



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](#)

박 사 학 위 논 문

황근 및 제주피막이 추출물의
기능성 화장품 소재 개발 연구

梁 旭 慧

제주대학교 대학원
화학과

2023년 8월

황근 및 제주피막이 추출물의 기능성 화장품 소재 개발 연구

이 논문을 이학 박사 학위논문으로 제출함

梁 旭 慧

제주대학교 대학원

화 학 과

지도교수 이 남 호

梁旭慧의 이학 박사 학위논문을 인준함

2023년 6월

심사위원장 尹景变 인
위 원 任 喜 貞 인
위 원 柳 銀 淑 인
위 원 金 基 玉 인
위 원 李 南 昊 인

Development of Functional Cosmetic Ingredients from *Talipariti hamabo* and *Hydrocotyle japonica*

A Dissertation submitted to the graduate school of
Jeju National University in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Doctor of
Philosophy in Chemistry
under the supervision of Nam Ho Lee

The dissertation for the degree of Doctor of Science
by LIANG XU HUI
has been approved by the dissertation committee.

2023. 6.

Chair Kyung-Sup Yoon

Member Hee-Jung Im

Member Em-Sook Yoo

Member Grok Kim

Member Nam Ho Lee

목 차

List of Tables	vi
List of Figures	viii
List of Abbreviations	xvi
Abstract	xviii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 시약 및 기기	8
2. 생리 활성 평가	9
1) 항산화	9
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	9
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	10
(3) DPPH radical 소거 활성 측정	11
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	12
(5) 세포 보호 효과	13
(1) HaCaT 세포 배양	13
(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	13
2) 항염	14
(1) RAW264.7 세포 배양	14
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	14
(3) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	14
(4) 세포 독성 평가 (MTT assay)	15
3) 항균	16
(1) 균주 배양	16
(2) Paper disc diffusion method	16

(3) MIC (minimum inhibitory concentration)	16
(4) MBC (minimum bactericidal concentration)	17
3. 통계 처리	17
III. 연구 1 : 황근 잎 추출물의 항염, 항산화 및 항균 활성 성분 연구	18
1. 재료	18
2. 황근 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	20
1) 시료의 추출 및 분획	20
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	21
(1) VLC에 의한 분리과정	21
3. 분리된 화합물의 구조 분석	23
1) Compound 1의 구조 동정	23
2) Compound 2의 구조 동정	26
3) Compound 3의 구조 동정	29
4) Compound 4의 구조 동정	32
5) Compound 5의 구조 동정	35
4. 황근 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	38
1) 추출물 및 분획물의 항산화 활성 실험 결과	38
(1) 총 폴리페놀 함량	38
(2) 총 플라보노이드 함량	39
(3) DPPH radical 소거 활성	40
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	41
2) 항염	42
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	42
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	44
3) 항균	46
(1) Paper disc diffusion method	46
(2) MIC 및 MBC	48
5. 요약 및 결론	49

IV. 연구 2 : 황근 가지 추출물의 항염, 항산화 활성 성분 연구	52
1. 재료	52
2. 황근 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	54
1) 시료의 추출 및 분획	54
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	55
(1) VLC에 의한 분리과정	55
3. 분리된 화합물의 구조 분석	57
1) Compounds 1-5의 구조 동정	57
2) Compounds 6, 7의 구조 동정	66
3) Compounds 8-10의 구조 동정	70
4) Compound 11의 구조 동정	76
5) Compound 12의 구조 동정	79
6) Compounds 13, 14의 구조 동정	82
5) Compound 15의 구조 동정	87
4. 황근 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	91
1) 추출물 및 분획물의 항산화 활성 실험 결과	91
(1) 총 폴리페놀 함량	91
(2) 총 플라보노이드 함량	92
(3) DPPH radical 소거 활성	93
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	94
2) 항염	95
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	95
(2) 전염증성 cytokine (TNF- α) 생성 억제 활성	97
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	98
1) 세포 보호 효과	98
(1) 세포 독성 평가 (MTT assay)	98
(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	99
2) 항염	101
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	101

(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	102
6. 요약 및 결론	105
V. 연구 3 : 제주피막이 지상부 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구	109
1. 재료	109
2. 제주피막이 지상부의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	111
1) 시료의 추출 및 분획	111
2) <i>n</i> -Hexane 분획물의 활성 성분 분리	112
(1) VLC에 의한 분리과정	112
3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	114
(1) VLC에 의한 분리과정	114
3. 분리된 화합물의 구조 분석	116
1) Compound 1, 2의 구조 동정	116
2) Compounds 3, 6, 8의 구조 동정	121
3) Compounds 4, 5, 7, 9의 구조 동정	127
4) Compound 10의 구조 동정	134
5) Compound 11의 구조 동정	137
6) Compound 12의 구조 동정	140
7) Compound 13의 구조 동정	143
8) Compound 14의 구조 동정	146
9) Compounds 15, 16의 구조 동정	149
10) Compounds 17, 18의 구조 동정	154
11) Compound 19의 구조 동정	159
12) Compound 20의 구조 동정	162
4. 제주피막이 지상부의 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	165
1) 추출물 및 분획물의 항산화 활성 실험 결과	165
(1) 총 폴리페놀 함량	165
(2) 총 플라보노이드 함량	166
(3) DPPH radical 소거 활성	167

(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	168
2) 항염	169
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	169
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	172
3) 항균	175
(1) Paper disc diffusion method	175
(1) MIC 및 MBC	177
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	179
1) 항산화	179
(1) DPPH radical 소거 활성	179
(2) ABTS ⁺ radical 소거 활성	181
2) 항염	183
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	183
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	186
6. 요약 및 결론	194
V. 최종 결론 및 고찰	201
VI. 참고문헌	203

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1	24
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 2	27
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 3	30
Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 4	33
Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 5	36
Table 6. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> leaves	40
Table 7. SC_{50} values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> leaves	41
Table 8. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> leaves	47
Table 9. MIC and MBC values of <i>T.hamabo</i> leaves on <i>S.epidermidis</i>	48
Table 10. Activities of isolated compounds from <i>T. hamabo</i> leaves	51
Table 11. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 1–5	60
Table 12. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 6, 7	67
Table 13. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 8–10	72
Table 14. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 11	77
Table 15. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 12	80
Table 16. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 13, 14	84
Table 17. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 15	89
Table 18. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> branches	93
Table 19. SC_{50} values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> branches	94
Table 20. Activities of isolated compounds from <i>T.hamabo</i> branches	107

Table 21. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 1, 2	118
Table 22. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 3, 6, 8	123
Table 23. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 4, 5, 7, 9	129
Table 24. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 10	135
Table 25. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 11	138
Table 26. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 12	141
Table 27. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 13	144
Table 28. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 14	147
Table 29. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 15, 16	151
Table 30. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 17, 18	156
Table 31. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 19	160
Table 32. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 20	163
Table 33. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>H. japonica</i> aerial parts	167
Table 34. SC_{50} values of ABTS^+ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>H. japonica</i> aerial parts	168
Table 35. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>H.</i> <i>japonica</i> aerial parts	176
Table 36. MIC and MBC values of <i>H. japonica</i> aerial parts on <i>S.epidermidis</i> and <i>c.acens</i>	178
Table 37. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of isolates 17-20 from <i>H. japonica</i> aerial parts	180
Table 38. SC_{50} values of ABTS^+ radical scavenging activities of isolates 17-20 from <i>H. japonica</i> aerial parts	182
Table 39. Activities of isolated compounds from <i>H. japonica</i> aerial parts	198

List of Figures

Figure 1. Anti-oxidative system inside human body	3
Figure 2. Chemical structures of anti-oxidants	3
Figure 3. Inflammation mechanism in macrophage cell	5
Figure 4. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents	9
Figure 5. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents	10
Figure 6. Picture of <i>Talipariti hamabo</i> leaves	19
Figure 7. Extraction and solvent fraction of <i>T.hamabo</i> leaves	20
Figure 8. Isolation of compounds from <i>T.hamabo</i> leaves	22
Figure 9. Chemical structure of compound 1	23
Figure 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in chloroform- <i>d</i>	25
Figure 11. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in chloroform- <i>d</i>	25
Figure 12. Chemical structure of compound 2	26
Figure 13. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in methanol- <i>d</i> ₄	28
Figure 14. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in methanol- <i>d</i> ₄	28
Figure 15. Chemical structure of compound 3	29
Figure 16. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in methanol- <i>d</i> ₄	31
Figure 17. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in methanol- <i>d</i> ₄	31
Figure 18. Chemical structure of compound 4	32
Figure 19. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in methanol- <i>d</i> ₄	34
Figure 20. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in methanol- <i>d</i> ₄	34
Figure 21. Chemical structure of compound 5	35
Figure 22. ¹ H-NMR spectrum of compound 5 in methanol- <i>d</i> ₄	37
Figure 23. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5 in methanol- <i>d</i> ₄	37
Figure 24. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from	

<i>T.hamabo</i> leaves	38
Figure 25. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> leaves	39
Figure 26. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> leaves	40
Figure 27. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> leaves	41
Figure 28. Effects of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells ·	42
Figure 29. Effects of Extract(A) and EtOAc(B) fraction from <i>T.hamabo</i> leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	43
Figure 30. Effects of EtOAc from <i>Talipariti hamabo</i> leaves on TNF- α (A), IL-6 (B) and PGE ₂ (C) production in LPS-induced RAW 264.7 cells	45
Figure 31. Picture of <i>Talipariti hamabo</i> branches	53
Figure 32. Extraction and solvent fraction of <i>T.hamabo</i> branches	54
Figure 33. Isolation of compounds from <i>T.hamabo</i> branches	56
Figure 34. Chemical structure of compounds 1-5	59
Figure 35. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in chloroform- <i>d</i>	61
Figure 36. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in chloroform- <i>d</i>	61
Figure 37. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in chloroform- <i>d</i>	62
Figure 38. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in chloroform- <i>d</i>	62
Figure 39. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in chloroform- <i>d</i>	63
Figure 40. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in chloroform- <i>d</i>	63
Figure 41. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in chloroform- <i>d</i>	64
Figure 42. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in chloroform- <i>d</i>	64
Figure 43. ¹ H-NMR spectrum of compound 5 in chloroform- <i>d</i>	65

Figure 44. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 in chloroform- <i>d</i>	65
Figure 45. Chemical structure of compounds 6, 7	66
Figure 46. ^1H -NMR spectrum of compound 6 in chloroform- <i>d</i>	68
Figure 47. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 in chloroform- <i>d</i>	68
Figure 48. ^1H -NMR spectrum of compound 7 in chloroform- <i>d</i>	69
Figure 49. ^{13}C -NMR spectrum of compound 7 in chloroform- <i>d</i>	69
Figure 50. Chemical structure of compounds 8 -10	71
Figure 51. ^1H -NMR spectrum of compound 8 in chloroform- <i>d</i>	73
Figure 52. ^{13}C -NMR spectrum of compound 8 in chloroform- <i>d</i>	73
Figure 53. ^1H -NMR spectrum of compound 9 in chloroform- <i>d</i>	74
Figure 54. ^{13}C -NMR spectrum of compound 9 in chloroform- <i>d</i>	74
Figure 55. ^1H -NMR spectrum of compound 10 in chloroform- <i>d</i>	75
Figure 56. ^{13}C -NMR spectrum of compound 10 in chloroform- <i>d</i>	75
Figure 57. Chemical structure of compound 11	76
Figure 58. ^1H -NMR spectrum of compound 11 in chloroform- <i>d</i>	78
Figure 59. ^{13}C -NMR spectrum of compound 11 in chloroform- <i>d</i>	78
Figure 60. Chemical structure of compound 12	79
Figure 61. ^1H -NMR spectrum of compound 12 in methanol- <i>d</i> ₄	81
Figure 62. ^{13}C -NMR spectrum of compound 12 in methanol- <i>d</i> ₄	81
Figure 63. Chemical structure of compounds 13, 14	83
Figure 64. ^1H -NMR spectrum of compound 13 in methanol- <i>d</i> ₄	85
Figure 65. ^{13}C -NMR spectrum of compound 13 in methanol- <i>d</i> ₄	85
Figure 66. ^1H -NMR spectrum of compound 14 in methanol- <i>d</i> ₄	86
Figure 67. ^{13}C -NMR spectrum of compound 14 in methanol- <i>d</i> ₄	86
Figure 68. Chemical structure of compound 15	88
Figure 69. ^1H -NMR spectrum of compound 15 in pyridine- <i>d</i> ₅	90
Figure 70. ^{13}C -NMR spectrum of compound 15 in pyridine- <i>d</i> ₅	90
Figure 71. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> branches	91

Figure 72. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> branches	92
Figure 73. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> branches	93
Figure 74. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> branches	94
Figure 75. Effects of extract and solvent fractions from <i>T.hamabo</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	95
Figure 76. Effect of <i>n</i> -Hex (A) and EtOAc (B) fraction from <i>T.hamabo</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	96
Figure 77. Effect of EtOAc fraction from <i>T.hamabo</i> branches on TNF- α production in LPS-induced RAW 264.7 cells	97
Figure 78. Cell protective effects of compound 15 from <i>T.hamabo</i> branches	98
Figure 79. (A) Cell viability on HaCaT cells damaged by H ₂ O ₂ . (B) Cell protective effects of compound 15 from <i>T.hamabo</i> branches on HaCaT cells damaged by H ₂ O ₂	100
Figure 80. Effects of isolated compound 15 from <i>T.hamabo</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	101
Figure 81. Effects of isolated compound 15 from <i>T.hamabo</i> branches on TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), PGE ₂ (D) and production in LPS-induced RAW 264.7 cells	104
Figure 82. Picture of <i>Hydrocotyle japonica</i>	110
Figure 83. Extraction and solvent fraction of <i>H. japonica</i> aerial parts	111
Figure 84. <i>n</i> -Hex isolation of compounds from <i>H. japonica</i> aerial parts	113
Figure 85. EtOAc isolation of compounds from <i>H. japonica</i> aerial parts	115
Figure 86. Chemical structure of compounds 1 , 2	117

Figure 87. ^1H -NMR spectrum of compound 1 in chloroform- <i>d</i>	119
Figure 88. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in chloroform- <i>d</i>	119
Figure 89. ^1H -NMR spectrum of compound 2 in chloroform- <i>d</i>	120
Figure 90. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 in chloroform- <i>d</i>	120
Figure 91. Chemical structure of compounds 3, 6, 8	122
Figure 92. ^1H -NMR spectrum of compound 3 in chloroform- <i>d</i>	124
Figure 93. ^{13}C -NMR spectrum of compound 3 in chloroform- <i>d</i>	124
Figure 94. ^1H -NMR spectrum of compound 6 in chloroform- <i>d</i>	125
Figure 95. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 in chloroform- <i>d</i>	125
Figure 96. ^1H -NMR spectrum of compound 8 in chloroform- <i>d</i>	126
Figure 97. ^{13}C -NMR spectrum of compound 8 in chloroform- <i>d</i>	126
Figure 98. Chemical structure of compounds 4, 5, 7, 9	128
Figure 99. ^1H -NMR spectrum of compound 4 in chloroform- <i>d</i>	130
Figure 100. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 in chloroform- <i>d</i>	130
Figure 101. ^1H -NMR spectrum of compound 5 in chloroform- <i>d</i>	131
Figure 102. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 in chloroform- <i>d</i>	131
Figure 103. ^1H -NMR spectrum of compound 7 in chloroform- <i>d</i>	132
Figure 104. ^{13}C -NMR spectrum of compound 7 in chloroform- <i>d</i>	132
Figure 105. ^1H -NMR spectrum of compound 9 in chloroform- <i>d</i>	133
Figure 106. ^{13}C -NMR spectrum of compound 9 in chloroform- <i>d</i>	133
Figure 107. Chemical structure of compound 10	134
Figure 108. ^1H -NMR spectrum of compound 10 in chloroform- <i>d</i>	136
Figure 109. ^{13}C -NMR spectrum of compound 10 in chloroform- <i>d</i>	136
Figure 110. Chemical structure of compound 11	137
Figure 111. ^1H -NMR spectrum of compound 11 in chloroform- <i>d</i>	139
Figure 112. ^{13}C -NMR spectrum of compound 11 in chloroform- <i>d</i>	139
Figure 113. Chemical structure of compound 12	140
Figure 114. ^1H -NMR spectrum of compound 12 in chloroform- <i>d</i>	142
Figure 115. ^{13}C -NMR spectrum of compound 12 in chloroform- <i>d</i>	142

Figure 116. Chemical structure of compound 13	143
Figure 117. ¹ H-NMR spectrum of compound 13 in chloroform- <i>d</i>	145
Figure 118. ¹³ C-NMR spectrum of compound 13 in chloroform- <i>d</i>	145
Figure 119. Chemical structure of compound 14	146
Figure 120. ¹ H-NMR spectrum of compound 14 in chloroform- <i>d</i>	148
Figure 121. ¹³ C-NMR spectrum of compound 14 in chloroform- <i>d</i>	148
Figure 122. Chemical structure of compounds 15, 16	150
Figure 123. ¹ H-NMR spectrum of compound 15 in methanol- <i>d</i> ₄	152
Figure 124. ¹³ C-NMR spectrum of compound 15 in methanol- <i>d</i> ₄	152
Figure 125. ¹ H-NMR spectrum of compound 16 in methanol- <i>d</i> ₄	153
Figure 126. ¹³ C-NMR spectrum of compound 16 in methanol- <i>d</i> ₄	153
Figure 127. Chemical structure of compounds 17, 18	155
Figure 128. ¹ H-NMR spectrum of compound 17 in methanol- <i>d</i> ₄	157
Figure 129. ¹³ C-NMR spectrum of compound 17 in methanol- <i>d</i> ₄	157
Figure 130. ¹ H-NMR spectrum of compound 18 in Dimethyl sulfoxide- <i>d</i> ₆ ..	158
Figure 131. ¹³ C-NMR spectrum of compound 18 in Dimethyl sulfoxide- <i>d</i> ₆ ..	158
Figure 132. Chemical structure of compound 19	159
Figure 133. ¹ H-NMR spectrum of compound 19 in methanol- <i>d</i> ₄	161
Figure 134. ¹³ C-NMR spectrum of compound 19 in methanol- <i>d</i> ₄	161
Figure 135. Chemical structure of compound 20	162
Figure 136. ¹ H-NMR spectrum of compound 20 in methanol- <i>d</i> ₄	164
Figure 137. ¹³ C-NMR spectrum of compound 20 in methanol- <i>d</i> ₄	164
Figure 138. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from <i>H. japonica</i> aerial parts	165
Figure 139. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from <i>H. japonica</i> aerial parts	166
Figure 140. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from <i>H. japonica</i> aerial parts	167
Figure 141. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent	

fractions from <i>H. japonica</i> aerial parts	168
Figure 142. Effects of extract and solvent fractions from <i>H. japonica</i> aerial partson NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	169
Figure 143. Effect of Extract (A), <i>n</i> -Hex (B), EtOAc (C) and <i>n</i> -BuOH (D) fraction from <i>H. japonica</i> aerial parts on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	171
Figure 144. Effects of Extract from <i>H. japonica</i> aerial parts on TNF- α (A) and IL-1 β (B) production in LPS-induced RAW 264.7 cells	173
Figure 145. Effects of isolated from <i>H. japonica</i> aerial parts on TNF- α (A) and IL-1 β (B) production in LPS-induced RAW 264.7 cells	174
Figure 146. DPPH radical scavenging activities of isolates 17-20 from <i>H. japonica</i> aerial parts	179
Figure 147. ABTS ⁺ radical scavenging activities of isolates 17-20 from <i>H. japonica</i> aerial parts	181
Figure 148. Effects of isolated Compound 10 (A), Compound 12 (B), Compound 16 (C) Compound 19 (D) from <i>H. japonica</i> aerial parts on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	185
Figure 149. Effects of isolated compound 10 from of <i>H. japonica</i> aerial parts on TNF- α (A), IL-6 (B) production in LPS-induced RAW 264.7 cells	187
Figure 150. Effects of isolated compound 12 from of <i>H. japonica</i> aerial parts on TNF- α (A), IL-6 (B), PGE ₂ (C) and L-1 β (D) production in LPS-induced RAW264.7 cells	189
Figure 151. Effects of isolated compound 15 from of <i>H. japonica</i> aerial parts on TNF- α (A), IL-6 (B), PGE ₂ (C) production in LPS-induced RAW2 64.7 cells	191
Figure 152. Effects of isolated compound 19 from of <i>H. japonica</i> aerial parts	

on TNF- α (A), IL-6 (B), PGE₂ (C) and IL-1 β (D) production in
LPS-induced RAW 264.7 cells 193

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BHT	Butylhydroxytoluene
brs	Broad singlet
CC	Column chromatography
CDCl ₃	Chloroform-d
CD ₃ OD	methanol-d ₄
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
dt	Doublet of triplets
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethyl acetate
Fr.	Fraction
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalent
GAM	Gifu anaerobic medium
H ₂ O	water
<i>H. japonica</i>	<i>Hydrocotyle japonica</i> Makino
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
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
m	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexane
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
PBS	Phosphate buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ROS	Reactive oxygen species
QE	Quercetin equivalent
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
t	Triplet
TLC	Thin layer chromatography
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TSB	Tryptic soy broth
<i>T. hamabo</i>	<i>Talipariti hamabo</i>
VLC	Vacuum liquid chromatography

Development of Functional Cosmetic Ingredients from *Talipariti hamabo* and *Hydrocotyle japonica*

LIANG XU HUI

Department of chemistry
The Graduate School
Jeju National University

Abstract

In this study, we investigated anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial constituents from *Talipariti hamabo* and *Hydrocotyle japonica* Makino.

Five constituents were isolated from the extract of *T. hamabo* leaves; oleic acid (1), isoquercetin (2), nicotiflorine (3), 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (4), *p*-hydroxyphenethyl-*trans*-ferulate (5). 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.

Upon the anti-oxidative studies with DPPH and ABTS⁺ radicals, potent radical scavenging activities were observed in the ethyl acetate (EtOAc) and *n*-Butanol (BuOH) fractions. *T. hamabo* leaves were in the anti-inflammatory tests using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells, the EtOAc fraction inhibited the nitric oxide (NO) production without causing cell toxicity, effectively. Moreover, the EtOAc fraction reduced pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and prostaglandin (PG) E₂. Also, the EtOAc and *n*-BuOH fractions showed anti-bacterial activities against *Staphylococcus epidermidis*.

Fifteen constituents were isolated from the extract of *T. hamabo* branches; methyl stearate (1), oleic acid (2), linolenic acid (3), α -linolenic acid (4), ethyl linolenate (5), friedelin (6), friedelinol (7), glutinol (8), 3β -olean-12-en-3-ol (9), oleanolic-acid (10), β -sitosterol (11), *p*-hydroxyphenethyl-*trans*-ferulate (12), caffeic acid (13), caffeic anhydride (14), triumfettalarein (15). 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.

On the anti-oxidative studies with DPPH and ABTS⁺ radicals, potent radical scavenging activities were observed in the EtOAc fractions. Also, for the cellular protective effects on HaCaT keratinocytes damaged by H₂O₂, compound 15 indicated protective effects against oxidative stress. *T. hamabo* branches were in the anti-inflammatory tests using LPS stimulated RAW 264.7 cells, the *n*-hexane(Hex) and EtOAc fraction inhibited the NO production without causing cell toxicity, effectively. Moreover, the EtOAc fraction reduced pro-inflammatory cytokines TNF- α and compound 15 reduced pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 β and PGE₂.

Twenty constituents were isolated from the extract of *H. japonica* aerial parts; (*E*)-phytol (1), neophytadiene (2), ethyl oleate (3), 1-monoolein (4), linolenic acid (5), ethyl linoleate (6), 1-linoleoyl glycerol (7), ethyl linolenate(8), 1-linolenoyl glycerol (9), 1,9-octadecadiene-4,6-diyn-3S-ol (10), β -sitosterol (11), capsidiol-3-acetate (12), (-)-hinokinin (13), chlorophyll-11 (14), (2S)-1-*O*-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-3-*O*- β -galactopyranosylglycerol(15), (2S)-1-*O*-(7Z,10Z,13Z-hexadecatrienoyl)-3-*O*- β -galactopyranosylglycerol(16), isorhamnetin-3-*O*- β -D-glucoopyranoside (17), quercetin-3-*O*- β -D-galactoside (18), quercetin 3-*O*-6''-caffeoyl- β -D-galactopyranoside (19), zizyflavoside (20).

Flavonoids compound 17, 18, 19, 20 in the anti-oxidative studies with DPPH and ABTS⁺ radicals potent radical scavenging activities were observed. In the

anti-inflammatory tests using LPS stimulated RAW 264.7 cells, the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-BuOH fraction inhibited the NO production without causing cell toxicity, effectively. Moreover, the extract and *n*-Hex fraction reduced pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . Compound **12,19** reduced pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 β and PGE₂. Compound **15** reduced pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and PGE₂. Compound **10** reduced pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6. Also, the EtOAc fractions showed anti-bacterial activities against *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*.

Based on these results, it was suggested that the extract and isolated compounds from *T. hamabo* and *H. japonica* could be potentially applicable as natural source for pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

I. 서론

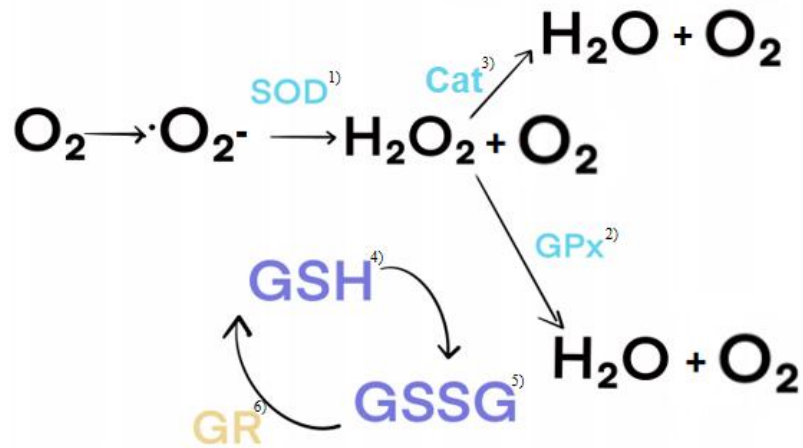
최근 건강하고 여유로운 삶이 요구되고 있는 가운데 기능성 화장품에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다. 이에 따라 최근의 화장품은 단순한 미용의 개념에서 진화하여 질병의 예방과 치료의 개념이 도입된 고기능성, 다기능성을 지닌 미백, 주름개선, 자외선 차단용과 같은 기능성 화장품(cosmeceuticals)이 큰 비중을 차지하고 있으며, 기능성 화장품 신소재의 개발도 활발하게 진행되고 있다.¹ 성별과 연령에 관계 없이 사람들은 건강하고 깨끗한 피부에 대한 관심이 높아지고 있으며, 지속적인 경제의 성장으로 사람들의 생활수준이 향상되고, 인간의 수명 또한 연장됨에 따라 고령화 인구 비율이 증가하고 있어 초고령화 사회로의 진입을 앞두고 있다. 노령인구의 증가로 인해 노화와 관련된 다양한 질병의 발생이 또한 증가하고 있으며, 이러한 질병의 발생은 노화에 의한 체내 항산화 시스템의 불균형과 복잡한 관계가 있다.² 이에 따라 식물 등 천연물로부터 얻어지는 기능성 물질들을 원료로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.³ 또한 이러한 요구에 대응하여 천연물을 중심으로 한 미백효과, 노화억제 및 자외선 차단 기능 등 유용한 소재에 대한 개발이 이루어지고 있다.⁴

1. 항산화

피부 노화의 대표적 원인 물질 중 하나인 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 대사과정에서도 생성될 수 있으며, 지속적인 자외선 노출로 인해 피부의 광산화적 손상을 유발시키기도 한다.^{5,6} 그 중 피부 노화는 내인성과 외인성 노화의 두 가지 유형으로 나눌 수 있다. 내인성 노화는 인간의 지속적인 성장과 연령의 점진적인 증가에 따른 자연적 및 유전적 요인에 의한 노화를 말하며, 외인성 노화는 자외선 및 외부 자극 환경의 지속적인 노출로 인해 유발되며, 이러한 외부요인에 의한 노화는 피부 노화에 큰 영향을 미친다.⁷ 외인성 노화의 요인인 각종 스트레스, 자외선 조사, 환경오염 물질, 체내 대사작용 등은 인체 내 프리라디칼 생성을 촉진시키지만 체내 방어 시스템인 항산화 물질과 항산화 효소에 의해 제거된다. 그러한 보호막이 파괴되면서 잔류한 프리라디칼은 노화를 촉진할

뿐만 아니라 생체 조직에 손상을 줄 수 있다.⁸ Nitric oxide, superoxide 라디칼, nitrogen dioxide, peroxy, hydroxyl, hydroperoxy, alkoxy 등과 같은 활성산소 종들은 인간의 대사과정에서 발생한 물질이지만 인체 내 세포에 손상을 유발하여 노화와 관련된 질병의 주요 인자로 작용하고 있다.⁹ 활성산소종은 많은 호기성 세포 대사 과정에서 생성되며, 여기에는 지질, 단백질, DNA를 포함한 다양한 세포 내 표적과 반응하는 superoxide, 과산화수소 등이 포함된다.¹⁰ ROS는 정상적인 호기성 대사 중에도 생성되지만, 산화적 스트레스 동안에도 증가하며, 이는 세포 사멸, 돌연변이, 염색체 이상, 암 발생 등을 초래할 수 있다.¹¹ 세포 내 ROS의 농도는 항산화 효소의 영향을 받는데, 주요 항산화 효소 3가지는 superoxide dismutase (SOD), catalase, 그리고 glutathione peroxidase (GPx)이다.¹² SOD는 superoxide 라디칼을 과산화수소와 O₂로 변환시키는 반면, catalase는 과산화수소를 물과 O₂로 변환시킨다.¹³ 체내 활성산소는 catalase, superoxide dismutase 등과 같은 항산화제에 의해 억제되어 활성산소로 인한 질병을 예방할 수 있다¹⁴(Figure 1).

프리라디칼을 억제할 수 있는 외부천연 항산화제로는 비타민 C (L-ascorbic acid), 비타민 E, β-carotene 등이 있다.¹⁵ 대표적으로 많이 쓰이는 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)은 경제적이고 효과가 우수하다는 장점이 있지만, 안전성에 대한 논란이 있어 현재는 사용량이 감소하는 추세이며, 이로 인해 천연물 유래 항산화제에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있는 실정이다¹⁶(Figure 2).



- 1) SOD: superoxide dismutase 2) GPx: glutathione peroxidase 3) Cat: Catalase
 4) GSH: Glutathione 5) GSSG: L-Glutathione oxidized 6) GR: Glutathione reductase

Figure 1. Anti-oxidative system inside human body.

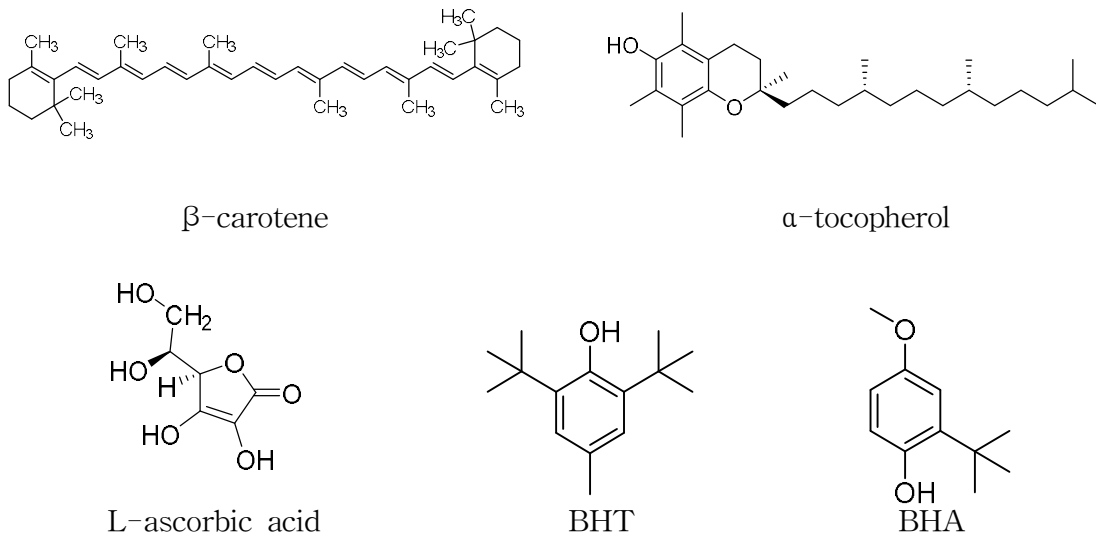


Figure 2. Chemical structures of anti-oxidants.

2. 항염

그람-음성균(gram-negative bacteria)의 세포 외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포 외막으로부터 방출되어 패혈증과 패혈증성 쇼크를 일으킨다. LPS는 RAW 264.7과 같은 단핵 식세포(macrophage 또는 monocyte)로부터 다양한 염증 반응 인자로 알려진 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β 와 같은 염증 전구 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)을 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{17,18} 특히 TNF- α , IL-1 β 는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도한다. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 산화질소(nitric oxide, NO)를 생성한다.¹⁹ 일반적인 NO 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 과도한 NO 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.²⁰

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다.²¹ COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 PGs의 합성 등 정상적인 생체 기능에 작용하며, COX-2는 동물이나 인간의 염증 반응 부위에서 발견된다. COX-2에 의한 PGs의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있으며, 염증매개물질이 PGE₂를 형성시킨다. PGE₂는 염증반응, 면역반응 및 혈관형성(angiogenesis) 촉진 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.^{22,23} 따라서, arachidonic acid로부터 PGs류를 합성하는데 관련된 효소인 COX-2는 염증을 차단하는데 주된 목표가 되고 있다.

인체피부는 해부학적으로 외부와의 경계면에 위치하여 다양한 감염원들인 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 알레르기 유발 인자 및 자외선에 항상 노출되어 있다. 정상적인 경우, 인체 피부에서는 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 치유의 작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 과도하게 작용하게 되면 알러지 반응이나 아토피 피부염, 접촉성 피부염과 같은 만성염증 반응을 초래하게 된다.²⁴ 구체적인 예로서 인체피부가 장기간 태양광선에 노출될 경우, 자외선은 활

성산소종을 유발하게 된다. 또한 과량의 ROS 발생은 산화 환원 불균형 상태를 일으켜 표피와 진피를 구성하는 세포와 세포 사이의 기질, 혈관 등에서 염증을 유발하는 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 및 효소(iNOS, COX-2), 그리고 이들 효소의 산물들인 PGE₂, 산화질소(NO)등이 생성되어 만성 염증상태가 된다.²⁵⁻²⁷ 따라서 항염증 효능 소재들은 피부 자극완화 효과가 필요한 화장품류와 더불어 여드름 및 아토피를 완화하는데 도움을 주는 화장품류에 자주 활용되고 있다. 이러한 소재들은 화장품 배합시 피부 안전성 면에서 부작용이 없어야 한다. 한편, 최근에는 안전하고 효과가 우수한 천연물 유래의 자극완화 소재 및 화장품 개발이 증가되고 있는 추세이다²⁸ (Figure 3).

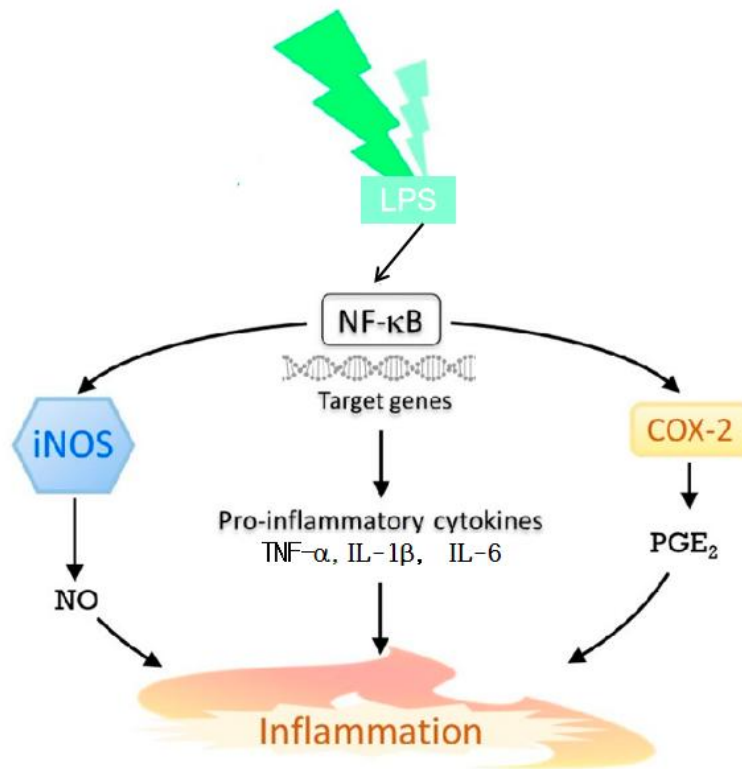


Figure 3. Inflammation mechanism in macrophage cell.

3. 항균

여드름은 면포, 구진, 낭종, 결절, 색소 침착 등 다양한 피부병변으로 얼굴, 등, 가슴에 호발하는 모낭 피지선의 만성 염증질환이다. 여드름의 발생시기는 사춘기 부터 성인기까지 발생 연령대가 다양해지고 있다. 여드름의 중증도가 심해질 경우 수치심, 우울증, 대인기피증, 자신감 저하를 유발하고, 삶의 질을 낮추는 등 생활에 미치는 영향을 간과할 수 없다.²⁹

여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 피부질환으로, 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 사춘기 나이에 분비되기 시작하는 안드로젠은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 과각화를 일으키며, 이로 인해 모낭이 막힘에 따라 모낭내부가 *Cutibacterium acnes*를 비롯한 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다.^{30,31} 동시에 *Staphylococcus epidermidis*와 같은 세균들이 모낭 주위에서 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다.³² 여드름 원인균인 *C. acnes*는 피부 내에 존재하는 상재균으로 정상상태에서는 피부면역 시스템에 의해 관용된다. 그러나 안드로젠의 과다 분비에 의한 피부지방 조성의 불균형 및 *C. acnes*의 증식으로 인하여 여드름과 같은 피부질환이 발생한다.³³ 호기성균인 *S. epidermidis*는 외모낭이나 모낭의 중간에서 성장하며, 원발성 피부질환 및 여드름 증상의 속발성을 악화시키는 원인균이다. 이러한 *C. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 주로 사용되고 있다.

현재 여드름 치료제로 쓰이고 있는 약제로는 retinoid, benzoyl peroxide, clindamycin, erythromycin, triclosan 등과 같이 화장품 응용이 부적합한 의료용 항생제나 화학 합성품들이 대부분이며, 이들은 피부자극, 간독성, 내성 발생 등의 부작용이 알려져 있다.^{34,35} 따라서 여드름 피부에 효과적이고 피부에 안전하며 부작용을 최소화 할 수 있는 천연 항균물질에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이며, 많은 연구자들이 이러한 여드름 치료제를 개발하려고 노력 중이다.³⁶

따라서 본 연구에서는 제주도 자생 식물인 황근 잎, 가지 및 제주피막이 지상부를 추출 하고 극성별 용매 분획물을 제조하여 항산화, 항염, 항균 활성을 확인하

고 크로마토그래피, NMR 등을 이용해 유효 성분을 분리·동정하였다. 또한 분리된 화합물의 효능 및 작용기전을 규명하여 화장품 또는 의약품, 식품분야의 천연 소재로써 응용 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 활성 성분 분리에 사용된 용매들은 Merck, OCI 및 대정화금의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co.)을 사용하였고, gel filtration chromatography (GFC)에는 SephadexTM 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 사용하였으며 TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나 발색 시약에 침적시킨 후 heat gun을 사용하여 건조시켰다. 발색 시약으로는 KMnO₄ 수용액 (3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 anisaldehyde (1% anisaldehyde-5% H₂SO₄)를 사용하였다.

화합물의 구조 분석을 위해 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance) spectrometer는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆, pyridine-*d*₅를 사용하였다.

2. 생리 활성 평가

1) 항산화

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis 방법³⁷을 사용하여 실험하였다. 정량을 위한 표준 검정 곡선(standard calibration curve)에는 gallic acid를 표준물질로 사용하였다. 농도별로 희석한 gallic acid 표준 용액과 시료를 100 μ L씩 취한 후 증류수 900 μ L를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 그 다음, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 첨가하여 상온에서 3분 반응시킨 후 7%(w/v) Na_2CO_3 용액 200 μ L를 첨가하여 혼합한 후 증류수 700 μ L을 넣어 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 반응 후 96 well plate에 옮기고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값을 표준 검정 곡선에 대입하여 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양으로 환산하였다. 표준 검정 곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 4).

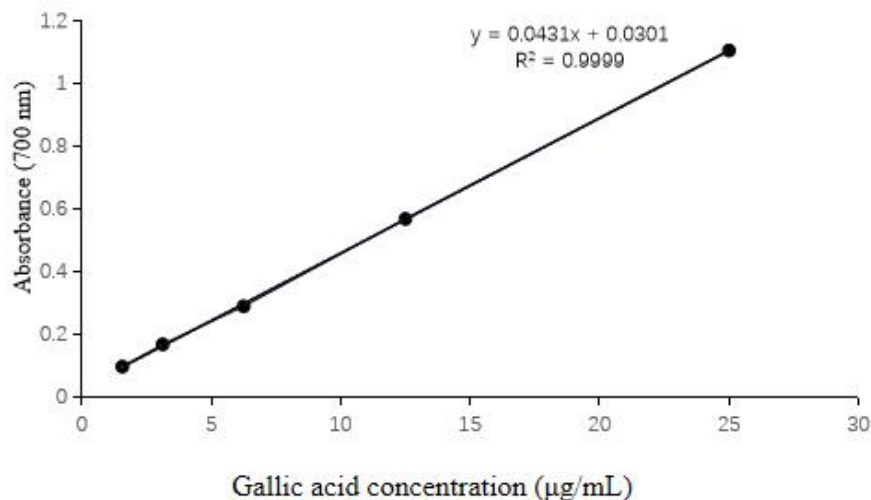


Figure 4. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Moreno 등의 방법³⁸을 사용하여 실험하였다. 표준 검정 곡선(standard calibration curve)에는 quercetin을 표준물질로 사용하였다. 농도별로 희석한 시료 100 μL , 95% EtOH 300 μL , 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 20 μL , 1 M CH_3COONa 20 μL , 증류수 560 μL 각각 첨가하여 1 mL가 되도록 혼합하였다. 상온에서 30분 동안 반응시킨후 96 well plate에 옮기고, microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준 검정 곡선(standard calibration curve)을 이용해 구하였으며 표준 검정 곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 5).

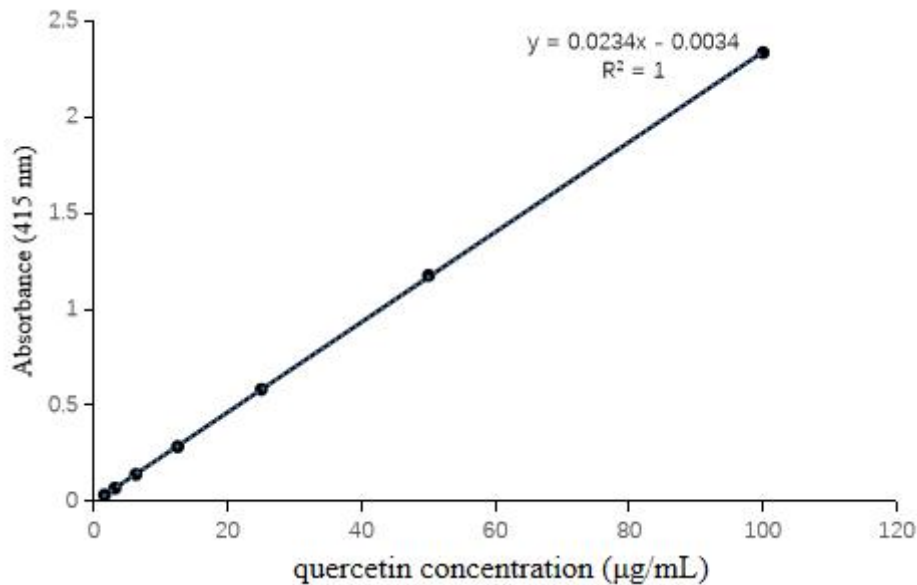


Figure 5. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents.

(3) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH radical 소거 활성 실험 Blois의 방법³⁹을 응용하여 실험하였다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical을 합성한 단일전자, 안정적인 질소 중심 상자성 화합물이다. 라디칼 제거제가 존재할 때 DPPH 자유 라디칼은 전자 또는 수소 원자를 받아 안정한 DPPH-H 화합물을 형성한다. 그의 변색 정도는 수신된 전자의 수와 정량적으로 관련이 있다. 보라색의 DPPH 라디칼이 항산화제와 반응하게 되면 라디칼이 소거되면서 노란색으로 변할 수 있다. DPPH 시약은 EtOH를 사용하여 0.2 mM로 희석한 다음 사용하였다. 96 well plate에 시료를 각각 20 µL씩 넣고 0.2 mM DPPH 용액을 180 µL씩 가하여 상온에서 15분 간 반응시켰다. 반응시킨 후, microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음과 같은 식을 이용하여 라디칼 소거율을 %로 계산하였으며, 시료가 라디칼을 50% 소거할 때의 농도(SC₅₀)를 구하였다. 양성 대조군(positive control)에는 BHT를 사용하였다.

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

Abs_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

Abs_{sample} : 515 nm에서 시료와 DPPH 반응액의 흡광도

Abs_{blank} : 515 nm에서 시료 자체의 흡광도

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법⁴⁰을 응용하여 실험하였다. ABTS는 K₂S₂O₈과 황산칼륨에 의해 산화되어 청록색의 자유 라디칼 양이온 ABTS⁺을 생성 할 수 있다. 청록색의 ABTS⁺는 항산화제에 의해 환원되어 무색의 ABTS가 된다. 이 실험은 흡광도가 감소하는 것을 측정하여 항산화 능력을 확인하는 실험이다. ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해 7.4 mM ABTS 용액과 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 상온 및 암실에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. ABTS⁺ 용액은 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.02가 되도록 ethanol로 희석하여 실험에 사용하였다. 실험은 96 well plate에 시료를 농도별로 각각 20 µL씩 가 한 후 희석한 ABTS⁺ 용액 180 µL을 첨가하여 상온에서 15 분간 반응시켰다. 반응 시킨 후 microplate reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료가 라디칼을 50% 소거할 때의 농도(SC₅₀)를 계산하였다. 양성 대조군(positive control)에는 BHT를 사용하였다.

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

Abs_{control} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

Abs_{sample} : 700 nm에서 시료와 ABTS 반응액의 흡광도

Abs_{blank} : 700 nm에서 시료 자체의 흡광도

(5) 세포 보호 효과

1) HaCaT 세포 배양

Immortalised human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 Korean Cell Line Bank (KLCB)로부터 분양 받아 실험에 사용하였으며, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% fetal bovin serum (FBS)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였고, 3일 에 한번 계대 배양하였다.

2) 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

HaCaT cell을 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 전배양하였다. 전배양시킨 cell의 배지를 제거하고 세포독성 평가로 결정된 농도의 과산화수소를 처리하여 배양하였다. 20분 후 과산화수소를 제거하고 dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)로 2회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 처리하고 24시간 배양한 후 MTT assay 로 세포생존율(%)을 계산하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다.

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

2) 항염

(1) RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 cell은 마우스 대식세포 (Murine macrophage cell line)인 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양받았다. 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA) 이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고 2일에 한번 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

24 well plate에 RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 배양하였다. 이후, cell을 100 ng/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 sample을 농도별로 각각 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양시킨 후, 생성된 NO의 양을 측정하기 위해 96 well plate에 세포 상등액 100 µL와 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. Sodiumnitrite (NaNO₂)을 사용하여 표준 검정 곡선(standard curve)을 작성하여 정량하였다. 표준 검정곡선의 r² 값은 0.99 이상이었으며 양성대조군 (positive control)으로는 2-amino-4-picoline (5 µM)을 사용하였다.

(3) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하여 TNF-α, IL-6, IL-1 β 및 PGE₂의 생성량을 측정하였다. RAW264.7 세포(2×10^5 cell/well)를 18시간 동안 배양한 다음 세포를 LPS(1 µg/mL) 및 농도별 샘플을 처리하여 24시간 동

안 배양하였다. 그 후, 상등액을 취하고 ELISA kit (TNF- α (BD Biosciences), IL-6 (invitrogen, USA), PGE₂ (R&D Systems, USA), IL-1 β (R&D Systems, USA)를 사용하여 정량하였다. 표준 검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

(4) 세포 독성 평가(MTT assay)

세포독성 평가는 MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 이용하였다. 24 well plate에 RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전배양하였다. 배양 시킨 cell을 100 ng/mL의 LPS가 포함된 배지로 교환한 후 sample을 농도별로 각각 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 500 μ g/mL의 농도로 MTT 시약을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 3시간 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 후 96 well plate 옮긴 다음 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

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

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응 용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료 반응 용액의 흡광도

3) 항균

(1) 균주배양

피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM3709, CCARM 3710, CCARM 3711) 와 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)는 항생제 내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *S. epidermidis*는 배양 배지를 TSB (tryptic soy broth)로 사용하여 37°C Incubator에서 호기성 조건으로 24시간 마다 계대 배양하였다. *C. acnes*는 배양 배지를 GAM (gifu anaerobic medium)으로 하여, 37°C Incubator에서 혐기 상태로 48시간 마다 계대 배양하였다.

(2) Paper disc diffusion method

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 paper disc diffusion 법을 실시하여 각 균주에 대한 생육 저지환을 확인하였다. *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)의 균수를 조절하여 0.8% agar를 포함하는 소프트 배지에 넣고 1.5% agar를 포함하는 고체 배지 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다. *C. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)는 위와 같은 방법으로 실시하고 37°C에서 48시간 혐기 배양한 후 형성된 생육 저지환의 크기를 측정하였다.

*S. epidermidis*는 1.5×10^6 그리고 *C. acnes*는 5.0×10^7 CFU/mL로 균수를 맞추었으며, 양성 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

(3) MIC (minimum inhibitory concentration)

최소 억제 농도 (MIC)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소 농도로 미생물에 대한 MIC 값이 낮을수록 시료 물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고

할 수 있다. MIC 측정은 액체 배지 희석법을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 two-fold-dilution 법으로 시료의 농도를 두 배씩 묶힌 배지 100 μ L와 2.0×10^5 CFU/mL로 조절한 균 100 μ L를 넣어주었다. *S. epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *C. acnes*는 37°C에서 48시간 혐기 조건하에서 배양하여 균의 증식이 나타나지 않는 최소 농도를 확인하였다.

(4) MBC (minimum bactericidal concentration)

MIC는 균의 최소 억제 농도로서 균이 모두 사멸했음을 의미하는 것이 아니므로 균의 최소 사멸 농도 (MBC)를 확인하기 위해 MIC 값 이상의 시료 배양액을 고체 배지에 획선 도말하여 배양한 후 colony의 형성 여부를 확인하여 균이 전혀 자라지 않은 농도를 MBC 값으로 하였다. MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 사용해 시료 배양액을 찍어내어 1.5% agar를 포함하는 고체배지에 도말한 후 *S. epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *C. acnes*는 37°C에서 48시간 혐기조건 하에서 배양하여 colony가 형성되지 않는 최소 농도를 확인하였다.

3. 통계 처리

본 연구에서 진행한 모든 실험은 동일 조건 하에서 3회 반복 실시하였다. 모든 실험 결과는 평균 (mean) \pm 표준편차 (standard deviation)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Excel software (version 2020, Microsoft Corp., Washington, USA)를 사용하여 student's *t*-test를 실시하여 평가하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계적 검정 후 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미 있다고 판단하였다. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

Ⅲ. 연구 1 : 황근 잎 추출물의 항염, 항산화 및 항균 활성 성분 연구

1. 재료

황근(*Talipariti hamabo*)은 아욱과(Malvaceae) 식물인 주로 중국, 한국, 일본에 분포한다. 아욱과에 속하는 황근의 학명을 한국의 식물도감이나 국가표준식물목록에서는 대부분 “*Hibiscus hamabo* Siebold & Zucc.”을 정명으로 하고 있다. 그러나 이후 일본의 식물분류학자 Nakai는 속명을 ‘Hibiscus’에서 ‘Pariti’로 변경하여 “*Pariti hamabo* (Siebold & Zucc.) Nakai(1936)”으로 이명 처리하였다. 최근 APG III의 계통학적 분류체계에서 미국의 식물학자 Fryxell, Paul Arnold는 속명 ‘Pariti’를 다시 ‘Talipariti’로 변경하여 “*Talipariti hamabo* (Siebold & Zucc.) Fryxell(2001)”로 이명 처리하였다.^{41,43}

황근은 해안가에 나는 낙엽관목으로 높이 1 m 내외이고 식물체에 황외색 성모(여러 갈래로 갈라져 별 모양의 털)가 밀생한다. 잎은 어긋나고 달걀을 거꾸로 세운 모양의 원형이며 가장자리에 잔 톱니가 있다. 꽃은 7~8월에 피고 가지 끝의 잎겨드랑이에 달리며 황색이고 안쪽 밑부분은 검은 홍색이다. 작은 포는 8~10개가 중앙부까지 합쳐지고 꽃받침 조각과 꽃잎은 5개씩이다. 수술은 많고 수술대가 합생한다. 암술대는 5개이고 암술머리는 검은 홍색이다. 열매는 삭과(蒴果)로 8~9월에 결실하며 달걀 모양으로 뾰족하고 잔털이 있으며 5개로 갈라진다. 약용은 주로 전초 혹은 뿌리를 사용한다. 약용효과는 주로 살충, 해독, 해열, 이뇨 적용 등의 효능이 있다.⁴²

황근 잎은 호생하며 편원형 또는 도란상 원형이고 급한 예두이며 원저 또는 아심장저이고 두꺼우며 길이 3~6 cm, 너비 3~7 cm로서 표면에 털이 약간 있고 뒷면에 회백색 밀모가 있으며 가장자리에는 둔거치가 있다. 엽병은 길이 8~20 mm이고 탁엽은 길이 10 mm정도로서 빨리 떨어진다.⁴³

한국에서는 제주도의 용암 해안지역 염습지 주변에 자라며, 전라남도 해남, 고흥, 완도 등의 남해안 섬지역 표고 50 m 이하의 하구 또는 해안가의 자갈층 진흙이나 모래땅에서 아주 드물게 자라는데 주로 다육성 식물이나 덩굴성 식물과 같이

어우러져 산다.^{44,45}

현재까지 보고된 황근 관련문헌 중, 황근속(또는 무궁화속) 아욱과 식물 추출물에 대한 분리된 화합물 및 항산화, 항염 및 미백활성등 관한 연구가 있지만, 황근에 대한 분리된 산물이나 효능관련 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 황근 잎 추출물의 활성 성분을 분리, 구조 동정하여, 항산화, 항염 및 항균 효능 연구를 진행 하였다.

본 연구에 사용한 황근 잎은 2020년 12월에 제주도 한림읍 상대리에서 채집하였다(시료번호:504). 채집한 황근 잎은 40℃에서 건조시킨후 분쇄하여 사용하였다 (Figure 6).



Figure 6. Picture of *Talipariti hamabo* leaves.

2. 황근 잎의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 시료의 추출 및 분획

건조 및 분쇄된 황근잎 1 kg을 70% 에탄올 20 L에 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치 및 filter paper를 이용하여 추출액을 여과하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 얻어진 추출물 여액은 40°C 이하의 수욕상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물은 233.2 g을 얻었다. 얻어진 70% 에탄올 추출물을 150 g을 증류수 1 L에 현탁시키후, 분액 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane(*n*-Hex), ethyl acetate(EtOAc), *n*-butanol(*n*-BuOH), water(H₂O) fraction을 얻었다(Figure 7).

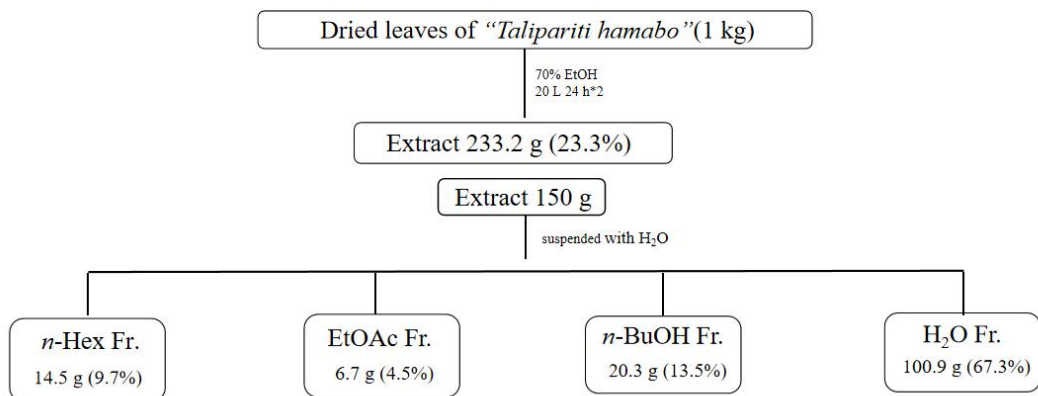


Figure 7. Extraction and solvent fraction of *T.hamabo* leaves.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

(1) VLC에 의한 분리과정

Ethyl acetate 분획물 5.0 g을 무게를 달후 극성 크기별로 나누기 위해 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (5-50%)가 될 때 까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 300 mL씩 용출하여 총 32개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-32).

VLC fraction중 Fr. V9 (82 mg)를 감압 농축한 후에 단일 compound 1을 얻었다.

Fr. V18-19 (200 mg)는 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=15:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 5 (31 mg)를 얻고 V20-21 (220 mg)은 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=5:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 5 (63.4 mg)를 얻었다.

Fr. V22-23 (160.2 mg)은 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=5:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 4 (10.9 mg)를 얻었다.

Fr. V24 (794 mg)는 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=3:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 2와 compound 4가 혼합(41 mg)된 형태로 분리하였다.

Fr. V26 (743 mg)은 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=1.5:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 3 (111 mg)을 얻었다(Figure 8).

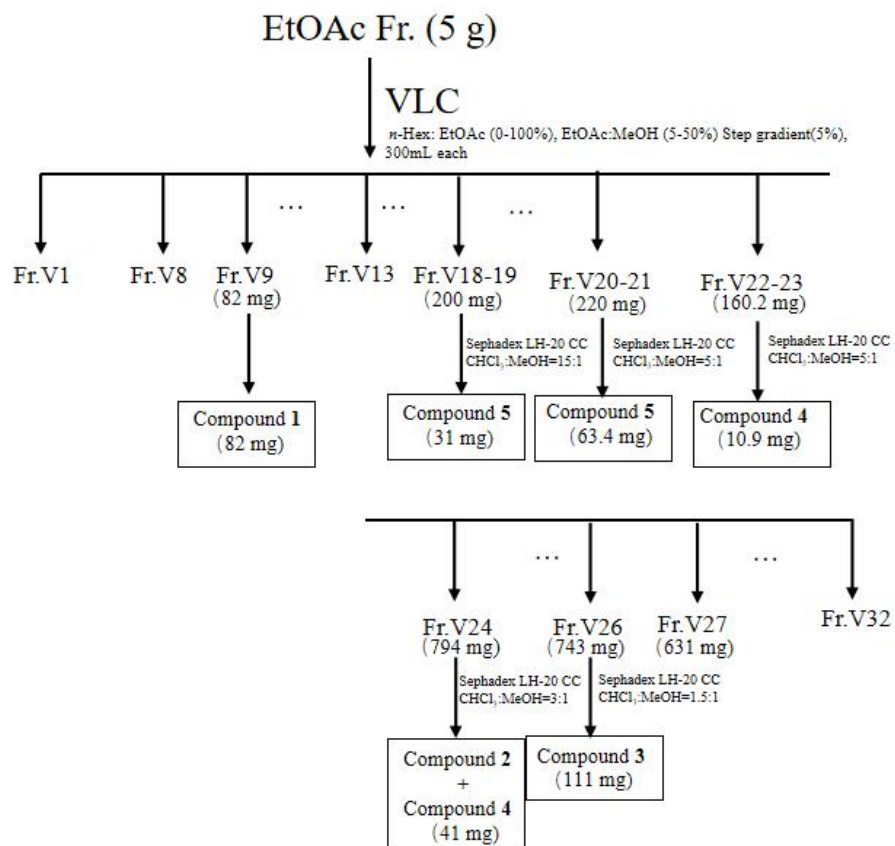


Figure 8. Isolation of compounds from *T.hamabo* leaves.

3. 분리 된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 18개 카본 피크를 관찰되었으며 δ_{C} 178.1피크를 통해 carbonyl group을 가지고 있음을 확인하였고 δ_{C} 130.8, 131.0피크 및 δ_{H} 5.32(2H) 피크를 통하여 이중결합을 1개 가지고 있을 것으로 예상하였다. δ_{H} 0.86 (3H, t, 6.9) 및 δ_{C} 14.6 피크를 통해 methyl group이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 이중결합이 1개 있는 불포화 지방산을 예상하며 문헌^{46,47}을 확인한 결과, Compound 1은 oleic acid로 확인되었다(Figure 9-11, Table 1).

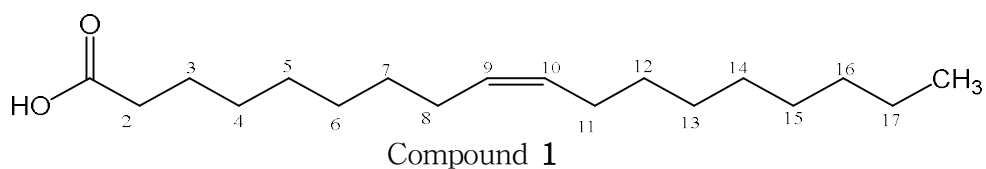


Figure 9. Chemical structure of compound 1.

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

No.	Compound 1	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		178.1
2	2.3 (2H, t, 7.6)	33.9
3	1.61 (2H, m)	25.0
4	1.29 (2H, m)	29.6
5	1.29 (2H, m)	29.5
6	1.29 (2H, m)	29.4
7	1.29 (2H, m)	29.9
8	1.99 (2H, m)	27.4
9	5.32 (1H, m)	130.0
10	5.32 (1H, m)	130.2
11	1.99 (2H, m)	27.4
12	1.29 (2H, m)	30.0
13	1.29 (2H, m)	29.7
14	1.29 (2H, m)	29.8
15	1.29 (2H, m)	29.7
16	1.29 (2H, m)	32.1
17	1.29 (2H, m)	22.9
18	0.86 (3H, t, 6.9)	14.3

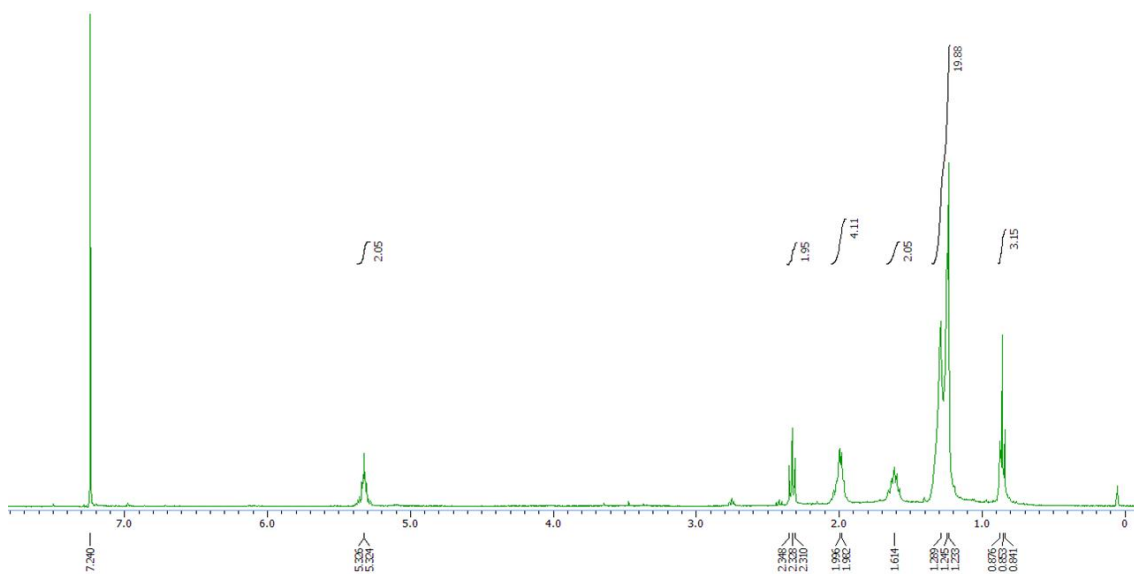


Figure 10. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **1** in chloroform-*d*.

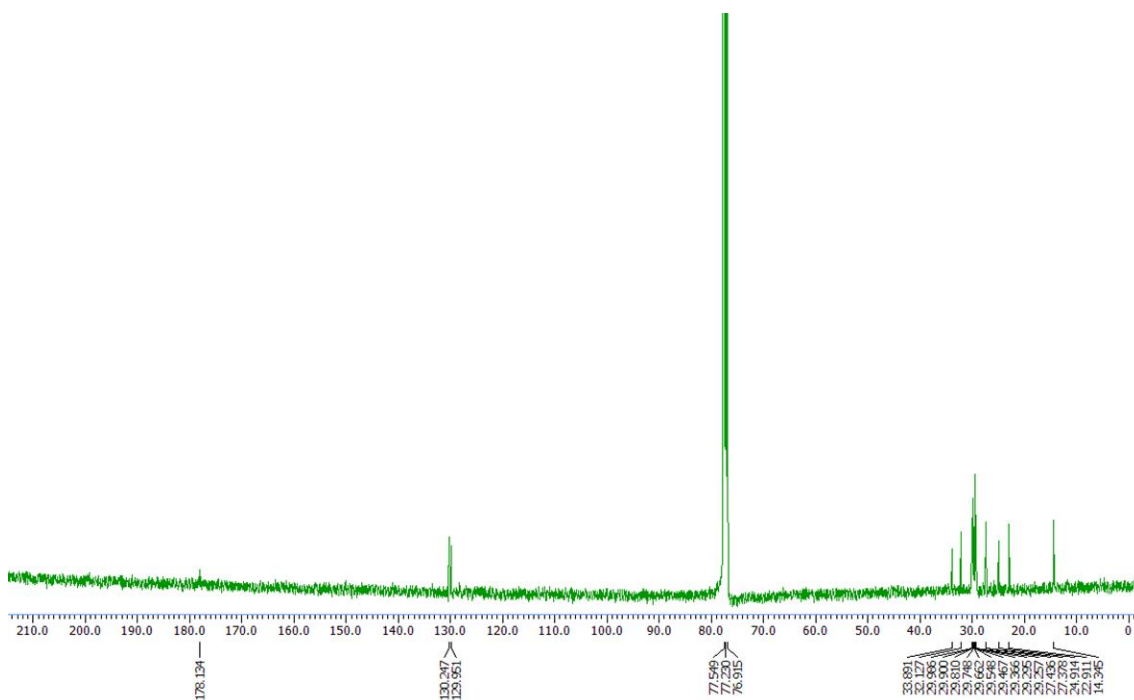
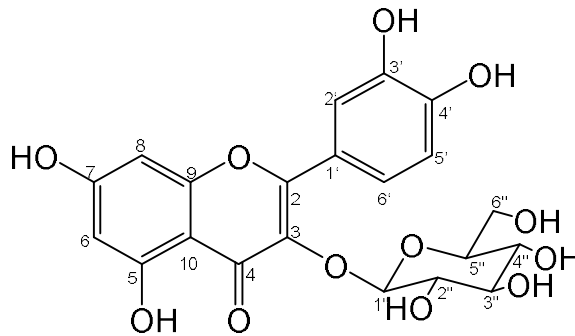


Figure 11. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **1** in chloroform-*d*.

2) Compound 2의 구조 동정

Compound 2는 ^{13}C NMR spectrum에서 총 21개 카본 피크를 관찰되었으며 δ_{H} NMR 데이터를 통해 2개 aromatic ring 구조를 가지고 있음을 예상하였다. 그리고 ^{13}C NMR에서 당은 카본피크를 제외한 15개의 카본피크로 부터 flavonoid 골격 화합물을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.20 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 및 6.39 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. δ_{H} 7.71 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 8.7$ Hz) 및 7.59 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 나머지 δ_{H} 5.26 (1H, d, $J = 7.3$ Hz) 피크는 aromatic proton으로 coupling constant 값과 δ_{C} 62.7-104.4의 6개 카본 피크를 통해 β -form의 glucopyranoside를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁴⁸ 비교하여 compound 2는 isoquercetin (3-*O*- β -D-glucopyranoside)로 확인되었다 (Figure 12-14, Table 2).



Compound 2

Figure 12 . Chemical structure of compound 2.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 2	
	δ_{H}	(int., multi., J Hz)
2		
3		
4		
5		
6	6.20	(1H, d, 2.3)
7		
8	6.39	(1H, d, 2.3)
9		
10		
1'		
2'	7.71	(1H, d, 2.3)
3'		
4'		
5'	6.87	(1H, d, 8.7)
6'	7.59	(1H, dd, 8.7, 2.3)
1''	5.26	(1H, d, 7.3)
2''	3.49	(1H, d, 8.7)
3''	3.48	(1H, d, 9.2)
4''	3.42	(1H, d, 9.2)
5''	3.22	(1H, m)
6''	3.70	(1H, dd, 10.5, 6.8)
	3.57	(1H, dd, 14.7, 5.5)

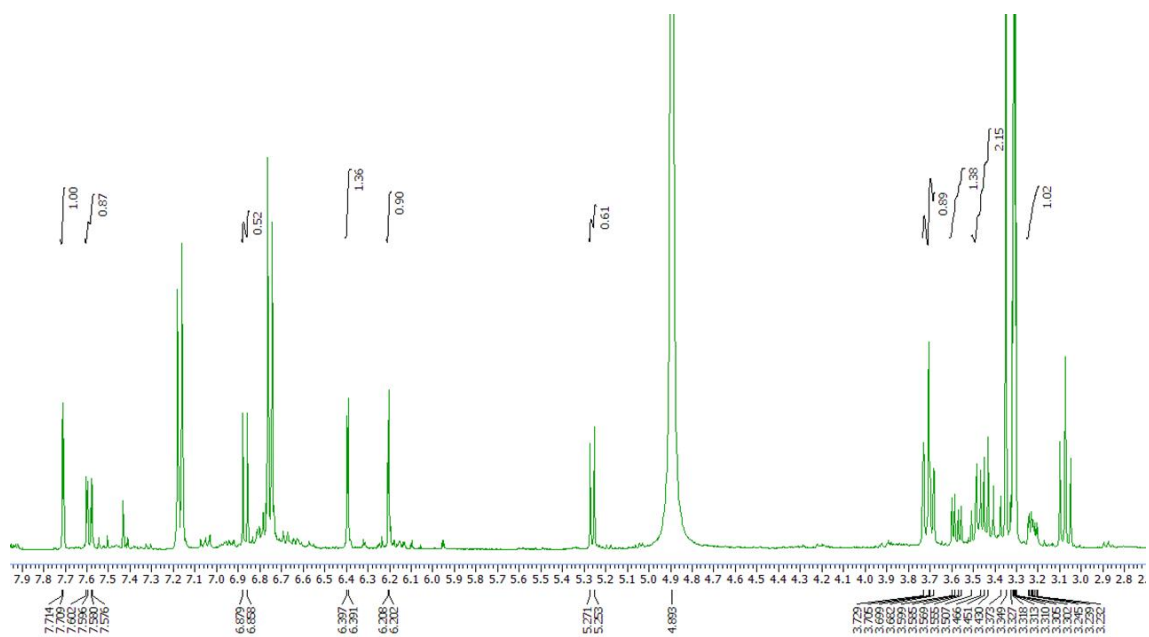


Figure 13. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in methanol- d_4 .

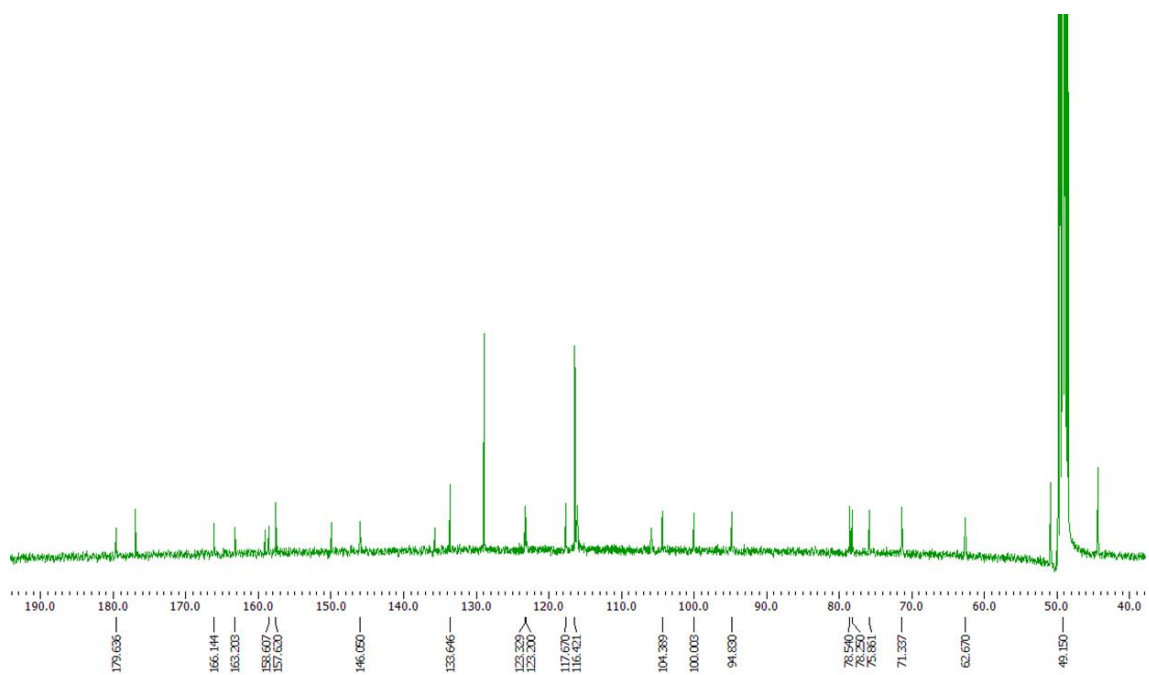
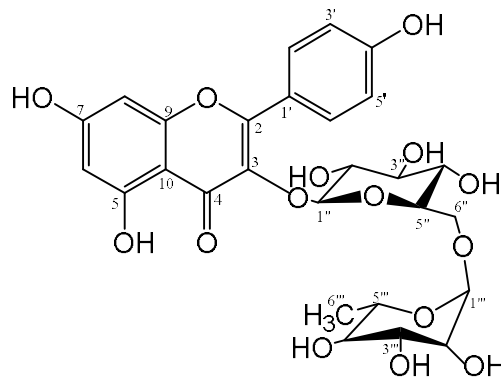


Figure 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in methanol- d_4 .

3) Compound 3의 구조 동정

Compound 3은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 27개 카본 피크를 관찰되었으며 δ_{H} NMR 데이터를 통해 2개 aromatic ring 구조를 가지고 있음을 예상하였다. 그리고 ^{13}C NMR에서 당은 카본피크를 제외한 15개의 카본피크로부터 flavonoid 골격은 있는 화합물을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.21 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 및 6.41 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상되었다. δ_{H} 8.07 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.89 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring을 예상되었다 나머지 δ_{H} 5.13 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크에 및 δ_{H} 4.52 (1H, d, $J = 0.9$ Hz) 그리고 δ_{C} 17.9-104.6의 12개 카본피크를 종합해서 해당하는 당을 coupling constant 및 anomeric proton를 통하여 α -form 및 β -form의 rutinoside를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁴⁹ 비교하여 compound 3은 kaempferol-3-*O*-rutinoside로 확인되었다(Figure 15-17, Table 3).



Compound 3

Figure 15. Chemical structure of compound 3.

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

Compound 3		
No.	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		158.7
3		135.6
4		179.6
5		163.2
6	6.21 (1H, d, 1.8)	100.0
7		166.2
8	6.41 (1H, d, 1.8)	95.0
9		159.5
10		105.8
1'		122.9
2'	8.07 (1H, d, 8.7)	132.5
3'	6.89 (1H, d, 8.7)	116.3
4'		161.7
5'	6.89 (1H, d, 8.7)	116.3
6'	8.07 (1H, d, 8.7)	132.5
1''	5.12 (1H, d, 7.8)	104.7
2''	3.35–3.63 (1H, sugar H)	75.9
3''	3.35–3.63 (1H, sugar H)	77.3
4''	3.35–3.63 (1H, sugar H)	71.6
5''	3.35–3.63 (1H, sugar H)	78.3
6''	3.35–3.63 (1H, sugar H)	68.7
1'''	4.52 (1H, d, 0.9)	102.6
2'''	3.30–3.63 (1H, sugar H)	72.2
3'''	3.30–3.63 (1H, sugar H)	72.4
4'''	3.30–3.63 (1H, sugar H)	74.0
5'''	3.30–3.63 (1H, sugar H)	69.9
6'''	1.12 (3H, d, 5.9)	17.1

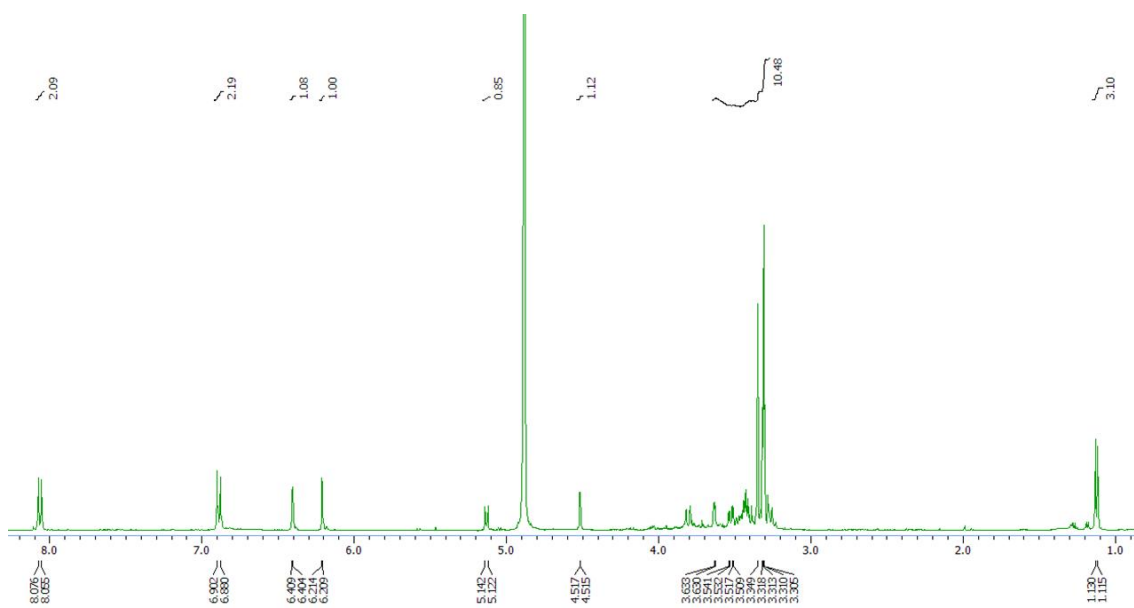


Figure 16. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in methanol- d_4 .

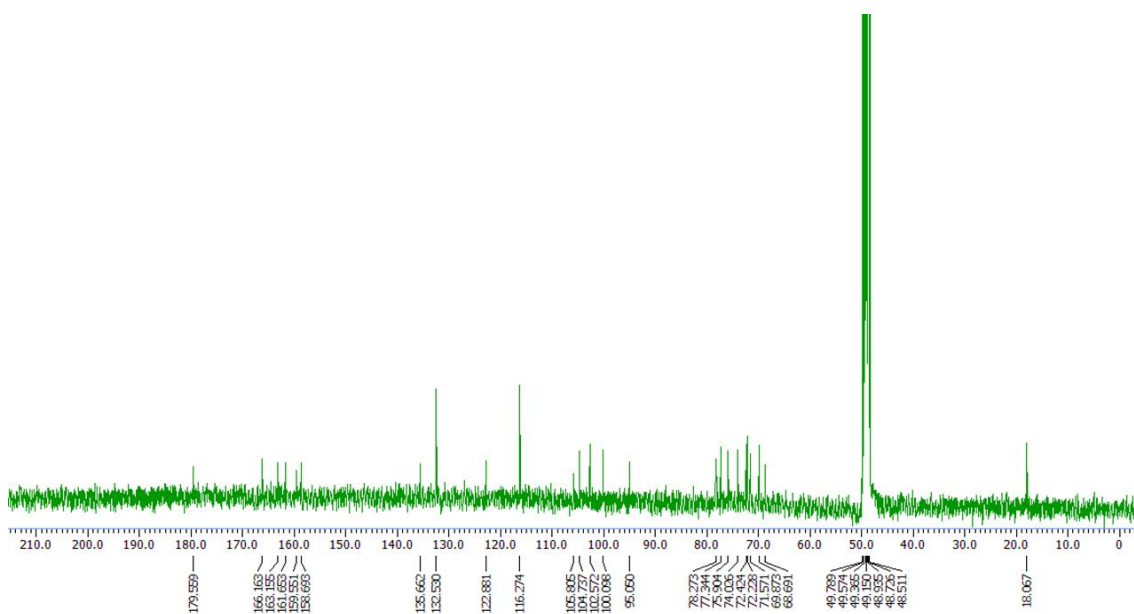
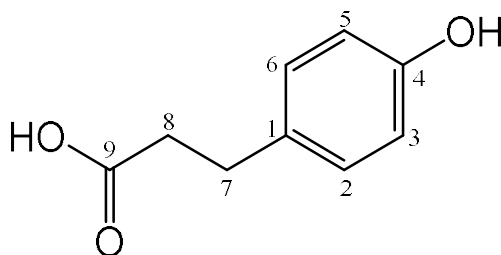


Figure 17. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in methanol- d_4 .

4) Compound 4의 구조 동정

Compound 4은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.75 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.14 (1H, d, $J = 8.7$ Hz) 및 δ_{H} 6.75 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.14 (1H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 을 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring이 예상되었다. δ_{H} 3.07 (2H, t, $J = 9.2$ Hz)피크는 deshielding된 것으로 anisotropic이 때문에 화학적 이동이 높아진 benzyl 위치 methylene group를 예상하였다.

^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 177.0 시그널을 통해 카본닐기를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌과⁵⁰ 비교하여 compound 4는 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid 로 확인되었다(Figure 18-20, Table 4).



Compound 4

Figure 18. Chemical structure of compound 4.

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **4** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 4	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		133.6
2	6.75 (1H, d, 8.7)	116.4
3	7.17 (1H, d, 8.7)	129.0
4		157.6
5	7.17 (1H, d, 8.7)	129.0
6	6.75 (1H, d, 8.7)	116.4
7	3.07 (2H, t, 9.2)	44.3
8	3.35 (2H, t, 9.2)	50.9
9		177.0

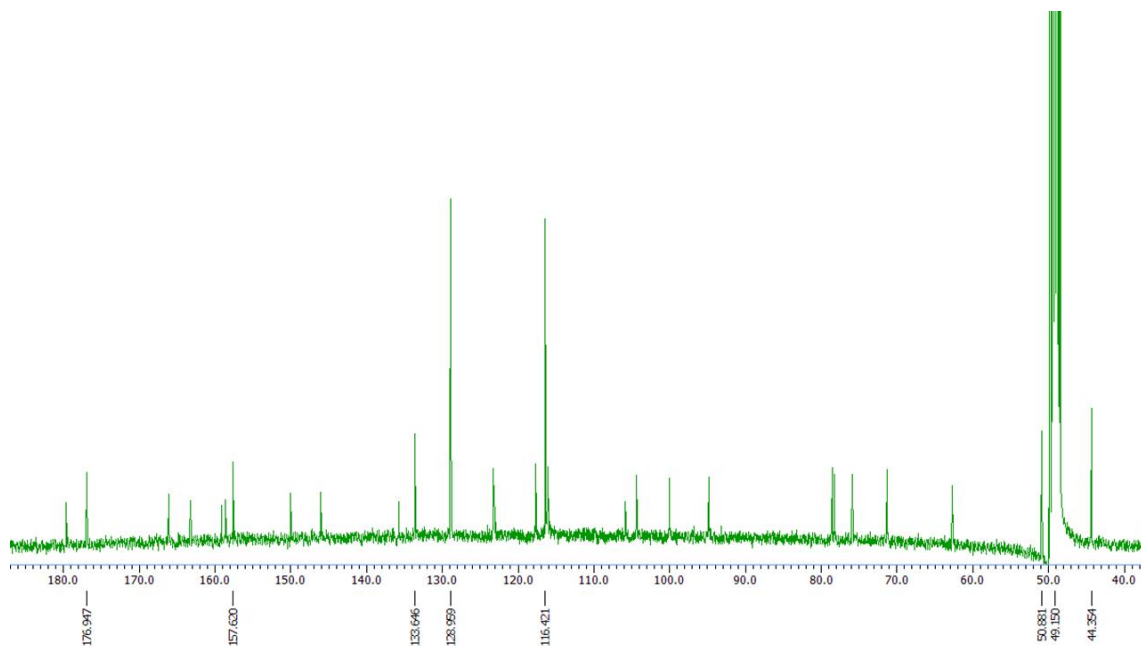


Figure 19. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** in methanol- d_4 .

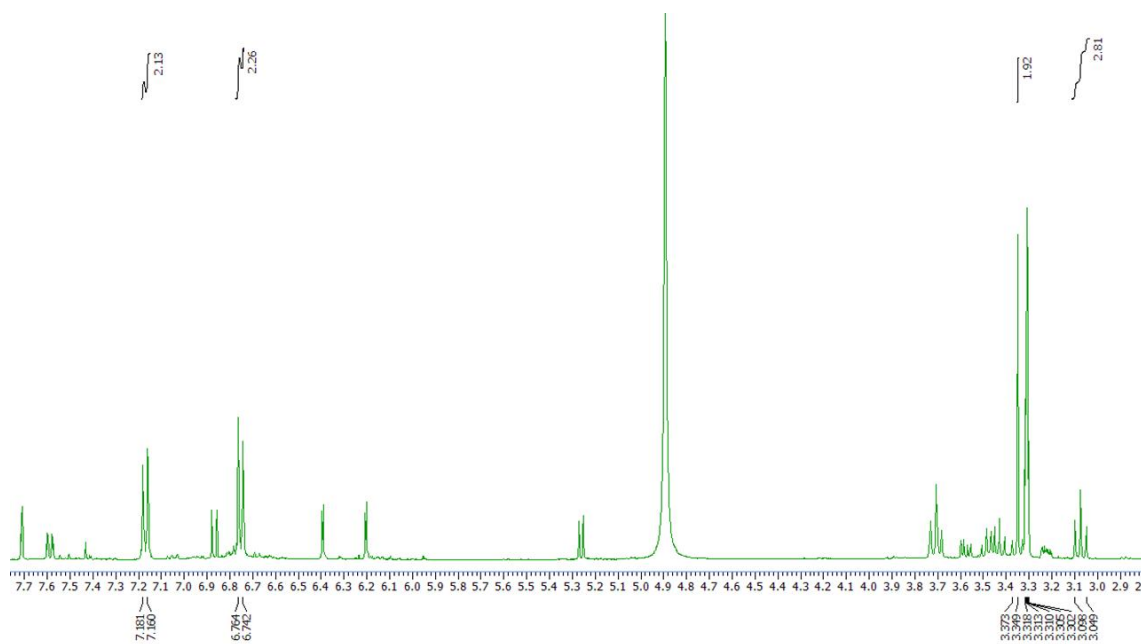
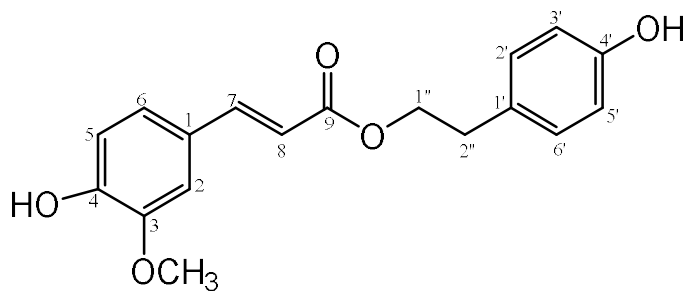


Figure 20. ^1H -NMR spectrum of compound **4** in methanol- d_4 .

5) Compound 5의 구조 동정

Compound 5는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.41 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), δ_{H} 6.40 (1H, d, $J = 15.6$ Hz) 피크의 chemical shift 값과 coupling constant 값은 통하여 trans form의 이중 결합이 있음을 예상하였다. 또한 δ_{H} 7.11 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), δ_{H} 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) 그리고 δ_{H} 7.02 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. δ_{H} 7.04(2H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.71 (2H, d, $J = 8.7$ Hz)피크의 coupling constant 값과 chemical shift 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 하고 있는 대칭구조의 aromatic ring을 예상하였다. δ_{H} 3.88 (3H, s)피크는 integral 보아 methoxy group이 있음을 예상하였다. δ_{H} 3.46 (2H, t, $J = 7.3$ Hz)피크는 deshielding된 것으로 보아 산소가 인접한 methylene group proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 대칭구조를 포함하여 총 18개의 carbon 피크가 관찰을 되었다. 그중에 δ_{C} 169.3 시그널을 통해 carbonyl group를 예상하였다. 또한 δ_{C} 56.5시그널을 통해 methoxy group를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁵¹비교하여 compound 5는 *p*-Hydroxyphenethyl *trans*-ferulate로 확인 되었다(Figure 21-23, Table 5).



Compound 5

Figure 21. Chemical structure of compound 5.

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **5** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 5	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		128.4
2	7.11 (1H, d, 1.8)	111.6
3		149.4
4		149.9
5	6.79 (1H, d, 8.2)	116.6
6	7.02 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.4
7	7.41 (1H, d, 15.6)	142.2
8	6.40 (1H, d, 15.6)	118.8
9		169.3
1'		131.2
2'	7.04 (1H, d, 8.7)	130.9
3'	6.71 (1H, d, 8.7)	116.4
4'		157.1
5'	6.71 (1H, d, 8.7)	116.4
6'	7.04 (1H, d, 8.7)	130.9
1''	3.46 (2H, t, 7.3)	42.7
2''	2.75 (2H, t, 7.3)	35.9
-OCH ₃	3.88 (3H, s)	56.5

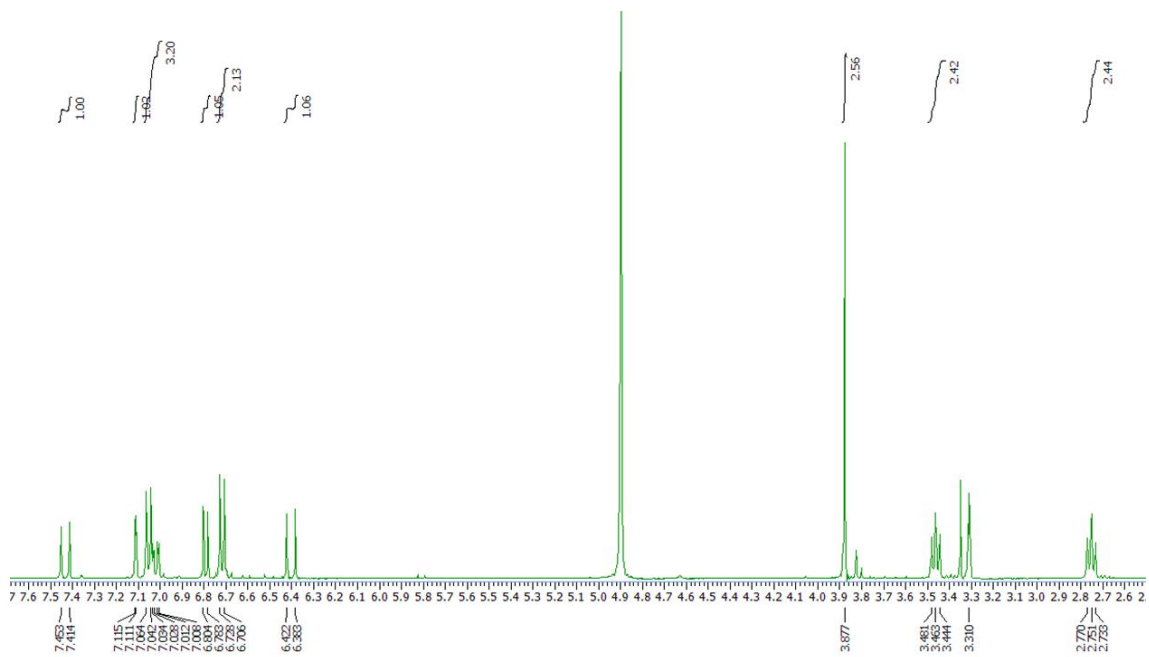


Figure 22. ^1H -NMR spectrum of compound **5** in methanol- d_4 .

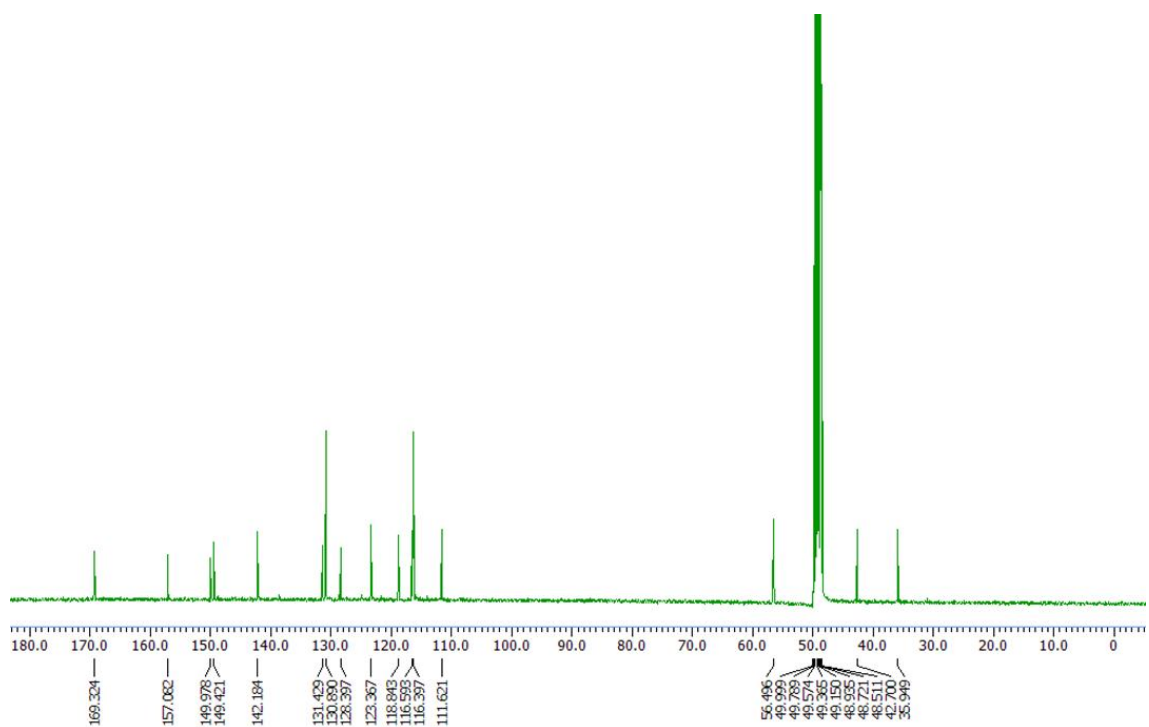


Figure 23. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5** in methanol- d_4 .

4. 황근 잎 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 추출물 및 분획물의 항산화 활성 실험 결과

(1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량 측정은 gallic acid로 표준물질을 이용하여 황근 잎의 추출물 및 분획물에서 총 폴리페놀에 함유한 함량을 측정하였다. 황근 잎 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량은 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallicacid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이 111.6±0.8 mg/g GAE, *n*-BuOH 분획물이 135.8±1.5 mg/g GAE로 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 24).

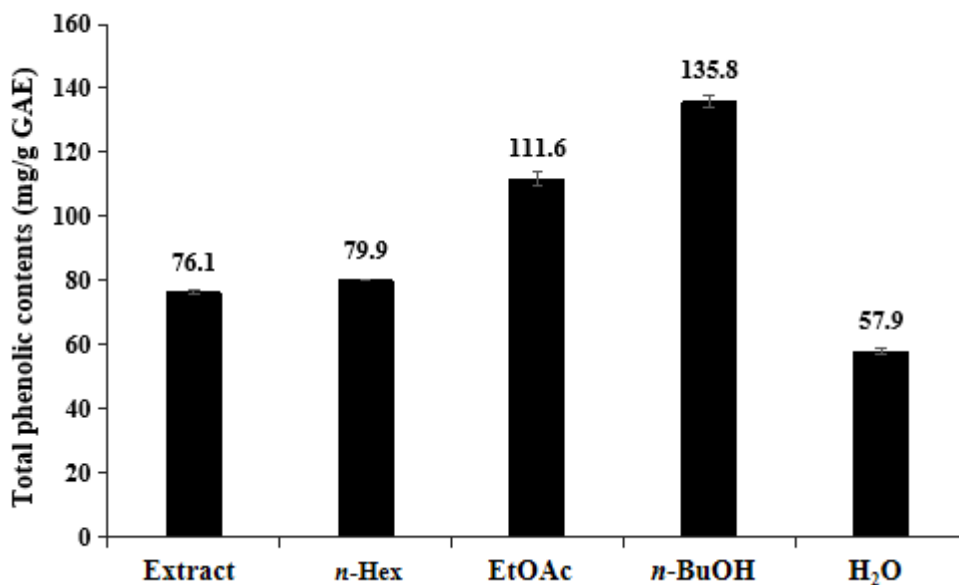


Figure 24. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량 측정은 quercetin을 표준물질로 이용하여 황근 잎 추출물 및 분획물 총 플라보노이드에 함유한 함량을 측정하였다. 황근 잎 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량은 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetinequivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이 95.6 ± 2.3 mg/g QE로 분획물 중 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다 (Figure 25).

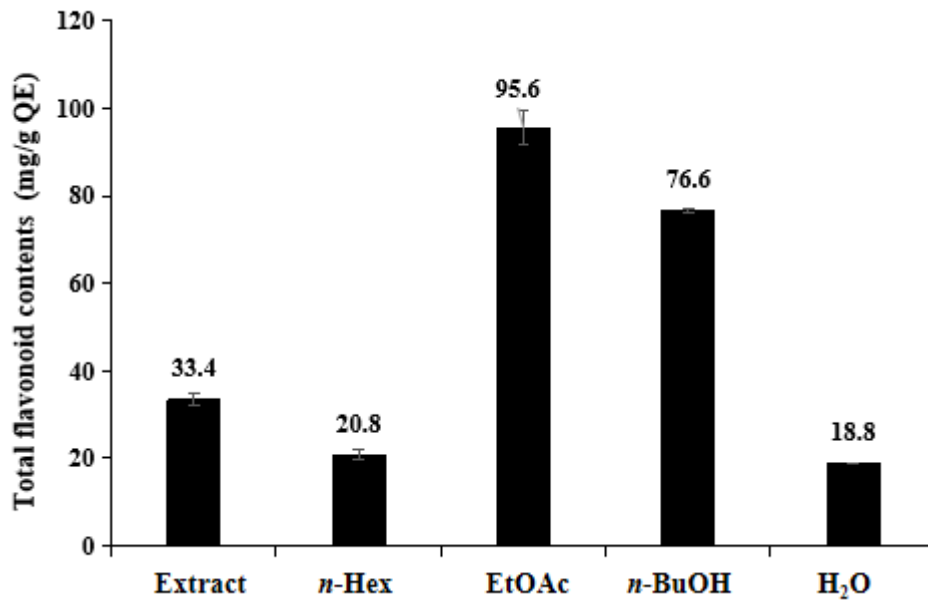


Figure 25. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

황근 잎의 추출물 및 분획물에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 6.25-400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC_{50} 값을 계산하였다. 실험 결과는 extract, *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O 분획물에서 extract, *n*-Hex, H_2O 분획물을 제외한 EtOAc, *n*-BuOH분획물의 SC_{50} 값이 각각 73.9, 44.3 $\mu\text{g/mL}$ 로, 대조군인 BHT ($\text{SC}_{50} = 76.6 \mu\text{g/mL}$)보다 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 26, Table 6).

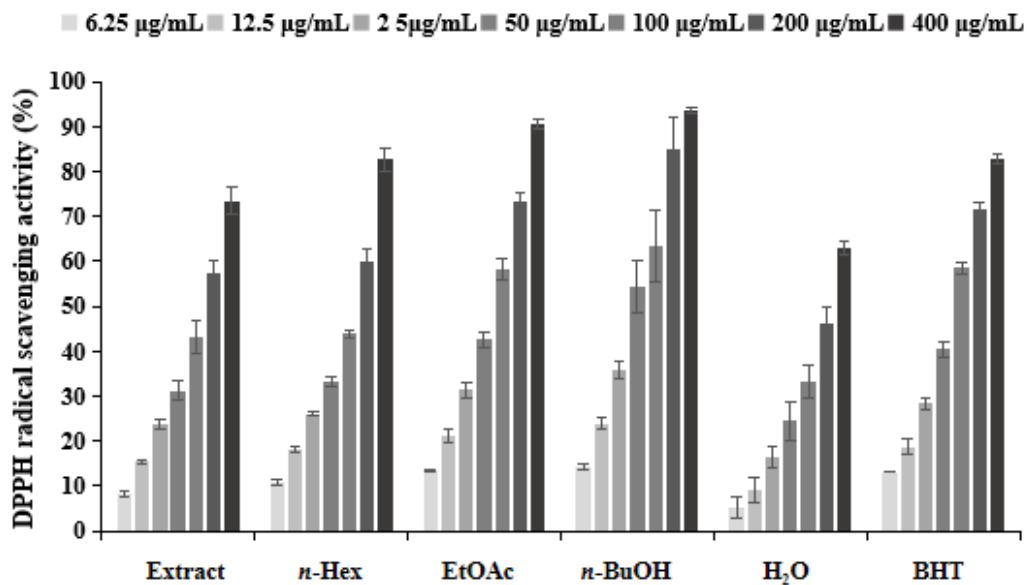


Figure 26. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 6. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H_2O	BHT
SC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	148.1	138.0	73.9	44.3	260.1	76.6

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

황근 잎의 추출물 및 분획물에 대한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 6.25 - 100 µg/mL의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과는 extract, *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물에서 EtOAc 분획물의 SC₅₀ 값이 44.1 µg/mL로 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었다 (Figure 27, Tabel 7).

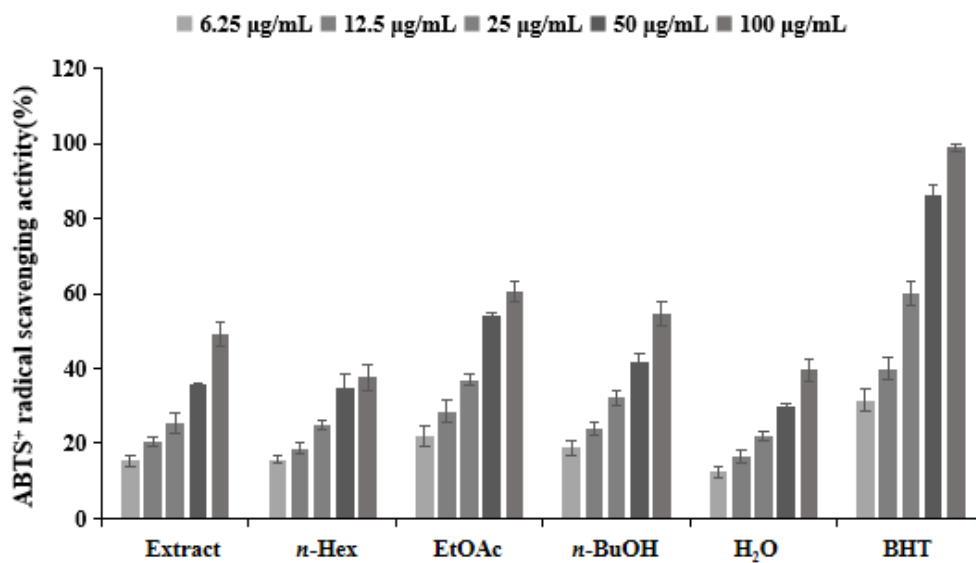


Figure 27. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 7. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	>100	>100	44.1	82.4	>100	18.8

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

황근 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell 을 이용하여 nitric oxide 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 70% EtOH 추출물 및 각 용매 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 nitric oxide 생성억제 활성을 보였다. 이에 따라 추가 실험을 진행하였다. 그 결과, 추출물 농도는 200, 300, 400 µg/mL로 하여 EtOAc 분획물의 25, 50, 100, 200 µg/mL로 추가 실험을 진행한 결과, 황근 잎 추출물 및 EtOAc 분획물은 세포 독성 없이 nitric oxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 그중 EtOAc 분획물 IC₅₀ 값은 77.1 µg/mL으로 확인되었다(Figure 28-29).

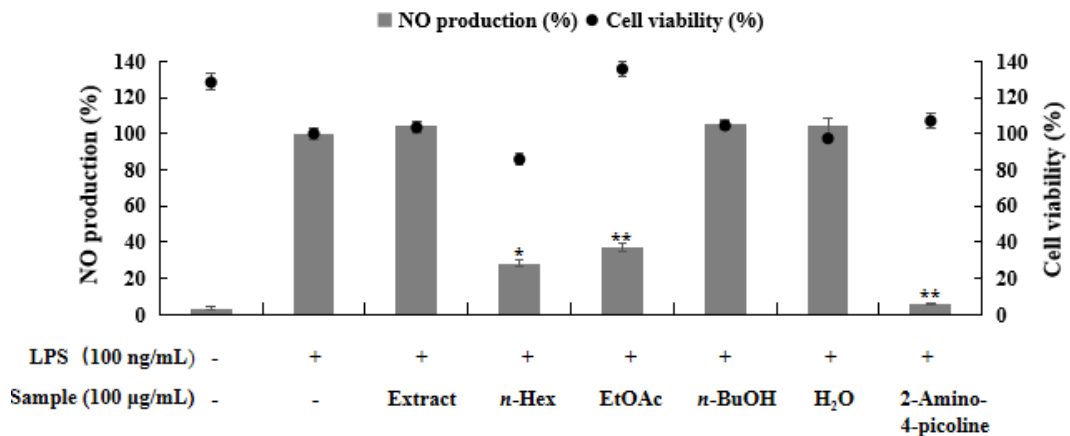
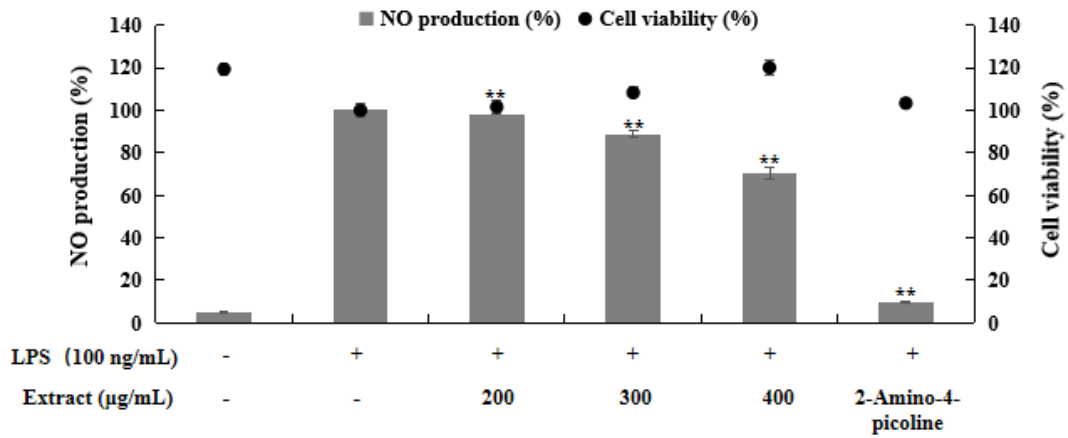


Figure 28. Effects of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Values are the mean SEM of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(A)



(B)

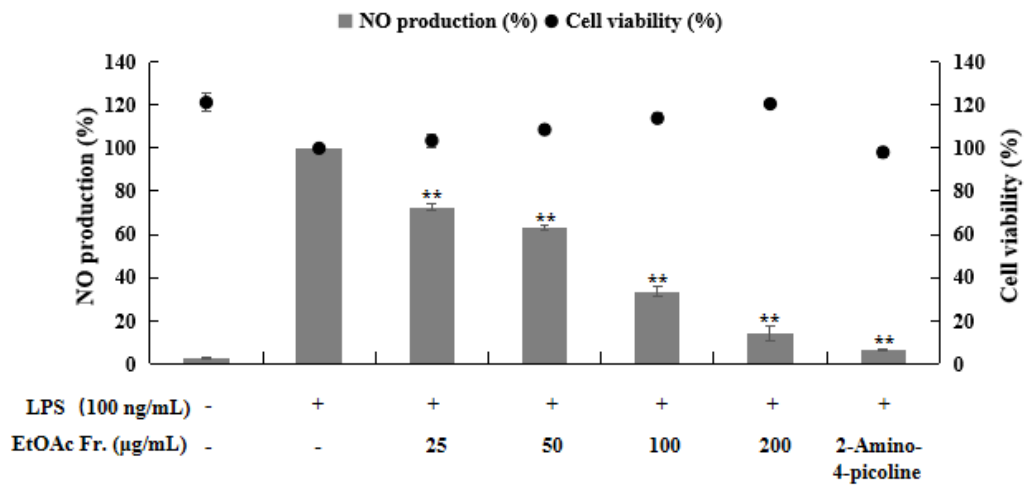
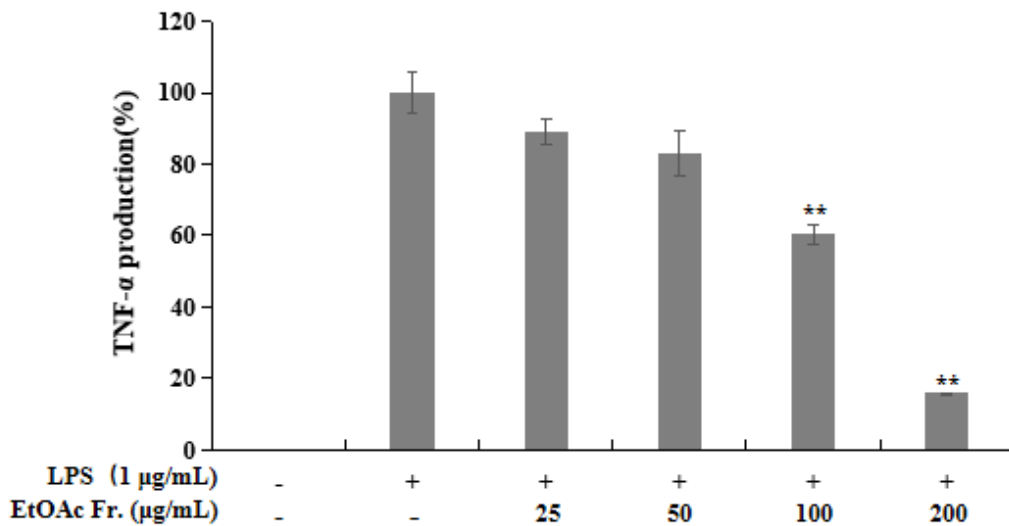


Figure 29. Effects of Extract(A) and EtOAc(B) fraction from *T.hamabo* leaves on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

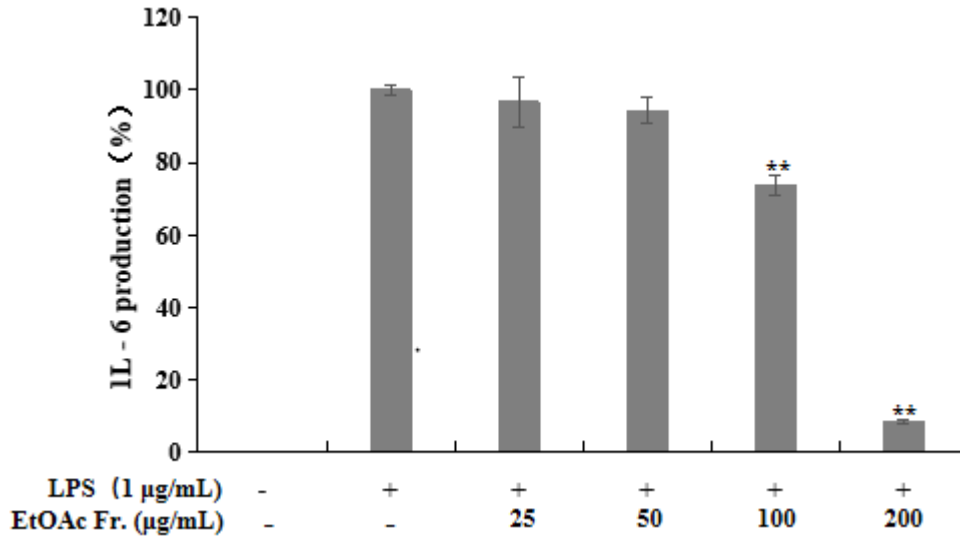
(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성

황근 잎 EtOAc 분획물의 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 전염증성 cytokines IL-6, TNF- α , 및 PGE₂ 억제 활성을 측정하였다. 세포 독성이 나타나지 않은 농도 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 황근 잎 EtOAc 분획물이 IL-6, TNF- α , 및 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 30).

(A)



(B)



(C)

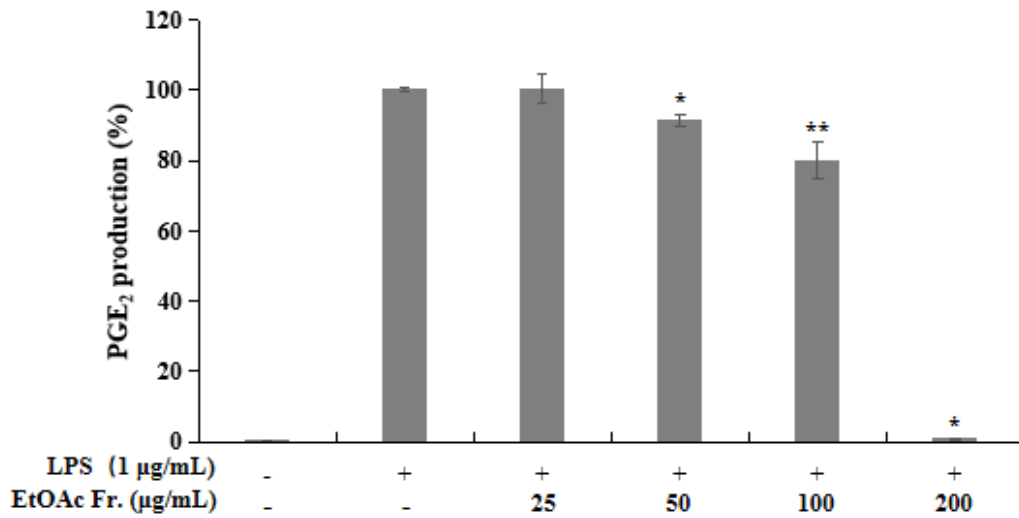


Figure 30. Effects of EtOAc from *Talipariti hamabo* leaves on TNF- α (A), IL-6 (B) and PGE₂ (C) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3) 항균

(1) Paper disc diffusion method

황근 잎 추출물 및 분획물의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 3종과 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 4종을 사용하였고 positive control은 erythromycin을 사용하여 Paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 측정한 실험 결과, *S. epidermidis*균은 *n*-BuOH 분획물은 *S. epidermidis* 3종에 대한 생육억제 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, EtOAc 분획물은 *S. epidermidis* (CCARM 3710)을 제외한 모든 균주에 대해 생육억제 활성을 나타내었다. 그리고 황근 잎 추출물 및 분획물은 여드름균에 대한 생육억제 활성이 없는 것으로 확인되었다(Table 8).

Table 8. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* leaves.

Bacterial density (1.5×10^6 CFU/mL)	Clear zone (mm) ¹⁾		
	<i>S.epidermidis</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	N.A. ³⁾	N.A.	N.A.
<i>n</i> -Hex	N.A.	N.A.	N.A.
EtOAc	11.5	N.A.	9
<i>n</i> -BuOH	12	9	11
H ₂ O	N.A.	N.A.	N.A.
Erythromycin ²⁾	33.5	N.A.	30

1)Concentration of sample: 4 mg

2)Concentration of positive control: 40 μ g

3)N.A.: No activity

2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통하여 균주에 대한 생육억제 활성을 나타내는 추출물 및 용매 분획물에 대한 추가적으로 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사균 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험 사용한 시료는 10 mg/mL를 two-fold-dilution법으로 농도를 두 배씩 희석하면서 실시 하였다.

실험 결과는 균주 *S. epidermidis* 경우 EtOAc 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고, 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 이용해서 MBC를 확인 하였다. 실험 결과는 EtOAc 분획물에서 *S. epidermidis* 3종에 대한 MBC 값을 모두 확인할 수 있었다. *n*-BuOH 분획물의 경우 CCARM 3710를 균주에서 MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 9).

Table 9. MIC and MBC values of *T.hamabo* leaves on *S.epidermidis*.

	<i>S.epidermidis</i>					
	CCARM3709		CCARM3710		CCARM3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	2000	>4000	4000	>4000	4000	>4000
<i>n</i> -Hex Fr.	4000	>4000	4000	>4000	4000	>4000
EtOAc Fr.	1000	4000	2000	4000	1000	4000
<i>n</i> -BuOH Fr.	4000	>4000	4000	4000	1000	>4000
H ₂ O Fr.	4000	>4000	4000	>4000	2000	>4000

Unit: µg/mL

5. 요약 및 결론

본 연구에서는 황근 잎 추출물의 화장품 및 의약품 소재로서의 가능성을 확인하기 위해 다양한 생리 활성 실험과 성분 연구를 진행하였다.

황근 잎 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 이 중 EtOAc 분획물은 VLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리한 단일 물질은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 예상한 후 문헌과 비교하여 총 5개의 화합물을 동정하였다.

분리한 화합물은 oleic acid (1), isoquercetin (2), nicotiflorine (3), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (4), *p*-hydroxyphenethyl-*trans*-ferulate (5)로 확인되었다.

황근 잎의 항산화 실험 결과, EtOAc, *n*-BuOH 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 각각 111.6±0.8 mg/g, 35.8±1.5 mg/g GAE 및 95.6±2.3 mg/g QE로 확인되었으며, DPPH radical 소거 활성 실험에서 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 대조군인 BHT보다 우수하거나 유사한 radical 소거 활성을 나타내었다. 또한 보고된 Compound 1-5는 문헌^{52,53,54,55}을 통해 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 효과적인 NO 생성 억제 활성을 나타내었고, EtOAc 분획물은 TNF- α , IL-6 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. Compound 1, 2, 3, 5는 cytokine 생성 억제 및 항염 관련 단백질 발현 저해를 통해 NO 생성을 억제하는 것으로 문헌^{55,56,57,58}을 통해 확인하였다.

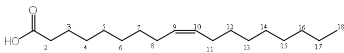
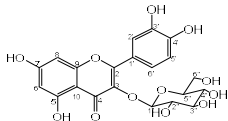
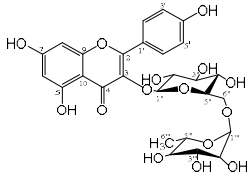
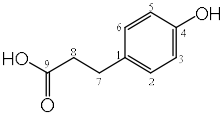
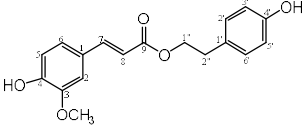
항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis*

(CCARM 3709, 3710, 3711)를 이용하여 한천 확산법(paper disc diffusion method)을 통한 생육저지환(clear zone), 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 그 결과, 황근잎 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 *S. epidermidis*에 대한 우수한 항균활성을 나타내었다. 또한 분리된 화합물 1-3의 항균활성은 문헌^{59,60,61}을 통해 확인하였다.

황근 잎에서 분리된 화합물의 효능에 대한 문헌조사결과, Compound 1은 항산화, 항염, 항균, 항종양, 항암 활성^{62,63}이 보고되어 있으며, Compound 2는 항산화, 항염, 항균, 항당뇨 및 항암 활성^{64,65}이 알려져있다. Compound 3은 항산화, 항염, 항균, α -glucosidase억제 및 anti-hyaluronidase활성^{66,67}이 보고되어 있으며, Compound 4는 항산화, 항증식 및 항지질 과산화 활성^{68,69}이 알려져있다. 또한 Compound 5는 항산화, 항염, α -glucosidase억제 및 항 AGEs 활성^{70,71}이 보고되어 있다. (Table 10).

이상의 연구 결과를 바탕으로 황근 잎은 항산화, 항염 및 항균 활성을 갖는 기능성 화장품 및 의약품 관련 천연 소재로서 개발 가능할 것이라 사료된다.

Table 10. Activities of isolated compounds from *T. hamabo* leaves.

NO.	Compound	structure	activities
1	Oleic acid		anti-oxidant activity ⁵² anti-inflammatory activity ⁵⁶ anti-bacterial activity ⁵⁹ anti-tumor activity ⁶² anti-cancer activity ⁶³
2	Isoquercetin		anti-oxidant activity ⁵⁴ anti-inflammatory activity ⁵⁷ anti-bacterial activity ⁶⁰ anti-diabetic activity ⁶⁴ anti-tumor activity ⁶⁵
3	Kaempferol-3-O-rutinoside		anti-oxidant activity ⁵⁴ anti-inflammatory activity ⁵⁸ anti-bacterial activity ⁶¹ α -glucosidase inhibitory activity ⁶⁶ anti-hyaluronidase activities ⁶⁷
4	3-(4-Hydroxyphenyl) propionic Acid		anti-oxidant activity ⁵³ anti-proliferative activity ⁶⁸ anti-Lipid Peroxidation activity ⁶⁹
5	<i>p</i> -Hydroxyphenethyl- <i>trans</i> -ferulate		anti-oxidant activity ⁵⁵ anti-inflammatory activity ⁵⁵ anti-AGEs activity ⁷⁰ α -glucosidase inhibitory activity ⁷¹

IV. 연구 2 : 황근 가지 추출물의 항염, 항산화 활성 성분 연구

1. 재료

황근 (*Talipariti hamabo*)는 아욱과 (Malvaceae) 식물인 주로 중국, 한국, 일본의 분포한다. 해안 염분 토양에서 잘 자라고 있다. 빛을 좋아하고 단기 침수, 고온 및 저온(-10℃)에 강하다. 토양에 대한 강한 적응력, 산성 및 알칼리성 토양 모두 잘 자랄 수 있다. 진흙 코팅(pH 값 8.0, 염도 약 1.5%), 언덕과 산(pH 값 5.5) 및 해변의 내부에서 자랄 수 있으며 염수 알칼리 및 해수 침수에 매우 강하고 주요 줄기가 간헐적으로 약 1미터 동안 조수에 잠기고 여전히 정상적으로 자라고 꽃이 피고 열매를 맺는다. 분포지역은 동경 121°49' 00" -122°15' 05", 북위 29°56' 37" -30°14' 52" 이다(Figure 31).⁷²

생태 환경에서 해변 히비스커스는 염분 및 알칼리에 매우 강하고 간헐적인 홍수 및 파도 튀김에 강하며 불모지에 강하며 뿌리 시스템이 잘 발달되어 있어 강한 바람 저항과 파도 제거 특성을 가지고 있다. 파도가 튀고 방파제를 덮는 것을 크게 줄였으며 연못과 제방의 방풍 보호를 위한 개척 수종과 물과 토양 보전 산림 수종으로 사용할 수 있다.⁷³

현재까지 보고된 황근 관련문헌 중, 황근속(또는 무궁화속) 아욱과 식물 추출물에 대한 분리된 화합물 및 항산화, 항염 및 미백활성 등 관한 연구가 있지만, 황근에 대한 분리된 산물이나 효능관련 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 황근 가지 추출물의 활성 성분을 분리, 구조 동정하여, 항산화, 항염 및 항균 효능 연구를 진행 하였다.

본 연구에 사용한 황근 가지는 2020년 12월에 제주도 한림읍 상대리에서 채집하였다(시료번호:505). 채집한 황근 가지는 40℃에서 건조시킨후 분쇄하여 사용하였다 (Figure 31).



Figure 31. Picture of *Talipariti hamabo* branches.

2. 황근 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 시료의 추출 및 분획

건조 및 분쇄된 황근 가지 1.35 kg을 70% 에탄올 20 L에 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치 및 filter paper를 이용하여 추출액을 여과하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 얻어진 추출물 여액은 40℃ 이하의 수욕상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 131.1 g을 얻었다. 얻어진 70% 에탄올 추출물 120 g을 증류수 1 L에 현탁시킨후, 분액 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다.(Figure 32).

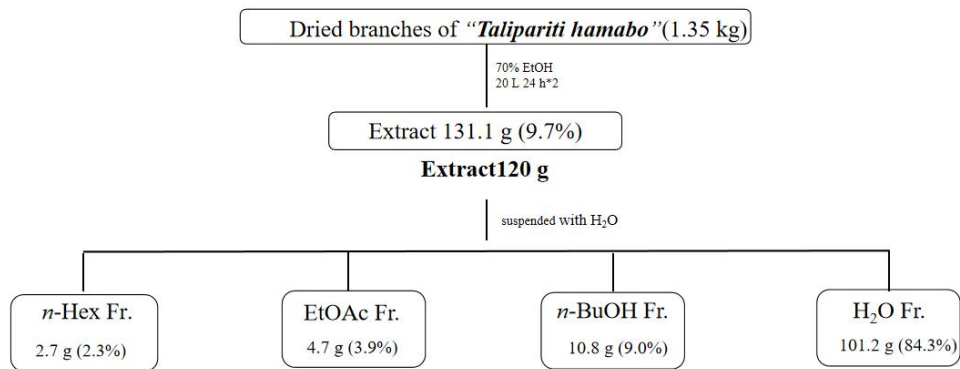


Figure 32. Extraction and solvent fraction of *T.hamabo* branches.

2) Ethyl acetate 분획물의 대한 활성 성분 분리

(1) VLC에 의한 분리과정

Ethyl acetate 분획물 4.5 g을 극성 크기별로 나누기 위해 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (5-50%)가 될 때까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 300 mL씩 용출하여 총 24개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-24).

Fr. V4 (95 mg)는 용매조건 *n*-Hex:EtOAc=20:1으로 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 5 (45.4 mg)와 compound 6 (27.7 mg)를 얻었다.

Fr. V5 (111.5 mg)는 바이엘병 밑에 결정부분(39.5mg)을 감압 농축한후에 powder를 얻은후 compound 6와 compound 7가 혼합(39.5mg)된 형태로 얻었고 용매조건 *n*-Hex:EtOAc=10:1으로 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 8 (30.3 mg), compound 9 (54.9 mg)를 얻었다. 그리고 V9-11 (68.6 mg)은 용매조건 *n*-Hex:EtOAc=2:1으로 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 7 (4.6 mg)을 얻었다.

Fr. V6-7 (246.8 mg)은 용매조건 *n*-Hex:EtOAc=4:1으로 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 9 (38.6 mg), compound 2 (94.4 mg)를 얻었다.

Fr. V8 (86.9 mg)은 용매조건 *n*-Hex:EtOAc=4:1으로 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 4 (35.5 mg), compound 3 (12 mg), compound 10 (10.9 mg), compound 11 (12.9 mg)를 얻었다.

Fr. V12-14 (178.4 mg)은 용매조건 CHCl₃:MeOH=17:1 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 1 (20.1 mg)를 얻었다.

Fr. V15-21 (306.1 mg)은 용매조건 CHCl₃:MeOH=15:1 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 12 (43.5 mg)를 얻었다.

Fr. V22-23 (180.2 mg)은 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=8:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 13와 compound 14가 혼합(16.2 mg)된 형태로 분리하였다.

Fr. V24 (438.5 mg)는 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=7:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 15 (55.9 mg)를 얻었다. (Figure 33).

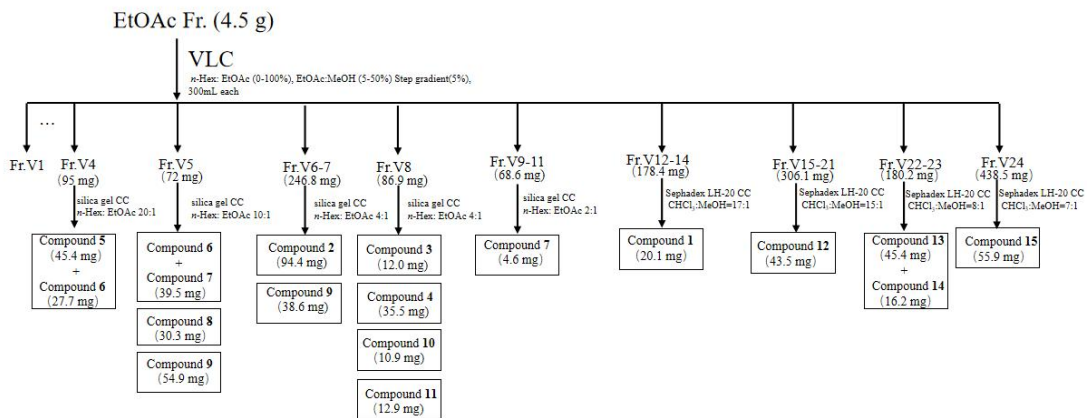


Figure 33. Isolation of compounds from *T.hamabo* branches.

3. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compounds 1-5의 구조 동정

Compound 4는 ^1H NMR spectrum을 통해 δ_{H} 5.34 (6H, m, overlap) 피크는 olefin methine proton으로 예상하였다. δ_{H} 2.78 (2H, t, $J = 5.9$ Hz), δ_{H} 2.78 (2H, t, $J = 5.9$ Hz), δ_{H} 2.03 (2H, m) 피크는 일반적으로 aliphatic proton에 비해 deshielding을 때문에 chemical shift 값은 높아진 것으로 allylic methyl group으로 예상하였다. δ_{H} 0.95 (3H, t, $J = 7.3$ Hz) 피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 18개 카본 피크를 관찰되었으며, 그중에서 δ_{C} 179.1 시그널을 통해 carboxy group를 가지고 있음을 확인하였고 또한 10개의 aliphatic 카본을 확인하였다. δ_{C} 132.2, 127.3, 128.3, 128.1, 127.9, 130.4의 시그널을 통해서 3개의 이중결합 구조 가지고 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌⁷⁶ 통해 compound 4은 α -linolenic acid로 확인되었다(Figure 34, 41, 42, Table 11).

Compound 5 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound 4와 비교하여 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. ^1H NMR spectrum을 통해 δ_{H} 5.32- 5.35 (6H, m, overlap) 피크는 olefin methine proton으로 예상하였다. δ_{H} 0.95 (3H, t, $J = 7.6$ Hz) δ_{H} 4.1 (2H, q, $J = 14.4$ Hz) 피크는 ester group를 직접 연결한 ethyl group를 예상하였고 δ_{H} 0.95 (3H, t, $J = 7.6$ Hz) 피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개 카본 피크를 관찰되었으며, 그중에서 δ_{C} 174.1 시그널을 통해 carbonyl group를 가지고 있음을 확인하였고 또한 13개의 aliphatic 카본을 확인하였다. δ_{C} 127.3, 127.9, 128.1, 128.2, 128.4, 128.5의 시그널을 통해서 3개의 이중결합 구조 가지고 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌⁷⁷ 통해 compound 5은 ethyl linolenate로 확인되었다(Figure 34, 43, 44, Table 11).

Compound 3은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound 4와 비교하면 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 18개 카

본 피크를 관찰되었으며 , 그중에서 δ_C 130.4, 127.7, 130.2, 128.3의 시그널을 통해서 2개의 이중결합 구조 가지고 있음 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌⁷⁵통해 compound **3**은 linolenic acid로 확인되었다(Figure34, 39 40, Table 11).

Compound **1**은 ^1H NMR spectrum을 통해 δ_H 0.86 (3H, t, $J = 6.9$ Hz)피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. δ_H 3.64 (3H, s) 피크는 methoxy group의 피크를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 18개 카본 피크가 관찰되었으며, 그중에서 δ_C 174.6시그널을 통해 Ester group를 가지고 있음을 확인하였고 또한 17개의 aliphatic 카본을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌⁷⁴통해 compound **1**은 methyl stearate로 확인되었다(Figure 34-36, Table 11).

Compound **2**는 ^{13}C NMR spectrum에서 18개 카본 피크를 관찰되었으며 δ_C 178.1피크를 통해 carbonyl group를 가지고 있음 카본 피크를 확인하였고 δ_C 130.8, 131피크 및 δ_H 5.32 (2H) 피크를 통하여 이중결합을 1개 가지고 있을 것으로 예상하였다. δ_H 0.86 (3H) 및 δ_C 14.6 피크를 통해 methyl group이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌^{46,47}이중결합이 1개 있는 불포화 지방산 골격을 가지고 있음을 구조를 예상하였다. compound **2**은 oleic acid로 확인되었다(Figure 34, 37, 38, Table 11).

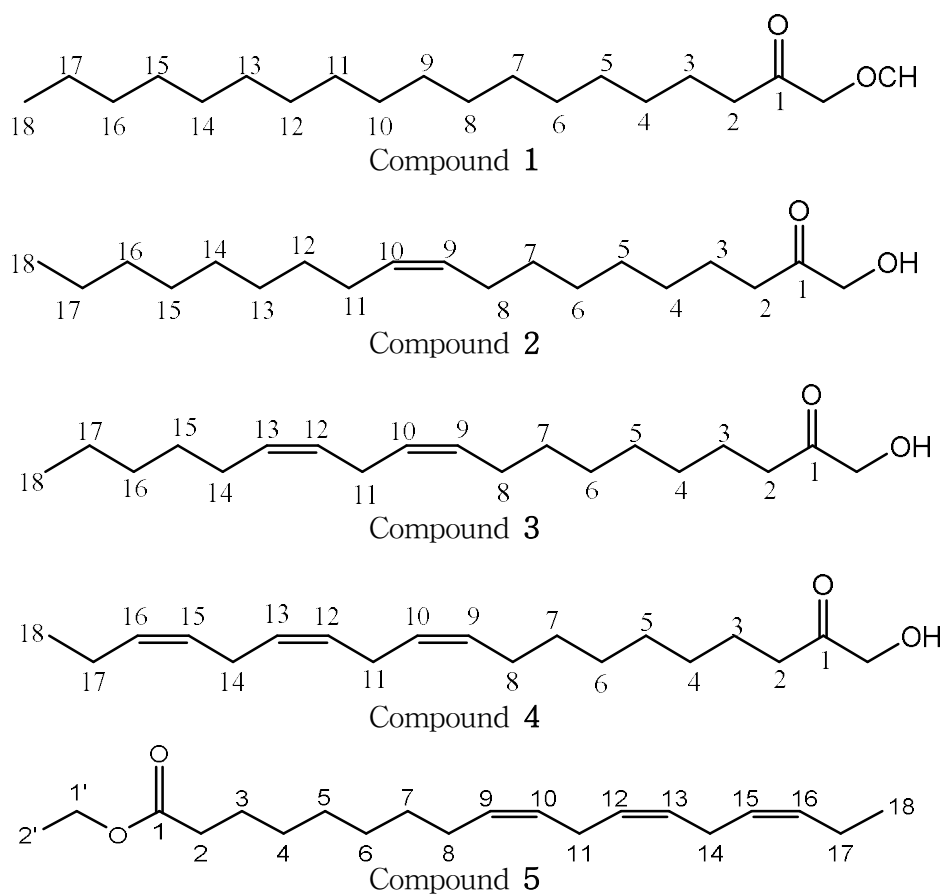


Figure 34. Chemical structure of compounds 1-5.

Table 11. ¹H and ¹³C NMR data of compounds **1–5** (400 and 100 MHz, *chloroform-d*)

No.	Compound 1		Compound 2		Compound 3		Compound 4		Compound 5	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1		174.6		178.1		179.7		179.1		174.1
2	2.28 (2H, t, 7.6)	34.3	2.31 (2H, t, 7.6)	33.9	2.32 (2H, t, 7.6)	34.2	2.32 (2H, t, 7.6)	34.1	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6
3	1.25 (2H, m)	25.2	1.61 (2H, m)	25.0	1.62 (2H, t, 7.1)	27.4	1.61 (2H, m)	27.4		22.8
4	1.25 (2H, m)	29.1	1.29 (2H, m)	29.6	1.29 (2H, m)	29.6	1.29 (2H, m)	29.4		27.4
5	1.25 (2H, m)	29.2	1.29 (2H, m)	29.5	1.29 (2H, m)	29.5	1.29 (2H, m)	29.3	1.26–1.28 (10H, m)	25.7
6	1.25 (2H, m)	29.5	1.29 (2H, m)	29.4	1.29 (2H, m)	29.9	1.29 (2H, m)	29.9		25.8
7	1.25 (2H, m)	29.6	1.29 (2H, m)	29.9	1.29 (2H, m)	29.8	1.29 (2H, m)	29.5		25.2
8	1.25 (2H, m)	29.7	1.98–2.09 (2H, m)	27.4	2.02 (2H, t, 3.4)	25.8	2.01 (2H, m)	25.8	2.77 (2H, m)	29.3
9	1.25 (2H, m)	29.8	5.28–5.38 (1H, m)	130.0	5.35 (1H, m)	130.4	5.34 (1H, m)	132.2	5.32–5.35 (1H, m)	127.3
10	1.25 (2H, m)	29.9	5.28–5.38 (1H, m)	130.2	5.35 (1H, m)	127.7	5.34 (1H, m)	127.3	5.32–5.35 (1H, m)	127.9
11	1.25 (2H, m)	29.9	1.98–2.09 (2H, m)	27.4	2.75 (2H, t, 6.6)	24.9	2.78 (2H, t, 5.9)	24.9	2.77 (2H, m)	29.3
12	1.25 (2H, m)	29.9	1.29 (2H, m)	30.0	5.35 (1H, m)	130.2	5.34 (1H, m)	128.3	5.32–5.35 (1H, m)	128.1
13	1.25 (2H, m)	29.9	1.29 (2H, m)	29.7	5.35 (1H, m)	128.3	5.34 (1H, m)	128.1	5.32–5.35 (1H, m)	128.2
14	1.25 (2H, m)	29.9	1.29 (2H, m)	29.8	2.02 (2H, t, 3.4)	32.1	2.78 (2H, t, 5.9)	25.7	2.77 (2H, m)	29.6
15	1.25 (2H, m)	29.4	1.29 (2H, m)	29.7	1.29 (2H, m)	29.3	5.34 (1H, m)	127.9	5.32–5.35 (1H, m)	128.4
16	1.25 (2H, m)	32.1	1.29 (2H, m)	32.1	1.29 (2H, m)	29.2	5.34 (1H, m)	130.4	5.32–5.35 (1H, m)	128.5
17	2.04 (2H, m)	22.9	1.29 (2H, m)	22.9	1.29 (2H, m)	22.9	2.03 (2H, m)	20.0	2.77 (2H, m)	29.8
18	0.86 (3H, t, 6.9)	14.3	0.86 (3H, t, 6.9)	14.3	0.85 (3H, t, 4.6)	14.3	0.95 (3H, t, 7.3)	14.3	0.95 (3H, t, 7.6)	14.3
1'									1.23 (3H, t, 7.1)	14.5
2'									4.1 (2H, q, 14.4)	60.4
OCH ₃	3.64 (3H, s)	51.7								

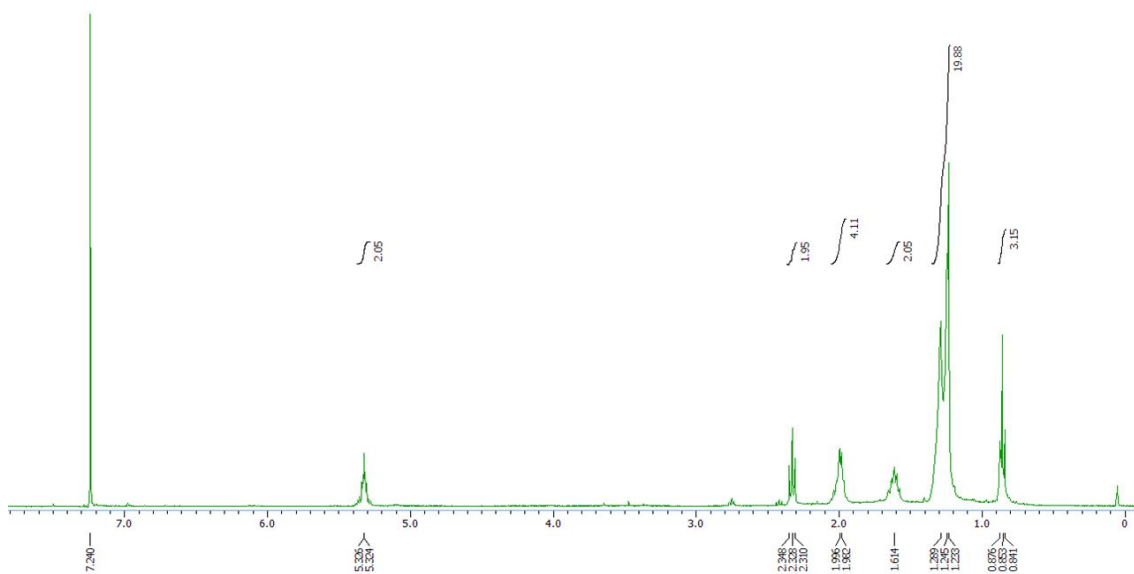
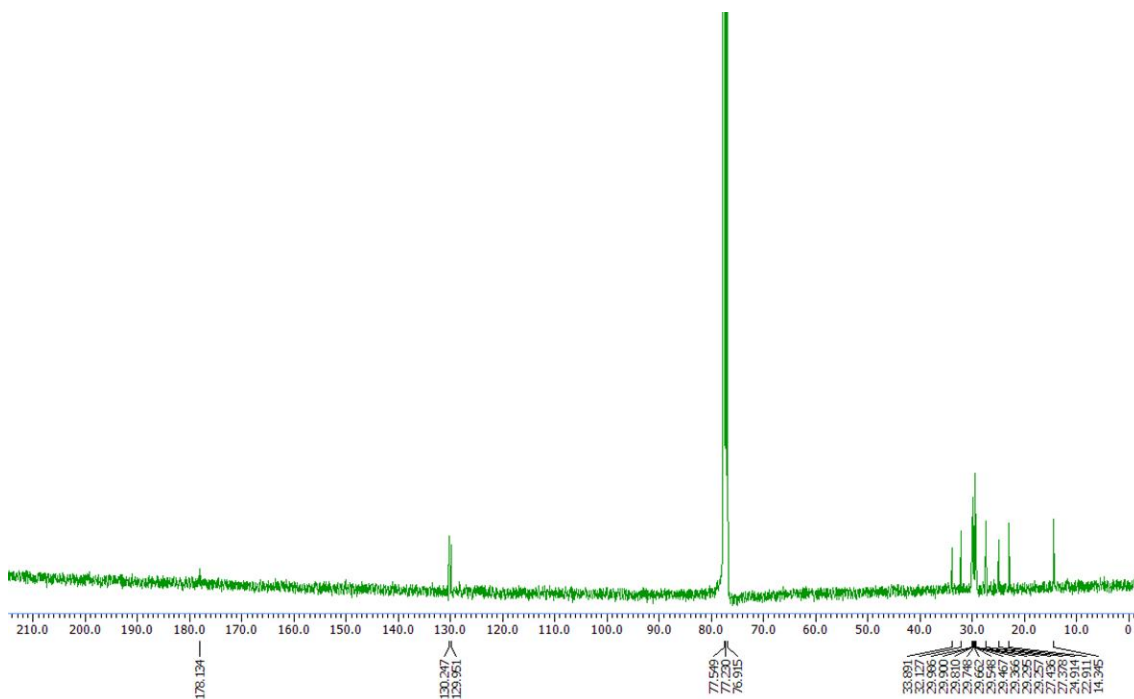


Figure 37. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **2** in chloroform-*d*.



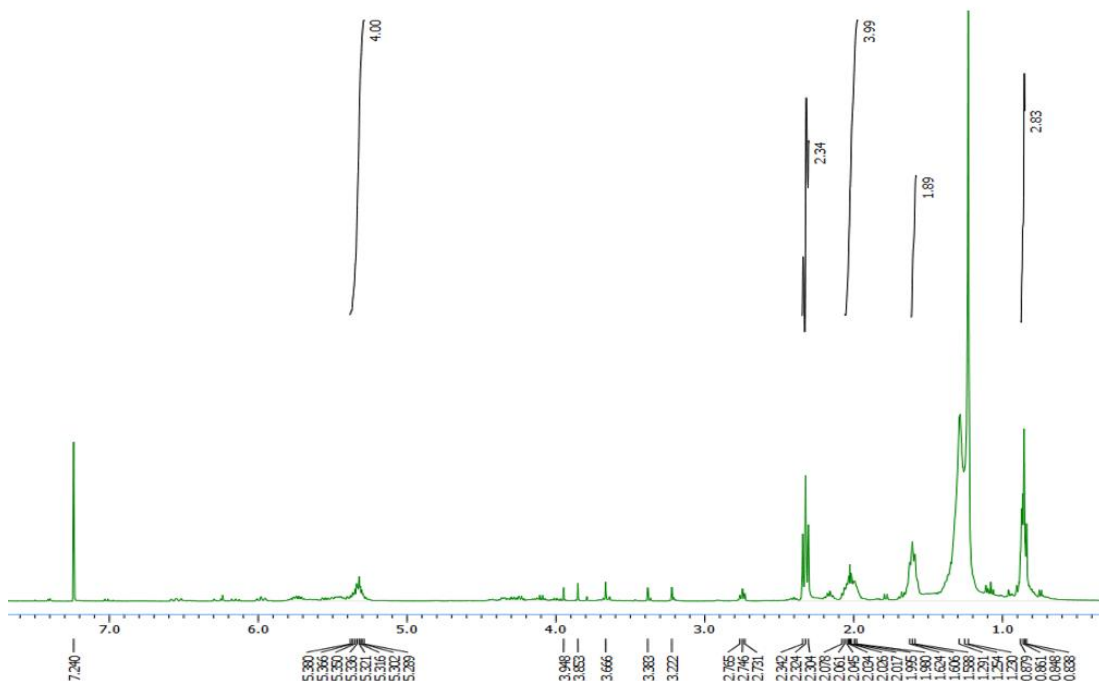


Figure 39. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in chloroform-*d*.

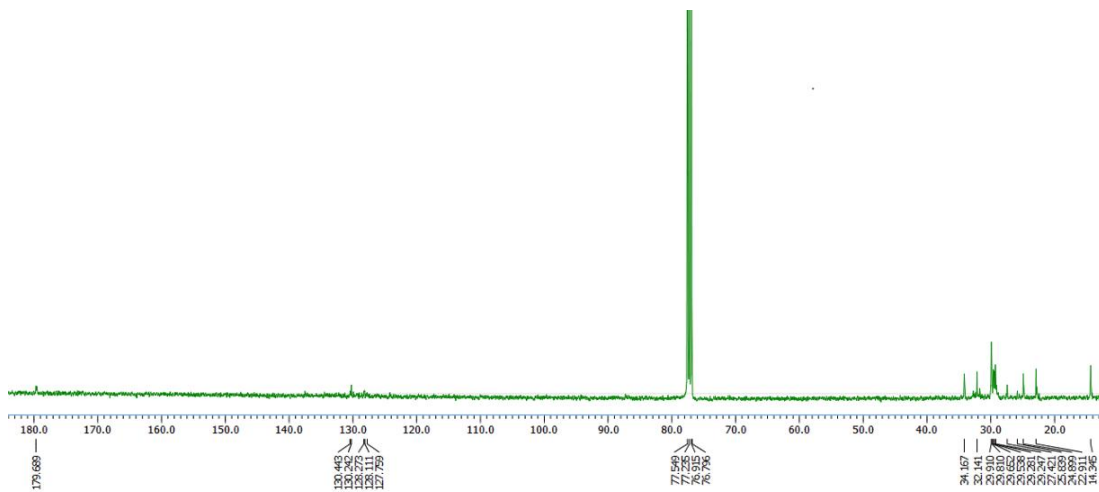


Figure 40. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in chloroform-*d*.

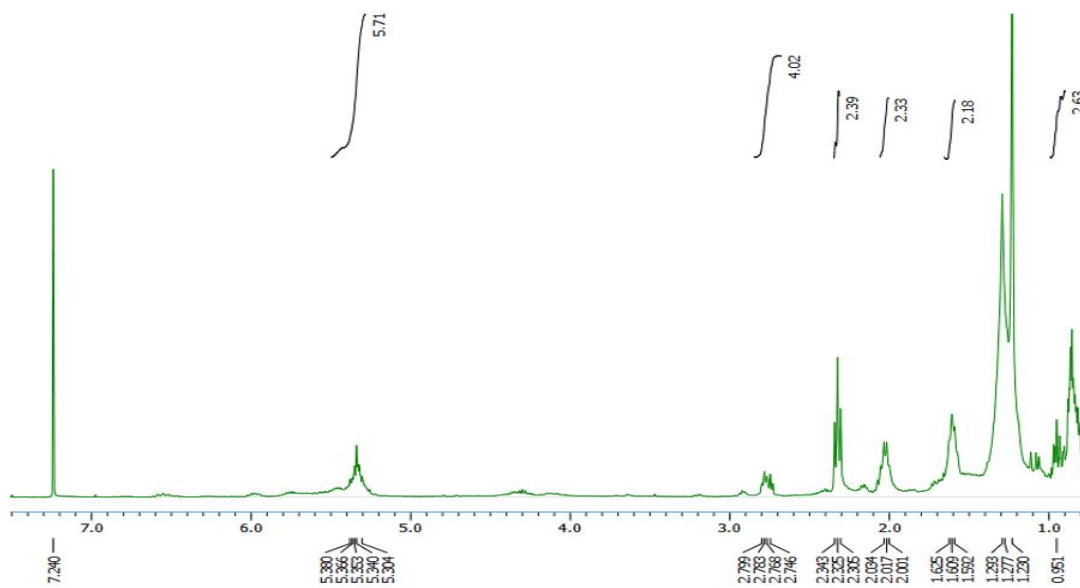


Figure 41. ^1H -NMR spectrum of compound **4** in chloroform-*d*.

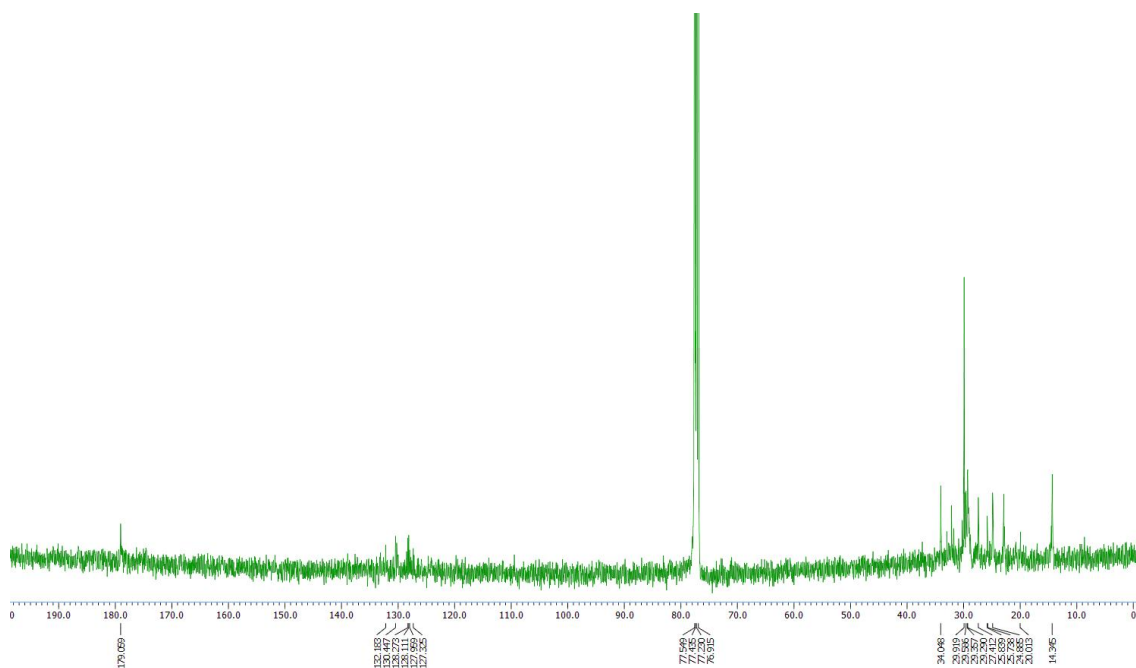


Figure 42. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** in chloroform-*d*.

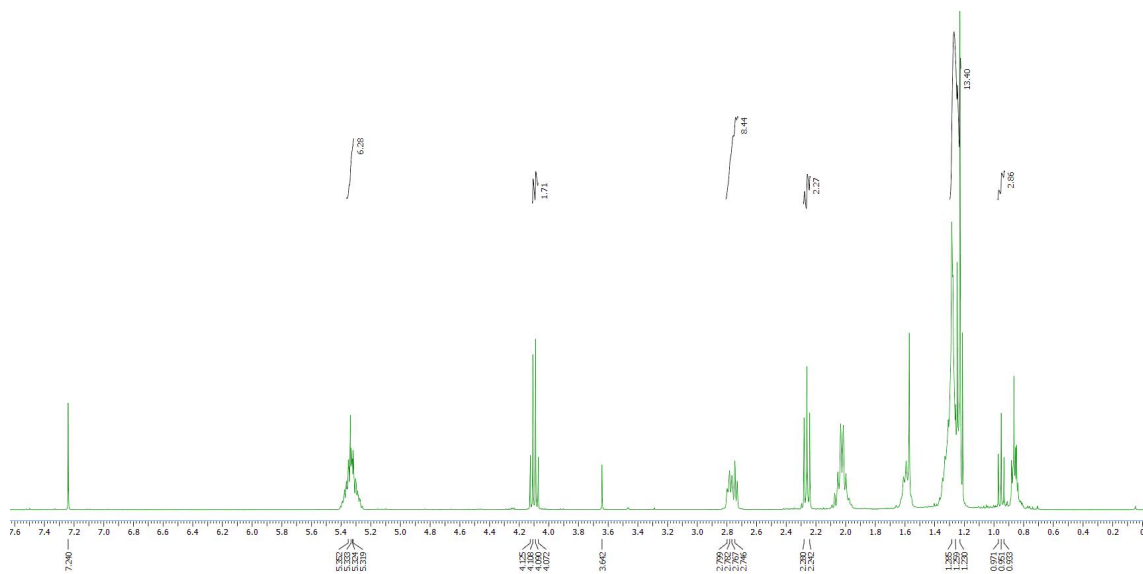


Figure 43. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **5** in chloroform-*d*.

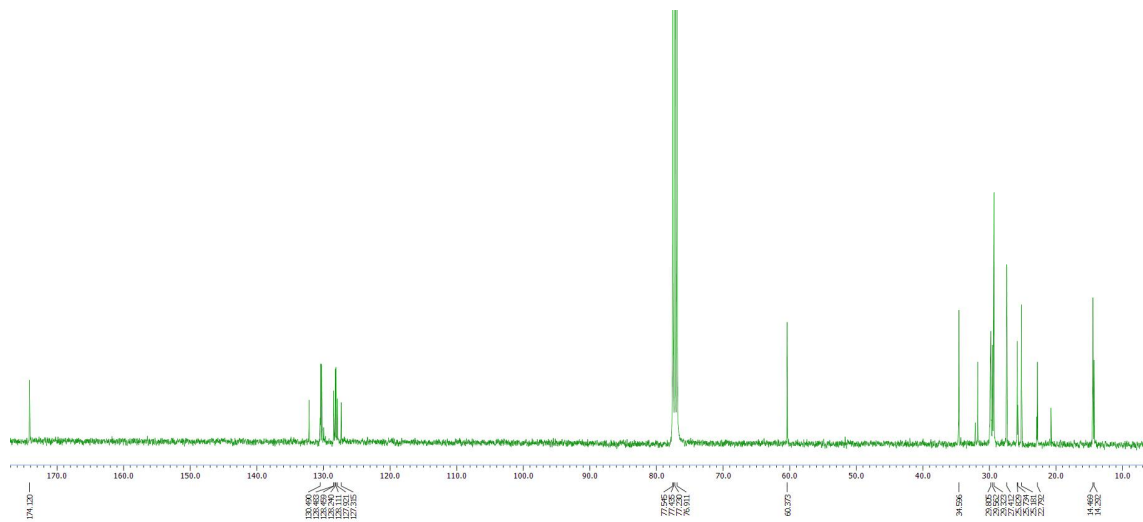


Figure 44. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **5** in chloroform-*d*.

1) Compounds 6, 7의 구조 동정

Compound 6은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 30개의 carbon피크가 있는 것이 확인되었고 δ_{C} 213.5의 피크는 carbonyl group를 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.86 (3H, s), 0.7 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.98 (3H, s), 1.02 (3H, s), 1.16 (3H, s), 0.97 (3H, s), 0.93 (3H, s), chemical shift 값 및 integral로 보아 8개의 methyl group을 확인하여 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 triterpene구조로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁷⁸비교하여 compound 6은 friedelin로 확인되었다(Figure 45-47, Table 12).

Compound 7은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 비교한 결과를 보면 compound 1를 같은 triterpene구조를 예상하였다. δ_{C} 72.9의 피크는 deshielding된 으로 보아 산소가 인접한 sp^3 임을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁷⁸비교하여 compound 7은 friedelinol로 확인되었다(Figure 45, 48, 49, Table 12).

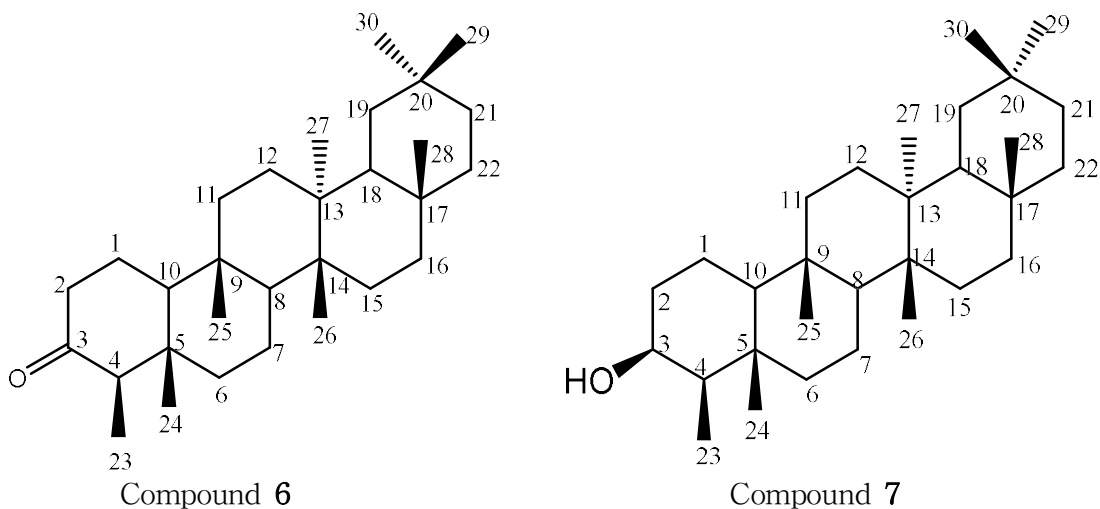


Figure 45. Chemical structure of compounds 6,7.

Table 12. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **6**, **7** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 6		Compound 7	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1	1.97 (1H, m) 1.75 (1H, m)	22.5	1.69 (1H, m) 1.45 (1H, m)	15.9
2	2.39 (1H, dd, 13.7, 2.3) 2.31 (1H, dd, 6.9, 5.9)	41.7	1.98 (1H, m) 1.56 (1H, m)	36.3
3		213.5	3.72 (1H, d, 12.3)	72.9
4	2.26 (1H, q, 6.9)	58.4	1.23 (1H, m)	49.3
5		42.4		38.0
6		41.5	1.74 (1H, m) 0.98 (1H, m)	41.9
7		18.4	1.42 (1H, m) 1.39 (1H, m)	17.7
8		53.3	1.28 (1H, m)	53.4
9		37.6		37.3
10		59.6	0.93 (1H, m)	61.5
11		35.8	1.45 (1H, m) 1.24 (1H, m)	35.5
12		30.7	1.34 (1H, m) 1.33 (1H, m)	30.2
13		39.9		39.9
14		38.5		38.5
15		32.9	1.55 (1H, m) 1.31 (1H, m)	32.5
16		36.2	1.46 (1H, m) 1.16 (1H, m)	35.8
17		30.2		29.9
18		43.0	1.56 (1H, dd, 12.4, 5.1)	43.0
19		35.5	1.37 (1H, m) 1.23 (1H, m)	35.2
20		28.4		28.4
21		32.6	1.49 (1H, m) 1.28 (1H, m)	32.9
22		39.5	0.94 (1H, m) 1.49 (1H, m)	39.5
23	0.86 (3H, s)	7.1	0.93 (3H, s)	11.8
24	0.70 (3H, s)	14.9	0.86 (3H, s)	16.6
25	0.85 (3H, s)	18.2	0.94 (3H, s)	18.4
26	0.98 (3H, s)	20.5	0.98 (3H, s)	20.3
27	1.02 (3H, s)	18.9	1.03 (3H, s)	18.9
28	1.16 (3H, s)	32.3	1.16 (3H, s)	32.3
29	0.97 (3H, s)	32.0	0.96 (3H, s)	35.2
30	0.93 (3H, s)	35.2	0.97 (3H, s)	31.9

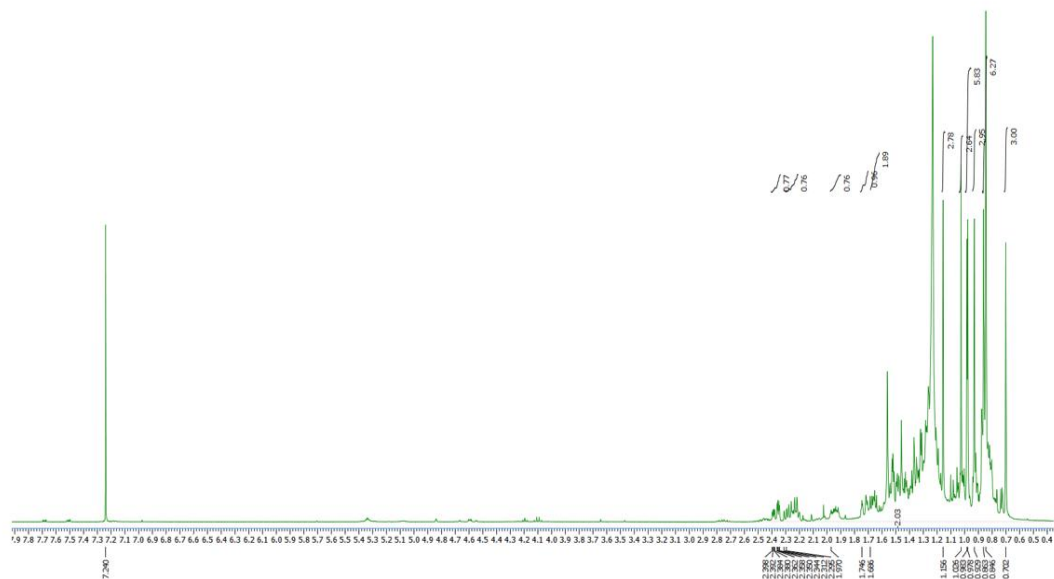


Figure 46. ^1H -NMR spectrum of compound **6** in chloroform-*d*.

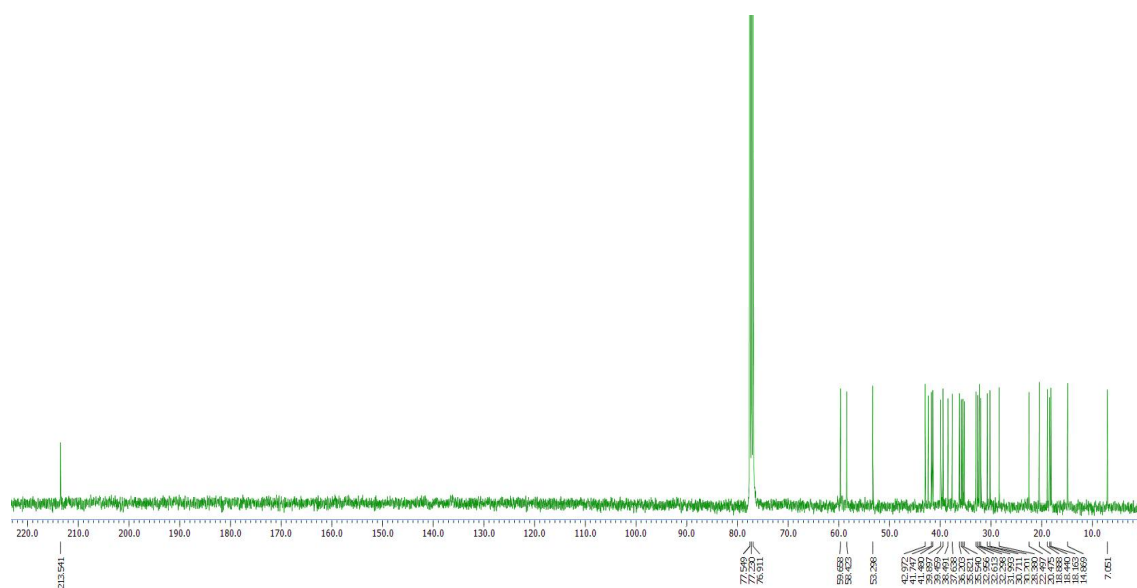


Figure 47. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in chloroform-*d*.

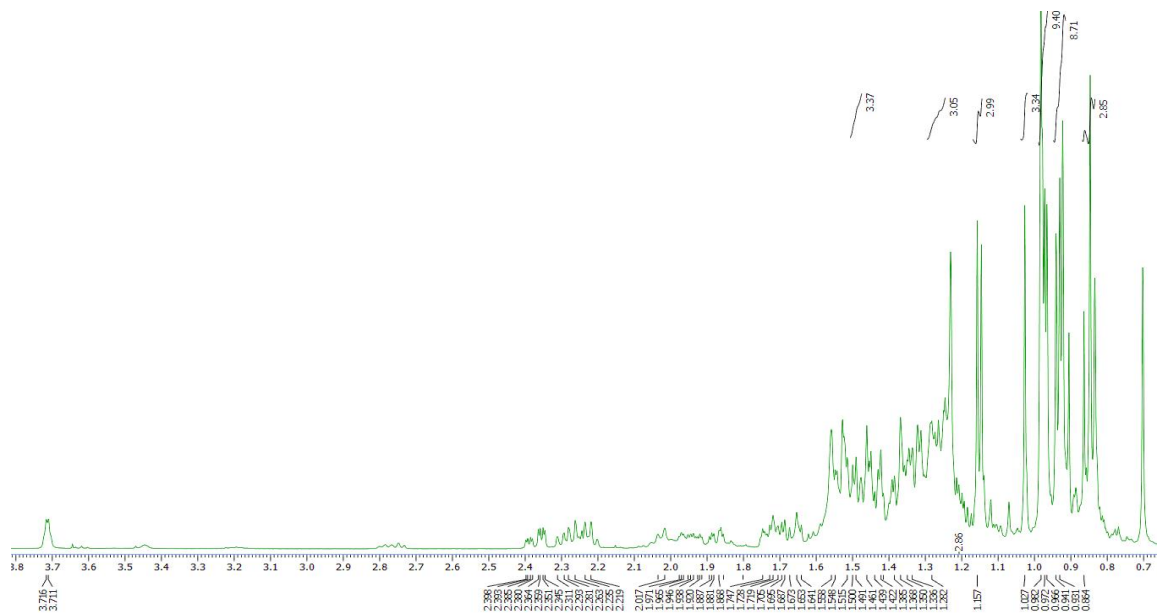


Figure 48. ^1H -NMR spectrum of compound **7** in chloroform-*d*.

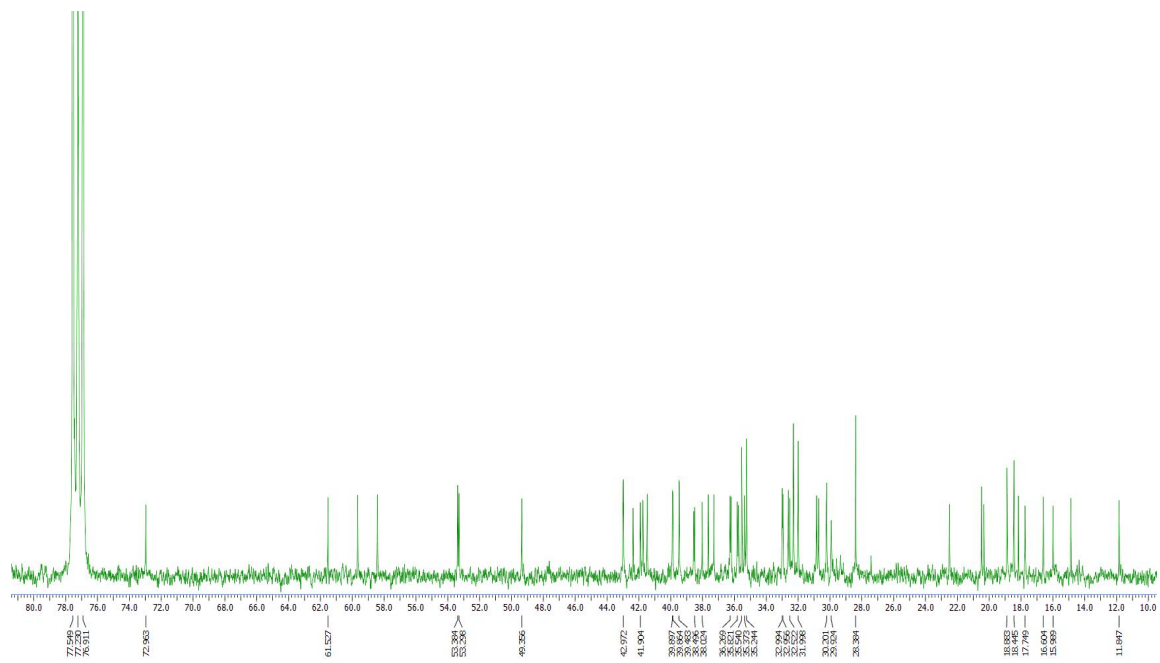


Figure 49. ^{13}C -NMR spectrum of compound **7** in chloroform-*d*.

3) Compounds 8–10의 구조 동정

Compound 8은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 1.07 (3H, s), 1.15 (3H, s), 0.83 (3H, s), 0.98 (3H, s), 0.96 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.02 (3H, s), 0.91 (3H, s), chemical shift 값 및 integral로 보아 8개의 methyl group을 예상하였다. δ_{H} 5.61 (1H, d, $J = 5.9$ Hz) 피크는 sp^2 혼소 탄소 시그널으로 이중결합 구조를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 30개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 76.6의 시그널은 산소가 인접한 위치의 methine carbon를 예상하였다. 3차 카본 δ_{C} 122.3, 4차 카본 δ_{C} 141.8는 olefin group을 확인하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 triterpene 구조으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁷⁹ 비교하여 compound 8은 glutinol로 확인되었다(Figure 50–52, Table 13).

Compound 9는 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound 7와 비교하여 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. compound 8은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.80(3H, s), 0.97 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.94(3H, s), 1.11 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.86 (3H, s), chemical shift 값 및 integral로 보아 8개의 methyl group을 예상하였다. δ_{H} 5.16 (1H, t, $J = 3.7$ Hz) 피크는 sp^2 혼소 탄소 시그널으로 이중결합 구조를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 30개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 79.2의 시그널은 산소가 인접한 위치의 methine carbon를 예상하였다. 3차 카본 δ_{C} 122.9, 4차 카본 δ_{C} 145.4는 olefin group를 확인하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 triterpene 구조으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁸⁰ 비교하여 compound 9는 3 β -olean-12-en-3-ol로 확인되었다(Figure 50, 53, 54, Table 13).

Compound 10은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound 8와 비교하여 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. compound 9는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.95 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.73 (3H, s), 0.90 (3H, s), 1.11 (3H, s), 0.75 (3H, s), 0.87 (3H, s), chemical shift 값 및 integral은 보아 7개의 methyl group을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 30개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 183.9 시그널은 carboxy group를 예상하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 triterpene 구조으로 예상하였다. 이

를 바탕으로 문헌⁸¹ 비교하여 compound 10은 Oleanolic acid로 확인되었다 (Figure 50, 55, 56, Table 13).

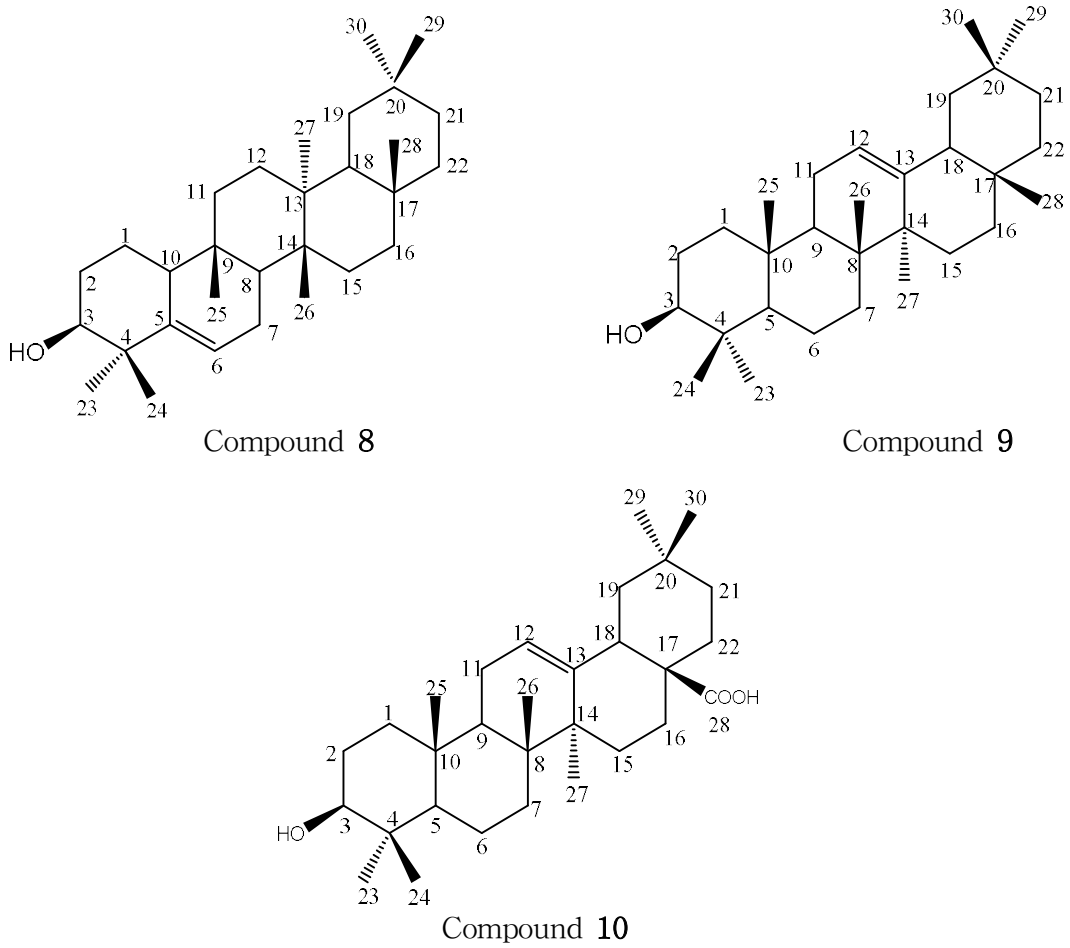


Figure 50. Chemical structure of compounds 8-10.

Table 13. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **8**–**10** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 8		Compound 9		Compound 10	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1	1.55 (1H, m) 1.48 (1H, m)	23.8	1.6 (2H, m)	38.8		38.6
2	1.84 (1H, m) 1.68 (1H, m)	18.4	1.59 (2H, m)	27.3		28.2
3	3.45 (1H, t, 2.8)	76.6	3.22 (1H, dd, 11.2, 4.6)	79.2	3.19 (1H, dd, 11.0 4.6)	79.3
4		39.5		38.9		39.5
5		141.8	0.77 (1H, s)	55.4		55.4
6	5.61 (1H, d, 5.9)	122.3		18.6		18.5
7	1.95 (1H, m) 1.84 (1H, m)	28.0		32.8		33.2
8	1.53 (1H, m)	43.2		39.9		38.9
9		35.0	1.54 (1H, m)	47.8		47.8
10	2.03 (1H, m)	49.9		37.1		37.2
11	1.50 (1H, m) 1.38 (1H, m)	34.8	1.87 (2H, m)	23.7		23.1
12	1.33 (2H, m)	30.6	5.16 (1H, t, 3.7)	121.9	5.25 (1H, t, 3.7)	122.8
13		38.0		145.4		143.7
14		41.0		41.9		41.8
15	1.48 (1H, m) 1.33 (1H, m)	32.3	1.97 (2H, m)	26.4		27.9
16	1.53 (1H, m) 1.36 (1H, m)	36.2	1.75 (2H, m)	26.2		23.6
17		30.3		32.7		46.7
18	1.58 (1H, m)	47.6	1.55 (1H, m)	47.4	2.79 (1H, dd, 13.3, 4.6)	41.2
19	1.55 (1H, m) 0.93 (1H, m)	35.3	1.67 (2H, m)	47.0		46.0
20		28.5		37.3		30.7
21	1.41 (1H, m) 1.26 (1H, m)	33.2		34.9		34.0
22	1.58 (1H, m) 0.93 (1H, m)	39.1		37.3		32.6
23	1.07 (3H, s)	29.0	0.80 (3H, s)	15.7	0.95 (3H, s)	28.2
24	1.15 (3H, s)	25.6	0.97 (3H, s)	28.3	0.87 (3H, s)	15.5
25	0.83 (3H, s)	16.4	0.92 (3H, s)	15.8	0.73 (3H, s)	14.3
26	0.98 (3H, s)	18.6	0.94 (3H, s)	17.0	0.90 (3H, s)	15.8
27	0.96 (3H, s)	19.8	1.11 (3H, s)	25.9	1.11 (3H, s)	26.1
28	1.12 (3H, s)	32.6	0.85 (3H, s)	28.6		183.9
29	1.02 (3H, s)	34.7	0.88 (3H, s)	33.6	0.75 (3H, s)	32.8
30	0.91 (3H, s)	32.2	0.86 (3H, s)	23.9	0.87 (3H, s)	23.7

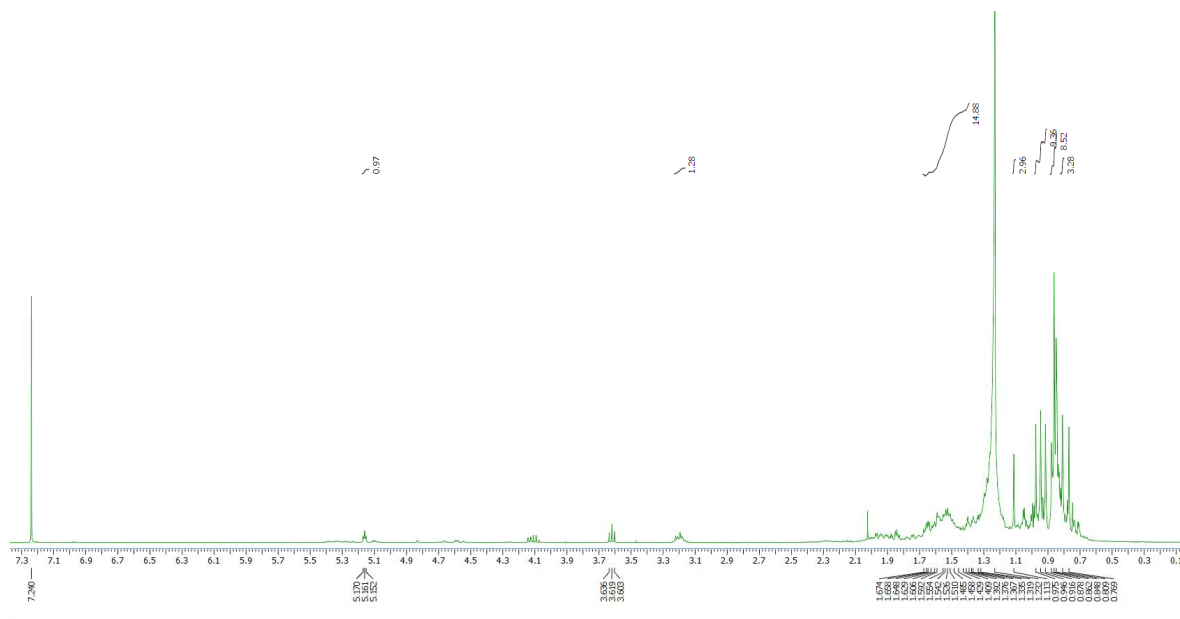


Figure 53. ^1H -NMR spectrum of compound **9** in chloroform-*d*.

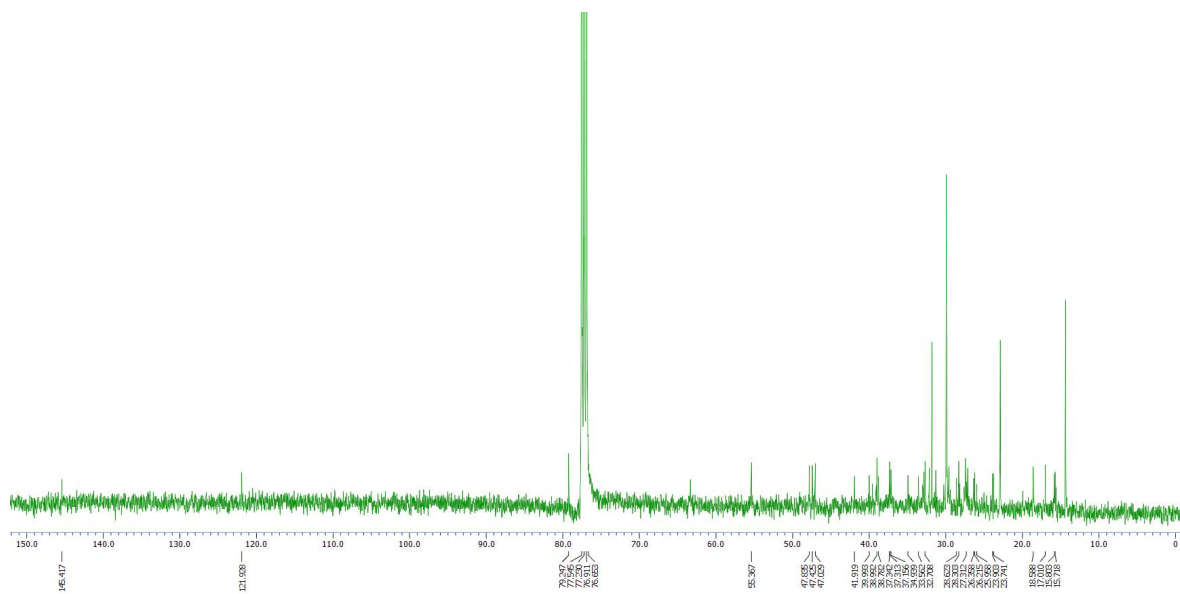


Figure 54. ^{13}C -NMR spectrum of compound **9** in chloroform-*d*.

4) Compound 11의 구조 동정

Compound 11은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.66 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.81 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.79 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.83 (3H, t, $J = 7.8$ Hz) chemical shift 값 및 integral로 보아 6개의 methyl group을 예상하였다. δ_{H} 5.34 (1H, d, $J = 5.5$ Hz) 피크는 sp^2 혼소 탄소 시그널으로 이중 결합 구조를 예상하였다. δ_{H} 3.50 (1H, m) 의 시그널은 산소가 인접해 있는 sp^3 혼성한 methine proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 29개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 11.9, 19.8, 18.9, 19.4, 19.0, 12.2의 시그널을 methyl 카본으로 이를 통해 sterol 계열의 화합물로 예상하였다. 3차 카본 δ_{C} 121.7, 4차 카본 δ_{C} 140.7은 olefin group 확인하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 이를 바탕으로 문헌⁷⁹ 비교하여 compound 11은 β -sitosterol로 확인되었다(Figure 57-59, Table 14).

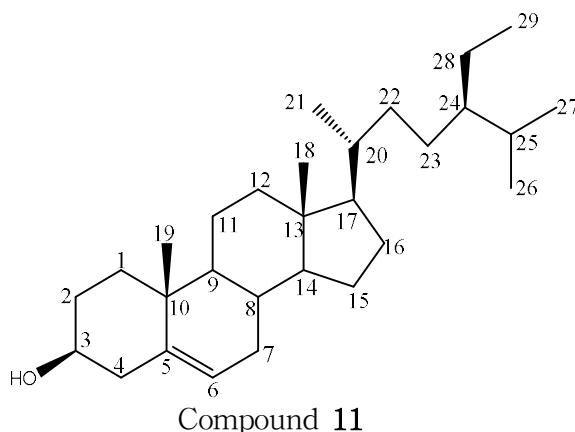


Figure 57. Chemical structure of compound 11.

Table 14. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **11** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 11	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1		37.2
2		29.7
3	3.52 (1H, m)	71.8
4		42.3
5		140.7
6	5.34 (1H, d, 5.5)	121.7
7		31.9
8		31.6
9		50.1
10		36.4
11		21.1
12		39.7
13		42.3
14		56.7
15		24.3
16		28.9
17		56.0
18	0.66 (3H, s)	11.9
19	0.99 (3H, s)	19.8
20		36.1
21	0.91 (3H, d, 6.4)	18.9
22		34.3
23		26.0
24		45.8
25		29.4
26	0.81 (3H, d, 6.9)	19.4
27	0.79 (3H, d, 6.9)	19.0
28		22.7
29	0.83 (3H, t, 7.8)	12.2

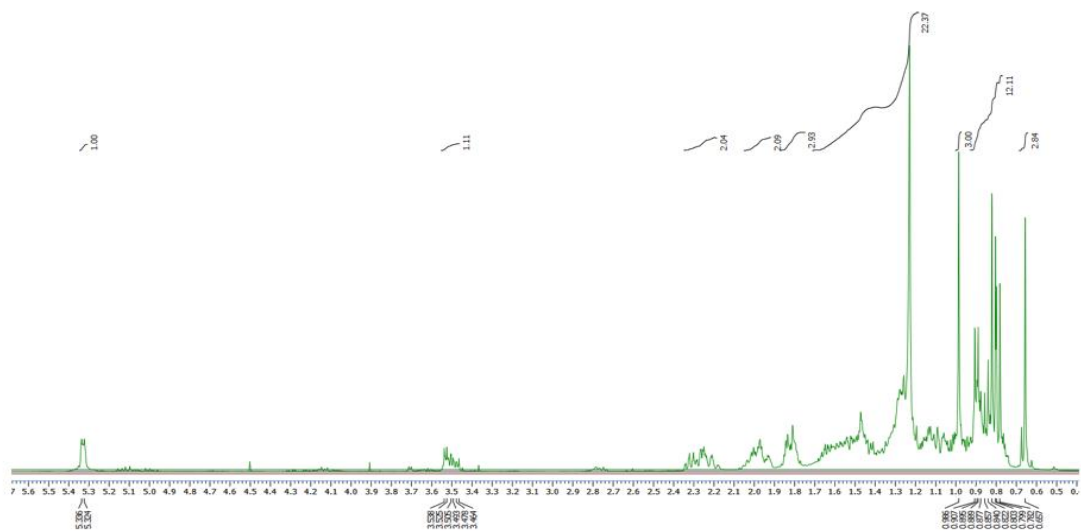


Figure 58. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **11** in chloroform-*d*.

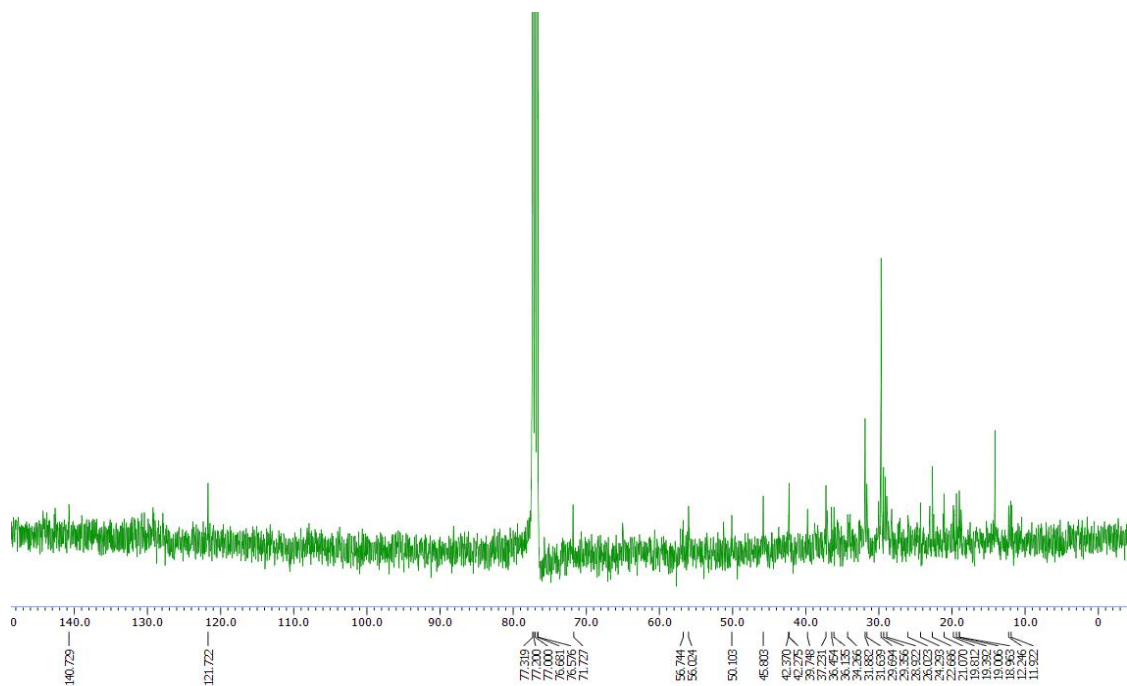


Figure 59. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **11** in chloroform-*d*.

5) Compound 12의 구조 동정

Compound 12는 환근잎에서 분리된 compound 5은 같은 화합물인 이를 바탕으로 문헌⁵¹ 비교하여 compound 12는 *p*-Hydroxyphenethyl *trans*-ferulate로 확인되었다(Figure60-62, Table 15).

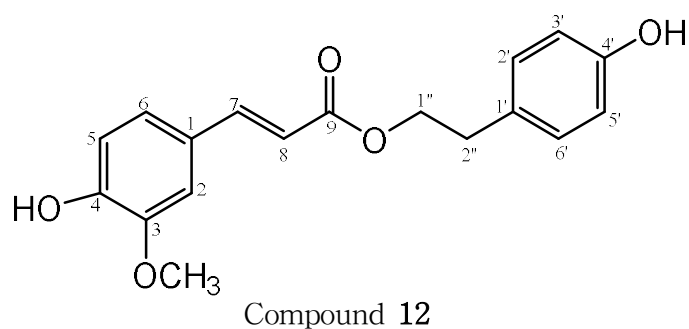


Figure 60. Chemical structure of compound 12 .

Table 15. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **12** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 12	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		128.4
2	7.11 (1H, d, 1.8)	111.6
3		149.4
4		149.9
5	6.79 (1H, d, 8.2)	116.6
6	7.02 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.4
7	7.41 (1H, d, 15.6)	142.2
8	6.40 (1H, d, 15.6)	118.8
9		169.3
1'		131.2
2'	7.04 (1H, d, 8.7)	130.9
3'	6.71 (1H, d, 8.7)	116.4
4'		157.1
5'	6.71 (1H, d, 8.7)	116.4
6'	7.04 (1H, d, 8.7)	130.9
1''	3.46 (2H, t, 7.3)	42.7
2''	2.75 (2H, t, 7.3)	35.9
-OCH ₃	3.88 (3H, s)	56.5

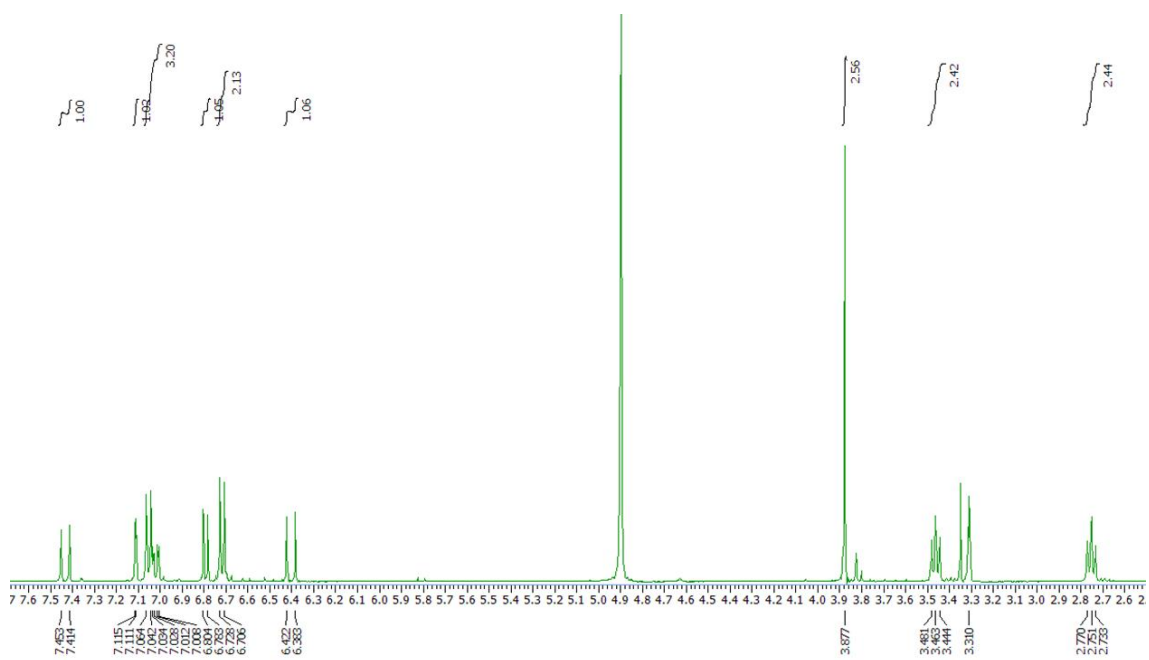


Figure 61. ^1H -NMR spectrum of compound **12** in methanol- d_4 .

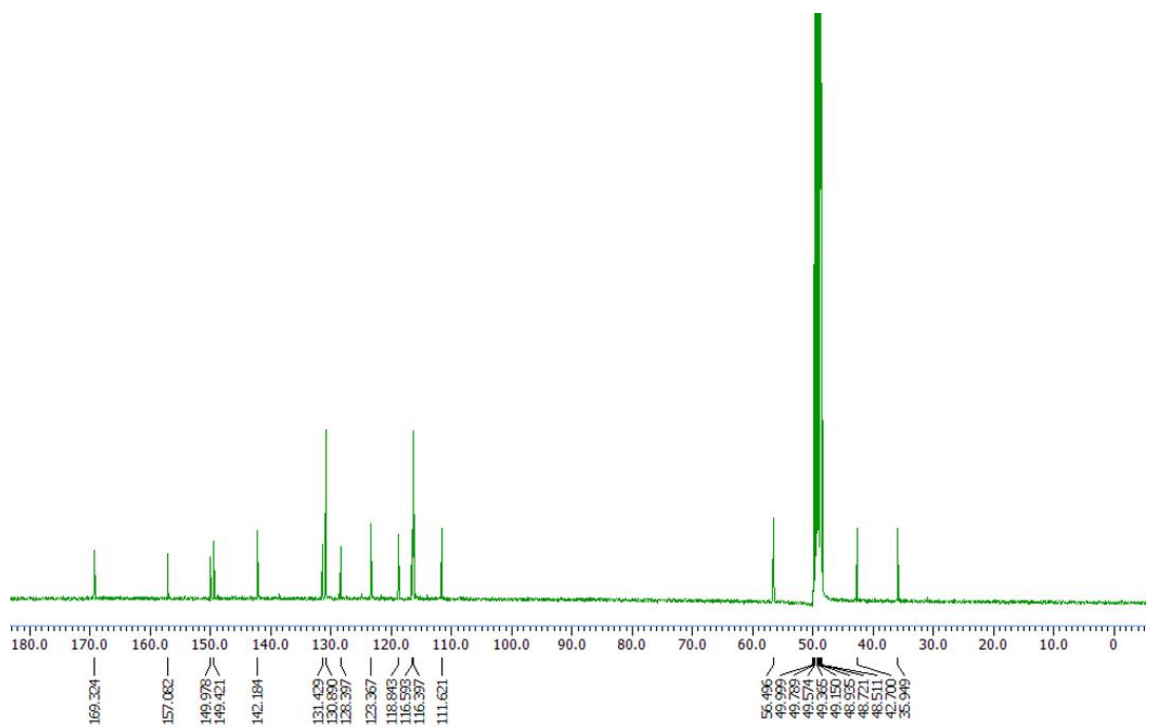
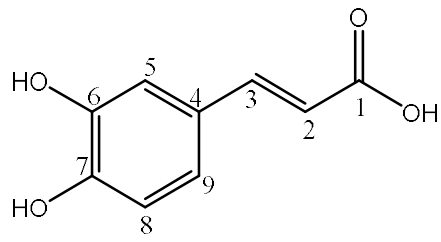


Figure 62. ^{13}C -NMR spectrum of compound **12** in methanol- d_4 .

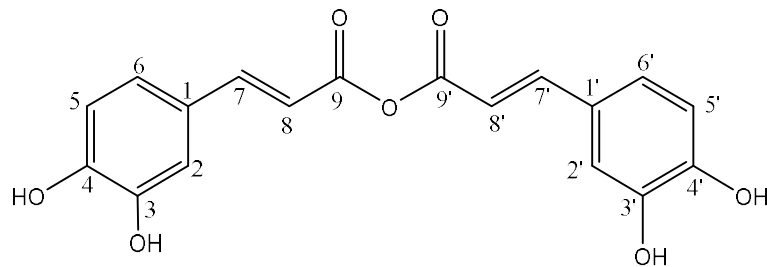
6) Compounds 13, 14의 구조 동정

Compound 13은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.19 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), δ_{H} 7.53 (1H, d, $J = 16.0$ Hz) 피크의 chemical shift 값과 coupling constant 값은 통하여 trans form의 이중 결합이 있음을 예상하였다. 또한 δ_{H} 7.03 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), δ_{H} 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) 그리고 δ_{H} 6.93 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 9개의 carbon 피크가 관찰을 되었다. 그중에 δ_{C} 169.3 시그널을 통해 carboxy group를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁸²과 비교하여 compound 13은 caffeic acid로 확인되었다(Figure 63-65, Table 16).

Compound 14는 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound 13와 비교하여 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. compound 14는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), δ_{H} 6.63 (1H, d, $J = 16.0$ Hz) 피크의 chemical shift 값과 coupling constant 값은 통하여 trans form의 이중 결합이 있음을 예상하였다. 또한 δ_{H} 7.02 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), δ_{H} 6.93 (1H, dd, $J = 8.2, 2.3$ Hz) 그리고 δ_{H} 6.92 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 두개 대칭구정을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 18개의 carbon 피크가 관찰을 되었다. 그중에 두개 δ_{C} 169.4 시그널을 통해 carboxy group를 확인하였고 anhydride 계열의 화합물로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌⁸³과 비교하여 compound 14는 caffeic anhydride로 확인되었다(Figure 63, 66, 67, Table 16).



Compound 13



Compound 14

Figure 63. Chemical structure of compounds 13, 14.

Table 16. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **13**, **14** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 13		Compound 14	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		169.3		128.3
2	6.19 (1H, d, 16.0)	115.2	7.02 (1H, d, 2.3)	115.2
3	7.53 (1H, d, 16.0)	147.1		147.1
4		128.2		149.7
5	7.03 (1H, d, 1.8)	115.2	6.92 (1H, d, 8.2)	116.4
6		147.0	6.93 (1H, dd, 8.2, 2.3)	123.1
7		149.9	7.50 (1H, d, 16.0)	146.9
8	6.78 (1H, d, 8.2)	116.8	6.22 (1H, d, 16.0)	116.4
9	6.93 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.1		169.4
1'				128.3
2'			7.02 (1H, d, 2.3)	115.2
3'				147.1
4'				149.7
5'			6.92 (1H, d, 8.2)	116.4
6'			6.93 (1H, dd, 8.2, 2.3)	123.1
7'			7.50 (1H, d, 16.0)	146.9
8'			6.63 (1H, d, 16.0)	116.4
9'				169.4

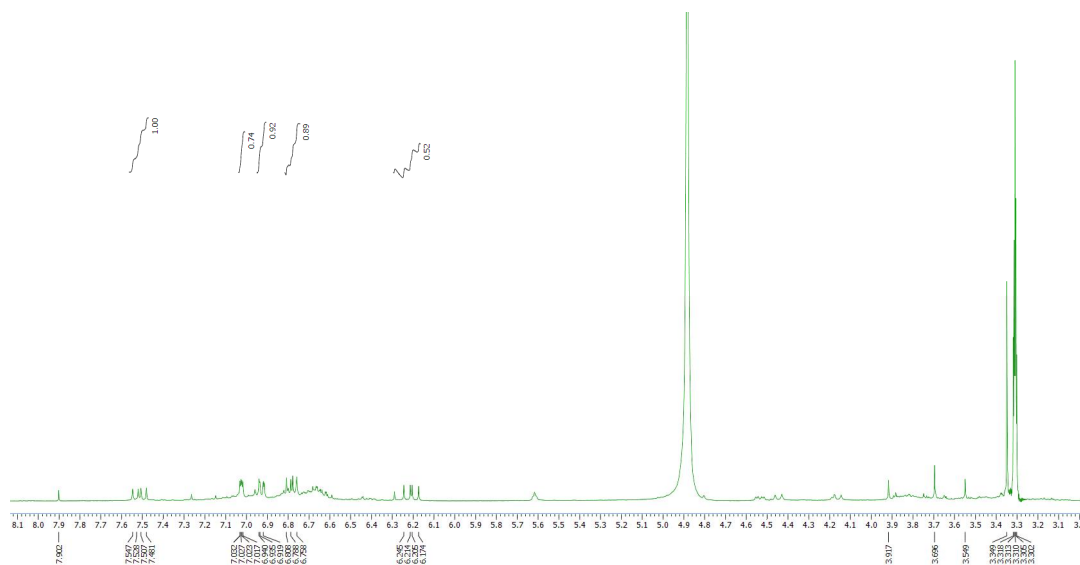


Figure 64. ^1H -NMR spectrum of compound **13** in methanol- d_4 .

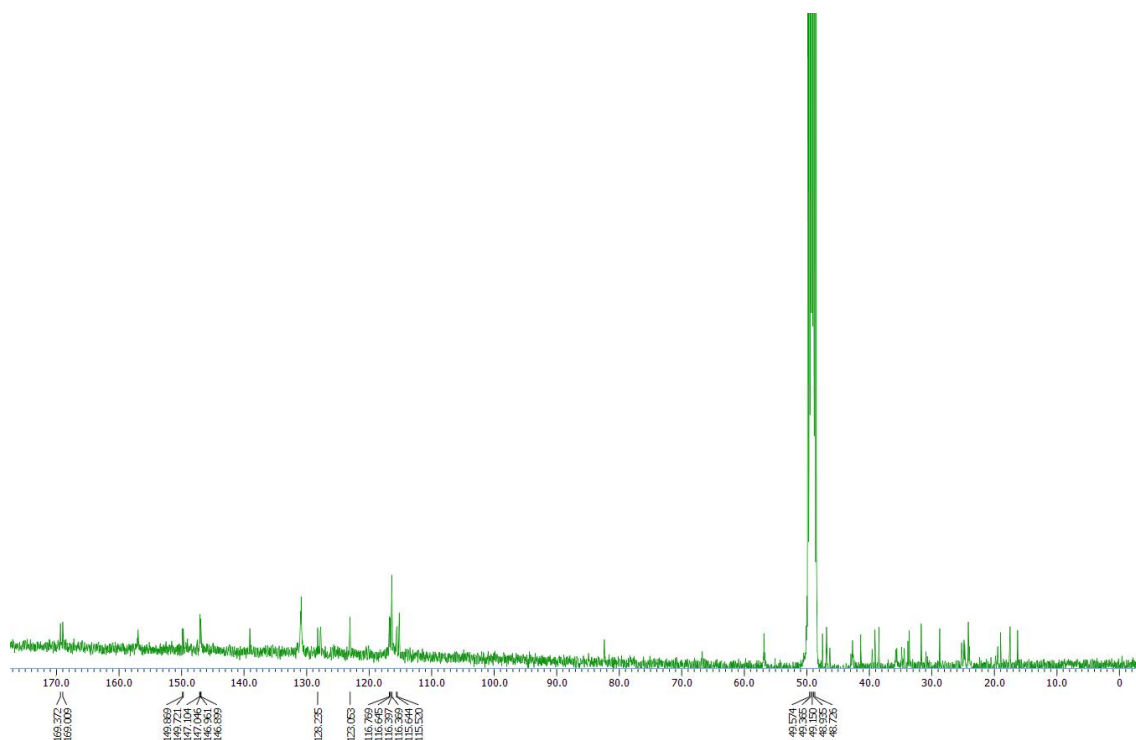


Figure 65. ^{13}C -NMR spectrum of compound **13** in methanol- d_4 .

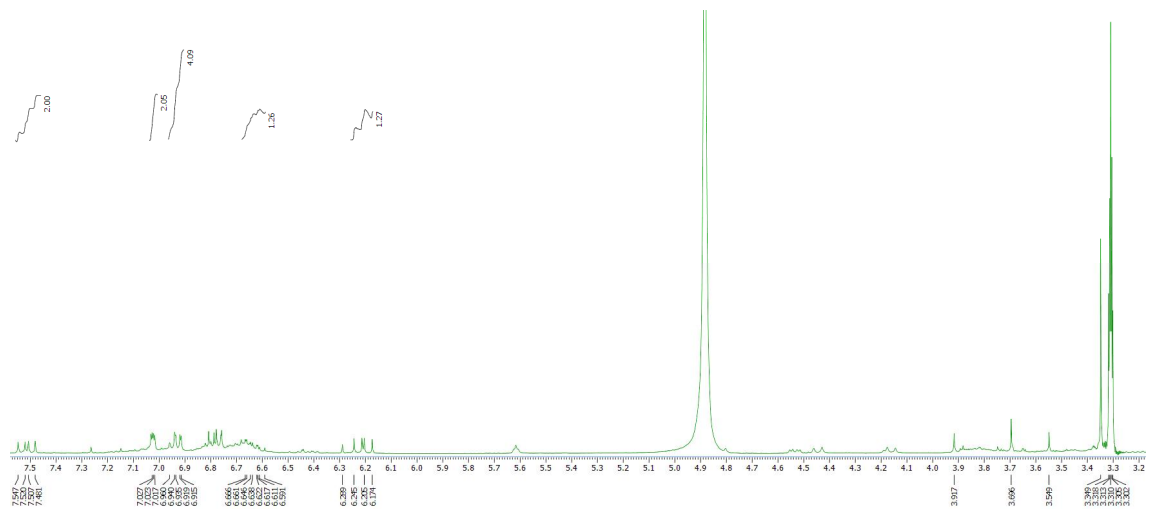


Figure 66. ^1H NMR spectrum of compound **14** in methanol- d_4 .

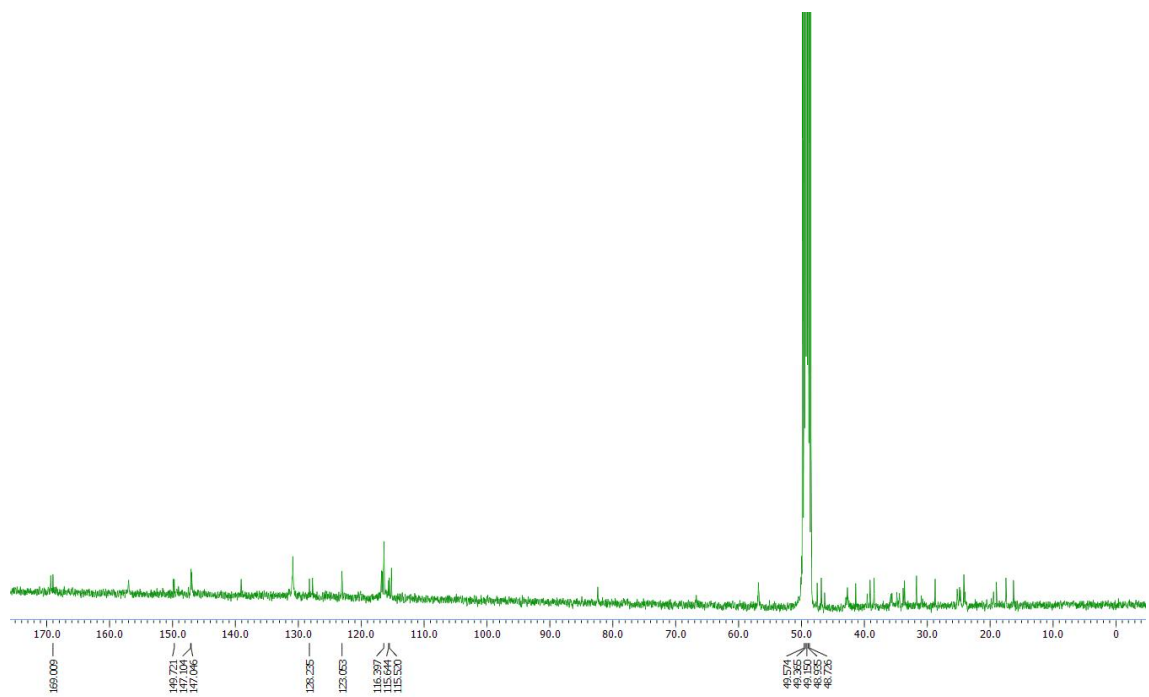
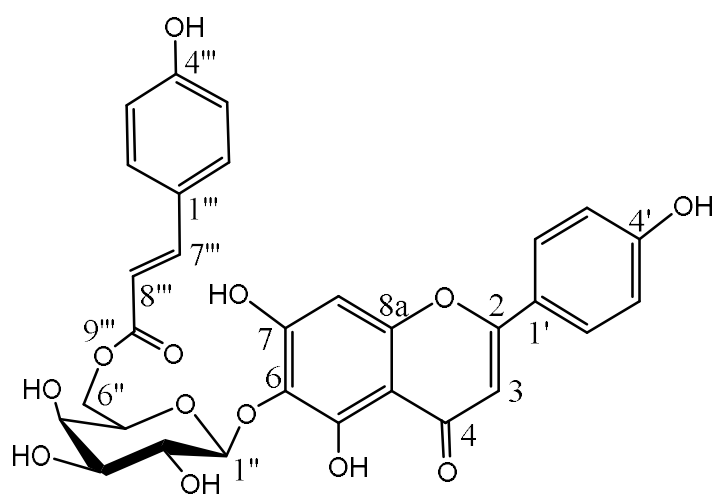


Figure 67. ^{13}C NMR spectrum of compound **14** in methanol- d_4 .

7) Compound 15의 구조 동정

Compound 15는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 8.45 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), δ_{H} 7.16 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 하고 있는 대칭 구조의 aromatic ring proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 179.2 시그널을 통해 carbonyl group 를 예상하였다. δ_{C} 104.6 시그널을 통해 ^1H NMR spectrum를 종합하며 scutellarein의 aglycone 구조를 직접 연결하는 것으로 예상하였다. 또한 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.85 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), δ_{H} 6.51 (1H, d, $J = 16.0$ Hz) trans form의 이중 결합이 있음을 예상하였다. 그리고 δ_{H} 7.51 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), δ_{H} 7.13 (2H, d, $J = 8.6$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 하고 있는 대칭 구조의 aromatic ring proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ_{C} 161.8 시그널을 통해 oxhydryl group 를 예상하였다. δ_{C} 167.8 시그널을 통해 carboxy group 를 예상하였으며, ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 이 *p*-coumaroyl의 aglycone구조를 직접 연결하는 것으로 예상하였다. δ_{H} 6.26 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크의 anomeric proton 피크를 예상하였고 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하며 β -galactopyranose를 예상하였다. 그중에 anomeric proton는 scutellarein를 연결관계를 확인하였고 β -galactopyranose는 *p*-coumaroyl group으로 연결관계를 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌⁸⁴과 비교하여 compound 15는 triumfettalarein로 확인되었다 (Figure 68-70, Table 17).



Compound 15

Figure 68. Chemical structure of compound 15.

Table 17. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **15** (400 and 100 MHz, pyridine- d_5).

Compound 15		
No.	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		162.2
3	6.70 (1H, s)	100.4
4		179.2
4a		105.7
5		157.8
6		135.5
7		166.5
8	6.70 (1H, s)	95.1
8a		163.2
1'		122.4
2', 6'	8.45 (2H, d, 8.7)	132.3
3', 5'	7.16 (2H, d, 8.7)	116.5
4'		158.3
1''	6.26 (1H, d, 7.8)	104.6
2''	4.40 (1H, m, overlapped)	76.5
3''	4.20 (1H, m)	71.7
4''	4.40 (1H, t, 3.7)	78.7
5''	4.20 (1H, m)	76.5
6a''	4.85 (1H, dd, 11.7, 5.5)	64.7
6b''	5.01 (1H, d, 11.5)	
1'''		126.6
2''', 6'''	7.51 (2H, d, 8.6)	131.2
3''', 5'''	7.13 (2H, d, 8.6)	117.2
4'''		161.8
7'''	7.85 (1H, d, 16.0)	145.6
8'''	6.51 (1H, d, 16.0)	115.4
9'''		167.8

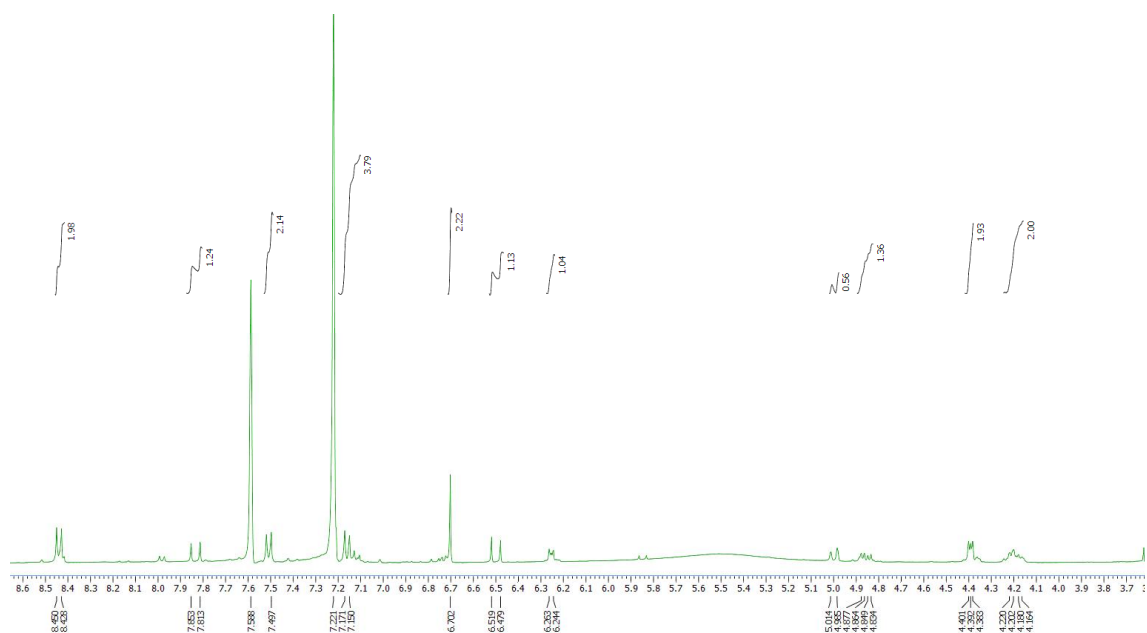


Figure 69. ^1H NMR spectrum of compound **15** in $\text{pyridine-}d_5$.

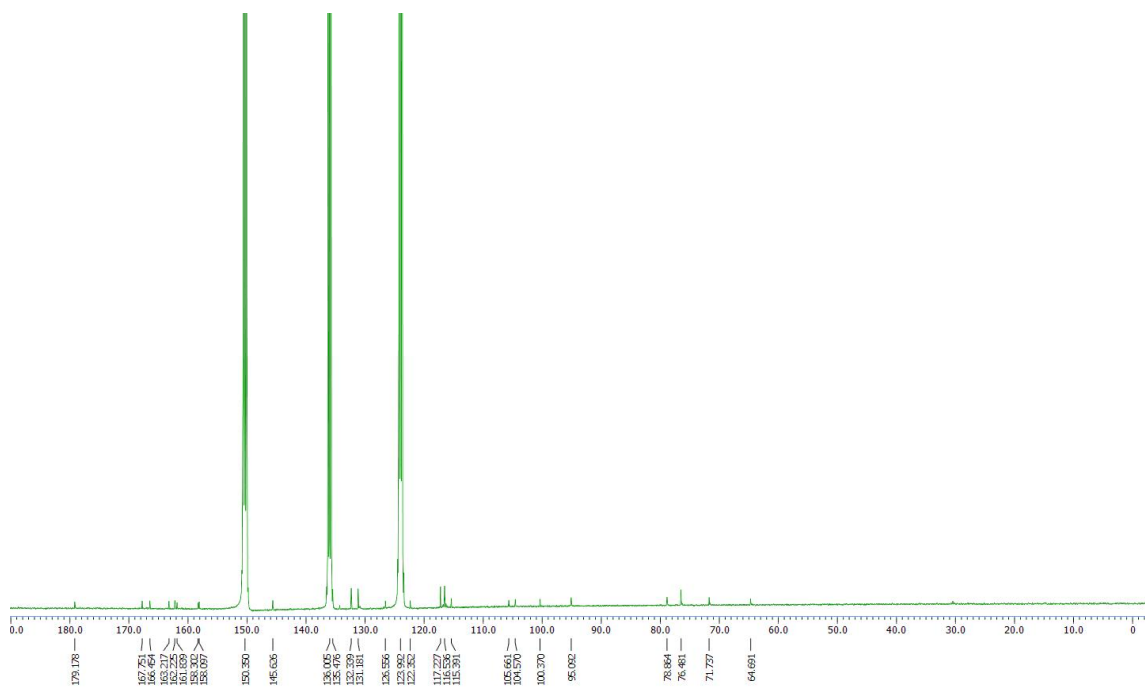


Figure 70. ^{13}C NMR spectrum of compound **15** in $\text{pyridine-}d_5$.

4. 황근 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 추출물 및 분획물의 항산화 활성 실험 결과

(1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량 측정은 gallic acid로 표준물질을 이용하여 황근 가지의 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀에 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallicacid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이 43.7 ± 2.3 mg/g GAE로 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 71).

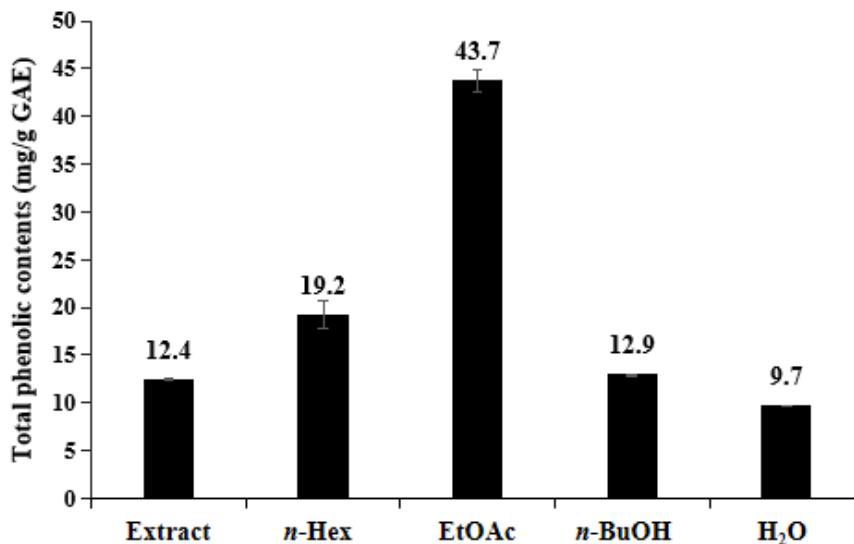


Figure 71. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *T.hamabo* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량

플라보노이드 함량 측정은 quercetin으로 표준물질을 이용하여 황근 가지 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 황근 가지 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량은 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetinequivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이 23.3 ± 1.5 mg/g QE로 분획물 중 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다 (Figure 72).

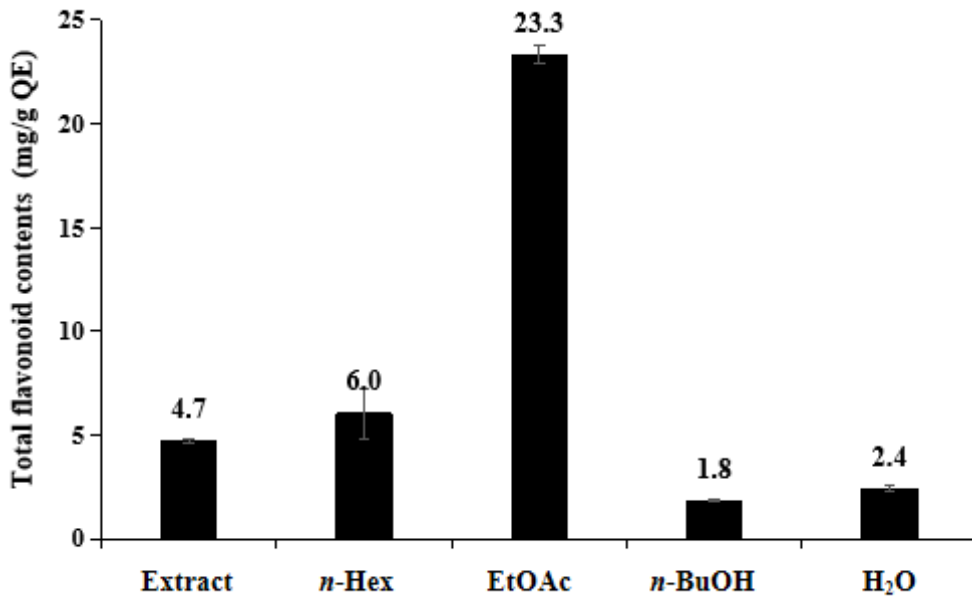


Figure 72. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *Thamabo* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

황근 가지 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 50 - 800 µg/mL의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, EtOAc 분획물의 SC₅₀ 값이 232.8 µg/mL로 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 73, Table 18).

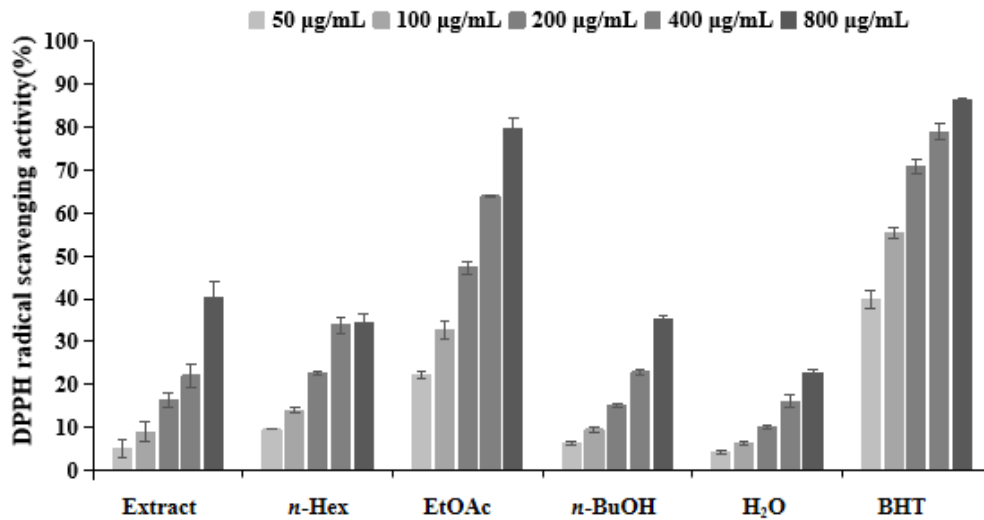


Figure 73. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 18. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* branches.

	Extract	n-Hex	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	>800	>800	232.8	>800	>800	66.1

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

황근 가지 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 6.25 - 400 µg/mL의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC₅₀값을 계산하였다. 실험 결과, EtOAc 분획물의 SC₅₀ 값이 48.6 µg/mL로 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 74, Tabel 19).

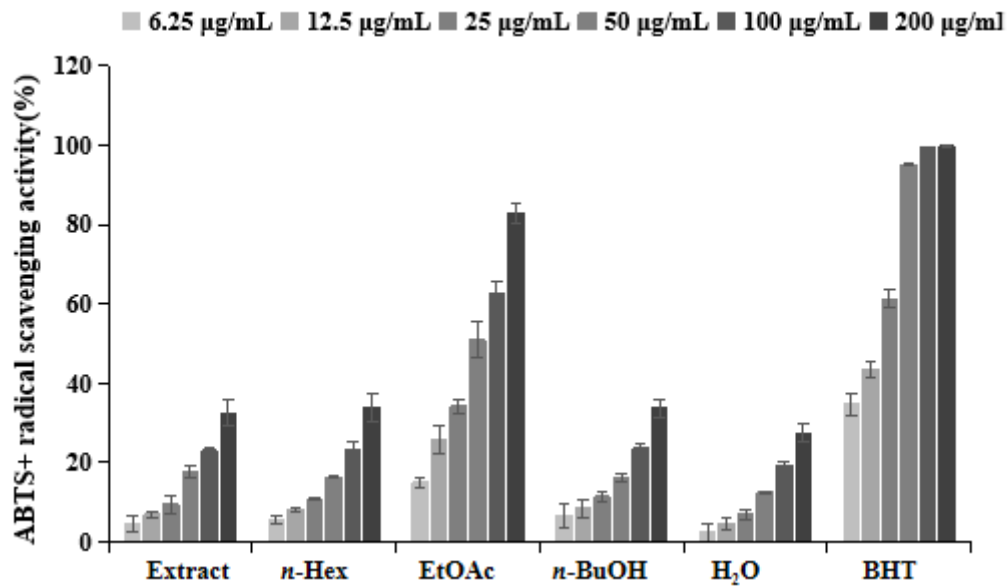


Figure 74. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 19. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *T.hamabo* branches.

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	>200	>200	48.6	>200	>200	17.1

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

황근 가지 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 70% EtOH 추출물 및 각 용매 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 nitric oxide 생성 억제 활성이 보였으나, *n*-Hex 분획물 및 EtOAc 분획물에서는 세포 독성이 나타났다. 이에 추가적인 농도에서 실험을 진행하였다. 실험 결과, 황근 가지 *n*-Hex 분획물 및 EtOAc 분획물은 100 µg/mL의 농도이하에서 세포 독성 없이 nitric oxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. *n*-Hex 분획물 IC₅₀ 값은 36.9 µg/mL, EtOAc 분획물 IC₅₀ 값은 27.0 µg/mL로 확인되었다(Figure 75-76).

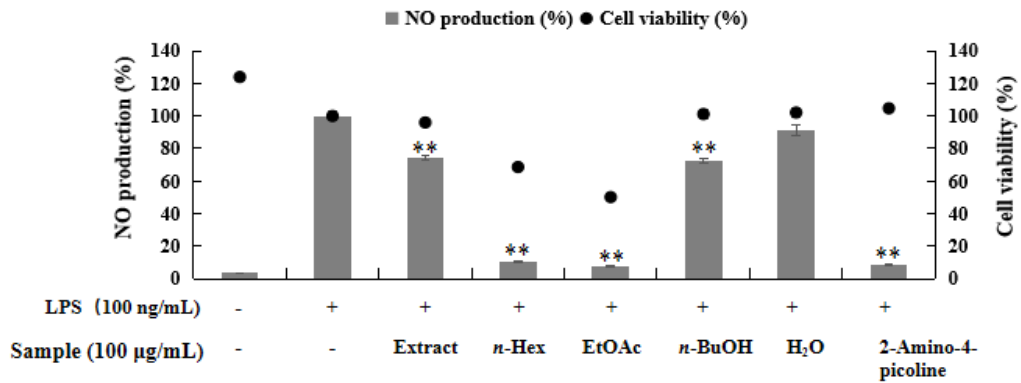
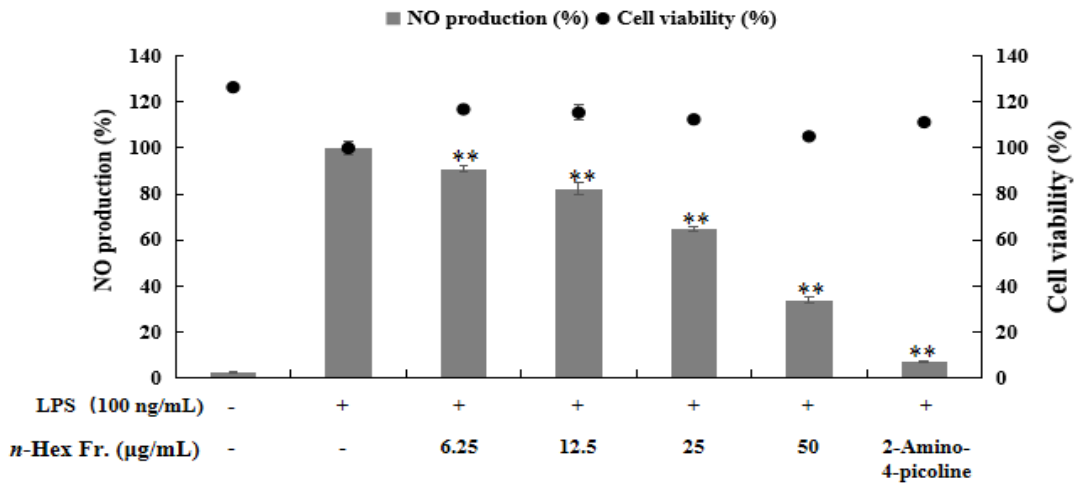


Figure 75. Effects of extract and solvent fractions from *T.hamabo* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. Values are the mean SEM of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(A)



(B)

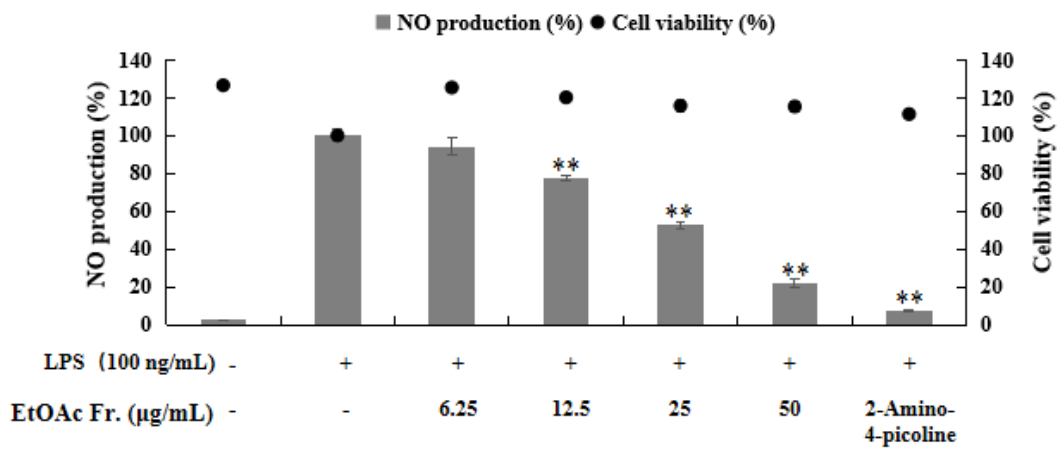


Figure 76. Effect of *n*-Hex (A) and EtOAc (B) fraction from *T.hamabo* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Values are the mean SEM of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(2) 전염증성 cytokine (TNF- α) 생성 억제 활성

황근 가지 EtOAc 분획물의 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokines 억제 활성을 측정하였다. 세포 독성이 나타나지 않은 농도 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 황근 가지 EtOAc 분획물은 TNF- α 생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 77).

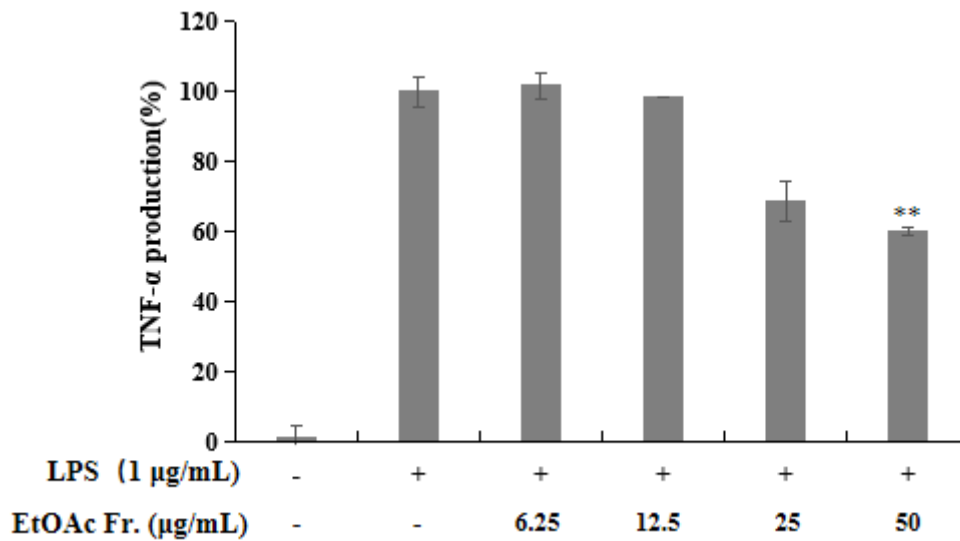


Figure 77. Effect of EtOAc fraction from *T.hamabo* branches on TNF- α production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 세포 보호 효과

(1) 세포 독성 평가 (MTT assay)

HaCaT 세포를 이용하여 과산화수소(H_2O_2)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 시료의 농도를 정하기 위해 HaCaT 세포에 대한 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, compound **15**는 2.5, 5, 10 μM 의 농도에서 세포 생존율이 모두 90%이상으로 나타났다. 따라서 본 실험에서 사용될 시료의 농도는 세포독성을 나타내지 않은 농도인 2.5, 5, 10 μM 로 설정하였다 (Figure 78).

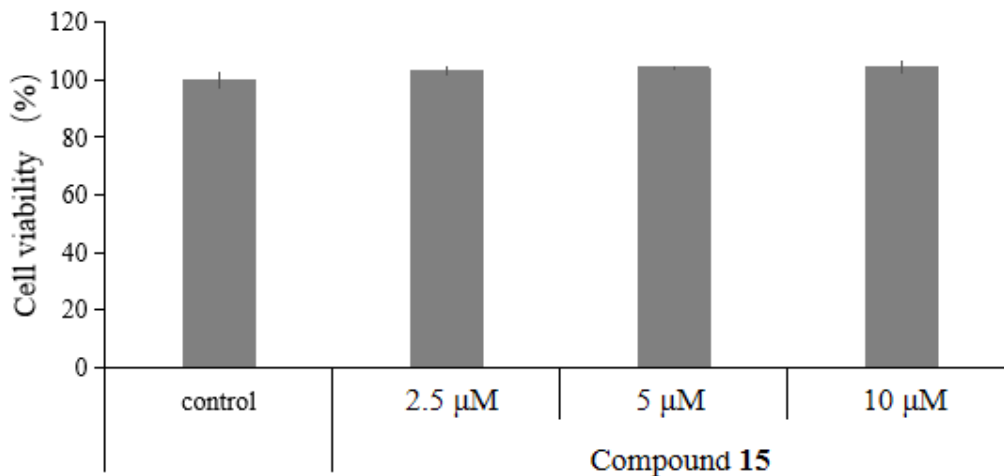
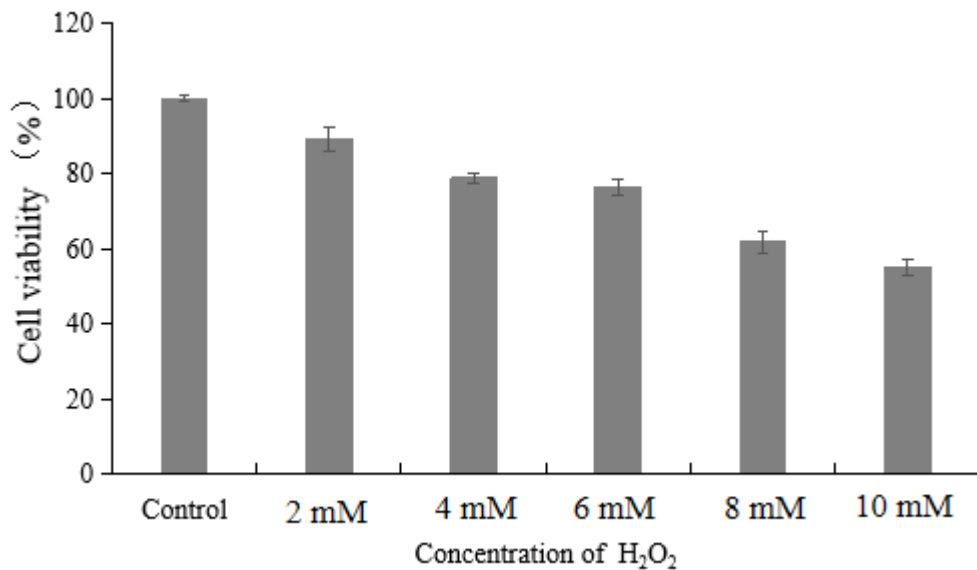


Figure 78. Cell protective effects of compound **15** from *T.hamabo* branches. HaCaT cells were treated with different concentration of samples and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 과산화수소 (H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 전에 실험에 사용될 H₂O₂의 농도를 정하기 위해 H₂O₂ 농도에 따른 HaCaT cell의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 8 mM의 농도에서 세포 생존율이 61.8%로 확인되었다 (Figure 79). 따라서 본 실험에서는 8 mM의 H₂O₂를 처리하여 손상된 세포에 2.5, 5, 10 μM의 compound 15를 처리하였다. 그 결과, compound 15는 2.5, 5, 10 μM의 농도에서 각각 80.6, 85.3, 86.4%의 세포 생존율이 확인되었으며, compound 15는 H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 20.2, 25.1, 25.2%의 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다. (Figure 79).

(A)



(B)

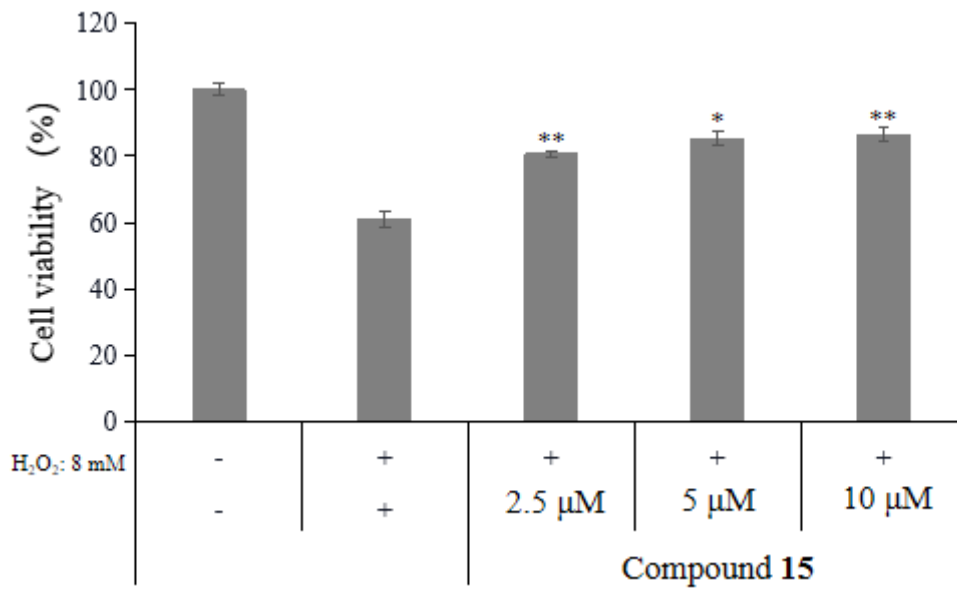


Figure 79. (A) Cell viability on HaCaT cells damaged by H₂O₂. (B) Cell protective effects of compound 15 from *T.hamabo* branches on HaCaT cells damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

분리된 화합물 15의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 nitric oxide 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 화합물은 25, 50, 100, 200, 400 μM 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 화합물 15는 세포 독성 없이 nitric oxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 화합물 15의 IC_{50} 값은 97.8 μM 로 확인되었다(Figure 80).

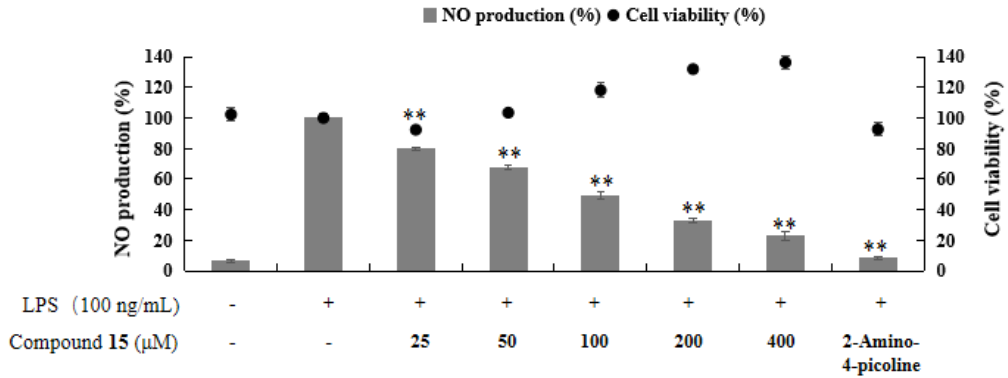
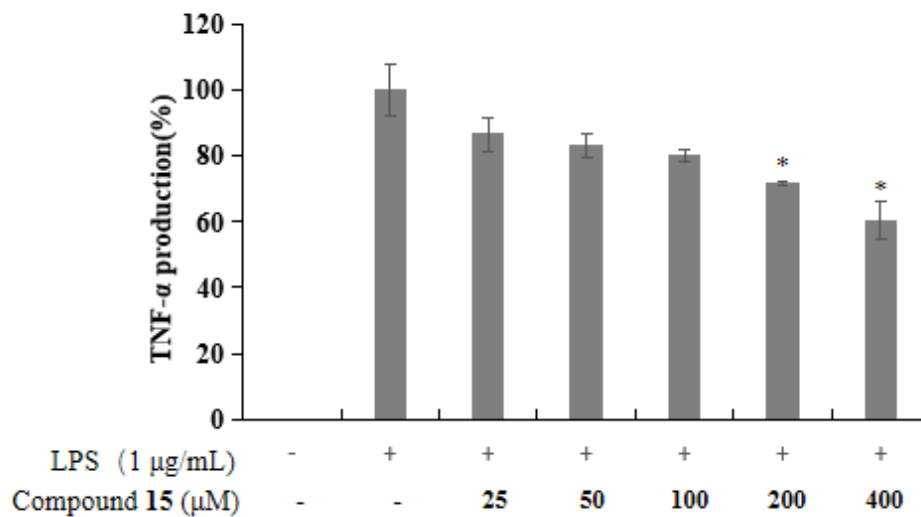


Figure 80. Effects of isolated compound 15 from *T.hamabo* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Values are the mean SEM of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

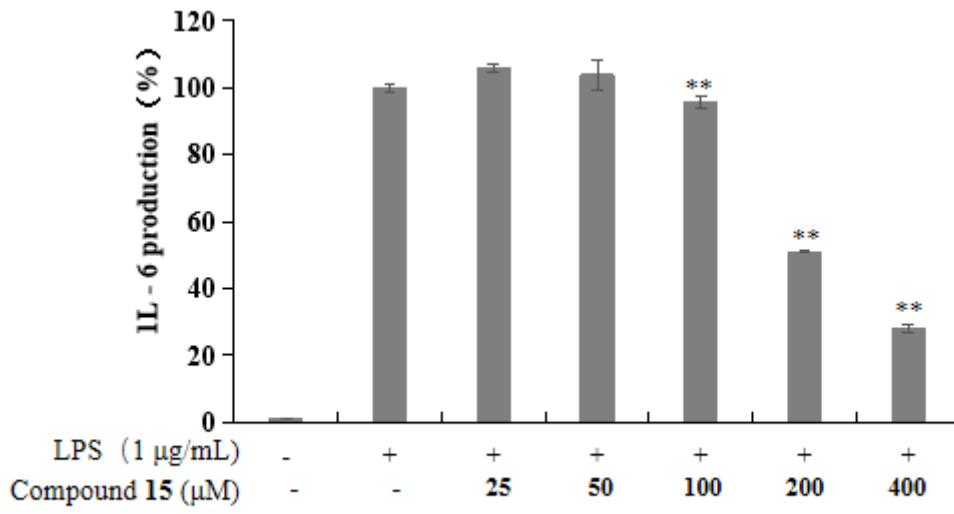
(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성

황근 가지 분리된 화합물 15의 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 전염증성 cytokines IL-6, TNF- α , IL-1 β 및 PGE₂ 억제 활성을 측정하였다. 세포 독성이 나타나지 않은 농도 25, 50, 100, 200, 400 μ M를 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 화합물 15는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제 시키는 것으로 확인되었다(Figure 81).

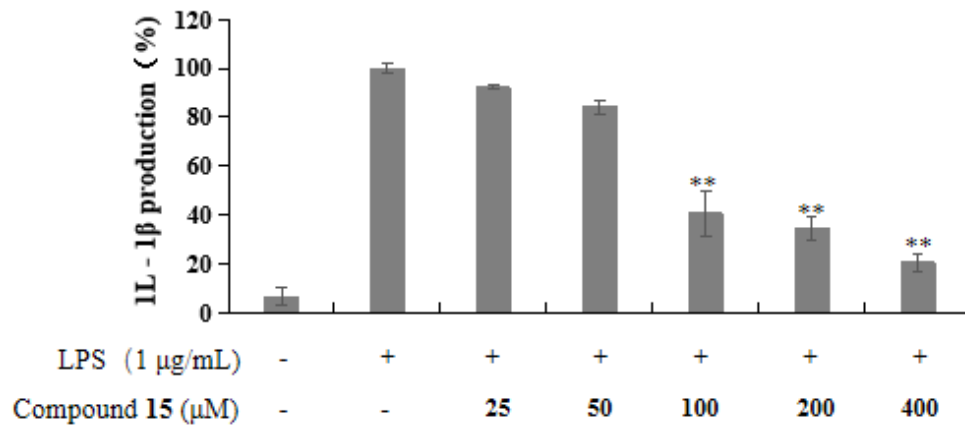
(A)



(B)



(C)



(D)

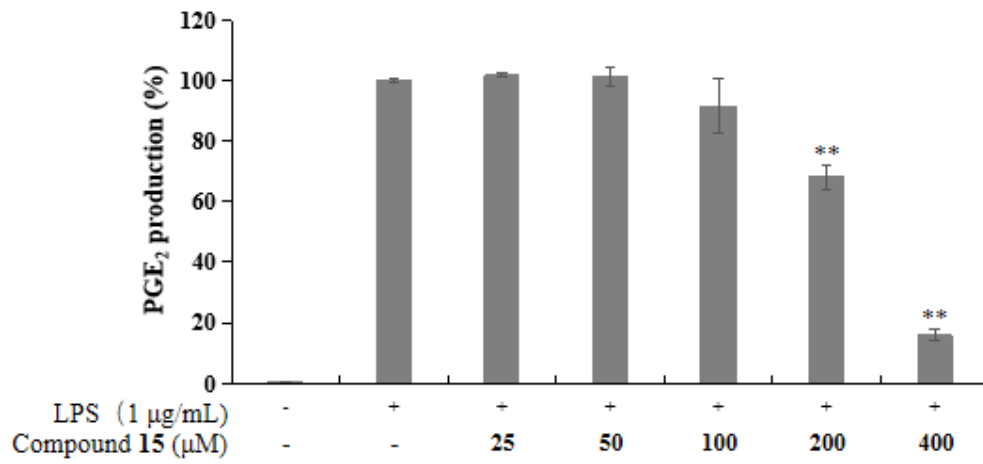


Figure 81. Effects of isolated compound 15 from *T.hamabo* branches on TNF- α (A), IL-6 (B), 1L-1 β (C), PGE₂ (D) and production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

6. 요약 및 결론

본 연구에서는 황근 가지 추출물의 화장품 및 의약품 소재 개발 가능성을 판단하기 위해 다양한 생리 활성 실험과 성분 연구를 진행하였다.

황근 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 이중 EtOAc 분획물은 VLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리한 단일 물질은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 예상한 후 문헌과 비교하여 총 15개의 화합물을 동정하였다.

분리한 화합물은 methyl stearate (1), oleic acid (2), linolenic acid (3), α -linolenic acid (4), ethyl linolenate (5), friedelin (6), friedlinol (7), glutinol (8), 3 β -olean-12-en-3-ol (9), oleanolic acid (10), β -sitosterol (11), *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (12), caffeic acid (13), caffeic anhydride (14), triumfettalarein (15)로 확인되었다.

황근 가지의 항산화 실험 결과, EtOAc 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 각각 43.7 \pm 2.3 mg/g GAE 및 23.3 \pm 1.5 mg/g QE로 나타났으며, DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험에서 EtOAc 분획물은 각각 232.8, 48.6 μ g/mL로 나타내었다. 분리된 화합물중 friedelin (7), oleanolic acid (10), β -sitosterol (11), *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (12), caffeic acid (13)가 우수한 radical 소거 활성을 나타내는 것으로 문헌^{85,86,87,88,89}에 보고되어있다. 또한 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 항염 활성을 측정 하였으며, 그 결과 NO 저해능 IC₅₀ 값이 각각 36.9 μ g/mL 및 27.0 μ g/mL로 확인되었고, 특히 EtOAc 분획물을 전염증성 cytokine인 TNF- α 의 생성을 효과적으로 억제시켰다. EtOAc 분획물에서 분리된 화합물중 linolenic acid (3), α -linolenic acid (4), ethyl linolenate (5), friedelin (6), friedelinol (7), 3 β -olean-12-en-3-ol (9), oleanolic acid (10), *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (12)의 항염 활성은 문헌^{90,91,92,93,94,95,96,97}에 보

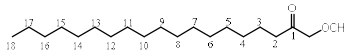
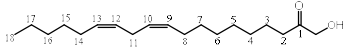
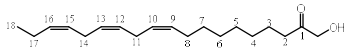
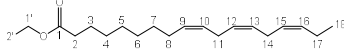
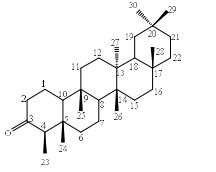
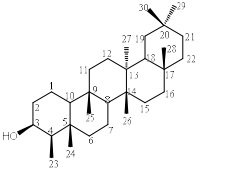
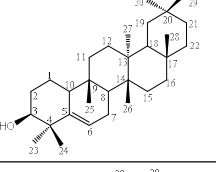
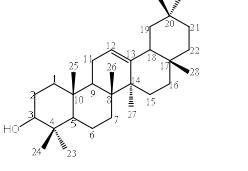
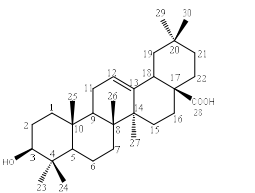
고 되어 있다.

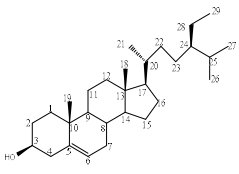
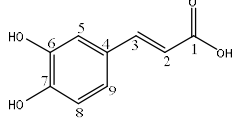
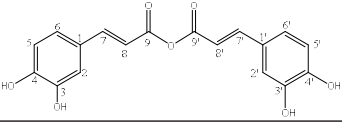
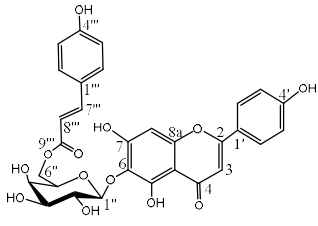
그 밖의 향균 가지에서 분리된 화합물의 알려진 활성으로는 Compound 3의 항염, 항말라리아, 증식 방지등의 활성^{90,98,99}이 있으며, Compound 4는 항염, 항종양 활성^{90,100}이 보고 되어 있다. Compound 5는 항염, α -glucosidase 억제, α -amylase 억제, 멜라닌 생성 억제 활성^{92,101,102}이 보고 되어 있으며. Compound 6을 항산화, 항염, 항고지혈증, 항케양성, 지사제등의 효능^{85,93,103,104,105}이 알려져 있다. 또한 Compound 7은 항염, 항혈관신생, 세포독성, 항균 등의 활성^{94,106,107,108}이 있으며, Compound 8은 진통제, prolyl endopeptidase 억제 활성^{109,110}이 알려져 있고, Compound 9는 항염, 항균 및 항진균, 항우울제 활성^{95,111,112}등이 보고되어 있다. Compound 10은 항산화, 항염, 항 당뇨, 항균, 항바이러스제, 항암 및 구충제, 항종양 활성^{86,96,113,114,115,116,117,118}이 알려져 있고, Compound 11은 항산화, 저콜레스테롤혈증, 항균, 혈관 신생, 면역 조절 등의 활성^{87,119,120,121,122}이 보고되어 있다. Compound 13은 항산화, 항 B형 간염 바이러스, 항염 및 항응고 활성^{89,123,124}이 있으며, Compound 14는 항 HBV 활성¹²⁵이 문헌에 보고되어 있다(Table 20).

특히, EtOAc 분획물에서 분리된 compound 15는 지금까지 활성에 대한 연구가 보고되지 않았으며, 본 연구에서는 compound 15에 대한 항염 및 항산화 실험을 진행하였다. 그 결과, compound 15는 효과적인 NO 생성 억제 활성을 농도 의존적으로 나타내었고 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 HaCaT 세포에서 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인한 결과, 세포 독성을 나타내지 않은 2-10 μ M의 농도에서 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 향균 가지는 항산화, 항염 활성을 갖는 기능성 화장품 및 의약품 관련 천연 소재로서 개발 가능할 것이라 사료된다.

Table 20. Activities of isolated compounds from *T.hamabo* branches.

NO.	Compound	structure	activities
1	Methyl Stearate		
3	Linoleic acid		anti-inflammatory activity ⁹⁰ anti-malarial activity ⁹⁸ anti-proliferative Activity ⁹⁹
4	α -linolenic acid		anti-inflammatory activity ⁹¹ anti-tumor activity ¹⁰⁰
5	Ethyl linolenate		anti-inflammatory activity ⁹² α -glucosidase inhibitory activity ¹⁰¹ α -amylase inhibitory activity ¹⁰¹ melanogenesis inhibitory activity ¹⁰²
6	Friedelin		anti-oxidant activity ⁸⁵ anti-inflammatory activity ⁹³ hypolipidemic activity ¹⁰³ anti-ulcerogenic activity ¹⁰⁴ anti-diarrhoeal activity ¹⁰⁵
7	Friedelinol		anti-inflammatory activity ⁹⁴ anti-angiogenic activity ¹⁰⁶ cytotoxic activity ¹⁰⁷ anti-microbial activity ¹⁰⁸
8	Glutinol		analgesic activity ¹⁰⁹ prolyl endopeptidase inhibition activity ¹¹⁰
9	3 β -olean-12-en-3-ol		anti-inflammatory activity ⁹⁵ anti-bacterial and anti-fungal activities activity ¹¹¹ anti-depressant activity ¹¹²
10	Oleanolic acid		anti-oxidant activity ⁸⁶ anti-inflammatory activity ⁹⁶ anti-diabetogenic activity ¹¹³ anti-microbial activity ¹¹⁴ anti-viral activity ¹¹⁵ anti-cancer activity ¹¹⁶ anti-parasitic activity ¹¹⁷

			anti-tumor activity ¹¹⁸
11	β -sitosterol		anti-oxidant activity ⁸⁷ hypocholesterolemic activity ¹¹⁹ anti-microbial activity ¹²⁰ angiogenic activity ¹²¹ immunoregulatory activity ¹²²
13	Caffeic acid		anti-oxidant activity ⁸⁹ anti-hepatitis B virus activity ¹²³ anti-inflammatory and anti-coagulatory activity ¹²⁴
14	Caffeic anhydride		anti-HBV activity ¹²⁵
15	Triumfettalarein		anti-oxidant activity anti-inflammatory activity

V. 연구 3 : 제주피막이 지상부 추출물의 항산화, 항염 및 항균 활성 성분 연구

1. 재료

제주피막이 (*Hydrocotyle japonica Makino*)는 산형과 (Apiaceae) 식물로 주로 한국에 분포한다.

제주피막이는 제주도의 나무그늘에서 자라는 다년초로서 전체가 녹색이며 원줄기가 지상으로 뻗으면서 마디에서 뿌리가 내리고 가지끝이 굽으며 땅속에서 월동하고 가지가 서지 않는다. 잎은 호생하고 원형이며 지름 5~20 mm로서 5-7개로 중앙까지 갈라지며 가장자리에 톱니가 있고 엽병은 길이 7~20 mm이며 낙엽은 지름1.2 mm정도 로서 얇은 막질이다. 꽃은 6~9월에 피고 백색이며 액생하는 화경 끝에 달리고 화경은 엽병과 길이가 거의 비슷하며 소화경이 없다.

제주피막이는 두메피막이풀이라고도 한다. 그늘진 곳에서 자란다. 줄기 전체가 땅위로 뻗으며 마디에서 뿌리를 낸다. 가지는 서지 않고 땅속에서 겨울을 지낸다. 잎은 어긋나고 둥글며 지름 5~20 mm이다. 밑부분은 넓게 벌어지고 5~7갈래로 갈라지며 가장자리에 톱니가 있다. 잎자루는 길이 7~20 mm이고 턱잎은 막질(膜質:얇은 종이처럼 반투명한 것)이다.¹²⁶

꽃은 양성화로서 6~9월에 흰색으로 피는데, 잎겨드랑이에서 꽃대가 나와 그 끝에 달린다. 작은꽃대는 없고 꽃대는 잎자루와 비슷한 길이이다. 꽃잎은 5개로서 밋밋하고 끝부분이 좁아 뽕족해진다. 수술은 5개이고 씨방은 하위(下位), 암술대는 실 모양이다. 열매는 분열과로서 납작하고 둥글며 2~4개씩 달린다. 잎은 한방이나 민간에서 지혈제로 쓴다. 한국(제주)에 분포한다.¹²⁷

현재까지 보고된 제주피막이 관련문헌 중, 제주피막이 산형과 식물 추출물에 대한 분리된 화합물 및 항산화, 항염 및 미백활성에 대한 연구가 있으나, 제주피막이에 대한 유효성분 및 효능관련 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구는 제주피막이 추출물의 활성 성분을 분리, 구조 동정하여, 항산화, 항염 및 항균 효능 연구를 진행 하였다.

본 연구에 사용한 제주피막이는 6월 제주시 한경면 용수리에서 채집하였다(시료번호 506). 채집한 제주피막이는 먼저 40℃에서 건조시킨후 분쇄하여 사용하였다(Figure 82).



Figure 82. Picture of *Hydrocotyle japonica*.

2. 제주피막이 지상부의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 시료의 추출 및 분획

건조 및 분쇄된 제주피막이 0.3 kg을 70% 에탄올 6 L에 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치 및 300 mm filter paper를 이용하여 추출액을 여과하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 얻어진 추출물 여액은 40℃ 이하의 수욕상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물은 94 g을 얻었다. 얻어진 70% 에탄올 추출물 15 g을 증류수 1 L에 현탁시킨 후, 분액 깔때기를 이용하여 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다.(Figure 83).

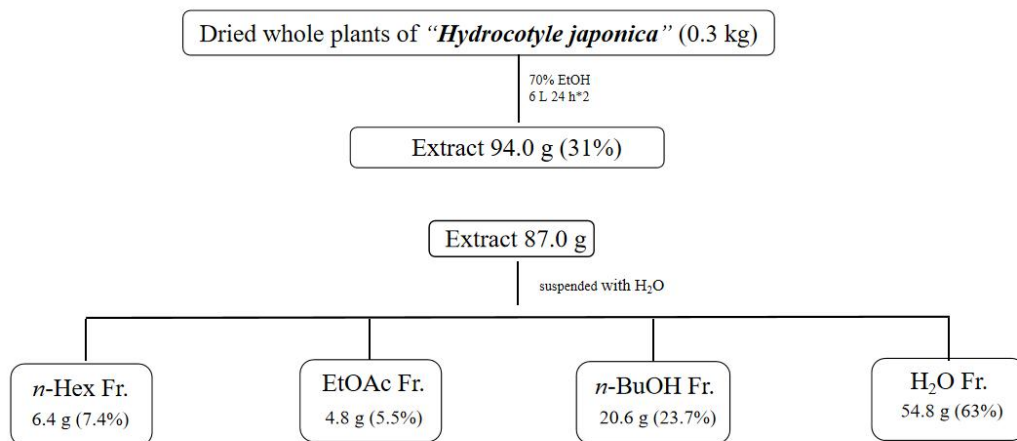


Figure 83. Extraction and solvent fraction of *H. japonica* aerial parts.

2) *n*-Hexane 분획물의 활성 성분 분리

(1) VLC에 의한 분리과정

n-hexane 분획물 5.1 g을 극성 크기별로 나누기 위해 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%), EtOAc:MeOH (5-50%)가 될 때 까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 300 mL씩 용출하여 총 21개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-21).

VLC fraction 중 Fr. V2 (70.1 mg)는 감압 농축한 후에 단일 화합물²를 얻었다. 그리고 Fr. V17 (51.8 mg)은 감압 농축한 후에 혼합된 형태의 compound 4, 5, 9를 얻었다.

Fr. V4-5 (141.5 mg)는 용매조건 *n*-Hex:EtOAc=15:1으로 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 8 (23.8 mg), compound 6 (23.8 mg) 및 compound 1 (34.4 mg)를 얻고 Fr.V6 (217.0 mg)은 같은 용매조건을 이용하여 compound 3 (12.5 mg) 및 compound 10 (83.7 mg)를 얻었다.

Fr. V8 (191.2 mg)은 용매조건 *n*-Hex:EtOAc=6.5:1으로 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 11 (11.4 mg)를 얻었다.

Fr. V9 (212.6 mg)는 용매조건 CHCl₃:MeOH=80:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 1 (12.0 mg) 및 compound 13(17 mg)을 얻고 Fr.V10 (157.1 mg)은 같은 용매조건을 이용하여 compound 1 (13.8 mg) 및 compound 12 (17.1 mg)를 얻었다. 세 컴파운드를 합쳐서 제주피막이 에서 compound 1 총 60.2 mg를 얻었다.

Fr. V11 (139.7 mg)은 용매조건 CHCl₃:MeOH=50:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 14 (12.0 mg)를 얻었다.

Fr. V12 (111.0 mg)는 용매조건 CHCl₃:MeOH=45:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 5 (21.6 mg) 및 compound 14 (14.4 mg)를 얻었다. 두 컴파운드를 합쳐서 제주피막이에서 compound 14 총 24.4 mg를 얻었다.

Fr. V14-15 (128.8 mg)의 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=40:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 7 (2.4 mg)를 얻었다.

Fr. V18-20 (129.3 mg)의 용매조건 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=40:1$ 으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound 6 (25.7 mg)를 얻었다(Figure 84).

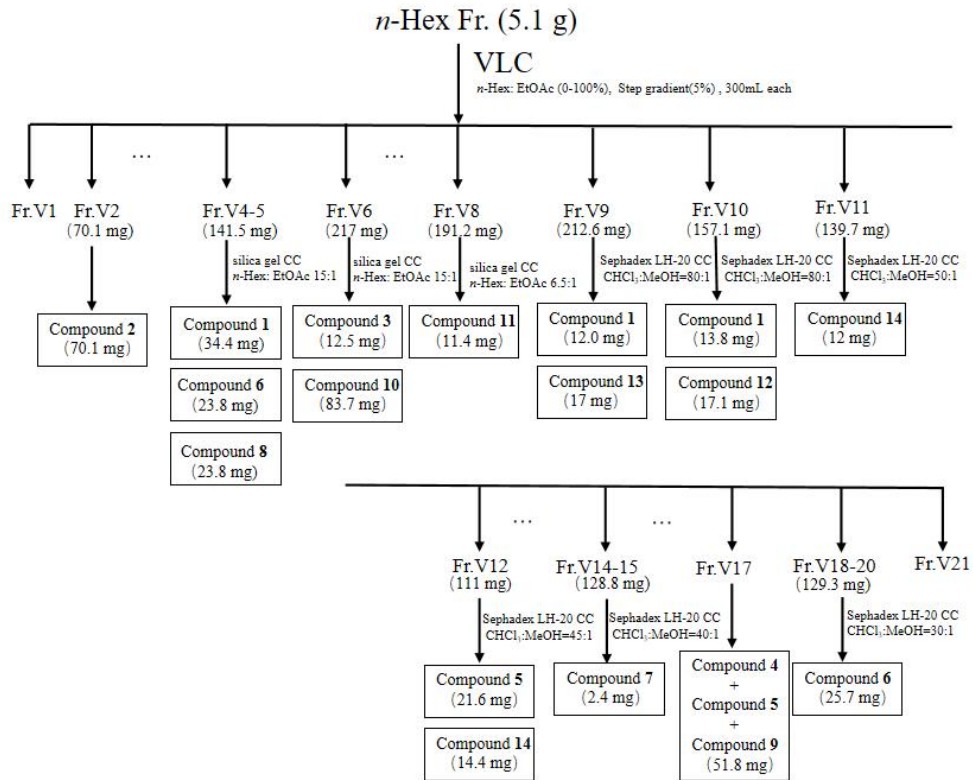


Figure 84. *n*-Hex isolation of compounds from *H. japonica* aerial parts.

3) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

(1) VLC에 의한 분리과정

EtOAc 분획물 5 g을 극성 크기별로 나누기 위해 순상 silica gel을 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography (VLC)를 진행하였다. 용매의 극성은 5%씩 *n*-Hex:EtOAc (0-100%)가 될 때 까지 높였으며 그 후 100% MeOH를 300 mL씩 용출하여 총 35개의 fraction을 얻었다(Fr. V1-21).

Fr. V24 (558.6 mg)는 용매조건 CHCl_3 :MeOH=4:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound **15** (41.6 mg), compound **16** (33 mg) 및 compound **19** (29.5 mg), compound **20** (10.4 mg)를 얻었다.

Fr. V25 (761.2 mg)는 용매조건 CHCl_3 :MeOH=4:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound **17** (27.5 mg)를 얻었다.

Fr. V26 (554.6 mg)은 용매조건 CHCl_3 :MeOH=4:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound **18** (55.6 mg)를 얻었다.

Fr. V33 (124.5 mg)은 용매조건 CHCl_3 :MeOH=4:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound **18** (22.8 mg)를 얻었다.

Fr. V34 (415.9 mg)는 용매조건 CHCl_3 :MeOH=2:1으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 compound **16** (16.1 mg)를 얻었다(Figure 85).

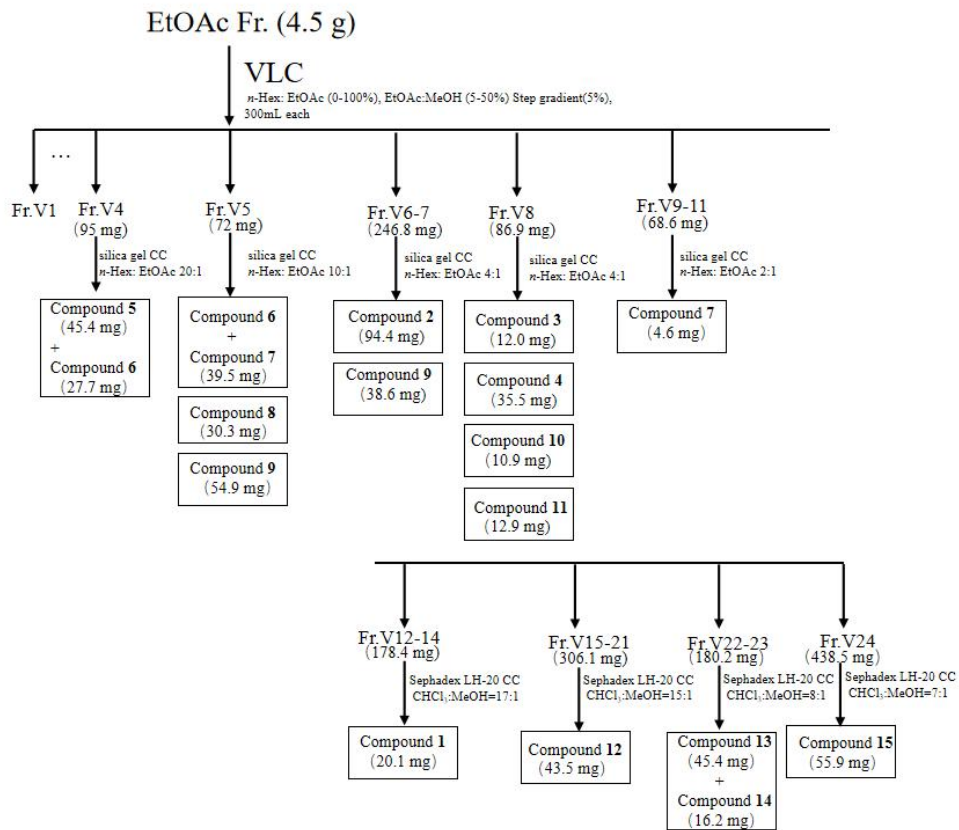


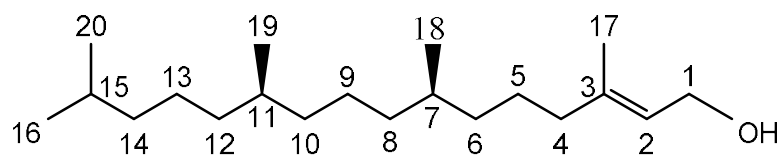
Figure 85. EtOAc isolation of compounds from *H. japonica* aerial parts.

3. 분리된 화합물의 구조 분석

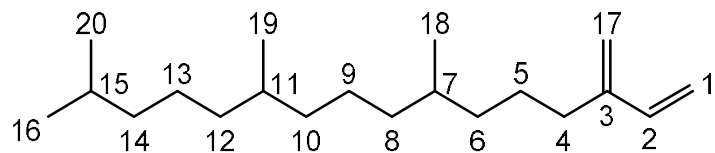
1) Compounds 1, 2의 구조 동정

Compound 1은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.66 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 0.83 (3H, d, $J = 2.3$ Hz), 0.82 (3H, d, $J = 3.2$ Hz), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz) chemical shift 값 및 integral로 보아 5개의 methyl group을 예상하였다. δ_{H} 5.39 (1H, dt, $J = 7.3, 1.4$ Hz) 피크는 sp^2 혼소 탄소 시그널으로 이중결합 구조를 예상하였다. 4.13 (2H, d, $J = 7.3$ Hz) 피크와 δ_{C} 59.6 피크에 통해 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 140.6, 123.2의 시그널은 이중결합 피크를 예상하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 diterpenes 구조으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹²⁸과 비교하여 compound 1은 (*E*) - phytol로 확인되었다(Figure 86-88, Table 21).

Compound 2는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.82 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.84 (3H, d, $J = 5.5$ Hz), chemical shift 값 및 integral로 보아 4개의 methyl group을 예상하였다. δ_{H} 5.04 (1H, dd, $J = 11.0, 4.0$ Hz), 5.21 (1H, dd, $J = 17.4, 4.0$ Hz) 및 6.38 (1H, dd, $J = 17.4, 11.0$ Hz) 피크는 sp^2 혼소 탄소 시그널으로 allyl proton를 예상하였다. 4.98 (1H, br s), 4.97 (1H, br s) 피크는 sp^2 혼소 탄소 시그널으로 이중결합 구조를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 113.2, 115.6, 139.3, 146.8의 시그널은 이중결합 피크를 예상하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 diterpenes 구조으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹²⁹과 비교하여 compound 2는 neophytadiene로 확인되었다(Figure 86, 89, 90, Table 21).



Compound 1



Compound 2

Figure 86. Chemical structure of compounds 1, 2.

Table 21. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **1**, **2** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

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}
1	4.13 (2H, d, 7.3)	59.6	5.04 (1H, dd, 11.0, 4.0) 5.21 (1H, dd, 17.4, 4.0)	113.2
2	5.39 (1H, dt, 7.3, 1.4)	123.2	6.38 (1H, dd, 17.4, 11.0)	139.3
3		140.6		146.8
4	1.97 (2H, t, 8.2)	39.6	2.16 (2H, m)	31.8
5		25.3	1.55 (2H, m)	25.8
6		36.9	1.24 (1H, m) 1.33 (1H, m)	37.2
7		32.9	1.40 (2H, m)	32.9
8		37.6	1.24 (2H, m)	37.5
9		24.7	1.24 (1H, m), 1.22 (1H, m)	24.7
10		37.6	1.24 (2H, m)	37.6
11		33.0	1.40 (1H, m)	32.9
12		37.5	1.24 (2H, m)	37.6
13		25.0	1.20 (1H, m), 1.30 (1H, m)	24.7
14		40.1	1.24 (2H, s)	29.9
15	1.50 (1H, sept, 6.4)	28.2	1.53 (1H, m)	28.2
16	0.85 (3H, d, 6.4)	22.8	0.82 (3H, d, 6.4)	19.9
17	1.66 (3H, br s, 5.0)	22.9	4.98 (1H, br s), 4.97 (1H, br s)	115.6
18	0.83 (3H, d, 2.3)	19.9	0.86 (3H, d, 6.4)	22.9
19	0.82 (2H, d, 3.2)	20.0	0.86 (3H, d, 6.4)	22.8
20	0.85 (3H, d, 6.4)	16.4	0.84 (3H, d, 5.5)	19.9

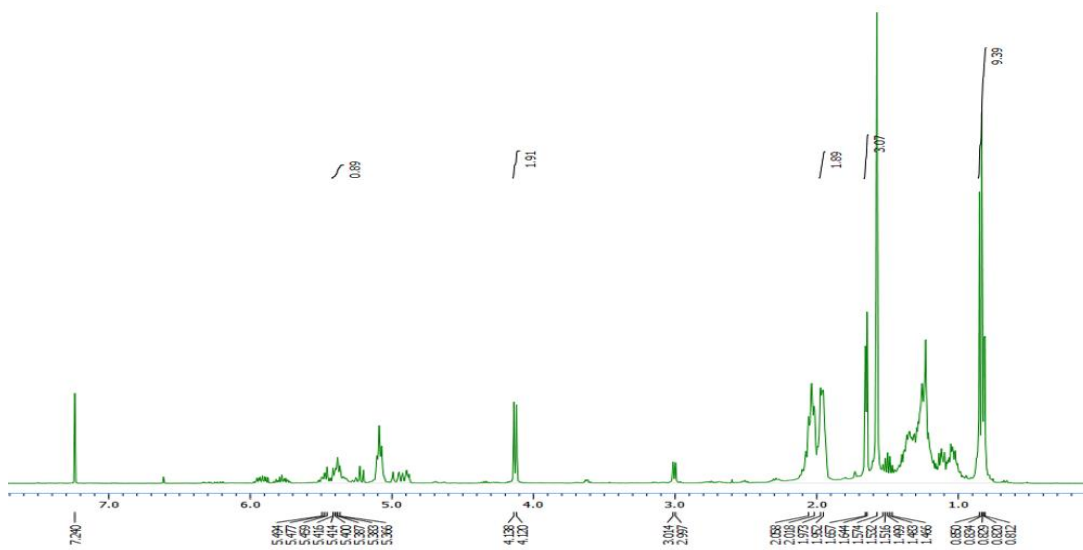


Figure 87. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in chloroform-*d*.

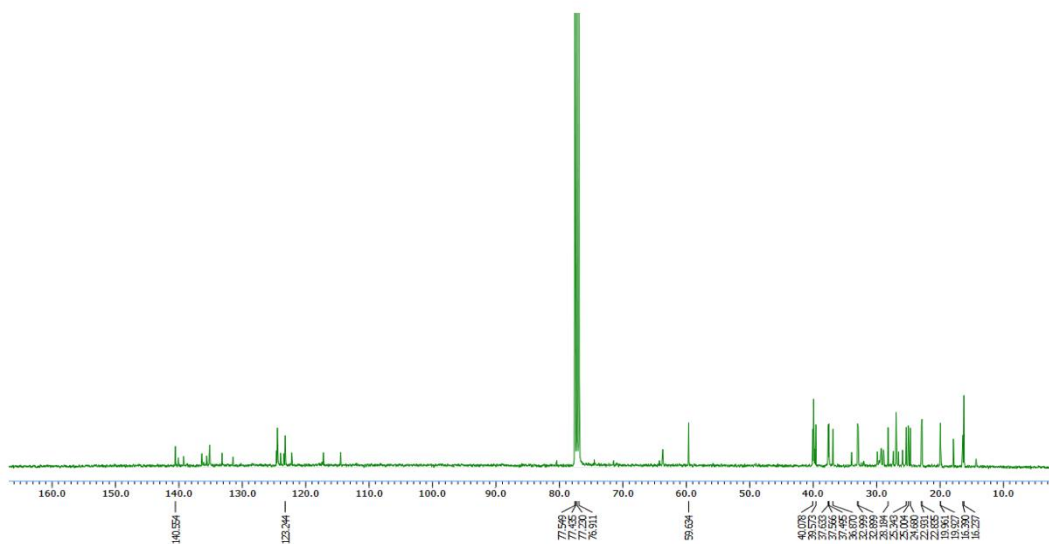


Figure 88. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in chloroform-*d*.

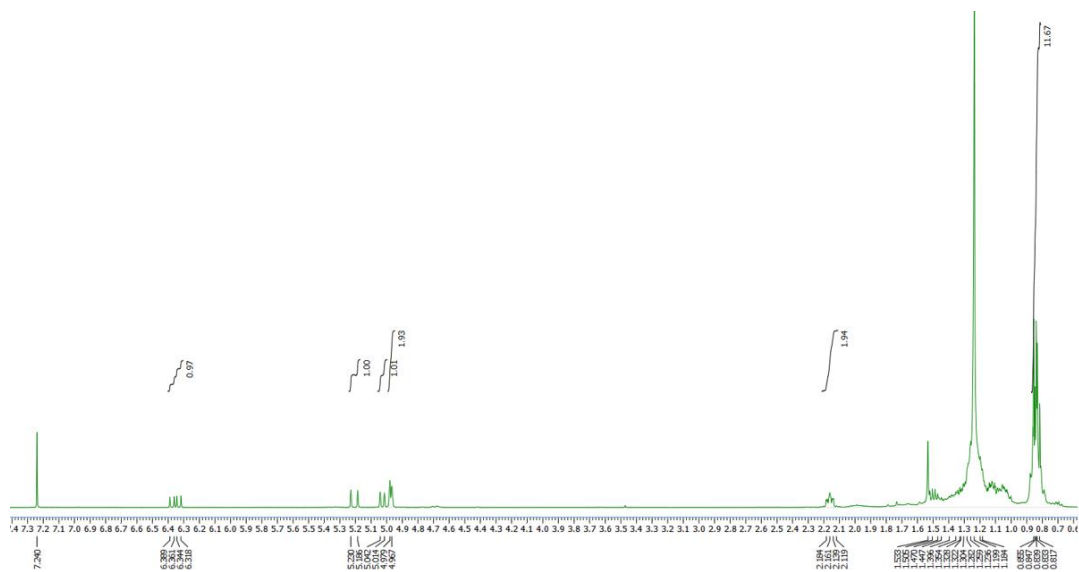


Figure 89. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in chloroform-*d*.

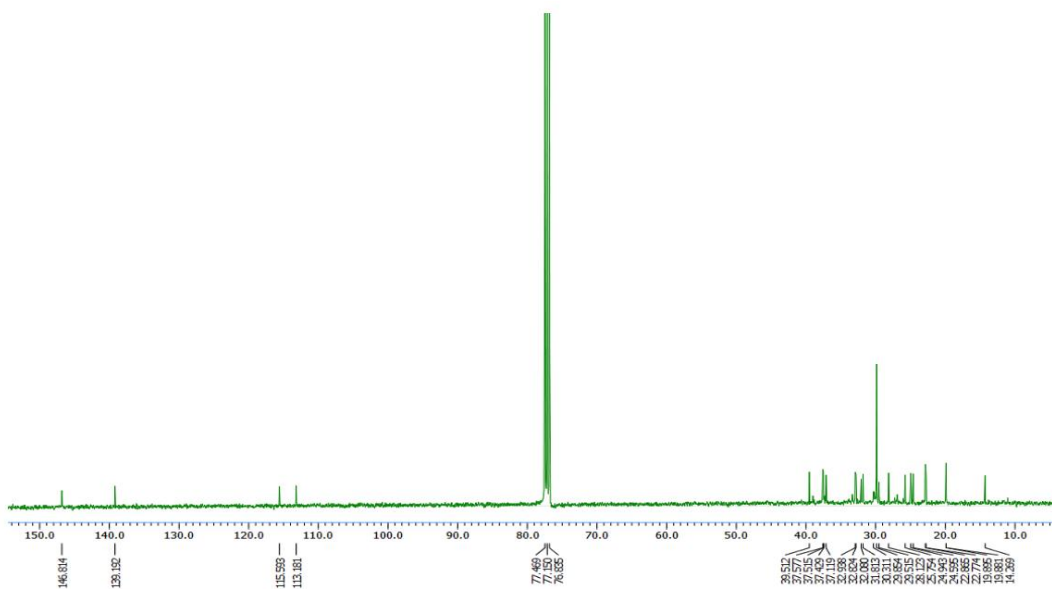


Figure 90. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in chloroform-*d*.

2) Compounds **3**, **6**, **8**의 구조 동정

Compound **8**은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 δ_{H} 5.27–5.39 (6H, m, overlap) 및 δ_{C} 132.2, 127.3, 128.5, 128.2, 127.9, 130.4의 시그널을 통해서 3개의 이중결합 구조를 가지고 있음을 확인하였다. δ_{H} 4.10 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 0.86 (3H, m) 피크 및 δ_{C} 174.1, 14.5, 60.4피크는 ester group를 직접 연결한 ethyl group를 예상하였다. δ_{H} 0.86 (3H, m) 피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개 카본 피크가 관찰되었으며 이를 바탕으로 문헌¹³²과 비교하여 compound **8**은 ethyl linolenate로 확인되었다(Figure 91, 96, 97, Table 22).

Compound **6**은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound **2** 비교 보고 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개 카본 피크를 관찰되었으며, 그중에서 δ_{C} 130.5, 130.4, 127.9, 128.1의 시그널을 통해서 2개의 이중결합 구조 가지고 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³²통해 compound **6**은 ethyl linoleate로 확인되었다(Figure 91, 94, 95, Table 22).

Compound **3**은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound **6** 및 compound **8** 비교보고 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 20개 카본 피크를 관찰되었으며, 그중에서 δ_{C} 130.2, 128.0의 시그널을 통해서 1개의 이중결합 구조 가지고 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌^{130,131}통해 compound **3**은 ethyl oleate로 확인되었다(Figure 91–93, Table 22).

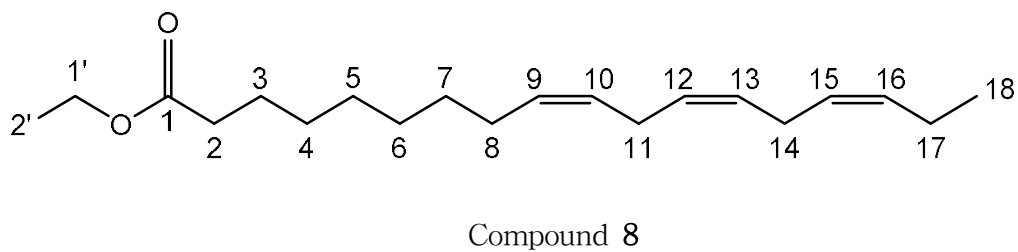
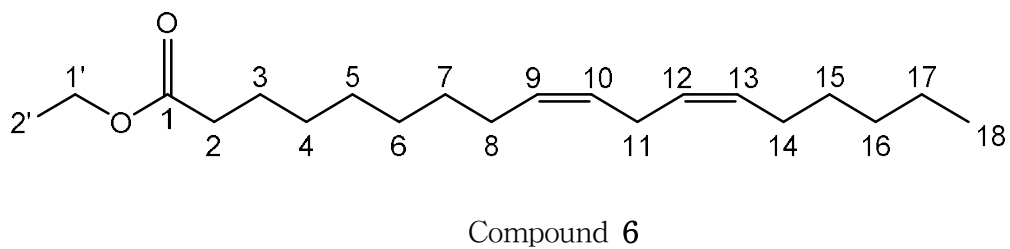
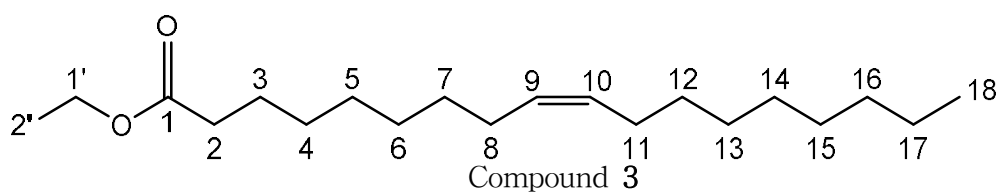


Figure 91. Chemical structure of compounds 3, 6, 8.

Table 22. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **3**, **6**, **8** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 3		Compound 6		Compound 8	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1		173.9		174.1		174.1
2	2.26 (2H, t, 7.3)	34.4	2.27 (2H, t, 7.3)	34.6	2.26 (2H, t, 7.6)	34.6
3	1.56~1.65 (2H, m)	27.2	1.56~1.60 (2H, m)	25.2	1.56~1.60 (2H, m)	27.4
4	1.23 (2H, m)	29.2	1.23 (2H, m)	29.3	1.23 (2H, m)	29.3
5	1.23 (2H, m)	29.1	1.23 (2H, m)	29.4	1.23 (2H, m)	29.4
6	1.23 (2H, m)	29.3	1.23 (2H, m)	29.5	1.23 (2H, m)	29.8
7	1.23 (2H, m)	29.7	1.23 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, m)	29.9
8	2.0~2.01 (2H, m)	27.2	1.99~2.07 (2H, m)	27.4	1.99~2.01 (2H, m)	25.8
9	5.30~5.37 (1H, m)	130.2	5.27~5.39 (1H, m)	130.5	5.27~5.39 (1H, m)	132.2
10	5.30~5.37 (1H, m)	128.0	5.27~5.39 (1H, m)	130.4	5.27~5.39 (1H, m)	127.3
11	2.0~2.01 (2H, m)	25.6	2.75 (1H, t, 7.1)	25.8	2.78 (2H, t, 12.4)	25.1
12	1.23 (2H, m)	29.7	5.27~5.39 (1H, m)	127.9	5.27~5.39 (1H, m)	128.5
13	1.23 (2H, m)	29.6	5.27~5.39 (1H, m)	128.1	5.27~5.39 (1H, m)	128.2
14	1.23 (2H, m)	29.4	2.78 (2H, t, 6.2)	27.4	2.78 (2H, t, 12.4)	25.7
15	1.23 (2H, m)	29.3	1.60 (2H, m)	29.4	5.27~5.39 (1H, m)	127.9
16	1.23 (2H, m)	29.4	1.30 (2H, m)	30.4	5.27~5.39 (1H, m)	130.4
17	1.23 (2H, m)	22.7	1.30 (2H, m)	22.8	1.99~2.01 (2H, m)	22.9
18	0.86 (3H, m)	14.1	0.87 (3H, m)	14.5	0.86 (3H, m)	14.2
1'	4.10 (2H, q, 7.3)	60.1	4.10 (2H, q, 7.3)	60.4	4.10 (2H, q, 7.3)	60.4
2'	0.86 (3H, m)	14.2	1.25 (3H, m)	14.3	0.86 (3H, m)	14.5

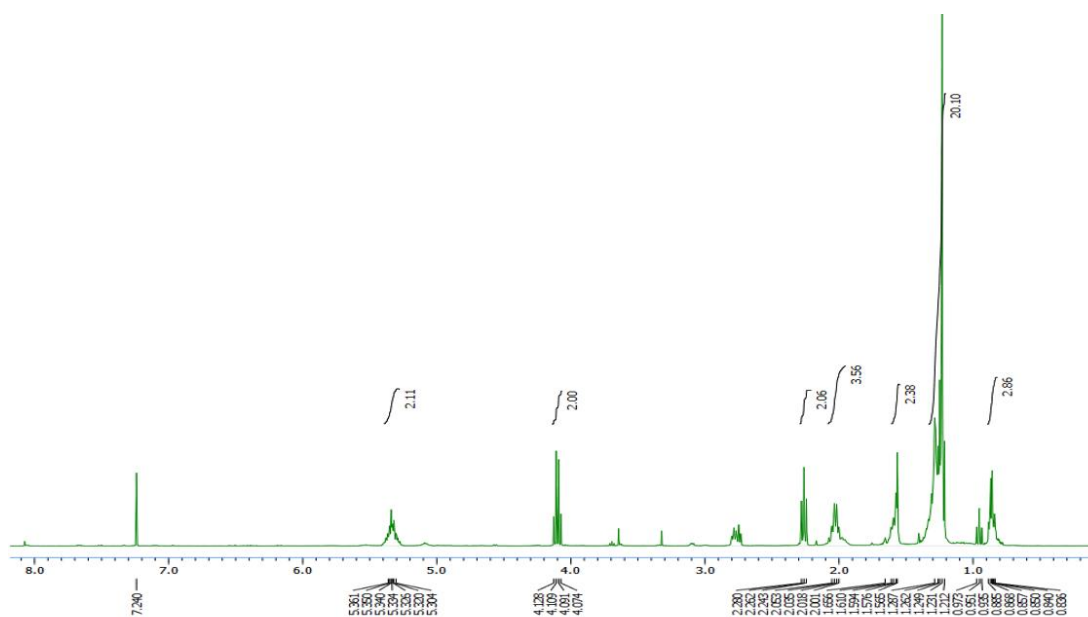


Figure 92. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in chloroform-*d*.

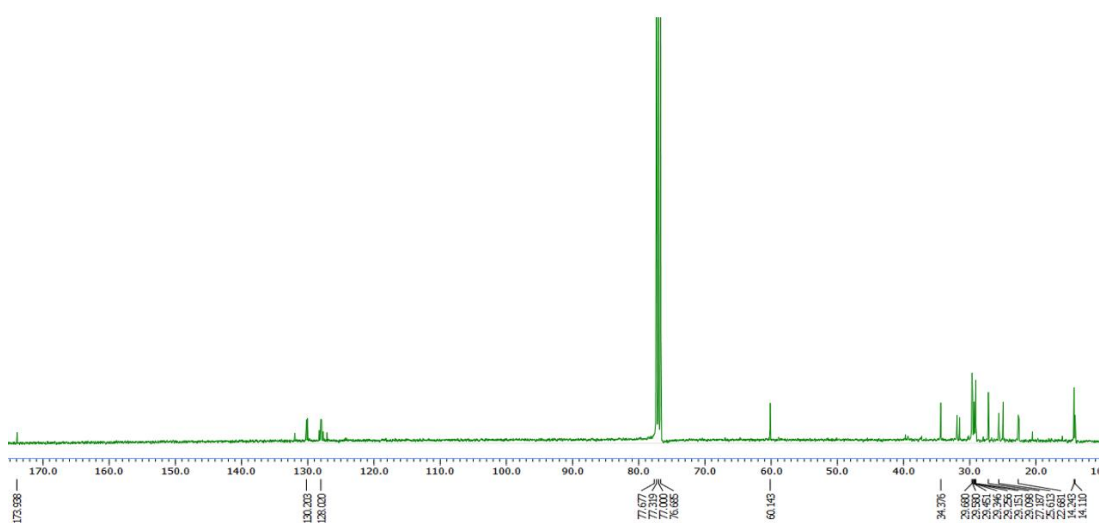


Figure 93. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in chloroform-*d*.

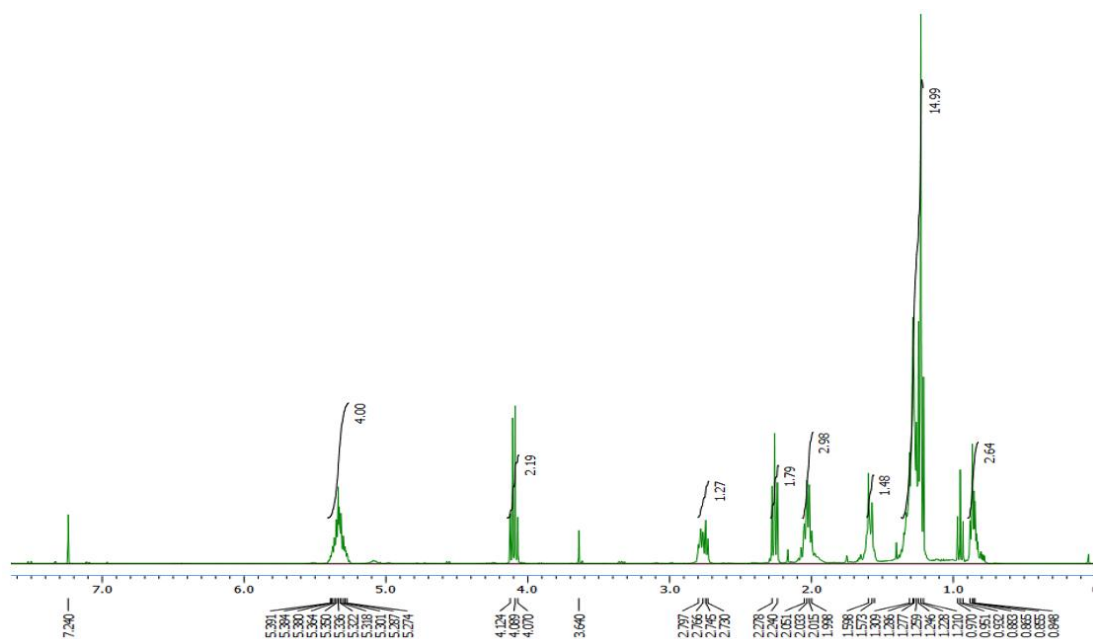


Figure 94. ^1H -NMR spectrum of compound **6** in chloroform-*d*.

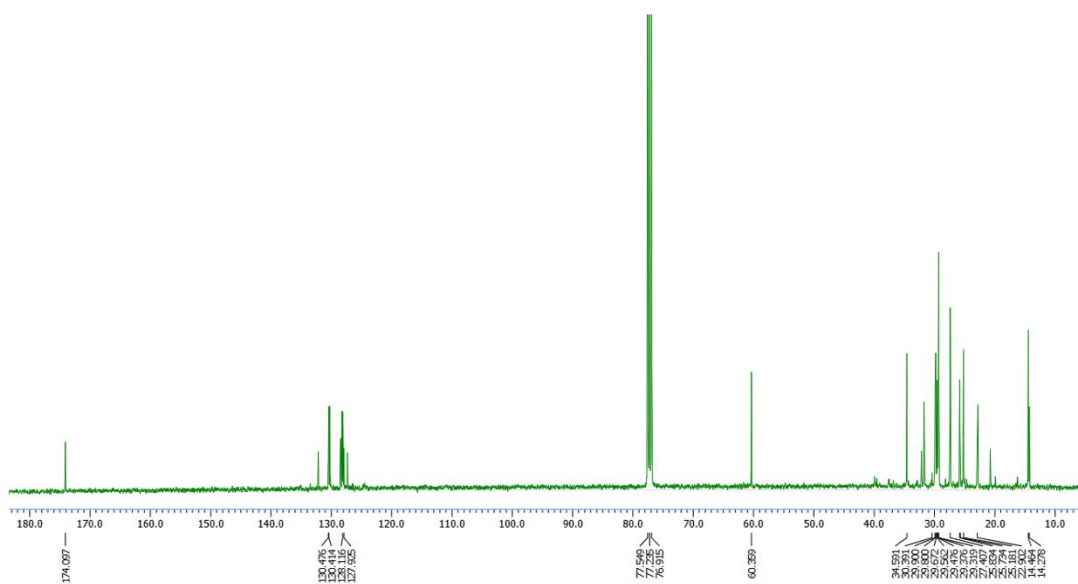


Figure 95. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in chloroform-*d*.

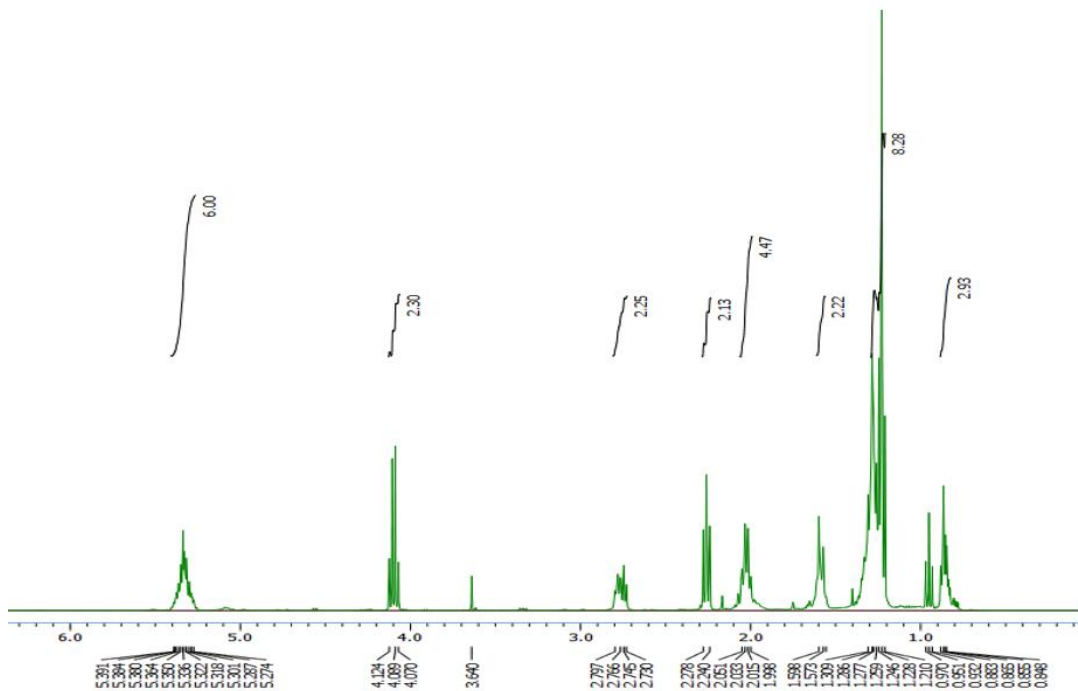


Figure 96. ^1H -NMR spectrum of compound **8** in chloroform-*d*.

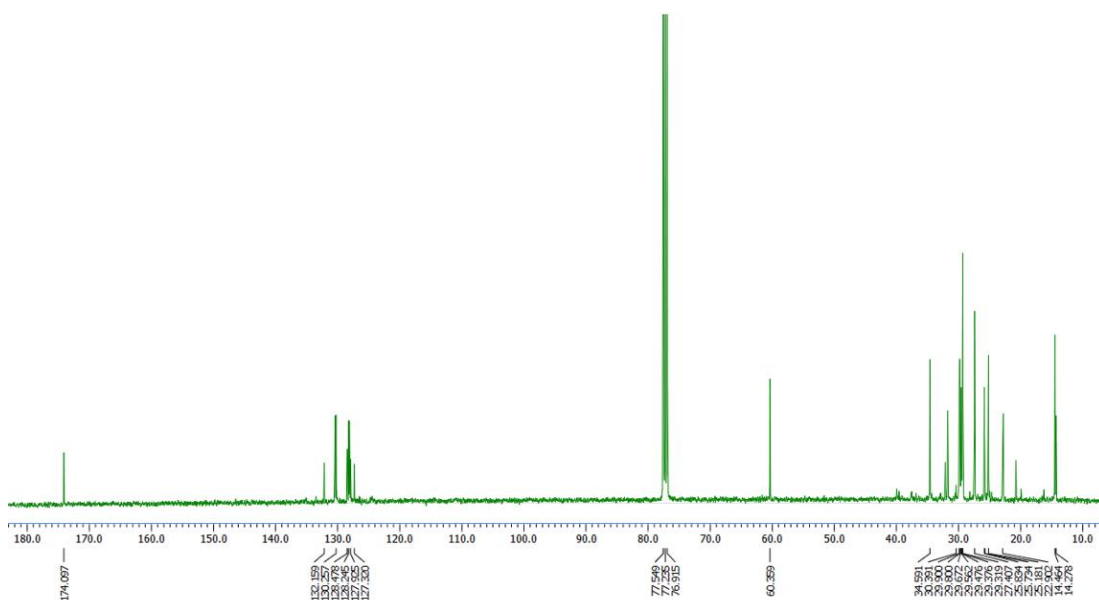


Figure 97. ^{13}C -NMR spectrum of compound **8** in chloroform-*d*.

3) Compounds 4, 5, 7, 9의 구조 동정

Compound 5는 ^1H NMR spectrum을 통해 δ_{H} 5.33 (4H, m, overlap) 피크는 olefin methine proton으로 예상하였다. δ_{H} 2.75 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), δ_{H} 2.26 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), δ_{H} 2.01 (2H, m) 피크는 일반적으로 aliphatic proton에 비해 deshielding을 때문에 chemical shift 값은 높아진 것으로 allylic methyl group으로 예상하였다. δ_{H} 0.86 (3H, m) 피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 18개 카본 피크가 관찰되었으며, 그중에서 δ_{C} 179.4 시그널을 통해 carboxy group를 가지고 있음을 확인하였고 δ_{C} 130.4, 130.2, 128.3, 128.1의 시그널을 통해서 2개의 이중결합 구조 가지고 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³⁴ 통해 compound 5은 linolenic acid로 확인되었다(Figure 98, 101, 102, Table 23).

Compound 7은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 ^{13}C NMR spectrum에서 총 21개 카본 피크가 관찰되었으며 δ_{C} 174.5 시그널을 통해 carbonyl group를 가지고 있음을 예상하였고 δ_{C} 130.0, 128.3, 128.1, 130.2의 시그널을 통해서 2개의 이중결합 구조 가지고 있음을 예상하였다. δ_{H} 4.13 (1H, dd, $J = 11.5, 5.9$ Hz), 4.19 (1H, dd, $J = 11.5, 3.2$ Hz), 3.92 (1H, m), 3.68 (1H, dd, $J = 11.5, 3.7$ Hz), 3.60 (1H, dd, $J = 11.5, 5.9$ Hz) 및 δ_{C} 65.3, 70.5, 63.4 피크는 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. δ_{H} 0.82 (3H, t, $J = 5.5$ Hz) 피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³⁵과 비교하여 compound 7은 1-linoleoyl glycerol로 확인되었다(Figure 98, 103, 104, Table 23).

Compound 9는 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound 10 과 비교하면 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 21개 카본 피크를 관찰되었으며, 그중에서 δ_{C} 130.2, 127.9, 128.2, 130.0, 128.0, 130.2의 시그널을 통해서 3개의 이중결합 구조 가지고 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³⁵ 통해 compound 9은 1-linolenoyl glycerol로 확인되었다(Figure 98, 105, 106, Table 23).

Compound 4은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound 7과 비

교하면 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 21개 카본 피크가 관찰되었으며, 그중에서 δ_{c} 130.4, 130.2의 시그널을 통해서 1개의 이중결합 구조 가지고 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³³ 통해 compound 4 은 1-monoolein로 확인되었다(Figure 98-100, Table 23).

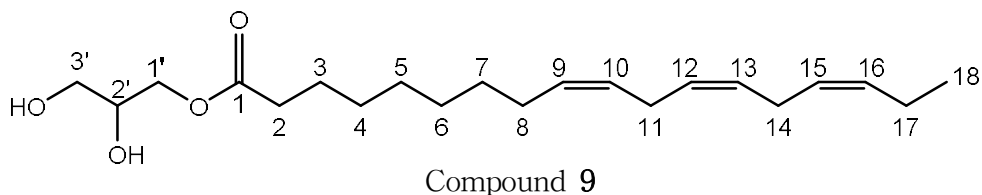
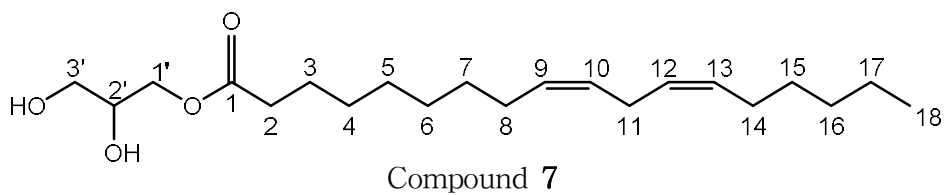
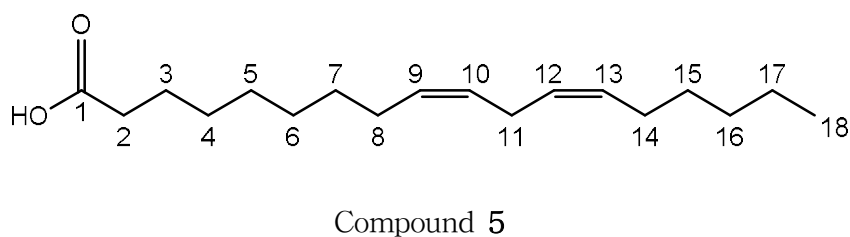
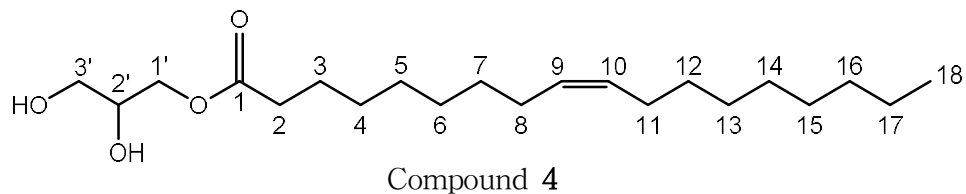


Figure 98. Chemical structure of compounds 4, 5, 7, 9.

Table 23. ¹H and ¹³C NMR data of compounds 4, 5, 7, 9 (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 4		Compound 5		Compound 7		Compound 9	
	δ_H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_C	δ_H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_C	δ_H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_C	δ_H (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_C
1		174.3		180.3		174.5		174.3
2	2.33 (2H, m)	34.1	2.33 (2H, m)	34.3	2.31 (2H, t, 7.6)	34.5	2.33 (2H, m)	34.1
3	1.60 (2H, m)	25.6	2.03 (2H, m)	25.7	1.60 (2H, m)	25.1	1.60 (2H, m)	25.6
4	1.23 (2H, s)	29.6	1.23 (2H, m)	29.4	1.2-1.34 (2H, m)	29.9	1.23 (2H, s)	29.1
5	1.23 (2H, s)	29.6	1.23 (2H, m)	29.3	1.2-1.34 (2H, m)	29.8	1.23 (2H, s)	29.3
6	1.23 (2H, s)	29.8	1.23 (2H, m)	29.6	1.2-1.34 (2H, m)	29.7	1.23 (2H, s)	29.7
7	1.23 (2H, s)	29.9	1.23 (2H, m)	29.9	1.2-1.34 (2H, m)	29.6	1.23 (2H, s)	29.7
8	1.99~2.01(2H, m)	27.2	2.01 (2H, m)	27.4	2.01 (2H, m)	27.4	2.03 (2H, t, 6.9)	27.1
9	5.30~5.37 (1H, m)	130.4	5.33 (1H, m)	130.4	5.30~5.38 (1H, m)	130.0	5.27~5.37 (1H, m)	130.2
10	5.30~5.37 (1H, m)	130.2	5.33 (1H, m)	128.1	5.30~5.38 (1H, m)	128.3	5.27~5.37 (1H, m)	127.9
11	1.99~2.01 (2H, m)	25.6	2.75 (2H, t, 6.9)	24.9	2.75 (2H, t, 6.6)	25.8	2.78 (2H, m)	25.6
12	1.23 (2H, s)	29.9	5.33 (1H, m)	130.2	5.30~5.38 (1H, m)	128.1	5.27~5.37 (1H, m)	128.2
13	1.23 (2H, s)	29.6	5.33 (1H, m)	128.3	5.30~5.38 (1H, m)	130.2	5.27~5.37 (1H, m)	130.0
14	1.23 (2H, s)	29.8	2.26 (2H, t, 7.3)	27.4	2.76 (2H, t, 7.1)	27.4	2.78 (2H, m)	25.6
15	1.23 (2H, s)	29.5	1.60 (2H, S)	29.8	1.2-1.34 (2H, m)	29.2	5.27~5.37 (1H, m)	128.0
16	1.23 (2H, s)	31.9	1.3 (2H, m)	31.7	1.2-1.34 (2H, m)	32.1	5.27~5.37 (1H, m)	130.2
17	1.23 (2H, s)	22.8	2.01 (2H, m)	22.8	1.2-1.34 (2H, m)	22.7	2.03 (2H, t, 6.9)	20.5
18	0.86 (3H,m)	14.1	0.86 (3H, m)	14.3	0.82 (3H,t, 5.5)	14.3	0.95 (3H, m)	14.1
1'	4.15 (1H, dd, 11.5, 5.9) 4.10 (1H, dd, 11.5, 3.2)	65.1	2.01 (2H, m)	22.8	4.13 (1H, dd, 11.5, 5.9) 4.19 (1H, dd, 11.5, 3.2)	65.3	4.15 (1H, dd, 11.5, 5.9) 4.10 (1H, dd, 11.5, 3.2)	65.1
2'	3.91 (1H, m)	70.3	2.01 (2H, m)	22.8	3.92 (1H, m)	70.5	3.91 (1H, m)	70.3
3'	3.69 (1H, dd, 11.5, 3.7) 3.66 (1H, dd, 11.5, 5.9)	63.3	0.86 (3H, m)	14.3	3.68 (1H, dd, 11.5, 3.7) 3.60 (1H, dd, 11.5, 5.9)	63.4	3.69 (1H, dd, 11.5, 3.7) 3.66 (1H, dd, 11.5, 5.9)	63.3

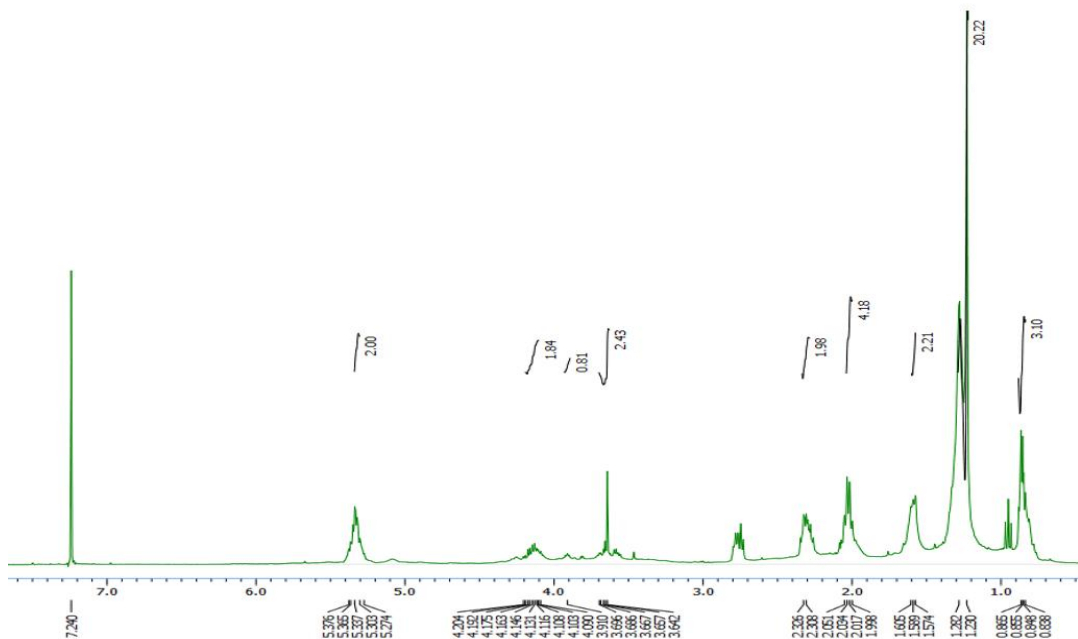


Figure 99. ^1H -NMR spectrum of compound **4** in chloroform-*d*.

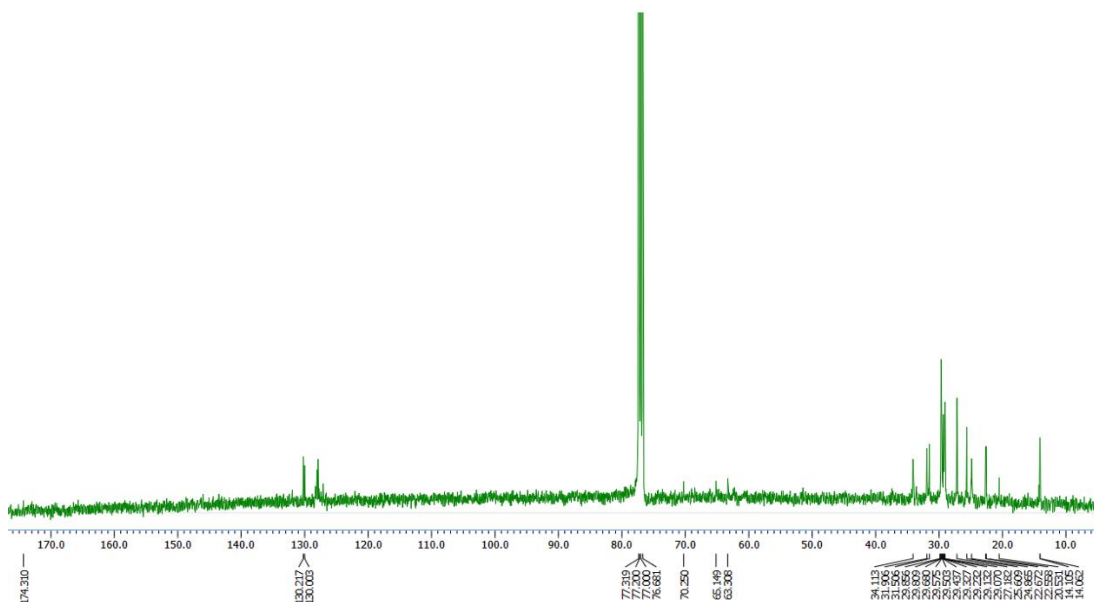


Figure 100. ^{13}C -NMR spectrum of compound **4** in chloroform-*d*.

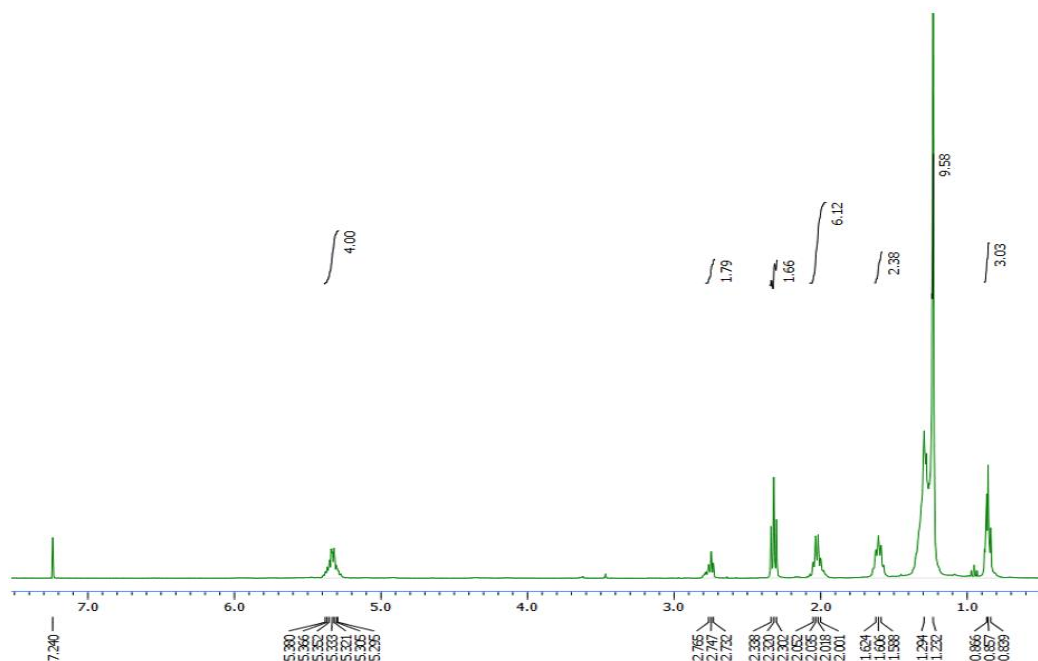


Figure 101. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **5** in chloroform-*d*.

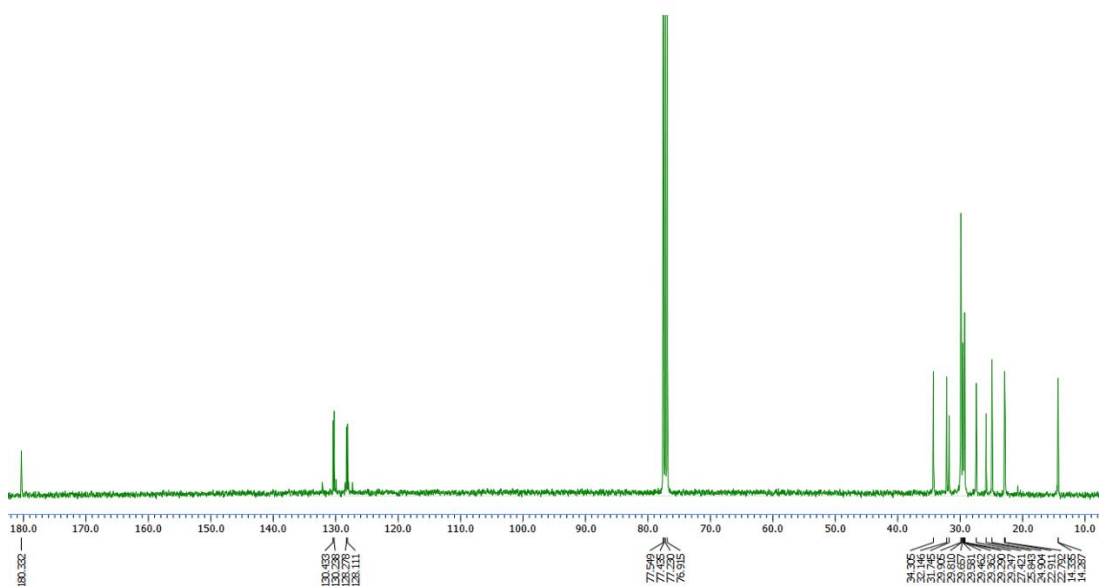


Figure 102. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **5** in chloroform-*d*.

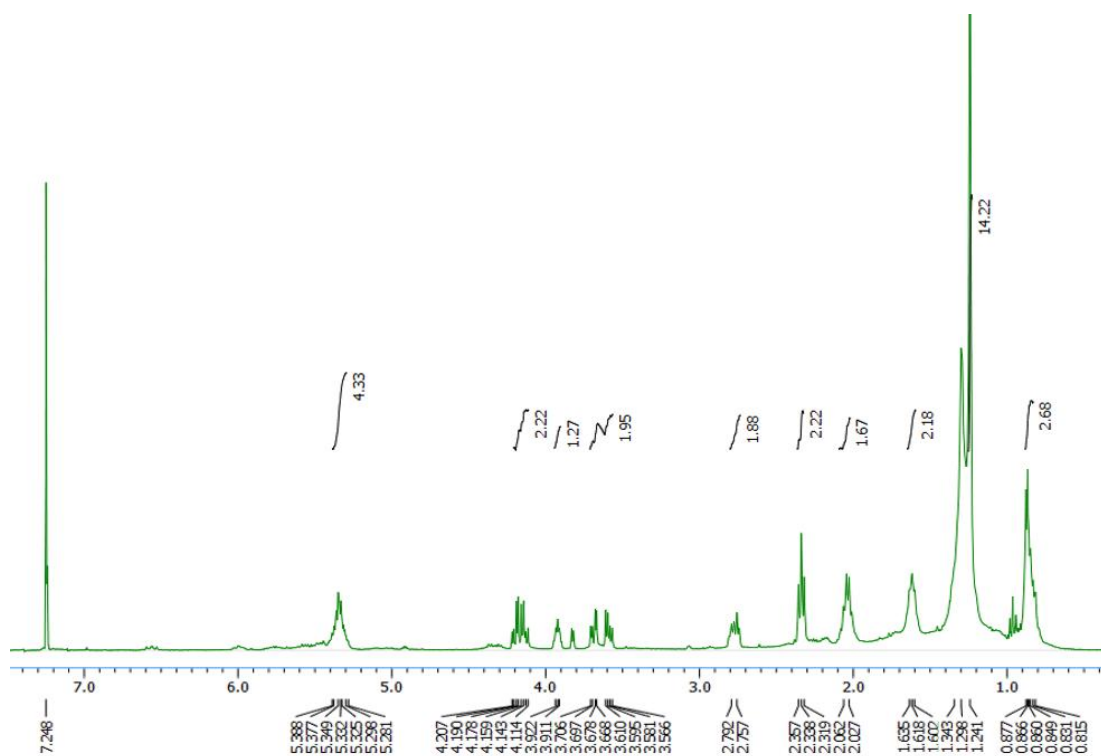


Figure 103. ^1H -NMR spectrum of compound **7** in chloroform-*d*.

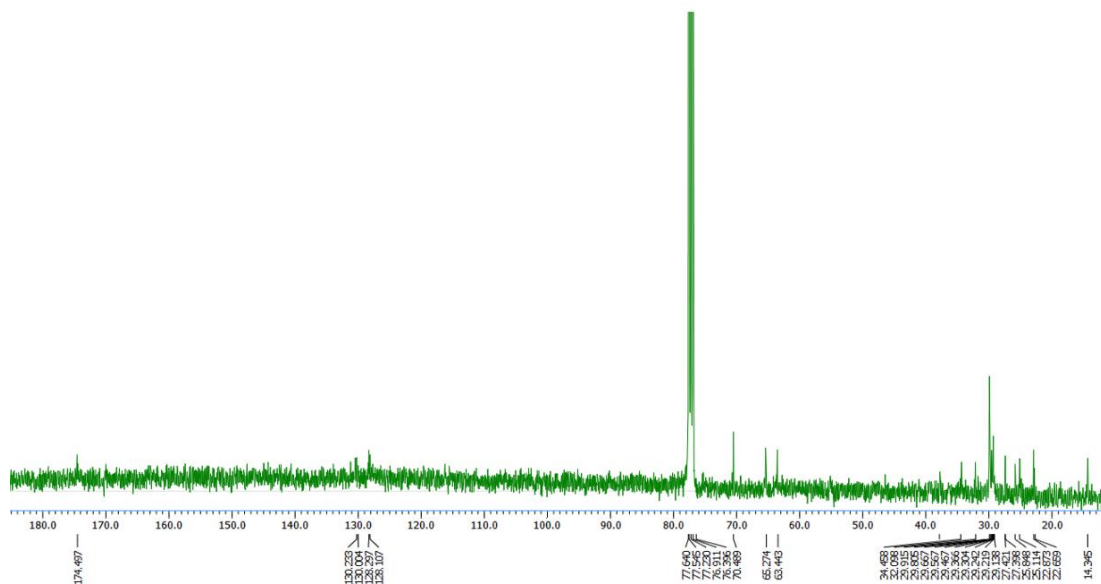
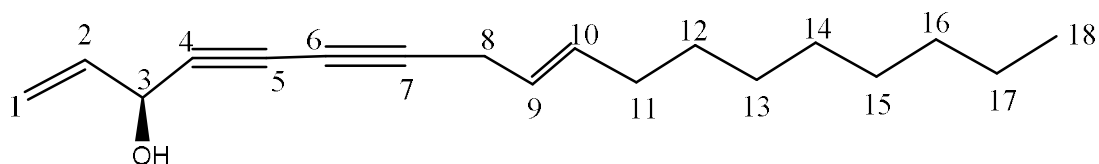


Figure 104. ^{13}C -NMR spectrum of compound **7** in chloroform-*d*.

4) Compound 10의 구조 동정

Compound 10은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 ^{13}C NMR spectrum에서 총 18개 카본 피크가 관찰되었으며 δ_{C} 117.2, 136.4, 122.1, 133.2의 시그널 및 δ_{H} 5.46 (1H, dd, $J = 16.9, 4.0$ Hz), 5.23 (1H, dd, $J = 10.1, 4.0$ Hz), 5.94 (1H, ddd, $J = 16.9, 10.1, 5.5$ Hz), 5.35 (1H, m), 5.46 (1H, m) 피크를 통해서 2개의 이중결합 구조 가지고 있음을 예상하였다. δ_{C} 64.2, 71.5, 74.4, 80.5의 시그널은 sp^3 혼성 carbon 피크를 통해서 2개의 삼중결합 구조를 가지고 있음을 예상하였다. δ_{H} 4.89 (1H, d, $J = 5.5$ Hz) 및 δ_{C} 63.7 피크는 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. δ_{H} 0.87 (3H, t, $J = 6.9$ Hz) 및 δ_{C} 14.3 피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³⁶과 비교하여 compound 10은 1,9-Octadecadiene-4,6-diyne-3S-ol로 확인되었다 (Figure 107-109, Table 24).



Compound 10

Figure 107. Chemical structure of compound 10.

Table 24. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **10** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 10	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1	5.46 (1H, dd, 16.9, 4.0)	117.3
	5.23 (1H, dd, 10.1, 4.0)	
2	5.94 (1H, ddd, 16.9, 10.1, 5.5)	136.4
3	4.89 (1H, d, 5.5)	63.7
4		74.4
5		71.5
6		64.2
7		80.5
8	3.02 (2H, d, 6.9)	17.9
9	5.35 (1H, m)	122.1
10	5.46 (1H, m)	133.3
11	2.01 (2H, q, 6.9)	27.4
12	1.25 (2H, m)	29.9
13	1.25 (2H, m)	29.5
14	1.35 (2H, m)	29.4
15	1.25 (2H, m)	29.4
16	1.25 (2H, m)	32.0
17	1.25 (2H, m)	22.9
18	0.87 (3H, t, 6.9)	14.3

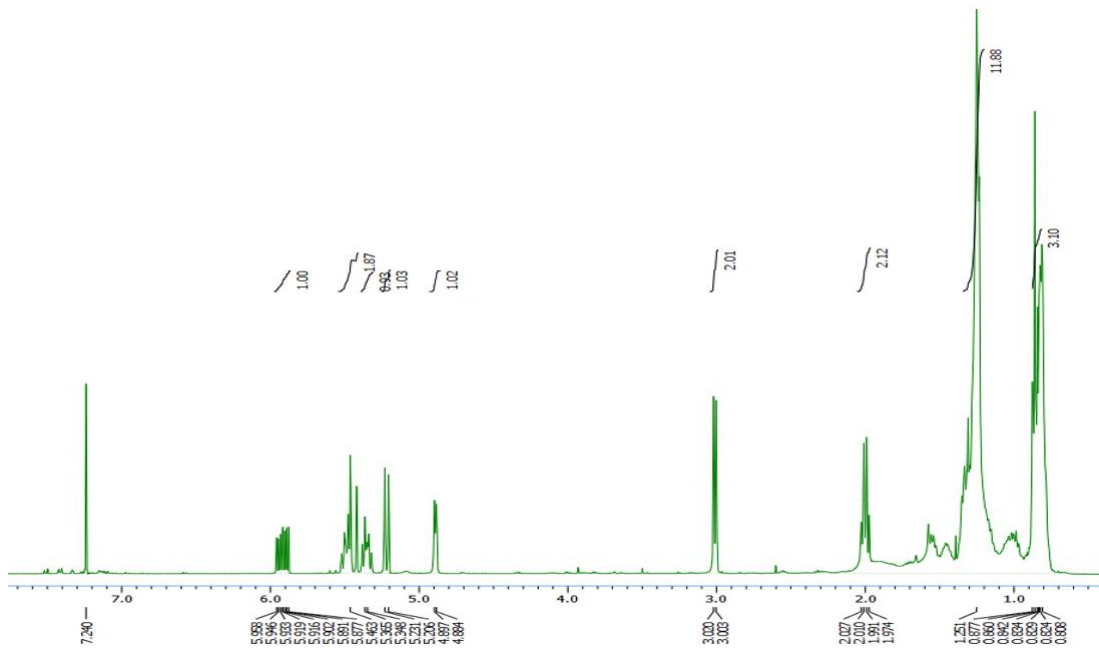


Figure 108. ^1H -NMR spectrum of compound **10** in chloroform-*d*.

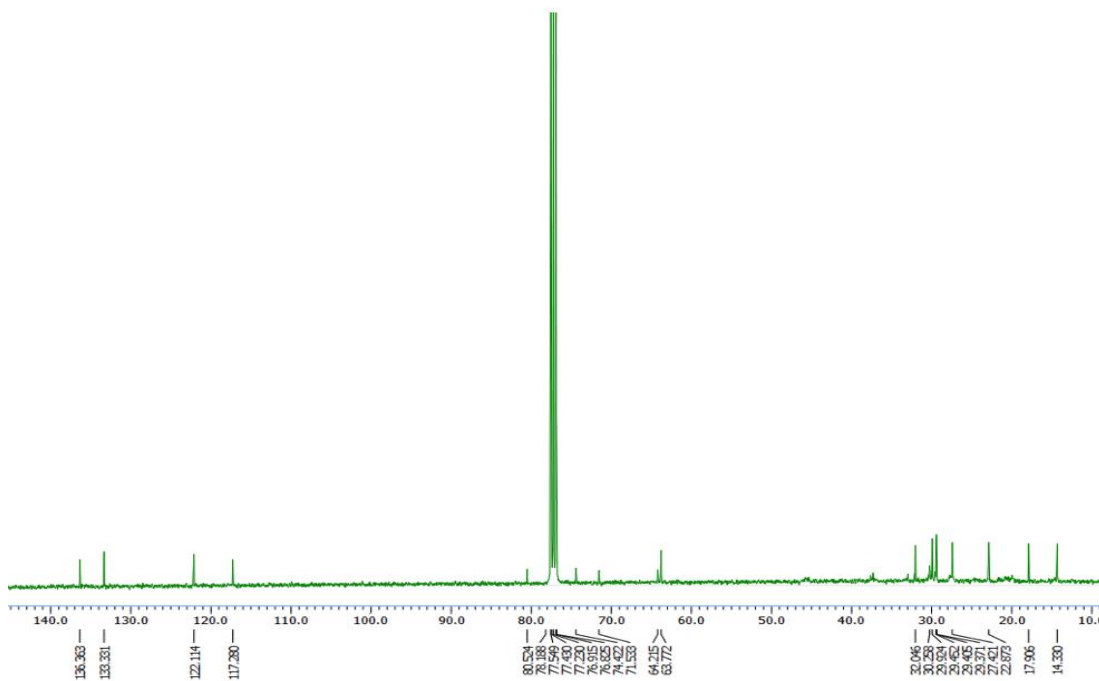
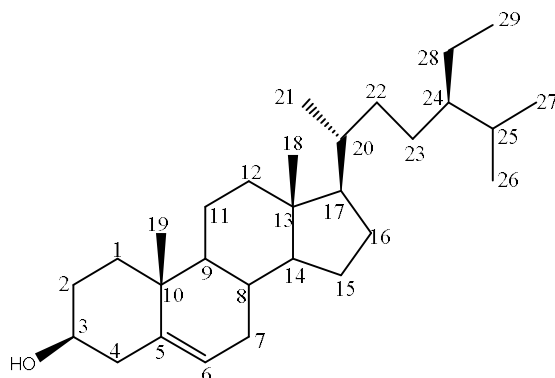


Figure 109. ^{13}C -NMR spectrum of compound **10** in chloroform-*d*.

5) Compound 11의 구조 동정

Compound 11은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 0.67 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.82 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.78 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.83 (3H, t, $J = 7.8$ Hz) chemical shift 값 및 integral로 보아 6개의 methyl group을 예상하였다. δ_{H} 5.33 (1H, d, $J = 5.5$ Hz) 피크는 sp^2 혼소 탄소 시그널으로 이중 결합 구조를 예상하였다. δ_{H} 3.50 (1H, m) 의 시그널은 산소가 인접해 있는 sp^3 혼성한 methine proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 29개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 19.6, 12.2, 19.2, 19.1, 19.6, 12.5의 시그널을 methyl 카본으로 이를 통해 sterol 계열의 화합물로 예상하였다. 3차 카본 δ_{C} 121.9, 4차 카본 δ_{C} 140.9는 olefin group을 확인하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 이를 바탕으로 문헌¹³⁷과 비교하여 compound 11은 β -sitosterol로 확인되었다(Figure 110-112, Table 25).



Compound 11

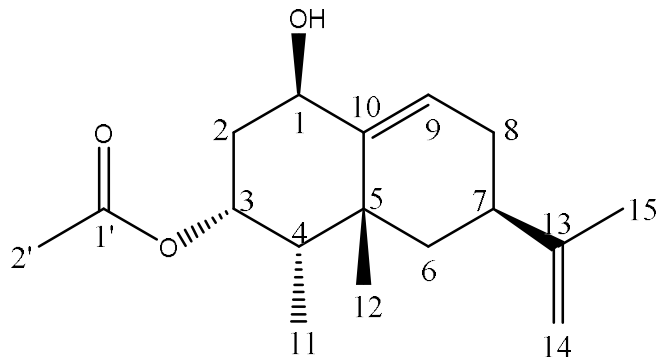
Figure 110. Chemical structure of compound 11.

Table 25. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **11** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 11	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1		37.5
2		29.7
3	3.50 (1H, m)	72.0
4		42.4
5		140.9
6	5.33 (1H, d, 5.5)	121.9
7		31.9
8		31.7
9		50.4
10		36.7
11		21.3
12		39.9
13		42.6
14		57.0
15		24.6
16		29.1
17		56.1
18	0.67 (3H, s)	12.3
19	0.99 (3H, s)	19.6
20		36.7
21	0.93 (3H, d, 6.4)	19.2
22		34.3
23		25.6
24		46.0
25		29.4
26	0.82 (3H, d, 6.9)	19.6
27	0.78 (3H, d, 6.9)	19.1
28		22.8
29	0.83 (3H, t, 7.8)	12.5

6) Compound 12의 구조 동정

Compound 12는 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 ^{13}C NMR spectrum에서 총 17개 카본 피크가 관찰되었으며 δ_{C} 109.1, 129.4, 140.1, 149.4의 시그널 및 δ_{H} 5.93 (1H, dd, $J = 6.9, 1.8$ Hz), 4.66–4.70 (each, 1H, d, $J = 1.4$ Hz) 피크 통해서 2개의 이중결합 구조 가지고 있음을 예상하였다. 그중 δ_{C} 109.1, 149.4의 시그널은 propenyl group 구조 가지고 있음을 예상하였다. δ_{H} 2.07 (3H, s), 1.71 (3H, s), 1.40 (3H, s), 0.85 (3H, d, $J = 7.3$ Hz) 및 δ_{C} 32.2, 21.6, 21.2, 10.2 피크는 4개 methyl group이 있음을 예상하였다. δ_{C} 170.6의 시그널은 sp^2 혼성 carbon 피크로 carbonyl group를 가지고 있음을 예상하였다. δ_{C} 74.8 시그널 및 δ_{H} 4.36 (1H, t, $J = 3.2$ Hz) 피크는 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³⁸과 비교하여 compound 12는 capsidiol 3-acetate로 확인되었다 (Figure 113–115, Table 26).



Compound 12

Figure 113. Chemical structure of compound 12.

Table 26. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **12** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 12	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1	4.36 (1H, t, 3.2)	74.8
2		33.2
3	5.62 (1H, dt, 12.8, 4.6)	69.6
4		44.6
5		39.3
6		44.8
7		40.3
8		30.5
9	5.93 (1H, dd, 6.9, 1.8)	129.4
10		140.1
11	0.85 (3H, d, 7.3)	10.2
12	1.40 (3H, s)	32.2
13		149.5
14	4.66-4.70 (each, 1H, d, 1.4)	109.1
15	1.71 (3H, s)	21.6
1'		170.6
2'	2.07 (3H, s)	21.2

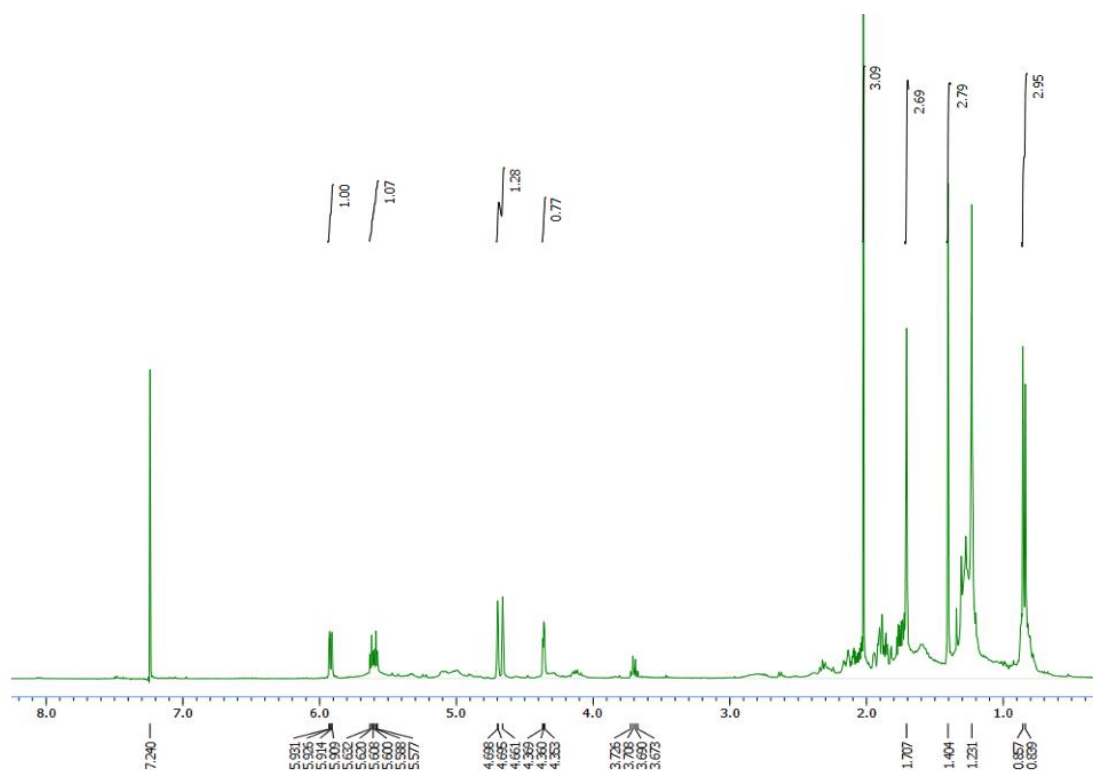


Figure 114. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **12** in chloroform-*d*.

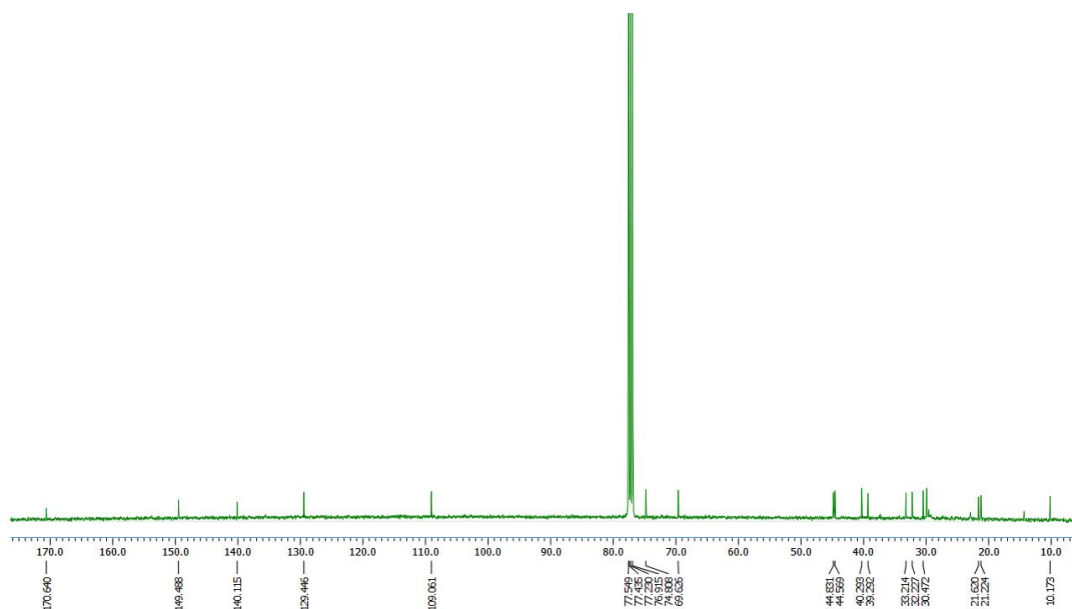


Figure 115. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **12** in chloroform-*d*.

7) Compound **13**의 구조 동정

Compound **13**은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.44 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.58 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz) 및 6.61(1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.68 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.44 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling 하고 있는 2개 aromatic ring proton를 예상하였고 δ_{H} 5.92 (4H, m) 피크는 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 결합한 methylene proton 2개로 예상하였다. 또한 δ_{H} 4.10 (1H, dd, $J = 6.9, 2.3$ Hz), 3.84(1H, dd, $J = 8.0, 2.3$ Hz) 피크는 산소에 인접한 위치의 methylene proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 19개의 carbon 피크가 있는 것은 확인되었고 δ_{C} 178.6의 시그널은 lactone group인 carbon로 예상하였다. δ_{C} 101.2 피크는 deshielding된 것으로 보아 ^1H NMR spectrum 같이 보면 전기음성도가 큰 산소가 2개가 결합한 methylene carbon(-OCH₂O-)로 예상하였다. 또한 δ_{C} 71.9 피크는 deshielding된 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소가 결합한 sp^3 혼성 탄소로 예상하였다. ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum를 종합하여 dibenzyltyrolactones - type lignans 구조으로 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹³⁹ 과 비교하여 compound **13**은 (-)-hinokinin로 확인되었다(Figure 116-118, Table 27).

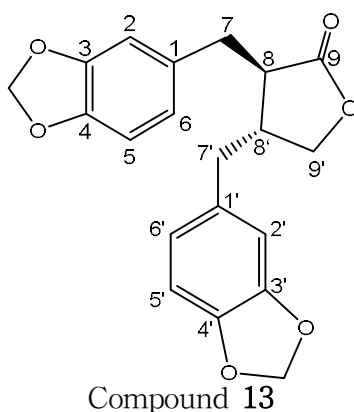


Figure 116. Chemical structure of compound **13**.

Table 27. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **13** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 13	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1		131.8
2	6.44 (1H, d, 1.8)	108.5
		148.1
4		146.6
5	6.71 (1H, d, 7.8)	108.6
6	6.58 (1H, dd, 7.8, 1.8)	121.9
	2.96 (1H, dd, 13.9, 5.0)	
7	2.82 (1H, dd, 13.9, 5.0)	35.1
8	2.40-2.54 (1H, m)	46.7
9		178.6
1'		131.5
2'	6.61 (1H, d, 1.8)	109.7
3'		148.1
4'		146.6
5'	6.68 (1H, d, 8.2)	109.0
6'	6.44 (1H, dd, 8.2, 1.8)	122.5
7'	2.56-2.58 (1H, m), 2.40-2.54 (1H, m)	38.5
8'	2.40-2.54 (1H, m)	41.4
	4.10 (1H, dd, 6.9, 2.3)	
9'	3.84 (1H, dd, 8.0, 2.3)	71.3
2-OCH ₂ O	5.92 (4H, m)	101.2

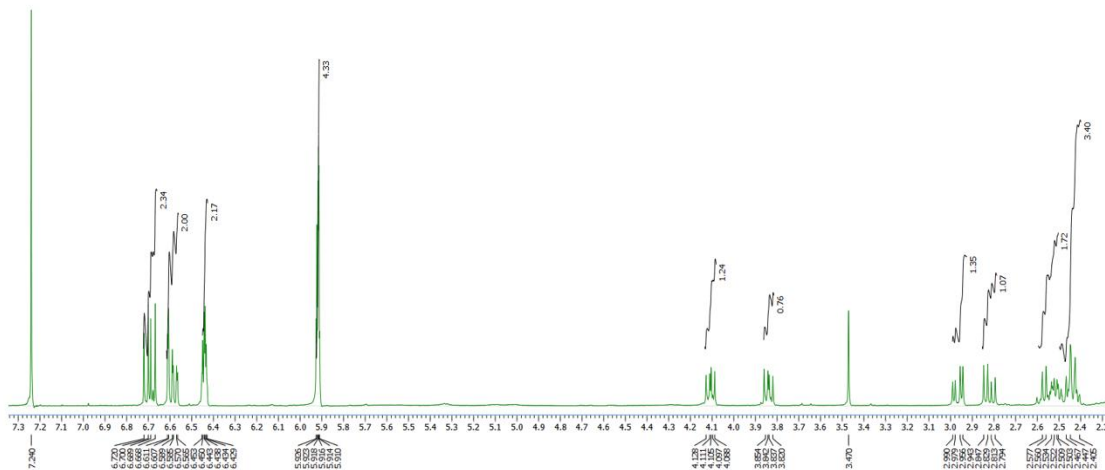


Figure 117. ^1H -NMR spectrum of compound **13** in chloroform-*d*.

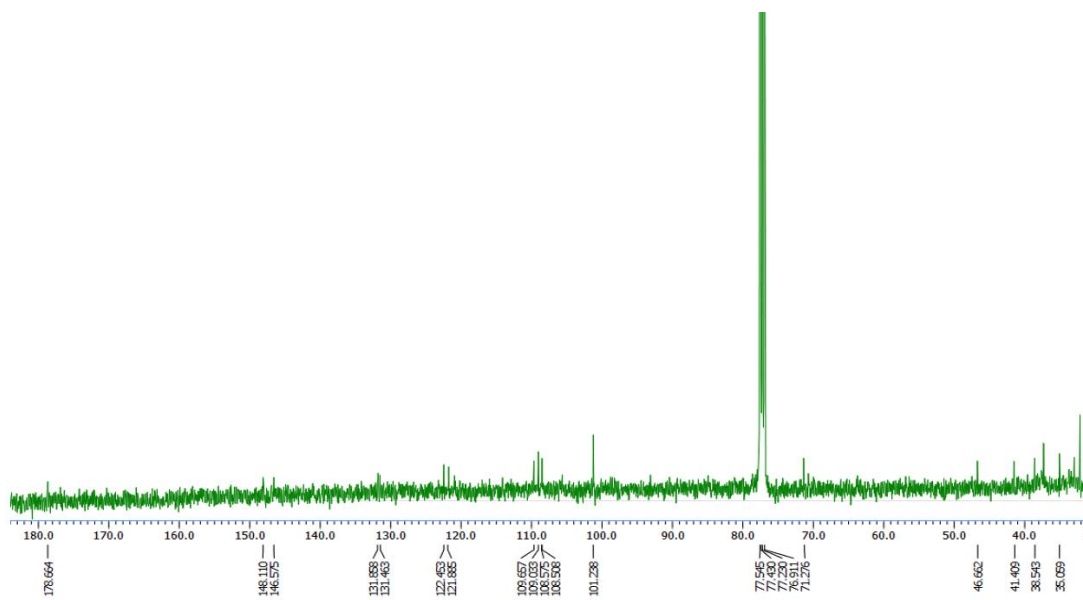


Figure 118. ^{13}C -NMR spectrum of compound **13** in chloroform-*d*.

8) Compound 14의 구조 동정

Compound 14는 ^1H NMR spectrum 분석 통해 δ_{H} 1.8 피크 이하에 나타난 피크는 sp^3 혼성을 갖는 methyl group의 proton로 예상되며, δ_{H} 3~4 피크에 나타난 signal들은 마찬가지로 sp^3 혼성을 갖는 methyl group의 proton로 예상되는데, 이는 일반적으로 1.5 피크에 나타나는 signal보다 그 값이 약간 deshielded된 영역에서 나타난 것으로 보아 F, I, N, S 등과 같은 원자가 이웃해 있을 것이라 예상하였다. 또한, 6피크 부근에 나타난 signal들은 vinyl group의 proton일 것이라 예상되며, 8~9.5 피크 부근에서 나타나는 signal은 4개의 pyrrole group을 고리형태로 문헌과 비교하여 결합하는 부분의 양성자들이 링 전류효과로 나타나는 피크로 확인되었다. 이를 바탕으로 문헌^{140,141}과 비교하여 compound 14는 chlorophyll-11로 확인되었다(Figure 119-121, Table 28).

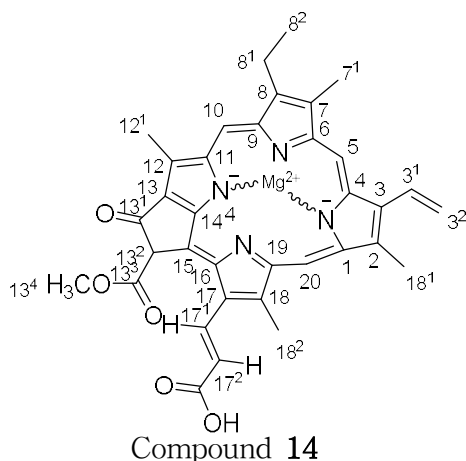


Figure 119. Chemical structure of compound 14.

Table 28. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **14** (400 and 100 MHz, chloroform-*d*).

No.	Compound 14	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2 ¹	3.65 (1H, s)	
3 ¹		
3 ²	6.24 (1H, d, 2.3)	
3 ²	6.13 (1H, d, 2.8)	
5		
7 ¹	3.38 (1H, s)	
8 ¹		
8 ²	1.65 (1H, d, 2.8)	
10		
12 ¹	3.87 (1H, s)	
13 ²		
13 ³		
13 ⁴		
17 ¹		
17 ²		
17 ³		
18		
18 ¹		
20		

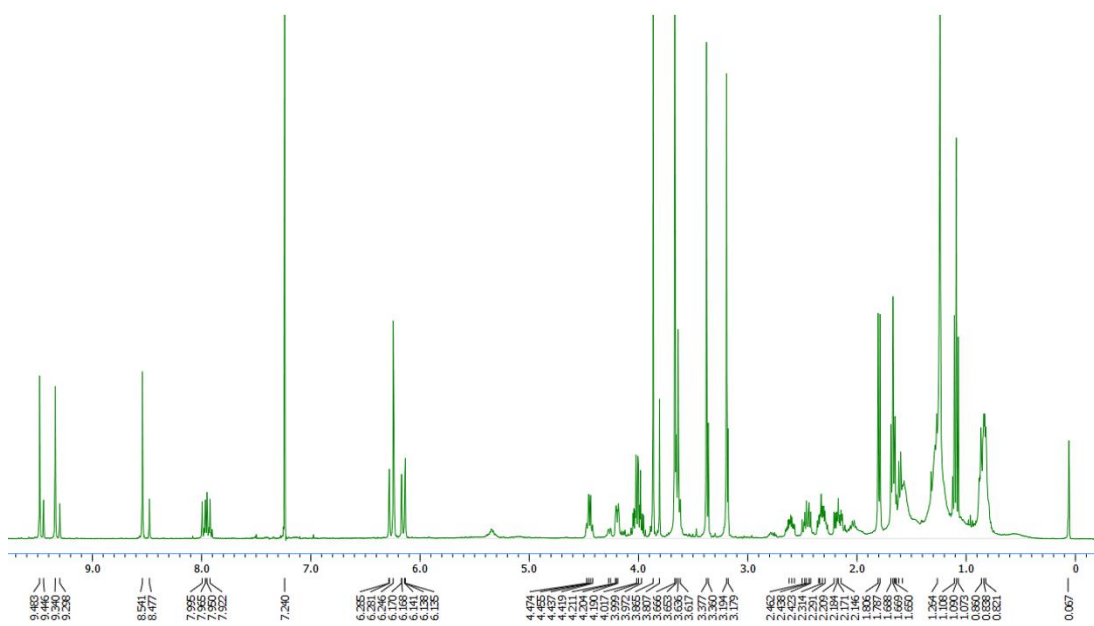


Figure 120. ^1H -NMR spectrum of compound **14** in chloroform-*d*.

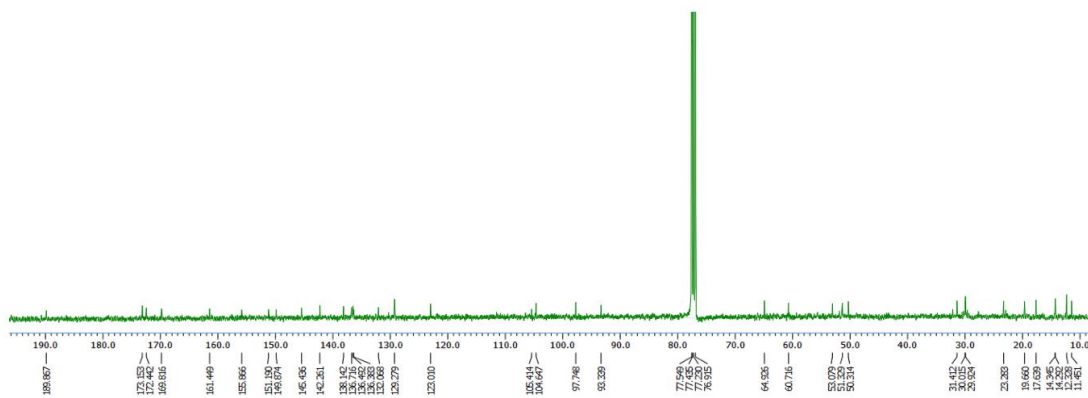
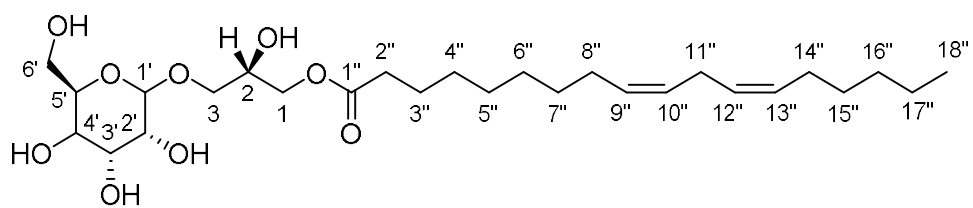


Figure 121. ^{13}C -NMR spectrum of compound **14** in chloroform-*d*.

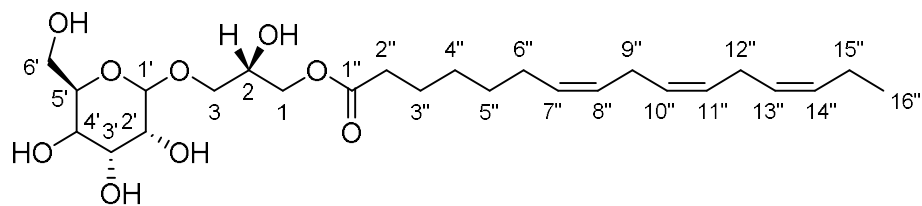
9) Compounds **15**, **16**의 구조 동정

Compound **16**은 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 통해 ^{13}C NMR spectrum에서 총 25개 카본 피크가 관찰되었으며 δ_{C} 175.1 시그널을 통해 carbonyl group를 가지고 있음을 예상하였고 δ_{C} 128.4, 129.0, 129.3, 129.4, 131.1, 132.9의 시그널을 통해서 3개의 이중결합 구조 가지고 있음을 예상하였다. δ_{C} 68.8, 70.2, 71.9 시그널 및 δ_{H} 3.65 (1H, dd, $J = 10.1, 3.7$ Hz), 3.90 (1H, dd, $J = 5.5, 3.7$ Hz), 3.93 (1H, m), 4.24 (1H, dd, $J = 12.4, 6.9$ Hz), 4.44 (1H, dd, $J = 12.4, 2.8$ Hz) 피크는 전기음성도가 큰 산소가 붙어있는 sp^3 혼성 carbon이 있는 것으로 예상하였다. δ_{C} 63.0 - 105.5의 6개 카본 피크를 종합해서 β -form의 glucopyranoside를 예상하였다. δ_{H} 0.97 (3H, t, $J = 7.6$ Hz) 피크는 methyl group이 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁴²과 비교하여 compound **16**는 (2S)-1 - O-(7Z,10Z,13Z-hexadecatrienoyl)-3-O- β -galactopyranosylglycerol로 확인되었다 (Figure 122-124, Table 29).

Compound **15**는 ^1H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR spectrum을 compound **16** 과 비교하여 거의 비슷한 형태구조를 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 25개 카본 피크가 관찰되었으며, 그중에서 δ_{C} 129.2, 129.4, 131.0, 131.1의 시그널을 통해서 2개의 이중결합 구조 가지고 있음 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁴² 통해 compound **15**는 (2S)-1 - O-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-3-O- β -galactopyranosylglycerol로 확인되었다 (Figure 122, 125, 126, Table 29).



Compound 15



Compound 16

Figure 122. Chemical structure of compounds 15, 16.

Table 29. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **15**, **16** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 15		Compound 16	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1	4.24 (1H, dd, 12.4, 6.9) 4.31 (1H, dd, 12.4, 7.7)	67.9	4.24 (1H, dd, 12.4, 6.9) 4.44 (1H, dd, 12.4, 2.8)	68.9
2	3.93 (1H, m)	70.4	3.93 (1H, m)	70.4
3	3.65 (1H, dd, 10.1, 3.7) 3.90 (1H, dd, 5.5, 3.7)	71.6	3.65 (1H, dd, 10.1, 3.7) 3.90 (1H, dd, 5.5, 3.7)	71.9
1'	4.43 (1H, d, 6.9)	105.5	4.24 (1H, d, 6.9)	105.5
2'	3.53 (1H, dd, 5.5, 2.3)	72.5	3.53 (1H, dd, 5.5, 2.3)	72.5
3'	3.50 (1H, dd, 6.9, 5.5)	74.7	3.50 (1H, dd, 6.9, 3.5)	74.9
4'	3.82 (1H, dd, 5.5, 3.9)	71.6	3.82 (1H, dd, 5.5, 3.9)	71.6
5'	3.52 (1H, m)	76.9	3.51 (1H, m)	76.9
6'	3.73 (1H, dd, 10.1, 2.8) 3.77 (1H, dd, 4.4, 3.9)	63.0	3.71 (1H, dd, 10.1, 2.8) 3.76 (1H, dd, 4.4, 3.9)	63.0
1''		175.1		175.1
2''	2.32 (2H, t, 7.3)	35.3	2.35 (2H, t, 7.3)	33.3
3''	1.61 (2H, m)	26.2	1.61 (2H, m)	26.2
4''	1.28-1.38 (2H, m)	30.5	1.33 (2H, m)	30.5
5''	1.28-1.38 (2H, m)	30.6	1.33 (2H, m)	30.7
6''	1.28-1.38 (2H, m)	30.4	2.09 (2H, m)	28.3
7''	1.28-1.38 (2H, m)	30.4	5.23-5.41 (1H, m)	128.4
8''	2.07 (2H, m)	28.4	5.23-5.41 (1H, m)	129.0
9''	5.23-5.41 (1H, m)	131.1	2.81 (2H, t, 5.6)	26.7
10''	5.23-5.41 (1H, m)	131.0	5.23-5.41 (1H, m)	129.3
11''	2.81 (2H, br t, 5.9)	26.6	5.23-5.41 (1H, m)	129.4
12''	5.23-5.41 (1H, m)	129.4	2.81 (2H, t, 5.6)	26.6
13''	5.23-5.41 (1H, m)	129.2	5.23-5.41 (1H, m)	131.2
14''	2.07 (2H, m)	28.4	5.23-5.41 (1H, m)	132.9
15''	1.28-1.38 (2H, m)	31.0	2.09 (2H, m)	21.7
16''	1.28-1.38 (2H, m)	32.9	0.97 (3H, t, 7.6)	14.9
17''	1.28-1.38 (2H, m)	23.9		
18''	0.90 (3H, t, 6.9)	14.7		

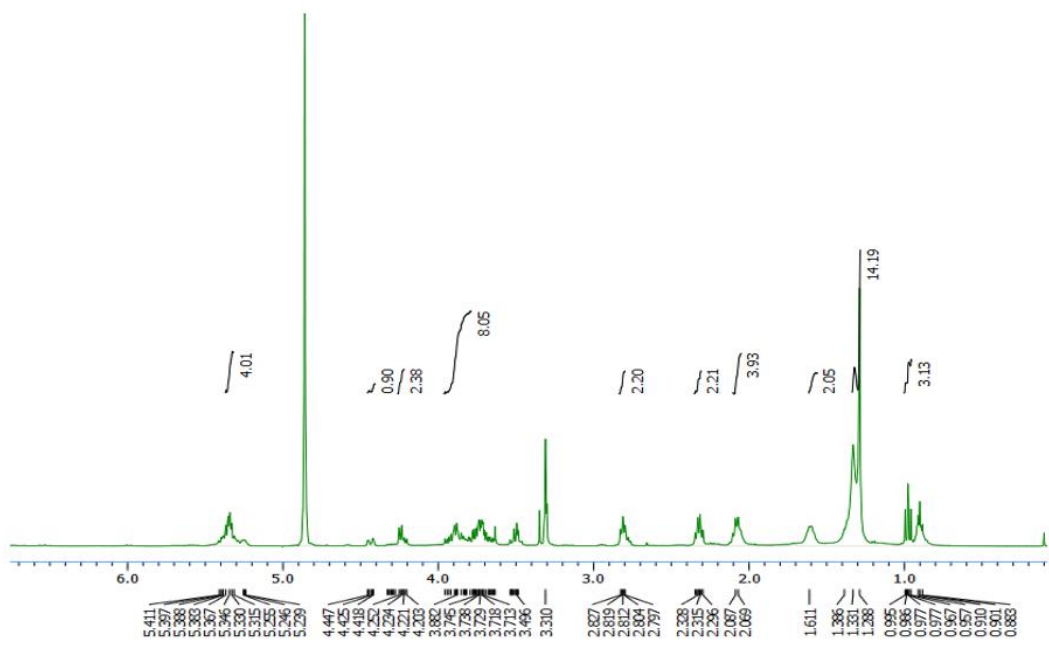


Figure 123. ¹H-NMR spectrum of compound **15** in methanol-*d*₄.

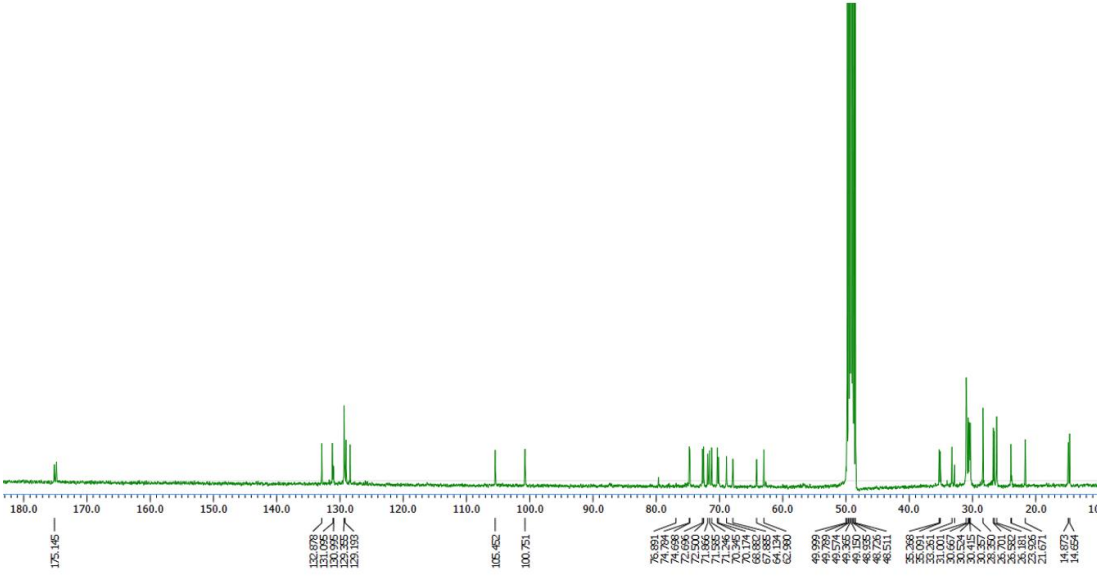


Figure 124. ¹³C-NMR spectrum of compound **15** in methanol-*d*₄.

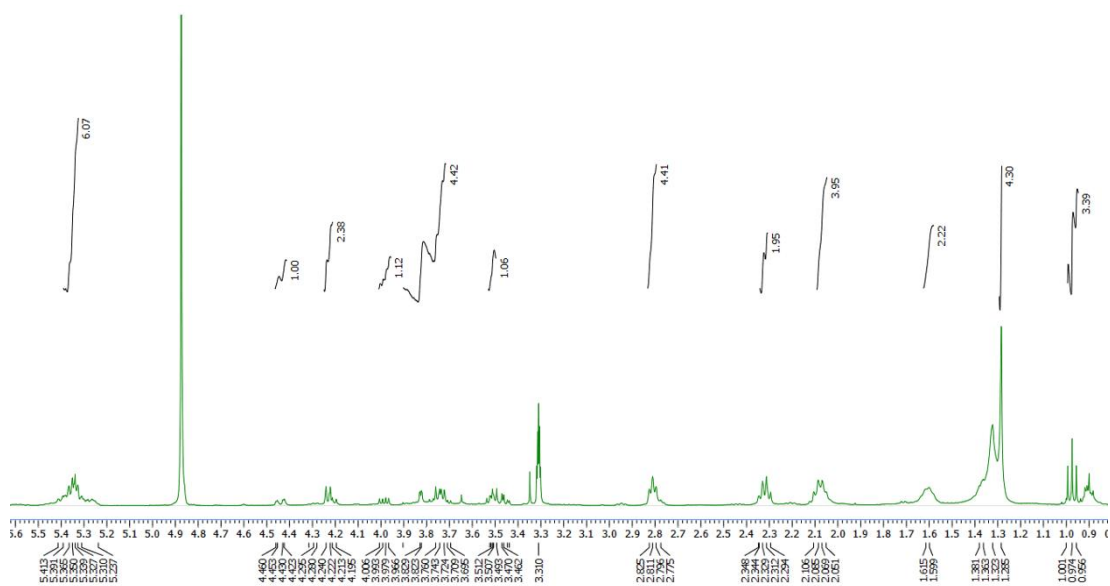


Figure 125. ^1H -NMR spectrum of compound **16** in methanol- d_4 .

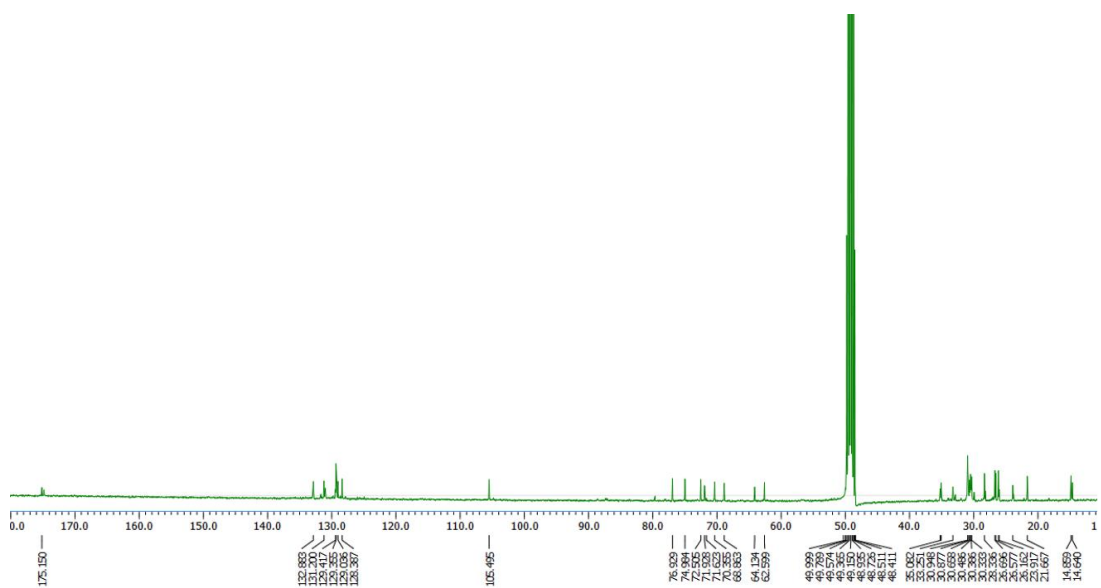


Figure 126. ^{13}C -NMR spectrum of compound **16** in methanol- d_4 .

10) Compounds **17**, **18**의 구조 동정

Compound **17**은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 22개 카본 피크가 관찰되었으며 δ_{H} NMR데이터를 종합하여 2개 aromatic ring구조를 가지고 있음을 예상하였다. 그리고 ^{13}C NMR에서 당을 제외하고 15개의 카본피크가 관찰된 것을 보아 flavonoid 골격 화합물을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.20 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 및 6.40 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. δ_{H} 7.92 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.57 (1H, brd, $J = 8.7$ Hz) 및 6.90(1H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 나머지 δ_{H} 5.40 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크에 coupling constant 값을 통하여 β -anomeric proton를 예상하고 δ_{C} 62.3-103.7의 6개 카본피크를 종합해서 β -form의 glucopyranoside를 예상하였다. δ_{C} 179.6의 시그널은 sp^2 혼성 carbon 피크로 carbonyl group를 가지고 있음을 예상하였다. δ_{H} 3.94 (3H, s) 및 δ_{C} 57.1피크는 1개 methoxy가 있음을 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁴³과 비교하여 compound **17**은 isorhamnetin3-O- β -D-glucopyranoside로 확인되었다(Figure 127-129, Table 30).

Compound **18**은 ^{13}C NMR spectrum에서 총 21개 카본 피크가 관찰되었으며 δ_{H} NMR데이터를 종합보아 2개 aromatic ring구조를 가지고 있음을 예상하였다. 그리고 ^{13}C NMR에서 당을 제외한 15개의 카본피크가 관찰된 것을 보아 flavonoid 골격 화합물을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.20 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 및 6.41 (1H, d, $J = 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. δ_{H} 7.67 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz), 7.53 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 및 6.82 (1H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 나머지 δ_{H} 5.37 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크에 coupling constant 값을 통하여 β -anomeric proton를 예상하고 δ_{C} 60.1-101.8의 6개 카본피크를 종합해서 β -form의 galactoside를 예상하였다. δ_{C} 177.5의 시그널은 sp^2 혼성 carbon 피크로 carbonyl group를 가지고 있음을 예상

하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁴⁴과 비교하여 compound 18은 quercetin-3-O- β -D-galactoside로 확인되었다(Figure 127, 130, 131, Table 30).

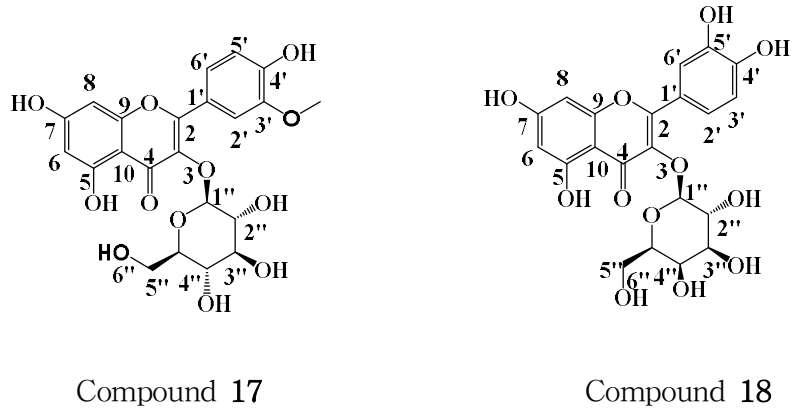


Figure 127. Chemical structure of compounds 17, 18.

Table 30. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **17**, **18** (400 and 100 MHz, methanol- d_4 and Dimethyl sulfoxide- d_6).

No.	Compound 17		Compound 18	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		158.8		156.3
3		135.5		133.5
4		179.6		177.5
5		163.2		161.2
6	6.20 (1H, d, 1.8)	99.9	6.20 (1H, d, 1.8)	98.7
7		166.1		164.1
8	6.40 (1H, d, 1.8)	94.9	6.41 (1H, d, 1.8)	93.5
9		158.6		156.2
10		105.6		103.9
1'		123.1		121.1
2'	7.92 (1H, d, 1.8)	114.5	7.53 (1H, d, 2.3)	115.9
3'		148.5		144.8
4'		150.9		148.5
5'	6.90 (1H, d, 8.7)	116.0	6.82 (1H, d, 8.7)	115.2
6'	7.57 (1H, brd, 8.7)	123.7	7.67 (1H, dd, 8.7, 2.3)	122.0
1''	5.40 (1H, d, 7.8)	103.7	5.37 (1H, d, 7.8)	101.8
2''	3.47 (1H, m)	75.1	3.31-3.65 (1H, m)	71.2
3''	3.47 (1H, m)	77.4	3.31-3.65 (1H, m)	73.2
4''	3.29 (1H, m)	71.4	3.31-3.65 (1H, m)	67.9
5''	3.27 (1H, m)	78.2	3.31-3.65 (2H, m)	75.8
6''	3.74 (1H, dd, 11.2, 1.4) 3.57 (1H, dd, 11.2, 3.2)	62.3	3.31-3.65 (1H, m)	60.1
OCH ₃	3.94 (3H, s)	57.1		

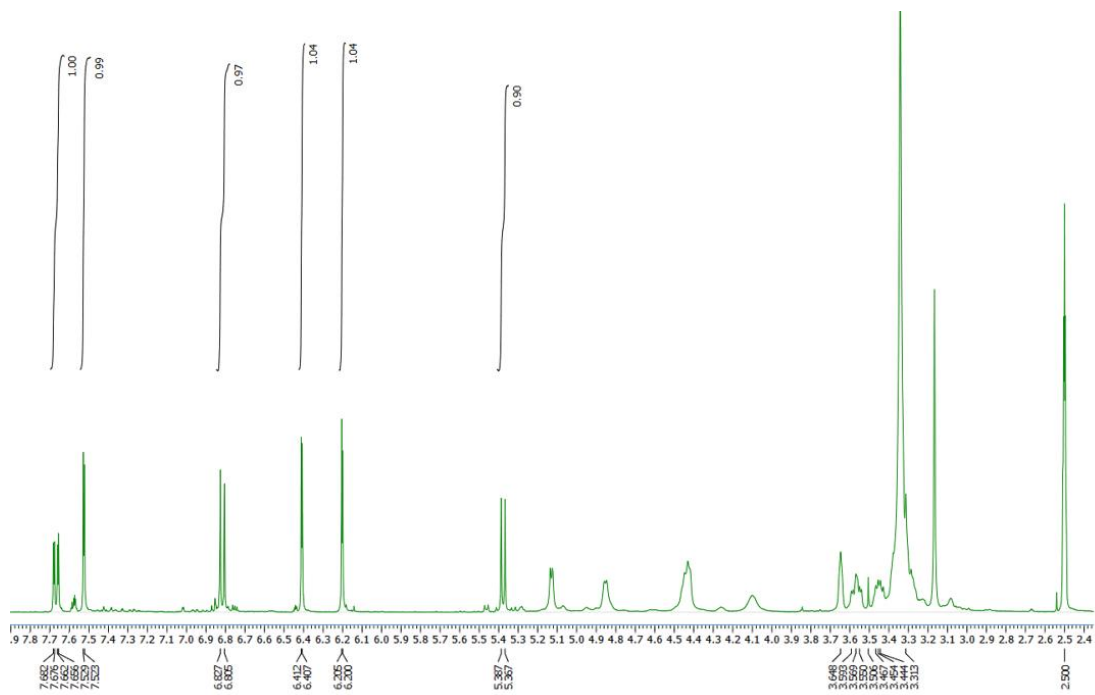


Figure 130. ^1H -NMR spectrum of compound **18** in Dimethyl sulfoxide- d_6 .

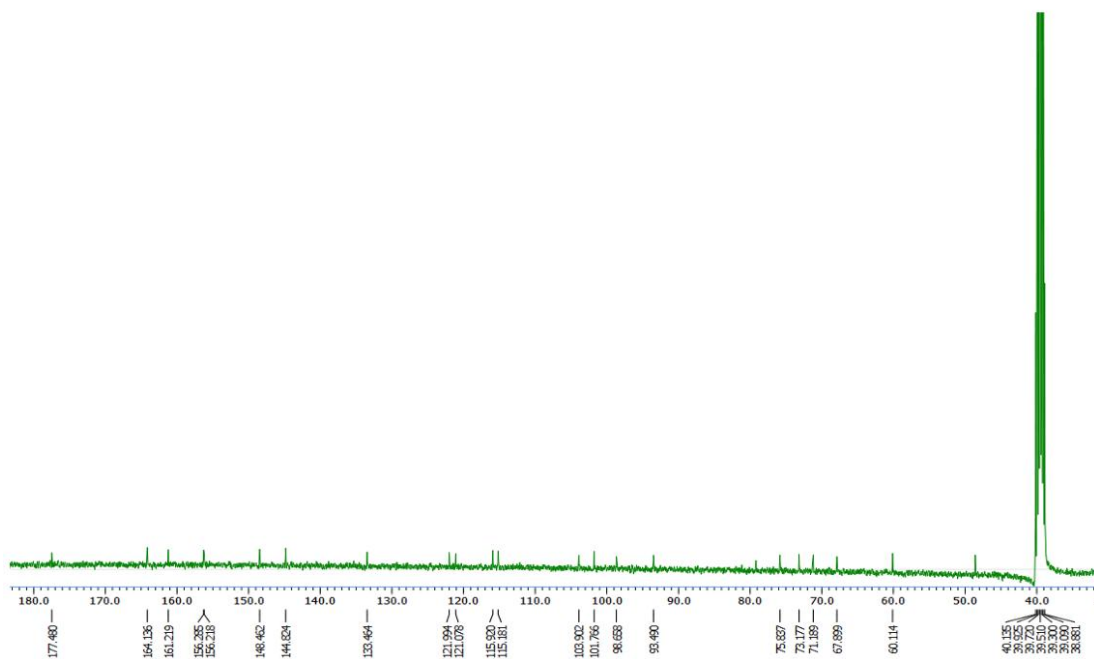
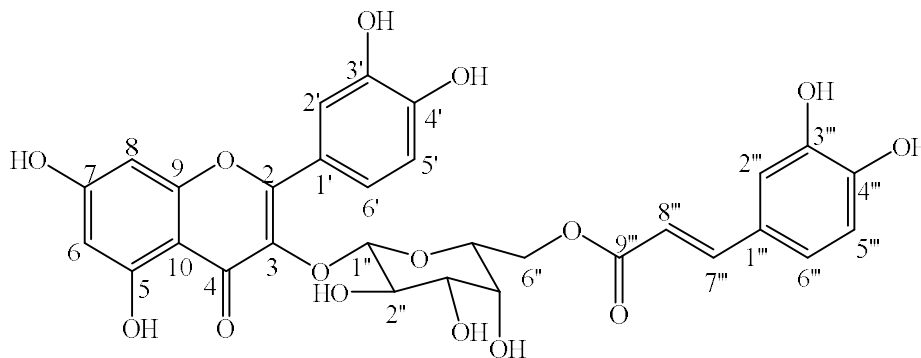


Figure 131. ^{13}C -NMR spectrum of compound **18** in Dimethyl sulfoxide- d_6 .

11) Compound 19의 구조 동정

Compound 19는 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.17 (1 H, d, $J = 1.8$ Hz) 및 6.37 (1 H, d, $J = 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 하고 있는 aromatic ring proton를 예상하였다. 그리고 δ_{H} 7.80 (1 H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.82 (1 H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.56 (1 H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) 및 δ_{H} 6.93 (1 H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.82 (1 H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.82 (1 H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 2개 aromatic ring이 있음을 예상하였다. δ_{H} 7.3 (1 H, d, $J = 16.0$ Hz) 및 6.02 (1 H, d, $J = 16.0$ Hz) trans form의 이중 결합이 있음을 예상하였다. δ_{H} 5.11 (1 H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크에 coupling constant 값을 통하여 β -anomeric proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 30개 카본 피크가 관찰되었으며 그중 δ_{C} 179.5 및 δ_{C} 169.0 시그널을 통해 carbonyl group를 예상하였다. δ_{C} 64.3-105.7의 6개 카본피크를 종합해서 β -form의 galactopyranoside를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁴⁵과 비교하여 compound 19는 quercetin 3-O-6''-caffeoyl- β -D- galactopyranoside로 확인되었다 (Figure 132-134, Table 31).



Compound 19

Figure 132. Chemical structure of compound 19.

Table 31. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **19** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 19	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		158.8
3		135.8
4		179.5
5		163.0
6	6.17 (1H, d, 1.8)	100.6
7		167.4
8	6.37 (1H, d, 1.8)	95.3
9		158.7
10		105.3
1'		123.1
2'	7.80 (1H, d, 1.8)	117.9
3'		146.0
4'		150.1
5'	6.82 (1H, d, 8.2)	116.3
6'	7.56 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.3
1''	5.11 (1H, d, 7.8)	105.7
2''	3.75-3.87 (1H, m)	73.2
3''	3.60 (1H, dd, 9.9, 5.9)	75.1
4''	3.75-3.87 (1H, m)	70.5
5''	3.75-3.87 (1H, m)	75.1
6''	4.18 (1H, dd, 11.5, 4.6)	
	4.30 (1H, dd, 10.5, 7.8)	64.3
1'''		127.8
2'''	6.93 (1H, d, 1.8)	115.3
3'''		146.9
4'''		147.2
5'''	6.82 (1H, d, 8.2)	116.6
6'''	6.82 (1H, dd, 8.2, 1.8)	123.3
7'''	7.32 (1H, d, 16.0)	147.2
8'''	6.02 (1H, d, 16.0)	115.3
9'''		169.0

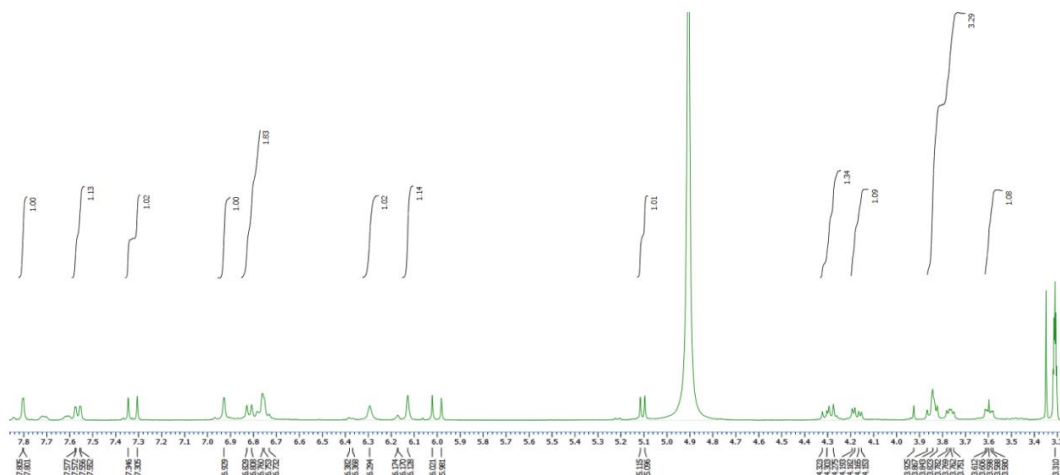


Figure 133. ^1H -NMR spectrum of compound **19** in methanol- d_4 .

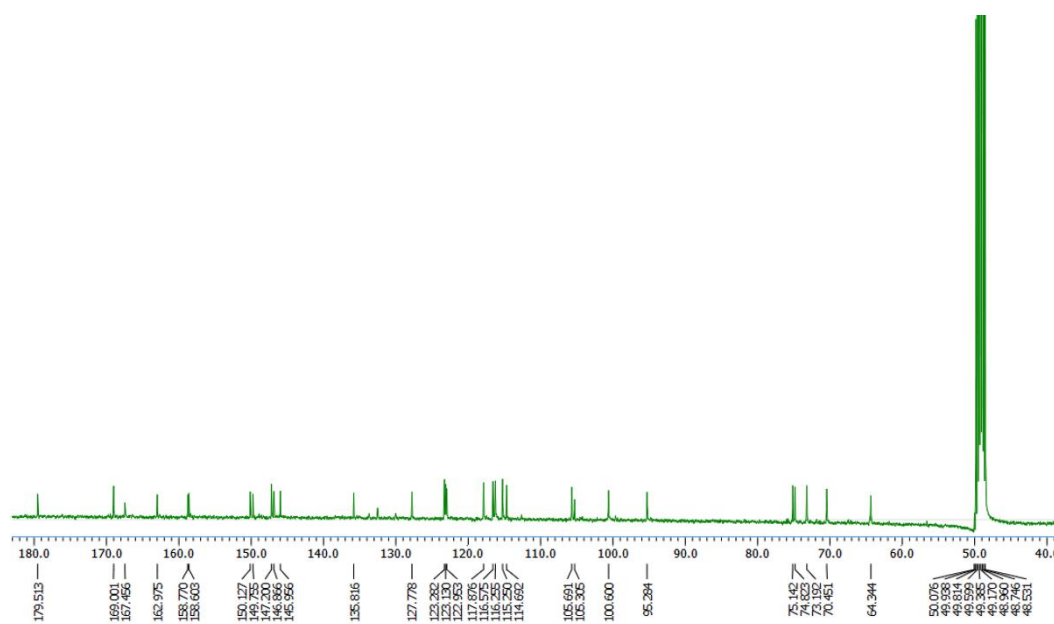
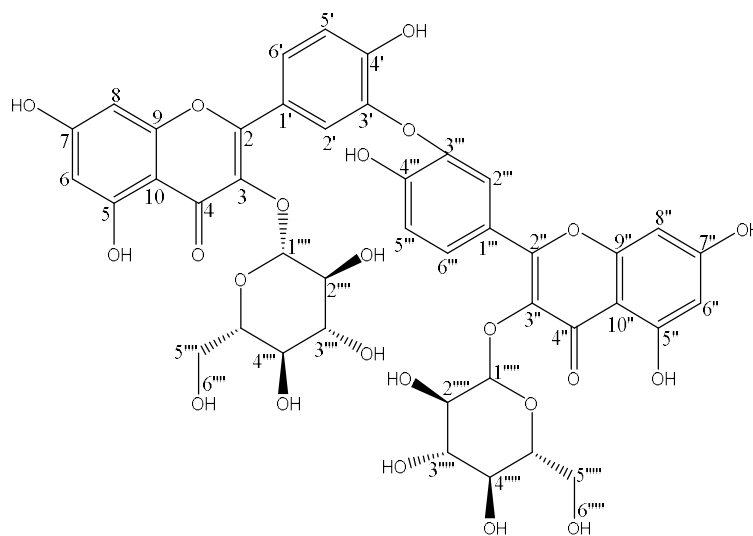


Figure 134. ^{13}C -NMR spectrum of compound **19** in methanol- d_4 .

12) Compound 20의 구조 동정

Compound 20은 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 6.17 (2H, br s) 및 6.36 (2H, br s) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 하고 있는 aromatic ring proton를 예상하였다. 그리고 δ_{H} 7.71 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.85 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.86 (2H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.57 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통하여 서로 *ortho*-coupling 및 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic ring이 있음을 예상하였다. δ_{H} 5.22 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 5.14 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 피크에 coupling constant 값을 통하여 β -anomeric proton를 예상하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 총 42개 카본 피크가 관찰되었으며 그중 δ_{C} 179.5 및 179.4 시그널을 통해 carbonyl group를 예상하였다. δ_{C} 62.0 - 105.5의 12개 카본피크를 종합해서 β -form의 glucopyranoside를 예상하였다. 이를 바탕으로 문헌¹⁴⁶과 비교하여 compound 20은 zizyflavoside B로 확인되었다(Figure 135-137, Table 32).



Compound 20

Figure 135. Chemical structure of compound 20.

Table 32. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **20** (400 and 100 MHz, methanol- d_4).

No.	Compound 20	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2, 2''		158.7, 158.5
3, 3''		135.9, 135.7
4, 4''		179.5, 179.4
5, 5''		163.1, 163.0
6, 6''	6.17 (2H, br s)	100.4, 100.4
7, 7''		167.2, 167.1
8, 8''	6.36 (2H, br s)	95.1, 95.1
9, 9''		158.7, 158.5
10, 10''		105.6, 105.5
1', 1''		123.3, 123.1
2', 2'''	7.71 (1H, d, 1.8), 7.85 (1H, d, 1.8)	116.2, 116.1
3', 3'''		146.0, 145.9
4', 4'''		150.1, 150.0
5', 5'''	6.86 (2H, d, 8.2)	117.9, 117.6
6', 6'''	7.57 (2H, dd, 8.2, 1.8)	123.0, 122.9
1''', 1''''	5.22 (1H, d, 7.3), 5.14 (1H, d, 7.8)	104.5, 105.5
2''', 2''''	3.42-3.44 (2H, m)	73.2, 75.2
3''', 3''''	3.47 (1H, m), 3.48 (1H, m)	78.5, 78.2
4''', 4''''	3.81 (1H, d, 4.9), 3.83 (1H, d, 4.6)	71.3, 70.1
5''', 5''''	3.57-3.58 (2H, m)	77.3, 75.2
6''', 6''''	3.64 (1H, d, 6.4), 3.72 (2H, dd, 11.9, 1.8)	62.6, 62.0

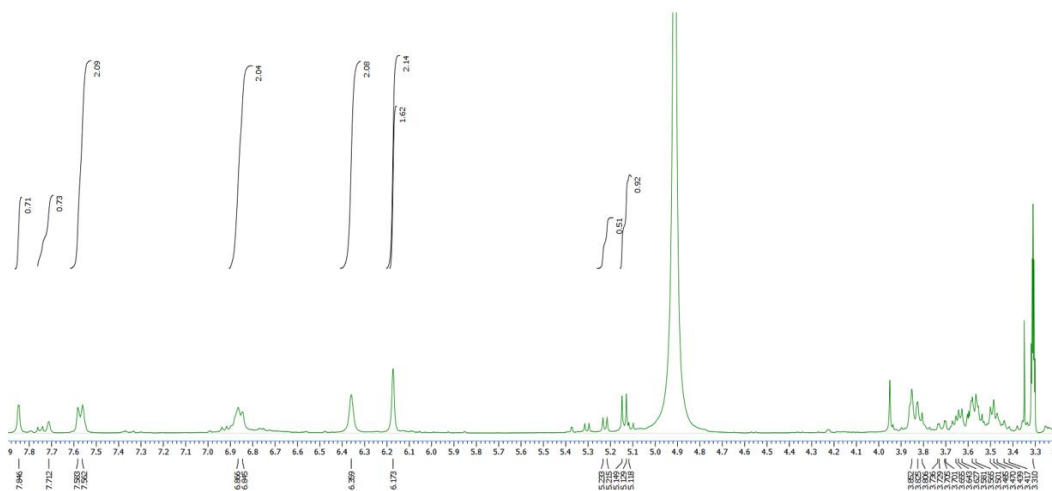


Figure 136. ^1H -NMR spectrum of compound **20** in methanol- d_4 .

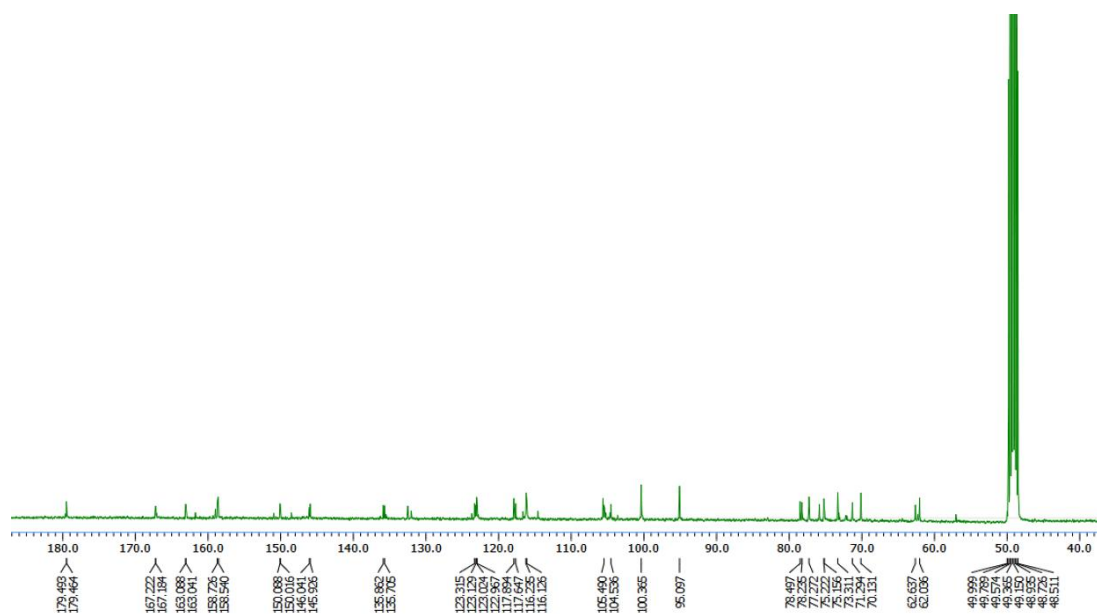


Figure 137. ^{13}C -NMR spectrum of compound **20** in methanol- d_4 .

4. 제주피막이 지상부의 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 추출물 및 분획물의 항산화 활성 실험 결과

(1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량 측정은 gallic acid로 표준물질을 이용하여 제주 피막이 추출물 및 분획물에서 총 폴리페놀에 함유한 함량을 측정하였다. 제주 피막이 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량은 시료 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양 (GAE; gallicacid equivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물은 97.0 ± 1.5 mg/g GAE로 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 138).

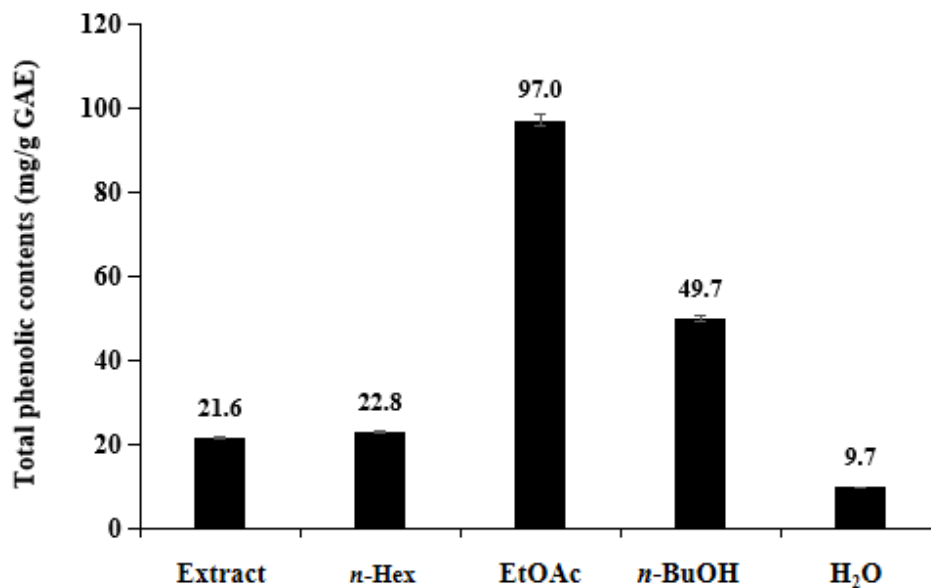


Figure 138. Total polyphenol contents of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial parts. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량 측정은 quercetin을 표준물질로 이용하여 제주 피막이 추출물 및 분획물 총 플라보노이드에 함유한 함량을 측정하였다. 제주피막이 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량은 시료 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetinequivalent)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물이 189.1 ± 2.3 mg/g QE로 분획물 중 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다 (Figure 139).

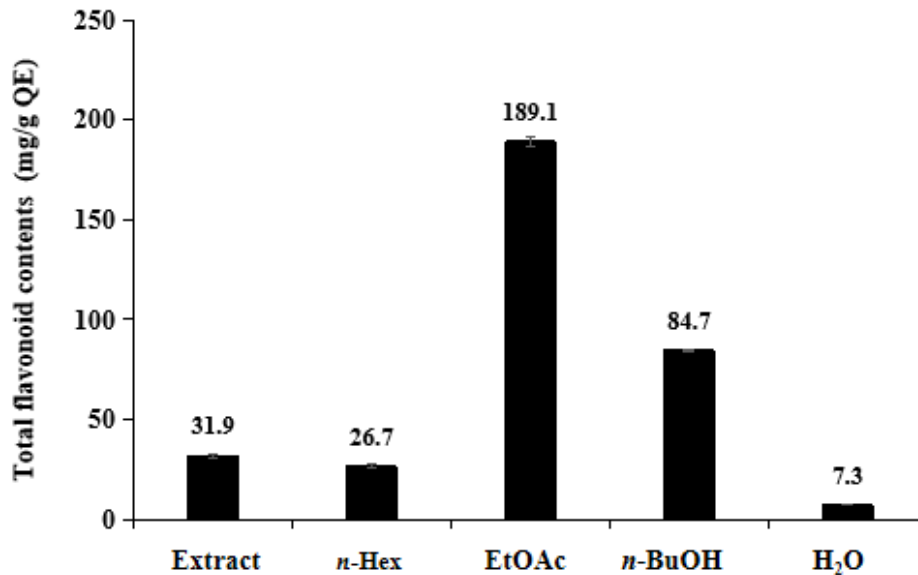


Figure 139. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial parts. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

제주피막이 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 25-400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC_{50} 값을 계산하였다. 실험 결과, EtOAc분획물을 SC_{50} 값이 232.8 $\mu\text{g/mL}$ 는 우수한 DPPH radical소거 활성을 나타내었다(Figure 140, Table 33).

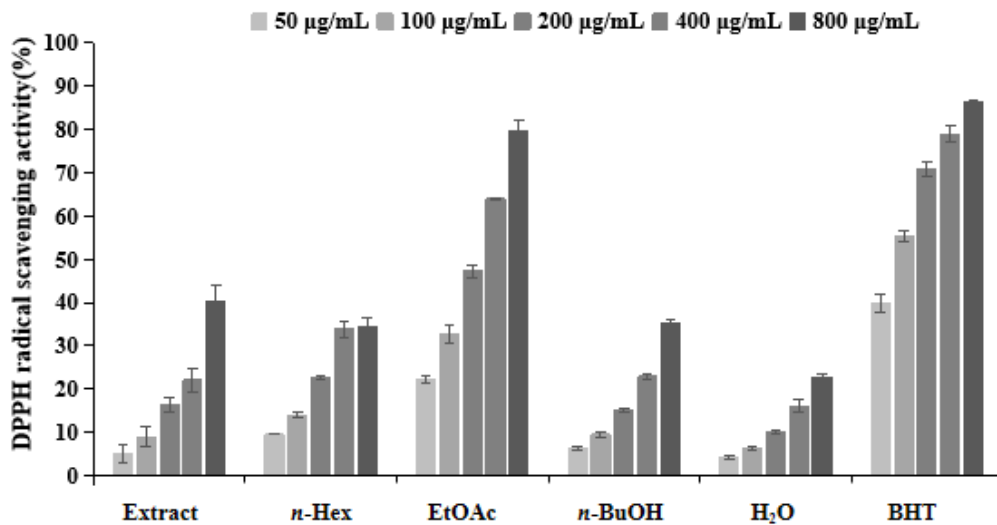


Figure 140. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 33. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial parts.

	Extract	n-Hex	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT
SC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	>800	>800	232.8	>800	>800	66.1

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

제주피막이 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 시료는 6.25 - 200 µg/mL의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, EtOAc분획물의 SC₅₀ 값이 48.6 µg/mL로 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 나타내었다(Figure 141, Tabel 34).

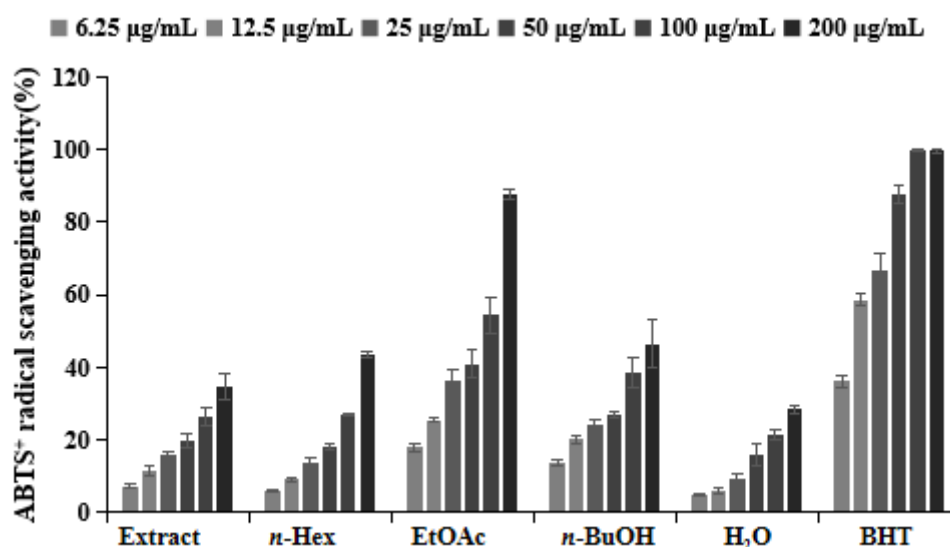


Figure 141. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 34. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial parts.

	Extract	n-Hex	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	>200	>200	48.6	>200	>200	17.1

2) 항염

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

제주피막이 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 70% EtOH 추출물 및 용매 분획물을 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 추출물 및 용매 분획물에서 nitric oxide 생성억제 활성을 보였지만, 추출물 및 *n*-Hex 분획물에서 세포 독성이 나타났다. 이에 따라 추출물 및 용매분획물의 세포 독성 없는 농도로 하여 추가 실험을 진행하였다. 그 결과, 제주피막이 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH등 용매 분획물은 세포 독성 없이 nitric oxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 그중 추출물 IC₅₀ 값은 40.9 µg/mL, *n*-Hex 분획물 IC₅₀ 값은 3.4 µg/mL 및 EtOAc 분획물 IC₅₀값은 48.3 µg/mL, *n*-BuOH 분획물 IC₅₀값은 98.6 µg/mL로 확인되었다(Figure 142-143).

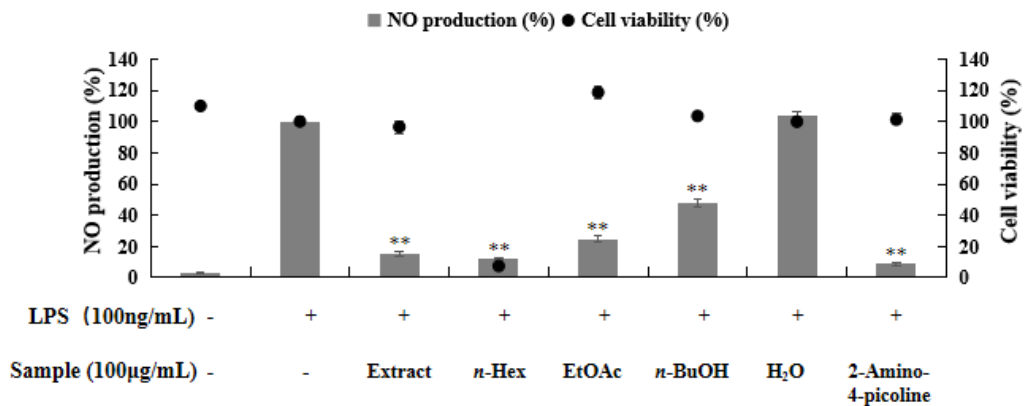
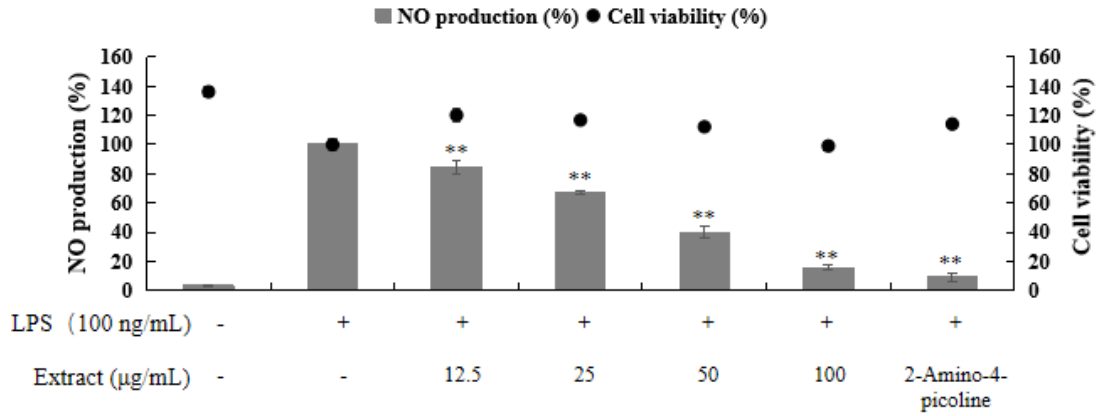
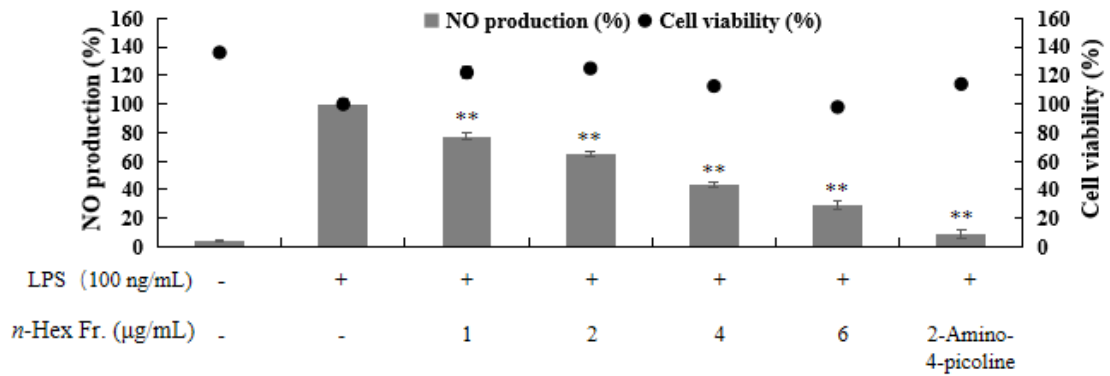


Figure 142. Effects of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial partson NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean ±SD of triplicate experiments. Values are the mean SEM of triplicate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

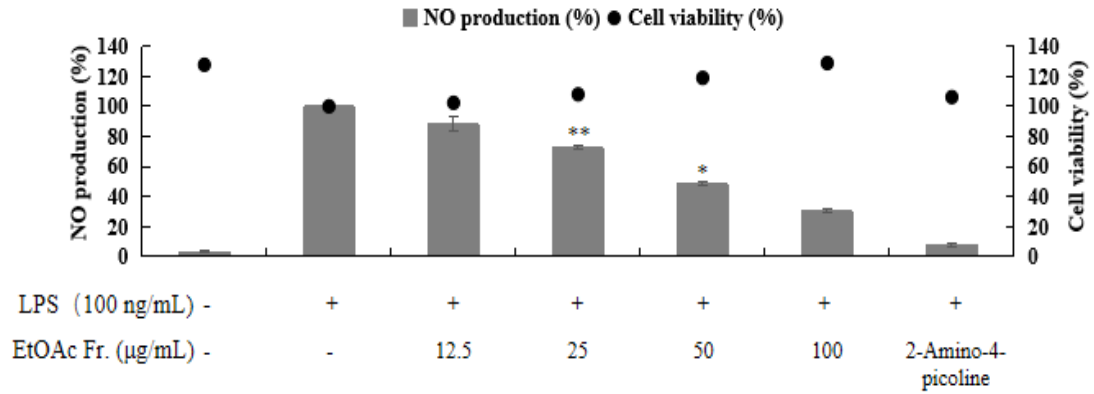
(A)



(B)



(C)



(D)

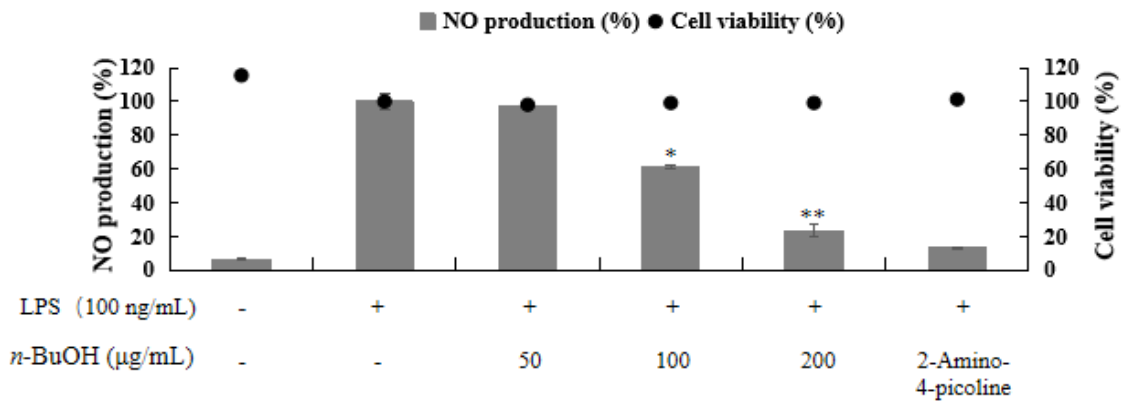
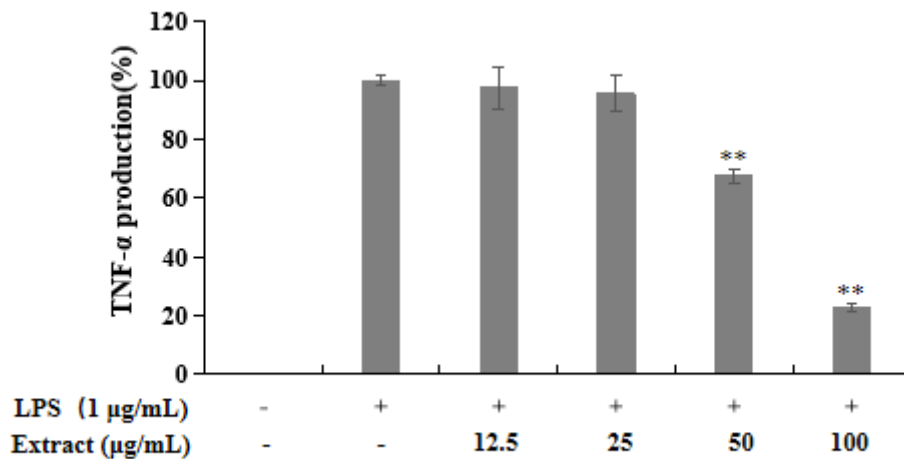


Figure 143. Effect of Extract (A), *n*-Hex (B), EtOAc (C) and *n*-BuOH (D) fraction from *H. japonica* aerial parts on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Values are the mean SEM of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성

제주피막이 지상부는 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 등 용매 분획물의 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 전염증성 cytokines TNF- α , IL-6, 1L-1 β 및 PGE₂ 억제 활성을 측정하였다. 그 중 추출물이 세포 독성이 나타나지 않은 농도 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL를 이용하여 실험을 진행한 결과 cytokines TNF- α , 1L-1 β 생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다. *n*-Hex용매 분획물이 세포 독성이 나타나지 않은 농도 1, 2, 4, 6 μ g/mL를 이용하여 실험을 진행한 결과 cytokines TNF- α , 1L-1 β 생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 144-145).

(A)



(B)

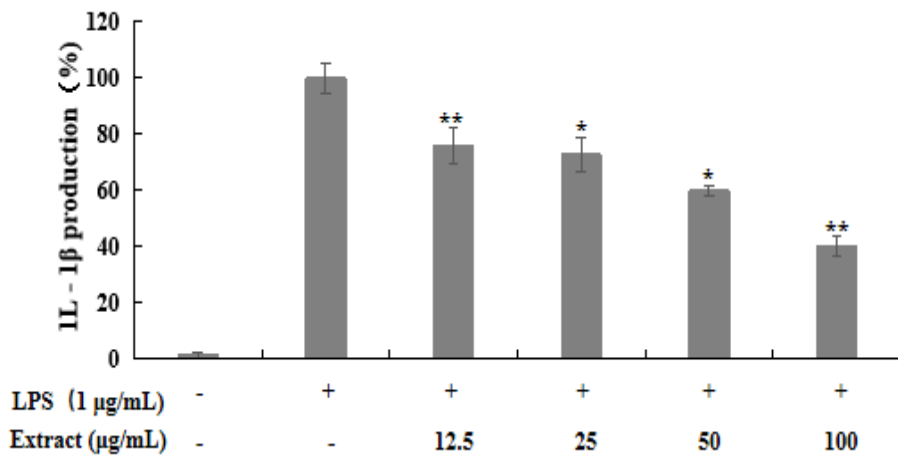
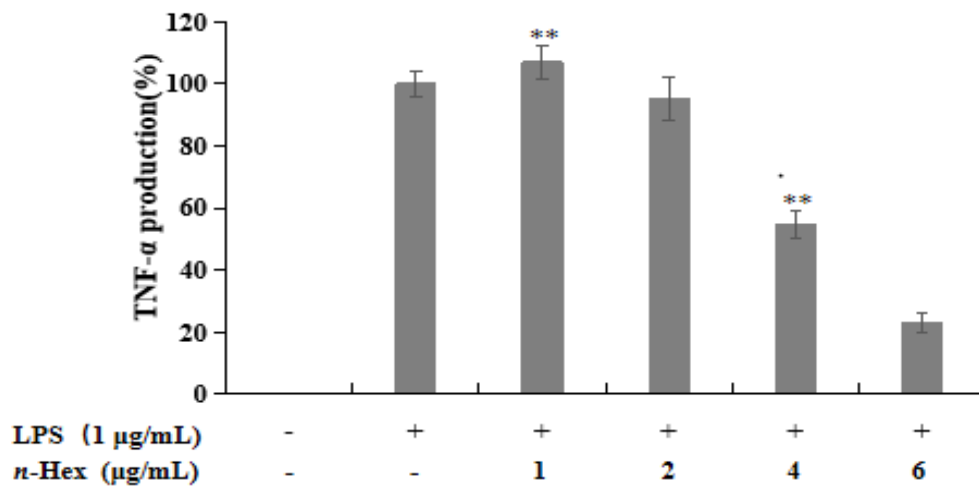
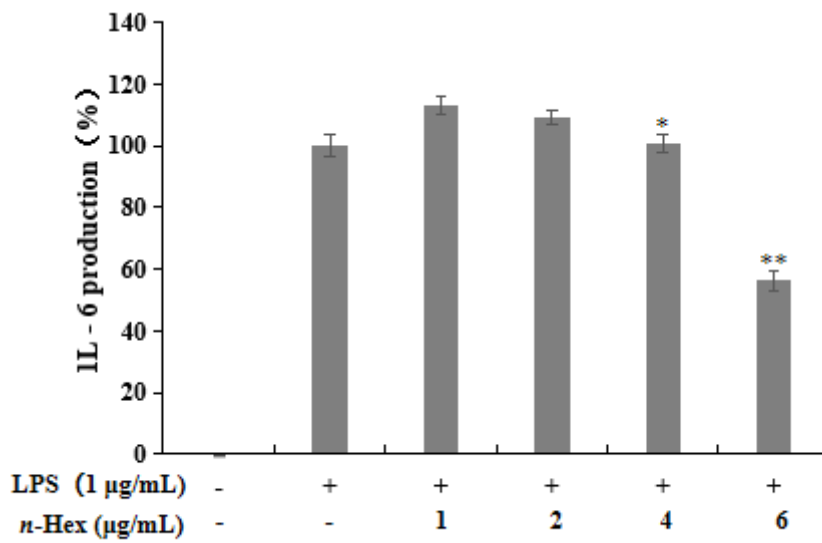


Figure 144. Effects of Extract from *H. japonica* aerial parts on TNF- α (A) and 1L-1 β (B) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01.

(A)



(B)



(C)

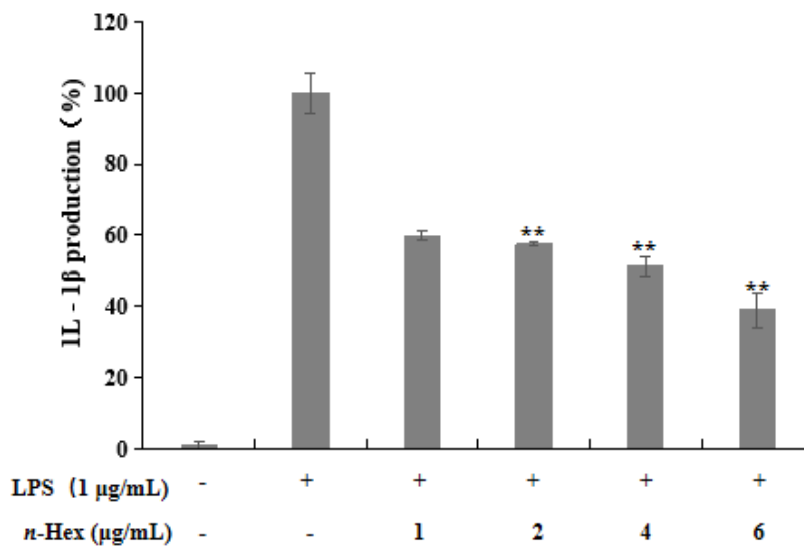


Figure 145. Effects of isolated from *H. japonica* aerial parts on TNF- α (A) and IL-1 β (B) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4) 항균

(1) Paper disc diffusion method

제주피막이 추출물 및 분획물의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 총3종과 여드름균인 *Cutibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 4종을 사용하였고 positive control은 erythromycin을 사용하여 실험했다. 측정된 실험 결과, 제주피막이는 *S.epidermidis*균 및 *C.acnes*균대상으로 EtOAc 분획물이 모든 균주에 대한 생육억제 활성을 나타내는 것을 확인하였다(Table 35).

Table 35. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from *H. japonica* aerial parts.

Bacterial density (1.5×10^6 CFU/mL)	Clear zone (mm) ¹⁾		
	<i>S. epidermidis</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711
Extract	N.A. ³⁾	N.A.	N.A.
<i>n</i> -Hex	N.A.	N.A.	N.A.
EtOAc	10	10.	10
<i>n</i> -BuOH	N.A.	N.A.	N.A.
H ₂ O	N.A.	N.A.	N.A.
Erythromycin ²⁾	33.5	N.A.	30

Bacterial density (1×10^8 CFU/mL)	Clear zone (mm) ¹⁾			
	<i>C. acens</i>			
	CCARM 0081	CCARM 9010	CCARM 9089	CCARM 9009
Extract	N.A. ³⁾	N.A.	N.A.	N.A.
<i>n</i> -Hex	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
EtOAc	10	10.	10	10.5
<i>n</i> -BuOH	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
H ₂ O	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Erythromycin ²⁾	45	N.A.	40	N.A.

1)Concentration of sample: 4 mg

2)Concentration of positive control: 40 μ g

3)N.A.: No activity

2) MIC 및 MBC

Paper disc diffusion법을 통하여 균주에 대한 생육억제 활성을 나타내는 제주피막이 추출물 및 용매 분획물에 대한 추가적으로 최소 억제 농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험 사용한 시료는 10 mg/mL를 two-fold-dilution법으로 농도를 두 배씩 희석하면서 실시 하였다.

실험 결과는 균주 *S. epidermidis* 경우 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고, 각각 MIC값 이상의 시료 배양액을 이용해서 MBC를 확인하였다. EtOAc 분획물의 경우 CCARM 3709 및 CCARM 3711를 균주에서 MBC 값을 확인할 수 있었다. 균주 *C. acnes*는 extract, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 실험한 모든 균주의 MIC를 확인하였고, 각각 MIC 값 이상의 시료 배양액을 이용해서 MBC를 확인하였다. EtOAc 분획물의 경우 CCARM 9009를 균주에서 MBC 값을 확인할 수 있었다(Table 36).

Table 36. MIC and MBC values of *H. japonica* aerial parts on *S.epidermidis* and *c.acens*.

<i>S.epidermidis</i>						
	CCARM3709		CCARM3710		CCARM3711	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	10000	>10000	10000	>10000	10000	>10000
<i>n</i> -Hex Fr.	5000	>10000	5000	>10000	5000	>10000
EtOAc Fr.	2500	10000	2500	>10000	2500	10000
<i>n</i> -BuOH Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
H ₂ O Fr.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

Unit: µg/mL

<i>C.acens</i>								
	CCARM 0081		CCARM 9010		CCARM 9089		CCARM 9009	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Extract	5000	>10000	10000	>10000	5000	>10000	2500	>10000
<i>n</i> -Hex Fr.	1250	>10000	2500	>10000	1250	>10000	625	>10000
EtOAc Fr.	5000	>10000	10000	>10000	5000	>10000	5000	2500
<i>n</i> -BuOH F.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
H ₂ O Fr.	>10000	>10000	10000	>10000	>10000	>10000	10000	>10000

Unit: µg/mL

5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항산화

(1) DPPH radical 소거 활성

제주피막이 EtOAc분획물에서 분리된 화합물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 각 화합물은 31.25-500 μM 의 농도로 진행하였으며 각각에 대한 SC_{50} 값을 계산하였다. 실험 결과는 EtOAc분획물에서 분리된 화합물은 대조군보다 더 우수한 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다.(Figure 146, Table 37).

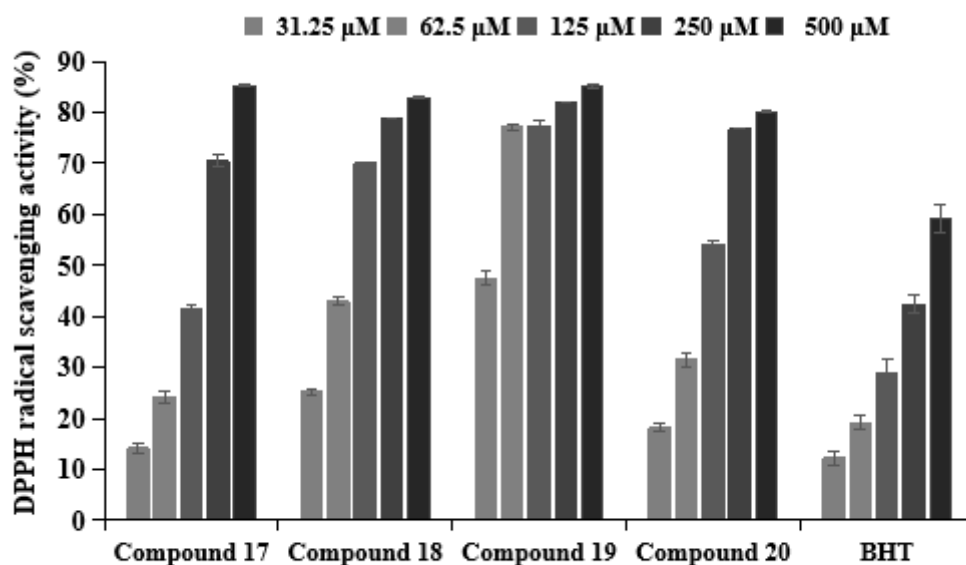


Figure 146. DPPH radical scavenging activities of isolates 17-20 from *H. japonica* aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 37. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of isolates 17-20 from *H. japonica* aerial parts.

Compound No.	Compound name	SC ₅₀ (μM)
17	isorhamnetin 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	162.2
18	quercetin-3- <i>O</i> -β-D-galactoside	78.8
19	Quercetin 3- <i>O</i> -6''-caffeoyl-β-D-galactopyranoside	33.9
20	Zizyflavoside B	113.5
Positive control	BHT	362.4

(2) ABTS⁺ radical 소거 활성

제주피막이 EtOAc분획물에서 분리된 화합물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 각 화합물은 31.25-500 μ M의 농도로 실험을 진행하였으며 각각에 대한 SC₅₀ 값을 계산하였다. 실험 결과, 모든 화합물은 우수한 ABTS⁺ radical 소거 활성을 보였으며 그중 compound 18은 대조군과 비슷한 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다.(Figure 147, Table 38).

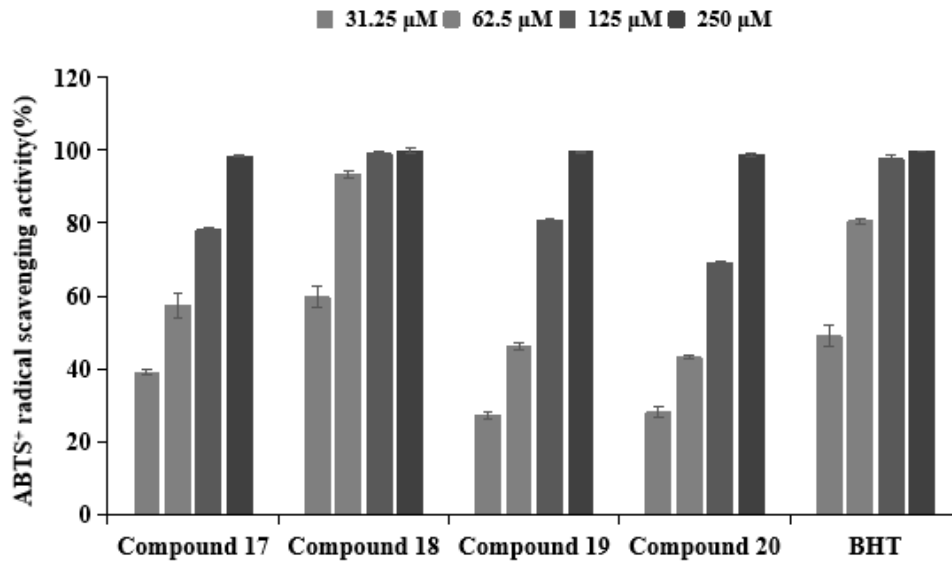


Figure 147. ABTS⁺ radical scavenging activities of isolates 17-20 from *H. japonica* aerial parts. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 38. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of isolates 17-20 from *H. japonica* aerial parts.

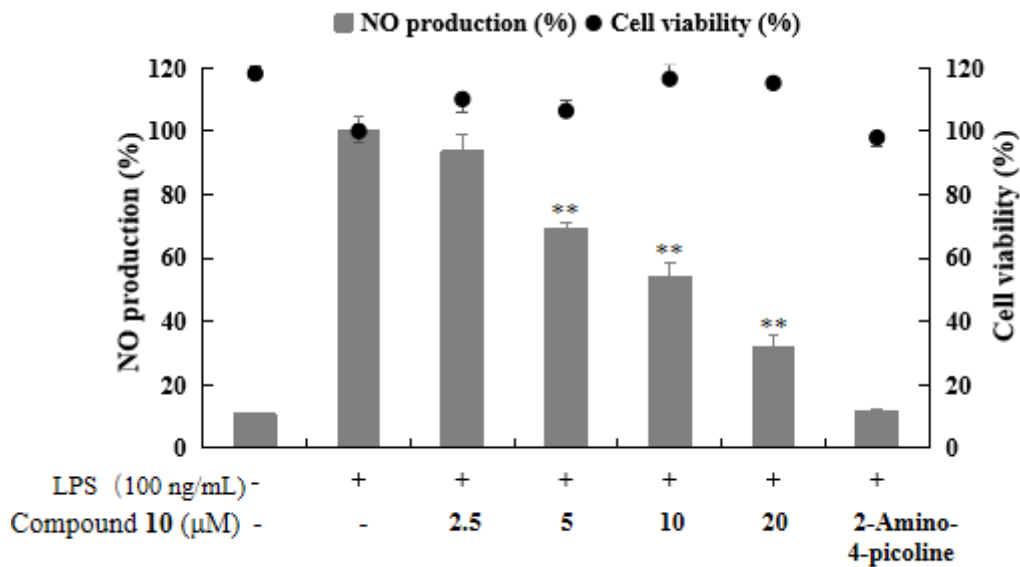
Compound No.	Compound name	SC ₅₀ (μM)
17	isorhamnetin 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	49.9
18	quercetin-3- <i>O</i> -β-D-galactoside	32.4
19	Quercetin 3- <i>O</i> -6''-caffeoyl-β-D-galactopyranoside	69.6
20	Zizyflavoside B	79
Positive control	BHT	32.4

2) 항염

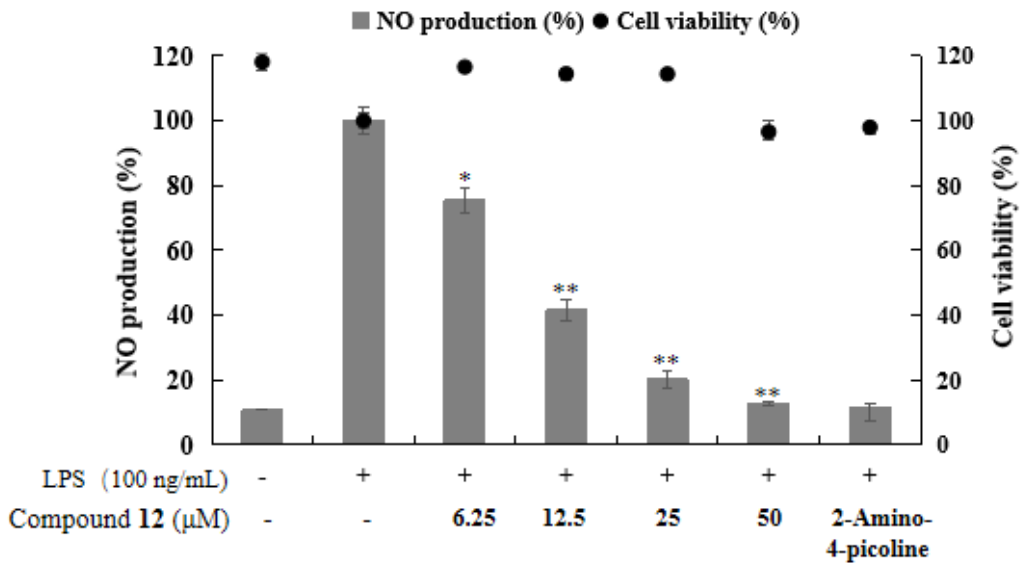
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

n-Hex 분획물에서 분리된 화합물 compound 10, 12 및 EtOAc 분획물에서 분리된 화합물 compound 16, 19 의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell 을 이용하여 nitric oxide 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. compound 10은 2.5, 5, 10, 20 μ M, compound 12는 6.25, 12.5, 25, 50 μ M, compound 16 및 compound 19는 50, 25, 100, 200, 400 μ M 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, 화합물10, 12, 16, 19는 세포 독성이 없이 nitric oxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. IC₅₀ 값은 각각 11.8, 10.9, 84.4 , 122.6 μ M 로 확인되었다(Figure 148).

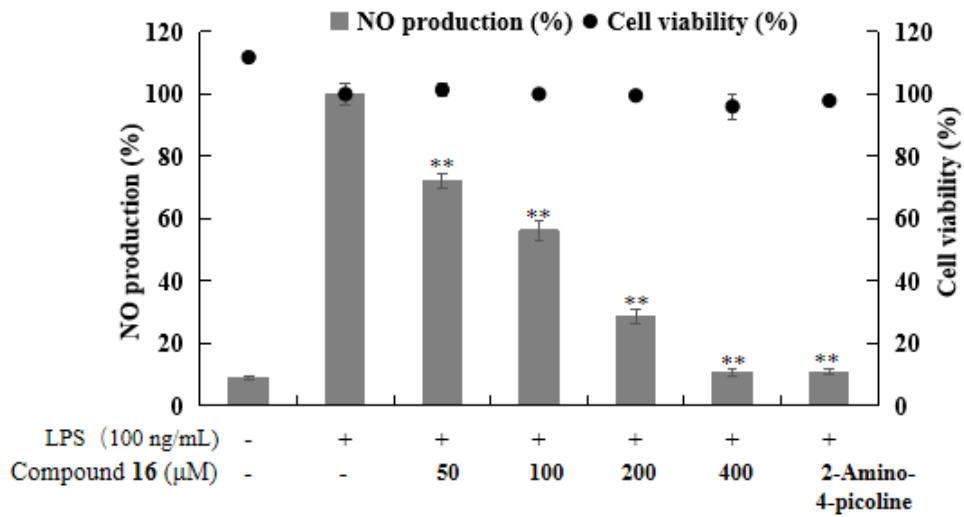
(A)



(B)



(C)



(D)

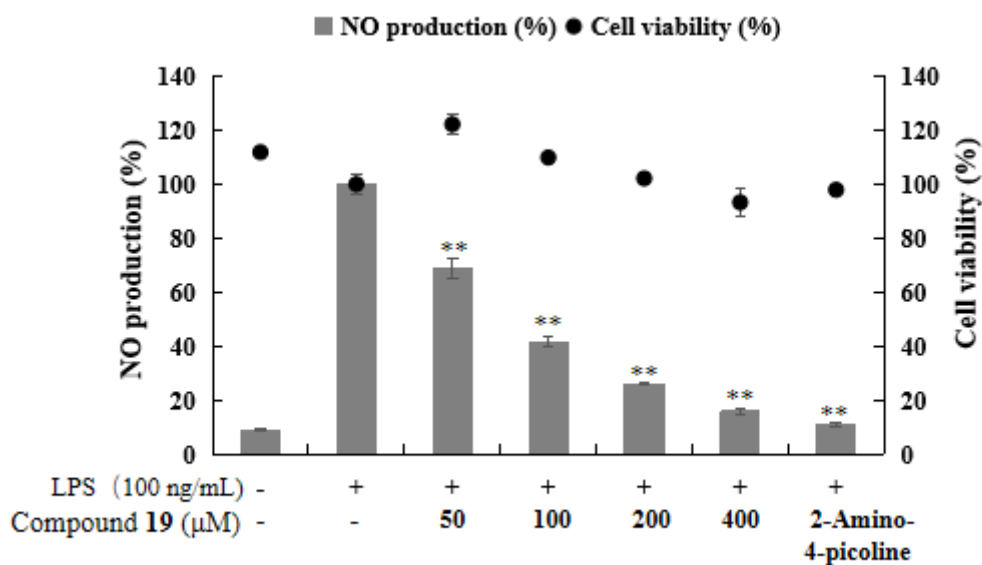
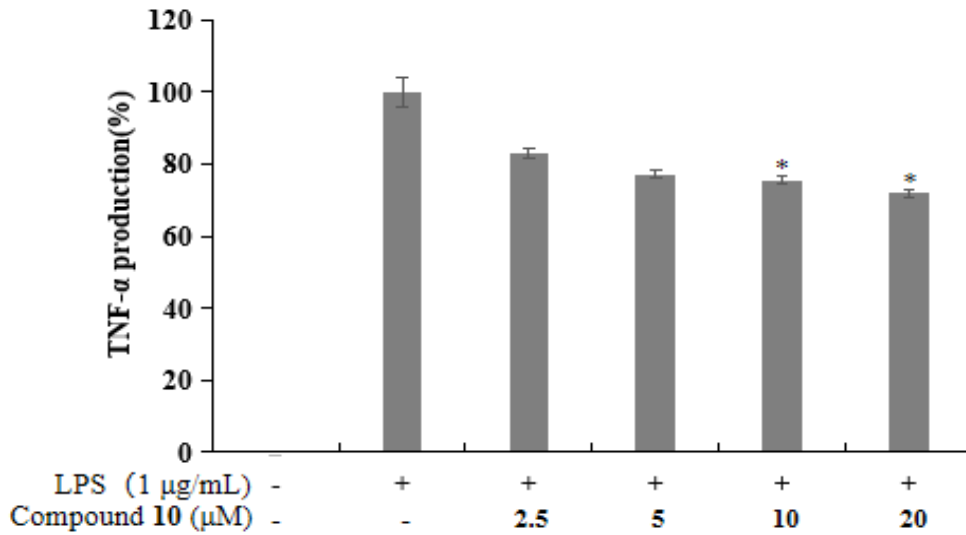


Figure 148. Effects of isolated Compound 10 (A), Compound 12 (B), Compound 16 (C) Compound 19 (D) from *H. japonica* aerial parts on NO production and cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Values are the mean SEM of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성

제주 피막이 지상부에서 분리된 화합물 compound **10**, **12**, **16**, **19**의 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 전염증성 cytokines IL-6, TNF- α , IL-1 β 및 PGE₂ 억제 활성을 측정하였다. 그중 compound **10**는 세포 독성이 나타나지 않은 농도 2.5, 50, 10, 20 μ M를 이용하여 실험을 진행한 결과 cytokines TNF- α , IL-6생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다. Compound **12**는 세포 독성이 나타나지 않은 농도 6.25, 12.5, 25, 50 μ M를 이용하여 실험을 진행한 결과 cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 PGE₂생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다. Compound **15** 및 **19**는 세포 독성이 나타나지 않은 농도 50, 100, 200, 400 μ M를 이용하여 실험을 진행한 결과 compound **15**는 cytokines TNF- α , IL-6 및 PGE₂생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있고 compound **19**는 cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 PGE₂생성을 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 149-152).

(A)



(B)

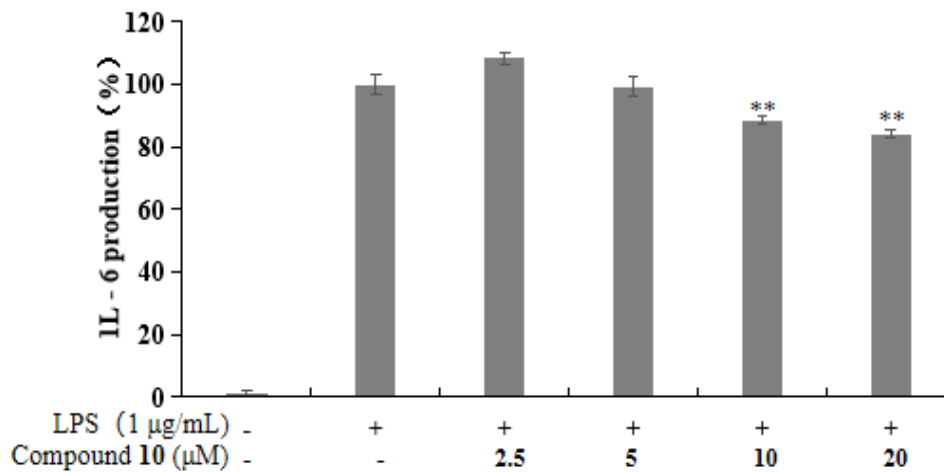
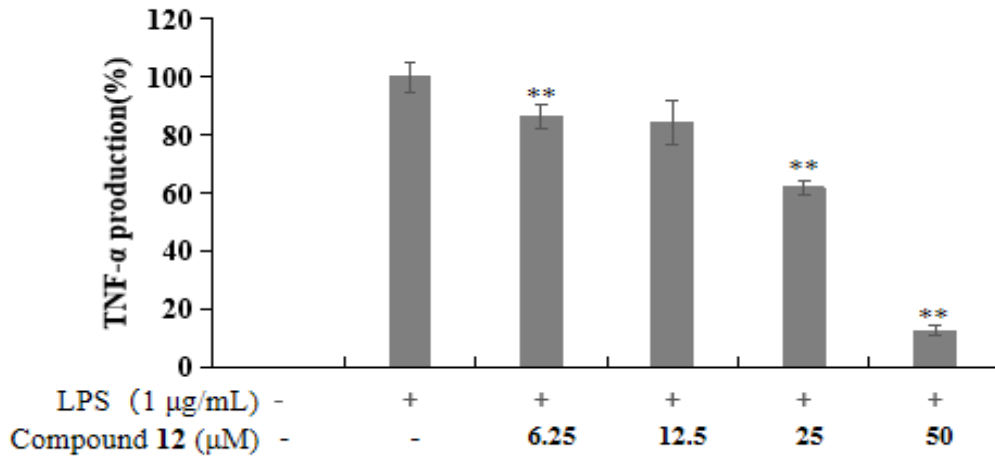
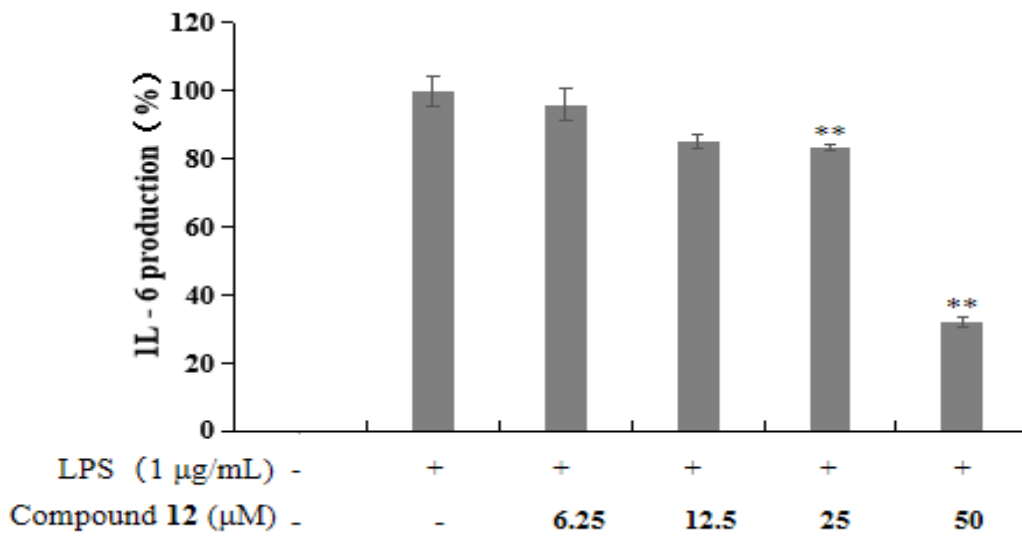


Figure 149. Effects of isolated compound 10 from of *H. japonica* aerial parts on TNF- α (A), IL-6 (B) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

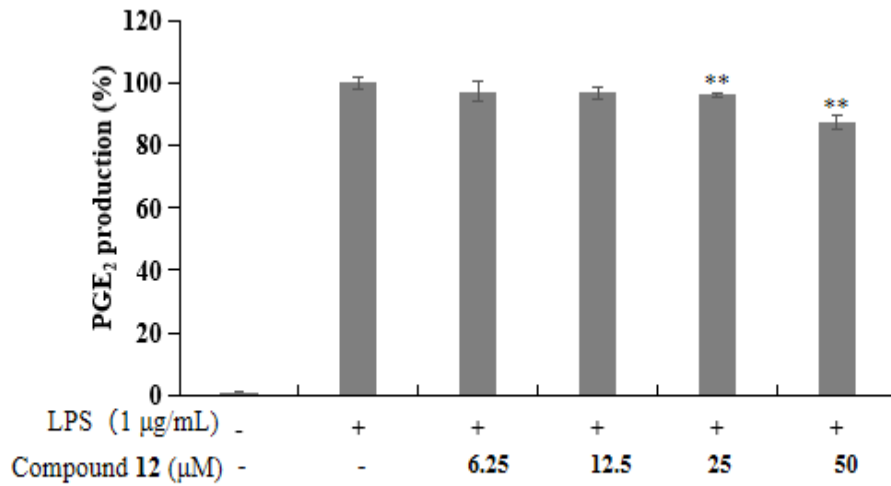
(A)



(B)



(C)



(D)

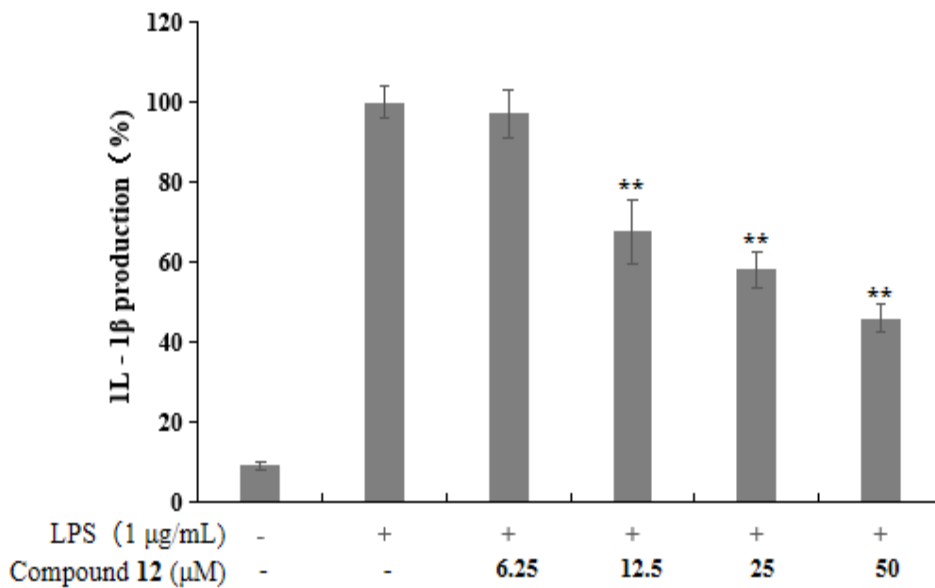
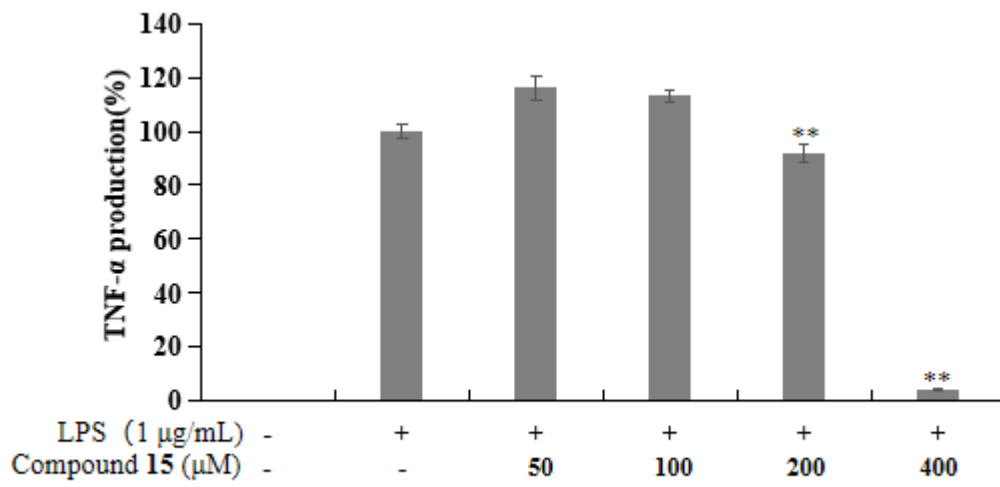
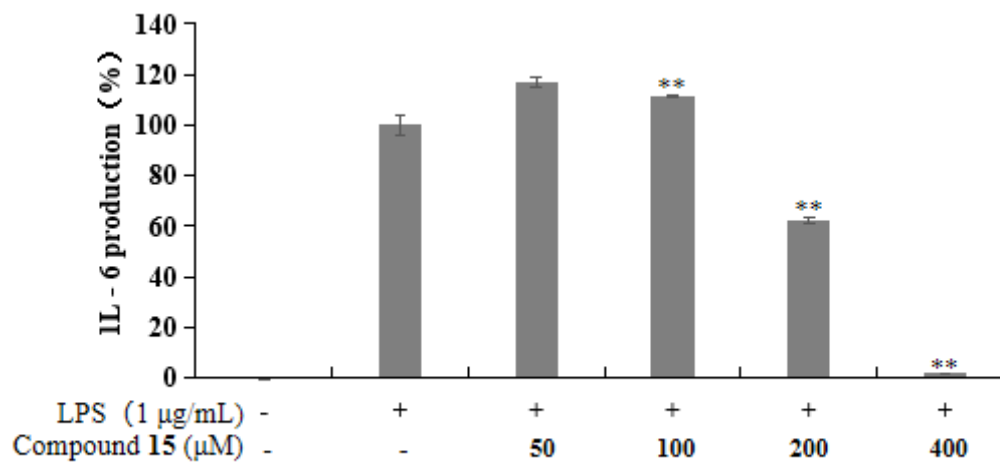


Figure 150. Effects of isolated compound 12 from of *H. japonica* aerial parts on TNF- α (A), IL-6 (B), PGE₂ (C) and L-1 β (D) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(A)



(B)



(C)

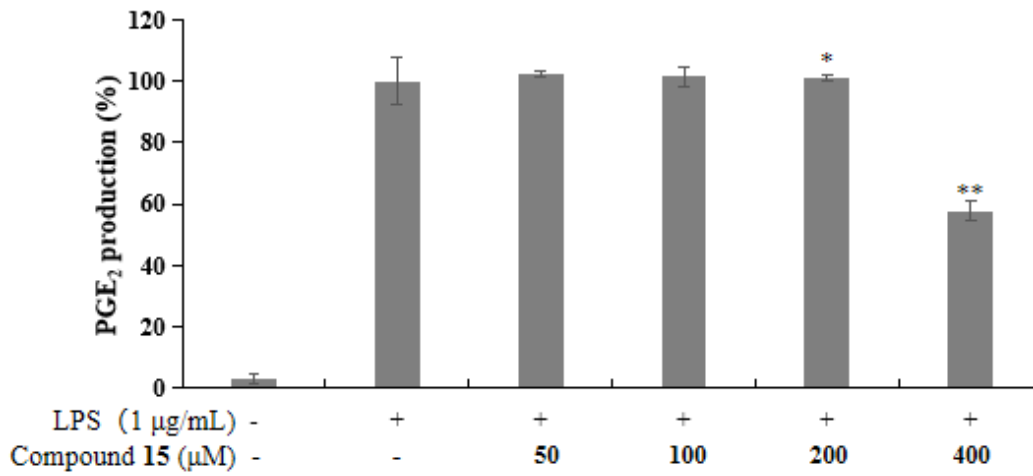
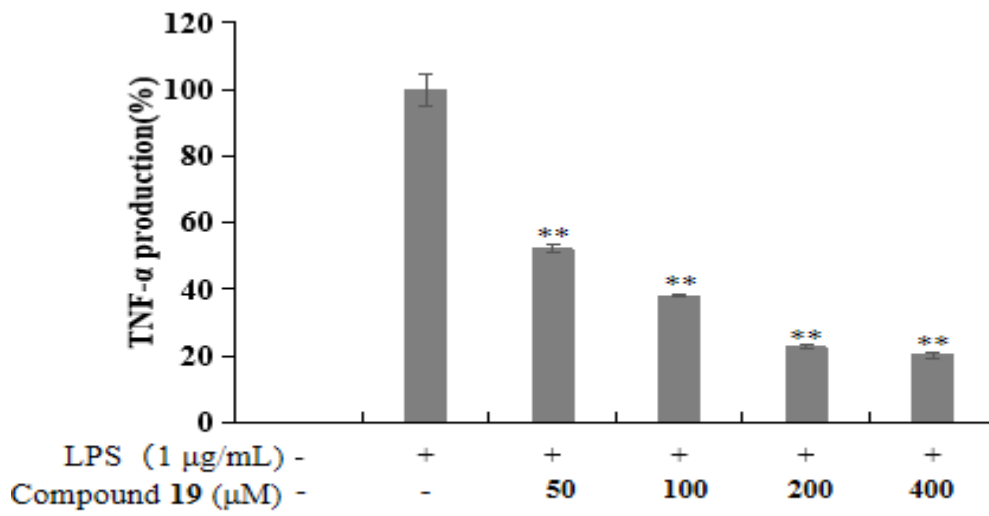
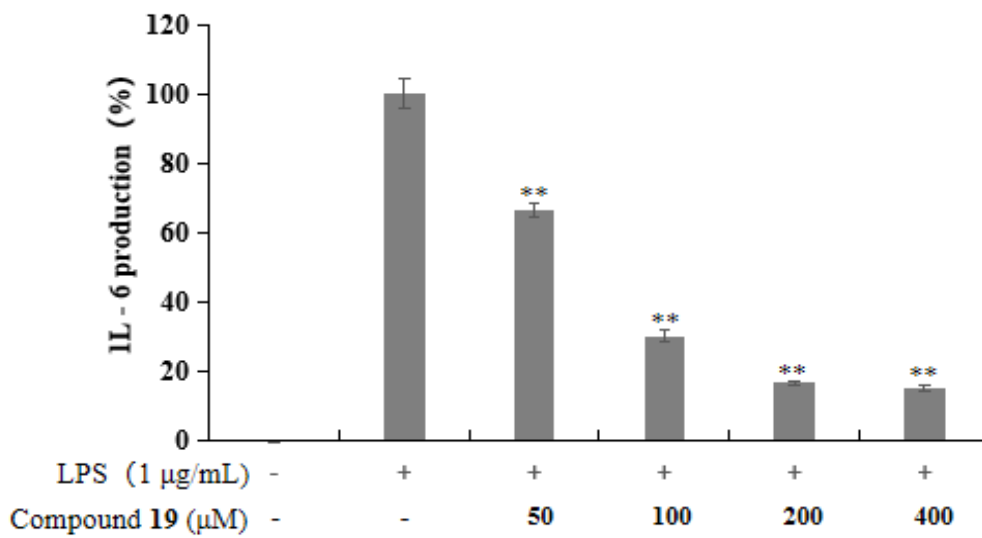


Figure 151. Effects of isolated compound **15** from of *H. japonica* aerial parts on TNF- α (A), IL-6 (B), PGE₂ (C) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

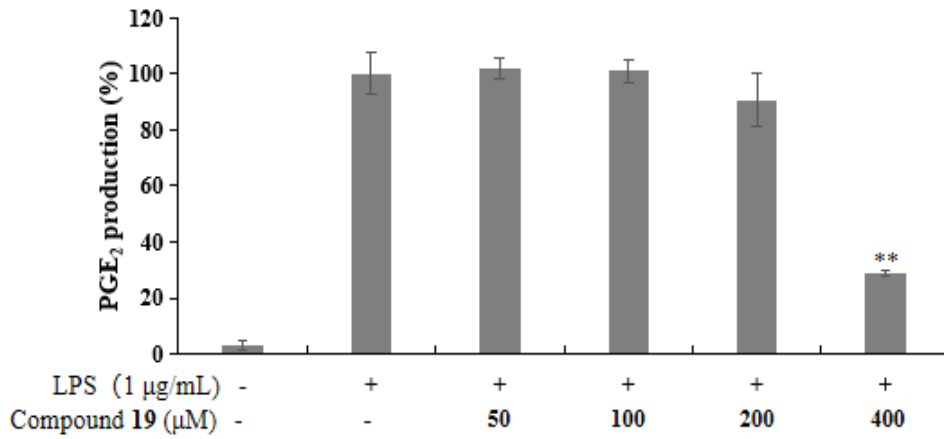
(A)



(B)



(C)



(D)

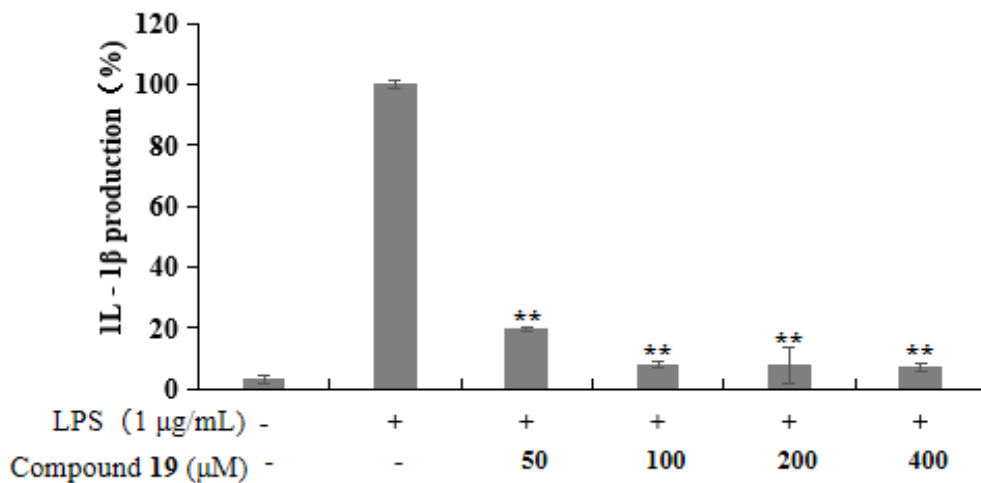


Figure 152. Effects of isolated compound **19** from of *H. japonica* aerial parts on TNF- α (A), IL-6 (B), PGE₂ (C) and IL-1 β (D) production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The data are represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

6. 요약 및 결론

본 연구에서는 제주피막이 추출물의 화장품 및 의약품 소재 개발 가능성을 판단하기 위해 다양한 생리 활성 실험과 성분 연구를 진행하였다.

제주피막이 지상부의 70% EtOH 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 이중 *n*-Hex, EtOAc 분획물은 VLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. 분리한 단일 물질은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 예상한 후 문헌과 비교하여 총 20개의 화합물을 동정하였다.

분리된 화합물은 (*E*)-phytol (1), neophytadiene (2), ethyl oleate (3), 1-monoolein (4), linolenic acid (5), ethyl linoleate (6), 1-linoleoyl glycerol (7), ethyl linolenate (8), 1-linolenoyl glycerol (9), 1,9-octadecadiene-4,6-diyne-3S-ol (10), β-sitosterol (11), capsidiol-3-acetate (12), (-)-hinokinin (13), chlorophyll-11 (14), (2S)-1-O-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-3-O-β-galactopyranosylglycerol (15), (2S)-1-O-(7Z,10Z,13Z-hexadecatrienoyl)-3-O-β-galactopyranosylglycerol (16), isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside (17), quercetin-3-O-β-D-galactoside (18), quercetin 3-O-6''-caffeoyl-β-D-galactopyranoside (19), Zizyflavoside (20)로 확인 되었다.

제주피막이 지상부의 항산화 실험 결과, EtOAc 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 각각 97.0±1.5 mg/g GAE 및 95.6±2.3 mg/g QE로 나타났으며, DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험에서 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 우수한 라디칼 소거 활성을 나타내었다. *n*-Hex 분획물에서 분리된 compound 1, 2, 5, 17 및 EtOAc 분획물에서 분리된 compound 18은 문헌^{147,148,149,150}을 통해 우수한 항산화 효능이 있음을 확인하였다. 그리고 추가적으로 플라보노이드 화합물인 17-20의 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였으며, 그결과 compound

17-20은 대조군보다 우수한 DPPH radical소거 활성이 있음을 확인하였다. Compound19는 대조군과 비슷한 ABTS⁺ radical소거 활성이 있음을 확인하였다.

항염 활성 실험 결과, extract 및 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH등 용매 분획물은 강한 NO 저해 활성을 나타내었으며, IC₅₀ 값은 각각 40.9 µg/mL, 3.4 µg/mL, 48.3 µg/mL, 98.6 µg/mL로 확인되었다. 그중에 compound 2, 5, 6, 7, 9, 16, 17 항염 활성은 문헌^{151,152,153,154,155,156,157}에 보고되어 있다. 또한 *n*-Hex분획물에서 분리된 compound 10, 12 및 EtOAc 분획물에서 분리된 compound 15, 19는 지금까지 보고되지 않았으며, 본 연구에서 compound 10, 12, 15, 19에 대한 항염실험을 진행하였다. 그 결과, compound 10, 12, 15, 19에 효과적인 NO 생성 억제 활성을 농도 의존적으로 나타내었고 그중 compound 12, 19 전염증성 cytokine인 TNF-α, IL-6, 1L-1β 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 그리고 compound 15 cytokine인 TNF-α, IL-6, PGE₂ 및 compound 10 cytokine인 TNF-α, IL-6의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다.

항균 활성을 확인하기 위해 피부 상재균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 여드름균인 *Cutibacterium acnes*(CCARM 0081, 9009, 9010)를 이용하여 한천 확산법(paper disc diffusion method)을 통한 생육 저지환(clear zone), 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소 사멸 농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 그 결과, 제주 피막이 지상부 EtOAc분획물은 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 우수한 항균 활성을 나타내었다. 또한 분리된 화합물 2, 4, 5, 17, 18은 항염 활성은 문헌^{158,159,160,161,162}을 통해 확인하였다.

제주피막이 지상부에서 분리된 화합물의 효능이 대한 문헌조사결과, Compound 1은 항산화, 항미코박테리아 및 항경련, 항염, 항결핵등 활성^{147,163,164,165,166}이 보고 되어있으며, Compound 2는 항산화, 항염, 항균 및 살충, α-glucosidase 억제등의 활성^{150,153,160,169,170}이 알려져 있다. Compound 3은 살비, 방충 및 산란 억제등 활성¹⁶⁹보고 되어있으며 Compound 4는 항균, 리파아제활성^{159,170}이 알려져 있다.

Compound 6은 항염, 항균 및 항축매, 미백, 항당뇨활성^{152,160,171,172,173}이 알려져 있고, Compound 7, 9는 항염 활성^{154,155}이 보고 되어 있다. Compound 13은 항염, GABA 수송 단백질 활성, 진통 및 항증식, 세포독성등의 효능^{174,175,176,177,178}이 알려져 있고, Compound 16은 항염 활성¹⁵⁶이 보고 되어 있다. Compound 17은 항염, 항균, 항 지방 생성, α -glucosidase 억제, 지사등 활성^{150,157,161,179,180,181}이 있으며, Compound 18은 항산화, 항균, α -glucosidase 억제, 항종양, 항우울등 활성^{162,182,183,184,185}이 알려져 있다. Compound 20은 세포독성 활성¹⁸⁶이 보고 되어 있다.(Table 39).

화합물 10은 불포화 지방 알코올 화합물로 이 화합물은 본 연구를 통해 우수한 NO 생성억제 및 TNF- α , IL-6의 생성을 저해시키는 활성을 가짐을 확인하였다. 화합물 10과 유사한 화합물인 팔카린디올(falcarindiol)의 활성을 문헌 연구를 통해 비교했다. 결과, 팔카린디올은 화합물 10보다 8번 위치에 히드록실기가 하나 더 많으며 항염 활성 및 TNF- α , IL-6, IL-1 β 억제 효과가 있다.¹⁸⁷ 팔카린디올은 히드록실기로 인해 전 염증 인자에 대한 나은 활성을 가지고 있다고 추측된다.

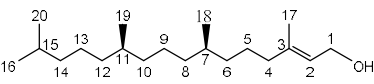
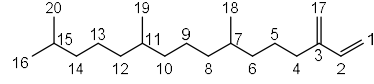
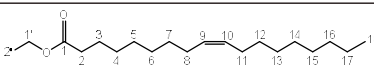
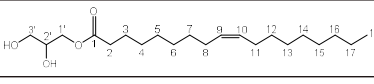
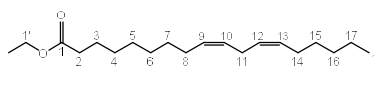
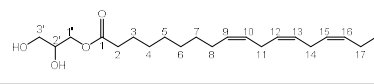
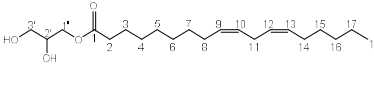
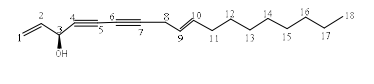
또한 화합물 12는 세스퀴테르펜화합물로 NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제하는 효과 있음을 실험을 통해 확인하였다. 화합물 12와 유사한 화합물인 캡사이신 (capsaicin)의 활성을 비교하면, 문헌^{188,189} 연구를 통해 화합물 12는 캡사이신보다 aliphatic group이 하나 더 있고, 캡사이신은 항염 활성을 가지며, TNF- α 및 PGE₂에 대한 억제 효과를 있다. 화합물 12는 aliphatic group의 영향으로 인해 캡사이신에 비해 항염 활성 및 전 염증 인자 억제 활성이 더 우수한 것으로 추측된다.

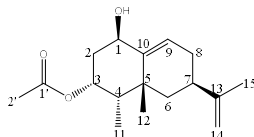
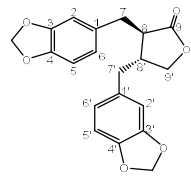
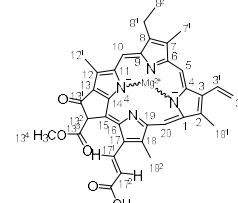
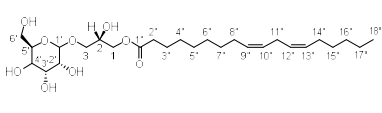
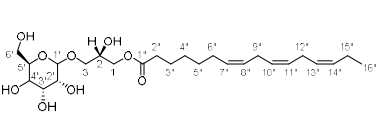
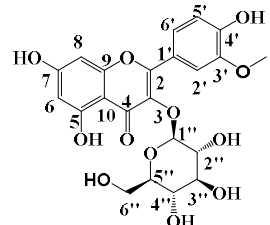
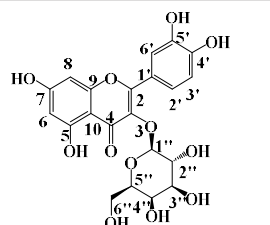
화합물 15는 지방산 배당체 화합물로 본 연구를 통해 우수한 항염 활성을 가지고 있음이 확인되었다. 화합물 15와 유사한 화합물 16의 활성을 비교하면 문헌 연구를 통해 화합물 16이 화합물 15보다 항염 활성이 우수함을 알 수 있다.¹⁵⁶ 화합물 15와 16의 구조를 비교하면 화합물 16에는 이중 결합이 하나 더 있다. 화합물 15는 이중결합 2개의 오메가 6 화합물이며, 화합물 16은 이중결합 3개의

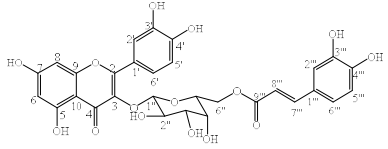
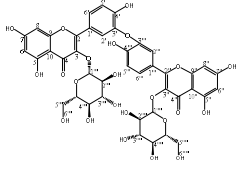
오메가 3 화합물이다. 오메가 3은 오메가 6보다 활성더 좋아서 화합물 16 이의 영향으로 항염 활성이 더 높은 것으로 추측된다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 제주피막이 지상부는 항산화, 항염 및 항균 활성을 갖는 기능성 화장품 또는 의약품 관련 천연 소재로써 개발 가능할 것이라 사료된다.

Table 39. Activities of isolated compounds from *H. japonica* aerial parts.

NO.	Compound	structure	activities
1	(E)-phytol		anti-oxidant activity ¹⁴⁷ anti-mycobacterial activity ¹⁶³ anti-spasmodic activity ¹⁶⁴ anti-inflammatory activity ¹⁶⁵ antitubercular activity ¹⁶⁶
2	Neophytadiene		anti-oxidant activity ¹⁴⁸ anti-inflammatory activity ¹⁵¹ anti-bacterial activity ¹⁵⁸ larvicidal activity ¹⁶⁷ α -glucosidase inhibition activity ¹⁶⁸
3	Ethyl oleate		acaricidal, repellent, and oviposition-deterrent activities ¹⁶⁹
4	1-Monoolein		anti-bacterial activity ¹⁵⁹ lipase activity ¹⁷⁰
6	Ethyl linoleate		anti-inflammatory activity ¹⁵² anti-bacterial activity ¹⁶⁰ anti-catalytic activity ¹⁷¹ tyrosinase activity ¹⁷² antidiabetic activity ¹⁷³
7	1-Linolenoyl Glycerol		anti-inflammatory activity ¹⁵⁴
9	1-Linoleoyl Glycerol		anti-inflammatory activity ¹⁵⁵
10	1,9-Octadecadiene-4,6-diyne-3S-ol		anti-inflammatory activity

12	Capsidiol 3-acetate		anti-inflammatory activity
13	(-)-Hinokinin		anti-inflammatory activity ¹⁷⁴ GABA transporter activity ¹⁷⁵ analgesic activity ¹⁷⁶ anti-proliferative activity ¹⁷⁷ cytotoxic activity ¹⁷⁸
14	Chlorophyll-11		
15	(2S)-1 - O-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-3-O-β-galactopyranosylglycerol		anti-inflammatory activity
16	(2S)-1 - O-(7Z,10Z,13Z-hexadecatrienoyl)-3-O-β-galactopyranosylglycerol		anti-inflammatory activity ¹⁵⁶
17	Isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside		anti-oxidant activity ¹⁵⁰ anti-bacterial activity ¹⁶¹ anti-inflammatory activity ¹⁵⁷ anti-adipogenic activity ¹⁷⁹ α-glucosidase inhibitory activity ¹⁸⁰ anti-diarrhoeal activity ¹⁸¹
18	Quercetin-3-O-β-D-galactoside		anti-bacterial activity ¹⁶² α-Glucosidase inhibitory ¹⁸² anti-oxidative activity ¹⁸³ anti-tumor activity ¹⁸⁴ anti-depressant activity ¹⁸⁵

19	Quercetin 3-O- 6'' -caffeoyl -β-D- galactopyranoside		anti-oxidant activity anti-inflammatory activity
20	Zizyflavoside B		cytotoxic activity ¹⁸⁶

V. 최종 결론 및 고찰

본 연구는 화장품 및 의약품 관련 천연물 유래 소재 개발에 대한 연구를 황근 잎, 가지 및 제주피막이 지상부 추출물과 용매 분획물에서 유효 성분을 분리, 동정하고 항산화, 항염 및 항균 효능을 확인하였다.

황근 잎 EtOAc 분획물에서 총 5개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 oleic acid (1), isoquercetin (2), nicotiflorine (3), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (4), *p*-hydroxyphenethyl-*trans*-ferulate (5)로 확인 되었다. 황근 잎에서 분리된 화합물 중 isoquercetin, nicotiflorine은 플라보노이드 화합물로 우수한 radical 소거 활성을 나타낸다는 것으로 많은 문헌^{190,191}에 보고되어있다. 또한, oleic acid, isoquercetin, nicotiflorine, *p*-hydroxyphenethyl-*trans*-ferulate은 항염 활성이 있는 것으로 알려져 있다.^{192,193,194,195}

*S. epidermidis*에 대한 항균 활성 실험 결과, 황근 잎 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 우수한 항균활성을 나타내었다.

황근 가지 EtOAc 분획물에서는 총 15개의 compound를 분리하였다. 분리한 화합물은 methyl stearate (1), oleic acid (2), linolenic acid (3), α -linolenic acid (4), ethyl linolenate (5), friedelin (6), friedelinol (7), glutinol (8), 3 β -olean-12-en-3-ol (9), oleanolic-acid (10), β -sitosterol (11), *p*-hydroxyphenethyl-*trans*-ferulate (12), caffeic acid (13), caffeic anhydride (14), triumfettalarein (15)로 확인 되었다.

분리된 화합물 중 활성이 보고 되지 않은 compound 15은 HaCaT 세포를 통해 2.5, 5, 10 μ M의 농도에서 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 compound 15는 효과적인 NO 생성 억제 활성을 농도 의존적으로 나타내었고, 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β , 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 억

제하는 것으로 확인되었다.

제주피막이 지상부의 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 총 20개의 compound를 분리하였다. 분리된 화합물은 (*E*)-phytol (1), neophytadiene (2), ethyl oleate (3), 1-monoolein (4), linolenic acid (5), ethyl linoleate (6), 1-linoleoyl glycerol (7), ethyl linolenate(8), 1-linolenoyl glycerol (9), 1,9-octadecadiene-4,6-diyne-3S-ol (10), β -sitosterol (11), capsidiol-3-acetate (12), (-)-hinokinin (13), chlorophyll-11 (14), (2S)-1 - *O*-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-3-*O*- β -galactopyranosylglycerol (15), (2S)-1 - *O*-(7Z,10Z,13Z-hexadecatrienoyl)-3-*O*- β -galactopyranosylglycerol(16), isorhamnetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (17), quercetin-3-*O*- β -D-galactoside (18), quercetin 3-*O*-6''-caffeoyl- β -D-galactopyranoside (19), zizyflavoside (20)로 확인되었다.

제주피막이 지상부의 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 분리된 플라보노이드 화합물은 우수한 radical 소거 활성을 있음이 보고되어있다. 활성이 보고 되지 않은 compound 10, 12, 15 및 19는 효과적인 NO 생성 억제 활성을 농도 의존적으로 나타내는 것으로 확인되었고 compound 12, 19는 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 그리고 compound 15는 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6 및 PGE₂의 생성을 저해시키고 compound 10은 TNF- α 및 IL-6의 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다.

또한 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*에 대한 항균 활성 실험 결과, 제주피막이 EtOAc 분획물은 모든 균주에 대해 우수한 활성을 나타내었다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 황근 잎, 가지 및 제주피막이 지상부는 항산화, 항염 및 항균 활성을 갖는 기능성 화장품 또는 의약품 관련 천연 소재로서 개발 가능할 것이라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Yun, B. S.; Lee, I. K.; Cho, Y, New Tricyclic Sesquiterpenes from the Fermentation Broth of *Stereum hirsutum*. *Journal of natural products*. **2002**, *65*(5): 786-788.
2. Yoo, I. D.; Kim, J. P.; Kim, W. G.; Yun, B. S.; Ryoo, I. J. Development of new natural antioxidants for cosmeceuticals. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. **2005**, *31*(4), 349-357.
3. Kwon, H. J.; Beom, S. H.; Hyun, J. A.; Kang, E. B.; Park, H. E.; Han, D. G.; An, B. J. Analysis of antioxidant activity, total phenol content, and flavonoid content of *Abelmoschus manihot* flower extracts. *Korean Journal of Food Preservation*, **2022**, *29*(1), 157-165.
4. Kang, H. C.; Cha, M. Y.; Kim, J. Y. A study of the antioxidant activities and whitening activities of *Areca* semen extracts as cosmetic ingredient. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, **2015**, *41*(3), 269-277.
5. Kim, K. Y.; Lee, N. K.; Herbal extracts research trend that have effects on melanin production and control. *Kor J Aesthet Cosmetol*, **2014**, *12*(4): 453-461.
6. Kim, J. Y.; Kim, J. Y.; Choi, C. H. Development of pre-assessment indicator for skin aging and anti-aging effect of inner skin by the cream product containing *Gynostemma pentaphyllum* gypenoside fraction. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. **2016**, *42*(3): 303-309.
7. Jung, S. H.; Yeom, H. J.; Oh, M. J.; A Study on the Verification of

- Physiological Activities of *Ternstroemia kwangtungensis* Merr. Extract. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. **2022**, 48(1): 39-46.
8. Dang, S. M.; Development of Anti-aging from Natural Materials by Inhibition of UV Stimulating. *Journal of the Korea Convergence Society*. **2021**, 12(1): 251-257.
 9. Shim, J. S.; Kim, S. D.; Kim, T. S. Biological activities of flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. *Korean Journal of Food Science and Technology*. **2005**, 37(1): 78-83.
 10. Cerutti, P. A.; Prooxidant states and tumor promotion. *Science*. **1985**, 227(4685): 375-381.
 11. Weydert, C. J.; Cullen, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*. **2010**, 5(1): 51-66.
 12. McCord, J. M.; Keele, Jr. B. B.; Fridovich, I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1971**, 68(5): 1024-1027.
 13. Liu, J.; Hinkhouse, M. M.; Sun, W. Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. *Human gene therapy*. **2004**, 15(3): 239-250.
 14. Dang, S. M.; Development of Anti-aging from Natural Materials by Inhibition of UV Stimulating. *Journal of the Korea Convergence Society*. **2021**, 12(1), 251-257.
 15. Shim, J. S.; Kim, S. D.; Kim, T. S.; Kim, K. N. Biological activities of

- flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 37(1), 78-83.
16. Park, C. H.; Kang, H.; Lee, S. G. Antioxidant activity of ethanol extracts and fractions from *Castanea crenata* inner shell. *Journal of Plant Biotechnology*, 2022, 49(2), 150-154.
17. Kim, Y. J.; Kim, S. Y.; Jeong, M. J. Antioxidant effect of ethanol extract from *Plantaginis Herba*. *The Korea Journal of Herbology*. 2018, 33(3): 37-43.
18. Lesslauer, W.; Tabuchi, H.; Gentz, R.; Brockhaus, M.; Schlaeger, E. J.; Grau, G.; Loetscher, H. Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide induced lethality. *European journal of immunology*. 1991, 21(11), 2883-2886.
19. Mohler, K. M.; Torrance, D. S.; Smith, C. A.; Goodwin, R. G.; Stremler, K. E.; Fung, V. P.; Widmer, M. B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *Journal of immunology*. 1993, 151(3), 1548-1561.
20. Hyun, E. A. ; Lee, H. J.; Yoon, W. J. : Park, S. Y.; Kang, H. K.; Kim, S. J.; and Yoo, E. S. Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage RAW264.7, *Yakhak Hoeji*. 2004, 48, 159.
21. WEISZ, A.; CICATIELLO, L.; ESUMI, H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and N G-monomethyl-L-arginine. *Biochemical*

Journal. **1996**, 316(1), 209-215.

22. Masferrer, J. L.; Zweifel, B. S.; Manning, P. T.; Hauser, S. D.; Leahy, K. M.; Smith, W. G.; Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1994**, 91(8), 3228-3232.
23. Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1994**, 91(25), 12013-12017.
24. Masferrer, J. L.; Zweifel, B. S.; Manning, P. T. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1994**, 91(8): 3228-3232.
25. Lawrence, T.; Willoughby, D. A.; Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*. **2002**, 2(10): 787-795.
26. Higuchi, M.; Higashi, N.; Taki, H.; Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *Journal of Immunology*. **1995**, 144(4), 1425-1431.
27. LAFLAMME, N.; RIVEST, S.; Toll like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram negative bacterial cell wall components. *The FASEB Journal*. **2001**, 15(1): 155-163.
28. Parish, L. C.; Parish, J. L.; Routh, H. B.; Witkowski, J. A. The treatment

of acne vulgaris with low dosage doxycycline. *Acta Dermatovenerologica Croatica*. 2005, 13(3), 0-0.

29. AHN, B. K.; LEE, S. J.; Namkoong, K.; CHUNG, Y. L.; LEE, S. H. Quality of life of acne patients. *Korean journal of dermatology*. 2005, 6-14.
30. Harper, J. C. An update on the pathogenesis and management of acne vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004, 51(1): 36-38.
31. Thiboutot. D. M.; Acne: an overview of clinical research findings. *Dermatologic clinics*. 1997, 15(1): 97-109.
32. Nishijima. S.; Kurokawa, I., Katoh. N.; The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *The Journal of dermatology*. 2000, 27(5): 318-323.
33. Koreck, A.; Pivarsci, A.; Dobozy, A. The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *Dermatology*. 2003, 206(2): 96-105.
34. Kim, H. S. Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ. *Seoul[Korea, 2011.*
35. Kang, M. S.; Oh, H. J.; Lee, H. C, Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology and Virology*. 2009, 39(1): 11-19.
36. Choi, J. Y.; Song, S. Y.; Lee, H. H. Antibacterial and anti-inflammatory activity of Corni fructus ethanol extract in *Propionibacterium acnes*. *Kor J*

Aesthet Cosmetol. **2015**, *13*(5): 623-630.

37. Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine" *J. Biol. Chem.* **1915**, *22*, 305-308.
38. 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.
39. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*. **1958**, *181*, 1199-1200.
40. 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.
41. 안영희. 제주도의 자생 황근 분포와 자생지 생태적 특성. *원예과학기술지*. **2003**, *21*(4): 440-446.
42. 한늘지기,"황근", NAVER, <https://blog.naver.com/jdchol/222539384665>
43. 백두산본초,"황근", NAVER, <https://cafe.naver.com/dirdyd/128671?art>
44. 나무위키 "황근", NAVER, <https://namu.wiki/w/%ED%99%A9%EA%B7%BC>
- 45.국립생물자원관,"황근", NAVER, https://blog.naver.com/nibr_bio/222862784256
46. Yang, N. Y.; Liu, L.; Tao, W. W.; Duan, J. A.; Liu, X. H.; Huang, S. P. Antithrombotic lipids from semen persicae. *Natural product research*. **2011**, *25*(17), 1650-1656.

47. Akita, C.; Kawaguchi, T.; Kaneko, F.; Yamamoto, H.; Suzuki, M. Solid-state¹³C NMR study on order→ disorder phase transition in oleic acid. *The Journal of Physical Chemistry B*. **2004**, *108*(15), 4862-4868.
48. Kuncoro, H.; Farabi, K.; & Rijai, L. Steroids and isoquercetin from *Lygodium microphyllum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **2017**, *7*(11), 136-141.
49. de, Oliveira. D. M.; Siqueira, E. P.; Nunes, Y. R. F. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2013**, *23*(4): 614-620.
50. Croitoru, R.; Fițigău, F.; Van, Den.; Broek, L. A. M. Biocatalytic acylation of sugar alcohols by 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid. *Process Biochemistry*. **2012**, *47*(12): 1894-1902.
51. Darwish, F. M. M.; Reinecke, M. G. Ecdysteroids and other constituents from *Sida spinosa* L. *Phytochemistry*. **2003**, *62*(8): 1179-1184.
52. Park, S. H.; Kim, J. E.; Yeum, H. S. Isolation and evaluation of anti-oxidative constituents from the extracts of *Ficus erecta* var. *sieboldii* king leaves. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. **2016**, *42*(4): 321-328.
53. Zieniuk, B.; Wołoszynowska, M.; Bialecka-Florjańczyk, E. Application of freeze-dried *Yarrowia lipolytica* biomass in the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnology Letters*. **2021**, *43*: 601-612.
54. Hou, W. C.; Lin, R. D.; Lee, T. H. The phenolic constituents and free radical scavenging activities of *Gynura formosana* Kiamnra. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture. 2005, 85(4): 615-621.

55. Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A. L.; Nieto-Camacho, A. Anti-hyperglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and metabolites from *Sida acuta* and *Sida rhombifolia*. *Química Nova*. 2017, 40: 176-181.
56. Santamarina, A. B.; Pisani, L. P.; Baker, E. J. Anti-inflammatory effects of oleic acid and the anthocyanin keracyanin alone and in combination: Effects on monocyte and macrophage responses and the NF- κ B pathway. *Food & Function*. 2021, 12(17): 7909-7922.
57. Lee, H. I.; Kim, E. H.; Lee, S. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of isoquercitrin isolated from aster scaber. 2019.
58. Hwang, D.; Kang, M. J.; Kang, C. W. Kaempferol-3-O- β rutinoside suppresses the inflammatory responses in lipopolysaccharide stimulated RAW264. 7 cells via the NF κ B and MAPK pathways. *International Journal of Molecular Medicine*. 2019, 44(6): 2321-2328.
59. Dilika, F.; Bremner, P. D.; Meyer, J. J. M. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*. 2000, 71(4): 450-452.
60. Ming, Y.; Duo.Zhi. S. H. I; Teng, Yu. W. Transformation of trollioside and isoquercetin by human intestinal flora in vitro. *Chinese journal of natural medicines*. 2016, 14(3): 220-226.
61. Bisignano, G.; Sanogo, R.; Marino, A. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters in applied microbiology*. 2000, 30(2): 105-108.

62. Carrillo, Pérez. C.; Cavia, Camarero. M. M. Alonso de la Torre S. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review. *Nutrición Hospitalaria*. **2012**, v. 27, n. 6.
63. DAILEY, O. D.; Wang, X.; Chen, F. Anticancer activity of branched-chain derivatives of oleic acid. *Anticancer research*. **2011**, 31(10): 3165-3169.
64. Zhang, R.; Yao, Y.; Wang, Y. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A y mice. *Nutrition & Metabolism*. **2011**, 8: 1-6.
65. D,a Silva. D. C.; Orfali, G. D.C.; Santana, M. G. Antitumor effect of isoquercetin on tissue vasohibin expression and colon cancer vasculature. *Oncotarget*. **2022**, 13: 307.
66. Habtemariam, S. α -Glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. *Natural Product Communications*. **2011**, 6(2): 1934578X1100600211.
67. Liana, L.; Rizal ,R.; Widowati, W. Antioxidant and anti-hyaluronidase activities of dragon fruit peel extract and kaempferol-3-o-rutinoside. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **2019**, 30(4): 247-252.
68. Gao, K.; Xu, A.; Krul, C. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *The Journal of nutrition*. **2006**, 136(1): 52-57.
69. Igwe, O. U.; Echeme, J. O. Isolation, Structural Elucidation and Anti-Lipid Peroxidation Activity of 3-(5-Hydroxy-2-(4-Hydroxyphenyl)-4-Methyl-Chromen-3-Yl) Propanoic Acid from the Stem Bark of *Brachystegia eurycoma* Harms. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*. **20**

14, 4(4): 447.

70. Nguyen,Ngoc. H.; Alilou, M.; Derbré, S. Chemical constituents of *Antidesma bunius* aerial parts and the anti-AGEs activity of selected compounds. *Phytochemistry*. **2022**, *202*: 113300.
71. Daou, M.; Elnaker ,N. A.; Ochsenkühn, M. A. In vitro α -glucosidase inhibitory activity of *Tamarix nilotica* shoot extracts and fractions. *Plos one*. **2022**, *17*(3): e0264969.)
72. 숲연구 임학박사 황호림의 (라운제나) **2020.6**
73. Kim, Y. D.; Kim, K. J .; Kim, S. H . Genetic Diversity in Three Populations of *Talipariti hamabo* (Malvaceae) in Jeju Island, Korea. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. **2007**, *37*(2):115-129.
74. Tulloch, P.; Mazurek, M. ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy of saturated, unsaturated, and oxygenated fatty acid methyl esters. *J. Lipids*. **1976**, *11*(3), 228-234.
75. Ming Huey, Chang.; Guei Jane, Wang.; Yueh Hsiung, Kuo.; et al. The Low Polar Constituents from *Bidens Pilosa* L. var. *Minor* (Blume) Sherff. *J. Journal of the Chinese Chemical Society*. **2013**, *47*(5), 1131-1136.
76. Yang, Q.; Cao, W.; Zhou, X.; Cao, W.; Xie, Y.; Wang, S. Anti-thrombotic effects of α -linolenic acid isolated from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **2014**. *14*, 348.
77. C, Escobedo-Martínez.; Lozada, M. C.; S, Hernández-Ortega. ^1H and ^{13}C NMR characterization of new cycloartane triterpenes from *Mangifera indica*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2012**, *50*(1), 52-57.

78. Thuc, D. N.; Thuy, V. T.; Mai, V. T. H. Chemical constituents from ethyl acetate extract of the stems of *Rourea oligophlebia* Merr. *Vietnam Journal of Chemistry*. **2020**, *58*(3), 298–301.
79. Zhong-Zhao, W.; Jun, L. I.; Xv-Li, T. et al. Triterpenes and steroids from semi-mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **2011**, *9*(3), 190–192.
80. Rehan, M.; Shafiullah, S. The anticancer activity of oleanane-type saponin from *Bombax ceiba* (in vitro) and theoretical investigation of signaling pathway. *MALAYSIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*. **2021**, *23*(1), 33–47.
81. Gohari, A. R.; Saeidnia, S.; Hadjiakhoondi, A. et al. Isolation and Quantificative Analysis of Oleanolic Acid from *Satureja mutica* Fisch. & CA Mey. *Journal of Medicinal Plants*. **2009**, *8*(29), 65–69.
82. Saleem, M.; Kim, H. J.; Jin, C. et al. Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*. *Archives of pharmacal research*. **2004**, *27*(3), 300–304.
83. Iqbal, K.; Nawaz, S. A.; Malik, A. et al. Isolation and lipoxygenase inhibition studies of phenolic constituents from *Ehretia obtusifolia*. *Chemistry & biodiversity*. **2005**, *2*(1), 104–111.
84. Barraza-Morales, A.; Medrano-Nahuat, D.; Peraza-Sánchez, S. R. Chemical constituents of the leaves of *Triumfetta semitriloba*. *Natural product communications*. **2013**, *8*(9), 1245–1246.
85. Sunil, C ; Duraipandiyar, V.; Ignacimuthu, S. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima*

tetracantha Lam. leaves. *Food chemistry*. **2013**, *139*(1-4): 860-865.

86. Yang, Z. G.; Li, H. R.; Wang, L. Y, Triterpenoids from Hippophae rhamnoides L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. **2007**, *55*(1): 15-18.
87. Baskar A. A.; Ignacimuthu, S.; Paulraj, G. M,. Chemopreventive potential of β -sitosterol in experimental colon cancer model-an in vitro and in vivo study. *BMC complementary and alternative medicine*. **2010**, *10*(1): 1-10.
88. Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A. L.; Nieto, Camacho. A. Anti-hyperglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and metabolites from Sida acuta and Sida rhombifolia. *Química Nova*. **2017**, *40*: 176-181.
89. Prevc, T. Šegatin, N; Ulrih, N .P. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*. **2013**, *109*: 13-19.
90. Kim, S. M.; Park, E.J.; Kim, J. Y. Anti-inflammatory effects of fermented lotus root and linoleic acid in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Life*. **2020**, *10*(11): 293.
91. Shen, Y.; Chen, G.; Xiao, A. In vitro effect of flaxseed oil and α -linolenic acid against the toxicity of lipopolysaccharide (LPS) to human umbilical vein endothelial cells. *Inflammopharmacology*. **2018**, *26*: 645-654.
92. Park, S. Y.; Seetharaman, R. Ko, M. J. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264. 7 cells. *International Immunopharmacology*. **2014**, *19*(2): 253-261.

93. He, L.; Yue, X.J.; Chen, Y. Z. Chemical Modification of Friedelin and Anti-inflammatory Activity. *Applied chemistry*. **1996** (5): 67.
94. Waghole, R. J.; Misar, A. V.; Kulkarni, N. S. In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of Tetrastigma sulcatum leaf extract, pure compound and its derivatives. *Inflammopharmacology*. **2022**, *30*(1): 291-311.
95. Shih, M. F.; Cheng, Y. D.; Shen, C. R. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of Euphorbia hirta L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *Journal of natural medicines*. **2010**, *64*: 330-335.
96. Kwon, T. H.; Lee, B. M.; Chung, S. H. Synthesis and NO production inhibitory activities of ursolic acid and oleanolic acid derivatives. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **2009**, *30*(1): 119-123.
97. Lan, T.; Huang, Y. P.; Liang, Q. P.; Study on chemical constituents from root and stem of Lycium barbarum L. *Natural Product Research and Development*. **2019**, *31*(9): 1491-1497.
98. Melariri, P.; Campbell, W.; Etusim, P. In vitro and in vivo antimalarial activity of linolenic and linoleic acids and their methyl esters. *Adv Stud Biol*. **2012**, *4*(7): 333-49.
99. Coakley, M.; Johnson, M. C.; McGrath, E. Intestinal bifidobacteria that produce trans-9, trans-11 conjugated linoleic acid: a fatty acid with antiproliferative activity against human colon SW480 and HT-29 cancer cells. *Nutrition and cancer*. **2006**, *56*(1): 95-102.
100. Liang, C.; Ye, W.; Zhu, C. Synthesis of doxorubicin α -linolenic acid

- conjugate and evaluation of its antitumor activity. *Molecular pharmaceuticals*. 2014, 11(5): 1378-1390.
101. Makinde, E. A.; Ovatlarnporn, C.; Sontimuang, C.; Chemical constituents from the aerial part of *Tiliacora triandra* (Colebr.) diels and their α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity. *Natural Product Communications*. 2020, 15(1): 1934578X19899595.
102. Huh. S.; Kim, Y. S.; Jung, E. Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated from *Oxalis triangularis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010, 33(7): 1242-1245.
103. Duraipandiyar, V.; Al-Dhabi, N. A.; Irudayaraj, S. S. Hypolipidemic activity of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* in hyperlipidemic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016, 26: 89-93
104. Queiroga, C. L.; Silva, G. F.; Dias, P. C. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacolog*. 2000, 72(3): 465-468.
105. Antonisamy, P.; Duraipandiyar, V.; Ignacimuthu, S. Anti-diarrhoeal activity of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* lam. in wistar rats. *South Ind. J. Biol. Sci*. 2015, 1: 34-37.
106. Toledo, C. R.; Pereira, V. V.; Duarte, L. P. Anti-angiogenic activity and safety of intraocular application of triterpenes. *Documenta Ophthalmologica*. 2021, 143: 259-270.
107. Lim, C. K.; Gan, S. Y.; Jong, V. Y. M. Cytotoxic activity of phytochemicals from the stem bark of *Calophyllum castaneum*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2019, 32(5).

108. Correa, G.; Abreu, V. D. C.; Martins, D. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). *Int J Pharm Pharm Sci.* **2014**, *6*(6): 75-81
109. Freire, S. M. F.; Torres, L.; Roque, N. F.; Analgesic activity of a triterpene isolated from *Scoparia dulcis* L.(Vassourinha). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **1991**, *86*: 149-151.
110. Ali, H.; Ullah, K.; Siddiqui, H. Chemical constituents from *Parrotia persica*-Structural derivatization and their potential prolyl endopeptidase inhibition activity. *Bioorganic Chemistry.* **2020**, *96*: 103526.
111. Schinor, E. C.; Salvador, M. J.; Ito, I. Y.; Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. *Brazilian Journal of Microbiology.* **2007**, *38*: 145-149.
112. Subarnas, A.; Tadano, T.; Oshima, Y. Pharmacological properties of β -amyryn palmitate, a novel centrally acting compound, isolated from *Lobelia inflata* leaves . *Journal of pharmacy and pharmacology.* **1993**, *45*(6): 545-550.
113. Yoshikawa, M.; Matsuda, H. Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs. *Biofactors.* **2000**, *13*(1-4): 231-237.
114. Horiuchi, K.; Shiota, S.; Hatano, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* **2007**, *30*(6): 1147-1149.

115. Khwaza, V.; Oyedeji, O. O.; Aderibigbe, B. A. Antiviral activities of oleanolic acid and its analogues. *Molecules*. **2018**, *23*(9): 2300. (抗病毒)
116. Tang, Z. Y.; Li, Y.; Tang, Y. T. Anticancer activity of oleanolic acid and its derivatives: Recent advances in evidence, target profiling and mechanisms of action. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2022**, *145*: 112397.
117. Szakiel, A.; Ruszkowski, D.; Grudniak, A. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*). *Planta medica*. **2008**, *74*(14): 1709–1715.
118. Cheng, K. G.; Su, C. H.; Yang, L. D. Synthesis of oleanolic acid dimers linked at C-28 and evaluation of anti-tumor activity. *European journal of medicinal chemistry*. **2015**, *89*: 480–489.
119. Sugano, M.; Morioka, H.; Ikeda, I. A comparison of hypocholesterolemic activity of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. *The Journal of nutrition*. **1977**, *107*(11): 2011–2019.
120. Sen, A.; Dhavan, P.; Shukla, K. K. Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -sitosterol isolated from *Momordica charantia*. *Sci Secure J Biotechnol*. **2012**, *1*(1): 9–13.
121. Choi, S.; Kim, K. W.; Choi, J. S. Angiogenic activity of β -sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. *Planta medica*. **2002**, *68*(04): 330–335.
122. Lee, J. H.; Lee, J. Y.; Park, J. H. Immunoregulatory activity by daucosterol, a β -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine*. **2007**, *25*(19):

3834-3840.

123. Wang, G. F.; Shi, L. P.; Ren, Y. D. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral research*. **2009**, *83*(2): 186-190.
124. Chao, P.; Hsu, C.; Yin, M. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutrition & metabolism*. **2009**, *6*(1): 1-8.
125. Wu, S. T.; Wang, Y. X.; Yu, B. H. Phenylpropanoids from *Brachybotrys paridiformis* Maxim. ex Oliv. and their anti-HBV activities. *Phytochemistry*. **2022**, *197*: 113114.
126. 조의환, 김일혁. *Hydrocotyle japonica* 의 약효성분에 관한 연구 (I). *약학회지*. **1988**, *32*(4): 281-286.
127. 지식백과, 두산백과, "제주피막이", NAVER, <https://terms.naver.com/entry.naver?docId>
128. Pongprayoon, U.; Baeckström, P.; Jacobsson, U.; Lindström, M.; Bohlin, L. Antispasmodic activity of β -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica*. **1992**, *58*(01), 19-21.
129. Ragasa, C. Y.; Tsai, P. W.; Shen, C. C. Antimicrobial terpenoids from *Erigeron sumatrensis*. *NRCP Research Journal*. **2009**, *10*(1): 27-32.
130. El-Askary, H. I.; Haggag, M. Y.; Abou-Hussein, D. R.; Hussein, S. M. Phytochemical investigation of the lipoidal fraction of *Passiflora caerulea* L. grown in Egypt. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. **2017**, *1*(1), 1-5.

131. Lao, A.; Fujimoto, Y.; & Tatsuno, T. Studies on the constituents of *Artemisia argyi* Levl et Vant. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. **1984**, *32*(2), 723-7274. (52-53)
132. Huh, S.; Kim, Y. S.; Jung, E.; Lim, J.; Jung, K. S.; Kim, M. O.; Lee, J. S.; Park, D. H. Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated from *Oxalis triangularis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2010**, *33*(7), 1242-1245.
133. Nitbani, F. O.; Siswanta, D.; Sholikhah, E. N.; Nurohmah, B. A. An improved synthesis of 1-monoolein. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. *IOP Publishing*. **2020**, (Vol. 823, No. 1, p. 012004).
134. Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. ¹H and ¹³C NMR of virgin oliveoil. An overview. *Magnetic Resonance in chemistry*. **1997**, *35*(13), S133-S146.
135. Lee, S. J.; Jang, H. J.; Kim, Y. Inhibitory effects of IL-6-induced STAT3 activation of bio-active compounds derived from *Salvia plebeia* R. Br. *Process Biochemistry*. **2016**, *51*(12): 2222-2229.
136. Liang C, Ding. Y.; Kim, J. A. Polyacetylenes from *Panax stipuleanatus* and their cytotoxic effects on human cancer cells. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **2011**, *32*(9): 3513-3516.
137. Pierre, L. L.; Moses, M. N.; Isolation and characterisation of stigmasterol and β -sitosterol from *Odontonema strictum* (acanthaceae). *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*. **2015**, *2*(1): 88-95.
138. Uegaki, R.; Kubo, S.; Fujimori, T. Stress compounds in the leaves of

- Nicotiana undulata induced by TMV inoculation. *Phytochemistry*. **1988**, 27(2): 365-368.
139. Arruda, C.; Eugênio, D. S.; Moreira, M. R.; . Biotransformation of (-)-cubebin by *Aspergillus* spp. into (-)-hinokinin and (-)-parabenzlactone, and their evaluation against oral pathogenic bacteria. *Natural product research*. **2018**, 32(23): 2803-2816.
140. Schuhr, C .A.; Radykewicz, T.; Sagner, S. Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochemistry Reviews*. **2003**, 2: 3-16.
141. Ragasa, C. Y.; Javier, E. S. C.; Tan I G. Antimutagenic terpenes and sterols from *Vitex parviflora*. *Philippine Journal of Science*. **2003**, 132(1): 21-26.
142. Kwon, H. C.; Zee, O. P.; Lee, K. R. Two new monogalactosylacylglycerols from *Hydrocotyle ramiflora*. *Planta medica*. **1998**, 64(05): 477-479. (cpd15-16)
143. Bahuguna, A.; Bharadwaj, S.; Bajpai, V. K. Insights into cyclooxygenase-2 inhibition by isolated bioactive compounds 3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoyl quinic acid and isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea*. *Phytomedicine*. **2021**, 90: 153638.
144. Xu, X.; Wang, P.; Wang, B. Glucose absorption regulation and mechanism of the compounds in *Lilium lancifolium* Thunb on Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2021**, 149: 112010.
145. Datta, B. K.; Datta, S. K.; Sarker, S. D. Quercetin 3-O-(6''-caffeoyl)-

- β -d-galactopyranoside from *Polygonum viscosum*. *Fitoterapia*. **2000**, *71*(4): 459-460.
146. Mostafa, M.; Takano, F.; Ohta, T. Unique phenyl ether type biflavonoids, zizyflavosides A and B with biomimetic synthesis for zizyflavoside A. *Heterocycles*. **2010**, *81*(11): 2497.
147. Benzidia, B.; Barbouchi, M.; Hammouch, H. Chemical composition and antioxidant activity of tannins extract from green rind of *Aloe vera* (L.) Burm. F. *Journal of King Saud University-Science*. **2019**, *31*(4): 1175-1181.
148. Olasehinde, T. A.; Olaniran, A. O.; Okoh, A. I. Cholinesterase inhibitory activity, antioxidant properties, and phytochemical composition of *Chlorococcum* sp. extracts. *Journal of Food Biochemistry*. **2021**, *45*(3): e13395.
149. Renda, G.; Özel, A.; Barut, B. Bioassay Guided Isolation of Active Compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz. *Records of Natural Products*. **2017**, *12*(1).
150. Kong, C. S.; Kim, Y. A.; Kim, M. M. Antioxidant activity and inhibition of MMP-9 by isorhamnetin and quercetin 3-O- β -D-glucopyranosides isolated from *Salicornia herbacea* in HT1080 cells. *Food Science and Biotechnology*. **2008**, *17*(5): 983-989.
151. Chang, C. S.; Sun, H. L.; Lii, C. K. . Gamma-linolenic acid inhibits inflammatory responses by regulating NF- κ B and AP-1 activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Inflammation*. **2010**, *33*: 46-57.
152. Cha, B. J.; Park, J. H.; Shrestha, S. Glycosyl glycerides from hydroponic

- Panax ginseng inhibited NO production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells. *Journal of Ginseng Research*. **2015**, *39*(2): 162-168.
153. Lee, S. J.; Jang, H. J.; Kim, Y. Inhibitory effects of IL-6-induced STAT3 activation of bio-active compounds derived from *Salvia plebeia* R. *Process Biochemistry*. **2016**, *51*(12): 2222-2229.
154. 고태나. 윤노리나무 가지 및 제주 흑무 추출물로부터 기능성 화장품 소재 개발 연구. 제주대학교 일반대학원, 2018.
155. Lee, S. J.; Jang, H. J.; Kim, Y. Inhibitory effects of IL-6-induced STAT3 activation of bio-active compounds derived from *Salvia plebeia* R. Br. *Process Biochemistry*. **2016**, *51*(12): 2222-2229.
156. Banskota, A. H.; Stefanova, R.; Gallan,t P. Nitric oxide inhibitory activity of monogalactosylmonoacylglycerols from a freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Natural Product Research*. **2013**, *27*(11): 1028-1031.
157. Al, Musayeib. N.; Perveen, S.; Fatima, I. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules*. **2011**, *16*(12): 10214-10226.
158. Ragasa, C. Y.; Tsai, P. W.; Shen, C. C. Antimicrobial terpenoids from *Erigeron sumatrensis*. *NRCP Research Journa*. **2009**, *10*(1): 27-32.
159. Jumina. J.; Lavendi, W.; Singgih, T. Preparation of monoacylglycerol derivatives from Indonesian edible oil and their antimicrobial assay against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scientific reports*. **2019**, *9*(1): 10941.
160. Lee, J. Y.; Kim, Y. S.; Shin, D.H. Antimicrobial synergistic effect of

- linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2002**, *50*(7): 2193-2199.
161. Wong, K. C.; Hag, Ali D. M.; Boey, P. L. Chemical constituents and antibacterial activity of *Melastoma malabathricum* L. *Natural product research*. **2012**, *26*(7): 609-618
162. Metwally, A.M.; Omar, A .A.; Harraz, .F M. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy magazine*. **2010**, *6*(23): 212.
163. Rajab, M. S.; Cantrell, C. L.; Franzblau, S. G. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta medica*. **1998**, *64*(01): 2-4.
164. Pongprayoon, U.; Baeckström, P.; Jacobsso, U. Antispasmodic activity of β -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica*. **1992**, *58*(01): 19-21.
165. Silva, R. O.; Sousa, F. B. M.; Damasceno, S. R. B. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental & clinical pharmacology*. **2014**, *28*(4): 455-464.
166. Saludes, J. P.; Garson, M. J.; Franzblau, S. G. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn.(Rubiaceae). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. **2002**, *16*(7): 683-685.

167. Aboaba, S. A.; Aiyelaagbe, O. O.; Ekundayo, O. Chemical composition, toxicity and larvicidal activity of the essential oil from the whole plant of *Acalypha segetalis* from South-West Nigeria. *Natural Product Communications*. **2010**, *5*(3): 1934578X1000500328.
168. Tahya, C. Y.; Karnelasatri, K. Gas chromatography-mass spectrometry analysis and α -glucosidase inhibitory activity of n-hexane extract of Bilajang Bulu (*Merremia Vitifolia*) leaves. *Walisongo Journal of Chemistry*. **2021**, *4*(2): 162-172.
169. Chen, Y. Dai, G. Acaricidal, repellent, and oviposition-deterrent activities of 2, 4-di-tert-butylphenol and ethyl oleate against the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus*. *Journal of Pest Science*. **2015**, *88*: 645-655.
170. Kanoh, H.; Iwata, T.; Ono, T. Immunological characterization of sn-1, 2-diacylglycerol and sn-2-monoacylglycerol kinase from pig brain. *Journal of Biological Chemistry*. **1986**, *261*(12): 5597-5602.
171. Oyman, Z. O.; Ming, W.; Van, der, Linde, R. Catalytic activity of a dinuclear manganese complex (MnMeTACN) on the oxidation of ethyl linoleate. *Applied catalysis A: general*. **2007**, *316*(2): 191-196.
172. Ko, G .A.; Cho, S. K. Ethyl linoleate inhibits α -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. **2018**, *22*(1): 53.9
173. Rayar, A.; Manivannan, R. Evaluation of Antidiabetic Activity of Ethyl Linoleate Isolated from *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn Seed. *Int Res*

J Pure Appl Chem. **2015**, *9*(2): 1-9.

174. Desai, D. C.; Jacob, J.; Almeida, A. Isolation, structural elucidation and anti-inflammatory activity of astragalol, (-) hinokinin, aristolactam I and aristolochic acids (I & II) from *Aristolochia indica*. *Natural product research.* **2014**, *28*(17): 1413-1417.
175. Timple, J. M. V; Magalhães, L. G.; Souza, Rezende. K. C. The lignan (-)-hinokinin displays modulatory effects on human monoamine and GABA transporter activities. *Journal of Natural Products.* **2013**, *76*(10): 1889-1895.
176. Montiel ,Ruiz. R. M.; Córdova, de. La. Cruz. M. González, Cortázar, M. Antinociceptive effect of hinokinin and kaurenoic acid isolated from *Aristolochia odoratissima* L. *Molecules.* **2020**, *25*(6): 1454.
177. Cunha, N. L.; Teixeira, G. M.; Martins, T. D. (-)-Hinokinin induces G2/M arrest and contributes to the antiproliferative effects of doxorubicin in breast cancer cells. *Planta Medica.* **2016**, *82*(06): 530-538.
178. De, Lima. R. G.; Lison, F. C. R.; Picão, T. B. In vitro and in silico cytotoxicity of hinokinin-loaded PLGA microparticle systems against tumoral SiHa cells. *Natural Product Research.* **2021**, *36*(18): 4690-4697.
179. Kong, C. S.; Seo, Y. Antiadipogenic activity of isohamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* **2012**, *34*(6): 907-911.
180. Kim, J. S.; Kwon, Y. S. Sa, Y. J. Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry. **2011**, *59*(1): 138-144.

181. Ogunro, O. B.; Ofeniforo, E. B.; Fakayode, A. E. Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside-rich fraction demonstrated efficacy against infectious, secretory, and osmotic models of diarrhoeal rats. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. **2023**, *21*(1): 1-23.
182. Kang, W. Y.; Song, Y. L.; Zhang, L. α -Glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L. *Medicinal Chemistry Research*. **2011**, *20*: 809-816.
183. Cho, E. J.; Yokozawa, T.; Rhyu, D. Y. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component compounds on lipid peroxidation. *The American journal of Chinese medicine*. **2003**, *31*(06): 907-917.
184. Chen, J.; Teng, J.; Ma, L. Flavonoids isolated from the flowers of *Limonium bicolor* and their in vitro antitumor evaluation. *Pharmacognosy Magazine*. **2017**, *13*(50): 222.
185. Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A.; Dissolution, solubility and cooperativity of phenolic compounds from *Hypericum perforatum* L. in aqueous systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2003**, *58*(3): 200-203.
186. Mostafa, M. A. H.; Khojah, H. M. J.; Ohta, T. Isolation and identification of novel selective antitumor constituents, sidrin and sidroside, from *Zizyphus spina-christi*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2023**, *31*(6): 1019-1028.
187. Venkatesan, T.; Choi, Y. W.; Lee, J. Falcarindiol inhibits LPS-induced inflammation via attenuating MAPK and JAK-STAT signaling pathways in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Molecular and cellular*

biochemistry. **2018**, *445*: 169-178.

188. Park, J. Y.; Kawada, T.; Han, I. S. Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor α by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: a PPAR γ ligand-like action as a novel mechanism. *FEBS letters*. **2004**, *572*(1-3): 266-270.
189. Kim, C. S.; Kawada, T. Kim, B. S. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cellular signalling*. **2003**, *15*(3): 299-306.
190. Cruz-Zúñiga, J. M.; Soto,Valdez. H.; Peralta, E. Development of an antioxidant biomaterial by promoting the deglycosylation of rutin to isoquercetin and querceti. *Food Chemistry*. **2016**, *204*: 420-426.
191. Levickienė, D. ; Jarienė, E. ; Gajewski, M. Influence of harvest time on biologically active compounds and the antioxidant activity in leaves of mulberry grown in Lithuania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. **2017**.*45*(2): 431-436.
192. Vassiliou, E. K.; Gonzalez, A.; Garcia ,C. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- α both in vitro and in vivo systems. *Lipids in Health and Disease*. **2009**, *8*(1): 1-10.
193. Tomani, J. C. D.; Kagisha, V.; Tchinda, A. T, The inhibition of NLRP3 inflammasome and IL-6 production by hibiscus noldeae baker f. Derived constituents provides a link to its anti-Inflammatory therapeutic potentials. *Molecules*. **2020**, *25*(20): 4693.
194. Izuegbuna, O.; Otunola, G.,; Bradley, G.; Chemical composition,

antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Opuntia stricta* cladode. *Plos one*. **2019**, *14*(1): e0209682.

195. Yang, B. Y.; Liu, Y.; Jiang, H. B. Phenylpropanoids from the fruits of *Nicandra physaloides* and their anti-inflammatory activities. *Natural product research*. **2017**, *31*(22): 2634-2640.