



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

올벚나무 잎 추출물의 항산화 및
항염 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

홍 혜 진

2019年 2月

올벚나무 잎 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

洪 慧 眞

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2018年 12月

洪慧眞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

2018年 12月

Anti-oxidative and Anti-inflammatory
Constituents from Extract of *Prunus pendula*
for. *ascendens* Leaves

Hye Jin Hong
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2018. 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	vii
Abstract	ix
I. 서론	1
1. 천연물	1
2. 항산화	2
3. 염증	3
II. 재료 및 실험 방법	5
1. 시약 및 기기	5
2. 재료	6
3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리	7
1) 울벳나무 잎의 추출 및 용매 분획	7
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	8
4. 생리 활성 평가	9
1) 항산화	9
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	9
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	10
(3) DPPH radical 소거 활성 측정	11
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	12
2) 항염	13
(1) RAW264.7 세포 배양	13
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	13

(3) 세포 독성 평가(MTT assay)	13
(4) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	14
(5) Western blot analysis	14
5. HPLC analysis	16
III. 결과 및 고찰	17
1. 분리된 화합물의 구조 분석	17
1) Compound 1 의 구조 동정	17
2) Compound 2 의 구조 동정	20
3) Compound 3 의 구조 동정	23
4) Compound 4, 5 의 구조 동정	26
2. HPLC 분석 결과	31
3. 울벳나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	33
1) 항산화	33
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	33
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	34
(3) DPPH radical 소거 활성 측정	35
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	36
2) 항염	37
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	37
(2) PGE ₂ 생성 억제 활성 측정	39
(3) 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	40
(4) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성 측정	42
4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	43
1) 항산화	43
(1) DPPH radical 소거 활성 측정	43
(2) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	45
2) 항염	47
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	47

IV. 요약 및 결론 48

V. 참고문헌 50

List of Tables

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors	16
Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis	16
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1	18
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 2	21
Table 5. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 3	24
Table 6. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 4 and 5	28
Table 7. Contents of isolated compounds by HPLC	32
Table 8. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	35
Table 9. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	36
Table 10. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds 1-5 from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	44
Table 11. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for isolated compounds 1-5 from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	46

List of Figures

Figure 1. Picture of <i>Prunus pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	6
Figure 2. Extraction and solvent fractionation of <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	7
Figure 3. Isolation of compounds from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	8
Figure 4. Calibration curve of standard gallic acid for quantification of total polyphenol contents	9
Figure 5. Calibration curve of standard quercetin for quantification of total flavonoid contents	10
Figure 6. Chemical structure of compound 1	17
Figure 7. ¹ H NMR spectrum of compound 1	19
Figure 8. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	19
Figure 9. Chemical structure of compound 2	21
Figure 10. ¹ H NMR spectrum of compound 2	22
Figure 11. ¹³ C NMR and DEPT-135° NMR spectrum of compound 2	22
Figure 12. Chemical structure of compound 3	24
Figure 13. ¹ H NMR spectrum of compound 3	25
Figure 14. ¹³ C NMR spectrum of compound 3	25
Figure 15. Chemical structures of compounds 4 and 5	27
Figure 16. ¹ H NMR spectrum of compound 4	29
Figure 17. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	29
Figure 18. ¹ H NMR spectrum of compound 5	30
Figure 19. ¹³ C NMR spectrum of compound 5	30
Figure 20. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract and EtOAc fractions	31
Figure 21. Total polyphenol contents of extract and solvent layers from	

<i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	33
Figure 22. Total flavonoid contents of extract and solvent layers from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	34
Figure 23. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	35
Figure 24. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	36
Figure 25. Effects of extract and solvent layers from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	38
Figure 26. Effect of EtOAc fraction from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves on PGE ₂ production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells	39
Figure 27. Effects of EtOAc fraction from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells	40
Figure 28. Effect of EtOAc fraction from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells	41
Figure 29. Effects of EtOAc fraction from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves on the levels of iNOS and COX-2 protein	42
Figure 30. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	43
Figure 31. ABTS ⁺ radical scavenging activities of isolated compounds from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves	45
Figure 32. Effects of isolated compounds from <i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	47

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)
BHT	<i>tert</i> -Butylhydroxytoluene
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i>
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CHCl ₃	Chloroform
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
Fr.	Fraction
GAE	Gallic acid equivalent
HPLC	High pressure liquid chromatography
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
int.	Integration
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

multi.	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
QE	Quercetin equivalent
ROS	Reactive oxygen species
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
TLC	Thin layer chromatography
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
V	VLC subfraction
VLC	Vacuum liquid chromatography

Abstract

In this study, *Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi was examined to identify the anti-oxidative and anti-inflammatory constituents. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated by analyzing the spectroscopic data including ^1H and ^{13}C NMR spectra, as well as the comparison of the data to the literature values.

Five phytochemicals were isolated from EtOAc fraction of *P. pendula* for. *ascendens* leaves; ursolic acid (**1**), prunasin (**2**), methyl *p*-coumarate (**3**), kaempferol (**4**) and astragalin (**5**). As far as we know, compounds **1-5** were isolated for the first time from this plant.

The content of the 70% EtOH extract and EtOAc fraction, including compound **5**, were analyzed quantitatively using high pressure liquid chromatography (HPLC).

On the anti-oxidation tests, the compound **4** (SC_{50} 100.2 μM) and **5** (SC_{50} 255.3 μM) showed good DPPH radical scavenging activity than positive control (BHT, SC_{50} 247.3 μM). Also, compounds **3** (SC_{50} 158.4 μM), **4** (SC_{50} 53.3 μM) and **5** (SC_{50} 180.3 μM) exhibited potent ABTS⁺ radical scavenging activities compared to BHT (SC_{50} 34.0 μM).

For the anti-inflammation studies using RAW264.7 macrophage cells stimulated with LPS, EtOAc fraction and compounds **4** and **5** inhibited the production of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6), expression of iNOS and COX-2 protein, significantly.

Based on these results, it was suggested that extract and isolated compounds from *P. pendula* for. *ascendens* leaves could be potentially applicable as anti-oxidative and/or anti-inflammatory cosmetic ingredients.

I. 서론

1. 천연물

100세 시대가 다가옴에 따라 단순히 오래 사는 것이 아닌 건강 유지와 미에 대한 관심이 점점 높아지면서 화장품 시장의 규모와 소비량은 급속도로 성장하면서 발전하고 있다.¹ 특히 로하스(LOHAS, Lifestyles of Health and Sustainability)처럼 자연 친화적인 삶을 추구하는 트렌드가 사회 전반적으로 자리 잡으면서 천연 화장품에 대한 수요와 공급이 전 세계적으로 확대되고 있다.² 이에 따라 천연물이 인체에 무해한 화장품 성분으로 인식되면서 피부 문제를 개선할 수 있는 효과적인 천연 유래의 화장품에 대한 관심이 증가하고 있다. 천연물은 다양한 생리활성물질의 원천으로서 크게 1차 대사산물과 2차 대사산물로 구분한다. 1차 대사산물은 생명체의 기본대사에 관여하는 물질이며, 2차 대사산물은 생물체의 고유성분에 해당하고 독특한 생리활성을 보유하고 있다. 대표적인 2차 대사산물중 하나인 페놀성 화합물은 천연 항산화제로 알려져 있으며 식물이 상처나 초식동물들로부터 자신을 보호하기 위해 형성되는 대사산물이다. 페놀성 물질은 주로 식물의 줄기, 잎과 꽃, 뿌리 등에 함유되어 있으며 식물의 종류나 특성에 따라 상당한 차이가 있다.³ 식물계에 존재하는 페놀성 화합물로는 phenylpropanoid, lignan, coumarin, flavonoid 및 tannin 등 방향족 성분이 있으며 다양한 생리활성을 가진다. 이중 플라보노이드는 야채, 과일, 차 등에서 발견되는 화합물로서 C₆-C₃-C₆를 기본골격으로 하는 물질이며 가장 일반적인 플라보노이드 화합물의 골격구조는 5번과 7번 위치에 hydroxy group (OH)을 갖고 있는 구조이다.⁴ 플라보노이드는 생체 내 산화작용을 억제한다고 알려져 있는 성분으로 항산화력을 나타내는 지표성분이다. 이외에도 항염증 및 항노화 등 생리활성이 있는 것으로 보고되어 있다.⁵

2. 항산화

인간뿐만 아니라 모든 생물체들은 산소를 이용하여 생명 유지에 필요한 에너지를 생성한다. 우리가 살아있는데 꼭 필요한 산소는 우리 몸에 이로운 작용을 하지만 스트레스, 흡연, 불규칙한 생활습관, 환경오염 및 미세먼지 등으로 체내의 활성산소종이 과다하게 생성된다. 생체 내 메커니즘으로도 활성산소가 제거되지 못하면 세포막과 DNA 손상, 피부암 및 피부노화 등으로 인하여 다양한 질병이 유발될 수 있다. 그 작용 과정에서 산소가 불안정해져 활성산소가 만들어진다. 활성산소란 ‘산소라디칼(oxygen free radical)로부터 파생된 여러 가지의 산소 화합물들을 일컫는 것’으로 이들은 모두 반응성이 높은 특징을 가지고 있어 쉽게 반응한다. 인체에 손상을 미치는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)은 대표적으로 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) 뿐만 아니라 생체 성분과의 반응에서 유래된 hydroperoxide (ROOH), alkoxy radical ($\text{RO}\cdot$), peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$), nitric oxide (NO) 등이 있다.⁶ 활성산소로부터 생체를 보호하기 위해 인체 세포에는 자기 방어기전인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione peroxidase (GSH-px) 등의 항산화 효소가 체내에서 다양한 메커니즘을 통해 항상성을 유지시킨다.

대표적인 항산화 물질로 ascorbic acid, carotenoid, α -tocopherol, flavonoid 등 천연 항산화제와 butylated hydroxy anisol (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT) 및 *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) 등 합성 항산화제가 널리 사용되고 있다.⁷ 하지만 기존의 합성 항산화 물질은 발암 및 기형 발생 등 부작용의 이유로 사용이 제한적이기 때문에 필요 이상의 활성산소를 제거할 수 있어 안전한 항산화제가 필요하다.⁸

3. 염증

염증은 작용기간에 따라 구분되는데 두드러기나 알러지 같은 즉각적인 조직손상이 발생하는 급성염증과 아토피, 과민성 피부 등 같은 지속적이고 장기적으로 이루어지는 과정을 갖는 만성염증으로 나뉜다.⁹ 염증 반응은 외부로부터 자극이나 세균 감염에 대해 면역세포가 인지하여 다양한 염증 매개물질을 분비함으로써 손상된 조직을 재생하려는 기전이다.¹⁰ 대식세포(macrophage), 호중구(neutrophil) 등과 같은 세포는 체내 면역 반응 조절을 담당하는 세포로 대표적인 염증 매개물인 nitric oxide (NO) 생성에 관여한다. 일반적으로 NO는 염증을 유발시키게 되며, 조직을 손상시키거나 유전자 변이를 시키는 등 부정적인 결과를 초래하게 된다. NO는 L-arginine에서 nitric oxide synthase (NOS)로 인해 생성된다. NOS는 3가지 형태로 존재하며 이 중 NO를 생성하고 염증반응을 조절하는 중요한 역할은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 담당한다. 이러한 iNOS가 과량 발현되면 NO가 과다하게 생성되어 염증 반응이 촉진된다. 또한, 염증 매개물질인 prostaglandin (PG)는 cyclooxygenase (COX)라는 효소로 인해 생성되며 두 가지 종류인 COX-1과 COX-2가 존재한다. COX-1은 대부분 조직에 존재하며 PG 생성에 관여하고, COX-2는 cytokine에 의해 발현이 증가되어 PG의 생성을 촉매하는 효소이다.

대표적인 염증을 매개하는 cytokine의 종류는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 IL-6 등이 있으며, 대식세포는 이들을 분비해서 다양한 염증반응을 매개한다. 이를 비롯해 iNOS, COX-2 효소의 발현을 통해 염증반응을 유발하고 염증 부위로 면역 세포의 이동을 촉진시킨다. 이러한 염증 인자는 자극에 반응하여 대식 세포 내 신호 전달 경로와 전사 인자의 활성화가 일어나 발현이 된다.^{11,12} 현재까지 개발 및 이용 되고 있는 항염증제는 크게 스테로이드계와 비스테로이드계로 나뉘고 있으며, 염증 반응의 주요 매개체인 프로스타글란딘 합성의 억제를 통해서 그 효과를 발휘한다. 하지만 항염증제는 심장, 신장 및 위장 질환의 유발과 같은 부작용으로 인체 안전성 면에서 문제점을 가지고 있어, 부작용을 최소화 하여 안전하게 사용할 수 있는 소재에 대한 연구 및 개발이 활발하게 진행되고 있다.

올벚나무(*Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi)는 장미과 (Rosaceae)에 속하는 낙엽활엽교목으로, 꽃이 잎보다 먼저 핀다. 다른 벚나무보다 일찍 꽃이 피므로 올벚나무라 한다. 높이 10 m에 가지가 가늘고 잎과 더불어 잔털이 있고 꽃은 암술대에 털이 없고 꽃받침통의 밑 부분이 특히 크고 털이 있으며 산형상으로 달리는 것이 특징이다. 따라서 가지, 잎, 꽃의 형태 등 부분적인 특색만으로도 식별이 가능하다. 꽃은 4월에 피고 홍색이며 2~5개가 산형으로 달리고 열매는 6~7월에 검게 익는다.¹³

벚나무 속 식물은 진정작용, 항염증작용, 항고지혈증 활성, 항암활성과 같은 생리활성을 가지고 있어 민간약제로 사용되어 왔다. 특히 벚나무의 열매를 앵두(앵도)라고 하여 식품으로 섭취하였는데 각기로 인한 심장마비, 부종, 유선염과 치통에 대한 민간요법으로 사용되었다.¹⁴ 최근 산벚나무 껍질인 화피의 우수한 항염효과가 보고¹⁵되어 있어 벚나무의 기능성 화장품 관련 천연 소재로서 이용 가능성이 높아졌다. 왕벚나무, 산벚나무 대상으로 연구가 이루어졌으나 올벚나무 잎에 대해서는 항산화 활성만 알려져 있고¹⁶ 아직까지 항염 활성 및 유효 성분 에 관한 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 올벚나무(*Prunus pendula* for. *ascendens*) 잎 추출물 및 용매 분획물의 항산화 및 항염 활성을 확인하고 다양한 유효 성분을 분리·동정하고자 하였다. 또한 분리된 화합물의 생리 활성을 확인하여 화장품 관련 천연 소재로서 활용 가능성을 연구하고자 한다.

II. 재료 및 실험 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck (Darmstadt, Germany), 대정화금 (Siheungsi, Gyeonggi-do, Korea) 및 OCI (Seoul, Korea)의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (2-25 μm , Sigma Co., St. Lois, MO, USA)을 사용하였으며, gel filtration chromatography에는 Sephadex™ LH-20 (25-100 μm , GE Healthcare Life Sciences, PA, USA)을 사용하였다. 분리 과정에서 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2 mm, Merck Co., Darmstadt, Germany)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, 발색 시약에 침적시킨 후 heat gun을 사용하여 건조 시켰다. 발색 시약으로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-5% H₂SO₄를 필요에 따라 사용하였다.

생리 활성 검색을 위한 흡광도 측정에는 microplate reader (Sunrise™, Tecan Co., SpectraMax® ABS Plus, Molecular Devices)를 이용하였다. 분리된 화합물들을 구조 분석하기 위해 사용된 nuclear magnetic resonance spectrometer (NMR)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.)이며, 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksburyk, MA, USA)와 Merck사의 NMR 전용 용매로 CD₃OD, CDCl₃, pyridine-*d*₅를 사용하였다. High pressure liquid chromatography (HPLC, Waters Co.)에는 Shiseido column (CAPCELL PAK C₁₈, 4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였고, 검출기는 UV detector (Waters 2998, Waters Co.)를 사용하였으며 용매는 HPLC-grade의 MeOH과 H₂O (Fisher scientific Korea Ltd., Gangnam-gu, Seoul)를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 올벚나무(*Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi) 잎 (시료번호 : 485)은 2017년 9월에 제주생물자원(주)에서 채집하였다. 구입한 올벚나무 잎은 동결 건조 후 분쇄하여 사용하였다(Figure 1).



Figure 1. Picture of *Prunus pendula* for. *ascendens* leaves.

3. 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 울벧나무 잎의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 울벧나무 잎 640.6 g을 70% EtOH 9.0 L에 넣고 상온에서 24 hr 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치에 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 37-40°C의 수욕 상에서 회전 진공 농축기 (rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 339.0 g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물 50.0 g을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O fraction을 얻었다. 이와 같은 방법으로 3회 더 반복 실시하였고, 추출물 총 50.0 g을 용매 분획하였다(Figure 2).

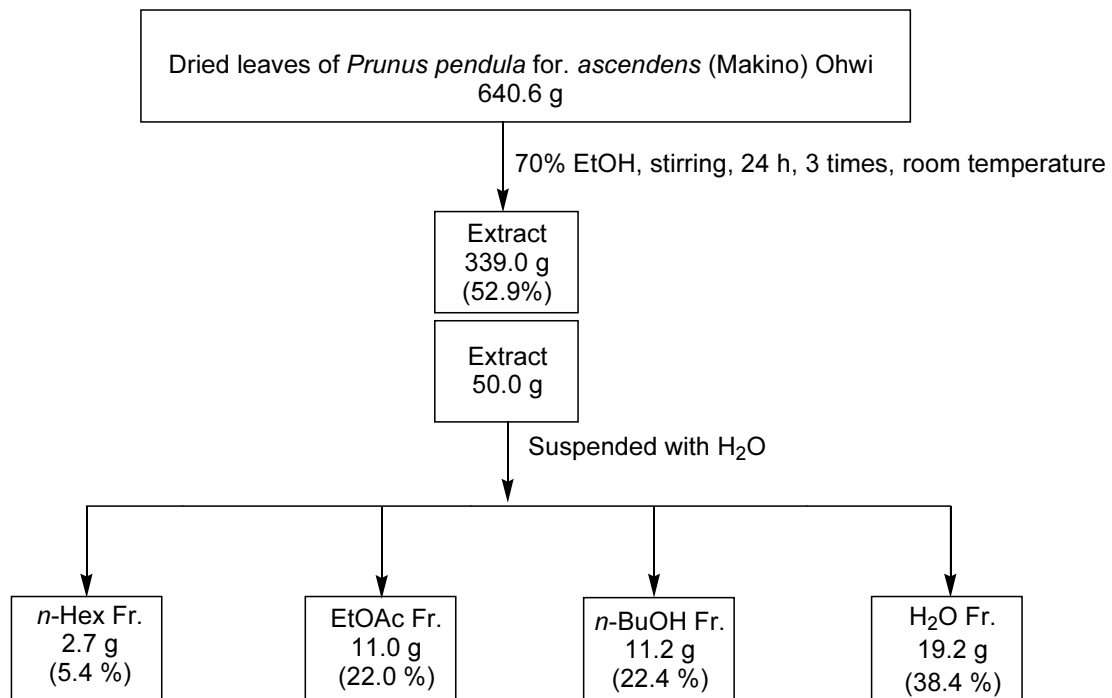


Figure 2. Extraction and solvent fractionation of *P. pendula* for. *ascendens* leaves.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획물층 중 EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 VLC를 수행하였다. 용매의 극성을 5-10% 높이는 방법으로 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (0-100%)을 각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-32). Fr. V9는 단일 화합물인 compound **1** (40.6 mg)로 확인되었다. Fr. V23 (836.3 mg)은 Sephadex LH-20 column chromatography (H₂O:MeOH = 1:1)를 수행하여 compound **2** (130.6 mg), compound **3** (13.6 mg) 및 compound **4** (143.9 mg)를 분리하였고, Fr. V24 (770.4 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (H₂O:MeOH = 1:1)를 수행하여 compound **5** (158.0 mg)를 분리하였다(Figure 3).

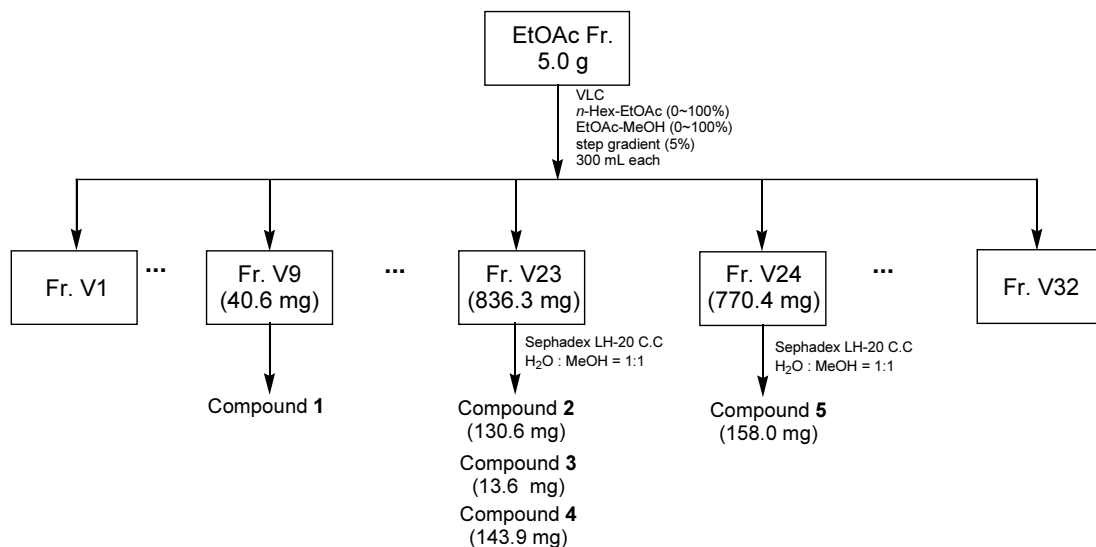


Figure 3. Isolation of compounds from *P. pendula* for. *ascendens* leaves.

4. 생리 활성 평가

1) 항산화

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis¹⁷ 법을 응용하여 실시하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 1 mg/mL의 농도로 제조한 후, 희석하여 표준검정곡선을 작성하였다. 농도별로 희석한 gallic acid 표준용액과 각 시료 용액 100 μ L를 microtube에 취하고 증류수 900 μ L를 가하여 희석하였다. 여기에 100 μ L Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 상온에서 3 min 반응시키고, 7%(w/v) Na_2CO_3 용액 200 μ L, 증류수 700 μ L를 가하여 혼합한 뒤 실온에서 1 hr 반응시킨다. 이후 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 통해 시료의 총 폴리페놀 함량을 환산하였고, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 4).

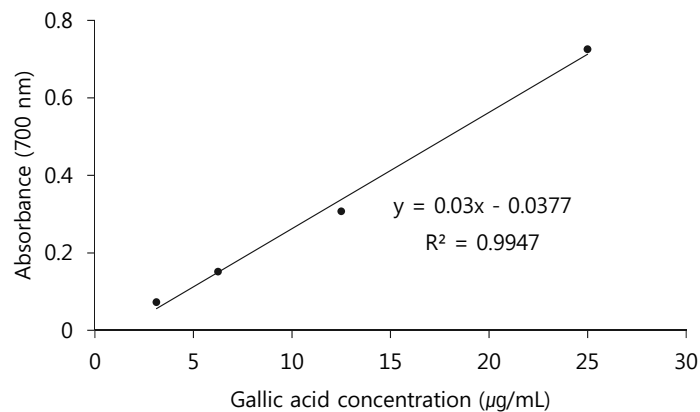


Figure 4. Calibration curve of standard gallic acid for quantification of total polyphenol contents.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis¹⁸ 법을 응용하여 실시하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하여 1 mg/mL의 농도로 제조한 후, 희석하여 표준검정곡선을 작성하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 quercetin 표준용액과 각 시료 용액 15 μ L와 ethylene glycol 150 μ L를 넣고 0.1 N NaOH 15 μ L를 첨가하여 상온에서 1 hr 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 통해 시료의 총 플라보노이드 함량을 환산하였고, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 5).

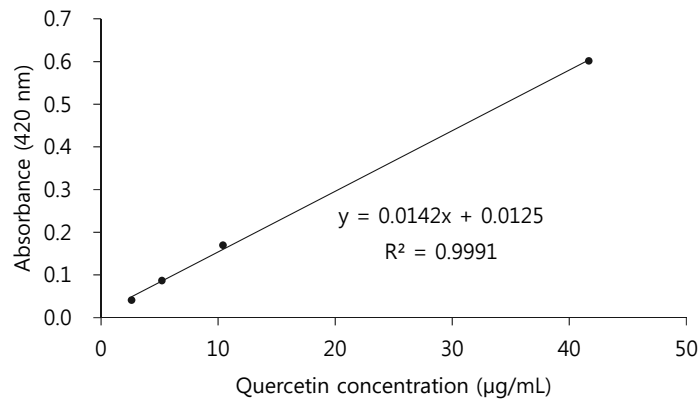


Figure 5. Calibration curve of standard quercetin for quantification of total flavonoid contents.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 안정한 free radical을 가진 보라색 DPPH가 항산화 물질로부터 수소를 공여 받아 DPPH-H [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine]이 되면 노란색으로 변화되어 흡광도의 감소가 일어나게 되는 원리를 이용하여 항산화 능력을 측정할 수 있다.

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois¹⁹ 등의 방법을 응용하여 실시하였다. DPPH 용액을 EtOH로 희석하여 515 nm에서 흡광도가 0.96 ± 0.02 가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료와 대조군을 각각 20 μ L씩 넣은 후 희석한 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L씩 첨가하여 상온에서 20-30 min 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 BHT를 사용하였으며, radical 소거율은 다음과 같은 식에 대입하여 %로 계산하였으며, 각 시료의 radical 소거율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다.

Radical scavenging activity (%)

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 청록색을 띠는 ABTS⁺ radical이 형성되는데, 이 청록색의 ABTS⁺ radical이 항산화 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 흡광도의 감소가 일어나게 되는 원리를 이용하여 항산화 능력을 측정할 수 있다.

ABTS⁺ radical 소거 활성 실험은 Re²⁰ 등의 방법을 응용하여 실시하였다. 7.0 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 16 hr 동안 암소에서 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. 이 용액을 EtOH로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.02가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 시료와 대조군을 20 µL씩 넣은 후 희석한 ABTS⁺ radical 용액 180 µL씩 첨가하여 암소에서 20 min 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 BHT를 사용하였으며, radical 소거율은 다음과 같은 식에 대입하여 %로 계산하였으며, 각 시료의 radical 소거율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다.

Radical scavenging activity (%)

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

2) 항염

(1) RAW264.7 세포 배양

마우스 대식세포(Murine macrophage cell line)인 RAW264.7 세포는 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양받아 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)과 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% CO₂ 조건으로 incubator에 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성화

24 well plate에 RAW264.7 cell을 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 18 hr 배양하였다. 0.1 µg/mL의 lipopolysaccharide (LPS)를 포함하는 배지로 교환하고 sample을 각각 처리하여 24 hr 배양하였다. 이후 96 well plate에 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 10 min 반응시킨 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였으며, 표준물질은 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용하여 표준검정곡선을 통해 정량하였고, 표준검정곡선의 r²값은 0.99 이상이었다. 대조군으로는 2-amino-4-picoline (10 µM)을 사용하였다.

(3) 세포 독성 평가(MTT assay)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 24 well plate에 RAW264.7 cell을 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 18 hr 배양하였다. 0.1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환하

고 sample을 각각 처리하여 24 hr 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT 시약을 첨가하여 37°C에서 3 hr 반응시킨 후, 상등액은 제거하였다. 살아 있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물에 DMSO를 가하여 용해시키고 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래의 식에 대입하여 %로 계산하였다.

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

Ab_{Scontrol} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Ab_{Ssample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

(4) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW264.7 cell을 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 18 hr 배양하였다. 0.1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환하고 sample을 각각 처리하여 24 hr 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액을 취하고 PGE₂ 및 전염증성 cytokine의 생성 함량은 각각 PGE₂ (R&D systems, USA), TNF-α (life technologies corp., USA), IL-1β (R&D systems, USA) 및 IL-6 (Thermo Fisher scientific, Austria) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 정량하였다. 각 표준물질 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 표준검정곡선을 작성하였으며, 표준검정곡선의 r²값은 0.99 이상이 었다.

(5) Western blot analysis

60 mm petri dish에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cell/dish로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 18 hr 배양하였다. 전 배양시킨 cell을 0.1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환하고 sample을 각각 처리하여 24 hr 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액을 제거하여 cold PBS (phosphate buffered saline, sigma Co.)로

세척한 후, lysis buffer (1 × RIPA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용하여 4°C 조건에서 overnight시켜 lysis 시켰다. 단백질 상등액만을 분리하기 위해 15,000 rpm, 20 min, 4°C 조건으로 원심분리 하였다. 단백질 정량을 위해 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 bradford 시약을 사용하였으며, 표준 검정곡선을 작성하여 정량하였고, 표준검정곡선의 r²값은 0.99 이상이었다.

정량한 단백질 20 μL를 8-12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 transfer stack을 이용해 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer 시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk가 포함된 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 90 min blocking 시킨 후, TTBS 용액으로 3회 세척하였다. membrane에 1차 항체 반응을 시키기 위해 iNOS antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), COX-2 antibody (1:1000, BD Biosciences) 및 β-actin antibody (1:20000, Sigma)를 희석하여 사용하였고, 4°C 조건에서 overnight 시켰다. 1차 반응이 끝난 membrane을 TTBS 용액으로 5회 세척 후 Horse Radish Peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체(1:5000 또는 1:20000, Santa Cruz Biotechnology)를 상온에서 1 hr 반응 시킨 후, TTBS 용액으로 5회 세척하였다. 단백질은 WESTAR NOVA 2.0 (CYANAGENm, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 확인하였다.

5. HPLC analysis

울벃나무 잎 추출물과 분획물에 대하여 분리한 화합물들의 정성 및 정량 분석을 HPLC로 수행하였다. 정성분석에는 추출물, 분획물 및 분리한 화합물들을 MeOH에 녹여 0.45 μ m syringe filter로 여과해 나온 여액을 분석하였다. 정량 분석에는 분리된 compound **2**, **4** 및 **5** 표준용액을 사용하여 얻어진 피크의 면적 값을 구하고 표준검정곡선을 작성하였다.

각 분석에는 주입 부피 10 μ L, 컬럼 온도 40 $^{\circ}$ C, 다음과 같은 조건으로 용매를 사용하여 용리시켰고, 1.0 mL/min의 유속으로 60 min 동안 분석하였으며, 검출기는 UV detector (260 nm)를 사용하였다.(Table 1-2).

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors.

Control Factor	Conditions
Injection Volume	10 μ L
Column	Shiseido CAPCELL PAK C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m)
Mobile phase	A: H ₂ O, B: MeOH
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Wavelength	260 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 ₂ O (%)	MeOH (%)
0	1.0	80	20
50	1.0	20	80
55	1.0	0	100
60	1.0	0	100

III. 결과 및 고찰

1. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 30개의 carbon 피크와 ^1H NMR spectrum에서 7개의 methyl group을 포함하는 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예상하였다. δ_{C} 180.4를 통해 1개의 carbonyl기가 있으며, δ_{C} 139.7 및 126.1의 피크로 보아 분자 내에 1개의 이중결합이 있음을 예상하였다. 또한 δ_{C} 78.6의 피크는 deshielding 된 것으로 보아 산소가 인접한 sp^3 carbon임을 예상할 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²¹을 통해 compound 1은 ursolic acid (3 β -hydroxy-12-ursen-28-oic acid)로 확인되었다(Figure 6-8, Table 3).

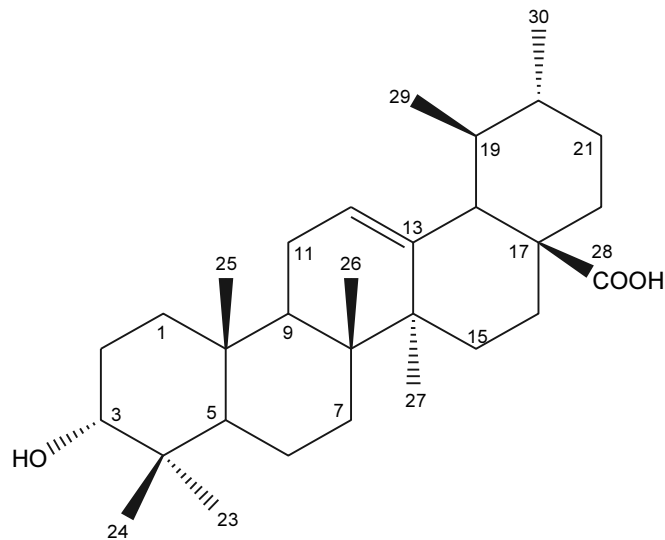


Figure 6. Chemical structure of compound 1.

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1** (400 and 100 MHz, pyridine- d_5).

No.	Compound 1 (pyridine- d_5)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		39.9
2		28.6
3	3.48 (1H, dd, 6.4, 10.3)	78.6
4		39.5
5		56.3
6		19.2
7		34.0
8		40.2
9		48.6
10		37.9
11		24.1
12	5.51 (1H, t, 3.2)	126.1
13		139.7
14		43.0
15		29.2
16		25.4
17		48.5
18	2.66 (1H, d, 11.4)	54.0
19		40.4
20		39.9
21		31.5
22		37.7
23	1.25 (3H, s)	29.3
24	1.05 (3H, s)	17.1
25	0.91 (3H, s)	16.1
26	1.08 (3H, s)	18.0
27	1.27 (3H, s)	24.4
28		180.4
29	1.02 (3H, d, 5.9)	17.9
30	0.97 (3H, d, 5.5)	21.9

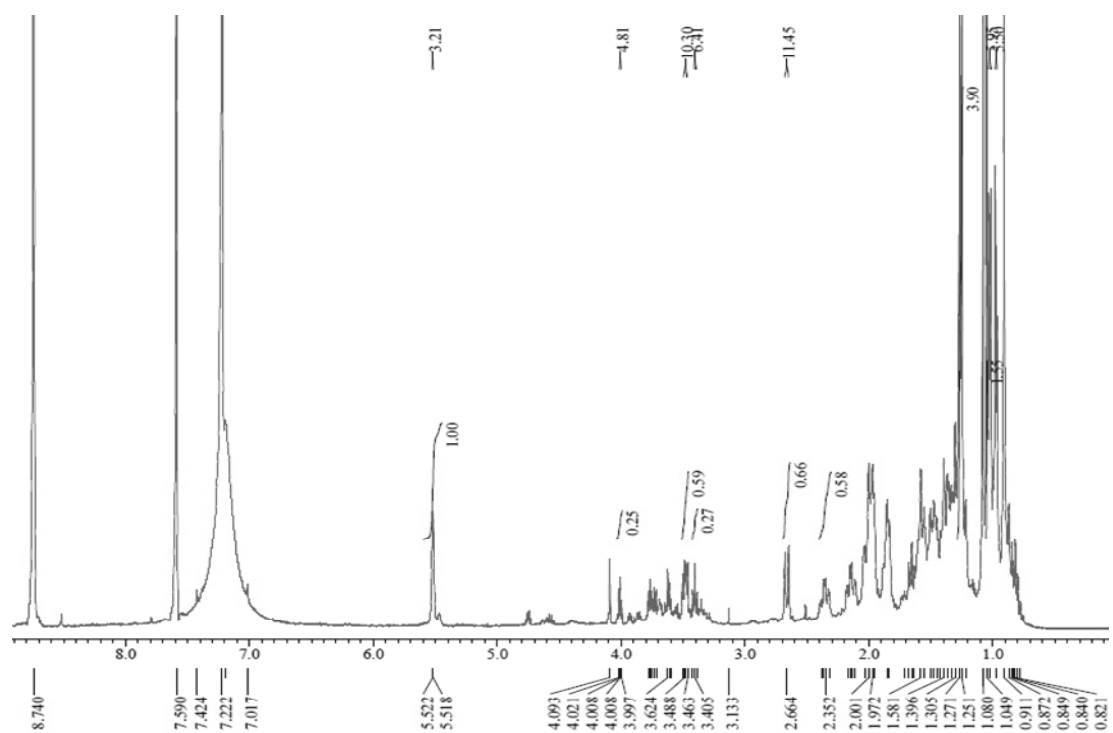


Figure 7. ^1H NMR spectrum of compound **1** (pyridine- d_5).

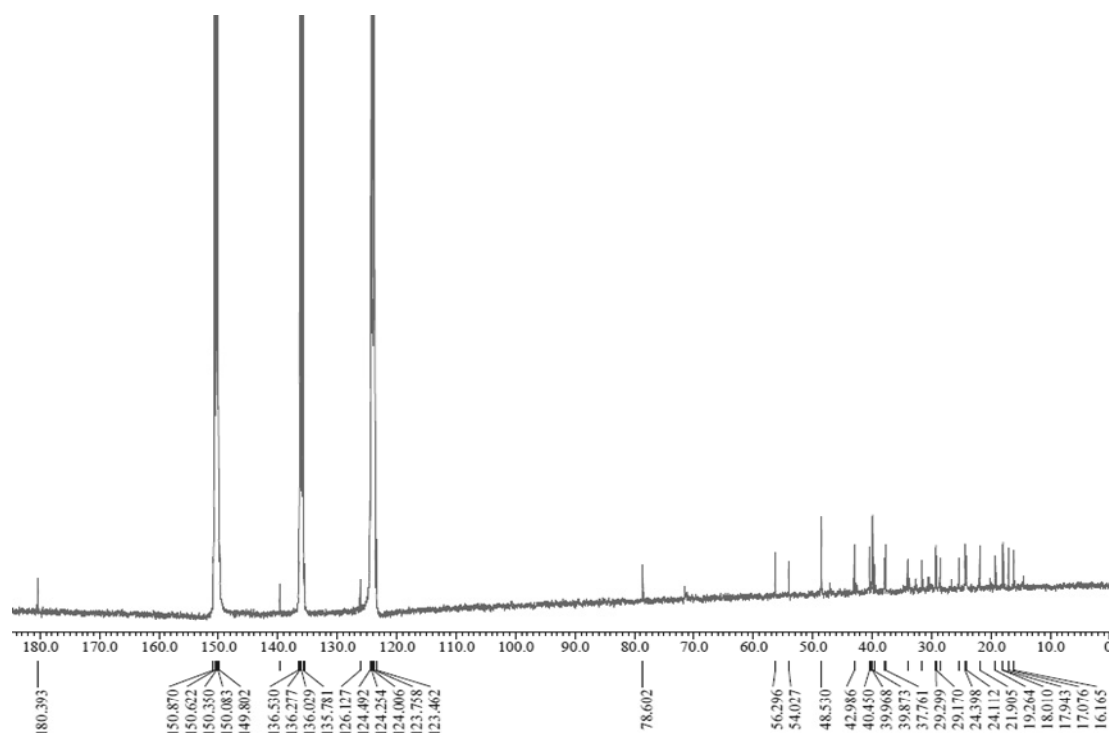


Figure 8. ^{13}C NMR spectrum of compound **1** (pyridine- d_5).

2) Compound **2**의 구조 동정

Compound **2**는 δ_{H} 7.58-7.59 (2H, m), 7.47-7.45 (3H, m) 및 δ_{C} 135.0, 131.1, 130.3, 129.1의 피크를 통해 대칭인 aromatic ring이 있음을 예상할 수 있다. 또한, 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 4.24 (1H, d, 7.3) 및 δ_{C} 102.0, 78.5, 77.9, 74.8, 71.6, 62.9의 6개의 피크를 통해 β -form의 glucopyranoside가 1개 결합되어 있음을 예상하였다. δ_{C} 68.5 및 δ_{H} 5.91 (1H, s)의 피크는 deshielding 된 것으로 보아 산소와 인접해 있는 carbon의 proton임을 예상할 수 있으며, δ_{C} 119.5의 피크는 DEPT-135°를 통해 4차 carbon임을 확인하였으며 일반적인 sp 혼성의 carbon보다 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 치환기가 결합되어 있을 것이라 예상하였고, 문헌을 통해 질소와 3중 결합을 하고 있는 carbon임을 확인하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²²과 비교하여 compound **2**는 prunasin임을 확인하였다(Figure 9-11, Table 4).

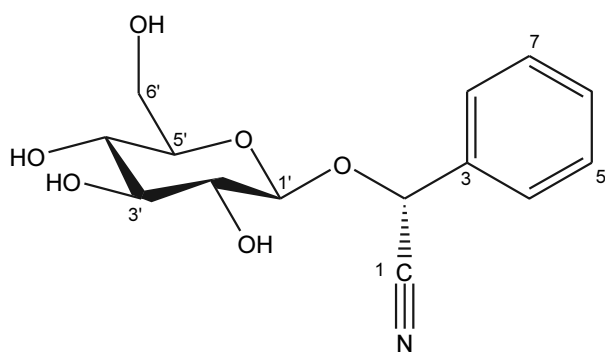


Figure 9. Chemical structure of compound **2**.

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz, CD_3OD).

No.	Compound 2 (CD_3OD)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		119.5
2	5.91 (1H, s)	68.5
3		135.0
4	7.59 (overlapped)	130.3
5	7.45–7.47 (overlapped)	129.1
6	7.45–7.47 (overlapped)	131.1
7	7.45–7.47 (overlapped)	129.1
8	7.58 (overlapped)	130.3
1'	4.24 (1H, d, 7.3)	102.0
2'	3.26–3.34 (1H, m)	74.8
3'	3.26–3.34 (1H, m)	77.9
4'	3.26–3.34 (1H, m)	71.6
5'	3.26–3.34 (1H, m)	78.5
6'	3.91 (1H, dd, 2.2, 11.9)	62.9
	3.70 (1H, dd, 6.0, 11.9)	

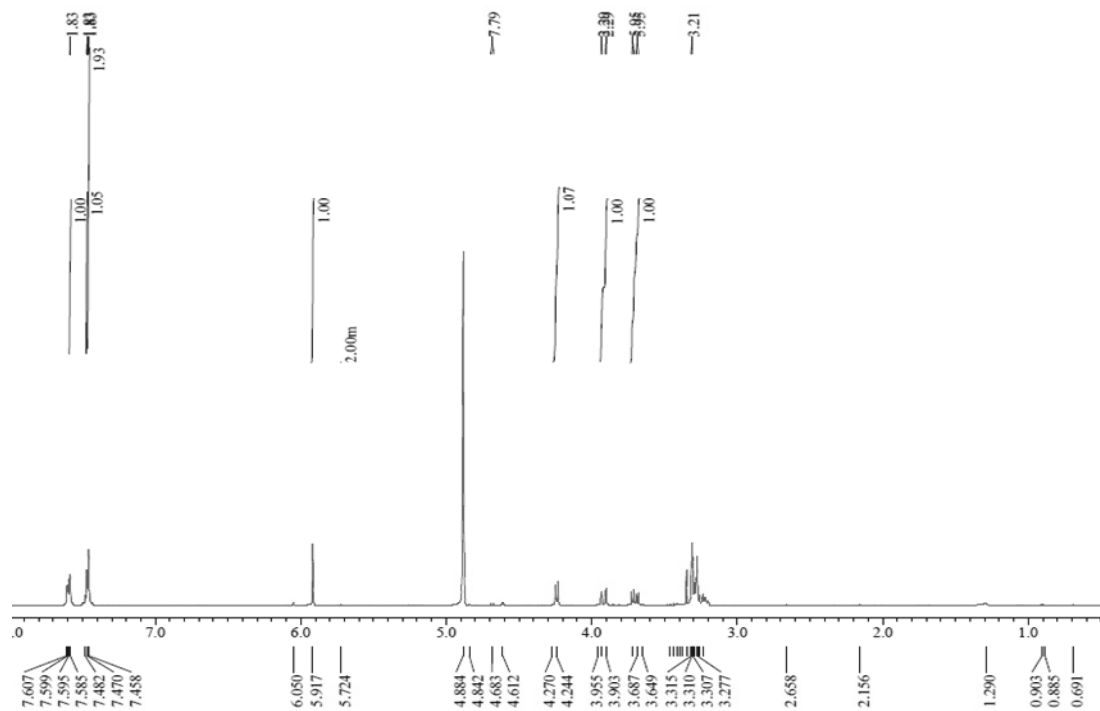


Figure 10. ^1H NMR spectrum of compound **2** (CD_3OD).

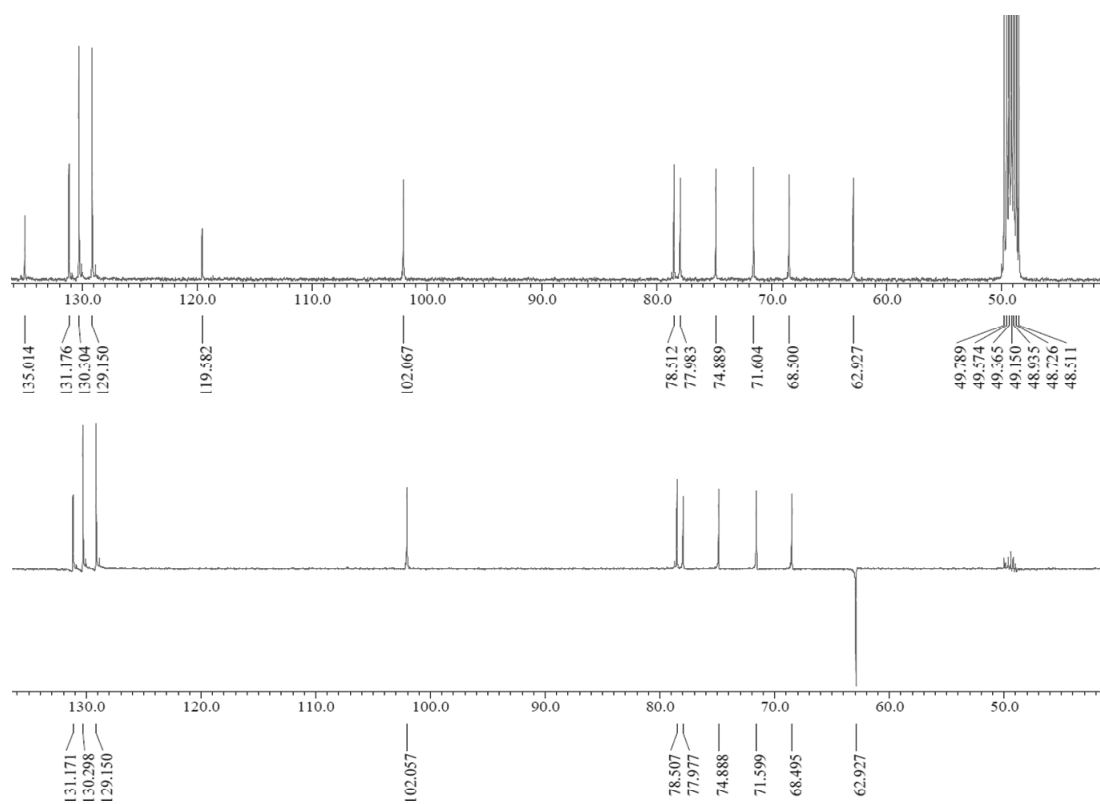


Figure 11. ^{13}C NMR and DEPT- 135° NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD .

3) Compound **3**의 구조 동정

Compound **3**은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.61 (1H, d, 16.0) 및 δ_{H} 6.25 (1H, d, 16.0) 피크의 chemical shift 값과 coupling constant 값을 통해 trans form의 이중결합이 있음을 예상할 수 있다. 또한, δ_{H} 7.39 (2H, d, 8.7)와 δ_{H} 6.81(2H, d, 8.7)의 피크는 적분 값과 coupling constant 값으로 보아 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring이 있음을 예상할 수 있다. δ_{H} 3.77 (3H, s)의 피크는 적분 값과 deshielding 된 것으로 보아 methoxy group이 있음을 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 두 개의 aromatic ring을 포함하여 총 10개의 carbon 피크가 관찰 되었으며, δ_{C} 51.7에 해당하는 methoxy group의 carbon을 제외하고 모두 sp^2 carbon으로 관측되었다. 그중 δ_{C} 168.4의 피크를 통해 분자 내에 ester 구조가 있음을 예상할 수 있으며 이들 데이터를 바탕으로 문헌²³과 비교하여 methyl *p*-coumarate로 확인되었다(Figure 12-14, Table 5).

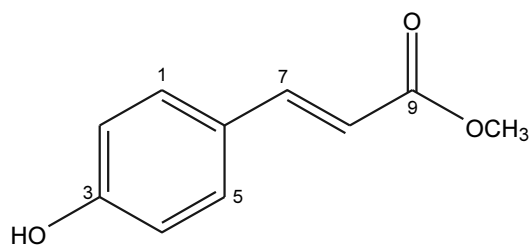


Figure 12. Chemical structure of compound **3**.

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz, CDCl_3).

No.	Compound 3	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		129.1
2	7.39 (1H, d, 8.7)	130.1
3	6.81 (1H, d, 8.7)	115.9
4		159.5
5	6.81 (1H, d, 8.7)	115.9
6	7.39 (1H, d, 8.7)	130.1
7	7.61 (1H, d, 16.0)	145.2
8	6.25 (1H, d, 16.0)	115.0
9		168.4
10	3.77 (3H, s)	51.7

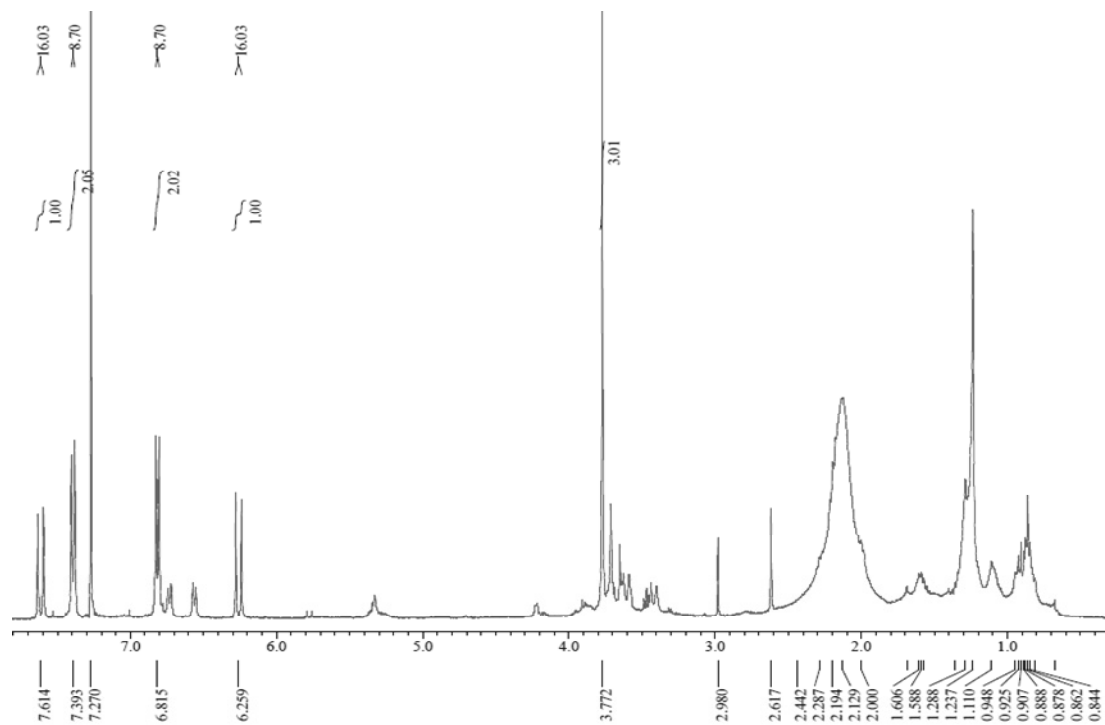


Figure 13. ^1H NMR spectrum of compound **3** (CDCl_3).

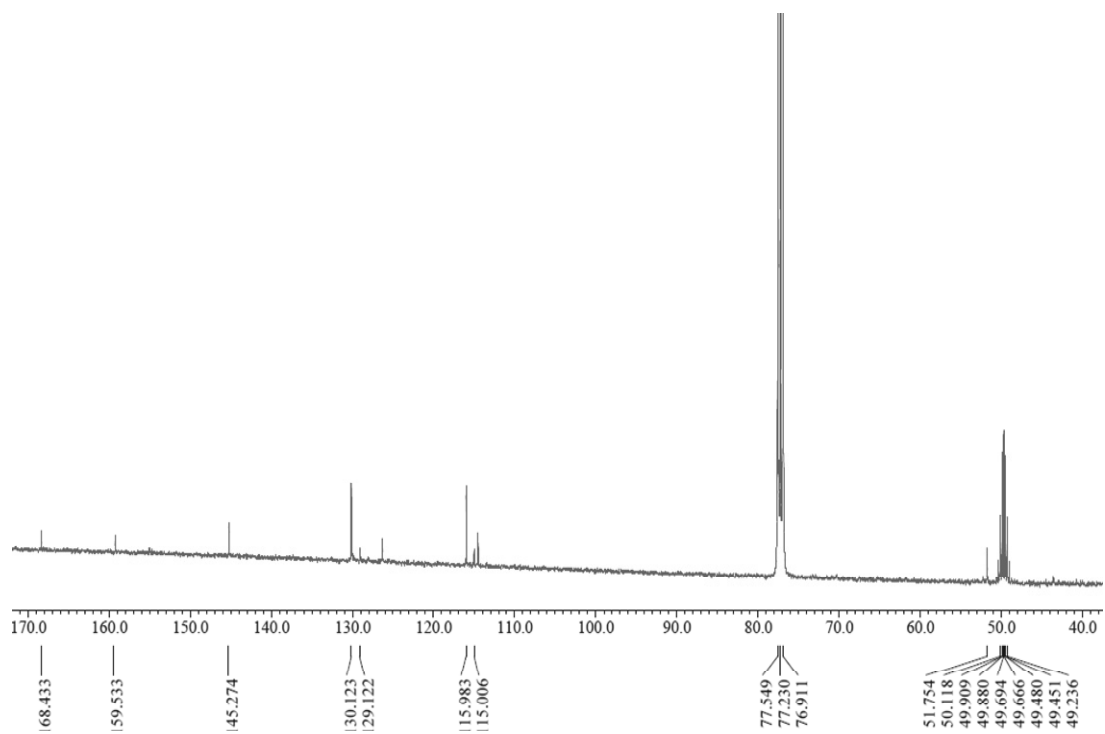
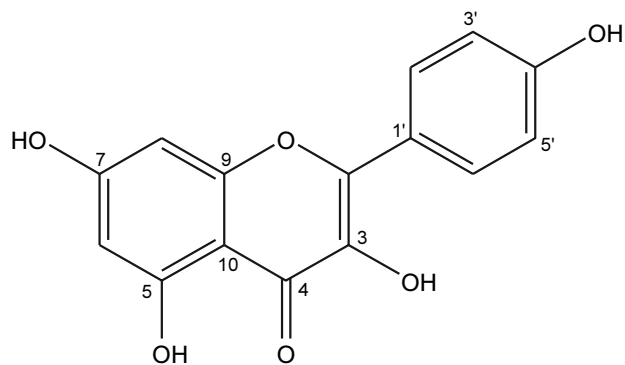


Figure 14. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** (CDCl_3).

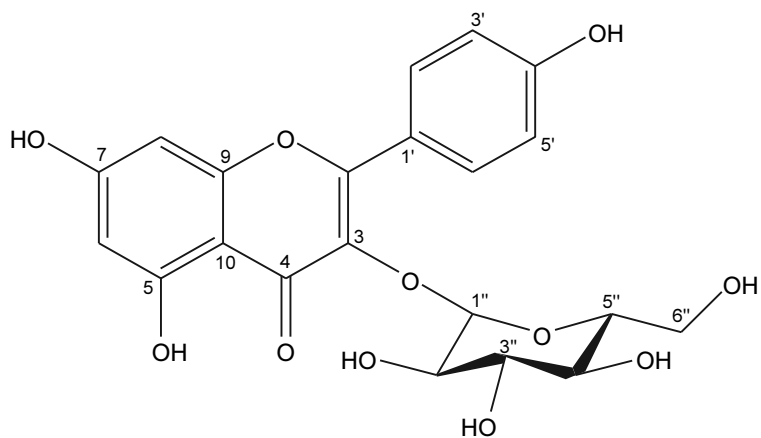
4) Compound **4**, **5**의 구조 동정

Compound **4**의 ^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 2개의 피크를 포함하여 총 15개의 carbon 피크가 있는 것으로 보아 B-ring이 대칭인 flavonoid 골격임을 예상하였다. 그 중, δ_{C} 177.4의 피크를 통해 1개의 carbonyl group이 있음을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 8.06 (2H, d, 8.7) 및 δ_{H} 6.89 (2H, d, 8.7) 피크의 적분 값과 coupling constant 값을 통해 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring을 확인할 수 있다. 또한, δ_{H} 6.37 (1H, d, 1.8) 및 δ_{H} 6.17 (1H, d, 1.8)의 피크는 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring의 proton임을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁴을 통해 compound **4**는 kaempferol으로 확인되었다(Figure 15-17, Table 6).

Compound **5**는 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum분석 결과, compound **4**와 유사한 구조임을 예상하였으며, 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 5.25 (1H, d, 7.3) 및 δ_{C} 62.7~104.1의 6개의 피크를 통해 β -form의 glucopyranoside가 결합되어 있음을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁵과 비교하여 compound **5**는 astragalín (kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside)로 확인되었다(Figure 15, 18, 19, Table 6).



Compound **4**



Compound **5**

Figure 15. Chemical structures of compounds **4** and **5**.

Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **4**, **5** (400 and 100 MHz, CD_3OD).

No.	Compound 4 (CD_3OD)		Compound 5 (CD_3OD)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		148.1		158.6
3				135.5
4		177.4		179.6
5		162.6		163.2
6	6.17 (1H, d, 1.8)	99.3	6.20 (1H, d, 1.8)	100.0
7		165.6		166.1
8	6.37 (1H, d, 1.8)	94.5	6.39 (1H, d, 1.8)	94.8
9		158.3		159.1
10		104.6		105.8
1'		123.8		122.9
2'	8.06 (1H, d, 8.7)	130.8	8.05 (1H, d, 8.7)	132.4
3'	6.89 (1H, d, 8.7)	116.4	6.88 (1H, d, 8.7)	116.2
4'		160.6		161.7
5'	6.89 (1H, d, 8.7)	116.4	6.88 (1H, d, 8.7)	116.2
6'	8.06 (1H, d, 8.7)	130.8	8.05 (1H, d, 8.7)	132.4
1''			5.25 (1H, d, 7.3)	104.1
2''			3.18–3.75 (m)	75.8
3''			3.18–3.75 (m)	78.5
4''			3.18–3.75 (m)	71.4
5''			3.18–3.75 (m)	78.1
6''			3.18–3.75 (m)	62.7

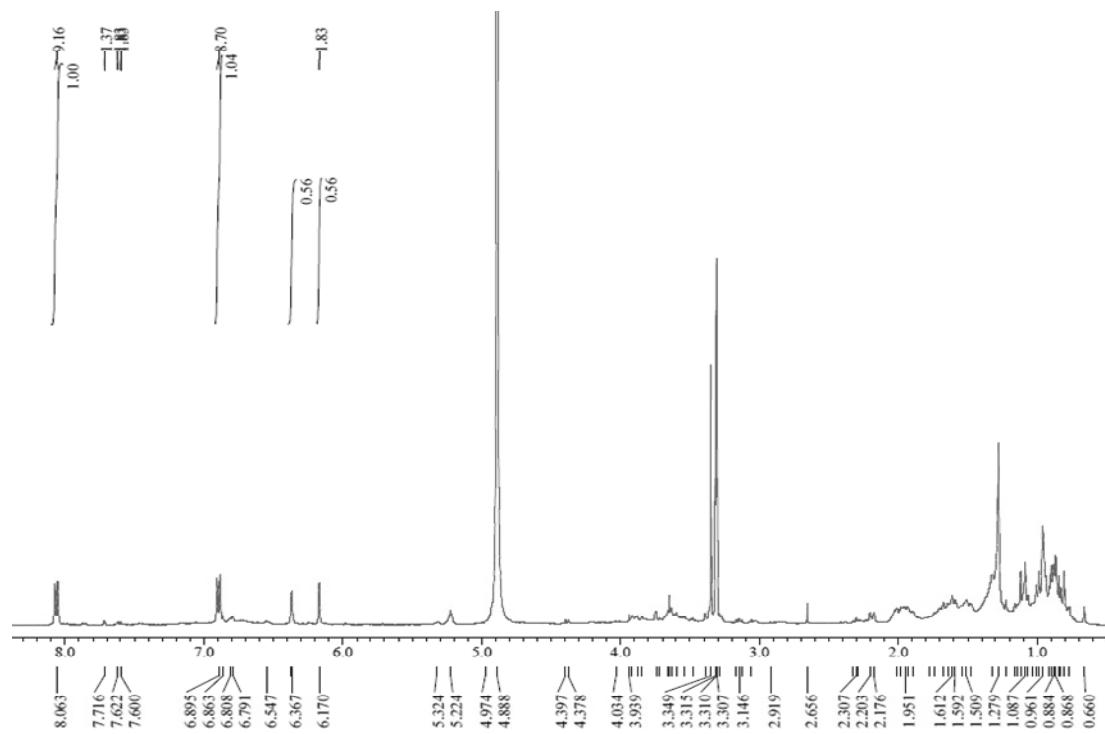


Figure 16. ^1H NMR spectrum of compound **4** (CD_3OD).

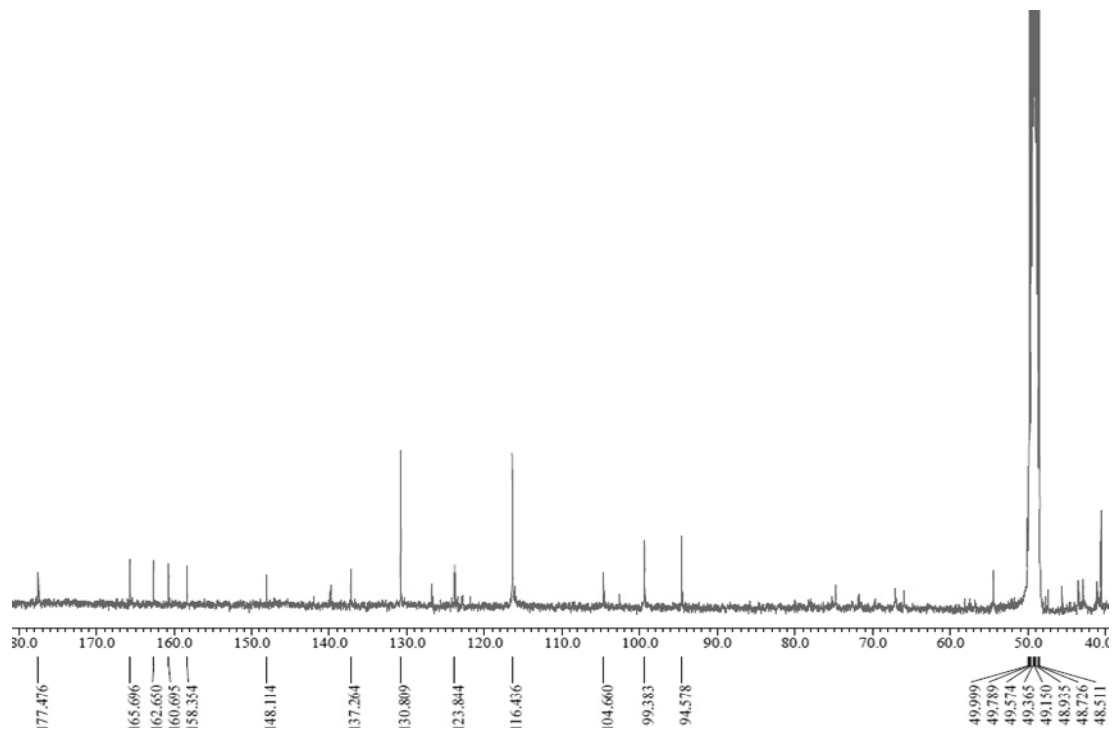


Figure 17. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** (CD_3OD).

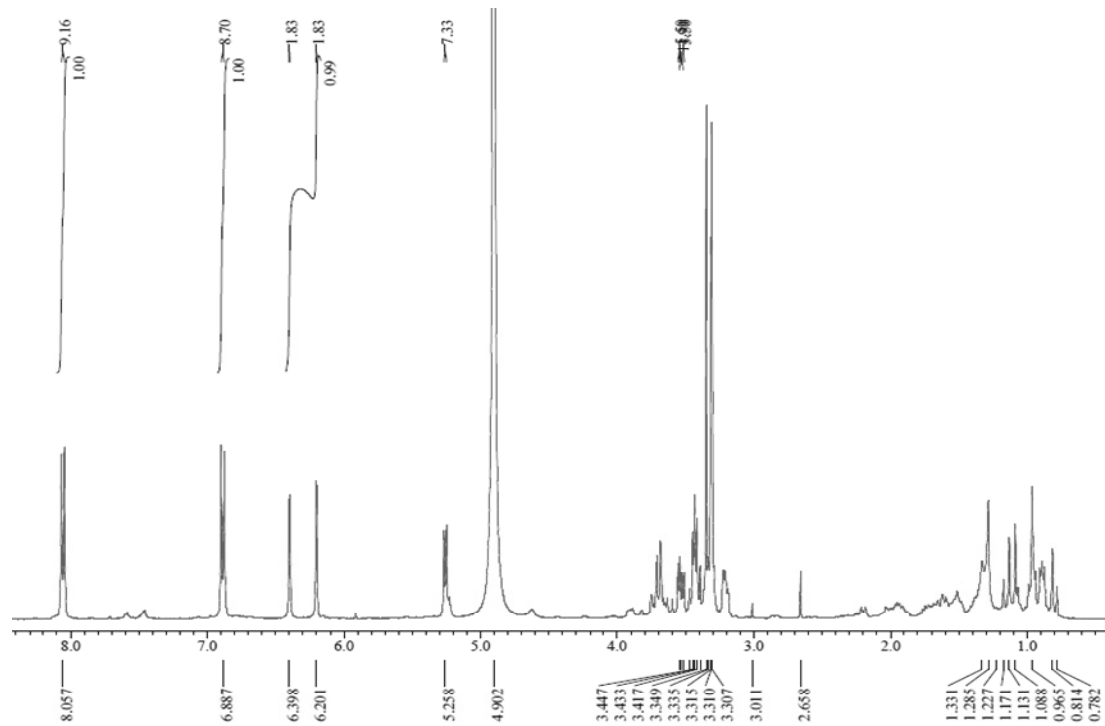


Figure 18. ^1H NMR spectrum of compound **5** (CD_3OD).

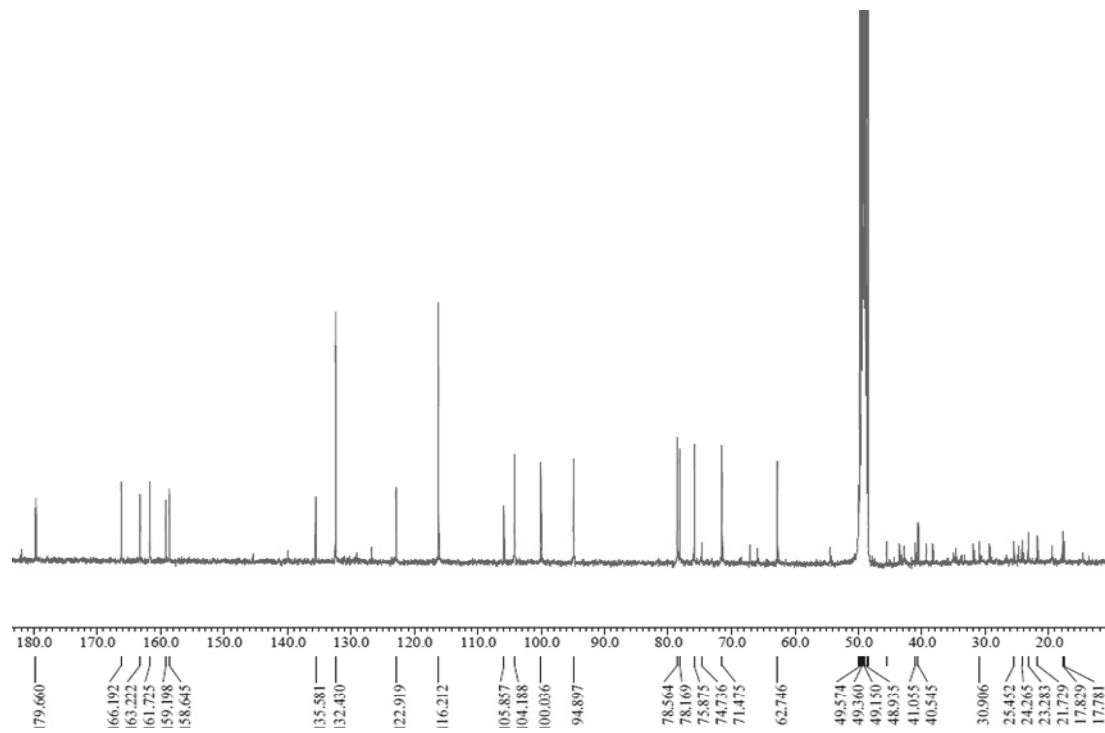


Figure 19. ^{13}C NMR spectrum of compound **5** (CD_3OD).

2. HPLC 분석 결과

올벚나무 잎 추출물, 분획물 및 분리한 화합물들의 주요 지표 성분을 확인하기 위해 HPLC를 통해 정성 및 정량을 분석하였다. HPLC 정성 분석 결과에서 EtOAc 분획물 피크의 머무름 시간 중 prunasin (2), astragal in (5), kaempferol (4)은 각각 13.2, 25.3, 35.5분대로 확인 되었다(Figure 20).

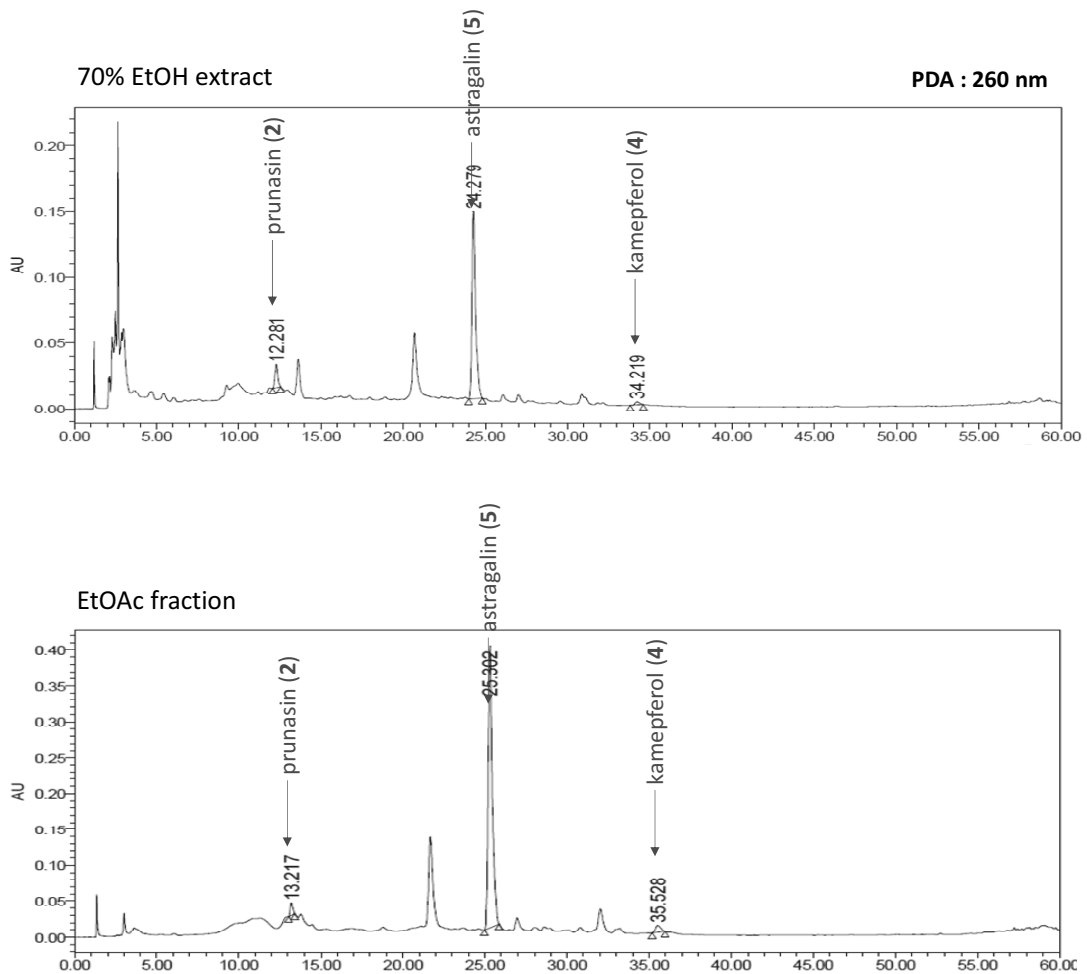


Figure 20. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract and EtOAc fractions.

HPLC 함량 분석 결과는 지표성분의 농도별로 농도(x축)와 피크의 면적비(y축)에 대한 검정곡선을 작성하였고, 회귀직선방정식에 대입하여 각각의 성분 함량을 산출하였다. 그 결과 올벚나무 잎의 추출물에서 prunasin (**2**), astragalin (**5**), kaempferol (**4**)이 각각 51.5, 5.9, 71.7 mg/g의 함량이 확인되었으며, *n*-Hex 분획물에서 kaempferol (**4**)이 6.7 mg/g의 함량이 확인되었다. EtOAc 분획물에서 prunasin (**2**), astragalin (**5**), kaempferol (**4**)이 각각 68.4, 11.0, 258.8 mg/g의 함량이 확인되었으며, *n*-BuOH 분획물에서 astragalin (**5**)이 39.0 mg/g의 함량이 확인되었다. 분석을 통해 추출물과 EtOAc 분획물에서 flavonoid 종류인 astragalin(**5**)의 함량이 다량 함유 되어 있음을 확인하였고, 항산화 및 항염이 우수할 것이라 예상하였다(Table 7).

Table 7. Contents of isolated compounds by HPLC.

	compound 2 (prunasin)	compound 4 (kaempferol)	compound 5 (astragalin)
70% EtOH extract	51.5	5.9	71.7
<i>n</i> -Hex fraction	-	6.7	-
EtOAc fraction	68.4	11.0	258.8
<i>n</i> -BuOH fraction	-	-	39.0
H ₂ O fraction	2.0	-	-

unit : mg/g

3. 올벚나무 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항산화 활성

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 표준용액 gallic acid의 표준검정곡선을 통해 올벚나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 중량을 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 측정하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물이 *n*-Hex, H₂O 분획물보다 많은 폴리페놀 (64.4, 80.9, 74.7 mg/g GAE)을 함유하고 있었다. 다른 항산화 활성 실험 결과 와도 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 21).

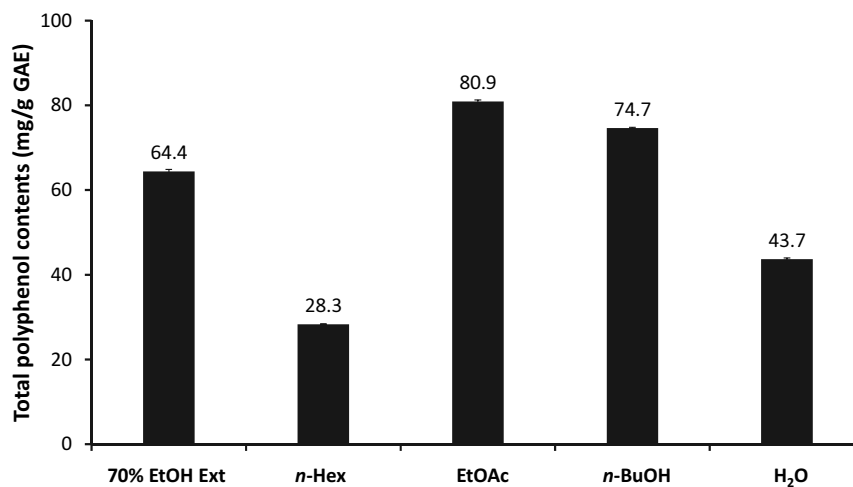


Figure 21. Total polyphenol contents of extract and solvent layers from *P. pendula* for. *ascendens* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 표준용액 quercetin의 표준검정곡선을 통해 올벚나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 중량을 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 측정하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, *n*-Hex 분획물 및 EtOAc 분획물에서 각각 250.5, 295.0, 278.7 mg/g QE로 *n*-BuOH 분획물과 H₂O 분획물보다 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 22).

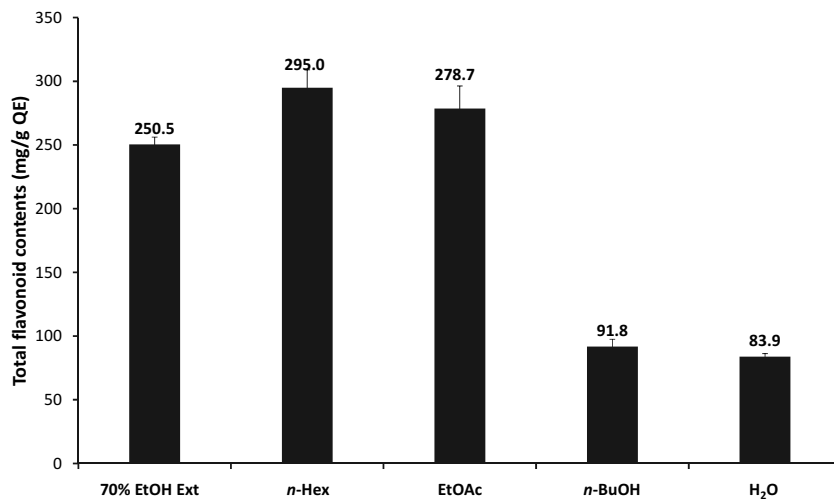


Figure 22. Total flavonoid contents of extract and solvent layers from *P. pendula* for. *ascendens* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

울벧나무 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 12.5-400 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 라디칼을 50% 소거하였을 때의 농도인 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물의 SC₅₀값이 각각 134.4, 129.5, 108.7, 137.8 µg/mL로, 대조군 BHT (SC₅₀: 261.0 µg/mL)와 비교하여 보았을 때 대조군보다 좋은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 23, Table 8).

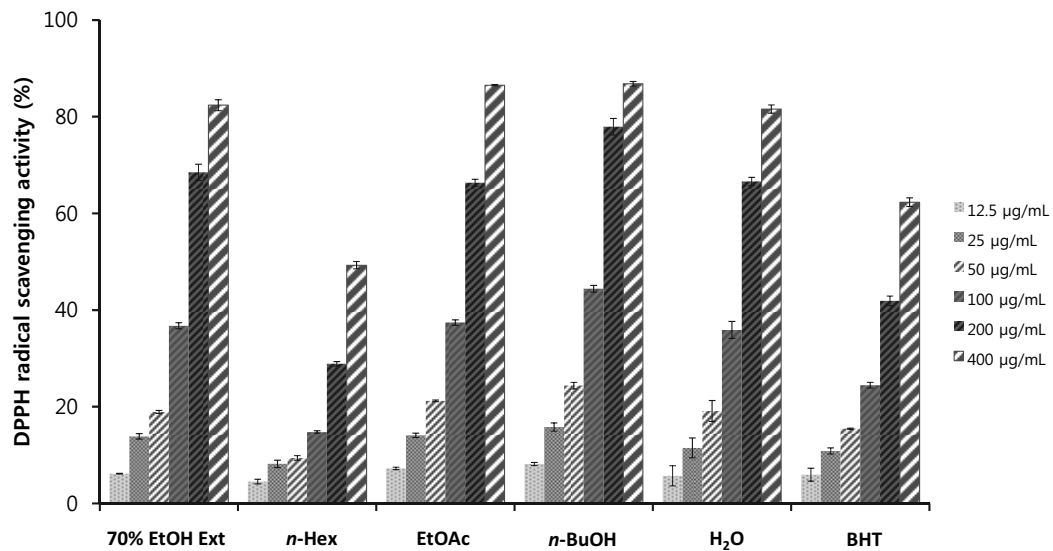


Figure 23. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *P. pendula* for. *ascendens* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 8. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *P. pendula* for. *ascendens* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	134.4	>400	129.5	108.7	137.8	261.0

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

울벧나무 잎 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 6.25-100 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많았던 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀값이 각각 27.2, 27.0 µg/mL로 radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 24, Table 9). 실험을 통해 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 free radical 소거 활성이 항산화 효능과의 상관관계가 있음을 예상할 수 있다.

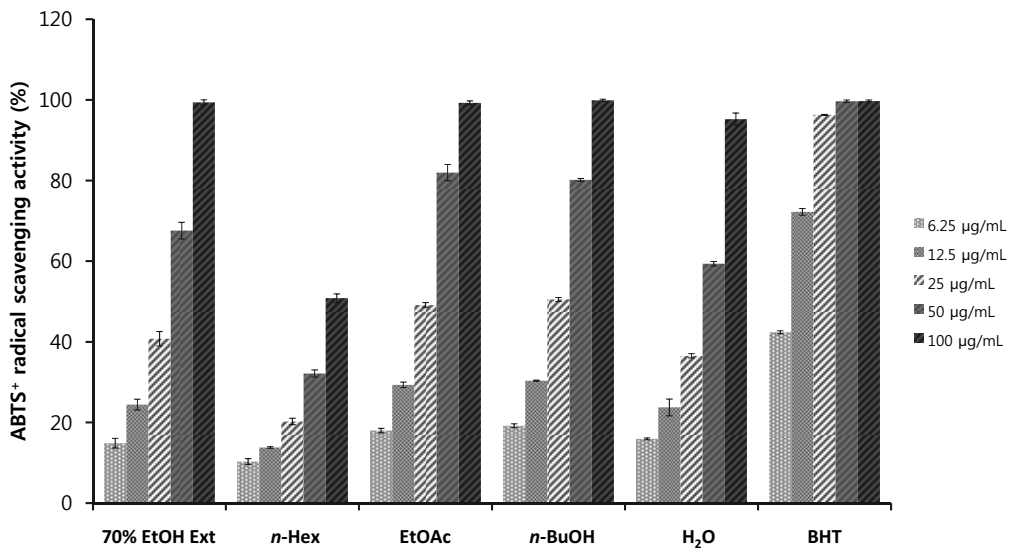


Figure 24. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from *P. pendula* for. *ascendens* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 9. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from *P. pendula* for. *ascendens* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	34.4	85.7	27.2	27.0	39.9	6.6

2) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

올벚나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 올벚나무 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대해 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 EtOAc 분획물에서 세포 독성 없이 약 76.3%의 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 추가적으로 EtOAc 분획물에 대해 6.25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 실험을 진행하였다. 그 결과, 올벚나무 잎 EtOAc 분획물이 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 감소하였으며, 50% 억제 되었을 때의 농도인 IC_{50} 값은 31.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Figure 25).

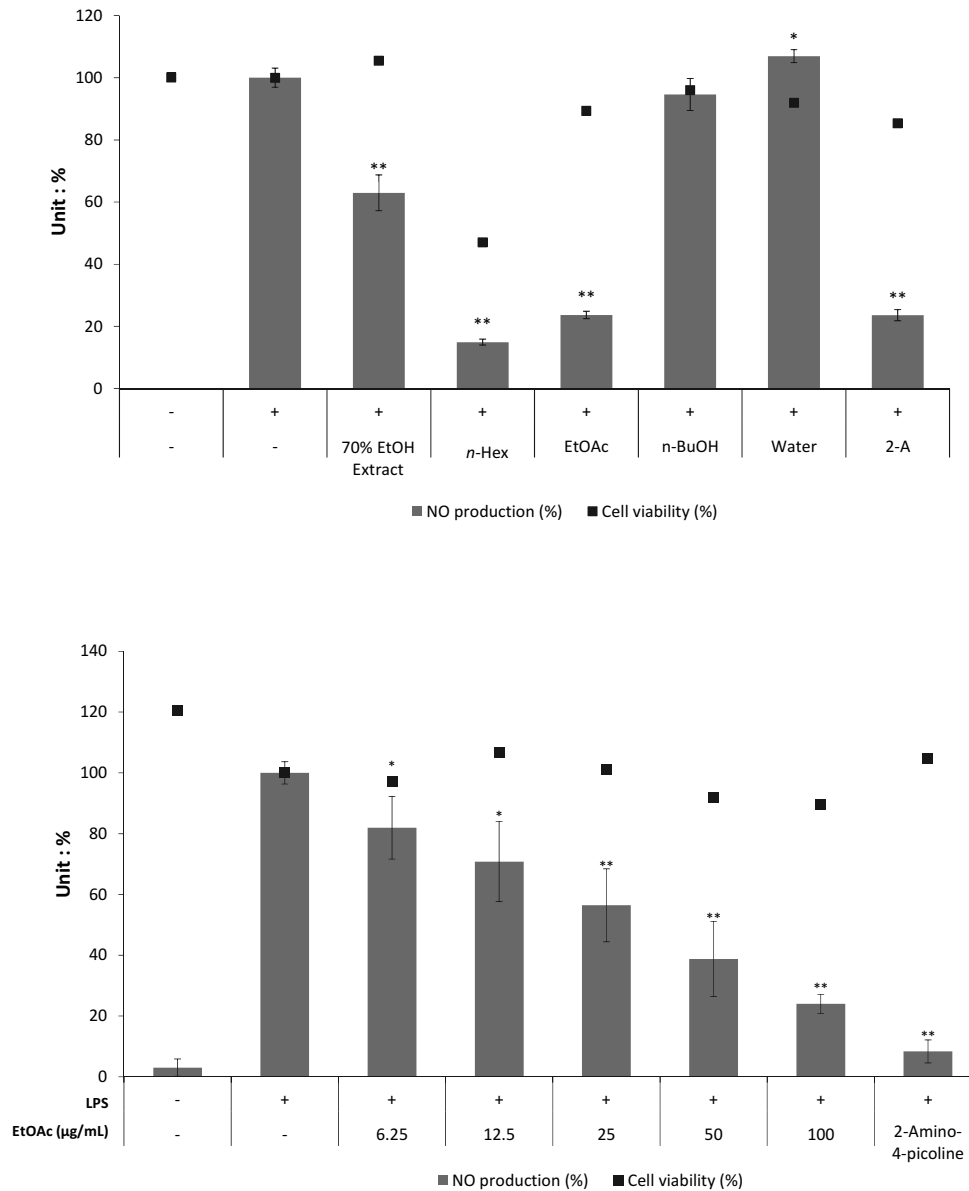


Figure 25. Effects of extract and solvent layers from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *P. pendula* for. *ascendens* leaves and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) PGE₂ 생성 억제 활성

올벚나무 잎 추출물과 분획물 중 항염 활성을 나타낸 EtOAc 분획물에 대해 농도별로 PGE₂ 생성억제 활성을 확인하기 위해 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 실험 결과, EtOAc 분획물에 대한 PGE₂의 생성이 농도 의존적으로 감소하였으며, IC₅₀ 값은 45.7 µg/mL로 확인되었다(Figure 26).

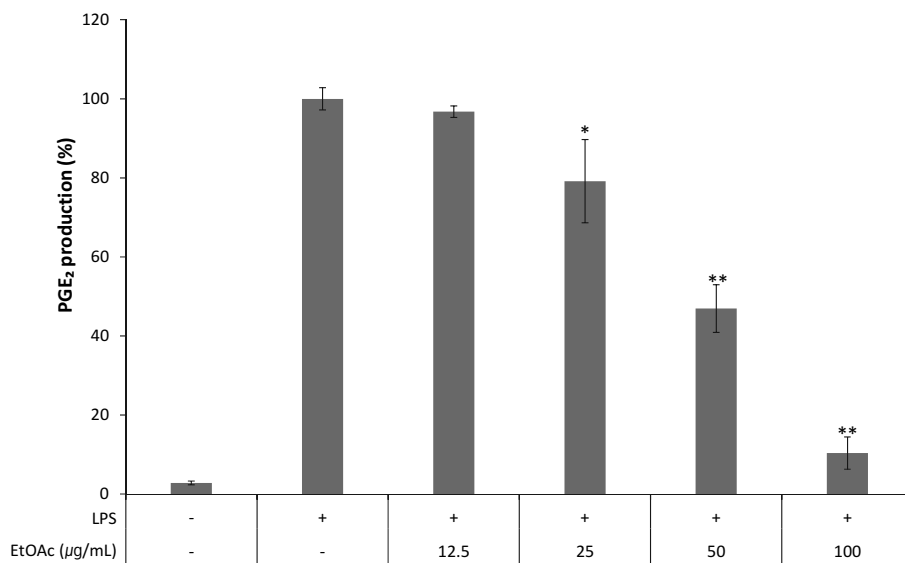


Figure 26. Effect of EtOAc fraction from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

(3) 전염증성 cytokine 생성 억제 활성

올벚나무 EtOAc 분획물에 대하여 전염증성 cytokine인 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 및 IL-6의 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit로 측정하였고, 실험은 12.5-100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였다. 그 결과 EtOAc 분획물은 TNF- α 의 생성을 억제하는데 영향을 미치지 않은 반면 IL-6 및 IL-1 β 의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. IL-6의 IC₅₀ 값은 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상이고, IL-1 β 의 IC₅₀ 값은 48.3 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Figure 27,28).

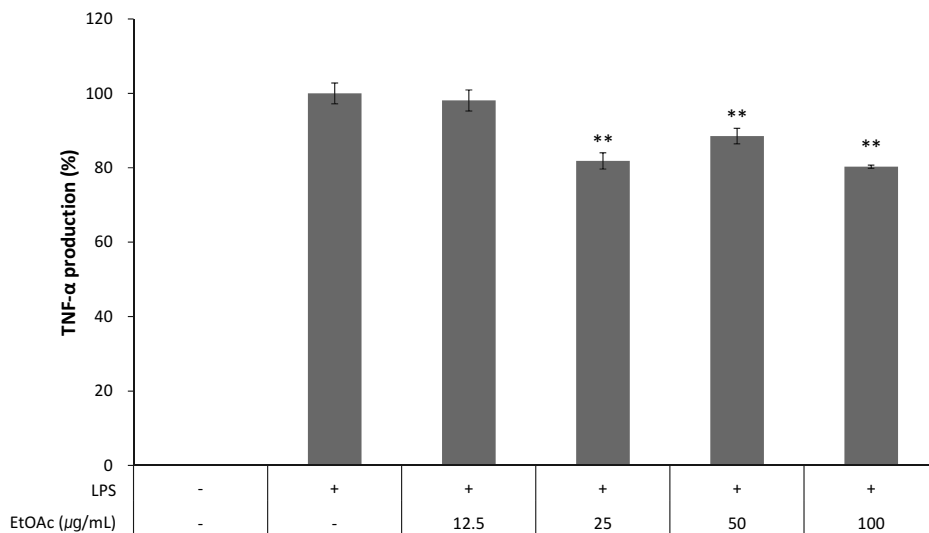


Figure 27. Effects of EtOAc fraction from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

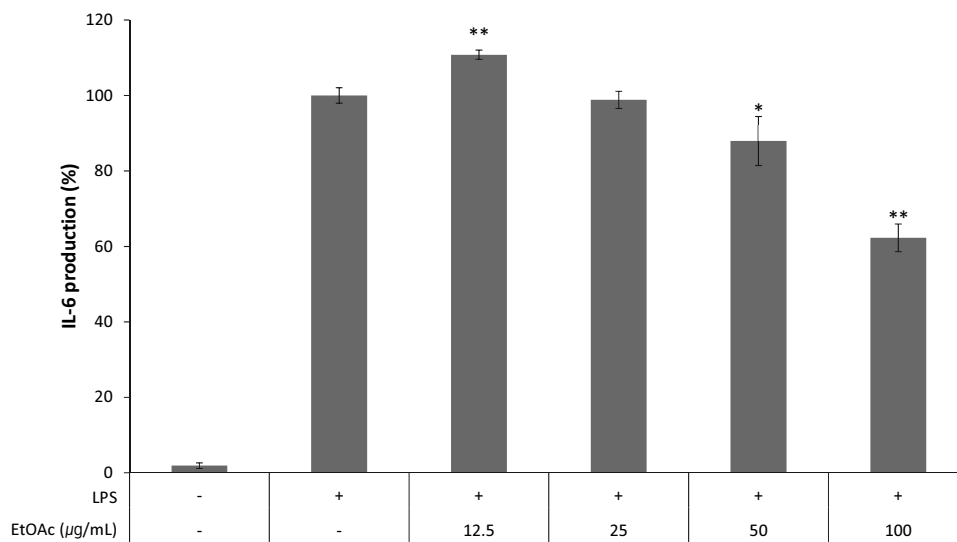
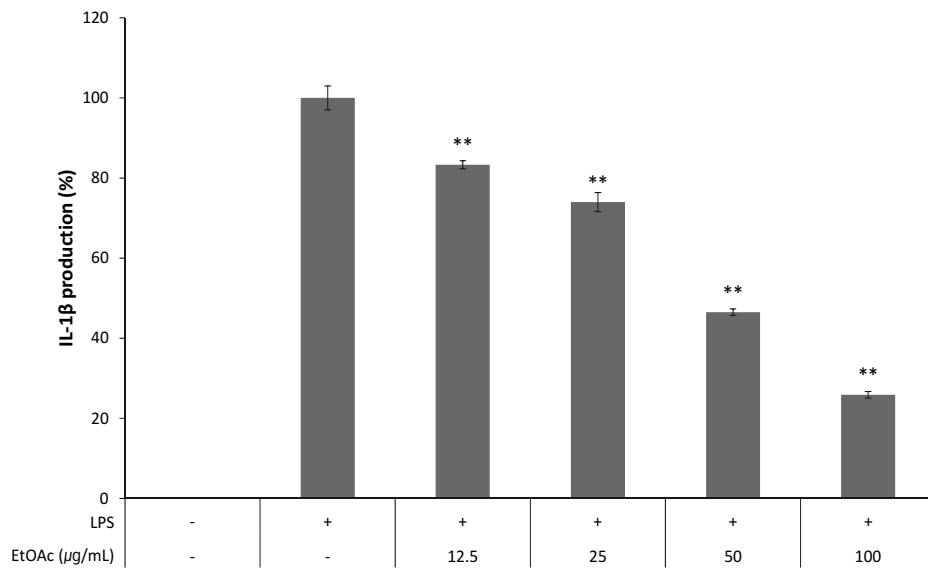


Figure 28. Effect of EtOAc fraction from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

(4) iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 활성

울벧나무 잎 EtOAc 분획물에 대하여 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 측정한 결과, iNOS 단백질의 발현은 NO 생성 억제되는 것과 같은 경향으로 iNOS 단백질의 발현이 저해되는 것을 확인할 수 있었으며, COX-2 단백질의 발현은 PGE₂ 생성 억제 기전에 영향을 미치는 것으로 COX-2 단백질의 발현이 저해되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 29).

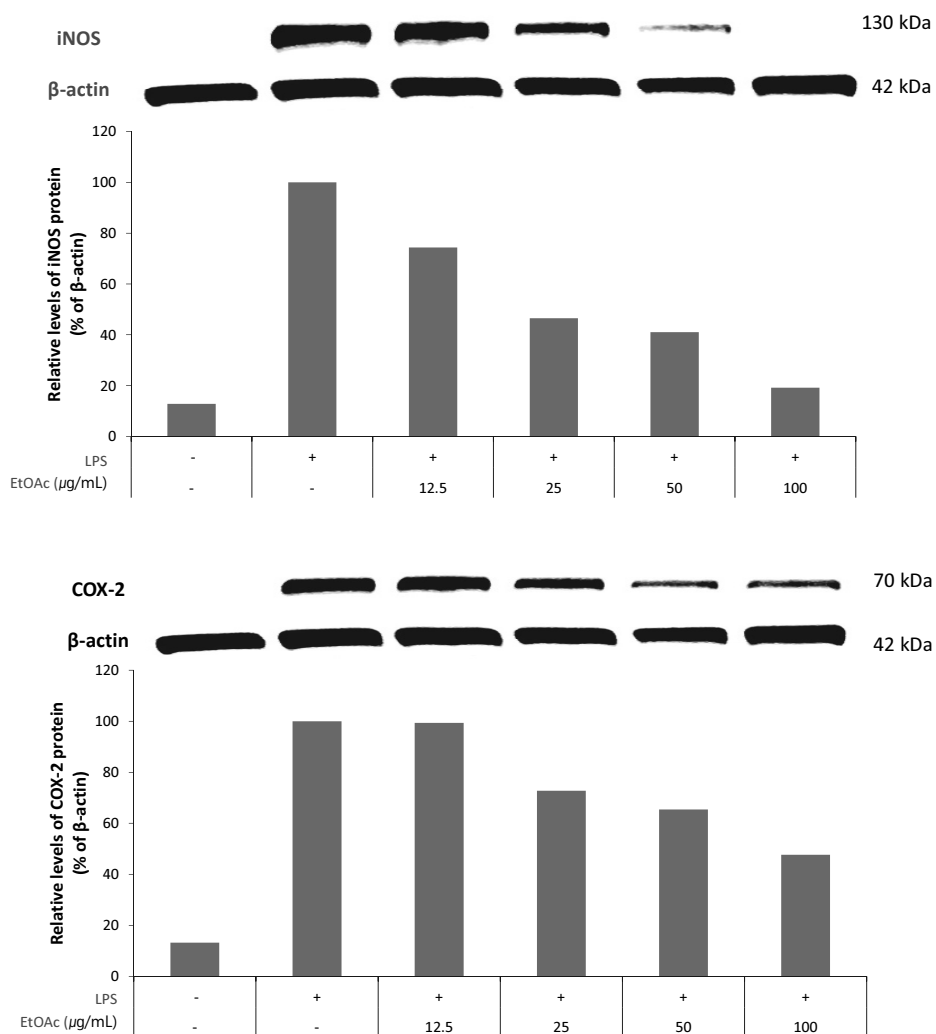


Figure 29. Effects of EtOAc fraction from *P. pendula* for. *ascendens* leaves on the levels of iNOS and COX-2 protein. The iNOS or COX-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin.

4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

올벚나무 잎 EtOAc 분획물로부터 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 25-400 μM 의 농도로 진행하였으며, SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과, compound **4**, **5**의 SC_{50} 값은 100.2, 255.3 μM 로 대조군인 BHT ($\text{SC}_{50} = 247.3 \mu\text{M}$)보다 좋은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Figure 30, Table 10).

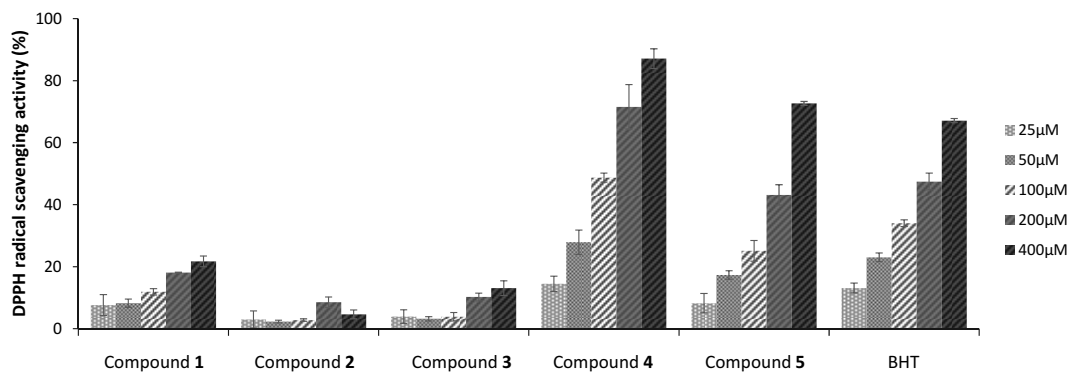


Figure 30. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds from *P. pendula* for. *ascendens* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 10. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds **1-5** from *P. pendula* for. *ascendens* leaves.

Compound No.	Compound name	SC ₅₀ (μM)
1	Ursolic acid	>400
2	Prunasin	>400
3	Methyl <i>p</i> -coumarate	>400
4	Kaempferol	100.2
5	Astragalin	255.3
Positive control	BHT	247.3

(2) ABTS⁺ radical 소거 활성

올벚나무 잎 EtOAc 분획물에서 분리된 화합물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 25-400 μM 의 농도로 진행하였으며, SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, compound **1**, **2**을 제외한 나머지 화합물들에서 농도 의존적으로 ABTS⁺ radical 소거 활성이 증가하였으며, compound **3**, **4**, **5**에서 SC₅₀값이 각각 158.4, 53.3, 180.3 μM 로 radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 31, Table 11).

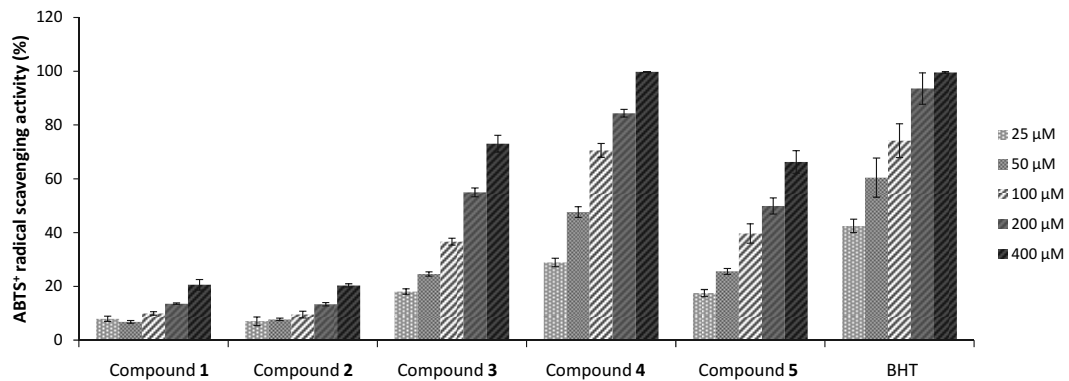


Figure 31. ABTS⁺ radical scavenging activities of isolated compounds from *P. pendula* for. *ascendens* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 11. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for isolated compounds **1-5** from *P. pendula* for. *ascendens* leaves.

Compound No.	Compound name	SC ₅₀ (μM)
1	Ursolic acid	>400
2	Prunasin	>400
3	Methyl <i>p</i> -coumarate	158.4
4	Kaempferol	53.3
5	Astragalin	180.3
Positive control	BHT	34.0

2) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

올벚나무 잎에서 분리된 화합물에 대하여 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 각 분리된 화합물 100 μ M 농도로 실험을 진행한 결과, compound 4, 5가 세포 독성 없이 약 47.5, 41.9% NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. Compound 4, 5의 경우 염증 매개자인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제한다는 연구^{26,27}가 보고되어 있어 추가적인 기전연구는 진행하지 않았다 (Figure 32).

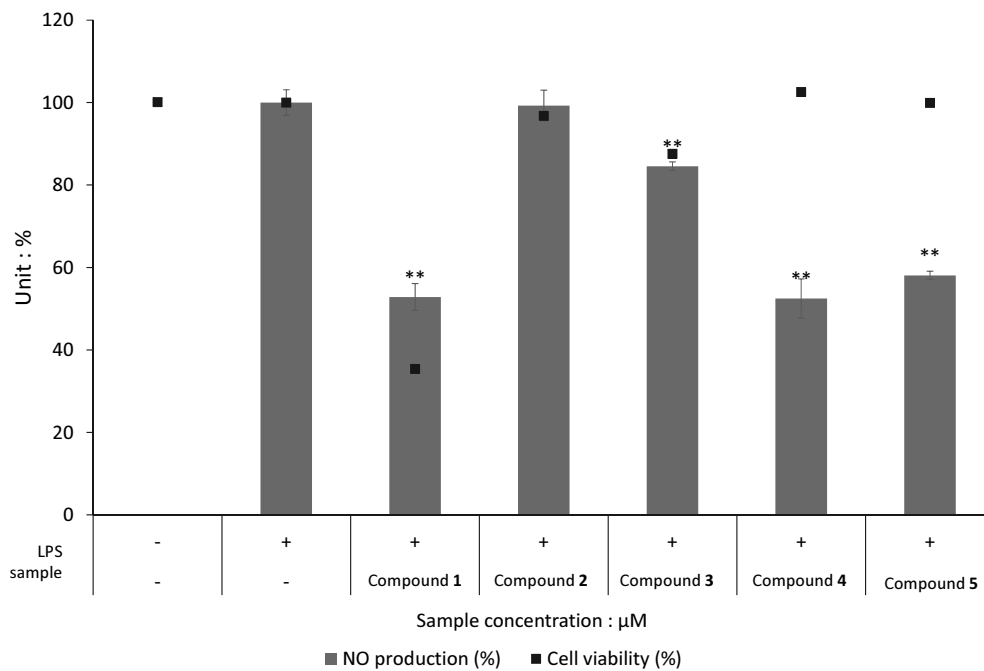


Figure 32. Effects of isolated compounds from *P. pendula* for *ascendens* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 μ g/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p <0.05; ** p <0.01

IV. 요약 및 결론

본 연구는 올벛나무(*Prunus pendula* for. *ascendens* (Makino) Ohwi) 잎 추출물과 용매 분획물에서 항산화 및 항염 활성을 검색하고, NMR 및 chromatography를 이용하여 유효성분을 분리·동정하였다. 분리된 화합물의 항산화 및 항염 활성을 확인하여 천연 소재로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

올벛나무 잎을 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었고, 추출물 및 용매 분획물의 항산화, 항염 활성 실험을 진행하였다. 항산화 활성 실험은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성을 진행하였고, 항산화 활성 실험 결과 추출물과 EtOAc에서 대조군만큼 좋은 활성을 나타내었다.

마우스 대식세포인 RAW264.7 cell을 이용하여 항염 활성 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물이 100 µg/mL 이하의 농도에서 세포 독성 없이 NO의 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었고, Western blot을 통해 올벛나무 잎 EtOAc 분획물은 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. PGE₂ 및 전염증성 cytokine (IL-1β 및 IL-6)의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였으며, PGE₂ 생성 억제 기전에 영향을 미치는 COX-2의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

이를 바탕으로 항산화 및 항염 활성이 우수한 올벛나무 잎의 EtOAc 분획물에 대해 vacuum liquid chromatography (VLC) 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 화합물을 분리하고, NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였으며 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리한 화합물은 ursolic acid (1), prunasin (2), methyl *p*-coumarate (3), kaempferol (4) 및 astragalol (5)로 확인되었으며, 이들은 모두 올벛나무 잎에서 처음으로 분리된 화합물이다. 분리된 화합물 중 비교적 과량으로 존재하는 prunasin (2), kaempferol (4) 및 astragalol (5)에 대한 함량을 확인하기 위하

여 HPLC 정량 분석을 수행한 결과, 70% EtOH 추출물에서 51.5, 5.9, 71.7 mg/g 함유하고 있었으며, EtOAc 분획물에서 68.4, 11.0, 258.8 mg/g으로 astragalin (5)에서 가장 많은 함유량을 나타냈다. 각 화합물의 함량 분석 결과가 활성실험 결과에 어떤 관련이 있는지 알아보기 위하여 compounds 1-5에 대한 항산화 및 항염 활성 실험을 진행하였다. 항산화 활성 실험 결과, DPPH 라디칼 소거활성에서는 kaempferol (4), astragalin (5)은 대조군보다 좋은 활성을 나타냈으며, ABTS⁺ 라디칼 소거활성은 methyl *p*-coumarate (3), kaempferol (4) 및 astragalin (5)에서 radical 소거 활성이 있음을 확인하였다. Kaempferol (4)과 astragalin (5)을 비교하였을 때, DPPH와 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성에서 차이가 나는 이유는 당의 영향인 것으로 문헌¹⁴을 통해 확인할 수 있었다.

항염 활성 실험 결과, kaempferol (4)과 astragalin (5)이 100 μ M 농도에서 세포독성 없이 NO의 생성을 억제시키는 효과를 나타내었고, 염증 매개인자인 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 억제한다는 연구가 보고^{26,27}되어 있다. 따라서 올벚나무 잎 EtOAc 분획물의 항염 활성에는 kaempferol (4)과 astragalin (5)이 관여하는 것으로 판단된다.

HPLC 정량 분석 결과와 비교하여 볼 때, EtOAc 분획물에서 astragalin (5)이 가장 높은 함량을 나타내었고, 기존의 연구를 통해 항산화²⁸, 항염²⁹ 활성이 보고되어있는 이 화합물로 인해 EtOAc 분획물이 다른 분획물에 비해 좋은 항산화, 항염 활성을 나타내는 것으로 예상할 수 있다.

최근에는 벚나무 꽃의 차 개발을 위하여 항산화 및 항염증 효과, 성분 분석 등에 관한 실험을 진행하여 벚나무가 우수한 자원이 될 수 있다는 보고³⁰가 있고, 벚나무의 심재 추출물에는 활성이 우수한 항산화 물질이 포함되어 있다는 연구 결과³¹가 보고되어 있다. 본 연구 결과를 바탕으로 올벚나무 잎도 항산화 및 항염 효과를 갖는 천연 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. 정수복, 화장품 원료로서 퍼플콘 껍질 추출물의 항산화 활성에 관한 연구, *신라대학교* **2018**, 석사학위논문.
2. Lim, D. Y., Volatile Compounds Analysis of the Extract from Dried Bark of *Prunus sargentii* and Physiological Activity of the Main Compound, Benzaldehyde. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **2014**, 12(2), 155-162.
3. 전명옥, 잣나무 잎 추출물의 항산화 효과와 세포 생리 활성에 미치는 영향, *건국대학교* **2017**, 박사학위논문.
4. 이남호, 천연물화학, *신일서적(주)*, **2014**, 1, 1-7
5. 김정원, 캠페롤과 그 배당체의 항산화 활성, 항염 및 멜라닌 생성억제 효과에 대한 연구, *건국대학교* **2014**, 박사학위논문.
6. 고하나, 윤노리나무 가지 및 제주 흑무 추출로부터 기능성 화장품 소재 개발 연구, *제주대학교* **2018**, 박사학위논문.
7. Cho, Y. J.; Ju, I. S.; Kim, B. C.; Lee, W. S.; Kim, M. J.; Lee, B. G.; An, B. J.; Kim, J. H.; Kwon, O. J.; Biological Activity of *Omija* (*Schizandra chinensis* Baillon) Extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **2007**, 50(3), 198-203.
8. Thayer, D. W.; Boyd, G.; Kim, A.; Fox, J. B.; and Farrell, H. M.; Fate of Gamma-Irradiated *Listeria monocytogenes* during Refrigerated Storage on Raw or Cooked Turkey Breast Meat. *J. Food Prot.*, **1998**, 61(8), 979-987.

9. 이만, 삼칠화(三七花)추출물의 항산화 및 항염 효능 탐색, *서경대학교* **2018**, 석사학위논문.
10. Kim, M. J.; Kim, K. B. W. R.; Park, S. H.; Choi, J. S.; Ahn, D. H.; Anti-inflammatory Effect of *Chondria crassicaulis* Ethanol Extract on MAPKs and NF- κ B Signaling Pathway in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, **2017**, 32(4), 352-360.
11. Baek, S.; Choi, J. H.; Ko, S. H.; Lee, Y. J.; Cha, D. S.; Park, E. Y.; Kang, Y. G.; Jeon, H.; Antioxidant and Anti-inflammatory Effect of *Nardostachys chinensis* in IFN- γ /LPS-stimulated Peritoneal Macrophage. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **2009**, 23(4), 853-859.
12. Kim, M. J.; Kim, K. B. W. R.; Park, S. H.; Choi, J. S.; Ahn, D. H.; Inhibitory Activity of *Sargassum hemiphyllum* Ethanol Extract on Inflammatory Response in LPS-induced RAW 264.7 Cells and Mouse Model. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, **2017**, 32(4), 319-327.
13. 이창복, 『대한식물도감(大韓植物圖鑑)』, 향문사, **1982**.
14. 정현아, 뱀나무 잎의 항산화 활성성분, *부경대학교* **2003**, 박사학위논문.
15. Park, J. M.; Lee, J. Y.; Park, T. S.; Hyun, S. J.; Kim, H. H.; Cho, Y. J.; Kwon, O. J.; Son, A. R.; Kim, D. S.; An, B. J.; A Study on the Cosmeceutical activities of *Prunus Sargentii* R. *J. Korean Soc., Appl. Biol. Chem.*, **2008**, 51(1), 70-78.
16. Jung, H. A.; Kim, A. R.; Chung, H. Y.; Choi, J. S.; *In Vitro* Antioxidant Activity of Some Selected *Prunus* Species in Korea. *Arch Pharm Res.*, **2002**, 25(6), 865-872.

17. Gutfinger, T. Polyphenols in Olive Oils. *J Am Oil Chem Soc.*, **1981**, *58*, 966-968.
18. 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.
19. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.
20. 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.
21. 김정은, 섬오갈피 열매, 참꽃나무 잎, 당근 지상부 및 구멍갈파래 추출물의 항염, 항균 활성 성분 연구, *제주대학교* **2016**, 박사학위논문.
22. Keita, S.; Shigeo, M.; Takashi, O.; Hiroki, T.; Motoyasu, O.; Osamu, S.; Masanori, K.; Suppressive Effect of Constituents Isolated from Kernel of *prunus armeniaca* on 5 α -Androst-16-en-3-one Generated by Microbial Metabolism. *J. Oleo Sci.*, **2006**, *55*(7), 353-364
23. Galland, S.; Mora, N.; Abert-vian, M.; Rakotomanomana, N.; Dangles, O.; Chemical Synthesis of Hydroxycinnamic acid glucosides and Evaluation of Their Ability To Stabilize Natural Colors via Anthocyanin Copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 7573-7579.
24. Kim, S. J.; Park, J.H.; Choi, S.Y.; Son, K. H.; Kim, K. U.; Isolated and Identification of Biological Activity Compounds from Leaves and Stem of *Peaonia lactiflora* Pallas. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **2007**, *15*(1), 6-11.

25. 문미연, 개가시나무, 산딸나무 및 벚꽃은잎의 활성성분 규명, *제주대학교 석사학위논문*, **2008**.
26. Liang, Y. C.; Huang, Y. T.; Tsai, S. H.; Lin-Shiau, S. Y.; Chen, C. F.; Lin, J. K.; Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, **1999**, *20*(10), 1945-1952.
27. Kim, M. S.; Kim, S. H.; Inhibitory Effect of Astragalin on Expression of Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Mediators through NF- κ B in Macrophages. *Arch Pharm Res.*, **2011**, *34*(12), 2101-2107.
28. Yi, J.; Wu, J. G.; Wu, Y. B.; Peng, W.; Antioxidant and Anti-proliferative Activities of Flavonoids from *Bidens pilosa* L var *radiata* Sch Bip. *Trop J Pharm Res.*, **2016**, *15*(2), 341-348.
29. Lee, H. B.; Kim, E. K.; Park, S. J.; Bang, S. G.; Kim, T. G.; Chung, D. W.; Isolation and anti-inflammatory effect of astragalin synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. *J. sci Food Agric.*, **2011**, *91*, 2315-2321.
30. Kim, H. J.; Heo, B. K.; Baek, S. H.; Park, Y. S.; Park, Y. J.; Effects of the tea manufacture method on mineral contents and sensory evaluation in flower and young leaf of *Prunus serrulata* lindl. var. *spontanea* Max. *People, Plants and Environment*, **2006**, *9*, 26-33.
31. Lee, S. S.; Lee, H. J.; Choi, D. H.; Studies on Biological Activity of Wood Extractives(VII). *Mokchae Konghak*, **2001**, *29*(2), 140-145.