



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

삼백초 및 돌외로부터 활성성분의
분리 및 구조 규명

濟州大學校 大學院

化 學 科

任 俊 煥

2013年 2月

삼백초 및 돌외로부터 활성성분의 분리 및 구조 규명

指導教授 李 南 昊

任 俊 煥

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

任俊煥의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2013年 2月

Isolation and Structure Determination of
Active Compounds from *Saururus Chinesis*
and *Gynostemma Pentaphyllum*

Jun-Hwan Yim
(Supervised by professor Nam Ho Lee)

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

2013. 2.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	iii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
List of Abbreviations	vii
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 시약 및 기기	6
2. 재료	7
3. 추출 조건 확립 및 분석	7
3-1. 삼백초 잎 및 돌의 추출 조건	7
3-2. 삼백초 추출물의 분석	7
3-3. 돌의 추출물의 분석	8
4. 추출, 분획 및 분리	9
4-1. 삼백초 잎의 추출 및 분획	9
4-2. Compound 1과 compound 2의 분리과정	10
4-3. Compound 3의 분리과정	10
4-4. VLC를 이용한 활성 성분분리	10
4-5. Compound 4의 분리과정	10
4-6. Compound 5의 분리과정	11
5. 추출, 분획 및 분리	14
5-1. 돌의 추출 및 분획	14
5-2. VLC를 이용한 활성 성분분리	15
5-3. Compound 6의 분리과정	15
6. 활성 검색	16

6-1. 총 폴리페놀 함량 측정	16
6-2. 총 플라보노이드 함량 측정	16
6-3. DPPH radical scavenging test	17
6-4. ABTS radical scavenging test	19
7. HPLC 분석	21
Ⅲ. 결과 및 고찰	22
1. 용매 추출 조건 결정	22
1-1. 삼백초 잎 추출물 분석	22
1-2. 돌의 추출물 분석	22
2. 삼백초 잎에서 분리된 화합물의 구조 결정	29
2-1. Compound 1의 구조 해석	29
2-2. Compound 2의 구조 해석	33
2-3. Compound 3의 구조 해석	37
2-4. Compound 4의 구조 해석	41
2-5. Compound 5의 구조 해석	46
3. 돌에서 분리된 화합물의 구조 결정	50
3-1. Compound 6의 구조 해석	50
4. 항산화 활성 실험 결과	55
4-1. 총 폴리페놀 함량 측정	55
4-2. 총 플라보노이드 함량 측정	58
4-3. DPPH radical scavenging test	61
4-3-1. 삼백초 잎 및 돌의 추출물의 활성 결과	61
4-3-2. 삼백초 잎 및 돌로부터 분리된 화합물의 활성결과	63
4-4. ABTS radical scavenging test	64
4-4-1. 삼백초 잎 및 돌의 추출물의 활성 결과	64
4-4-2. 삼백초 잎 및 돌로부터 분리된 화합물의 활성결과	67
5. HPLC 분석 결과	68
5-1. 삼백초 잎으로부터 분리된 화합물의 HPLC 분석 결과	68

5-2. 돌외로부터 분리된 화합물의 HPLC 분석 결과	70
IV. 요약 및 결론	71
V. 참고문헌	74

LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Procedure of first solvent fractionation from <i>S. chinensis</i>	9
Scheme 2. Isolation of compounds 1 and 2	11
Scheme 3. Isolation of compounds 1 and 3	11
Scheme 4. Isolation of compound 4	12
Scheme 5. Isolation of compound 5	12
Scheme 6. Procedure of solvent fractionation from <i>G. pentaphyllum</i> ..	14
Scheme 7. Isolation of compound 6	15

LIST OF TABLES

Table 1. Gradient elution condition for HPLC separation (<i>S. chinensis</i>)	8
Table 2. Gradient elution condition for HPLC separation (<i>G. pentaphyllum</i>)	8
Table 3. Gradient elution condition for HPLC separation (<i>S. chinensis</i>)	21
Table 4. Gradient elution condition for HPLC separation (<i>G. pentaphyllum</i>)	21
Table 5. NMR spectral assignments for compound 1	30
Table 6. NMR spectral assignments for compound 2	34
Table 7. NMR spectral assignments for compound 3	38
Table 8. NMR spectral assignments for compound 4	42
Table 9. NMR spectral assignments for compound 5	47
Table 10. NMR spectral assignments for compound 6	51

LIST OF FIGURES

Figure 1. Structures of anti-oxidants	3
Figure 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol	18
Figure 3. Scavenging of the ABTS ⁺ radical by an anti-oxidant	20
Figure 4. HPLC chromatogram of 0% aq. ethanol from <i>S. chinensis</i>	23
Figure 5. HPLC chromatogram of 20% aq. ethanol from <i>S. chinensis</i>	23
Figure 6. HPLC chromatogram of 40% aq. ethanol from <i>S. chinensis</i>	24
Figure 7. HPLC chromatogram of 60% aq. ethanol from <i>S. chinensis</i>	24
Figure 8. HPLC chromatogram of 80% aq. ethanol from <i>S. chinensis</i>	25
Figure 9. HPLC chromatogram of 100% ethanol from <i>S. chinensis</i>	25
Figure 10. HPLC chromatogram of 0% aq. ethanol from <i>G. pentaphyllum</i>	26
Figure 11. HPLC chromatogram of 20% aq. ethanol from <i>G. pentaphyllum</i>	26
Figure 12. HPLC chromatogram of 40% aq. ethanol from <i>G. pentaphyllum</i>	27
Figure 13. HPLC chromatogram of 60% aq. ethanol from <i>G. pentaphyllum</i>	27
Figure 14. HPLC chromatogram of 80% aq. ethanol from <i>G. pentaphyllum</i>	28
Figure 15. HPLC chromatogram of 100% ethanol from <i>G. pentaphyllum</i>	28
Figure 16. Chemical structure of compound 1	29
Figure 17. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	31
Figure 18. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	32
Figure 19. Chemical structure of compound 2	33
Figure 20. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	35
Figure 21. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	36

Figure 22. Chemical structure of compound 3	37
Figure 23. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	39
Figure 24. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	40
Figure 25. Chemical structure of compound 4	43
Figure 26. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	43
Figure 27. ¹³ C-NMR & DEPT-NMR spectra of compound 4 in CD ₃ OD	44
Figure 28. ¹ H- ¹ H COSY NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	44
Figure 29. HMQC NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	45
Figure 30. HMBC NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	45
Figure 31. Chemical structure of compound 5	46
Figure 32. ¹ H-NMR spectrum of compound 5 in DMSO-d ₆	48
Figure 33. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5 in DMSO-d ₆	49
Figure 34. Chemical structure of compound 6	52
Figure 35. ¹ H-NMR spectrum of compound 6 in DMSO-d ₆	53
Figure 36. ¹³ C-NMR spectrum of compound 6 in DMSO-d ₆	54
Figure 37. Calibration curve for quantification of total phenolic compounds	55
Figure 38. Total polyphenolic compounds of extracts. (<i>S. chinensis</i>)	56
Figure 39. Total polyphenolic compounds of solvent layers (<i>S. chinensis</i>)	56
Figure 40. Total polyphenolic compounds of extracts (<i>G. pentaphyllum</i>)	57
Figure 41. Total polyphenolic compounds of solvent layers (<i>G. pentaphyllum</i>)	57
Figure 42. Calibration curve for quantification of total flavonoids	58
Figure 43. Total flavonoids of extracts (<i>S. chinensis</i>)	59
Figure 44. Total flavonoids of solvent layers (<i>S. chinensis</i>)	59
Figure 45. Total flavonoids of extracts (<i>G. pentaphyllum</i>)	60

Figure 46. Total flavonoids of solvent layers (<i>G. pentaphyllum</i>)	60
Figure 47. DPPH radical scavenging activities of extracts from <i>S. chinensis</i> leaves	62
Figure 48. SC ₅₀ value of DPPH radical scavenging activities of EtOAc fr. and BuOH fr. from <i>S. chinensis</i> leaves	62
Figure 49. SC ₅₀ value of DPPH radical scavenging activities for compounds 1 , 2 , 3 and 5	63
Figure 50. ABTS radical scavenging activities of extracts from <i>S. chinensis</i> leaves	65
Figure 51. SC ₅₀ value of ABTS radical scavenging activities of EtOAc fr. from <i>S. chinensis</i> leaves	65
Figure 52. ABTS radical scavenging activities of extracts from <i>G. pentaphyllum</i>	66
Figure 53. SC ₅₀ value of ABTS radical scavenging activities of EtOAc fr. from <i>G. pentaphyllum</i>	66
Figure 54. SC ₅₀ value of ABTS radical scavenging activities of compounds 1 , 2 , 3 , 5 and 6	67
Figure 55. HPLC chromatogram of 40% ethanol and compound 5 from <i>S. chinensis</i>	68
Figure 56. HPLC chromatogram of compound 3 from <i>S. chinensis</i>	69
Figure 57. HPLC chromatogram of compound 1 from <i>S. chinensis</i>	69
Figure 58. HPLC chromatogram of 80% ethanol and compound 6 from <i>G. pentaphyllum</i>	70

List of Abbreviations

<i>S. chinensis</i>	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Baill.
<i>G. pentaphyllum</i>	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (THUNB.) MAKINO
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
Hex	<i>n</i> -Hexane
CHCl ₃	Chloroform
EtOAc	Ethyl acetate
BuOH	<i>n</i> -Butanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Vit. C	Vitamin C
Fr.	Fraction
CC	Column chromatography
TLC	Thin layer chromatography
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
NMR	Nuclear magnetic resonance
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
COSY	Correlation spectroscopy
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
2D	Two-dimensional
J	Coupling constant (Hz)
s	Singlet
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
m	Multiplet
int	Integration

Abstract

Saururus chinensis (Lour.) Baill. has been used in Korea as a folk medicine for the treatment of diuretic action. *Gynostemma pentaphyllum* (THUNB.) MAKINO is also one of the commonly used traditional medical herb for the prevention of various diseases.

In our continuing efforts to find biologically active compounds from plants in Jeju Island, we became interested in the extracts of *S. chinensis* and *G. pentaphyllum*. Repeated column chromatography of ethyl acetate and butanol-soluble fractions in the extract led to the isolation six compounds such as quercitrin (1), quercetin (2), catechin (3), (6S,9S)-roseoside (4), quercetin 3-*O*-glucuronide 6"-*O*-methly ester (5), ombuine 3-*O*-Rutinoside (6). Compounds 4 and 6 were isolated for the first time from *S. chinensis* and *G. pentaphyllum* respectively.

The total phenolic contents for the extract and solvent layers (Hex, CHCl₃, EtOAc, BuOH, water) were estimated as 30.3, 8.2, 11.4, 49.2, 32.9 and 7.7 mg (GAE/100 mg) respectively. In addition, the total flavonoid contents were measures as 17.2, 7.7, 26.6 and 18.2 (quercetin/100 mg) respectively for the extract, CHCl₃, EtOAc and BuOH fractions.

For the anti-oxidation activity test, compounds 1, 2, 3 and 5 showed DPPH radical scavenging activity with SC₅₀ of 37.5, 15.8, 9.6, 25.2 µg/mL respectively, whose activities were comparable to a positive control vitamin C (SC₅₀ : 6.9 µg/mL). In addition, compounds 1, 2, 3, 5 and 6 showed ABTS⁺ radical scavenging activities with SC₅₀ of 64.6, 12.5, 23.4, 19.2 and 78.4 µg/mL respectively, showing comparable activity to vitamin C (SC₅₀ : 11.9 µg/mL).

Based on these results, *S. chinensis* and *G. pentaphyllum* extracts could be potentially applicable as anti-oxiant cosmeceutical ingredient.

I. 서론

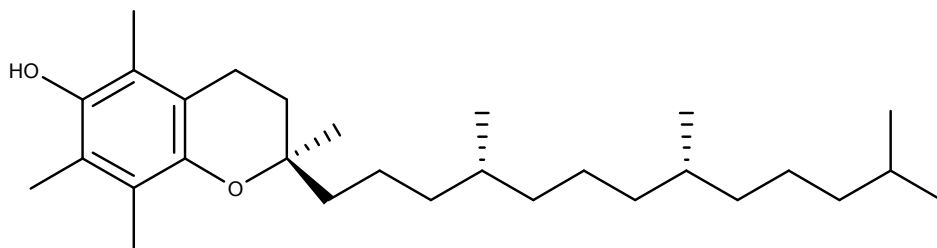
노화(aging)는 해부학적, 생화학적, 생리적, 행동적인 면을 포함한 모든 신체 변화를 말하는 것으로 이러한 신체의 변화는 두뇌, 소화기계, 골격 등 모든 신체에서 일어나며,¹⁾ 특히 피부는 기능적 구조적으로 변화되어 노화를 시각적으로 나타내어준다. 피부 노화 과정에서 탄력 저하, 피지생성 감소, 수분 손실 증가, 각질세포 응집력 강화, 주름생성, 기미, 주근깨 등의 특징을 보인다.²⁾ 피부는 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 있어 활성산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위협이 항상 존재한다.

생체 내에서 에너지 생산을 위한 산화과정 중에 상당량의 활성산소들이 생성되며, 이들 활성산소는 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되지만 순간적으로 활성산소가 다량으로 발생되거나 만성적으로 활성산소가 발생되어 항산화방어계의 균형이 깨지면 각종 질환의 원인이 된다.³⁾

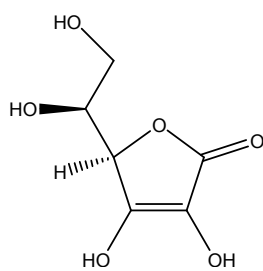
유해산소로 알려져 있는 활성산소인 superoxide anion radicals ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) 등은 가장 안정한 형태인 삼중항산소(triplet oxygen, $^3\text{O}_2$)가 환원되면서 생성되어지며, 이러한 활성산소는 반응성이 매우 강하여 이들에 의하여 야기되는 free radical 반응은 세포구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 비선택적, 비가역 반응에 의하여 파괴한다.⁴⁾ 따라서, 이러한 활성산소를 제거하기 위한 항산화제에는 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), propyl gallate(PG) 등과 같은 합성 항산화제, tocopherol류, flavonoids, 탄닌류, ascorbic acid, carotenoids, glutathione 등과 같은 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소가 있다⁵⁾(Figure 1). 그런데 합성 항산화제인 BHT와 BHA 등은 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 지금까지 널리 사용되어 왔으나, 간비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성 등의 문제가 제기되어 허용대상 식품이나 사용량이 엄격히 제한되고 있다.^{6,7)} 또한 tocopherol과 ascorbic acid 같은 천연 항산화제는 안전성은 높지만 단독으로는 산화 연쇄반응 저지 능력이 낮고 가격이 비싼 단점이 있다.⁸⁾ 이러한

이유로 최근에는 천연물로부터 보다 안전하고 경제적이며 효과가 뛰어난 항산화제를 분리 이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 식물유래 물질로 식물의 2차 대사산물은 자유라디칼과 활성산소의 생성을 억제하거나 제거하여 산화를 방지하기 때문에 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

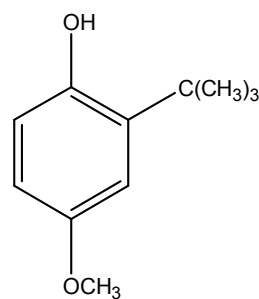
지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있다. 이 화합물은 하나 또는 둘 이상의 히드록시기로 치환된 방향족환을 가지고 있으며 자연에 대략 8000여종이 존재하며 항산화성, 항암성 등의 기능성을 가지고 있다.⁶⁾ 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로 많이 활용되고 있다.⁹⁾



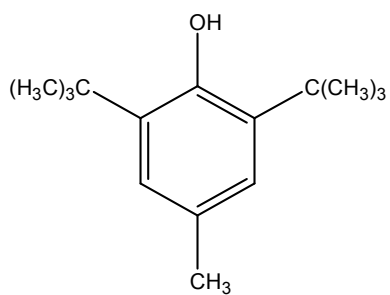
Vitamin A



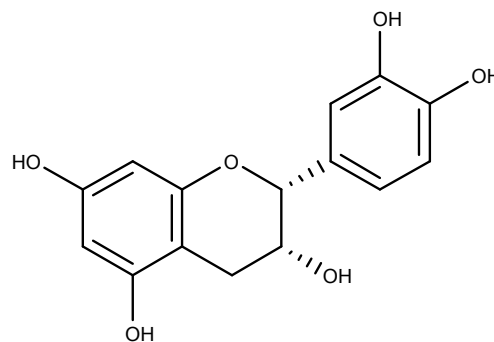
Vitamin C



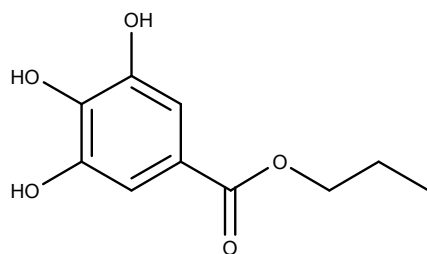
BHA



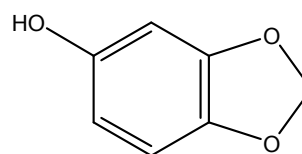
BHT



epi-catechin



Propyl gallate



Sesamol

Figure 1. Structures of anti-oxidants.

삼백초(*Saururus chinensis* (Lour.) Baill.)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 제주도와 지리산 일부지역에서 나는 다년생 초본이다. 야릇한 쓴맛이 있고 송장 썩는 냄새가 난다고 하여 ‘송장풀’이라고도 한다. 생육환경은 습기가 많은 계곡의 바람이 잘 통하고 공중습도가 높으며 반그늘인 곳에서 자란다. 키는 50~100 cm로, 잎은 길이 5~15 cm, 폭은 0.3~0.8 cm로 긴 타원형이며, 어긋나게 난다. 잎 표면은 연한 녹색이고 뒷면은 연한 백색이며 꽃이 필 무렵에는 윗부분의 잎 2~3개가 백색으로 변하고 5~7개의 맥이 있으며 끝은 뾰족하고 가장자리는 밋밋하다. 뿌리는 백색으로 흙속으로 파고들며 옆으로 뻗으면서 자란다. 꽃은 백색으로 아래로 처지다가 끝부분은 위로 올라가며 잎과 마주나고 길이는 10~15 cm이고, 꼬불꼬불한 털이 있다. 열매는 9~10월경에 꽃망울에 한 개씩이 둥글게 달린다. 관상용으로 쓰이고, 꽃을 포함한 잎과 줄기 뿌리는 약재로 쓰인다.¹⁰⁾

삼백초의 잎은 quercetin, quercitrin, isoquercetin, avicularin, rutin, tannin 등의 flavonoids를 유효성분으로 함유하고 있다.^{11,12)} 이 중 rutin (quercetin 3-rhamnosyl glucoside)은 quercetin 관련 flavonoid의 일종으로 과산화지질 형성 억제작용,¹³⁾ 항균효과,^{14,15)} 항돌연변이 작용과 발암성 물질의 활성감소,¹⁶⁾ 변이 암세포의 생육저해,¹⁷⁾ 혈압강하 및 모세혈관 강화작용 등이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 또한 quercitrin은 항염증 및 진통효과, 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있고,^{19,20)} quercetin은 항돌연변이, 항암성 뿐 아니라 동맥경화를 유발할 수 있는 인지인 LDL(Low density lipoprotein)의 산화와 cytotoxicity를 억제하는 효과도 보고되어 있다.^{21,22)} 추출조건에 대한 연구도 보고되어 있으나, 추출조건에 따른 유효성분 분리는 아직 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 항산화 물질이 풍부한 삼백초 잎을 HPLC 및 항산화 활성을 측정하여 에탄올 추출 조건을 확립하고, 그 추출 조건을 이용하여 삼백초 잎에서 유효성분을 분리 동정하고자 하였다.

돌외(*Gynostemma pentaphyllum*)는 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본류로서, 예로부터 칠엽담(七葉膽)이라고도 한다. 우리나라와 일본, 중국 등에서 자생하는 자생식물로 알려져 있으며 주로 산기슭이나 계곡, 숲속 같은 음지지역에서 서식한다.²³⁾ 줄기는 권수로 다른 것에 감겨 올라가며, 잎은 호생하고

새 발모양의 장상복엽인데 작은 잎은 5~7개로 막질이며 달걀꼴의 피침형이다. 자웅이주로 8~9월에 황록색 꽃이 원추화서로 액출하고 열매는 구형이다. 주로 전초 또는 지상부위를 약용으로 이용해 왔다.

돌외의 유효성분으로는 사포닌 외에도 flavonoids, rutin,²⁴⁾ minerals,²⁵⁾ vitamins, polysaccharides,²⁶⁾ carotenoids,²⁷⁾ alkaloids²⁸⁾ 등이 있는 것으로 보고된 바 있으나 추출 조건에 대한 연구는 아직까지 진행되지 않았다.

본 연구에서는 돌외를 HPLC 및 항산화 활성을 측정하여 돌외의 에탄올 추출 조건을 확립하고 돌외에서 유효성분을 분리 동정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck Co. 및 Jusei Co.의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography에는 silica gel(0.0020-0.025 mm, Sigma Co.), normal-phased silica gel column chromatography에는 silica gel 60(0.040-0.063 mm, Merck Co.)이 사용되었다. 분리 과정에서 사용된 TLC(Thin layer chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silicagel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp(254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조 시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다.

항산화 활성 검색에 사용된 UV/Vis spectrophotometer는 Thermo Electron Corporation사의 Multiskan Ex(ELISA reader), Biochrom Libra s22 (cambridge Inc., England)를 사용하였다.

삼백초 및 돌외로부터 에탄올 추출조건에 사용된 용매는 Fisher Co.에 HPLC 급 methanol을 사용하였다. HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Waters Co.의 600 controller를 사용하였다. HPLC는 펌프, 컬럼 오븐, 자동 시료주입기, PDA 검출기 (996 photodiode array detector, Waters Co.)로 구성되어 있으며, 측정시 컬럼은 Fortis Co.의 UniverSil C₁₈ (5 μ m, 150 × 4.6 mm)을 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT-NMR system, JEOL Co.)과 JNM-ECX 400(FT-NMR system, JEOL Co.)을, NMR 측정 용매는 CIL, Inc.의 NMR 전용 용매로 CD₃OD, DMSO-d₆를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용한 삼백초 잎은 2012년 2월과 2012년 9월에 제주발효명가 영농조합법인에서 구입하였다. 또한, 실험에 사용한 들외 전초는 2012년 9월에 제주 자원 식물 산업연구소에서 구입하였다. 구입한 삼백초 잎 및 들외 전초를 실온에서 자연 건조시킨 후, 분쇄하여 사용하였다.

3. 추출 조건 확립 및 분석

3-1. 삼백초 잎 및 들외 추출 조건

삼백초 잎 및 들외의 추출조건을 설정하기 위해 각각의 삼백초 잎과 들외 1 g 을 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% ethanol 10 mL에 침적하여, 실온에서 2 일동안 추출하였다.

3-2. 삼백초 추출물의 분석

각 추출물은 원심분리기(DAIHAN Science Co., CF-10)를 이용하여 13,500 rpm에서 10분 동안 원심분리 후, 0.45 μm 주사기 필터(Advantec Toyo Roshi Kai 님 Ltd., DISMIC^R-13_{HP})로 여과하여 사용하였다. 추출물은 HPLC(Waters Co., 600 controller, 717 plus auto sampler), UniverSil C₁₈ 컬럼(5 μm , 150 \times 4.6 mm), 20 μL 주입부피, 컬럼 온도 35 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여 분석하였다. 용리액은 각각 0.1% formic acid/초순수와 MeOH를 사용하였고, 1.0 mL/min 유속으로 40분 동안 추출물을 탐색하였다(Table 1).

3-3. 들의 추출물의 분석

각 추출물은 원심분리기(DAIHAN Science Co., CF-10)를 이용하여 13,500 rpm에서 10분 동안 원심분리 후, 0.45 μm 주사기 필터(Advantec Toyo Roshi Kai 님 Ltd., DISMIC^R-13_{HP})로 여과하여 사용하였다. 추출물은 HPLC(Waters Co., 600 controller, 717 plus auto sampler), UniverSil C₁₈ 컬럼(5 μm , 150 \times 4.6 mm), 10 μL 주입부피, 컬럼 온도 40 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여 분석하였다. 용리액은 각각 초순수와 MeOH를 사용하였고, 1.0 mL/min 유속으로 40분 동안 추출물을 탐색하였다(Table 2).

Table 1. Gradient elution condition for HPLC separation. (*S. chinensis*)

Time (min)	Flow (mL/min)	Water (%)	MeOH (%)
0	1.0	65	35
5	1.0	60	40
40	1.0	50	50

Table 2. Gradient elution condition for HPLC separation. (*G. pentaphyllum*)

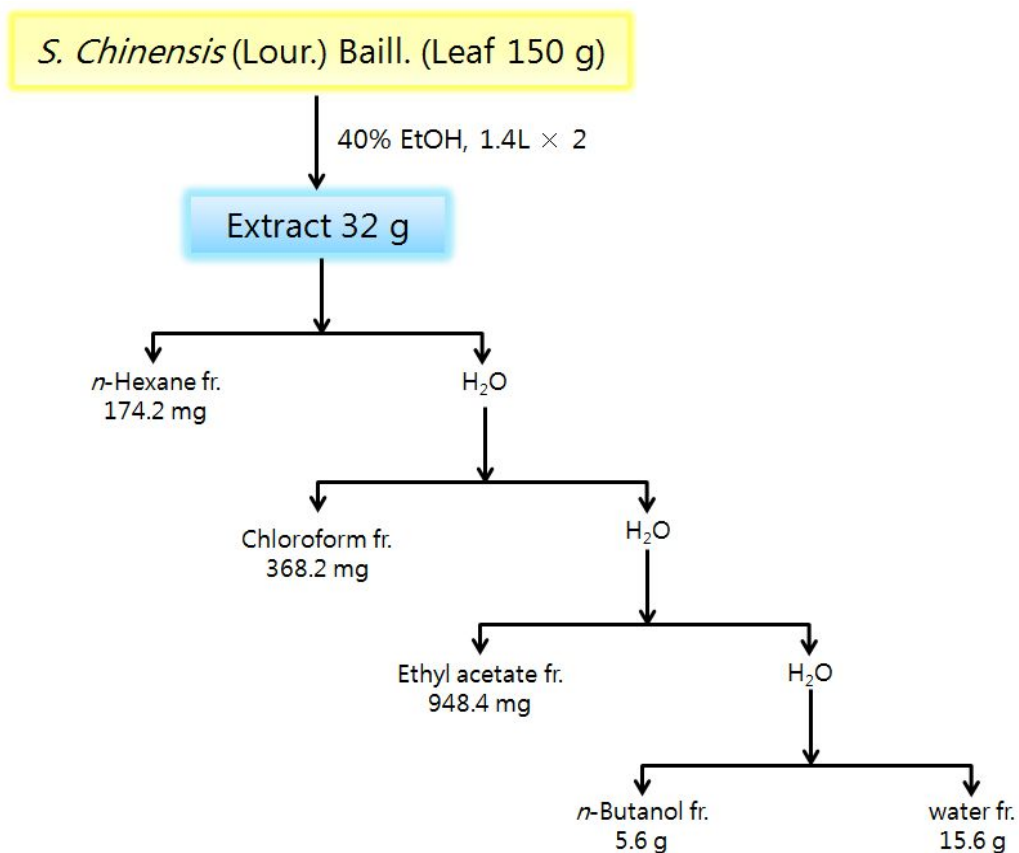
Time (min)	Flow (mL/min)	Water (%)	MeOH (%)
0	1.0	100	0
40	1.0	0	100

4. 추출, 분획 및 분리

4-1. 삼백초 잎의 추출 및 분획

건조된 삼백초 잎 150 g을 40% ethanol 2.0 L 에 침적하여, 실온에서 2일 동안 침출 시켰다. 침출 시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 여과하여 얻어진 여액은 40°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 40% ethanol 추출물 15 g을 얻었다.

얻어진 40 % ethanol 추출물을 H₂O 1 L 에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O fraction을 얻었다(scheme 1).



Scheme 1. Procedure of first solvent fractionation from *S. chinensis*.

4-2. Compound 1과 compound 2의 분리과정

삼백초 잎 추출물로 분획을 실시하여 얻은 EtOAc층 (381.0 mg)을 normal phased silica gel로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매 (CHCl₃/MeOH=2:1)로 전개시켜 10개의 fraction을 얻었으며, 그 중 Fr.7에서 compound 1(67.5 mg)과 Fr.4에서 compound 2(9.3 mg)을 얻었다(Scheme 2).

4-3. Compound 3의 분리과정

삼백초 잎 추출물로 분획을 실시하여 얻은 EtOAc층 (500.0 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(100% MeOH)로 전개시켜 총 4개의 fraction을 얻었고, 그 중 Fr.2(135.5 mg)를 다시 Sephadex LH-20으로 전개용매(CHCl₃/MeOH=2:1)로 전개시켜 5개의 fraction을 얻었으며, 그 중 Fr.3에서 compound 1(98.4 mg)과 Fr.4에서 compound 3(9.8 mg)을 얻었다(Scheme 3).

4-4. VLC를 이용한 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중에서 BuOH층 (2.5 g)을 분획하기 위하여 vacuum liquid chromatography(VLC)를 수행하였다. VLC(10 x 5 cm, silica gel, 20~40 mash)에서 Hex-EtOAc(0~100%), EtOAc-MeOH(0~50%)를 사용하여, 각 용매의 배합비를 5, 10%씩 증감하여 극성을 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출한 후, 각 fraction을 TLC을 확인하여 spot 패턴이 비슷한 것들을 모아 총 20개의 fraction을 얻었다.

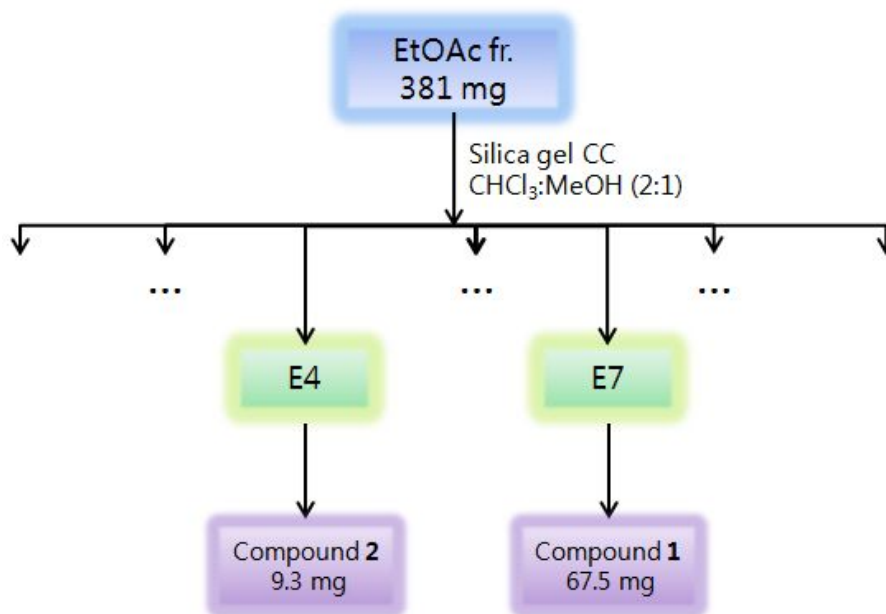
4-5. Compound 4의 분리과정

VLC에서 분획물 Fr.15(110.0 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(CHCl₃/MeOH=2:1)로 전개시켜 총 10개의 fraction을

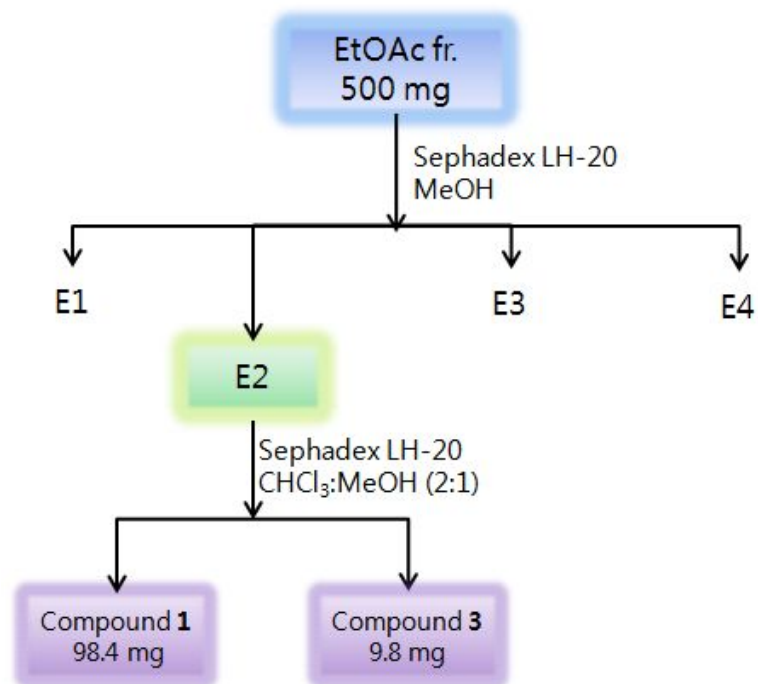
얻었고, 그 중 Fr.8에서 compound 4(16.8 mg)을 얻었다(Scheme 4).

4-6. Compound 5의 분리과정

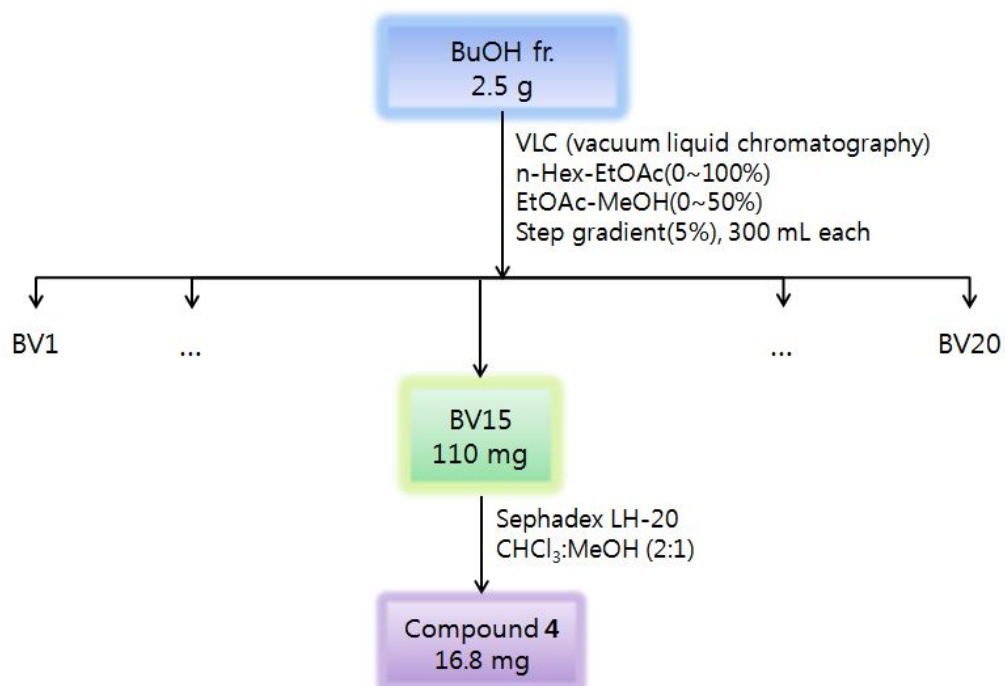
삼백초 잎 추출물로 분획을 실시하여 얻은 BuOH층 (500.0 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(100% MeOH)로 전개시켜 총 5개의 fraction을 얻었고, 그 중 Fr.3(97.5 mg)를 다시 Sephadex LH-20으로 전개용매(CHCl₃/MeOH=2:1)로 전개시켜 7개의 fraction을 얻었으며, 그 중 Fr.3에서 compound 5(5.7 mg)을 얻었다(Scheme 5).



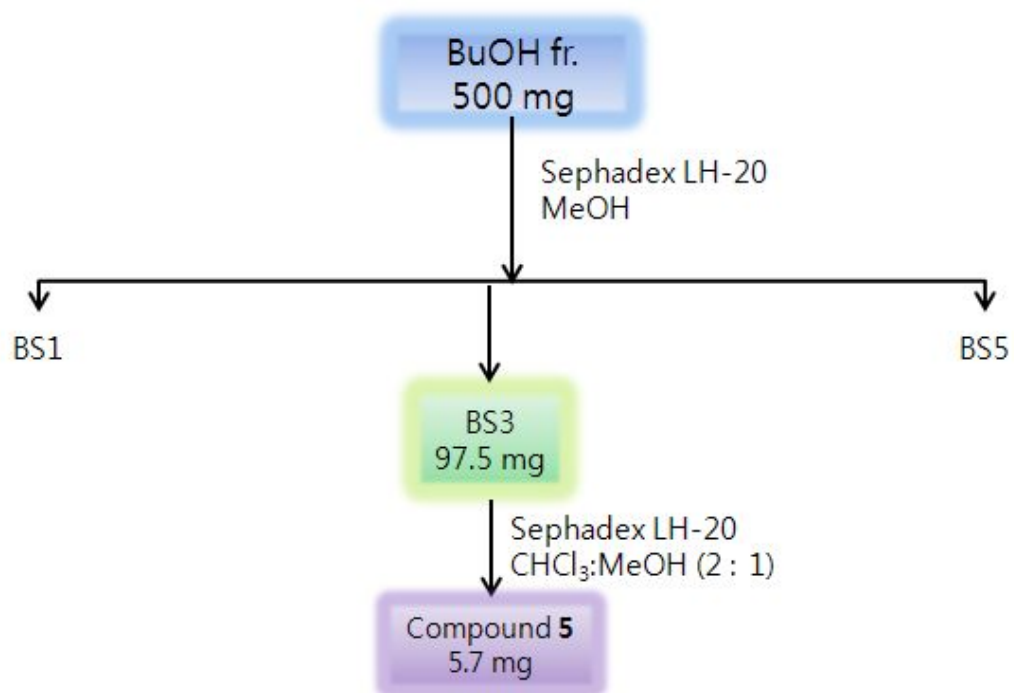
Scheme 2. Isolation of compounds 1 and 2.



Scheme 3. Isolation of compounds 1 and 3.



Scheme 4. Isolation of compounds 4.



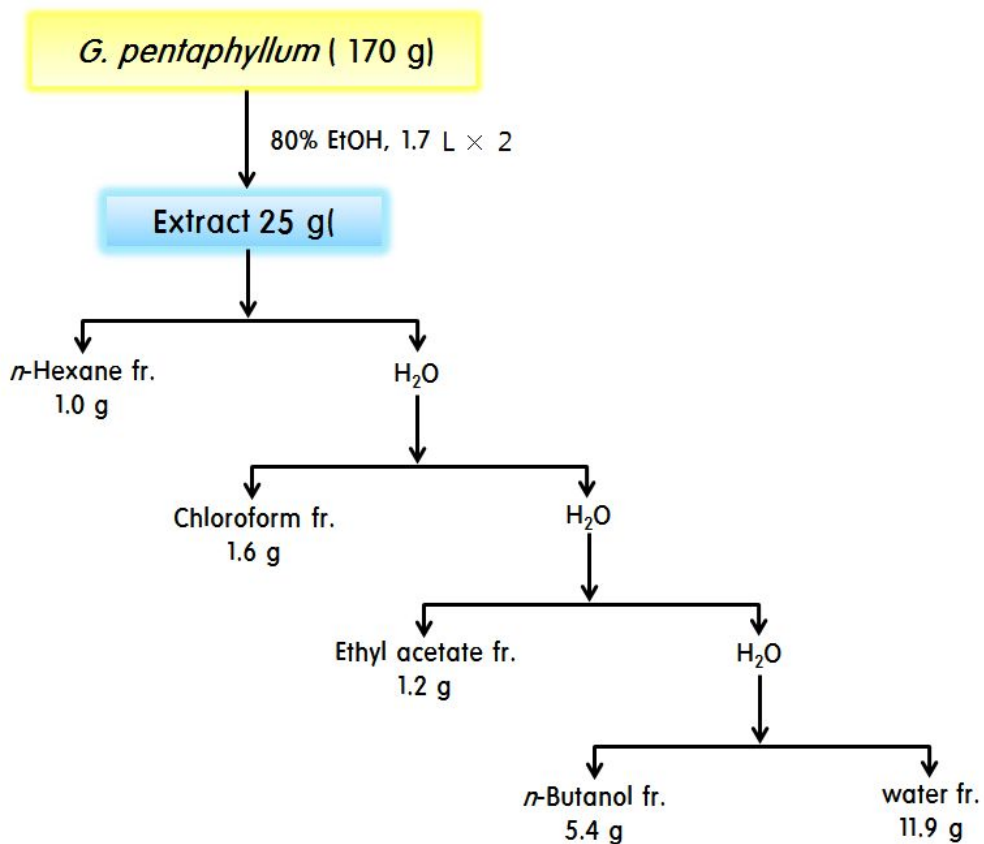
Scheme 5. Isolation of compounds 5.

5. 추출, 분획 및 분리

5-1. 돌외의 추출 및 분획

건조된 돌외 170.0 g을 80% ethanol 1.7 L 에 침적하여, 실온에서 2일 동안 침출 시켰다. 침출 시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 여과하여 얻어진 여액은 40℃ 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 80% ethanol 추출물 25 g을 얻었다.

얻어진 80% ethanol 추출물을 H₂O 1 L 에 현탁 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O fraction을 얻었다(scheme 6).



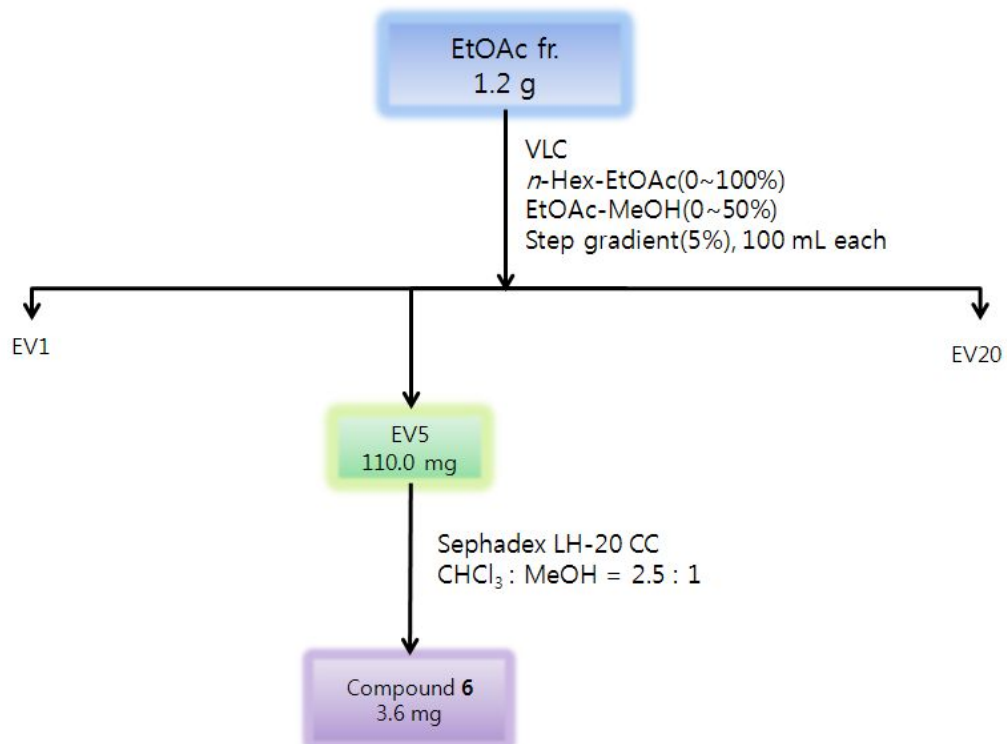
Scheme 6. Procedure of solvent fractionation from *G. pentaphyllum*.

5-2. VLC를 이용한 활성 성분 분리

용매분획 후 얻어진 각 분획층들 중에서 EtOAc분획층(1.2 g)을 삼백초 잎과 같은 방법으로 분획하기 위하여 vacuum liquid chromatography(VLC)를 수행하였다. VLC(10 x 5 cm, silica gel, 20~40 mash)에서 Hex-EtOAc(0~100%), EtOAc-MeOH(0~50%)를 사용하여, 각 용매의 배합비를 5, 10%씩 증감하여 극성을 높이는 방법으로 각 100 mL씩 용출한 후, 각 fraction을 TLC을 확인하여 spot 패턴이 비슷한 것들을 모아 총 20개의 fraction을 얻었다.

5-3. Compound 6의 분리과정

VLC에서 분획물 Fr.15(137.1 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전된 분획물을 glass column에 전개용매(CHCl₃/MeOH=2.5:1)로 전개시켜 7개의 fraction을 얻었고 그 중 Fr.2에서 compound 6(3.6 mg)을 얻었다(Scheme 7).



Scheme 7. Isolation of compound 6.

6. 활성 검색

6-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법²⁹⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO:EtOH=1:1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL가 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 µL를 micro tube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합하고, 증류수 700 µL를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 750 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 함량으로 환산 하였다.

6-2. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Davis법³⁰⁾을 변형하여 실시하였다. 각 시료들을 1 mg/mL로 용매에 녹인 다음, micro tube에 시료 용액 15 µL와 ethylene glycol 150 µL를 첨가하여 혼합한 후 다시 0.1 N NaOH 15 µL를 넣고 37°C 항온조에서 1시간동안 반응 후 UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 quercetin을 이용하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

6-3. DPPH radical scavenging test

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색방법으로 특히 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 방법이다. 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazyl은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 515 ~ 517 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해 주는 전자 공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색이 점점 옅어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다(Figure 2).

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois방법³¹⁾을 응용하여 다음과 같이 실행하였다.

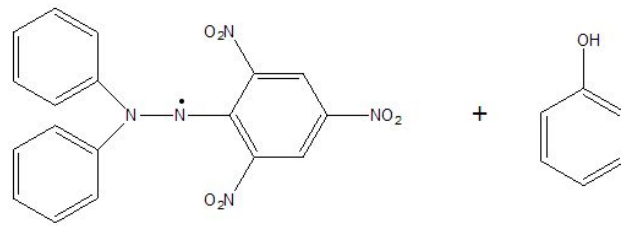
먼저 시료를 2 mg/mL 의 농도로 DMSO-*d*₆ 또는 DMSO-*d*₆와 50 % EtOH을 용매로 하여 녹인다. DPPH 시약은 2 mM이 되도록 녹여준 뒤 이를 가지고 희석액을 만든다. 희석액은 총 50 mL를 만들 때 95% EtOH 50 mL를 넣어 흡광도가 0.94에서 0.97이 되도록 맞추어 사용하였다. 맞춰진 DPPH 용액 0.180 mL에 농도가 각각 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 이 되도록 희석한 시료를 0.02 mL를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 UV/Vis 분광광도계를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거작용(%)을 구한다. 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료의 농도 (SC₅₀)를 계산하였다. 이때 사용된 대조군으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left(1 - \frac{B - C}{A} \right) \times 100$$

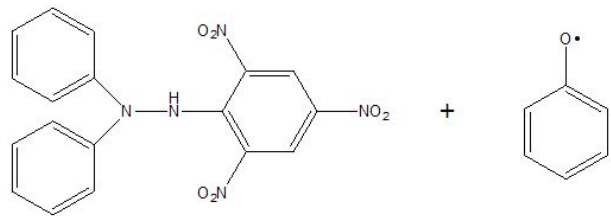
A : DPPH의 흡광도

B : DPPH와 시료반응액의 흡광도

C : 시료 자체의 흡광도



DPPH radical (violet, 525 nm)



Diphenylpicrylhydrazine
(yellow)

Phenoxy
(radical)

Figure 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol

6-4. ABTS radical scavenging test

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

ABTS radical cation 소거 활성은 Re & Pellegrin 등의 방법³²⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다: ABTS radical cation을 만들기 위하여 7.0 mM ABTS(in D.W) 용액과 2.45 mM potassium persulfate(in D.W) 용액을 1:1로 혼합하여 16시간동안 암소에서 반응시킨다. 반응 시킨 ABTS 용액과 ethanol을 1:60으로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.002 가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 ABTS 용액 180 μ L를 혼합하여 15분간 암소에서 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC_{50})를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left(1 - \frac{B - C}{A} \right) \times 100$$

A : ABTS의 흡광도

B : ABTS와 시료반응액의 흡광도

C : 시료 자체의 흡광도

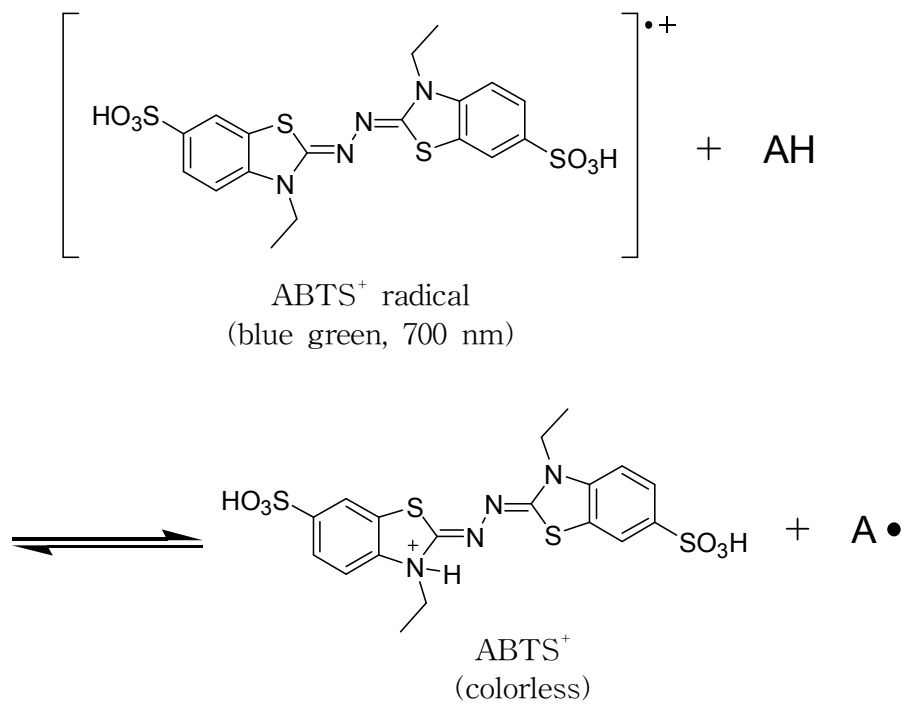


Figure 3. Scavenging of the ABTS⁺ radical by an anti-oxidant.

7. HPLC 분석

삼백초 및 돌의 추출물의 compound에 대한 정성 분석을 수행하였다. 먼저 삼백초는 HPLC(Waters Co., 600 controller, 717 plus auto sampler), UniverSil C₁₈ 컬럼(5 μ m, 150 × 4.6 mm), 20 μ L 주입부피, 350 nm, 컬럼 온도 35 $^{\circ}$ C를 유지하여 분석하였다. 용리액은 각각 0.1% formic acid/초순수와 MeOH를 사용하였고, 1.0 mL/min 유속으로 40분 동안 추출물을 탐색하였다(Table 3). 또한, 돌의는 HPLC(Waters Co., 600 controller, 717 plus auto sampler), UniverSil C₁₈ 컬럼(5 μ m, 150 × 4.6 mm), 10 μ L 주입부피, 254 nm, 컬럼 온도 40 $^{\circ}$ C를 유지하여 분석하였다. 용리액은 각각 초순수와 MeOH를 사용하였고, 1.0 mL/min 유속으로 40분 동안 추출물을 탐색하였다(Table 4).

Table 3. Gradient elution condition for HPLC separation. (*S. chinensis*)

Time (min)	Flow (mL/min)	Water (%)	MeOH (%)
0	1.0	65	35
5	1.0	60	40
40	1.0	50	50

Table 4. Gradient elution condition for HPLC separation. (*G. pentaphyllum*)

Time (min)	Flow (mL/min)	Water (%)	MeOH (%)
0	1.0	100	0
40	1.0	0	100

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 용매 추출 조건 결정

1-1. 삼백초 잎 추출물 분석

역상 컬럼(C₁₈)을 이용하여 각각의 삼백초 잎 에탄올 추출물의 분리도를 확인하였다. HPLC 크로마토그램 결과를 보면 3개의 피크를 확인 할 수 있다(Figure 4~9). 그 중 40% ethanol 추출물이 다른 추출물에 비해 머무름 시간이 14 min 근처의 피크가 가장 높은 것을 확인하였고 삼백초 잎을 40% ethanol로 사용하여 추출하였다.

1-2. 돌의 추출물 분석

역상 컬럼(C₁₈)을 이용하여 각각의 돌의 에탄올 추출물의 분리도를 확인하였다. HPLC 크로마토그램 결과를 보면 5개의 피크를 확인 할 수 있다(Figure 10~15). 그 중 80% ethanol 추출물이 다른 추출물에 비해 머무름 시간이 23 min 근처의 피크가 가장 높은 것을 확인하였고 돌외를 80% ethanol로 사용하여 추출하였다.

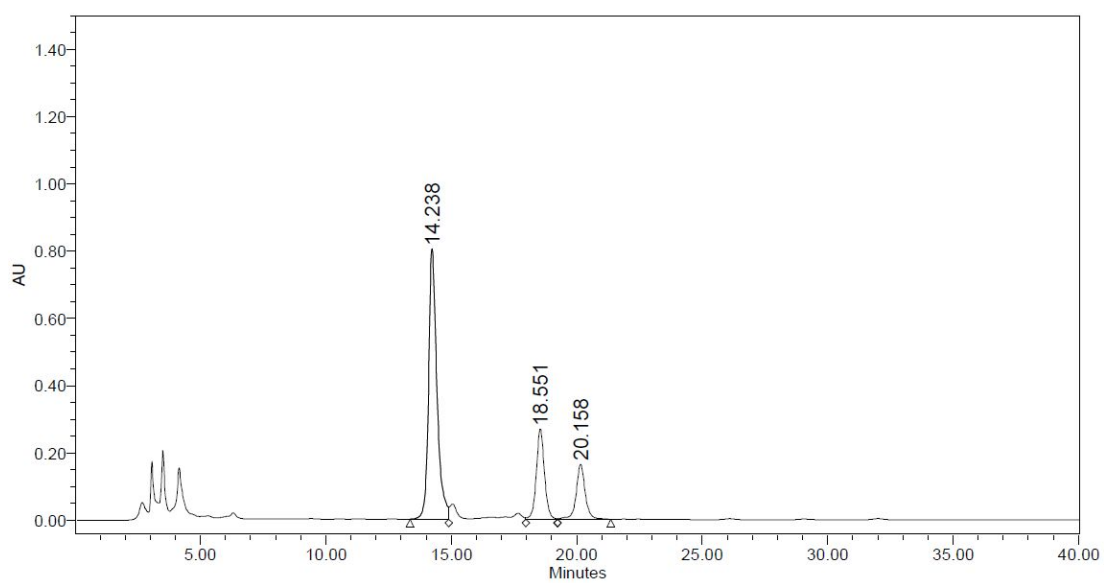


Figure 4. HPLC chromatogram of 0% aq. ethanol from *S. chinensis*.

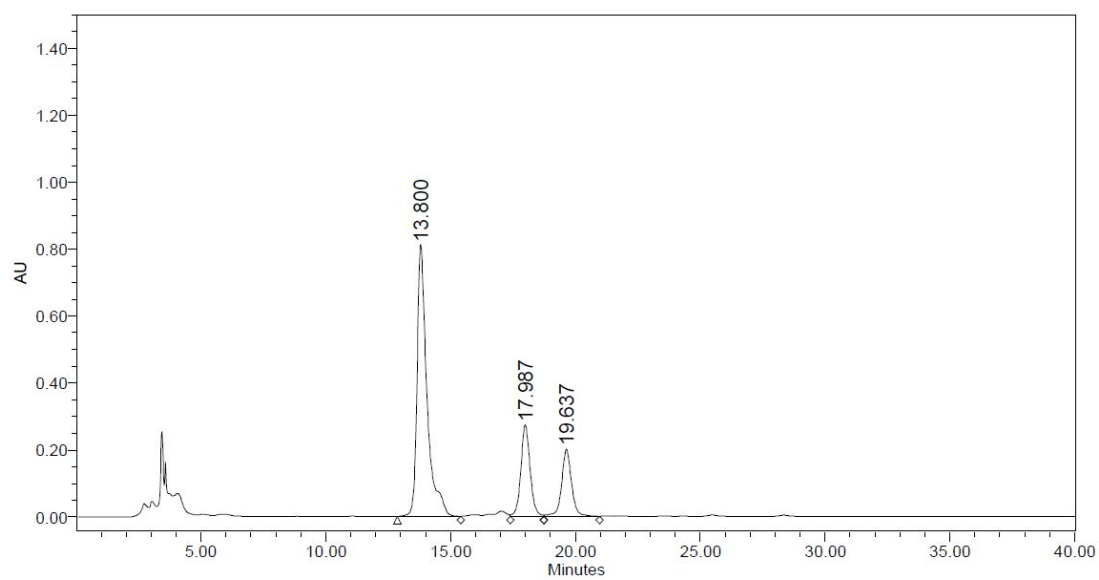


Figure 5. HPLC chromatogram of 20% aq. ethanol from *S. chinensis*.

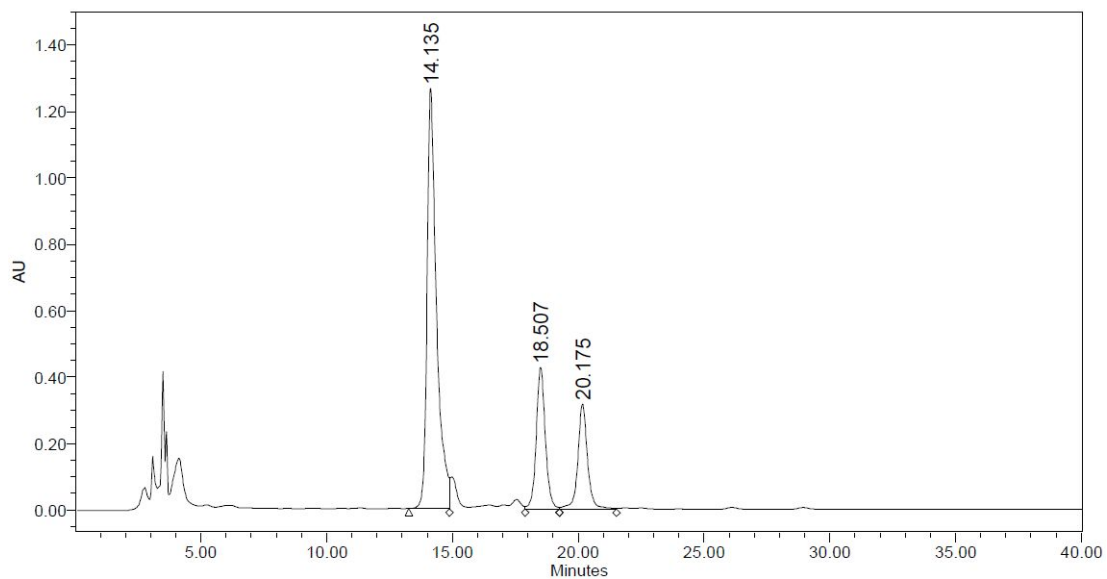


Figure 6. HPLC chromatogram of 40% aq. ethanol from *S. chinensis*.

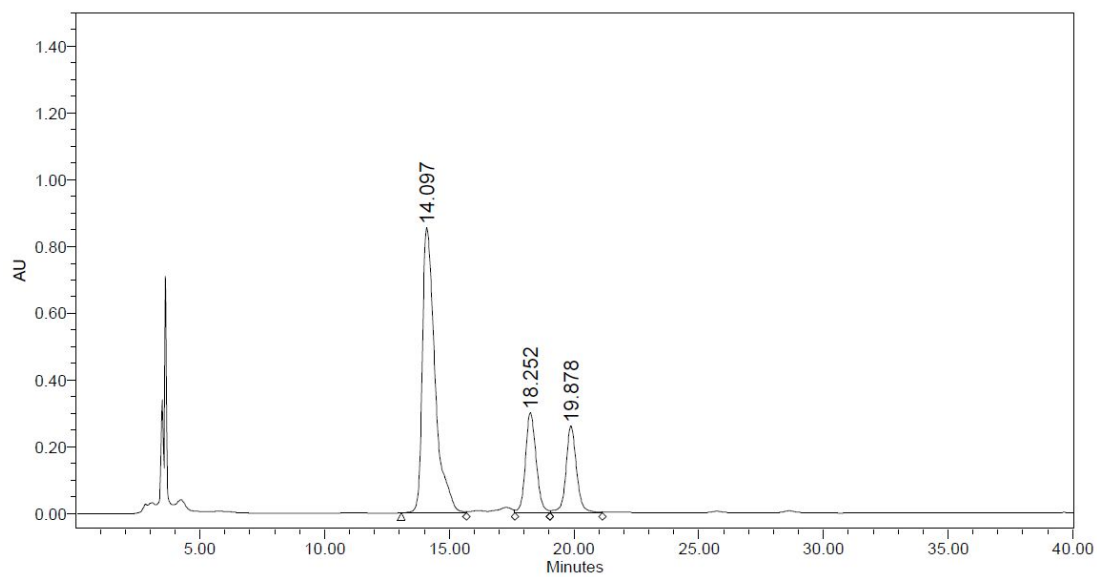


Figure 7. HPLC chromatogram of 60% aq. ethanol from *S. chinensis*.

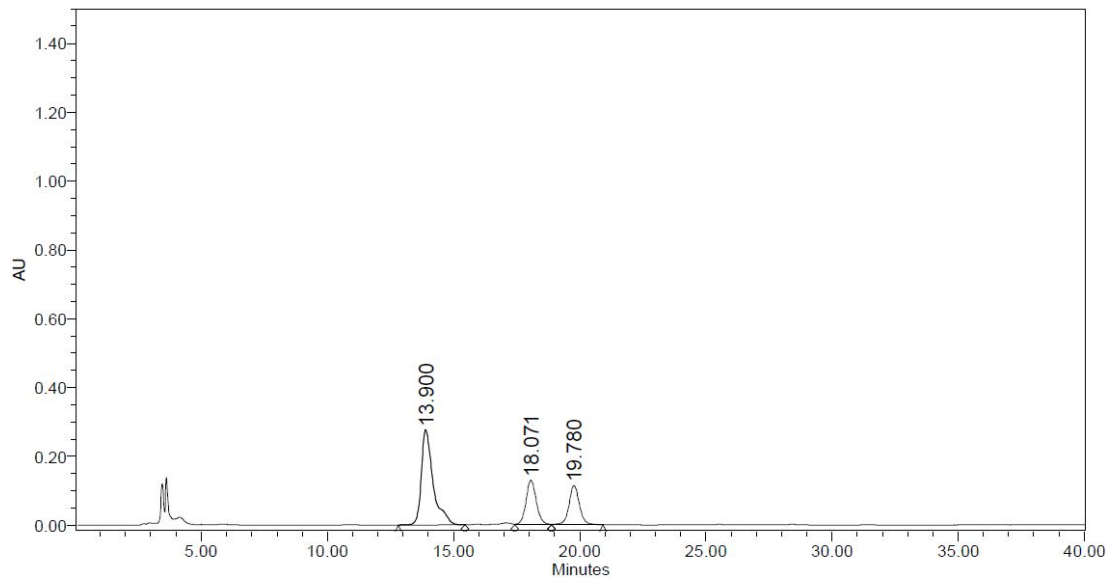


Figure 8. HPLC chromatogram of 80% aq. ethanol from *S. chinensis*.

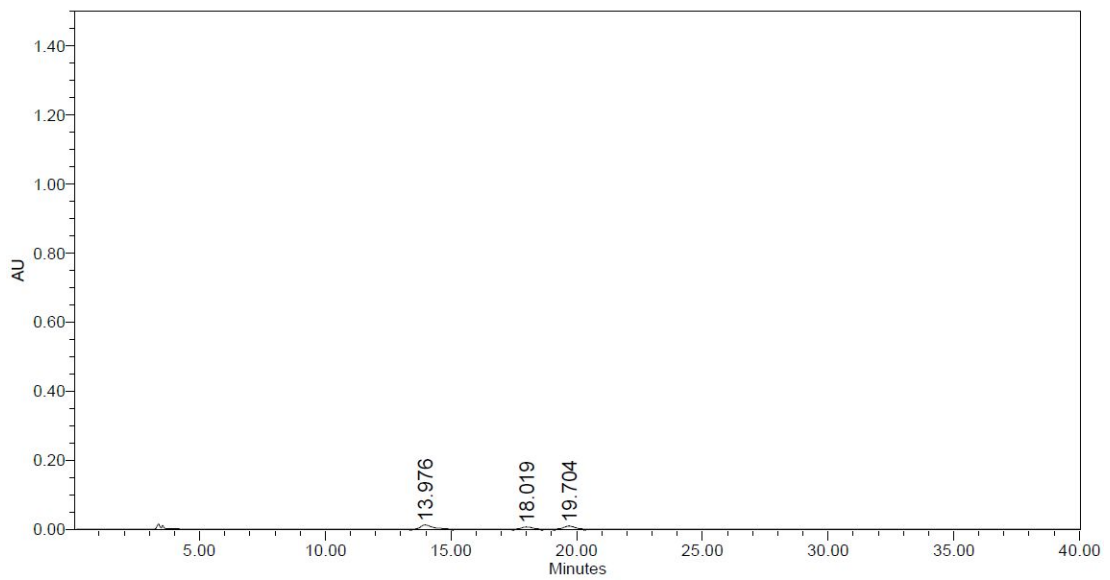


Figure 9. HPLC chromatogram of 100% ethanol from *S. chinensis*.

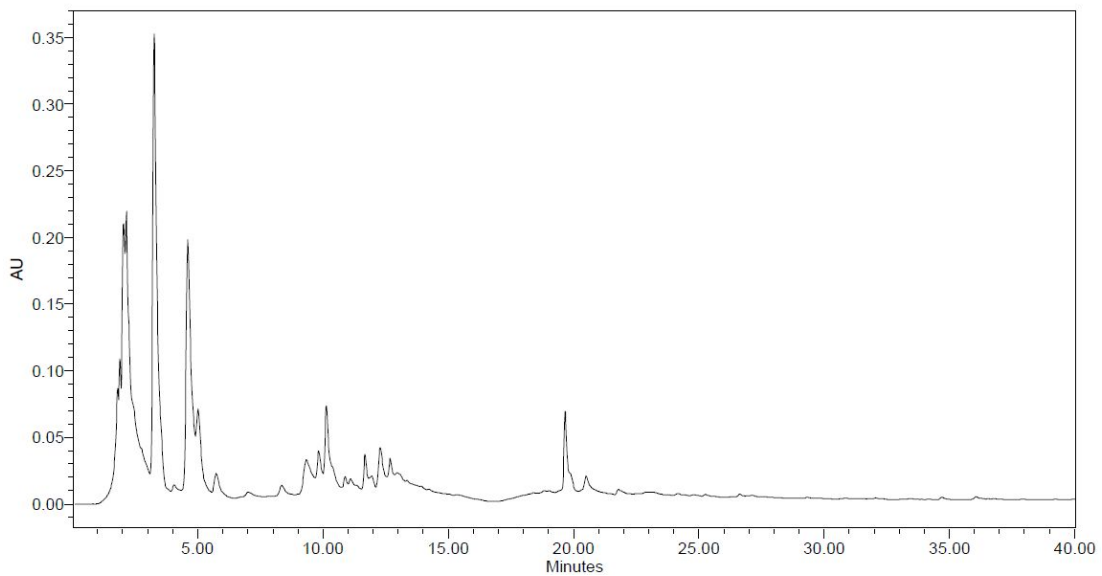


Figure 10. HPLC chromatogram of 0% aq. ethanol from *G. pentaphyllum*.

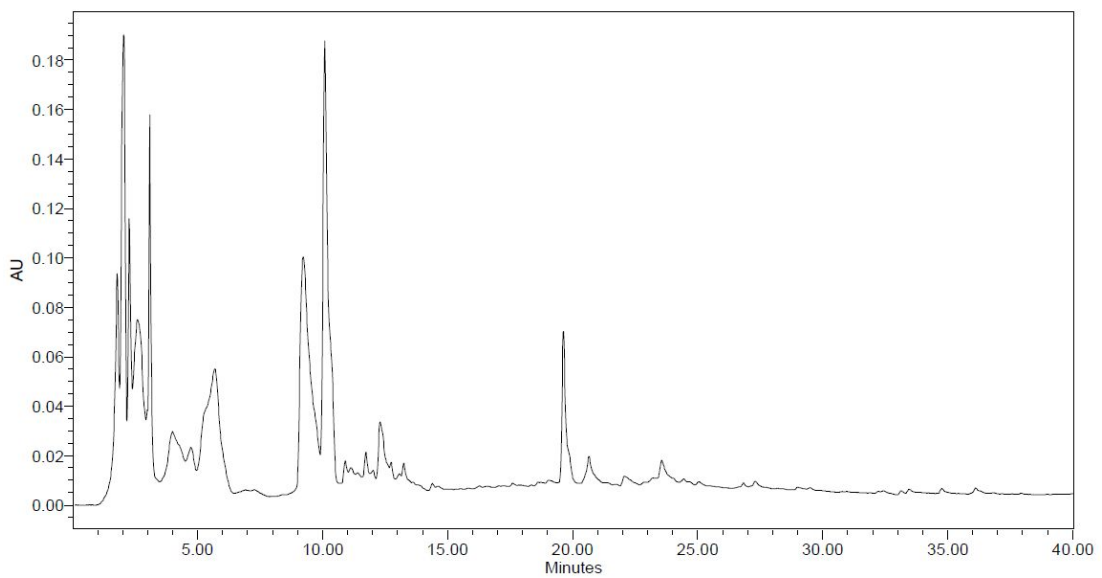


Figure 11. HPLC chromatogram of 20% aq. ethanol from *G. pentaphyllum*.

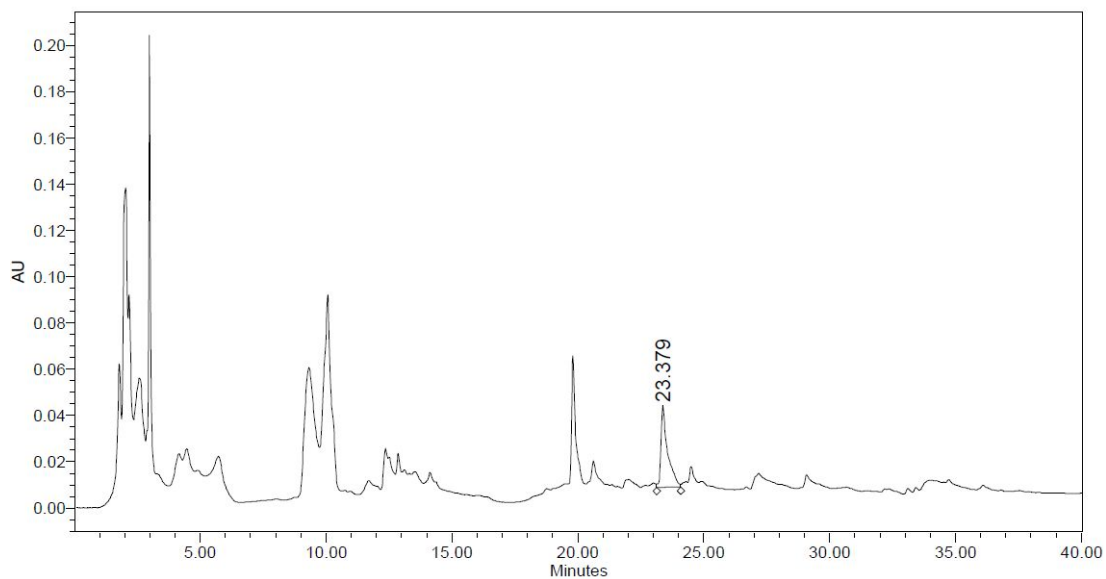


Figure 12. HPLC chromatogram of 40% aq. ethanol from *G. pentaphyllum*.

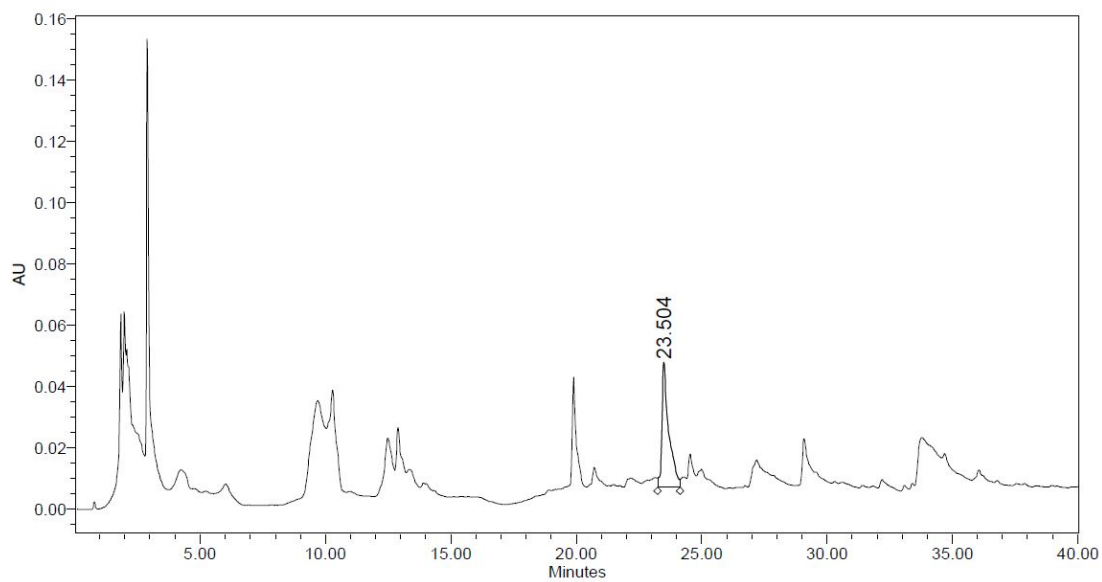


Figure 13. HPLC chromatogram of 60% aq. ethanol from *G. pentaphyllum*.

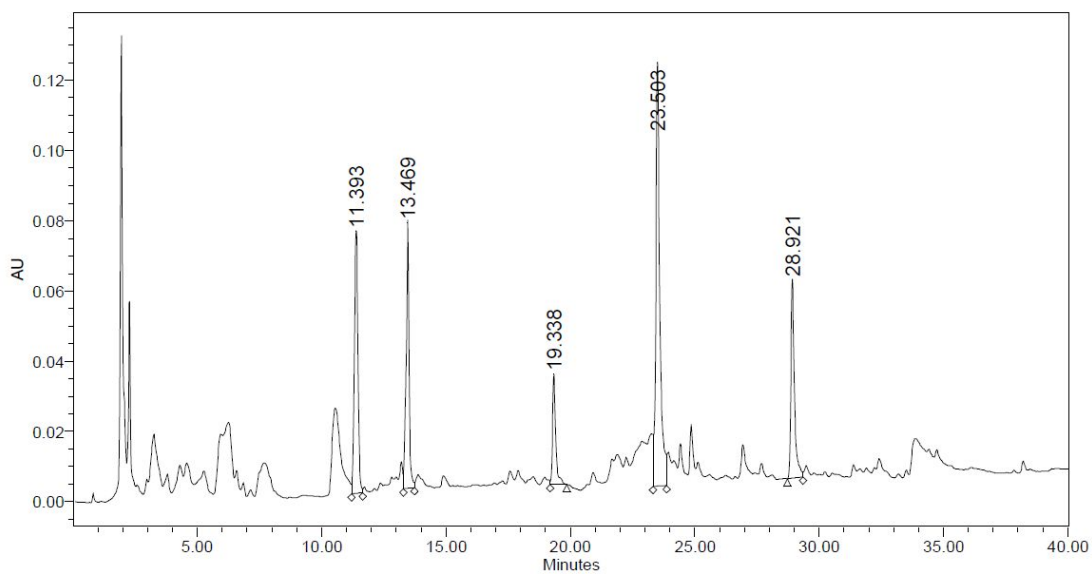


Figure 14. HPLC chromatogram of 80% aq. ethanol from *G. pentaphyllum*.

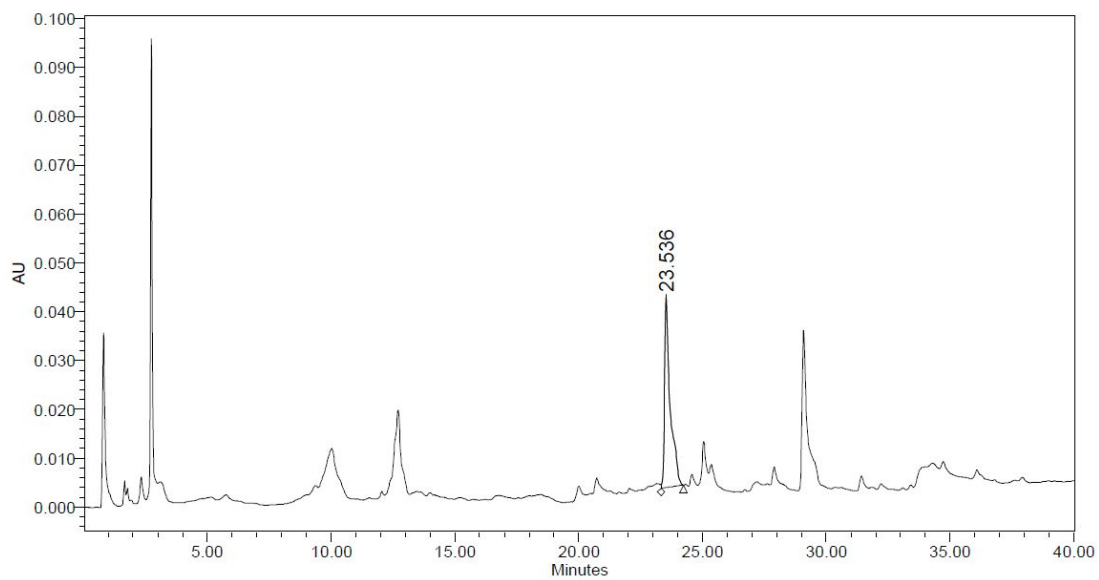


Figure 15. HPLC chromatogram of 100% ethanol from *G. pentaphyllum*.

2. 삼백초 잎에서 분리된 화합물 구조 결정.

2-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1은 ^{13}C -NMR spectrum에 의해 21개의 탄소로 구성된 화합물임을 알 수 있었으며 δ 179.7에서 carbonyl기를 포함하여 15개의 sp^2 탄소(δ 165.9~94.8) signal들이 관찰되어 compound 1은 flavonoid를 함유한 화합물일 것이라고 예상하였다.

^1H -NMR spectrum에서는 δ 7.33, 7.30, 6.90, 6.36, 6.19의 signal들이 sp^2 수소임을 예상할 수 있었으며 이들의 coupling constant(J)을 통하여 두 개의 meta coupling($J = 2.0, 2.1$ Hz)과 한 개의 ortho coupling($J = 8.2$ Hz)이 관찰되었다. 따라서 compound 1은 quercetin(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)을 함유하는 화합물일 것이라 예상을 하였다.

또한, ^1H -NMR spectrum에서는 δ 5.35~3.70에서 관찰되는 signal 및 0.94에서 관찰된 3H의 signal, δ 5.35의 anomeric proton signal(1H, d)의 존재로부터 1분자의 당이 함유된 화합물임을 알 수 있었고 문헌에 보고된 data와 비교한 결과³³⁾ quercitrin(quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside)임을 확인할 수 있었다(Figure 16, 17, 18).

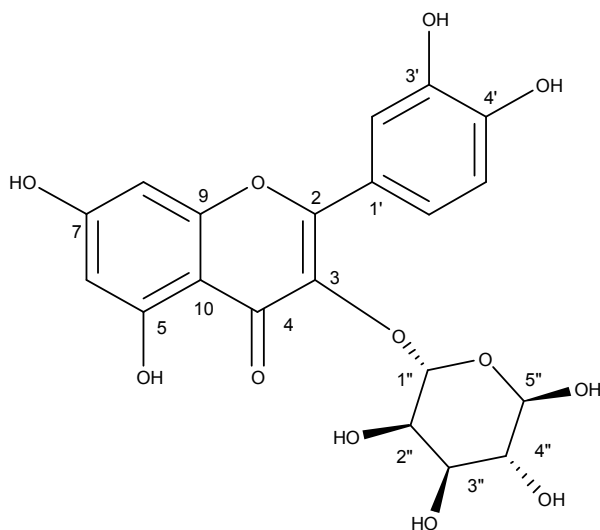


Figure 16. Chemical structure of compound 1.

Table 5. NMR spectroscopic data^a for compound **1** (400 MHz CD₃OD)

No.	compound 1	
	δ_{H} (int, multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
2		158.3
3		135.2
4		178.6
5		162.1
6	6.18 (1H, <i>d</i> , 2.1)	98.9
7		164.9
8	6.34 (1H, <i>d</i> , 2.1)	93.8
9		157.5
10		104.9
1'		122.0
2'	7.33 (1H, <i>d</i> , 2.1)	116.0
3'		145.4
4'		148.8
5'	6.91 (1H, <i>d</i> , 8.2)	115.4
6'	7.29 (1H, <i>dd</i> , 2.1, 8.2)	122.0
1''	5.34 (1H, <i>d</i> , 1.6)	102.6
2''	4.23 (1H, <i>dd</i> , 1.6, 3.1)	72.2
3''	3.76 (1H, <i>dd</i> , 3.2, 9.3)	72.1
4''	3.40 ~ 3.45 (1H, <i>m</i>)	72.3
5''	3.36 ~ 3.40 (1H, <i>m</i>)	70.9
6''	0.94 (3H, <i>d</i> , 6.2)	16.7

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

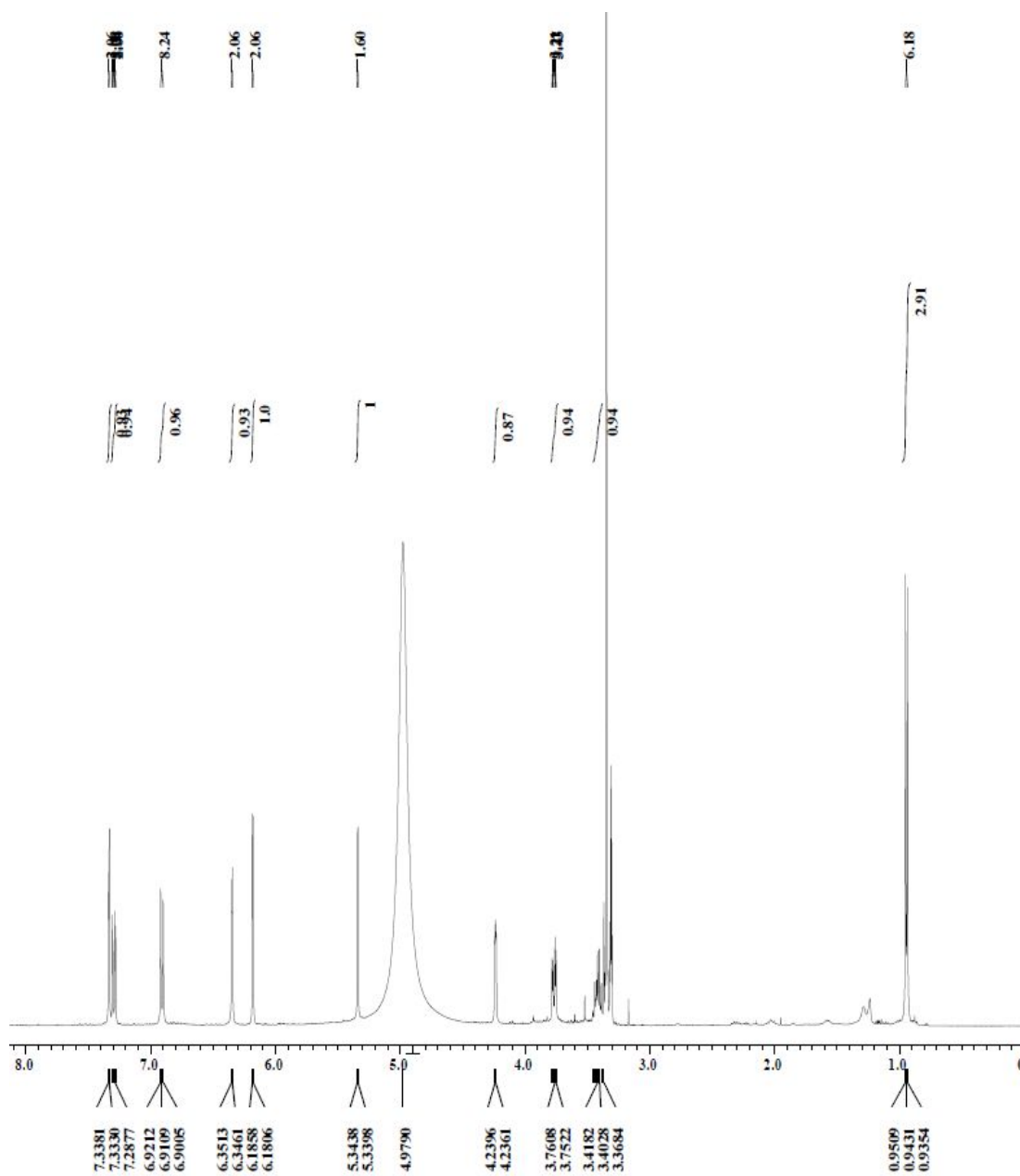


Figure 17. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **1** in CD_3OD

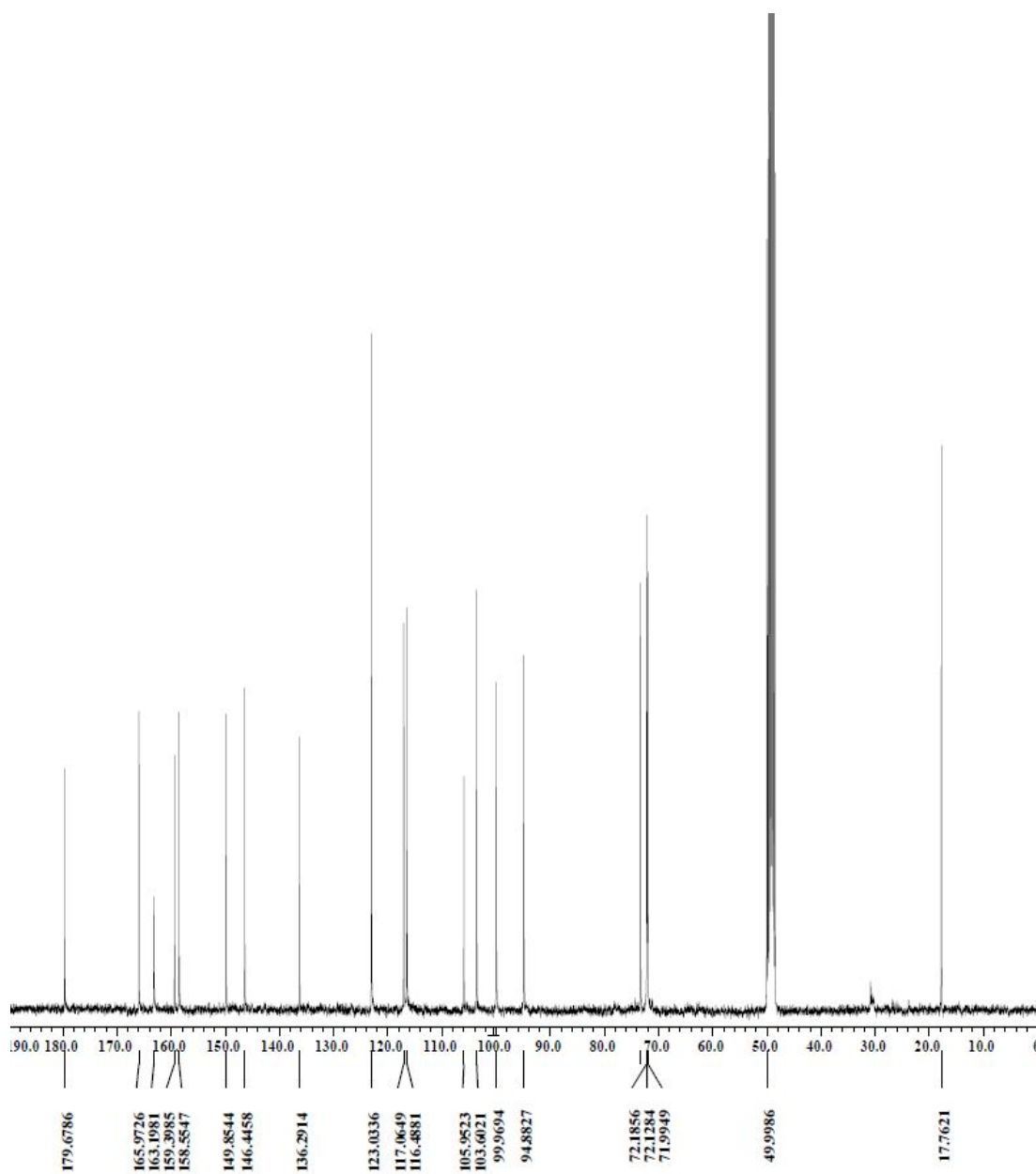


Figure 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD

2-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2의 구조를 확인하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 aromatic field의 signal이 관찰되는 영역인 δ 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)에서 phloroglucinol A-ring의 전형적인 meta coupling하는 proton signal이 관찰되었으며 δ 7.67 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.53 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz), 6.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)에서 B-ring에 기인하는 signal로 meta coupling과 ortho coupling하고 있음을 coupling constant(J)로 확인하였다. 이러한 결과로 B-ring이 catechol 구조임을 확인 할 수 있었고, C-ring과 관련된 proton signal은 관찰되지 않아 flavonol 계열 화합물로 예상하였다.

한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석에서는 δ 136.3과 147.9의 signal은 각각 C-3과 C-2로 flavonol 화합물의 특징이다. δ 147.7과 145.3은 B-ring의 C-4'과 C-3'로 hydroxyl group이 결합되어 있는 catechol 구조임을 알 수 있었다. A-ring의 C-8과 C-6은 각각 δ 93.5과 98.3에서 나타나며, hydroxyl group이 결합된 C-5, C-7과 C-9는 각각 δ 157.3, 164.7과 161.6에서 나타남으로써 전형적인 phloroglucinol A-ring으로 구성되어 있음을 알 수 있다.

문헌에 보고된 data와 비교한 결과³⁴⁾ compound 2는 quercetin으로 동정하였다(Figure 19, 20, 21).

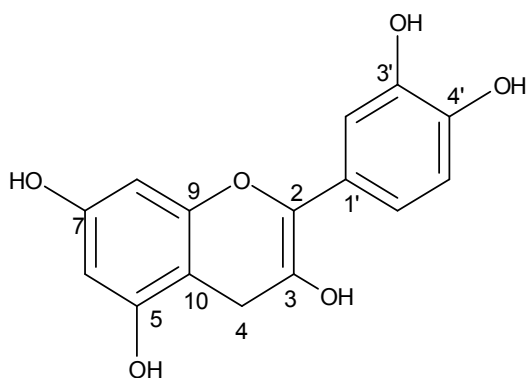


Figure 19. Chemical structure of compound 2.

Table 6. NMR spectroscopic data^a for compound **2** (400 MHz CD₃OD)

No.	compound 2	
	δ_{H} (int, multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
2		147.9
3		136.3
4		176.4
5		157.3
6	6.17 (1H, <i>d</i> , 2.1)	98.3
7		164.7
8	6.38 (1H, <i>d</i> , 2.1)	93.5
9		161.6
10		103.6
1'		123.2
2'	7.73 (1H, <i>d</i> , 2.3)	115.1
3'		145.3
4'		147.7
5'	7.53 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 2.3)	115.3
6'	6.88 (1H, <i>d</i> , 8.5)	120.8

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

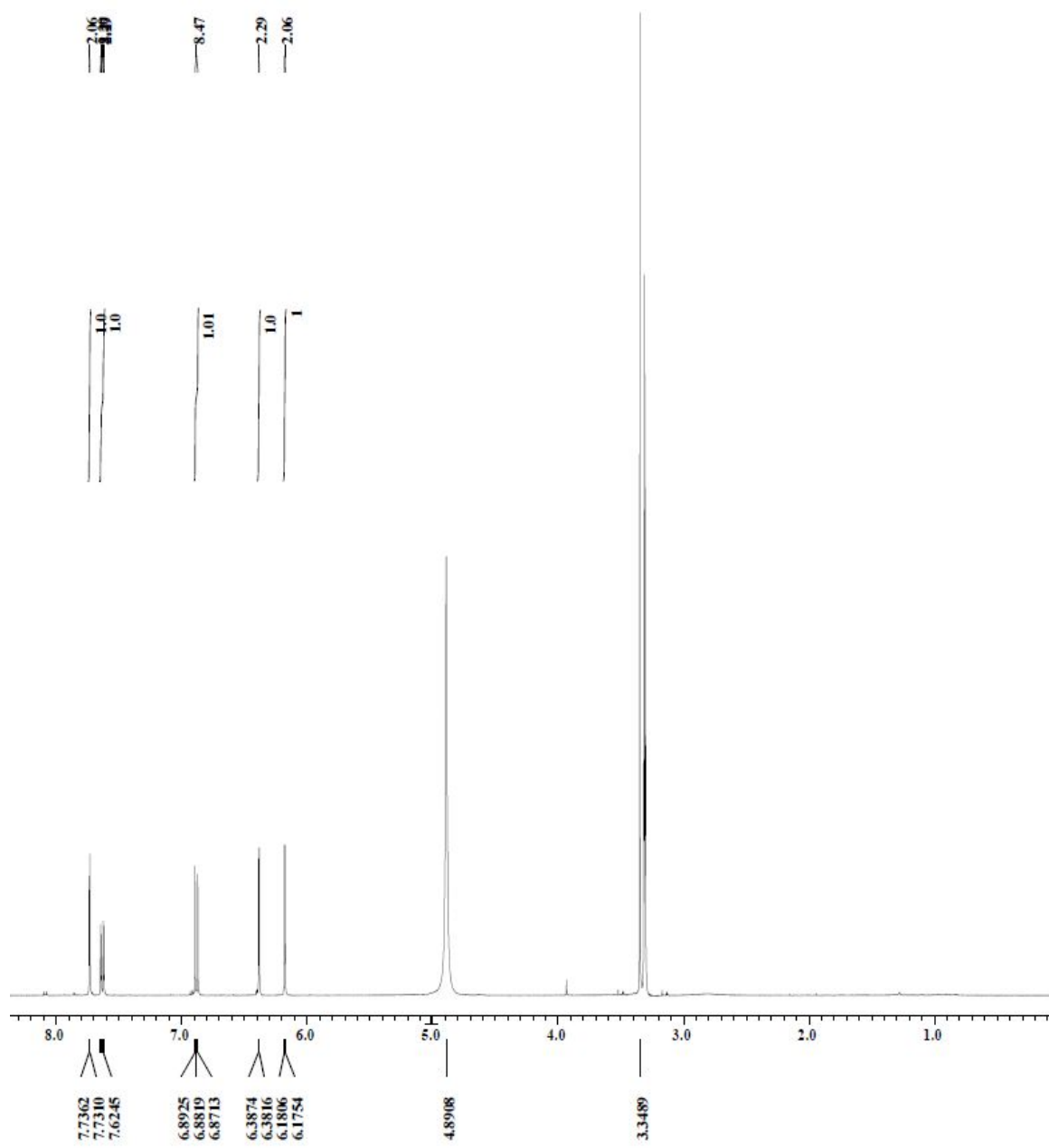


Figure 20. ¹H-NMR spectrum of compound **2** in CD₃OD

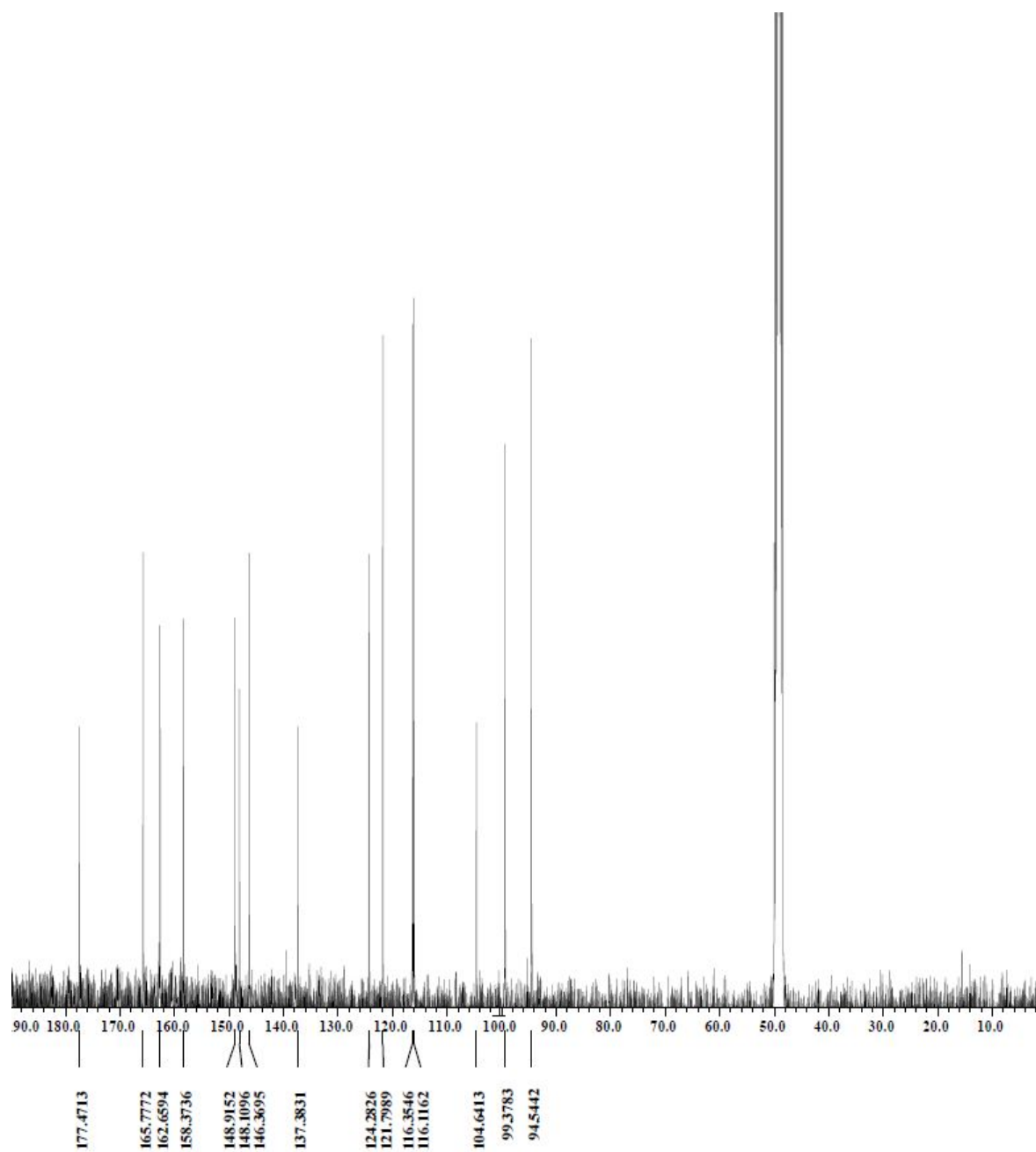


Figure 21. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD

2-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR을 측정하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 100~160 영역의 carbon signal과 ^1H -NMR spectrum에서 δ 5.85~6.83에서의 signal에 의해 aromatic ring이 있음을 알 수 있었으며, 1개의 methylene 수소가 관측되었다. 또한 δ 6.83 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.71 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$ Hz), 5.92 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 5.85 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)에서 coupling constant(J)로 보아 2개는 *ortho* coupling, 3개는 *meta* coupling을 하는 것으로 관측되었으며, ^{13}C -NMR spectrum으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것으로 보아 이는 전형적인 flavonoid임을 알 수 있었다. 이들 ^1H , ^{13}C -NMR data를 문헌과 비교한 결과³⁵⁾ compound 3은 catechin임을 알 수 있었다(Figure 22, 23, 24).

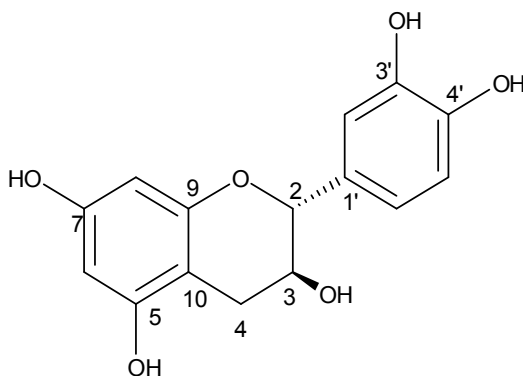


Figure 22. Chemical structure of compound 3.

Table 7. NMR spectroscopic data^a for compound **3** (400 MHz CD₃OD)

No.	Compound 3	
	δ_{H} (int, mult, <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2	4.56 (1H, d, 7.3)	83.0
3	3.97 (1H, ddd, 6.7, 6.7, 5.4)	68.9
4	2.84 (1H, dd, 16.1, 5.3)	28.6
	2.50 (1H, dd, 16.1, 8.0)	
5		157.7
6	5.85 (1H, d, 2.2)	96.4
7		157.0
8	5.92 (1H, d, 2.2)	95.6
9		157.9
10		100.9
1'		132.3
2'	6.83 (1H, d, 1.8)	115.4
3'		146.3
4'		146.3
5'	6.77 (1H, d, 8.1)	116.2
6'	6.71 (1H, dd, 8.1, 2.0)	120.1

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

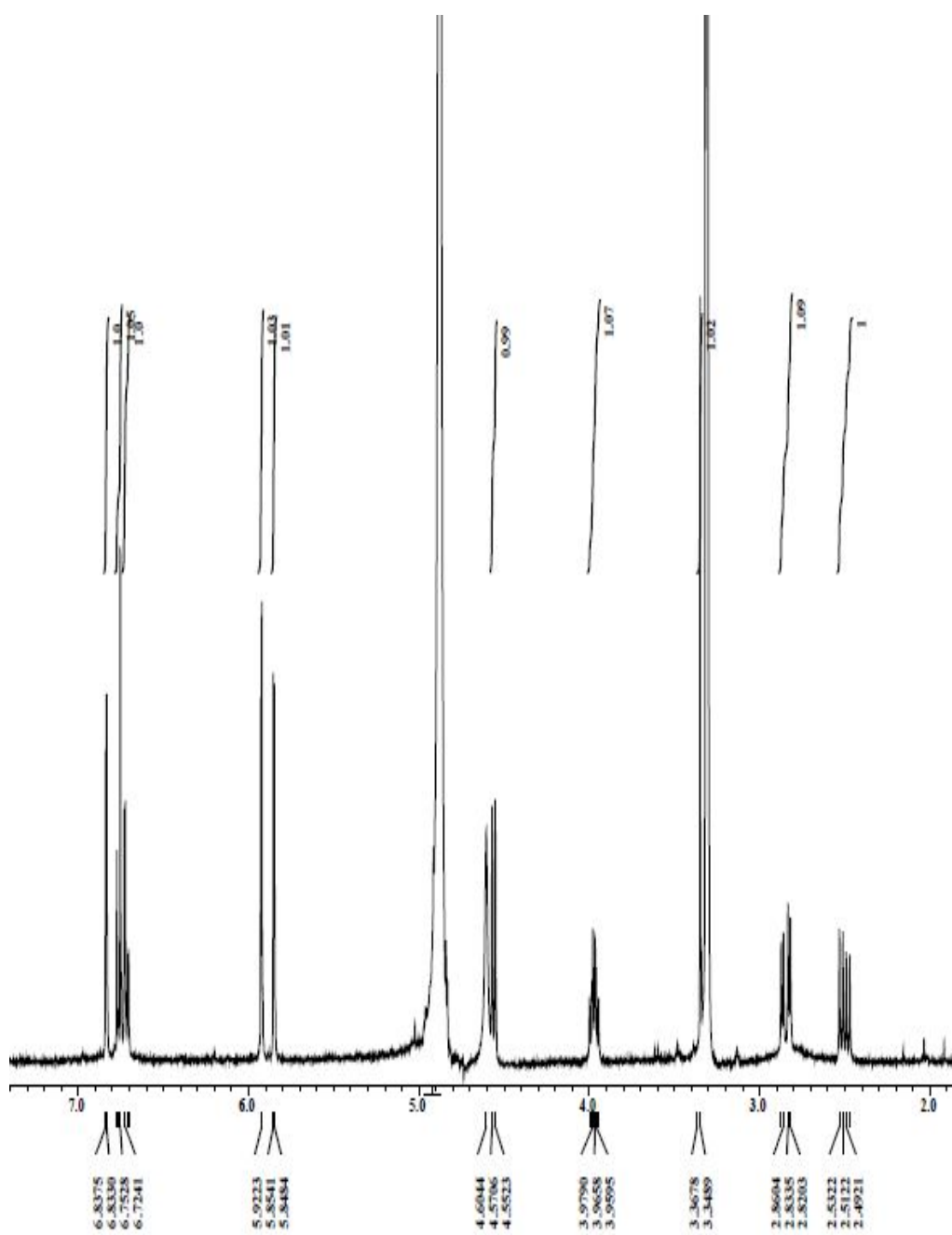


Figure 23. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **3** in CD_3OD

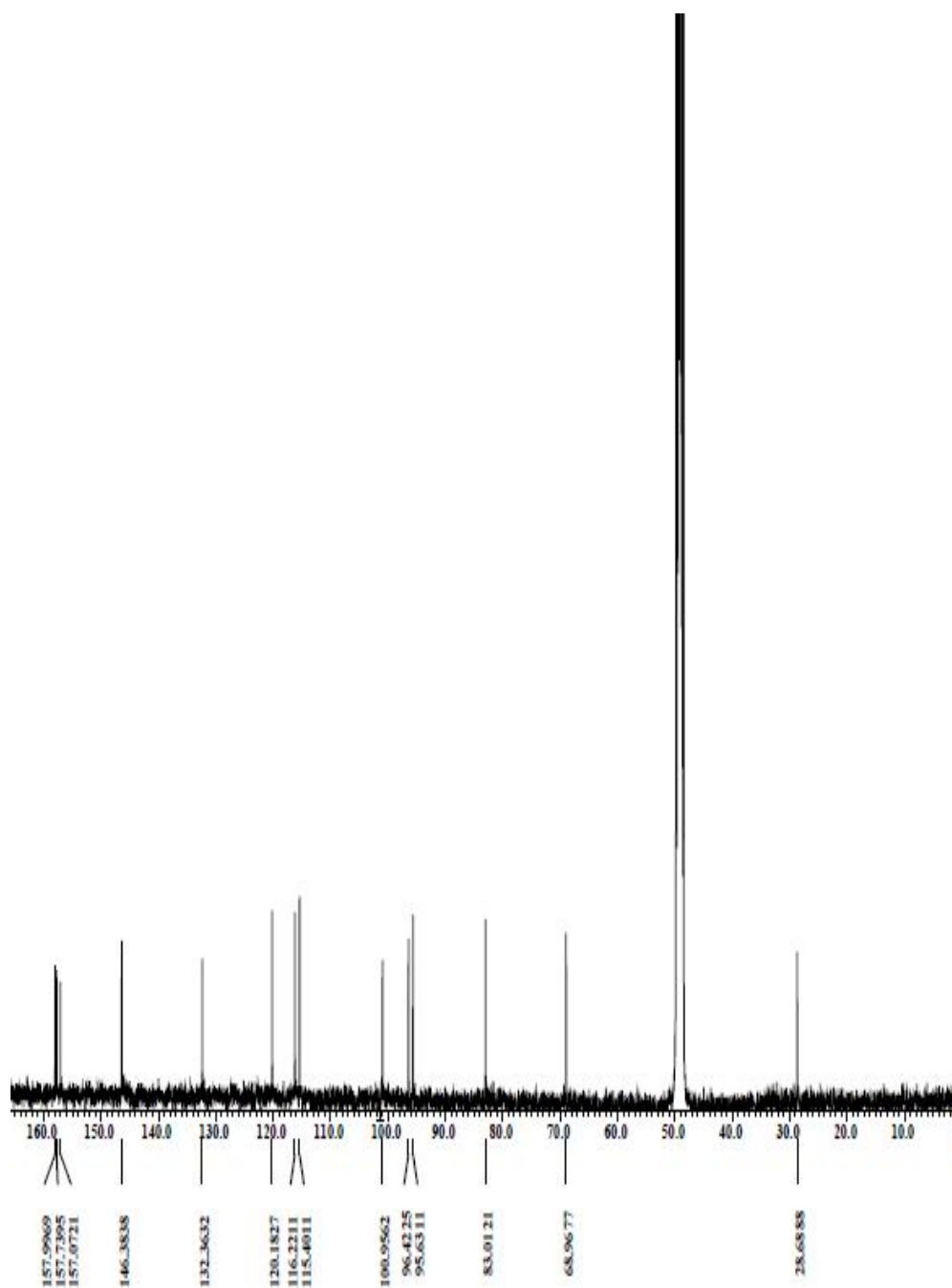


Figure 24. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

2-4. Compound 4의 구조해석

Compound 4의 구조를 확인하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 갈라짐이 singlet으로 나타나는 methyl signal이 각각 δ 1.03 (3H, s), 1.04 (3H, s), 1.92 (3H, s)에서 3개가 관찰되었으며, δ 1.92에서 나타난 methyl peak의 경우 down field shift하는 양상을 보이는 것으로 보아 allylic methyl signal로 예상하였다. 또한 doublet으로 갈라짐 양상을 나타내는 methyl signal이 δ 1.28 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)에서 확인되었다. Geminal coupling을 하는 것으로 보이는 methylene signal이 δ 2.16 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 2.54 (1H, d, $J = 17.0$ Hz)에서 관찰되었다. δ 4.53에서는 ^1H 의 multiplet처럼 보이는 methine signal이 관찰되었고, δ 5.85 (1H, dd, $J = 6.8, 15.8$ Hz), 5.87 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)에서는 trans 이중결합의 olefinic proton으로 예상되는 signal이 관찰되었다. 또한 δ 5.86 (1H, s)에서도 olefinic proton으로 예상되는 signal이 관찰되었다. 이외에도 anomeric proton으로 미루어 보아 β form으로 예상되는 당 signal이 각각 δ 3.16 (1H, m), 3.21 (1H, m), 3.24 (1H, m), 3.26 (1H, m), 3.64 (1H, dd, $J = 5.0, 11.6$ Hz), 3.86 (1H, dd, $J = 2.0, 11.6$ Hz), 4.35 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)에서 관찰되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 19개의 carbon peak가 관찰되었으며, ketone으로 예상되는 carbonyl peak가 δ 201.3에서 확인되었으며, olefinic carbon이 각각 δ 167.4, 135.4, 131.6, 127.3에서 관찰되었다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 δ 80.1, 77.4에서 oxygenated carbon signal 2개를 확인 할 수 있었는데, 이중 하나는 당과 인접한 carbon으로 확인되었다. 또한 δ 102.8에서 anomeric carbon 및 78.3, 78.2, 75.4, 71.8, 62.9에서 당의 carbon peak를 확인 할 수 있었다.

이상을 바탕으로 종합하여 볼 때 이 화합물은 norsesquiterpene의 iononol 타입이라 예상되었으며, HMBC correlation을 통해 (6S,9S)-roseoside으로 확인 되었고 문헌의 NMR 데이터와도³⁶⁾ 일치함을 확인하였다(Figure 25~30).

Table 8. NMR spectroscopic data^a for compound **4** (400 MHz CD₃OD)

No.	Compound 4	
	δ_{H} (int, mult, <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1		42.5
2	2.16 (1H, d, 17.0)	50.9
	2.54 (1H, d, 17.0)	
3		201.3
4	5.86 (1H, s)	127.3
5		167.4
6		80.1
7	5.87 (1H, d, 15.8)	131.6
8	5.85 (1H, dd, 6.8, 15.8)	135.4
9	4.53 (1H, m)	77.4
10	1.28 (3H, d, 6.4)	23.5
11	1.04 (3H, s)	24.8
12	1.03 (3H, s)	21.3
13	1.92 (3H, s)	19.7
1'	4.35 (1H, d, 7.8)	102.8
2'	3.16 (1H, m)	75.4
3'	3.21 (1H, m)	78.2
4'	3.24 (1H, m)	71.8
5'	3.26 (1H, m)	78.3
6'	3.64 (1H, dd, 5.0, 11.6)	62.9
	3.86 (1H, dd, 2.0, 11.6)	

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

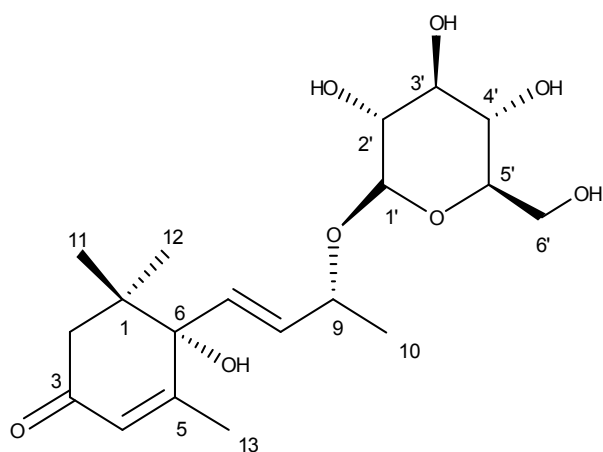


Figure 25. Chemical structure of compound 4.

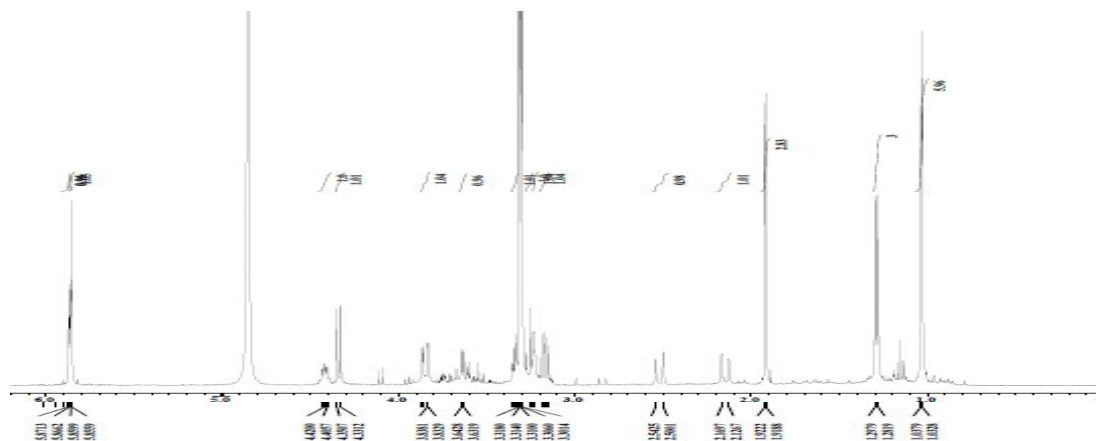


Figure 26. ^1H -NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD

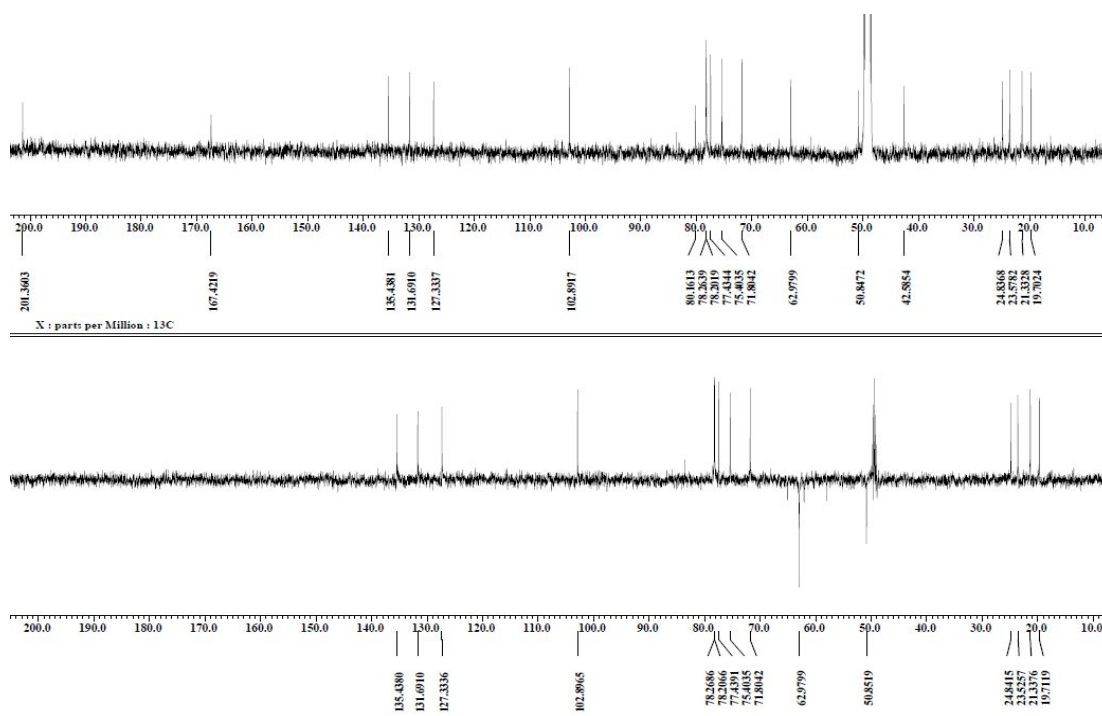


Figure 27. ¹³C-NMR & 135° DEPT-NMR spectra of compound 4 in CD₃OD

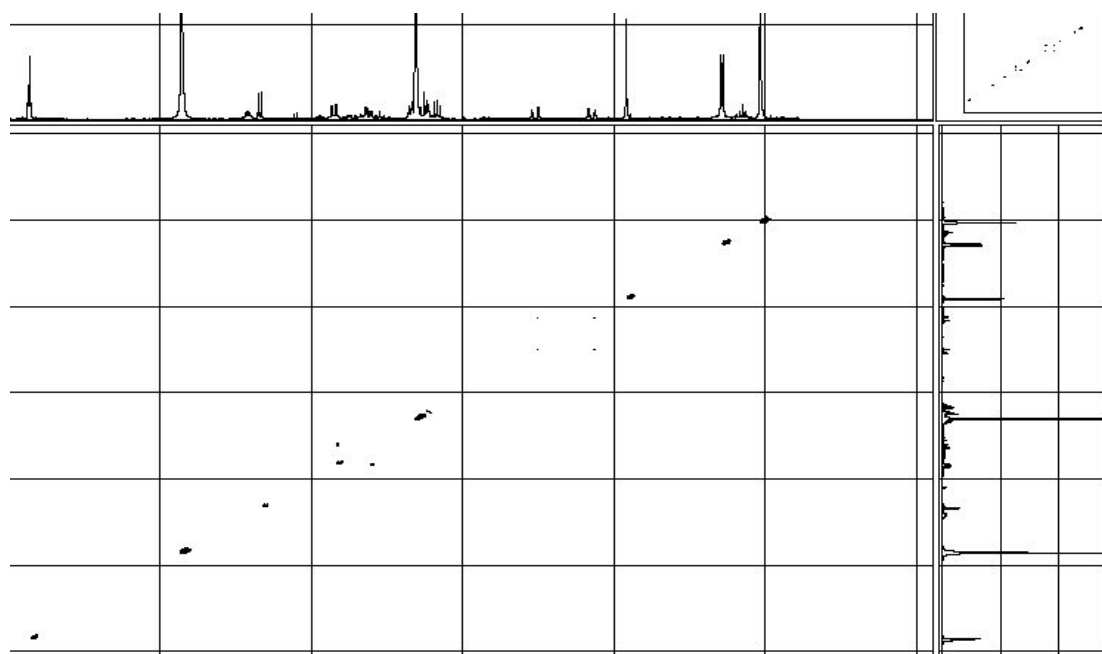


Figure 28. ¹H-¹H COSY NMR spectrum of compound 4 in CD₃OD.

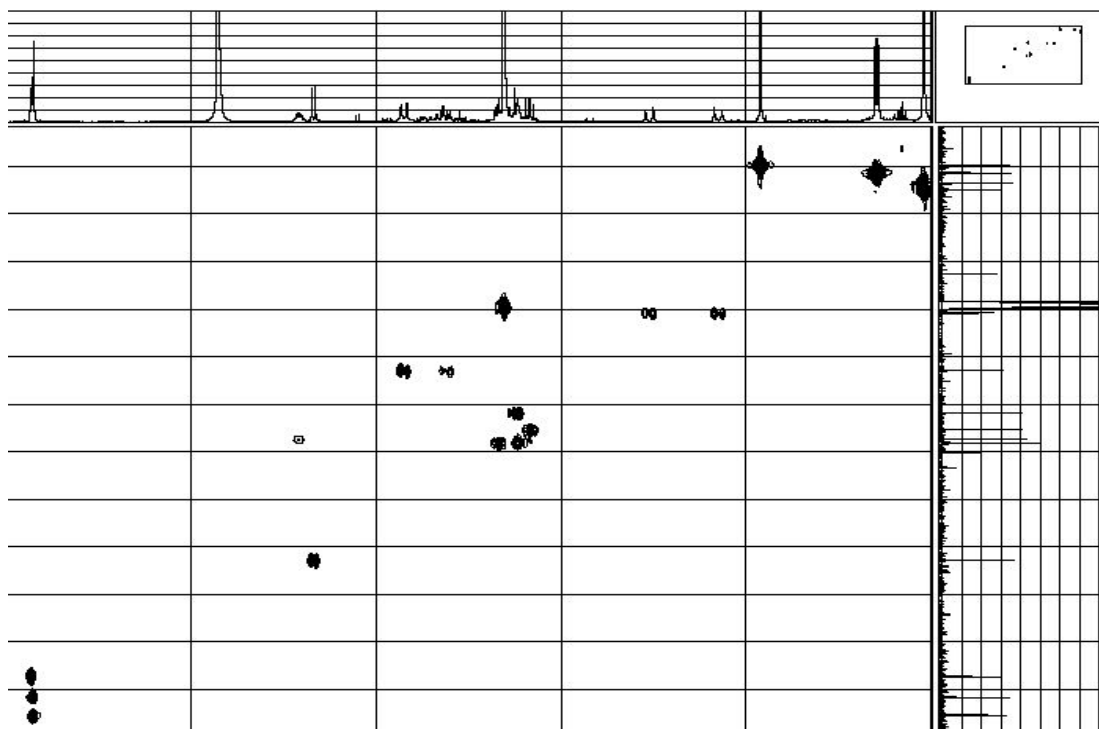


Figure 29. HMBC NMR spectrum of compound 4 in CD₃OD.

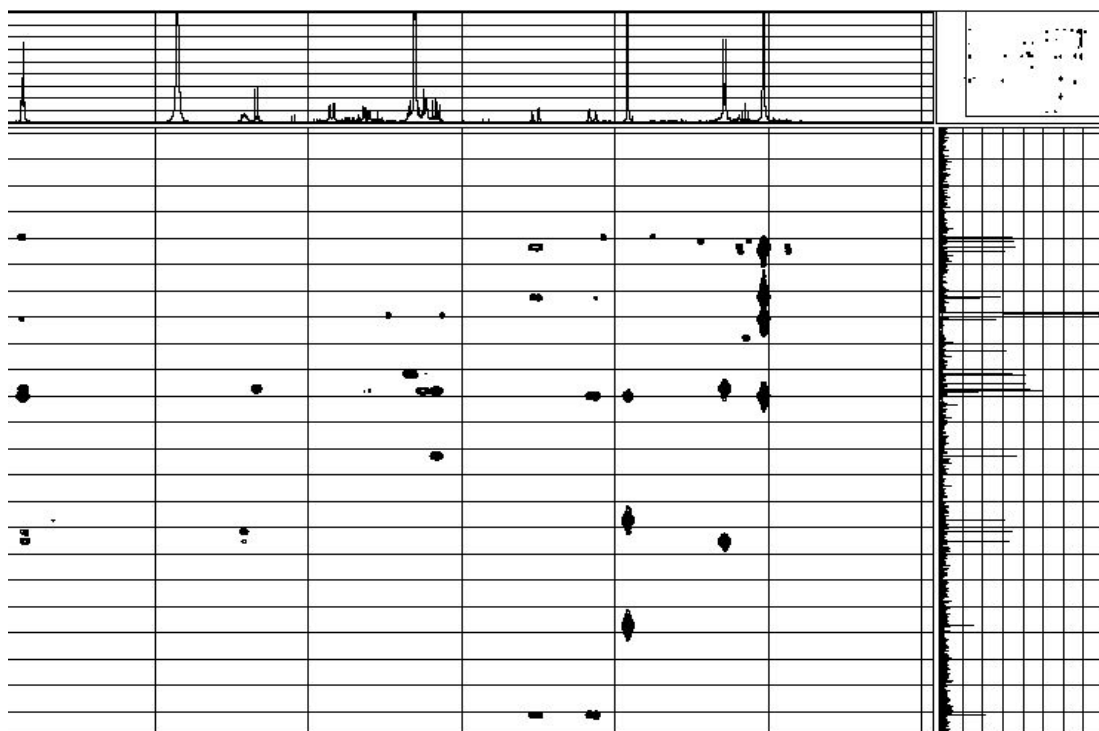


Figure 30. HMBC NMR spectrum of compound 4 in CD₃OD.

2-5. Compound 5의 구조해석

Compound 5는 ^{13}C -NMR spectrum에 의해 22개의 탄소로 구성된 화합물임을 알 수 있었으며 δ 177.5에서 carbonyl기를 포함하여 15개의 sp^2 탄소(δ 164.4~93.7) signal들이 관찰되어 compound 5는 flavonoid를 함유한 화합물일 것이라고 예상하였다.

^1H -NMR spectrum에서는 δ 7.38, 6.82, 6.40, 6.20, 5.58의 signal들이 sp^2 수소임을 예상할 수 있었으며 이들의 coupling constant(J)을 통하여 두 개의 meta coupling($J = 2.0, 2.0$ Hz)과 한 개의 ortho coupling($J = 8.4$ Hz)이 관찰되었다. 따라서 compound 5는 quercetin(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)을 함유하는 화합물일 것이라 예상을 하였다.

또한, ^1H -NMR spectrum에서는 δ 3.44~3.25에서 관찰되는 signal 및 3.16에서 관찰된 3H의 methoxy signal, δ 5.29의 anomeric proton signal(1H, d)과 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 171.3의 carbonyl기 존재로부터 1분자의 당에 ester가 함유된 화합물임을 알 수 있었고 문헌에 보고된 data와 비교한 결과³⁷⁾ quercetin 3- O - β -D-glucuronide-6"-methyl ester임을 확인할 수 있었다 (Figure 31, 32, 33).

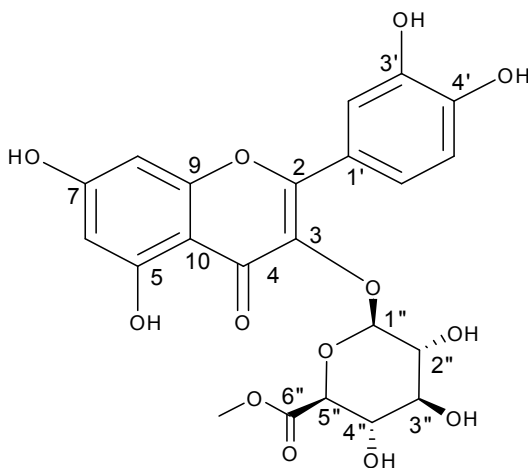


Figure 31. Chemical structure of compound 5.

Table 9. NMR spectroscopic data^a for compound **5** (400 MHz, DMSO-*d*₆).

No.	Compound 5	
	δ_{H} (int, mult, <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2		157.3
3		133.8
4		177.5
5		161.0
6	6.20 (1H, d, 2.0 Hz)	98.8
7		164.4
8	6.40 (1H, d, 2.0 Hz)	93.7
9		156.4
10		103.7
1'		120.5
2'	5.58 (1H, d, 2.0 Hz)	117.6
3'		144.8
4'		148.9
5'	6.82 (1H, d, 8.4 Hz)	115.3
6'	7.38 (1H, dd, 1.8, 8.4 Hz)	120.7
1''	5.29 (1H, d, 6.6 Hz)	102.5
2''		71.6
3''		74.1
4''		74.5
5''		76.4
6''		171.3
-OCH ₃	3.16 (3H, s)	52.1

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

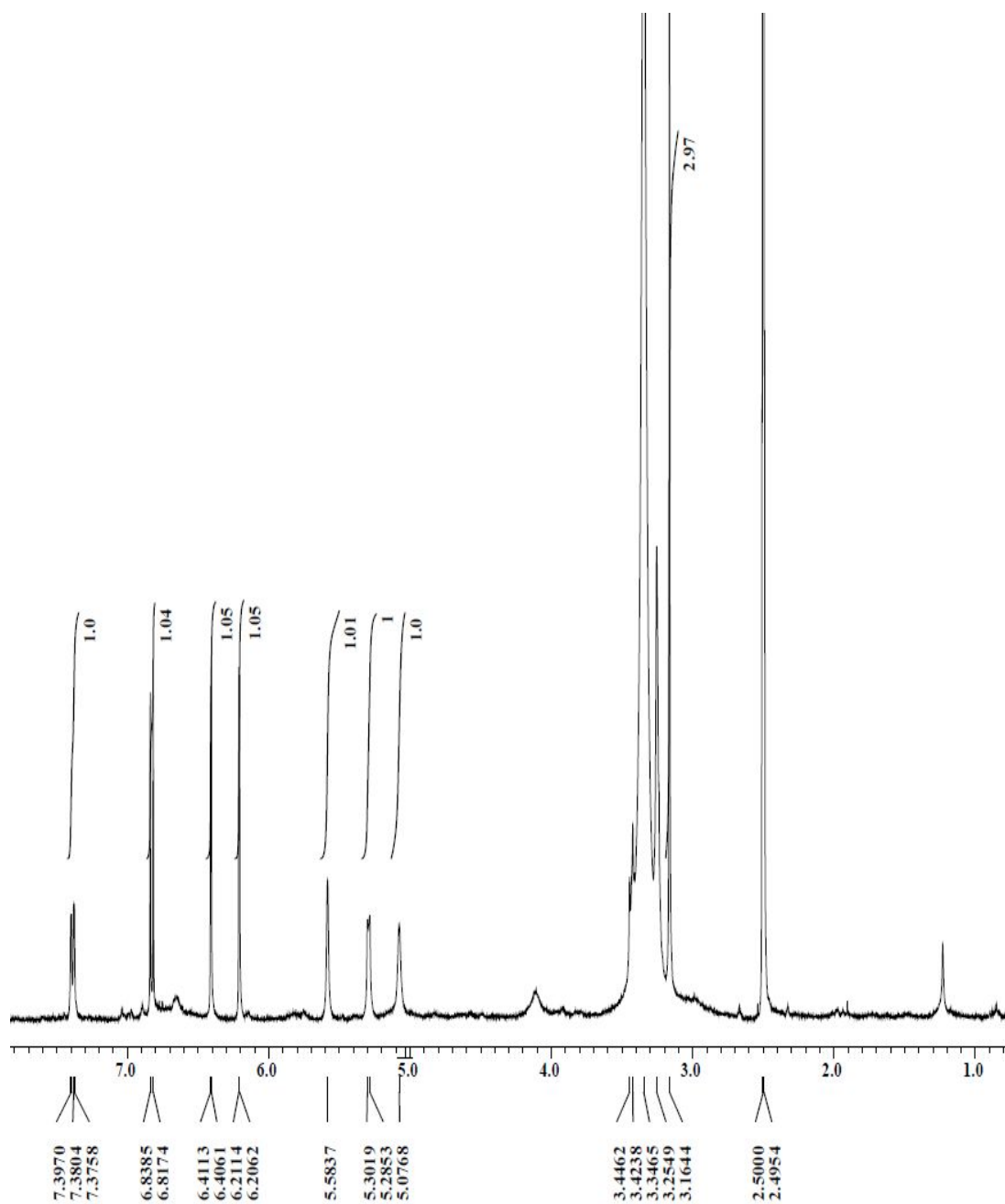


Figure 32. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **5** in $\text{DMSO-}d_6$

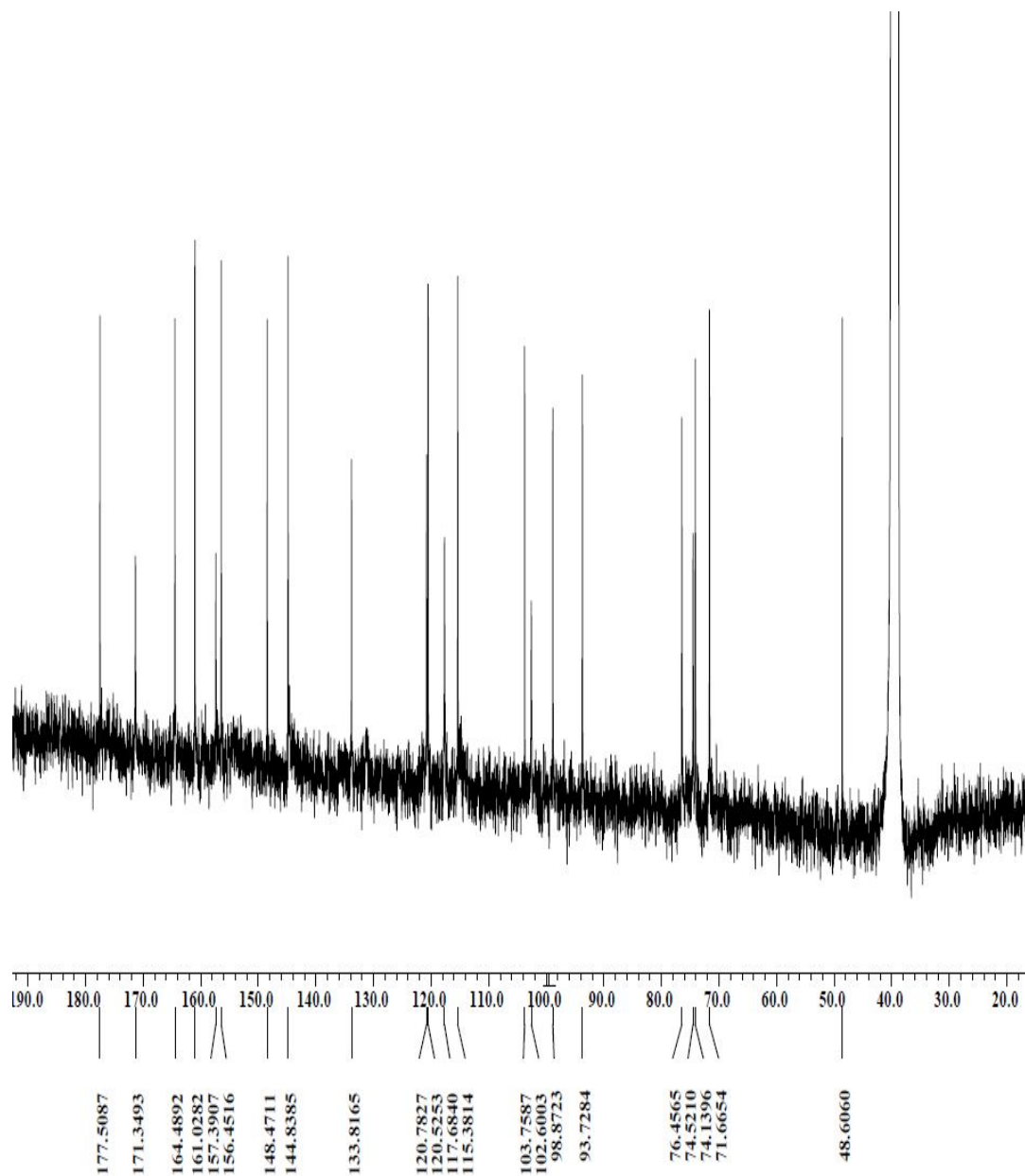


Figure 33. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 in $\text{DMSO}-d_6$

3. 돌외에서 분리된 화합물 구조 결정.

3-1. Compound 6의 구조해석

Compound 6는 ^{13}C -NMR spectrum에 의해 29개의 탄소로 구성된 화합물임을 알 수 있었으며 δ 179.7에서 carbonyl기를 포함하고 15개의 sp^2 탄소(δ 177.5~92.2) signal들이 관찰되어 compound 6는 flavonoid를 함유한 화합물일 것이라고 예상하였다.

^1H -NMR spectrum에서는 δ 55.6, 56.0에서 나타난 methyl peak의 경우 down field shift하는 양상을 보이는 것으로 보아 전기음성도가 큰 산소와 결합된 methoxy group를 확인하였다. δ 7.72, 7.55, 7.24, 6.69, 6.37의 signal들이 sp^2 수소임을 예상할 수 있었으며 이들의 coupling constant(J)을 통하여 두 개의 meta coupling($J = 2.0, 2.0$ Hz)과 한 개의 ortho coupling($J = 8.5$ Hz)이 관찰되었다.

또한, ^1H -NMR spectrum에서는 δ 5.38 (1H, d, $J = 7.3$ Hz)과 4.39 (1H, d, $J = 0.9$ Hz)에서 glucose와 rhamnose의 anomeric proton signal이 관찰되었으며, δ 0.97 (3H, d, $J = 6.18$ Hz)은 rhamnose의 angular methyl로 추정되는 peak가 관찰되었다.

^{13}C -NMR spectrum에서도 δ 101.1, 100.7에서 2개의 anomeric carbon signal로 추정되는 peak가 관찰되어 2분자의 당이 결합되어 있음을 확인 할 수 있었다. 또한, methoxy group의 위치를 확인하기 위해 HMBC correlation을 측정하여 ombuine 3-*O*-Rutinoside으로 확인 되었고 문헌의 NMR 데이터와도³⁸⁾ 일치하였다(Figure 34, 35, 36).

Table 10. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **6** (400 and 100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

No.	Compound 6	
	δ_{H} (int, mult, J Hz)	δ_{C}
2		156.4
3		133.8
4		177.5
5		160.9
6	6.37 (1H, d, 2.0 Hz)	97.9
7		165.1
8	6.69 (1H, d, 2.0 Hz)	92.2
9		156.7
10		105.0
1'		121.4
2'	7.55 (1H, d, 2.0 Hz)	111.3
3'		145.9
4'		150.1
5'	7.04 (1H, d, 8.5 Hz)	115.7
6'	7.72 (1H, dd, 2.0, 8.5 Hz)	122.4
1''	5.38 (1H, d, 7.3 Hz)	101.1
2''		74.0
3''		76.3
4''		69.8
5''		75.8
6''		66.8
1'''	4.39 (1H, d, 0.9 Hz)	100.8
2'''		70.3
3'''		70.5
4'''		71.8
5'''		68.2
6'''	0.97 (3H, d, 6.1 Hz)	17.7
-OCH ₃		56.0
-OCH ₃	3.87 (6H, s)	55.6

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

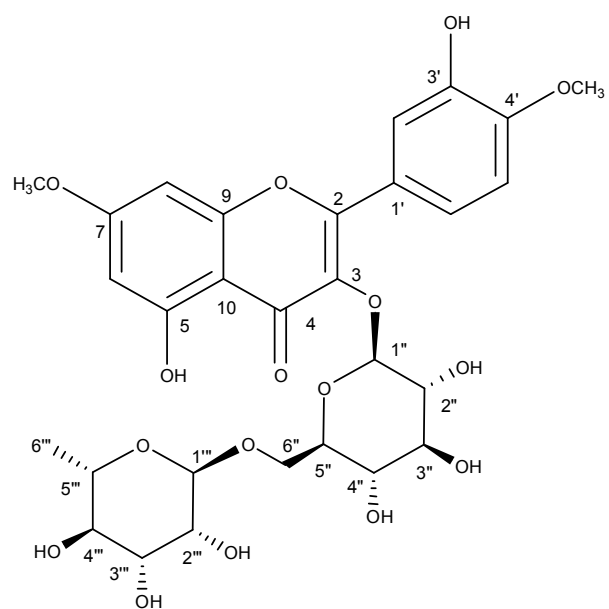


Figure 34. Chemical structure of compound 6.

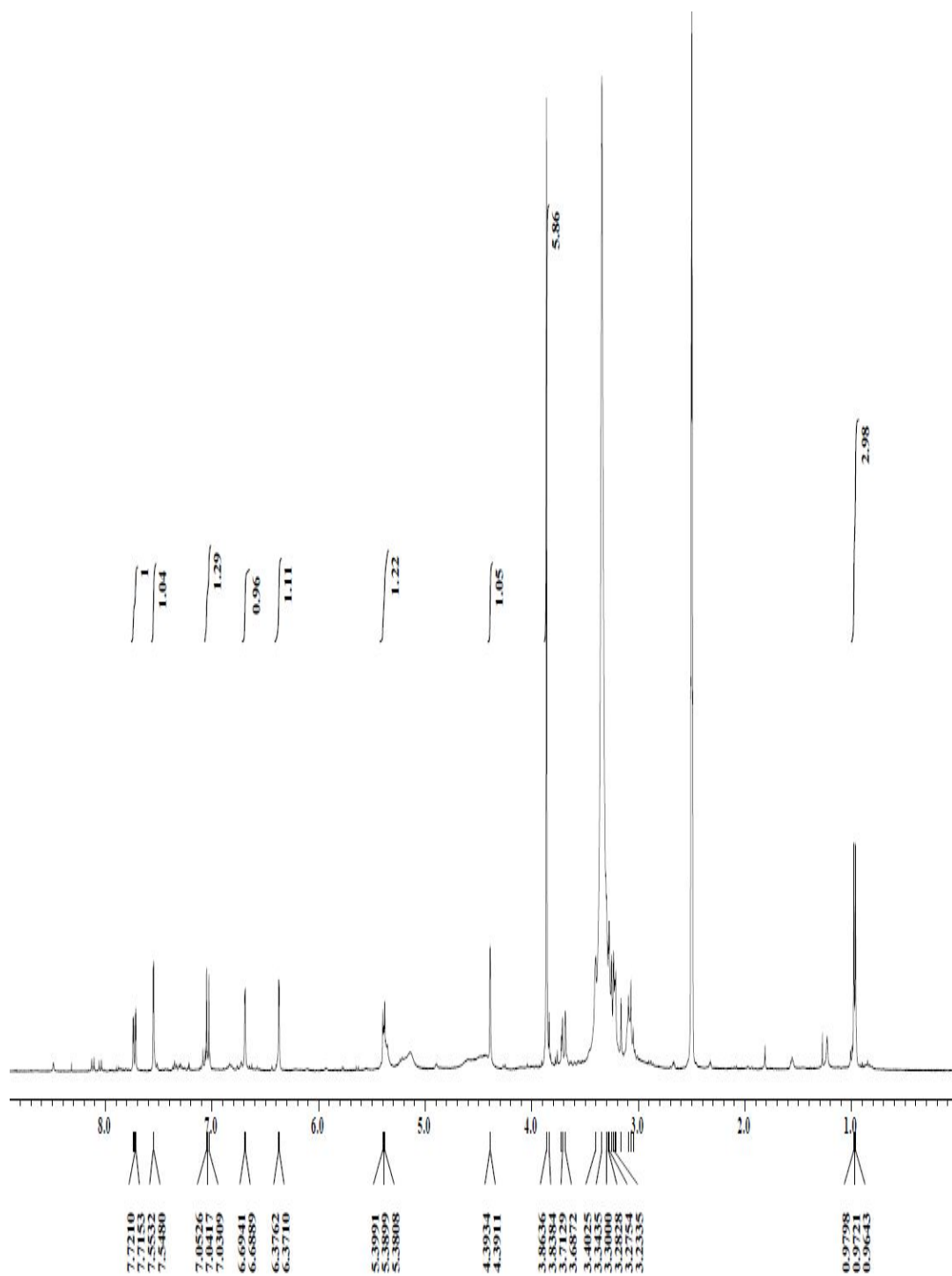


Figure 35. ^1H -NMR spectrum of compound **6** in $\text{DMSO}-d_6$

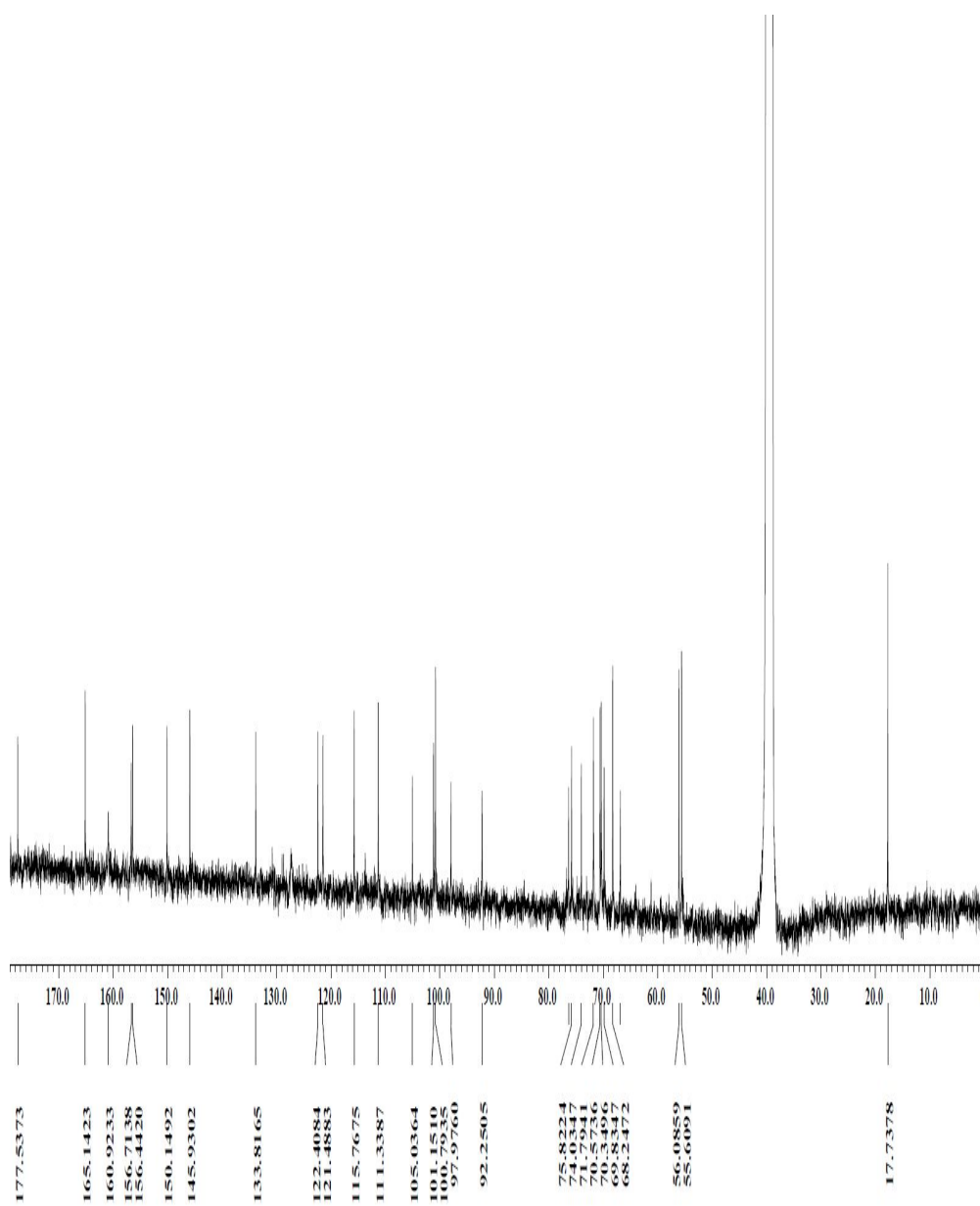


Figure 36. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in $\text{DMSO}-d_6$

4. 항산화 활성 실험 결과

4-1. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀계 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합을 하는 성질을 가지며 항암 및 항산화 효과와 같은 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.³⁹⁾

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 37)을 작성하여 삼백초와 들의 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 100 mg 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; Gallic acid equivalents)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 삼백초 추출 조건 중 40% 에탄올 추출물에서 30.3 mg GAE/100 mg, 분획물 중 EtOAc 및 BuOH layer에서 각각 49.2, 32.9 mg GAE/100 mg으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 38, 39). 또한 들의 추출 조건 중 80% 에탄올 추출물에서 19.2 mg GAE/100 mg, 분획물 중 EtOAc layer에서 22.9 mg GAE/100 mg으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 40, 41). 이는 다른 항산화 실험결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.

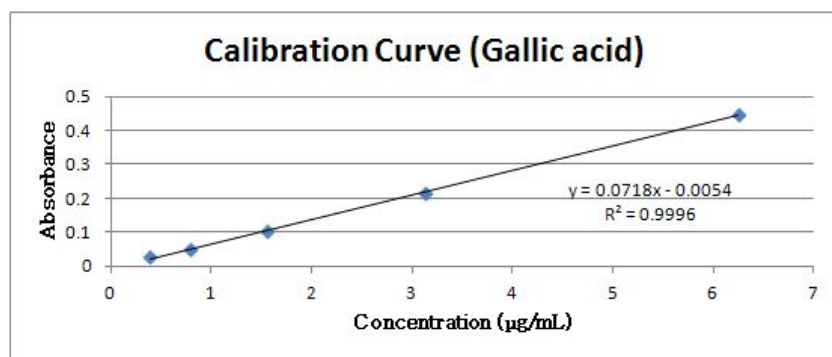


Figure 37. Calibration curve for quantification of total phenolic compounds.

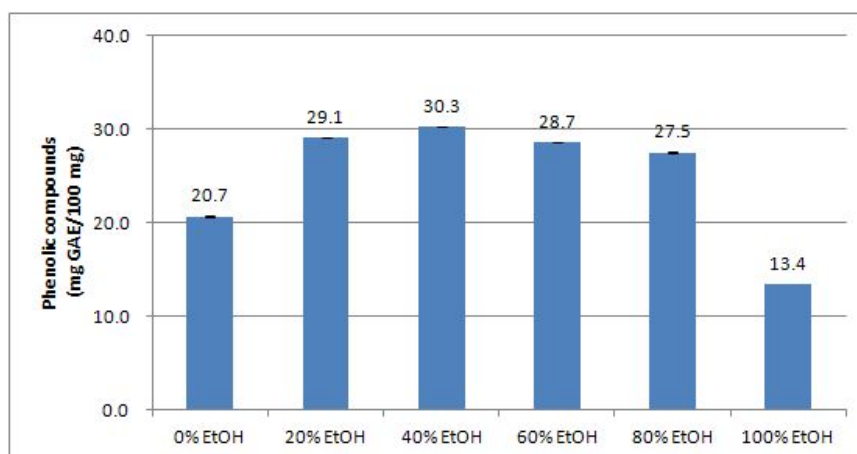


Figure 38. Total polyphenolic compounds of extracts. (*S. chinensis*)

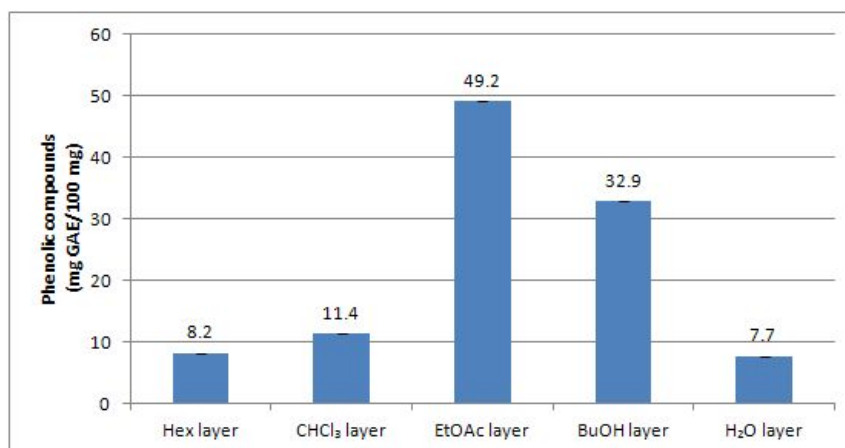


Figure 39. Total polyphenolic compounds of solvent layers. (*S. chinensis*)

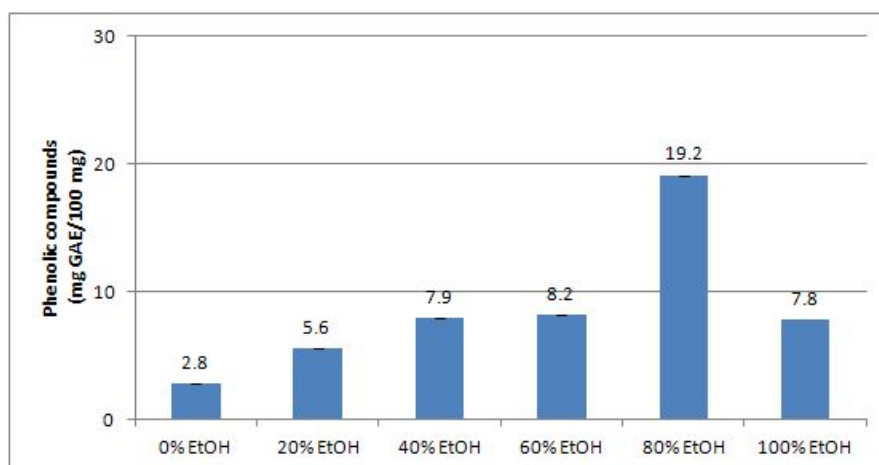


Figure 40. Total polyphenolic compounds of extracts. (*G. pentaphyllum*)

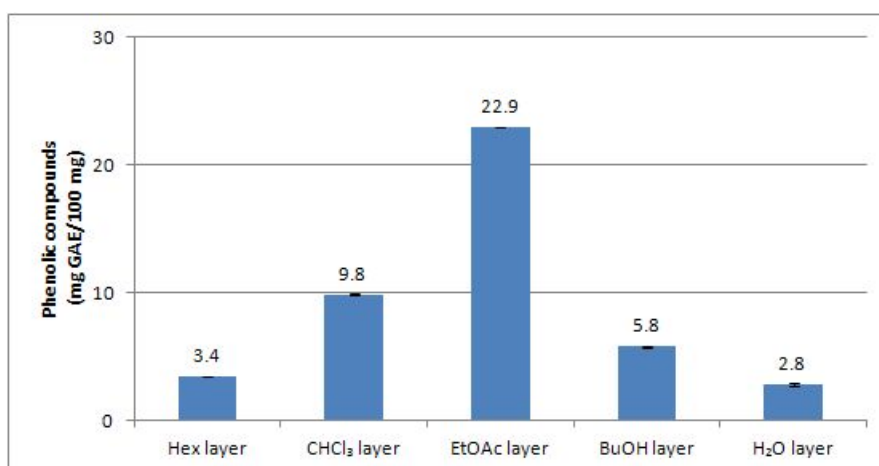


Figure 41. Total polyphenolic compounds of solvent layers. (*G. pentaphyllum*)

4-2. 총 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드는 페닐기 2개가 C₃사슬을 매개하여 결합한 C₆-C₃-C₆형 탄소골격 구조로 되어 있으며, 이것이 여러 당류와 에테르(ether) 결합을 통해 배당체(glycosides)의 형태로 존재하는 경우가 많다. 넓은 의미의 플라보노이드는 안토크산틴류(anthoxanthins)와 안토시아닌류(anthocyanins), 카테킨류(catechins)를 포함하지만, 좁은 의미에서는 안토크산틴류만을 말한다. 항균·항암·항바이러스·항알레르기 및 항염증 활성을 지니며, 독성은 거의 나타나지 않는 것으로 보고되고 있다.

Quercetin 표준용액을 사용한 검정곡선(Figure 42)을 작성하여 삼백초와 들의 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 100 mg 당 함유하고 있는 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 삼백초 추출 조건 중 40% 에탄올 추출물에서 17.2 mg quercetin/100 mg, 분획물 중 EtOAc 및 BuOH layer에서 각각 26.6, 18.2 mg quercetin/100 mg으로 비교적 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 43, 44). 또한 들의 추출 조건 중 80% 에탄올 추출물에서 7.3 mg quercetin/100 mg, 분획물 중 EtOAc layer에서 12.8 mg quercetin/100 mg으로 비교적 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다(Figure 45, 46).

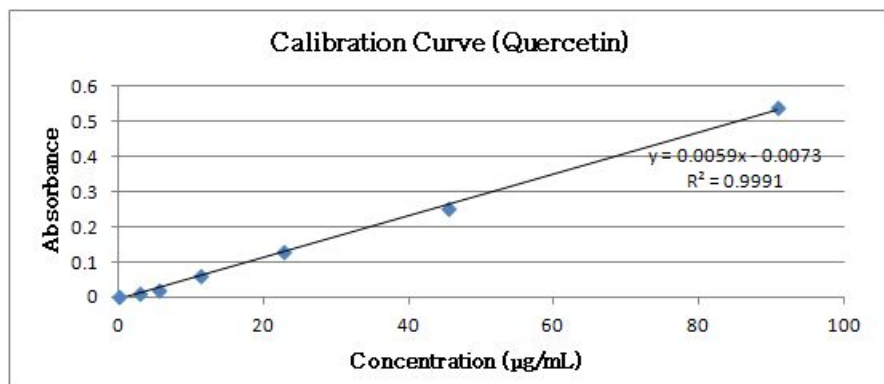


Figure 42. Calibration curve for quantification of total flavonoids.

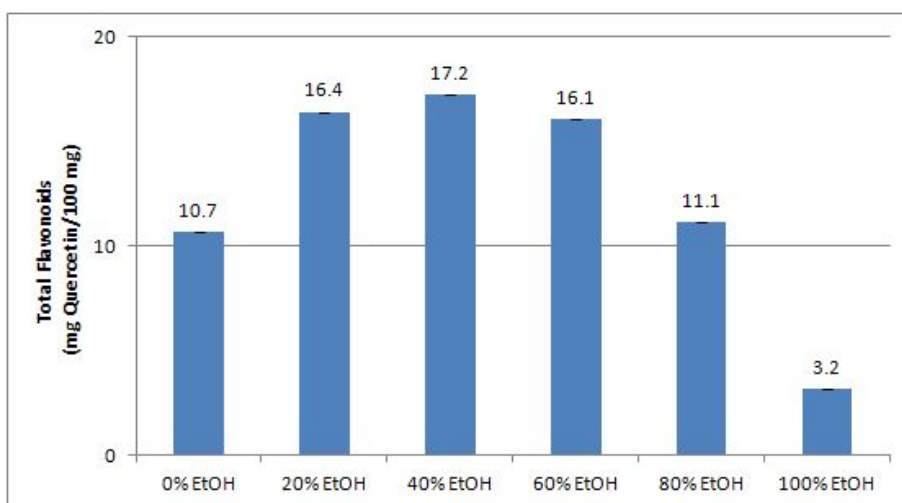


Figure 43. Total flavonoids of extracts. (*S. chinensis*)

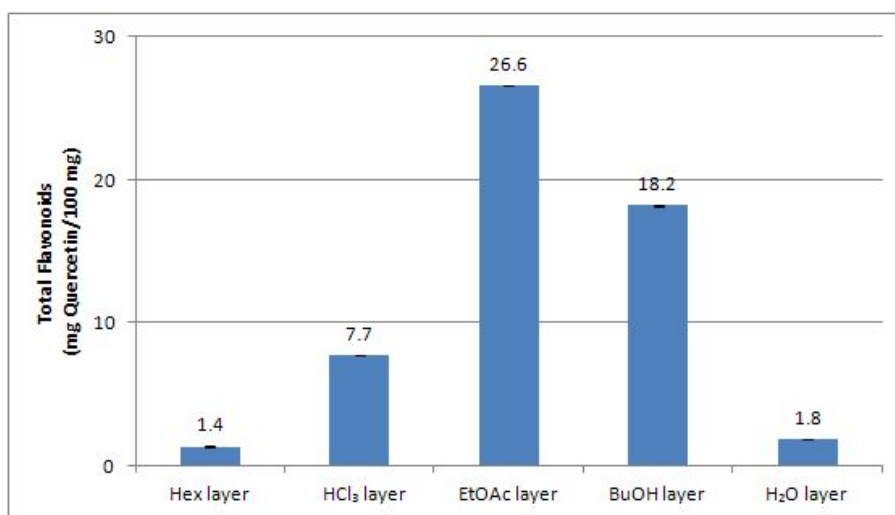


Figure 44. Total flavonoids of solvent layers. (*S. chinensis*)

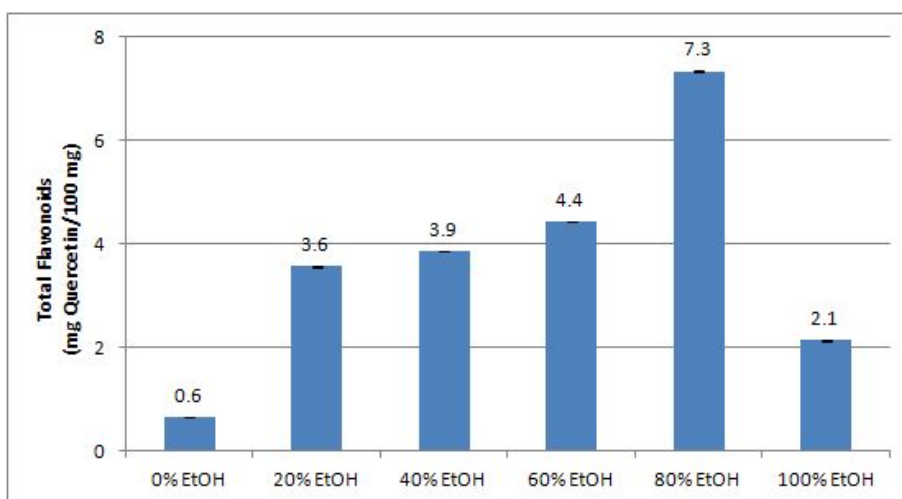


Figure 45. Total flavonoids of extracts. (*G. pentaphyllum*)

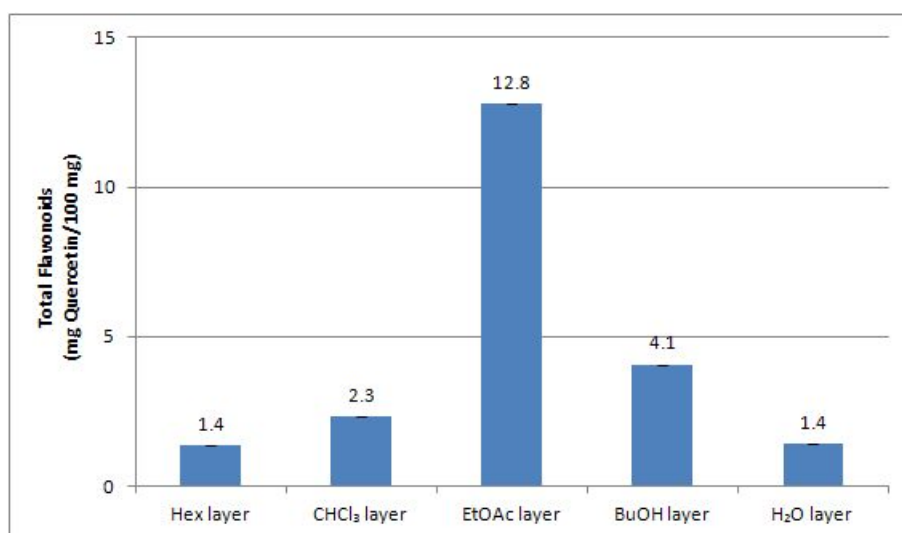


Figure 46. Total flavonoids of solvent layers. (*G. pentaphyllum*)

4-3. DPPH radical scavenging test

DPPH는 질소를 중심으로 그 자체가 매우 안정한 라디칼 구조의 화합물로서, 시료에 의하여 환원되어 라디칼이 소거되면 특유의 보라색이 없어지면서 515 ~ 517 nm에서 보이던 흡수파장이 사라지게 된다. 본 실험에서는 농도별로 DPPH radical 소거활성을 측정하여 SC₅₀ 값으로 표현하였다. SC₅₀ 값이 작을수록 활성이 좋을 것을 의미한다.

4-3-1. 삼백초 잎 및 돌의 추출물의 활성 결과

삼백초 잎의 40% ethanol 추출물 및 분획물을 갖고 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 시료의 농도가 100 µg/mL일 때 40% EtOH 추출물은 72.3%, Hex fr. 68.3%, CHCl₃ fr. 42.3, EtOAc fr. 85.7%, BuOH fr. 84.2%, H₂O fr. 30.5%의 소거활성을 보였으며 SC₅₀을 측정하기 위해 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL의 농도별로 소거활성을 실시하였다(Figure 47). 그 결과 EtOAc fr. 15.1 µg/mL, BuOH fr. 27.5 µg/mL로 대조군인 비타민 C의 SC₅₀인 7.5 µg/mL에 가깝지는 않지만 좋은 radical 소거능을 보임을 확인할 수 있었다(Figure 48).

돌의 80% ethanol 추출물 및 분획물을 갖고 DPPH radical 소거 활성을 검색하였으나 활성을 가지고 있지 않은 것으로 확인되었다.

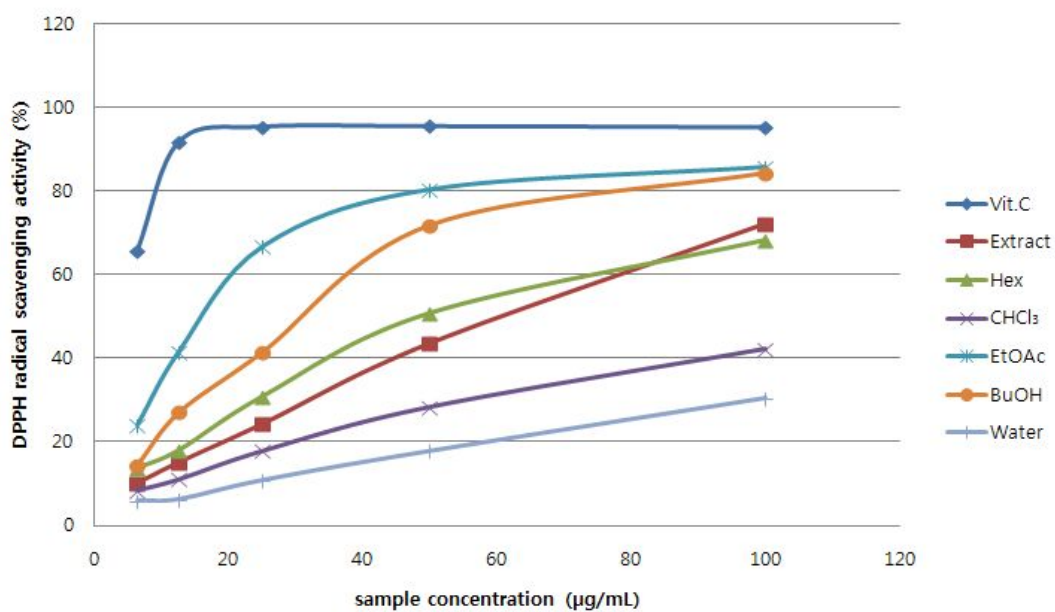


Figure 47. DPPH radical scavenging activities of extracts from *S. chinensis* leaves.

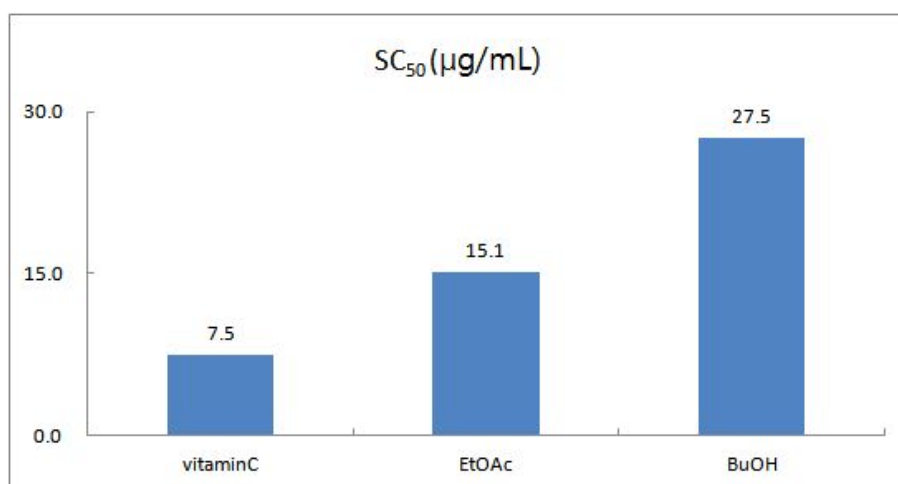


Figure 48. SC₅₀ value of DPPH radical scavenging activities of EtOAc fr. and BuOH fr. from *S. chinensis* leaves.

4-3-2. 삼백초 잎 및 돌외로부터 분리된 화합물의 활성 결과

EtOAc fr.과 BuOH fr.에서 분리된 compounds 1-6을 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. Compounds 4, 6에서는 활성을 가지고 있지 않은 것으로 확인되었고, 좋은 라디칼 소거능력을 보이는 compounds 1, 2, 3, 5의 SC₅₀을 측정하기 위해 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.13 µg/mL 의 농도별로 소거활성을 실시하였다(Figure 49). 그 결과 compound 1, compound 2, compound 3, compound 5의 SC₅₀값이 각각 37.5 µg/mL, 15.8 µg/mL, 9.6 µg/mL, 25.2 µg/mL로 compound 2와 compound 3인 경우 비타민 C와 유사한 SC₅₀값(6.9 µg/mL)을 가지며, compound 1과 compound 5는 다소 낮은 radical 소거활성을 가짐을 확인 하였다.

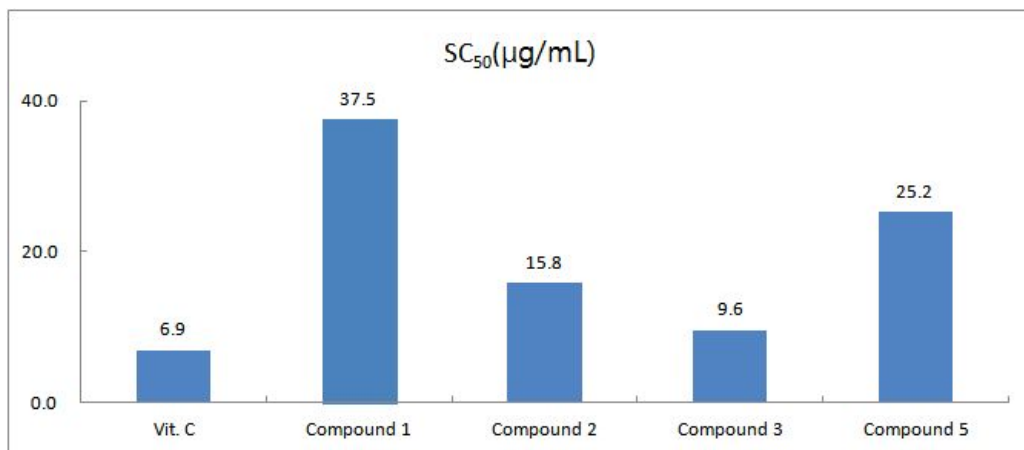


Figure 49. SC₅₀ value of DPPH radical scavenging activities of compounds 1, 2, 3 and 5.

4-4. ABTS radical scavenging test

4-4-1. 삼백초 잎 및 들의 추출물의 활성 결과

삼백초 잎의 40% ethanol 추출물 및 분획물을 갖고 ABTS radical 소거 활성을 검색하였다. 시료의 농도가 100 µg/mL일 때 40% EtOH 추출물은 72.3%, Hex fr. 42.6%, CHCl₃ fr. 41.4, EtOAc fr. 93.9%, BuOH fr. 74.4%, H₂O fr. 21.2%의 소거활성을 보였으며 SC₅₀을 측정하기 위해 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL의 농도별로 소거활성을 실시하였다(Figure 50). 그 결과 EtOAc fr. 28.1 µg/mL로 대조군인 비타민 C의 SC₅₀인 11.6 µg/mL에 가깝지는 않지만 좋은 radical 소거능을 보임을 확인할 수 있었다(Figure 51).

또한, 들의 80% ethanol 추출물 및 분획물을 갖고 ABTS radical 소거 활성을 검색하였다. 시료의 농도가 100 µg/mL일 때 80% EtOH 추출물은 70.9%, Hex fr. 12.5%, CHCl₃ fr. 27.4, EtOAc fr. 70.7%, BuOH fr. 22.6%, H₂O fr. 13.9%의 소거활성을 보였으며 SC₅₀을 측정하기 위해 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL의 농도별로 소거활성을 실시하였다(Figure 52). 그 결과 EtOAc fr. 59.1 µg/mL로 대조군인 비타민 C의 SC₅₀인 11.6 µg/mL에 가깝지는 않지만 좋은 radical 소거능을 보임을 확인할 수 있었다(Figure 53).

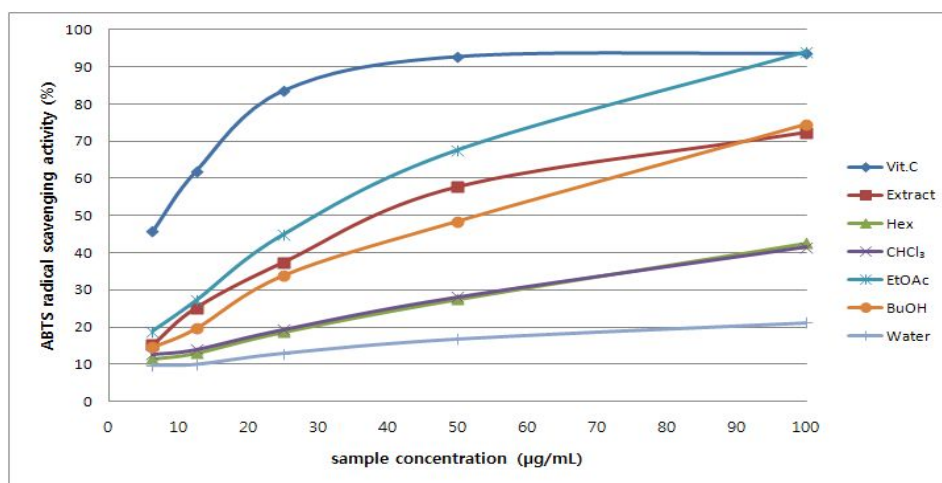


Figure 50. ABTS radical scavenging activities of extracts from *S. chinensis* leaves.

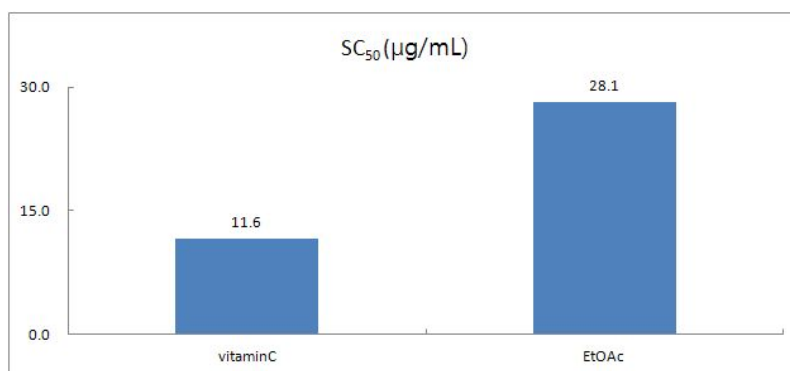


Figure 51. SC₅₀ value of ABTS radical scavenging activities of EtOAc fr. from *S. chinensis* leaves.

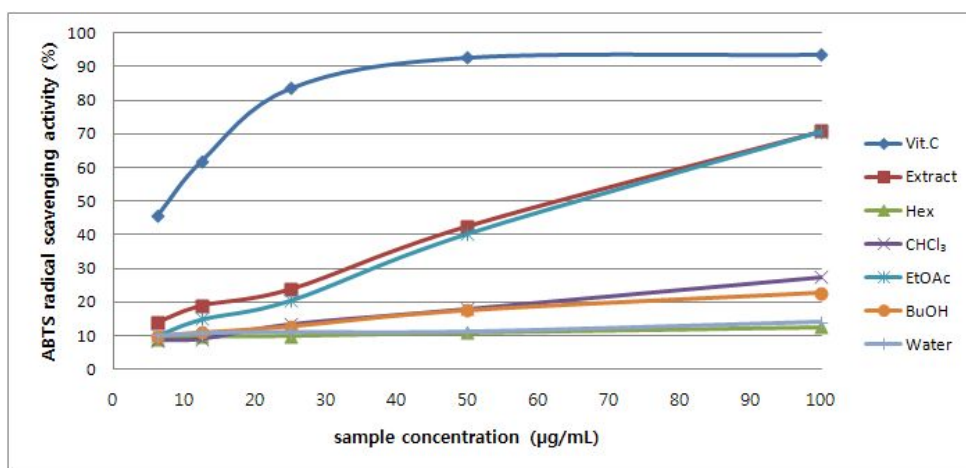


Figure 52. ABTS radical scavenging activities of extracts from *G. pentaphyllum*.

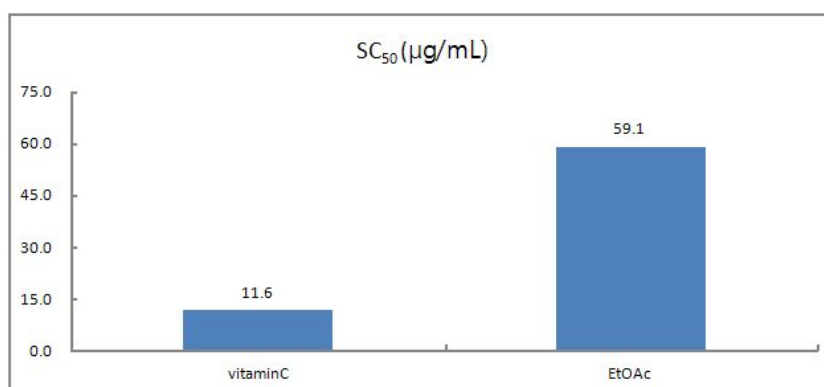


Figure 53. SC₅₀ value of ABTS radical scavenging activities of EtOAc fr. from *G. pentaphyllum*.

4-4-2. 삼백초 잎 및 들외로부터 분리된 화합물의 활성 결과

EtOAc fr.과 BuOH fr.에서 분리된 compounds 1-6을 ABTS radical 소거 활성을 검색하였다. Compounds 4에서는 활성을 가지고 있지 않은 것으로 확인되었고, 좋은 라디칼 소거능력을 보이는 compounds 1, 2, 3, 5, 6의 SC₅₀을 측정하기 위해 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.13 µg/mL 의 농도별로 소거활성을 실시하였다(Figure 54). 그 결과 compound 1, compound 2, compound 3, compound 5, compound 6의 SC₅₀ 값이 각각 64.6 µg/mL, 12.5 µg/mL, 23.4 µg/mL, 19.2 µg/mL, 78.4 µg/mL로 compound 2, compound 3과 compound 5인 경우 비타민 C와 유사한 SC₅₀값 (11.9 µg/mL)을 가지며, compound 1과 compound 6은 다소 낮은 radical 소거 활성을 가짐을 확인 하였다.

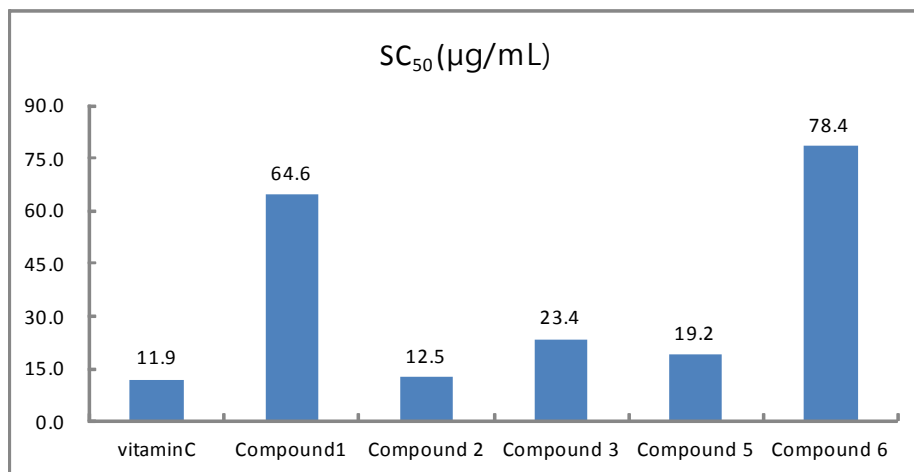


Figure 54. SC₅₀ value of ABTS radical scavenging activities of compounds 1, 2, 3, 5 and 6.

5. HPLC 분석 결과

5-1. 삼백초 잎으로부터 분리된 화합물의 HPLC 분석 결과

역상 컬럼(C₁₈)을 이용하여 삼백초 추출물 및 분리한 화합물의 분리도를 확인하였다. HPLC 크로마토그램 결과를 보면 40% 에탄올 추출물의 피크 중에서 머무름 시간이 가장 짧은 피크는 compound 5, 그 다음 피크는 compound 3, 머무름 시간이 가장 긴 피크는 compound 1으로 확인 할 수 있다(Figure 55~57).

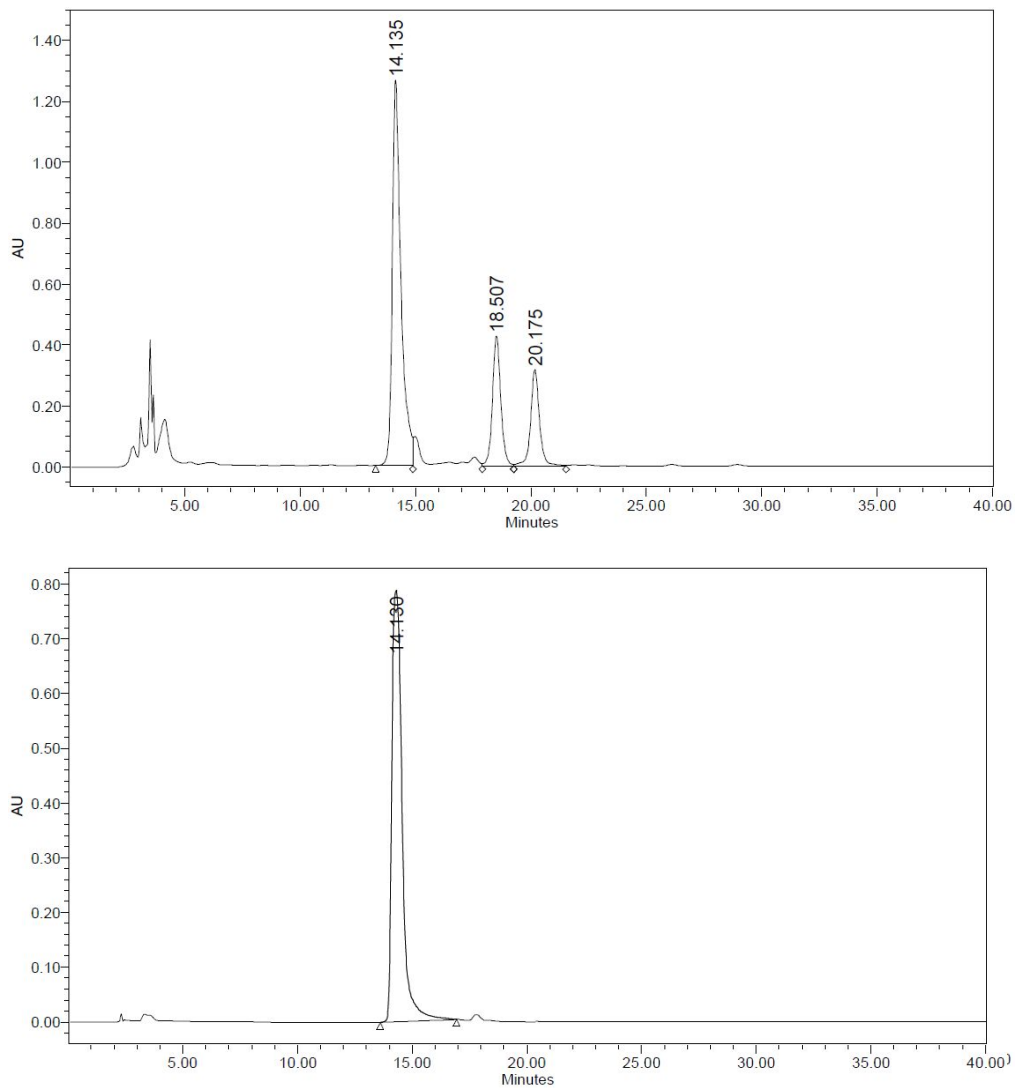


Figure 55. HPLC chromatogram of 40% ethanol and compound 5 from *S. chinensis*.

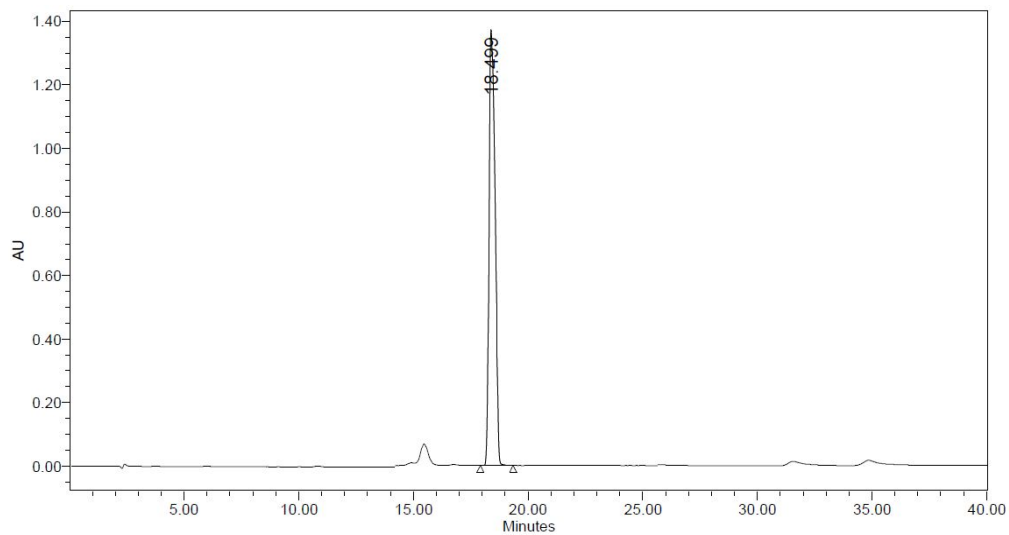


Figure 56. HPLC chromatogram of compound **3** from *S. chinensis*.

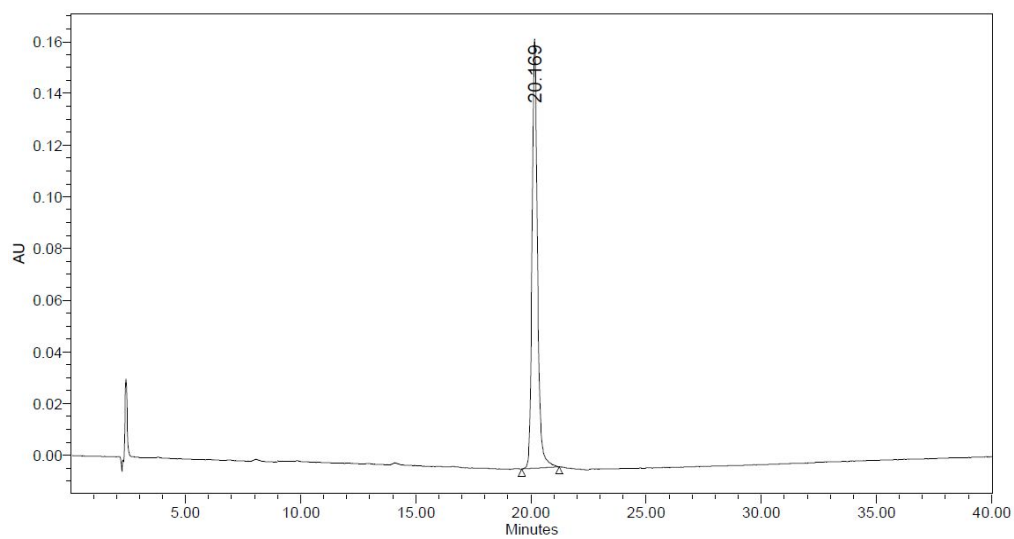


Figure 57. HPLC chromatogram of compound **1** from *S. chinensis*.

5-2. 돌외로부터 분리된 화합물의 HPLC 분석 결과

역상 컬럼(C₁₈)을 이용하여 돌외 추출물 및 분리한 화합물의 분리도를 확인하였다. HPLC 크로마토그램 결과를 보면 80% 에탄올 추출물의 피크 중에서 가장 긴 머무름 시간을 갖고 있는 피크는 compound 6으로 확인 할 수 있다(Figure 58).

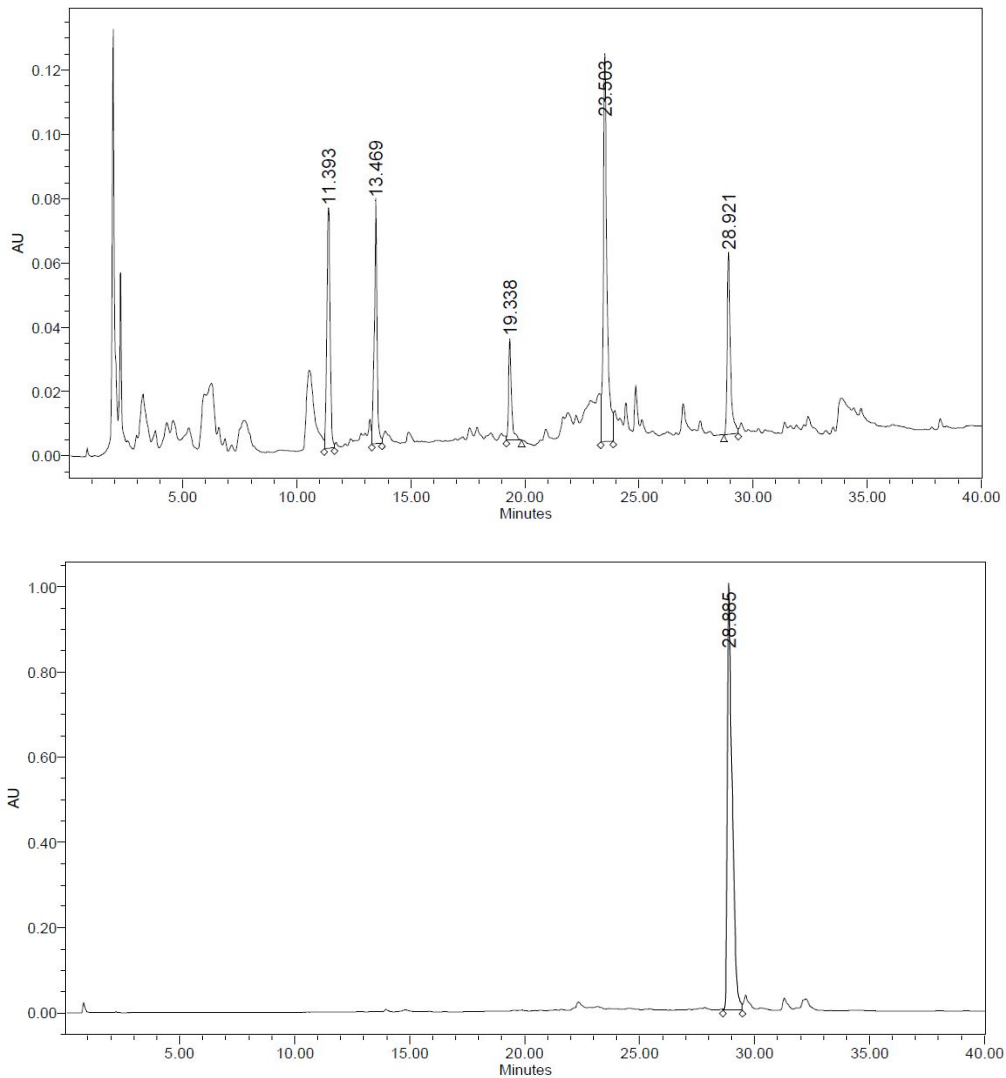


Figure 58. HPLC chromatogram of 80% ethanol and compound 6 from *G. pentaphyllum*.

IV. 요약 및 결론

제주에 자생하고 있는 삼백초 잎 및 돌외로부터 생리활성 성분을 분리·동정하고, 생리활성 검색을 통해 유효성분의 유·무를 알아보하고자 본 연구를 진행하게 되었다.

삼백초 잎의 에탄올 추출 조건을 선택하기 위해 각 추출물에 대한 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 결과 40% 에탄올 추출물에서 가장 높은 함량을 보였으며, 또한 HPLC로 분석한 결과, 40% 에탄올 추출물에서 지표물질의 함량이 가장 높은 것을 확인하여 40% 에탄올을 사용하여 추출하는 것이 적합한 것으로 나타났다. 삼백초 잎은 40% 에탄올 추출용매에서 얻어진 추출물을 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법 따라 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O 순으로 용매분획을 하여 분획물을 얻었다. 이들 중 삼백초 분획물에 대하여 DPPH radical 소거활성, ABTS⁺ radical 소거활성, 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량을 보이는 EtOAc 및 BuOH 분획들을 각각 vacuum liquid chromatography(VLC), normal silica gel column chromatography, sephadex LH-20를 실시하여 분리된 분획들을 1D, 2D NMR기기를 통하여 확인하였고 문헌들과 비교한 결과 삼백초 잎에서는 총 5개의 화합물인 quercitrin, quercetin, caethin, (6S,9S)-roseoside, quercetin 3-*O*-glucuronide-6"-methyl ester를 분리하였다.

이렇게 분리된 화합물들 중에 삼백초에서는 (6S,9S)-roseoside가 처음 분리되었다. 각각의 화합물에 대한 HPLC 분석 결과 40% 에탄올 추출물의 지표물질(quercetin 3-*O*-glucuronide-6"-methyl ester)을 분리하였고, caethin, quercitrin을 분리하였다.

또한, 돌외의 에탄올 추출 조건을 선택하기 위해 각 추출물에 대한 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 결과 80% 에탄올 추출물에서 가장 높은 함량을 보였으며, 또한 HPLC로 분석한 결과, 80% 에탄올 추출물에서 지표물질의 함량이 가장 높은 것을 확인하여 80% 에탄올을 사용하여 추출하는 것이 적합한 것으로 나타났다. 돌외는 80% 에탄올 추출용매에서 얻어진 추출물을 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법 따라 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate,

n-butanol, H₂O 순으로 용매분획을 하여 분획물을 얻었다. 이들 중 돌외 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거활성, 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량을 보이는 EtOAc 분획을 vacuum liquid chromatography(VLC), sephadex LH-20를 실시하여 분리된 분획들을 1D, 2D NMR기기를 통하여 확인하였고 문헌들과 비교한 결과 돌외에서는 총 1개의 화합물인 ombuine 3-*O*-rutinoside을 분리 하였으며 이 화합물은 돌외에서 처음으로 분리되었다.

삼백초 잎에 대한 항산화 활성 검색에서 추출물 및 분획물에 대한 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 결과 삼백초 40% 에탄올 추출물에서 시료 100 mg 당 총 폴리페놀 (30.3 mg GAE/100 mg) 및 플라보노이드 (17.2 mg quercetin/100 mg) 함량이 가장 높았다. 또한 ethyl acetate layer에서 시료 100 mg 당 총 폴리페놀 (49.2 mg GAE/100 mg) 및 플라보노이드 (26.6 mg quercetin/100 mg) 함량이 가장 높았으며, butanol layer에서는 총 폴리페놀 (32.9 mg GAE/100 mg) 및 플라보노이드 (18.2 mg quercetin/100 mg) 함량을 보였다. DPPH radical 소거활성 및 ABTS⁺ radical 소거활성 실험에서는 ethyl acetate 및 butanol layer에서 좋은 소거 활성을 보였다.

돌외에 대한 항산화 활성 검색에서 추출물 및 분획물에 대한 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 결과 돌외 80% 에탄올 추출물에서 시료 100mg 당 총 폴리페놀 (19.2 mg GAE/100 mg) 및 플라보노이드 (7.3 mg quercetin/100 mg) 함량이 가장 높았다. 또한 ethyl acetate layer에서 시료 100 mg 당 총 폴리페놀 (22.9 mg GAE/100 mg) 및 플라보노이드 (12.8 mg quercetin/100 mg) 함량이 가장 높았다. ABTS⁺ radical 소거활성 실험에서는 ethyl acetate layer에서 좋은 소거 활성을 보였다.

분리된 화합물의 DPPH radical 소거활성의 결과 quercetin, (RC₅₀ = 15.8 μg/mL), catethin (RC₅₀ = 9.6 μg/mL), quercetin 3-*O*-glucuronide-6"-methyl ester (RC₅₀ = 25.2 μg/mL)에서 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 대조군으로 쓰인 vitamin C(RC₅₀ = 6.9 μg/mL)와 유사한 소거활성을 나타내었고 quercitrin (RC₅₀ = 37.5 μg/mL)은 미미하지만 활성을 확인하였다. 또한 ABTS⁺ radical 소거활성 결과 quercetin, (RC₅₀ = 12.5 μg/mL), catethin (RC₅₀ = 23.4 μg/mL), quercetin 3-*O*-glucuronide-6"-methyl ester (RC₅₀ = 19.2 μg/mL)에

서 대조군인 vitamin C에 비해 좋은 활성 나타내었고 quercitrin ($RC_{50} = 64.6 \mu\text{g/mL}$), ombuine 3-*O*-rutinoside ($RC_{50} = 78.4 \mu\text{g/mL}$)은 미미하지만 활성을 확인하였다.

이상 생리활성 검색 결과 삼백초 잎과 돌외에서 분리한 quercitrin, quercetin, catethin, quercetin 3-*O*-glucuronide-6"-methyl ester, ombuine 3-*O*-rutinoside에서 DPPH radical 소거 및 ABTS⁺ radical 소거 능력이 좋은 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 실험결과를 바탕으로 삼백초 잎 및 돌외를 이용한 항산화제 개발 가능성을 기대 할 수 있을 것이라고 예상된다.

V. 참고문헌

- 1) 김숙희, 김화영, 노화, 민음사, 1997.
- 2) 김기연, 고희정, 김광옥, 김연주, 장문정, 피부관리학, 수문사, 1997.
- 3) Aruoma OI. Free radical, oxidative stress and antioxidants in human gealth and disease. *J. Am Oil Chem Soc.* 1998, 75, 199-212.
- 4) 문제학, 박근형, 차의 기능성 성분과 생리활성, 한국차학회지, 1995, 1, 177-193.
- 5) 김정은, 비쭈기나무 가지로부터 항산화, 미백 및 주름개선 활성 성분 규명, 제주대학교, 석사학위논문, 2011.
- 6) 김미보, 현선희, 박재성, 강미애, 고영환, 임상빈, 제주 자생식물 고압용매 추출물의 통합적 항산화 능력, *한국식품영양과학회지*, 2008, 37(11), 1491-1496.
- 7) 강미애, 김미보, 김지훈, 고영환, 임상빈, 식물 40종 고압용매 추출물의 통합적 항산화 능력 및 항균 활성, *한국식품영양과학회지*, 2010, 39(9), 1249-1256.
- 8) Jeong Hyang Woo, So Lim Shin, Young Deug Chang, and Cheol Hee Lee, Screening for Antioxidant Effects of Aerial Part Extracts Obtained from Sisten Compositae Species, *Folwer Res. J.*, 2009, 17(4), 271-278.
- 9) 고영국, 제주산 재래감귤 과피와 종자 추출물의 항산화 활성 및 주요 플라보노이드 분포, 제주대학교, 석사학위논문, 2009.
- 10) MS Koh, Antimicrobial Activity of *Saururus chinensis* Baill Extract. *J*

Korean Soc Food Sci Nutr, **2004**, *33*, 1098-1105.

11) 박종희, 이정규, 상용 약용 식물 도감, 신일상사, **2000**, 202-203.

12) Choe K. H., Yoon C. H., Kwon S. J., A study on chemical composition of Saururaceae growing in Korea(9999335) on flavonoid constituents of *Saururus chinensis*. *Journal of Korean Society of Analytical Science*, **1994**, *7(1)*, 11-15.

13) Cavallin, L., A. Bindol., and N. Siliprandi, Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids, *Pharmacol. Res. Commun.*, **1978**, *10*, 133-136.

14) Kimura. M. and Y. Hiromi, Interaction in the antibacterial activity of flavonoid from *Sophora japonica* L. to propionibacterium, *Yakugaku Zasshi*, **1984**, *104*, 340-346.

15) Han. S. S., and B. J. Lee, Studies on antimicrobial activities of morin alone and in combination with related flavonoids. *Chungbuk J. Pharm. sci.*, **1989**, *4*, 19-27.

16) Edenhader. R., and X. Tang, Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluorene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds, *Food and Chemical Toxicology*. **1996**, *35*, 357-372.

17) 이인선, 삼백초 열수추출물의 항암 및 세포독성 저해 효과, 농산물저장유통 학회지, **2001**, *8(2)*, 213-216.

18) Leighton. T., Ginther. C., Fluss. L., Harter. W. K., Cansado. J., and Notario. V., Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in Allium vegetable, In "phenolic compounds in food and their effect on health II", *American Chemical Society*, **1992**, *16*, 220-238.

19) Mun. S. L., H. S. Ryu. H. J. Lee. and J. S. Choi., Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles form *Zanthoxylum schinifolium*, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **1994**, *23*, 466-471.

20) Chung. T. Y., M. A. Kim., and A. D. Jones., Antioxidative activity of flavonoid isolated from Jindalrae flowers (*Rhododendron mucronlatum Turcz*), *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **1996**, *39*, 320-326.

21) Do JR., Kin KJ., Jo JH., Kim YM., Kim BS., KIN HK., Lim. SD., Lee SW., Antimicrobial, antigypertensive and anticancer activities of medicinal herbs, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **2005**, *37*, 206-213.

22) Pietta PG., Flavonoids as antioxidants, *J Nat Prod.*, **2000**, *63*, 1035-1042.

23) 민진우, 들의 사포닌 Gypenoside V로부터 인삼사포닌 C-K의 생산, 경희대학교, 석사학위논문, **2009**.

24) Fang ZP and Zeng XY, Isolation and identification of flavonoids and organic acid from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **1989**, *14(11)*, 676-678.

25) Zhang Z, Xie SJ, Huang SP and Zhang Q. Analysis of medicinal and nutritional components in *Gynostemma pentaphyllum*. *Shanxi Daxue*

Xuebao Ziran Kexueban, **1993**, *16(3)*, 307–310.

26) Deng S, Li X, Chen B, Deng F and Zhou X. Analysis of amino acids, vitamins, and chemical elements in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino. *Hunan Yike Daxue Xuebao (Bulletin of Hunan Medical University)*, **1994**, *19(6)*, 487–490.

27) Liu X, Ye W, Mo Z, Yu B, Zhao S, Wu H, Che C, Jiang R, Mak T.C.W & Hsiao W.L.W. Five new ocotillone-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1147–1151.

28) Arbain D, Cannon J.R, Afriastini Kartawinata K, Djamal R, Bustari A, Dharma A, Rosmawaty Rivai H, Zaherman Basir D., Sjafar M., Sjaiful Nawfa R. and Kosela S. Survey of some West Sumatran plants for alkaloids. *Econ. Bot.* **1989**, *43(1)*, 73–78.

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

30) Davis, F. B., Middleton, E., Davis, P. J., Blas, S. D., Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation *in vitro* of human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity, *Cell Calcium*, **1983**, *4*, 71–81

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

32) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A. Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, *26*,

1231-1237

33) 강상훈, 새우나무 잎 추출물로부터 항산화 및 항균 활성, 제주대학교, 석사학위논문, 2011.

34) 오은경, 붉가시나무 (잎)으로부터 기능성 화장품 활성 성분의 분리, 제주대학교, 석사학위논문, 2008.

35) 문미연, 개가시나무, 산딸나무 및 벚꽃은 잎의 활성성분 규명, 제주대학교, 석사학위논문, 2008.

36) Sohn, Y. M.; Chin, Y. W.; Yang, M. H.; Kim, J. W., Terpenoid constituents from the aerial parts of *Asplenium scolopendrium*, *Nat. Prod. Sci.*, 2008, 14(4), 265-2680.

37) LI Hongfang, MA Qingyun, LIU Yuqing, Qian Jinfu, ZHOU jun & ZHAO Youxing, Chemical Constituents from *Polygonum perfoliatum*, *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 2009, 15(5), 615-620

38) Hisashi Matsuda, Toshio Morikawa, Iwao Toguchida, and Masayuki Yoshikawa, Structural Requirements of Flavonoids and Related Compounds for Aldose Reductase Inhibitory Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, 2002 50(6), 788-795.

39) Lee, K. I., Kim, S. M., Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 2009, 38(3), 264-273.