



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

수단그라스로부터 항산화 및 항균
활성 성분 규명



濟州大學校 大學院

化 學 科

張 亨 守

2015年 2月

수단그라스로부터 항산화 및 항균 활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

張 亨 守

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2015年 2月

張亨守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

2015年 2月

Identification of Anti-oxidative and
Anti-bacterial Constituents of
Sorghum × drummondii (Nees ex Steud.)
Millsp. & Chase

Hyeang-Su Jang
(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	iii
List of Tables	iii
List of Figures	iii
List of Abbreviations	vi
Abstract	vii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 시약 및 기기	11
2. 재료	12
3. 추출, 분획 및 분리	
3-1. 수단그라스의 추출 및 분획	13
3-2. 활성 성분 분리	14
4. 활성실험	
4-1. 항산화 활성 실험	16
4-1-1. 총 페놀 함량측정	16
4-1-2. 총 플라보노이드 함량측정	16
4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험	17
4-1-4. ABTS radical cation 소거 활성 실험	18
4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험	20
4-2-1. 세포배양	20
4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가	20
4-2-3. 세포독성 평가	20
4-3. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백 활성 실험	

4-3-1. 세포배양	22
4-3-2. Melanogenesis 저해 효과 측정	22
4-4. 항균 활성	
4-4-1. Paper disc diffusion method	23
4-4-2. MIC (minimum inhibitory concentration)	23
III. 결과 및 고찰	
1. 화합물의 구조 결정	
1-1. Compound 1의 구조해석	24
1-2. Compound 2의 구조해석	27
1-3. Compound 3의 구조해석	31
1-4. Compound 4의 구조해석	34
2. 항산화 활성 실험 결과	
2-1. 총 페놀 함량 측정	37
2-2. 총 플라보노이드 함량측정	38
2-2. DPPH radical 소거 활성	40
2-3. ABTS radical cation 소거 활성	41
3. 항염 활성 실험 결과	42
5. 항균활성 실험 결과	
5-1. 추출물 및 분획물의 항균 활성평가	47
5-2. MIC (minimum inhibitory concentration)	48
IV. 요약 및 결론	49
V. 참고문헌	51

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from <i>Sorghum</i> <i>× drummondii</i> (Nees ex Steud.) Millsp. & Chase	13
Scheme 2. Procedure of isolation of compound 1 , compound 2 , compound 3 or compound 4 from <i>Sorghum</i> <i>× drummondii</i> (Nees ex <i>Steud.</i>) Millsp. & Chase	14

List of Tables

Table 1. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 1 (400 MHz, CDCl ₃)	24
Table 2. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 2 (400 MHz, pyridine- <i>d</i> ₅)	28
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 3 (400 MHz, CDCl ₃)	32
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 4 (500 MHz, CDCl ₃)	35
Table 5. Anti-bacterial activity of solvent fractions	47
Table 6. Anti-bacterial activity of solvent fractions	47
Table 7. MIC activity of solvent fractions	48

List of Figures

Figure 1. Oxidative damage pathway.	2
Figure 2. Chemical Structures of Anti-oxidants.	4

Figure 3. Melanin synthetic pathway	6
Figure 4. Major production pathways of NO and PGE ₂	8
Figure 5. Pictures of <i>Sorghum × drummondii</i> (Nees ex Steud.) Millsp. & Chase	12
Figure 6. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant	17
Figure 7. Scavenging of ABTS ⁺ radical by an anti-oxidant	21
Figure 8. Principle of MTT assay	25
Figure 9. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃	25
Figure 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃	26
Figure 11. Chemical structure of compound 2	29
Figure 12. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in pyridine- <i>d</i> ₅	29
Figure 13. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in pyridine- <i>d</i> ₅	30
Figure 14. Chemical structure of compound 3	32
Figure 15. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃	33
Figure 16. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃	33
Figure 17. Chemical structure of compound 4	35
Figure 18. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃	36
Figure 19. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃	36
Figure 20. Calibration curve for gallic acid of total polyphenolic	37
Figure 21. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers	38
Figure 22. Calibration curve for quantification of total flavonoids	39
Figure 23. Total flavonids of solvent layers	39
Figure 24. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers	40
Figure 25. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers	41
Figure 26. NO production inhibitory activities of extract and solvent layers	42

Figure 27. NO production inhibitory activities of *n*-Hex layer43
Figure 28. NO production inhibitory activities of EtOAc layer.43
Figure 29. Cell viability & Cytotoxicity of extract and solvent layers. ·44
Figure 30. Cell viability & Cytotoxicity of *n*-Hex layer.44
Figure 31. Cell viability & Cytotoxicity of EtOAc layer.45
Figure 32. NO production inhibitory activities.46
Figure 33. Cell viability & Cytotoxicity.46



List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<i>C. hallaisanensis</i>	<i>Carpinus hallaisanensis</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
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Fr.	Fraction
int	Integration
IL-6	interleukin-6
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LPS	Lipopolysaccharide
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
NMR	Nuclear magnetic resonance
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
se	Sephadex LH-20 CC subfraction
TLC	Thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor- α
V, v	VLC subfraction
Vit. C	Vitamin C
VLC	Vacuum liquid chromatography
D.W	Distilled Water

Abstract

Identification of Anti-oxidative and Anti-bacterial Constituents of *Sorghum × drummondii* (Nees ex *Steud.*) Millsp. & Chase

Hyeang-su Jang

Department of Chemistry, Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

Sorghum × drummondii (Nees ex Steud.) Millsp. & Chase was investigated for anti-oxidative and Anti-bacterial activities. The dried *Sorghum × drummondii* was extracted for 24 hour with 70% ethanol. The obtained extract was successively partitioned into *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) and water (H₂O) fractions. For the anti-oxidation tests, the ethanol extract, EtOAc, BuOH and H₂O fractions showed good DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities. The total phenolic contents for the extract and solvent layers (Hex, EtOAc, BuOH, water) were estimated as 34.0, 36.3, 136.0, 39.3 and 17.7 mg (GAE/1 mg) respectively. In Anti-bacterial activities, the Hex fraction, EtOAc fraction showed the considerable inhibition for *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermis*.

Therefore, futher phytochemical studies were conducted for the ethyl acetate fraction, which led to isolation of four constituents such as

p-hydroxybenzaldehyde (1), Luteolin (2), Luteoloside (3) apigenin (4).
All of the compounds were isolated for the first time from this plant.



I. 서론

1. 천연물의 이용

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

최근 BT분야의 천연물 이용은 생리활성 물질인 3차 기능 성분 물질이 건강관리, 다이어트나 미용 혹은 각종 질병 예방 효과를 기대하여 많이 이용되고 있다. 이와같은 천연물들은 오랜 기간 생약을 비롯한 기능성 식품 및 기능성 화장품 분야에서 첨단 BT 기술의 발전과 함께 크게 부상되어, 거대한 산업 분야로 성장하고 있다.

2. 항산화

활성산소는 우리가 일상생활에서 생명유지를 위해 숨을 쉬고 음식을 먹거나 움직이는 동안 인체 내에서 끊임없이 생성되어 사라지고 있다. 호흡을 통해 신체 안으로 들어온 공기중의 산소는 여러 대사과정을 통해 산화력이 강한 불안정한 상태의 산소로 바뀌게 되는데, 이를 활성산소라 한다. 불안정한 상태의 활성산소는 안정화하려는 성질을 가지기 때문에 주변 물질과 반응-결합(환원)하려 하는데 이때 정상세포와 결합하게 되면 그 세포는 공격(산화)을 받는 것이 되어 제 기능을 발휘하지 못하게 되는 것이다. 활성산소가 꼭 우리 몸에 무조건 해로운 것만은 아니지만 적정량의 활성산소는 세균과 바이러스 같은 병원체도 무차별 공격(산화)시켜 활동을 할 수 없게 만들어 주는 좋은 역할을 한다. 그러나 문제는 이것이 너무 많아지면 우리 몸을 구성하고 또 생명 유지에 필요로 하는 단백질, 지방, 탄수화물, 기타 필수물질들 까지도 무차별 공격(산화)한다는 것이다. 안타깝게도 현대인들은 음주, 흡연, 스트레스, 환경 오염등 나쁜 생활습관과 유해 환경으로 인해 더 많은 활성산소가 인체내에서 만들어지고 있고 이에 정상 세포 등이 활성산소(유해산소)의 위협에 노출되고 있다. 앞에서 언급한 바와 같이 우리가 호흡하는 과정, 음식물 대사 과정을 통해 필연적으로 발생되고 외부적인 유해 요소에 의해 생성되어지는 대표적인 활성산소에는 과산화수소(H_2O_2), 초과산화이온(O_2^-), 수산화라디칼($\cdot OH$) 등이 있다. 활성산소의 인체내의 작용을 구체적으로 살펴보면, 세균, 바이러스, 곰팡이등 병원체를 살균하는 효과 외에 최근엔 동맥경화의 주요 원인이 바로 LDL콜레스테롤이 산화되어 과산화지질로 변해 발생하게 된다는 사실이 밝혀지는 등 질병의 90%가 활성산소의 인체내 유해 작용과 연관이 있는 것으로 알려 지고 있다.

인체는 우리가 느끼지 못하는 사이에도 산화스트레스에 시달리고 있으나 다행히 이에 적정량의 활성산소를 유지하기 위해 과잉 생산된 활성산소를 제거하며 활성산소를 무해한 물과 산소로 만들어 공격(산화)을 무력화 시켜 균형을 맞추는 병사들을 가지고 있는데 바로 항산화 효소이다. 이와같은 항산화시스템을 작동 유지시키는 대표적인 인체 내 항산화 효소로는 SOD (superoxide dismutase), GPx (glutathione peroxidase), 카탈라제(catalase)가 있다.

SOD는 활성산소중 산화력이 제일 강한 수산화라디칼 ($\cdot\text{OH}$)과 초과산화이온 (O_2^-) 과산화수소와 산소로 변환시키는 효소로 SOD-1 (세포핵내), SOD-2 (세포질), SOD-3 (세포외액) 3종류가 있으며 이들 효소는 구리, 아연, 망간 등의 금속이온을 포함하고 있다. GPx는 SOD에 의해 분해되어 약화된 활성산소인 과산화수소를 무해한 물과 산소로 만들며 동맥경화 및 각종 심혈관질환을 유발하는 활성산소로 인해 생기는 유해한 부산물인 과산화지질을 해독시키는 클루타티온의 활동을 촉진하는 효소로 활성화 자리에 셀레늄(Se)을 포함하고 있다. 카탈라제(Catalase) 과산화수소를 직접 분해하는 역할을 한다. 이렇듯 우리 몸의 항산화효소는 과잉 발생한 유해 활성산소로부터 건강을 지키는 파수꾼 역할을 묵묵히 하고 있다(Figure 1).

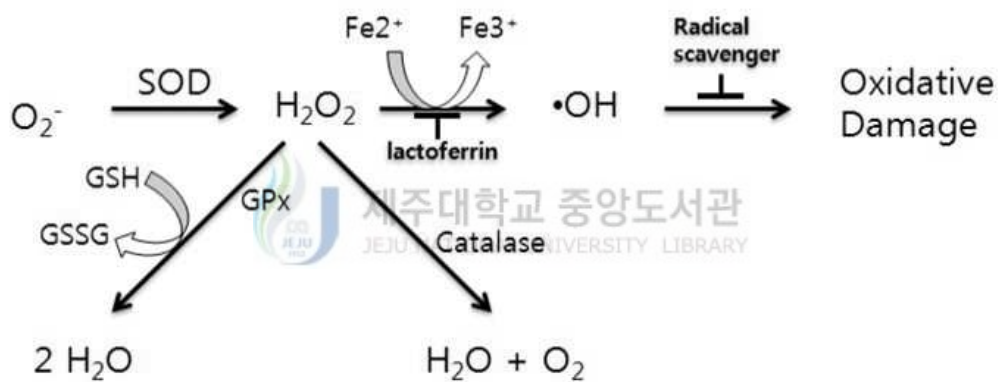


Figure 1. Oxidative damage pathway.

유해한 활성산소로부터 최전선에서 우리 몸을 지켜주고 있는 병사인 항산화효소는 안타깝게도 나이가 들어가면서 자연생성(활동)이 줄게 된다. 따라서, 인체의 노화의 속도는 빨라지고 질병과 유해한 환경 탓에 활성산소는 더 많이 생성되지만 충분히 제거 되지 않는 악순환이 시작된다. 그러나, 활성산소는 불안정한 상태이므로 주변의 무엇과 결합하려 하는 성질이 있다. 만약에 초과산화 이온(활성산소)이 단백질, 탄수화물, 지방, 기타 필수 물질과 반응하기 전에 제3의 물질

과 반응을 하여 안정이 된다면 초과산화 이온(활성산소)에 의한 피해를 줄일 수 있다. 이러한 물질을 일반적으로 항산화제(antioxidant)라고 부른다. 이 활성산소종은 NADPH oxidase에 의한 매개대사반응이나 외인성물질의 cytochrome P-450 의존성 대사반응, xanthine oxidase 등에 의한 효소반응, 오존, 자외선, 방사선, 흡연 등에 의해 생성되는데, 정상적인 대사과정에서는 생체 내 자기 방어체제인 항산화효소(superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등), 생물학적 항산화제(transferrin, ceruloplasmin, urate 등) 그리고 항산화물질(ascorbic acid, α -tocopherol, BHT 등) 등에 의해 제거된다(Figure 2). 하지만 항산화 시스템의 기능저하, 항산화제 결핍 등의 생체방어기구 이상과 각종 물리적, 화학적 요인들에 의한 생체 내 활성산소들의 과도한 생성이 생체 방어기구의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)를 야기할 수 있다. 그 결과 효소의 불안정화, 세포막과 조직 훼손, DNA 변성 및 세포 노화 등을 초래하여 암을 비롯한 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 염증, 자가면역질환 등의 심각한 장애를 일으키는 원인으로 지목되고 있다.^{2),3)}

본 연구에서는 DPPH radical 과 ABTS⁺ radical 소거 능력을 측정함으로써 항산화 능력을 조사하였다. 또한, total flavonoids 와 total polyphenol의 함량을 측정함으로써 대표적인 항산화 물질의 함량을 측정하였다.

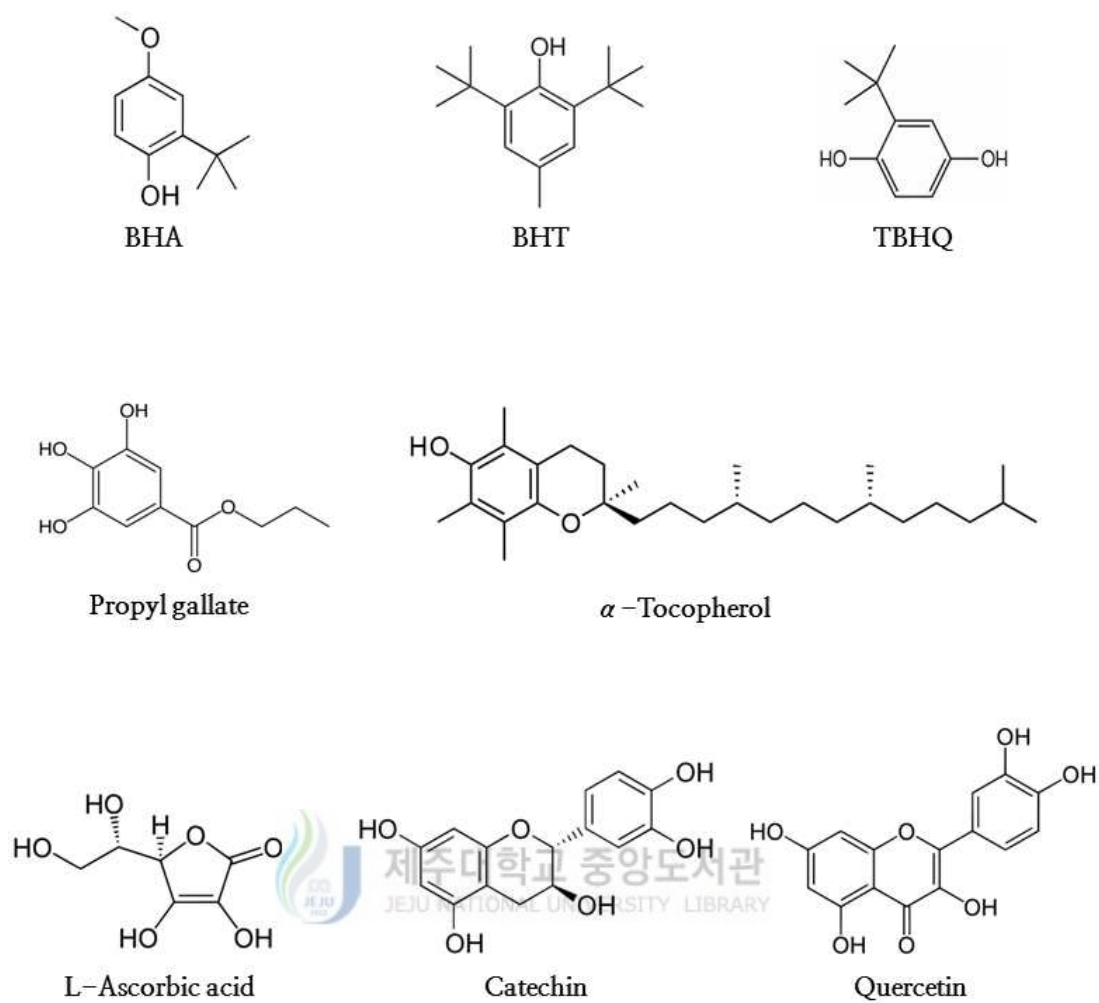


Figure 2. Chemical Structures of Anti-oxidants.

3. 미백

사람의 피부색은 인종과 지역, 성별, 연령 및 개인에 따라 다르며, 동일 신체라도 부위와 계절, 건강상태에 따라 다르다. 피부색은 표피에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)에서 생성되는 멜라닌(melanin)색소의 양과 분포에 의해 대부분 결정되며 진피의 혈관 속에 함유된 헤모글로빈(hemoglobin)과 피하조직의 카로틴(carotene)과 같은 색소의 양, 피부의 두께와 반사도 및 혈류량 등의 요인에 의해서도 영향을 받는다. 그중에 가장 중요한 역할을 하는 것이 멜라닌(melanin)이다. 각 인종별 피부색이 다른 것은 자신이 사는 환경 특히 빛의 양에 따라 가장 적합한 멜라닌 양을 가진 형태로 진화 적응한 까닭이다. 흑인은 아프리카등 햇빛이 강한곳에서 아주 살기 좋은 피부색이고 백인은 햇빛이 약한 유럽에서 살기 좋은 피부색이다. 만약 이들이 지역을 바꾸어서 살면 몸에 안좋은 영향을 받게 된다. 이것이 백인이 피부암이 많은 원인 중 하나이다. 멜라닌 세포는 표피에서 적황색 또는 흑갈색의 멜라닌을 생성하여 각질 형성세포로 전달하게 된다. 전달된 멜라닌은 표피 기저층 윗부분으로 확산되어 자외선에 의해 기저층의 세포가 손상되는 것을 방어한다.

멜라닌 색소는 멜라닌 세포 내에 존재하는 아미노산의 일종인 타이로신(tyrosine)이 타이로신아제(tyrosinase)라는 효소와 작용함으로서 만들어진다. 타이로신아제에 의해 타이로신이 산화되어 도파(DOPA)로 변하고, 도파가 산화하여 도파퀴논(DOPA quinone)으로 바뀐다. 도파퀴논은 자동으로 산화반응이 일어나 5,6-dihydroxyindole을 거치면서 최종적으로 흑갈색의 멜라닌을 만들어 낸다.

Melanin이 생성되는 과정을 살펴보면 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 (DCT)가 아주 중요하게 작용하는 것을 볼 수 있다(Figure 3).⁴⁾

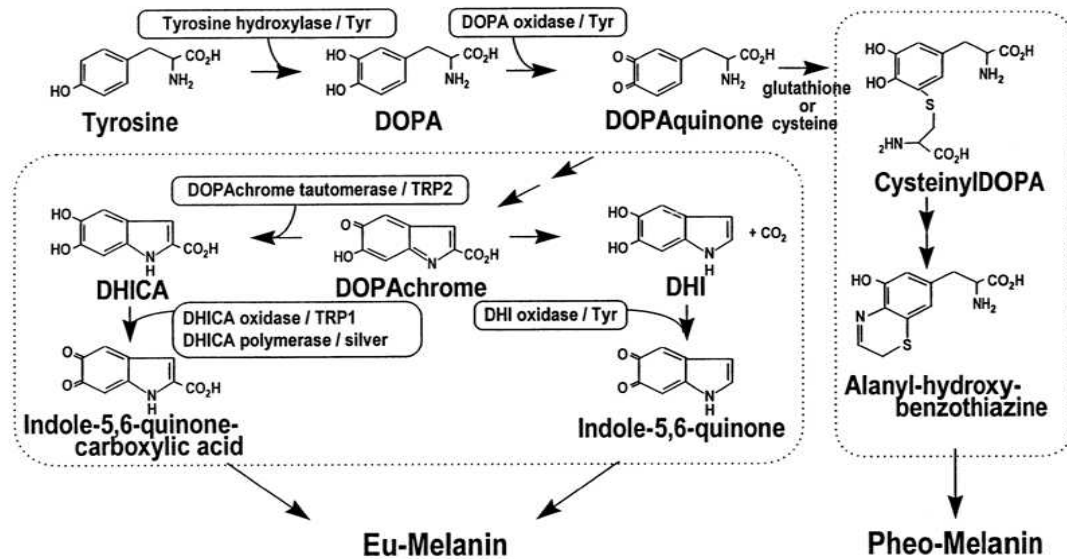


Figure 3. Melanin synthetic pathway

4. 항염



염증반응은 상처나 감염, 또는 자가면역 기전 등에 의해 나타나는 생체 반응으로서, 조직의 혈관 확장에 의한 부종, 발열, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체 반응이다.⁵⁾

피부에서의 염증은 매우 다양한 의미를 가진다. 아토피성 피부 질환, 여드름성 피부질환, 광 민감성 피부 질환 그리고 민감성 피부질환의 생리학적 기본 기전은 염증 반응의 과정을 거치며, 다양한 염증 현상에 의해 진피층을 파괴하는 효소인 hyaluronidase, lipoxygenase 등의 발현이 증가하여 피부의 노화 및 주름 형성에 직접적으로 영향을 준다. 다양한 원인에 의하여 일어나는 염증 반응은 조직과 원인에 상관없이 거의 비슷한 변화를 보인다. 따라서 공통적인 물질 요인의 존재가 있을 것으로 추정하고 있으며, 그 매개체로는 활성산소, 산화질소, PG (prostaglandin), 여러 사이토카인 등이 알려져 있다. 면역과 염증에 관련된 여러 사이토카인 중 IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10 및 IL-2는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 각종 염증질환의 발생과 진행

에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었다.⁶⁾

염증반응에서 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL-1, IL-6) 등 여러 염증성 매개체들을 방출한다. 이런 염증성 매개체들은 조직 손상의 복구와 보호의 역할도 하지만, 과량 생산되면 정상 조직에도 과도한 면역반응과 염증 반응을 일으키게 된다.¹⁰⁾

여기서 NO는 혈관확장 및 조직 손상에 주로 관여하고, PGE₂는 통증과 발열을 매개한다. 이들 중 NO는 여러 조직과 세포들에서 L-arginine으로부터 NOS (nitric oxide synthase)에 의해 합성되며, 혈관확장, 신경전달, 혈액응고, 면역 기능 조절 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 크게 cNOS와 iNOS의 두 가지 그룹으로 나눌 수 있다. 즉, neuronal, endothelial NOS는 cNOS에 속하며 이는 Ca²⁺-calmodulin 의존성이며 평상시에도 지속적으로 NO를 분비하고 있어 항상성을 조절한다. 이와 반면에 inducible NO (iNOS)는 INF- γ , IL-1, TNF- α 등의 cytokine이나 박테리아의 LPS (lipopolysaccharide)에 의해서 활성화되며 연계반응을 통해 장시간동안 대량의 NO를 생성하게 된다. 이러한 NO는 macrophage의 cytotoxic activity에 큰 영향을 미치므로 미생물이나 종양 세포로부터 숙주를 방어하는 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 과생된 NO에 의해서 류마티스 관절염 같은 염증 반응을 악화시키므로 유해한 작용을 나타나게 된다. 위와 같이 자극된 iNOS는 macrophage와 hepatocytes에 존재하게 되며, 염증이 다른 병원균들과 관여하는 동안 NO 생성은 현저하게 증가하고 세포독성을 나타나게 된다. 그러므로 염증성 자극의 반응에 의한 NO 생성의 저해는 염증성 질병에서 치료적 방법으로 사용될 수 있다⁷⁾ (Figure 4).

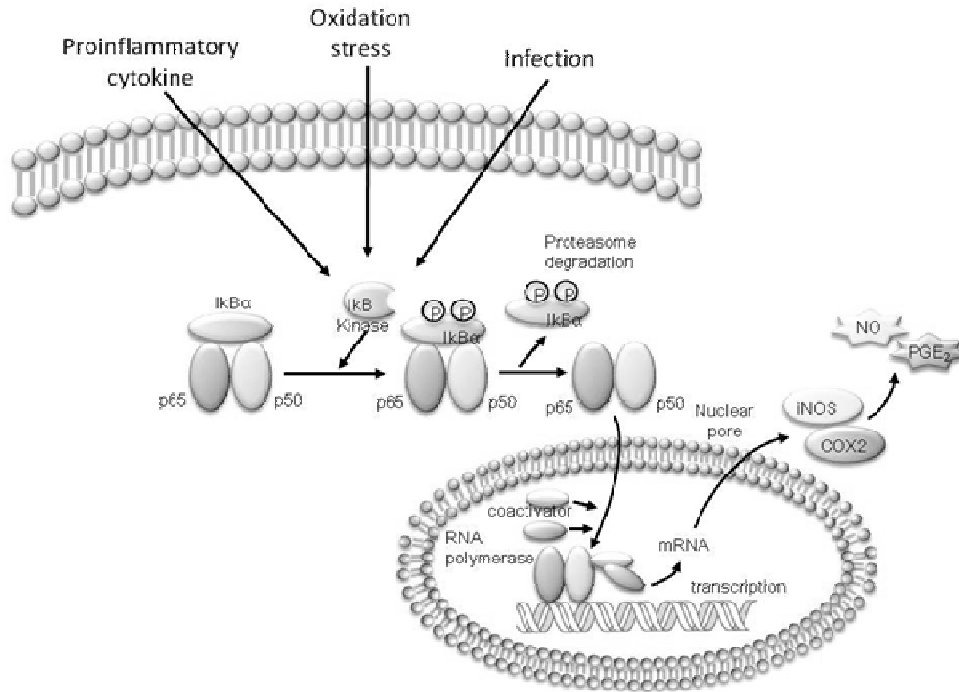


Figure 4. Major production pathways of NO and PGE₂

5. 항균

염증을 일으키는 원인은 무수히 많으나 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인도 그 중 하나이다. 피부상재균 중 여드름 유발에 관여하는 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* 등을 들 수 있다. 여드름은 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 이는 주로 사춘기 나이의 사람에게서 발생하는데 이는 사춘기 나이에 분비되기 시작하는 안드로겐이라는 남성호르몬 때문인데, 안드로겐은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 각화를 일으킨다. 피지의 분비증가와 표피각화로 모낭-피지선에서 피지가 정

체되어 모낭이 막힘에 따라 모낭 내부가 *Propionibacterium acnes*를 비롯한 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다. 동시에 *Staphylococcus epidermidis*와 같은 다른 세균들이 모낭 주위에 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다. 여드름 발생의 병리 조직학적인 기전은 *P. acnes*의 효소, 사이토카인 및 보체와 중성구, 손상된 각질 형성 세포에서 분비된 cytokine등이 염증을 일으키는데 관여하는 것으로 알려져 있으나, 아직 정확한 기전에 대해서는 알려지지 않았다. 따라서 피부염증이나 여드름의 치료 및 예방을 위해서 원인균에 대한 항균 작용을 하는 약제가 일반적으로 사용되고 있다.⁸⁾

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

따라서, 이런 문제점을 해결하는 안전성이 확보된 천연물을 이용한 항균효과가 있으면서 부작용이 없는 여드름 치료제를 개발하려고 노력중이며, 근대 염증분야 연구에서는 염증매개물질 생산 분비를 억제하는 천연 소염 물질을 찾는데 초점이 맞추어져 있는데 그 이유는 cortisol 합성세제와 같은 기존 소염제가 부작용이 많기 때문이다.⁹⁾

6. 수단그라스

수단그라스(*Sorghum × drummondii* (Nees ex Steud.) Millsp. & Chase)는 1년생, 다발형, 남방형, 벼과(Poaceae) 사료작물로 수수처럼 가뭇과 고온에 강하다. 전체적으로는 수수, 수단그라스계 잡종과 비슷하나 대가 더욱 가늘고 잎 너비와 길이가 좁고 작으며 분얼은 많다. 품종에 따라 차이는 있으나 예취하지 않으면 7~8월에 꽃이 피고 초장이 150~250 cm에 이르며 수수, 수단그라스계

잡종보다 느슨한 화서에 작고 타원형의 열매가 달린다. 잎 몸은 납작하고 끝이 뾰족하며 윗면은 담녹색으로 매끄럽고 약간 윤이 나며 두껍고 중간에 굵은 흰색을 띤 중앙맥이 있다. 수수, 수단그라스계 잡종에 비하여 잎이 길고 부드러우며 이의 비율이 높다. 초기 생육은 더디나 일단 정착하면 성장속도가 매우 빠르고 예취 후 가지를 많이 치고 재생이 잘된다.

원산지인 아프리카 전역을 비롯한 열대 및 아열대 지역, 여름철이 무더운 지역에서는 모두 잘 자란다. 텍사스, 에리조나 등 미국 남부지역, 멕시코, 호주, 아프리카 등 무덥고 건조한 지역으로 옥수수가 자라기에는 토양 비옥도가 강수량이 다소 낮은 지역에서 가축용 사료로 많이 재배한다. 토양에 대한 적응변위가 넓다.(중점토, 경사토양, 비옥한 식양토가 최상) 다른 초종에 비하여 열은 그늘, 저염분 및 강알칼리 토양에서도 잘 적응하는 편이다. 지하수위가 높거나 강알칼리 토양에서는 수량이 낮으며 산성토양(pH 5.5)에서도 재배가 가능하다.

우리나라에는 태풍과 바람이 많은 제주도 낙농 농가들이 한 번 쓰러지면 회복이 거의 불가능한 사일리지용 옥수수 대안으로 바람에 쓰러져도 어느정도 회복이 가능한 수단그라스계 잡종 품종들을 일본에서 구해다가 개인적으로 재배하던 것을 1980년대 초 서울대학교 농과대학(현 농업생명과학대학) 초지학실험실에서 순계를 비롯한 다수의 수단그라스계 잡종과 진주조, 테옥신트 등 다수의 여름작물들을 체계적으로 비교 연구하여 축협중앙회(현 농협중앙회)의 도입품종추천 심의회를 거쳐 공식적으로 도입·재배하기 시작하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 DAEJUNG chemical 및 Merck, Junsei의 제품을 사용하였다. High-performance liquid chromatography (HPLC)에는 silica gel (2-25 μ m, Sigma Co.), normal-phase column chromatography (CC)에는 silica gel (95-110 μ m, Meck Co.)이 사용되었고, MPLC(Medium pump liquid chromatography)에는 reversed phase silicagel (C18HS 12+M1946-3, Biotage Co.)의 컬럼을 사용하였다. 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20 (0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리 과정에 사용된 thin-layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Meck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하여 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 SunriseTM (Tecan Co.)을 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 NMR 전용용매로 CD₃OD 및 pyridine-*d*₅를 사용하였다.

2. 재료

수단그라스(*Sorghum × drummondii* (Nees ex Steud.) Millsp. & Chase)는 2012년 10월에 제주도 제주시 월평동 아침미소 농원에서 채집하였다. 채집한 수단그라스의 지상부(시료번호 : 349)는 음지에서 완전히 자연 건조 하였으며 분쇄하여 사용하였다.

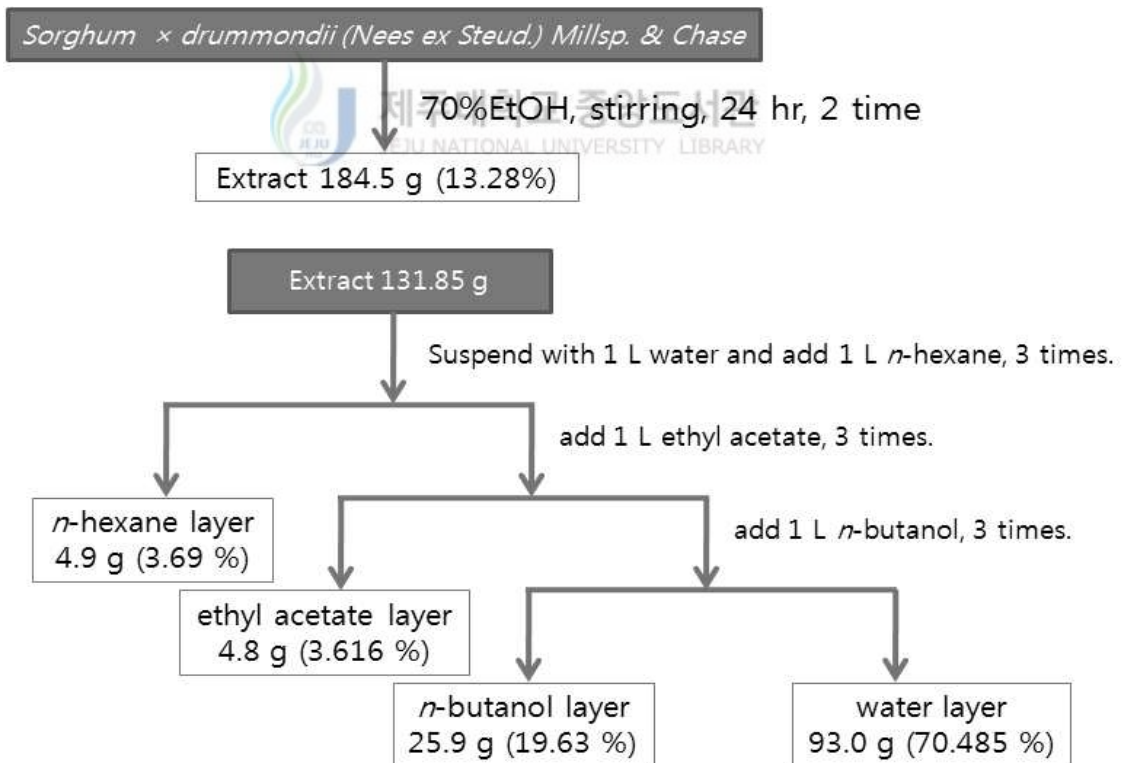


Figure. 5 Pictures of *Sorghum × drummondii*
(Nees ex Steud.) Millsp. & Chase

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 수단그라스의 추출 및 분획

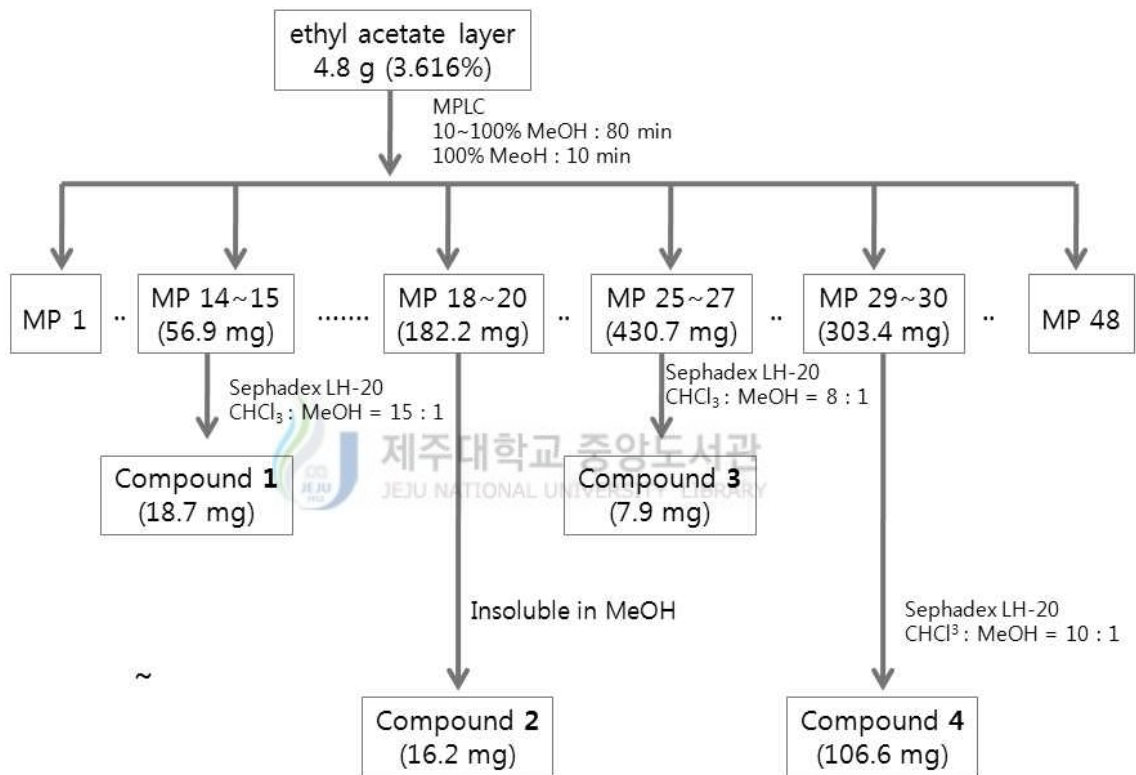
건조된 수단그라스 1.4 kg을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 20 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 131.85 g을 얻었다. 이 중 추출물을 증류수에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer, ethyl acetate layer, *n*-butanol layer, water layer 등 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다 (Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from *Sorghum x drummondii* (Nees ex Steud.) Millsp. & Chase

3-2. 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 4.76 g을 reversed phase silicagel (C18HS 12+M1946-3, Biotage Co.)의 컬럼을 사용하여 MPLC(Medium Pressure Liquid Chromatography)를 10~100% MeOH : 80 min, 100% MeOH : 10 min 씩 흘려주며 MP-1~MP-48 개의 fraction 으로 총 48개의 fraction으로 분리하였다(Scheme 2).



Scheme 2. Procedure of isolation of compound 1, compound 2, compound 3 or compound 4 from *Sorghum × drummondii* (Nees ex Steud.) Millsp. & Chase

MPLC로 분리한 fraction을 HPLC를 Method Set : 20~80% MeOH, Run time : 40 min으로 측정하여 각 Fraction의 성분의 양을 측정하였다.

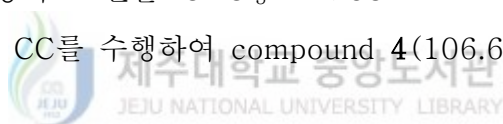
TLC (thin-layer chromatography)를 통하여 같은 스팟 fraction끼리 합친후 컬럼을 걸기위한 용매조건을 잡은후 Sephadex-LH 20 컬럼을 통하여 compound를 분리하였다.

MPLC fraction MP-14~MP-15 56.9 mg을 TLC를 통하여 같은 스팟임을 확인하여 이동상의 조건을 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 15 : 1$ 의 용매조건으로 Sephadex-LH 20 CC를 수행하여 compound 1(18.7 mg)를 분리하였다.

MPLC Fraction MP-18~MP-20 182.2 mg을 농축후 MeOH를 첨가하였을 때 녹지않고 vial에 가라앉는 파우더가 생성되었고, 이를 MeOH을 이용하여 재결정하여 compound 2(16.2 mg)를 얻었다.

MPLC Fraction MP-25~MP27 430.7 mg을 TLC를 통하여 같은 스팟임을 확인하여 이동상의 조건을 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 8 : 1$ 의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 3(7.9 mg)를 분리하였다.

MPLC Frantion MP-29~MP-30 (303.4 mg)을 TLC를 통하여 같은 스팟임을 확인하여 이동상의 조건을 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10 : 1$ 의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 4(106.6 mg)를 분리하였다.



4. 활성실험

4-1. 항산화 활성 실험

4-1-1. Total polyphenolic compounds 함량 측정

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법¹⁰⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO:EtOH =1:1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 μL 를 micro tube에 취하고 증류수 900 μL 를 가하여 total volume이 1 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 100 μL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na_2CO_3 용액 200 μL 를 가하여 혼합하고, 증류수 700 μL 를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 화합물 함량을 환산하였다.

4-1-2. Total flavonoids compounds 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측은 Davis¹¹⁾법을 변형하여 실시하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 용매에 녹인 다음, micro tube에 시료 용액 15 μL 와 ethylene glycol 150 μL 를 첨가하여 혼합한 후 다시 0.1 N NaOH 15 μL 를 넣고 37°C 항온조에서 1시간동안 반응 후 UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 quercetin을 이용하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

4-1-3. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radicals는 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여 받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine(DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되어 515 nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다(Figure 6).

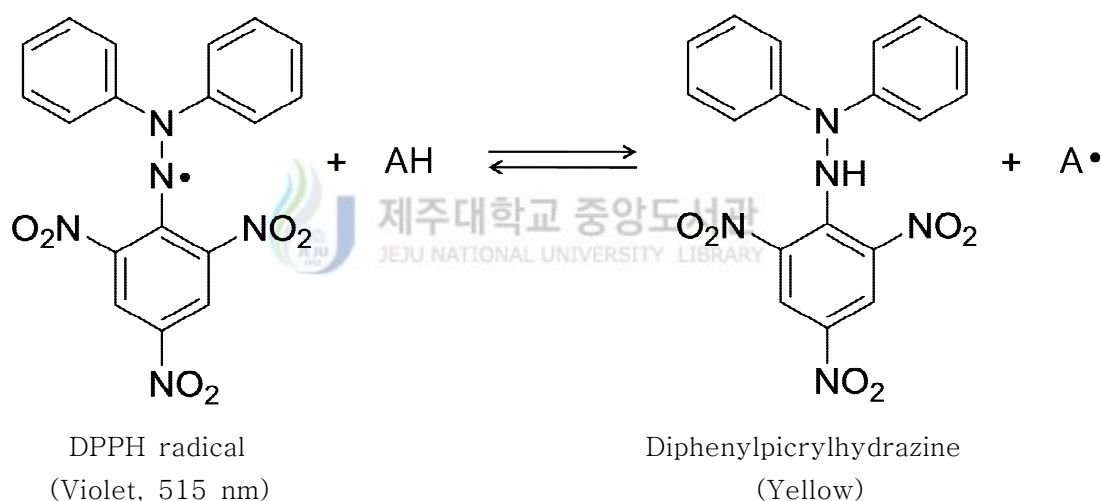


Figure 6. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant.

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 방법¹²⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 0.2 mM DPPH(in EtOH) 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 25분간 반응시킨 후, ELISA Reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백

분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 양성 대조군(positive control)으로는 BHT (butylated hydroxytoluene)를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

A_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 515 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-1-4. ABTS radical cation 소거 활성 실험

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

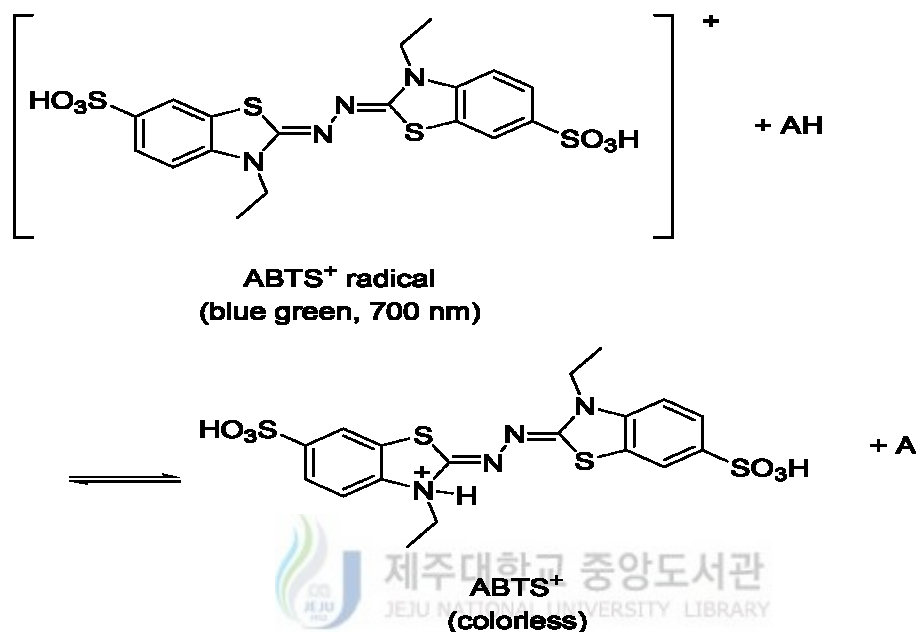
ABTS radical cation 소거 활성은 Re, Pellegrin 등의 방법¹³⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

ABTS radical cation을 만들기 위하여 7.0 mM ABTS (in D.W) 용액과 2.45 mM potassium persulfate (in D.W)용액을 1:1로 혼합하여 16시간동안 암소에서 반응시킨다. 반응 시킨 ABTS 용액과 ethanol을 1:60으로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.002가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μL(in EtOH)와 ABTS 용액 180 μL를 혼합하여 15분간 암소에서 반응시킨 후, ELISA Reader를 이

용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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



$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

A_{control} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 sample과 ABTS 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

4-2-1. 세포배양

마우스 대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가

6 well plate에 RAW 264.7 cells를 3×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후, 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cells을 1 μ g/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess 시약 100 μ L를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO₂)를 이용하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다.

4-2-3. 세포독성 평가

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 RAW 264.7 cell을 6 well plate에 3×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 배양 후, 1 μ g/mL LPS와 sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 500 μ g/mL

농도로 MTT를 첨가하여 37℃에서 3시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다(Figure 7). 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음의 식에 의해 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} : 570 nm에서 용매와 LPS를 처리한 control의 흡광도

A_{sample} : 570 nm에서 시료와 LPS를 처리한 sample의 흡광도

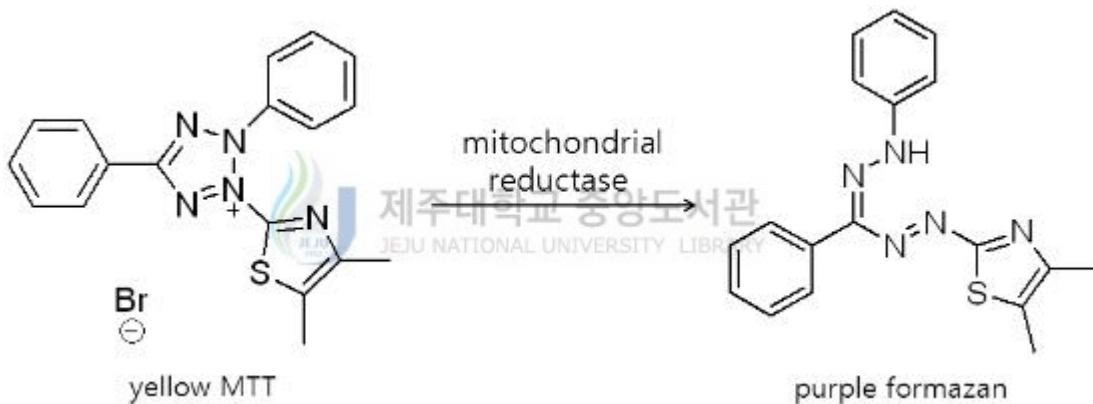


Figure 7. Principle of MTT assay.

4-3. B16F10 murine melanoma cell을 이용한 미백 활성실험

4-3-1. 세포배양

B16F10 murine melanoma cell은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin- streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-3-2. Melanogenesis 저해 효과 측정

B16F10 murine melanoma cell을 이용하여 추출물과 분획물 및 분리한 compound들의 세포내에서의 미백효과를 측정하기 위해 melanogenesis 저해 효과를 측정하였다.

6 well plate에 4.5×10^4 cells/mL가 되도록 세포를 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline) buffer로 세척하였다. 그리고 500 μ M의 α -MSH를 포함하는 배지로 교환 해주고 시료를 농도별로 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하여 원심분리 시켜 pellet만을 취한다. Pellet에 soncation buffer (1% triton X-100 and 0.2 mM PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride in sodium phosphate buffer)를 넣고 세포를 sonication해 준 후에 원심분리 시켜 분리한 pellet에는 1 N NaOH를 300 μ L 첨가하여 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 melanin contents를 확인하였다.

4-4. 항균 활성 실험

4-4-1. Paper disc diffusion method

수단그라스 추출물 및 분획물의 항균활성을 측정하기 위해 *Propionibacterium acnes* 및 *Staphylococcus epidermis*에 대하여 paper disc법으로 생육 억제율을 측정하였다.

*P. acnes*는 한천 1.5%를 포함하는 GAM 고체 배지에 10^4 CFU/mL *P. acnes*가 포함되어있는 액체배지 200 μ L를 넣은뒤 도말봉으로 도말한다. 액체배지가 고체배지에 충분히 흡수가 되면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려 37°C, 48시간 동안 혐기배양 후 형성된 원형 발육 저지환을 측정하였다.

*S. epidermidis*는 한천 1.5%를 포함하는 TSA 고체 배지에 10^5 CFU/mL *S. epidermidis*가 포함되어있는 액체 배지 200 μ L를 넣은 뒤 도말봉으로 도말한다. 액체 배지가 고체 배지에 충분히 흡수가 되면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려 37°C에서 24시간 동안 배양하여 디스크 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다.

4-4-2. MIC (minimum inhibitory concentration)

*P. acnes*의 MIC 측정은 paper disc의 방법과 동일하게 균을 배양하였다. 96 well plate 한줄에 배지를 150 μ L를 넣은후 2 mg/mL sample 150 μ L를 넣어 농도가 1000 μ g/mL 로 만들었으며 1000 μ g/mL well에서 150 μ L를 덜어 배지 150 μ L만 있는 well에 접종하여 500 μ g/mL로 희석하였다. 동일한 방법으로 농도를 250 μ g/mL, 125 μ g/mL, 62.5 μ g/mL, 31.25 μ g/mL, 15.63 μ g/mL, 7.81 μ g/mL, 3.91 μ g/mL, 1.95 μ g/mL 및 0.98 μ g/mL를 만들었으며 마지막 well은 control로 사용하였다. 희석한 sample에 10^4 CFU/mL *P. acnes* 15 μ L를 넣어 48 시간후 균이 자라지 않은 농도를 확인하여 이를 MIC로 정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1은 ^1H -NMR spectrum 분석 결과 δ 9.76(1H, s)에 signal로부터 aldehyde의 프로톤임을 예상하였다. 또한, δ 7.77 (2H, dd, 6.87, 1.83)과 δ 6.91(2H, dd, 6.87, 1.83)의 sp^2 혼성을 갖는 proton들로부터 coupling constant 값을 통하여 proton들간의 *ortho*-, *meta*- coupling을 하고 있는 대칭 구조의 aromatic ring을 예상하였다.

^{13}C -NMR spectrum 분석 결과 탄소 수가 5개 이상임을 예상할 수 있었고, 192.9의 signal은 proton NMR spectrum에서 예상하였던 aldehyde로 예상하였다. 다음에, 165.3, 133.6, 130.4, 117.0의 signal들은 aromatic ring의 시그널임을 예상하였다.

이를 바탕으로 Compound 1을 문헌과 비교하여 *para*-hydroxybenzaldehyde임을 확인하였다¹⁴⁾ (Figure 8).

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

No.	Compound 1	
	δ_c	δ_H (int, multi, J Hz)
1	130.4	
2	117.0	6.91(2H, dd, 6.87, 1.83)
3	133.6	7.77(2H, dd, 6.87, 1.83)
4	165.3	
5	133.6	7.77(2H, dd, 6.87, 1.83)
6	117.0	6.91(2H, dd, 6.87, 1.83)
7	192.9	9.76(1H, s)

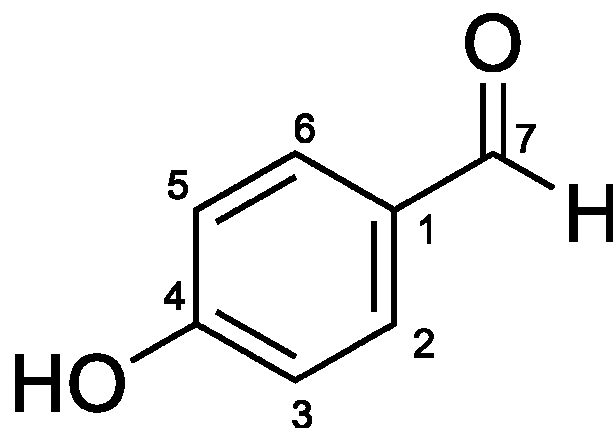


Figure 8. Chemical structure of compound 1

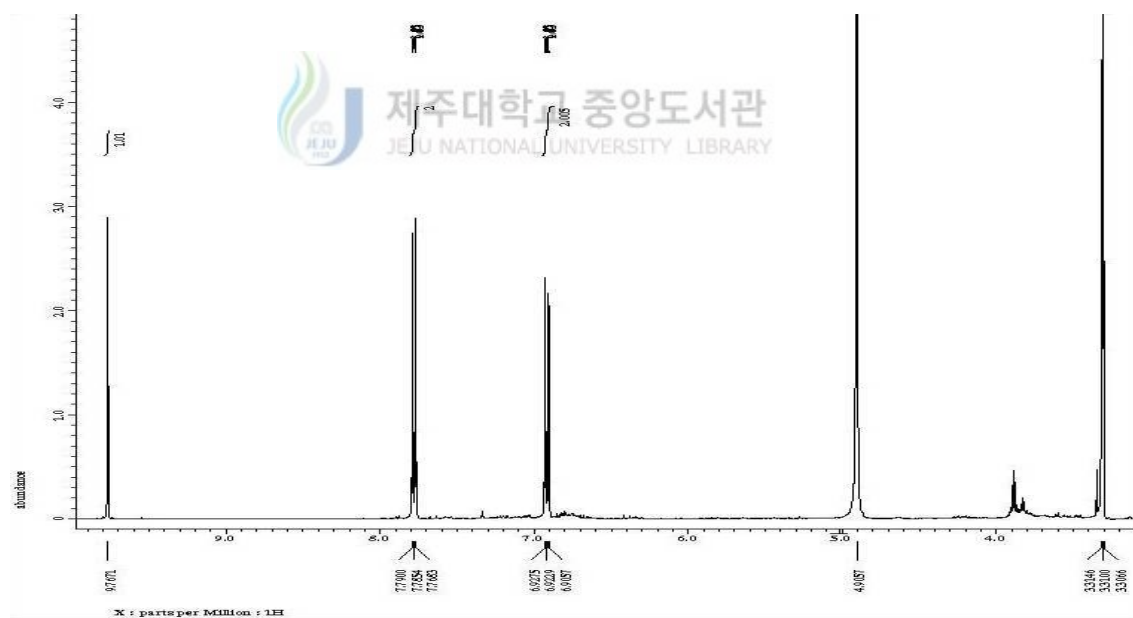


Figure 9. ^1H -NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3

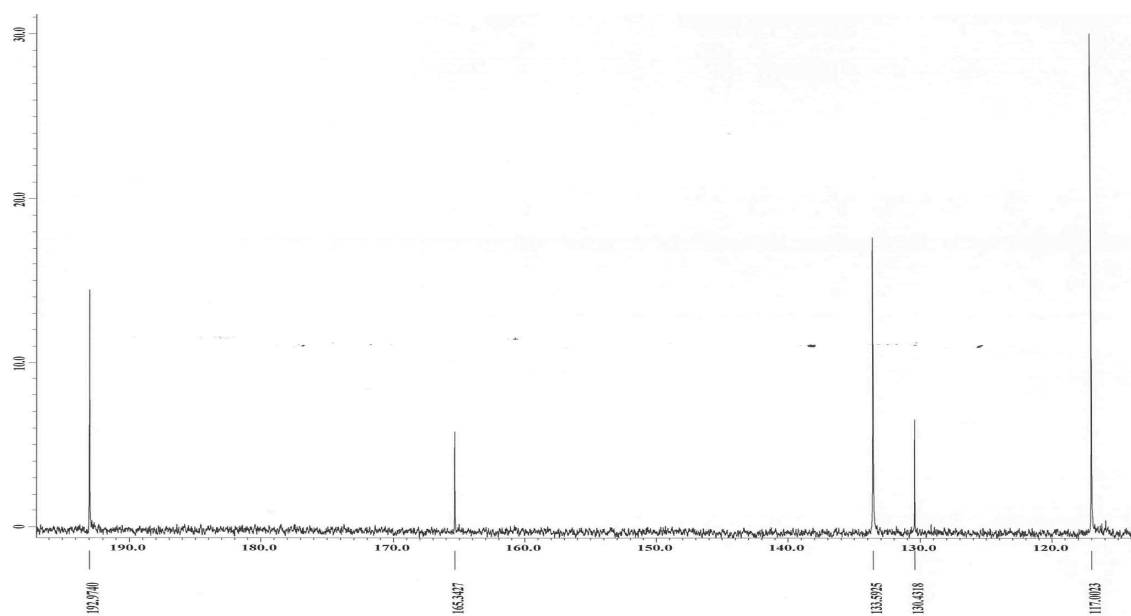


Figure 10. ^1H -NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3



1-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 7.52 (1H, br, d, 8.0, 2.0, H-6')과 δ 7.91 (1H, d, 2.0, H-2'), δ 7.27 (1H, d, 8.0, H-5') *ortho*-coupling 과 *meta*-coupling을 예측하였다. δ 5.85 (1H, d, 7.2, H-1")아래 쪽의 피크로 보아 당피크로 생각되었으며 δ 6.86(1H, br. s, H-6)와 δ 7.01(1H, br. s, H-8)의 피크로 보아 H-6번과 H-8사이에 당이 결합되어 있을 것으로 예상하였다.

한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석에서는 탄소 수가 21개임을 확인할 수 있었고, δ 183.3에서 방향족 고리 탄소에 carbonyl group이 존재함을 예상할 수 있었다. 100ppm~160ppm에서 나타나는 signal을 통해 sp^2 혼성 구조를 갖는 방향족 고리의 탄소가 존재함을 예상할 수 있었다.

이와 같은 정보를 문헌¹⁵⁾과 비교하여 luteoloside임을 알 수 있었다. 따라서 compound 2는 luteoloside로 구조 동정하였다(Figure 11).



Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 MHz, *pyridine-d*₅)

No.	Compound 2	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, <i>J</i> Hz)
1		
2	165.8	
3	104.6	6.96(1H, s)
4	183.3	
5	163.0	
6	102.3	6.86(1H, br. s)
7	164.5	
8	95.8	7.01(1H, br. s)
9	158.4	
10	107.1	
1'	123.2	
2'	115.2	7.91(1H, d, 2.0)
3'	148.3	
4'	152.4	
5'	117.4	7.27(1H, d, 8.0)
6'	120.2	7.52(1H, br, d, 8.0, 2.0)
1''	101.1	5.85(1H, d, 7.2)
2''	79.8	
3''	75.3	
4''	71.6	
5''	79.0	
6''	62.8	

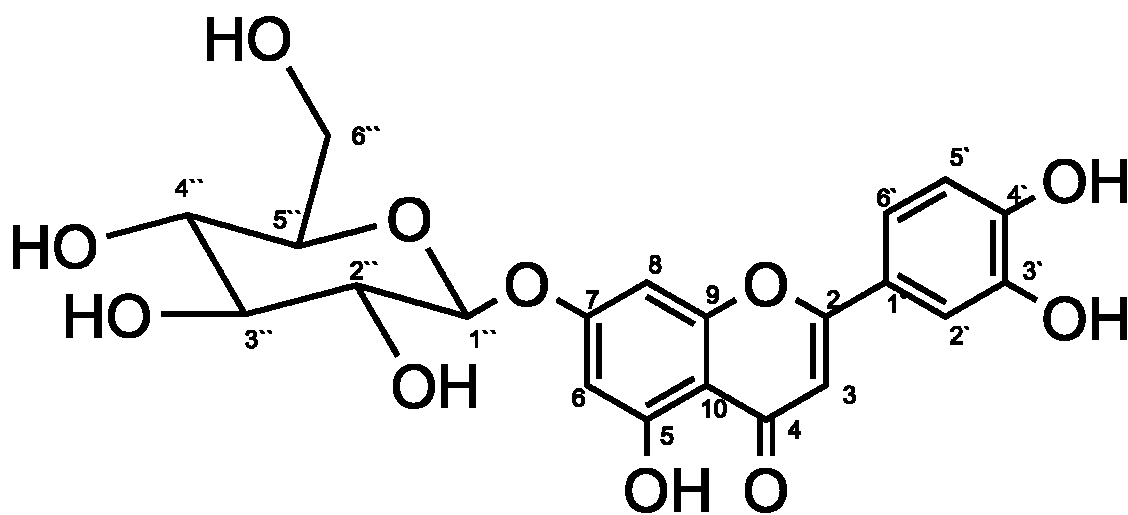


Figure 11. Chemical structure of compound 2

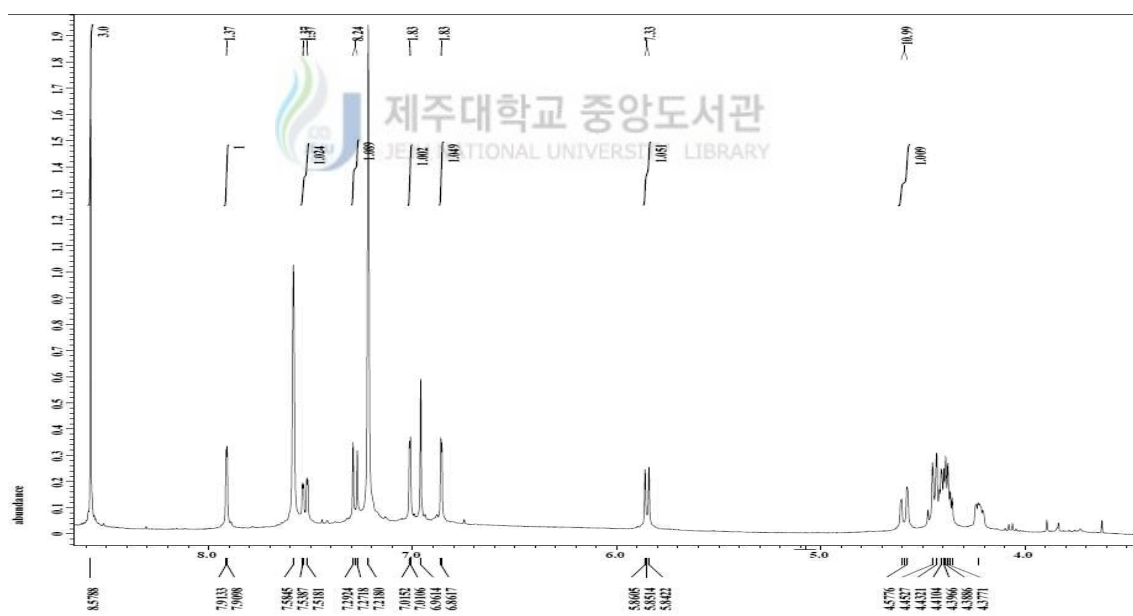


Figure 12. ¹H-NMR spectrum of compound 2 in pyridine-*d*₅

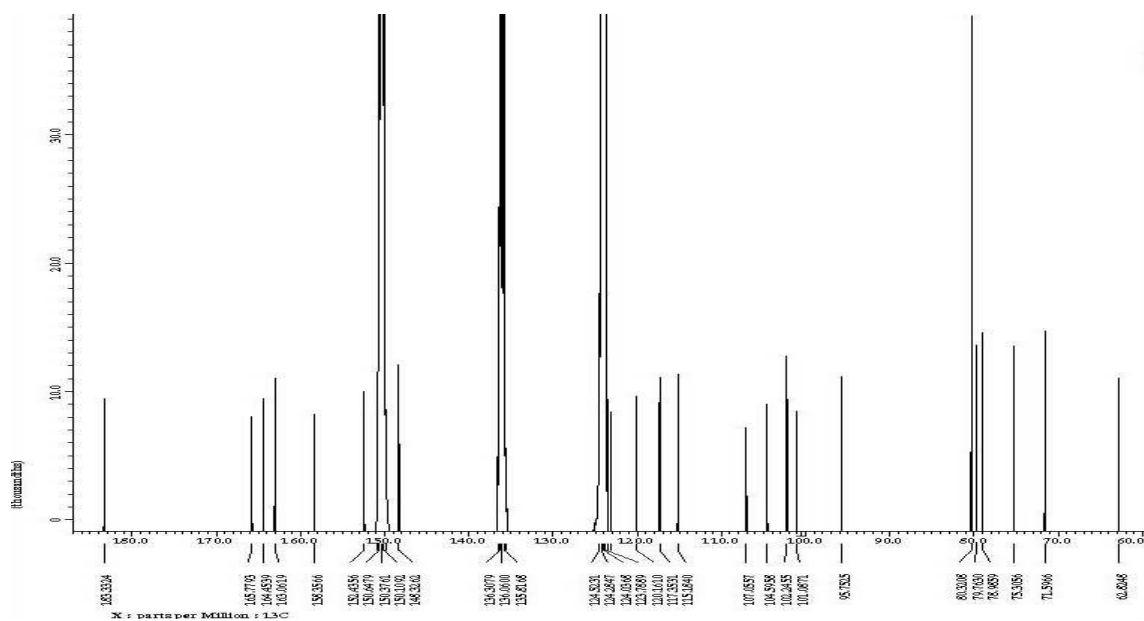


Figure 13. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 in pyridine- d_5

1-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C , NMR을 측정하였다.

^1H -NMR spectrum에서 δ 6.50 ppm~8.00 ppm에서 나타나는 signal을 통해 방향족 고리의 수소가 예상되었고, δ 6.43 (1H, d, 2.29 Hz), δ 6.2 (1H, 1.83 Hz)에서 meta coupling이 관측되고, δ 7.37 (1H, dd, 8, 2 Hz)과 δ 7.37 (1H, 2.4 Hz), δ 6.89 (1H, d, 9.16)에서 *ortho*-coupling 과 *meta*-coupling을 예측하였다.

한편 ^{13}C -NMR spectrum 분석에서는 탄소 수가 15개임을 확인할 수 있었고, δ 183.9에서 방향족 고리 탄소에 carbonyl group이 존재함을 예상할 수 있었다. 그리고 100ppm~160ppm에서 나타나는 signal을 통해 sp^2 혼성구조를 갖는 방향족 고리의 탄소가 존재함을 예상할 수 있었다.

이상과 같은 정보를 문헌¹⁶⁾와 비교하여 luteolin임을 알 수 있었다. 따라서 compound 3는 luteolin으로 구조 동정하였다(Figure 14).



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

No.	Compound 3	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1		
2	166.2	
3	103.9	6.41(1H, s)
4	183.9	
5	159.4	
6	100.2	6.20(1H, 1.83)
7	166.4	
8	95.1	6.43(1H, d, 2.29)
9	163.3	
10	105.4	
1'	120.4	
2'	114.2	7.37(1H, 2.4)
3'	147.1	
4'	151.1	
5'	116.9	6.89(1H, d, 9.16)
6'	123.7	7.37(1H, dd, 8, 2)

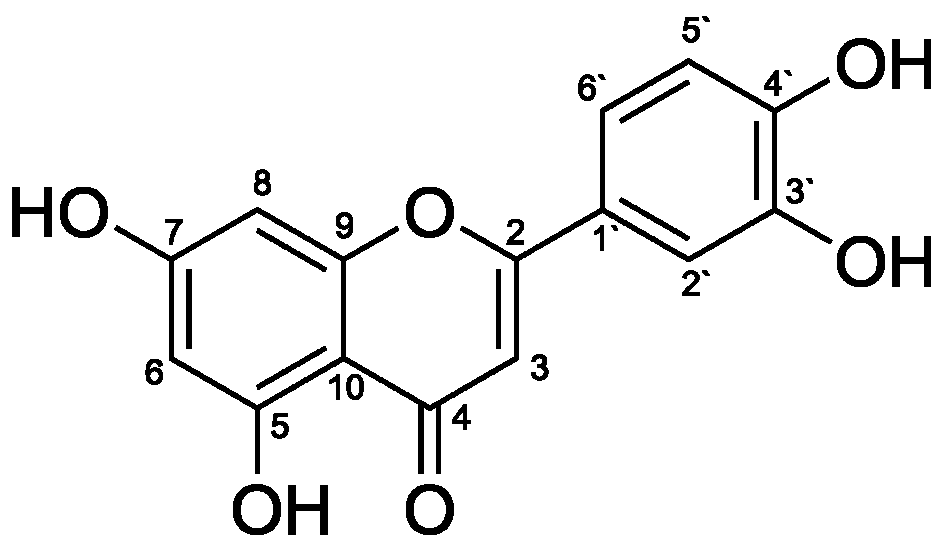


Figure 14. Chemical structure of compound **3**

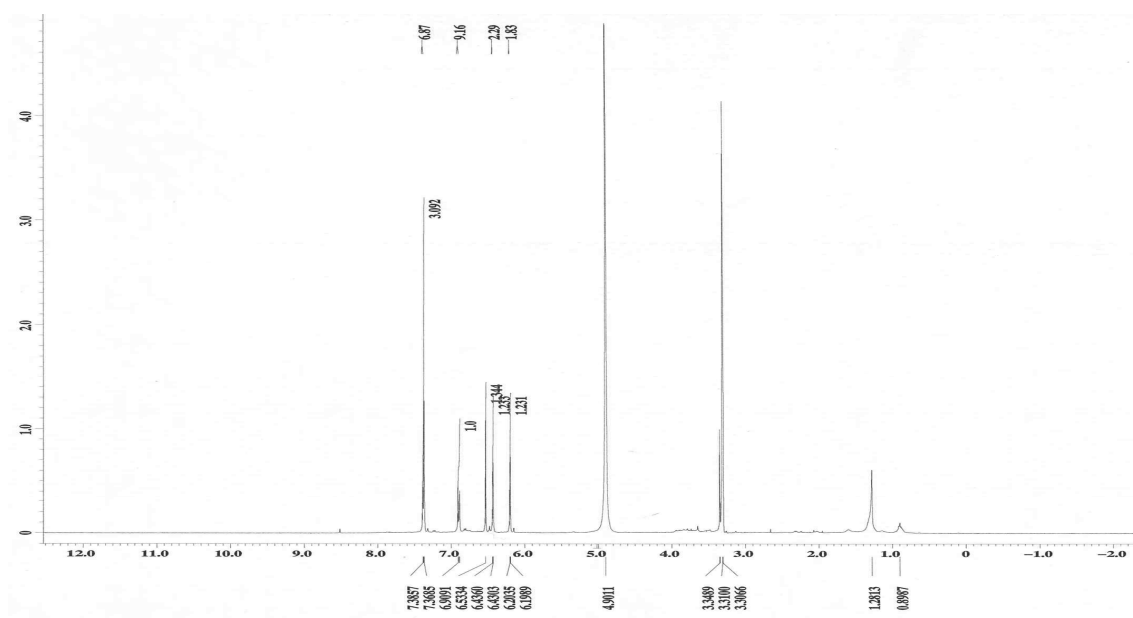


Figure 15. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3

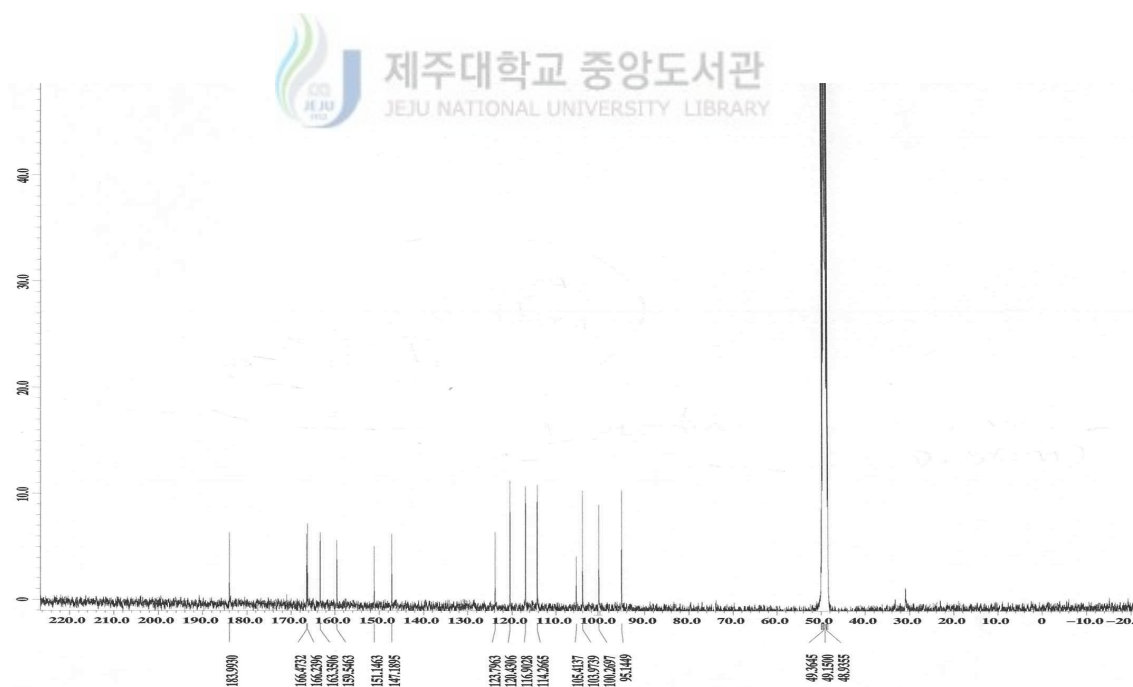


Figure 16. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3

1-4. Compound 4의 구조해석

Compound 4의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR을 측정하였다.

^1H -NMR spectrum에서 δ 7.84 (2H, d, 9 Hz), δ 6.92 (2H, d, 9 Hz)에서 B-ring의 *ortho* coupling이 관측되고, δ 6.78에서 나타난 signal은 전형적인 apigenin H-3의 peak였으며, A-ring의 두 개의 methine기에 의한 *meta*-coupling이 δ 6.45 (1H, d, 2 Hz)과 δ 6.21 (1H, d, 2 Hz)에서 관찰되었다.

한편, ^{13}C -NMR spectrum 분석에서는 flavonoid C-4번의 위치의 ketone기 peak가 δ 184.05에서 관측되어 flavonoid 화합물임을 알 수 있었으며 위의 부분 구조로 apigenin으로 구조동정 하였으며 표준품 비교로 aglycone 화합물인 apigenin임을 알 수 있었다. 따라서 compound 4는 apigenin으로 구조동정 하였다(Figure 17).



Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **4** (500 MHz, CDCl_3)

No.	Compound 4	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1		
2	166.4	
3	104.0	6.58(1H, s)
4	184.0	
5	163.4	
6	95.2	6.21(1H, d, 2)
7	166.2	
8	100.3	6.45(1H, d, 2)
9	159.6	
10	105.5	
1'	123.4	
2'	129.6	7.84(2H, d, 9)
3'	117.2	6.92(2H, d, 9)
4'	162.9	
5'	116.4	6.92(2H, d, 9)
6'	129.6	7.84(2H, d, 9)

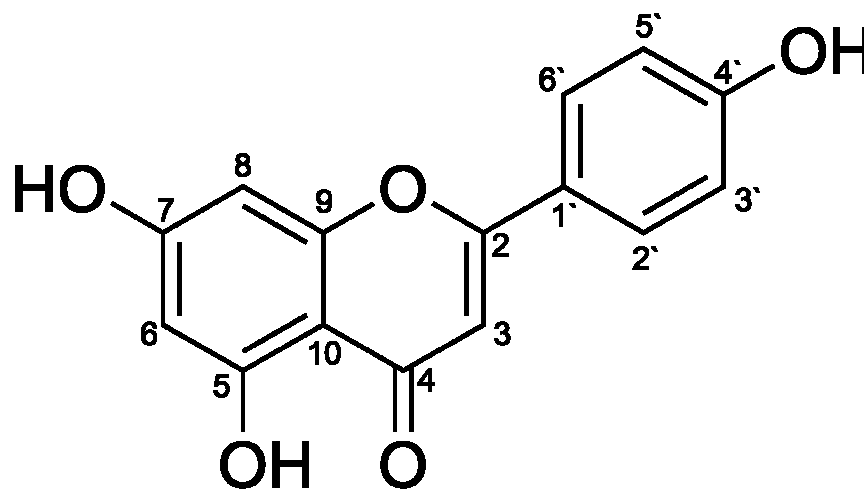


Figure 17. Chemical structure of compound **4**

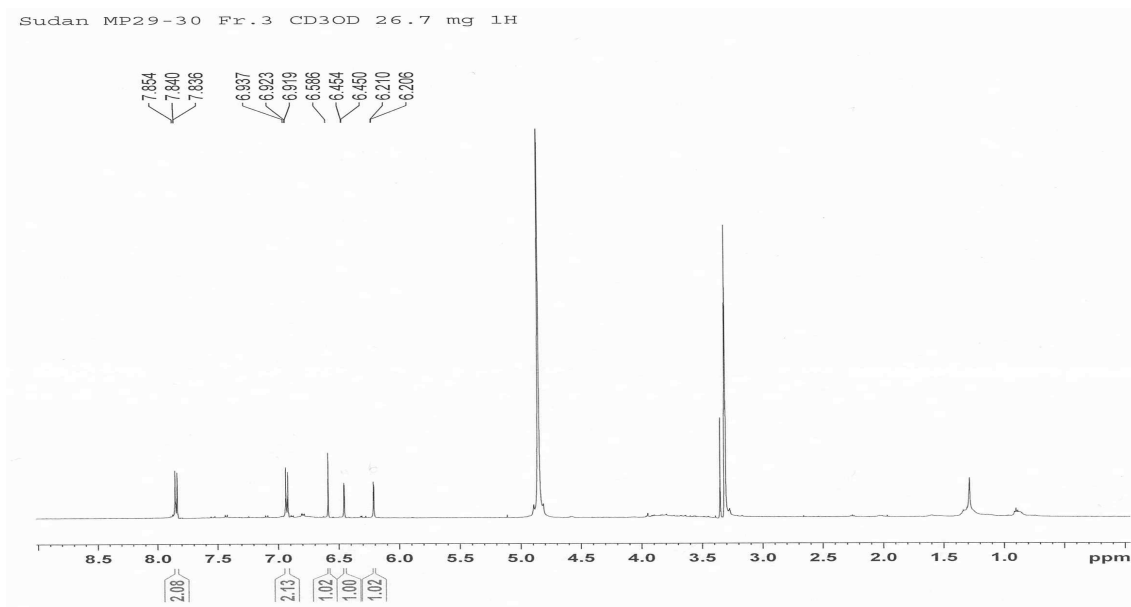


Figure 18. ^1H -NMR spectrum of compound **4** in CDCl_3

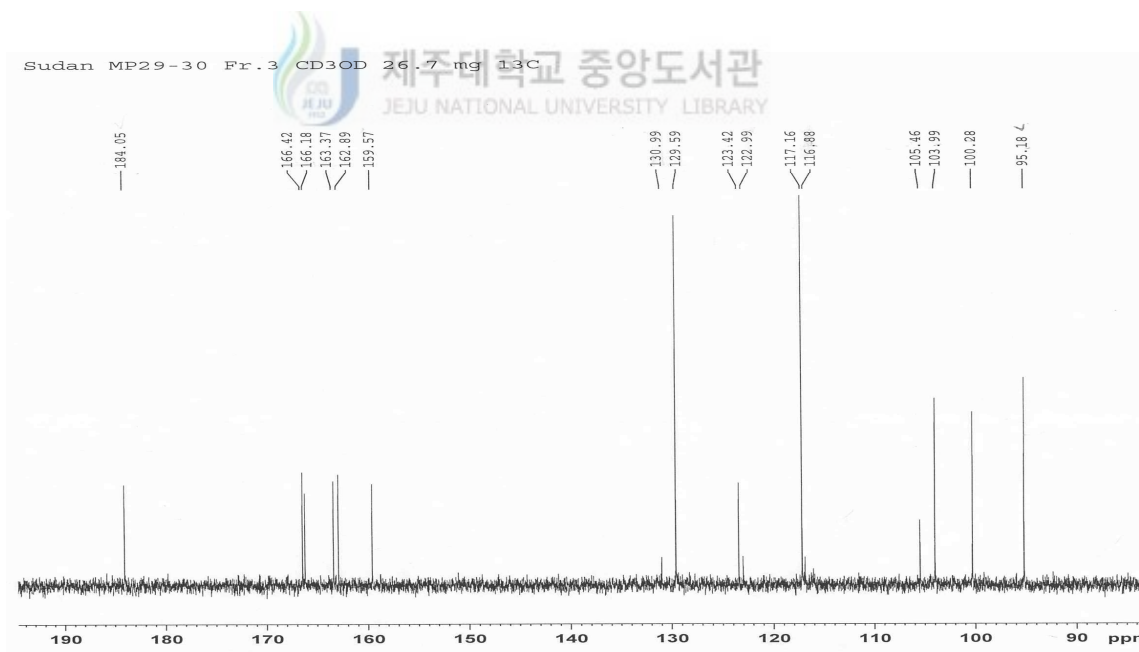


Figure 19. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** in CDCl_3

2. 항산화 활성 결과

2-1. Total polyphenolic compounds 함량 측정

Polyphenolic compounds는 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며 항암 및 항산화 효과와 같은 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.²²⁾

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선을 작성하여 수단그라스 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 polyphenolic compounds 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 1 mg 당 함유하고 있는 gallic acid 의 양(GAE)으로 환산하여 나타내었다.(Figure 20) 실험 결과, 추출물에서 24 μg GAE/1 mg, 분획물 중 EtOAc layer에서 135.9 μg GAE/1 mg으로 비교적 높은 polyphenolic compounds 함량을 나타내었다.(Figure 21) 이는 다른 항산화 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.

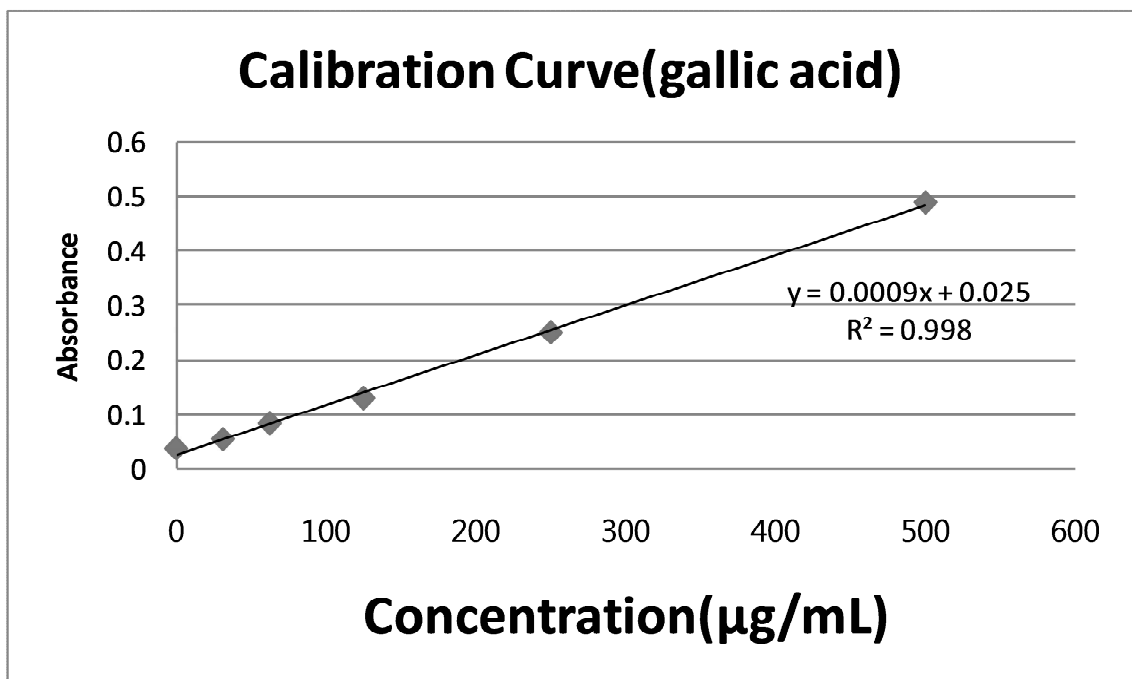


Figure 20. Calibration curve for gallic acid of total polyphenolic

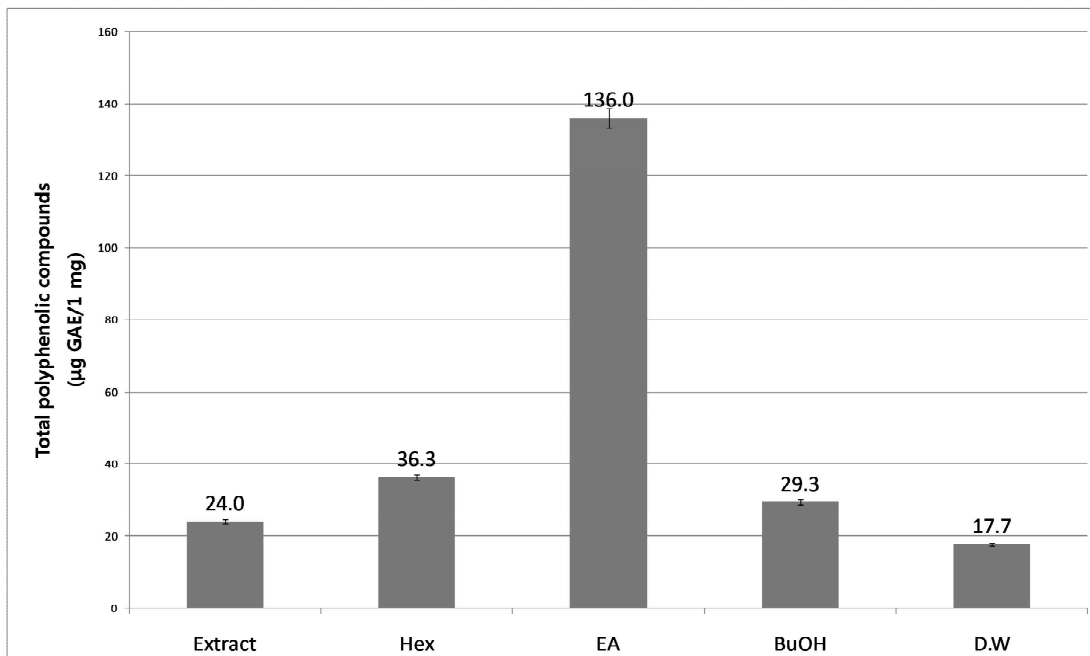


Figure 21. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers.

2-2. Total flavonoids compounds 함량 측정

플라보노이드는 페닐기 2개가 C₃ 사슬을 매개하여 결합한 C₆-C₃-C₆ 형 탄소골격 구조로 되어 있으며, 이것이 여러 당류와 에테르(ether) 결합을 통해 배당체(glycosides)의 형태로 존재하는 경우가 많다. 넓은 의미의 플라보노이드는 안토산틴류(anthoxanthins)와 안토시아닌류(anthocyanins), 카테킨류(catechins)를 포함하지만, 좁은 의미에서는 안토산틴류만을 말한다. 향균·항암·항바이러스·항알레르기 및 항염증 활성을 지니며, 독성은 거의 나타나지 않는 것으로 보고되고 있다.

Quercetin 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 22)을 작성하여 수단그라스의 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 1 mg당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다. 실험결과 추출물에서 43.42 µg quercetin/1 mg, 분획물 Hex, EA, BuOH, Water layer에서 각각 50.92 µg quercetin/1 mg, 186.75 µg quercetin/1 mg, 51.75 µg

quercetin/1 mg, 36.75 μ g quercetin/1 mg의 함량을 나타냈으며 그중 EA layer에서 비교적 높은 함량을 나타내었다(Figure 23).

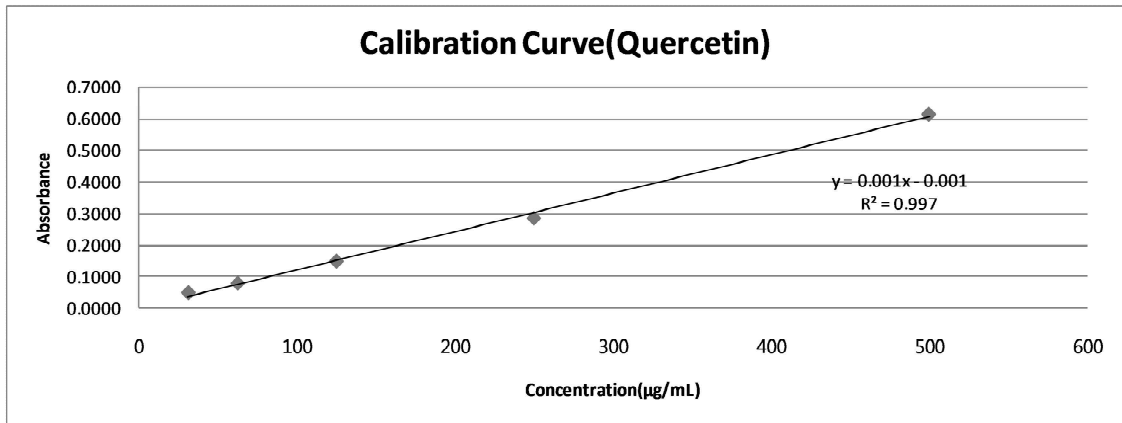


Figure 22. Calibration curve for quantification of total flavonoids

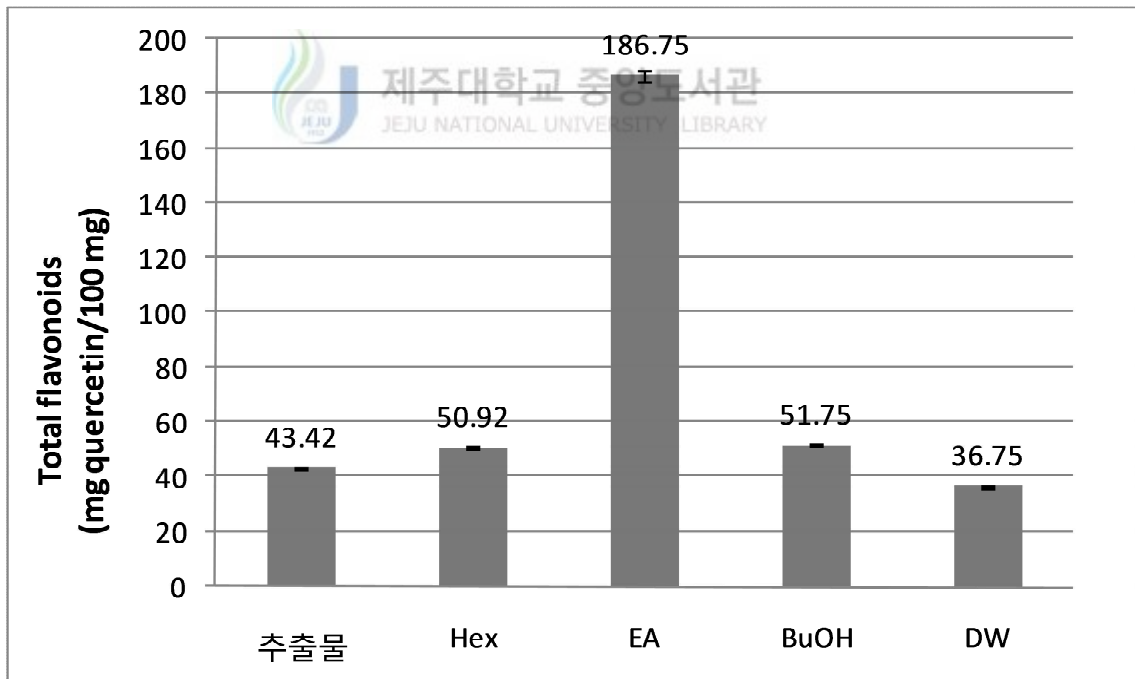


Figure 23. Total flavonoids of solvent layers.

2-3. DPPH radical 소거 활성 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성

수단그래프 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 각각의 분획물에 대하여 400, 200, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 실시하여 SC_{50} 값을 계산하였다(Figure 24).

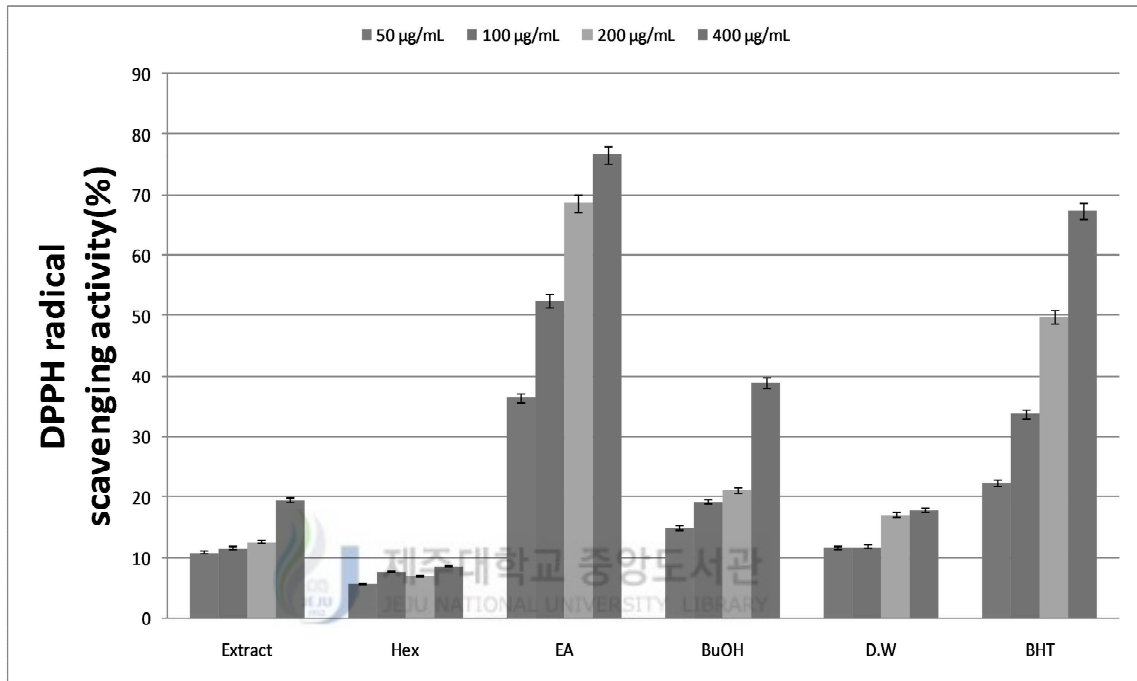


Figure 24. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers

그 결과, positive control인 BHT(SC_{50} 191.64 $\mu\text{g/mL}$)와 비교했을 때 91.44 $\mu\text{g/mL}$ 로 좋은 라디칼 소거활성을 보였다.

2-4. ABTS radical cation 소거 활성

수단그라스 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 나머지 분획물에 대하여 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 실시하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과, EtOAc에서 10.24 $\mu\text{g/mL}$ (대조군 BHT <25 $\mu\text{g/mL}$)로 활성을 나타내었다(Figure 25).

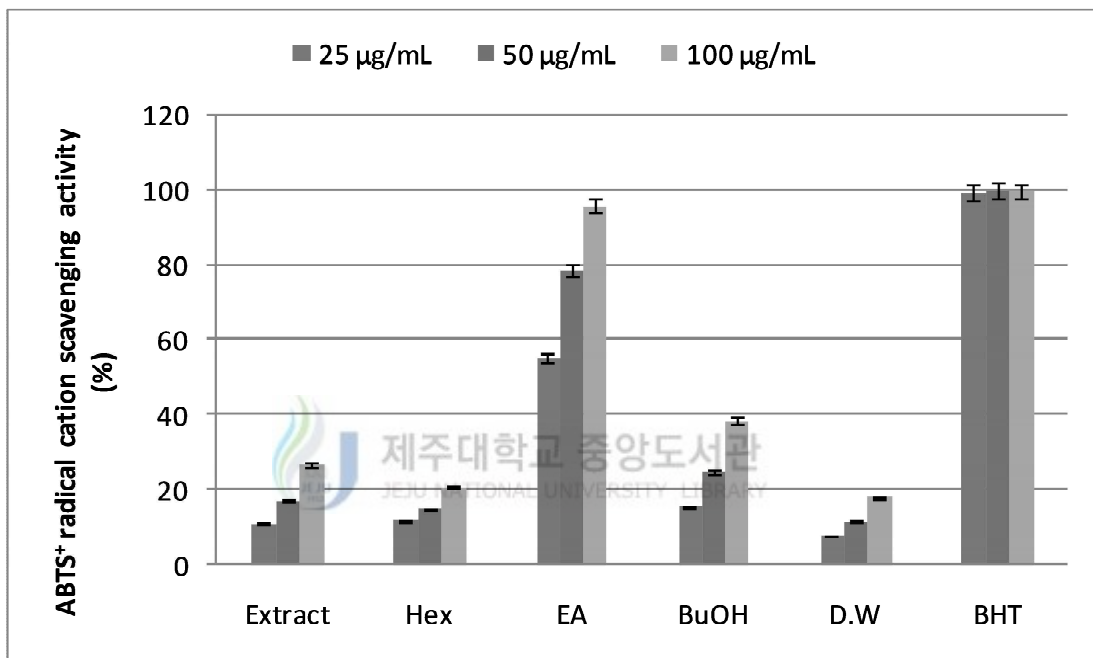


Figure 25. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers

3. 항염 활성 실험 결과

RAW264.7 cell을 이용하여 수단그라스의 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대한 nitric oxide (NO) 생성 억제 및 세포 독성을 측정하였다. 우선 sample 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, *n*-Hex layer에서는 60.01 %, EtOAc layer에서는 23.79 %가 감소하였다 이 값은 positive control인 Melasolv의 38.73 %보다 높거나 근사한 저해효과를 확인하였다(Figure 26).

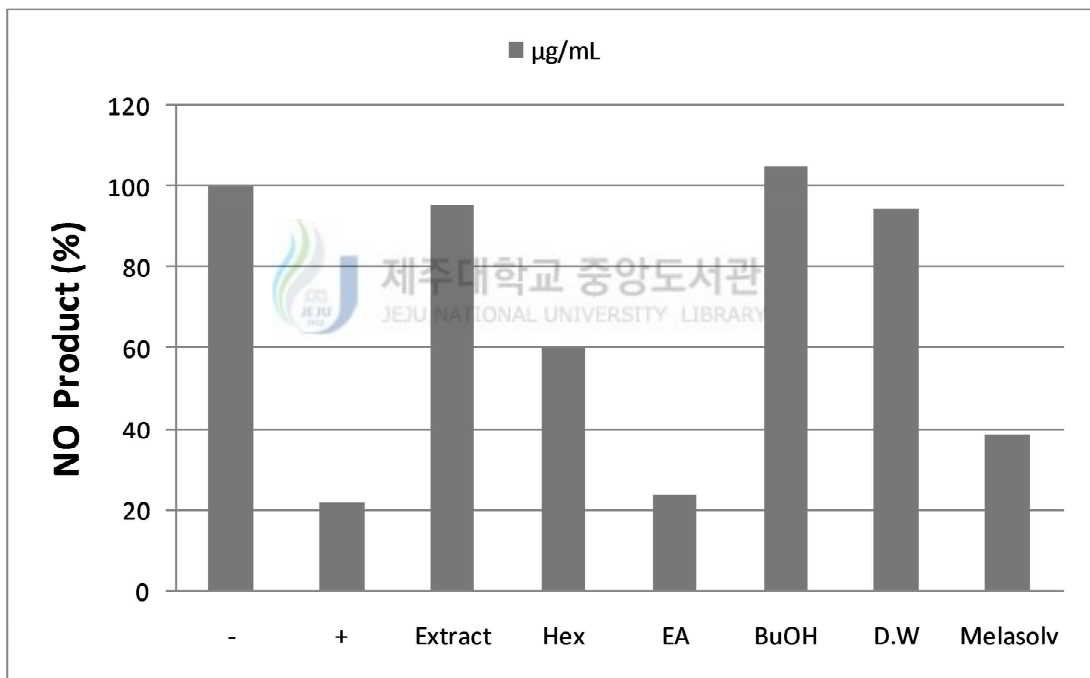


Figure 26. NO production inhibitory activities of extract and solvent layers.

분획물 및 컴파운드의 항산화 결과를 토대로 *n*-Hex layer 및 EtOAc layer 농도를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3개의 농도로서 항염, 항균활성 실험을 진행하여 *n*-Hex layer 및 EtOAc layer에서 농도 의존적으로

활성을 나타내는 것으로 확인할 수 있었으며(Figure 27, 28), MTT 및 LDH 실험을 통하여 세포독성을 측정한 결과 농도 의존적으로 세포 독성을 나타내는 것으로 확인할 수 있었다(Figure 29, 30, 31).

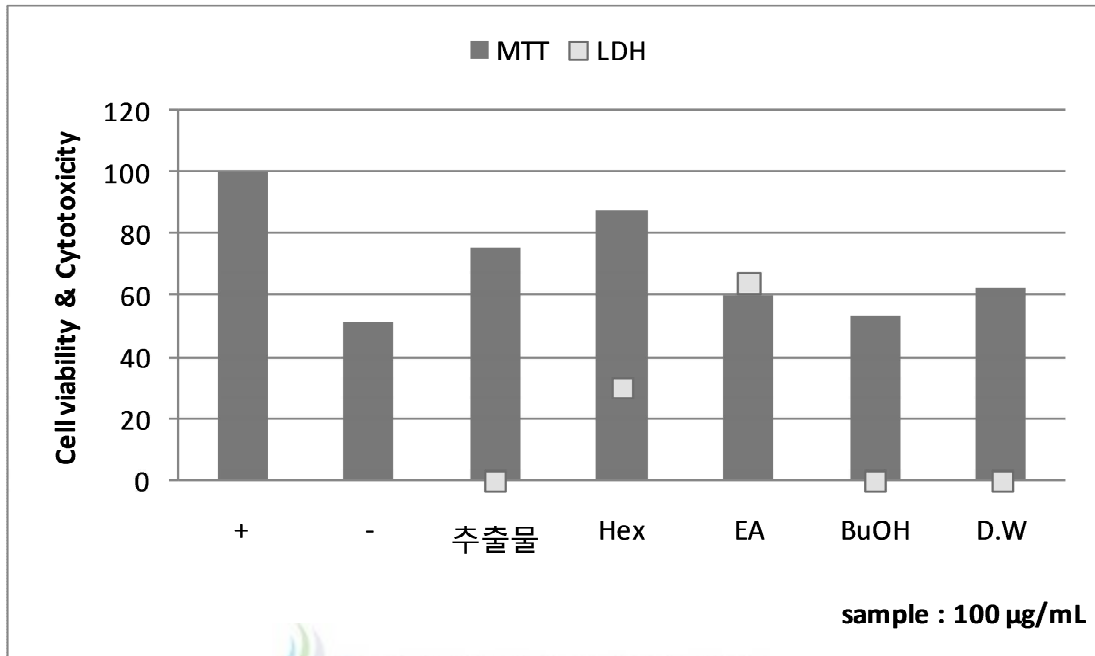


Figure 27. NO production inhibitory activities of *n*-Hex layer.

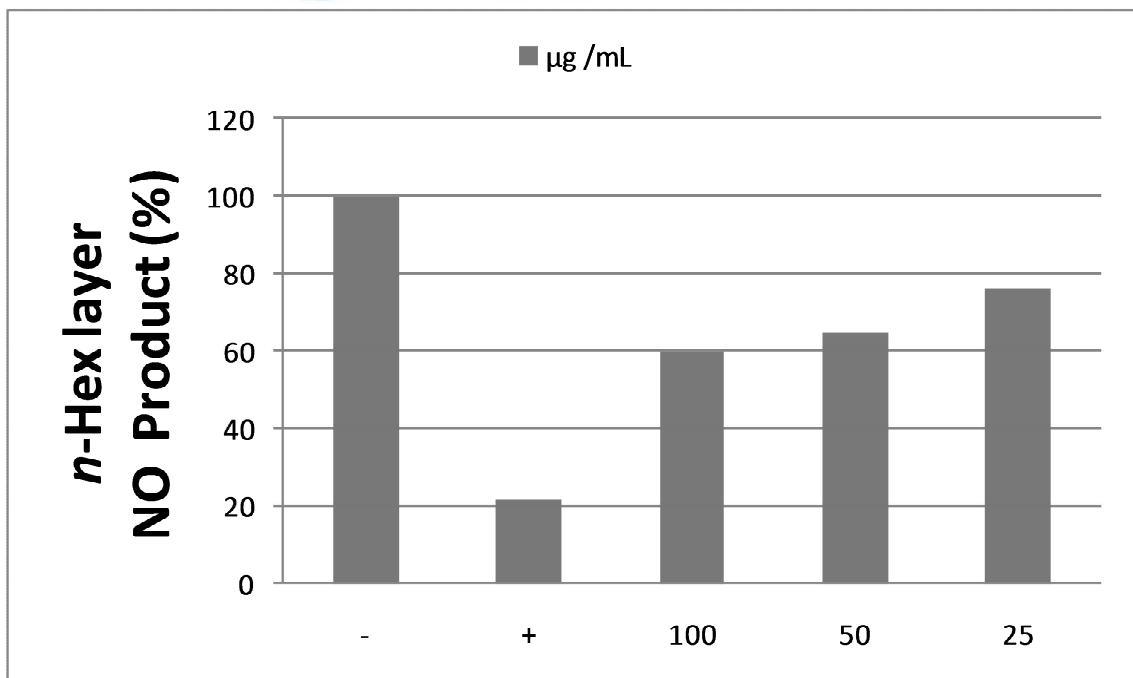


Figure 28. NO production inhibitory activities of EtOAc layer.

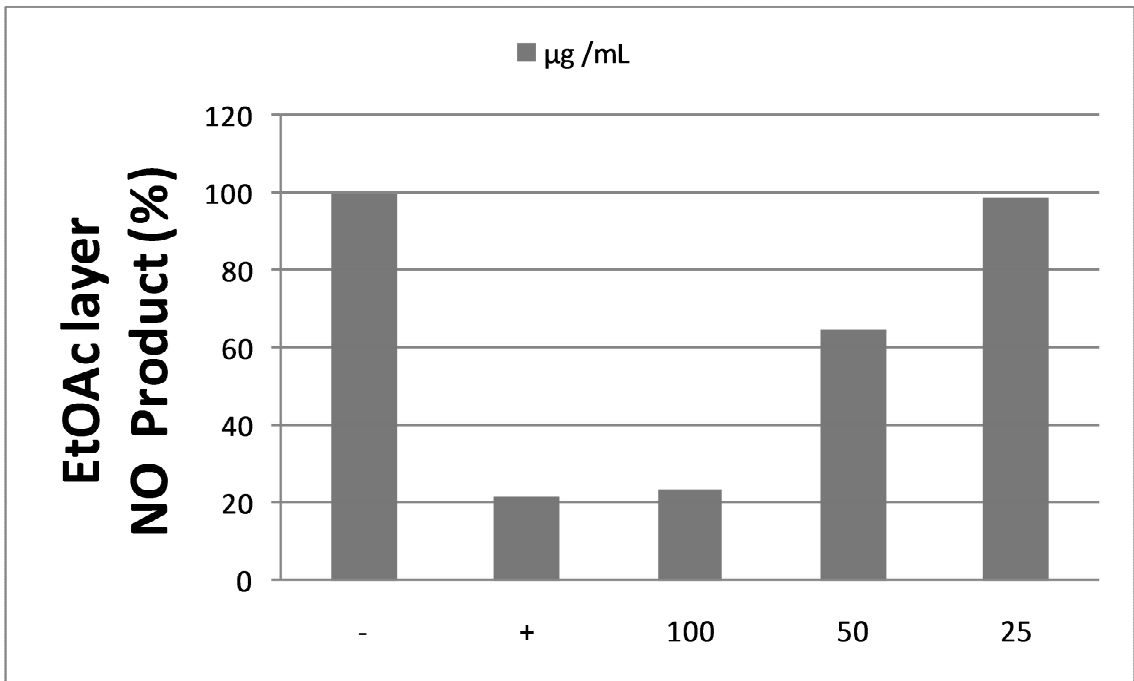


Figure 29. Cell viability & Cytotoxicity of extract and solvent layers.

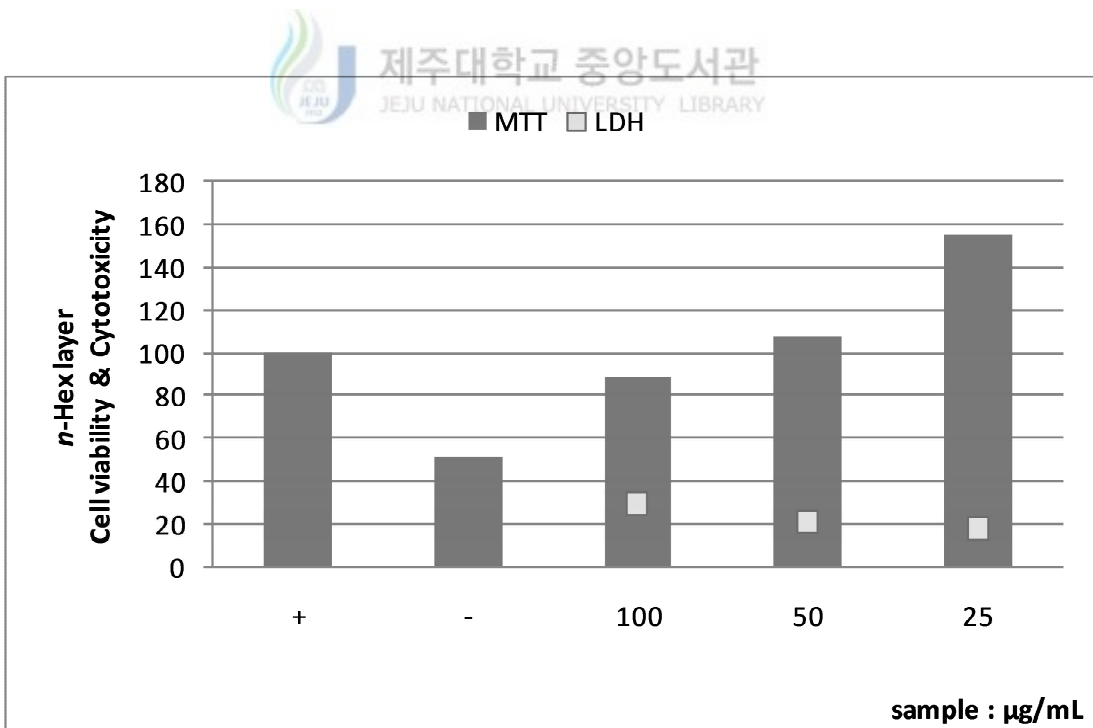


Figure 30. Cell viability & Cytotoxicity of *n*-Hex layer.

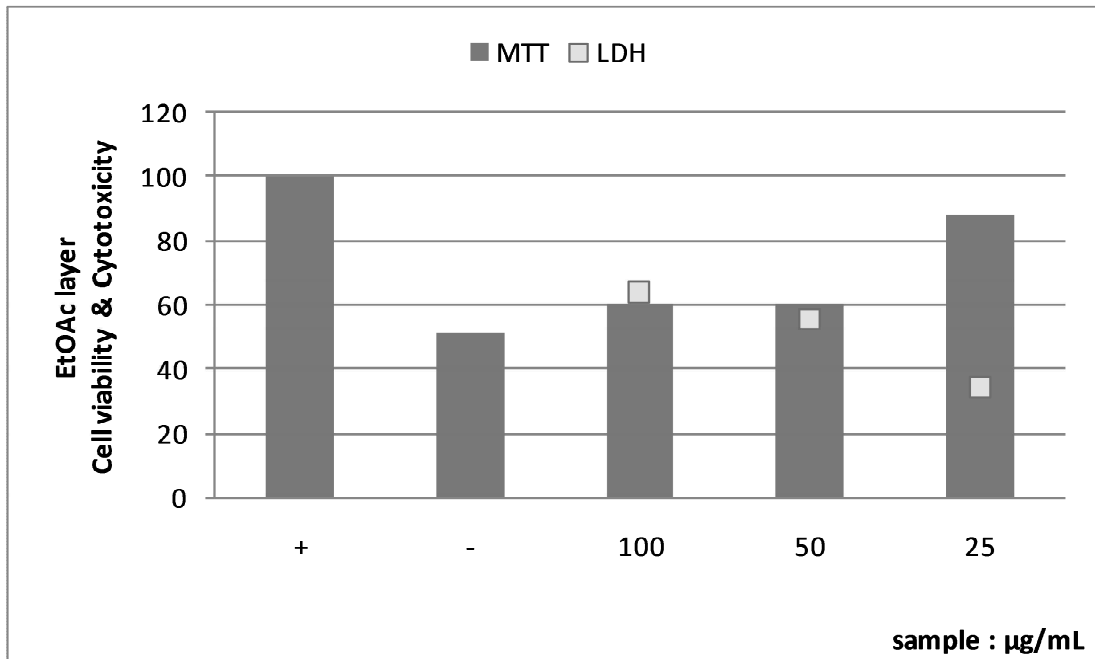


Figure 31. Cell viability & Cytotoxicity of EtOAc layer.

분리된 화합물 compound 1, compound 2, compound 3, compound 4에 대한 항염의 실험결과 compound 3 및 compound 4에서 높은 활성을 보였다. 세포독성 결과 compound 3인 경우 독성을 나타내지 않았지만 compound 4인 경우 높은 독성을 보이는 것으로 알 수 있었다(Figure 32, 33).

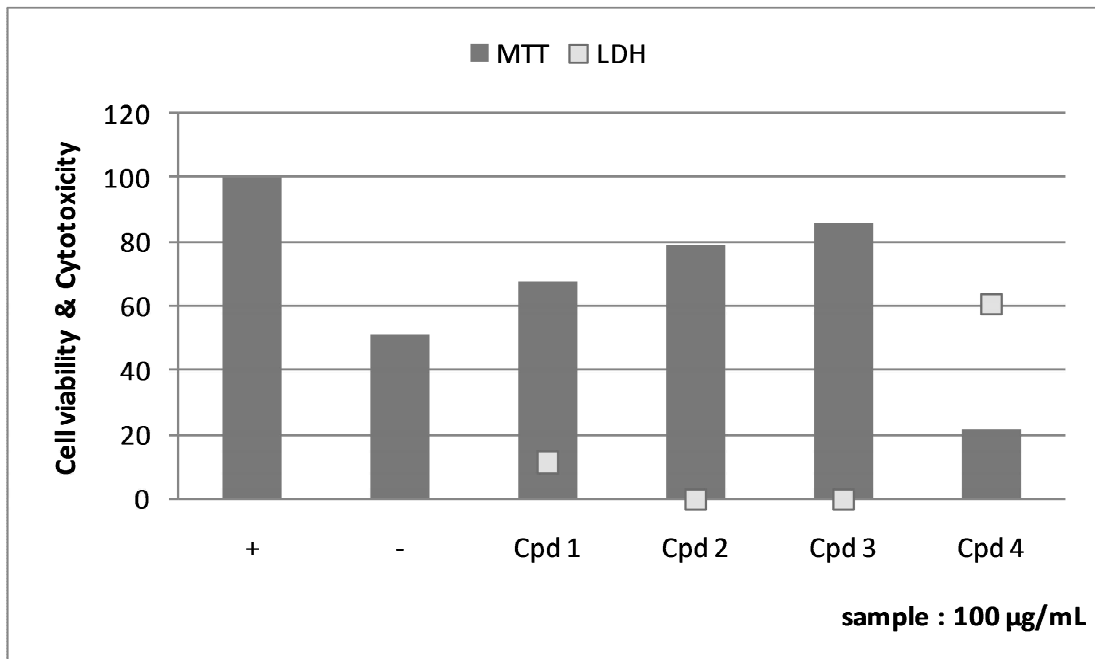


Figure 32. NO production inhibitory activities.

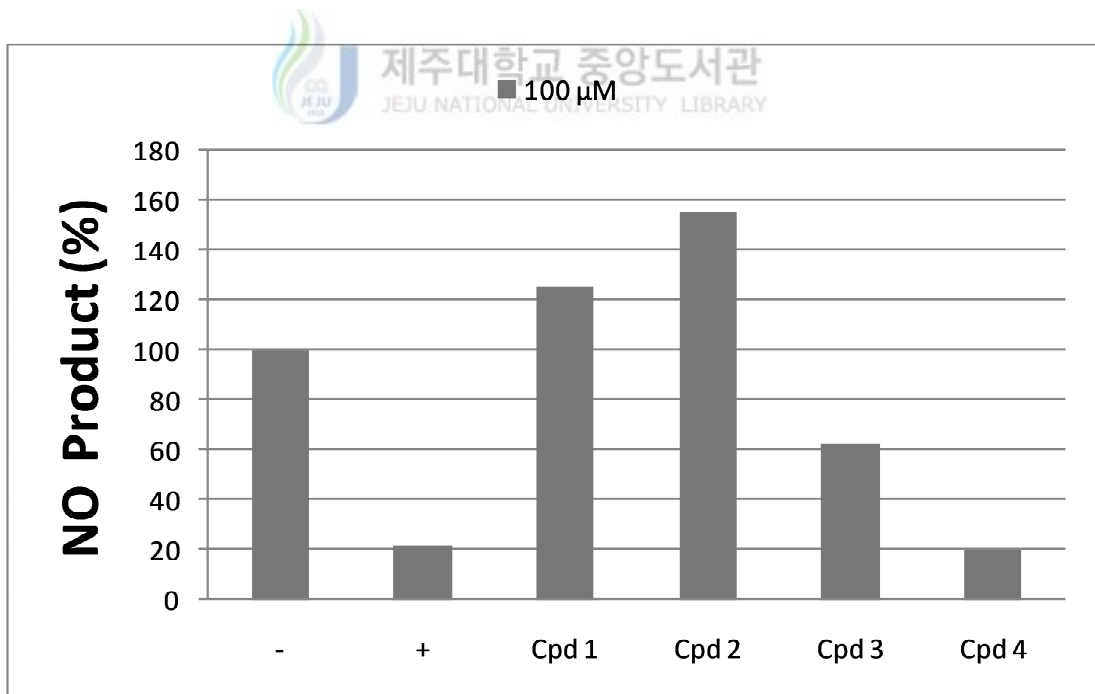


Figure 33. Cell viability & Cytotoxicity.

5. 항균 활성 실험 결과

5-1. 추출물 및 분획물의 항균 활성 평가

수단그라스 추출물 및 분획물의 항균 활성 측정을 위해 피부 상재균인 *P. acnes* 및 *S. epidermidis*을 사용하였다. 아그배나무 가지 분획물 중 Hex 분획물은 *P. acnes* 및 *S. epidermidis*의 paper disc diffusion test 직경값이 각각 19~21 mm, 19~20 mm로 대조균인 erythromycin과 비교하였을 때, 대조균만큼 활성이 좋게 나온 것을 확인하였다(Tables 5, 6).

Table 5. Anti-bacterial activity of solvent fractions

	Inhibition zone (mm)		
	<i>S.Epidermidis</i>	<i>S.Epidermidis</i>	<i>S.Epidermidis</i>
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	0	0	0
<i>n</i> -Hex	19	20	20
EtOAc	20	21	21
<i>n</i> -BuOH	0	0	0
D.W	0	0	0
Erythromycin	43	0	40

Table 6. Anti-bacterial activity of solvent fractions

	Inhibition zone (mm)		
	<i>P.Acnes</i>	<i>P.Acnes</i>	<i>P.Acnes</i>
	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010
Extract	0	0	0
<i>n</i> -Hex	21	19	20
EtOAc	20	21	20
<i>n</i> -BuOH	0	0	0
D.W	0	0	0
Erythromycin	43	42	0

5-2. MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

MIC (Minimum Inhibitory Concentration)는 균을 성장을 억제시키는 최소한의 농도를 확인하는 실험이다. Hex인 경우 모든 well에 균이 자람으로 인해 확인을 할 수가 없었으며 EtOAc층인 경우 대조군인 erythromycin과 같은 농도인 125 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 균을 저해시키는 것으로 보였지만 sample을 녹인 용매 (DMSO : EtOH = 1 : 1)에서도 125 $\mu\text{g/mL}$ 으로 보아 용매에 의한 영향이 있을 것으로 판단하여 90% DMSO를 용매로 사용하여 실험을 진행하였다.

90% DMSO인 경우 용매에 의한 MIC가 500 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나왔지만 EA층에서의 MIC값이 250 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타남으로 인해 항균활성이 있음을 확인할 수 있었다.

Table 7. MIC activity of solvent fractions

	Inhibition zone (mm)		
	<i>P.Acnes</i> CCARM 0081	<i>P.Acnes</i> CCARM 9009	<i>P.Acnes</i> CCARM 9010
DMSO(90%)	500	500	500
<i>n</i> -Hex	-	-	-
EtOAc	250	250	250
Erythromycin	500	500	500
DMSO : EtOAc =1:1	125	125	-
<i>n</i> -Hex	-	-	-
EtOAc	125	250	250
Erythromycin	125	250	250

IV. 요약 및 결론

본 논문은 천연 기능성 화장품 소재 개발 가능성을 알아보고자 본 연구를 진행하였다. 소재개발에 대한 연구는 재배가 쉬운 수단그라스를 이용하여 화합물을 분리하고 분리된 화합물에 대해 항산화에 대한 화장품 원료로 활용 가능한 생리활성을 검색하는 것으로 진행되었다.

수단그라스 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water layer를 얻었다. 이 추출물과 분획물들에 대해 항산화, 항염 및 항균활성을 진행하였다. 추출물 및 분획물들의 항산화 활성실험 결과, 총 폴리페놀 함량 측정에서는 EtOAc에서 139.7 μg GAE/1 mg으로 가장 높게 나왔다.

총 플라보노이드 함량 측정에서는 추출물에서 43.42 μg quercetin/1 mg, 분획물 Hex, EA, BuOH, Water layer에서 각각 50.92 μg quercetin/1 mg, 186.75 μg quercetin/1 mg, 51.75 μg quercetin/1 mg, 36.75 μg quercetin/1 mg의 함량을 나타냈으며 그중 EA layer에서 비교적 높은 함량을 나타내었다

DPPH 라디칼 소거능 실험에서는 EtOAc에서 positive control인 BHT (SC₅₀ 191.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 비교했을 때 91.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 좋은 라디칼 소거활성을 보였다. 또한, 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성결과, EtOAc에서 10.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (대조군 BHT(<25 $\mu\text{g}/\text{mL}$))로 활성을 나타내었다.

항염 소거능 실험에서는 *n*-Hex layer, EtOAc layer에서는 positive control인 Melasolv보다 높거나 근사한 저해효과를 확인하였다. *n*-Hex layer와 EtOAc layer의 경우에는 cell에 대한 독성이 있는 것으로 나타났다.

항균 실험에서는 *n*-Hex layer와 EtOAc layer에서 항균에 대한 활성을 보였으

며 MIC (Minimum Inhibitory Concentration)의 항균실험에서는 EtOAc layer 층에서 대조군인 Erythromycin과 비슷한 활성을 보이는 것으로 확인 할 수 있었다.

활성이 좋게 보이는 EtOAc layer으로 MPLC를 통하여 48개의 프랙션으로 나누었으며 컬럼을 통하여 *para*-hydroxybenzaldehyde, Luteoloside, Luteolin, apigenin 총 4개의 화합물을 분리하였으며 이 화합물은 수단그라스로부터 처음 분리된 물질이다.

위의 활성데이터로 보아 항산화의 경우 EtOAc layer에서 높은 활성을 나타냈으며 항염 및 항균 작용의 경우 EtOAc layer와 *n*-Hex layer층에서 활성을 보였으나 *n*-Hex layer층에서는 높은 독성을 나타냈으며 EtOAc layer의 경우 낮은 농도에서는 독성이 많이 줄어드는 것을 볼 수 있었다, 또한 수단그라스는 원물의 수급이 1년에 4회정도 채취가 가능하고 기후에 상관없이 잘 자라는 식물이기 때문에 원물의 수급량 또한 충분할 것으로 생각된다. 이로 인해, 아직 연구가 더욱더 필요하겠지만 수단그라스는 화장품의 천연 향산화제, 항염 및 항균 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

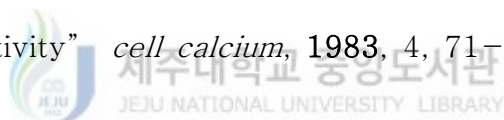
- 1) 공개특허, “한약재 복합 추출물을 포함하는 향염, 향산화, 및 미백, 향균효과를 지닌 기능성 화장료 조성물” , 2009
- 2) Cha, B. C.; Lee, S. K.; Lee, H. W.; Lee, E.; Choi, M. Y.; Rhim T. J.; Park, H. J. “Antioxidative effect of domestic plants” *Kor. J. Pharmacogn.*, 1997, 28, 15-20.
- 3) Kim, S. K. "Evaluation of antioxidant activity" *Safe Food*, 2008, 3(4), 35-39.
- 4) 한정환, “비양나무 가지의 향산화, 미백, 향염 활성 성분연구” , 2014, 4-5
- 5) 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.
- 6) Van, S. J.; Interleukin-6: an overview. *Annu Rev. Immunol*, 1998, 8: 253-278
- 7) Lefkowitz, J. B. “Cyclooxygenase-2 specificity and its clinical implications” *American Journal of Medicine*, 1999, 106, 43-50
- 8) Kim, Jin-Man; Oh, Han-cheol; Song, Seong-pil; Kim, Nam-kwen; Hwang, Chung-Yeon, “Study on the Anti-microbial Activity,

Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Several Herb-Extract”
Korean J. Oriental Physiology & Pathology, **2006**, 20(1), 103~114.

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

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

11) 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



12) Blois, M. S. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.

13) 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.

14) Study of Acid Catalysis for Condensation of 4-Hydroxybenzaldehyde With Acetone ; Chemistry Education, Faculty of Mathematics and Science, Yogyakarta State University; May **2014**, 18-20

15) 20) Lee, sanghyun., Choi, Mi Jin., Choi, JiMyung., Lee, Sullim., Kim,

Hyun Young., ; Flavonoids from *Taraxacum coreanum* protect from radical-induced oxidative damage, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol.6(40), 18 October, 2012, 6(40) 5377-5384

16) Hyunjin Lee, Seokwon Yang Saerom Park, Jae Heon Yang, Byeong_Suk Chae, Jae Soon Eun, Hoon Jeon, Jong Pil Lim, Yong-Hun Hwang, Jong-Han Park, and Dae Keun Kim ; Antioxidative Constituents of *Cyperus difformis* L. ; *Natural Product Sciences* ; 2009, 15(4), 241-245

