



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](#)

博士學位論文

우묵사스레피 및 감귤류
미숙과를 이용한 향장품 소재 연구



濟州大學校 大學院

化學科

吳泰憲

2011年 2月



우묵사스레피 및 감귤류
미숙과를 이용한 향장품 소재 연구

指導教授 李 南 昊

吳 泰 憲

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

吳泰憲의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ㉠

委 員 _____ ㉠

委 員 _____ ㉠

委 員 _____ ㉠

委 員 _____ ㉠

濟州大學校 大學院

2011年 2月



A Study on the Cosmetic Ingredients from
Immature Citrus and *Eurya emarginata* Makino

Tae-Heon Oh
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Doctor of Philosophy

2011. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



목 차

LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vii
SYMBOLS AND ABBREVIATIONS	xi
ABSTRACT	xiv
I. 서 론	1
1. 항염	2
2. 아토피	4
3. 우묵사스레피	6
4. 감귤	10
II. 시약 및 기기	18
III. 과제 1: 우묵사스레피로부터 유효 성분 분리 및 동정	20
1. 재료	20
2. 실험방법	20
2-1. 시료의 추출 및 용매 분획	20
2-2. 화합물의 분리 과정	21
2-2-1. Compound 1, 2, 3, 4의 분리과정	21
2-2-2. Compound 5, 6, 7의 분리과정	22
2-2-3. Compound 8, 9, 10, 11의 분리과정	23
2-3. 활성평가	24
2-3-1. 항산화 효능 평가	24
2-3-2. Cell culture	25
2-3-3. 세포 독성 측정	26

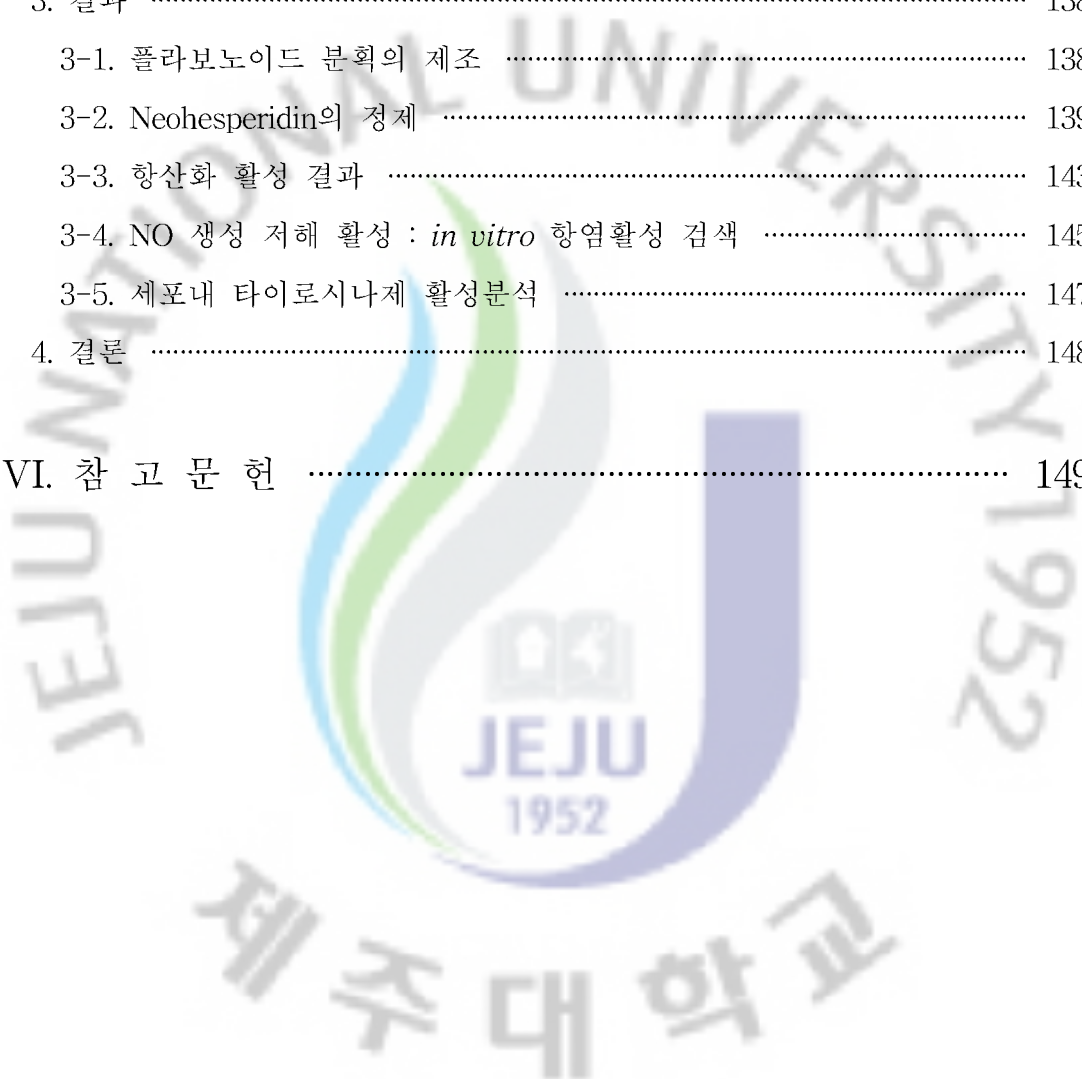
2-3-4. Melan-a cell의 melanin 생합성 저해 활성 측정	27
2-3-5. NO assay	27
2-3-6. Pro-inflammatory cytokines (IL-6)의 정량	28
2-3-7. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 생성 평가	28
2-3-8. 염증성 인자(iNOS, TNF- α , IL-6, COX-2)와 아토피 인자(MDC, ARC)의 mRNA 발현억제효과	28
2-3-9. Western blot analysis	30
2-3-10. Transient transfection과 luciferase assay	31
2-3-11. Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)	32
3. 결과	32
3-1. 우목사스레피에서 분리된 화합물의 구조 결정	32
3-1-1. Compound 1의 구조 결정	32
3-1-2. Compound 2, 3, 4의 구조 결정	37
3-1-3. Compound 5, 6, 7의 구조 결정	53
3-1-4. Compound 8의 구조 결정	56
3-1-5. Compound 9, 10, 11의 구조 결정	58
3-2. 활성 결과	63
3-2-1. 분리된 화합물에 대한 항산화 활성	63
3-2-2. Rengyolone의 melanin 생합성 억제효과	64
3-2-3. Rengyolone의 항염증 효과	65
3-2-4. Rengyolone의 항아토피 효과	71
3-2-5. Eutigoside C의 세포 독성 평가	75
3-2-6. Eutigoside C의 항염증 효과	76
3-2-7. Euticoside C의 항아토피 효과	86
4. 결론	88
IV. 과제 2: 감귤류 미숙과를 이용한 에센셜 오일의 개발 ..	90
1. 재료	90

2. 실험방법	92
2-1. 감귤류 정유의 추출	92
2-2. 감귤류 정유 추출물의 성분 분석	92
2-3. 생리활성 검색	92
2-3-1. 항산화 효능 평가	92
2-3-2. 감귤류 정유 추출물들의 항균 활성	94
2-3-3. Cell culture	96
2-3-4. MTT assay for cell viability	96
2-3-5. 면역세포에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향	97
2-3-6. NO assay	97
3. 결과	98
3-1. 감귤류 정유 추출	98
3-2. 성분분석	99
3-3. 항산화 활성	121
3-4. 항균활성	122
3-5. 감귤류 정유 추출물에 대한 최소저해농도 측정(MIC)	123
3-6. 면역세포에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향	127
3-7. NO 생성 억제 효과	130
4. 결론	131

V. 과제 3: 당유자 유래 네오헤스페리딘을 포함하는 플라보노이드 분획물의 분리 및 생리활성

1. 재료	132
2. 실험방법	132
2-1. Flavonid 분획의 제조	132
2-2. Neohesperidin의 정제	134
2-3. 생리활성 검색	135

2-3-1. 항산화 효능 평가	135
2-3-2. Cell culture	136
2-3-3. MTT assay for cell viability	137
2-3-4. NO assay	137
2-3-5. Cell tyrosinase activity assay in B16/F10 cell	137
3. 결과	138
3-1. 플라보노이드 분획의 제조	138
3-2. Neohesperidin의 정제	139
3-3. 항산화 활성 결과	143
3-4. NO 생성 저해 활성 : <i>in vitro</i> 항염활성 검색	145
3-5. 세포내 타이로시나제 활성분석	147
4. 결론	148
VI. 참고 문헌	149



LIST OF TABLES

Table 1. Vitamins included in citrus peel.	11
Table 2. Flavonoids included in citrus peel.	11
Table 3. The sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis.	30
Table 4. NMR spectroscopic data for compound 1.	34
Table 5. NMR spectroscopic data for compound 2 and eutigoside C.	41
Table 6. NMR spectroscopic data for compound 3 and eutigoside C.	42
Table 7. NMR spectroscopic data for compound 4 and eutigoside C.	43
Table 8. NMR spectroscopic data for compounds 5 and 6.	54
Table 9. NMR spectroscopic data for compound 7.	55
Table 10. NMR spectroscopic data for compound 8.	56
Table 11. NMR spectroscopic data for compound 9.	59
Table 12. NMR spectroscopic data for compounds 10 and 11.	59
Table 13. Antioxidant activity of compounds obtained from <i>E. emarginata</i> . ..	63
Table 14. Traditional names of Jeju endemic citrus species.	91
Table 15. Yield of essential oils in citrus species peel.	99
Table 16. Chemical composition (%) of <i>C. unshiu</i> peel essential oil.	100
Table 17. Chemical composition (%) of <i>C. sunki</i> peel essential oil.	101
Table 18. Chemical composition (%) of <i>C. benikoji</i> peel essential oil.	102
Table 19. Chemical composition (%) of <i>C. aurantium</i> peel essential oil. ·	103
Table 20. Chemical composition (%) of <i>C. paradisi</i> peel essential oil.	104
Table 21. Chemical composition (%) of <i>C. obovoidea</i> peel essential oil. ·	105
Table 22. Chemical composition (%) of <i>C. natsudaoidai</i> (Hagyul) peel essential oil.	106
Table 23. Chemical composition (%) of <i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i> peel essential	

oil.	107
Table 24. Chemical composition (%) of <i>C. hassaku</i> peel essential oil.	108
Table 25. Chemical composition (%) of <i>C. pseudogulgul</i> peel essential oil.	109
Table 26. Chemical composition (%) of <i>C. natsudaidai</i> (Cheonyahagyul) peel essential oil.	110
Table 27. Chemical composition (%) of <i>C. aurantium</i> peel essential oil. ·	111
Table 28. Chemical composition (%) of <i>C. platymamma</i> peel essential oil.	112
Table 29. Chemical composition (%) of <i>C. tamurana</i> peel essential oil. ...	113
Table 30. Chemical composition (%) of <i>C. erythroa</i> peel essential oil. ..	114
Table 31. Chemical composition (%) of <i>C. tangerina</i> peel essential oil. ..	115
Table 32. Chemical composition (%) of (<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i> peel essential oil.	116
Table 33. Chemical composition (%) of Inchanggul peel essential oil.	117
Table 34. Chemical composition (%) of <i>C. natsudaidai</i> (Singamha) peel essential oil.	118
Table 35. Chemical composition (%) of <i>C. natsudaidai</i> (Gamhwagyul) peel essential oil.	119
Table 36. Chemical composition (%) of <i>C. grandis</i> peel essential oil.	120
Table 37. Scavengings of DPPH and superoxide, NO radical by citrus essential oils.	122
Table 38. Disc diffusion assays of the essential oils of citrus against <i>Bacillus subtilis</i> and <i>B. cereus</i>	124
Table 39. Disc diffusion assays of the essential oils of citrus species against <i>Propionibacterium acnes</i>	125
Table 40. Minimal inhibitory concentrations of the essential oils of citrus species against <i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>P. acnes</i>	126
Table 41. Antioxidative activities for purified flavonid fraction.	145

LIST OF FIGURES

Figure 1. Photographs of <i>Eurya emarginata</i>	7
Figure 2. Structures of reported compounds from <i>E. emarginata</i>	9
Figure 3. Structures of some citrus flavonoids.	15
Figure 4. Changes in the flavonoids <i>C. grandis</i> Osbeck.	17
Figure 5. Procedure of extraction and solvent fraction from <i>E. emarginata</i>	21
Figure 6. Isolation of the compounds 1~4 from EtOAc Fr.	22
Figure 7. Isolation of the compounds 5~7 from CEA Fr.	23
Figure 8. Isolation of the compounds 8~11 from 2CDM Fr.	24
Figure 9. The Structure of renygolone (1) and key HMBC correlations. ..	33
Figure 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃ (400MHz).	35
Figure 11. ¹³ C-NMR and 135° DEPT spectrum of compound 1 in CDCl ₃ (100MHz).	35
Figure 12. HMQC spectrum of compound 1 in CDCl ₃	36
Figure 13. COSY spectrum of compound 1 in CDCl ₃	36
Figure 14. HMBC spectrum of compound 1 in CDCl ₃	37
Figure 15. The HMBC correlations for the compound 2.	38
Figure 16. The HMBC correlations for the compound 3.	39
Figure 17. The HMBC correlations for the compound 4.	39
Figure 18. TLC of compounds 2 and 4 H ₂ O fractions of hydrolysis products and D-glucose.	40
Figure 19. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃ (400MHz).	44
Figure 20. ¹³ C-NMR and 135° DEPT spectrum of compound 2 in CDCl ₃ (100MHz).	44
Figure 21. HMQC spectrum of compound 2 in CDCl ₃	45
Figure 22. COSY spectrum of compound 2 in CDCl ₃	45

Figure 23. HMBC spectrum of compound 2 in CDCl ₃	46
Figure 24. HR-FAB-MS spectrum of compound 2	46
Figure 25. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD (400MHz).	47
Figure 26. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD (100MHz).	47
Figure 27. HMQC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	48
Figure 28. COSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	48
Figure 29. HMBC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	49
Figure 30. NOESY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	49
Figure 31. LR-FAB-MS spectrum of compound 3	50
Figure 32. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD (400MHz).	50
Figure 33. ¹³ C-NMR and 135° DEPT spectrum of compound 4 in CD ₃ OD (100MHz).	51
Figure 34. HMQC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	51
Figure 35. COSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	52
Figure 36. HMBC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	52
Figure 37. HR-FAB-MS spectrum of compound 4	53
Figure 38. The Structures of eutigoside C (5), eutigoside B (6) and quercitrin (7).	53
Figure 39. ¹ H-NMR spectrum of compound 8 in CD ₃ OD (400MHz).	57
Figure 40. ¹³ C-NMR spectrum of compound 8 in CD ₃ OD (100MHz).	57
Figure 41. Structure of compounds 10 and 11	58
Figure 42. ¹ H-NMR spectrum of compound 9 in CD ₃ OD (400MHz).	60
Figure 43. ¹³ C-NMR spectrum of compound 9 in CD ₃ OD (100MHz).	60
Figure 44. ¹ H-NMR spectrum of compounds 10 and 11 in CD ₃ OD (400MHz).	61
Figure 45. ¹³ C-NMR spectrum of compounds 10 and 11 in CD ₃ OD (100MHz).	61
Figure 46. Structures of isolated compounds from <i>E. emarginata</i>	62
Figure 47. Effect of rengyolone on tyrosinase production in Melan-a cells. ..	

.....	64
Figure 48. Effect of rengyolone on melanin contents in Melan-a cells.	65
Figure 49. Effect of rengyolone on the production of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	66
Figure 50. Effect of rengyolone on the protein level of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	67
Figure 51. Effect of rengyolone on the mRNA expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	68
Figure 52. Effect of rengyolone on the mRNA expression of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	69
Figure 53. Effect of rengyolone on the mRNA expression of TNF- α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	70
Figure 54. Effect of rengyolone on the protein level of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	71
Figure 55. Effect of eutigoside C on the mRNA expression of MDC in HaCaT human keratinocytes.	72
Figure 56. Effect of eutigoside C on the mRNA expression of TARC in HaCaT human keratinocytes.	73
Figure 57. Effect of rengyolone on the phospho STAT1 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	74
Figure 58. Effect of rengyolone on the phospho STAT1 expression in hIFN- γ -stimulated HaCaT human keratinocytes.	74
Figure 59. Cytotoxicity of eutigoside C in RAW 264.7 cells.	75
Figure 60. Effect of eutigoside C on the production of NO and expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	78
Figure 61. Effect of eutigoside C on the production of PGE ₂ and expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	80
Figure 62. Effect of eutigoside C on the production of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	81

Figure 63. Effects of eutigoside C on the activation of NF- κ B in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	84
Figure 64. Effects of eutigoside C on the phosphorylation of MAPKs in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	85
Figure 65. Effect of eutigoside C on the mRNA expression of MDC in HaCaT human keratinocytes.	86
Figure 66. Effect of eutigoside C on the mRNA expression of TARC in HaCaT human keratinocytes.	87
Figure 67. Immature citrus species.	90
Figure 68. Cell viability of THP-1 cell treated with Cheonyahagyul and Geumgamja essential oils.	128
Figure 69. Cheonyahagyul and Geumgamja essential oils inhibit <i>P. acnes</i> -induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α (A) and IL-8(B).	129
Figure 70. Effect of <i>C. unshiu</i> on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	130
Figure 71. Immature <i>Citrus grandis</i> Osbeck.	132
Figure 72. HPLC chromatogram of purified flavonoid fraction.	139
Figure 73. MPLC chromatogram of neohesperidin.	140
Figure 74. ^1H NMR spectrum of neohesperidin (400MHz in DMSO- d_6). ·	141
Figure 75. ^{13}C NMR spectrum of neohesperidin (100MHz in DMSO- d_6). ·	141
Figure 76. HPLC chromatogram of authentic neohesperidin.	142
Figure 77. HPLC chromatogram of separated neohesperidin.	142
Figure 78. Effect of purified flavonoid fraction on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.	146
Figure 79. Effect of purified flavonoid fraction on tyrosinase activity mouse B16/F10 melanoma cells.	147

SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

BSA	bovine serum albumin
Bu	butyl, C ₄ H ₉ -
calcd.	calculated
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CC	column chromatography
COSY	correlated spectroscopy
COX-1	cyclooxygenase-1
COX-2	cyclooxygenase-2
cpd	compound
δ	chemical shift
d	doublet
dd	doublet of doublet
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EtOAc	ethyl acetate
FBS	fetal bovine serum
FID	flame ionized detector
Fr.	fraction
GC	gas chromatograph
GC/MSD	gas chromatograph/mass selective detector
hINF-γ	human interferon-γ
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation

HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high-performance liquid chromatography
HR-FAB-MS	high resolutionm fast atom bombardment mass spectrometry
HRP	horse radish peroxidase
I- κ B	inhibitory- κ B
INF- γ	interferon- γ
IgE	immunoglobulin E
iNOS	inducible NOS
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
<i>J</i>	coupling constant
JNK	c-Jun NH3-ternubak kinase
LB	Luria-Bertany
LDH	lactate dehydrogenase
LPS	lipopolysaccaride
LR-FAB-MS	low resolutionm fast atom bombardment mass spectrometry
m	multiplet
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDC	macrophage-derived chemokine
Me	methyl, CH ₃ -
MIC	minimum inhibitory concentration
MPLC	medium pressure liquid chromatography
MSD	mass selective detector
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-diphenyl tetrazolium bromid
multi.	multiplicity
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	nitric oxide

NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
NOS	NO synthase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGE ₂	prostaglandin E ₂
ppm	part per million
prep-HPLC	preparative high-performance liquid chromatography
PVDF	Polyvinylidene fluoride
R _f	retardation factor
s	singlet
SC ₅₀	50% scavenging concentration
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNP	sodium nitroprusside
t	triplet
TARC	thymus- and activation-regulated chemokine
TFF	tangential flow filtration
TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

ABSTRACT

For the development of functional cosmetic additives, we are continuously undergoing research on plants in Jeju island. In this research, we have studied *Eurya emarginata* and some citrus species as the potential plants applicable in cosmetic industry. *Eurya emarginata* Makino is an evergreen shrub distributed throughout Jeju island and southern part of Korea. Citrus fruits are the most important agriculture products in Jeju island. This thesis is divided into three parts.

In the first part, phytochemical study was conducted on the extract of *E. emarginata*, which resulted in the isolation of 11 compounds; renyolone (1), cleroidicin B (9), renyol (10), isorenyol (11) and three new glycoside compounds (2, 3, 4).

Among the isolated compounds, renyolone (1) was found to reduce the tyrosinase expression and melanin contents in Melan-a cells in dose-dependent manner. In this study, we also investigated anti-inflammatory activities of renyolone and eutigoside C on LPS-stimulated murine macrophage RAW 264.7 cells. Treatment with renyolone inhibited LPS-stimulated production of NO, iNOS, IL-6, TNF- α and COX-2. Eutigoside C inhibited LPS-stimulated production of NO, PGE₂ and IL-6. Furthermore the mRNA expressions atopic chemokine (MDC and TARC) in HaCaT human keratinocytes cells stimulated by hIFN- γ were reduced in dose-dependent manner by renyolone or eutigoside C.

In the second part, we analyzed chemical composition and product yield for 21 species of immature citrus essential oils. Major components of oils were limonene (55.4%~91.7%), β -myrcene (2.1%~32.1%), α -pinene (0.6~1.6%), β -pinene (0.6~1.6%) and linalool (0.4%~6.9%).

Two essential oils, *Citrus erythrosa* (Dongjunggyul) and *C. aurantium* (Joadeung), showed potent free radical scavenging activities in the DPPH and NO assays. Ten out of seventeen citrus essential oils exhibited antibacterial activity against *Propionibacterium acnes*. Especially, *C. obovoidea* (Geumgamja) essential oil reduced *P. acnes*-induced secretion of IL-8 and TNF- α in THP-1 cell, an indication of anti-inflammatory effect.

In the third part, a method for the large-scale purification of a citrus flavonoid from immature *C. grandis* peel was investigated. By applying a simple three-step procedure such as extraction, ultrafiltration, XAD-16 resin, neohesperidin was produced with high efficiency. This flavonoid fraction shows anti-oxidative, anti-inflammatory, and pro-melanogenesis activities.

In summary, some metabolites from *E. emarginata* as well as essential oils and a flavonoid from citrus species showed biological activities such as anti-oxidative, whitening, anti-inflammatory, anti-atopic, anti-acne, and pro-melanogenesis effects. This suggests that these plants might be applicable as raw materials for the production of cosmetically useful ingredients.



I. 서 론

「화장품법」에 의하면 “화장품”이라 함은 인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다. 다만, 「약사법」 제2조 제4호의 의약품에 해당하는 물품은 제외한다.

“기능성화장품”이라 함은 화장품중에서 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품에 해당되는 것으로서 보건복지부령이 정하는 화장품을 말한다.

화장품에 사용하는 기능성 원료에는 미백제, 자외선 방어제, 노화방지제, 주름방지제, 보습제, 항염증제, 헤어 컨디셔닝제, 헤어 스타일링제, 분체, 색재, 유제, 향균제, 소취제, 계면활성제, 육모제 등이 있다.¹

최근의 글로벌 경제위기에도 화장품산업은 국내 시장규모가 2008년도 5조 1,046억원으로 전년대비 17.2% 성장하였으며, 이 중 기능성 화장품은 1조 1,033억원으로 2008년 들어 처음으로 1조원을 넘어섰다. 또한 화장품 산업에 대한 연구개발투자 재원도 2007년보다 12.4% 증가한 1,309억으로 경기침체의 영향을 비교적 덜 받았으며, 최근 고령화, 여성의 소득증대, 웰빙 추세 등에 따라 기능성 제품을 비롯한 화장품에 대한 수요가 증가하고 있을 뿐 아니라, 화장품을 소비자인 동시에 고가의 에스테틱을 대신하는 대체재로 인식하고 있다.²

천연물 내에 존재하는 물질들의 다양한 생리활성 기능이 보고되면서 의약품 및 화장품의 원료로서 천연 생리활성물질에 대한 관심이 집중되고 있다. 하지만 추출물을 상업화함에 있어서 추출물에 함유되어 있는 생리활성물질의 함량이 작고, 다양한 물질을 포함하기 때문에 분리 및 정제의 과정이 복잡한 것이 가장 큰 문제점으로 야기되고 있다. 이런 문제점을 보완하기 위해서 추출효율을 여러 방도에서 높이는 연구가 시도 되었다. 추출에 가장 큰 영향을 미치는 추출 용매와 추출시간 및 온도, 초임계 유체와 sonication을 이용한 추출 등 다양한 연구가 시

도 되었고 있지만, 추출물 자체의 생리활성 성분이 미량 존재하고 그 한계가 존재하게 된다.³ 따라서 본 연구에서는 제주 지역에서 자생 하고 있는 우묵사스레피 및 과잉 생산 조절을 위해 인해 버려지는 감귤 미숙과의 식물자원 중 추출물이나 향기자원 내에 존재하는 생리활성 물질을 대량으로 분리, 정제 하는 방법을 연구하고 분리된 물질에 대한 생리활성을 확인하고자 하였다.

1. 항염

사람의 신체방어는 면역반응을 통하여 병원체로부터 보호받을 수 있다. 바이러스나 박테리아와 같은 외래 미생물에 대한 생체방어 기작으로는 자연면역(innate immunity)과 특이면역(specific immunity)으로 나뉘어지며, 이는 면역관련 세포에서 주로 분비되는 cytokine에 의해서 매개된다.⁴

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 prostaglandins, HETE (hydroxyicosatetraenoic acid), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 일으킨다.⁵

내독소로 잘 알려진 LPS(lipopolysaccharide)는 그람-음성세균의 세포외막에 존재하며, 대식세포(macrophage) 또는 단핵세포(monocyte)로부터 다양한 염증 발병 인자로 알려진 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁶ 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid를 PGs (prostaglandins)으로 바뀌는 과정 및 NO (nitric oxide) 형성 과정으로 이어지게 된다.⁷

COX (cyclooxygenase)는 arachidonic acid를 PGs으로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 현소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지등 정상적인 생체기능에 작용하지만,⁸ COX-2는 염증매개물질인 PGE₂(Prostaglandin E₂)를 형성시킨다. PGE₂와 같은 물질은 염증반응, 면역반응, 그리

고 angiogenesis를 촉진 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.⁹

체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 PGE₂ 등의 염증인자가 NO synthase 및 COX-2에 의해 형성된다. 이 중 NO는 NO synthase (NOS)라는 유도성 (inducible) 또는 상존성(constitutive) 효소에 의하여 생성되어지는 반응성 radical로서 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다. NOS는 물리 화학적 성상에 따라 3종류의 동종 효소로 나누어진다.¹⁰ Type I (neuronal NOS)과 Type III (endothelial NOS)는 세포속에서 계속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS (constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS 및 cytokine, 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II (inducible NOS)로 나누어진다.¹¹ 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다.^{12,13}

NF- κ B는 염증반응, 면역 반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하는 전사인자로서 종양형성, 자가면역질환, 염증질환에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.¹⁴ 세포질 속에서 p65와 p50의 heterodimer와 억제 단백질인 inhibitory- κ B (I- κ B)와 함께 비활성 상태로 존재하다가 외부로부터 LPS 또는 cytokine과 같은 염증성 자극이 주어지면 I- κ B kinase가 활성화되어 degradation (분해)되고 heterodimer는 활성화되어 핵안으로 이동하여 염증을 유도하는 cytokine, iNOS, COX-2 등의 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.^{15,16}

MAPK는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 그리고 stress-activated protein kinase/c-Jun NH3-terminal kinase (SAPK/JNK)로 구분되는데,¹⁷ 이 중 ERK는 주로 세포의 증식, 분화 및 생존 등의 반응을 촉발시키는 성장인자에 의해 활성화 된다고 알려져 있으며, p38과 JNK는 여러 가지 스트레스에 의해 활성화되어 세포 자연사에 관여하며 다양한 병리적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁸

TNF- α 와 같은 다 기능성 cytokine은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 특히, 암 촉진 과정에서 일어나는 피부염증

에 중요한 역할을 하며,¹⁹ 여러 염증질환과 알러지 현상에 TNF- α 에 대한 항체를 처리하였을 때 증상이 완화되었다.²⁰

아스피린이 개발된 이래로 오랫동안 비스테로이드성 항염증 약물(nonsteroidal anti-inflammatory drug)의 사용은 통증의 완화시켜왔으며, 비마약성 진통제의 대부분 역시 항염증 효과를 가지므로 급성 및 만성 염증 질환의 치료에 적절히 사용되어 왔다.²¹ 그러나 이 약의 장기 사용은 위궤양, 출혈, 천공과 같은 심각한 부작용을 초래하여 새롭거나 개선된 치료제 개발은 필수적이고 시급한 실정이다. 이러한 부작용을 극복하는 문제와 관련지어 천연물에서 그 활성 성분을 찾으려는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

이에 본 연구에서는 감귤 정유 추출물과 당유자 및 우묵사스레피로부터 분리한 물질에 대해 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증성 cytokine, NO 및 COX-2 생성억제 정도를 검색하였다.

2. 아토피

아토피(atopy)는 그리스어인 a-topos가 어원으로서 “특이한”, “이상한”, “부적당한” 또는 “비정상적인 반응” 등의 뜻을 가지고 있으며, 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역물질(면역 글로불린-E)을 쉽게 형성함으로써 천식, 고초열, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 등을 잘 일으키는 유전적 경향을 말한다. 이들 질환은 환자 개개인의 유전적 소인, 환경, 연령 등에 따라 단독으로 또는 여러 질환이 동시에 나타나는 수가 있다.

2005년의 아토피 피부염 유병률이 1000명당 91.4명으로 2001년에 비해 4년만에 7.6배나 증가하였으며, 2007년 아토피 피부염 환자중 9세 이하가 53.4%를 차지하는 것으로 특히 아동과 청소년들에게서 많이 나타났다.²²

이는 매우 흔한 피부병으로 어린이의 약 10~15%가 아토피 피부염을 가지고 있으며 75%의 환자가 1세 이전에 발생된다. 그러나 한살이 지나도 증상이 호전되지 않고 습진이 얼굴, 목에서 몸통, 사지로 퍼지면 아토피성 피부염이 되는 것이다. 즉, 약 90%의 어린이 환자가 5년 내 저절로 호전되며 약 5% 환자가 어른

이 되어도 지속된다고 알려져 있다. 아토피성 피부염의 발병원인은 유전적, 면역학적 요인 이외에 환경적, 정신적 요인 등이 악화요인으로 작용한다고 알려져 있으나 원인이 아직 확실하게 규명되지 못하고 있다.

최근 아토피 피부염의 발생률의 증가에 영향을 미치는 요인으로는 대기오염, 핵가족화, 모유수유의 감소, 항생제 사용의 증가로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 주거 환경 변화, 공업 발달로 인한 새로운 항원 물질의 등장 등이 관여하는 것으로 생각되어진다.

아토피 피부염의 발병기전은 아직 분명하게 밝혀지고 있지는 않지만, 유전적 요인, 환경적 요인과 함께, 면역학적 요인과 피부 보호막의 변화가 작용한다고 생각되고 있다. 현재까지 여러 연구들로부터 추정되는 개략적인 아토피 피부염의 생리기전은 allergen이 IgE(immunoglobulin E)에 의해 인식되면 랑게르한스 세포 표면 IgE 부착 Fc 수용체에 유착되어 T 림프구에 항원을 전달 함으로서 T 림프구가 활성화 되게 된다. 이때 자가 펩타이드나 staphylococcus 의 초항원(super-antigen)에 의해서도 T 림프구가 활성화될 수 있다. 아토피 피부염의 병변에 침윤되는 염증세포는 주로 Th2 세포로서 IL-4, IL-5 등의 사이토카인을 생성하여, 혈중 IgE의 상승을 촉진하고, 호산구의 증가를 유도한다. cAMP phosphodiesterase가 상승되어 있는 아토피 피부염의 비 정상적인 단구에 의해 PGE의 생성이 증가하게 되고 이로 인해 Th1 림프구의 침윤이 억제된다. 이는 Th1의 증식을 억제 세포 매개성 면역의 저하를 초래하며, 각종 cytokine에 의해 기억 T 림프구의 복귀를 촉진시킴으로서 습진성 병변이 유발되게 된다.

또한, 아토피 피부염 환자의 각질 형성 세포에는 고농도의 TSLP와 MDC (macrophage-derived chemokine)가 존재한다. TSLP는 CD11c+ 수지상 세포를 자극해서 TARC (Thymus-and activation-regulated chemokine)와 MDC 생성을 증가시킨다. 이러한 cytokine의 농도는 아토피 피부염의 증상과 밀접한 연관성을 가지고 있다.

아토피 피부염에 대한 효과적인 치료법은 아직 정립되지 않았으나, 피부염의 치료뿐만 아니라 생활 습관의 변화와 정서적 긴장 완화 등의 관리와 예방이 모두 중요하다.

아토피성 피부염의 치료는 가려움, 발진 등을 감소시키고 발작의 정도와 재발

을 조절하며 자기 스스로 관리하는 기술을 교육하는 등 다양한 면에 목적을 두고 있다. 일반적으로 증상에 따른 외용제나 보습제를 이용하여 치료하고 있지만 최근에는 새로운 면역억제제나 조절제 치료가 이용되고 있다.

현재 아토피성 피부염의 치료용으로 쓰이는 국소 항염증제인 스테로이드나 항히스타민제 등은 강한 면역 억제 효능을 발휘하기 때문에 알러지성 질환에 가장 효과적인 약물로 많이 사용되고 있으나 스테로이드제를 장기간 사용할 경우 오히려 혈관 수축, 성장 장애, 불면증 등의 증상을 일으키며, 항히스타민제의 경우도 위장관 자극, 두통, 시야가 흐려지는 등의 부작용으로 인해 제한적으로 사용되고 있다.²³

따라서 새로운 아토피성 피부염 치료제의 개발이 절실한 실정이며, 아토피성 피부염 환자의 혈청에는 MDC와 TARC의 농도가 높으며 사이크로스포린 A를 투여하거나 국소용 코르티코스테로이드를 이용한 치료에서 MDC와 TARC 농도가 감소하며 질환이 호전됨이 증명되었다. 인터페론감마(IFN- γ)는 특히 피부 각질형성세포를 일차 표적으로 하며 이러한 세포에서 여러 케모카인들을 생성시키는 강력한 자극제로 작용한다.

시험관내 실험(*in vitro*)에서 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 IFN- γ 또는 종양괴사인자(TNF- α)로 자극하면 MDC와 TARC가 다량 발현되며 이러한 케모카인을 조절할 수 있는 물질은 아토피성 피부염 질환 치료제로 사용될 수 있음이 제시되었다.

이에 본 연구에서는 우묵사스레피에서 분리한 물질에 대해 MDC와 TARC 농도 감소를 통한 아토피성 피부염에 대한 치료효과를 확인하고자 하였다.

3. 우묵사스레피

차나무과(*Theaceae*) 식물은 전 세계적으로 40속 600종이 열대, 아열대, 온대지방에 분포하며, 일반적으로 차나무는 충치예방, 입 냄새 제거, 혈압상승억제, 혈중콜레스테롤 상승억제 등의 효과가 있으며, 항암작용에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다.²⁴ 차나무와 동일한 속에 해당하는 동백나무에서도 항미생물과 항

산화 효과가 보고되었고,²⁵ 우묵사스레피나무, 후피향나무 등은 민간에서 약재로 사용되고 있으며, 최근에는 성분분석 및 활용화에 대한 연구가 이루어지고 있다.^{26,27}

Eurya 속에는 전세계적으로는 20여종이 알려져 있고 동아시아와 말레이 난대에 분포하고 있지만 국내에는 사스레피나무(*E. japonica* Thunberg)와 우묵사스레피(*E. emarginata* (Thunberg) Makino), 섬사스레피(*E. japonica* for. *integra* T. Lee), 떡사스레피(*E. Japonica* var. *aurescens* Rehder et Wils)가 자생하고 있다. 이들 종은 쉽게 번식시킬 수 있고 생육이 강해 정원수, 생울타리, 화환의 소재로서 그리고 약용자원식물로도 긴요하게 이용되고 있으며, 서해의 안면도, 동해안으로는 부산을 비롯하여 포항까지 분포하는 것으로 알려졌다.²⁸



Figure 1. Photographs of *Eurya emarginata*.

우묵사스레피는 차나무과에 속하는 상록관목으로 섬쥐똥나무 또는 개사스레피 나무라고 불린다. 높이 2~3m이고 수피는 회색을 띤 흰색으로 작은가지는 옅은 노란색을 띤 갈색의 털이 밀생한다. 잎은 어긋나며 끝이 오목한 좁은 거꾸로 된 달걀모양으로 가장자리에 물결모양의 거치가 있고 뒤로 말린다. 질이 두꺼우며 잎의 앞면은 녹색으로 광택이 있으며 뒷면은 옅은 녹색이다. 꽃은 암수딴그루로 6월에 피며 녹색을 띤 흰색으로 잎겨드랑이에 밑을 향해 1~3개씩 달린다. 꽃받침은 2개로 납작한 원모양이고 가장자리가 막질이며 꽃잎은 달걀모양이다. 열매

는 장과로 10~11월에 자주색을 띤 검은색으로 익으며 둥근모양이다.²⁹ 주로 식용, 관상용, 공업용에 쓰이고, 정원수 및 민간에서는 잎을 거담, 이뇨에 약으로 쓴다.³⁰

우묵사스레피에서 분리 보고 되어진 화합물로는 1974년 Morita 등이 발표한 논문에서 chrysoeriol, hyperin, quercitrin을 분리, 보고 하였으나 생리활성은 보고되지 않았다.³¹ 선행 연구로 우묵사스레피 잎에서 quercitrin, eutigoside B, eutigoside C를 분리하여 전골수 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포주에서 세포증식이 억제되었음을 확인하였다.^{32,33} 또한, eutigoside B, eutigoside C는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등의 pro-inflammatory cytokine의 생성억제, iNOS의 발현 및 COX-2의 생성 억제효과가 있음을 보고하였다.³⁴ 이 후 chrysoeriol, apigenin, (2R, 3R)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavan, quercitrin, hyperin, quryanoside, euryamaside를 분리하여 치매예방효과와 항산화 활성을 검토하여 보고하였다.²⁶

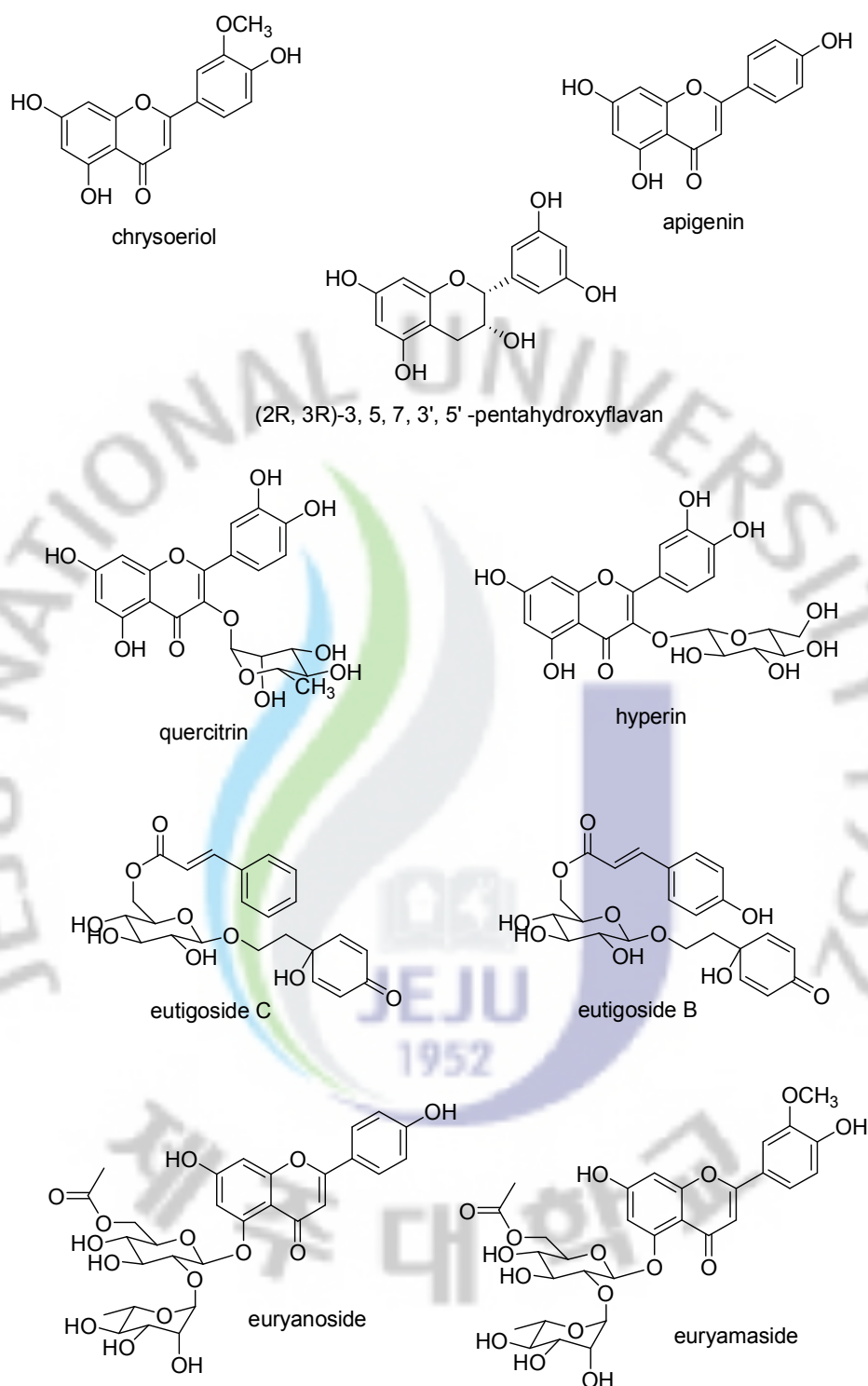


Figure 2. Structures of reported compounds from *E. emarginata*.

4. 감귤

감귤류(citrus)는 쌍떡잎식물강 운향목 운향과(*Rutaceae*) 감귤아과(*Aurantidideae*)에 속하는 식물을 말하며, 감귤로 취급하는 것은 감귤속(*Citrus*), 금귤속(*Fortunella*), 탕자나무속(*Poncirus*) 및 클리메니아(*Clymenia*)의 4속이며, 이들 중 재배 대상은 전자의 3속이다.³⁵ 귤 종류는 모두 상록관목 또는 소교목으로 가지에 가시가 있다.

감귤의 원산지는 인도로부터 중국 중남부에 이르는 아시아 대륙의 동남부와 그 주변으로 추정되고 있으며, 인도의 앳삼 지방 동남부에서는 라임이 탄생되었고, 서쪽에서는 시트론, 리모니아, 레몬이 탄생되었는데, 그 원생지와 그 주변에서 많은 감귤들이 불어나게 되어 중국을 거쳐 우리나라와 일본에까지 전파 된 것으로 추정하고 있다.

건조된 감귤류의 과피 속에는 과피의 30~50%에 해당하는 양의 알콜 용해성 고형물이 존재하며, 이 중 80% 정도는 포도당, 과당, 설탕 등이 차지하고 있다. 또한 1~7% 정도의 bioflavonoid가 존재하며 기타 각종 vitamin, 소량의 limonoid, 0.01% 정도의 페놀계 화합물(phenolics), 0.3%의 오일(oil) 등이 존재한다. 감귤 과피 중에 포함된 알콜 불용성 고형물은 대개 polysaccharides로 펙틴 23%, hemicellulose 13% 및 cellulose 20~30%으로서 과피 전체 고형물 중 50~60% 정도가 알콜 불용성 고분자 당류에 속한다.³⁶

감귤류 과피 속에 포함된 성분 중 펙틴을 포함하는 식용섬유를 충분한 양으로 섭취할 경우 동맥경화증, 고지혈증 및 당뇨 예방에 도움이 된다. Carotenoid 및 비타민 C 등이 감귤류 과피에 많이 들어 있으며 기타 여러 종류의 비타민이 포함되어 있다(Table 1). 특히, 다양한 종류의 바이오플라보노이드가 감귤 과피에 존재하며(Table 2), 오렌지, 레몬 및 감귤의 주요성분은 hesperidin이며, grapefruit의 주요성분은 naringin이고, 유자에는 naringin과 hesperidin 등이 비슷한 양으로 포함되어 있다.^{37~39}

Table 1. Vitamins included in citrus peel.

성분	mg/kg
Ascorbic acid	1,360
Biotin	0.05
Caratenoids	100
β -carotene	2.5
Choline	230
Folic acid	0.12
Inositol	2,570
Niacin	9
Pantothenic acid	5
Pyridoxine	1.8
Riboflavin	0.9
Thiamin	1.2

Table 2. Flavonoids included in citrus peel.

Grapefruit	Lemon	Tangerin	Orange	Mandarin
Apigenin	Apigenin	Hesperidin	Auranetin	Diosmin
Eriodictyol	Chrysoeriol	Nobiletin	Hesperidin	Flavon
Hesperetin	Diosmin	Tangeretin	Naringin	Hesperidin
Hesperidin	Eriocitrin	More...	Neohesperidin	Naringin
Isorhamnetin	Hesperidin		Nobiletin	Naringenin
Kaempferol	Isorhamnetin		Rutin	Nobiletin
Naringin	Limocitrin		Sinensetin	Quercetin
Poncirin	Limocitrol		Tangeretin	Rutin
Quersetin	Naringin		Vitexin	Tangeretin
Qutin	Neohesperidin		More...	More...
More...	Poncirin			
	Quercetin			
	More...			

감귤류 과피는 각종 약리활성작용, 예를 들어, 심장순환기 질환과 관련된 지질 대사 개선 효과, 항암 및 항바이러스 작용 등을 가진 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 헤스페리딘 또는 헤스페레틴은 모세혈관강화, 투과성 감소, 혈압 강하, 혈중 콜레스테롤 강하, 항혈소판 응집, 항염증 및 항바이러스 작용을 한다고 알려져 있고, 바이오플라보노이드는 항산화, 혈압강하, 항암 및 항바이러스 작용을 한다고 알려져 있으며, 나린제닌 및 나린진은 콜레스테롤 강하, 항암 및 항위궤양 작용을 한다고 알려져 있다.³⁷

감귤은 현대인에게 필요한 생리활성 물질들이 풍부한 생물산업 소재로 그 가치가 매우 높다고 할 수 있으며, 식품 산업은 물론 화장품산업과 의약산업 등 다양한 분야에서 연구 개발이 활발히 진행되고 있다.

1960년부터 2005년 6월까지의 감귤류에 관한 국내특허 532건 중 식품(271건), 의약품(68건), 화장품(58건)에 관계된 출원이 74.6%에 달하고 있으며, 향후 감귤류의 다양한 성분의 효능에 대한 연구와 아울러 2차 가공산업 분야에 대한 투자와 연구개발이 필요하다.³⁵

우리나라에서 감귤 재배의 기록은 고려중엽이나, 그 이전부터 자생했을 것으로 추정되고 있다. 기록이 없기 때문에 재래 귤의 도입경로나 도입연대는 분명하지 않으나 남해안 지역은 감귤의 자생지권에 속하므로 자생종이었으리라는 추측할 수 있다.

제주도에서 개량종 감귤 재배가 시작된 것은 1911년 서흥동 천주교회의 엄신부가 일본에 있는 친구로부터 받은 온주밀감 묘목을 시험 재배하면서 부터이며, 1930년대 서귀포 주변지역으로 확산되었으며, 1960년대에 들어서 감귤 수요가 증가하고, 1968년 감귤 증산정책이 책정되면서 재배가 급격히 확산되었다.⁴⁰

제주산 감귤은 맛과 향이 좋고 각종 비타민을 함유하고 있으며 한국인에게 생식으로 가장 많이 이용되는 과일 중의 하나이며 약용으로도 예로부터 그 효과를 인정받아 두루 사용되어 오고 있다. 또한, FTA 체결과 과도한 감귤 생산량으로 인하여 미국산 오렌지에 대응하는 신품종 감귤의 개발 및 과잉 생산된 제주산 감귤의 새로운 용도 및 수요를 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다.

식물 정유는 식물 내 함유되어 있는 방향성 기름 성분(essential oil)으로 주로 식물의 내분비선에서 분비되는 2차 대사산물이며, 최근 천연원료에 대한 관심이

고조되면서 여러 정유성분에 대한 방향효과, 향균 및 방부효과에 대한 연구, 식품 및 의약품, 화장품 등의 첨가제로서의 활용이 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 특히, 국내에서는 온주 품종의 감귤 정유의 항진균성 및 여드름균에 대한 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

특히 감귤정유는 감귤껍질 flavedo 층의 유포(oil glands) 중에 함유되어 있는 방향성분으로 감귤의 종류는 물론 동일종에서도, 기후, 풍토, 과실의 온숙 및 저장의 시간적 변화 등에 의해서 성분의 변화가 있으며, 세정제, 식품향료 의약품 등에 첨가제로 널리 이용되고 있다.

주성분인 d-limonene (65~88%)은 인체 및 환경에 유해한 영향을 주지 않는 물질로 1996년 미국 마케팅 선정 에디슨상을 수상한 특수 강력 세정제로 선진국에서는 보편적으로 사용하는 세정제이다.³⁵

천연물로부터 향을 추출하는 방법은 크게 증류법(distillation), 압착법(expression), 용매추출법(solvent extraction)으로 나뉘어진다. 증류법은 essential oil을 추출하는데 있어 90% 이상 사용되며, 그 종류에는 water distillation, steam distillation, water and steam distillation, dry distillation 등이 있다.

식물체에 수증기를 불어넣어 파괴된 유세포로부터 분리하거나 또는 증기압으로 유리하여 얻어지는 향 물질은 수증기를 따라서 증류된다. 증류성분의 비점은 대개 150~300℃ 정도 되는데 수증기 증류법을 이용할 경우 그 성분들은 실제의 비점보다 떨어지는 저온에서 증류된다. 따라서 향료성분의 분해나 변질을 막는 것이 가능하다. 수증기법은 추출법 압착법에 비해 대규모로 생산하는데 적합해서 공업적으로 널리 이용되고 있다. 그러나 열에 불안정한 것 혹은 수용성 향료의 생산에는 부적당하다.

Expression 법은 감귤류 종류에 이용되며, 과피를 압착시키면 정유와 과즙의 혼합물을 얻게 되는데 pectin 및 그 외의 성분도 포함되어 있기 때문에 현탁상태로 되어 있다. 방치 후 분액해서 유분을 취한다.

이 방법에는 ecuelle법, sponge법, 기계적 방법 등 세가지가 있다. Ecuelle법은 약 1 cm 길이의 침이나 스파이크 모양의 돌출물이 다수 나와 있는 직경 20 cm의 나팔이나 funnel 모양의 금속기구인 ecuelle이라는 특수한 기구를 이용하여 채유하는 방법으로 이태리 북부에서 예로부터 행해지고 있다.

Sponge법은 이태리 남부등에서 행해지는 방법으로 소규모의 가내 수공업적 방법으로 과피를 손으로 눌러 나오는 정유를 다른 손에 쥔 sponge에 흡수시키고 이것을 다시 짜서 나온 액을 별도의 용기에 담아 과즙과 정유를 분액해서 채유하는 것이다.

기계적 방법은 과피를 벗기거나 압착하거나 분액 정제 등의 전과정을 기계적 방법에 의해 행하는 채유법으로 미국 캘리포니아 지방에서는 많이 사용하고 있다.

Extraction법은 열에 불안정한 장미, 자스민, 네롤리 등과 같은 꽃에 대해서 사용하며, 비휘발성 용제 추출법과 휘발성 용제추출법 등이 있다. 비휘발성 용제추출법은 남프랑스 지방에서 널리 행해지는 방법으로 지방이나 지방유가 꽃향 성분을 잘 흡수한다는 성질을 이용한 것으로 흡수법(absorption)이라고 할 수 있다.

휘발성 용제추출법은 Robiquet에 의해서 처음으로 응용되었던 방법으로 설비, 용매, 조작방법 등을 개량하여 근대적 방법으로 오늘날에 널리 이용되고 있다.

Essential oil은 10~30개의 탄소원자를 함유하는데 분자량이 작을수록 쉽게 기화하므로 대부분의 휘발성 방향 물질은 isoprene 2개 또는 3개로 구성된 mono-terpenoid와 sesquiterpenoid이다. Essential oil에 들어있는 향 물질은 단일 성분보다는 다수의 화학성분이 상호작용하여 단일 성분의 성능을 높여주는 시너지 효과(synergy effect)를 일으키거나, 단일 성분의 부작용을 막아주는 억제작용(quenching effect)이 나타나는 것으로 알려져 있다.⁴¹

그러나, 진행된 연구들은 현재 제주에서 재배되는 온주품종의 성숙과 유래 감귤 정유에만 국한되어 향균활성에 대한 연구만이 진행된 상태이다. 이에 본 연구에서는 신품종 개량을 위한 미숙성 감귤 정유에 대한 향균과 항산화, 항염증 효과 및 성분 분석 등의 연구를 진행하고자 하였다. 감귤류의 정유 성분은 열에 약하여 expression 법을 이용하여 채유하여야 하나, 실제 얻어지는 essential oil의 양이 극히 미미하거나 전무하여 본 연구에서는 water distillation 법을 이용하여 얻어내었다.

감귤류의 과실은 다양한 bioflavonoid를 함유하고 있으며, 이는 비타민 P로 알려져 있고 필수적인 영양요소는 아니지만, 건강에 도움을 주는 역할을 하고 있는 물질군이다. 감귤류에서 주로 발견되는 주성분은 hesperidin, naringin 외에 rutin,

naringin, neohesperidin, sinensetin, poncirin, didymin 등이며, 대부분 감귤류에서 나타나는 노란색소의 물질로, 화학 구조적으로 플라보노이드 골격을 포함하고 있다.

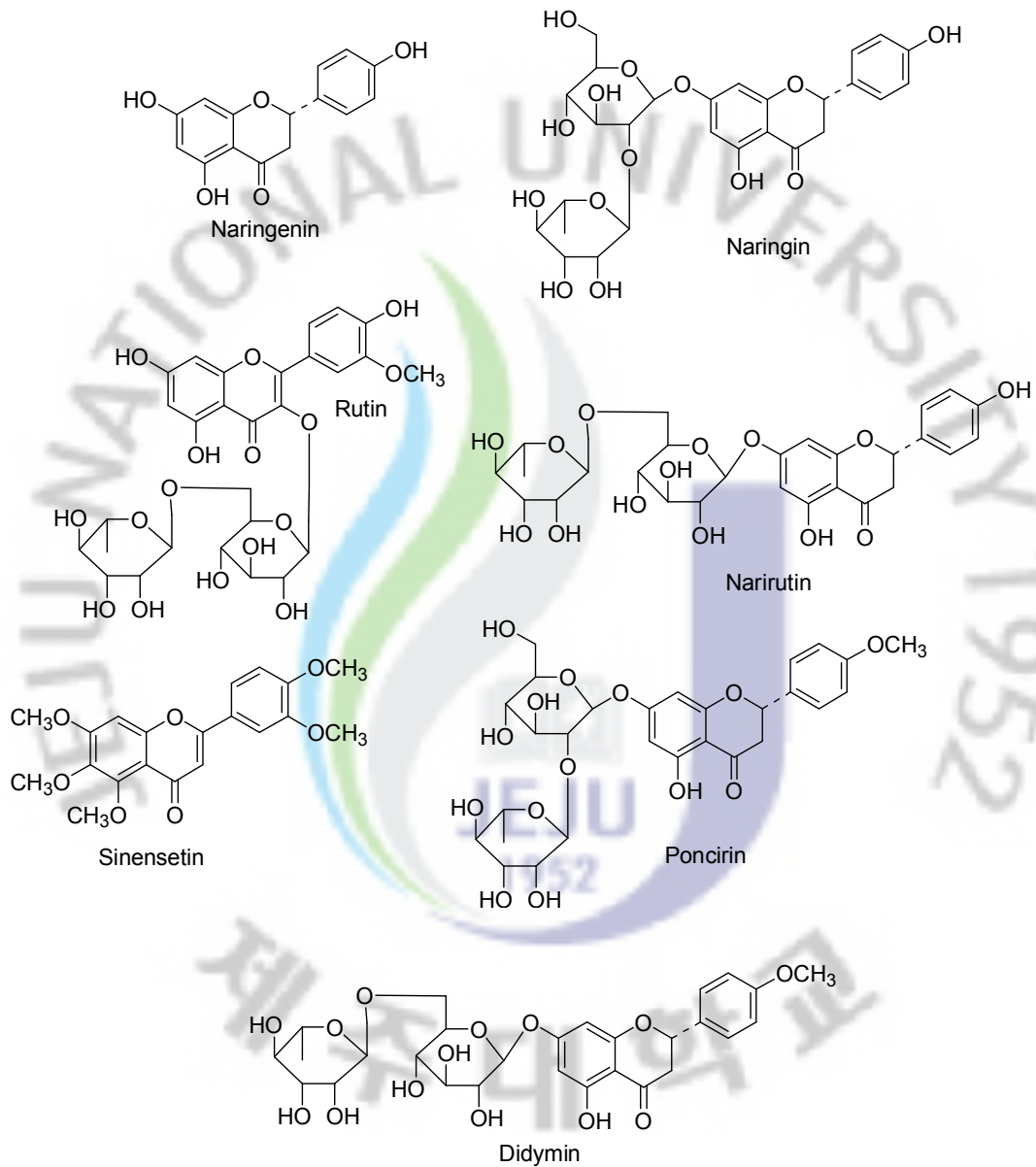
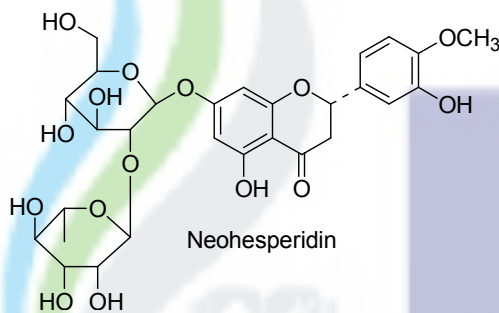


Figure 3. Structures of some citrus flavonoids.

플라보노이드 중에서 neohesperidin은 감귤에는 함량이 많지 않으나 당유자, 지각, 편귤에서 함량이 많음을 확인 한 바 있다. 당유자(*Citrus grandis*)는 제주도에서 자생되는 약용과일로써, 유자보다 열매가 약 10 배 정도 크고, naringin 등의 플라보노이드가 풍부해 기침과 감기에 좋다고 알려진 과실이다. 특히 당유자 미숙과(반지름 7.7 mm 내외)의 neohesperidin 함량은 33% (건조 중량 기준)에 이르러, 지금까지 보고된 어떤 품종보다도 높은 것으로 나타났다. 그러나, 당유자의 숙성 정도에 따라, 네오헤스페리딘 함량이 급격히 감소함을 확인하였다.

따라서 이른 시기의 미숙과에는 경쟁력 있는 상당량의 neohesperidin이 기대되며, 6월 22일경 수확된 당유자의 경우 건조중량 기준으로 33%의 neohesperidin이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다.⁴²



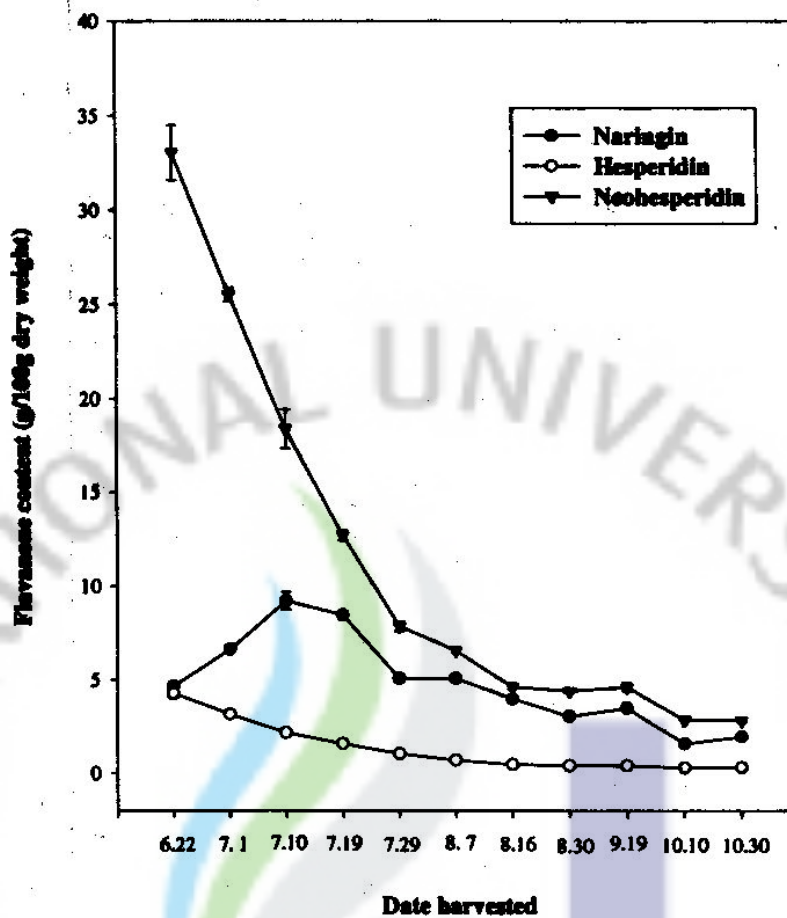


Figure 4. Changes in the flavonoids of *C. grandis* Osbeck.

상기한 바와 같이 감귤유래 플라보노이드가 많은 활성을 보이는데 반하여, 생산 조절에 따른 미숙과의 낙과를 이용한 미성숙 감귤로 부터 대량의 플라보노이드 분획의 제조 및 이의 생리 활성을 확인하고자 하였으며, 다른 감귤류에 비하여 특히 neohesperidin을 다량 함유 하고 있는 당유자로부터 neohesperidin 함유 플라보노이드의 활성을 확인하고자 하였다.

II. 시약 및 기기

우묵사스레피의 추출 및 분리 실험에 사용한 무기염류 및 일반용매는 시약등급을 사용하였다. 물질분리를 위해 사용한 Sephadex LH-20 (bead size 25 ~ 100 μm)은 Pharmacia (Sweden)의 제품을, HPLC column은 Shisheido (Japan)의 제품을 사용하였으며, HPLC는 Hitachi (Japan)의 L-7100 pump, L-7200 UV detector를 사용하였다. HPLC 용매는 Baxter (Burdick & Jackson, USA) 제품을 사용하였다. NMR 스펙트럼은 JNM-LA 400 (FT NMR system, JEOL Co. Japan)을 이용하여 측정하였다. 화학이동 값은 ppm으로 나타내었고, 짝지움 상수 (J value)는 Hz로 나타내었다. NMR 신호의 표기는 s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet 등으로 표시하였다. NMR용 CD_3OD , CDCl_3 는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)사의 제품을 사용하였다. High resolution 과 low resolution mass spectrum은 한국기초과학지원연구원(Korea basic science institute Seoul center) 서울지원에 의뢰하여 측정하였다.

활성 검색을 위해 동물세포배양을 위한 CO_2 incubator는 Cellstar (USA)제품을 사용하였으며, microplate reader는 Amersham Pharmacia Biotech (NY, USA) 제품을 사용하였다. Lipopoly-saccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, Fetal bovine serum (FBS)와 DMEM 배지는 Gibco (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. IL-6 정량을 위한 ELISA kit 는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였으며, 세포 독성 평가를 위한 lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity detection kit 는 Promega (Madison, WI, USA)로부터 구입하였다. 그 외 모든 시약은 표준등급시약을 구입하여 실험에 사용하였다. Western blot 실험을 위한 iNOS, COX-2, I κ B- α , p38, ERK1/2, phospho-ERK 1/2, JNK 그리고 phospho-JNK antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 phospho-p38 antibody는 BD Biosciences (San Diego, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

미성숙 감귤류 정유 추출물들의 성분 분석에 필요한 GC와 GC/MSD는 FID를 이용한 영린기기의 600D(Korea)와 HP사의 5972 MSD를 장착한 HP 5890 GC/MSD (USA)를 이용하였다. 컬럼은 DB-1HT (30 m, ID:0.32 mm, Film:0.1 μ m)가 이용되었으며, 오븐 조건은 초기 40°C에서 5 분, 210°C까지 10°C/min의 기율기로 승온하여 210°C에서 28 분간 머물렀다. 생리활성 검색에 필요한 spectrophotometer는 Bio-tek Inc. (VT, USA)의 Power Wave를 사용하였다.

당유자 미숙과 추출에 사용된 methanol과 ethanol은 동양제철화학주식회사의 extra pure급을 사용하였고, 고분자량의 물질을 제거하기 위해서 사용된 ultrafiltration kit은 Millipore 사의 prep/scale TFF cartridge (USA)를 사용하였다. Flavonoid만을 선택적으로 획득하기 위해 충전제로서 Amberlite XAD-16을 Sigma에서 구매하였다. HPLC 검출의 standard로 사용된 naringin, neohesperidin의 표준품은 각각 Sigma 사에서 구입하여 사용하였다. Prep-HPLC는 Waters Delta Prep 4000 (USA)을 이용하였고, 컬럼은 prep novapack HR C₁₈ 7.8×300 mm을 이용하였다. 검출은 Waters의 2487 UV detector (USA)를 이용하여 254 nm에서 하였고, MPLC는 Yamazen 사의 Pump 540과 Prep·UV-10V Set (Japan)를 이용하였다. MPLC의 컬럼은 Yamazne 사의 ULTRA PACK SI-40B, 26×300 mm 컬럼을 사용하였다. 정량에 사용한 HPLC는 PDA detector Waters 2996 (USA)을 갖춘 alliance 2695 Separation Module 시스템을 사용하였으며, 컬럼은 Waters의 Sunfire 4.6 mm×250 mm(5 μ m)를 이용하였다.

Ⅲ. 과제 1: 우묵사스레피로부터 유효성분 분리 및 동정

1. 재료

이 실험에 사용한 우묵사스레피(시료번호: 293)는 2006년 8월 하순 잎과 잔가지를 포함하여 제주대학교 교내에서 채집하여 사용하였다.

2. 실험방법

2-1. 시료의 추출 및 용매 분획

채집된 시료 5.3 Kg을 건조 과정 없이 세절하여 100% 메탄올 45 L를 이용하여 1회, 70% 메탄올 45 L를 이용하여 1회 24 시간 침출 및 교반 하여 추출물을 얻었다. 추출된 용매는 Whatman No. 5 filter를 이용 하여 감압 여과 및 감압 농축을 실시하였다. 이 추출물 중 12.3 g을 취하여 물 1 L에 분산시킨 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH을 각각 1회에 1 L씩 가하여 용매 분획하는 것을 각 용매 당 3회 반복하여 실시하였다(Figure 5).

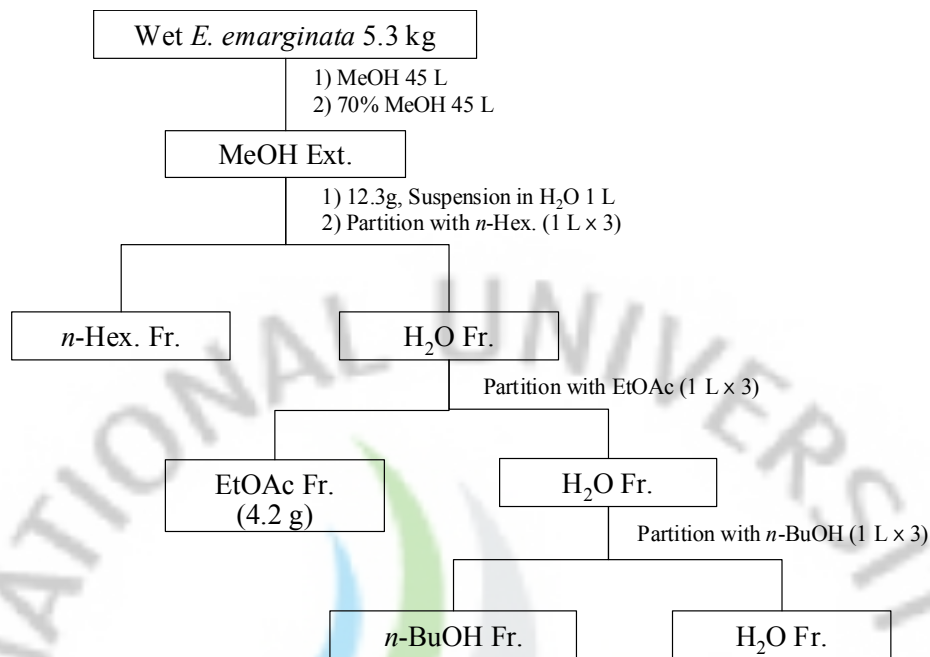


Figure 5. Procedure of extraction and solvent fraction from *E. emarginata*.

2-2. 화합물의 분리 과정

2-2-1. Compound 1, 2, 3, 4의 분리과정

용매 분획으로 얻은 에틸아세테이트 분획 4.32 g을 소량의 메탄올에 녹이고 약 30배의 무게인 120 g의 셀라이트(celite)의 표면에 흡착시킨 후 감압 농축하여 메탄올을 건조 시킨 후 컬럼관에 충전 하였다. 각각 1 L의 유기용매를 흘려 hexan 분획(CHx Fr.) 8.7 mg, 디클로로메탄 분획(CDM Fr.) 1.05 g, 에틸아세테이트 분획(CEA Fr.) 2.69 g, 메탄올 분획(CMe Fr.) 434 mg을 얻었다.

셀라이트 충전제를 이용하여 얻은 CDM Fr. 1.05 g을 2.5×48 cm로 충전된 순상 실리카겔 컬럼에서 chloroform/methanol (6/1)의 용매를 이용하여 3NP1~3NP7, 3NPF 까지 8개의 분획으로 나누었다. 이 중 3NP4 (69.2 mg)와 3NP6 (29.0 mg)분획에서 compound 1과 compound 2를 얻었다.

3NP7분획은 농축 후 메탄올 첨가 시 불용성의 침전이 생기는데 이를 별도로

취해내고 3NP7-aPPT분획으로 재명명하였다. 이 3NP7-aPPT분획과 3NPF분획은 소량의 불순물을 제거하기 위하여 다시 1.5×48 cm로 충전된 순상 실리카겔 컬럼에서 chloroform/methanol (6/1)의 용매를 이용하여 6NP13 (67.1 mg)과 6NP10 (48.1 mg) 분획을 얻었으며, 이 두 개의 분획을 compound 3, compound 4로 하였다(Figure 6).

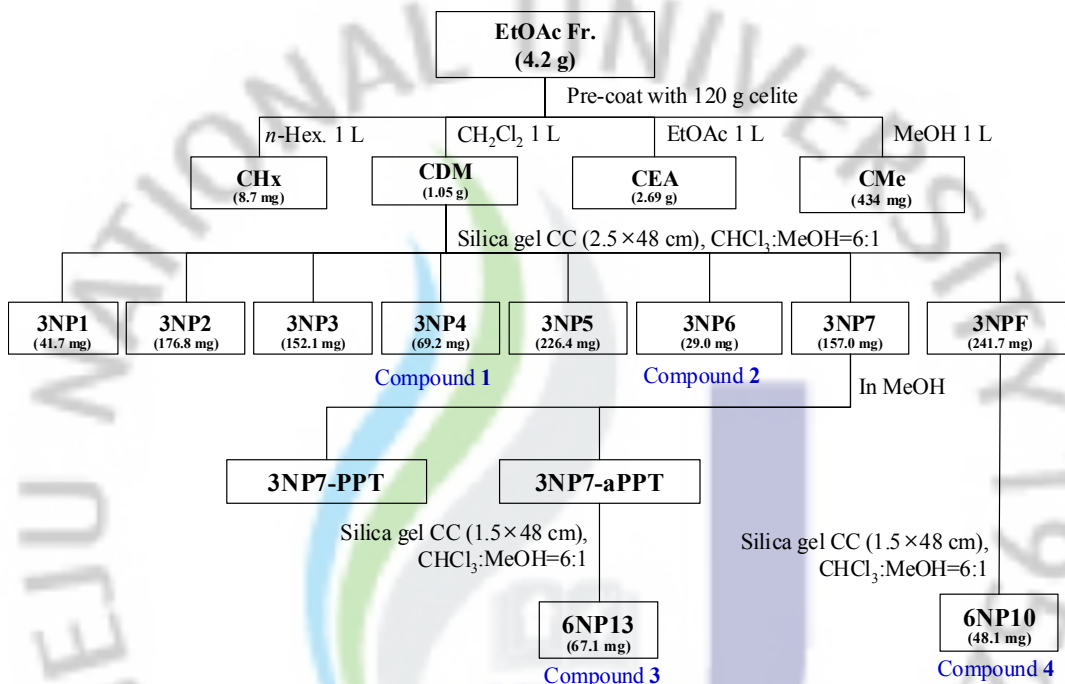


Figure 6. Isolation of compounds 1~4 from EtOAc Fr.

2-2-2. Compound 5, 6, 7의 분리과정

Celite를 이용한 EtOAc 분획인 CEA Fr. 2.5 g을 취하여 3.0×50 cm로 충전된 순상 실리카겔 컬럼에서 chloroform/methanol (6/1)의 용매를 이용하여 4NP1~4NP6, 4NPF 까지 7개의 분획으로 나누었다. 이 중 역시 4NP5분획과 4NPF 분획이 단일 화합물 위주의 분획으로 판단하였다.

4NP6 분획은 1.5×50 cm로 충전된 순상 실리카겔 컬럼에서 chloroform/methanol (3/1)의 용매를 이용하여 8개의 분획으로 나누었으며, 그 중 5NP3 분

획을 C₁₈ RP-HPLC를 이용 CH₃CN/H₂O (1/9→1/0)의 gradient elution 조건으로 용출시켜 5 mg의 7HP1 분획을 얻었으며 이는 compound 6으로 얻어졌다(Figure 7).

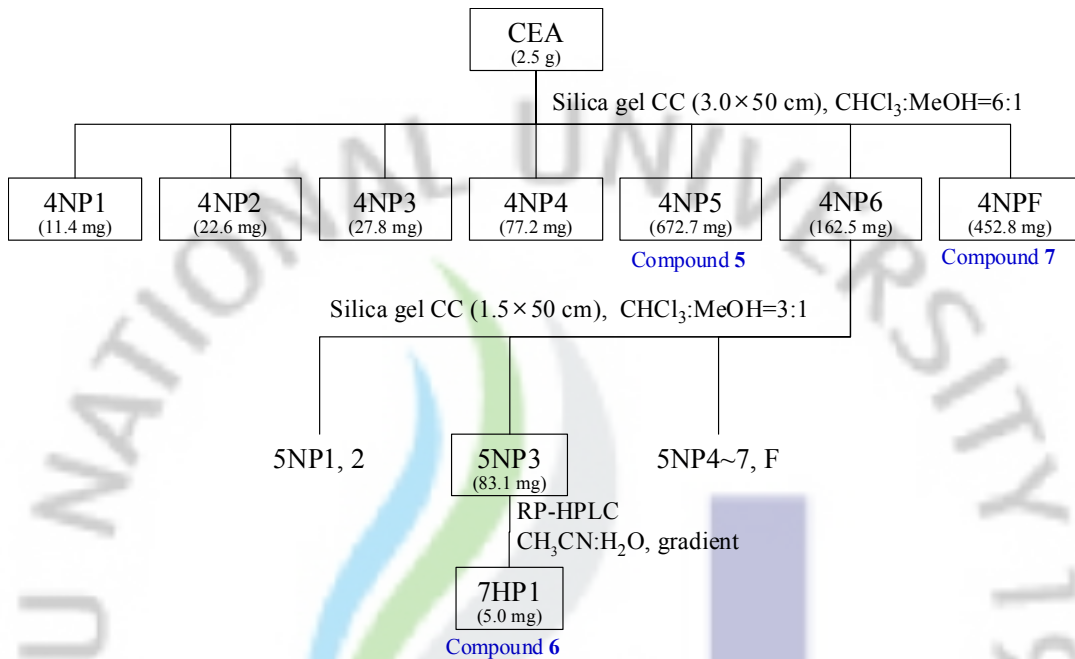


Figure 7. Isolation of compounds 5~7 from CEA Fr.

2-2-3. Compound 8, 9, 10, 11의 분리과정

분리 과정을 보다 단순화 하기 위하여 추출물 40.2 g을 pre-coat한 550 g의 celite를 컬럼에 충전 한 후 각 2 L의 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, MeOH를 통과 시켜 각각 2CHx, 2CDM, 2CEA, 2CMe 분획을 얻었다.

이 중 2CHx Fr. 1.0 g을 취하여 3.0×35 cm로 충전된 순상 실리카겔 컬럼에서 chloroform/methanol (10/1)의 용매를 이용하여 총 5개의 분획을 얻었으며, 그 중 ANP4 분획을 31.3 mg 얻었으며 이를 compound 8로 하였다. 2CDM Fr. 중 1.5 g을 취하여 3.0×35 cm로 충전된 순상 실리카겔 컬럼에서 chloroform/methanol (6/1)의 용매를 이용하여 총 11개의 분획을 얻었으며, 이 중 CNP4 43.3 mg을

compound 9 로 얻을 수 있었으며, CNP10 분획은 비슷한 구조를 가진 것으로 추측되는 compound 10과 compound 11의 mixture 형태로 137.8 mg 얻어졌다 (Figure 8).

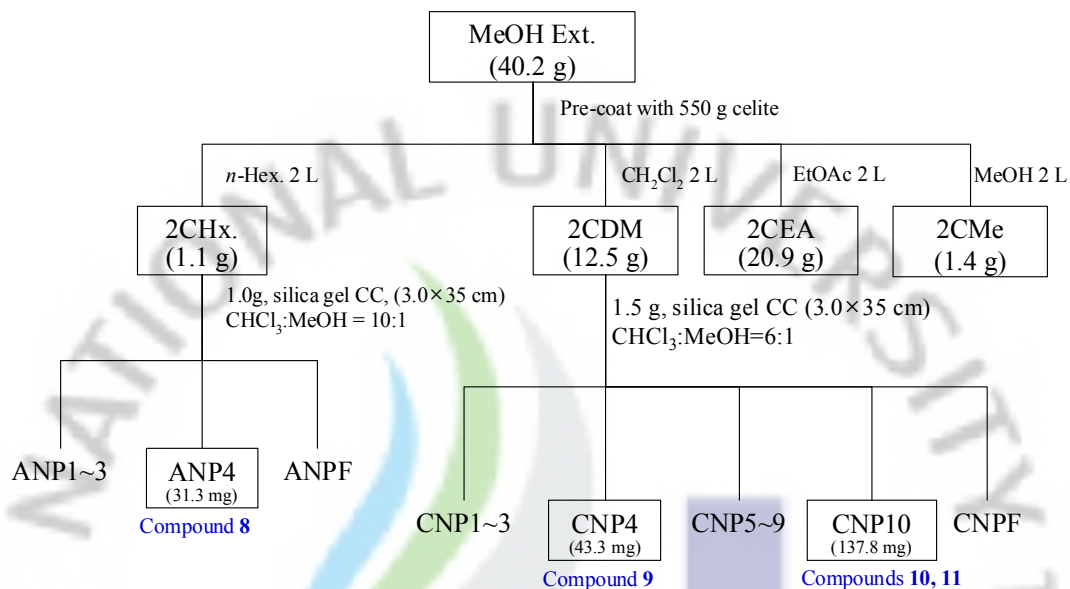


Figure 8. Isolation of compounds 8~11 from 2CDM Fr.

2-3. 활성평가

2-3-1. 항산화 효능 평가

우목사스레피에서 분리한 물질에 대한 항산화 활성을 측정하고자 DPPH free radical scavenging assay와 xanthine oxidase inhibition/superoxide radical scavenging assay를 실시하였다.

1) DPPH radical scavenging assay

항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하여 시료의 라디

칼 소거효과를 측정하는 Blois법을 활용 하였다.⁴³ DPPH free radical scavenging assay는 에탄올에 녹인 각각의 농도의 시료를 96 well plate에 분주하고 0.1 mM DPPH를 처리한 후 실온에서 10 분 반응 시킨 후 흡광도는 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 DPPH 의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(SC₅₀)로 표시하였다.

2) Xanthine oxidase inhibition and superoxide scavenging assay

Xanthine을 기질로 하여 xanthine oxidase에 의해 생성된 uric acid의 양을 290 nm에서 흡광도를 측정하여 검색하였고, superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원법으로 517 nm에서 측정하였다.^{44,45} 반응액은 100 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 1 mM xanthine, 0.5 mM EDTA, 59 µg/mL BSA를 여러 농도의 시료에 첨가하여 25°C에서 10 분간 정치한 후 0.5 U/mL xanthine oxidase를 첨가한 후 25°C에서 10 분간 다시 반응 시켜 uric acid의 생성을 유도하였고, superoxide 소거 활성은 1 mM NBT 를 첨가한 후 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀ 및 SC₅₀)로 표시하였다.

2-3-2. Cell culture

본 실험에서 사용한 대식 세포주(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 분양 받았으며, 인간 각질형성 세포주(human keratinocyte cell line)는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받았다. Melan-a cell은 C57BL6 mice에서 채취하여 만들어낸 immortalized melanocyte로 런던대학 St. George 의과대학의 Dr. D. C. Bennet으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온 조건하에서 배양하였으며, 세대 배양은 3일에 한번 씩 시행하였다.

2-3-3. 세포독성 측정

1) Melan-a cell에 대한 세포 독성 평가

세포 생존률을 측정하기 위해 crystal violet assay를 시행하여 측정하였다. Melan-a cell 1.0×10^5 cells/mL의 농도를 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL)을 포함하는 RPMI 1640 배지에 200 nM TPA를 첨가하여 현탁하였다. 현탁세포 1 mL을 24 well plate (Falcon, Becton Dickinson)에 넣고 5% CO₂-95% 공기 조건으로 37°C에서 세포부착을 위해 24 시간 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고, PBS (Phosphate buffer saline)로 두 번 세척한 후, 0.1% crystal violet (in 10% ethanol)을 각 well에 500 µL씩 넣고 5 분 동안 실온에서 고정시킨 후, 증류수로 4회 세척하여 남아 있는 crystal violet을 제거하였다. 세포에 염색된 crystal violet은 95% ethanol을 각 well에 1 mL씩 넣어 녹인 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성 평가

RAW 264.7 세포를 18 시간 배양한 후 농도별 시료와 LPS (1 µg/mL)를 동시에 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액(2 mg/mL in PBS)을 첨가하여 4 시간 동안 반응시켰다. 상층액을 완전히 제거하고 DMSO를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 독성 정도를 평가하였다.

3) LDH cytotoxicity assay

LDH (젖산탈수소효소)는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로 원형질막의 손상이 있으면 세포 밖의 배양액으로 급격하게 분비된다. LDH 유리의 증가는 원형질막의 손상된, 즉 죽은 세포가 증가함을 나타내는 것이다.⁴⁶ HaCaT 피

부 각질세포에는 자극제로 hIFN- γ (10 ng/mL)를 RAW 264.7 세포에는 자극제로 LPS (1 μ g/mL)를 농도별 시료와 동시 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양 후 배지를 얻어 12,000 rpm에서 3 분간 원심 분리하였다. LDH assay는 cytotoxicity detection kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였으며, 96well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50 μ L와 reconstituted substrate mix를 50 μ L를 넣고, 실온, 암 조건에서 30 분 반응 시킨 후 50 μ L의 1N HCl stop solution을 넣은 후 microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 평균 흡광도를 구하였으며, 대조군 (LDH control)의 흡광도 값과 비교하여 세포 독성을 평가하였다.

2-3-4. Melan-a cell의 melanin 생합성 저해 활성 측정

Melan-a cell의 melanin 생합성 저해율을 측정하기 위해 다음과 같이 하였다. Melan-a cell 1.0×10^5 cells/mL의 농도를 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL)을 포함하는 RPMI 1640 배지에 200 nM TPA를 첨가하여 현탁하였다. 현탁세포 1 mL을 24 well plate (Falcon, Becton Dickinson)에 넣고 5% CO₂-95% 공기 조건으로 37°C에서 세포부착을 위해 24 시간 배양하였다. 세포가 안정화되면 새로운 배지로 교환하며 시료를 농도별로 3일 동안 동일하게 처리한 후 24 시간 후에 생성된 melanin을 0.85 N KOH에 용해하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Negative control으로는 시료액을 녹인 용액을 넣었고, positive control로 PTU를 넣어 생성된 melanin 양을 백분율로 나타내어 비교하였다.

$$\text{Melanin 생성 저해율(\%)} = \frac{\text{각 시료액의 반응흡광도}}{\text{공시험액의 반응흡광도}} \times 100$$

2-3-5. NO assay

RAW 264.7 세포에 대하여 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절 한 후 24 well plate 에 접종하고, 시험물질과 LPS (1 μ g/mL)를 함유한 새로운

배지를 동시에 처리하여 24 시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μL를 혼합하여 96 well plates에서 10 분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 serial dilution하여 얻었다(1~100 μM).

2-3-6. Pro-inflammatory cytokines (IL-6)의 정량

RAW 264.7 세포 (1.5×10^5 cells/mL)를 18시간 전 배양하고 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시처리 하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min) 하여 얻어진 상층액의 IL-6 함량을 측정하였다. 정량은 murine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D system, Inc, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.⁴⁷

2-3-7. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 평가

RAW 264.7 세포 (1.5×10^5 cells/mL)를 18시간 전 배양하고 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시처리 하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min) 하여 상층액을 얻었다. PGE₂의 측정은 PGE₂ murine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D system, Inc, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

2-3-8. 염증성 인자(iNOS, TNF-α, IL-6, COX-2)와 아토피 인자 (MDC, TARC)의 mRNA 발현억제효과

1) RNA 분리

RAW 264.7 세포는 18 시간 전 배양하고 농도별 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 25 U/mL)를 동시 처리하여 24 시간 배양하였다. HaCaT 세포는 24 시간 전 배양하고 농도별 시료와 hIFN- γ (10 ng/mL)을 동시 처리하여 배양하였다. Total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRI-reagent를 500 μL 첨가하여 균질화 한 후 CHCl_3 를 첨가하여 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 isopropyl alcohol을 첨가하여 원심분리 한 RNA를 침전시키고 75%의 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 ethanol로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹인 다음, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, 흡광도 260 nm 와 280 nm의 비율(A260/A280 nm)이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 얻었다.

2) cDNA 합성

cDNA 합성은 Improm-IITMcDNA kit (Promega)를 이용하여, 1 μg 의 total RNA를 oligo (dT)18 primer, dNTP (0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 그리고 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 min heating 시킨 후 반응을 중지시켜 cDNA를 합성하였다.

3) PCR

위 실험에서 합성된 cDNA로부터 MDC, TARC, iNOS, TNF- α , IL-6 및 β -actin을 증폭시키기 위하여 2 μL cDNA, 4 μM 의 5' 과 3' primer, 10x buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM MgCl_2 , 1 unit Taq polymerase (Promega, WI, USA)를 넣고 distilled water로 최종 볼륨을 25 μL 로 맞추고 Perkin-Elmer Thermal Cycler (유전자 증폭기)를 이용하여 PCR을 시행하였다. 이 때 PCR 조건은 94 $^{\circ}\text{C}$ /45 초 55~60 $^{\circ}\text{C}$ /45 초, 72 $^{\circ}\text{C}$ /60 초, 35 회 이며, PCR에 의하여 생성된 산물을 1.0% ~ 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하고, ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였

다(Table 3).

Table 3. The sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis.

Gene		Primer sequences	Fragment size(bp)
MDC	F	5'-GCATGGCTCGCCTACAGACT-3'	497
	R	5'-GCAGGGAGGGAGGCAGAGGA-3'	
TARC	F	5'-ATGGCCCCACTGAAGATGCT-3'	351
	R	5'-TGAACACCAACGGTGGAGGT-3'	
iNOS	F	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	496
	R	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	
TNF- α	F	5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'	364
	R	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	
IL-6	F	5'-GTA CTCCAGAAGACCAGAGG-3'	308
	R	5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
h β -actin	F	5'-ATGGGTCAGAAGGATTccTATG-3'	588
	R	5'-CAGCTCGTAGCTCTTCTCCA-3'	
m β -actin	F	5'-GTGGGCCCGCCCTAGGCACCAG-3'	603
	R	5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	

2-3-9. Western blot analysis

염증유발인자인 iNOS와 COX-2 그리고 아토피성 피부염 신호전달 단백질인

STAT1 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 단백질 발현량 변화를 측정하였다.

RAW 264.7 세포는 18 시간 전 배양하고 농도별 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 25 U/mL)를 동시 처리하여 24 시간 배양하였다. HaCaT 세포는 24 시간 전 배양하고 농도별 시료와 IFN- γ (10 ng/mL)을 동시 처리하여 배양하였다. 세포를 2~3 회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가하여 30 분 ~ 1 시간 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μg 의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200mA 로 2 시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skin milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 overnight 실시하였다. iNOS의 발현양을 검토히기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1 : 1000) (Santa-Cruz)를 COX-2의 발현양을 검토히기 위한 항체로는 anti-rabbit COX-2 (1 : 1000) (Santa-Cruz)를 사용하였다. Phosphorylation 된 STAT1과 total STAT1의 발현 양을 검토히기 위한 항체로는 anti-rabbit STAT1 (phospho-STAT1, 1 : 250) (Cell signaling, USA)과 anti-mouse STAT1 (1 : 250) (BD, USA)를 사용하였다. 각 항체들은 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2 시간 반응 시킨 후 TTBS로 3 회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG (Amersham Co.)를 1 : 2500 ~ 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 40 분간 반응 시킨 후 TTBS로 3 회 세정하여 ECL 기질(Amersham Co.)과 1 분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

2-3-10. Transient transfection과 luciferase assay

세포에 NF- κB 를 transfection 시키기 위하여 50 ng 의 NF- κB promoter-based luciferase reporter plasmid (Panomics, Redwood City, CA, USA) 와 내부표준 물질로 사용하는 Renilla luciferase reporter plasmid (Promega) 10 ng을

TransFast™ transfection reagent (Promega)를 이용하여 co-transfection 시켜주었다. Transfection 24 시간이 지난 후, 시험물질과 LPS (1 µg/m)를 처리하고 20 시간을 배양해주었다. Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega)를 이용하여 세포내의 luciferase 활성을 측정해주었다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 그 활성 정도를 조사하였다.

2-3-11. Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)

세포내의 NF-κB-DNA binding 활성도를 측정하기 위하여 gel-shift assay system kit (Promega)를 이용하여 EMSA 를 시행하였다. NF-κB 서열을 포함하는 double-stranded oligonucleotides 를 [γ -³²P]ATP (2.5 µCi; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)와 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 섞어주었으며, EMSA 를 위한 probe 로 이용하였다. 세포로부터 분리한 핵 단백질 5 µg 을 gel-shift binding buffer [4% glycerol, 1 mm MgCl₂, 0.5 mm EDTA, 0.5 mm DTT, 50 mm NaCl, 10 mm Tris-HCl (pH 7.5), 0.05 mg/mL poly(deoxyinosine-deoxycytosine)]와 배양해주고 라벨된 probe 와 실온에서 20 분 반응시켜주었다. 각각의 시료를 6% non-denaturing polyacrylamide gel를 이용하여 전기영동해주고, 전기영동이 끝나면 깨끗하게 씻은 후 건조하여 X-ray 필름에 감광해주었다.

3. 결과

3-1. 우묵사스레피에서 분리된 화합물의 구조 결정

3-1-1. Compound 1의 구조 결정

Compound 1의 구조를 확인하기 위하여 ¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz)과 ¹³C-NMR, 135° DEPT (CDCl₃, 100MHz)를 측정하였다(Figure 10~14).

Compound 1에 대한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 살펴보면 δ 6.74 (1H, dd, $J=10.3, 1.5$)와 δ 5.59 (1H, d, $J=10.3$)의 두 peak에서부터 *cis*- 형태의 이중 결합이 있음을 예상할 수 있다. 약 δ 3.8에서 δ 4.3 사이에 3개의 수소는 전기음성도가 높은 원소와 결합하고 있는 탄소와 결합하고 있고, δ 2.2에서 δ 2.8 사이의 4개의 수소는 sp^3 혼성탄소와 결합하고 있는 것으로 예상할 수 있으나 각각의 coupling constant 값이 비슷하여 coupling 관계를 명확히 하기 힘들다.

$^{13}\text{C-NMR}$, 135° DEPT을 통하여 1개의 carbonyl carbon signal (δ 197.6)과 다른 전기음성도가 큰 원소와 결합한 1개의 4급 carbon signal (δ 75.4)을 확인하였으며, $^1\text{H-NMR}$ 에서 확인한 바와 같이 2개의 sp^2 carbon signal (δ 148.8, 128.5)을 포함 하여 총 8개의 carbon signal을 확인하였다.

이들의 결합관계를 확인하기 위하여 2D NMR인 HMQC, COSY, HMBC를 측정하였으며, 그 결과 δ 39.6의 carbon signal과 결합하고 있는 δ 2.21 부근의 두 개의 수소는 δ 66.4의 carbon signal과 결합하고 있는 δ 3.96 부근의 두 개의 수소와 이웃하고 있으며 이 δ 66.4의 carbon signal은 전기 음성도가 높은 산소와 같은 원소에 결합하고 있는 것으로 추정되므로 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-$ 의 부분구조를 예상할 수 있다. 마찬가지로 δ 40.2의 carbon signal은 산소와 결합하고 있는 δ 81.5의 탄소와 이웃하고 있어 $-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-$ 의 구조를 예상 할 수 있다.

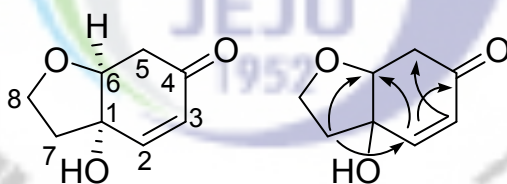


Figure 9. The structure of renyolone (1) and key HMBC correlations.

이 들 부분 구조는 HMBC spectrum을 이용하여 전체 구조를 예상하였으며, 이 구조는 문헌과 비교하여 3,3a,7,7a - tetrahydro - 3a - hydroxy -6 (2H) - benzofuranone인 renyolone (또는 Halleridone, Cleroindicin F)로 동정되었다.⁴⁸ Rennyolone은 우복사스레피에서는 처음으로 분리되었다.

Table 4. NMR spectroscopic data^a for compound 1.

Position	Compound 1		
	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)	DEPT
1	75.4		C
2	148.8	6.74 (1H, dd, 10.3, 1.5)	CH
3	128.5	5.96 (1H, d, 10.3)	CH
4	197.6		C
5	40.2	2.75 (1H, dd, 16.9, 4.6) 2.56 (1H, dd 16.9, 5.5)	CH ₂
6	81.5	4.20 (1H, ddd 4.6, 5.5, 1.5)	CH
7	39.6	2.31 (1H, ddd, 13.0, 8.5, 6.6) 2.18 (1H, ddd, 13.0, 8.0, 6.4)	CH ₂
8	66.4	4.03 (1H, ddd, 8.6, 8.5, 6.4) 3.89 (1H, ddd, 8.6, 8.0, 6.6)	CH ₂

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 400 and 100 MHz, respectively.

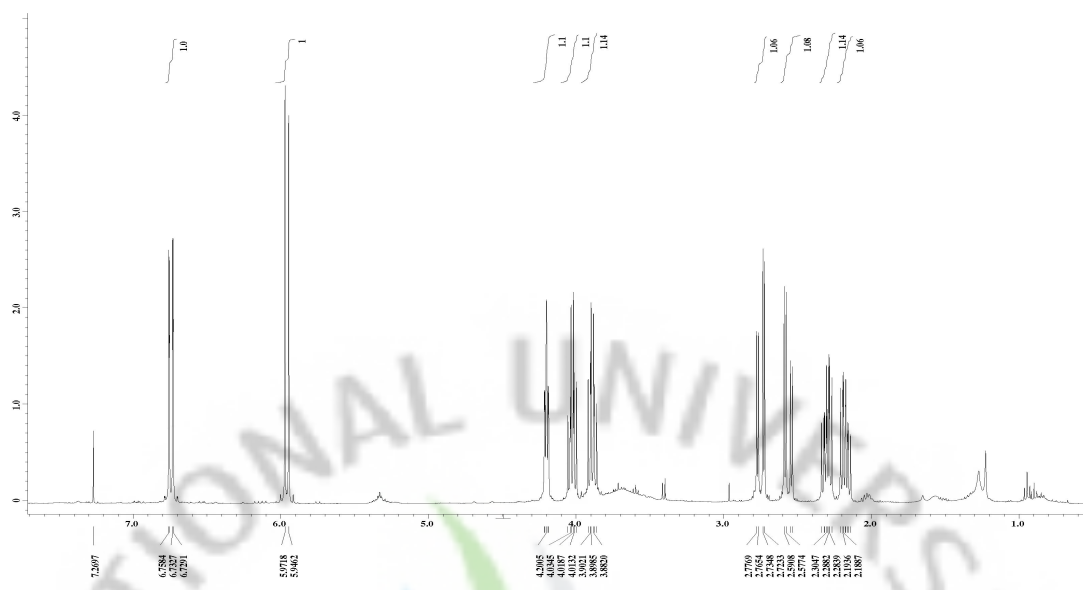


Figure 10. ^1H -NMR spectrum of compound 1 in CDCl_3 (400MHz).

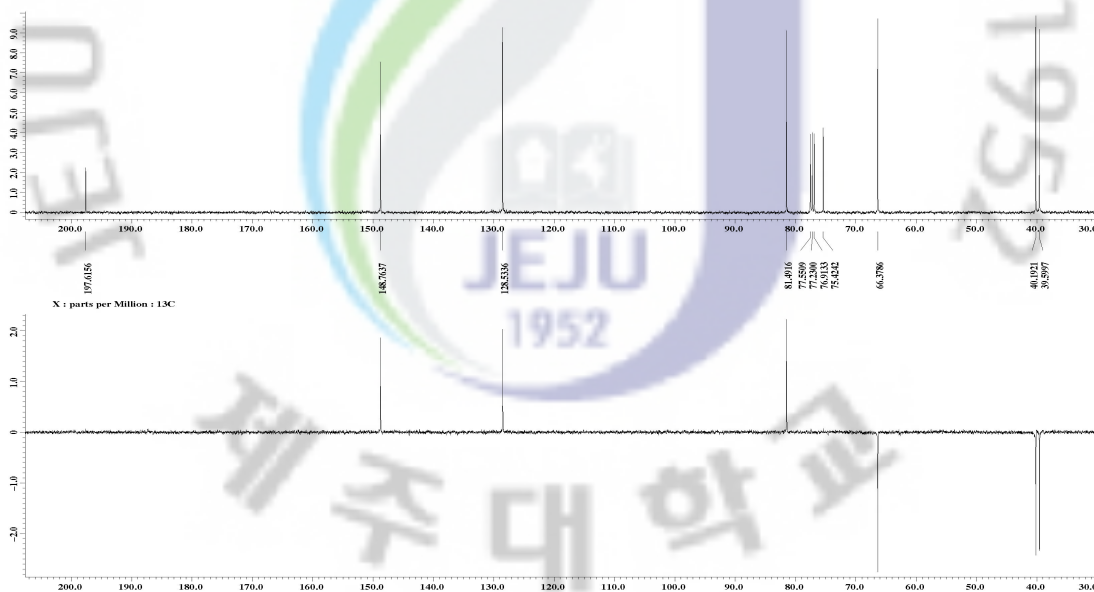


Figure 11. ^{13}C -NMR and 135° DEPT spectrum of compound 1 in CDCl_3 (100MHz).

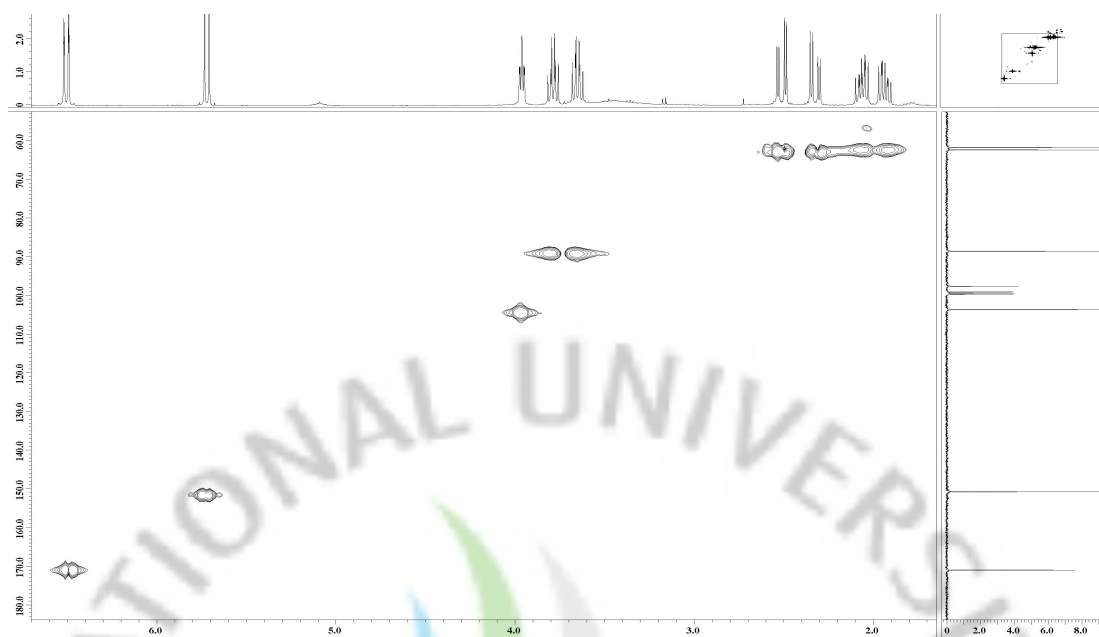


Figure 12. HMQC spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

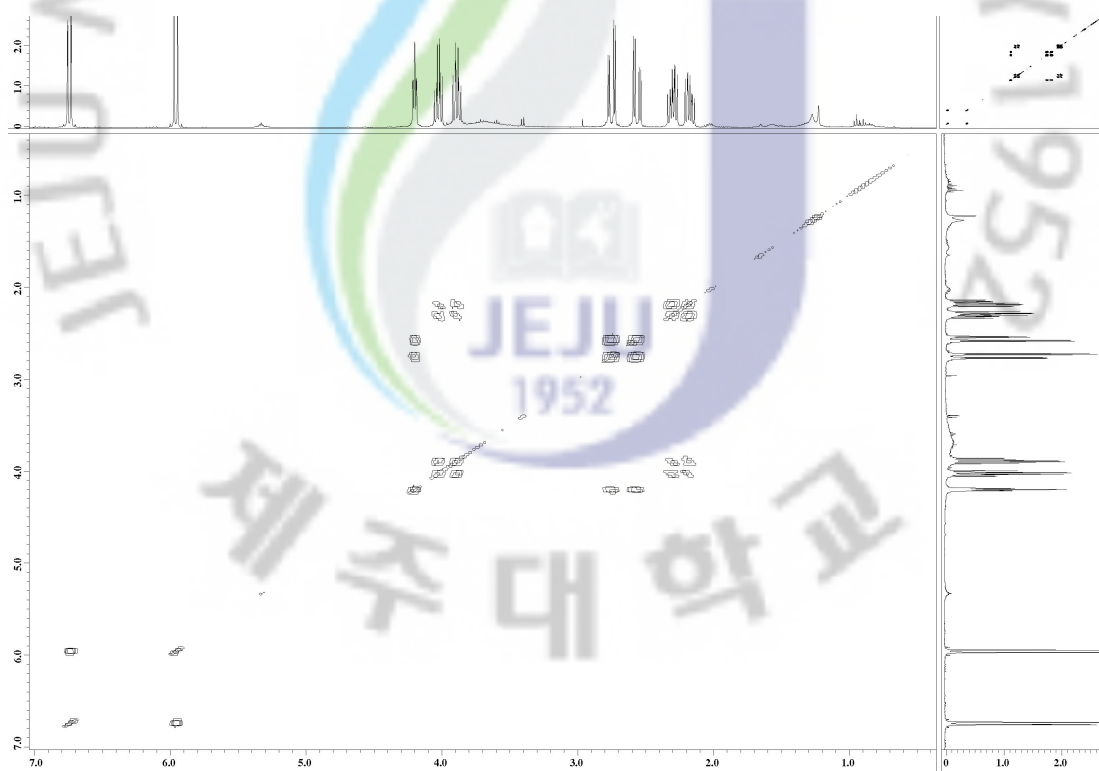


Figure 13. COSY spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

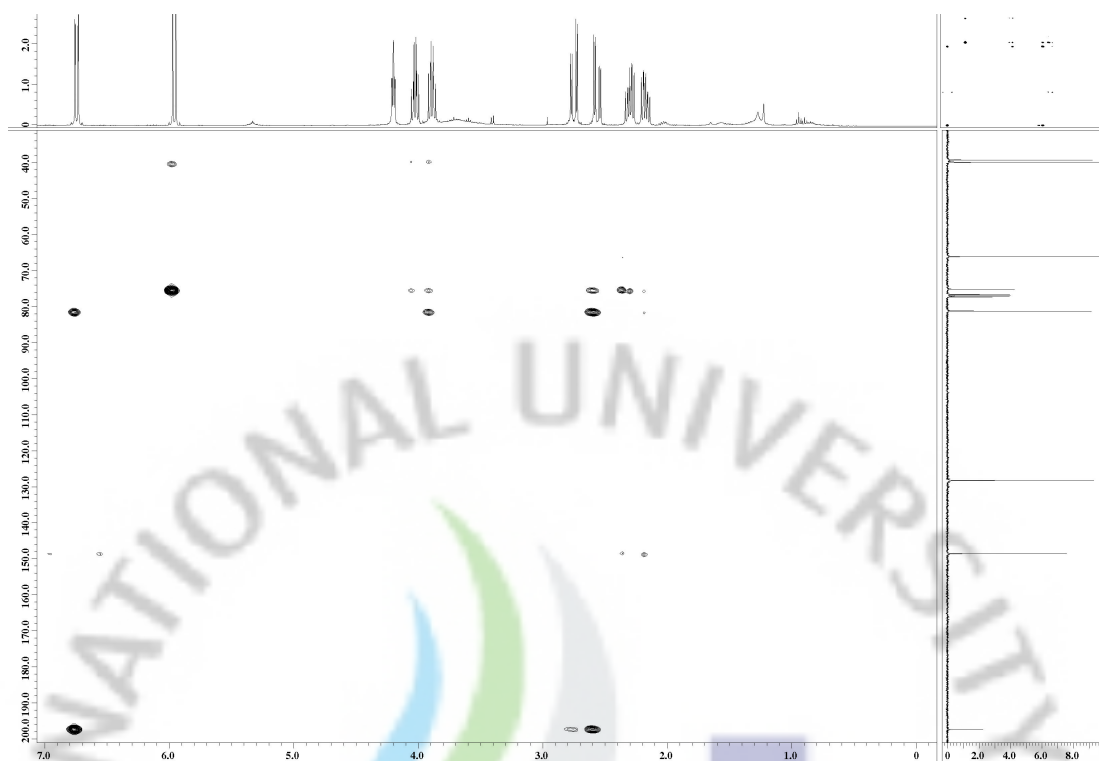


Figure 14. HMBC spectrum of compound 1 in CDCl_3 .

3-1-2. Compound 2, 3, 4의 구조 결정

Compound 2, 3, 4의 구조를 확인하기 위하여 ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC, HMQC의 1D 및 2D NMR을 측정하였다. 이들의 1D NMR의 결과를 종합하여 본 결과 모두 glucose에 cinnamic acid가 중합한 형태의 부분구조를 가짐을 예측할 수 있었다, 이와 같은 부분구조는 *Eurya tigang*에서 이미 보고된 eutigosid C에 포함되어 있는 구조로서⁴⁹ 각 화합물과 eutigoside C의 1D NMR을 Table 5에 비교하였다.

Compound 2에서 δ 172.2의 carbonyl carbon signal과 HMQC 확인 결과 methoxy group으로 예상되는 δ_{C} 51.9 δ_{H} 3.63 (3H, s) signal을 확인 하였다. δ 34.6과 δ 65.3의 CH_2 signal의 결합 관계는 COSY spectrum을 이용하여 예측 가능 하였으며 1D NMR과의 조합 결과 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-$ 의 부분 구조를 예상하였다. 최종적인 전체 구조는 HMBC long range coupling을 이용하여 결정하였다.

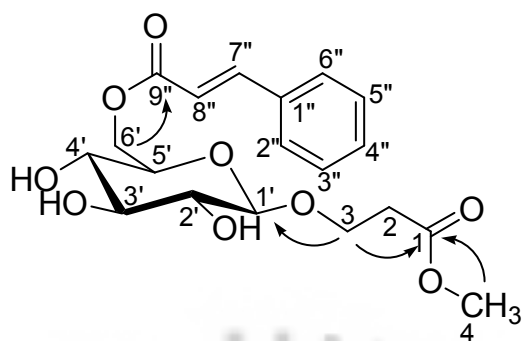


Figure 15. The HMBC correlations for the compound 2.

Compound 3에서 δ 6.72 (1H, d, $J=3.2$), δ 6.66 (1H, d, $J=8.5$), δ 6.57 (1H, dd, $J=8.5, 3.2$)의 3개의 sp^2 혼성 proton signal로부터 δ 6.57 수소로부터 *ortho*와 *meta* 위치에 수소가 존재하는 phenyl ring 구조를 예상할 수 있다. δ 154.3과 δ 146.6의 carbon signal로부터 두 탄소는 전기음성도가 높은 산소와 같은 원소에 결합하고 있음을 예상하였다.

그 결과 δ 32.2의 carbon signal과 결합하고 있는 δ 2.64 부근의 두 개의 수소는 δ 71.0의 carbon signal과 결합하고 있는 δ 3.89 부근의 두 개의 수소와 이웃하고 있으며 이 δ 71.0의 carbon signal은 전기 음성도가 높은 산소와 같은 원소에 결합하고 있는 것으로 추정되므로 $-O-CH_2-CH_2-C-$ 의 부분구조를 예상할 수 있다.

δ_c 56.1에 결합하고 있는 δ_H 3.63 (3H, s) proton signal은 methoxy group으로 예상되며, 이 methoxy group의 위치를 확인하기 위하여 NOESY spectrum을 이용한 결과 δ 6.72의 proton signal과 NOESY signal을 보이는 것으로 보아 δ 154.3의 탄소에 결합하고 있는 것으로 확인 되었다.

각각의 결합 관계는 2D NMR 결과를 이용하여 예측하였으며, 최종적인 전체 구조는 HMBC long range coupling을 이용하여 결정되었다.

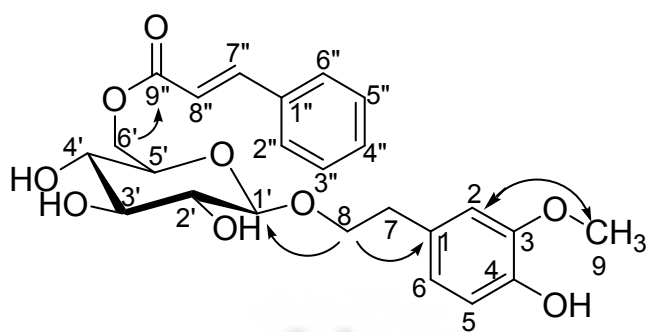


Figure 16. The HMBC and NOESY correlations for the compound 3.

Compound 4는 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 정리 하면, compound 3에서부터 3, 4번 탄소가 약 3 ppm 정도 shield 되고 있으며, 9번 위치인 δ 56.1의 carbon signal이 없어지는 것으로 보아 compound 3의 3번 탄소의 methoxy group이 hydroxy group으로 치환된 형태인 것으로 예상하였다.

그 외의 결합 관계는 2D NMR 결과를 이용하여 확인하였으며, 최종적인 전체 구조도 HMBC long range coupling을 이용하여 확인되었다.

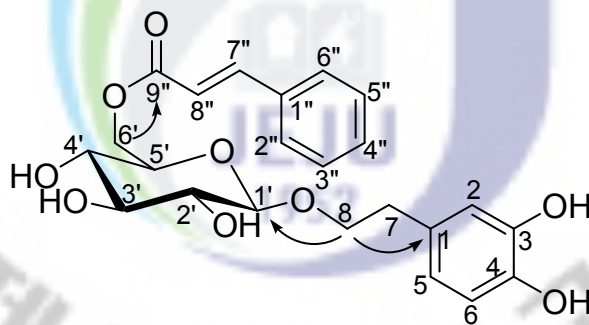


Figure 17. The HMBC correlations for the compound 4.

NMR 구조 분석 결과를 토대로 문헌검색을 한 결과 compound 2, 3, 4는 현재 문헌상에 보고되지 않은 구조의 화합물들로 추정되었으며, 이 구조를 명확히 하기 위하여 LR-FAB-MS 및 HR-FAB-MS를 측정하였다. compound 2는 예상되는 분자식 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_9$ 로 HR-FAB-MS 결과 $[m/z = 419.1319 (\text{M}+\text{Na})^+]$ (calcd. for

C₁₉H₂₄O₉Na, 419.1318)로 분자식이 정확히 맞음을 확인 하였다. 광학 활성 측정에서 이 화합물은 비선광도 [α]_D = +3.7 (0.06%, MeOH)로 나타났다.

Compound 3의 예상 분자식은 C₂₄H₂₈O₉로서 LR-FAB-MS 결과 [m/z = 460.19 (M)⁺] (calcd. for C₂₄H₂₈O₉, 460.1733)로 확인 하였다. 광학 활성 측정에서 이 화합물은 비선광도 [α]_D = -38.4 (0.07%, MeOH)로 나타났다.

Compound 4의 예상 분자식은 C₂₃H₂₆O₉로서 HR-FAB-MS 결과 [m/z = 446.1577 (M)⁺] (calcd. for C₂₃H₂₆O₉, 446.1577)로 분자식이 정확히 맞음을 확인 하였다. 광학 활성 측정에서 이 화합물은 비선광도 [α]_D = -40.6 (0.06%, MeOH)로 나타났다.

Compound 2와 compound 4의 당이 glucose임을 확증하였다. 각 1 mg의 화합물에 5% HCl 용액 1 mL를 가하여 90°C에서 2 시간 동안 교반하였다. CHCl₃과 H₂O를 각 5 mL 가하여 상층의 H₂O 분획을 농축하여 authentic D-glucose와 비교하였다. 문헌을 참고하여 CH₂Cl₂:MeOH:H₂O = (70:27:3)의 전개용매로 전개 후 anisaldehyde 발색시약으로 발색시켰으며,⁶⁶ 가수분해로 얻은 당은 R_f가 0.12로 D-glucose와 같은 위치에 나타났다. 따라서 compound 2, 3, 4의 구조를 확정하고 각각을 eutigoside D, F, E로 명명하였다.

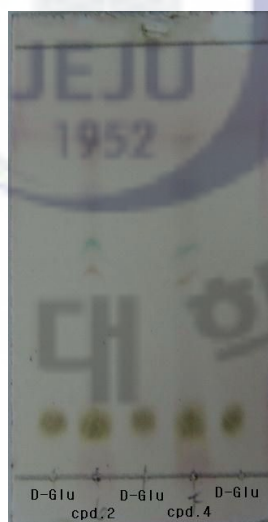


Figure 18. TLC of compounds 2 and 4 H₂O fractions of hydrolysis products and D-glucose.

Table 5. NMR spectroscopic data^a for compound **2** and eutigoside C.

Position	Compound 2			Eutigoside C	
	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)	DEPT	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)
1	172.2		C	69.2	
2	34.6	2.42 (2H, m)	CH ₂	154.3	6.69 (2H, d, 9.0)
3	65.3	4.04 (1H, m) 3.85 (1H, m)	CH ₂	127.8	6.05 (2H, d, 9.0)
4	51.9	3.63 (3H, s)	CH ₃	187.8	
5	-	-	-	127.7	6.05 (2H, d, 9.0)
6	-	-	-	154.2	6.69 (2H, d, 9.0)
7	-	-	-	41.0	2.04 (2H, t, 5.0)
8	-	-	-	65.9	3.96 (1H, m) 3.66 (1H, m)
1'	103.1	4.25 (1H, d, 7.8)	CH	104.4	4.33 (1H, d, 7.8)
2'	74.1	3.16 (1H, dd, 9.0, 7.8)	CH	75.4	3.35~3.39 (1H, m)
3'	76.0	3.34 (2H, m)	CH	77.9	3.35~3.39 (2H, m)
4'	70.0	3.34 (2H, m)	CH	71.7	3.22 (2H, t)
5'	73.3	3.51(1H, dd, 9.0, 6.0)	CH	75.0	3.52 (1H, m)
6'	63.5	4.50 (1H, dd, 11.8, 2.0) 4.32 (1H, dd, 11.8, 2.0)	CH ₂	64.8	4.53 (1H, dd, 11.8, 2.2) 4.34 (1H, dd, 11.8, 2.2)
1''	134.2		C	135.7	
2''	128.9	7.48 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
3''	128.2	7.34 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
4''	130.4	7.34 (3H, m)	CH	130.8	7.40 (3H, m)
5''	128.2	7.34 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
6''	128.9	7.48 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
7''	145.6	7.67 (1H, d, 16.0)	CH	146.5	7.72 (1H, d, 16.2)
8''	117.5	6.45 (1H, d, 16.0)	CH	115.9	6.55 (1H, d, 16.2)
9''	167.4		C	168.5	

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 400 and 100 MHz, respectively.

Table 6. NMR spectroscopic data^a for compound **3** and eutigoside C.

Position	Compound 3			Eutigoside C	
	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)	DEPT	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)
1	127.1		C	69.2	
2	117.4	6.72 (1H, d, 3.2)	CH	154.3	6.69 (2H, d, 9.0)
3	154.3		C	127.8	6.05 (2H, d, 9.0)
4	146.6		C	187.8	
5	116.7	6.66 (1H, d, 8.5)	CH	127.7	6.05 (2H, d, 9.0)
6	113.6	6.57 (1H, dd, 8.5, 3.2)	CH	154.2	6.69 (2H, d, 9.0)
7	32.2	2.64 (2H, t, 7.4)	CH ₂	41.0	2.04 (2H, t, 5.0)
8	71.0	3.98 (1H, m) 3.80 (1H, m)	CH ₂	65.9	3.96 (1H, m) 3.66 (1H, m)
9	56.1	3.63 (3H, s)	CH ₃	-	-
1'	104.6	4.25 (1H, d, 7.8)	CH	104.4	4.33 (1H, d, 7.8)
2'	75.3	3.16 (1H, dd, 9.0, 7.8)	CH	75.4	3.35~3.39 (1H, m)
3'	77.9	3.34 (2H, m)	CH	77.9	3.35~3.39 (2H, m)
4'	71.7	3.34 (2H, m)	CH	71.7	3.22 (2H, t)
5'	75.0	3.51(1H, dd, 9.0, 6.0)	CH	75.0	3.52 (1H, m)
6'	64.9	4.50 (1H, dd, 11.8, 2.0) 4.32 (1H, dd, 11.8, 2.0)	CH ₂	64.8	4.53 (1H, dd, 11.8, 2.2) 4.34 (1H, dd, 11.8, 2.2)
1''	135.6			135.7	
2''	130.0	7.50 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
3''	129.3	7.37 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
4''	131.5	7.37 (3H, m)	CH	130.8	7.40 (3H, m)
5''	129.3	7.37 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
6''	130.0	7.50 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
7''	146.6	7.66 (1H, d, 16.0)	CH	146.5	7.72 (1H, d, 16.2)
8''	118.6	6.51 (1H, d, 16.0)	CH	115.9	6.55 (1H, d, 16.2)
9''	168.6			168.5	

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 400 and 100 MHz, respectively.

Table 7. NMR spectroscopic data^a for compound 4 and eutigoside C.

Position	Compound 4			Eutigoside C	
	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)	DEPT	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)
1	127.0		C	69.2	
2	118.3	6.61 (1H, d, 3.0)	CH	154.3	6.69 (2H, d, 9.0)
3	151.1		C	127.8	6.05 (2H, d, 9.0)
4	149.4		C	187.8	
5	116.9	6.48 (1H, dd, 8.5, 3.0)	CH	127.7	6.05 (2H, d, 9.0)
6	114.8	6.58 (1H, d, 8.5)	CH	154.2	6.69 (2H, d, 9.0)
7	32.1	2.88 (1H, t, 7.4)	CH ₂	41.0	2.04 (2H, t, 5.0)
8	71.1	3.98 (1H, m) 3.77 (1H, m)	CH ₂	65.9	3.96 (1H, m) 3.66 (1H, m)
1'	104.6	4.25 (1H, d, 7.8)	CH	104.4	4.33 (1H, d, 7.8)
2'	75.3	3.16 (1H, dd, 9.0, 7.8)	CH	75.4	3.35~3.39 (1H, m)
3'	77.9	3.34 (2H, m)	CH	77.9	3.35~3.39 (2H, m)
4'	71.7	3.34 (2H, m)	CH	71.7	3.22 (2H, t)
5'	75.0	3.51(1H, dd, 9.0, 6.0)	CH	75.0	3.52 (1H, m)
6'	64.9	4.50 (1H, dd, 11.8, 2.0) 4.32 (1H, dd, 11.8, 2.0)	CH ₂	64.8	4.53 (1H, dd, 11.8, 2.2) 4.34 (1H, dd, 11.8, 2.2)
1''	135.6			135.7	
2''	130.0	7.51 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
3''	129.3	7.37 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
4''	131.5	7.37 (3H, m)	CH	130.8	7.40 (3H, m)
5''	129.3	7.37 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
6''	130.0	7.51 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
7''	146.6	7.67 (1H, d, 16.0)	CH	146.5	7.72 (1H, d, 16.2)
8''	118.6	6.52 (1H, d, 16.0)	CH	115.9	6.55 (1H, d, 16.2)
9''	168.5			168.5	

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 400 and 100 MHz, respectively.

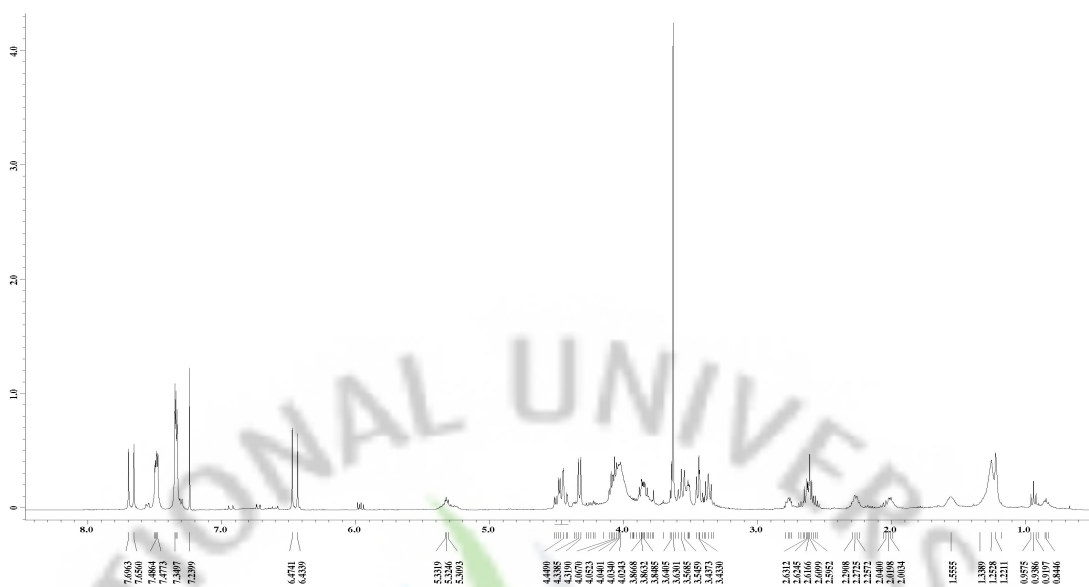


Figure 19. ^1H -NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3 (400MHz).

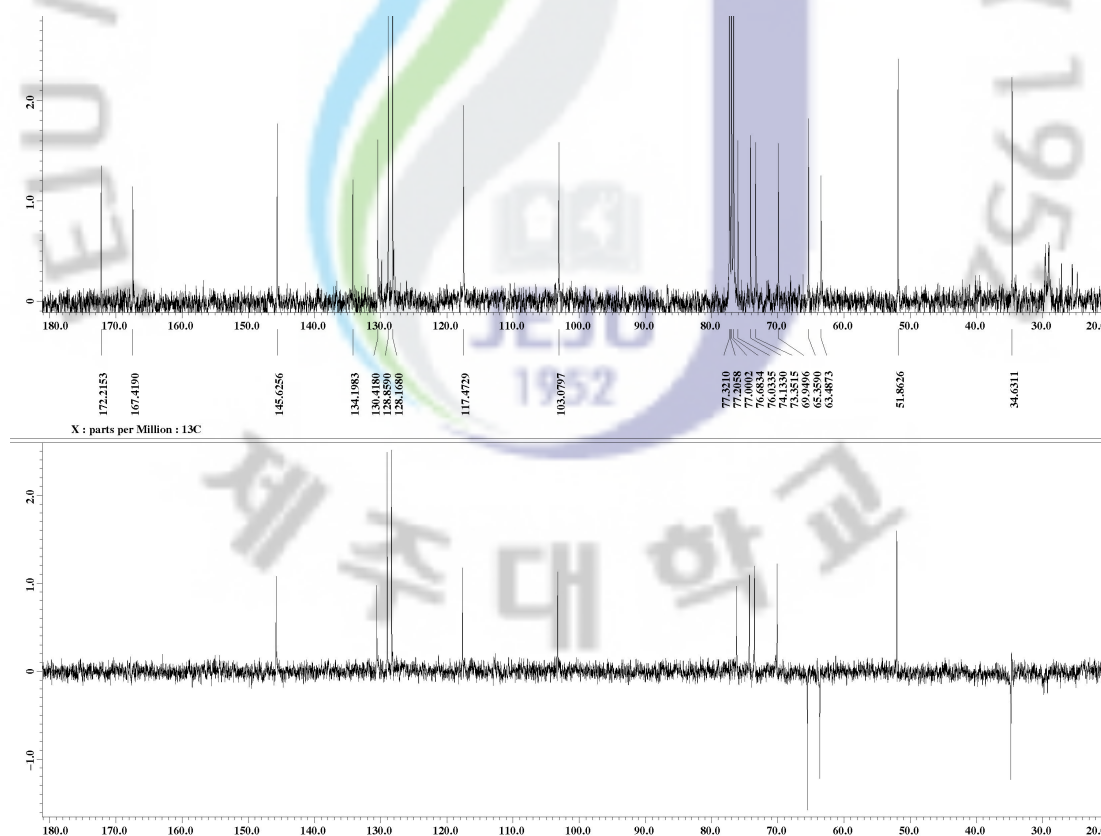


Figure 20. ^{13}C -NMR and 135° DEPT spectrum of compound 2 in CDCl_3 (100MHz).

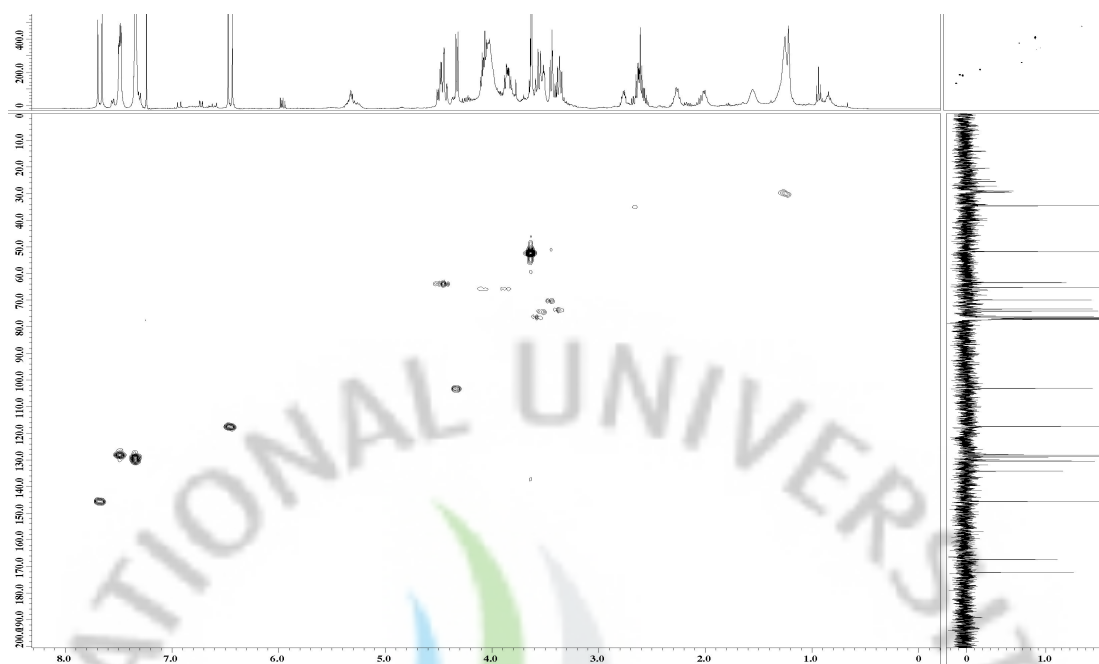


Figure 21. HMQC spectrum of compound **2** in CDCl_3 .

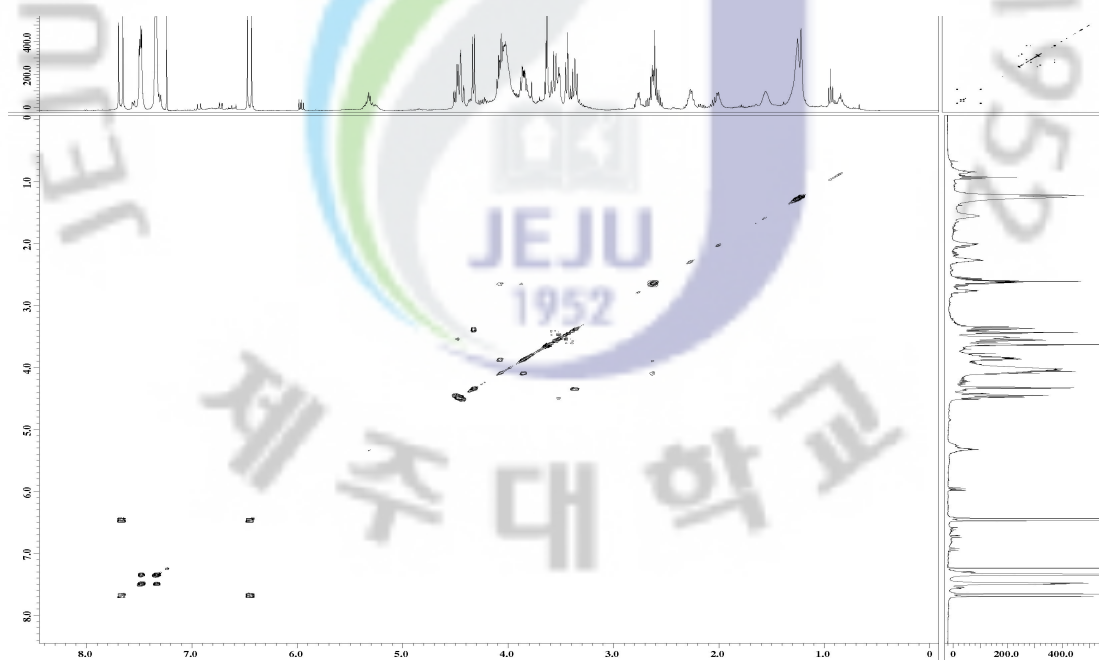


Figure 22. COSY spectrum of compound **2** in CDCl_3 .

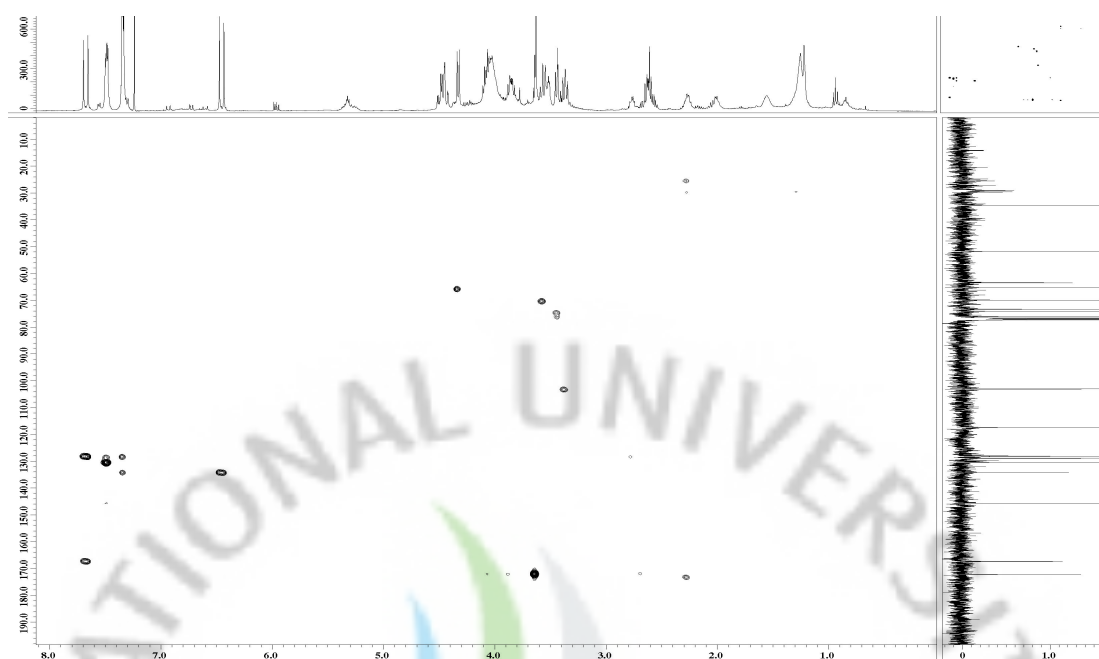


Figure 23. HMBC spectrum of compound 2 in CDCl_3 .



Figure 24. HR-FAB-MS spectrum of compound 2.

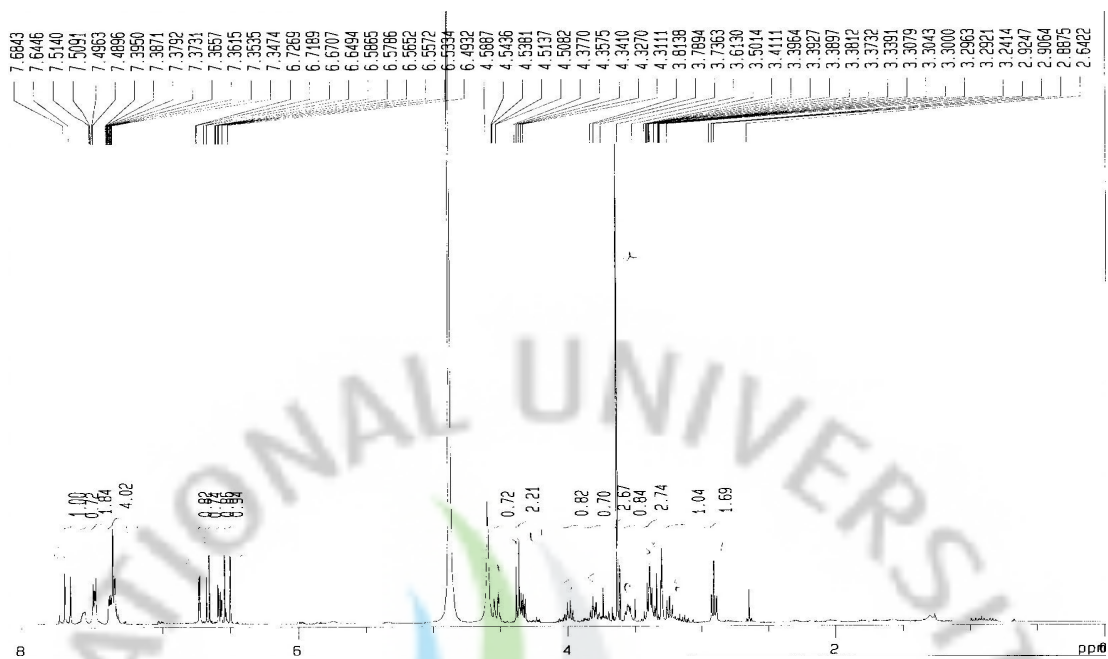


Figure 25. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD (400MHz).

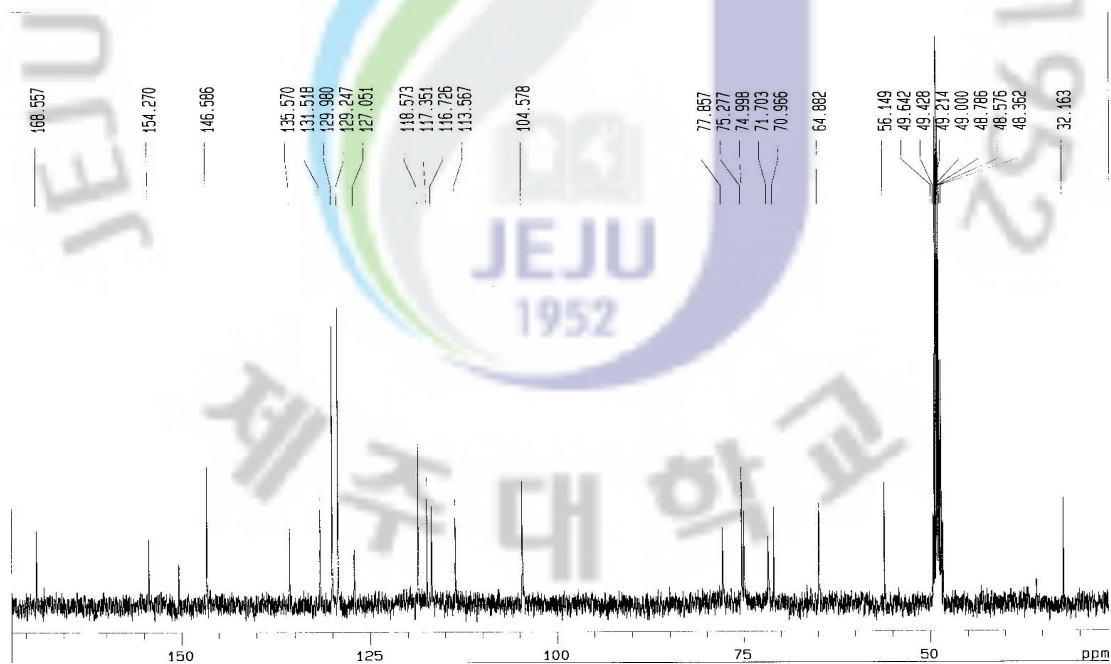


Figure 26. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD (100MHz).

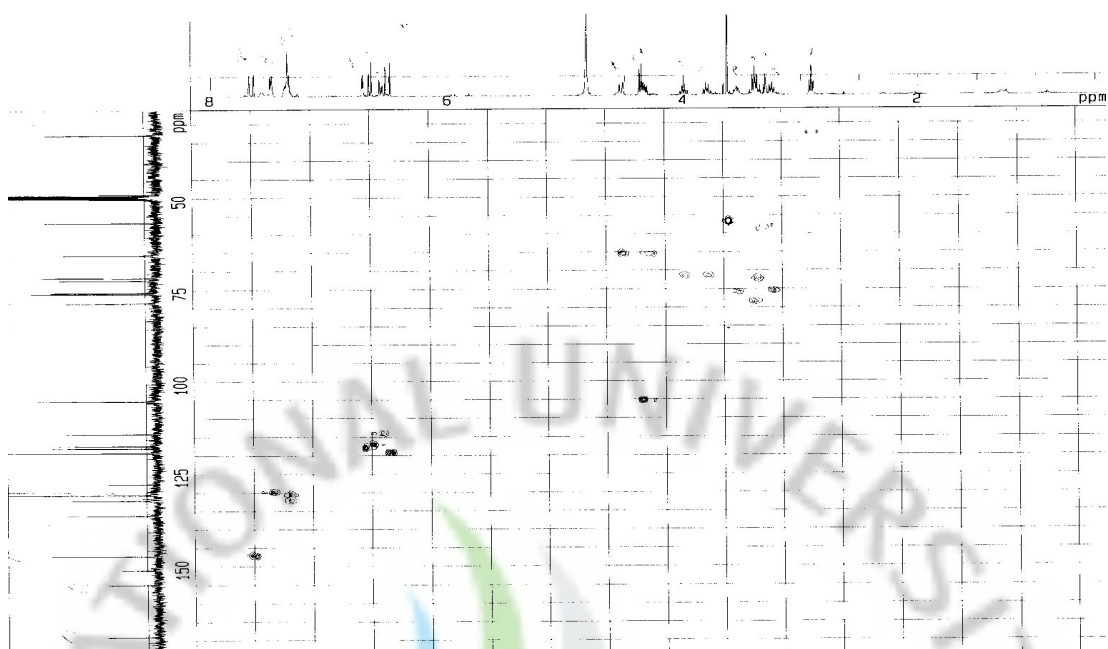


Figure 27. HMQC spectrum of compound **3** in CD₃OD.

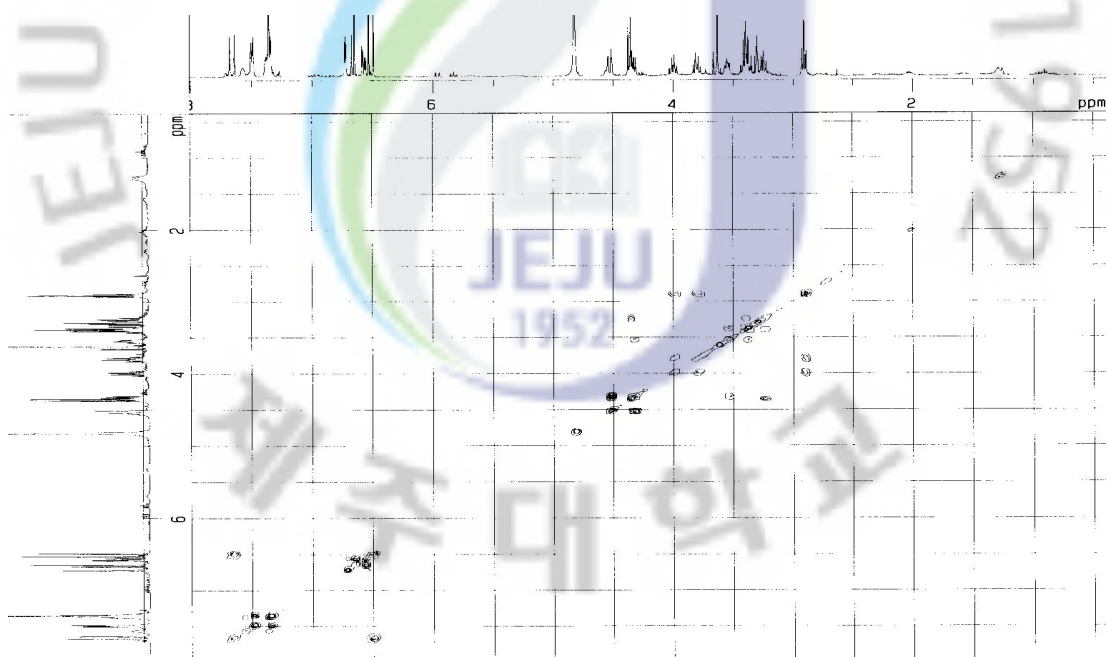


Figure 28. COSY spectrum of compound **3** in CD₃OD.

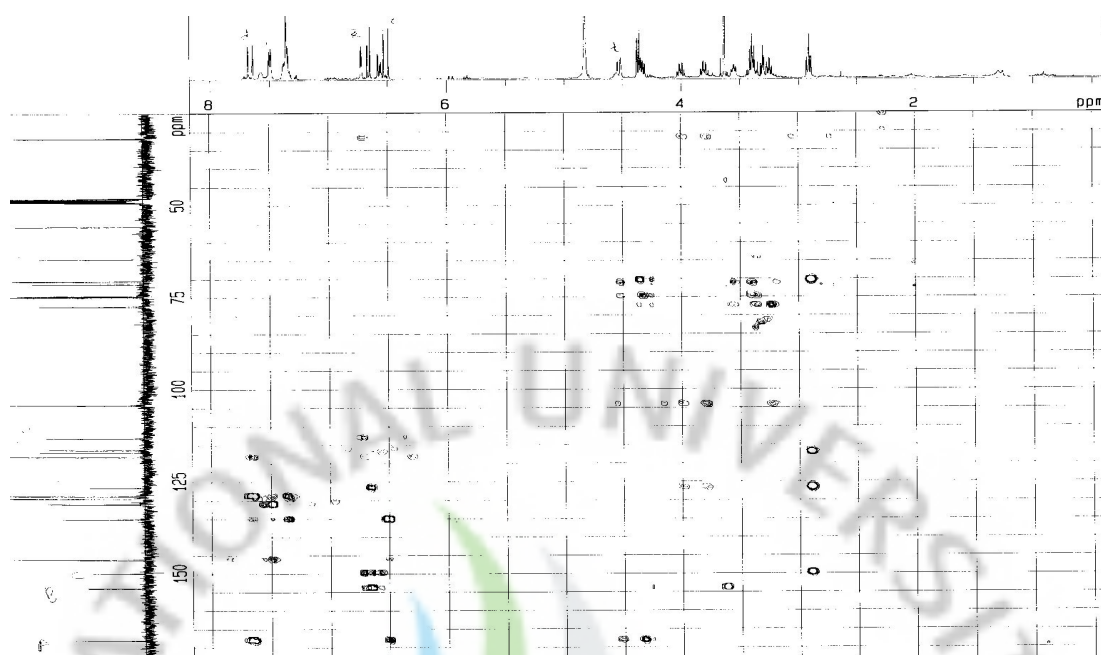


Figure 29. HMBC spectrum of compound **3** in CD₃OD.

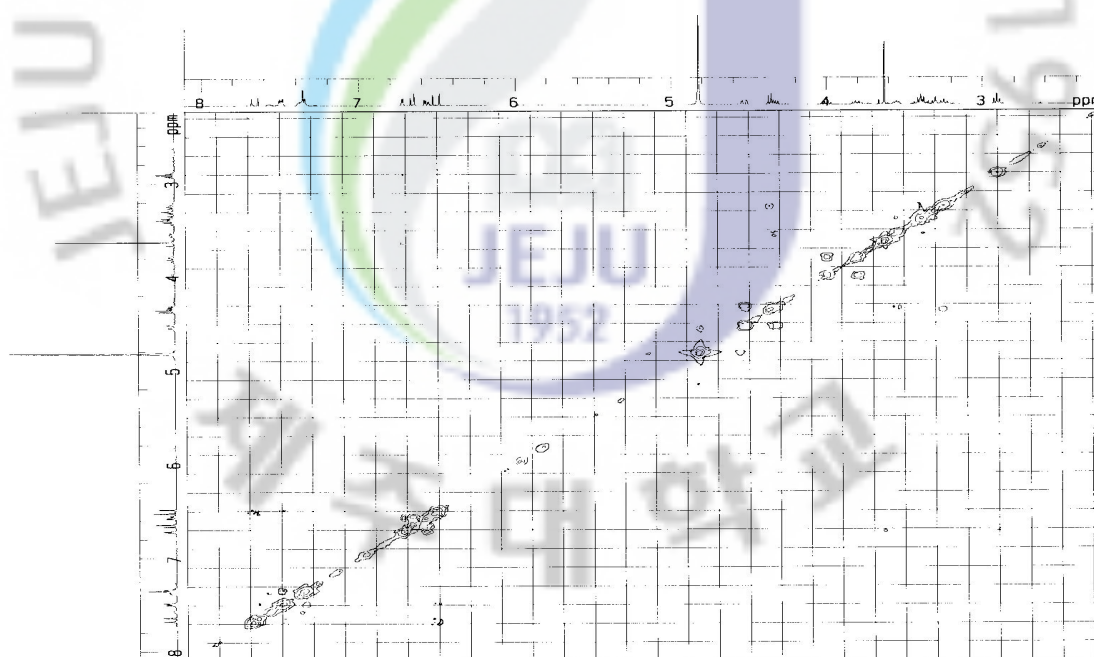


Figure 30. NOESY spectrum of compound **3** in CD₃OD.

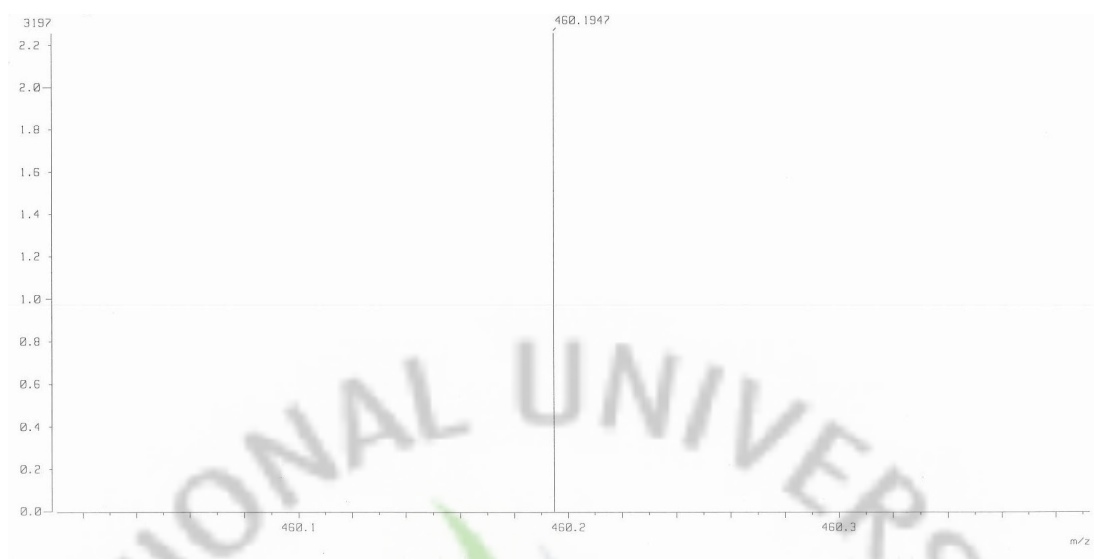


Figure 31. LR-FAB-MS spectrum of compound 3.

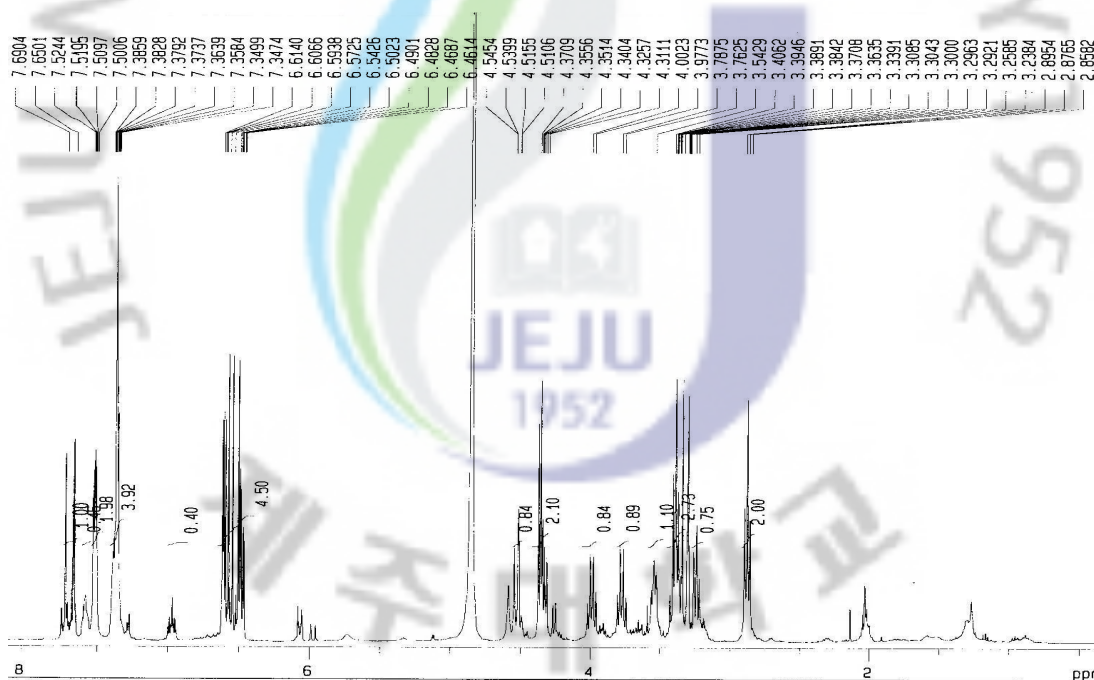


Figure 32. ¹H-NMR spectrum of compound 4 in CD₃OD (400MHz).

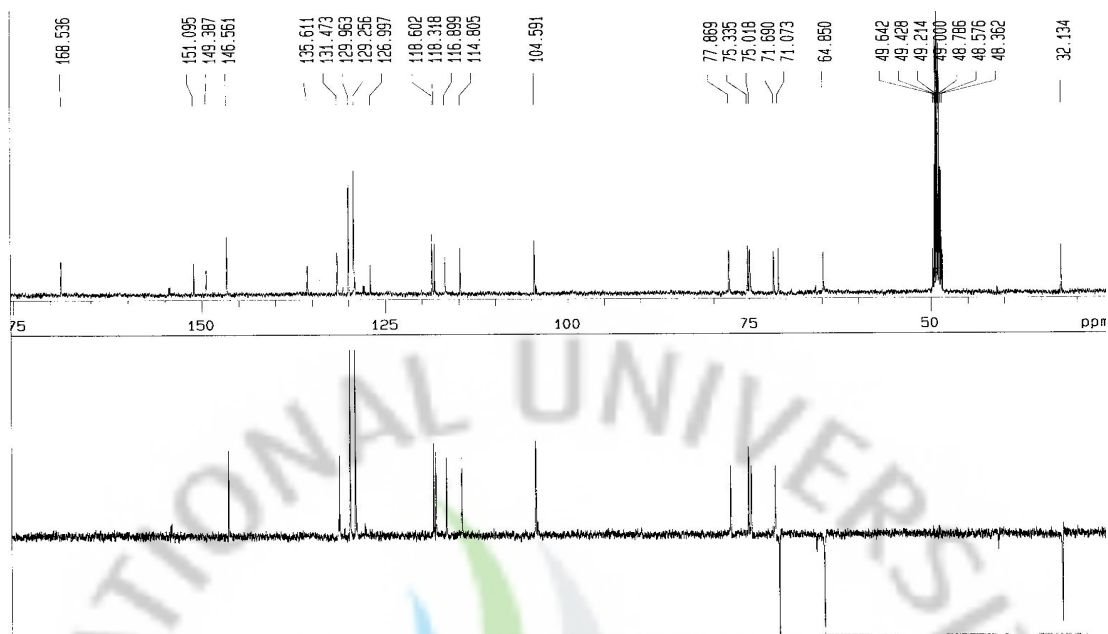


Figure 33. ^{13}C -NMR and 135° DEPT spectrum of compound 4 in CD_3OD (100MHz).

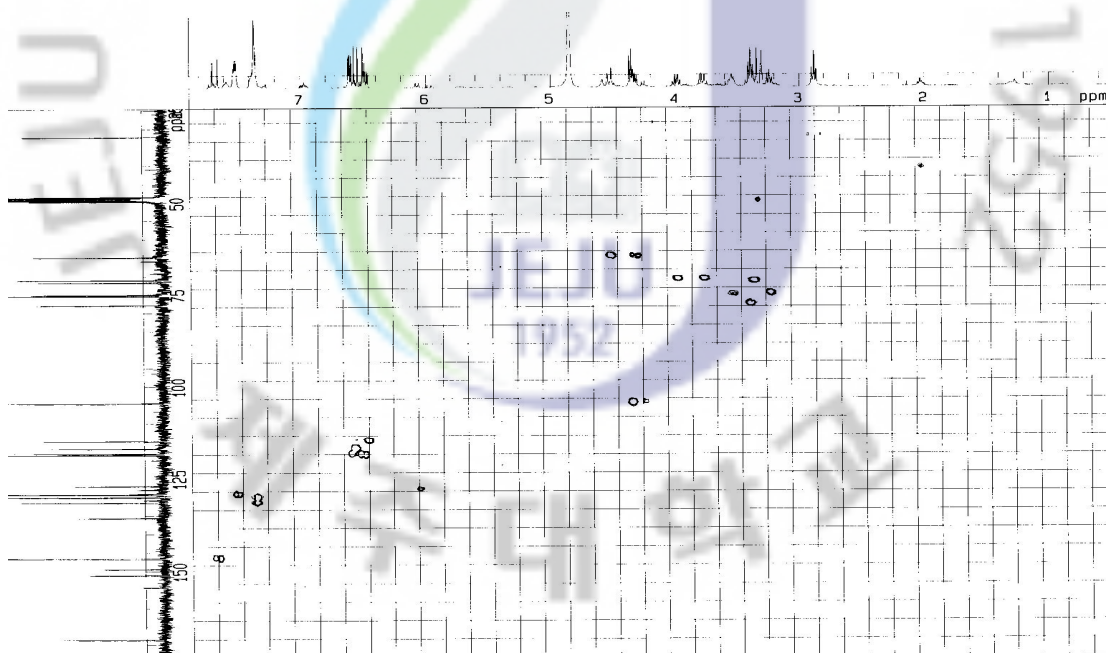


Figure 34. HMQC spectrum of compound 4 in CD_3OD .

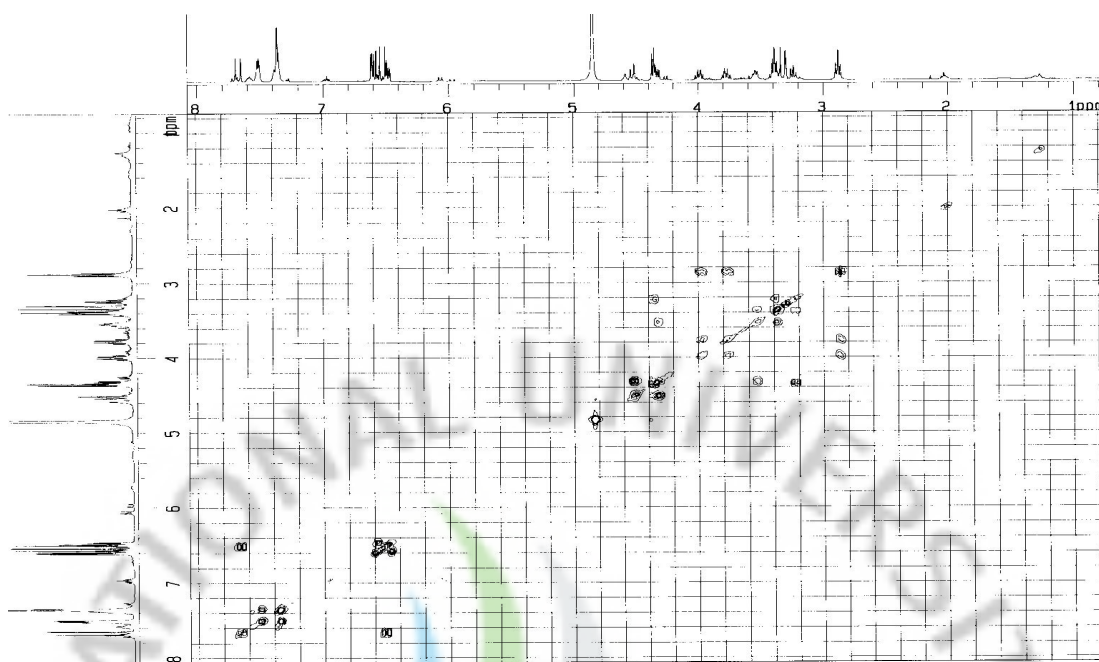


Figure 35. COSY spectrum of compound 4 in CD₃OD.

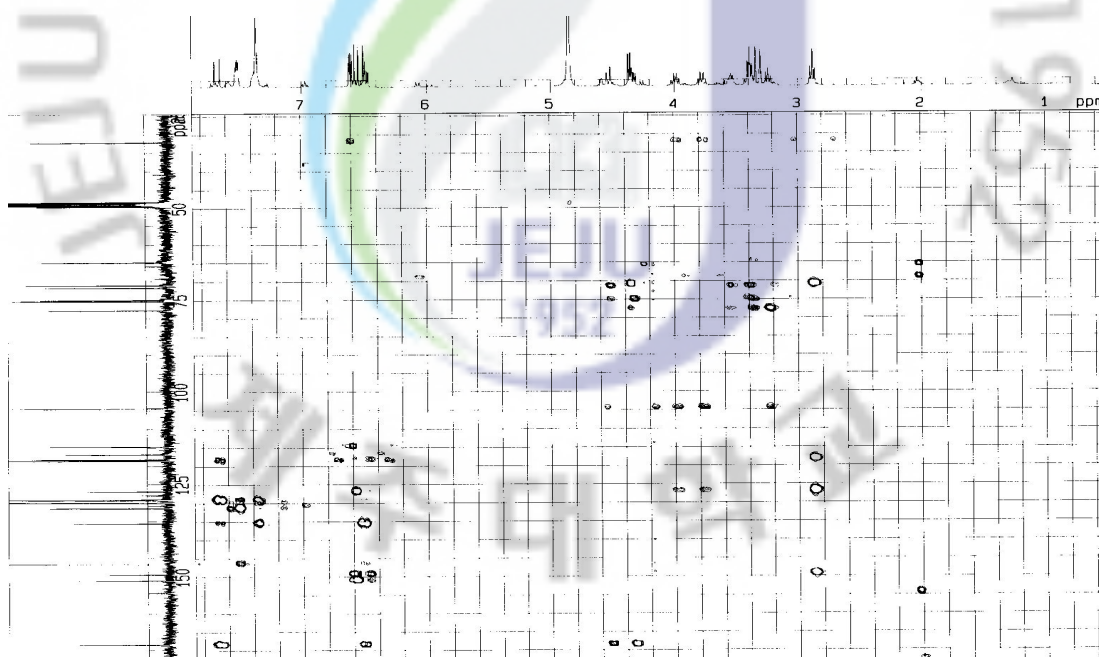


Figure 36. HMBC spectrum of compound 4 in CD₃OD.

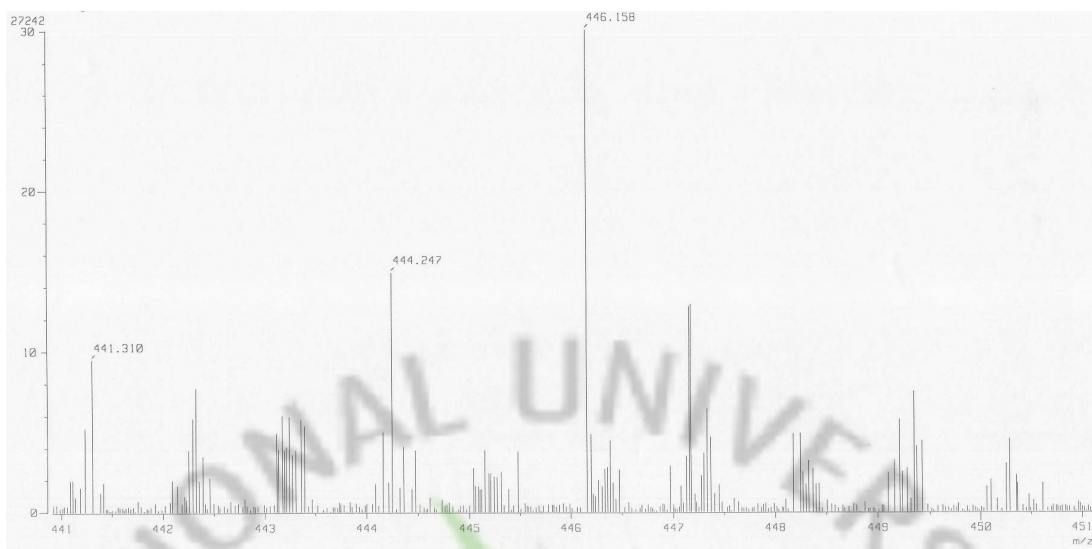


Figure 37. HR-FAB-MS spectrum of compound 4.

3-1-3. Compound 5, 6, 7의 구조 결정

Compound 5, 6, 7의 구조를 확인하기 위하여 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100MHz)을 측정하여 구조를 예측하였고, 문헌과 대조하여 동정되었다. 이들은 각각 eutigoside C (5), eutigoside B (6)⁴⁹, Quercitrin (7)³² 이었으며, 이들은 앞에서 서술 한 바와 같이 이미 우묵사스레피로부터 분리, 보고되어진 물질들이다.

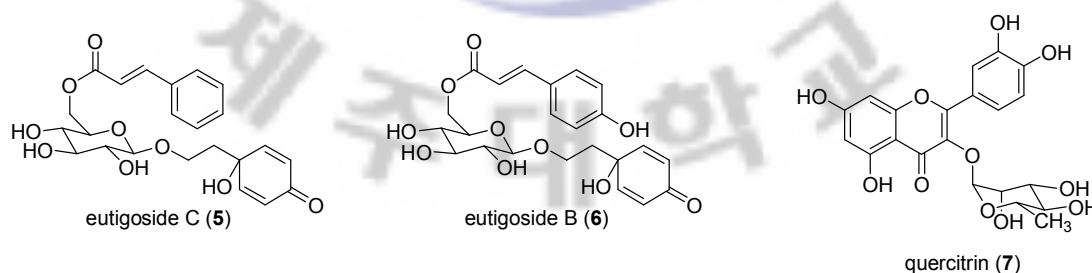


Figure 38. The Structures of eutigoside C (5), eutigoside B (6) and quercitrin (7).

Table 8. NMR spectroscopic data^a for compounds **5** and **6**.

Position	Compound 5		Compound 6	
	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H (int., multi, <i>J</i> Hz)
1	69.2		69.2	
2	154.3	6.69 (2H, d, 9.0)	154.3	6.97 (2H, dd, 10.2)
3	127.8	6.05 (2H, d, 9.0)	128.0	6.07 (2H, dd, 10.2)
4	187.8		187.8	
5	127.7	6.05 (2H, d, 9.0)	127.9	6.07 (2H, dd, 10.2)
6	154.2	6.69 (2H, d, 9.0)	154.3	6.99 (2H, dd, 10.2)
7	41.0	2.04 (2H, t, 5.0)	41.0	2.03 (2H, t, 6.6)
8	65.9	3.96 (1H, m)	65.9	3.96 (1H, m)
		3.66 (1H, m)		3.66 (1H, m)
1'	104.4	4.33 (1H, d, 7.8)	104.9	4.32 (1H, d, 7.8)
2'	75.4	3.35~3.39 (1H, m)	75.5	3.18 (1H, dd, 9.0, 8.0)
3'	77.9	3.35~3.39 (2H, m)	77.9	3.31~3.39 (2H, m)
4'	71.7	3.22 (2H, t)	71.8	3.31~3.39 (2H, m)
5'	75.0	3.52 (1H, m)	75.0	3.52 (1H, m)
6'	64.8	4.53 (1H, dd, 11.8, 2.2)	64.6	4.48 (1H, dd, 11.8, 2.2)
		4.34 (1H, dd, 11.8, 2.2)		4.34 (1H, dd, 11.8, 2.2)
1''	135.7		127.0	
2''	129.9	7.76 (2H, m)	131.2	7.47 (2H, d, 8.6)
3''	129.2	7.40 (3H, m)	116.9	6.81 (2H, br, d, 8.6)
4''	130.8	7.40 (3H, m)	161.5	
5''	129.2	7.40 (3H, m)	116.9	6.81 (2H, br d, 8.6)
6''	129.9	7.76 (2H, m)	131.2	7.47 (2H, d, 8.6)
7''	146.5	7.72 (1H, d, 16.2)	146.8	7.64 (1H, d, 16.2)
8''	115.9	6.55 (1H, d, 16.2)	114.9	6.35 (1H, d, 16.2)
9''	168.5		169.1	

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 400 and 100 MHz, respectively.

Table 9. NMR spectroscopic data^a for compound **7**.

Position	Compound 7	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (int., multi, <i>J</i> Hz)
2	159.3	
3	136.2	
4	179.6	
5	163.2	
6	99.8	6.19 (1H, d, 2.2)
7	165.9	
8	94.7	6.36 (1H, d, 2.2)
9	158.5	
10	105.9	
1'	122.97	
2'	116.9	7.31 (1H, d, 2.2)
3'	146.4	
4'	149.8	
5'	116.3	6.90 (1H, d, 8.1)
6'	122.85	7.29 (1H, dd, 8.1, 2.2)
1''	103.5	5.34 (1H, d, 1.7)
2''	71.9	4.21 (1H, dd, 3.4, 1.7)
3''	72.1	3.74 (1H, dd, 9.4, 3.4)
4''	73.2	3.33 (1H, dd, 9.4, 9.0)
5''	72.0	3.41 (1H, dq, 9.0, 6.1)
6''	17.6	0.93 (3H, d, 6.1)

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 400 and 100 MHz, respectively.

3-1-4. Compound 8의 구조 결정

^1H -NMR 측정 결과 7.5 ppm 근처의 5개의 proton signal로부터 phenyl ring의 존재를 예상할 수 있었으며, δ 6.47과 δ 7.81의 두 수소의 coupling constant가 16.0 Hz인 것으로 *trans*-형의 이중결합이 존재함을 예상 할 수 있었다.

^{13}C -NMR 측정 결과 마찬가지로 δ 128~ δ 135 사이의 4개의 carbon signal은 대칭성을 나타내는 phenyl ring의 존재를 나타내어 주며, δ 117.2 및 δ 147.1에서 이중결합이 하나 존재함을 예상 할 수 있다. δ 172.1의 carbon signal로부터 carboxylic acid group을 예상하여 문헌과 비교하여 다음과 같은 구조인 cinnamic acid로 동정되었다.⁵¹

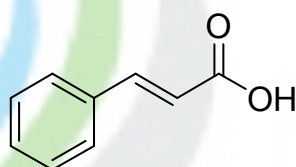


Table 10. NMR spectroscopic data^a for compound 8.

Position	Compound 8	
	δ ^{13}C	δ ^1H (int., multi, J Hz)
1	169.1	
2	117.8	6.25 (1H, d, 16.0)
3	144.9	7.42 (1H, d, 16.0)
4	129.9	
5, 9	128.4	7.18 (3H, m)
6, 8	127.6	7.33 (2H, m)
7	133.9	7.18 (3H, m)

^a ^1H , ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 solution at 400 and 100 MHz, respectively.

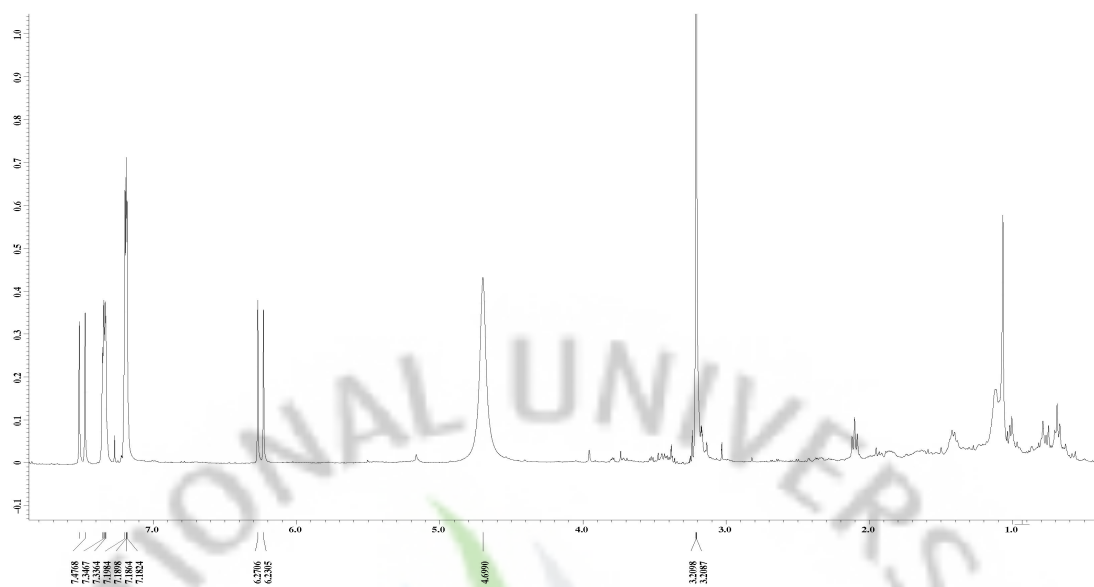


Figure 39. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **8** in CD_3OD (400MHz).

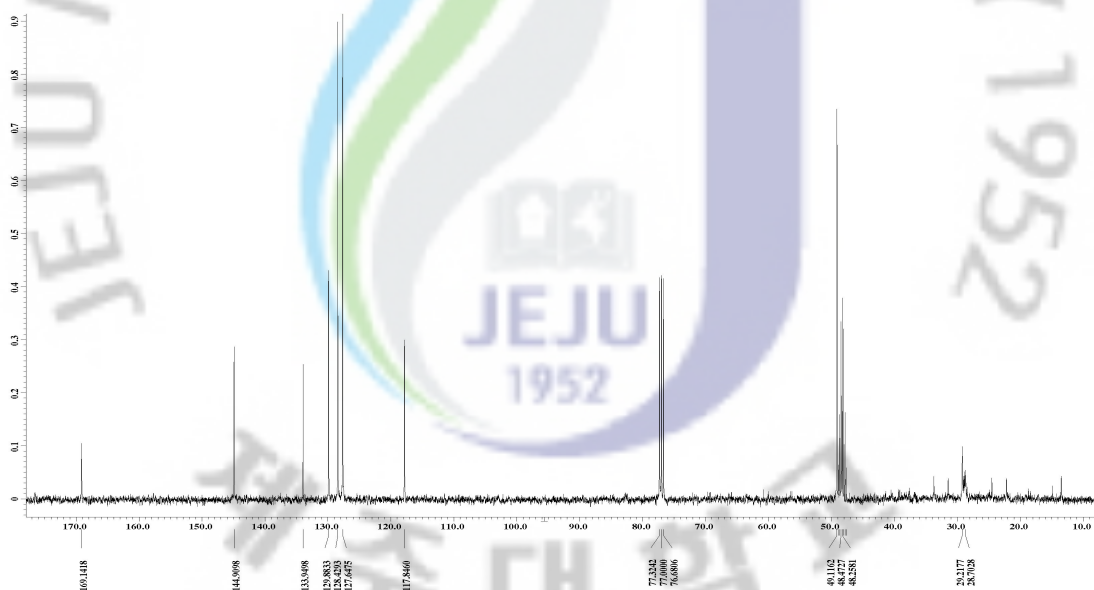
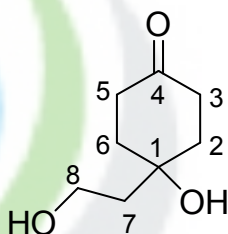


Figure 40. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **8** in CD_3OD (100MHz).

3-1-5. Compound 9, 10, 11의 구조 결정

Compound 9는 ^{13}C -NMR 측정 결과 6개의 carbon signal을 얻을 수 있었고, intensity 차이를 이용하여 대칭으로 존재하는 2개의 탄소를 더하여 8개의 탄소가 존재함을 예상하였다. 이들은 rengyolone (1)과 유사한 화합물로 예상 하였으며 9의 경우 1에서 2번과 3번 탄소 사이의 이중결합이 환원되고, 6번 탄소가 결합하여 있던 산소가 역시 환원된 것이 가장 큰 특징이며 그 외의 탄소들은 다소간 shift 하였다. 이를 기초로한 문헌 대조 결과 9는 cleroidicin B로 동정되었다.⁵²



Compound 10과 11은 혼합물의 형태로 분리 되었으며 ^{13}C -NMR 측정 결과 6개의 carbon signal 2 set이 공존하고 있다. 9와 마찬가지로 intensity 차이를 이용하여 각각은 대칭으로 존재하는 2개의 탄소를 더하여 각 8개의 탄소가 존재함을 예상하였다. 10과 11은 9에서 carbonyl group이 alcohol로 환원된 것이 가장 큰 특징이며 그 외의 탄소들은 다소간 shift 하였다. 이를 기초로한 문헌 대조 결과 10과 11은 각각 rengyol 과 isorengyol로 동정되었다.⁵³

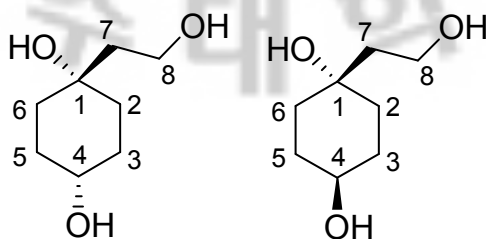


Figure 41. Structure of compounds 10 and 11.

Table 11. NMR spectroscopic data^a for compound **9**.

Position	Compound 9	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (int., multi, <i>J</i> Hz)
1	70.5	
2, 6	36.7	1.70 (2H, m)
		2.06 (2H, m)
3, 5	37.0	2.19 (2H, m)
		2.70 (2H, m)
4	212.8	
7	41.5	1.80 (2H, t, 6.6)
8	59.5	3.92 (2H, t, 6.6)

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 400 and 100 MHz, respectively.

Table 12. NMR spectroscopic data^a for compounds **10** and **11**.

Position	Compound 10		Compound 11	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (int., multi, <i>J</i> Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (int., multi, <i>J</i> Hz)
1	70.85		72.0	
2, 6	36.1		34.3	
3, 5	31.3		30.8	
4	70.80		68.5	
7	45.6		43.3	
8	59.2		59.0	

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400 and 100 MHz, respectively.

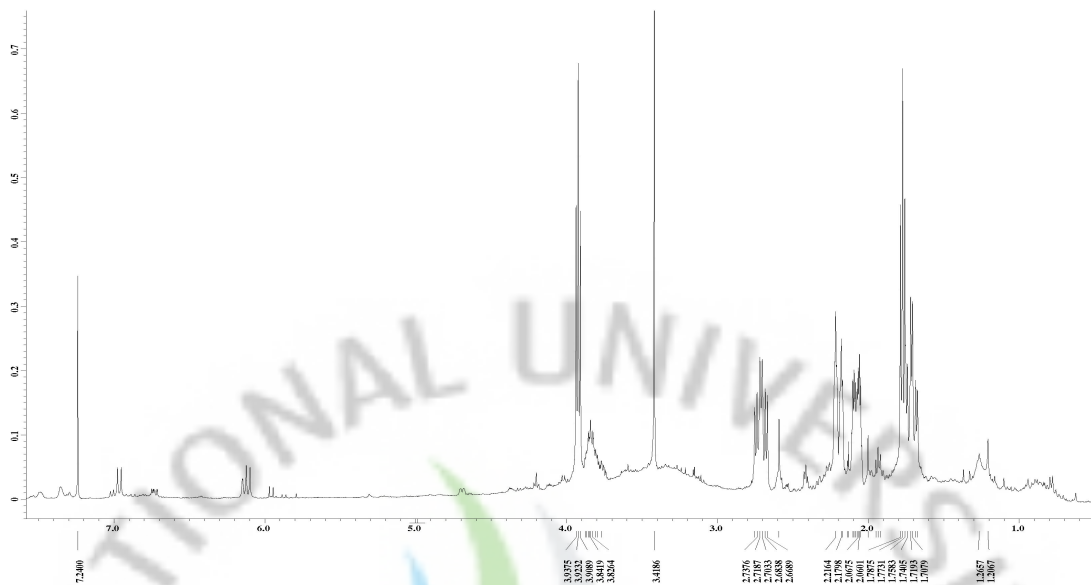


Figure 42. ^1H -NMR spectrum of compound **9** in CD_3OD (400MHz).

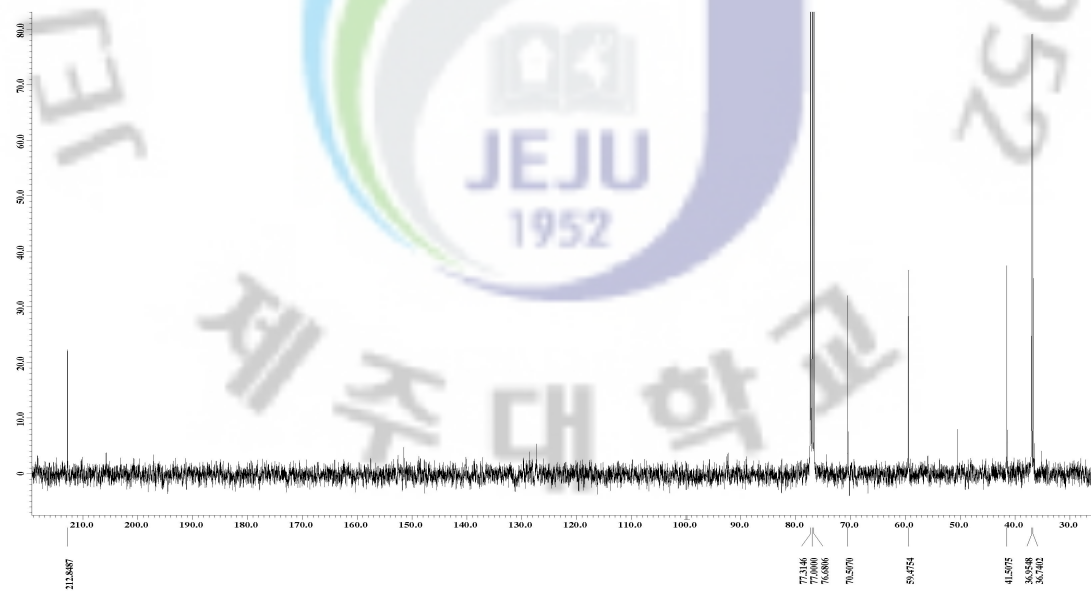


Figure 43. ^{13}C -NMR spectrum of compound **9** in CD_3OD (100MHz).

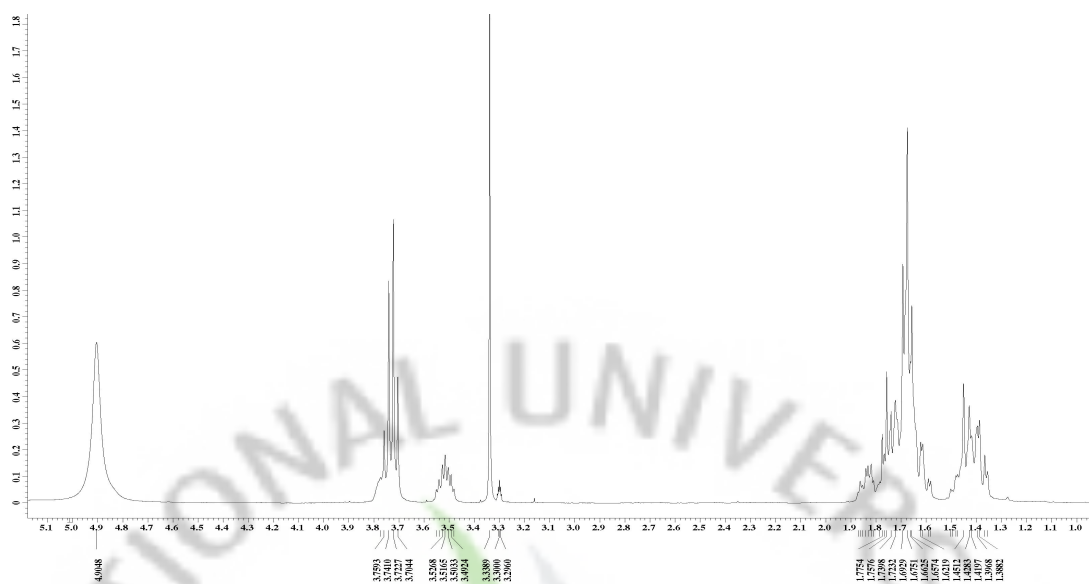


Figure 44. ^1H -NMR spectrum of compounds **10** and **11** in CD_3OD (400MHz).

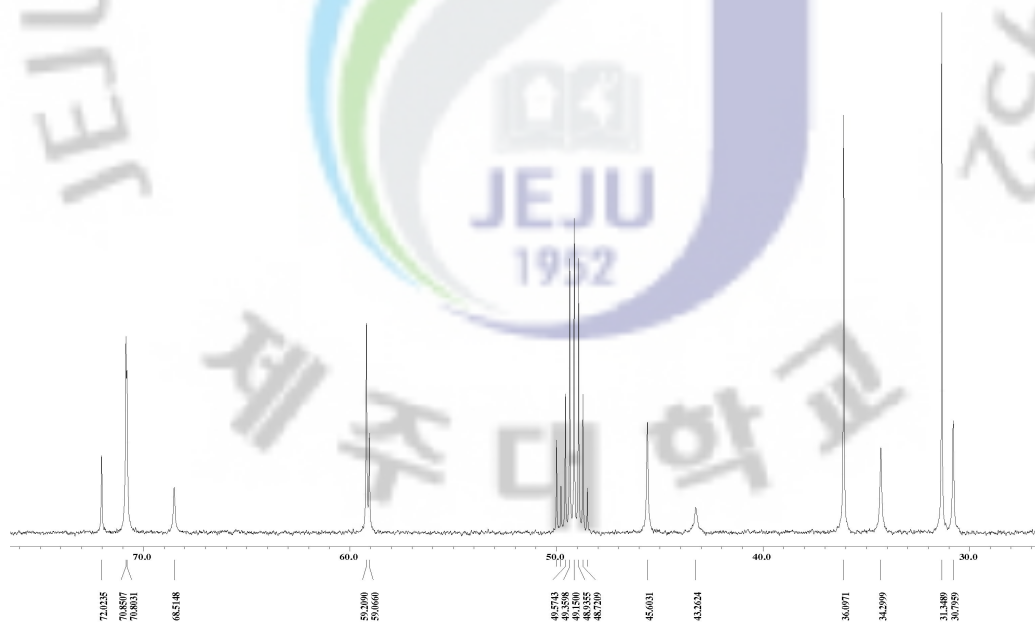


Figure 45. ^{13}C -NMR spectrum of compounds **10** and **11** in CD_3OD (100MHz).

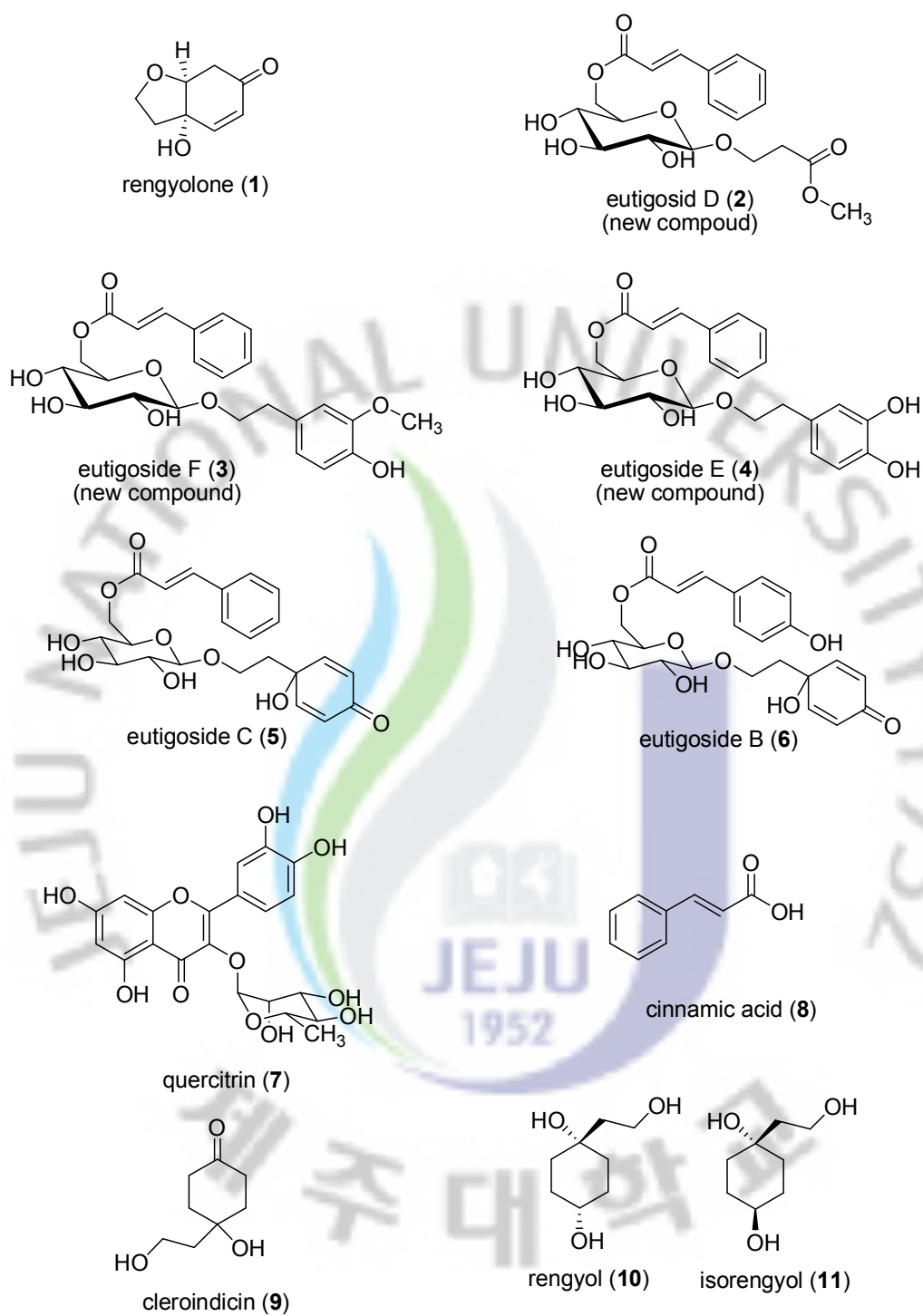


Figure 46. Structures of isolated compounds from *E. emarginata*.

3-2. 활성 결과

3-2-1. 분리된 화합물에 대한 항산화 활성

분리된 4개의 화합물에 대한 항산화 효능(DPPH radical scavenging activity, xanthine oxidase inhibitory activity, superoxide radical scavenging activity)을 평가하였다(Table 13). 그 결과 compound 3과 compound 4는 대조군인 ascorbic acid나 trolox보다는 높지 않지만 다른 화합물들에 비해 높은 DPPH 라디칼 소거효과를 나타내었다. Xanthine oxidase 의 경우 4개의 화합물 모두 비슷한 효과를 나타내었으며, superoxide 소거 효과는 compound 3이 대조군인 trolox와 유사한 효과를 나타내었다.

Table 13. Antioxidant activity of compounds obtained *E. emarginata*.

Sample	SC ₅₀ (μg/mL)		
	DPPH radical scavenging activity	Xanthine oxidase inhibitory activity	Superoxide radical scavenging activity
Compound 1	>1000	335.0	>1000
Compound 2	>1000	298.9	>1000
Compound 3	23.6	242.2	211.4
Compound 4	40.4	480.4	>1000
Compound 5	246.7	205.6	>1000
Compound 8	>1000	-	-
Compound 9	>1000	-	-
Compounds 10, 11	>1000	-	-
Butylated hydroxy anisole (BHA)	25.8	NA	NA
Ascorbic acid	4.1	-	-
Trolox	7.9	269.6	193.2
Allopurinol	NA	4.25	25.2

NA : not available method

3-2-2. Rengyolone의 melanin 생합성 억제효과

분리한 4개의 화합물 중에서 분리 양이 많았던 rengyolone에 대해 melanin 생합성 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 melanin 생합성에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase를 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Figure 47). 또한 melanin 양에 대해서도 농도 의존적 억제 효과를 보여주었다(Figure 48).

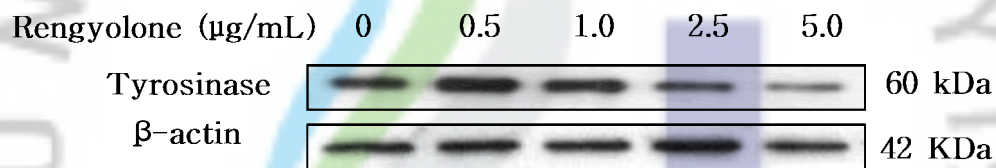


Figure 47. Effect of rengyolone on tyrosinase production in Melan-a cells. Melan-a cells (1×10^5 cells/mL) were incubated with the rengyolone for 24 hr. Whole-cell lysates were prepared and the protein level was determined by western blotting.

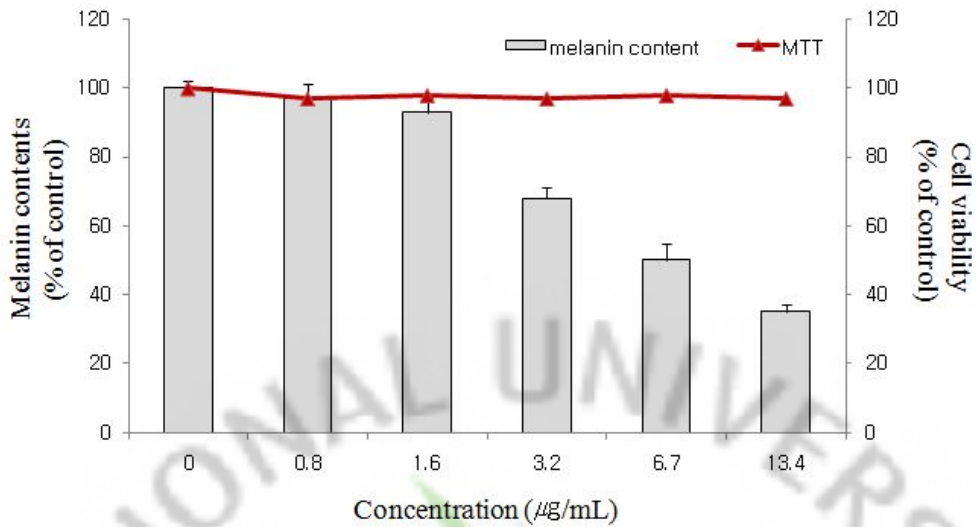


Figure 48. Effect of rengyolone on melanin contents in Melan-a cells. Melan-a cells (1×10^5 cells/mL) were incubated with the rengyolone for 24 hr. Melanin contents were determined by absorbance analysis at 405 nm.

3-2-3. Rengyolone의 항염증 효과

1) Rengyolone이 NO와 iNOS 생성에 미치는 영향

Rengyolone이 NO 생성에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. Figure 49에서, rengyolone이 농도 의존적으로 LPS에 의해 생성된 NO 생성량을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 다양한 연구에서 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.^{54,55} 따라서, NO 생성 억제 메커니즘을 알아보기 위하여, rengyolone이 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. Rengyolone을 대식세포에 처리하였을 때 iNOS 단백질 발현 및 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할

수 있었다 (Figure 50~51).

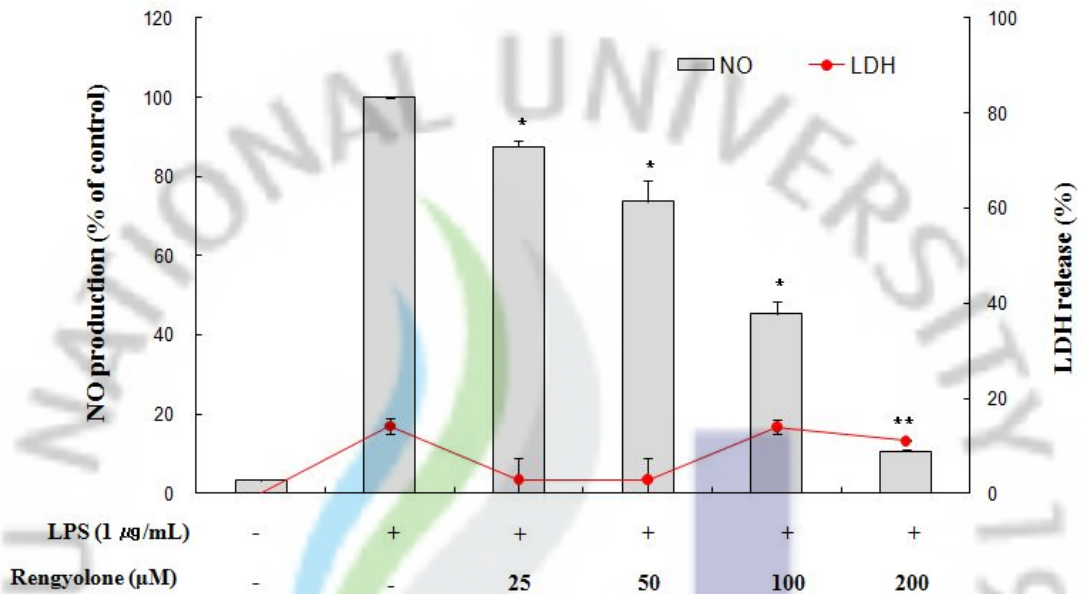


Figure 49. Effect of rengyolone on the production of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.7×10^5 cells/mL) were stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence of rengyolone for 24 hr. Cell cytotoxicity was determined using LDH release method. The data represent the mean \pm SD of duplicate experiments.

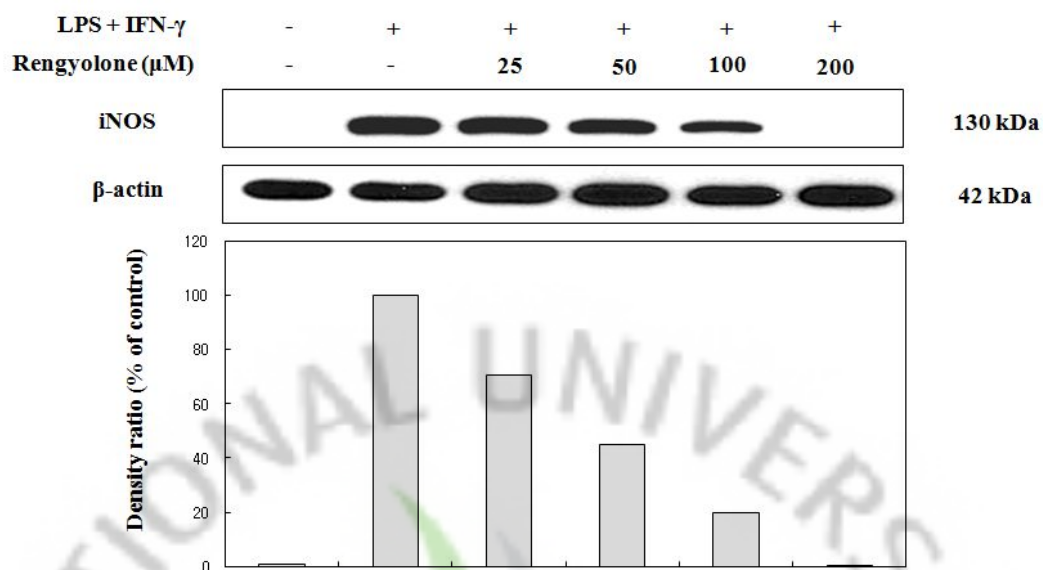


Figure 50. Effect of rengyolone on the protein level of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (1 μ g/mL) plus IFN- γ (25 U/mL) in the presence of rengyolone (25, 50, 100, and 200 μ M) for 20 hr. Whole-cell lysates were prepared and the protein level was determined by western blotting.

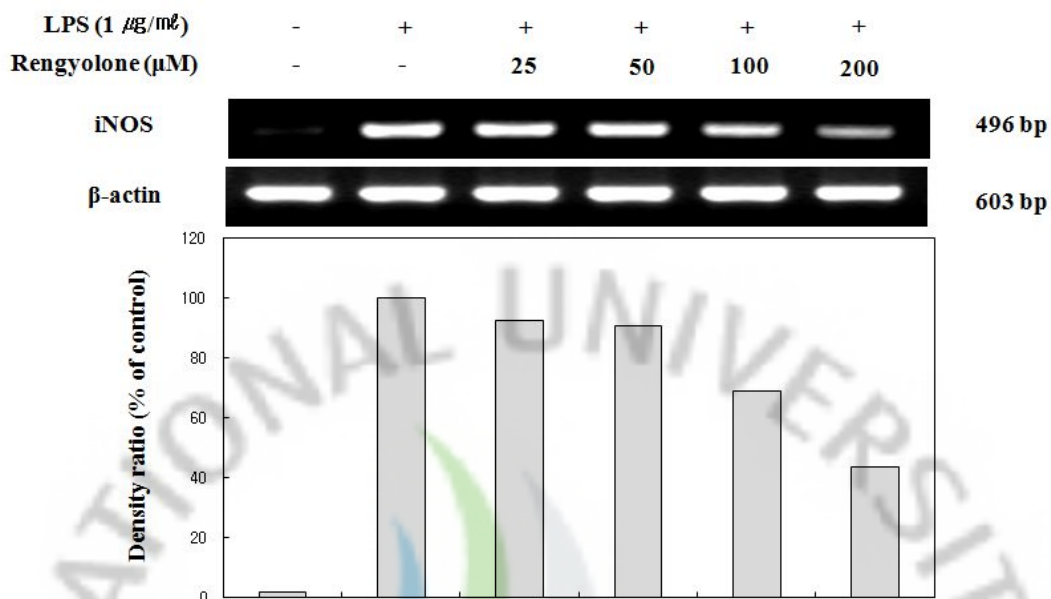


Figure 51. Effect of rengyolone on the mRNA expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of rengyolone (25, 50, 100, and 200 μM) for 18 hr. The mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR.

2) Rengyolone의 염증성 cytokine (IL-6, TNF- α) 및 COX-2 효소 억제효과

IL-6와 TNF- α 는 초기-염증성 cytokine으로서 염증진행에 매우 중요하게 작용하며 COX-2는 염증시에만 발현되는 유도형 효소로서 prostaglandin을 과량 생성하여 염증을 악화 시키는 주요 효소이다.

Rengyolone에 의해 염증성 cytokine (IL-6, TNF- α) 및 COX-2 효소의 생성이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Figure 52~54).

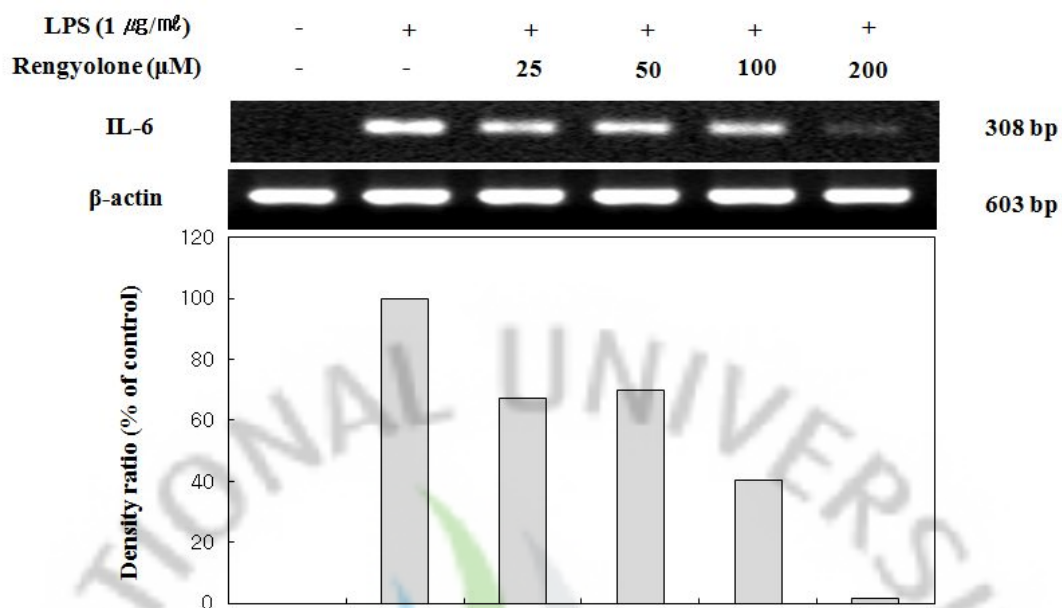


Figure 52. Effect of rengyolone on the mRNA expression of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of rengyolone (25, 50, 100, and 200 μM) for 18 hr. The mRNA expression of IL-6 was determined by RT-PCR.

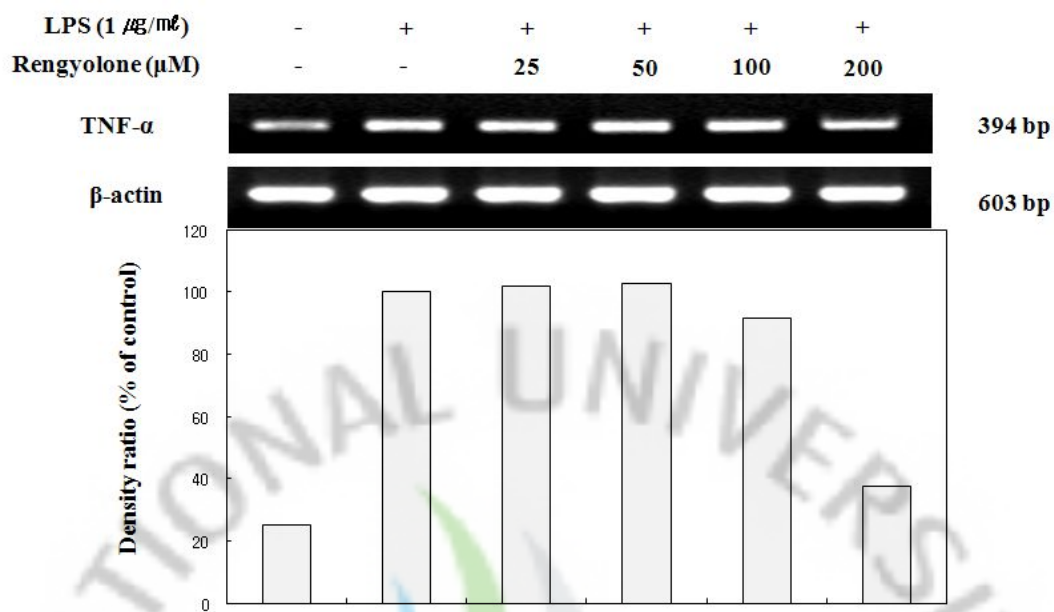


Figure 53. Effect of rengyolone on the mRNA expression of TNF- α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of rengyolone (25, 50, 100, and 200 μM) for 18 hr. The mRNA expression of TNF- α was determined by RT-PCR.

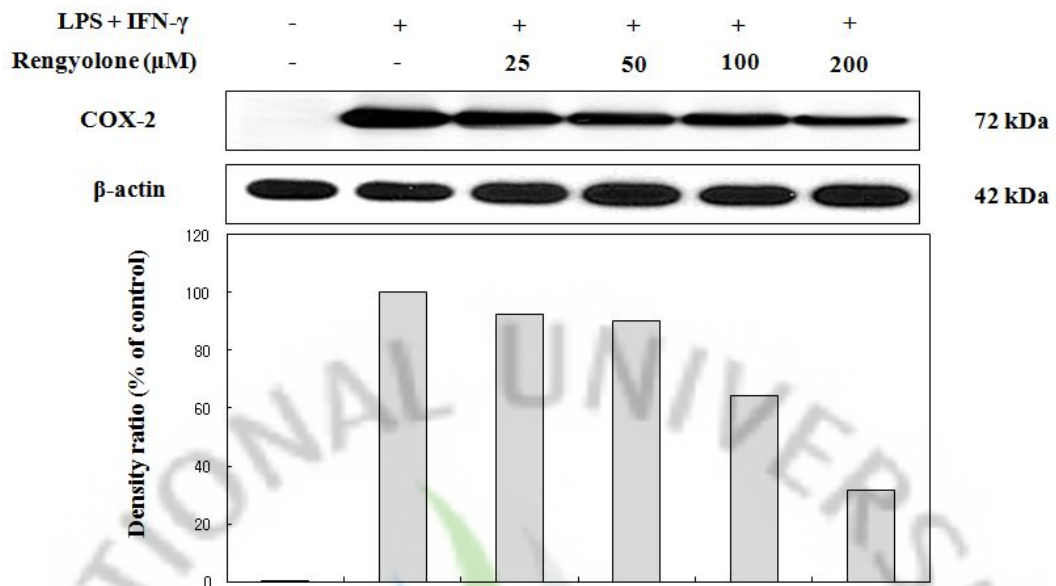


Figure 54. Effect of rengyolone on the protein level of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (1 μ g/mL) plus IFN- γ (25 U/mL) in the presence of rengyolone (25, 50, 100, and 200 μ M) for 20 hr. Whole-cell lysates were prepared and the protein level was determined by western blotting.

3-2-4. Rengyolone의 항아토피 효과

피부세포(HaCaT cell)에서 아토피 인자로 작용하는 chemokine 억제효과 아토피성 염증 환자의 혈액에서 MDC (monocyte-derived chemokine)와 TARC (thymus and activation-regulated chemokine)는 비정상적으로 증가하므로 최근 들어 MDC와 TARC가 아토피성염증의 중요한 지표로 대두되었다.

Rengyolone에 대하여 HaCaT cell (각질 세포주)에서 아토피 인자로 알려져 있는 MDC 및 TARC 억제 활성을 조사한 결과 농도 의존적인 MDC, TARC 억제 효과를 나타내었다(Figure 55, 56). 아토피성 피부염 신호전달 단백질인 STAT1 인산화에 미치는 영향을 확인한 결과 농도 의존적으로 STAT1 인산화에서 억제 효과를 보였다. 또한 전제 STAT를 같이 나타내 줌으로써 STAT1 자체에 영향

을 주어 감소하는 것이 아님을 확인하였다(Figure 57, 58).

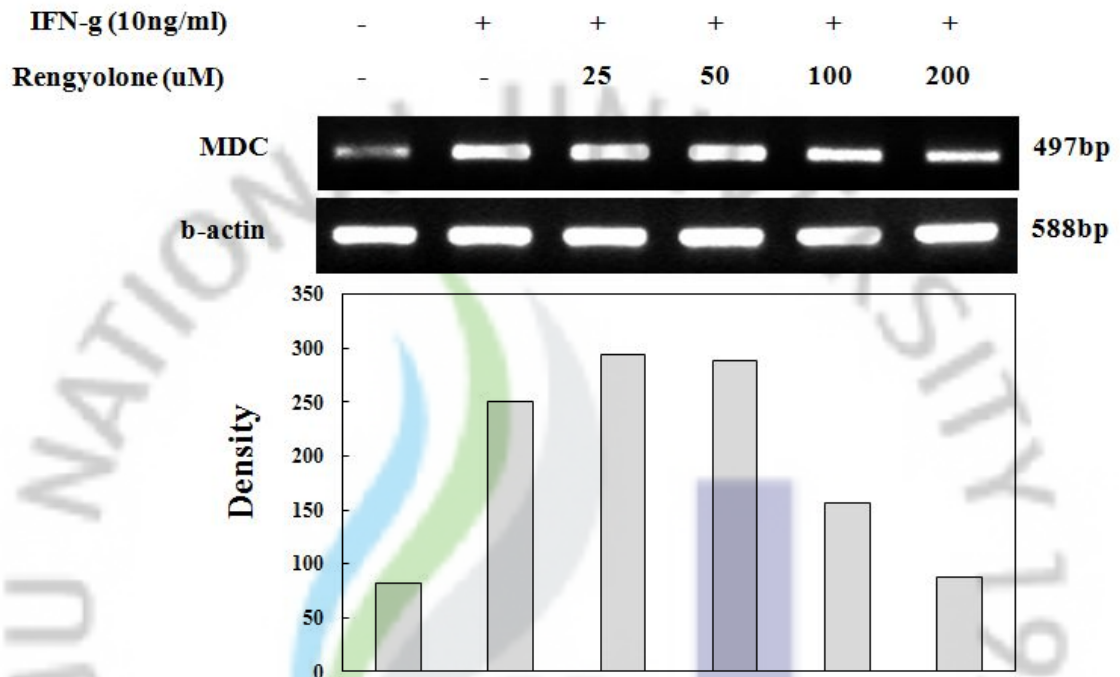


Figure 55. Effect of rengyolone on the mRNA expression of MDC in HaCaT human keratinocytes. Cells were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of MDC was determined from the 24 hr culture of cells stimulated by hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of rengyolone (25, 50, 100, 200 μ M).

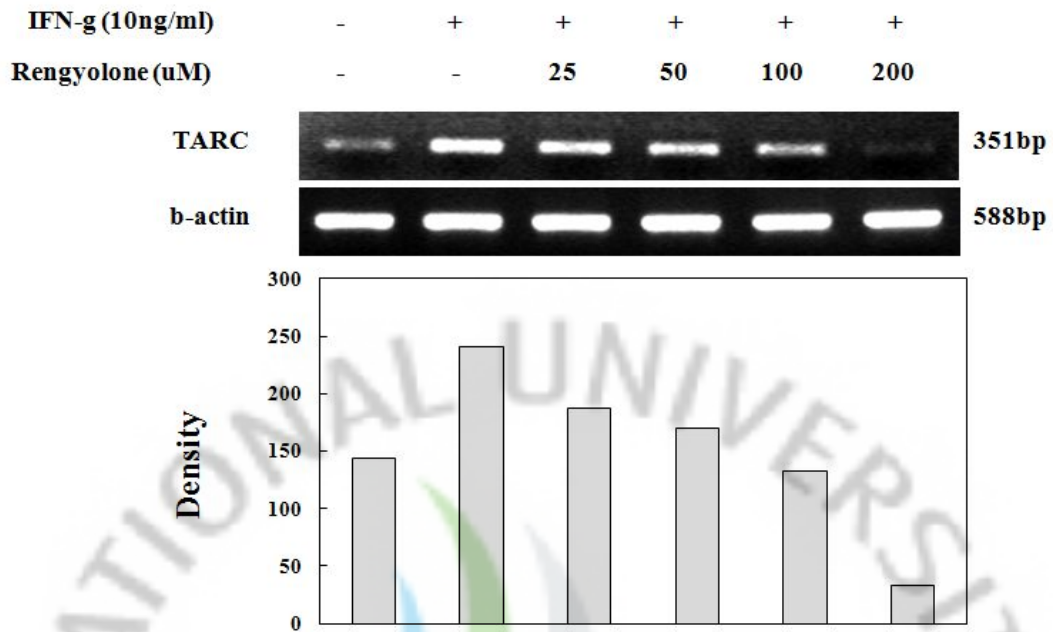


Figure 56. Effect of rengyolone on the mRNA expression of TARC in HaCaT human keratinocytes. Cells were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of TARC was determined from the 24 hr culture of cells stimulated by hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of rengyolone (25, 50, 100, 200 μ M).

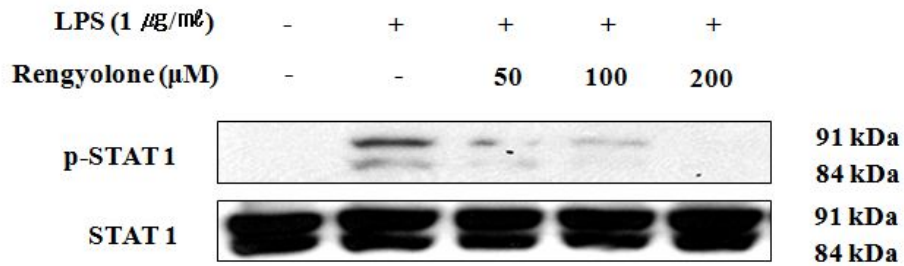


Figure 57. Effect of rengyolone on the phospho STAT1 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS only or LPS plus different concentration (50, 100, 200 μM) of sample for 3hr. Whole-cell lysates (30 μg) were prepared and the protein level was subjected to 8% SDS-PAGE and expression of phospho-STAT1 was determined by western blotting.

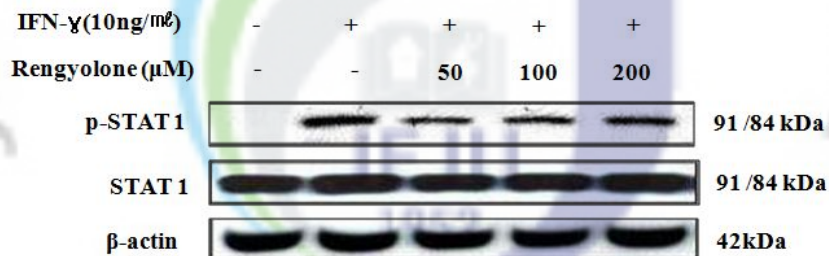


Figure 58. Effect of rengyolone on the phospho STAT1 expression in hIFN- γ -stimulated HaCaT human keratinocytes. The cells were stimulated with 10 ng/ mL of hIFN- γ only or hIFN- γ plus different concentration (50, 100, 200 μM) of sample for 3hr. Whole-cell lysates (30 μg) were prepared and the protein level was subjected to 8% SDS-PAGE and expression of phospho-STAT1 was determined by western blotting.

3-2-5. Eutigoside C의 세포 독성 평가

Eutigoside C의 독성은 LDH release 방법과 MTT assay 방법을 이용하여 측정하였다. MTT assay 방법을 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, 독성이 나타나지 않았다. LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. 실험에 이용된 25~200 μM 의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다(Figure 59).

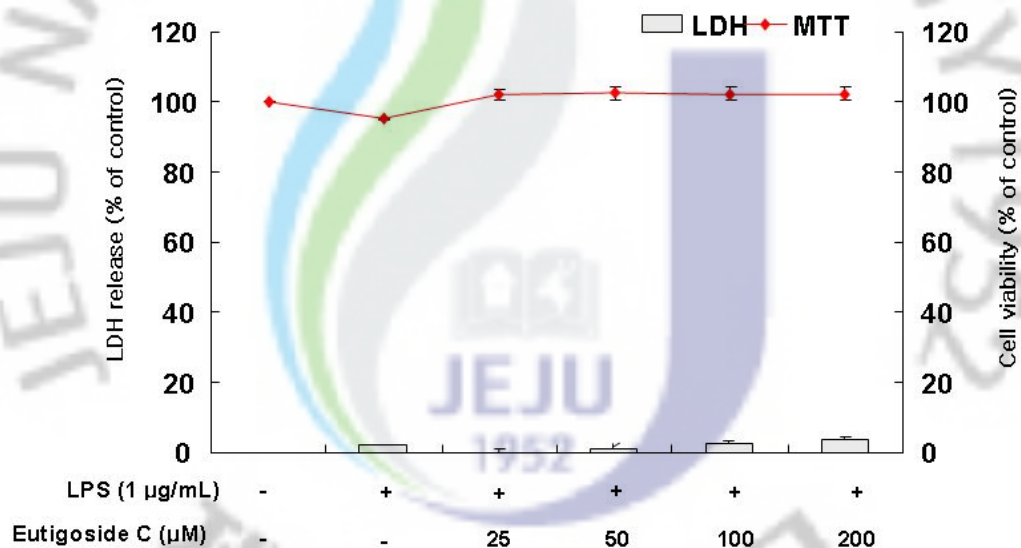


Figure 59. Cytotoxicity of eutigoside C in RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) alone or with different concentrations of eutigoside C (25, 50, 100, 200 μM) for 24 hr. Lactase dehydrogenase (LDH) release is expressed as a percentage of total cellular LDH. Cell viability is represented as relative absorbance compared with controls. Data represent mean \pm s.d. of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

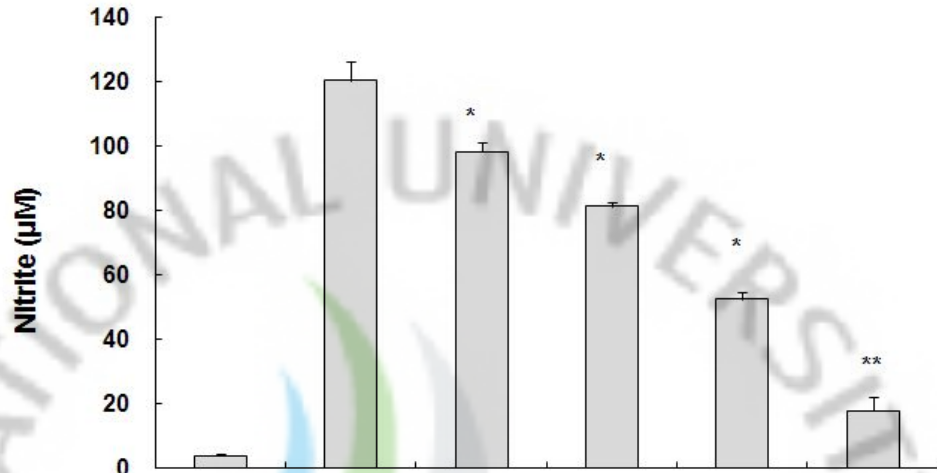
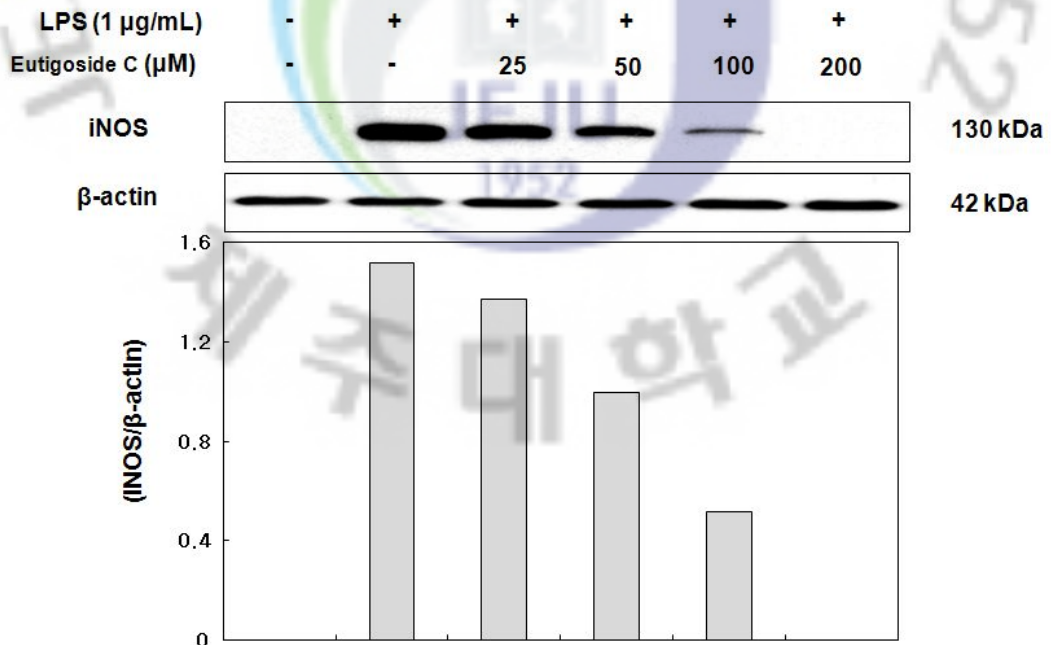
3-2-6. Eutigoside C의 항염증 효과

1) Inflammatory mediators (NO, PGE₂ and IL-6) 생성에 미치는 영향

Eutigoside C가 NO 생성에 미치는 영향에 대하여 확인한 결과 농도 의존적으로 LPS에 의해 생성된 NO 생성량을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 eutigoside C가 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 확인한 결과 LPS에 의해 생성된 iNOS 단백질 발현 및 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 60). 이러한 결과는 NO의 생성 억제가 iNOS 발현 억제를 통한 것으로 여겨진다.

다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin (PGE₂)합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것이다.⁵⁶ Eutigoside C가 LPS로부터 유도된 PGE₂ 생성 및 COX-2 발현에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 실험을 진행하였다. Eutigoside C를 다양한 농도로 처리한 결과, PGE₂ 생성이 농도 의존적으로 억제되는 결과를 확인할 수 있었으며, 이와 마찬가지로 COX-2의 단백질 발현 및 mRNA 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. (Figure 61). 이러한 결과는 eutigoside C가 COX-2의 유전자 발현을 조절함으로써 COX-2의 단백질 발현 및 PGE₂ 생성을 조절하는 것으로 여겨진다.

Pro-inflammatory cytokine인 IL-6는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다.⁵⁷ Eutigoside C가 IL-6 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, RAW 264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)과 eutigoside C를 처리하여 IL-6 생성에 대한 억제 효과를 조사하였다. 그 결과, 농도 의존적으로 IL-6 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 이 때 IC₅₀은 30.4 µM 이었다 (Figure 62).

A**B**

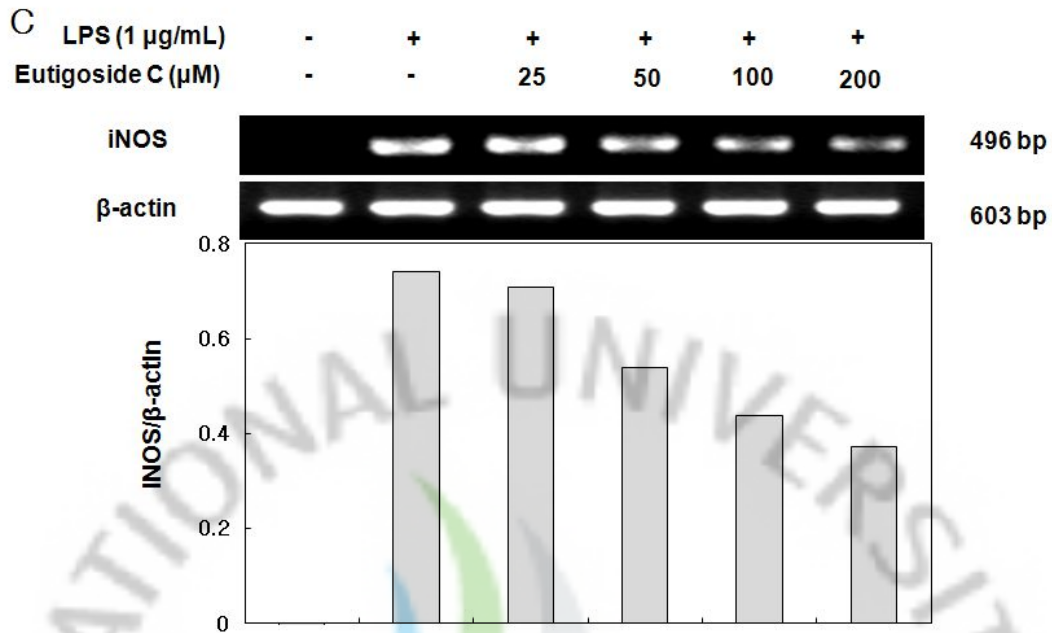
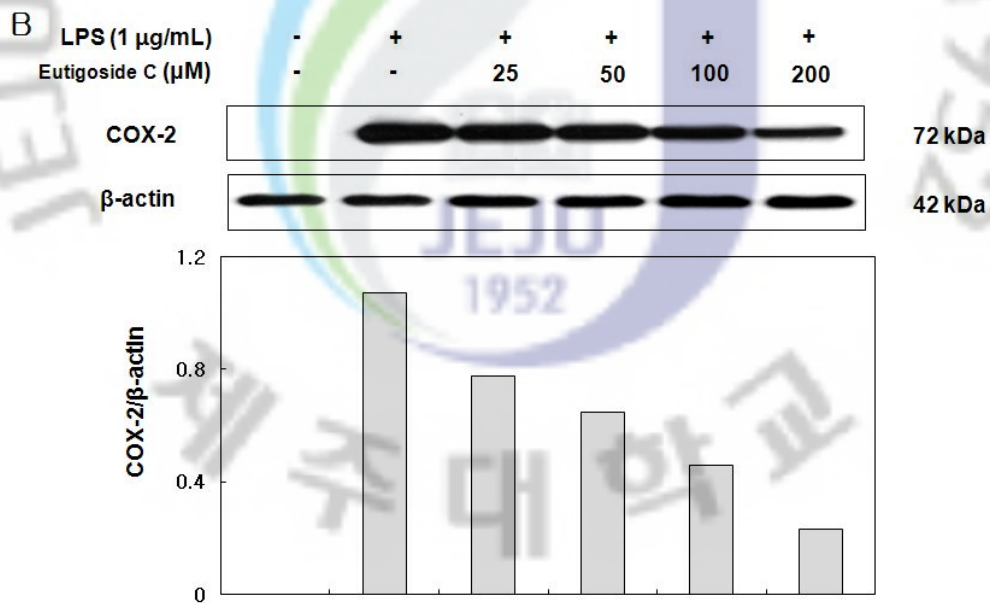
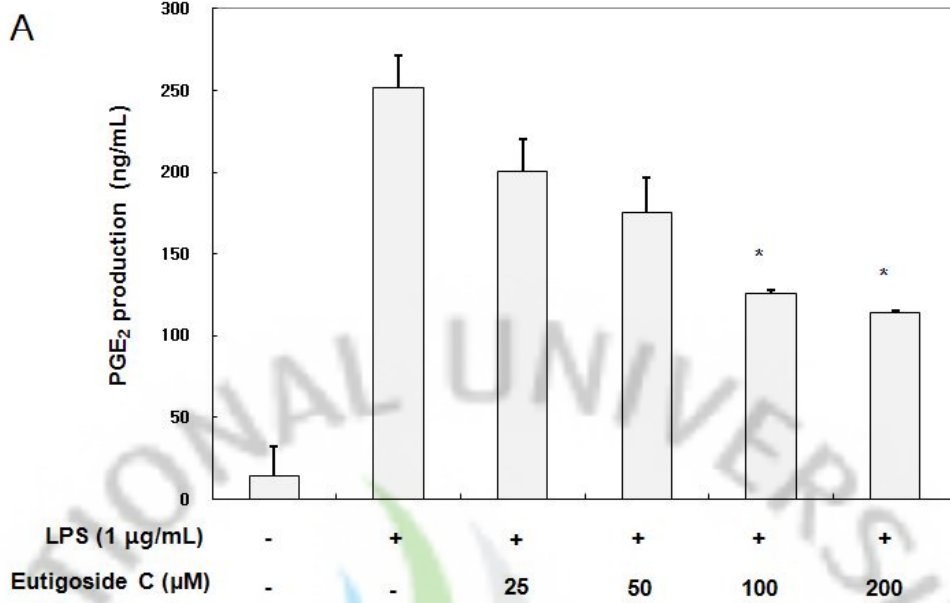


Figure 60. Effect of eutigoside C on the production of NO and expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 μM) of eutigoside C for 24 hr. The production of nitric oxide was determined by Griess reagent method. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ compared with the LPS alone. (B) The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 μM) of eutigoside C for 20 hr. Whole-cell lysates (30 μg) were prepared and the protein level was subjected to 10% SDS-PAGE, and expression of iNOS was determined by western blotting. β -actin was used here as an internal control. (C) The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 μM) of eutigoside C for 18 hr. Total RNA was isolated and the mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR. β -actin was used here as an internal control.



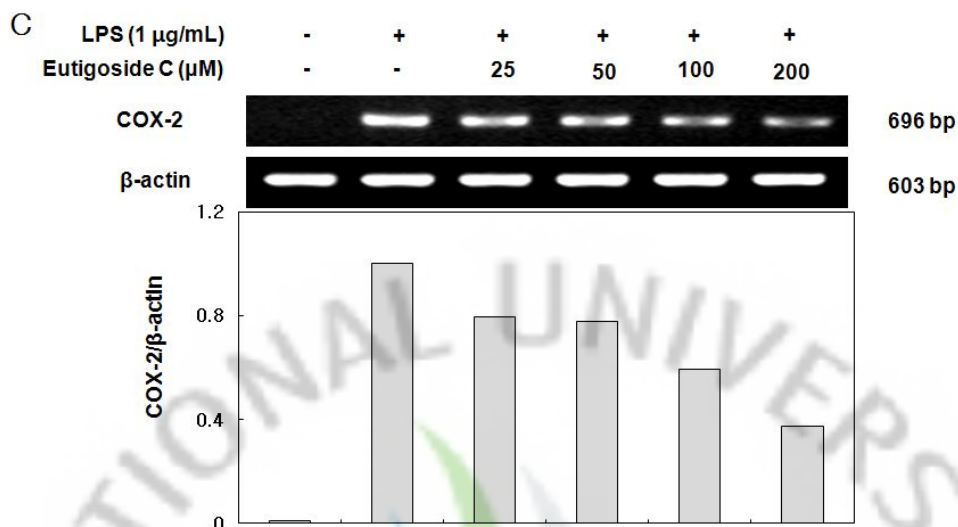


Figure 61. Effect of eutigoside C on the production of PGE₂ and expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 µM) of eutigoside C for 24 hr. The production of PGE₂ released in the culture medium was assayed by EIA method. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared with the LPS alone. (B) The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 µM) of eutigoside C for 20 hr. Whole-cell lysates (30 µg) were prepared and the protein level was subjected to 10% SDS-PAGE, and expression of COX-2 was determined by western blotting. β-actin was used here as an internal control. (C) The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 µM) of eutigoside C for 18 hr. Total RNA was isolated and the mRNA expression of COX-2 was determined by RT-PCR. β-actin was used here as an internal control.

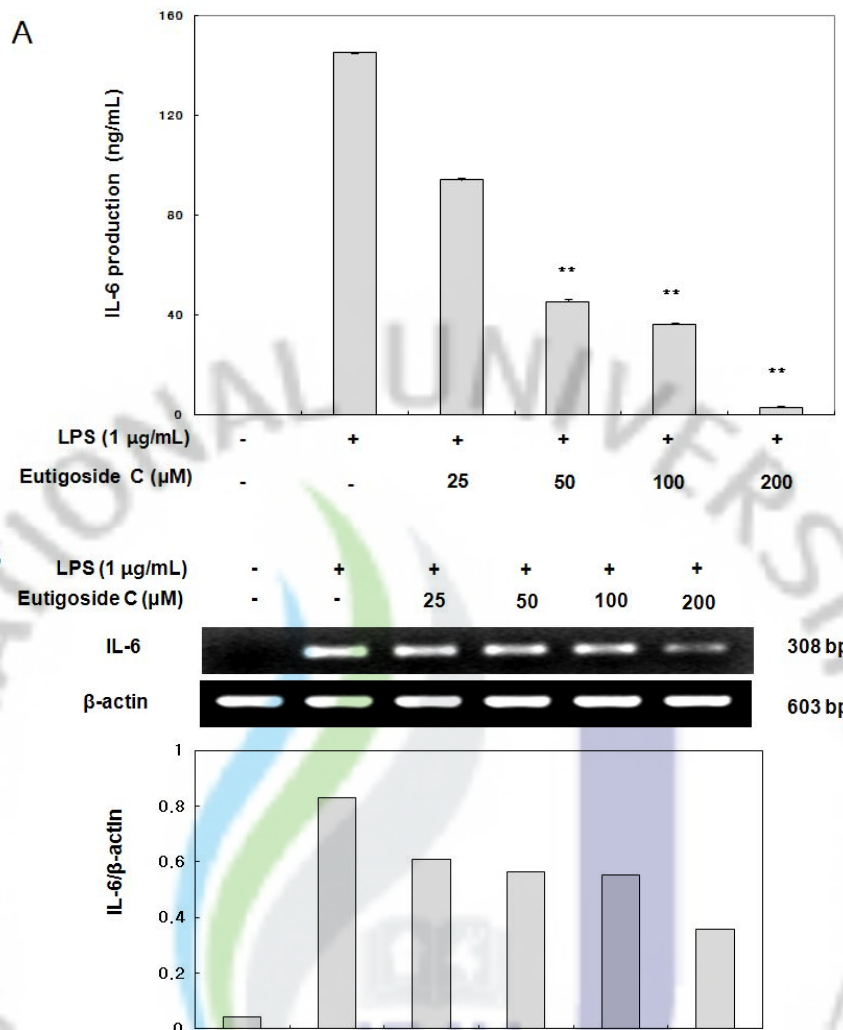
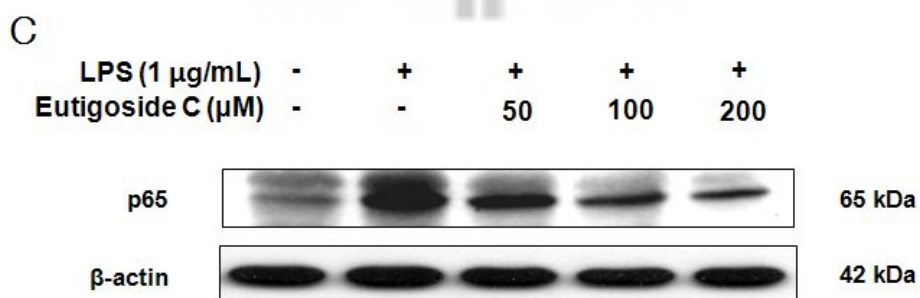
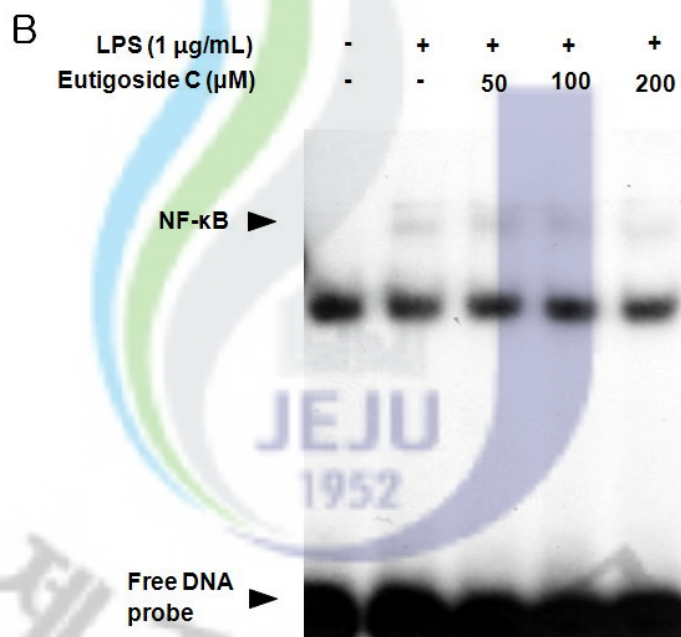
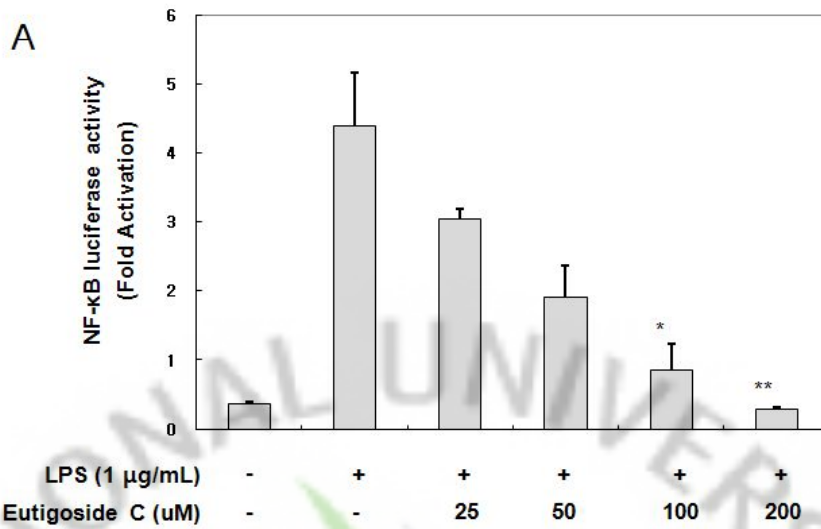


Figure 62. Effect of eutigoside C on the production of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 µM) of eutigoside C for 24 hr. The production of IL-6 released in the culture medium was assayed by ELISA method. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the LPS alone. (B) The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 µM) of eutigoside C for 18 hr. Total RNA was isolated and the mRNA expression of IL-6 was determined by RT-PCR. β-actin was used here as an internal control.

2) Eutigoside C 가 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

NF- κ B 는 염증반응에서 iNOS, COX-2 그리고 inflammatory cytokines 발현에 중요하게 작용한다.^{58,59} Eutigoside C 가 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 luciferase activity assays를 수행한 결과, eutigoside C 가 농도의존적으로 NF- κ B 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 63A). NF- κ B 활성의 억제는 다양한 NF- κ B 신호전달의 간섭에 의해 이루어진다.^{60,61} 전사인자의 전사촉진은 전사인자에 DNA가 binding 함으로써 조절되는데,⁶² eutigoside C 가 이러한 NF- κ B-DNA binding 활성화에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 EMSA 방법을 수행하였다. Eutigoside C를 세포에 처리하였을 때, LPS 에 의해 유도되는 NF- κ B binding 이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 63B). p65는 LPS 등에 의해 활성화된 대식세포에서 NF- κ B의 주요한 구성요소로 알려져 있다. 따라서, Western blotting 방법을 이용하여 핵단백질 내에 있는 p65 단백질의 발현을 확인해 보았다. 그 결과 eutigoside C가 LPS 에 의해 활성화되는 NF- κ B-p65 발현을 NF- κ B-DNA binding 활성억제와 마찬가지로 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 63C). 핵내로의 전사인자의 이동 및 NF- κ B의 DNA binding 은 이들의 억제 단백질인 I κ B- α 의 인산화 및 degradation에 의해 조절되게 된다.⁶³ NF- κ B-DNA binding이 이러한 I κ B- α degradation과 연관되어 있는지를 알아보기 위하여, I κ B- α 의 cytoplasmic level을 측정하여 보았다. LPS 로 20분 자극을 주었을 때, I κ B- α 가 degradation 되는 것을 확인할 수 있었으며, eutigoside C 를 처리하였을 때 농도 의존적으로 이러한 발현이 회복되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 63D). 이러한 결과는 LPS 로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 eutigoside C 에 의한 염증매개 물질의 억제가 NF- κ B DNA binding 활성억제 및 핵내로의 이동 억제를 통한 것으로 여겨진다.



D

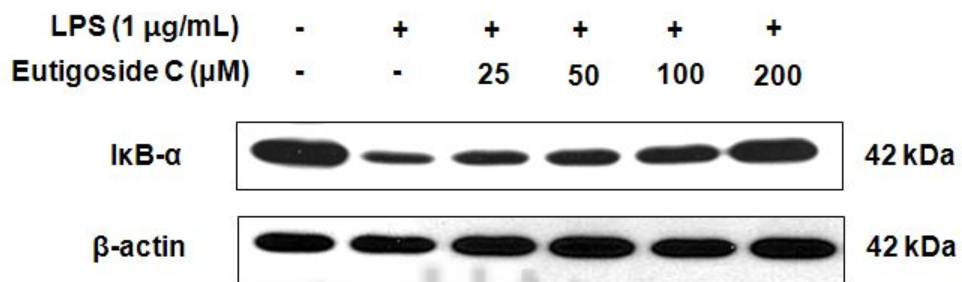


Figure 63. Effects of eutigoside C on the activation of NF- κ B in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) Cells were transiently cotransfected with NF- κ B promoted luciferase reporter plasmid (pNF- κ -Luc) and Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-null) as internal control for 30 h, and then stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 μM) of eutigoside C for 16 hr. The luciferase activity was measured and data were normalized by Renilla luciferase expression vector. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the LPS alone. (B) The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or LPS plus different concentrations (50, 100, 200 μM) of eutigoside C for 2 hr. Nuclear extracts (10 μg) were prepared and assayed for nuclear NF- κ B binding activity by EMSA. (C) The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or LPS plus different concentrations (50, 100, 200 μM) of eutigoside C for 1 hr. Nuclear extracts (20 μg) were prepared and the protein level was subjected to 10% SDS-PAGE, and expression of NF- κ B-p65 was determined by western blotting. β -actin was used here as an internal control. (D) The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or LPS plus different concentrations (25, 50, 100, 200 μM) of eutigoside C for 20 min. Whole-cell lysates (30 μg) were prepared and the protein level was subjected to 12% SDS-PAGE, and expression of I κ B- α was determined by western blotting. β -actin was used here as an internal control.

3) Eutigoside C 가 MAPK 활성화에 미치는 영향

세 종류의 MAP kinases (ERK, JNK and p38 MAPK)는 활성화된 대식세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 이러한 kinase 는 세포성장, 분화 그리고 자극에 의한 유전자 발현에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다.^{64,65} 따라서, eutigoside C 가 이러한 세 종류의 MAP kinases 인산화에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실험을 진행한 결과, eutigoside C 가 LPS로 유도된 ERK 1/2, JNK 및 p38 인산화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 64).

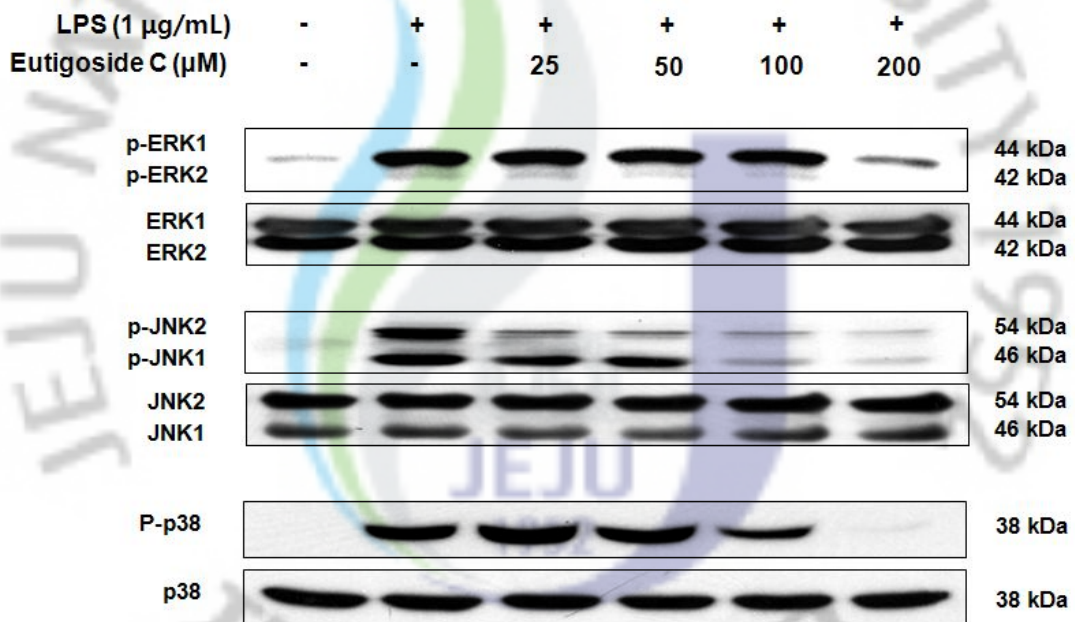


Figure 64. Effects of eutigoside C on the phosphorylation of MAPKs in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.6×10^6 cells/mL) were stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of Eutigoside C for 20 min. Whole-cell lysates were prepared and the protein level was determined by western blotting.

3-2-7. Euticoside C의 항아토피 효과

Euticoside C에 대하여 HaCaT cell (각질 세포주)에서 아토피 인자로 알려져 있는 MDC 및 TARC 억제 활성을 조사한 결과 농도 의존적으로 MDC 및 TARC 발현이 억제되었다(Figure. 65, 66).

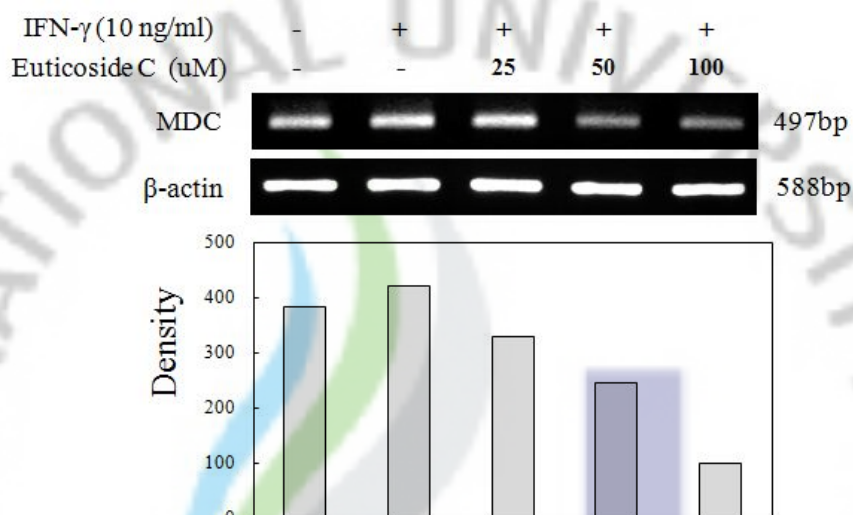


Figure 65. Effect of eutigoside C on the mRNA expression of MDC in HaCaT human keratinocytes. Cells were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of MDC was determined from the 24 hr culture of cells stimulated by hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of eutigoside (25, 50, 100 μ M).

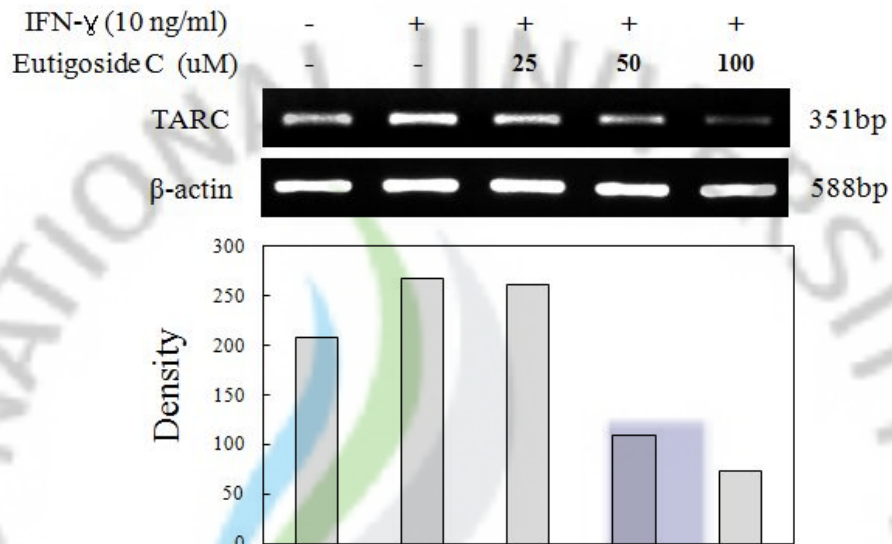


Figure 66. Effect of eutigoside C on the mRNA expression of TARC in HaCaT human keratinocytes. Cells were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of TARC was determined from the 24 hr culture of cells stimulated by hIFN- γ (10 ng/mL) in the presence of eutigoside C (25, 50, 100 uM).

4. 결론

우묵사스레피로부터 총 11개의 화합물을 분리 동정되었다. 이들 중 eutigoside C (5), eutigoside B (6), Quercitrin (7)은 이미 우묵사스레피로부터 분리, 보고되어진 물질이며, rengyolone (1)을 포함한 cleroidicin B (9), rengyol (10), isorengyol (11)은 우묵사스레피에서는 처음으로 분리되었다. 그리고 3개의 new compounds (compound 2, 3, 4)를 분리, 동정되었다.

분리된 화합물에 대해 항산화, 미백(tyrosinase inhibition assay), 주름(elastase inhibition assay) 효과를 확인한 결과 new compound인 compound 3 ($SC_{50} = 23.6 \mu\text{g/mL}$)과 compound 4 ($SC_{50} = 40.4 \mu\text{g/mL}$)는 대조군인 ascorbic acid ($SC_{50} = 4.1 \mu\text{g/mL}$)나 trolox ($SC_{50} = 7.9 \mu\text{g/mL}$)보다는 높지 않지만 다른 화합물들에 비해 높은 DPPH 라디칼 소거효과를 나타내었다. Tyrosinase 및 elastase 저해 효과는 나타나지 않았다. 분리양이 많았던 rengyolone에 대해 여러 생리 활성을 확인하여 보았다.

Melan-a cell에서의 melanin 생합성 억제 효과 확인 결과 melanin 생합성에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase를 농도 의존적으로 억제함을 확인하였고, melanin 양에 대해서도 농도 의존적 억제하는 효과를 보여주었다.

항염 활성 확인을 위해 대식세포인 RAW 264.7 cell에 rengyolone과 eutigoside C를 처리하였을 때 농도 의존적인 NO, iNOS 발현 억제를 나타내었으며, 염증성 cytokine (IL-6, TNF- α , PGE₂) 및 COX-2 효소의 생성도 농도 의존적으로 억제되었다. eutigoside C의 경우 염증반응에서 iNOS, COX-2 그리고 inflammatory cytokines 발현에 중요하게 작용을 하는 NF- κ B의 활성을 농도 의존적으로 억제하였으며, NF- κ B의 주요한 구성요소인 p65 단백질의 발현을 확인한 결과 eutigoside C가 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B-p65 발현을 NF- κ B-DNA binding 활성억제와 마찬가지로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, NF- κ B-DNA binding이 이러한 I κ B- α degradation과 연관되어 있는지를 알아보기 위하여, I κ B- α 의 cytoplasmic level을 측정하여 보았다. 그 결과, I κ B- α 가 degradation 되는 것을 확인할 수 있었으며, eutigoside C를 처리하였을 때 농도

의존적으로 이러한 발현이 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

피부 각질 세포(HaCaT cell)에서 아토피 인자로 작용하는 chemokine 억제효과는 아토피성 염증 환자의 혈액에서 MDC (monocyte-derived chemokine)와 TARC (thymus and activation-regulated chemokine)가 비정상적으로 증가하므로 최근 들어 MDC와 TARC가 아토피성 염증의 중요한 지표로 대두되었다. Rengyolone과 eutigoside C에 대하여 HaCaT cell (각질 세포주)에서 아토피 인자로 알려져 있는 MDC 및 TARC 억제 활성을 조사한 결과 농도 의존적인 MDC, TARC 억제효과를 나타내었다. Rengyolone에 대해 아토피성 피부염 신호 전달 단백질인 STAT1 인산화에 미치는 영향을 확인한 결과 농도 의존적으로 STAT1 인산화에서 억제 효과를 보였다.

본 연구의 결과를 바탕으로 기능성 화장품 소재의 개발에 필요한 기초 자료를 구축하였고, 향후 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

IV. 과제 2: 감귤류 미숙과를 이용한 에센셜 오일의 개발

1. 재료

실험에 사용된 감귤은 서귀포시 하효동 지역의 일반 농가와, 제주시 해안동 일대의 농가, 그리고 서귀포시에 위치한 난지농업연구원 감귤연구센터 등지에서 Table 14에 표기한 각각의 시기에 수확하였다.

수확 직후 외피를 4~8등분하여 벗겨낸 상태로 -20°C 냉동고에 보관 순차적으로 실험에 이용하였다.



Figure 67. Immature citrus species.

Table 14. Traditional names of Jeju endemic citrus species.

감귤명	학명	채집 지역	채집날짜
온주	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	제주시	10. 8.
진귤	<i>C. sunki</i> Hort. ex Tanaka	감귤연구소	10. 30.
감자	<i>C. benikoji</i> Hort. ex Tanaka	감귤연구소	10. 30.
지각	<i>C. aurantium</i> L.	감귤연구소	10. 30.
Seminole	<i>C. paradisi</i> Mac. × <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tanaka	서귀포시	10. 8
금감자	<i>C. obovoidea</i> Hort. ex Takahash	서귀포시	10. 8
하귤	<i>C. natsudaidai</i> Hayata	서귀포시	10. 8
청견	<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>	서귀포시	10. 8
홍팔삭	<i>C. hassaku</i> Hort. ex Y. Tan.	감귤연구소	10. 30.
사두감	<i>C. pseudogulgul</i> Hort. ex Tanaka	감귤연구소	10. 30.
천야하귤	<i>C. natsudaidai</i> Hayata	서귀포시	10. 8
좌등	<i>C. aurantium</i> L.	서귀포시	10. 8
병귤	<i>C. platymamma</i> Hort. ex Tanaka	서귀포시	10. 10
일향하	<i>C. tamurana</i> Hort. ex Tanaka	감귤연구소	10. 30.
동정귤	<i>C. erythrosa</i> Hort. ex Tanaka	감귤연구소	10. 30.
편귤	<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tanaka	감귤연구소	10. 30.
부지화	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	서귀포시	10. 10
인창귤	-	감귤연구소	10. 30.
신감하	<i>C. natsudaidai</i> Hayata	서귀포시	10. 10
감화귤	<i>C. natsudaidai</i> Hayata	감귤연구소	10. 30.
당유자	<i>C. grandis</i> Osbeck	북제주군	10. 15

2. 실험방법

2-1. 감귤류 정유의 추출

본 연구의 실험에서는 상대적으로 수율이 높은 distillation 방법을 사용하였다. 5 L 둥근 플라스크에 수분 수집기를 연결하고, 수분 수집기 위에 reflux condensor를 연결한다. 기존의 수분 수집기가 가열되어 정유 성분이 시간이 지남에 따라 없어지는 단점을 보완하기 위하여 수집된 수분이 머무르는 부위에 또한번의 냉각기를 달아 사용하였다.

수집된 감귤류의 외피를 칼로 4등분하여 벗겨내고 무게를 정확히 칭량하여 약 400 g의 감귤 외피와 3.5 L의 정제수를 5 L 둥근플라스크에 넣어 가열하였다.

시료가 들어 있는 정제수가 끓어올라 수분수집기에 수분이 포집되면 가능한 적은 열량을 가하면서 12 시간 까지 포집하였다.

2-2. 감귤류 정유 추출물의 성분 분석

추출된 정유 성분은 먼저 GC로 분석하였다. GC의 컬럼은 DB-1HT (30 m, ID:0.32 mm, Film:0.1 μ m) 가 이용되었으며, 오븐 조건은 초기 40°C에서 5 분, 210°C까지 10°C/min의 기울기로 승온하여 210°C에서 28 분간 머물렀다. Injector는 230°C, FID detector는 250°C에서 유지하였다.

GC/MSD 분석은 GC와 동일한 조건에서 수행하였으나 다만 MSD의 온도는 312°C로 유지하였다. GC/MSD에 의해 분석된 정유 성분은 기기의 Wiley 138 database에 존재하는 물질들과 가장 가까운 mass spectrum pattern을 보여주는 것으로 추정하였으며, 70% 미만으로 거의 match가 되지 않는 것은 제거하였다.

2-3. 생리활성 검색

2-3-1. 항산화 효능 평가

감귤류 정유 추출물들의 항산화 활성을 측정하고자 DPPH free radical scavenging assay와 superoxide radical scavenging assay, NO radical scavenging assay를 실시하였다.

1) DPPH radical scavenging assay

농도별로 희석한 시료를 96 well plate에 분주하고 0.1 mM DPPH를 처리한 후 실온에서 10 분 반응시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 DPPH radical 소거활성은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (SC₅₀)로 표시하였다.

2) Superoxide scavenging assay

Superoxide의 양은 NBT 환원법으로 측정하였다. 반응액은 100 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 1 mM xanthine, 0.5 mM EDTA, 59 µg/mL BSA, 1mM NBT를 첨가한 후 여러 농도의 시료에 첨가하여 25°C에서 10 분간 방치하였다. 0.5 U/mL xanthine oxidase를 첨가한 후 25°C에서 10 분간 반응 후 흡광도는 560 nm에서 측정하였다. superoxide 소거 활성은 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(SC₅₀)로 표시하였다.

3) NO radical scavenging assay

10mM SNP 용액 100 µL에 시료를 농도별로 첨가한 후 25°C에서 2-3 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess 시약(2.5%(v/v) phosphoric acid, 1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphythylenediamine)을

첨가하여 25℃에서 10 분간 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 소거활성은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(SC₅₀)로 표시하였다.

2-3-2. 감귤류 정유 추출물들의 항균 활성

1) 사용 균주

감귤류 정유 추출물들의 기능적 측면에서 약리효과, 특히 항균작용에 대한 연구로 Gram 양성균(+)으로 알려진 *Bacillus subtilis*균과 *Bacillus cereus*을 대상으로 총 20종의 essential oil의 항균효과를 측정하였다. 아울러 피부에서 여드름을 일으키는 것으로 알려진 *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919)와 표피 포도상구균으로 알려진 *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 3958)을 대상으로 항균 활성을 실시하였다. 실험에 사용한 균주들은 American Type Culture Collectin (ATCC)에서 구입하여 사용하였다.

2) Paper disc diffusion method

Gram 양성균(+)으로 알려진 *Bacillus subtilis*과 *Bacillus cereus*을 대상으로 총 20 종의 감귤 정유 추출물들의 항균효과를 측정하였다.

NaCl 10 g, Yeast extract 5 g, Tryptone 10 g, 증류수 1000 mL를 용기에 넣고 가열하여 충분히 용해시키고, 5 N NaOH를 소량 첨가하여 pH를 7.0로 맞춘다. 이것을 100 mL 용량의 삼각플라스크에 20 mL씩 나누어 넣고 가압멸균기에 1,055 g/cm²의 증기압력과 온도 121℃로 15 분 동안 멸균하여 LB배지를 준비한다.

제조한 액체배지 내에 agar 15 g을 첨가하고 가열하여 충분히 용해시키고, pH를 7.0이 되게 맞춘 후, 121℃에서 15 분 동안 가압 멸균하여 멸균 캐비닛에서 petri dish에 분주하여 LB고체배지를 준비한다.

Ampicillin을 3차 증류수에 녹여 0.5 mg/mL의 농도로 제조하여 ampicillin stock solution을 준비한다.

시료는 특별한 전처리 과정 없이 실험에 이용하였다. 준비된 공시균을 분광광도

계를 이용하여 측정하고 생균수를 $1\sim 9\times 10^8$ 으로 맞추고 vortex mixer를 이용하여 진탕 혼합한 후, 균점종액으로 이용한다. 준비된 점종액을 멸균하여 twister를 이용하여 배지 전체에 고르게 도말하고, 배지 상단과 하단에 멸균 디스크를 올려 놓는다.

시료 15 μL 를 마이크로 피펫을 이용하여 정확하게 점종한다. 이렇게 처리된 배지를 37°C 에서 24 시간 배양한 후, 성장 저지대(inhibition zone)의 지름을 측정한다.

성장저지대는 다음과 같이 계산하였다.

$$W = (T - D) / 2$$

여기에서, W = 저지대의 폭(mm)

T = 시료와 저지대의 전체 지름(mm)

D = 시료의 지름(mm)

실험은 1 회를 실시하였으며 각 회당 2 plate를 실시하여 평균을 내었다.

여드름균 생육억제효과를 측정하기 위해 에센셜 오일과 식물추출물들은 여드름균인 *Propionibacterium acnes* 와 표피 포도상구균인 *Staphylococcus epidermis* 균에 대하여 paper disc법으로 생육 억제율을 측정하였다. 이때 *P. acnes*는 GAM 배지에서 anaerobic jar를 이용하여 혐기배양 하였고, *S. epidermis*는 TSB 배지에서 호기성 배양하였다. 한천 0.7%를 포함하는 GAM 배지 8 mL에 균주를 50 μL 씩을 넣어 (10^7 개) 한천 1.5%를 포함하는 GAM 배지 위에 붓는다. 한천 0.7%를 포함하는 GAM 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올려서 배양하여 혐기성 (jar) 37°C 에서 24 시간, 48 시간 배양한 다음 디스크 주변에 형성된 원형 발육 저지 환의 크기를 측정하였다. 이때 대조군으로는 항여드름 효과가 높은 것으로 알려진 티 트리오일(tea tree oil)과 살리실산(salicylic acid)을 사용하였다.

3) Minimum Inhibitory Concentration

최소억제농도(MIC)측정은 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 사용하였다. 균들을 각각의 배양배지와 조건에서 배양한 후 균 현탁액을 농도가 약 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL로 희석하여, 최종농도가 10^5 CFU/mL이 되도록 조절하였다. 다양한 농도의 시료를 처리하고 각각 균주의 생육적온에서 배양 후, 균 증식이 나타나지 않는 최소농도를 MIC로 정하였다.

2-3-3. Cell culture

Human fibroblast cell (사람 섬유아세포)은 태평양(주)에서 murine macrophage cell line (마우스 대식세포)인 RAW 264.7은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온 조건하에서 배양하였으며, 계대 배양은 3일에 한번 씩 시행하였다.

Human monocytic cell line (사람 단핵구 세포)는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS이 함유된 RPMI1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온 조건하에서 배양하였으며, 계대 배양은 2 일에 한번 씩 시행하였다.

2-3-4. MTT assay for cell viability

1) Human fibroblast cell과 THP-1 cell에 대한 세포 독성 평가

각 세포들을 24 시간 배양한 후 시료들을 여러 농도로 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액(2 mg/mL in PBS)을 첨가하여 4 시간 동안 반응시켰다. 상층액을 완전히 제거하고 DMSO를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대

한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 독성 정도를 평가하였다.

2) RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성 평가

RAW 264.7 세포를 18 시간 배양한 후 농도별 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시에 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액 (2 mg/mL in PBS)을 첨가하여 4 시간 동안 반응시켰다. 상층액을 완전히 제거하고 DMSO를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 독성 정도를 평가하였다.

2-3-5. 면역세포에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

배양된 THP-1 세포(1×10^5 cells/mL)를 6well plate에 분주하여 배양한 후, serum free 배지로 교체하고, 여드름 유발 균주인 *Propionibacterium acnes* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 시료를 농도별로 동시 처리하여 48 시간 배양하였다. 배양 후 세포 배지로 분비된 IL-8과 TNF- α 를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Kit (Bio source, Camarillo, CA)를 이용하여 측정하였다.

2-3-6. NO assay

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 농도별 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24 시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 nitrite (NO_2^-)의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess 시약 [1% (W/V) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μL 를 혼합하여 96 well plate에서 10 분 동안 반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm

에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 NaNO₂ (sodium nitrite)를 standard로 비교하였다.

3. 결과

3-1. 감귤류 정유 추출 결과

제주도 내에서 21종의 감귤을 수확하여 수율이 높은 water distillation 방법을 이용하여 에센셜 오일을 포집하였다. 12 시간을 포집하여 얻은 각 감귤류 정유 수율은 다음(Table 15)과 같다. 21종의 감귤 중 감자 > 진귤 = seminole > 일향하 정유 추출물이 2% 이상의 수율을 나타내었다.

Table 15. Yield of essential oils in citrus species peel.

감귤명	학명	수율(%)	감귤명	감귤명	수율(%)
온주	<i>C. unshiu</i>	0.38	좌등	<i>C. aurantium</i>	0.89
진귤	<i>C. sunki</i>	2.50	병귤	<i>C. platymamma</i>	1.90
감자	<i>C. benikoji</i>	3.50	일향하	<i>C. tamurana</i>	2.10
지각	<i>C. aurantium</i>	0.90	동정귤	<i>C. erythrosa</i>	0.90
Seminole	<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>	2.50	편귤	<i>C. tangerina</i>	1.40
금감자	<i>C. obovoidea</i>	0.89	부지화	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	1.40
하귤	<i>C. natsudaidai</i>	0.60	인창귤	-	0.30
청견	<i>C. unshiu</i> × <i>C.</i> <i>sinensis</i>	1.00	신감하	<i>C. natsudaidai</i>	0.20
홍팔삭	<i>C. hassaku</i>	0.44	감화귤	<i>C. natsudaidai</i>	1.20
사두감	<i>C. pseudogulgul</i>	0.70	당유자	<i>C. grandis</i>	0.77
천야하귤	<i>C. natsudaidai</i>	0.60			

3-2. 성분분석 결과

20 종의 각 감귤 정유 추출물들의 성분을 분석한 결과 (Table 16~36) 총 약 50개의 성분이 분석되었으며, 97% 이상이 휘발성 성분이었다. Limonene (55.4% to 91.7%), myrcene (2.1% to 32.1%) 이 정유 추출물 성분 중 주요 성분임을 확인하였으며 그 외 성분으로 α -pinene (0.6% to 1.6%), linalool (0.4% to 6.9%), β -pinene (0.24% to 2.0%)과 α -terpinolene (0.07% to 0.54%) 등을 확인하였다.

Table 16. Chemical composition (%) of *C. unshiu* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.222	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.151 (91)
2	3.321	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.695 (94)
3	4.220	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.745 (91)
4	5.032	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	3.043 (91)
5	6.864	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	81.917 (91)
6	7.029	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.219 (90)
7	7.226	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.996 (94)
8	7.533	2-Allyltoluene (C ₁₀ H ₁₂)	0.044 (95)
9	7.654	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.441 (95)
10	7.950	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.134 (78)
11	8.542	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.18 (78)
12	9.124	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.486 (93)
13	9.398	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.437 (90)
14	9.936	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.064 (94)
15	10.001	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.032 (96)
16	10.429	Perilla aldehyde (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.076 (95)
17	11.768	Bornylene (C ₁₀ H ₁₆)	0.04 (95)
18	12.459	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.243 (72)
19	13.128	α -Humulene (C ₁₅ H ₂₄)	0.055 (78)

Table 17. Chemical composition (%) of *C. sunki* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.316	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.0943 (94)
2	4.282	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	4.277 (91)
3	5.039	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.63 (90)
4	6.849	dl-limonene (C ₁₀ H ₁₆)	86.514 (91)
5	7.013	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.843 (91)
6	7.079	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.194 (94)
7	7.606	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.08 (97)
8	7.935	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.38 (78)
9	9.108	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.323 (97)
10	9.339	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.389 (90)
11	9.931	Cyclooctane (C ₈ H ₁₆)	0.084 (92)
12	11.094	2,4-Mesitylenediamine (C ₉ H ₁₄ N ₂)	0.151 (83)
13	11.796	Terpinyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.22 (87)
14	12.301	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.11 (80)
15	12.465	β -Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.736 (95)
16	13.134	β -Selinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.117 (97)
17	13.65	2,5-dimethyl-3-methylene-1,5-heptadiene (C ₁₀ H ₁₆)	0.077 (89)
18	13.738	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.107 (72)
19	14.012	δ -cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.13 (98)

Table 18. Chemical composition (%) of *C. benikoji* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.299	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.886 (94)
2	4.210	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.345 (91)
3	4.999	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.812 (91)
4	6.908	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	91.680 (91)
5	7.040	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.206 (91)
6	7.117	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.113 (94)
7	7.281	Linalool oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.479 (86)
8	7.533	Linalool oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.242 (78)
9	7.621	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.042 (96)
10	7.917	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.537 (83)
11	8.630	4-(1-Methylethenyl)cyclohex-2-enone (C ₉ H ₁₂ O)	0.016 (86)
12	8.751	Citronella (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.16 (91)
13	9.102	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.253 (96)
14	9.343	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.4 (90)
15	9.596	P-menth-1-en-9-al (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.033 (72)
16	9.991	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.037 (95)
17	10.089	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.028 (72)
18	10.418	Perilla aldehyde (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.03 (81)
19	10.561	E-citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.036 (91)
20	11.099	2,4-Mesitylenediamine (C ₉ H ₁₄ N ₂)	0.069 (83)
21	12.042	Bornylene (C ₁₀ H ₁₆)	0.03 (83)
22	12.448	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.024 (83)
23	14.006	δ -Cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.044 (98)

Table 19. Chemical composition (%) of *C. aurantium* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.295	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.732 (94)
2	4.206	β -Pinene ((C ₁₀ H ₁₆)	0.717 (91)
3	5.018	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.613 (91)
4	6.652	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	87.304 (94)
5	6.893	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.726 (91)
6	7.157	Linalool Oxide(C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.311 (86)
7	7.552	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.055 (96)
8	7.914	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	2.875 (83)
9	8.506	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.161 (86)
10	8.605	<i>cis</i> -7-Methylenebicyclo[3.3.0]octan -2-one(C ₉ H ₁₂ O)	0.043 (80)
11	9.087	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.217 (95)
12	9.351	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.753 (90)
13	9.932	Cyclooctane (C ₈ H ₁₆)	0.251 (92)
14	10.086	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.064 (78)
15	10.590	Linalyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.334 (90)
16	11.095	2,4-Mesitylenediamine (C ₉ H ₁₄ N ₂)	0.110 (83)
17	12.049	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.145 (86)
18	12.291	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.387 (78)

Table 20. Chemical composition (%) of *C. paradisi* × *C. tangerina* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.217	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.213 (91)
2	3.316	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.548 (94)
3	4.215	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.055 (91)
4	5.455	β -Mycene (C ₁₀ H ₁₆)	4.433 (91)
5	6.958	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	71.284 (91)
6	7.078	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.175 (91)
7	7.276	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.57 (94)
8	7.561	2-Allyltoluene (C ₁₀ H ₁₂)	0.089 (93)
9	7.682	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.538 (96)
10	8.164	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	6.912 (87)
11	8.603	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.253 (80)
12	8.790	Citronella (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.096 (87)
13	9.218	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.641 (93)
14	9.481	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	2.501 (90)
15	9.963	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.025 (91)
16	10.029	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.037 (97)
17	10.172	Methylthymylether (C ₁₁ H ₁₆ O)	0.316 (90)
18	10.468	Perilla aldehyde (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.299 (94)
19	10.600	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.189 (94)
20	11.126	Thymol (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.674 (87)

Table 21. Chemical composition (%) of *C. obovoidea* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.210	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.198 (91)
2	3.309	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.533 (94)
3	4.197	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.729 (91)
4	5.009	β -Myrene (C ₁₀ H ₁₆)	0.828 (81)
5	6.874	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	83.385 (94)
6	7.016	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.347 (91)
7	7.203	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.622 (94)
8	7.291	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.181 (78)
9	7.642	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.410 (97)
10	7.894	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.322 (90)
11	8.519	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.116 (83)
12	9.111	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.337 (95)
13	9.364	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.969 (90)
14	9.726	Decanal (C ₁₀ H ₂₀ O)	0.768 (78)
15	9.934	α -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.065 (94)
16	10.088	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.069 (78)
17	10.417	8-methylene-bicyclo[5.1.0]octane (C ₉ H ₁₄)	0.035 (80)
18	10.560	E-Citral(C ₁₀ H ₁₆ O)	0.09 (91)
19	12.282	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.074 (90)
20	14.004	δ -cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.037 (98)

Table 22. Chemical composition (%) of *C. natsudaidai* (Hagyul) peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.200	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.207 (91)
2	3.298	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.316 (93)
3	4.198	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.771 (91)
4	5.229	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	3.417 (90)
5	6.830	d1-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	82.431 (91)
6	6.995	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.478 (91)
7	7.182	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.832 (94)
8	7.269	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.243 (78)
9	7.511	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.111 (80)
10	7.620	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.378 (97)
11	7.906	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.485 (80)
12	8.509	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.078 (78)
13	9.101	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.404 (96)
14	9.354	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.922 (78)
15	9.705	Decanal (C ₁₀ H ₂₀ O)	0.642 (78)
16	9.924	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.076 (95)
17	10.089	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.077 (78)
18	12.052	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.248 (86)

Table 23. Chemical composition (%) of *C. unshiu* × *C. sinensis* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.292	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.742 (94)
2	4.181	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.235 (91)
4	5.212	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.059 (90)
5	6.792	d1-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	91.493 (93)
6	6.956	α -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.267 (96)
7	7.044	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.247 (95)
8	7.362	1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	0.013 (74)
9	7.581	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.069 (96)
10	7.878	Linalool (C ₁₀ H ₁₆)	0.439 (80)
11	8.503	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.109 (78)
12	9.106	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.582 (96)
13	9.336	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.830 (90)
14	9.688	Decanal (C ₁₀ H ₂₀ O)	0.523 (72)
15	9.918	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.029 (96)
16	9.984	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.042 (97)
17	10.082	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.086 (78)
18	10.554	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.120 (94)
19	12.046	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.165 (86)
20	16.390	α -Sinensal(C ₁₅ H ₂₂ O)	0.081 (80)

Table 24. Chemical composition (%) of *C. hassaku* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.282	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.746 (94)
2	4.182	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.122 (90)
3	5.125	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.28 (87)
4	6.749	d1-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	94.026 (93)
5	6.935	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.378 (91)
6	7.835	Linalool (C ₁₀ H ₁₆)	0.174 (90)
7	8.603	4-(1-Methylethenyl)cyclohex-2- enone (C ₉ H ₁₂ O)	0.076 (91)
8	9.074	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.082 (93)
9	9.316	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.349 (93)
10	9.985	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.173 (97)
11	12.289	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.193 (86)

Table 25. Chemical composition (%) of *C. pseudogulgul* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.205	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.255 (91)
2	3.304	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.498 (94)
3	4.192	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.041 (91)
4	4.982	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.859 (91)
5	6.836	d1-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	80.145 (91)
6	7.000	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.562 (94)
7	7.198	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	8.028 (94)
8	7.286	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.196 (86)
9	7.626	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.321 (96)
10	7.911	Linalool (C ₁₀ H ₁₆)	0.755 (86)
11	7.977	p-Mentha-1,5,8-triene (C ₁₀ H ₁₄)	0.068 (94)
12	9.107	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.384 (96)
13	9.348	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.785 (91)
14	9.929	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.166 (95)
15	9.995	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.053 (95)
16	10.094	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.107 (78)
17	10.423	8-methylene-bicyclo[5.1.0]octane (C ₉ H ₁₄)	0.226 (87)
18	10.555	Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.143 (90)
19	12.035	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.048 (86)
20	12.277	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.081 (83)
21	13.999	δ -cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.034 (96)
22	18.727	Tridecanoic acid (C ₁₃ H ₂₆ O ₂)	0.067 (90)

Table 26. Chemical composition (%) of *C. natsudaidai* (Cheonyahagyul) peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.194	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.188 (91)
2	3.293	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.12 (91)
3	4.181	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.67 (91)
4	4.993	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.963 (90)
5	6.748	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	81.632 (94)
6	6.935	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.355 (94)
7	7.121	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.644 (94)
8	7.373	Pentylcyclopropane (C ₈ H ₁₆)	0.096 (78)
9	7.494	Linalool oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.214 (90)
10	7.582	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.3 (96)
11	7.878	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.682 (80)
12	9.085	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.38 (93)
13	9.348	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.009 (90)
14	9.918	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.14 (91)
15	9.984	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.048 (97)
16	10.083	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.049 (78)
17	10.423	perilla aldehyde (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.315 (93)
18	10.544	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.059 (91)
19	12.046	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.251 (87)
20	12.288	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.216 (86)
21	12.606	trans-2-Undecen-1-ol (C ₁₁ H ₂₂ O)	0.06 (83)
22	13.637	α -Selinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.17 (94)
23	13.922	Farnesene (C ₁₅ H ₂₄)	0.154 (78)
24	13.999	δ -Cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.086 (97)

Table 27. Chemical composition (%) of *C. aurantium* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.287	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.738 (93)
2	4.186	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.691 (91)
3	4.987	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.817 (91)
4	6.797	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	87.544 (91)
5	6.962	α -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.406 (94)
6	7.038	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.118 (95)
7	7.192	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.140 (86)
8	7.368	1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	0.080 (72)
9	7.477	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.058 (72)
10	7.576	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.075 (96)
11	7.960	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	3.061 (72)
12	8.508	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.092 (83)
13	9.090	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.196 (94)
14	9.364	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.533 (90)
15	9.923	Cyclooctane (C ₈ H ₁₆)	0.196 (92)
16	9.989	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.076 (97)
17	10.088	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.104 (78)
18	10.593	Linalyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.405 (90)
19	11.086	2,4-Mesitylenediamine (C ₉ H ₁₄ N ₂)	0.114 (83)
20	12.041	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.185 (86)
21	12.293	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.368 (86)
22	14.487	Farnesol (C ₁₅ H ₂₆ O)	0.099 (90)

Table 28. Chemical composition (%) of *C. platymamma* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.293	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.649 (93)
2	4.193	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.943 (91)
3	5.527	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	22.167 (90)
4	6.870	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	72.008 (91)
5	7.034	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.669 (94)
6	7.242	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.044 (86)
7	7.615	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.070 (97)
8	7.945	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.325 (86)
9	8.515	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.106 (83)
10	9.107	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.321 (96)
11	9.349	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.733 (90)
12	10.095	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.260 (78)
13	10.566	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.268 (91)
14	12.036	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.040 (86)
15	12.278	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.043 (86)
16	13.451	γ -Cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.035 (87)

Table 29. Chemical composition (%) of *C. tamurana* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.195	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.273 (91)
2	3.294	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.238 (94)
3	4.204	Sabinene (C ₁₀ H ₁₆)	2.282 (94)
4	5.214	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	3.573 (91)
5	6.694	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	74.477 (93)
6	7.089	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.552 (94)
7	7.364	1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	0.149 (78)
8	7.572	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.338 (95)
9	7.978	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	4.415 (87)
10	8.735	Citronella (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.303 (90)
11	9.141	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.679 (95)
12	9.349	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.982 (90)
13	9.931	<i>cis</i> -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.373 (94)
14	10.095	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.228 (78)
15	10.556	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.254 (91)
16	11.104	Carvacrol (C ₁₀ H ₁₄ O)	1.047 (90)

Table 30. Chemical composition (%) of *C. erythrosa* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.277	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.643 (91)
2	4.199	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	2.002 (91)
3	5.362	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	25.273 (90)
4	6.689	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	67.661 (93)
5	6.908	α -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.427 (94)
6	6.985	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.123 (95)
7	7.150	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.130 (86)
8	7.556	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.058 (97)
9	7.874	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.866 (86)
10	8.751	Citronella (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.075 (90)
11	9.080	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.233 (96)
12	9.311	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.384 (90)
13	10.550	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.094 (90)
14	11.077	2,4-Mesitylenediamine (C ₉ H ₁₄ N ₂)	0.136 (83)
15	12.031	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.065 (86)
16	12.273	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.142 (86)
17	12.437	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.075 (87)

Table 31. Chemical composition (%) of *C. tangerina* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.282	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.544 (91)
2	4.203	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.764 (91)
3	5.509	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	32.104 (90)
4	6.814	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	55.377 (91)
5	6.990	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.335 (91)
6	7.067	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.164 (95)
7	7.593	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.100 (97)
8	8.010	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	3.284 (90)
9	9.107	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.301 (96)
10	9.348	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.517 (90)
11	9.930	Cyclooctane (C ₈ H ₁₆)	0.123 (93)
12	10.149	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.897 (78)
13	10.621	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	1.140 (91)
14	11.092	2,4-Mesitylenediamine (C ₉ H ₁₄ N ₂)	0.075 (83)
15	11.795	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.236 (95)
16	12.058	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.464 (86)
17	12.343	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	1.761 (80)
18	12.453	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.052 (72)

Table 32. Chemical composition (%) of (*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.287	α-Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.041 (93)
2	4.176	β-Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.598 (91)
3	4.987	β-Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	3.391 (90)
4	6.797	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	88.459 (94)
5	6.984	(E)-β-Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	1.023 (91)
6	7.061	γ-Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.757 (95)
7	7.368	1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	0.018 (83)
8	7.576	α-Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.211 (97)
9	7.894	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.173 (78)
10	9.123	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.283 (96)
11	9.331	α-Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.562 (91)
12	9.704	Decanal (C ₁₀ H ₂₀ O)	0.870 (78)
13	9.979	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.062 (96)
14	10.406	8-methylene-bicyclo[5.1.0]octane (C ₉ H ₁₄)	0.082 (83)
15	11.931	Citronellyl propionate (C ₁₃ H ₂₄ O ₂)	0.021 (91)
16	12.600	1,10-Decanediol (C ₁₀ H ₂₂ O ₂)	0.062 (72)

Table 33. Chemical composition (%) of Inchanggyul peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.199	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.138 (91)
2	3.298	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.356 (91)
3	4.187	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.621 (91)
4	4.987	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	3.161 (91)
5	6.907	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	80.075 (93)
6	7.039	α -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.349 (94)
7	7.225	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.565 (94)
8	7.302	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.270 (83)
9	7.642	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.266 (97)
10	7.916	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.684 (86)
11	8.531	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.137 (72)
12	8.629	<i>cis</i> -7-methylenebicyclo[3.3.0] octane-2-one (C ₉ H ₁₂ O)	0.048 (80)
13	9.101	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.331 (95)
14	9.364	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.031 (90)
15	9.935	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.165 (94)
16	10.001	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.060 (97)
17	10.088	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.046 (78)
18	10.417	8-methylene-bicyclo[5.1.0]octane (C ₉ H ₁₄)	0.199 (86)
19	10.549	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.062 (78)
20	12.052	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.252 (87)
21	12.282	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.055 (80)
22	12.436	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.122 (86)
23	12.600	1,14-tetradecanediol (C ₁₄ H ₃₀ O ₂)	0.035 (83)
24	13.116	Cyclofenchene (C ₁₀ H ₁₆)	0.018 (72)
25	13.456	γ -Cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.144 (76)
26	13.928	Farnesene (C ₁₅ H ₂₄)	0.204 (80)
27	14.005	δ -Cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.078 (98)
28	18.831	Hexadecanoic acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	0.663 (86)

Table 34. Chemical composition (%) of *C. natsudaidai* (Singamha) peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.198	α -Thujene (C ₁₀ H ₁₆)	0.143 (91)
2	3.297	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.326 (91)
3	4.185	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.684 (91)
4	5.019	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.933 (90)
5	6.862	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	78.528 (93)
6	7.016	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.387 (91)
7	7.202	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.665 (94)
8	7.290	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.372 (78)
9	7.630	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.227 (96)
10	7.926	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.841 (78)
11	8.628	4-(1-methylethenyl)cyclohex-2-enone(C ₉ H ₁₂ O)	0.054 (87)
12	9.111	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.377 (96)
13	9.374	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.156 (90)
14	9.933	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.190 (93)
15	9.999	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.072 (95)
16	10.098	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.069 (78)
17	10.559	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.081 (83)
18	11.096	3-Methoxyacetophenone (C ₉ H ₁₀ O ₂)	0.093 (80)
19	12.051	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.277 (86)
20	12.237	α -Cubebene (C ₁₅ H ₂₄)	0.089 (86)
21	12.292	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.093 (86)
22	12.435	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.161 (86)
23	12.610	1,14-tetradecanediol (C ₁₄ H ₃₀ O ₂)	0.054 (83)
24	13.641	α -Selinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.177 (94)
25	14.003	δ -Cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.106 (98)
26	18.819	Pentadecanoic acid (C ₁₅ H ₃₀ O ₂)	0.613 (80)
27	20.256	Methyl linolenate (C ₁₉ H ₃₂ O ₂)	0.754 (90)

Table 35. Chemical composition (%) of *C. natsudaidai* (Gamhwagyul) peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.298	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.340 (93)
2	4.186	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.816 (91)
3	4.987	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	2.998 (87)
4	6.819	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	78.360 (91)
5	6.995	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.795 (91)
6	7.170	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	6.472 (94)
7	7.499	2-Allyltoluene (C ₁₀ H ₁₂)	0.049 (95)
8	7.609	α -Terpinolene(C ₁₀ H ₁₆)	0.397 (96)
9	8.037	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	4.921 (90)
10	9.112	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.495 (95)
11	9.364	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.142 (90)
12	9.923	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.081 (95)
13	9.989	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.031 (95)
14	10.088	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.042 (78)
15	10.549	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.051 (87)
16	11.744	α -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.051 (96)
17	12.041	Neryl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.054 (86)
18	12.282	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.071 (86)
19	12.436	Elemene (C ₁₅ H ₂₄)	0.019 (83)
20	16.385	α -Sinensal (C ₁₅ H ₂₂ O)	0.108 (87)

Table 36. Chemical composition (%) of *C. grandis* peel essential oil.

	Retention time (min)	Constituent	Peak area (%)
1	3.286	α -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.754 (91)
2	4.186	β -Pinene (C ₁₀ H ₁₆)	0.246 (91)
3	5.294	β -Myrcene (C ₁₀ H ₁₆)	22.645 (91)
4	6.840	dl-Limonene (C ₁₀ H ₁₆)	68.076 (91)
5	7.016	(E)- β -Ocimene (C ₁₀ H ₁₆)	0.483 (91)
6	7.126	γ -Terpinene (C ₁₀ H ₁₆)	1.603 (94)
7	7.268	Linalool Oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	0.642 (86)
8	7.608	α -Terpinolene (C ₁₀ H ₁₆)	0.080 (95)
9	7.948	Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	1.469 (90)
10	8.749	Citronella (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.205 (90)
11	9.100	1-Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.219 (96)
12	9.352	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	0.664 (90)
13	9.923	δ -4-Carene (C ₁₀ H ₁₆)	0.040 (90)
14	9.989	dl-Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	0.057 (96)
15	10.098	Z-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.175 (78)
16	10.416	E-Citral (C ₁₀ H ₁₆ O)	0.131 (94)
17	12.292	Geranyl acetate (C ₁₂ H ₂₀ O ₂)	0.234 (86)
18	13.455	Epi-bicyclosesquiphellandrene (C ₁₅ H ₂₄)	0.294 (93)
19	13.993	δ -Cadinene (C ₁₅ H ₂₄)	0.050 (96)
20	18.753	Tetradecanoic acid (C ₁₄ H ₂₈ O ₂)	0.181 (90)
21	20.179	(E,Z)-1,5-Cyclodecadiene (C ₁₀ H ₁₆)	0.175 (83)

3-3. 항산화 활성 결과

1) DPPH free radical scavenge assay

감귤류 정유 추출물의 DPPH 라디칼 소거 효과를 확인한 결과 총 21개의 정유 추출물 중 11개의 추출물이 높은 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타내었으며, 그 중 좌등($SC_{50} = 6.7 \mu\text{L/mL}$)과 동정굴($SC_{50} = 5.7 \mu\text{L/mL}$)이 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다(Table 37).

2) Superoxide radical scavenging assay

감귤류 정유 추출물의 superoxide 라디칼 소거 효과를 확인한 결과 총 21개의 정유 추출물 중 금감자($SC_{50} = 10.9 \mu\text{L/mL}$)와 천야하굴($SC_{50} = 16.1 \mu\text{L/mL}$) 2개의 정유 추출물이 다른 정유 추출물과 비교하여 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다(Table 37).

3) NO radical scavenging assay

감귤류 정유 추출물의 NO 라디칼 소거 효과를 확인한 결과 총 21개의 정유 추출물 중 10개의 추출물이 높은 NO 라디칼 소거 효과를 나타내었으며, 그 중 좌등($SC_{50} = 1.8 \mu\text{L/mL}$)과 동정굴($SC_{50} = 2.0 \mu\text{L/mL}$)이 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다(Table 37).

Table 37. Scavengings of DPPH and superoxide, NO radical by citrus essential oils.

Citrus essential oils	DPPH radical scavenging activity	Superoxide radical scavenging activity	NO radical scavenging activity
	SC ₅₀ (μL/mL)		
치각(<i>C. aurantium</i>)	15.2	> 100	20.0
Seminole (<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>)	11.6	> 100	> 100
금감자(<i>C. obovoidea</i>)	> 100	10.9	> 100
하귤(<i>C. natsudaikai</i>)	> 100	97.8	> 100
청견(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>)	19.3	> 100	27.8
천야하귤(<i>C. natsudaikai</i>)	> 100	16.1	> 100
좌등(<i>C. aurantium</i>)	6.7	> 100	1.8
병귤(<i>C. platymamma</i>)	12.5	> 100	22.3
일양하(<i>C. tamurana</i>)	9.96	> 100	21.7
동정귤(<i>C. erythrosa</i>)	5.7	> 100	2.0
편귤(<i>C. tangerina</i>)	19.6	> 100	22.3
부지화 (<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	10.8	> 100	8.5
감화귤(<i>C. natsudaikai</i>)	13.0	> 100	28.7
당유자(<i>C. grandis</i>)	10.6	> 100	10.9

3-4. 항균활성 결과

감귤류 에센셜 오일의 항균 활성 검색을 위하여 *Bacillus subtilis* 균과

*Bacillus cereus*을 대상으로 총 20 종의 essential oil의 항균효과를 측정하였다. 시료 15 μ L를 마이크로 피펫을 이용하여 정확하게 접종하여 처리된 배지를 37°C에서 24 시간 배양한 후 측정된 성장 저지대의 지름은 Table 38과 같다.

*Bacillus subtilis*와 *Bacillus cereus* 균주를 이용한 항균 활성 실험에서는 일향하와 편굴 두 종이 가장 좋은 활성을 나타내었고 그 이후로, 부지화, seminole, 금감자, 청견, 좌등, 동정굴, 감화굴 등이 활성을 나타내었다.

Propionibacterium acnes 균주를 이용한 항균 활성 실험에서는 부지화가 가장 좋은 활성을 보이며, 이후로, 일향하, 금감자, 청견, 천야하굴, 신감하 등이 좋은 활성을 보였다(Table 39). 표피 포도상 구균인 *Staphylococcus epidermidis*에 대해서는 단지 천야하굴과 금감자만이 생육저해환을 만들어 내었다.

3-5. 감귤류 정유 추출물에 대한 최소저해농도 측정(MIC)

Paper disc법에 의한 실험결과로 항균력이 높게 나타난 정유 추출물에 대한 최소저해농도(MIC)를 액체배지희석법(broth dilution method)으로 측정하였다. 그 결과 금감자와 천야하굴 정유 추출물의 경우 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919)와 표피 포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis* (KCTC 3958)에 대해 항균효과가 나타났으며, 특히 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes*에 대해서는 금감자, 천야하굴 외에 9개의 감귤 정유 추출물에서 항균활성을 나타냄을 확인하였다(Table 40).

Table 38. Disc diffusion assay of the essential oils of citrus species against *Bacillus subtilis* and *B. cereus*.

감귤명	학명	저지대폭 (mm)	
		<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
온주	<i>C. unshiu</i>	1.0	1.0
진귤	<i>C. sunki</i>	0.5	2.0
감자	<i>C. benikoji</i>	0.0	1.0
지각	<i>C. aurantium</i>	1.0	-
Seminole	<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>	2.0	3.0
금감자	<i>C. obovoidea</i>	2.0	2.0
하귤	<i>C. natsudaidai</i>	1.0	2.5
청견	<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>	2.0	3.0
홍팔삭	<i>C. hassaku</i>	0.0	1.0
천야하귤	<i>C. natsudaidai</i>	1.0	2.5
좌등	<i>C. aurantium</i>	2.0	2.0
병귤	<i>C. platyamma</i>	0.5	1.5
일향하	<i>C. tamurana</i>	2.5	4.0
동정귤	<i>C. erythroa</i>	2.0	1.5
편귤	<i>C. tangerina</i>	2.5	4.0
부지화	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	1.0	3.5
인창귤	-	0.5	2.0
신감하	<i>C. natsudaidai</i>	1.0	1.0
감화귤	<i>C. natsudaidai</i>	2.0	2.5
당유자	<i>C. grandis</i>	1.0	0.5

Table 39. Disc diffusion assays of the essential oils of citrus species against *Propionibacterium acnes*.

감귤명	학명	저지대폭(mm)
온주	<i>C. unshiu</i>	0.0
진귤	<i>C. sunki</i>	0.0
감자	<i>C. benikoji</i>	0.0
지각	<i>C. aurantium</i>	-
Seminole	<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>	0.0
금감자	<i>C. obovoidea</i>	6.0
하귤	<i>C. natsudaidai</i>	4.0
청견	<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>	6.0
홍팔삭	<i>C. hassaku</i>	5.0
천야하귤	<i>C. natsudaidai</i>	6.0
좌등	<i>C. aurantium</i>	4.0
병귤	<i>C. platymamma</i>	2.0
일향하	<i>C. tamurana</i>	7.0
동정귤	<i>C. erythroa</i>	3.5
편귤	<i>C. tangerina</i>	2.0
부지화	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	8.5
인창귤	-	5.0
신감하	<i>C. natsudaidai</i>	6.0
감화귤	<i>C. natsudaidai</i>	4.0
당유자	<i>C. grandis</i>	5.0

Table 40. Minimal inhibitory concentrations of the essential oils of citrus species against *Staphylococcus epidermidis* and *P. acnes*.

감귤명	학명	<i>S. epidermidis</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>P. acnes</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
감자	<i>C. benikoji</i>	> 50	5.0
지각	<i>C. aurantium</i>	> 50	2.5
Seminole	<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>	> 50	10.0
금감자	<i>C. obovoidea</i>	2.5	0.31
하귤	<i>C. natsudaidai</i>	> 50	1.25
청견	<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>	> 50	> 50
사두감	<i>C. pseudogulgul</i>	> 50	> 50
천야하귤	<i>C. natsudaidai</i>	10	0.31
좌등	<i>C. aurantium</i>	> 50	5.0
병귤	<i>C. platymamma</i>	> 50	> 50
일향하	<i>C. tamurana</i>	> 50	2.5
동정귤	<i>C. erythroa</i>	> 50	20.0
편귤	<i>C. tangerina</i>	> 50	> 50
부지화	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	> 50	2.5
감화귤	<i>C. natsudaidai</i>	> 50	> 50
당유자	<i>C. grandis</i>	> 50	5.0
Triclosan		7.8	15.6

3-6. 면역세포에서 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

높은 항균 효과를 나타내었던 금감자와 천야하굴의 정유 추출물에 대해 면역세포에서의 항염증 효과를 확인하기 위해 TNF- α 와 IL-8의 생성에 어느 정도 영향을 주는지 확인하였다. 본 실험에서는 염증 유발인자로서 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919)를 사용하였다. 염증 유발인자인 *P. acnes*와 시료를 면역세포인 THP-1 세포주에 처리하여 유도된 염증을 어느 정도까지 억제하는지를 확인하였다. 그 결과 금감자 정유 추출물의 경우 농도 의존적으로 유도된 TNF- α 를 억제함을 확인하였다. 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 약 45% 정도 억제 효과를 나타내었다. 천야하굴 정유 추출물의 경우는 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 약 24% 정도 TNF- α 를 억제함을 확인하였다. IL-8의 경우 TNF- α 와 마찬가지로 금감자 정유 추출물은 농도 의존적으로 IL-8의 생성을 억제하였다. 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 약 73% 정도의 강력한 염증 억제 효과를 나타내었다. 천야하굴 정유 추출물은 IL-8의 생성 억제 효과가 나타나지 않았다.

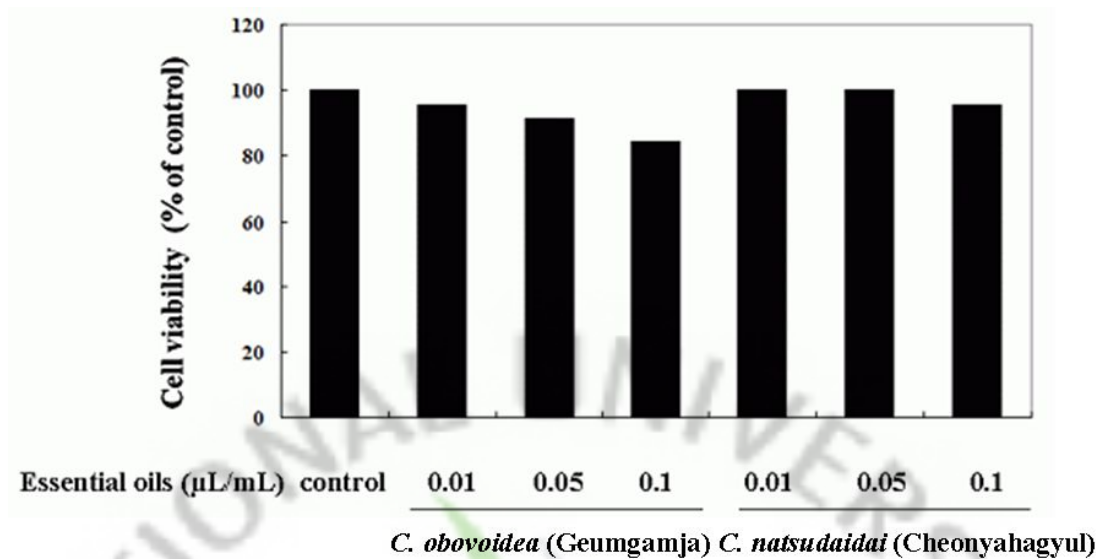


Figure 68. Cell viability of THP-1 cell treated with *C. obovoidea* (Geumgamja) and *C. natsudaidai* (Cheonyahagyul) essential oils. MTT assay was performed after incubation THP-1 cell treated with various concentration of Cheonyahagyul and Geumgamja essential oils for 24h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. MTT (2 mg/mL in phosphate-buffered saline) was added to each well in a 1/10 volume of media. Cells were incubated at 37°C for 4 h, and dimethylsulfoxide (DMSO) was added to dissolve the formazan crystals. The absorbance was then measured at 540 nm using a microplate reader. The entire experiment was performed in triplicate, and results were confirmed by three independent experiments.

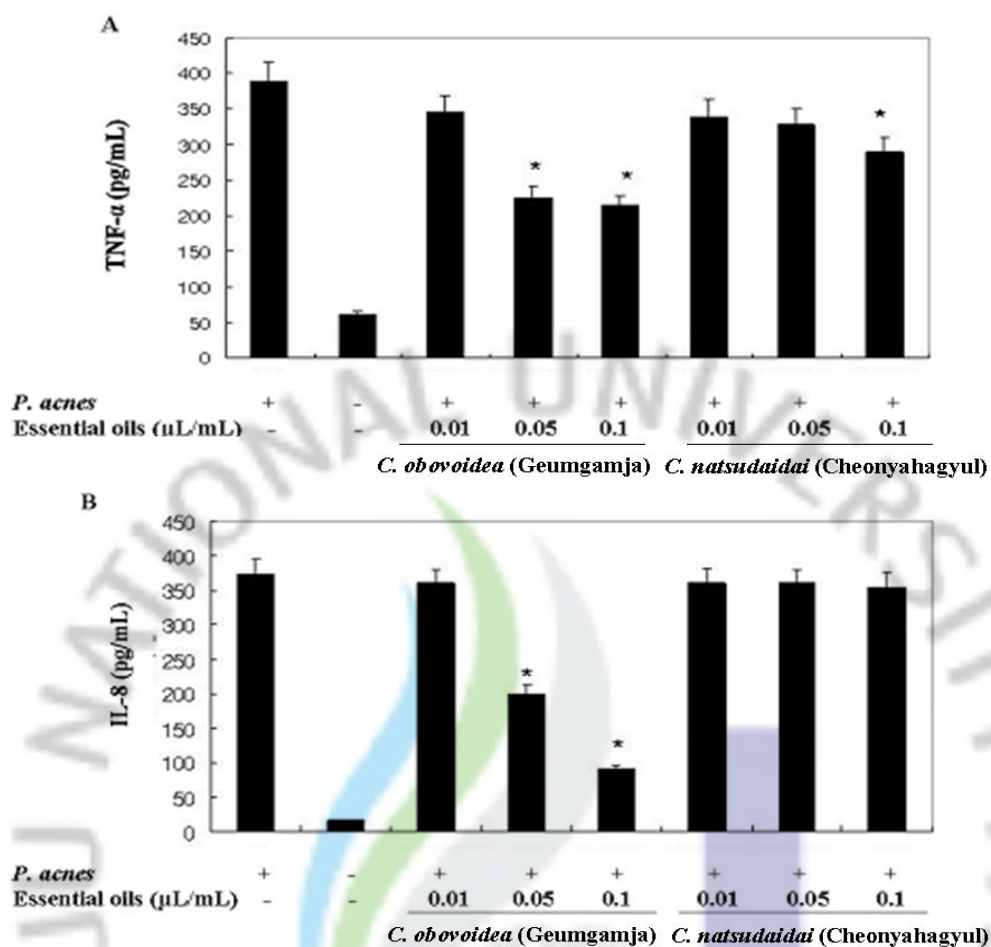


Figure 69. *C. obovoidea* (Geumgamja) and *C. natsudaoidai* (Cheonyahagyul) essential oils inhibit *P. acnes*-induced secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α (A) and IL-8(B). THP-1 cells were stimulated with and without *P. acnes* and the supernatants were harvested after 48hr. Culture supernatants were added to 96-well plates and then diluted biotinylated anti-IL-8 or TNF- α was added to the sample wells. After incubation for 3h at room temperature the sample wells were washed. Streptavidin-HRP was distributed to the sample wells and the plate was then incubated for 30min at room temperature. After incubation, all the wells were washed, and 3,3',5',5'-tetramethylbenzidine (TMBZ) substrate solution was added. After incubation in the dark, absorbance was read at 450 nm for 12-14min. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. *P. acnes* alone.

3-7. NO 생성 억제 효과

최근 체내 염증 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대하여 여드름 균에 대해 높은 항균 효과를 나타내었던 온주(*C. unshiu*) 정유 추출물이 미치는 영향을 조사하였다.

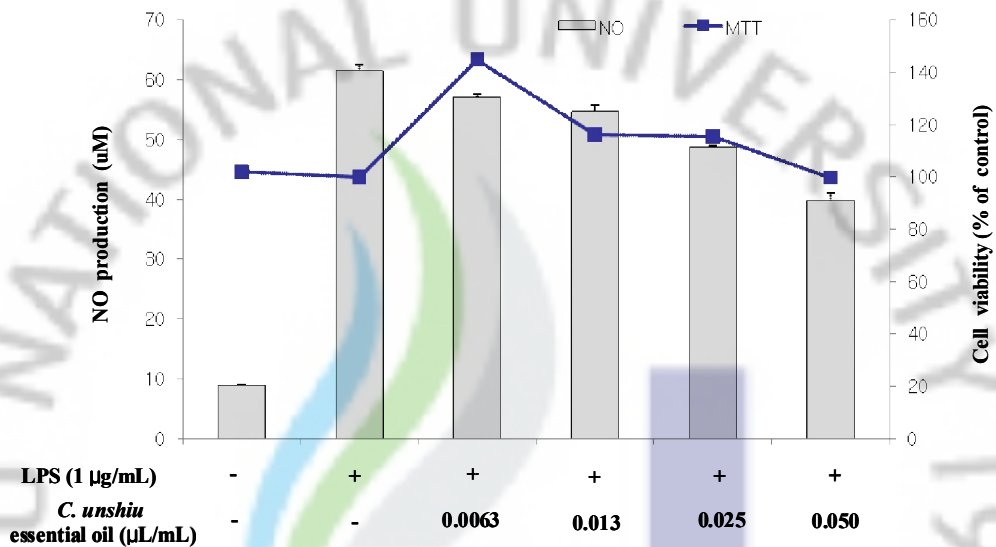


Figure 70. Effect of *C. unshiu* on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or with LPS plus various concentrations of *C. unshiu* essential oil (0.05, 0.025, 0.013, 0.0063%) for 24 hr. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined from the 24-h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of *C. unshiu* essential oil. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LPS alone.

4. 결론

본 연구에서는 제주도내 일원에서 21종의 시료를 수확하여 증류법을 이용, 감귤 에센셜 오일을 얻을 수 있었으며, 이중 진귤, 감자, seminole, 병귤, 일향하 등의 수율이 2%이상을 얻을 수 있었고, 특히 감자 종의 경우 3.5%의 높은 수율을 얻을 수 있었다.

GC/MSD를 이용한 성분 분석 결과 리모넨 성분이 다량 함유 되어 있어, 감정 조절, 항박테리아, 소염진통 등의 효능을 기대할 수 있다.

에센셜 오일들의 항산화 활성에서는 좌등, 동정귤 등이 가장 좋은 활성을 보였고, 그 이후로 부지화와 당유자, 일향하 등이 좋은 활성을 보였다.

*Bacillus subtilis*와 *Bacillus cereus* 균주를 이용한 항균 활성 실험에서는 일향하와 편귤 두 종이 가장 좋은 활성을 나타내었고 그 이후로, 부지화, Seminole, 금감자, 청견, 좌등, 동정귤, 감화귤 등이 활성을 나타내었다. *Propionibacterium acnes* 균주를 이용한 항균 활성 실험에서는 부지화가 가장 좋은 활성을 보이며, 이후로, 일향하, 금감자, 청견, 천야하귤, 신감하 등이 좋은 활성을 보였다. 표피 포도상구균인 *Staphylococcus epidermidis*에 대해서는 단지 천야하귤과 금감자만이 생육저해환을 만들어 내었다.

MTT assay에서는 seminole, 청견, 동정귤, 편귤, 당유자 등이 높은 생존률을 나타내었다. 이상과 같은 결과를 바탕으로 했을 때 감귤 에센셜 오일이 향장품의 소재로서의 사용 가능성을 확인 하였다.

V. 과제 3: 당유자 유래 네오헤스피리딘을 포함하는 플라보노이드 분획물의 분리 및 생리활성

1. 재료

당유자 미숙과는 6월 중순 경 및 10월 중순 경 농가로부터 직접 구입하여 건조하지 않고 신선품 그대로 이용하였다. 장시간 보존이 필요한 경우는 -75°C 의 냉동고 안에 보관하였다. 가정용 녹즙기 또는 제주대학교의 TIC설비인 습식 분쇄기를 이용 분쇄하여 이용하였다.



Figure 71. Immature *Citrus grandis* Osbeck

2. 실험방법

2-1. Flavonid 분획의 제조

추출은 80% (v/v) 메탄올 수용액을 시료 무게의 1.5배를 가하고, 중탕 가운데 1 시간 동안 끓게 하고 상온으로 식힌 후 착즙하여 고형분을 제거한 후 필터하는 것을 2회 반복하였다.

감압 농축 과정 도중 용액이 시럽상이 되면 약간의 메탄올을 첨가하여 펙틴으로 추정되는 노란색의 고체를 원심분리(9,000 rpm supra 22k)하는 방법으로 제거하였다. 시제품의 생산에 있어서는 제주대 TIC내의 장비인 습식 분쇄기와 추출기, 농축기와 탈수기 및 고속 원심분리기를 이용하였다.

Calvarano 등이 Bergamot peels의 산업적 이용을 위하여 naringin을 추출하는 방법을 보고하였는데, hot water로 추출 후 ultrafiltration 하고, macroporous cross-linked polystyrene인 Amberlite XAD-16 resin에 흡착시켜서 얻는 방법이 있다.⁶⁶ 이에 XAD-16에 의한 flavonoid의 흡착 및 분리를 시도하였다.

원심분리한 시료는 메탄올을 제거하기 위하여 완전히 농축 시키고 동결건조를 거친 다음 다시 무게의 25배량에 해당하는 증류수에 녹였다. 다시 증류수에 녹은 시료는 Adventec No 2. 필터로 ultrafiltration에 알맞도록 여과하였다. Ultrafiltration Kit (Cut Off 10K와 3K)은 Millipore의 Prep/ Scale TFF 2.5ft² Cartridge 와 1ft² Cartridge, Wilo 사의 화학용 펌프 PM-015NM을 사용하였고, 순환되는 용액의 양을 측정한 결과 사용 권장 범위 내인 3~4 L/min의 용액이 순환되었으며, 여과액은 약 1 L/hour 정도의 속도로 용출되었다.

여과되지 않고 순환되는 용액은 여과된 용액만큼을 보충하여 농도가 점점 열어짐에도 불구하고 필터를 통과하여 빠져나가는 용액의 양이 많아지면 많아질수록 고형분이 생겨나므로 수시로 용액을 다시 필터하여 주었다.

분자량에 따른 여과물이 계속해서 나오는지 확인해 보기 위해서 Yamazen의 MPLC system에 연결하여 UV 흡광도를 관찰하였다. 이렇게 얻어진 여과액은 XAD-16 resin column에 농축 없이 바로 통과시켰다.

Ultrafiltration 후의 용액에서 flavonoid 분획을 획득하기 위하여 nonionic polymeric absorbent인 Amberlite XAD-16을 이용하였다.

600 g의 XAD-16 resin을 판매시에 충전되어 있는 이온성 물질을 24 시간 동안 충분히 물로 씻어준 후 앞에서 얻어진 여과액 4 L를 흘리며 column은 감압하거나, MPLC에 장착하는 방식으로 가압하여 속도를 높였다. 일단 흡착된 물질

중에서 당류 등 극성 물질을 제거하기 위해 4 L의 증류수를 다시 통과 시켰으며, 그 이후 60% ethanol 용액 2 L를 통과시켜 flavonoid 분획을 얻고 나서, methanol 2 L를 통과시켜 흡착된 다른 비극성 물질들을 회수한 다음 원래의 부피만큼으로 수축할 때까지 물을 흘려 알코올을 제거하여 다시 반복 사용하였다.

Ultrafiltration과정이 있는 경우, 역산하여 볼때 약 100~120g의 시료가 600 g의 resin에 대해 통과 될 수 있고, 흡착되어 나오는 flavonoid 분획은 25~30 g/1회 정도였다. Ultrafiltration을 적용하지 않은 경우와 비교하여, 추출물 용액을 바로 XAD-16 resin 컬럼을 시도하는 경우 600 g에 대해서 10 g 내외만 통과 시켜도 압력이 생겨 전개용액의 흐름이 차단되며, 2~3 회 사용후 컬럼을 세척해야 할 정도로 오염이 심하였다.

2-2. Neohesperidin의 정제

알칼리용액 추출법⁶⁷을 응용하여 당유자 과피의 4배량의 0.1N NaOH (pH 11~12) 용액에 약 1 시간 교반 침적 시킨 후 원심분리(12,000 rpm supra 22k, 한일) 하여 추출액을 분리하였다. 이 추출액을 HCl로 pH 6.5까지 중화시킨 후 약 1/3 량이 될 때까지 감압 농축시켰다. 이 농축액의 pH를 4.5로 조정하고 냉장고 0°C에서 10일 정도 방치하였다.

문헌대로라면 10일 정도 지나서 naringin hydrate의 석출이 생기고 잔액을 ethyl acetate로 추출하여 감압농축하여 chloroform을 첨가한 다음, 냉장고에서 10~20일간 더 방치하면서 회백색의 neohesperidin의 석출되어야 하지만, 냉장고 안에서 3개월째까지 아무런 변화가 없어 적용하지 못하였다.

용매 추출법⁶⁸은 정상적으로 추출한 시료의 시럽상 농축액을 chloroform을 첨가하여 냉장고에 역시 3개월까지 방치하였으나 역시 예상되는 결정을 얻을 수 없었다.

일반적인 고정상인 순상 실리카겔로 분리하였다는 문헌들은 있었으나, HPLC 분석결과 효과적인 분리는 이루어지지 않았고, 역상 실리카겔, Sephadex LH-20 등으로 column chromatography를 실시하여 보았으나, 역시 산업화에 적합하다 할 만큼 효과적이지 못하였다.

대다수의 문헌들의 neohesperidin의 분리 혹은 정량을 HPLC로 보고 하고 있고, 본 연구에서도 HPLC를 통해 분석 또는 정량은 가능하나, 산업화에 적용하기에는 유지비용이 너무 많은 단점이 있다.

이에 본 연구에서는 일반 용매를 사용할 수 있는 중압크로마토그래피(MPLC)를 이용하고자 하였다. MPLC를 이용한 컬럼에서도 대다수의 2용매계에서는 효과적인 분리가 이루어지지 않았으며 최종적으로 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 26 : 14 : 3$ 이라는 용매 조성으로 효과적인 분리를 이룰 수 있었다.

2-3. 생리활성 검색

2-3-1. 항산화 효능 평가

당유자에서 정제한 플라보노이드 분획의 항산화 활성을 측정하고자 DPPH free radical scavenging assay와 superoxide anion scavenging assay, xanthine oxidase inhibition/superoxide radical scavenging assay, NO radical scavenging assay를 실시하였다.

1) DPPH radical scavenging assay

DPPH free radical scavenging assay는 에탄올에 녹인 각각의 농도의 시료를 96 well plate에 분주하고 0.1 mM DPPH를 처리한 후 실온에서 10 분 반응 시킨 후 흡광도는 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(SC_{50})로 표시하였다.

2) Superoxide anion scavenging assay

Superoxide anion 소거활성은 PMS/NADH system을 이용하여 생성된 superoxide anion의 양을 NBT환원법으로 517 nm에서 측정하였다. 반응액은 각 시료에 125 μM NADH와 63 μM 의 NBT를 넣고, 8 μM 의 PAS를 첨가하여

superoxide의 생성을 유도하였다.

3) Xanthine oxidase inhibition and superoxidase scavenging assay

Xanthine을 기질로 하여 xanthine oxidase에 의해 생성된 uric acid의 양을 290 nm에서 흡광도를 측정하여 검색하였고, superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원법으로 517 nm에서 측정하였다. 반응액은 100 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 1mM xanthine, 0.5mM EDTA, 59 µg/mL BSA 여러농도의 시료에 첨가하여 25°C에서 10 분간 정치한 후 0.5 U/mL xanthine oxidase를 첨가한 후 25°C에서 10 분간 다시 반응 시켜 uric acid의 생성을 유도하였고, superoxide 소거 활성은 1mM NBT 를 첨가한 후 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀ 및 SC₅₀)로 표시하였다.

4) NO radical scavenging assay

10mM SNP (sodium nitroprusside)용액 100 µL에 시료를 농도별로 첨가한 후 25°C에서 2-3 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess 시약(2.5% (v/v) phosphoric acid, 1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphyethylenediamine) 을 첨가하여 25°C에서 10 분간 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide 소거활성은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(SC₅₀)로 표시하였다.

2-3-2. Cell culture

Murine macrophage cell line (마우스 대식세포)인 RAW 264.7와 mouse melanoma cell line인 B16/F10 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온 조건하에서 배양하였으며,

계대 배양은 3일에 한번씩 시행하였다.

2-3-3. MTT assay for cell viability

RAW 264.7 세포를 18 시간 배양한 후 농도별 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동시에 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액(2 mg/mL in PBS)을 첨가하여 4 시간 동안 반응시켰다. 상층액을 완전히 제거하고 DMSO를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 독성 정도를 평가하였다.

2-3-4. NO assay

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 농도별 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24 시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 nitrite (NO_2^-)의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess 시약 [1% (W/V) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μL 를 혼합하여 96 well plate에서 10 분동안 반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 NaNO_2 (sodium nitrite)를 standard로 비교하였다.

2-3-5. Cell tyrosinase activity assay in B16/F10 cell

Mouse melanoma cell line인 B16/F10 세포를 6well plate에 5×10^4 cell/mL이 되게 준비한 후, 24 시간동안 37°C CO₂ 향온기에서 배양하고, 멜라닌 생합성 유도물질인 $\alpha\text{-MSH}$ 50nM을 처리하고 동시에 시료분획(EtOH:PBS=1:1)을 농도별

로 처리하였다. 72 시간 동안 37°C 항온기에서 배양하였으며 36 시간이 지난 후, 배지교체와 동시에 시료를 다시 처리하였다. 세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 수확하고, 이렇게 수확된 cell에 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 1% Triton X-100을 함유한 67mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 500 μ L 처리하여 sonication 하였으며, 이 상태로 1 시간동안 얼음에서 보관하였다. 1 시간 후 4°C 원심분리기에서 15,000 rpm으로 15 분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 tyrosinase 활성분석에 사용하였다. 세포내 tyrosinase 활성분석은 세포내의 존재하는 tyrosinase의 작용결과 생성되는 DOPA chrome을 미색법에 의해 측정했다. 120 μ L의 67mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 기질로서 5 μ L의 1.5mM L-tyrosine과 40 μ L의 25mM L-DOPA를 혼합한 후 위에서 얻은 상층액 100 μ L를 처리하여 37°C 항온기에서 2 시간 반응시켰다.

반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하여 mushroom tyrosinase의 활성을 기준으로 하여 단백질 1 μ g당 unit으로 효소 활성을 나타내었다.

3. 결과

3-1. 플라보노이드 분획의 제조

과실에서 flavonoid류를 대량 분획하기 위해 자주 사용되는 XAD-16 흡착법을 이용하였으며, naringin과 neohesperidin이 주성분인 flavonoid 분획을 분취하였다.

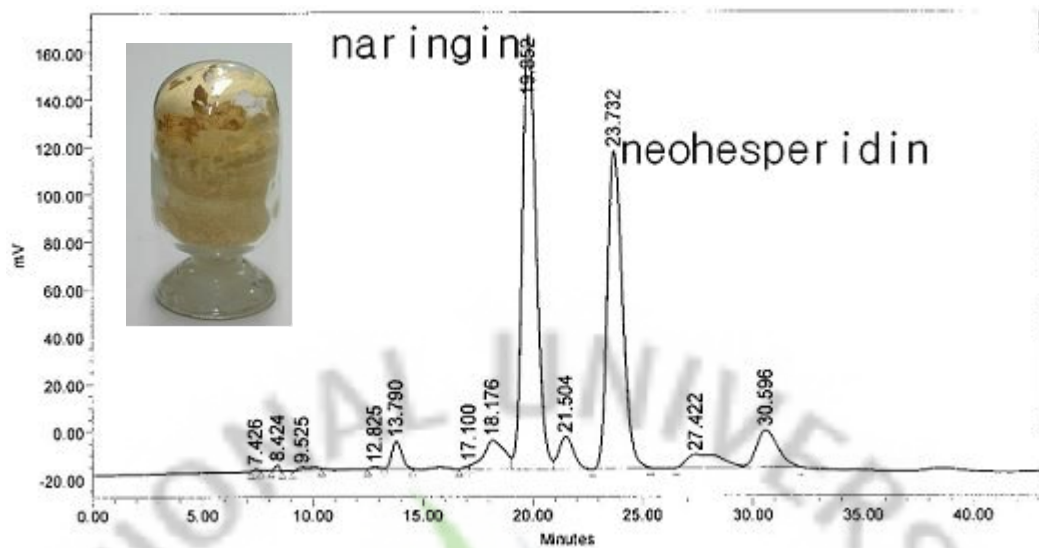


Figure 72. HPLC chromatogram of purified flavonoid fraction.

3-2. Neohesperidin의 정제

시료로 사용한 당유자 미숙과피에는 naringin과 neohesperidin이 같이 존재하여, 당유자 알칼리 추출액의 산성화 과정에서의 naringin hydrate 석출에 의한 neohesperidin과의 분리를 시도하였으나, 3개월 이상 지난 시점까지도 결정이 생기지 않았다.

野村男次의 80% 메탄올 추출법에 따라 neohesperidin의 석출을 시도하였으나, 역시 3개월 이상 방치해도 결정은 생기지 않았다. 다만 chloroform과 물의 액면에 회백색의 고체를 수차례 관찰하였으나 이를 얻기 위한 조작에서 위의 물층과 닿으면 바로 녹아들어가므로 인해 얻어내기가 불가능하였다.

이 분획의 성분 분석을 TLC로 시도하였으나, 여러 문헌을 참고하여 여러 용매 조성을 적용하더라도 쉽게 R_f 값이 차이나지 않았으며, 두 성분이 공존하더라도 한개의 spot으로 나타나는 현상이 잦아 TLC 또는 일반적인 순상 컬럼으로는 분리 여부가 거의 확인할 수가 없었다.

이러한 현상으로 인하여 XAD-16 column 통과 시 60% ethanol 용액의 앞 분획은 naringin과 뒷 분획은 neohesperidin과 TLC R_f 값이 일치하는 경향을 보이 나, HPLC로 분석해 보면(mobile phase : Water : MeOH : acetic acid = 57 : 43

: 0.5, Flow rate:1 mL/min) 두 분획의 비율만 다를 뿐 서로 상당량 섞여 있음을 확인할 수 있었다. 일반적인 flash column chromatography로는 효과적인 분리를 이룰 수 없었고, HPLC의 방법으로는 경제성을 얻을 수 없다고 판단한 결과, MPLC를 이용하여 효율적인 분리를 이룰 수 있었으며, 사용한 용매는 CHCl_3 : MeOH : H_2O = 26 : 14 : 3 있었다. 26 mm×300 mm 컬럼에 20 mL/min의 유속으로 용매를 흘렸으며, injection 양은 앞서 기술한 전개용매에 0.2 g/mL의 농도로 녹인 플라보노이드 분획을 4 mL씩 주입하였다. Neohesperidin과 naringin 사이는 약 4 분이며 각 injection간의 간격은 약 16 분 내외이다(Figure 73).

1회 총 0.8 g의 플라보노이드 분획을 주입하여, detect range 2.56에서 30%를 상회할 때 수집하도록 프로그램 하였다. 이러한 프로그램에 의하여 수집된 neohesperidin 분획은 소량의 물에 부유 시킨 후 클로로포름을 가한 후 약 12 시간 냉장고에 방치한다. 클로로포름 층에 있는 네오헤스페리딘 침전물을 glass filter를 이용하여 filtration하고 소량의 메탄올로 세척 후 회수하였다.

이 과정에서 얻어지는 neohesperidin은 평균 214 mg/g 플라보노이드 분획 이었다. Neohesperidin의 구조 확인을 위한 NMR 스펙트럼은 Figure 74 및 Figure 75에 나타나 있다. 순도는 HPLC를 이용하여 정량하였으며, 98%로 제시된 Sigma 사의 제품과 비교 95%로 정량되었다(Figure 76, 77).

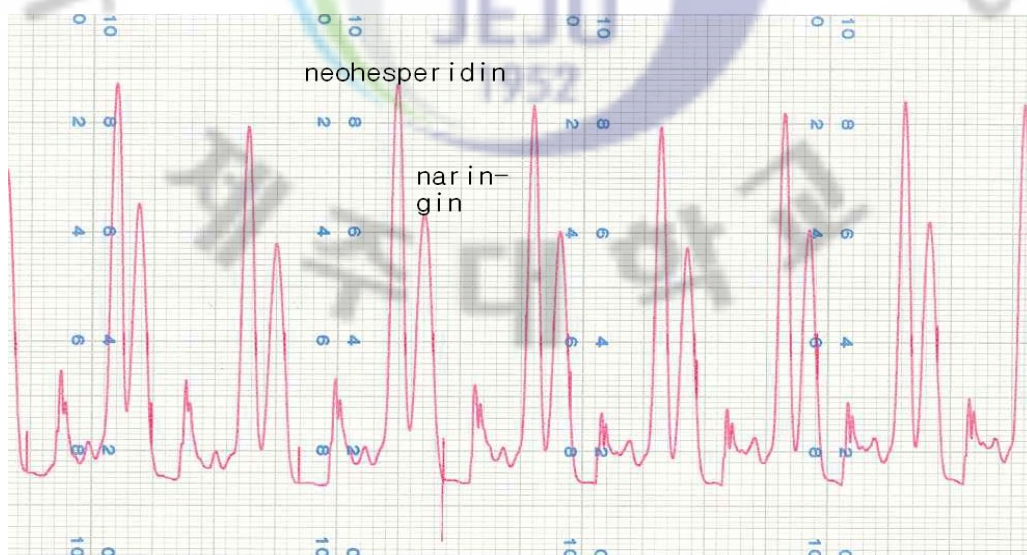


Figure 73. MPLC chromatogram of neohesperidin.

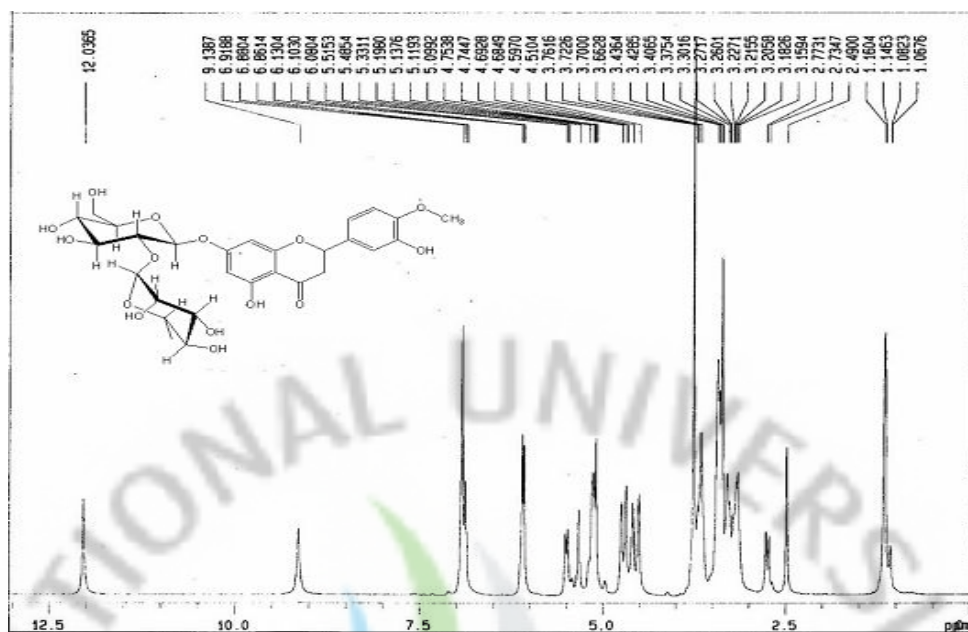


Figure 74. ^1H NMR spectrum of neohesperidin (400MHz in $\text{DMSO}-d_6$).

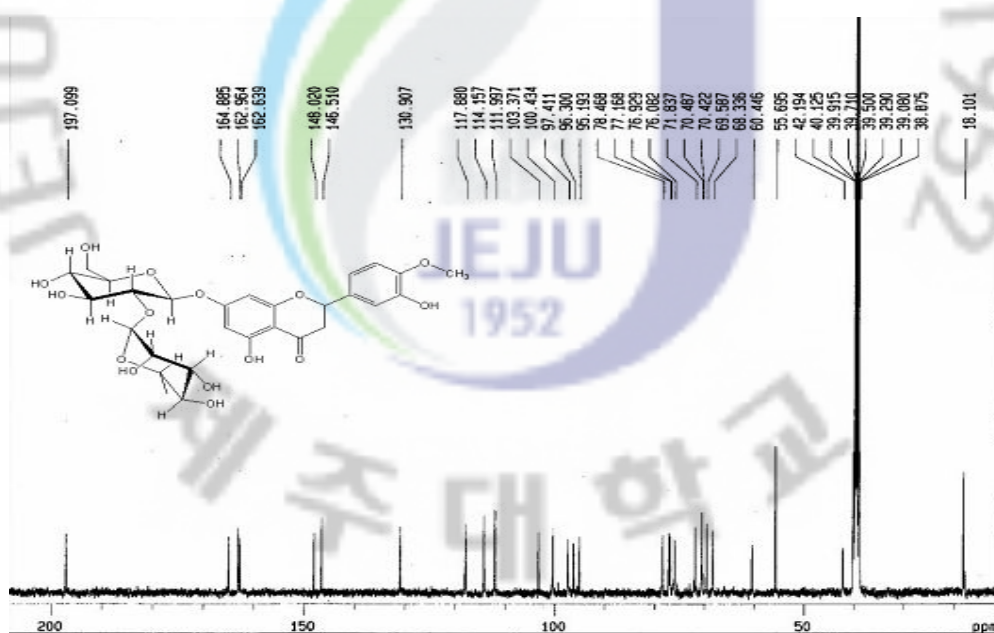


Figure 75. ^{13}C NMR spectrum of neohesperidin (100MHz in $\text{DMSO}-d_6$).

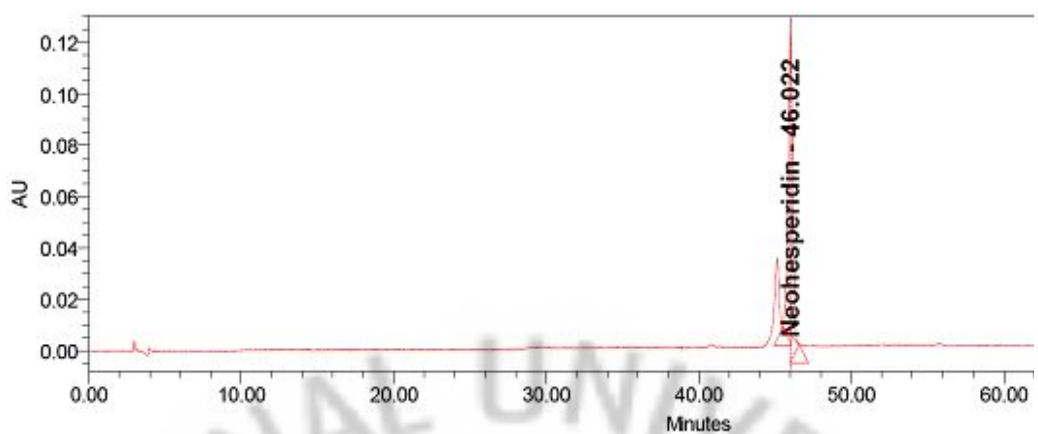


Figure 76. HPLC chromatogram of authentic neohesperidin (1 mg/mL).

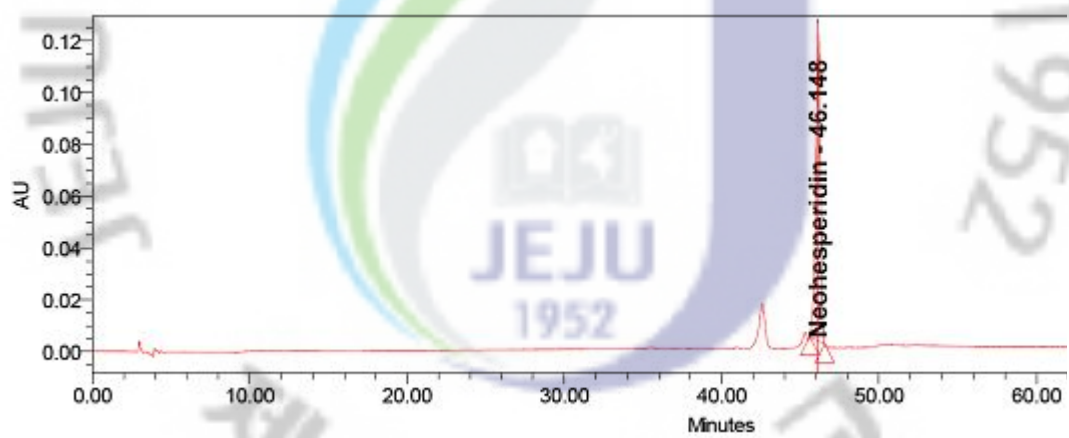


Figure 77. HPLC chromatogram of separated neohesperidin (1 mg/mL)

3-3. 항산화 활성 결과

1) DPPH radical scavenge assay

당유자 미숙과 과실에서 정제한 플라보노이드 분획의 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인한 결과 SC₅₀ 값은 492.2 µg/mL 이었으며 이는 양성대조군으로 사용한 시료들보다는 낮은 활성이지만 제주대학교 TIC가 보유하고 있는 30% 플라보노이드를 함유한 감귤과피 분획물 TIC B (SC₅₀=591.4 µg/mL)보다 좋은 활성이었다(Table 41).

2) Superoxide anion scavenging assay

PMS/NADH로 유발된 superoxide radical에 의해 NBT는 자주색의 formazan으로 환원된다. 시료내 superoxide radical 소거활성이 존재하는 경우, 시료 첨가에 의해 formazan의 생성이 억제되며 흡광도가 감소하게 된다. 실험의 정확도는 superoxide dismutase (SOD)를 가지고 확인하였다.

플라보노이드 정제 분획의 superoxide 자유기 소거활성에 대한 SC₅₀ 값은 140.6 µg/mL이었다. 이는 양성대조군으로 사용한 trolox보다 약간 낮은 활성이었으나 제주대학교 TIC에서 보유한 감귤과피 에탄올 추출물인 TIC A (SC₅₀=329.0 µg/mL) 및 30% 플라보노이드를 함유한 분획 TIC B (SC₅₀ > 1000 µg/mL)보다 좋은 활성이었다(Table 41).

3) Xanthine oxidase inhibition and superoxidase scavenging assay

Xanthine oxidase는 생체내의 purine 대사에 관여하는 효소로 xanthine 또는 hypoxanthine을 산화시켜 urea를 형성하게 한다. xanthine oxidase는 분자성의 산소를 수소 수용체로 이용하여 xanthine을 요산형으로 산화하는 반응을 촉매한다. 따라서 xanthine oxidase의 저해 효과는 free radical의 생성을 억제하므로 항산화, 노화 및 항암등과 연관되어 생물학적으로 중요한 의의를 가진다.

superoxide 소거 활성 방법은 xanthine/xanthine oxidase system에 의해 발생되는 superoxide anion radical를 항산화제가 제거시키는 정도를 확인하는 실험으로 nitroblue tetrazolium (NBT)의 감소 정도를 통하여 항산화능을 측정한다. 실험의 정확도는 xanthine oxidase 억제제인 allopurinol을 가지고 확인하였다. 플라보노이드 정제 분획은 xanthine oxidase 억제 활성을 보였으며 IC₅₀ 값은 132.7 μ g/mL으로 TIC A 및 TIC B보다 높은 활성이었다. 또한 xanthine oxidase 억제 활성과 더불어 superoxide 생성억제 활성을 보여주었으며 이는 PMS/NADH법에 의한 superoxide 소거 활성과 일치하는 결과이다(Table 41).

4) NO assay

생리적 조건에서 자연적으로 NO를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 검색하였다.

플라보노이드 정제 분획의 nitric oxide 라디칼 소거활성은 500 μ g/mL 농도에서 30.8%로 나타났으며 제주대학교 TIC에서 추출한 감귤과피 에탄올 추출물인 TIC A와 비슷한 활성을 나타내었다(Table 41).

Table 41. Antioxidative activities for purified flavonoid fraction.

Sample	SC ₅₀ and IC ₅₀ (μg/mL)				
	DPPH radical scavenging assay	Superoxide anion scavenging assay	Superoxide scavenging assay	Xanthine oxidase inhibitory activity	NO radical scavenging activity
플라보노이드 정제 분획	492.2 ±14.8	140.6 ±5.4	41.9±0.07	132.7±15.4	*
TIC A	NT	329.0±4.3	*	*	*
TIC B	591.4±11.0	>1000	39.3±3.3	*	367.7±29.7
BHA	11.1±0.9	NT	NT	NT	NT
Trolox	11.4±0.1	101.8±6.2	NT	NT	*
L-Ascorbic acid	12.2±0.1	12.2±0.1	NT	NT	NT
Queretin	6.1±0.03	NT	5.6±0.4	*	*
Curcumin	NT	NT	87.7±0.4	*	121.1±8.4
Allopurinol	NT	NT	2.9±0.1	1.5±0.1	NT
SOD	NT	6.1±0.03 (U/mL)	0.55±0.003 (U/mL)	NT	NT

• * Can't calculate the value of SC₅₀ and IC₅₀

• NT : Not test

3-4. NO 생성 저해 활성 : *in vitro* 항염활성 검색

RAW 264.7 세포에 LPS (1 μg/mL)와 여러 가지 농도의 시료를 동시에 첨가한 후 24 시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 nitrite의 형태로 측정하였다. 당유자 플라보노이드 정제 분획은 125, 250, 500 μg/mL 에서 농도부터 농도 의존적으로 NO 생성량을 억

제함을 확인하였다(Figure 78). 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서는 cell viability의 감소에 의한 NO 감소로 추정할 수 있다.

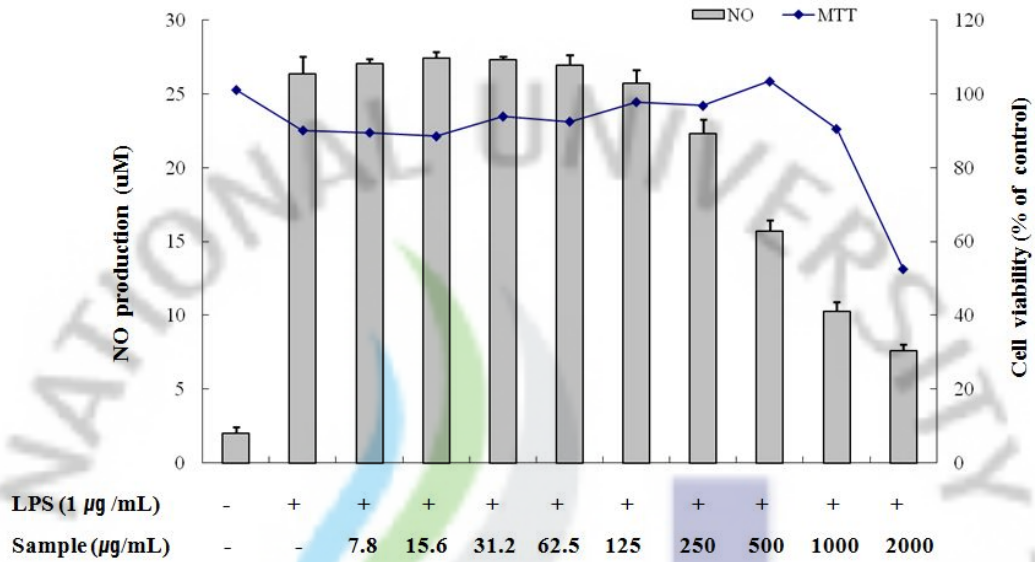


Figure 78. Effect of purified flavonoid fraction on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS only or with LPS plus various concentrations of purified flavonoid fraction for 24 hr. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined from the 24-h culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of Citrus unshiu essential oil. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus LPS alone.

3-5. 세포내 타이로시나제 활성분석

양성 대조군으로 사용한 arbutin의 저해활성이 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 50% 정도 나오는 조건에서 실험하였다. 이 조건에서 플라보노이드 정제 분획은 농도 의존적으로 melanogenesis를 유도하고 있었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에서는 두드러진 활성을 나타내지 않았다.

플라보노이드 정제 분획 병행투여군의 melanogenesis 유도활성은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 α -MSH만 처리된 대조군보다 6배정도 높게 나타나고 있음을 알 수 있다. 따라서 플라보노이드 정제 분획은 α -MSH 병행 투여조건에서 melanogenesis를 유도하고 있음을 확인하였다(Figure 79).

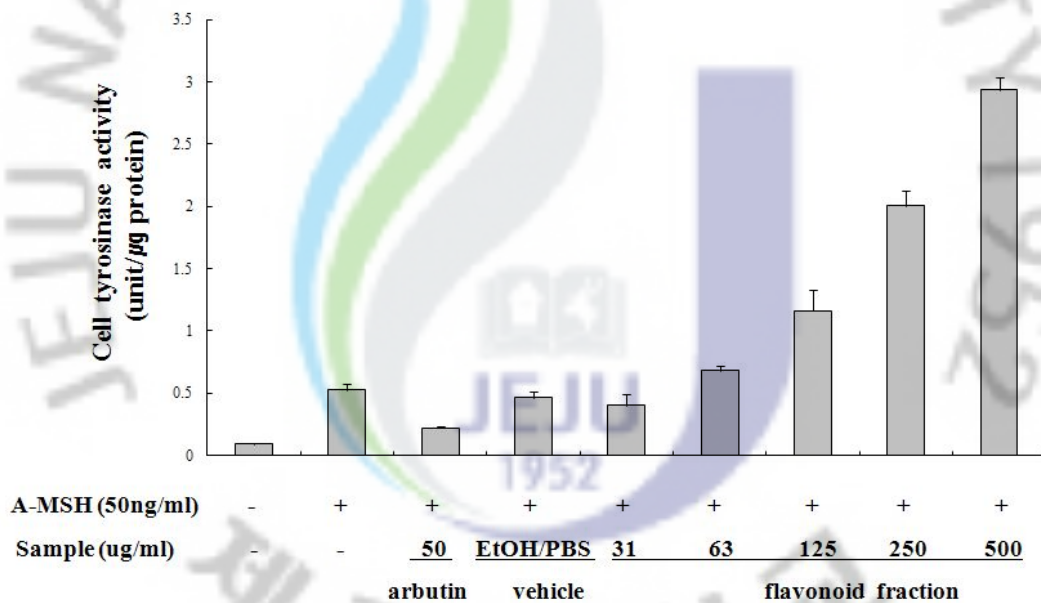


Figure 79. Effect of purified flavonoid fraction on tyrosinase activity mouse B16/F10 melanoma cells.

4. 결론

본 연구에서는 국내에서 생산된 당유자의 미숙과를 이용하여 neohesperidine의 함량이 많은 flavonoid 분획을 얻고자 하였다.

당유자 미숙과를 6월 21일경 및 10월 중순 수확하여 신선품 그대로를 2회 80% 메탄올로 추출하여 ultrafiltration, XAD-16 레진을 사용한 MPLC 등 일련의 정제 과정을 거쳐 flavonoid 분획을 획득하였으며 이 과정의 수율은 신선품 기준 9.2%, 건조중량 기준으로 15.3%였다. 이 분획의 성분은 neohesperidin이 약 64%, naringin이 약 29%를 차지하였다.

이 분획은 높은 DPPH 및 NO, superoxide 소거활성과 xanthine oxidase 억제활성을 가지고 있으며, 또한 우수한 *in vitro* 항염 활성을 보여주었다. 이 분획은 항산화 및 항염 활성이 우수한 성분이 함유되어 있는 것으로 생각되며, 이들의 자유기 소거활성과 *in vitro* 항염활성은 두 활성의 시너지 효과로 인해 다양하고 유익한 생리활성을 보여줄 것으로 기대된다.

위의 플라보노이드 분획으로부터 고순도(95%이상)의 neohesperidin을 얻었으며, 이 과정의 수율은 플라보노이드 분획에 대하여 21.4%였다.

참고로 본 연구에서 얻어지는 고순도 neohesperidin인 경우, 매우 고가로 판매되고 있다. 또한, 본 기술은 다른 소재 분야에도, 예를 들면 녹차, 해조류 등, 파급 효과가 기대된다. 본 연구 결과를 토대로 산업경제적 측면에서는, 우선, 제품개발 및 산업화에 따른 부가가치 창출 효과가 기대되고 있다. 또한, 현재 감귤열매숙기에 따르는 미숙과는 버려지고 있기 때문에, 미이용 감귤자원이 활용된다면, 이의 수매 및 활용에 따른 감귤농가에 대한 경제적 효과가 기대된다.

VI. 참고문헌

1. 한국과학기술정보연구원. 화장품 기능성 원료 개발동향. *과학기술부*, 2006.
2. 한국보건산업진흥원. 2009년 화장품산업 분석 보고서. 2009.
3. 도연경. 천연추출물의 생리활성 증대 및 고순도화 공정 연구. *경희대학교 대학원 석사학위논문*. 2008.
4. Klaus, B. Interleukin 1, Interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunology Letters*. 1988, 19, 183~192.
5. Willoughby, D. A. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.*, 1975. 34(6), 471~478.
6. S. J. An; H. O. Pae; G. S. Oh; B. M. Choi; S. Jeong; S. I. Jang; H. Oh; T. O. Kwon; C, E, Song and H. T. Chung. Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophage by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *International Immunopharmacology*. 2002, 2, 1173~1181.
7. Funk, C. D.; Funk, L. B.; Kennedy, M. E.; Pong, A. S. Fitzgerald G. A.. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J*. 1991, 5, 2304~2312.
8. Masferrer J. L.; Zweifel B. S.; Manning P. T.; Hauser S. D.; Leahy K. M.;

- Smith W. G.; Isakson P. C.; Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcer-ogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1994**, *91(25)*, 3228~3232.
9. Seibert K.; Zhang Y.; Leahy K.; Hauser S.; Masferrer J.; Perkins W., Lee L.; Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1994**, *91(25)*, 12013~12017.
10. Gaby, W.; Josef, P. and Dieter, K. Mechanism of Suppression of Inducible Nitric-Oxide Synthase(iNOS) Expression in Interferon (INF)- γ -stimulated RAW 264.7 cells by Dexamethasone. *J. Biological Chemistry*. **1997**, *272(26)*, 11679~11687.
11. Hartmut K.; Christuan E.; Irmgard I. B. and Ulrich F. In Murine 3T3 Fibroblasts, Different Second Messenger Pathways Resulting in the Induction of NO Synthase II (iNOS) Converge in the Activation of Transcription Factor NF- κ B. *J. Biological Chemistry* **1996**, *271(11)*, 6039~6044.
12. 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. *Biochem J*. **1996**, *316*, 209~215.
13. Mu M. M.; Chakravortty D.; Sugiyama T.; Koide N.; Takahashi K.; Mori I.; Yoshida T.; Yokochi T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res*. **2001**, *7*, 431~438.

14. Kiemer A. K.; Hartung T.; Huber C.; Vollmar A. M. Phyllanthus amarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. *J. Hepatol.* **2003**, *38(3)*, 289~97.
15. Rossi A.; Kapahi P.; Natoli G.; Takahashi T.; Chen Y.; Karin M.; Santoro M. G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **2000**, *403(6765)*, 103-108.
16. Nomura Y. NF-kappaB activation and IkappaB alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci.* **2001**, *68(15)*, 1695~1701.
17. Kimura A.; Ohmichi M.; Kurachi H.; Ikegami H.; Hayakawa J.; Tasaka K.; Kanda Y.; Nishio Y.; Jikihara H.; Matsuura N.; Murata Y. Role of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res.* **1999**, *59(20)*, 5133~5142.
18. Kim J. H.; Kim D. H.; Baek S. H.; Lee H. J.; Kim M. R.; Kwon H. J.; Lee C. H. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF-kappaB and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, *Biochem Pharmacol.* **2006**, *71(8)*, 1198~1205.
19. Groves, R. W.; Allen, M. H.; Ross, E. L. and Baker, J. N. W. N. Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br. J. Dermatol.* **1994**, *32*, 345~352.

20. Wakefield, P. E.; James, W. D.; Samlaska, C. P.; Meltzer, M. S.; Tumor necrosis factor. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1991**, *24*, 675~685.
21. Jung, J. H. et al., The Inhibitory Effect of CW-501027 and CW-501029 on the Anti-inflammatory Action in Rats. *Yakhak Hoeji.* **2004**, *48(6)*, 317~324.
22. 이귀희. 아로마 오일이 DNCB로 아토피 피부염이 유발된 동물모델의 항염증 및 면역에 미치는 영향. *대전대학교 석사학위논문* **2010**.
23. 강태진; 이상로. 아토피 피부염이 원인파 치료. *BioWave* **2010**, *12(3)*, 1~25.
24. Soonja Oh; Jin-ho Lee; Kwang-Sup Ko; Dong-Bum Shin; and Seok Chan Koh. Antioxidative activity, including Inhibitory activities of ACE, APN and α -amylase, in Theaceae Plants Native to Jeju Island. *Korean J. Plant Res.* **2010**, *23(5)*, 406~414.
25. Lee, S. Y.; E. J. Hwang; G. H. Kim; Y. B. Choi; C. Y. Lim and S. M. Kim. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L.. *Korean J. Med. Crop Sci.* **2005**, *13(3)*, 93~100.
26. You, H. S. Phytochemical constituents and biological activity of *Eurya emarginata* (Thunb.) Makino. *Ph. D. thesis, Sungkyunkwan University* **2008**.
27. Shin, M. H. Antioxidative constituents from the fruits of *Ternstroemia japonica* Thunberg. *Ph. D. Thesis, Pusan National University* **2001**.

28. 문성기; 성정숙. *Eurya* 속의 종분포에 관하여. *경성대학교 논문집(자연·예술 편)* 1997, 제18집 2권, 47~54.
29. 오구균. 생태수목도감. *광일문화사* 2005.
30. 이영노; 이경서; 신용만. 제주자생식물도감. *여미지* 2001.
31. Morita, N.; Shimizu, M.; Kasli, M.; Kubo, Y. Studies on Medical resources. XXXIV. The constituents of Genus *Eurya*.(1). *E. japonica* THUNB. and *E. emarginata*, MAKINO. *Yakugaku Zasshi* 1974, 94, 872~874.
32. 양홍철; 박수영; 강희경; 이남호. 우묵사스레피의 플라보노이드 화합물의 분리 및 동정. *Cheju Journal of Life Science* 2001, 4, 103~110
33. 문지영. 우묵사스레피를 이용한 활성성분 eutigoside의 분리. *제주대학교 대학원 석사학위 논문* 2003.
34. Park Soo-Yeong; Lee Hye-Ja; Yoon Weon-Jong; Kang Gyoung-Jin; Moon Ji-Young; Lee Nam-Ho; Kim Se-Jae; Kang Hee-Kyoung; Yoo Eun-Sook. Inhibition effect of eutigosides isolated from *Eurya emarginata* on the inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacol Research* 2005, 28(11), 1244~1250.
35. (주)인포베이스 감귤류 특허기술 동향 조사 보고서. (재)제주하이테크산업진흥원 제주전략산업기획단 2005.
36. Ranganna S.; Govindarajan V. S.; Ramana K. V. Citrus fruits – varieties,

- chemistry, technology, and quality evaluation. Part II. Chemistry, technology, and quality evaluation. A. Chemistry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, *18(4)*, 313~386.
37. 한국과학기술원. 감귤류의 과피 분말 또는 과피 추출물을 포함하는 기능성 건강식품 공개번호 특1999-0079683.
- 38 Russell L. Ruseff. Flavonoids and Citrus Quality. *ACS Symposium Series(Citrus nutrition and quality)* **1980**, *143*, 83~107,
39. Steven Nagy. Citrus science and technology. *Avi. Pub. Co.* **1977**
40. 오윤옥. 제주도 감귤재배의 기원과 분포에 관한 연구, *고려대학교 교육대학원 석사학위논문* **1994**.
41. 한국아로마테라피 협회. 제주산 식물자원 Essential Oil의 산업화 가능성 평가연구. (재)제주하이테크산업진흥원 제주전략산업기획단 **2005**.
42. 한국식품개발연구원, 감귤류 과피로부터 고감미도 감미료 Neohseperidin-dihydrochalcone 제조기술 개발, 농림부, **2000**
43. Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1198~1200.
44. Nishikimi, M.; N. A. Roa; K. Yagi. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46*, 849~854.
45. Fridovich, I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 4053~4057.

46. Fernandez, M.; Rios, J. C.; Jos, A.; Repetto, G. Comparative cytotoxicity of alachlor on RTG-2 trout and SH-SY5Y human cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2006**, *51*, 515~520.
47. Cho, J. Y.; Baik, K. U.; Jung, J. H.; Park, M. H. In vitro antiinflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *398*, 399~407
48. Felix B.; Mariona C.; Pedro de M.; Marta F.; Josep F.; Sonia R. From p-benzoquinone to cyclohexane chiron: first asymmetric synthesis of (+)-rengyolone and (+)- and (-)-menisdaurilide *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14(14)*, 2021~2032.
49. Khan, I. A.; Erdelmeier, C. A.; Sticher, O.; Rali, T. New phenolic glucosides from the leaves of *Eurya tigang*. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55(9)*, 1270~1274.
50. Varughese, T.; Rahaman, M.; Kim, N. S.; Cho, S. C.; Moon, S. S. Gamnamoside, a phenylpropanoid glycoside from persimmon leaves (*Diospyros kaki*) with an inhibitory effect against an alcohol metabolizing enzyme. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30(5)*, 1035~1038
51. Renmin Liu; Aifeng Li; Ailing Sun. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Baill. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1052*, 217~221.
52. Jun Tian; Qin-shi Zhao; Hong-Jie Zhang; Zhong-Wen Lin; Han-dong

- Sun. New Cleroindicans from *Clerodendrum indicum*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 766~769.
53. Christoph Kobler; Franz Effenberger. Chemo enzymatic synthesis of renygol and isorenygol. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4823~4828.
54. Bove, P. F.; van der Vliet, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 515~527.
55. Suh, S. J.; Chung, T. W.; Son, M. J.; Kim, S. H.; Moon, T. C.; Son, K. H.; Kim, H. P.; Chang, H. W.; Kim, C. H. The naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK1/2 via NF-kappaB regulation, in RAW 264.7 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *447*, 136~146.
56. Williams, J. A.; Shacter, E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25693-25699.
57. Johnson, G. L.; Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **2002**, *298*, 1911~912.
58. Libermann, T. A.; Baltimore, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **1990**, *10*, 2327~2334.
59. Ohshima, H.; Tazawa, H.; Sylla, B. S.; Sawa, T. Prevention of human

cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat. Res.* **2005**, *591*, 110~122.

60. Baldwin, A. S. Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996, *14*, 649~683.
61. Karin, M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27339~27342.
62. Wang, T.; Zhang, X.; Li, J. J. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 1509~1520.
63. Karin, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* **1999**, *18*, 6867~6874.
64. Raingeaud, J.; Gupta, S.; Rogers, J. S.; Dickens, M.; Han, J.; Ulevitch, R. J.; Davis, R. J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7420~7426.
65. Cobb, M. H. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1999, *71*, 479~500.
66. Calvarano, M.; Postorino, E.; Gionfriddo, F.; Calvarano, I.; Bovalo, F. Naringin extraction from exhausted Bergamot peels. *Perfumer & Flavorist* **1996**, *21*, 1~4

67. 野村男次. 夏ミカンからの ナリソキソ, 小才ヘスヘリシソの 抽出分離と 新 甘味料の製造, 食品工業 7下 1973, 121-125.
68. Nishiura M.; Esaki, S.; Kamiya, S. Flavonoids in *Citrus* and related genera part I. Distribution of flavonoid glycosides in *Citrus* and *Poncirus*. *Agr. Biol, Chem.* 1969, 33, 1109~1118



감사의 글

문득 언제부터가 화학과라는 공간은 삶이 되어버렸고, 돌아보니 7년이라는 시간이 지나버렸습니다. 결코 짧지 않은 그 기간동안 무얼 해왔나 아쉬움이 남지만, 이제 그만 마무리 하고 또 다른 시작을 하기 위한 반성으로 남겨두면서, 이 논문이 완성되는데 도움을 주신 많은 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

많이 부족하고 모자라는 저를 지금까지 지도 해주시고, 지켜봐 주신 이남호 교수님께 감사드립니다. 지금은 정년을 훌쩍 넘겨 뵙기가 어렵지만 항상 따뜻이 격려해주시던 한성빈 교수님, 항상 너털웃음 속에 진지한 가르침을 주신 정덕상 교수님, 장난스러움과 엄격함으로 진심을 나타내 주신 김덕수 교수님, 언제나 한결 같으니 좋으신 변종철 교수님께 감사드립니다.

자리에서 고개만 돌려 마주쳐도 따스한 미소를 주시고, 진심어린 충고해 주신 강창희 교수님, 별일 아니라는 듯이 따끔한 충고와 격려를 주신 이선주 교수님, 사소한 것을 놓치지 않도록 조언해 주신 김원형 교수님, 모든 교수님의 가르침으로 지금의 제가 있어 깊은 감사를 드립니다. 실험의 결과를 얻도록 해주시고 논문을 심사·지도해 주신 의대 유은숙 교수님, 제주 테크노파크의 김기욱 실장님께 감사의 말씀을 드립니다.

제 부족함에 따끔한 질책으로 스스로 공부할 수 있도록 해 주신 백종석 선배님, 실험이나, 강의나, 생활이나 이런저런 소소한 일에도 많은 도움을 주셨던 한충훈 선배님, 이지혁 선배님, 부희정 선배님, 이지아 누님께도 고맙다는 말씀 드립니다. 후배이지만, 친구처럼 때론 선배처럼 많은 일을 도와주고 또 알려준 혜자, 그리고 실험 결과에 많은 도움을 주신 현창구 박사님, 김상숙 선생님께 감사의 마음을 드립니다.

오랜 기간만큼 함께 희노애락의 시간을 보냈던, 지금은 졸업해서 각자의 일을 하고 있는 정미, 홍철이, 봉석이, 영민이, 미연이, 려경이, 주희 모두 고맙고, 같은 시간이 그리울 겁니다. 이제 같이 졸업할 정아나 유태, 정은이, 성환이, 우리 서로 많은 도움이 되었을 거라 믿습니다. 열심히 실험하고 계신 윤진석 선배님과

상희, 하나, 인정이와 수영이 좋은 결과 얻으시길 바랍니다. 성천이와 정환이를 비롯한 일일이 다 열거하지도 못하는 같이한 많은 학부생들, 고맙고 앞으로 좋은 일만 많기를 바랍니다.

마지막으로, 길고 긴 시간 참아주고 지켜봐 주고 조언해준 내 인생의 동반자 지영이, 아빠가 좀 바쁘니 나중에 놀고 지금은 봐달란 말에 기특하게도 많이 참아준 우리 사랑스런 아들 성민이, 새벽마다 촛불 켜고 수많은 시간을 기도해 주시고 걱정해 주신 어머님과 장인어른, 장모님 그리고, 온 식구들 오래 기다려 주신 것에 말로 다 할 수 없는 고마움의 마음을 다합니다. 앞으로 잘 살겠습니다.

일일이 다 열거 할 수 없는 수많은 분들께 이 책장으로나마 머리 숙여 감사의 말씀을 전합니다. 많은 분들의 가르침과 조언이 있었기에 많은 것을 배우고 오늘에 이르렀으니, 앞으로 더욱 열심히 살겠습니다. 감사합니다.

2011년 2월

오 태 현