

자생식물 이용 기술 개발 사업
Plant Diversity Research Center

자생식물로부터 노화억제 식품의약 개발
Development of Anti-aging Pharmaceuticals
from Natural Herbs

부 경 대 학 교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “자생식물로부터 노화억제 식품의약개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2003 . 8 .

주관연구기관명 : 부 경 대 학 교

주관연구책임자 : 최 재 수

협동연구기관명 : 부 산 대 학 교

협동연구책임자 : 정 해 영

보고서 초록

과제관리번호	PF002201-07/08	해당단계 연구기간	2000.09.16 - 2003.06.30	단계 구분	(1단계) / (총3단계)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	자생식물로부터 노화 억제 식품의약개발			
연구책임자	최재수	해당단계 참여연구원수	총 : 11명 내부 : 9명 외부 : 2명	해당단계 연구비	정부: 270,000 천원 기업: 46,000 천원 계: 316,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	부경대학교		참여기업명	샘타코	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요 약				보고서 면수	161
<ul style="list-style-type: none"> · 국내 자생식물 600종 이상을 수집하여 노화 지표인 활성 산소·질소 소거능을 검색한 결과 IC₅₀ 5 µg/ml 이하에서 활성을 나타내는 자생식물 80종을 발굴하였음. · 이들 활성 자생식물 ① 갯으로부터 7종, ② 울금에서 3종, ③ 영경귀에서 2종, ④ 합환피에서 2종, ⑤ 비파에서 4종, ⑥ 연수에서 7종, ⑦ 솔잎에서 3종, ⑧ 뱀나무에서 15종, ⑨ 들깨에서 3종, ⑩ 황금에서 4종, ⑪ 단삼에서 3종, ⑫ 고들빼기에서 2종을 분리·동정하였음. · 뱀잎의 genistein 유도체, 연수의 kaempferol 유도체, 단삼의 lithospermate 유도체, 인삼의 ginsenoside Rd가 강한 활성을 나타내었음, 이들의 작용기전은 활성산소, 질소 제거 및 생성억제, NF-KB활성 및 COX-2와 iNOS 유전자 발현 억제에 의함. · 노화 지표 발굴은 DNA chip, RDA 및 2D/Mass로 총 55종 발굴 하였음. · 항노화활성 물질에 대해 총 7건의 특허를 출원하고, 이들 중 특히 “연수유래 캄페롤 및 그 유도체를 유효성분으로 하는 효소보호제 및 항노화제”는 참여기업 샘타코에 기술 이전하여 식품의약으로 개발 하였음 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	자생식물, 노화억제, 연수, 뱀나무, 단삼, 노화지표			
	영 어	natural herb, anti-aging, <i>Nelumbo nucifera</i> , <i>Prunus serrulata</i> , <i>Salvia miltiorrhza</i> , aging biomarker			

요 약 문

I. 제 목 : 자생식물로부터 노화억제 식품의약개발에 관한 연구

II. 연구개발의 배경, 목적 및 필요성

- ◎ 배경 : 노인 인구의 고령화와 더불어 만성 유병률 증가에 의한 사회적·의료적 제반 문제를 근본적으로 해결하고 인간 삶의 질을 향상시키기 위하여 노화 과정을 과학적으로 규명하고 노화 조절기법을 개발함으로써 노화에 따른 노인성 질환의 근본적인 해결 방법을 제시하고자 함.
- ◎ 목적 : 노인인구의 증가로 인한 노인들의 만성 유병률 증가에 의한 사회적·의존적 제반문제를 근본적으로 해결하고 인간 삶의 질 향상을 위하여 자생식물 및 그들로부터 분리된 활성성분의 탐색과 작용기전규명 나아가서 노화지표를 발굴하고자 함.
- ◎ 필요성 : 노인 인구의 급증으로 노인성 질환의 유병률 증가를 초래하여 삶의 질 저하를 근본적인 해결방법이 절실히 요구됨.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2000)	초·목본 자생식물들을 대상으로하여 노화표지인자 NFκB, iNOS, COX-2, 활성산소·질소 저해능을 탐색하고 활성성분을 분리동정하고, RDA법으로 새로운 노화 표지 인자를 발굴한다.	<ol style="list-style-type: none"> ① 초·목본자생식물 300종 수집 ② 활성 초본식물의 분획 및 활성성분분리 동정 ③ 최근 새롭게 발굴된 노화 표지인자인 NFκB, iNOS, COX-2, 활성산소·질소지표로 활성 식물 분획 및 활성성분 탐색 (후보활성 자생식물: 벚나무잎, 장미꽃, 연수, 단삼, 녹차, 비파, 결명자 등) ④ 새로운 노화지표를 subtractive library 중에서 Young조직의 Clone을 제거하고 실제로 Old 조직에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 효과적으로 검출하는 RDA기법으로 발굴하고, 노화 과정에서 발현량 변화확인
2차년도 (2001)	초·목본 자생식물로 부터 노화표지인자 NFκB, iNOS, COX-2, 활성산소·질소 저해능을 탐색하고 활성성분을 분리 동정하고, RDA법으로 발굴된 노화지표로 활성식물 및 활성성분을 탐색한다. 그리고 proteomics로 새로운 노화 표지인자를 발굴하여 자생식물효능 탐색에 활용토록 한다.	<ol style="list-style-type: none"> ① 초·목본자생식물 300종 수집 ② 활성 목본 식물의 분획 및 활성성분 분리 동정 ③ 1차년도의 노화표지인자 (NFκB, iNOS, COX-2, 활성산소·질소 및 RDA기법으로 새롭게 발굴된 지표로 목본활성식물, 활성분획, 활성성분을 탐색함 ④ RDA로 새롭게 발굴된 노화 표지인자를 지표로 활성식물의 효능 탐색 ⑤ 노화과정에서 노화조직으로부터 단백질을 분리한 후 2D Gel/Madi-top Mass로 새로운 노화지표 인자를 발굴
3차년도 (2002)	DNAchip 및 Proteomics로 새롭게 발굴된 노화표지인자를 지표로 추가로 활성성분을 분리 동정하고, 활성 성분들의 분자작용기전, 약리효능 및 안전성을 평가하여 항노화 식품의약을 개발한다.	<ol style="list-style-type: none"> ① 새로운 노화지표를 DNA chip으로 발굴 ② DNA chip 및 proteomics로 새롭게 발굴된 노화 표지인자를 지표로 활성목본 및 초본식물 활성탐색 및 활성 성분 분리동정 ③ 1, 2, 3차 년도 발굴된 활성 성분의 약리, 효능 및 안전성 평가 ④ DNA chip 및 Proteomics를 이용하여 항노화 작용기전 규명 ⑤ 6종의 노화제어 식품의약 시작품 개발

IV. 연구개발결과

국내 자생식물 등 총 600종 이상을 수집하고 노화활성억제 표지인 ROS와 peroxy-nitrite 소거능을 검색한 결과 IC₅₀ 5 µg/ml 이하에서 활성을 나타내는 자생식물 80종 이상을 발굴하였으며 그 중 국내 자생식물 40종 이상의 추출물을 분획하여 활성을 검토한 후 ①갯(*Brassica juncea*)에서 phenolic acid와 acylated flavonoids, sinapoyl glucoside, isorhamnetin 3, 7-di-*O*-β-D-glucoside, kaempferol-3-*O*-(2-*O*-feruloyl-β-D-glucosyl-(1→2)-β-D-glucoside)-7-*O*-β-D-glucoside, kaempferol-3-*O*-β-D-glucosyl-(1→2)-*O*-β-D-glucoside-7-*O*-β-D-glucoside, kaempferol 7-*O*-β-D-triglucoside, ②울금(*Curcuma longa*)에서 diarylheptanoids (curcumin I, II, III), ③영경귀(*Cirsium japonicum*)에서 flavonoids (luteolin and its 5-*O*-glucoside), ④합환피(*Albizia julibrissin*)에서 flavonoid (3',4',7-trihydroxy flavone), sulfuretin, luteolin, ⑤비파 (*Eriobotrya japonica*)에서 phenolic acid (caffeic acid), flavonoids, ionone glycoside, chlorogenic acid isomer, ⑥연수(*Nelumbo nucifera*)에서 flavonoids (kaempferol, kaempferol 3-*O*-glucuronopyranosyl methyl ester, kaempferol 3-*O*-glucuronopyranoside, kaempferol 3-*O*-glucopyranoside, myricetin 3,5-demethylether 3-*O*-glucopyranoside, kaempferol 3-*O*-galactopyranoside, kaempferol 3-*O*-glucopyranosyl-(16)-rhamnopyranoside), ⑦솔잎(*Pinus densiflora*)에서 lignan (isolarisiresinol xyloside)과 flavonoid, ⑧벚나무(*Prunus serrulata var. spontanea*)에서 phenolic acid [2-*O*-(6-benzoyl)-glucopyranosyl *o*-(*Z*)-coumaric acid], flavonoids [prunetin, genistein, quercetin, prunetin 4-*O*-glucopyranoside, kaempferol 3-*O*-arabinofuranoside, prunetin 5-*O*-glucopyranoside, kaempferol 3-*O*-xylopyranoside, genistin, kaempferol 3-*O*-glucopyranoside, quercetin 3-*O*-glucopyranoside], triterpenoids [ursolic acid, 2-hydroxyursolic acid, trihydroxy urs-12-en-28-oic acid glucoside ester, tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid glucoside ester], ⑨들깨 (*Perilla frutescence*)에서 flavonoids (apigenin, chrysoeriol, luteolin), ⑩황금 (*Scutellaria baicalensis*)에서 flavonoids (wogonin, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxy flavone, baicalein, baicalin), ⑪단삼 (*Salvia miltiorrhiza*)에서 dihydroxy phenyllactic acid methylester, dihydroxy phenyllactamide, rosmarinic acid methylester, ⑫고들빼기(*Ixeris sonchifolia*)에서 luteolin과 luteolin 7-*O*-glucoside를 분리 동정하였다. ⑬산복사 flavonoid 성분의 구조와 활성 상관관계를 확립하였다.

- 벚잎의 genistein 유도체, 연수의 kaempferol 유도체, 단삼의 lithospermate 유도체, 인삼의 ginsenoside Rd가 강한 활성을 나타내었다. 이들의 작용 기전은 활성 산소·질소 제거 및 생성 억제, NFκB 활성, COX-2, iNOS 유전자 발현 억제에 의한다.
- 새로운 노화 지표 발굴을 DNA chip, RDA 및 2D/Mass로 발굴하였다. IB, IKK, XOD, GATA, Ferritin, -GT, ATP synthase, HSP 70, plasminogen activator,

cyclophilin, SOD, p450, cathepsin, GrpE-like 1, PDGFR 외 39종 (총 55종)

V. 연구개발결과의 활용계획

- 제 1단계에서 도출된 항노화 활성 물질에 대해 총 7건의 특허를 출원하고, 이 들 중 특히 “연수 유래 캄페롤 및 그 유도체를 유효 성분으로 하는 효소 보호 제 및 항노화제”는 참여 기업 샘타코에 기술 이전하여 식품의약으로 개발함.
- 제 1단계에서 탐색한 항노화 활성 물질 중 특히 캄페롤은 안전성 및 효능 평가를 거쳐 노화 조절 신약 개발에 활용함.
- 항노화 활성 물질이 함유된 자생 식물들을 식품 의약으로 개발하여 국민 보건 향상과 고부가가치 수출 전력 상품으로 개발할 것임.
- 새로운 노화 지표들은 노화 진단 기술 및 노인병 조기 진단에 활용하고, 노화 기전 규명 및 노화 조절 기법 발굴에 활용함.
- 연수의 항노화 식품의약 개발로 연수의 대량 생산을 유도함으로써 농민의 소득 증대에 기여함.

S U M M A R Y

We discovered that 80 kinds of natural herbs have IC₅₀ of 5 µg/ml by screening collected more than 600 kinds of natural herbs for reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) scavenging activity. From these active natural herbs, 53 active compounds were identified.

Genistein derivatives from *Prunus serrulata*, kaempfeol derivatives from *Nelumbo nucifera*, lithospermate derivertives from *Salvia miltiorrhiza* and ginsenoside Rd from ginseng showed the potent activity. These reaction mechanisms are due to ROS and RNS scavenging, decrease of NF-κB activation and inhibition of COX-2 and iNOS gene expression.

On the other hand, 55 kinds of aging biomarkers were identified using DNA chip, RDA and 2D/Maldi-top Mass.

C O N T E N T S

Chapter 1. Synopsis of research and development project

1. Background
2. Objective
3. Necessity
4. Aims and Process

Chapter 2. The present condition of the internal and external technical development

Chapter 3. Accomplishment contents and results of research and development

1. Isolation of active principles from natural plants
2. Action mechanism of active phenolic compounds
3. Action mechanism of *Nelumbo nucifera* and its derivatives
4. Action mechanism of *Salvia miltiorrhiza* and its derivatives
5. Novel aging-biomarker factor discovery

Chapter 4. Aim attainment and coherence of related field

1. Aim attainment
2. Self-evaluation of aim attainment based on criteria of evaluation

Chapter 5. Application plan of results of research and development

Chapter 6. The external scientific and technical information collected from research and development process

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

- 1절. 자생식물로부터 노화억제 활성물질 분리동정
- 2절. 활성 phenol성 화합물의 작용기전
- 3절. 연수와 그 유래 성분의 작용기전
- 4절. 단삼과 그 유래 성분의 작용기전
- 5절. 새로운 노화지표인자 발굴

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 배경

- 노인 인구의 고령화와 더불어 만성 유병률 증가에 의한 사회적·의료적 제반 문제를 근본적으로 해결하고 인간 삶의 질을 향상시키기 위하여 노화 과정을 과학적으로 규명하고 노화 조절기법을 개발함으로써 노화에 따른 노인성 질환의 근본적인 해결 방법을 제시하고자 한다.

2. 목적

- 노인인구의 증가로 노인들의 만성유병률 증가에 의한 사회적·의료적 제반 문제를 근본적으로 해결하고 인간 삶의 질 향상을 위하여 자생식물 및 그들로부터 분리된 활성성분의 탐색과 작용기전규명 나아가서 노화지표를 발굴하고자 하였다.

3. 필요성

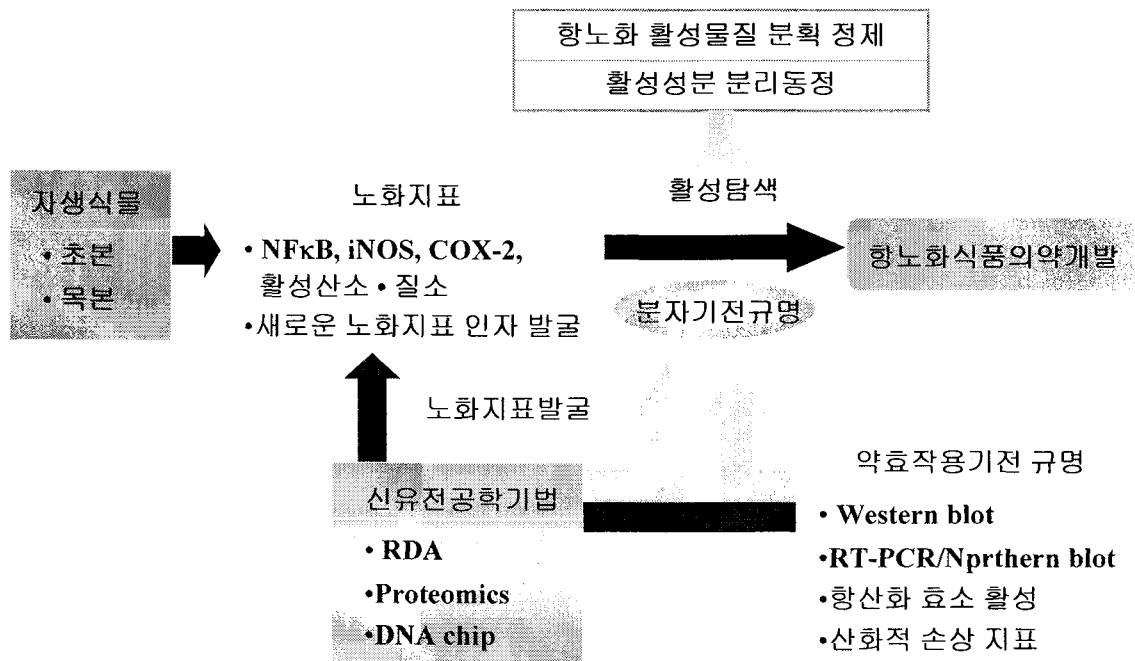
- 우리나라 노인 인구는 2001년에 7.1%, 2010년에 9.9%, 2030년에 19.3%로 급증하게 될 전망이며, 이러한 인구의 고령화와 더불어 만성 질환 유병률의 증가로 여러 사회적, 의료적인 문제를 초래하게 될 것이다. 즉, 65세 이후에는 약 50% 이상의 인구에서 1개 이상의 병변이 발견됨으로써, 노화에 따라 암, 동맥경화, 당뇨병 등 노인성 질환의 발병률이 현저히 증가하고 있다. 이렇게 나이가 들어가면서 만성 유병률 증가에 의한 사회적·의료적 제반 문제를 근본적으로 해결하고 인간의 삶의 질을 향상시키기 위하여 전세계적으로 노화 과정을 과학적으로 규명하고 노화 조절 기법을 개발함으로써 노화에 따른 노인성 질환의 근본적인 해결방법이 절실히 요구되고 있다.

4. 연구개발 목표 및 과정

- 연구개발 목표
 - 자생식물(600종 이상)로부터 노화표지인자인 NFκB, iNOS, COX-2, ONOO의 저해능을 탐색하고 활성성분을 분리 동정한다. 그 활성성분의 약리, 효능 및 기전을 분자수준에서 규명하고, 안정성을 검정하여 항노화 식품의약(nutraceuticals)을 개발한다. 또한 지속적으로 새로운 노화표지인자를 RDA, Proteomics, DNA chip 등의 분자기법으로 발굴하고 자생식물들의 효능탐색 지표로 삼아 다양한 항노화 식품의약의 개발에 활용한다.

· 연구개발 과정:

: 자생식물들을 수집·추출하여 노화지표, NFκB, inducible NO synthase, cyclo oxygenase 활성산소·질소를 지표로 활성자생식물 및 활성분획을 탐색하고, 활성분획에서 활성성분을 분리 정제한다. 이들 활성성분들의 작용기전을 분자생물학적인 기법으로 규명한다. 그리고 RDA, 2D/Maldi-top Mass 및 DNA chip으로 새로운 노화 지표인자들을 발굴하였다.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

1) 국내외 연구기관의 연구개발 실적

미국, 일본, 유럽 등의 선진국은 고령화 사회에 대비하여 20~30년 전부터 노화 억제 식품의약 및 의약품 개발에 관심을 가지고 연구투자를 하고 있다. 그러나 기존의 비타민 제제와 항산화물질을 중심으로 항노화 연구가 진행되고 있을 뿐 천연 약용 및 식용식물로부터 대대적이고 체계적인 연구는 전무한 상태이다.

2) 당해 연구기관의 연구개발 실적

- (a) 연구책임자(최재수) : 항산화물질 및 노화억제 물질을 천연물로부터 분리 정제하여 최근 3년간 국제학술지 22편, 국내학술지 24편을 발표하였으며 결명자, 단삼, 패장근 등에서 수종의 신물질을 분리하였다. 또한 알로에, 결명자 및 곰피의 항산화에 관한 국내 특허 18건을 등록 및 출원하였다. 제1단계 연구에서 연수, 뱀나무, 단삼, 인삼, 비파 등에서 활성성분 50여종을 분리 정제하였으며, 특히 연수의 kaempferol, 뱀나무의 genistin, 단삼의 dimethyl lithospermate가 강한 활성을 나타내는 물질로 규명되었다.
- (b) 연구원(정해영) : 본 연구실은 14년 전부터 노화연구를 시작하여 왔으며 최근 3년간 국제학술지 38편, 국내학술지 15편 등 총 53편의 논문을 발표했으며, 노화조절 연구의 핵심 기술을 보유하고 있다. 최근에는 노화의 주된 원인이 되는 활성산소·질소의 생성이 노화 과정에서 미세 염증 반응에 기인한다는 노화의 새로운 가설 분자 염증 가설, "Molecular Inflammation Hypothesis of Aging" (*Micro. Res. Techniq.*, 2002, 59(4):264-72; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2001, 928:327-35)을 제안하여, 국외 여러 노화학자들로부터 지지를 받고 있으며, 또한, 이들 연구자들의 DNA chip data가 본 가설을 지지해 주고 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절. 자생식물로부터 노화억제 활성물질 분리동정

1. 실험방법

가. 실험재료

벗나무 (*Prunus serrulata* var. *spontanea*) 와 왕벗나무 (*P. yedoensis*)는 1999년 4월 부산 금정산에서 채집 (김명기 박사 (Korea Environmental and Ecological Technology Service)의 감정)하였으며, 단삼은 타이완의 Chien Yuan Herbal Medicinal Co. (서울대학교 천연물과학연구소 지형준 교수 감정)에서 구입하였고 식물 표본은 서울대학교 천연물과학연구소의 표본실에 보관하고 있다. 이외 활성실험에 사용된 실험재료의 MeOH 추출물은 한국 생명공학원의 자생식물연구소 (Plant Diversity Research Center) 산하에 있는 한국식물추출물 은행에서 구입하거나 경북 의성, 봉화의 약초시험장 시험포 (안동대학교 손건호 교수 감정)에서 채집하여 사용하였고, 산복사 (*P. davidiana*) 줄기는 부산 평화시장에서 구입 (부산대학교 약학대학 박종희 교수로부터 감정) 사용하였으며, 산 벗나무 (*P. sargentii*)는 경남 고성에서 직접 채집하여 사용하였다. 갯은 전라남도 여수에서 채집하였으며 표본은 부산대학교 식품 영양학과의 식물표본실에 보관해 두었다. 울금, 연수, 함환피 등 실험에 사용한 한약재료는 한약건재상으로부터 구입하여 사용하였다.

나. 시약 및 기기

(1) 시약

Column packing materials은 Kieselgel 60 (Si gel, 70-230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734)과 Sephadex LH-20 (bead size 25-100 μ m, Sigma), Sep-Pak cartridges (C18, Waters Co., USA) 그리고 RP-18 (LiChroprep RP-18, 40-63 μ m, Merck)을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (0.25 mm, precoated, Merck, Art. 5715)과 RP 18 F_{254s} (Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 각각 50 % H₂SO₄, Mg/HCl 및 FeCl₃ 용액을 사용하였다. 그리고 추출 및 column chromatography에는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정시 사용한 용매는 CD₃OD (Merck, deuterium degree 99.95 %), DMSO-*d*₆ (Merck, deuterium degree 99.95 %), CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95 %) 그리고 pyridine-*d*₅ (Aldrich Chemicals, 99 atom % D)이다. DPPH, L-ascorbic acid, DL-penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid)는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 DHR-123 (dihydrorhodamine 123)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였으며, ONOO⁻는 Cayman Chemicals Company (Ann Arbor, MI, USA)으로부터 구

입하여 항산화활성 실험에 사용하였다.

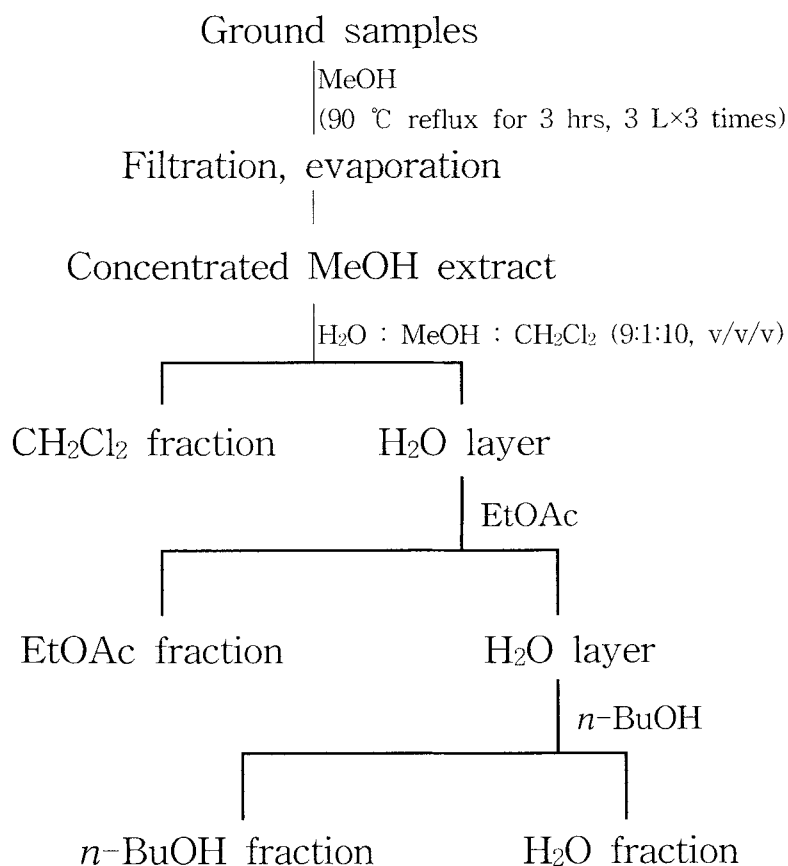
(2) 기기

IR spectrum은 Perkin-Elmer 2000 spectrophotometer를 사용하여 KBr disc법으로 측정하였다. UV spectrophotometer는 Shimadzu 202 UV spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. EIMS는 JEOL JMS-700 spectrometer로, LR-, HR-FABMS는 JEOL JMSH \times 110/110 A spectrometer를 사용하였다. NMR은 JEOL JNM ECP 400 (^1H -NMR 400 MHz; ^{13}C -NMR 100 MHz) 그리고 Bruker AM 300 (^1H -NMR 300 MHz; ^{13}C -NMR 75.5 MHz)을 사용하여 측정하였으며, 2D-NMR인 HMQC, HMBC, COSY, NOESY는 pulsed field gradient를 사용하여 측정하였다. 화학적 이동 (chemical shift)은 tetramethylsilane (TMS)을 내부표준물질로 사용하여 ppm 단위로 나타내었다. 즉, CD_3OD 는 δ_{H} 3.30과 δ_{C} 49.0 ppm에서의 peak, DMSO d_6 는 δ_{H} 2.50과 δ_{C} 39.5 ppm에서의 peak, pyridine d_5 는 δ_{H} 7.19, 7.56, 8.70과 δ_{C} 123.5, 135.5, 149.5 ppm에서의 peak를 기준으로 나타내었다. ^1H -NMR와 ^{13}C -NMR의 다중도 (multiplicities)는 각각 s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), ddd (double double doublet), brd (broad doublet), dt (double triplet) 그리고 m (multiplet)으로 표시하였다. DPPH radical 흡광도는 microplate reader spectrophotometer VERSAmax (Molecular Devices, CA, USA)로 측정하였고, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)와 oxidized DHR 123의 형광 강도 (fluorescence intensity)는 microplate fluorescence reader FL 500 (Bio-Tek Instruments Inc.)로 측정하였다.

다. 추출 및 분획

실험에 사용한 모든 실험재료의 MeOH 추출 및 각 용매별 분획 과정은 Scheme 1에 나타내었다. 뽕나무 잎 (1.8 kg)의 경우는 CH_2Cl_2 획분 144 g, EtOAc 획분 77 g, BuOH 획분 105 g과 하층의 H_2O 획분 145 g을 얻었다. 뽕나무의 꽃과 줄기, 산복사 그리고 왕 뽕나무의 각 용매별 분획은 잎과 동일하게 실행하였다. 잘 말린 단삼 (*Salvia miltiorrhiza*) 8.5 kg을 마쇄하여 methanol (9 L)로 3시간 동안 환류 냉각기를 사용하여 3회 추출 후 여과하고, 농축하여 MeOH 추출물 1.03 kg을 얻었다. 계통적 분석법에 따라 순차적으로 분획하여, CH_2Cl_2 soluble fraction (165 g)과 EtOAc soluble fraction (80 g), *n*-BuOH soluble fraction (80 g), H_2O fraction (675 g)으로 나누었다. 건조한 합환피 18.2 kg으로부터 MeOH 추출물 (2.97 kg)을 얻었으며, 얻어진 MeOH 추출물을 H_2O 에 녹인 후 극성이 다른 용매를 이용하여 순차적으로 분획하여 CH_2Cl_2 (931.8 g), EtOAc (86.2 g), *n*-BuOH (649.5 g) 그리고 H_2O (1181.8 g) 획분을 얻었다. 솔잎 건조 분말 (8.5 kg)로부터 MeOH 추출물 (2.1 kg)을 얻었으며 이 추출물을 증류수로 현탁한 다음, CH_2Cl_2 (600 g), EtOAc (200 g), *n*-BuOH (450 g) 그리고 H_2O (750 g)로 연속적으로 분획 하였다. 기름을 짜고 남은 들깨박 (10 kg)을 분쇄하여 560 g의 MeOH 추출액을 얻었다. 이 추출물을 분획

하여 *n*-hexane 분획 (257.3 g), CH₂Cl₂ 분획 36.5 g, EtOAc 분획 10.4 g, BuOH 분획 82.1 g을 얻었다. 나머지 H₂O 층을 농축하여 141.2 g의 H₂O 분획을 얻었다. 갖 건조 분말 (3.67 kg)로 부터 MeOH 추출물 (400 g)을 얻고, 이 추출물을 증류수도 현탁한 다음, CH₂Cl₂ (76 g), EtOAc (2.5 g), *n*-BuOH (31 g) 그리고 H₂O (286 g)로 연속적으로 분획 하였다. 울금 (200 g)의 건조된 근경을 MeOH로서 추출하여 MeOH 추출물 (21 g)을 얻었다. 이 추출물을 H₂O에서 현탁시킨 후, 극성이 다른 용매로 분획하여 CH₂Cl₂ 추출물 (14.4 g), EtOAc 추출물 (2.2 g)과 H₂O 잔류물 (3.5 g)을 얻었다. 건조하여 분말로 한 연수 (*Nelumbo nucifera*, 3.4 kg)로 부터 MeOH 추출물 560 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 CH₂Cl₂, EtOAc 그리고 *n*-BuOH로 계속해서 분획하여 CH₂Cl₂ (330 g), EtOAc (20 g), 그리고 *n*-BuOH (66 g) 분획물들과 H₂O 잔사 (140 g)을 얻었다.



Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of plant materials.

라. 성분의 분리

(1) 뽕나무 EtOAc 획분의 성분 분리 및 분광학적 특성

뽕나무 (*P. serrulata* var. *spontanea*)의 MeOH 추출물과 그 획분들, CH₂Cl₂,

EtOAc, *n*-BuOH 획분과 H₂O 층에 대하여 DPPH radical 소거 활성법, 세포내 활성 산소종 생성 억제 활성법, 그리고 ONOO⁻ 소거 활성법을 사용한 항산화활성 실험계에서, EtOAc 획분의 활성이 가장 높게 나타났다. 이에 EtOAc 획분을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, Sep-Pak C18 cartridge, 그리고 RP-18 column chromatography를 수행하여 항산화 활성 성분을 분리하였다. 각 subfractions 및 분리·정제된 화합물에 대하여 CH₂Cl₂ : MeOH (10 : 1, 7 : 1, 5 : 1, 3 : 1), EtOAc : MeOH (20 : 1, 10 : 1, 5 : 1), 그리고 EtOAc : MeOH : H₂O (21 : 4 : 3 또는 24 : 2 : 1) 전개용매로서 TLC 하여 50 % H₂SO₄ (TLC sprayer, Merck)로 발색시켜 200 °C의 hot plate에서 탄화시켰다. 그리고 254 nm와 365 nm의 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, USA)를 사용하여 형광을 띠는 물질을 검출하였다. 또한 Liebermann-burchard법을 사용하여 triterpenoid 화합물을 검출하였다. 즉 빗나무 잎의 MeOH 추출물로부터 얻은 EtOAc 획분 약 77 g을 전개용매 EtOAc : MeOH (8 : 1 → 1 : 1, gradient)로서 silica gel column chromatography하여 14개의 subfractions (fr. 1-14)을 얻었다. Fr. 1 (1 g)을 전개용매 CH₂Cl₂ : MeOH (2 : 1 → MeOH)로 Sephadex LH-20 column chromatography하여 compounds **1** (prunetin, 30 mg)과 **2** (genistein, 15 mg)를 얻었다. Fr. 1의 여액 (430 mg)과 fr. 2 (300 mg)를 합쳐서 acetic anhydride-pyridine 반응액으로 acetylation시킨 후, petroleum benzine:ether (5 : 1 → 1 : 1, EtOAc, gradient)로서 silica gel column chromatography하여 ursolic acid acetate (**3a**)와 2 α -hydroxy ursolic acid diacetate (**4a**)를 분리하였으며 각 화합물을 deacetylation시켜 compound **3** (ursolic acid, 50 mg)과 **4** (2 α -hydroxy ursolic acid, 70 mg)을 얻었다. Fr. 3 (7.53 g)을 *n*-hexane : EtOAc (1 : 1 → EtOAc, MeOH)로서 silica gel column chromatography하여 compound **5** (quercetin, 20 mg)과 **6** (2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 40 mg)을 분리하였다. Fr. 4 (6.72 g)는 MeOH 재결정법에 의해 compound **7** (prunetin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside, 1.58 g)를 분리하였으며, 그 모액 (5.14 g)은 용매 EtOAc : MeOH (10 : 1 → MeOH, gradient)로서 silica gel column chromatography한 후 Sephadex LH-20 (MeOH)로 정제하여 compounds **8** (sphingolipid, 10 mg)과 **9** (kaempferol 3-*O*- α -L-arabinofuranoside, 15 mg)를 얻을 수 있었다. Fr. 5 (1.66 g)는 MeOH로서 Sephadex LH-20 column chromatography하여 compound **10** (1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 40mg)을 분리하였다. 동일한 분리방법으로 fr. 6 (2.59 g)에서 compounds **11** (prunetin 5-*O*- β -D-glucopyranoside, 40 mg)과 **12** (kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranoside, 80 mg)을 얻었다. Fr. 7은 전개용매 EtOAc : MeOH (20 : 1 → MeOH, gradient)로 silica gel column chromatography를 수행하여 compound **13** (naringenin 7-*O*- β -D-glucopyranoside, 10 mg)를 분리하였다. Fr. 8과 9 (3.88 g)는 합쳐서 MeOH로 재결정하여 compound **14** (genistin, 200 mg)를 얻었으며, 나머지 모액 (3.5 g)은 Sephadex LH-20 (MeOH)로 column chromatography하여 compound **15** (kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside, 100 mg)을 분리하였다. Fr. 13 (2.82 g)은 RP-18 column으로 H₂O-MeOH (0 % → 100 %, gradient)을 전개용매로 분획하였으며 그 중 20 % MeOH 획분을 다시 Sephadex LH-20으로 정제하여 compound

16 (orobol-7-*O*- β -D-glucopyranoside, 10 mg)을 얻었다. Fr. 14 (4.76 g)는 전개용매 EtOAc : MeOH (10 : 1 \rightarrow MeOH, gradient)을 사용한 silica gel column, H₂O-MeOH (0 % \rightarrow 100 %, gradient)을 사용한 Sep Pak C18 cartridge, 그리고 Sephadex LH-20으로 정제하여 각각 compounds **17** (2a, 3a, 24-trihydroxyurs-12-en-28-oic- β -D-glucopyranoside, 24 mg)과 **18** (2a, 3a, 19a, 24-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic- β -D-glucopyranoside, 24 mg), **19** (2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl-*o*-(*Z*)-coumaric acid, 60 mg), **20** (quercetrin 3-*O*- β -D-glucopyranoside, 60 mg), 그리고 **21** (kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside, 7 mg)을 얻었다.

Compound 1 (prunetin) : Colorless needles ; m.p. 238-239 °C ; EI-MS (*m/z*, %) : 284 (M⁺, 100), 283 (M⁺-H, 48), 166 (52), 138 (22), 118 (14) ; UV_{max} (MeOH) : 262 (log ϵ 3.29), 334 (sh 2.37) nm ; + NaOMe 271 (3.30), 356 (sh 2.63) ; + NaOAc 261 (3.29), 332 (sh 3.39) ; + NaOAc + H₃BO₃ 262 (3.29), 332 (sh 2.40) ; + AlCl₃ 274 (3.26), 312 (sh 2.54), 377 (2.36) ; + AlCl₃ + HCl 274 (3.25), 313 (sh 2.47), 379 (2.34) nm ; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.96 (1H, brs, 5-OH), 9.60 (1H, brs, 4' -OH), 8.41 (1H, s, H-2), 7.39 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.66 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.41 (1H, *J* = 2.1 Hz, H-6), 3.86 (3H, s, OCH₃) ; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 180.40 (C-4), 165.20 (C-7), 161.72 (C-5), 157.48 (C-4'), 157.44 (C-9), 154.37 (C-2), 130.12 (C-2', 6'), 122.48 (C-3), 121.01 (C-1'), 115.04 (C-3', 5'), 105.39 (C-10), 98.01 (C-6), 92.40 (C-8), 56.08 (OMe) [Farkas *et al.*, 1969].

Compound 2 (genistein) : ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.95 (1H, brs, 5-OH), 9.99 (1H, brs, 4' -OH), 8.31 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, d, *J* = 8.6, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.37 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.21 (1H, *J* = 2.1 Hz, H-6) ; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 180.14 (C-4), 164.52 (C-7), 161.96 (C-5), 157.57 (C-9, 4'), 157.37 (C-2), 130.11 (C-2', 6'), 122.22 (C-3), 121.20 (C-1'), 115.02 (C-3', 5'), 104.34 (C-10), 99.00 (C-6), 93.67 (C-8) [Wang *et al.*, 1999b].

Compound 3 (ursolic acid) : ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 5.48 (1H, brs, H-12), 3.45 (1H, dd, *J* = 6.0, 4.1 Hz, H-3a), 2.62 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H-18), 1.23 (3H, s, H-23), 1.21 (3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-30), 0.93 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-29), 0.87 (3H, s, H-25) ; ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 179.80 (C-28), 139.20 (C-13), 125.55 (C-12), 78.06 (C-3), 55.77 (C-5), 53.49 (C-18), 47.99 (C-9, 17), 42.45 (C-14), 39.91 (C-8), 39.43 (C-19), 39.34 (C-4), 39.32 (C-1), 39.02 (C-20), 37.38 (C-10), 37.22 (C-22), 33.52 (C-7), 31.01 (C-21), 28.74 (C-23), 28.63 (C-15), 28.07 (C-2), 24.85 (C-16), 23.85 (C-27), 23.57 (C-11), 21.34 (C-30), 18.73 (C-6), 17.45

(C-29), 17.40 (C-26), 16.51 (C-25), 15.61 (C-24) [Takeoka *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 1999].

Compound 4 (2 α -hydroxy ursolic acid) : EIMS m/z 472 [C₃₀H₄₈O₄]⁺, 248, 203, ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 5.46 (1H, brs, H-12), 4.11 (1H, ddd, J = 4.2, 9.5 Hz, H-2 β), 3.37 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3 α), 2.61 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-18), 1.26 (3H, s, H-23), 1.21 (3H, s, H-27), 1.06 (3H, s, H-26), 1.03 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-30), 0.98 (3H, s, H-25), 0.96 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-29) ; ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 179.77 (C-28), 139.21 (C-13), 125.49 (C-12), 83.73 (C-3), 68.53 (C-2), 55.87 (C-8), 53.47 (C-18), 48.04 (C-9), 47.97 (C-17), 47.89 (C-1), 42.49 (C-14), 39.99 (C-18), 39.77 (C-4), 39.44 (C-19), 39.36 (C-20), 38.39 (C-10), 37.37 (C-22), 33.47 (C-7), 31.04 (C-21), 29.31 (C-23), 28.59 (C-15), 24.84 (C-16), 23.88 (C-27), 23.69 (C-11), 21.38 (C-29), 18.79 (C-6), 17.63 (C-24), 17.47 (C-25), 17.41 (C-26), 16.97 (C-30) [Jung *et al.*, 1999].

Compound 5 (quercetin) : EI-MS (m/z , %) : 302 (M⁺, 100), 153 (7.2), 137 (10.4) [Young *et al.*, 1991].

Compound 6 (2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid) : Amorphous white powder ; EIMS m/z 487 [C₃₀H₄₈O₅-H]⁺, 248, 203 ; LR-FABMS m/z 511.2 [C₃₀H₄₈O₅+Na]⁺ ; HR-FABMS m/z 511.3399 [C₃₀H₄₈O₅+Na]⁺ (Calc. for 511.6979) ; IR (KBr) ν_{\max} 3422, 1691, 1458 cm⁻¹ ; ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 5.44 (s, H-12), 4.56 (d, J = 2.4 Hz, H-3), 4.41 (dt, J = 3.9, 10.0 Hz, H-2), 4.08 (d, J = 10.9 Hz, H-24b), 3.79 (d, J = 10.9 Hz, H-24a), 2.59 (d, J = 11.2 Hz, H-18), 1.92 (d, J = 11.6 Hz, H-1b), 1.80 (d, J = 11.7 Hz, H-1a), 1.66 (s, H-23), 1.11 (s, H-27), 1.01 (s, H-26), 0.98 (s, H-25), 0.94 (d, J = 6.4 Hz, H-30), 0.91 (d, J = 6.4 Hz, H-29) ; ¹³C-NMR data (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 179.9 (C-28), 139.19 (C-13), 125.50 (C-12), 74.17 (C-3), 66.19 (C-2), 65.16 (C-24), 53.49 (C-18), 49.42 (C-5), 48.08 (C-9), 47.99 (C-17), 45.13 (C-4), 43.16 (C-1), 42.46 (C-14), 40.16 (C-8), 39.42 (C-19), 39.38 (C-20), 38.50 (C-10), 38.50 (C-10), 37.41 (C-22), 33.95 (C-7), 31.05 (C-21), 28.59 (C-15), 24.86 (C-16), 23.79 (C-23, 27), 23.78 (C-11), 21.35 (C-29), 18.84 (C-6), 17.44 (C-30), 17.34 (C-26), 17.16 (C-25) [Chusheng *et al.*, 1988].

Compound 6a (methylation of compound 6 with diazomethane, methyl 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid) : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.24 (t, J = 3.3 Hz, H-12), 3.99 (m, $W_{1/2}$ = 22.4 Hz, H-2), 3.86 (brd, H-3), 3.70 (d, J = 11.2 Hz, H-24a), 3.45 (d, J = 11.2 Hz, H-24b), 2.22 (d, J = 11.2 Hz, H-18), 1.13 (s, H-23), 1.08 (s, H-27), 0.93 (d, J = 6.3 Hz, H-30), 0.91 (s, H-25), 0.85 (d, J = 6.3 Hz, H-29), 0.70 (s, H-26) ; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ :

178.06 (C-28), 138.22 (C-13), 125.22 (C-12), 73.30 (C-3), 66.29 (C-2), 65.49 (C-24), 52.82 (C-18), 51.44 (OMe), 48.67 (C-5), 48.05 (C-17), 47.40 (C-9), 43.98 (C-4), 42.04 (C-14), 41.63 (C-1), 39.62 (C-8), 39.03 (C-19), 38.85 (C-20), 38.03 (C-10), 33.61 (C-22), 33.10 (C-7), 30.62 (C-21), 27.96 (C-15), 24.18 (C-16), 23.72 (C-27), 23.44 (C-11), 22.23 (C-23), 21.15 (C-29), 18.19 (C-6), 17.02 (C-30), 16.86 (C-25), 16.78 (C-26) [Sakakibara and Kaiya, 1983; Kojima *et al.*, 1987; 1989].

Compound 7 (prunetin 4'-O- β -D-glucopyranoside, prunitrin) : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.91 (1H, brs, 5-OH), 8.42 (1H, s, H-2), 7.51 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 7.11 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 6.67 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.42 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-6), 4.91 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 3.87 (3H, s, OCH₃) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.56 (C-4), 165.63 (C-7), 161.71 (C-5), 157.91 (C-9), 157.62 (C-4'), 155.02 (C-2), 130.46 (C-2', 6'), 124.44 (C-1'), 122.60 (C-3), 116.47 (C-3', 5'), 105.72 (C-10), 100.57 (C-1''), 98.44 (C-6), 92.89 (C-8), 77.19 (C-5''), 76.63 (C-3''), 73.42 (C-2''), 69.95 (C-4''), 60.93 (C-6''), 56.46 (OMe) [Geibel, 1995; Geibel and Feucht, 1991 ; Geibel *et al.*, 1990].

Compound 8 (sphingolipid) : Amorphous white powder; LR-FABMS m/z 866.6 [C₄₈H₉₃NO₁₀+Na]⁺; HR-FABMS m/z 866.66967, Calc. for 867.2611 [C₄₈H₉₃NO₁₀+Na]⁺ ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 8.59 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, amide linkage), 5.51 (1H, m, H-9), 5.42 (1H, m, H-8), 5.26 (1H, m, H-2), 4.93 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.74 (1H, dd, $J = 6.9, 10.0$ Hz, H-1), 4.60 (1H, m, H-2''), 4.50 (1H, dd, $J = 5.3, 8.0$ Hz, H-1), 4.48 (1H, dd, $J = 3.1, 12.6$ Hz, H-6''), 4.32 (1H, dd, $J = 5.1, 12.6$ Hz, H-6''), 4.30 (1H, m, H-4''), 4.28 (1H, m, H-3), 4.17 (2H, m, H-3'', 4), 4.00 (1H, t, $J = 8.2$ Hz, H-2''), 3.89 (1H, m, H-5''), 2.20, 2.10, 1.76 (m), 1.32, 1.24 [s, (CH₂)_n], 0.87 (t-like, $J = 7.0$ Hz, CH₃) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 175.56 (C-1'), 130.32 (C-8), 130.11 (C-9), 105.51 (Glu-C-1''), 78.47 (C-5''), 78.37 (C-3''), 75.82 (C-3), 75.08 (C-2''), 72.40 (C-2'), 72.35 (C-4), 71.39 (C-4''), 70.38 (C-1), 62.56 (C-6''), 51.67 (C-2), 35.49, 33.91, 32.04, 29.94, 29.84, 29.79, 29.52, 27.85 (C-10'), 27.50 (C-7'), 26.72, 25.78, 22.86 (C-17', all CH₂), 14.20 (CH₃) [Kang *et al.*, 1999 ; Sang *et al.*, 2002].

Compound 9 (kaempferol 3-O- α -L-arabinofuranoside, juglanin) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.63 (1H, brs, 5-OH), 10.88(1H, brs, OH), 10.20 (1H, brs, OH), 8.02 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.63 (1H, brs, H-1''); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.62 (C-4), 164.16 (C-7), 161.16 (C-5), 159.91 (C-4'), 156.74 (C-9), 156.32 (C-2), 133.37 (C-3), 130.75 (C-2', 6'), 120.67 (C-1'), 115.37 (C-3', 5'), 103.97 (C-10), 108.02 (C-1''), 98.63 (C-6), 93.64 (C-8), 86.30 (C-4''), 82.09 (C-2''), 77.06 (C-3''), 60.82 (C-5'') [De Almeida *et al.*,

1998 ; Kim *et al.*, 1994].

Compound 10 (1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid) :
Amorphous white powder ; EIMS m/z 504 [$C_{30}H_{48}O_6$]⁺, 248, 203; LR-FABMS m/z 527.1 [$C_{30}H_{48}O_6+Na$]⁺ ; HR-FABMS m/z 527.3349 [$C_{30}H_{48}O_6+Na$]⁺ (Calc. for 527.6996) ; ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 5.56 (s, H-12), 4.67 (d, J = 2.8 Hz, H-3), 4.29 (dd, J = 2.2, 9.4 Hz, H-2), 4.19 (d, J = 9.0 Hz, H-1), 4.17 (d, J = 10.9 Hz, H-24b), 3.80 (d, J = 11.0 Hz, H-24a), 2.59 (d, J = 11.2 Hz, H-18), 1.65 (s, H-23), 1.28 (s, H-25), 1.17 (s, H-27), 1.12 (s, H-26), 0.95 (d, J = 6.0 Hz, H-30), 0.90 (d, J = 6.4 Hz, H-29) ; ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 179.88 (C-28), 138.19 (C-13), 126.96 (C-12), 81.04 (C-1), 74.54 (C-3), 71.52 (C-2), 65.15 (C-24), 53.41 (C-18), 49.27 (C-5), 49.14 (C-9), 48.04 (C-17), 44.77 (C-4), 43.70 (C-10), 42.42 (C-14), 40.78 (C-8), 39.40 (C-19), 39.36 (C-20), 37.41 (C-7, 22), 31.06 (C-21), 28.66 (C-15), 27.68 (C-11), 24.91 (C-16), 23.83 (C-23), 23.81 (C-27), 21.34 (C-29), 18.94 (C-6), 17.79 (C-26), 17.44 (C-30), 13.54 (C-25) [Sakakibara *et al.*, 1983 ; Li *et al.*, 1998 ; Guang-Yi *et al.*, 1989].

Compound 11 (prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside, prunetinoside) :
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.55 (1H, brs, 4' -OH), 8.26 (1H, s, H-2), 7.32 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2' , 6'), 6.80 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3' , 5'), 6.87 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-8), 6.89 (1H, J = 2.5 Hz, H-6), 4.82 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 3.88 (3H, s, OCH₃) ; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 175.02 (C-4), 163.50 (C-7), 158.73 (C-5), 158.62 (C-9), 157.20 (C-4'), 151.79 (C-2), 130.32 (C-2' , 6'), 124.84 (C-1'), 122.22 (C-3), 114.89 (C-3' , 5'), 109.73 (C-10), 103.53 (C-1''), 102.60 (C-6), 93.84 (C-8), 77.60 (C-5''), 75.83 (C-3''), 73.53 (C-2''), 69.91 (C-4''), 60.91 (C-6''), 56.05 (OMe) [Khalid *et al.*, 1989].

Compound 11a (acid hydrolysis of compound 11 with 5 % H₂SO₄ in MeOH, prunetin) : ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.96 (1H, brs, 5-OH), 9.60 (1H, brs, 4' -OH), 8.41 (1H, s, H-2), 7.39 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2' , 6'), 6.82 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3' , 5'), 6.66 (1H, s, H-8), 6.41 (1H, s, H-6), 3.87 (3H, s, OCH₃) ; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 180.40 (C-4), 165.22 (C-7), 161.74 (C-5), 157.51 (C-4'), 157.45 (C-9), 154.38 (C-2), 130.13 (C-2' , 6'), 122.51 (C-3), 121.03 (C-1'), 115.07 (C-3' , 5'), 105.41 (C-10), 98.03 (C-6), 92.41 (C-8), 56.09 (OMe).

Compound 12 (kaempferol 3-O- β -D-xylopyranoside) : ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.58 (1H, brs, 5-OH), 10.89(1H, brs, OH), 10.24 (1H, brs, OH), 8.02 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2' , 6'), 6.89 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3' , 5'), 6.44 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.33 (1H, d, J = 6.8 Hz,

H-1'') ; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 177.39 (C-4), 164.27 (C-7), 161.20 (C-5), 160.11 (C-4'), 156.34 (C-9), 156.17 (C-2), 133.11 (C-3), 130.81 (C-2', 6'), 120.70 (C-1'), 115.26 (C-3', 5'), 103.91 (C-10), 101.71 (C-1''), 98.76 (C-6), 93.70 (C-8), 75.82 (C-4''), 73.69 (C-2''), 69.41 (C-3''), 65.94 (C-5'') [Agrawal, 1992].

Compound 13 (naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside, prunin) : ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.31 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.80 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.18 (1H, t, J = 2.2 Hz, H-6), 6.20 (1H, t, J = 2.2 Hz, H-8), 5.36 (1H, dt, J = 1.9, 2.8 Hz, H-2), 4.96 (1H, dd, J = 4.4, 8.0 Hz, H-1''), 3.89 (1H, dd, J = 1.7, 10.6 Hz, H-6a''), 3.86 (1H, dd, J = 3.2, 12.0 Hz, H-6b''), 3.40 3.50 (4H, m, aliphatic proton), 3.16 (1H, dd, J = 13.0, 17.8 Hz, H-3b), 2.74 (1H dd, J = 3.0, 17.0 Hz, H-3a) ; ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 199.35 (C-4), 167.83 (C-7), 165.76 (C-5), 165.41 (C-4'), 159.92 (C-9), 131.65 (C-1'), 129.93 (C-2', 6'), 117.14 (C-3', 5'), 105.74 (C-10), 102.06 (C-1''), 98.80 (C-6), 97.72 (C-8), 81.51 (C-2), 79.06 (C-5''), 78.61 (C-2''), 75.45 (C-3''), 71.95 (C-4''), 63.14 (C-6''), 44.96 (C-3) [Choi *et al.*, 1991b].

Compound 14 (genistin) : ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.94 (1H, brs, 5-OH), 9.59 (1H, brs, 4'-OH), 8.43 (1H, s, H-2), 7.40 (2H, d, J = 8.6, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.71 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.47 (1H, J = 2.1 Hz, H-6), 5.06 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-1'') ; ^{13}C NMR (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 180.79 (C-4), 163.24 (C-7), 161.61 (C-5), 157.56 (C-9, 4'), 154.81 (C-2), 130.55 (C-2', 6'), 122.99 (C-3), 121.42 (C-1'), 115.41 (C-3', 5'), 106.44 (C-10), 100.16 (C-1''), 99.91 (C-6), 94.98 (C-8), 77.35 (C-5''), 76.37 (C-3''), 73.23 (C-2''), 69.81 (C-4''), 60.82 (C-6'') [Wang *et al.*, 1999b].

Compound 15 (kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside, astragalol) : ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.61 (1H, brs, 5-OH), 8.04 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.22 (1H, J = 2.0 Hz, H-6), 5.46 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-1'') ; ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 177.53 (C-4), 164.18 (C-7), 161.27 (C-5), 159.99 (C-4'), 156.44 (C-9), 156.34 (C-2), 133.26 (C-3), 130.94 (C-2', 6'), 120.97 (C-1'), 115.16 (C-3', 5'), 104.08 (C-10), 100.95 (C-1''), 98.76 (C-6), 93.72 (C-8), 77.52 (C-5''), 76.48 (C-3''), 74.28 (C-2''), 69.96 (C-4''), 60.91 (C-6'') [Young *et al.*, 1991 ; Park *et al.*, 1991].

Compound 16 (orobol 7-O- β -D-glucopyranoside, oroboside) : ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.21 (1H, s, H-2), 7.03 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.86 (1H, dd, J = 2.0, 8.2 Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.69 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.51 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 4.95 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1''), 3.91

(1H, dd, $J = 2.4, 12.0$ Hz, H-6a''), 3.71 (1H, dd, $J = 5.7, 12.0$ Hz, H-6b''), 3.47-3.53 (3H, aliphatic proton) ; ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 183.31 (C-4), 165.57 (C-7), 164.37 (C-5), 160.03 (C-9), 156.13 (C-2), 147.73 (C-2'), 147.08 (C-6'), 125.96 (C-3), 124.39 (C-1'), 122.49 (C-4'), 118.22 (C-3'), 117.16 (C-5'), 108.83 (C-10), 102.44 (C-1''), 101.90 (C-6), 96.66 (C-8), 79.19 (C-5''), 78.65 (C-3''), 75.51 (C-2''), 72.02 (C-4''), 63.22 (C-6'') [Agrawal, 1989 ; Arora *et al.*, 2000].

Compound 17 (2a, 3a, 24-trihydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside) : Amorphous white powder ; EIMS m/z 488 [$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{10}\text{-H+glycoside}$] $^+$, 248, 203; LR-FABMS m/z 673.4 [$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{10}\text{+Na}$] $^+$; IR (KBr) ν_{max} 3423, 1735, 1459, 1074, 1030 cm^{-1} ; ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data (400 MHz and 100 MHz, pyridine- d_5) see Table 16.

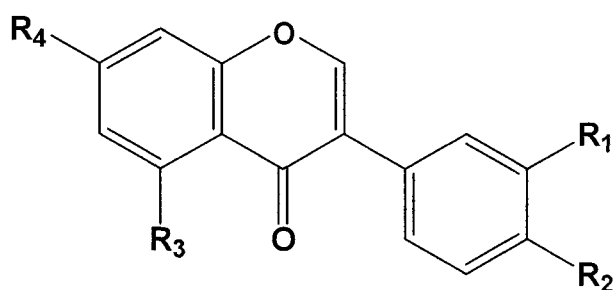
Compound 18 (2a, 3a, 19a, 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside) : Amorphous white powder; LR-FABMS m/z 689.3 [$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{+Na}$] $^+$; ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data (400 MHz and 100 MHz, pyridine- d_5) see Table 16 (El Lahlou *et al.*, 1999).

Compound 19 (2-O- β -(6'-benzoyl) glucopyranosyl-o-(Z)-coumaric acid) : Amorphous white powder ; UV_{max} (MeOH): 223, 264 nm; HR-FABMS m/z 453.1162 [$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9 + \text{Na}$] $^+$; ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data (400 MHz and 100 MHz, CD_3OD) see Table 17.

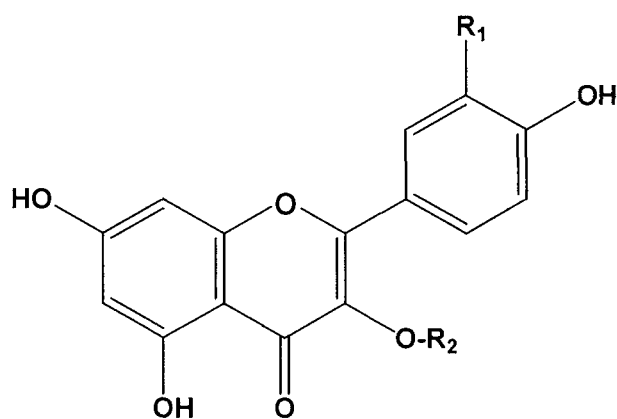
Compound 20 (quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside, isoquercitrin) : ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.64 (1H, brs, 5-OH), 10.88 (1H, brs, OH), 9.73 (1H, brs, OH), 9.23 (1H, brs, OH), 7.57 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.84 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.46 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'') ; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.44 (C-4), 164.10 (C-7), 161.24 (C-5), 156.32 (C-2), 156.19 (C-9), 148.45 (C-4'), 144.80 (C-3'), 133.33 (C-3), 121.60 (C-6'), 121.18 (C-1'), 116.21 (C-5'), 115.21 (C-2'), 103.99 (C-10), 100.88 (C-1''), 98.65 (C-6), 93.51 (C-8), 77.56 (C-5''), 76.51 (C-3''), 72.27 (C-2''), 69.94 (C-4''), 60.98 (C-6'') [Young *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1991].

Compound 21 (kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside, kaempferol 3-sambubioside) : ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.09 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.18 (1H, brs, H-6), 5.35 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 4.72 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'''), 3.98 (1H, m, H-2''), 3.95 (1H, dd, $J = 5.0, 12.0$ Hz, H-5b''),

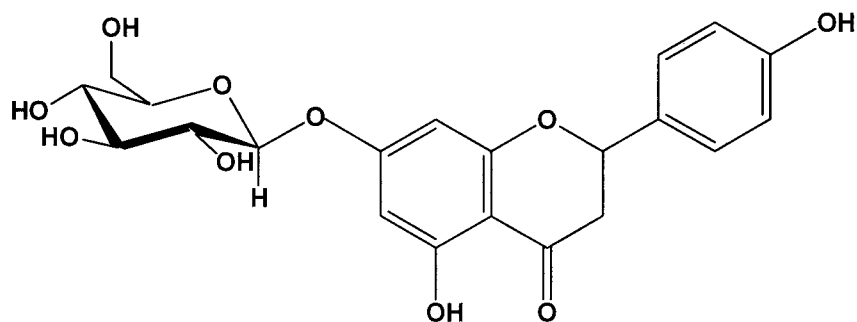
3.81 (1H, m, H-4''), 3.68 (1H, m, H-3''), 3.60 (1H, dd, $J = 5.6, 12.0$ Hz, H-6b''), 3.53 (1H, dd, $J = 6.3, 12.0$ Hz, H-6a''), 3.51 (1H, m, H-4'''), 3.43 (1H, m, H-5''), 3.38 (1H, m, H-2'''), 3.37 (1H, m, H-3'''), 3.22 (1H, dd, $J = 1.6, 11.6$ Hz, H-5a''') ; ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 180.55 (C-4), 167.04 (C-7), 163.93 (C-5), 162.32 (C-4'), 159.26 (C-9), 159.00 (C-2), 135.80 (C-3), 133.18 (C-2', 6'), 123.54 (C-1'), 117.04 (C-3', 5'), 106.44 (C-10, 1'''), 102.01 (C-1''), 100.72 (C-6), 95.52 (C-8), 81.29 (C-2''), 78.02 (C-3'''), 77.84 (C-5''), 76.00 (C-3''), 75.84 (C-2'''), 71.86 (C-4'''), 71.03 (C-4''), 67.55 (C-5'''), 62.75 (C-6'') [Jung *et al.*, 1999 ; Beninger *et al.*, 1998].



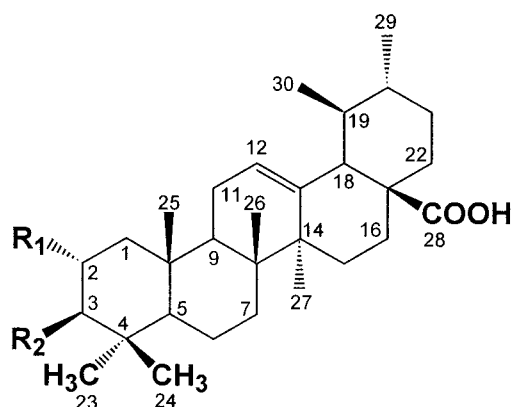
Prunetin (1) : $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{OMe}$
 Genistein (2) : $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$,
 Prunetin 4'- O - β -D-glucopyranoside (7) : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{O-Glu}, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{OMe}$
 Prunetin 5- O - β -D-glucopyranoside (11) : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{O-Glu}, R_4 = \text{OMe}$
 Genistin (14) : $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{O-Glu}$
 Orobol 7- O - β -D-glucopyranoside (16) : $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{O-Glu}$



Quercetin (5) : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$
 Kaempferol 3- O - α -L-arabinofuranoside (9) : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Ara}$
 Kaempferol 3- O - β -D-xylopyranoside (12) : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Xyl}$
 Kaempferol 3- O - β -D-glucopyranoside (15) : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Glu}$
 Quercetin 3- O - β -D-glucopyranoside (20) : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{Glu}$
 Kaempferol 3- O - β -D-xylopyranosyl D-glucopyranoside (21) : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Glu-(1}\rightarrow\text{2)-Xyl}$

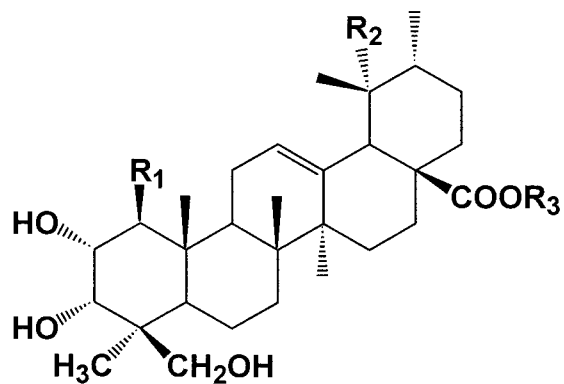


Naringenin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (13)



Ursolic acid (3): $R_1=H$, $R_2=OH$

2a-Hydroxyursolic acid (4): $R_1=OH$, $R_2=OH$



2a, 3a, 24-Trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6) : $R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=H$

Methyl 2a, 3a, 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6a) : $R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=Me$

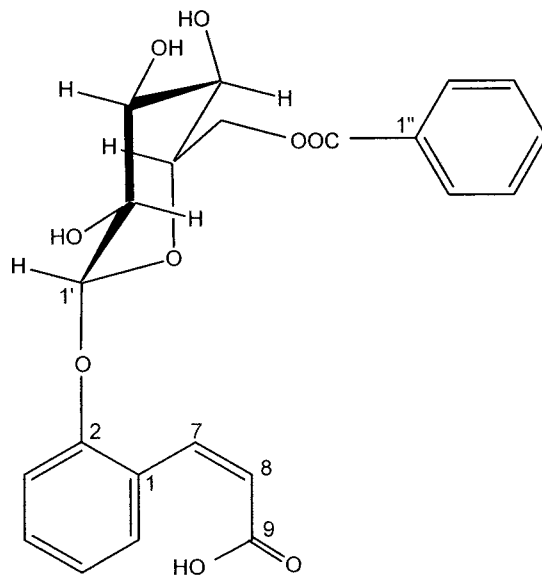
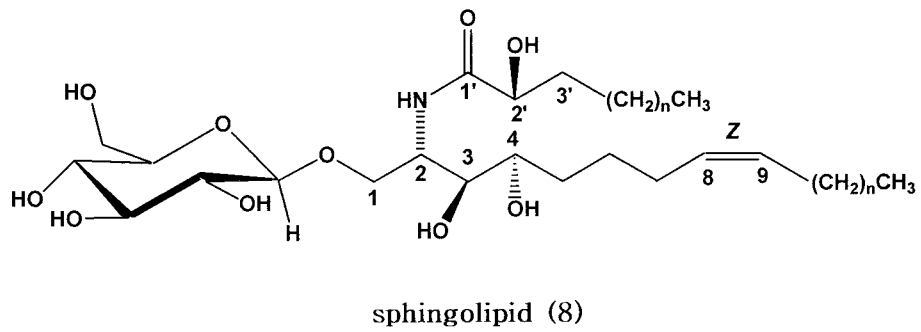
1 β , 2a, 3a, 24-Tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10) : $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=H$

2a, 3a, 24-Trihydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (17) :

$R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=\beta$ -D-glucopyranoside

2a, 3a, 19a, 24-Tetrahydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (18) :

$R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=\beta$ -D-glucopyranoside



2-O- β -(6'-benzoyl) glucopyranosyl *o*-(*Z*) coumaric acid (19)

Fig. 1. Chemical structures of isolated compounds from
P. serrulata var. *spontanea* leaves.

(2) 단삼에서 분리된 화합물의 분광학적 성질

단삼의 MeOH 추출물과 그 분획물들의 항산화 활성은 이미 알려진바 있으며 (Kang *et al.*, 1997), 수용성 활성 성분을 검색하던 중 *n*-BuOH 층에서 lignan glycoside인 compound 22를 분리하였으며, EtOAc 층에서는 depside인 compound 23을 분리하였다. 단삼의 MeOH 추출물의 *n*-BuOH 층 (60 g)을 1N HCl로 이온화시킨 Amberlite IR-120 Plus 음이온 교환수지를 통과시킨 후 MCI-gel column chromatography를 H₂O, H₂O : MeOH (1 : 2, 1 : 1, 2 : 1), MeOH로 용출하여 5개의 분획으로 나누었다. 그 두 번째 분획물을 CH₂Cl₂ : MeOH = 9:1을 용매로 silica gel column chromatography를 하여 50 % H₂SO₄ reagent에서 어두운 갈색으로 발색되는 화합물을 분리하였으며, 최종적으로 Sephadex LH-20으로

정제하여 compound **22** (27.5 mg)을 얻었다. 단삼의 EtOAc 분획을 CH₂Cl₂ : MeOH (15 : 1)의 용매로 SiO₂ column chromatography하여 12개의 sub-fraction (F1~F12)을 얻었다. 그 중 F3을 재차 CH₂Cl₂ : MeOH (20 : 1)의 용매로 SiO₂ column chromatography하고 Sephadex LH-20으로 정제하여 연한 노란색의 무정형 분말 compound **23** (240 mg)를 얻었다.

Compound 22 [(+)-1-hydroxypinoresinol-1-O-β-D-glucoside] : Amorphous powder $[\alpha]_D^{20}$: -9.3° (c 0.009, MeOH). HR-FABMS m/z : 559.1448 (Calcd for C₂₆H₃₂O₁₂Na, m/z 559.1452, Δ -0.4 mmu) ; positive-FABMS m/z 559 [M+Na]⁺, 536[M]⁺ ; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.11 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-2'), 7.03 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2''), 6.88 (1H, dd, J = 1.8, 7.9 Hz, H-6''), 6.86 (1H, dd, J = 1.8, 7.8 Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5''), 6.72 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 4.69 (1H, s, H-2), 4.58 (1H, s, H-6), 4.49 (1H, t, J = 8.8 Hz, H-4), 4.39 (1H, d, J = 10.4, H-8), 4.33 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1'''), 3.93 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-8), 3.88 (3H, s, OCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.80 (1H, dd, J = 5.9 & 9.1 Hz, H-4), 3.68 (1H, dd, J = 2.2, 12.1 Hz, H-6'''), 3.51 (1H, dd, J = 5.8, 12.0 Hz, H-6'''), 3.40 (1H, m, H-5), 3.14 (2H, dd, J = 2.5, 6.8 Hz, H-3''', 4'''), 3.02 (1H, dt, J = 2.3, 7.3, 7.5 Hz, H-2'''), 2.87 (1H, m, H-5''') ; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 150.1 (C-3''), 149.2 (C-3'), 148.3 (C-4''), 148.1 (C-4'), 133.9 (C-1''), 129.4 (C-1'), 123.2 (C-6'), 120.7 (C-6''), 117.1 (C-5''), 116.0 (C-5'), 114.9 (C-2'), 111.5 (C-2''), 100.9 (C-1'''), 100.0 (C-1), 90.8 (C-2), 87.6 (C-6), 79.1 (C-3'''), 78.8 (C-5'''), 75.6 (C-2'''), 74.1 (C-8), 73.0 (C-4), 72.0 (C-4'''), 63.3 (C-6'''), 61.1 (C-5), 57.4 (OMe), 57.2 (OMe).

Compound 23 (dimethyl lithospermate): Yellow amorphous hygroscopic powder; $[\alpha]_D^{20}$: +164.3° (c 0.07, MeOH); positive-ion FABMS m/z 567 [M+H]⁺ ; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε) 252.6 (4.57), 286.4 (4.52), 304.6 (4.51), 332.6 (4.47) ; IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3384.6 (OH), 2954.6 (-CH), 1723.4 (ester), 1610.2, 1509.1 (aromatic ring), 1444.1 (-CH₂), 1263.6, 1161.9, 1113, 978.4, 866.8, 809.3; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.60 (1H, d, J = 15.9 Hz), 7.30 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.82 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.72 (1H, dd, J = 1.8, 7.7 Hz), 6.72 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.68 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.64 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.63 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.64 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.63 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.50 (1H, dd, J = 1.8 & 7.7 Hz), 6.36 (1H, d, J = 15.9 Hz), 5.84 (1H, d, J = 4.8 Hz), 5.14 (1H, d, J = 4.8 Hz), 4.53 (1H, d, J = 4.5 Hz), 3.65 (3H, s, OCH₃), 3.67 (3H, s, OCH₃) ; ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 171.83, 170.03, 165.88, 147.19, 145.84, 145.51, 145.12, 144.25, 142.62, 131.04, 126.69, 126.05, 122.24, 121.13, 120.15, 117.37, 117.20, 116.61, 115.54, 115.08, 113.05, 86.33, 72.94, 54.89, 52.50, 52.01, 40.28.

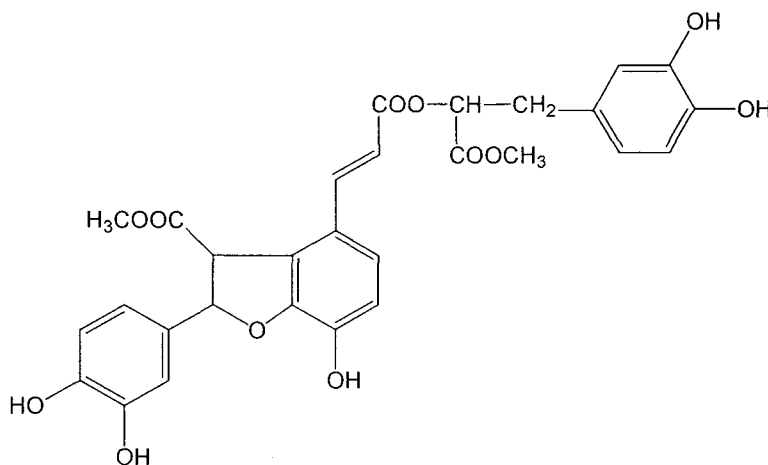
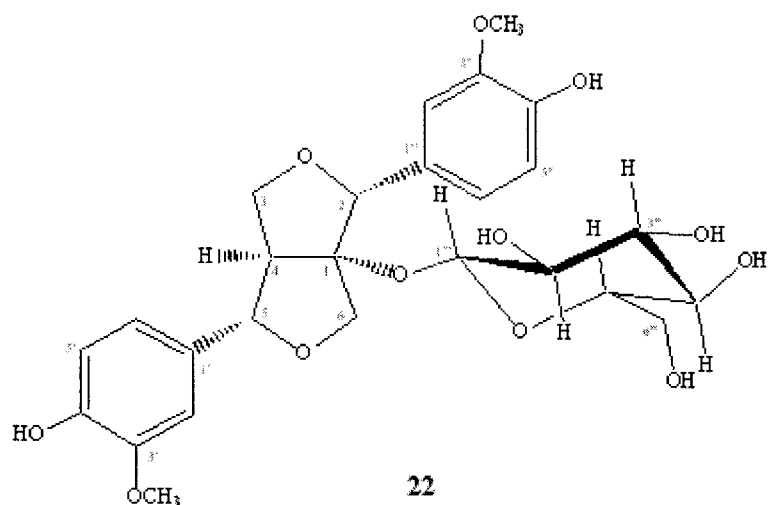


Fig. 2. Chemical structures of isolated compounds from the rhizome of *Salvia miltiorrhiza*.

(3) 합환피 EtOAc 획분에서 분리된 화합물들의 분광학적 성질

각각의 추출물들의 항산화 활성 실험 모델 시스템에 의해 검색한 결과, 이들 중 EtOAc 획분의 활성이 가장 높게 나타났다. 그 결과 EtOAc 획분을 CH₂Cl₂-MeOH (gradient) 용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 수행하여 29개의 subfractions을 얻었다. Fraction 19 (14.6 g)는 H₂O-MeOH (gradient)로서 Sephadex LH-20과 RP-18 gel column chromatography하여 compound 24 (12 mg)을 얻었다. Fraction 20 (17.5 g)은 MeOH로서 Sephadex LH-20으로 정제하여 compound 25 (200 mg)를 얻었다.

Compound 24 (Sulfuretin) : Amorphous orange powder ; EIMS m/z (int.) : 270 (100), 253 (20), 242 (12), 213 (18), 92 (27) ; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ :

7.59 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-4), 7.50 (1H, brs, H-2'), 7.21 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-6'), 6.83 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.68 (1H, brs, H-7), 6.67 (1H, brs, H-10) ; ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 185.3 (C-3), 170.6 (C-6), 169.2 (C-8), 150.2 (C-4'), 148.5 (C-2), 147.5 (C-3'), 127.6 (C-4), 127.2 (C-6') , 126.3 (C-1'), 119.7 (C-2'), 117.5 (C-5'), 115.7 (C-9), 115.5 (C-10), 114.9 (C-7), 100.2 (C-5).

Compound 25 (3',4',7-Trihydroxyflavone) : Amorphous yellow powder ; EIMS m/z (int.) : 270 (100), 242 (35), 137 (81), 121 (30) ; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.75 (1H, brs, OH), 9.80 (1H, brs, OH), 9.37 (1H, brs, OH), 7.86 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 7.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.38 (1H, dd, $J=2.0$ and 8.6 Hz, H-6'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.93 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8) 6.89 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5'), 6.88 (1H, d, $J=2.0, 8.6$ Hz, H-6) ; ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 176.2 (C-4), 162.6 (C-2), 162.5(C-7), 157.3 (C-9), 149.1 (C-4), 145.7 (C-3'), 126.5 (C-5), 122.1 (C-1'), 118.5 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.9 (C-10), 114.7 (C-6), 113.1 (C-2), 104.5 (C-3), 102.3 (C-8).

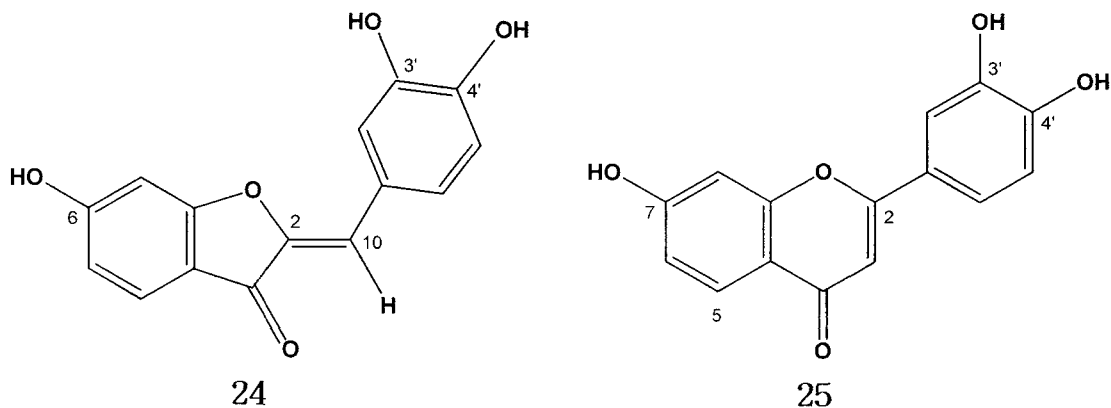


Fig. 3. Chemical structures of two flavonoid compounds isolated from the stem bark of *Albizzia julibrissin*.

(4) 솔잎 EtOAc 획분에서 분리된 화합물들의 분광학적 성질

EtOAc 분획물이 항산화 실험 모델 시스템 (tested model systems)에서 강한 항산화 활성을 보였으므로 EtOAc 100 g을 EtOAc-MeOH (gradient)을 사용하여 silica gel column chromatography하고 9개의 분획 (분획물 1~9)을 얻었다. Fraction 3 (9.5 g)을 다시 CH_2Cl_2 -MeOH을 5 : 1로 혼합한 용액을 사용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 compounds 26 (kaempferol 3-*O*-galactoside 6''-acetate, 40 mg)과 27 (isolariciresinol xyloside, 74 mg) 그리고

compound **29** (5,7,8,4'-tetrahydroxy-3-methylflavone-8-*O*- β -D-glucopyranoside, 60 mg)를 얻었다. Fraction 4 (6 g)을 CH₂Cl₂-MeOH을 5 : 2로 silica gel column chromatography를 실시하여, compounds **28** (kaempferol 3-*O*-galactoside, 22 mg) 과 **30** (kaempferol 3-*O*- β -D-glucoside, 12.8 mg), 그리고 **31** (6-methyl-kaempferol 3-*O*- β -D-glucoside, 10.9 mg)을 얻었다.

Compound 26 (kaempferol 3-*O*-galactopyranoside 6''-acetate) : Yellow powder ; UV λ_{max} (MeOH) 258, 353 nm ; FABMS m/z 513 [M + Na]⁺ ; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.58 (OH), 10.88 (OH), 10.18 (OH), 8.04 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2' and 6'), 6.85 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3' and 5'), 6.45 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.32 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1''), 4.07 (1H, dd, J = 7.8, 11.3 Hz, H-6''b), 3.90 (1H, dd, J = 4.3, 11.3 Hz, H-6''a), 3.62 (1H, d, J = 4.3 Hz, H-4''), 3.60 (1H, d, J = 4.3 Hz, H-5''), 3.56-3.51 (1H, m, H-2''), 3.42-3.38 (1H, m, H-3''), 1.74 (CH₃) ; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 156.4 (C-2), 133.2 (C-3), 177.5 (C-4), 161.2 (C-5), 98.7 (C-6), 164.1 (C-7), 93.7 (C-8), 156.4 (C-9), 103.8 (C-10), 120.8 (C-1'), 130.9 (C-2' and 6'), 115.0 (C-3' and 5'), 160.0 (C-4'), 101.7 (C-1''), 70.9 (C-2''), 72.8 (C-3''), 68.1 (C-4''), 72.8 (C-5''), 63.1 (C-6''b), 169.8 (COO), 20.1 (CH₃).

Compound 27 [(+)-isolarisiresinol xylopyranoside] : $[\alpha]_D^{20}$ +4.02. (c, 0.005, MeOH) ; HREIMS : m/z 492.1995 (C₂₅H₃₂O₁₀) ; EIMS (m/z , %) : 492 ([M]⁺, 27.3), 359 ([M - xylose + H]⁺, 65.4) ; ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 7.29 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2'), 7.17 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.99 (1H, dd, J = 1.6, 8.1 Hz, H-6'), 6.84 (1H, s, H-5), 6.81 (1H, s, H-2), 4.61 (1H, d, J =7.5 Hz, H-1''), 4.59 (1H, dd, J = 1.9 Hz and 10.4 Hz, H-9'b), 4.53 (1H, brd, J = 10.8 Hz, H-7'), 4.27 (1H, d, J = 4.0, 10.0 Hz, H-9b), 4.23 (1H, dd, J = 5.0, 10.0 Hz, H-9a), 4.20 (1H, m, H-4''), 4.20 (1H, dd, J = 2.2, 12.0 Hz, H-5''b), 4.11 (1H, d, J =10.7 Hz, H-3''), 4.03 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-2''), 3.72 (OMe, C-3), 3.69 (OMe, C-3'), 3.61 (1H, dd, J = 4.1, 10.4 Hz, H-9'a), 3.57 (1H, dd, J = 6.0, 12.0 Hz, H-5''a), 3.37 (1H, m, H-8'), 3.32 (1H, dd, J = 15.6, 11.3 Hz, H-7b), 3.12 (1H, dd, J = 15.6, 4.4 Hz, H-7a), 2.47 (1H, m, H-8) ; ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 128.05 (C-1), 112.49 (C-2), 146.89 (C-3), 145.98 (C-4), 117.89 (C-5), 134.03 (C-6), 33.75 (C-7), 39.16 (C-8), 64.19 (C-9), 137.81 (C-1'), 114.33 (C-2'), 148.46 (C-3'), 146.36 (C-4'), 116.5 (C-5'), 122.53 (C-6'), 47.33 (C-7'), 45.41 (C-8'), 68.48 (C-9'), 106.0 (C-1''), 75.09 (C-2''), 78.44 (C-3''), 71.11 (C-4''), 67.14 (C-5''), 55.84 (OMe, C-3''), 55.99 (OMe, C-3').

Compound 28 (kaempferol 3-*O*-galactopyranoside) : ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.62 (1H, brs, OH), 8.06 (2H, d, J = 8.05 Hz, H-2', 6'), 6.85 (2H, d, J = 8.05 Hz, H-3', 5'), 6.43 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J =

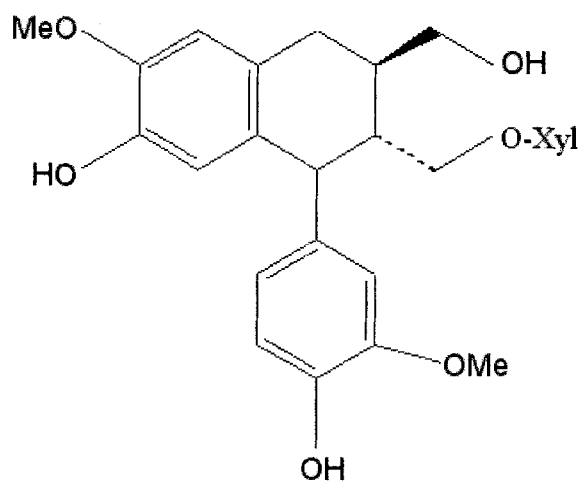
1.8 Hz, H-6), 5.39 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'') ; ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.38 (C-2), 133.24 (C-3), 177.53 (C-4), 161.30 (C-5), 98.71 (C-6), 164.17 (C-7), 93.67 (C-8), 156.38 (C-9), 103.94 (C-10), 121.89 (C-1'), 130.88 (C-2', 6'), 115.06 (C-3', 5'), 159.95 (C-4'), 101.67 (C-1''), 71.2 (C-2''), 73.10 (C-3''), 67.88 (C-4''), 75.77 (C-5''), 60.20 (C-6'').

Compound 29 (5,7,8,4'-tetrahydroxy-3-methylflavone-8-O- β -D-glucopyranoside) : Yellow powder ; UV λ_{max} (MeOH) : 275 ($\log \epsilon$ 4.15), 296 (3.98), 338 (4.09), 368 (4.00) ; +NaOMe 280 (4.22), 333 (4.02), 405 (4.26) ; + NaOAc 278 (4.20), 306 (4.02), 365 (3.98); + NaOAc + H_3BO_3 276 (4.17), 337 (4.06) ; + AlCl_3 278 (4.09), 312 (4.00), 360 (4.09), 412 (sh 3.85) ; + AlCl_3 + HCl 232 (4.10), 286 (4.09), 310 (4.03), 360 (4.12) and 412 (3.82) nm ; EI-MS m/z (rel. int. %) : 331 [$\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_9\text{O}_5$] (24.5), 330 [$\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$](100), 315 (3.6), 312 (6.3), 287 (38.5), 271 (1.1), 259 (2.1), 243 (0.5), 182 (15.5), 181 (3.8), 121 (31.6), 118 (3.5) ; HR-FABMS [(M + H) $^+$: m/z 493.1349 for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$, $\Delta +0.3$ mmu] ; ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.03 (3H, s, 6- CH_3), 3.23-3.25 (1H, m, H-3''), 3.31 (2H, m, H-4'', H-5''), 3.40 (1H, m, H-2''), 3.60 (2H, m, H-6''), 3.80 (OCH $_3$), 4.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 6.97 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', H-5'), 8.25 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', H-6'), 10.24 (1H, s, OH), 12.85 (1H, s, OH) ; ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.65 (CH_3), 59.56 (OCH $_3$), 60.50 (C-6''), 68.99 (C-4''), 74.05 (C-2''), 75.82 (C-5''), 77.46 (C-3''), 103.31 (C-10), 106.76 (C-6), 107.19 (C-1''), 115.65 (C-3', C-5'), 120.64 (C-1'), 125.21 (C-8), 130.89 (C-2', C-6'), 137.47 (C-3), 144.82 (C-9), 146.12 (C-7), 154.33 (C-5), 155.44 (C-2), 160.24 (C-4'), 177.94 (C-4).

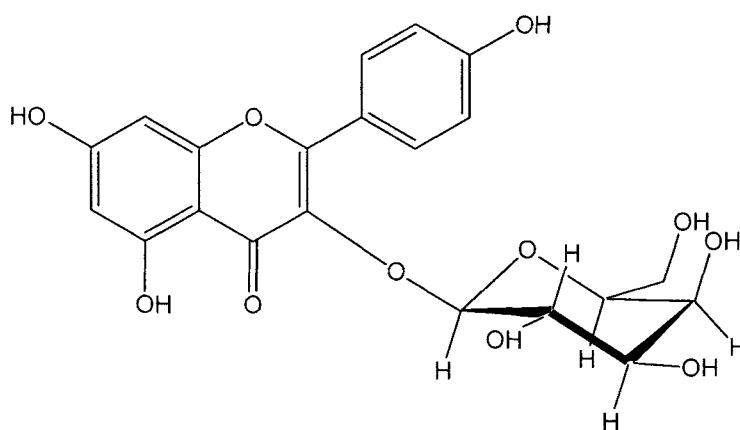
Compound 30 (kaempferol 3-O- β -D-glucoside) : Yellow powder ; ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.59 (OH), 8.03 (2H, d, $J = 8.84$ Hz, H-2', H-6'), 6.88 (2H, d, $J = 8.84$ Hz, H-3', H-5'), 6.38 (1H, d, $J = 1.92$ Hz, H-8), 6.16 (1H, d, $J = 1.92$ Hz, H-6), 5.44 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.56 (1H, d, $J = 11.28$ Hz, H-6''a), 3.33 (1H, dd, $J = 3.64, 11.3$ Hz, H-6''b), 3.21 (2H, m, H-2'', H-3''), 3.08 (2H, m, H-4'', 5'') ; ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.2 (C-4), 165.3 (C-7), 161.1 (C-5), 159.9 (C-4'), 156.5 (C-9), 156.0 (C-2), 133.1 (C-3), 130.8 (C-2', C-6'), 120.9 (C-1'), 115.1 (C-3', C-5'), 103.5 (C-10), 100.9 (C-1''), 99.0 (C-6), 93.8 (C-8), 77.4 (C-5''), 76.4 (C-3''), 74.2 (C-2''), 69.9 (C-4''), 60.8 (C-6'').

Compound 31 (6-methylkaempferol 3-O- β -D-glucoside) : Yellow powder ; ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.86 (OH), 8.03 (2H, d, $J = 8.81$ Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, $J = 8.81$ Hz, H-3', H-5'), 6.50 (1H, s, H-8), 5.46 (1H, d, $J = 7.47$ Hz, H-1''), 1.99 (3H, s, 6- CH_3) ; ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ :

177.4 (C-4), 162.3 (C-7), 159.8 (C-4'), 158.1 (C-5), 156.0 (C-2), 154.0 (C-9),
133.1 (C-3), 130.8 (C-2', C-6'), 121.0 (C-1'), 115.1 (C-3', C-5'), 106.7 (C-6),
103.6 (C-10), 100.9 (C-1''), 92.7 (C-8), 77.4 (C-5''), 76.4 (C-3''), 74.1 (C-2''), 69.9
(C-4''), 60.8 (C-6''), 7.34 (CH₃).

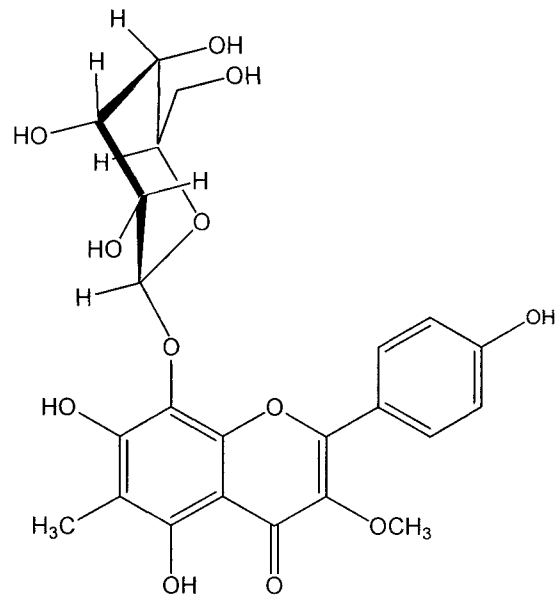


27

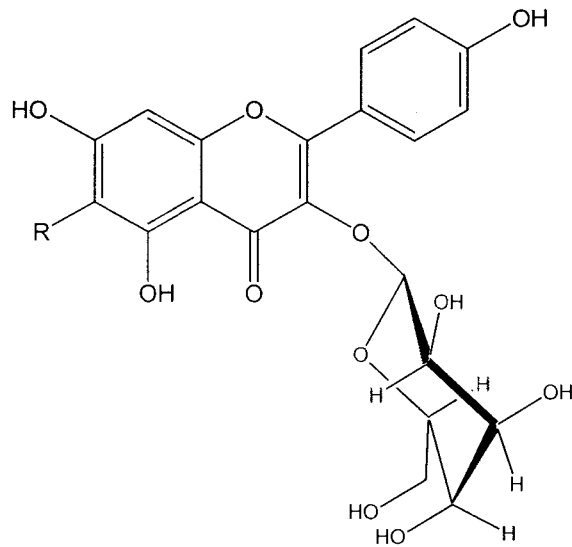


26 : R = COCH₃

28 : R = H



29



30 : R = H

31 : R = CH₃

Fig. 4. Chemical structures of isolated compounds from *Pinus densiflora*.

(5) 붉음 들깨박의 EtOAc 획분에서 분리된 화합물들의 분광학적 성질

붉음 들깨박의 각 용매 분획물들에 대해 DPPH radical, ONOO, 그리고 ROS 소거 효과를 검색한 결과 활성이 높게 나타난 EtOAc 분획에 대해 chromatography를 하여 항산화 활성 성분을 분리하였다. EtOAc 분획 (10.4 g)을 용매 CH₂Cl₂→MeOH (gradient)로서 silica gel column chromatography하여 subfraction을 얻었다.

각 subfraction들에 대해 CH_2Cl_2 또는 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$ 비율의 혼합 용매를 사용하여 compounds **32**~**34** (chrysoeriol, apigenin, luteolin)과 β -sitosterol glucoside (**35**)을 분리 동정하였다.

Compound 32 (chrysoeriol) : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.89 (3H, s, OCH_3), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.51 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.91 (1H, s, H-3), 6.93 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 7.56 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.57 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-6') ; $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 163.6 (C-2), 103.2 (C-3), 181.8 (C-4), 161.4 (C-5), 98.8 (C-6), 164.1 (C-7), 94.0 (C-8), 157.3 (C-9), 103.7 (C-10), 120.3 (C-1'), 110.2 (C-2'), 156.7 (C-3'), 148.0 (C-4'), 115.7 (C-5'), 121.5 (C-6'), 55.2 (OCH_3).

Compound 33 (apigenin) : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.51 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.78 (1H, s, H-3), 6.93 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', H-5'), 7.91 (2H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-2', H-6'), 12.96 (1H, s, OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 164.1 (C-2), 102.8 (C-3), 181.7 (C-4), 161.4 (C-5), 98.7 (C-6), 163.6 (C-7), 93.9 (C-8), 157.2 (C-9), 103.6 (C-10), 121.1 (C-1'), 128.4 (C-2'), 115.8 (C-3'), 161.1 (C-4'), 115.9 (C-5'), 128.4 (C-6').

Compound 34 (luteolin) : $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.22 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.50 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 6.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.44 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 12.93 (1H, s, OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 164.4 (C-2), 102.8 (C-3), 181.8 (C-4), 161.5 (C-5), 99.0 (C-6), 164.0 (C-7), 94.0 (C-8), 157.4 (C-9), 103.7 (C-10), 119.1 (C-1'), 113.2 (C-2'), 145.8 (C-3'), 149.9 (C-4'), 116.1 (C-5'), 121.6 (C-6').

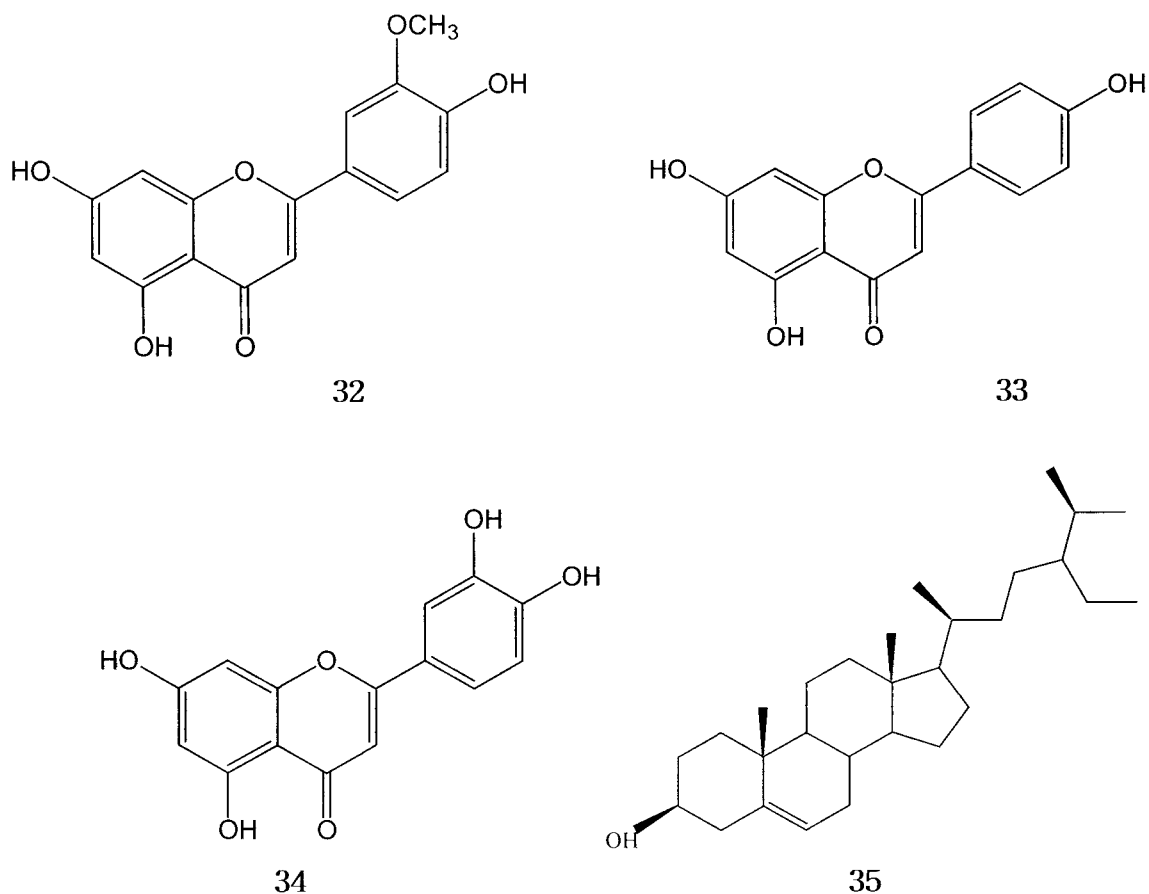


Figure 5. Structures of compounds isolated from the roasted defatted perilla meal.

(6) 갖의 *n*-BuOH 획분에서 분리된 화합물들의 분광학적 성질

갖의 MeOH 추출물과 각 획분물들을 DPPH 라디칼 소거 활성을 검색한 결과 EtOAc 와 BuOH 획분은 강한 DPPH 소거활성을 나타내었으며, BuOH 획분은 EtOA획분보다 훨씬 더 높게 나타났다. 그러므로 BuOH 획분 (30g)을 CH₂Cl₂→MeOH (gradient)로서 silica gel column chromatography하여 22개의 subfraction을 얻었다. Fraction 4 (1.2g)은 EtOAc-MeOH-H₂O로 Si gel column으로 더 분리하여 compound **39** (86.5mg)을 얻었다. Fraction 16 (1.8g)은 EtOAc-MeOH-H₂O로 Si gel column으로 더 분리하여 compound **37** (24mg)와 **38** (35mg)을 얻었다. Fraction 18 (1.2g)은 EtOAc-MeOH-H₂O (21:4:3)으로 Si gel column으로 더 분리하여 compound **36** (45mg)을 얻었다.

Compound 36 (kaempferol 7-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside) : Yellow amorphous powder ;

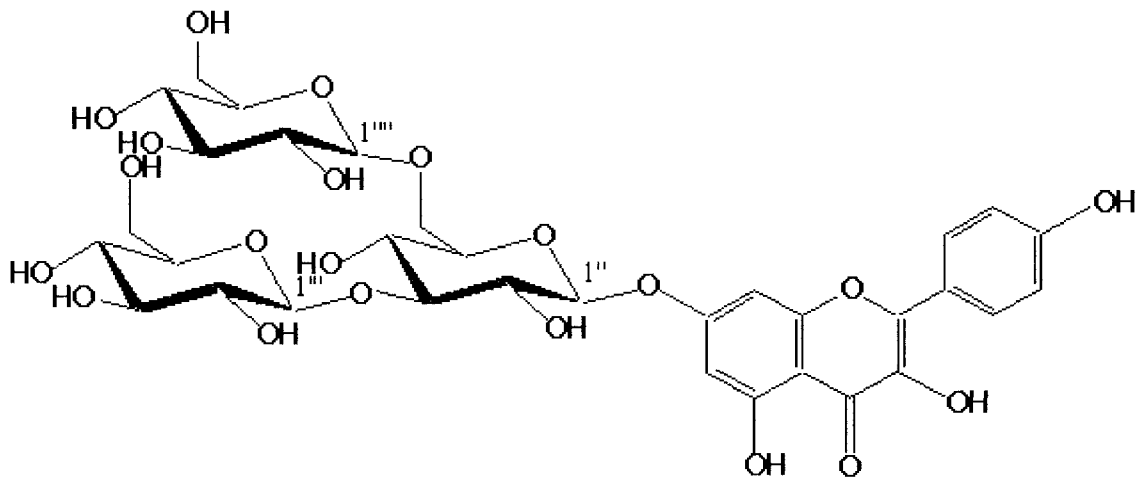
C₃₃H₄₀O₂₁, FAB-MS (negative) m/z : 771 [M - H]⁻, 609 [M - H, 162]⁻, 447 [M - H, 162 × 2]⁻; UV λ max (MeOH) 268 (log ε 4.26), 348 (4.16), 371 (4.19), 399 (4.14) nm; + NaOMe 246 (4.60), 270 (4.59), 302 (4.39), 390 (4.51); + NaOAc 271 (4.23), 348 (4.11), 374 (4.11), 401 (4.04); + NaOAc + H₃BO₃ 270 (4.23), 348 (4.13), 372 (4.13); + AlCl₃ 272 (4.44), 302 (4.27), 348 (4.31), 378 (4.37), 404 (4.35); + AlCl₃ + HCl 272 (4.33), 302 (4.14), 348 (4.21), 396 (4.21); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.02 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1'''), 5.07 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1''), 5.39 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1'''), 6.44 (1H, J = 2.1 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.89 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3', 5'), 8.05 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2', 6'), 9.84 (1H, s, OH), 10.21 (1H, s, OH), 12.60 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.6 (C-4), 162.99 (C-7), 160.8 (C-5), 160.1 (C-4'), 157.1 (C-9), 156.0 (C-2), 133.5 (C-3), 131.0 (C-2', 6'), 120.7 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 105.7 (C-10), 103.2 (C-1'''), 99.8 (C-1''), 99.3 (C-6), 100.9 (C-1'''), 94.7 (C-8), 77.1 (C-3''), 76.6 (C-5'', C-5'''), 76.4 (C-5'''), 76.3 (C-3'''), 76.2 (C-3'''), 74.1 (C-2''), 73.3 (C-2'''), 73.1 (C-2'''), 69.7 (C-4'', 4'''), 69.6 (C-4'''), 68.0 (C-6''), 60.8 (C-6'''), 60.6 (C-6''').

Compound 37 (kaempferol-3-O-(2-O-feruloyl-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside)-7-O-glucopyranoside) : FAB-MS (negative) m/z : 947.0 [M - H]⁻, 785 [M - H, 162]⁻, 771 [M - H, feruloyl]⁻, 609 [M - H, feruloylglucosyl]⁻, 447 [M - H feruloylsophorosyl]⁻; UV : λmax (MeOH) 244 (log ε 4.30), 268 (4.29), 297 (4.19), 330 (4.33), 354 (4.18) nm; + NaOMe 245 (4.39), 271 (4.34), 348 (4.39), 380 (4.55); + NaOAc 221 (4.28), 244 (4.10), 268 (4.09), 332 (4.14); + NaOAc + H₃BO₃ 243 (4.15), 268 (4.16), 333 (4.19), 352 (4.08); + AlCl₃ 234 (4.06), 270 (4.03), 302 (3.95), 336 (4.06), 354 (3.95); + AlCl₃+ HCl 234 (4.04), 277 (4.04), 299 (3.97), 335 (4.07), 399 (3.69); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : KP-moiety 6.42 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.72 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 8.00 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2', H-6'), 6.92 (2H, d, J =8.9 Hz, H-3', H-5'); Feruloyl moiety 7.16 (1H, brd, J = 2.0 Hz, H-2), 6.73 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.96 (1H, brd, J = 8.0 Hz, 2.0 Hz, H-6), 6.38 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 7.46 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-9), 3.77 (1H, s, OCH₃); 3-*O*-sugar moiety 5.73 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1''), 3.53 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-2''), 3.05 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-5''), 5.09 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1'''), 4.69 (1H, dd, J = 9.0 Hz, 8.6 Hz, H-2'''); 7-*O*-sugar moiety 5.07 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1'''); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) : KP-moiety 155.9 (C-2), 133.1 (C-3), 177.5 (C-4), 160.8 (C-5), 99.3 (C-6), 162.7 (C-7), 94.4 (C-8), 156.2 (C-9), 105.1 (C-10), 120.8 (C-1'), 130.9 (C-2', C-6'), 115.3 (C-3', C-5'), 160.1 (C-4'); Feruloyl moiety 125.7 (C-1), 111.0 (C-2), 147.8 (C-3), 149.1 (C-4), 115.4 (C-5), 122.6 (C-6), 165.8 (C-7), 115.1 (C-8), 144.5 (C-9), 55.6 (OCH₃); 3-*O*-sugar moiety 97.1 (C-1''), 79.3 (C-2''),

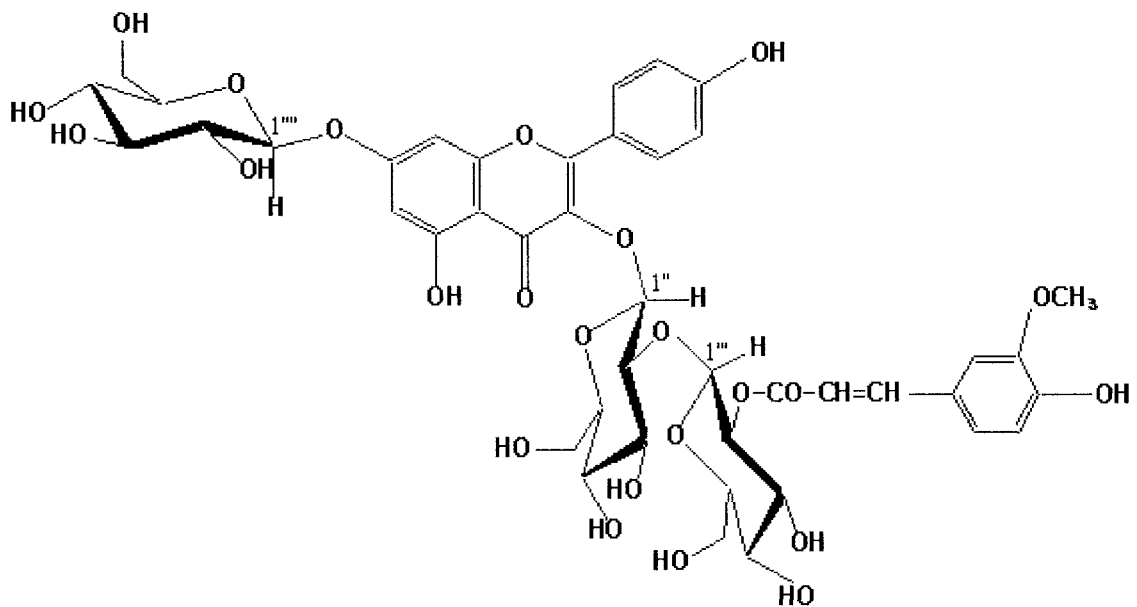
76.9 (C-3''), 70.2 (C-4''), 77.3 (C-5''), 60.9 (C-6''), 99.3 (C-1'''), 73.7 (C-2'''), 74.5 (C-3'''), 70.2 (C-4'''), 76.5 (C-5'''), 60.6 (C-6''') ; 7-*O*-sugar moiety 99.8 (C-1'''), 73.1 (C-2'''), 76.4 (C-3'''), 69.6 (C-4'''), 77.2 (C-5'''), 60.7 (C-6''').

Compound 38 (kaempferol-3- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside-7- β -D-glucopyranoside) : FAB-MS (negative) m/z : 771 [M - H]⁻, 609 [M - H, 162], 447 [M - H, 162 \times 2] ; UV : λ_{\max} (MeOH) 259 (log ϵ 4.40), 341 (4.22) nm ; + NaOMe 267 (4.46), 342 (4.22), 388 (4.30) ; + NaOAc 258 (4.46), 344 (4.26) ; + NaOAc + H₃BO₃ 257 (4.44), 345 (4.25) ; + AlCl₃ 266 (4.37), 293 (4.11), 343 (4.13), 391 (4.03) ; + AlCl₃ + HCl 266 (4.30), 292 (4.04), 334 (4.06), 390 (3.92) ; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.43 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-8), 8.07 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3', H-5') ; 3-*O*-sugar moiety 5.70 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-1''), 4.61 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1''') ; 7-*O*-sugar moiety 5.08 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1''') ; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 155.9 (C-2), 133.1 (C-3), 177.6 (C-4), 160.9 (C-5), 99.2 (C-6), 162.7 (C-7), 94.4 (C-8), 156.2 (C-9), 105.6 (C-10), 120.6 (C-1'), 131.0 (C-2' and C-6'), 115.3 (C-3', C-5'), 160.3 (C-4') ; 3-*O*-sugar moiety 99.7 (C-1''), 82.5 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.5 (C-6''), 104.2 (C-1'''), 74.4 (C-2'''), 76.5 (C-3'''), 69.6 (C-4'''), 77.0 (C-5'''), 60.6 (C-6''') ; 7-*O*-sugar moiety 97.8 (C-1'''), 73.5 (C-2'''), 76.6 (C-3'''), 69.6 (C-4'''), 77.6 (C-5'''), 60.8 (C-6''').

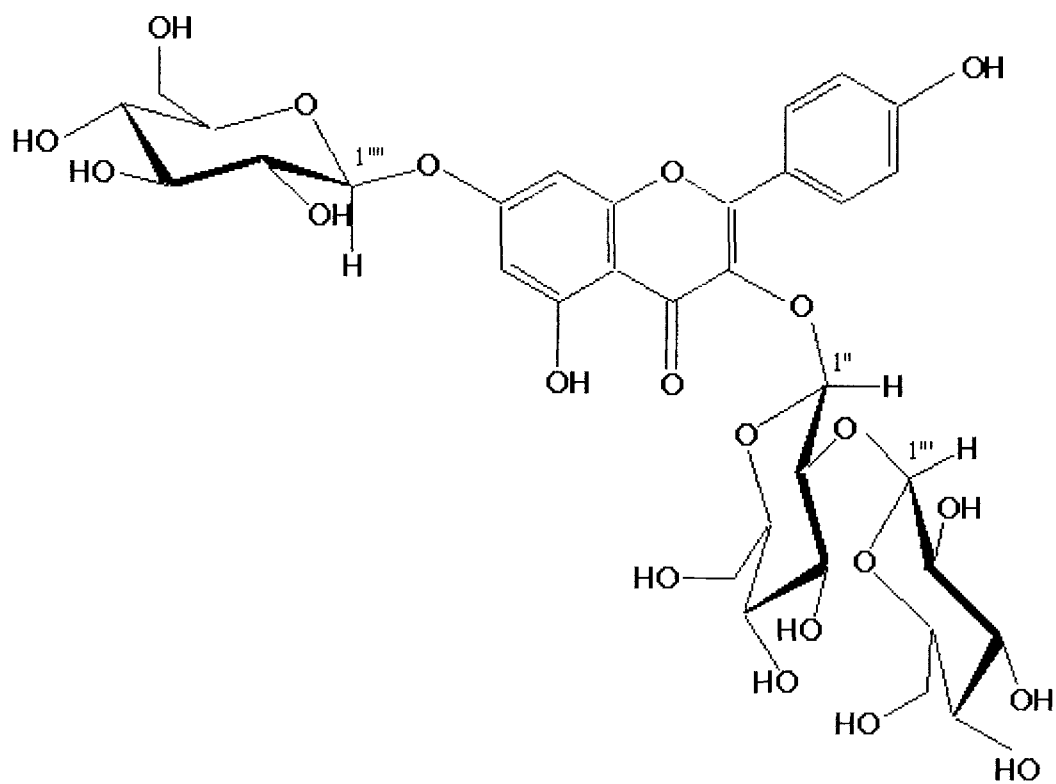
Compound 39 (1-*O*-sinapoyl glucopyranoside) : Amorphous white powder ; $[\alpha]_D^{20}$ -6.25. (c 0.016, MeOH); FAB-MS (positive) m/z : 409 [M + Na]⁺ ; IR (KBr) : 3449, 1701, 1025~1110 cm⁻¹ ; UV λ_{\max} (MeOH) 226 (log ϵ 4.28), 240 (4.29), 331 (4.39) nm ; + NaOMe 213 (5.13), 260 (4.53), 385 (4.61) ; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.05 (2H, s, H-2, H-6), 7.64 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 6.55 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 3.80 (6H, s, OCH₃), 5.46 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1') ; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 124.3 (C-1), 106.4 (C-2, C-6), 148.0 (C-3, C-5), 146.0 (C-4), 138.6 (C-7), 114.3 (C-8), 165.3 (C-9), 56.1 (CH₃), 94.2 (C-1'), 72.6 (C-2'), 77.8 (C-3'), 69.6 (C-4'), 76.5 (C-5'), 60.6 (C-6').



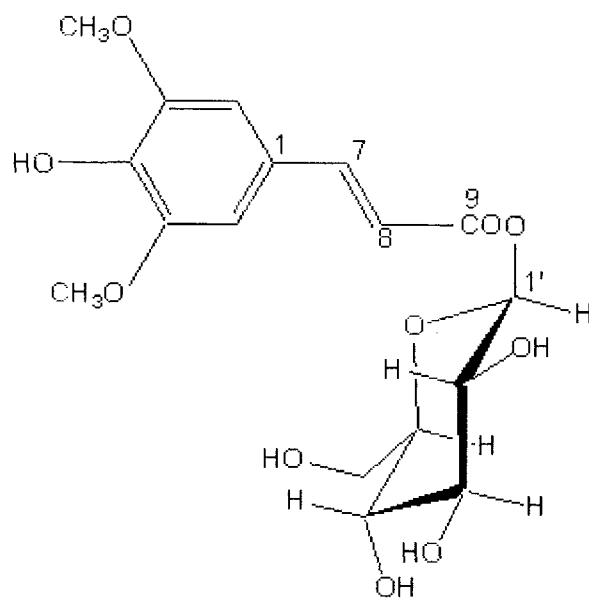
36



37



38



39

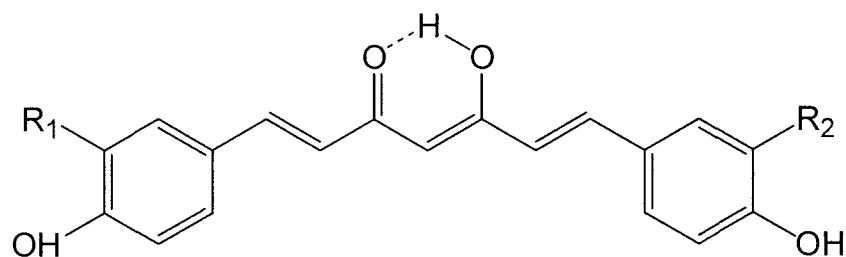
Figure 6. Structures of compounds isolated from *Brassica juncea* L.

(7) 울금의 EtOAc 획분에서 분리된 화합물들의 분광학적 성질

Compound 40 (curcumin I) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) δ ; 3.86 (6H, s, $2 \times \text{OCH}_3$), 5.92 (1H, s, H-4), 6.65 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2, 7), 6.83 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5', 5''), 7.12 (2H, d, $J = 2.0$ & 8.3 Hz, H-6', 6''), 7.28 (2H, d, $J = 2.0$, H-2', 2''), 7.55 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-1, 6) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6) ; 185.0 (C-3, 5), 150.5 (C-4', 4''), 149.2 (C-3', 3''), 141.9 (C-1, 7), 128.6 (C-1', 1''), 124.3 (C-6', 6''), 122.8 (C-2, 6), 116.7 (C-5', 5''), 112.0 (C-2', 2''), 102.1 (C-4), 56.8 ($2 \times \text{OCH}_3$).

Compound 41 (curcumin II) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) δ ; 3.86 (3H, s, OCH_3), 5.92 (1H, s, H-4), 6.60 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.66 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2), 6.83 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.85 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'', 5''), 7.11 (1H, d, $J = 1.7, 8.5$ Hz, H-6'), 7.28 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 7.51 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 7.55 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-6), 7.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-1) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6) δ ; 185.0 (C-3), 184.9 (C-5), 161.0 (C-4''), 150.5 (C-4'), 149.2 (C-3'), 141.9 (C-1), 141.5 (C-7), 131.4 (C-2'', 6''), 128.6 (C-1'), 128.2 (C-1''), 124.3 (C-6'), 122.7 (C-2), 122.5 (C-6), 117.3 (C-3'', 5''), 116.7 (C-5'), 112.0 (C-2'), 102.2 (C-4), 56.8 (OCH_3).

Compound 42 (curcumin III) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) δ ; 5.92 (1H, s, H-4), 6.61 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2, 6), 6.85 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 4'), 6.85 (2H, d, $J = 8.5$, H-3'', 5''), 7.51 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 7.51 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', 6''), 7.56 (2H, d, $J = 16.0$ Hz, H-1, 7) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6) δ ; 185.0 (C-3, 5), 161.0 (C-4', 4''), 141.5 (C-1, 7), 131.4 (C-2', 6', 2'', 6''), 128.2 (C-1', 1''), 122.5 (C-2, 6), 117.2 (C-3', 5', 3'', 5''), 102.2 (C-4).



40: $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OCH}_3$

41: $\text{R}_1=\text{OCH}_3, \text{R}_2=\text{H}$

42: $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$

Figure 7. Structures of compounds isolated from *C. longa*.

(8) 연수의 EtOAc획분에서 분리된 화합물들의 분광학적 성질

활성이 뛰어난 EtOAc 분획물 (20 g)을 silica gel과 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 사용하여 kaempferol (43), kaempferol 3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl methylester (44), kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (45), kaempferol 3-*O*- β -D-galactopyranoside (46), myricetin 3',5'-dimethylether 3-*O*- β -D-glucopyranoside (47), kaempferol 3-*O*- α -L-rhamno-pyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (48) 및 kaempferol 3-*O*- β -D-glucuronopyranoside (49)를 분리하였다.

Compound 43 (kaempferol) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.92 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 8.06 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 12.47 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 175.9 (C-4), 163.9 (C-7), 160.7 (C-5), 159.2 (C-4'), 156.2 (C-9), 146.8 (C-2), 135.7 (C-3), 129.5 (C-2', 6'), 121.7 (C-1'), 115.4 (C-3', 5'), 103.0 (C-10), 98.2 (C-6), 93.5 (C-8).

Compound 44 (kaempferol 3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl methyl ester) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.57 (1H, s, OMe), 5.47 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1'), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.43 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.89 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 8.02 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 12.51 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.2 (C-4), 169.0 (C-6''), 164.3 (C-7), 161.2 (C-5), 160.2 (C-4'), 156.6 (C-9), 156.4 (C-2), 133.0 (C-3), 130.9 (C-2', 6'), 120.6 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 104.0 (C-10), 101.4 (C-1'), 98.9 (C-6), 93.8 (C-8), 75.6 (C-5''), 75.5 (C-3''), 73.9 (C-2''), 71.5 (C-4''), 51.9 (OMe).

Compound 45 (kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.47 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 6.21 (1H, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.88 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 8.05 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 12.62 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.6 (C-4), 164.2 (C-7), 161.3 (C-5), 160.0 (C-4'), 156.5 (C-9), 156.4 (C-2), 133.3 (C-3), 131.0 (C-2', 6'), 121.0 (C-1'), 115.2 (C-3', 5'), 104.1 (C-10), 100.9 (C-1''), 98.8 (C-6), 93.7 (C-8), 77.6 (C-5''), 76.5 (C-3''), 74.3 (C-2''), 70.0 (C-4''), 60.9 (C-6'').

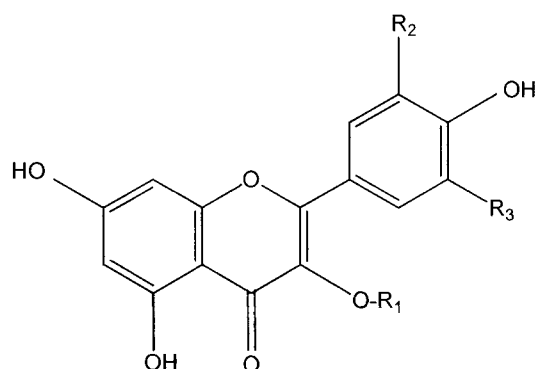
Compound 46 (kaempferol 3-*O*- β -D-galactopyranoside) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.41 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 6.21 (1H, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.43 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.86 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 8.08 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 12.63 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.6 (C-4), 164.2 (C-7), 161.2 (C-5), 160.0 (C-4'), 156.4 (C-9), 156.4 (C-2),

133.2 (C-3), 131.0 (C-2', 6'), 120.9 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 104.0 (C-10), 101.7 (C-1''), 98.7 (C-6), 93.7 (C-8), 75.8 (C-5''), 73.1 (C-3''), 71.2 (C-2''), 67.9 (C-4''), 60.2 (C-6'').

Compound 47 (myricetin 3',5'-dimethylether 3-O- β -D-glucopyranoside) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.84 (6H, s, OCH_3), 5.59 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 6.22 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.50 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 7.49 (2H, s, H-2', 6'), 9.17 (1H, brs, OH), 10.87 (1H, brs, OH), 12.60 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.4 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-9), 156.3 (C-2), 147.4 (C-3', 5'), 138.6 (C-4'), 133.1 (C-3), 119.8 (C-1'), 106.9 (C-2', 6'), 104.0 (C-10), 100.7 (C-1''), 98.7 (C-6), 93.8 (C-8), 77.4 (C-5''), 76.4 (C-3''), 74.3 (C-2''), 69.8 (C-4''), 60.5 (C-6''), 56.2 (OCH_3).

Compound 48 (kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.97 (3H, s, $J = 6.2$ Hz, CH_3), 4.38 (1H, s, H-1'''), 5.30 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 6.23 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.45 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.89 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 7.97 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 10.22 (1H, brs, OH), 11.01 (1H, brs, OH), 12.55 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.4 (C-4), 164.2 (C-7), 161.1 (C-5), 160.0 (C-4'), 156.8 (C-9), 156.4 (C-2), 133.2 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 120.8 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 103.9 (C-10), 101.3 (C-1''), 100.7 (C-1'''), 98.7 (C-6), 93.7 (C-8), 75.1 (C-5''), 76.4 (C-3''), 74.1 (C-2''), 71.8 (C-4'''), 70.6 (C-2'''), 70.3 (C-3'''), 69.9 (C-4''), 68.2 (C-5'''), 66.9 (C-6''), 17.7 (C-3''').

Compound 49 (kaempferol 3-O- β -D-glucuronopyranoside) : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.43 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 6.15 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.36 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.86 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 8.02 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 12.48 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.4 (C-4), 171.4 (C-6''), 164.5 (C-7), 161.1 (C-5), 160.1 (C-4'), 156.4 (C-9), 156.4 (C-2), 133.2 (C-3), 131.0 (C-2', 6'), 120.7 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 103.8 (C-10), 101.3 (C-1''), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8), 76.1 (C-5''), 75.2 (C-3''), 73.9 (C-2''), 71.8 (C-4'').



Kaempferol (43): $R_1=H, R_2=H, R_3=H$

Kaempferol 3-O- β -D-glucuronopyranosyl methyl ester (44): $R_1=Gl-Me, R_2=R_3=H$

Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside (45): $R_1=Glu, R_2=R_3=H$

Kaempferol 3-O- β -D-galactopyranoside (46): $R_1=Gal, R_2=R_3=H$

Myricetin 3',5'-dimethylether 3-O- β -D-glucopyranoside (47): $R_1=Glu, R_2=R_3=OCH_3$

kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (48):

$R_1=Rha-(1\rightarrow6)-Glu, R_2=R_3=H$

Kaempferol 3-O- β -D-glucuronopyranoside (49): $R_1=Gln, R_2=R_3=H$

Fig. 8. Chemical structures of compounds from the stamens of *N. nucifera*.

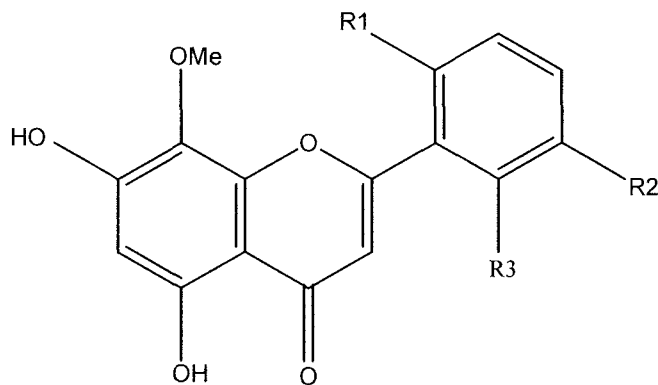
(9) 황금 EtOAc 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정

황금의 여러 분획물들 중 EtOAc (17 g) 분획물을 silica gel column chromatography 하여 33 개의 subfractions를 얻었다. 그 중 3 번 fraction에서 compound **50** (wogonin)을 분리하였으며, 8~12번을 합친 다음 다시 silica gel column chromatography 하여 compounds **51** (baicalein)과 **52** (5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone)을 얻었다. 그리고 30~33번을 fraction을 합하여 다시 silica gel column chromatography하여 compound **53** (baicalin)을 얻었다.

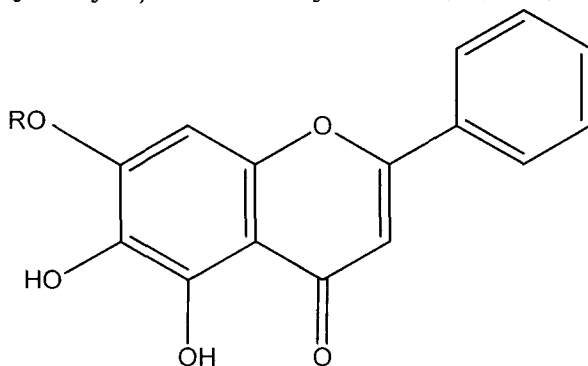
Compound 50 (wogonin) : ^1H-NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 3.85 (3H, s, OMe), 6.31 (1H, s, H-6), 6.98 (1H, s, H-3), 7.57-7.62 (3H, m, H-3', 4', 5'), 8.05-8.07 (2H, m, H-2', 6), 10.81 (1H, brs, 7-OH), 12.50 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}C-NMR$ (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 61.0 (OMe), 99.1 (C-6), 103.7 (C-10), 105.0(C-3), 126.2 (C-2', 6'), 127.7 (C-8), 129.2 (C-2', 5'), 130.8 (C-1'), 132.0 (C-4'), 149.6 (C-9), 156.2 (C-5), 157.3 (C-7), 163.0 (C-2), 182.0 (C-4).

Compound 52 (5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone) : ^1H-NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 3.71 (3H, s, 8-OMe), 3.74 (3H, s, 2'-OMe),

6.27 (1H, s, H-3), 6.32 (1H, s, H-6), 6.57 (1H, d, $J = 8.9\text{Hz}$, H-3'), 6.88 (1H, d, $J = 8.9$, H-4'), 9.03 (1H, brs, 5'-OH), 9.43 (1H, brs, 2'-OH), 10.76 (1H, brs, 7-OH), 12.55 (1H, brs, 5-OH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 60.4 (6'-OMe), 60.8 (8-OMe), 99.0 (C-6), 103.6 (C-10), 111.1 (C-3'), 111.5 (C-3), 114.8 (C-1'), 119.8 (C-4'), 127.6 (C-8), 143.4 (C-5'), 145.9 (C-6'), 148.2 C-9), 150.3 (C-2'), 156.2 (C-5), 157.1 (C-7), 160.7 (C-2), 181.7 (C-4).



wogonin (50) : $R_1=R_2=R_3=H$
 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone (52) : $R_1=R_2=OH$, $R_3=OMe$



baicalein (51) : $R=H$
 baicalin (53) : $R=\text{glucuronic acid}$

Figure 9. Structures of compounds isolated from *S. baicalensis*.

마. 항산화 활성 실험

(1) DPPH radical 소거 활성

각 시료의 DPPH radical에 대한 소거활성 방법은 다음과 같다 (Blois, 1958). 각 농도별 시료 (1.25-120 $\mu\text{g/mL}$)를 메탄올에 녹인 뒤 160 μL 씩 취하여 1.5×10^{-4} M 농도로 메탄올에 용해시킨 DPPH 용액 40 μL 와 잘 혼합하였다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader spectrophotometer VERSAmax로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free

radical 소거활성을 백분율로 나타내고 50 % 소거농도 (IC_{50} 는 $\mu\text{g/mL}$ 혹은 μM 로 표현)을 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다 [Yoshida *et al.*, 1989 ; Yamasaki *et al.*, 1994].

(2) 활성산소종 생성 억제 활성

먼저 phosphate buffer (50 mM, pH 7.4)를 사용하여 12.5 mM DCFH-DA와 600 units/mL esterase를 20 °C에 stock solution으로 저장하였다. 실험시 2.5 μM DCFH-DA와 1.5 units/mL esterase를 혼합하여 22 °C에서 20분간 배양하여 DCFH 용액을 조제하였고 시료 첨가 전까지 암소에서 냉동 보관하였다. 간세포주 (AC₂F)를 6시간 동안 serum free media에 배양한 후, 각 농도별 시료 (MeOH 추출물인 경우 40 $\mu\text{g/mL}$, 각 분획물인 경우 10 $\mu\text{g/mL}$)와 $\cdot\text{O}_2$ 를 첨가한 1시간 뒤, 전환된 DCF의 형광 강도의 변화를 microplate fluorescence reader FL 500으로 excitation wavelength 460 nm와 emission wavelength 530 nm에서 각각 30분간 측정하였다. DCF의 형광 강도의 변화가 감소하였다는 것은 시료, 즉 항산화성분의 활성산소종의 소거 활성으로, DCFH가 산화되지 않았다는 것을 의미한다 (Chung *et al.*, 2001 ; Zou *et al.*, 2002).

(3) ONOO⁻ 소거 활성

Kooy *et al.* (1994)의 방법에 의해 합성 ONOO⁻ 첨가하여 직접적인 ONOO⁻ 소거활성을 형광광도법을 이용하여 살펴보았다. 먼저 dimethylformamide로 녹인 DHR 123 (5 mM)은 질소 충전하여 80 °C에서 stock solution으로 저장하였다. 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4), 5 mM potassium chloride로 조제한 buffer를 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μM 과 혼합시켜, 최종농도가 5 μM 이 되도록 DHR 123을 첨가하였다. 이렇게 만들어진 working solution에 시료와 authentic ONOO⁻를 첨가하면 5분 후, 비 형광성의 DHR 123이 형광성의 rhodamine 123으로 바뀌게 되는데, 이 형광물질을 microplate fluorescence reader FL500로 excitation wavelength 468 nm과 emission wavelength 525 nm에서 측정하였다.

(4) Hydroxyl radical 생성 분석

추출물 (최종농도 : 0.5 mg/mL)을 1 mM H₂O₂ 와 0.2 mM FeSO₄에 넣고 37 °C에서 5분간 배양하였다. 그런 다음, esterase 처리된 2 μM 의 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCHF-DA)를 첨가하였으며, 형광성의 변화는 여기 파장 485 nm, 방출 파장 530 nm에서 30분간 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 수중 자생식물 MeOH 추출물의 항산화 활성

(1) 수중 자생식물 MeOH 추출물의 peroxynitrite와 total ROS 소거 활성

자생식물로부터 항산화 활성을 가지는 식물을 찾기 위하여 한국의 자생식물 100종에 대해 peroxynitrite와 total ROS 소거능을 검색하였다 (Table 1). 그 중 25종에서 total ROS 소거능이 나타났으며, *Macleaya cordata* R. Br., *Salvia plebeia* R. Br., *Cassia tora* L., *Angelica gigas* Nakai가 IC₅₀치 1.7 ± 0.36 , 4.3 ± 1.08 , 4.9 ± 0.17 그리고 5.8 ± 1.01 $\mu\text{g/ml}$ 로서 양성 대조군인 trolox (7.61 ± 0.12 $\mu\text{g/ml}$)보다 강한 효과를 나타냈다. 다른 35종은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50 % 미만의 total ROS 저해활성을 나타낸 반면, 그 나머지 종들은 오히려 total ROS를 발생시키는 것으로 관찰되었다.

Peroxynitrite 소거 효과 실험에서는 대부분의 시료에서 소거활성이 나타났다. 그 중 *Schisandra chinensis* Baill, *Campsis grandiflora* (Thunb.) K. Schum., *Cedrela sinensis* A. Juss., *Pleuropterus multiflorus* Turcz. 그리고 *Veronica linariaefolia* Pall이 IC₅₀치가 0.48 ± 0.10 , 0.59 ± 0.15 , 0.60 ± 0.10 , 0.64 ± 0.10 , 그리고 0.91 ± 0.23 $\mu\text{g/ml}$ 로서 양성대조군인 penicillamine (1.72 ± 0.05 $\mu\text{g/ml}$)보다 두배나 강한 활성을 보였다.

결과적으로 실험한 전체 식물 중 25종은 total ROS와 ONOO-소거능을 나타냈으며, *Salvia plebeia* R. Br., *Macleaya cordata* R. Br., *Cassia tora* L., 그리고 *Angelica gigas* Nakai는 두 가지의 레디칼에 대한 강한 소거 활성을 나타내었다.

(2) 수중 자생식물 MeOH 추출물의 total ROS 소거 활성 (Table 2)

Table 1. Scavenging effects of Korean medicinal plants on total ROS and ONOO⁻

Family	Scientific name	Part used	ROS IC ₅₀ (μ g/ml)	ONOO ⁻ IC ₅₀ (μ g/ml)
Actinidiaceae	<i>Actinidia arguta</i> Planch.	LF	-	7.28±0.88
Apocynaceae	<i>Trachelospermum asiaticum</i> var. <i>intermedium</i> Nakai	AP	38.0±6.05	2.67±0.39
Araceae	<i>Acorus calamus</i> L. var. <i>angustatus</i> Bess.	LF	-	8.22±0.96
Bignoniaceae	<i>Campsis grandiflora</i> (Thunb.) K. Schum.	LF	>>100	0.59±0.15
Boraginaceae	<i>Symphytum officinale</i> L.	AP	>>100	2.36±0.12
Campanulaceae	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.	AP	-	4.24±0.54
Caryophyllaceae	<i>Dianthus sinensis</i> L.	AP	-	29.15±5.15
Compositae	<i>Achillea sibirica</i> Ledeb.	AP	-	1.83±0.12
	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	AP	52.5±1.40	5.86±0.73
	<i>Aster koraiensis</i> Nakai	AP	-	2.78±0.32
	<i>Aster tararicus</i> L.	AP	94.1±25.49	2.47±0.25
	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.	AP	>>100	2.89±0.55
	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>latilobum</i> (Max.) Kitagawa	AP	-	6.29±0.85
	<i>Echinops setifer</i> Iljin	AP	>>100	5.30±0.99
	<i>Inula helenium</i> L.	AP	35.2±5.38	4.53±0.18
	<i>Ixeris dentata</i> (Thunb.) Nakai	AP	96.9±15.34	3.54±0.27
	<i>Ixeris dentata</i> (Thunb.) Nakai	WP	>>100	1.35±0.08
Crassulaceae	<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch	AP	>>100	6.43±0.27
Ericaceae	<i>Rhododendron mucronulatum</i> Turcz.	AP	-	1.72±0.08
Geraniaceae	<i>Geranium sibiricum</i> L.	AP	41.1±13.95	2.39±0.28
Haemodoraceae	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	AP	-	9.20±0.46
Iridaceae	<i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC.	FR	>>100	7.39±0.37
	<i>Iris koreana</i> Nakai	AP	>>100	14.18±2.78
	<i>Iris nertschinskia</i> Lodd.	AP	95.6±18.18	7.82±0.34
	<i>Iris pallasii</i> var. <i>chinensis</i> Fisch.	LF	>>100	10.61±0.57
Lamiaceae	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	AP	-	6.45±0.49
	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv.	AP	18.7±4.65	2.91±0.68
	<i>Perilla frutescens</i> Brit. var. <i>crispa</i> Decne	AP	>>100	1.47±0.16
	<i>Salvia plebeia</i> R. Br.	AP	4.3±1.08	1.20±0.04
Lardizabalaceae	<i>Akebia quinata</i> (Thunb.) Decaisne.	LF	>>100	1.65±0.20
Leguminosae	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	AP	-	11.12±0.35
	<i>Caragana sinica</i> (Buchoz) Rehder	AP	>>100	19.46±8.83
	<i>Cassia occidentalis</i> L.	AP	59.8±2.70	5.97±1.09

Table 1. continued

Family	Scientific name	Part used	ROS IC ₅₀ (µg/ml)	ONOO ⁻ IC ₅₀ (µg/ml)
Leguminosae	<i>Cassia tora</i> L.	AP	4.9±0.17	7.76±0.27
	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	AP	>>100	12.87±0.51
	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	SD	-	22.97±1.62
	<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i> Regel.	AP	>>100	41.36±2.45
Liliaceae	<i>Allium thunbergii</i> G. Don.	AP	>>100	12.75±0.86
	<i>Allium tuberosum</i> Roth.	AP	>>100	5.41±0.51
	<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merr.	AP	-	8.67±3.84
	<i>Asparagus oligoclonos</i> Max	AP	-	4.21±0.36
	<i>Asparagus oligoclonos</i> Max	ST	-	12.75±0.93
	<i>Disporum sessile</i> D. Don ssp. <i>flavens</i> Kitagawa	AP	-	14.76±1.06
	<i>Hemerocallis fulva</i> L.	AP	>>100	8.96±0.21
	<i>Hemerocallis fulva</i> var. <i>kwanso</i> Regel	AP	>>100	10.33±0.79
	<i>Hemerocallis lilioasphodelus</i> L.	AP	>>100	5.93±0.80
	<i>Hosta lancifolia</i> Engl.	AP	-	38.95±2.13
	<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang	LF	-	62.83±1.96
	<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang	WP	-	15.08±0.33
	<i>Polygonatum odoratum</i> (Miller) Druce var. <i>pluriflorum</i> (Miq.) Ohwi.	AP	-	8.68±0.70
	<i>Rohdea japonica</i> Roth.	LF	>>100	32.23±0.66
	<i>Scilla scilloides</i> (Lindl.) Druce.	AP	-	14.54±0.76
	Lythraceae	<i>Lythrum anceps</i> (Koehne) Makino	AP	21.5±0.89
Magnoliaceae	<i>Schisandra chinensis</i> Baill.	LF	-	0.48±0.10
Malvaceae	<i>Althaea rosea</i> Cav.	AP	>>100	12.15±0.24
	<i>Gossypium indicum</i> Lam.	LF	>>100	61.21±0.10
	<i>Hibiscus manihot</i> L.	AP	-	4.16±0.60
Meliaceae	<i>Cedrela sinensis</i> A. Juss.	LF	-	0.60±0.10
Moraceae	<i>Ficus carica</i> L.	AP	-	11.15±0.94
	<i>Ficus carica</i> L.	LF	86.7±12.6	5.72±0.42
Oleaceae	<i>Forsythia viridissima</i> Lindl.	AP	>>100	5.07±0.92
Onagraceae	<i>Oenothera odorata</i> Jacq.	AP	>>100	2.24±0.05
Orchidaceae	<i>Dendrobium moniliforme</i> (L.) Sw.	AP	>>100	9.02±1.58
Papaveraceae	<i>Macleaya cordata</i> R. Br.	AP	1.7±0.36	4.06±0.18
Plantaginaceae	<i>Plantago asiatica</i> L.	AP	60.8±8.12	1.54±0.11
	<i>Plantago asiatica</i> L.	SD	>>100	3.51±0.20
Polygonaceae	<i>Rumex acetocella</i> L.	AP	25.0±5.62	6.36±0.94
	<i>Pleuropterus multiflorus</i> Turcz.	AP	12.8±0.67	0.64±0.10

Table 1. continued

Family	Scientific name	Part	ROS used IC ₅₀ (µg/ml)	ONOO ⁻ IC ₅₀ (µg/ml)
Polygonaceae	<i>Reynoutria elliptica</i> (Koidz.) Migo	LF	10.7±1.00	1.47±0.19
	<i>Rumex crispus</i> L.	AP	>>100	10.25±0.62
Primulaceae	<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i> (Led.) R.Knuth	AP	>>100	19.67±1.41
	<i>Lysimachia Christina</i> Hance	WP	-	31.72±0.12
Pteridaceae	<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i> (Desv.) Underw	AP	>>100	11.80±0.46
Ranunculaceae	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx.	AP	-	10.81±0.08
	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.	AP	11.3±0.98	1.95±0.12
	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.	FL	9.4±0.53	1.56±0.17
	<i>Pulsatilla koreana</i> Nakai	AP	>>100	4.14±0.42
Rosaceae	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	AP	-	7.79±1.33
	<i>Potentilla discolor</i> Bunge	AP	>>100	5.68±0.22
Rubiaceae	<i>Galium verum</i> L. var. <i>asiaticum</i> Nakai	AP	60.9±5.56	4.18±0.08
Rutaceae	<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz.	AP	>>100	2.28±0.17
	<i>Ruta graveolens</i> L.	AP	>>100	10.80±0.29
	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> S. et Z.	LF	-	3.02±0.83
	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> S. et Z.	AP	-	5.68±0.34
Saururaceae	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	AP	42.2±1.23	1.27±0.01
	<i>Saururus chinensis</i> Baill.	AP	-	2.92±0.16
Scrophulariaceae	<i>Veronica linariaefolia</i> Pall	AP	>>100	0.91±0.23
Solanaceae	<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>francheti</i> (Masters) Hort.	AP	-	1.10±0.10
	Umbelliferaeacea e	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch.) Benth. et Hooker f.	AP	>>100
<i>Angelica gigas</i> Nakai		AP	5.8±1.01	2.61±0.13
<i>Angelica gigas</i> Nakai		FR	-	8.25±0.51
<i>Angelica gigas</i> Nakai		LF	-	3.21±0.20
<i>Foeniculum vulgare</i> Gaertner		AP	-	5.85±1.26
<i>Ligusticum tenuissimum</i> Nakai (Kitagawa)		AP	-	5.80±0.51
<i>Ostericum koreanum</i> (Max.) Kitagawa		AP	22.2±2.45	2.36±0.39
<i>Peucedanum japonicum</i> Thunb.		AP	-	18.10±1.23
Valerianaceae	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fischer.	AP	-	16.19±1.27
	<i>Patrinia villosa</i> (Thunb.) Juss.	AP	52.3±6.02	1.49±0.13
Violaceae	<i>Viola mandshurica</i> W. Becker.	AP	-	13.34±0.31
Zingiberaceae	<i>Zingiber mioga</i> (Thunb.) Rosc.	AP	-	5.62±1.46
Penicillamine				1.72±0.05
Trolox			7.61±0.12	

Results are the mean ± S. E. (n=3)

Penicillamine and Trolox were used as positive controls on peroxynitrite and total ROS.

- showed the total ROS generation under the experimental conditions.

Abbreviations used: AP, aerial part; FL, flower; FR, fruit; LF, leaves; SD, seed; ST, stem; WP, whole plant

Table 2. Scavenging antiactivity of Korean medicinal plants on total ROS

Family	Scientific name	Part used	ROS Inhibition percentage
Araliaceae	<i>Aralia continentalis</i>	ST	-84.47 ± 3.33
	<i>Aralia continentalis</i>	LF	9.40 ± 4.18
	<i>Aralia continentalis</i>	FR	-175.23 ± 2.74
	<i>Aralia continentalis</i>	RT	-32.69 ± 3.20
	<i>Aralia elata</i>	LF	-6.35 ± 1.45
	<i>Aralia elata</i>	ST	15.67 ± 2.39
	<i>Fatsia japonica</i>	HW	10.41 ± 3.72
	<i>Fatsia japonica</i>	SB	19.85 ± 0.78
	<i>Hedera rhombea</i>	LF	-46.04 ± 2.05
	<i>Hedera rhombea</i>	LF	-117.41 ± 4.19
	<i>Hedera rhombea</i>	FR	-66.44 ± 2.15
	<i>Hedera rhombea</i>	WP	28.45 ± 3.19
	<i>Hedera rhombea</i>	ST	-131.62 ± 0.93
Balsaminaceae	<i>Impatiens balsamia</i>	FL	-83.45 ± 9.87
Compositae	<i>Artemisia princeps</i> var. <i>orientalis</i>	WP	-37.45 ± 4.80
	<i>Aster spathulifolius</i>	ST	-62.00 ± 1.33
	<i>Aster spathulifolius</i>	LF	-126.07 ± 7.03
	<i>Aster spathulifolius</i>	RT	24.18 ± 4.70
	<i>Aster spathulifolius</i>	FL	-17.94 ± 0.84
	<i>Carpesium abrotanoides</i>	ST	18.46 ± 1.14
	<i>Carpesium abrotanoides</i>	LF	0.66 ± 0.85
	<i>Carpesium abrotanoides</i>	RT	30.90 ± 2.41
	<i>Chrysanthemum lucidum</i>	WP	36.80 ± 1.40
	<i>Ixeris dentata</i>	WP	-32.02 ± 2.98
	<i>Ixeris dentata</i> var. <i>albiflora</i>	AP	-35.95 ± 4.39
	<i>Ixeris dentata</i> var. <i>albiflora</i>	RT	-46.99 ± 0.76
	<i>Ixeris stolonifera</i>	WP	-317.77 ± 4.18
	<i>Solidage virga aurea</i> var. <i>gigantea</i>	WP	-187.72 ± 5.10
	<i>Youngia denticulata</i>	WP	-84.81 ± 2.24
Cornaceae	<i>Aucuba japonica</i>	SB	1.13 ± 2.03
	<i>Aucuba japonica</i>	LF	-129.48 ± 6.52
	<i>Aucuba japonica</i>	ST	-57.04 ± 4.80
	<i>Aucuba japonica</i>	HW	-23.09 ± 5.33
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea batatas</i>	FR	-7.28 ± 1.76
Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus glabra</i>	LF	-143.88 ± 4.10
	<i>Elaeagnus glabra</i>	ST	29.35 ± 1.11
	<i>Elaeagnus glabra</i>	SB	61.39 ± 1.15
	<i>Elaeagnus glabra</i>	LF	25.92 ± 6.86
	<i>Elaeagnus glabra</i>	HW	44.51 ± 2.61
	<i>Elaeagnus umbellata</i>	LF&ST	-90.74 ± 2.10
	<i>Elaeagnus umbellata</i>	LF&ST&FL	-8.63 ± 4.20
	<i>Elaeagnus umbellata</i>	BR	42.66 ± 1.84

Table 2. continued.

Family	Scientific name	Part used	ROS Inhibition percentage
Ericaceae	<i>Vaccinium bracteatum</i>	HW	38.44 ± 3.47
	<i>Vaccinium bracteatum</i>	LF	19.92 ± 2.06
	<i>Vaccinium bracteatum</i>	SB	32.05 ± 3.00
	<i>Ficus thunbergii</i>	ST	36.29 ± 0.85
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i>	LF	85.14 ± 2.86
Juglandaceae	<i>Juglans sinensis</i>	RSB	118.70 ± 5.53
	<i>Juglans sinensis</i>	SB	105.28 ± 4.22
Labiatae	<i>Melissa officinalis</i>	WP	91.26 ± 4.32
Leguminosae	<i>Albizia julibrissin</i>	SB	48.74 ± 5.90
	<i>Albizia julibrissin</i>	RSB	44.20 ± 1.84
	<i>Albizia julibrissin</i>	LF	90.99 ± 7.38
Moraceae	<i>Cudrania tricuspidata</i>	LF	6.47 ± 0.48
	<i>Cudrania tricuspidata</i>	HW	62.71 ± 1.28
	<i>Cudrania tricuspidata</i>	SB	15.28 ± 2.99
	<i>Morus alba</i>	LF	60.66 ± 1.35
	<i>Morus alba</i>	ST&HW	63.71 ± 2.04
	<i>Morus alba</i>	ST&SB	23.20 ± 3.18
	<i>Morus alba</i>	BR	123.68 ± 4.69
	<i>Morus alba</i>	SB	84.46 ± 3.68
Pinaceae	<i>Abies koreana</i>	LF(1)	41.50 ± 1.01
	<i>Abies koreana</i>	ST	-6.38 ± 1.83
	<i>Pinus parviflora</i>	LF	-58.82 ± 7.74
	<i>Pinus thunbergii</i>	LF	-116.89 ± 11.07
	<i>Pinus thunbergii</i>	HW	-55.09 ± 5.15
	<i>Pinus thunbergii</i>	ST	-206.51 ± 8.05
	<i>Pinus thunbergii</i>	SB	0.73 ± 2.40
	<i>Tsuga sieboldii</i>	ST	36.81 ± 2.22
	<i>Tsuga sieboldii</i>	LF	5.56 ± 1.96
Polygonaceae	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	ST	-23.03 ± 1.12
	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	RT	62.92 ± 1.16
	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	LF	61.30 ± 1.93
	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	FR	52.84 ± 1.39
Rosaceae	<i>Crataegus pinnatifida</i>	FR	19.43 ± 1.85
	<i>Eriobotrya japonica</i>	HW	50.71 ± 1.31
	<i>Eriobotrya japonica</i>	SB	51.12 ± 2.37
	<i>Pyrus calleryana</i> var. <i>fauriei</i>	FR	6.88 ± 7.39
	<i>Rhodotypos scandens</i>	FR	8.86 ± 1.94
	<i>Rubus corchorifolius</i>	AP	58.23 ± 0.38

Table 2. continued.

Family	Scientific name	Part used	ROS Inhibition percentage
	<i>Rubus coreanus</i>	FR	19.18 ± 1.07
	<i>Rubus crataegifolius</i>	LF	28.11 ± 2.48
	<i>Rubus crataegifolius</i>	ST	29.84 ± 0.82
	<i>Rubus crataegifolius</i>	LF&ST	2.92 ± 1.43
	<i>Rubus hirsutus</i>	LF	-49.54 ± 2.29
	<i>Rubus hirsutus</i>	WP	-33.31 ± 0.76
	<i>Rubus idaeus</i> var. <i>microphullus</i>	FR	2.22 ± 1.49
	<i>Rubus takesimensis</i>	ST	47.60 ± 0.96
	<i>Rubus takesimensis</i>	RT	25.56 ± 2.01
	<i>Rubus takesimensis</i>	LF	36.64 ± 1.55
	<i>Sorbus alnifolia</i>	FR	13.48 ± 1.04
Rubiaceae	<i>Mitchella undulata</i>	WP	3.81 ± 2.62
Rutaceae	<i>Citrus dachibana</i>	SB	28.52 ± 1.38
	<i>Citrus dachibana</i>	LF	-10.64 ± 1.59
	<i>Citrus dachibana</i>	HW	-28.40 ± 1.33
Theaceae	<i>Camellia japonica</i>	FR	40.81 ± 0.39
	<i>Camellia japonica</i>	SB	43.63 ± 0.24
	<i>Camellia japonica</i>	HW	-1.57 ± 6.23
	<i>Camellia japonica</i>	LF	31.76 ± 6.44
	<i>Camellia japonica</i>	ST	9.16 ± 1.11
	<i>Camellia japonica</i> for. <i>albipetala</i>	LF	11.34 ± 2.45
	<i>Eurya emarginata</i>	ST	34.64 ± 1.89
	<i>Eurya emarginata</i>	LF	24.69 ± 1.38
	<i>Eurya japonica</i>	HW	37.11 ± 0.47
	<i>Eurya japonica</i>	LF	22.71 ± 7.55
	<i>Eurya japonica</i>	SB	30.99 ± 1.64
Ulmaceae	<i>Celtis choseniana</i>	ST	-76.18 ± 1.68
	<i>Celtis choseniana</i>	FR	-10.63 ± 1.60
	<i>Celtis choseniana</i>	LF	-109.49 ± 1.63
Vitaceae	<i>Ampelopsis brevipedunculata</i> var. <i>heterophylla</i>	ST	21.31 ± 1.33
	<i>Cayratia japonica</i>	LF	-10.51 ± 1.28
	<i>Vitis coignetiae</i>	LF	-102.59 ± 4.05
	<i>Vitis coignetiae</i>	ST	64.03 ± 0.98
Trolox			69.19 ± 0.46

Abbreviations used : AP, aerial part ; FL, flower ; FR, fruit ; LF, leaves ; SD, seed ; ST, stem ; SB, stem bark ; HW, heart wood ; RT, root ; WP, whole plant ; BR, branch ; RSB, roasted stem bark

나. 아시아 식물의 항산화 활성

(1) 아시아 식물의 total free radical 소거 활성

Table 3. Screening of Asian herbs (final 0.5 mg/ml) for total free radical scavenging activities

Latin name	% of control
<i>Achyranthes japonica</i> Leveille et Vaniot	35.9
<i>Aconitum cormichaeli</i> Debeaux	102.0
<i>Acorus gramineus</i> Solander	105.3
<i>Adenophora tryphylla</i> var. <i>japonica</i> Hara	48.1
<i>Akebia quinata</i> Decaisne	72.7
<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk	131.9
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	16.1
<i>Angelica dahurica</i> Benth et Hook	86.0
<i>Angelica gigas</i> Nakai	73.0
<i>Arctium loppa</i>	101.2
<i>Asiasarunm sieboldi</i> F. Maekawa	44.5
<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merrill	62.0
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	44.6
<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	30.5
<i>Bupleurum falcatum</i> L.	328.7
<i>Caesalpinia sappan</i>	5.4
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	68.9
<i>Cassia tora</i> L.	50.5
<i>Castanea crenata</i>	16.8
<i>Catalpa ovata</i> G. Don	69.3
<i>Chrysanthemum sinense</i>	44.3
<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ram.	180.5
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarow	25.7
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	45.2
<i>Cistanche salsa</i>	58.1
<i>Clematis mandshurica</i>	44.7
<i>Cnidium officinale</i> Making	26.3
<i>Codonopsis pilosula</i>	62.6
<i>Coix lachryma jobi</i> Linne var. <i>ma yuen</i> Stapf	63.9
<i>Corydalis ternata</i>	67.7

Table 3. continued.

Latin name	% of control
<i>Croton tiglium</i> L.	181.2
<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	110.3
<i>Cyperus rotundus</i> L.	56.3
<i>Dendrobium monile</i>	28.2
<i>Elaeagnus umbellata</i>	80.1
<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	21.0
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	235.7
<i>Euphoria longana</i> Lamark	35.4
<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	48.4
<i>Forsythia koreana</i> Nakai	43.9
<i>Fritillaria ussuriensis</i> Maxim	44.8
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	24.1
<i>Gastrodia elata</i> Blume	30.8
<i>Gentiana scabra</i> Bunge	68.9
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	35.0
<i>Hordeum vulgare</i> L.	75.4
<i>Ledebouriella seseloides</i> Wolff	49.1
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	118.4
<i>Lilium speciosum</i> Thunb. var. <i>tametomo</i> Sieb. et Zucc.	111.3
<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang	56.9
<i>Lycium chinense</i>	28.5
<i>Lycium chinese</i> Miller	67.7
<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinvaud	92.2
<i>Morus alba</i> Linne	128.0
<i>Ostericum koreanum</i>	107.5
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall. var. <i>tricocarpa</i> Bunge	14.5
<i>Panax notoginseng</i> F.H. Chen	186.3
<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>acuta</i> Kudo	103.1

Table 3. continued.

Latin name	% of control
<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	50.5
<i>Pinellia ternata</i> Tenor et Breitenbach	47.9
<i>Piper longum</i>	106.8
<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	31.3
<i>Polygonatum sibiricum</i> Redoute	45.3
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg	52.9
<i>Poncirus trifoliata</i> Rafin esque	174.0
<i>Prunus armeniaca</i> L. var. <i>ansu</i> Max.	223.2
<i>Prunus percica</i> Sieb. et Zucc	108.5
<i>Quercus acutissima</i>	29.6
<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i>	56.4
Making	18.2
<i>Rubus coreanum</i> Miquel	127.8
<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briguët	17.8
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	45.4
<i>Sinomenium acutum</i> Rehder et wilson	36.7
<i>Sophora flavescence</i> Aiton	39.8
<i>Sophora japonica</i> L.	33.0
<i>Sorghum nervosum</i> Bess	1214.5
<i>Thuja orientalis</i>	252.7
<i>Trichosanthes kirilowii</i> Max.	31.8
<i>Typha orientalis</i> presl	25.5
<i>Ulmus Davidiana</i> Planch. var. <i>japonica</i> Nakai	186.0
<i>Xanthium strumarium</i>	39.5
<i>Zea mays</i> L.	43.4
<i>Zingber officinale</i> Roscoe	33.4
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	

(2) 활성있는 아시아 식물의 용량-반응 상관관계

Table 4. Dose-response relationships of the effective Asian Herbs (% of control)

Herbal name	concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	2	10	50	250	500
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	102.3±1.2	61.3±0.8	31.5±0.9	19.0±0.8	7.4±1.1
<i>Rubus coreanum</i> Miquel	92.6±0.9	59.4±0.5	47.9±1.3	28.7±1.1	28.0±0.6
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall. var. <i>tricarpa</i> Bunge	97.3±0.7	74.5±1.1	45.6±0.9	38.1±1.4	22.4±0.9
<i>Caesalpinia sappan</i>	86.5±0.8	68.0±0.9	37.4±1.1	12.1±0.9	3.2±0.7
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	89.4±0.7	72.2±0.8	48.8±1.0	25.8±0.8	24.8±0.7
<i>Castanea crenata</i>	115.5±1.0	103.2±1.0	57.7±0.8	22.1±0.9	16.6±0.8

(3) $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , 그리고 $\cdot\text{O}_2$ 에 대한 Free radical 소거활성

Table 5. Free radical scavenging activities for $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , and $\cdot\text{O}_2$

Herbal name	Free radical species		
	$\cdot\text{OH}$	H_2O_2	$\cdot\text{O}_2$
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	38.75±9.55	3.83±1.07	9.26±2.88
<i>Rubus coreanum</i> Miquel	24.71±2.53	4.59±1.40	10.35±2.88
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall. var. <i>tricarpa</i> Bunge	27.95±1.77	19.15±0.75	23.24±5.42
<i>Caesalpinia sappan</i>	24.71±1.86	6.24±0.62	83.70±7.23
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	101.80±5.40	10.69±0.98	32.14±2.88
<i>Castanea crenata</i>	5.81±0.49	4.92±0.76	15.25±1.44

다. 아메리카 식물의 항산화 활성

(1) 아메리카 식물의 ROS 소거 활성 (Table 6)

Table 6. Screening of American herbs (0.5 mg/ml) for ROS-scavenging activities

General name	Latin name	% of control
Agrimony	<i>Agrimonia eupatoria</i>	19.3
Allspice Pwd	<i>Pimenta officinalis</i>	33.6
Allspice Whole	<i>Pimenta officinalis</i>	57.9
Alum Gran		117.3
Anise Seed	<i>Pimpinella anisum</i>	202.2
Barberry	<i>Berberis vulgaris</i>	63.3
Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	135.0
Bay Leaf	<i>Laurus nobilis</i>	40.7
Beef Broth		302.2
Bell Peppers-Diced		57.6
Bentonite Clay		229.8
Black Walnut Lf.	<i>Juglans nigra</i>	46.1
Bladderwrack	<i>Fucus vesiculosus</i>	754.7
Blue Cohosh	<i>Gaulophyllum thalictroides</i>	149.6
Blueberry Leaf		58.0
Buckthorn	<i>Rhamnus cathartica</i>	153.5
Butchers Broom	<i>Ruscus aculeatus</i>	192.2
Calendula Flowers	<i>Calendula officinalis</i>	98.8
Cardomom Pwd	<i>Eletaria cardamomum</i>	1009.4
Cascara sagrada Bark	<i>Rhamnus purshiana</i>	114.7
Catnip Herb	<i>Nepeta cataria</i>	375.5
Chamomile	<i>Anthemis nobils(Roman)</i> <i>Matricaria chamomilla</i>	552.3
Chia Seed		169.4
Chicken Broth		561.8
Chickweed herb	<i>Stellaria media</i>	53.9
Chili Pepper Pwd.		55.0
Chives	<i>Allium schoenoprasum</i>	188.8
Cider Mate		210.8
Comfrey Root C/S	<i>Symphytum officinale</i>	17.3
Cumin Whole	<i>Cuminum cyminum</i>	47.0
		573.7
Damiana	<i>Turnera aphrodisiaca</i>	100.2
Dandelion Root-Raw	<i>Taraxacum officinale</i>	141.6
Dill Seed	<i>Anethum graveolens</i>	107.2
Dill Weed	<i>Anethum graveolens</i>	53.1
Dong Quai Pwd	<i>Angelica sinensis</i>	333.0
Dulse	<i>Rhodymenia palmata</i>	114.8
Elder Flowers	<i>Sambucus canadensis</i>	79.3

Table 6. continued.

General name	Latin name	% of control
Fairies-N-Flowers		33.9
Potpourri		44.4
Feminini Tea	<i>Foeniculum luteum</i>	317.4
Fennel Seed	<i>Tanacetum parthenium</i> or	73.0
Feverfew	<i>Chrysanthemum parthe</i> <i>Polygonum multiflorum</i>	71.8
Fo-Ti root		
Gentian	<i>Gentiana lutea</i>	102.3
Giant Horsetail Herb (Shavegrass)	<i>Equisetum arvense</i> <i>E. hiemale</i>	226.4
Goldenod	<i>Solidago spp.</i>	63.1
Gotu Kola C/S	<i>Centella asiatica</i>	418.3
Greek Oreganoleat	<i>Origanum majorana</i>	46.9
Hawthorn Berries	<i>Crataegus oxycantha</i>	185.9
Herb.Oran. Spice Tea		139.8
Herb.seasoning		44.5
Hibiscus Flowers	<i>Hibiscus bancroftianus</i>	63.2
Hops Flowers	<i>Humulus lupulus</i>	126.3
Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	151.7
Irish Moss	<i>Chondrus crispus</i>	235.0
Jasmine Tea	<i>Gelsemium sempervirens</i>	24.6
Juniper Berries	<i>Juniperus communis</i>	416.7
Kelp Flakes	<i>Alaria esculenta</i>	68.0
Lady's Mantle	<i>Alchemilla vulgaris</i>	161.5
Lavender	<i>Lavendula officinale</i>	228.5
Lemon Peel	<i>Citrus limon</i>	107.1
Lemon verbena leaf	<i>Aloysia triphylla</i>	103.6
Lemongrass	<i>Cymbopogon citratus</i>	79.3
Licorice Root C/S	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	29.8
Licorice Tea	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	114.5
Linden flowers	<i>Tilia spp.</i>	27.8
Marjoram	<i>Majorana hortensis</i>	68.5
milk thistle	<i>Silybum marianum</i>	90.1
Mugwort Herb	<i>Artemisia vulgaris</i>	201.8
Mullein	<i>Verbascum thapsus</i>	67.7
Mushroom		41.3
Nutmeg Pwd.	<i>Myristica fragrans</i>	25.4
Oat Straw	<i>Avena sativa</i>	111.4
Onion Pwd.	<i>Allum cepa</i>	445.8
Oregano-Greek	<i>Origanum majorana</i>	38.9
Orris Root C/S	<i>Iris germanica</i>	43.0

Table 6. continued.

General name	Latin name	% of control
Parsley	<i>Petroselinum sativa</i>	208.1
passion flower	<i>Passiflora incarnata</i>	323.2
Pau D'arco C/S	<i>Tabebuia impetiginosa and other</i>	92.1
Pau D'arco Pwd.	<i>species</i>	228.5
Pepper Black-Coarse	<i>Tabebuia impetiginosa and other</i>	197.8
peppercorns-tell	<i>species</i>	203.7
Peppermint		29.8
Pleurisy Root		106.7
Poppy sed	<i>Mentha piperita</i>	164.1
Pumpkin Pie Spice	<i>Asclepias tuberosa</i>	17.6
Queen of the Meadow Root	<i>Papaver spp.</i>	151.8
Raspberry Leaf	<i>Cucurbita pepo</i>	79.6
Rosebuds	<i>Eupatorium purpureum</i>	19.8
Rosehips C/S	<i>Rubus spp.</i>	36.4
Rosehips Pwd.	<i>Rosa gallica</i>	36.7
Rosehips Whole	<i>Rosa gallica</i>	29.8
Rosemary Whole(leaf)	<i>Rosa gallica</i>	72.4
Rosemary Whole(PWD)	<i>Rosa gallica</i>	35.6
Sage-Rubbed	<i>Rosemarinus officinalis</i>	68.2
Sage Whole	<i>Rosemarinus officinalis</i>	25.0
Senna C/S	<i>Salvia officinale</i>	37.3
Sensuali Tea	<i>Salvia officinale</i>	36.1
Slippery Elm C/S	<i>Cassia acutifolia</i>	47.3
Slippery Elm Pwd.		41.3
Spearmint	<i>Ulmus fulva</i>	36.0
Spirulina	<i>Ulmus fulva</i>	282.6
Squawvine	<i>Mentha spicata</i>	64.8
Star Anise-Whole		86.9
	<i>Mitchella repens</i>	
	<i>Ilicium verum</i>	
Tansy	<i>Tanacetum vulgare</i>	92.8
Tarragon Leaf	<i>Artemisia dracunculus</i>	252.1
Tilia Star Flowers		23.5
Uva Ursi	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	59.2
Valerian	<i>Valerian officinale</i>	60.1
Vervain Blue	<i>Vervena hastata</i>	124.0
White Oak	<i>Quercus alba</i>	16.5
White Pine	<i>Pinus strobus</i>	19.2
Wild cherry Bark	<i>Prunus virginiana</i>	42.6
Wild Yau Root	<i>Dioscorea villosa</i>	125.0
Witch hazel leaf	<i>Hamamelis virginiana</i>	31.8
wintergreen herb	<i>Gaultheria procumben</i>	41.6
WoodBetony Herb	<i>Stachys officinalis</i>	327.1
Worm wood	<i>Artemisia annua</i>	444.0
Yerba Mate Leaf Roasted	<i>Ilex paraguariensis</i>	50.4

(2) 활성 아메리카 식물의 용량-반응 상관관계

Table 7. Dose-response relationships of the effective American herbs (% of control)

Herbal name	concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	2	10	50	250	500
White pine	126.7 \pm 0.5	99.3 \pm 0.4	60.5 \pm 0.5	30.3 \pm 0.3	27.8 \pm 0.9
White oak	64.9 \pm 1.1	49.3 \pm 0.9	30.8 \pm 0.5	17.8 \pm 0.9	16.5 \pm 0.3
Agrimony	128.2 \pm 0.9	112.2 \pm 1.0	91.4 \pm 1.1	12.2 \pm 0.3	7.2 \pm 0.6
Pumpkin pie spice	117.6 \pm 0.9	84.1 \pm 0.3	81.3 \pm 0.7	48.2 \pm 0.2	25.5 \pm 0.6
Rosebuds	57.2 \pm 1.2	46.7 \pm 0.8	36.7 \pm 0.2	14.6 \pm 0.4	14.7 \pm 0.9

(3) 활성 아메리카 식물 획분들의 ROS 소거효과

Table 8. The ROS scavenging effect of herbal fractions (% of control)

Fraction \ Herb name	Peppermint	Pumpkin pie spice	White oak	White pine	Agrimony
methanol	23.5 \pm 1.1	25.7 \pm 1.6	29.1 \pm 1.1	75.2 \pm 3.4	31.5 \pm 0.4
<i>n</i> -butanol	28.8 \pm 2.1	35.0 \pm 0.9	16.0 \pm 1.1	19.8 \pm 1.0	13.9 \pm 0.3
ethyl acetate	31.1 \pm 1.2	11.5 \pm 0.9	32.8 \pm 1.5	20.0 \pm 0.1	18.4 \pm 1.1
methylene chloride	103.9 \pm 2.5	41.4 \pm 0.3	191.8 \pm 0.9	398.2 \pm 9.3	315.5 \pm 3.4
water	55.3 \pm 1.3	106.1 \pm 1.6	5.9 \pm 0.5	49.0 \pm 1.1	37.1 \pm 1.3

(4) Western herb 28종의 authentic peroxynitrite와 SIN-1 분해로부터 생성된 peroxynitrite에 대한 소거효과

Table 9에서 보는 바와 같이 28종의 western herb중에서 witch hazel bark > rosemary > jasmine tea > sage > elippery elm > black walnut leaf > Queen Anne's lace > Linden flower 순으로 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조화합물인 penicillamine과 유사하게 80%이상으로 소거활성이 강하게 나타났다. Authentic peroxynitrite와 SIN-1 분해로부터 생성된 peroxynitrite 모두에 대하여서도 가장 소거활성이 좋은 *Hamamelis virginiana* L.의 주성분인 hamamelitanin (Fig. 10)의 peroxynitrite에 대한 소거효과를 Fig. 11.에 나타내었다. Hamamelitanin의 소거효과는

농도 의존적으로 대조화합물인 gallic acid와 penicillamine보다도 높게 나타났다.

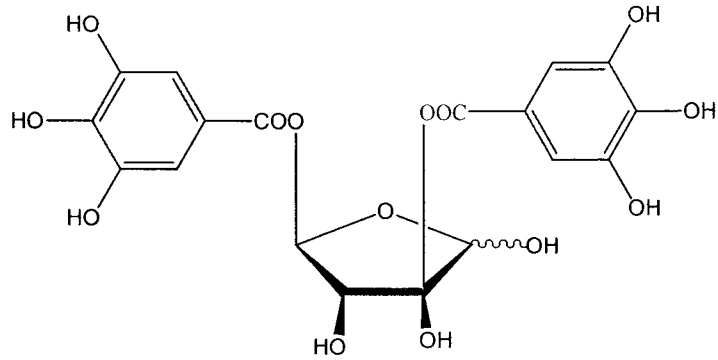


Fig. 10. Hamamelitanin의 구조

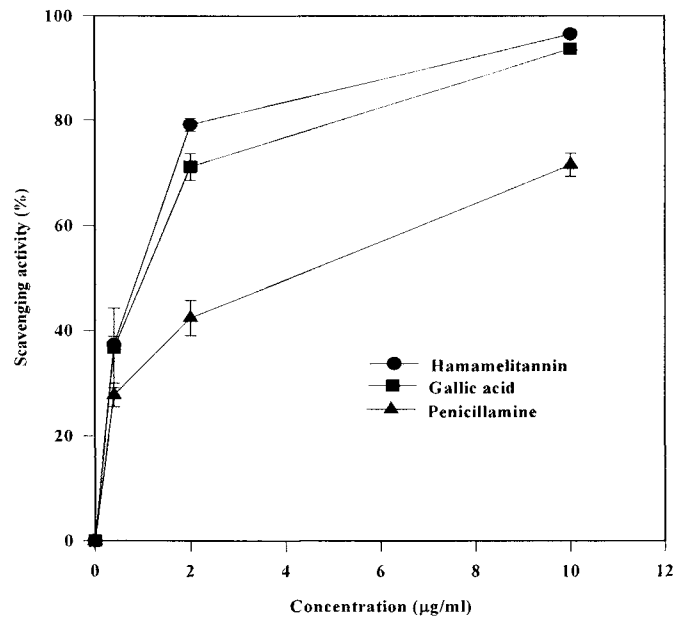


Figure 11. Dose response curves of hamamelitannin (●), gallic acid (■), and penicillamine (▲) on peroxynitrite scavenging activity (mean \pm S.E., n=3).

Table 9. ONOO⁻ (10 µM) scavenging activities of herb extracts (5.0 µg/ml)

Common name	Latin name	Family name	Authentic ONOO ⁻ (%)	ONOO ⁻ from decomposition of SIN-1(%)
Witch hazel bark	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Hamamelidaceae	92.68 ± 0.40	95.26 ± 0.81
Rosemary whole	<i>Rosemarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	87.99 ± 1.64	66.13 ± 2.68
Jasmine tea	<i>Jasminum officinale</i> L.	Oleaceae	87.17 ± 0.50	89.31 ± 0.67
Sage whole	<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	84.69 ± 0.79	64.18 ± 3.82
Slippery elm	<i>Ulmus fulva</i> Mich.	Ulmaceae	82.34 ± 1.38	43.97 ± 2.94
Black walnut leaf	<i>Juglans nigra</i> L.	Juglandaceae	81.29 ± 3.48	59.10 ± 5.40
Queen Anne's lace	<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae	81.68 ± 2.06	81.83 ± 0.57
Linden flower	<i>Tilia platiphyllos</i> Scop. <i>Tilia cordata</i> Mill.	Tiliaceae	80.48 ± 7.63	76.11 ± 3.81
Allspice	<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	Myrtaceae	79.68 ± 2.35	78.66 ± 2.06
Chickweed herb	<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	Caryophyllaceae	77.16 ± 7.43	49.56 ± 2.10
Cat's claw	<i>Uncaria tomentosa</i> Wild D.C.	Rubiaceae	76.61 ± 3.33	32.50 ± 5.65
Spearmint	<i>Mentha x piperita</i> L.	Lamiaceae	76.21 ± 4.14	73.08 ± 2.64
White pine	<i>Pinus strobus</i> L.	Pinaceae	69.32 ± 1.54	67.96 ± 4.68
Vervain blue	<i>Verbena hastata</i> L.	Verbenaceae	59.20 ± 2.10	67.24 ± 0.82
Oregano-Greek	<i>Origanum majorana</i> L.	Lamiaceae	59.02 ± 9.58	65.37 ± 1.72
Dillweed	<i>Anethum graveolens</i> L.	Apiaceae	58.98 ± 8.24	54.77 ± 1.77
Licorice root	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Fabaceae	56.77 ± 3.22	41.90 ± 3.57
Agrimony	<i>Agrimonia eupatoria</i> L. <i>Agrimonia procera</i> Wallr.	Rosaceae	52.70 ± 3.22	39.93 ± 2.54
Tumeric	<i>Curcuma longa</i> L.	Zingiberaceae	50.06 ± 3.76	31.70 ± 4.74
Rosehips whole	<i>Rosa canina</i> L.	Rosaceae	40.74 ± 5.06	58.14 ± 2.30
Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Myristicaceae	40.21 ± 2.20	44.83 ± 0.58
Senna whole	<i>Cassia angustifolia</i> Vahl <i>Cassia senna</i> L.	Fabaceae	38.92 ± 5.88	47.05 ± 2.65
Comfrey root	<i>Symphytum officinale</i> L.	Boraginaceae	38.82 ± 5.70	35.94 ± 1.64
Bay leaf	<i>Laurus nobilis</i> L.	Lauraceae	36.47 ± 3.94	24.62 ± 5.72
Orris root	<i>Iris</i> spec. (prob., <i>Iris</i>	Iridaceae	35.48 ± 1.25	52.34 ± 1.62
Cumin whole	<i>versicolor</i>)	Apiaceae	32.02 ± 2.05	59.42 ± 3.01
Chamomile	<i>Cuminum cyminum</i> L.	Asteraceae	29.97 ± 2.57	60.94 ± 3.68
Dandelion root	<i>Chamomilla recutita</i> (L.)	Asteraceae	18.16 ± 8.86	20.19 ± 2.26
Penicillamine*	Rauschert <i>Taraxacum officinale</i> Weber		86.34 ± 0.18	88.38 ± 0.49

Data are means ± S.E. for triplicate measurements. * Used as a positive control.

라. 엉겅퀴의 항산화 활성

(1) 엉겅퀴 각 부위별 MeOH 추출물과 그 분획물들의 항산화 활성

Table 10. Antioxidant activities of *Cirsium*

Samples Fractions	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	ROS Inhibition ratio (%)	·OH		ONOO ⁻ IC ₅₀ (µg/mL) ^c	
			Inhibition ratio (%) ^a	IC ₅₀ (µg/mL) ^b		
Flower	MeOH	51.9	48.89 ± 5.32	-343.05 ± 34.17	-	11.27 ± 0.24
	CH ₂ Cl ₂	369.85	62.72 ± 9.39	-454.98 ± 40.75	-	19.94 ± 0.19
	EtOAc	17.1	30.77 ± 6.60	60.93 ± 10.69	31.64 ± 2.63	1.37 ± 0.10
	BuOH	12.75	58.27 ± 12.05	11.32 ± 11.13	-	2.09 ± 0.04
	H ₂ O	78.35	41.45 ± 7.26	-12.52 ± 3.14	-	12.13 ± 0.13
Root	MeOH	10.15	57.52 ± 17.22	23.73 ± 5.36	-	-
	CH ₂ Cl ₂	132.85	53.35 ± 4.50	-406.38 ± 13.55	-	-
	EtOAc	3.35	72.91 ± 13.97	58.85 ± 2.34	27.00 ± 0.86	-
	BuOH	61.5	54.06 ± 24.51	55.84 ± 3.62	26.23 ± 1.77	-
	H ₂ O	97.50	44.94 ± 6.68	19.28 ± 7.49	-	-
Stem	MeOH	11.85	65.59 ± 8.94	-181.58 ± 25.83	-	8.27 ± 0.22
	CH ₂ Cl ₂	176.65	59.92 ± 8.35	20.32 ± 15.67	-	25.58 ± 0.71
	EtOAc	7.85	58.30 ± 10.74	62.77 ± 3.08	14.00 ± 1.53	0.41 ± 0.01
	BuOH	9.75	68.14 ± 12.56	56.70 ± 3.95	30.00 ± 0.49	1.45 ± 0.14
	H ₂ O	53.10	49.52 ± 11.94	23.87 ± 1.49	-	1.12 ± 0.74
Leaf	MeOH	84.85	72.63 ± 23.01	50.40 ± 2.65	-	1.78 ± 0.07
	CH ₂ Cl ₂	294.9	58.74 ± 5.58	-244.64 ± 8.57	-	-
	EtOAc	6.75	64.65 ± 7.29	53.12 ± 5.49	37.05 ± 3.67	5.80 ± 0.04
	BuOH	5.85	67.95 ± 12.21	69.75 ± 1.88	30.00 ± 2.67	1.49 ± 0.05
	H ₂ O	83.85	69.08 ± 10.02	51.40 ± 10.33	34.57 ± 2.55	9.41 ± 0.52
L-ascorbic acid	0.75					
Trolox		69.36 ± 2.56				
Penicillamine					2.60 ± 0.16	

Trolox and MeOH extract : ROS inhibition concentration at 40 µg/mL

Fractions : ROS inhibition concentration at 20 µg/mL

(2) 영경키에서 분리된 화합물들의 구조

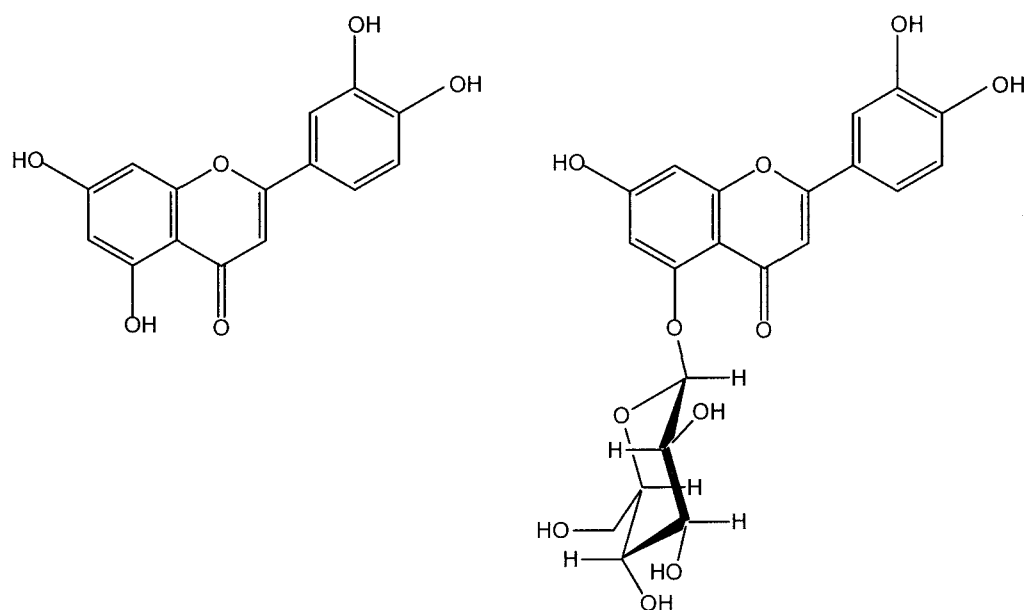


Fig. 12. 영경키에서 분리한 flavonoid의 구조

(3) 영경키에서 분리된 화합물들의 항산화 활성

Table 11. Total ROS scavenging activities of isolated compounds derived from *Cirsium*

Compounds	ROS ^a
luteolin	48.43 ± 0.71
Luteolin-5-O-glucoside	72.33 ± 0.77
Trolox	72.87 ± 1.31

ROS inhibition concentration at 40 µg/mL

마. 비파 각 부위별 MeOH 추출물과 그 분획물들의 항산화 활성

Table 12. Antioxidant activities of several part of *Eriobotrya japonica*

		DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ROS (% of control)	ONOO- IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Leaves	MeOH (LM)	9.25	170.8 \pm 66.61	9.4 \pm 1.04
	CH ₂ Cl ₂ (LMC)	29.10	16.3 \pm 1.70	13.3 \pm 1.29
	EtOAc (LME)	2.76	67.7 \pm 6.29	4.4 \pm 0.64
	BuOH (LMB)	5.31	93.1 \pm 12.09	2.5 \pm 0.18
	H ₂ O (LMH)	12.41		3.6 \pm 0.91
Fruit	MeOH (FM)		43.4 \pm 4.17	43.4 \pm 4.17
	CH ₂ Cl ₂ (FMC)		13.4 \pm 0.43	13.4 \pm 0.43
	EtOAc (FME)	>>200	3.3 \pm 0.31	3.3 \pm 0.31
	BuOH (FMB)		23.78 \pm 0.41	23.78 \pm 0.41
	H ₂ O (FMH)			
Seed	MeOH (SM)	116.50	>>200	38.0 \pm 0.43
	CH ₂ Cl ₂ (SMC)	35.92		32.0 \pm 0.94
	EtOAc (SME)	7.50	79.3 \pm 25.79	2.3 \pm 0.14
	BuOH (SMB)	64.32	>>200	29.0 \pm 0.28
	H ₂ O (SMH)	>120		
Branch	MeOH (BM)	6.42	46.49 \pm 1.06	1.912 \pm 0.048
	CH ₂ Cl ₂ (BMC)	32.3	-131.48 \pm 1.93	9.513 \pm 0.211
	EtOAc (BME)	1.54	70.57 \pm 3.43	0.007 \pm 0.002
	BuOH (BMB)	8.33	40.48 \pm 11.08	2.079 \pm 0.090
	H ₂ O (BMH)	51.9	22.88 \pm 2.83	14.218 \pm 0.365
Trolox			69.04 \pm 0.18	

a : MeOH ext. : 0.5 mg/mL b : Fraction : 0.25 mg/mL

마. 뽕나무의 항산화 활성

(1) 수종 뽕나무의 부위별 MeOH 추출물의 항산화 활성

항산화제는 금속이온과 결합하거나 자동산화의 연쇄반응을 유도하는 free radical 을 소거하거나 혹은 생성된 과산화물을 분해하여 불활성화되어 활성을 나타내게 되는데, 이러한 기전은 하나 이상이 관여할 수도 있고 서로 상승작용을 일으키기도 한다 (Moure *et al.*, 2001). 따라서 천연물의 항산화 활성을 검색하거나, 분리 화합물의 활성 기전을 밝히기 위하여 3가지 항산화 실험계, 즉 DPPH radical 소거 활성법과, 활성산소종 생성 억제활성법 그리고 ONOO 소거활성법으로 항산화 활성을 평가하였다. 한국에서 자생하는 섬개뽕나무, 산복사, 귀룽나무, 울뽕나무, 산뽕나무, 뽕나무, 그리고 왕뽕나무의 7종의 뽕나무 (Table 13)를 대상으로 각 부위별 MeOH 추출물을 사용하여 실험하였다.

Table 13. Some selected *Prunus* genus in tested model systems

Plants	Common name in Korea
<i>P. buergeriana</i>	섬개벚나무
<i>P. davidiana</i>	산복사
<i>P. padus</i>	귀룽나무
<i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i>	울벚나무
<i>P. sargentii</i>	산벚나무
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	벚나무
<i>P. yedoensis</i>	왕벚나무

(가) 수종 벚나무의 부위별 MeOH 추출물의 DPPH radical 소거활성

DPPH radical 방법은 다른 항산화 실험계처럼 과도한 산화조건을 유도할 필요가 없어서 원시료의 열분해에 대한 위험율이 작고, 상온에서 radical을 용매에 간단히 용해시키는 것만으로 수행하기 때문에 간편하게 항산화성을 측정할 수 있다 (Bondet *et al.*, 1997). 수종 벚나무 추출물을 대상으로 한 DPPH radical 소거활성 결과를 Table 14에 나타내었다. 섬개벚나무의 잎을 제외한 모든 MeOH 추출물에서 강한 DPPH 소거 활성을 보였는데, 특히 울벚나무의 수피의 MeOH 추출물의 소거활성은 IC₅₀ 1.63 µg/mL로 대조군으로 사용된 항산화제인 L-ascorbic acid (IC₅₀ 1.7 µg/mL)와 유사한 활성을 나타내었다. 또한 산복사, 귀룽나무의 각 부분별 MeOH 추출물과 산벚나무의 가지, 벚나무의 심재 그리고, 왕벚나무 가지의 MeOH 추출물의 DPPH 소거활성이 < IC₅₀ 10 µg/mL로 나타나는 것으로 보아, 이들 벚나무 추출물의 항산화활성이 강력한 radical 소거 활성에 기인됨을 알 수 있었다. 이외에도 산벚나무 잎과 수피의 radical 소거 활성의 IC₅₀가 각각 18.99 µg/mL와 15.69 µg/mL로, 벚나무의 잎과 꽃은 각각 21.88 µg/mL, 14.30 µg/mL로 측정되었다. 수종의 벚나무들의 부위별 DPPH radical 소거활성을 살펴보면 주로 가지와 심재에서 가장 좋은 활성을 나타내었고 잎과 꽃, 그리고 열매 순으로 활성이 나타났다. 특히 섬개벚나무의 경우 잎에서의 활성은 나타나지 않는 반면, 수피와 심재에서는 각각 3.35 µg/mL와 4.00 µg/mL로 강한 활성을 나타낸 것으로 보아 항산화활성 성분은 주로 잎이 아닌 수피나 심재에 존재할 것으로 여겨진다.

(나) 수종 벚나무의 부위별 MeOH 추출물의 활성산소종 억제활성

생체 내에서 생성되는 활성산소종을 직접적으로 정량 측정하는 방법으로 간세포주 (AC₂F)에서 생성된 활성산소종에 위해 비형광 probe인 DCFH 형광성을 띠는 DCF로 전환되는 기전을 이용하였다. 수종 벚나무의 부위별 MeOH 추출물에 대한 활성산소종 억제율 (%)을 측정하였으며 실험결과는 Table 14에 나타내었다. 산복사, 왕벚나무 가지 그리고 벚나무 심재의 억제율 (%)은 40 µg/mL 농도에서 각각 83.78 ± 1.31 %, 72.06 ± 1.35 % 그리고 71.20 ± 0.63 %로 가장 높았고, 대조군인

Trolox ($73.56 \pm 0.31 \%$)와 유사한 활성을 보였다. 특히 왕벗나무의 잎 추출물은 자동산화물을 억제하여 melanin 생성을 감소 시킨다는 것이 알려져 있기 때문에 (Matsuda *et al.*, 1994), 이 벗나무에서는 활성산소종을 억제하는 다양한 성분이 존재할 것으로 여겨진다. 섬개벗나무 잎과 벗나무 수피의 활성산소종 생성 억제 활성은 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 매우 낮게 측정된 반면, 섬개벗나무, 올벗나무의 활성은 모든 부위에서 50 % 이상의 활성을 나타내었다. 특히 벗나무의 잎과 꽃의 MeOH 추출물의 경우 DPPH와 ONOO⁻와 같은 다른 항산화계와는 달리 활성산소종 생성 억제 활성이 낮게 나타나는 것으로 보아, 이들 벗나무의 항산화 활성은 활성산소종 억제 기전에 크게 영향을 받지 않는다는 것을 추정할 수 있었다. 이외 다른 벗나무 MeOH 추출물이 활성산소종에 대해 30 %에서 60 % 정도의 좋은 활성을 보이는 것으로 보아, 이들 벗나무 속 식물들이 활성산소종 억제활성을 통해서도 항산화 활성을 나타내는 것으로 여겨졌다.

(다) 수종 벗나무의 부위별 MeOH 추출물의 ONOO⁻ 소거 활성

수종 벗나무 MeOH 추출물의 ONOO⁻ 소거활성을 측정하기 위해 직접적인 합성 ONOO⁻ 소거 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 14에 나타내었다. 산복사와 산벗나무의 잎과 가지는 ONOO⁻ 소거율이 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 $92.84 \pm 0.16 \%$ 와 $91.92 \pm 0.88 \%$, $91.63 \pm 0.39 \%$ 로 가장 높게 나타났으며, 올벗나무의 수피, 산벗나무의 꽃, 그리고 왕벗나무 잎에서도 동일농도에서 각각 $76.28 \pm 0.21 \%$ 와 $80.63 \pm 0.81 \%$, $72.85 \pm 3.88 \%$ 로 모두 대조군인 penicillamine ($71.14 \pm 0.47 \%$)보다 높은 활성을 나타내었다. 추출물임에도 불구하고 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 이들 벗나무의 항산화활성에 ONOO⁻ 소거활성이 크게 기여하고 있음을 알 수 있었다. 섬개벗나무 잎을 제외한 대부분의 벗나무 속 식물의 MeOH 추출물은 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 50 % 정도의 좋은 ONOO⁻ 소거활성을 나타내었다.

Table 14. Scavenging activities of the MeOH extracts of some selected *Prunus* genus on DPPH radical, total ROS and ONOO⁻

Plants	Parts of plant used	DPPH ^a	Total ROS ^b	ONOO ^{-c}
		IC ₅₀ (µg/mL)	Inhibition ratio (%) Mean ± SE	Inhibition ratio (%) Mean ± SE
<i>P. buergeriana</i> *	Leaf	145.75	-1.49 ± 8.31	8.22 ± 2.75
	Stem bark	3.35	58.41 ± 0.29	55.84 ± 0.84
	Heartwood	4.00	51.32 ± 0.37	42.35 ± 0.90
<i>P. davidiana</i> **	Stem	3.60	83.78 ± 1.31	92.84 ± 0.16
<i>P. padus</i> *	Leaf	2.75	60.60 ± 0.80	46.69 ± 1.88
	Stem	4.50	31.04 ± 0.97	40.34 ± 1.96
	Flower	5.40	39.11 ± 1.04	35.33 ± 3.04
<i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i> *	Leaf	5.40	57.64 ± 2.23	57.20 ± 0.70
	Stem bark	1.63	75.84 ± 0.91	76.28 ± 0.21
	Heartwood	3.35	64.33 ± 1.20	49.16 ± 1.05
<i>P. sargentii</i> **	Leaf	18.99	58.83 ± 1.94	91.92 ± 0.88
	Fruit	79.06	39.57 ± 2.37	61.41 ± 1.43
	Stem	8.03	57.88 ± 1.10	91.63 ± 0.39
	Stem bark	15.69	30.78 ± 3.85	47.35 ± 1.78
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	Leaf**	21.88	6.90 ± 2.70	67.81 ± 3.15
	Flower**	14.30	12.22 ± 1.63	80.63 ± 0.81
	Stem bark**	67.15	1.17 ± 2.22	34.55 ± 7.95
<i>P. yedoensis</i>	Heartwood*	4.05	71.20 ± 0.63	61.36 ± 1.91
	Stem*	3.20	72.06 ± 1.35	67.77 ± 1.51
	Leaf**	27.08	48.34 ± 3.29	72.85 ± 3.88
L-ascorbic acid		1.71		
Trolox			73.56 ± 0.31	
Penicillamine				74.14 ± 0.47

*Some of samples tested were purchased and **the others of samples were collected and then extracted with hot MeOH. ^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀: µg/mL). ^bROS is the inhibition percent of total ROS generation in hepatocyte at the concentration of 40 µg/mL. ^cONOO⁻ is the inhibition percent of peroxynitrite at the test concentration of 10 µg/mL.

(2) 3종의 벚나무 MeOH 추출물과 각 획분들의 항산화활성

산복사와 왕벚나무 잎 그리고 벚나무의 잎, 수피, 꽃의 MeOH 추출물 그리고 각 획분 (CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 획분)과 H₂O 층에 대하여 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO⁻ 소거활성을 측정하였다. 산복사와 왕벚나무 잎의 MeOH 추출물, 각 획분 그리고 H₂O층에 대한 항산화활성 실험은

Table 15에 나타내었다. 산복사의 DPPH radical 소거 활성은 EtOAc 획분 > *n*-BuOH 획분 > MeOH 추출물 >> CH₂Cl₂ 획분 >> H₂O층 순으로 나타났으며, 이 결과로서 산복사의 DPPH radical 소거 활성을 지닌 성분은 대부분 EtOAc 획분과 *n*-BuOH 획분에 존재함을 알 수 있었다. 산복사 MeOH 추출물의 활성산소종 억제율은 40 µg/mL 농도에서 83.78 ± 1.31%로 매우 높게 나타났으며, 분획과정을 통해 EtOAc 획분, CH₂Cl₂ 획분, *n*-BuOH 획분 순으로 각각 83.18 ± 3.30 %와 70.39 ± 3.70 %, 56.71 ± 3.42 %로 높게 측정된 것으로 보아, H₂O층을 제외한 모든 획분에 활성산소종 억제활성을 가진 성분이 포함되어 있을 것으로 여겨졌다. 또한 산복사는 10 µg/mL 농도에서 MeOH 추출물과 EtOAc 획분, CH₂Cl₂ 획분, *n*-BuOH 획분에서 모두 70 % 이상의 강력한 ONOO⁻ 소거활성을 나타내었는데, 이는 대조군인 penicillamine의 소거활성이 74.14 ± 0.47 %임을 고려해볼 때, 상당히 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 3가지 항산화실험을 통해 산복사의 MeOH 추출물과 EtOAc 획분, *n*-BuOH 획분은 radical 소거와 활성산소종과 ONOO⁻의 억제 기전을 통해 항산화활성을 나타냄을 알 수 있었다. 왕벚나무 잎의 EtOAc 획분에서 DPPH radical 소거 활성과 ONOO⁻ 소거활성이 각각 IC₅₀ 6.08 µg/mL와 10 µg/mL 농도에서 87.24 ± 1.11 %억제율로서 가장 높게 나타났으나, 활성산소종 억제활성은 거의 나타내지 않았다. 이는 왕벚나무 잎은 활성산소종 억제와는 다른 기전, 즉 radical 소거나 ONOO⁻ 소거활성에 의해 항산화활성을 나타낼 것으로 여겨진다. 벚나무의 잎, 가지, 꽃의 MeOH 추출물 그리고 각 획분 (CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 획분)과 H₂O층에 대하여 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO⁻ 소거활성을 측정하여 Table 15에 나타내었다. 벚나무 잎의 EtOAc 획분은 DPPH radical 소거활성이 IC₅₀ 7.98 µg/mL로 나타났으며, 또한 ONOO⁻에 대해서는 10 µg/mL 농도에서 95.37 ± 0.12 % 소거함으로서 실험한 획분 중 가장 강하게 나타났다. 특히 ONOO⁻ 소거활성은 H₂O층을 제외하고 모두 65 % 이상의 강한 소거활성을 나타내었는데, 이는 대조군인 penicillamine의 소거율이 74.14 ± 0.47%임을 고려해볼 때 상당히 높은 활성임을 알 수 있었다. 그러나 잎의 경우 활성산소종에 대한 억제활성은 EtOAc 획분에서도 27.7 ± 4.2 %로 낮게 나타났다. 잎과 마찬가지로 벚나무 수피의 경우도 EtOAc 획분이 DPPH radical 소거활성과 ONOO⁻ 소거율이 각각 IC₅₀ 5.65 µg/mL과 10 µg/mL 농도에서 87.54 ± 0.15%로 가장 높았으며, 이외 다른 획분에서는 낮게 나타났다. 벚나무의 꽃의 DPPH radical 소거활성은 EtOAc 획분 > *n*-BuOH 획분 > MeOH 추출물 > H₂O층 >> CH₂Cl₂ 획분 순으로 나타났으며, IC₅₀는 각각 2.3, 2.8, 14.3, 19.75, 64.45 µg/mL로 측정되었고, ONOO⁻ 소거활성은 H₂O층을 제외하고 모두 65 % 이상의 강한 소거활성을 나타내었다. 벚나무의 수피와 꽃의 EtOAc 획분은 활성산소종 억제율이 40 µg/mL 농도에서 각각 48.34 ± 1.25 %와 52.56 ± 0.68 %로 나타났다.

벚나무에 대한 이러한 항산화활성 결과를 미루어보아 항산화활성 성분이 여러 획분 중 EtOAc 층에 가장 많이 존재하고 있을 것으로 추정할 수 있었고, 주로 radical 소거나 ONOO⁻ 소거에 의해 항산화활성을 나타낼 것으로 여겨졌다.

Table 15. Antioxidant activities of the MeOH extracts and its fractions of *P. davidiana* stem, *P. yedoensis* leaf and *P. serrulata* var *spontanea* leaf, stem bark and flower

Plants	MeOH and its fractions used	DPPH ^a	Total ROS ^b			ONOO ^{-c}		
		IC ₅₀	Inhibition ratio (%)			Inhibition ratio (%)		
		($\mu\text{g/mL}$)	Mean	\pm	SE	Mean	\pm	SE
<i>P. davidiana</i>								
Stem	MeOH	3.60	83.78	\pm	1.31	92.84	\pm	0.16
	CH ₂ Cl ₂	52.00	70.39	\pm	3.70	70.73	\pm	0.55
	EtOAc	2.57	83.18	\pm	3.30	95.56	\pm	0.23
	<i>n</i> BuOH	2.93	56.71	\pm	3.42	84.77	\pm	0.34
	H ₂ O	772.52	0.88	\pm	1.98	33.51	\pm	1.61
<i>P. yedoensis</i>								
Leaf	MeOH	27.08	42.77	\pm	3.29	75.46	\pm	3.88
	CH ₂ Cl ₂	32.30	219.6	\pm	18.37	48.55	\pm	1.47
	EtOAc	6.08	33.33	\pm	4.79	87.24	\pm	1.11
	<i>n</i> BuOH	50.13	6.20	\pm	2.75	47.89	\pm	2.13
	H ₂ O	57.38	4.14	\pm	4.64	29.36	\pm	5.31
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>								
Leaf	MeOH	21.88	6.9	\pm	2.7	67.81	\pm	3.15
	CH ₂ Cl ₂	65.70	-176.2	\pm	4.9	65.35	\pm	0.46
	EtOAc	7.98	27.7	\pm	4.2	95.37	\pm	0.12
	<i>n</i> BuOH	48.55	15.3	\pm	3.5	83.85	\pm	1.15
	H ₂ O	18.95	8.9	\pm	2.8	41.29	\pm	6.01
Stem bark	MeOH	67.15	1.17	\pm	2.22	34.55	\pm	7.95
	CH ₂ Cl ₂	183.2	11.62	\pm	6.64	39.37	\pm	4.83
	EtOAc	5.65	48.34	\pm	1.25	87.54	\pm	0.15
	<i>n</i> BuOH	78.9	7.84	\pm	1.57	39.63	\pm	4.77
	H ₂ O	189.3	0.77	\pm	5.07	30.45	\pm	3.29
Flower	MeOH	14.3	12.22	\pm	1.63	80.63	\pm	0.81
	CH ₂ Cl ₂	64.45	142.6	\pm	1.98	65.19	\pm	1.31
	EtOAc	2.3	52.56	\pm	0.68	93.82	\pm	0.34
	<i>n</i> BuOH	2.8	33.37	\pm	7.39	69.38	\pm	1.62
	H ₂ O	19.75	43.77	\pm	1.84	24.34	\pm	4.10
L-ascorbic acid	1.71							
Trolox		73.56	\pm	0.31				
Penicillamine					74.14	\pm	0.47	

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀: $\mu\text{g/mL}$). ^bROS is the inhibition percent of total ROS generation in hepatocyte at the concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$. ^cONOO⁻ is the inhibition percent of peroxyntirite at the test concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$.

(3) 뽕나무 EtOAc 획분에서 분리된 화합물의 구조결정

뽕나무 (*P. serrulata* var. *spontanea*) 잎의 획분 중 항산화활성이 가장 높은 EtOAc 획분을 대상으로 column chromatography하여 13 종의 flavonoid 화합물 [prunetin (1), genistein (2), quercetin (5), prunetin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (7), kaempferol-3-*O*- α -L-arabinofuranoside (9), prunetin-5-*O*- β -D-glucopyranoside (11), kaempferol-3-*O*- β -D-xylopyranoside (12), naringenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (13), genistin (14), kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (15), orobol-7-*O*- β -D-glucopyranoside (16), quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (20) and kaempferol-3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (21)]과 6종의 triterpenoid 화합물 [ursolic acid (3), 2 α -hydroxyursolic acid (4), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy urs-12-en-28-oic acid (6), 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (17), and 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (18)], 그리고 각각 1종의 sphingolipid (8)와 phenolic 화합물 [2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl-*o*-(*Z*) coumaric acid (19)]을 각각 분리, 정제하였으며 구조를 밝히기 위해 IR, UV, EIMS, LR-, HR-FABMS, 1D-NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)과 2D-NMR (HMQC, HMBC, COSY, NOESY)의 분광학적 방법을 사용하여 측정하였다.

(가) Flavonoid 화합물의 구조 결정

① 6종의 flavonol 화합물의 구조결정 (5, 9, 12, 15, 20, 21)

분리한 모든 flavonol 화합물은 aqueous MeOH로 재결정하여 노란색 결정성 화합물로서 얻을 수 있었다. Compound 5는 quercetin 표품과 함께 TLC 확인하였고, EIMS 분석시 분자이온 peak가 m/z 302에서 base peak로 나타나고 있으며, C 환에서 *retro* Diels-Alder 분해에 의한 $[A + H]^+$ 가 m/z 153에서, $[B]^+$ 가 m/z 137에서 나타나는 것으로 보아, A와 B 환에 각각 dihydroxy group을 가진 flavonol인 quercetin로 확인 동정할 수 있었다 (Young *et al.*, 1991 ; 강 등, 2000). Compound 9, 12, 15과 20은 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였고, 각각 kaempferol 3-*O*- α -L-arabinofuranoside (9) [De Almeida *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1994], kaempferol-3-*O*- β -D-xylopyranoside (12) [Agrawal, 1992], kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (15), 그리고 quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (20) [Young *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1991]로 구조 결정할 수 있었다.

Kaempferol 화합물은 $^1\text{H-NMR}$ 에서 특징적인 signal인 *meta*-coupling 하고 있는 proton signals [δ 6.21 (1H, $J = 2.0$ Hz, H-6)과 δ 6.44 (1H, $J = 2.0$ Hz, H-8) 부근의 doublet signals]과 A_2B_2 type의 B 환의 proton들의 존재를 나타내는 signals [δ 6.89 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5')과 δ 8.02 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6')]이 관찰되었다. 그리고 quercetin은 $^1\text{H-NMR}$ 에서 *meta*-coupling 하는 특징적인 proton signals [δ 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)과 δ 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8)]과

ortho-dihydroxy group을 가지는 B 환의 특징적인 proton signals [δ 6.84 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5')와 δ 7.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2') 그리고 δ 7.57 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-6')]이 관찰되었다 (강 등, 2000). 또한, flavonoid 골격에 결합된 당의 종류와 당의 결합양식은 당의 1번 수소의 특징적인 $^1\text{H-NMR}$ signal과 coupling constant (J 치, 결합상수) [δ_{H} 5.40 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)]로부터 β -D-glucopyranoside로 동정하였다 (Agrawal, 1992).

Compound **21**은 CD_3OD 로서 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Jung *et al.*, 1999; Beninger *et al.*, 1998). $^1\text{H-NMR}$ 에서 *meta*-coupling 하는 proton signals (δ_{H} 6.18과 δ_{H} 6.38) 그리고 A_2B_2 type의 B 환의 proton signals [δ_{H} 6.87 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5')과 δ_{H} 8.09 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6')]이 관찰되어 kaempferol 골격을 하는 화합물임을 추정할 수 있었다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 kaempferol의 B 환에 기인하는 signals [δ_{C} 133.18 (C-2', 6'), δ_{C} 117.04 (C-3', 5')]과, 당의 1번 탄소에 기인하는 signals [δ_{C} 106.44와 δ_{C} 102.01]이 관찰되어, kaempferol에 2분자의 당이 결합한 구조임을 추정할 수 있었다. 또한, 당의 위치와 결합순서를 확인하기 위하여 2D-NMR인 HMQC와 HMBC spectrum을 측정하였으며, β -D-glucose의 H 1" [δ_{H} 5.35 ($J = 7.6$ Hz)] 및 C-1" (δ_{C} 102.0) 그리고 β -D-xylose의 H-1'" [δ_{H} 4.72 ($J = 7.6$ Hz)]와 C-1'" (δ_{C} 106.4)의 one bond correlation과 long range correlation을 결정하였다. β -D-glucose의 H-1"은 kaempferol C-3 (δ_{C} 135.80)과 상관관계를 가지며, β -D-xylose의 H-1'" [δ_{H} 4.72 ($J = 7.6$ Hz)]는 D-glucose의 C-2" (δ_{C} 81.29)에 long range correlation하는 것으로 보아 kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (**21**)로 구조를 동정하였다.

② 1종의 flavanone 화합물의 구조결정 (**13**)

Compound **13**은 CD_3OD 로 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Choi *et al.*, 1991b). Flavanone 화합물의 특징적인 signals [δ_{H} 2.74 (H-3a), δ_{H} 3.16 (H-3b), δ_{H} 5.36 (H-2)]을 관찰할 수 있었고, δ_{H} 6.18 (H-6)과 δ_{H} 6.20 (H-8)의 signals은 5, 7 위치에 hydroxy group가 치환되어 있으며, 7번에 당이 결합된 flavanone 화합물임을 추정할 수 있었다 (강 등, 2000 ; Choi *et al.*, 1991b ; Agrawal, 1989). 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ_{C} 81.51과 δ_{C} 44.96에서 flavanone 화합물의 특징적인 C2-C3의 결합을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside, 즉 prunin으로 동정하였다.

③ 6종의 isoflavone 화합물의 구조결정 (**1**, **2**, **7**, **11**, **14**, **16**)

화합물 **1**, **2**, **7**, **11**, **14**은 $\text{DMSO}-d_6$ 로 compound **16**은 CD_3OD 로 각각 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였고, prunetin (**1**) [Farkas *et al.*, 1969], genistein (**2**) [Wang *et al.*, 1999b], prunetin-4'-O- β -D-glucopyranoside (**7**) [Geibel, 1995 ; Geibel and Feucht, 1991; Geibel *et al.*, 1990], prunetin-5-O- β -D-glucopyranoside (**11**) [Khalid *et al.*, 1989], genistin (**14**) [Wang *et al.*, 1999b], orobol-7-O- β -D-glucopyranoside (**16**) [Agrawal, 1989 ;

Arora *et al.*, 2000]로 구조 결정할 수 있었다. Isoflavonoid를 DMSO- d_6 로 NMR 측정하였을 경우 5번 위치에 free hydroxy group을 가진 isoflavonoid 화합물은 특징적으로 δ_H 9, 13에서 signal을 보인다 (우, 1996 ; 강, 2000 ; Agrawal, 1989). Compound 7과 11은 prunetin 배당체이며 당의 결합 위치가 각각 4' 그리고 5번으로 차이점을 보였다. 이에 화합물 11을 acid hydrolysis하여 당 제거 위치에서 나타나는 free hydroxy group의 1H -NMR과 ^{13}C -NMR signals을 문헌치와 비교함으로써 당의 위치를 확정하였다. Compound 11의 가수분해물의 1H -NMR과 ^{13}C -NMR signals은 prunetin (1)과 동일하게 나타났으며, 원시료의 NMR data와 비교해볼 때 δ_H 12.96 (1H, brs, 5-OH)의 signal이 새로이 나타났고, C-4의 δ_C 175.02가 δ_C 180.40로 저자장 이동한 것으로 보아 당의 결합 위치는 C-5의 hydroxy group으로 확인할 수 있었고 (Mabry *et al.*, 1970), 그 결과 이 화합물의 구조는 prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside로 결정하였다.

Compound 16의 1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum에서 flavonoid의 B 환에 *ortho* dihydroxy group을 가지는 proton signals [δ_H 7.03 (1H, d, $J = 2.0$, H-2'), δ_H 6.86 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$, H-6'), δ_H 6.81 (1H, d, $J = 8.2$, H-5')]과 isoflavonoid의 특징적인 H-2의 signal (δ_H 8.21, s)이 관찰되었다. 또한 δ_H 4.95 (d, $J = 7.4$, H-1'')에서 당의 존재가 확인되었다. 당의 결합 위치를 확정하기 위해 HMBC spectrum를 측정하였으며, δ_H 4.95가 orobol 골격의 C-7 (δ_C 165.57)과 correlation하는 것으로 보아 orobol-7-O- β -D-glucopyranoside임을 최종 확인할 수 있었다.

(나) Triterpenoid 화합물의 구조 결정 (3, 4, 6, 10, 17, 18)

Compounds 3, 4, 6, 10, 18의 1H -NMR와 ^{13}C -NMR spectrum (pyridine- d_5)은 문헌치와 일치함으로써 그 화합물들의 구조를 각각 ursolic acid (3) [Takeoka *et al.*, 2000 ; Jung *et al.*, 1999], 2 α -hydroxyursolic acid (4) [Jung *et al.*, 1999], 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6) [Chusheng *et al.*, 1988], 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10) [Sakakibara *et al.*, 1983 ; Li *et al.*, 1998 ; Guang-Yi *et al.*, 1989], 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside (18) [El Lahlou *et al.*, 1999]로 동정하였다. Compound 17은 흰색 무정형 분말로서 분리되었으며, IR spectrum에서는 3422 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} 에서 각각 hydroxy group과 glycosidic linkage에 기인하는 peak가 나타났다. 이 관능기, 즉 hydroxy group의 위치를 확인하기 위해 EIMS spectrum를 측정하였으며, ursane계 혹은 oleanane계 triterpenoid 화합물에서 특징적으로 나타나는 *retro* Diels-Alder 분해 반응에 기인된 ion peak가 나타났다 (강 등, 2000). 즉, 이 화합물의 EIMS spectrum에서 m/z (% intensity) 488 ([M-glucose+1], 0.38), 248 (100), 203 (84.85), 240 (2.83), 239 (12.66)의 ion peaks가 나타나는 것으로서 hydroxy group이 D/E 환이 아닌 A/B 환에 존재한다는 것을 알 수 있었다 [El Lahlou *et al.*, 1999]. 1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_H 2.49 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-18)와 δ_C 126.01 (C-12), δ_C 138.38 (C-13)의 signals이 나타나는 것으로 보아, 이 화합물은 ursane계 triterpenoid임을 알 수 있었고 (Doddrell *et al.*, 1974), triterpenoid aglycone에 상응하는 1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum은 화합물 6과 일치하였다.

(Chusheng *et al.*, 1988). 또한 δ_H 6.24 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1')와 δ_C 62-96 (95.67, 74.00, 78.85, 71.16, 79.16, 62.27)로부터 당에 존재를 확인할 수 있었다. 또한 HMBC spectrum에서 δ_H 6.24의 당의 signal이 triterpenoid의 carboxyl group에 해당되는 δ_C 176.20와 correlation 하는 것으로 보아 그 구조는 2a, 3a, 24 trihydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside(**17**)임을 동정할 수 있었고, LR-FABMS (positive ion)에서 m/z 673에서 $[M + Na]^+$ ion peak가 관찰되어, 분자식이 $C_{36}H_{58}O_{10}$ 임을 재확인하였다. Triterpenoid 화합물의 생리활성을 살펴보면, 세포독성 (Numata *et al.*, 1989; Yamagishi *et al.*, 1988)을 가지고 있어서 HeLa cell, MK한 항증식작용 (Castro *et al.*, 1997)을 나타내며, VSV (vesicular stomatitis virus), HRV 1B (rhinovirus type 1B), HIV에 대한 항바이러스 활성 (Poehland *et al.*, 1987; Aquino *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1996; Kashiwada *et al.*, 1998)이 보고되고 있다. 또한 *Panax ginseng*에서 분리된 ginsenoside 화합물은 종양의 전이를 억제하는 효과가 있다고 한다 (Mochizuki *et al.*, 1995). 뿐만 아니라 triterpenoid 배당체에서 저혈당효과 (Yoshikawa *et al.*, 1996b)와 함께 알코올 흡수 저해효과 (Yoshikawa *et al.*, 1996c), 염증에 대한 억제효과 (Yasukawa *et al.*, 1996), 마우스의 대식세포에서의 NO 생성을 억제하는 활성 (Honda *et al.*, 2000)을 가진다고 한다. 최근 새로이 triterpenoid의 항산화활성에 관한 연구가 진행되고 있다 (Zhu *et al.*, 1999 ; Song and Yen, 2002 ; Hamburger *et al.*, 2002).

(다) Sphingolipid 화합물의 구조 결정 (8)

이 화합물은 무정형 흰색 분말로 분리되었으며, LR-FABMS에서 $[M+Na]^+$ ion peak가 m/z 866.6에서 나타났고, HR-FABMS에서는 m/z 866.6697으로 측정되어, 계산치 (Calc. for 867.2611)와 DEPT spectrum과 비교하여 분자식을 $C_{48}H_{93}NO_{10}$ 으로 결정하였다. 1H -NMR과 ^{13}C -NMR data에서 2개의 terminal methyl groups [δ_H 0.87 (t-like, $J = 7.0$ Hz)]과 2개의 aliphatic long chain [δ_H 1.24 (CH_2)_n]의 signals을 확인하였고, 질소와 결합된 탄소(δ_C 51.67)와 amide carbonyl group (δ_C 175.6)의 signals의 관찰로 당의 존재를 추정할 수 있었다. 특히 δ_H 5.26 (H-2), δ_C 70.38 (C-1), 51.67 (C-2), 75.82 (C-3), 72.35 (C-4), 175.56 (C-1'), 72.40 (C-2')에 해당하는 sphingoid 골격의 화학적 이동치는 실제로 (2S,3S,4R)-phytosphingosine의 문헌치 (Kang *et al.*, 1999 ; Sang *et al.*, 2002)와 일치하여 1-O- β -D-glucopyranosyl (2S,3S,4R,8E)-2-[(2' R)-2'-hydroxypalmitoylamino]-8-octadecene-1,3,4-triol로 추정할 수 있었다. 그리고 HMBC spectrum에서 δ_H 4.2 (m, H-1a)은 δ_C 72.40 (C-2')과 당의 signal인 δ_H 4.8 (d, H-1'')은 δ_C 70.38 (C-1)과, δ_H 4.6 (m, H-1)은 δ_C 51.67 (C-2)과, δ_H 8.6 (NH)은 δ_C 175.56 (C-1')과 correlation하고 있는 것으로 보아 이들 구조가 인접해 있음을 추정할 수 있었다. 또한 이중결합을 이루는 탄소 C-8과 C-9은 이웃하는 탄소의 화학적 이동치가 δ_C 32-33 일때는 *trans*로, δ_C 27-28 일때는 *cis*로 확인할 수 있는데 (Stothers, 1972), 이 화합물의 경우 δ_C 27.5 (C-7')와 δ_C 27.9 (C-10')에서 관측됨으로서 *cis* 즉, *Z*-configuration함을 추정할 수 있었다.

Table 16. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data (pyridine- d_5) of isolated triterpenoids 17 and 18 from *P. serrulata* var. *spontanea*

	17		18	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	0.81, d, $J=3.1$ 1.95, d, $J=3.4$	43.25 (CH ₂)	0.84, d, $J=12.5$ 1.92, d, $J=2.0, 12.5$	43.15 (CH ₂)
2	4.45, dt, $J=4.0, 11.6$	66.20 (CH)	4.44, dd, $J=2.0, 10.0$	66.30 (CH)
3	4.57, brd, $W_{1/2} = 6$	74.19 (CH)	4.58, d, $J=2.0$	74.23 (CH)
4		45.12 (C)		45.15 (C)
5	1.81, m	49.44 (CH)	1.84, d, $J=12.5$	49.53 (CH)
6	1.64, m	18.87 (CH ₂)	1.65, m	19.11 (CH ₂)
7	1.39, m	33.95 (CH ₂)	1.65, m	33.96 (CH ₂)
8		40.36 (C)		40.80 (C)
9	1.86, m	48.13 (CH)	2.08, d, $J=7.6$	47.87 (CH)
10		38.50 (C)		38.60 (C)
11	2.01, m	23.91 (CH ₂)	2.10, m	24.35 (CH ₂)
12	5.41, s	126.01 (CH)	5.51, s	128.37 (CH)
13		138.38 (C)		139.24 (C)
14		42.46 (C)		42.12 (C)
15	1.13, m	28.57 (CH ₂)	1.20, m, 2.40, m	29.20 (CH ₂)
16	1.93, m	24.61 (CH ₂)	1.94, m	26.10 (CH ₂)
17		48.32 (C)		48.64 (C)
18	2.49, d, $J=11.3$	53.26 (CH)	2.89, s	54.40 (CH)
19	0.87, d, $J=5.2$	39.27 (CH)		72.66 (C)
20	0.87, d, $J=5.2$	39.09 (CH)	1.30, m	42.12 (CH)
21	1.33, m	30.76 (CH ₂)	1.20, m	26.70 (CH ₂)
22	1.88, m	36.75 (CH ₂)	1.84, m, 2.00, m	37.73 (CH ₂)
23	1.65, s	23.77 (CH ₃)	1.64, s	23.78 (CH ₃)
24	3.80, dd, $J=10.9, 16.0$ 4.10, dd, $J=5.2, 16.0$	65.16 (CH ₂)	3.81, d, $J=10.8$ 4.11, d, $J=11.1$	65.19 (CH ₂)
25	1.03, s	17.27 (CH ₃)	1.05, s	17.20 (CH ₃)
26	1.14, s	17.57 (CH ₃)	1.18, s	17.40 (CH ₃)
27	1.11, s	23.67 (CH ₃)	1.59, s	24.50 (CH ₃)
28		176.20 (C)		177.08 (C)
29	0.86, d, $J=5.2$	21.20 (CH ₃)	1.04, d, $J=6.3$	16.70 (CH ₃)
30	0.89, d, $J=6.5$	17.31 (CH ₃)	1.36, s	26.98 (CH ₃)
Glu 1'	6.24, d, $J=8.0$	95.67 (CH)	6.26, d, $J=8.1$	95.83 (CH)
2'	4.18, m	74.00 (CH)	4.20, m	74.01 (CH)
3'	4.27, m	78.85 (CH)	4.28, m	78.90 (CH)
4'	4.35, m	71.16 (CH)	4.32, m	71.24 (CH)
5'	4.00, m	79.16 (CH)	4.02, m	79.24 (CH)
6'	4.37, dd, $J=4.6, 12.0$ 4.44, dd, $J=4.0, 11.6$	62.27 (CH ₂)	4.45, dd, $J=2.0, 12.0$ 4.36, dd, $J=4.5, 12.0$	62.35 (CH ₂)

그리고 ^1H - ^1H COSY spectrum에서 amide group에 기인되는 δ_{H} 8.6이 δ_{H} 5.4 (H-2)와 cross peak를 이루고 있으며, 특히 H-1의 δ_{H} 4.7과도 correlation을 형성하고 있는 것으로 나타났다. 이들 실험 data와 sphingoid moiety의 signal이 문헌치 (Sang *et al.*, 2002)와 일치하는 것으로 보아 이 sphingolipid의 구조는 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-[(2'*R*)-2'-hydroxypalmitoyl-aminol]-8-octadecene-1,3,4-triol의 sphingoid 골격과 2개의 long chain fatty acid로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다. Kang 등 (Kang *et al.*, 1999)에 의해 제시된 aralia cerebroside와 fatty acid moiety에서 유사한 구조를 띄나 이 화합물은 *Z*-configuration을 하고 있으며 -(CH₂)_n- unit가 8개가 더 결합되어있는 것으로 사료된다.

(라) Phenol성 화합물의 구조 결정 (19)

이 화합물은 무정형 흰색 분말로 분리되었다. LR-과 HR-FABMS spectrum에서 *m/z* 453.1162의 [M + Na]⁺ peak가 관찰되었고, ¹³C-NMR과 DEPT data에 의해 분자식을 C₂₂H₂₂O₉으로 결정하였다. UV spectrum에서 NaOMe 첨가시 264 nm (3.96)의 흡수대가 255 nm (4.12)로 저자장 이동한 것으로 보아 산의 존재를 확인할 수 있었다. ¹H과 ¹³C-NMR spectra (Table 17)는 하나의 hydroxy cinnamic acid, glycosidic group과 benzoyl group에 기인된 signals을 확인할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ_{H} 5.95 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, H-8), 6.91 (1H, dd, *J* = 7.5 Hz, H-5), 7.03 (1H, dd, *J* = 7.5 Hz, H-4), 7.11 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-3), 7.24 (1H, d, *J* = 12.6, H-7), 7.47 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-6)에서 *o*-hydroxy cinnamic acid 유도체의 특징적인 화학적 이동치가 나타났으며, ¹³C-NMR spectrum에서도 이에 상응하는 δ_{C} 171.48, 157.20, 139.33, 132.30, 131.80, 127.77, 123.70, 122.58, 117.59의 signals이 나타났다. 또한 C7-C8 double bond는 *J* 치 (*J* = 12.6 Hz)가 작기 때문에 *cis*-configuration함으로 추정할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ_{H} 4.93 (1H, d, *J* = 7.5 Hz)에서 당의 존재와, δ_{H} 7.45 (2H, dd, *J* = 7.6 Hz, H-3'', H-5''), 7.61 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-4''), 8.01 (2H, d, *J* = 7.9 Hz, H-2'', H-6'')에서 benzoyl group의 존재를 확인할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서 당의 methylene 탄소 (C-6')가 δ_{C} 66.09로 저자장 이동하고, 이웃하는 탄소 (C-5')가 δ_{C} 72.72로 고자장 이동한 것으로 보아 benzoyl group이 당의 6번 탄소에 결합되어 있음을 알 수 있었다. HMQC와 HMBC spectrum에서 benzoyl carbonyl group (δ_{C} 168.55)과 H 6' (δ_{H} 4.43, δ_{H} 4.69) 그리고 C-2 (δ_{C} 157.20)와 H-1' (δ_{H} 4.93) 사이에 나타나는 correlation으로 benzoyl group이 β -glucopyranose의 C-6' 과 결합하고 있음을 추정할 수 있었다. 이상의 분광학적 방법을 통해 이 화합물은 2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl-*o*-(*Z*)-coumaric acid로 동정하였으며, 천연에서 처음으로 분리된 신규화합물이다.

Table 17. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data (CD_3OD) of phenolic compound 19 from *P. serrulata* var. *spontanea*

Position	^1H	^{13}C
1		127.77 (C)
2		157.20 (C)
3	7.11 (1H, d, $J=7.7$ Hz)	117.59 (CH)
4	7.03 (1H, dd, $J=7.5$ Hz)	131.80 (CH)
5	6.91 (1H, dd, $J=7.5$ Hz)	123.70 (CH)
6	7.47 (1H, d, $J=7.8$ Hz)	132.30 (CH)
7	7.24 (1H, d, $J=12.6$ Hz)	139.33 (CH)
8	5.95 (1H, d, $J=12.6$ Hz)	122.58 (CH)
9		171.48 (C)
1'	4.93 (1H, d, $J=7.5$ Hz)	103.50 (CH)
2'	3.50 (1H, m)	78.79 (CH)
3'	3.78 (1H, dd, $J=8.0, 8.5$ Hz)	76.31 (CH)
4'	3.54 (1H, m)	75.65 (CH)
5'	3.46 (1H, m)	72.72 (CH)
6'	4.43 (1H, dd, $J=7.5, 11.8$ Hz)	66.09 (CH_2)
	4.69 (1H, dd, $J=2.0, 11.8$ Hz)	
1''		132.06 (C)
2'', 6''	8.01 (1H, d, $J=7.9$ Hz)	131.42 ($\text{CH}\times 2$)
3'', 5''	7.45 (1H, d, $J=7.6, 7.9$ Hz)	130.38 ($\text{CH}\times 2$)
4''	7.61 (1H, d, $J=7.5$ Hz)	135.13 (CH)
7''		168.55 (C)

(4) 뱀나무에서 분리된 화합물들의 항산화 활성

DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO⁻ 소거활성이 높게 나타난 뱀나무 EtOAc 획분을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, Sep-Pak C18 cartridge, 그리고 RP-18 column chromatography를 수행하여 항산화 활성 성분을 분리하였다. 13 종의 flavonol 화합물 (1, 2, 5, 7, 9, 11-16, 20, 21)과 6 종의 triterpenoid 화합물 (3, 4, 6, 10, 17, 18), 1 종의 sphingolipid (8)와 phenol 성 화합물 (19)을 각각 분리, 정제하였으며, 그 중에서 6 종의 flavonol 화합물인 quercetin (5), kaempferol 3-*O*- α -L-arabinofuranoside (9), kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranoside (12), kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (15), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (20) kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (21)과 5종의 isoflavone 화합물인 prunetin (1), genistein (2), prunetin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (7), prunetin 5-*O*- β -D-glucopyranoside (11),

genistin (14), 6종의 triterpenoid 화합물인 ursolic acid (3), 2 α -hydroxyursolic acid (4), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6), 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside (17), and 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside (18), 그리고 하나의 phenol성 화합물인 2-O- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl-o-(Z)-coumaric acid (19)를 대상으로 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO⁻ 소거활성을 평가하였다.

(가) Flavonoid 화합물과 phenol성 화합물의 항산화 활성

6종의 flavonol 화합물과 5종의 isoflavone 화합물, 그리고 하나의 phenol성화합물의 항산화활성 실험결과를 Table 18에 나타내었다. Quercetin (5)과 그 배당체인 quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (20)은 DPPH radical 소거활성이 각각 IC₅₀ 3.54 μ M와 4.63 μ M로 대조군인 L-ascorbic acid의 11.50 μ M에 비해 2배 정도 활성이 강하게 나타났다. 또한 ONOO⁻에 대한 소거 활성 역시 IC₅₀ 0.93 \pm 0.14 μ M와 1.08 \pm 0.06 μ M로 대조군인 penicillamine의 3.20 \pm 0.36 μ M에 비해 약 3배의 활성을 보였다. Quercetin은 구조내 catechol을 가지고 있기 때문에 (Okawa *et al.*, 2001; Rice Evans *et al.*, 1996 ; Haenen *et al.*, 1997), peroxy radical에 대해서도 H-donor로 작용하여 항산화활성을 나타내는데 (Torel *et al.*, 1986), 본 실험에서도 free radical 소거 활성 (Burda and Oleszek, 2001)에 의해 항산화활성을 나타낸 것으로 여겨진다. 그러나 활성산소종 억제실험계에서는 40 μ g/mL 농도에서 이 두 화합물은 양성대조군인 Trolox의 활성에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었다. 그리고 4종류의 kaempferol 배당체들은 3가지 실험계에서 다소 낮은 활성을 나타내었는데 이는 활성에 중요한 영향을 미치는 3번 위치의 hydroxy group에 모두 당에 치환된 배당체이기 때문으로 여겨진다 (Heijnen *et al.*, 2001 ; Bor *et al.*, 1997 ; Cao *et al.*, 1997 ; Foti *et al.*, 1996). Isoflavone 화합물인 genistein (2)과 그 배당체인 genistin (14)는 DPPH radical과 ONOO⁻에 대한 소거 활성을 다소 나타내었고, genistin (14)의 경우 당의 결합으로 genistein (2)의 활성보다 약간 낮게 나타났다. 특히 isoflavonoid의 DPPH radical 소거활성은 3번 위치 hydroxy group가 없기 때문에 다른 종류의 flavonoid 화합물보다 약하게 나타난다 (Okawa *et al.*, 2001). 그러나, 또다른 isoflavone 화합물인 prunetin (1), prunetin 4'-O- β -D-glucopyranoside (7), prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside (11)은 사용한 항산화 실험계에서 활성을 나타내지 않았다. Isoflavonoid의 항산화활성은 실제로 liposomal system에서 대사를 받아 coumestrol이나 equol 되면 H-donor로 작용하여 금속이온에 의한 peroxy radical 혹은 free radical을 소거하며, 특히 4' 위치의 hydroxy group이 중요하게 작용한다고 한다 (Arora *et al.*, 1998 ; Mitchell *et al.*, 1998). 이외에도 isoflavonoid는 ROS에 의한 지질과산화를 억제한다고 한다 (Toda and Shirataki, 1999). Phenol성 화합물인 2-O- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl-o-(Z)-coumaric acid (19)은 ONOO⁻ 실험계에서 IC₅₀ 6.78 \pm 0.35 μ M로 좋은 활성을 보였는데, 이는 화합물 구조내 hydroxycinnamic acid을 가지고 있기 때문인 것으로 여겨지며, 특히 이러한 구조들은 ONOO⁻에 대한 소거 활성이 보고된 바 있다 (Foley

et al., 1999; Natella *et al.*, Cuvelier *et al.*, 1992 ; Pannala *et al.*, 1998 ; Ketsawatsakul *et al.*, 2000).

Table 18. Antioxidant activities of flavonoids and a phenolic compound isolated from *P. serrulata* var. *spontanea*

Compounds	DPPH ^a IC ₅₀ (μM)	Total ROS ^b Inhibition ratio (%)	ONOO ^{-c} IC ₅₀ (μM)
1	876.40	NS	NS
2	3.95 ± 10 ³	NS	24.42 ± 1.24
5	3.54	40.80 ± 0.44	0.93 ± 0.14
7	858.30	NS	NS
9	100.39	36.80 ± 0.54	10.51 ± 0.77
11	>> 10 ³	NS	NS
12	100.39	38.90 ± 0.96	16.78 ± 3.99
14	2.82 ± 10 ³	NS	44.50 ± 6.06
15	107.59	39.60 ± 0.45	6.98 ± 0.37
19	167.90		6.78 ± 0.35
20	4.63	72.50 ± 0.21	1.08 ± 0.06
21	> 200	53.10 ± 0.56	10.34 ± 1.21
L-Ascorbic acid	11.50		
Trolox (40 μg/mL)		73.56 ± 0.31	
Penicillamine			3.20 ± 0.36

^a DPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀: μM). ^bROS is the inhibitory activity of total free radical generation in hepatocyte (Inhibition ratio : %). ^cONOO⁻ is the inhibitory activity of peroxyntirite (IC₅₀: μM). NS represent as no effect up to a concentration of 100 μM in total ROS and ONOO⁻ test.

(나) Triterpenoid 화합물의 항산화 활성

벗나무에서 분리한 6종의 triterpenoid 화합물에 대한 항산화활성 실험결과를 Table 19에 요약하였다. 실험에 사용된 triterpenoid 화합물은 고농도에서도 DPPH radical scavenger로서 활성을 나타내지 않았으나, 활성산소종 억제 실험계에서는 높은 활성을 나타내었고, 그 상대적 활성 정도는 2α-hydroxyursolic acid (**4**) > 2α, 3α, 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**6**) > ursolic acid (**3**) > Trolox (as positive control) > 2α, 3α, 24-trihydroxy-urs-12-en-28-O-β-D-glucopyranoside (**17**) > 1β, 2α, 3α, 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**10**) > 2α, 3α, 19α, 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-O-β-D-glucopyranoside (**18**)로 나타났다. 또한 compounds **6**과 **18**은 각각 IC₅₀ (50 % inhibition concentration) 4.90 ± 0.38 μM와 IC₅₀ 6.88 ± 0.46 μM로 강한 ONOO⁻ 소거활성을 나타내었으며, 이는 양성 대조군인 penicillamine의 IC₅₀ 5.11 ± 0.23 μM에 상응하는 활성이었다. 그리고 compounds **10**

과 17은 각각 IC_{50} $25.18 \pm 2.68 \mu M$ 과 $82.05 \pm 2.80 \mu M$ 로 ONOO⁻ 소거활성을 나타내었으나, 반면 compounds 3과 4는 ONOO⁻ 소거활성을 나타내지 않았다.

Triterpenoid 화합물은 주로 항바이러스, 세포독성에 대한 연구가 주로 이루어져 왔으나 (Poehland *et al.*, 1987 ; Aquino *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1996 ; Kashiwada *et al.*, 1998), 근자에 이르러 버섯에서 분리한 4환성 triterpenoid 화합물과 달맞이꽃 등에서 분리한 몇 종류의 triterpenoid 화합물의 항산화활성이 보고되고 있다 (Zhu *et al.*, 1999; Song and Yen, 2002 ; Hamburger *et al.*, 2002). 또한 dihydro- γ -pyronyl-triterpenoid, 즉 chromosaponin I은 수용성 radical initiator 인 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride가 유도하는 soybean phosphatidylcholine의 산화를 억제한다고 한다. 이러한 지질과산화에 대한 triterpenoid 화합물의 높은 억제활성은 이들 화합물의 지용성에 의한 것으로 보고되고 있다 (Song and Yen, 2002).

Table 19. Antioxidant activities of triterpenoids isolated from *P. serrulatvar. spontanea*

Compounds	DPPH ^a IC ₅₀ (μM)	ROS ^b IC ₅₀ (μM)	ONOO ^{-c} IC ₅₀ (μM)
3	NS	3.74 ± 0.50	>> 200
4	NS	0.16 ± 0.02	118.90 ± 20.82
6	NS	3.40 ± 0.66	4.90 ± 0.38
10	NS	8.50 ± 1.00	25.18 ± 2.68
17	NS	8.31 ± 0.19	82.05 ± 2.80
18	NS	8.93 ± 2.62	6.88 ± 0.46
L-Ascorbic acid	11.50		
Trolox		6.09 ± 1.29	
Penicillamine			5.11 ± 0.23

^a DPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀: μM). ^bROS is the inhibitory activity of total free radical generation in hepatocyte (IC₅₀: μM). ^cONOO⁻ is the inhibitory activity of peroxynitrite (IC₅₀: μM). NS represent as no effect up to a concentration of 100 μM .

사. 단삼 *n*-BuOH 획분에서 분리된 화합물의 구조결정 및 활성

(1) 화합물의 구조결정

(가) 화합물 22의 구조결정

단삼의 MeOH 추출물의 *n*-BuOH soluble fraction을 column chromatography 하여 기저 물질인 compound 22를 분리하였다. Compound 22는 무정형 분말로서 선광도가 $[\alpha]_D^{20}$: -9.3° (c 0.009, MeOH)이며, 그 분자량은 HR-FABMS에서 m/z : 559.1448 (Calcd for C₂₆H₃₂O₁₂Na, m/z 559.1452, Δ -0.4 mmu), positive-FABMS

m/z : 559 $[M+Na]^+$, 536 $[M]^+$ 로 관찰되어 분자량 536의 $C_{26}H_{32}O_{12}$ 의 분자식을 갖는 것으로 나타났다. 그 구조를 밝히기 위해 1H -과 ^{13}C -NMR spectra 와 DEPT, HMQC 그리고 HMBC experiments을 하였으며, HMBC spectrum 에서 δ 4.33 의 glucose anomeric proton signal과 δ 100.0 (C-1) 의 signal이 상관관계를 가짐으로써 hydroxypinoresinol의 C-1의 위치에 glucose 한 분자가 결합되어 있음을 알 수 있었고, 문헌의 데이터와 잘 일치하였다 (Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998). 그러므로, compound 22의 구조는 (+)-1-hydroxypinoresinol-1- O - β -D-glucoside로 확인되었다. Compound 22는 라틴 아메리카의 약용식물인 *Bauhinia tarapotensis* Benth. (Leguminosae), (Braca *et al.*, 2001), 중국 전통 약용 식물인 *Stauntonia hexaphylla* Dence (Lardizabalaceae), (Wang *et al.*, 1993), *Olea* plants (Oleaceae)의 수피 (Tsukamoto *et al.*, 1985) 그리고 sage인 *Salvia officinalis* (Lamiaceae) (Wang *et al.*, 1998)에서 보고된 바 있으나, 단삼에서는 처음으로 분리되었다.

(나) 화합물 23의 구조결정

이 화합물의 IR spectrum을 보면 3348.6 cm^{-1} 에서 hydroxyl group, 1723.4에서 acid ester, 1610.2와 1509.1에서는 방향족 환에 의한 흡수 peak를 볼 수 있었다. 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6)에서 δ 7.60 과 6.36에서 coupling 상수가 15.9 Hz의 *trans*-olefin proton signal, δ 7.30과 6.82의 coupling 상수가 8.4 Hz의 1,2,3,4-tetrasubstituted benzene ring에 기인하는 proton signal, δ 5.84와 4.53에서 coupling 상수가 4.8과 4.5 Hz로 각각 나타난 것은 vicinally arranged two methine proton signal임을 알 수 있다. 또한, δ 6.72와 6.50에서 나타난 double doublet signal과 δ 6.68과 6.63의 각각의 doublet, δ 6.72와 6.64에서 나타난 doublet signal은 2개의 1,2,3-trisubstituted benzene ring을 나타낸다. δ 5.14의 double doublet은 인접한 methylene (δ 2.89~2.97) 수소와 coupling 하여 나타난 것이며, 2개의 carbomethoxyl signal이 δ 3.65와 3.64에서 나타났다. 이상은 ^{13}C -NMR spectrum을 통해서도 확인되었다. Positive-ion FABMS에서 분자이온 peak가 m/z 567 $[M+H]^+$ 에서 나타났으므로 분자량 566인 화합물임을 확인하였다. 또한 Kohda 등 (1989)이 보고한 spectral data와 비교하여 잘 일치하였으므로 compound 23을 dimethyl lithospermate로 동정하였다.

(2) 단삼에서 분리된 화합물 22의 활성

활성 산소종을 포함하여 free 또는 non-free radicals은 염증, 관상동맥 심장질환, 암, Alchemies's disease, 류머티스 관절염, 그리고 동맥경화와 같은 여러 질병을 유발한다 (Beckman *et al.*, 1996 ; Podrez *et al.*, 1999). 이러한 질병들은 radical 소거제들에 의해서 증상이 개선된다고 보고되었다 (Hermann *et al.*, 1999).

Compound 22는 IC_{50} 3.23 \pm 0.04 μM 로 peroxynitrite의 활성을 저해하였으며, 이는 양성 대조군인 IC_{50} 치가 6.72 \pm 0.25 μM 인 penicillamine보다 두 배나 활성이 강하게 나타났다. 또한, Table 8에 나타내었듯이 total ROS와 DPPH radical 소거활성이 IC_{50} 치 2.26 \pm 0.07와 32.3 \pm 0.13 μM 이며, 각각의 양성대조구인 Trolox

(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)와 l-ascorbic acid는 IC₅₀치가 각각 1.43 ± 0.04와 11.4 ± 0.07 μM로 나타났다. 그러므로, (+)-1-hydroxypinoresinol-1-O-β-D-glucoside가 free radical 관련 질병의 예방과 치료에 사용 가능성을 제시하고 있다.

Table 20. Scavenging activities of (+)-1-hydroxypinoresinol-1-O-β-D-glucoside isolated from *S. miltiorrhiza* on peroxynitrite, total ROS and DPPH radicals

	IC ₅₀ (μM)		
	Peroxynitrite	Total ROS	DPPH
(+)-1-Hydroxypinoresinol-1-O-β-D-glucoside	3.23 ± 0.04	2.26 ± 0.07	32.3 ± 0.13
Penicillamine	6.72 ± 0.25		
Trolox		1.43 ± 0.04	
L-Ascorbic acid			11.4 ± 0.07

Results are mean ± S.D. (n=3)

Penicillamine, Trolox and l-ascorbic acid were used as positive controls for peroxynitrite, total ROS and DPPH radicals, respectively.

아. 합환피의 항산화 활성

(1) 합환피 MeOH 추출물과 각 획분들의 항산화 활성

합환피의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물에서 분획된 CH₂Cl₂-, EtOAc-, n-BuOH, 그리고 H₂O 가용성 획분들을 가지고 안정한 DPPH free radicals 소거능, hydroxyl radical 억제, DCFH-DA를 사용한 신장 파쇄액들에 총 활성 산소종 생성 억제능과 peroxynitrite 소거능을 측정하였다. Table 21 에서 요약한 바와 같이 DPPH에 대한 MeOH 추출물과 각각의 획분들의 소거활성은 EtOAc > n-BuOH > MeOH > CH₂Cl₂ > H₂O 순서이며 그들의 IC₅₀은 각각 19.09, 47.85, 86.56, 156.09 그리고 194.86 μg/mL이다. CH₂Cl₂-, EtOAc-, n-BuOH, 그리고 H₂O 가용성 획분들은 20 μg/mL의 농도일때 43.91 ± 2.03 %, 43.79 ± 1.16 %, 38.25 ± 4.93 % 그리고 50.32 ± 6.25 %로 양성 대조군인 trolox의 농도가 40 μg/mL 일때보다도 강한 활성 산소종 생성 억제능을 나타내었다. 반면, MeOH의 억제력은 40 μg/mL의 농도에서도 trolox보다 활성산소종 생성 억제능이 약했다. EtOAc획분은 다른 획분들보다도 ·OH를 억제시키는 것이 강했다. ONOO 시스템에서는 MeOH 추출물과 각 획분들은 penicillamin (IC₅₀ 2.55 ± 0.14)과 비교했을 때 IC₅₀이 15 μg/mL보다도 작아 보

통의 활성을 보였으나 특히, *n*-BuOH 가용성 획분은 IC₅₀이 2.33 ± 0.12 µg/mL로 penicillamin과 유사한 활성을 나타내었다. 이들 결과는 합환피의 MeOH 추출물 뿐만 아니라 MeOH에서 분획된 EtOAc 획분이 free radicals, ONOO⁻, hydroxyl radicals을 포함하는 활성산소종의 소거제들이며, free radicals, ONOO⁻, 활성산소종이 소거 되는 것이 그들의 항산화 활성능에 기여한다. 이것은 EtOAc 획분이 실험 모델계에서 강한 소거활성을 가지는 반면, CH₂Cl₂와 H₂O 획분은 약한 활성을 보여 주었다.

Table 21. Antioxidant activities of extracts derived from *Albizzia julibrissin* on DPPH, ·OH, ONOO⁻, and ROS

Samples	DPPH ^a	ONOO ^{-b}	·OH ^c	ROS ^d
MeOH	86.56	11.76 ± 0.76	-165.95 ± 20.64	31.95 ± 21.3
CH ₂ Cl ₂	156.09	17.42 ± 0.79	-428.17 ± 16.29	43.91 ± 50.0
EtOAc	19.09	11.62 ± 0.76	58.71 ± 5.49	43.79 ± 3.4
<i>n</i> -BuOH	47.85	2.33 ± 0.12	29.46 ± 3.36	38.25 ± 3.7
H ₂ O	194.86	16.83 ± 1.40	20.57 ± 8.88	40.38 ± 3.20
L-Ascorbic acid	1.63			
Trolox				45.36 ± 14.64
Penicillamine		2.55 ± 0.14		

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀ : µg/mL). ^bONOO⁻ is the inhibitory activity of peroxynitrite (IC₅₀ : µg/mL). ^c·OH is the inhibition percent of hydroxyl radical generation in 1.0 mM H₂O₂ and 0.2 mM FeSO₄ at the test concentration of 40 µg/mL. ^dROS is the inhibition percent of total free radical generation in kidney postmicrosomal fraction at the concentration of 40 µg/mL. (*ROS inhibitory concentration at 20 µg/mL).

(2) 합환피 EtOAc 획분에서 분리된 화합물들의 구조 결정

항산화 활성을 갖는 EtOAc 가용성 획분으로 부터 두 개의 알려진 flavonoids (24와 25)를 분리하였다. 이들 화합물들은 이미 발표된 분광학적인 data와 비교하여 sulfuretin (24) 과 3',4',7-trihydroxyflavone (25)으로 결정하였다 (Chamsuksai *et al.*, 1981 ; Farag *et al.*, 1997 ; Park *et al.*, 2000). 화합물 24의 분리는 *Albizzia* 종에서는 처음으로 발견되었다.

(3) 합환피에서 분리된 화합물 24와 25의 항산화 활성

화합물 24과 25의 항산화 활성을 Table 22에 나타내었다. 화합물 24과 25는 DPPH 라디칼에서 IC₅₀ 8.52 µM과 2.20 µM을 가지면서 강한 항산화 활성을 보였으며 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 12.78 µM과 비교했을 때 각각 2배와 6배나 좋은 IC₅₀ 나타내었다. 화합물 24와 25는 또한 활성 산소종에서 각각 IC₅₀ 0.73 ± 0.07 µM과 3.90 ± 0.15 µM를 가지는 강한 억제 활성을 보였다. 화합물 24은 특히 trolox보다도 5배나 강한 활성을 가졌다. ONOO⁻ 시스템에서, 화합물 24와 25는 각

각 IC₅₀ 4.21 ± 0.12 μM과 5.78 ± 0.21 μM을 가지면서 penicillamine과 비교해 보았을 때 좋은 억제 활성을 보였다. 화합물 24와 25는 ·OH에서는 각각 IC₅₀ 4.59 ± 0.21 μM과 8.58 ± 0.66 μM을 가지며 보통의 활성을 보였다. 비록 화합물 24은 DPPH 라디칼 소거력, 항 류마티스 그리고 세포독성 활성이 있으며, 화합물 25는 항 염증성에 관해서 이미 발표는 되어 있으나 24와 25의 항산화 활성에 관해서는 처음이다 (Lee *et al.*, 1993 ; Westenburg *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2000 ; Choi *et al.*, 2002). 구조와 활성의 상관관계에 있어 24와 25는 모든 실험된 모델 시스템에서 좋은 활성을 나타내므로 B-ring의 3',4'-ortho 관능기가 항산화 활성에 가장 중요하다는 것을 가리킨다.

Table 22. Antioxidant activities of compounds derived from *Albizzia julibrissin* on DPPH, ·OH, ONOO⁻, and total ROS

Compounds	IC ₅₀ (μM)			
	DPPH ^a	ONOO ^b	·OH ^c	Total ROS ^d
Sulfuretin (24)	8.52	4.21 ± 0.12	4.59 ± 0.21	0.73 ± 0.07
3',4',7-Trihydroxyflavone (25)	2.20	5.78 ± 0.21	8.58 ± 0.66	3.90 ± 0.15
L-Ascorbic acid	12.78			
Trolox			3.98 ± 0.07	3.66 ± 0.17
Penicillamine		4.46 ± 0.11		

^aDPPH is the free radical scavenging activity. ^bONOO⁻ is the inhibitory activity of peroxyntirite. ^c·OH is the inhibitory activity of hydroxyl radical. ^dROS is the inhibitory activity of total free radical.

자. 솔잎의 항산화 활성

(1) 솔잎 MeOH 추출물과 각 획분들의 항산화 활성

Table 23에서 요약한 바와 같이, DPPH 증가함에 있어 추출물들의 소거 활성은 EtOAc > *n*-BuOH > MeOH > H₂O > CH₂Cl₂ 분획물 순으로 증가하였으며, 상기 추출물들의 IC₅₀은 각각 13.2, 24.3, 32.5, 25.1 및 45.4 g/mL 이었는데, 이들 중에서 EtOAc 가용성 분획물이 free radical을 소거하는데 가장 뛰어난 효과를 가지고 있다는 것이 확인되었으며 40, 40, 및 10 g/mL의 농도에서 EtOAc-획분은 ·OH, 총 활성 산소종 및 ONOO⁻를 각각 82.13 ± 5.31, 59.15 ± 3.4, 및 95.6 ± 0.09 %로 현저하게 억제하였다. 이로서 솔잎의 MeOH 추출물 뿐만 아니라 MeOH 추출물의 EtOAc-획분도 free radical, ONOO⁻ 및 ·OH을 포함한 활성 산소종의 소거제임을 알 수 있었으며, free radical과 ONOO⁻ 및 활성 산소종을 소거하는 능력은 이들의 항산화 활성에 의해서 나타났다. EtOAc 획분은 높은 소거 활성을 가지고 있는 반면, CH₂Cl₂과 H₂O 획분은 둘 다 실험 모델 시스템에서 약한 활성을 보여주었다.

Table 23. Antioxidant activities of extracts derived from *P. densiflora* on DPPH, ·OH, ONOO⁻, and ROS

Extracts	DPPH ^a	ONOO ^b	·OH ^c	ROS ^d
MeOH	32.5	80.38 ± 1.44	-29.79 ± 5.18	-392.80 ± 21.3
CH ₂ Cl ₂	45.4	21.36 ± 1.04	-357.45 ± 10.4	-907.36 ± 50.0
EtOAc	13.2	95.60 ± 0.09	82.13 ± 5.31	59.15 ± 3.4
<i>n</i> -BuOH	24.3	82.28 ± 1.89	61.70 ± 4.42	50.55 ± 3.7
H ₂ O	25.1	69.02 ± 1.29	27.66 ± 0.43	40.38 ± 3.20
L-ascorbic acid	9.1			14.7 ± 1.5
Penicillamine		93.14 ± 0.52		

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀ : µg/mL). ^bONOO⁻ is the inhibition percent of peroxyxynitrite at the test concentration of 10 µg/mL. ^c·OH is the inhibition percent of hydroxy radical generation in 1.0 mM H₂O₂ and 0.2 mM FeSO₄ at the test concentration of 40 µg/mL. ^dROS is the inhibition percent of total free radical generation in kidney postmicrosomal fraction at the concentration of 40 µg/mL.

(2) 솔잎 EtOAc 획분에서 분리된 화합물들의 항산화 활성

항산화 활성을 갖는 EtOAc 가용성 획분으로 부터 하나의 새로운 flavonoid (29)와 함께 이미 알려진 flavonoids (26, 28, 30, 31)와 하나의 알려진 lignan (27)을 분리하였다. 이들 화합물들은 각각 (+)-isolarisiresinol 9-*O*-β-D-xylopyranoside (27), kaempferol-3-*O*-β-D-galactopyranoside-6''-acetate (26), kaempferol 3-*O*-β-D-galactopyranoside (28), 5,7,8,4'-Tetrahydroxy-3-methylflavone-8-*O*-β-D-glucopyranoside (29), kaempferol 3-*O*-β-D-glucoside (30), 6-methylkaempferol 3-*O*-β-D-glucoside (31)로써, 분광학적인 방법으로 분석하고, 최종적으로 표준시료와 비교하여 확인함으로써 밝혔다. 이들 화합물 중 5,7,8,4'-tetrahydroxy-3-methylflavone-8-*O*-β-D-glucopyranoside (29)는 천연에서는 처음으로 발견되었으며, kaempferol-3-*O*-β-D-galactopyranoside-6''-acetate (26)는 천연에서 2번째로 발견하였다.

(3) 솔잎에서 분리된 compound 26-28의 항산화 활성

Table 24에서는 분리된 3개의 화합물들의 항산화 활성을 나타내었다. Flavonoids인 kaempferol 3-*O*-β-D-galactopyranoside (28) 및 이것의 6''-acetate (26), 그리고 하나의 lignan인 (+)-isolarisiresinol 9-*O*-β-D-xylopyranoside (27)는 DPPH와 ONOO⁻ 모델 시스템에서 좋은 항산화 활성을 보여주었다. Lignan (27)은 DPPH radical에 대해 IC₅₀이 7.42 M정도인 강력한 radical 소거 활성을 보였으며 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid 보다도 효과가 좋았다. 또 다른 한편 ONOO⁻에서 화합물 27는 IC₅₀이 29.86 ± 0.20 M 정도로 중간정도의 소거 활성을 나타내었다. Flavonoids (26, 28)는 ONOO⁻에 대해 IC₅₀이 각각 24.42 ± 1.24 M 및 16.99 ±

3.99 M 정도로 중간 정도의 활성을 나타냈으며, DPPH radical에 대해서는 IC₅₀이 각각 92.34 M 및 72.74 M 정도로 높은 소거활성을 나타내었다. Lignan은 항종양 (antitumor), 항스트레스 (antistress), 항유사분열 (antimitotic), 항바이러스 (antiviral), 항간세포독성 (antihepatotoxic), 및 심혈관의 활성과 같은 여러가지 생물학적 활성을 가진다고 알려져 있다.

Table 24. Antioxidant activities of isolated compounds derived from *P. densiflora* on DPPH and ONOO⁻

Compounds	DPPH ^a	ONOO ^{-b}
26	92.34	24.42 ± 1.24
27	7.49	29.86 ± 0.20
28	74.72	16.99 ± 3.99
L-ascorbic acid	7.98	
Penicillamine		3.20 ± 0.36

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀ : μM).

^bONOO⁻ is the inhibitory activity of peroxynitrite (IC₅₀ : μM)

차. 볏잎 들깨박의 항산화 활성

(1) 볏잎 들깨박 MeOH 추출물과 각 분획물들의 항산화 활성

볶잎 들깨박의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 DPPH radical 소거 효과는 Table 25 에서 나타내었다. MeOH 추출물과 여기에서 분획된 EtOAc, *n*-BuOH, 그리고 CH₂Cl₂ 획분의 IC₅₀은 각각 33.99, 3.30, 11.11, 그리고 16.26 μg/mL 이었으며, 반면 *n*-hexane-과 H₂O 가용성 획분들은 효과가 없었다 (>80 μg/mL). 볏잎 들깨박의 MeOH 추출물과 이 추출물에서 *n*-hexane-, CH₂Cl₂-, EtOAc-, *n*-BuOH-, 그리고 H₂O-용매로 분획된 획분들의 ONOO⁻를 억제시키는 활성은 EtOAc > *n*-BuOH > CH₂Cl₂ > MeOH > H₂O > *n*-hexane 순이며 이들의 IC₅₀은 각각 0.7 ± 0.08, 1.6 ± 0.08, 2.8 ± 0.11, 11.9 ± 0.68, 14.2 ± 0.20, 그리고 >>100 μg/mL 로 볏잎 들깨박의 MeOH 추출물에서 분획된 EtOAc 가용성 획분이 ONOO⁻를 소거하는 효과가 두드러지게 나타났다. 특히 ONOO⁻의 소거제로 잘 알려진 penicillamine보다도 ONOO⁻를 소거하는 효과가 좋았다. *n*-BuOH 획분도 EtOAc 획분보다는 약하나 ONOO⁻에서 강한 소거 활성을 나타내었다. 그러나 *n*-hexane 가용성 획분은 고농도에서조차도 활성이 없었다. EtOAc, *n*-BuOH, 그리고 CH₂Cl₂ 획분은 total ROS에서도 각각 IC₅₀ 6.9 ± 0.44, 25.2 ± 3.03, 그리고 28.4 ± 0.91 μg/mL을 가지며 유의적인 억제활성을 가졌다.

Table 25. Antioxidant activities of extracts derived from *P. frutescens* on DPPH, ONOO⁻, and ROS

Extracts	DPPH ^a	ONOO ^{-b}	ROS ^c
MeOH	33.9	11.9 ± 0.68	-
<i>n</i> -Hexane	>120	>>100	-
CH ₂ Cl ₂	16.3	2.8 ± 0.11	28.4 ± 0.91
EtOAc	3.3	0.7 ± 0.08	6.9 ± 0.44
<i>n</i> -BuOH	11.1	1.6 ± 0.08	25.2 ± 3.03
H ₂ O	86.8	14.2 ± 0.20	79.3 ± 6.60
L-Ascorbic acid	<0.63		
Penicillamine		2.91 ± 0.64	

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀ : µg/mL). ^bONOO⁻ is the inhibition percent of peroxynitrite (IC₅₀ : µg/mL). ^cROS is the inhibition percent of total free radical generation in kidney postmicrosomal fraction (IC₅₀ : µg/mL).

(2) 볶음 들깨박 EtOAc 획분에서 분리된 화합물들의 구조 결정

(가) Compound 32 (chrysoeriol)의 구조

이 화합물의 ¹H-NMR 을 보면 δ6.91, 6.20, 6.51은 A ring의 H-3, H-6 그리고 H-8로 지정되며 δ7.57, 6.93, 7.56에는 proton이 δ3.89에는 methoxy이 존재한다. ¹³C-NMR 에서는 δ55.20에서 고자장에 methoxy기로 치환된 탄소 peak와 방향족 환에 의한 저자장의 peak, 그리고 δ181.76의 ketone peak를 확인할 수 있다. 또한 이 화합물은 HMBC, HMQC spectrum 으로 proton-carbon의 양상을 확인하여 chrysoeriol로 동정하였다.

(나) Compound 33 (apigenin)의 구조

이 화합물의 ¹H-NMR spectrum 을 보면 δ6.51 (*J* = 2.0)와 6.20 (*J* = 2.0)의 proton이 coupling 하고 있음을 알 수 있으며, B ring의 2', 6' proton과 5', 3' proton이 중첩되어 나타나 대칭을 이루고 있음을 알 수 있고, δ12.96의 hydroxyl기에 의한 singlet을 확인할 수 있다. ¹³C-NMR spectrum 에서는 B ring의 δ115.85와 128.38의 carbon이 중첩되어 나타남을 알 수 있으며, δ181.64의 hydroxyl기에 의한 탄소 peak를 확인할 수 있었다. 이상의 결과와 문헌의 data (Nakasugi, 2000)를 비교하여 이 화합물을 apigenin으로 동정하였다.

(다) Compound 34 (luteolin)의 구조

이 화합물도 compounds 32, 33과 마찬가지로 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서는 3개의 aromatic protone $\delta 7.41$, 6.94 그리고 7.44 signal인 B ring H-2', H-5', H-6'이 coupling하고 있음을 알 수 있으며, 또 $\delta 6.22$ 와 $\delta 6.50$ 은 A ring의 H-6과 H-8로 정하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 보면 $110\sim 150$ 사이의 benzen ring에 의한 peak를 확인할 수 있으므로 이상의 결과로 이 화합물이 luteolin으로 동정하였다.

(3) 볏음 들깨박에서 분리된 compound 32-34의 항산화 활성

볶음 들깨박의 메탄올 추출물의 EtOAc 회분에서 분리된 화합물들의 항산화 활성을 Table 26에서 나타내었다. 분리된 화합물들 중 luteolin은 $1.43 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 을 가지며 ONOO $^-$ 을 억제시켰으며, $20 \mu\text{g/mL}$ 농도에서는 53 % total ROS를 억제시켰다. Luteolin의 ONOO $^-$ 소거효과는 ONOO $^-$ 소거제로 잘 알려진 penicillamine 보다도 2배 이상으로 강력했다. Luteolin은 또한 IC_{50} 치 $1.7\mu\text{M}$ 농도에서 DPPH radical 소거활성을 나타내었다. Luteolin의 radical 소거 효과는 잘 알려진 항산화제인 L-ascorbic acid보다도 훨씬 더 효과가 좋았다. Luteolin은 항산화제로 잘 알려져 있다 (Torel *et al.*, 1986).

Table 26. Antioxidant activities of isolated compounds derived from *P. frutescens* on DPPH, ONOO $^-$, and ROS

Compounds	DPPH ^a	ONOO $^-$ ^b	ROS ^c
32	>100	NS ^d	5.0 ± 0.3
33	>100	NS	5.0 ± 0.5
34	1.7	1.43 ± 0.27	53.0 ± 2.2
L-Ascorbic acid	11.5		
Penicillamine		2.91 ± 0.64	

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC_{50} : μM). ^bONOO $^-$ is the inhibition activity of peroxynitrite (IC_{50} : μM). ^cROS is the inhibition activity of total free radical generation in kidney postmicrosomal fraction at the concentration of $20 \mu\text{g/mL}$. ^dNS is represent as no effect up to a concentration of $100 \mu\text{M}$.

카. 갓에서 분리된 화합물들의 구조결정

Compounds 36-38과 phenolic glucoside(39)을 methanol 추출물의 *n*-BuOH 가용성 분획에서 분리하였다. 36-38의 구조는 kaempferol 7-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]glucopyranoside (36), kaempferol-3-*O*-(2-*O*-feruloyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside)-7-*O*-glucopyranoside (37), kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside-7-*O*- β -D-glucopyranoside (38), 1-*O*-sinapoyl glucopyranoside (39)로 알려진 분광적인 데이터와 비교해서 동정하였다. 화합물 36는 무정형 노란 분말로 얻었고, 색소

반응법인 Mg-HCl test와 Molisch test에서 분홍색으로 나타나는 것으로 보아 flavonol glycoside의 특성을 가진다는 것을 알 수 있다. Negative ion FAB mass spectrum [m/z 771: (M-H)⁺]로 **36**는 kaempferol triglucoside이다. **36**를 산 가수분해해서 aglycon으로서 kaempferol과 당인 D-glucose를 얻었다. ¹H-NMR에서 anomeric proton과 H-2사이 coupling constant가 약 7.5Hz 사이에 나타나는 것으로 보아 모든 glucose는 또 다른 glucose 또는 aglycone에 β-결합하고 있음을 알 수 있다. **36**의 UV spectrum에서 268과 371nm에 3-hydroxyl flavonol의 전형적인 최대 흡광을 나타내었다. NaOMe첨가시 band I에서 19nm의 장파색단으로의 변화와 AlCl₃+HCl 존재시 band I에 25 nm 이동은 C-4' 과 C-5 위치에 free hydroxyl groups의 존재를 추측하였다. NaOAc로 처리 후 Band II에서 장파색단으로의 변화가 없으므로 glucose는 flavonol aglycone의 C-7에 결합하고 있다. **36**의 HMBC spectrum에서 δ5.07에 glucose anomeric proton은 δ162.85에 kaempferol C-7과 관련되었으며 δ4.02 (glucose-a)와 δ5.39 (glucose-b)에 다른 glucose anomeric protons의 signals은 각각 δ77.14에 C-3과 δ68.01에 C-6 inner glucose와 관련되고, glucose-b는 C-6에 inner glucose와 관련되었다. 이러한 결과들을 기초로, **36**의 구조는 (kaempferol 7-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)]-glucopyranoside)로서 결정하였다. 이것은 천연에서 신물질로서 처음 보고한다. 화합물 **36-39**은 각각 8.6, 24.7, 318.7과 8.6 μg/ml의 IC₅₀치 DPPH 라디칼의 소거활성을 나타내었다. 반면 L-ascorbic acid은 IC₅₀치가 1.9 μg/ml이었다.

타. 울금 EtOAc 획분에서 분리한 화합물들의 peroxynitrite 소거활성

Table 28와 Fig. 13에서 분리된 diarylhepatnoids의 peroxynitrite 소거 활성을 나타내었다. 방향족 3-methoxy-4-hydroxy-cinnamoyl (feruloyl)기가 peroxynitrite의 강력한 소거제임을 나타낸 반면에 coumaroyl 기를 가진 curcumin III는 소거 효과가 낮았다. 특히, feruloyl기를 두 개 함유하는 curcumin I는 가장 강력한 소거 활성을 보여주었다. Curcumin I의 소거 활성은 penicillamine과 비교 검토하였을때 각각 40.0 ± 0.04μM와 2.38 ± 0.34μM 이었다. Peroxynitrite 소거 활성에 대한 울금의 MeOH 추출물, curcumins I, II 그리고 III의 상대적인 소거 효과들은 구조적인 차이로 설명될 수 있다. 구조적으로, curcumin I은 두 개의 ortho-methoxylated phenols과 한 개의 β-diketone 으로 이루어져 있으며, 그리고 그들은 모두 공액결합 (conjugate)되어 있고, curcumin III은 두 개의 parahydroxylated phenols과 한 개의 β-diketone으로 이루어진 반면에, curcumin II는 각각 ortho-methoxylated와 para-hydroxylated phenols, 그리고 β-diketone으로 이루어져 있다. 이러한 결과로 부터 ortho-methoxylated phenol (feruloyl group)이 가장 높은 peroxynitrite 소거 활성을 나타내기 위하여 필요하다는 것을 증명하였다. 이 결과들은 peroxynitrite 의존성 tyrosine nitration을 억제하는 최근의 연구결과와도 잘 일치하였다. Ferulic acid는 p-coumaric acid보다 더욱 더 강력하다(Pannala *et al.*, 1998). Hydroxycinnamates와 관계된 phenolic acids는 그들의 수소-공여 특성(Rice-

Evans *et al.*, 1996)과 금속-킬레이트화 특성(Salah *et al.*, 1995)에 의해서 강력한 항산화제들로서의 기능을 한다고 보고되었다. 몇몇 연구들은 이 화합물들은 단백질-결합과 유리 tyrosine의 peroxynitrite으로 인한 nitration을 막을 수 있었고 dihydrorhodamine 123과 DNA(Oshima *et al.*, 1998)의 peroxynitrite으로 인한 산화를 억제 할 수 있다. 이 결과들은 나타난 peroxynitrite소거 활성이 화학 구조의 변화에 의해서 이루어지고 따라서 여러 가지 다른 종류들의 화합물들의 소거 활성들에 대하여도 적용된다고 할 수 있다. 이 결과 울금의 MeOH 추출물과 그것의 다양한 분획물들, 그리고 이들로부터 분리한 성분들이 peroxynitrite로 인한 동맥경화, 허혈/관류, 그리고 염증이 발생하는 것을 억제하는 경향을 나타내었으며 이들 천연 화합물들이 생체조건의 병리학적인 상태에서 다양한 peroxynitrite으로 인한 손상들을 예방하는 연구가 진행된다면 더욱 더 의미가 있으리라고 여겨진다.

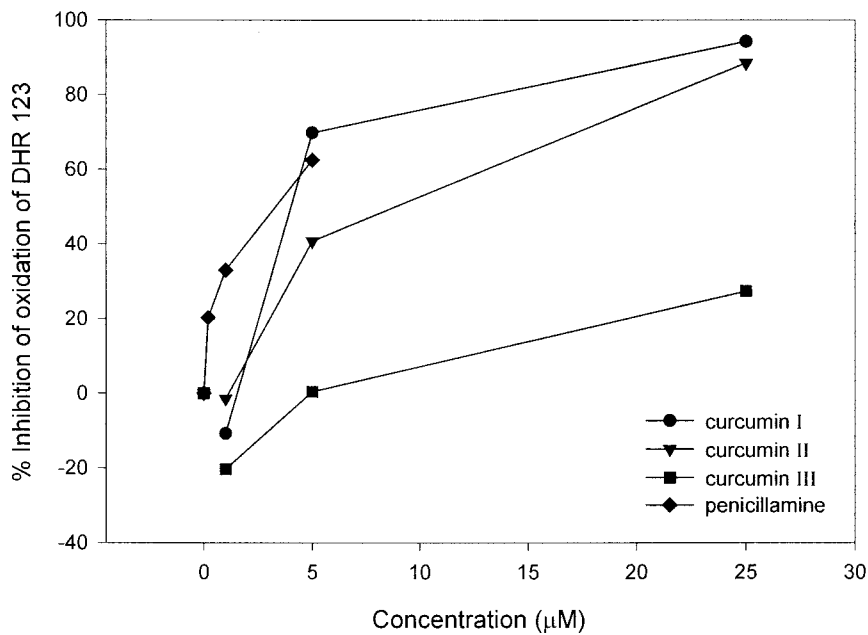


Fig. 13. Concentration-dependent scavenging of curcumin I, II, III and penicillamine on authentic peroxynitrite.

Table 27. Peroxynitrite scavenging activities of extracts derived from *C. longa*

Extracts	ONOO ^{-a}
methanol	1.7 ± 0.08
dichloromethane	1.3 ± 0.09
ethyl acetate	0.3 ± 0.08
water	55.0 ± 7.67
penicillamine	13.14 ± 0.52

Table 28. Peroxynitrite scavenging activities of isolated compounds derived from *C. longa*

Compounds	ONOO ^a
curcumin I	10.88 ± 0.11
curcumin II	18.90 ± 0.90
curcumin III	96.53 ± 4.20
penicillamine	15.94 ± 2.31

ONOO^{-a} : Inhibitory activity of peroxynitrite (IC₅₀: μg/ml)

파. 황금의 peroxynitrite 소거활성

(1) 황금 MeOH 추출물과 각 분획물들의 peroxynitrite 소거활성

황금의 MeOH 추출물과 극성이 다른 각각 분획물들의 peroxynitrite 소거활성은 Table 29에서 나타내었다. 10 μg/ml 농도에서 MeOH 추출물은 50.89 ± 0.62 %의 소거 활성을 나타내었다. MeOH 추출물에서 분획된 극성이 다른 분획물들의 peroxynitrite 소거활성을 살펴보면 동일농도 10 μg/ml에서 CH₂Cl₂ (68.68 ± 0.99 %) > EtOAc (39.68 ± 3.02 %) > *n*-BuOH (34.20 ± 3.43 %) > H₂O (6.08 ± 2.30 %) fr. 순으로 나타났다. Peroxynitrite 소거제로 잘 알려진 penicillamine 의 활성 (71.23 ± 1.15 %) 보다는 다소 낮은 활성을 나타내었다.

황금의 MeOH 추출물과 극성이 다른 각각 분획물들의 total ROS 소거 활성은 Table 30에서 나타내었다.

Table 29. The peroxynitrite scavenging activity of various fractions from *Scutellaria baicalensis*

Samples	Inhibitory ratio (%) ^a
	mean ± SE
MeOH	50.89 ± 0.62
CH ₂ Cl ₂	68.68 ± 0.99
EtOAc	39.68 ± 3.02
BuOH	34.20 ± 3.43
H ₂ O	6.08 ± 2.30
Penicillamine	71.23 ± 1.15

^aPeroxyntirite scavenging concentration at 10 µg/ml

Table 30. Total ROS scavenging activities of extracts derived from *S. baicalensis*

Extracts	Inhibition % ^a
Methanol	79.32 ± 0.96
Dichloromethane	81.40 ± 1.70
Ethyl acetate	73.11 ± 1.68
BuOH	64.64 ± 1.64
Water	31.80 ± 3.32
Trolox	77.38 ± 4.51

^ainhibition %: Inhibitory activity of total ROS (MeOH and Trolox; 40µg/ml, fractions; 20 µg/ml).

(2) 분리된 화합물들의 peroxynitrite 소거활성

황금의 EtOAc 분획물로부터 분리된 화합물들의 peroxynitrite 소거활성을 측정하여 그 결과를 Table 31에서 나타내었다. 5, 7, 2', 5'-Tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone은 peroxynitrite 소거 효과에 대해 소거제로 잘 알려진 penicillamine의 활성보다도 IC₅₀ (50 % 억제농도) 수치가 훨씬 낮은 것으로 보아 항산화 효과를 나타냄을 알 수 있었으나 wogonine과 baicalein 은 활성이 저조하였다. 반면 baicalein의 배당체인 baicalin을 측정한 결과 0.71 ±0.01의 IC₅₀ 수치로 분리된 화합물들 중 가장 항산화 활성이 높았다.

Table 31. The peroxynitrite scavenging activity of isolated compounds from *Scutellaria baicalensis*

Compounds	IC ₅₀ (μM)
	mean ± SE
Wogonin	6.70 ± 0.30
5, 7, 2', 5'-Tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone	0.87 ± 0.03
Baicalein	5.55 ± 0.28
Baicalin	0.71 ± 0.01
Penicillamine	3.75 ± 0.09

하. 연수 (*Nelumbo nucifera*) Stamen의 항산화 활성 성분

연수 (*Nelumbo nucifera* Gaertner, Nymphaeaceae) MeOH 추출물은 ONOO를 강력히 소거하고 또한 미약하지만 DPPH radical을 소거하고 total ROS 발생을 억제하였으므로 여러 가지 용매, 즉 dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc) 그리고 *n*-butanol (*n*-BuOH)으로 분획하고 활성을 검색한 결과 EtOAc 가용성 분획물에서 강한 활성이 나타났다. 따라서 반복된 silica gel과 Sephadex LH-20 column chromatography를 사용하여 일곱 개의 알려진 flavonoids [kaempferol (43), kaempferol 3-*O*-β-D-glucuronopyranosyl methylester (44), kaempferol 3-*O*-β-D-glucopyranoside (45), kaempferol 3-*O*-β-D-galactopyranoside (46), myricetin 3',5'-dimethylether 3-*O*-β-D-glucopyranoside (47), kaempferol 3-*O*-α-L-rhamno-pyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (48) 및 kaempferol 3-*O*-β-D-glucuronopyranoside (49)를 분리하였다. 이들중에서 kaempferol (43)은 모든 활성실험에서 효과가 좋았으며 kaempferol 3-*O*-β-D-glucuronopyranosyl methylester (44)와 kaempferol 3-*O*-β-D-glucuronopyranoside (49)은 DPPH radical과 ONOO 소거활성을 나타낸 반면에 kaempferol 3-*O*-β-D-glucopyranoside (45)과 kaempferol 3-*O*-β-D-galactopyranoside (46)는 단지 ONOO 소거활성을 나타내었다.

Table 32에 나타난 바와 같이 EtOAc, *n*-BuOH 그리고 H₂O 분획물들은 DPPH radical을 50 % inhibition concentration (IC₅₀) 치가 잘 알려진 L-ascorbic acid의 6.2 μg/mL와 유사하게 각각 13.5, 34.5 그리고 37.5 μg/mL로서 강력히 소거하였다. Total ROS 발생억제효과에서는 이들 분획물들의 IC₅₀ 치는 각각 7.81 ± 0.91, 42.25 ± 0.33 그리고 64.64 ± 3.35 μg/ml로서, EtOAc 분획물이 positive control인 Trolox (IC₅₀ 28.42 ± 1.21 μg/ml)보다 더욱 좋은 억제효과를 나타내었다. 또한 MeOH 추출물과 이의 분획물들은 authentic ONOO를 EtOAc fraction (IC₅₀ 0.11 ± 0.06 μg/ml) > *n*-BuOH fraction (IC₅₀ 3.41 ± 0.26 μg/ml) > MeOH extract (IC₅₀ 18.90 ± 2.14 μg/ml) > H₂O layer (IC₅₀ 28.01 ± 1.21 μg/ml) > CH₂Cl₂ fraction (IC₅₀ 35.52 ± 1.01 μg/ml) 순으로 현저히 억제하였다 EtOAc과 *n*-BuOH

분획물의 ONOO⁻ 소거활성은 positive control인 penicillamine (IC₅₀ 치는 8.27 ± 0.06 µg/ml) 보다 약 8배와 2배로 좋은 효과를 나타내었다. 이상과 같은 결과는 연수의 EtOAc 분획물에서 가장 많은 항산화성 물질들이 함유되어 있다고 생각되어 Si gel과 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 kaempferol (43), kaempferol 3-O-β-D-glucuronopyranosyl methylester (44), kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside (45), kaempferol 3-O-β-D-galactopyranoside (46), myricetin 3',5'-dimethylether 3-O-β-D-glucopyranoside (47), kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (48) 그리고 kaempferol 3-O-β-D-glucuronopyranoside (49)를 분리 동정하였다. Table 33에서는 이들 flavonoid 화합물들의 항산화 활성을 나타내었다. 이들 중에서 compound 43이 측정된 세가지 model system에서 가장 우수한 효과를 나타내었으며 compounds 44 와 49는 DPPH와 ONOO⁻ test에서 소거활성이 나타남 반면에 compounds 45과 46는 단지 ONOO⁻ test에서 활성이 나타났다.

Table 32. Antioxidant activities of the MeOH extract and its solvent soluble fractions of the stamens of *N. nucifera*

Samples	DPPH ^a IC ₅₀ (µg/ml)	Total ROS ^b IC ₅₀ (µg/ml) Mean±SE ^d	ONOO ^{-c} IC ₅₀ (µg/ml) Mean±SE ^d
MeOH	273.5	> 100	18.90 ± 2.14
CH ₂ Cl ₂	279.0	> 100	35.52 ± 1.01
EtOAc	13.5	7.81 ± 0.91	0.11 ± 0.06
<i>n</i> -BuOH	34.5	42.25 ± 0.33	3.41 ± 0.26
H ₂ O	37.5	64.64 ± 3.35	28.01 ± 1.21
L-Ascorbic acid	6.2		
Trolox		28.42 ± 1.21	
Penicillamine			8.27 ± 0.06

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀: µg/ml). ^bTotal ROS is the inhibitory activity of the total free radical generation in the kidney postmicrosomal fraction (IC₅₀: µg/ml). ^cONOO⁻ is the inhibitory activity of authentic peroxynitrite (IC₅₀: µg/ml). ^dValues of total ROS and ONOO⁻ were expressed as the mean ± standard error of three or five experiments.

Table 33. Antioxidant activities of isolated compounds 43–46 and 49 from the stamens of *N. nucifera*

Compounds	DPPH ^a IC ₅₀ (μM)	Total ROS ^b IC ₅₀ (μM) Mean±SE ^d	ONOO ^c IC ₅₀ (μM) Mean±SE ^d
43	13.8	26.84 ± 2.05	3.00 ± 0.07
44	61.4	> 100	10.51 ± 0.77
45	> 100	> 100	6.98 ± 0.37
46	> 100	> 100	16.59 ± 3.99
49	20.1	> 100	3.18 ± 0.39
L-Ascorbic acid	11.5		
Trolox		6.09 ± 1.29	
Penicillamine			5.11 ± 0.23

^aDPPH is the free radical scavenging activity (IC₅₀: μM). ^bTotal ROS is the inhibitory activity of the total free radical generation in the kidney postmicrosomal fraction (IC₅₀: μM). ^cONOO⁻ is the inhibitory activity of authentic peroxynitrite (IC₅₀: μM). ^dValues of total ROS and ONOO⁻ were expressed as the mean ± standard error of three or five experiments.

2절. 활성 phenol성 화합물의 작용기전

1. 자생식물로부터 분리된 phenol성 화합물의 작용기전

자생식물로부터 peroxynitrite scavenger를 분리 동정하기 위해 600 종 이상 herbs를 screening 하였으며, peroxynitrite scavenging activity는 형광측정법을 이용하여 실험하였다. 이들 중 커피콩, 벚나무의 잎, 연수 즉 연꽃의 수술이 강한 작용이 있는 것으로 나타났다. 이들의 peroxynitrite scavenging activity는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. IC₅₀ (μM) values on ONOO⁻ scavenging activities of active compounds isolated from *Prunus serrulata* var. *spontanea*

Compounds	IC ₅₀ (μM)
Quercetin	0.9±0.2
Genistein	24.4±2.0
Genistin	44.5±10.6
Prunetin	>>200
Prunetrin	>> 200
Biochanin A	>>200
Daidzein	>>200
Penicillamine*	3.2±0.7

생약의 MeOH fraction들이 최종농도 10 ug/ml에서 나타내는 peroxynitrite scavenging activity를 조사한 결과, 벚잎의 fraction 들이 10 ug/ml에서 나타내는 peroxynitrite scavenging activity를 나타내었다 (Fig. 1).

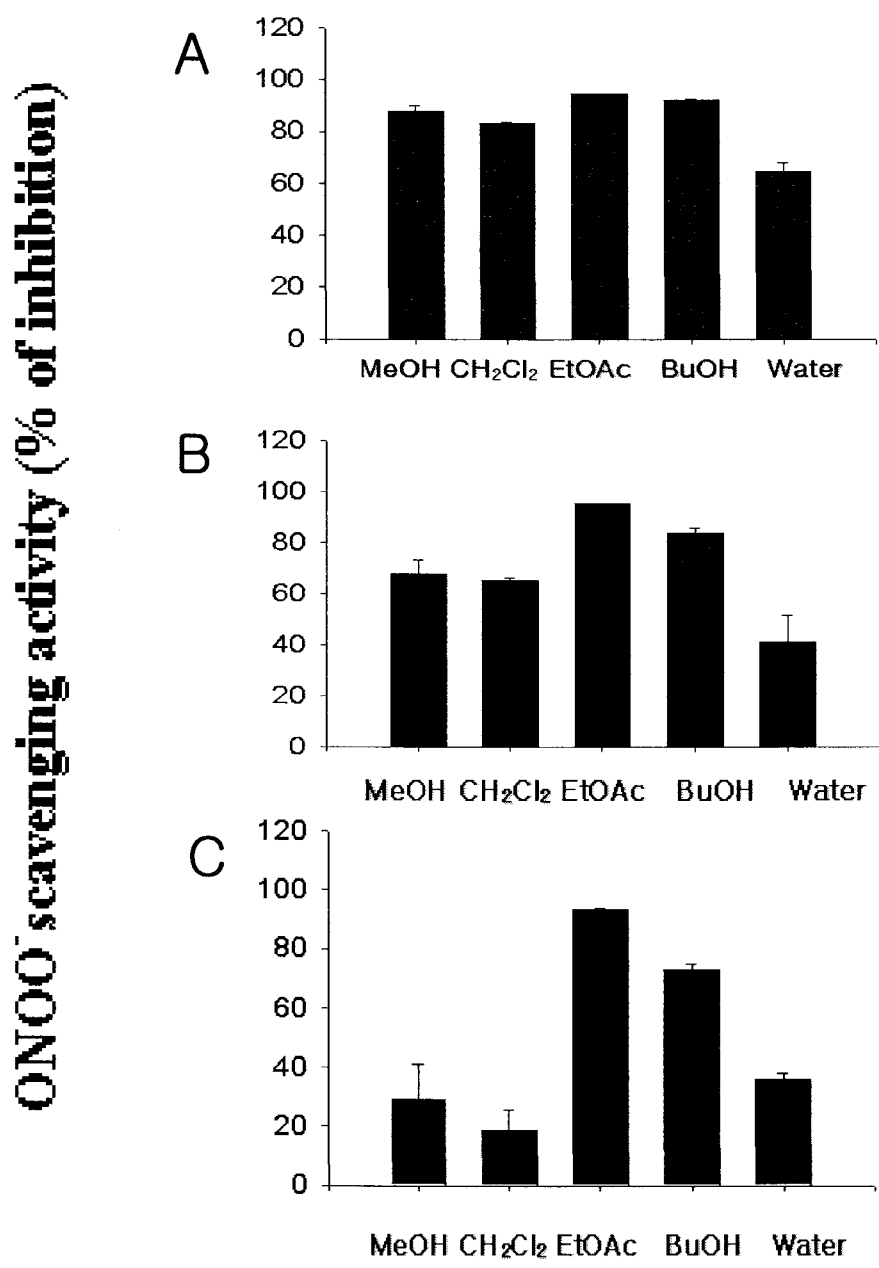


Figure 1. ONOO⁻ scavenging activities of *Coffea arabica* extracts (A), *Prunus serrulata var. spontanea* extracts (B), and *Nelumbo nucifera* extracts (C). ONOO⁻ scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DHR 123 as described in Material and Methods.

Data are mean S.D. of triplicate measurements. DHR123, dihydrorhodamine 123 MeOH, methanol; CH₂Cl₂, dichloromethan; EtOAc, ethylacetate; BuOH, n-butanol fraction.

이들 중 EtOAc fraction이 가장 강한 활성을 나타내었으므로 이 층을 더욱 분리하였다. 벗잎의 EtOAc 층에서 분리된 성분들의 peroxynitrite scavenging activity를 IC₅₀으로 나타내었는데, 강한 peroxynitrite scavenging activity로 순서로 나열하면 quercetin, genistein과 genistin의 순서이며, 이들을 대상으로 결정하였다. 이 실험에서 penicillamine을 reference compound로 사용하였으며, quercetin은 penicillamine 보다 강한 활성을 나타내었다. 연수의 경우도 마찬가지로 EtOAc fraction이 강한 활성을 나타내었으며 이 층을 더욱 분리 하였다. 연수 EtOAc 층의 유효 성분으로 kaempferol과 그 구조 유사체들로 밝혀졌으며 이중에서 가장 활성이 강한 kaempferol을 대상으로 결정하였으며, kaempferol은 penicillamine 보다 강한 peroxynitrite scavenging activity를 나타내었다. 커피 성분들의 peroxynitrite scavenging activity를 측정된 결과 hydroquinone과 phenol이 활성을 나타내었고 이 중에서 가장 강한 활성을 나타내는 hydroquinone을 대상 성분으로 결정하였다.

2. ONOO⁻ 억제기전

활성산소에 민감하며, 세포내 항상성을 유지시키는 데 주요한 역할을 담당하는 효소중의 하나인 GSH reductase에 대해 peroxynitrite가 미치는 영향에 대해 검토하였다. Peroxynitrite는 강력한 반응성으로 효소내의 단백질에 작용하여 산화 또는 nitration을 야기시켜 SH기의 변화, tyrosine의 nitration 을 초래한다. 이 실험에서 peroxynitrite의 농도를 증가시키기에 따라 GSH reductase의 activity는 현저히 저하되었으며, 이 상태의 효소내 protein nitration 정도를 nitrotyrosine antibody를 이용하여 검토해본 결과 peroxynitrite의 농도 의존적으로 nitration 증가가 관찰되었다. 이러한 peroxynitrite 독성에 대한 scavengers 들의 GSH reductase를 보호작용에 대해 조사하였다. 그래프는 peroxynitrite를 처리한 효소의 활성을 0으로 하고 control을 100으로 한 그래프로 이렇게 scavenger의 처리에 의해 활성의 상승이 관찰되었으므로, scavenger는 효소를 peroxynitrite에 의한 활성저하로부터 보호하였다 (Fig. 2).

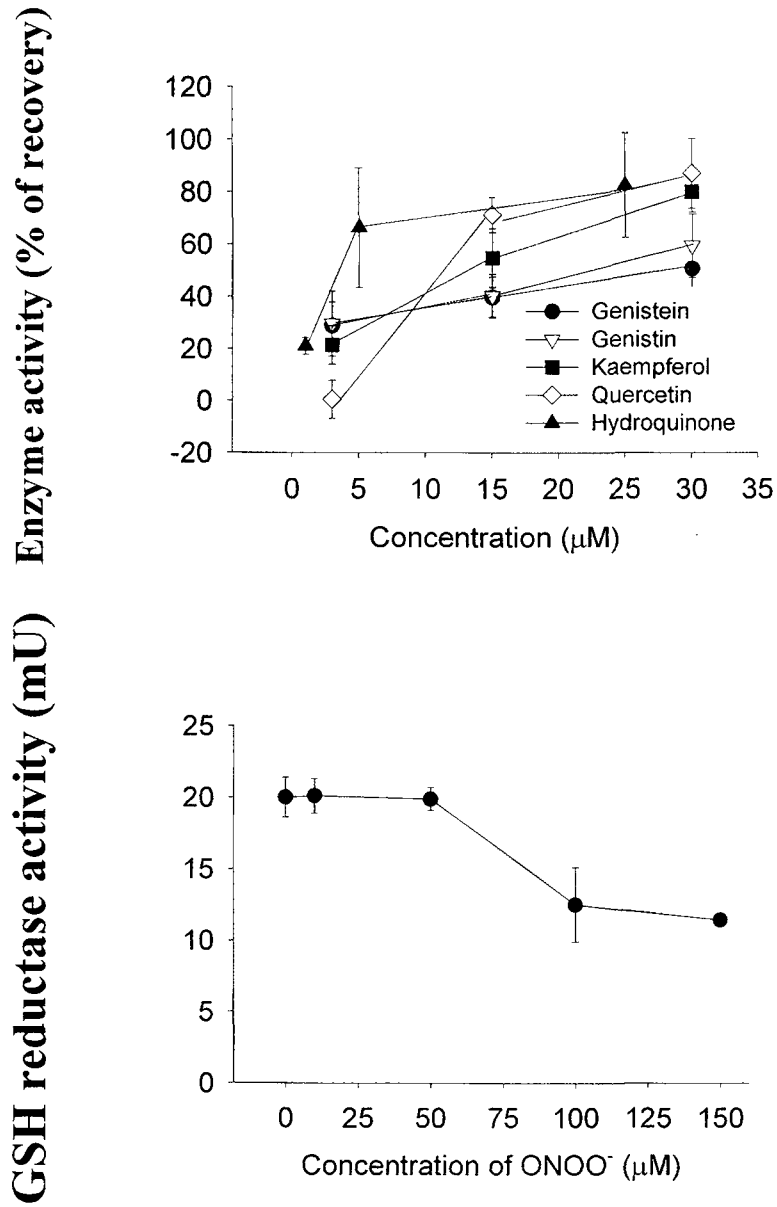


Figure 2. Suppression of the activity of GSH reductase by ONOO⁻ and restoration by hydroquinone or flavonoids.

The enzymatic change of GSH reductase activity induced by ONOO⁻ in the absence (A) or presence (B) of hydroquinone or flavonoids was determined by NADPH reduction method as described in Materials and Methods. **p<0.01, ***p<0.001 represent significant difference compared to normal or control.

이 상태의 효소내의 nitration level을 western blot으로 측정 한 결과 peroxynitrite의 처리에 의해 nitration은 증가하였다 (Fig. 3).

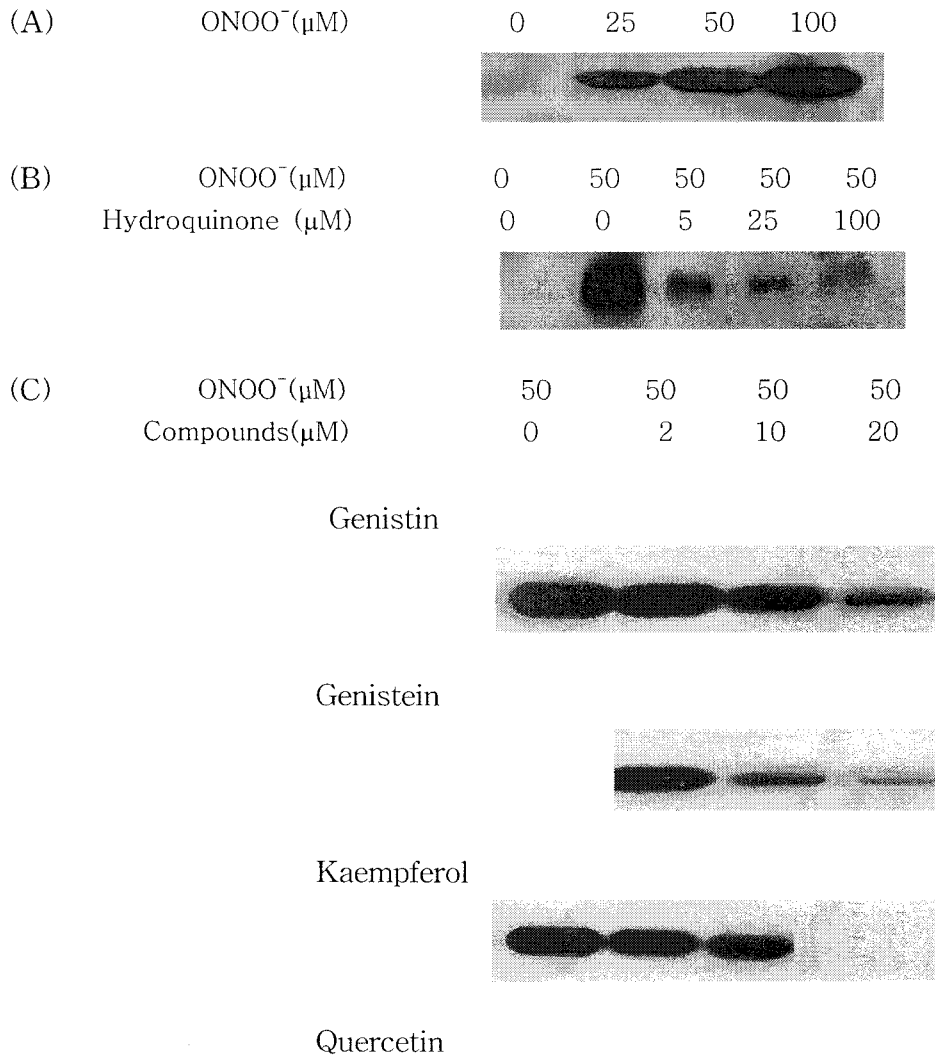


Figure 3. Nitrotyrosine formation of GSH reductase by ONOO⁻ and inhibition by hydroquinone or flavonoids.

The nitrotyrosine level of GSH reductase triggered by ONOO⁻ in the absence (A) or presence (B) of hydroquinone or presence (C) of flavonoids was analyzed by Western blot with antibody specific for nitrotyrosine

그림 B에서와 같이 hydroquinone 의 농도를 증가시킴에 따라 nitration의 감소를 관찰할 수 있으며, 그림 C에서도 genistin, genistein, kaempferol, quercetin에 대해 농도 의존적인 효소의 nitration의 생성 억제가 관찰되었다. 또한 보호작용은 구조상 관관계 따른 peroxynitrite scavenging activity와 일치하였으므로 이들은 peroxynitrite를 scavenge 하여 효소내의 단백질의 modification을 억제함으로써 효소의 활성을 보호하는 것으로 사료된다. Scavenger들의 peroxynitrite에 의한 tyrosine의 nitration 억제기전을 spectrophotometric analysis 검토하였다 (Fig. 4).

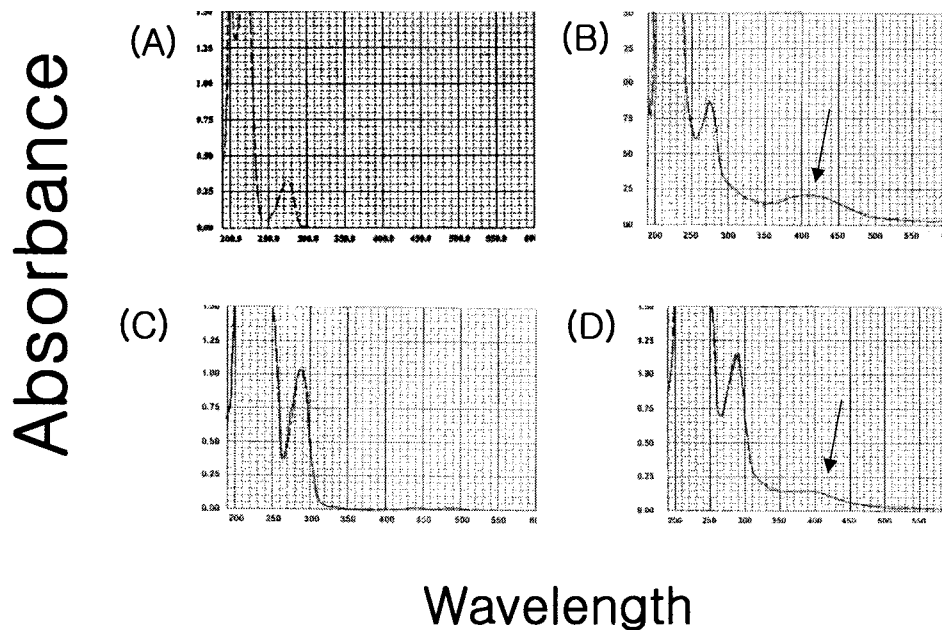


Figure 4. Interaction of hydroquinone or flavonoids with ONOO . A, tyrosine (500 mM); B, tyrosine (500 mM) with ONOO (500 mM); C, hydroquinone (500 mM); D, hydroquinone (500 mM) with ONOO (500 mM)

이는 peroxynitrite scavenging mechanism을 나타내는 방법으로 peroxynitrite에 의한 nitration의 증거로 190 nm에서 600 nm까지 scan하여 430 nm 근처의 peak를 관찰하는 방법이다. 그림 A는 tyrosine에 관한 것이다. tyrosine 과 peroxynitrite 와의 반응에서처럼 430 nm 근처의 nitration peak가 나타나면 스스로 nitration 되므로써 peroxynitrite를 scaveng한다는 것을 알 수 있다. 그림 B는 hydroquinone에 대한 그림으로 hydroquinone은 peroxynitrite 와 interaction에 의해 430 nm에서 peak가 관찰되므로 nitration 과정으로 peroxynitrite를 scavenge 함을 알 수 있다. hydroquinone과는 달리 genistein, genistin, kaempferol, quercetin은 다른 mechanism을 경유한다. 즉, genistein, genistin, kaempferol, quercetin의 경우에는 430 nm의 peak가 나타나지 않으므로 이들은 electron donation 과정으로 peroxynitrite를 scavenge 한다고 사료된다. 따라서 scavenger들은 peroxynitrite에 의한 효소의 protein modification을 저해하였다. 그 inhibitory mechanism은 두 가지로 구별되며 이는 nitration과 electron donation 과정이다. Flavonoids 는 electron donation 과정으로 peroxynitrite를 scavenge 하였으며, hydroquinone 은 nitration 과정으로, peroxynitrite를 저해하는 것으로 나타났다. Peroxynitrite 전구체인 superoxide와 nitric oxide 에 대한 소거능을 검토하였다. 그 결과 quercetin, kaempferol, hydroquinone은 superoxide 와 nitric oxide에 대한 소거능을 나타내었으며, 그 중 quercetin은 가장 강한 활성을 나타내었다.

3. 세포배양계에서 염증 억제작용

사용한 cells은 ATCC에서 분양 받은 RAW 264,7 macrophage cell을 사용하였다. NO_x (NO₂/NO₃) level은 NO analyzer로 측정하였으며, protein level은 western blot으로, transcription factor의 DNA-binding activity는 EMSA로 측정하였다. Scavenger의 전처리에 의해 세포에서 분비된 NO_x의 inhibition은 농도의존적으로 증가하였다. Macrophage에 LPS를 처리하면 염증상태와 같이 cytokine 유리 등의 response들이 야기된다. NO₂/NO₃는 이러한 반응을 야기시키는 mediator 중의 하나로 control 상태에서는 낮은 level을 보이지만 LPS 처리에 의해 이와 같이 증가하였다. 이러한 증가는 scavenger를 1, 5, 25 uM 처리함에 따라 감소하였으며 이러한 그림을 정리한 것이 위의 그래프와 표이다. 모두 강한 NO₂/NO₃ 생성억제효과를 나타내었으며, isoflavonol 계에 비하여 flavonol 계와 hydrquinone은 강한 효과를 나타내었다 (Fig. 5).

Scavenger 처리에 의한 NO_x의 농도의 감소가 iNOS expression과 일치하는 것을 확인하기 위하여 iNOS의 protein level을 측정하였다. 그 결과 iNOS activation과 NO_x의 농도는 일치하였으며, scavenger의 iNOS activation에 미치는 영향을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

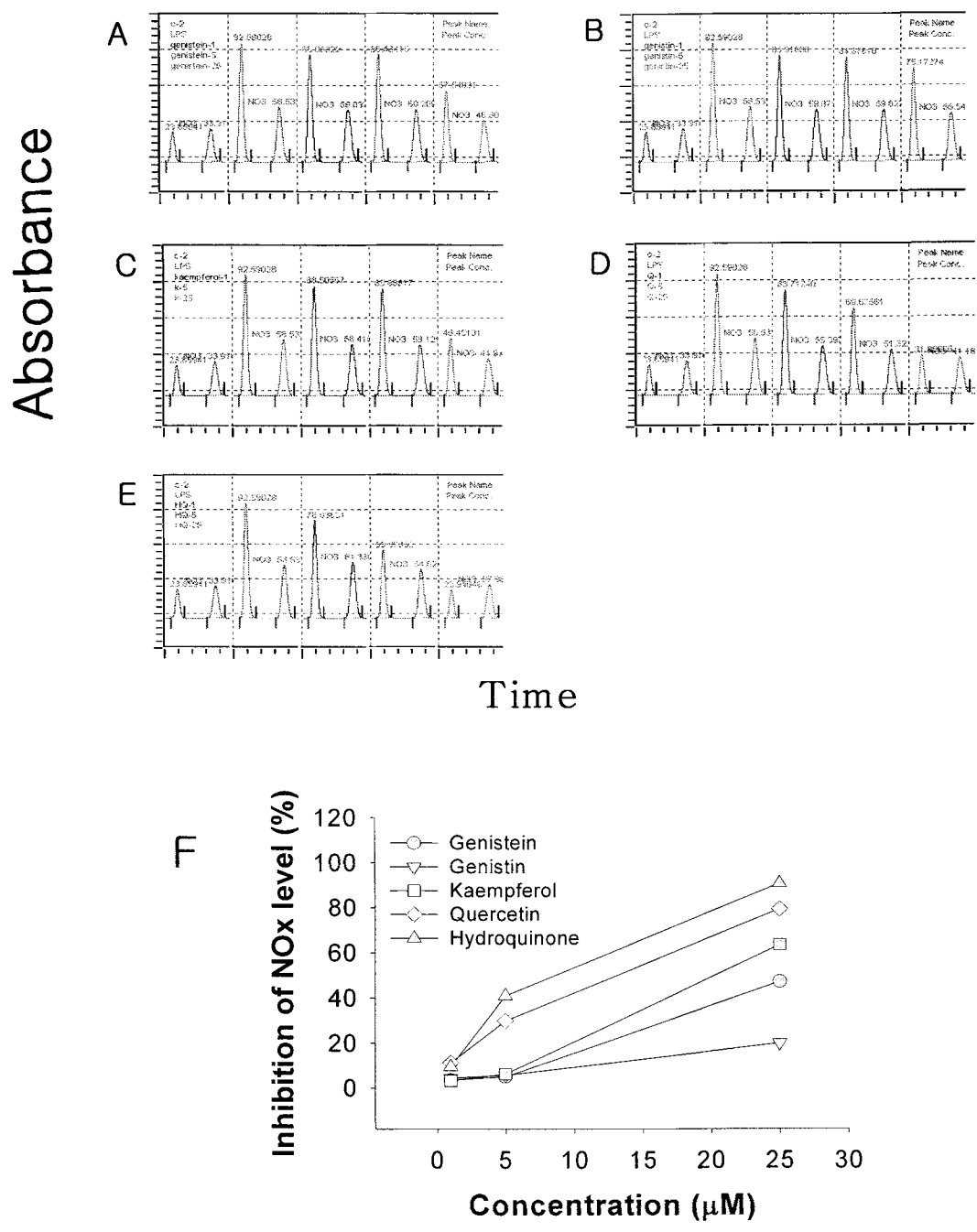


Figure 5. Effect of hydroquinone or flavonoids on NO₂/NO₃ production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

LPS (ng/ml)	0	100	100	100	100
Compounds (μ M)	0	0	5	25	50
Genistein					
Genistin					
Kaempferol					
Hydroquinone					
LPS (ng/ml)	0	100	100	100	100
Quercetin (μ M)	0	0	1	5	25

Figure 6. Effect of hydroquinone or flavonoids on LPS-induced iNOS level in RAW 264.7 cells.

The cells were pretreated with various concentrations of hydroquinone or flavonoids for 3 hr and then treated with or without LPS (100 ng/ml) for 24 hr. Total cellular protein was separated on SDS-polyacrylamide gels and blotted with antibody specific for iNOS as described in Materials and Methods. LPS, lipopolysaccharide.

이러한 iNOS의 expression의 변화의 원인을 규명하기 위하여 iNOS promoter region에 있는 transcription factor들의 activity에 대한 실험을 실시하였다. 염증상태에 중요한 역할을 나타내는 NF- κ B의 scavenger에 의한 영향을 알아보았다. LPS 처리 직후와 60 min에서 측정된 결과 Hydroquinone과 isoflavonol계인 genistein, genistin은 NF- κ B의 DNA binding activity를 감소시켰지만 flavonol계인 kaempferol과 quercetin에서 NF- κ B의 DNA binding activity에 현저한 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 7).

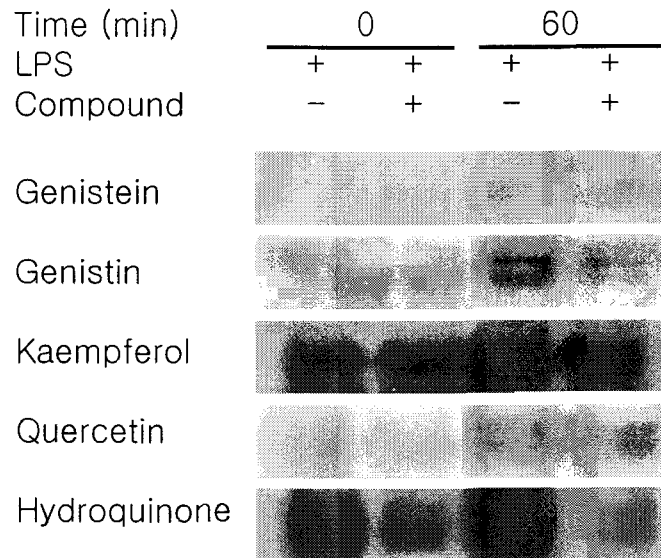


Figure 7. Effect of hydroquinone or flavonoids on NF- κ B-DNA binding activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were pretreated with hydroquinone or flavonoids for 3 hr in the presence or absence of LPS (100 ng/ml) for different time points. Nuclear extracts were prepared and assayed for NF- κ B induction by EMSA as described in Materials and Methods. LPS, lipopolysaccharide; NF- κ B, nuclear factor-kappa B.

또 다른 redox-sensitive transcription factor인 AP-1의 scavenger에 의한 modulation을 알아보았다. flavonol계는 AP-1의 DNA binding activity를 현저하게 감소시켰으며, hydroquinone, isoflavonol계인 genistein 및 genistin은 AP-1의 DNA binding activity에 영향을 미치지 않는 결과를 나타내었다 (Fig. 8).

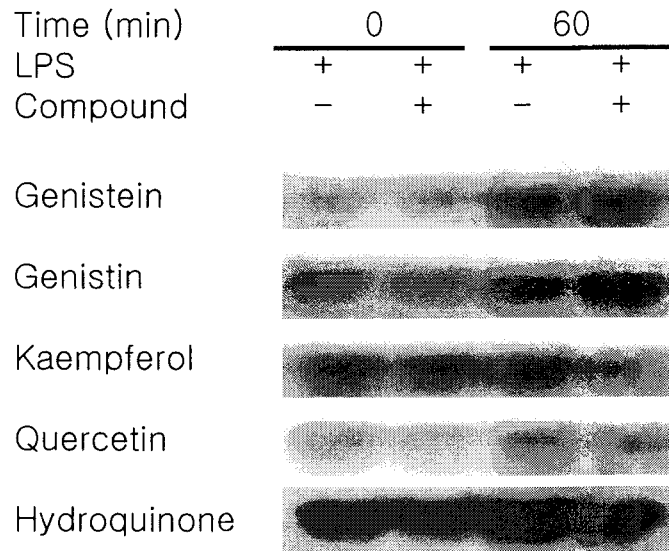


Figure 8. Effect of hydroquinone or flavonoids on AP-1-DNA binding activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were pretreated with hydroquinone or flavonoids for 3 hr in the presence or absence of LPS (100 ng/ml) for different time points. Nuclear extracts were prepared and assayed for AP-1 induction by EMSA as described in Materials and Methods. LPS, lipopolysaccharide; AP-1, activator protein-1

iNOS promoter region에 존재하는 다른 transcription factor NF-IL6의 scavenger에 의한 DNA-binding activity의 변화를 알아보았다. 이는 주로 tyrosine kinase의 activation에 의하여 활성화되는 transcription factor라 알려져 있다. tyrosine kinase inhibitor로 알려진 genistein은 NF-IL6의 DNA binding activity를 감소시켰으며, genistin, flavonol계의 kaempferol과 quercetin, hydroquinone은 NF-IL6의 DNA binding activity에 영향을 미치지 않는 결과를 나타내었다. 그러므로 scavenger들은 iNOS의 promoter에 각각 다르게 작용하였다 (Fig. 9).

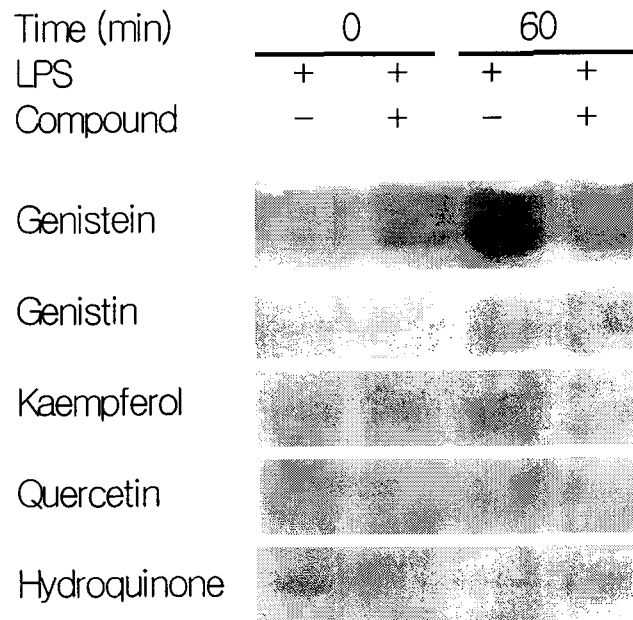


Figure 9. Effect of hydroquinone or flavonoids on C/EBPb-DNA binding activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were pretreated with hydroquinone or flavonoids for 3 hr in the presence or absence of LPS (100 ng/ml) for different time points. Nuclear extracts were prepared and assayed for C/EBPb induction by EMSA as described in Materials and Methods. LPS, lipopolysaccharide; C/EBPb, CCAAT-enhancer binding protein b.

이러한 transcription factor의 활성화에 영향을 주는 pathway 중의 하나인 MAPK kinase pathway 중 ERK pathway를 검토하였다. 실험 결과 NF- κ B의 DNA binding activity에 미치는 영향과는 달리, hydroquinone과 flavonoid계의 scavenger가 ERK의 phosphorylation을 억제하였으며, isoflavonoid계의 영향은 미약하였다 (Fig. 10).

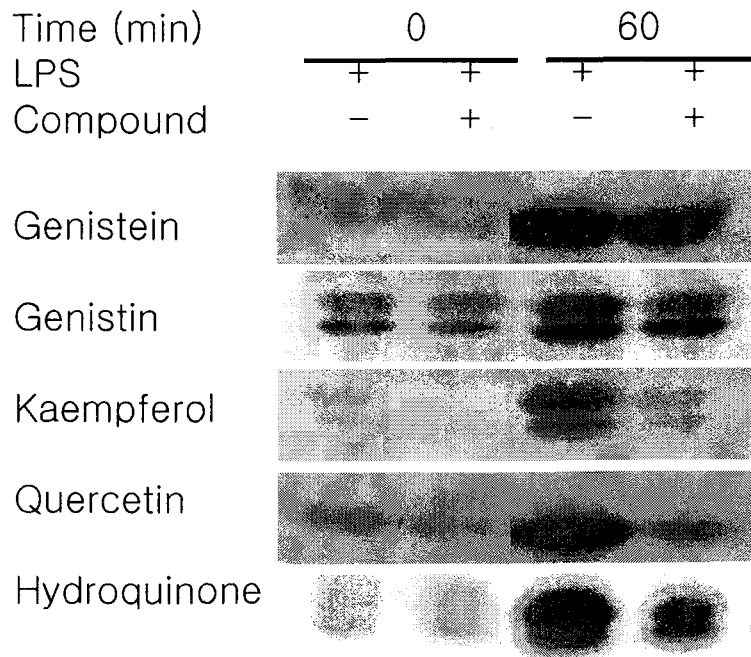


Figure 10. Effect of hydroquinone or flavonoids on phosphorylation of ERK1/2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were pretreated with hydroquinone or flavonoids for 3 hr in the presence or absence of LPS (100 ng/ml) for different time points. Total cellular proteins were prepared and separated on SDS-polyacrylamide gels and blotted with antibody specific for pERK as described in Materials and Methods. LPS, lipopolysaccharide; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2.

이상의 결과를 요약하면, scavenger에 의하여 iNOS gene expression은 현저히 감소하였다. 그 기전을 규명하기 위하여 transcription factor와 ERK 인산화를 검토해 본 결과 hydroquinone은 NF- κ B, ERK의 인산화를 모두 억제시켰다. Flavonol계는 AP-1 DNA binding activity와 ERK 인산화를 억제시켰으며, isoflavonol계 중 genistein은 transcription factor NF-IL6 및 NF- κ B의 activation을 억제하였으며, genistin은 NF- κ B의 활성화를 억제함으로써 iNOS expression을 저해하였으므로 이들은 강력한 NO pathway 조절 작용을 나타내며 각각 differentially modulate 할 것으로 사료된다.

4. 활성 성분의 *in vivo* 활성

Scavenger 들의 *in vivo*에 미치는 영향을 규명하기 위한 실험을 실시하였다. SD rat을 이용하였으며, 각각 6개월, 20 개월 된 쥐를 young과 old model를 이용하였다. 약물은 15 mg/kg로 5일간 투여하였으며, 6일째에 sacrifice 하였다. protein level 을 western blot으로 확인하였으며, ROS level을 측정하기 위하여 DCFDA를 이용

한 fluorometric assay를 실시하였다. Scavenger들은 NO pathway에 작용하였으므로 특히 nitrotyrosine level과 NOx level을 측정해보았다. Young group에 비하여 old group에서 protein nitration level은 증가되었으며, reference compound인 indimethacine 투여군과 함께 hydroquinone군, genistin, kaempferol 투여군에서 그 nitration level은 감소하였다. NOx 역시 나이에 따라 증가하였으며, hydroquinone군, genistin, kaempferol 투여군에서도 NOx level은 감소하여 nitration과 일치하는 결과를 나타내었다. 그러므로 이들은 *in vivo* 상태에서도 nitric oxide의 level을 조절하여 peroxynitrite의 생성에 영향을 미친다고 사료된다. 세포 내 ROS 생성이 활발한 mitochondrial fraction에서 활성산소 level을 측정하였다. 나이에 따른 ROS level의 증가가 확인하였으며, 이 증가는 hydroquinone, genistein, kaempferol의 투여에 의하여 억제되었다. 이상을 요약하면 첫째로 hydroquinone, genistein, genistin, kaempferol, quercetin이 peroxynitrite scavenging activity를 나타내었으며, 이들은 peroxynitrite에 의한 GSH reductase의 활성감소를 완화시켰다. hydroquinone은 nitration 과정으로 flavonoids는 electron donation 과정으로 peroxynitrite를 scavenging 하였다. 또한, RAW cell을 사용하여 LPS로 염증상태를 유발한 model에서 iNOS 억제에 의한 NO 생성 저하가 확인되었으며, 이러한 iNOS gene expression의 downregulation은 NF- κ B, AP-1, NF-IL6등의 transcription factor와 ERK가 관련 될 것이라 사료된다. 마지막으로 이러한 작용이 *in vivo*에 나타나는 지를 규명하기 위한 실험에서 active components의 투여에 의하여 노화과정에서 증가된 ROS, NOx, protein nitration이 억제되었다. 위의 결과를 그래프로 다시 정리하였다 (Fig. 11).

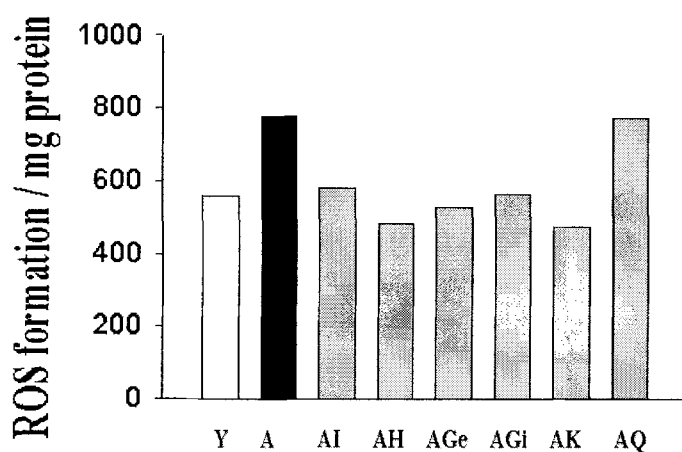
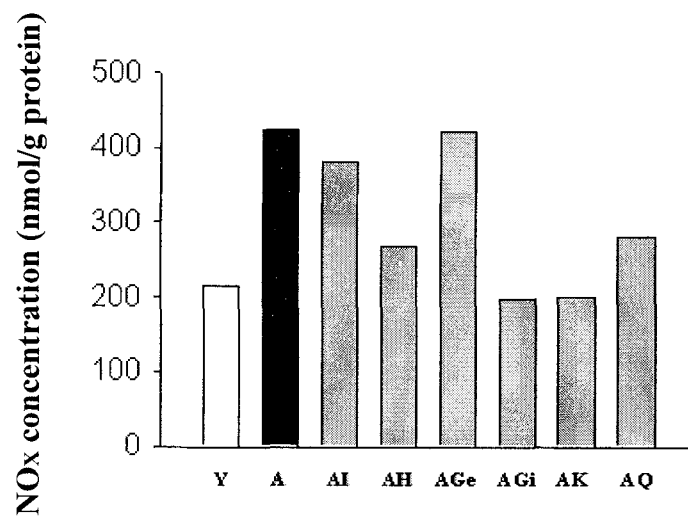


Figure 11. Effect of hydroquinone or flavonoids on NOx level (A) and ROS level (B) *in vivo*.

The rats were administrated hydroquinone or flavonoids for 5 day. The levels of NOx were determined by Griess reaction as described in Materials and Methods. The levels of ROS were determine by fluorometric assay with DCFDA as described in Materials and Methods. Y, young rat; A, old rat; AI, indomethacin injected old rat; AH, hydroquinone injected old rat; AGe, genistein injected old rat; AGi, genistin injected old rat; AK, kaempferol injected old rat; AQ, quercetin injected old rat.

3절. 연수와 그 유래 성분의 작용기전

연수로부터 분리된 kaempferol, kaempferol 3-*O*-glucuronic acid, kaempferol 3-*O*-glucoside, and kaempferol 3-*O*-galactoside 등의 성분들의 ONOO scavenging activity 및 antioxidative activity 능력을 DHR 123 시약을 이용하여 microplate fluorescence spectrophotometer로 측정하였다.

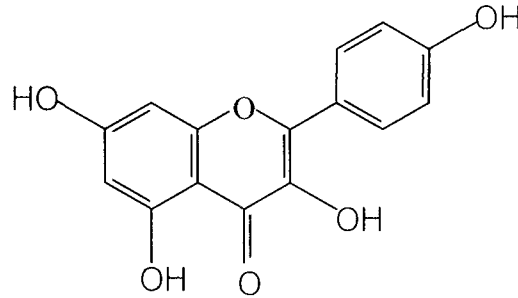


Fig.1. Structure of kaempferol

Table 1에서 확인할 수 있듯이 kaempferol은 아주 강력한 ONOO scavenging activity 효과를 나타내고 있고, Table 2에서는 antioxidative activity 능력을 나타내고 있다.

Table 1. Peroxynitrite scavenging activities of active compounds isolated from *Nelumbo nucifera*

Compounds of <i>Nelumbo nucifera</i>	IC ₅₀ (μM)
Kaempferol	3.0 ± 0.2
Kaempferol 3- <i>O</i> -glucuronic acid	3.2 ± 0.7
Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	7.0 ± 0.7
Kaempferol 3- <i>O</i> -galactoside	16.6 ± 7.0
Penicillamine	3.2 ± 0.7

Table 2. IC₅₀ (mM) of kaempferol on related free radicals scavenging activities

Components	IC ₅₀ (μM)	
	NO	· O ₂
Kaempferol	8.2 ± 1.4	102.1 ± 26.3
Carboxy-PTIO	1.5 ± 0.2	ND
Trolox	ND	92.7 ± 13.0

이에 kaempferol의 ONOO⁻에 의해 발생하는 protein nitration의 저해 효과를 Western blotting으로 살펴본 결과 Fig. 2에서 보듯이 GSH reductase에 ONOO⁻를 처리하였을 때 nitration 되었는데 kaempferol과 함께 처리하였을 때에도 농도 의존적으로 protein-nitration을 저해하였음을 알 수가 있다. 이것은 kaempferol이 ONOO⁻를 제거함으로써 protein nitration을 억제한다는 것을 나타내고 있다.

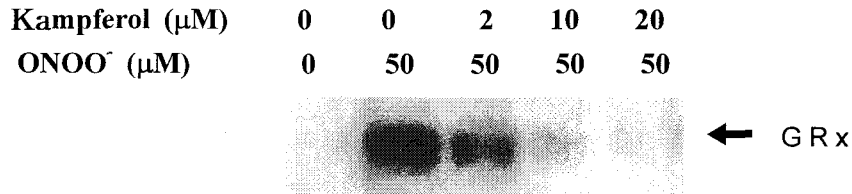


Fig. 2. Effect of kaempferol on nitration of GSH reductase(B)

또한 LPS를 처리한 mice에서 kaempferol에 의한 NO₂/NO₃양 측정을 한 결과 normal group과 비교하여 control group에서 NO₂/NO₃ 양이 유의성 있는 증가를 보였으며, control group과 비교하여 kaempferol을 처리한 group에서는 모두 유의성이 있는 감소 효과를 보였었다 (Fig. 3).

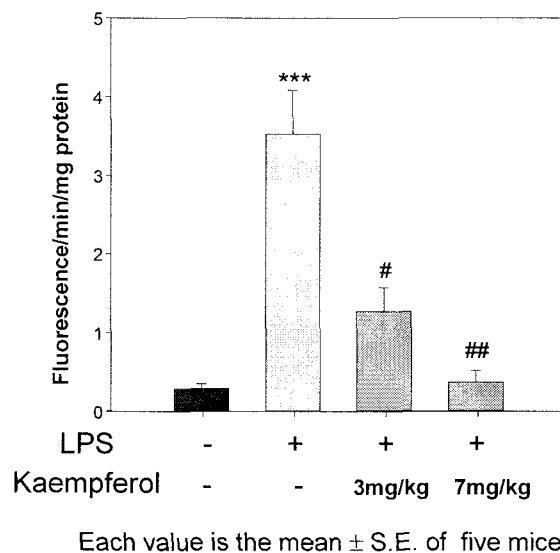


Fig. 3. Effects of kaempferol on NO_x level in LPS-treated mice

그리고 LPS를 처리한 mice에서 kaempferol에 의한 ROS 생성량을 측정한 결과 normal group과 비교하여 control group에서 ROS의 양이 증가하였고, control group과 비교하여 kaempferol을 처리한 group에서는 모두 유의성이 있는 감소 효과를 보였었다 (Fig. 4).

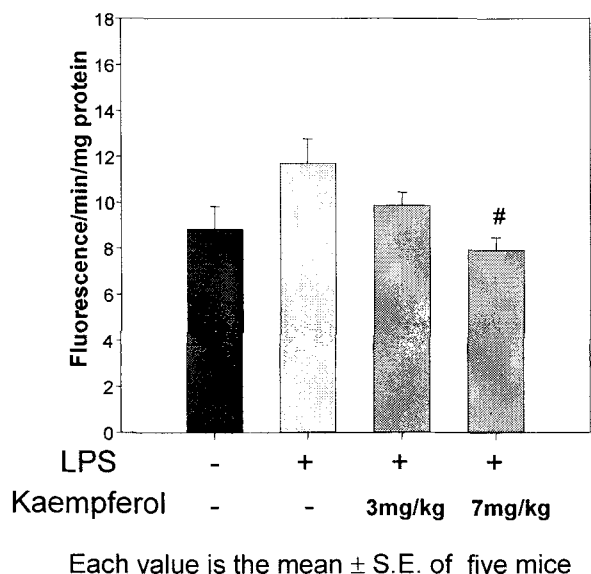


Fig. 4. Effects of kaempferol on ROS generation in LPS-treated mice.

Aged rat을 이용하여 kaempferol의 효과를 알아보는 실험을 하였다. Serum에서 NO₂/NO₃의 양을 측정된 결과 young group에 비하여 old group에서 유의성 있는 증가를 보였고, kaempferol을 투여한 group에서는 유의성 있는 감소를 보이고 있다 (Fig. 5).

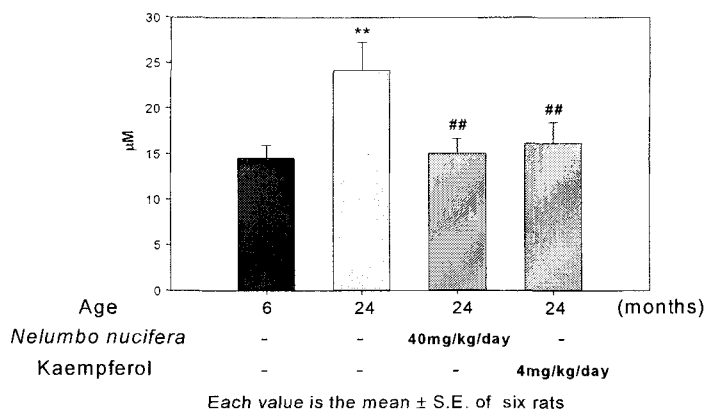


Fig. 5. Effect of extracts of *Nelumbo nucifera* and kaempferol on the NOx level in serum

또한 kidney에서 ROS의 생성량을 측정된 결과, 마찬가지로 young group에 비하여 old group에서 유의성 있는 증가를 보였고, kaempferol을 투여한 group에서는 유의성 있는 감소를 보이고 있다 (Fig. 6).

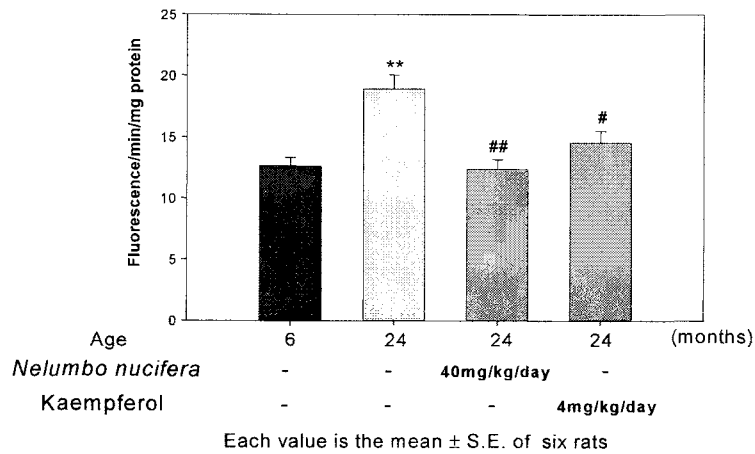


Fig. 6. Effect of extracts of *Nelumbo nucifera* and kaempferol on ROS generation in kidney homogenate.

Protein nitration 저해효과를 측정한 결과 앞의 결과와 비슷한 결과가 나타났다 (Fig. 7).

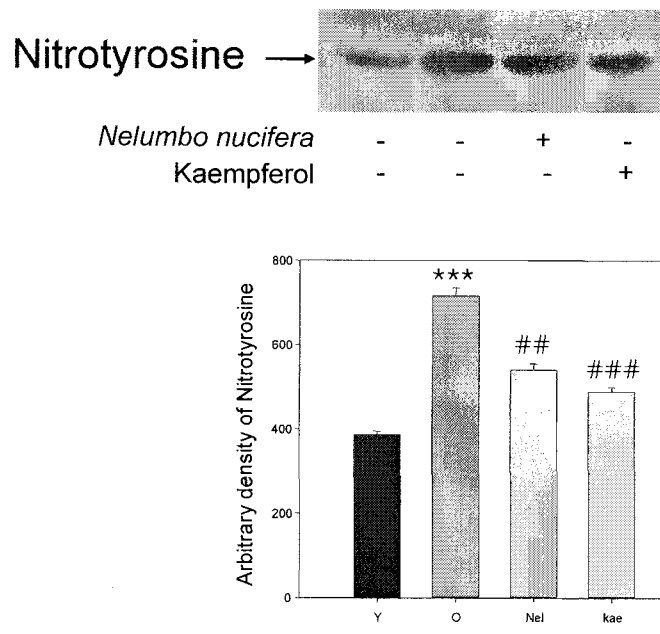


Fig. 7. Effects of extracts of *Nelumbo nucifera* and kaempferol on the ONOO⁻-related protein nitration in aged rats.

또한 iNOS 발현량을 Western blotting을 통하여 실험한 결과 young group에 비하여 old group에서 iNOS의 양이 증가하였고, old group에서는 kaempferol을 투여한 group에서는 감소하는 효과를 보였다 (Fig 8).

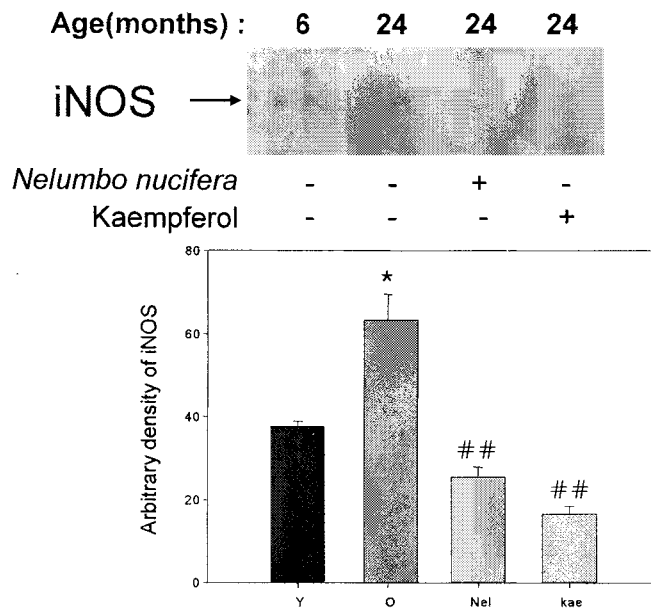


Fig 8. Effects of extracts of *Nelumbo nucifera* and kaempferol on iNOS gene expression.

마찬가지로 NF- κ B 활성을 저해하는 효과를 EMSA 방법을 통하여 activity를 측정 한 결과 old group에서 binding activity가 증가하였고, old group과 비교하여 kaempferol을 투여한 group에서의 binding activity가 감소하는 효과를 보였다 (Fig 9).

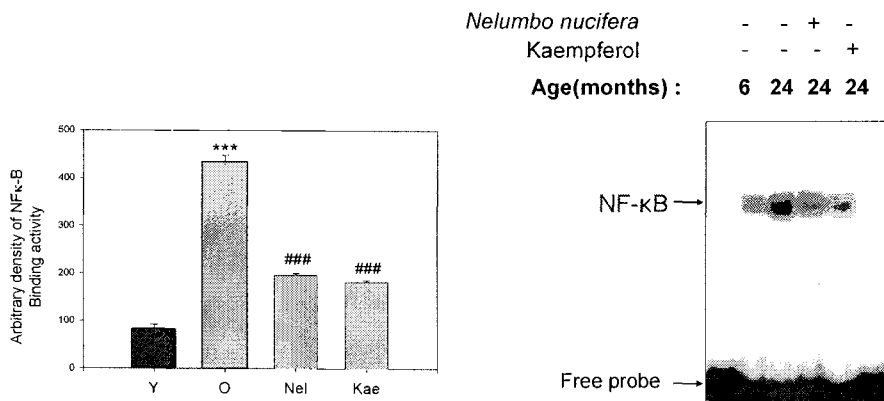


Fig. 9. Effects of extracts of *Nelumbo nucifera* and kaempferol on NF- κ B

Aged rat에서의 kaempferol에 의하여 I κ -B β 효과를 Western blotting으로 확인한 결과 NF- κ B가 old group에서 감소하였으나, kaempferol을 투여한 old group에서는 I κ -B β 가 증가하는 모습을 나타내고 있다 (Fig. 10).

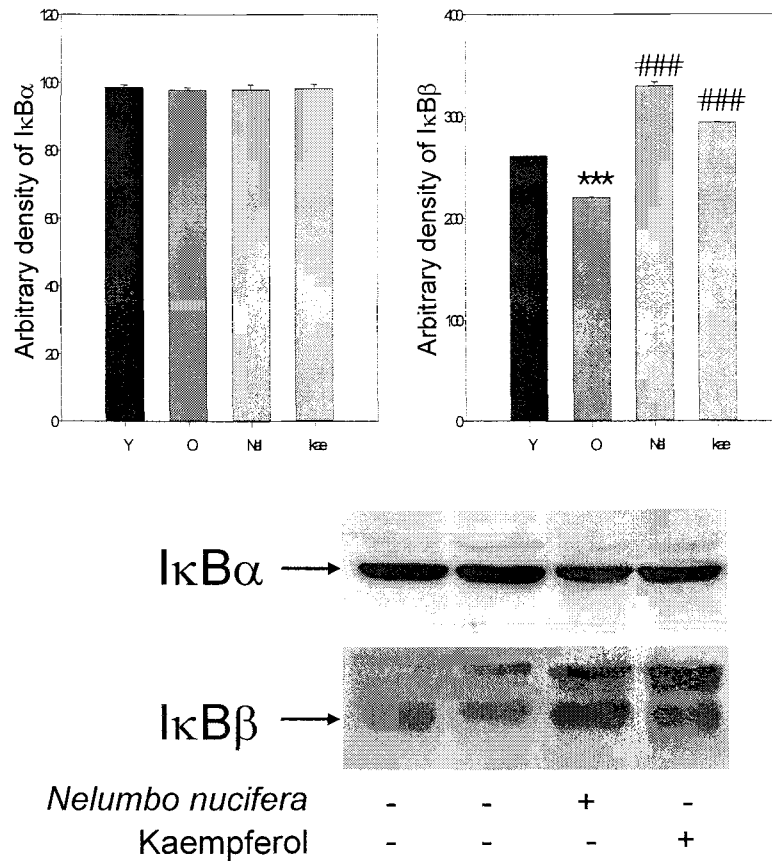


Fig. 10. Effects of extracts of *Nelumbo nucifera* and kaempferol on Iκ-B

이상의 결과를 종합하여 볼때 연수에서 유래한 kaempferol은 생체내의 ONOO를 효과적으로 저해함을 알 수가 있다

4절. 단삼과 그 유래 성분의 작용 기전

1. 단삼 분획의 ROS 및 ONOO⁻ 소거 활성과 동정

가. 단삼 분획의 ROS 와 ONOO⁻ 소거 활성과 활성분획으로부터 활성성분의 탐색

단삼의 메탄올 추출물 100 ug/ml의 A와 B분획의 ROS 제거 활성을 조사한 결과, A분획이 B분획보다 높은 ROS 제거 활성을 보였다. A분획을 다시 A-1, A-2, A-3분획으로 세분하여 ROS 제거 활성을 조사한 결과, A-2분획과 3분획에서 각각 65.5와 52.3의 제거 활성을 보였으며, 분획 A-2가 가장 높은 제거 활성이 있는 것으로 나타났다. 이것은 positive control인 56 %의 제거 활성을 가진 positive control인 trolox보다 높은 제거활성을 보였다 (Table 1).

Table 1. Effect of the fractions from *Salvia miltiorrhiza* on ROS scavenging activity (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Fraction	ROS scavenging activity (inhibition %)
MeOH	50.6 \pm 0.5
Fr. A	55.5 \pm 2.0
Fr. B	44.5 \pm 1.1
Fr. A-1	11.6 \pm 3.7
Fr. A-2	65.7 \pm 1.5
Fr. A-3	51.3 \pm 2.4
Trolox [*]	56.3 \pm 2.4

ROS scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DCFDA as described in Materials and Methods. Each value is mean \pm S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

따라서 분획 A에서 보여진 ROS 제거 활성은 대부분 A-2분획에 기인한 것으로 사료된다. Table 2에서 보는 것과 같이 10 ug/ml의 ONOO⁻에 대한 제거 활성 역시 A-2분획이 98.2 %의 강한 활성을 보여 주었으며, 이것은 96.5 %의 ONOO⁻에 대한 제거 활성을 가진 penicillamine보다 높았다. 이것은 단삼 성분이 crude extract로서 단일 positive control인 penicillamine보다 더욱 강한 활성을 나타낸 것으로 천연 당제로서 그 약효가 매우 강하다는 것을 시사한다.

Table 2. ONOO⁻ scavenging activity of the fractions from *Salvia miltiorrhiza* (10 µg/ml)

Fraction	ONOO scavenging activity (inhibition %)
MeOH	85.5 ± 0.38
Fr. A	86.7 ± 0.61
Fr. B	78.5 ± 0.53
Fr. A-1	43.4 ± 0.74
Fr. A-2	98.2 ± 0.06
Fr. A-3	98.4 ± 0.16
Penicillamine*	96.5 ± 0.11

ONOO scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DHR 123 as described in materials and methods. Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

본 연구에서, 이러한 crude extract중에 강한 활성을 나타내는 성분을 정확히 조사하기 위해 A-2분획의 성분을 분석한 결과 다섯 가지의 성분, lithospermate A, dimethyl lithospermate A, lithospermate B, Mg lithospermate B, NH₂/K lithospermate B를 얻었고 이것으로 ONOO 제거 활성을 측정하였다.

Table 3. Scavenging activity of authentic ONOO⁻ by the constituents (100 μM) from *Salvia miltiorrhiza*

Compounds	ONOO ⁻ scavenging activity (inhibition %)
Protocatechuic aldehyde	74.11±1.77
3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactamide	42.33±0.66
Rosmarinic acid	82.38±0.27
Lithospermate	73.21±0.61
Dimethyl lithospermate	88.78±0.55
Lithospermate B	84.44±0.14
Magnesium lithospermate B	82.84±0.19
NH ₂ /K lithospermate B	79.67±0.64
Tanshinone I	-
Tanshinone IIA	-
Cryptotanshinone	8.47±1.53
Penicillamine*	70.49±1.21

ONOO⁻ scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DHR 123 as described in Methods. Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control. -, no effect.

Table 3에서 보듯이 ONOO⁻ 제거 활성이 알려진 다른 성분 보다 A-2분획에서 얻은 성분들의 ONOO⁻ 제거 활성능이 강하게 나타났으며 그 중에 특히, dimethyl lithospermate A가 88.78 %의 제해로 가장 강한 활성을 보였다.

A-2분획의 다섯 가지 단삼 성분의 분자 구조는 그림 2와 같다. 특이하게, dimethyl lithospermate A는 다른 성분과는 달리 두 개의 메틸기(-CH₃)를 가지고 있었다.

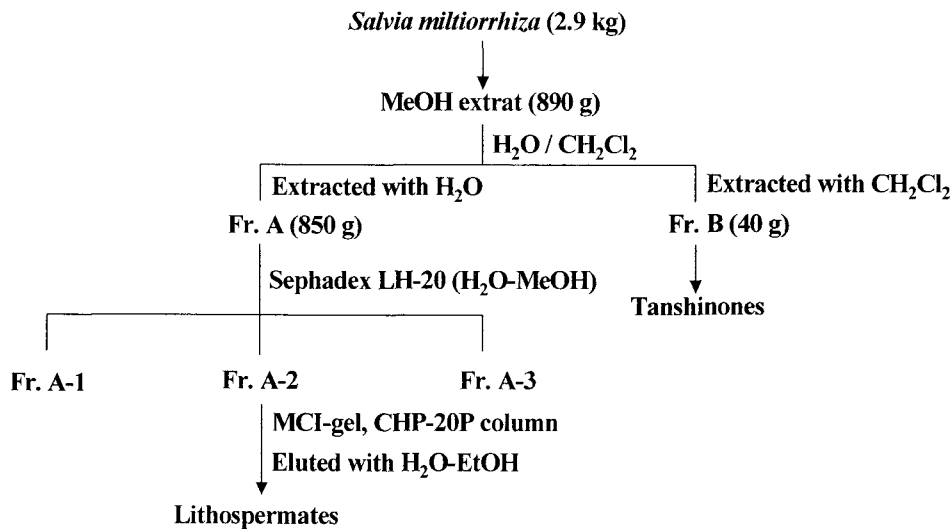


Fig. 1. Fractionation and isolation of *Salvia miltiorrhiza*.

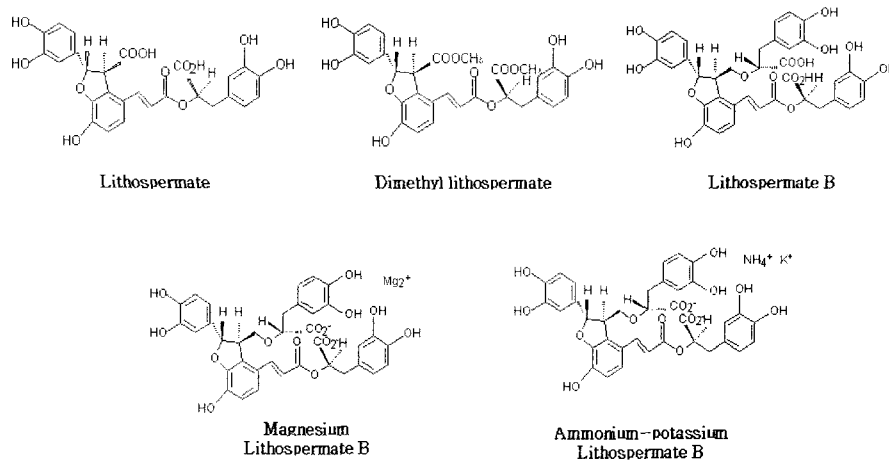


Fig. 2. Structures of the active ingredients of *Salvia miltiorrhiza*.

다섯가지의 단삼 성분의 ONOO 제거 활성에 대한 IC_{50} 농도를 검토한 결과, dimethyl lithospermate의 IC_{50} (50%의 저해 효과를 나타내는 농도)이 0.33 μ M으로 가장 강한 활성을 나타내었다. 이것은 ONOO 제거제로 잘 알려져 있는 penicillamine (IC_{50} =4.7 μ M) 보다 강한 활성을 나타내었다 (Table 4).

Table 4. IC₅₀ (μM) of lithospermates for scavenging activity of authentic ONOO⁻

Compounds	ONOO ⁻ scavenging (IC ₅₀ μM)
Lithospermate	1.81±0.19
Dimethyl lithospermate	0.33±0.08
Lithospermate B	0.73±0.17
Magnesium lithospermate B	0.60±0.21
NH ₂ /K lithospermate B	0.91±0.05
Penicillamine*	4.70±0.33

ONOO⁻ scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DHR 123 as described in Methods. Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

2. SIN-1에 의해 생성된 ROS/RNS 에 대한 단삼성분의 제거 활성

가. 단삼성분의 ONOO 제거 활성

SIN-1은 $\cdot O_2$ 와 NO를 생성하므로써, 결국 ONOO⁻의 축적을 가져오는데, 이러한 단삼 성분에 대한 SIN-1의 전구체에 의해 생성되는 ONOO⁻ 억제능을 검토한 결과, A-2분획의 다섯가지 성분들 모두 penicillamine(IC₅₀ = 1.96 μM) 보다 낮은 IC₅₀ 농도를 보여 주었으며, 특히, dimethyl lithospermate A는 가장 낮은 0.60 μM의 IC₅₀ 농도로 가장 강한 활성을 나타내었다 (Table 5).

Table 5. Scavenging activity of lithospermates on SIN-1 induced ONOO⁻

Compounds	ONOO ⁻ scavenging (IC ₅₀ μM)
Lithospermate	0.96 ± 0.01
Dimethyl lithospermate	0.60 ± 0.03
Lithospermate B	0.67 ± 0.02
Magnesium lithospermate B	0.98 ± 0.07
NH ₂ /K lithospermate B	0.63 ± 0.02
Penicillamine*	1.96 ± 0.20

ONOO⁻ scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DHR 123 as described in methods. Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

나. 단삼 성분의 $\cdot O_2^-$ 제거 활성

SIN-1에 의해 생성되는 전구체인 $\cdot O_2^-$ 제거능을 검토한 결과, lithospermate A, lithospermate B, Mg lithospermate B, NH₂/K lithospermate B의 IC₅₀은 각각 14.44, 17.01, 12.99, 22.32 uM로 기준 $\cdot O_2^-$ 제거제인 trolox보다 약하지만, 비교적 강한 제거활성을 나타내었으며, dimethyl lithospermate A은 IC₅₀가 0.82 uM로 역시 가장 강한 $\cdot O_2^-$ 제거 활성능을 가진 것으로 나타났다(Table 6).

Table 6. ROS scavenging activity in SIN-1-induced ROS system

Compounds	ROS scavenging (IC ₅₀ μM)
Lithospermate	14.44 ± 0.71
Dimethyl lithospermate	0.82 ± 0.02
Lithospermate B	17.01 ± 0.20
Magnesium lithospermate B	12.99 ± 0.16
NH ₂ /K lithospermate B	22.32 ± 3.53
Trolox*	10.02 ± 1.12

ROS scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DCFDA as described in methods. Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

이로써, 단삼성분이 ONOO 뿐만 아니라 $\cdot O_2^-$ 도 강력하게 제거함을 알 수 있었다.

다. 단삼 성분의 NO 제거 활성

SIN-1에 의해 생성되는 ONOO 의 또 다른 전구체인 NO 제거능을 검토한 결과, 다섯 가지 단삼 성분 모두 기준 NO의 제거제 carboxy-PTIO와 유사한 NO 제거능을 나타내었다(Table 7). 이런 결과로 볼 때 단삼성분은 ONOO 및 $\cdot O_2^-$ 뿐만 아니라 NO도 제거함으로써 ONOO 축적을 억제할 것으로 사료된다(Table 7).

Table 7. ·NO scavenging effect of lithospermates in SIN-1-induced ·NO system

Compounds	·NO scavenging (IC ₅₀ μM)
Lithospermate	6.67 ± 0.40
Dimethyl lithospermate	5.00 ± 0.38
Lithospermate B	4.16 ± 0.47
Magnesium lithospermate B	6.03 ± 0.23
NH ₂ /K lithospermate B	5.04 ± 0.17
Carboxy-PTIO*	6.97 ± 0.32

NO scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DAF-2.

Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

3. LPS 처리된 생쥐 신장 homogenate에서의 단삼 성분의 ONOO⁻ 소거 활성

가. 단삼 성분의 ONOO 소거 활성

마우스에 LPS를 처리하여 유도된 ONOO 생성을 억제하는 단삼성분의 활성에 대해 실험하였다. LPS는 대식세포를 활성화시켜 ·O₂ 와 ·NO이 결합하여 결국, ONOO를 생성하게 하는데, Table 8에서 보는 것과 같이 ONOO 소거에 대해 실험한 결과, dimethyl lithospermate가 9.22 μM의 IC₅₀으로 가장 강한 활성을 나타냈으며, 이것은 IC₅₀이 1.96 μM의 penicillamine과 유사한 활성을 가지는 것으로 나타났다. 이로써 SIN-1에 의해 생성 유도된 ONOO에 대한 소거능과 유사하게 LPS에 의해 유도된 ONOO에 대해서도 강한 소거활성을 나타냈다.

Table 8. ONOO⁻ scavenging activity of lithospermates in LPS-treated mouse kidney homogenate

Compounds	ONOO ⁻ scavenging (IC ₅₀ μM)
Lithospermate	19.22 ± 0.62
Dimethyl lithospermate	9.22 ± 0.57
Lithospermate B	17.39 ± 0.23
Magnesium lithospermate B	14.67 ± 0.68
NH ₂ /K lithospermate B	13.45 ± 0.30
Penicillamine*	9.29 ± 0.13

The mice were pretreated with intraperitoneal injection of 5 mg/kg and 24 hr later decapitated. The kidney was isolated and homogenized with phosphate buffer. The homogenate was incubated without or with active components. ONOO⁻ scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DHR 123. Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

나. 단삼 성분의 총 ROS($\cdot O_2$, H_2O_2 , $\cdot OH$) 소거 활성

LPS 처리된 마우스의 신장 homogenate를 사용하여 총 ROS의 소거능을 조사하였다. LPS를 처리하면, 대식세포가 활성화되고, 따라서 NADPHox, COX, XOD와 같은 효소로 하여금 $\cdot O_2$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 과 같은 ROS 생성을 유도하게 된다. Table 9에서는 homogenate에 단삼 추출물을 처리한 후 30분간 총활성산소 소거능을 검토한 결과, 총 ROS 또한 trolox와 유사한 IC₅₀ 농도를 나타내었으며, dimethyl lithospermate가 가장 큰 소거 활성을 보였다. 그래서 dimethyl lithospermate의 *in vivo*에서의 ROS 및 ROS 소거 활성을 검토하고자 하였다.

Table 9. ROS scavenging activity of lithospermates in LPS-treated mouse kidney homogenate

Compounds	ROS scavenging (IC ₅₀ , μM)
Lithospermate	4.10±0.47
Dimethyl lithospermate	0.56±0.11
Lithospermate B	3.75±0.40
Magnesium lithospermate B	3.60±0.27
NH ₂ /K lithospermate B	5.41±0.70
Trolox*	2.49±0.21

The mice were pretreated with intraperitoneal injection of 5 mg/kg and 24 hr later decapitated. The kidney was isolated and homogenized with phosphate buffer. The homogenate was incubated without or with active components. ROS scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DCFDA. Each value is the mean ± S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

다. 단삼 성분의 ·NO 소거 활성

Table 10에서와 같이 LPS 처리에 의해 생성된 ·NO에 대한 소거능을 조사한 결과, 다섯 가지의 단삼성분들 모두 carboxy-PTIO와 유사한 소거활성을 보여 주었다. LPS 처리에 의해 대식세포에서 NOS에 의해 ·NO가 발생되는데, 이러한 ·NO에 대해서도 dimethyl lithospermate가 IC₅₀ = 3.99 μM로 가장 강한 활성을 나타냈으며, 이것은 carboxy-PTIO(IC₅₀ = 6.74 μM) 보다 두 배 이상의 강한 활성을 보여주는 것이다.

Table 10. \cdot NO scavenging activity of lithospermates in LPS-treated mouse kidney homogenate

Compounds	\cdot NO scavenging (IC ₅₀ μ M)
Lithospermate	6.92 \pm 0.24
Dimethyl lithospermate	3.99 \pm 0.36
Lithospermate B	6.92 \pm 0.24
Magnesium lithospermate B	6.33 \pm 0.14
NH ₂ /K lithospermate B	5.69 \pm 0.39
Carboxy-PTIO*	6.74 \pm 0.07

The mice were pretreated with intraperitoneal injection of 5 mg/kg and 24 hr later decapitated. The kidney was isolated and homogenized with phosphate buffer. The homogenate was incubated without or with active components. \cdot NO scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DAF-2. Each value is the mean \pm S.E. of triplicate measurements.

* Used as a positive control.

4. *In vitro* 및 *in vivo*에서 단삼 성분의 ROS/RNS 소거 활성

가. 배양 YPEN 혈관 내피세포에서 cell viability에 대한 dimethyl lithospermate의 효과

본 연구의 결과에서 보여준 다섯 가지 단삼의 활성성분 중 가장 활성이 강한 dimethyl lithospermate를 각각 2.5, 5, 10 μ M을 처리하여 YPEN 세포의 cell viability를 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 SIN-1 600 μ M을 세포에 처리하였을 때 SIN-1에 의해 생성이 유도된 ONOO⁻에 의해 세포가 control의 75 %까지 cell viability가 억제되고, dimethyl lithospermate을 함께 처리한 세포에서는 cell viability가 회복되는 경향을 보였다. 이로써 SIN-1에 의해 억제되었던 cell viability가 dimethyl lithospermate에 의해 증가되었으며, 이것은 SIN-1에 의해 생성된 ONOO⁻가 dimethyl lithospermate에 의해 소거 됨으로써 cell viability가 회복된 것으로 생각되어진다.

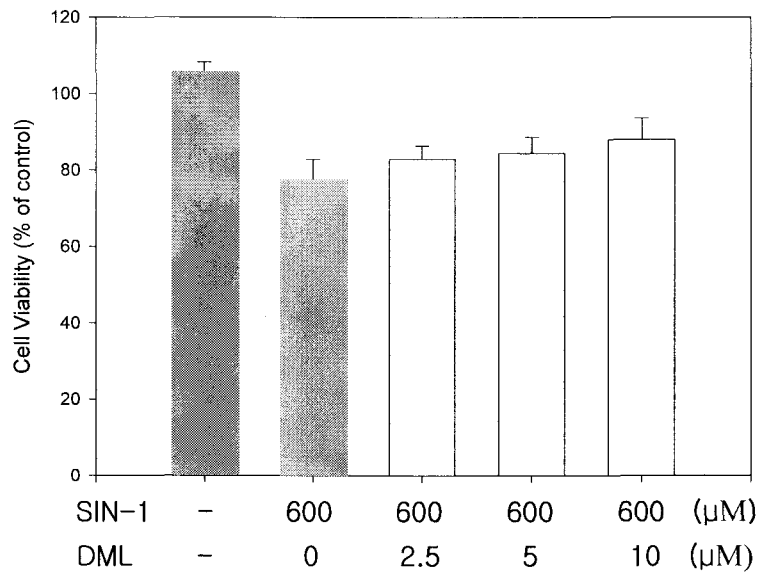


Fig. 3. Effect of dimethyl lithospermate on cell viability in ONOO⁻-induced YPEN endothelial cell by SIN-1.

The cells were pretreated with various concentration of dimethyl lithospermate for 3hr and then treated with or without SIN-1 (600 μM) for 24 hr. The MTT assay was done as described in Methods. Data are mean ± S.D. of triplicate measurements.

나. AAPH에 의해 유도된 배양 사람의 피부 섬유아세포의 ROS생성에 대한 dimethyl lithospermate의 효과

AAPH 500μM로 ROS 생성을 유도한 사람의 피부 섬유아세포에 dimethyl lithospermate를 처리하여 ROS생성이 억제되는가를 DCFDA 형광 probe를 사용하여 형광 현미경으로 분석하였다. Fig. 4에서 보듯이 untreated control에 비해 AAPH 각각 500 μM, 1 mM 처리 한 것은 ROS 생성이 현저히 증가하였으며, 각각 dimethyl lithospermate 1, 2, 4 μM 처리한 것은 ROS 생성이 심하게 감소되었고, dimethyl lithospermate 4 μM은 control과 유사하게 ROS생성이 억제되었다(Fig. 4).

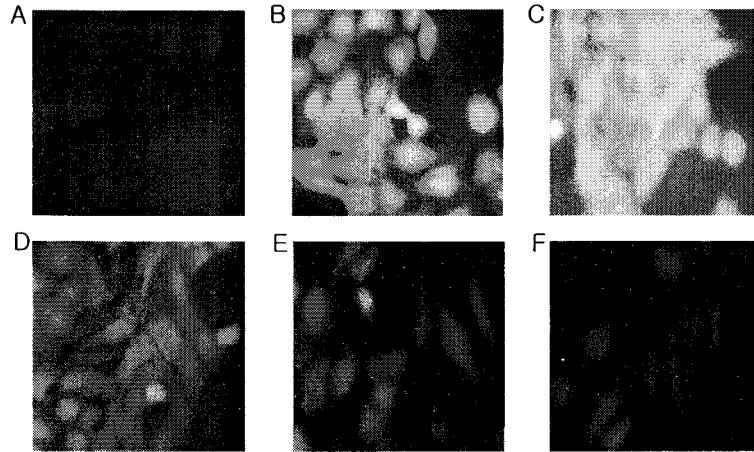


Fig. 4. Microscopic observation of DCF fluorescence in dimethyl lithospermate(DML)-treated YPEN endothelial cell.

Cells were incubated in serum free medium with or without DML for 8 hr, followed by DCFH-DA. A, untreated control ; B, AAPH 500 μ M ; C, AAPH 1mM ; D, AAPH 500 μ M + DML 1 μ M; E, AAPH 500 μ M + DML 2 μ M; F, AAPH 500 μ M + DML 4 μ M.

다. LPS처리 생쥐의 ROS와 질소 level에 dimethyl lithospermate가 미치는 영향

5 mg/kg의 LPS를 생쥐에 처리하여 LPS를 처리하여 $\cdot O_2$ 생성계를 활성화시킨 후 유도된 ROS와 ONOO에 대한 dimethyl lithospermate의 영향을 조사하였다. LPS에 의해 ONOO의 생성이 증가하였지만, dimethyl lithospermate 각각 1, 2, 4 mg/kg의 처리에 의해 ONOO의 생성이 control level로 감소하였다(Fig. 5). 또한, ROS 생성도 LPS에 의해 증가되지만 dimethyl lithospermate처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였고 LPS 처리군과 비교하여 유의성 있는 차이를 보였다. 특히, dimethyl lithospermate 2, 4 mg/kg을 처리하였을 때 control level 이하로 유의성 있게 ROS 생성이 억제되었다(Fig. 5).

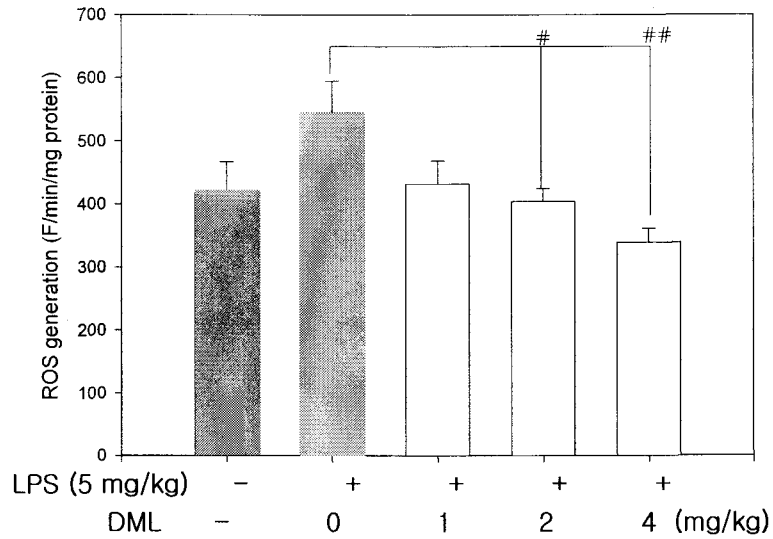


Fig. 5. Inhibitory effect of dimethyl lithospermate on ROS generation in LPS-treated mice.

The mice were treated with LPS and then 1 hr later followed by intraperitoneal treatment with dimethyl lithospermate(DML). ROS generation were determined by fluorometric assay with DCFDA as described in materials and methods. LPS, Lipopolysaccharide ; DML, dimethyl lithospermate ; ROS, reactive Oxygen species. Each value is the mean \pm S.E. of six mice. Statistical significance : #p<0.05, ##p<0.01 vs. LPS-only-treated group.

라. LPS 처리 생쥐의 혈중 질소 농도에 dimethyl lithospermate이 미치는 영향

LPS 처리에 의해 유도된 혈중에 유도된 NO₂/NO₃ level에 dimethyl lithospermate의 영향을 조사하였다. LPS 처리에 의해 혈중 NO₂/NO₃ 농도가 현저하게 증가하였으며, 단삼 2 mg/kg 처리에 의해 혈중 NO₂/NO₃ 농도가 현저하게 감소되었고, 이것은 유의성 있는 차이를 나타냈다(Fig. 6).

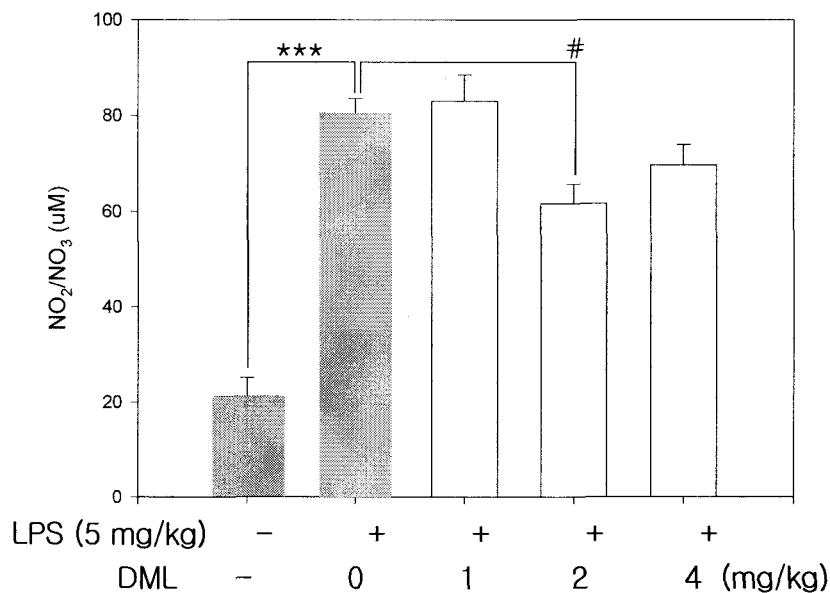


Fig. 6. Inhibitory effect of dimethyl lithospermate on serum NO₂/NO₃ levels in LPS-treated mice.

The mice were treated with LPS and 1hr later followed by intraperitoneal treatment with dimethyl lithospermate. NO₂/NO₃ level was determined by Griess reaction as described in methods. LPS, lipopolysaccharide ; DML, dimethyl lithospermate ; Each value is the mean ± S.E. of six mice. Statistical significance : p<0.001 vs. LPS-untreated group and #p<0.05 vs. LPS-only-treated group.

5. 노화 흰쥐에서의 dimethyl lithospermate의 ROS/RNS 소거 활성

가. 노화 흰쥐에서의 dimethyl lithospermate의 ONOO 소거 활성

노화된 흰쥐에서의 dimethyl lithospermate의 ONOO 소거 활성을 조사하기 위해 6개월령 된 흰쥐와 20개월령 된 흰쥐에 dimethyl lithospermate을 복강주사하여 ONOO 소거 활성을 조사하였다. 6개월 된 흰쥐에 비해 20개월 된 노화 흰쥐에서 ONOO 생성이 유의성 있게 증가되었으며, 노화 흰쥐에 dimethyl lithospermate 5, 10 mg/kg을 주사한 경우 농도 의존적으로 ONOO 생성이 감소되었다. Dimethyl lithospermate 10mg/kg을 주사 한 흰쥐의 경우 ONOO level이 6개월 된 흰쥐의 level 까지 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7).

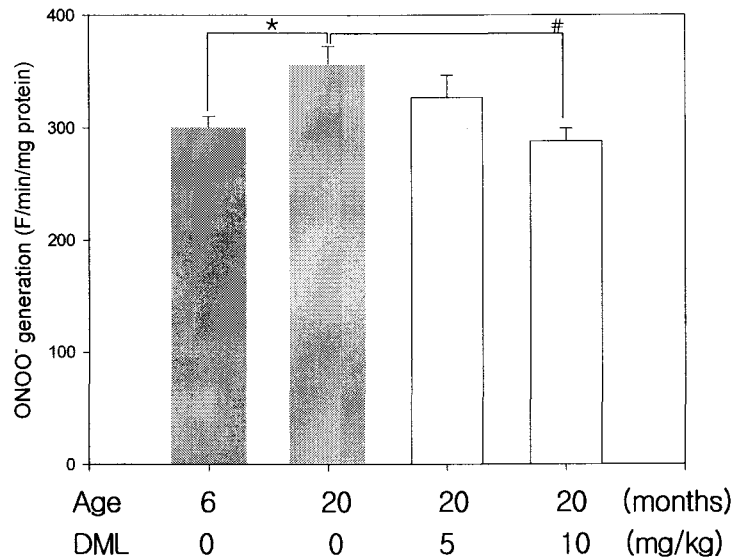


Fig. 7. Inhibitory effect of dimethyl lithospermate on ONOO⁻ generation in aged SD rats.

The rats were treated with dimethyl lithospermate and 8 hr later decapitated. The kidney was isolated, homogenized, and analyzed. The levels of ONOO⁻ were determined by DHR 123 as described in Methods. Each value is the mean \pm S.E. of six rats. Statistical significance : * $p < 0.05$, vs. 6-month-old rats and # $p < 0.05$ vs. untreated group of 24-month-old rats.

나. 노화 흰쥐에서의 dimethyl lithospermate의 NO₂/NO₃ level에 대한 작용

노화된 흰쥐에서의 dimethyl lithospermate의 NO₂/NO₃ level에 대한 작용을 조사한 결과, 6개월 (young) 된 흰쥐에 비해 20개월 (old)된 흰쥐의 NO₂/NO₃ level이 현저하게 증가되어 있었고, dimethyl lithospermate에 의해 역시, 농도 의존적으로 NO₂/NO₃ level이 감소되었다. Dimethyl lithospermate 10mg/kg을 주사 한 흰쥐의 경우 NO₂/NO₃ level이 6개월 된 흰쥐의 level 까지 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 8).

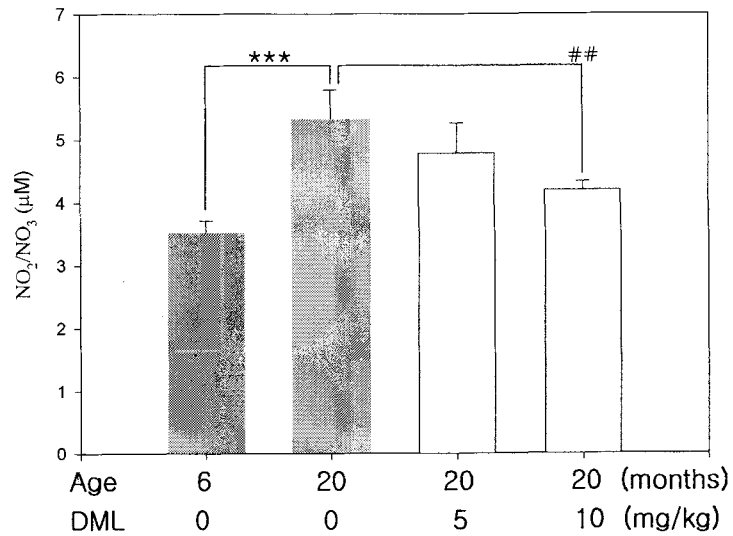


Fig. 8. Inhibitory effect of dimethyl lithospermate on serum NO₂/NO₃ levels in aged SD rats.

The rats were treated with dimethyl lithospermate and 8 hr later decapitated. The kidney was isolated, homogenized, and analyzed. The levels of NO₂/NO₃ were determined by Griess reaction as described in methods. Each value is the mean ± S.E. of six rats. Statistical significance : ***p<0.001 vs. 6-month-old rats and ##p<0.01 vs. untreated group of 24-month-old rats.

다. 노화 흰쥐에서의 dimethyl lithospermate의 ROS 소거 작용

노화된 흰쥐에서, ROS의 level이 6개월 흰쥐보다 현저하게 증가 되어있었다. Dimethyl lithospermate 5, 10 mg/kg을 주사한 경우 농도 의존적으로 ROS level이 억제되었으며, 각각 6개월 흰쥐의 ROS level 만큼 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 9). 본 연구의 결과로, 단삼의 성분인 dimethyl lithospermate에 노화과정에서 생성 증가되는 활성질소종 뿐만 아니라 활성산소종을 소거하는 작용이 있을 것으로 사료된다.

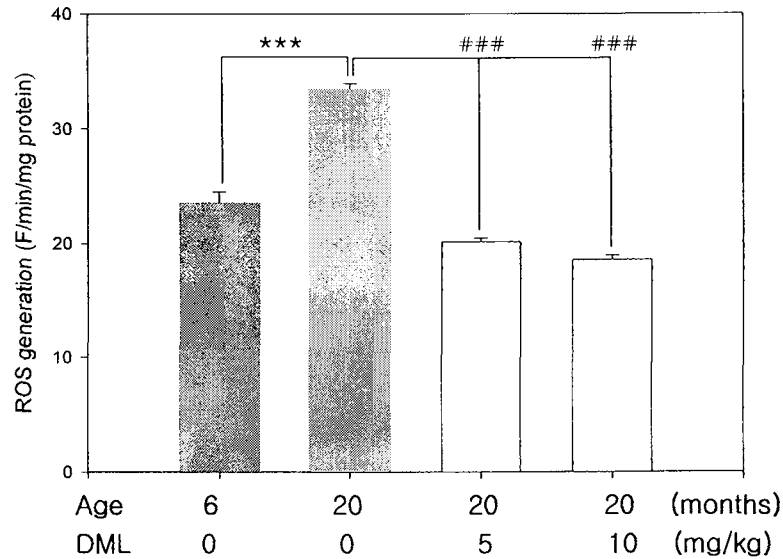


Fig. 9. Inhibitory effect of dimethyl lithospermate on ROS generation in aged SD rats.

The rats were treated with dimethyl lithospermate and 8 hr later decapitated. The kidney was isolated, homogenized, and analyzed. The levels of ROS were determined by fluorometric assay with DCFDA as described in materials and methods. DML, dimethyl lithospermate; ROS, reactive oxygen species. Each value is the mean \pm S.E. of six rats. Statistical significance : *** $p < 0.001$ vs. 6-month-old rats and ### $p < 0.001$ vs. untreated group of 24-month-old rats.

6. Dimethyl lithospermate의 ROS/RNS 소거 활성 기전

가. Dimethyl lithospermate의 ONOO 소거기전

단삼성분들이 어떠한 기전으로 ONOO 를 소거하는가에 대해 검토하였다. Tyrosine 은 ONOO 와 반응하며 430nm에서 최대 흡광을 가지는 3-nitrotyrosine(Fig. 10)을 생성한다. 단삼성분들과 ONOO 이 반응하여 단삼성분들이 nitration되어 nitro화물이 생성되는가를 검토한 결과, 430 nm에서 흡광도를 가지지 않으므로 (Fig. 10C, 10D, 10F) 단삼성분이 nitration 되지 않고, electron donation에 의해 ONOO 소거할 가능성이 시사되었다. 그리고 Fig. 10A에서 보듯이 tyrosine 없이 ONOO 만 존재할 경우 430 nm에서 peak가 없으나, 거기에 tyrosine 첨가할 경우 430 nm에서 peak가 나타나 나(Fig. 10B), Fig. 10D, 10E, 10F에서 보듯이 단삼성분을 각각 5, 10, 20 μ M 첨가할 경우 농도 의존적으로 3-nitrotyrosine의 peak가 사라짐을 알 수 있다. 이것은 단삼성분이 매우 효과적으로 tyrosine의 nitration을 억제함을 알 수 있고, 이것은 electron donation에 의해 소거함을 의미한다.

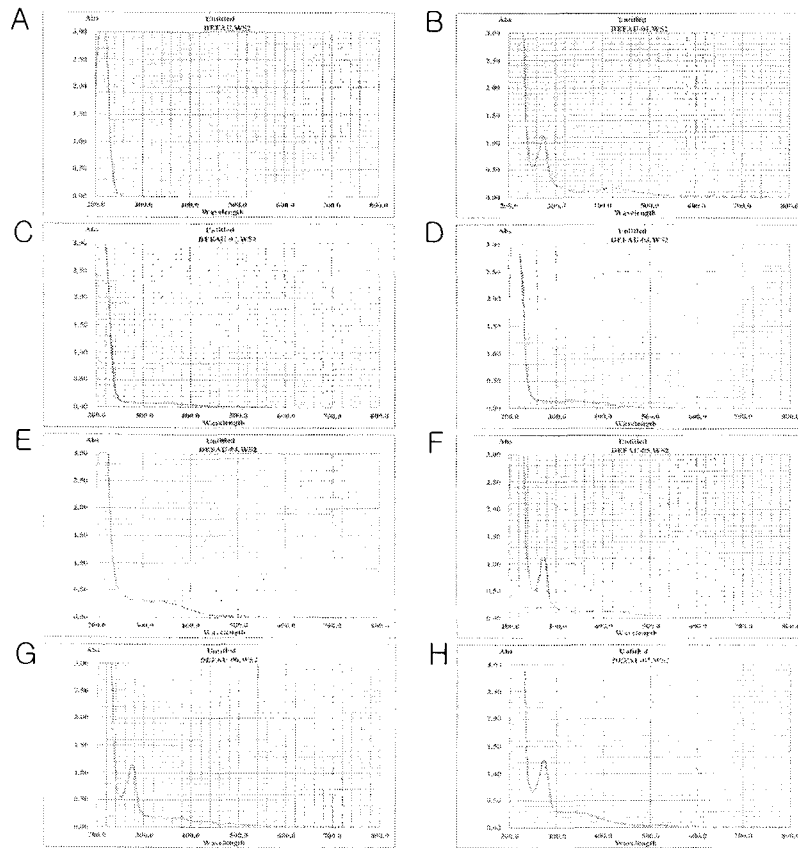


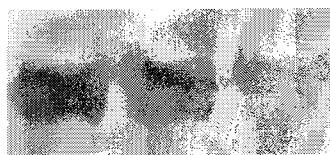
Fig. 10. Inhibitory effect of dimethyl lithospermate on the nitration of tyrosine by ONOO .

A, ONOO (40 μ M); B, tyrosine (40 μ M); C, dimethyl lithospermate (DML) 5 μ M with ONOO ; D, DML 10 μ M with ONOO ; E, DML 20 μ M with ONOO ; F, tyrosine, DML 5 μ M with ONOO ; D, tyrosine, DML 10 μ M with ONOO ; E, tyrosine, DML 20 μ M with ONOO ; Each mixed solution was incubated at 37 $^{\circ}$ C with shaking for 1 hr and scanned between 190 and 600 nm with spectrophotometric analysis. The spectrum of the peak displayed at 430 nm reflects the formation of 3-nitrotyrosine.

나. Dimethyl lithospermate의 albumin nitration 저해 효과

Albumin의 tyrosine이 ONOO 에 의해 nitration 되는 정도에 단삼 성분이 미치는 영향을 anti-nitrotyrosine 항체로 검토했었다. 그 결과, 단삼 성분은 albumin의 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 현저히 저해함을 알 수 있었다. 이것은 단삼 성분이 ONOO 를 electron donation에 의해 효과적으로 ONOO 를 소거함으로써 albumin의 nitration을 저해한 것으로 사료된다(Fig. 11).

DML (μM)	0	5	10
ONOO ⁻ (μM)	100	100	100



DML (μM)	0	5	10
ONOO ⁻ (μM)	100	100	100

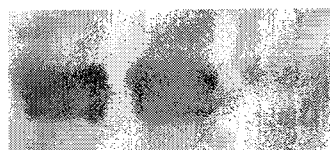
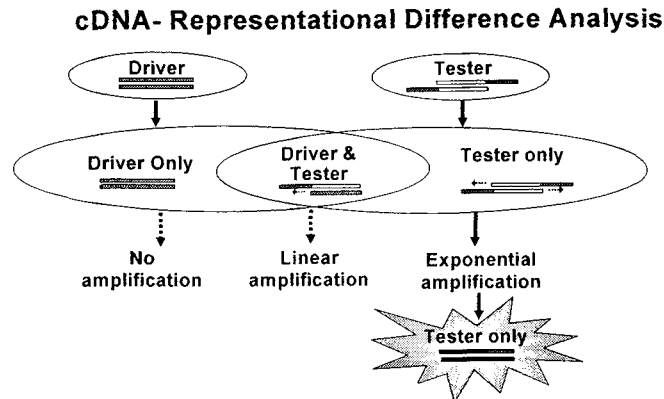


Fig. 11. Effect of dimethyl lithospermate on albumin nitration by ONOO .

Dimethyl lithospermate was added to bovine serum albumin. The reaction samples were incubated with shaking at 25 °C for 1 hr. After ONOO was added, all samples were further incubated with shaking at 25 °C for 30 min. DML, dimethyl lithospermate.

5절. 새로운 노화지표인자 발굴

- 새로운 노화지표를 Scheme 1과 같이 subtractive library 중에서 young 조직의 clone을 제거하고 실제로 old 조직에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 효과적으로 검출하는 RDA 기법으로 18종 발굴하였다(Table 1).



또한 Scheme 2와 같이 young과 old 조직에서 RNA를 추출하여 microarray 분석 방법으로 22종의 유전자를 발굴하였다 (Table 2).

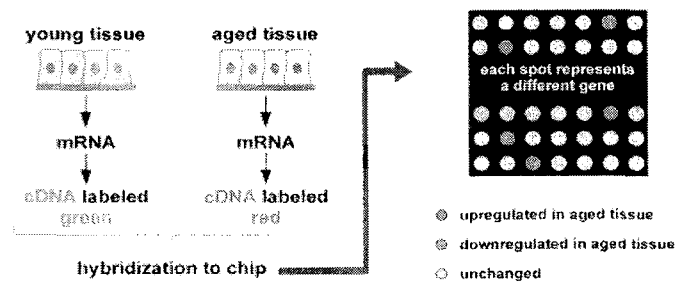


Table 1. Genes up-regulated with aging in rat kidney by cDNA-RDA

Clone No.	Gene name	Accession No.	Function
1	Rattus norvegicus cyclophilin B (Ppib), mRNA	NM_022536	Proinflammatory factor
2	Rattus norvegicus xanthine dehydrogenase (Xdh), mRNA	NM_017154	Oxidative stress response
3	Rattus norvegicus Ferritin subunit H (Fth1), mRNA	NM_012848	Oxidative stress response
4	GATA transcription factor	D13518	Inflammation
5	Fructose 1,6-bisphosphatase	M86240	Gluconeogenesis
6	Rat receptor for advanced glycosylation end products (RAGE)	L33413	Amplification of inflammation
7	Rattus norvegicus gamma-glutamyl transpeptidase	M33821	Oxidative stress/redox
8	Rattus norvegicus Ste-20 related kinase SPAK mRNA	NM_019362	Serine/threonine kinase activity
9	TGF1-beta	NM_021578	Inflammation
10	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene	NM_017081	Interconvert active glucocorticoids
11	Endothelin-1	NM_012548	Inflammation
12	pro-alpha2(I)collagen (COL-I)	AF004877	Inflammation/ extracellular matrix
13	Fas-associated factor	NM_130406	Apoptosis
14	Rattus norvegicus ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide (Atp1a1)	NM_012504	Cation transporter
15	Rattus norvegicus Urinary plasminogen activator, urokinase (Plau), mRNA	NM_013085	Tissue degradation & cell migration
16	Tamm-Horsfall protein (Urmodulin)	NM_017082	Activation of cytokine expression
17	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit (EC 1.6.5.3)	NM_022536	Mitochondrial OXPHOS
18	Rat heat shock 70 kD protein 8 (Hspa8)	NM_031165	Chaperone

Table 2. Aging-related up-regulated in rat kidney using microarray

Encoded protein	Δ Age (fold)	Function
Superoxide dimutase 3 (Cu,Zn-SOD)	↑ 6.12	Stress response
Cytochrome P-450 isozyme 5 (P450 IVB)	↑ 3.25	Stress response
Cathepsin S	↑ 3.11	Stress response
Cathepsin E	↑ 2.75	Stress response
Testosterone-repressed prostate message 2 (Clusterin)	↑ 2.87	Stress response
UDP-glucuronosyltransferase 1 family	↑ 2.32	Stress response
Stress-inducible chaperon (GrpE-like 1)	↑ 2.11	Stress response
Selenoprotein W	↑ 2.26	Stress response
Calpain small unit	↑ 2.45	Stress response
Low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	↑ 2.40	Stress response
Pancreatic secretory trypsin inhibitor type II	↑ 2.51	Stress response
Cystatin C	↑ 2.89	Stress response
VHL protein mRNA	↑ 2.04	Stress response
Pancreatic secretory trypsin inhibitor type II (PSTI-II)	↑ 2.10	Inflammatory response
IgG-2b gene	↑ 2.20	Inflammatory response
Antigen CD37	↑ 2.01	Inflammatory response
Leukocyte common antigen	↑ 2.36	Inflammatory response
Ly6-C antigen	↑ 2.10	Inflammatory response
CD81 antigen	↑ 2.00	Inflammatory response
Toll protein mRNA (TLR4)	↑ 2.04	Inflammatory response
Complement factor 1	↑ 3.07	Inflammatory response
Platelet-derived growth factor receptor	↑ 2.17	Inflammatory response

그리고 young과 old 조직에서 단백질을 분리한 후, 2D/MALDI-TOF Mass로 새로운 노화지표 15종을 발굴하였다 (Table 3).

Table 3. List of the identified peptides by peptide mass fingerprinting

LCY Spot	LCO Spot	Gene name	SwissProt AccNo.	Species	pI	MW (kDa)
23	23	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE	P11598	RAT	5.88	56623.7
24	24	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE	P11598	RAT	5.88	56623.7
29	29	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE	P04785	RAT	4.82	56951.6
42	42	ATP SYNTHASE BETA CHAIN,	P10719	MOUSE	5.18	56353.8
56	56	ACTIN	P10365	THELA	5.44	45.6
79	79	PROHIBITIN	P24142	MOUSE	5.57	29804.2
101	101	ATP SYNTHASE D CHAIN,	P31399	RAT	6.21	18632.3
2	2	Serum albumin precursor	P02770	RAT	6.09	68719.2
8	8	Fibrinogen beta chain precursor	P14480	RAT	7.89	54303.6
19	19	Alpha enolase	P17182	MOUSE	6.37	47141.1
43	43	FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE	P19112	RAT	5.54	39609.6
131	131	Cathepsin B precursor	P00787	RAT	5.36	37470.2
138	138	Antioxidant protein 2	O35244	RAT	5.64	24818.7
174	174	Ferritin heavy chain	P19132	RAT	5.86	21126.8
189	189	Tubulin alpha-6 chain	P05216	MOUSE	4.96	49909.6
200	200	Peroxiredoxin 2	P35704	RAT	5.34	21783.8
201	201	Major urinary protein precursor	P02761	RAT	5.85	20737

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	달 성 도(%)	내 용
활성자생식물 탐색	100	활성식물 20종이상 발굴
활성성분 탐색	100	활성물질 10종이상 발굴
새로운 노화지표인자 발굴	100	노화지표 2종이상 발굴
특허 및 논문실적	100	<ul style="list-style-type: none"> · 특허 7건 출원 · SCI등재논문 7편 · SCI비등재논문 7편 · SCI등재논문에 투고중 : 11편

2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
활성 자생식물의 탐색	20종이상 발굴하였음
활성물질 탐색	10종 이상 발굴하였음
새로운 노화지표인자 발굴	2종이상 발굴하였음
특허 및 논문 실적	<ul style="list-style-type: none"> · 특허 7건 출원 · SCI등재논문에 7편 발표하였음

제 5 장 연구 개발 결과의 활용계획

- 제 1단계에서 도출된 항노화 활성 물질에 대해 총 7건의 특허를 출원하고, 이 들 중 특히 “연수 유래 캄페롤 및 그 유도체를 유효 성분으로 하는 효소 보호 제 및 항노화제”는 참여 기업 샘타코 바이오 코리아에 기술 이전하여 식품의약 개발케 한다.
- 제 1단계에서 탐색한 항노화 활성 물질 중 특히 캄페롤은 안전성 및 효능 평가를 거쳐 노화 조절 신약 개발에 활용한다.
- 항노화 활성 물질이 함유된 자생 식물들을 식품 의약으로 개발하여 국민 보건 향상과 고부가가치 수출 전력 상품으로 개발한다.
- 새로운 노화 지표들은 노화 진단 기술 및 노인병 조기 진단에 활용하고, 노화 기전 규명 및 노화 조절 기법 발굴에 활용한다.
- 연수의 항노화 식품의약 개발로 연수의 대량 생산을 유도함으로써 농민의 소득 증대에 기여한다.

제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

1. 식이제한은 프리라디칼과 지질산화를 감소시킨다.: 생명연장을 위한 가능한 메카니즘
- J Nutr Sci Vitaminol. 2002. Aug.; 48(4): 257-64
2. 노화방지 약은 있는가?
- J Gerontol A Bio Sci Med Sci. 2003. Jun; 58(6): 483
3. 노화방지 약: 장, 단점
- J Gerontol A Bio Sci med Sci. 2002. Oct; 57(10): m636-9
4. 노화에 있어서의 보호와 대체의약
- Urologe A. 2002. Jul; 41(4): 318-24.
5. 노화방지연구 그리고 일반인들과의 대화의 필요성
- Science. 2003. Feb 28; 299(5611): 1323
6. 노화와 노화관련 질병에서의 약리학적 상호간섭
- Ann N Y Acad Sci. 2002 Apr; 959: 295-307
7. 노화에 있어 천연약물을 이용한 건강 향상과 질병예방
- J Aging Health. 2002. Feb; 14(1): 57-78
8. 성장도 포유동물에 있어 부정적인 충격을 가한다.
- Evol Dev. 2002. Jun-Feb; 4(11): 55-61
9. 쥐 liver cells의 autophagic 단백질 분해에서의 노화 관련된 변화: 식이제한의 노화방지 효과
- J Gerontol A Biol Sci med Sci. 2001. Sep; 56(9): B375-83
10. 생명연장 관련 genes: 노화와 수명에 성장 호르몬과 성장의 상관관계
- J. Gentol A Biol Sci. med Sci. 2001. Aug; 56(80): B340-9.

제 7 장 참고문헌

- Agrawal, P. K., *Carbon 13-NMR of flavonoids. Amsterdam, The Netherlands, 283-364, 1989.*
- Agrawal, P. K., NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochem.*, 31, 3307-3330, 1992.
- Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C., Conti, C. and Stein, M. L., Plant metabolites. structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*, *J. Nat. Prod.*, 52, 679-685, 1989.
- Arora, A., Nair, M. G. and Strasburg, G. M., Antioxidant activities of Isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system, *Arch. Biochem. Biophys.*, 356(2), 133-141, 1998.
- Arora, A., Valcic, S., Cornejo, S., Nair, M. G., Timmermann, B. N. and Liebler, D., Reactions of genistein with alkylperoxy radicals, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 638-645, 2000.
- Beckman, J. S. and Koppenol, W. H., Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 271, C1424-C1437, 1996.
- Beninger, C. W., Hosfield, G. L. and Nair, M. G., Flavonol glycosides from the seed coat of a new manteca (*Phaseolus vulgaris* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2906-2910, 1998.
- Blois, M. S., Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1202, 1958.
- Bondet, V., Brand Williams, W. and Berset, C., Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH- free radical method, *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 30, 609-615, 1997.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Stettmaier, K., Antioxidant effects of flavonoids, *Biofactor*, 6, 399-402, 1997.
- Burda, S., Oleszek, W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779, 2001.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R. L., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 749-760, 1997.
- Castro, V. H., Ramirez, E., Mora, G. A., Iwase, Y., Nagao, T., Okabe, H., Matsunaga, H., Katano, M and Mori, M., Structures and antiproliferative activity of saponins from *Sechium pittieri* and *S. talamancense*, *Chem. Pharm. Bull.*, 45(2) 349-358, 1997.
- Chamsuksai, P., Choi, J. S., and Woo, W. S., 3',4',7-Trihydroxyflavone in

- Albizzia julibrissin*. *Arch. Pharm. Res.*, 4, 129-131, 1981.
- Choi, J. S., Yokozawa, T. and Oura, H., Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin diabeti methanlic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin, *Plant Med.*, 57(3), 208-211, 1991b.
- Choi, J. W., Yoon, B-. J., Huh, K., Park, K-. Y., Lee, K-. T., and Park, H-. J., Anti-rheumatoidal effect of sulfuretin isolated from the heartwood of *Rhus veniciflua* in rats and mice. *Nutraceuticals and Food*, 7, 347-352, 2002.
- Chung, H. Y., Choi, H. R., Park, H. J., Choi, J. S. and Choi, W. C., Peroxynitrite scavenging and cytoprotective activity of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether from the marine alge *Symphyclocladia laticula*, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3614-3621, 2001.
- Chusheng, H.; Zhuangxin, Z.; Gansun, L.; Jun, Z. Isolation and identification of two new triterpenes from *Actinidia eriantha*. *Acta Botanica Yunnanica*, 10, 93-100, 1998.
- Cuvelier, M. E., Richard, H. and Berset, C., Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure activity relationship, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(2), 324-325, 1992.
- De Almeida, A. P., Miranda, M. M. F. S., Simoni, I. C., Wigg, M. D., Lagrota, M. H. C. and Costa, S. S., Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea Americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytother. Res.*, 12, 562-567, 1998.
- Dietz, H. and Winterhalter, P., Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. *Phytochemistry*, 42, 1005-1010, 1996.
- Doddrell, D. M., Khong, P. W. and Lewis, K. G., The stereochemical dependence of ¹³C chemical shifts in olean-enes and urs-12-enes as an aid to structural assignment, *Tetrahedron Lett.*, 27, 2381-2384, 1974.
- El Lahlou, H., Hirai, N., Tsuda, M. and Ohigashi, H., Triterpene phytoalexins from nectarine fruits, *Phytochem.*, 52, 623-629, 1999.
- Farag, S. F., EI-Emary, N. A., Makboul, M. A., Hasanean, H. A., and Niwa, M., Phytochemical investigation of *Wedelia prostrata* Hook et ARN. (HEMSL.) ; II-The ethyl acetate soluble fraction of the methanol extract. *Bull. Pharm. Sci.*, 20, 37-46, 1997.
- Farkas, L., Nógrádi, M., Antus, S., and Gottsegen,Á., About the existence of padmakastein and padmakastin, *Tetrahedron.*, 25, 1013-1019, 1969.
- Foley, S., Naveratnam, S., McGarvey, D. J., Land, E. J., Truscott, T. G. and Rice Evans, C. A., Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1202-1208, 1999.
- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. and Rubero, G., Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure activity

- relationship, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 497-501, 1996.
- Geibel, M., Feucht, W., Flavonoid 5 glucosides from *Prunus cerasus* bark and their characteristic weak glucosidic bonding, *Phytochem.*, 30, 1519-1521, 1991.
- Geibel, M., Geiger, H., and Treuter, D., Tectochrysn 5 and genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*, *Phytochem.*, 29, 1351-1353, 1990.
- Geibel, M., Sensitivity of the fungus *Cytospora prsonii* to the flavonoids of *Prunus cerasus*, *Phytochem.*, 38, 599-601, 1995.
- Guang-Yi, L.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. Pentacyclic triterpenes from the fruits of *Rosa sterilis*, *J. Nat. Prod.* 52, 162-166, 1989.
- Haenen, G. R. M. M., Paquay, J. B. G., Korthouwer, R. E. M. and Bast, A., Peroxynitrite scavenging by flavonoid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 590-593, 1997.
- Hamburger, M., Riese, U., Graf, H., Melzig, M. F., Ciesielski, S., Baumann, D., Dittmann, K. and Wegner, C., Constituents in evening primrose oil with radical scavenging cyclooxygenase and neutrophil elastase inhibitory activities, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5533-5538, 2002.
- Heijnen, C. G. M., Haenen, G. R. M. M., Van Acker, F. A. A., Van der Vijgh, W. J. F. and Bast, A., Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups, *Toxicology In Vitro*, 15, 3-6, 2001.
- Hermann, M., Kapiotis, S., Hofbauer, R., Exner, M., Seelos, C., Held, I. and Gmeiner, B., Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Lett.* 445, 212-214, 1999.
- Honda, T., Gribble, G. W., Suh, N., Finlay, H. J., Rounds, B. V., Bore, L., Favalaro, F., Jr., Wang, Y., Sporn, M. B., Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages, *J. Med. Chem.*, 43, 1866-1877, 2000.
- Jung, H. A., Park, J. C., Chung, H. Y., Kim, J., and Choi, J. S., Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*, *Arch. Pharm. Res.*, 22, 213-218, 1999.
- Kang, H. S. Chung, H. Y. Jung, J. H. Kang, S. S. Choi, J. S. Antioxidant effect of *Salvia miltiorrhiza*, *Arch. Pharm. Res.*, 20, 496-500, 1997.
- Kang, S. S., Kim, J. S., Xu, Y. N. and Kim, Y. H., Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata*, *J. Nat. Prod.*, 62, 1059-1060, 1999.
- Kashiwada, T., Wang, H. K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Cosentino, L. M., Kozuka, M., Okabe, H., Ikeshiro, Y., Hu, C. Q., Yen, E. and Lee, K. H., Anti AIDS agents. 30. anti HIV activity

- of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids, *J. Nat. Prod.*, 61, 1090-1095, 1998.
- Ketsawatsakul, U., Whiteman, M. and Halliwell, B., A reevaluation of the peroxy-nitrite scavenging activity of some dietary phenolics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279, 692-699, 2000.
- Khalid, S. A., Gellért, M., Szendrei, K., and Duddeck, H., Prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside, and isoflavone from the peduncle of *Prunus avium* and *P. cerasus*, *Phytochem.*, 28(5), 1560-1561, 1989.
- Kim, H. J., Woo, E. R., and Park, H. K., A novel lignan and flavonoids from *Polygonum aviculare*. *J. Nat. Prod.*, 57, 581-586, 1994.
- Kim, H. Y., Yokozawa, T., Cho, E. J., Cheigh, H. S., Choi, J. S. and Chung, H. Y., In vitro and in vivo antioxidants effects of mustard leaf (*Brassica juncea*). *Phytotherapy Research*, accepted, 2002.
- Kohda, H., Takeda, O., Tanaka, S., Yamasaki, K., Yamashita, A., Kurokawa, T. and Ishibashi, S. Isolation of inhibitors of adenylate cyclase from danshen, the root of *Salvia miltiorrhiza*, *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1287, 1989.
- Kojima, H. and Ogura, H., Configurational studies on hydroxy groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanane and ursane-type triterpenes by NMR spectroscopy. *Phytochem.*, 28, 1703-1701, 1989.
- Kojima, H., Tominaga, H., Sato, S. and Ogura, H., Pentacyclic triterpenoids from *Prunella vulgaris*, *Phytochem.*, 26, 1107-1111, 1987.
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S., Peroxy-nitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamin 123, *Free Radical. Biol. Med.*, 16, 149-156, 1994.
- Lee, S. J., Son, K. H., Chang, H. W., Do, J. C., Jung, K. Y., and Kang, S. S., Antiinflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonol glycosides. *Arch. Pharm. Res.*, 16, 25-28, 1993.
- Li, B. Z., Wang, B. G., Jia, Z. J., Pentacyclic triterpenoids from *Rubus xanthocarpus*, *Phytochem.*, 49, 2477-2481, 1998.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomass, M. B., The systematic identification of flavonoids, Springer, Heidelberg, 1970.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomass, M. B., The systematic identification of flavonoids. Springer, Heidelberg, pp. 41-61 (1970).
- Matsuda, H., Nakamura, S., and Kubo, M., Studies of cuticle drugs from natural sources. II. Inhibitory effects of *Prunus* plants on melanin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, 17(10), 1417-1420, 1994.
- Mitchell, J. H., Gardner, P. T., McPhail, D. B., Morrice, p. c., Collins, A. R. and Duthie, G. G., Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems, *Arch. Biochem. Biophys.*, 360(1), 142-148, 1998.
- Mochizuki, M., Yoo, Y. C., Matzuzawa, K., Sato, K., Saiki, I., Tono oka, S.,

- Samukawa, K. I. and Azuma, I., Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside Rb2, 20(R) and 20(S) ginsenoside Rg3, of Red ginseng, *Biol. Pharm. Bull.*, 18(9), 1197-1202, 1995.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, C., Domínguez, M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J. and Parajó, J. C., Natural antioxidant from residual sources, *Food Chem.*, 72, 145-171, 2001.
- Nakasugi, T., Nakashima, M. and Komai, K., Antimutagens in gaiyon. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3256-3266. 2000.
- Natella, F., Nardini, M., Felice, M. D. and Scaccini, C., Benzoic acid and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure activity relationship, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1453-1459, 1999.
- Nielsen, J. K., Olsen, C. E. and Petersen, M. K., Acylated flavonol glycoside from cabbage leaves. *Phytochemistry*, 34 (2), 539-544, 1993.
- Numata, A., Yang, P., Takahashi, C., Fujiki, R., Nabae, M. and Fujita, E., Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, goshishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 37(3) 648-651, 1989.
- Okawa, M., Junei, K., Nohara, T. and Ono, M., DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull.*, 24(10), 1202-1205, 2001.
- Oshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., and Gillbert, I., Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids : Effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Rad. Biol. Med.*, 25, 1057-1065, 1998.
- Pannala, A., Rajaq, R., Halliwell, B., Singn, S., Rice Evans, C. A., Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 594-606, 1998.
- Park, H-. J., Kwon, S-. H., Kim, G-. T., Lee, J-. H., Choi, J-. H., Choi, J. W., and Park, K-. Y., Physicochemical and biological characteristics of flavonoids to isolated from the heartwoods of *Rhus verniciflus*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 31, 345-350, 2000.
- Park, H. J., Young, H. S., Park, K. Y., Rhee, S. H., Chung, H. Y. and Choi, J. S., Flavonoids from the whole plants of *Orostachys japonicus*, *Arch. Pharm. Res.*, 14(2), 167-171, 1991.
- Podrez, E. A., Schmitt, D., Hoff, H. F. and Hazen, S. L., Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 1547-1560.
- Poehland, B. L., Carté, B. K., Francis, T. A., Hyland, L. J., Allaudeen, H. S. and Troupe, N., In vitro antiviral activity of dammar resin triterpenoids, *J. Nat. Prod.*, 50, 706-713, 1987.

- Rice Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G., Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 20(7), 933-956, 1996.
- Sakakibara, J., Kaiya, T., Triterpenoids of *Rhododendron japonicum*, *Phytochem.*, 22, 2547-2552, 1983.
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., and Rice-Evans, C., Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 339-346, 1995.
- Sang, S., Kikuzaki, H., Lapsley, K., Rosen, R. T., Nakatani, N., and Ho, C.T., Sphingolipid and other constituents from almond nuts (*Prunus amygdalus Batsch*), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4709-4712, 2002d.
- Song, T. Y. and Yen, G. C., Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3322-3327, 2002.
- Stothers, J. B., Carbon 13 NMR spectroscopy, Academic Press: New York, 1972.
- Takeoka, G., Dao, L., Teranishi, R., Wong, R., Flessa, S., Harden, L., and Edwards, R., Identification of three triterpenoids in almond hulls, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3437-3439, 2000.
- Toda, S. and Shirataki, Y., Inhibitory effects of isoflavones on lipid peroxidation by reactive oxygen species, *Phytotherapy Res.*, 13, 163-165, 1999.
- Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P., Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phytochem.*, 25(2), 383-385, 1986.
- Tsukamoto, H.; Hisada, S.; Nishibe S., Lignans from bark of the *Olea* plants. II, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 1232-1241, 1985.
- Wang, H. B.; Mayer, R.; Rücker, G.; Neugerbauer, M., Bisepoxylic glycosides from *Stauntonia hexaphylla*, *Phytochemistry*. 34, 1621-1624, 1993.
- Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Booren, A. M. and Gray, J. I., Antioxidant polyphenols from Tart cherries (*Prunus cerasus*), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 840-844, 1999b.
- Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; LaVoie, E.; Huang, T. C.; Ho, C. T. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4869-4873, 1998.
- Westenburg, H. E., Lee, K. J., Lee, S. K., Fong, H. H. S., and Van Breemen, R. B., Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygia*. *J. Nat. Prod.*, 63, 1696-1698, 2000.
- Xu, H. X., Zeng, F. Q., Wan, M. and Sim, K. Y., Anti HIV triterpene acids from *Geum japonicum*, *J. Nat. Prod.*, 59(7), 643-645, 1996.
- Yamagishi, T., Zhang, D. C., Chang, J. J., McPhail, D. R., McPhail, A. T.

- and Lee, K. H., The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid A and -B, *Phytochem.*, 27(10), 3213-3216, 1988.
- Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., Electrochemical method for estimating the autoxidative effects of methanol extracts of crude drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, 42(8), 1663-1665, 1994.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kasahara, Y., Kimura, Y., Yamanocuchi, S., Kumaki, K., Tamura, T., and Takino, M., Inhibitory effect of di-, trihydroxy triterpenes from the flowers of Compositae on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 19(10), 1329-1331, 1996.
- Yokozawa, T., Kim, H. Y., Cho, E. J., Choi, J. S. and Chung, H. Y. : Antioxidant effects of isorhamnetin 3,7-di-*O*- β -D-glucopyranoside isolated from mustard leaf (*Brassica juncea*) in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Agricultural and Food Chemistry*, in press, 2002.
- Yoshida, T., Saito, T. and Kadoya, S., New acylated flavonol glycoside in *Allium tuberosum* Rottler. *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 97-107, 1987.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Harada, E., Morikawa, T., Yamahara, J., Matsuda, H., Bioactive saponin and glycosides. VII. On the hypoglycemic principles from the root cortex of *Aralia elata* SEEM. : structure related hypoglycemic activity of oleanolic acid oligoglycoside, *Chem. Pharm. Bull.*, 44(10), 1923-1927, 1996b.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Yoshizumi, S., Murakami, T., Yamahara, J. and Matsuda, H., Bioactive saponin and glycosides. V. acylated polyhydroxyolean-12-ene triterpene oligoglycosides, camelliasaponins A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, and C₂, from the seeds of *Camellia japonica* L. : structures and inhibitory activity on alcohol absorption, *Chem. Pharm. Bull.*, 44(10), 1899-1907, 1996c.
- Young, H. S., Park, J. C., Park, H. J., Lee, J. H., and Choi, J. S., Phenolic compounds of the leaves of *Eucommia ulmoides*. *Arch. Pharm. Res.*, 14(2), 114-117, 1991.
- Zhu, M., Chang, Q., Wong, C. L. Chong, F. S. and Li, R. C., Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*, *Phytother. Res.*, 13, 529-531, 1999.
- Zou, Y., Kim, A. R., Kim, J. E., Choi, J. S. and Chung, H. Y., Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncea*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5884-5890, 2002.
- 강삼식, 손건호, Part 8. triterpenoids ; Part 20. flavonoids, 천연물성분 구조결정법, 서울대학교 출판부, 2000.
- 우원식, 천연물화학연구법 pp. 14, 서울대학교 출판부, 1996.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
과제명		자생식물로부터 노화 억제 식품의약개발			
연구기관		부경대학교	연구책임자	최재수	
총연구기간		2000년 09월 16일 ~ 2003년 06월 30일 (28개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		270,000	46,000	316,000	
기술분야		생명공학기술			
참여기업		샘타코 바이오 코리아			
공동연구기관		부산대학교			
위탁연구기관					
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ()	2. 기술이전(√)	3. 후속연구추진()	4. 타사업에 활용()
		5. 선행 및 기 초연구()	6. 기타목적활용 (교육,연구)()	7. 활용중단(미활용)	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에
의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2003년 8월 일

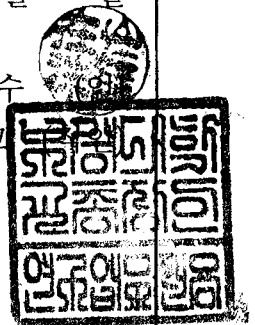
연구책임자 :

최 재 수

연구기관장 :

부 경 대 학 교

과학기술부장관 귀하



[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

- 초·목본 자생식물로부터 노화표지인자 NF-κB, iNOS, COX-2, 활성산소·질소 저해능을 탐색하고 활성성분을 분리·동정하고, RDA법으로 발굴된 노화지표로 활성식물 및 활성성분을 규명하였다. 그리고 노화조직으로부터 단백질을 분리한 후 2D Gel/Madi-top Mass로 새로운 노화지표인자를 발굴하여 그것을 지표로 활성목본 및 초본식물 활성탐색 및 활성성분 분리·동정하였다. 발굴된 활성 성분의 약리, 효능 및 안전성을 평가하고 DNA chip 및 proteomics를 이용하여 항노화 작용기전 규명하고 최종적으로 항노화 식품의약을 개발하였다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록) 일자	발명자 (출원인)	출원 국	비 고
벗나무 잎으로부터 분리한 항산화제 활성을 갖는 신규한 2-O-(6-벤조일)-글루코피라노실 o-(Z)-쿠마릭 산을 포함한 천연화합물.	제 2001-55753호.	2001년 9월 11일	최 재수·정 해영·정 현아	대한 민국	
솔잎유래의 항산화물질 및 그 분리 방법.	10-2002-0008120호.	2002년 2월 15일	최 재수·정 해영·정 미정	대한 민국	
울금유래의 항산화물질 및 그 분리 방법.	제 2002-18319호.	2002년 4월 3일	최 재수·정 해영·김 정은·김 병수	대한 민국	
연수유래 캄페롤 및 그 유도체를 유효성분으로 하는 효소 보호제 및 항노화제.	제2002-30371 호.	2002년 5월 30일	정 해영·최 재수	대한 민국	
커피유래 3-메틸-1,2-사이클로펜탄당은 유효성분으로 하는 효소 보호제 및 항노화제.	제2002-30372 호.	2002년 5월 30일	정해영·최재수	대한 민국	
항산화활성을 갖는 연수 추출물 및 그로부터 분리된 플라보노이드 화합물을 함유한 조성물.	제 2003-0008105 호.	2003년 2월 10일	최 재수·정 해영·김 정은·정 현아	대한 민국	
황금 추출물 또는 이로부터 분리한 바이칼린, 바이칼레인, 우고닌 또는 5,7,2,5-테트라하이드록시-8,6-디메톡시플라본을 함유하는 노화 방지 및 억제용 약학 조성물.	10-2003-0037012 호.	2003년 6월 10일	정 해영·김 재현·최 재수	대한 민국	

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
<i>Natural Product Science</i>	A flavonol diglucoside from the leaves from <i>Brassica juncea</i> .	2000년12월 일	6(4), 199-200	한국생약학회	대한민국	
<i>Nat. Prod. Sci.</i>	Antioxidant activity of roasted defatted Perilla seed.	2001년9월 일	7(3), 72-75	한국생약학회	대한민국	
<i>Fitoterapia</i>	A new C-methylated flavonoid glycoside from <i>Pinus densiflora</i> .	2001년9월 일	72, 943-945	Elsevier Science	네덜란드	SCIE
<i>Arch. Gerontology and Geriatrics.</i>	Age-related changes in redox status of rat serum.	2002년9월 일	34, 956-957	Elsevier Science	아일랜드	SCI
<i>Phytotherapy Res.</i>	Antioxidant principles from the needles of red pine, <i>Pinus densiflora</i> .	in press (2003)		John Wiley & Sons	영국	SCI
<i>J. Pharmacy and Pharmacology</i>	Selective peroxynitrite scavenging activity of 3-methyl-1,2-cyclopentanedi one from coffee extract.	2002년10월 일	54, 1385-1392	Royal Pharmaceutical Soc	영국	SCI
<i>Arch. Pharm. Res.</i>	In vitro antioxidant activity of some selected <i>Prunus</i> species in Korea.	2002년12월 일	25(6), 865-872	대한약학회	대한민국	SCIE
<i>Microscopy Research & Techniques</i>	Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction.	2002년4월 일	59, 264-272	John Wiley & Sons	미국	SCI

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI계재여부
<i>Phytotherapy Res.</i>	Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts.	2002년4월 일	16, 364-367	John Wiley & Sons	영국	SCI
<i>Arch. Pharm. Res.</i>	A new kaempferol 7-O-triglucoside from the leaves of <i>Brassica juncea</i> L.	2002년10월 일	25(5), 621-624	대한약학회	대한민국	SCIE
<i>Arch. Pharm. Res.</i>	Further isolation of peroxynitrite and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging isorhamnetin 7-O-glucoside from the leaves of <i>Brassica juncea</i> L.	2002년10월 일	25(5), 625-627	대한약학회	대한민국	SCIE
<i>Mechanisms of Ageing and Development</i>	Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging.	2002년6월 일	123, 1589-1595	Elsevier Science	아일랜드	SCI
<i>J. Agricultural and Food Chemistry</i>	Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from <i>Brassica juncea</i> .	2002년6월 일	50, 5884-5890	American Chemical society	미국	SCI
<i>Arch. Pharm. Res.</i>	Further isolation of antioxidative (+)-1-hydroxypinoresinol-1-O- α -D-glucoside from the rhizome of <i>Salvia miltiorrhiza</i> that acts on peroxynitrite, total ROS and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.	2003년2월 일	26(1), 24-27	대한약학회	대한민국	SCIE
<i>Arch. Pharm. Res.</i>	Antioxidant principles of <i>Nelumbo nucifera</i> stamens.	2003년4월 일	26(4), 279-285	대한약학회	대한민국	SCIE
<i>Phytotherapy Res.</i>	In vitro peroxynitrite scavenging activity of diarylheptanoids from <i>Curcuma longa</i> .	2003년5월 일	17, 481-484	John Wiley & Sons	영국	SCI
<i>Arch. Pharm. Res.</i>	Antioxidant activity from the stem bark of <i>Albizia julibrissin</i>	2003년6월 일	26(6), 458-462	대한약학회	대한민국	SCIE
계: 17건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
대한약학회	Molecular mechanism of Calorie restriction for the anti-inflammatory action.	2001년 월 일		대한약학회	대한민국
국제노화학회	A Proposal for Inflammatory Process of Aging Based on Anti-oxidative Mechanism of Calorie Restriction.	2001년 월 일		국제노화학회	캐나다
일본노화학회	The Inflammatory Hypothesis of Aging : Anti-aging mechanism of Calorie Restriction.	2001년 월 일		일본노화학회	일본
독성학회	Peroxynitrite Scavenging Activity of Herb Extracts.	2001년 월 일		독성학회	대한민국
한국노화학회	Changes of Nitrosative Stress during Aging.	2001년 월 일		한국노화학회	대한민국
대한약학회	A new flavonol glycoside from Brassica juncea L.	2002년 월 일		대한약학회	대한민국
대한약학회	Hydroquinone from Coffee Modulates Reactivity of Peroxynitrite and Nitric Oxide Production.	2002년 월 일		대한약학회	대한민국
대한약학회	2-DE/MALDI-TOF MS Analysis of Age-dependent Mitochondrial Proteome in Rat Liver.	2002년 월 일		대한약학회	대한민국
대한약학회	Regulation of Redox-sensitive Transcription Factors in aging process.	2002년 월 일		대한약학회	대한민국
대한약학회	Influence of Aging on MAPKs Activity in Rat Kidney.	2002년 월 일		대한약학회	대한민국
대한약학회	Probing for Differentially Expressed Genes in Aged Monkey Muscle by cDNA-Representational Difference Analysis.	2002년 월 일		대한약학회	대한민국
계: 11건수					

3. 연구성과

- 본 연구를 통하여 천연물을 이용한 노화 조절 식품의약 개발의 가능성을 제시함으로써 오랜 전통 문화를 지닌 우리나라가 경쟁력 있는 분야의 하나임을 인식시켰음
- 전통약용 식물에서 개발함으로써 자생 식물의 중요성을 인식시키게 됨
- 노인성 질환을 예방할 수 있는 방안이 제시됨

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

- 제 1단계에서 도출된 항노화 활성 물질에 대해 총 7건의 특허를 출원하고, 이들 중 특히 “연수 유래 캄페롤 및 그 유도체를 유효 성분으로 하는 효소보호제 및 항노화제”는 참여 기업 샘타코 바이오 코리아에 기술 이전하여 식품의약으로 개발함.
- 제 1단계에서 탐색한 항노화 활성 물질 중 특히 캄페롤은 안전성 및 효능평가를 거쳐 노화 조절 신약 개발에 활용함.
- 항노화 활성 물질이 함유된 자생 식물들을 식품 의약으로 개발하여 국민 보건 향상과 고부가가치 수출 전력 상품으로 개발할 것임.
- 새로운 노화 지표들은 노화 진단 기술 및 노인병 조기 진단에 활용하고, 노화 기전 규명 및 노화 조절 기법 발굴에 활용함.
- 연수의 항노화 식품의약 개발로 연수의 대량 생산을 유도함으로써 농민의 소득 증대에 기여함.

나. 활용방법

- 노화방지 식품의약으로 개발하여 노인성 질환 예방에 활용함.
- 연수의 부가가치를 증대시켜 농가의 소득 증대에 기여할 것임.
- 연수의 활성 성분을 노화 방지 신약으로 개발에 활용함

다. 차년도이후 활용계획(6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

- 연수의 주성분 캄페롤의 항노화 신약개발을 위한 기초 실험
- 단삼의 주성분 lithospermate 유도체의 항노화 식품의약개발
- 뽕나무의 활성성분 flavonoid의 항노화 식품의약개발
- 이상의 모두는 참여기업인 샘타코 바이오 코리아에 기술 이전하여 2단계, 3단계에서 제품화할 계획임
- 관련 제약업체 및 식품업체의 투자 유도
- 기능성 자생식물 개발로 농민 소득 증대

5. 기대효과

- 노화 억제 식품의약을 개발함으로써 자생식물들의 부가가치 증대
- 고부가가치 제품에 대한 수입대체
- 미래형 고부가 가치의 신산업 창출
- 노화 억제 식품의약 개발을 통한 실버산업 분야의 세계 시장 점유 가능
- 노인층 인구의 생산력 활용을 통한 국가적 복지 부담 감소
 - 예상매출액(단위: 10,000백만원), 수입대체효과(단위: 1,000백만원), 수출증대효과(단위: 1,000백만원), 원가절감(단위: 1,000백만원,기존대비%), 에너지절감효과(단위: 500백만원), 생산성 향상(단위: 500백만원,기존대비%) 인력양성 또는 고용창출효과(단위:100명)

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과 중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

- 식물 연꽃의 추출(연수) 및 그로부터 분리된 캄페롤로 노화조절 식품 의약 개발

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	PF002201-07/08			
과제명	자생식물로부터 노화 억제 식품의약개발			
사업명	21C 프론티어연구개발사업			
세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구기관	부경대학교	기관유형	대학	
참여기관(기업)	부산대학교			
총연구기간	2000년 09월 16일 ~ 2003년 06월 30일 (28개월)			
총연구비	정부(270)천원	민간(46)천원	합계(316)천원	
연구책임자 1	성명	최 재 수	주민번호	
	근무기관 부서	부경대학교	E-mail	choijs@pknu.ac.kr
	직위/직급	교 수	전화번호	051-620-6335
연구책임자 2	성명	정 해 영	주민번호	
	근무기관 부서	부산대학교	E-mail	hyjung@pusan.ac.kr
	직위/직급	교 수	전화번호	051-510-2814
실무연락책임자	성명	최 재 수	소속/부서	부경대학교
	직위/직급	교 수	E-mail	choijs@pknu.ac.kr
	전화번호	051-620-6335	FAX	051-620-6330
	주소	(608 - 737) 부산시 남구 대연3동		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

- 과학 기술부 프론티어 개발사업, 자생식물 이용 개발사업(2000.10 ~ 2003.6, 정부 2억 7천만원, 민간 4천 6백만원 투입)으로 추진된 본 연구에서는 노화 지표가 되는 활성산소 및 활성질소, NF- κ B, iNOS, COX-2 저해능을 지표로 600여종 이상의 자생식물들을 탐색하였음.
- 노화된 동물에서 연수와 캠페롤을 장기간 투여하여 노화억제 효능을 조사하였음.
- 연수 추출물과 그 활성성분 캠페롤이 노화의 원인물질 활성산소, 활성질소 생성을 억제할 뿐만 아니라 직접 제거하는 활성을 확인하였음
- 연수와 캠페롤은 ONOO⁻에 의한 단백질 nitration을 억제하였음
- 연수와 캠페롤은 활성산소, 활성질소 생성 효소를 억제하였음
- 연수와 캠페롤은 노화 촉진성 전사인자 NF- κ B의 활성을 억제하였음

<기술적 특징>

- (1) 최근 노화 조절에 관해 관심은 많으나 아직 노화를 현저히 조절하는 식품이나 의약은 국내에 거의 없음
- (2) 천연물을 이용한 치료제 개발은 여러 곳에서 시도되고 있는 중임
- (3) 본 연구개발 성과인 연수와 캠페롤은 최근 급증하고 있는 노인성 질환 예방 가능성 식품으로 주목받을 것임

[용도·이용분야]

- (1) 본 연구를 통하여 천연물을 이용한 노화조절 식품의약 개발이 가능함을 보임으로서 오랜 전통 문화를 지닌 우리나라가 경쟁력 있는 분야의 하나임을 제시하였음
- (2) 전통 약용 식물에서 개발함으로써 자생식물의 중요성을 인식시키게 됨
- (3) 노인성 질환을 예방할 수 있는 방안이 제시됨

■ 기술의 분류

[기술코드] 421 (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업 기계설비 소재 정밀화학·공정 생명과학
 원자력 자원 에너지 항공·우주 해양
 교통 보건·의료 환경 기초·원천 기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발 신공정개발 기존제품개선 기존공정개선
 기타 ()

[기술의 용도] (복수 선택(√로 표시)가능합니다)

- 기계설비 부품소자 원료재료 소프트웨어
 가공처리기술 자동화기술 불량률 감소 등 현장애로기술
 제품설계기술 공정설계기술 기타 ()

■ 산업재산권 보유현황(기술과 관련한)

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호
특허	벗나무 잎으로부터 분리한 항산화제 활성을 갖는 신규한 2-O-(6-벤조일)-글루코피라노실 o-(Z)-쿠마릭 산을 포함한 천연 화합물.	대한민국	출원	2001년 9월 11일	제 2001-55753 호.
특허	솔잎유래의 항산화물질 및 그 분리 방법.	대한민국	출원	2002년 2월 15일	10-2002-0008120 호.
특허	울금유래의 항산화물질 및 그 분리 방법.	대한민국	출원	2002년 4월 3일	제 2002-18319 호.
특허	연수유래 캄페롤 및 그 유도체를 유효성분으로 하는 효소 보호제 및 항노화제.	대한민국	출원	2002년 5월 30일	제 2002-30371 호.
특허	커피유래 3-메틸-1,2-사이클로펜탄당온을 유효성분으로 하는 효소 보호제 및 항노화제.	대한민국	출원	2002년 5월 30일	제 2002-30372 호.
특허	항산화활성을 갖는 연수 추출물 및 그로부터 분리된 플라보노이드 화합물을 함유한 조성물.	대한민국	출원	2003년 2월 10일	제 2003-0008105 호.
특허	황금 추출물 또는 이로부터 분리한 바이칼린, 바이칼레인, 우고닌 또는 5,7,2,5-테트라하이드록시-8,6-디메톡시플라본을 함유하는 노화 방지 및 억제용 약학 조성물.	대한민국	출원	2003년 6월 10일	10-2003-0037012 호.

* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재

* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

■ 기술이전 조건

이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 유상 <input type="checkbox"/> 무상	최저기술료	64,800 천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전 소요기간	2 년 6 개월	실용화예상시기	2003 년도
기술이전시 선행요건	선급금 : 16,200,000원 최저 기술료 : 64,800,000원		

* 기술이전시 선행요건 : 기술이전을 위한 사전준비사항(필수 설비 및 장비, 전문가 확보 등)을 기술

* 실용화예상시기 : 기술을 활용한 대표적인 제품이 최초로 생산이 시작되는 시기를 기재

■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개씩 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
✓	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
✓	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적용시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
✓	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	단삼의 항노화제 기술
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input checked="" type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	<p style="text-align: center;">단삼 및 단삼 성분의 노화억제 식품의약 개발</p> <p>· 초·목본 자생식물 수집하여 활성 목본 식물의 분획 및 활성성분 분리 동정한다. 노화표지인자 (NF-κB, iNOS, COX-2, 활성산소·질소)로 목본활성식물, 활성분획, 활성성분을 탐색하고 RDA로 새롭게 발굴된 노화 표지인자를 지표로 활성식물의 효능을 탐색하였다. 그 결과, 단삼 및 단삼의 lithospermate 유도체가 강한 활성을 나타내었다.</p>

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호	PF002201-07/08			
과제명	자생식물로부터 노화 억제 식품의약개발			
사업명	21C 프론티어연구개발사업			
세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구기관	부경대학교	기관유형	대학	
참여기관(기업)	부산대학교			
총연구기간	2000년 09월 16일 ~ 2003년 06월 30일 (28개월)			
총연구비	합계 : (316)백만원 - 정부 : (270)백만원 민간 : (46)백만원			
연구책임자	소속	부경대학교	성명	최재수
	전화번호	051-620-6335	E-mail	choijs@pknu.ac.kr
연구개발 주요내용				
자생식물(연수, 단삼, 벗잎)에서 항노화 식품의약 개발				
· 초·목본 자생식물 수집하여 활성 목본 식물의 분획 및 활성성분 분리 동정한다. 노화표지인자 (NF-κB, iNOS, COX-2, 활성산소·질소)로 목본활성식물, 활성분획, 활성성분을 탐색하고 RDA로 새롭게 발굴된 노화 표지인자를 지표로 활성식물의 효능을 탐색하였다. 그 결과, 연수, 단삼, 벗잎이 강한 노화억제 활성을 나타내었다.				

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.