



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

진굴 가지 추출물의 항염, 항산화 및
항균 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

金 姬 秀

2017年 2月

진균 가지 추출물의 항염, 항산화 및 항균 활성 성분 연구

指導教授 李南昊

金姬秀

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 12月

金姬秀의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

委員

委員

李昌久

李鍾轍

李南昊



濟州大學校 大學院

2016年 12月

Anti-inflammatory, Anti-oxidative and
Anti-bacterial Constituents from *Citrus sunki*
Branches

Hee Su Kim
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2016. 12.

This thesis has been examined and approved.

CHANG-GU HYUN
JONG-CHUL BYUN
Nam Ho Lee

12/16
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	iii
List of Abbreviations	vi
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 시약 및 기기	7
2. 재료	8
3. 추출, 분획 및 분리	9
1) 진균 가지의 추출 및 분획	9
2) EtOAc 분획물의 활성 성분 분리	10
4. 활성 실험	11
1) 항산화 활성	11
(1) 총 폴리페놀 함량	11
(2) 총 플라보노이드 함량	12
(3) DPPH radical 소거 활성	12
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	14
2) 항염 활성	15
(1) RAW264.7 세포 배양	15
(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	16
(3) 세포독성 평가	16
(4) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	17
3) 항균 활성	18
(1) 균주 배양	18

(2) Paper disc diffusion method	18
III. 결과	20
1. 분리된 화합물의 구조 분석	20
1) Compound 1의 구조 동정	20
2) Compound 2의 구조 동정	23
3) Compound 3의 구조 동정	26
4) Compound 4의 구조 동정	29
2. 진균 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	32
1) 항산화 활성	32
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	32
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	33
(3) DPPH radical 소거 활성	34
(4) ABTS ⁺ radical 소거 활성	35
2) 항염 활성	36
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	36
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	39
3) 항균 활성	43
3. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	45
1) 항염 활성	45
(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성	46
(2) PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성	48
IV. 결론 및 고찰	52
V. 참고문헌	54

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1	21
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 2	24
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 3	27
Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 4	30
Table 5. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for <i>C. sunki</i> branches	34
Table 6. SC_{50} values of ABTS^+ radical scavenging activities for <i>C. sunki</i> branches	35
Table 7. IC_{50} values of <i>C. sunki</i> branches on PGE_2 and pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells	42
Table 8. Anti-bacterial activities of <i>Citrus sunki</i> branches determined by the paper diffusion method	44
Table 9. IC_{50} values of isolated compounds from <i>C. sunki</i> branches on NO production using RAW264.7 cells	45
Table 10. IC_{50} values of compound 3 from <i>C. sunki</i> branches on PGE_2 and pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells	51

List of Figures

Figure 1. Antioxidant enzyme system in vivo	4
Figure 2. Nitric oxide synthase by NOS	5
Figure 3. Pictures of <i>Citrus sunki</i>	8
Figure 4. Extraction and solvent fractionation of <i>Citrus sunki</i> branches	9
Figure 5. Isolation of compounds from <i>Citrus sunki</i> branches	10
Figure 6. Calibration curve for quantification of gallic acid	11

Figure 7. Calibration curve for quantification of quercetin	12
Figure 8. Principle of DPPH radical scavenging by an anti-oxidant	13
Figure 9. Principle of ABTS ⁺ radical scavenging by an anti-oxidant	14
Figure 10. Principle of MTT assay	16
Figure 11. Paper disc diffusion test	19
Figure 12. Chemical structure of compound 1	20
Figure 13. ¹ H NMR spectrum of compound 1	22
Figure 14. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	22
Figure 15. Chemical structure of compound 2	23
Figure 16. ¹ H NMR spectrum of compound 2	25
Figure 17. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	25
Figure 18. Chemical structure of compound 3	26
Figure 19. ¹ H NMR spectrum of compound 3	28
Figure 20. ¹³ C NMR spectrum of compound 3	28
Figure 21. Chemical structure of compound 4	29
Figure 22. ¹ H NMR spectrum of compound 4	31
Figure 23. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	31
Figure 24. Total phenolic contents of extract and solvent fractions	32
Figure 25. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions	33
Figure 26. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions	34
Figure 27. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions	35
Figure 28. Effects of extract and solvent fractions from <i>C. sunki</i> branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells	37
Figure 29. Effects of EtOAc fraction from <i>C. sunki</i> branches on NO produc- tion in LPS-induced RAW264.7 cells	38
Figure 30. PGE ₂ production of EtOAc fraction from <i>C. sunki</i> branches	39
Figure 31. TNF-α production of EtOAc fraction from <i>C. sunki</i> branches	40

Figure 32. IL-1 β production of EtOAc fraction from <i>C. sunki</i> branches	41
Figure 33. IL-6 production of EtOAc fraction from <i>C. sunki</i> branches	42
Figure 34. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from <i>C. sunki</i> branches on <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> and <i>P. acnes</i>	43
Figure 35. Effects of compound 1 , 3 and 4 from <i>C. sunki</i> branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells	46
Figure 36. Effects of compound 3 from <i>C. sunki</i> branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells	47
Figure 37. PGE ₂ production of compound 3 from <i>C. sunki</i> branches	48
Figure 38. TNF- α production of compound 3 from <i>C. sunki</i> branches	49
Figure 39. IL-1 β production of compound 3 from <i>C. sunki</i> branches	50
Figure 40. IL-6 production of compound 3 from <i>C. sunki</i> branches	51

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BHT	Butylated hydroxytoluene
CC	Column chromatography
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i>
CHCl ₃	Chloroform
<i>C. sunki</i>	<i>Citrus sunki</i>
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Fr.	Fraction
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallic acid equivalents
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
int.	Integration
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
MeOH	Methanol
MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
NMR	Nuclear magnetic resonance

<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
QE	Quercetin equivalents
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
TLC	Thin layer chromatography

Abstract

In this study, we investigated bioactive constituents from *Citrus sunki* branches. Phytochemical investigation of the ethanol extract from *C. sunki* branches resulted in the isolation of four constituents; nobiletin (**1**), 6-demethoxytangeretin (**2**), 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone (**3**) and hesperidin (**4**). The chemical structures of these compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to literature values. As far as we know, compound **3** was isolated for the first time from this plant.

For the anti-inflammatory activity tests using RAW264.7 murine macrophage cells, the EtOAc fraction and isolated compounds (**1** and **3**) inhibited nitric oxide (NO) production significantly. Also, EtOAc fraction and compound **3** showed inhibition activities on production of PGE₂ and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6).

On the screening of anti-oxidative activities, the EtOAc fraction showed potent DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities. Moreover, the total phenolic contents and total flavonoid contents for the EtOAc fraction were estimated as 71.9 mg/g GAE and 79.9 mg/g QE, respectively.

On the anti-bacterial activity studies of *C. sunki*, *n*-Hex and EtOAc fractions showed activities on *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3711) and *P. acnes* (CCARM 9009).

Based on these results, extract of *C. sunki* branches could be potentially applicable as anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-bacterial ingredients.

I. 서론

오늘날 인류가 사용하고 있는 의약품의 절반은 천연물에서 유래한 것들이다. 천연물 의약품의 역사는 인류의 탄생과 더불어 시작되었지만 생리활성 물질의 본체가 밝혀진 것은 19세기 이후 과학의 눈부신 발전 덕분이다. 그 후 약효를 높이고 부작용을 최소화하기 위한 지속적인 연구를 통해 오늘날 널리 사용되는 천연물 의약품이 출현하게 되었다.¹ 최근에는 의약품 원료로써 뿐만 아니라 천연물 화장품, 건강 기능성 식품으로의 개발도 다양하게 이루어지고 있다. 천연물은 대부분 식물, 동물, 미생물의 2차 대사산물과 1차 대사산물의 일부 및 광물로 이루어져 있다. 이러한 천연물의 유용성을 평가하여 천연물 의약, 고기능성 식품, 천연물 화장품, 천연 살충제 등의 고부가가치의 상품으로 개발하는 천연물 산업에 대한 관심이 고조되고 있으며 이미 선진 각국에서는 이 분야의 연구개발에 역점을 두고 각종 천연물의 제품화와 산업화에 역량을 집중하고 있는 추세이다.²

1. 진귤

감귤류는 한방이나 생약의 원료로 사용되고 있는 기능성 약효 성분이 많이 함유되어 있는 과일로써, 우리나라는 기상적, 지리적으로 감귤 재배지 중 최북단에 위치하고 있어서 내한성이 강한 만다린계의 온주밀감류가 감귤 생산의 주종을 이루고 있다.³ 현재 제주도에서 대표적인 과실로 재배되고 있는 것은 20세기 초 일본으로부터 도입된 온주밀감류가 대부분이며, 제주 자생 재래 감귤 중 진귤 (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)은 제주지역에서 '산물'로 불리는 것으로 다른 이름으로는 '산귤'이라고 부르기도 한다.⁴ 진귤 열매의 향과 맛이 독특하여 조선시대에는 임금님께 올리는 제주도의 대표 진상품이었다. 이러한 감귤류는 polyphenol류, vitamin류, limonoid류 등의 다양한 화합물을 함유하고 있으며 rutin, deosmine 등의 일반적인 flavonoid 및 hesperidin, naringin 등 Citrus 과일 특유의 flavonoid, 또한 감귤류 외에는 보고되지 않은 감귤류 고유의 tangeretin, nobiletin 등의 flavonoid가 함유되어 있다.⁵ 감귤 과피에는 페놀성 화합물이 높은

농도로 존재하기 때문에 flavonoid의 풍부한 공급원이 된다.⁶ 예로부터 진귤의 과피를 건조시킨 것을 진피라고 하여 기가 멎친 것을 풀어주고 비장 기능을 강화시켜 메스꺼움, 소화불량, 해수, 가래를 없애주며 이뇨작용의 효과가 있어서 한약재로 사용되어 왔다.⁷ 진피는 한의학에서는 없어서는 안 될 필수적인 한약재로 사용되어 왔으나, 최근에는 일반 온주밀감의 건조과피를 진피로 잘못 인식하여 한약재로 사용하고 있어 이를 바로 잡을 필요가 있다. 진귤 등의 재래감귤류와 온주밀감류는 모두 분류학상으로는 Citrus 속에 해당되며 최근 성분조사, 생리활성에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 특히 과피의 기능성에 대한 관심들이 집중되어 있는데 예를 들면 항염 작용 및 설사억제효능, 항알러지 효과, 대식세포의 활성 증대 등과 같은 약리활성들이 보고된 바 있다.⁸

감귤을 재배 할 때 이상이 생긴 가지를 자르거나 혼잡한 부분의 가지를 정리하기 위해 가지를 자르는 전정(剪定) 작업을 하는데 이때 전정 작업 후 폐자원이 발생한다. 이에 본 연구에서는 진귤 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 진귤 가지로부터 분리된 화합물들의 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 항염 활성에 대한 연구를 진행하여 폐자원의 재활용뿐만 아니라 식의약품, 화장품 등의 신소재로써 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 항산화

피부는 항상 산소와 접촉하고 있으며 산화적 스트레스(자외선, 공해, 미생물 등)에 노출되어 있다. 이들 산화적 스트레스는 생체 내 산화적 손상 및 항상성 붕괴를 통하여 피부노화를 가속화시킬 수 있다. 피부노화의 원인은 크게 두 가지로 구분된다. 특별한 환경적 요인 없이 시간의 흐름에 따라 피부구조의 변화와 생리적 기능이 쇠퇴하여 나타나는 내인성 노화와 공해, 자외선과 같은 외부 환경 요인에 의해서 나타나는 외인성 노화로 구분된다. 광노화는 자외선에 의한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 통하여 나타나는 피부노화이다.⁹

ROS란 높은 산화력을 갖는 산소 종으로 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2), hydroxyl radical ($\cdot HO$) 등과 이들이 불포화 지방산과 반응하면서 생성되는 peroxy radical ($ROO\cdot$), alkoxy radical ($RO\cdot$)

radical ($RO\cdot$), hydroperoxide (ROOH)등이 포함된다. ROS는 강력한 반응성으로 세포막을 이루고 있는 인지질을 산화시켜 세포를 파괴할 뿐만 아니라, MMPs의 발현을 촉진시켜 콜라겐, 엘라스틴 섬유를 분해시킨다. 콜라겐 및 엘라스틴 섬유가 물리적 구조를 유지하지 못하면 피부는 탄력을 나타내지 못하고 결과적으로 주름이 생기게 된다.¹⁰ 하지만 피부에는 자외선과 활성산소의 광산화적 공격으로부터 피부 세포 및 조직을 지키는 항산화제가 있다. 항산화제에는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase 등의 효소적 항산화제와 비타민 E, 비타민 C, 유비퀴놀, 카로티노이드, 글루타치온 및 플라보노이드 등의 비효소적 항산화제가 있다. 이들 항산화제들은 피부에서 상호 협력적인 작용으로 항산화 방어망을 구축하여 활성산소로부터 피부 세포 및 조직을 보호하는 역할을 한다(Figure 1). 하지만 자외선에 계속해서 노출되면 피부에는 과잉의 활성산소가 생성되고 이들 활성산소들은 피부의 항산화제들을 파괴시킴으로써 항산화 방어망을 붕괴시킨다. 이어서 세포 구성 성분인 지질, 단백질 및 DNA 등의 산화적 손상과 진피 매트릭스 고분자의 파괴 등으로 피부노화는 가속화된다.¹¹ 따라서 생체 내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 ROS를 조절할 수 있는 합성 또는 천연항산화제 개발연구의 필요성이 강조되고 있다. 이러한 노력의 일환으로 노화 및 각종 질병을 예방하고 치료하기 위한 목적으로 사용되었던 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT) 등의 합성 항산화제들이 지니는 안전성 문제를 극복하고자 천연항산화제에 대한 탐색이 활발히 진행되고 있다.¹²

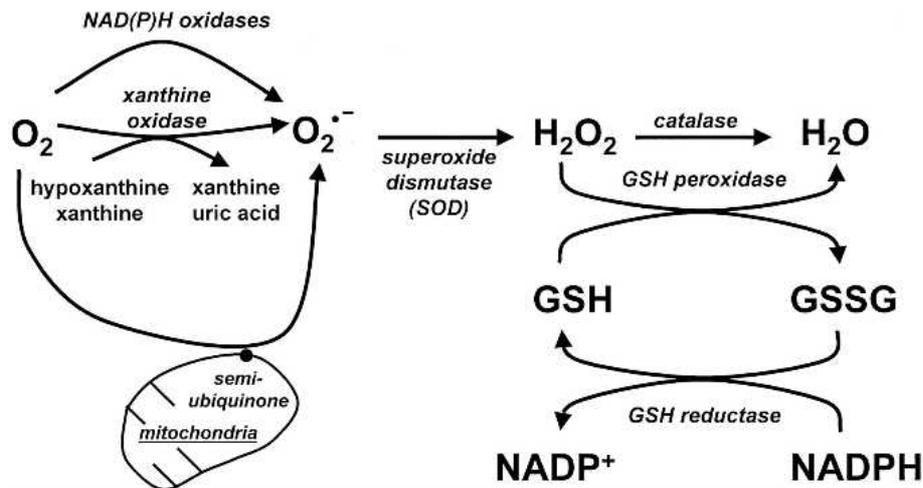


Figure 1. Antioxidant enzyme system in vivo.

3. 항염

염증 반응은 상처나 감염, 자가면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서, 조직의 혈관확장에 의한 부종, 발열, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체반응이다. 염증반응에서 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO), prostaglandin (PG) E_2 , tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)- 1β , IL-6 등 여러 염증성 매개체들을 방출한다.¹³ 이 과정에서 과량의 NO 및 PGE_2 등의 염증인자가 NO synthase (NOS) 및 cyclooxygenase (COX)에 의해 형성된다.

NOS는 크게 cNOS와 iNOS의 두 가지 그룹으로 나눌 수 있다. 즉, neuronal, endothelial NOS는 cNOS에 속하며 이는 Ca^{2+} -calmodulin 의존성이며 정상시에도 지속적으로 NO를 분비하고 있어 항상성을 조절한다. 이와 반면에 inducible NO (iNOS)는 INF- γ , IL-1, TNF- α 등의 cytokine이나 박테리아의 lipopolysaccharide (LPS)에 의해서 활성화되며 연계반응을 통해 장시간동안 대량의 NO를 생성하게 된다(Figure 2).¹⁴

COX는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신

장 기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하며, COX-2는 염증매개물질인 PGE₂를 형성한다. PGE₂는 염증반응, 면역반응 그리고 angiogenesis 촉진 등 암 발생에도 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁵

이와 같은 염증 매개인자들의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다.¹⁶

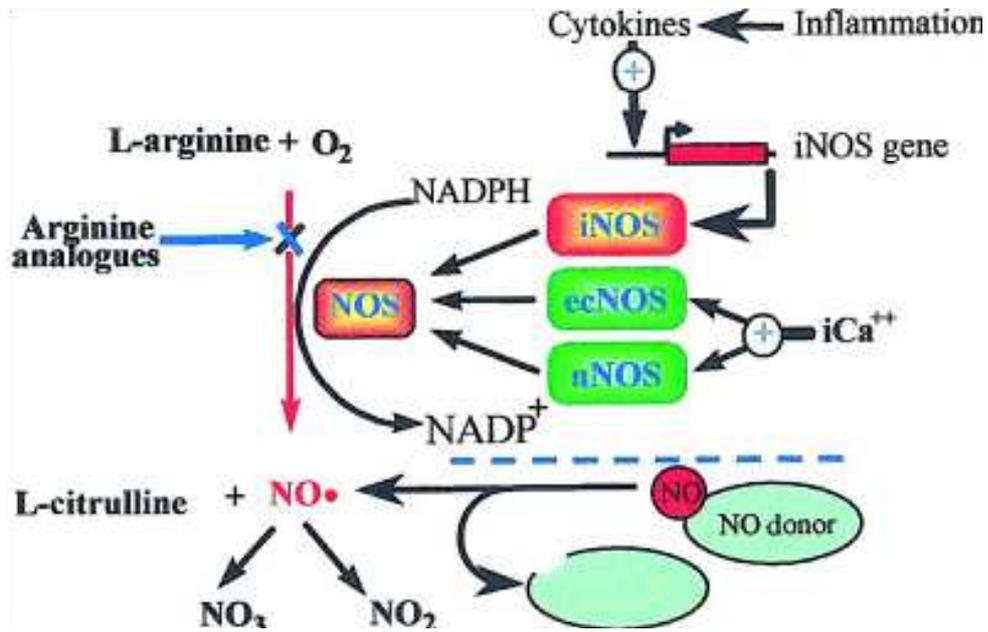


Figure 2. Nitric oxide synthase by NOS.

4. 항균

*Staphylococcus aureus*는 그람 양성 구균 중 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 세균으로 혈장응고효소인 coagulase를 생산하다. *S. aureus*는 건강한 성인의 비강 내에서 약 40%가 발견되며 비강이나 피부 등에서 다른 사람에게 전파되고 흔히 수술부위 감염, 폐렴 등 병원 내 감염증을 일으키는 균으로 알려져 있으며, 유아에 장염을 일으키고 이차적으로 다발성 장 궤양과 천공을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 피부 연조직 감염증, 골관절염, 폐렴, 균혈증 등 다양하면서도 중증 감염증을 일으키는 병원체로서 오래전부터 중요성이 인식되어 왔다. 항균제

가 개발되어 세균성 감염증의 치료에 전기가 마련된 이후에도 *S. aureus*는 여러 항균제에 대해서 내성을 획득함으로써 여전히 인류에게 중요한 병원체로 남아 있다.¹⁷

*Staphylococcus epidermidis*는 그람 양성 구균으로 인체의 각종 피부 및 점막 표면에 널리 분포하는 정상 세균이며, 황색 포도상구균(*S. aureus*)과는 달리 coagulase-음성인 것이 특징이다. *S. epidermidis*는 피부 상재균이지만 기회병원 균으로써 염증반응을 유발하고 모낭 주위에서는 여드름과 여드름 합병증을 일으키는 역할도 한다.¹⁸

*Propionibacterium acnes*는 피부 여드름 원인세균으로 알려져 있다. 다양한 요인에 의해 피부 모공이 막히게 되는 경우, 절대 혐기성 세균인 *P. acnes*가 모공 내에서 증식하게 되고, 지질분해효소인 lipase를 분비하여 피지의 주성분인 triglyceride를 free fatty acid로 분해한다. 생성된 free fatty acid는 모낭 벽 상피 세포를 자극하여 각질세포형성이 증가되고, 동시에 정체 과각화가 이루어져 여드름 형성과정의 초기 단계인 미세 면포를 형성하게 된다. 그리고 계속해서 각질과 피지가 분비됨으로써 모낭벽이 얇아지고 마침내 염증을 일으키게 된다. 이후, 염증이 계속되면 모공에 막혀 있던 피지나 각질, 노폐물 등이 모공의 벽을 부수고 피부 내부로 넘쳐 고름이 차 있는 상태인 농포를 만들어 염증을 악화시켜 더욱 아프게 한다.¹⁹

이러한 균들을 약물로 치료하는데 약물제의 부작용과 항생제 내성균주의 출현 등 여러 가지 문제점이 나타나고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 안전성이 확보된 천연물로부터 항균 활성 물질의 개발이 활발하게 진행되고 있다.²⁰

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck, Junsei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (2-25 μm , Sigma Co.), normal-phase column chromatography (CC)에는 silica gel (95-110 μm , Merck Co.)이 사용되었고, 겔 여과 크로마토그래피에는 SephadexTM LH-20 (0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리 과정에 사용된 thin-layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-5% H₂SO₄를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 microplate reader (SunriseTM, Tecan Co.)을 이용하였다.

구조분석에 이용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용용매로 CDCl₃, DMSO-*d*₆를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 진귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) 가지(시료번호 : 467)는 2015년 3월에 서귀포시 남원읍 소재 국립원예특작과학원 감귤연구소에서 채집하였다. 채집한 진귤 가지는 실온 및 음지에서 완전히 자연 건조 하였으며 분쇄하여 사용하였다(Figure 3).



Figure 3. Pictures of *Citrus sunki*.

3. 추출, 분획 및 분리

(1) 진꺠 가지의 추출 및 분획

건조 및 분쇄 된 진꺠 가지 1.8 kg을 70%(v/v) EtOH 18 L에 넣고 실온에서 24 시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 회전 농축기 (rotary evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 220 g을 얻었다.

추출물 20 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획층을 얻었으며, 이와 같은 방법으로 3회 더 반복 실시하여, 추출물 총 80 g을 용매 분획하였다 (Figure 4).

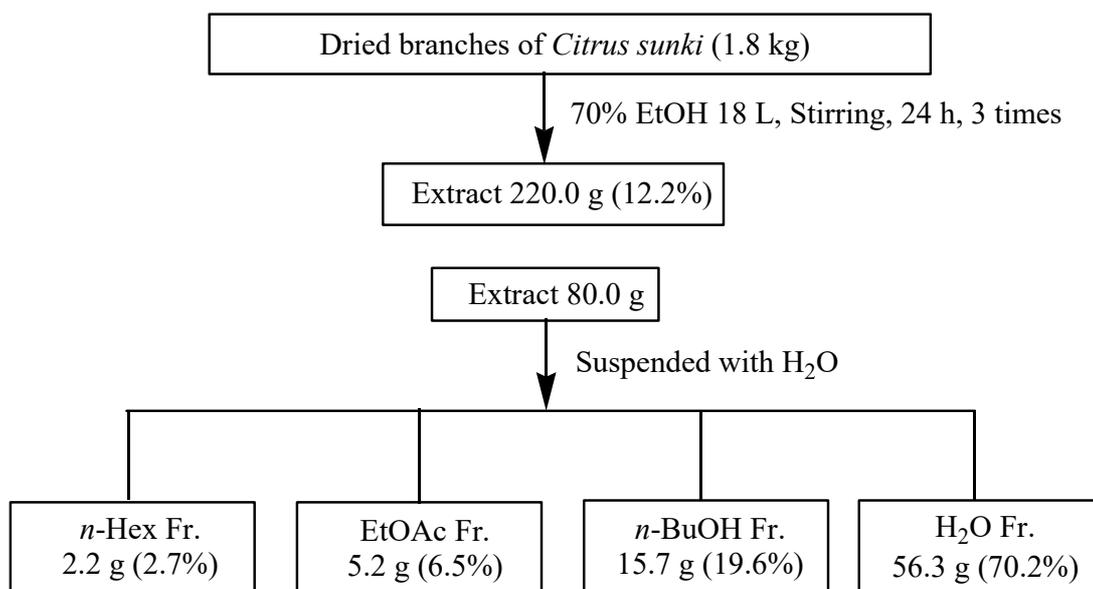


Figure 4. Extraction and solvent fractionation of *Citrus sunki* branches.

(2) EtOAc 분획물의 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중 ethyl acetate 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 VLC를 수행하였다. 기울기 용리법을 이용해 *n*-Hex:EtOAc (0~100%), EtOAc:MeOH (0~50%)의 용매조건으로 극성 비율을 5 또는 10%씩 높이면서 각각 300 mL씩 용출시켜 총 30개의 fraction을 얻었다. VLC fraction들 중 Fr. V9 (125.3 mg)을 CHCl₃:MeOH=30:1의 용매조건으로 Sephadex LH-20 컬럼을 수행하여 compound 3 (9.4 mg)을 얻었고, Fr. V13 (179.0 mg)을 CHCl₃:MeOH=20:1의 용매조건으로 silica gel 컬럼을 수행하여 compound 1 (29.3 mg)을 얻었다. 또한 Fr. V21 (431.5 mg)을 CHCl₃:MeOH=20:1의 용매조건으로 Sephadex LH-20 컬럼을 수행하여 compound 2 (22.0 mg)을 얻었다. Fr. V25 (406.6 mg)는 메탄올을 사용해 재결정하여 compound 4 (20.6 mg)을 얻었다 (Figure 5).

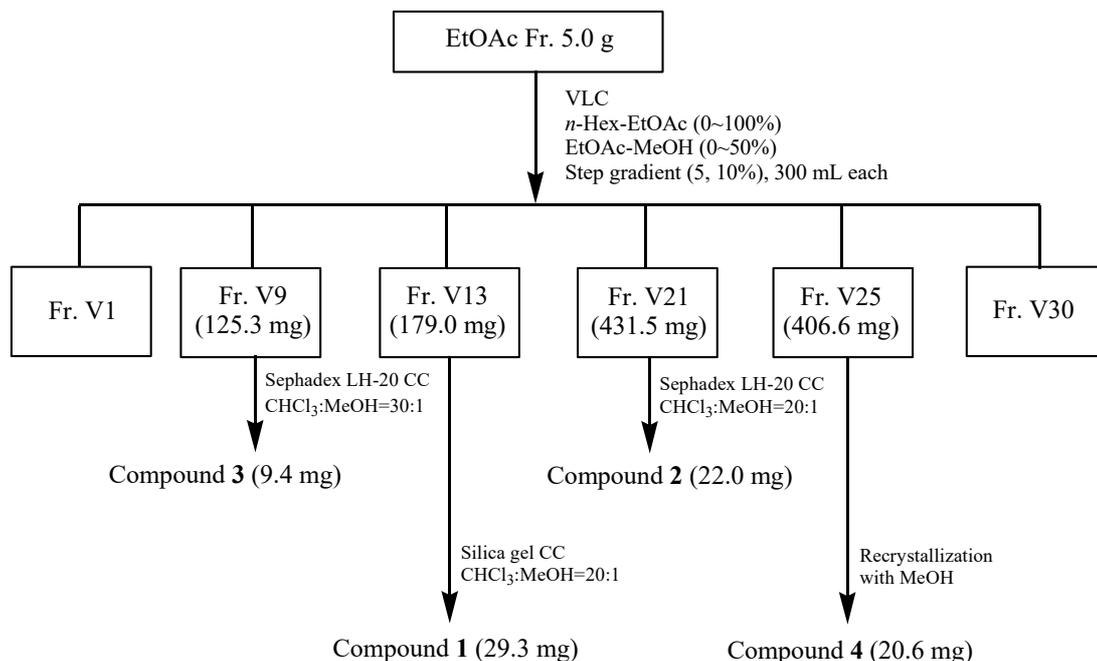


Figure 5. Isolation of compounds from *Citrus sunki* branches.

4. 활성실험

1) 항산화 활성

(1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법²¹⁾을 응용하여 실시하였다. 시료 용액 100 μL 에 증류수 900 μL 를 가하여 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 100 μL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na_2CO_3 용액 200 μL 를 가하여 혼합한 후 증류수 700 μL 을 가하여 total volume이 2 mL가 되도록 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하고, gallic acid를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 통해 시료의 총 폴리페놀 함량을 환산하였다. 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다(Figure 6).

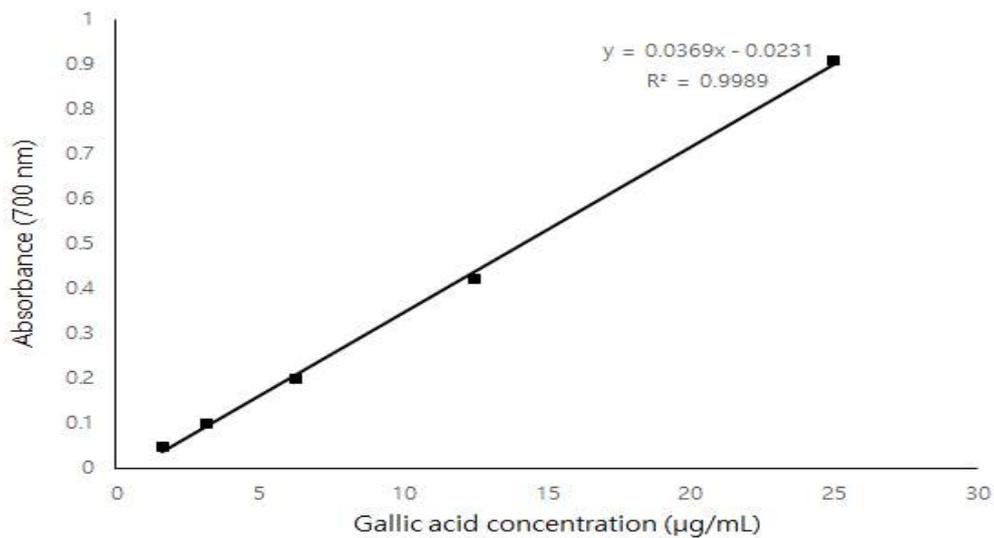


Figure 6. Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents.

(2) 총 플라보노이드 함량

총 flavonoids 함량은 Davis법²²을 응용하여 실시하였다. 시료 용액 15 μL 에 ethylene glycol 150 μL 를 가하여 혼합한 후 다시 0.1 N NaOH 15 μL 를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하고, quercetin을 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 통해 시료의 총 플라보노이드 함량을 환산하였다. 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이 었다(Figure 7).

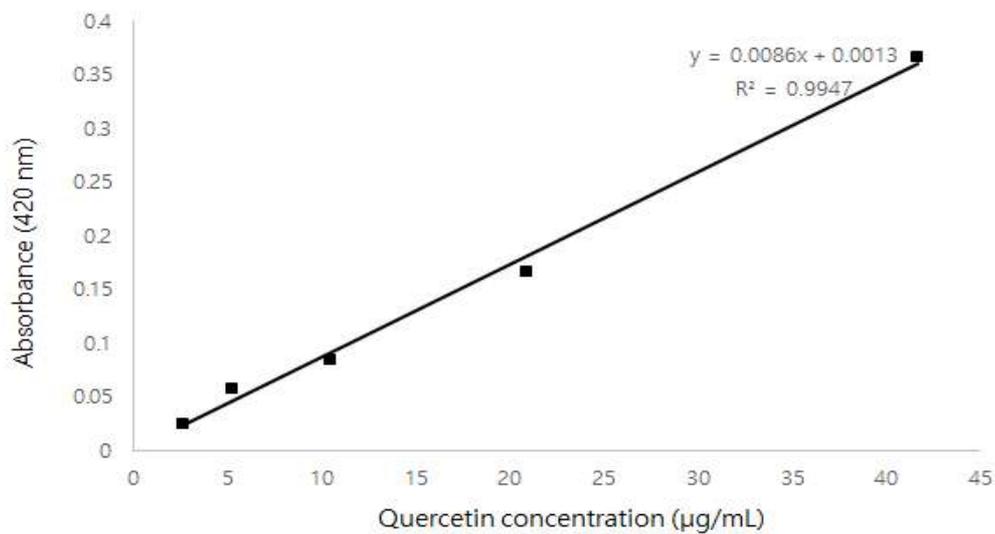


Figure 7. Calibration curve of standard quercetin for determination of total flavonoid contents

(3) DPPH radical 소거 활성

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radical들은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이

다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여 받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되어 515 nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있다(Figure 8).

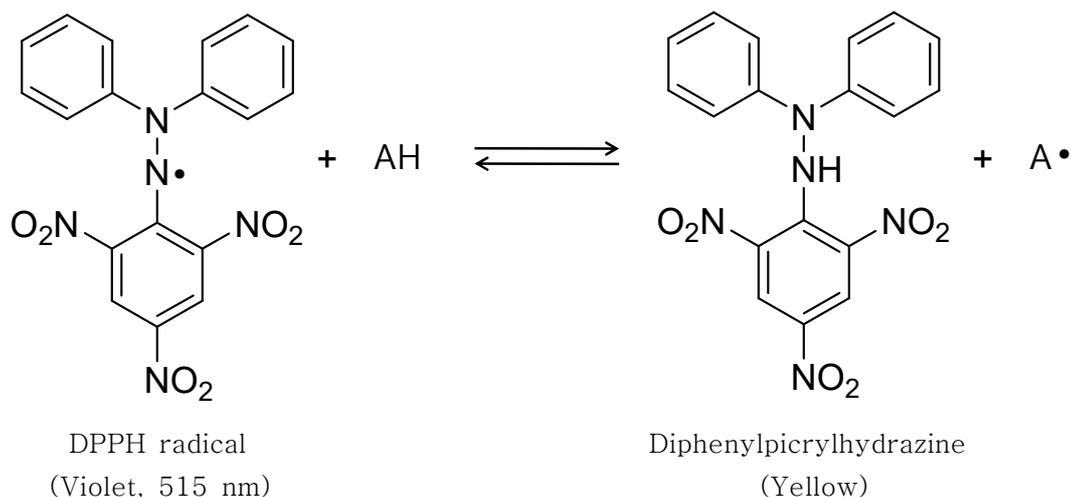


Figure 8. Principle of DPPH radical scavenging by an anti-oxidant.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법²³을 응용하여 실시하였다. DPPH free radical에 대한 시료의 전자공여능을 측정하기 위해, 시료 20 μ L에 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L를 가하여 실온에서 20 분간 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고, radical 소거 활성은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다. 또한, 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다.

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

A_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 515 nm에서 sample 자체의 흡광도

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성화

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 total antioxidant activity (TAC)의 측정방법 중의 한 가지로 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 특징적인 청록색을 띠는 ABTS⁺ radical이 형성되는 것을 이용하는 방법이다. 이 청록색의 ABTS⁺ radical은 산화될 수 있는 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 그와 반응한 물질의 산화가 일어나게 되어 흡광도의 감소가 일어나 항산화 능력을 측정할 수 있다(Figure 9).

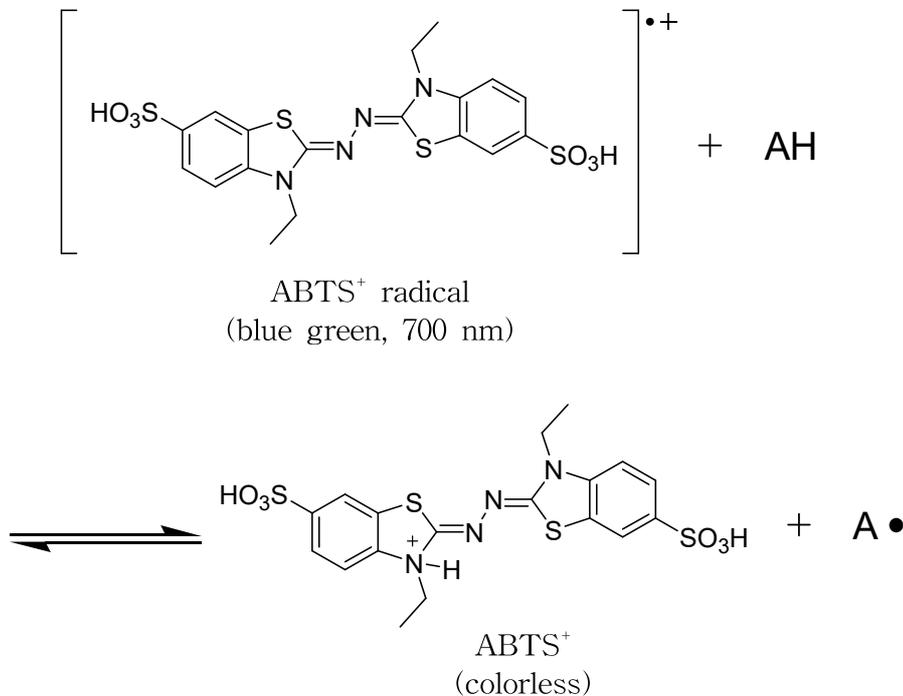


Figure 9. Principle of ABTS⁺ radical scavenging by an anti-oxidant.

ABTS⁺ radical 소거 활성화는 Re 등의 방법²⁴을 응용하여 실시하였다. ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하기 위해, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온, 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical을 형성시켰다. 이 용액을 ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78±0.02가

되도록 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 20 μ L에 희석한 ABTS⁺ 용액 180 μ L를 가하여 실온에서 15분 동안 반응시키고 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical 소거 활성은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산하였으며 각 시료의 radical 소거 활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도 (SC₅₀)를 구하였다.

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

A_{control} : 700 nm에서 ABTS⁺의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 sample과 ABTS⁺ 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도

2) 항염 활성

(1) RAW264.7 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온 기에서 배양하였으며, 2일 간격으로 계대 배양 하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well로 분주하고 37°C , 5% CO_2 조건하에서 18시간 전 배양하였다. $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 포함하는 배지로 교환해주고 sample을 농도 별로 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 생성된 NO의 양은 상등액 $100 \mu\text{L}$ 와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine in 2.5% phosphoric acid) $100 \mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응 시킨 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO_2)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 통해 정량하였다. 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

(3) 세포독성 평가

세포 독성은 MTT assay를 이용하여 실험하였다. 생존하면서 대사가 왕성한 세포는, 세포 내 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색인 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]를 환원시켜 보라색을 띠는 불용성 formazan을 형성한다(Figure 10).

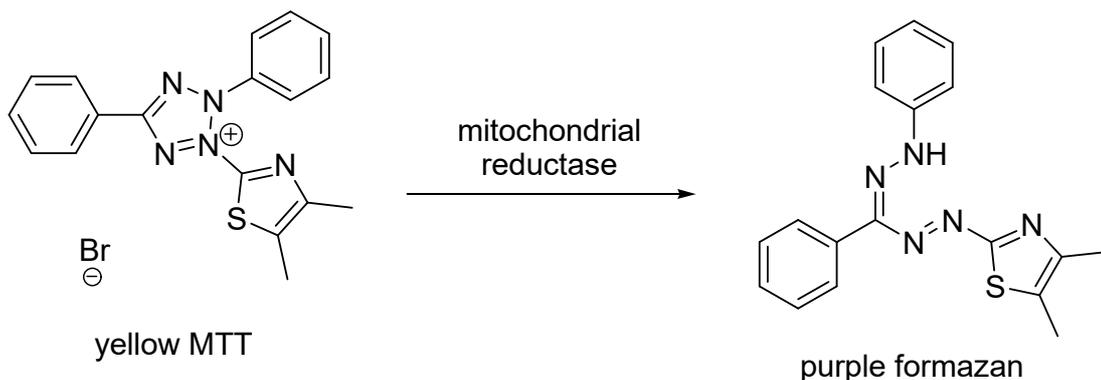


Figure 10. Principle of MTT assay.

RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환해주고 sample을 농도 별로 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37 °C에서 3시간 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

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

A_{control} : 용매를 처리한 후 형성된 formazan의 흡광도

A_{sample} : sample을 처리한 후 형성된 formazan의 흡광도

(4) PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 활성화

24 well plate에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환해주고 sample을 농도 별로 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포 배양 상층액의 cytokine 생성 함량을 각각 mouse TNF-α (Invitrogen, USA), IL-6 (Invitrogen, USA), IL-1β (R&D Systems, USA) 및 PGE₂ (R&D Systems, USA) ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) kit를 사용하여 정량 하였으며, 표준물질에 대한 표준검정곡선의 r²값은 0.99 이상이었다.

3) 항균 활성

(1) 균주 배양

황색포도상구균인 *Staphylococcus aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), 표피포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 여드름균인 *Propionibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *S. aureus*는 LB (Luria bertani) 배지로 배양하였고 *S. epidermidis*인 경우, 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37°C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다. *P. acnes*인 경우, 배양배지를 GAM broth로 하여 37°C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 배양하였다.

(2) Paper disc diffusion method

시료의 항균활성을 측정하기 위해 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089) 10종에 대하여 paper disc diffusion method로 생육 억제 활성을 측정하였다. 각 균주를 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 1.5×10^6 CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8 % agar를 포함하는 각각의 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 24시간 동안, *P. acnes*는 48시간 동안 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다 (Figure 11).

대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

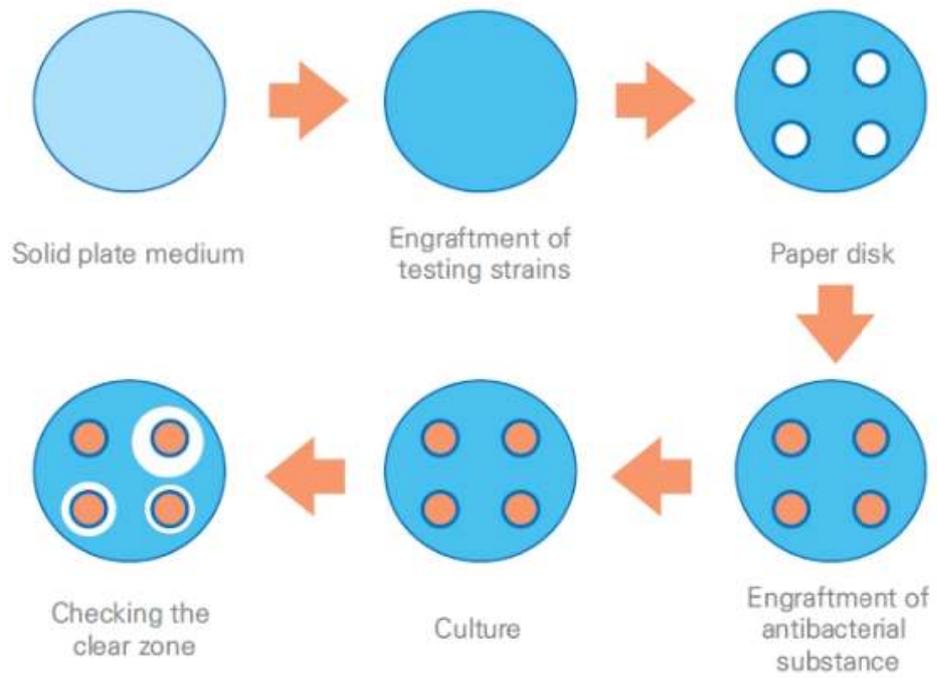


Figure 11. Paper disc diffusion test.

III. 결과

1. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 1의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, 21개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 62.5, 62.2, 62.1, 61.9, 56.3, 56.2 및 δ_{H} 4.11 (3H, s), 4.03 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.96 (3H, s)의 피크를 통해 6개의 methoxy group이 결합되어 있는 flavonoid 골격일 것이라 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.58 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz), 7.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.00 (1H, d, $J = 8.5$ Hz) 피크의 coupling constant값을 통하여 proton들 간의 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하고 있는 1개의 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 또한 δ_{H} 6.63 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton이며, δ_{C} 177.6 피크를 통해 1개의 carbonyl group이 분자 내에 존재함을 알 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁵을 통해 compound 1은 nobiletin (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone)으로 확인 되었다(Figure 12, 13, 14, Table 1).

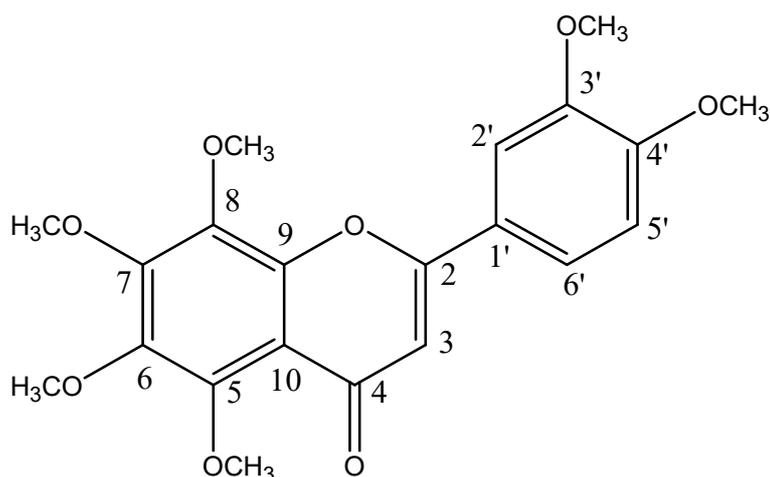


Figure 12. Chemical structure of compound 1.

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

No.	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		161.2
3	6.63 (1H, s)	107.1
4		177.6
5		144.3
6		138.2
7		151.6
8		147.9
9		148.6
10		115.0
1'		124.2
2'	7.42 (1H, d, 2.0)	108.7
3'		149.4
4'		152.1
5'	7.00 (1H, d, 8.5)	111.4
6'	7.58 (1H, dd 2.0, 8.5)	119.8
OCH_3	4.11 (3H, s)	62.5
OCH_3	4.03 (3H, s)	62.2
OCH_3	3.99 (3H, s)	62.1
OCH_3	3.97 (3H, s)	61.9
OCH_3	3.96 (3H, s)	56.3
OCH_3	3.96 (3H, s)	56.2

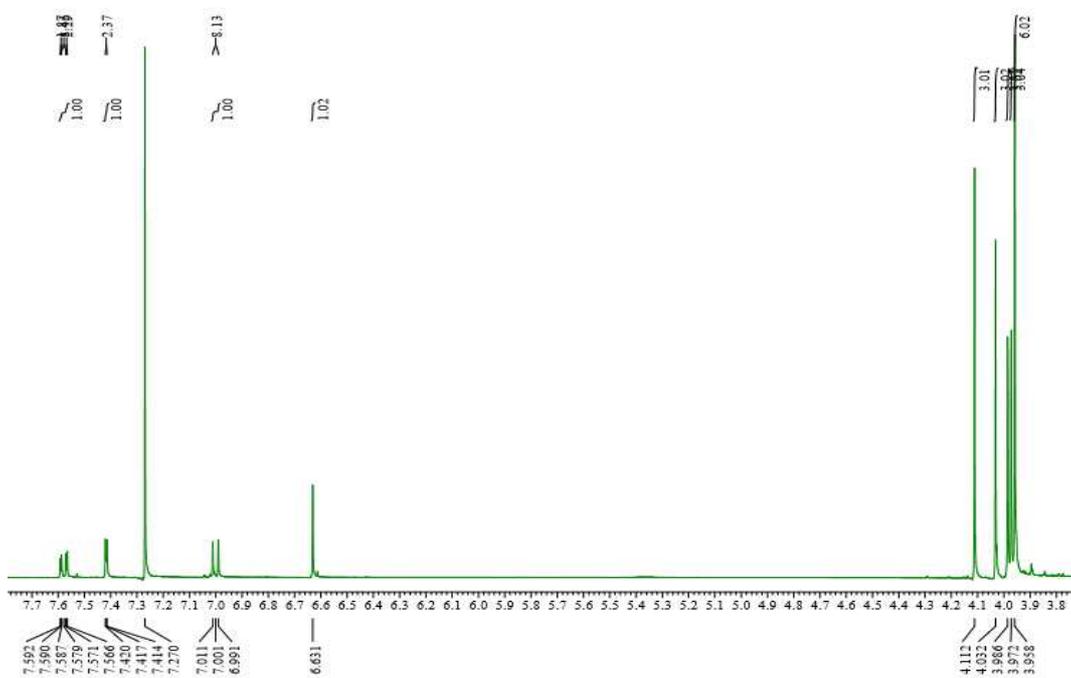


Figure 13. ^1H NMR spectrum of compound **1** (CDCl_3).

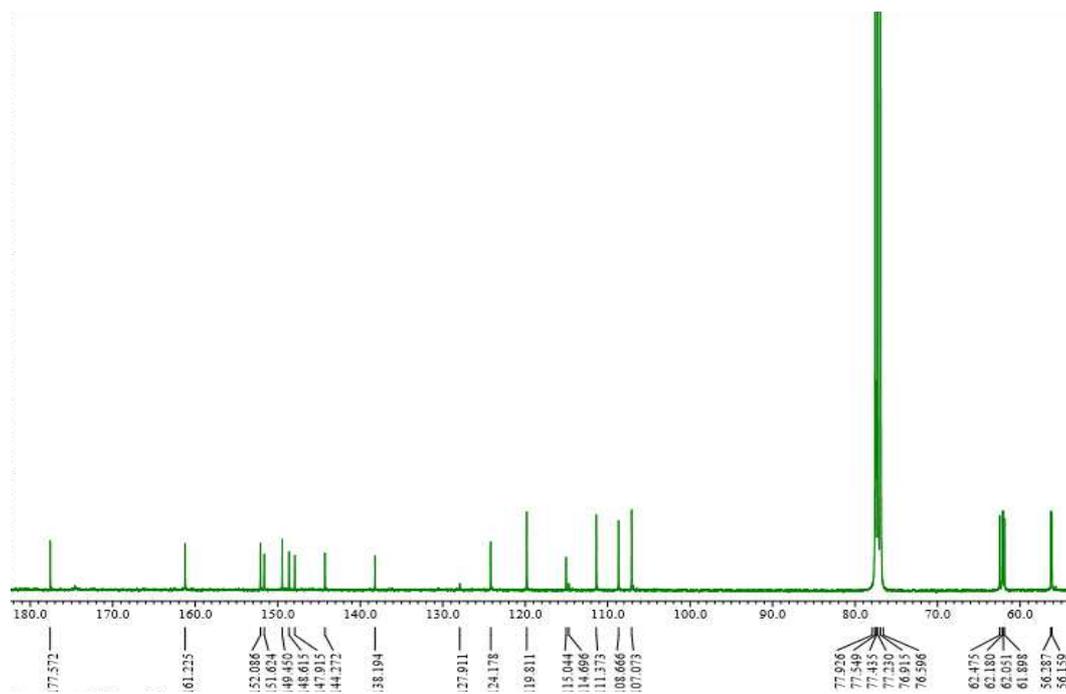


Figure 14. ^{13}C NMR spectrum of compound **1** (CDCl_3).

2) Compound 2의 구조 동정

Compound 2는 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, 17개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 61.8, 56.7, 56.4, 55.6 및 δ_{H} 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.89 (3H, s)의 피크를 통해 4개의 methoxy group이 분자 내에 존재함을 예상할 수 있고 δ_{C} 178.1의 피크를 통해 1개의 carbonyl group이 있음을 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.89 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.02 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) 피크의 coupling constant 및 적분 값을 통해 서로 *ortho*-coupling을 하는 대칭인 2개의 aromatic proton이 있음을 알 수 있으며, δ_{H} 6.60 (1H, s), 6.44 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합되어 있는 proton이다. 이들을 종합하여 보면, 4개의 methoxy group이 결합되어 있는 B ring이 대칭인 flavonoid 골격의 구조를 예상할 수 있으며, 문헌^{26,27}을 통해 compound 2는 6-demethoxytangeretin (5,7,8,4'-tetramethoxyflavone)으로 확인 되었다(Figure 15, 16, 17, Table 2).

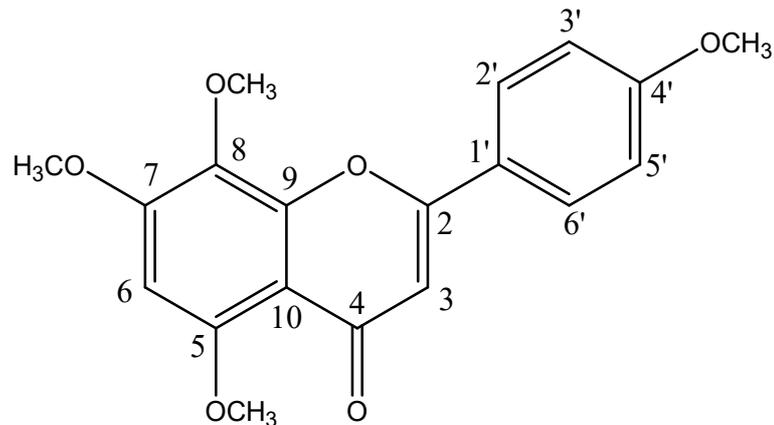


Figure 15. Chemical structure of compound 2.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (400 and 100 MHz, CDCl_3)

No.	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		162.4
3	6.60 (1H, s)	107.1
4		178.1
5		152.1
6	6.44 (1H, s)	92.7
7		156.6
8		130.9
9		156.5
10		109.2
1'		124.1
2'	7.89 (2H, d, 8.7)	127.8
3'	7.02 (2H, d, 8.7)	114.6
4'		160.8
5'	7.02 (2H, d, 8.7)	114.5
6'	7.89 (2H, d, 8.7)	127.8
OCH_3	4.01 (3H, s)	61.8
OCH_3	3.99 (3H, s)	56.7
OCH_3	3.96 (3H, s)	56.4
OCH_3	3.89 (3H, s)	55.6

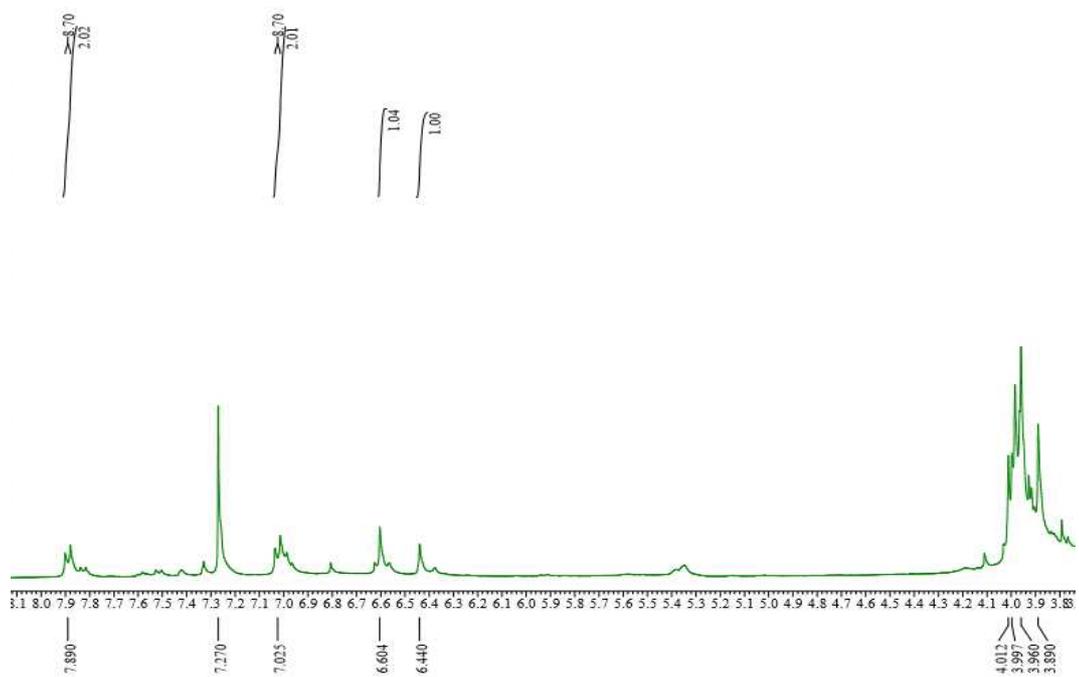


Figure 16. ^1H NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

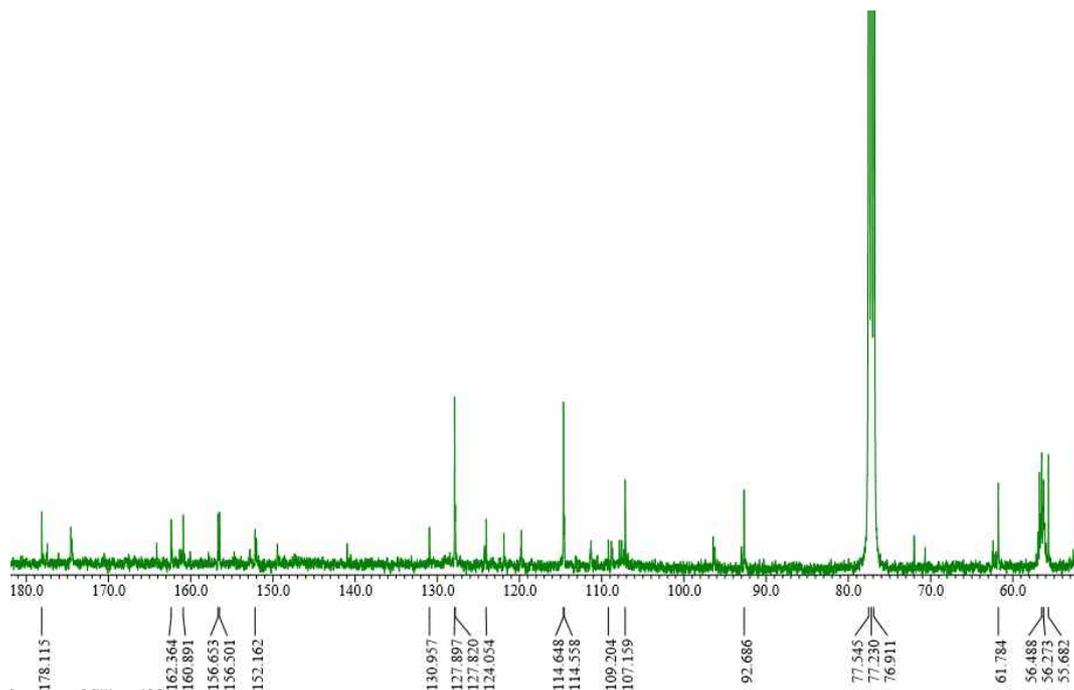


Figure 17. ^{13}C NMR spectrum of compound **2** (CDCl_3).

3) Compound 3의 구조 동정

Compound 3은 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, 19개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 62.3, 61.9, 61.3, 56.2 및 δ_{H} 4.12 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.95 (3H, s)의 피크를 통해 flavonoid 골격에 4개의 methoxy group이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.55 (1H, dd, $J = 1.4, 8.2$ Hz), 7.42 (1H, d, $J = 1.4$ Hz) 및 7.06 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)의 피크를 통해 flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton이 있으며, δ_{H} 6.60 (1H, s)의 피크는 sp^2 혼성을 하는 carbon에 결합하고 있는 proton으로 예상할 수 있다. 또한 δ_{C} 183.2 피크를 통해 1개의 carbonyl group이 분자 내에 존재함을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁸을 통해 compound 3은 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone으로 확인 되었다(Figure 18, 19, 20, Table 3).

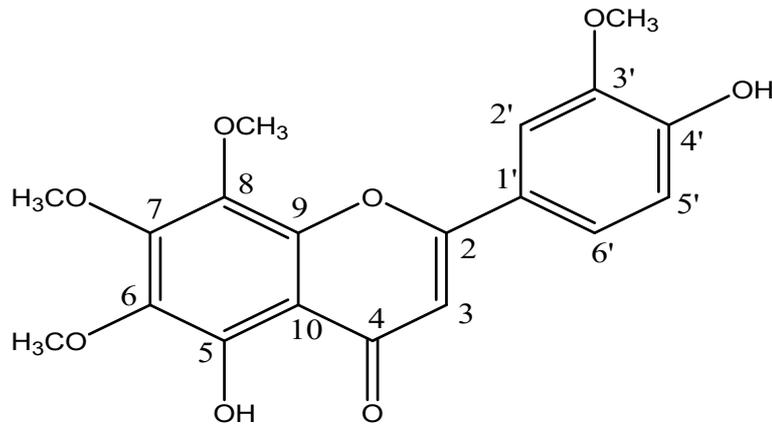


Figure 18. Chemical structure of compound 3.

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

No.	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		164.2
3	6.60 (1H, s)	104.0
4		183.2
5		149.6
6		136.8
7		153.2
8		133.1
9		149.8
10		107.1
1'		123.5
2'	7.42 (1H, d, 1.4)	108.5
3'		145.9
4'		147.1
5'	7.06 (1H, d, 8.2)	115.3
6'	7.55 (1H, dd, 1.4, 8.2)	120.9
6-OCH ₃	3.95 (3H, s)	61.3
7-OCH ₃	4.12 (3H, s)	61.9
8-OCH ₃	3.96 (3H, s)	62.3
3'-OCH ₃	4.01 (3H, s)	56.2

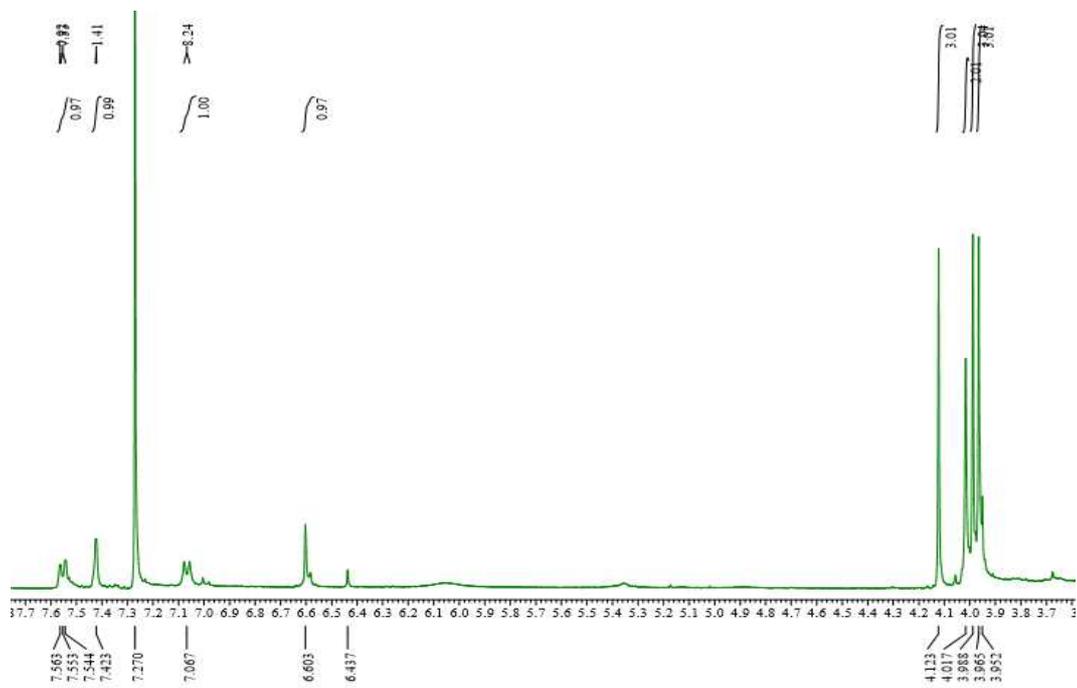


Figure 19. ^1H NMR spectrum of compound **3** (CDCl_3).

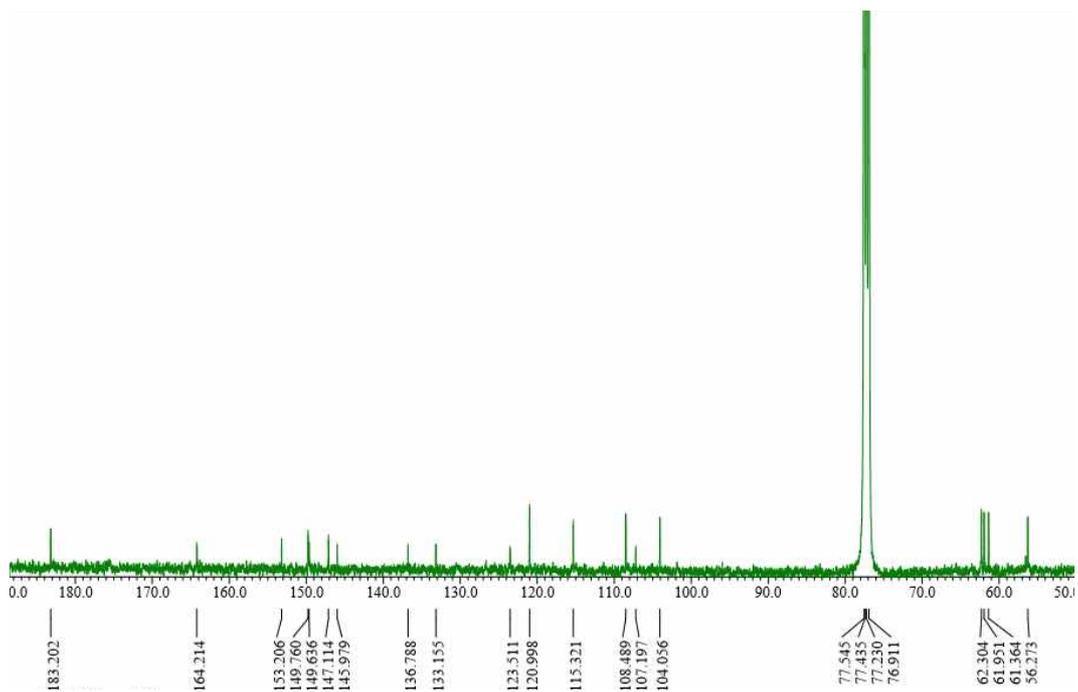


Figure 20. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** (CDCl_3).

4) Compound 4의 구조 동정

Compound 4는 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, 27개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 55.7 및 δ_{H} 3.77 (3H, s) 의 피크를 통해 methoxy group이 1개 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 3.10–3.70 의 overlap 되어 있는 여러 개의 proton 피크와 δ_{H} 4.97 (1H, d, $J = 7.3$ Hz) 및 δ_{H} 4.52 (1H, brs)에 해당하는 당의 anomeric proton, 그리고 ^{13}C NMR spectrum에서 15개의 flavonoid 골격의 피크와 1개의 methoxy group 외에 12개의 carbon 피크가 더 관찰되는 것으로 보아, flavonoid 골격에 두 개의 육탄당이 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. δ_{H} 6.94 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 1.4$ Hz) 및 6.89 (1H, dd, $J = 1.4, 7.8$ Hz)의 피크로 보아, flavonoid의 B ring에 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하는 3개의 aromatic proton이 있으며, δ_{H} 6.14 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), δ_{H} 6.12 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)의 피크로 보아 A ring에는 서로 *meta*-coupling을 하는 aromatic proton이 있음을 예상할 수 있다. δ_{H} 1.08 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)와 δ_{H} 4.52 (1H, brs) 피크의 coupling constant 및 적분값을 통해 α -form의 rhamnopyranoside를 예상하였고, δ_{H} 4.97 (1H, d, $J = 7.3$ Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 β -form의 glucopyranoside가 결합되어 있는 구조인 것을 예상할 수 있다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌^{29,30}을 통해 compound 4는 hesperidin으로 확인 되었다(Figure 21, 22, 23, Table 4).

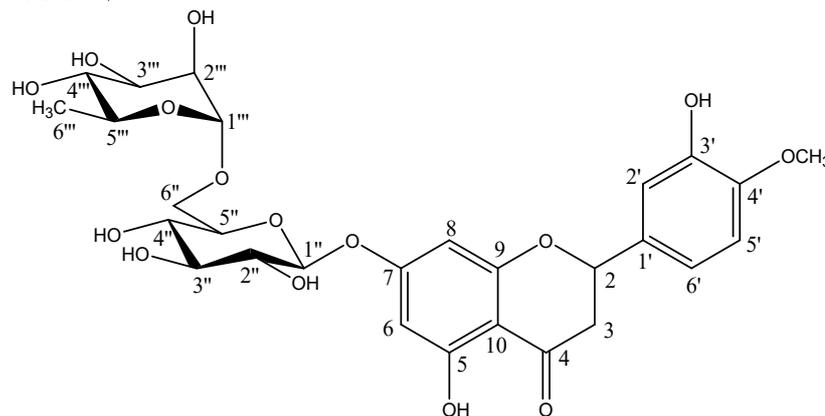


Figure 21. Chemical structure of compound 4.

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **4** (400 and 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2	5.50 (1H, dd, 12.4, 2.7)	78.4
3	2.77 (1H, dd, 17.2, 3.2)	42.0
	3.10-3.70 (1H, overlap)	
4		197.0
5		163.0
6	6.12 (1H, d, 2.3)	96.3
7		165.1
8	6.14 (1H, d, 2.3)	95.5
9		162.5
10		103.3
1'		130.9
2'	6.93 (1H, d, 1.4)	114.1
3'		146.4
4'		148.0
5'	6.94 (1H, d, 7.8)	112.0
6'	6.89 (1H, dd, 1.4, 7.8)	117.9
1''	4.97 (1H, d, 7.3)	99.4
2''	3.10-3.70	70.2
3''	3.10-3.70	75.5
4''	3.10-3.70	68.3
5''	3.10-3.70	76.2
6''	3.10-3.70	66.0
1'''	4.52 (1H, brs)	100.6
2'''	3.10-3.70	72.0
3'''	3.10-3.70	69.6
4'''	3.10-3.70	70.7
5'''	3.10-3.70	73.0
6'''	1.08 (3H, d, 6.0)	17.8
4'-OCH ₃	3.77 (3H, s)	55.7

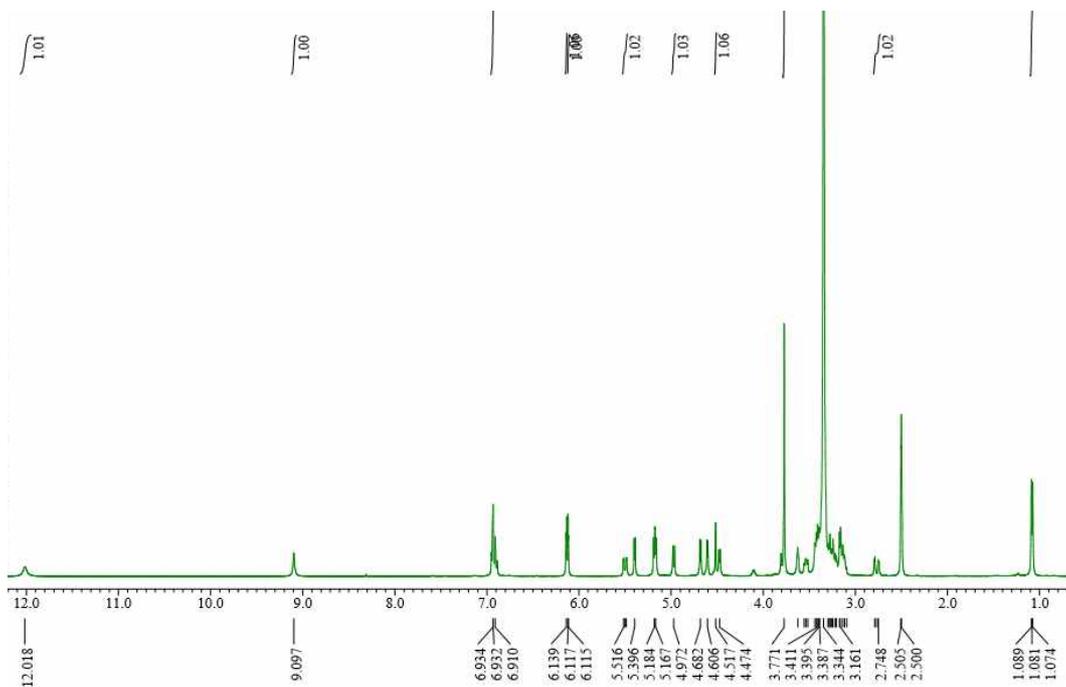


Figure 22. ^1H NMR spectrum of compound 4 ($\text{DMSO}-d_6$).

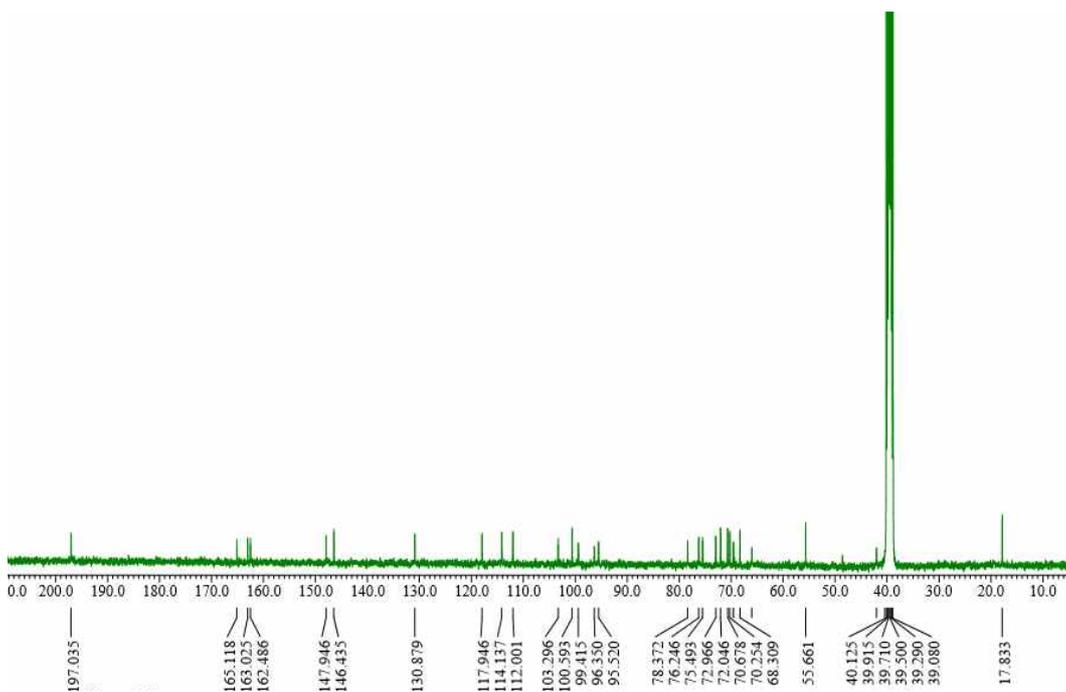


Figure 23. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 ($\text{DMSO}-d_6$).

2. 진균 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항산화 활성

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선을 작성하여 진균 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 그 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물에서 각각 71.9, 56.8 mg/g GAE로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 24). 이는 다른 항산화 활성 실험결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다.

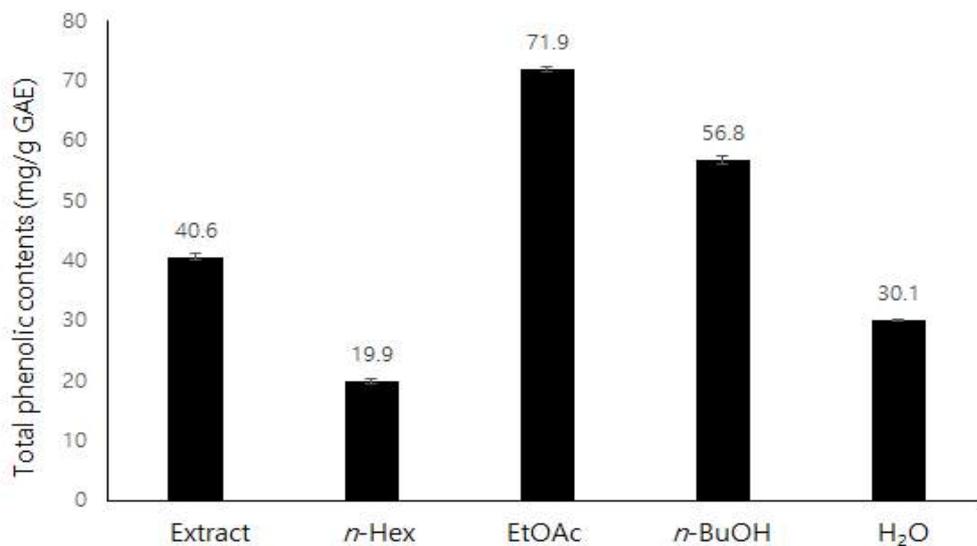


Figure 24. Total phenolic contents of extract and solvent fractions from *C. sunki* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

Quercetin 표준 용액을 사용한 표준 곡선을 작성하여 진굴 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, EtOAc 분획물에서 79.9 mg/g QE로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다 (Figure 25).

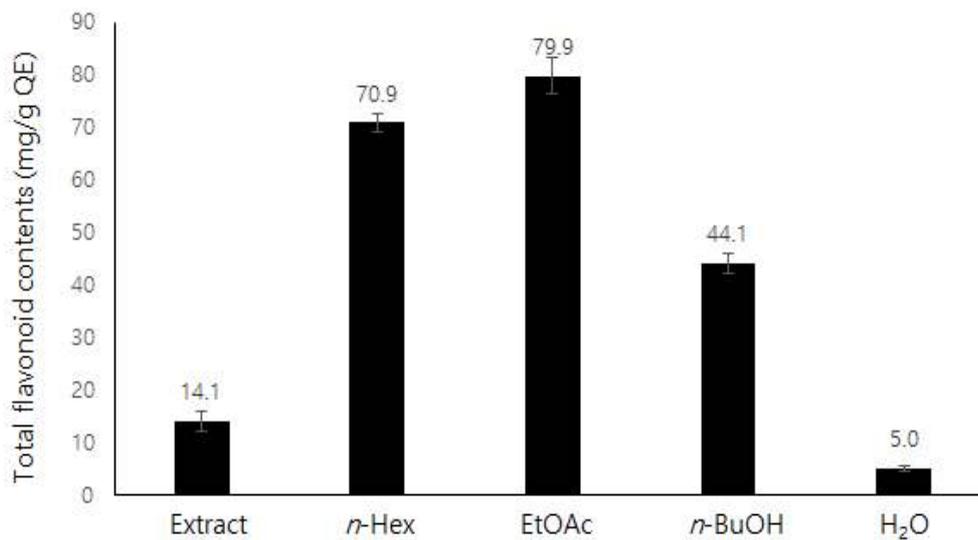


Figure 25. Total flavonoid contents of extract and solvent fractions from *C. sunki* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(3) DPPH radical 소거 활성

진균 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 분획물에 대하여 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 모든 분획물에서 농도의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 보였고, 각 분획물들의 SC₅₀값은 Extract(505.1 µg/mL), *n*-Hex 분획물(864.2 µg/mL), EtOAc 분획물(205.7 µg/mL), *n*-BuOH 분획물(422.9 µg/mL)로 확인되었다(Figure 26, Table 5).

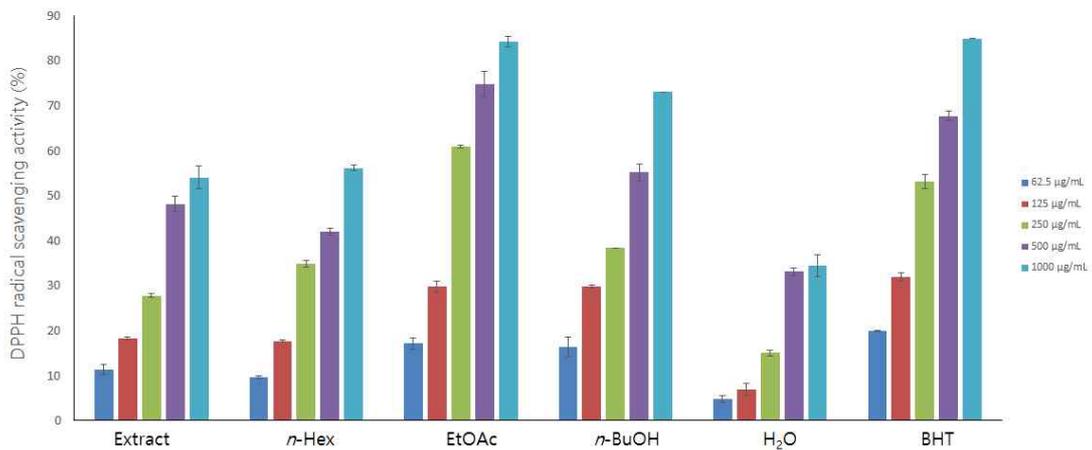


Figure 26. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. sunki* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 5. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for *C. sunki* branches

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	505.1	864.2	205.7	422.9	>1000	231.1

(4) ABTS⁺ radical 소거 활성

진균 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 분획물에 대하여 6.26, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과, 모든 분획물에서 농도의존적으로 ABTS⁺ radical 소거 활성을 보였고 각 분획물들의 SC₅₀값은 Extract(187.5 µg/mL), EtOAc 분획물(57.3 µg/mL), *n*-BuOH 분획물(81.6 µg/mL), H₂O 분획물(160.3 µg/mL)로 확인하였다(Figure 27, Table 6).

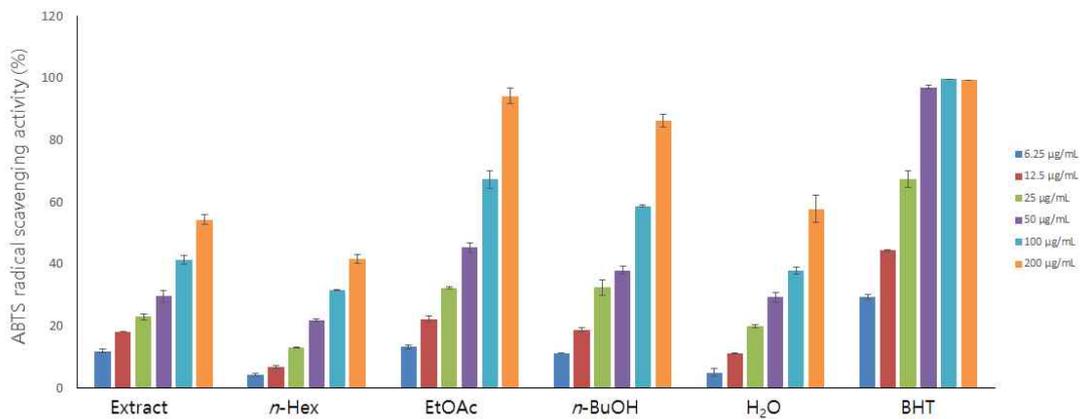


Figure 27. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. sunki* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 6. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for *C. sunki* branches

	Extract	<i>n</i> -Hex	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	187.5	>200	57.3	81.6	160.3	16.1

2) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

진굴 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물의 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 진굴 가지 70% EtOH 추출물 및 분획물에 대해 100 µg/mL의 농도로 NO 생성을 확인한 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 NO 생성이 감소하는 것을 확인하였으나 세포 독성 측정 결과 *n*-Hex 분획물에서 세포 독성이 나타남을 확인하였다.(Figure 28). EtOAc 분획물에서는 100 µg/mL 농도에서 세포 독성 없이 NO를 80% 이상 크게 감소시키는 것을 확인함에 따라 EtOAc 분획물을 추가적으로 40, 60, 80, 100 µg/mL 농도에서 실험을 진행하였다. 그 결과, EtOAc 분획물이 세포독성 없이 농도가 높아짐에 따라 NO 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으며, IC₅₀값은 64.7 µg/mL로 확인되었다(Figure 29).

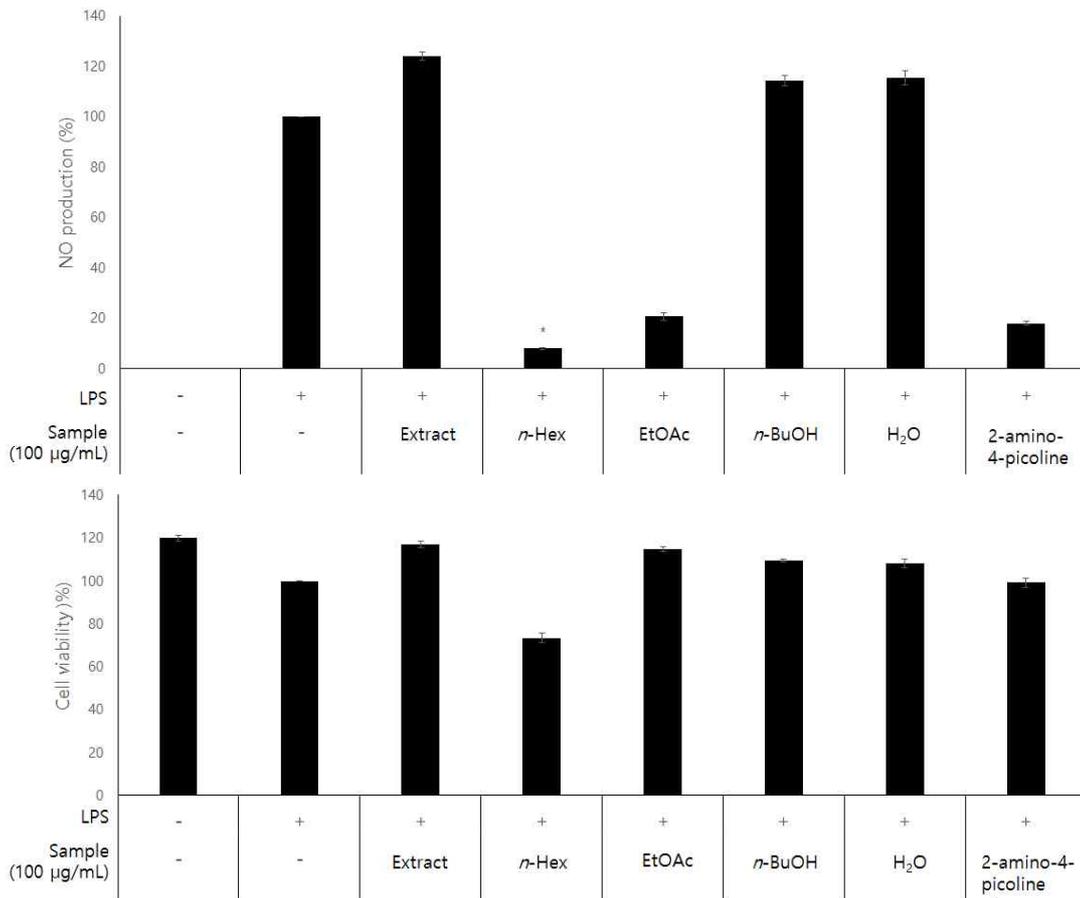


Figure 28. Effects of extract and solvent fractions from *C. sunki* branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *C. sunki* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. sunki* branches. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

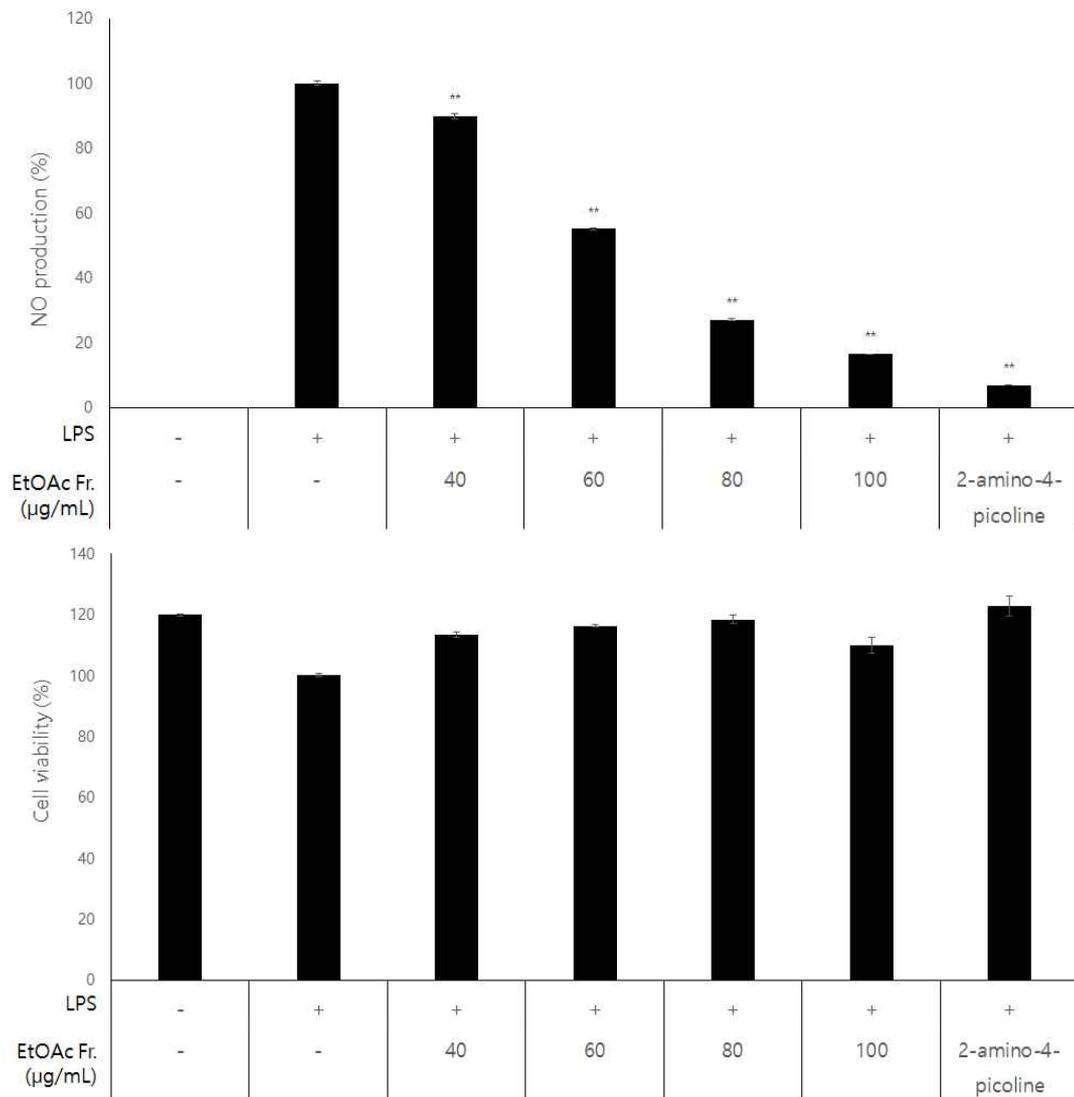


Figure 29. Effects of EtOAc fraction from *C. sunki* branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *C. sunki* branches EtOAc fraction and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of EtOAc fraction. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성

농도별로 NO 생성 억제 실험을 진행한 EtOAc 분획물에 대하여 항염 활성 기전을 연구하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 실험 결과 EtOAc 분획물은 PGE₂ 및 IL-1 β , IL-6의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다. 그러나 TNF- α 의 경우 활성이 나타나지 않았다(Figure 30-33). PGE₂ 및 IL-1 β , IL-6의 IC₅₀값은 각각 40.5, 55.1, 96.7 μ g/mL로 확인되었다(Table 7).

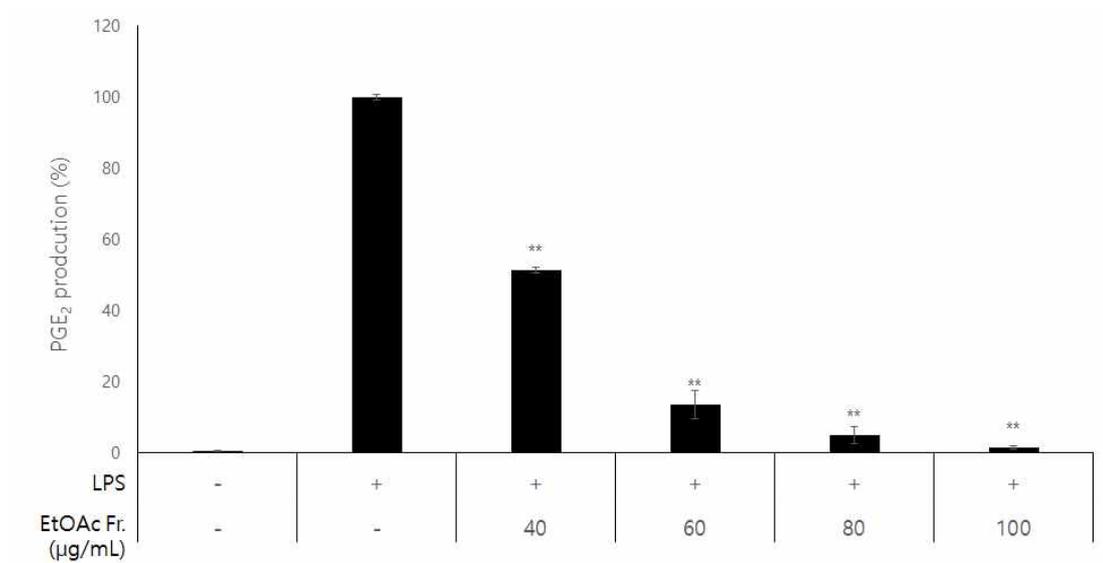


Figure 30. Effects of EtOAc fraction from *C. sunki* branches on PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01.

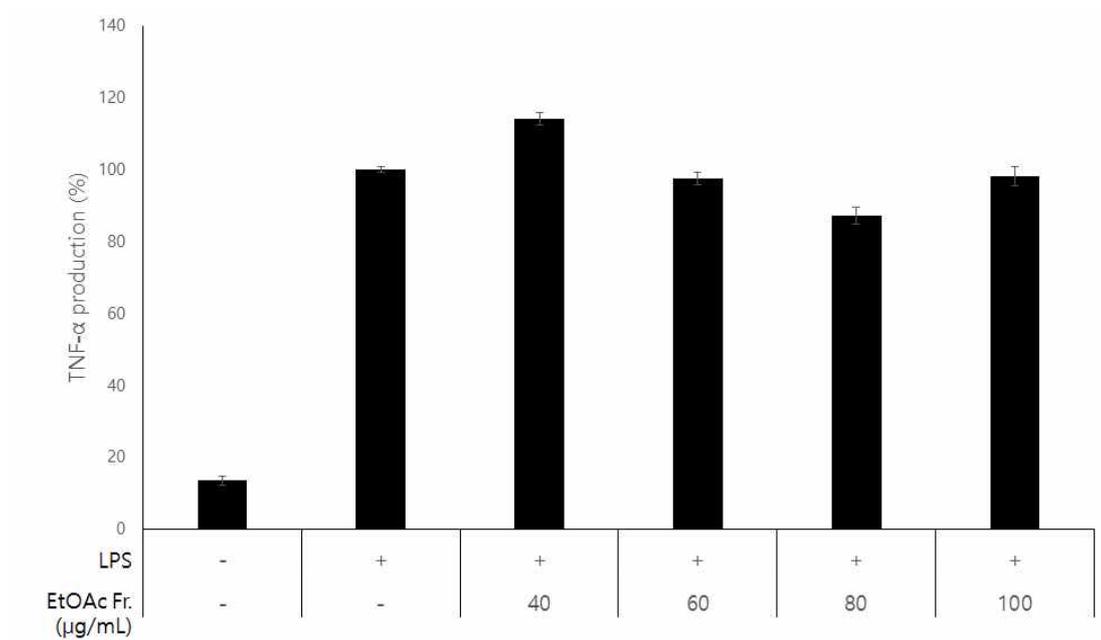


Figure 31. Effects of EtOAc fraction from *C. sunki* branches on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

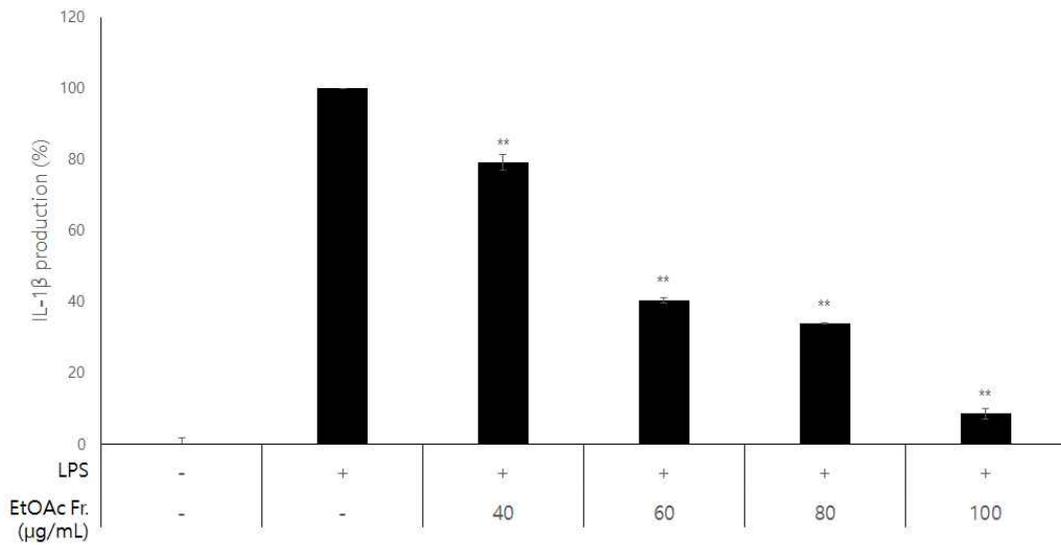


Figure 32. Effects of EtOAc fraction from *C. sunki* branches on IL-1 β production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

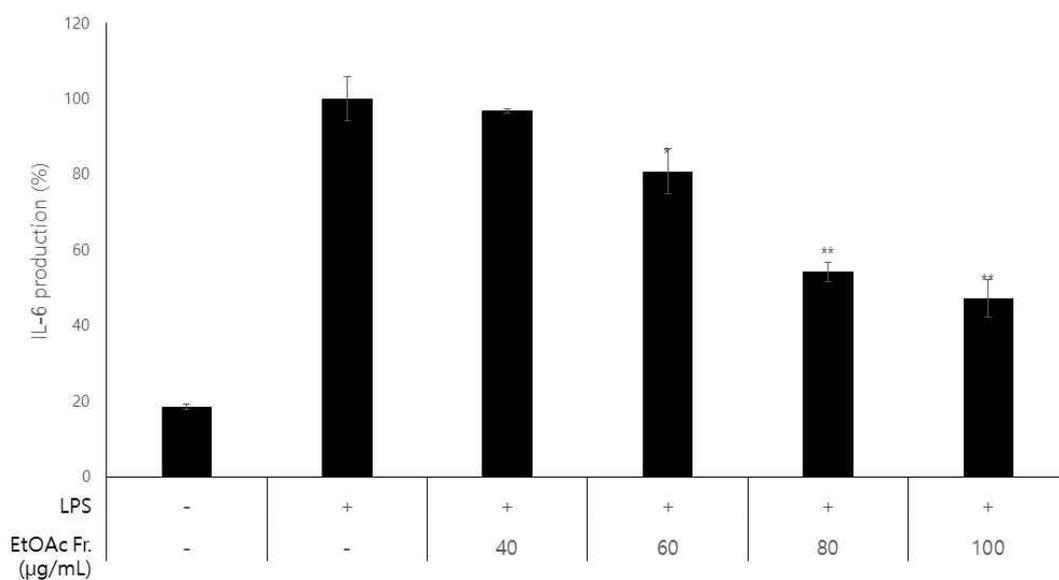


Figure 33. Effects of EtOAc fraction from *C. sunki* branches on IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table 7. IC₅₀ values of *C. sunki* branches on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF- α	IL-1 β	IL-6
IC ₅₀ (µg/mL)	40.5	N.A.	55.1	96.7

* N.A. : No Activity

3) 항균 활성

진굴 가지 *n*-Hex, EtOAc 분획물에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 paper disc diffusion method로 clear zone을 확인하였다. 그 결과 진굴 가지 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 9009) 균에 대한 항균 활성이 있음을 확인하였다(Figure 34, Table 8).

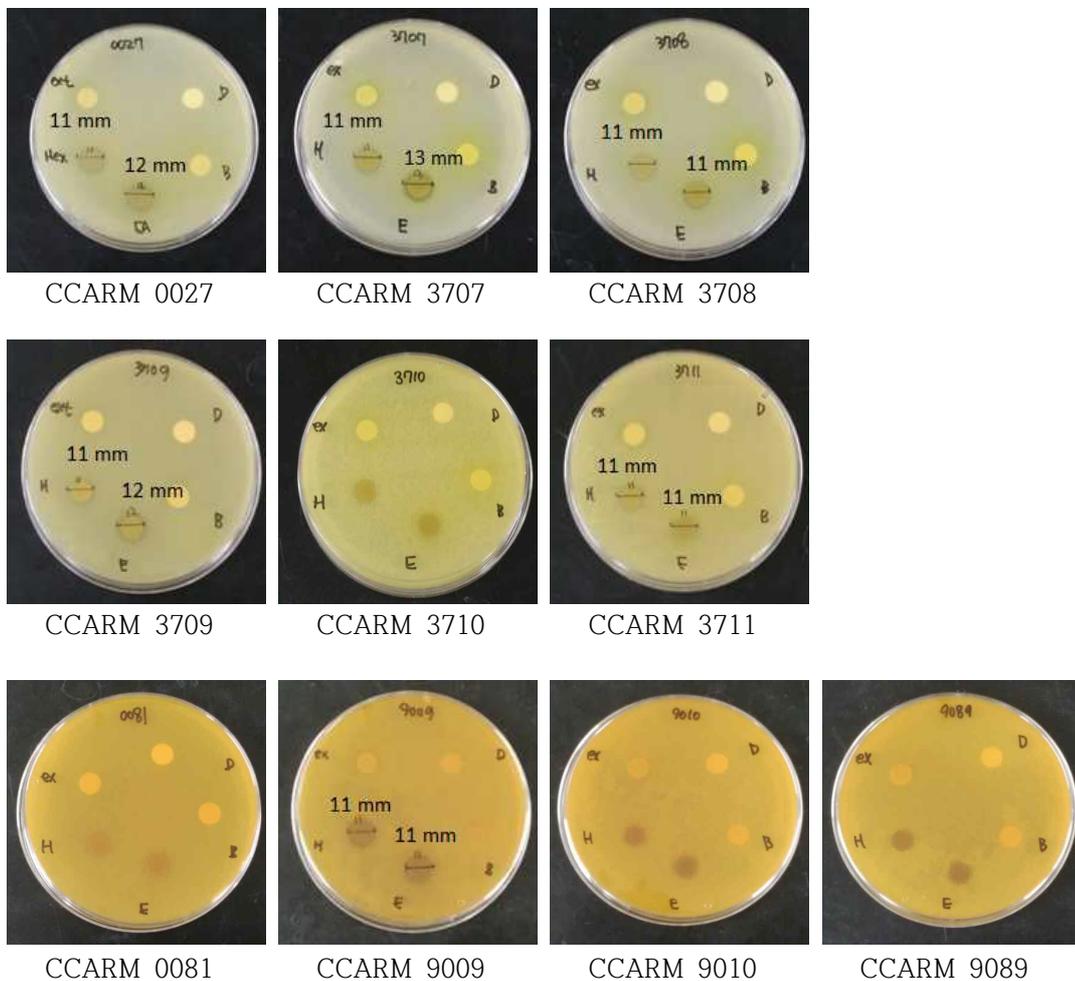


Figure 34. Anti-bacterial activities of extract and solvent fractions from *C. sunki* branches on *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes*.

Table 8. Anti-bacterial activities of *n*-Hex and EtOAc fraction from *C. sunki* branches determined by the paper diffusion method

	Clear zone (mm)									
	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>			
	CCARM 0027	CCARM 3707	CCARM 3708	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
<i>n</i> -Hex	11	11	11	11	N.D.	11	N.D.	11	N.D.	N.D.
EtOAc	12	13	11	12	N.D.	11	N.D.	11	N.D.	N.D.
Erythromycin	22	34	11	30	N.D.	28	28	32	32	33

* Sample : 2 mg

* Positive control : erythromycin (20 µg)

* Disc size : 8 mm

* N.D. : Not detected

3. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항염 활성

(1) Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

진굴 가지로부터 분리한 화합물에 대한 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포독성(MTT assay)을 확인하였다. 각각의 화합물에 대하여 100, 200 μ M의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, compound 4는 세포독성이 있는 반면에 compound 1, 3에서 세포독성 없이 NO 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다(Figure 35). compound 3의 IC₅₀값은 139.5 μ M로 확인할 수 있었다(Table 10). 이 중 compound 1에 대해서는 항염 활성 기전 연구가 보고되어 있으므로³¹ 추가적인 기전 연구를 진행하지 않았으며, compound 3은 추가적으로 항염 활성 기전 연구를 진행하였다(Figure 36).

Table 9. IC₅₀ values of isolated compounds from *C. sunki* branches on NO production using RAW264.7 cells

Compound	1	3	4
IC ₅₀ (μ M)	<100	139.5	>200

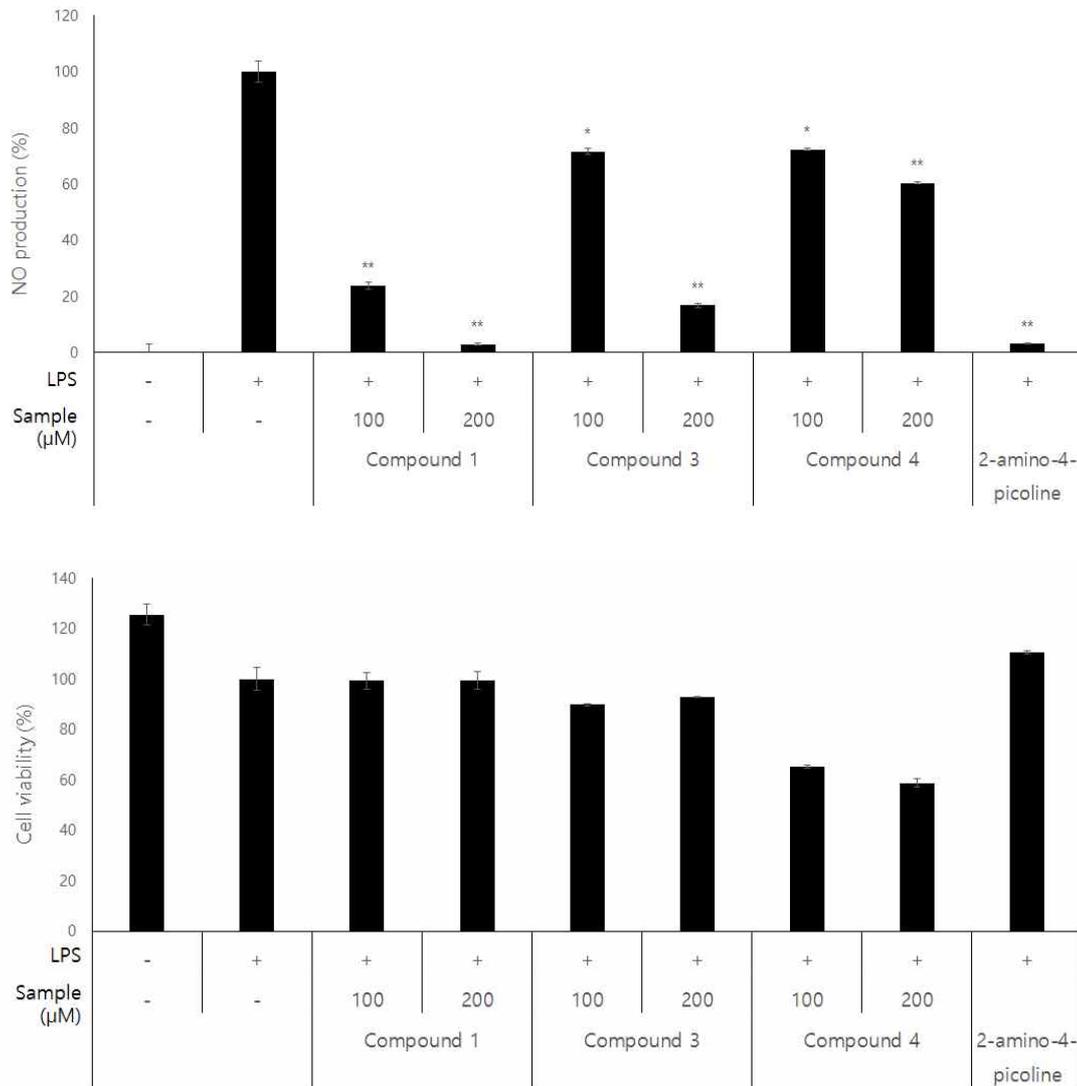


Figure 35. Effects of compound 1, 3 and 4 from *C. sunki* branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus *C. sunki* branches compound 1, 3, 4 and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 μM) for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of compound 1, 3 and 4. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

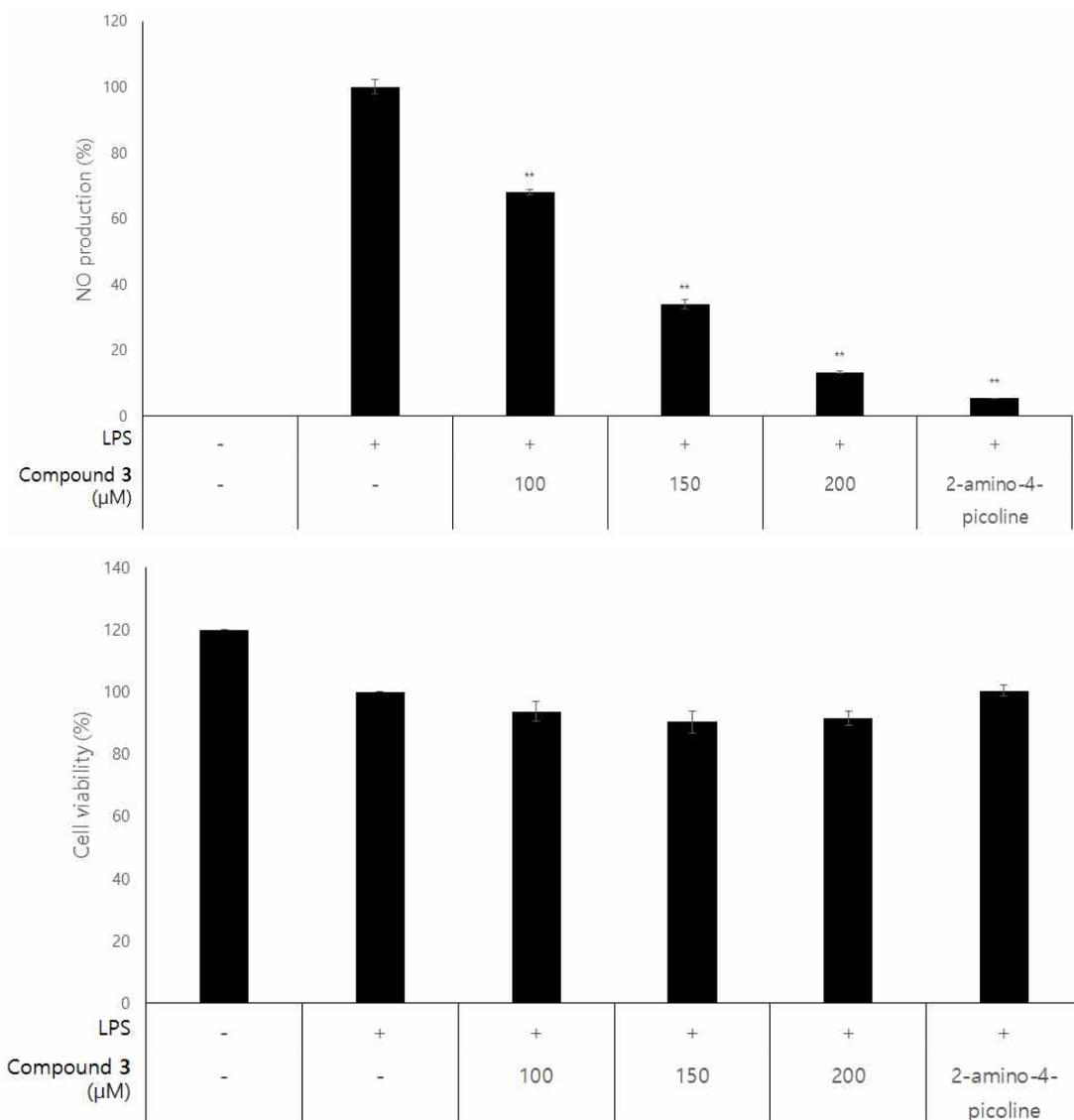


Figure 36. Effects of compound **3** from *C. sunki* branches on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus *C. sunki* branches compound **3** and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 μM) for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of compound **3**. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(2) Compound 3의 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β 및 IL-6) 생성 억제 활성

진굴 가지에서 분리된 화합물인 compound 3에 대한 항염 활성 연구가 보고 되어 있지 않아 sandwich ELISA kit를 이용하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-1β 및 IL-6) 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, PGE₂, IL-1β 및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 억제 시키는 것을 확인하였고, TNF-α는 약간 감소시키는 것을 확인하였다(Figure 37-40). PGE₂, IL-1β, IL-6의 IC₅₀값은 각각 150.8, 154.2, 138.6 μM로 확인되었다(Table 10).

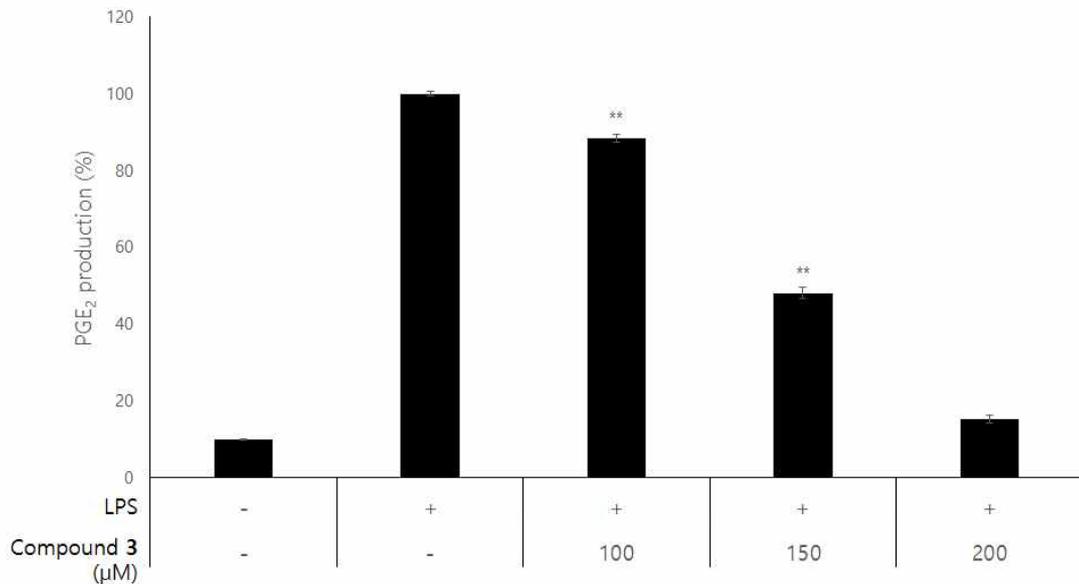


Figure 37. Effect of isolated compound 3 from *C. sunki* branches on PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

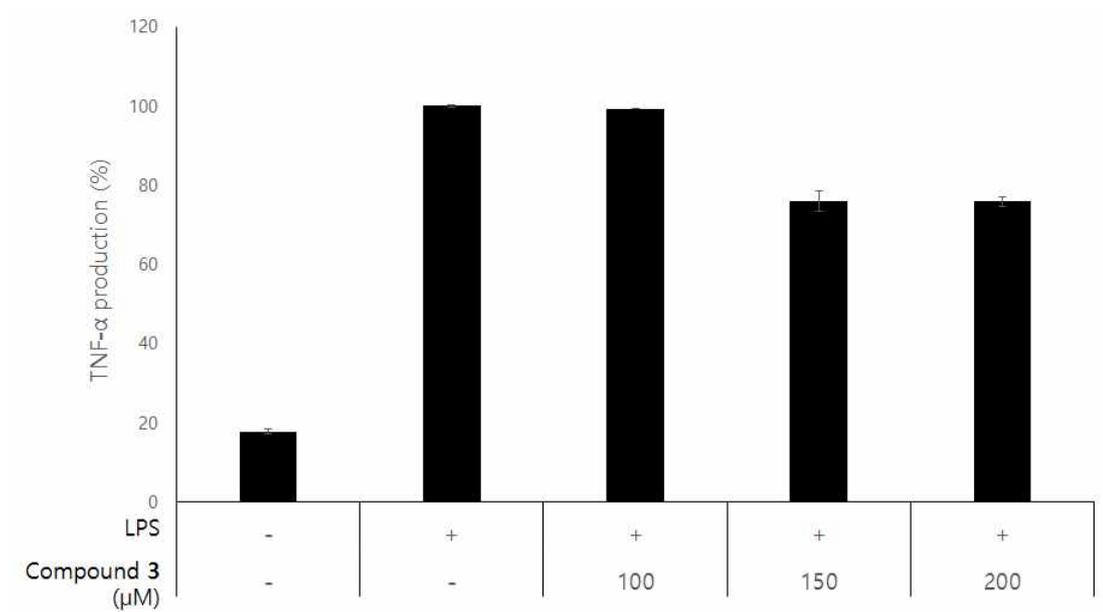


Figure 38. Effect of isolated compound **3** from *C. sunki* branches on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

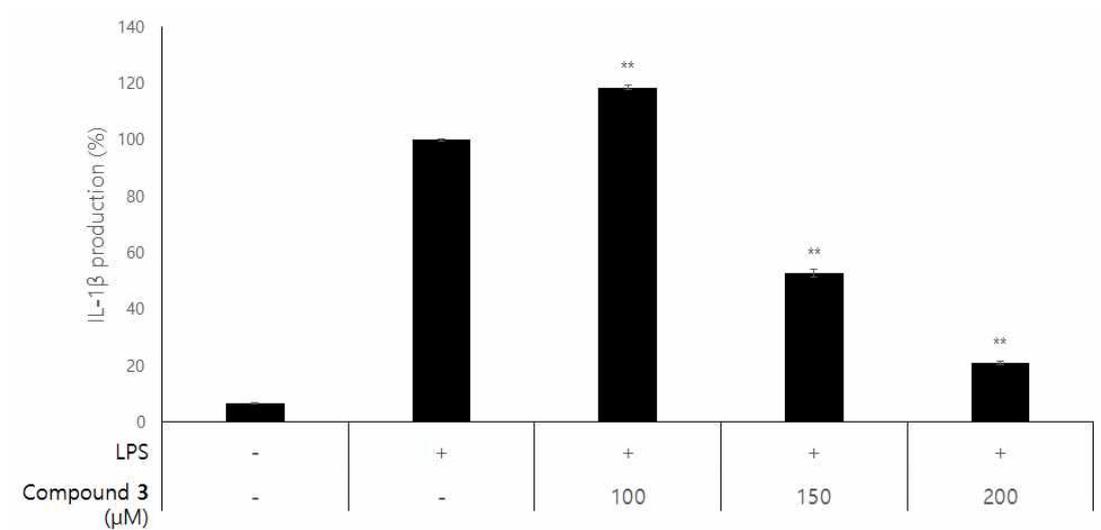


Figure 39. Effect of isolated compound **3** from *C. sunki* branches on IL-1 β production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

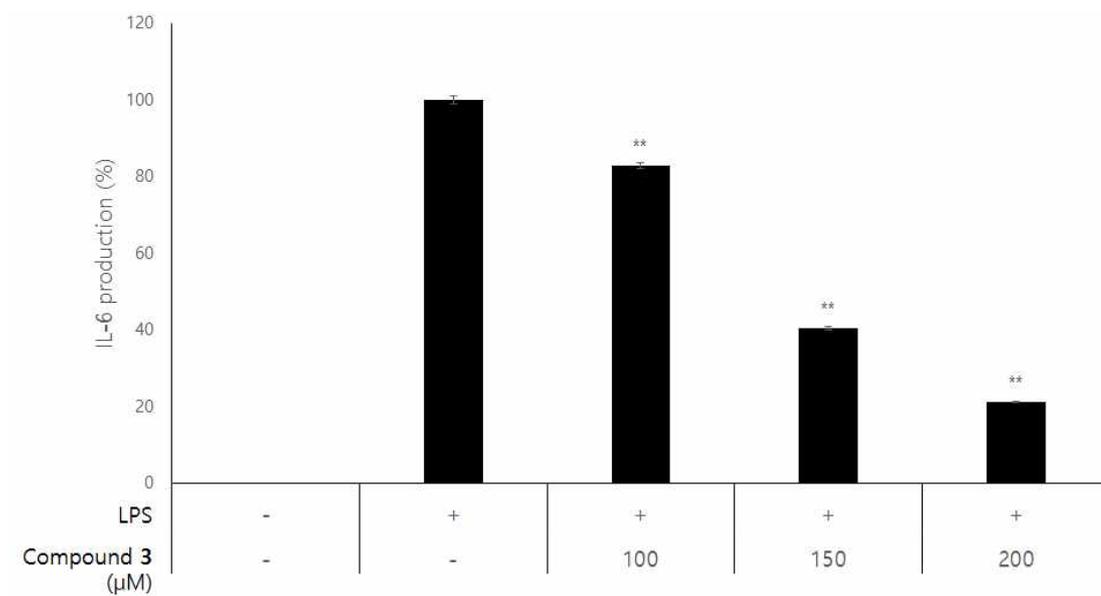


Figure 40. Effect of isolated compound **3** from *C. sunki* branches on IL-6 production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table 10. IC₅₀ values of compound **3** from *C. sunki* branches on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF- α	IL-1 β	IL-6
IC ₅₀ (μg/mL)	150.8	>200	154.2	138.6

IV. 결론 및 고찰

Citrus 속 식물의 과피는 오랫동안 생약으로 사용되어 왔으며 특히 진귤의 과피인 진피는 한약재의 구성 성분에서 매우 중요한 약재성분으로 인정되어 왔다. 감귤에는 flavonoid, carotinoid, limonoid 등 다양한 기능성 성분을 함유하는 것으로 알려져 있으며 이 중 flavonoid는 60여 종이 존재하는 것으로 보고되고 있다. 감귤에 존재하는 flavonoid는 flavanone, flavone 및 polymethoxyflavone (PMF)으로 구분할 수 있다. 지금까지 감귤류의 항산화 및 항염 활성에 대한 연구는 주로 과육이나 과피에 대한 것이 대부분이며, 주로 온주밀감에 관한 연구가 많이 이루어져 있다.^{32,33}

따라서 본 연구는 제주 재래귤인 진귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) 가지를 이용한 천연 항염, 항산화 및 항균 소재로서의 활용 가치를 높이고자 수행하였다. 소재 개발을 위한 연구방법으로는 제주도 자생의 진귤 가지부분을 이용하여 추출물 및 분획물로부터 화합물을 분리·동정하고 이들의 항염, 항산화 및 항균 활성을 검색하는 것으로 진행하였다.

먼저 DPPH radical 소거 활성 실험 결과 진귤 가지 EtOAc 분획물에서 가장 우수한 소거능이 관찰되었으며 Kang⁸ 등이 진귤 과피 추출물에서 DPPH 소거 활성 실험 결과, EtOAc 분획물의 소거활성이 가장 우수한 것과 유사한 경향을 보인다. 한편 Hyon³⁴ 등은 진귤 과피 추출물에서 DPPH 소거 활성의 SC₅₀값을 생과피에서는 440 µg/mL, 건조 과피에서는 560 µg/mL로 보고하였다. 본 연구결과, 진귤 가지 추출물의 SC₅₀ 값이 505.1 µg/mL로 비슷한 것으로 확인하였다.

또한 마우스 대식세포인 RAW264.7 cell을 이용한 항염 실험결과에서, EtOAc 분획물에서 좋은 활성이 있는 것을 확인하였다. Kang⁸ 등이 EtOAc 분획물에서 가장 강한 NO 생성 억제 활성을 보고한 결과와 비슷함을 확인하였다.

두 실험 결과로 볼 때, 항산화 활성과 항염 활성이 모두 우수하게 나타나는 분획층은 EtOAc 분획물이었다. EtOAc 층의 염증과 관련된 기전인 PGE₂ 및 cytokine 억제 정도를 확인한 결과, EtOAc층은 PGE₂ 및 IL-1β, IL-6의 생성을 억제함으로써 염증 반응을 저해하는 것으로 확인되었다.

피부 관련 균주인 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 이용하여 paper diffusion method로 항균 활성을 측정한 결과, 진굴 가지 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3711) 및 *P. acnes* (CCARM 9009)에 대한 항균 활성이 있음을 확인하였다.

이 같은 결과를 바탕으로 EtOAc 분획물로부터 vacuum liquid chromatography (VLC), silica gel chromatography 및 Sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 ^1H 및 ^{13}C NMR을 이용하여 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 4개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 nobiletin (1), 6-demethoxytangeretin (2), 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone (3), hesperidin (4)로 확인되었다. 분리된 화합물 중 compound 3은 진굴에서 처음으로 분리된 화합물이다. Compound 1, 2, 4는 모두 진굴 과피에서 분리·동정되어 보고되었다.^{35,36}

분리된 화합물들 중 compound 1, 3, 4는 이미 항산화 및 항염 활성 실험이 보고되었고, 항염 활성 기전 연구가 아직 보고되지 않은 compound 3에 대해 PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제에 관한 실험을 진행하였다. 그 결과 compound 3은 PGE₂ 및 IL-1 β , IL-6 생성을 억제하면서 염증 반응을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로 보아 진굴 가지 EtOAc 분획물에서 항염 활성을 보이는 것은 compound 1, 3, 4의 항염 활성과 관련이 있는 것으로 사료된다.

이상의 연구 결과를 통해 진굴 가지는 화장품 및 의약품 관련 천연 항산화, 항염 및 항균 소재로서의 이용 가능성을 확인할 수 있었고, 한 해 수만 톤씩 발생하는 감귤 폐자원이 다양한 기능성 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. 김진웅, 김기현, 김선여. 천연물의약품. *동명사*, 2016, 3-4.
2. 한국발명진흥회, 천연물 의약 및 화장품에 대한 patent Map 분석. *Invention & patent*. 2004, 29, 50-52.
3. Jeong, S. M.; Kim, S. Y.; Park, H. R.; Lee, S. C. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of extracts from *Citrus unshiu* peels. *J Korean Soc. Food Sci.* 2004, 38, 462-469.
4. Kim, H. Y. Distribution, taxonomy, horticultural characters of the local *Citrus* spp. in Cheju, and genetic markers among them. *PhD Dissertation. Cheonnam National University*, Cheonnam, Korea, 1988.
5. Cha, J. Y.; Kim, S. Y.; Jeong, S. J.; Cho, Y. S. Effects of hesperetin and narigenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *Korean J Life Sci.* 1999, 9, 389-394.
6. Manthey, J. A.; Grohmann K. Penolics in citrus peel by products: Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in *Citrus* peel molasses. *J Agric Food Chem.* 2001, 49, 3268-3273.
7. 육창수, 아세아 생약도감, *경원출판사*, 1997, 273-305.
8. Kang, S. H.; Lee, Y. J.; Lee, C. H.; Kim, S. J.; Lee, D. H.; Lee, Y. K.; Park, D. B. Physiological activities of peel of Jeju-indigenous *Citrus sunki* Hort. Tanaka. *Kor. Food Sci Technol.* 2005, 37, 983-988.
9. Yang, H. G.; Kim, H. J.; Kim, H. S., Park, S. N. Antioxidative and antibacterial activities of *artemisia princeps* Pampanni Extracts. *Korean J. Microviol. Biotechnol.* 2012, 40, 250-260.

10. Won, D. H.; Han, S. B.; Hwang, J. P.; Kim, S. J.; Park, J. N.; Park, S. N. Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of *Lindera obtusiloba* Blume Extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **2012**, 38, 297-304.
11. Kim, K. J.; Gim, A. H.; Kim, J. H.; Kim, D. H.; Lee, S. R.; Park, J. H.; Lim, J. W.; Ha, J. H.; Park, S. N. Antioxidant Activities of *Gynura procumbens* Extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **2015**, 41, 181-187.
12. Choi, B. K.; Lee, S. H.; Kim, N. S.; Cho, S. Y.; Jang, H. H.; Kim, J. B.; Lee, Y. M.; Yoon, S. G.; Lee, S. H. Anti-oxidative and Anti-allergic Effect of *Salvia plebeia* R. Ethanol Extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* **2014**, 45, 332-337.
13. Park, Y. H.; Lim, S. H.; Ham, H. J.; Kim, H. Y.; Jeong, H. N.; Kim, K. H.; Kim, S. M. Isolation of Anti-inflammatory Active Substance β -Sitosterol from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Stem. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **2010**, 39, 980-985.
14. Lefkowitz, J. B. Cyclooxygenase-2 specificity and its clinical implications. *American Journal of Medicine* **1999**, 106, 43S-50S.
15. Kim, N. K.; Kim, M. H.; Yoon, C. S.; Choi, S. W. Studies on the Anti-inflammatory Activity of *Paulownia coreana* Uyeki Leaf Extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **2006**, 32, 241-247.
16. Lee, S. Y.; Hyun, J. M.; Kim, S. S.; Park, S. M.; Park, K. J.; Choi, Y. H.; Kim, S. H.; Yu, S. N.; Ahn, S. C. Anti-inflammatory Effect of *Citrus unshiu* Peels Fermented with *Aspergillus niger*. *J. of Life Science* **2014**, 24, 750-756.
17. Choi, S. K.; Cho, G. J. characteristics and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from horse. *Journal of life science* **2008**,

- 18, 69-74.
18. Kang, M. S.; Oh, H. J.; Lee, H. C.; Oh, J. S.; Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Inhibiting the Proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology and Virology*, **2009**, 39, 11-19.
19. Sohn, H. Y.; Kim, Y. S.; Kum, E. J.; Kwon, Y. S.; Son, K. H. Screening of Anti-acnes Activity of Natural Products against *Propionibacterium acnes*. *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **2006**, 34, 265-272.
20. Seong, J. M.; Park, N. Y.; Lee, S. H.; Effect of *Schizandra chinensis* and Pine Needle on Growth of Pathogens Relate to Acne. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 31, 69-74.
21. Folin, O.; Denis, W. A colorimetric method for determination of phenols(phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* **1915**, 22, 305-308.
22. 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.
23. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, 181, 1199-1200.
24. 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.
25. Said, A.; Nabaweya. M. E.; Rashed K.; Fouche G.; Zheng, Y. T.; Selim, K. A.; Tawila, A. Anticancer, Anti HIV-1 and Antimicrobial Potentials of Methanol Extract and Non Polar Fractions of *Citrus volkameriana* Leaves

- and Phytochemical Composition. *Research J. of Medicinal Plant* **2015**, 9, 201-214.
26. Machida, K.; Keisuke, O. On the flavonoid Constituents from the Peels of *Citrus hassaku* HORT. ex TANAKA. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 1092-1094.
27. Phan, T. A.; Tran, L. Q.; Nguyen, T. T. Antioxidant Constituents from the stem of *Tetrastigma erusbescense* Planch.(Vitaceae). *Natural Product Sciences* **2014**, 20, 22-28.
28. Naisheng, B.; Kan, H.; Zhu, Z.; Lai, C. S.; Li, Z. Q.; Shao, X.; Pan, M. H.; Ho, C, T. Flavonoid from *Rabdosia rubescens* exert anti-inflammatory and growth inhibitory effect against human leukemia HL-60 cells. *Food Chemistry* **2010**, 122, 831-835.
29. Shuyun, S.; Kelong, H.; Yuping, Z.; Suqin, L. Preparative isolation and purification of two flavonoid glycosides from *Taraxacum mongolicum* by high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology* **2008**, 60, 81-85.
30. Aksit, H.; M.Celik, S.; Ozkan, S.; Erenler, R.; Demirtas, I.; Telci, I.; Elmastas, M. Complete Isolation and Characterization of Polar Portion of *Mentha dumetorum* Water Extract. *Rec. Nat. Prod.* **2014**, 8, 277-280.
31. Na, L.; Takashi, S.; Yuji, T.; Yoshihiro, M.; Yutaka, S.; Masamichi, Y.; Akira, I. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 65, 2065-2071
32. Hwang, J. H.; Park, K. Y.; Oh, Y. S.; Lim, S. B. Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Citrus Peels. *J. Korean Soc Food Sci.*

Nur. **2013**, 42, 153-160.

33. 현주미, 제주 재래귤, ‘부지화’ 미숙과 추출물 및 감귤 정유 성분의 기능성 화장품 소재화 연구, *제주대학교* **2016**, 박사학위논문.
34. Hyon, J. S.; Kang, S. M.; Senevirathne, M.; Koh, W. J.; Yang, T. S.; Oh, M. C.; Oh, C. K.; Jeon, Y. J.; Kim, S. H. Antioxidative activities of Extracts from Dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* Peels. *J. Korean Soc Food Sci Nut.* **2010**, 39, 1-7.
35. Choi, S. Y.; Hwang, J. H.; Ko, H. C.; Park, J. G.; Kim, S. J. Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- κ B and ROS production in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology* **2007**, 113, 149 - 155.
36. 고희철, 진균, 제주조릿대 및 미역쇠 성분 동정 및 생리활성 연구, *제주대학교* **2010**, 박사학위논문.