. 3	Cpd. 4
70% EtOH extract	2.19	7.75	3.00
EtOAc fraction	35.18	4.61	4.85
<i>n</i> -BuOH fraction	2.16	29.38	14.65

Unit: mg/g

### 3. 항산화 활성 실험 결과

#### 1) 스타푸르트 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험

##### (1) 총 폴리페놀 함량 측정

Gallic acid를 표준물질로 사용하여 표준검정곡선을 작성하고, 스타푸르트 가지 추출물 및 분획물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 추출물 및 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다(Figure 32). 그 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 폴리페놀 (248.33 mg/g GAE)을 함유하고 있었으며, 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다.

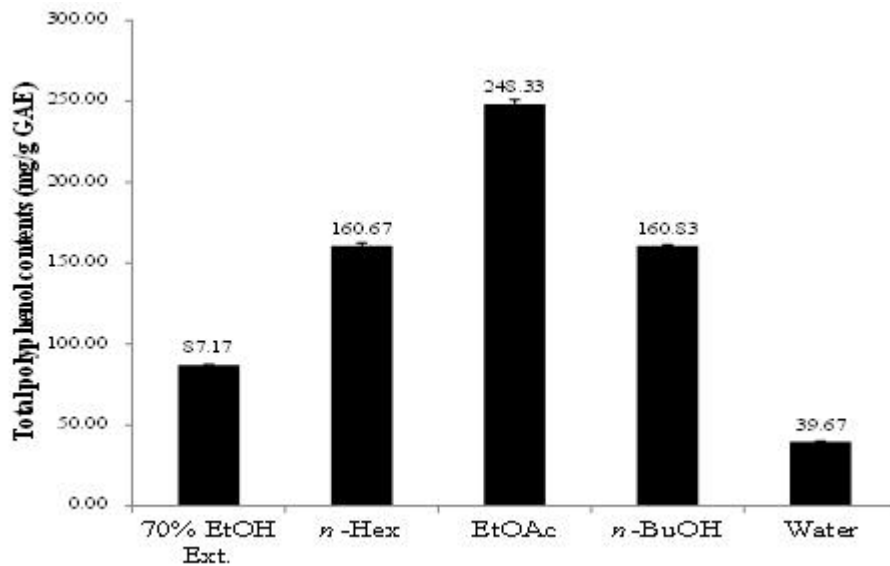


Figure 33. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *A. carambola* branches. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(2) DPPH radical 소거 활성 측정

스타푸르트 가지 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 시료의 농도는 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해  $\text{SC}_{50}$ 값을 계산하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, *n*-Hex, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의  $\text{SC}_{50}$ 값이 각각 167.9, 44.2, 43.1, 55.8  $\mu\text{g/mL}$ 로, 대조군 BHT ( $\text{SC}_{50}$ : 452.1  $\mu\text{g/mL}$ )와 비교하여 보았을 때 대조군보다 매우 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 33, Table 9).

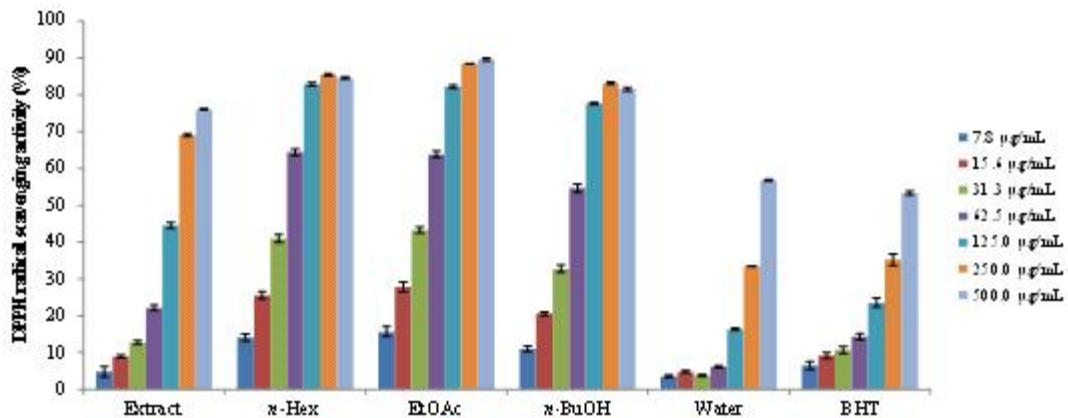


Figure 34. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *A. carambola* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 9.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *A. carambola* branches

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
$\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	167.9	44.2	43.1	55.8	428.4	452.1

(3) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정

스타푸르트 가지 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성을 측정하였다. 시료의 농도는 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC<sub>50</sub> 값이 각각 33.8, 15.5, 8.8, 17.7 µg/mL로, 대조군 BHT (SC<sub>50</sub>: 7.9 µg/mL)와 비교하여 보았을 때 대조군만큼 좋은 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 34, Table 10).

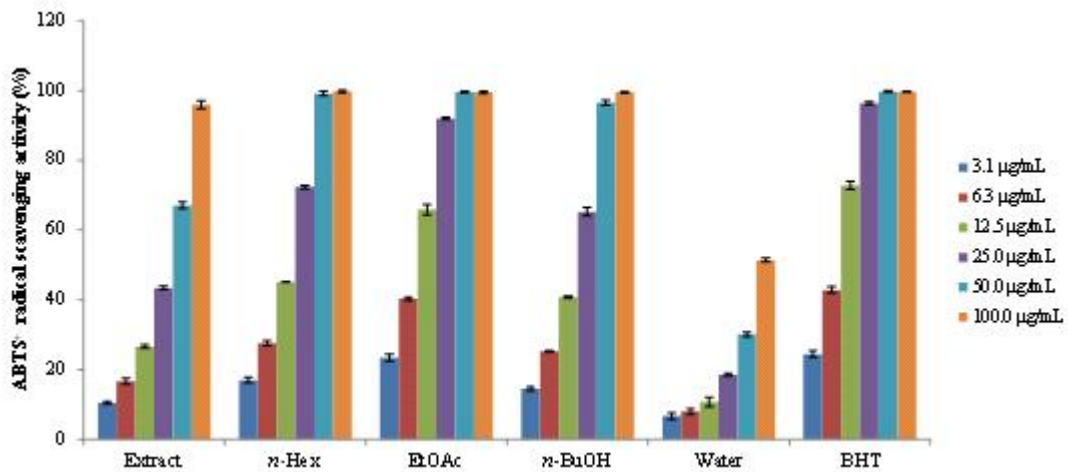


Figure 35. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *A. carambola* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 10. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *A. carambola* branches

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H <sub>2</sub> O	BHT
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	33.8	15.5	8.8	17.7	95.4	7.9

## 2) 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### (1) DPPH radical 소거 활성 측정

스타푸르트 가지에서 분리된 화합물에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 시료의 농도는 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0  $\mu\text{M}$ 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해  $\text{SC}_{50}$  값을 계산하였다. 그 결과, compound 1의  $\text{SC}_{50}$  값이 38.7  $\mu\text{M}$ 로 대조군인 ascorbic acid ( $\text{SC}_{50}$ : 43.5  $\mu\text{M}$ )보다 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 35, Table 11).

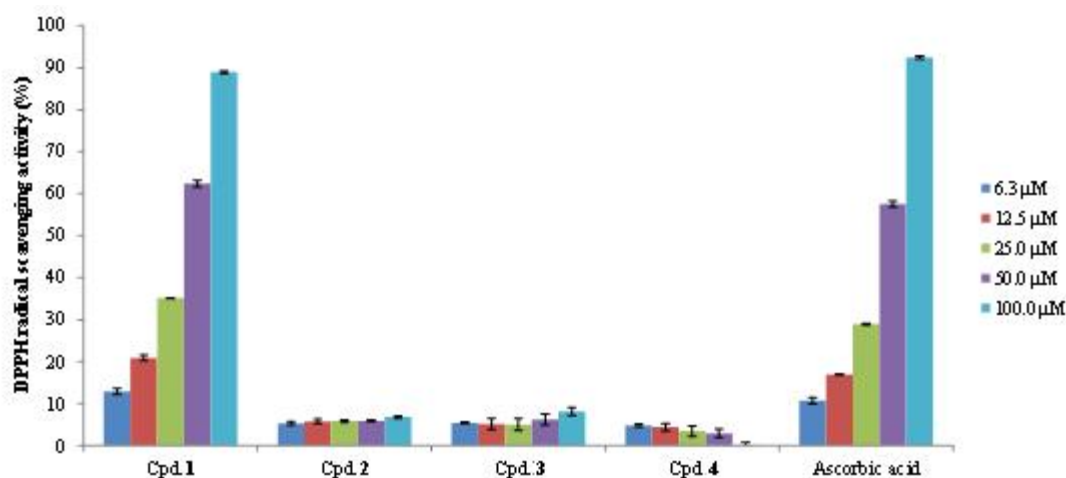


Figure 36. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds 1-4. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 11.  $\text{SC}_{50}$  values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds 1-4

	1	2	3	4	Ascorbic acid
$\text{SC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	38.7	>100	>100	>100	43.5

### (2) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정



스타푸르트 가지에서 분리된 화합물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거활성을 측정하였다. 시료의 농도는 0.8, 1.63, 3.1 6.3 12.5, 25.0, 50.0, 100.0  $\mu\text{M}$ 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 그 결과, compound 1, 3 및 4에서 매우 좋은 활성을 보였으며 각각의 SC<sub>50</sub> 값은 12.0, 20.9, 34.2  $\mu\text{M}$ 로 대조군인 ascorbic acid (SC<sub>50</sub>: 31.8  $\mu\text{M}$ )와 유사한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 36, Table 12).

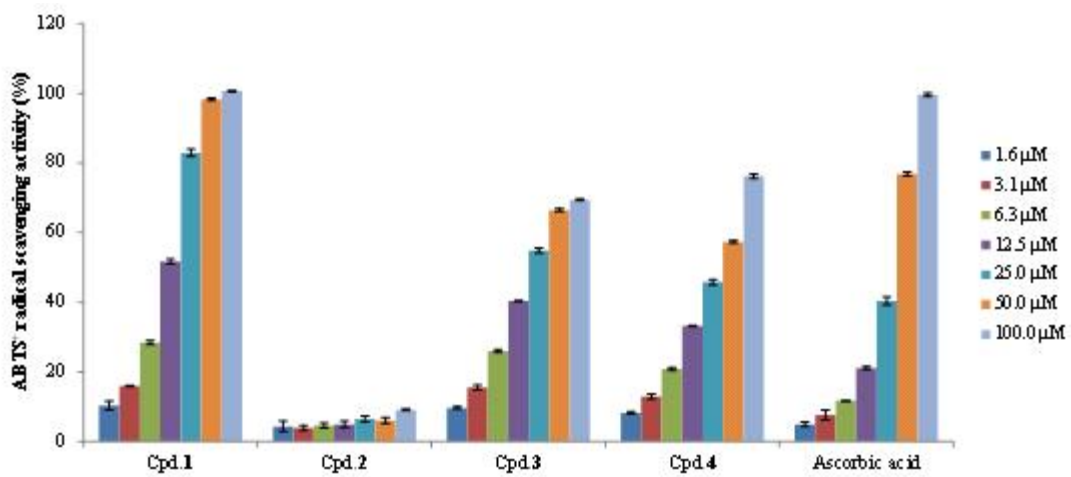


Figure 37. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of isolated compounds 1-4. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

Table 12. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities for isolated compounds 1-4

	1	2	3	4	Ascorbic acid
SC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	12.0	>100	20.9	34.2	31.8

#### 4. 항염 활성 실험 결과

##### 1) 스타푸르트 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

###### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

스타푸르트 가지 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 nitric oxide 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 우선 70% EtOH 추출물 및 각 용매 분획물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 모든 sample에서 세포 독성이 없다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 EtOAc 분획물에서 nitric oxide 생성 억제 활성을 확인하였고(Figure 37), 이에 따라 추가적으로 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 실험을 진행하였다. 그 결과 스타푸르트 가지 EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 nitric oxide 생성을 억제한다는 것을 확인하였으며,  $\text{IC}_{50}$  값은 85.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 확인되었다(Figure 38).

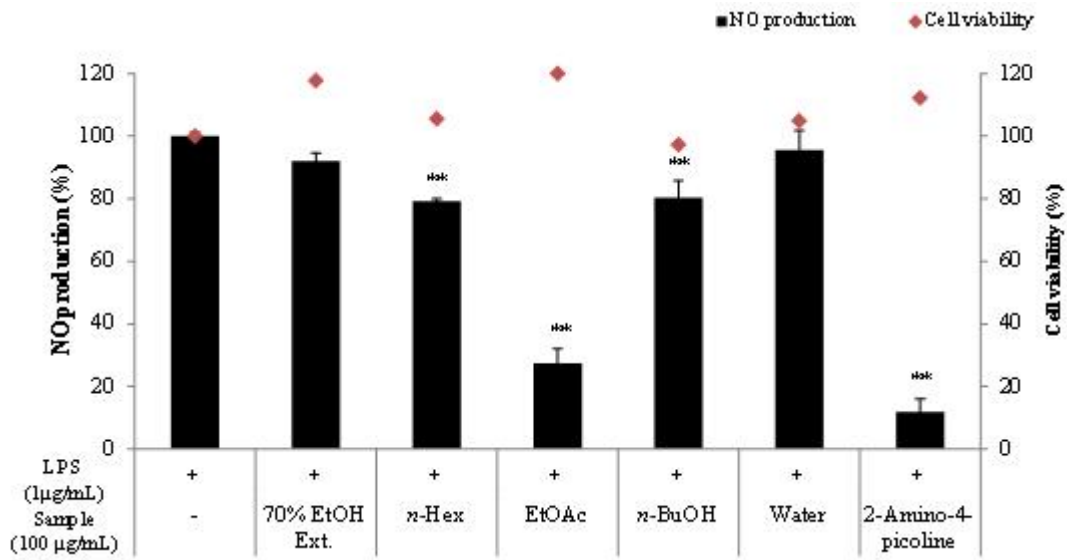


Figure 38. Effects of extract and solvent fractions from *A. carambola* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *A. carambola* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

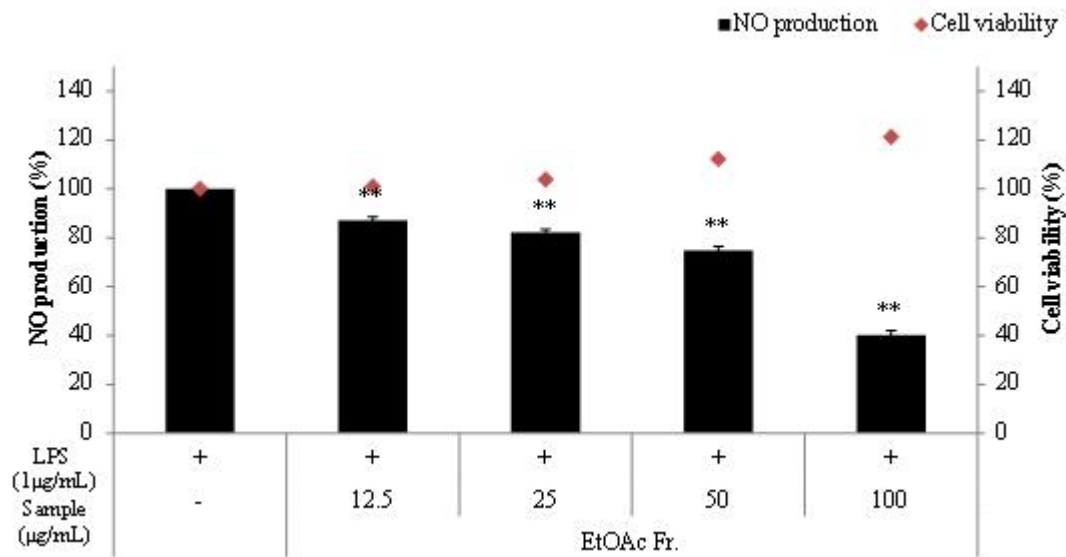


Figure 39. Effects of EtOAc fraction from *A. carambola* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from *A. carambola* branches for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

(2) IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성 억제 활성 측정

NO 생성 억제 활성을 보였던 EtOAc 분획물의 전염증성 cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ ) 억제활성을 측정하였다. Sample은 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도를 이용하여 실험을 진행하였다.

그 결과, 스타푸르트 가지 EtOAc 분획물은 IL-6의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었으며,  $\text{IC}_{50}$  값은 70.80  $\mu\text{g/mL}$ 으로 확인하였다(Figure 39).

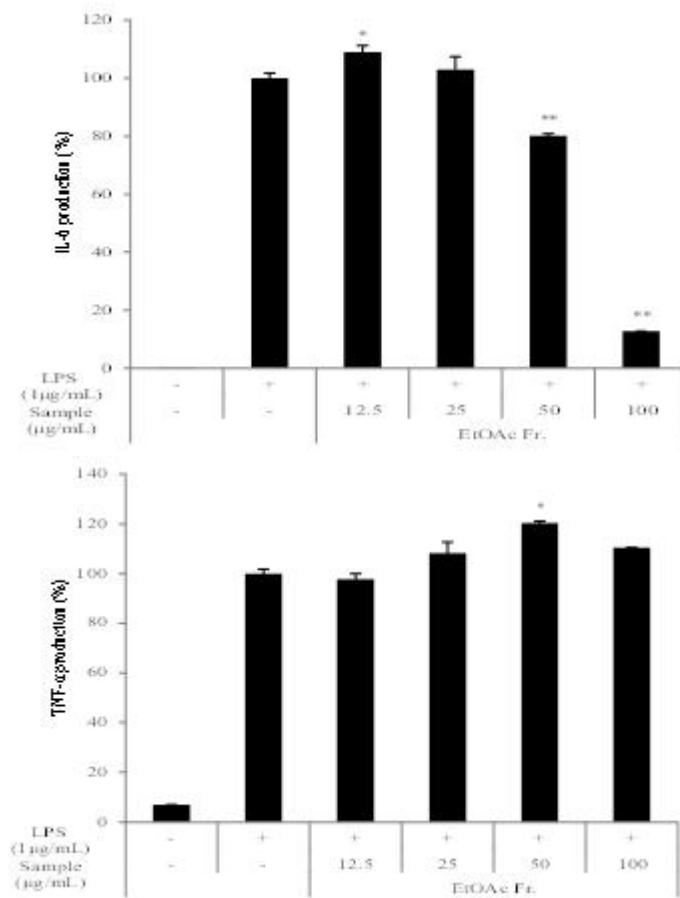


Figure 40. Effects of EtOAc fraction from *A. carambola* branches on IL-6 and TNF- $\alpha$  production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### (3) Western blot analysis

스타푸르트 가지 EtOAc 분획물에서 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 COX-2 및 iNOS 단백질 발현 억제 활성을 측정하였다. 그 결과 EtOAc 분획물은 iNOS 단백질 발현을 농도의존적으로 억제한다는 것을 확인하였다(Figure 40).

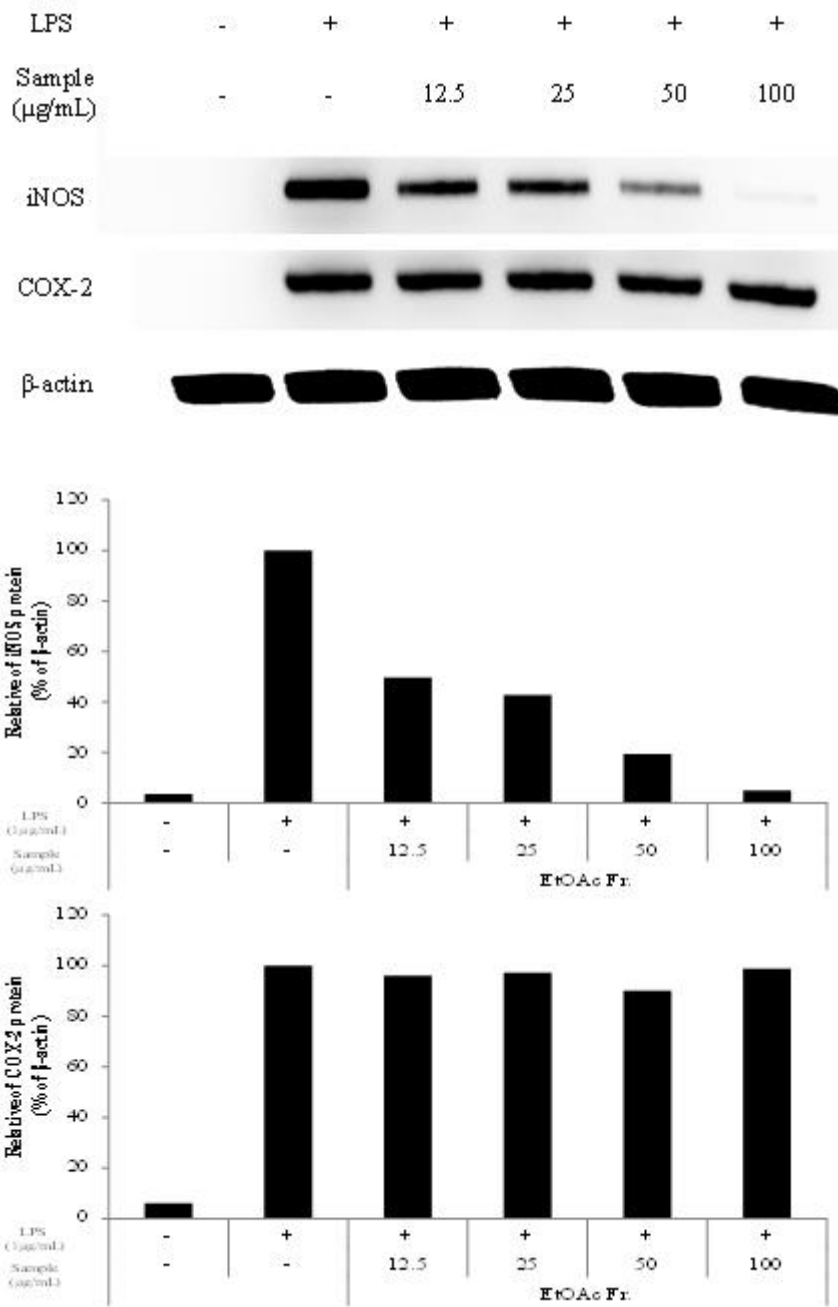


Figure 41. Effect of isolated EtOAc layer from *A. carambola* branches on levels of iNOS and COX-2 protein expression in RAW264.7 macrophage. Result are mean  $\pm$  SD of triplicate data.

## 2) 분리된 화합물의 활성 실험 결과

### (1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

스타푸르트 가지에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 우선 항염 활성이 보고된 compound 2를<sup>29-31</sup> 제외한 각 화합물에 대해 100, 200, 300  $\mu$ M의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 300  $\mu$ M 농도에서 compound 1, 3은 세포 독성 없이 20% 정도의 NO 생성 억제 활성이 있으며, compound 4는 세포 독성 없이 30% 이상의 NO 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다(Figure 41).

이중 새롭게 발견된 화합물인 compound 3에 대하여 추가적인 실험을 진행하였고, 그 결과 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 42).



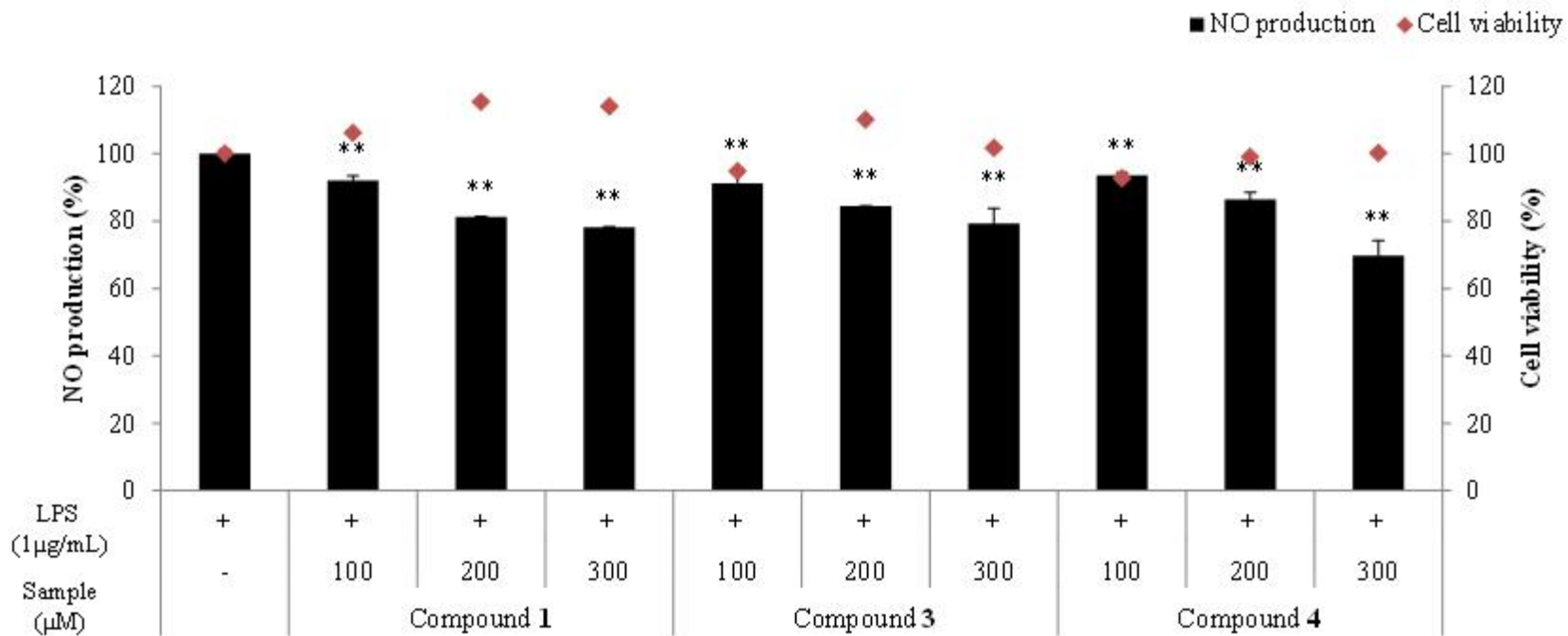


Figure 42. Effects of isolated compounds 1, 3 and 4 on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1, 3 and 4 for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

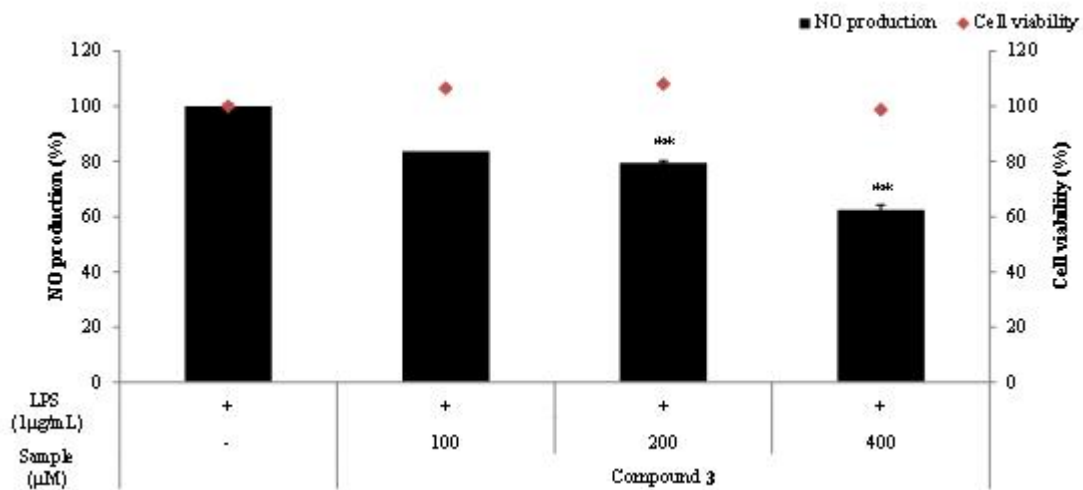


Figure 43. Effects of isolated compound **3** on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound **3** for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

(2) Compound 3의 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성 억제 활성 측정

Compound 3의 전염증성 cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ ) 억제활성을 측정하였다. Sample은 50, 100, 200, 400  $\mu$ M 농도를 이용하여 실험을 진행하였다.

그 결과, compound 3는 400  $\mu$ M 이하의 농도에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성 억제에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Figure 43).

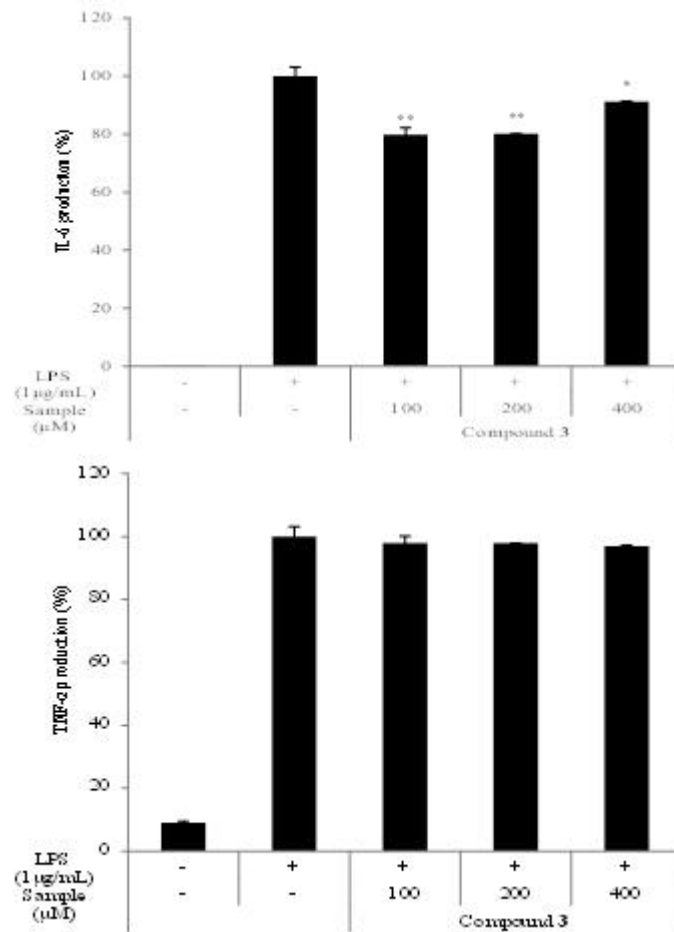


Figure 44. Effects of compound 3 on IL-6 and TNF- $\alpha$  production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01

### (3) Compound 3의 Western blot analysis

스타푸르트 가지에서 분리된 화합물인 compound 3에 대해 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 COX-2 및 iNOS 단백질 발현 억제 활성을 측정하였다. 그 결과 compound 3은 COX-2 발현억제에는 영향을 주지 않지만 iNOS 단백질 발현은 농도의존적으로 억제한다는 것을 확인하였다(Figure 44).

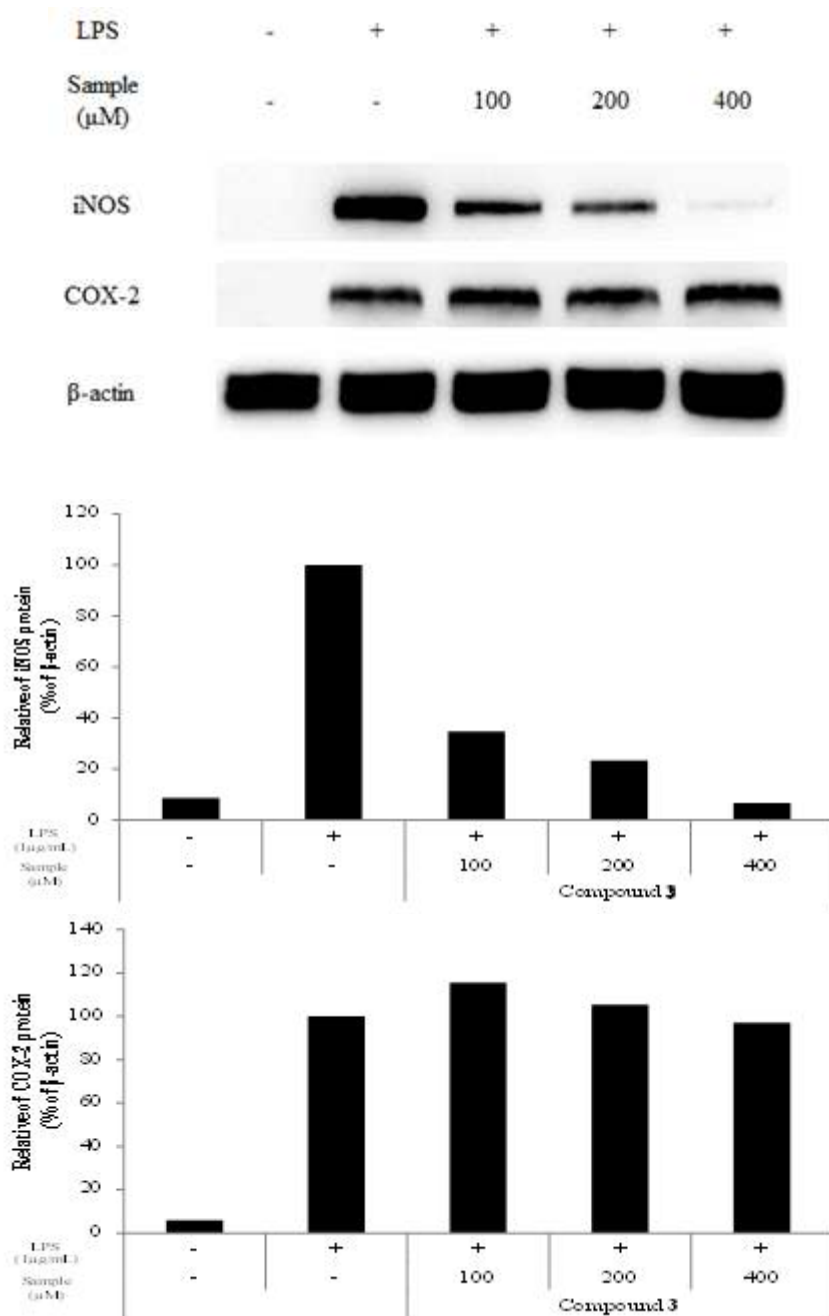


Figure 45. Effect of isolated compound **3** on levels of iNOS and COX-2 protein expression in RAW264.7 macrophage. Result are mean  $\pm$  SD of triplicate data.

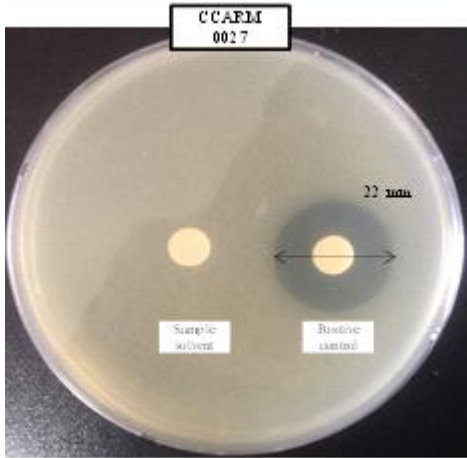
## 5. 항균 활성 실험 결과

### 1) 스타푸르트 가지 추출물 및 분획물의 항균 활성 실험 결과

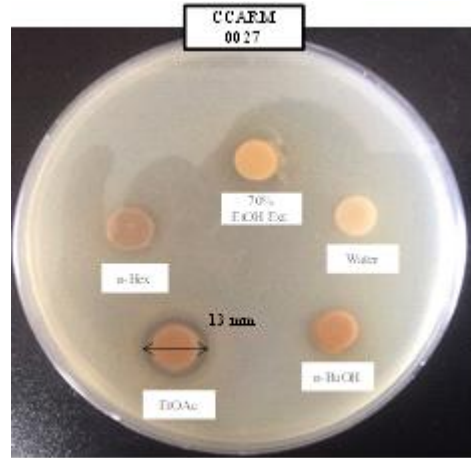
#### (1) Paper disc diffusion method

스타푸르트 가지 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성을 측정하기 위해 피부상재균인 *Staphylococcus aureus* (CCARM 0027, 3708), *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)의 총 5개 균주를 사용하였고, positive control로는 erythromycin을 사용하였다.

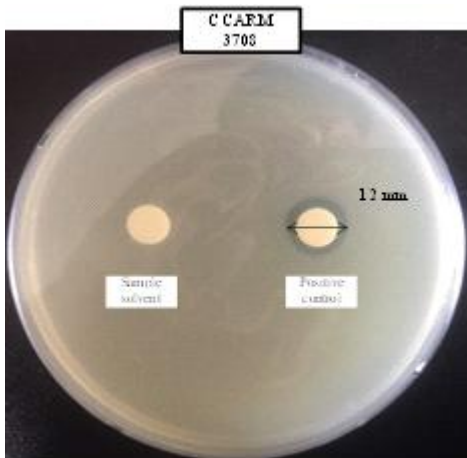
그 결과, EtOAc 분획물이 실험한 모든 균주에 대해 원형발육저지환을 생성하는 것을 확인하였다. 또한 추출물과 *n*-Hex 분획물에서 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3711)에 대해 활성을 나타내었으며, *n*-BuOH 분획물은 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)에 대해 생육억제 활성을 나타내었다(Figure 45, Table 13).



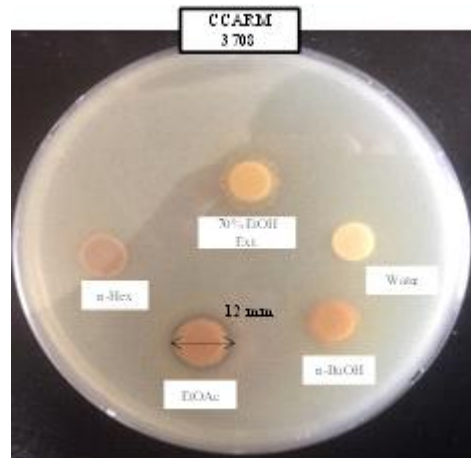
*S. aureus* CCARM 0027



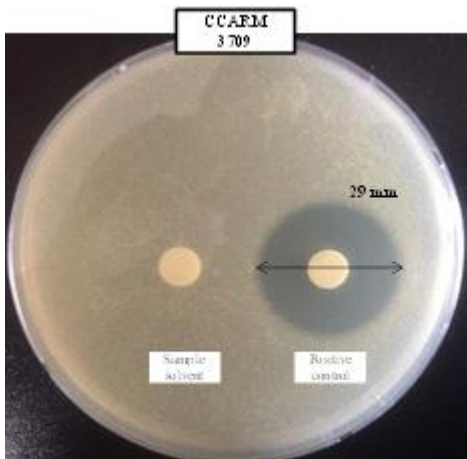
*S. aureus* CCARM 0027



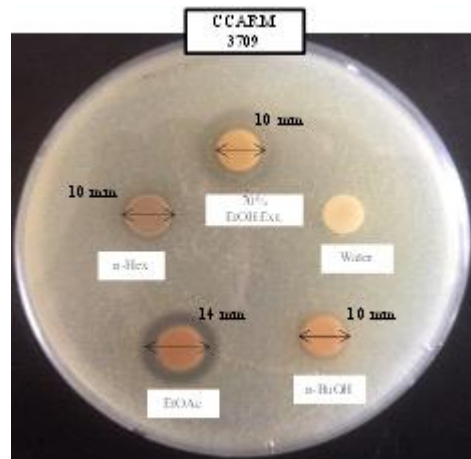
*S. aureus* CCARM 3708



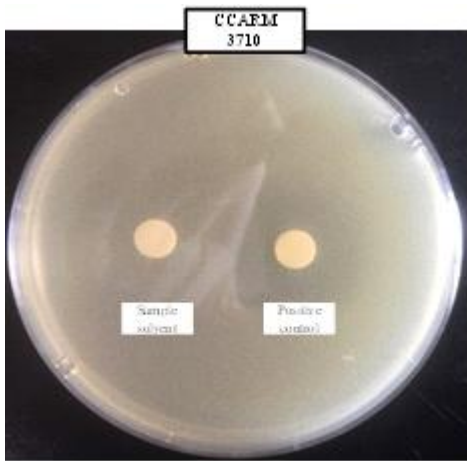
*S. aureus* CCARM 3708



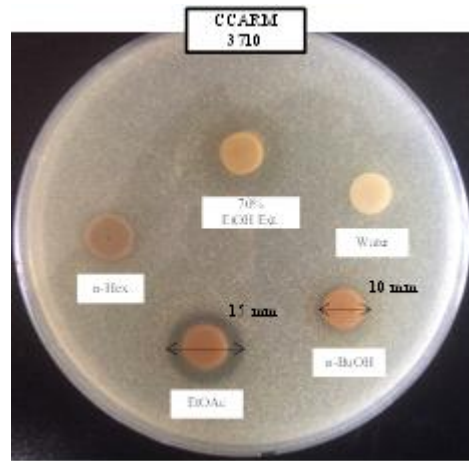
*S. epidermidis* CCARM 3709



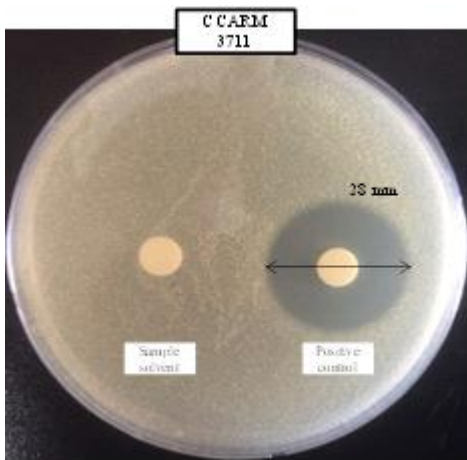
*S. epidermidis* CCARM 3709



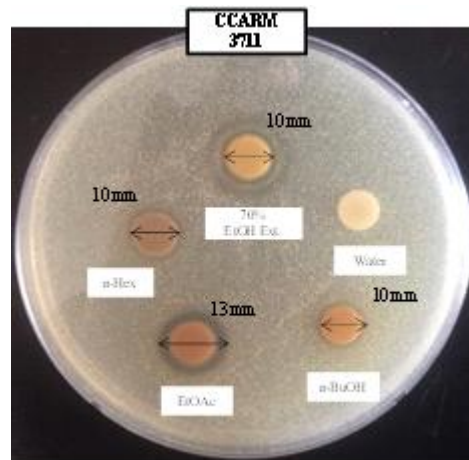
*S. epidermidis* CCARM 3710



*S. epidermidis* CCARM 3710



*S. epidermidis* CCARM 3711



*S. epidermidis* CCARM 3711

Figure 46. Results of paper disc diffusion method of extract and solvent fractions from branches of *A. carambola* on *S. aureus* and *S. epidermidis*.



Table 13. Anti-bacterial activity of extract and solvent fractions from *A. carambola* branches

Bacterial density ( $1.5 \times 10^6$ CFU/mL)	Clear zone (mm)				
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		
	CCARM 0027	CCARM 3708	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	N.A.	N.A.	10	N.A.	10
<i>n</i> -Hex fr.	N.A.	N.A.	10	N.A.	10
EtOAc fr.	14	12	14	15	13
<i>n</i> -BuOH fr.	N.A.	N.A.	10	10	10
H <sub>2</sub> O fr.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Positive control	22	12	29	N.A.	28
Sample solvent	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Sample : 2 mg

positive control : Erythromycin (+) (20 µg)

Disc size : 8 mm

N.A. : No Activity

## (2) MIC and MBC

Paper disc diffusion을 통해 활성이 있었던 추출물 및 용매 분획물에 대해 추가적으로 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 4 mg/mL를 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 희석 하면서 실시하였다. 그 결과 70% EtOH 추출물 및 EtOAc 분획층에서 실험한 모든 균주에 대해 MIC 값을 확인할 수 있었으며(Table 14), EtOAc 분획물의 경우 *S. epidermidis* (CCARM 3711)에 대해 MBC 값(4000 µg/mL)을 확인할 수 있었다(Figure 46, Table 14).

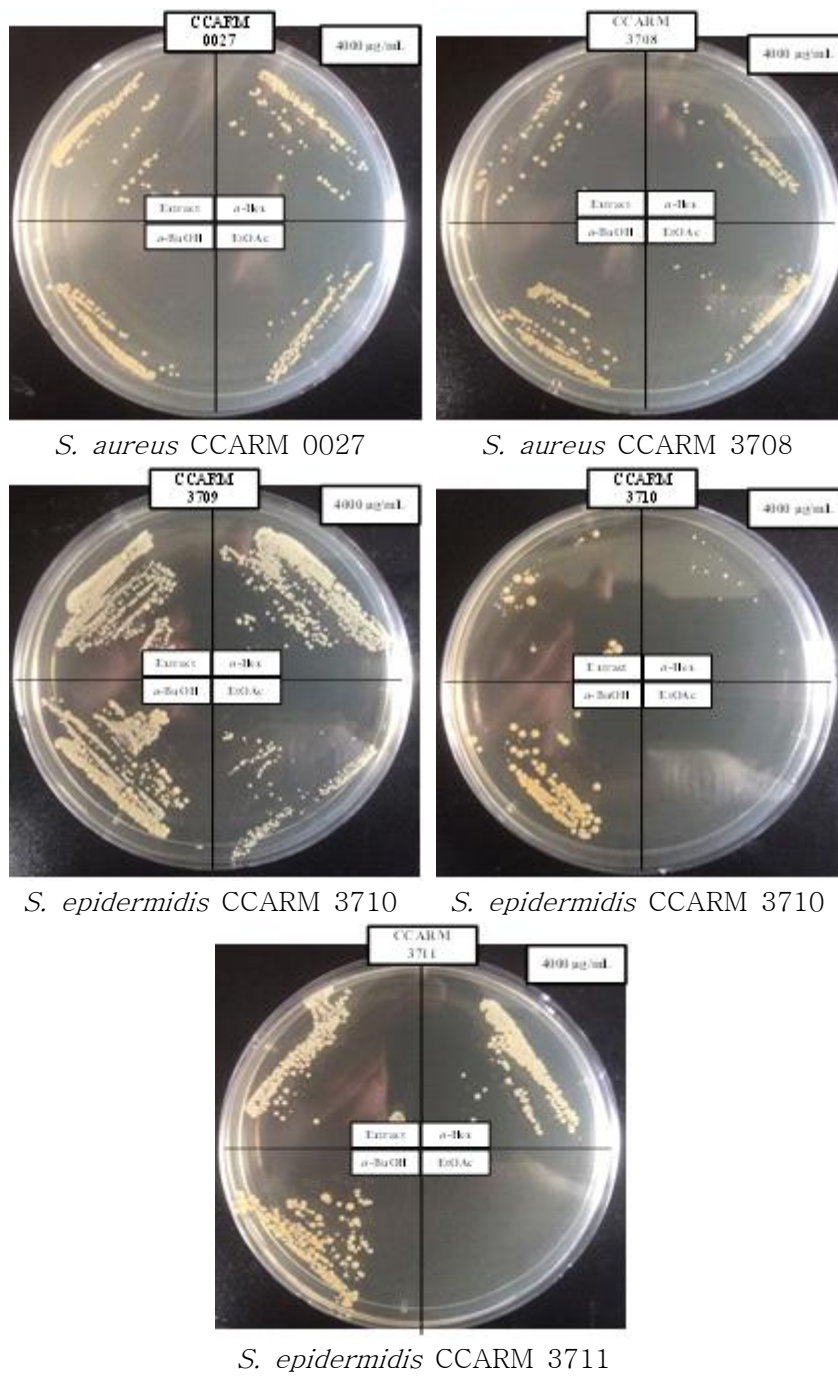


Figure 46. Results of MIC and MBC of extract and solvent fractions from *A. carambola* branches on *S. aureus* and *S. epidermidis*.

Table 14. MIC and MBC value of *A. carambola* branches

	<i>S. aureus</i>				<i>S. epidermidis</i>					
	CCARM 0027		CCARM 3708		CCARM 3709		CCARM 3710		CCARM 3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>Extract</b>	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000
<b><i>n</i>-Hex</b>	N.A.	N.A.	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000
<b>EtOAc</b>	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000	4000	4000
<b><i>n</i>-BuOH</b>	N.A.	N.A.	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000

N.A.: No Activity

Unit: µg/mL

## IV. 요약 및 결론

본 연구는 아열대 식물인 스타푸르트 가지의 천연 항산화, 항염 및 항균 활성 소재로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

스타푸르트 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O분획물을 얻고, 이들의 항산화, 항염, 및 항균 활성실험을 진행하였다. 항산화 실험결과 총 폴리페놀 함량은 EtOAc 분획물 (248.33 mg/g GAE)에서 가장 높은 함량을 나타내었으며, DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> radical소거활성에서는 모든 분획물이 대조군인 BHT보다 우수한 활성을 나타내었다. 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물에서 NO생성 억제활성이 있음을 확인하였고, 이를 western blot을 통해 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시킨다는 것을 확인하였다. Paper disc diffusion 법을 이용한 항균실험에서는 H<sub>2</sub>O분획물을 제외한 모든 분획물에서 항균효과가 나타남을 확인 하였다.

이와 같은 결과를 바탕으로 우수한 활성을 보인 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물을 MPLC, VLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하였고, 1D, 2D NMR 및 HR-ESI-MS를 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며 문헌과 비교하여 총 4개의 화합물을 분리·동정하였다. 분리된 화합물은 *epi*-catechin (1), daucosterol (2), phloretin 3'-*C*-(4-*O*-β-D-glucopyranosyl)-β-D-fucopyranosyl-6'-*O*-α-L-arabinofuranoside (3) 및 carambolaside J (4)로 확인되었으며, compound 3은 자연계에서 처음으로 분리된 화합물이다.

스타푸르트 가지 추출물 및 용매 분획물에 대한 분리된 화합물(1, 3 and 4)의 함량을 HPLC로 이용해 측정하였다. 70% EtOH 추출물에서는 compound 1, 3 및 4가 각각 2.19, 7.75, 3.00 mg/g, EtOAc 분획물에서는 35.18, 4.61, 4.85 mg/g, *n*-BuOH 분획물에서는 2.16, 29.38, 14.65 mg/g 함유되어 있는 것으로 분석되었다.

각 화합물의 함량 분석 결과가 활성 실험 결과와 어떠한 연관이 있는 지 알아보기 위해 compound 1-4에 대해 추가 실험을 진행하였다. 항산화 실험 결과

DPPH radical 소거 활성실험은 compound 1이(SC<sub>50</sub>: 38.7 μM)대조군(ascorbic acid, SC<sub>50</sub>: 43.5 μM)보다 우수한 활성을 나타내었다. 또한 ABTS<sup>+</sup> radical소거 활성실험에서는 compound 1 (SC<sub>50</sub>: 12.0 μM), 3 (SC<sub>50</sub>: 20.9 μM) 및 4 (SC<sub>50</sub>: 34.2 μM)가 대조군(ascorbic acid, SC<sub>50</sub>: 31.8 μM)만큼 좋은 활성을 나타내었다.

항염 활성 실험결과, compound 1, 3 및 4는 세포독성 없이 NO의 생성을 농도의존적으로 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 자연계에서 처음 분리된 compound 3의 iNOS 단백질발현을 확인한 결과, compound 3이 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

HPLC 함량 분석 결과와 비교하여 볼 때, EtOAc 분획물에서 compound 1의 함량이 가장 높다는 점을 확인할 수 있었고, 기존의 연구를 통해 항산화<sup>32</sup>, 항균<sup>33</sup> 활성이 보고 되어있는 이 화합물로 인해 EtOAc 분획물이 다른 분획물에 비해 좋은 항산화, 항균 활성을 나타내는 것으로 예상할 수 있다.

또한 EtOAc에 함유되어 있는 compound 3 및 4는 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성은 나타나지만 DPPH 라디칼 소거활성은 나타나지 않는다는 점을 확인하였으며, 이는 문헌을 통하여 compound 3 및 4처럼 phloretin 골격을 모체로 하여 당이 결합되어있는 화합물들의 특징임을 확인하였다. 이러한 특징의 갖는 화합물들은 주로 스타푸르트 열매들로부터 분리보고<sup>25-26</sup>가되었으며, 추가적인 연구를 통해 이러한 화합물들의 정확한 반응 경로를 확인할 필요가 있음이 판단된다.

본 연구 결과, 스타푸르트 가지 추출물 및 분리된 화합물은 우수한 항산화, 항염 및 항균 효과를 가지고 있고, 이를 바탕으로 스타푸르트 가지 추출물을 활용하여 화장품 또는 의약품 관련 천연 소재로서의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## V. 참고문헌

1. 공개특허. 아그배나무 가지 추출물, 분획물 또는 화합물을 포함하는 화장품 조성물. 2014.
2. Seo, J. E.; Hwang, E. S.; Kim, G. H. Antioxidative and Differentiation Effects of *Artemisia capillaris* T. Extract on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage of MC3T3-E1 Osteoblast Cells, *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2011, 40, 1532-1536.
3. Naver, 2012.04.06., <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=3574180&cid=58949&categoryId=58983>, 2017.11.20
4. Bae, S. J. Studies on the Antioxidative and Antimicrobial Effects of *Chondria crassicaulis*, *Journal of Life Science* 2004, 14, 411-416.
5. Oh, S. K.; Kim, D. J.; Chun, A. R.; Yoon, M. R.; Kim, K. J.; Lee, J. S.; Jong, H. C.; Kim, Y. K. Antioxidant Compounds and Antioxidant Activities of Ethanol Extracts from Milling By-products of Rice Cultivars, *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2010, 39, 624-630.
6. Willoughby, D. A. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 1975, 34, 471-478.
7. Yoon, Weon-Jong; Lee, Jung-A; Kim Kil-Nam; Kim, Ji-Y; Park, Soo-Yeong. *In vitro* Anti-inflammatory Activity of the *Artemisia fukudo* Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. *Korean Soc. of Food Sci. Techn.* 2007, 39(4), 464-469.
8. 이해자; 강경진; 윤원중; 강희경; 김영석; 김소미; 유은숙. RAW264.7 및

- HaCaT cell에서 당유자 미숙과의 염증억제 효과. *Kor. J. Pharmacogn.* **2006**, *37(2)*, 74-80.
9. Lee, Sun-Sook; Imm, Jee-Young; Han, Young-Sook. The Improvement Effect of Lotus Leaf Extracts on Acne Skin. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **2012**, *10(2)*, 405-413.
  10. Kim, Sang-Suk.; Hyun, Ju-Mi; Kim, kwang-Sik; Park, Kyung-Jin; Park, Suk-Man; Chol, Young-Hun. Influence of Essential Oil in ‘Shiranuhi’ Immature Fruit on Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **2013**, *21(6)*, 493-497.
  11. 국립환경과학원. 한국 기후변화 평가 보고서 (기후변화 영향 및 적응), *환경부·국립환경과학원* **2014**.
  12. 정중규; 김해란; 유영한. 지구온난화에 따른 상수리나무와 굴참나무의 생육 반응에 관한 연구, *한국환경생태학회지* **2010**, *24(6)*, 648-656.
  13. 송국만; 현화자; 강창훈; 김문홍. 제주도 무인도서의 식물상과 생활영. *한국환경과학회지* **2009**, *18(11)*, 1309-1324.
  14. 김천환. 아열대채소 도입 및 재배법 개발. *국립원예특작과학원* **2012**.
  15. Shu-Dong, Wei.; Hui, Chen.; Ting, Yan.; Yi-Ming, Lin.; Hai-Chao, Zhou.; Identification of antioxidant components and fatty acid profiles of the leaves and fruits from *Averrhoa carambola*, *Food Science and Technology*, **2014**, *55*, 278-285.
  16. Henrique, H. Moresco.; Gustavo, S. Queiroz.; Moacir, G. Pizzolatti.; Inês, M. C. Brighente. Chemical constituents and evaluation of the



- toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves, *Rev. bras. farmacogn.* **2012**, *22(2)*, 319-324.
17. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* **1981**, *58*, 966-968.
  18. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
  19. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* **1999**, *26*, 1231-1237.
  20. 조연정. 부지화 잎·가지 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구. *제주대학교 2017, 석사학위논문.*
  21. 현주미. 제주 재래굴·부지화 미숙과 추출물 및 감굴 정유 성분의 기능성 화장품 소재화 연구. *제주대학교 2016, 박사학위논문.*
  22. 강종석. 제주 자생 뱀딸기 추출물의 기능성 화장품 소재화 연구. *제주대학교, 2014. 석사학위논문.*
  23. 한정환. 비양나무 가지의 항산화, 미백, 항염 활성 성분 연구. *제주대학교 2014, 석사학위논문.*
  24. 김수영. 뽕잎피나무 잎으로부터 항염 및 주름개선 활성 성분 연구. *제주대학교 2013, 석사학위논문.*
  25. Dina Faek El-Kashef; Ashraf Nageeb El-Sayed Hamed; Hany Ezzat

- Khalil; Rehab Mahmoud Abd-Elbaky; Mohamed Salah Kamel. Phytochemical and antimicrobial studies of *Pachypodium lamerei*, *Journal of Medicinal Plants Research* **2015**, *9(47)*, 1123-1130
26. Dan, Yang.; Haihui, Xie.; Xuchao, Jia.; Xiaoyi, Wei. Flavonoid C-glycosides from star fruit and their antioxidant activity, *Journal of Functional Foods* **2015**, *16*, 204-210.
27. Dan, Yang.; Xuchao, Jia.; Haihui, Xie.; Xiaoyi, Wei. Further dihydrochalcone C-glycoside from the fruit of *Averrhoa carambola*, *Food Science and Technology* **2016**, *65*, 604-609.
28. Dan, Yang.; Xuchao, Jia.; Haihui, Xie.; Xiaoyi, Wei. Further dihydrochalcone C-glycoside from the fruit of *Averrhoa carambola*, *Food Science and Technology* **2016**, *65*, 604-609.
29. 문승리. 섬오가피나무 줄기로부터 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성 성분 규명. *제주대학교* **2016**, 석사학위논문.
30. Hang, Jun Qing; Wang, Yong; Li, Yong Hui; Lai, Wei Yong; Li, Hai Long; Duan, Jin Ao; Pei, Li Xia. Two New Natural Products from the Fruits of *Alpinia oxyphylla* with Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Activated RAW264.7 Macrophage Cells. *Arch Pharm Res* **2012**, *35(12)*, 2143-2146.
31. Kim, Ju Sun; Kim, Jin Cheul; Shim, Sang Hee; Lee, Eun Ju; Jin, Wen Yi; Bae, Ki Hwan; Son, Kun Ho; Kim, Hyun Pyo; Kang, Sam Sik; Chang, Hyeun Wook. Chemical Constituents of the Root of *Dystaenia takeshimana* and Their Anti-Inflammatory Activity. *Arch Pharm Res* **2006**, *29(8)*, 617-623.

32. H.,Fumio;O., Masateru; M., Chikako; I., Yasuyuki; S., Yusuke; S., Keiichi; N., Gen-ichiro; N., Itsuo; N., Toshihiro. Evaluation of the Anti-oxidative Effect (in vitro) of Tea Polyphenols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67(2)*, 396-401
33. S., Sumiko; S., Masato; M., Tohru; I., Hideyoki; H., Tsutomu; Y., Takashi; T., Tomofusa. Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of  $\beta$ -lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **1999**, *22(12)*, 1388-1390