

항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발  
Development of Antioxidative Neuroprotective Nutraceuticals

항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발  
Development of Antioxidative Neuroprotective Nutraceuticals

연구기관  
한국과학기술연구원

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발”과제 (세부과제 “항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발”) 의 보고서로 제출합니다.

2003. 6.

주관연구기관명	: 한국과학기술연구원
주관연구책임자	: 진창배
연 구 원	: 이용섭, 김동현, 임혜원
"	: 송운선, 김형자, 서선희
"	: 정경자, 이문정, 조은영
"	: 이용하, 이은하, 박정안
"	: 이지선, 이지용, 문창상
"	: 유 호, 이광섭, 이범훈
"	: 박장현, 문성재, 이선민
"	: 노현애
공동연구기관명	: (주)LG생명과학기술원
공동연구책임자	: 박미정
위탁연구기관명	: 이화여자대학교
위탁연구책임자	: 이상국

여 백

## 보고서 초록

과제관리번호	PF002103-01	해당단계 연구기간	2000.09.16 - 2003.06.30	단계 구분	(1단계) / (총3단계)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구과제명	중 과제명	항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발			
	세부(단위)과제명	항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발			
연구책임자	진창배	해당단계 참여연구원수	총 : 34명 내부 : 8명 외부 : 26명	해당단계 연구비	정부: 600,000천원 기업: 600,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술연구원 생체대사연구센터		참여기업명	(주)LG생명과학기술원	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 : 이화여자대학교		연구책임자 : 이상국		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	1
<p>연구목표는 국내 자생식물로부터 항산화성 유효성분들을 분리 동정하고 이들의 국소 허혈성 뇌손상에 대한 신경보호 효능을 검색하고, 약리 및 안전성 규명을 통하여 뇌신경보호제로 개발하고자 하는 것임.</p> <p>연구추진은 1) 뇌신경보호 효능이 이미 입증된 aloesin의 후속 약효 약리 및 안전성 연구를 통한 전임상 후보물질 도출연구를 수행하며, 후속대체물질을 확보하기 위하여 2) aloesin 유사체 확보를 통한 후속물질 도출연구와, 3) 다른 식물 종으로부터 새로운 구조의 후속대체물질 확보를 위한 연구를 수행하였음. 한편 자원확보 차원에서 위탁과제를 수행하여 57종의 자원식물 메탄올 추출물로부터 항산화 효능이 우수한 5종을 확보하였으며 8종에서 iNOS 저해 활성이 우수하여 이들에 대한 작용기전 및 효능 물질을 분리하는 연구도 수행하였음.</p> <p>연구결과, aloesin은 3-30 mg/kg(i.v.) 용량범위에서 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에 있어 신경보호 효과를 나타내었으며, 특히 영구적 허혈성 뇌손상 백서모델에서도, 기존 대조물질인 MK-801보다, 신경보호 효능이 더욱 우수하게 나타남. 또한 aloesin은 <i>in vivo</i>에서 조사된 apoptotic cell death의 여러 분자생물학적 현상을 뚜렷이 억제하는 것으로 나타남. Aloesin은 일반행동, 중추신경계, 심장순환계, 호흡기계, 소화기계, 운동신경계, 면역계, 체온에 미치는 영향 등을 관찰한 일반약리 시험 및 급성, 아급성, 유전독성 시험 결과에서 매우 안전한 화합물로 규명됨.</p> <p>Aloesin 계열 후속물질로 도출된 10종의 화합물들 중, 7-O-methylaloesin은 aloesin과 비교할 때 항산화 작용 및 rat primary cortical cell culture를 이용한 산화성 세포독성으로부터의 신경보호 효능이 우수하고, 국소 허혈성 뇌손상 동물모델에서도 신경보호 효능을 나타냄.</p> <p>한편 손바닥선인장 및 치자를 연구한 결과, 21종의 화합물이 순수하게 분리되었으며, 그 중 6종의 화합물들은 자연계에서 처음 분리되었음. 분리 화합물들의 항산화 작용 및 배양 신경세포에서의 신경보호 효능을 검색한 결과, KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)는 1) 다양한 항산화 검색시스템에서 모두 강력한 항산화 효능을 나타내었으며 2) 배양 신경세포를 사용한 검색에서도 신경세포 보호효과가 우수하며, 3) 일시적 뇌허혈 백서모델에서도 허혈유발 30분 후 10 mg/kg 용량으로 단회 정맥 투여한 결과, 경색용적 및 부종을 모두 대조군에 비해 약 50%의 감소를 나타냄으로서 뚜렷한 조직학적 신경보호 효과는 물론 신경행동학적 회복 효과를 나타내었음. 또한, 4) KYS 50182의 정맥투여 급성독성 실험결과 LD<sub>50</sub>는 150 mg/kg 이상으로 나타나 적어도 15배 이상의 safety margin을 가지는 것으로 예측됨. 따라서 KYS 50182를 활성성분으로 포함하고 있는 손바닥선인장의 추출물은 후속 개발연구를 진행하면 뇌졸중 치료제나 신경보호용 식품의약으로의 개발 가능성이 매우 높은 것으로 사료됨.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	항산화제, 허혈성 뇌졸중, 신경보호, 알로에신, 손바닥선인장, 식품의약			
	영 어	Antioxidant, Ischemic stroke, Neuroprotection, Aloesin, <i>Opuntia ficus-indica</i> , Nutraceutical			

# 여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

뇌허혈은 임상적으로 심장정지 및 뇌졸중(중풍)에서 가장 보편적으로 나타나는 형태로 난치성 뇌신경세포 손상이 야기되어 뇌허혈 환자는 뇌기능 소실로 불구가 되거나, 혼수상태에 빠질 수 있으며, 심한 경우에는 사망에 이르게 된다. 미국의 한 통계조사에 따르면 뇌졸중의 연간 발생빈도는 약 50만명에 이르며, 이 환자에 대한 치료비는 연간 약 300억불에 달하고, 심장질환과 암 다음으로 높은 사망율을 나타낸다. 한편 국내의 경우 단일 질환으로서는 제1위의 사망원인으로 추정되고 있으며 매년 약 20만명의 성인들이 뇌졸중으로 고통을 받고 있는 실정이다.

뇌졸중은 허혈에 의해 다량의 glutamate와 같은 흥분성 신경전달물질이 유리되어 수용체 작용을 통해 과량의 칼슘이 세포 내로 유입되어 excitotoxicity를 일으킴으로써 궁극적으로 뇌신경세포를 사멸시킨다는 glutamate cascade 가설이 제안된 이래 선진국의 제약회사 및 연구소에서는 NMDA 수용체 길항약 개발을 필두로 하여 신경보호제 개발에 심혈을 기울인 결과 몇 종류의 약물들이 임상시험 단계에 있는 수준이나 이 질환에 의한 뇌손상과 관련된 기전들의 복잡 다단성, 뇌조직 내로의 약물 침투, 부작용, 임상시험의 어려움 등에 관한 문제들로 말미암아 치료제 개발에 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다. 따라서 허혈성 뇌졸중 발생 후에는 혈전용해제를 제외하고는 허혈에 의해 야기되는 뇌손상을 경감시킬 수 있는 신경보호제가 현재까지는 임상적으로 없는 상태이므로 그 개발이 시급한 실정이다.

한편, 허혈성 뇌손상의 병인기전에 있어 세포 내 과량의 cytotoxic 칼슘이온의 유입은 NO 합성효소의 활성화에 의한 과량의 NO 생성을 통해 활성산소종(reactive oxygen species)을 발생시킨다. 또한 미토콘드리아 내에 증가된 칼슘이온은 oxidative phosphorylation을 uncoupling시킴으로써 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical들의 생성 증가를 초래한다. 이와 같은 free radical들은 DNA 손상 외에도 lipid peroxidation에 의해 세포막을 손상시킨다. 더욱이 자발적 또는 치료에 의해 허혈 부위의 혈액 공급이 회복되어져 재관류가 일어날 때에도 공급되는 산소가 free radical들을 더욱 발생시킬 수 있다. 따라서 최근 허혈 및 재관류 시 발생하는 free radical들이 신경세포 손상 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 항산화제를 뇌졸중 치료를 위한 신경보호제로서 개발하려는 노력이 점차 증가되고 있는

추세이다. 또한 항산화제는 부작용 측면에서도 다른 target들에 대하여 개발하려는 약물들보다도 우수할 것으로 예측되고 있다.

이와 같이 free radical들에 의한 뇌신경세포의 손상은 뇌졸중의 발병 및 증상의 악화에 중요한 원인이 되므로, 본 과제에서는 체내에서 free radical들을 효과적으로 제거할 수 있는 항산화제를 천연물로부터 분리하여 이들을 다양한 검색체계에서 항산화효과의 검색, 활성산소에 의한 뇌신경세포의 손상 억제효과를 검색한 후, 허혈성 뇌졸중 동물모델에서 뇌신경세포 손상 보호효과와 안전성을 최종적으로 확인하여 뇌졸중 치료제 혹은 뇌신경보호용 식품의약을 개발하고자 한다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

연구 내용	연구 범위
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 자생식물자원 확보 및 표준 엑스 제조</li> <li>- 단일성분 분리 및 구조규명</li> <li>- 항산화 효능 검색</li> <li>- 뇌신경보호 효능 검색</li> <li>- 항산화성 뇌신경보호 성분의 안전성 검색</li> <li>- 항산화 성분 대량분리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 자생식물로부터 항산화성 물질 분리, 구조 규명 및 유효성분 대량분리</li> <li>- 항산화 효능 검색(DPPH 자유기 소거력, xanthine/xanthine oxidase 억제력, O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical 소거력, 지질과산화 억제력, NO 생성 억제력 등)</li> <li>- 배양 뇌신경세포 시스템에서의 <i>in vitro</i> 신경세포 보호 효능 검색</li> <li>- 생체 내 투여에 의한 <i>in vivo</i> 국소 허혈성 뇌손상 보호 효능 검색</li> <li>- 약물의 <i>in vivo</i> BBB 투과성 검색</li> <li>- 약동 연구</li> <li>- 약리 기전 및 일반약리 연구</li> <li>- 일반 및 특수독성 시험</li> </ul>

### IV. 연구개발결과

본 과제에서는 국내 자생식물로부터 항산화성 유효성분들을 분리 동정하고 이들의 국소 허혈성 뇌손상에 대한 신경보호 효능을 검색하고, 약리 및 안전성 규명을 통하여 뇌신경보호제로 개발하고자 하였다.

연구추진전략으로는 1) 뇌신경보호 효능이 이미 입증된 KIST-JJP(aloesin)의 후속 약효 약리 및 안전성 연구를 통한 전임상 후보물질 도출연구를 수행하며, 후속대체 물질을 확보하기 위하여 2) aloesin의 유사체 확보를 통한 aloesin 계열의 후속물질 도출연구와, 3) 다른 식물 종으로부터 새로운 구조의 후속대체물질 확보를 위한 연

구를 수행하였다. 또한 한편으로는 자원확보 차원에서 위탁과제를 수행하여 57종의 자원식물 메탄올 추출물로부터 합다리나무 등 항산화 효능이 우수한 5종을 확보하였으며 육박나무, 갯메꽃 등 8종에서 iNOS 저해 활성이 우수하여 이들에 대한 작용기전 및 효능 물질을 분리하는 연구도 수행하였다.

연구결과, aloesin은 3-30 mg/kg(i.v.) 용량범위에서 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에 있어 유의한 신경보호 효과를 나타내었으며, 특히 영구적 허혈성 뇌손상 백서모델에서도, 비록 독성으로 인하여 개발이 중단되었지만 이제까지 가장 효능이 우수한 뇌졸중치료제 후보물질로 잘 알려진 MK-801보다, aloesin은 신경보호 효능이 더욱 우수하게 나타났다. 또한 aloesin은 *in vivo*에서 조사된 apoptotic cell death의 여러 분자생물학적 현상을 뚜렷이 억제하는 것으로 나타났다. 더욱, aloesin은 일반행동, 중추신경계, 심장순환계, 호흡기계, 소화기계, 운동신경계, 면역계, 체온에 미치는 영향 등을 관찰한 일반약리 시험 및 급성, 아급성, 유전독성 시험 결과에서 매우 안전한 화합물임이 밝혀졌으므로 후속연구로 다른 약물과의 병용투여 가능성, 전임상 및 임상연구가 계속하여 진행된다면 새로운 뇌졸중 치료제로 개발될 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Aloesin 계열의 후속물질로 도출된 10종의 화합물들 중에서, KYS 50163 (7-O-methylaloesin)은 aloesin과 비교할 때 항산화 작용 및 rat primary cortical cell culture를 이용한 xanthine/xanthine oxidase(X/XO) 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유발 세포독성으로부터의 신경보호 효능이 우수하고, 국소 허혈성 뇌손상 동물모델에서도 신경세포보호 효능을 나타내므로 후속연구를 추진할 가치가 있는 것으로 보인다.

또 다른 후속대체물질을 도출하기 위하여 식물 901-15(손바닥선인장) 및 895-15(치자)를 연구한 결과, 21종의 화합물이 순수하게 분리되었으며, 그 중 6종의 화합물들은 자연계에서 처음으로 분리되었다. 분리된 화합물들의 항산화 작용 및 rat primary cortical cell culture에서의 신경보호 효능을 검색한 결과, KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)는 1) 검색한 모든 항산화 검색시스템에서 강력한 항산화 효능을 보였으며(DPPH free radical 소거력, IC<sub>50</sub> = 19 μM; X/XO 활성 억제력, IC<sub>50</sub> = 139 μM; Iron-dependent 지질과산화 억제력, IC<sub>50</sub> = 2.4 μM; NO 발생 억제력, IC<sub>50</sub> = 10.3 μM; Caspase-1, 3, 9 각각의 저해력, IC<sub>50</sub> = 0.24, 0.6, 0.4 mM), 2) Primary rat cortical cell을 사용한 검색에서 신경세포의 보호효과(X/XO-유발독성 억제력, IC<sub>50</sub> = 2.1 μM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-유발독성 억제력, IC<sub>50</sub> = 1.9 μM; NMDA-유발독성 억제력, 100 μM에서 54% 보호효과; 성장인자 제거에 의한 세포사멸에 대한 억제력, 100 μM에서 86% 보호효과) 또한 우수하며, 3) 일시적 뇌허혈 백서모델에서도 허혈유발 30분 후에 10 mg/kg 용량으로 정맥을 통하여 단회 투여한 결과, 대뇌 피질 경색용적, 총 및 교정 총 경색용적, 부종을 모두가 대조군에 비해 약 50% 수



준의 유의성 있는 감소를 나타냄으로서 뚜렷한 조직학적 신경보호 효과를 나타내었으며 또한 대조군에 비해 유의성 있는 신경행동학적 회복 효과를 나타내었다. 또한, 4) KYS 50182의 정맥투여 급성독성 실험결과 LD<sub>50</sub>는 150 mg/kg 이상으로 나타나, 유효 약효용량이 10 mg/kg 정도이므로 적어도 15배 이상의 safety margin을 가지는 것으로 나타났다.

뇌졸중의 병변 현상은 다양한 기전을 통하여 일어난다. 반면에, 현재 개발되고 있는 뇌졸중 치료제 후보물질들은 대부분 흥분성 아미노산 신경계의 활성화에 의하여 유발되는 뇌신경세포의 독성을 억제하거나, 항산화 작용에 의한 뇌졸중의 증세 완화, 세포사멸과정의 억제 등 대부분 단일 작용기전을 목표로 하고 있으므로 비록 개발되더라도 효과적인 뇌졸중 치료제로 기대되기 어려울 것으로 보인다.

이런 측면을 고려할 때, KYS 50182는 항산화 작용이 우수할 뿐만 아니라, NMDA 수용체 활성화에 의하여 유발되는 뇌신경세포의 독성을 억제하며, 활성산소 종에 의하여 유발되는 신경세포독성을 억제하며, 세포사멸과정을 지연시키는 3가지 이상의 작용효과를 통하여 뇌신경세포 보호효능을 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 KYS 50182가 신경보호 효능을 나타내는 기초적인 자료는 상당히 확보되었으므로 향후에는 이 화합물을 활성성분으로 포함하고 있는 손바닥선인장의 추출물은 식물 추출물의 규격화, 표준화, 적정투여량 등의 후속 개발연구를 진행하면 뇌졸중 치료제나 뇌신경세포 보호용 식품의약으로 개발될 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- 국소 허혈성 뇌졸중 질환동물모델 시험에서 aloesin의 뇌신경보호 효능과 더불어 안전성이 확인되었으므로, 향후 aloesin의 뇌신경보호 약리 작용기전의 규명 등의 추가 전임상 및 임상시험을 수행하여 뇌신경 보호제 혹은 뇌졸중 치료제로 활용하고자 한다.
- 후속물질인 KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)는 강력한 항산화 효과, 여러 *in vitro* 뇌신경세포체계에서 신경세포의 손상을 보호하는 효과를 나타내는 등 다양한 작용효과가 이미 밝혀졌으며, 국소 허혈성 뇌졸중 동물모델에서도 뇌신경보호 효과가 나타났으므로 이 화합물의 목표로 하는 1차적인 효능은 이미 입증되었다고 사료된다. 따라서 후속 연구에서는 KYS 50182의 생체이용률, 약동력학, BBB 이행률, 경구투여 시의 신경보호 효능 등을 조사하고, 이 화합물을 함유하고 있는 식물 추출물의 규격화, 표준화, 적정 투여량 등을 연구하여 뇌졸중 치료제나 뇌신경세포 보호용 식품의약으로 활용하기 위한 연구를 수행하고자 한다.

# S U M M A R Y

I. Title : Development of Antioxidative Neuroprotective Nutraceuticals

II. Objective and Importance of the Project

Stroke is a major cause of death and permanent disability, and occurs more frequently in people over age 65. It occurs when blood flow to a region of the brain is obstructed and may result in death of brain tissue. Stroke is the third leading cause of death and the leading cause of disability in the United States. Approximately 600,000 strokes, or brain attacks, occur in the United States each year and of these, approximately 150,000 (25%) are fatal. Total cost of stroke to the United States was estimated at about \$30 billion each year. It was reported that stroke is also the leading cause of death in Korea as a single disease and approximately 200,000 patients are suffering from this disease each year.

Ischemic stroke is caused by blockage in an artery that supplies blood to the brain, resulting in a deficiency in blood flow. During ischemic stroke, diminished blood flow initiates a series of events that may result in additional, delayed damage to brain cells. Recurrent stroke is also frequent; about 25 percent of people who recover from their first stroke will have another stroke within 5 years. Recurrent stroke is a major contributor to stroke disability and death, with the risk of severe disability or death from stroke increasing with each stroke recurrence.

Early treatment can help minimize damage to brain tissue and improve the prognosis (outcome). Acute treatment for ischemic stroke involves removing the blockage and restoring blood flow. **Tissue plasminogen activator (t-PA)** is only a medication at the present time that can break up blood clots and restore blood flow when administered within 3 hours of the event. However, this medication carries a risk for increased intracranial hemorrhage and is not used for hemorrhagic stroke.

Neuroprotectants are medications that protect the brain from secondary injury caused by stroke. There are several different classes of neuroprotectants that show promise for future therapy, including calcium

channel antagonists and glutamate receptor antagonists. These agents modulate neuronal receptors to reduce release of excitatory neurotransmitters. However, these agents often produce severe toxic or side effects probably due to the contribution to early stage of neuronal signal transduction cascades.

On the other hand, brain ischemia initiates a complex cascade of metabolic events, several of which involve the generation of nitrogen and oxygen free radicals. These free radicals and related reactive chemical species mediate much of damage due to their higher reactivity that occurs after transient brain ischemia, and in the penumbral region of infarcts caused by permanent ischemia. Therefore, the use of antioxidant compounds, for example, 21-amino steroids, has shown neuroprotection in animal models.

The objective of this project was to develop antioxidative neuroprotective nutraceuticals, which can reduce the neuronal injury after ischemia or mitigate the symptom of ischemic stroke, from Korean native plants.

### III. Contents and Scope of the Project

Contents	Scope of the Project
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparation of native plants extracts</li> <li>- Isolation and structure determination of constituents from natural products</li> <li>- Antioxidative activity screening</li> <li>- Neuroprotective activity screening</li> <li>- Safety tests of neuroprotective constituents</li> <li>- Large scale isolation of antioxidative constituents</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolation and structure determination of antioxidative constituents from native plants</li> <li>- Antioxidative activity screening (DPPH free radical scavenging, superoxide anion radical scavenging in xanthine/xanthine oxidase system, lipid peroxidation inhibition, NO production inhibition, etc.)</li> <li>- <i>In vitro</i> neuroprotective activity screening in neuronal cell culture systems</li> <li>- <i>In vivo</i> neuroprotective activity screening in rat models of focal cerebral ischemia</li> <li>- <i>In vivo</i> blood-brain barrier penetration test</li> <li>- Pharmacokinetic study</li> <li>- General pharmacology study</li> <li>- Acute and chronic toxicity tests</li> </ul>

#### IV. Results of the Project

In this project, we tried to develop neuroprotective nutraceuticals from Korean native plant through the isolation and structure determination of antioxidative constituents, and antioxidative activity screening, neuroprotective activity screening in neuronal cell systems and *in vivo* neuroprotective activity screening in focal cerebral ischemic rat models, for isolates.

Aloesin isolated from *Aloe vera*, which has been known to have antioxidative activity, was selected as the first candidate of this work because this compound has been already proven to be effective as a potential neuroprotectant from *in vivo* activity screening using a transient focal cerebral ischemic rat model. Transient focal cerebral ischemia was induced by occlusion of middle cerebral artery for 2 hr with a silicone-coated 4-0 nylon monofilament in male Sprague-Dawley rats under isoflurane anesthesia. Treatments with aloesin at the doses of 3 and 10 mg/kg (i.v.) significantly reduced both infarct volume and edema by approximately 47% compared with the control group, producing remarkable behavioral recovery effect. Treatment at the dose of 30 mg/kg also significantly reduced infarct volume to a lesser extent by approximately 33% compared with the control group, but produced similar degree of behavioral recovery effect. Furthermore, treatment with aloesin in a permanent focal cerebral ischemic rat model was found to produce better neuroprotective activity than MK-801, a well known anti-stroke candidate. In addition, general pharmacological studies showed that aloesin was a quite safe compound. The results suggest that aloesin can serve as a lead chemical for the development of neuroprotective agents by providing neuroprotection against focal ischemic neuronal injury.

For the development of back-up compounds for aloesin as neuroprotectants, we tried to synthesize or further isolate aloesin derivatives from *Aloe vera*. Additionally, methanol extracts of 57 Korean native plants were studied for antioxidative activity to discover five plants with potent DPPH free radical scavenging activity and eight plants extracts with strong iNOS production inhibitory activity.

Among ten derivatives of aloesin synthesized or isolated from *Aloe vera*, KYS 50163 (7-O-methylaloesin) exhibited improved antioxidative activities in various assay systems, inhibitory activity for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or xanthine (X)/xanthine oxidase (XO)-induced oxidative injury and neuroprotective activity in a focal

cerebral ischemic rat model when compared with the parent compound aloesin.

Plants *Opuntia ficus-indica* and *Gardeniae Fructus* were also studied to search back-up compounds for the development of neuroprotective nutraceuticals, resulting in the isolation and structure determination of totally 21 pure compounds. It is notable that six compounds isolated from *Gardeniae Fructus* were identified for the first time from nature. Among compounds tested for the antioxidative activity, KYS 50182 (quercetin 3-methyl ether) showed the most potent antioxidative activity (DPPH free radical scavenging,  $IC_{50} = 19 \mu\text{M}$ ; superoxide anion scavenging in X/XO system,  $IC_{50} = 15.1 \mu\text{M}$ ; Iron-dependent lipid peroxidation inhibition,  $IC_{50} = 2.4 \mu\text{M}$ ; NO production inhibition,  $IC_{50} = 10.3 \mu\text{M}$ ; Caspase-1, 3, 9 inhibitions,  $IC_{50} = 0.24, 0.6, 0.4 \text{ mM}$ , respectively). KYS 50182 also showed neuroprotective activities against neuronal cell injuries induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $IC_{50} = 1.9 \mu\text{M}$ ), superoxide anion radicals generated in xanthine/xanthine oxidase system ( $IC_{50} = 2.1 \mu\text{M}$ ), NMDA (54% protection at  $100 \mu\text{M}$ ) and growth factor withdrawal (86% protection at  $100 \mu\text{M}$ ). Furthermore, treatment with KYS 50182 at the dose of 10 mg/kg (i.v.) significantly reduced both infarct volume and edema by approximately 50% compared with the control group, producing remarkable behavioral recovery effect. In addition, the  $LD_{50}$  value of KYS 50182 was found to be over 150 mg/kg when administrated intravenously to rats, indicating that the safety margin of this compound is at least 15-fold.

#### V. Application of the Research

We have found that KYS 50182, one of the active constituents isolated from *Opuntia ficus-indica*, possesses potent free radical scavenging effects and neuroprotective effects in ROS-induced neuronal cell death models and transient focal cerebral ischemic rat models. The extract containing that constituent also showed potent free radical scavenging effects and neuroprotective effects in ROS-induced neuronal cell death models.

In the future work, we will develop the extract of *Opuntia ficus-indica* as a neuroprotective nutraceutical through the optimization, standardization and efficacy validation of the plant extract followed by general pharmacology and safety tests of the extract.

# C O N T E N T S

Part I. Outline and objective of the project .....	17
Part II. General trends in technical development related to the project .....	21
Part III. Methods and results .....	27
Part IV. Achievements and contribution to the related research fields .....	131
Part V. Plan for application of results of the project .....	135
Part VI. Technical informations obtained in the course of the project .....	137
Part VII. References .....	139
Appendix : Sub-Project .....	141

# 여 백

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	27
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	131
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	135
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	137
제 7 장 참고문헌 .....	139
부록 : 위탁과제(이화여자대학교 약학대학) .....	141



여 백

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

현대의학의 발달로 이제는 선진국에서의 평균 수명이 75세에서 85세까지 증가되었으며, 향후 20년 이내에 85세 이상을 능가할 가능성이 있다. 따라서 노령인구가 증가함에 따라 노인성 질환과 노인건강은 향후 삶의 질 향상을 위하여 가장 큰 사회적 문제 중 하나가 되었다.

뇌허혈(cerebral ischemia)은 임상적으로 심장정지(cardiac arrest) 및 뇌졸중(stroke)에서 가장 보편적으로 나타나는 형태로서, 특히 고령인구에서 발생 빈도가 매우 높으며 이로 인해 난치성 뇌손상이 야기되어 아주 중요한 의료상의 문제점으로 남아있다. 이 질환은 뇌신경세포 손상으로 인한 뇌기능 소실로 불구가 되거나, 혼수상태에 빠질 수 있으며, 심한 경우에는 사망에 이르게 된다. 미국의 한 통계조사에 따르면 뇌졸중의 연간 발생빈도는 약 50만명에 이르며, 이 환자에 대한 치료비만도 연간 약 300억불에 달하고 심장질환과 암에 이어서 사망의 3번째 원인으로 꼽히고 있다.<sup>1)</sup> 한편 국내의 경우 단일 질환으로서는 제1위의 사망원인으로 추정되고 있으며 매년 약 20만명의 성인들이 뇌졸중으로 고통을 받고 있는 실정이다.<sup>2)</sup> 이 질환의 예방목적으로 사용되는 약물들은 고혈압 치료제, 뇌혈류 개선제 및 고지혈증 치료제 등이 있으나, 뇌졸중 발생 후에는 혈전용해제를 제외하고는 허혈에 의해 야기되는 뇌신경세포 손상을 보호해 줄 수 있는 적절한 치료제가 현재로서는 없는 실정이므로 개발이 시급하다.

선진국에서는 오래 전부터 뇌허혈로부터 뇌손상에 이르는 일련의 병인 기전 및 치료방법을 모색하기 위하여 뇌허혈의 실험동물 모델을 개발하는 연구 및 *in vitro* neuronal/glial cell culture system을 이용하는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이런 실험모델을 토대로 하여 1980년대에는 ischemia에 의해 다량의 glutamate와 같은 흥분성 신경전달물질이 유리되어 수용체 작용을 통해 과량의 calcium이 세포내로 유입되어 excitotoxicity를 일으킴으로서 궁극적으로 뇌신경세포를 사멸시킨다는 glutamate cascade 가설이 제안되었다.<sup>3)</sup> 이 가설을 근거로 선진국의 제약회사 및 연구소에서는 집중적인 연구를 수행한 결과 다수의 NMDA 수용체 길항약들을 개발하였다. 이 약물들은 실험동물 모델에서 focal ischemia에 의한 뇌손상을 감소시켜 일부가 현재 임상시험 중에 있으나 거의 대부분은 임상에서 부작용 내지는 효능이 검증되지 않아서 개발이 중단되었다. 또한 amplification 과정에 관여하는 칼슘이온의 세포내로의 유입을 막기 위하여 Nimodipine, Lofarizine(Syntex; 제2상에서 종료), SNX111, Isradipine과 같은 칼슘 channel blocker들이 시도되었으나 그 효과가 일정하게 나타나지 않았으며 여전히 연구되어야 할 부분으로 남아있다.

뇌손상에 의한 뇌세포 사멸의 마지막 expression 단계를 차단할 목적으로 Pharmacia & Upjohn Company에서는 free radical scavenger로서 Tirilazad를 제3상에서 고용량으로 시험하였으나 safety 문제로 말미암아 중단되었다.<sup>4)</sup> 이와 같이 현재 여러 가지 약물들이 뇌졸중의 신경보호제로서 임상시험 단계에 있는 수준이나

이 질환에 의한 뇌손상과 관련된 기전들의 복잡다단성, 뇌조직 내로의 약물 침투, 부작용 등에 관한 문제들로 말미암아 많은 부분이 아직도 연구 개발되어야 할 대상으로 남아 있는 실정이다.

한편, 허혈성 뇌손상의 neurotoxic cascade에 있어 세포내 과량의 cytotoxic 칼슘이온은 NOS의 활성화 및 과량의 NO 생성을 통해 reactive oxygen species(ROS, RNS)를 발생시킨다. 또한 mitochondria에 있어 증가된 칼슘이온은 oxidative phosphorylation을 uncoupling시킴으로써 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical들의 생성 증가를 초래한다. 이와 같은 free radical들은 DNA 손상 외에도 lipid peroxidation에 의해 세포막을 손상시킨다. 더욱이 자발적 또는 치료에 의해 허혈 부위의 blood flow가 회복되어져 reperfusion이 일어날 때는 공급되는 산소가 free radical들을 발생시키는 생화학적 반응을 증강시킬 수 있다. 따라서 최근에는 이런 free radical들에 의한 뇌신경세포 손상을 방지하기 위하여 항산화제를 뇌졸중 치료를 위한 신경보호제로서 개발하려는 노력이 아래의 표 1과 같이 시도되고 있다.

표 1. 항산화성 뇌졸중 치료제 개발 동향

Drug	Source	Mechanism of Action	Phase
Tirilazad Mesylate	Pharmacia	LPO inhibitor/NOS inhibitor	Abandoned
Edaravone	Mitsubishi Pharma	Antioxidant/Free radical scavenger	L-2001
Ebselen	Daiichi Pharmaceutical	Antioxidant	Preregistered
Nicaraven	Chugai/Novartis	LPO inhibitor/ Free radical scavenger	Preregistered
NS-7	Nippon Shinyaku/Schering AG	NOS inhibitor/Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> channel blocker	P II
NXY-059	Centaur/AstraZeneca	Free radical scavenger	P II
AEOL-10113	Incara	Antioxidant	Preclinical
AEOL-10150	Incara	Antioxidant	IND
BN-80933	Beaufour-Ipsen	Free radical scavenger/nNOS inhibitor	Preclinical
L-Dehydroascorbic Acid	Progenics	Free radical scavenger	Preclinical
EUK-189	Eukarion	Antioxidant	Preclinical
GT-015	GoBang	Nitrate	Preclinical
GT-715	GoBang	Nitrate	Preclinical
SPBN	Centaur/Eisai	Free radical scavenger	Preclinical
SUN-N8075	Suntory/Taisho	Antioxidant/Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> channel blocker	Preclinical
KR-31378	KRICT	Antioxidant/K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub> channel activator	Preclinical

최근에는 이 중에서도 signaling molecule 및 neurotoxin으로서 작용할 수 있는 free radical인 NO가 허혈성 뇌손상에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다는 보고가 증가 일로에 있는 추세이다.<sup>5)</sup> 그러나 현재 선진 제약회사에서 진행되고 있는 연구 방향은 주로 vitamine E 및 C의 구조 변형 등을 이용한 항산화제 합성을 통하여 뇌졸중 치료제로서 개발하는 분야에 초점이 맞추어져 있으나, 뇌허혈 후 동반되는 뇌손상의 속도를 늦추거나 예방을 위한 식품의약의 개발은 미진한 것으로 보인다.

한편, 과거 천연물로부터 항산화제 탐색연구가 항산화 활성을 이용한 식품 첨가제 등 식품소재로 활발히 연구되어 왔다. 최근 들어, 항산화제와 여러 질병간의 상

관관계가 점차 밝혀짐으로써 이들을 류마티스를 포함한 염증치료제, 암예방제, 노화억제제, 치매예방제, 미백제, 동맥경화증 치료제 등 수 많은 질병치료제 및 보호제로 개발하려는 경향으로 점차 확대되고 있다. 항산화 효과는 주로 플라보노이드 계열의 polyphenol류 화합물에 많이 존재하며, 그 약리 효과는 이들을 함유한 식품을 섭취할 때 심장병, 동맥경화증과 같은 심혈관계 질환, 암 등에 대한 예방 효과가 있다는 것이 오래 전부터 민간에 널리 알려져 왔다. 그러나 현재까지 알려진 플라보노이드와 같은 polyphenol 류의 천연 항산화제들은 대부분 항산화 효과가 만족할 수준에 미치지 못하거나, 효능이 강하지만 뇌 내로의 약물 이행도(BBB 투과성), 선택성, 용해도 등의 문제점들로 인하여 치료제로의 개발에 많은 어려움이 있어 왔다.

국내에서도 우수한 뇌신경보호제 개발을 적극적이며 효율적으로 추진하기 위해서는, *in vitro* 연구 외에 무엇보다도 임상에 매우 유사한 허혈성 뇌손상의 실험동물 모델 및 뇌손상 평가법을 이용하여 천연물추출을 통해 도출되는 항산화성 후보물질들의 효능 검색과 그 약리 기전, 약동, 대사 및 안전성 규명 연구를 체계적으로 확립해 나가는 것이 필요하므로 이에 대한 연구 투자가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 특히 국소 허혈성 뇌손상의 *in vivo* 효능 검색 연구는 본 연구실이 주축이 되어 소수의 연구자들에 의해서만 진행되고 있는 실정이므로 이 분야의 선진국 수준으로의 활발한 응용을 위해서는 적절한 지원을 통한 시스템의 구축이 필요하다.

현재 뇌졸중 치료제를 개발하기 위하여 선진외국에서 활발한 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 현재까지 뇌졸중 및 치매와 같은 노인성 뇌신경질환에 대한 뚜렷한 치료제가 없는 실정이다. 미국, 일본, 유럽국가와 같은 선진국들은 물론 우리나라도 노인층 인구 증가에 따른 환자발생률이 점차 증가 일로에 있으므로 뇌손상 보호제 개발은 막대한 수요를 창출할 것이며, 그 시장규모 또한 엄청날 것으로 보인다. 특히, 천연물로부터 새로운 뇌손상 보호제를 개발하면 자생식물의 고부가가치를 높일 뿐만 아니라 경제·산업적인 파급효과 또한 상당할 것이므로 대단히 중요한 연구분야로 여겨진다.

알로에는 설사, 화상, 피부염 등의 치료를 위한 민간요법으로 오래 사용되어 왔으며 최근에는 건강식품 또는 화장품으로도 많이 사용되고 있다. 알로에의 주요 성분 중 하나인 알로에신[8-C-β-D-glucopyranosyl-7-hydroxy-5-methyl-2-(2-oxopropyl)-4H-1-benzopyran-4-one]은 크로몬(chromone) 유도체에 속하는 화합물로 비타민 E의 항산화 활성 부위와 강력한 항산화제로 알려진 트롤록스(Trolox)와 유사한 기본골격을 갖고 있다. 또한, 알로에신은 창상 치유 효과, 위궤양 치료 효과, 미백 효과, 시스플라틴의 신장 독성 감소 효과 등의 다양한 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다. 그러나 지금까지는 알로에신의 허혈성 질환에 대한 치료 효능에 대하여 전혀 밝혀진 바가 없었다. 이에 본 연구자들은 알로에신이 구조적으로 항산화 효능을 나타내는 골격을 갖추고 있고, 허혈로 인한 뇌손상을 방지할 수 있을 것으로 기대하여 예비실험을 수행한 결과, 일시적 뇌허혈 동물모델에서 뇌손상을 억제한다는 사실을 발견하였다. 따라서 본 연구에서는 알로에신의 다양한 모델 시스템에서의 뇌

신경세포 손상억제 효능 검색, 작용기전의 규명, 안전성, 일반약리 시험 등 다양한 연구를 수행하여 알로에신을 허혈로 인한 뇌손상 보호용 후보물질로 개발하며, 알로에신을 함유하고 있는 알로에를 뇌손상 보호용 식품의약으로 개발하고자 하였다.

또한 알로에신 이외에도 국내 자생식물의 추출물을 대상으로 항산화 효능을 검색하고, 항산화 효능이 입증된 식물추출물로부터 단일성분들을 분리하여 이들의 항산화 효능, 뇌신경세포 보호효능, 허혈성 동물모델에서의 뇌손상 보호 효능 등을 검색하여 효능이 우수한 성분들을 알로에신의 후속대체물질 및 식품의약으로 개발하고자 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

선진국에서는 이미 오래 전부터 뇌허혈로부터 뇌손상에 이르는 일련의 병인 기전 및 치료방법을 모색하기 위하여 뇌허혈의 실험동물 모델, 특히 rat이나 gerbil을 사용하는 rodent model을 개발하는 연구 및 *in vitro* brain tissue slice 또는 neuronal/glial cell culture system을 이용하는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이런 실험모델을 토대로 하여 1980년대에는, ischemia에 의해 다량의 glutamate와 같은 흥분성 신경전달물질이 유리되어 수용체 작용을 통해 과량의 calcium이 세포내로 유입되어 excitotoxicity를 일으킴으로서 궁극적으로 뇌신경세포를 사멸시킨다는 glutamate cascade 가설이 제안되어졌다. 이 가설에 바탕을 두고 세포외액중의 glutamate 농도 측정, glutamate 수용체 길항약 특히 NMDA 수용체의 길항약이나 magnesium의 사용 및 adenosine 수용체 효능약과 같은 glutamate 유리 억제제와 methionine sulfoximine과 같은 glutamate 합성 억제제 등을 사용한 실험결과들에 의하여 이 가설은 널리 지지를 받게 되었다. 그 후에 선진국의 제약회사 및 연구소에서는 이들 여러 가지 가운데 NMDA 수용체의 길항약 개발에 집중적으로 노력을 기울인 결과 CGS 19755, MK-801, Dextrophan, Remacemide, Eliprodil, Magnesium sulfate, CNS 1102 등과 같은 화합물들을 개발하였다. 이 약물들은 실험동물 모델에 있어 focal ischemia에 의한 뇌손상을 감소시키는 것으로 나타남으로써 일부가 현재 임상시험 중에 있으나 대부분은 임상에서 부작용 내지는 효능이 검증되지 않음으로서 중단되었으며 특히 CGS 19755와 Eliprodil은 제 3상에서 중단되었다. 반면에 global ischemia에 의한 뇌손상은 다른 종류의 glutamate 수용체에 속하는 AMPA/kainate 수용체의 길항약인 NBQX에 의하여 감소되는 것으로 보고되었다.<sup>6)</sup> 또한 amplification 과정에 관여하는 칼슘이온의 세포내로의 유입을 막기 위하여 Nimodipine, Lofarizine, SNX111, Isradipine과 같은 칼슘 channel blockers가 시도되었으나 그 효과가 일정하게 나타나지 않았으며, GM1 ganglioside(제3상에서 종료)를 포함하는 protein kinase C 억제제들의 효과도 응용하려고 시도되었으나 여전히 연구되어야 할 부분으로 남아있다. 마지막 expression 단계를 차단할 목적으로 Pharmacia & Upjohn Company에서는 free radical scavenger로서 Tirilazad와 같은 21-aminosteroid lipid-peroxidation inhibitor 화합물들을 개발해 나가고 있으며, 최근에는 Na<sup>+</sup> channel 차단제(Lubeluzole, Riluzole, Fosphenytoin), nitric oxide (NO) 합성효소 억제제와 여러 종류의 neurotrophic factor (Trofermin; Scios Nova)들도 뇌신경보호에 효과가 있는 것으로 관찰되어 이들을 응용한 약물을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들 후보약물들의 개발 현황이 표 2에 요약되어 있다.

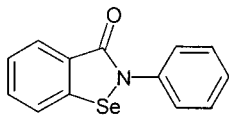
## 표 2. Acute stroke trials of agents affecting excitotoxicity

Drug category	Drug name	Mechanism	Trial status
Glutamate antagonists	YM872	AMPA antagonists	P II: ongoing
	ZK-200775 (MPQX)		P IIa: abandoned
	CGS 19755 (Selfotel)	Competitive NMDA antagonists	P III: no efficacy
	Aptiganel (Cerestat)	NMDA channel blockers	P III: no efficacy
	Dextrorphan		P II: abandoned
	Dextromethorphan		Abandoned
	Magnesium		P III: ongoing
	NPS 1506		P Ib/IIa: ongoing
	Remacemide		P III in CP bypass: borderline efficacy
	ACEA 1021 (licostinel)	NMDA glycine-site antagonist	P I: abandoned
GV 150526		Abandoned	
Eliprodil	NMDA polyamine-site antagonist	P III: abandoned	
Voltage-gated calcium-channel antagonist	Nimodipine	Reduction of Ca <sup>2+</sup> influx	P III: no efficacy
	Flunarizine		P III: no efficacy
Voltage-dependent potassium-channel agonist	BMS-204352	Reduction of Ca <sup>2+</sup> influx	P III: ongoing
Sodium -channel antagonist	Fosphenytoin	Reduction of excitation & glutamate release	P III: no efficacy
GABA agonist	Clomethiazole	Reduction of excitation & glutamate release	P III: ongoing
Free-radical scavengers	Tirilazad	Reduction of free-radical-mediated injury	P III: no efficacy
	Ebselen		P III: borderline efficacy
Unknown	Lubeluzole	Reduction of glutamate release & neuronal excitability, or reduction of NO-mediated injury	P III: no efficacy

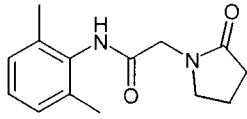
특히 허혈성 뇌손상의 neurotoxic cascade에 있어 세포내 과량의 cytotoxic 칼슘 이온은 NO 합성효소의 활성화 및 과량의 NO 생성을 통해 ROS(RNS)를 발생시킨다. 또한 mitochondria에 있어 증가된 칼슘이온은 oxidative phosphorylation을 uncoupling시킴으로써 에너지 공급의 더 한층의 감소 및 free radical들의 생성 증가를 초래한다. 이와 같은 free radical들은 DNA 손상외에도 lipid peroxidation에 의해 세포막을 손상시킨다. 더욱이 자발적 또는 치료에 의해 허혈 부위의 blood flow가 회복되어져 reperfusion이 일어날 때는 공급되는 산소가 free radical들을 발생시키는 생화학적 반응을 증강시킬 수 있다. 따라서 최근에는 이런 free radical들에 의한 뇌신경세포손상을 방지하기 위하여 항산화제를 뇌졸중 치료를 위한 신경보호제로서 개발하려는 노력이 다음과 같이 선진국에서 진행되고 있다.

### (1) Daiichi Pharmaceutical ; Ebselen, Nefiracetam

Daiichi Pharm.에서는 항산화 효능이 있는 Ebselen과, 현재 mode of action은 잘 알려져 있지는 않지만, TRANSLON이란 brand name으로 cerebrovascular disorder에 적용하여 시판되고 있는 Nefiracetam을 뇌손상 보호제로 개발하고 있다.



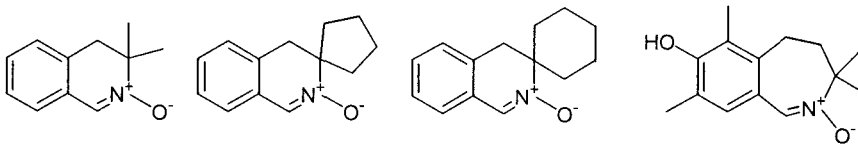
Ebselen



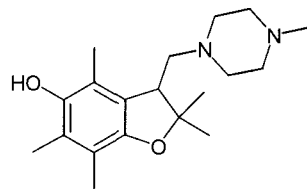
Nefiracetam

(2) Hoechst Marion Roussel ; cyclic nitron type compounds

뇌졸중은 혈관손상에 의한 질환으로 특히 뇌혈관 손상에 직접적인 원인은 free radical로 알려져 왔다. 따라서 이러한 radical들을 trapping 할 수 있는 compounds를 약제로 이용하려는 연구는 활발히 진행되었는데, 그 중 주목받고 있는 물질 중 하나가 PBN (phenyl-tert-butyl-nitron)이다. 특히 Hoechst Marion Roussel (HMR)은 이 PBN보다 강력한 radical trapping 물질로 cyclic nitron type 물질을 개발하였다. 이런 물질들은 특히 radical-induced oxidative damage 받은 조직의 보호제로 사용 가능하다고 발표했다. HMR에서는 vitamin E 유도체인 MDL-74180DA를 개발하고 있는데, 이 화합물은 antioxidant의 효과를 나타내는 부분과 lipophilicity를 증가시키는 부분의 결합한 구조를 가지고 있으며, rat 모델에서 transient focal cerebral ischemia 후 infarct volume을 감소시키는데 효과가 있다는 보고가 있다.



cyclic Nitron

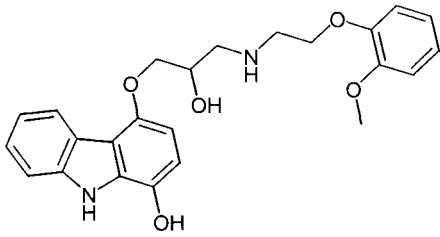


MDL-74180DA

(3) SmithKline Beecham ; Carvedilol (SB-209995)

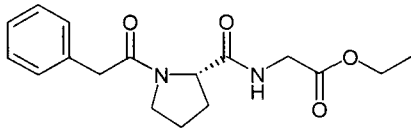
SmithKline Beecham 사에서는 antioxidant activity 중 특히 iron-catalyzed lipid peroxidation에 가장 유용하게 적용될 수 있다는 Carvedilol을 뇌손상 치료제로 개발하고 있다고 보고하였다.





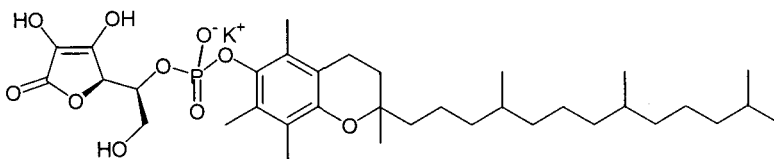
(4) Russian Academy of Medical Sciences ; GVS-111

동물 실험에서 restoring cognition/memory에 효과가 있고, neurodegenerative diseases의 pathogenic mechanisms에 대해 연구되었는데, GVS-111은 neuronal voltage-gated  $Ca^{2+}$ 과  $K^+$  channels을 block하고, neurotoxic한 glutamate 농도에서 ROS의 증가가 발견되는데 이 단계에서도 neurons의 survival을 증가시키는데 효과가 있다고 보고하였다.



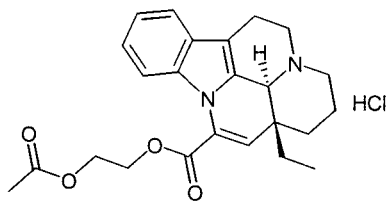
(5) Senju Pharmaceuticals

Senju Pharm.에서는 수용성인 Vitamin C와 지용성인 Vitamin E를 결합시킨 구조의 화합물이 free-radical scavenger로서 myocardial infarction, heart failure, arrhythmia, cerebral infarction, stroke 등에 적용될 수 있다는 보고를 하였다.



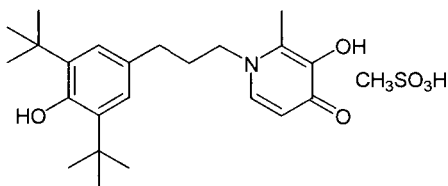
(6) Gedeon Richter ; RGH-5279

*trans*-Apovincaminic acid ester 유도체인 RGH-5279가 anti-ischemic 및 anti-amnesic 쪽에 이용 가능하다고 보고되었다. 이 화합물의 lipid peroxidation 저해효과는 enzymatic (NADPH-induced)와 nonenzymatic ( $Fe^{2+}$ -induced)에서  $IC_{50}$  value가 각각 6.3과 4.8 $\mu$ M로 나타났으며, anti-ischemic activity는 cerebral ischemia 모델에서  $ED_{50}$ 가 0.76 mg/kg (i.p.)로 같은 모델에서 idebenone과 vitamin E는 각각 4.5 mg/kg (i.p.)와 17.80 mg/kg (i.p.)로 상대적으로 우수한 효과를 나타낸다고 보고되었다.

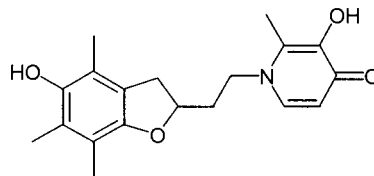


(7) Cerebrus ; 276705 , 276707

ortho-Hydroxypyridinone 유도체들은 iron-chelating과 antioxidant 특성을 나타내어 oxidative stress, 특히 stroke에 유효한 neuroprotective agent로 가능성이 있다는 보고가 되었다.



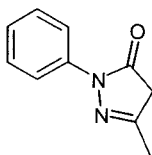
**276705**



**276707**

(8) Mitsubishi Chemical ; Edaravone (MCI-186)

그 동안 개발된 free-radical trapping 물질들은 낮은 lipophilicity와 빠르게 몸에서 배출되어 직접적인 약효가 발현되기 힘들었다. 반면에 Mitsubishi chemical에서 개발한 Edaravone은 lipophilic한 항산화 화합물로 hydroxyl radical scavenging activity를 가지는 것으로 보고 되었으며, 현재 임상단계는 phase III에 있다.



(10) 국내의 경우

국내에서는, 서울대학교에서 brain cell culture system을 이용하여 흥분성 아미노산에 의해 유발되는 neurotoxicity를 억제하는 천연물을 검색하는 연구가 수행되고 있다.

일부 의과대학에서는 cerebral ischemia의 *in vivo* 및 *in vitro* model을 이용하여 세포사멸의 신호변환 기전 등을 규명하는 연구가 수행되고 있으며, 한국화학연구원 에서 항산화성 K<sup>+</sup> channel activator 또는 NMDA glycine site antagonist를 합성하여 뇌손상 치료제로 개발하려는 연구가 진행되고 있다.

한편 KIST에서는 focal cerebral ischemia의 뇌손상질환 백서 model을 개발 확립하여 여러 물질들의 다양한 생체 내 투여에 의한 뇌신경보호 효능을 검색하는 연구를 수행하고 있다.

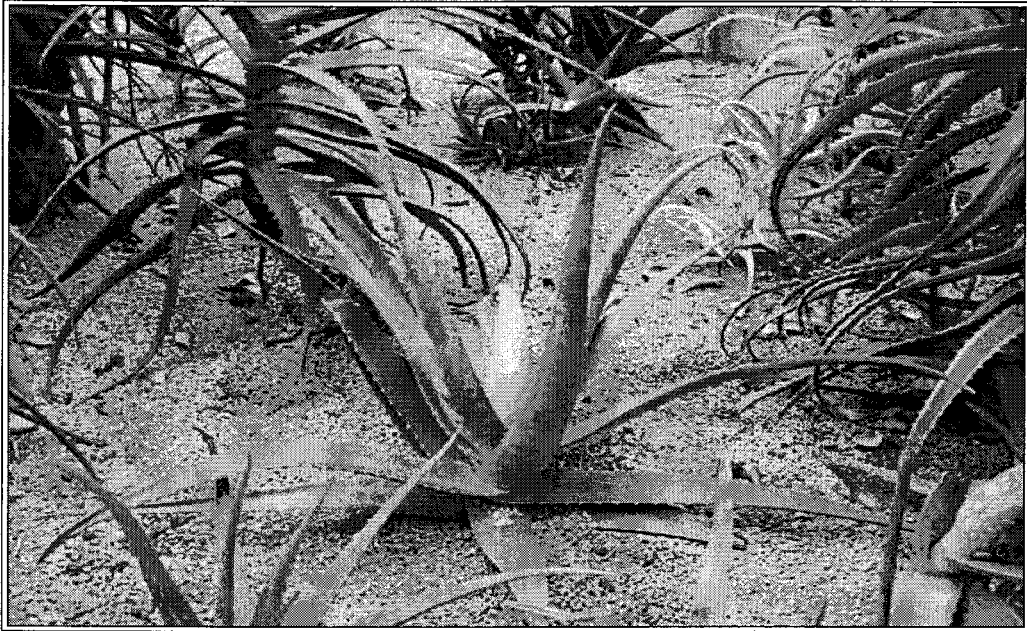
최근에는 염증억제약물에 의해서 Alzheimer병과 파킨슨씨병의 발병률이 감소한다는 보고가 있는 이후, 뇌 염증 반응을 매개하는 대표적인 세포인 마이크로글리아 세포의 활성화(activated microglia)를 억제하는 물질의 탐색연구가 일부 대학에서 시도되고 있다.

또한 경희대학교 한의과대학에서는 국내 자생식물유래 한약재로부터 신경보호효과가 있는 식의약품을 개발하려는 연구가 진행되고 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 알로에(Aloe)에 대한 연구

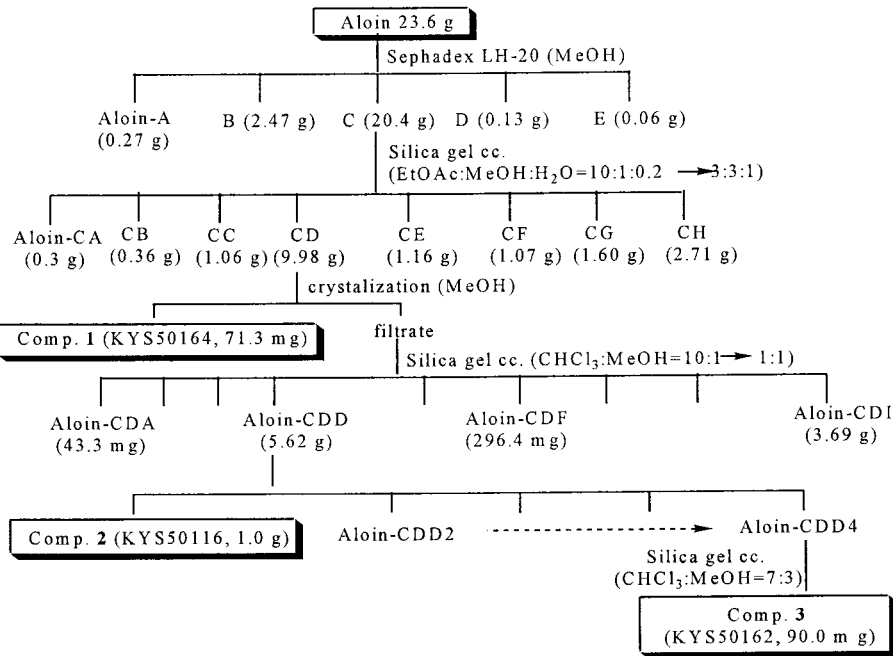
#### Aloe Vera



#### 1. 알로에 유효성분의 분리방법

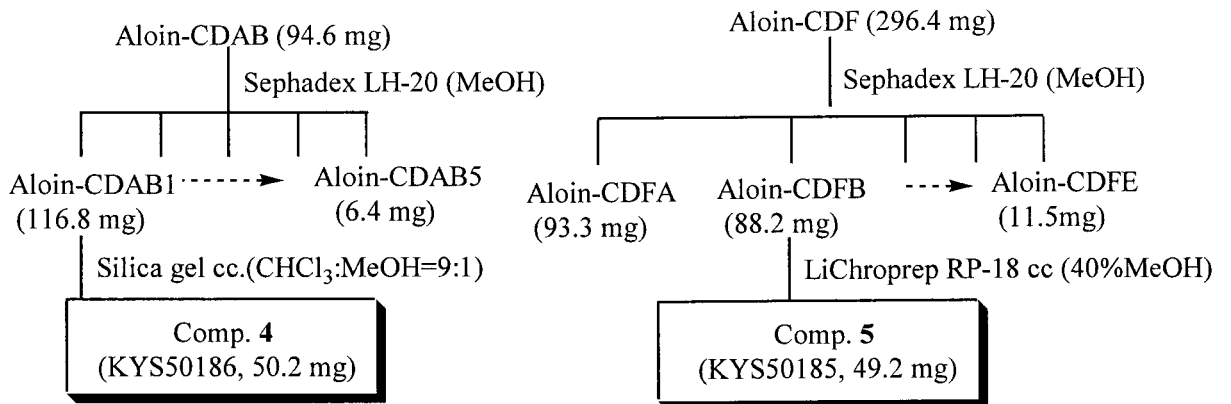
##### 가. 화합물 1-3의 분리

본 실험에 사용된 Aloin은 2000년 12월 18일 Nacalai Tesque Inc. (Japan)에서 판매하는 시약을 구입하여 실험에 이용하였다. Aloin 23.6 g을 Sephadex LH-20(MeOH)을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 소 분획(Aloin A~E)으로 나누었다. 소 분획 Aloin C (20.4 g)를 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 8개의 소 분획(Aloin CA~CH)으로 나누었다. 이용한 용매는 ethyl acetate/methanol/water(10:1:0.2 → 3:3:1)를 사용하였으며, 마지막은 메탄올로 칼럼을 씻어 주었다. 소 분획 Aloin CD (9.98 g)은 메탄올을 용매로 재결정을 실시하여 화합물 1(KYS 50164, 71.3 mg)을 얻었다. 여액은 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 9개의 소 분획(Aloin CDA~CDI)으로 나누었다. 이용한 용매는 CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10:1 → 1:1)를 사용하였으며, 마지막은 메탄올로 칼럼을 씻어 주었다. 네 번째 소 분획(Aloin CDD)은 Sephadex LH-20(MeOH)을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 화합물 2(KYS 50116, 1.0 g)를 분리 하였고, 소 분획(Aloin CDD4)은 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 화합물 3(KYS 50162, 90.9 mg)을 분리하였다.



나. 화합물 4와 5의 분리

소 분획(Aloin-CDAB) 94.6 mg을 Sephadex LH-20(MeOH)을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 분획 (Aloin-CDAB1~5)으로 나누었으며, 첫 번째 분획 (Aloin-CDAB1) 116.8 mg을 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 화합물 4(KYS 50186, 50.2 mg)를 분리하였다. 이때 사용한 용매는 CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9/1)의 혼합용매를 전개용매로 사용하였다. 소 분획(Aloin-CDF) 296.4 mg을 Sephadex LH-20(MeOH)을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 분획 (Aloin-CDFA~E)으로 나누었으며, 소 분획(Aloin-CDFB) 88.2 mg는 LiChroprep RP-18을 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 사용한 용매는 40% methanol을 사용하여 화합물 5(KYS 50185, 49.2 mg)를 분리하였다.



## 2. 알로에신 유도체의 합성

### 가. 화합물 6(KYS 50161, 10R,S-8-C-Glucosylaloesol)의 합성

25 mg(0.063 mmoles)의 aloesin(KYS50116)을 5 ml의 메탄올에 용해하고 47 mg(1.24 mmoles)의 NaBH<sub>4</sub>를 가하여 실온에서 3시간 반응시킨다. 이 반응 용액을 3N HCl 용액으로 pH 3으로 acidify한 후 부탄올로 생성물을 추출한다. 한데 모은 부탄올용액을 농축하여 남은 잔사를 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=6:4)하여 화합물 6(KYS 50161, 23.2 mg)을 93%의 수율로 얻을 수 있었다.<sup>7)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 6.59 (1H, s, H-6), 5.98 (1H, s, H-3), 4.85 (1H, br, H-1'), 4.8-3.35 (6H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 2.64 (1H, d, J=6.52 Hz, H-9), 2.60 (3H, s, 5-Me), 1.17 (3H, d, J=6.04 Hz, 11-Me).

### 나. 화합물 7(KYS 50163, 8-C-Glucosyl-7-O-methylaloesin)의 합성

93.5 mg(0.237 mmoles)의 aloesin(KYS 50116)을 10 ml의 메탄올에 용해하고 CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> ether 용액을 천천히 가하여 30분 동안 반응시킨다. 반응 후 농축한 잔사는 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=5:1)하여 화합물 7(KYS 50163, 56.8 mg)을 얻을 수 있었다.<sup>8)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 6.82 (1H, s, H-6), 6.05 (1H, s, H-3), 4.87 (1H, d, overlapped with water peak, H-1'), 4.8-3.35 (8H, m, H-2', 3', 4', 5', 6', 9), 3.83 (3H, s, OMe), 2.65 (3H, s, 5-Me), 2.18 (3H, s, 11-Me).

### 다. 화합물 8(KYS 50187, aloeresin A)의 합성

87.3 mg(0.221 mmoles)의 aloesin(KYS50116)을 14 ml의 THF에 용해하여 0°C에서 54.5 mg(0.332 mmoles)의 4-coumaric acid를 가한 후, 92.2 mg(0.443 mmoles)의 DCC와 14.5 mg(0.11 mmoles)의 DMAP를 가하여 반응시킨다. 이 반응 용액은 3-5일 동안 실온에서 반응시킨 후, 불용물질은 필터하고 여액은 농축한 다음, silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=6:1)하여 화합물 8(KYS 50187, 27.9 mg)을 얻을 수 있었다.<sup>9)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.29 (1H, d, J=16.2 Hz, H-3''), 7.24 (2H, d, J=8.41 Hz, H-5'', 9''), 6.64 (2H, d, J=8.49 Hz, H-6'', 8''), 6.46 (1H, s, H-6), 6.08 (1H, s, H-3), 6.98 (1H, d, J=15.9 Hz, H-2''), 5.45 (1H, dd, J=9.81, 9.58 Hz, H-2'), 5.04 (1H, d, J=10.1 Hz, H-1'), 3.82 (1H, dd, J=12.1, 1.9 Hz, H-6'), 3.63 (3H, m, H-3', 6', 9), 3.39 (2H, m, H-4', 5'), 2.53 (3H, s, 12-Me), 2.24 (3H, s, 11-Me).

### 라. 화합물 9(KYS 50205, aloeresin F)의 합성

45.0 mg(0.114 mmoles)의 aloesin(KYS 50116)을 5 ml의 THF에 용해하고 29.1 mg

(0.197 mmoles)의 cinnamic acid를 가한 후, 54.1 mg(0.263 mmoles)의 DCC와 8.01 mg(0.0657 mmoles)의 DMAP를 가하여 실온에서 반응시킨다. 이 반응 용액은 3일 동안 반응시킨 후, ethyl acetate로 충분히 추출한 후 농축한 다음, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수한 다음, 농축한 잔사는 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=10:1)하여 화합물 9(KYS 50205, 21.5 mg)와 19.5 mg의 aloesin(KYS 50116)을 얻을 수 있었다.<sup>9)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.29 (1H, d, J=15.72 Hz, H-3''), 7.23 (5H, m, H-ph), 6.46 (1H, s, H-6), 6.19 (1H, d, J=16.02 Hz, H-2''), 6.19 (1H, s, H-3), 5.55 (1H, dd, J=9.62, 9.56 Hz, H-2'), 5.04 (1H, d, J=10.1 Hz, H-1'), 3.82 (1H, dd, J=12.1, 1.8 Hz, H-6'), 3.63 (3H, m, H-3', 6', 9), 3.41 (2H, m, H-4', 5'), 2.52 (3H, s, 12-Me), 2.23 (3H, s, 11-Me).

마. 화합물 10(KYS 50206, 4''-methoxyaloeresin F)의 합성

45.0 mg(0.114 mmoles)의 aloesin(KYS 50116)을 5 ml의 THF에 용해하고 34.97 mg(0.196 mmoles)의 4-methoxycinnamic acid를 가한 후, 53.9 mg(0.262 mmoles)의 DCC와 8.01 mg(0.0657 mmoles)의 DMAP를 가하여 실온에서 반응시킨다. 이 반응 용액은 3일 동안 반응시킨 후, ethyl acetate로 충분히 추출한 후 농축한 다음, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수한 다음, 농축한 잔사는 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피를 실시(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=10:1)하여 화합물 10(KYS 50206, 18.9 mg)과 10.0 mg의 aloesin(KYS 50116)을 얻을 수 있었다.<sup>9)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.32 (2H, d, J=7.97 Hz, H-5'', 9''), 7.29 (1H, d, J=16.2 Hz, H-3''), 6.77 (2H, d, J=8.61 Hz, H-6'', 8''), 6.59 (1H, s, H-6), 6.10 (1H, s, H-3), 6.04 (1H, d, J=16.0 Hz, H-2''), 5.54 (1H, t, J=9.60 Hz, H-2'), 5.04 (1H, d, J=10.2 Hz, H-1'), 3.82 (1H, dd, J=12.1, 1.62 Hz, H-6'), 3.69 (3H, s, OMe), 3.60 (3H, m, H-3', 6', 9), 3.40 (2H, m, H-4', 5'), 2.53 (3H, s, 12-Me), 2.24 (3H, s, 11-Me).

### 3. 알로에 유효성분의 구조규명

가. 화합물 1(KYS 50164)의 구조분석

화합물 1은 메탄올 용액에서 결정으로 생성된다. <sup>1</sup>H-NMR에서 δ 7.70에서 triplet(J=8.0 Hz) peak(H-6)와 δ 7.25(H-7)와 7.06(H-5)에서의 doublet peak는 하나의 aromatic ring에서 기인한 peak들이며, δ 7.26(H-4)과 7.10(H-2)에서의 broad한 singlet peak는 또 다른 aromatic ring에서 기인한 것임을 알 수 있었다. δ 4.89에서는 2개의 수소에서 기인한 benzyl proton의 존재와 δ 3.81-3.14에서의 복잡한 peak는 sugar의 존재를 예상할 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY로부터 δ 4.78에서의 10번 수소는 3.63에서의 peak와 cross peak가 나타나 anomeric proton임을 알 수 있었다. 따라서 화합물 1은 문헌과의 비교에 의하여 aloin

A(isobarbaloin)로 동정하였다.<sup>10,11)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.70 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H-6), 7.26 (1H, s, H-4), 7.25 (1H, d, overlapped with H-4, H-7), 7.10 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5), 4.89 (2H, d, *J*=1.08 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 4.78 (1H, d, *J*=1.57 Hz, H-10), 3.79 (1H, dd, *J*=11.6, 1.28 Hz, H-6'), 3.65-3.14 (6H, m, H-1', 2', 3', 4', 5', 6').

나. 화합물 2(KYS 50116)의 구조분석

화합물 2는 무색의 amorphous powder로 TLC plate에서 황산 발색 시 노란색으로 발색된다. <sup>1</sup>H-NMR에서 δ 6.58(H-6)에서의 singlet과 6.05(H-3)에서의 peak는 aloesin의 chromone moiety에서 기인하는 peak임을 알 수 있으며, δ 4.85에서의 doublet peak(*J*=9.8 Hz)는 glucose의 anomeric proton에서 기인하며 β-form임을 알 수 있었다. δ 3.91-3.32에서의 multiplet peaks는 2번에 치환하고 있는 9번의 methylene peak를 포함하여 sugar의 나머지 수소에서 기인하는 peak가 나타나고 있다. δ 2.59에서의 singlet peak는 3개의 수소에 해당하는 peak로 aromatic에 치환하고 있기 때문에 down-field shift하고 있으며, δ 2.19에서의 단일 피크는 11번의 methyl peak에서 기인한 것임을 알 수 있었다. 따라서 화합물 2는 aloesin으로 동정하였다.<sup>12)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 6.58 (1H, s, H-6), 6.06 (1H, s, H-3), 4.85 (1H, d, *J*=9.8 Hz, H-1'), 4.8-3.35 (8H, m, H-2', 3', 4', 5', 6', 9), 2.59 (3H, s, 5-Me), 2.19 (3H, s, 11-Me).

다. 화합물 3(KYS 50162)의 구조분석

화합물 3은 <sup>1</sup>H-NMR에서 화합물 2와 유사하게 나타나고 있으나, δ 3.85에서 3개의 수소에서 기인한 methoxy peak가 있으며, δ 4.19에서의 quartet은 aloesin에서의 carbonyl group이 reduction되어 methine proton이 생성되어 δ 1.17에서의 peak(H-11)와 coupling을 하기 때문임을 알 수 있었다. 따라서 δ 2.64에서의 doublet는 9번에서 기인한 것으로 aloesin의 9번 수소와 비교할 때 up-field로 이동한 것을 알 수 있었다. 따라서 화합물 3은 8-C-glucosyl-7-O-methyl-(10S)-aloesol로 동정하였다.<sup>12)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 6.83 (1H, s, H-6), 6.01 (1H, s, H-3), 4.89 (1H, d, *J*=9.95 Hz, H-1'), 4.19 (1H, q, H-10), 4.15 (1H, t, H-3'), 3.85 (3H, s, OMe), 3.77 (1H, dd, *J*=12.08, 2.09 Hz, H-6'), 3.57 (1H, dd, *J*=12.0, 5.72 Hz, H-6'), 3.40-3.24 (3H, m, H-2', 4', 5'), 2.71 (3H, s, 5-Me), 2.64 (2H, d, *J*=6.58 Hz, H-9), 1.17 (3H, d, *J*=6.23 Hz, 11-Me).

라. 화합물 4(KYS 50186)의 구조분석

화합물 4는 <sup>1</sup>H-NMR에서 화합물 3과 똑같은 peak가 나타나고 있으나 aromatic 영역에서 *trans* vinyl group에서 기인한 peak와 phenyl ring에서 기인한 peak가 나타나고 있는 것을 알았다. 즉, δ 7.24와 6.05에서의 doublet peak (*J*=16.0 Hz)는 *trans* vinyl group이 나타



나고,  $\delta$  7.23과 7.13에서 5개의 수소에 해당하는 peak가 나타나 이 화합물에는 하나의 phenyl ring에 *trans* vinyl이 있는 cinnamic acid가 치환하고 있음을 알 수 있었다.  $\delta$  5.56에서의 triplet peak( $J=9.9$  Hz)는 sugar의 2번에서 기인한 peak로 화합물 3에서 cinnamoyl group이 2번에 치환되어 down-field shift된 것임을 알 수 있었다.  $\delta$  5.02에서 anomeric proton이 10.1 Hz로 나타나 역시 glucos가  $\beta$ -form임을 알 수 있으며,  $\delta$  3.67에서의 singlet peak는 methoxy peak를,  $\delta$  2.50에서 12번의 methyl peak가 나타남을 알 수 있었다. 또한,  $\delta$  1.12에서의 doublet peak는 10번의 methine peak와 coupling을 하고 있음을 알았고,  $\delta$  2.63에서의 multipet peak 역시 10번의 methine peak와 coupling을 함을 알았다. 따라서 화합물 4는 8-C-glucosyl-7-O-methyl-(10S)-aloesol에 cinnamic acid가 치환된 형태인 aloeresin E로 동정하였으며, 10번의 absolute configuration은 optical rotation과 문헌에 의하여 (S)임을 알았다.<sup>12)</sup>

$[\alpha]_D^{24} -131.3^\circ$  ( $c$  0.0367, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.24 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-3''), 7.23 (2H, m, H-ph), 7.13 (3H, m, H-ph), 6.67 (1H, s, H-6), 6.05 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-2''), 5.94 (1H, s, H-3), 5.56 (t,  $J=9.9$  Hz, H-2'), 5.02 (1H, d,  $J=10.1$  Hz, H-1'), 4.18 (1H, q, H-10), 3.78 (5H, m, H-3', 4', 5', 6'), 3.67 (3H, s, OMe), 2.63 (2H, m, H-9), 2.50 (3H, s, 12-Me), 1.12 (3H, d,  $J=6.17$  Hz, 11-Me).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  182.6 (C-4), 168.0 (C-1''), 167.9 (C-2), 162.3 (C-7), 160.0 (C-8a), 146.8 (C-3''), 145.0 (C-5), 135.9 (C-4''), 132.0 (C-7''), 130.4 (C-5'', 9''), 129.9 (C-6'', 8''), 118.7 (C-2''), 117.6 (C-4a), 113.0 (C-6), 112.6 (C-3), 112.2 (C-8), 83.2 (C-5'), 78.2 (C-3'), 74.6 (C-2'), 73.0 (C-4'), 72.5 (C-1'), 67.2 (C-10), 63.4 (C-6'), 57.5 (OMe), 45.0 (C-9), 24.1 (C-11), 24.0 (C-12).

마. 화합물 5(KYS 50185)의 구조분석

화합물 5는  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $\delta$  7.24와 5.91에서 *trans* vinyl peak ( $J=15.8$  Hz)에서 기인한 peak가 나타나고,  $\delta$  7.18과 6.62에서 각각 2개의 수소에서 기인한 peak가 doublet peak( $J=8.8$  Hz)로 나타나 aromatic ring이 ortho coupling을 하여 *para* 치환임을 알았다.  $\delta$  5.52에서의 triplet peak( $J=9.7$  Hz)는 sugar의 2번에서 기인한 peak로 이 화합물에 치환된 coumaroyl group이 sugar의 2번에 치환되었음을 알 수 있었다.  $\delta$  5.04에서의 doublet peak는 anomeric proton으로 coupling constant가 10.0 Hz로  $\beta$ -form임을 예상할 수 있었다.  $\delta$  3.74에서의 singlet peak는 methoxy group에서 기인한 peak로 aloesin의 7번 위치가 methylation을 알았다. 따라서 이 화합물은 문헌과 비교하여 7-O-methylaloesin A (7-O-methyl-2'-O-coumaroylaloesin)로 동정하였다.<sup>9)</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.23 (1H, d,  $J=16.7$  Hz, H-3''), 7.18 (2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-5'', 9''), 6.66 (1H, s, H-6), 6.62 (2H, d,  $J=8.6$  Hz, H-6'', 8''),

6.11 (1H, s, H-3), 5.91 (1H, d,  $J=15.8$  Hz, H-2''), 5.52 (1H, t,  $J=9.7$  Hz, H-2'), 5.04 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-1'), 3.82 (3H, m, H-9, 6'), 3.74 (3H, s, OMe), 3.66-3.32 (4H, m, H-3', 4', 5', 6'), 2.59 (3H, s, 12-Me), 2.23 (3H, s, 11-Me).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  205.0 (C-10), 182.4 (C-4), 168.4 (C-1''), 163.4 (C-2), 162.5 (C-7), 161.7 (C-7''), 160.0 (C-8a), 147.0 (C-3''), 145.1 (C-5), 131.5 (C-5'', 9''), 127.4 (C-4''), 117.1 (C-6'', 8''), 114.4 (C-2''), 113.9 (C-3), 113.2 (C-6), 112.4 (C-8), 83.2 (C-5'), 78.2 (C-3'), 74.3 (C-2'), 72.9 (C-1'), 72.5 (C-4'), 63.7 (C-6'), 57.5 (OMe), 30.3 (C-11), 24.1 (C-12).

#### 4. 알로에 유효성분 및 알로에신 유도체의 활성검색

##### 가. 실험방법

##### (1) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) free radical 소거력

천연물로부터 분리된 추출물이나 단일성분들의 free radical 제거효과를 측정하기 위하여 안정적인 free radical로서 DPPH를 이용하여 실험하였다.<sup>13)</sup> DMSO 또는 탈이온수에 녹인 여러 농도의 시험물질과 300  $\mu\text{M}$  DPPH ethanolic 용액을 96-well microtiter plate에 가하고 37°C incubator에서 30 분간 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험군의 free radical 소거력은 DMSO 또는 탈이온수를 처리한 대조군에 대한 비율로서 계산되었으며 아래와 같은 계산식에서 산출하였다.<sup>14)</sup>  $\text{IC}_{50}$ 값은 DPPH 흡광도에 의해서 계산되는 free radical의 농도를 50% 억제하는데 요구되는 시험물의 농도를 Grapad Prizm<sup>®</sup>를 이용하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{대조군}} - \text{Abs}_{\text{시험군}})}{\text{Abs}_{\text{대조군}}} \times 100$$

##### (2) Xanthine/xanthine oxidase(X/XO) 활성 억제력

XO는 xanthine을 산화시켜 최종 산물로서 uric acid와 superoxide를 생성하므로 295 nm에서 측정되는 uric acid의 흡광도 값을 통해 XO의 활성도를 측정하는 McCord의 방법에 따라 XO 활성 억제력을 실험하였다.<sup>15)</sup> 10  $\mu\text{l}$ 의 DMSO 또는 탈이온수 존재 하에서 100  $\mu\text{M}$ 의 X 용액(in sodium phosphate buffer, pH 7.8) 980  $\mu\text{l}$ 와 0.04 U의 XO 10  $\mu\text{l}$ 를 상온에서 5분간 반응시킨 후 생성된 uric acid의 흡광도를 295 nm에서 측정하여 대조군의 값으로 하고, X와 XO 반응에 여러 농도의 시험물질을 가한 후 295 nm에서의 흡광도 값을 시험군의 값으로 하여 시험군의 XO활성 억제력은 대조군에 대한 시험물질의 비율로서 계산되었으며  $\text{IC}_{50}$ 값은 XO enzyme 활성을 50% 억제하는데 필요한 시험물질의 농도를 나타낸다.

### (3) Iron-dependent lipid peroxidation(LPO) 억제력

Iron-dependent LPO 억제효과를 측정하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) rat을 희생하여 whole brain을 적출한 후 20 mM Tris buffer(pH 7.4)를 rat brain에 가하여 조직을 분쇄하고 4°C로 냉장된 원심분리기에서 3000 × g 의 속도로 10분간 원심분리한 후 상층액을 얻어 LPO 실험에 사용하였다. Brain homogenate(195 µl), 100 µM Fe<sup>+2</sup>, 400 µM ascorbic acid, DMSO 또는 탈이온수에 녹인 여러 농도의 시험물질을 가하여 최종 volume을 200 µl로 하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. LPO는 polyunsaturated fatty acids로부터 생성되는 주요 산물인 malonaldehyde 농도를 측정함으로써 계산된다.<sup>16)</sup> Malondaldehyde 측정을 위해서 반응물의 발색시약으로서 10.3 mM N-methyl-2-phenylindole을 가하고 강염산 150 µl를 가하여 산성조건 하에서 45°C에서 60분간 반응시킨 후 생성된 발색물의 흡광도를 586 nm에서 측정하였다.

### (4) Lipopolysaccharide/interferon-γ(LPS/IFN-γ)에 의해 유발된 NO 발생 억제력

Preincubation된 Raw 264. 7 cell을 여러 농도의 시험물질 존재 하에서 2 µg/ml LPS와 10 U/ml을 포함하는 배지에서 24시간 배양한 후 culture medium으로 release된 nitrite(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 Griess reaction 방법을 이용하여 측정하였다.<sup>17)</sup> 24시간 배양 후 300 µl 배지와 500 µl의 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 혼합하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 발색된 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer(V-550, Jasco Co., Japan)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 측정된 흡광도로부터 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 정량을 위해 기지농도의 sodium nitrite를 사용하여 standard curve를 작성하여 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 실제 농도를 정량하였다.

### (5) nNOS enzyme 활성 측정

nNOS enzyme의 specific activity는 [<sup>3</sup>H]L-arginine으로부터 nNOS enzyme에 의해서 생성되는 [<sup>3</sup>H]L-citrulline의 농도로부터 측정되었다.<sup>18)</sup> Murine neuronal recombinant enzyme(nNOS)는 Cayman, Chem.(MI, USA)로부터 구매하여 사용하였으며 50 mM HEPES, pH 7.4, 0.4 M [<sup>3</sup>H]L-arginine, 2 mM NADPH, 10 µg/ml calmodulin, 3 µM TBH<sub>4</sub>, 3 µM FAD, 3 µM FMN, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 unit NOS와 여러 농도의 시험물질을(final volume, 200 µl) 가하고 37°C에서 60분 동안 반응시켰다. 1.2 ml ice-cold stop buffer(5 mM HEPES, pH 5.5, 20 mM sodium acetate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA)를 넣어 반응을 정지시키고 반응 mixture를 Dowex 50W-X8 resin, Na<sup>+</sup> form에 loading 시켰다. Ion exchange chromatography 원리에 의해서 반응하지 않은 [<sup>3</sup>H]L-arginine의 NH<sub>2</sub><sup>+</sup>는 Dowex의 O<sup>-</sup>와 정전기적인 결합으로 column에 남아 있게 되며 nNOS enzyme에 의해 생성된 [<sup>3</sup>H]L-citrulline은 column에서 elution되므로 Dowex를 통과한 elutant를 liquid scintillation counter로 정량하여 nNOS activity를 계산하였다.

#### (6) Rat 대뇌피질 신경세포의 일차배양

Rat 태자의 대뇌로부터 분리한 신경세포의 배양은 조 등의 방법에 따라 수행하였다.<sup>19)</sup> 즉, 16 내지 18일 된 SD rat 태자의 대뇌피질 부분을 분리한 후 해부현미경을 이용하여 뇌막을 제거하였다. 이로부터 얻은 조직을 25 mM 포도당, 5% 우태아 혈청, 5% 말 혈청, 2 mM L-글루타민을 함유한 배지(MEM, Gibco BRL)에서 알코올 램프로 입구의 크기를 조절한 파스테르 피펫을 이용하여 단일세포로 분리하였다. 분리된 세포를 poly-L-lysine과 라미닌으로 코팅된 24 well 세포배양 용기에 웰당 4 내지  $5 \times 10^5$  세포의 밀도로 이식하여 37°C 배양기에서 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 배양하였다. 주당 2회 배양액의 일부를 교환하였으며, 이식 후 7 내지 9일에 10  $\mu$ M cytosine arabinoside를 24 내지 72시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시켰다. 배양세포는 이식 후 10 내지 14일 후에 실험에 사용하였다.

#### (7) 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포 손상 보호

배양한 대뇌피질 신경세포를 HEPES-조절된 염 용액(HCSS)으로 3회 세척한 후 잔틴(0.5 mM) 및 잔틴 옥시다제(10 mU/ml)를 함유하는 무혈청배지(serum-free MEM; 25 mM 포도당, 2 mM 글루타민을 첨가한 MEM)로 10분간 처리하여 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼에 의한 세포손상을 유발하였다. 이를 다시 HCSS로 세척하고 무혈청 MEM으로 배양액을 교환하여 37°C 배양기에서 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 20 내지 24시간 동안 배양하였다. 과산화수소에 의한 신경세포 손상유발은 배양세포를 세척한 후 100  $\mu$ M 과산화수소를 함유하는 HCSS로 5분간 처리한 다음 다시 세척하고 무혈청 MEM으로 배양액을 교환하여 20 내지 24시간 동안 배양하였다. 이와 같이 유발된 신경세포 손상에 대한 시험물질의 영향을 측정하기 위해서는 배양된 신경세포를 여러 농도의 시험물질로 1시간 동안 전처리한 후 손상 유발물질과 시험물질을 동시에 가하여 상기한 바와 같이 일정시간 동안 처리하고, 20 내지 24시간 동안 배양한 후 신경세포의 손상정도를 측정하였다. 배양한 신경세포를 위상차 현미경을 이용하여 형태학적으로 손상정도를 평가하거나, 배양액 상층에 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 양을 pyruvate(Sigma)를 기질로 하여 측정하였다. 산화적 신경손상에 대한 시험물질의 억제효과는 손상을 유발하지 않은 대조군에서의 LDH에 대한 백분율로 표시하였다. 실험 결과는 1회 2군씩 2 내지 4회 반복하여 얻은 데이터를 평균하여 나타내었으며, 50% 억제효과를 나타내는 농도(IC<sub>50</sub>)는 프리즘(Prism; Graphpad software Inc., USA)을 이용한 비선형 회귀분석으로 계산하였다.

(8) NMDA 또는 성장인자 제거 유발 신경독성실험을 위한 rat 해마와 대뇌피질 신경세포의 일차배양

Rat의 뇌조직 중 해마(hippocampus)와 피질부위는 임신한지 17일된 SD rat 태자의 뇌로부터 현미경 하에서 적출하였다. 적출한 해마와 피질은 각각의 세포로부터 분리되도록 피펫으로 잘게 분쇄한 후, 분쇄물을 원심분리하여 얻은 세포만을 poly-L-lysine이 코팅된 96 웰 플레이트의 각 웰당 해마세포는  $2.5 \times 10^4$  세포, 피질세포는  $5 \times 10^4$  세포가 되도록 각각 첨가하였다. 각 웰에 B-27 보충영양액(Life technologies) 2%, 글루타메이트 25 M, 글루타민 0.5 mM이 포함된 뉴로베이살(Life technologies) 배양액 200  $\mu$ l를 첨가한 후 37°C에서 배양하였다. 72시간 후 클루타메이트가 결여된 혼합배양액으로 배양액을 교환한 후 계속 배양하였다. 신경독성 실험은 7 내지 10일 후에 실시하였다.

(9) NMDA로 인한 신경독성에 대한 뇌신경세포 손상 보호

200  $\mu$ M의 NMDA(Sigma)를 해마의 배양 신경세포에 2시간 동안 처리하여 뇌 세포 손상을 유발하였다. 시험물질은 주어진 농도로 NMDA와 같이 처리한 후 제거하지 않고 실험 기간(2시간) 내내 잔존하도록 하였다. NMDA 처리 후 24시간 뒤에 LDH 측정용 키트(Boehringer Mannheim)를 사용하여 배양액으로 유리된 LDH 양을 측정하였다.

(10) 성장인자 제거로 인한 신경독성에 대한 뇌신경 세포손상 보호

배양한 대뇌피질 신경세포를 DMEM 배양액에 B27 보충 영양액을 2% 첨가한 배양액을 사용하여 배양하다가 B-27을 제거한 DMEM만으로 교환하여 영양부족으로 인한 세포사멸을 유도하였다. 24시간 후에 세포괴사에 의해 유리된 LDH를 LDH 측정용 키트(Boehringer Mannheim)로 측정하여 세포사멸 정도를 정량하였다.

(11) 중대뇌동맥 폐쇄(middle cerebral artery occlusion, MCAO)에 의한 일시적 또는 영구적 국소 허혈성 뇌 손상 백서 모델의 제작

체중 250~300 g의 웅성 Sprague-Dawley rat(대한실험동물센터)를 실험동물로 사용하였다. 수술은 실험 당일에 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>를 운반기체로 사용하는 1.5% isoflurane(중의제약 포란액) 흡입마취 하에서 보온 패드와 보온 램프를 사용하여 실험동물의 체온을 약 37±0.5°C로 유지하면서 Nagasawa and Kogure의 방법에 준하여 시행하였다(그림 1).<sup>20)</sup> 즉, 이소플루렌 흡입마취 하에서 목의 정중선을 따라 경부를 절개하고 미주신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 우측 총경동맥, 내경동맥, 그리고 외경동맥을 조심스럽게 분리하였다. 총경동맥과 외경동맥은 결찰하고 내외경동맥의 분지점으로부터 내경동맥 내로 17 mm의 프로브를 삽입하여 삽입부위 바로 위쪽을 결찰함으로써 중대뇌동맥의 기저부를 폐쇄하였다. 프로브는 4-0 나일론 수술실 (Nitcho Kogyo Co., Ltd., Japan)의 한쪽 끝을 옆에 의해 구형으로 만들

어 그 부분을 제외하고 17 mm로 자른 후 실리콘(Bayer Dental, Xantopren)을 경화제 (Optosil-Xantopren Activator, Bayer Dental)와 잘 혼합한 것에 다른 쪽 끝 부분 약 7 내지 9 mm 정도를 넣어서 피복하며 두께는 0.3 내지 0.4 mm가 되도록 하였다. 뇌 허혈 유발 시작 후 약 25 내지 30분경에 수술한 백서의 신경학적 결손을 측정하여 증상을 나타내는 백서만을 허혈군에 포함시켰다. 신경학적 결손은 주로 공중에서 백서의 꼬리를 완전히 들었을 때 좌측 전족 굴곡이 일어나는 지와 꼬리를 위로 들었을 때 또는 자발적으로 왼쪽으로 돌아가는 증상이 일어나는 지를 관찰하여 평가하였다. 120분 동안 일시적으로 중대뇌동맥을 폐쇄한 후 다시 isoflurane 흡입마취 하에서 봉합 부위를 절개하여 구형의 프로브 끝을 다시 10 mm 정도 밖으로 뽑아냄으로써 이를 재관류시켜 일시적 국소 뇌 허혈 백서 모델로 사용하거나 또는 프로브를 그냥 내버려두는 영구적 국소 뇌 허혈 백서 모델 모두를 사용하였다. 그 후, 역시 수술부위를 봉합하고 약 1일 후 신경학적 결손을 측정하고 희생시켜서 적출한 뇌조직에 대하여 조직학적 염색법을 시행하였다.

#### (12) 국소 허혈성 뇌 손상 백서 모델에서의 조직학적 뇌손상 평가

120분 동안의 일시적 또는 영구적 국소 뇌 허혈 백서모델에서 허혈에 의해 유발되는 뇌 손상을 평가하기 위하여 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 염색을 시행하였다.<sup>21)</sup> 중대뇌동맥 폐쇄 후 약 1일이 경과한 후 단독으로 백서를 희생시키고 신속하게 뇌를 적출하였다. 뇌 주형(ASI Instruments, Warren, MI, USA)을 이용하여 전두극으로부터 1 mm되는 지점부터 2 mm 두께의 연속적으로 잘려진 뇌 관측 절편 각각에 0.9% 생리식염수로 제조된 2% TTC 용액을 가하고 37°C에서 60분간 배양하여 염색하였다. TTC로 염색된 뇌 절편을 10% 인산완충 포르말린(phosphate-buffered formalin) 용액으로 고정시킨 후 각 절편의 뒷면 영상을 CCD 비디오 카메라를 이용하여 컴퓨터에서 획득하였다. 이로부터 진한 적색으로 염색이 되지 않은 경색이 일어난 대뇌피질 및 선조체 지역의 면적(mm<sup>2</sup>)은 영상분석용 소프트웨어(Optimas, Edmonds, WA, USA)를 사용하여 측정하였으며, 경색 용적(mm<sup>3</sup>)은 절편들의 경색 면적의 총합계에 절편 두께를 곱함으로써 계산하였다. 이때, 총 경색 용적은 대뇌피질 및 선조체 지역 각각에서의 경색 용적의 합계로서 나타내었다. 한편, 부종의 효과를 보완하기 위하여 교정 경색 용적을 계산하였는데, 각 절편에 있어 교정 총 경색 면적은 허혈 반대측(좌측) 대뇌 반구의 총 면적으로부터 허혈 동측(우측) 대뇌 반구에 있어서의 정상조직의 면적을 빼줌으로써 계산하였고, 교정 총 경색 용적은 교정 총 경색 면적으로부터 상기와 같은 방식으로 계산하였다. 또한, 허혈이 유발된 대뇌 반구의 부종율은 하기식에 의하여 산출되었다.

$$\text{부종율}(\%) = \frac{A-B}{B} \times 100$$

A: 총 관측 절편들에서 허혈이 유발된 대뇌 반구의 용적 (mm<sup>3</sup>)

B: 총 관측 절편들에서 정상 대뇌 반구의 용적 (mm<sup>3</sup>)

## *Preparation of Focal Cerebral Ischemic Rat Models*

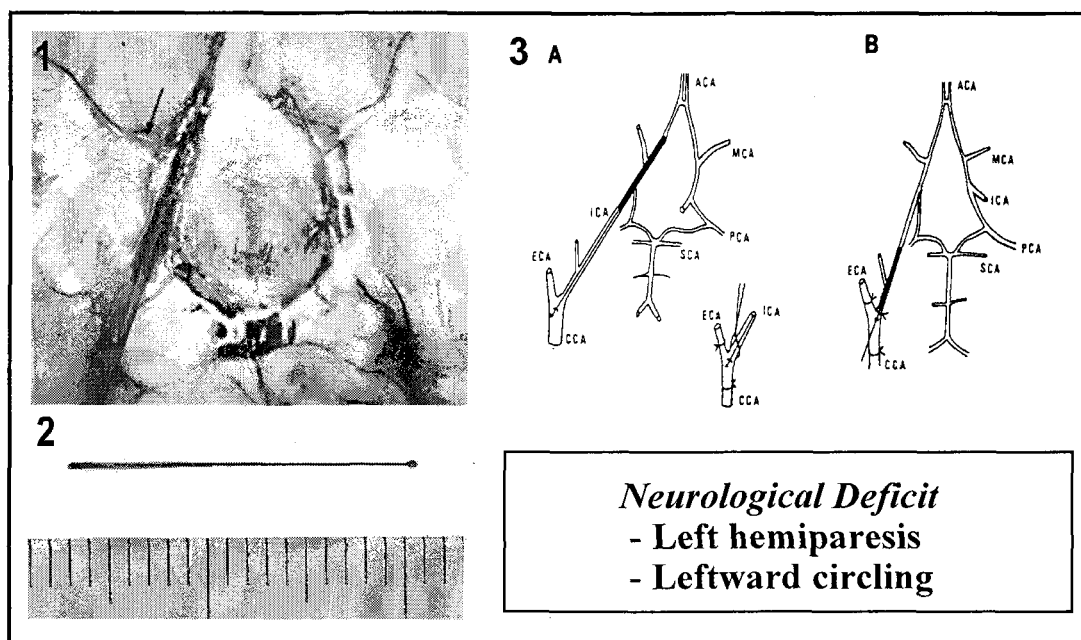


그림 1. 1: Silicone rubber cylinder inserted from right internal carotid artery obstructs blood flow to middle cerebral artery (MCA, arrow). 2: Cylinder is made of 4-0 nylon surgical thread coated with silicone mixed with hardener on distal end and heated at proximal end. Millimeter scale; each increment represents 1 mm. 3: Schematic representation of position of silicone rubber cylinder during occlusion of right middle cerebral artery (A) and after recirculation (B). ACA, anterior cerebral artery; PCA, posterior cerebral artery; ICA, internal carotid artery; ECA, external carotid artery; CCA, common carotid artery; SCA, superior cerebellar artery.

한편, 대뇌피질 및 선조체에 있어서 TTC 염색의 intensity는 위의 image processing software를 사용하여 측정된 optical density로서 나타내어지며 허혈성 손상부위의 손상정도를 나타내는 injury index는 다음과 같이 계산되어졌다.

$$\text{Injury index} = 1 - (\text{optical density on the injury side} / \text{optical density on the control side})$$

(13) 국소 허혈성 뇌 손상 백서 모델에서의 신경행동학적 결손 평가

국소 허혈성 뇌 손상 백서에서의 신경행동학적 결손 정도를 Relton 등의 신경행동학적 점수(neurological score) 측정법에 따라 하기와 같이 측정하였다.<sup>22)</sup> 구체적으로, 전족 굴곡(forelimb flexion, 백서의 꼬리를 잡고 공중에 완전히 들었을 때의 좌측 전족 굴곡), 전곡 굴곡 기간(duration of forelimb flexion, 10초까지의 측정기간 동안 전족 굴곡 기간) 및 움직임의 대칭(백서의 꼬리를 잡고 뒷발을 공중에 든 채로 앞발만으로 걷게 하였을 때 움직임의 대칭)을 검사항목으로 하여 각 반응에 따라 아래 표 3에 나타난 바와 같은 점수를 부여하였다.

표 3. 신경행동학적 점수 측정법

검사항목	점수				
	0	1	2	3	4
전족 굴곡	좌측 전족의 움직임이 전혀 없음	좌측 전족의 제한된 움직임	좌측 전족의 덜 뻗는 또는 더 느린 움직임	대칭적 움직임	-
전족 굴곡 기간	8-10초	6-8초	4-6초	2-4초	0-2초
움직임의 대칭	좌측 전족의 움직임이 전혀 없음	좌측 전족의 움직임이 극미하고 백서 회전함	좌측 전족이 우측보다 덜 뻗음	전족을 뻗고 정상적으로 걸음	-

상기 표 3에 따라 부여된 각 검사항목의 점수를 모두 합산하여 최종적인 신경행동학적 점수를 산정하였으며 여기에서 10점은 정상인 상태, 즉 신경학적 결손이 전혀 없는 것을 의미하며, 점수가 작을수록 신경학적 결손이 크게 나타나는 것을 의미한다.

(14) 국소 허혈성 뇌 손상 백서 뇌조직에서의 DNA fragmentation

Brain matrix(ASI Instruments, MI, USA)를 이용하여 rat brain의 frontal pole로부터 5 mm to 10 mm coronal section을 분리한 후 SNET buffer(100mM NaCl, 10mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 0.5% (w/v) SDS)를 첨가하여 testle로 균질화시킨다. RNase A 100 ul/ml를 처리하고 30℃에서 1시간 반응시킨 후, proteinase K 100



$\mu\text{l}/\text{ml}$ 를 처리하고 shaking incubator에서 55°C overnight 반응시킨다. Sample과 같은 양의 PCI(phenol: Chloroform: isoamylalcohol = 25: 24: 1, Sigma)를 섞은 후 inverting하고 3,000 g, 10분간 원심분리한다. 상층액을 조심스럽게 새 튜브에 옮기고, CIA(chloroform: isoamylalcohol = 24: 1, sigma)를 sample과 같은 양을 섞은 후 inverting하고 3,000 g, 10 min 원심분리 한다. Sample의 1/10 부피의 3 M Sodium acetate, 2배 부피의 100% ethanol을 넣고 하얀 DNA 침전물을 확인한다. 70% ethanol을 넣고 4°C 3,500 g에서 원심분리 후 상온에서 건조시키고, TE buffer로 pellet을 풀어준 뒤, 4°C에서 보관한다. Sample 간의 농도를 같도록 맞추고 DNA 6× gel-loading buffer를 섞어준다. final concentration 1:10,000으로 SYBR (Molecular probes)을 처리하여 1.5% agarose gel에 전기영동을 한다. Gel image는 Kodak digital Science 1D(CCD-based image detection systems)로 촬영한 후 computer에 저장하였다.

#### (14) 국소 허혈성 뇌 손상 백서 뇌조직에서의 Western blotting

Brain matrix를 이용하여 rat brain의 frontal pole로부터 5 mm to 10 mm 사이의 두께를 slice하여 분리한다. Normal brain은 허혈을 일으키지 않은 rat에서 분리하였고, contralateral hemisphere는 허혈을 일으킨 백서에서 뇌손상을 받지 않은 왼쪽 뇌를 분리하여 실험하였다. 그와 반대로 ipsilateral hemisphere는 손상을 받은 오른쪽 뇌를 사용하였고, 모두 선조체와 대뇌피질을 함께 사용하였다. 분리한 조직은 lysis buffer(0.2 M mannitol, 0.05 M sucrose, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 0.1 mM PMSF, 1 uM pepstatin A, 1 uM leupeptin, 0.1 uM aprotinin)를 가하고 glass homogenizer로 균질화시킨다. 이 lysate는 1,000 g에서 원심분리하여 상층액은 cytosol, pellet은 mitochondria fraction으로 분리한다. Nuclei와 mitochondria fraction은 1% triton X-100을 포함하는 lysis buffer로 풀어주고 얼음에서 30분간 방치시킨 뒤 protein 농도를 측정하였다.

본 실험에서는 procaspase-3와 activated caspase-3가 nucleus, mitochondria, cytoplasm 모두에 분포하기 때문에, brain을 preparation할 때 fraction을 나누지 않고 실험하였고, western blotting을 수행할 때 well 당 150  $\mu\text{g}$ 의 protein을 loading 하였다.

이 시료는 2× SDS sample buffer(100mM Tris-HCl, 3.1 g DTT, 4% SDS, 0.001% (w/w) bromophenol blue, and 20% glycerol)와 혼합하여 100°C에서 10분간 끓이고, 12-15% SDS-PAGE를 수행하였다. Caspase-3를 확인하기 위해서는 well 당 150  $\mu\text{g}$ , Bcl-2, Bax, m-calpain, AIF를 보기 위해서는 well 당 60-80  $\mu\text{g}$ 의 protein을 loading하였다. Nitrocellulose membrane(Millipore)으로 transfer시킨 후 nonspecific binding을 없애기 위해 5% skim milk(Tris-buffered saline-tween 20, pH 7.6)에 넣어 상온에서 1시간 동안 incubation 한다.

Western blot analysis는 anti- $\beta$ -actin mouse monoclonal antibody(1:2000,

Sigma), anti-cleaved caspase-3 rabbit antibody(1:500, Cell signaling), anti-Bax rabbit antibody(1:1000, Santacruz), mouse monoclonal anti-Bcl-2 antibody(1:1000, Santacruz), anti-m-calpain rabbit antibody(1:1000, Chemicon), anti-AIF goat antibody(1:1000, Santacruz)로 overnight 반응시키고, HRP-conjugated anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG(1:10000, Pierce)를 1시간 반응시킨 후 ECL system(Pierce)을 이용하여 Hyper X-ray film(Amersham)에 노출시켜 protein의 발현과 localization 변화를 측정하였다. 각 protein의 density는 image processing software를 사용하여 측정하였다(Optimas, WA, USA).

#### (15) 국소 허혈성 뇌 손상 백서 뇌조직에서의 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry 분석을 수행하기 위해 허혈 유발 후 약 1일에 백서를 엔토타발(한림제약) 50 mg/kg(i.p)로 마취시켜 심장을 통해  $Ca^{2+}$ -free Tyrode solution 150 ml로 perfusion시키고, 200 ml의 4% paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 고정시킨다. 뇌조직은 신속히 적출하여 4% paraformaldehyde에서 후고정을 시킨 후 section하기 하루 전에 20% sucrose 용액에 보관한다. Dry ice에서 급속 냉동시킨 뇌조직은 cryostat(Leica)로 옹기고 40  $\mu$ m 두께로 section하여 glass에 올린다. 뇌조직은 상온에서 하룻밤 건조시키고 -20°C에서 보관한다.

Section은 acetone으로 10분간 고정시킨 후 PBS로 씻어 주고 3%  $H_2O_2$ 로 endogenous peroxidase를 quenching시킨다. Section을 다시 씻어주고 rabbit serum으로 상온에서 1시간 동안 blocking하고 anti-cleaved caspase-3(Cell signalling, 1:100)를 상온에서 하룻밤 반응시킨다. 뇌조직은 다시 씻어주고 biotinylated secondary antibody, ABC reagent(Vector lab.) 순으로 30분씩 상온에서 반응시키고 NovaRED(Vector lab.)로 염색한 후 methylgreen으로 counterstaining한다. 마지막으로 뇌조직은 xylene으로 rehydration시키고 mounting한 뒤, 광학현미경(Optimas, Japan)에서  $\times 12.5$ 와  $\times 400$  배율로 관찰한 후 Optimas program을 이용하여 image를 저장하였다.

#### (16) 통계 처리

모든 실험치는 평균치 $\pm$ 표준오차로 표시하였고, 각 군 사이의 유의성은 Student's t-test 또는 분산 분석법(ANOVA)으로 분석한 후 Duncan's multiple range test로 사후 검정하여  $p < 0.05$ 인 것을 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## 나. 주요 실험결과

### (1) 항산화 효능

알로인에서 분리·동정된 화합물과 합성한 화합물들에 대하여 상기에서 기술한 방법을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능, 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능, 잔틴/잔틴 옥시다제-유발 독성 억제효과, 과산화수소-유발 독성 억제효과를 각각 측정하여 그 결과를 아래 표 4에 나타내었다. 분리된 화합물 1-5중에서 화합물 5의 7-O-methylaloesin A가 DPPH 라디칼 소거능력이 우수하였으며, 화합물 2인 aloesin의 DPPH 라디칼 소거능은 대조약물로 사용한 vitamin E보다 우수하게 나타나고 있음을 알았다. 화합물 4(aloesin E)는 잔틴/잔틴 옥시다제에 의해 생성되는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능이 대조약물인 allopurinol보다 우수하였다. 그러나 합성 화합물의 항산화 효과는 분리된 화합물의 경우보다 상당히 우수하게 나타나고 있는데, 화합물 7(8-C-Glucosyl-7-O-methylaloesin)은 DPPH 라디칼 소거능( $ED_{50}=77 \mu\text{M}$ )도 항산화제로 잘 알려진 vitamin C와 유사한 효과를 보이고, 잔틴/잔틴 옥시다제에 의한 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능( $ED_{50}=251 \mu\text{M}$ )도 비교적 우수하게 나타나고 있다. 또한,  $300 \mu\text{g/ml}$ 에서의 잔틴/잔틴 옥시다제에 의하여 유발된 독성 억제력( $IC_{50}=97 \mu\text{M}$ ) 및 과산화수소에 의하여 유발된 억제력( $IC_{50}=19 \mu\text{M}$ )은 가장 효과가 우수한 것으로 나타났다.

표 4. 알로에 성분들의 항산화 효능

화합물	DPPH Scavenging ( $IC_{50}$ , $\mu\text{M}$ )	X/XO Inhibitory ( $IC_{50}$ , $\mu\text{M}$ )	X/XO 유발독성 억제 (at $300 \mu\text{g/ml}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ 유발독성 억제력 (at $300 \mu\text{g/ml}$ )
화합물 2(KYS 50116)	140	441	23.8% 억제	<10% 억제
화합물 3(KYS 50162)	491	199	-	-
화합물 4(KYS 50186)	>464	42.3	-	-
화합물 5(KYS 50185)	91	-	-	-
화합물 6(KYS 50161)	>500	461	27.4% 억제	<10% 억제
화합물 7(KYS 50163)	77	251	$IC_{50}=97 \mu\text{M}$	$IC_{50}=19 \mu\text{M}$
화합물 8(KYS 50187)	60	230.2	-	-
화합물 9(KYS 50205)	110	183.2	-	-
화합물 10(KYS 50206)	114	-	-	-
Vitamin C	70	-	-	-
Vitamin E	>500	-	-	-
Allopurinol	-	68	-	-

특히, 알로에신의 검색된 항산화 효능을 요약하면 다음과 같다:

- DPPH free radical 소거력 (ED<sub>50</sub>: Aloesin 140 μM, V-C 70 μM, V-E >500 μM)
- Xanthine/xanthine oxidase 활성 억제력 (IC<sub>50</sub>: Aloesin 441 μM, Allopurinol 68 μM)
- Primary rat cortical cell의 cytotoxicity 억제력: 0.3 mg/ml 에서 X/XO 유발 독성을 24%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유발 독성을 10% 이하로 억제
- Iron-dependent LPO 억제력 (IC<sub>50</sub>: BHT 2.6 μM): 1 mg/ml 에서 17% 억제
- nNOS 활성 억제력 (IC<sub>50</sub>: 7-NI 6.9, NAME 11 μg/ml): 1 mg/ml에서 20% 억제
- Caspase-3 활성 억제력 : IC<sub>50</sub>= ~30 μM

## (2) 알로에신의 허혈성 뇌졸중 동물 모델에서의 *in vivo* 뇌신경보호 효능

### (가) 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서 모델에서의 뇌신경보호 효능

#### ① 반복 투여 시의 뇌신경보호 효능

수용성이며 항산화능이 있는 알로에신의 뇌신경보호 효능을 검색하기 위하여, 뇌졸중의 임상에 매우 유사한 허혈성 뇌손상 실험동물 모델로서 실리콘으로 피복된 4-0 나일론 수술실을 사용하여 중대뇌동맥의 기저부를 일시적으로 폐쇄한 후 재관류하여 대뇌피질(cortex) 및 선조체(striatum)에서 손상을 유발시키는 120분 일시적 국소 뇌허혈 백서 모델을 사용하여 허혈 유발 약 1일 후에 조직학적 뇌손상 및 신경학적 결손에 대한 보호효과를 조사하여 보았다. 알로에신을 허혈 유발 후 30분, 2시간 및 4시간 3회에 걸쳐 1, 3, 10, 30 또는 50 mg/kg 용량을 대퇴정맥 내로 반복 투여하였으며 뇌경색 크기를 측정하기 위해 TTC로 염색되어진 여러 처치군의 대표적인 각 뇌의 절편들이 그림 2에서 보여진다. 1 및 50 mg/kg 처치군에서는 유의성 있는 신경보호 효과가 관찰되지 않았으나 3, 10, 30 mg/kg 처치군 모두에서는 대뇌피질과 선조체 경색용적(infarct volume) 및 총 경색용적(total infarct volume, 그림 3), 교정 총 경색용적(corrected total infarct volume, 그림 4), 부종율(% edema, 그림 5) 모두가 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(표 5). 특히 3 및 10 mg/kg의 용량에서 효과가 가장 우수하게 나타나 경색용적 및 부종율 모두를 약 47% 정도 감소시키는 뚜렷한 신경보호 효과를 나타내었다. 한편 손상 지수(injury index)에 있어서는 대조군에 비해 알로에신 처치에 의해 다소 감소하는 경향은 있었으나 3 mg/kg 처치군에서만 유의성이 나타났다(표 5, 그림 6). 또한 신경행동학적 점수도 3, 10, 30 mg/kg 처치군 모두에서 허혈 유발 약 1일 후에 대조군에 비해 유의성 있게 상당히 증가되어짐으로써 현저한 신경행동학적 회복 효과를 나타내었다(표 6, 그림 7). 따라서 알로에신이 뇌졸중 발생 후 허혈성 뇌 손상을 방지할 수 있는 정맥주사용 신경보호제로서의 효능을 가지고 있으며 또한 기타 뇌 손상 질환 치료를 위한 신경보호제로서 사용될 가능성이 있음을 제시한다.

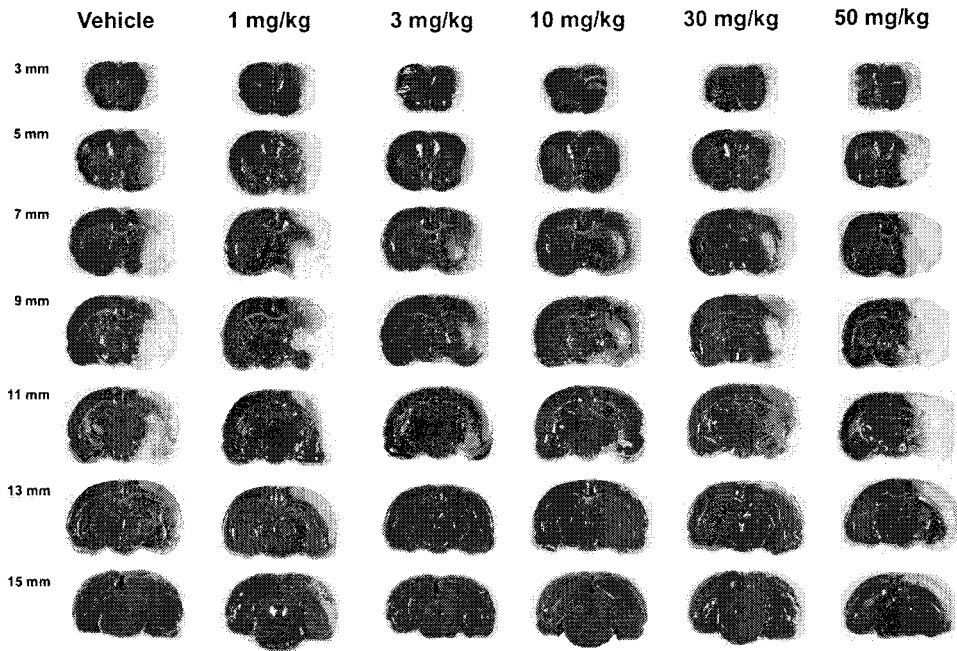


그림 2. 120분 동안 일시적으로 중대뇌동맥을 폐쇄하고 허혈 유발 후 약 1일에 뇌 경색 크기를 측정하기 위해 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)로 염색되어진 여러 처치군의 대표적인 각 뇌의 절편들을 보여준다. 각 뇌는 전두극으로부터 1 mm되는 지점부터 연속적으로 2 mm 두께의 7개의 coronal 절편으로 잘려졌다. 각 절편의 뒷면 영상이 보여지며 TTC에 의해 정상조직은 진한 적색으로 염색되나 경색조직은 염색이 되지 않는다. 왼쪽의 수치들은 뇌의 전두극으로부터의 거리를 나타낸다.

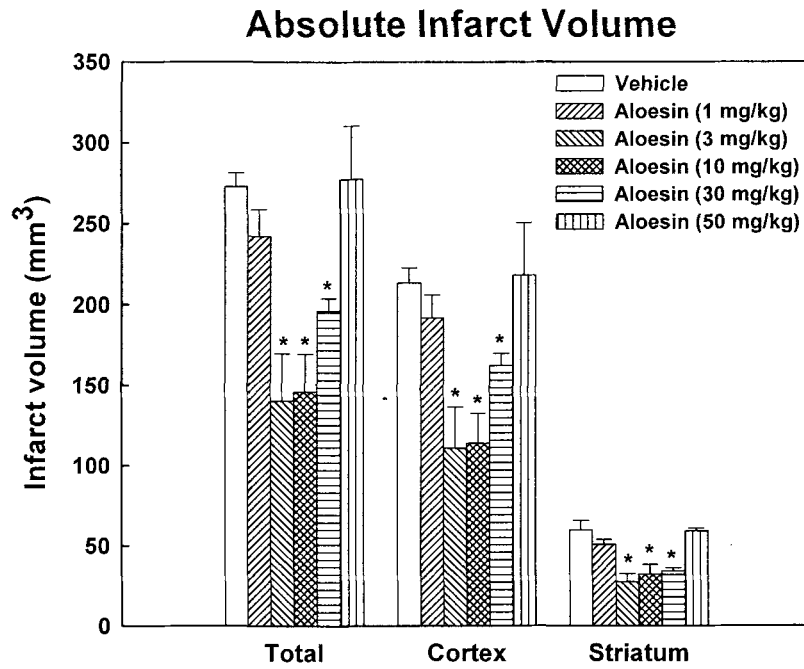


그림 3. 120분 일시적 국소 뇌 허혈 백서 모델에 있어 허혈 유발 후 30분, 2시간 및 4시간 3회에 걸쳐 정맥 내로 반복 투여된 알로에신의 대뇌 피질, 선조체 및 총 경색 용적에 대한 용량별 효과를 나타낸다. \*Duncan's multiple range test 결과 대조군과 유의성 있는 차이( $p < 0.05$ ).

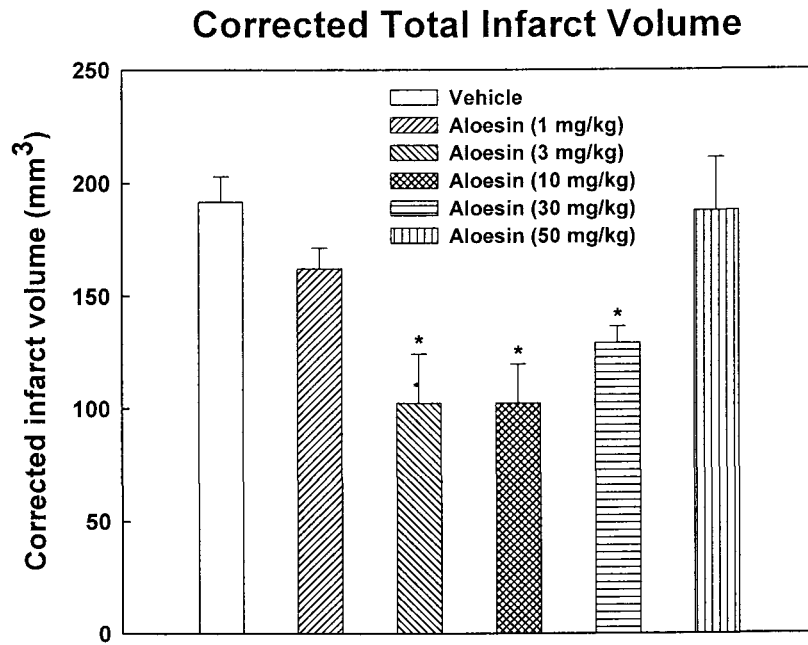


그림 4. 120분 일시적 국소 뇌 허혈 백서 모델에 있어 허혈 유발 후 30분, 2시간 및 4시간 3회에 걸쳐 정맥 내로 반복 투여된 알로에신의 교정 총 경색 용적에 대한 용량별 효과를 나타낸다. \*Duncan's multiple range test 결과 대조군과 유의성 있는 차이( $p < 0.05$ ).

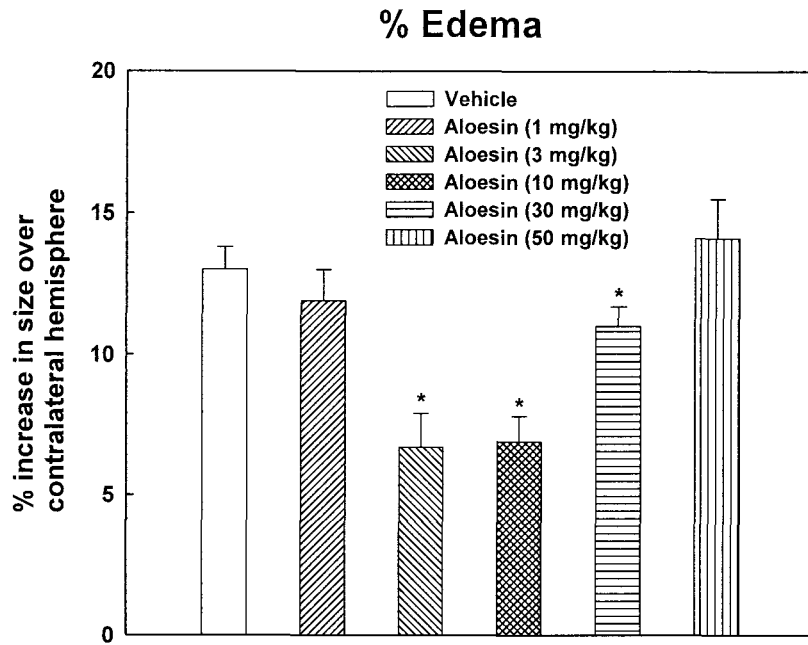


그림 5. 120분 일시적 국소 뇌 허혈 백서 모델에 있어 허혈 유발 후 30분, 2시간 및 4시간 3회에 걸쳐 정맥 내로 반복 투여된 알로에신의 부종율에 대한 용량별 효과를 나타낸다. \*Duncan's multiple range test 결과 대조군과 유의성 있는 차이( $p < 0.05$ ).



## Injury Index

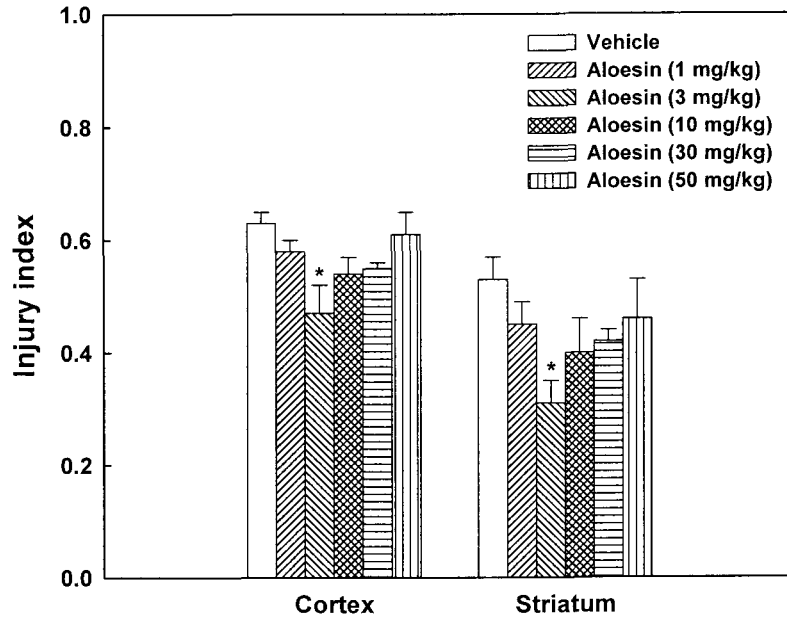


그림 6. 120분 일시적 국소 뇌 허혈 백서 모델에 있어 허혈 유발 후 30분, 2시간 및 4시간 3회에 걸쳐 정맥 내로 반복 투여된 알로에신의 대뇌 피질과 선조체에 있어 손상 지수에 대한 용량별 효과를 나타낸다. \*Duncan's multiple range test 결과 대조군과 유의성 있는 차이( $p < 0.05$ ).

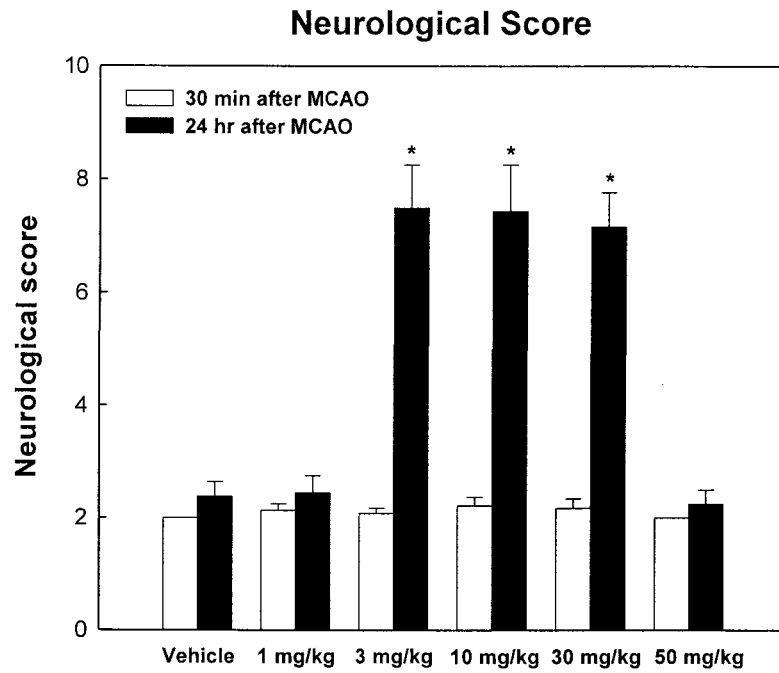


그림 7. 120분 일시적 국소 뇌 허혈 백서 모델에 있어 허혈 유발 후 30분, 2시간 및 4시간 3회에 걸쳐 정맥 내로 반복 투여된 알로에신의 신경행동학적 점수에 대한 용량별 효과를 나타낸다. 신경학적 결손 평가는 허혈 유발 후 약 30분 바로 전과 24시간에 시행되어졌다. \*Duncan's multiple range test 결과 허혈 유발 후 24시간에서 대조군과 유의성 있는 차이( $p < 0.05$ ).

표 5. 알로에신의 투여 용량에 따른 뇌 손상 지표에 대한 효과

Treatment	n	Absolute infarct volume			Corrected total infarct volume	% Edema	Injury index	
		Striatum	Cortex	Total			Striatum	Cortex
Vehicle (saline)	8	59.6±6.1	213.3±9.3	272.9±8.5	191.7±11.3	13.0±0.8	0.53±0.04	0.63±0.02
1 mg/kg	11	50.7±3.2	191.6±14.3	242.3±16.6	162.2±9.3	11.9±1.1	0.45±0.04	0.58±0.02
3 mg/kg	11	27.5±4.8*	110.8±25.6*	140.3±29.4*	102.4±21.8*	6.7±1.2*	0.31±0.04*	0.47±0.05*
10 mg/kg	9	32.0±6.1*	113.9±18.6*	145.9±23.7*	102.3±17.4*	6.9±0.9*	0.40±0.06	0.54±0.03
30 mg/kg	6	33.9±2.1*	162.2±7.6*	169.1±7.7*	129.0±7.4*	11.0±0.7*	0.42±0.02	0.55±0.01
50 mg/kg	4	59.1±1.7	218.3±32.4	277.4±33.2	187.7±23.5	14.1±1.4	0.46±0.07	0.61±0.04

n: 실험동물 수.

실험치는 평균치±표준오차로 표시됨.

\*Duncan's multiple range test 결과 대조군과 유의성 있는 차이(p<0.05).

표 6. 알로에신의 투여 용량에 따른 신경행동학적 점수에 대한 효과

Measured time after MCAO	Treatment					
	Vehicle (saline)	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	50 mg/kg
30 min	2.00±0.00	2.13±0.12	2.08±0.10	2.22±0.15	2.17±0.17	2.00±0.00
24 hr	2.38±0.26	2.45±0.30	7.50±0.76*	7.44±0.82*	7.17±0.60*	2.25±0.25

실험치는 평균치±표준오차로 표시됨.

\*Duncan's multiple range test 결과 24시간에서 대조군과 유의성 있는 차이 (p<0.05).

② 경시적인 단회 투여 시 뇌신경보호 효능

그림 8에 도시된 바와 같이 알로에신의 유효 정맥 투여용량인 10 mg/kg로 허혈 유발 후 30분에 단회 투여 시 유의성 있는 조직학적 신경보호 효과(총 경색용적 31%, 교정 총 경색용적 31%, 부종을 36% 감소) 및 신경행동학적 회복효과를 나타 내었다. 반면 허혈 유발 후 120분에 투여 시 약한 조직학적 신경보호 효과(총 경색

용적 20%, 교정 총 경색용적 22%, 부종율 18% 감소) 및 신경행동학적 회복효과를 나타내는 경향은 있었으나 유의성은 없었다. 따라서 10 mg/kg의 정맥 투여용량으로 단회 투여 시의 Therapeutic time window는 2시간 이내로 예측되어진다.

③ 기존 대조약물들과의 뇌신경보호 효능 비교 검색

120분 일시적 국소 허혈성 뇌손상에 대하여 강력한 NMDA receptor channel blocker로 알려진 대조약물 MK-801(1 mg/kg, i.p.)의 단회 투여 시의 신경보호 효능을 검색한 결과 허혈 유발 후 30분에 투여 시 알로에신 보다는 우수한 유의성 있는 조직학적 신경보호 효과(총 경색용적 82%, 교정 총 경색용적 84%, 부종율 71% 감소) 및 행동학적 회복효과를 나타내었다(그림 9). 또한 free radical scavenger로서 acute stroke의 치료제로 일본에서 최근에 승인받은 Edaravone (MCI-186, 3 mg/kg, i.v.)을 허혈 유발 후 30분에 투여 시 유의성 있는 조직학적 신경보호 효과(총 경색용적 61%, 교정 총 경색용적 62%, 부종율 55% 감소) 및 행동학적 회복효과를 나타내었다.

120분 일시적 국소 허혈성 뇌손상에 대한 알로에신의 신경보호 효능을 상기한 기존에 알려진 신경보호제 후보물질들과의 효능을 비교한 결과가 표 7에 보여진다.

표 7. Comparisons among neuroprotective agents in 120-min transient ischemia

Agents	Administration	Reduced infarct volume (%)
Aloesin 10 mg/kg, i.v.	0.5, 2 and 4 hr after onset of ischemia	47%
	0.5 hr after onset of ischemia	31%
	2 hr after onset of ischemia	22% No significance
MK801 1 mg/kg, i.p.	0.5 hr after onset of ischemia	84%
MCI-186 (Edaravone) 3 mg/kg, i.v.	0.5 hr after onset of ischemia	62%

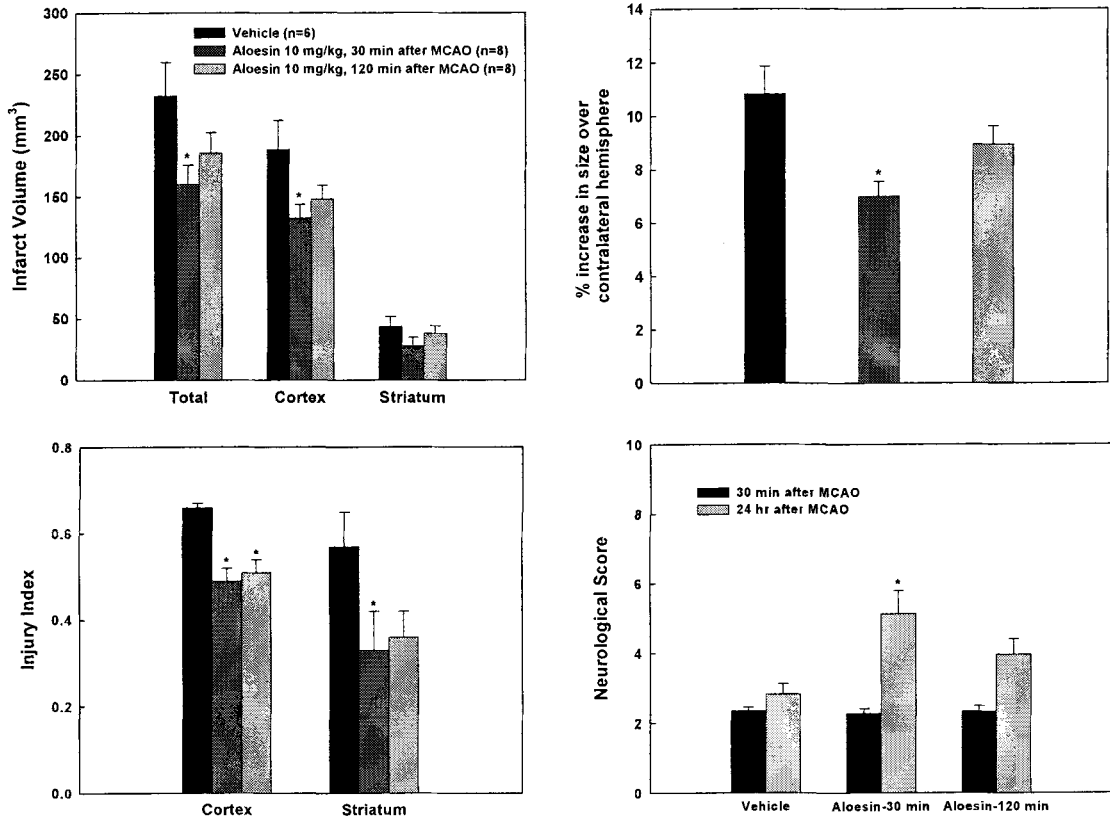


그림 8. Temporal effects of single administration of aloesin in a 120-min MCAO rat model.

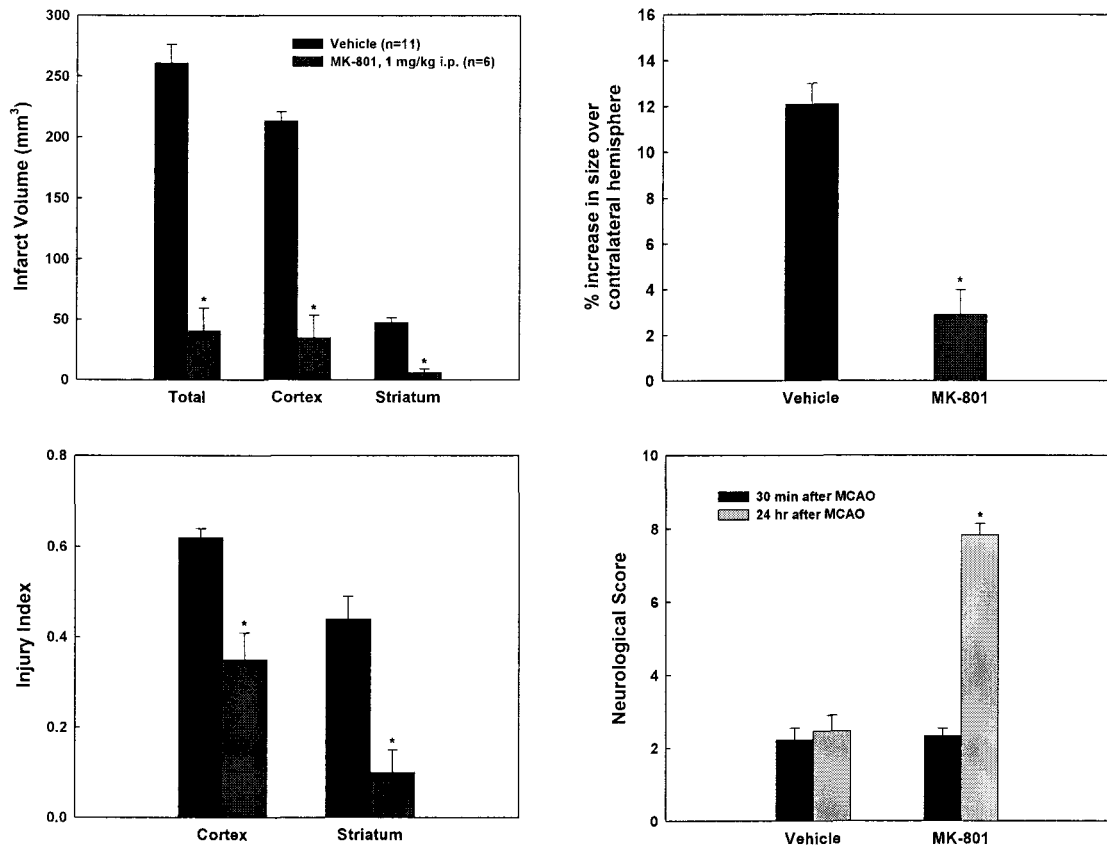


그림 9. Neuroprotective effects of MK-801 (1 mg/kg, i.p.) in a 120-min MCAO rat model.

#### ④ 반복 투여 시의 Apoptosis 억제 효능

##### ㉠ DNA fragmentation 억제 효과

Apoptosis에 대한 알로에신의 영향을 조사하기 위하여 120분 MCAO 후 DNA fragmentation이 일어나기 시작하는 18 및 24시간에서 rat brain의 striatum과 cortex를 분리하여 조직으로부터 DNA를 추출하여 laddering을 확인하였다. 그 결과 vehicle group에서는 apoptosis에 의하여 DNA fragmentation이 일어나 laddering 형태가 두드러지게 나타났으며, 알로에신(10 mg/kg, i.v.)을 허혈 유발 후 0.5, 2, 4시간에 3회 반복 투여했을 때 이러한 DNA laddering 현상이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(그림 10). 따라서 알로에신이 120분 MCAO에서 apoptosis에 의한 신경세포사멸을 억제하는 효과가 있다고 사료되어진다.

##### ㉡ Caspase-3 activation 억제 효과

중대뇌동맥의 일시적 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상에 있어서 caspase-3는 apoptosis 후 32 kDa의 procaspase-3가 17 kDa 및 19 kDa의 activated form으로 cleave 된다고 알려져 있다. 따라서 cleaved caspase-3의 antibody를 이용하여 western blot을 수행하였다. Vehicle과 알로에신을 투여한 rat brain을 12, 24시간에 관찰하였을 때, transient focal ischemia에서는 그림 11의 lane 4와 같이 24시간에서 증가하는 cleaved caspase-3가 알로에신의 투여 시 lane 7과 같이 상당히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 activated caspase-3 immunoreactivity의 뇌 조직 내 분포를 조사하기 위해서 immunohistochemistry를 수행하였을 때, 그림 12에서 보듯이 infarct region에서 activated caspase-3 immunoreactivity가 감소하였다. 따라서 알로에신이 허혈에 의하여 유발되는 caspase-3 activation을 억제하는 효과가 있다고 사료되어진다.

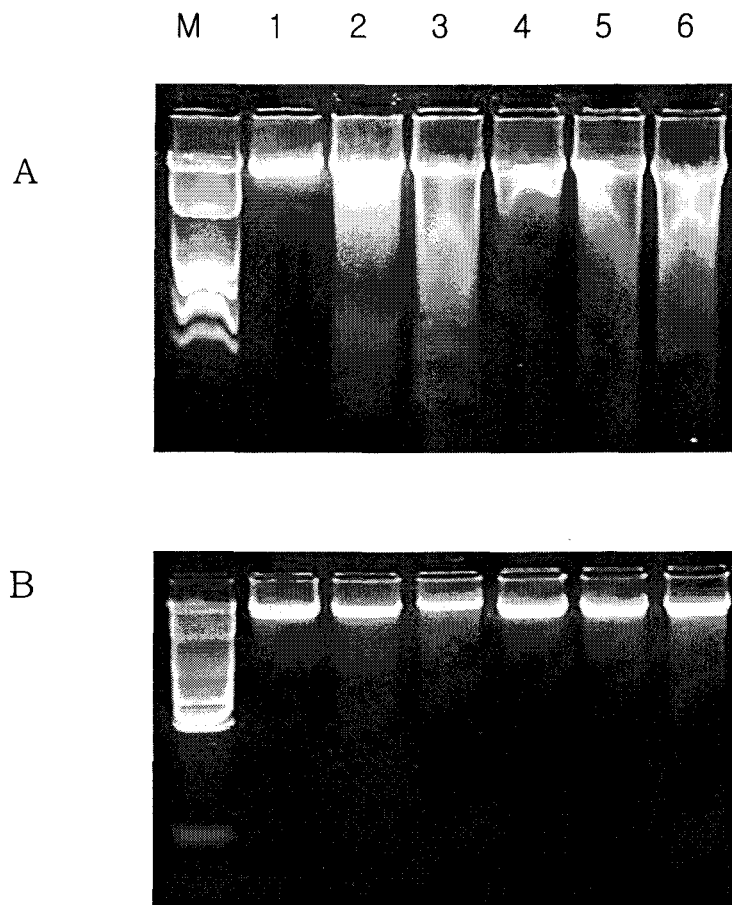


그림 10. Agarose gel electrophoretic DNA laddering patterns. Reduced DNA fragmentation by aloesin was observed in the samples from 18 hr and 24 hr of reperfusion. A, 120-min MCAO with vehicle treatment; B, 120-min MCAO with aloesin treatment; M, marker; 1, striatum contralateral; 2, striatum ipsilateral-18 hr; 3, striatum ipsilateral-24 hr; 4, cortex contralateral; 5, cortex ipsilateral-18 hr; 6, cortex ipsilateral-24 hr.



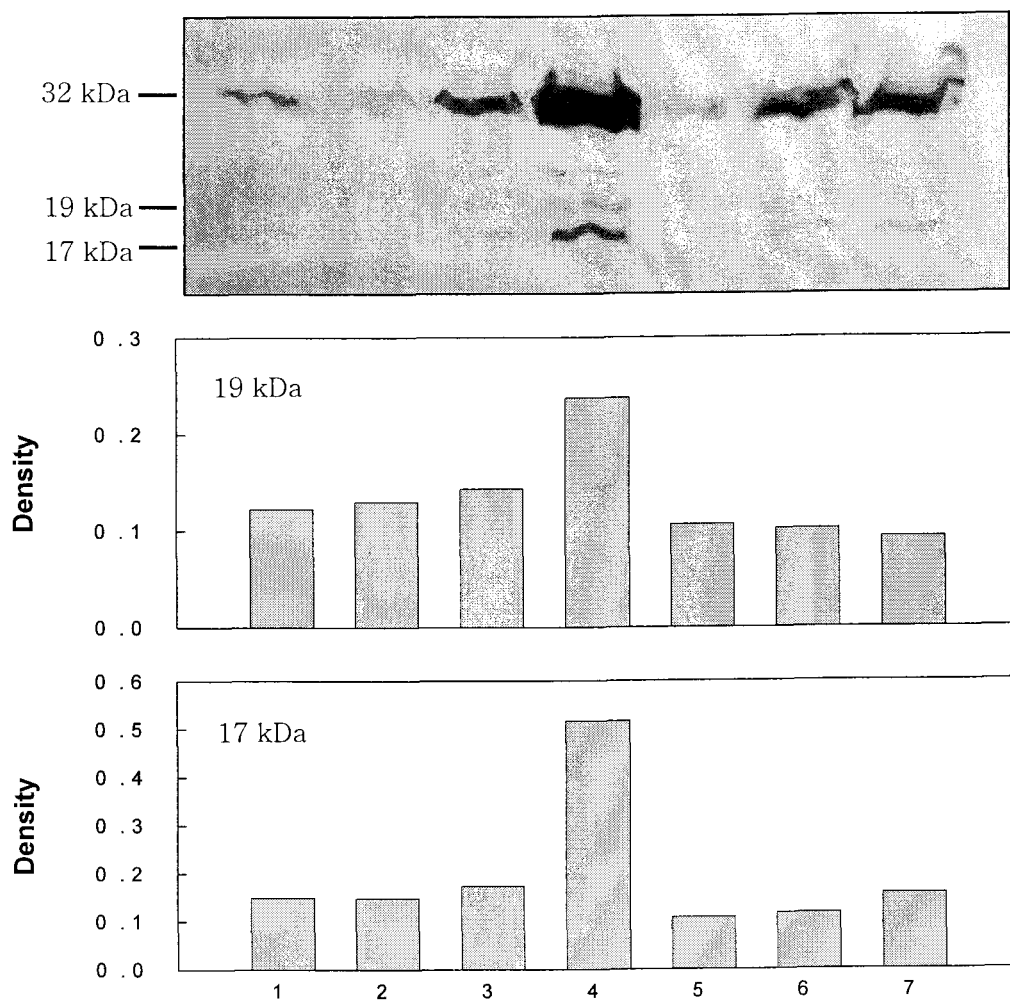


그림 11. Inhibition of ischemia-induced caspase-3 activation by aloesin. In the bottom panels, the results represent optical density. 1, normal; 2, vehicle contralateral-24 hr; 3, vehicle ipsilateral-12 hr; 4, vehicle ipsilateral-24 hr; 5, aloesin contralateral-24 hr; 6, aloesin ipsilateral-12 hr; 7, aloesin ipsilateral-24 hr.

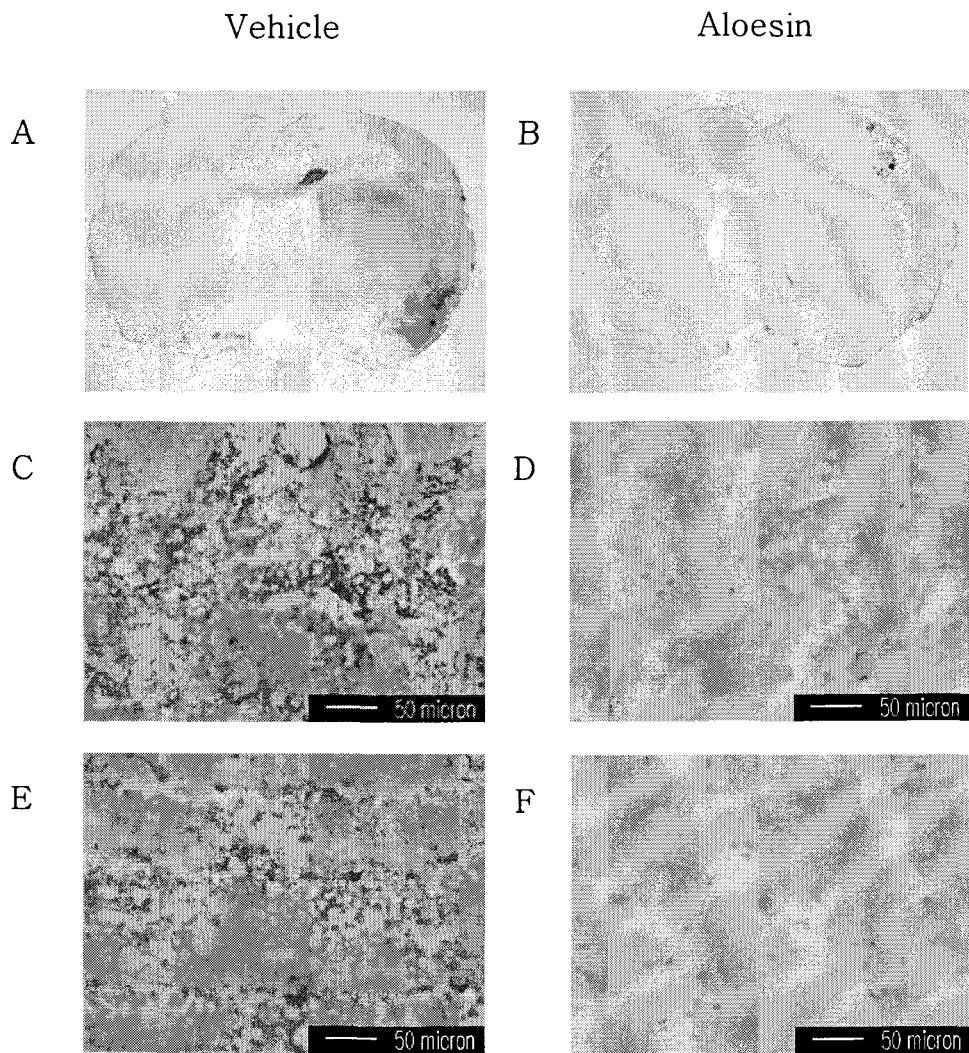


그림 12. Inhibition of ischemia-induced activated caspase-3 immunoreactivity by aloesin. Activation of caspase-3 (brown color) after 120-min MCAO was reduced in infarct regions at 24 hr. A, B, X12.5; C, D, striatum ipsilateral, X400; E, F, cortex ipsilateral, X400.

#### ㉔ Calpain cleavage의 억제 효과

m-Calpain은 necrotic cell death와 apoptotic neuronal injury에서 중요한 mediator로서 intracellular cysteine protease이며,  $Ca^{2+}$ 의 농도가 높을 때 활성화된다. 따라서 m-calpain의 80 kDa, large subunit의 cleavage의 변화를 western blot을 수행하여 조사하였다. Vehicle treatment group에서는 latent calpain(80 kDa)의 degradation이 현저하였으나, 알로에신 투여 시에는 degradation의 양이 감소하였다(그림 13).

#### ㉕ Bcl-2 down regulation과 bax translocation의 억제 효과

Bcl-2 protein은 mitochondrial proton flux에 영향을 미쳐  $\Delta\Psi_m$ 을 안정화 시키고  $Ca^{2+}$  homeostasis를 조절한다. 또한 ROS level을 감소시키고, neuronal cell mitochondria에서 calcium uptake capacity를 가져  $Ca^{2+}$ -mediated death를 억제할 수 있다. Bcl-2는 membrane에 결합한 상태로 존재하는데, Bax-induced caspase activation을 억제하기도 한다. 일시적 국소 뇌허혈 모델에서 Bcl-2의 발현량은 24시간에서 감소하는데 반해 알로에신의 투여 시는 24시간에서 Bcl-2 발현량의 감소가 현저히 억제되었다(그림 14).

한편 pro-apoptotic protein인 Bax는 cytosol에서 mitochondria로 translocation되면서 transducing signal로서의 역할을 한다. Bax는 conformational changes(dimerization, oligomerization)를 일으켜 mitochondrial outer membrane에 들어가 very-high-conductance channels, lipidic pore, large cytochrome c conducting channel을 형성한다. 이로 인해 Bax는  $\Delta\Psi_m$  loss, matrix swelling, cytochrome c 방출을 일으켜 cell death가 일어난다. Bax 또한 western blot을 수행한 결과, 그림 15에서와 같이 vehicle group에서는 cytosol에서 mitochondria로의 translocation이 24시간까지 증가하였으나, 알로에신 투여군에서는 cytosol에서의 Bax는 감소되지 않았고, mitochondria에서는 감소하여 Bax의 translocation이 억제되는 것으로 사료되어진다.

#### ㉖ Apoptosis-inducing factor(AIF) translocation의 억제 효과

Mitochondrial intermembrane flavoprotein인 AIF는 caspase-independent 기전으로 chromatin condensation, large-scale DNA fragmentation을 일으키는데 apoptosis 동안 mitochondria에서 cytosol과 nucleus로 translocation하는 것으로 알려져 있다. Vehicle 처치군에서는 mitochondria의 AIF가 24시간에서 상당히 감소하는데 반해 알로에신을 투여한 군에서는 감소 정도가 저하됨으로써 알로에신이 허혈에 의해 유발되는 AIF의 translocation을 억제하는 것으로 사료되어진다(그림 16).

이상의 결과로 볼 때 알로에신은 허혈에 의해 유발되는 뇌신경세포의 apoptotic cell death와 관련된 여러 분자생물학적 현상을 뚜렷이 억제하는 신경보호 효과를 나타내는 것이 확인되어졌다.

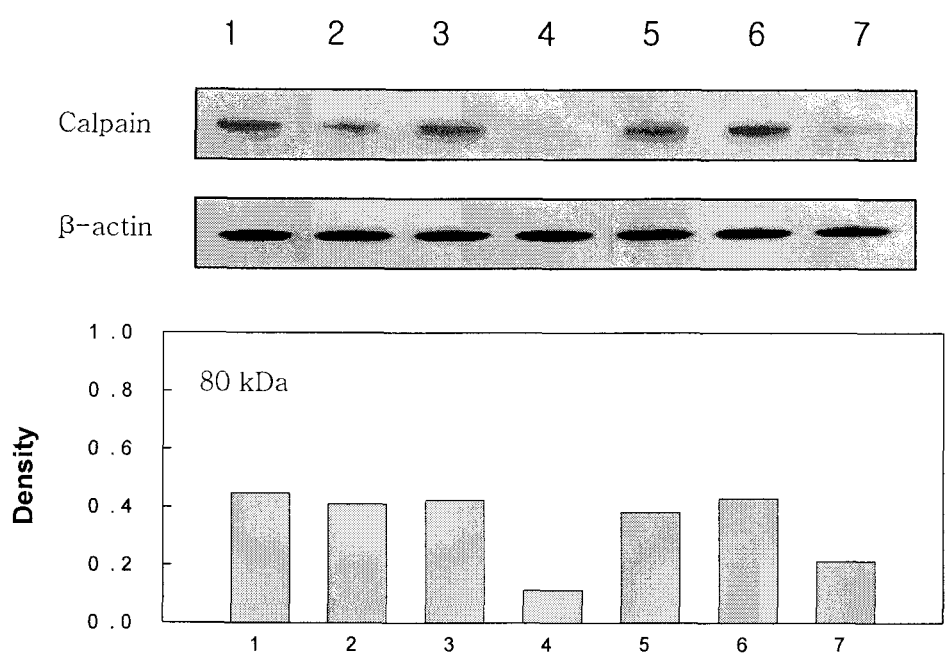


그림 13. Inhibition of ischemia-induced m-calpain cleavage by aloesin. In the bottom panel, the results represent optical density. 1, normal; 2, vehicle contralateral-24 hr; 3, vehicle ipsilateral-4 hr; 4, vehicle ipsilateral-24 hr; 5, aloesin contralateral-24 hr; 6, aloesin ipsilateral-4 hr; 7, aloesin ipsilateral-24 hr.

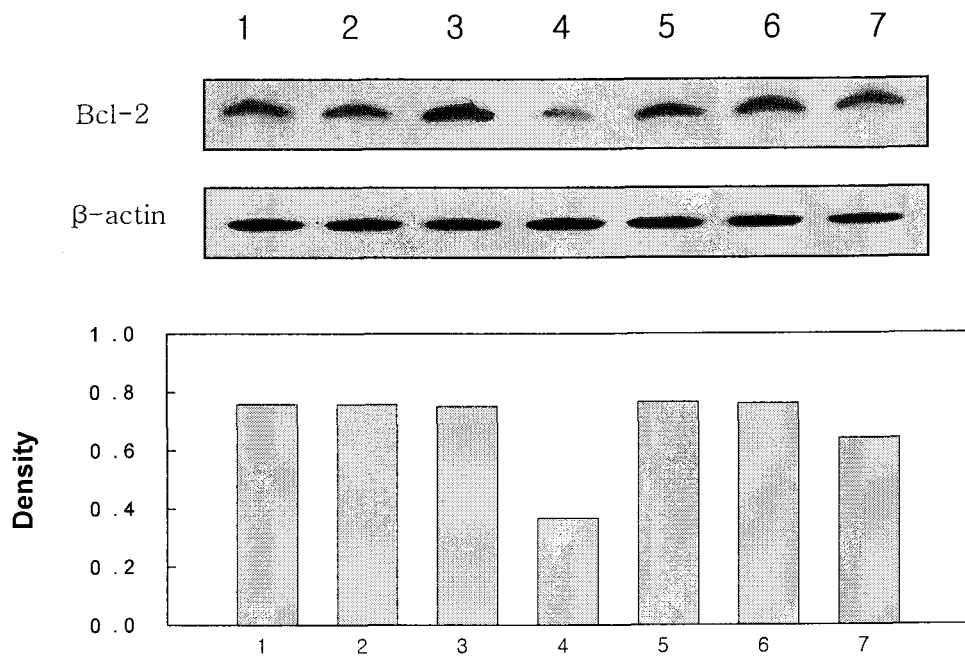


그림 14. Inhibition of ischemia-induced decrease in bcl-2 expression by aloesin. In the bottom panel, the results represent optical density. 1, normal; 2, vehicle contralateral-24 hr; 3, vehicle ipsilateral-4 hr; 4, vehicle ipsilateral-24 hr; 5, aloesin contralateral-24 hr; 6, aloesin ipsilateral-4 hr; 7, aloesin ipsilateral-24 hr.

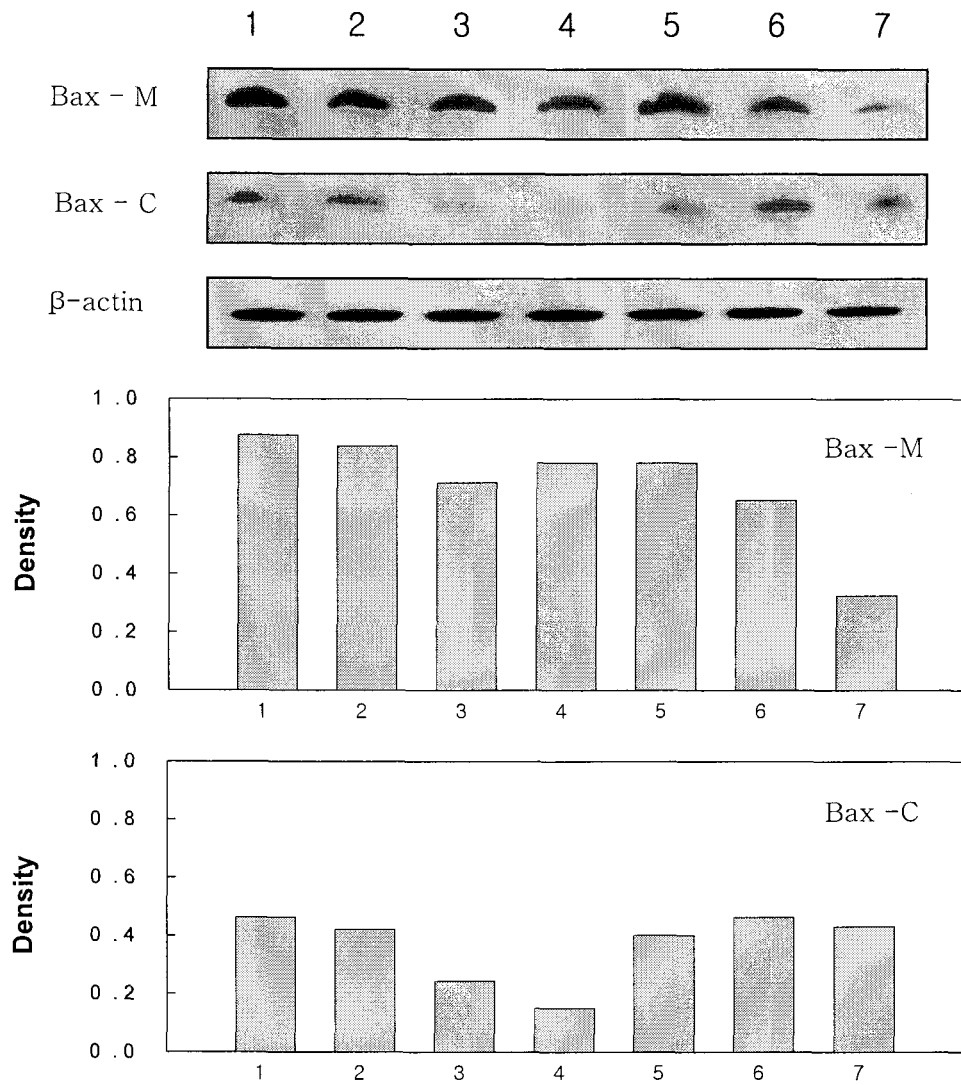


그림 15. Inhibition of ischemia-induced bax translocation into the mitochondria by aloesin. In the bottom panels, the results represent optical density. 1, normal; 2, vehicle contralateral-24 hr; 3, vehicle ipsilateral-4 hr; 4, vehicle ipsilateral-24 hr; 5, aloesin contralateral-24 hr; 6, aloesin ipsilateral-4 hr; 7, aloesin ipsilateral-24 hr.

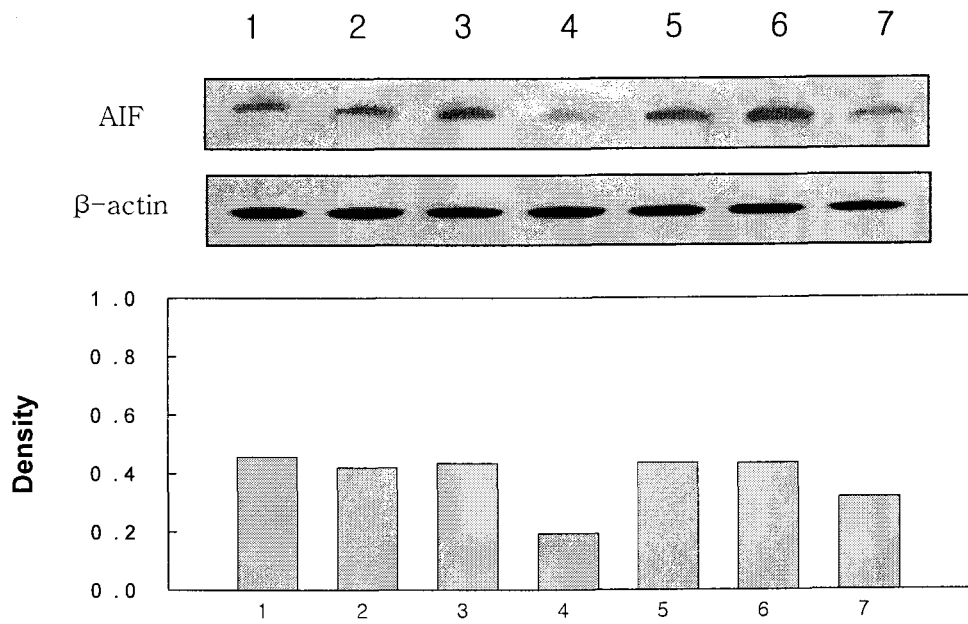


그림 16. Inhibition of ischemia-induced AIF translocation into the cytosol by aloesin. In the bottom panel, the results represent optical density. 1, normal; 2, vehicle contralateral-24hr; 3, vehicle ipsilateral-4 hr; 4, vehicle ipsilateral-24 hr; 5, aloesin contralateral-24 hr; 6, aloesin ipsilateral-4 hr; 7, aloesin ipsilateral-24 hr.

## (나) 영구적 국소 허혈성 뇌손상 백서 모델에서의 뇌신경보호 효능

### ① 반복 투여 시의 뇌신경보호 효능

약 1일 동안 중대뇌동맥을 폐쇄한 영구적 국소 허혈성 뇌손상 백서 모델에 있어서 알로에신을 10 mg/kg 용량으로 뇌허혈 유발 후 0.5, 2 그리고 4시간에 3번 반복하여 정맥 투여한 군에서 TTC 염색을 한 결과 대조군에 비해 알로에신을 투여한 군의 경우 cortex와 striatum 모두에서 infarction 부위의 크기가 감소하였다(그림 17). 대조군과 알로에신을 3번 투여한 군의 striatum에서 infarct volume이 각각  $35.77 \pm 8.06$ 에서  $15.87 \pm 3.45$ 로 약 50%, cortex에서는  $138.62 \pm 17.58$ 에서  $35.93 \pm 10.09$ 로 약 70% infarct volume이 유의적으로 감소하였고 corrected infarct volume은  $131.35 \pm 17.10$ 에서  $49.27 \pm 10.56$ 으로 약 60% 감소하였다. 부종을 또한 알로에신을 투여한 군에서 약 50% 정도 감소하였다. 각 군의 injury index를 계산한 결과 cortex에서  $0.69 \pm 0.01$ 에서  $0.41 \pm 0.08$ 로 알로에신 투여군이 유의적으로 감소하였다. 뇌허혈로 인한 신경행동학적 결손에 대해서도 알로에신이 대조군에 비해 유의성 있는 신경행동학적 회복효과가 있음을 알 수 있었다(그림 18).

### ② 경시적인 단회 투여 시의 뇌신경보호 효능

알로에신을 뇌허혈 유발 후 0.5, 2 또는 4시간에 10 mg/kg 용량으로 단회 투여하여 경시적인 신정보호 효능을 비교 검색하였다(그림 19). 알로에신을 뇌허혈 유발 후 0.5시간에 단회 투여한 경우 대조군과 비교했을 때, striatum에서 infarct volume이  $48.65 \pm 8.32$ 에서  $24.49 \pm 6.37$ 로 약 40%, cortex에서는  $157.19 \pm 19.6$ 에서  $56.95 \pm 18.07$ 로 약 60% 유의적으로 감소하였고 corrected infarct volume은  $150.35 \pm 17.48$ 에서  $72.40 \pm 19.14$ 로 약 60% 감소하였다. 부종율은  $11.59 \pm 1.43$ 에서  $5.29 \pm 1.20$ 으로 약 50% 정도 감소하였다. 각 군에서 injury index를 계산한 결과 cortex에서  $0.67 \pm 0.02$ 에서  $0.37 \pm 0.09$ 로 알로에신을 0.5시간에 단회 투여한 군에서 유의적으로 감소하였다. 알로에신을 뇌허혈 유발 후 2시간에 단회 투여한 군에서는 cortex에서만 대조군에 비해 infarct volume이  $157.19 \pm 19.6$ 에서  $72.43 \pm 21.83$ 으로 약 53% 유의적인 감소를 보였고 corrected infarct volume은  $150.35 \pm 17.48$ 에서  $84.94 \pm 20.23$ 으로 약 43% 감소하였다. 부종율과 injury index는 약간 감소하였으나 유의성이 없었다. 뇌허혈 후 4시간에 알로에신을 투여한 군은 대조군과 비교했을 때 infarct volume, 부종율, injury index 모두 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 한편 신경행동학적 결손 정도를 측정된 결과 뇌허혈 유발 후 0.5시간에 투여했을 때에만 대조군과 비교하여 유의적인 신경행동학적 회복 효과를 나타냈다. 따라서 10 mg/kg의 정맥 투여용량으로 단회 투여 시의 Therapeutic time window는 4시간 이내로 예측되어진다.



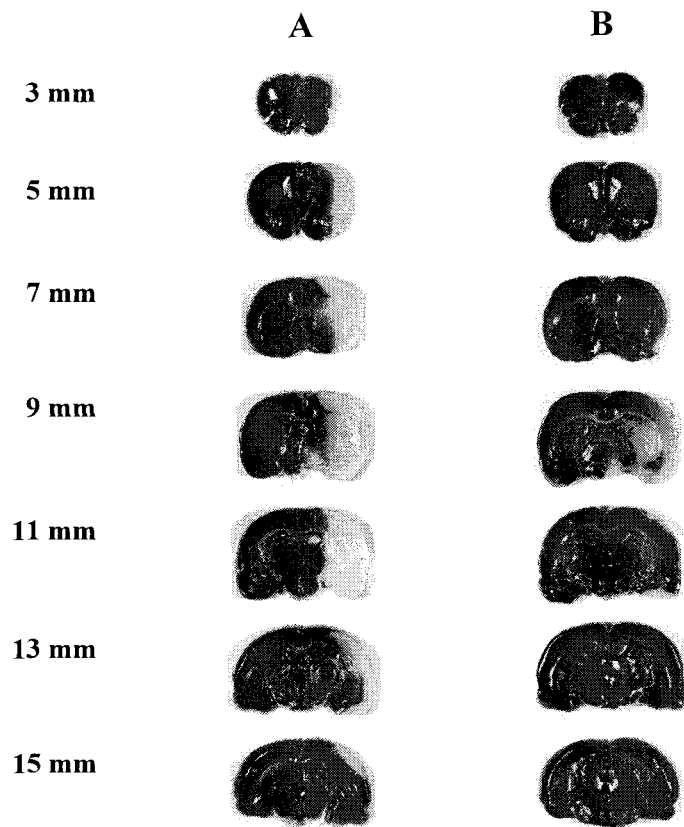


그림 17. Coronal sections of the TTC-stained rat brains of the vehicle- and aloesin-treated groups. Each section was cut out coronally into 2 mm thick slices from the frontal lobe. A is a control group and B is an aloesin treatment group at 0.5, 2 and 4 hr after onset of ischemia (3 times administration, 10 mg/kg, i.v.).

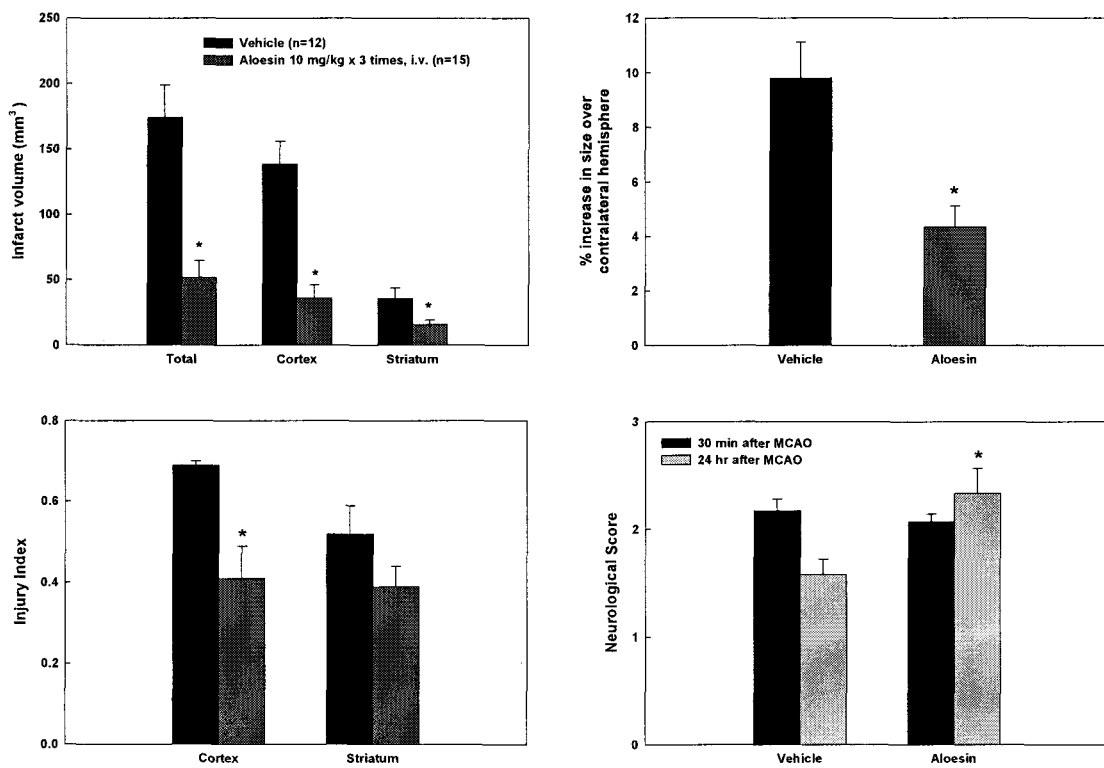


그림 18. Effects of multiple administrations of aloesin (10 mg/kg, i.v.) in a permanent MCAO rat model.

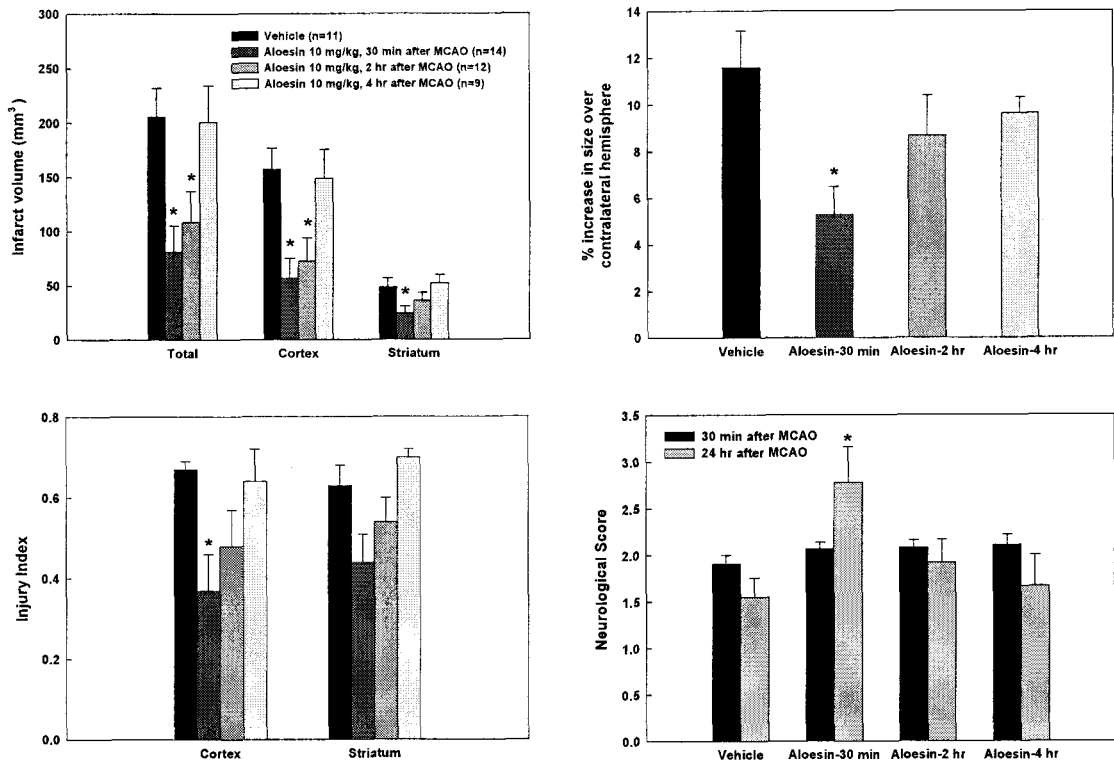


그림 19. Temporal effects of single administration of aloesin (10 mg/kg, i.v.) in a permanent MCAO rat model.

### ③ 기존 대조약물들과의 뇌신경보호 효능 비교 검색

연구적 중대뇌동맥 폐쇄로 인한 허혈성 뇌손상에 대한 알로에신의 신경보호 효능을 기존 대조약물로서 MK-801, Ebselen 및 Edaravone을 사용하여 비교하였다(표 8). MK-801을 뇌허혈 유발 후 0.5시간에 복강 내로 투여 시 대조군과 비교했을 때 cortex에서만 infarct volume이  $161.44 \pm 26.58$ 에서  $64.45 \pm 20.64$ 로 약 60% 감소하였고 striatum에서는 대조군과 투여군 사이에 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. Corrected infarct volume은  $157.28 \pm 26.43$ 에서  $92.57 \pm 23.89$ 로 약 40% 유의적으로 감소하였다. 부종율은  $10.21 \pm 2.28$ 에서  $5.56 \pm 0.95$ 로 약 45% 감소하였다. 그러나 손상 정도를 나타내는 injury index는 대조군과 차이가 없었다(그림 20).

Free radical scavenger로서 알려진 Ebselen을 뇌허혈 유발 후 0.5시간에 10 또는 30 mg/kg의 용량으로 복강 내에 투여한 경우 striatum의 infarct volume은 대조군과 별 차이가 없었고 cortex에서는  $167.66 \pm 9.46$ 에서  $123.71 \pm 22.68$  및  $102.32 \pm 35.69$ 로 감소하기는 하였지만 유의성은 없었다. 부종율과 injury index에서도 투여군과 대조군 사이에 별 차이가 나타나지 않았다.

Edaravone을 뇌허혈 유발 후 0.5시간에 3 mg/kg 용량으로 정맥 투여한 경우 대조군과 비교했을 때, striatum에서 infarct volume이  $51.87 \pm 5.40$ 에서  $20.15 \pm 5.50$ 로 약 55%, cortex에서는  $140.90 \pm 17.28$ 에서  $64.89 \pm 16.06$ 으로 약 60% 유의적으로 감소하였고 corrected infarct volume은  $138.65 \pm 14.03$ 에서  $61.11 \pm 18.30$ 으로 약 50% 감소하였다. 부종율은  $11.51 \pm 0.80$ 에서  $7.97 \pm 0.85$ 로 약 30% 정도 감소하였다. 그러나 injury index에는 유의적인 차이가 없었다.

한편 신경행동학적 회복효과에 있어서는 대조 약물로 사용한 MK-801과 Edaravone 투여군에서는 유의적인 신경행동학적 회복효과를 나타냈으나 Ebselen의 경우에는 10 mg/kg의 용량으로 투여한 군에서만 대조군과 유의적인 차이를 나타냈다.

### 8. Comparisons among neuroprotective agents in permanent ischemia

Agents	Administration	Reduced infarction volume (%)
Aloesin 10 mg/kg, i.v.	0.5, 2 & 4 hr after onset of ischemia	63%
	0.5 hr after onset of ischemia	52%
	2 hr after onset of ischemia	44%
	4 hr after onset of ischemia	No protective effect
MK801 1 mg/kg, i.p.	0.5 hr after onset of ischemia	41%
Ebselen 10 mg/kg, i.p.	0.5 hr after onset of ischemia	29%
		No significance
Ebselen 30 mg/kg, i.p.	0.5 hr after onset of ischemia	34%
		No significance
MCI-186 (Edaravone) 3 mg/kg, i.v.	0.5 hr after onset of ischemia	50%

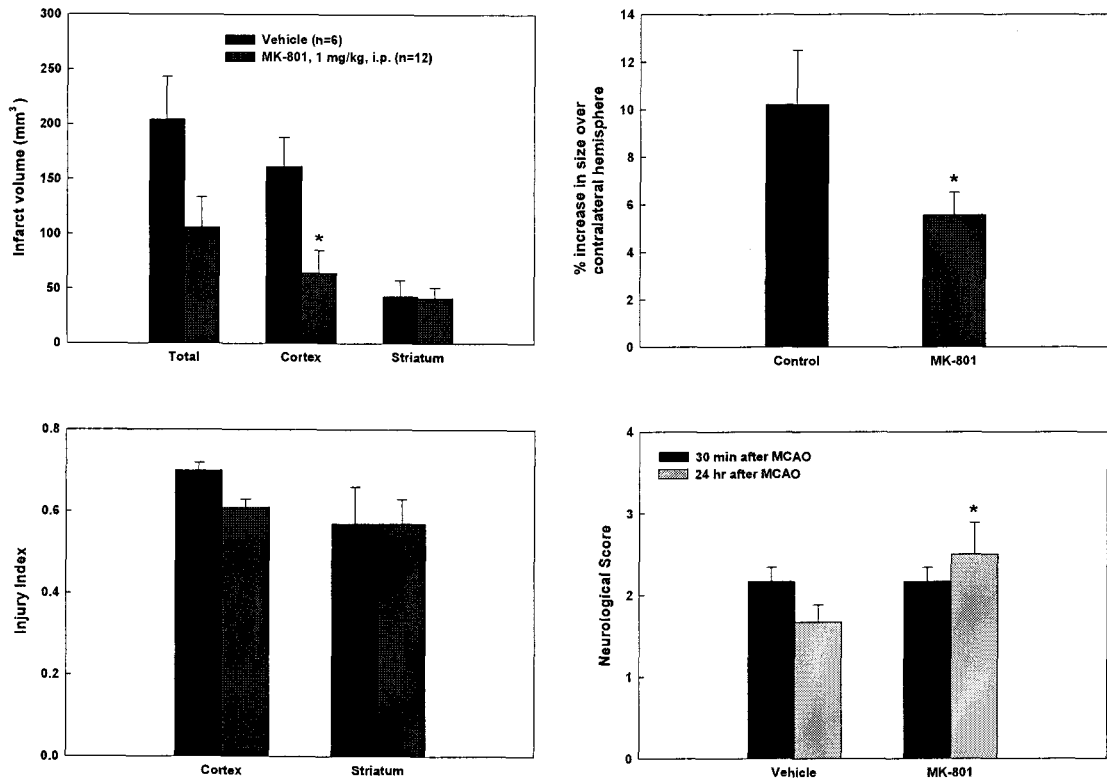


그림 20. Neuroprotective effects of MK-801 (1 mg/kg, i.p.) in a permanent MCAO rat model.

#### ④ 반복 투여 시의 Apoptosis 억제 효능

##### ㉠ DNA fragmentation 억제 효과

영구적 중대뇌동맥 폐쇄로 인해 뇌조직에서 DNA fragmentation이 일어난다고 알려져 있다. 뇌허혈로 인한 DNA degradation은 활성산소(ROS)에 의한 직접적인 손상과 caspase-3에 의해 활성화되는 CAD(Caspase-Activated DNase)와 같은 endonuclease에 의한 간접적인 손상이 복합적으로 일어난다. 본 연구는 중대뇌동맥 폐쇄로 인한 DNA degradation이 알로에신에 의해 억제되는지 확인하기 위해 정상 백서의 뇌와 18시간 혹은 24시간 동안 중대뇌동맥을 폐쇄한 백서의 뇌에서 DNA를 추출하여 agarose gel 상에서 관찰하였다. 그 결과 정상군에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았고 18시간 혹은 24시간 동안 허혈을 유발한 대조군에서 DNA fragmentation이 일어났다. 같은 방법으로 뇌허혈을 유발하고 그 후 0.5, 2 그리고 4시간에 알로에신을 3번 반복 투여한 군에서 DNA를 추출하여 agarose gel 상에서 관찰하였을 때 대조군에 비해 DNA fragmentation이 현저히 감소하였다(그림 21).

##### ㉡ 알로에신에 의한 TUNEL positive cell의 감소

뇌허혈로 인한 DNA fragmentation을 평가하는 다른 방법으로 TUNEL염색을 시행하였다. TUNEL 염색은 DNA degradation으로 발생하는 DNA free 3-OH end에 labeled nucleotide를 붙여 fragmented된 DNA를 확인하는 방법이다. Agarose gel 상에서 DNA fragmentation을 확인한 결과와 일관성 있게 TUNEL 염색에서도 대조군의 cortex와 striatum에서 TUNEL positive cell이 많이 관찰되었고 알로에신 투여군에서 TUNEL positive cell이 현저히 감소하였다(그림 22).

##### ㉢ Caspase-3 activation 억제 효과

Apoptosis에 있어서 중요한 역할을 하는 caspase-3에 대한 알로에신의 *in vivo* 효과를 조사하기 위해 영구적 중대뇌동맥 폐쇄로 인해 뇌허혈이 일어난 백서의 뇌에서 active form caspase-3를 면역조직화학적 방법으로 확인한 결과, 그림 23에서 보듯이 대조군(A)의 경우 activated caspase-3가 뇌허혈 손상부위에 전반적으로 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 알로에신을 투여한 군(B)에서는 뇌허혈 손상부위의 감소와 함께 activated caspase-3의 면역강도가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

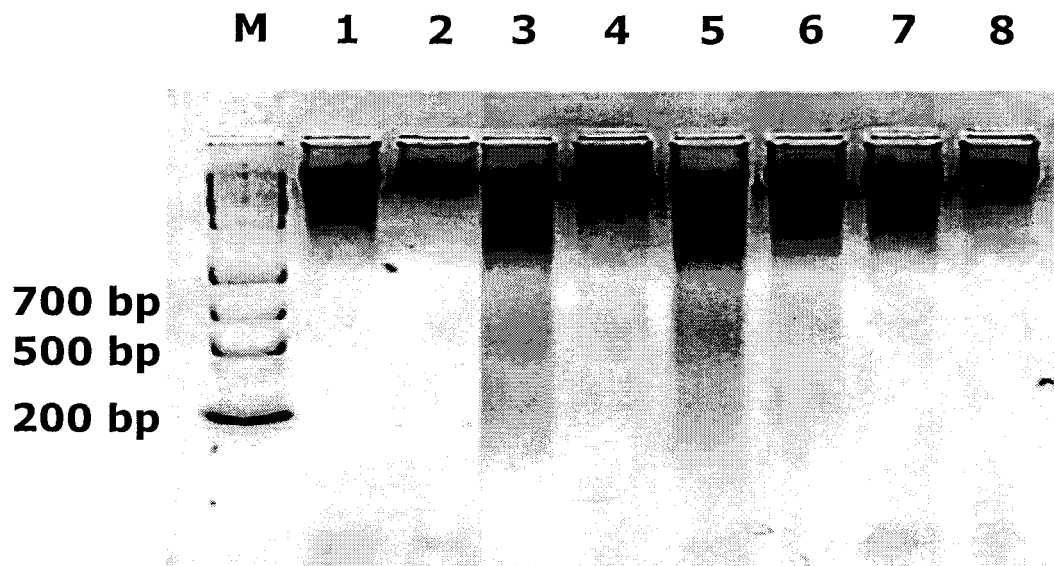


그림 21. Representative agarose gel electrophoresis exhibiting DNA fragmentation in rat brains obtained at 18 and 24 hr after onset of middle cerebral artery occlusion. Lane M is marker. 1: normal cortex, 2: normal striatum, 3: 18 hr ischemic cortex, 4: 18 hr ischemic striatum, 5: 24 hr ischemic cortex, 6: 24 hr ischemic striatum, 7: 24 hr ischemic cortex in the aloesin treatment group, 8: 24 hr ischemic striatum in the aloesin treatment group.



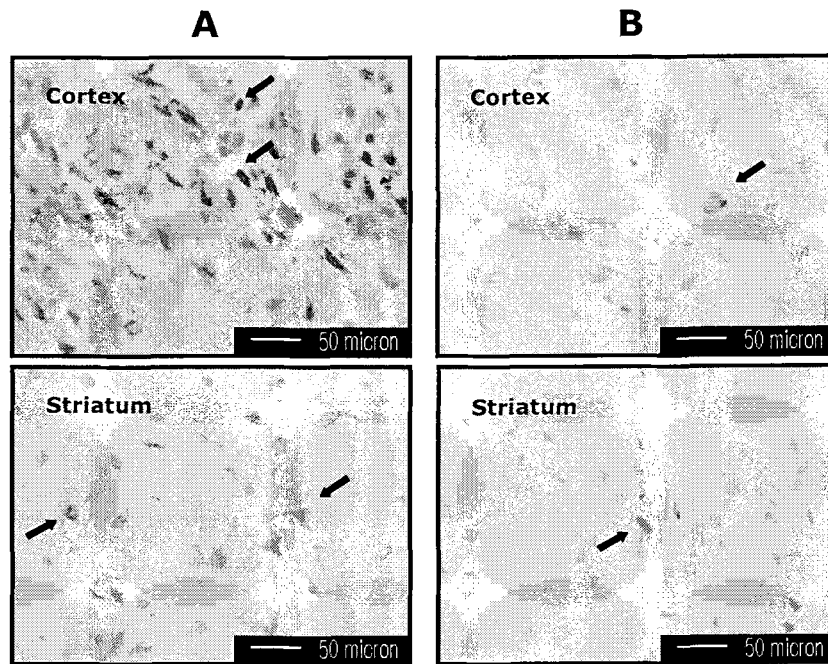


그림 22. Representative TUNEL staining for tissue sections from rat brains obtained at 24 hr after onset of ischemia. A represents the cortex and striatum of the control group and B represents those of the aloesin treatment group (3 times administration of 10 mg/kg, i.v. ).

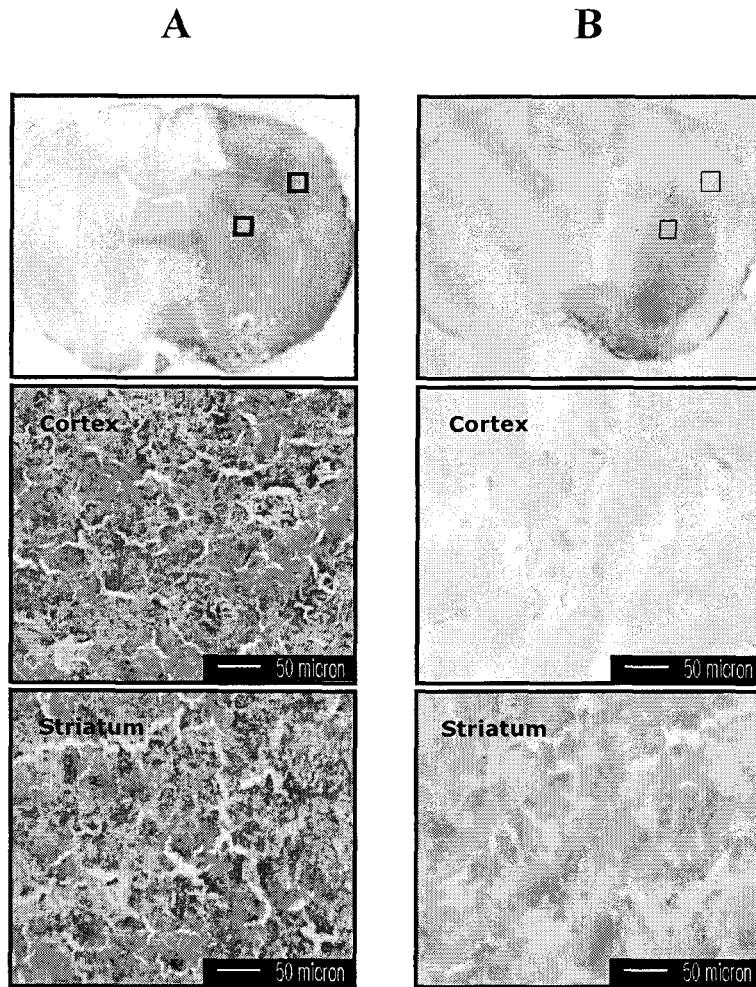


그림 23. Representative immunohistochemical staining of rat brains using cleaved caspase-3 antiserum. A is the control ischemic brain section (30  $\mu$ m) and B is the brain section of the aloesin treatment group (3 times administration of 10 mg/kg, i.v.).

(3) 알로에신의 in vivo 투여에 의한 혈중 농도 profile 및 뇌조직 내로의 약물 투과성 검색

정상 백서에서의 단회 정맥투여(10 mg/kg) 후 경시적인 혈중 및 뇌조직 내의 알로에신 농도를 switching HPLC/UV detector를 이용하여 측정된 결과가 표 9에서 보여진다. 혈중에서는 비교적 빠른 속도로 소실되어졌으며 뇌조직 내로의 투과성은 비교적 약한 것으로 나타났으나 뇌에서는 천천히 소실되어지는 패턴을 보여주었다. 한편 뇌조직 내로의 약물 투과성의 지표가 되는 뇌조직(ng/g tissue)/plasma 농도(ng/ml) ratio를 측정된 결과 투여 후 5분에서는 0.006, 30분에서는 0.02, 60분에서는 0.03, 120분에서는 0.92로 나타나 비교적 뇌조직 내에는 머무르는 시간은 긴 것으로 사료되어진다.

표 9. Concentrations of aloesin in plasma and brain after a single intravenous administration (10 mg/kg) to normal rats

Time (min)	Concentration (ng/ml or g tissue)		
	Plasma	Brain	Brain/Plasma
5	14816 ± 1031	81 ± 40	0.006
30	1492 ± 966	29 ± 26	0.019
60	444 ± 103	13 ± 14	0.029
120	12 ± 7	11 ± 6	0.917

또한 120분 일시적 허혈성 뇌손상 백서모델에서의 알로에신의 단회 정맥 투여 (10 mg/kg) 후 경시적인 혈중 및 뇌조직 내의 알로에신 농도를 측정된 결과가 표 10에서 보여진다. 알로에신이 허혈에 관계없이 양쪽 대뇌반구에 비슷한 수준으로 이행되는 것이 확인되어졌으며, 특히 중대뇌동맥의 재관류 시 손상된 뇌조직 내로의 이행이 정상조직보다도 3배 이상 높게 나타났다.

표 10. Concentrations of aloesin in plasma and brain after a single intravenous administration (10 mg/kg) to 120-min ischemic rats

Treatment Group (Ischemia 유발 후 투여시간 + 투여 후 샘플 채취시간)	Concentration		
	Plasma ( $\mu\text{g/ml}$ )	Brain ( $\text{ng/g tissue}$ )	
		Contralateral	Ipsilateral
30분 + 30분	3.51 $\pm$ 0.74	13.04 $\pm$ 2.56	13.65 $\pm$ 2.08
30분 + 60분	0.37 $\pm$ 0.11	7.23 $\pm$ 0.31	6.76 $\pm$ 0.06
120분(Reperfusion) + 30분	2.12 $\pm$ 0.41	14.62 $\pm$ 2.11	47.74 $\pm$ 2.91

(4) KYS 50163의 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서 모델에서의 *in vivo* 뇌신경보호 효능  
 알로에신 유도체 후속물질 KYS 50163(7-O-methylaloesin, 10 mg/kg)의 허혈 유발 후 30분에 단회 정맥 내 투여 시 120분 동안의 일시적 국소 허혈성 뇌손상에 대한 신경보호 효능을 검색한 결과 대뇌피질 경색용적, 총 및 교정 총 경색용적, 부종을 모두 대조군에 비해 각각 35.1, 33.9, 35.0, 29.8%의 유의성 있는 감소를 나타냄으로서 뚜렷한 조직학적 신경보호 효과를 나타내었으며 또한 대조군에 비해 유의성 있는 신경행동학적 회복 효과를 나타내었다(그림 24). 이는 알로에신의 같은 처치에 의해 나타나는 뇌신경보호 효능과 유사한 수준이었다.

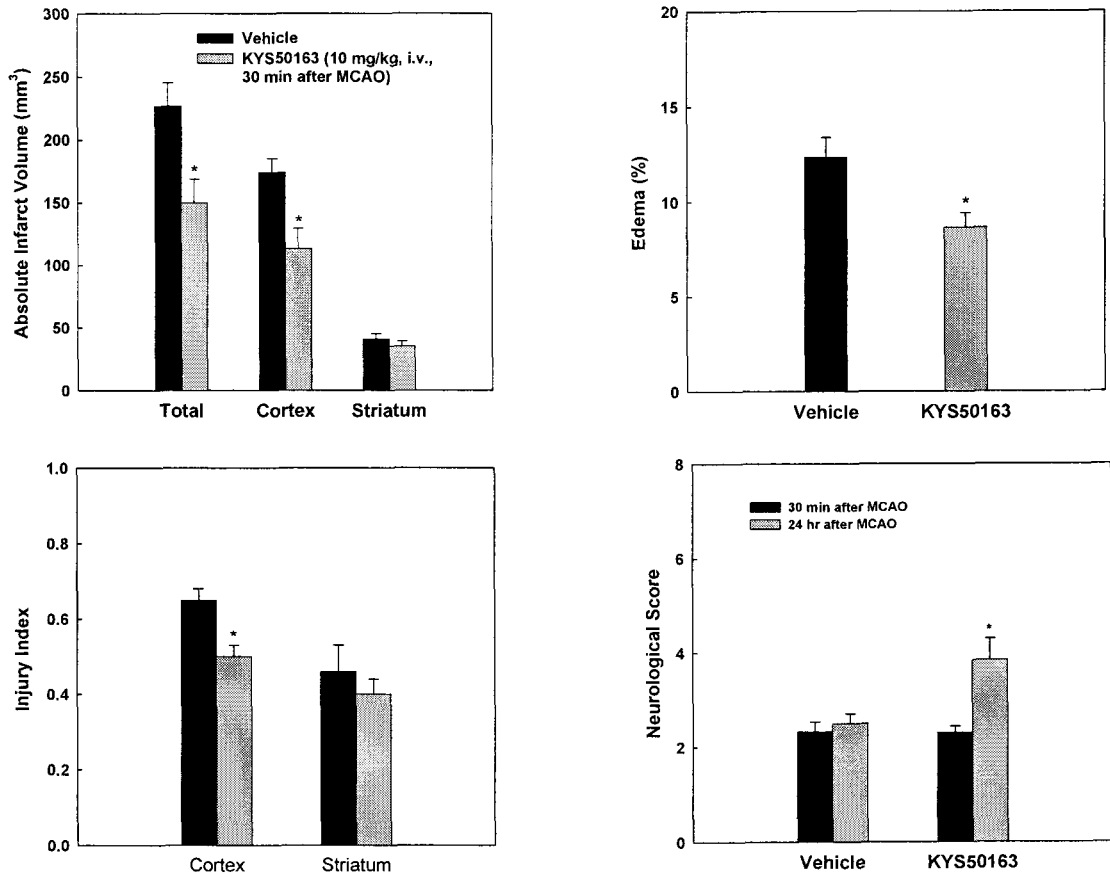
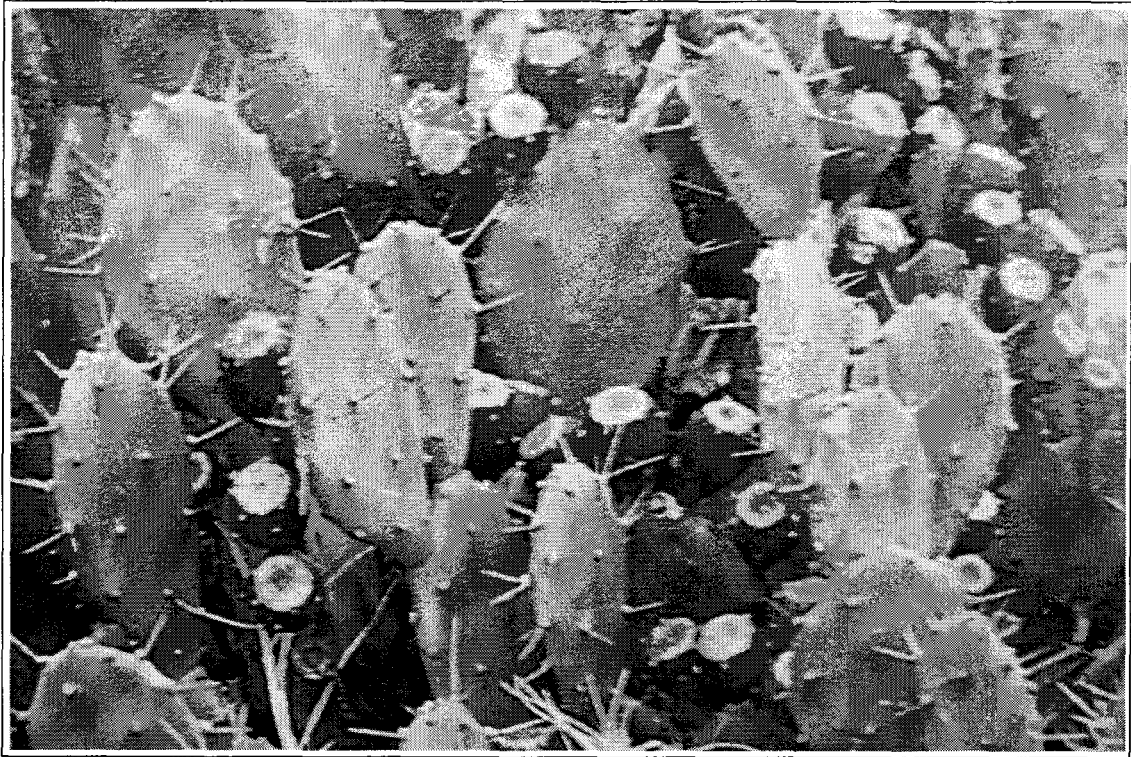


그림 24. Neuroprotective effects of 7-O-methylaloesin (KYS 50163, 10 mg/kg, i.v.) in a 120-min MCAO rat model.

## 제 2절 손바닥선인장에 대한 연구



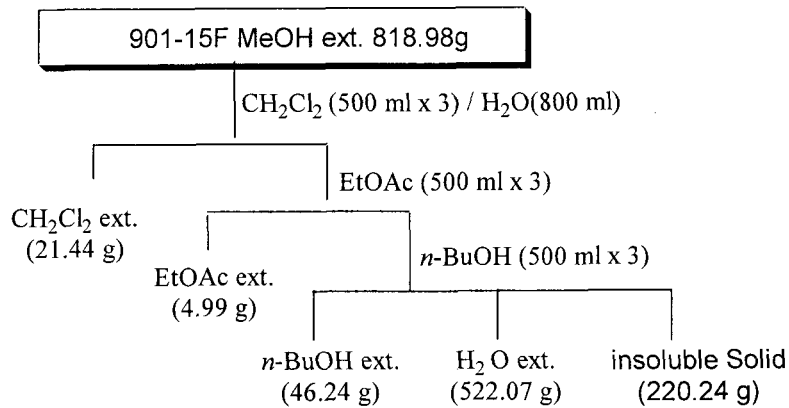
### 1. 손바닥선인장 유효성분의 분리방법

본 실험에 사용된 손바닥선인장(식물 901-15)의 줄기와 열매는 2001년 1월 서울시 동대문구 제기동 경동시장에서 구입하였으며, 열매는 씨를 제거한 후 사용하였다.

식물 901-15 줄기- 신선한 손바닥 선인장 줄기(생중량 32.5 kg)를 세절한 후 실온에서 메탄올로 3회 추출한 후 감압 농축하여 메탄올추출물 (819 g)을 얻었다.

식물 901-15 열매 - 씨를 제거한 신선한 열매(생중량 7.8 kg)를 세절한 후 실온에서 메탄올로 3회 추출한 후 감압 농축하여 메탄올추출물 (498 g)을 얻었다.

손바닥선인장 줄기-메탄올추출물을 800 ml의 증류수에 현탁시킨 후 methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 500 ml $\times$ 3), ethyl acetate (EtOAc, 500 ml $\times$ 3) 및 *n*-butanol (BuOH, 500 ml $\times$ 3)을 이용하여 순차적으로 용매 분획을 하여 각각의 용매추출물을 21.44 g, 4.99 g 및 46.24 g씩을 얻었다.

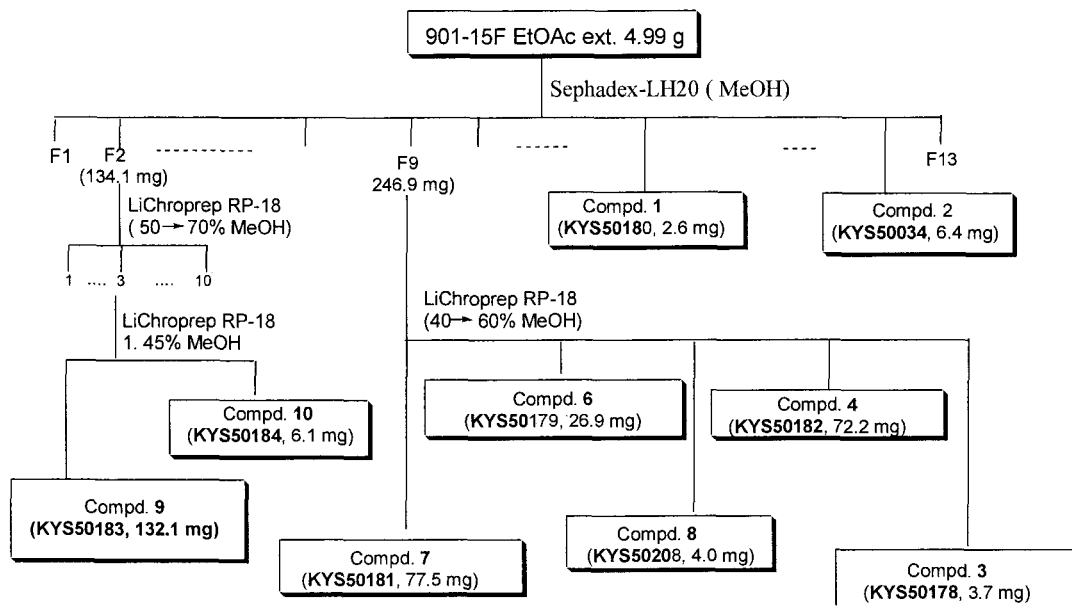


손바닥선인장 열매- 메탄올추출물을 800 ml의 증류수에 현탁시켜 methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 500 ml $\times$ 3), ethyl acetate (EtOAc, 500 ml $\times$ 3) 및 *n*-butanol (BuOH, 500 ml $\times$ 3)을 이용하여 순차적으로 용매 분획을 하여 각각의 용매추출물을 7.4 g, 3.5 g 및 34 g씩을 얻었다.

가. 손바닥선인장 줄기로부터 활성성분의 분리

손바닥선인장 줄기의 ethyl acetate 분획 4.98 g을 메탄올을 전개용매로 사용하고 세파텍스(Cat. No. LH-20-100, 시그마)를 고정상으로 이용하여 칼럼 크로마토그래피(4 $\times$ 35 cm)를 실시하였다. 얻어진 분획들은 순상 실리카겔 TLC(전개용매: 디클로로메탄:메탄올 = 5:1)와 역상 실리카겔 TLC(전개용매: 물:메탄올 = 40:60)로 관찰한 후, 유사한 극성을 갖는 화합물끼리 모아 17개의 소 분획(분획 1 - 분획 17)으로 나누었다. 소 분획 12를 역상 칼럼크로마토그래피(LiChroprep RP-18, 40~63  $\mu\text{m}$ , 2.5 $\times$ 35 cm)를 실시하여 정제하였다. 용출액은 40 % 메탄올로 시작하여 60 % 메탄올까지 점진적으로 극성을 높여가면서 실시하여 극성에 따라서 12개의 소 분획(분획 12A-분획 12L)으로 나누었다. 이중 순수한 화합물이 중점적으로 존재하는 화합물 분획인 2번째 분획(12B)을 메탄올을 전개용매로 사용하여 세파텍스 칼럼 크로마토그래피(2.5 $\times$ 35 cm)를 실시하여 화합물 9(KYS 50183, 132.1 mg)와 10(KYS 50184, 6.1 mg)을 얻었다. 중간정도의 극성을 나타내는 소 분획 5번째 분획(12E)은 순수한 화합물로 화합물 6(KYS 50179, 30.7 mg)을 얻을 수 있었다. 소 분획 12C로부터 메탄올을 전개용매로 이용하여 세파텍스 칼럼 크로마토그래피를 실시하여(2.5  $\times$  35 cm) 화합물 7(KYS 50181, 77.5 mg)를 얻었다. 역시 소 분획 12I로부터는 위에서 사용한 조건과 동일한 조건을 이용하여 세파텍스 칼럼 크로마토그래피와 50 % 메탄올을 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피(LiChroprep RP-18, 40~63  $\mu\text{m}$ , 2 $\times$ 35 cm)를 실시하여 화합물 4(KYS 50182, 59.3 mg)와 화합물 8(KYS 50208, 4.0 mg)를 얻었다. 가장 늦게 용출된 분획인 소 분획 12K로부터는 메탄올을 전개용매로 하여 세파텍스 칼럼 크로마토그래피를 실시하고, 이를 다시 역상 실리카겔 TLC (10 $\times$ 10 cm $\times$  0.25 mm, 50 % MeOH)를 이용하여 UV 램프에서 단일 화합물로 보이는 화합물을 분취하여 화합물

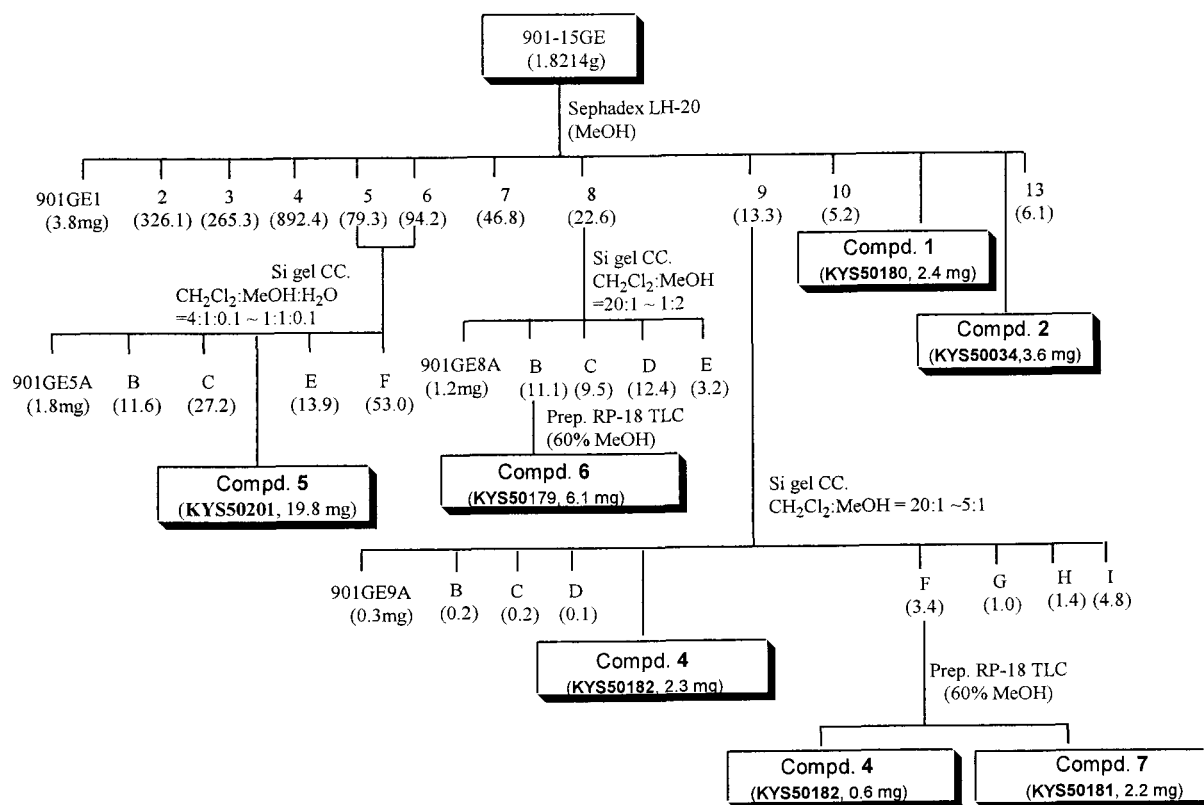
3(KYS50178, 5.2 mg)을 얻었다. 또한, ethyl acetate를 세파덱스 칼럼하여 분획한 분획 중에서 15번째 분획인 분획15로부터 세파덱스 겔 칼럼 크로마토그래피(2.0×30 cm, 메탄올)와 역상 실리카겔 TLC(10×10 cm×0.25 mm, 60 % MeOH)를 실시하여 화합물 1(KYS50180, 10 mg)과 화합물 2(KYS 50034, 10 mg)을 얻었다.



나. 손바닥선인장 열매로부터 활성성분의 분리

손바닥선인장 열매의 ethyl acetate 분획 1.82 g을 세파덱스를 이용한 칼럼 크로마토그래피(4.0 × 26.5 cm, 메탄올)를 실시하여 순상 실리카겔 TLC와 역상 실리카겔 TLC를 병행하여 전개용매의 극성을 바꾸어가면서 전개시켜 유사한 극성을 갖는 화합물끼리 모아 13개의 소 분획(분획 1 - 분획 13)으로 나누었다. 소 분획 11은 순수한 화합물로 2.4 mg의 화합물 1(KYS 50180)을 얻을 수 있었고, 소 분획 12로부터는 3.6 mg의 화합물 2를 얻을 수 있었다. 소 분획 8은 실리카겔을 이용한 칼럼 크로마토그래피(2 × 30 cm)를 실시하였다. 전개용매는 디클로로메탄과 메탄올(20/1)의 혼합용매이며 점차로 극성을 높여서 디클로로메탄과 메탄올(1/2)의 혼합용매로 칼럼을 용출시켜 화합물 6 (KYS 50179, 6.1 mg)을 얻을 수 있었다. 소 분획 9는 실리카겔을 이용한 칼럼 크로마토그래피(1 × 18.5 cm)를 실시하였다. 전개용매는 디클로로메탄과 메탄올(20/1)의 혼합용매이며 점차로 극성을 높여서 디클로로메탄과 메탄올(5/1)의 혼합용매로 칼럼을 용출시켜서 화합물 7(KYS 50181, 2.2 mg), 화합물 3 (KYS 50178, 0.6 mg), 화합물 5(KYS 50201, 3.0 mg)를 각각 순수하게 분리하였다.





## 2. 손바닥선인장 유효성분의 구조규명

### 가. 화합물 1(KYS 50180)의 구조분석

화합물 1은 노란색의 무정형 분말로서 TLC에서 10% 황산 발색시 노란색으로 발색 되었다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $\delta$  6.07 (1H, br s)과 6.29 (1H, br s)에서의 peak는 flavonoid의 A ring에서 기인한 H-6과 H-8 peak이고,  $\delta$  6.80과 7.78 에서의 doublet peak는 각각 두 개의 수소에 해당하는 peak로 B ring에서 기인한 H-2', 6' 과 H-3', 5' 의 수소가 서로 *ortho* coupling ( $J=8.1$  and  $8.3$  Hz)을 하고 있어, 이 화합물이 kaempferol moiety의 화합물임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 13개의 carbon peak가 나타나고 있으며,  $\delta$  179.5 (C-4)의 peak는 carbonyl기에서 기인한 것임을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물 1은 kaempferol임을 알 수 있었으며, 문헌과도 잘 일치하고 있다.<sup>23)</sup>

$^1\text{H-NMR}$ : 표 11 참조

### 나. 화합물 2(KYS 50034)의 구조분석

화합물 2는 노란색 무정형의 분말로서 TLC에서 10% 황산 발색시 노란색으로 발색 되어 flavonoid의 일종임을 예상하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $\delta$  6.08 (1H, d,  $J=1.8$  Hz)의 peak와  $\delta$  6.28 (1H, d,  $J=1.7$  Hz)의 peak는 의 A ring의 H-6과 H-8에서 기인한 peak로 서로 *meta* coupling을 하고 있음을 알 수 있었다.  $\delta$  6.78 (1H, d,  $J=8.5$  Hz)의 peak는 H-5' 에서 기인된 peak로 H-6' 에서 기인한  $\delta$  7.53 (1H, dd,  $J=8.5, 1.8$ Hz) peak와 *ortho* coupling을 하고 있고, 또한  $\delta$  7.53 (H-6')에서의 peak는 H-2' 에서 기인한  $\delta$  7.63 (1H, d,  $J=1.75$  Hz) peak와 *meta* coupling을 하고 있어 aromatic ring이 ABX system으로 치환된 화합물임을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물 2는 quercetin임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서도 15개의 carbons로 구성된 화합물로, carbonyl기에서 기인한 peak가  $\delta$  176.3 (C-4)에서 나타나고 있으며, 문헌과도 잘 일치하고 있다.<sup>24)</sup>

$^1\text{H-NMR}$ : 표 11 참조

### 다. 화합물 3(KYS 50178)의 구조분석

화합물 3은 노란색의 무정형 분말로서 TLC에서 10% 황산 발색시 노란색으로 발색 되었다. CIMS에서는 molecular ion peak가 301( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )에서 나타나고 있으며, IR 스펙트럼에서  $3484\text{ cm}^{-1}$ 에서의 broad한 peak는 free hydroxyl기의 존재를 추정 할 수 있었고,  $1652\text{ cm}^{-1}$ 로부터  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl기가 있음을 예상하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 3개의 proton에 해당하는 peak가  $\delta$  3.68에서 나타나고 있는데 이것은 methoxy 기를 예상할 수 있었다.  $\delta$  6.10(1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-6)과 6.30(1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-8)에서의 peak는 flavonoid의 A ring에서 기인한 peak이며,  $\delta$  6.82(1H, d,  $J=8.8$  Hz)와 7.88(1H, d,  $J=8.8$  Hz)의 peak들은 flavonoid의 B ring이 *para* 치환체로 각각 H-3', 5' 과 H-2', 6' 에 해당하는 peak이며, 이 화합물이 kaempferol moiety를 가진다는 것을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서도 화합물 1과 유사한 pattern으로 나타나고 있지만, methoxy 기에서 기인

한 peak가  $\delta$ 60.9에서 나타나고 있어, 화합물 3은 kaempferol에 methoxy기가 치환된 형태임을 알 수 있었다. HMQC에서  $\delta$  3.68에서의 methoxy peak는  $\delta$  60.9에서의 peak와 cross peak가 나타나고 있고,  $\delta$  6.10(H-6)에서의 peak가  $\delta$  100.2에서의 peak와 cross peak가 나타나고 있으며,  $\delta$  6.30(H-8)에서의 peak는  $\delta$  95.2에서의 peak와 cross peak가 나타나 A ring의 정확한 chemical shift를 알 수 있었다. 또한  $\delta$  6.82(H-3', 5')에서의 peak는  $\delta$  117.0에서의 peak와  $\delta$  7.88(H-2', 6')에서의 peak는  $\delta$  131.8에서의 peak와 각각 correlation이 있어 B ring의 정확한 chemical shift를 동정하였다. HMBC에서는  $\delta$  3.68 (OMe)에서의 peak가  $\delta$  139.9(C-3)에서의 peak와 상호작용을 하고 있어서 kaempferol의 C-3번 위치에 methoxy기가 치환되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 이상의 기기분석 결과와 문헌과의 비교를 통하여 화합물 3을 kaempferol 3-methyl ether로 동정하였다.<sup>25)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR: 표 11 참조

라. 화합물 4(KYS 50182)의 구조분석

화합물 4는 노란색의 무정형 분말로서 TLC에서 10% 황산 발색시 노란색으로 발색 되었다. FABMS에서는 molecular ion peak가 317([M+H]<sup>+</sup>)에서 나타났으며, IR 스펙트럼에서 3412 cm<sup>-1</sup>에서의 broad한 peak는 free hydroxyl기의 존재를 추정 할 수 있었고, 1652 cm<sup>-1</sup>로부터  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl기가 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR에서의 data가 화합물 2와 유사한 pattern을 보였으나, 3개의 proton에 해당하는  $\delta$  3.68의 singlet peak로부터 methoxy 기가 있음을 예상하였다.  $\delta$  6.09(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-6)와 6.29(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-8)의 peak는 flavonoid의 A ring에서 기인한 peak이며,  $\delta$  6.69(1H, d, *J*=8.1 Hz), 7.43(1H, dd, *J*=8.5, 1.9 Hz), 7.52(1H, d, *J*=1.9 Hz)의 peak들은 flavonoid의 B ring에서 기인한 H-5', H-6' 및 H-2'의 peak로 이 화합물이 quercetin moiety를 갖는다는 것을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR에서도  $\delta$  60.9의 peak로부터 methoxy peak를 확인할 수 있었으며,  $\delta$  180.4(C-4)의 peak는 carbonyl기에서 기인한 peak임을 알았다. 따라서 화합물 4는 quercetin에 methoxy기가 치환된 형태임을 알 수 있었다. 그러나 이 methoxy group의 정확한 치환을 알기 위하여 HMQC와 HMBC 실험을 하였다. HMQC에서  $\delta$  3.68의 peak는  $\delta$  60.9 peak와 cross peak가 나타나 methoxy기를 확인 할 수 있었으며,  $\delta$  6.09 (H-6)의 peak가  $\delta$  100.1의 peak와 cross peak가 나타나고 있으며,  $\delta$  6.29(H-8) peak는  $\delta$  95.1의 peak와 cross peak가 나타나 A ring의 정확한 chemical shift를 알 수 있었다. 또한  $\delta$  6.69(H-5')에서의 peak는  $\delta$ 116.9에서의 peak와,  $\delta$  7.43(H-6')에서의 peak는  $\delta$  122.7에서의 peak와 correlation이 있으며,  $\delta$  7.52(H-2')의 peak는  $\delta$  116.8에서의 peak와 각각 correlation이 있어 B ring의 정확한 chemical shift도 동정할 수 있었다. HMBC에서  $\delta$  3.68(OMe) peak가 C-3( $\delta$  139.9)과 상호작용을 하고 있어서 quercetin의 C-3번 위치에 methoxy기가 치환되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 다른 correlation peaks도 기본 골격이 quercetin임을 확인 하였다. 이상의 기기분석 결과와 문헌과의 비교를 통하여 이 화합물을 quercetin 3-methyl ether로 확인 동정하였다.<sup>25)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR: 표 11 참조

#### 다. 화합물 5(KYS 50201)의 구조분석

화합물 5는 노란색의 무정형 분말로서 TLC에서 10% 황산 발색 시 노란색으로 발색 되었다. FABMS에서는 molecular ion peak가 647([M+H]<sup>+</sup>)에서 나타났다. IR 스펙트럼에서 3400 cm<sup>-1</sup>에서의 broad한 peak로 free hydroxyl기의 존재를 추정 할 수 있었고, 1654 cm<sup>-1</sup>로부터  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl기가 있음을 예상하였다. 1604 cm<sup>-1</sup>과 1508 cm<sup>-1</sup>에서의 흡수 peak로 aromatic double bond의 존재를 예상 하였고, 1206 cm<sup>-1</sup>에서 sugar group의 C-O peak가 특징적으로 나타났음을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR에서 3개의 proton에 해당하는  $\delta$  3.96의 singlet peak로부터 methoxy기가 있다는 것을 알 수 있었다.  $\delta$  3-4사이의 복잡한 peak형태로 sugar의 존재를 예상 할 수 있었으며,  $\delta$  1.11(3H, d,  $J=6.2$  Hz)의 peak는 rhamnose의 methyl group에 해당하는 특징적인 peak이며,  $\delta$  4.54 (br s)의 peak는 rhamnose의 anomeric proton에 해당하는 peak로 그 coupling constant로  $\alpha$ -form을 예상 할 수 있었고,  $\delta$  5.24의 doublet은 다른 sugar의 anomeric proton에 해당하는 peak이며 coupling constant가 7.5 Hz로 나타나  $\beta$ -form으로 결합하고 있음을 알 수 있었다.  $\delta$  6.22(1H, d,  $J=2.1$  Hz)의 peak와  $\delta$  6.42(1H, d,  $J=2.1$  Hz)의 peak는 flavonoid의 A ring에서 기인하는 peak로 각각 H-6과 H-8에 해당하며,  $\delta$  6.92(1H, d,  $J=8.5$  Hz)의 peak,  $\delta$  7.64(1H, dd,  $J=2.1, 8.5$  Hz)의 peak 그리고  $\delta$  7.95(1H, d,  $J=2.0$  Hz)의 peak들은 flavonoid의 B ring에서 기인한 H-5', H-6' 및 H-2'의 peak로 이 화합물의 aglycone이 quercetin moiety임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼에서  $\delta$ 70-79에서의 peaks는 2개의 sugar에서 기인한 것으로 rhamnose에서 기인한 peak가  $\delta$  74.2(rham-4), 72.7(rham-3), 72.5(rham-2), 70.2(rham-5)에서 나타나며, glucose에서 기인한 peak가  $\delta$  78.6(glc-5), 77.7(glc-3), 76.3(glc-2), 72.0(glc-4)와 6번 탄소에서 기인한 peak가  $\delta$  68.9에서 나타나고 있는데, 이것은 rhamnose가 glucose의 6번 탄소에 치환되어 저자장으로 이동한 것임을 알 수 있었다.  $\delta$ 18.3의 peak는 rhamnose의 H-6 그리고  $\delta$  102.9는 rhamnose의 anomeric carbon의 특징적인 signal이며,  $\delta$  104.9 peak는 glucose의 특징적인 anomeric carbon임을 알 수 있었다. HMQC에서  $\delta$  3.96은  $\delta$  57.2와 cross peak가 나타나 methoxy기를 확인 할 수 있었고,  $\delta$ 4.54(rham-1)의 peak는  $\delta$  102.9(rham-1)에서의 peak와 correlation이 있으며,  $\delta$  5.24(glc H-1) peak는 glucose의  $\delta$  104.9(glc-1)에서의 peak와 correlation을 보여 화합물 5에 치환된 sugar를 알 수 있었다. 그러나 sugar의 치환된 위치와 methoxy기가 치환된 위치를 알기 위하여 HMBC 실험을 실시하였다. 그 결과  $\delta$  3.96(OMe)의 peak가  $\delta$ 148.7(C-3)의 peak와 상호작용이 나타나 methoxy기가 C-3위치에 치환되어 있음을 알 수 있었다.  $\delta$  4.54(rham-1)의 peak는  $\delta$  68.9에서의 peak(glc-6)와 상호작용을 보여 glucose의 H-6위치에 rhamnose가 치환된 것을 확인 하였고,  $\delta$  5.24(glc-1)의 peak는  $\delta$  135.9(C-3)의 peak와 상호작용이 나타나 C-3위치에 glucose가 치환되어 있다는 사실을 알 수 있었다. 이상의 기기분석 결과와 문헌과의 비교를 통하여 화합물 5의 구조를 isorhamnetin-3-O-rutinoside (nacissin)로 동정하였다.<sup>26)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR: 표 11 참조

#### 바. 화합물 6(KYS 50179)의 구조분석

화합물 6은 노란색의 무정형 분말로서 TLC에서 10% 황산 발색시 주황색으로 발색 되었다. FABMS에서는 molecular ion peak가 289([M+H]<sup>+</sup>)에서 으며, IR 스펙트럼에서는 3426 cm<sup>-1</sup>에서의 broad한 peak로 free hydroxyl기의 존재를 추정 할 수 있었고, 1640 cm<sup>-1</sup>로부터 carbonyl기가 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR data는 화합물 1과 유사하지만, δ 4.39(1H, d)에서의 peak와 δ 4.80(1H, d)에서의 peak들의 coupling constant(J=11.58 Hz)로 두 수소가 서로 trans 결합을 하고 있는 dihydroflavanol임을 예상 할 수 있었다. H-8에서 기인한 δ 5.77(1H, d, J=1.9 Hz)의 peak와 H-6에서 기인한 δ 5.81(1H, d, J=2.0 Hz)의 peak는 flavonoid의 A ring에서 기인한 peak로 서로 meta coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. δ 7.24(2H, J=8.5 Hz)와 6.72(2H, J=8.5 Hz) peak는 B ring에서 기인하는 peak로 역시 이 화합물이 kaempferol moiety를 하고 있음을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR에서 C-2와 C-3에서 기인한 peak가 δ 84.0과 72.7에서 각각 나타나고 있어 oxygen이 인접하고 있는 carbon임을 예상 할 수 있었다. 또한 저자장에서 나타나고 있는 δ 197.4(C-4)에서의 peak는 flavonol 구조의 carbonyl기에서 기인한 peak로 saturate된 peak를 예상 할 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY에서도 δ 4.39 에서 H-3 peak와 δ 4.80 에서 H-2 peak가 서로 coupling을 보이고, δ 7.24(H-2', 6')와 δ 6.72(H-3', 5')의 peak들도 correlation이 있어 B ring이 para 치환체인 flavonol 구조임을 예상 할 수 있었다. HMQC로부터 화합물의 정확한 peak들을 동정할 수 있었다. 즉, H-3에서 기인한 δ 4.39의 peak는 δ 72.7의 peak와 상관관계가 나타나고 있고, δ 4.80(H-2)의 peak는 δ 84.0의 peak와 cross peak가 나타나고 있어 정확한 peak를 동정하였다. 또한 δ 5.77(H-8)에서의 peak는 δ 95.4 peak와 correlation이 있고, δ 5.81(H-6)에서의 peak는 δ 96.5 peak와 correlation이 있어 A ring의 정확한 chemical shift를 동정 할 수 있었다. δ 6.72(H-3', 5')에서의 peak는 δ 115.3 peak와, δ 7.24(H-2', 6')에서의 peak는 δ 129.5 peak와 cross peak가 나타나 B ring의 정확한 chemical shift를 동정하였다. HMBC 실험을 통하여 이들 치환체들의 정확한 위치를 알 수 있었다. δ 4.80 (H-2)에서의 peak는 δ 84.0(C-3), 197.6(C-4), 124.3(C-1) 그리고 129.5(C-2', 6')의 peak들과 상호작용을 하고 있어 flavonoid의 B ring이 2번 탄소에 치환된 구조임을 알 수 있었다. 또한 δ 5.81(H-6)에서의 peak는 δ 167.8(C-7), 95.4(C-8), 101.0(C-10)의 peak들과 상호작용을 하고 있으며, δ 5.77(H-8)에서의 peak는 δ 167.8(C-7), 163.5(C-9), 101.0(C-10)의 peak들과 상호작용을 하고 있음을 알 수 있었다. 이상의 data들을 종합하여 이 화합물이 dihydrokaempferol (aromadendrin)임을 확인 하였고, 이들은 문헌과도 잘 일치하고 있다.<sup>27)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR: 표 12 참조

#### 사. 화합물 7(KYS 50181)의 구조분석

화합물 7은 노란색의 무정형 분말로서 TLC에서 10% 황산 발색시 주황색으로 발색 되어 flavonoid의 일종임을 예상하였다. FABMS에서는 molecular ion peak가 305([M+H]<sup>+</sup>)에서 나타났다. IR 스펙트럼에서 3366 cm<sup>-1</sup>에서 broad한 peak는 free

hydroxyl기로 예상 할 수 있었고, 1640 cm<sup>-1</sup>에서의 흡수peak를 통해 carbonyl기가 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR의 data는 화합물 2와 유사하지만 δ 4.40(1H, d)의 peak와 4.80(1H, d)의 peak들의 coupling constant가 11.58 Hz나타나 두 수소가 서로 *trans* 결합을 하고 있는 dihydroflavanol임을 예상 할 수 있었다. H-8에서 기인한 δ 5.77(1H, d, *J*=1.7 Hz)의 peak와 H-6에서 기인한 δ 5.81(1H, d, *J*=1.7 Hz)의 peak는 flavonoid의 A ring에서 기인한 peak로 *meta* coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. H-5'에서 기인한 δ 6.69(1H, d, *J*=8.1 Hz)의 peak는 H-6'에서 기인한 δ 6.74(1H, dd, *J*=8.1, 1.5 Hz)의 peak와 *ortho* coupling 하고 있으며, δ 6.74 (H-6')에서의 peak는 δ 6.86(1H, d, *J*=1.4 Hz)의 peak(H-2')와 *meta* coupling을 하고 있어 B ring이 ABX system으로 치환된 quercetin moiety를 가진다는 것을 알 수 있었다. 그러나 C ring의 2번과 3번이 quercetin과는 달리 saturate된 구조임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR에서도 C-2와 C-3에서 기인한 peak가 δ 83.1과 δ 74.1에서 각각 나타나고 있어 oxygen이 인접하고 있는 carbon임을 확인 할 수 있었고, 또한 저자장에서 나타나고 있는 δ 198.8(C-4)의 peak는 flavanol 구조의 carbonyl기에서 기인한 peak임을 알 수 있었다. 이상의 기기분석 결과와 다른 화합물 간의 비교, 그리고 문헌과의 비교를 통하여 이 화합물을 dihydroquercetin(taxifolin)으로 동정하였다.<sup>24,27)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR: 표 12 참조

#### 아. 화합물 8(KYS 50208)의 구조분석

화합물 8 역시 flavonoid의 일종으로 노란색 무정형의 분말이며, TLC에서 10% 황산 발색시 노란색으로 발색 되었다. FABMS에서는 molecular ion peak가 289([M+H]<sup>+</sup>)에서 나타났으며, IR 스펙트럼에서 3386 cm<sup>-1</sup>에서 broad한 peak는 free hydroxyl기로 예상 할 수 있었고, 1640 cm<sup>-1</sup>로부터 carbonyl기가 있음을 예상하였다. <sup>1</sup>H-NMR에서 각각 하나의 proton에 해당하는 peak가 δ 2.59(1H, dd, *J*=17.1, 3.1 Hz)와 2.97(1H, dd, *J*=17.1, 12.6 Hz)에서 나타나고 있는데 coupling constant가 17.1 Hz로 나타나 geminal coupling임을 예상 할 수 있었으며, 이 peak들은 다시 δ 5.18(1H, dd, *J*=12.6, 3.1 Hz)의 peak와 서로 vicinal coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. H-8에서 기인한 δ 5.77(1H, d, *J*=2.1 Hz)의 peak와 H-6에서 기인한 δ 5.79(1H, d, *J*=2.1 Hz)의 peak는 flavonoid의 A ring에서 기인한 peak로 서로 *meta* coupling을 하고 있으며, δ 6.69(1H, br s, H-6')와 6.68(1H, br s, H-5') 그리고 δ 6.81(1H, s, H-2')의 peaks는 flavonoid의 B ring에서 기인한 것을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR에서 C-2의 chemical shift가 δ 80.9에서 나타나는 것으로 C-2에 oxygen이 인접하고 있음을 예상 할 수 있었고, C-3의 chemical shift가 δ 44.5에서 나타나 화합물 7과 달리 C-3의 위치가 methylene (CH<sub>2</sub>)인 flavanon 구조임을 알 수 있었다. δ 198.8(C-4)의 peak 역시 saturated carbonyl기의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 기기분석 결과와 화합물간의 비교, 그리고 문헌과의 비교를 통하여 이 화합물을 eriodictyol로 동정하였다.<sup>23,24)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR: 표 12 참조

자. 화합물 9(KYS 50183)의 구조분석

화합물 9는 흰색의 무정형 분말로서 TLC에서 10% 황산으로 발색시 노란색으로 발색 되었다. FABMS에서 molecular ion peak가 371([M+H]<sup>+</sup>)에서 나타났다. IR spectrum에서는 3412 cm<sup>-1</sup>에의 broad한 peak로 free hydroxyl기의 존재를 추정 할 수 있었고, 1654 cm<sup>-1</sup>로부터 ketone기가 있음을 예상하였으며, 1038 cm<sup>-1</sup>의 강한 흡수 band로 C-O 결합이 존재함을 예상 할 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR에서는 각각 3개의 proton에 해당하는 singlet peak들이 δ 0.92와 0.94에서의 sharp하게 나타나 quaternary carbon에 치환된 methyl기를 예상하였으며, δ 1.18에서는 3개의 proton에 해당하는 doublet peak(J=6.4 Hz)는 인접한 곳에 tertiary proton이 있음을 예상 할 수 있었다. 또한 δ 1.84에서의 doublet peak는 3개의 proton에 해당하며, coupling constant(J=0.9 Hz)와 chemical shift로 allylic coupling을 하고 있는 methyl group임을 예상하였으며, δ 1.96과 2.34의 doublet은 각각 하나의 proton에 해당하며 coupling constant가 16.7 Hz로 두개의 수소가 geminal coupling을 하고 있음을 예상하였다. δ 3-4 사이의 복잡한 peak로 sugar의 존재를 추정하였고, δ 3.53(1H, dd, J=11.8, 5.8 Hz)과 3.77(1H, dd, J=11.8, 1.8 Hz)에서의 peaks는 sugar의 H-6에서 기인한 methylene peak이며, δ 4.23에서의 doublet은 anomeric proton에서 기인한 것으로 coupling constant가 7.5 Hz로 나타나 β-형태로 결합하고 있음을 알 수 있었다. δ 5.47(1H, dd, J=15.0, 8.5 Hz)에서의 peak와 δ 5.64(1H, dd, J=15.3, 9.2 Hz)에서의 peak는 trans vinyl에서 기인한 peak로 doublet of doublet은 vinyl group 양쪽에 수소가 있음을 예상 할 수 있었다. 하나의 proton에 해당하는 δ 5.78에서의 peak는 broad singlet으로 또 하나의 이중결합에서 기인한 것으로 vinyl group의 하나는 4급 탄소(quaternary carbon)임을 예상 할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 13개의 탄소를 구성된 aglycone에 6탄당으로 구성된 sugar가 치환된 화합물임을 예상 할 수 있었다. δ 101.4의 peak는 anomeric carbon에서 기인한 peak임을 알 수 있었으며, δ 63.3(C-6), 72.2(C-4), 75.4(C-2), 78.6(C-3), 78.7(C-5)의 chemical shift로부터 이 화합물에 치환되어 있는 sugar가 glucose임을 확인할 수 있었다. 또한 δ 202.3에서의 peak는 saturated carbonyl carbon임을 예상하였다. DEPT(135°)로부터 δ 22.6, 24.1, 28.1, 28.5에서의 4개의 primary carbon(CH<sub>3</sub>)과 2개의 secondary carbon(CH<sub>2</sub>), 10개의 tertiary carbon(CH), 3개의 quaternary carbon(C)으로 구성된 terpen화합물임을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 실험을 실시하여 peak들의 correlation을 규명하였으며, HMQC 실험을 통하여 이들 peak들의 정확한 chemical shift를 알 수 있었다. 즉, δ 0.92와 0.94에서의 11번과 12번의 peak는 δ 28.5와 28.1에서의 peak들과 correlation이 있으며, δ 1.84에서의 10번 peak는 δ 24.1에서의 peak와 correlation을 보여 이들의 정확한 chemical shift를 동정하였다. δ 1.96과 2.34에서의 2번에서 기인한 doublet peak는 δ 48.7에서의 탄소와 상관관계가 나타나고 있으며, δ 2.60의 6번 peak는 δ 57.3에서의 peak와 cross peak가 나타나고 있음을 알 수 있었다. Glucose에서 기인한 δ 3.09-3.16사이의 복잡한 peak들도 δ 72.1-78.7에서의 탄소들과의 cross peak로 정확한 chemical shift를 확인하였으며, δ 4.39에서의 9번에서 기인한 multiplet은 δ 75.2에서의 peak와 상관관계가 나타나고 있음을 알 수 있었다. δ 4.23에서의 anomeric proton은 δ

101.4에서의 peak와 correlation을 보이고 있으며,  $\delta$  5.47에서의 8번 peak는  $\delta$  137.5에서의 peak와 상관관계가 나타나고,  $\delta$  5.64에서의 7번 peak는  $\delta$  131.8에서의 peak와 cross peak가 나타나 vinyl group을 동정할 수 있었다.  $\delta$  5.78에서의 4번에 해당하는 singlet peak는  $\delta$  126.6에서의 peak와 상관관계가 나타나 다른 위치에 치환된 tertiary vinyl group의 chemical shift를 동정하였다. HMBC spectrum으로부터는 anomeric proton에서 기인한  $\delta$  4.23에서의 peak가  $\delta$  75.2에서의 9번 peak와 상호작용을 보여 glucose는 9번에 O-glycoside로 결합하고 있음을 알 수 있었다. 그러므로 이 화합물에는 1-butene으로 이루어진 chain에서 3번 위치에 glucose가 O-glycoside로 결합한 side chain이 있음을 알았다. 이 chain의 terminal에 위치한 vinyl은  $\delta$  57.3의 6번에 해당하는 tertiary carbon과 상관관계가 있으며,  $\delta$  2.61에서의 6번 수소는  $\delta$  0.92와 0.94에서의 dimethyl groups이 결합하고 있는  $\delta$  37.5에서의 1번 carbon과 상관관계를 나타내고 있어, side chain은  $\delta$  57.3의 6번 carbon에 결합하고 있음을 알 수 있었다.  $\delta$  0.92와 0.94에서의 dimethyl peak는 2번의 methylene group에서 기인한  $\delta$  48.6에서의 peak와 상관관계가 나타나고 있으며,  $\delta$  1.96와 2.34에서의 2번 수소는  $\delta$  202.3에서의 carbonyl carbon과 상관관계가 있어 3번에 carbonyl group이 결합한 것을 알 수 있었다. 한편, 5번의 이중결합에 치환된 15번의 methyl group에서 기인한  $\delta$  1.84에서의 peak는 1-butenyl group이 결합하고 있는  $\delta$  57.3에서의 6번 carbon과  $\delta$  126.6에서의 4번 탄소,  $\delta$  165.9에서의 5번 탄소와 correlation을 보이고 있으며, 4번 수소에서 기인한  $\delta$  5.78에서의 peak는  $\delta$  57.3에서의 6번 탄소와 correlation을 보이고 있어 화합물이 ring을 이루고 있음을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 cyclohexene에 carbonyl group이 있으며, glycoside결합을 하고 있는 terpene임을 알 수 있었다. 한편, absolute configuration은 CD에서 242 nm에서 negative, 320 nm에서 positive cotton effect를 나타내 6S임을 알았고,  $^{13}\text{C}$ -NMR에서 9번에서 기인한 탄소의 chemical shift가 9R에서의 chemical shift보다 up-field에서 나타나 9S임을 알았으며, 문헌과도 잘 일치함을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 이 화합물은 (6S,9S)-3-oxo-a-ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인 동정하였다.<sup>28)</sup>

$^1\text{H}$ -NMR: 표 12 참조

#### 차. 화합물 10(KYS 50184)의 구조분석

화합물 10은 물리화학적 성질 및 spectral data를 검토한 결과 화합물 9와 유사한 구조를 나타내었다. FABMS에서 molecular ion peak가 409([M+Na]<sup>+</sup>)로 나타났고, IR spectrum에서는 3412  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 broad한 peak로 free hydroxyl기의 존재를 추정할 수 있었으며, 1654  $\text{cm}^{-1}$ 로부터 carbonyl기가 있음을 예상하였고, 1038  $\text{cm}^{-1}$ 의 강한 흡수 band로 C-O 결합이 존재함을 예상할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR에서도 화합물 9와 유사한 peak pattern을 보여주고 있었다. 즉,  $\delta$  0.91, 0.94, 1.19, 1.84에서의 peak들은 각각 H-12, 11, 10, 13에서 기인한 methyl peak이고,  $\delta$  2.03(1H, d,  $J=16.9$  Hz)과 2.51(1H, d,  $J=16.9$  Hz)에서의 peak들은 H-2에서 기인한 methylene peak임을 알 수 있었다.  $\delta$  4.17(1H, d,  $J=7.5$  Hz)에서의 peak는  $\beta$ -glucose의 anomeric proton이며, 하나의 proton에 해당하는  $\delta$  4.43의 복잡한 peak는



H-9에서 기인한 peak임을 알 수 있었다. 그러나 화합물 10은 화합물 9와는 달리 H-6에서 기인하는 peak가 나타나지 않았으며, H-7의 vinyl group에서 기인한  $\delta$  5.92(1H, d,  $J=15.6$  Hz)에서의 peak가 화합물 9의 경우보다 down filed로 이동하여 doublet으로 나타나 오로지 vicinal coupling만 나타나 6번 위치에 hydroxy group이 치환된 구조임을 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum도 화합물 9와 대부분 일치하지만  $\delta$  49.8에서의 6번 탄소의 chemical shift가 up filed로 이동한 것을 확인 할 수 있어 hydroxy group이 C-6 위치에 치환되어 있음을 알 수 있었다. 이상의 데이터를 종합하여 이 화합물은 화합물 9의 구조에서 H-6위치에 hydroxyl기가 치환되어 있는 구조이며, corchoionoside C (6*S*,9*S*-roseoside)로 동정하였고 문헌과도 잘 일치함을 알았다.<sup>29)</sup>

$^1\text{H-NMR}$ : 표 12 참조

Table 11.  $^1\text{H}$  NMR data for compounds 1-5 (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NO.	1	2	3	4	5
6	6.07 (br s)	6.08 (d, 1.8)	6.10 (d, 1.9)	6.09 (d, 1.8)	6.22 (d, 2.1)
8	6.29 (br s)	6.28 (d, 1.8)	6.30 (d, 1.9)	6.29 (d, 1.8)	6.42 (d, 2.1)
2'	7.78 (d, 8.3)	7.63 (d, 1.8)	7.88 (d, 8.9)	7.52 (d, 2.0)	7.95 (d, 2.0)
3'	6.80 (d, 8.1)		6.82 (d, 8.8)		
5'	6.80 (d, 8.1)	6.78 (d, 8.5)	6.82 (d, 8.8)	6.79 (d, 8.5)	6.92 (d, 8.5)
6'	7.78 (d, 8.3)	7.53 (dd, 8.5, 1.8)	7.88 (d, 8.9)	7.43 (dd, 8.5, 2.0)	7.64 (dd, 8.5, 2.1)
OMe			3.68 (s)	3.68 (s)	3.96 (s)
Glc-1					5.24 (d, 7.5)
2					3.26-3.47 (m)
3					3.26-3.47 (m)
4					3.26-3.47 (m)
5					3.26-3.47 (m)
6					3.50 (d, 9.3)
Rham-1					5.54 (br s)
2					3.26-3.47 (m)
3					3.26-3.47 (m)
4					3.26-3.47 (m)
5					3.26-3.47 (m)
6					1.11 (d, 6.2)

표 12. <sup>1</sup>H NMR data for compounds 6-7 (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

NO.	6*	7	8	9	10
2	4.87 (d, 11.6)	4.80 (d, 11.5)	5.18 (dd, 12.7, 3.1)	1.96 (d, 16.7) 2.34 (d, 16.7)	2.06 (d, 16.9) 2.51 (d, 16.9)
3	4.44 (d, 11.6)	4.40 (d, 11.5)	2.59 (dd, 17.1, 3.1), 2.97 (dd, 17.1, 12.7)		
4				5.78 (s)	5.77 (s)
6	5.81 (d, 2.0)	5.81 (d, 1.7)	5.79 (d, 2.1)	2.60 (d, 9.1)	
7				5.64 (dd, 15.3, 9.2)	5.87 (d, 15.6)
8	5.77 (d, 1.9)	5.77 (d, 1.7)	5.77 (d, 2.1)	5.47 (dd, 15.3, 8.6)	5.62 (dd, 15.5, 7.2)
9				4.38 (m)	4.43 (quin)
10				1.18 (d, 6.4)	1.18 (d, 6.4)
11				0.94 (s)	0.93 (s)
12				0.92 (s)	0.91 (s)
13				1.84 (d, 0.9)	1.84 (d, 1.3)
2'	7.24 (d, 8.5)	6.86 (d, 1.4)	6.81 (br s)		
3'	6.72 (d, 8.5)				
5'	6.72 (d, 8.5)	6.69 (d, 8.1)	6.68 (br s)		
6'	7.24 (d, 8.5)	6.74 (dd, 8.1, 1.5)	6.69 (br s)		
Glc.-1				4.23 (d, 7.5)	4.67 (d, 7.5)
2				3.09 3.16 (m)	3.06 3.15 (m)
3				3.09 3.16 (m)	3.06 3.15 (m)
4				3.09 3.16 (m)	3.06 3.15 (m)
5				3.09 3.16 (m)	3.06 3.15 (m)
6				3.53 (dd, 11.8, 5.8) 3.77 (dd, 11.8, 1.8)	3.52 (dd, 12.4, 6.6) 3.74 (dd, 11.8, 2.2)

\*: Pyridine - d<sub>5</sub>

### 3. 손바닥선인장 추출물 및 유효성분의 활성검색

#### 가. 손바닥선인장 추출물의 항산화 작용 및 뇌신경세포 보호 효과

손바닥선인장의 여러 가지 추출물의 자유라디칼 소거효과, 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드음이온라디칼(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 소거 효과 그리고 과산화수소-유발 신경독성 억제효능을 상기한 바와 같은 방법으로 측정하였다. 손바닥선인장 열매의 메탄올 추출물, 디클로로메탄 분획물, 부탄올 분획물, 물 분획물은 라디칼 소거능 및 잔틴/잔틴 옥시다제 또는 과산화수소 유발 신경독성 억제효능을 거의 보이지 않은 반면에, 아세트산 에틸 분획물은 라디칼 소거능이 60.0 µg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고, 잔틴/잔틴 옥시다제-유발 신경독성 억제효능이 67.7 µg/ml, 과산화수소-유발 신경독성 억제효능이 115.9 µg/ml인 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 현저한 신경보호효과를 보이므로

뇌졸중 또는 알츠하이머 질환의 치료에 유용한 것으로 사료되어진다(표 13). 한편, 디클로로메탄 대신에 클로로포름을 사용하여 얻어진 분획은 디클로로메탄 분획과 동일한 정도의 활성을 나타내었다.

표 13. 손바닥선인장 추출물의 항산화 및 뇌신경세포 보호 효능

용매분획 \ 활성	DPPH 라디칼 소거능 (IC <sub>50</sub> , µg/ml)	잔틴/잔틴 옥시다제-유발 신경세포독성 억제효과 (IC <sub>50</sub> , µg/ml)	과산화수소-유발 신경세포독성 억제효과 (IC <sub>50</sub> , µg/ml)
열매의 메탄올 추출물 (GM)	>500	>1,000	>1,000
열매의 디클로로메탄 분획 (GD)	145.4	>1,000	>1,000
열매의 에틸 아세테이트 분획 (GE)	60.0	67.7	115.9
열매의 부탄올 분획 (GB)	142.2	>1,000	>1,000
열매의 물 분획 (GH)	>500	>1,000	>1,000
가공한 열매의 메탄올 추출물 (SM)	312.6	600.8	457.6
가공한 열매의 디클로로메탄 분획 (SD)	367.5	277.1	202.2
가공한 열매의 에틸 아세테이트 분획 (SE)	58.0	22.2	21.2
가공한 열매의 부탄올 분획 (SB)	206.3	570.6	803.9
가공한 열매의 물 분획 (SH)	>500	>1,000	852.1
줄기의 메탄올 추출물 (FM)	>500	>1,000	>1,000
줄기의 디클로로메탄 분획 (FD)	448.2	>1,000	>1,000
줄기의 에틸 아세테이트 분획 (FE)	60.0	15.2	17.5
줄기의 부탄올 분획 (FB)	>500	>1,000	>1,000
줄기의 물 분획 (FH)	>500	>1,000	>1,000

나. 손바닥선인장으로부터 분리된 성분들의 항산화 작용 및 뇌신경세포 보호 효과

손바닥선인장에서 분리·동정된 활성성분들에 대하여 상기에서 기술한 방법을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능, 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능, 잔틴/잔틴 옥시다제-유발 신경독성 억제효과, 과산화수소 유발 신경독성 억제효과, NMDA 활성화에 의한 신경독성 억제효과, 성장인자 제거로 인한 세포사멸에 대한 신경독성 억

제효과를 각각 측정하였다. 그 결과, 분리된 화합물 3-옥소- $\alpha$ -이오놀  $\beta$ -D-글루코사이드, 캠페롤, 디히드로캠페롤, 캠페롤 3-메틸 에테르, 퀘르세틴, 디히드로퀘르세틴 및 퀘르세틴 3-메틸 에테르 중에서 퀘르세틴, 디히드로퀘르세틴 및 퀘르세틴 3-메틸 에테르의 3종 화합물들은 DPPH 라디칼 소거능력이 우수하였으며, 디히드로퀘르세틴과 퀘르세틴 3-메틸 에테르는 잔틴/잔틴 옥시다제에 의해 생성되는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능이 우수하였다(표 14). 캠페롤, 퀘르세틴, 디히드로퀘르세틴 및 퀘르세틴 3-메틸 에테르의 4종 화합물들은 표 15에 나타나 있듯이, 잔틴/잔틴 옥시다제에 의하여 유발된 신경세포의 손상뿐만 아니라 과산화수소에 의하여 유발된 신경세포의 손상을 가장 강력하게 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 디히드로퀘르세틴과 퀘르세틴 3-메틸 에테르는 NMDA 활성화에 의한 신경독성 억제효과가 우수하였으며, 특히 퀘르세틴 3-메틸 에테르는 성장인자 제거로 인해 초래되는 세포사멸에 의한 신경독성 억제효과 또한 우수하였다.

표 14. 손바닥선인장 성분의 항산화 효능

화합물 \ 활성	DPPH 라디칼 소거능 (IC <sub>50</sub> , $\mu$ g/ml)	슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능 (IC <sub>50</sub> , $\mu$ g/ml)
캠페롤	>50	>50
디히드로캠페롤	>50	>50
캠페롤 3-메틸 에테르	>50	>50
퀘르세틴	2.89	>50
디히드로퀘르세틴	4.49	2.48
퀘르세틴 3-메틸 에테르	3.76	4.77

표 15. 손바닥선인장 성분의 뇌신경세포 보호 효능

활성 화합물	잔틴/잔틴 옥시다제-유발 신경세포독성 억제효과 (IC <sub>50</sub> , μg/ml)	과산화수소 -유발 신경세포독성 억제효과 (IC <sub>50</sub> , μg/ml)	NMDA-유발 신경세포독성 억제효과	성장인자제거 -유발 신경세포독성 억제효과
캄페롤	24.9	29.7	-	-
디히드로캄페롤	>300	>300	-	-
캄페롤 3-메틸 에테르	-	>300	-	-
퀘르세틴	5.5	4.1	-	-
디히드로퀘르세틴	16.6	7.8	33% 억제 (9 μg/ml) 47% 억제 (30 μg/ml)	-
퀘르세틴 3-메틸 에테르	0.65	0.60	21% 억제 (9 μg/ml) 54% 억제 (30 μg/ml)	31% 억제 (9 μg/ml) 86% 억제 (30 μg/ml)

다. KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)의 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서 모델에서의 *in vivo* 뇌신경보호 효능

손바닥선인장으로부터 분리된 유효 항산화 및 뇌신경세포 보호성분인 퀘르세틴(KYS 50034), 퀘르세틴 3-메틸 에테르, 또는 디히드로퀘르세틴(racemate, KYS 50190)을 허혈 유발 시작 후 30분에 10 mg/kg 용량으로 복강 내로 단회 투여하여 뇌신경보호 효능을 비교 검색하였다. 그 결과, 퀘르세틴 3-메틸 에테르 투여군에서는 대뇌 피질 경색 용적 및 총 경색 용적, 교정 총 경색 용적 및 부종을 모두에서 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 각각 55.3, 49.6, 45.6 및 54.7%의 유의성 있는 감소를 나타냄으로써 뚜렷한 조직학적 뇌신경세포 보호효과를 보여주었다. 반면에 퀘르세틴 투여군에서는 부종에서만 28.9%의 유의성 있는 감소를 보여주었으며 디히드로퀘르세틴 투여군에서는 아무런 유의성 있는 보호효과를 나타내지 못했다. 이러한 모든 결과는 하기 표 16 및 그림25에서 보여진다.

한편 신경행동학적 회복효과에 있어서는 퀘르세틴 및 퀘르세틴 3-메틸 에테르 투여군들에서만 대조군에 비해 신경행동학적 점수가 유의성 있게 증가됨으로써 신경행동학적 회복효과를 나타냄을 알 수 있었다(표 17).

또한 위에서 가장 우수한 뇌신경보호 효능을 나타낸 퀘르세틴 3-메틸 에테르를 같은 용량으로 허혈 유발 후 30분에 단회 정맥 내 투여 시 뇌신경보호 효능을 검색한 결과 대뇌피질 경색용적, 총 및 교정 총 경색용적, 부종을 모두가 대조군에 비해 각각 55.6, 50.3, 49.3, 50.9%의 유의성 있는 감소를 나타냄으로서 뚜렷한 조직학적 신경보호 효과를 나타내었으며 대조군에 비해 유의성 있는 신경행동학적 회복 효과를 나타내었다(그림 26). 이는 위에서 기술된 복강 내 투여 시의 효능과 유사한 수준이므로 비경구 투여경로에 별다른 관계없이 뚜렷한 뇌신경보호 효능을 나타냄을 알 수 있었다.

표 16. 퀘르세틴, 퀘르세틴 3-메틸 에테르, 디히드로퀘르세틴의 *in vivo* 뇌신경보호 효능

처리	n	경색 용적			교정 총 경색 용적	부종율(%)
		선조체	대뇌피질	총		
부형제(식염수)	6	36.7± 2.0	181.8± 11.4	218.6± 12.5	150.0± 7.1	12.8± 1.0
퀘르세틴	9	30.1± 4.9	130.5± 18.6	161.1± 21.4	110.6± 15.8	9.1± 1.1*
퀘르세틴 3-메틸 에테르	11	28.9± 3.1	81.2± 20.8*	110.1± 22.9*	81.6± 17.8*	5.8± 0.7*
디히드로퀘르세틴	8	30.1± 4.3	169.4± 12.7	199.5± 16.5	130.7± 13.1	11.9± 0.5

n: 실험동물 수

\*턴칸의 다중 범위 검정 결과 (Duncan's multiple range test) 대조군과 유의성 있는 차이 (p<0.05)

표 17. 퀘르세틴, 퀘르세틴 3-메틸 에테르, 디히드로퀘르세틴의 신경행동학적 회복효과

중대뇌동맥 폐쇄 후 측정 시까지의 시간	처리			
	부형제(식염수)	퀘르세틴	퀘르세틴 3-메틸 에테르	디히드로퀘르세틴
30분	2.33 ± 0.24	2.44 ± 0.24	2.36 ± 0.15	2.33 ± 0.16
24시간	2.50 ± 0.41	4.56 ± 0.53*	4.81 ± 0.44*	3.00 ± 0.33

\*턴칸의 다중 범위 검정 결과 24시간에서 대조군과 유의성 있는 차이 (p<0.05)



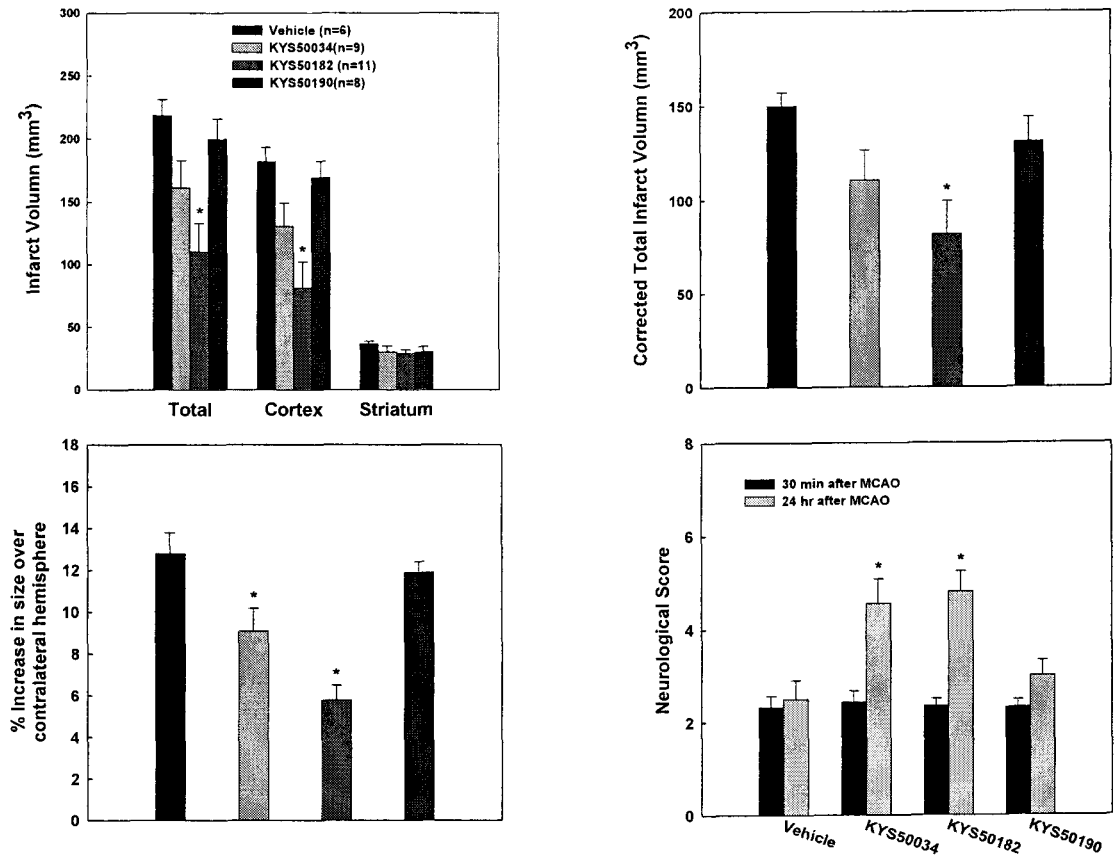


그림 25. Neuroprotective effects of KYS 50034, KYS 50182 and KYS 50190 (10 mg/kg i.p.) administered 30 min after onset of ischemia in a 120-min MCAO rat model.

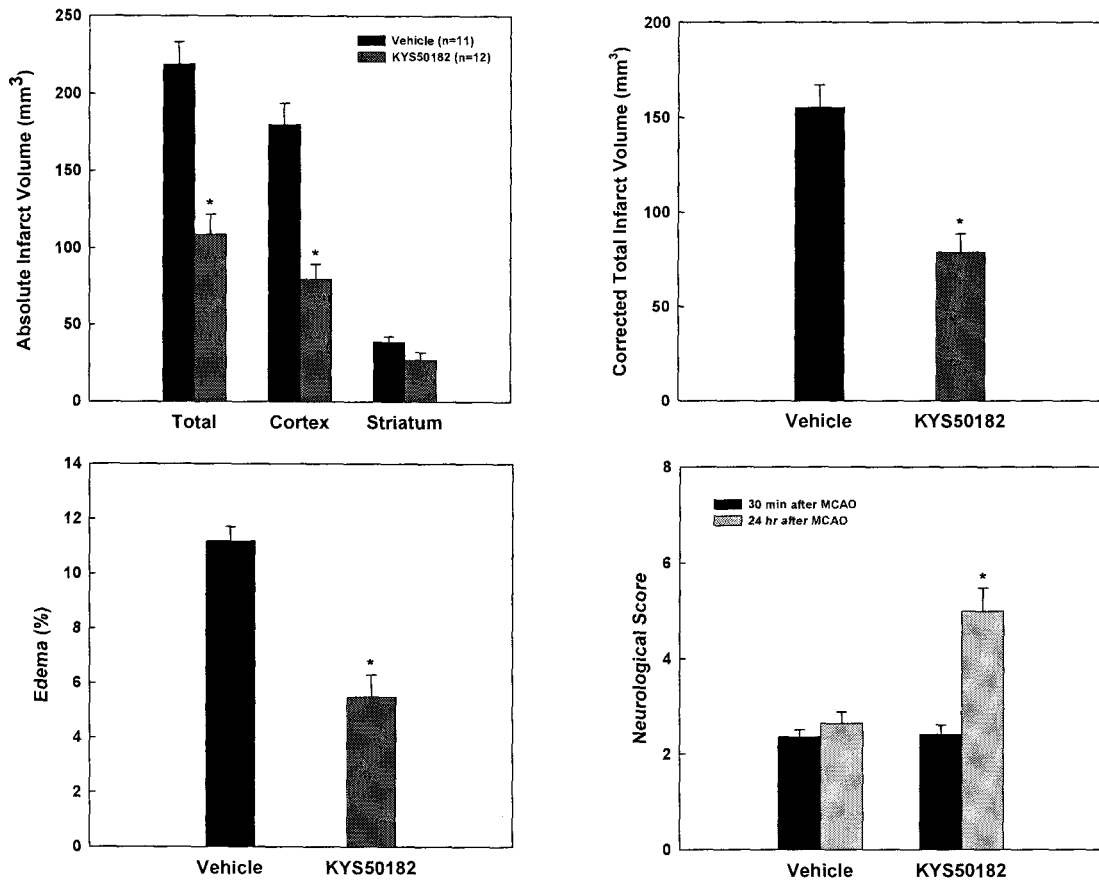


그림 26. Neuroprotective effects of KYS 50182 (10 mg/kg, i.v.) administered 30 min after onset of ischemia in a 120-min MCAO rat model.

#### 4. 알로에신과 퀘르세틴 3-메틸 에테르의 병용 투여 시의 뇌신경보호 효과

120분 일시적 허혈성 뇌손상 백서 모델에 있어서 뇌신경보호 효능을 나타내었던 알로에신과 퀘르세틴 3-메틸 에테르를 허혈 유발 후 30분에 각각 10 mg/kg의 용량으로 단회 정맥 내 병용투여 시의 뇌신경보호 효능을 검색한 결과 대뇌피질 경색용적, 총 및 교정 총 경색용적, 부종을 모두가 대조군에 비해 각각 66.4, 59.1, 56.9, 62.6%의 유의성 있는 감소를 나타냄으로써 각각의 단독 투여 시의 효과보다는 우수한 뚜렷한 조직학적 신경보호 효과를 나타내었으며 또한 대조군에 비해 유의성 있는 신경행동학적 회복 효과를 나타내었다(그림 27).

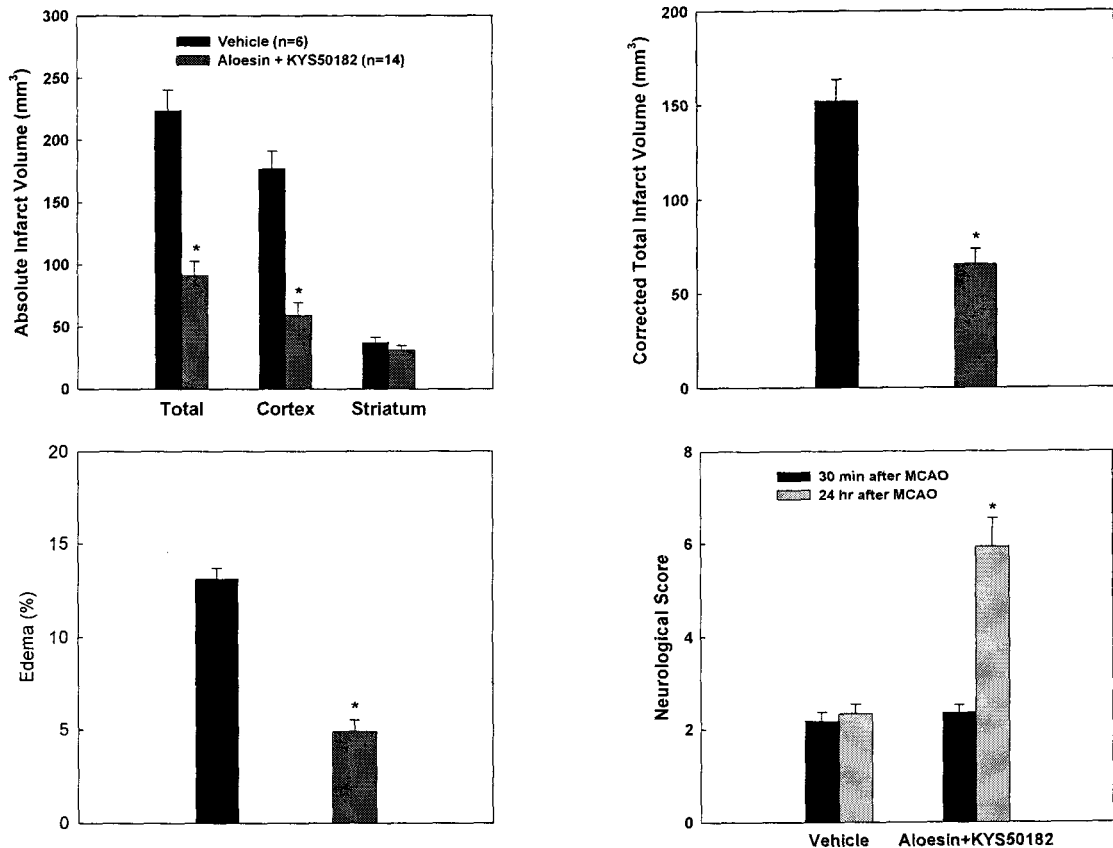


그림 27. Neuroprotective effects of aloesin and KYS 50182 concomitantly administered 30 min after onset of ischemia at the dose of 10 mg/kg (i.v) in a 120-min MCAO rat model.

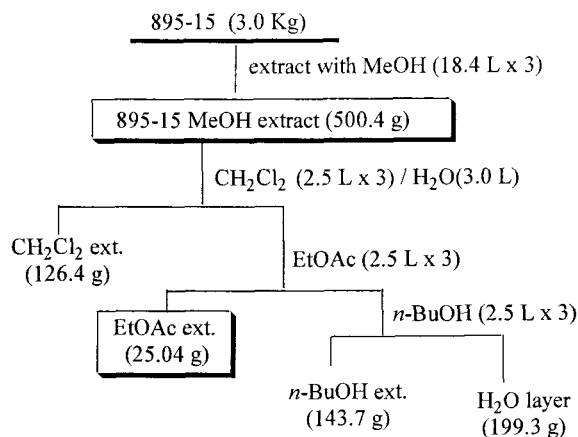
### 제 3 절 치자에 대한 연구



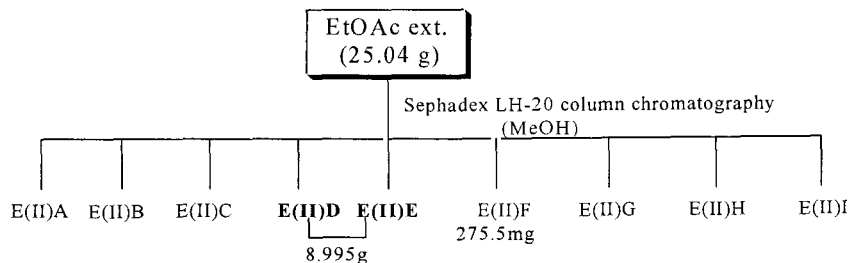
#### 1. 치자 유효성분의 분리방법

한방에서 생약으로 쓰이고 있는 치자(식물 895-15)는 2000년 6월 17일 한약방에서 구입하여 실험에 이용하였다. 잘 건조된 생약 3.0 kg을 18.4 l의 MeOH에 담그어 실온에서 4~5일 동안 냉침하여 여과하였고, 용매는 40℃이하에서 감압 건조하여 MeOH ext.를 만들었다. 이를 3번 반복 실험한 결과 총 MeOH ext. 500.4 g을 추출하였다.

MeOH ext. 500.4 g을 3000 ml의 물에 현탁 시키고, 2500 ml의 dichloromethane, ethyl acetate 그리고 *n*-butyl alcohol로 용매 극성에 따라 순차적으로 각각 3회씩 반복 추출하여 분획을 나누었다.



EtOAc 엑스 9.5086 g을 일차적으로 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피 (MeOH)를 실시하여 EA~EJ의 10개의 소 분획을 얻었고, 이차적으로 EtOAc 엑스 13.33 g을 일차와 같은 조건으로 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 E(II)A~E(II)I의 9개의 소 분획을 얻었으며, 일부는 1차 분리한 소 분획과 합쳐서 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 성분을 분리하였다.

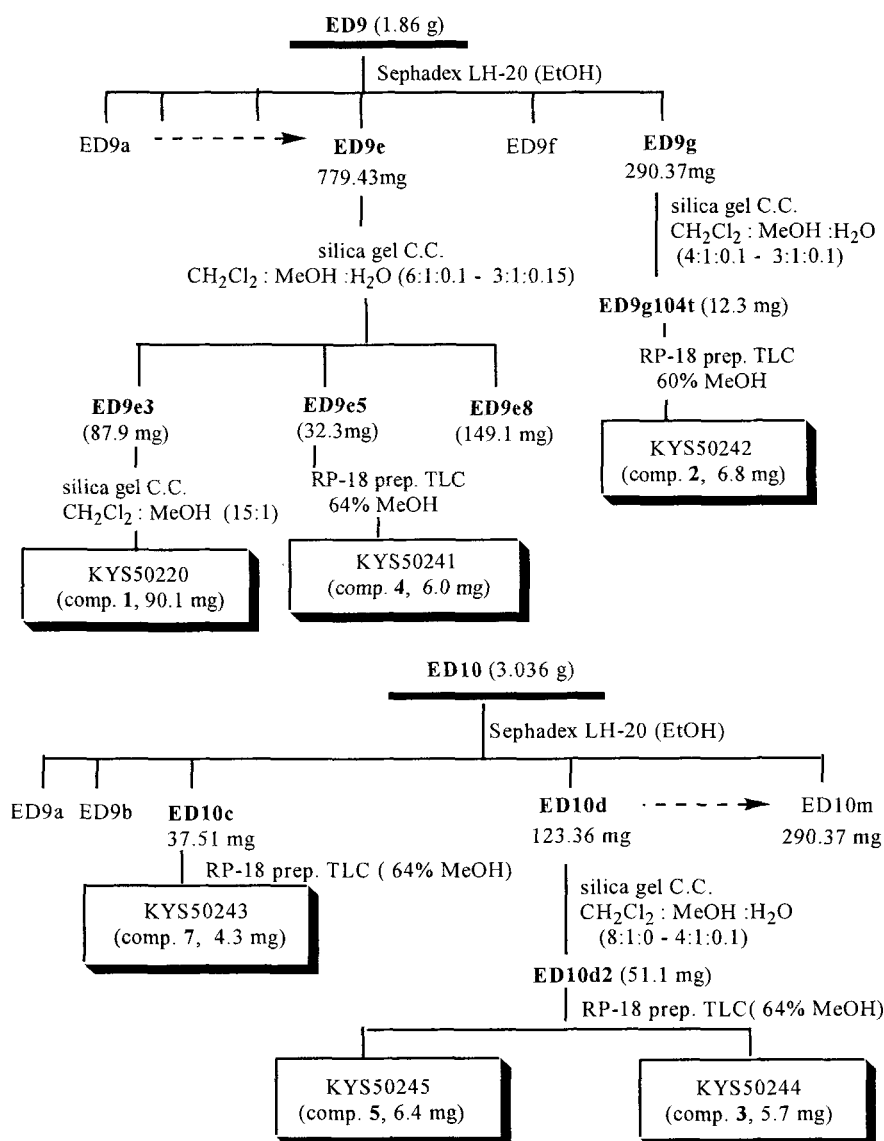


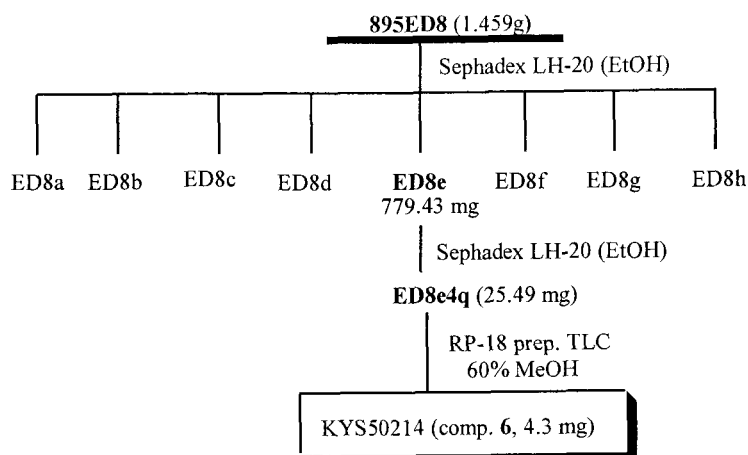
#### 가. 화합물 1-7의 분리

소 분획 895EE분획을 silica gel column chromatography(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1:0.1 → 3:1.5:0.2)를 실시하여 얻은 8개의 소 분획중 EE2 분획 9.8 mg을 prep RP-18 TLC를 실시하여 화합물 1(KYS 50220, 7.2 mg)을 얻었으며, 소 분획 895ED9e3 779.4 mg을 silica gel을 이용한 column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 6:1:0.1-3:1:0.15)를 반복 실험하여 화합물 1(KYS 50220, 90.12 mg)을 추가로 분리하였으며, ED9분획 1.86 g을 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피 (EtOH)를 실시하여 얻은 10개의 소 분획 중 소 분획 895ED9e5 32.3 mg을 분취용 역상 TLC (64% MeOH)를 이용하여 화합물 4(KYS 50241, 6.0 mg)을 얻을 수 있었으며, 소 분획 895ED9g 290.3 mg으로부터 silica gel을 이용한 칼럼 크로마토그래피와 분취용 역상 TLC (60% MeOH)를 이용하여 화합물 2(KYS 50242, 6.8 mg)을 얻을 수 있었다.

소 분획 895ED10분획 3.03 g을 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피 (EtOH)를 실시하여 얻은 13개의 소 분획중 ED10c분획 37.5 mg을 분취용 RP-18 TLC (64%

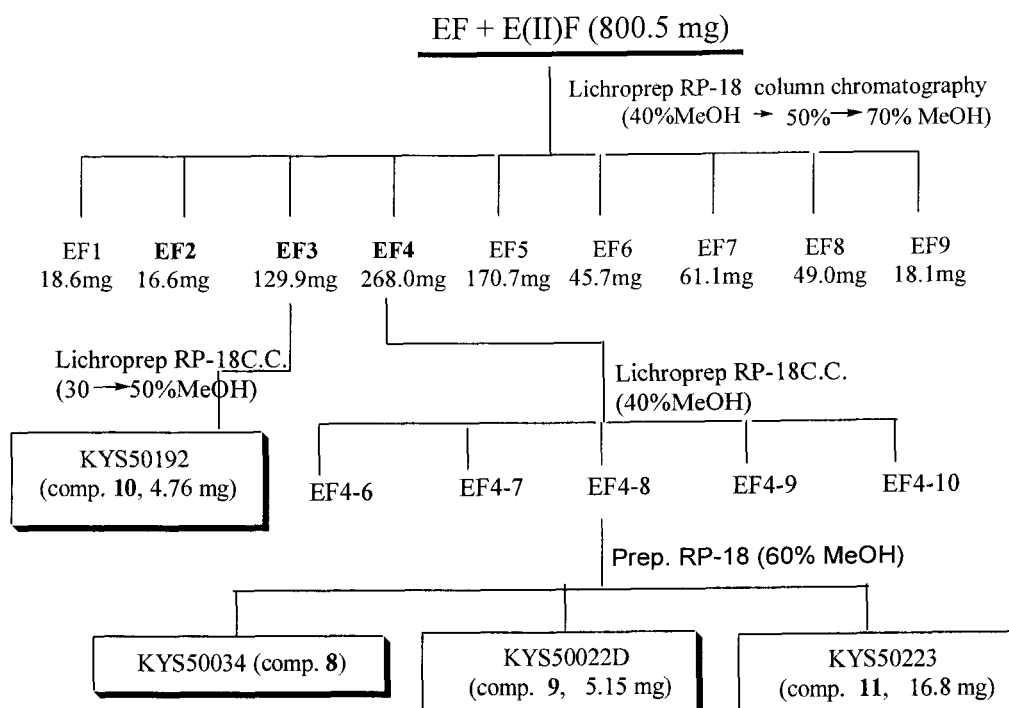
MeOH)를 실시하여본 화합물 7(KYS 50243, 4.3 mg)을 얻었으며, 소 분획 895ED10d 분획 123.3 mg을 다시 silica gel 칼럼 크로마토그래피 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 8:1:0-4:1:0.1)를 실시하여 9개의 분획을 얻었다. 이 중 895ED10d2 분획 51.1 mg을 분취용 RP-18 TLC (64% MeOH)를 실시하여 화합물 5(KYS 50225, 6.4 mg)와 화합물 3(KYS 50244, 5.7 mg)을 얻었다. 소 분획 895ED8분획 1.46 g을 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피(EtOH)를 실시하여 895ED8a-ED8h의 8개의 소 분획을 얻었고, 895ED8e분획 779 mg을 다시 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피(EtOH)를 실시하여 10개의 소 분획으로 나누었다. 이 중 895ED8e4 분획을 silica gel 칼럼 크로마토그래피와 RP-18 prep TLC를 실시하여 화합물 6(KYS 50214, 4.3 mg)을 얻었다.





나. 화합물 8, 9, 10과 11의 분리

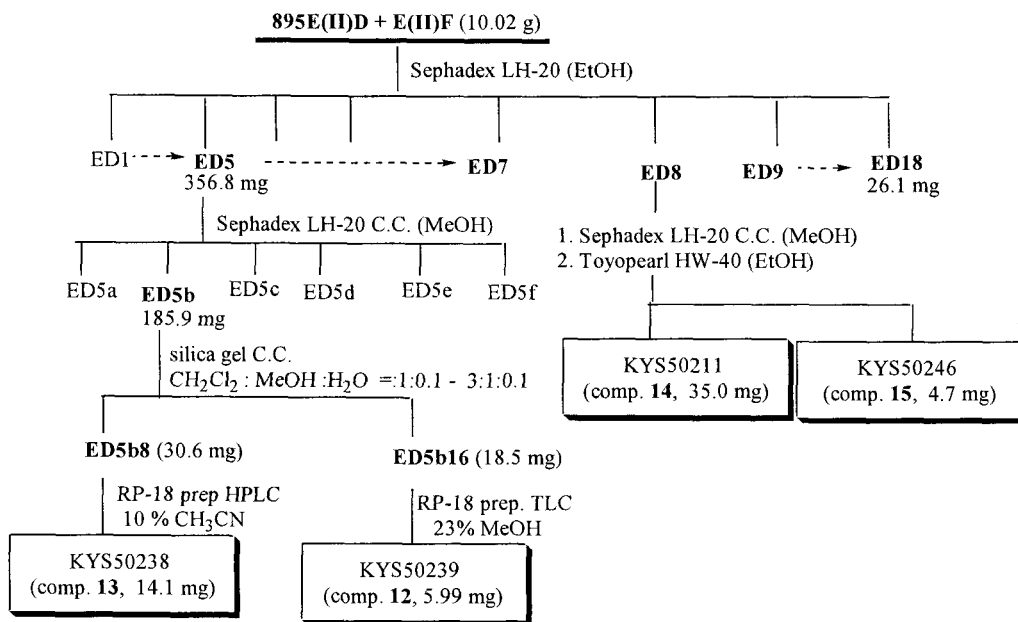
소 분획EF와 E(II)F 분획 805 mg을 역상 실리카젤을 이용한 칼럼 크로마토그래피(30%→50% 메탄올)를 실시하여 EF1~EF9의 9개의 소 분획을 얻었고, 이 중 EF3 분획 129.9 mg을 역상 실리카젤을 이용한 칼럼 크로마토그래피(30%→50% 메탄올)를 실시하여 화합물 10(4.76 mg)을 얻었다. EF4 분획 268 mg을 역상 실리카젤을 이용한 칼럼 크로마토그래피(40% 메탄올)를 실시하여 화합물 8(KYS 50034), 화합물 9(KYS 50022D, 5.15 mg), 화합물 11(KYS 50223, 16.85 mg)을 순수하게 얻었다.



다. 화합물 12, 13, 14과 15의 분리

소 분획 895E(II)와 E(II)F 분획 10.2 g을 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피 (EtOH)를 실시하여 얻은 ED1~ED18의 소 분획중 ED5 분획 185.95 mg을 다시 MeOH로 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피 실시하고, 그 중 ED5b 분획 30.65 mg을 prep RP-18 TLC를 실시하여 2개 성분의 mixture를 25.92mg 얻었다. 이 mixture를 prep HPLC(10% CH<sub>3</sub>CN)를 실시하여 화합물 13(KYS 50238, 14.1 mg)을 분리하였다. 소 분획 ED5b16 분획 18.5 mg을 RP-18 prep TLC를 실시하여 얻은 ED5b16-1 분획으로부터 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피(MeOH)를 실시하여 화합물 12(KYS 50239, 5.99 mg)를 얻었다.

소 분획 ED8e분획 779 mg을 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피(EtOH)를 실시하여 10개의 소 분획을 얻었으며, 분획 ED8e5d(131.3 mg)를 Toyopearl HW-40 (EtOH)을 이용한 정제와 분취용 역상 TLC(40% 메탄올)를 실시하여 화합물 15(KYS 50246, 4.7 mg)와 화합물 14(KYS 50211, 35.0 mg)를 얻을 수 있었다.



2. 치자 유효성분의 구조규명

가. 화합물 1(KYS 50220)의 구조분석

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 1개의 caffeoyl기와 1개의 sinapoyl기가 확인되었고, quinic acid의 4번과 5번의 수소 peak가 저자장으로 이동하였으므로, 이들의 hydroxy기가 치환되었음을 알 수 있었고, δ 3.62에서 methoxy peak가 관찰되었으므로 quinic acid의 methyl ester임을 추정할 수 있었다. HMBC spectrum등과 3-O-caffeoyl-4-O-sinapoylquinic acid spectrum data와 비교하여 확인한 결과



sinapoyl의 carbonyl기의 탄소와 4번 위치의 수소, caffeoyl의 carbonyl기의 탄소와 5번 수소사이의 correlation이 관찰되었고, quinic acid의 1번 위치의 carbonyl 탄소와 methoxy기에 기인한 수소 peak와의 correlation이 보이므로, 이 화합물은 5번과 4번의 hydroxy기가 각각 caffeoyl과 sinapoyl로 치환된 methyl 5-O-caffeoyl-4-O-sinapoylquininate로 동정하였다.<sup>30)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 2.01(1H, dd, J=6.2, 13.99 Hz, H-6), 2.14(3H, ddd, J=6.86, 3.38, 14.03 Hz, H-2,6), 3.62 (3H, s, OMe), 3.70 (6H, s, 2 x OMe), 4.26 (1H, m, H-5), 5.02 (1H, dd, J=3.01, 8.18 Hz, H-4), 5.04 (1H, dd, J=6.34, 14.18 Hz, H-3), 6.05 (1H, d, J=15.88 Hz, H-2'), 6.29 (1H, d, J=15.86 Hz, H-2''), 6.63 (2H, d, J=8.19 Hz, H-8'), 6.76 (2H, bs, H-5'', H-9''), 6.80 (1H, dd, J=1.92, 8.27 Hz, H-9'), 6.84(1H, d, J=1.97Hz, H-5') 7.38 (1H, d, J=15.89 Hz, H-3'), 7.52 (1H, d, J=17.72 Hz, H-3'').

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 38.8 (C-6), 39.0 (C-2), 53.5 (OMe), 57.2 (2x OMe), 69.1 (C-3), 69.5 (C-3), 75.4 (C-4), 76.2 (C-1), 107.3 (C-5'', 9''), 114.9 (C-2'), 115.6 (C-5'), 116.0 (C-2''), 116.9 (C-8'), 123.5 (C-9'), 127.0 (C-4''), 127.9 (C-4'), 140.0 (C-7''), 147.2 (C-6'), 148.1 (C-3'), 148.2 (C-3''), 149.8 (C-6'', 8''), 150.2 (C-7'), 168.3 (C-1'), 168.8 (C-1''), 175.6 (COOMe).

#### 나. 화합물 2(KYS 50242) 구조분석

<sup>1</sup>H-NMR에서 aromatic 영역에서 2분자의 caffeoyl기의 peak가 관찰되었으며, aliphatic moiety에서도 2개의 -CH<sub>2</sub> peak와 1개의 -CH<sub>3</sub> peak가, δ 3.61에서 methoxy peak가 관찰되었다. Quinic acid의 3,4,5번 proton이 전부 저자장쪽으로 이동함을 보여, 이 화합물은 3,4,5번이 2개의 caffeoyl과 aliphatic으로 치환된 quinic acid methyl ester로 추정할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR에서 δ 170.4, 174.7에서 carbonyl 기의 peak와 178.4에서 free acid의 peak가 관찰되었다. HMQC에서 caffeoyl기의 carbonyl기의 탄소와 quinic acid의 3, 5번위치의 수소와의 correlation이 관찰되었으며, 1번 위치의 carbonyl 탄소와 methoxy기의 correlation이 관찰되었다. 따라서 본 화합물은 3,5번이 각각 caffeoyl로, 4번 위치가 (3-hydroxy-3-methyl)glutaroyl기로 치환된 methyl 3,5-di-O-caffeoyl-4-O-(3-hydroxy-3-methyl)glutaroylquininate로 규정하였다.<sup>30)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 1.21 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 2.07-2.25 (4H, m, H-2, H-6), 2.30-2.52 (4H, m, 2x-CH<sub>2</sub>), 3.61 (3H, s, OMe), 5.18 (1H, dd, J=3.2, 6.67 Hz, H-4), 5.32 (1H, brd, J=3.9 Hz, H-3), 5.50 (1H, m, H-5), 6.13 (1H, d, J=15.9 Hz, H-2'), 6.22 (1H, d, J=15.9 Hz, H-2''), 6.65 (1H, d, J=8.4Hz, H-8'), 6.69 (1H, d, J=8.2Hz, H-8''), 6.86 (1H, dd, J=1.96, 8.21 Hz, H-9'), 6.88 (1H, dd, J=1.91, 8.17 Hz, H-9''), 6.96 (1H, d, J=1.83Hz, H-5') ,6.99 (1H, d, J=1.82 Hz, H-5''), 7.41 (1H, d, J=14.5 Hz, H-3'), 7.51 (1H, d, J=14.5 Hz, H-3'').

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 26.9 (-CH<sub>3</sub>), 35.3 (C-6), 36.3 (C-2), 46.2 (-CH<sub>2</sub>), 46.5 (-CH<sub>2</sub>) 52.1 (OMe), 68.2 (C-5), 68.3 (C-3), 69.8 (C-4), 70.1 (C-OH), 73.4 (C-1), 113.4 (C-2'), 113.9 (C-2''), 114.0 (C-5'), 114.1 (C-5''), 115.4 (C-8''), 115.5 (C-8'), 122.2 (C-9''), 122.3 (C-9'), 126.5 (C-4''), 126.8 (C-4'), 145.8 (C-6''), 145.9 (C-6'), 146.6 (C-3''), 146.9 (C-3'), 148.7 (C-7''), 148.9 (C-7'), 166.5 (C-1'), 167.3 (C-1''), 170.4 (COO), 174.7 (COOMe), 178.4 (COOH).

#### 다. 화합물 3(KYS 50244)구조분석

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 1개의 caffeoyl기와 1개의 sinapoyl기가 확인되었고, quinic acid의 4번과 5번의 수소 peak가 저자장으로 이동하였으므로, 이들의 hydroxy기에 치환되었음을 알 수 있었고, δ 1.18과 4.08에서 ethyl peak가 관찰되었으므로 quinic acid의 ethyl ester임을 추정할 수 있었다. HMBC spectrum에서 확인한 결과 sinapoyl의 carbonyl 탄소와 4번 위치의 수소, caffeoyl의 carbonyl 탄소와 5번 수소사이의 correlation이 관찰되었고, quinic acid의 1번 위치의 carbonyl 탄소와 ethyl기에 기인한 수소 peak와의 correlation이 보이므로, 이 화합물은 5번과 4번의 위치의 hydroxy기가 각각 caffeoyl과 sinapoyl로 치환된 ethyl 5-O-caffeoyl-4-O-sinapoylquinolate로 동정하였다.<sup>30)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 1.18 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 2.02 (1H, dd, *J*=6.3, 13.8 Hz, H-2), 2.15-2.26 (3H, m, H-2,6), 3.78 (6H, s, 2×OMe), 4.08 (2H, m, -CH<sub>2</sub>), 4.27 (1H, brd, *J*=2.6, 5.39Hz, H-3), 5.06 (1H, dd, *J*=2.85, 8.15 Hz, H-4), 5.49 (1H, br dd, *J*=7.4, 13.3 Hz, H-5), 6.09 (1H, d, *J*=15.83 Hz, H-2'), 6.35 (1H, d, *J*=15.83 Hz, H-2''), 6.66 (1H, d, *J*=8.16 Hz, H-8'), 6.76 (2H, bs, H-5'', H-9''), 6.82 (1H, dd, *J*=1.52, 8.23 Hz, H-9'), 6.90 (1H, d, *J*=1.67Hz, H-5') 7.43 (1H, d, *J*=15.86 Hz, H-3'), 7.57 (1H, d, *J*=15.84 Hz, H-3'').

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 13.3 (C-CH<sub>3</sub>), 37.3 (C-2), 37.6 (C-6), 55.8 (2x OMe), 61.7 (C-CH<sub>2</sub>), 67.7 (C-3), 68.1 (C-5), 74.0 (C-4), 74.8 (C-1), 105.9 (C-5'', 9''), 113.4 (C-2'), 114.1 (C-5'), 114.5 (C-2''), 115.5 (C-8'), 122.1 (C-9'), 125.5 (C-4''), 126.4 (C-4'), 138.7 (C-7''), 145.9 (C-6'), 146.7 (C-3'), 146.8 (C-3''), 148.4 (C-6'', 8''), 149.1 (C-7'), 167.0 (C-1'), 167.4 (C-1''), 175.7 (COOMe).

#### 라. 화합물 4(KYS 50241)의 구조분석

<sup>1</sup>H-NMR상에서 1개의 caffeoyl기와 1개의 sinapoyl기가 확인되었고, quinic acid의 3,5번 위치의 수소가 저자장으로 이동하였으므로, 이들의 hydroxy기에 치환체가 치환되었음을 알 수 있었고, δ 3.49에서 methoxy peak가 관찰되어 이 화합물의 quinic acid의 methyl ester임을 확인하였다. HMBC의 스펙트럼에서 sinapoyl기에서 기인하는 carbonyl 탄소와 5번 위치의 수소, caffeoyl기에서 기인하는 carbonyl 탄소와 3번 수소사이의 correlation이 관찰되었고, quinic acid의 1번 위치의 carbonyl 탄

소와 methoxy기의 수소 peak와의 correlation이 보이므로, 이 화합물은 3번과 5번의 hydroxy기가 각각 caffeoyl과 sinapoyl로 치환된 methyl 3-O-caffeoyl-5-O-sinapoylquininate로 동정하였다.<sup>30)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 1.93-2.09 (4H, m, H-2, H-6), 3.49 (3H, s, OMe), 3.66 (6H, s, 2 x OMe), 3.77 (1H, dd, J=3.17, 6.66 Hz, H-4), 5.10 (1H, brd, J= Hz, H-3), 5.19 (1H, m, H-5), 6.02 (1H, d, J=15.9 Hz, H-2'), 6.27 (1H, d, J=15.88 Hz, H-2''), 6.57 (1H, d, J=8.15Hz, H-8'), 6.71 (2H, s, H-5'', H-9''), 6.76 (1H, dd, J=1.98, 8.21 Hz, H-9'), 6.84 (1H, d, J=1.97Hz, H-5'), 7.35 (1H, d, J=15.89 Hz, H-3'), 7.48 (1H, d, J=15.88 Hz, H-3'').

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 34.7 (C-2), 35.8 (C-6), 52.0 (OMe), 55.8 (2x OMe), 68.8 (C-4), 71.1 (C-5), 71.2 (C-5), 73.7 (C-1), 105.9 (C-5'', 9''), 113.8 (C-2'), 114.1 (C-5'), 115.3 (C-2''), 115.5 (C-8'), 122.1 (C-9'), 125.8 (C-4''), 126.6 (C-4'), 138.5 (C-7''), 145.9 (C-6'), 146.2 (C-3''), 146.4 (C-3'), 148.5 (C-6'', 8''), 148.8 (C-7'), 167.0 (C-1'), 167.6 (C-1''), 174.6 (COOMe).

#### 마. 화합물 5(KYS 50245) 구조분석

<sup>1</sup>H-NMR상에서 1개의 caffeoyl기와 1개의 sinapoyl기가 확인되었고, quinic acid의 3,5번 위치의 수소가 저자장으로 이동하였으므로, 이들의 hydroxy기에 치환체가 치환되었음을 알 수 있었고, δ 1.18과, 4.07에서 ethyl group에서 기인한 peak가 관찰되어 이 화합물의 quinic acid의 ethyl ester임을 추정하였다. HMBC의 스펙트럼에서 sinapoyl의 carbonyl 탄소와 5번 위치의 수소, caffeoyl기의 carbonyl 탄소와 3번 수소사이의 correlation이 관찰되었고, quinic acid의 1번 위치의 carbonyl 탄소와 ethoxy기에서 기인한 수소 peak와의 correlation이 보이므로, 이 화합물은 3번과 5번의 hydroxy기가 각각 caffeoyl과 sinapoyl로 치환된 ethyl 3-O-caffeoyl-5-O-sinapoylquininate로 동정하였다.<sup>30)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 1.18 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 2.06-2.22 (4H, m, 13.8 Hz, H-2,H-6), 3.78 (6H, s, 2xOMe), 3.90 (1H, dd, J=2.93, 6.35 Hz, H-4), 4.07 (2H, m, -CH<sub>2</sub>), 5.23 (1H, brd, J=3.35Hz, H-3), 5.33 (1H, m, H-5), 6.10 (1H, d, J=15.92 Hz, H-2'), 6.39 (1H, d, J=15.88 Hz, H-2''), 6.70 (1H, d, J=8.15 Hz, H-8'), 6.83 (2H, s, H-5'', H-9''), 6.88 (1H, brd, J=1.62 Hz, H-9'), 6.95 (1H, d, J=1.97 Hz, H-5') 7.48 (1H, d, J=15.89 Hz, H-3'), 7.61 (1H, d, J=15.88 Hz, H-3'').

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz): δ 13.3 (C-CH<sub>3</sub>), 34.6 (C-2), 35.8 (C-6), 55.8 (2x OMe), 61.6 (C-CH<sub>2</sub>), 68.8 (C-4), 70.8 (C-5), 71.1 (C-3), 73.6 (C-1), 105.9 (C-5'', 9''), 113.8 (C-2'), 114.1 (C-5'), 115.3 (C-2''), 115.5 (C-8'), 122.0 (C-9'), 125.8 (C-4''), 126.6 (C-4'), 138.5 (C-7''), 145.9 (C-6'), 146.2 (C-3''), 146.8 (C-3'), 148.5 (C-6'', 8''), 148.8 (C-7'), 167.0 (C-1'), 167.6 (C-1''), 174.2 (COOMe).

바. 화합물 6(KYS 50214)의 구조분석

$^1\text{H-NMR}$ , spectrum에서 aromatic 영역에서 1개의 sinapoyl기와 1개의 vanillic acid에 의한 peak와  $\delta$  3.34-4.47에서 당에 기인한 peak가 관찰되었으며, 4.93 ppm에서 glucose의 anomeric proton이  $J=7.3$  Hz 으로 관찰되었으므로, 이 화합물은  $\beta$ -configuration을 갖는 배당체로 추정되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 당의 anomeric carbon이  $\delta$  102.0으로 저자장으로 이동하여 관찰되었으며, 1개의 ester carbon peak와 1개의 free acid로 추정되는 peak가 관찰되었다. 이들의 결합구조를 규명하기 위하여, HMBC, TOCSY등의 spectrum과 본 화합물과 유사한 vanillic acid 4-O- $\beta$ -D-(6'-O-galloyl)glucopyranoside의 spectrum과 비교하였을때 이 화합물은 vanillic acid의 4번 위치에 당이 결합되어있고, 당의 6번 위치가 sinapoyl기와 ester결합을 하는 vanillic acid 4-O- $\beta$ -D-(6'-O-sinapoyl)glucopyranoside로 동정하였다.<sup>31)</sup>

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  3.34 (1H, d,  $J=8.9\text{Hz}$ , H-4'), 3.39(1H, t,  $J=8.8$ , Hz, H-3'), 3.50 (1H, t,  $J=2.03$ , 7.4Hz, H-2'), 3.69 (1H, dd,  $J=2.3$ , 6.2Hz, H-5'), 4.28 (1H, dd,  $J=6.9$ , 11.9Hz, H-6'), 4.47 (1H, dd,  $J=2.07$ , 11.9 Hz, H-6'), 4.93 (1H, d,  $J=7.3\text{Hz}$ , H-1'), 6.32 (1H, d,  $J=15.8\text{Hz}$ , H-2''), 6.8 (2H, s, H-5'',H-9''), 7.08 (1H, d,  $J=8.4\text{Hz}$ , H-5), 7.45 (1H, d,  $J=1.9$  Hz, H-2), 7.50 (1H, dd,  $J=1.91$ , 6.8 Hz H-2), 7.54 (1H, d,  $J=15.8$  Hz, H-3'').

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz):  $\delta$  56.7 (OMe), 56.9 (2xOMe), 64.7 (C-6'), 71.7 (C-4'), 74.8 (C-2'), 75.7 (C-5'), 77.8 (C-3'), 102.0 (C-1'), 106.9 (C-5'', 9''), 114.4 (C-6), 115.7 (C-2''), 116.5 (C-5), 124.5 (C-2), 126.5 (C-4''), 127.3 (C-1), 139.6 (C-7''), 147.3 (C-3''), 149.5 (C-6'', 8''), 150.3 (C-4), 168.8 (COOMe), 170.16 (COOH).

사. 화합물 7(KYS 50243) 구조분석

$^1\text{H-NMR}$ 에서 1개의 caffeoyl기가 관찰되었으며, quinic acid의 5번 위치의 수소가 저자장으로 이동하였으므로, 5번 위치의 hydroxyl기가 caffeoyl로 치환된 chlorogenic acid로 추정되었으며,  $\delta$  1.16과 4.06에서 ethyl기에 의한 peak가 관찰되어 이 화합물은 quinic acid의 1번 위치에 ethyl기와 ester결합을 하는 chlorogenic acid ethyl ester로 동정하였다.<sup>32)</sup>

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  1.16 (3H, t,  $J=7.13$ , 14.2 Hz, - $\text{CH}_3$ ), 1.93 (1H, dd,  $J=6.3$ , 13.8 Hz, H-2), 2.05-2.14 (4H, m, H-2, 6), 3.65 (1H, dd,  $J=3.09$ , 7.52 Hz, H-4), 3.78 (1H, d,  $J=2.55$  Hz, H-3), 4.06 (2H, m, - $\text{CH}_2$ ), 5.20 (1H, br dd,  $J=7.02$ , 12.2 Hz, H-5), 6.14 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-2'), 6.66 (1H, d,  $J=8.07$  Hz, H-8'), 6.86 (1H, dd,  $J=1.89$ , 8.21 Hz, H-9'), 6.93 (1H, d,  $J=1.92\text{Hz}$ , H-5') 7.45 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-3').

아. 화합물 8(KYS 50034)의 구조분석

이 화합물은 노란색의 무정형 고체로,  $^1\text{H-NMR}$ 에서의 peak 모양이 flavonoid임

을 알 수 있었다.  $\delta$  7.60에서의 doublet peak는 2'에서 기인한 peak로  $\delta$  7.48에서의 peak(dd, 1H,  $J=1.6, 8.4$  Hz)와 meta coupling을 하고 있으며, 이 peak는  $\delta$  6.76에서의 doublet peak와 ortho coupling(d, 1H,  $J=8.4$  Hz)을 하고 있음을 알 수 있었다. 이것은 flavonoid의 B ring에서 기인한 것이고 이들이 ABX system으로 치환하고 있음을 알 수 있었다. 또한,  $\delta$  6.27에서의 peak와 6.48에서의 peak는 A ring에서 기인한 peak임을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물 8은 quercetin으로 결정하였으며, authentic sample과도 일치함을 알았다.<sup>24)</sup>

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz):  $\delta$  6.27 (s, 1H, H-6), 6.48 (s, 1H, H-8), 6.76 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 7.48 (dd, 1H,  $J=1.6, 8.4$  Hz, H-6'), 7.60 (d, 1H,  $J=1.5$  Hz, H-2').

#### 자. 화합물 9(KYS 50022)의 구조분석

이 화합물은 <sup>1</sup>H-NMR에서 화합물 8과 유사한 peak 모양을 나타내고 있지만,  $\delta$  3-4에서 나타나는 복잡한 peak를 통해 당의 존재를 확인하였고, 당의 anomeric proton이 5.15 ppm에서의 doublet peak는 coupling constant가 7.3 Hz로 나타나 glucose가  $\beta$ -결합하고 있음을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR과 문헌을 비교하여 그 구조를 quercetin에 glucose 한 분자가 결합되어 있는 quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoquercitrin)로 동정하였다.

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz):  $\delta$  3.0-4.0 (6H, m, H-2", 3", 4", 5", 6"), 5.15 (1H, d,  $J=7.3$  Hz, H-1"), 6.10 (1H, H-6), 6.29 (1H, H-8), 6.76 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 7.48 (1H, dd,  $J=1.6, 8.4$ Hz, H-6'), 7.60 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2').

#### 차. 화합물 10(KYS 50192)의 구조분석

이 화합물은 흰색의 amorphous powder로, 메탄올에 대한 용해도가 현저하게 떨어져서 메탄올에서 고체를 얻을 수 있었다. TLC plate에서 황산 발색시 처음엔 노란색을 띠다가 시간이 지나면서 붉은색을 띠게 되었다. <sup>1</sup>H NMR에서의 peak pattern은 화합물 2와 유사하지만 quinic acid의 3번과 5번에서 기인하는 peak가 서로 나뉘어져서 나타나고 있는 점이 다르다. 즉, 화합물 2에서는  $\delta$  5.42에서 두개의 수소에 해당하는 peaks가 multiplet으로 overlap되어 나타나고 있지만, 화합물 6에서는  $\delta$  5.55와 5.39에서 각각 multiplet으로 나타나고 있다. 또한 4번에서 기인하는 peak가  $\delta$  3.91에서 doublet of doublet으로 나타나고 있는데 화합물 2와는 다르게 4번 수소와 5번 수소의 coupling constant 가 9.86 Hz로 크게 나타나고 있다. <sup>13</sup>C NMR에서도 화합물 2와 유사하지만 quinic acid의 3번과 5번을 제외한 나머지 peak들이 전체적으로 저자장으로 이동하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 3,5-di-O-caffeoylquinic acid로 추정하고 정확한 구조 규명을 위하여 현재 실험 중에 있다.<sup>33-36)</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  2.04 (m, 1H, H-2<sub>ax</sub>), 2.11 (m, 2H, H-6), 2.28 (dd,

1H,  $J=15.2, 2.7$  Hz, H-2<sub>eq</sub>), 3.91 (dd, 1H,  $J=9.9, 3.4$  Hz, H-4), 5.39 (m, 1H, H-3), 5.55 (m, 1H, H-5), 6.31, 6.43 (d, each 1H,  $J=15.8$  Hz, H-8'), 6.78 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz, H-5'), 6.96, 6.97 (dd, each 1H,  $J=8.2, 2.0$  Hz, H-6'), 7.06, 7.08 (d, each 1H,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 7.59, 7.62 (d, each 1H,  $J=15.8$  Hz, H-7').  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  36.6 (C-2), 39.7 (C-6), 71.5 (C-5), 72.1 (C-4), 73.5 (C-3), 75.4 (C-1), 114.3 (C-2'), 114.5, 115.0 (C-8'), 115.5 (C-5'), 122.0 (C-6'), 126.9, 127.1 (C-1'), 145.7, 145.7 (C-7'), 145.9, 146.0 (C-3'), 148.3, 148.5 (C-4'), 168.1, 168.5 (C-9'), 180.4 (COOH).

#### 카. 화합물 11(KYS 50223)의 구조분석

이 화합물 역시 dicaffeoylquinic acid 유도체로 TLC에서 발색시 노란색이다가 점차 붉은색으로 변한다. <sup>1</sup>H NMR에서의 peak pattern이 화합물 7과 유사하여 4,5-DCQA임을 예상하였다. 5번에서 기인하는 peak가  $\delta$  5.67에서 multiplet으로 나타나고,  $\delta$  5.11에서 4번에서 기인한 peak가 doublet of doublet (1H,  $J=9.5, 2.6$  Hz)으로 나타나고 있다. 이것은 두 group의 caffeoyl group이 quinic acid의 4번과 5번에 치환된 형태임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C NMR에서도 화합물 7과 일치하는 모습으로 나타나 이 화합물이 4,5-DCQA임을 확인 할 수 있었다. 이상의 데이터를 종합하여 이 화합물은 4,5-O-dicaffeoylquinic acid로 규명하였다.<sup>37-40)</sup>

<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  2.06 ~ 2.30 (m, 4H, H-2, 6), 4.36 (m, 1H, H-3), 5.11 (dd, 1H,  $J=9.5, 2.6$  Hz, H-4), 5.67 (m, 1H, H-5), 6.16, 6.27 (d, each 1H,  $J=15.9$  Hz, H-8'), 6.72, 6.73 (d, each 1H,  $J=8.2$  Hz, H-5'), 6.87, 6.90 (dd, each 1H,  $J=8.3, 1.9$  Hz H-6'), 6.99, 7.01 (d, each 1H,  $J=1.8$  Hz, H-2'), 7.49, 7.58 (d, each 1H,  $J=15.9$  Hz, H-7').

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  37.5 (C-2), 38.6 (C-6), 68.1 (C-3), 68.6 (C-5), 75.0 (C-4), 75.5 (C-1), 113.7 (C-8'), 114.2 (C-2'), 115.5 (C-5'), 122.1 (C-6'), 126.6 (C-1'), 145.7 (C-7'), 146.6, 146.7 (C-3'), 148.6 (C-4'), 167.3, 167.6 (C-9'), 176.5 (COOH).

#### 타. 화합물 12(KYS 50239)와 13(KYS 50238)의 구조분석

화합물 12는 <sup>1</sup>H-NMR에서 H-3에 기인하는 특징적인 signal이 7.41 ppm에서  $J=0.83$  Hz의 doublet으로 나타났으며, 4.61 ppm에서 glucose의 anomeric proton이  $J=7.83$  Hz로  $\beta$ 결합함을 알 수 있었다. Geniposidic acid의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR의 결과와 문헌과의 비교로 확정하였다.<sup>41)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz):  $\delta$  2.05 (1H,  $J=8.0, 18.78$  Hz, dd, H-5), 2.58 (1H,  $J=7.57, 7.72$  Hz, H-9), 3.04 (2H, m, H-6), 4.19 (2H, m, H-10), 4.6 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, anomeric-H), 5.69 (1H, s, H-7), 7.38 (1H, d,  $J=0.95$  Hz, H-3).

화합물 13은 무색의 결정으로,  $^1\text{H-NMR}$ 에서 H-3에 기인하는 특징적인 signal이 7.41 ppm에서  $J=0.83$  Hz의 doublet으로 나타났으며, 3.69 ppm에서는 methyl ester에 기인하는 3H의 signal이 singlet으로 3.01-3.31 ppm사이에서 나타나는 peak로 당 한 분자가 존재함을 알 수 있었고, 4.61 ppm에서 glucose의 anomeric proton이  $J=7.83$  Hz로  $\beta$ 결합함을 알 수 있었다. Geniposide의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 의 결과와 문헌과의 비교로 확정하였다.<sup>41)</sup>

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  2.0 (1H, br dd,  $J=5.6, 16.3$  Hz, H-5), 2.6, 3.04 (2H, m, H-6), 2.6 (1H, dd, 7.6,  $J=15.3$  Hz, H-9), 3.61 (3H, s, OMe), 4.2 (2H, m, H-10), 4.6 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, anomeric-H), 5.69 (1H, s, H-7), 7.41 (1H, d,  $J=0.8$  Hz, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz):  $\delta$  35.6 (C-5), 38.7 (C-6), 47.4 (C-9), 50.7 (OMe), 60.4 (C-10), 61.6 (C-6'), 70.5 (C-4'), 73.8 (C-2'), 76.8 (C-3'), 77.4 (C-5'), 97.2 (C-1), 99.31 (C-1'), 111.5 (C-4), 127.3 (C-7), 143.8 (C-8), 152.3 (C-3), 168.5 (C-11).

파. 화합물 14(KYS 50211)와 15(KYS 50246)의 구조분석

화합물 14는  $^1\text{H-NMR}$ 에서 aromatic 영역에서 3개의 수소에 해당하는 peak는 ABX system으로 치환하고 있으며, 두개의 doublet peak( $J=15.85$  Hz)은 그 coupling constant가 큰 것으로 미루어 trans 위치로 치환하고 있는 화합물임을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 caffeic acid로 동정하였다.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  6.14 (1H, d,  $J=15.85$  Hz, H-2), 6.69 (1H, d,  $J=8.15$  Hz, H-8), 6.85 (1H, dd,  $J=1.99, 8.17$  Hz, H-9), 6.94 (1H, d,  $J=1.98$  Hz, H-5), 7.45 (1H, d,  $J=15.86$  Hz, H-3).

화합물 15는  $^1\text{H-NMR}$ 에서 aromatic 영역에서 trans vinyl에 해당하는 peak가 7.48과 6.24 ppm에서 doublet으로 나타나고 두개의 peak에 해당하는 peak가 6.80 ppm에서 singlet으로 나타나 aromatic ring이 대칭으로 치환하고 있음을 알았다. 또한 3.78 ppm에서 6개의 수소에 해당하는 peak가 나타나 aromatic ring에 두개의 methoxy group이 치환되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 sinapic acid로 동정하였다.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  7.48 (1H, d,  $J=15.79$  Hz, H-7), 6.80 (2H, s, H-2, 6), 6.24 (1H, d,  $J=15.85$  Hz, H-8), 3.78 (3H, s, OMe).

### 3. 치자 유효성분의 활성검색

한방에서 쓰이고 있는 생약 치자 추출물로부터 2종의 flavonoid 계열 화합물, 2종의 iridoid 화합물, caffeic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, vanillic acid 4-O- $\beta$ -D-(6"-sinapoyl)glucopyranoside를 분리하여 구조를 규명하였다. 또한, 6종의 quinic acid 유도체 등 총 13종의 화합물을 분리하여 구조를 규명하였다. 분리된 단일 물질 중 화합물 1-6의 6개의 화합물은 자연계에서 처음으로 분리 보고 되는 물질이며, 화합물 7은 치자에서 처음 분리 보고되는 것이다.

이들 단일물질에 대한 항산화 활성을 DPPH에 의한 자유라디칼 소거 능력과 잔틴/잔틴옥시다제에 의한 슈퍼 옥사이드 음이온 라디칼의 소거능력, AAPH의 유도에 의한 리놀렌산의 지질 과산화 저해작용에 대한 검색을 실시하였다.

#### 가. 치자 추출물 및 분리된 화합물들의 자유라디칼 소거효과

Positive control로 기존에 라디칼 소거제로 잘 알려진 아스코르빈산(비타민 C), 알파-토코페롤(비타민 E), 레스베라트롤(resveratrol)을 사용하여 항산화제들의 자유라디칼 소거효과를 비교한 결과를 표 18에 제시하였다. 제시되는 데이터는 3회 실시 평균값이다.

표 18에서 알 수 있는 바와 같이 895-15의 에틸 아세테이트 분획 및 그로부터 분리한 화합물들의 자유라디칼 소거효과를 기존의 활성산소 소거제과 비교한 결과, 레스베라트롤이나 아스코르빈산(비타민 C)의 자유라디칼 소거효과와 유사한 효과를 나타내고 있으며, 에틸 아세테이트 분획과 에틸 아세테이트로부터 분리한 화합물 대부분은  $\alpha$ -토코페롤(비타민 E)보다 우수한 효과를 보이고 있음을 알 수 있다.



표 18. 치자 추출물 및 분리된 화합물들의 자유라디칼 소거효능

시험물질	자유라디칼 소거효과 (IC <sub>50</sub> , µg/ml)
메탄올 추출물	>50
디클로로메탄 분획	>50
아세트산에틸 분획	14.02 ± 1.25
부탄올 분획	>50
물 분획	>50
화합물 1(KYS 50220)	8.25 ± 0.17
화합물 2(KYS 50242)	4.39 ± 0.02
화합물 3(KYS 50244)	6.08 ± 0.06
화합물 4(KYS 50241)	8.5 ± 0.36
화합물 5(KYS 50245)	9.52 ± 0.31
화합물 6(KYS 50214)	22.67 ± 0.44
화합물 7(KYS 50243)	7.1 ± 0.42
화합물 8(KYS 50034)	5.88 ± 0.71
화합물 9(KYS 50022)	16.56 ± 1.04
화합물 10(KYS 50192)	5.64 ± 0.11
화합물 11(KYS 50223)	5.89 ± 0.21
화합물 12(KYS 50239)	>50
화합물 13(KYS 50238)	>50
화합물 14(KYS 50211)	3.22 ± 0.08
화합물 15(KYS 0246)	6.94 ± 1.06
아스코르빈산(비타민 C)	5.53 ± 0.13
α-토코페롤(비타민 E)	9.42 ± 0.26
레스베라트롤(resveratrol)	17.05 ± 1.08

나. 치자 추출물 및 분리된 화합물들의 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼( $O_2^-$ )의 소거 효과

Xanthine(X)과 xanthine oxidase(XOD)의 반응으로 생성되는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical)의 생성을 억제시키는 효능을 평가하기 위하여 토다 등의 방법을 다음과 같이 수행하였다.<sup>42)</sup>

즉, 0.1 mM xanthine, 0.1 mM EDTA, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  소혈청 알부민 (Bovine serum albumin, BSA), 25 mM 니트로블루 테트라졸륨 (Nitroblue tetrazolium, NBT)과 40 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액, 각 농도별로 희석한 시험 화합물 용액, 그리고  $1.4 \times 10^3$  단위 XOD를 포함하는 최종부피가 200  $\mu\text{l}$ 인 용액을 혼합하여 25 $^\circ\text{C}$ 에서 20분간 반응시켰다. 상기 반응용액에 6 mM  $\text{CuCl}_2$  6.6  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 생성된 포마잔 (formazan)을 560 nm에서 흡광도를 측정하여 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온 소거효과를 비교한 결과를  $\text{IC}_{50}$  값으로 구하였다.  $\text{IC}_{50}$ 은 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide radical,  $O_2^-$ ) 소거 효과를 계산하여 50% 억제효과를 나타내는 농도( $\text{IC}_{50}$ )를 의미한다.

치자 추출물과 분리한 각 화합물의 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical,  $O_2^-$ ) 소거효과를 기존의 활성산소 소거제인 아스코르빈산(비타민 C), 알파-토코페롤(비타민 E), 레스베라트롤(resveratrol)의 효과와 비교한 결과를 표 19에 나타내었다. 제시되는 데이터는 3회 실시 평균값이다.

표 19에 나타난 바와 같이, 895-15 추출물과 메탄올 추출물로부터 분획한 에틸 아세테이트 분획의 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide radical,  $O_2^-$ ) 소거효과를 기존의 소거제들과 비교한 결과, 895-15 메탄올 추출물과 메탄올 추출물로부터 분획한 에틸 아세테이트 분획 그리고 부탄올 분획이 매우 높은 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었으며, 에틸 아세테이트분획은 특별히 높은 활성을 나타내고 있음을 확인할 수 있다. 또한, 에틸 아세테이트로부터 분리한 화합물 대부분에서 높은 활성산소 소거활성을 나타내고 있었으며, 특히 화합물 7과 14의 효과는 상당히 우수하게 나타나고 있으며, 6종의 신규 화합물들 또한 우수한 효과를 나타내고 있어 이들이 항산화 효과의 주성분임을 입증하고 있다. 이들 화합물 외에 다른 화합물들도 항산화효과를 나타내고 있음을 알 수 있다. 그러나 기존의 항산화제로 알려진 화합물 대부분은 효과가 없음을 알 수 있다.

표 19. 치자 추출물 및 분리된 화합물들의 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온라디칼( $O_2^-$ )의 소거 효능

시험물질	잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 (superoxide anion radical, $O_2^-$ ) 소거효과 ( $IC_{50}$ , $\mu g/ml$ )
메탄올 추출물	36.14 ± 8.43
디클로로메탄 분획	>50
아세트산에틸 분획	1.46 ± 0.32
부탄올 분획	18.03 ± 3.23
물 분획	47.39 ± 4.32
화합물 1(KYS 50220)	1.8 ± 0.43
화합물 2(KYS 50242)	2.28 ± 0.23
화합물 3(KYS 50244)	2.04 ± 0.27
화합물 4(KYS 50241)	2.16 ± 0.31
화합물 5(KYS 50245)	2.69 ± 0.09
화합물 6(KYS 50214)	46.32 ± 3.5
화합물 7(KYS 50243)	0.97 ± 0.02
화합물 8(KYS 50034)	>50
화합물 9(KYS 50022)	3.41 ± 0.27
화합물 10(KYS 50192)	2.90 ± 0.14
화합물 11(KYS 50223)	3.29 ± 0.42
화합물 12(KYS 50239)	>50
화합물 13(KYS 50238)	>50
화합물 14(KYS5 0211)	0.54 ± 0.03
화합물 15(KYS 50246)	12.97 ± 3.12
아스코르빈산(비타민 C)	>50
$\alpha$ -토코페롤(비타민 E)	>50
레스베라트롤(resveratrol)	>50

다. 치자 추출물 및 분리된 화합물들의 지질과산화물 생성 억제 효과

치자 추출물 및 분리된 화합물들의 지질과산화물 생성 억제 효과를 실험하였다. 지질과산화물은 여러 산화반응에 의해 지질이 과산화 되어 생성되는 물질로, 각종 반응성이 큰 활성산소와 자유 라디칼(free radical) 등이 불포화 지방산이 다량 함유된 세포막의 인지질을 산화시켜 세포막에 지질과산화물이 생성된다. 세포막에 지질과산화물이 축적되면 세포막의 유동성과 기능성이 저하되어 세포기능이 저해되고 세포구조가 변화되는 등 조직상에 국소적인 장애가 생긴다. 895-15 추출물 및 분리된 화합물들의 지질과산화물 생성 억제 효과를 다음과 같이 측정하였다.

AAPH, [2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride]에 의한 linoleic acid의 산화작용을 억제시키는 효능을 평가하기 위해 손 등의 Ferric thiocyanate assay를 수정하여 실시하였다.<sup>43)</sup> 즉, 3 mg/ml linoleic acid, 15 mg/ml Tween-20, 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충용액(pH7.0), 1.7 mM AAPH를 혼합하여 만든 용액에 에탄올에 희석한 시료용액을 최종부피가 300  $\mu$ l 되도록 혼합하여 37°C에서 150분간 반응시켰다(반응용액 중 각 시료의 최종농도는 3.125  $\mu$ g/ml이다). 상기 반응용액 0.1 ml와 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml,  $2 \times 10^{-2}$  M FeCl<sub>2</sub> 0.1 ml를 혼합하여 3분 후에 microplate reader로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 895-15 추출물과 분리한 각 화합물의 지질과산화물 생성 억제율(A, %)을 아래의 공식으로 구하고 그 결과를 표 20에 나타내었으며, 기존 소거제인 아스코르빈산(비타민 C), 알파-토코페롤(비타민 E), 레스베라트롤 및 트롤록스의 효과와 비교하였고, 제시되는 값은 3회 평균값이다.

$$A (\%) = \text{시험물질 시료의 반응흡광도} / \text{대조군의 반응흡광도} \times 100$$

표 20에서 보이는 바와 같이, 895-15 메탄올 추출물과 메탄올 추출물로부터 분획한 에틸 아세테이트 분획에서 높은 활성을 보여주고 있으며, 부탄올 분획에서 유의성이 있는 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 또한, 에틸 아세테이트로부터 분리한 화합물 대부분에서 높은 활성을 보여주고 있는데 이는 항산화제로 잘 알려진 여러 화합물과 유사한 효과를 보이고 있음을 알 수 있었다. 따라서 치자 추출물 및 분리된 화합물들은 대조물질과 비교할 만한 지질과산화물 저해활성을 나타내었다.

표 20. 차자 추출물 및 분리된 화합물들의 지질과산화물 생성 억제 효능

시험물질	지질과산화물 생성 억제율 (%)
메탄올 추출물	23.5
디클로로메탄 분획	1.6
에틸 아세테이트 분획	49.9
부탄올 분획	31.1
물 분획	3.7
화합물 1(KYS 50220)	56.0
화합물 2(KYS 50242)	52.0
화합물 3(KYS 50244)	54.9
화합물 4(KYS 50241)	54.7
화합물 5(KYS 50245)	53.8
화합물 6(KYS 50214)	38.4
화합물 7(KYS 50243)	51.1
화합물 8(KYS 50034)	54.2
화합물 9(KYS 50022)	49.9
화합물 10(KYS 50192)	51.5
화합물 11(KYS 50223)	51.7
화합물 12(KYS 50239)	4.8
화합물 13(KYS 50238)	2.0
화합물 14(KYS 50211)	54.1
화합물 15(KYS 50246)	38.1
아스코르빈산(비타민 C)	44.1
$\alpha$ -토코페롤(비타민 E)	61.2
레스베라트롤(resveratrol)	39.1
트롤록스(Trolox)	61.6

## 제 4 절 후보물질의 효능 및 안전성 검색(공동연구과제)

### 1. 알로에신(Aloesin)의 안전성 평가(일반약리 및 독성 시험)

#### 가. 마우스와 랫드를 이용한 독성시험

알로에신의 안전성 평가를 위해 마우스와 랫드를 이용한 급성 및 반복투여 독성 시험을 실시하였다. 급성독성시험에서 단회 정맥 투여하였을 때(100, 300, 1000 mg/kg) 저용량 군 및 최고용량인 1000 mg/kg을 투여한 군에서도 사망 동물이 발생하지 않았고, 시험물질 투여와 관련한 임상적 이상소견들이 관찰되지 않았다. 또한 대조군과의 유의성 있는 체중 변화, 사료 섭취량, 물 섭취량의 차이는 나타나지 않았다. 따라서 알로에신의 무독성량은 정맥주사 시 적어도 1000 mg/kg 이상으로 판단되었다. 아급성 독성시험에서는 랫드를 이용한 dose range finding study(DRF)를 수행하였다. 7일 DRF 시험에서는 250, 500, 1,000 mg/kg을 단회, 정맥투여로 7일 동안 male 5마리와 female 5마리에 투여하였고, 아무런 이상증세가 관찰되지 않았다. 본 시험에서도 시험물질 투여와 관련한 사망이나 임상적 이상소견들이 관찰되지 않아 알로에신이 매우 안전한 물질임을 알 수 있었다.

#### 나. 염색체 이상 유발성 확인을 위한 유전독성 시험의 수행

Aloesin의 히스티딘 요구성 살모넬라 균(TA98, TA100, TA1535, TA1537)과 트립토판 요구성 대장균(WP2 uvrA)에 대한 복귀 돌연변이 유발성 여부를 대사활성계 비적용 및 적용 시 조사하였다. 시험물질의 적용 가능 최고 농도인 500 µg/plate를 최고 농도로 하고, 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6 µg/plate의 6 농도의 시험물질군과 음성 및 양성 대조군에 대해 시험을 실시하였다. Aloesin의 복귀 돌연변이 시험 결과 대사 활성계 적용 여부에 관계없이 5개 시험 균주 모두에서 음성 대조군에 대한 시험물질 처리군의 복귀돌연변이 집락수의 유의적인 증가는 관찰되지 않았다. 이상의 시험결과, aloesin은 본 시험 조건하의 히스티딘 요구성 균주인 salmonela typhimurim TA98, TA100, TA1535, TA1537의 4개 균주와 트립토판 요구성 균주인 E. coli WP2 uvrA 시험 균주에 대해 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

#### 다. 일반약리 시험

일반약리 시험은 약물이 사람에게 목적으로 하는 약리 작용이외의 다른 약리 작용(즉, 부작용)을 나타내는 지 여부를 알아보기 위한 시험으로 임상에 진입하기 전에 꼭 실행해야 하는 시험이다. 특히 약물이 생체에 적용되었을 때 실시간으로 중요 장기(심장, 호흡, 뇌)의 기능에 어떠한 영향을 미치는지를 알 수 있기 때문에 독성시험과는 별도로 필히 진행해야 하는 시험이다.

(1) 마우스에서의 일반행동 및 중추신경계에 미치는 영향 시험

Irwin의 다차원관찰법을 기준으로 한다.<sup>44)</sup> 마우스(ICR male mouse, 20-25 g)에 약물(10 mg/kg 과 300mg/kg)을 투여한 후, 5분, 30분, 1시간 후에 Irwin 관찰법에 준하여 일반 행동에 미치는 영향, 중추신경계에 미치는 영향(정향반사, 동공반사, 운동성, 자율신경계 이상, 경련유무, 진통, 체온 등) 및 임상증상을 관찰하고 점수를 기록하였다.

각 시간별로 알로에신 투여 마우스와 정상 마우스에서 Irwin 관찰법에 따른 행동 차이를 볼 수 없었으므로 알로에신은 일반행동이나 신경계에는 영향이 없음을 알 수 있었다. 그와는 반대로 대조약물로 사용한 중추신경 억제제인 클로로프로마진은 대부분의 일반행동 파라미터에 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다.

(2) Aloesin의 랫드 호흡기계에서의 부작용 여부를 검색

웅성 SD 랫드에 urethane(1.25g/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 호흡수 측정기(RM-95, Columbus Instruments)에 넣고, 매 2분 간격으로 약물 투입전의 호흡량, 호흡수(rate/min)를 측정하였다. 랫드의 호흡이 안정화된 후에 aloesin 10, 100, 500 mg/kg를 복강으로 단회 투여하고 1시간동안 2분 간격으로 호흡수, 호흡량에 미치는 영향을 관찰하였다. 알로에신은 각 용량에서 각 시간별로 호흡수와 호흡량에 아무런 영향을 미치지 않았다.

(3) 심장순환계에 미치는 영향

체중 350-450 g인 SD계 랫드를 urethane(1.25g/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 대퇴 동맥과 대퇴 정맥, 경동맥에 각각 cannula를 삽입하고 대퇴 동맥에 삽입한 catheter와 경동맥에 연결한 catheter를 pressure transducer 및 physiograph (Cardiomax II, Columbus Instrumnets, USA)에 연결해 혈압 및 심박수, 심박출량을 측정한다. 약 1 시간 동안 혈압이 안정된 것을 확인한 후 정맥내로 1분 동안 약물을 투여하고, 매 3분 간격으로 2시간 동안 혈압, 심박동수, 심박출량 등을 측정하였다. 알로에신은 투여용량에서(3 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg) 유의할만한 심장순환계 기능 이상을 나타내지 않았다.

(4) 소화기계에 미치는 영향

위장관 운동에 미치는 약물의 영향을 조사하기 위한 시험이다. 마우스에 charcoal을 경구투여한 후 일정시간 내에 소장 내 이동거리를 측정하여 장관 내 수송능의 지표로 사용한다. 마우스에 약물을 정맥투여(3, 10, 300 mg/kg)하고, 15분 후에 마우스에 차콜(5% charcoal, 0.5% CMC)을 경구투여한 후 30 분 후에 마우스를 치사시키고 즉시 유문부에서 맹장 직전까지 적출한 후 charcoal meal의 소장 내 차콜의 이동거리(위유문에서부터 맹장직전)를 측정하여 이를 전체 소장길이에 대한 백분율(%)로 환산하여 나타낸다. 알로에신은 각 용량에서 위장관운동에 아무런 영

향이 없었다.

(5) 운동신경계에 미치는 영향

일명 rota-rod test라고도 하며 돌아가는 회전봉 위에서 마우스가 일정시간 동안 떨어지지 않고 균형을 유지하는 것을 관찰하는 것이며 균형감각 및 근력평가를 위한 시험이다. 중추신경 억제제의 경우 마우스가 균형을 잡지 못하고 떨어지는 것을 관찰할 수 있다.

시험에 사용하는 마우스는 시험전날 미리 5분간 테스트하여 떨어지지 않는 마우스로만 선별한다. 시험 바로 직전에 다시 한번 테스트한 후 3분 동안 떨어지지 않는 마우스로 시험하였다. 약물투여 후 5분, 30분, 1시간, 3시간 뒤에 돌아가는 회전봉 위에서 2분 동안 유지시켰을 때 균형을 잡지 못하고 떨어지는 마우스는 운동신경계에 이상이 생긴 것으로 보고 떨어지는 마우스의 수를 측정한다. 알로에신 투여군(10, 50, 300 mg/kg, iv)의 경우, 모든 용량에서 떨어지는 마우스는 없었으나 대조약물군(클로로프로마진, 3 mg/kg, iv)은 10마리 모두 떨어지는 것을 관찰하였다.

(6) 체온에 미치는 영향

체온조절 중추에 대한 영향을 시험하기 위하여 약물투여 후 랫드의 체온 변화를 측정하였다. 실험 전에 직장체온계(Thermalert TH-5, Physitemp, USA)를 이용하여 랫드의 체온을 30 분 간격으로 2-3 회 측정하여 체온이 거의 일정하게 안정화된 랫드를 선택하여 약물을 투여하고, 약물 투여 후에 직장 체온(°C)을 측정하여 대조군과 비교한다. 알로에신 10 및 50 mg/kg(i.v.)을 투여 후 체온을 5분, 10분, 15분, 30 분, 1시간에 측정하였으나 유의할만한 체온변화를 관찰할 수 없었다. 따라서 체온을 저하시킴으로써 뇌손상 보호효과를 나타낸 것은 아닌 것으로 사료된다.

(7) 통각에 미치는 영향

생체의 방어 반응에 해당되는 통증에 대한 효과를 확인하는 시험으로서 초산을 복강주사하여 통증을 일으킨 다음에 통증에 따른 도피 반응(writhing)회수를 증가시키는 지 감소시키는 지 정도를 측정하였다. 마우스에 약물을 투여하고, 약물 투여 15분 후에 0.6% acetic acid 용액을 0.1 ml/10g 용량으로 마우스에 복강 내 주사한 후, 아크릴로 만든 투명한 관찰상자에 마우스를 넣고 acetic acid 용액 투여 10분 후부터 10분간 마우스의 writhing syndrome 횟수를 측정하여 대조군과 비교하였다.<sup>45)</sup> 도피 반응(writhing)을 시작하는 시간(onset time) 및 도피 반응 회수를 측정한 결과 300 mg/kg(i.v.) 투여군에서 유의성 있는 진통 효과를 관찰하였다.

(8) 혈액응고에 대한 영향

사람의 혈액응고 시간에 변화를 주는 지 확인하기 위하여 혈액응고 파라미터인 APTT(activated partial thrombin time), PT(prothrombin time)의 변화를 측정하였



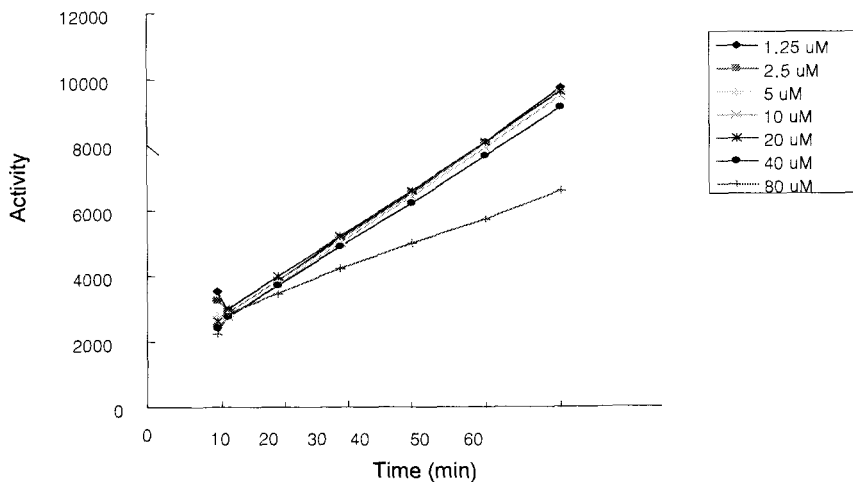
다. 약물 처치(1, 5, 10, 50, 100, 500  $\mu\text{M}$ )후 사람의 혈액에서 APTT, PT의 변화를 측정 한 결과 대조군과 비교 시 유의성 있는 차이가 없었다.

## 2. 알로에신의 약리 연구

### 가. 뇌신경보호 효능 연구 및 평가

(1) 세포자멸(apoptosis) 기전에서 중요한 역할을 하는 caspase 억제 효과를 검증하기 위하여 caspase 1, caspase 3, caspase 9 효소를 분리 정제하여 aloesin의 효소활성 억제 효과를 확인하였다. 알로에신은 caspase 3의 활성만 억제하였으며, caspase 1과 9의 활성에는 아무 영향이 없었다. Ki 값은 30  $\mu\text{M}$  정도로 아주 뛰어나지는 않지만 효소활성 직접 억제효과가 있음을 확인하였다.

### Aloesin slightly inhibits caspase-3 activity



(2) 뇌신경세포 손상 억제 효과를 *in vitro*에서 확인하기 위하여 배양한 랫드의 해마 세포(hippocampal cell)나 대뇌피질 세포(cortical cell)에서 세포사 저해력을 검색하였고, 랫드의 뇌신경세포 배양은 다음과 같이 실험하였다. 랫드의 뇌조직 중 해마와 피질부위는 임신한지 17일된 SD 랫드 태아의 뇌로부터 현미경하에서 적출하였다. 적출한 해마와 대뇌피질은 각각의 세포로부터 분리되도록 피펫으로 잘게 분쇄한 후, 분쇄물을 원심분리하여 얻은 세포만을 폴리라이신(poly-L-lysine)이 코팅된 96 웰 플레이트의 각 웰당 해마세포는  $2.5 \times 10^4$  세포, 피질세포는  $5 \times 10^4$  세포가 되도록 각각 첨가하였다. 각 웰에 B-27 보충영양액(Life technologies) 2%, 글루타메이트 25 M, 글루타민 0.5 mM이 포함된 뉴로배이살(Life technologies) 배양액

200  $\mu$ l를 첨가한 후 37°C에서 배양시켰다. 72시간 후 클루타메이트가 결여된 혼합 배양액으로 다시 교환한 후 계속 배양하였다. 신경세포 독성실험은 7 내지 10일 후에 실시하였다.

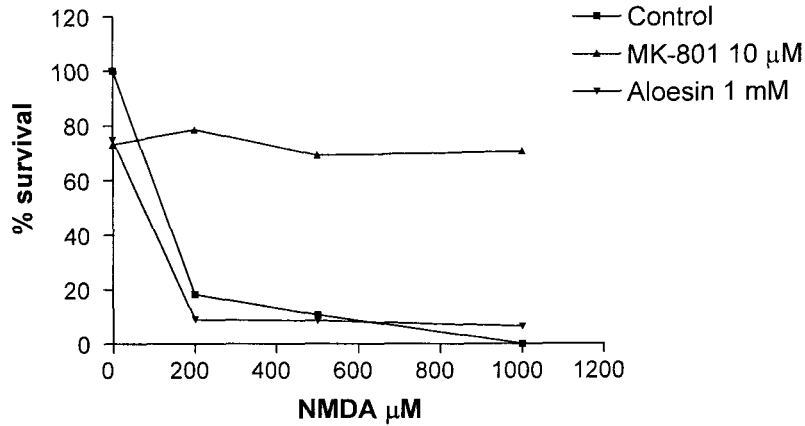
NMDA로 인한 신경세포 독성에 대한 신경보호 실험은 200  $\mu$ M의 NMDA를 배양된 해마세포에 2시간 동안 처리하여 신경세포 손상을 유발하였다. 시험물질은 주어진 농도로 NMDA와 같이 처리한 후 제거하지 않고 실험 기간(2시간) 내내 존존하도록 하였다. NMDA 처리 후 24시간 뒤에 LDH 측정용 키트(Boehringer Mannheim)를 사용하여 배양액으로 유리된 LDH 양을 측정하였다.

성장인자 제거로 인한 신경세포 독성에 대한 신경보호 실험은 배양한 대뇌피질 세포를 DMEM 배양액에 B27 보충 영양액을 2% 첨가한 배양액을 사용하여 배양하다가 B-27을 제거한 DMEM만으로 교환하여 영양부족으로 인한 세포사멸을 유도하였다. 24시간 후에 세포괴사에 의해 유리된 LDH를 LDH 측정용 키트(Boehringer Mannheim)로 측정하여 세포사멸 정도를 정량하였다.

위와 같이 흥분성 독소인 NMDA 처리로 rat hippocampal cell의 사멸을 유도하는 방법과 growth factor 제거 후 rat cortical cell의 사멸을 유도하는 두가지 방법을 이용하여, aloesin 처리군과 비처리군에서의 세포사멸 정도를 비교하였다. 세포사멸 정도는 세포사멸 후 배양액 중으로 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 측정하는 방법을 사용하였다.

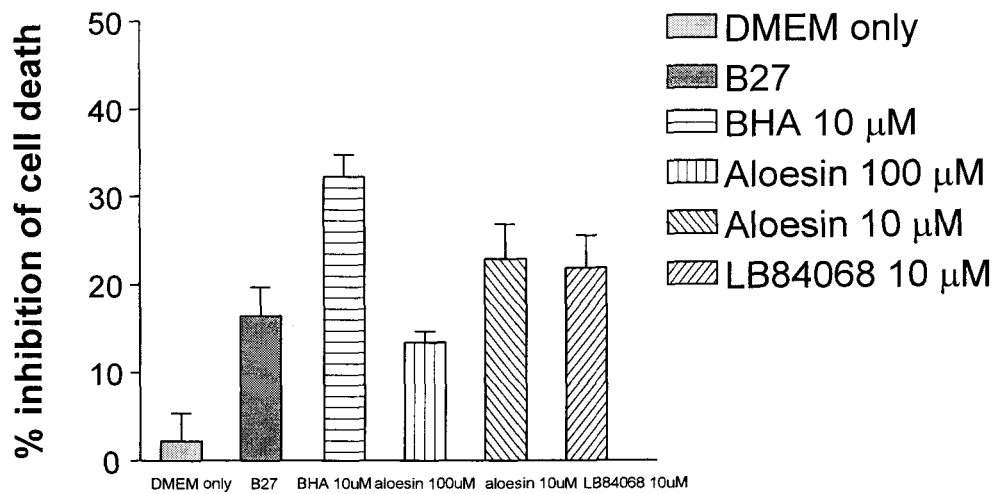
Aloesin 10  $\mu$ M과 100  $\mu$ M을 처리하였을 때 NMDA로 유도한 세포사멸에는 아무런 효과가 없었지만, growth factor 제거로 인한 세포사멸을 저해(10-30%)하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 알로에신은 강력하지는 않지만 여러 메카니즘(caspase 3의 직접저해, 항산화작용)으로 apoptosis로 인한 뇌신경세포 사멸을 방지하는 효과를 보이는 것으로 사료된다.

## Aloesin did not protect cells from NMDA-induced cell death



\*Embryonic Rat Hippocampal culture

## Neuroprotective effect of aloesin on growth factor withdrawal-induced neuronal cell death



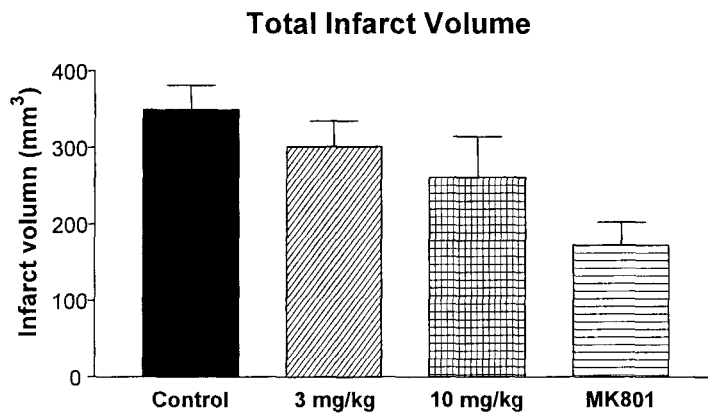
\*Embryonic rat cortical cell culture

하지만 면역세포로부터 유래된 Jurkat 세포에 Fas를 처리하여 세포에서 인위적으로 apoptosis를 일으킨 다음에 알로에신을 처리하였을 때에는 알로에신 10  $\mu\text{M}$  및 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM에서도 세포사멸 억제 효과가 없었음을 관찰하였다. 이런 것으로 보아 알로에신은 세포사멸을 강하게 직접 유도하는 모델에서는 효과가 없음을 알 수 있으며 알로에신의 정확한 약리 메카니즘은 좀 더 연구가 필요한 것으로 사료된다.

### (3) 뇌졸중 동물 모델에서의 약효 재확인

알로에신의 뇌신경 보호효과 재검증 및 약효의 국제적인 인정을 얻기 위해 스위스 소재인 MDS팬랩(Panlab)에 약효 검증을 의뢰하였다. KIST의 동물모델과 유사한 국소 허혈성 뇌손상 백서 모델을 이용하였으며, 알로에신은 3 mg/kg, 10 mg/kg 용량으로 뇌허혈 유도 후 30분, 2시간, 4시간 후에 정맥 주사하였다. 알로에신은 10 mg/kg 용량에서 선조체 부위의 뇌손상에 보호 효과를 보였다. 이것으로 알로에신의 뇌허혈로 인한 뇌손상 보호효과는 재확인 되었다.

## 뇌손상 보호 효과 재 확인 시험 결과 (MDS panlab)



### 나. 알로에신이 면역계에 미치는 영향에 대한 약리 연구

알로에신은 허혈성 뇌손상 동물모델에서 뇌 부종을 경감시키는 효과가 있었다. 뇌부종은 염증 반응에 의해 생기는 현상이므로 부종경감의 약리 메커니즘을 밝히기 위한 시험을 수행하였다.

#### (1) 랫드의 족부종 모델(Rat paw edema model)에서의 알로에신의 효과

Rat paw edema model은 랫드의 뒷발에 carragenan(3%)을 이용하여 족 부종을 발생시킨 후 약물이 부종을 경감시키는 효과가 있는지를 보는 시험으로 주로 소염제의 약효를 볼 때 사용한다. carragenan을 랫드의 뒷발에 주사한후, 알로에신을 100, 400 mg/kg 으로 복강 주사하고 3시간 뒤에 부종생성 정도를 pleyththermometer를 이용하여 약물 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 알로에신 처리군과 vehicle 처리군과의 차이를 볼 수 없었다. 이에 비해 대조약물인 세레브렉스는 30% 정도 부종 억제 효과를 나타내었다.

## (2) 알로에신의 T 세포 증식에 미치는 영향

사람 혈액을 이용한 혼합 임파구반응(mixed lymphocyte reaction: MLR)에서 효능을 검색하였다.

MLR은 이종(異種) 사람의 혈액에서 임파구를 분리하여 혼합하였을 때 서로의 주요 조직학적 적합성 구조(MHC)가 맞지 않아 거기에 반응하여 면역세포인 T 세포가 증식하게 되는 반응이다. 알로에신의 효과를 보기 위하여 알로에신 처리군과 비처리군으로 나누어 임파구 배양을 실시하고 3일 후에 트리톱을 처리하여 48 시간 후에 임파구의 증식정도를 radioactivity의 변화로 측정하였다. 대조군에서 면역세포의 증가가 관찰되었으나 알로에신 처리군(1 nM~ 1 mM)과 대조군이 차이가 없었다. 따라서 알로에신은 면역억제 기능은 없는 것으로 사료된다.

## (3) 급성 간 손상 동물 모델에서의 알로에신 효과 검색

Lipopolysaccharide(LPS)와 galactosamine을 투여한 후 증가된 cytokine을 이용하여 급성간염을 일으키는 모델과 acetaminophen 유래 간손상 모델에서 알로에신의 효과를 시험하였다. 알로에신 100, 300 mg/kg를 rat에 LPS(1mg)나 acetaminophen(500 mg) 투여 전에 복강 내로 투여하고 6시간 후에 한번 더 투여한 다음 24시간 후에 mortality와 간손상 지표 물질인 AST, ALT level을 측정하였다. 알로에신 투여군과 대조군에서 차이가 없는 것으로 보아 간손상 보호 효과가 없음을 확인하였다.

이상과 같은 독성, 부작용과 약효 평가 실험에서 알로에신은 유효약효용량 대비 독성용량비인 therapeutic window가 100 이상인 매우 안전한 물질로 보이며, 약효 면에서도 *in vitro*와 *in vivo*에서 apoptosis로 인한 뇌세포 손상이나 뇌조직 손상에 대해 보호효과가 있음을 알 수 있었다. 하지만 이러한 약효가 치료제로서 세계적인 경쟁력이 있을 정도로 탁월한 지에 대해서는 아직 의문이 있고 경쟁력 확보를 위해 경쟁물질과의 더 많은 연구가 필요한 것으로 보인다. 그 외 소염작용이나 apoptosis로 인한 간손상보호를 기대하였으나 특별한 효과가 없었으며, 알로에신의 약리 기전에 대해서도 아직 모르는 부분이 많아 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다. 따라서 알로에신은 과량에서도 독성을 보이지 않는 안전성에서는 우수한 물질이나 허혈성 뇌졸중의 뇌손상 치료제로써 세계적인 경쟁력을 확보하기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다. 그러나 안전성과 약효를 두루 갖춘 물질로서 건강 보조제나 식품의약으로서의 경쟁력은 매우 우수하다고 볼 수 있을 것이다.

## 3. 대량의 알로에신 공급(약리 및 안전성 시험에 필요한 알로에신을 공급)

알로에 추출분(외국에서 구입)에서 약 100 g의 알로에신을 분리하여 약 80 g을 독성시험 및 약리시험에 사용하였다.

#### 4. 손바닥선인장 추출물에서 분리한 항산화성 물질들의 약효 및 안전성

##### 가. *In vitro* 뇌손상 보호효과 검색

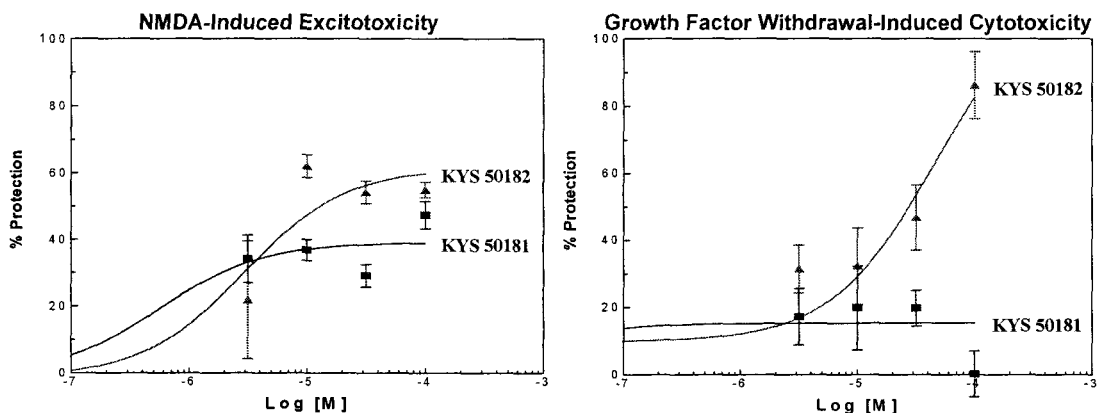
901-15F 및 901-15G로부터 분리된 단일물질의 항산화 효과를 여러 시험에서 측정한 결과, KYS 50181과 KYS 50182의 IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) 값들이 가장 우수하여 이 화합물들을 대상으로 우선 *in vitro* caspase activity에 대한 저해 효과와 신경세포 보호 효능을 검색하였고, 그 외 항산화능이 우수한 13개 compound의 신경세포 보호 효과도 검색하였다.

(1) Caspase-1, 3, 9의 저해효과(IC<sub>50</sub>, 각각 mM)를 측정한 결과, KYS 50181은 각각의 효소에 대하여 >4, 3.7, >4이었으며, KYS 50182는 각각 0.24, 0.6, 0.4로 KYS 50182가 약하지만 유의성 있게 caspase들의 활성을 저해하였다. 그 외 13개 compound 검색결과, caspase 저해능을 나타내는 compound들은 모두 수백  $\mu$ M대 (0.35 mM - 0.82 mM)의 IC<sub>50</sub>치를 나타내었다.

(2) 배양한 rat hippocampal cell에서 NMDA-induced excitotoxicity 억제효과를 검색한 결과, KYS 50181은 100  $\mu$ M에서 47%, 3  $\mu$ M에서 33%의 신경세포 보호효과를 나타내었으며, KYS 50182는 100  $\mu$ M에서 54%, 3  $\mu$ M에서 21%의 신경세포 보호효과를 나타내었다.

(3) 배양한 rat cortical cell에서 growth factor withdrawal-induced apoptosis 억제효과를 검색한 결과, KYS 50181은 3~100  $\mu$ M의 농도에서 보호효과가 없었으나, KYS 50182는 100  $\mu$ M에서 86%, 3  $\mu$ M에서 31%의 신경세포 보호효과를 보였다.

결론적으로, KYS 50182는 항산화 효능뿐만 아니라 NMDA-유도 cytotoxicity, growth factor withdrawal-induced apoptosis 조건에서 신경세포보호 효능이 우수하게 나타나 뇌신경보호용 식품의약 또는 뇌졸중 치료제로 개발될 가능성이 높을 것으로 사료되었다.



나. KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)의 안전성 검색

KYS 50182의 안전성 검색을 통하여 식품의약이나 뇌졸중 치료제로의 개발 가능성을 조사하기 위해 KIST로부터 공급받은 KYS 50182를 이용하여 male 및 female mouse 각 10마리에서 급성독성 시험을 진행하였다. 정맥주사시의 LD<sub>50</sub>값은 150 mg/kg 정도로 추정되며 유효 약효를 나타내는 용량에 비해 15배 정도의 safety margin이 있을 것으로 사료된다. Compound 자체의 물에 대한 solubility가 좋지 않아 더 높은 용량에서의 시험이 불가능하여 정확한 LD<sub>50</sub>값은 구하기 곤란하였다. 또한 급성독성시험 진행시 고용량의 compound를 사용해야하는 관계로 KYS 50182가 용해될 수 있는 vehicle을 연구하였다. KYS 50182는 다음과 같은 조성으로 사용하여 실험하였는데 40% HPCD(hydroxy propyl b-cyclodextrin)와 cosolvent를 9:1 비로 혼합하면 석출 및 침전이 생기지 않았다(참고: cosolvent = PEG:Ethanol;tween = 85:10:5). 이상과 같은 preliminary한 안전성 시험에서 KYS 50182는 알로에신에 비해서는 안전성이 떨어지는 것처럼 보이나 정맥투여에서 보다 경구투여에서는 더 높은 안전성이 확보될 수도 있으므로 경구투여에 필요한 실험 data를 제반 실험(pharmacokinetics, 제형)을 통해 확보한 후에 안전성 시험을 다시 시도하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

## 제 5 절 연구결과 및 고찰

알로에신은 3-30 mg/kg(i.v.) 용량범위에서 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에 있어 유의한 신경보호 효과를 나타내었으며, 특히 영구적 허혈성 뇌손상 백서모델에서도, 비록 독성으로 인하여 개발이 중단되었지만 이제까지 가장 효능이 우수한 뇌졸중치료제 후보물질로 잘 알려진 MK-801보다, 알로에신은 신경보호 효능이 더욱 우수하게 나타났다. 또한 알로에신은 *in vivo*에서 조사된 apoptotic cell death의 여러 분자생물학적 현상을 뚜렷이 억제하는 것으로 나타났다. 더욱, 알로에신은 일반행동, 중추신경계, 심장순환계, 호흡기계, 소화기계, 운동신경계, 면역계, 체온에 미치는 영향 등을 관찰한 일반약리 시험 및 급성, 아급성, 유전독성 시험 결과에서 매우 안전한 화합물임이 밝혀졌으므로 후속연구로 다른 약물과의 병용투여 가능성, 전임상 및 임상연구가 계속하여 진행된다면 새로운 뇌졸중 치료제로 개발될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

한편 알로에, 손바닥선인장 및 치자의 3종의 식물을 대상으로 activity-guided fractionation 및 크로마토그래피를 실시하여 총 31종의 화합물을 순수하게 분리하였다.

널리 식용하고 있는 식물인 알로에로부터는 5종의 aloesin 유도체를 분리하여 활성을 검색하였고, 활성을 증가시키기 위하여 5종의 aloesin 유도체를 합성하여 항산화 활성을 검색하였다.

손바닥선인장에서는 8종의 flavonoid 계열 화합물과 2종의 terpen 계열의 화합물을 분리하여 구조를 동정하였으며, 6종의 화합물은 이 식물에서 처음으로 분리 보고하는 물질임을 알았다.

한방에서 쓰이고 있는 생약 치자의 추출물로부터 8종의 퀴닉산 유도체와 2종의 flavonoid 계열 화합물, 2종의 iridoid 화합물, 1종의 글루코즈 유도체 및 caffeic acid와 sinapic acid를 분리하여 구조를 규명하였다. 이 화합물 중에서 6종의 quinic acid 유도체(화합물 1-6)는 자연계에서 처음으로 분리하여 보고하였으며, 역시 quinic acid유도체인 chlorogenic acid ethyl ester(KYS50243)는 이 식물로부터 처음 분리 보고한 화합물이다.

이상의 총 35종의 분리·합성된 활성성분들에 대하여 상기에서 기술한 방법을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능, 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능, 잔틴/잔틴 옥시다제-유발 신경독성 억제효과, 과산화수소 유발 신경독성 억제효과, NMDA 활성화에 의한 신경독성 억제효과, 성장인자 제거로 인한 세포사멸에 대한 신경독성 억제효과를 각각 측정하였다. 그 결과, 분리된 화합물 대부분은 높은 항산화활성을 나타내내고 있음을 알 수 있었다.

특히 알로에엑스의 중간체인 알로인에서 분리된 화합물 1-5중에서 화합물 5의 7-O-methylaloesin A가 DPPH 라디칼 소거능력이 우수하였으며, 화합물 2인 aloesin의 DPPH 라디칼 소거능은 대조약물로 사용한 vitamin E보다 우수하게 나타나고 있음을 알았다. 화합물 4(aloesin E)는 잔틴/잔틴 옥시다제에 의해 생성되는



슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능이 대조약물인 allopurinol보다 우수하였다. 그러나 합성 화합물의 항산화 효과는 분리된 화합물의 경우보다 상당히 우수하게 나타나고 있는데, 화합물 7(8-C-Glucosyl-7-O-methylaloesin)은 DPPH 라디칼 소거능 ( $ED_{50}=77 \mu M$ )도 항산화제로 잘 알려진 vitamin C와 유사한 효과를 보이고, 잔틴/잔틴 옥시다제에 의한 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능( $ED_{50}=251 \mu M$ )도 비교적 우수하게 나타나고 있다. 또한,  $300 \mu g/ml$ 에서의 잔틴/잔틴 옥시다제에 의하여 유발된 독성 억제력( $IC_{50}=97 \mu M$ ) 및 과산화수소에 의하여 유발된 억제력( $IC_{50}=19 \mu M$ )은 가장 효과가 우수한 것으로 나타났다.

선인장에서 분리된 화합물중에는 퀘르세틴, 디히드로퀘르세틴 및 퀘르세틴 3-메틸 에테르의 3종 화합물들은 DPPH 라디칼 소거능력이 우수하였으며, 디히드로퀘르세틴과 퀘르세틴 3-메틸 에테르는 잔틴/잔틴 옥시다제에 의해 생성되는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능이 우수하였다. 캄페롤, 퀘르세틴, 디히드로퀘르세틴 및 퀘르세틴 3-메틸 에테르의 4종 화합물들은 잔틴/잔틴 옥시다제에 의하여 유발된 신경세포의 손상뿐만 아니라 과산화수소에 의하여 유발된 신경세포의 손상을 가장 강력하게 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 디히드로퀘르세틴과 퀘르세틴 3-메틸 에테르는 NMDA 활성화에 의한 신경독성 억제효과가 우수하였으며, 특히 퀘르세틴 3-메틸 에테르는 성장인자 제거로 인해 초래되는 세포사멸에 의한 신경독성 억제효과 또한 우수하였다. 따라서, 캄페롤, 디히드로퀘르세틴, 퀘르세틴 3-메틸 에테르 또는 이들을 포함하는 손바닥선인장의 에틸 아세테이트 추출물은 우수한 항산화 작용, 뇌신경세포 보호작용 및 뇌허혈 동물모델에서 뚜렷한 신경세포 보호효과를 나타내므로 뇌신경질환과 심장허혈의 예방 및 치료에 유효하다는 사실을 확인하였다.

치사에서 분리된 화합물 중 6종의 신규 화합물들 또한 우수한 효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 잔틴/잔틴 옥시다제에 의해 생성되는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능은 KYS50243과 KYS50211의 두 화합물의 효능이 상당히 우수하게 나타나고 있고, 신규 화합물 역시 높은 항산화 활성을 보여 이들이 항산화 효과의 주 성분임을 입증하고 있다. AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride]에 의한 지질과산화물 생성 억제능은 iridoid 화합물을 제외한 phenolic 계열의 화합물에서 높은 항산화 작용을 나타내고 있다.

## 제 6 절 결론

- ☞ Aloesin은 일시적 및 특히 영구적 국소 허혈성 뇌손상에 대해 우수한 신경보호 효능 입증
- ☞ Aloesin은 안전성이 매우 우수한 뇌졸중 치료제 후보물질로 입증
- ☞ Aloesin은 apoptotic cell death를 억제하는 것으로 사료되며 신경보호 작용의 명확한 약리 기전을 더욱 규명해 나가는 것이 필요
- ☞ 3종의 자생식물로부터 항산화성 단일성분 분리/구조 규명(총 31종 도출)
  - ▶ 알로에 성분 Aloesin의 Back-up 물질 10종 도출 및 항산화/신경세포 보호 효능 검색
  - ▶ 치자로부터 Back-up 물질 11종 분리 및 항산화 효능 검색
  - ▶ 손바닥선인장으로부터 Back-up 물질 10종 도출 및 항산화/신경세포 보호 효능 검색



손바닥선인장에 포함된 Quercetin 3-methyl ether(KYS 50182)는

- 1) ROS 소거력
- 2) 산화적 손상에 대한 뇌신경세포 보호 효능
- 3) 허혈성 뇌손상 동물모델에서 신경보호 효능이 우수하므로

뇌졸중 치료제로의 개발 가능성이 매우 높음



손바닥선인장은 뇌신경보호용 식품의약으로의  
개발 가능성이 매우 높음

여 백

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 연도별 연구개발목표의 달성도

#### [1년차]

연차	연구목표 및 평가착안점	연구 결과	달성도 (%)
1년차	자생식물자원 확보 및 표준 엑스 제조 및 단일성분 분리, 구조 규명(5종내외)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 약리, 안전성 시험을 위하여 aloesin을 대량 분리하여 참여 기업에 제공(1,500 mg 이상)</li> <li>2. Aloesin의 후속대체물질 확보를 위해 aloesin과 유사한 구조의 단일물질 5종 도출</li> </ol>	100
	항산화 효능 검색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aloesin 및 분리 성분의 DPPH free radical 소거력 검색: KYS 50163(7-O-methylaloesin)이 가장 우수(<math>ED_{50} = 77 \mu M</math>)</li> <li>2. Xanthine(X)/xanthine oxidase(XO) 억제력 검색: KYS 50163이 가장 우수 (<math>ED_{50} = 251 \mu M</math>)</li> <li>3. Rat primary cortical cell을 사용한 X/XO 또는 <math>H_2O_2</math> 유발 산화성 세포독성 억제력 검색: KYS 50163의 뇌신경세포 보호효능이 가장 우수함(X/XO, <math>ED_{50} = 97 \mu M</math>; <math>H_2O_2</math>, <math>ED_{50} = 193 \mu M</math>).</li> <li>4. 이외, NO 발생 또는 nNOS 활성화 억제력 및 iron-dependent lipid peroxidation 억제력 검색 수행</li> <li>5. 결론적으로, KYS 50163이 aloesin의 후속물질로서의 가능성을 보임.</li> </ol>	100
	뇌신경보호 효능 검색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aloesin의 <i>in vivo</i> 투여에 의한 뇌조직 내로의 약물 투과성 검색: 정상 및 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에서의 단회 정맥투여(10 mg/kg) 후 경시적인 plasma와 뇌조직 농도를 측정하여 BBB 투과성을 조사한 결과 뇌조직 내로의 이행이 확인되었으며 특히 재판류시 뇌손상 조직으로의 이행이 정상조직보다 3배 이상 높게 나타남.</li> <li>2. Aloesin의 허혈성 뇌손상에 대한 <i>in vivo</i> 신경보호 효능 검색: 120분 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에서 1 mg/kg 정맥투여 용량에서는 신경보호 효과가 나타나지 않았으나 3 mg/kg를 투여한 결과, 10 mg/kg 용량과 비슷한 수준의 뚜렷한 조직학적 신경보호 효과 및 행동학적 회복 효과가 나타남.</li> </ol>	100
	안전성 검색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aloesin의 일반약리 시험 중에서 일반행동, 중추신경계, 심장순환계, 소화기계, 운동신경계, 체온에 미치는 영향평가 완료</li> <li>2. Aloesin의 단회 정맥투여 급성 독성시험 완료</li> <li>3. 일반약리 및 안전성 시험 결과, aloesin은 부작용 및 독성이 거의 없는 매우 안전한 약물로 평가됨.</li> </ol>	100

[2년차]

연차	연구목표 및 평가착안점	연구 결과	달성도 (%)
2년차	자생식물자원 확보 및 표준 엑스 제조 및 단일성분 분리, 구조 규명(5종내외)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aloesin 유사구조의 단일물질 KYS 50185(aloesin E)와 KYS 50186(7-O-methyl-aloesin A) 2종을 추가 분리함.</li> <li>2. Aloesin의 7-위치를 변형한 aloesin 유사체 3종(KYS 50187, KYS 50205, KYS 50206) 도출함.</li> <li>3. 후속 후보식물인 901-15(손바닥선인장)로부터 단일물질 10종(KYS 50034, KYS 50178 - 50184, KYS 50201, KYS 50208)을 분리하였음.</li> <li>4. 결론적으로 2차년도에서는 총 15종을 도출함.</li> </ol>	100
	신규 확보물질의 항산화 효능 검색	<p>자생식물 60여종의 매탄올 추출물에 대한 항산화 효능 평가 및 합다리나무 추출물의 항산화 효능 확인(위탁과제)</p> <p>Aloesin 유사체의 DPPH free radical 소거력 측정(IC<sub>50</sub>, μM): KYS 50185(91), 50186(&gt;464), 50187(60), 50205(110), 50206(114)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 손바닥선인장으로부터 분리된 성분들의 항산화 효능 검색 완료</li> <li>2. 그 중, <b>KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)</b>가 모든 항산화 검색시스템에서 강력한 효능을 나타냄. <ul style="list-style-type: none"> <li>- DPPH free radical 소거력, IC<sub>50</sub> = 19 μM</li> <li>- X/XO 활성 억제력, IC<sub>50</sub> = 139 μM</li> <li>- Iron-dependent lipid peroxidation 억제력, IC<sub>50</sub> = 2.4 μM</li> <li>- LPS/IFN-γ에 의해 유발된 NO 발생 억제력, IC<sub>50</sub> = 10.3 μM</li> </ul> </li> </ol>	100
	후속물질의 <i>in vitro</i> 뇌신경보호 효능 검색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. KYS 50181과 50182를 대상으로 primary rat cortical cell의 oxidative cytotoxicity 억제력 측정(IC<sub>50</sub>, μM)한 결과에서도 KYS 50182의 뇌신경세포보호 효능이 가장 우수하였음. <ul style="list-style-type: none"> <li>- X/XO 유발독성 억제력, IC<sub>50</sub> = 2.1 μM</li> <li>- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유발독성 억제력, IC<sub>50</sub> = 1.9 μM</li> <li>- NMDA-induced excitotoxicity 억제력: 100 μM에서 54%, 3 μM에서 21%의 신경세포 보호효과 보임.</li> <li>- Growth factor withdrawal-induced apoptosis 억제력: 100 μM에서 86%, 3 μM에서 31%의 신경세포 보호효과 보임.</li> </ul> </li> <li>2. 결론적으로, <b>KYS 50182</b>는 뇌신경세포보호 효과 또한 매우 우수하므로 다양한 작용효과를 보유한 후속대체물질로 선정함.</li> </ol>	100
	국소 허혈성 뇌손상 백서모델에서의 <i>in vivo</i> 신경보호 효능 검색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 120분 일시적 국소 허혈성 뇌손상에 대한 경시적인 aloesin(10 mg/kg, i.v.)의 단회 투여 시의 신경보호 효능 검색: <b>Therapeutic time window</b>는 2시간 이내로 예측됨</li> <li>2. Aloesin(10 mg/kg, i.v.)의 반복 투여 시의 <i>in vivo</i> apoptosis 억제력 검색: DNA fragmentation, caspase-3 활성화 및 cleaved PARP 생성이 허혈 유발 후 24 시간에서 감소됨으로써 <b>apoptosis</b>가 억제되는 것으로 사료됨.</li> </ol> <p>영구적 국소 허혈성 뇌손상 백서 모델에서 허혈 유발 후 시간에 따른 aloesin(10 mg/kg, i.v.)의 단회 또는 반복 투여 시의 뇌손상 보호 효능 검색: <b>Therapeutic time window</b>는 4시간 이내로 예측되며, <b>MK-801</b> 및 일시적 뇌허혈 모델에서보다 더 우수한 신경보호 효능을 관찰할 수 있었음.</p>	100
	안전성 검색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aloe 추출분에서 약 100 g의 aloesin을 분리하여 약리 및 안전성 시험에 원활히 공급하여 사용함.</li> <li>2. Aloesin은 면역계 및 호흡기계에 영향을 미치지 않았고 유전독성 및 아급성 독성 시험결과 별다른 이상을 나타내지 않음으로써 매우 안전한 약물로 평가됨.</li> </ol>	100

[3년차]

연차	연구목표 및 평가착안점	연구 결과	달성도 (%)	
3년차	자생식물자원 확보 및 표준 엑스 제조 및 단일성분 분리, 구조 규명(5종내외)	1. 또 다른 후속식물 895-15(치자)의 항산화 효능이 있는 EtOAc 분획 으로부터 총 11개의 단일물질들을 분리하여 구조를 규명 2. 그 중, KYS 50214, 50220, 50241, 50242, 50244, 50245는 자연계에 서 처음으로 분리되었음.	100	
	신규 확보물질의 항산화 효능 검색	자생식물 60여종의 메탄올 추출물에 대한 iNOS 억제 효능 평가 및 육박나무 추출물의 효능 확인 및 작용기전 규명(위탁과제) 신규 도출된 11종 화합물에 대하여 DPPH radical 소거력, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical 소거력 및 lipid peroxidation 억제력 검색을 통한 항산화 효능 검색 완료하였으며 대부분의 화합물은 강력한 항산화 효능을 보임.	100	
	후속물질의 <i>in vitro</i> 뇌신경보호 효능 검색	KYS 50182 계열 13종 화합물의 caspase 1, 3, 8, 9 활성 저해력 검색: 대부분의 화합물들이 caspase 3, 8, 9의 활성을 모두 저해하는 것으로 나타났으며 IC <sub>50</sub> 값은 수백 µM대(0.35 mM - 0.82 mM)에 해당함. 배양한 rat hippocamal과 cortical 신경세포에서 NMDA-induced excitotoxicity 및 growth factor withdrawal-induced apoptosis 억제력 검색: KYS 50182에 이어 50130과 50179가 우수한 효과를 나타내었으며 특히 50130의 경우 IC <sub>50</sub> 값이 0.3 µM 정도로 매우 우수한 보호효과를 나타냄.	100	
	국소 허혈성 뇌손상 백서모델에서의 <i>in vivo</i> 신경보호 효능 검색	KYS 50163(10 mg/kg, i.v.)의 일시적 허혈 유발 후 30분에 단회 투여 시의 신경보호 효능 검색: 약 35% 수준의 유의성 있는 뇌경색 감소를 나타냄으로서 조직학적 신경보호 효과를 나타냄.	Aloesin의 <i>in vivo</i> apoptosis 억제력 검색: 일시적 허혈성 뇌손상 백서모델에 허혈 유발 후 aloesin(10 mg/kg, i.v.)의 3회 반복 투여 시 선조체 및 대뇌피질에서 허혈 유발 후 24시간에서 나타나는 bcl-2 감소, bax의 translocation, m-calpain의 활성화, AIF의 translocation 모두가 aloesin에 의해 억제되는 것을 확인함. KYS 50182(10 mg/kg, i.v.)의 일시적 허혈 유발 후 30분에 단회 투여 시의 신경보호 효능 검색: 약 50% 수준의 유의성 있는 뇌경색 감소를 나타냄으로서 뚜렷한 조직학적 및 행동학적 신경보호 효과를 나타냄. 이는 복강 내 투여 시의 효능과 유사한 수준임. Aloesin과 KYS 50182(10 mg/kg, i.v.)의 일시적 허혈 유발 후 30분에 단회 병용투여 시의 신경보호 효능 검색: 약 60% 수준의 유의성 있는 뇌경색 감소를 나타냄으로서 우수한 조직학적 및 행동학적 신경보호 효과를 나타냄. 대조약물 ebselen(10, 30 mg/kg, i.v.) 및 edaravone(3 mg/kg, i.v.)의 신경보호 효능 비교 검색 완료 이와 같은 연구결과, KYS 50182는 뇌졸중 동물모델에서도 뚜렷한 뇌손상 보호 효능을 가지는 것이 입증되었으므로 이 화합물이 포함된 손바닥선인장의 추출물은 신경보호 및 뇌졸중 증상 완화용 식품의약 개발을 위한 후보식물로 선정하고자 함.	100
안전성 검색	KYS 50182의 용매조정 확보 및 정맥투여 시의 급성독성 실험 결과 LD <sub>50</sub> 는 150 mg/kg 이상으로, 유효 약효용량이 10 mg/kg 정도이므로 적어도 15배정도의 safety margin을 가짐.	100		

## 제 2절 관련 분야의 기술발전예의 기여도

본 과제에서 도출된 천연물 성분들의 뇌손상 신경보호용 식품의약 개발 연구를 통하여 항산화 효능, 뇌신경세포 보호 효능, 동물모델에서의 효능검색 등 다양한 활성검색체계가 체계적으로 갖추어지게 되었으므로 향후 천연물을 이용한 뇌손상 신경보호제 식품의약 개발뿐만 아니라 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머병, 파킨슨씨병 등 관련 뇌손상 질환의 치료제 개발분야에도 많은 기여를 할 수 있을 것으로 보인다.

또한, 본 과제를 통하여 국내 자생식물로부터 분리된 단일성분들은 다른 질환의 치료제 개발을 위한 활성검색 및 신약의 개발에 활용될 수 있으며, 다수의 화합물들이 자연계에서 처음으로 분리되어 보고될 예정이므로 화합물의 구조규명 등 천연물화학 분야에도 많은 기여를 할 것으로 보인다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

국소 허혈성 뇌졸중 질환동물모델 시험에서 aloesin의 뇌신경보호 효능과 더불어 안전성이 확인되었으므로, 향후 aloesin의 뇌신경보호 약리 작용기전의 규명 등의 추가 전임상 및 임상시험을 수행하여 뇌신경 보호제 혹은 뇌졸중 치료제로 활용하고자 한다.

후속물질인 KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)는 강력한 항산화 효과, 여러 *in vitro* 뇌신경세포체계에서 신경세포의 손상을 보호하는 효과를 나타내는 등 다양한 작용효과가 이미 밝혀졌으며, 국소 허혈성 뇌졸중 동물모델에서도 뇌신경보호 효과가 나타났으므로 이 화합물의 목표로 하는 1차적인 효능은 이미 입증되었다고 사료된다. 따라서 2단계 후속 연구에서는 KYS 50182의 생체이용률, 약동력학, BBB 이행률, 경구투여 시의 신경보호 효능 등을 조사하고, 이 화합물을 함유하고 있는 식물추출물의 규격화, 표준화, 적정 투여량 등을 연구하여 뇌졸중 치료제나 뇌신경세포 보호용 식품의약으로 활용하기 위한 연구를 수행하고자 한다.



여 백

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 지금까지는 허혈(ischemia)에 의해 다량의 글루타메이트(glutamate)와 같은 흥분성 신경전달물질이 유리되어 수용체 작용을 통해 과량의 칼슘이온이 세포내로 유입되어 흥분성독성 일으킴으로서 궁극적으로 뇌신경세포를 사멸시킨다는 glutamate cascade 가설이 제안된 이래 glutamate 수용체 길항약 특히 NMDA 수용체의 길항약 분야의 연구가 주종을 이루었으나, 최근에는 허혈 및 재관류 시 발생하는 활성산소들이 신경세포 손상 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 항산화제를 뇌졸중 치료를 위한 신경보호제로서 개발하려는 노력이 점차 증가되고 있는 추세임.
- 최근, 염증억제약물에 의해서 Alzheimer 병과 파킨슨씨병의 발병률이 감소한다는 보고가 있는 이후, 뇌 염증 반응을 매개하는 대표적인 세포인 마이크로글리아 세포(microglia cells)의 활성화를 억제하는 물질의 탐색을 통한 뇌졸중 치료제 개발 연구분야도 관심을 받고 있다.

여 백

## 제 7 장 참고문헌

1. Pulsinelli, W. *Sci. Am. Sci. Med.* **1995**, 2, 16-25.
2. 김종성, 최스미, 뇌졸중의 모든 것, 도서출판 정담, 서울, **1998**.
3. Choi, D. W. *J. Neurosci.* **1987**, 7, 369-379.
4. Hall, E. D. *Neuroscientist* **1997**, 3, 42-51.
5. Iadecola, C. *Trends in Pharmacol. Sci.* **1997**, 20, 132-9.
6. Bucan, A. M., Lesiuk, H., Barnes, K. A. Li, H., Smith, K. E., Xue, D. *Stroke* **1993**, 24 (suppl. 1), 1148-52.
7. Che, Q.-M., Akao, T., Hattori, M., Kobashi, K., Namba, T. *Chem Pharm. Bull.* **1991**, 39, 704-8.
8. Speranza, G., Dada, G., Lunazzi, L., Gramatica, P., Manitto, P. *Phytochemistry* **1986**, 25, 2219-22.
9. Speranza, G., Gramatica, P., Dada, G., Manitto, P. *Phytochemistry* **1985**, 24, 1571-3.
10. Conner, J. M., Gray, A. I., Reynolds, T., Waterman, P. G. *Phytochemistry* **1990**, 29, 941-4.
11. Rauwald, H.-W., Roth, K. *Arch. der Pharm.* **1984**, 317, 362.
12. Okamura, N., Hine, N., Harada, S., Fujioka, T., Mihashi, K., Yagi, A. *Phytochemistry* **1996**, 43, 495-8.
13. Blois, M. S. *Nature* **1958**, 181, 1199-1200.
14. Lim, K. T., Hu, C., Kitts, D. D. *Food Chemistry and Toxicology* **2001**, 39, 229-237.
15. McCord, J. M., Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 5753-6.
16. Reiter, R. J. *FASEB Journal* **1995**, 9, 526-533.
17. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. *Anal. Biochem.* **1982**, 126, 131-8.
18. Balligand, J. L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W. W., Pimental, D., Malinski, T. A., Kapturczak, M., Taha, Z., Lowenstein, C. J., Davidoff, A. J., Kelly, R. A. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27580-8.
19. Cho, J., Kong, J.-Y., Jeong, D.-Y., Lee, K. .D., Lee, D. U., Kang, B.-S. *Life Sci.*, **2001**, 68, 1567-1573.
20. Nagasawa, H., Kogure, K. *Stroke* **1989**, 20, 1037-43.
21. Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., Bartkowski, H. M. *Stroke* **1986**, 17, 1304-8.
22. Relton, J. K., Beckey, V. E., Hanson, We. L., Whalley, E. T. *Stroke* **1997**, 28, 1430-6.
23. Agrawal, P. K. *Carbon-13 NMR of flavonoids* **1989**, 152-153, Elsevier.
24. Markham, K. R. and Ternai, B. *Tetrahedron.* **1976**, 32, 2607-2612.

25. Roitman, J. N. and James, L. F. *Phytochemistry*. **1985**, *24*, 835-848.
26. Pabst, A., Barron, D., Smon, E., and Schreier, P. *Phytochemistry*. **1992**, *31*, 1649-1652.
27. Jeong, S. J., Jun, K. Y. and Kang, T. H. *Kor. J. Pharmacogn.* **1999**, *30*, 84-97.
28. Cui, B., Nakamura, M., Kinjo, J. and Nohara, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, *41*, 178-182.
29. Cali, I., Kuruuzum, A., Lorenzetto, P. A., Ruedi, P., *Phytochemistry* **2002**, *59*, 451-7.
30. Nishizawa, M., Izuhara, R., Kaneko, K., Koshihara, Y., and Fujimoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 87-95.
31. Conrad, J., Bogler, B., Klaiver, I., Reeb, S., Guse, J.H., Roos, G. and Kraus, W. *Natural Product Letters* **2001**, *15*, 35.
32. Lin, L.-C., Kuo, Y.-C., Chou, C.-J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 405-408.
33. Haribal, M., Feeny, P., Lester, C. C. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 103-108.
34. Pauli, G. F.; Poetsch, F.; Nahrstedt, A. *Phytochemical Analysis* **1998**, *9*, 177-185.
35. Timmermann, B. N., Hoffmann, J. J., Jolad, S. D., Schram, K. H., Klenck, R. E., Bates, R. B. *J. Nat. prod.* **1983**, *46*, 365-368.
36. Hwang, Y. J., Lee, S. H., Ryu, S. Y., Ahn, J. W., Kim, E.-J., Ro, J. S., Lee, K. S. *Kor. J. Pharmacogn.* **1994**, *25*, 11-19.
37. Cheminat, A., Zawatzky, R., Becker, H., Brouillard, R. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2787-2794.
38. Nishizawa, M., Izuhara, R., Kaneko, K., Koshihara, Y., Fujimoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 87-95.
39. Hennessy, D., Hook, I., Sheridan, H., McGee, A. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 489-490.
40. Kim, S. Y., Kwon, Y. S., Kim, C. M. *Kor. J. Pharmacogn.* **1999**, *30*, 420-422.
41. Ueda, S., Kobayashi, K., Muramatsu, T. and Inouye, H., *Planta Med.* **1981**, *41*, 189.
42. Toda, S., Kumura, M., Ohnishi, M. *Planta Med.*, **1991**, *57*, 8-10.
43. Son, S., Lewis, B. A. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 468-472.
44. Irwin, S. *Psychopharmacologia* **1968**, *13*, 222-257.
45. Collier, H. O. J., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* **1968**, *32*, 295-310.

<위탁과제>

## 천연 항산화 물질의 검색 및 분리

이화여자대학교 약학대학/이상국

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

천연 항산화 물질의 검색 및 분리

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)는 산화적 스트레스를 유도하여 세포 및 조직 손상을 일으켜 뇌졸중과 같은 허혈성 뇌질환 및 각종 퇴행성 뇌질환을 일으키는 주요 원인이 되는 것으로 밝혀지고 있다. 최근 의학기술의 발달에 따라 평균 수명이 증가하는 추세에 있으며, 뇌질환은 연령이 증가할수록 발병률 또한 증가하는 추세에 있기 때문에 앞으로 뇌질환으로 인한 사망률 또한 증가할 것으로 여겨진다. 이러한 경향에 따라, 본 위탁연구에서는 국내 자생식물의 항산화 활성을 검색하고 유효 물질을 분리함과 동시에 그 작용 기전을 연구함으로써 국내 자생식물의 의약품 개발의 자원으로서의 이용 가치를 높임과 동시에 뇌질환 억제 및 뇌신경 보호 활성을 지닌 새로운 물질 개발에 이바지하고자 하였다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구과제에서는 국내 자생식물들의 항산화 활성을 DPPH free radical 소거능 평가법 및 iNOS에 의한 NO 생성 저해능을 측정하는 방법을 이용하여 검색하고, 활성이 뛰어난 식물들로부터 항산화 유효 물질을 분리하고 그 작용 기전을 연구하고자 하였다.

- ▶ 민간의약 및 기존 연구에서 유효 활성 성분이 보고되었던 과를 중심으로 하여 총 57종의 국내 자생식물을 선정하여 메탄올 추출물을 확보하였다.
- ▶ 확보된 추출물들에 대하여 DPPH free radical 소거능 및 iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의한 NO(nitric oxide) 생성 저해능을 평가하였다.
- ▶ NO 생성 저해능이 뚜렷이 나타났던 추출물들에 대하여 NO 생성 저해 작용 기전을 연구하였다.
- ▶ 항산화 활성 물질 분리를 위하여, free radical 소거능 및 NO 생성 저해 활성이 가장 높게 나타났던 식물들에 대하여 용매 분획화를 시도하여 활성 분획을 검색하였다.



#### IV. 연구개발결과

기존 연구 결과 및 문헌 조사를 통하여 총 57종의 국내 자생식물을 항산화 활성 검색 대상으로 선정하였고 이들의 표준메탄올추출물을 확보하여 DPPH free radical 소거 활성 및 iNOS에 의한 NO 생성 저해 활성을 평가하였다. 그 결과 합다리나무, 소귀나무, 검노린재, 서어나무, 비쭈기나무 추출물이 DPPH free radical 소거 활성이 뛰어난 것으로 나타났다. 특히 합다리나무 추출물은 IC<sub>50</sub>가 0.1 µg/ml로 나타나 강력한 항산화 효능을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 육박나무, 갯메꽃, 아왜나무, 섬바다, 홍꿀 추출물은 세포 독성은 일으키지 않으면서 iNOS에 의한 NO 생성 저해 활성이 뚜렷한 것으로 나타났다. NO 생성 저해 활성이 뚜렷하였던 육박나무와 갯메꽃 추출물을 대상으로 이들의 NO 생성 저해 작용 기전을 Western blot analysis와 RT-PCR법을 이용하여 확인하여 본 결과 농도 의존적으로 iNOS 단백질 및 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

실험 결과 항산화 효능이 있는 것으로 확인된 식물들 중에서 문헌 조사에서 식물 성분 및 생리 활성에 대하여 많은 연구가 이루어지지 않았던 합다리나무와 갯메꽃을 항산화 활성 후보 물질 분리 식물로 선정하여 각각에 대하여 식물을 수집하여 용매 분획물을 만들어 항산화 활성을 검색하였다. 그 결과 갯메꽃은 n-hexane 층에서 NO 생성 저해 활성이 나타나는 것을 알 수 있었으나 합다리나무 용매 분획물에서는 DPPH radical 소거 활성이 나타나지 않아 합다리나무의 경우에는 식물을 다시 수집하여 용매 분획을 만들어 radical 소거 활성을 다시 평가해야 할 것으로 여겨진다.

본 연구를 통하여 항산화 효능을 지닌 국내 자생식물을 확인할 수 있었으며 이러한 연구 성과는 의약품 개발의 자원으로서 국내 자생식물의 이용 가치를 높임과 동시에 이후 자생식물로부터의 항산화 효능 물질 분리 연구의 기초 자료로서 이용 가치가 있을 것으로 여겨진다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과로 DPPH free radical 소거 활성이 있는 것으로 확인된 합다리나무 및 NO 생성 저해 활성이 있는 것으로 나타난 갯메꽃, 육박나무는 이후 국내 자생식물로부터 항산화 활성 물질 분리 연구에 있어서 1차 대상 식물이 될 수 있을 것으로 여겨지며, 분리된 물질의 동정 및 작용 기전 연구를 통하여 새로운 항산화 효능 물질의 발굴 및 새로운 기전을 가진 물질 개발에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

## S U M M A R Y

Recent studies suggest that reactive oxygen species(ROS) play important roles in various human disease including stroke and neurodegenerative disorders. On this line, potent antioxidants, especially which are present in natural products, have received considerable attention for the development of effective therapeutic agents.

In this study, in order to identify potential natural antioxidants from Korean indigenous plants and study these mechanism of actions, we collected fifty-seven methanolic extracts and investigated these antioxidant potentials. As a result, nine plant extracts were found to exhibit the DPPH free radical scavenging activity in the criteria of  $IC_{50} < 40 \mu\text{g/ml}$ , and eight plant extracts inhibited nitric oxide formation on lipopolysaccharide(LPS)-activated RAW 264.7 cells in the criteria of % inhibition at  $40 \mu\text{g/ml} > 70\%$ . In particular, the extracts of *Melioma oldhami* ( $IC_{50} = 0.1 \mu\text{g/ml}$ ), *Myrica rubra* ( $IC_{50} = 16.2 \mu\text{g/ml}$ ), *Symplocos paniculata* ( $IC_{50} = 23.0 \mu\text{g/ml}$ ), *Carpinus laxiflora* ( $IC_{50} = 25.1 \mu\text{g/ml}$ ), and *Cleyera japonica* ( $IC_{50} = 26.2 \mu\text{g/ml}$ ) showed a potent radical scavenging activity, and the extracts of *Actinodaphne lancifolia* ( $IC_{50} = 2.5 \mu\text{g/ml}$ ), *Calystegia soldanella* ( $IC_{50} = 4.3 \mu\text{g/ml}$ ), *Viburnum awabuki* ( $IC_{50} = 5.9 \mu\text{g/ml}$ ), *Dystaenia takeshimana* ( $IC_{50} = 7.6 \mu\text{g/ml}$ ), and *Citrus dachibana* ( $IC_{50} = 9.6 \mu\text{g/ml}$ ) showed a potent inhibitory activity of nitric oxide production. Subsequent study also exhibited that extracts of *Actinodaphne lancifolia* and *Calystegia soldanella* suppressed the iNOS protein and gene expression in a dose-dependent manner. Further study for the identification of active principles from these lead extracts might be warranted. These results suggest that Korean indigenous plants, especially *Melioma oldhami*, *Actinodaphne lancifolia* and *Calystegia soldanella*, might be potential candidates for the development of natural antioxidants.

# 여 백

# C O N T E N T S

Part I. The outline and objective of this study .....	151
Part II. The general trend of technical development related to this study .....	153
Part III. Methods and results .....	155
Part IV. The achievements and contribution to the related research fields .....	171
Part V. The plan for application of results of this study .....	173
Part VI. Technical informations obtained in the course of this study .....	175
Part VII. References .....	177

여 백

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	151
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	153
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	155
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	171
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	173
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	175
제 7 장 참고문헌 .....	177

# 여 백

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1절 연구 개발의 배경

최근 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)는 노화, 암, 뇌질환, 순환계 질환 등 각종 질병의 주요 원인으로 알려지고 있다. 뇌질환과 관련된 활성산소종으로는 superoxide anion( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), hydroxy radical(OH $\cdot$ ), 그리고 nitric oxide(NO)를 언급할 수 있으며, 이들은 저농도에서는 세포 내에서 신호를 전달하는 매개체(second messenger)로도 작용할 수 있으나 염증 반응, prooxidant enzyme의 과발현 등에 의해 과량 생성되어 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도할 경우 세포를 구성하는 핵산, 단백질, 지질의 과산화물을 유도하여 조직 손상을 유발하고 이는 뇌졸중과 같은 허혈성 뇌질환이나 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease와 같은 퇴행성 뇌질환을 일으키는 주요 요인으로 작용하게 된다 (reviewed in Chan, 2001, and Behl, *et al.*, 2002).

따라서 이러한 ROS에 대한 체내 방어 체계를 활성화시키거나 또는 항산화제를 이용하여 ROS를 소거하는 방법은 허혈성 또는 퇴행성 뇌질환 치료의 효과적인 치료 전략이 될 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 배경에 따라 선진국에서는 뇌졸중 및 Alzheimer's disease 치료를 위한 목적으로 항산화제를 이용하려고 시도하고 있고 관련 연구들 또한 활발하게 이루어지고 있다.

천연물은 새로운 의약품 개발의 원천으로서 중요한 역할을 담당해오고 있으며, 천연물 유래 물질은 새로운 구조 및 작용기전을 지닌 경우가 많아 앞으로도 지속적인 관심 대상이 될 수 있을 것으로 여겨진다. 이에 따라 여러 질병을 대상으로 하여 천연물 유래 항산화제를 개발하고자 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 국내외 자생식물의 경우 아직 그 성분 및 생리활성에 대한 연구가 미흡한 단계에 있어, 새로운 의약품 자원의 보고로서 더욱 가치가 있을 것으로 여겨진다.

이러한 배경에 따라, 본 연구과제에서는 총괄과제의 뇌신경보호용 식품의약품 개발의 최종 목표를 추구하기 위하여 국내 자생식물로부터 여러 항산화 시험법을 적용하여 항산화 효능 물질을 분리하고 그 작용기전을 연구하여 새로운 치료제 개발의 선도 물질을 제공함과 동시에 의약품 개발의 자원으로서 국내 자생식물의 이용 가치를 높이고자 하였다.

### 제 2절 연구 개발의 필요성

의학 기술의 발달에 따라 전세계적으로 인류의 평균 수명이 연장되고 있는 추세에 있고, 또한 뇌질환은 비교적 50대 이후 장년~노년기에 발병할 확률이 높아 앞으로 뇌질환의 발병



및 그로 인한 사망률은 점차 증가할 것으로 예측되고 있다. 실제로 통계청의 '98년도 사망원인 통계'에 따르면 50대 이후에는 뇌혈관 질환이 가장 큰 사망원인으로 고령일수록 뇌출혈, 뇌졸중, 뇌경색으로 사망하는 경우가 많은 것으로 나타났다.

이러한 고령화 추세에 따라 효과적인 뇌질환 치료 및 예방 물질을 개발하는 것이 필수적이라고 할 수 있는데, 현재 국내 신약개발 연구 동향은 주로 암 치료 및 예방제 개발에 더 초점이 맞추어져 있으며 아직까지는 대부분의 치료 약물을 수입에 의존하는 실정이다. 또한 뇌질환은 궁극적으로 육체적 또는 정신적 장애를 동반하여 장기적인 치료를 필요로 하기 때문에 환자 및 그 가족들이 겪게 되는 정신적, 경제적인 부담 또한 증가할 수밖에 없다. 따라서 효과적인 뇌질환 치료 및 예방 효능 물질 개발을 통하여 부가가치의 창출을 통한 국가 경제 발전 및 국민 보건 복지의 증대에 기여할 수 있을 것으로 여겨진다.

또한, 국내 자생식물에 대해서는 서식지가 한정되어 있어 식물의 정확한 동정 및 대량 확보가 어렵기 때문에 그동안 함유 성분이나 성분들의 생리활성에 대한 연구가 활발하게 이루어지지 못하고 있다. 따라서 본 연구를 통하여 국내 자생식물들의 항산화 활성을 검색하고 유효 물질을 분리하며 그 기전을 연구함으로써 새로운 의약품 개발의 자원으로서 국내 자생식물의 가치를 높이는 데에도 이바지할 수 있을 것으로 여겨진다.

### 제 3절 연구 개발의 목표 및 범위

본 연구과제에서는 국내 자생식물들의 항산화 활성을 DPPH free radical 소거능 평가법 및 iNOS에 의한 NO 생성 저해능을 측정하는 방법을 이용하여 검색하고, 활성이 큰 식물들로부터 항산화 유효 물질을 분리하고 그 작용 기전을 연구하여, 궁극적으로 새로운 항산화 활성 물질을 제공하여 뇌질환 치료 및 예방제 개발의 선도 물질을 제공하는 것을 최종 목표로 하였다.

- ▶ 기존 연구 결과 및 문헌 조사를 토대로, 항산화 활성 검색 대상이 되는 자생식물을 선정하고 그 메탄올 추출물을 확보
- ▶ 확보된 메탄올 추출물들의 항산화 활성을 DPPH free radical 소거능 평가법 및 iNOS에 의한 NO 생성 저해능 측정법을 통하여 검색
- ▶ 항산화 활성 식물들을 대량 확보하여 유효 항산화 활성 물질 분리 및 동정
- ▶ 항산화 활성 작용기전 연구

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

ROS가 유발하는 산화적 스트레스가 뇌졸중과 같은 허혈성 뇌질환 및 각종 퇴행성 뇌질환의 주요 원인이 될 수 있다는 여러 연구 결과들에 따라 (reviewed in Chan, 2001, and Behl *et al.*, 2002), 천연물 유래 또는 합성된 항산화 효능 물질들을 뇌질환 치료 및 예방제로 개발하고자 많은 연구들이 이루어지고 있다.

허혈성 뇌질환 억제 또는 뇌신경 보호 효과가 있는 천연물 유래 물질로는 resveratrol, curcumin, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), S-allylcysteine, *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) 등으로서 기존에 다른 질환을 모델로 한 연구들에서 항산화 효능 물질로 보고되었던 물질들이다. Resveratrol은 이미 여러 연구에서 항산화, 항염증, 항암 및 암예방 효능이 있는 것으로 알려지고 있는데 (Frèmont, 2000, Bhat, *et al.*, 2002), 허혈성 뇌질환 동물 모델에 있어서도 resveratrol은 산화적 스트레스에 의한 뇌 조직 손상을 억제하는 것으로 나타났다 (Sinha, *et al.*, 2002, Wang, *et al.*, 2002). 항염증 및 암예방 효능이 알려진 curcumin도 허혈성 뇌질환 동물 모델에서 자체의 항산화 활성 및 xanthine oxidase에 의한 superoxide anion의 생성을 막는 기전을 통하여 뇌 조직의 손상을 억제하는 것으로 보고되었다 (Ghoneim, *et al.*, 2002). 항산화, 항염증, 암예방 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려지고 있는 녹차의 주요 tannin 성분인 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)는 산화적 스트레스에 의한 허혈성 뇌조직 손상 및 Parkinson's disease의 실험 모델인 N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)에 의해 유도되는 dopaminergic neuron의 손상을 억제하는 것으로 알려졌다 (Levites, *et al.*, 2001, Nagai, *et al.*, 2002). S-allylcysteine도 허혈성 뇌질환 동물 모델에서 산화적 스트레스에 의한 free radical 생성, 지질 과산화 및 신경세포 사멸을 억제하는 것으로 나타났고 (Numagami, *et al.*, 2001), *Ginkgo biloba* extract (EGb 761)도 NO가 유도하는 hippocampus 세포 사멸을 방어하는 활성을 지닌 것으로 보고되었다 (Bastianetto, *et al.*, 2000).

하지만 기존 연구는 이미 알려져 있는 항산화 효능 물질들을 뇌질환 관련 실험동물 모델에 적용하여 뇌세포 및 조직 손상 억제 작용을 확인하는 경우가 대부분이며, 천연물, 특히 국내외 자생 식물로부터 뇌세포 및 조직 보호 효과가 있는 새로운 물질을 발굴하고 그 기전을 밝히는 연구는 아직 활성화되지 못한 상태이다.

# 여 백

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 연구 내용

본 연구과제에서는 천연물로부터 유효 항산화 효능 물질을 분리하기 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.

- ▶ 민간의약 및 기존 연구에서 유효 활성 성분이 보고되었던 과를 중심으로 하여 총 57종의 국내 자생식물을 선정하여 메탄올 추출물을 확보하였다.
- ▶ 확보된 추출물들에 대하여 DPPH free radical 소거능 및 iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의한 NO(nitric oxide) 생성 저해능을 평가하였다.
- ▶ NO 생성 저해능이 뚜렷이 나타났던 추출물들에 대하여 NO 생성 저해 작용 기전을 연구하였다.
- ▶ 항산화 활성 물질 분리를 위하여, free radical 소거능 및 NO 생성 저해 활성이 가장 높게 나타났던 식물들에 대하여 용매 분획화를 시도하여 활성 분획을 검색하였다.

### 제 2절 연구 방법

#### 1. 식물의 선정

본 연구의 대상이 된 자생식물 57종은 문헌 조사를 통하여 민간 의약에서 이용되었거나 기존 연구에서 생리활성이 있는 것으로 보고되었던 과를 중심으로 선정하였으며 식물들의 메탄올 추출물은 한국자생식물연구사업단에서 분양받아 사용하였다. 추출물들은 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

#### 2. 세포 배양

본 연구에 이용된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7은 10% FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1주일에 3회 계대 배양하였다.

## 2. DPPH free radical 소거능 측정

DPPH는 3.16 mM이 되도록 pure ethanol에 녹여 보관용액으로 제조하였고, 사용 전에 최종농도가 300  $\mu$ M이 되도록 ethanol로 희석하였다. 식물 추출물을 DMSO를 이용하여 연속하여 희석하여 4개 농도로 만들었고, 이들을 5  $\mu$ l씩 96 well plate에 옮겼다. 대조군에는 DMSO를 5  $\mu$ l씩 넣었다. 그 다음 희석된 DPPH 용액을 95  $\mu$ l씩 넣고 parafilm으로 밀봉한 뒤 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 515 nm에서 microplate reader(Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA)로 흡광도를 측정하고 대조군에 대한 % inhibition을 구하여 시료의 free radical 소거능을 평가하였다.

## 3. iNOS에 의한 NO 생성 저해 활성 평가

RAW 264.7 세포를 phenol red가 없는 DMEM을 이용하여  $5 \times 10^5$  cells/ml로 희석한 뒤 24 well에 넣고 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시켰다. 그다음 PBS로 1~2회 세척하고 FBS와 phenol red가 없는 DMEM을 넣은 뒤 검색 시료와 동시에 lipopolysaccharide(LPS, 최종농도 1  $\mu$ g/ml)을 가하여 20시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액 100  $\mu$ l를 취하여 96 well plate에 옮긴 뒤 Griess reagent(1% sulfanilamide 용액과 0.1% N-(1-naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride 용액을 1:1로 사용 직전에 섞음)를 180  $\mu$ l 가하여 발색 정도를 540 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. Sodium nitrite를 이용하여 따로 standard curve를 작성한 다음 흡광도를 nitrite의 농도로 환산하여 NO 생성량을 평가하였다. LPS만 처리한 대조군과 비교하여 % inhibition을 구하였고 이로부터 non-linear regression analysis를 이용하여 IC<sub>50</sub> 값을 구하여 검색 시료들의 NO 생성 저해능을 비교 평가하였다.

## 4. 세포독성 평가 - SRB assay

실험 전 검색 시료들을 10% DMSO에 희석한 뒤 10  $\mu$ l씩 취하여 96 well plate로 옮겨 test plate를 만들었다. RAW 264.7 세포를 DMEM을 이용하여  $5 \times 10^4$  cells/ml로 희석하여 190  $\mu$ l씩 96 well plate에 넣고 3일간 배양하였다. zero day control은 검색 시료를 처리하지 않고 희석된 세포만 96 well plate에 넣은 뒤 30분간 배양하고 다음의 방법을 실시하였다. 배양 후 50% trichloroacetic acid(TCA) 용액을 가하여 최종 농도가 10%가 되도록 한 뒤 4°C에서 30분~1시간 동안 배양하여 세포를 고정시킨 다음 수돗물로 4~5회 반복 세척하고 공기 중에서 말렸다. 그 다음 0.4% sulforhodamine B(SRB) 용액으로 30분~1시간 동안 고정된 세포를 염색하고 1% acetic acid 용액으로 4~5회 반복 세척하고 공기 중에서 말렸다. 마른 후 10 mM tris buffer (pH 10.0)를 넣고 microplate shaker로 흔들어 염색된 세포를 녹이고 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험군과 대조군 각각 zero day control 수치를 보정한

다음 대조군과 비교하여 시험군의 % survival을 구하였다. 각 시험군의 효력은 % survival로부터 non-linear regression analysis를 통하여 얻어진 IC<sub>50</sub> 값으로 상호 비교하였다.

## 5. Western blot analysis

RAW 264.7 세포를 100 mm dish에  $5 \times 10^6$  cells/dish로 넣고 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 PBS로 2회 세척한 다음 FBS가 없는 DMEM을 넣고 검색 시료와 LPS(1  $\mu$ g/ml)를 동시에 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 배양 후 cold PBS로 2회 세척한 다음 lysis buffer를 가하여 세포를 떼어내고 BCA법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 이 중 40  $\mu$ g을 8% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기 영동하였고 분리된 단백질을 PVDF membrane으로 옮겼다. methanol을 이용하여 membrane을 완전히 건조시킨 뒤 1/1000으로 희석된 anti-iNOS primary antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 1/2000으로 희석된 anti- $\beta$ -actin primary antibody(Sigma, St. Louis, MO, USA)와 상온에서 1시간 20분 동안 배양하였다. PBST를 이용하여 5분간 3회 세척한 뒤 anti-mouse 또는 anti-rabbit secondary antibody(Santa Cruz)와 상온에서 50분간 배양한 다음 PBST로 5분간 3회 세척하고 ECL western blotting detection reagents(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 결과를 확인하였다.

## 6. RT-PCR

RAW 264.7 세포를 100 mm dish에  $5 \times 10^6$  cells/dish로 넣고 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 PBS로 2회 세척한 다음 FBS가 없는 DMEM을 넣고 검색 시료와 LPS(1  $\mu$ g/ml)를 동시에 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 TRI reagent를 이용하여 lysis시킨 다음 chloroform을 처리하여 세포 내의 RNA를 분리하였다. isopropanol을 처리하여 분리된 RNA를 침전시킨 후 75% ethanol로 세척하고 ethanol을 공기 중에서 건조시킨 뒤 남은 RNA pellet을 nuclease-free water로 녹였다. 녹인 RNA를 55°C에서 10분간, 72°C에서 5분간 가열하고 즉시 얼음에 넣어 RNA가 single strand 형태로 존재하도록 하였다. UV spectrophotometer를 이용하여 260/280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA의 양 및 순도를 결정한 다음 1  $\mu$ g을 역전사 반응(reverse transcription)에 이용하였다. 역전사 반응은 avian myeloblastosis virus(AMV)의 역전사 효소와 oligo dT primer를 이용하여 42°C에서 60분동안 실시하여 cDNA를 생성하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 target gene(iNOS 및  $\beta$ -actin)에 선택적인 primer 및 Taq polymerase를 이용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. PCR 반응조건은 cycle 시작 전 94°C에서 4분간 가열하여 cDNA를 single strand로 만들어 준 다음 매 cycle 당 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 39초간 elongation하는 과정을 28회 반복하였고 cycle 종료 후 72°C에서 5분간 생성

된 strand를 extension하는 과정을 거쳤다. PCR 반응이 끝난 후에는 증폭된 DNA를 2% agarose gel을 이용하여 80 V에서 1시간 동안 전기 영동하였고, 10,000배 희석한 SYBR Gold staining solution(Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)으로 1시간~1시간 30분 동안 염색한 다음 Alpha Imager™(Alpha Innotech Corp., USA)로 염색된 DNA를 관찰하였다.

PCR 반응에 사용된 primer의 sequence는 표 1과 같다.

표 1. PCR 반응에 사용된 primer의 sequence

Target gene	Sequences		Product size (bp)
iNOS	Sense	5'-ATGTCCGAAGCAAACATCAC-3'	401
	Antisense	5'-TAATGTCCAGGAAGTAGGTG-3'	
β-actin	Sense	5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'	514
	Antisense	5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'	

## 7. 메탄올 추출물들의 용매 분획화

건조된 갯메꽃(100 g) 및 합다리나무(500 g)를 그대로 또는 잘게 잘라서 증류 메탄올을 넣고 90분간 3회 sonication하여 추출하였다. 추출액을 감압 농축기로 농축시킨 다음 무게를 측정하고 증류수를 약간 가하여 현탁시켜 분별 깔대기에 넣었다. 그 다음 n-hexane, methylene chloride, n-butanol, 물 등을 이용하여 극성이 작은 순서대로 넣어 용매 분획물을 얻은 다음 이들을 농축하였다. 각 용매 분획물들을 소량을 취하여 DMSO에 녹여 NO 생성 억제 활성 또는 DPPH radical 소거 활성을 평가하였다.

## 제 3절 연구 결과 및 고찰

### 1. DPPH free radical 소거 활성

총 57종의 자생식물 메탄올 추출물들에 대하여 DPPH free radical 소거활성을 검색한 결과 최고농도인 100 µg/ml에서 합다리나무를 비롯한 총 22종의 식물 추출물들이 50% 이상의 radical 소거 활성을 나타내었다 (표 2). 이들을 대상으로 농도를 계열 희석하여 농도별 radical 소거 활성을 측정하였고 이를 이용하여 IC<sub>50</sub>을 구하였다. 그 결과 합다리나무 (IC<sub>50</sub> =

0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), 소귀나무 ( $\text{IC}_{50} = 16.2 \mu\text{g/ml}$ ), 검노린재 ( $\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{g/ml}$ ), 서어나무 ( $\text{IC}_{50} = 25.1 \mu\text{g/ml}$ ), 비쭈기나무 ( $\text{IC}_{50} = 26.2 \mu\text{g/ml}$ )에서 유의성 있는 DPPH free radical 소거 활성이 있는 것으로 나타났고 이들 중에서 함다리나무 추출물은  $\text{IC}_{50}$ 가 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 가장 뚜렷한 radical 소거 활성이 있음을 알 수 있었다.

## 2. iNOS에 의해 유도되는 NO 생성 억제 활성

총 57종의 자생식물 메탄올 추출물들에 대하여 RAW 264.7 세포를 이용하여 LPS 처리에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 저해 효능을 평가하였다. 최고농도인 40  $\mu\text{g/ml}$ 에서 갯메꽃을 비롯한 28종의 추출물들이 50% 이상의 NO 생성 저해 효과를 나타내었고 (표 3), 이 중 갯메꽃, 섬바디, 아왜나무, 거지덩굴, 육박나무, 홍굴, 부지깽이나물, 헛개나무, 노각나무 추출물들은 70% 이상의 저해 활성을 나타내어 이들을 대상으로 하여 농도에 따른 NO 생성 저해 효과를 평가하였다. 그 결과 육박나무 추출물이  $\text{IC}_{50}$ 가 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타나 가장 뛰어난 억제 활성을 나타내었고, 갯메꽃 ( $\text{IC}_{50} = 4.3 \mu\text{g/ml}$ ), 아왜나무 ( $\text{IC}_{50} = 5.9 \mu\text{g/ml}$ ), 섬바디 ( $\text{IC}_{50} = 7.9 \mu\text{g/ml}$ ), 홍굴 ( $\text{IC}_{50} = 9.6 \mu\text{g/ml}$ ) 추출물들도  $\text{IC}_{50}$  값이 10  $\mu\text{g/ml}$  이하로 나타나 iNOS에 의한 NO 생성을 효과적으로 저해하는 것으로 나타났다 (표 4 및 그림 1).

## 3. RAW 264.7 세포에서의 세포독성 평가

이와 같은 NO 생성 저해 효과가 iNOS의 효소 발현 또는 유도된 효소 자체에 대한 억제 효과가 아닌 세포독성에 의한 결과인지를 확인하기 위하여, RAW 264.7 세포에 대한 자생식물 추출물들의 세포독성을 SRB 염색법으로 확인하였다. 표 5에 나타난 바와 같이, iNOS에 의한 NO 생성을 효과적으로 저해하였던 육박나무, 갯메꽃, 아왜나무, 섬바디, 홍굴, 부지깽이나물, 헛개나무, 노각나무, 거지덩굴 추출물들에서 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 이들 추출물들의 NO 생성 저해 효과는 iNOS 효소 발현 유도 과정 또는 발현된 iNOS 효소 자체에 대한 저해 효과로 여겨진다.



표 2. 57종의 자생식물 메탄올 추출물들의 DPPH free radical 소거 활성

번호	국명	학명	부위	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
1	갯메꽃	<i>Calystegia soldanella</i>	전초	>100
2	거지덩굴	<i>Cayratia japonica</i>	열매	>100
3	검노린재	<i>Symplocos paniculata</i>	잎	23
4	검팽나무	<i>Celtis choseniana</i>	열매	>100
5	고추나무	<i>Staphylea choseniana</i>	열매	>100
6	고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	뿌리	>100
7	고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	전초	>100
8	곰취	<i>Ligularia fischeri</i>	전초	>100
9	광나무	<i>Ligustrum japonicum</i>	소지	>100
10	광대수염	<i>Lamium album var barbatum</i>	전초	>100
11	괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	줄기	>100
12	꽃황새냉이	<i>Cardamine amaraeformis</i>	전초	>100
13	나도승마	<i>Kirengeshoma koreana</i>	전초	39.5
14	나도승마	<i>Kirengeshoma koreana</i>	뿌리	>100
15	냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	지상부	>100
16	노각나무	<i>Stewartia koreana</i>	줄기	62
17	노루삼	<i>Actaea asiatica</i>	전초	>100
18	눈썹백	<i>Thuja koraiensis</i>	잎	65.9
19	대팻집나무	<i>Ilex macropoda</i>	줄기	61.5
20	덜꿩나무	<i>Viburnum erosum</i>	열매	37.6
21	덧나무	<i>Sambucus sieboldiana</i>	줄기-수피	>100
22	말채나무	<i>Cornus walteri</i>	줄기	>100
23	모새나무	<i>Vaccinium bracteatum</i>	줄기-수피	54.3
24	미륵냉이	<i>Lepidium ruderales</i>	전초	>100
25	박달목서	<i>Osmanthus insularis</i>	줄기-수피	>100
26	번행초	<i>Tetragonia tetragonoides</i>	전초	>100
27	부지깽이나물	<i>Erysimum aurantiacum</i>	잎, 줄기	>100
28	비쭈기나무	<i>Cleyera japonica</i>	줄기-수피	26.2

표 2. 57종의 자생식물 메탄올 추출물들의 DPPH free radical 소거 활성 (계속)

번호	국명	학명	부위	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
29	산사	<i>Crataegus pinnatifida</i>	줄기	52.7
30	살갈퀴	<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetalis</i>	전초	>100
31	생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	잎, 줄기	64.9
32	생달나무	<i>Cinnamomum japonicum</i>	줄기-수피	38.9
33	서어나무	<i>Carpinus laxiflora</i>	줄기-수피	25.1
34	선갈퀴	<i>Asperula odorata</i>	전초	>100
35	섬바디	<i>Dystaenia takeshimana</i>	지상부	>100
36	섬바디	<i>Dystaenia takeshimana</i>	뿌리	>100
37	소귀나무	<i>Myrica rubra</i>	줄기-수피	16.2
38	속단	<i>Phlomis umbrosa</i>	전초	>100
39	솔비나무	<i>Maackia fauriei</i>	줄기-수피	>100
40	실거리나무	<i>Caesalpinia japonica</i>	잎, 줄기	78.1
41	아왜나무	<i>Viburnum awabuki</i>	잎	71
42	왕괴불나무	<i>Lonicera vidalii</i>	잎	>100
43	왜성정향나무	<i>Syringa velutina</i> var. <i>kamibayashi</i> 'Miss Kim'	잎, 줄기	>100
44	육박나무	<i>Actinodaphne lancifolia</i>	소지	47.2
45	정금나무	<i>Vaccinium oldhami</i>	줄기	33.3
46	좁굴거리	<i>Daphniphyllum glaucescens</i>	줄기	>100
47	줄댕강나무	<i>Abelia tyaihyoni</i>	줄기	>100
48	치녀치마	<i>Heloniopsis orientalis</i>	전초	>100
49	팔배나무	<i>Sorbus alnifolia</i>	줄기	56.1
50	합다리나무	<i>Melioma oldhami</i>	줄기-수피	0.1
51	혈떡이풀	<i>Tjarella polyphylla</i>	뿌리	59.8
52	헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i>	줄기	95.5
53	호자덩굴	<i>Mitchella undulata</i>	전초	>100
54	홍굴	<i>Citrus dachibana</i>	줄기-수피	>100
55	황새냉이	<i>Cardamine flexuosa</i>	지상부	>100
56	흰새덕이	<i>Neolitsea aciculata</i>	잎	58.3
57	흰씀바귀	<i>Ixeris dentata</i> var. <i>albiflora</i>	지하부	>100

표 3. 자생식물 메탄올 추출물들의 NO 생성 저해 효과 (40 µg/ml에서의 저해 활성)

번호	국명	학명	부위	% Inhibition
1	갯메꽃	<i>Calystegia soldanella</i>	전초	83.6
2	거지덩굴	<i>Cayratia japonica</i>	열매	79.6
3	검노린재	<i>Symplocos paniculata</i>	잎	51.8
4	검팽나무	<i>Celtis choseniana</i>	열매	24.4
5	고추나무	<i>Staphylea choseniana</i>	열매	14.2
6	고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	뿌리	13
7	고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	전초	61.9
8	곰취	<i>Ligularia fischeri</i>	전초	45.5
9	광나무	<i>Ligustrum japonicum</i>	소지	64.5
10	광대수염	<i>Lamium album var barbatum</i>	전초	29.2
11	괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	줄기	38.1
12	꽃황새냉이	<i>Cardamine amaraeformis</i>	전초	35.6
13	나도승마	<i>Kirengeshoma koreana</i>	전초	58.1
14	나도승마	<i>Kirengeshoma koreana</i>	뿌리	-9.9
15	냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	지상부	35.7
16	노각나무	<i>Stewartia koreana</i>	줄기	70.3
17	노루삼	<i>Actaea asiatica</i>	전초	49.6
18	눈측백	<i>Thuja koraiensis</i>	잎	53.4
19	대팻집나무	<i>Ilex macropoda</i>	줄기	34.2
20	덜꿩나무	<i>Viburnum erosum</i>	열매	17.5
21	덧나무	<i>Sambucus sieboldiana</i>	줄기-수피	46
22	말채나무	<i>Cornus walteri</i>	줄기	51.4
23	모새나무	<i>Vaccinium bracteatum</i>	줄기-수피	48.3
24	미륵냉이	<i>Lepidium ruderale</i>	전초	60.9
25	박달목서	<i>Osmanthus insularis</i>	줄기-수피	-20.1
26	번행초	<i>Tetragonia tetragonoides</i>	전초	11
27	부지깽이나물	<i>Erysimum aurantiacum</i>	잎, 줄기	71.5
28	비쭈기나무	<i>Cleyera japonica</i>	줄기-수피	-12.1

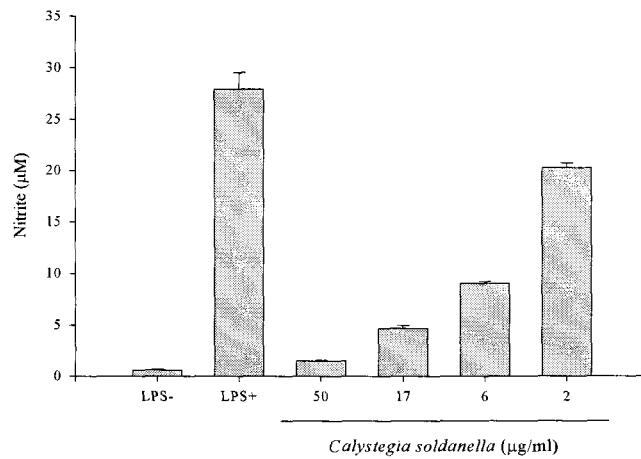
표 3. 자생식물 메탄올 추출물들의 NO 생성 저해 효과 (40 µg/ml에서의 저해 활성; 계속)

번호	국명	학명	부위	% Inhibition
29	산사	<i>Crataegus pinnatifida</i>	줄기	57.9
30	살갈퀴	<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetalis</i>	전초	-14.4
31	생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	잎, 줄기	65.9
32	생달나무	<i>Cinnamomum japonicum</i>	줄기-수피	29.7
33	서어나무	<i>Carpinus laxiflora</i>	줄기-수피	43.7
34	선갈퀴	<i>Asperula odorata</i>	전초	42.2
35	섬바디	<i>Dystaenia takeshimana</i>	지상부	81.9
36	섬바디	<i>Dystaenia takeshimana</i>	뿌리	52.3
37	소귀나무	<i>Myrica rubra</i>	줄기-수피	21
38	속단	<i>Phlomis umbrosa</i>	전초	4.5
39	솔비나무	<i>Maackia fauriei</i>	줄기-수피	51.9
40	실거리나무	<i>Caesalpinia japonica</i>	잎, 줄기	32.9
41	아왜나무	<i>Viburnum awabuki</i>	잎	81.4
42	왕괴불나무	<i>Lonicera vidalii</i>	잎	-21.8
43	왜성정향나무	<i>Syringa velutina</i> var. <i>kamibayashi</i> 'Miss Kim'	잎, 줄기	28.1
44	육박나무	<i>Actinodaphne lancifolia</i>	소지	74.3
45	정금나무	<i>Vaccinium oldhami</i>	줄기	68.3
46	좀굴거리	<i>Daphniphyllum glaucescens</i>	줄기	47
47	줄맹강나무	<i>Abelia tyaihyoni</i>	줄기	66
48	치녀치마	<i>Heloniopsis orientalis</i>	전초	65.2
49	팔배나무	<i>Sorbus alnifolia</i>	줄기	69.1
50	합다리나무	<i>Melioma oldhami</i>	줄기-수피	51.4
51	혈떡이풀	<i>Tjarella polyphylla</i>	뿌리	67.7
52	헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i>	줄기	71.4
53	호자덩굴	<i>Mitchella undulata</i>	전초	16.9
54	홍굴	<i>Citrus dachibana</i>	줄기-수피	72.3
55	황새냉이	<i>Cardamine flexuosa</i>	지상부	26.6
56	흰새덕이	<i>Neolitsea aciculata</i>	잎	63.6
57	흰씀바귀	<i>Ixeris dentata</i> var. <i>albiflora</i>	지하부	63.4

표 4. 40 µg/ml에서 70%이상 저해활성을 나타내었던 추출물들의 NO 생성 저해 효력

번호	국명	학명	부위	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
1	갯메꽃	<i>Calystegia soldanella</i>	전초	4.3
2	저지덩굴	<i>Cayratia japonica</i>	열매	15.5
27	부지깽이나물	<i>Erysimum aurantiacum</i>	잎-줄기	16.6
35	섬바디	<i>Dystaenia takeshimana</i>	지상부	7.6
41	아왜나무	<i>Viburnum awabuki</i>	잎	5.9
44	육박나무	<i>Actinodaphne lancifolia</i>	소지	2.5
52	헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i>	줄기	19.3
54	홍굴	<i>Citrus dachibana</i>	줄기-수피	9.6

(A)



(B)

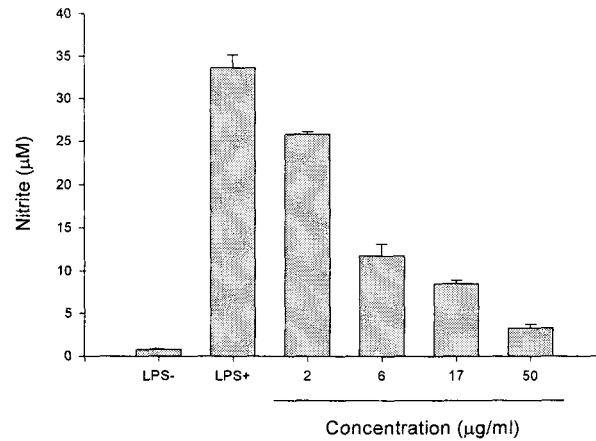


그림 1. 갯메꽃(A)와 육박나무(B)의 농도 의존적인 NO 생성 저해 활성

표 5. 자생식물 메탄올 추출물들의 RAW 264.7 세포에 대한 독성 평가

번호	국명	학명	부위	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
1	갯메꽃	<i>Calystegia soldanella</i>	전초	> 50
2	거지덩굴	<i>Cayratia japonica</i>	열매	> 50
3	검노린재	<i>Symplocos paniculata</i>	잎	> 50
4	검팽나무	<i>Celtis choseniana</i>	열매	> 50
5	고추나무	<i>Staphylea choseniana</i>	열매	> 50
6	고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	뿌리	> 50
7	고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	전초	> 50
8	곰취	<i>Ligularia fischeri</i>	전초	> 50
9	광나무	<i>Ligustrum japonicum</i>	소지	> 50
10	광대수염	<i>Laniam album var barbatum</i>	전초	> 50
11	괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	줄기	> 50
12	꽃황새냉이	<i>Cardamine amaraeformis</i>	전초	> 50
13	나도승마	<i>Kirengeshoma koreana</i>	전초	> 50
14	나도승마	<i>Kirengeshoma koreana</i>	뿌리	> 50
15	냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	지상부	> 50
16	노각나무	<i>Stewartia koreana</i>	줄기	> 50
17	노루삼	<i>Actaea asiatica</i>	전초	> 50
18	눈측백	<i>Thuja koraiensis</i>	잎	3.56
19	대팻집나무	<i>Ilex macropoda</i>	줄기	> 50
20	덜꿩나무	<i>Viburnum erosum</i>	열매	> 50
21	덧나무	<i>Sambucus sieboldiana</i>	줄기-수피	> 50
22	말채나무	<i>Cornus walteri</i>	줄기	> 50
23	모새나무	<i>Vaccinium bracteatum</i>	줄기-수피	> 50
24	미륵냉이	<i>Lepidium ruderae</i>	전초	> 50
25	박달목서	<i>Osmanthus insularis</i>	줄기-수피	> 50
26	번행초	<i>Tetragonia tetragonoides</i>	전초	> 50
27	부지깽이나물	<i>Erysimum aurantiacum</i>	잎, 줄기	> 50
28	비쭈기나무	<i>Cleyera japonica</i>	줄기-수피	> 50

표 5. 자생식물 메탄올 추출물들의 RAW 264.7 세포에 대한 독성 평가 (계속)

번호	국명	학명	부위	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
29	산사	<i>Crataegus pinnatifida</i>	줄기	> 50
30	살갈퀴	<i>Vicia angustifolia var. segetalis</i>	전초	34.79
31	생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	잎, 줄기	> 50
32	생달나무	<i>Cinnamomum japonicum</i>	줄기-수피	> 50
33	서어나무	<i>Carpinus laxiflora</i>	줄기-수피	33.48
34	선갈퀴	<i>Asperula odorata</i>	전초	> 50
35	섬바디	<i>Dystaenia takeshimana</i>	지상부	> 50
36	섬바디	<i>Dystaenia takeshimana</i>	뿌리	> 50
37	소귀나무	<i>Myrica rubra</i>	줄기-수피	> 50
38	속단	<i>Phlomis umbrosa</i>	전초	> 50
39	솔비나무	<i>Maackia fauriei</i>	줄기-수피	> 50
40	실거리나무	<i>Caesalpinia japonica</i>	잎, 줄기	> 50
41	아왜나무	<i>Viburnum awabuki</i>	잎	> 50
42	왕괴불나무	<i>Lonicera vidalii</i>	잎	> 50
43	왜성정향나무	<i>Syringa velutina var. kamibayashi</i> 'Miss Kim'	잎, 줄기	> 50
44	육박나무	<i>Actinodaphne lancifolia</i>	소지	> 50
45	정금나무	<i>Vaccinium oldhami</i>	줄기	> 50
46	좁굴거리	<i>Daphniphyllum glaucescens</i>	줄기	> 50
47	줄맹강나무	<i>Abelia tyaihyoni</i>	줄기	> 50
48	치녀치마	<i>Heloniopsis orientalis</i>	전초	32.23
49	팔배나무	<i>Sorbus alnifolia</i>	줄기	> 50
50	합다리나무	<i>Melioma oldhami</i>	줄기-수피	> 50
51	혈떡이풀	<i>Tjarella polyphylla</i>	뿌리	> 50
52	헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i>	줄기	> 50
53	호자덩굴	<i>Mitchella undulata</i>	전초	> 50
54	홍귤	<i>Citrus dachibana</i>	줄기-수피	> 50
55	황새냉이	<i>Cardamine flexuosa</i>	지상부	> 50
56	흰새덕이	<i>Neolitsea aciculata</i>	잎	> 50
57	흰씀바귀	<i>Ixeris dentata var. albiflora</i>	지하부	> 50

#### 4. 갯메꽃과 육박나무 메탄올 추출물의 NO 생성 저해 작용기전 연구

iNOS에 의한 NO 생성 저해 효과가 가장 뚜렷한 것으로 나타났던 갯메꽃 및 육박나무 메탄올 추출물에 대하여 이들의 작용기전을 탐색하여 보았다. 우선 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 Western blot analysis를 이용하여 확인해 본 결과 (그림 2)에 나타난 바와 같이 이들 추출물들은 농도 의존적으로 iNOS 단백질 발현을 저해하였으며 특히 최고농도인 20  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 뚜렷한 저해 효과를 나타내었다. 또한 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR법을 이용하여 확인해 보았는데 이들 추출물들은 iNOS 유전자 발현에 있어서도 농도 의존적인 저해 활성을 나타내었다 (그림 3). 따라서 갯메꽃과 육박나무 추출물들의 NO 생성 저해 효과는 iNOS 유전자 및 단백질 발현을 저해하는 작용 기전에 의한 것으로 여겨진다.

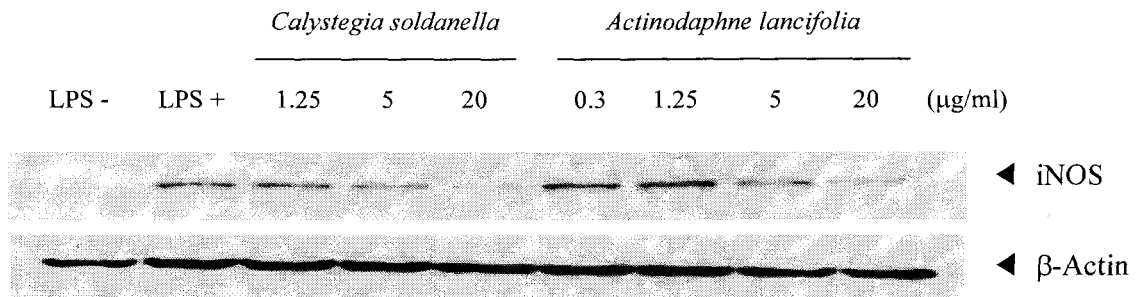


그림 2. 갯메꽃(*Calystegia soldanella*)과 육박나무(*Actinodaphne lancifolia*) 메탄올 추출물의 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

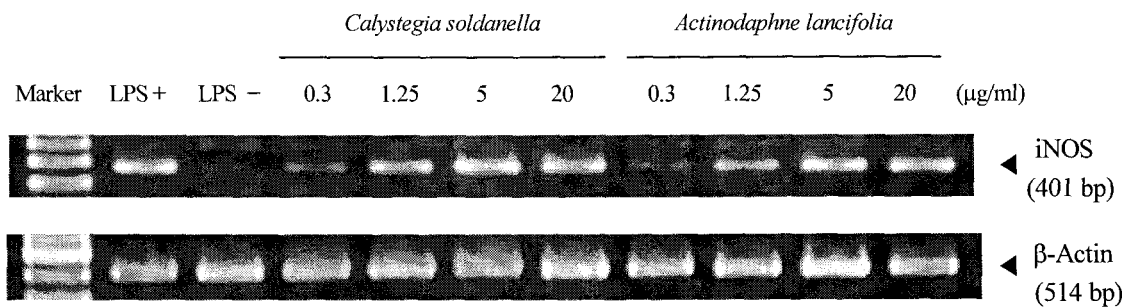


그림 3. 갯메꽃(*Calystegia soldanella*)과 육박나무(*Actinodaphne lancifolia*) 메탄올 추출물의 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향



5. 갯메꽃 및 합다리나무 메탄올 추출물의 용매 분획화 및 각 분획물들의 생리활성 검색

지금까지의 결과 및 문헌 조사를 토대로 하여, NO 생성 저해 활성이 강하게 나타났던 갯메꽃과 DPPH free radical 소거 효과가 뚜렷하게 나타났던 합다리나무를 항산화 활성 후보물질을 분리하기 위한 식물로 선정하였다. 이들을 국내 자생지에서부터 수집하여 메탄올 추출물을 만들고 상기한 방법에 따라 용매 분획화를 실시하여 NO 저해 활성 및 DPPH free radical 소거 활성을 측정하였다.

표 5에 나타난 바와 같이 새로운 갯메꽃 용매 분획물 중 n-hexane 및 methylene chloride 분획에서 NO 생성 저해 활성이 나타났는데, iNOS 실험 조건에서의 세포독성을 확인해 본 결과 n-hexane 분획은 최고농도인 20 µg/ml에서 세포 생존률이 80% 이상이었으나 methylene chloride 분획은 26.8%로 나타났다. 따라서 methylene chloride층의 NO 생성 저해 작용은 세포독성과 밀접한 연관이 있을 것으로 여겨지며, 세포 독성을 수반하지 않으면서 iNOS 저해 활성을 나타내었던 n-hexane 분획으로부터 유효 활성 물질을 분리할 수 있을 것으로 여겨진다.

그러나, 새로운 합다리나무 추출물은 표준식물추출물에서의 결과와는 달리 메탄올 추출물을 포함한 모든 용매 분획에서 DPPH free radical 소거 활성이 나타나지 않았다 (표 6). 이러한 결과는 식물 채집시 동정이 제대로 되지 않았거나 채집 시기가 달랐기 때문으로 여겨지며, 따라서 식물 자원을 다시 확보하여 용매 분획물을 만들어 각 분획들의 활성을 다시 검사해 보아야 할 것으로 여겨진다.

표 5. 새로 수집한 갯메꽃 용매 분획물들의 NO 생성 저해 활성

	n-hexane	methylene chloride	n-buthanol	water
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	1.1	0.4	> 20	> 20
% Survival at 20 µg/ml	> 80	26.8	> 80	> 80

표 6. 새로 수집한 합다리나무 용매 분획물들의 DPPH free radical 소거 활성

	methanol	n-hexane	methylene chloride	n-buthanol	water
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

지금까지의 결과를 종합하면, 총 57종의 국내 자생식물 표준메탄올추출물 중에서 합다리나무, 소귀나무, 검노린재, 서어나무, 비쭈기나무 추출물이 DPPH free radical 소거 활성이 뛰어난 것으로 나타났고, 육박나무, 갯메꽃, 아왜나무, 섬바디, 홍굴 추출물은 세포 독성은 일으키지 않으면서 iNOS에 의한 NO 생성 저해 활성이 뚜렷한 것으로 나타났다. 이들 중에서 문헌 조사 결과 식물 성분 및 생리 활성에 대하여 많은 연구가 이루어지지 않았던 합다리나무와 갯메꽃을 항산화활성 후보 물질 분리 식물로 선정하여 각각에 대하여 식물을 수집하여 용매 분획물을 만들어 항산화 활성을 검색하였다. 그 결과 갯메꽃은 n-hexane 층에서 NO 생성 저해 활성이 나타나는 것을 알 수 있었으나 합다리나무 용매 분획물에서는 DPPH radical 소거 활성이 나타나지 않아 합다리나무의 경우에는 식물을 다시 수집하여 용매 분획을 만들어 radical 소거 활성을 다시 평가해야 할 것으로 여겨진다.

한편, NO 생성 저해 활성이 뚜렷하게 나타났던 갯메꽃과 육박나무 표준식물추출물의 NO 생성 저해 작용 기전을 알아보기 위하여 iNOS 단백질 및 유전자 발현에 미치는 영향을 Western blot analysis와 RT-PCR법으로 확인하여 보았다. 결과에서 나타난 바와 같이 갯메꽃과 육박나무 추출물은 농도 의존적으로 iNOS 단백질 및 유전자 발현으로 억제하는 것으로 나타나 이러한 작용 기전을 통하여 NO 생성을 저해하는 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 이들 식물로부터 iNOS 효소 유도 저해 기전을 통한 NO 생성 저해 활성을 가진 유효 성분을 분리할 수 있을 것으로 전망되며, 특히 갯메꽃의 경우에는 본 연구 결과를 통하여 n-hexane 분획에서 NO 생성을 저해하는 것으로 나타났으므로 때문에 앞으로 이 분획에서 NO 생성 저해 유효 물질을 분리할 수 있을 것으로 여겨진다.

# 여 백

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 연구개발목표의 달성도

구 분	연구개발 목표 및 평가 착안점	달성도
2차년도 (2001. 7 ~ 2002. 6)	식물자원으로부터 항산화효능 검색	100%
	▶ 50여 종의 식물자원 확보 및 추출물 제조 유무	100%
	▶ 각 추출물들의 항산화 활성 검색 유무	100%
3차년도 (2002. 7 ~ 2003. 6)	항산화 효능 물질의 분리, 동정 및 작용기전 연구	100%
	▶ 유효 식물의 다량 확보 및 물질 분리 유무	100%
	▶ 항산화 효능 작용 기전 연구 유무	100%

### 제 2절 관련 분야의 기술발전예의 기여도

본 연구에서는 57종의 국내 자생식물 메탄올 추출물의 DPPH free radical 소거 활성 및 iNOS에 의한 NO 생성 저해 활성을 검색하였으며, 이러한 연구 결과를 국내외 관련 논문에 투고 및 발표한 바 있다 (Kim, *et al.*, 2003a, Kim, *et al.*, 2003b, Kim, *et al.*, 2003c). 이러한 연구 성과는 의약품 개발의 원천으로서 국내 자생식물의 이용 가치를 높임과 더불어 차후 자생식물로부터의 항산화 효능 물질 분리 연구의 기초 자료로서 이용될 수 있을 것으로 여겨진다. 특히 본 연구를 통하여 합다리나무 추출물은 강력한 DPPH free radical 소거 활성을 나타내었고 갯메꽃과 육박나무 메탄올 추출물은 iNOS의 유도를 저해하는 기전을 통하여 NO 생성을 효과적으로 저해하는 것으로 확인되었기 때문에 이들 식물들은 앞으로 새로운 항산화 효능 물질 분리를 위한 일차적인 대상으로서 가치가 있을 것으로 생각된다.

# 여 백

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과로 DPPH free radical 소거 활성이 있는 것으로 확인된 합다리나무 및 NO 생성 저해 활성이 있는 것으로 나타난 켄메꽃, 육박나무는 이후 국내 자생식물로부터 항산화 활성 물질 분리 연구에 있어서 1차 대상 식물이 될 수 있을 것으로 여겨지며, 분리된 물질의 동정 및 작용 기전 연구를 통하여 새로운 항산화 효능 물질의 발굴 및 새로운 기전을 가진 물질 개발에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

# 여 백

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과정 중 항산화 활성이 나타났던 국내 자생식물들에 대한 문헌 조사 결과, 이들의 성분 및 생리활성에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있음을 확인하였다.

DPPH free radical 소거 활성을 나타내었던 소귀나무의 경우 diarylheptanoid, flavonoid, terpenoid 계열 물질을 함유하는 것으로 알려졌으며 (Inoue, *et al.*, 1984, Nonaka, *et al.*, 1983, Sakurai, *et al.*, 1986) 항산화 활성, 항 androgenic activity, melanin 합성 억제 활성이 있는 것으로 보고되었다 (Matsuda, *et al.*, 1995, Matsuda, *et al.*, 2001, Sakurawi, *et al.*, 1996, Xi, *et al.*, 2001). 가장 강력한 radical 소거 활성을 나타내었던 합다리나무의 경우에는 동식물에 대한 성분 및 활성 보고는 없으나 동속 식물에서 triterpenoid glycoside가 함유되어 있는 것으로 알려졌다 (Abe *et al.*, 1996).

또한 NO 생성 저해 효과가 있었던 갯메꽃의 경우에는 resin glycoside인 soldanellin A, B 그리고 caffeic acid ester, coumaric acid ester 들이 함유되어 있는 것으로 알려졌는데 (Gaspar, 1999, Gaspar 2001, Tori *et al.*, 2000), 함유 성분에 대한 생리활성 연구 결과는 아직 보고된 바 없다. 또한 육박나무에서는 lignan류 및 lactonic compound들이 함유 성분으로 보고되었고 갯메꽃과 마찬가지로 함유 성분의 생리활성에 대해서는 연구가 거의 이루어지지 않았다 (Tanaka *et al.*, 1989, Kim *et al.*, 2002). 그리고 아왜나무는 diterpene, sesquiterpene 류들을 함유하는 것으로 알려졌고 (Fukuyama, *et al.*, 1996a, Fukuyama, *et al.*, 1996b, Kawaga, *et al.*, 1998, Kubo, *et al.*, 1999, Kubo, *et al.*, 2001), 동속 식물에서 항산화 활성, 통각 완화 및 자궁근 이완 작용이 있는 것으로 보고되었다 (Calle, *et al.*, 1999, Iwai, *et al.*, 2001).



# 여 백

## 제 7 장 참고문헌

- Abe, F., Yamauchi, T., Shibuya, H., and Kitagawa, I., Triterpenoid glycosides from bark of *Meliosma lanceolata*, *Phytochemistry*, 42; 809-814: 1996.
- Bastianetto, S., Zheng, W.H., and Quirion, R., The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C, *J. Neurochem.*, 74; 2268-2277: 2000.
- Bhat, K.P.L., and Pezzuto, J.M., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 957; 210-229: 2002.
- Behl, C., and Moosmann, B., Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach, *Free Radic. Biol. Med.*, 33; 182-191: 2002.
- Calle, J., Toscano, M., Pinzon, R., Baquero, J., and Bautista, E., Antinociceptive and uterine relaxant activities of *Viburnum tononis* alive (Caprifoliaceae), *J. Ethnopharmacol.*, 66; 71-73: 1999.
- Chan, P.H., Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 21; 2-14: 2001.
- Gaspar, E.M.M., New pentasaccharide macrolactone from the European Convolvulaceae *Calystegia soldanella*, *Tetrahedron Lett.* 40; 6861-6864: 1999.
- Gaspar, E.M.M., Soldanellin B-The first acylated nonlinear tetrasaccharide macrolactone from the European Convolvulaceae *Calystegia soldanella*, *Eur. J. Org. Chem.* 369-373: 2001.
- Ghoneim, A.I., Abdel-Naim, A.B., Khalifa, A.E., and El-Denshary, E.S., Protective effects of curcumin against ischemia/reperfusion insult in rat forebrain, *Pharmacol. Res.*, 46; 273-279: 2002.
- Frèmont, L., Biological effects of resveratrol, *Life Sci.*, 66; 663-673: 2001.

Fukuyama, Y., Minami, H., Ichikawa, R., Takeuchi, K., and Kodama, M., Hydroperoxylated guaiane-type sesquiterpenes from *Viburnum awabuki*, *Phytochemistry*, 42; 741-746: 1996.

Fukuyama, Y., Minami, H., Takeuchi, K., Kodama, M., and Kawazu, K., Neovibsanines A and B, unprecedented diterpenes from *Viburnum awabuki*, *Tetrahedron Lett.*, 37; 6767-6770: 1996b.

Inoue, T., Arai, Y., and Nagai, M., Diarylheptanoids in the bark of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc., *Yakugaku Zasshi*, 104; 37-41: 1984.

Iwai, K., Onodera, A., and Matsue, H., Antioxidant activity and inhibitory effect of Gamazuni (*Viburnum dilatatum* Thunb.) on oxidative damage induced by water immersion restraint stress in rats. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 52; 443-451: 2001.

Kagawa M., Minami, H., Nakahara, M., Takahashi, H., Takaoka, S., and Fukuyama, Y., Oleanane-type triterpenes from *Viburnum awabuki*, *Phytochemistry*, 47; 1337-1341: 1998.

Kim, M.R., Jung, H.J., Min, B.S., Oh, S.R., Kim, C.S., Ahn, K.S., Kang, W.S. and Lee, H.K., Constituents from the stems of *Actinodaphne lancifolia*, *Phytochemistry*. 59; 861-865: 2002.

Kim, Y., Min, H.Y., Park, E.J., Lee, Y.S., Jin, C., and Lee, S.K., Evaluation of the antioxidant potential of Korean indigenous plant extracts by free radical scavenging activity, *Nat. Prod. Sci.*, 9; 80-82: 2003a.

Kim, Y., Min, H.Y., Park, H.J., Lee, E.J., Park, E.J., Hwang, H.J., Jin, C., and Lee, S.K., Suppressive effects of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by *Calystegia soldanella* methanolic extract on lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells, *Eur. J. Cancer Prev.*, 2003b. (Submitted)

Kim, Y., Min, H.Y., Park, H.J., Lee, E.J., Park, E.J., Hwang, H.J., Jin, C., and Lee, S.K., Suppressive effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the methanol extract of *Actinodaphne lancifolia*, *Phytother. Res.*, 2003c. (Revised)

Kubo, M., Minami, H., Hayashi, E., Kodama, M., Kawazu, K., and Fukuyama, Y.,

Neovibsanin C, a macrocyclic peroxide-containing neovibasane-type diterpene from *Viburnum awabuki*, *Tetrahedron Lett.*, 40; 6261-6265: 1999.

Kubo, M., Fujii, T., Hioki, H., Tanaka, M., Kawazu, K., and Fukuyama, Y., Siprovibsanin A, an unprecedented vibsane-type 18-norditerpene from *Viburnum awabuki*, *Tetrahedron Lett.*, 42; 1081-1083: 2001.

Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M.B.H., and Mandel, S., Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration, *J. Neurochem.*, 78; 1073-1082: 2001.

Matsuda, H., Higashino, M., Chen, W., Tosa, H., Inuma, M., and Kubo, M., Studies of cuticle drugs from natural sources. III. Inhibitory effect of *Myrica rubra* on melatonin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, 18; 1148-1150: 1995.

Matsuda, H., Yamazaki, M., Matsuo, K., Asanuma, Y., and Kubo, M. Anti-androgenic activity of *Myrica* Cortex-isolation of active constituents from bark of *Myrica rubra*, *Biol. Pharm. Bull.*, 24; 259-263: 2001.

Nagai, K., Jiang, M.H., Hada, J., Nagata, T., Yajima, Y., Yamamoto, S., and Nishizaki, T., (-)-Epigallocatechin gallate protects against NO stress-induced neuronal damage after ischemia by acting as anti-oxidant, *Brain Res.*, 956; 319-322, 2002.

Nonaka, G.I., Muta, M., and Nishioka, I., Myricatin, a galloyl flavanonol sulfate and prodelphinidin gallates from *Myrica rubra*, *Phytochemistry*, 22; 237-241: 1983.

Numagami, Y., and Ohnishi, T., S-Allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia, *J. Nutr.*, 131; 1100S-1105S: 2001.

Sakurai, N., Yaguchi, Y., and Inoue, T., Triterpenoids from *Myrica rubra*, *Phytochemistry*, 26; 217-219: 1986.

Sinha, K., Chaudhary, G., Gupta, Y.K., Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats, *Life Sci.*, 71; 655-665: 2002.

Tanaka, H., Nakamura, T., Ichino, K., and Ito, K., Two lactonic compounds, lancifolide and isolancifolide, from *Actinodaphne lancifolia*, *Phytochemistry*, 28; 626-628: 1989.

Tori, M., Ohara, Y., Nakashima, K., and Sono, M. Caffeic and coumaric acid esters from *Calystegia soldanella*, *Fitotherapia*, 71; 353-359: 2000.

Xi, Y., Luo, Z., Cheng, D., Xu, C., and Wang, Y., Effect of CA storage on active oxygen metabolism in Chinese bayberry fruit (*Myrica rubra*), *Zhejiang Daxue Xuebao, Nongye Yu Shengming Kexueban*, 27; 311-313: 2001.

Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G.E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G.Y., and Sun, A.Y., Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils, *Brain Res.*, 958; 439-447: 2002.

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

# 여 백

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	21C 프론티어연구개발사업		
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업		
과제명		항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발		
연구기관		한국과학기술연구원	연구책임자	진창배
총연구기간		2000년 09월 16일 ~ 2003년 06월 30일 (28개월)		
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계
		600,000	600,000	1,200,000
기술분야		생명과학분야/생물자원 생산이용 기술/식물자원 생산이용 기술		
참여기업		(주)LG생명과학기술원		
공동연구기관		(주)LG생명과학기술원		
위탁연구기관		이화여자대학교		
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ( )	2. 기술이전( )	3. 후속연구추진(√)
		4. 타사업에 활용( )	5. 선행 및 기초연구( )	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 6월 일

연구책임자 : 진 창 배 (인)  
연구기관장 : 김 유 승 (직인)

과학기술부장관 귀하



여 백

## [첨부1]

# 연구결과 활용계획서

## 1. 연구목표 및 내용

### 가. 연구 최종목표

국내 자생식물로부터 항산화성 유효성분들을 분리하여 뇌신경보호 효능, 약리대사 및 안전성을 규명함으로써 이를 함유하고 있는 식물은 뇌신경보호용 식품의약으로, 효능이 우수한 단일성분들은 뇌졸중 치료제로 개발하고자 함.

### 나. 연구내용

본 과제에서는 뇌신경보호효능이 일부 입증된 aloesin을 추가적인 뇌신경보호효능 실험 및 안전성, 약리연구 등을 통하여 전임상 후보물질로 도출하고자 하였으며, 후속대체물질연구를 위하여 aloesin 유사체 연구 및 국내 자생식물로부터 항산화성 유효성분들을 분리 동정하고 이들의 국소 허혈성 뇌손상에 대한 신경보호 효능을 검색하고, 약리 및 안전성 규명을 통하여 뇌신경보호제로 개발하고자 하였다. 또한 자원확보 차원에서 위탁과제를 수행하여 57종의 자원식물 메탄올 추출물로부터 합다리나무 등 항산화 효능이 우수한 5종을 확보하였으며 육박나무, 갯메꽃 등 8종에서 iNOS 저해 활성이 우수하여 이들에 대한 작용기전 및 효능 물질을 분리하는 연구도 수행하였다.

Aloesin을 3-30 mg/kg(i.v.)의 다양한 용량범위에서 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에 효능을 검색한 결과, 유의한 신경보호 효과를 나타내었으며, 특히 영구적 허혈성 뇌손상 백서모델에서는 뇌졸중치료제 후보물질로 잘 알려진 MK-801보다, aloesin은 신경보호 효능이 더욱 우수하게 나타났다. 또한 aloesin은 *in vivo*에서 조사된 apoptotic cell death의 여러 분자생물학적 현상을 뚜렷이 억제하는 것으로 나타났다. 더욱, aloesin은 일반약리 시험 및 급성, 아급성, 유전독성 시험 결과에서 매우 안전한 화합물임이 밝혀졌다.

Aloesin 계열의 후속물질로 간단한 합성방법 또는 알로에로부터 성분분리를 통하여 중에서 10종의 화합물들을 도출하였다. 그 중, KYS 50163 (7-O-methylaloesin)은 aloesin과 비교할 때 항산화 작용 및 rat primary cortical cell culture를 이용한 xanthine/xanthine oxidase 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유발 세포독성으로부터의 신경보호 효능이 우수하고, 국소 허혈성 뇌손상 동물모델에서도 신경세포보호 효능을 나타내었다.

또 다른 후속대체물질을 도출하기 위하여 식물 손바닥선인장 및 치자로부터 단일성분을 분리한 결과, 21종의 화합물이 순수하게 분리되었으며, 그 중 6종의 화합물들은 자연계에서 처음으로 분리되었다. 분리된 화합물들은 다양한 검색체계에서의 항산화 작용, rat primary cortical cell culture에서의 신경보호 효능, 일시적 뇌

허혈 백서모델에서의 뇌신경보호효능을 검색하였다. 연구결과, KYS 50182 (quercetin 3-methyl ether)는 1) 검색한 모든 항산화 검색시스템에서 강력한 항산화 효능을 보였으며, 2) Rat primary cortical cell culture를 사용한 검색시스템에서 신경세포의 보호효과 또한 우수하며, 3) 일시적 뇌허혈 백서모델에서도 허혈유발 30분 후에 10 mg/kg 용량으로 정맥을 통하여 단회 투여한 결과, 대뇌피질 경색용적, 총 및 교정 총 경색용적, 부종을 모두가 대조군에 비해 약 50% 수준의 유의성 있는 감소를 나타냄으로서 뚜렷한 조직학적 신경보호 효과를 나타내었으며 또한 대조군에 비해 유의성 있는 신경행동학적 회복 효과를 나타내었다. 또한, 4) KYS 50182의 정맥투여 급성독성 실험결과 LD<sub>50</sub>는 150 mg/kg 이상으로 나타나, 유효 약 효용량이 10 mg/kg 정도이므로 적어도 15배 이상의 safety margin을 가지는 것으로 나타났다.

## 2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

### 가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
알로에신을 함유하는 허혈성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 이를 포함하는 제제	KR 01-18228	2001. 04. 06	진창배, 김동현, 이용섭, 정경자, 김형자 (KIST)	한국	출원
프로폴리스 및 그 구성성분의 새로운 용도	KR 01-8668	2001. 02. 21	박은희, 진창배, 이용섭, 송운선, 이재열 (KIST)	한국	출원
손바닥선인장 추출물 및 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 신경세포 보호용 조성물	KR 01-66810	2001. 10. 29	이용섭, 진창배, 김형자, 박호균, 조정숙, 송운선, 박미정 (KIST)	한국	출원
Use of Opuntia Ficus-indica Extract and Compounds Isolated Therefrom for Protecting Nerve Cells	WO 03/037324 (PCT/KR02/0210)	2003. 05. 08 (2002. 10. 29)	이용섭, 진창배, 김형자, 박호균, 조정숙, 송운선, 박미정 (KIST)	PCT	공개 (출원)
치자 추출물 및 치자로부터 분리된 신규 화합물 및 그 용도	KR 03-36482	2003. 06. 05	이용섭, 진창배, 이재열, 김형자, 서선희, 송운선 (KIST)	한국	출원

나. 프로그램 등록목록 : 해당없음

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역 : 해당없음

라. 발생품 및 시작품 내역 : 해당없음

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재여부
Arch. Pharm. Res.	Inhibition of angiogenesis by propolis	2002년 8월 31일	25권 4호	대한약학회	한국	미게재
Cancer Letters	Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity	2002년 1월 10일	175권 1호	Elsevier Science	Ireland	게재
Brain Research	Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from <i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i> .	2003년 3월 7일	965권 1-2호	Elsevier Science	England	게재
Natural Product Sci.	Evaluation of the antioxidant potential of Korean indigenous plant extracts by free radical scavenging activity	2003년 6월 30일	9권 2호	한국생약학회	한국	미게재
계: 4건						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행 기관	국명
제53차 대한약리학회 추계학술대회(심포지움)	Neuroprotective effect of aloesin in a rat model of transient focal cerebral ischemia	2001년 11월 6일		대한약학회	한국
50th Annual Congress of Society for Medicinal Plants	Neuroprotective effects of antioxidant constituents isolated from <i>Opuntia</i> <i>ficus-indica</i> var. <i>saboten</i> Makino	2002년 9월 9일		유럽생약학회	스페인
제51차 대한약학회 추계학술대회	Neuroprotective mechanisms of aloesin against focal ischemic brain injury	2002년 10월 18일		대한약학회	한국
제51차 대한약학회 추계학술대회	Neuroprotective effects of treatment with aloesin in rat model of permanent focal cerebral ischemia	2002년 10월 18일		대한약학회	한국
제52차 대한약학회 춘계학술대회	Neuroprotective effects of antioxidative constituents isolated from plants	2003년 4월 17일		대한약학회	한국
계: 5 건					

3. 연구성과 : 해당없음

※ 기술이전이나 기업화 완료(추진중 포함) 실적

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

본 연구결과로 얻어진 후속물질인 KYS 50182(quercetin 3-methyl ether)는 강력한 항산화 효과, 여러 *in vitro* 뇌신경세포체계에서 신경세포의 손상을 보호하는 효과를 나타내는 등 다양한 작용효과가 이미 밝혀졌으며, 국소 허혈성 뇌졸중 동물모델에서도 뇌신경보호 효과가 나타났으므로 이 화합물의 목표로 하는 효능은 이미 입증되었다고 사료된다. 따라서 KYS 50182를 함유하고 있는 손바닥선인장의 추출물을 뇌손상보호용 식품의약으로 개발하기 위한 2단계 연구에 활용하고자 함.

나. 활용방법

KYS 50182의 생체이용률, 약동력학, BBB 투과도, 경구투여 시의 신경보호 효능

등을 조사하고, 이 화합물을 함유하고 있는 식물 추출물의 규격화, 표준화, 적정 투여량 등을 연구하여 뇌졸중 치료제나 뇌신경보호용 식품의약으로 활용하기 위한 연구를 수행하고자 함.

#### 다. 차년도이후 활용계획

국소 허혈성 뇌졸중 질환동물모델 시험에서 aloesin의 뇌신경보호 효능과 더불어 안전성이 확인되었으므로, 향후 aloesin의 뇌신경보호 약리 작용기전의 규명 등의 추가 전임상 및 임상시험을 수행하여 뇌신경보호제 혹은 뇌졸중 치료제로 활용하고자 함.

### 5. 기대효과

#### 가. 기술적 측면

- 천연물을 이용한 뇌신경보호용 식품의약 개발 분야에 기여
- 뇌신경보호제의 효능 검색 체계 확립
- 허혈성 뇌손상의 병태생리학적 기전 연구에 기여
- 뇌신경보호제 개발을 위한 임상시험 시 요구되는 기초 자료 제공
- 기타 뇌손상과 관련된 난치성 뇌질환 치료제 개발 분야에도 기여

#### 나. 사회경제적 측면

- 뇌신경보호용 기능성 식품 또는 치료제 개발로 국내자생 식물의 고부가 가치 창출 및 막대한 수출 효과 기대
- 천연물 유래 뇌신경보호 활성성분의 국내외 물질 특허 획득 및 기술 수출
- 국내 제약산업의 활성화
- 21세기 최대 시장으로 떠오를 것으로 기대되는 노화관련 산업의 경쟁력 확보

### 6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재) : 해당없음

[첨부2]

## 기술 요약서

■ 기술의 명칭

알로에신을 함유하는 허혈성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 이를 포함하는 제제
---

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	PF002103-01			
과제명	항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발			
사업명	21C 프론티어연구개발사업			
세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구기관	한국과학기술연구원	기관유형	정부출연연구소	
참여기관(기업)	(주)LG생명과학기술원			
총연구기간	2000. 09. 16 - 2003. 06. 30			
총연구비	정부(600,000)천원    민간(600,000)천원    합계(1,200,000)천원			
연구책임자 1	성명	진창배	주민번호	
	근무기관 부서	한국과학기술연구원 생체대사연구센터	E-mail	cbjin@kist.re.kr
	직위/직급	센터장/책임연구원	전화번호	02) 958-5069
연구책임자 2	성명	박미정	주민번호	
	근무기관 부서	(주)LG생명과학기술원	E-mail	mpark@lgls.co.kr
	직위/직급	선임연구원	전화번호	042) 866-2104
실무연락책임자	성명	이용섭	소속/부서	한국과학기술연구원 의약화학연구센터
	직위/직급	책임연구원	E-mail	yslee@kist.re.kr
	전화번호	02) 958-5167	FAX	02) 958-5189
	주소	(136-791) 서울시 성북구 하월곡동 39-1		

## ■ 기술의 주요내용

### [기술의 개요]

뇌허혈은 임상적으로 심장정지 및 뇌졸중(중풍)에서 가장 보편적으로 나타나는 형태로 난치성 뇌신경세포 손상이 야기되어 뇌허혈 환자는 뇌기능 소실로 불구가 되거나, 혼수상태에 빠질 수 있으며, 심한 경우에는 사망에 이르게 된다. 미국의 뇌졸중의 연간 발생빈도는 약 50만명에 이르며, 심장질환과 암 다음으로 높은 사망률을 나타낸다. 국내의 경우는 단일 질환으로서는 제 1위의 사망원인으로 추정되고 있으며 매년 약 20만명의 성인들이 뇌졸중으로 고통을 받고 있는 실정이다. 반면에 허혈성 뇌졸중 발생 후에는 혈전용해제를 제외하고는 허혈에 의해 야기되는 뇌손상을 경감시킬 수 있는 신경보호제가 현재까지는 임상적으로 없는 상태이므로 그 개발이 시급한 실정이다.

본 발명의 알로에신은 3-30 mg/kg(i.v.) 용량범위에서 일시적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에 있어 유의한 신경보호 효과를 나타내었으며, 특히 영구적 허혈성 뇌손상 백서모델에서도, 비록 독성으로 인하여 개발이 중단되었지만 이제까지 가장 효능이 우수한 뇌졸중치료제 후보물질로 잘 알려진 MK-801보다 신경보호 효능이 더욱 우수하게 나타났다. 또한 알로에신은 일반행동, 중추신경계, 심장순환계, 호흡기계, 소화기계, 운동신경계, 면역계, 체온에 미치는 영향 등을 관찰한 일반약리 시험 및 급성, 아급성, 유전독성 시험 결과에서 매우 안전한 화합물임이 밝혀졌으므로 후속연구로 다른 약물과의 병용투여 가능성, 전임상 및 임상연구가 계속하여 진행된다면 새로운 뇌졸중 치료제로 개발될 가능성이 높을 것으로 사료된다.

### <기술적 특징>

- (1) 알로에신은 일시적 및 영구적 국소 허혈성 뇌손상 백서모델에서 유의한 신경보호 효과를 나타내 뇌손상 보호 효능이 우수함.
- (2) 알로에신은 급성, 아급성, 유전독성 등의 시험 결과에서 매우 안전한 화합물이며, 일반약리시험에서도 부작용이 거의 없는 것으로 나타났음.
- (3) 알로에신은 물에 대한 용해도가 뛰어나.

### [용도/이용분야]

- (1) 뇌졸중 치료용 신경보호제 후보물질
- (2) 뇌손상질환 치료용 신경보호제 후보물질
- (3) 허혈성 심장질환 예방 및 보호용 후보물질





■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개씩 선택(√호 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(√호 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(√호 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② 외국기술의 소화흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
√	③ 외국기술의 개선개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신창명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[ 기술개요 ]

기술명	손바닥선인장을 이용한 뇌신경보호용 식품의약 개발
개발단계	■ 연구개발 계획   □ 연구개발 중   □ 연구개발 완료
기술개요	손바닥선인장에서 분리된 성분인 KYS 50182는 항산화효능, 뇌신경세포의 보호효능, 허혈성 뇌손상 동물모델에서의 신경보호 효능이 우수하므로 손바닥선인장의 추출물을 뇌신경보호용 식품의약으로 개발하고자 함.

[ 기술을 도출한 과제현황 ]

과제관리번호	PF2-2			
과제명	항산화성 뇌신경보호용 식품의약 개발			
사업명	21C 프론티어연구개발사업			
세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구기관	한국과학기술연구원	기관유형	정부출연연구소	
참여기관(기업)	(주) SK 케미칼			
총연구기간	2003. 08. ~ 2006. 03. (2년 8월)			
총연구비	합계 : (1,375)백만원 - 정부 : (687.5)백만원   민간 : (687.5)백만원			
연구책임자	소속	한국과학기술연구원 생체대사연구센터	성명	진창배
	전화번호	02) 958-5069	E-mail	cbjin@kist.re.kr
연구개발 주요내용				
<p>손바닥선인장의 성분 중 하나인 KYS 50182는 항산화 작용이 우수할 뿐만 아니라, NMDA 수용체 활성화에 의하여 유발되는 뇌신경세포의 독성을 억제하며 또한 활성 산소종에 의하여 유발되는 신경세포독성을 억제하며, 신경세포 사멸과정을 지연시키는 등 3가지 이상의 작용효과를 통하여 뇌신경세포 보호효능을 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 KYS 50182가 신경보호 효능을 나타내는 기초적인 자료는 상당히 확보되었으므로 이 화합물을 활성성분으로 포함하고 있는 손바닥선인장의 추출물을, 식물 추출물의 규격화, 표준화, 제제화, 적정 투여량, 안전성 등의 후속 개발연구를 진행하여 뇌신경세포 보호용 식품의약으로 개발하고자 함.</p>				