



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

‘부지화’ 잎·가지 추출물의 항염 및
항산화 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

趙 娟 停

2017年 2月

‘부지화’ 잎·가지 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구

指導教授 李南昊

趙娟停

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 12月

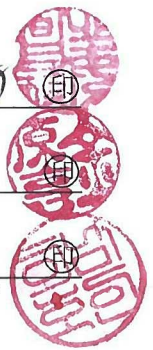
趙娟停의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

委員

委員

姜昌禧
金原亨
李南昊



濟州大學校 大學院

2016年 12月

Anti-inflammatory and Anti-oxidative
Constituents from 'Shiranuhi'
Leaves and Branches

Yeon Jeong Jo
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2016. 12.

This thesis has been examined and approved.

Chang Hee Kang
Won Hyung Kim
Nam Ho Lee

12/16
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



목 차

List of Tables	iv
List of Figures	vi
List of Abbreviations	x
Abstract	xii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 시약 및 기기	6
2. 재료	7
3. 생리 활성 평가	8
1) 항염	8
(1) RAW264.7 cell 배양	8
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	8
(3) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	8
(4) 세포 독성 평가(MTT assay)	9
2) 항산화	10
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	10
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	11
(3) DPPH radical 소거 활성 측정	11
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	12
III. 연구 1 : 부지화 잎 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구	13
1. 부지화 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	13
1) 부지화 잎의 추출 및 용매 분획	13

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	14
2. 분리된 화합물의 구조 분석	15
1) Compound 1, 2의 구조 동정	15
2) Compound 3, 4의 구조 동정	20
3) Compound 5의 구조 동정	26
3. 부지화 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	29
1) 항염	29
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	29
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	32
2) 항산화	34
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	34
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	35
(3) DPPH radical 소거 활성 측정	36
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	37
4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	38
1) 항염	38
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	38
(2) Compound 3, 4의 PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	41
① Compound 3	41
② Compound 4	43
2) 항산화	45
(1) DPPH radical 소거 활성 측정	45
(2) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	46
5. 요약 및 결론	47
IV. 연구 2 : 부지화 가지 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구	49
1. 부지화 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	49
1) 부지화 가지의 추출 및 용매 분획	49
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	50

2. 분리된 화합물의 구조 분석	51
1) Compound 1, 2, 3의 구조 동정	51
2) Compound 4, 5, 6, 7의 구조 동정	56
3. 부지화 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	61
1) 항염	61
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	61
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	64
2) 항산화	66
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	66
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	67
(3) DPPH radical 소거 활성 측정	68
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	69
4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	70
1) 항염	70
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	70
(2) Compound 4의 PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	73
2) 항산화	75
(1) DPPH radical 소거 활성 측정	75
(2) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	76
5. 요약 및 결론	77
V. 종합 결론 및 고찰	79
VI. 참고문헌	81

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1 and 2	17
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 3 and 4	22
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 5	27
Table 4. IC_{50} values of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE_2 and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells	33
Table 5. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves	36
Table 6. SC_{50} values of ABTS^+ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves	37
Table 7. IC_{50} values of isolated compounds 1-5 from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells	40
Table 8. IC_{50} values of compound 3 from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE_2 and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells	42
Table 9. IC_{50} values of compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE_2 and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells	44
Table 10. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds 1-5 from ‘Shiranuhi’ leaves	45
Table 11. SC_{50} values of ABTS^+ radical scavenging activities for isolated compounds 1-5 from ‘Shiranuhi’ leaves	46
Table 12. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1 and 3	53
Table 13. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 4 and 6	58
Table 14. IC_{50} values of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ branches on PGE_2 and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced	

RAW264.7 cells	65
Table 15. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches	68
Table 16. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches	69
Table 17. IC ₅₀ values of isolated compounds 1 , 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells ..	72
Table 18. IC ₅₀ values of compound 4 from ‘Shiranuhi’ branches on PGE ₂ and pro-inflammatory cytokines and production in LPS-induced RAW264.7 cells	74
Table 19. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds 1 , 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ branches	75
Table 20. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for isolated compounds 1 , 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ branches	76

List of Figures

Figure 1. Chemical structures of flavonoid	2
Figure 2. Picture of ‘Shiranuhi’ tree	7
Figure 3. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents	10
Figure 4. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents	11
Figure 5. Extraction and solvent fractionation of ‘Shiranuhi’ leaves	13
Figure 6. Isolation of compounds from ‘Shiranuhi’ leaves	14
Figure 7. Chemical structures of compound 1 and 2	16
Figure 8. ¹ H NMR spectrum of compound 1	18
Figure 9. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	18
Figure 10. ¹ H NMR spectrum of compound 2	19
Figure 11. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	19
Figure 12. Chemical structures of compound 3 and 4	21
Figure 13. ¹ H NMR spectrum of compound 3	23
Figure 14. ¹³ C NMR spectrum of compound 3	23
Figure 15. ¹ H NMR spectrum of compound 4	24
Figure 16. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	24
Figure 17. HMQC spectrum of compound 4	25
Figure 18. HMBC spectrum of compound 4	25
Figure 19. Chemical structures of compound 5	26
Figure 20. ¹ H NMR spectrum of compound 5	28
Figure 21. ¹³ C NMR spectrum of compound 5	28
Figure 22. Effects of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	30

Figure 23. Effects of EtOAc fractions from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	31
Figure 24. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE ₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells	32
Figure 25. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells	33
Figure 26. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves	34
Figure 27. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves	35
Figure 28. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves	36
Figure 29. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves	37
Figure 30. Effects of isolated compounds 1-5 from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	39
Figure 31. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	40
Figure 32. Effects of isolated compound 3 from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE ₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells	41
Figure 33. Effects of isolated compound 3 from ‘Shiranuhi’ leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells	42
Figure 34. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE ₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells	43
Figure 35. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells	44
Figure 36. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds 1-5 from ‘Shiranuhi’ leaves	45

Figure 37. ABTS ⁺ radical scavenging activities of isolated compounds 1-5 from ‘Shiranuhi’ leaves	46
Figure 38. Extraction and solvent fractionation of ‘Shiranuhi’ branches ...	49
Figure 39. Isolation of compounds from ‘Shiranuhi’ branches	50
Figure 40. Chemical structures of compounds 1-3	52
Figure 41. ¹ H NMR spectrum of compound 1	54
Figure 42. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	54
Figure 43. ¹ H NMR spectrum of compound 2	55
Figure 44. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	55
Figure 45. Chemical structures of compounds 4-7	57
Figure 46. ¹ H NMR spectrum of compound 4	59
Figure 47. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	59
Figure 48. ¹ H NMR spectrum of compound 5 and 6	60
Figure 49. ¹³ C NMR spectrum of compound 5 and 6	60
Figure 50. Effects of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	62
Figure 51. Effects of EtOAc fractions from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	63
Figure 52. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ branches on PGE ₂ and TNF-α production in LPS-induced RAW264.7 cells	64
Figure 53. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ branches on IL-1β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells	65
Figure 54. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches	66
Figure 55. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches	67
Figure 56. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches	68

Figure 57. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches	69
Figure 58. Effects of isolated compounds 1 , 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	71
Figure 59. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	72
Figure 60. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ branches on PGE ₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells	73
Figure 61. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ branches on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells	74
Figure 62. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds 1 , 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ branches	75
Figure 63. ABTS ⁺ radical scavenging activities of isolated compounds 1 , 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ branches	76

List of Abbreviations

BHA	<i>tert</i> -Butylhydroxyanisol
BHT	<i>tert</i> -Butylhydroxytoluene
CC	Column chromatography
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i>
CHCl ₃	Chloroform
COX-2	Cyclooxygenase-2
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
Fr.	Fraction
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalent
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
int.	Integration
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MP	MPLC subfraction
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
multi.	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance

NO	Nitric oxide
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMF	Polymethoxyflavonoid
QE	Quercetin equivalent
ROS	Reactive oxygen species
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
TLC	Thin layer chromatography
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
V	VLC subfraction
VLC	Vacuum liquid chromatography

Abstract

In this study, we investigated anti-inflammatory and anti-oxidative constituents from 'Shiranuhi (*Citrus unshiu* Marc. × *C. sinensis* Osbeck) × *C. reticulata* Blanco)' leaves and branches. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values.

Five phytochemicals were isolated from the extract of 'Shiranuhi' leaves; sinensetin (**1**), isosinensetin (**2**), 5-desmethylinensetin (**3**), 7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone (**4**) and hesperidin (**5**). As far as we know, compounds **2**, **3** and **4** were isolated for the first time from this plant. On the anti-inflammation studies using RAW264.7 cells, the EtOAc fraction and compounds **1-4** inhibited the production of NO, PGE₂ and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) effectively. For the anti-oxidation tests, the compound **5** showed strong ABTS⁺ radical scavenging activity with SC₅₀ 25.8 μ M, and its activity was comparable to a positive control BHT (SC₅₀ 29.8 μ M).

Seven constituents were isolated from the extract of 'Shiranuhi' branches; nobiletin (**1**), sinensetin (**2**), tetramethylscutellarein (**3**), 6-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (**4**), 5-desmethylinensetin (**5**), cirsimaritin (**6**) and hesperidin (**7**). As far as we know, compounds **4**, **5** and **6** were isolated for the first time from this plant. On the anti-inflammation studies using RAW264.7 cells, the EtOAc fraction and compounds **1**, **3** and **4** inhibited the production of NO, PGE₂ and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) effectively. For the anti-oxidation tests, the compound **4** (SC₅₀ 128.7 μ M) showed stronger DPPH radical scavenging activity than BHT (SC₅₀ 402.2 μ M), a positive control. Also, the compound **4** (SC₅₀ 17.9 μ M) showed stronger ABTS⁺

radical scavenging activity than BHT (SC_{50} 29.8 μ M), a positive control.

Based on these results, it was suggested that extract and isolated compounds from 'Shiranuhi' leaves and branches could be potentially applicable as anti-inflammatory and/or anti-oxidative ingredients.

I. 서론

최근 생활수준의 향상과 현대 의학의 발달에 따른 인간수명의 증가로 건강하고 아름다운 삶에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 노화방지와 건강유지를 위한 기능성 식·의약품 및 화장품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹ 이로 인하여 새로운 기능성 소재 개발에 대한 요구 또한 증가하고 있는데, 천연에서 유래한 phytochemical은 인체에 유용한 다양한 생리활성을 보유하고 있어 기능성 소재의 새로운 자원으로 각광받고 있다. 이전에는 식물을 주 연구 대상으로 연구하여 왔으나 현재는 미생물, 동물, 해양 자원 등 자연에 존재하는 모든 것을 대상으로 천연물에 대한 연구가 광범위하게 이루어지고 있다.²

천연물은 크게 1차 혹은 2차 대사산물로 분류할 수 있으며 이 중 2차 대사산물이 주 연구 대상이 된다. 2차 대사산물은 생명 유지 및 발육, 번식에는 필수적이지 않지만 생물체의 특정 조직이나 기관에 편중되어 존재하며, 어느 순간에 고유한 기능을 수행하는 물질로써 매우 다양한 구조 및 생리 활성을 가진다. 이러한 2차 대사산물은 구조적 특징에 따라서 alkaloid, terpenoid, flavonoid 등의 물질들로 분류할 수 있다.³ 이 중, flavonoid는 C₆-C₃-C₆를 기본골격으로 하는 물질로 자연계에 널리 분포하는 담황색 또는 노란색 계통의 색소화합물이다(Figure 1). 항염증, 항산화, 항노화 및 항당뇨 등의 여러 생리적, 약리적 효능이 있는 것으로 밝혀져 식품, 의약품, 화장품 등 여러 분야에서 연구가 활발히 진행되고 있다.⁴ 특히, naringenin, hesperetin, nobiletin, tangeretin 등의 flavonoid는 감귤류에 많이 함유되어 있는 화합물이며 이들의 기능성에 대한 평가로 항산화, 항염증, 항균, 항바이러스 등의 효과가 보고되었다.⁵

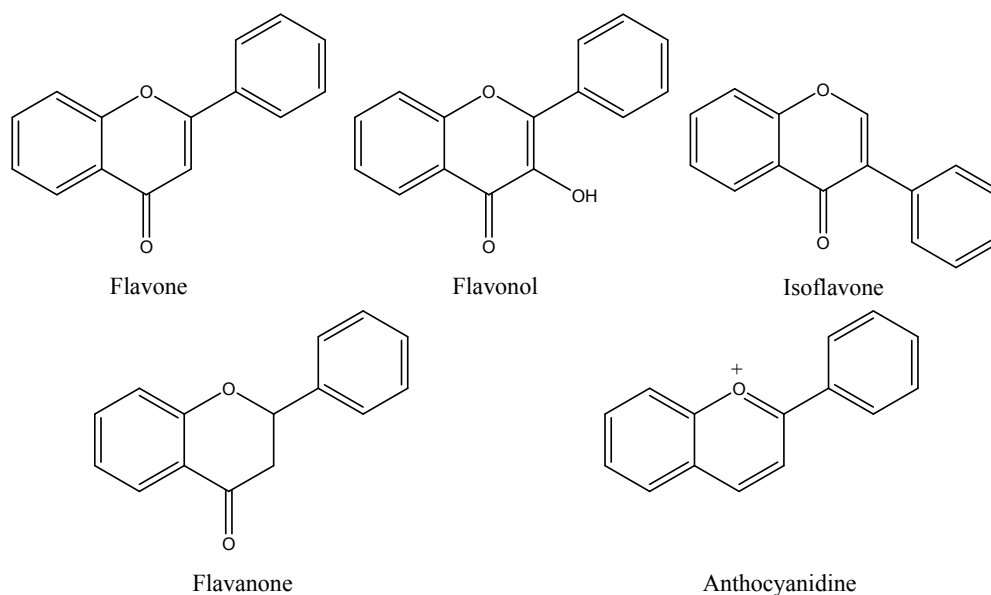


Figure 1. Chemical structures of flavonoid.

피부는 신체의 가장 바깥쪽에 위치하며 외부로부터 신체를 보호하는 역할을 하기 때문에 다양한 외부 인자에 노출되어 있다. 피부에 영향을 주는 외부 인자로 는 계절변화와 같은 기후적인 요인과 화장품, 의류와 같은 일상 생활용품, 주변 생활환경에서 접할 수 있는 환경요인 등 다양한 요인이 존재한다.⁶

체내에 박테리아나 바이러스와 같은 외부물질이 유입되면 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증 매개 물질을 분비함으로써 몸을 보호해주는 것을 염증반응 이라고 한다. 염증반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며, 여러 자극이나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화 되어, nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), pro-inflammatory cytokine을 생성함으 로써 통증, 부종, 열 등의 염증 반응을 유발하고, 염증부위로 면역세포의 이동을 촉진시킨다.⁷

염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase (NOS)에 의해 합 성된다. NOS에는 endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS (iNOS)의 세 가지 형태가 있으며, 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성은 병리학적으로 중요한 역할을 한다. 일반적으로 정상적인 NO는 세균을 죽이거나 종양을 제거하는 중요

한 면역반응의 역할을 한다. 외부 요인에 의해 과도하게 생성된 NO는 염증을 유발시켜 신경 손상, 조직 손상 및 유전자 변이를 일으키는 것으로 알려져 있다.⁸ 이러한 외부 요인에는 lipopolysaccharide (LPS)가 해당되는데, LPS는 그람 음성 박테리아의 외부 세포막을 구성하는 성분으로 내독소로 잘 알려져 있으며 대식세포의 활성화 인자이다. LPS로 자극된 대식세포는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6, IL-8, IL-10 등과 같은 cytokine을 생성하여 세포매개성 면역반응 및 염증반응에 관여한다.⁹

Prostaglandin (PG)은 세포막에 존재하는 인지질에서 나온 arachidonic acid로부터 유래된 호르몬이다. cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid가 PG으로 변화하는 것을 촉진시키는 효소로써, 특히 COX-2는 암세포에 의해 발생한 염증, growth factor, cytokine 등의 다양한 자극에 의해 유발된다. 생성된 PG들 중 PGE₂는 염증반응에 깊이 관여하며, 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다.⁸

면역반응의 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로는 TNF- α , IL-6, IL- 1β 등이 있으며 대식세포 등은 이들을 분비하여 다양한 염증반응을 매개하고 NO와 PGE₂ 생성을 유도한다. 즉, iNOS, COX-2의 발현과 NO, PGE₂의 생성은 면역세포의 대표적인 염증인자이다.^{7,8}

한편, 염증반응을 유발하는 원인 중 또 다른 하나는 체내에서 생성되는 산화적 스트레스인데 특히 흡연이나 음주, 비만, 독성물질 등은 체내 산화적 스트레스를 증가시켜 염증반응을 유발함으로써 만성질환을 일으킨다고 알려져 있다.⁷ 산소는 생물에게 없어서는 안되는 요소지만, 식품 또는 동물의 세포 등과 같은 여러 유기물질에 대해 산화 반응을 유발시켜 많은 부작용을 나타내게 되는 양면성을 가지고 있다.

가장 안정한 형태인 삼중항산소(³O₂)가 환원되어 생성되는 superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$), singlet oxygen (¹O₂) 및 그 외의 lipid peroxide (ROOH), free radical (RO \cdot , ROO \cdot) 등의 반응성이 큰 산소화합물을 통틀어 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)이라고 한다.¹⁰ 생체 대사 과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소종은 산소의 환원 대사물질로써 미토콘드리아나 peroxisome 등의 정상세포 내 대사과정이나 세포질

내 효소들의 작용으로 내부로부터 형성되거나 다양한 외부 요인에 의해 형성된다. 과도하게 생성된 ROS는 DNA와 단백질 및 지방의 심한 손상을 일으켜 세포의 손상을 가져오기 때문에 세포들은 ROS의 생성 및 축적에 대항하기 위한 항산화 시스템을 가지고 있다. ROS의 발생이 세포내 항산화 능력을 초과하는 경우에는 신체가 산화적 스트레스에 노출되어 노화, 암, 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 피부 손상, 관절염 및 치매 등의 다양한 질병이 유발된다.¹¹

활성산소로 인하여 발생될 수 있는 피해를 줄이기 위하여 합성 항산화제인 *tert*-Butylhydroxyanisol (BHA) 및 *tert*-Butylhydroxytoluene (BHT) 등은 탁월한 효과와 경제성으로 현재까지 많이 사용되어 왔다. 하지만 최근에는 인체에 대한 안전성의 문제로 α -tocopherol, vitamin C, flavonoid, carotenoid 등과 같은 천연 항산화제에 관심이 모아지고 있다. 이러한 천연 항산화제는 합성 항산화제보다 안전하고 효과가 뛰어나지만 가격이 비싼 단점을 갖고 있어, 새롭고 안전한 천연물 소재를 찾으려는 노력이 필요한 실정이다.¹²

지금까지 보고된 천연 항산화제 등의 생리 활성 물질은 대부분 식물 유래로, 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있다. 폴리페놀 화합물인 flavonoid, tannin, carotenoid, glutathione 등의 천연 항산화제는 생체 내에서 노화를 억제시키거나, 동맥경화증, 염증, 퇴행성 질환 및 암을 예방하는데 아주 효과적인 것으로 보고되었다. 또한, 강한 항산화 활성을 가지는 폴리페놀 화합물은 염증반응을 매개하는 cytokine, COX-2, iNOS, NO 및 PGE₂의 활성을 저해한다고도 보고되었다.¹³

제주산 만감류의 생산량은 2015년 기준 전체 감귤 생산량(635,032톤)의 10.6%에 해당하는 67,406톤으로 매년 꾸준히 증가하고 있다. 그중 부지화의 생산량은 2009년(27,252톤)에 비해 2015년(43,218톤) 2배 가까이 증가하였다. 이에 따라 재배 농가에서는 고품질의 감귤을 생산하기 위하여 간벌 및 전정 작업을 시행하고 있는데, 이때 발생하는 감귤 나무의 잎, 가지 등은 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 이로 인하여 최근에는 이와 같은 감귤 유래 잉여자원의 부가가치를 높이는 자원 순환형 소재 발굴의 필요성이 대두되고 있다.

부지화는 1972년 일본 농림성 과수시험장에서 청견과 폰칸(중야3호)을 교배해 육성한 교잡종으로 일본에서는 처음에 ‘데코폰’이라고 불렀으나, 1990년에 일반명 및 품종명을 ‘부지화(不知火, しらぬひ, shiranuhi)’라고 공표하였다. 1990년대 중반부터 제주도에서 조금씩 재배되었고, 1998년부터 볼록하게 튀어 나온 꼭지 부분이 제주도를 대표하는 한라산을 닮았다고 해서 ‘한라봉’이라는 통일된 상표명을 갖게 되었다. 열매가 크고 과즙의 당도가 높기 때문에 소비자들이 선호하여 제주에서는 온주밀감 다음으로 생산량이 많다.¹⁴

부지화 과피 추출물에 대해서는 항산화¹⁵, 항염¹⁶, 항비만¹⁷ 등의 효능이 알려져 있고 부지화 미숙과 과피 추출물에 대해서는 항산화, 항염, 미백¹⁸ 등의 효능이 알려져 있다. 또한, sinensetin, tangeretin, nobiletin 등의 polymethoxyflavonoid (PMF)가 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 하지만 아직까지 부지화 잎, 가지에 대한 생리 활성 및 유효 성분에 대한 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 감귤유래 잉여자원인 부지화(*Citrus unshiu* Marc. × *C. sinensis* Osbeck) × *C. reticulata* Blanco) 잎, 가지 추출물 및 용매 분획물의 항염, 항산화 활성을 확인하고 다양한 유효 성분을 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물의 항염 및 항산화 활성을 확인하여 기능성 식·의약품 및 화장품 관련 천연 소재로써의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획, 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Junsei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co.)을 사용하였으며, medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co.)에는 KP-C18-HS (Biotage Co.) 컬럼을 사용하였다. Silica gel chromatography에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck Co.)을 사용하였고, gel filtration chromatography에는 Sephadex™ LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. 분리 과정에 사용된 thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 사용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-5% H₂SO₄를 필요에 따라 사용하였다.

생리 활성 검색을 위한 흡광도 측정에는 microplate reader (Sunrise™, Tecan Co.)를 이용하였다. 구조분석에 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.) 혹은 AVANCE III (FT-NMR system, 500 MHz, Bruker Co.)를 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CDCl₃, DMSO-*d*₆를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 시료인 부지화(*Citrus unshiu* Marc. × *C. sinensis* Osbeck) × *C. reticulata* Blanco) 잎(시료번호 : 464), 가지(시료번호 : 465)는 2015년 3월에 서귀포시 남원읍 소재 국립원예특작과학원 감귤연구소에서 채집하여 사용하였다 (Figure 2).



Figure 2. Picture of 'Shiranuhi' tree.

3. 생리 활성 평가

1) 항염

(1) RAW264.7 cell 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell은 american type cell culture (ATCC)로부터 분양받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 2일 간격으로 계대 배양하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환하고 sample을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 생성된 NO의 양은 세포 배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였으며, sodium nitrite (NaNO₂)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 통해 정량하였고, 표준검정곡선의 r²값은 0.99 이상이었다. 또한, 각 시료의 NO 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다.

(3) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환

하고 sample을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액의 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 함량을 각각 PGE₂ (R&D Systems, USA), TNF- α (Invitrogen, USA), IL-1 β (R&D Systems, USA), IL-6 (Invitrogen, USA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 정량하였으며, 표준물질에 대한 표준검정곡선의 r²값은 0.99 이상이었다. 또한, 각 시료의 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC₅₀)를 구하였다.

(4) 세포 독성 평가(MTT assay)

24 well plate에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 1 μ g/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환하고 sample을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 500 μ g/mL의 농도로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후, 상등액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 이를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

2) 항산화

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법²⁰을 응용하여 실시하였다. 시료 용액 100 μL 에 증류수 900 μL 를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μL 를 첨가하여 상온에서 3분간 반응시키고, 7%(w/v) Na_2CO_3 용액 200 μL 를 가하여 혼합한 후 증류수 700 μL 을 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선 (Figure 3)을 통해 시료의 총 폴리페놀 함량을 환산하였고, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

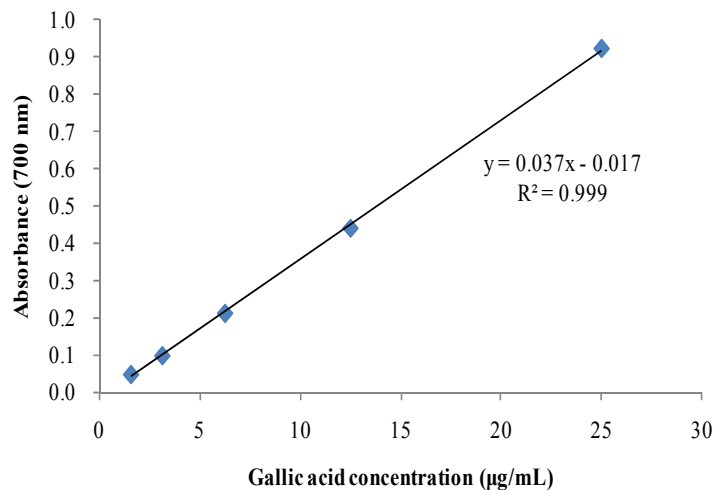


Figure 3. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법²¹을 응용하여 실시하였다. 시료 용액 15 µL에 ethylene glycol 150 µL를 가하여 혼합한 후 0.1 N NaOH 15 µL를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이를 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선(Figure 4)을 통해 시료의 총 플라보노이드 함량을 환산하였고, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

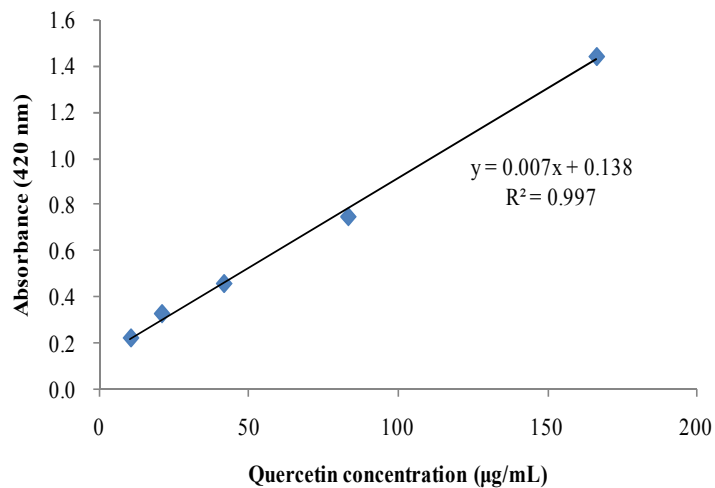


Figure 4. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법²²을 응용하여 실시하였다. DPPH free radical에 대한 시료의 전자공여능을 측정하기 위해, 시료 20 µL에 0.2 mM DPPH 용액 180 µL를 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고, radical 소거 활성은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다. 또한, 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다.

Radical scavenging activity (%)

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS⁺ radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법²³을 응용하여 실시하였다. ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 상온, 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. 이 용액을 ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.02가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 20 µL에 희석한 ABTS⁺ 용액 180 µL를 가하여 상온에서 15분 동안 반응시키고 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical 소거 활성은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산하였으며, 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다.

Radical scavenging activity (%)

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

Ⅲ. 연구 1 : 부지화 잎 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구

1. 부지화 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 부지화 잎의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 부지화 잎 1.5 kg을 70%(v/v) EtOH 30 L에 넣고 상온에서 24 시간 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℃ 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 432.0 g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물 20 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었으며, 이와 같은 방법으로 8회 더 반복 실시하여, 추출물 총 180 g을 용매 분획하였다(Figure 5).

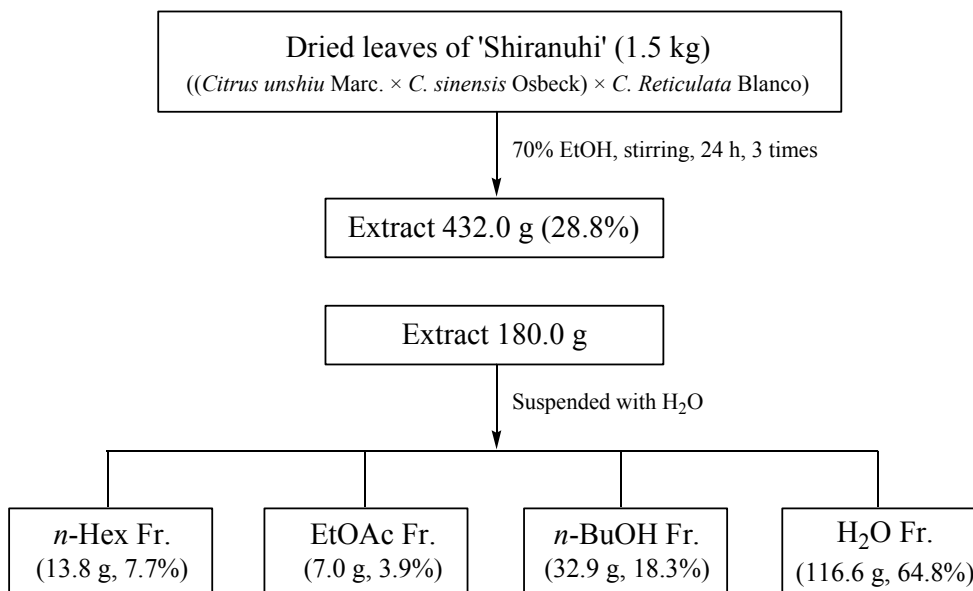


Figure 5. Extraction and solvent fractionation of 'Shiranuhi' leaves.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate 분획물 5.0 g을 극성별로 세분화하기 위하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 수행하였다. 용매의 극성을 5, 10%씩 높이는 방법으로 *n*-Hex-EtOAc (0~100%), EtOAc-MeOH (0~100%)을 각 300 mL씩 용출하여 총 30개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-30).

VLC fraction들 중 Fr. V8-11 (328.4 mg)은 메탄올을 사용해 재결정하여 compound **3** (115.7 mg)을 얻었고, Fr. V15, 16 (295.6 mg)은 단일 화합물인 compound **1**로 확인되었다. Fr. V17-19 (211.8 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼 (CHCl₃:MeOH=30:1)을 수행하여 compound **1** (51.3 mg) 및 compound **4** (12.0 mg)를 분리하였으며, Fr. V22 (526.5 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼 (CHCl₃:MeOH=20:1)을 수행하여 compound **2** (36.5 mg)를 분리하였다. 또한, Fr. V25, 26 (580.6 mg)은 메탄올을 사용해 재결정하여 compound **5** (110.2 mg)를 얻었다(Figure 6).

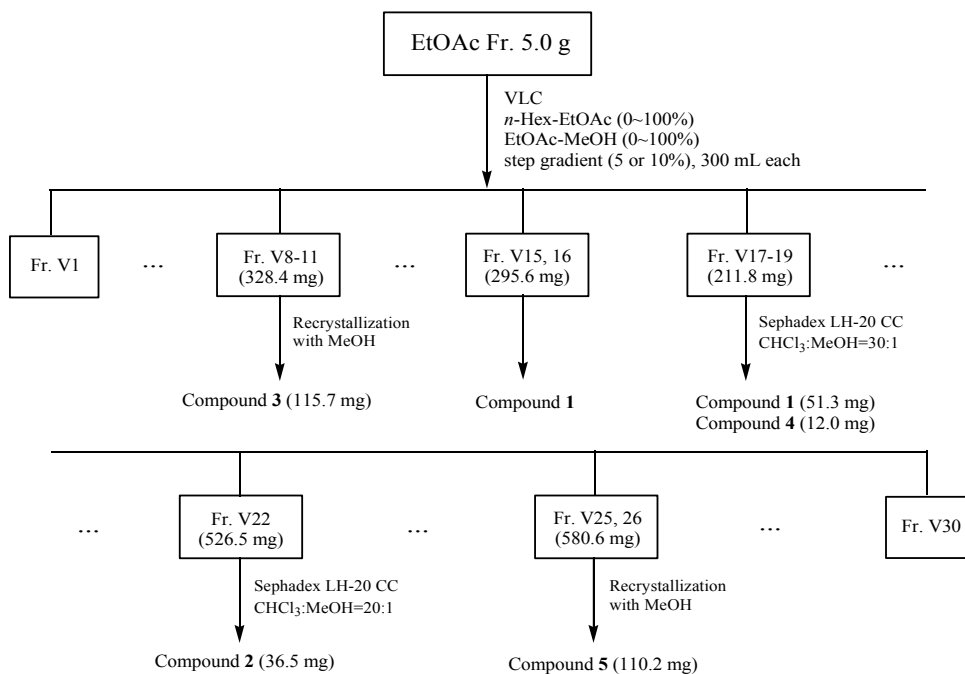


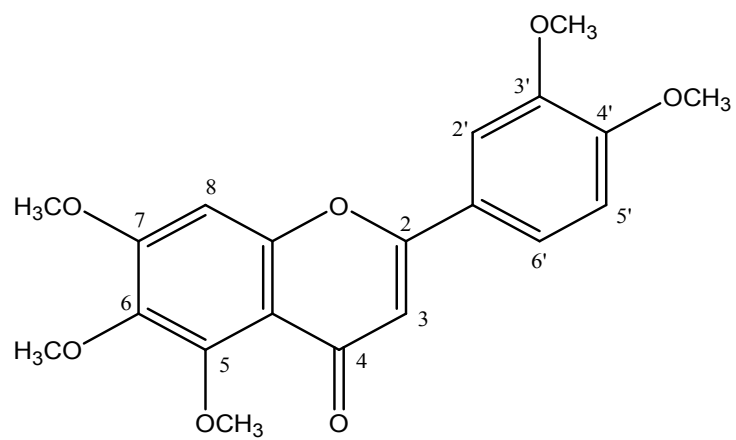
Figure 6. Isolation of compounds from 'Shiranuhi' leaves.

2. 분리된 화합물의 구조 분석

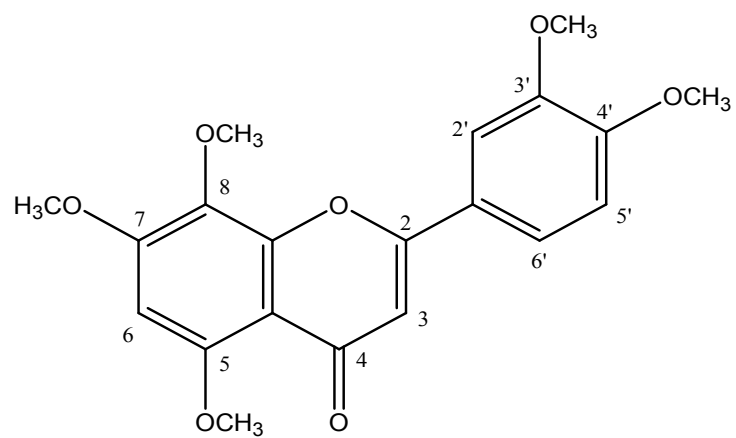
1) Compound 1, 2의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 20개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 56.2, 56.2, 56.4, 61.6, 62.3 및 δ_{H} 3.89 (3H, s), 3.93 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.97 (3H, s)의 피크를 통해 5개의 methoxy group이 결합되어 있는 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 또한, δ_{C} 177.3의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재함을 알 수 있으며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.94 (1H, d, $J = 8.7$), 7.29 (1H, d, $J = 2.2$) 및 7.47 (1H, dd, $J = 8.7, 2.2$)의 피크로 보아, flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton을 예상할 수 있다. δ_{H} 6.57 (1H, s) 및 6.78 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton으로, 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁴을 통해 compound 1은 sinensetin (5,6,7,3',4'-penta-methoxyflavone)으로 확인되었다(Figure 7-9, Table 1).

Compound 2는 ^{13}C NMR spectrum에서 20개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 56.1, 56.2, 56.4, 56.7, 61.6 및 δ_{H} 3.95 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.98 (3H, s), 4.01 (3H, s)의 피크를 통해 5개의 methoxy group이 결합되어 있는 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 또한, compound 2의 NMR spectrum data가 C_6 및 C_8 에 해당하는 피크를 제외하고는 compound 1과 매우 유사한 것으로 보아, methoxy group이 6번이 아닌 8번 위치에 치환되어 있는 구조 이성질체일 것이라 예상하였고, 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁵을 통해 compound 2는 isosinensetin (5,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone)으로 확인되었다(Figure 7, 10, 11, Table 1).



Compound 1



Compound 2

Figure 7. Chemical structures of compound 1 and 2.

Table 1. ¹H and ¹³C NMR data of compound **1** and **2** (400 and 100 MHz, CDCl₃)

No.	Compound 1		Compound 2	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2		161.2		160.6
3	6.57 (1H, s)	107.4	6.61 (1H, s)	107.2
4		177.3		178.0
5		152.6		152.1
6		140.4	6.43 (1H, s)	92.5
7		157.7		156.6
8	6.78 (1H, s)	96.4		130.7
9		154.6		156.4
10		112.9		109.0
1'		124.1		124.1
2'	7.29 (1H, d, 2.2)	108.7	7.41 (1H, d, 1.8)	108.5
3'		149.3		149.3
4'		151.9		151.9
5'	6.94 (1H, d, 8.7)	111.2	6.98 (1H, d, 8.2)	111.2
6'	7.47 (1H, dd, 8.7, 2.2)	119.7	7.58 (1H, dd, 8.2, 1.8)	119.7
5-OCH ₃	3.97 (3H, s)	62.3	4.01 (3H, s)	56.7
6-OCH ₃	3.89 (3H, s)	61.6		
7-OCH ₃	3.95 (3H, s)	56.2	3.98 (3H, s)	56.4
8-OCH ₃			3.97 (3H, s)	61.6
3'-OCH ₃	3.97 (3H, s)	56.2	3.95 (6H, s)	56.2
4'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	56.4	3.95 (3H, s)	56.1

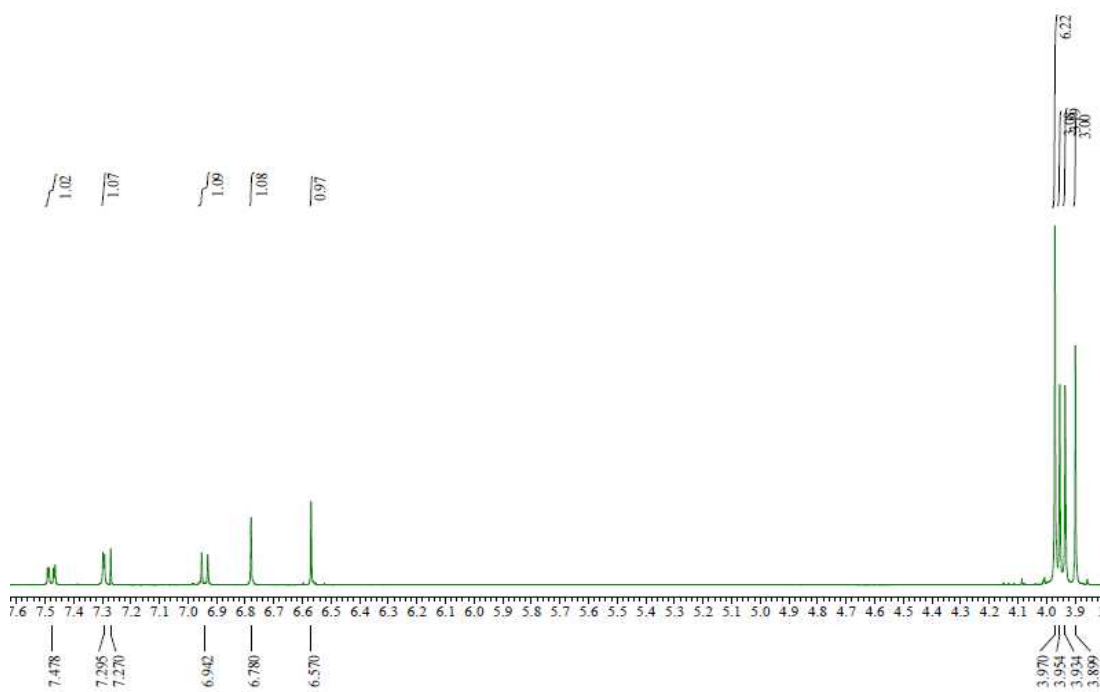


Figure 8. ^1H NMR spectrum of compound **1** (CDCl_3).

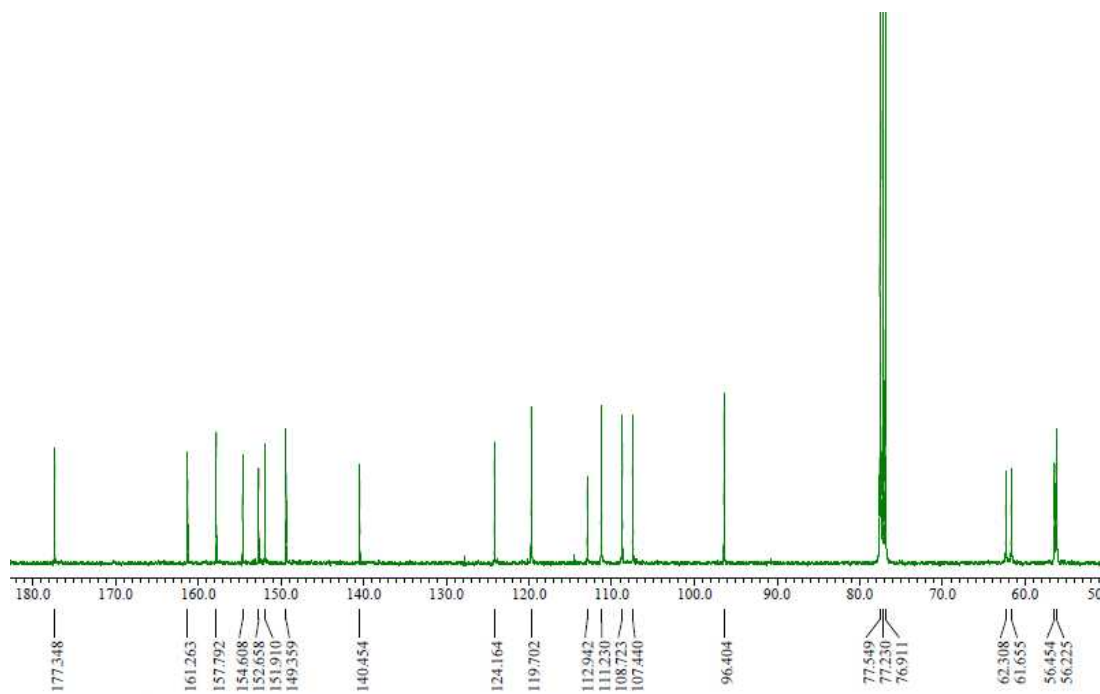


Figure 9. ^{13}C NMR spectrum of compound **1** (CDCl_3).

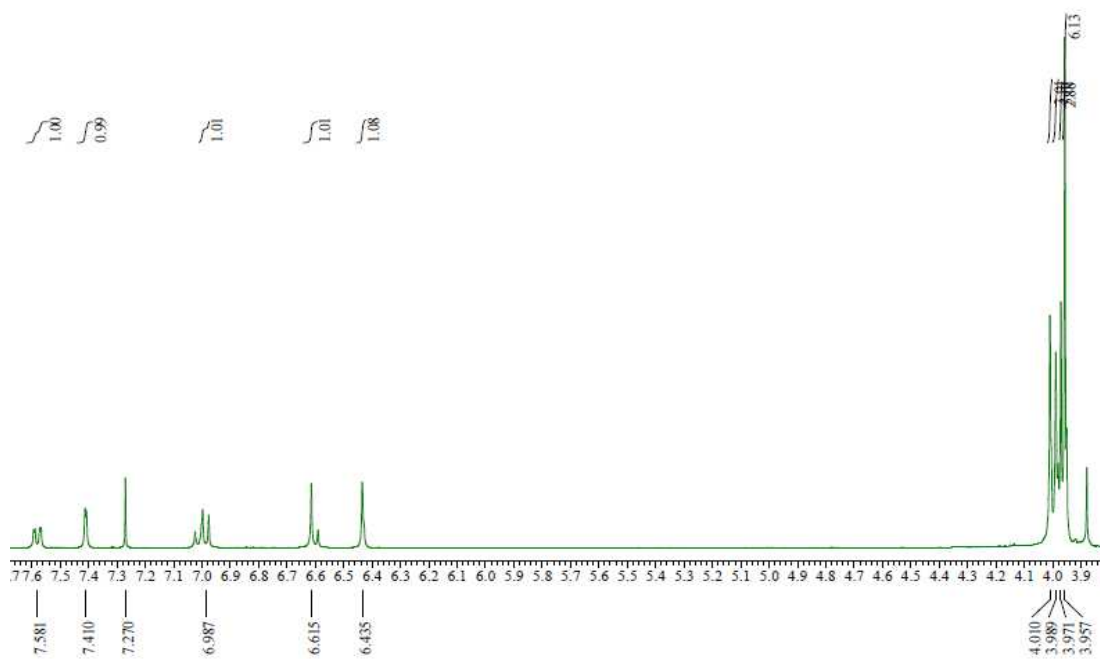


Figure 10. ^1H NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

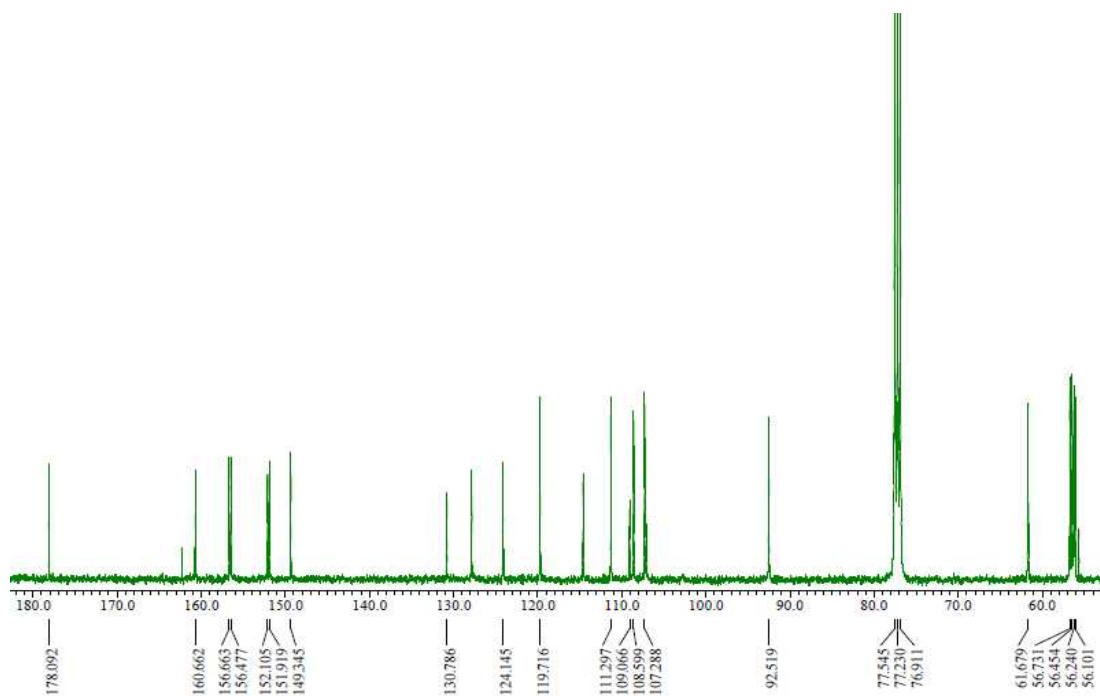
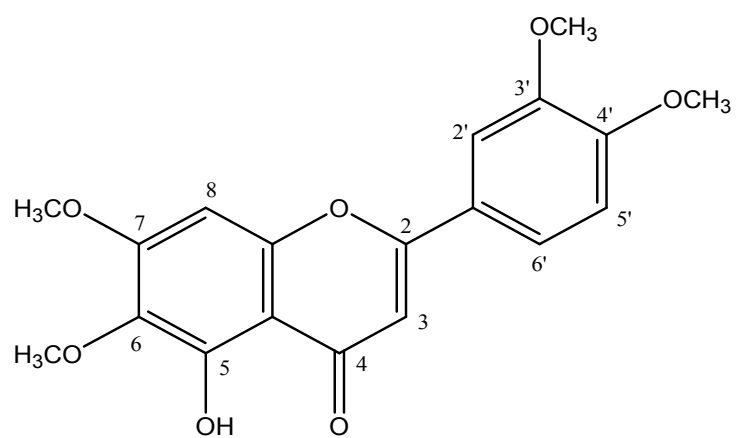


Figure 11. ^{13}C NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

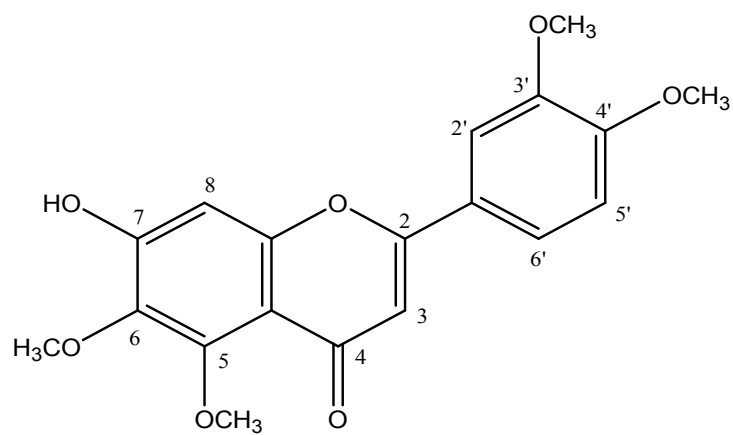
2) Compound 3, 4의 구조 동정

Compound 3은 ^{13}C NMR spectrum에서 19개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 56.2, 56.2, 56.4, 61.0 및 δ_{H} 3.91 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.97 (3H, s)의 피크를 통해 4개의 methoxy group이 결합되어 있는 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 또한, δ_{C} 182.7의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재함을 알 수 있으며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.95 (1H, d, $J = 8.7$), 7.30 (1H, d, $J = 1.8$) 및 7.49 (1H, dd, $J = 8.7, 1.8$)의 피크로 보아, flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton이 있음을 예상할 수 있다. δ_{H} 6.52 (1H, s) 및 6.56 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton으로, 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁶을 통해 compound 3은 5-desmethylninensetin (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)으로 확인되었다(Figure 12-14, Table 2).

Compound 4는 ^{13}C NMR spectrum에서 19개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 56.2, 56.2, 62.0, 62.3 및 δ_{H} 3.93 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.96 (3H, s), 4.01 (3H, s)의 피크를 통해 4개의 methoxy group이 결합되어 있는 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 이를 통해 compound 4는 compound 3의 구조 이성질체로, flavonoid의 A ring에 치환기의 위치가 다를 것이라 예상하였다. 정확한 구조 동정을 위해 2D NMR인 HMQC 및 HMBC를 측정하였다. HMQC spectrum을 통해 각각의 proton과 carbon 사이의 one bond 결합 위치를 확인하였고, HMBC spectrum 분석을 통해 proton과 carbon 사이의 long range coupling을 확인하여 전체 구조를 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁷을 통해 compound 4는 7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone으로 확인되었다(Figure 12, 15-18, Table 2). 현재까지 이 화합물에 대해서는 ^1H NMR data만 알려져 있으며, 본 논문에서 ^{13}C NMR data는 처음 밝힌다.



Compound 3



Compound 4

Figure 12. Chemical structures of compound 3 and 4.

Table 2. ¹H and ¹³C NMR data of compound **3** and **4** (CDCl₃)

No.	Compound 3 (400 and 100 MHz)		Compound 4 (500 and 125 MHz)	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2		164.1		161.5
3	6.52 (1H, s)	104.4	6.56 (1H, s)	107.1
4		182.7		177.6
5		153.3		149.4
6		132.7		138.2
7		158.9		154.7
8	6.56 (1H, s)	90.7	6.86 (1H, s)	99.4
9		153.1		154.0
10		106.2		112.8
1'		123.8		119.8
2'	7.30 (1H, d, 1.8)	108.8	7.30 (1H, d, 1.8)	108.8
3'		149.4		151.5
4'		152.4		152.0
5'	6.95 (1H, d, 8.7)	111.2	6.94 (1H, d, 8.7)	111.3
6'	7.49 (1H, dd, 8.7, 1.8)	120.2	7.48 (1H, dd, 8.7, 1.8)	124.2
5-OCH ₃			3.94 (3H, s)	56.2
6-OCH ₃	3.91 (3H, s)	61.0	4.01 (3H, s)	62.3
7-OCH ₃	3.97 (3H, s)	56.4		
3'-OCH ₃	3.95 (3H, s)	56.2	3.96 (3H, s)	62.0
4'-OCH ₃	3.96 (3H, s)	56.2	3.93 (3H, s)	56.2

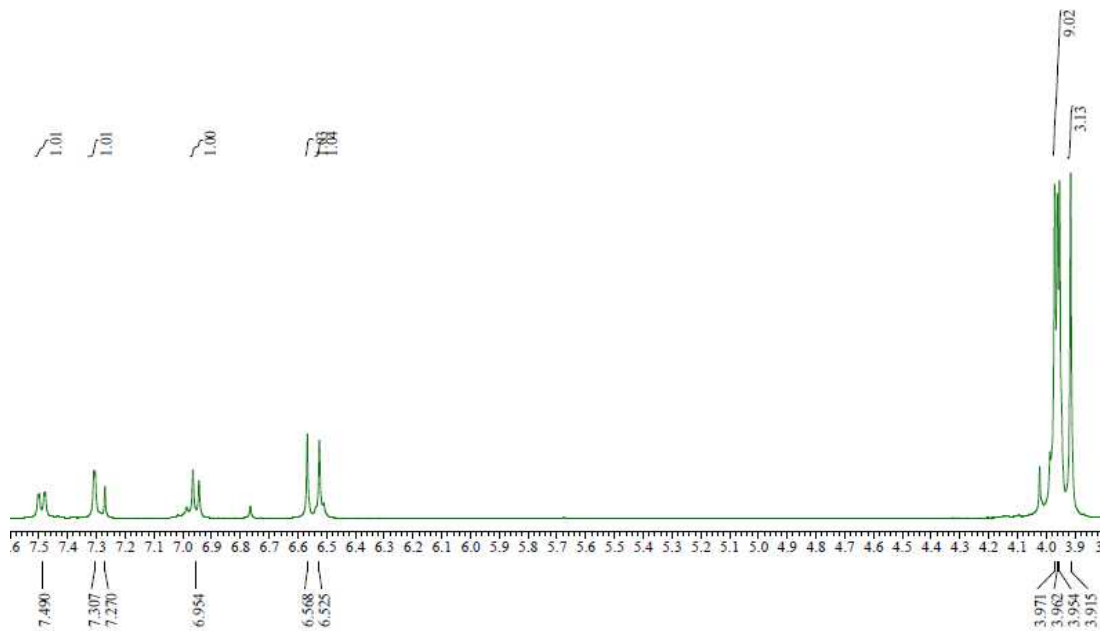


Figure 13. ^1H NMR spectrum of compound **3** (CDCl_3).

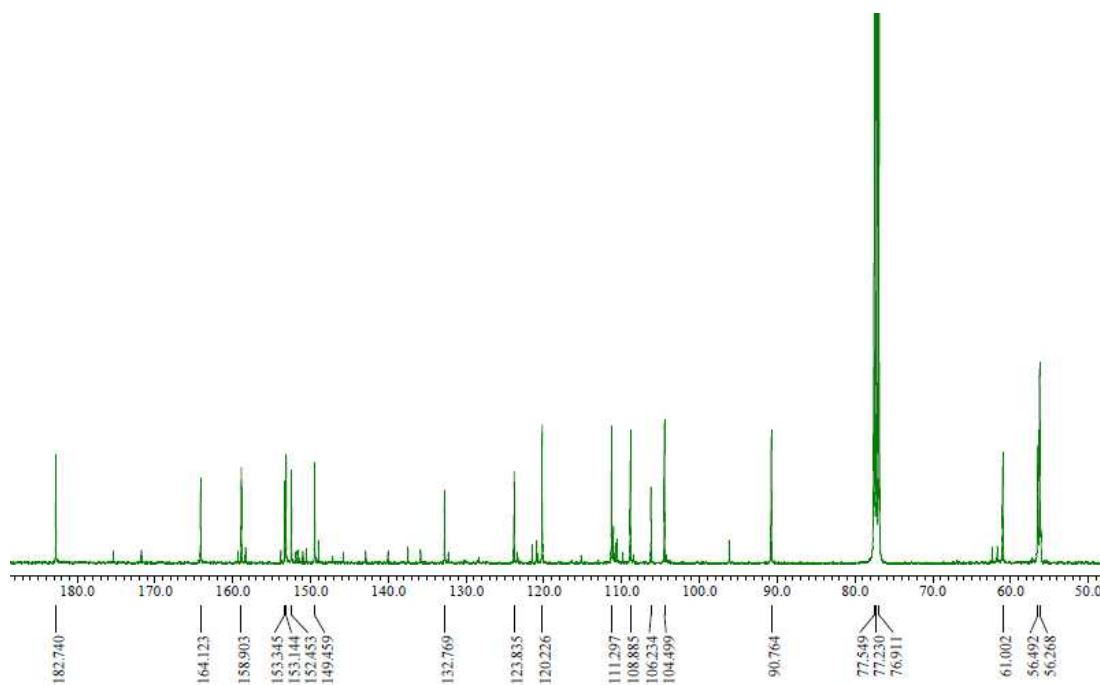


Figure 14. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** (CDCl_3).

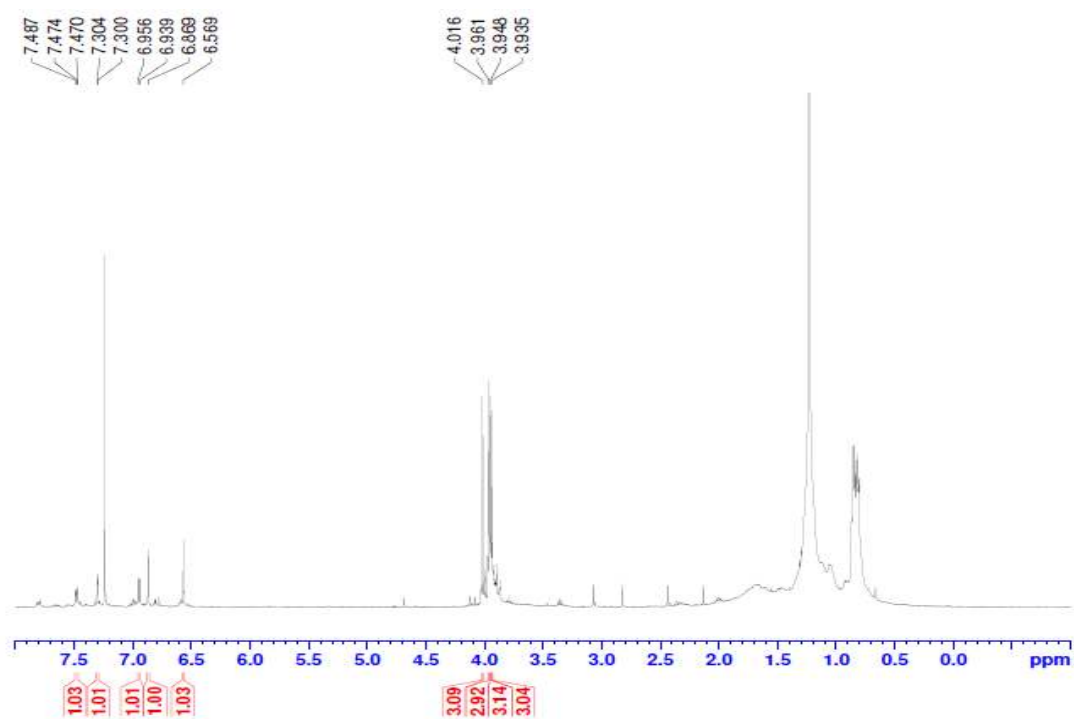


Figure 15. ^1H NMR spectrum of compound **4** (CDCl_3).

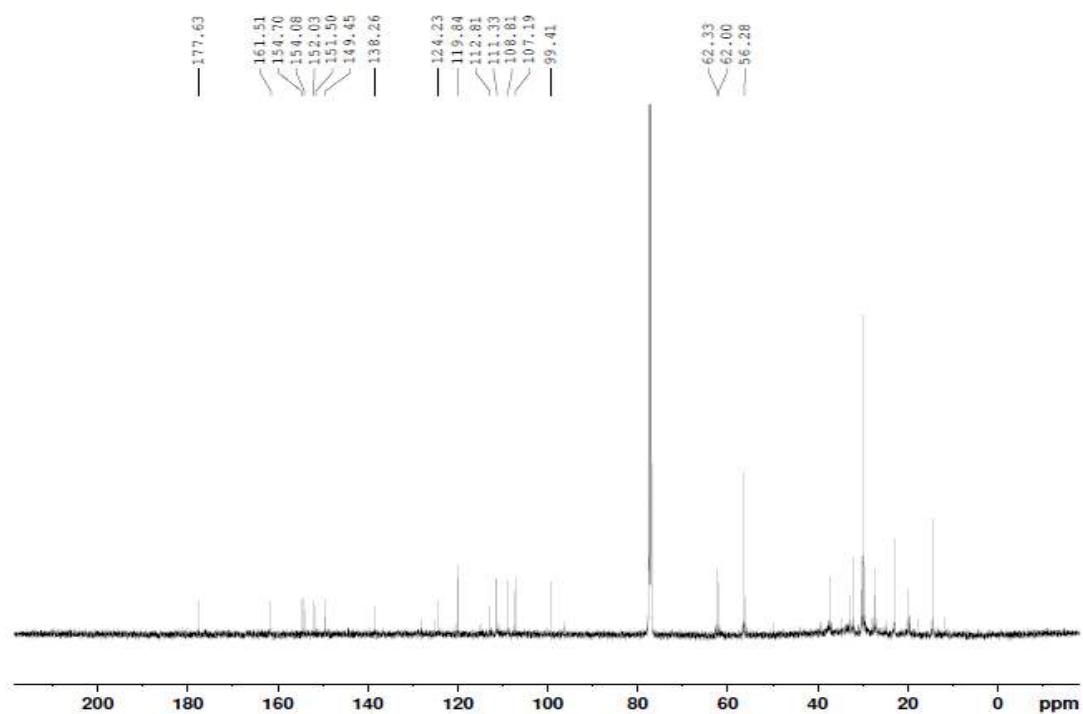


Figure 16. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** (CDCl_3).

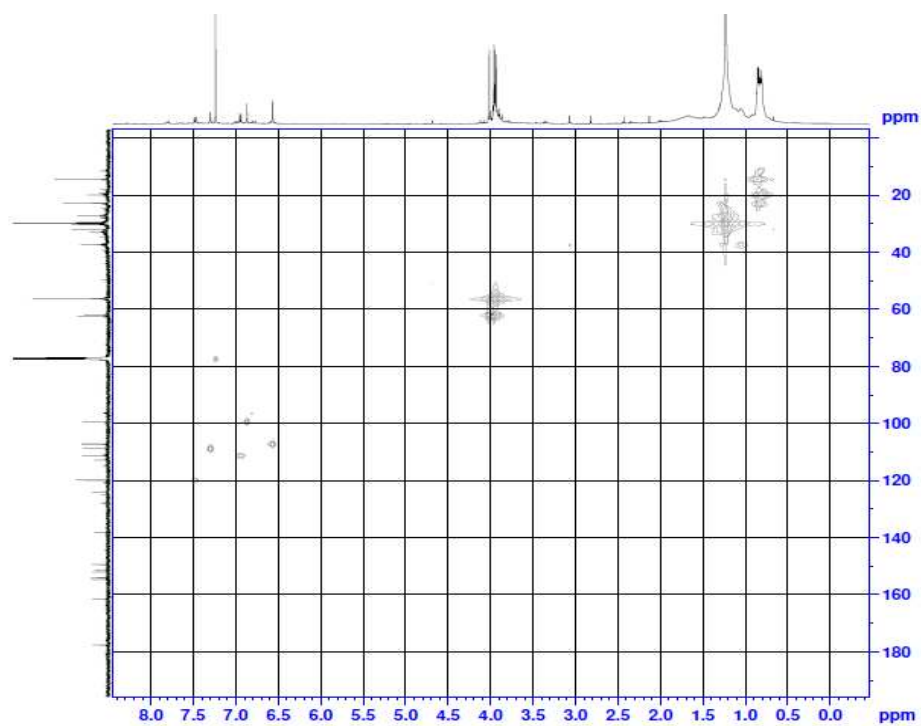


Figure 17. HMQC spectrum of compound **4** (CDCl₃).

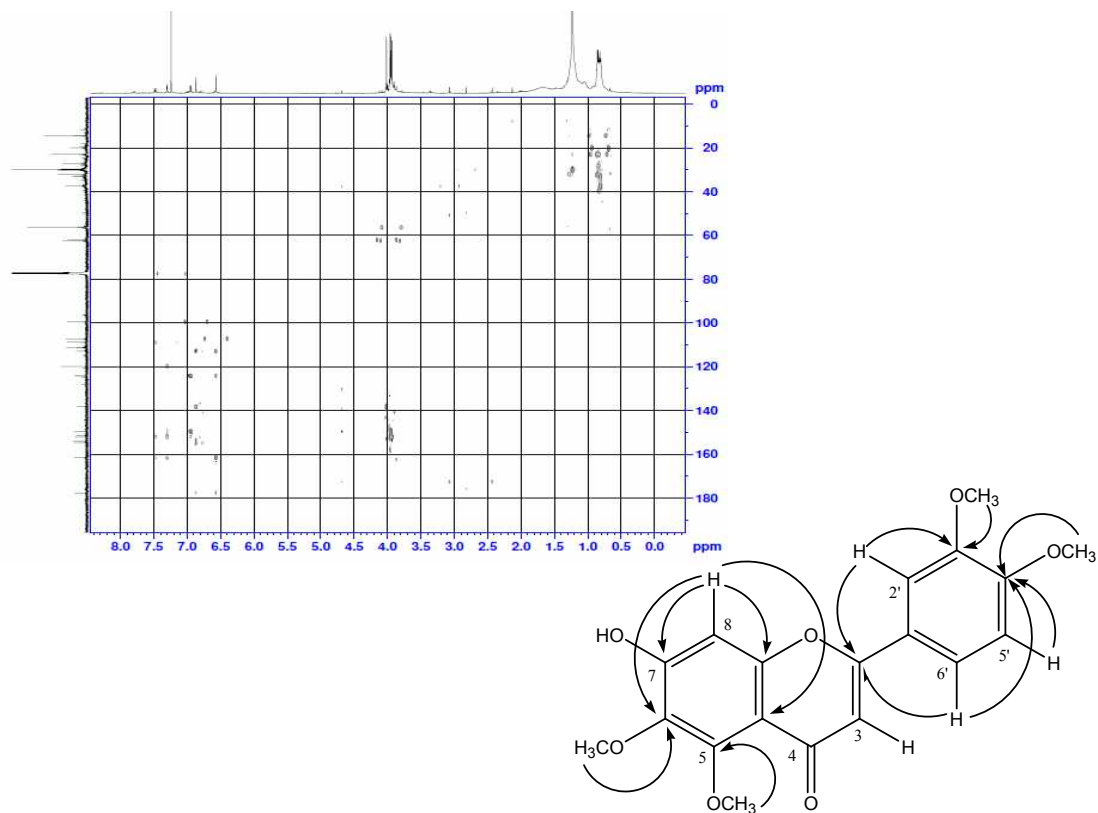
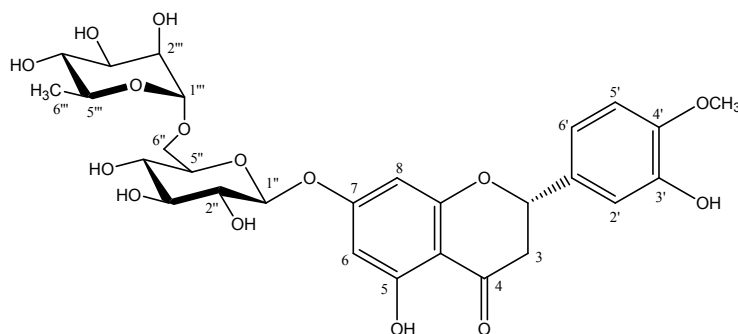


Figure 18. HMBC spectrum of compound **4** (CDCl₃).

3) Compound 5의 구조 동정

Compound 5는 ^{13}C NMR spectrum에서 28개의 carbon 피크가 관찰되며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 3.12-3.62의 overlap 되어 있는 여러 개의 proton 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는 δ_{H} 4.52 (1H, d, $J = 0.7$) 및 δ_{H} 4.97 (1H, d, $J = 7.3$)의 피크를 통해 flavonoid 골격에 2개의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. 그중 δ_{C} 55.6 및 δ_{H} 3.77 (3H, s)의 피크를 통해 1개의 methoxy group 및 δ_{C} 197.0의 피크를 통해 1개의 carbonyl group이 분자 내에 존재함을 예상하였다. 또한, δ_{H} 6.89 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$), 6.93 (1H, d, $J = 1.8$) 및 6.94 (1H, d, $J = 8.2$)의 피크로 보아, flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton이 있으며, δ_{H} 6.11 (1H, d, $J = 2.2$), 6.13 (1H, d, $J = 2.2$)의 피크로 보아 A ring에 서로 *meta*-coupling을 하는 2개의 aromatic proton이 있음을 예상할 수 있다. Flavonoid 골격에 결합되어 있는 2개의 육탄당 중 하나는 δ_{H} 1.08 (3H, d, $J = 6.4$) 및 δ_{H} 4.52 (1H, d, $J = 0.7$) 피크의 적분값 및 coupling constant값을 통해 α -form의 rhamnopyranoside를 예상하였고, 다른 하나는 δ_{H} 4.97 (1H, d, $J = 7.3$) 피크의 coupling constant값을 통해 β -form의 glucopyranoside가 결합되어 있을 것이라 예상할 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁸을 통해 compound 5는 hesperidin (hesperitin-7-rutinoside)으로 확인되었다(Figure 19-21, Table 3).



Compound 5

Figure 19. Chemical structure of compound 5.

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

No.	Compound 5	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2	5.50 (1H, dd, 12.3, 3.2)	78.3
3	2.77 (dd, 16.9, 3.2)	42.0
	3.12–3.62 (1H, overlap)	
4		197.0
5		165.1
6	6.11 (1H, d 2.2)	95.5
7		163.0
8	6.13 (1H, d, 2.2)	96.3
9		162.4
10		103.2
1'		130.8
2'	6.93 (1H, d, 1.8)	112.0
3'		147.9
4'		146.4
5'	6.94 (1H, d, 8.2)	114.1
6'	6.89 (1H, dd, 8.2, 1.8)	117.9
4'-OCH ₃	3.77 (3H, s)	55.6
1''	4.97 (1H, d, 7.3)	99.4
2''	3.12–3.62 (sugar H)	72.0
3''	3.12–3.62 (sugar H)	75.4
4''	3.12–3.62 (sugar H)	69.5
5''	3.12–3.62 (sugar H)	76.2
6''	3.12–3.62 (sugar H)	66.0
1'''	4.52 (1H, d, 0.7)	100.5
2'''	3.12–3.62 (sugar H)	70.6
3'''	3.12–3.62 (sugar H)	70.2
4'''	3.12–3.62 (sugar H)	72.9
5'''	3.12–3.62 (sugar H)	68.2
6'''	1.08 (3H, d, 6.4)	17.8

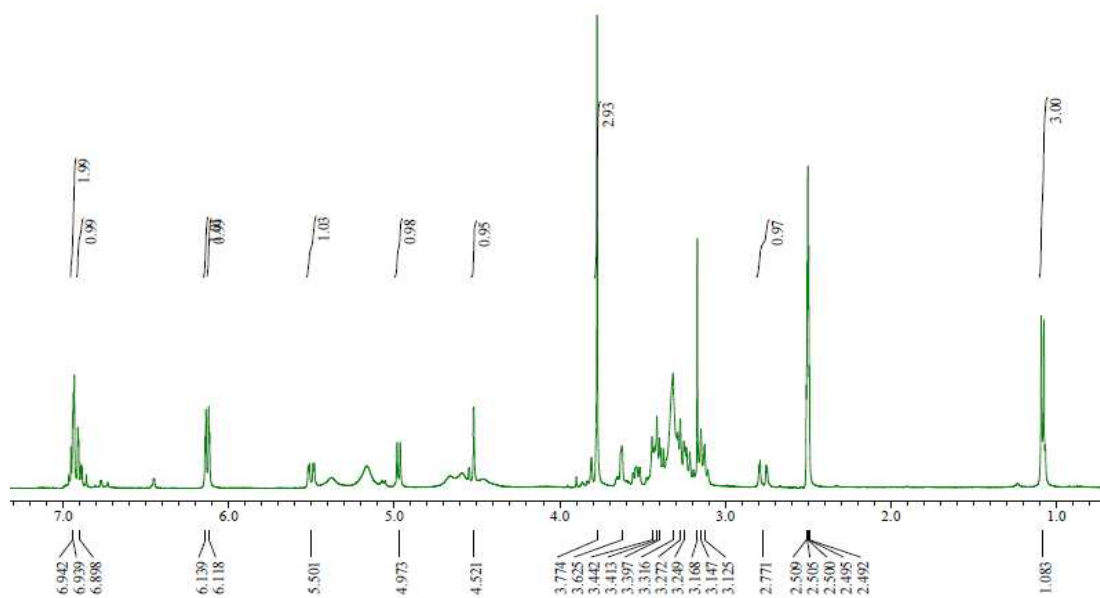


Figure 20. ^1H NMR spectrum of compound **5** ($\text{DMSO-}d_6$).

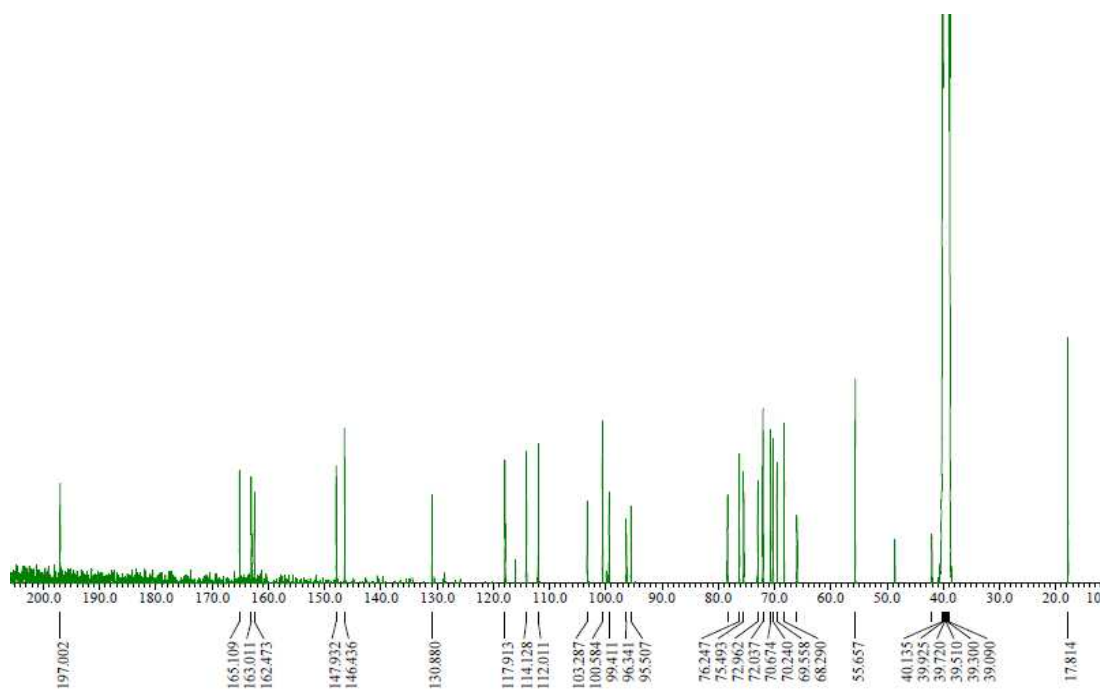


Figure 21. ^{13}C NMR spectrum of compound **5** ($\text{DMSO-}d_6$).

3. 부지화 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

부지화 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 우선 70% EtOH 추출물 및 각 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 EtOAc 분획물에서 NO 생성 억제 활성을 확인하였다(Figure 22). EtOAc 분획물이 100 µg/mL 농도에서 20% 정도의 세포 독성을 보였으나 NO를 80% 이상 크게 감소시키는 것을 확인함에 따라 추가적으로 독성이 없는 범위인 20, 40, 60 µg/mL 농도에서 실험을 진행하였다. 그 결과 부지화 잎 EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, IC₅₀값은 38.5 µg/mL로 확인되었다(Figure 23).

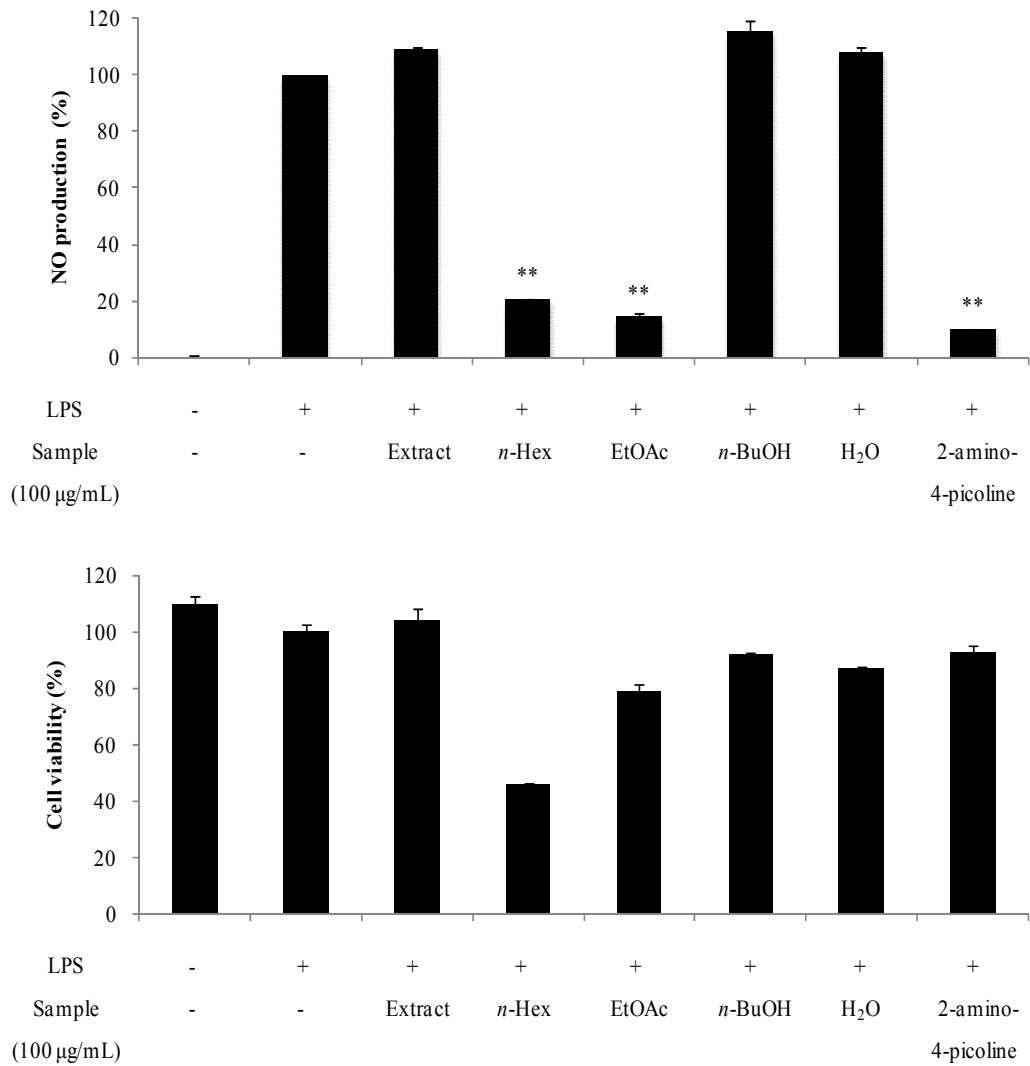


Figure 22. Effects of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus ‘Shiranuhi’ leaves and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

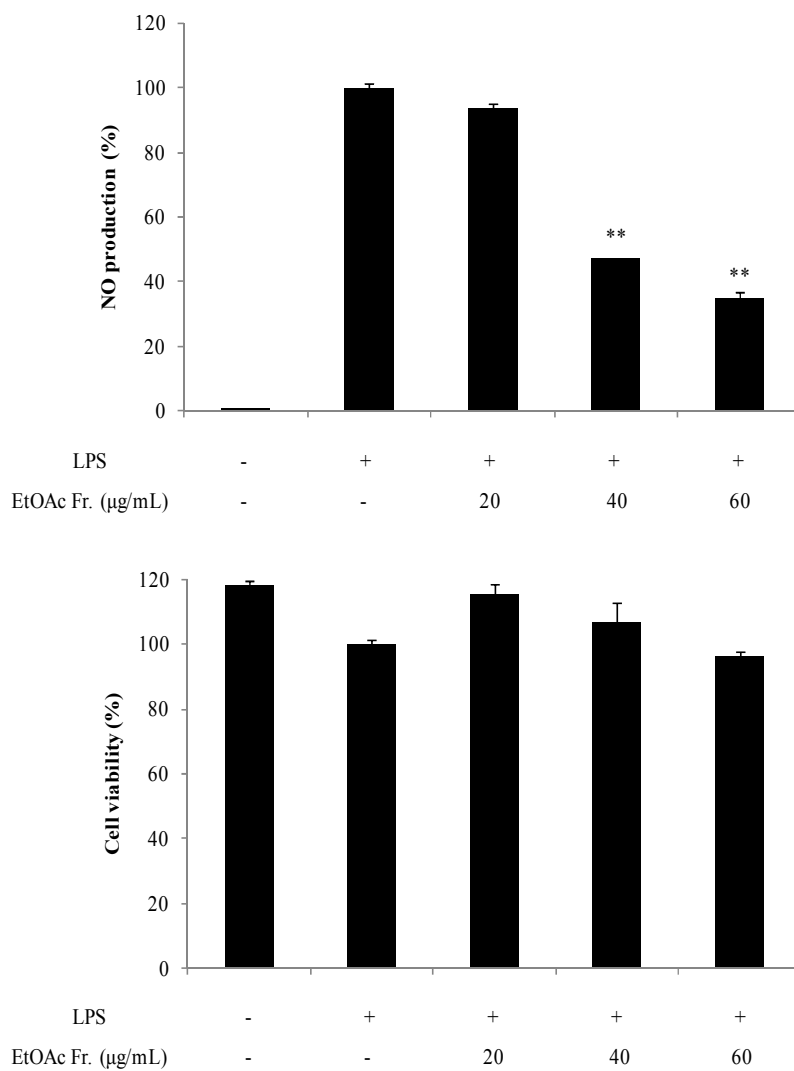


Figure 23. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ leaves for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

LPS로 염증이 유도된 대식세포는 전염증성 cytokine을 분비하게 되는데 이를 통하여 염증 반응의 정도를 알아볼 수 있다. 부지화 잎 EtOAc 분획물에서 이러한 cytokine을 얼마나 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)를 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 그 결과, 부지화 잎 EtOAc 분획물은 PGE₂, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었으며(Figure 24, 25), 각각의 IC₅₀값이 52.1, 23.2, 31.3, 31.0 μ g/mL로 활성이 있음을 확인하였다(Table 4).

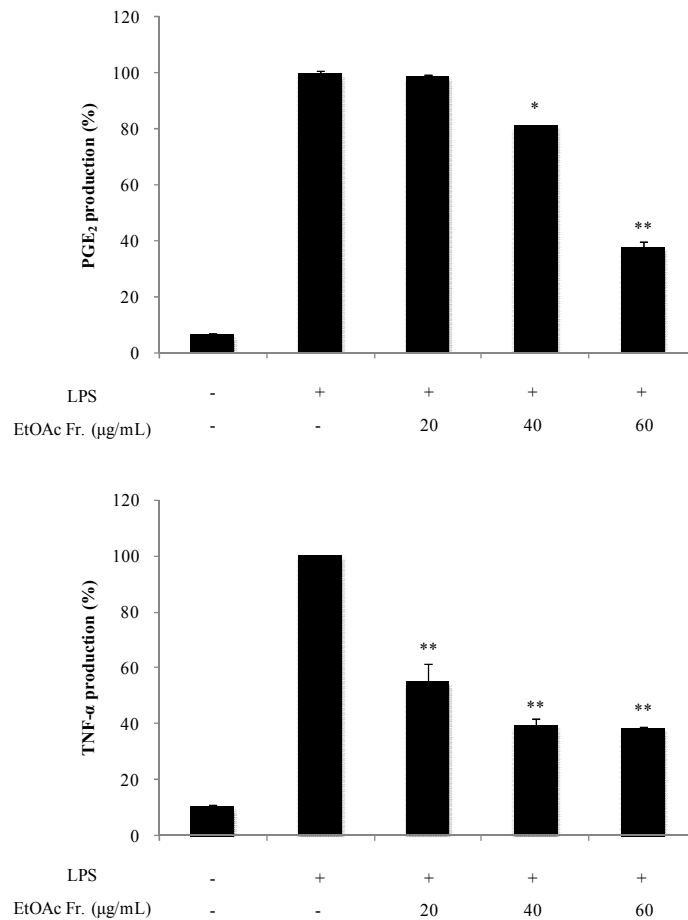


Figure 24. Effects of EtOAc fraction from 'Shiranuhi' leaves on PGE₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

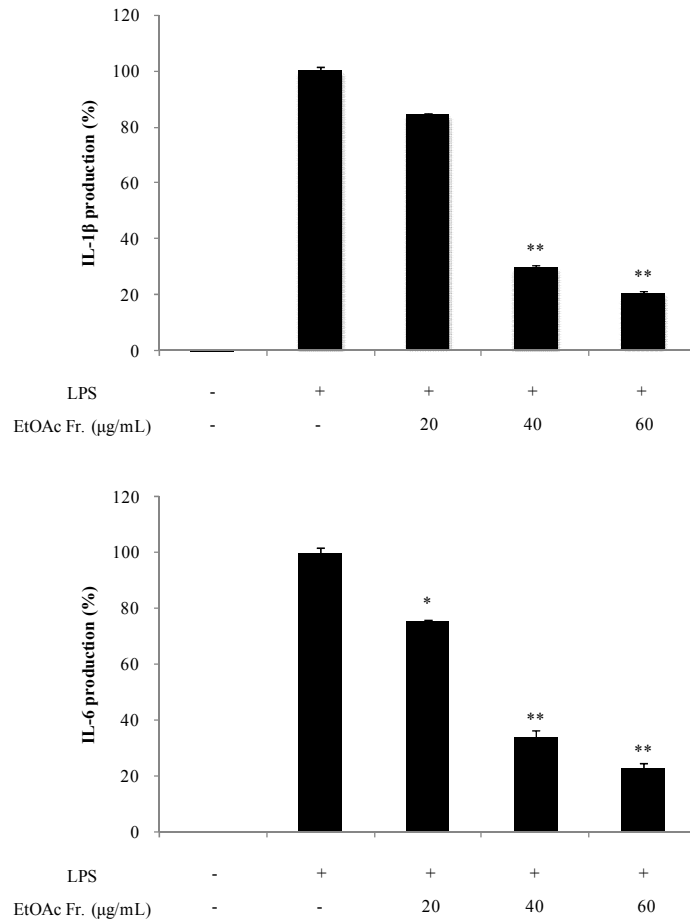


Figure 25. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Table 4. IC₅₀ values of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF- α	IL-1 β	IL-6
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	52.1	23.2	31.3	31.0

2) 항산화 활성

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

Gallic acid를 표준물질로 사용하여 표준검정곡선을 작성하고, 부지화 잎 추출물 및 분획물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 추출물 및 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 폴리페놀(139.6 mg/g GAE)를 함유하고 있었으며, 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 26).

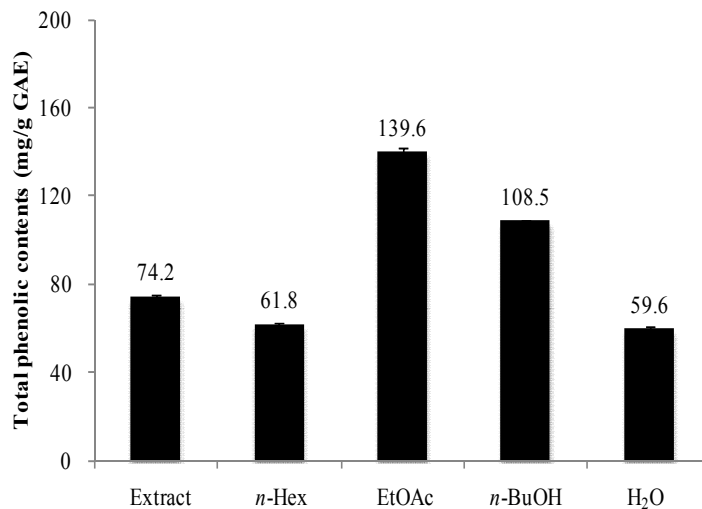


Figure 26. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from 'Shiranuhi' leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

Quercetin을 표준물질로 사용하여 표준검정곡선을 작성하고, 부지화 잎 추출물 및 분획물에 함유된 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 추출물 및 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 플라보노이드(169.3 mg/g QE)를 함유하고 있었으며, 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 27).

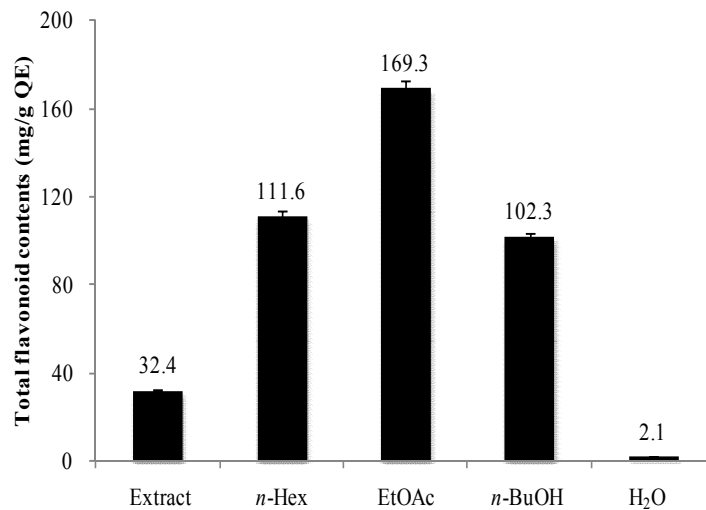


Figure 27. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from 'Shiranuhi' leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

부지화 잎 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물 및 H₂O 분획물의 SC₅₀값이 각각 532.5, 253.4, 291.4, 773.1 µg/mL로 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 28, Table 5).

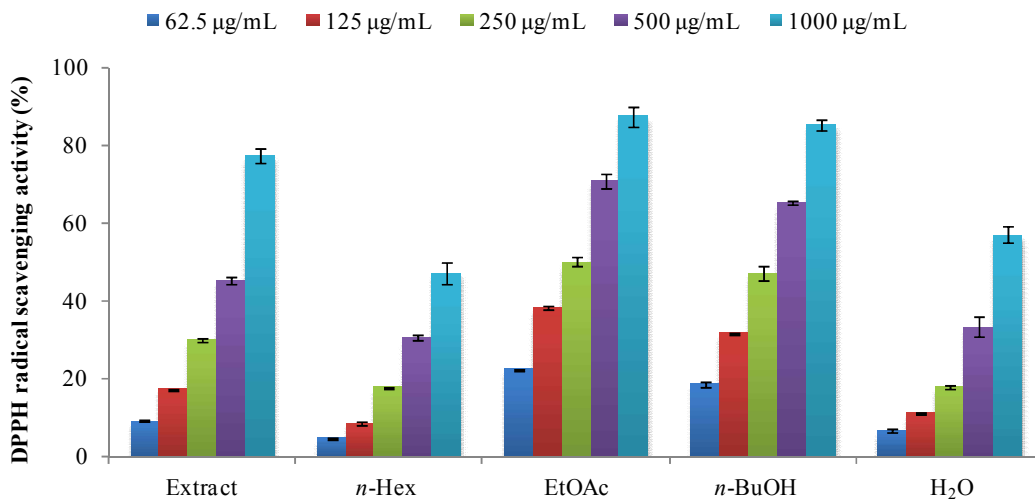


Figure 28. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 5. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	532.5	>1000	253.4	291.4	773.1	80.9

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

부지화 잎 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물 및 H₂O 분획물의 SC₅₀값이 각각 85.9, 39.8, 66.0, 147.0 µg/mL로 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 29, Table 6).

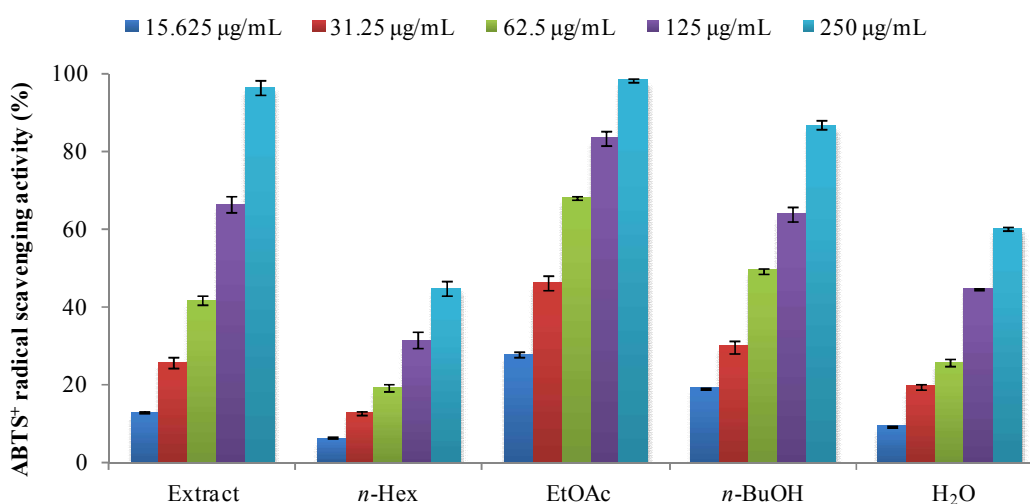


Figure 29. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 6. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ leaves

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	85.9	>250	39.8	66.0	147.0	6.7

4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

부지화 앞에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 우선 각 화합물에 대해 50, 100, 200 μM 의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 200 μM 농도에서 compound 5는 세포 독성 없이 17% 정도의 NO 생성 억제 활성이 있으며, compound 1-4는 세포 독성 없이 50% 이상의 NO 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다(Figure 30).

또한, Compound 4는 추가적으로 100, 150, 200 μM 의 농도에서 실험을 진행하여 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 31).

Compound 1, 2, 3, 4의 IC_{50} 값이 각각 116.5, 63.4, 148.8, 162.1 μM 로 활성이 있음을 확인하였다(Table 7). 이 중 compound 1²⁹, 2³⁰에 대해서는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 억제하는 기전으로 항염 활성이 있음이 보고되어 있으며, 현재까지 항염 활성 기전 연구가 되어 있지 않은 compound 3, 4에 대하여 추가적인 실험을 진행하였다.

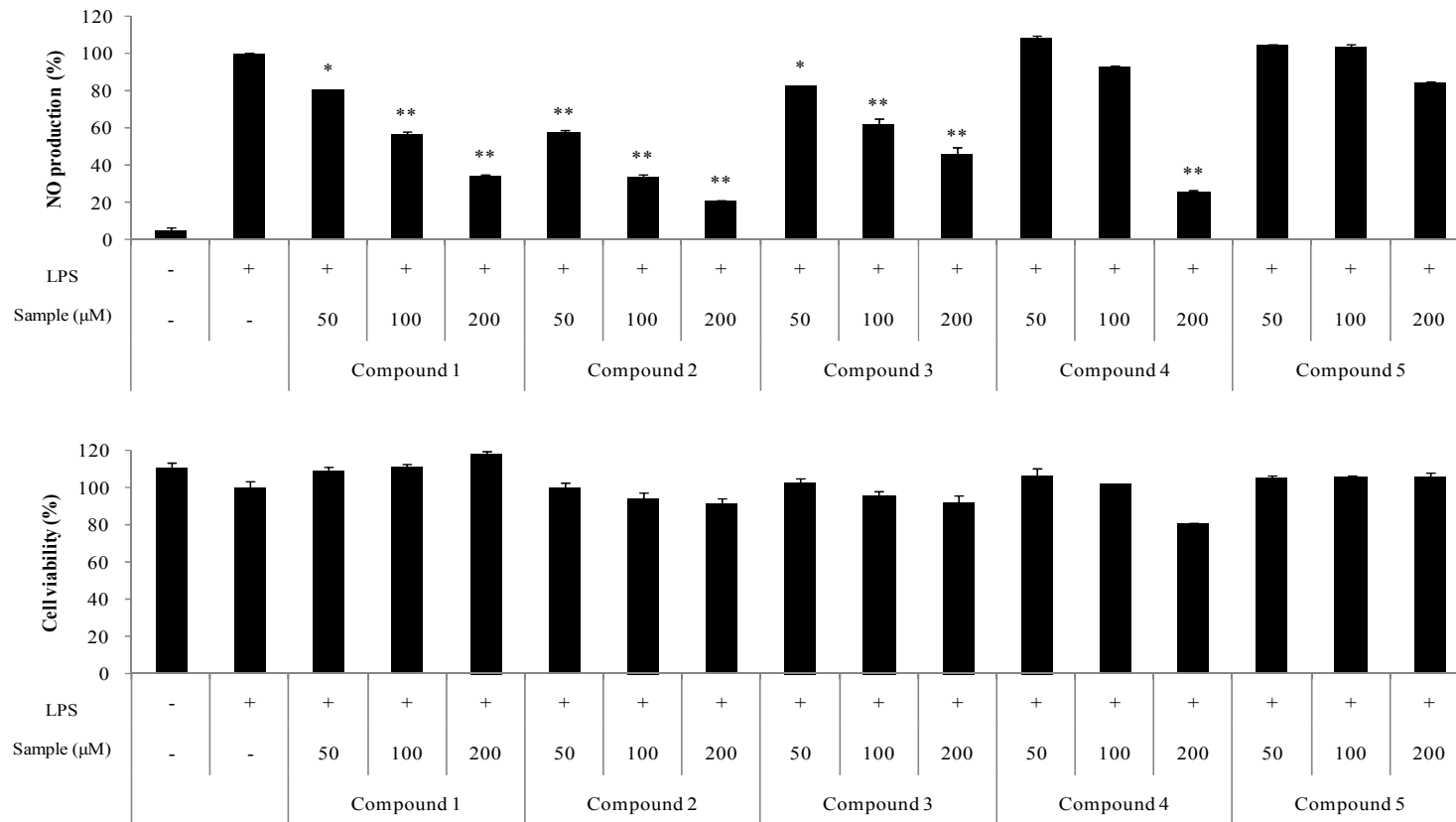


Figure 30. Effects of isolated compounds 1–5 from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1–5 from ‘Shiranuhi’ leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

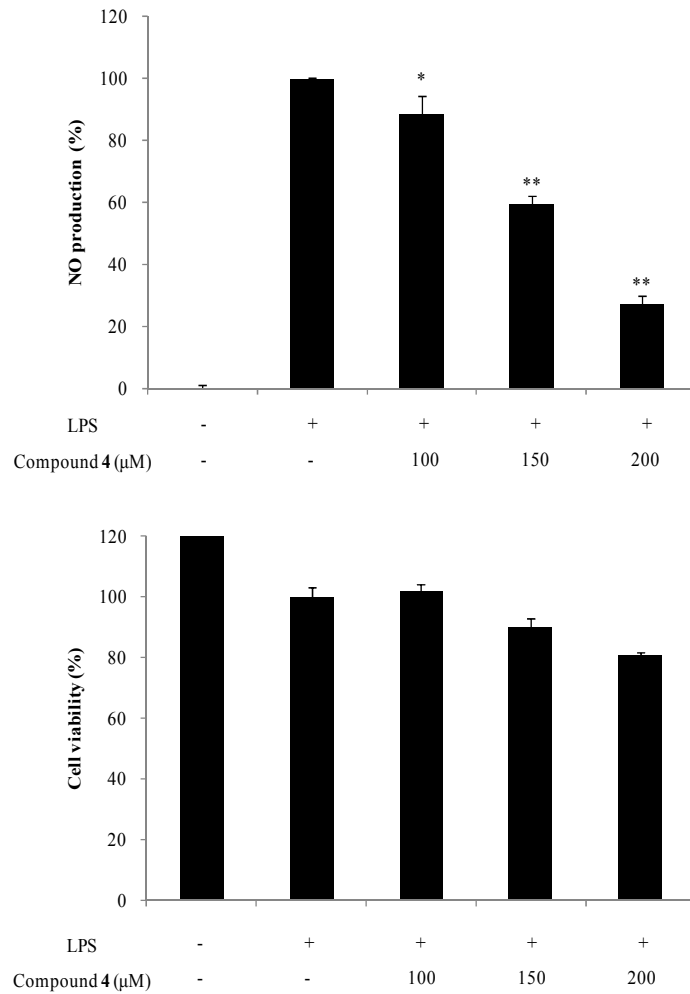


Figure 31. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Table 7. IC₅₀ values of isolated compounds 1–5 from ‘Shiranuhi’ leaves on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells

Compound	1	2	3	4	5
IC ₅₀ (μM)	116.5	63.4	148.8	112.9	>200

(2) Compound 3, 4의 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

① Compound 3

부지화 잎에서 분리된 화합물인 compound 3에 대한 항염 활성 기전 연구가 IL-6³¹ 억제 활성 외에는 보고된 바가 없으므로 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, compound 3은 PGE₂, TNF- α 및 IL-1 β 의 생성을 농도 의존적으로 억제시키며, 앞서 보고되었던 것과 같이 IL-6의 생성 또한 억제시킨다는 것을 확인하였다(Figure 32, 33). PGE₂, IL-1 β 및 IL-6의 IC₅₀값은 각각 101.3, 123.3, 94.3 μ M로 활성이 있음을 확인하였다(Table 8).

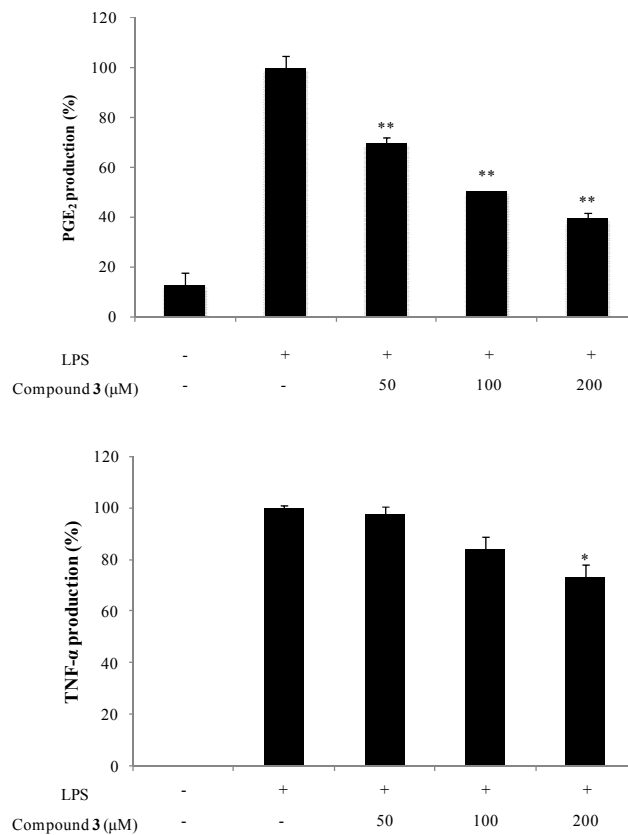


Figure 32. Effects of isolated compound 3 from 'Shiranuhi' leaves on PGE₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

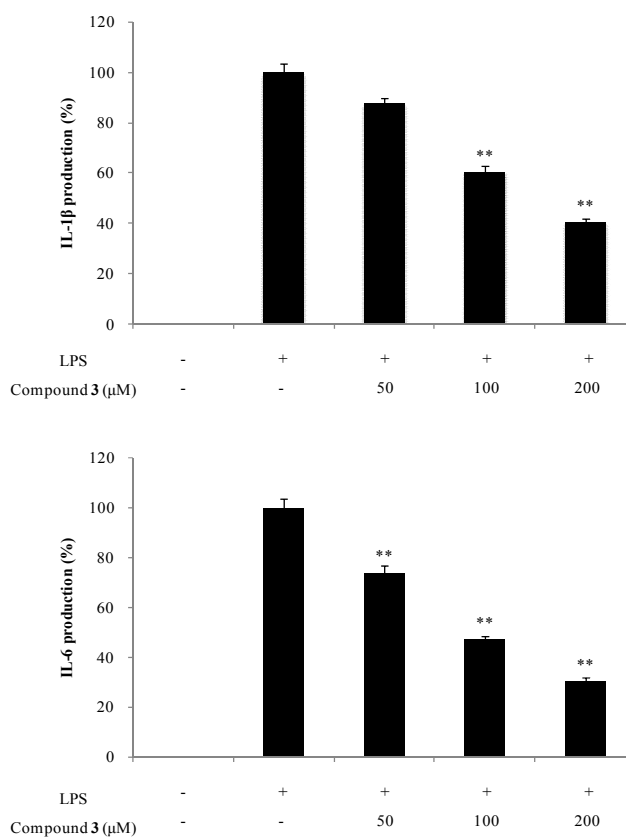


Figure 33. Effects of isolated compound **3** from ‘Shiranuhi’ leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Table 8. IC₅₀ values of compound **3** from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF- α	IL-1 β	IL-6
IC ₅₀ (μ M)	101.3	>200	123.3	94.3

② Compound 4

부지화 잎에서 분리된 화합물인 compound 4에 대한 항염 활성 기전 연구가 보고 되어 있지 않으므로 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, compound 4는 PGE₂의 생성 억제에는 영향을 미치지 않지만, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 억제 시키는 것을 확인할 수 있었으며(Figure 34, 35), TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 IC₅₀값이 각각 129.1, 172.7, 168.2 μ M로 활성이 있음을 확인하였다 (Table 9).

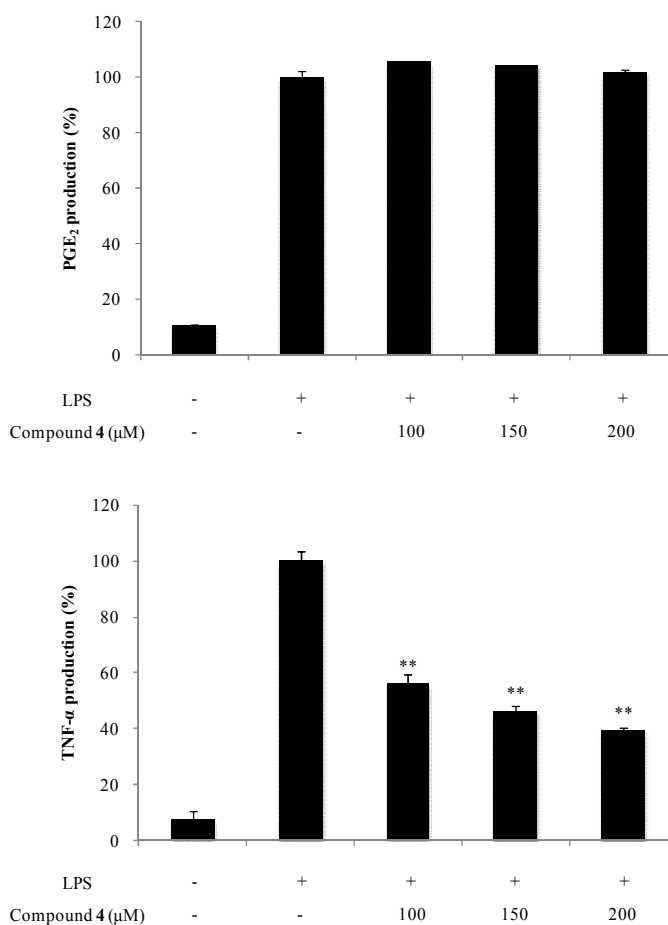


Figure 34. Effects of isolated compound 4 from 'Shiranuhi' leaves on PGE₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

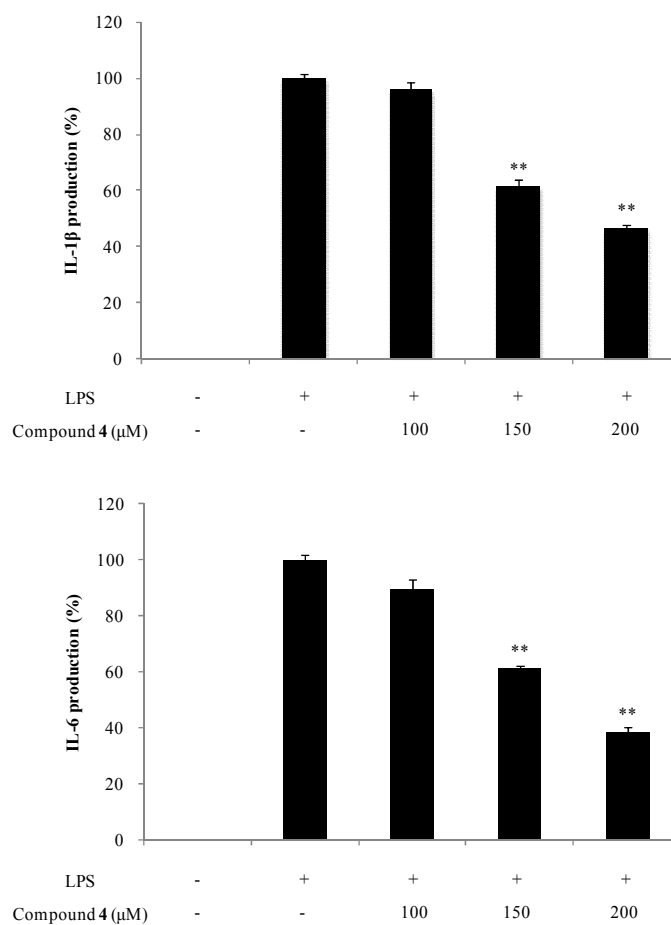


Figure 35. Effects of isolated compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Table 9. IC₅₀ values of compound 4 from ‘Shiranuhi’ leaves on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF- α	IL-1 β	IL-6
IC ₅₀ (μM)	N.A.*	129.1	172.7	168.2

* N.A. : No activity

2) 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

부지화 잎에서 분리된 화합물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μM 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과, compound 3, 5의 SC_{50} 값은 각각 944.1, 708.8 μM 로 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 36, Table 10).

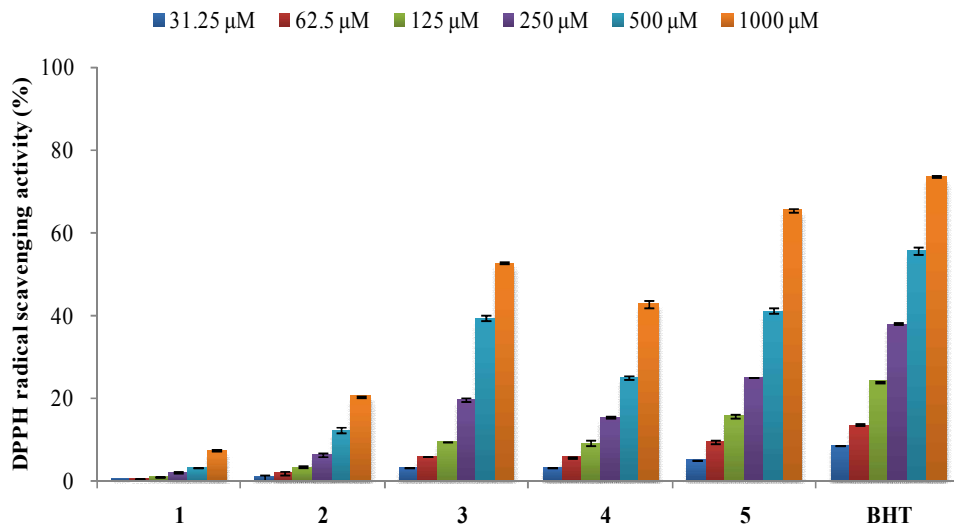


Figure 36. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds 1-5 from 'Shiranuhi' leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 10. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds 1-5 from 'Shiranuhi' leaves

	1	2	3	4	5	BHT
SC_{50} (μM)	>1000	>1000	944.1	>1000	708.8	402.2

(2) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

부지화 잎에서 분리된 화합물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μM 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, compound 2, 3, 4, 5의 SC₅₀값이 각각 695.9, 157.6, 396.5, 25.8 μM 로 활성이 있었으며(Figure 37, Table 11), 특히, compound 5는 대조군인 BHT (SC₅₀ = 29.8 μM)와 유사한 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다.

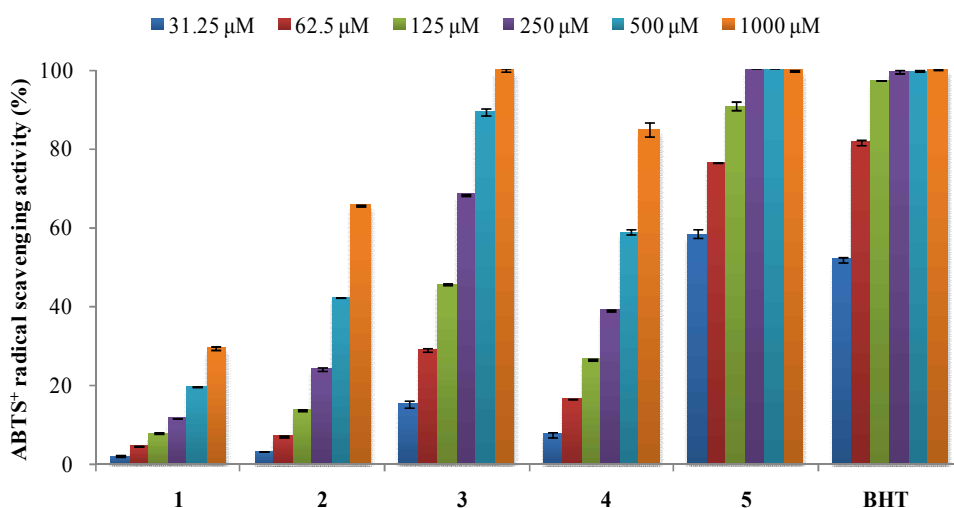


Figure 37. ABTS⁺ radical scavenging activities of isolated compounds 1–5 from ‘Shiranuhi’ leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 11. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for isolated compounds 1–5 from ‘Shiranuhi’ leaves

	1	2	3	4	5	BHT
SC ₅₀ (μM)	>1000	695.9	157.6	390.6	25.8	29.8

5. 요약 및 결론

현재까지 부지화 과피, 과육에 대해서는 다양한 생리 활성 및 성분 연구가 보고되어 있지만, 잎에 대해서는 알려진 생리 활성이 없으며 활성 성분에 대한 연구 또한 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 부지화 잎 추출물 및 분획물의 다양한 생리 활성을 확인하고, 부지화 잎의 유효 성분을 분리·동정하여 기능성 식·의약품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

부지화 잎 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O fraction을 얻었다. 용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 EtOAc 분획물에 대해 vacuum liquid chromatography (VLC) 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하고, ¹H, ¹³C NMR, HMQC, HMBC 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 sinensetin (1), isosinensetin (2), 5-desmethylinensetin (3), 7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone (4), hesperidin (5)으로 확인되었다. 분리된 화합물 중 compound 1, 5는 부지화 과피에서 분리 보고된 적이 있는 화합물이지만, compound 2, 3, 4는 부지화에서 처음으로 분리되었다.

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 20, 40, 60 µg/mL의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, 또한 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6)의 생성을 억제 하는 것을 확인하였다. 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, compounds 1-5가 NO의 생성을 억제시키는 것을 확인하였으며, 항염 활성이 보고되어 있지 않은 compound 3, 4는 추가적인 항염 활성 기전 연구를 진행하였다. 실험 결과, compound 3은 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β 및 IL-6)의 생성을 억제하는 효과가 있으며, compound 4는 PGE₂ 생성 억제에는 영향을 미치지 않지만 전염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성을 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다.

부지화 잎에 대한 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 폴리페놀(139.6 mg/g GAE)과 플라보노이드(169.3 mg/g QE)를 함유하고 있었으며, 이

들 데이터를 통해 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높았던 EtOAc 분획물에서 가장 좋은 radical 소거 활성이 있음을 확인하였다. 분리된 화합물에 대한 DPPH radical 소거 활성 실험 결과, compound **3**, **5**의 SC₅₀값이 각각 944.1, 708.8 μM로 활성이 있었으며, ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, compound **2**, **3**, **4**, **5**의 SC₅₀값이 각각 695.9, 157.6, 396.5, 25.8 μM로 활성이 있음을 확인하였다. 특히, compound **5**는 대조군인 BHT (SC₅₀ = 29.8 μM)와 유사한 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 부지화 잎 추출물은 항염 및 항산화 효과가 있는 식·의약품 및 화장품 관련 천연 소재로써의 활용 가능성이 있음을 확인하였다.

IV. 연구 2 : 부지화 가지 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구

1. 부지화 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 부지화 가지의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 부지화 가지 1.3 kg을 70%(v/v) EtOH 26 L에 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 187.4 g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물 20 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었으며, 이와 같은 방법으로 8회 더 반복 실시하여, 추출물 총 180 g을 용매 분획하였다(Figure 38).

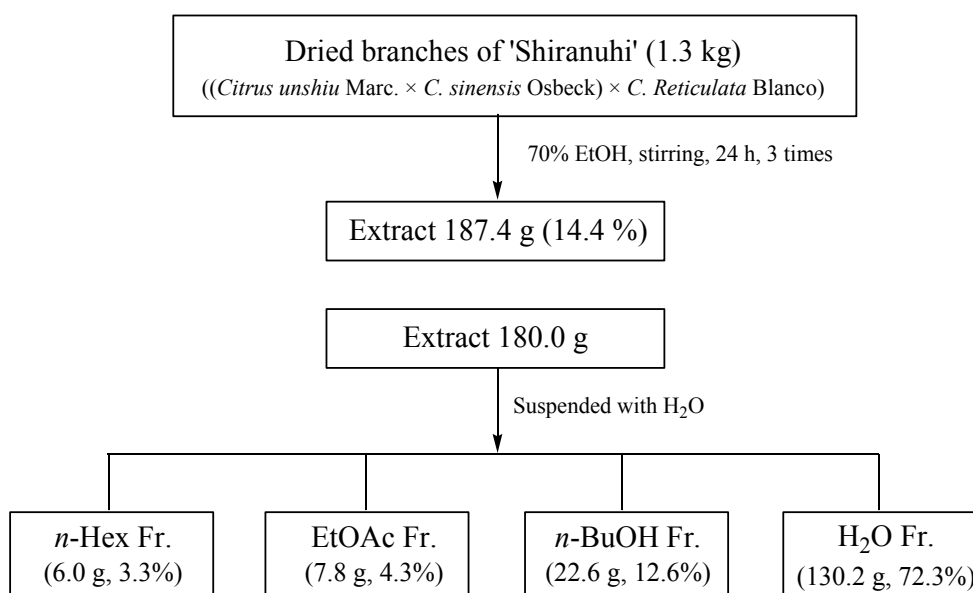


Figure 38. Extraction and solvent fractionation of 'Shiranuhi' branches.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate 분획물 5.0 g을 극성에 따라 세분화하기 위하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. 컬럼은 역상 silica gel (KP-C18-HS, 40+ M, Biotage Co.)을 사용하였으며, H₂O-MeOH (10~100%)의 용매를 gradient 조건으로 각 40 mL씩 용출하여 총 48개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-48).

MPLC fraction들 중 Fr. MP19 (179.5 mg)는 단일 화합물인 compound 7로 확인되었고, Fr. MP25, 26 (146.8 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼 (CHCl₃:MeOH=15:1)을 수행하여 compound 4 (33.6 mg)를 분리하였다. 또한, Fr. MP29-32 (285.6 mg)는 silica gel 컬럼(*n*-Hex:EtOAc=1:2)을 수행하여 compound 1 (15.4 mg), 2 (47.2 mg), 3 (11.9 mg) 및 compound 5와 6이 섞여있는 fraction (12.5 mg)을 분리하였다. Compound 5는 앞서 부지화 앞에서 분리한 화합물이며, compound 6은 잘 알려진 화합물이므로 더 이상의 분리는 진행하지 않았다(Figure 39).

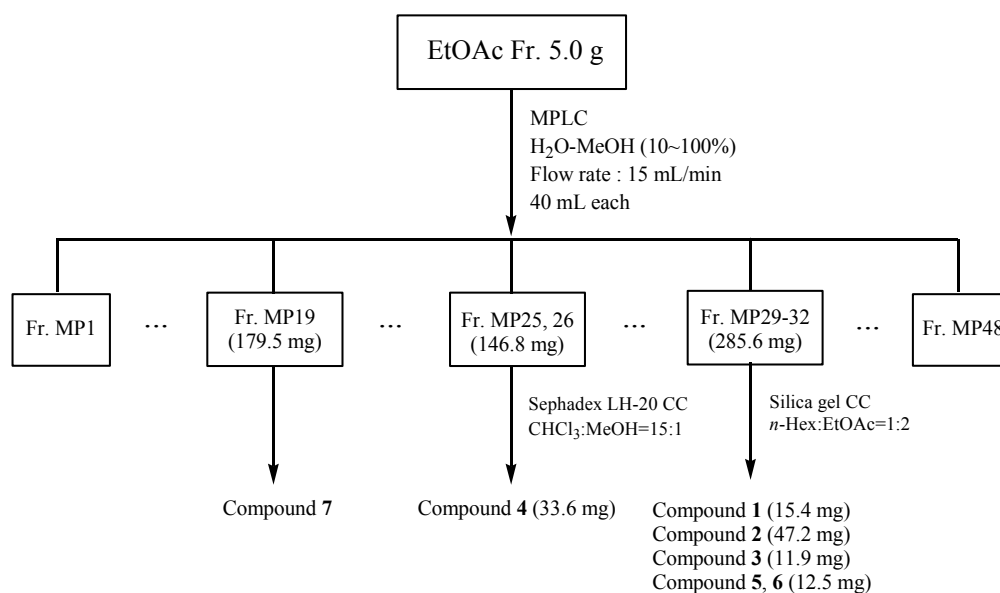


Figure 39. Isolation of compounds from 'Shiranuhi' branches.

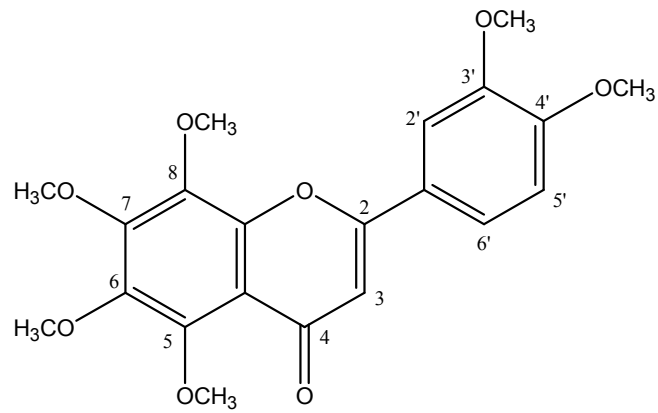
2. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1, 2, 3의 구조 동정

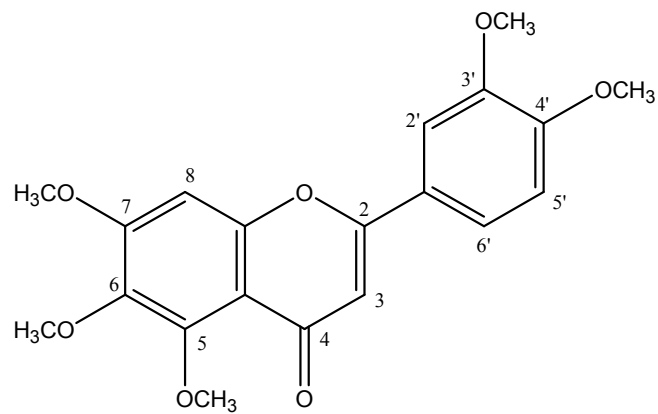
Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 21개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 56.1, 56.2, 61.8, 62.0, 62.1, 62.4 및 δ_{H} 3.96 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.98 (3H, s), 4.03 (3H, s), 4.11 (3H, s)의 피크를 통해 6개의 methoxy group이 결합되어 있는 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 또한, δ_{C} 177.5의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재함을 알 수 있으며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.00 (1H, d, $J = 8.7$), 7.42 (1H, d, $J = 1.8$) 및 7.57 (1H, dd, $J = 8.7, 1.8$)의 피크로 보아, flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton을 예상할 수 있다. δ_{H} 6.63 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton으로, 이들 데이터를 바탕으로 문헌³²을 통해 compound 1은 nobiletin (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxy-flavone)으로 확인되었다(Figure 40-42, Table 12).

Compound 2는 앞서 부지화 앞에서 분리된 화합물인 sinensetin으로 확인되었다(Figure 40).

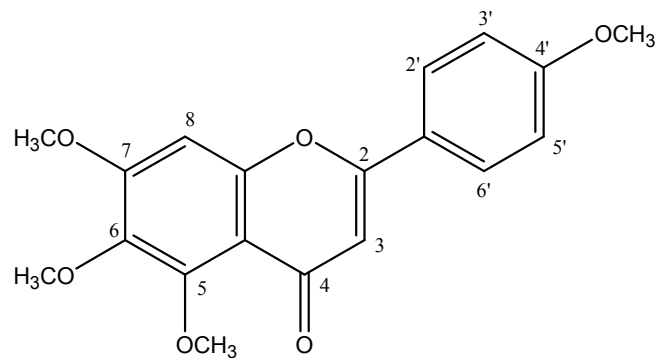
Compound 3은 ^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 2개의 carbon 피크를 포함하여 총 17개의 carbon 피크가 관찰되며, 그중 δ_{C} 55.5, 56.4, 61.0, 61.8 및 δ_{H} 3.76 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.94 (3H, s)의 피크를 통해 4개의 methoxy group이 결합되어 있는 B ring이 대칭인 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 또한, δ_{C} 175.6의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재함을 알 수 있으며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.10 (2H, d, $J = 8.7$) 및 8.02 (2H, d, $J = 8.7$) 피크의 적분값과 coupling constant 값을 통해 flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*-coupling을 하는 대칭인 2개의 aromatic proton을 예상할 수 있다. δ_{H} 6.71 (1H, s) 및 δ 7.21 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton으로, 이들 데이터를 바탕으로 문헌³³을 통해 compound 3은 tetramethylscutellarein (5,6,7,4'-tetramethoxyflavone)으로 확인되었다(Figure 40, 43, 44, Table 12).



Compound 1



Compound 2



Compound 3

Figure 40. Chemical structures of compounds 1-3.

Table 12. ¹H and ¹³C NMR data of compound **1** and **3** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 1 (CDCl ₃)		Compound 3 (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ _H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ _C	δ _H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ _C
2		161.2		160.2
3	6.63 (1H, s)	107.0	6.71 (1H, s)	106.0
4		177.5		175.6
5		144.2		151.5
6		138.2		139.7
7		151.6		157.4
8		147.9	7.21 (1H, s)	97.3
9		148.6		153.9
10		115.0		112.0
1'		124.2		123.0
2'	7.42 (1H, d, 1.8)	108.7	8.02 (1H, d, 8.7)	127.8
3'		149.4	7.10 (1H, d, 8.7)	114.4
4'		152.1		161.8
5'	7.00 (1H, d, 8.7)	111.4	7.10 (1H, d, 8.7)	114.4
6'	7.57 (1H, dd, 8.7, 1.8)	119.8	8.02 (1H, d, 8.7)	127.8
5-OCH ₃	4.03 (3H, s)	61.8	3.80 (3H, s)	61.8
6-OCH ₃	3.96 (3H, s)	62.4	3.76 (3H, s)	61.0
7-OCH ₃	4.11 (3H, s)	62.1	3.94 (3H, s)	56.4
8-OCH ₃	3.96 (3H, s)	62.0		
3'-OCH ₃	3.98 (3H, s)	56.2		
4'-OCH ₃	3.97 (3H, s)	56.1	3.85 (3H, s)	55.5

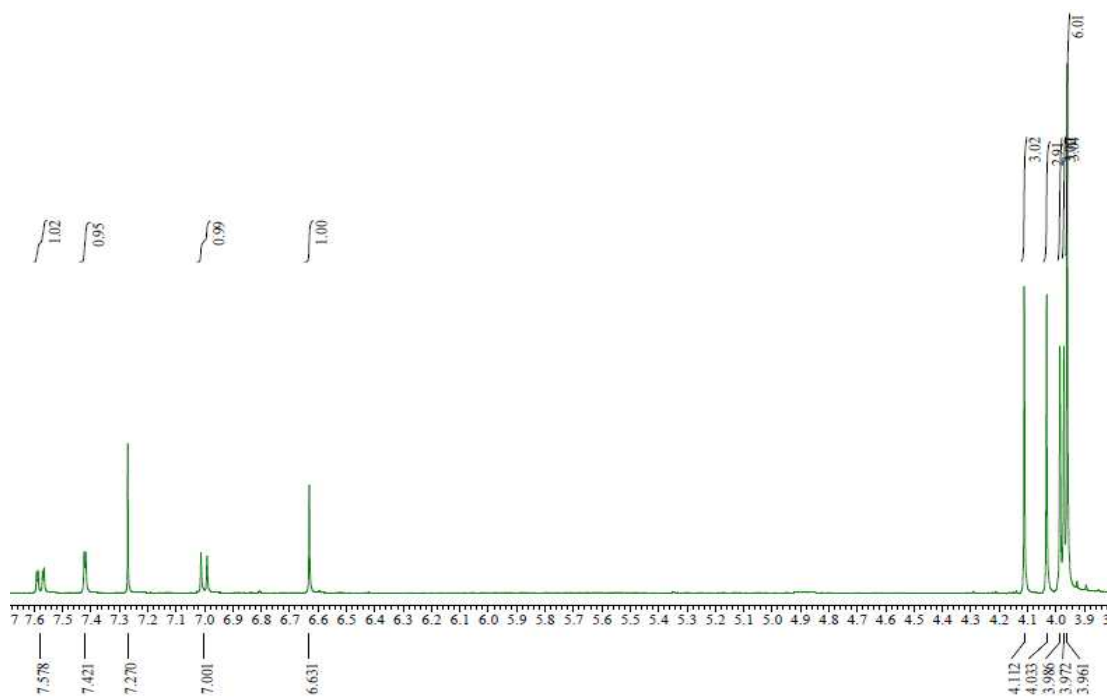


Figure 41. ^1H NMR spectrum of compound 1 (CDCl_3).

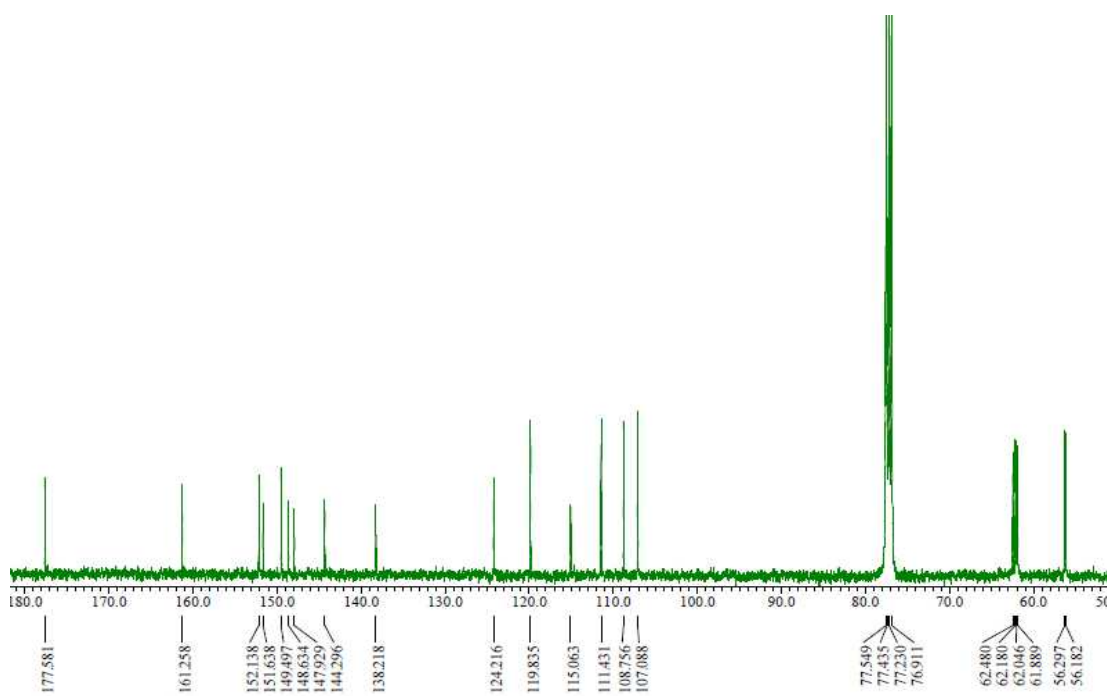


Figure 42. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (CDCl_3).

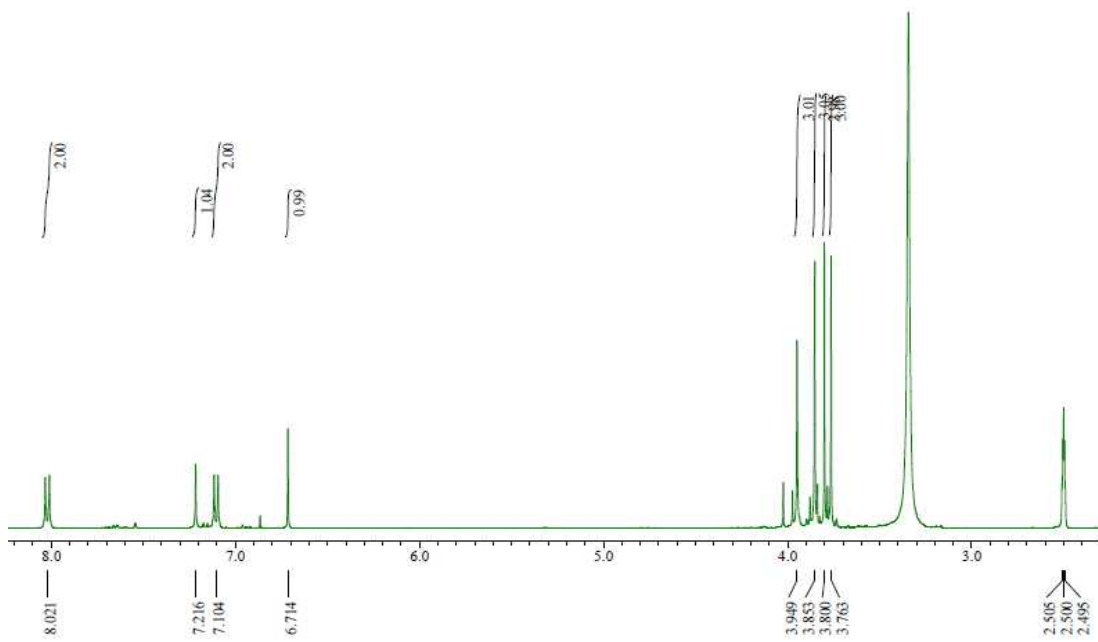


Figure 43. ^1H NMR spectrum of compound **3** ($\text{DMSO-}d_6$).

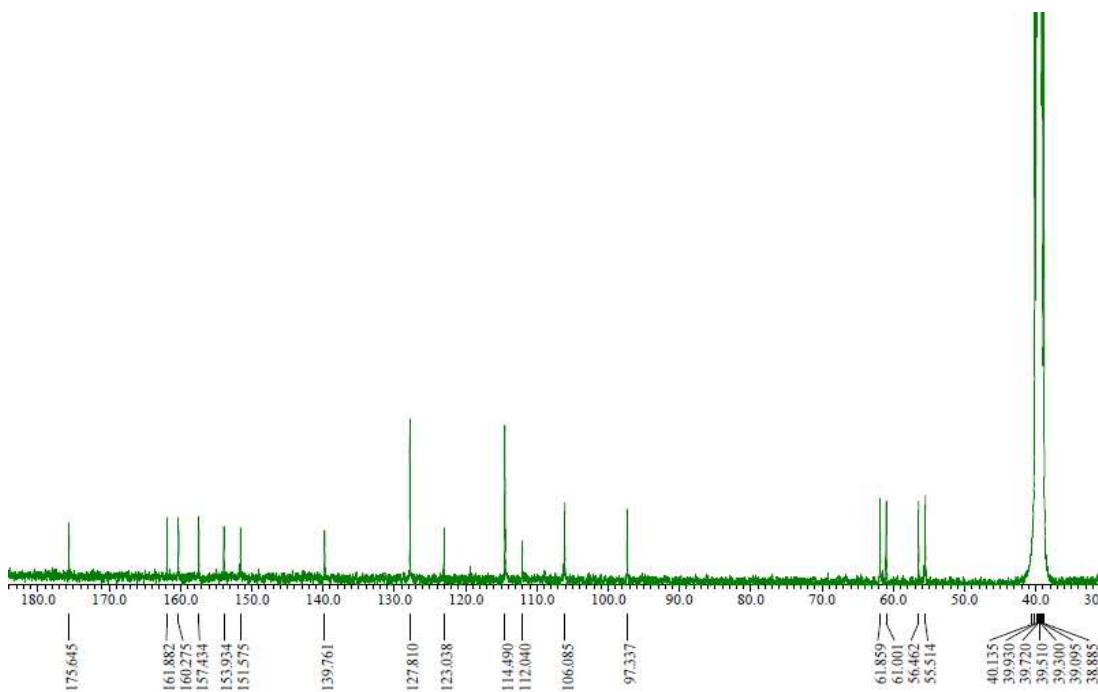


Figure 44. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** ($\text{DMSO-}d_6$).

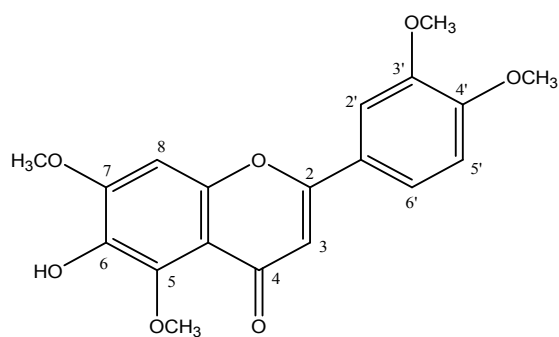
2) Compound 4, 5, 6, 7의 구조 동정

Compound 4는 ^{13}C NMR spectrum에서 19개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 56.2, 56.3, 56.6, 62.7 및 δ_{H} 3.96 (3H, s), 3.98 (3H, s), 4.02 (3H, s), 4.03 (3H, s)의 피크를 통해 4개의 methoxy group이 결합되어 있는 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 또한, δ_{C} 177.3의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재함을 알 수 있으며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.97 (1H, d, $J = 8.7$), 7.34 (1H, d, $J = 1.8$) 및 7.51 (1H, dd, $J = 8.7, 1.8$)의 피크로 보아, flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton을 예상할 수 있다. δ 6.62 (1H, s) 및 δ 6.84 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton으로, 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁵을 통해 compound 4는 6-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavone으로 확인되었다(Figure 45-47, Table 13).

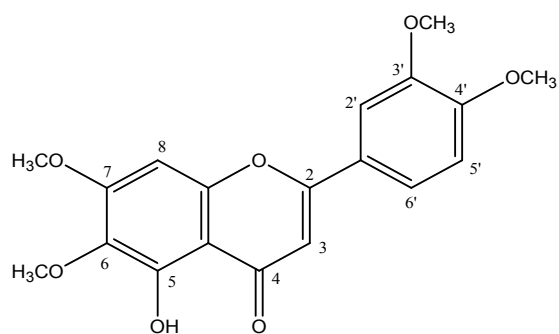
Compound 5는 앞서 부지화 앞에서 분리된 화합물과 동일한 5-desmethyl-sinensetin으로 확인되었다(Figure 45).

Compound 6은 ^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 2개의 carbon 피크를 포함하여 총 17개의 carbon 피크가 관찰되며, 그중 δ_{C} 56.4, 60.0의 피크를 통해 2개의 methoxy group이 결합되어 있는 B ring이 대칭인 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. 또한, δ_{C} 182.3의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재함을 알 수 있으며, ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.13 (2H, d, $J = 8.7$) 및 7.96 (2H, d, $J = 8.7$) 피크의 적분값과 coupling constant 값을 통해 flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*-coupling을 하는 대칭인 2개의 aromatic proton을 예상할 수 있다. δ_{H} 6.84 (1H, s) 및 δ 7.04 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton으로, 이들 데이터를 바탕으로 문헌³⁴을 통해 compound 6은 cirsimaritin (5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone)으로 확인되었다(Figure 45, 48, 49, Table 13).

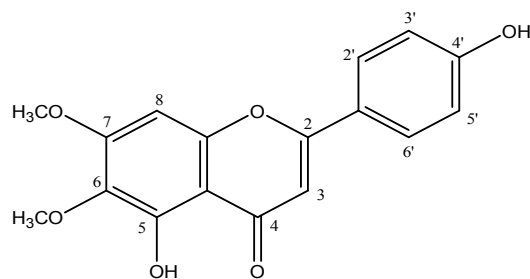
Compound 7은 앞서 부지화 앞에서 분리된 화합물과 동일한 hesperidin으로 확인되었다(Figure 45).



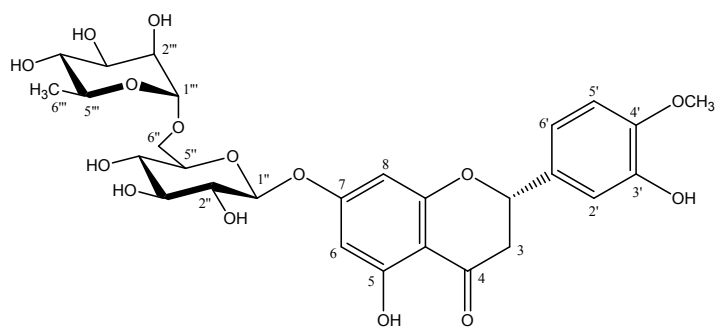
Compound 4



Compound 5



Compound 6



Compound 7

Figure 45. Chemical structures of compounds 4-7.

Table 13. ¹H and ¹³C NMR data of compound **4** and **6** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 4 (CDCl ₃)		Compound 6 (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	δ _H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ _C	δ _H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ _C
2		161.6		164.0
3	6.62 (1H, s)	107.3	6.84 (1H, s)	102.6
4		177.3		182.3
5		144.2		152.6
6		136.9		131.8
7		152.4		158.5
8	6.84 (1H, s)	96.4	7.04 (1H, s)	91.7
9		152.0		152.0
10		112.4		105.0
1'		124.3		120.9
2'	7.34 (1H, d, 1.8)	108.8	7.96 (1H, d, 8.7)	128.5
3'		149.4	7.13 (1H, d, 8.7)	115.9
4'		152.1		161.4
5'	6.97 (1H, d, 8.7)	111.3	7.13 (1H, d, 8.7)	115.9
6'	7.51 (1H, dd, 8.7, 1.8)	119.8	7.96 (1H, d, 8.7)	128.5
5-OCH ₃	4.02 (3H, s)	62.7		
6-OCH ₃			3.93 (3H, s)	60.0
7-OCH ₃	4.03 (3H, s)	56.6	3.73 (3H, s)	56.4
3'-OCH ₃	3.98 (3H, s)	56.3		
4'-OCH ₃	3.96 (3H, s)	56.2		

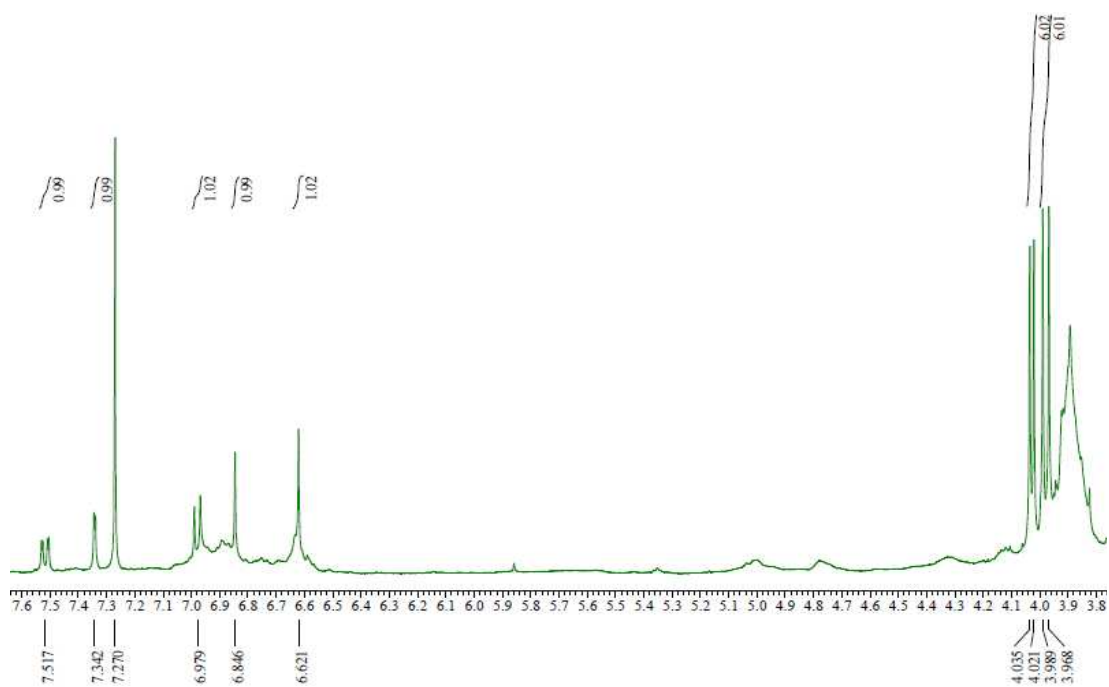


Figure 46. ^1H NMR spectrum of compound **4** (CDCl_3).

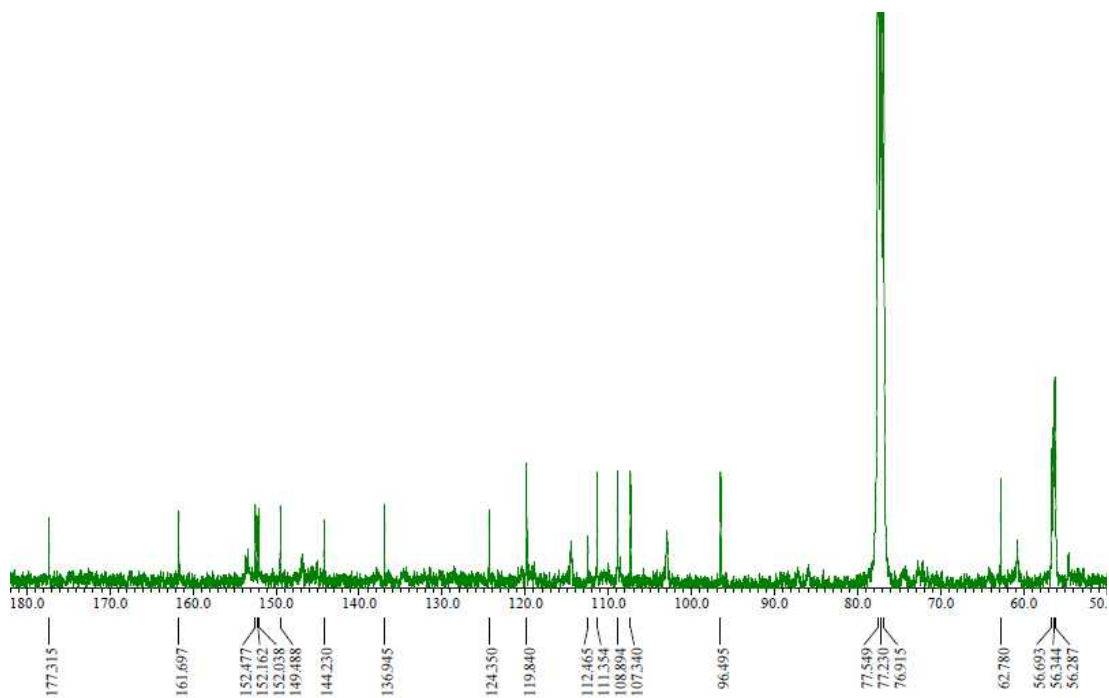


Figure 47. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** (CDCl_3).

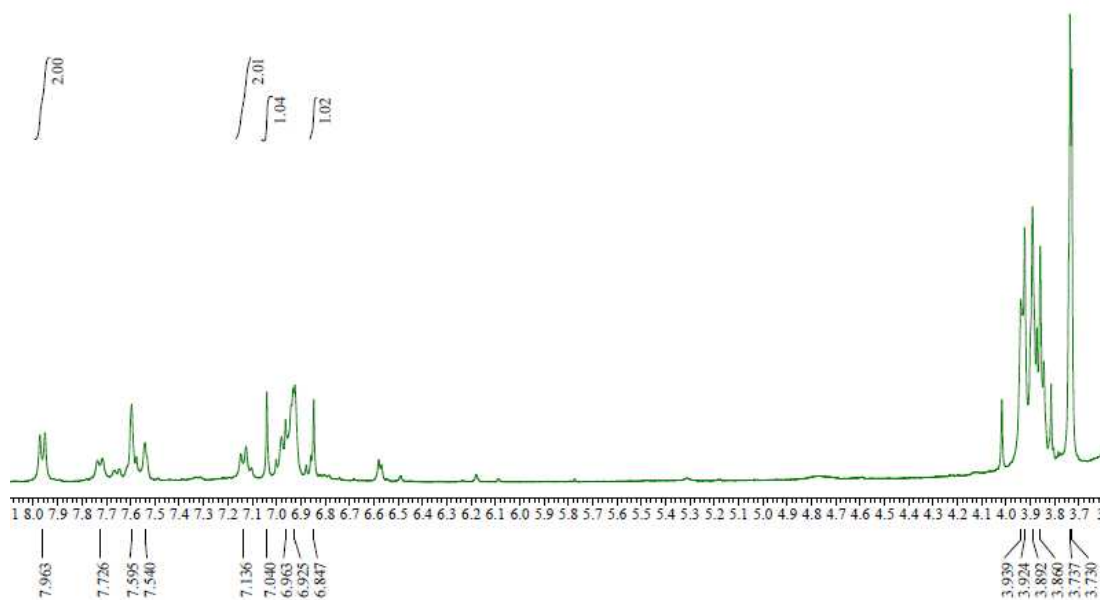


Figure 48. ^1H NMR spectrum of compound **5** and **6** ($\text{DMSO}-d_6$).

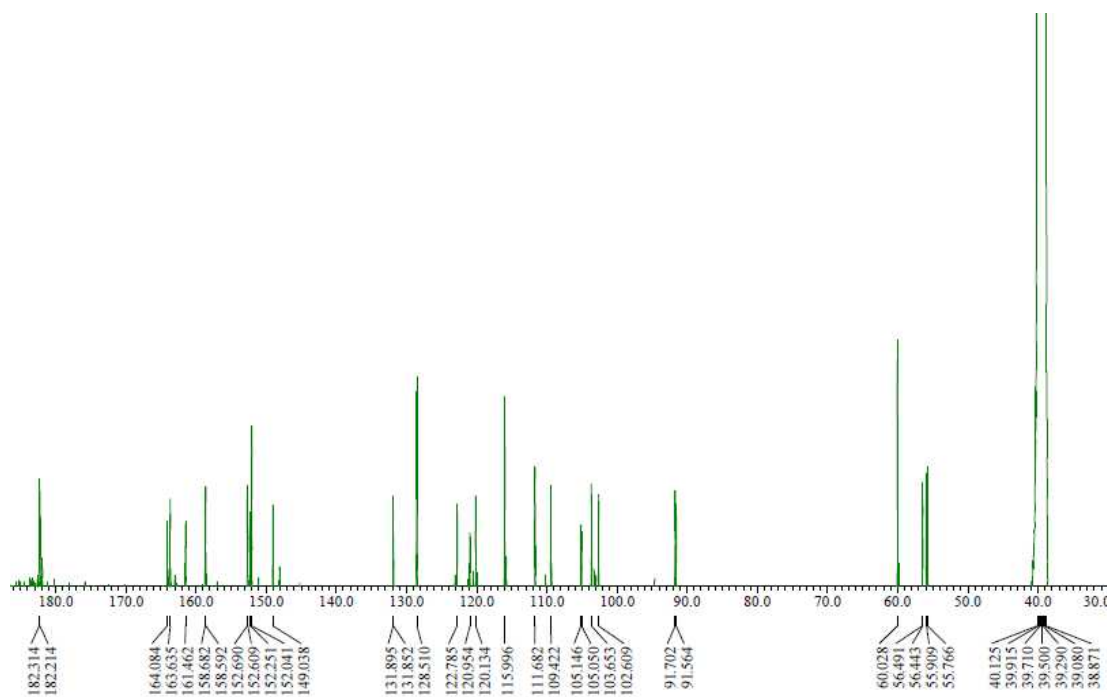


Figure 49. ^{13}C NMR spectrum of compound **5** and **6** ($\text{DMSO}-d_6$).

3. 부지화 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

부지화 가지 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 우선 70% EtOH 추출물 및 각 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 EtOAc 분획물에서 NO 생성 억제 활성을 확인하였다(Figure 50). EtOAc 분획물이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 28% 정도의 세포 독성을 보였으나 NO를 90% 이상 크게 감소시키는 것을 확인함에 따라 추가적으로 독성이 없는 범위인 20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 실험을 진행하였다. 그 결과 부지화 가지 EtOAc 분획물은 세포에 대한 독성 없이 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, IC_{50} 값은 30.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Figure 51).

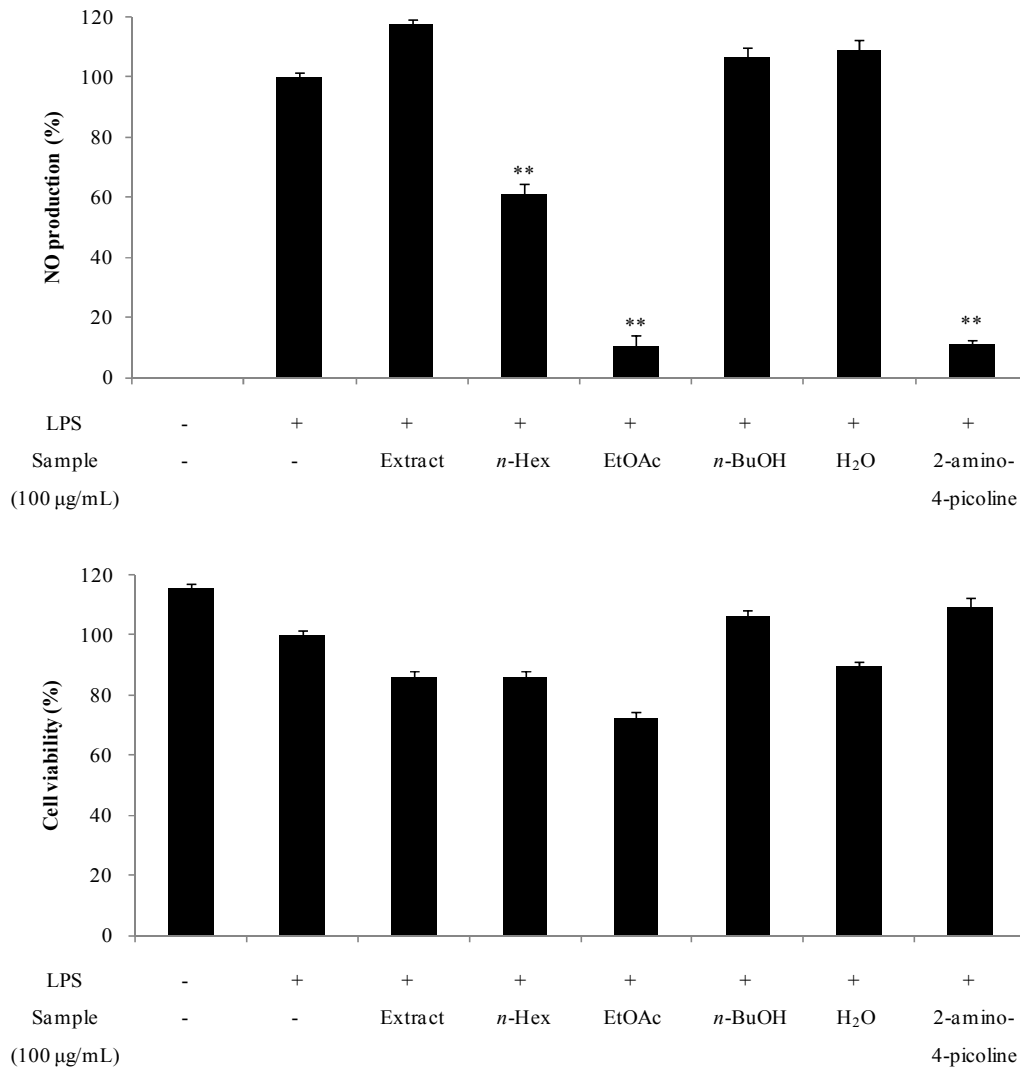


Figure 50. Effects of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus ‘Shiranuhi’ branches 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

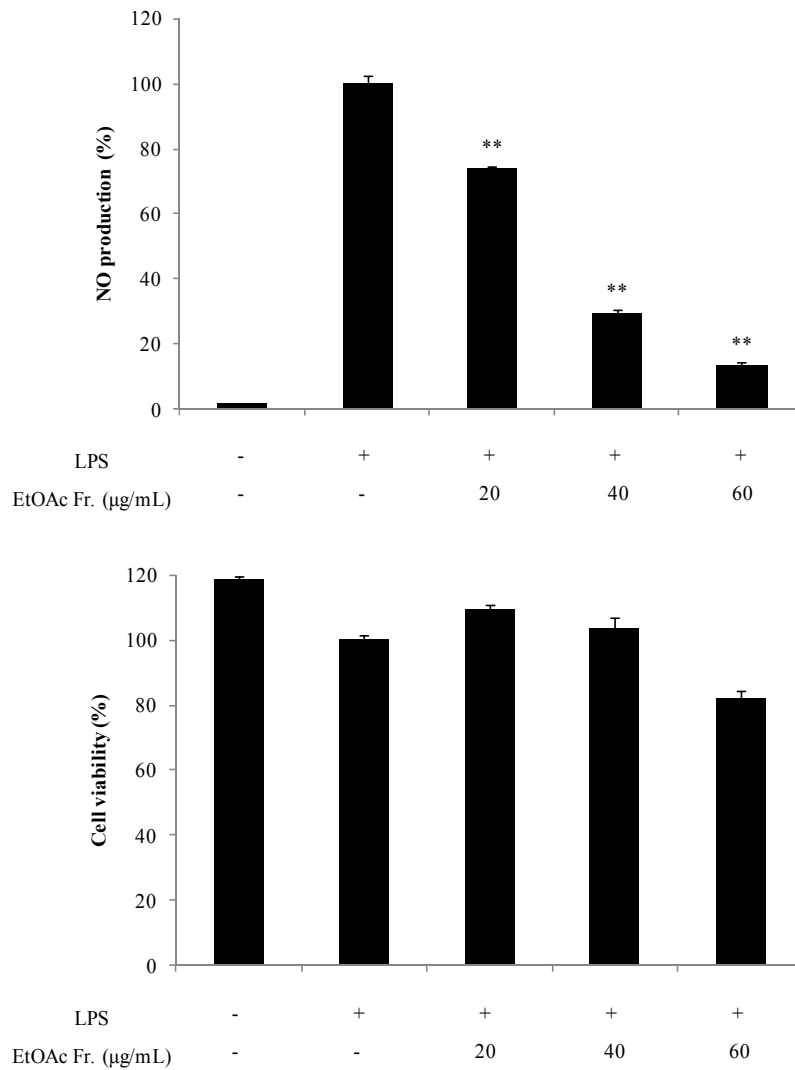


Figure 51. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ branches for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

LPS로 염증이 유도된 대식세포는 전염증성 cytokine을 분비하게 되는데 이를 통하여 염증 반응의 정도를 알아볼 수 있다. 부지화 가지 EtOAc 분획물에서 이러한 cytokine을 얼마나 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)를 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 그 결과, 부지화 가지 EtOAc 분획물은 PGE₂, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었으며(Figure 52, 53), PGE₂, IL-1 β 및 IL-6의 IC₅₀값이 각각 45.7, 42.1, 45.0 μ g/mL로 활성이 있음을 확인하였다(Table 14).

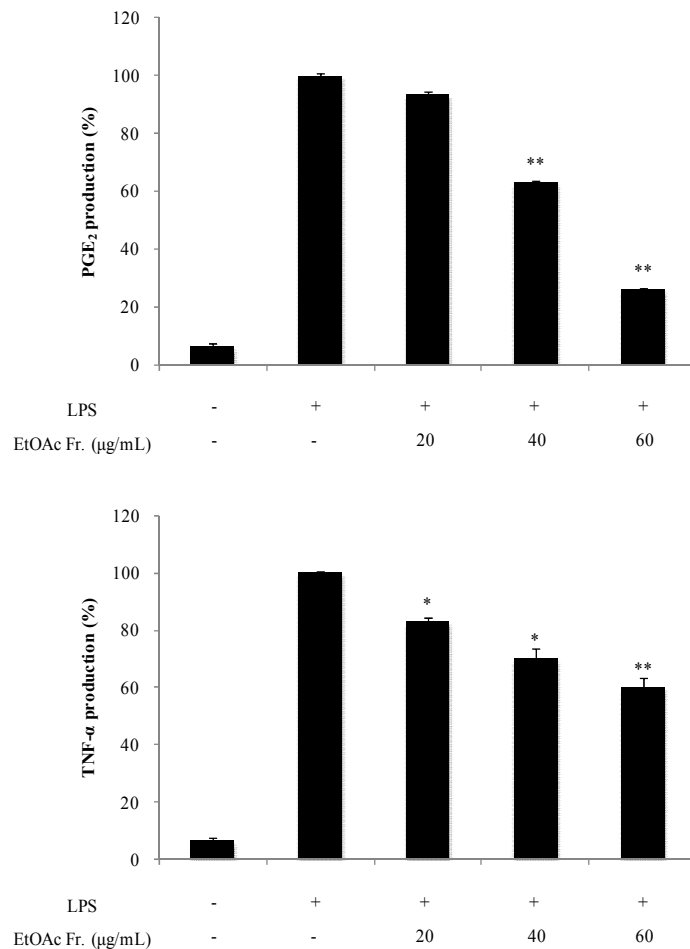


Figure 52. Effects of EtOAc fraction from 'Shiranuhi' branches on PGE₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

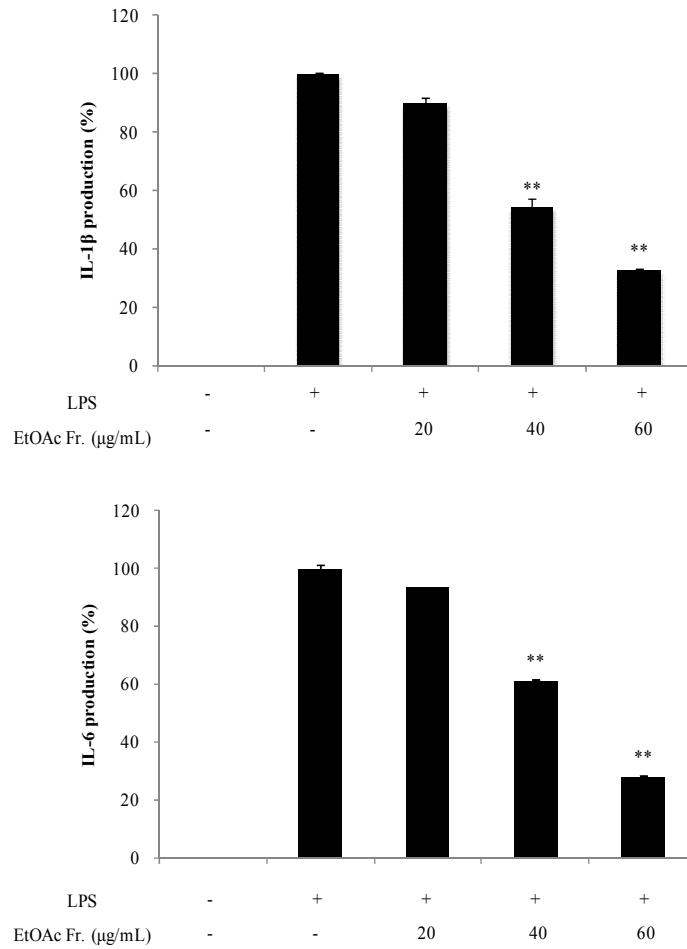


Figure 53. Effects of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ branches on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

Table 14. IC₅₀ values of EtOAc fraction from ‘Shiranuhi’ branches on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF- α	IL-1 β	IL-6
IC ₅₀ (μ g/mL)	45.7	>60	42.1	45.0

2) 항산화 활성

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

Gallic acid를 표준물질로 사용하여 표준검정곡선을 작성하고, 부지화 가지 추출물 및 분획물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 추출물 및 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 폴리페놀(159.1 mg/g GAE)를 함유하고 있었으며, 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 54).

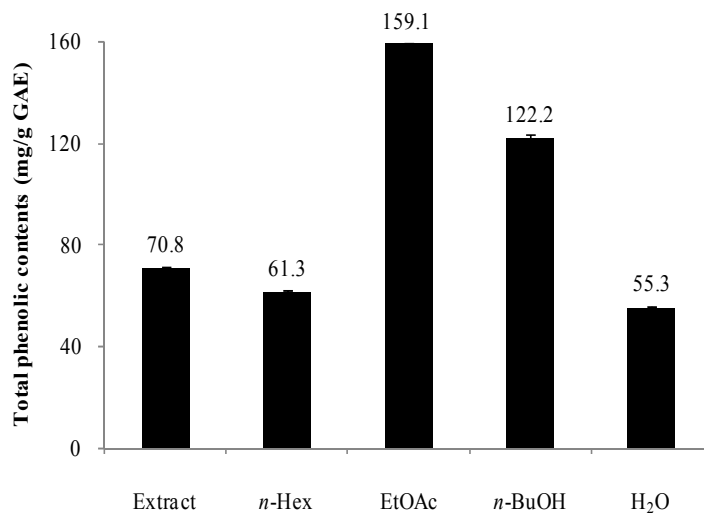


Figure 54. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from 'Shiranuhi' branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

Quercetin을 표준물질로 사용하여 표준검정곡선을 작성하고, 부지화 가지 추출물 및 분획물에 함유된 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 추출물 및 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 플라보노이드(87.4 mg/g QE)를 함유하고 있었으며, 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 55).

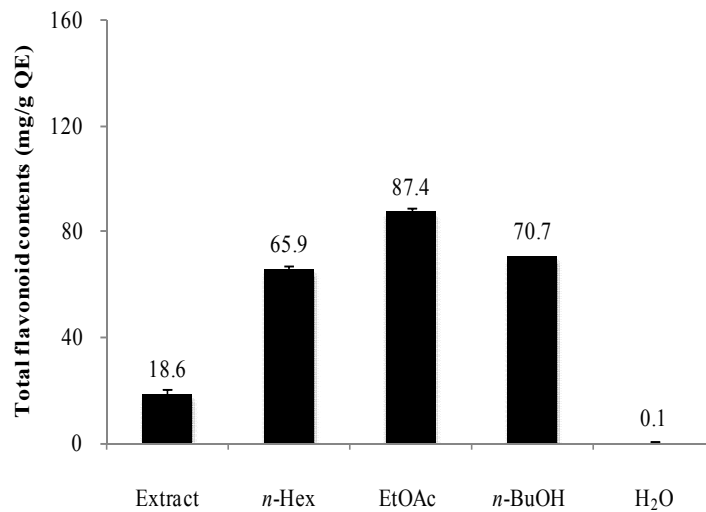


Figure 55. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

부지화 가지 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, *n*-Hex 분획물, EtOAc 분획물 및 *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀값이 각각 987.6, 999.3, 147.2, 196.0 µg/mL로 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 56, Table 15).

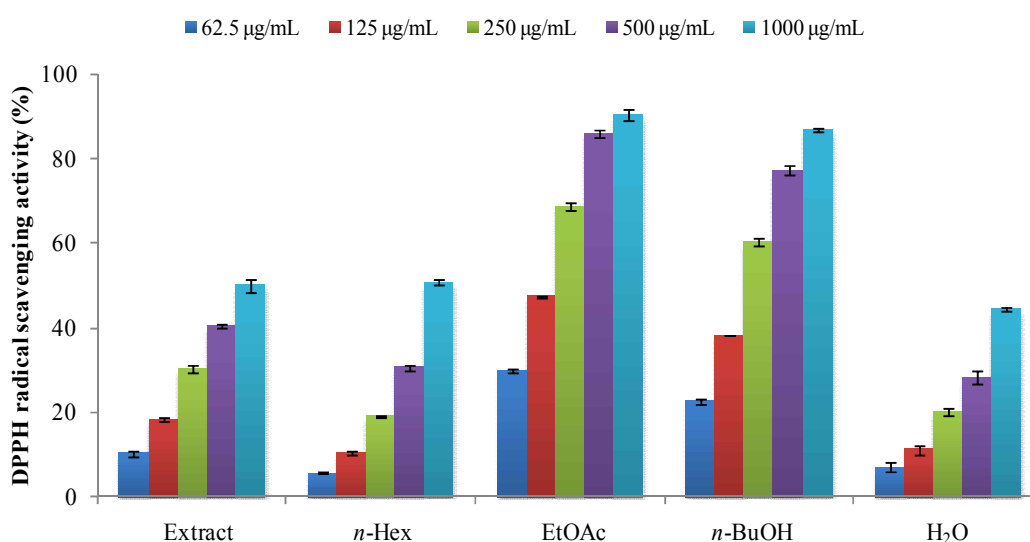


Figure 56. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 15. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	987.6	999.3	147.2	196.0	>1000	80.9

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

부지화 가지 추출물 및 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물, *n*-Hex 분획물, EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물 및 H₂O 분획물의 SC₅₀값이 각각 115.8, 216.8, 25.0, 42.2, 107.8 µg/mL로 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다 (Figure 57, Table 16).

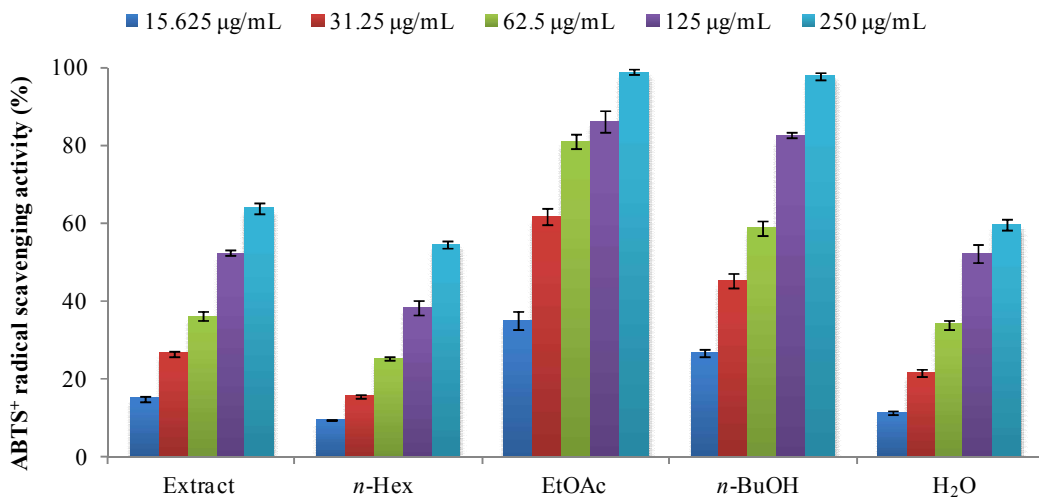


Figure 57. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 16. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for extract and solvent fractions from ‘Shiranuhi’ branches

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	115.8	216.8	25.0	42.2	107.8	6.9

4. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

부지화 가지에서 분리된 화합물에 대한 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. Compound 2, 5, 7 (Figure 30) 및 6³⁵은 앞서 항염 활성이 보고된 바 있어 compound 1, 3, 4에 대하여 실험을 진행하였다. 우선 각 화합물에 대해 50, 100, 200 μM 의 농도로 실험을 진행하였으며, 그 결과 compound 4는 세포 독성이 있는 반면에 compound 1, 3은 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다(Figure 58).

Compound 4는 추가적으로 세포 독성이 없는 농도 범위인 10, 20, 30 μM 의 농도에서 실험을 진행하여 NO의 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 59).

Compound 1, 3, 4의 IC_{50} 값은 각각 97.9, 95.9, 18.2 μM 로 활성이 있음을 확인하였다(Table 17). 이 중 compound 1³⁶은 PGE_2 및 $\text{TNF-}\alpha$ 의 생성을 억제하는 기전으로, compound 3³⁷은 PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ 및 IL-6 의 생성을 억제하는 기전으로 항염 활성이 있음이 보고되어 있다. 현재까지 항염 활성 기전 연구가 되어 있지 않은 compound 4에 대하여 추가적인 실험을 진행하였다.

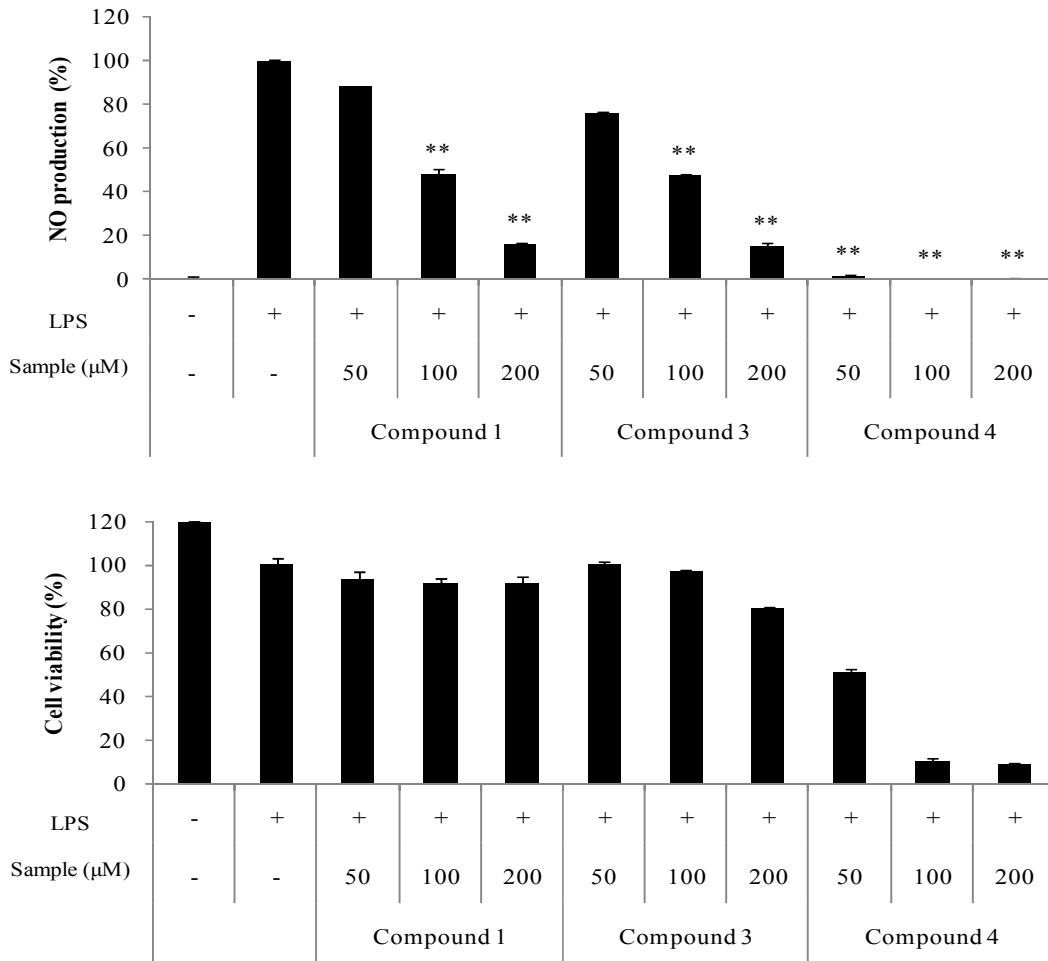


Figure 58. Effects of isolated compounds 1, 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1, 3 and 4 from ‘Shiranuhi’ leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

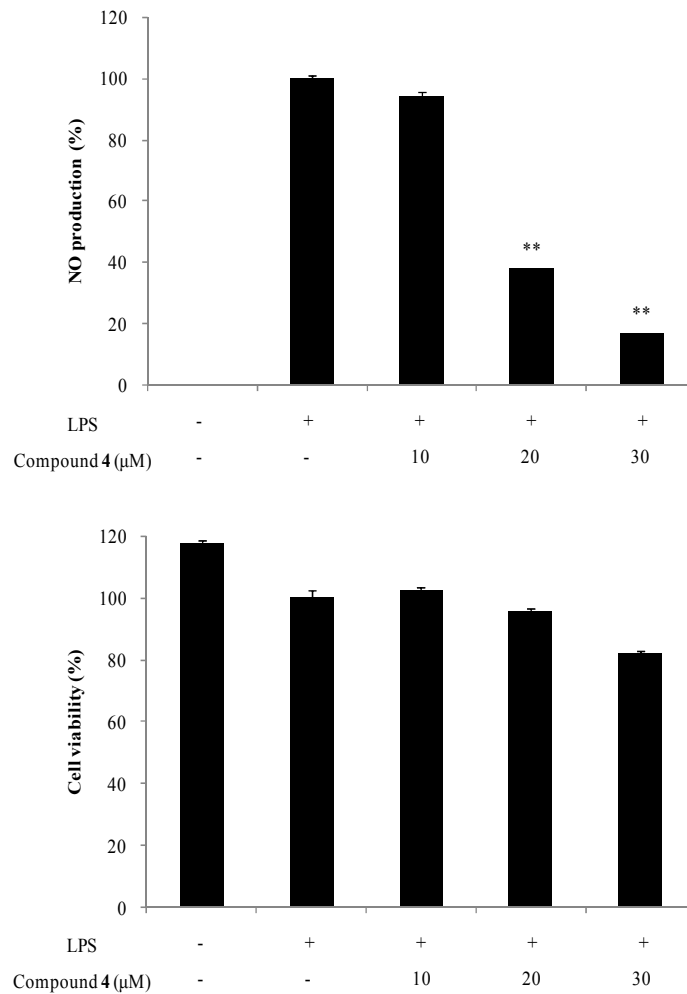


Figure 59. Effects of isolated compound **4** from ‘Shiranuhi’ branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compound **4** from ‘Shiranuhi’ leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Table 17. IC₅₀ values of isolated compounds **1**, **3** and **4** from ‘Shiranuhi’ branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells

Compound	1	3	4
IC ₅₀ (μM)	97.9	95.9	18.2

(2) Compound 4의 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

부지화 가지에서 분리된 화합물인 compound 4에 대한 항염 활성 기전 연구가 보고되어 있지 않으므로 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, compound 4는 PGE₂의 생성 억제에는 영향을 미치지 않지만, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 억제 시키는 것을 확인하였으며(Figure 60, 61), TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 IC₅₀값이 각각 10.1, 22.3, 20.4 μ M로 활성이 있음을 확인하였다(Table 18).

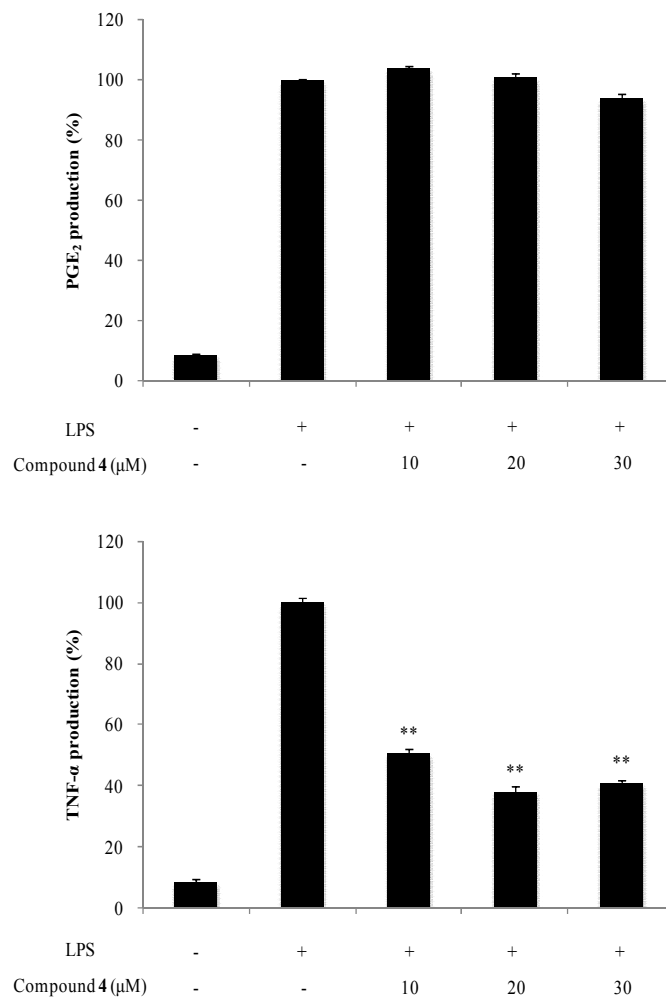


Figure 60. Effects of isolated compound 4 fraction from 'Shiranuhi' branches on PGE₂ and TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

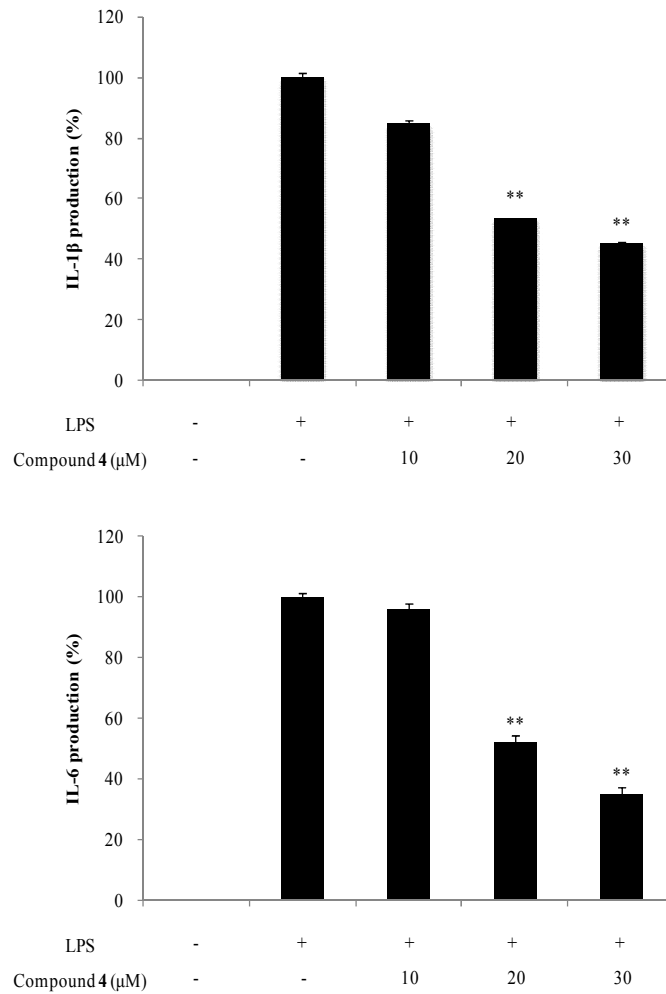


Figure 61. Effects of isolated compound 4 fraction from ‘Shiranuhi’ branches on IL-1 β and IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

Table 18. IC₅₀ values of compound 4 from ‘Shiranuhi’ branches on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines and production in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF- α	IL-1 β	IL-6
IC ₅₀ (μ M)	N.A.*	10.1	22.3	20.4

* N.A. : No activity

2) 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

부지화 가지에서 분리된 화합물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. Compound **2**, **5**, **7** (Figure 36, 37) 및 **6**³⁸은 앞서 항산화 활성이 보고된 바 있어 compound **1**, **3**, **4**에 대하여 실험을 진행하였다. 실험은 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μM 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과, compound **4**의 SC_{50} 값이 128.7 μM 로 대조군인 BHT ($\text{SC}_{50} = 402.2 \mu\text{M}$)보다 우수한 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 62, Table 19).

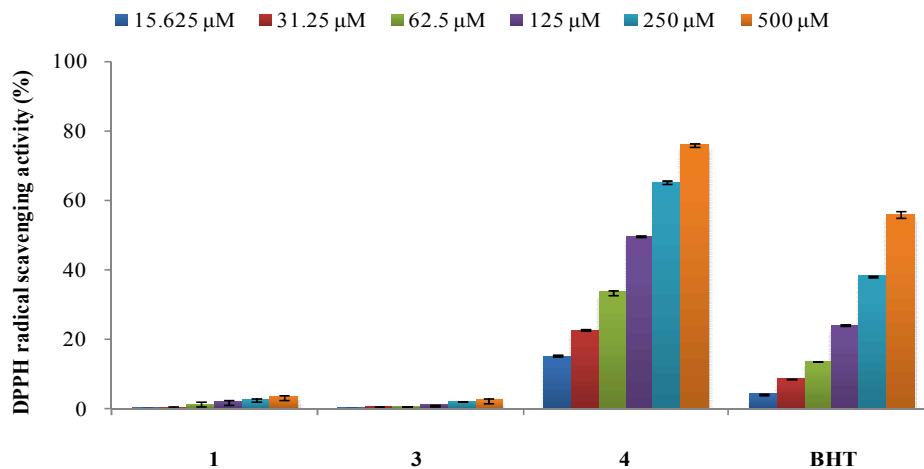


Figure 62. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds **1**, **3** and **4** from ‘Shiranuhi’ branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 19. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds **1**, **3** and **4** from ‘Shiranuhi’ branches

	1	3	4	BHT
SC_{50} (μM)	N.A.*	N.A.*	128.7	420.2

* N.A. : No activity

(2) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

부지화 가지에서 분리된 화합물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 15.625, 31.25, 62.5, 125 μM 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대해 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, compound **4**의 SC₅₀값이 17.9 μM 로 대조군인 BHT (SC₅₀ = 29.8 μM)보다 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 63, Table 20).

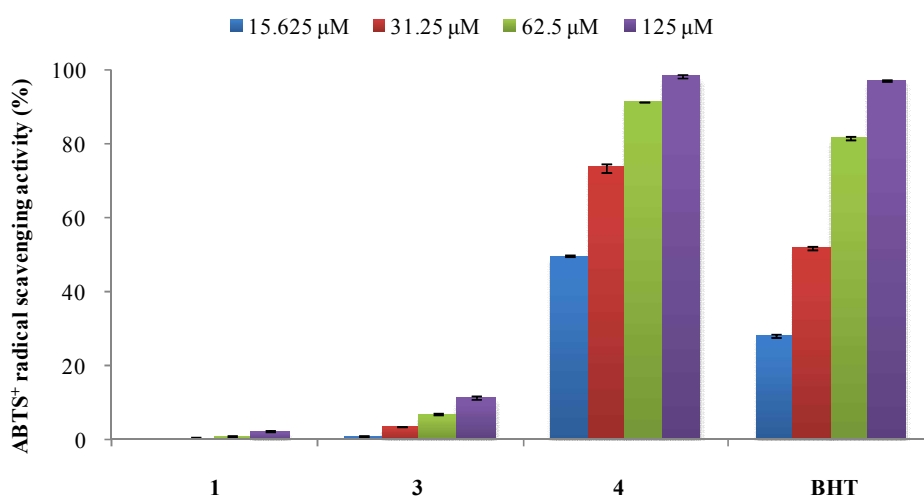


Figure 63. ABTS⁺ radical scavenging activities of isolated compounds **1**, **3** and **4** from ‘Shiranuhi’ branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 20. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for isolated compounds **1**, **3** and **4** from ‘Shiranuhi’ branches

	1	3	4	BHT
SC ₅₀ (μM)	N.A.*	N.A.*	17.9	29.8

* N.A. : No activity

5. 요약 및 결론

현재까지 부지화 과피, 과육에 대해서는 다양한 생리 활성 및 성분 연구가 보고되어 있지만, 가지에 대해서는 알려진 생리 활성이 없으며, 활성 성분에 대한 연구 또한 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 부지화 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리 활성을 확인하고, 부지화 가지의 유효 성분을 분리·동정하여 기능성 식·의약품 및 화장품 관련 천연 소재로써의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

부지화 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O fraction을 얻었다. 용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중 EtOAc 분획물에 대해 medium pressure liquid chromatography (MPLC), silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하고, ¹H, ¹³C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 7개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 nobiletin (1), sinensetin (2), tetramethylscutellarein (3), 6-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (4), 5-desmethylinensetin (5), cirsimaritin (6), hesperidin (7)으로 확인되었다. 분리된 화합물 중 compound 1, 2, 3, 7은 부지화 과피에서 분리 보고된 적이 있는 화합물이지만, compound 4, 5, 6은 부지화에서 처음으로 분리되었다.

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 20, 40, 60 µg/mL의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 또한 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β 및 IL-6)의 생성을 억제 하는 것을 확인하였다. 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, compound 1, 3, 4가 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제 시키는 것을 확인하였다. 항염 활성이 보고되어 있지 않은 compound 4는 추가적인 항염 활성 기전 연구를 진행하였으며, 실험 결과 PGE₂ 생성 억제에는 영향을 미치지 않지만 전염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성을 억제 하는 효과가 있는 것을 확인하였다.

부지화 가지에 대한 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 폴리

페놀(159.1 mg/g GAE)과 플라보노이드(87.4 mg/g QE)를 함유하고 있었으며, 이들 데이터를 통해 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 가장 높았던 EtOAc 분획물에서 가장 좋은 radical 소거 활성이 있음을 확인하였으며, 분리된 화합물에 대한 항산화 활성 실험 결과, compound 4가 대조군인 BHT보다 우수한 DPPH radical 소거 활성(SC₅₀: 128.7 μM) 및 ABTS⁺ radical 소거 활성(SC₅₀: 17.9 μM)이 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 부지화 가지 추출물은 항염 및 항산화 효과가 있는 식·의약품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 활용가능성이 있음을 확인하였다.

V. 종합 결론 및 고찰

감귤류(Citrus)는 운향과(Rutaceae), 감귤아과(Auranoidideae)에 속하는 식물로 polyphenol, vitamin, limonoid 등의 다양한 화합물을 함유하고 있으며, 감귤 과피 중에 존재하는 풍부한 carotenoid, flavonoid, terpenoid는 순환계 질환의 예방 및 개선 효과 등 다양한 생리적 작용을 가진다.³⁹ 또한, 감귤류의 과실은 다양한 bioflavonoid를 함유하고 있다고 보고된다. 이는 비타민 P로 알려져 있으며 필수적인 영양요소는 아니지만, 건강에 도움을 주는 역할을 하고 있는 물질군이다. 감귤류에서 주로 발견되는 주성분은 hesperidin, naringin, rutin, narirutin, neohesperidin, sinensetin 등의 PMF (polymethoxyflavonoid)이며, 화학 구조적으로 플라보노이드 골격을 포함하고 있다.⁴⁰ 플라보노이드류는 항암, 항염 및 자외선으로부터의 보호 등과 같은 다수의 유익한 효과들 때문에 천연적인 치료제들로 다양하게 사용되고 있다. 현재 가장 주목 받고 있는 플라보노이드 성분은 식물에서 추출하는 것들이 많고, 자몽, 오렌지, 레몬 등에서 추출한 Citrus bioflavonoid가 가장 유명하다.

이에 따라 감귤은 현대인에게 필요한 생리활성 물질들이 풍부한 생물 산업 소재로 그 가치가 매우 높다고 할 수 있으며, 식품 산업은 물론 화장품 산업과 의약 산업 등 다양한 분야에서 연구 개발이 진행되고 있다.²⁰

따라서, 본 연구는 선행 연구가 되어 있지 않은 ‘부지화(*Citrus unshiu* Marc. × *C. sinensis* Osbeck) × *C. reticulata* Blanco)’ 잎, 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리 활성을 검색하고 이들의 유효 성분을 분리·동정하였다. 부지화 잎으로부터 sinensetin (1), isosinensetin (2), 5-desmethylinensetin (3), 7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone (4), hesperidin (5)을 분리하였고, 부지화 가지로부터 nobiletin (1), sinensetin (2), tetramethylscutellarein (3), 6-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (4), 5-desmethylinensetin (5), cirsimaritin (6), hesperidin (7)을 분리하였다. 이 화합물들은 이미 부지화 과피에서 분리된 sinensetin, tangeretin, nobiletin 등과 같은 PMF로써, PMF는 항암, 항증식, 항균, 항알레르기 활성 등과 같은 다양한 기능성을 가지는 화합물로 알려져 있

다.⁴¹ 본 연구를 통해 부지화 잎, 가지에서 분리된 화합물들은 항염증 및 항산화 효과를 갖는 것이 확인되었고, 이외에 추가적인 연구를 통해 다양한 생리활성을 확인할 수 있을 것이라 판단된다.

DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험을 통하여 부지화 잎, 가지에서 분리된 화합물들의 항산화 활성을 확인하였다. 보고에 따르면, 일반적으로 플라보노이드는 항산화 효과가 뛰어나다고 알려져 있다. 플라보노이드에 결합된 hydroxy group의 개수와 결합 위치에 따라 항산화 활성이 나타나는 메커니즘이 영향을 받게 되며, 특히, 플라보노이드의 B ring의 3'4'-catechol moiety가 라디칼 소거 활성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.⁴² 이에 따라 부지화 잎, 가지에서 분리된 화합물 중 1개 이상의 hydroxy group 결합된 hesperidin, 6-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavone, 5-desmethylinensetin, 7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone이 나머지 PMF 화합물보다 우수한 radical 소거 활성을 갖는 것으로 사료된다.

Nobiletin, sinensetin 등의 PMF는 NO, PGE₂ 및 전염증성 cytokine을 억제하는 기전으로 항염 활성^{29,30}이 보고되어 있다. 부지화 잎, 가지에서 분리된 PMF 화합물 또한 실험을 통하여 NO의 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 이중 4개의 methoxy group과 1개의 hydroxy group을 갖는 유사한 구조의 세 화합물, 5-desmethylinensetin, 7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone, 6-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavone에 대하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성 억제 활성을 비교 분석한 결과, 세 화합물 모두 전염증성 cytokine의 생성을 억제시키는 것을 확인하였으며, 5-desmethylinensetin은 PGE₂의 생성 또한 억제시키는 것을 확인하였다. 반면에, 7-hydroxy-5,6,3',4'-tetramethoxyflavone과 6-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxyflavone은 PGE₂의 생성 억제에 영향을 미치지 않았다. 이를 통하여 플라보노이드의 5번 위치에 결합된 hydroxy group이 PGE₂의 생성 억제 활성에 관련이 있을 것이라 사료된다.

본 연구 결과를 바탕으로 부지화 잎, 가지 추출물 및 분리된 화합물의 우수한 항염 및 항산화 효과를 확인하였고, 이를 통해 버려지는 감귤 유래의 잉여자원인 부지화 잎, 가지가 기능성 식·의약품 및 화장품 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

VI. 참고문헌

1. Park, S. J.; Seong, D. H.; Park, D. S.; Kim, S. S.; Gou, J. G.; Ahn, J. H.; Yoon, W. B.; Lee, H. Y. Chemical Compositions of Fermented *Codonopsis lanceolata*, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2009**, 38, 396-400.
2. Jin, K. S.; Oh, Y. N.; Park, J. A.; Lee, J. Y.; Jin S. J.; Hyun, S. K.; Hwang, H. J.; Kwon, H. J.; Kim, B. W. Anti-Oxidant, Anti-Melanogenic, and Anti-Inflammatory Activities of *Zanthoxylum schinifolium* Extract and its Solvent Fractions, *Korean J Microbiol Biotechnol* **2012**, 40, 371-379.
3. 강성호; 박상규; 이영아; 오혁근; 최희욱; 황기준. 천연물 추출 및 분리 분석, *자유아카데미* **2015**.
4. Yoo, Y. C.; Lee, G. W.; Cho, Y. H. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Extracts from the Flowers of *Weigela subsessilis* on RAW 264.7 Macrophages, *Journal of Life Science* **2016**, 26, 338-345.
5. 차재영. 감귤류 플라보노이드의 생리기능 활성, *한국생명과학회* **2001**, 31, 19-24.
6. Yoon, Y. M.; Bae, S. H.; An, S. K.; Choe, Y. B.; Ahn, K. J; An, I. S. Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin and Skin Cell Signaling Pathways, *Kor J Aesthet Cosmetol* **2013**, 11, 417-426.
7. Kim, Y. S.; Lee, S. J.; Hwang, J. W.; Kim, E. H.; Park, P. J.; Jeong, J. H. Anti-Inflammatory Effects of Extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. Leaves on RAW264.7 Macrophages, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2012**, 41, 1205-1210.
8. Lee, H. N.; Lim, D. Y.; Lim, S. S.; Kim, J. D.; Yoon, J. H. Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract from *Eupatorium japonicum*, *Korean J Food Sci Technol* **2011**, 43, 65-71.

9. Lee, J. H.; Kim, J. H.; Kim, Y. I. Anti-inflammatory Effect of *Benincasae Semen* Herbal-acupuncture at KI10 on nephritis in rats, *Journal of Pharmacopuncture* **2010**, 13, 51-65.
10. Seo, J. E.; Hwang, E. S.; Kim, G. H. Antioxidative and Differentiation Effects of *Artemisia capillaris* T. Extract on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage of MC3T3-E1 Osteoblast Cells, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2011**, 40, 1532-1536.
11. Bae, S. J. Studies on the Antioxidative and Antimicrobial Effects of *Chondria crassicaulis*, *Journal of Life Science* **2004**, 14, 411-416.
12. Oh, S. K.; Kim, D. J.; Chun, A. R.; Yoon, M. R.; Kim, K. J.; Lee, J. S.; Jong, H. C.; Kim, Y. K. Antioxidant Compounds and Antioxidant Activities of Ethanol Extracts from Milling By-products of Rice Cultivars, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2010**, 39, 624-630.
13. Chae, J. W.; Cho, Y. J. Antioxidative Activity of Extracts from *Sambucus williamsii* var. coreana, *Korean J Plant Res* **2012**, 25, 363-371.
14. 이상협; 김화선; 조성원; 이중석; 고정삼. 가온재배한 한라봉감귤의 품질특성, *Korean J Food Preserv* **2006**, 13, 538-542.
15. Park, G. H.; Lee, S. H.; Kim, H. Y.; Jeong, H. S.; Kim, E. Y.; Yun, Y. W.; Nam, S. Y.; Lee, B. J. Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits, *J Fd Hyg Safety* **2011**. 26. 355-360.
16. Lee, K. H.; Suh, S. J.; Lee, K. H.; Yang, J. B.; Choi, S. U.; Park, S. S. Anti-inflammatory effect of peel extracts from citrus fruits. *J Fd Hyg Safety* **2013**. 28, 342-348.

17. Lim, H. J.; Seo, J. E.; Chang, Y. H.; Han, B. K.; Jeong, J. K.; Park, S. B.; Choi, H. J.; Hwang, J. N. Anti-obesity effects of jeju hallabong tangor (*Citrus kiyomi*×*ponkan*) peel extracts in 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2014**, 43, 1688-1694.
18. 현주미. 제주 재래귤, ‘부지화’ 미숙과 추출물 및 감귤 정유 성분의 기능성 화장품 소재화 연구, *제주대학교* **2016**, 박사학위논문.
19. 한샘. 한라봉으로부터 플라보노이드 성분의 분리 및 정량, *중앙대학교* **2010**, 석사학위논문.
20. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* **1981**, 58, 966-968.
21. 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 Ca²⁺-ATPase activity, *Cell Calcium* **1983**, 4, 71-81.
22. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, 181, 1199-1200.
23. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* **1999**, 26, 1231-1237.
24. Yoshihara, O.; Mitsuo, M. Biotransformation of Sinesetin by the Larvae of the Common Cutworm (*Spodoptera litura*), *Biol Pharm Bull* **2004**, 27, 1289-1292.
25. Ko, H. C.; Jang, M. G.; Kang, C. H.; Lee, N. H.; Kan, S. I.; Lee, S. R.; Park, D. B.; Kim, S. J. Preparation of a polymethoxyflavone-rich fraction (PRF) of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka and its antiproliferative

- effects, *Food chemistry* **2010**, 123, 484-488.
26. Benkiniouar, R.; Touil, A.; Zaidi, F.; Rhouati, S.; Chosoon, E.; Seguin, E.; Comte, G.; Bellbert, F. Isolation and Identification of Five free flavonoid aglycones from *Thymus numidicus*, *J Soc Alger Chim* **2010**, 20, 11-15.
27. Mizuno, M.; Yoshinobu, M.; Toshiyuki, T.; Hiroko, T.; Munekazu, I. Two New Flavones in *Citrus Reticulata*, *Journal of Natural Product* **1987**, 50, 751-753.
28. Shuyun, S.; Kelong, H.; Yuping, Z.; Suqin, L. Preparative isolation and purification of two flavonoid glycosides from *Taraxacum mongolicum* by high-speed counter-current chromatography, *Separation and Purification Technology* **2008**, 60, 81-85.
29. Shin, H. S.; Kang, S. I.; Yoon, S. A.; Ko, H. C.; Kim, S. J. Sinensetin Attenuates LPS-Induced Inflammation by Regulating the Protein Level of I κ B- α , *Biosci Biotechnol Biochem* **2012**, 76, 847-849.
30. 김세재; 고희철; 강성일; 신혜선; 강창희. 진굴 과피 추출물 또는 이로부터 분리한 폴리메톡시플라본을 유효성분으로 함유하는 염증 예방 또는 치료용 조성물, *대한민국 공개특허(공개번호 1020110134742)*, **2011**.
31. Nam, J. Y.; Lee, H. S.; Lee, S. W.; Chung, M. Y.; Yoo, E. S.; Rho, M. C.; Kim, Y. K. Effect of Kikkanol F Monoacetate and 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone Isolated from *Chrysanthemum indicum* L. on IL-6 Production, *Kor J Pharmacogn* **2005**, 36, 186-190.
32. Dao, P. T. A.; Quan, T. L.; Mai, N. T. T. Antioxidant Constituents from the Stem of *Tetrastigma erusbescense* Planch. (Vitaceae), *Natural Product Sciences* **2014**, 20, 22-28.
33. Lee, S. H.; Moon, B. H.; Park, Y. H.; Lee, E. J.; Hong, S. W.; Lim, Y. H.

- Methyl Substitution Effects on ^1H and ^{13}C NMR Data of Methoxyflavones, *Bull Korean Chem Soc* **2008**, 29, 1793-1796.
34. Rudrapaul, P.; Gruner, M.; Knleröker, H. J.; Dinda, B. Flavones and triterpenes from the leaves of *Vitex peduncularis*, *Indian Journal of Chemistry* **2015**, 54, 279-282.
35. Bai, S.; He, K.; Roller, M.; Lai, C. S.; Shao, X.; Pan, M. H.; Bily, A.; Ho, C. T. Flavonoid glycosides from *Microtea debilis* and their cytotoxic and anti-inflammatory effects, *Fitoterapia* **2011**, 82, 168-172.
36. Zhang, H.; Xi, W.; Zhou, Z.; Wang, H. L.; Bai, Z. Bioactivities and structure of polymethoxylated flavones in *citrus*, *Journal of Food, Agriculture & Environment* **2013**, 11, 237-242.
37. Manthey, J. A.; Grohmann, K.; Montanari, A.; Ash, K.; Manthey, C. L. Polymethoxylated Flavones Derived from Citrus Suppress Tumor Necrosis Factor- α Expression by Human Monocytes, *J Nat Prod* **1999**, 62, 441-444.
38. Yokozawa, T.; Chen, C. P.; Dong, E.; Tanaka, T.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical, *Biochemical Pharmacology* **1998**, 56, 213-222.
39. 박근홍, 감귤류 4종의 항산화 효과의 비교, *충북대학교* **2012**, 석사학위논문.
40. 오태현. 우묵사스레피 및 감귤류 미숙과를 이용한 향장품 소재 연구, *제주대학교* **2011**, 박사학위논문.
41. 고희철. 진귤, 제주조릿대 및 미역쇠 성분 동정 및 생리활성 연구, *제주대학교* **2010**, 박사학위논문.

42. Pannala, A. S.; Chan, T. S.; O'Brien, P. J.; Rice-Evans, C. A. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 282, 1161-1168.