



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

소사나무 잎의 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성 성분 연구



濟州大學校 大學院

化 學 科

姜 芝 美

2015年 2月

소사나무 잎의 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

姜 芝 美

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



姜芝美의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (인)

委 員 _____ (인)

委 員 _____ (인)

濟州大學校 大學院

2015年 2月

Identification of Anti-oxidative,
Skin Whitening, Anti-inflammatory and
Anti-bacterial Constituents from the Leaves
of *Carpinus turczaninowii* Hance

Ji Mi Kang

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2015. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	iv
List of Tables	iv
List of Figures	v
List of Abbreviations	vii
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 시약 및 기기	5
2. 재료	6
3. 추출, 분획 및 분리	7
3-1. 소사나무 잎의 추출 및 분획	7
3-2. Ethyl acetate layer의 활성 성분 분리	8
3-2-1. Compound 1, compound 2의 분리 과정	8
3-2-2. Compound 3, compound 4의 분리 과정	9
4. 활성 실험	10
4-1. 항산화 활성 실험	10
4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정 실험	10
4-1-2. DPPH radical 소거 활성 실험	10
4-1-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험	11
4-1-4. Superoxide radical anion 소거 활성 실험	12
4-2. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험	12
4-2-1. 세포배양	12
4-2-2. Melanogenesis 저해 효과 측정 실험	13
4-2-3. 세포독성 평가 실험	13
4-3. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험	14
4-3-1. 세포배양	14

4-3-2. Nitric oxide 생성 억제 평가	14
4-3-3. 세포독성 평가 실험	15
4-4. 항균 활성 실험	16
4-4-1. Paper disc diffusion test	16
4-4-2. Minimum inhibitory concentration test	16
4-4-3. Minimum bactericidal concentration test	16
III. 결과 및 고찰	17
1. 화합물의 구조 결정	17
1-1. Compound 1의 구조해석	17
1-2. Compound 2와 compound 3의 구조해석	20
1-3. Compound 4의 구조해석	25
2. 항산화 활성 실험 결과	31
2-1. 총 폴리페놀 함량 측정	31
2-2. DPPH radical 소거 활성	33
2-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성	33
2-3. ABTS radical cation 소거 활성	35
2-3-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성	35
2-4. Superoxide radical anion 소거 활성	37
2-4-1. 추출물 및 분획물의 superoxide radical anion 소거 활성	37
3. 미백 활성 실험 결과	39
3-1. B16F10 murine melanoma cell에서의 melanin contents 측정 및 세포 독성 평가	39
3-1-1. 추출물 및 분획물의 melanin contents 측정 및 세포독성 평가	39
3-2-2. 분리된 화합물의 melanin contents 측정 및 세포독성 평가	40
3-2. B16F10 melanoma cell에서 intracellular tyrosinase 측정	42
3-2-1. 추출물 및 분획물의 intracellular tyrosinase 측정	42
3-2-2. 분리된 화합물의 intracellular tyrosinase 측정	43
4. 항염 활성 실험 결과	44

4-1. RAW 264.7 cell에서의 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포독성 평가	44
5. 항균 활성 실험 결과	46
5-1. 추출물 및 분획물의 paper disc diffusion assay에 의한 항균 활성 측정	46
5-2. 추출물 및 분획물의 minimum inhibitory concentration 및 minimum bactericidal concentration 측정	47
6. 결론	48
7. 참고문헌	50



List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and solvent layers from the leaves of <i>C. turczaninowii</i>	7
Scheme 2. Procedure of isolation of compounds 1 and 2	8
Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 3 and 4	9

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound 1	18
Table 2. ^1H and ^{13}C -NMR data of compounds 2 and 3	21
Table 3. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound 4	26
Table 4. Paper disc diffusion of extract and solvent layers from the leaves of <i>C. turczaninowii</i>	46
Table 5. Antibacterial activity of extract and solvent layers from the leaves of <i>C. turczaninowii</i>	47

List of Figures

Figure 1. Chemical structures of anti-oxidants	2
Figure 2. Picture of <i>Carpinus turczaninowii</i>	6
Figure 3. Chemical structure of compound 1	18
Figure 4. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	19
Figure 5. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	19
Figure 6. Chemical structure of compound 2	22
Figure 7. Chemical structure of compound 3	22
Figure 8. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	23
Figure 9. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	23
Figure 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	24
Figure 11. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	24
Figure 12. Chemical structure of compound 4	27
Figure 13. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	28
Figure 14. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	28
Figure 15. DEPT-135 spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	29
Figure 16. COSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	29
Figure 17. HMQC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	30
Figure 18. HMBC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	30
Figure 19. Calibration curve for quantification of total polyphenolic compounds	32
Figure 20. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers ..	32
Figure 21. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers	34
Figure 22. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers	34
Figure 23. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers	36
Figure 24. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract	

and solvent layers	36
Figure 25. Superoxide anion scavenging activities of extract and solvent layers	38
Figure 26. SC ₅₀ values of Superoxide anion scavenging activities of extract and solvent layers	38
Figure 27. Effect of extract and solvent layers on melanin contents and cytotoxicities	39
Figure 28. Effect of ethyl acetate layer on melanin contents and cytotoxicities	40
Figure 29. Effect of compounds on melanin contents and cytotoxicities..	41
Figure 30. Effect of compound 1 and 4 on melanin contents and cytotoxicities	41
Figure 31. Intracellular tyrosinase inhibition of extract and solvent layers..	41
Figure 32. Intracellular tyrosinase inhibition of ethyl acetate layer	42
Figure 33. Intracellular tyrosinase inhibition of compounds	43
Figure 34. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract and solvent layers	44
Figure 35. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of ethyl acetate layer	45

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<i>C. turczaninowii</i>	<i>Carpinus turczaninowii</i>
CC	Column chromatography
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CHCl ₃	Chloroform
COSY	Correlation spectroscopy
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalents
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
int	Integration
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LDH	Lactate dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MSH	Melanocyte stimulating hormone
MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
NBT	Nitroblue tetrazolium
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
s	Singlet
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50 %
TLC	Thin layer chromatography
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
Vit. C	Vitamin C
XO	Xanthine oxidase
δ	Chemical shift

Abstract

Identification of Anti-oxidative, Skin Whitening, Anti-inflammatory and Anti-bacterial Constituents from the Leaves of *Carpinus turczaninowii* Hance

Ji Mi Kang

Department of Chemistry, Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

Carpinus turczaninowii Hance, a deciduous shrub growing in Jeju island, was investigated for anti-oxidative, skin whitening, anti-inflammatory and anti-bacterial activities. The dried *C. turczaninowii* leaves was extracted for 24 hours with 70 % ethanol. The obtained extract was successively partitioned into *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) and water (H₂O) layers. For the anti-oxidation tests, the ethanol extract, EtOAc and *n*-BuOH layers showed good DPPH, ABTS⁺ radical and superoxide radical anion scavenging activities. The total phenolic contents for the extract and solvent layers (*n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O) were estimated as 279.3, 92.3, 447.3, 224.3 and 139.3 μg (GAE/1 mg) respectively. Moreover, when tested in B16F10 melanoma cells, EtOAc layer showed the good cellular melanogenesis inhibitory activity. In anti-inflammatory screenings, EtOAc layer showed the good nitric oxide production inhibitory activity in LPS-induced RAW 264.7 cell. Also on the screening of anti-bacterial activities, the extract and EtOAc layer showed the considerable inhibition for *Staphylococcus epidermidis*.

Therefore, further phytochemical studies were conducted for the ethyl

acetate layer, which led to isolation of four constituents such as ethyl gallate (1), quercitrin (2), afzelin (3), quercitrin-2''-O-gallate (4). As far as we know, all of the compounds except ethyl gallate (1), quercitrin-2''-O-gallate (4) were isolated for the first time from this plant.

On screening of skin whitening activities, the compounds 1 and 4 showed considerable inhibition on the production of melanin contents for the B16F10 melanoma cell without showing cell toxicities.

Based on these results, it is suggested that *C. turczaninowii* leaves extract could be potentially applicable in the cosmetical and/or pharmaceutical industries, especially as anti-oxidant, skin whitening, anti-inflammatory and anti-bacterial ingredient.



I. 서론

1) 항산화

최근 생활 환경의 개선과 현대 의학의 발달에 의해 인간의 수명이 매우 연장됨에 따라 노화에 대한 관심이 높아지고, 이와 함께 많은 노화 관련 연구가 진행되고 있지만 노화 현상은 매우 복잡하여 한 일 기전으로 설명하기는 어렵다. 그러나 그 중에서 현재까지 노화 연구 분야에서 가장 주목을 받고 있는 것은 free radical theory이다. free radical theory에 따르면 생물은 나이에 따라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 손상이 증가하는데, 이들 ROS는 생체가 외부로부터의 방사선, 자외선 등의 노출, 대기오염 물질, 항생제의 남용과 더불어 체내의 생화학 반응에 의해 생성되며, 여러 문제를 야기한다고 알려져 있다.^{1), 2)}

인체는 약 60조개의 세포들로 이루어져 있다. 이 세포들 안의 미토콘드리아에서 산소와 영양물질을 이용해서 에너지를 만드는 대사과정에서 오차가 발생하면서 약1~2% 정도가 활성산소로 변하게 된다. 이 활성산소들은 너무나 불안정하여 그 종류에 따라 수십만 분의 일초 내지는 백만분의 일초 정도의 짧은 시간 밖에 존재하지 않지만 자신들의 안정을 위하여 주위의 물질들 즉, 단백질, 지질, 혈액, 근육, 뼈 등으로부터 닥치는 대로 전자를 빼앗아 산화시키므로 우리들 인체에 막대한 피해를 준다. 이처럼 활성산소는 생성과 소멸을 반복하면서 많은 질병을 유발시키고 노화도 촉진시키고 있다.³⁾

피부에는 활성산소종으로 유도되는 산화적 스트레스에 대항하기 위하여 항산화 방어망이 구축되어 있다. 효소적 항산화제인 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase(GSHPx) 등은 $O_2^{\cdot-}$ 및 H_2O_2 (또는 과산화물)와 같은 활성산소를 처리하며, 비효소적 항산화제인 비타민 E, 비타민 C, 카로티노이드 및 플라보노이드 등은 ROS를 제거하는데 기여한다.

1O_2 및 $\cdot OH$ 은 반응성이 매우 큰 활성산소로 생체 내에 이들 활성산소를 처리할 수 있는 항산화 효소가 없기 때문에 상기의 비효소적 항산화제들은 1O_2 및 $\cdot OH$ 를 제거하는데 매우 효율적인 항산화제들이며 피부노화 억제에서도 매우 중요하다. 따라서 피부 항산화 방어망을 튼튼하게 구축함으로써 피부 노화

를 지연시키기 위해서는 외부로부터 추가적인 항산화제의 보충이 이루어져야 한다.⁴⁾

항산화제는 주로 합성 항산화제와 천연 항산화제로 구분하며, 현재 널리 쓰이는 합성 항산화제는 대표적으로 BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole), PG (propyl gallate), TBHQ (tertiary butyl-hydroquinone) 등이 있고, 천연 항산화제로는 대표적으로 α -tocopherol과 flavonoids, carotenoids, ascorbic acid 등이 있다(Figure 1).

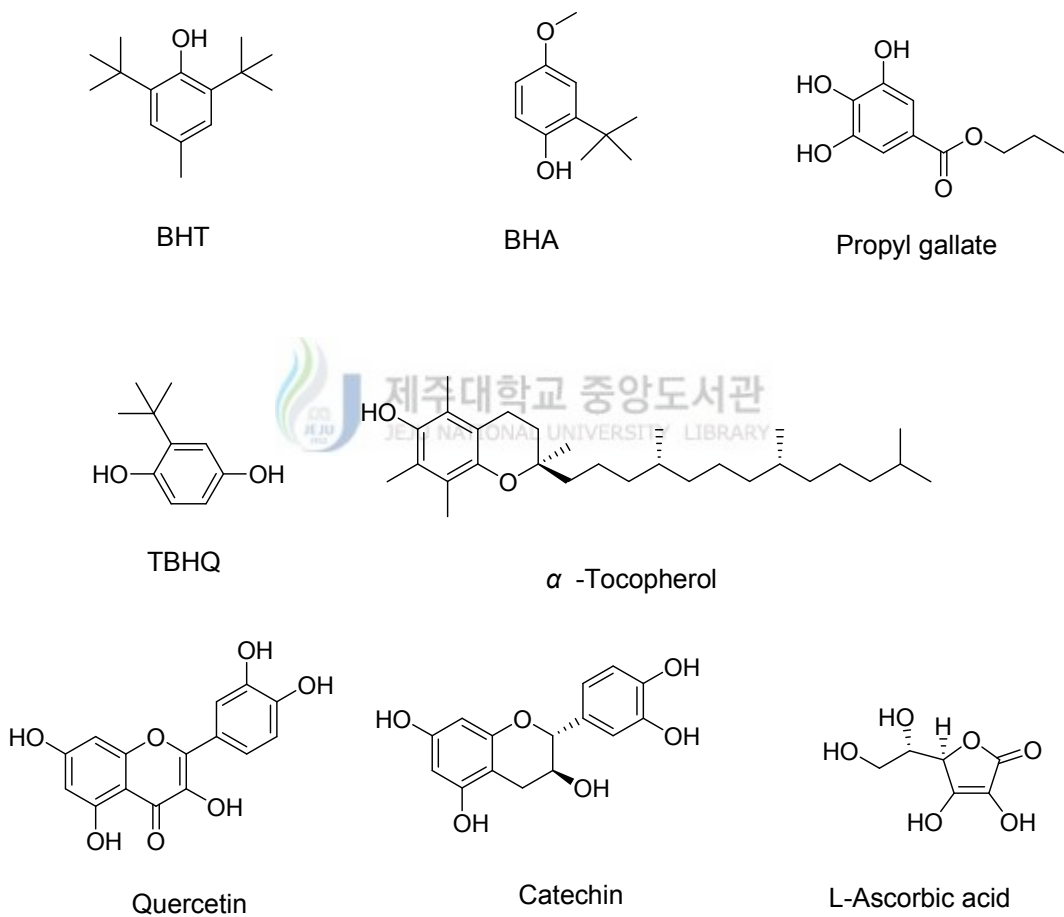


Figure 1. Chemical structures of Anti-oxidants.

이러한 항산화제에 대한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich가 superoxide radical을 소거하는 효소인 SOD (superoxide dismutase)를 발견한 이후 시작되어 최근에는 식품첨가물로서의 항산화제 개발, 각종 질병의 예방을 위한 건강식품, 노화억제를 목적으로 하는 의약품 및 화장품산업으로까지 다양화되고 있는 상태이다. 따라서 인체에 무해하면서도 보다 강한 항산화 효과를 나타내는 천연항산화제의 연구에 관심이 모아지고 있다.⁵⁾

2) 미백

피부의 색은 멜라닌, 헤모글로빈, 카로틴의 3인에 의해 결정되는데 이중 가장 중요한 역할을 하는 것을 멜라닌이다. 멜라닌세포는 표피의 기저층에서 흑갈색의 멜라닌을 생성하는 나뭇잎모양의 수지상세포이다. 멜라닌의 주요한 역할은 피부에서 발생하는 활성산소나 프리라디칼(free-radical)을 제거하고, 또 자외선의 투과를 막아 피부의 내부를 보호하는 것이다. 멜라닌을 만드는 출발물질은 인체에 정상적으로 존재하는 아미노산의 일종인 tyrosine이다. tyrosine은 멜라닌 세포 내에서 tyrosinase라는 효소에 의해 산화되어 DOPA로 변하고, DOPA는 더욱 산화하여 DOPA quinone으로 바뀐다. DOPA quinone은 이후 자동 산화반응을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 eumelanin을 만들어낸다. 한편 DOPA quinone이 cysteine을 만나게 되면 cysteinyl DOPA가 만들어지고 그 결과 적갈색의 pheomelanin이 만들어진다. 이후 생성된 멜라닌은 melanosome에 실려 각질형성세포로 전달된다.⁶⁾

그러나 melanin이 과잉 생산이 되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하며 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾

최근의 미백효과에 대한 연구는 피부 미백효과와 항산화작용, 피부노화방지를 포함하는 포괄적인 개념으로 진행되고 있다. 현재 알려져 있는 미백에 대한 연구는 자외선 차단 소재 연구, 멜라닌(melanin) 세포에 멜라닌의 합성을 명령하는 신호전달 물질인 cytokine의 작용을 조절하는 연구, 유전자 발현억제, tyrosinase 작용억제, 활성산소 제거소재, 색소환원, 각질층 제거 촉진소재 연구 등의 여러 일 방법으로 진행되고 있다. 이중에서도 tyrosinase의 활성을

억제하여 멜라닌(melanin)의 초기 생성을 감소시키는 기전이 가장 많이 연구되고 있다.⁸⁾

3) 염증과 항균

염증반응은 상처나 감염, 또는 자가면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서, 조직의 혈관 확장에 의한 부종, 발열, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체반응이다.⁹⁾

일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

또한 염증을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다. 피부상재균 중 여드름 유발에 관여하는 *Staphylococcus epidermidis* 등을 들 수 있다. 여드름은 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다.¹¹⁾

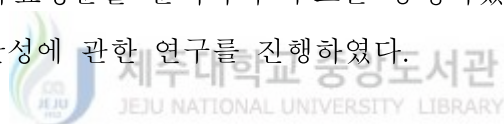
S. epidermidis 등의 균이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 사용되고 있다. 예로 triclosan, benzoyl peroxide, azelaic acid, retinoid, tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin 등의 항생제가 사용되고 있다. 그러나 benzoyl peroxide와 retinoid는 피부건조증이나 과민증을 유발하고, tetracycline, erythromycin, macrolide, clindamycin은 항생제에 대한 내성 발생으로 인하여 지속적인 사용이 어렵고 간독성이 심하며, 칸디다증과 같은 기회감염증이 나타날 수도 있다는 부작용이 있다.

따라서, 이런 문제점을 해결하는 안전성이 확보된 천연물을 이용한 항균효과가 있으면서 부작용이 없는 여드름 치료제를 개발하려고 노력중이며, 근래 염증분야 연구에서는 염증매개물질 생산 분비를 억제하는 천연소염물질을 찾는 데 초점이 맞추어져 있는데 그 이유는 cortisol 합성세제와 같은 기존 소염제가 부작용이 많기 때문이다.¹²⁾

소사나무(*Carpinus turczaninowii*)는 자작나무과(Betulaceae)식물로서 한국특산식물로 제주에서 자라며 낙엽 활엽 관목으로 잎은 어긋나고, 달걀형이며 길이는 3~3 cm × 2~3 cm이며, 끝은 뾰족하고 겹톱니가 있으며 측맥은 10~12쌍이고, 뒷면 맥 위에 털이 많고 턱잎이 선형이다. 꽃은 암수 한 그루로 4~5월에 피며 열매 길이는 3~5cm이다. 포는 8~16개로, 반달갈형이며, 톱니가 있으며, 아랫부분이 열매를 약간 둘러싸며, 비대칭 한쪽에만 톱니가 발달하고, 9~10월에 성숙한다.

현재까지 소사나무에 대한 연구로는 식물분류학 분야에서 잎으로부터 flavonoid, terpenoid¹³⁾ 등이, 잎으로부터 flavonoid배당체¹⁴⁾가 분리 동정되어 보고되어 있다.

본 연구에서는 소사나무 잎 추출물 및 분획물의 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성을 검색하고 유효성분을 분리하여 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 다양한 생리활성에 관한 연구를 진행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck, Junsei의 제품을 사용하였다. MPLC (medium pressure liquid chromatography)에는 reversed phase silicagel (Frash 40+M, Biotage Co.)을 사용하였고, open column에 사용한 normal-phased column chromatography (CC)에는 silica gel (95-110 μm , Merck Co.), 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20 (0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리 과정에 사용된 thin-layer chromatography (TLC)는 precoated silica gelaluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 이용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH를 필요

에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 Sunrise™ (Tecan Co.)와 Biochrom Libra S22 (Cambridge Inc., England)를 이용하였다.

구조분석에 이용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL)와 AVANCE III 500 (FT-NMR system, Bruker)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용용매로 CD₃OD를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 소사나무(시료 번호 : 308) 잎은 2011년 5월에 제주 한라수목원에서 채집하였다(Figure 2). 채집한 소사나무 잎은 실온 및 음지에서 완전히 자연 건조하였으며 분쇄하여 사용하였다.



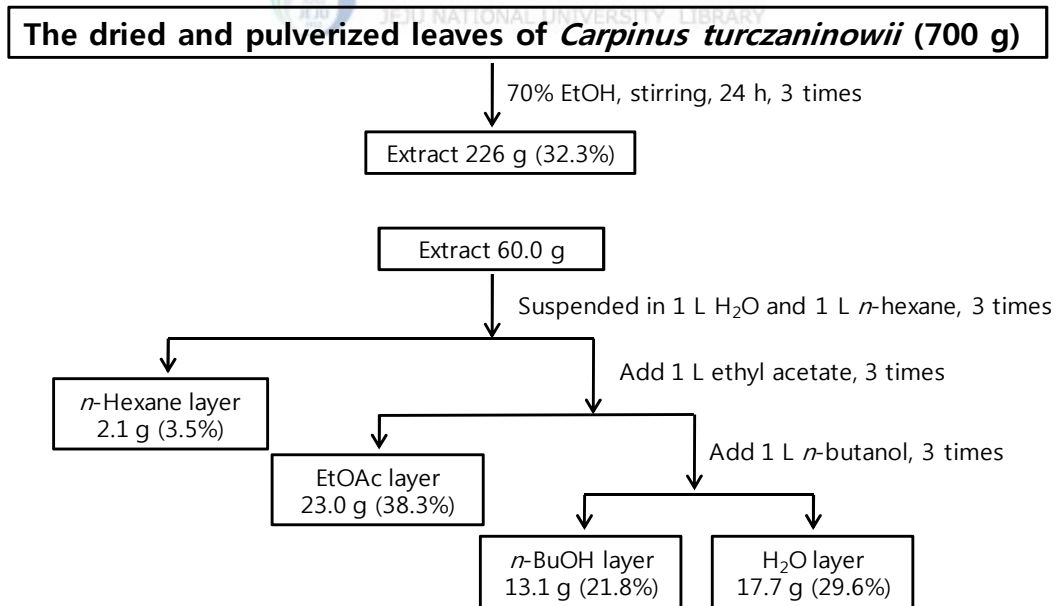
Figure 2. Picture of *Carponus turczaninowii*.

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 소사나무 잎의 추출 및 용매 분획

소사나무 잎을 추출하기 위해 음건한 후 분쇄하여 추출을 하였다. 추출은 소사나무 잎의 건조물 700 g을 70% (v/v)에탄올 약 14 L에 넣고 실온에서 24 시간동안 교반을 하였다. whatman 여과지를 사용하여 감압 여과 장치로 추출액을 취하고, 잔류물을 동일한 방법으로 2회 더 반복 추출하였다. 이렇게 얻은 여액을 37~40 °C의 물증탕에서 회전 감압 농축장치(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% ethanol 추출물 226 g을 얻었다.

얻어진 70% ethanol 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O layer를 얻었다. 이러한 방법으로 70% ethanol 추출물 60.0 g을 분획하였고, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O layer 각각 2.1 g, 23.0 g, 13.1 g, 17.7 g을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and solvent layers from the leaves of *C. turczaninowii*.

3-2. Ethyl acetate layer의 활성 성분 분리

3-2-1. Compound 1, compound 2 의 분리 과정

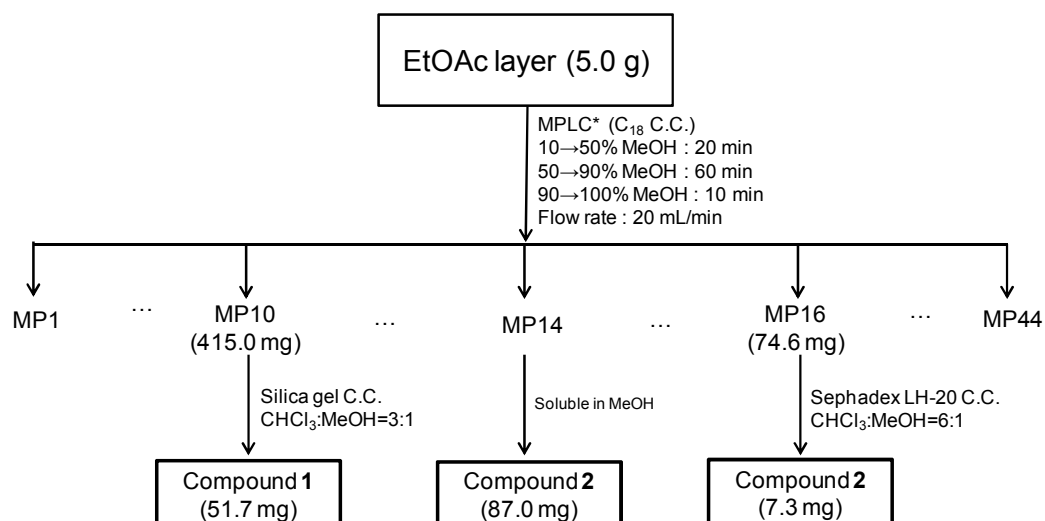
용매 분획 후 얻어진 EtOAc layer를 극성별로 세분화하기 위하여 MPLC (medium pressure liquid chromatography)를 수행하였다. EtOAc layer 5.0 g을 MeOH 10 mL에 녹여 주입하였으며, column은 역상 실리카겔(C₁₈)을 사용하였다.

MeOH-H₂O (10~50 %, 20 min), MeOH-H₂O (50~90 %, 60 min), MeOH-H₂O (90~100 %, 10 min)의 용매로 극성을 낮추면서 gradient 방법으로 각 40 mL씩 용출하여 44개의 fraction을 얻었다.

MPLC fraction들 중 MP.10 415.0 mg을 CHCl₃:MeOH=3:1의 용매 조건으로 silica gel column을 수행하여 compound 1 (51.7 mg)을 얻었다.

MPLC fraction들 중 MP.14를 감압 농축한 후 MeOH을 첨가하여 원심 분리하였고 이 중 상등액만 취하여 compound 2 (87.0 mg)를 분리하였다.

MPLC fraction들 중 MP.16 (74.6 mg)을 CHCl₃:MeOH=6:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column을 수행하여 compound 2 (7.3 mg)를 추가로 분리하였다(Scheme 2).



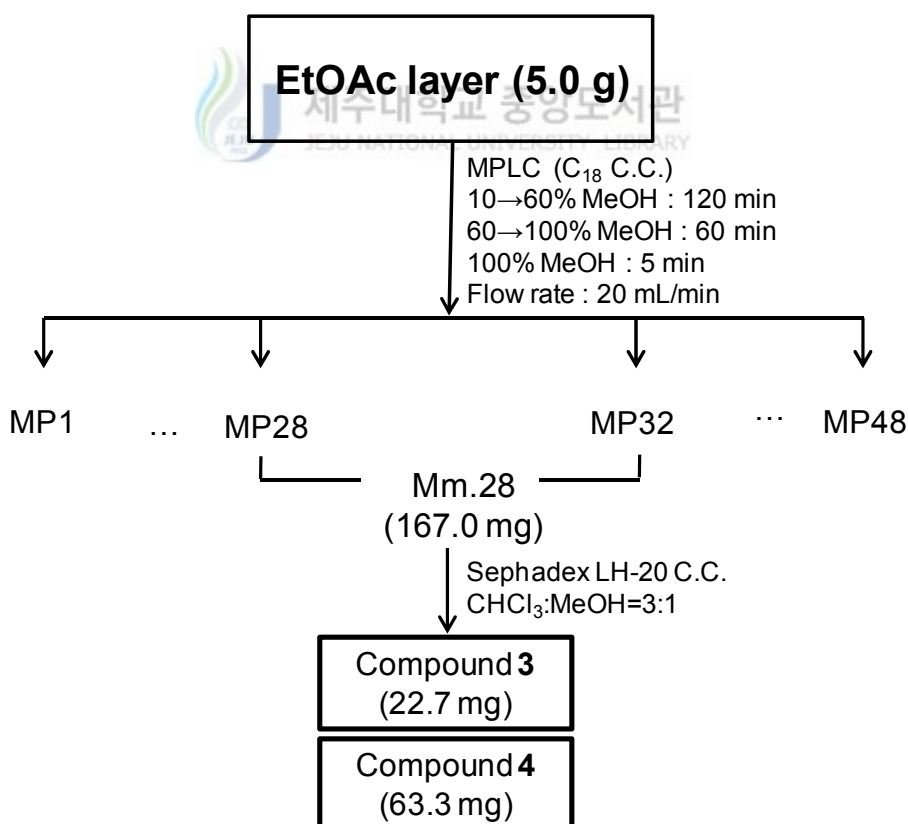
Scheme 2. Procedure of isolation of compounds 1, 2.

3-2-2. Compound 3과 compound 4의 분리 과정

용매 분획 후 얻어진 EtOAc layer를 극성별로 세분화하기 위하여 MPLC를 한 번 더 수행하였다. EtOAc layer 5.0 g을 MeOH 10 mL에 녹여 주입하였으며, column은 역상 실리카겔(C₁₈)을 사용하였다.

MeOH-H₂O (10~60 %, 120 min), MeOH-H₂O (60~100 %, 60 min), MeOH (100 %, 5 min)의 용매로 극성을 낮추면서 gradient 방법으로 각 40 mL씩 용출하여 48개의 fraction을 얻었다.

MPLC fraction의 TLC check를 한 후에 spot들의 패턴이 비슷한 MP.28부터 MP.32까지를 합쳤다. 이 후 mixture Mm.28 167.0 mg을 CHCl₃:MeOH=3:1의 용매 조건으로 Sephadex LH-20 column을 수행하여 TLC check를 한 후에 spot들의 패턴이 비슷한 것끼리 모아 compound 3 (22.7 mg)과 compound 4 (63.3 mg)을 얻었다(Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 3, 4.

4. 활성 실험

4-1. 항산화 활성 실험

4-1-1. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법¹⁵⁾을 약간 변형하여 실시하였다. Calibration curve는 gallic acid 표준 용액을 1 mg/mL 농도로 제조한 후, 이를 사용하여 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 희석하여 작성하였다. 먼저, 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 제조를 하였다. 그리고 농도별로 희석한 gallic acid 표준 용액과 시료를 100 µL씩 취한 후, 증류수 900 µL를 넣어 total volume 이 각각 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 각각 100 µL 첨가하여 실온에서 약 3분정도 반응을 시키고, Na₂CO₃ 용액(7%, w/v) 200 µL를 가하여 혼합한 후 증류수 700 µL를 넣어 total volume이 각각 2 mL가 되도록 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 상등액을 취하여 ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며 이 흡광도로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

4-1-2. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois방법¹⁶⁾을 응용하여 다음과 같이 실행하였다. 먼저 시료를 1 mg/mL 농도로 만든 후, 이를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL 농도로 희석한다. DPPH시약은 DMSO를 사용하여 2 mM 농도로 녹여준 뒤 이를 EtOH에 0.2 mM로 희석하여 사용한다. 이 후 농도별로 희석한 시료 용액을 96 well plate에 각각 20 µL씩 넣고 multi pipette을 사용하여 0.2 mM DPPH 180 µL를 넣어 상온에서 10분간 반응시키고, ELISA reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정한다. DPPH radical 소거율(%)은 아래의 식에 의해 계산하였으며, 각 시료가 DPPH radical을 50% 감소시킬 때의 농도(SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 양성대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect(\%)} = \left\{ 1 - \frac{B-C}{A} \right\} \times 100$$

A : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

B : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

C : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

4-1-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험

ABTS radical cation 소거 활성은 Re & Pellegrin 등의 방법¹⁷⁾을 응용하였고, 실험은 다음과 같이 진행하였다.

7.0 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 16시간 이상 차광상태에서 반응을 시켜 ABTS⁺ radical을 만들었다. 이 ABTS⁺ radical용액을 ethanol에 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.002가 되도록 조절하여 실험에 사용한다. 이 후 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 각각 20 µL와 ABTS⁺ radical용액 180 µL를 혼합하여 15분간 차광상태에서 반응시키고, ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정한다. ABTS⁺ radical 소거율(%)은 아래의 식에 의해 계산하였으며 각 시료가 ABTS⁺ radical을 50% 감소시킬 때의 농도(SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 양성대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect(\%)} = \left\{ 1 - \frac{B-C}{A} \right\} \times 100$$

A : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

B : 700 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

C : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

4-1-4. Superoxide anion cation 소거 활성 실험

Superoxide anion cation 소거 활성 실험은 Wang 등의 방법¹⁸⁾을 응용하였고 실험은 다음과 같이 진행하였다.

먼저 시료를 1 mg/mL 농도로 만든 후, 이를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 μ g/mL 농도로 희석한다. 이 후 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 각각 10 μ L와 0.1 M potassium phosphate buffer 40 μ L를 혼합한 후, 0.4 mM xanthine (in buffer)과 0.24 mM NBT (in buffer)를 1:1 로 혼합한 용액을 100 μ L 첨가한다. 마지막으로 0.2 units/mL xanthine oxidase를 각각 100 μ L 넣고 25 $^{\circ}$ C 에서 5 분 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 560 nm 에서 흡광도를 측정한다. superoxide anion cation 소거율(%)은 아래의 식에 의해 계산하였으며 각 시료가 superoxide anion cation을 50 % 감소시킬 때의 농도(SC₅₀)를 구하였다. 각 시료는 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였다. 이 때 양성대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.


$$\text{Superoxide anion cation scavenging activity(\%)} = \left\{ 1 - \frac{B}{A} \right\} \times 100$$

A : XO와 xanthine의 흡광도 변화

B : XO, xanthine, 폴리페놀을 혼합한 용액의 흡광도 변화

4-2. B16F10 murine melanin cell을 이용한 미백 활성 실험

4-2-1. 세포배양

B16F10 murine melanoma cell은 한국세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL와 10 % FBS (fetal bovine serum)가 함유된 DMEM (dulbecco's modified eagle medium, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

4-2-2. Melanogenesis 저해 효과 측정

6 well plate에 5.0×10^4 cells/mL가 되도록 세포를 분주하고, 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline)buffer로 세척하였다. 그리고 100 nM의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환해주고 시료를 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척한다. 이 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하여 원심분리 시켜 pellet만을 취한다. pellet에 sonication buffer (1 % Triton X-100 and 0.2 mM PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride in sodium phosphate buffer))를 넣고 세포를 sonication해주고, 15,000 RPM으로 20분 동안 원심분리 시켰다. 분리한 pellet에는 1 M NaOH를 각각 300 μ L 첨가하여 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 melanin contents를 확인하였으며, 상등액은 L-DOPA와 반응시켜 ELISA reader로 475 nm에서 세포내의 tyrosinase를 확인하였다. 양성대조군(positive control)은 Melasolve (20 μ M)를 사용하였다.



4-2-3. 세포 독성 평가

세포독성 평가는 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay와 LDH (lactate dehydrogenase) assay를 이용하였다.

MTT assay는 위의 B16F10 murine melanoma cell에 시료를 처리하고 72시간 배양시킨 후 세포를 배양하고 있는 well에 5 mg/mL 농도의 MTT시약을 100 μ L 첨가하였다. 이후 37 °C, 5 % CO₂조건에서 2~3시간 동안 더 배양하고, 배지를 제거한 후에 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

LDH assay는 cytotoxicity detection kit로 측정하였다. 먼저 B16F10 murine melanoma cell를 72시간 배양시켰다. 이 후 배양액 100 μ L와 diapholase, NAD⁺ 및 INT 혼합액 100 μ L를 혼합한 후 암실에서 5분 동안 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평

가하였다.

4-3. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

4-3-1. 세포배양

마우스 대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7cell은 한국세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% antibiotic-antimycotic과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GIBCO, GrandIsland, NY, USA)배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 2 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-3-2. Nitric oxide 생성 억제 평가

24 well plate에 RAW 264.7 cell을 3×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cell을 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Greiss 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl ethylene diamine in 2.5% phosphoric acid)을 사용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 96 well plate에서 세포배양액 100 µL와 Griess 시약 100 µL를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다. 이때 양성대조군(positive control)으로는 2-amino-4-picoline (10 µM)을 사용하였다.

4-3-3. 세포독성 평가 실험

세포독성 평가는 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay와 LDH (lactate dehydrogenase) assay를 이용하였다.

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay 는 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 3×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 배양 후, 1 µg/mL LPS와 sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 이 후 배양액에 5 mg/mL 농도의 MTT시약을 100 µL 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후, 배지를 제거하였다. 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

LDH assay는 B16F10 melanoma cell의 세포독성 평가와 동일하게 cytotoxicity detection kit로 측정하였다. RAW 264.7 murine macrophage cell을 이용한 실험에서 시료를 처리하고 24시간 배양시킨 후에 배양액 100 µL와 diapholase, NAD⁺ 및 INT 혼합액 100 µL를 혼합한 후 암실에서 5분간 반응시킨다. ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하고 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

4-4. 항균 활성 평가

4-4-1. Paper disc diffusion test

시료의 항균활성을 측정하기 위해 *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 다음과 같이 paper disc diffusion법으로 생육 억제율을 측정하였다.

McFarland standard No.1 농도의 균 현탁액을 0.85 % 생리식염수로 희석하여 10^7 CFU/mL 되게 한 후 200 μ L를 한천 1.5 %를 포함하는 TSA (tryptic soy agar)에 spreading한다. 이 후 균이 처리된 TSA에 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려 37°C에서 24 시간 동안 배양하여 paper disc 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다. 양성대조군(positive control)으로는 erythromycin (6.25 mg/mL)을 사용하였다.

4-4-2. Minimum inhibitory concentration test

최소억제농도(MIC)는 broth-serial dilution method¹⁹⁾를 통하여 확인하였다. 96 well에 TSB (tryptic soy broth)배지 150 μ L를 넣고 10 mg/mL 농도의 시료용액을 150 μ L 넣은 후 혼합하여 TSB배지로 2 배씩 희석한다. 여기 각 well에 McFarland standard No. 1농도의 균 현탁액을 0.85 % 생리식염수로 희석한 10^5 CFU/mL 농도의 균을 15 μ L 넣고, 37°C, 24시간동안 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. MIC값은 흡광도 값이 급격히 낮아진 농도로 구하였다. 양성대조군(positive control)으로는 erythromycin (5 mg/mL)을 사용하였다.

4-4-3. Minimum bactericidal concentration test

최소살균농도(MBC)는 Bamba등의 방법²⁰⁾을 통하여 확인하였다. MIC 측정 후 균의 증식이 관찰되지 않은 최고 농도의 배양액부터 한 백금이 취하여 TSA 평판배지에 streaking한 후, 37 °C에서 24시간 동안 배양하여 균을 완전하게 사멸(99.9 %)시키는 최고 농도로 MBC를 설정하였다. 양성대조군(positive control)으로는 erythromycin (5 mg/mL)을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 동정

1-1. Compound 1의 구조 동정

Compound 1의 구조를 확인하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.34(3H, t)과 4.27(2H, q)의 proton peak과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 14.7, 61.8의 carbon peak으로 보아 전기음성도가 큰 원소에 인접한 ethyl 기를 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 168.6 ppm값으로 carboxylic group의 carbon을 예상하였으며, $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 7.04(2H, s)과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 110.0~146.5 signal로 보아 대칭구조의 aromatic proton을 예상하였다. 예상한 부분 구조를 기본으로 하여 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 문헌²¹⁾과 비교한 결과 compound 1은 ethyl gallate임을 확인할 수 있었다(Figure 3).



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

No.	Compound 1	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	121.8	
2	110.0	7.04(1H, s)
3	146.5	
4	139.7	
5	146.5	
6	110.0	7.04(1H, s)
7	168.6	
8	61.8	4.27(2H, q)
9	14.7	1.34(3H, t)

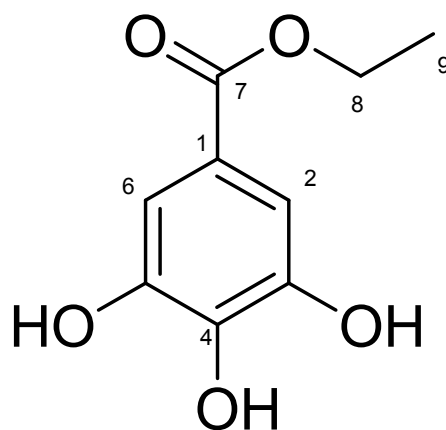
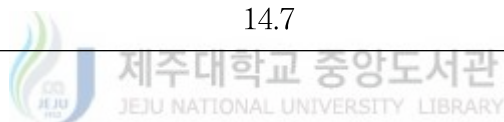


Figure 3. Chemical structure of compound **1**.

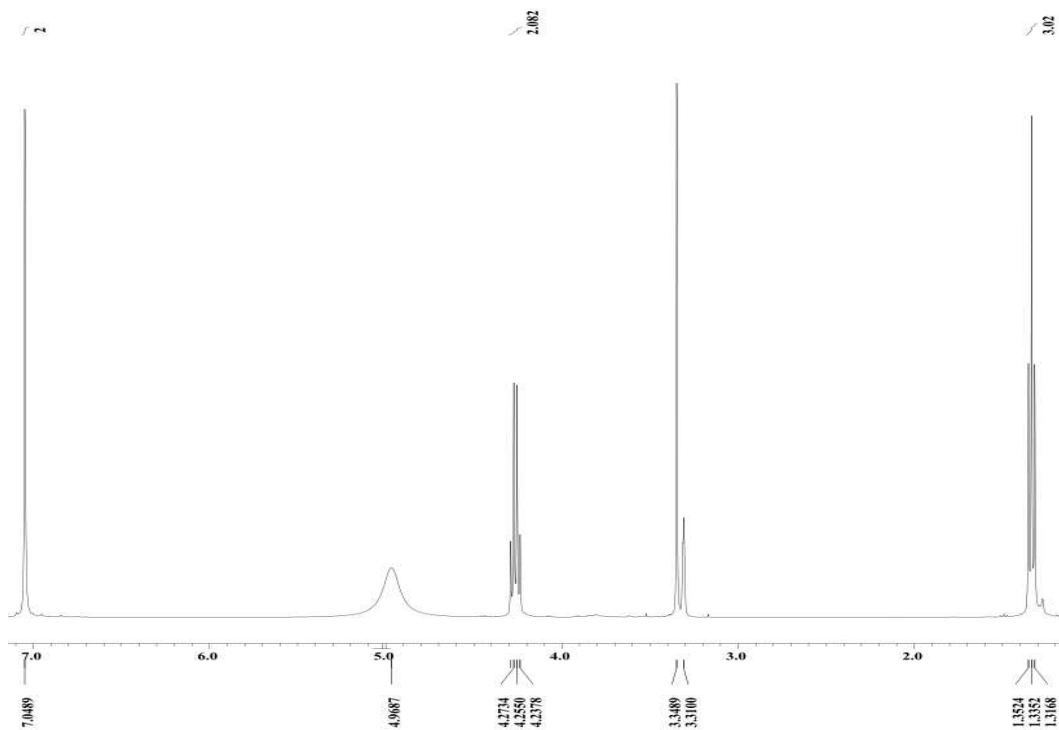


Figure 4. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in CD_3OD .

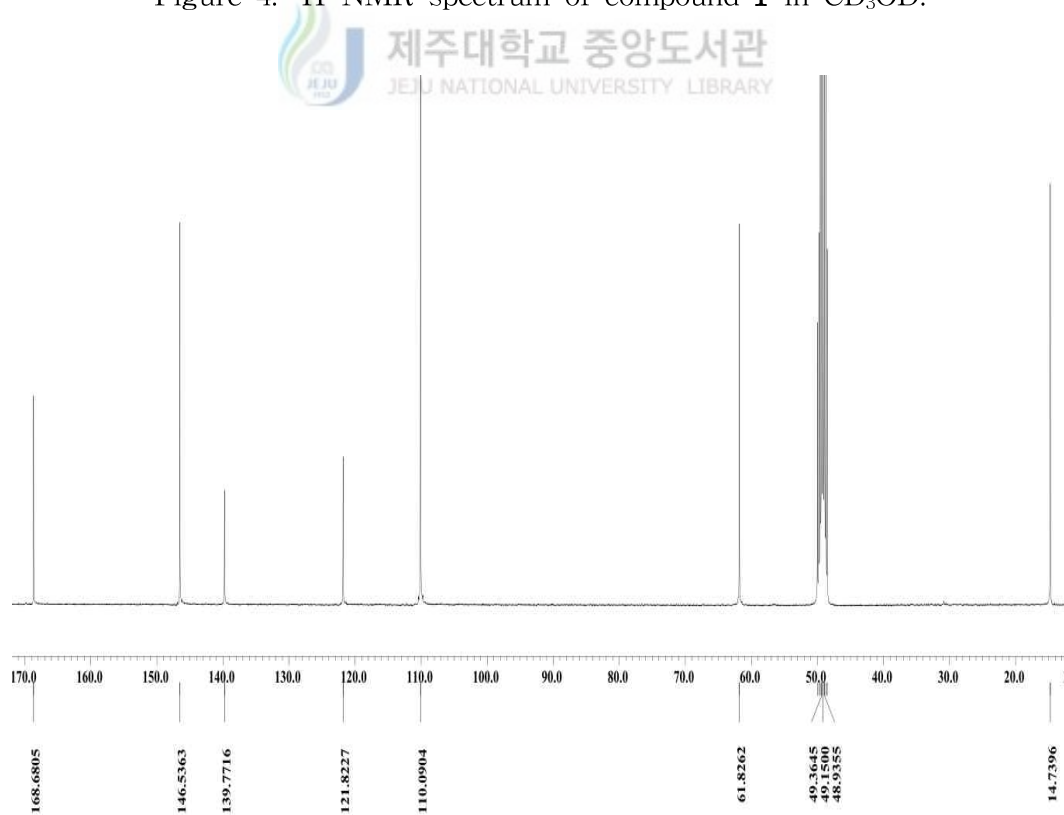


Figure 5. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in CD_3OD .

1-2. Compound 2와 compound 3의 구조 동정

Compound 2의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 6.20(1H, d, $J = 1.8$ Hz)와 δ 6.37(1H, d, $J = 1.8$ Hz)의 signal은 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하는 sp^2 proton으로 예상하였으며, δ 6.91(1H, d, $J = 8.2$ Hz), δ 7.32(1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz), δ 7.33(1H, d, $J = 1.8$ Hz)의 signal은 aromatic ring의 proton으로 coupling constant 값을 통하여 각각 *ortho*-*meta*-coupling하는 것으로 나타났다. 또한 δ 5.34(1H, d, $J = 1.4$ Hz) δ 4.22 ~ 3.33 부근의 복잡한 signal로부터 당이 하나 치환된 구조임을 알 수 있었는데, δ 0.94(3H, d, $J = 5.9$ Hz)에서 doublet으로 나타나는 특징인 methyl proton peak를 통하여 치환된 당이 rhamnose인 것으로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석결과, 19개 이상의 carbon signal과 δ 158.7(C-2), 136.4(C-3), 179.8(C-4)의 carbon peak로부터 flavonol의 골격임을 알 수 있었으며²²⁾, 이를 바탕으로 문헌²³⁾과 비교하여 compound 2는 quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside 즉, quercitrin으로 동정하였다(Figure 6).

Compound 3의 ^1H 와 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 비교한 결과, compound 2와 비슷한 경향을 보이는 것으로 보아 이 역시 rhamnose가 치환된 flavonoid로 예상하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과, δ 6.92(2H, dd, $J = 7.0, 2.0$ Hz)와 δ 7.76(2H, dd, $J = 6.8, 2.0$ Hz)의 signal은 aromatic ring의 proton으로 적분 값과 coupling constant 값을 통하여 *ortho*-*meta*-coupling을 하는 대칭구조임을 예상할 수 있었고, δ 6.18(1H, d, $J = 2.0$ Hz)과 δ 6.36(1H, d, $J = 2.0$ Hz)의 signal은 coupling constant 값을 통하여 *meta*-coupling을 하는 벤젠고리로 예상하였다. ^1H 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data를 비교한 결과 aglycone은 kaempferol이며 3번 위치에 rhamnose가 치환되어 있는 것으로 예상하였다. 치환된 당의 signal은 δ 103.6, 73.3, 72.2, 72.1, 17.8 이며 anomeric proton의 coupling constant 값($J = 1.5$ Hz)을 통하여 문헌²⁴⁾과 비교하여 α -L-rhamnopyranoside임을 확인하였다. 이를 바탕으로 compound 3은 kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside 즉, afzelin으로 동정하고 문헌²⁵⁾과 일치함을 확인하였다(Figure 7).

Table 2. ¹H and ¹³C-NMR data of compounds **2** and **3** (CD₃OD).

No	Compound 2 (400 and 100 MHz)		Compound 3 (500 and 125 MHz)	
	δ_C	δ_H (int, multi, <i>J</i> Hz)	δ_C	δ_H (int, multi, <i>J</i> Hz)
2	158.7		158.7	
3	136.4		136.3	
4	179.8		179.7	
5	163.4		163.3	
6	100.0	6.20(1H, d, 1.8)	99.9	6.18(1H, d, 2)
7	166.0		166.0	
8	94.8	6.37(1H, d, 1.8)	94.9	6.36(1H, d, 2)
9	159.5		159.4	
10	106.0		106.0	
1'	123.1		122.8	
2'	117.1	7.33(1H, d, 1.8)	132.0	7.76(1H, dd, 2, 6.8)
3'	146.6		116.6	6.92(1H, dd, 2, 7)
4'	150.6		161.7	
5'	116.5	6.91(1H, d, 8.2)	116.6	6.92(1H, dd, 2, 7)
6'	123.0	7.32(1H, dd, 1.8, 8.2)	132.0	7.76(1H, dd, 2, 6.8)
1''	103.7	5.34(1H, d, 1.4)	103.6	5.37(1H, d, 1.5)
2''	72.0	4.22-3.33(sugar H)	72.1	4.22-3.71(sugar H)
3''	72.2		72.2	
4''	73.4		73.3	
5''	72.2		72.2	
6''	17.8	0.94(3H, d, 5.9)	17.8	0.92(3H, d, 6)

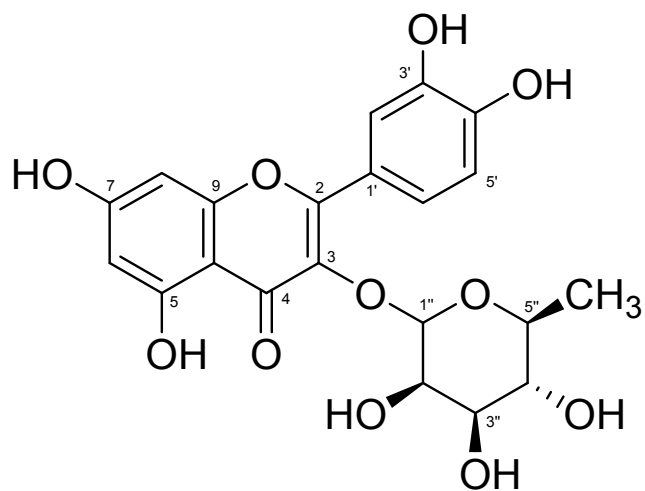


Figure 6. Chemical structure of compound 2.



Figure 7. Chemical structure of compound 3.

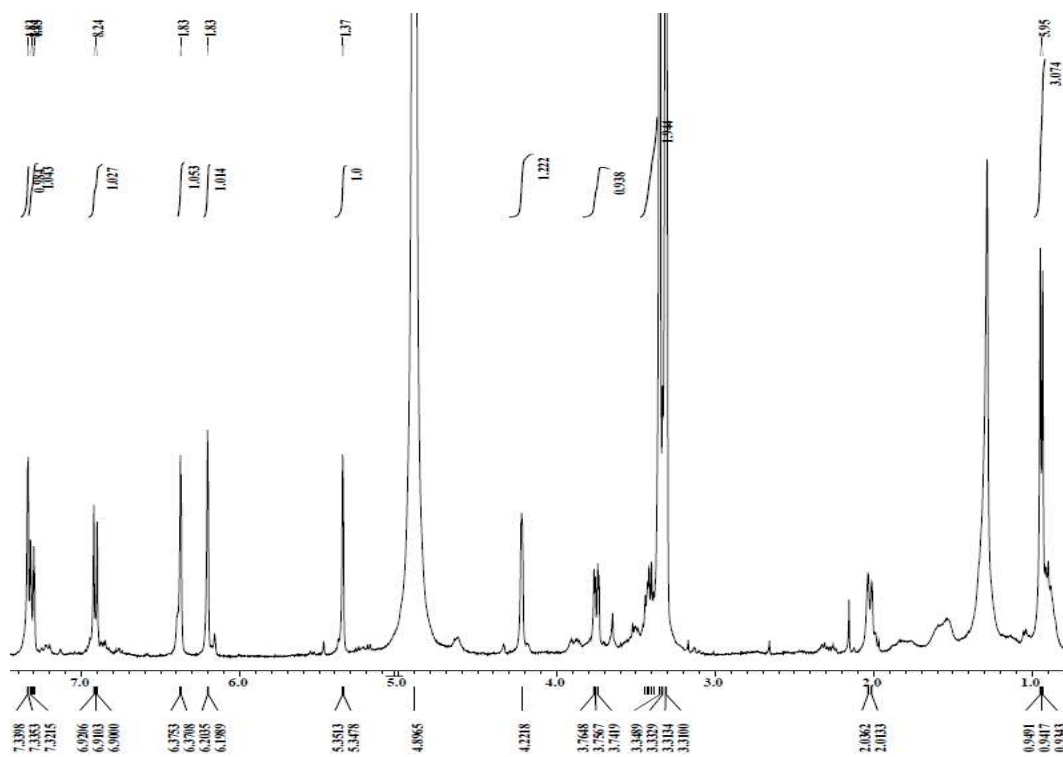


Figure 8. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD .

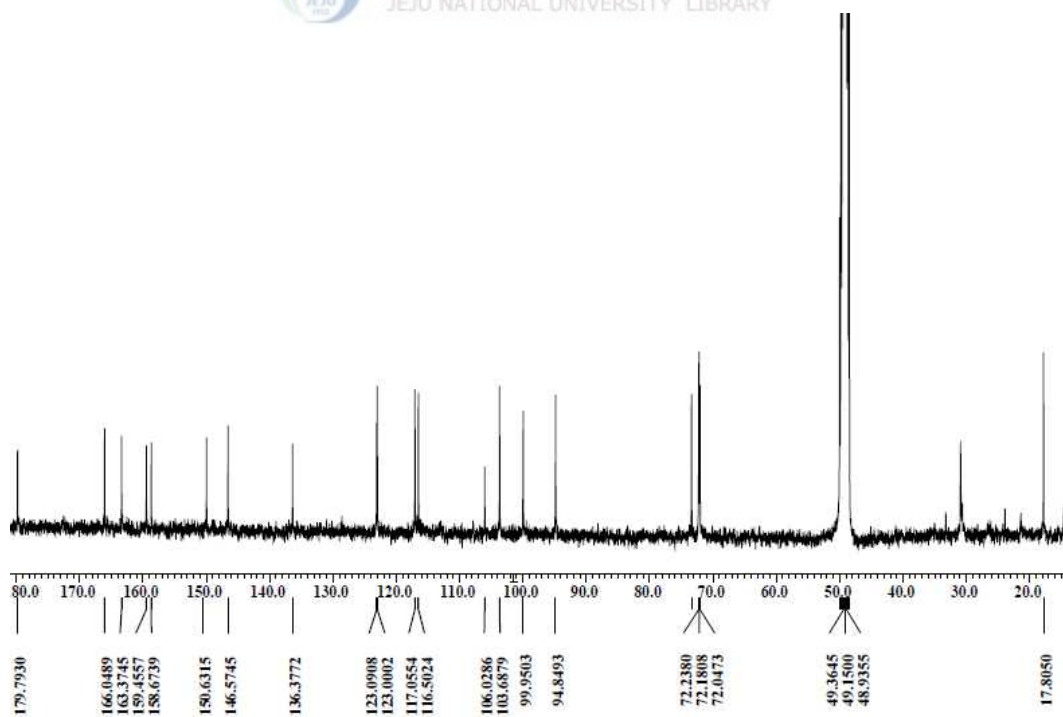


Figure 9. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD .

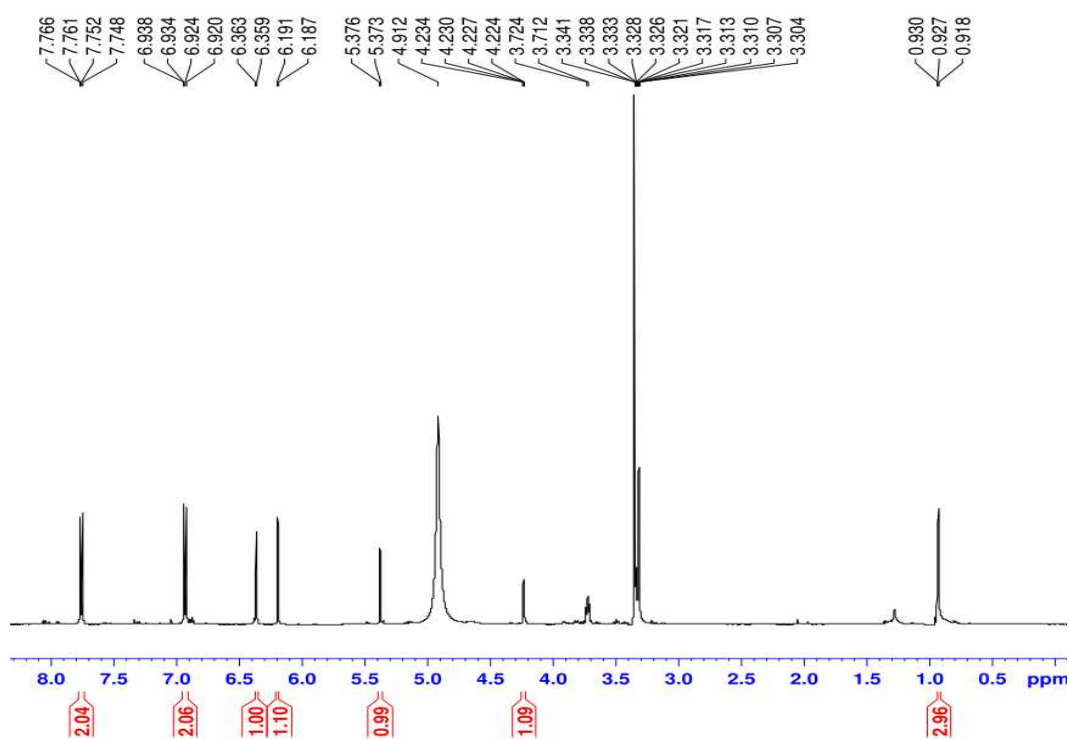


Figure 10. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD .

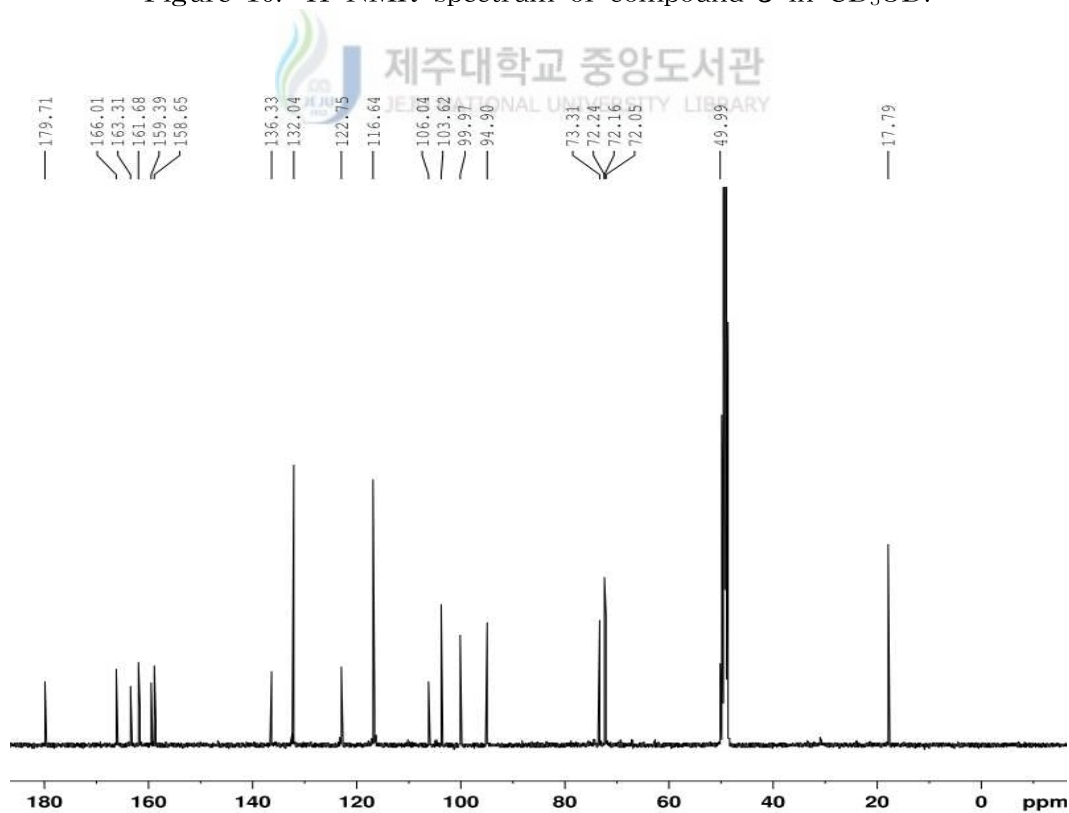


Figure 11. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD .

1-3. Compound 4의 구조 동정

Compound 4 는 ^1H 와 ^{13}C -NMR data를 비교한 결과, compound 2와 비슷한 경향을 보이는 것으로 보아 이 역시 flavonoid 3번 위치에 rhamnose가 치환된 quercitrin이 있음을 예상하였다.

또한 δ 7.07(2H, s)의 proton signal과 δ 110.4, 121.3, 140.0, 146.6, 167.5 ppm의 carbon signal를 통해 대칭구조인 galloyl기가 있음을 예상하였다.

DEPT-135 spectrum을 통해 탄소의 종류를 확인하였고(Figure 15), ^1H - ^1H COSY NMR spectrum을 통해 서로 coupling하고 있는 수소를 확인하였으며(Figure 16), HMQC를 통해서는 탄소에 직접 결합되어 있는 수소를(Figure 17), HMBC를 통해서는 각 탄소에 대해 long-range 결합을 하는 수소를 확인하였다(Figure 18).

이를 바탕으로 문헌²⁶⁾과 비교하여 compound 4는 quercetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- α -rhamnopyranoside, 즉 quercitrin-2''-*O*-gallate 로 동정하였다(Figure 12).



Table 3. ^1H and ^{13}C -NMR data of compound **4** (500 and 125 MHz, CD_3OD).

No.	Compound 4	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
2	158.5	
3	135.7	
4	179.4	
5	163.2	
6	99.9	6.18(1H, d, 2)
7	165.9	
8	94.8	6.36(1H, d, 2)
9	159.3	
10	105.9	
1'	121.3	
2'	116.5	7.36(1H, d, 2)
3'	146.5	
4'	149.9	
5'	117.0	6.93(1H, d, 8.5)
6'	122.9	7.34(1H, dd, 2, 8.5)
1''	100.6	5.50(1H, d, 1.5)
2''	73.6	5.64(1H, dd, 1.5, 2)
3''	73.8	4.03-3.46(sugar H)
4''	70.2	
5''	72.3	
6''	17.9	1.03(3H, d, 5.5)
1'''	121.3	
2'''	110.4	7.07(2H, s)
3'''	146.6	
4'''	140.0	
5'''	146.6	
6'''	110.4	
7'''	167.5	

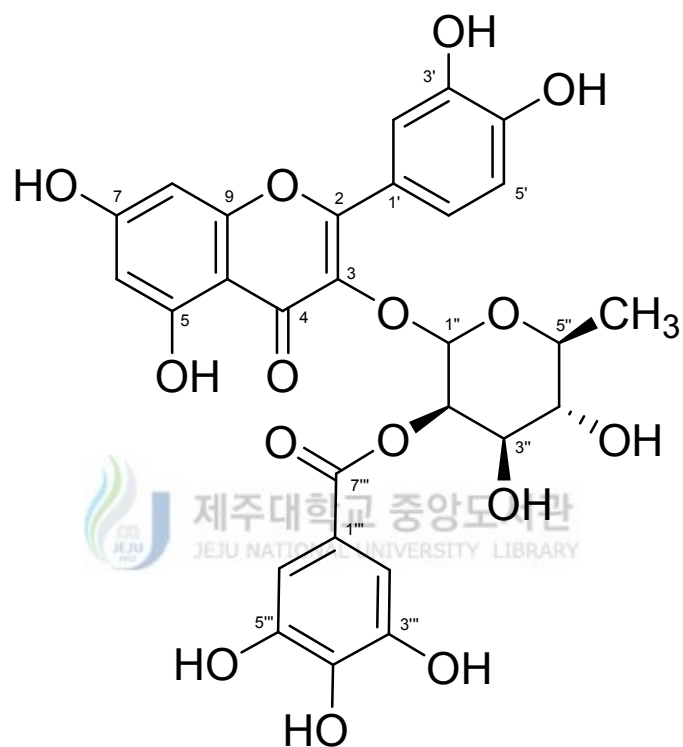


Figure 12. Chemical structure of compound 4.

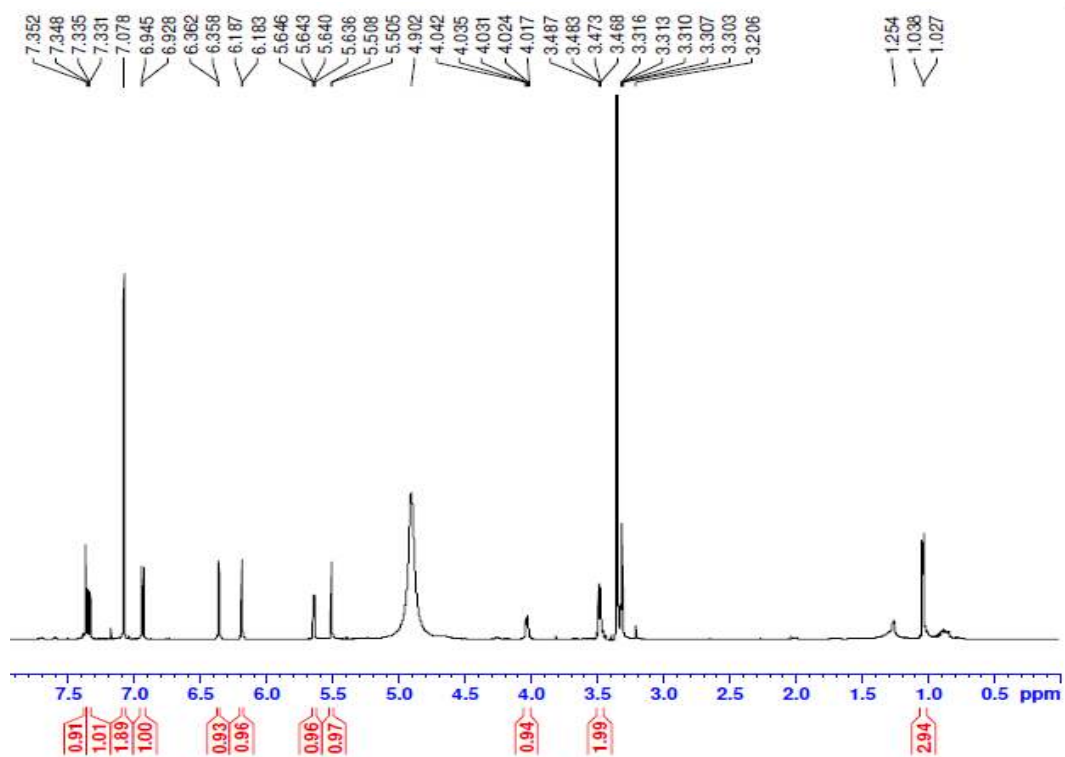


Figure 13. ^1H -NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD .

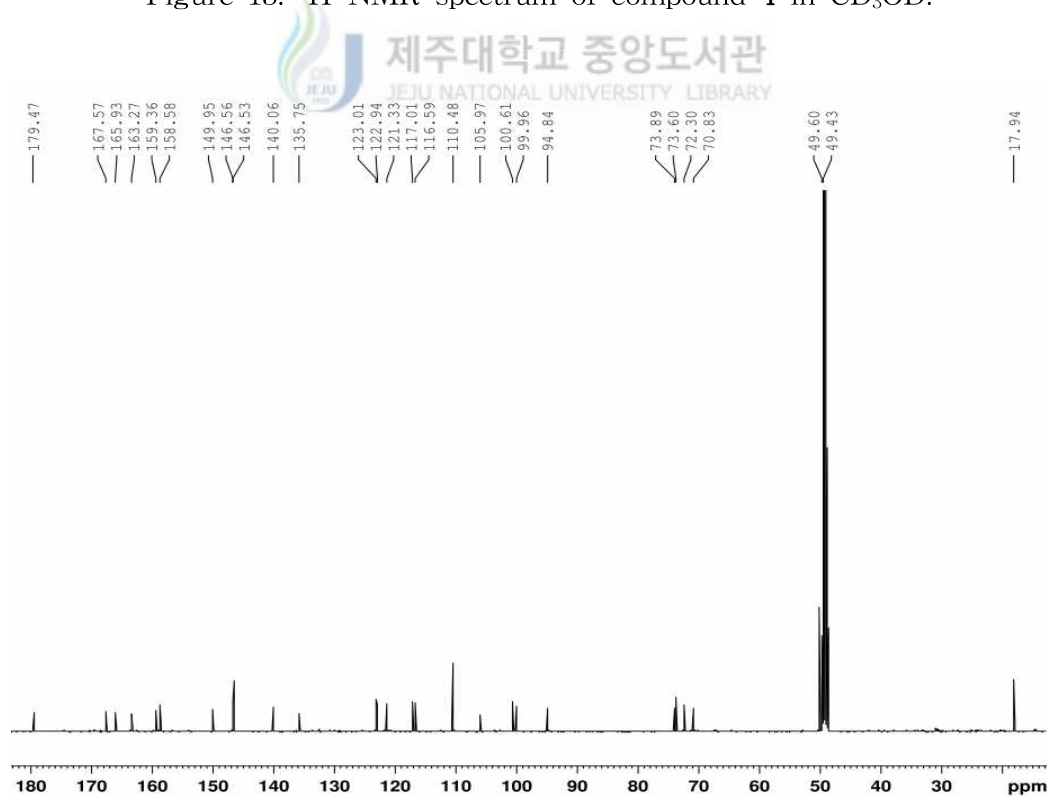


Figure 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD .

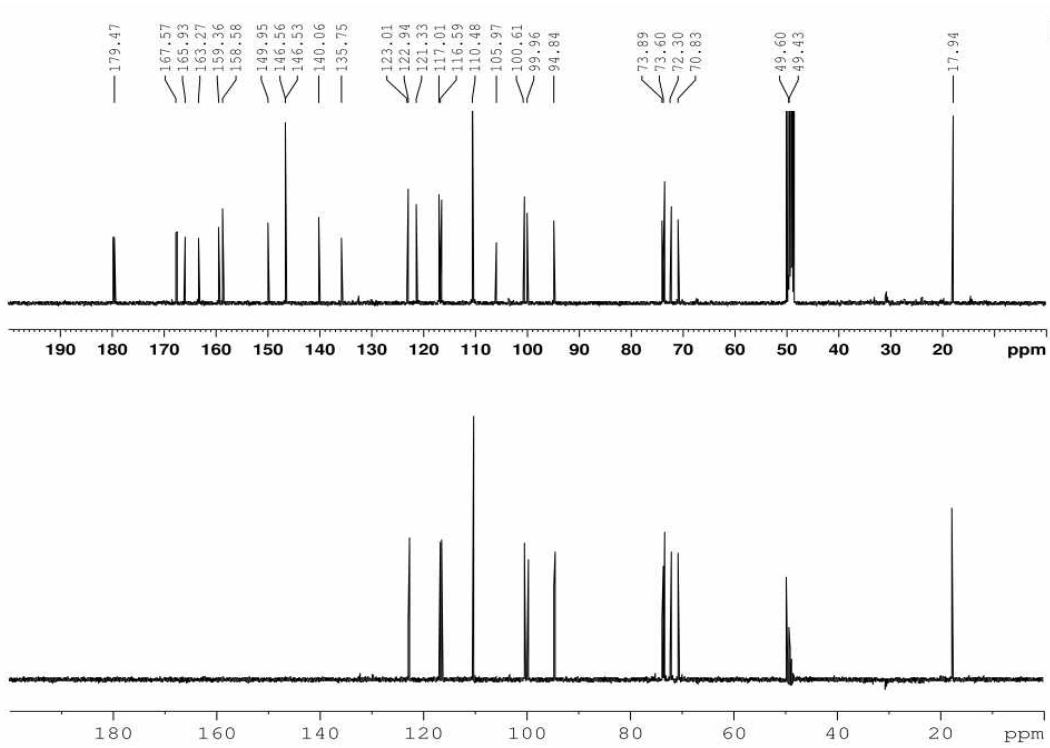


Figure 15. DEPT-135 spectrum of compound 4 in CD₃OD.

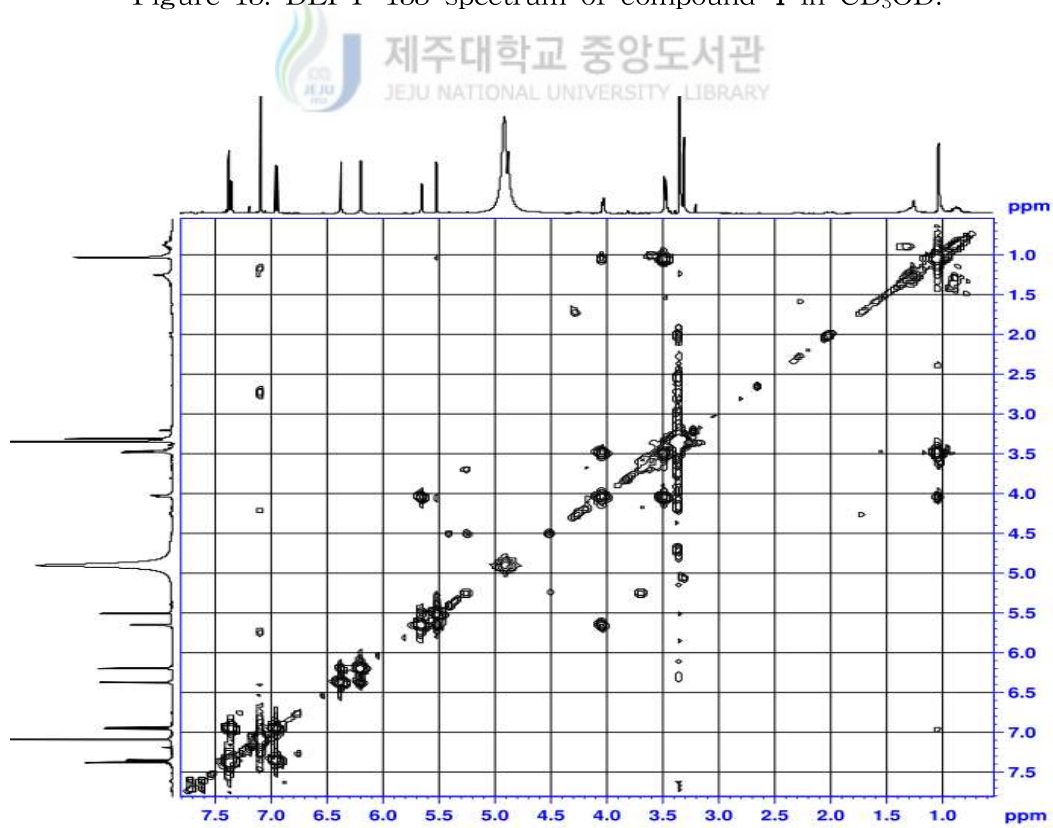


Figure 16. COSY spectrum of compound 4 in CD₃OD.

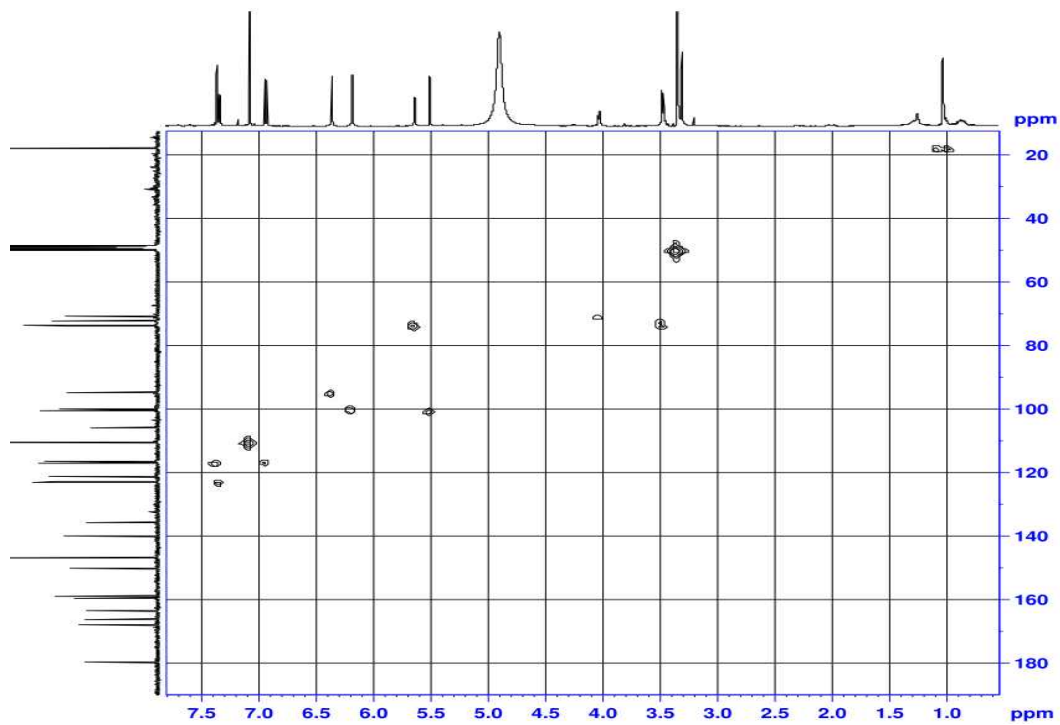


Figure 17. HMQC spectrum of compound **4** in CD₃OD.

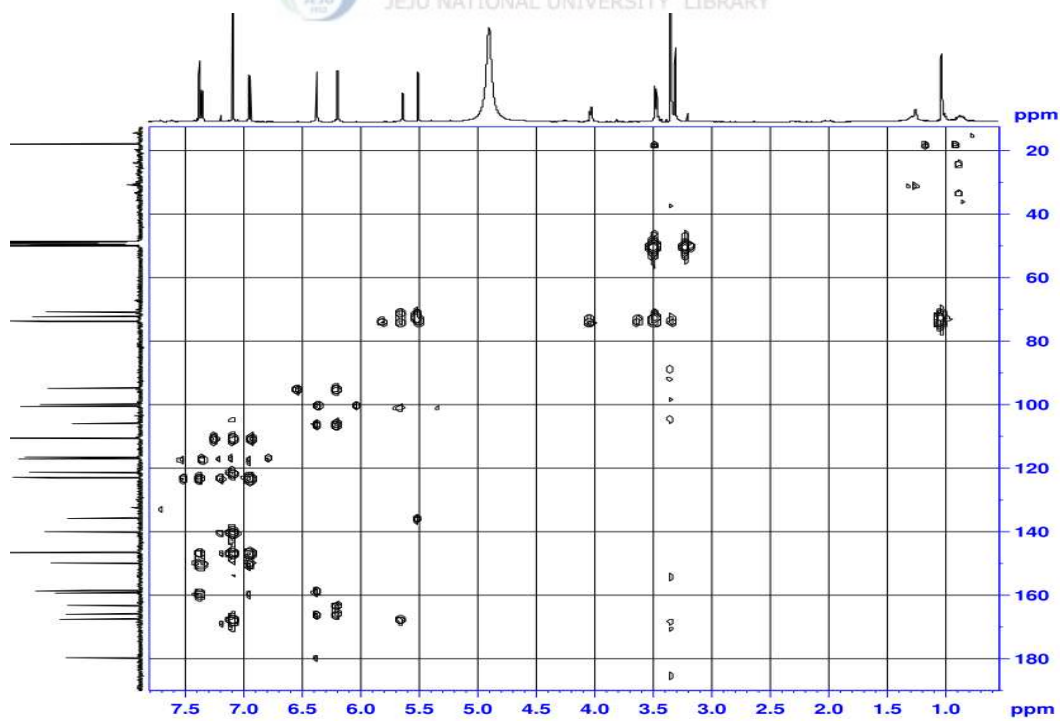


Figure 18. HMBC spectrum of compound **4** in CD₃OD.

2. 항산화 활성 실험 결과

2-1. 총 폴리페놀 함량 측정

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 19)을 작성하여 소사나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 1 mg 당 함유하고 있는 gallic acid 의 양(GAE ; gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다.

실험 결과, 추출물에서 279.3 μg GAE/1 mg, 분획물 중 EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 447.3, 224.3 μg GAE/1 mg으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 20). 이는 다른 항산화 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.



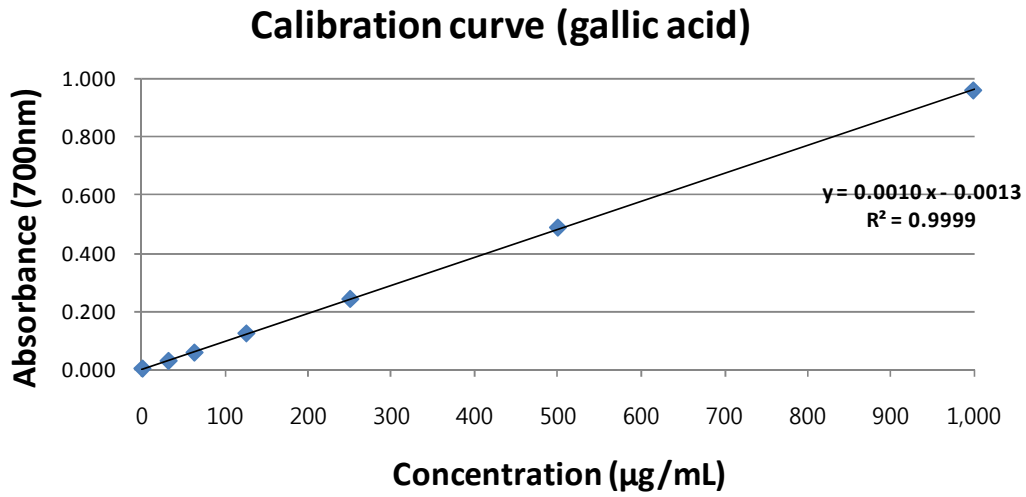


Figure 19. Calibration curve for quantification of total polyphenolic compounds.

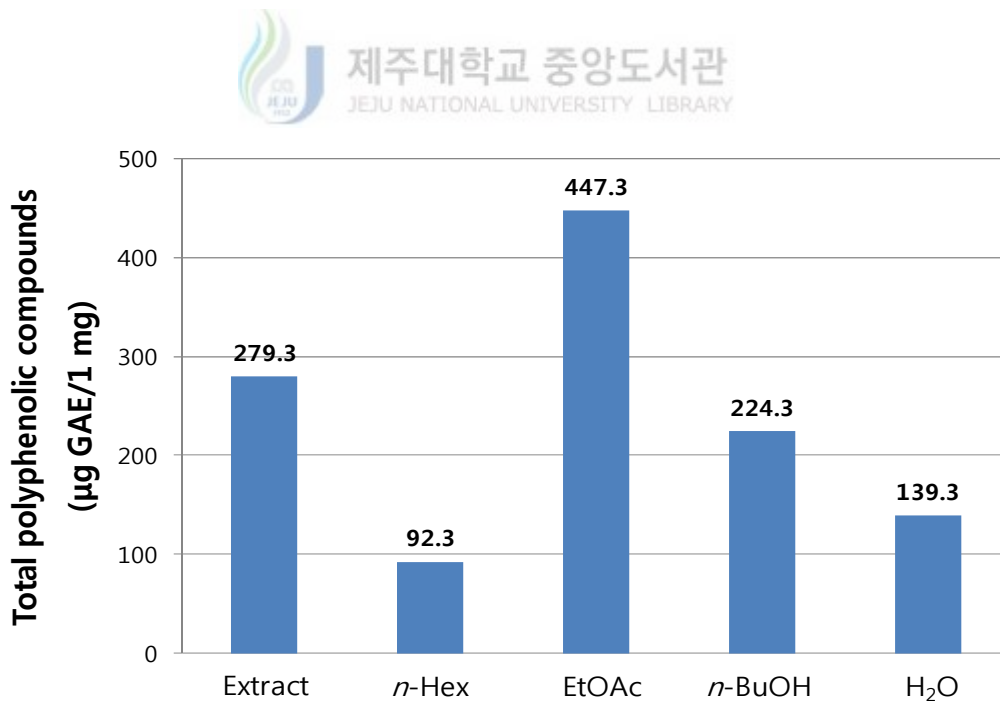


Figure 20. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers.

2-2. DPPH radical 소거 활성

2-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성

소사나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물 및 분획물에 대하여 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 실험을 실시하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과 SC_{50} 값이 추출물에서 15.8 $\mu\text{g/mL}$, EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 9.4, 19.8 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C (7.4 $\mu\text{g/mL}$)만큼의 좋은 DPPH radical 소거활성을 나타내었다 (Figure 21-22).



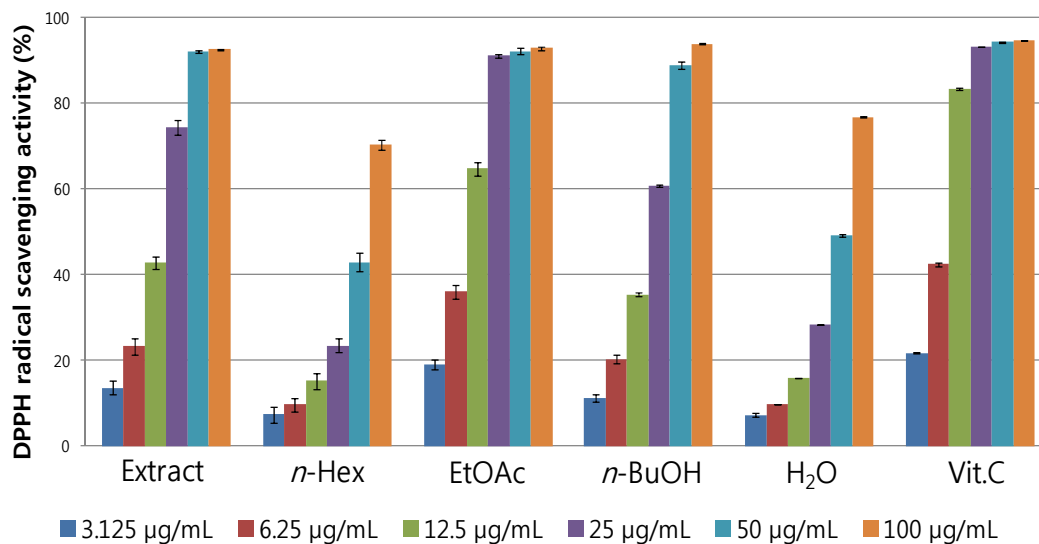


Figure 21. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.

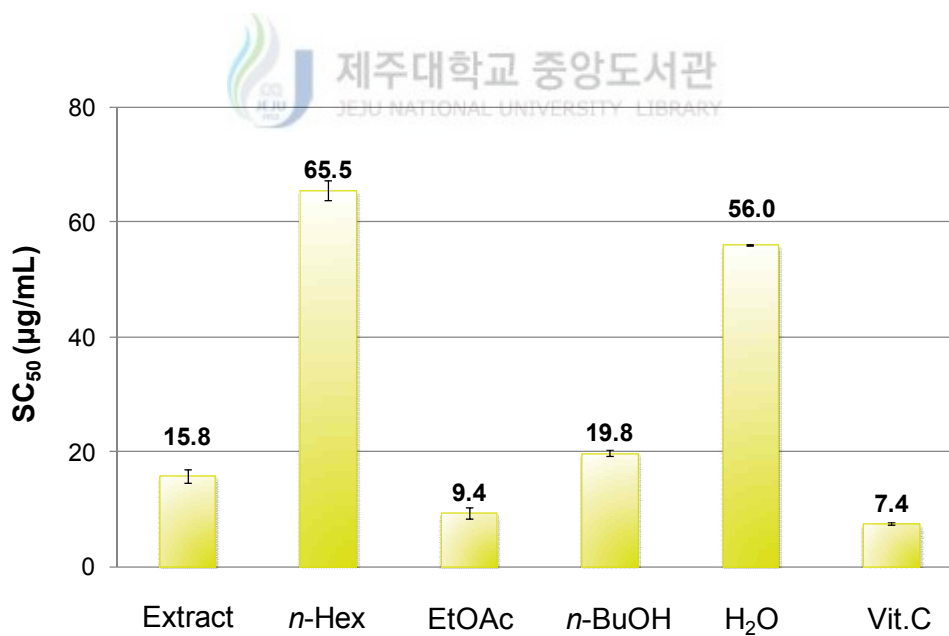


Figure 22. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.

2-3. ABTS radical cation 소거 활성

2-3-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성

소사나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대하여 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 실험을 실시하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과 추출물에서 8.1 $\mu\text{g/mL}$, EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O layer에서 SC_{50} 값이 각각 5.0, 8.8, 18.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 vitamin C (5.8 $\mu\text{g/mL}$)만큼 좋은 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 23-24).



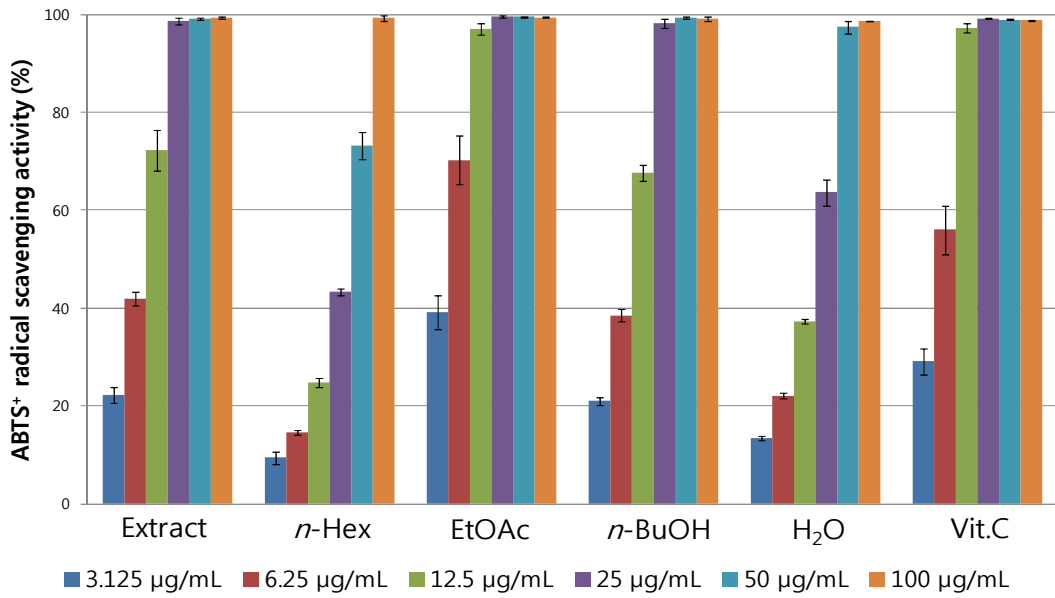


Figure 23. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers.

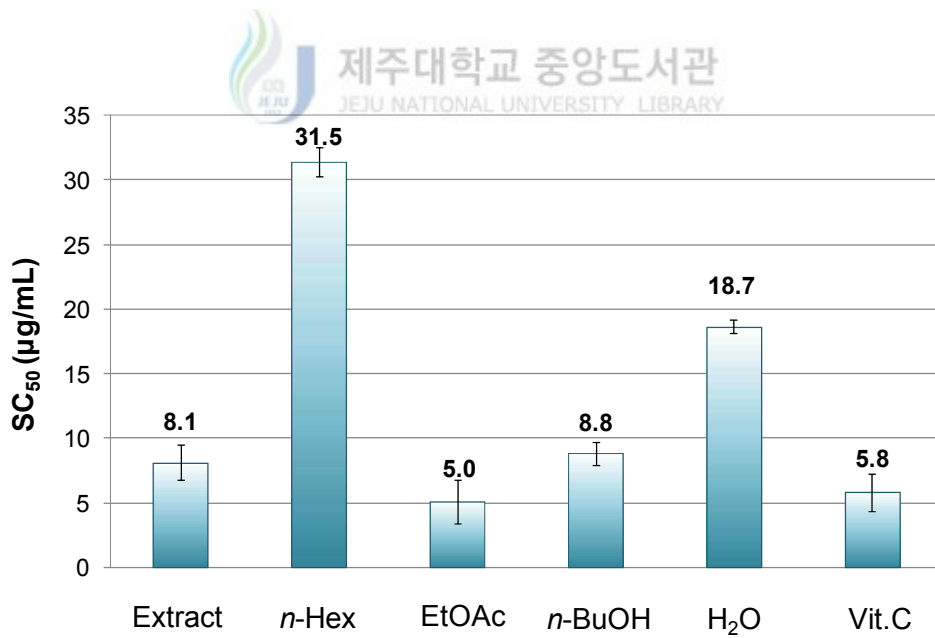


Figure 24. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers.

2-4. Superoxide radical anion 소거 활성

2-4-1. 추출물 및 분획물의 superoxide radical anion 소거 활성

소사나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대하여 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 실험을 실시하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과 SC_{50} 값이 추출물에서 32.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O layer에서 각각 20.2, 22.7, 51.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인 vitamin C (21.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 유사한 superoxide radical anion 소거 활성을 나타냈다(Figure 25-26).

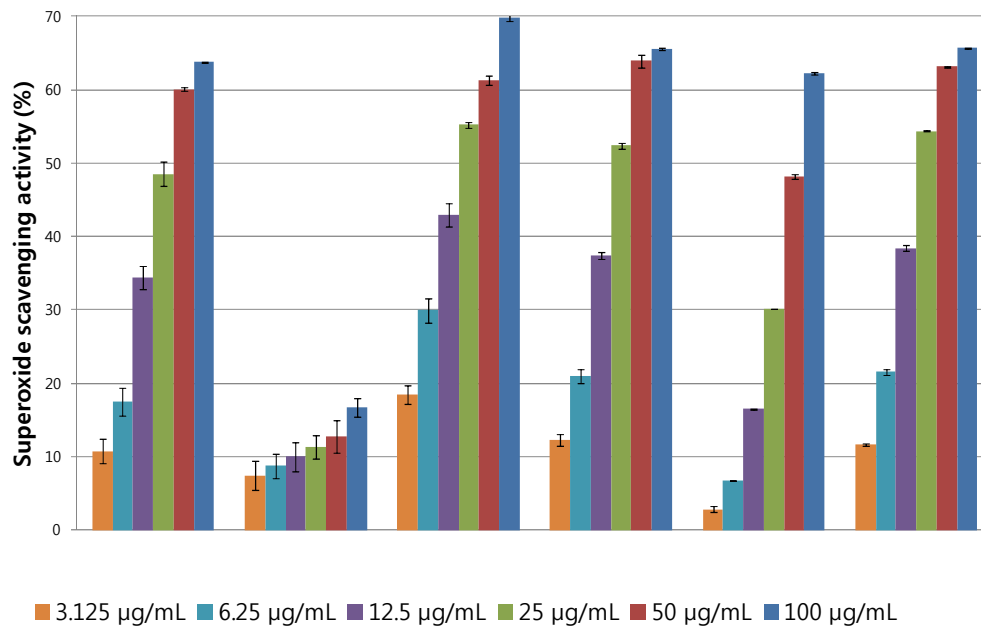


Figure 25. Superoxide radical anion scavenging activities of extract and solvent layers.

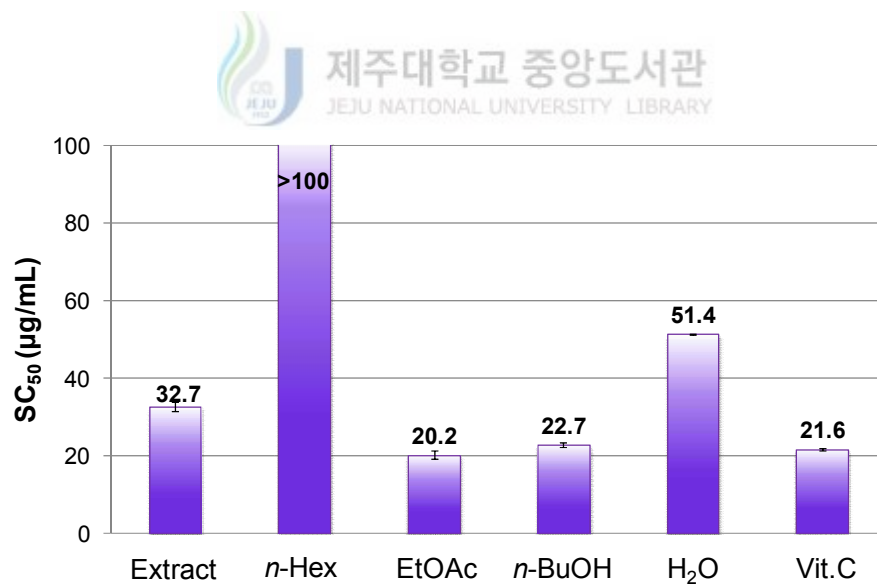


Figure 26. SC₅₀ values of superoxide radical anion scavenging activities of extract and solvent layers.

3. 미백 활성 실험 결과

3-1. B16F10 murine melanoma cell에서의 melanin contents 측정 및 세포독성 평가

3-1-1. 추출물 및 분획물의 melanin contents 측정 및 세포독성 평가

소사나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL 농도로 melanin contents 양을 확인한 결과 추출물에서 72.2%의 저해율을 나타냈으며, 분획물 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 각각 73.3, 84.3, 33.7, 79.4%의 저해율로 대조군인 Melasolve (67.2%, concentration : 20 µM)보다 좋은 미백 활성을 나타냈다(Figure 27).

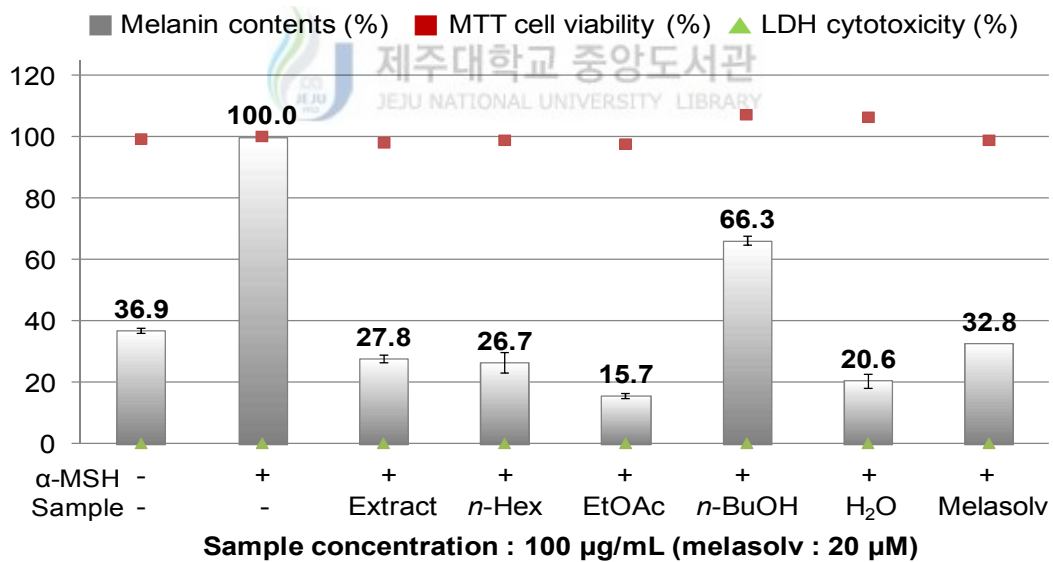


Figure 27. Effect of extract and solvent layers on melanin contents and cytotoxicities.

이 중 EtOAc layer의 melanin contents 저해율이 84.3%로 가장 좋은 미백 활성을 나타내어 농도별로 희석하여 추가 실험을 진행한 결과, 농도의존적으로 melanin contents의 양이 감소하는 것을 알 수 있었다(Figure 28).

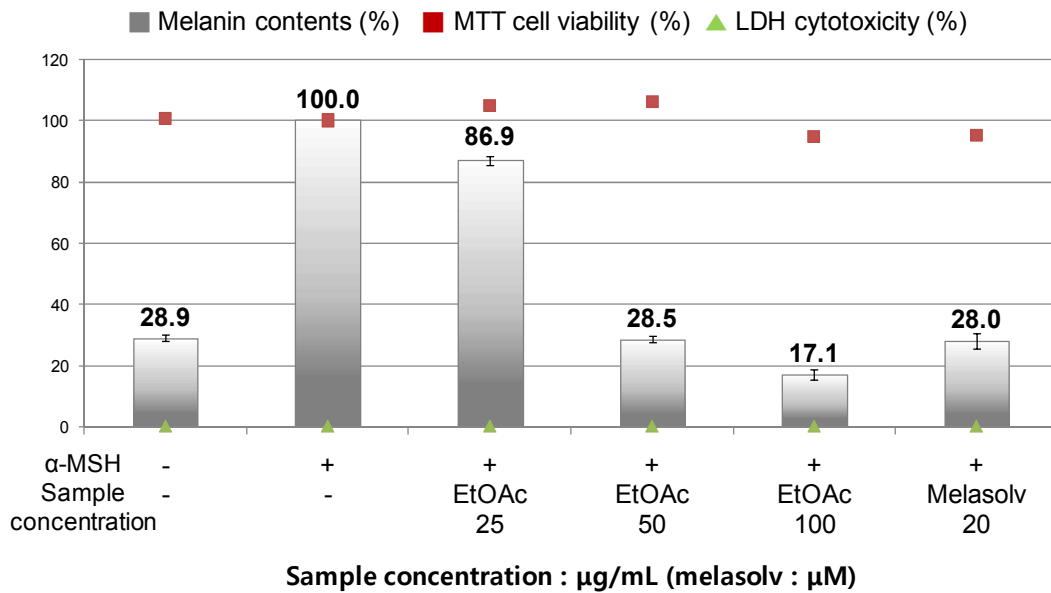


Figure 28. Effect of ethyl acetate layer on melanin contents and cytotoxicities.

3-1-2. 분리된 화합물의 melanin contents 측정 및 세포독성 평가

분리된 화합물에 대해 250 μM 농도로 melanin contents 양을 확인한 결과 compound 1과 compound 4에서 79.5, 79.4%의 저해율을 나타내며 LDH를 방출하지 않고, MTT cytotoxicity (%)가 줄어 든 것을 알 수 있었다(Figure 29). 이는 compound 1과 compound 4가 세포의 성장을 억제시켜 melanin contents 가 줄어들었다고 해석하였으며 농도를 줄여 추가 실험을 진행하였다(Figure 30).

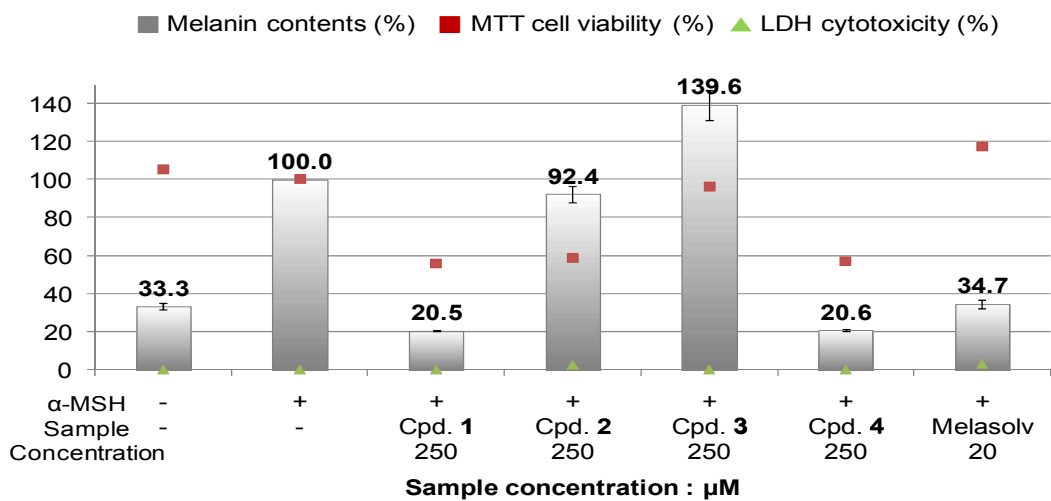


Figure 29. Effect of compounds on melanin contents and cytotoxicities.

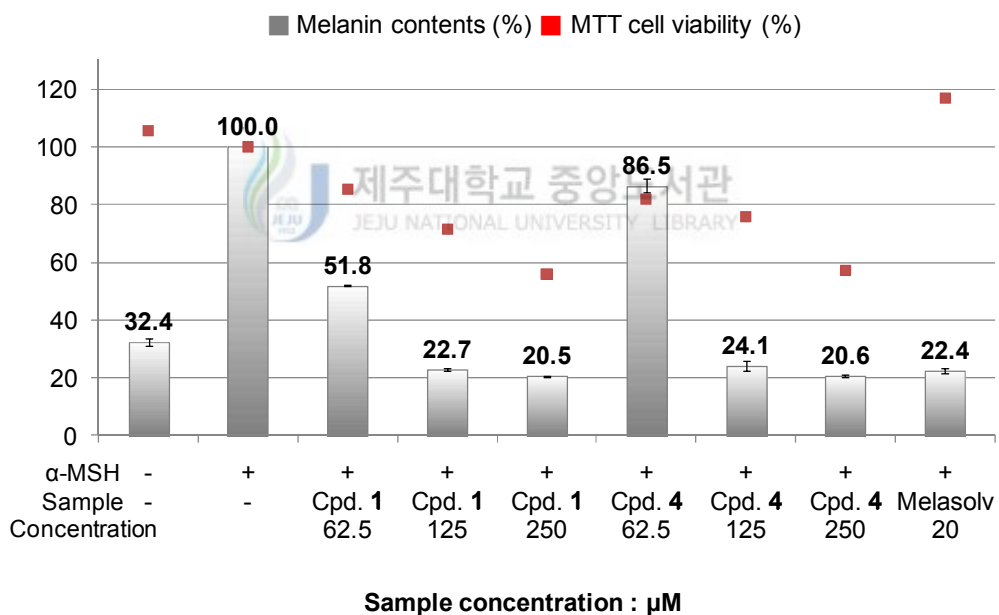


Figure 30. Effect of compound 1, 4 on melanin contents and cytotoxicities.

3-2. B16F10 melanoma cell에서 intracellular tyrosinase 측정 결과

3-2-1. 추출물 및 분획물의 intracellular tyrosinase 측정 결과

소사나무 잎 70 % 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL 농도로 intracellular tyrosinase 양을 확인한 결과 추출물에서 55.9 %의 저해율을 나타냈으며, 분획물 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 각각 42.9, 81.0, 49.7, 61.3 %의 저해율로 대조군인 Melasolve (19.3 %, concentration : 20 µM)보다 좋은 intracellular tyrosinase 저해율을 보였다(Figure 31).

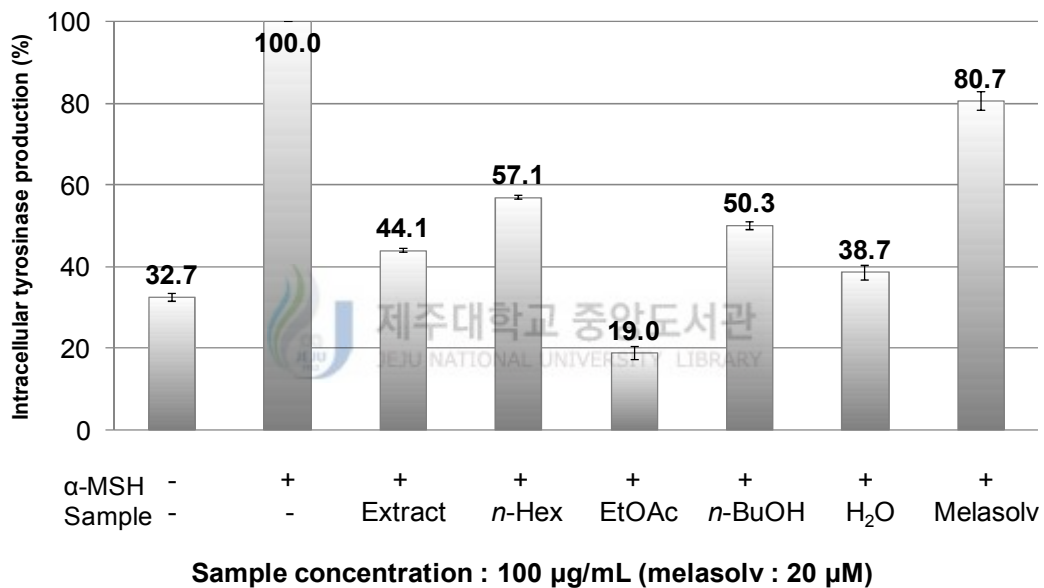


Figure 31. Intracellular tyrosinase inhibition of extract and solvent layers.

위 결과를 바탕으로 가장 활성이 좋은 EtOAc layer를 농도별로 희석하여 intracellular tyrosinase 양을 측정하여 농도 의존적으로 intracellular tyrosinase 를 저해하는 것을 확인하였다(Figure 32).

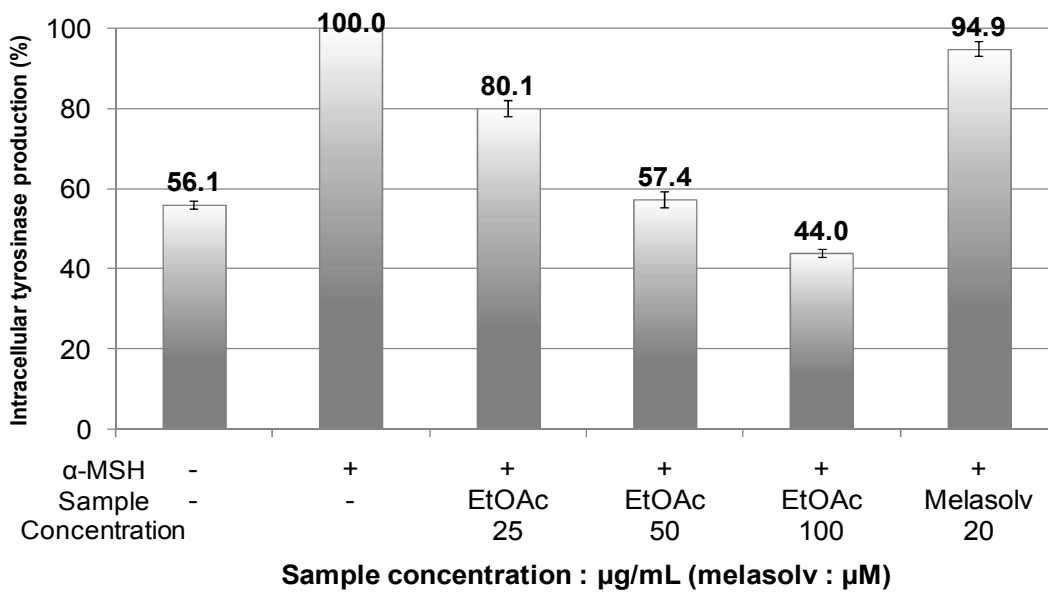


Figure 32. Intracellular tyrosinase inhibition of ethyl acetate layer.

3-2-2. 분리된 화합물의 intracellular tyrosinase 측정 결과

소사나무 잎으로부터 분리한 compound 1과 compound 4에 대해 62.5, 125, 250 μM 농도로 처리하였을 때의 intracellular tyrosinase 양을 확인한 결과, 두 화합물 모두 농도의존적으로 intracellular tyrosinase의 양이 감소하는 것을 알 수 있었다(Figure 33).

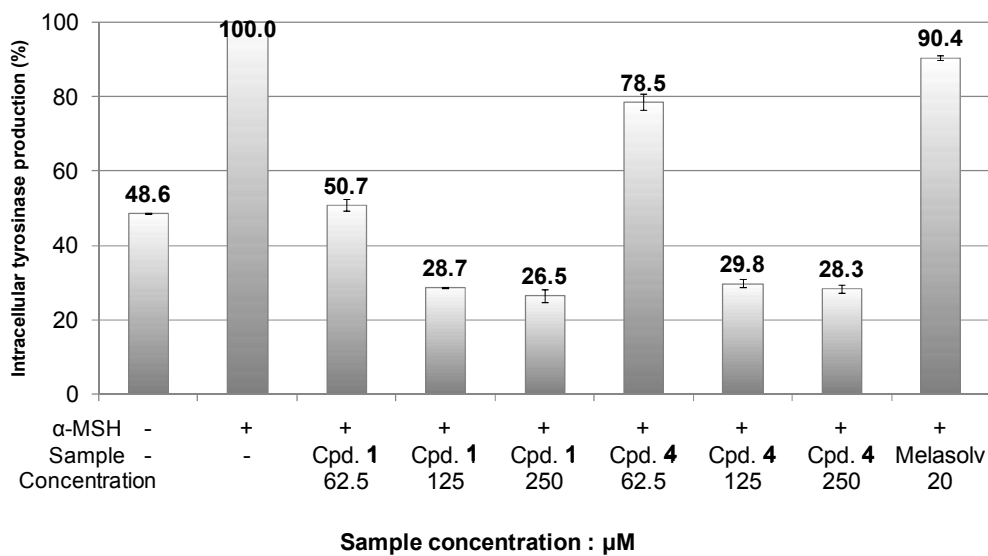


Figure 33. Intracellular tyrosinase inhibition of compounds.

4. 항염 활성 실험결과

4-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포독성 평가

소사나무 잎 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대해 50 µg/mL 농도로 NO 생성량을 확인한 결과 추출물에서 34.6%의 저해율을 나타냈으며, 분획물 *n*-Hex, EtOAc layer 에서 각각 43.3, 55.3%의 저해율로 좋은 항염 활성을 나타냈다(Figure 34).

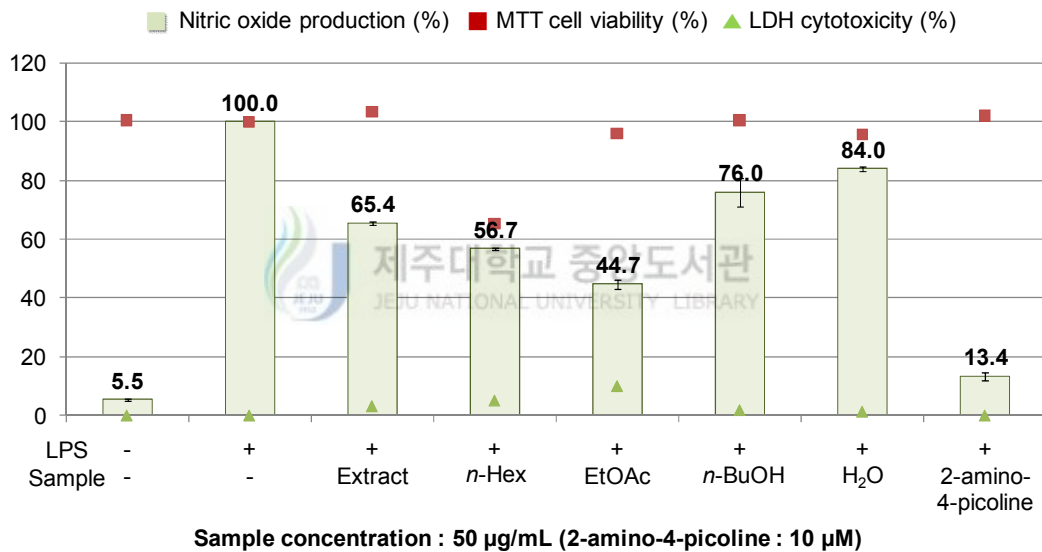


Figure 34. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of extract and solvent layers.

위 결과를 바탕으로 NO의 생성이 가장 많이 줄어든 EtOAc layer를 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 추가 실험을 진행하였다. 그 결과 EtOAc layer는 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 세포독성이 나타났고, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 세포독성 없이 NO 생성량을 각각 14.2, 40.1 % 감소시켜 좋은 항염 활성을 나타내는 것을 확인하였다(Figure 35).

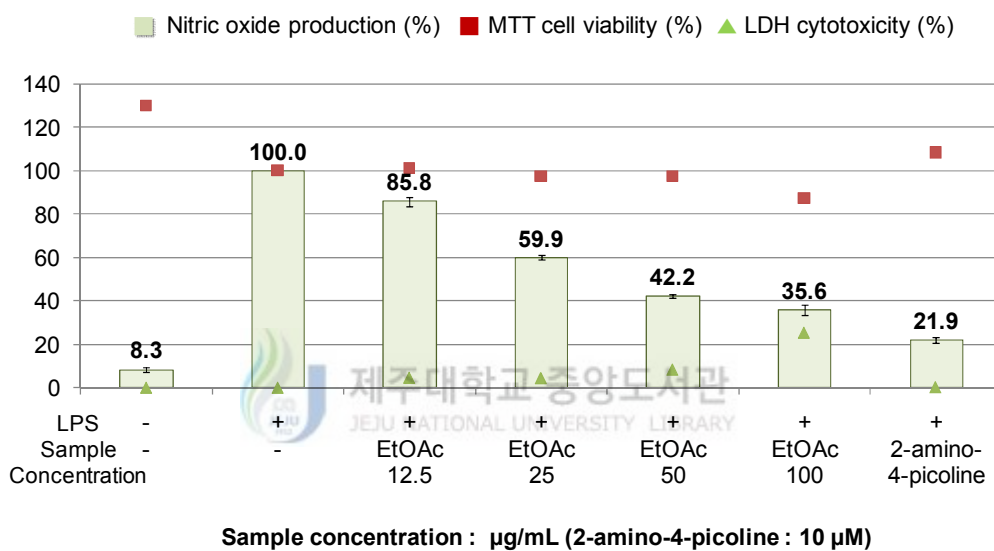


Figure 35. NO production inhibitory activities and cytotoxicities of ethyl acetate layer.

5. 항균 활성 실험 결과

5-1. Paper disc diffusion method 측정

소사나무 잎 추출물 및 분획물의 항균 활성 측정을 위해 피부 상재균인 *S. epidermidis*를 사용하였다. *S. epidermidis* 3709와 3711에서 EtOAc layer의 paper diffusion test 직경 값이 각각 22, 19 mm로, 양성대조균인 erythromycin의 직경 값(26 mm, 26 mm)과 비교하였을 때 근접한 값을 보이면서 좋은 항균 활성을 나타내었다.

Table 4. Paper disc diffusion of extract and solvent layers from the leaves of *C. turczaninowii*.

		<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709	<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711
		Clear zone (mm) ^{a)}	
Sample ^{c)}	Extract	20	17
	<i>n</i> -Hexane layer	13	12
	EtOAc layer	22	19
	<i>n</i> -BuOH layer	13	15
	H ₂ O layer	13	- ^{b)}
Negative control	DMSO:EtOH (1:1)	-	-
Positive control ^{c)}	Erythromycin	26	26

a) The diameter of the paper disk, 8 mm.

b) No activity.

c) Concentration : sample (100 mg/mL), erythromycin (6.25 mg/mL).

5-2. 추출물 및 분획물의 minimum inhibitory concentration 및 minimum bactericidal concentration 측정

소사나무 잎 추출물 및 분획물에 대해 minimum inhibitory concentration를 측정한 결과, *S. epidermidis* 3709에서 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH layer는 156.25 µg/mL에서 최소저해농도를 나타냈으며 H₂O layer에서는 625 µg/mL에서 최소저해농도를 나타내어 양성대조군인 erythromycin 보다는 활성이 없었지만 비교적 좋은 활성을 나타내었다. *S. epidermidis* 3711에서 EtOAc layer의 MIC값이 78.25 µg/mL로 추출물 및 분획물 중 가장 좋은 활성을 나타냈다.

이후 minimum bactericidal concentration를 측정한 결과 *S. epidermidis* 3709에서 추출물 및 분획물 모두가 항균 활성을 나타내었으나, 그 중에서도 EtOAc layer의 MBC값이 156 µg/mL로 가장 좋은 활성을 나타냈다. *S. epidermidis* 3711에서는 *n*-BuOH layer의 MBC값이 156 µg/mL로 가장 좋은 활성을 나타냈다.

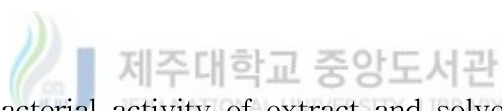


Table 5. Antibacterial activity of extract and solvent layers from the leaves of *C. turczaninowii*.

		<i>S. epidermidis</i> CCARM 3709		<i>S. epidermidis</i> CCARM 3711	
		MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
Sample	Extract	156.25	1250.00	312.25	1250.00
	<i>n</i> -Hexane	156.25	312.00	156.25	1250.00
	EtOAc	156.25	156.00	78.25	1250.00
	<i>n</i> -BuOH	156.25	1250.00	312.50	625.00
	H ₂ O	625.00	2500.00	625.00	2500.00
Negative control	DMSO:EtOH =1:1	625.00	5000.00	625.00	5000.00
Positive control	Erythromycin	0.076	0.300	0.076	4.880

6. 결론

본 논문은 제주에 자생하고 있는 소사나무(*Carpinus turczaninowii*) 잎 추출물로부터 얻은 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고, 좋은 활성을 갖는 분획물에서 화합물을 분리·동정하였다. 또한 본 연구는 분리된 화합물들의 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성에 대한 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 진행하게 되었다.

소사나무 잎의 70%에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer를 얻었고 이 추출물과 분획물들에 대해 항산화, 미백, 항염 및 항균 활성 실험을 진행하였다.

추출물 및 분획물들의 항산화 활성 실험 결과, 총 폴리페놀 함량 측정에서는 EtOAc layer에서 447.3 µg/mL로 가장 높았다. DPPH 라디칼 소거능 실험에서는 추출물, EtOAc, *n*-BuOH layer에서 SC₅₀값이 각각 15.8, 9.4, 19.8 µg/mL로 positive control인 vitamin C (14.5 µg/mL)와 유사한 라디칼 소거 활성을 보였다. 또한 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성 실험 결과, 추출물에서 8.1 µg/mL, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 SC₅₀값이 각각 5.0, 8.8, 18.7 µg/mL로 대조군인 vitamin C (5.8 µg/mL)와 유사한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었으며, superoxide radical anion 소거 활성 실험에서는 EtOAc layer의 SC₅₀값이 20.2 µg/mL로 대조군인 vitamin C (21.6 µg/mL)에 비해 좋은 superoxide radical anion 소거 활성을 나타내었다.

추출물 및 분획물들의 미백 활성 실험 결과, B16F10 murine melanoma cell에서 100 µg/mL 농도로 melanin contents양을 확인하였을 때 추출물, *n*-Hex, EtOAc, H₂O layer에서 각각 72.2, 73.3, 84.3, 79.4%의 저해율로 대조군인 Melasolve (67.2%, concentration : 20 µM)보다 좋은 미백 활성을 나타냈다.

추출물 및 분획물들의 항염 활성 실험은 NO의 생성량을 비교하여 측정하였는데, EtOAc layer가 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성량을 저해시키는 것을 확인 할 수 있었다.

추출물 및 분획물들의 항균 활성 실험 결과, EtOAc layer의 MIC값 및

MBC값이 추출물 및 분획물 중 가장 낮아 좋은 항균 활성을 나타냈다.

이와 같은 결과를 바탕으로 EtOAc layer에서 화합물 분리를 진행하였고, medium pressure liquid chromatography (MPLC), 순상 silicagel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D, 2D NMR을 이용하여 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 4개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 ethyl gallate (1), quercitrin (2), afzelin (3), quercitrin-2"-O-gallate (4)로 확인되었다. 이 중 compound 1과 4는 소사나무에서 처음으로 분리하였다.

이렇게 분리된 화합물들에 대해 문헌조사를 한 결과 분리한 4개의 화합물들이 항산화^{27)~32)} 및 항염^{29), 31)~33)}활성에 관한 선행 연구가 진행되어있었다.

분리된 화합물들에 대해 B16F10 murine melanoma cell에서 compound 1, 4를 250 μ M농도로 처리하였을 때, LDH를 방출하지 않아 세포독성이 없음을 알 수 있었다. 또한 위의 두 화합물을 농도별로 처리한 결과 melanin의 생성량, 세포생장률 및 세포 내 tyrosinase의 양이 농도의존적으로 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 compound 1, 4가 세포생장을 억제함과 동시에 세포 내 tyrosinase 생성을 억제하여 melanin의 생성량을 감소시키는 것을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 소사나무 잎을 이용한 천연 항산화제, 미백제, 항염 성분 및 항균제 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

7. 참고문헌

- 1) Lee, H. J.; Park, S. N. "Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Quercus salicina* Blume Extracts" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2011**, 37(2), 143-152.
- 2) Ahn, Y. J.; Kim, S. Y.; Ok, J. H.; Wang, H.; Park, C. H.; Kim, S. H.; Heo, Y. S.; Jeon, Y. H.; Park, S. S. "Antioxidant Activity of *Persicaria perfoliata* Extracts" *J. Soc. Coemet. Scientists Korea*, **2009**, 35(3), 235-241.
- 3) 손장락, "생노병사의열쇠, 활성산소와 항산화제", 바이오메디컬, **2004**, 15.
- 4) Han, S. B.; Kwon, S. K.; Kong, B. J.; Kim, K. J.; Park, S. N. "Antioxidative Effect and Tyrosinase Inhibitory Activity of the Unripened Fruit Extract of *Rubus coreanus* Miquel", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2013**, 39(4), 295-302.
- 5) Ahn, Y. J.; Kim, S. Y.; Ok, J. H.; Wang, H.; Park, C. H.; Kim, S. H.; Heo, Y. S.; Jeon, Y. H.; Park, S. N. "Antioxidant Activity of *Persicaria perfoliata* Extracts", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2009**, 35(3), 235-241
- 6) 하병조, "기능성 화장품", 신광출판사, **2001**, 67-69
- 7) 김정은, "비쭈기나무 잎으로부터 항산화 미백 및 주름개선 활성 성분 규명", 제주대학교대학원, 2011, 석사학위논문.
- 8) L, T. H.; Kim H. J.; Kim Y. B. "Depigmentation Activity of Barley, Unpolished Rice, Job's-tear", *대한안미비인후피부과학회지*, **2003**, 16(2), 57-78.

9) Yoon, W. J.; Lee, J. A.; Kim, K. N.; Kim, J. Y.; Park, S. Y. "In vitro anti-inflammatory activity of the *Artemisia flkudo* extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells" *Korean J. Food Sci. Technol.*, **2007**, *39* 464-469.

10) Yoon, W. J.; Lee, J. A.; Kim, K. N.; Kim J. Y.; Park, S. Y. "In vitro Anti-inflammatory Acrivity of the *Artemisia fukudo* Extracts in Murine Macrophage RAW264.7 Cells" *Korean J. Food Sci. Technol.*, **2007**, *39*(4), 464-469.

11) Kim, J. M.; Oh, H. C.; Song, S. P.; Kim, N. K.; Hwang, C. Y. "Study on the Anti-microbial Activity, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of *Several Herb-Extract*" *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **2006**, *20*(1), 103-114.

12) Lee, M. H.; Jeong, J. H.; Jeong, M. S.; Chang, S. H.; Erk, H. "Anti-inflammatory Function of the Sophora japonica Extract Rutin: The Inhibitory Effect of Rutin of Korean Sophora japonica on the Productions of NO and TNF-alpha from Mouse Peritoneal Macrophages" *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **2010**, *18*(2), 105-112.

13) 고태나, 소사나무 잎으로부터 항산화 및 항염 활성 성분 규명, 제주대학교 대학원, **2012**, 석사학위논문.

14) Jeon, J. I. ; Jang, J. S. "Foliar flavonoids of genus *Carpinus* in eastern Asia primarily based on native taxa to Korea" *Kor. J. Plant Tax.*, **2000**, *30*(2), 139-153.

15) Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(phenol dericatives) in urine" *J. Biol. Chem.*, **1915**, *22*, 305-308.

- 16) Blois, M. S. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.
- 17) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A. Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, *26*, 1231-1237.
- 18) Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; J. E. L.; Huang, T. C.; Ho, C. T. "Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*)" *Food Chemistry*, **2001**, *75*, 197-202.
- 19) 신일상사, 최신 실험 미생물학, 미생물 및 면역학분과회, **2001**.
- 20) Bamba H.; Kondo Y.; Wong R. M. "Evaluation of an assay method of the susceptibility of antimicrobial agents using a 96-well flat-bottom microplate and a microplate reader" *Am J Gastroenterol*, **1997**, *92*, 659-664.
- 21) Estrada¹, O.; Hasegawa¹, M.; Mujica, F. G.; Motta, N.; Perdomo¹, E.; Solorzano, A.; Mendez¹, J.; Mendez¹ B.; Zea, E. G. "Identification and activity of ethyl gallate as an antimicrobial compound produced by *Geranium carolinianum*" *Weed Biology and Management*, **2009**, *9*, 169 - 172.
- 22) Burn. D. C. ; Ellis, D. A.; March, R. E. "A predictive tool for assessing ¹³C-NMR chemical shifts of flavonoids" *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, *45*, 835-845.

- 23) Lee, J. H.; Ku, C. H.; Baek, N. I.; Kim, S. H.; Park, H. W.; Kim, D. K. "Phytochemical Constituents from *Diodia teres*" *Arch. Pharm. Res.*, **2004**, 27(1), 40-43.
- 24) 천연물화학고재편찬위원회, "천연물화학", 영림사, 2003, 130-131
- 25) Chung, S. K.; Kim, Y. C.; Takaya, Y.; Terachima, K.; Niwa, M. "Novel Flavonol Glycoside, 7-*O*-Methyl Mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and Its Antioxidant Effect" *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 54, 4664-4668.
- 26) Omar, E.; Masahisa. H.; Freddy, G. M.; Norma M.; Elsa P.; Alejandra S.; Jeannette M.; Bernardo M.; Gabriela Z. "Evaluation of Flavonoids from *Bauhinia megalandra* Leaves as Inhibitors of Glucose-6-Phosphatase System" *Phytother. Res.* **2005**, 19, 859 - 863.
- 27) Chen, Y.; Wang, J.; Oua, Y.; Chena, H.; Xiao, S.; Liu, G.; Cao, Y.; Huang, Q. "Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from *Eucalyptus* leaves (*Eucalyptus grandis* · *Eucalyptus urophylla* GL9)", *Journal of Functional Foods*, **2014**, 7, 737-745.
- 28) Zheng G.; Xu L.; Wua P.; Xie, H.; Jiang, Y.; Chen, F.; Wei, X. "Polyphenols from longan seeds and their radical-scavenging activity" *Food Chemistry*, **2009**, 116, 433-436.
- 29) Choe, K. I.; Kwon, J. H.; Park, K. H.; Oh, M. H.; Kim, M. H.; Kim, H. H.; Cho, S. H.; Chung, E. K.; Ha, S. Y.; Lee, M. W. "The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR" *Molecules*, **2012**, 17, 11484-11494.

- 30) Xu, G. H.; Ryoo, I. J.; Kim, Y. H.; Choo, S. J.; Yoo, I. D. "Free radical scavenging and anti elastase activities of flavonoids from the fruits of *Thuja orientalis*" *Archives of Pharmacal Research*, **2009**, *32*(2), 275-282
- 31) Mao, Y. W.; Tseng, H. W.; Liang, W. L.; Chen, I. S.; Chen S. T.; Lee, M. H.; "Anti-Inflammatory and Free Radial Scavenging Activities of the Constituents Isolated from *Machilus zuihoensis*" *Molecules*, **2011**, *16*, 9451-9466.
- 32) Kim, B. H.; Choi, J. S.; Yi, E. H.; Lee, J. K.; Won, C.; Ye, S. K.; Kim, M. K. "Relative Antioxidant Activities of Quercetin and Its Structurally Related Substances and Their Effects on NF- κ B/CRE/AP-1 Signaling in Murine Macrophages" *Molecules and Cells*, **2013**, *35*, 410-420.
- 33) Park, P. H.; Hur, J.; Kim, Y. C.; An, R. B.; Sohn, D. S. "Involvement of heme oxygenase-1 induction in inhibitory effect of ethyl gallate isolated from *Galla Rhois* on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages" *Archives of Pharmacal Research*, **2011**, *34*(9), 1545-1552.