

이학석사 학위논문

# 고삼의 항산화 활성성분

지도교수 최 재 수

이 논문을 사 학 위 논문 제출함



2005년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

정 희 진

# 정희진의 이학석사 학위논문을 인준함

2004년 12월 13일

주 심      농학박사      남   택   정



위   원      이학박사      류   은   순



위   원      약학박사      최   재   수



# 목 차

Abstract -----	1
I. 서론 -----	4
II. 재료 및 방법 -----	7
1. 재료 -----	7
2. 시약 및 기기 -----	7
2-1. 시약 -----	7
2-2. 기기 -----	8
3. 방법 -----	9
3-1. 추출 및 분획 -----	9
3-2. 성분의 분리 -----	11
3-3. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 획분의 성분 분리 -----	12
3-4. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 획분에서 분리된 성분의 분광학적 성질 -----	15
4. 항산화 활성 실험 -----	23
4-1. DPPH radical 소거 활성 -----	23
4-2. 활성 산소종 생성 억제 활성 -----	25
4-3. ONOO 소거 활성 -----	29
4-4. Hydroxy radical 소거 활성 -----	32
III. 결과 및 고찰 -----	34
1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 항산화활성 -----	34
2. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 분획에서 분리된 화합물의 구조 결정 -----	37
2-1. Phenolic 화합물의 구조 결정 (1-3, 12) -----	37
2-2. Pterocarpan 화합물의 구조 결정 (4-5, 14) -----	49

2-3. Flavonoid 화합물의 구조 결정 (6-11, 13)-----	61
3. 분리된 화합물의 항산화활성 -----	77
3-1. Phenol성 화합물과 pterocarpan 화합물의 항산화활성 -----	77
3-2. Flavonoid 화합물의 항산화활성 -----	79
IV. 요약 및 결론 -----	81
V. 참고 문헌 -----	83

감사의 글

# **Antioxidant Constituents from the Roots of *Sophora flavescens* Ait.**

**Hee-Jin Jung**

***Department of Food and Life Science, Graduate School,  
Pukyong National University***

## **Abstract**

Sophorae Radix, the dried roots of *Sophora flavescens*, a well-known Chinese traditional medicine has been used as a diuretic, stomachic, antipyretic, anthelmintic and eczema. This plant grows as a perennial herb, and is widely distributed in northeast Asian countries; it is currently rare in the wild, but commonly cultivated and available commercially in Korea. Phytochemical studies on this plant have so far yielded such as alkaloids, flavonoids, chromones, and saponins.

In the present studies, the antioxidant activity of the MeOH extract and its organic solvent soluble fractions such as CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH fractions and H<sub>2</sub>O layer from the roots of *S. flavescens* were evaluated by the DPPH radical, total ROS, ONOO<sup>-</sup> and ·OH scavenging or inhibitory tests. Among those fractions of the MeOH extract of the roots of *S. flavescens* tested in four model systems, generally the EtOAc fraction showed the strong inhibition activity. The radical scavenging effect of the EtOAc fraction on DPPH radical exhibited strong antioxidant activity, whereas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction showed moderate activities in test model systems. In this study, the antioxidant effect for the potential to scavenge of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction derived from *S. flavescens* was

investigated.

The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-soluble fraction was successive-column-chromatographed over silica gel, Sephadex LH-20 and RP-18 to isolate compounds (compounds **1-14**) as represented by four phenolic compounds [*trans*-hexadecyl ferulic acid (**1**), *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**), *trans*-hexadecyl sinapic acid (**3**), umbelliferone (**12**)], three pterocarpan compounds [(-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6*aR*,11*aR*)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**), (-)-maackiain (**5**), trifolirhizin (**14**)] and seven flavonoid compounds [xanthohumol (**6**), formononetin (**7**), desmethylanhydroicaritin (**8**), (2*S*)-2'-methoxykurarinone (**9**), (2*S*)-3β,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone (**10**), (2*S*)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone (**11**), kuraridin (**13**)]. The structural identification of these compounds was performed by analysis of 1D (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR) and 2D NMR (HMQC and HMBC) spectral data, and by comparisons with published spectral data. Among them, compounds **2**, **4**, **6**, **8**, and **10** were isolated from this plant for the first time.

Also, the antioxidant activities of some isolated compounds were evaluated by the DPPH radical and ONOO<sup>-</sup> scavenging tests. Among the tested compounds, compounds **1-4** and **8** showed the DPPH radical scavenging effects with IC<sub>50</sub> values of 33.01, 57.06, 39.84, 35.83, and 18.11 μM, respectively. L-Ascorbic acid, when used as a positive control, exhibited an IC<sub>50</sub> value of 7.39 μM. **1-4** and **8** appear to exert significant scavenging effects on authentic ONOO<sup>-</sup>. The IC<sub>50</sub> values of **1-4** and **8** are 5.76 ± 1.19, 15.06 ± 1.64, 8.17 ± 4.97, 1.95 ± 0.29, and 4.06 ± 2.41 μM, respectively. Penicillamine (IC<sub>50</sub> = 2.36 ± 0.79 μM) was used as a positive control. However, the other compounds (**5-7**, **9-14**) showed no activity at the highest concentration (100 μM) in both free radical and ONOO<sup>-</sup> scavenging tests.

The antioxidant effects of active compounds **1-4** and **8** on both DPPH radicals and ONOO<sup>-</sup> are believed to be attributable to their hydrogen-donating ability. Compounds **1-4** and **8** contain free phenolic hydroxyl groups in their structures, and phenolic

hydroxyls have been recognized to function as electron or hydrogen donors. These results suggest that flavonoids, hydroxycinnamates and related phenolic acids are reported to function as potent antioxidant by virtue of their hydrogen donating. Thus, the free radical and ONOO<sup>-</sup> scavenging activity of these compounds may be mostly related to their phenolic hydroxyl groups and it may play an important role in the actions of the *S. flavescens*.

The present work would tend to isolate the antioxidant capacities from the *S. flavescens*. It will be interesting to further investigate the antioxidant activity of these natural compounds in preventing various radical-mediated injuries in pathological stations *in vivo*.

## I. 서론

고삼 (苦參, *Sophorae Radix*)은 콩과 (Leguminosae)의 다년생 초본으로서 주피를 벗긴 뿌리로 한방에서는 이뇨, 이질, 해열과 위출혈 등에 쓰이는 생약재이며, 우리나라, 일본, 중국과 시베리아 등지에서 자생한다. 임상학적으로 습진, 피부화농증, 여성의 음부소양 등의 피부병에 대하여 외용하였다 (신, 1986). 이 약의 성상은 원주형을 이루고, 바깥면은 어두운 갈색 또는 황갈색이며, 세로 주름이 뚜렷하고 짧은 피목이다 (이, 1997). 고삼의 성분으로는 3~4 %의 alkaloids와 6~10 %의 flavonoids 그리고 saponins 등이 함유하고 있음이 알려져 있다 (Kyogoku *et al.*, 1973 ; Wu *et al.*, 1985 ; Ryu *et al.*, 1997b ; Yagi *et al.*, 1989 ; Ding *et al.*, 1992).

고삼으로부터 분리된 prenylated flavonoids 화합물의 작용기는 탄소 5개로 이루어진 isoprenyl group과 탄소 10개의 lavandulyl group을 가지는 flavonoids로서 그 성분과 생리활성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다 (Barron and Ibrahim, 1996 ; Matern *et al.*, 1988 ; Peters and Nagern, 1997 ; Tahara and Ibrahim *et al.*, 1995). 이 식물의 대부분은 Chinese medicine에 항염증제로 사용되고, 이들 식물 구성성분들은 flavonoids 골격 구조의 일부로서 isoprenyl (3,3-dimethylallyl), geranyl (E-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl), 1,1-dimethylallyl 그리고 lavandulyl (5-methyl-2-isoprenyl-hex-4-enyl)잔기를 가지는 화학적 group이다 (Yamamoto *et al.*, 2002). 이전 보고에 따르면, prenylated flavonoids의 생리 활성으로는 혈소판 응집 저해효과 (Ko *et al.*, 1999), 항종양 활성 (Ryu *et al.*, 1997a), phospholipase C<sub>γ</sub> 저해 활성 (Lee *et al.*, 1997), cyclooxygenase와 lipoxygenase 활성에 대한 영향이 보고된 바 있다 (Kimura *et al.*, 1986 ; Chi *et al.*, 2001). 또한 Kim 등 (2003)은 고삼의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분으로부터 Tyrosinase inhibitory 활성에 대한 prenylated flavonoids 화합물인 sophoraflavanone G, Kuraridin 그리고 kurarinone을 분리, 동정하여 그 활성을

보고 하였다. 특히 prenylated flavonoids는 일반적인 flavonoids보다 친유성 (hydrophobic)을 가지는데, 이는 의약적으로 topically 방법을 사용할 때 세포막과 피부점막을 통해 쉽게 스며드는 이점이 있다. 또한 prenylated flavonoids가 arachidonic acid metabolizing 효소에 대해 저해 활성을 가지게 될 때 이는 항 염증제로 사용된다. 이전 연구에서는 thromboxanes (TX), prostaglandin (PG), hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) 대사 효소, cyclooxygenase (COX) 그리고 lipoxygenases (LOX)에 대해 몇 개의 prenylated flavonoids의 저해 활성에 대해 보고하였다 (Kim *et al.*, 2002a). 이것은 지용성에 대한 prenylation의 효과가 쉽게 흡수하는 것으로 혈액에서 지단백질 입자와 함께 결합되어 이동하기 때문이다. 이와 같이 산화적 stress를 포함한 류마티스와 같은 염증성 조건의 치료에 이런 식물의 사용이 민족 약물학과 관련되어 있음을 보고하였다 (Dufall *et al.*, 2003).

생체내 산소가 유입되어 세포 내에서 이용될 때, superoxide anion radical ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) 그리고 지질의 free radical 즉, alkoxy radical ( $\text{RO}\cdot$ ), alkyl peroxy radical ( $\text{ROO}\cdot$ )과 같은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 부산물로 생성된다 (Singh, 1989). 또한 peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )는 생체 내에서 nitric oxide ( $\text{NO}^-$ )과  $\text{O}_2$ 의 반응으로 생성되는 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)으로 ROS와 함께 활성종 (reactive species)에 포함된다 (Sawa *et al.*, 2000 ; Balavoine and Genletii, 1999). 생체 내에서 활성 산소종 (ROS)과 질소종 (RNS)은 세포내 여러 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산 그리고 DNA를 산화시켜 염증을 유발하고 세포내 조직을 손상시켜며 (Beckman *et al.*, 1990), 많은 퇴행성 질환, 즉 암 (Dreher *et al.*, 1996), 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심-혈관 질환, 심부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다. 앞으로 활성종에 의해 유발된 많은 질환을 예방할 뿐만 아니라, 그 발암성과 독성이 문제시되고 있는 합성 항산화제 (Brancen,

1975)를 대체하기 위해, 천연물로부터 강력하면서 독성이 없는 천연 항산화제를 찾아내는 것이 절실히 요구된다.

따라서 본 연구에서는 고삼의 항산화성 flavonoids의 동정과 항산화 활성의 규명에 대한 연구를 위하여 고삼의 MeOH 추출물과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물들의 항산화 활성을 DPPH radical, ROS 소거 활성, peroxy nitrite 및 hydroxy radical 소거 활성으로 살펴보았다. 그 결과로 EtOAc 획분이 활성이 높았으나, 본 연구에서는 그 활성 연구가 많이 이루어지지 않은 비극성 분획인 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분을 가지고 silica gel column chromatography와 Sephadex LH-20 그리고 RP-18 gel을 사용하여 성분을 분리하고, 분리된 화합물의 구조는 IR, UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC, HMQC 및 EIMS 등의 분광학적 방법을 이용하여 화합물 **1~14**를 분리·동정하였다. 이들 분리한 phenolic 화합물, pterocarpan 화합물 그리고 flavonoids 화합물의 항산화 활성을 DPPH radical과 peroxy nitrite 소거 활성을 통하여 항산화 활성이 나타났음을 밝혔다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에서 사용한 고삼 (*Sophora flavescens*)은 2003년 4월 서울에 소재한 남성당 건재 약방에서 국산으로 구입하였다. 식물 표본은 본 연구실에 보관하였다 (NO.20030320).

### 2. 시약 및 기기

#### 2-1. 시약

Column packing materials은 kiesel gel 60 (Si gel, 70-230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734)과 sephadex LH-20 (bead size 25-100  $\mu\text{m}$ , Sigma), RP-18 (Lichroprep® RP-18, 40-63  $\mu\text{m}$ , Merck)을 사용하였으며, TLC (Thin layer chromatography) plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (0.25 mm, precoated, Merck, Art. 5715)과 RP 18 F<sub>254s</sub> (Merck, Art. 5685)를 사용하였으며, spray reagent는 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 사용하였다. 추출 및 column chromatography에는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정시 사용한 용매는 DMSO-*d*<sub>6</sub> (Merck, deuterium degree 99.95 %), CDCl<sub>3</sub> (Merck, deuterium degree 99.95 %)이다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 과 L-ascorbic acid, DL-penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid), trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) 와 DHR 123 (dihydrorhodamine 123)은 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)로 부터 구입하였으며, ONOO는 Cayman Chemicals Company (Ann Arbor, MI, U.S.A.)으로 부터 구입하여 항산화 활성 실험을 시행하였다.

## 2-2. 기기

IR spectrum은 Perkin-Elmer 2000 spectrophotometer를 사용하여 KBr disc 법으로 측정하였다. UV spectrophotometer는 VARIAN UV-Visible spectrophotometer를 사용하였고, CD 측정은 JASCO-715 spectropolarimeter를 사용하여 측정하였으며, 선광도는 Perkin-Elmer polarimeter 341 (U.S.A.)을 사용하였다. 또한 EIMS는 JEOL JMS-700 spectrometer를 사용하였다. TLC plate에 의한 화합물 검색시 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, U.S.A.)로 장파장 (365 nm), 단파장 (254 nm)에서 각각 관찰하였다. DPPH radical 흡광도는 microplate reader spectrophotometer VERSA max (Molecular Devices, CA, U.S.A.)로 측정하였고, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)와 oxidized DHR 123의 형광 강도는 microplate fluorescence reader FLX 800 (Bio-Tek Instruments Inc.)로 측정하였다. NMR spectrum은 JEOL JNM-ECP 400 ( $^1\text{H}$ -NMR 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz)을 사용하여 측정하였으며, 2D-NMR 인 HMBC, HMQC는 pulsed field gradient를 사용하여 측정하였다.

### 3. 방법

#### 3-1. 추출 및 분획

고삼 (*Sophora flavescens* Ait.) 뿌리의 MeOH 추출 및 각 용매별 분획 과정은 scheme 1에서 나타내었다. 건조한 고삼 뿌리 (5 kg)을 분쇄하여 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 10 L의 MeOH을 넣은 후 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과하였으며 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 1,067 g MeOH 추출액을 얻었다. 그 중 MeOH 추출 농축액 약 0.5 g 을 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다. 나머지 1,066 g은 H<sub>2</sub>O : MeOH (9/1, v/v)의 혼합용매로 녹인 다음 분획 깔대기에 부어 동량의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 넣어 가용부를 모아 무수망초 (sodium sulfate, anhydrous)로 처리한 다음 농축하였다. 이와 같은 방법으로 더 반복하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획 114 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 H<sub>2</sub>O 분획층에 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 획분 124 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법을 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분 305 g 과 하층의 H<sub>2</sub>O 획분 524 g 을 얻었다. 모든 분획 약 0.1 g은 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다.

# *Sophora flavescens*

(5 Kg)

MeOH (70 °C reflux, 10 L×3 times)

Filtration, evaporation

Concentrated MeOH extract (1,067 g)

H<sub>2</sub>O:MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1:10, v/v/v)

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fr. (114 g)

H<sub>2</sub>O layer

EtOAc

EtOAc fr. (124 g)

H<sub>2</sub>O layer

*n*-BuOH

*n*-BuOH fr. (305 g)

H<sub>2</sub>O fr. (524 g)

Scheme 1. Extraction and fractionation of the roots of

*Sophora flavescens* Ait.

### 3-2. 성분의 분리

고삼 (*S. flavescens*)의 MeOH 추출물과 그 분획인 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH  
획분과 H<sub>2</sub>O 층에 DPPH radical 소거 활성법, 세포내 활성 산소종 생성 억제  
활성법, hydroxy radical 소거 활성 그리고 peroxy nitrite 소거 활성법을  
이용하여 항산화 활성 실험을 하였다.

이에 EtOAc 획분이 활성이 높았으나, 본 연구는 활성성분이 많이  
밝혀지지 않은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20 그리고 RP-  
18 column chromatography를 수행하여 항산화 활성 성분을 분리하였다. 각  
subfractions 및 분리·정제된 화합물에 대하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (20:1, 15:1, 10:1),  
Hexane : EtOAc (10:1, 5:1) 전개용매로서 TLC 하여 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (TLC sprayer,  
Merck)로 발색시켜 200 °C 의 hot plate에서 탄화시켰다. 그리고 254 nm와 365  
nm의 UV lamp를 사용하여 형광을 띠는 물질을 검출하였다.

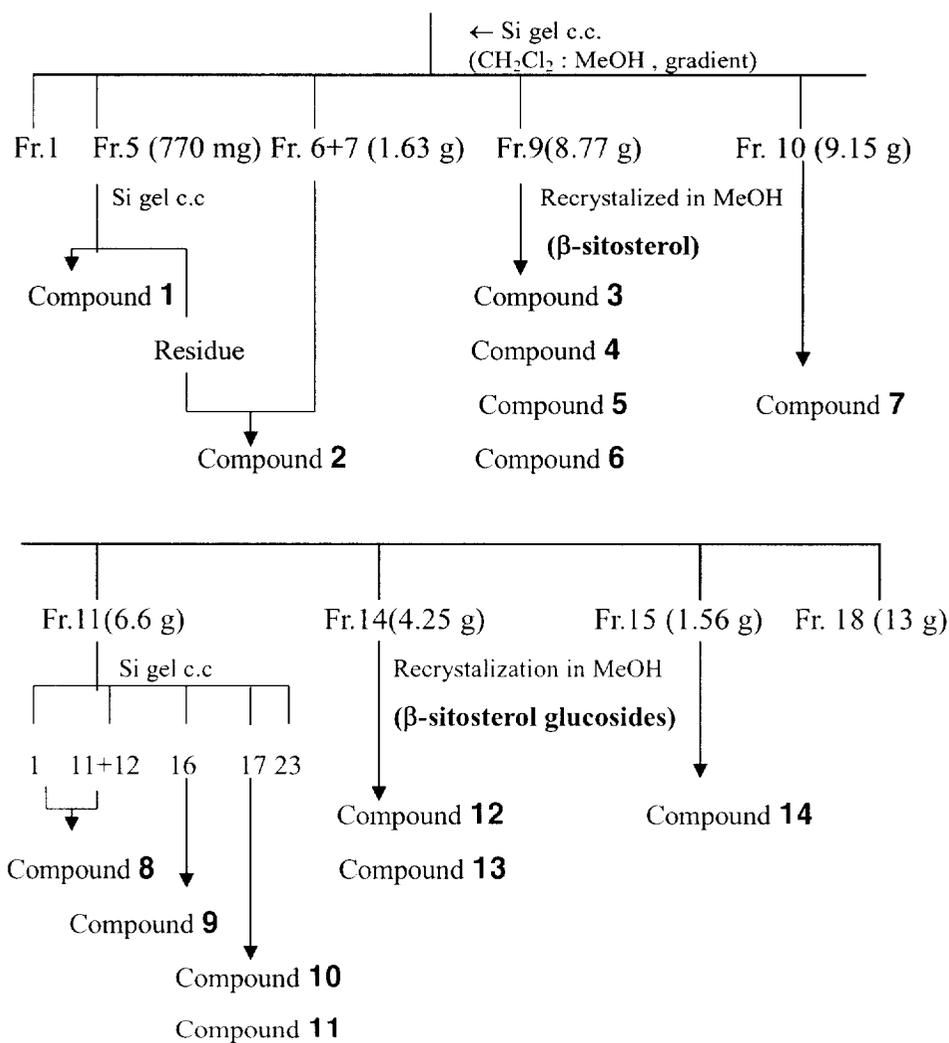
### 3-3. 고삼 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분의 성분 분리

고삼의 MeOH 추출물로부터 얻은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분을 대상으로 성분 분리한 과정을 Scheme 2에서 나타내었다. 고삼 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분 114 g중 70 g을 전개용매 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 80:1 → 1:1, MeOH, gradient)로서 silica gel column chromatography하여 18개의 subfractions (Fr.1-18)을 얻었다.

Fr.5 (770 mg)을 전개용매 Hexane : EtOAc (12:1 → 10:1, EtOAc, gradient)로 silica gel column chromatography하여 subfraction (fr. 5-1 ~ fr. 5-6)을 얻었으며, 이중 fr.5-5를 MeOH 재결정법에 의해 compound **1** (*trans*-hexadecyl ferulic acid, 15 mg)을 분리하였으며, fr.5-4 (250 mg)와 Fr.6+7 (1.63 g)을 합쳐서(1.88 g) 전개용매 Hexane : EtOAc (20:1)로 silica gel 하여 compound **2** (*cis*-octadecyl ferulic acid, 9 mg) 을 얻었다. Fr.9 (8.77 g)을 MeOH 결정법에 의해 β-sitosterol (55 mg)을 얻었고, 그 모액은 (8.72 g) 전개용매 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (100:1 → 1:1, MeOH, gradient)로 silica gel column 하여 compound **3** (*trans*-hexadecyl sinapic acid, 15 mg)와 compound **4** [(-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6a*R*,11a*R*)-8,9-methylenedioxypterocarpan, 10 mg], compound **5** [(-)-maackiain, 70 mg] 그리고 compound **6** (xanthohumol, 10 mg)을 얻었다. Fr.10 (9.15 g)을 전개용매 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (80:1 → 1:1, MeOH, gradient)로 silica gel column 하여 compound **7** (formononetin, 15 mg)을 얻었다. Fr.11 (6.6 g)을 전개용매 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (40:1 → 1:1, MeOH, gradient)을 사용하여 silica gel column 하여, subfraction (fr.11-1 ~ 11-23)을 얻었다. fr.11-11 (150 mg)과 fr.11-12 (165 mg)을 합쳐서 (315 mg) Sephadex LH-20으로 정제하여 compound **8** (desmethylanhydroicaritin, 10 mg)을 얻었으며, fr.11-16 (1.2 g)을 전개용매 Hexane : EtOAc (2:1 → EtOAc, gradient)로서 silica gel column 하여 Sephadex LH-20 (MeOH)과 RP-18 column으로 정제하여 compound **9** [(2*S*)-2'-methoxykurarinone, 24 mg]을 얻었고.

fr.11-17 (819.5 mg)을 전개용매 Hexane : EtOAc (1:1 → EtOAc, gradient)을 사용하여 silica gel column 하여 Sephadex LH-20 (MeOH) column와 RP-18 column으로 정제하여 compound **10** [(2*S*)-3 $\beta$ ,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-flavanone, 18 mg]과 compound **11** [(2*S*)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-flavanone, 25 mg]을 얻었다. Fr.14 (4.25 g)을 전개용매 Hexane : EtOAc (1:1 → EtOAc, gradient)을 사용하여 silica gel column 하여 compound **12** (umbelliferone, 52 mg)을 분리하였으며, 나머지 모액 (4.2 g)은 Sephadex LH-20 (MeOH)과 RP-18로 정제하여 compound **13** (kuraridin, 8 mg)을 얻었다. Fr.15 (1.56 g)은 MeOH 재결정법에 의해 compound **14** (trifolirhizin, 100 mg)을 얻었다.

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fr. (70 g)**



Scheme 2. Isolation of compounds **1–14** from the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of *Sophora flavescens* Ait.

### 3-4. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분에서 분리된 성분의 분광학적 성질

화학적 이동 (chemical shift)은 용매 peak를 기준으로, 혹은 내부 표준물질 tetramethylsilane (TMS)을 사용하여 ppm 단위를 나타내었다. 즉 DMSO-*d*<sub>6</sub>는 δ<sub>H</sub> 2.50과 δ<sub>C</sub> 39.5 ppm에서의 peak, CDCl<sub>3</sub>는 내부표준 물질 (TMS)을 기준으로 나타내었다. <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR의 다중도 (multiplicities)는 각각 s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (double doublet), brd (broad doublet), brt (broad triple) 그리고 m (multiplet)으로 표시하였다.

Compound **1** (*trans*-hexadecyl ferulic acid). Colorless needles, recrystallized from MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. EIMS (*m/z*, %) : 418 (M<sup>+</sup>, 100), 194 [(M-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>)<sup>+</sup>, 75], 177 [(M-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O-H)<sup>+</sup>, 27], 150 [(M-C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 19], 137 (24), 117 (8), 89 (9); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.61 (1H, d, *J*=16.1 Hz, H-7), 7.08 (1H, dd, *J*=1.9, 8.1 Hz, H-6), 7.04 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2), 6.92 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 6.29 (1H, d, *J*=16.1 Hz, H-8), 4.19 (2H, t, *J*=6.7 Hz, H-1'), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.70 (2H, m, H-2'), 1.25 (26H, s, H-3'-15'), 0.88 (3H, t, *J*=6.5 Hz, H-16'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 167.4 (C-9), 147.9 (C-4), 146.7 (C-3), 144.1 (C-7), 127.0 (C-1), 123.0 (C-6), 115.7 (C-5), 114.7 (C-8), 109.3 (C-2), 64.4 (C-1'), 55.9 (OMe), 31.9 (C-14'), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.8 (C-5'-13'), 25.9 (C-3'), 22.7 (C-15'), 14.1 (C-16').

Compound **2** (*cis*-octadecyl ferulic acid). EIMS (*m/z*, %) : 446 (M<sup>+</sup>), 194 [(M-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>)<sup>+</sup>, 100], 177 [(M-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O-H)<sup>+</sup>, 73]; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.77 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2), 6.88 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 7.10 (1H, dd, *J*=1.9, 8.1 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, *J*=12.9 Hz, H-7), 5.82 (1H, d, *J*=12.9 Hz, H-8), 4.12 (2H, t, *J*=6.7 Hz, H-1'), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.68 (2H, m, H-2'), 1.25 (30H, s, H-3'-17'), 0.88 (3H, t, *J*=6.5 Hz, H-18'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 166.6 (C-9), 147.0 (C-4), 145.9 (C-3), 143.6 (C-7), 127.3 (C-1), 125.6 (C-6), 116.9 (C-8), 113.8 (C-5), 112.8 (C-2), 64.4 (C-1'), 55.9 (OMe), 31.9 (C-3'), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 (C-5'-15'), 22.7 (C-17'), 14.1 (C-18').

Compound **3** (*trans*-hexadecyl sinapic acid). EIMS ( $m/z$ , %) : 448 ( $M^+$ ), 224 [ $M^+-(CH_2)_{15}CH_3+H$ , 88], 207 (224-OH, 43), 180 (224-COOH+H, 30), 167 (224-CHCOOH+H, 39);  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 7.54 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-7), 7.02 (2H, s, H-2, H-6), 6.52 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-8), 4.11 (2H, t,  $J=6.7$  Hz, H-1'), 3.77 (3H, s, OCH<sub>3</sub> $\times$ 2), 1.63 (2H, m, H-2'), 1.22 (26H, s, H-3'~15'), 0.88 (3H, t,  $J=6.5$  Hz, H-16');  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 166.6 (C-9), 148.0 (C-3, 5), 138.4 (C-7), 124.3 (C-1), 114.9 (C-8), 106.2 (C-2, 6), 63.7 (C-1'), 56.1 (OMe), 31.2 (C-14'), 28.9, 28.9, 28.7, 28.6 (C-5'~13'), 25.4 (C-3'), 22.1 (C-15'), 13.9 (C-16').

Compound **4** [(-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6a*R*,11a*R*)-8,9-methylenedioxypterocarpan]. Colorless needles; m.p 172-173 °C; EIMS ( $m/z$ , %): 314 ( $M^+$ , 100);  $[\alpha]_D^{20}$ : - 14.12° ( $c=0.004$ , MeOH); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 241 (sh, log  $\epsilon$  3.69), 312 (3.59) nm ; + NaOMe 309 (3.66) ; + NaOAc 311 (3.66) ; + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 241 (3.72), 313 (3.59) ; + AlCl<sub>3</sub> 240 (3.70), 311 (3.59) ; + AlCl<sub>3</sub> + HCl 240 (3.67), 312 (3.58) nm;  $^1H$ -NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.04 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H-1), 6.73 (1H, s, H-7), 6.67 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H-2), 6.44 (1H, s, H-10), 5.91 (2H, each d,  $J=12.9$  Hz, -OCH<sub>2</sub>O-), 5.52 (1H, d,  $J=6.9$  Hz, H-11a), 4.34 (1H, dd,  $J=5.0, 10.9$  Hz, H-6eq), 3.91 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.70 (1H, t,  $J=10.9$  Hz, H-6ax), 3.52 (1H, m, H-6a);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 154.2 (C-10a), 148.2 (C-9), 147.3 (C-3), 143.3 (C-4a), 141.8 (C-8), 134.0 (C-4), 121.0 (C-1), 117.7 (C-6b), 113.9 (C-11b), 105.4 (C-2), 104.8 (C-7), 101.3 (-OCH<sub>2</sub>O-), 93.8 (C-10), 78.4 (C-11a), 66.9 (C-6), 56.3 (OMe), 40.3 (C-6a).

Compound **5** [(-)-Maackiain]. mp 165 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : - 12.93° ( $c=0.03$ , MeOH);  $^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 7.24 (1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-1), 6.96 (1H, s, H-7), 6.52 (1H, s, H-10), 6.48 (1H, dd,  $J=2.4, 8.3$  Hz, H-2), 6.28 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-4), 5.92 (2H, each d,  $J=13.7$  Hz, -OCH<sub>2</sub>O-), 5.50 (1H, d,  $J=6.9$  Hz, H-11a), 4.22 (1H, dd,  $J=4.0, 10.5$  Hz, H-6eq), 3.59 (1H, t,  $J=10.5$  Hz, H-6ax), 3.57 (1H, m, H-6a);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 158.7 (C-3), 156.3 (C-4a), 153.7 (C-10a), 147.5 (C-9), 141.0 (C-8),

132.0 (C-1), 118.2 (C-6b), 111.3 (C-11b), 109.7 (C-2), 105.3 (C-7), 102.8 (C-4), 101.0 (-OCH<sub>2</sub>O-), 93.2 (C-10), 77.9 (C-11a), 65.8 (C-6), 39.6 (C-6a).

Compound **6** (xanthohumol). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 7.76 (1H, d, *J*=15.3 Hz, H-2), 7.66 (1H, d, *J*=15.3 Hz, H-3), 7.57 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-2', 6'), 6.84 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3', 5'), 6.07 (1H, s, H-6), 5.14 (1H, br t, *J*=6.9 Hz, H-2''), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.13 (2H, d, *J*=6.9 Hz, H-1''), 1.70 (3H, br s, H-4''), 1.60 (3H, br s, H-5''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 191.4 (C-4), 162.9 (C-7), 160.6 (C-5), 160.5 (C-9), 159.9 (C-4'), 142.3 (C-2), 130.4 (C-2', 6'), 129.8 (C-3''), 126.0 (C-1'), 123.8 (C-3), 123.1 (C-2''), 115.9 (C-3', 5'), 107.3 (C-8), 104.4 (C-10), 91.1 (C-6), 55.7 (OMe), 25.5 (C-4''), 21.0 (C-1''), 17.7 (C-5'').

Compound **7** (formononetin). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 8.44 (1H, s, H-2), 7.97 (1H, d, *J*=8.9 Hz, H-5), 7.51 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-2', 6'), 6.98 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3', 5'), 6.94 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-8), 6.87 (1H, dd, *J*=2.4, 8.9 Hz, H-6), 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 174.6 (C-4), 162.6 (C-7), 158.9 (C-4'), 157.4 (C-9), 153.1 (C-2), 130.0 (C-2', 6'), 127.3 (C-5), 124.3 (C-1'), 123.1 (C-3), 116.6 (C-10), 115.2 (C-6), 113.6 (C-3', 5'), 102.1 (C-8), 55.1 (OMe).

Compound **8** (desmethylanhydroicaritin). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 12.40 (1H, s, 5-OH), 10.73 (1H, s, 7-OH), 10.12 (1H, s, 4'-OH), 9.36 (1H, s, 3-OH), 8.03 (2H, d, *J*=8.9 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, *J*=8.9 Hz, H-3', 5'), 6.29 (1H, s, H-6), 5.17 (1H, t, *J*=6.8 Hz, H-2''), 3.42 (2H, d, *J*=6.8 Hz, H-1''), 1.74 (3H, br s, H-4''), 1.62 (3H, br s, H-5''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 176.1 (C-4), 161.1 (C-7), 159.1 (C-4'), 158.3 (C-5), 153.4 (C-9), 146.7 (C-2), 135.5 (C-3), 130.9 (C-3''), 129.3 (C-2', 6'), 122.5 (C-2''), 121.9 (C-1'), 115.4 (C-3', 5'), 105.6 (C-8), 102.9 (C-10), 97.8 (C-6), 25.4 (C-5''), 21.2 (C-1''), 17.8 (C-4'').

Compound **9** [(2*S*)-2'-methoxykurarinone]. Yellow amorphous powder; mp 102~104 °C;  $[\alpha]_D^{20}$ : + 0.25° (c=0.012, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 288 (4.02) nm; CD (c  $1.4 \times 10^{-4}$ , MeOH)  $[\theta]_{336} + 2.49$ ,  $[\theta]_{289} - 8$ ; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.30 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6'), 6.42 (2H, m, H-3', 5'), 6.12 (1H, s, H-6), 5.44 (1H, d, *J*=2.4, 13.4 Hz, H-2), 4.87 (1H, br t, *J*=6.7 Hz, H-4''), 4.55 (1H, br s, H-9''a), 4.47 (1H, br s, H-9''b), 3.72 (3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>), 3.70 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.17 (1H, dd, *J*=13.4, 16.4 Hz, H-3a), 2.86 (1H, dd, *J*=2.5, 16.4 Hz, H-3b), 2.50 (2H, m, H-1''), 2.49 (1H, m, H-2''), 1.92 (2H, m, H-3''), 1.58 (3H, s, H-10''), 1.52 (3H, s, H-6''), 1.42 (3H, s, H-7''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 188.7 (C-4), 162.3 (C-9), 162.2 (C-7), 159.6 (C-5), 158.8 (C-4'), 157.3 (C-2'), 147.9 (C-8''), 130.6 (C-5''), 127.3 (C-6'), 123.4 (C-4''), 117.5 (C-1'), 110.7 (C-9''), 106.9 (C-8), 106.8 (C-5'), 104.3 (C-10), 98.9 (C-3'), 92.5 (C-6), 73.1 (C-2), 55.3 (5-OMe), 55.2 (2'-OMe), 46.8 (C-2''), 44.1 (C-3), 30.7 (C-3''), 26.8 (C-1''), 25.5 (C-6''), 18.5 (C-10''), 17.5 (C-7'').

Compound **10** [(2*S*)-3 $\beta$ ,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-flavanone]. Yellow amorphous powder;  $[\alpha]_D^{20}$ : - 0.71° (c=0.018, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 289.3 (4.03) nm, 325.9 (3.57) nm; CD (c  $1.2 \times 10^{-4}$ , MeOH)  $[\theta]_{335} + 3.46$ ,  $[\theta]_{289} - 16.32$ ; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.29 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-2', 6'), 6.77 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3', 5'), 6.16 (1H, s, H-6), 5.08 (1H, br t, *J*=6.8 Hz, H-2''), 4.90 (1H, d, *J*=11.3 Hz, H-2), 4.25 (1H, d, *J*=11.3 Hz, H-3), 3.70 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.06 (2H, d, *J*=6.8 Hz, H-1''), 1.50 (3H, br s, H-5''), 1.53 (3H, br s, H-4''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 190.3 (C-4), 161.1 (C-7), 160.9 (C-9), 160.8 (C-4'), 159.5 (C-5), 130.0 (C-3''), 129.0 (C-2', 6'), 128.1 (C-1'), 122.6 (C-2''), 114.8 (C-3', 5'), 107.3 (C-8), 102.4 (C-10), 92.8 (C-6), 82.2 (C-2), 72.5 (C-3), 55.3 (OMe), 25.5 (C-4''), 21.3 (C-1''), 17.5 (C-5'').

Compound **11** [(2*S*)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-flavanone]. Amorphous yellow powder; m.p 204~206 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.28 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-2', 6'), 6.77 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3', 5'), 6.14 (1H, s, H-6), 5.31

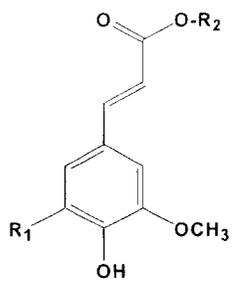
(1H, dd,  $J=3.0, 12.4$  Hz, H-2), 5.09 (1H, tt,  $J=7.1$  Hz, H-2''), 3.70 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.11 (2H, d,  $J=7.1$  Hz, H-1''), 2.93 (1H, dd,  $J=12.4, 16.4$ Hz, H-3eq), 2.54 (1H, dd,  $J=3.0, 16.4$  Hz, H-3ax), 1.58 (3H, br s, H-5''), 1.53 (3H, br s, H-4''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  : 188.2 (C-4), 161.6 (C-7), 161.4 (C-9), 159.6 (C-5), 157.4 (C-4'), 129.9 (C-1'), 129.6 (C-3''), 127.8 (C-2', 6'), 122.9 (C-2''), 115.1 (C-3', 5'), 107.4 (C-8), 104.5 (C-10), 92.7 (C-6), 77.9 (C-2), 55.3 (OMe), 44.6 (C-3), 25.5 (C-4''), 21.5 (C-1''), 17.5 (C-5'').

Compound **12** (umbelliferone). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  : 10.56 (1H, s, 7-OH), 7.92 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-4), 7.52 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H-5), 6.78 (1H, dd,  $J=2.2, 8.6$  Hz, H-6), 6.71 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-8), 6.19 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  : 161.3 (C-2), 160.4 (C-7), 155.5 (C-9), 144.5 (C-4), 129.7 (C-5), 113.1 (C-6), 111.4 (C-4), 111.3 (C-10), 102.2 (C-8).

Compound **13** (kuraridin). Yellow amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  : 14.87 (1H, s, 9-OH), 7.94 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-2), 7.85 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-3), 7.43 (1H, d,  $J=8.9$  Hz, H-6'), 6.38 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-3'), 6.32 (1H, dd,  $J=2.4, 8.9$  Hz, H-5'), 6.04 (1H, s, H-6), 4.98 (1H, m, H-4''), 4.57 (1H, br s, H-9''a), 4.50 (1H, br s, H-9''b), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.50 (2H, m, H-1), 2.49 (1H, m, H-2''), 2.01 (2H, t,  $J=6.7$  Hz, H-3''), 1.65 (3H, s, H-10''), 1.59 (3H, s, H-7''), 1.51 (3H, s, H-6''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  : 191.9 (C-4), 165.2 (C-5), 162.6 (C-7), 161.1 (C-9), 160.3 (C-4'), 158.9 (C-2'), 147.8 (C-8''), 138.6 (C-2), 130.4 (C-5''), 130.3 (C-6'), 123.4 (C-4''), 122.8 (C-3), 113.7 (C-1'), 110.8 (C-9''), 108.0 (C-8), 106.6 (C-5'), 104.4 (C-10), 102.5 (C-3'), 90.6 (C-6), 55.5 (OMe), 46.1 (C-2''), 30.8 (C-3''), 26.7 (C-1''), 25.6 (C-6''), 18.5 (C-10''), 17.6 (C-7'').

Compound **14** [trifolirhizin: (-)-maackiain-3- $\alpha$ - $\beta$ -D-glucopyranoside]. White amorphous powder; m.p 145~148 °C; EIMS:  $m/z$  446 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  : 7.36 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H-1), 6.99 (1H, s, H-7), 6.70 (1H, dd,  $J=2.4, 8.6$

Hz, H-2), 6.55 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-4), 6.53 (1H, s, H-10), 5.93 (2H, each d,  $J=12.9$  Hz, -OCH<sub>2</sub>O-), 5.57 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, H-11a), 4.84 (1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-1'), 4.27 (1H, dd,  $J=4.0, 10.5$  Hz, H-6eq), 3.62 (1H, t,  $J=10.5$  Hz, H-6ax), 3.32-3.43 (2H, m, H-5', H-6'), 3.15-3.28 (3H, m, H-2',H-3',H-4'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  : 158.4 (C-3), 156.2 (C-4a), 153.6 (C-10a), 147.4 (C-9), 141.1 (C-8), 131.8 (C-1), 118.2 (C-6b), 114.2 (C-11b), 110.4 (C-2), 105.3 (C-7), 104.0 (C-4), 101.0 (-OCH<sub>2</sub>O-), 100.2 (C-1'), 93.2 (C-10), 77.6 (C-11a), 69.7 (C-2', 3', 4'), 65.8 (C-6), 60.6 (C-6'), 39.7 (C-6a).

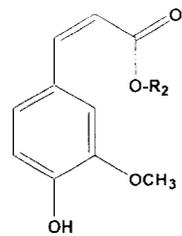


**1**  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

**1A**  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}$

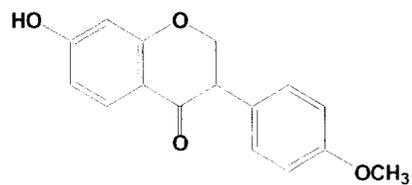
**3**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

**3A**  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$

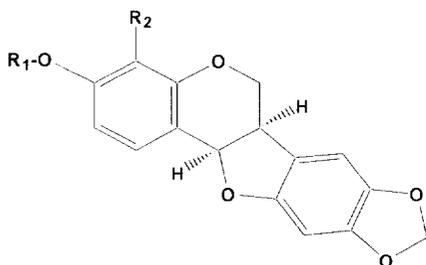


**2**  $R_2 = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$

**2A**  $R_2 = \text{H}$



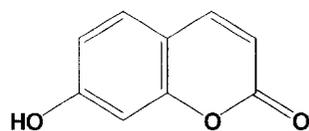
**7**



**4**  $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OH}$

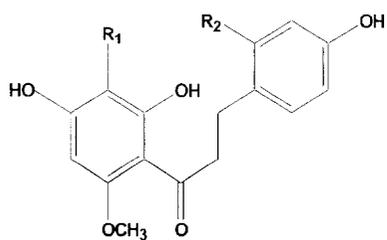
**5**  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}$

**14**  $R_1 = \text{Glu}, R_2 = \text{H}$



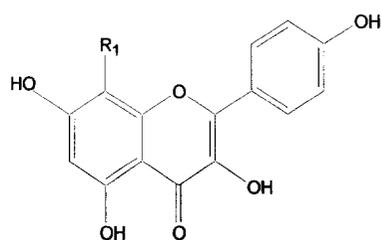
**12**

Fig. 1. Chemical structures of compounds **1-5**, **7**, **12**, **14**



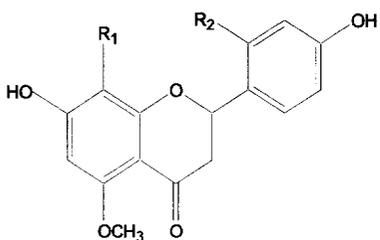
**6**  $R_1 = A, R_2 = H$

**13**  $R_1 = B, R_2 = OH$

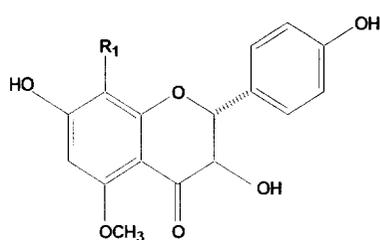


**8**  $R_1 = A$

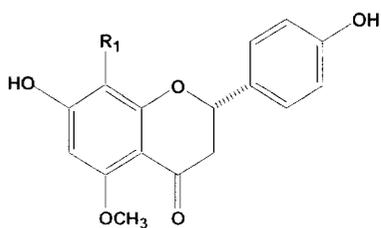
**8A**  $R_1 = H$



**9**  $R_1 = B, R_2 = OMe$



**10**  $R_1 = A$



**11**  $R_1 = A$

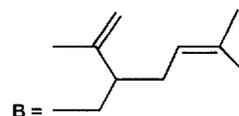
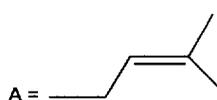


Fig. 2. Chemical structures of compounds **6, 8-11, 13**

## 4. 항산화 활성 실험

### 4-1. DPPH radical 소거 활성

DPPH radical 소거반응은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색법으로 특히 phenol 과 aromatic amine 화합물의 항산화 활성의 측정에 많이 사용되는 방법이다 (Blois, 1958). 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine 은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 520nm 에서 강한 흡수 band 를 보이는 특성을 가지고 있다. 그러나 phenol 과 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하게 되며 공여체로부터 전자나 hydrogen radical 을 받아 phenoxy radical 을 생성하게 된다. 이때 흡수 band 도 사라지고 안정한 분자가 된다. 즉, 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 의 색은 점점 옅어지게 되고, 흡광도 감소하게 되므로 반응액의 색이 보라색에서 노란색으로 변하는 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다 (Fig. 3) [Yokozawa *et al.*, 1998; Hatano *et al.*, 1989].

각 시료의 DPPH radical 에 대한 소거활성 측정은 다음과 같다 (Blois, 1958). 각 농도별 시료 (1.25 - 120  $\mu\text{m}/\text{mL}$ )를 메탄올에 녹인 뒤 160  $\mu\text{L}$  씩 취하여  $1.5 \times 10^{-4}$  M 농도로 메탄올에 용해시킨 DPPH 용액 40  $\mu\text{L}$  와 잘 혼합하였다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader spectrophotometer VERSA max 로 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고 50 % 소거농도 ( $\text{IC}_{50}$ 는  $\mu\text{g}/\text{mL}$  혹은  $\mu\text{M}$  로 표현)을 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다 (scheme 3) [Yoshida *et al.*, 1989; Yamasaki *et al.*, 1994].

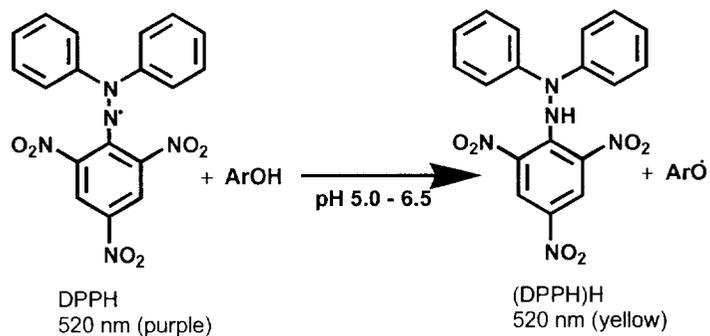
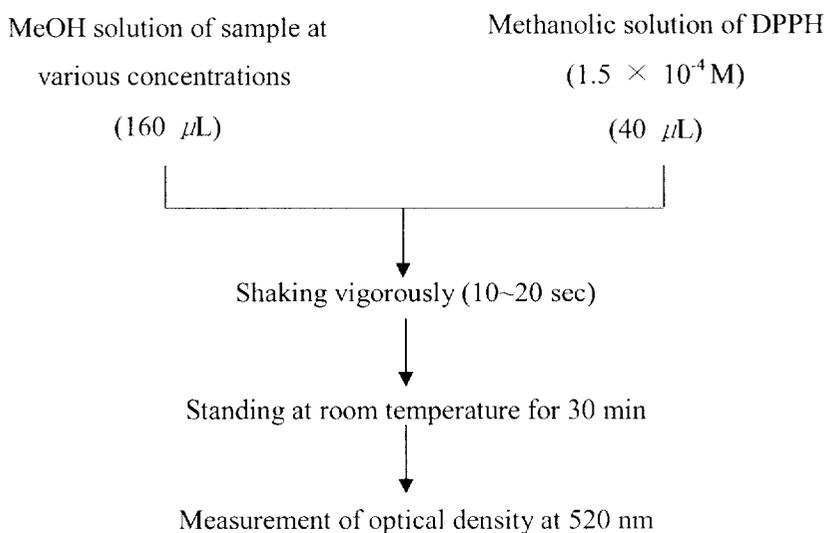


Fig.3 . DPPH radical scavenging action of antioxidants [ArOH].  
(Blois, 1958)



Scheme 3 . Measurement of DPPH radical scavenging activity.

#### 4-2. 활성 산소종 생성 억제 활성

하나 또는 그 이상의 비공유 전자를 가지면서 독립적으로 존재할 수 있는 종류들을 유리기(free radical)라고 하며, 이들은 정상적인 세포 또는 병리상태의 세포의 이물질 대사 또는 이온화 조사를 통해 생성된다. 분자내 산소와 같은 전자 수용체들이 이 유리기들과 즉각 반응하여 그 자신이 radical 이 되는데 이들을 reactive oxygen species (ROS)라 한다.

생물학적 조직에서의 지방산화에 의한 손상 정도를 측정하기 위해, 세포배양에서 비형광 probe 인 DCFH-DA 를 이용하여 생물 세포의 활성산소종을 직접적으로 정량 측정할 수 있는 방법을 사용하고 있다 (Bass *et al.*, 1983 ; Hempel *et al.*, 1999 ; Wang and Joseph., 1999). DCFH-DA 는 안정한 비 형광성 분자로 세포막에 쉽게 교차 결합하며 세포내 존재하는 esterase 에 의해 deacetylation 되어 비형광성 환원물질인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 전환된다. DCFH 는 세포내 활성 산소가 존재하면 급격히 산화되어 형광성 산화물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)가 형성되므로 (Fig. 4) 이 형광의 변화를 측정함으로써 세포내 활성 산소종 특히,  $\cdot O_2$ 의 초기 생성량을 정량할 수 있게 된다 (LeBel and Bondy, 1990). 그러나 DCFH-DA 는 수용성 활성산소종에 대해서는 특이성이 없기 때문에 그 사용에 다소 제한되는 문제가 있다 (Delia *et al.*, 1997).

Scheme 4에 나타내었듯이 LPS 처리한 수컷 Wistar rats (체중 150 - 200 g)의 신선한 kidney homogenate 상등액 190  $\mu$ l 에 여러 농도의 extract 나 compound 를 10  $\mu$ l 를 혼합하고, 12.5 mM DCFH-DA 를 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 100배 희석한 것 50  $\mu$ l 와 함께 5분간 shaking 한다. 생성된 reactive oxygen species (ROS)는 microplate fluorescence spectrophotometer (Bio-Tek Instruments Inc.)에서 excitation wavelength 485 nm 와 emission wavelength 530 nm 에서 3 ~ 5분 간격으로 30분간 측정하였다 (LeBel and Bondy, 1990). 형광

강도가 증가하지 않은 것은 실험한 화합물이 활성 산소종을 소거하여, DCFH가 산화되지 않았으므로 항산화 물질임을 의미한다.

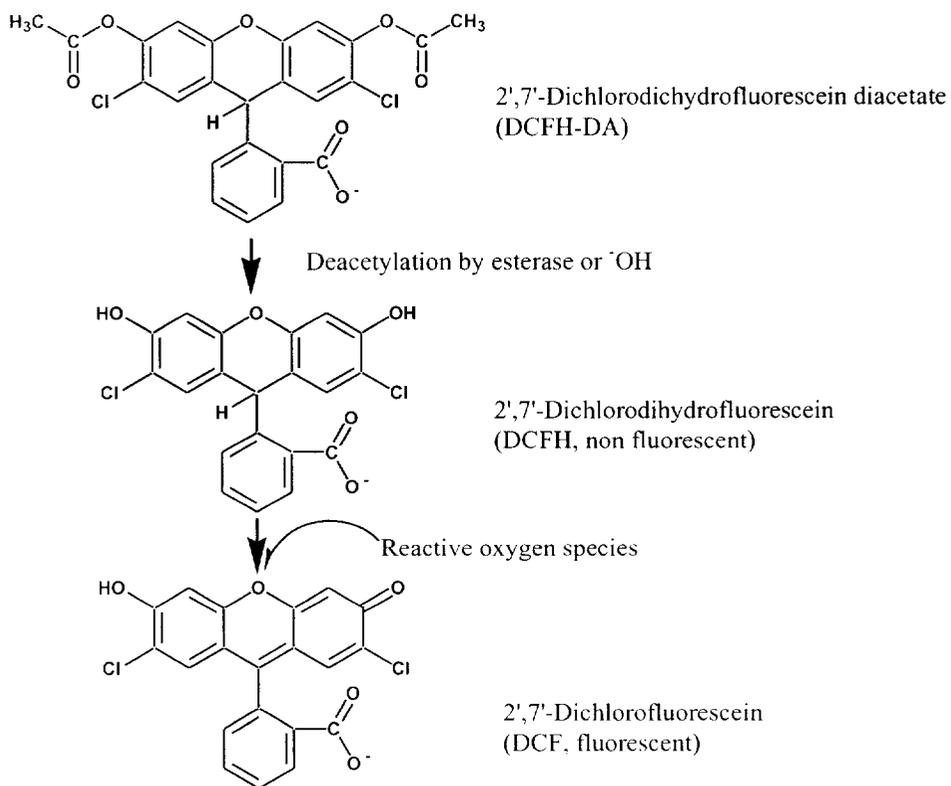
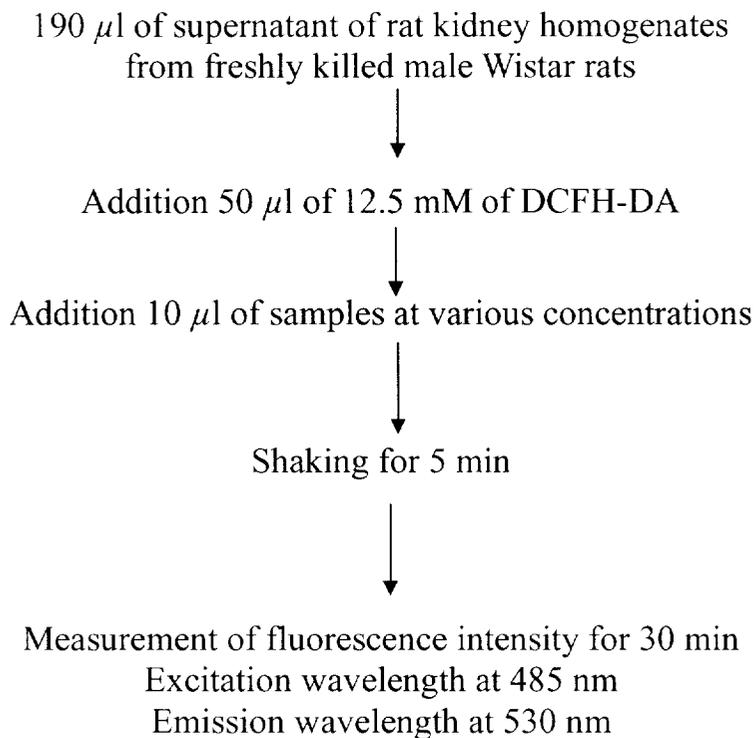


Fig. 4 . Assay of the inhibitory activity on the ROS generation.

(LaBel and Bondy, 1990)



Scheme 4 . Measurement of the inhibition on the ROS generation by DCF method.

### 4-3. Peroxynitrite 소거활성

Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )는  $\text{NO}\cdot$  와  $\cdot\text{O}_2^-$  가 반응하여 생성되는 것으로,  $\text{NO}\cdot$ 와 유사한 생리작용을 가지며, 주요 생리 작용으로는 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanyl cyclase의 자극, tyrosine nitration 외에 lysine, protein의 methionine 잔기의 산화 및 지질 과산화 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아에 의한 호흡 억제, membrane pump 억제, GSH의 고갈, ADP ribose synthase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해와 여러 만성 질환의 병변과 관련됨이 보고되어 있다 (Althaus *et al.*, 1994 ; Haenen *et al.*, 1997 ; Lin *et al.*, 1997).  $\text{ONOO}^-$ 는 다른 free radical에 비해 상대적으로 안정하지만, 생리적 pH에서 쉽게 proton화 되어 반응성이 매우 높은 peroxynitrous acid ( $\text{ONOOH}$ )로 전환되는데, 이 물질은 반감기 (1.9 s)가 매우 짧고, 여러 세포 독성 물질인 nitrogen dioxide, nitronium ion 및 hydroxy radical의 전구체로 작용하여 oxidation, nitration, hydroxylation 반응을 유발한다 (Nonoyama *et al.*, 1999). 그러나 세포 내에서는  $\text{ONOO}^-$  소거 활성에 관여하는 효소계가 없으므로, 그 소거활성물질을 찾는 것이 더욱 중요하다 (Choi *et al.*, 2002). 지금까지 보고된 천연 또는 합성의  $\text{ONOO}^-$  소거능을 갖는 물질로는 flavonoid (Choi *et al.*, 2002), catechin, polyphenol (Van *et al.*, 2000 ; Chung *et al.*, 1998), ergothioneine (Aruoma *et al.*, 1999), defroxamine, urate, glutathione (Menconi *et al.*, 1998), melatonin (Cuzzocrea *et al.*, 1999) 그리고 D(-)-penicillamine (Fici *et al.*, 1997) 이 있다.

$\text{ONOO}^-$  소거능은 Kooy *et al.*, (1994)의 방법을 약간 변형하여 DHR 123의 산화를 측정하였다 (Scheme 5). Dimethylformamide로 녹인 DHR 123 (5 mM)는 질소 충전하여  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  에서 stock solution으로 저장하였다. 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate, 5 mM potassium chloride로 조제한 buffer (pH 7.4)를 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100  $\mu\text{M}$ 과 섞어, DHR 123의

최종 농도가 5  $\mu\text{M}$ 이 되도록 한다. 이 working solution에 시료와 authentic ONOO<sup>-</sup>를 첨가하면 5분 후, 비형광성의 DHR 123이 형광성의 rhodamine 123으로 바뀌게 된다 (Fig.5). 이 형광물질을 microplate fluorescence reader FL 800 (Bio-Tek Instruments Inc.)로 excitation, emission wavelength 각각 480 nm와 530 nm에서 측정하였다. 결과는 DHR 123 산화 저해 백분율로서 mean  $\pm$  standard error ( $n = 3$ )로 나타내었다.

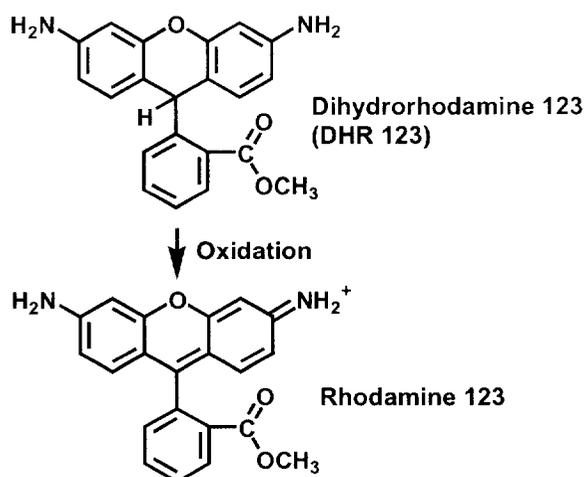
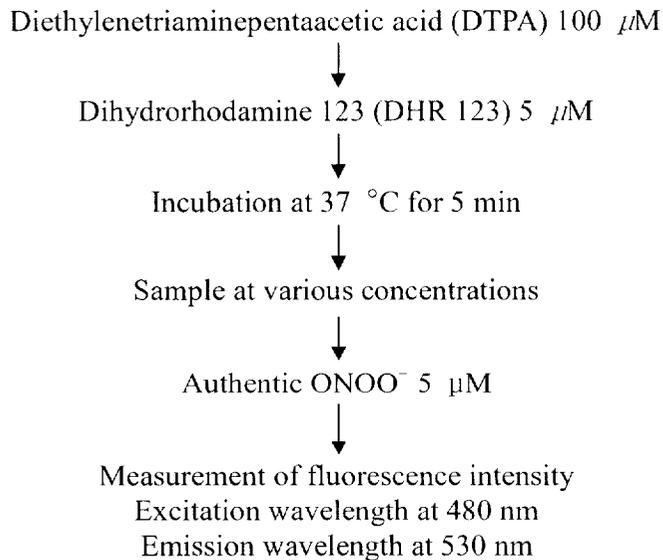


Fig. 5 . ONOO<sup>-</sup>-mediated oxidatin of DHR 123.

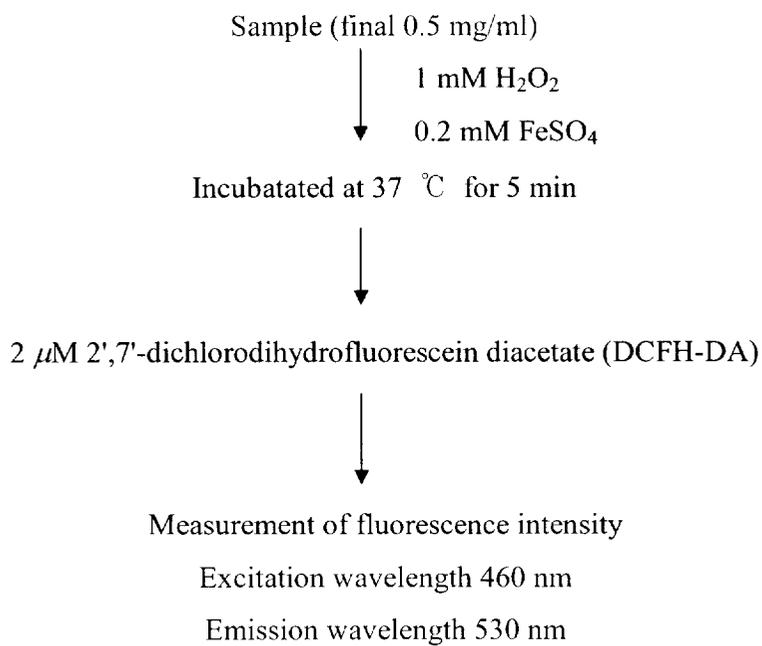
(Crow, 1997)



Scheme 5 . Measurement of the ONOO<sup>-</sup> scavenging activity.

#### 4-4. Hydroxy radical 소거활성

활성산소의 종류로는 superoxide radical, hydroxy radical, hydrogen peroxide 및 singlet oxygen 등이 있다. 그 중에서 hydroxy radical은 fenton 반응에서  $\text{Fe}_2^+$ 와 같은 전이 금속이 존재할 때  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로부터 생성되어진다. 일반적으로 hydroxy radical은 짧은 반감기 ( $\sim 10^{-9}$  sec)를 가지기 때문에 매우 반응성이 높다. 각 농도의 시료 (최종농도 0.5 mg/mL)에 1mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  그리고 0.2 mM  $\text{FeSO}_4$ 를 잘 섞어서 37 °C에서 5분 동안 배양하였다. 배양시킨 후 2  $\mu\text{M}$  2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 첨가시킨 후 산화된 DCF의 형광 강도를 microplate reader를 사용하여 excitation wavelength 460 nm, emission wavelength 530 nm에서 30분간 형광 변화를 측정하였다 (Scheme 6).



Scheme 6. Measurement of the hydroxy radical scavenging effect  
(LaBel and Bondy, 1990)

### III. 결과 및 고찰

#### 1. MeOH 추출물과 각 획분들의 항산화 활성

고삼의 MeOH 추출물 그리고 각 획분물  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, *n*-BuOH과  $\text{H}_2\text{O}$ 층 대하여 DPPH radical 소거 활성, 활성산소종 생성 억제활성, ONOO<sup>-</sup> 소거 활성 그리고 Hydroxy radical 소거 활성을 측정하였다.

고삼 MeOH 추출물 그리고 각 획분  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, *n*-BuOH과  $\text{H}_2\text{O}$  층에 대한 항산화활성 실험은 Table 1에 나타내었다. 고삼의 DPPH radical 소거 활성은 EtOAc 획분 >  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분 > MeOH 추출물 > *n*-BuOH 획분 >  $\text{H}_2\text{O}$  층 순으로 나타났으며, 이 결과로 고삼의 DPPH radical 소거 활성을 지닌 성분은 대부분 EtOAc 획분과  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분에 존재함을 알 수 있었다. 고삼 EtOAc 분획의 활성산소종 억제 농도는  $1.63 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ 로 낮게 나타났으며, 대조군인 trolox는  $23.67 \pm 0.82 \mu\text{g/mL}$  보다 높은 저해 활성을 나타냈으며 MeOH 추출물,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분, *n*-BuOH 분획 순으로,  $16.82 \pm 0.98$ ,  $18.98 \pm 4.81$ ,  $27.17 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$ 로 측정된 것으로 보아  $\text{H}_2\text{O}$ 층을 제외한 모든 획분에 활성산소종 억제활성을 가진 성분이 포함되어 있을 것으로 여겨진다. ONOO<sup>-</sup>소거 활성은 EtOAc 분획이  $4.64 \pm 1.78 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮은 저해 농도를 나타냈으며, 그 다음으로  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분, MeOH 추출물, *n*-BuOH 획분,  $\text{H}_2\text{O}$  층 순으로 나타났다. Hydroxy radical 소거 활성은  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분이  $11.78 \pm 0.37 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮은 저해 농도를 나타냈으며, 그 다음으로 *n*-BuOH 획분 > EtOAc 분획 >  $\text{H}_2\text{O}$  층 순으로 저해 농도가 높게 나타났다.

고삼에 대한 이러한 항산화활성 결과를 미루어보아 항산화활성 성분이 여러 획분 중 EtOAc 분획과  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분에 많이 존재하고 있음을 추정할 수 있으며, 주로 radical 소거나 활성 산소종 억제 활성에 의해 항산화활성을 나타낼 것으로 여겨진다. 본 연구에서는 항산화 활성 연구가 많이 이루어지

지 않은 지용성 분획인  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  휘분을 가지고 활성성분 물질을 분리 하고자 하였다.

Table 1. Antioxidant activities of extracts derived from *S. flavescens* on DPPH, ROS, ONOO<sup>-</sup>, and ·OH

Samples	DPPH <sup>a</sup>	ROS <sup>b</sup>	ONOO <sup>-c</sup>	·OH <sup>d</sup>
MeOH	55.10	16.82 ± 0.98	25.76 ± 2.58	8.69 ± 0.34
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	37.01	18.98 ± 4.81	23.41 ± 1.70	11.78 ± 0.37
EtOAc	23.57	1.63 ± 0.03	4.64 ± 1.78	14.68 ± 0.29
<i>n</i> -BuOH	108.06	27.17 ± 0.55	27.78 ± 0.95	14.66 ± 0.91
H <sub>2</sub> O	953.85	NS	57.76 ± 5.22	NS
L-Ascorbic acid	1.94			
Trolox		23.67 ± 0.82		1.6 ± 0.31
Penicillamine			1.58 ± 0.11	

<sup>a</sup>DPPH is the free radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>: μg/mL). <sup>b</sup>ROS is the inhibitory activity of total free radical generation in kidney postmicrosomal fraction at the concentration of 40 μg/mL (IC<sub>50</sub>: μg/mL).

<sup>c</sup>ONOO<sup>-</sup> is the inhibitory activity of authentic peroxynitrite (IC<sub>50</sub>: μg/mL). <sup>d</sup>·OH is the inhibitory activity of hydroxyl radical generation in 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.2mM FeSO<sub>4</sub> at the test concentration of 40 μg/mL (IC<sub>50</sub>: μg/mL). NS represents no inhibitory effect at 40 mg/mL.

## 2. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분에서 분리된 화합물의 구조결정

고삼의 획분 중 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분을 대상으로 column chromatography하여 14종의 화합물 *trans*-hexadecyl ferulic acid (**1**), *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**), *trans*-hexadecyl sinapic acid (**3**), (-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6aR,11aR)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**), (-)-maackiain (**5**), xanthohumol (**6**), formononetin (**7**), desmethylanhydroicaritin (**8**), (2S)-2'-methoxykurarinone (**9**), (2S)-3β,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone (**10**), (2S)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone (**11**), umbelliferone (**12**), kuraridin (**13**), trifolirhizin (**14**)을 분리·정제하였으며 구조를 밝히기 위해 IR, UV, EIMS, 1D (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR)과 2D (HMBC, HMQC) NMR의 분광학적 방법을 사용하여 측정하였다. 분리된 화합물은 silica gel TLC상 극성 순으로 numbering을 하였다.

### 2-1. Phenol성 화합물의 구조 결정 (**1-3, 12**)

이 화합물은 흰색의 무정형 분말로 얻어졌으며, EIMS spectrum (Fig. 6)에서 *m/z* (% intensity) 194 ([M-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>]<sup>+</sup>, 100)와 177 ([M-C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O-H]<sup>+</sup>, 54)의 peak가 나타나는 것으로 methoxy과 hydroxy group이 치환된 cinnamic잔기의 특성을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 7)과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Fig. 8)에서 전형적인 ABX spin system에서 δ 6.92 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 7.08 (1H, dd, *J*=1.9, 8.1 Hz, H-6), 7.04 (1H, dd, *J*=1.9 Hz, H-2)는 각각 *ortho*, *ortho/meta* 그리고 *meta* coupling을 가진 세개의 aromatic protons임을 확인하였다. 또한 *trans* double bond는 coupling constant가 큰 δ 7.61 (1H, d, *J*=16.1 Hz)와 δ 6.29 (1H, d, *J*=16.1 Hz)의 signal에 의해 확인하였다. 또한 aliphatic alcohol잔기는 δ 1.25 (26H, s)에서 *n*-hexadecyl long-chain methylenes과 δ 0.88 (3H, t, *J*=6.5 Hz)에서 하나의

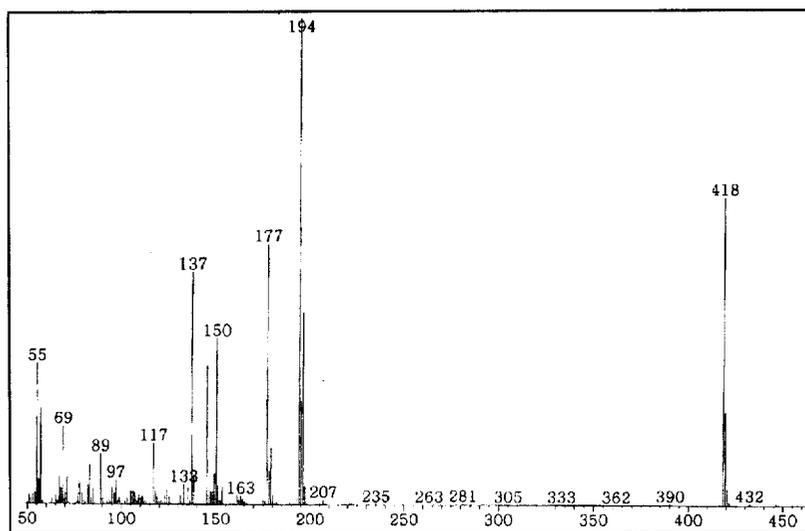
terminal methyl을 확인하였다. 이상의 분광학적 방법을 통해 이 화합물은 *trans*-hexadecyl ferulic acid (**1**)로 동정하였다 (Kim *et al.*, 2001).

Compound **2**는 무정형 흰색 분말로 분리되었으며 EIMS spectrum (Fig. 9)에서  $m/z$  446  $[M]^-$ 의 base peak가 나타났으며,  $m/z$  194  $[(M-C_{16}H_{32})^+]$ , 100]와 177  $[(M-C_{16}H_{32}O+H)^+]$ , 73]에서 각각 methylcaffeic acid와 methylcaffeoyl의 분열 peak가 관찰되었다.  $^1H$ -NMR spectrum (Fig. 10)에서  $\delta$  3.93 (3H, s)의 methoxy group과  $\delta$  6.79, 5.82 ( $J=12.9$  Hz)에서 두개의 *cis*-olefinic protons 그리고 세개의 aromatic protons (ABX)  $\delta$  6.88 (1H, d,  $J=8.1$  Hz), 7.08 (1H, d,  $J=1.9, 8.1$  Hz), 7.77 (1H, d,  $J=1.6$  Hz)의 feruloyl잔기의 특징을 확인하였다. 또한 aliphatic alcohol잔기는  $\delta$  0.88 (3H, t,  $J=6.5$  Hz)에서 하나의 terminal methyl group과  $\delta$  1.25 (30H, s),  $\delta$  1.68 (2H, m) 그리고  $\delta$  4.12 (2H, t,  $J=6.7$  Hz)에서 저자장 triplet이 oxycarbonyl 작용기에 인접한 methylene과 상응하는 것을 확인할 수 있었다. Baldé *et al.*, (1991) 등이 *Pavetta owariensis* (Rubiaceae)의 *n*-hexane 추출물에서 2개의 ferulic acid esters인 octadecyl *trans*- 와 *cis*-ferulic acid를 분리 보고 하였다. 이 화합물이 compound **1** 과 비교하여 terminal methyl group에  $(CH_2)_2$ 가 더 많은 octadecyl ferulic acid로 *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**)로 동정하였으며, 이전에 Bernards and Lewis (1992) 등이 *Salnum tuberosum* 에서 *trans*-form을 분리하였다. 이 화합물은 고삼 MeOH 추출물의  $CH_2Cl_2$  분획으로 부터 처음으로 순수하게 분리·동정 하였으며,  $^{13}C$ -NMR spectral data는 이전에 보고되지 않았으나, HMBC와 HMQC를 사용하여  $^{13}C$ -NMR assignment를 정립하여 제시하였다 (Table 2).

Compound **3**은 노란색의 무정형 분말로 분리되었으며, EIMS spectrum (Fig. 14)에서  $m/z$  (% intensity) 224  $[M^+-(CH_2)_{15}CH_3+H]$ , 88], 207 (224-OH, 43), 180 (224-COOH+H, 30), 167 (224-CHCOOH+H, 39)에서 peak가 관찰되었다. 이 화합물에 존재하는 acyl group은 sinapic acid로  $^1H$ -NMR spectrum (Fig. 15)에서

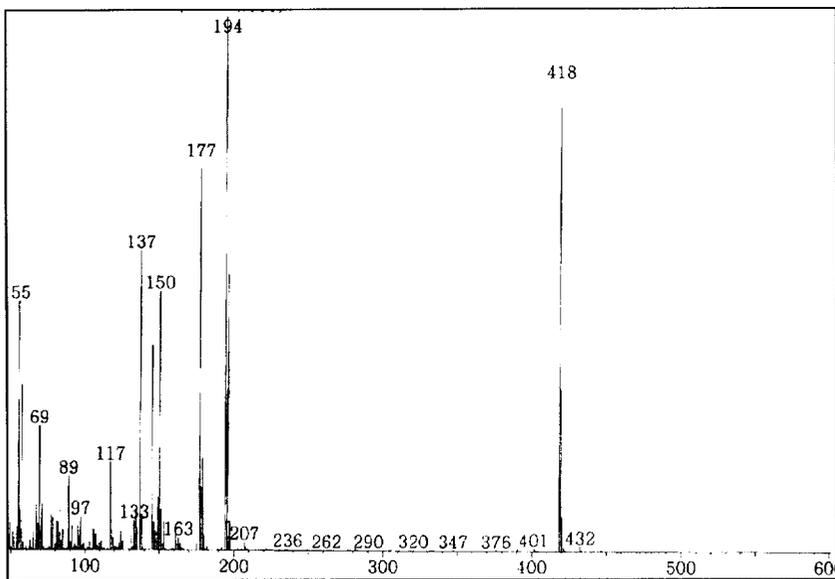
$\delta$  3.77 (3H, s)의 2개의 methoxy group과  $\delta$  7.02 (1H, s, H-2, 6)의 2개의 singlet proton이 관찰되었으며,  $\delta$  7.54 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-7)과  $\delta$  6.52 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-8)에서 coupling constant가 약 16 Hz로 나타나는 것으로 보아 이 화합물은 *E*-configuration을 하고 있음을 알 수 있었다 (Asada *et al.*, 1988). 또한 aliphatic alcohol잔기는  $\delta$  1.22 (26H, s)에서 *n*-hexadecyl long-chain methylenes과  $\delta$  0.86 (3H, t,  $J=6.5$  Hz)에서 하나의 terminal methyl을 확인하였다 (Zhang *et al.*, 2000). 이상의 분광학적 방법을 통해 이 화합물은 *trans*-hexadecyl sinapic acid (**3**)로 동정하였다 (Zhang *et al.*, 2000).

Compound **12**은 흰색의 침상 결정으로 DMSO- $d_6$ 로  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 17)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 18)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Jung *et al.*, 1994).  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 17)에서  $\delta$  6.19 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-3)과  $\delta$  7.92 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-4)에서 olefinic proton signal을 관찰 할 수 있었고, 또한  $\delta$  6.78 (1H, dd,  $J=2.2, 8.6$  Hz)과  $\delta$  6.81 (1H, d,  $J=2.2$  Hz)에서 H-6과 H-8이 benzylic *meta* coupling을 하고 있으며,  $\delta$  10.56의 hydroxy기가 치환된 coumarin형태임을 알 수 있었다. 이상의 결과로 umbelliferone (**12**)으로 동정하였다.



**Fig. 6.** EI mass spectrum of compound **1**





**Fig. 9.** EI mass spectrum of compound **2**

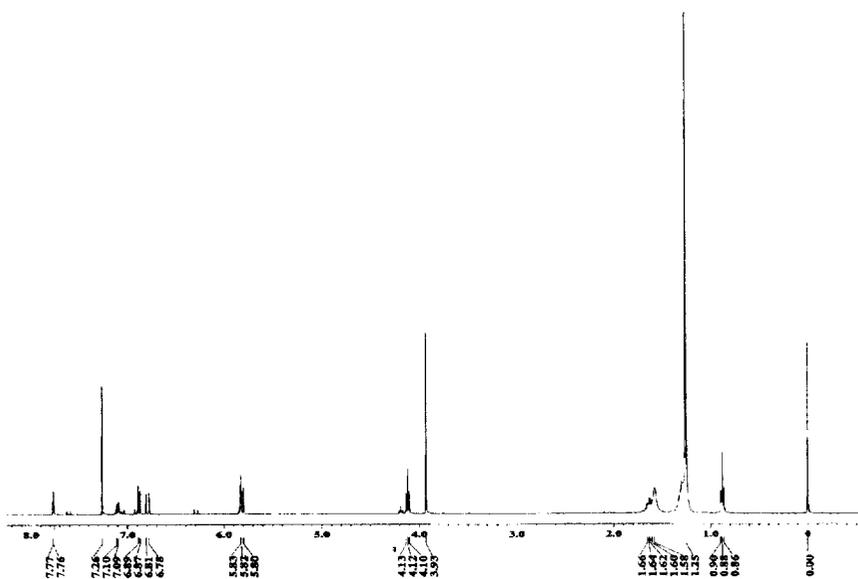


Fig. 10.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

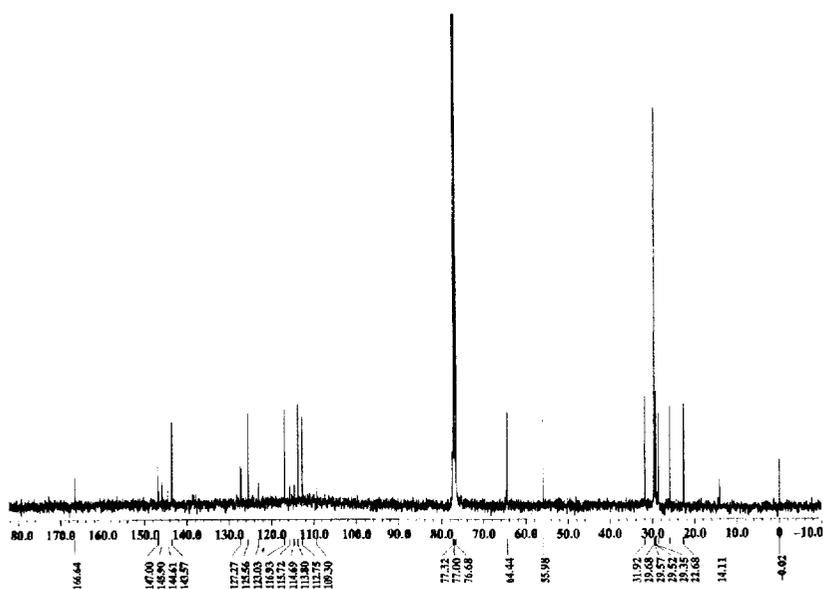


Fig. 11.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

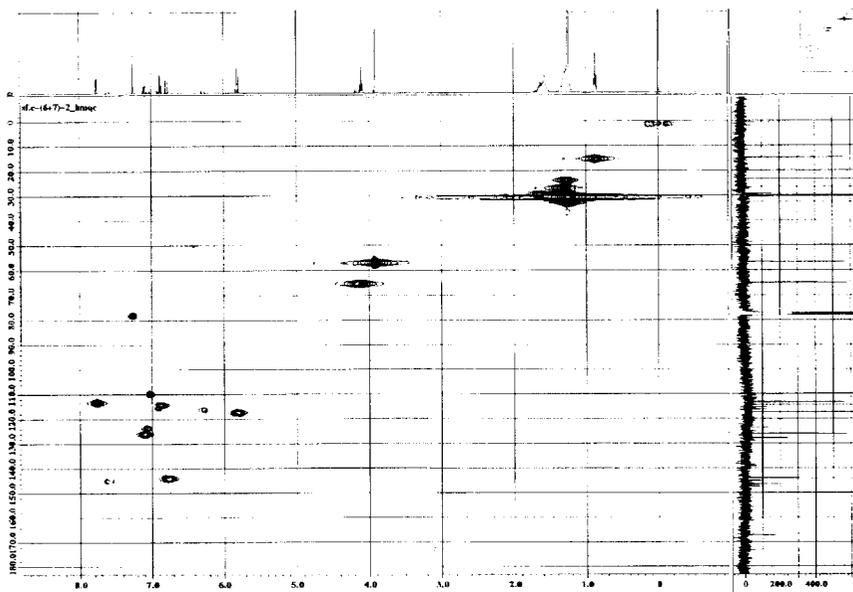


Fig. 12. HMQC spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

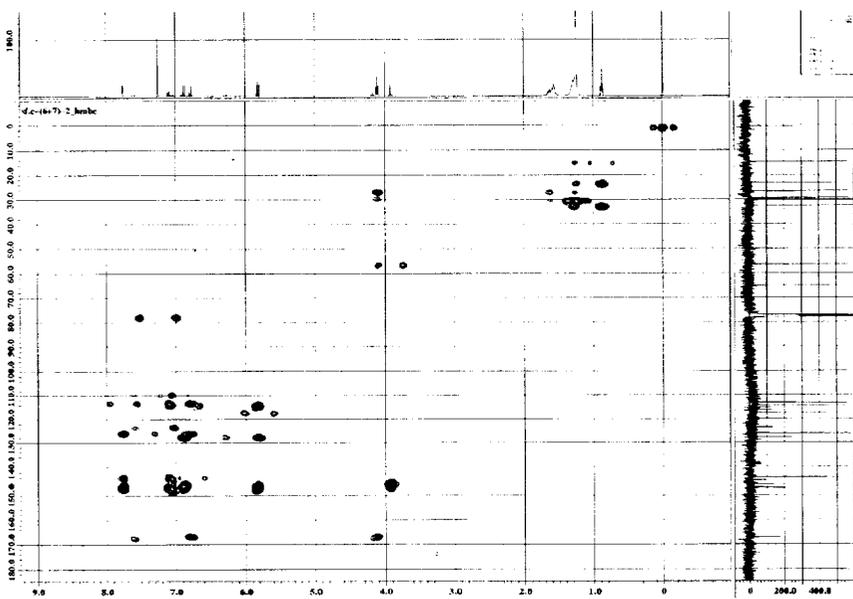
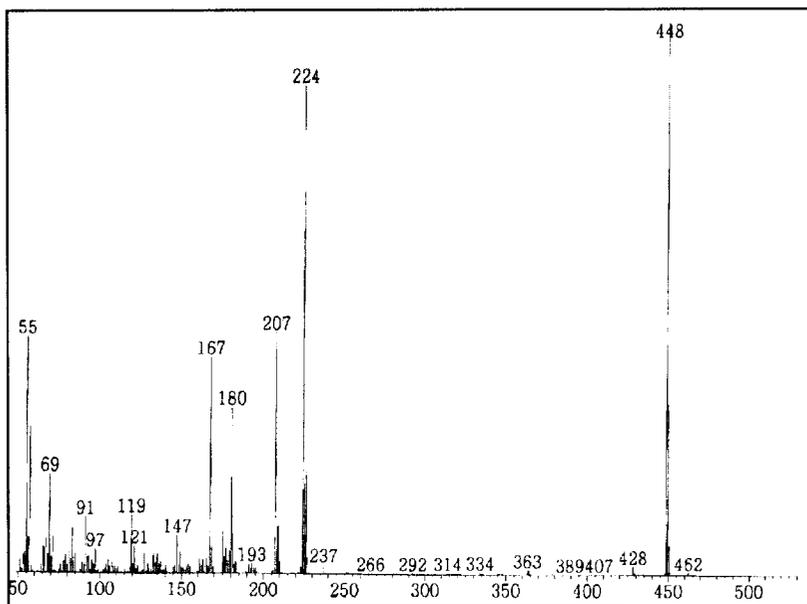


Fig. 13. HMBC spectrum of compound **2** in  $\text{CDCl}_3$

Table 2.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound **2**  
(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Position	$^1\text{H}$ -NMR $\delta$ (m, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ -NMR
1		127.3
2	7.77 (1H, d, $J=1.9$ Hz)	112.8
3		145.9
4		147.0
5	6.88 (1H, d, $J=8.1$ Hz)	113.8
6	7.08 (1H, dd, $J=1.9, 8.1$ Hz)	125.6
7	6.79 (1H, d, $J=12.9$ Hz)	143.6
8	5.82 (1H, d, $J=12.9$ Hz)	116.9
9		166.6
1'-OCH <sub>2</sub>	4.12 (2H, t, $J=6.7$ Hz)	64.4
3'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	1.68 (2H, m)	31.9
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1.25 (30H, s)	29.7, 29.6, 29.5, 29.4
17'		22.7
18'-CH <sub>3</sub>	0.88 (3H, t, $J=6.5$ Hz)	14.1
OCH <sub>3</sub>	3.93 (3H, s)	55.9

Assignments based on HMQC, HMBC experiments.



**Fig. 14.** EI mass spectrum of compound **3**

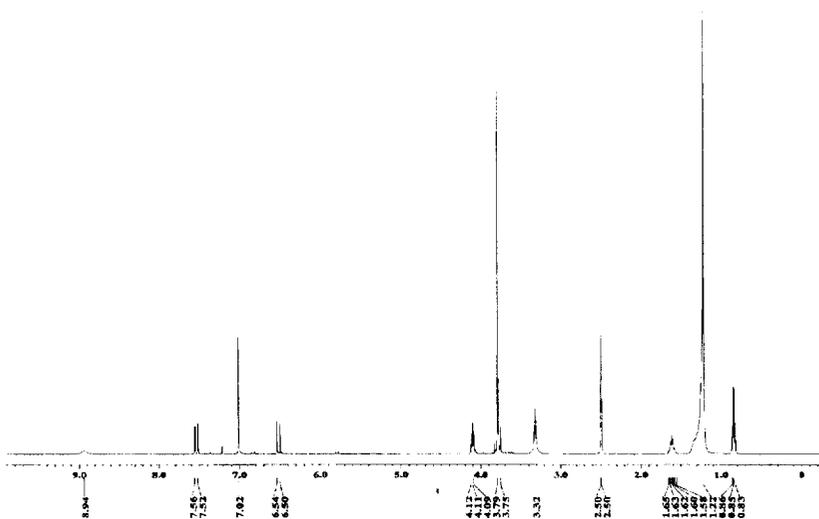


Fig. 15.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{DMSO-}d_6$

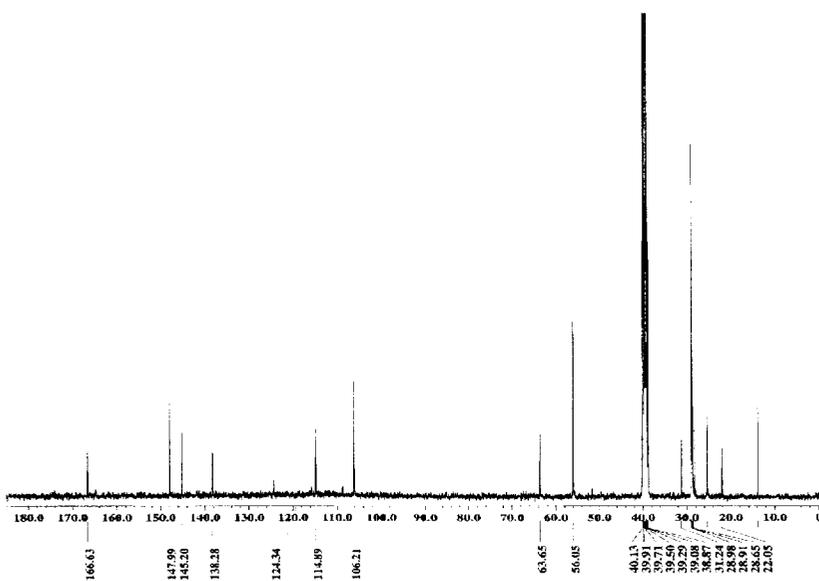


Fig. 16.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **3** in  $\text{DMSO-}d_6$

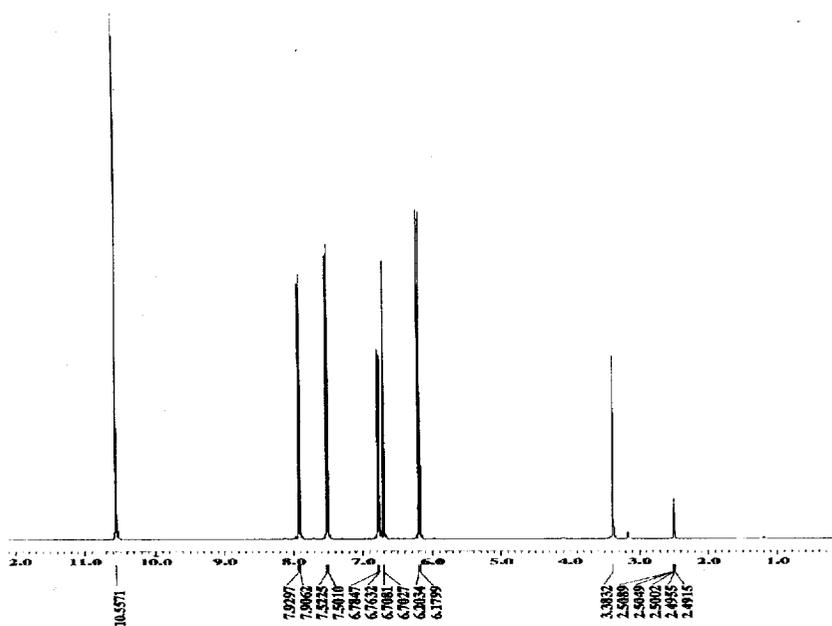


Fig. 17.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **12** in  $\text{DMSO-}d_6$

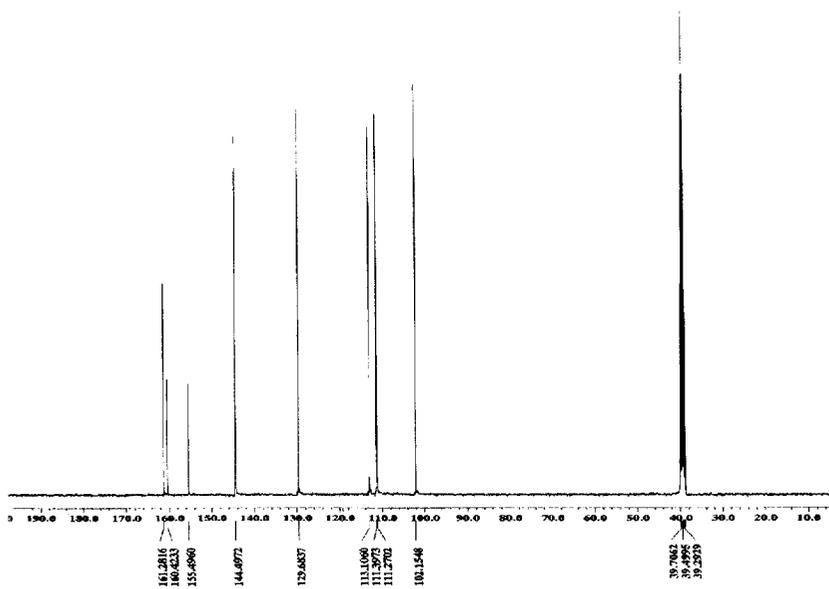


Fig. 18.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **12** in  $\text{DMSO-}d_6$

## 2-2. Pterocarpan 화합물의 구조 결정 (4, 5, 14)

Pterocarpan은 콩과식물 (Leguminosae) 의 많은 종에서 알려진 isoflavonoids이다. 천연에서 존재하는 pterocarpan는 6aR,11aR 그리고 6aS,11aS 즉, *dextro* 와 *laevo-isomer*에 상응하는 두개의 입체이성체 형태가 나타난다. 이런 화합물은 ring B와 C의 더 안정된 *cis-fusion*을 가지게 된다. Pterocartan은 phytoalexins으로서 항균 활성을 가지는 것으로 잘 알려져 있으며, 콩과 식물에서의 발현은 분류학상 중요한 의의를 가지게 된다 (Máximo *et al.*, 1998).

Compound **4**는 흰색의 분말로서 분리되었으며, EIMS spectrum (Fig. 19)에서  $m/z$  314  $[M]^+$ 의 base peak가 나타났으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 21)에서  $\delta$  5.52 (1H, d,  $J=6.9$  Hz), 4.34 (1H, dd,  $J=5.0, 10.9$  Hz), 3.70 (1H, t,  $J=10.9$  Hz)과 3.52 (1H, m) signal은 각각 H-11a, H-6eq, H-6ax 와 H-6a에 위치하고, 이것은 pterocarpan골격에 상응하는 peak를 나타낸다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 21)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 22)에서 C-11a ( $\delta$  5.52)의 oxymethine과  $\delta$  7.04 (H-1)의 AB doublet 사이가 관찰됨으로써 ring A의 C-1과 C-11a에 AB system의 위치를 확인하였다. 또한  $\delta$  5.91 (2H, each d,  $J=12.9$  Hz),  $\delta$  6.73 (H-7) 그리고 6.44 (H-10)에서 aromatic ring D에서 methylenedioxy잔기를 확인할 수 있었고,  $\delta$  3.91 (3H, s)에서 methoxy group을 확인하였다. HMBC experiment (Fig. 23)에 의해  $\delta$  3.91의 methoxy group이  $\delta$  147.3 (C-3)의 signal이 correlation 됨을 알 수 있었다. 이 화합물의 절대적 배위는 선광도의 negative sign으로 그 구조가 6aR,11aR의 입체구조를 가진다 (Park *et al.*, 2003). 이상의 분광학적 방법에 의하여 compound **4**의 구조는 (-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6aR,11aR)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**)으로 동정하였다. 예전에 *Petalostemon purpureus* Rydb. (Leguminosae) 식물에서 입체구조가 positive signal인 (+)-4-hydroxy-3-

methoxy-(6a*S*,11a*S*)-8,9-methylenedioxypterocarpan을 분리 보고하였으며, (Chaudhuri *et al.*, 1995), 또한 Amazonas와 Pará States Brasil의 upland forests 'terra firme'에서 자생하는 식물인 *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. Allem timber tree (Cook *et al.*, 1978) 와 콩과식물인 개느삼 (*Echinosophora koreensis* Nakai)에서 compound **4**를 분리 보고된 바 있으나 (Kim *et al.*, 2002b), 고삼에서는 처음으로 분리·동정되었으며, 이 화합물의 분리로 <sup>13</sup>C-NMR assignment를 정립하여 제시하였다 (Table 3).

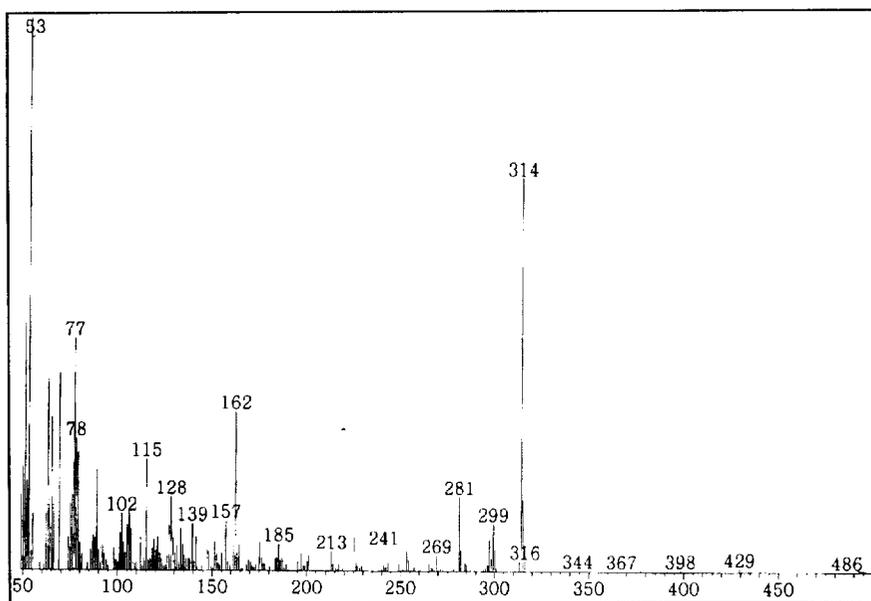
Compound **5**는 흰색의 분말로서 분리되었으며, DMSO-*d*<sub>6</sub>로 <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 24)과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Fig. 25)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다. 선광도 측정에서 (-) sign으로 입체구조가 *R*체임을 나타낸다 (Park *et al.*, 2003). Compound **5**를 (-)-macckiain (**5**)으로 동정하였다.

Compound **14**는 흰색의 무정형 분말로서 DMSO-*d*<sub>6</sub>로 <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 28)과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Fig. 29)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Stevenson *et al.*, 1996). IR spectrum (Fig. 26)에서 hydroxyl group (3368 cm<sup>-1</sup>)과 aromatic C=C (1622 cm<sup>-1</sup>) 그리고 glycosidic linkage (1074 cm<sup>-1</sup>) 의 흡수 peak가 나타났다. 또한 HMBC experiment (Fig. 31)에서 δ 4.84 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1')가 maackiain 골격의 C-3 (δ 158.4)과 correlation하는 것으로 보아 이 구조는 (-)-maackiain-3-*O*-β-D-glucopyranoside, 즉 trifolirhizin (**14**)으로 동정하였다.

Table 3.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound **4**  
(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Position	$^1\text{H}$ -NMR $\delta$ (m, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ -NMR
1	7.04 (1H, d, $J=8.6$ Hz)	121.0
2	6.67 (1H, d, $J=8.6$ Hz)	105.4
3		147.3
4		134.0
4a		143.3
6-ax	3.70 (1H, t, $J=10.9$ Hz)	66.9
6-eq	4.34 (1H, dd, $J=5.0, 10.9$ Hz)	
6a	3.52 (1H, m)	40.3
6b		117.7
7	6.73 (1H, s)	104.8
8		141.8
9		148.2
10	6.44 (1H, s)	93.8
10a		154.2
11a	5.52 (1H, d, $J=6.9$ Hz)	78.4
11b		113.9
-OCH <sub>2</sub> O-	5.91 (2H, each d, $J=12.9$ Hz)	101.3
OCH <sub>3</sub>	3.91 (3H, s)	56.3

Assignments based on HMQC, HMBC experiments.



**Fig. 19.** EI mass spectrum of compound **4**

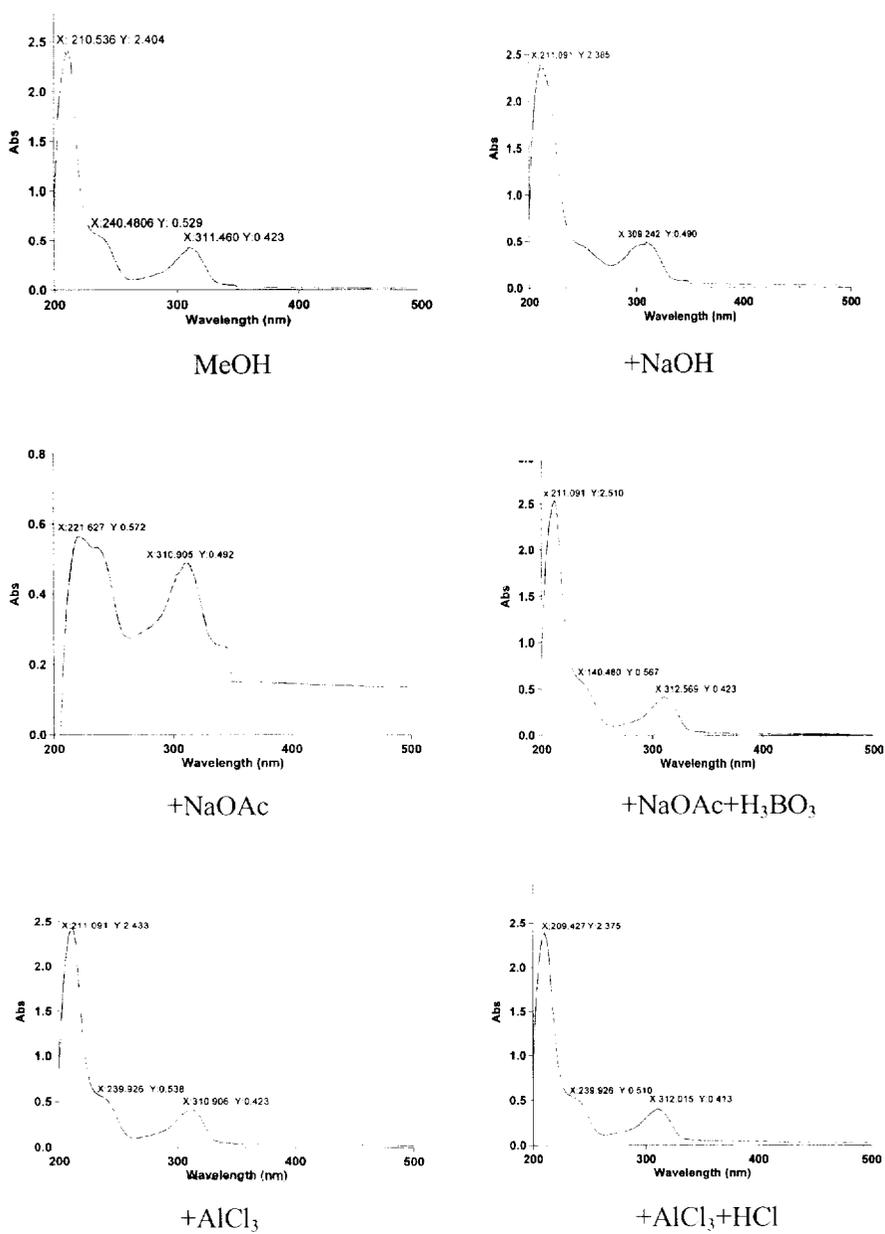


Fig. 20. UV spectrum of compound 4

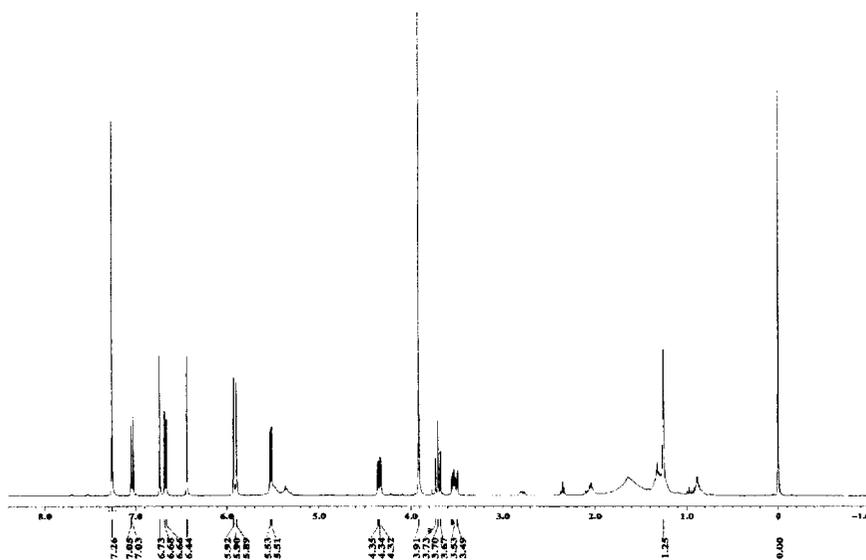


Fig. 21.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **4** in  $\text{CDCl}_3$

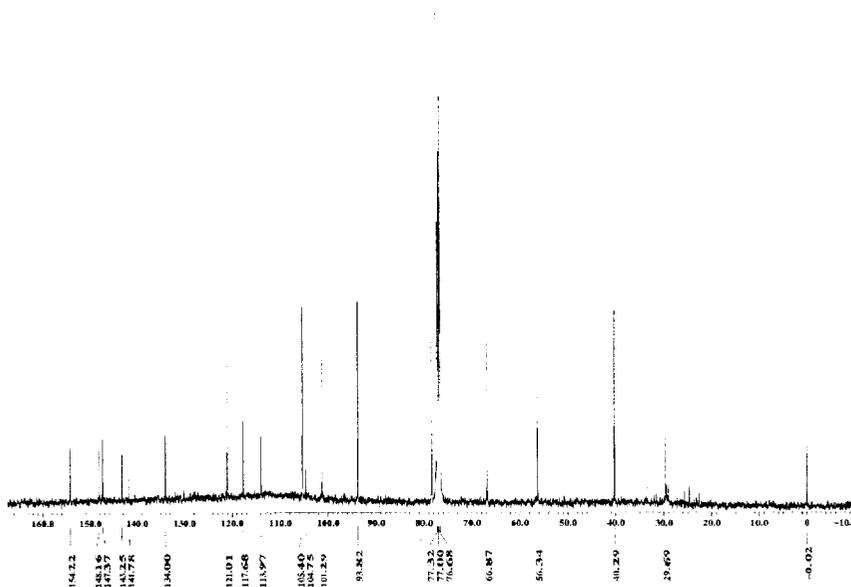


Fig. 22.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **4** in  $\text{CDCl}_3$

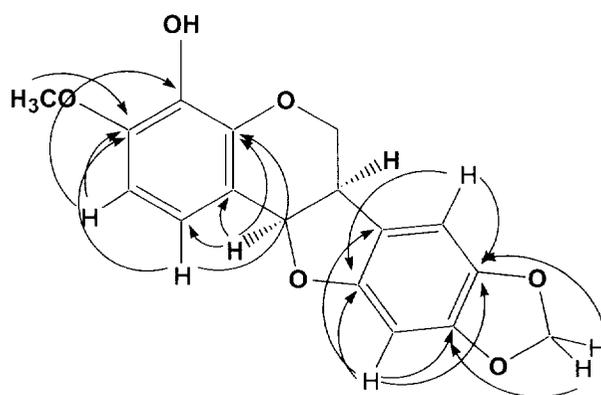
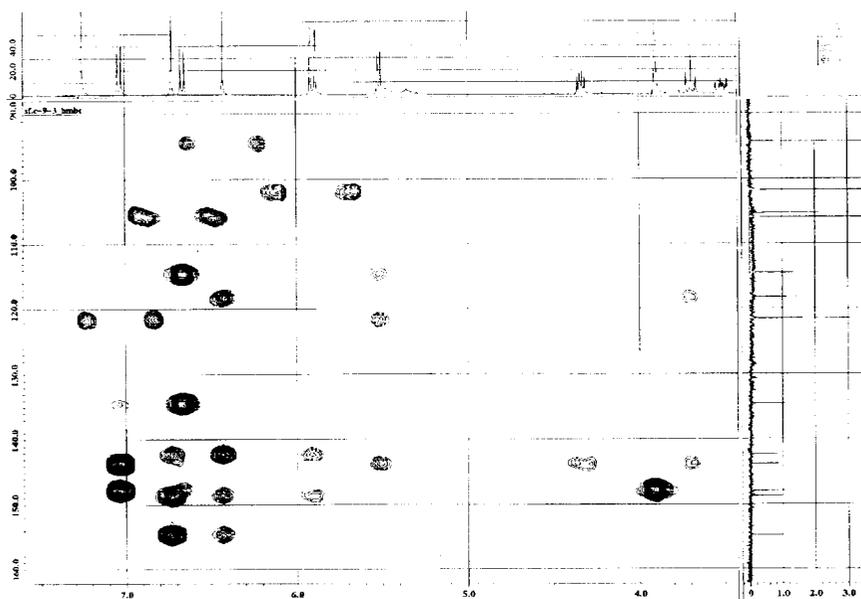


Fig. 23. HMBC spectrum and long range correlation of compound **4** in  $\text{CDCl}_3$

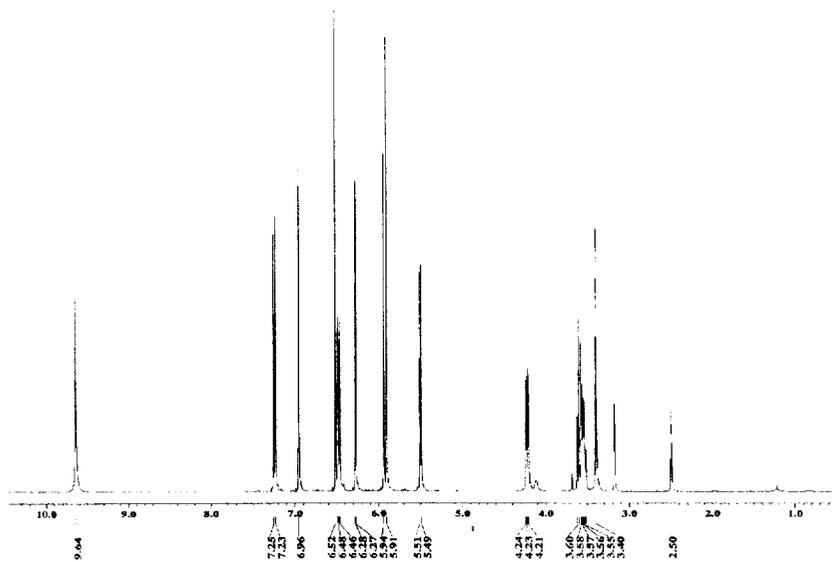


Fig. 24.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **5** in  $\text{DMSO-}d_6$

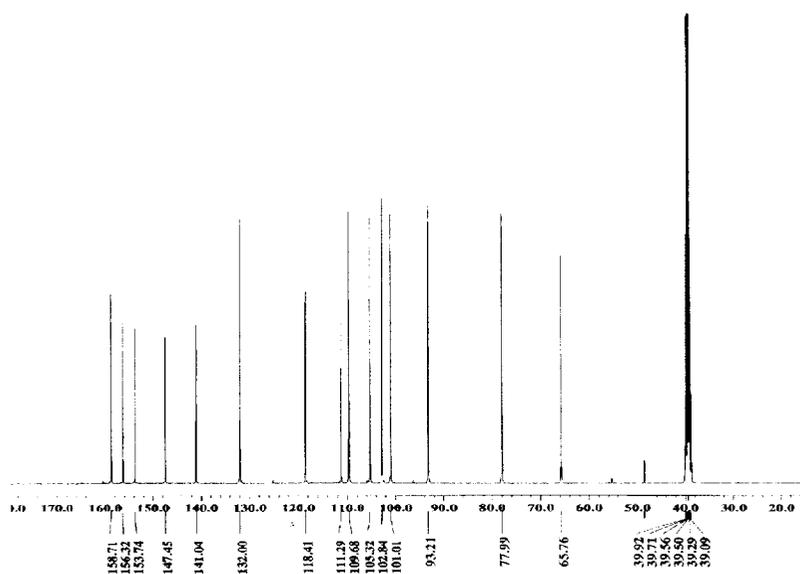


Fig. 25.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **5** in  $\text{DMSO-}d_6$

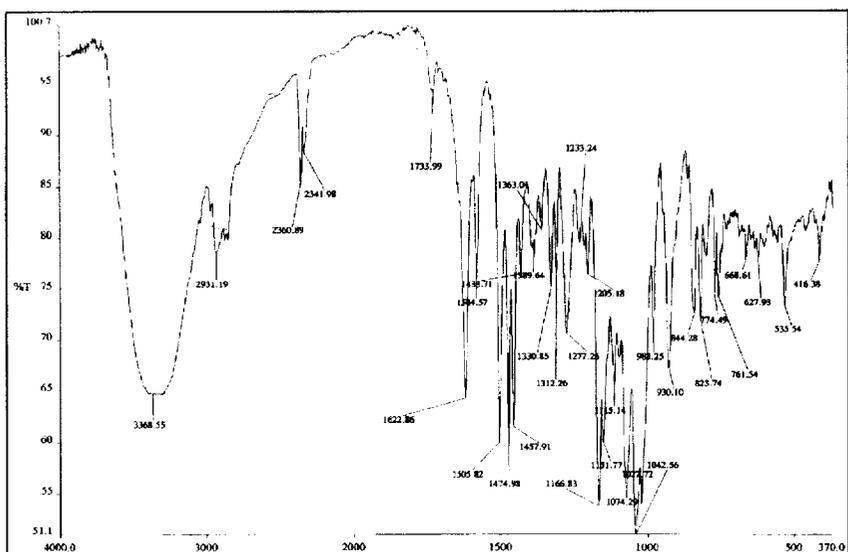


Fig. 26. IR spectrum of compound **14**

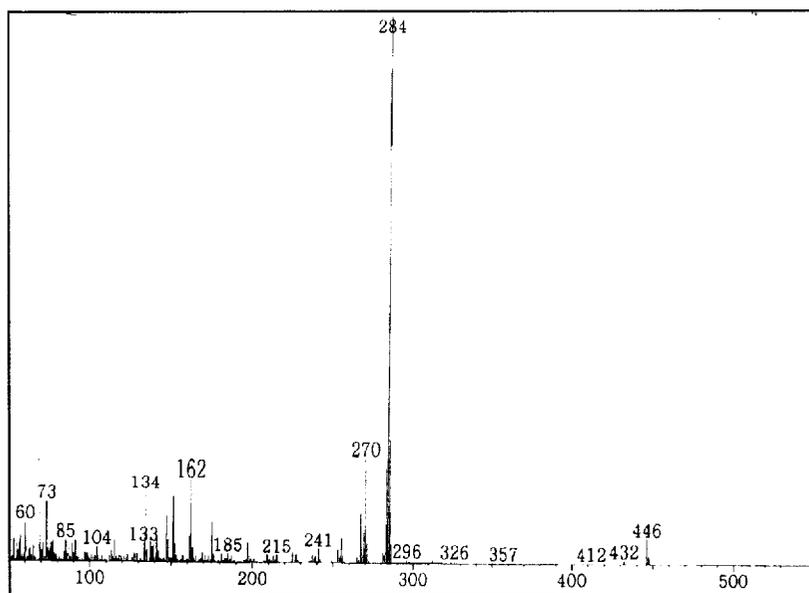


Fig. 27. EI mass spectrum of compound **14**

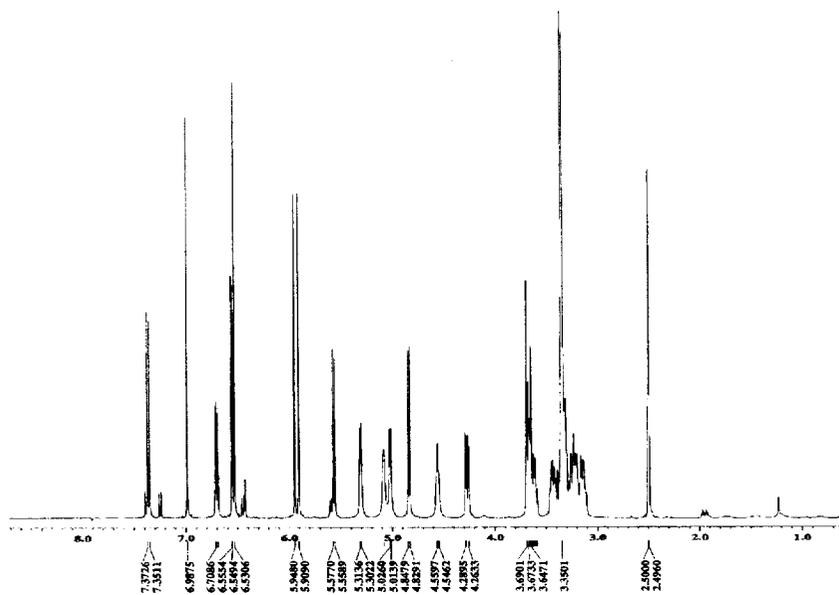


Fig. 28.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **14** in  $\text{DMSO-}d_6$

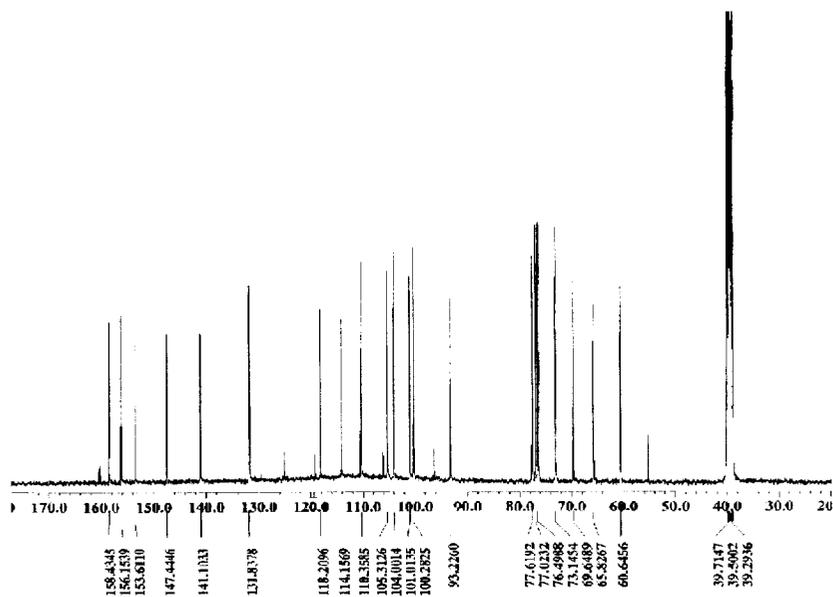


Fig. 29.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **14** in  $\text{DMSO-}d_6$

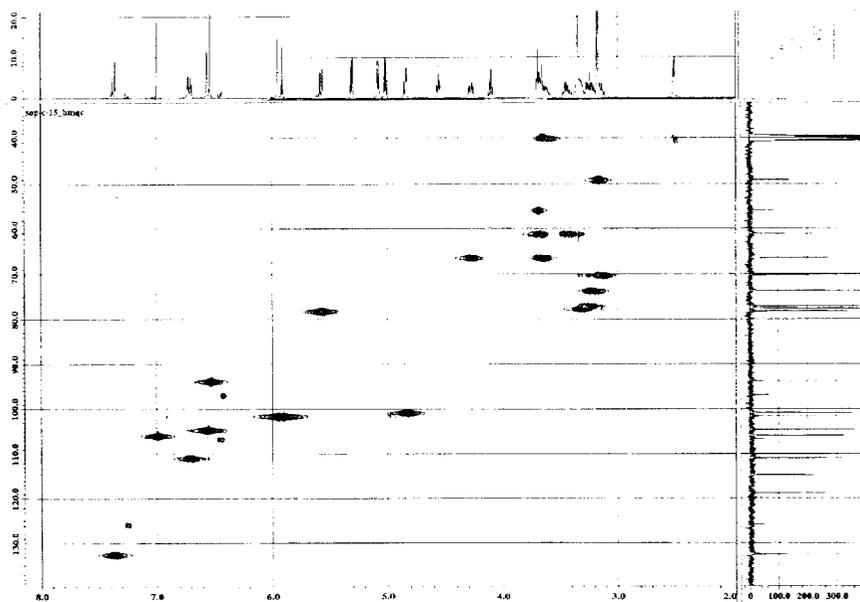


Fig. 30. HMQC spectrum of compound **14** in DMSO- $d_6$

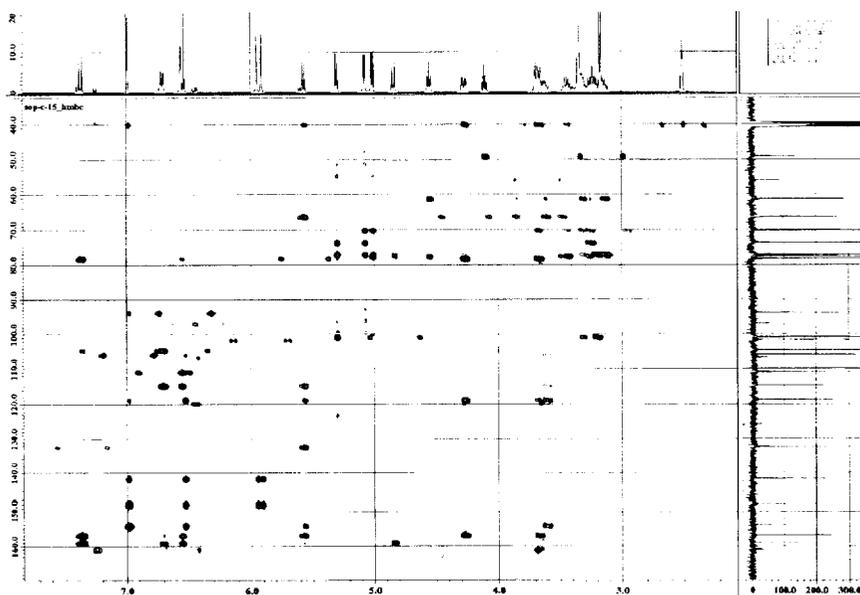


Fig. 31. HMBC spectrum of compound **14** in DMSO- $d_6$

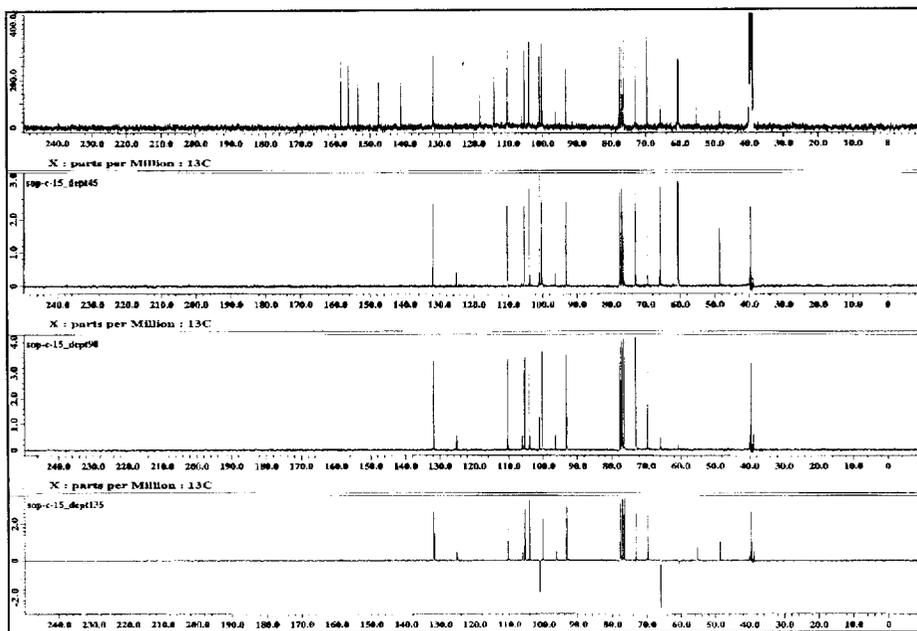


Fig. 32. DEPT spectrum of compound **14** in  $\text{DMSO}-d_6$

### 2-3. Flavonoid 화합물의 구조 결정 (6-10, 13)

Compound **6**은 노란색 분말로서 DMSO- $d_6$ 로  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 33)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 34)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Stevens *et al.*, 1997). C-2의 double bond는 H-2 ( $\delta$  7.76)와 H-3 ( $\delta$  7.66)사이의 coupling constant 15.0 Hz의 peak로 그 입체구조가 *E*-form으로 관찰되었으며 또한  $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl group의 peak를 확인하였다. 이 화합물은 xanthohumol (**6**)로 Cannabinaceae 속 *Humulus lupulus* L., 식물로부터 분리되었으나 (Stevens *et al.*, 1997), 고삼에서는 처음으로 분리 보고하는 화합물이다.

Compound **7**는 흰색의 침상결정으로 DMSO- $d_6$ 로  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 35)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 36)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Ryu *et al.*, 1997b). 이 화합물을 formononetin (**7**)으로 동정하였다.

Compound **8**은 노란색의 분말로서  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 37)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 38)에서  $\text{A}_2\text{B}_2$  type의 B환의 proton signals  $\delta$  8.03과  $\delta$  6.93이 관찰되었으며 B환에 기인하는 signal  $\delta$  129.3 (C-2', 6')과  $\delta$  115.4 (C-3', 5')을 관찰하였다. 또한 one proton siglet  $\delta$  6.29는 C-8에 치환된 carbon을 가진 kaempferol을 기본으로 한 aglycon임을 추정할 수 있다. 또한  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 37)에서  $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl group은  $\delta$  1.62, 1.74 (3H, br s)에서 methyl proton과  $\delta$  3.42 (2H, d,  $J=6.8$  Hz)에서 methylene proton 그리고  $\delta$  5.17 (1H, t,  $J=6.8$  Hz)에서 olefinic proton에 의해 확인할 수 있었으며, 또한  $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl group의 위치는 HMBC experiment (Fig. 40)을 측정하여 prenyl group의 H-1" [ $\delta$  3.42 (2H, d,  $J=6.8$  Hz)]이 C-3" ( $\delta$  161.1) 및 C-9 ( $\delta$  153.4)에 각각 correlation 함을 확인하였다. 이상의 결과로 이 화합물은 desmethylanhydroicaritin (**8**)으로 *Marshallia*속의 식물로부터 분리되었으나 (Jakupovic *et al.*, 1988), 고삼에서는 처음으로 분리 보고하는 성분이다.

Compound **9**은 노란색의 분말로서, DMSO-*d*<sub>6</sub>로 <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 43)과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Fig. 44)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Kang *et al.*, 2000). <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 43)에서 δ 2.86 (1H, d, *J*=2.5, 16.4 Hz, H-3a), 3.17 (1H, d, *J*=13.4, 16.4 Hz, H-3b), 5.44 (1H, dd, *J*=2.5, 13.4 Hz, H-2)와 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Fig. 44)에서 δ 73.1와 δ 44.1에서 flavanone 합화물의 특징적인 C-2-C3의 결합을 확인 할 수 있었다. 또한 δ 3.72 (3H, s, 2'-OMe)와 δ 3.70 (3H, s, 5-OMe)에서 두개의 methoxy group과 δ 1.42, 1.52, 1.58 (각각 3H, s)와 δ 1.92 (2H, m), 2.49 (1H, m), 2.50 (2H, m), 4.55 (1H, br s), 4.47 (1H, br s), 4.87 (1H, br t, *J*=6.7 Hz)에서 lavandulyl group이 있음을 확인하였다. Lavandulyl group의 위치와 flavanone골격에서 두개의 methoxy group의 위치는 HMBC experiment (Fig. 46)에 의해서 각각 C-8, C-5와 C-2'에 correlation하고 있음을 관찰하였다. 이 구조의 C-2에서 절대적 배위는 CD 측정에 의해서 335 nm와 289 nm에서 positive effect를 나타냄으로 그 입체구조가 *S*-form 임을 확인하였다. 그러므로 compound **9**을 (2*S*)-2'-methoxykurarinone (**9**)으로 동정하였다 (Kang *et al.*, 2000).

Compound **10**은 노란색 분말로서 얻어졌으며 DMSO-*d*<sub>6</sub>로 <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 48)과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Fig. 49)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Jakupovic *et al.*, 1988). <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 48)에서 δ 7.29 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-2', 6')과 δ 6.77 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3', 5')에서 전형적인 para 치환된 benzene ring의 signal을 확인하였고, <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Fig. 49)에서 C-2의 resonance가 δ 82.2의 저자장 chemical shift를 나타냄으로써 flavan unit가 2, 3 *trans* configuration을 하고 있음을 나타내고 (Jakupovic *et al.*, 1988), 또한 γ,γ-dimethylallyl group은 δ 1.54, 1.57 (3H, br s)에서 methyl proton과 δ 3.06 (2H, d, *J*=6.8 Hz)에서 methylene proton 그리고 δ 5.08 (1H, t, *J*=6.8 Hz)에서 olefinic proton에 의해 확인할 수 있었다. 또한 γ,γ-dimethylallyl group의 위치는 HMBC experiment (Fig. 50)을 측정하여 prenyl group의 H-1" [δ 3.06 (2H, d, *J*=6.8

Hz)]이 C-3" ( $\delta$  130.0) 및 C-9 ( $\delta$  160.8)에 각각 correlation 함을 확인하였다. 이 화합물의 절대적 배위는 CD측정에 의해서 335 nm와 289 nm에서 positive effect를 나타내는 것으로 보아 이 입체구조가 S-form임을 확인하였다. 이상의 분광학적 방법을 통해 이 화합물은 (2S)-3 $\beta$ ,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-flavanone (**10**)으로 동정 하였으며, 이전에 *Mashallia*속 식물 (Jakupovic *et al.*, 1988)에서 분리 보고 되었으나, 고삼에서는 처음으로 분리 보고되었다.

Compound **11**는 노란색 무정형 분말로서  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 51)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 52)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Komatsu *et al.*, 1970).  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 51)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 52)에서 flavanone 화합물의 특징적인 signal등을 확인할 수 있었으며 (Komatsu *et al.*, 1970), 또한  $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl group이 있음을 확인하였다. 이 화합물의 입체 구조는 H-2와 H-3사이의 diaxial couplings ( $J=12.4$  Hz)는 C-2에 S-configuration하고 있음을 알 수 있었다. 이런 분광학적 측정에 의해 이 구조는 (2S)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-flavanone (**11**)으로 동정하였다 (Komatsu *et al.*, 1970).

Compound **13**는 오렌지색의 oil로서, DMSO- $d_6$ 로  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (Fig. 53)과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (Fig. 54)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 kuraridin (**13**)으로 동정하였다 (Ryu *et al.*, 1997b).

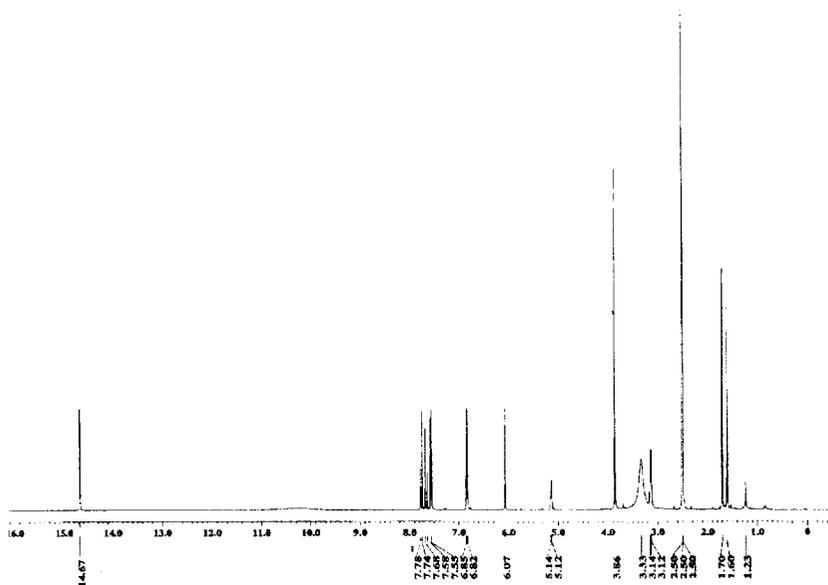


Fig. 33.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **6** in  $\text{DMSO-}d_6$

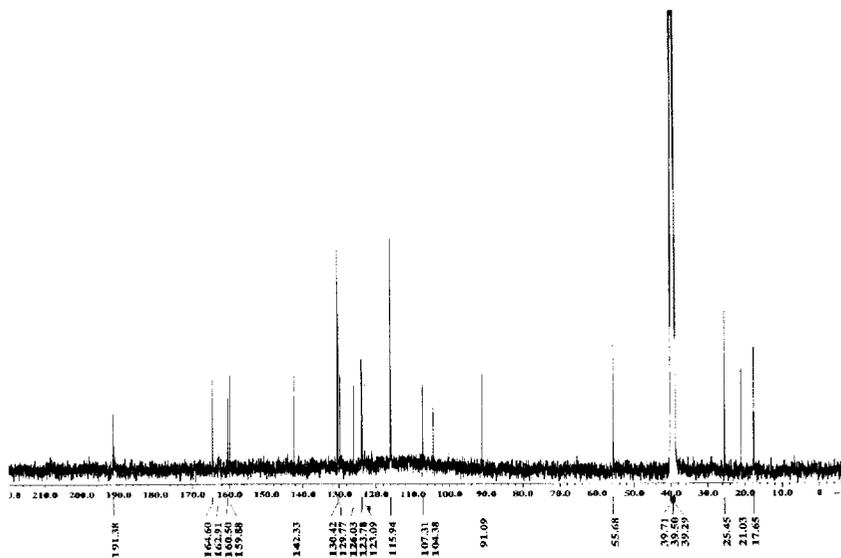


Fig. 34.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **6** in  $\text{DMSO-}d_6$

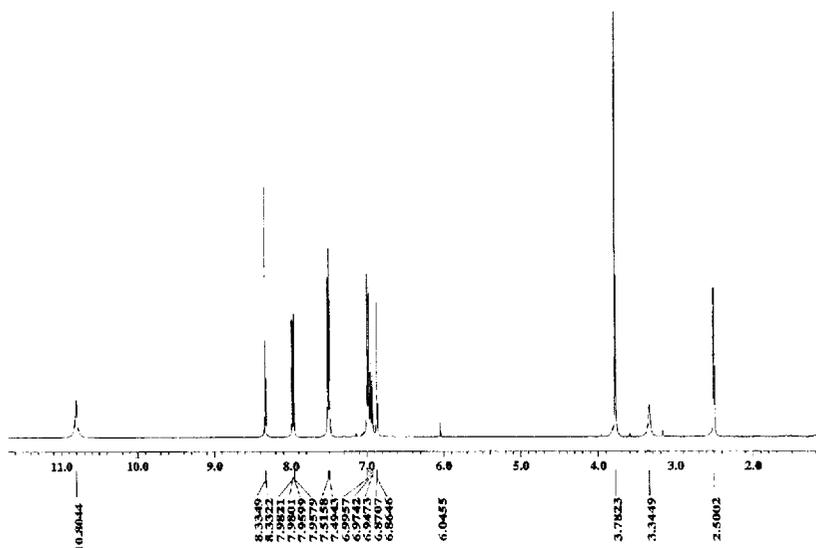


Fig. 35.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{DMSO-}d_6$

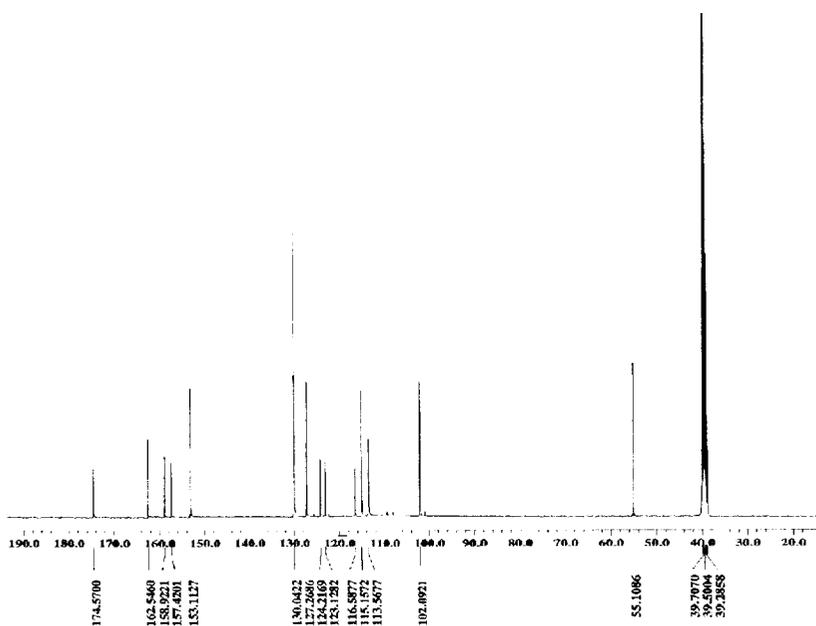


Fig. 36.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **7** in  $\text{DMSO-}d_6$

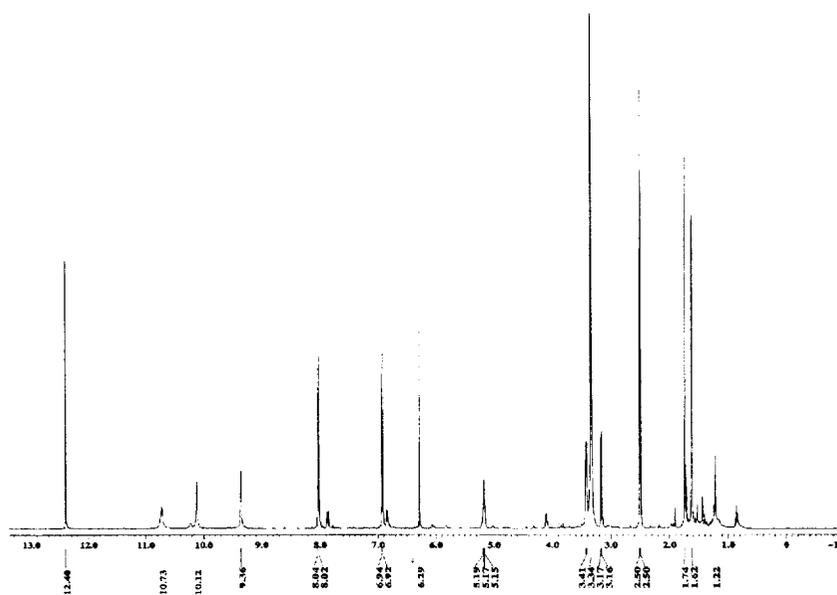


Fig. 37.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **8** in  $\text{DMSO-}d_6$

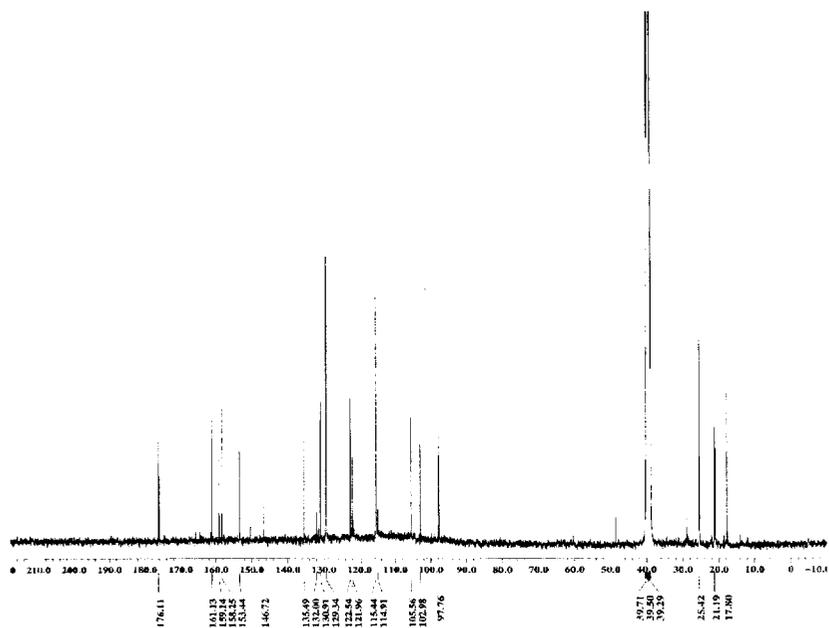


Fig. 38.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **8** in  $\text{DMSO-}d_6$

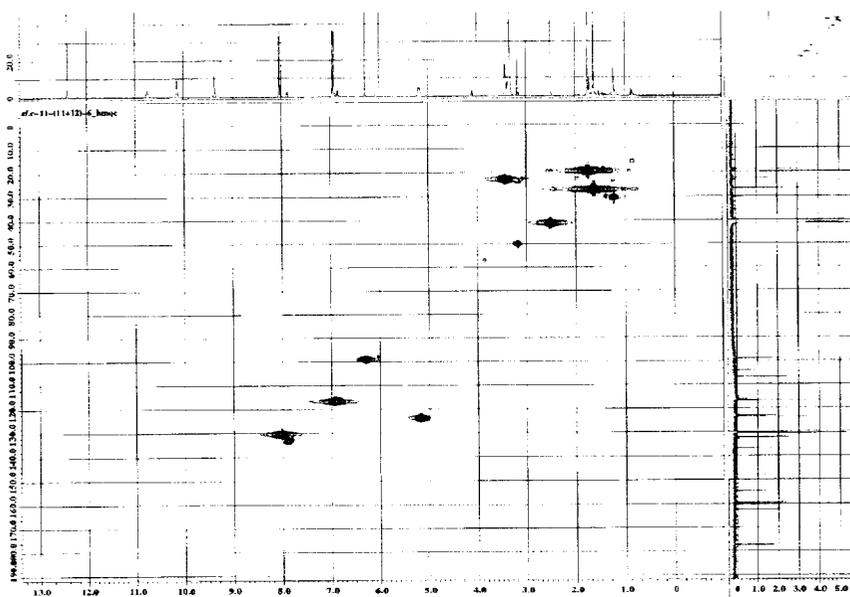


Fig. 39. HMBC spectrum of compound **8** in DMSO- $d_6$

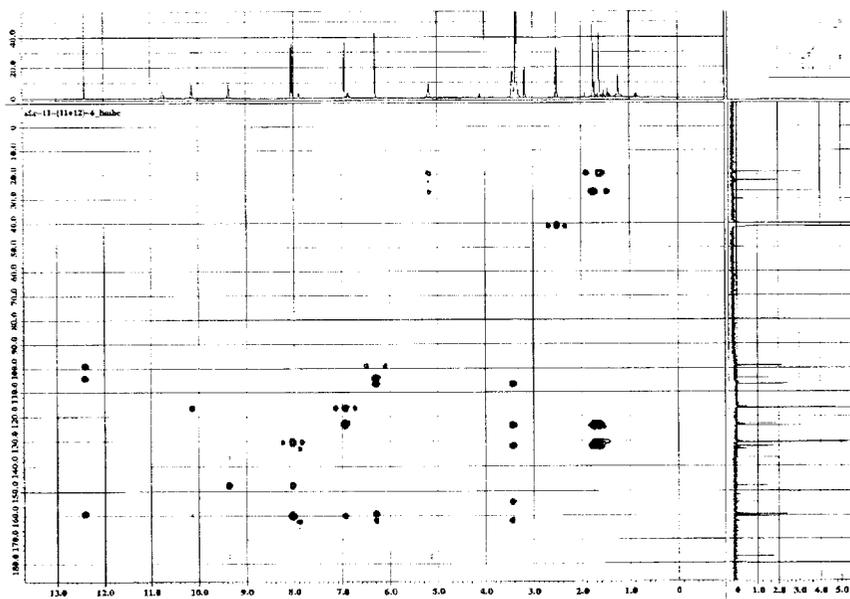
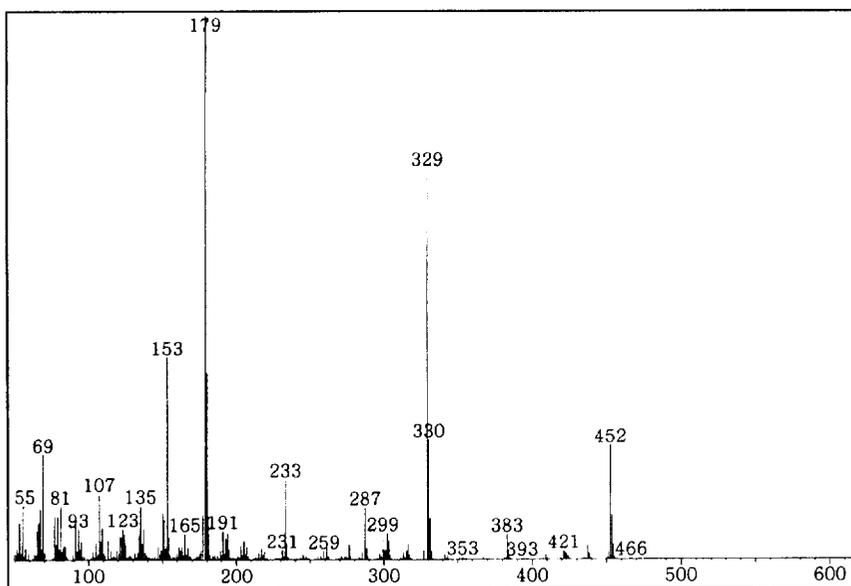
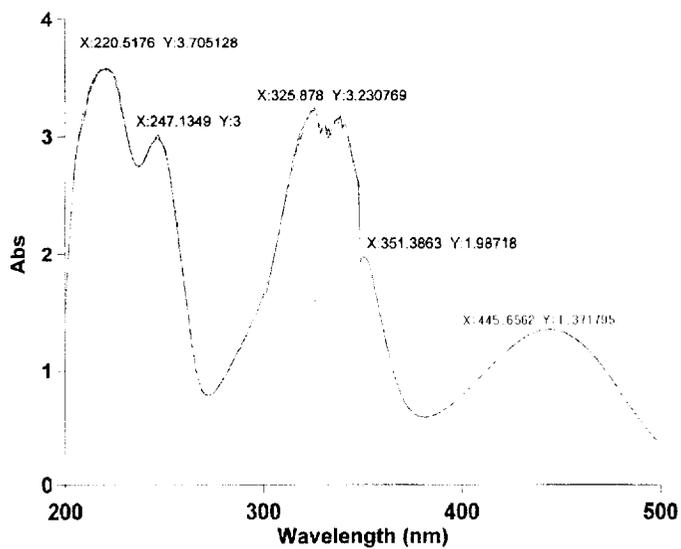
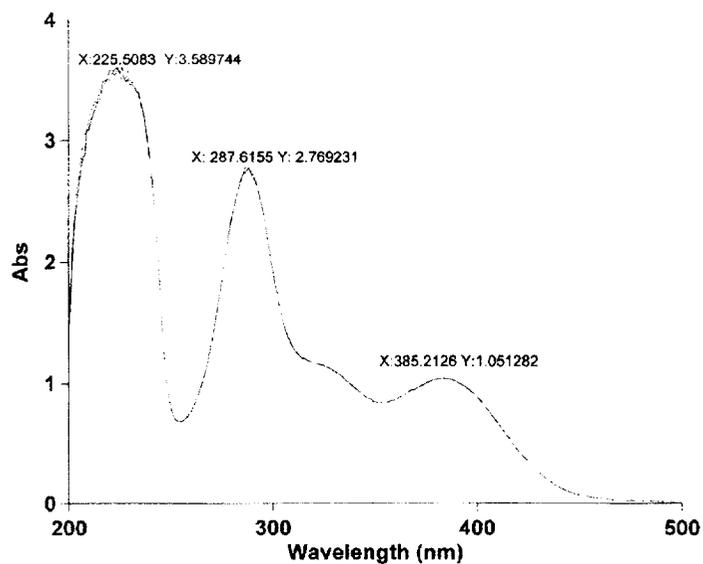


Fig. 40. HMBC spectrum of compound **8** in DMSO- $d_6$



**Fig. 41.** EI mass spectrum of compound **9**



**Fig. 42.** UV spectrum of compound **9**

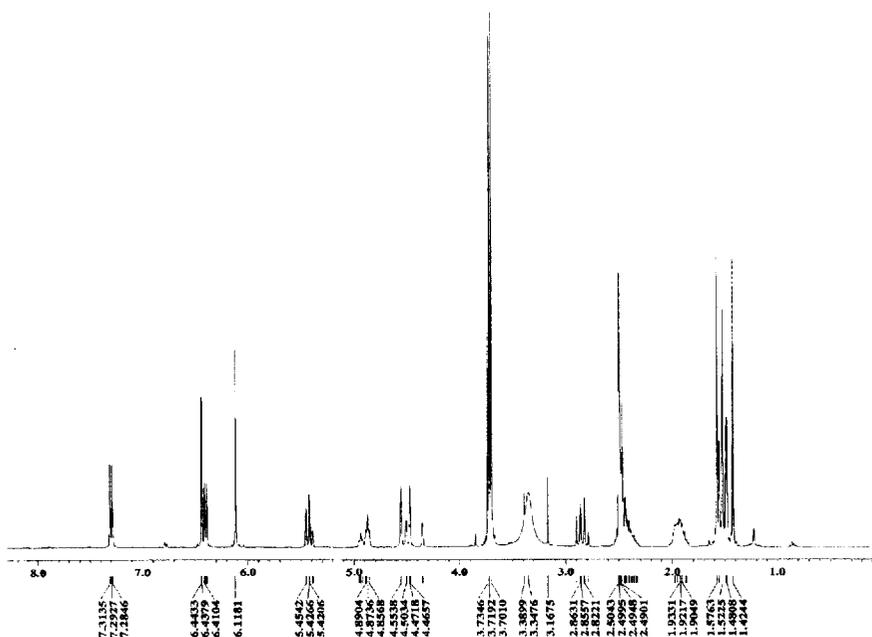


Fig. 43.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **9** in  $\text{DMSO-}d_6$

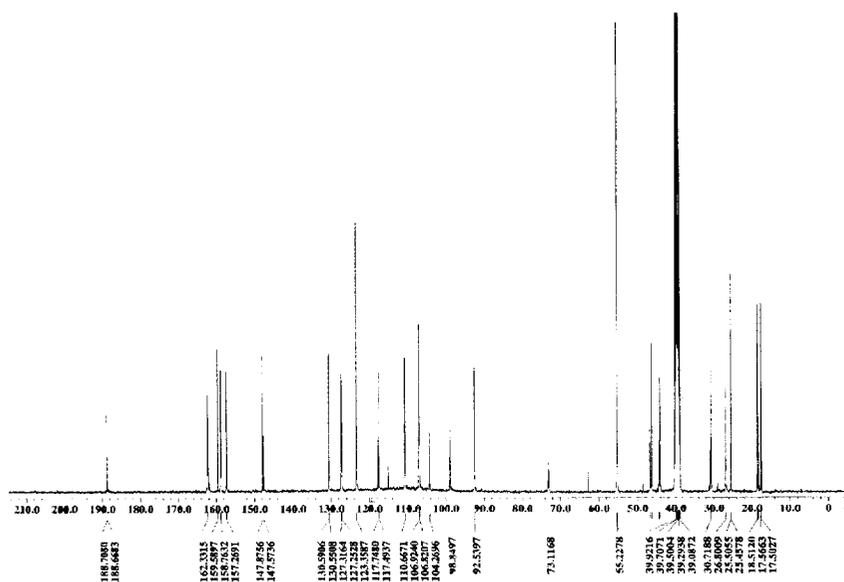


Fig. 44.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound **9** in  $\text{DMSO-}d_6$

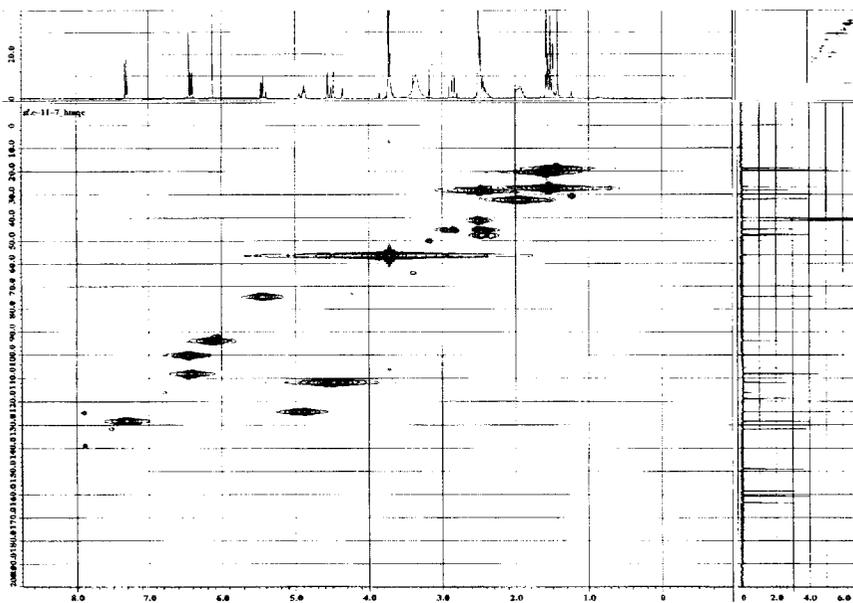


Fig. 45. HMQC spectrum of compound **9** in DMSO- $d_6$

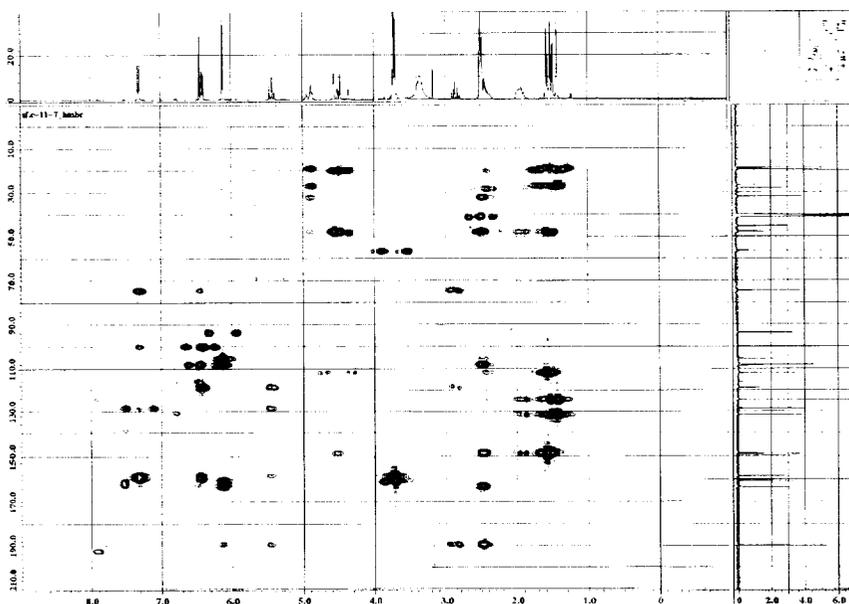


Fig. 46. HMQC spectrum of compound **9** in DMSO- $d_6$

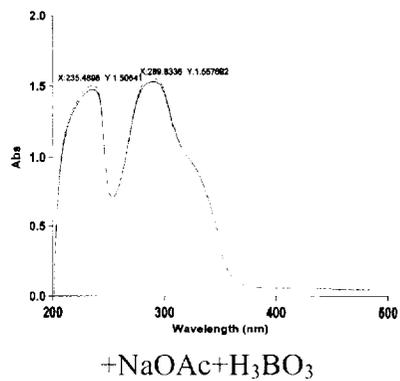
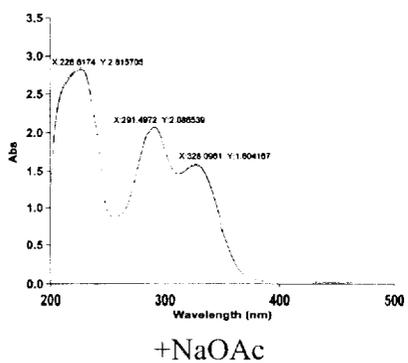
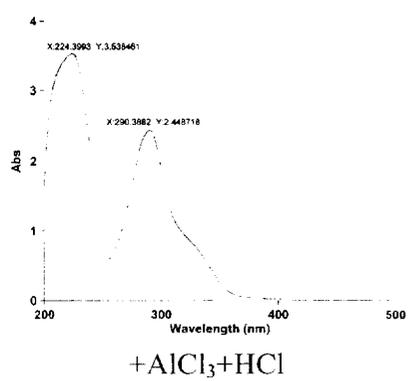
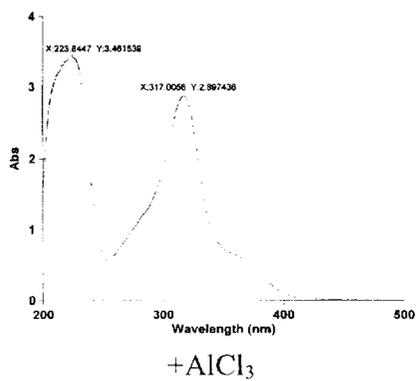
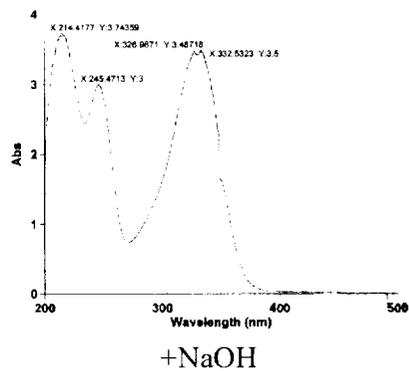
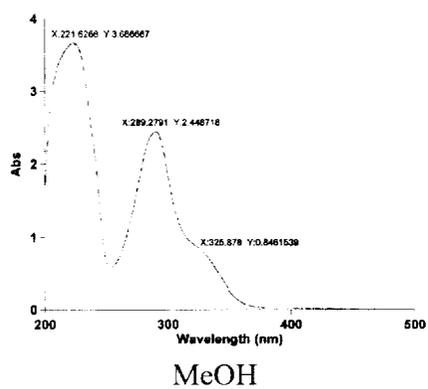


Fig. 47. UV spectrum of compound **10**

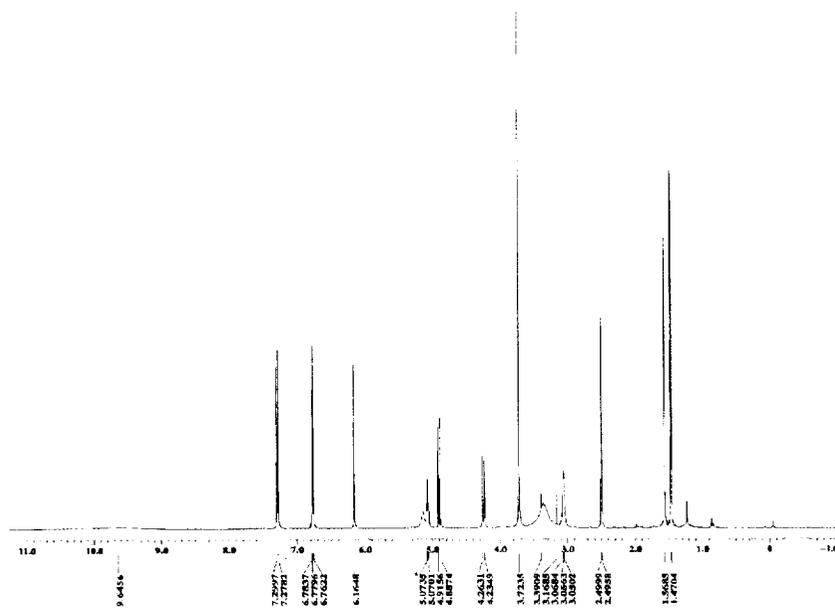


Fig. 48.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **10** in  $\text{DMSO-}d_6$

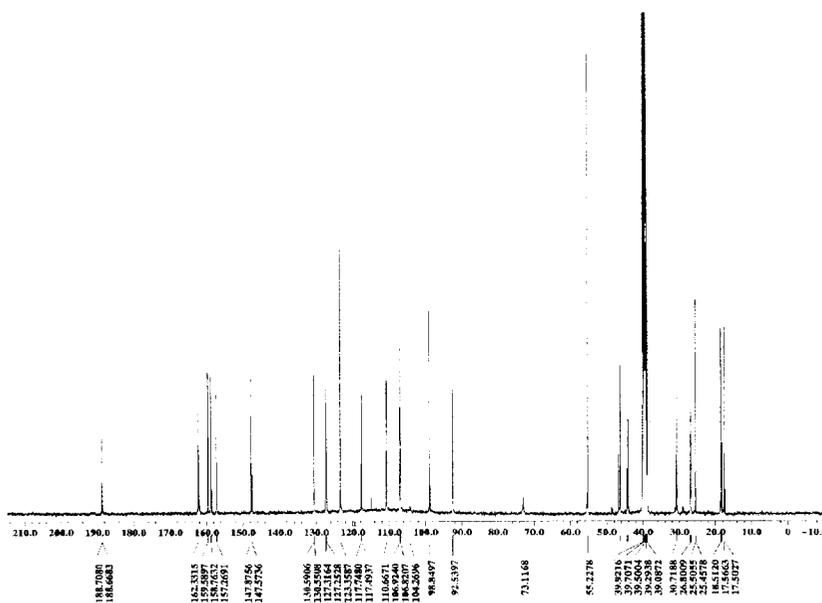


Fig. 49.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **10** in  $\text{DMSO-}d_6$

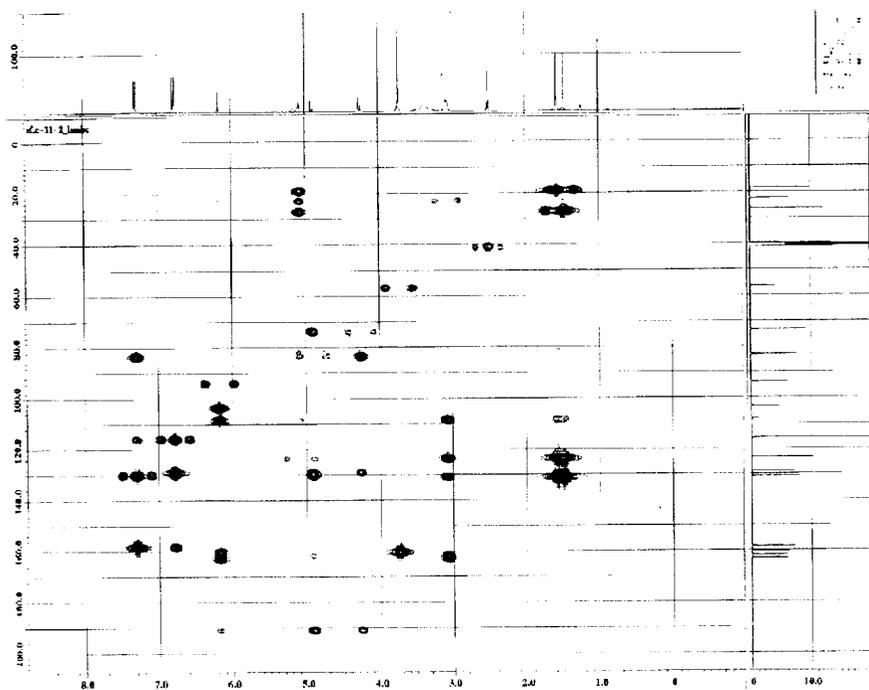


Fig. 50. HMBC spectrum of compound **10** in DMSO- $d_6$

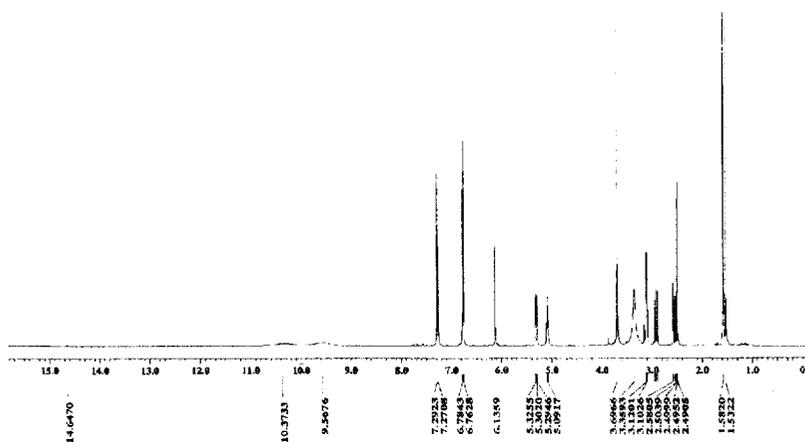


Fig. 51.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound **11** in  $\text{DMSO-}d_6$

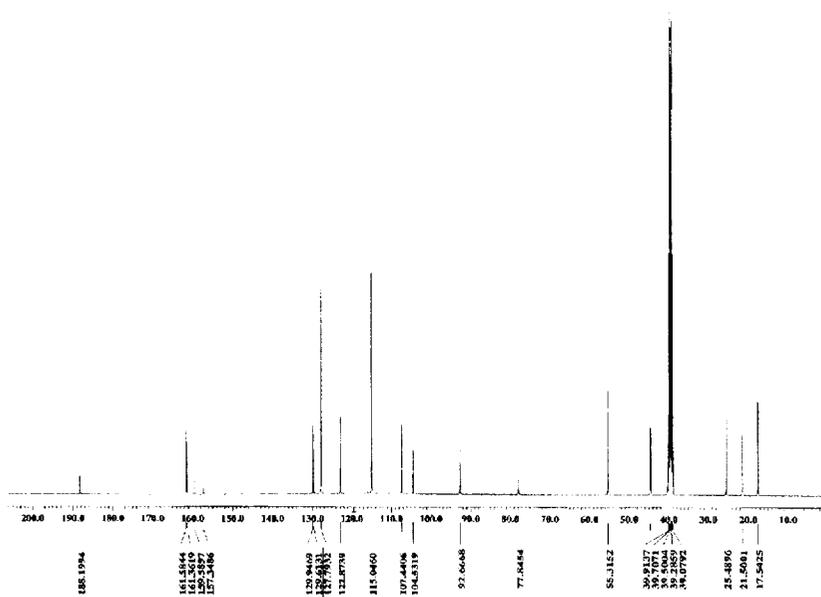


Fig. 52.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound **11** in  $\text{DMSO-}d_6$

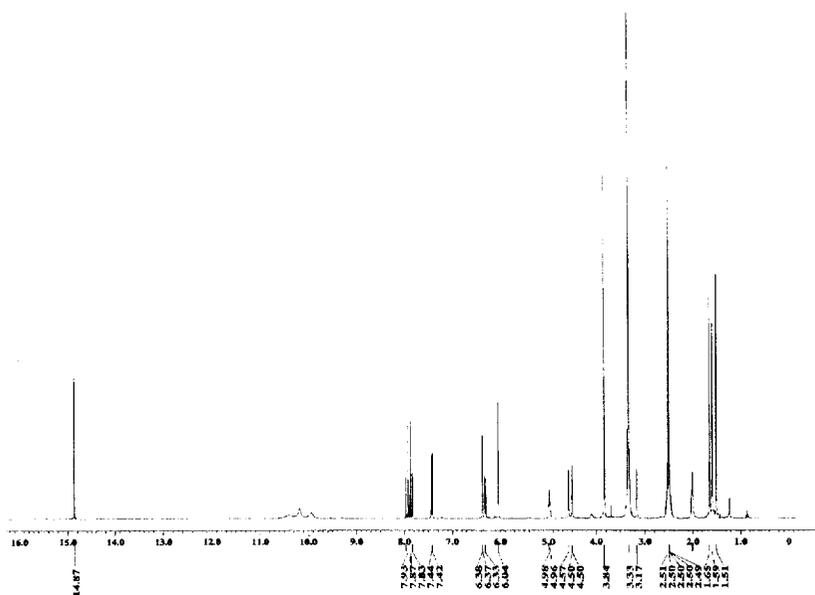


Fig. 53. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound **13** in DMSO-*d*<sub>6</sub>

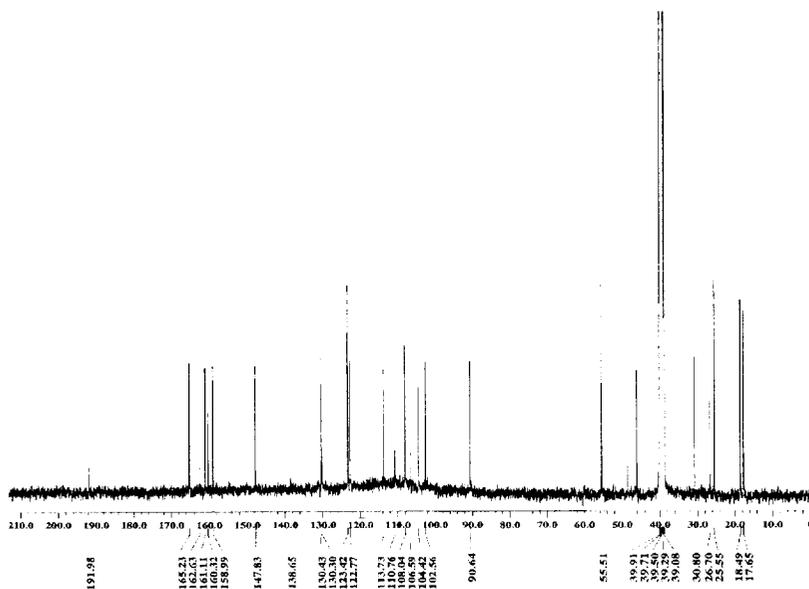


Fig. 54. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound **13** in DMSO-*d*<sub>6</sub>

### 3. 분리된 화합물의 항산화 활성

고삼  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 항산화활성 성분을 분리하였다. 4종의 phenol성 화합물 (**1-3**, **12**), 3종의 pterocarpan 화합물 (**4-5**, **14**)과 7종의 flavonoids 화합물 (**6-11**, **13**)을 각각 분리·정제하였으며, 그 중에 5종의 화합물 [*trans*-hexadecyl ferulic acid (**1**), *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**), *trans*-hexadecyl sinapic acid (**3**)와 (-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6*aR*,11*aR*)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**)과 desmethylanhydroicaritin (**8**)]에 대하여 DPPH radical 소거 활성과 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 평가하였다. 이외의 화합물에서는 활성이 나타나지 않았다. 화합물의 항산화 활성 실험결과를 Table 4에 나타내었다.

#### 3-1. Phenol성 화합물과 pterocarpan 화합물의 항산화 활성

고삼  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분으로 부터 분리한 3종의 phenol성 화합물인 *trans*-hexadecyl ferulic acid (**1**), *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**) 그리고 *trans*-sinapic acid hexadecyl (**3**)와 pterocarpan 화합물 (-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6*aR*,11*aR*)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**)의 DPPH radical 소거 활성 실험을 하였다. 화합물 **1**과 **2**는 ferulic acid가 결합된 화합물로 화합물 **1**과 **2**의 DPPH radical 소거 활성에서는 IC<sub>50</sub> 값이 33.01 과 57.06  $\mu\text{M}$ 의 활성을 보였으며, 비교 화합물인 *trans*-ferulic acid의 IC<sub>50</sub> 값이 9.79  $\mu\text{M}$ 의 활성을 보임으로, 말단 잔기에 aliphatic long chain이 결합함으로써 활성이 감소함을 알 수 있었다 (**1 vs 1A**, **3 vs 3A**). 또한 ONOO<sup>-</sup> 실험계에서는 IC<sub>50</sub> 값이  $5.76 \pm 1.19$ 과  $15.06 \pm 1.64$   $\mu\text{M}$ 로 좋은 활성 효과를 나타냈다. 화합물 **2**는 *cis*-form을 가진 화합물로 *trans*-form인 화합물 **1**과 비교함으로써 활성이 감소됨을 알 수 있었다 (**1 vs 2**). 화합물 **3**은 DPPH radical 소거 활성과 ONOO<sup>-</sup>소거 활성은 각각 IC<sub>50</sub> 값이 39.84  $\mu\text{M}$  과  $8.17 \pm 4.97$   $\mu\text{M}$ 로 두 가지 실험계에서 좋은

활성을 보였다. 그러나 이 화합물에서도 aliphatic long chain이 결합함으로써 활성이 감소함을 알 수 있었다. 위와 같은 화합물에 있어서 항산화 효과는 *cis-form*으로 존재하는 것과 aliphatic long chain이 결합함으로써 활성이 감소함을 알 수 있었다. Pterocarpan 구조인 (-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6a*R*,11a*R*)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**)은 DPPH radical에 대해 IC<sub>50</sub> 값이 35.83 μM의 활성이 나타났으나, ONOO<sup>-</sup> 실험계에서는 IC<sub>50</sub> 값이 1.95 ± 0.29 μM로 대조군이 penicillamine의 IC<sub>50</sub> 값이 2.36 ± 0.79 μM 보다 좋은 활성을 보였다. Phenolic acid의 항산화 활성은 구조내 hydroxycinnamic acid을 가지고 있기 때문인 것으로 여겨지며, 특히 이러한 구조들은 ONOO<sup>-</sup>에 대한 소거 활성이 보고된 바 있다 (Foley *et al.*, 1990 ; Natella *et al.*, Cuvelier *et al.*, 1992 ; Pannala *et al.*, 1998 ; Ketsawatsakul *et al.*, 2000). 이와 같은 결과로 DPPH radical에 대한 항산화 소거 활성은 그것의 hydrogen donating 능력에 기인하는 것으로 생각되어진다 (Hatano *et al.*, 1989). Compounds **1-4**는 화합물 구조내에 free phenolic hydroxy groups을 포함하고 있으며, phenolic hydroxyls은 전자 또는 수소 donor로써 작용한다고 보고한 바 있다 (Saracoglu *et al.*, 2004).

Pannala 등 (1998)은 ONOO<sup>-</sup>의 2가지 소거활성 기전을 제시하였는데, (1) nitration (2) electron donation에 의해 monohydroxy group을 가진 phenol성 화합물은 자신이 nitration됨으로서 ONOO<sup>-</sup>소거활성을 나타내고, *o*-dihydroxy group을 가진 catechol 구조의 경우 electron donation 기전을 통해 활성 질소종을 감소시킨다고 한다 (Pannala *et al.*, 1997, 1998 ; Kerry and Rice-Evans, 1999).

### 3-2. Flavonoid 화합물의 항산화 활성

고삼  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  획분에서 분리한 flavonoid 화합물 중 desmethylanhydroicaritin (**8**)을 비교 화합물인 kaempferol (**8A**)과 함께 DPPH radical 소거 활성과  $\text{ONOO}^-$  소거 활성을 각각 측정하였다. Compound **8**은 aglycon인 kaempferol에 prenyl group이 결합한 화합물로 DPPH radical과  $\text{ONOO}^-$ 에 대한 소거 활성에서 각각  $\text{IC}_{50}$  값이  $18.11 \mu\text{M}$  과  $4.06 \pm 2.41 \mu\text{M}$ 로 좋은 소거활성을 보였다 (**8** vs **8A**). 구조 동력학적 관점에서 radical 소거 활성물질은 free radical에게 전자나 수소를 제공하거나, 전자쌍을 받아서 활성을 나타내는데, C-3위치의 free hydroxy group은 4-keto group과 수소결합을 형성시킴으로서 free radical 소거활성을 증진시킨다고 한다 (Williams *et al.*, 1975 ; Heijnen, *et al.*, 2001).

Table 4. Antioxidant activities of compounds derived from *S. flavescens* on DPPH and ONOO<sup>-</sup>

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM)	
	DPPH <sup>a</sup>	ONOO <sup>-b</sup>
<b>1</b>	33.01	5.76 ± 1.19
<b>2</b>	57.06	15.06 ± 1.64
<b>3</b>	39.84	8.17 ± 4.97
<b>4</b>	35.83	1.95 ± 0.29
<b>8</b>	18.11	4.06 ± 2.41
<b>1A</b> ( <i>trans</i> ferulic acid)	9.79	0.35 ± 0.22
<b>3A</b> ( <i>trans</i> sinapic acid)	3.28	0.47 ± 0.12
<b>8A</b> (kaempferol)	6.33	1.12 ± 0.26
penicillamine		2.36 ± 0.79
L-ascorbic acid	7.39	

<sup>a</sup>DPPH is the free radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>: μM). <sup>b</sup>ONOO<sup>-</sup> is the inhibitory activity of peroxynitrite (IC<sub>50</sub>: μM).

#### IV. 요약 및 결론

생체 내에서 활성 산소종 (ROS)과 질소종 (RNS)은 세포내 여러 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산 그리고 DNA를 산화시켜 염증을 유발하고 세포내 조직을 손상시켜며, 많은 퇴행성 질환, 즉 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심-혈관 질환 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다. 강한 free radical에 의한 산화적 손상을 방지하기 위해 천연물로부터 항산화활성 성분을 분리, 동정, 개발하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 이에 자생하는 고삼의 항산화 활성을 검색하였다.

고삼의 MeOH 추출물과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물들의 항산화 활성을 DPPH radical, hydroxy radical, peroxyntirite 및 ROS 소거 활성으로 살펴보았다. 위에 대한 결과로 분획물 중에서 EtOAc 획분이 항산화활성이 좋았으나, 항산화 활성 성분이 많이 알려지지 않은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 획분을 대상으로 반복적으로 column chromatography하여 14종의 화합물 *trans*-hexadecyl ferulic acid (**1**), *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**), *trans*-hexadecyl sinapic acid (**3**), (-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6*aR*,11*aR*)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**), (-)-maackiain (**5**), xanthohumol (**6**), formononetin (**7**), desmethylanhydroicaritin (**8**), (2*S*)-2'-methoxykurarinone (**9**), (2*S*)-3β,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone (**10**), (2*S*)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone (**11**), umbelliferone (**12**), kuraridin (**13**), trifolirhizin (**14**)을 분리·정제하였으며, 구조를 밝히기 위해 IR, UV, EIMS, 1D (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR)와 2D (HMBC, HMQC) NMR의 분광학적 방법을 사용하여 측정하였다. 분리된 화합물 중 *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**), (-)-4-hydroxy-3-methoxy-(6*aR*,11*aR*)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**), xanthohumol (**6**),

desmethylanhydroicaritin (**8**), (2*S*)-3 $\beta$ ,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)-flavanone (**10**)은 고삼에서 처음으로 분리된 화합물들이다. 14종의 화합물 중에서 5종의 화합물에 대하여 항산화 활성을 측정하였으며, *trans*-hexadecyl ferulic acid (**1**), *cis*-octadecyl ferulic acid (**2**), *trans*-hexadecyl sinapic acid (**3**)는 DPPH radical에서 IC<sub>50</sub> 값이 33.01, 57.06 과 39.84  $\mu$ M의 활성을 보였으며, ONOO<sup>-</sup> 실험계에서는 IC<sub>50</sub> 값이 5.76  $\pm$  1.19, 15.06  $\pm$  1.64 과 8.17  $\pm$  4.97  $\mu$ M로 좋은 활성 효과를 나타냈다. (-)-4-Hydroxy-3-methoxy-(6*aR*,11*aR*)-8,9-methylenedioxypterocarpan (**4**)은 ONOO<sup>-</sup>소거 활성에서 IC<sub>50</sub> 값이 1.95  $\pm$  0.29  $\mu$ M로 대조군인 penicillamine의 IC<sub>50</sub> 값 2.36  $\pm$  0.79  $\mu$ M보다 좋은 활성을 보였다. 또한 desmethylanhydroicaritin (**8**)은 DPPH radical 소거 활성과 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성에서 IC<sub>50</sub> 값이 18.11  $\mu$ M과 4.06  $\pm$  2.41  $\mu$ M로 좋은 활성을 보였다. 이와 같은 결과로 phenolic 화합물은 구조 내 hydroxycinnamic acid을 가지고 있기 때문인 것으로 여겨지며, 그것의 hydrogen donating 능력에 기인하는 것으로 사료된다.

## V. 참고 문헌

신민교, 임상본초학, 남산당, 1986.

이영노, 원색한국식물도감, (주) 교학사, 1997.

Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. T., Scherch, H. M., Sethy, V. H. and Von Voigtlander, P. F., Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers. An approach to nitric oxide neurotoxicity, *Res. Commu. Chem. Datho. Pharmacol.*, 83, 243-249, 1994.

Asada, Y., Hirayama, Y. and Furuya, T., Acylated flavonols from *Crocoshia crocosmiiflora*, *Phytochemistry*, 27, 1497-1501, 1988.

Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E. and Mahmood, N., Protection against oxidative damage and cell death by natural antioxidant ergothioneine, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1043-1053, 1999.

Balavoine, G. G. and Genleti, Y. V., Peroxynitrite scavenging by different antioxidants, Part I : convenient assay, *Nitric Oxide*, 3, 40-45, 1999.

Baldé, A. M., Claeys, M., Pieters, L. A., Wray, P. V. and Vlietinck, A. J., Ferulic acid esters from stem bark of *Pavetta owariensis*, *Phytochemistry*, 30, 1024-1026, 1991.

Barron, D. and Ibrahim, R. K., Isoprenylated flavonoids a survey, *Phytochemistry*, 43, 921-982, 1996.

Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejza, P. Seeds, M. C. and Thomas, M., Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils; a graded response to membrane stimulation, *J. Immun.*, 130, 1910-1917, 1983.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87, 1620-1624, 1990.

Bernalds, M. A. and Lewis, N. G., Alkyl ferulates in wound healing potato tubers, *Phytochemistry*, 31, 3409-3412, 1992.

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

- Branen, A. L., Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59-63, 1975.
- Chaudhuri, S. K., Huang, L., Fullas, F., Brown, D. M., Wani, M. C. and Wall, M. E., Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan, *J. Nat. Prod.*, 58, 1966-1969, 1995.
- Chi, Y. S., Jong, H. G., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P., Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenase and lipoxygenase, *Biochemistry Pharmacology*, 62, 1185-1191, 2001.
- Choi, J. S., Chung, H. Y., Kang, S. S., Jung, M. J., Kim, J. W., No, J. K. and Jung, H. A., The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite, *Phytochemistry*, 16, 232-235, 2002.
- Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y., Kye, I. S., No, J. K. and Baek, B. S., Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4484-4486, 1998.
- Crow, J. P., Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1, 145-157, 1997.
- Cook, J. T., Ollis, D. W., Sutherland, I. O. and Gottlieb, O. R., Pterocarpan from *Dalbergia spruceana*, *Phytochemistry*, 17, 1419-1422, 1978.
- Cuzzocrea, S., Tan, D. X., Costantino, G., Mazzon, E., Caputi, A. P. and Reiter, R. J., The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy in the rat, *FASEB J.*, 13, 1930-1938, 1999.
- Cuvelier, M. E., Richard, H. and Berst, C., Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols; Structure-activity relationship, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 324-325, 1992.
- Delia, D., Aiello, A., Meroni, L., Nicolini, M., Reed, J. C. and Pierotti, M., Role of antioxidants and intracellular free radicals in retinamide-induced cell death, *Carcinogenesis*, 18, 943-948, 1997.

- Ding, Y., Tian, R. H., Kinjo, J., Nohara, T. and Kitagawa, I., Three new oleanene glycosides from *Sophora flavescens*, *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2990-2994, 1992.
- Dreher, D. and Junod, F., Role of oxygen free radicals in cancer development, *Eur. J. Cancer*, 32A, 3038, 1996.
- Dufall, K. G., Ngadjui, B. T., Simeon, K. F., Abegaz, B. M. and Croft, K. D., Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West Africa medicinal plant *Dorstenia mannii*, *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 67-72, 2003.
- Fici, G. J., Althaus, J. S. and Von Voigtlander, P. E., Effects of lazarooids and a peroxyxynitrite scavengers in a cell model of peroxyxynitrite toxicity, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 223-228, 1997.
- Foley, S., Naveratnam, S., McGarvey, D. J., Land, E. J., Truscott, T. G and Rice-Evans, C. A., Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1202-1208, 1999.
- Haenen, G. R. M. M., Paquay, J. B. G., Korthouwer, R. E. M. and Bast, A., Peroxyxynitrite scavenging by flavonoid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 590-593, 1997.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M. A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T., Effect of the interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 2016-2021, 1989.
- Heijnen, C. G. M., Haenen G. R. M. M., Van Acker, F. A. A., Van der Vijgh, W. J. F. and Bast, A., Flavonoids as peroxyxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups, *Toxicology In Vitro*, 15, 3-6, 2001.
- Hempel, S. T., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A. and Flaherty, D. M., Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 146-159, 1999.
- Jakupovic, J. J., Paredes, L., Bohlmann, F. and Watson, L., Prenyl flavans from *Marshallia* species, *Phytochemistry*, 27, 3273-3275, 1988.

- Jung, N. I., Yook, C. S. and Lee, H. K., Coumarins from the roots of *Angelica decursiva-albiflora*, *Kor. J. Pharmacogn*, 25, 311-318, 1994.
- Kang, T. H., Jeong, S. J., Ko, W. G., Kim, N. Y., Lee, B. H., Inagaki, M., Miyamoto, T., Higuchi, R. and Kim, Y. C., Cytotoxic lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens*, *J. Nat. Prod.*, 63, 680-681, 2000.
- Kerry, N. and Rice-Evans, C. A., Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationship, *J. Neurochem.*, 73, 247-253, 1999.
- Ketsawatsakul, U., Whiteman, M. and Halliwell, B., A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279, 692-699, 2000.
- Kim, J. S., Yoo, Han, S. J., Byun, J. H., Xu, Y. N., Yoo, S. W., Kang, S. S., Son, K. H., Chang, H. W. and Kim H. P., Minor constituents from the roots of *Sophora flavescens*, *Natural Product Sciences*, 7, 5-8, 2001.
- Kim, D. W., Chi, Y. S., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, J. S., Kang, S. S. and Kim, H. P., Effects of *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and *In Vivo* inflammatory response, *Arch. Pharm. Res.*, 25, 329-335, 2002a.
- Kim, J. S., Byun, J. H., Kang, S. S., Son, K. S., Kim, H. P. and Chang, H. W., Isolation of flavonoids and a saponin from *Echinosophora koreensis*, *Kor. J. Pharmacogn*, 33, 110-115, 2002b.
- Kim, S. J., Son, H. K., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P., Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*, *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1348-1350, 2003.
- Kimura, Y., Okuda, H., Nomura, T., Fukai, T. and Archi, S., Effects of flavonoids and homogenates, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1223-1227, 1986.
- Ko, F. N., Cheng, Z. J., Lin, C. N. and Teng, C. M., Scavenging and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*, *Free Radical Biology Medicine*. 25, 160-168, 1998.
- Komatsu, M., Tomimori, T., Hatayama, K. and Mikuriya, N., Studies on the constituents of *Sophora* species. IV. Constituents of the root of *Sophora angustifolia* Sieb. Et

- Zucc. (1), *Yakugaku Zasshi*, 90, 463-468, 1970.
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S. Peroxynitrite mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 149-156, 1994.
- Kyogoku, K., Hatayama, K. and Komatsu, M., Constituents of Chinese crude drug "Kushen" (the root of *Sophora flavescens* Ait.). Isolation of five new flavonoids and formononetin, *Chem. Pharm. Bull.*, 21, 2733-2738, 1973.
- LeBel, C. P. and Bondy, S. C., Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosome, *Neurochem. Int.*, 17, 435-440, 1990.
- Lee, H. S., Ko, H. R., Ryu, S. Y., Oh, W. K., Kim, B. Y., Ahn, S. C., Mheen, T. I. and Ahn, J. S., Inhibition of phospholipase C<sub>γ1</sub> by the prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*, *Planta Med.*, 63, 266-268, 1997.
- Lin, K. T., Xue, J. Y., Sun, F. F. and Wong, P. Y. K., Reactive oxygen species participate in peroxynitrite induced apoptosis in HL-60 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 115-119, 1997.
- Matern, U., Strasser, H., Wendoff, H. and Hamerski, D., Coumarins and furanocoumarins. In: Constabel, F., Vasil, I. K. (Eds.), cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 5. *Academic Press, San Diago*, pp. 3-21. 1998.
- Máximo P. and Lourenço, A., A pterocarpan from *Ulex parviflorus*, *Phytochemistry*, 48, 359-362, 1998.
- Menconi, M. J., Unno, N., Smith, M., Aguirre, D. E. and Fink, M. P., Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxy radical, and peroxynitrite, *Biochem. Biophys. Acta*, 1425, 189-203, 1998.
- Natella, F., Nardini, M., Felice, M. D and Scaccini, C., Benzoic acid and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relationship, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1453-1459, 1999.
- Nkengfack, A. E., Vouffo, T. W., Vardamides, I. C., Kouam, J., Fomum, Z. T., Meyer, M. and Sterner, O., Phenolic metabolites from *Erythrina* species, *Phytochemistry*, 46, 573-578, 1997.
- Nonoyama, N., Chiba, K., Hisatome, K., Suzuki, H. and Shintani, F., Nitration and

- hydroxylation of substituted phenols by peroxynitrite. Kinetic feature and an alternative mechanistic view, *Tetrahedron Letter*, 40, 6933-6937, 1999.
- Pannala, A., Rajaq, R., Halliwell, B., Singn, S. and Rice-Evans, C. A., Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 594-606, 1998.
- Pannala, A., Rice-Evans, C. A. Halliwell, B. and Singn, S., Inhibition of peroxynitrite mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 164-168, 1997.
- Park, J. A., Kim, H. J., Jin, C. B., Lee, K. T. and Lee, Y. S., A new pterocarpan, (-)-Maackiain sulfate, from the roots of *Sophora subprostrata*, *Arch. Pharm. Res.*, 26, 1009-1013, 2003.
- Peters, V. and Nagern, T. J., Trioxygenated naturally occurring xanthenes, *Phytochemistry*, 44, 197-214, 1997.
- Ryu, S. H., Choi, S. U., Kim, S. K., No, Z., Lee, C. O. and Ahn, J. W., *In vitro* antitumor activity of flavonoids from *Sophora flavescens*, *Phytotherapy Res.*, 11, 51-53, 1997a.
- Ryu, S. Y., Lee, H. S., Kim, Y. K. and Kim, S. H., Determination of isoprenyl and lavandulyl positions of flavonoids from *Sophora flavescens* by NMR experiment, *Arch. Pharm. Res.*, 20, 491-495, 1997b.
- Saracoglu, I., Varel, M., Harput, U. and Nagatsu, A., Acylated flavonoids and phenol glycosides from *Veronica thymoides* supsp. *Pseudocinerea*, *Phytochemistry*, 65, 2379-2385, 2004.
- Sawa, T., Akaike, T. and Maeda, H., Tyrosine nitration by peroxynitrite formed nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, 275, 32467-32474, 2000.
- Singh, A., Chemical and biochemical aspects of activated oxygen: singlet oxygen, superoxide anion, and related species, In Miquel, J., Quintanilha, A. T., and Weber, H. (Eds.). *CRC Handbook of free radicals and antioxidants in Biomedicine*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1, 17-28, 1989.
- Stevens, J. E., Ivancic, M., Hsu, V. L. and Deinzer, M. L., Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*, *Phytochemistry*, 44, 1575-1585, 1997.

- Stevenson, P. C. and Veitch, N. C., Isoflavans from the roots of *Cicer judaicum*, *Phytochemistry*, 43, 695-700, 1996.
- Tahara, S. and Ibarahim, R. K., Prenylated isoflavonoids an update, *Phytochemistry*, 38, 1073-1094, 1995.
- Van, D. K., McConnell, P. and Marquardt, L., Green tea extract and its polyphenols markedly inhibit luminol-dependent chemiluminescence activated by peroxynitrite or SIN-1, *Luminescence*, 15, 37-43, 2000.
- Wang, H. and Joseph, J. A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 612-616, 1999.
- Williams, R. F., Shinkai, S. and Bruice, T. C., Radical mechanisms for 1,5-dihydroflavin reduction of carbonyl compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 1763-1767, 1975.
- Wu, L. J., Miyasa, T., Ueno, A., Kuroyanagi, M., Noro, T., Fukushima, S. and Sasaki, S., Studies on the constituents of *Sophora flavescens* Ait. IV, *Yakugaku Zasshi*, 105, 1034-1039, 1985.
- Yagi, A., Fukunaga, N., Okuzako, N., Mifuchi, I. and Kawamoto, F., Antifungal substances from *Sophora flavescens*, *Shoyakugaku Zasshi*, 43, 343-347, 1989.
- Yamamoto, H., Zhao, P. and Inoue, K., Origin of isoprenoid units in a lavandulyl moiety of sophoraflavanone G from *Sophora flavescens* cultured cells. *Phytochemistry*, 60, 263-267, 2002.
- Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., Electrochemical method for estimating the autoxidative effects of methanol extracts of crude drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 1663-1665, 1994.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I., Study on the inhibitory effects of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Biochemical Pharmacology*, 56, 213-222, 1998.
- Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T., Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1919-1921, 1989.

Zhang J. H., Zhao, Y. Y., Liu, Q. X. and Ye, X. J., Studies on the chemical constituents from *Sophora flavescens* Ait, *China J. Chin. Mat. Med.*, 25, 37-38, 2000.

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많은 분들의 도움과 관심이 있었기에 이 자리를 빌어 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 부족한 저에게 변함없는 관심과 가르침으로 이끌어 주셨으며, 아낌없는 지도와 따뜻한 격려, 그리고 사랑으로 감싸주신 최재수 교수님께 깊은 존경과 감사의 마음을 전합니다.

또한 바쁘신 중에서도 부족한 논문을 심의하여 주신 남택정 교수님, 류은순 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 학문적·인격적으로 큰 가르침을 베풀어 주신 최진호 교수님, 류홍수 교수님, 변대석 교수님, 김형락 교수님께도 감사를 드립니다.

그리고 각별한 관심으로 저를 지켜봐 주신 고신대학교 강진훈 교수님, 서재수 교수님, 이정숙 교수님, 정동관 교수님께도 감사를 드립니다.

실험실에서 동고동락한 여러 선·후배님들께 감사의 마음을 전합니다. 특히 실험에 많은 도움을 주신 정현아, 강혜숙 선배님과 생활하면서 식구처럼 지냈던 미정언니, 옆에서 위로가 되어준 숙경언니, 따뜻한 격려로 힘이 되어준 유정언니, 항상 열심히 하는 모습으로 모범이 되어준 주정언니, 실험실 막내 춘환씨, 힘들때 마다 도움과 위로가 되었던 사랑하는 친구 나영이, 또한 함께 실험하면서 정 들었던 영란언니와 여러 선·후배님들께 감사 드립니다. 늘 한결 같은 마음으로 걱정해주고 사랑해주는 친구들 아영, 은영, 동련, 하니, 세영, 유미, 은경에게도 고마움과 우정을 전합니다.

마지막으로 헌신적인 사랑과 관심으로 뒷바라지 해주시고, 부족한 저를 자랑스럽게 여기시는 사랑하는 아버지, 어머니 그리고 동생 찬우에게 이 작은 결심을 받치며, 진심으로 감사 드립니다.

2004년 12월

정희진 올림.