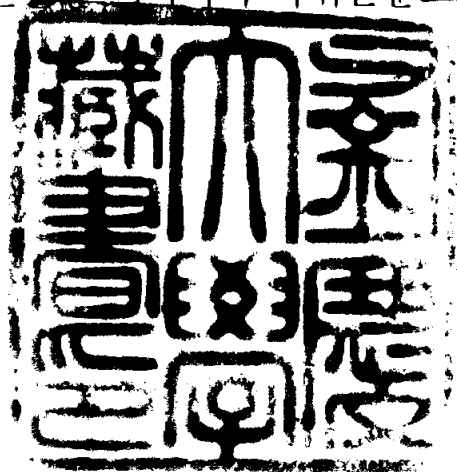


이학박사 학위논문

벚나무 잎의 항산화 활성성분

지도교수 최 재 수

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함



2003년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

정 현 아

정현아의 이학박사 학위논문을 인준함

2002년 12월 21일

주 심 이학박사 최 진 호 

부 심 약학박사 손 병 화 

위 원 약학박사 정 해 영 

위 원 농학박사 남 태 정 

위 원 약학박사 최 재 수 

목 차

LIST OF SCHEMES -----	i
LIST OF TABLES -----	ii
LIST OF FIGURES -----	iii
ABBREVIATIONS -----	vi
LIST OF SYMBOLS -----	viii
 ABSTRACT -----	 1
 I. 서론 -----	 6
 II. 실험방법 -----	 17
1. 재료 -----	17
2. 시약 및 기기 -----	17
2-1. 시약 -----	17
2-2. 기기 -----	18
3. 방법 -----	19
3-1. 뽕나무의 추출 및 분획 -----	19
3-2. 성분의 분리 -----	21
3-2-1. Methylation 방법 -----	22
3-2-2. Acid hydrolysis 방법 -----	22
3-2-3. Acetylation과 deacetylation 방법 -----	22

3-2-4. Liebermann-Burchard 검색법 -----	22
3-3. 뱀나무 EtOAc 획분의 성분 분리 -----	23
3-4. 뱀나무 EtOAc 획분에서 분리된 성분의 분광학적 성질 -----	27
4. 항산화활성 실험 -----	39
4-1. DPPH radical 소거 활성 -----	39
4-2. 활성산소종 생성 억제 활성 -----	41
4-3. ONOO ⁻ 소거 활성 -----	44
III. 결과 및 고찰 -----	47
1. 수종 뱀나무의 부위별 MeOH 추출물의 항산화활성 -----	47
1-1. 수종 뱀나무의 부위별 MeOH 추출물의 DPPH radical 소거 활성 -----	48
1-2. 수종 뱀나무의 부위별 MeOH 추출물의 활성산소종 생성 억제 활성 -----	48
1-3. 수종 뱀나무의 부위별 MeOH 추출물의 ONOO ⁻ 소거 활성 -----	49
2. 3종의 뱀나무 MeOH 추출물과 각 획분들의 항산화활성 -----	51
3. 뱀나무 EtOAc 획분에서 분리된 화합물의 구조결정 -----	54
3-1. Flavonoid 화합물의 구조 결정 -----	54
3-1-1. 6종의 flavonol 화합물의 구조결정 (5, 9, 12, 15, 20, 21) -----	55
3-1-2. 1종의 flavanone 화합물의 구조결정 (13) -----	61
3-1-3. 6종의 isoflavone 화합물의 구조결정 (1, 2, 7, 11, 14, 16) -----	61

3-2. 6종의 triterpenoid 화합물의 구조결정 (3, 4, 6, 10, 17, 18)	66
3-3. Sphingolipid 화합물의 구조결정 (8)	73
3-4. Phenol성 화합물의 구조결정 (19)	81
4. 분리된 화합물들의 항산화활성	89
4-1. Flavonoid 화합물과 phenol성 화합물의 항산화활성	89
4-2. Triterpenoid 화합물의 항산화활성	92
5. Flavonoid 화합물의 구조와 ONOO ⁻ 소거 활성 상관관계	94
5-1. Flavonol 화합물의 ONOO ⁻ 소거활성	94
5-2. Flavone 과 flavan 화합물의 ONOO ⁻ 소거활성	97
5-3. Flavanone 화합물의 ONOO ⁻ 소거활성	99
5-4. Flavonoid 화합물의 구조와 ONOO ⁻ 소거활성 상관관계	101
IV. 요약 및 결론	103
V. 참고문헌	110

감사의 글

LIST OF SCHEMES

Scheme	page
Scheme 1. Extraction and fractionation of the leaves of <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> . -----	20
Scheme 2. Isolation of compounds 1–12 from the EtOAc fraction of <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	25
Scheme 3. Isolation of compounds 13–21 from the EtOAc fraction of <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	26
Scheme 4. Measurement of DPPH radical scavenging activity. -----	40
Scheme 5. Measurement of the ROS by DCF. -----	43
Scheme 6. Measurement of the ONOO [−] scavenging activity. -----	46
Scheme 7. <i>retro</i> Diels-Alder fragmentation of compound 5 . -----	57
Scheme 8. <i>retro</i> Diels-Alder fragmentation of compound 17 . -----	69
Scheme 9. Two possible mechanisms of the scavenging activity on ONOO [−] . -----	102

LIST OF TABLES

Table	page
Table 1. Some selected <i>Prunus</i> genus in tested model systems -----	47
Table 2. Scavenging activities of the MeOH extracts of some selected <i>Prunus</i> genus on DPPH radical, total ROS and ONOO ⁻ -----	50
Table 3. Antioxidant activities of the MeOH extracts and its fractions of <i>P. davidiana</i> stem, <i>P. yedoensis</i> leaf and <i>P.</i> <i>serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaf, stem bark, and flower -----	53
Table 4. ¹ H- and ¹³ C-NMR spectral data (pyridine- <i>d</i> ₅) of isolated triterpenoids 17 and 18 from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> ---	72
Table 5. ¹ H- and ¹³ C-NMR spectral data (CD ₃ OD) of phenolic compound 19 from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> -----	82
Table 6. Antioxidant activities of flavonoids and a phenolic compound isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> -----	91
Table 7. Antioxidant activities of triterpenoids isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> -----	93
Table 8. IC ₅₀ values for the ONOO ⁻ scavenging effect of flavonols -----	95
Table 9. IC ₅₀ values for the ONOO ⁻ scavenging effect of flavones and a flavan -----	97
Table 10. IC ₅₀ values for the ONOO ⁻ scavenging effect of flavanones -----	100

LIST OF FIGURES

Figure	page
Fig. 1. Chemical structures of flavonols and isoflavones isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	35
Fig. 2. Chemical structures of a flavanone isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	36
Fig. 3. Chemical structures of 3 β -hydroxy triterpenoids isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	36
Fig. 4. Chemical structures of 2 α , 3 α , 24-trihydroxy triterpenoids isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	37
Fig. 5. Chemical structure of a sphingolipid isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	38
Fig. 6. Chemical structure of a phenolic compound isolated from <i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> leaves. -----	38
Fig. 7. Radical scavenging action of antioxidants [ArOH]. -----	40
Fig. 8. Assay of the ROS scavenging activity. -----	42
Fig. 9. ONOO ⁻ -mediated oxidation of DHR 123. -----	46
Fig. 10. EI-MS spectrum of compound 5 . -----	57
Fig. 11. ¹ H-NMR spectrum of compound 21 in CD ₃ OD. -----	58
Fig. 12. ¹³ C-NMR spectrum of compound 21 in CD ₃ OD. -----	58
Fig. 13. HMQC spectrum of compound 21 in CD ₃ OD. -----	59

Fig. 14.	HMBC spectrum of compound 21 in CD ₃ OD. -----	60
Fig. 15.	¹ H-NMR spectrum of compound 13 in CD ₃ OD. -----	63
Fig. 16.	¹³ C-NMR spectrum of compound 13 in CD ₃ OD. -----	63
Fig. 17.	¹ H-NMR spectrum of compound 16 in CD ₃ OD. -----	64
Fig. 18.	¹³ C-NMR spectrum of compound 16 in CD ₃ OD. -----	64
Fig. 19.	HMBC spectrum of compound 16 in CD ₃ OD. -----	65
Fig. 20.	IR spectrum of compound 17 . -----	68
Fig. 21.	LR-FABMS spectrum of compound 17 . -----	68
Fig. 22.	EI-MS spectrum of compound 17 . -----	69
Fig. 23.	¹ H-NMR spectrum of compound 17 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	70
Fig. 24.	¹³ C-NMR spectrum of compound 17 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	70
Fig. 25.	HMBC spectrum of compound 17 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	71
Fig. 26.	¹ H-NMR spectrum of compound 8 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	76
Fig. 27.	¹³ C-NMR spectrum of compound 8 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	76
Fig. 28.	DEPT spectrum of compound 8 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	77
Fig. 29.	HMBC spectrum of compound 8 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	78
Fig. 30.	¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 8 in pyridine- <i>d</i> ₅ . -----	79
Fig. 31.	FABMS spectrum of compound 8 . -----	80
Fig. 32.	UV spectrum of compound 19 . -----	83
Fig. 33.	¹ H-NMR spectrum of compound 19 in CD ₃ OD. -----	84
Fig. 34.	¹³ C-NMR spectrum of compound 19 in CD ₃ OD. -----	84
Fig. 35.	DEPT spectrum of compound 19 in CD ₃ OD. -----	85
Fig. 36.	HMQC spectrum of compound 19 in CD ₃ OD. -----	86
Fig. 37.	HMBC spectrum of compound 19 in CD ₃ OD. -----	87

Fig. 38. FABMS spectrum of compound 19 . -----	88
Fig. 39. Chemical structures of flavonols used in ONOO ⁻ scavenging test. -----	96
Fig. 40. Chemical structures of flavones used in ONOO ⁻ scavenging test. -----	98
Fig. 41. Chemical structure of a flavan, catechin used in ONOO ⁻ scavenging test. -----	98
Fig. 42. Chemical structures of flavanones used in ONOO ⁻ scavenging test. -----	100

ABBREVIATIONS

RO·	alkoxyl radical
ROO·	alkyl peroxy radical
ArOH	aromatic alcohol
¹³ C-NMR	carbon 13 nuclear magnetic resonance
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterium dimethyl sulfoxide
CD ₃ OD	deuterium methanol
Pyridine- <i>d</i> ₅	deuterium pyridine
DCFH-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
CH ₂ Cl ₂	dichloromethane
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
EI	electron impact
EtOAc	ethyl acetate
Hz	herz (sec ⁻¹)
HMBC	heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	heteronuclear multiple-quantum coherence
HR-FAB	high resolution fast atom bombardment
COSY	homonuclear correlation spectroscopy
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
·OH	hydroxyl radical
IR	infrared
IC ₅₀	50 % inhibition concentration
LR-FAB	low resolution fast atom bombardment
MS	mass spectrometry
MeOH	methanol
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
NO·	nitric oxide radical
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
1D	one dimension

ONOOH	peroxynitrous acid
ONOO ⁻	peroxynitrite
¹ H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
rel. int	relative intensity
¹ O ₂	singlet oxygen
·O ₂ ⁻	superoxide anion radical
TLC	thin layer chromatography
2D	two dimension
UV	ultraviolet
H ₂ O	water

LIST OF SYMBOLS

J coupling constant (Hz)

M^+ molecular ion

m/z mass/charge ratio

δ chemical shift

Antioxidant Constituents from the Leaves of *Prunus serrulata* var. *spontanea*

Hyun–Ah Jung

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

Abstract

When humans use oxygen for respiration and combustion, reactive oxygen species (ROS) are formed as by-products including superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals of lipids such as alkoxyl radical ($\text{RO}\cdot$) and peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$). In addition, peroxynitrite (ONOO^-) is the reactive nitrogen species (RNS) formed by the *in vivo* reaction of nitric oxide ($\text{NO}\cdot$) and $\cdot\text{O}_2^-$, and followed by protonation to be highly reactive peroxynitrous acid (ONOOH). These ROS and RNS may act as potent oxidizing and nitrating agents to damage several components in the body, such as lipid, protein, nucleic acid, and DNA. Also, these reactive species are likely to be involved in many human degenerative diseases such as cancer, aging, arteriosclerosis, rheumatoid arthritis and allergy.

For several years, many researchers have investigated powerful, and nontoxic antioxidants from natural sources, especially edible or medicinal plants to prevent the above free radical related disorders in human as well as replace synthetic compounds, which may be carcinogenic and harmful to lungs and liver.

In an effort to find these natural antioxidants, we have focused on plants in the genus

Prunus, which have been previously reported the biological activities such as sedative, anti-inflammatory, anti-hyperlipidemic, anti-tumor and antioxidant activities. There are about 25 species of *Prunus* (Rosaceae) grown in Korea, but only 6 species are indigenous. *P. serrulata* var. *spontanea* (Rosaceae) is a large sized tree widely distributed throughout Korea. The red fruits of this plant are edible and are used in traditional folk medicine against heart failure from beriberi, dropsy, mastitis, an emmenagogue, and toothache. Also, the bark of *P. serrulata* var. *sponatenea*, *P. yedoensis*, and *P. sargentii*, so called Pruni Cortex, have been used for detoxification, and relaxation, and as an antitussive in traditional Korean medicine.

It was investigated the antioxidant activities of the methanol (MeOH) extracts of several parts (leaf, flower, fruit, stem bark, and heartwood) of some selected *Prunus* species, including *P. buergeriana*, *P. davidiana*, *P. padus*, *P. pendula* for. *ascendens*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *spontanea*, and *P. yedoensis* by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, total ROS generation in kidney homogenates using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and the peroxynitrite (ONOO⁻) scavenging/inhibitory activity test. Most of the MeOH extracts tested showed significant antioxidant activities with IC₅₀ (50% inhibition concentration) < 10 µg/mL, comparable to L-ascorbic acid (IC₅₀ 1.71 µg/mL) as a well-known antioxidant, especially like the stem bark of *P. pendula* for. *ascendens* with IC₅₀ 1.63 µg/mL. Most samples tested also showed good antioxidant activities in total ROS, and the ONOO⁻ system. The inhibition activity of *P. pendula* for. *ascendens* stem bark, *P. yedoensis* stem and *P. serrulata* var. *spontanea* heartwood on total ROS were as good as that of positive control Trolox (73.56 ± 0.31%) at concentration of 40 µg/mL with 75.84 ± 0.91%, 72.06 ± 1.35%, and 71.20 ± 0.63%, respectively. In ONOO⁻ system, the stem of *P. davidiana*, and the leaves and stem of *P. sargentii* showed the stronger inhibition activity than penicillamine (74.14 ± 0.47%) at concentration of 10 µg/mL with 92.84 ± 0.16%, 91.92 ± 0.88%, and 91.63 ± 0.39%, respectively.

Also, it was evaluated the antioxidative activities of the solvent-partitioned fractions, such as dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) soluble

fractions and water (H₂O) layer of *P. davidiana* stem, *P. yedoensis* leaves as well as the leaves, stem bark, and flower of *P. serrulata* var. *spontanea*. Among those fractions of three genus *Prunus* tested in three model systems, the EtOAc fractions showed the strongest activities. Especially, the scavenging activity of the leaves of *P. serrulata* var. *spontanea* on the DPPH increased in the order of EtOAc > H₂O > MeOH > *n*-BuOH > CH₂Cl₂ and were 7.98, 18.95, 21.88, 48.55, and 65.70 $\mu\text{g/mL}$ in their IC₅₀, respectively. The radical scavenging effect of the EtOAc fraction on DPPH radical was comparable to that of L-ascorbic acid as 1.71 $\mu\text{g/mL}$, which is a well-known antioxidant. In addition, the EtOAc soluble fraction at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ also significantly inhibited the ONOO⁻ by 95.37 $\pm$ 0.12%.

Because the EtOAc soluble fraction of the MeOH extract of *P. serrulata* var. *spontanea* leaves exhibited strong antioxidant activity, it was carried out column chromatography of this fraction by using silica gel, Sephadex LH-20, Sep-Pak cartridges, and RP 18 to isolate twenty-one compounds (compounds **1–21**) as represented by thirteen flavonoids [prunetin (**1**), genistein (**2**), quercetin (**5**), prunetin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**7**), kaempferol 3-*O*- α -L-arabinofuranoside (**9**), prunetin 5-*O*- β -D-glucopyranoside (**11**), kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranoside (**12**), naringenin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (**13**), genistin (**14**), kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**15**), orobol 7-*O*- β -D-glucopyranoside (**16**), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**20**) and kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**21**)], six triterpenoids [ursolic acid (**3**), 2 α -hydroxyursolic acid (**4**), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**6**), 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**10**), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (**17**), and 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (**18**)], one sphingolipid (**8**) and one phenolic compound [2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl *o*-(*Z*)-coumaric acid (**19**)]. Among these isolated compounds, compounds **8**, **17** and **19** were first reported in nature, and all isolated compounds were first isolated in the plant of *P. serrulata* var. *spontanea*. The structural identifications of these compounds were elucidated by 1D (¹H-, ¹³C-NMR, DEPT), 2D NMR (HMQC,

HMBC, ^1H - ^1H COSY, and NOESY) spectral data, IR, UV, EIMS, and FABMS data and comparison with the published spectral data.

Also, the antioxidant activities of some isolated compounds were evaluated by the same methods as those of the extracts and fractions of the genus *Prunus*. In case of the antioxidant activities of flavonoids, compound **5** and its glucoside **20** exhibited strong antioxidant activity with $3.54\ \mu\text{M}$ and $4.63\ \mu\text{M}$ on DPPH radical, as well as $0.93 \pm 0.14\ \mu\text{M}$ and $1.08 \pm 0.06\ \mu\text{M}$ on ONOO^- . Compounds **9**, **12**, **15**, **20** and **21** were marginal activities in the tested model system. With regard to the antioxidant activities of triterpenoids, all isolated compounds showed no activity as a DPPH radical scavenger, whereas there was high scavenging activity on total ROS in the order of $4 > 6 \geq 3 > \text{Trolox (as positive control)} > 17 \geq 10 \geq 18$. Compounds **6** and **18** showed high ONOO^- scavenging activities with $\text{IC}_{50}\ 4.90 \pm 0.38\ \mu\text{M}$ and $\text{IC}_{50}\ 6.88 \pm 0.46\ \mu\text{M}$, respectively, by positive control penicillamine with $\text{IC}_{50}\ 5.11 \pm 0.23\ \mu\text{M}$. Compounds **10** and **17** had ONOO^- scavenging activity with $\text{IC}_{50}\ 25.18 \pm 2.68\ \mu\text{M}$ and $82.05 \pm 2.80\ \mu\text{M}$, respectively, whereas **3** and **4** showed no activities on ONOO^- . From the above results, it was concluded that the antioxidant activity of the leaves of *P. serrulata* var. *spontanea* may be correlated with their active components such as flavonoids, a phenolic compound and triterpenoids.

In the continuous course of investigations on the structure-activity relationship of flavonoids as ONOO^- scavengers, it was examined the activity of some selected flavones, flavonols, flavanones and a flavan, catechin on authentic ONOO^- . On the basic structure of flavonols, the existence of 3-hydroxy group proved to be important in the ONOO^- scavenging mechanism for example, IC_{50} of qalangin and qalangin 3-*O*-methylether were $3.37 \pm 0.99\ \mu\text{M}$, and no activity at $10\ \mu\text{M}$, respectively. Nevertheless, quercetin and its 3-*O*-glucoside showed significant activities ($\text{IC}_{50} < \text{penicillamine as positive control with } 2.91 \pm 0.64\ \mu\text{M}$) for their *o*-dihydroxy group (catechol) at B ring. In case of flavanones, the important structural factor was catechol group in A-ring or B-ring such as eriodictyol and taxifolin with $4.45 \pm 0.70\ \mu\text{M}$ and $3.94 \pm 0.40\ \mu\text{M}$,

respectively. Additional methoxyl group *ortho* to the C-4' hydroxy group may increase the activities on ONOO⁻ like hesperetin with $6.01 \pm 1.16 \mu\text{M}$ and $2.57 \pm 0.36 \mu\text{M}$. Like flavanones, a flavan and flavones with catechol group in A-ring or B-ring exhibited the activities, IC₅₀ of baicalin, luteolin and catechin were $1.44 \pm 0.12 \mu\text{M}$, $1.43 \pm 0.27 \mu\text{M}$, and $1.16 \pm 0.06 \mu\text{M}$ respectively, however acacetin, apigenin and chrysin showed no activities at $10 \mu\text{M}$, for the absence of *o*-dihydroxy group. These results were similar to other researches on flavonoid-induced scavenging activity of ONOO⁻, which results from two possible mechanisms as nitration and electron donation. Of isolated from *P. serrulata* var. *spontanea*, two flavonol, quercetin (**5**) and its glucosides (**20**) with *o*-dihydroxy group may show the scavenging activity on ONOO⁻ by electron donation, on the other hand, the rest flavonoids kaempferol and its glucosides (**9**, **12**, **15**, and **21**) were likely to exhibit their activities by nitration.

In conclusion, most tested plants in the genus *Prunus*, especially *P. serrulata* var. *spontanea* leaves could be act as a preventing agent with respect to free-radical related disease for their antioxidant capacities on free radicals. Also, the antioxidant potential of the isolated compounds such as flavonoids, triterpenoids and phenolic compounds from the EtOAc fraction of *P. serrulata* var. *spontanea* leaves will be possible to suggest the opportunities of the systemical studies on antioxidant activity-structure relationship and development of powerful and nontoxic natural antioxidant drug.

I. 서론

벚나무는 장미과 (Rosaceae)에 속하며 북반구 온대지방에 분포하고, 전세계에 약 200 여종이 밝혀져 있으며 우리나라에는 보통 낙엽수로서 약 15 종이 자생한다. 벚나무 속 (*Prunus* genus)에 속하는 벚나무 [*Prunus serrulata* Lindley var. *spontanea* (Mix.) Wils.]는 우리 나라에서 전남, 전북, 경남, 경북, 충북, 평북의 표고 100-1560m 지역에 야생하며 지리적으로는 일본, 중국에 분포하는 높이가 20 m에 달하는 낙엽 교목이다. 수피는 옆으로 벗겨지며 암자색이고 잔가지에는 털이 없다. 잎은 호생, 난형, 난상 피침형이거나, 길이 6-12 cm의 끝이 아주 뾰족한 침상이고, 양면에는 털은 없으나 가장자리에 가는 톱니와 겹톱니가 있다. 엽병은 길이 2-3 cm로서 2-3개의 선이 있다. 4-5월에 연한 홍색 또는 거의 백색의 꽃이 피며, 산화방서로 2-5 송이씩 달린다. 열매는 핵과로 둥근 모양을 하고 있으며, 6-7월에 붉은 색에서 검은 색으로 익는다 (이, 1997; 이, 1985).

생체내 산소가 유입되어 세포 내에서 이용될 때, superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_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 (ONOO^-)는 생체 내에서 nitric oxide ($\text{NO}\cdot$)과 $\cdot\text{O}_2^-$ 의 반응으로 생성되는 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)으로 ROS와 함께 활성종 (reactive species)에 포함된다 (Sawa *et al.*, 2000; Balavoine and Geletii, 1999). 이들 ROS와 RNS는 세포내 여러 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산 그리고 DNA를 산화시켜 염증을 유발하고 세포내 여러 조직을 손상시키며 (Beckman *et al.*, 1990), 많은 퇴행성 질환, 즉 암 (Dreher *et al.*, 1996), 노화 (Sohal, 2002), 동맥경화, 류마티스 관절염, 그리고 알레르기 (Griffiths and Lunec, 1996; Squadrito and Pryor, 1998; Choi *et al.*, 2002)에 관련되어 있을 것으로 여겨지고 있다. 활성종에

의해 유발된 많은 질환을 예방할 뿐만 아니라, 그 발암성과 독성이 문제시되고 있는 합성 항산화제 (Branen, 1975)를 대체하기 위해, 천연물로부터 강력하면서도 독성이 없는 천연 항산화제를 찾아내는 것이 절실히 요구되었다.

벚나무 속 식물은 진정작용, 항염증작용, 항고지혈증활성, 항암활성과 같은 생리활성을 가지고 있어, 오래 전부터 민간 약제로 사용되어왔다 (Kritikar and Baru, 1974). 특히 벚나무의 열매를 앵두 (앵도)라고 하여 식품으로 섭취하였는데, 각기로 인한 심장마비, 부종, 유선염과 치통에 대한 민간요법으로 사용되었다. 또한 벚나무 (*P. serrulata* var. *spontanea*)의 수피는 산벚나무 (*P. sargentii*), 왕벚나무 (*P. yedoensis*) 수피와 함께 한방에서 화피 (樺皮) 혹은 앵피 (櫻皮) [Pruni Cortex]라고 불리며, 완화, 진해, 해독작용을 가지기 때문에 기침과 위염, 위암의 치료에 사용되었다 (김, 1997). 특히 벚나무 수피로부터 분리한 flavonoid계 화합물인 'sakuranin'은 기침약의 원료로 사용된다. 벚나무 내피는 식중독, 생선 중독, 벼룩 중독에도 효과가 있으며, 특히 고등어, 가다랭이 같은 등푸른 생선에 중독되었을 때 벚나무 내피를 달여 먹으면 효과가 있을 뿐만 아니라 소화불량이나 설사에도 효능을 나타낸다고 한다. 벚나무 수피 달인 물을 차로 늘 마시면 기관지와 폐가 튼튼해지고 위장 기능도 좋아지며 피부질환을 완화하는 것으로 알려져 있다. 그리고 벚꽃을 차로 마시면 위장과 폐 기능이 좋아진다고 한다. 이외에 벚나무 속의 식물들에 대한 성분분리 및 생리활성에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.

Kitajima와 Tanaka (Kitajima and Tanaka, 1993)는 감기 치료에 효능이 있는 *P. zippeliana* 잎과 가지로부터 22-dehydroclerosteryl acetate, stigmasteryl acetate, β -sitosterol, stigmasterol, clerosterol, 22-dehydroclerosterol, β -sitosterol과 stigmasterol 3-O- β -D-glucopyranoside, ursolic acid, oleanolic acid, 2 α -hydroxyursolic acid, tormentic acid, methyl linolate, phytol, prunasin, *dl*-mandelic acid, kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside, *d*-mandelic acid β -D-glucopyranoside

를 분리, 동정하였다. *P. yedoensis*와 *P. zippeliana*의 잎은 tyrosinase 혹은 자동산화로 인한 melanin 생성을 억제한다고 한다 (Matsuda *et al.*, 1994).

Sang 등은 *P. amygdalus* Batsch로부터 *p*-hydrobenzoic acid, protocatechuic acid, 3-prenyl-4- β -D-glucopyranosyl-4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, catechin, 3'-O-methylquercetin 3-O- β -D-glucopyranoside, 3'-O-methylquercetin 3-O- β -D-galactopyranoside, 3'-O-methylquercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside, kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside, naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside과 같은 phenol성 항산화 물질들과 ursolic acid (Sang *et al.*, 2002a; Sang *et al.*, 2002b), sesquiterpene인 amygdalotone (Sang *et al.*, 2002c)과 sphingolipid인 1-O- β -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*R*,4*E*,8*Z*)-2-[(2*R*)-2-hydroxyhexadecanoylamino]-4,8-octadecadiene-1,3-diol, β -sitosterol, daucosterol, uridine, adenosine을 분리하여 그 구조를 보고하였다 (Sang *et al.*, 2002d). 또한 *P. amygdalus*의 종자는 albino 토끼에서 혈당 저하효과를 나타내었다고 한다 (Teotia and Singh, 1997).

또한 Takeoka 등 (Takeoka *et al.*, 2000)은 *P. dulcis* (Mill.)로부터 human immunodeficiency virus (HIV)에 대한 항바이러스활성, 항염증작용, 그리고 항암활성이 보고된 triterpenoid 화합물인 betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid을 분리하였다 (Sang *et al.*, 2002c; Takeoka *et al.*, 2000).

*P. africana*에서 9개의 triterpenoid 화합물이 분리되었는데 그 구조는 각각 2 α , 3 α -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 α -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 α -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, 3 β , 24-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 α , 23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 α , 24-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 24-O-*trans*-ferulyl-3-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 24-O-*cis*-ferulyl-3-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 그리고 24-O-*trans*-ferulyl-2,3-dihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (Fournieu *et al.*, 1996)로 동정되었으며, neolignan 화합물인 4-O- β -D-glucopyranosyl-(7,8)-dimethoxyisolariciresinol (Scarpato *et al.*, 1998)도 분리, 동정되었다.

P. mume (매실나무)의 꽃은 한방에서 해독, 위염, 거담, 진정효과를 가지며, 눈병이나 피부병 등을 치료하기 위해 사용되어왔으며, 쥐의 수정체내 aldose reductase를 억제하고, thrombin으로 유도된 토끼의 혈소판 응집에 대해 억제활성을 가지는 것으로 보고되었다 (Yoshida *et al.*, 1993). *P. mume*의 꽃으로부터 flavonol oligoglycoside 화합물인 2''-O-acetylrutin, 2''-O-acetyl-3-O-methylrutin, quercetin 3-O-(2'',6''- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-galactopyranoside, quercetin 3-O-rhamnosyl(1 $\rightarrow$ 6)galactoside, rutin, quercetin 3-O-neohesperidoside, isorhamnetin 3-O-rhamnoside, chlorogenic acid, benzyl- β -D-glucopyranoside, benzyl alcohol xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)glucopyranoside, chavicol β -D-glucose, eugenylglucoside, phytol (Yoshikawa *et al.*, 2002a), 수종의 triterpene 화합물과, amygdalin, prunasin (Yoshida *et al.*, 1993)이 분리되었다. Ichikawa 등 (Ichikawa *et al.*, 1989)은 이 식물의 미성숙 종자로부터 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde를 분리하였고, 이 식물의 열매와 종자의 hexane 추출물은 항돌연변이 활성을 나타내었다고 한다 (Dogasaki *et al.*, 1992).

Bilia 등 (Bilia *et al.*, 1993)은 *P. prostrata*에서 5-(β -D-glucopyranosyloxy)-2-(3-hydroxybutyl)-1,3,3-trimethylcyclohexene, 4-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-(3-methyl-2-butenyl)benzoic acid, fraxinol 6- β -D-galactopyranoside, 6,7-dihydroxy-5-methoxycoumarin 6- β -D-glucopyranoside, β -sitosterol 3-O- β -D-galactopyranoside, ampelopsionoside, boscalin 4'- β -D-glucopyranoside, mandshurin, fraxinol, herniarin, umbelliferone, kaempferol, dihydroquercetin, benzyl β -D-glucopyranoside, rutin, 그리고 dihydrokaempferol를 분리하였다. 뿐만 아니라, flavonol 화합물과 dimeric A-type protoanthocyanidin 화합물인 5,7,2',5'-tetrahydroxy-(2R,3R)-flavan-3-ol, 7-methoxyl-(+)-catechin, *ent*-epiafzelechin (2 α $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 α $\rightarrow$ 8) quercetin, *ent*-epiafzelechin (2 α $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 α $\rightarrow$ 8) afzelechin, *ent*-epiafzelechin (2 α $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 α $\rightarrow$ 8) kaempferol, *ent*-epiafzelechin (2 α $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 α $\rightarrow$ 8) epicatechin, *ent*-epiafzelechin (2 α $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 α $\rightarrow$ 8) epiafzelechin, *ent*-epiafzelechin (2 α $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 α $\rightarrow$ 8) catechin, (+)-

catechin 그리고 (-)-epicatechin를 분리하여 그 구조를 밝혔다 (Bilia *et al.*, 1996).

2개의 C₂₅-epoxyapocarotenol 화합물, 즉 UV-형광색소인 persicaxanthin, persicachrome, 그리고 C₂₇-epoxyapocarotenol 화합물, C₃₀-epoxyapocarotenol 화합물이 *P. domestica*의 말린 열매 (prune: 말린자두)로부터 분리되었다 (Gross *et al.*, 1981). Nakatani 등 (Nakatani *et al.*, 2000)은 phenol성 화합물인 *p*-coumaric acid, vanillic acid β -D-glucoside, protocatechuic acid, 그리고 caffeic acid와 함께 4-amino-4-carboxychroman-2-one을 분리하여 구조를 동정하였다. 이 화합물은 항산화제인 neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 그리고 chlorogenic acid과 같은 caffeoylquinic acid isomer와 함께 존재할 때 상승작용을 가지는 것으로 보고되었다 (Kayano *et al.*, 2002). 뿐만 아니라, 이 식물의 수피에서 domesticoside (2-O- β -glucopyranosyl-4-O-methylphloretacetophenone) (Nagarajan and Parmar, 1977)가 분리되었으며, 심재로부터 isosakuranetin, prudomestin, dihydrokaempferide, naringenin, 3,5,7-trihydroxy-8,4'-dimethylflavanone, 5,7,4'-trihydroxy-3-methoxyflavanone (Parmar *et al.*, 1992)이 분리되었으며, 잎과 열매 (plum:자두)로부터 몇가지의 kaempferol과 quercetin의 배당체 (Henning and Herrmann, 1980)가 분리되었다. 자두의 향기성분으로 (*E*)-2-hexanal, butyl acetate, butyl butylate (Horvat *et al.*, 1992)이 확인되었으며 말린 열매로부터 furfural, benzaldehyde, ethyl cinnamate가 확인되었다 (Moutounet *et al.*, 1975). 자두와 그 과즙에는 phenol성 화합물이 많이 포함되어 있으며, 대부분 hydroxycinnamate 화합물이고, human LDL에 대하여 항산화 활성을 보이는 neochlorogenic acid, chlorogenic acid 역시 확인되었다 (Donovan *et al.*, 1998). 자두는 ethyl cinnamate와 coumarin 화합물과 같은 phenol성 화합물을 소량 포함하며 (Stohr *et al.*, 1975), Fang 등 (Fang *et al.*, 2002)은 말린 열매로부터 phenol성 화합물을 체계적으로 연구하여 6가지의 서로 다른 dicaffeoyl quinic acid ester 이성체를 확인하였다.

P. armeniaca (살구나무) 뿌리에서 A-type protoanthocyanidin 화합물인 *ent*-epiafzelechin-3-*O*-*p*-hydroxybenzoate-(4 α →8, 2 α →*O*→7)-epiafzelechin (Prasad *et al.*, 1998), *ent*-epiafzelechin-(4 α →8, 2 α →*O*→7)-epiafzelechin (mahuannin A), *ent*-epiafzelechin-(4 α →8, 2 α →*O*→7)-(+)-afzelechin, *ent*-epiafzelechin-(4 α →8, 2 α →*O*→7)-(-)-afzelechin이 분리되었다 (Prasad *et al.*, 1999). 뿐만 아니라, 새로운 aromatic glycoside 화합물인 4-*O*-glycosyloxy-hydroxy-6-methoxyacetophenone이 분리되었다 (Prasad, 1999). Rawat (Rawat *et al.*, 1998) 등은 이 식물에서 β -sitosterol, 2,6-dihydroxy-4-methoxycetophenone, kaempferol, aromadendrin, quercetin, β -sitosterol- β -D-glucoside, pleoside를 분리하였으며, 식물성장 억제인자로 알려진 mahuannin A, ephedrannin A, mahuannin B, 그리고 13'-hydroxy mahuannin A를 분리하였다. Prasad (Prasad, 2000)는 *ent*-epiafzelechin-(4 α →8', 2 α →*O*→7)-(-)-epicatechin, 그 isomer인, *ent*-epiafzelechin-(4 α →8', 2 α →*O*→7)-(-)-catechin와 함께 kaempferol 7-*O*-methylether, β -sitosterol- β -D-glucoside, methyl-4-hydroxybenzene를 분리하여 보고하였다.

진정효과를 가지며 감기, 두통, 심장 및 내장기관의 질환 치료에 대한 효능이 알려져 있는 *P. ssiori*와 *P. padus* (귀룽나무)의 수피로부터, Yoshinari 등 (Yoshinari *et al.*, 1984)은 lignan xyloside 화합물인 ssioriside [(8*S*,8'*S*)-4,4'-dihydroxy-3,4,3',5'-tetramethoxyl-8,8'-butyrolignan 9-*O*- β -D-xylopyranoside]와 prupaside [(8*R*,7*S*,8'*R*)-5,5'-dimethoxylariciresinol 9'-*O*- β -D-xylopyranoside]를 분리하였으며, 또한 prunasin, syringin, glucosyringin, 1,4-dihydroxy-2,6-dimethoxybenzene 1-*O*- β -D-glucopyranoside, roseoside, lyoniside, schizandriside를 분리, 구조를 밝혔으며, (+)-catechin와(-)-epicatechin의 혼합물도 확인하였다. 또한 *P. ssiori*의 수피로부터 phenylpropanoid glycoside 화합물인 2-(3,4-methylenedioxyphenyl)-ethyl-(6-*O*-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside과 3-*O*-caffeoyl- β -D-fructofuranosyl 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranoside, 6-*O*-caffeoyl-D-glucopyranoside, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-(6-*O*-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside가 분리, 보고되었다 (Abdallah *et al.*,

1994).

*P. puddum*의 수피로부터 prunetin과 함께, isoflavanone 화합물인 padmakastein과 그 배당체인 padmakastin이 분리되어 4',5-dihydroxy-7-methoxyisoflavanone과 그 4'-glucoside로 구조가 동정되었다 (Farkas *et al.*, 1969).

P. buergeriana (섬개벚나무)의 수피로부터 phenylpropanoid glucoside ester 화합물인 6-*O*-caffeoyl-1-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside, 6-*O*-*p*-coumaroyl-D-glucopyranoside, 1,6-di-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside, 6-*O*-caffeoyl-D-glucopyranoside, (2*R*)-[(6-*O*-caffeoyl)- β -D-glucopyranosyloxy]benzeneacetonitrile (Shimomura *et al.*, 1988), (3*R*)-3-methyl-3-(6-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranosyloxy)-pentan-5-olide (Shimomura *et al.*, 1989)가 분리, 동정되었다.

Flavanone xyloside 화합물인 sakuranetin 5-*O*- β -D-xyropyranoside, sesquilignan 화합물인 dihydrobuddlenol 그리고, neolignan 화합물인 sakuraresinol이 *P. jamasakura* 수피로부터 sakuranin, neosakuranin, ($\pm$)-eriodictyol, (+)-catechin, (-)-epicatechin, ($\pm$)-lyoniresinol와 함께 분리되었다 (Yoshinari *et al.*, 1990).

고혈압 치료효능이 있는 것으로 보고된 *P. spinosa* 가지로부터 mahuanin A와 ent-epiafzelechin-(2 α →7, 4 α →8)-epicatechin가 분리되었고 (González *et al.*, 1992), 꽃으로부터 kaempferol과 quercetin의 배당체를 분리하였다 (Olszewska and Wolbis, 2001).

Phenolic glucoside 화합물인 pryanaside A [2'- β -D-glucopyranosyloxybenzyl 2-(6-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyloxy)benzoate]와 pryanaside B [2'-(6-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyloxy)benzyl 2- β -D-glucopyranosyloxy-6-hydroxybenzoate], (+)-taxifolin, dehydrodicatichin A, virgaureoside A, henryoside, populine이 *P. grayana* 심재로부터 분리되었다 (Shimomura *et al.*, 1989). 수피로부터는 phenylpropanoid glucoside 화합물인 2-(4-hydroxyphenyl)-ethyl-(6-*O*-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside, 3,4,5-trimethoxybenzoyl- β -D-glucopyranoside, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-(6-*O*-

caffeoyl)- β -D-glucopyranoside, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl- β -D-glucopyranoside, 6-O-caffeoyl-D-glucopyranose (Shimomura *et al.*, 1987a), grayanoside A [2-(4-hydroxyphenyl)-ethyl-(6-O-feruloyl)- β -D-glucopyranoside], grayanoside B [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-(6-O-feruloyl)- β -D-glucopyranoside], grayanin [(2R)-((6-O-caffeoyl)- β -D-glucopyranosyloxy)benzeneacetonitrile]가 각각 분리되었다 (Shimomura *et al.*, 1987b). 그리고 phenylpropanoid로 치환된 tocopherol 유도체인, prunusol A와 B는 이 식물의 leaf wax로부터 분리되어 보고되었다 (Osawa *et al.*, 1991).

El Lahlou (El Lahlou *et al.*, 1999) 등은 *P. persica* (복숭아나무, 복사나무) 열매에서 7개의 triterpenoid 화합물을 분리하였는데, 각각 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid, 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxyolean-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 α , 24-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 α , 24-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 β , 24-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid, 2 α , 3 α -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, 그리고 2 α , 3 α -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid로 구조를 결정하였다. 이 식물의 leaf wax는 hydrocarbons (C₂₂-C₃₄), triterpenoids, primary alcohols (C₂₆-C₃₄) 그리고 그 esters (C₄₂-C₅₂)로 구성되어 있으며 hexacosanoate, octacosanoate, eicosanoate의 sitosteryl ester 화합물을 보고하였다 (Baker *et al.*, 1979). 이 종의 꽃 추출물은 UV-B와 UV-C로 유도되는 DNA 손상과 피부의 발암에 대한 보호효과를 가진다고 한다 (Heo *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). 또한 이 추출물은 UV-B로 인한 정상인의 keratinocyte의 손상에 대한 보호효과가 보고된바 있다 (Kim *et al.*, 2000).

*P. cerasus*로부터, Fe (II)-induced liposome peroxidation bioassay에서 강력한 항산화활성을 보이는 chlorogenic acid, 그 methyl ester, 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopenta-2,5-diol과 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)-cyclopenta-2,3-diol와 함께 2-hydroxy-3-(O-hydroxyphenyl) propanoic acid를 보고하였다 (Wang *et al.*, 1999a). 또한 polyphenol 화합물인 5,7,4'-trihydroxyflavanone, 5,7,4'-trihydroxyisoflavone,

chlorogenic acid, 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol-3-rhamnoside, 5,7,4'-trihydroxyflavonol-3-rutinoside, 5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavonol-3-rutinoside, 5,7,4'-trihydroxyisoflavone-7-glucoside, 그리고 Fe (II)-induced liposome peroxidation bioassay에서 항산화활성을 보인 6,7-dimethoxyl-5,8,4'-trihydroxyflavone도 분리되었으며 (Wang *et al.*, 1999b), anthocyanin도 많이 함유하고 있음이 밝혀졌다 (Wang *et al.*, 1997; Chandra *et al.*, 1993). Kaempferol과 quercetin의 3번 위치에 rutinoside와 glucoside가 결합된 화합물을 각각 분리하여 보고하였고 (Scaller and Von Elbe, 1970; Olden and Nybom, 1968), 앞에서도 quercetin 3-glucoside, kaempferol 3-rhamnoside, quercetin 3-rhamnoside, quercetin 3-glucoside (Geissman, 1956)를 확인하였다. Kaempferol 7-glucoside, isorhamnetin 3-rutinoside, quercetin과 kaempferol 4'-glucoside, 그리고 kaempferol 3-(2^G-glucosyl-rutinoside)는 sweet cherry에서 kaempferol 3-rhamnosyl-4'-glucoside는 sour cherry로부터 각각 분리하였다 (Shrikhande and Francis, 1973). 이 뱃나무 종의 수피에서는 tectochrysin 5-glucoside, genistein 5-glucoside, pinostrobin, naringenin, prunin, sakuranetin, sakuranin, dihydrowogonin 7-glucoside, chrysin, tectochrysin, genistein, prunetin, 그리고 prunetin 5-glucoside이 분리되어 보고되었다 (Geibel *et al.*, 1990; 1991; 1995). 또한 6개의 caffeoylquinic acid 이성체, 4가지의 *p*-coumarylquinic acid 이성체, caffeic acid, *p*-coumaric acid와 함께, kaempferol 3-rhamnoglucoside와 kaempferol 3-glucoside이 보고되었다 (Scaller and Von Elbe, 1970). Benzyl-β-D-glucoside, 6-hydroxy-2,6-dimethyl-2-(*E*),7-dienyl-β-D-glucoside, 2-methoxy-4-(2-propenyl)phenyl-β-D-glucoside (Schwab *et al.*, 1990) 그리고 flavonol tetraglycoside 화합물인 quercetin 3-*O*-rutinosyl-7,3'-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-rutinosyl-4'-di-*O*-glucoside (Henning and Herrmann, 1980)와 함께 isoflavanone 화합물인 prunetin 5-*O*-β-D-glucoside (Khalid *et al.*, 1989)를 *P. avium*과 *P. cerasus*의 잎과 화경 (peduncle)으로부터 분리하였다. 또한 *P. cerasus*으로부터 항산화활성이 있는 melatonin을 확인하였다 (Burkhardt *et al.*, 2001). *P. persica*와 *P. armeniaca*에서

amygdalin이 분리되었고, *P. macrophylla* 에서 prunasin의 존재가 확인되었다 (Shimomura *et al.*, 1987b).

P. davidiana 가지의 MeOH 추출물과 분리 화합물인 prunin, (+)-catechin 그리고 hesperetin 5-*O*-glucoside는 고지방 식이를 투여한 쥐와 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킨 쥐에서 모두 혈당저하효과와 저지혈증을 나타내었다 (Choi *et al.*, 1991a; Choi *et al.*, 1991b; Choi *et al.*, 1991c).

이와 같이 벚나무 속의 식물에 관한 연구가 많이 진행되고 있으며, 근자에도 항산화활성과 화합물 분리와 정제에 관련하여 다양한 논문들이 발표되고 있다 (Burkhardt *et al.*, 2001; Donovan *et al.*, 1998; Kayano *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1999). 이에 본 실험실에서는 한국에서 자생하는 7종의 벚나무 속 식물 [*P. buergeriana* (섬개벚나무), *P. davidiana* (산복사), *P. padus* (귀룽나무), *P. pendula* for. *ascendens* (올벚나무), *P. sargentii* (산벚나무), *P. serrulata* var. *spontanea* (벚나무), 그리고 *P. yedoensis* (왕벚나무)]에 대한 항산화활성을 검색하였고, 그 중, *P. serrulata* var. *spontanea* 와 *P. yedoensis*, 그리고 *P. davidiana* 를 선택하여 그 획분에 대한 항산화활성을 살펴보았다. 그리고 항산화활성이 나타낸 *P. serrulata* var. *spontanea* 를 선택하여 그 획분 중 가장 활성이 뛰어난 EtOAc 획분에서 항산화 활성성분을 분리하고자 silica gel, sephadex LH-20, Sep-Pak cartridges와 RP-18 column chromatography를 수행하였다. 천연물로부터 항산화성분을 분리, 동정하기 위해서 사용되는 항산화활성 검색법은 다양하게 제시되고 있는데, 이는 활성을 갖는 성분들의 기전이 다양하기 때문이다 (Arnao *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998). 이에 본 실험실에서는 간편하면서도 많이 사용되고 있는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 [total reactive oxygen species (ROS)] 그리고 peroxynitrite (ONOO⁻) 소거활성을 지표로 항산화활성을 평가하였다. *P. serrulata* var. *spontanea* 의 EtOAc 획분에서 각각 6종의 flavonol 화합물과 isoflavone 화합물 그리고 1종의 flavanone 화합물을 분리하였다. 또한 6종의 triterpenoid 화합물

을 분리하여, 구조를 동정하였고 각각 1종의 spingolipid 화합물과 phenol성 화합물을 분리하여 그 구조를 동정하였다. 그 중 1종의 triterpenoid 화합물과 phenol성 화합물, 그리고 spingolipid 화합물은 신규 물질로서 분리되었다. 분리된 flavonoid 화합물과 triterpenoid 화합물, phenol성 화합물의 항산화활성은 추출물과 획분에서와 동일한 3가지 항산화활성 검색법으로 조사하였다.

벗나무의 강한 항산화활성을 보이는 EtOAc 분획에서 13종의 flavonoid 화합물을 분리하여 그 항산화활성을 검색하던 중, flavonoid 기본 골격 뿐만 아니라, 치환기의 위치와 수에 따라 활성이 다양하게 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 본 실험실에서는 수종의 flavonoids, 즉 flavonol, flavone, flavan, 그리고 flavanone 화합물을 대상으로 flavonoid 화합물의 구조와 ONOO⁻ 억제 활성과의 상관관계를 살펴보았다. Flavonoid 화합물에 대한 ONOO⁻ 활성은 electron donation 혹은 nitration 기전에 의한 것으로 알려져 있는데 본 실험실에서는 다양한 종류의 flavonoid 화합물로서 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

II. 실험 방법

1. 재료

Prunus serrulata var. *spontanea* 와 *P. yedoensis* 는 1999년 4월 부산 금정산에서 직접 채집하였으며, 김명기 박사 (Korea Environmental and Ecological Technology Service)의 감정 하에 시료로 채택하였다. 이외 활성실험에 사용된 *P. buergeriana*, *P. padus*, *P. pendula* for. *ascendens*의 MeOH 추출물은 한국 생명공학원의 자생식물연구소 (Plant Diversity Research Center) 산하에 있는 한국식물추출물 은행에서 구입하여 사용하였고, *P. davidiana* 줄기는 부산 평화시장에서 구입하여 부산대학교 박종희 교수로부터 감정하여 사용하였으며, *P. sargentii* 의 재료는 2002년 5월 경남 고성에서 직접 채집하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Column packing materials은 Kieselgel 60 (Si gel, 70–230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734)과 Sephadex LH-20 (bead size 25–100 μ m, Sigma), Sep-Pak cartridges (C18, Waters Co., USA) 그리고 RP 18 (LiChroprep[®] RP-18, 40–63 μ m, Merck)을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (0.25 mm, precoated, Merck, Art. 5715)과 RP 18 F_{254s} (Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 각각 50 % H₂SO₄, Mg-HCl 및 FeCl₃ 용액(phenol성 혹은 flavonoid 화합물)과 Liebermann-Burchard 반응시액 (triterpenoid 화합물)을 사용하였다. 그리고 추출 및 column chromatography에는 1급 시약을 사용하였다.

NMR 측정시 사용한 용매는 CD₃OD (Merck, deuterium degree 99.95 %),

DMSO- d_6 (Merck, deuterium degree 99.95 %), $CDCl_3$ (Merck, deuterium degree 99.95 %) 그리고 pyridine- d_5 (Aldrich Chemicals, 99 atom % D)이다.

DPPH, L-ascorbic acid, DL-penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid)는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 DHR 123 (dihydrorhodamine 123)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였으며, $ONOO^-$ 는 Cayman Chemicals Company (Ann Arbor, MI, USA)으로부터 구입하여 항산화활성 실험을 시행하였다.

2-2. 기기

IR spectrum은 Perkin-Elmer 2000 spectrophotometer를 사용하여 KBr disc법으로 측정하였다. UV spectrophotometer는 Shimadzu 202 UV spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. TLC plate에 의한 화합물 검색시 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, USA)로 장파장 (365 nm), 단파장 (254 nm)에서 각각 관찰하였다. 또한 EIMS는 JEOL JMS-700 spectrometer로, LR-, HR-FABMS는 JEOL JMSH $\times$ 110/110 A spectrometer를 사용하였다. NMR spectrum은 JEOL JNM-ECP 400 (1H -NMR 400 MHz; ^{13}C -NMR 100 MHz) 그리고 Bruker AM 300 (1H -NMR 300 MHz; ^{13}C -NMR 75.5 MHz)을 사용하여 측정하였으며, 2D-NMR인 HMQC, HMBC, COSY, NOESY는 pulsed field gradient를 사용하여 측정하였다.

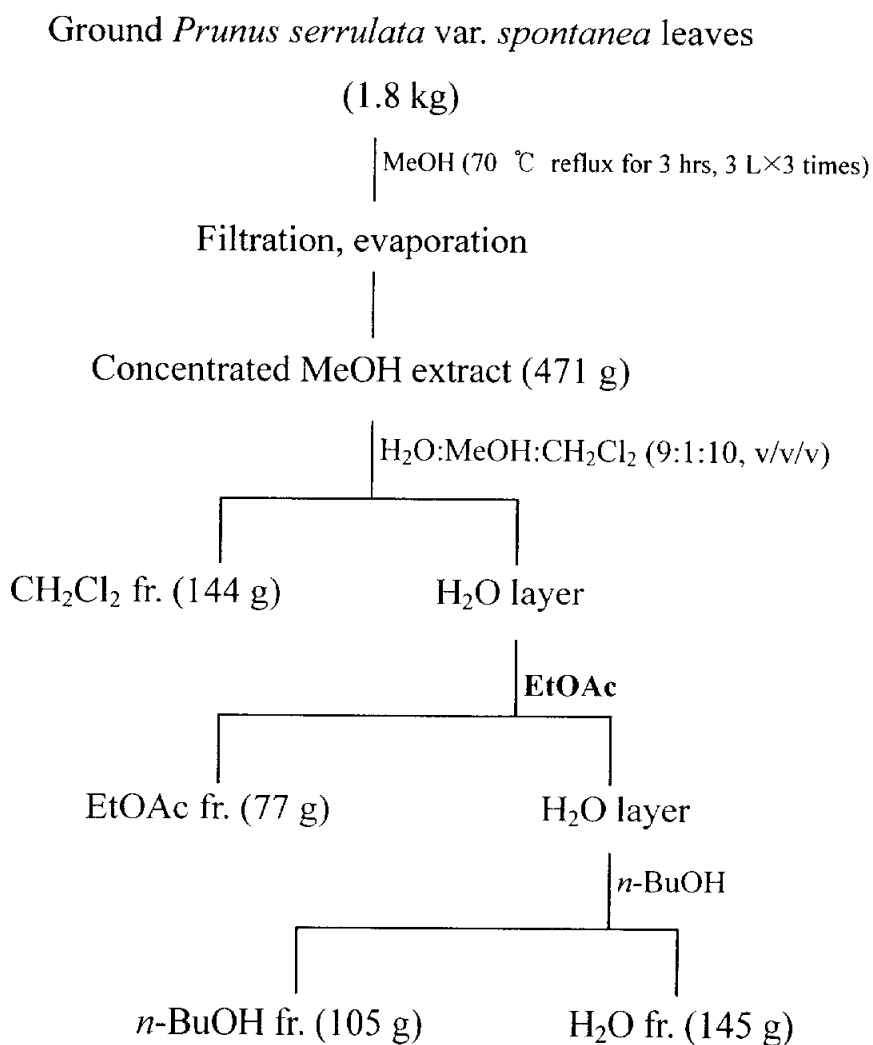
DPPH radical 흡광도는 microplate reader spectrophotometer VERSAmax (Molecular Devices, CA, USA)로 측정하였고, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)와 oxidized DHR 123의 형광 강도 (fluorescence intensity)는 microplate fluorescence reader FL 500 (Bio-Tek Instruments Inc.)로 측정하였다.

3. 방법

3-1. 추출 및 분획

벚나무 (*P. serrulata* var. *spontanea*) 잎의 MeOH 추출 및 각 용매별 분획 과정은 Scheme 1에서 나타내었다. 건조한 벚나무 잎 (1.8 kg)을 마쇄하여 환류 냉각기를 부착한 삼각 플라스크 (5 L)에 담은 후 3 L의 MeOH을 넣은 후 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 Whatman NO. 2로 여과하였으며 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 471 g MeOH 농축액을 얻었다. 그 중 MeOH 추출 농축액 약 5g은 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다. 나머지 465g은 H₂O:MeOH (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 다음 분액 깔대기에 부어, 동량의 CH₂Cl₂를 넣어 세게 흔든 다음 24 시간 동안 평형화시켰다. 이후 아래층의 CH₂Cl₂ 가용부를 모아 무수 망초 (sodium sulfate, anhydrous)로 처리한 다음 농축하였다. 이와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 CH₂Cl₂ 획분 144 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 H₂O 분획층에 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 획분 77 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분 105 g과 하층의 H₂O 획분 145 g을 얻었다. 모든 획분 약 0.1 g은 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다.

벚나무의 꽃과 줄기, 산복사 그리고 왕벚나무의 각 용매별 분획은 이와 동일하게 실행하였다.



Scheme 1. Extraction and fractionation of the leaves of *P. serrulata* var. *spontanea*.

3-2. 성분의 분리

벗나무 (*P. serrulata* var. *spontanea*)의 MeOH 추출물과 그 획분들, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 획분과 H₂O 층에 대하여 DPPH radical 소거 활성법, 세포내 활성산소종 생성 억제 활성법, 그리고 ONOO⁻ 소거 활성법을 사용한 항산화 활성 실험계에서, EtOAc 획분의 활성이 가장 높게 나타났다. 이에 EtOAc 획분을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, Sep-Pak C18 cartridge, 그리고 RP 18 column chromatography를 수행하여 항산화활성 성분을 분리하였다. 각 subfractions 및 분리·정제된 화합물에 대하여 CH₂Cl₂:MeOH (10:1, 7:1, 5:1, 3:1), EtOAc:MeOH (20:1, 10:1, 5:1), 그리고 EtOAc:MeOH:H₂O (21:4:3 또는 24:2:1) 전개용매로서 TLC 하여 50 % H₂SO₄ (TLC sprayer, Merck)로 발색시켜 200 °C 의 hot plate에서 탄화시켰다. 그리고 254 nm와 365 nm 의 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, USA)를 사용하여 형광을 띠는 물질을 검출하였다. 또한 Liebermann-burchard법을 사용하여 triterpenoid 화합물을 검출하였다.

3-2-1. Methylation 방법

시료 30 mg을 소량의 MeOH에 완전히 용해시킨 후, diazomethane (CH_2N_2 in ether)으로 처리하여, 그 반응 생성물을 MeOH로 재결정하거나 적절한 column chromatography하여 정제하였다 (Woo *et al.*, 1984).

3-2-2. Acid hydrolysis 방법

10 mg의 시료를 5 % H_2SO_4 (15 mL, MeOH)에서 3시간동안 환류냉각시킨 후, 반응액을 농축시켜 MeOH를 증발시켰다. 이후 EtOAc로 분액하여 그 획분을 농축하고 MeOH로 재결정하거나 적절한 column chromatography하여 정제하였다 (Park *et al.*, 1991).

3-2-3. Acetylation과 deacetylation 방법

1g 화합물을 기준으로 acetic anhydride (10 mL) 그리고 용제로 pyridine (5 mL)을 사용하여 실온에서 완전히 녹인 후 1일 방치한다. 얼음물을 첨가하여 반응을 중지한 후 생긴 화합물을 여과지에 거르고 계속 H_2O 로 세척하여 적절한 column chromatography로 분리, 정제하였다 (Ahmad *et al.*, 1986).

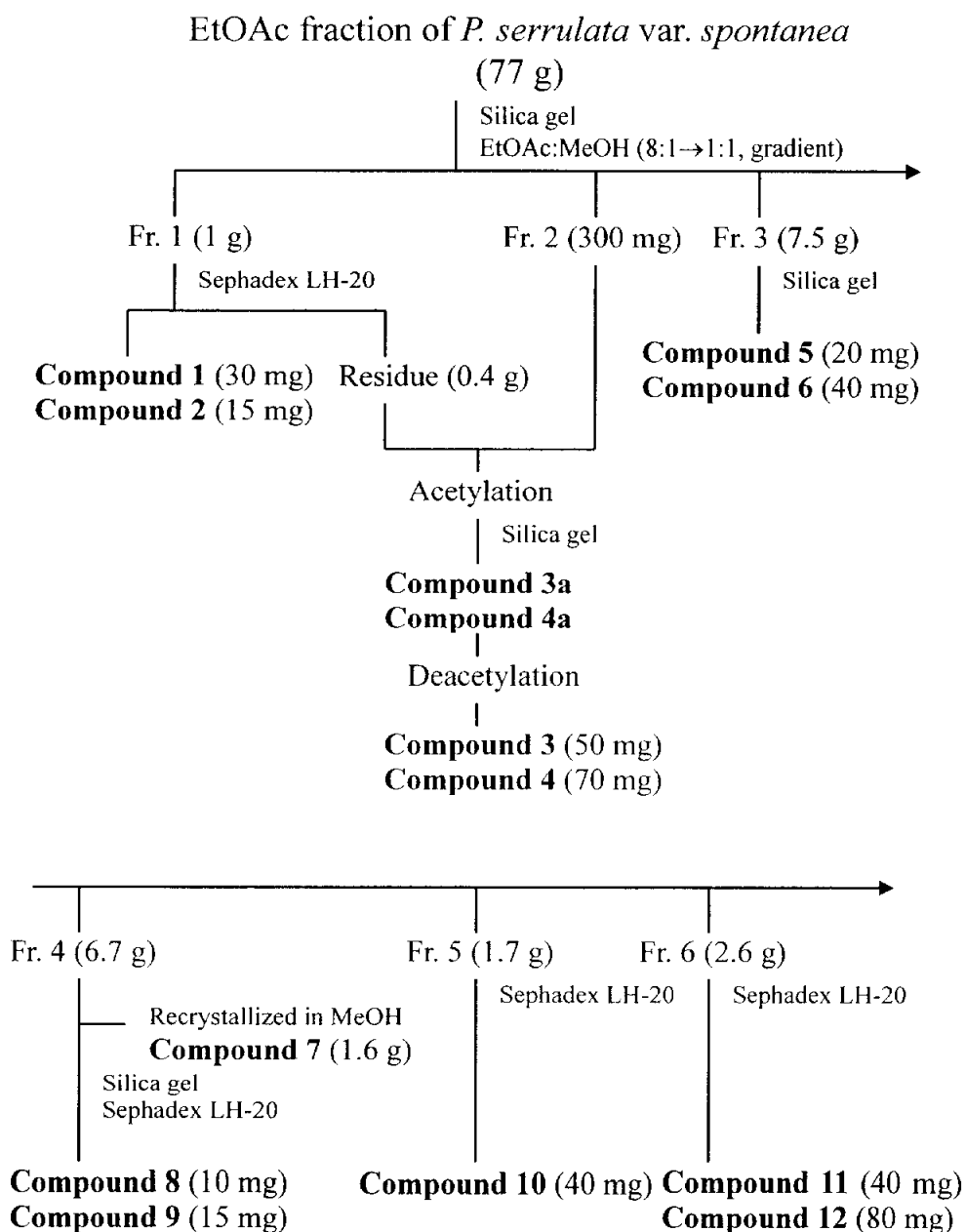
3-2-4. Liebermann-Burchard 검색법

Steroid 화합물, terpenoid 화합물 그리고 triterpenoid 화합물 (saponins)를 검색하는 발색시약으로, 유리접시에 무수초산 한 방울을 떨어뜨리고, 시료 0.5 mg을 용해한 후, 주변에 농축 H_2SO_4 한 방울을 떨어뜨린 후, 초자봉으로 살짝 접촉시킬 때 양 액의 경계부위가 적색-청색-녹색으로 정색되는가 관찰한다 (우, 1996).

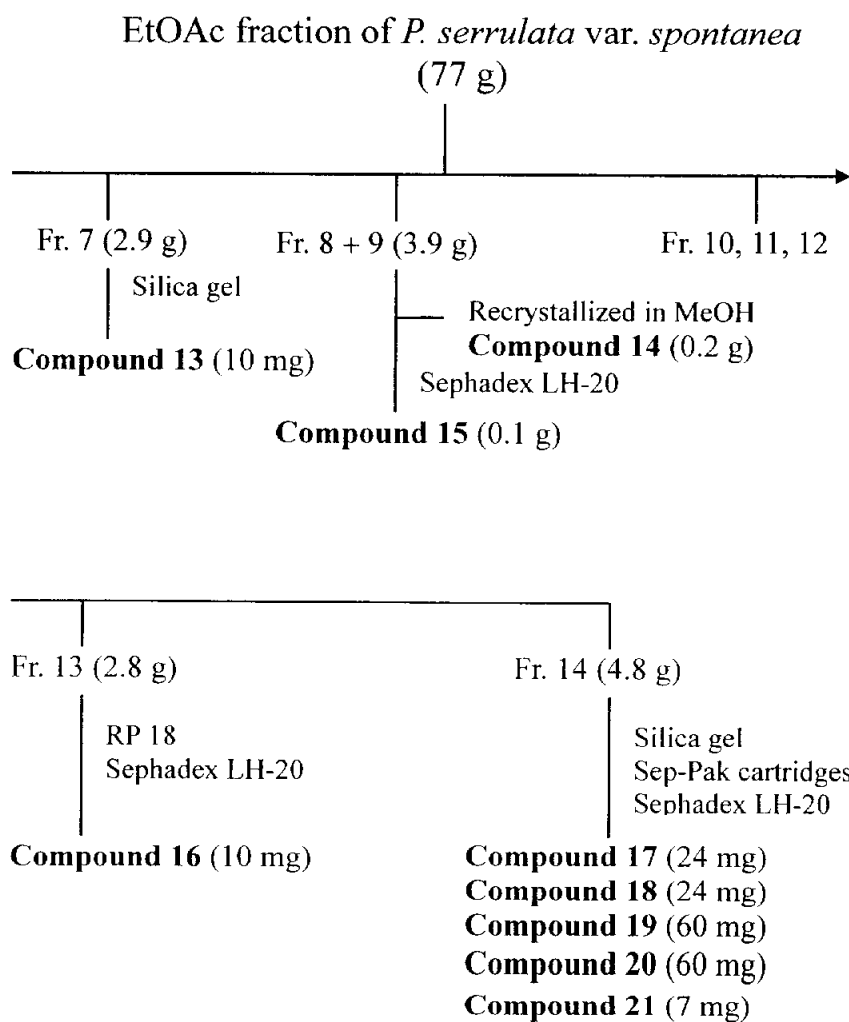
3-3. 뽕나무 EtOAc 획분의 성분 분리

뽕나무 잎의 MeOH 추출물로부터 얻은 EtOAc 획분을 대상으로 성분 분리한 과정을 Scheme 2과 3에서 나타내었다. 뽕나무 EtOAc 획분 약 77 g을 전개용매 EtOAc:MeOH (8:1→1:1, gradient)로서 silica gel column chromatography하여 14개의 subfractions (fr. 1-14)을 얻었다. Fr. 1 (1g)을 전개용매 CH₂Cl₂:MeOH (2:1→MeOH)로 Sephadex LH-20 column chromatography하여 compound 1 (prunetin, 30 mg)과 2 (genistein, 15 mg)를 얻었다. Fr. 1의 여액 (430 mg)과 fr. 2 (300 mg)를 합쳐서 acetic anhydride-pyridine 반응액으로 acetylation시킨 후, petroleum benzin:ether (5:1→1:1, EtOAc, gradient)로서 silica gel column chromatography하여 ursolic acid acetate (3a)와 2 α -hydroxy ursolic acid diacetate (4a)를 분리하였으며 각 화합물을 deacetylation시켜 compound 3 (ursolic acid, 50 mg)과 4 (2 α -hydroxy ursolic acid, 70 mg)을 얻었다. Fr. 3 (7.53 g)을 *n*-hexane:EtOAc (1:1→EtOAc, MeOH)로서 silica gel column chromatography하여 compound 5 (quercetin, 20 mg)과 6 (2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 40 mg)을 분리하였다. Fr. 4 (6.72 g)는 MeOH 재결정법에 의해 compound 7 (prunetin 4'-O- β -D-glucopyranoside, 1.58 g)을 분리하였으며, 그 모액 (5.14 g)은 용매 EtOAc:MeOH (10:1→MeOH, gradient)로서 silica gel column chromatography한 후 Sephadex LH-20 (MeOH)로 정제하여 compound 8 (sphingolipid, 10 mg)과 9 (kaempferol 3-O- α -L-arabinofuranoside, 15 mg)를 얻을 수 있었다. Fr. 5 (1.66 g)는 MeOH로서 Sephadex LH-20 column chromatography하여 compound 10 (1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 40mg)을 분리하였다. 동일한 분리 방법으로 fr. 6 (2.59 g)에서 compound 11 (prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside, 40 mg)과 12 (kaempferol 3-O- β -D-xylopyranoside, 80 mg)을 얻었다. Fr. 7은 전개용매 EtOAc:MeOH (20:1→MeOH, gradient)로 silica gel column chromatography를 수행하여 compound 13 (naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside, 10 mg)를 분리하였

다. Fr. 8과 9 (3.88 g)는 합쳐서 MeOH로 재결정하여 compound **14** (genistin, 200 mg)를 얻었으며, 나머지 모액 (3.5 g)은 Sephadex LH-20 (MeOH)로 column chromatography하여 compound **15** (kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside, 100 mg)을 분리하였다. Fr. 13 (2.82 g)은 RP-18 column으로 H₂O-MeOH (0 %→100 %, gradient)을 전개용매로 분획하였으며 그 중 20% MeOH 획분을 다시 Sephadex LH-20으로 정제하여 compound **16** (orobol 7-*O*- β -D-glucopyranoside, 10 mg)을 얻었다. Fr. 14 (4.76 g)는 전개용매 EtOAc:MeOH (10:1→MeOH, gradient)을 사용한 silica gel column, H₂O-MeOH (0 %→100 %, gradient)을 사용한 Sep-Pak C18 cartridge, 그리고 Sephadex LH-20으로 정제하여 각각 compound **17** (2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic- β -D-glucopyranoside, 24 mg)과 **18** (2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic- β -D-glucopyranoside, 24 mg), **19** (2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl *o*-(*Z*)-coumaric acid, 60 mg), **20** (quercetrin 3-*O*- β -D-glucopyranoside, 60 mg), 그리고 **21** (kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1→2)- β -D-glucopyranoside, 7 mg)을 얻었다.



Scheme 2. Isolation of compounds **1–12** from the EtOAc fraction of *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.



Scheme 3. Isolation of compounds **13–21** from the EtOAc fraction of *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.

3-4. 벚나무 EtOAc 획분에서 분리된 성분의 분광학적 성질

화학적 이동 (chemical shift)은 용매 peak를 기준으로, 혹은 내부 표준물질로 tetramethylsilane (TMS)을 사용하여 ppm 단위로 나타내었다. 즉, CD₃OD는 δ_H 3.30과 δ_C 49.0 ppm에서의 peak, DMSO-*d*₆는 δ_H 2.50과 δ_C 39.5 ppm에서의 peak, pyridine-*d*₅는 δ_H 7.19, 7.56, 8.70과 δ_C 123.5, 135.5, 149.5 ppm에서의 peak를 기준으로 나타내었고, CDCl₃는 내부표준물질 (TMS)을 기준으로 나타내었다. ¹H-NMR와 ¹³C-NMR의 다중도 (multiplicities)는 각각 s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), ddd (double double doublet), brd (broad doublet), dt (double triplet) 그리고 m (multiplet)으로 표시하였다.

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

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

(C-3', 5'), 104.34 (C-10), 99.00 (C-6), 93.67 (C-8) [Wang *et al.*, 1999b].

Compound 3 (ursolic acid). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5): δ 5.48 (1H, brs, H-12), 3.45 (1H, dd, $J = 6.0, 4.1$ Hz, H-3 α), 2.62 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-18), 1.23 (3H, s, H-23), 1.21 (3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.93 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-29), 0.87 (3H, s, H-25); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5): δ 179.80 (C-28), 139.20 (C-13), 125.55 (C-12), 78.06 (C-3), 55.77 (C-5), 53.49 (C-18), 47.99 (C-9, 17), 42.45 (C-14), 39.91 (C-8), 39.43 (C-19), 39.34 (C-4), 39.32 (C-1), 39.02 (C-20), 37.38 (C-10), 37.22 (C-22), 33.52 (C-7), 31.01 (C-21), 28.74 (C-23), 28.63 (C-15), 28.07 (C-2), 24.85 (C-16), 23.85 (C-27), 23.57 (C-11), 21.34 (C-30), 18.73 (C-6), 17.45 (C-29), 17.40 (C-26), 16.51 (C-25), 15.61 (C-24) [Takeoka *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 1999].

Compound 4 (2 α -hydroxy ursolic acid). EIMS m/z 472 [$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$] $^+$, 248, 203, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5): δ 5.46 (1H, brs, H-12), 4.11 (1H, ddd, $J = 4.2, 9.5$ Hz, H-2 β), 3.37 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3 α), 2.61 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 1.26 (3H, s, H-23), 1.21 (3H, s, H-27), 1.06 (3H, s, H-26), 1.03 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.98 (3H, s, H-25), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-29); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5): δ 179.77 (C-28), 139.21 (C-13), 125.49 (C-12), 83.73 (C-3), 68.53 (C-2), 55.87 (C-8), 53.47 (C-18), 48.04 (C-9), 47.97 (C-17), 47.89 (C-1), 42.49 (C-14), 39.99 (C-18), 39.77 (C-4), 39.44 (C-19), 39.36 (C-20), 38.39 (C-10), 37.37 (C-22), 33.47 (C-7), 31.04 (C-21), 29.31 (C-23), 28.59 (C-15), 24.84 (C-16), 23.88 (C-27), 23.69 (C-11), 21.38 (C-29), 18.79 (C-6), 17.63 (C-24), 17.47 (C-25), 17.41 (C-26), 16.97 (C-30) [Jung *et al.*, 1999].

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

Compound 6 (2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid). Amorphous white powder; EIMS m/z 487 [$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{-H}$] $^+$, 248, 203; LR-FABMS m/z 511.2 [$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{+Na}$] $^+$; HR-FABMS m/z 511.3399 [$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{+Na}$] $^+$ (Calc. for 511.6979); IR

(KBr) $\nu_{\max}$ 3422, 1691, 1458 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5): 5.44 (s, H-12), 4.56 (d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 4.41 (dt, $J = 3.9, 10.0$ Hz, H-2), 4.08 (d, $J = 10.9$ Hz, H-24b), 3.79 (d, $J = 10.9$ Hz, H-24a), 2.59 (d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 1.92 (d, $J = 11.6$ Hz, H-1b), 1.80 (d, $J = 11.7$ Hz, H-1a), 1.66 (s, H-23), 1.11 (s, H-27), 1.01 (s, H-26), 0.98 (s, H-25), 0.94 (d, $J = 6.4$ Hz, H-30), 0.91 (d, $J = 6.4$ Hz, H-29); $^{13}\text{C-NMR}$ data (100 MHz, pyridine- d_5): 179.9 (C-28), 139.19 (C-13), 125.50 (C-12), 74.17 (C-3), 66.19 (C-2), 65.16 (C-24), 53.49 (C-18), 49.42 (C-5), 48.08 (C-9), 47.99 (C-17), 45.13 (C-4), 43.16 (C-1), 42.46 (C-14), 40.16 (C-8), 39.42 (C-19), 39.38 (C-20), 38.50 (C-10), 38.50 (C-10), 37.41 (C-22), 33.95 (C-7), 31.05 (C-21), 28.59 (C-15), 24.86 (C-16), 23.79 (C-23, 27), 23.78 (C-11), 21.35 (C-29), 18.84 (C-6), 17.44 (C-30), 17.34 (C-26), 17.16 (C-25) [Chusheng *et al.*, 1988].

Compound 6a (methylation of compound 6 with diazomethane, methyl 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid), See 3-2-1. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 5.24 (t, $J = 3.3$ Hz, H-12), 3.99 (m, $W_{1/2} = 22.4$ Hz, H-2), 3.86 (brd, H-3), 3.70 (d, $J = 11.2$ Hz, H-24a), 3.45 (d, $J = 11.2$ Hz, H-24b), 2.22 (d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 1.13 (s, H-23), 1.08 (s, H-27), 0.93 (d, $J = 6.3$ Hz, H-30), 0.91 (s, H-25), 0.85 (d, $J = 6.3$ Hz, H-29), 0.70 (s, H-26); $^{13}\text{C-NMR}$ data (100 MHz, CDCl_3): 178.06 (C-28), 138.22 (C-13), 125.22 (C-12), 73.30 (C-3), 66.29 (C-2), 65.49 (C-24), 52.82 (C-18), 51.44 (OMe), 48.67 (C-5), 48.05 (C-17), 47.40 (C-9), 43.98 (C-4), 42.04 (C-14), 41.63 (C-1), 39.62 (C-8), 39.03 (C-19), 38.85 (C-20), 38.03 (C-10), 33.61 (C-22), 33.10 (C-7), 30.62 (C-21), 27.96 (C-15), 24.18 (C-16), 23.72 (C-27), 23.44 (C-11), 22.23 (C-23), 21.15 (C-29), 18.19 (C-6), 17.02 (C-30), 16.86 (C-25), 16.78 (C-26) [Sakakibara and Kaiya, 1983; Kojima *et al.*, 1987; 1989].

Compound 7 (prunetin 4'- O - β -D-glucopyranoside, prunitrin). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.91 (1H, brs, 5-OH), 8.42 (1H, s, H-2), 7.51 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 7.11 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 6.67 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.42 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-6), 4.91 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 3.87 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 180.56 (C-4), 165.63 (C-7), 161.71 (C-5), 157.91 (C-9), 157.62

(C-4'), 155.02 (C-2), 130.46 (C-2', 6'), 124.44 (C-1'), 122.60 (C-3), 116.47 (C-3', 5'), 105.72 (C-10), 100.57 (C-1''), 98.44 (C-6), 92.89 (C-8), 77.19 (C-5''), 76.63 (C-3''), 73.42 (C-2''), 69.95 (C-4''), 60.93 (C-6''), 56.46 (OMe) [Geibel, 1995; Geibel and Feucht, 1991; Geibel *et al.*, 1990].

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

Compound 9 (kaempferol 3-*O*-α-L-arabinofuranoside, juglanin). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.63 (1H, brs, 5-OH), 10.88 (1H, brs, OH), 10.20 (1H, brs, OH), 8.02 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.63 (1H, brs, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.62 (C-4), 164.16 (C-7), 161.16 (C-5), 159.91 (C-4'), 156.74 (C-9), 156.32 (C-2), 133.37 (C-3), 130.75 (C-2', 6'), 120.67 (C-1'), 115.37 (C-3', 5'), 103.97 (C-10), 108.02 (C-1''), 98.63 (C-6), 93.64 (C-8), 86.30 (C-4''), 82.09 (C-2''), 77.06 (C-3''), 60.82 (C-5'') [De Almeida *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1994].

Compound 10 (1β, 2α, 3α, 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid).

Amorphous white powder; EIMS m/z 504 [$C_{30}H_{48}O_6$] $^+$, 248, 203; LR-FABMS m/z 527.1 [$C_{30}H_{48}O_6+Na$] $^+$; HR-FABMS m/z 527.3349 [$C_{30}H_{48}O_6+Na$] $^+$ (Calc. for 527.6996); 1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5): 5.56 (s, H-12), 4.67 (d, $J = 2.8$ Hz, H-3), 4.29 (dd, $J = 2.2, 9.4$ Hz, H-2), 4.19 (d, $J = 9.0$ Hz, H-1), 4.17 (d, $J = 10.9$ Hz, H-24b), 3.80 (d, $J = 11.0$ Hz, H-24a), 2.59 (d, $J = 11.2$ Hz, H-18), 1.65 (s, H-23), 1.28 (s, H-25), 1.17 (s, H-27), 1.12 (s, H-26), 0.95 (d, $J = 6.0$ Hz, H-30), 0.90 (d, $J = 6.4$ Hz, H-29); ^{13}C -NMR data (100 MHz, pyridine- d_5): 179.88 (C-28), 138.19 (C-13), 126.96 (C-12), 81.04 (C-1), 74.54 (C-3), 71.52 (C-2), 65.15 (C-24), 53.41 (C-18), 49.27 (C-5), 49.14 (C-9), 48.04 (C-17), 44.77 (C-4), 43.70 (C-10), 42.42 (C-14), 40.78 (C-8), 39.40 (C-19), 39.36 (C-20), 37.41 (C-7, 22), 31.06 (C-21), 28.66 (C-15), 27.68 (C-11), 24.91 (C-16), 23.83 (C-23), 23.81 (C-27), 21.34 (C-29), 18.94 (C-6), 17.79 (C-26), 17.44 (C-30), 13.54 (C-25) [Sakakibara *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1998; Guang-Yi *et al.*, 1989].

Compound 11 (prunetin 5- O - β -D-glucopyranoside, prunetinoside). 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.55 (1H, brs, 4'-OH), 8.26 (1H, s, H-2), 7.32 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.80 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8), 6.89 (1H, $J = 2.5$ Hz, H-6), 4.82 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 3.88 (3H, s, OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.02 (C-4), 163.50 (C-7), 158.73 (C-5), 158.62 (C-9), 157.20 (C-4'), 151.79 (C-2), 130.32 (C-2', 6'), 124.84 (C-1'), 122.22 (C-3), 114.89 (C-3', 5'), 109.73 (C-10), 103.53 (C-1''), 102.60 (C-6), 93.84 (C-8), 77.60 (C-5''), 75.83 (C-3''), 73.53 (C-2''), 69.91 (C-4''), 60.91 (C-6''), 56.05 (OMe) [Khalid *et al.*, 1989].

Compound 11a (acid hydrolysis of compound 11 with 5 % H₂SO₄ in MeOH, prunetin). See 3-2-2. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.96 (1H, brs, 5-OH), 9.60 (1H, brs, 4'-OH), 8.41 (1H, s, H-2), 7.39 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.66 (1H, s, H-8), 6.41 (1H, s, H-6), 3.87 (3H, s, OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.40 (C-4), 165.22 (C-7), 161.74 (C-5), 157.51 (C-4'), 157.45 (C-9), 154.38 (C-2), 130.13 (C-2', 6'), 122.51 (C-3), 121.03 (C-1'),

115.07 (C-3', 5'), 105.41 (C-10), 98.03 (C-6), 92.41 (C-8), 56.09 (OMe).

Compound 12 (kaempferol 3-O- β -D-xylopyranoside). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.58 (1H, brs, 5-OH), 10.89 (1H, brs, OH), 10.24 (1H, brs, OH), 8.02 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.33 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.39 (C-4), 164.27 (C-7), 161.20 (C-5), 160.11 (C-4'), 156.34 (C-9), 156.17 (C-2), 133.11 (C-3), 130.81 (C-2', 6'), 120.70 (C-1'), 115.26 (C-3', 5'), 103.91 (C-10), 101.71 (C-1''), 98.76 (C-6), 93.70 (C-8), 75.82 (C-4''), 73.69 (C-2''), 69.41 (C-3''), 65.94 (C-5'') [Agrawal, 1992].

Compound 13 (naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside, prunin). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.31 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.80 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.18 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.20 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-8), 5.36 (1H, dt, $J = 1.9, 2.8$ Hz, H-2), 4.96 (1H, dd, $J = 4.4, 8.0$ Hz, H-1''), 3.89 (1H, dd, $J = 1.7, 10.6$ Hz, H-6a''), 3.86 (1H, dd, $J = 3.2, 12.0$ Hz, H-6b''), 3.40-3.50 (4H, m, aliphatic proton), 3.16 (1H, dd, $J = 13.0, 17.8$ Hz, H-3b), 2.74 (1H dd, $J = 3.0, 17.0$ Hz, H-3a); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD₃OD) δ : 199.35 (C-4), 167.83 (C-7), 165.76 (C-5), 165.41 (C-4'), 159.92 (C-9), 131.65 (C-1'), 129.93 (C-2', 6'), 117.14 (C-3', 5'), 105.74 (C-10), 102.06 (C-1''), 98.80 (C-6), 97.72 (C-8), 81.51 (C-2), 79.06 (C-5''), 78.61 (C-2''), 75.45 (C-3''), 71.95 (C-4''), 63.14 (C-6''), 44.96 (C-3) [Choi *et al*, 1991b].

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

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

Compound 16 (orobol 7-O- β -D-glucopyranoside, oroboside). ^1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.21 (1H, s, H-2), 7.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.86 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$ Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.69 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.51 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 4.95 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.91 (1H, dd, $J = 2.4, 12.0$ Hz, H-6a''), 3.71 (1H, dd, $J = 5.7, 12.0$ Hz, H-6b''), 3.47–3.53 (3H, aliphatic proton); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 183.31 (C-4), 165.57 (C-7), 164.37 (C-5), 160.03 (C-9), 156.13 (C-2), 147.73 (C-2'), 147.08 (C-6'), 125.96 (C-3), 124.39 (C-1'), 122.49 (C-4'), 118.22 (C-3'), 117.16 (C-5'), 108.83 (C-10), 102.44 (C-1''), 101.90 (C-6), 96.66 (C-8), 79.19 (C-5''), 78.65 (C-3''), 75.51 (C-2''), 72.02 (C-4''), 63.22 (C-6'') [Agrawal, 1989; Arora *et al.*, 2000].

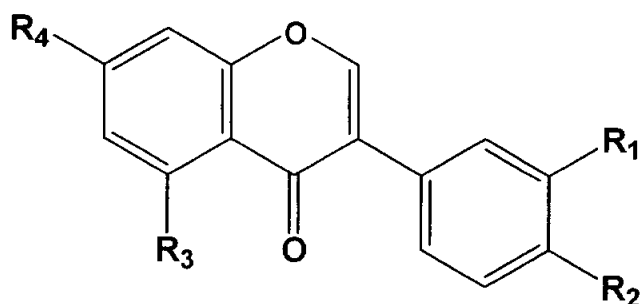
Compound 17 (2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside). Amorphous white powder; EIMS m/z 488 [$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{10}$ -H+glycoside] $^+$, 248, 203; LR-FABMS m/z 673.4 [$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{10}$ +Na] $^+$; IR (KBr) ν_{max} 3423, 1735, 1459, 1074,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

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

Compound 19 (2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl *o*-(*Z*)-coumaric acid). Amorphous white powder; UV_{max} (MeOH): 223, 264 nm; HR-FABMS *m/z* 453.1162 [C₂₂H₂₂O₉ + Na]⁺; ¹H-NMR and ¹³C-NMR data (400 MHz and 100 MHz, CD₃OD) see Table 2.

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

Compound 21 (kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside, kaempferol 3-sambubioside). ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.09 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.18 (1H, brs, H-6), 5.35 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 4.72 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1'''), 3.98 (1H, m, H-2''), 3.95 (1H, dd, *J* = 5.0, 12.0 Hz, H-5b'''), 3.81 (1H, m, H-4''), 3.68 (1H, m, H-3''), 3.60 (1H, dd, *J* = 5.6, 12.0 Hz, H-6b''), 3.53 (1H, dd, *J* = 6.3, 12.0 Hz, H-6a''), 3.51 (1H, m, H-4'''), 3.43 (1H, m, H-5'''), 3.38 (1H, m, H-2'''), 3.37 (1H, m, H-3'''), 3.22 (1H, dd, *J* = 1.6, 11.6 Hz, H-5a'''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 180.55 (C-4), 167.04 (C-7), 163.93 (C-5), 162.32 (C-4'), 159.26 (C-9), 159.00 (C-2), 135.80 (C-3), 133.18 (C-2', 6'), 123.54 (C-1'), 117.04 (C-3', 5'), 106.44 (C-10, 1'''), 102.01 (C-1''), 100.72 (C-6), 95.52 (C-8), 81.29 (C-2''), 78.02 (C-3'''), 77.84 (C-5''), 76.00 (C-3''), 75.84 (C-2'''), 71.86 (C-4'''), 71.03 (C-4''), 67.55 (C-5'''), 62.75 (C-6'') [Jung *et al.*, 1999; Beninger *et al.*, 1998].



Prunetin (1) : $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH, R_4 = OMe$

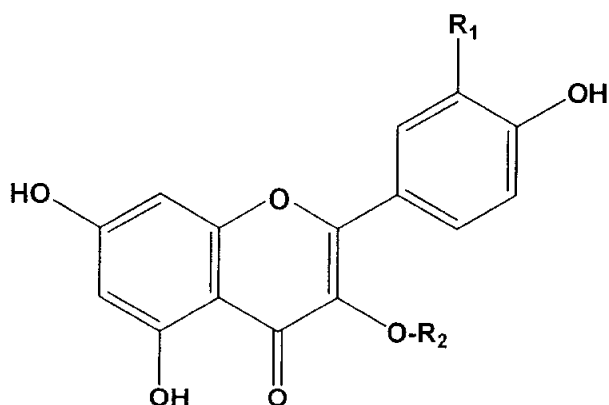
Genistein (2) : $R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OH$,

Prunetin 4'-O- β -D-glucopyranoside (7) : $R_1 = H, R_2 = O-Glu, R_3 = OH, R_4 = OMe$

Prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside (11) : $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = O-Glu, R_4 = OMe$

Genistin (14) : $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH, R_4 = O-Glu$

Orobol 7-O- β -D-glucopyranoside (16) : $R_1 = R_2 = R_3 = OH, R_4 = O-Glu$



Quercetin (5) : $R_1 = OH, R_2 = H$

Kaempferol 3-O- α -L-arabinofuranoside (9) : $R_1 = H, R_2 = Ara$

Kaempferol 3-O- β -D-xylopyranoside (12) : $R_1 = H, R_2 = Xyl$

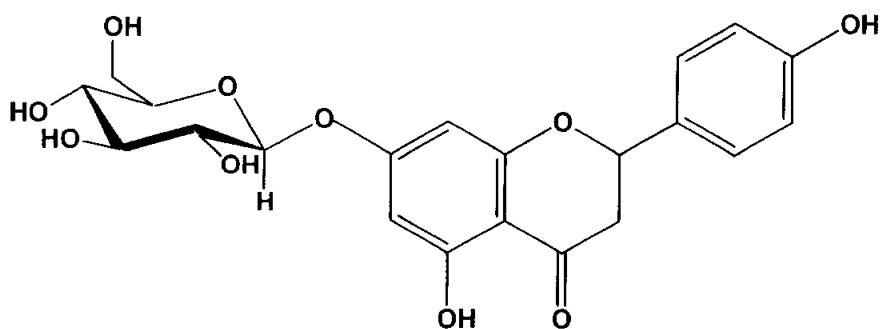
Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside (15) : $R_1 = H, R_2 = Glu$

Quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (20) : $R_1 = OH, R_2 = Glu$

Kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (21) :

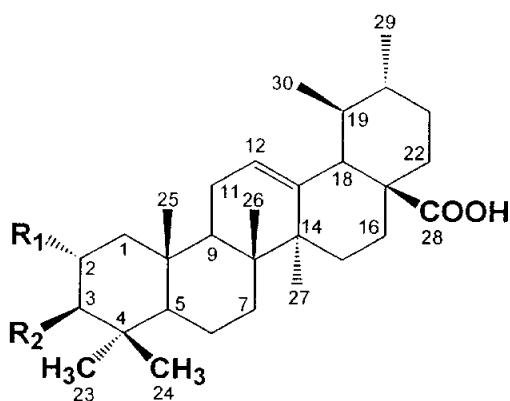
$R_1 = H, R_2 = Glu-(1\rightarrow2)-Xyl$

Fig. 1. Chemical structures of flavonols and isoflavones isolated from *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.



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

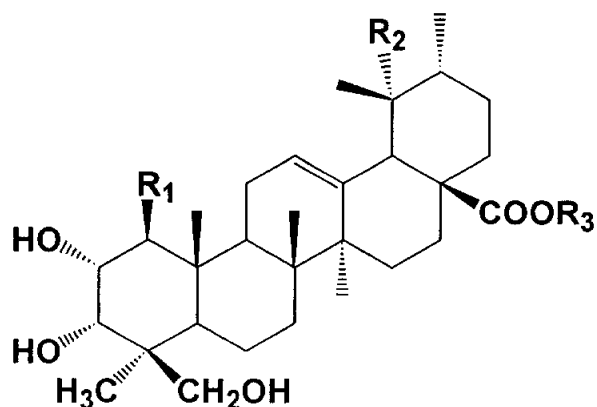
Fig. 2. Chemical structure of a flavanone isolated from *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.



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

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

Fig. 3. Chemical structures of 3 β -hydroxy triterpenoids isolated from *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.



2 α , 3 α , 24-Trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6): R₁=H, R₂=H, R₃=H

Methyl 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6a): R₁=H, R₂=H, R₃=Me

1 β , 2 α , 3 α , 24-Tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10): R₁=OH, R₂=H, R₃=H

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

R₁=H, R₂=H, R₃= β -D-glucopyranoside

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

R₁=H, R₂=OH, R₃= β -D-glucopyranoside

Fig. 4. Chemical structures of 2 α , 3 α , 24-trihydroxy triterpenoids isolated from *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.

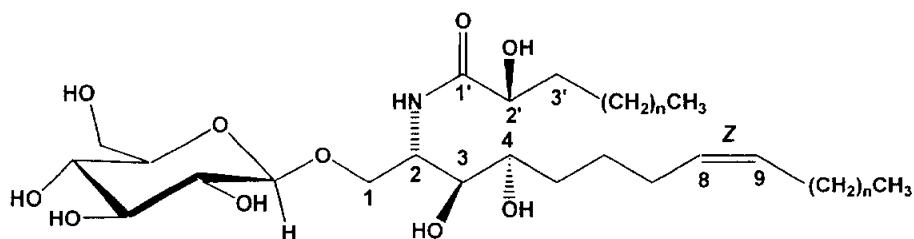
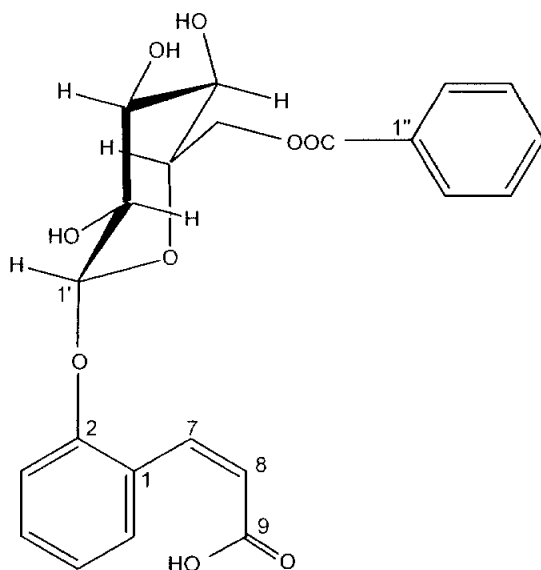


Fig. 5. Chemical structure of a sphingolipid isolated from *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.



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

Fig. 6. Chemical structure of a phenolic compound isolated from *P. serrulata* var. *spontanea* leaves.

4. 항산화 활성 실험

4-1. DPPH radical 소거 활성

DPPH radical 소거반응은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색법으로 특히 phenol과 aromatic amine 화합물의 항산화 활성의 측정에 많이 사용되는 방법이다 (Blois, 1958). 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 520nm에서 강한 흡수 band를 보이는 특성을 가지고 있다. 그러나 phenol과 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 band도 사라지고 안정한 분자가 된다. 즉, 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색은 점점 얼어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 보라색에서 노란색으로 변하는 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다 (Fig. 7) [Yokozawa *et al.*, 1998; Hatano *et al.*, 1989].

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

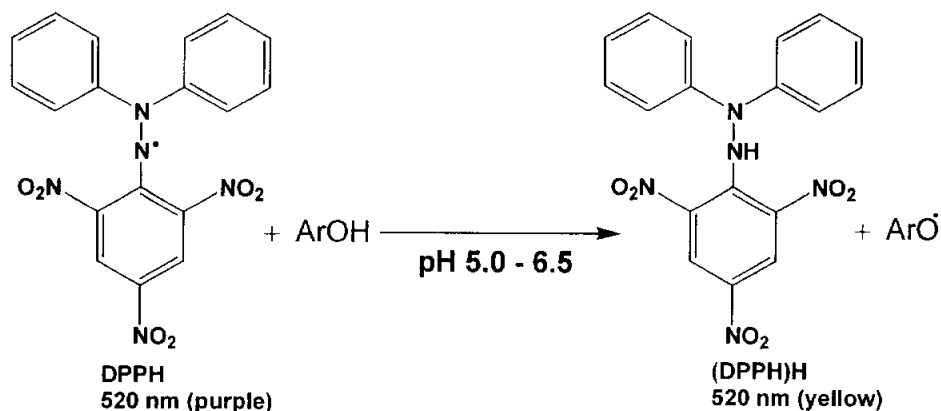
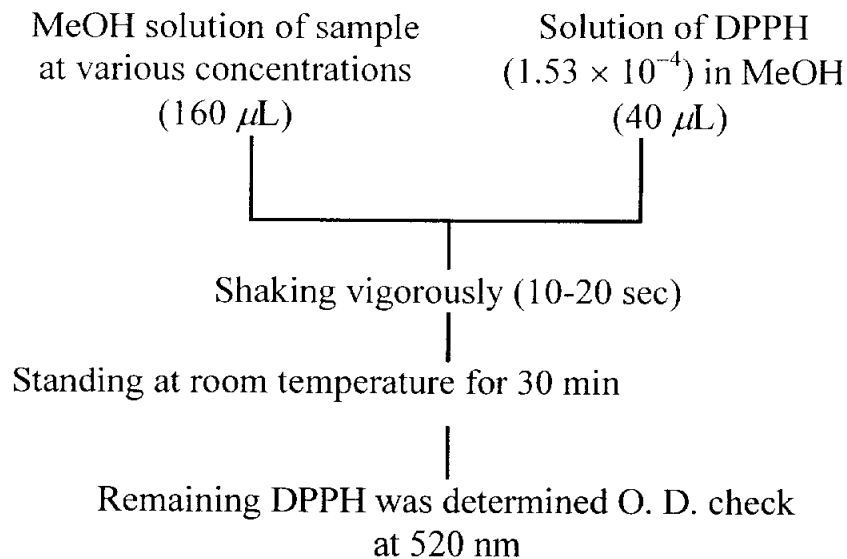


Fig. 7. Radical scavenging action of antioxidants [ArOH] (Son and Lewis, 2002).



Scheme 4. Measurement of DPPH radical scavenging activity.

4-2. 활성산소종 생성 억제 활성

생물학적 조직에서의 지방산화에 의한 손상 정도를 측정할 때, 세포배양계에서 비형광 probe인 DCFH-DA를 이용하여 생물 세포의 활성산소종을 직접적으로 정량 측정할 수 있는 방법을 사용하고 있다(Bass *et al.*, 1983; Hempel *et al.*, 1999; Wang and Joseph, 1999). 이 방법은 spin trapping시약을 산화시켜 ESR spectroscopy로 측정하는 방법 (Sawada and Carlson, 1987)에 비해 간단하나 민감하기 때문에 산화적 스트레스에 의해 발생하는 초기 세포내 산화반응을 신속하게 측정할 수 있다. DCFH-DA는 안정한 비 형광성 분자로 세포막에 쉽게 교차결합하며 세포내 존재하는 esterase에 의해 deacetylation되어 비형광, 환원형인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 전환된다. DCFH는 세포내 활성산소의 존재 시 급격히 산화되어 형광성, 산화형의 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)가 형성되므로 (Fig. 8), 이 형광성의 변화를 측정함으로써 세포내 활성산소종 (특히 $\cdot\text{O}_2^-$)의 초기 생성량을 정량화 할 수 있게 된다 (LeBel and Bondy, 1990). 그러나 DCFH-DA는 수용성 활성산소종에 대해서는 특이성이 없기 때문에 그 사용에 다소 제한이 있는 문제점이 있다 (Delia *et al.*, 1997).

먼저 phosphate buffer (50 Mm, pH 7.4)를 사용하여 12.5 mM DCFH-DA와 600 units/mL esterase를 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 stock solution으로 저장하였다. 실험시 2.5 μM DCFH-DA와 1.5 units/mL esterase를 혼합하여 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 배양하여 DCFH 용액을 조제하였고 시료 첨가 전까지 암소에서 냉동 보관하였다. 간세포주 (AC₂F)를 6시간 동안 serum free media에 배양한 후, 각 농도별 시료 (MeOH 추출물인 경우 40 $\mu\text{g/mL}$, 각 분획물인 경우 10 $\mu\text{g/mL}$)와 $\cdot\text{O}_2^-$ 를 첨가한 1시간 뒤, 전환된 DCF의 형광 강도의 변화를 microplate fluorescence reader FL 500으로 excitation wavelength 460 nm와 emission wavelength 530 nm에서 각각 30분간 측정하였다 (Scheme 5). DCF의 형광 강도의 변화가 감소하였다는 것은 시료, 즉 항산화성분의 활성산소종의 소거 활성으로, DCFH가 산화되지 않았다는 것을 의미한다 (chung *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002).

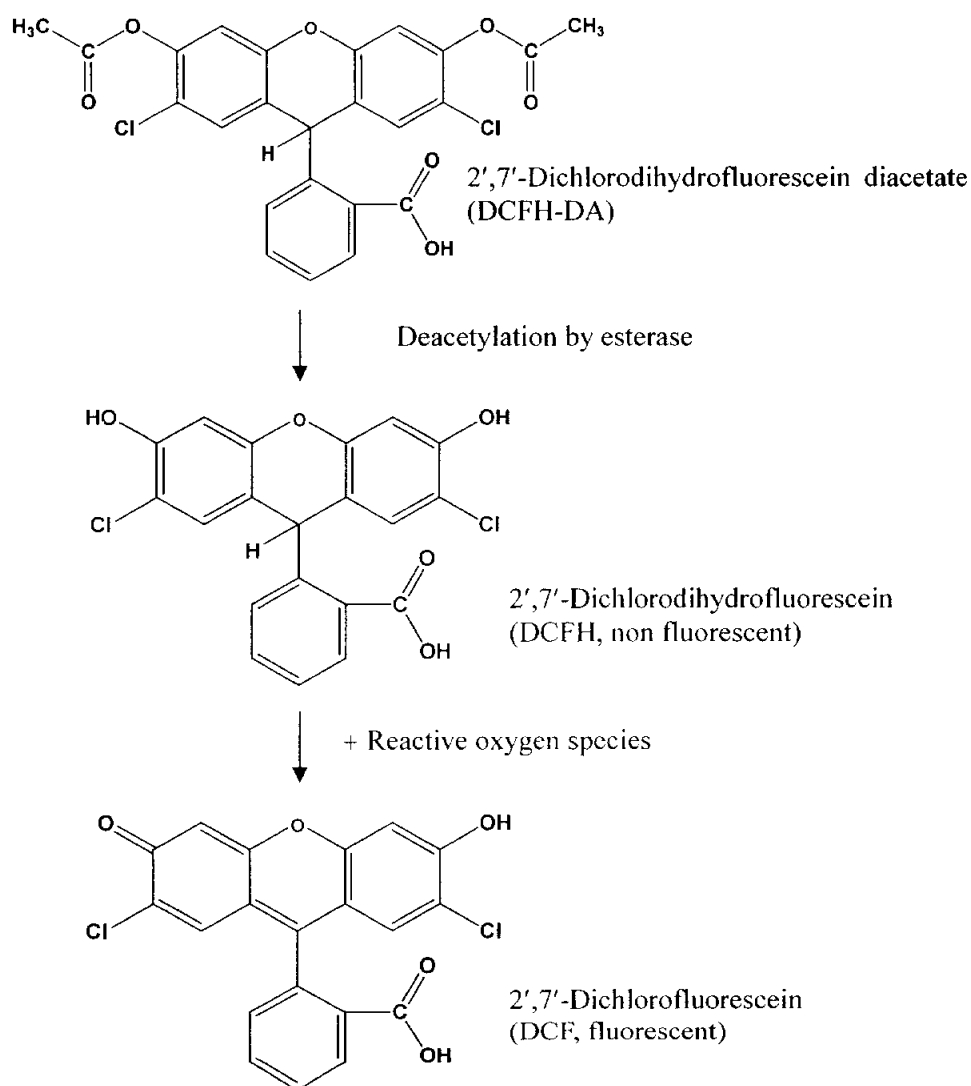
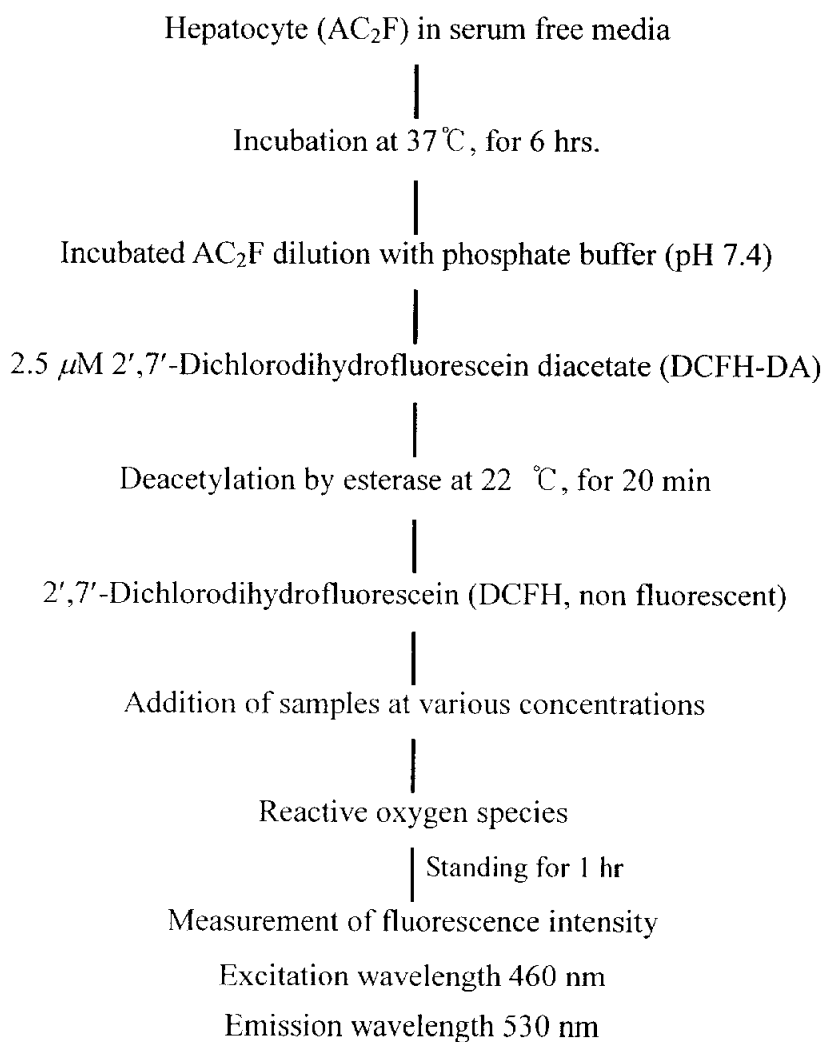


Fig. 8. Assay of the ROS scavenging activity
(Chung *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002).



Scheme 5. Measurement of the ROS by DCF
(Hempel *et al.*, 1999).

4-3. ONOO⁻ 소거 활성

ROS로 유발된 산화적 손상과 퇴행성 질환의 관련성에 대한 연구는 많이 이루어지고 있다 (Dreher *et al.*, 1996; Sohal, 2002). 대식세포, 호중구 등에서 생성될 뿐만 아니라, nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 L-arginine을 기질로 하여 합성되는 NO[•]는 짝없는 전자를 가진 free radical로서 반응성이 크고, 반감기가 아주 짧은 특징을 갖는 활성 산소이다 (Sawa *et al.*, 2000; Balavoine and Geletii, 1999). 뿐만 아니라, NO[•]는 세포막을 쉽게 확산할 수 있어서 다른 활성산소종들과 반응할 수 있으며, 특히 내피세포혈관, 대식세포 내에서 NO[•]와 $\cdot\text{O}_2^-$ 가 동시에 생성되면, $\cdot\text{O}_2^-$ 와 쉽게 반응하여 ONOO⁻를 생성하기도 한다 (Chung *et al.*, 1998; Beckman *et al.*, 1990). ONOO⁻는 NO[•]와 유사한 생리작용을 가지며, 주요한 생리적 작용으로 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanyl cyclase의 자극, tyrosine nitration 외에 lysine, protein의 methionine 잔기의 산화 및 지질과산화 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아에 의한 호흡억제, membrane pump 억제, GSH의 고갈, ADP ribose synthase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해와 많은 만성질환의 병변과 관련성이 보고되어 있다 (Althaus *et al.*, 1994; Haenen *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997). ONOO⁻는 다른 free radical에 비하여 상대적으로 안정한 활성종이지만, 생리적 pH에서 쉽게 proton화 되어 반응성이 매우 높은 peroxynitrous acid (ONOOH)로 전환되는데, 매우 짧은 반감기 (1.9 s)를 가지는 이 반응물질은 여러 세포 독성 물질인 nitrogen dioxide, nitronium ion 및 hydroxy radical의 전구체로 작용하여 oxidation, nitration, hydroxylation 반응을 유발한다 (Nonoyama *et al.* 1999). 또한 세포막을 산화시키거나 또는 세포막을 통과한 후 H₂O₂에 비해 수 천 배에 이르는 반응속도로 일차 배양된 신경세포에 수초간의 짧은 시간 내 급속한 손상을 유발하는 등 많은 만성질환과 관련된 것으로 보고 있다 (Balavoine and Geletii, 1999; Patel *et al.*, 1999). 뿐만 아니라, 세포내

ONOO⁻ 소거활성에 관여하는 효소계가 없기 때문에, 그 소거활성물질을 찾는 것이 더욱 중요하다 할 수 있다 (Choi *et al.*, 2002). 천연 그리고 합성 ONOO⁻ 소거성분에는 flavonoid (Choi *et al.*, 2002), catechin, polyphenol (Van Dyke *et al.*, 2000, Chung *et al.*, 1998), ergothioneine (Auroma *et al.*, 1999), defroxamine, urate, glutathione (Mencini *et al.*, 1998), melatonin (Cuzzocrea *et al.*, 1999) 그리고 D-(-)-penicillamine (Fici *et al.*, 1997) 등이 잘 알려져 있다.

ONOO⁻를 측정하는 방법에는 ONOO⁻에 의한 tyrosine 잔기의 nitration을 측정하는 방법이 있으며, UV-vis spectroscopy, GC-MS spectroscopy, amino acid analysis, HPLC analysis 및 nitrotyrosine에 특이적인 polyclonal 또는 monoclonal antibody를 이용한 방법 등이 있다. 이 외에도 형광광도법, 화학발광법, 분광광도법 등이 있지만, 본 실험에서는 Kooy *et al.* (1994)의 방법에 의해 합성 ONOO⁻를 첨가하여 직접적인 ONOO⁻ 소거활성을 형광광도법을 이용하여 살펴보았다.

실험에 앞서 dimethylformamide로 녹인 DHR 123 (5 mM)은 질소 충전하여 -80 °C에서 stock solution으로 저장하였다. 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4), 5 mM potassium chloride로 조제한 buffer를 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μM과 혼합시켜, 최종농도가 5 μM이 되도록 DHR 123을 첨가하였다. 이렇게 만들어진 working solution에 시료와 authentic ONOO⁻를 첨가하면 5분 후, 비 형광성의 DHR 123이 형광성의 rhodamine 123으로 바뀌게 되는데 (Fig. 9), 이 형광물질을 microplate fluorescence reader FL500로 excitation wavelength 468 nm과 emission wavelength 525 nm에서 측정하였다 (Scheme 6).

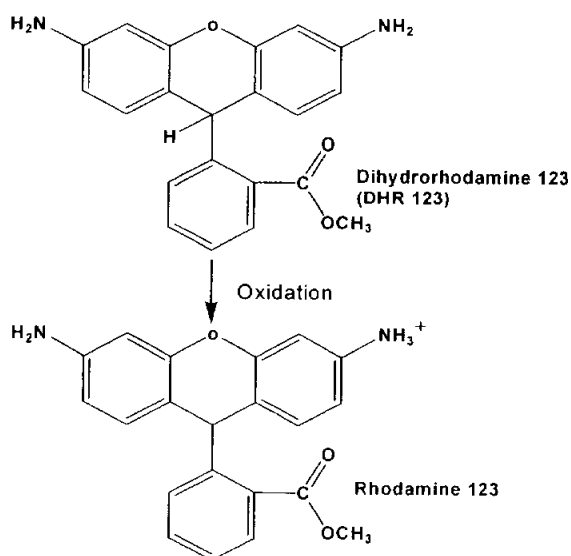
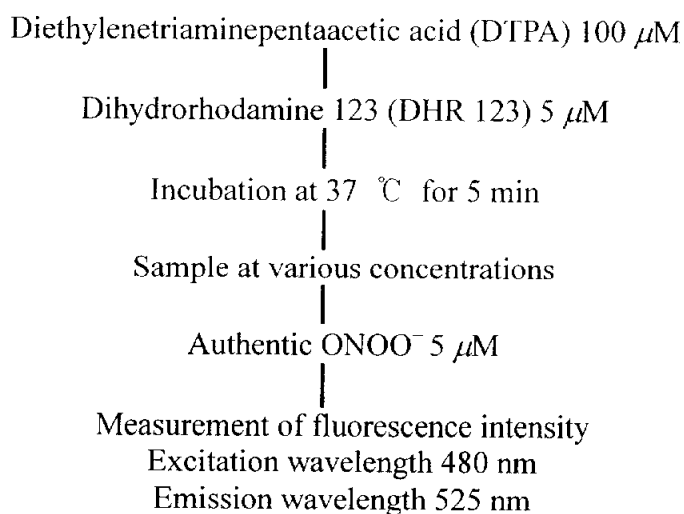


Fig. 9. ONOO^- -mediated oxidation of DHR 123
(Hempel *et al.*, 1999).



Scheme 6. Measurement of the ONOO^- scavenging activity
(Chung *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002).

III. 결과 및 고찰

1. 수종 벗나무의 부위별 MeOH 추출물의 항산화활성

항산화제는 금속이온과 결합하거나 자동산화의 연쇄반응을 유도하는 free radical을 소거하거나 혹은 생성된 과산화물을 분해하여 불활성화시킴으로서 활성을 나타내게 되는데, 이러한 기전은 하나 이상이 관여할 수도 있고 서로 상승작용을 일으키기도 한다 (Moure *et al.*, 2001). 따라서 천연물의 항산화활성을 검색하거나, 분리 화합물의 활성 기전을 밝히기 위해서는 다양한 활성측정법을 사용할 필요가 있다. 이에 저자는 3가지 항산화 실험계, 즉 DPPH radical 소거 활성법과, 활성산소종 생성 억제활성법 그리고 ONOO⁻ 소거활성법으로 항산화활성을 평가하였다.

한국에서 자생하는 섬개벗나무, 산복사, 귀룽나무, 올벗나무, 산벗나무, 벗나무, 그리고 왕벗나무의 7종의 벗나무 (Table 1)를 대상으로 각 부위별 MeOH 추출물을 사용하여 실험하였고, 시료의 구입 및 채집은 다음과 같다. 섬개벗나무, 귀룽나무, 올벗나무의 각 부위별 MeOH 추출물과 벗나무 심재, 그리고 왕벗나무의 가지는 한국 생명공학원의 자생식물연구소 (Plant Diversity Research Center) 산하에 있는 한국식물추출물 은행에서 구입하여 사용하였고, 산복사 줄기와 산벗나무, 벗나무의 잎, 꽃, 수피 그리고 왕벗나무의 잎은 직접 채집하여, 벗나무의 잎의 MeOH 추출법과 동일한 방법으로 MeOH 추출하여 사용하였다.

Table 1. Some selected *Prunus* genus in tested model systems

Plants	Common name in Korea
<i>P. buergeriana</i>	섬개벗나무
<i>P. davidiana</i>	산복사
<i>P. padus</i>	귀룽나무
<i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i>	올벗나무
<i>P. sargentii</i>	산벗나무
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	벗나무
<i>P. yedoensis</i>	왕벗나무

1-1. 수종 뽕나무의 부위별 MeOH 추출물의 DPPH radical 소거활성

DPPH radical 방법은 다른 항산화 실험계처럼 과도한 산화조건을 유도할 필요가 없어서 원시료의 열분해에 대한 위험율이 작고, 상온에서 radical을 용매에 간단히 용해시키는 것만으로 수행하기 때문에 간편하게 항산화성을 측정할 수 있다 (Bondet *et al.*, 1997).

수종 뽕나무 추출물을 대상으로 한 DPPH radical 소거활성 결과를 Table 2에 나타내었다. 섬개뽕나무의 잎을 제외한 모든 MeOH 추출물에서 강한 DPPH 소거 활성을 보였는데, 특히 올뽕나무의 수피의 MeOH 추출물의 소거활성은 IC_{50} 1.63 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군으로 사용된 항산화제인 L-ascorbic acid (IC_{50} 1.7 $\mu\text{g/mL}$)와 유사한 활성을 나타내었다. 또한 산복사, 귀룽나무의 각 부분별 MeOH 추출물과 산뽕나무의 가지, 뽕나무의 심재 그리고, 왕뽕나무 가지의 MeOH 추출물의 DPPH 소거활성이 $< IC_{50}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나는 것으로 보아, 이들 뽕나무 추출물의 항산화활성이 강력한 radical 소거 활성에 기인됨을 알 수 있었다. 이 외에도 산뽕나무 잎과 수피의 radical 소거 활성의 IC_{50} 가 각각 18.99 $\mu\text{g/mL}$ 와 15.69 $\mu\text{g/mL}$ 로, 뽕나무의 잎과 꽃은 각각 21.88 $\mu\text{g/mL}$, 14.30 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다. 수종의 뽕나무들의 부위별 DPPH radical 소거활성을 살펴보면 주로 가지와 심재에서 가장 좋은 활성을 나타내었고 잎과 꽃, 그리고 열매 순으로 활성이 나타났다. 특히 섬개뽕나무의 경우 잎에서의 활성은 나타나지 않는 반면, 수피와 심재에서는 각각 3.35 $\mu\text{g/mL}$ 와 4.00 $\mu\text{g/mL}$ 으로 강한 활성을 나타낸 것으로 보아 항산화활성 성분은 주로 잎이 아닌 수피나 심재에 존재할 것으로 여겨진다.

1-2. 수종 뽕나무의 부위별 MeOH 추출물의 활성산소종 억제활성

생체 내에서 생성되는 활성산소종을 직접적으로 정량 측정하는 방법으로 간세포주 (AC₂F)에서 생성된 활성산소종에 대해 비형광 probe인 DCFH-DA가 강한 형광성을 띠는 DCF로 전환되는 기전을 이용하였다. 수종 뽕나무의 부위별 MeOH 추출물에 대한 활성산소종 억제율(%)을

측정하였으며 실험결과는 Table 2에 나타내었다. 산복사, 왕벚나무 가지 그리고 벚나무 심재의 억제율 (%)은 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $83.78 \pm 1.31\%$, $72.06 \pm 1.35\%$ 그리고 $71.20 \pm 0.63\%$ 로 가장 높았고, 대조군인 Trolox ($73.56 \pm 0.31\%$)와 유사한 활성을 보였다. 특히 왕벚나무의 잎 추출물은 자동산화를 억제하여 melanin 생성을 감소시킨다는 것이 알려져 있기 때문에 (Matsuda *et al.*, 1994), 이 벚나무에서는 활성산소종을 억제하는 다양한 성분이 존재할 것으로 여겨진다. 섬개벚나무 잎과 벚나무 수피의 활성산소종 생성 억제 활성은 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 매우 낮게 측정된 반면, 섬개벚나무, 올벚나무의 활성은 모든 부위에서 50% 이상의 활성을 나타내었다. 특히 벚나무의 잎과 꽃의 MeOH 추출물의 경우 DPPH와 ONOO^- 와 같은 다른 항산화계와는 달리 활성산소종 생성 억제 활성이 낮게 나타나는 것으로 보아, 이들 벚나무의 항산화활성은 활성산소종 억제 기전에 크게 영향을 받지 않는다는 것을 추정할 수 있었다. 이와 다른 벚나무 MeOH 추출물이 활성산소종에 대해 30%에서 60% 정도의 좋은 활성을 보이는 것으로 보아, 이들 벚나무 속 식물들이 활성산소종 억제활성을 통해서도 항산화활성을 나타내는 것으로 여겨졌다.

1-3. 수종 벚나무의 부위별 MeOH 추출물의 ONOO^- 소거 활성

수종 벚나무 MeOH 추출물의 ONOO^- 소거활성을 측정하기 위해 직접적인 합성 ONOO^- 소거 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 산복사와 산벚나무의 잎과 가지는 ONOO^- 소거율이 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $92.84 \pm 0.16\%$ 와 $91.92 \pm 0.88\%$, $91.63 \pm 0.39\%$ 로 가장 높게 나타났으며, 올벚나무의 수피, 산벚나무의 꽃, 그리고 왕벚나무 잎에서도 동일농도에서 각각 $76.28 \pm 0.21\%$ 와 $80.63 \pm 0.81\%$, $72.85 \pm 3.88\%$ 로 모두 대조군인 penicillamine ($71.14 \pm 0.47\%$)보다 높은 활성을 나타내었다. 추출물임에도 불구하고 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 이들 벚나무의 항산화활성에 ONOO^- 소거활성이 크게 기여하고 있음을 알 수 있었다. 섬개벚나무 잎을 제외한 대부분의 벚나무 속 식물의 MeOH 추출물은 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 50% 정도의 좋은 ONOO^- 소거활성을 나타내었다.

Table 2. Scavenging activities of the MeOH extracts of some selected *Prunus* genus on DPPH radical, total ROS and ONOO⁻

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

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

2. 3종의 뱀나무 MeOH 추출물과 각 획분들의 항산화활성

산복사와 왕뱀나무 잎 그리고 뱀나무의 잎, 수피, 꽃의 MeOH 추출물 그리고 각 획분 (CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 획분)과 H_2O 층에 대하여 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO^- 소거활성을 측정하였다. 산복사와 왕뱀나무 잎의 MeOH 추출물, 각 획분 그리고 H_2O 층에 대한 항산화활성 실험은 Table 3에 나타내었다. 산복사의 DPPH radical 소거 활성은 EtOAc 획분 > *n*-BuOH 획분 > MeOH 추출물 >> CH_2Cl_2 획분 >> H_2O 층 순으로 나타났으며, 이 결과로서 산복사의 DPPH radical 소거 활성을 지닌 성분은 대부분 EtOAc 획분과 *n*-BuOH 획분에 존재함을 알 수 있었다. 산복사 MeOH 추출물의 활성산소종 억제율은 $40 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 $83.78 \pm 1.31\%$ 로 매우 높게 나타났으며, 분획과정을 통해 EtOAc 획분, CH_2Cl_2 획분, *n*-BuOH 획분 순으로 각각 $83.18 \pm 3.30\%$ 와 $70.39 \pm 3.70\%$, $56.71 \pm 3.42\%$ 로 높게 측정된 것으로 보아, H_2O 층을 제외한 모든 획분에 활성산소종 억제활성을 가진 성분이 포함되어 있을 것으로 여겨졌다. 또한 산복사는 $10 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 MeOH 추출물과 EtOAc 획분, CH_2Cl_2 획분, *n*-BuOH 획분에서 모두 70 % 이상의 강력한 ONOO^- 소거활성을 나타내었는데, 이는 대조군인 penicillamine의 소거활성이 $74.14 \pm 0.47\%$ 임을 고려해볼 때, 상당히 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 3가지 항산화실험을 통해 산복사의 MeOH 추출물과 EtOAc 획분, *n*-BuOH 획분은 radical 소거와 활성산소종과 ONOO^- 의 억제 기전을 통해 항산화활성을 나타냄을 알 수 있었다.

왕뱀나무 잎의 EtOAc 획분에서 DPPH radical 소거 활성과 ONOO^- 소거 활성이 각각 IC_{50} $6.08 \mu\text{g/mL}$ 와 $10 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 $87.24 \pm 1.11\%$ 억제율로서 가장 높게 나타났으나, 활성산소종 억제활성은 거의 나타내지 않았다. 이는 왕뱀나무 잎은 활성산소종 억제와는 다른 기전, 즉 radical 소거나 ONOO^- 소거활성에 의해 항산화활성을 나타낼 것으로 여겨진다.

벚나무의 잎, 가지, 꽃의 MeOH 추출물 그리고 각 획분 (CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 획분)과 H₂O층에 대하여 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO⁻ 소거활성을 측정하여 Table 3에 나타내었다. 벚나무 잎의 EtOAc 획분은 DPPH radical 소거활성이 IC₅₀ 7.98 µg/mL로 나타났으며, 또한 ONOO⁻에 대해서는 10 µg/mL 농도에서 95.37 ± 0.12% 소거함으로서 실험한 획분 중 가장 강하게 나타났다. 특히 ONOO⁻ 소거활성은 H₂O층을 제외하고 모두 65% 이상의 강한 소거활성을 나타내었는데, 이는 대조군인 penicillamine의 소거율이 74.14 ± 0.47%임을 고려해볼 때 상당히 높은 활성임을 알 수 있었다. 그러나 잎의 경우 활성산소종에 대한 억제활성은 EtOAc 획분에서도 27.7 ± 4.2%로 낮게 나타났다. 잎과 마찬가지로 벚나무 수피의 경우도 EtOAc 획분이 DPPH radical 소거활성과 ONOO⁻소거율이 각각 IC₅₀ 5.65 µg/mL과 10 µg/mL 농도에서 87.54 ± 0.15%로 가장 높았으며, 이외 다른 획분에서는 낮게 나타났다. 벚나무의 꽃의 DPPH radical 소거활성은 EtOAc 획분 > *n*-BuOH 획분 > MeOH 추출물 > H₂O층 >> CH₂Cl₂ 획분 순으로 나타났으며, IC₅₀는 각각 2.3, 2.8, 14.3, 19.75, 64.45 µg/mL로 측정되었고, ONOO⁻ 소거활성은 H₂O층을 제외하고 모두 65% 이상의 강한 소거활성을 나타내었다. 벚나무의 수피와 꽃의 EtOAc 획분은 활성산소종 억제율이 40 µg/mL 농도에서 각각 48.34 ± 1.25%와 52.56 ± 0.68%로 나타났다.

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

Table 3. Antioxidant activities of the MeOH extracts and its fractions of *P. davidiana* stem, *P. yedoensis* leaf and *P. serrulata* var. *spontanea* leaf, stem bark and flower

Plants	MeOH and its fractions used	DPPH ^a IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Total ROS ^b			ONOO ^{-c}		
			Inhibition ratio (%)			Inhibition ratio (%)		
			Mean	$\pm$	SE	Mean	$\pm$	SE
<i>P. davidiana</i>								
Stem	MeOH	3.60	83.78	$\pm$	1.31	92.84	$\pm$	0.16
	CH ₂ Cl ₂	52.00	70.39	$\pm$	3.70	70.73	$\pm$	0.55
	EtOAc	2.57	83.18	$\pm$	3.30	95.56	$\pm$	0.23
	<i>n</i> -BuOH	2.93	56.71	$\pm$	3.42	84.77	$\pm$	0.34
	H ₂ O	772.52	0.88	$\pm$	1.98	33.51	$\pm$	1.61
<i>P. yedoensis</i>								
Leaf	MeOH	27.08	-42.77	$\pm$	3.29	75.46	$\pm$	3.88
	CH ₂ Cl ₂	32.30	-219.64	$\pm$	18.37	48.55	$\pm$	1.47
	EtOAc	6.08	33.33	$\pm$	4.79	87.24	$\pm$	1.11
	<i>n</i> -BuOH	50.13	6.20	$\pm$	2.75	47.89	$\pm$	2.13
	H ₂ O	57.38	4.14	$\pm$	4.64	29.36	$\pm$	5.31
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>								
Leaf	MeOH	21.88	6.9	$\pm$	2.7	67.81	$\pm$	3.15
	CH ₂ Cl ₂	65.70	-176.2	$\pm$	4.9	65.35	$\pm$	0.46
	EtOAc	7.98	27.7	$\pm$	4.2	95.37	$\pm$	0.12
	<i>n</i> -BuOH	48.55	15.3	$\pm$	3.5	83.85	$\pm$	1.15
	H ₂ O	18.95	8.9	$\pm$	2.8	41.29	$\pm$	6.01
Stem bark	MeOH	67.15	1.17	$\pm$	2.22	34.55	$\pm$	7.95
	CH ₂ Cl ₂	183.2	-11.62	$\pm$	6.64	39.37	$\pm$	4.83
	EtOAc	5.65	48.34	$\pm$	1.25	87.54	$\pm$	0.15
	<i>n</i> -BuOH	78.9	-7.84	$\pm$	1.57	39.63	$\pm$	4.77
	H ₂ O	189.3	0.77	$\pm$	5.07	30.45	$\pm$	3.29
Flower	MeOH	14.3	12.22	$\pm$	1.63	80.63	$\pm$	0.81
	CH ₂ Cl ₂	64.45	-142.68	$\pm$	1.98	65.19	$\pm$	1.31
	EtOAc	2.3	52.56	$\pm$	0.68	93.82	$\pm$	0.34
	<i>n</i> -BuOH	2.8	33.37	$\pm$	7.39	69.38	$\pm$	1.62
	H ₂ O	19.75	43.77	$\pm$	1.84	24.34	$\pm$	4.10
L-ascorbic acid		1.71						
Trolox			73.56	$\pm$	0.31			
Penicillamine						74.14	$\pm$	0.47

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

3. 벚나무 EtOAc 획분에서 분리된 화합물의 구조결정

벚나무 (*P. serrulata* var. *spontanea*) 잎의 획분 중 항산화활성이 가장 높은 EtOAc 획분을 대상으로 column chromatography하여 13 종의 flavonoid 화합물 [prunetin (1), genistein (2), quercetin (5), prunetin 4'-O-β-D-glucopyranoside (7), kaempferol 3-O-α-L-arabinofuranoside (9), prunetin 5-O-β-D-glucopyranoside (11), kaempferol 3-O-β-D-xylopyranoside (12), naringenin 7-O-β-D-glucopyranoside (13), genistin (14), kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside (15), orobol 7-O-β-D-glucopyranoside (16), quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside (20) and kaempferol 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside (21)]과 6종의 triterpenoid 화합물 [ursolic acid (3), 2α-hydroxyursolic acid (4), 2α, 3α, 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6), 1β, 2α, 3α, 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10), 2α, 3α, 24-trihydroxy-urs-12-en-28-O-β-D-glucopyranoside (17), and 2α, 3α, 19α, 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-O-β-D-glucopyranoside (18)], 그리고 각각 1종의 sphingolipid (8)와 phenolic 화합물 [2-O-β-(6'-benzoyl)-glucopyranosyl o-(Z)-coumaric acid (19)]을 각각 분리, 정제하였으며 구조를 밝히기 위해 IR, UV, EIMS, LR-, HR-FABMS, 1D NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR)과 2D-NMR (HMQC, HMBC, COSY, NOESY)의 분광학적 방법을 사용하여 측정하였다. 분리된 화합물은 silica gel TLC (CH₂Cl₂:MeOH 용매 10:1, 7:1, 3:1로 전개)상 극성 순으로 numbering을 하였다.

3-1. Flavonoid 화합물의 구조 결정

2개의 방향족환과 3개의 탄소로 이루어진 탄소 15개로 된 일련의 C₆-C₃-C₆ 화합물을 flavonoid라고 한다. 여러 가지 기본골격이 있으며, 각각 특유의 명칭을 가진다. 특히 flavonoid의 C-3번 위치에 OH기를 가진 것을 flavonol이라고 하고, 3번 위치에 B 환이 결합한 골격을 가진 화합물을 isoflavonoid라고 한다. 또한 C-2번과 C-3번의 이중결합이 없는 flavonoid 화합물을 flavanone이라고 한다 (우, 1996). 그 구조는 Fig. 1과 2에서 제시하였고 NMR data는 3-2-2 단락에서 자세히 제시하였다.

3-1-1. 6종의 flavonol 화합물의 구조결정 (5, 9, 12, 15, 20, 21)

분리한 모든 Flavonol 화합물은 aqueous MeOH로 재결정하여 노란색 결정성 화합물로서 얻을 수 있었다. 또한 장, 단파 (각각 365 nm, 254 nm)에서 spot을 확인할 수 있었고, 50% H₂SO₄ 용액 처리 후 hot plate에서 탄화시켰을 때 노란색으로 발색할뿐만 아니라, Mg-HCl 및 FeCl₃ 용액 반응이 양성인 것으로 보아, flavonoid 화합물임을 추정할 수 있었다 (우, 1996). Compound 5는 quercetin 표품과 함께 TLC 확인하였고, EIMS 분석시 분자이온 peak가 m/z 302에서 base peak로 나타나고 있으며, C 환에서 retro Diels-Alder 분해에 의한 $[A + H]^+$ 가 m/z 153에서, $[B]^+$ 가 m/z 137에서 나타나는 것으로 보아 (Fig. 10, Scheme 7), A와 B 환에 각각 dihydroxy group을 가진 flavonol인 quercetin로 확인 동정할 수 있었다 (Young *et al.*, 1991; 강 등, 2000). Compound 9, 12, 15과 20은 DMSO-*d*₆로 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였고, 각각 kaempferol 3-*O*- α -L-arabinofuranoside (9) [De Almeida *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1994], kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranoside (12) [Agrawal, 1992], kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (15), 그리고 quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (20) [Young *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1991]로 구조 결정할 수 있었다.

Kaempferol 화합물은 ¹H-NMR에서 특징적인 signal인 *meta*-coupling 하고 있는 proton signals [δ 6.21 (1H, J = 2.0 Hz, H-6)과 δ 6.44 (1H, J = 2.0 Hz, H-8) 부근의 doublet signals]과 A₂B₂ type의 B 환의 proton들의 존재를 나타내는 signals [δ 6.89 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3', 5')과 δ 8.02 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2', 6')]이 관찰되었다. 그리고 Quercetin은 ¹H-NMR에서 *meta*-coupling 하는 특징적인 proton signals [δ 6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6)과 δ 6.41 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8)]과 *ortho*-dihydroxy group을 가지는 B 환의 특징적인 proton signals [δ 6.84 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-5')와 δ 7.53 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2') 그리고 δ 7.57 (1H, dd, J = 2.0,

9.0 Hz, H-6')이 관찰되었다 (장 등, 2000). 또한, flavonoid 골격에 결합된 당의 종류와 당의 결합양식은 당의 1번 수소의 특징적인 $^1\text{H-NMR}$ signal과 coupling constant (J 치, 결합상수) [δ_{H} 5.40 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)]로부터 β -D-glucopyranoside로 동정하였다 (Agrawal, 1992).

Compound **21**은 CD_3OD 로서 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 11)과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 12)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Jung *et al.*, 1999; Beninger *et al.*, 1998). $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 11)에서 *meta*-coupling 하는 proton signals (δ_{H} 6.18과 δ_{H} 6.38) 그리고 A_2B_2 type의 B 환의 proton signals [δ_{H} 6.87 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5')과 δ_{H} 8.09 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6')]이 관찰되어 kaempferol 골격을 하는 화합물임을 추정할 수 있었다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 12)에서 kaempferol의 B 환에 기인하는 signals [δ_{C} 133.18 (C-2', 6'), δ_{C} 117.04 (C-3', 5')]과, 당의 1번 탄소에 기인하는 signals [δ_{C} 106.44와 δ_{C} 102.01]이 관찰되어, kaempferol에 2분자의 당이 결합한 구조임을 추정할 수 있었다. 또한, 당의 위치와 결합순서를 확인하기 위하여 2D NMR인 HMQC (Fig. 13)와 HMBC spectrum (Fig. 14)을 측정하였으며, β -D-glucose의 H-1'' [δ_{H} 5.35 ($J = 7.6$ Hz)] 및 C-1'' (δ_{C} 102.0) 그리고 β -D-xylose의 H-1''' [δ_{H} 4.72 ($J = 7.6$ Hz)]와 C-1''' (δ_{C} 106.4)의 one bond correlation과 long range correlation을 결정하였다. β -D-glucose의 H-1''은 kaempferol C-3 (δ_{C} 135.80)과 상관관계를 가지며, β -D-xylose의 H-1''' [δ_{H} 4.72 ($J = 7.6$ Hz)]는 D-glucose의 C-2'' (δ_{C} 81.29)에 long range correlation하는 것으로 보아 kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (**21**)로 구조를 동정하였다.

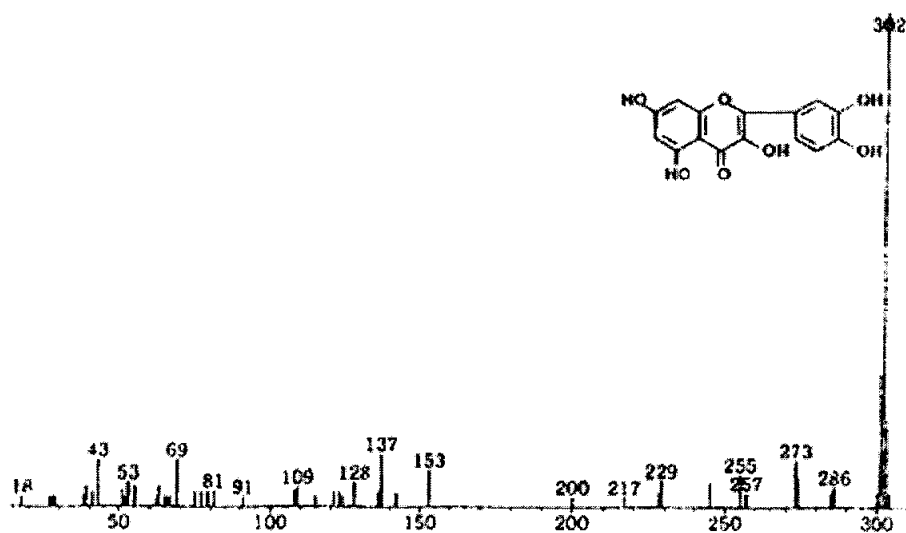
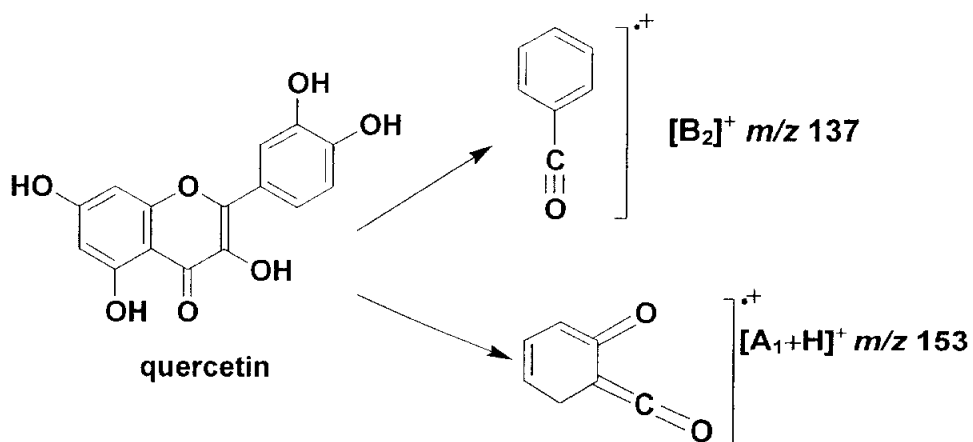
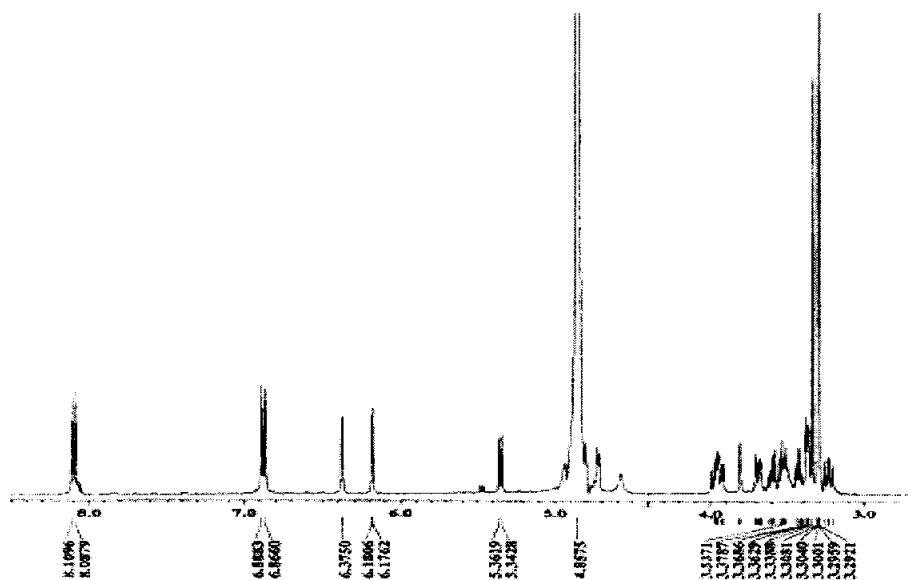


Fig. 10. EI-MS spectrum of compound 5.



Scheme 7. *retro* Diels-Alder fragmentation of compound 5.



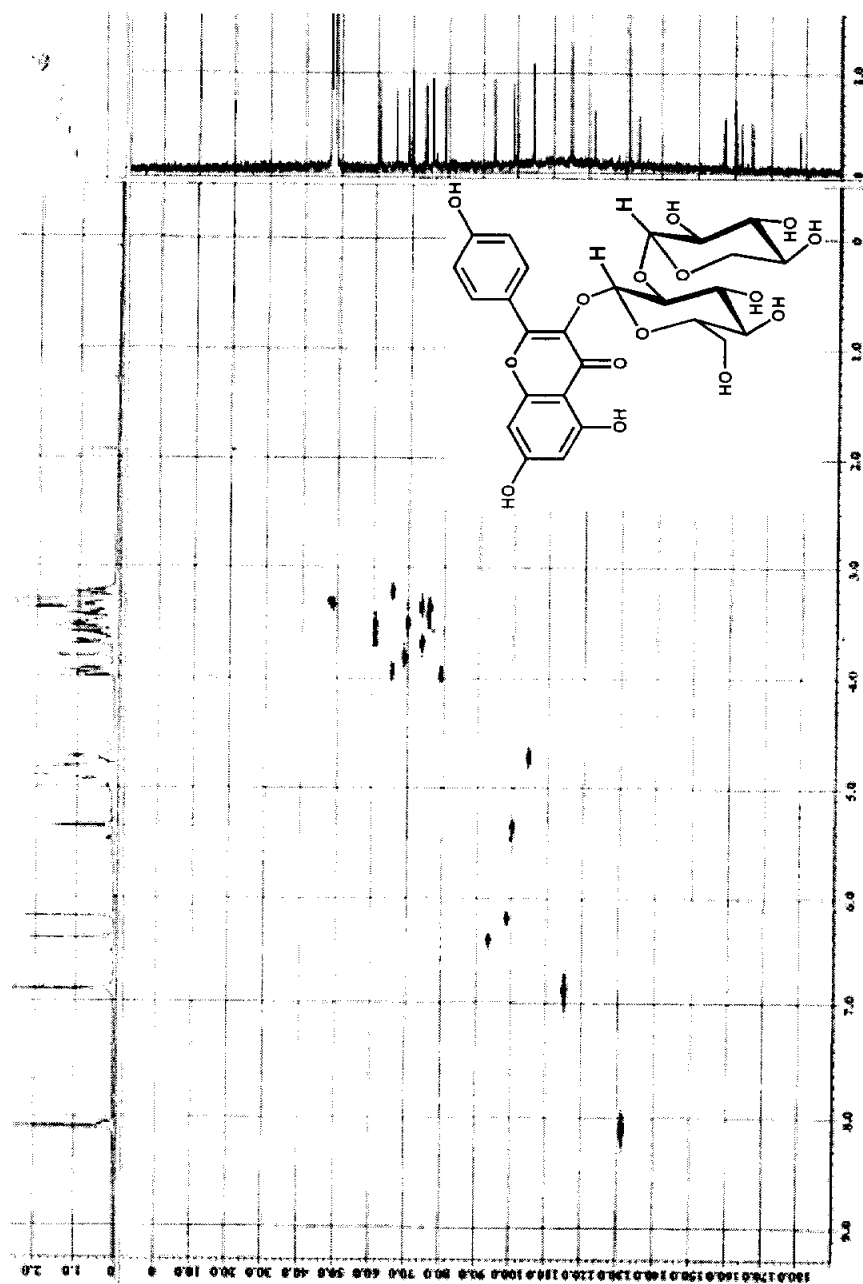


Fig. 13. HMQC spectrum of compound **21** in CD₃OD.

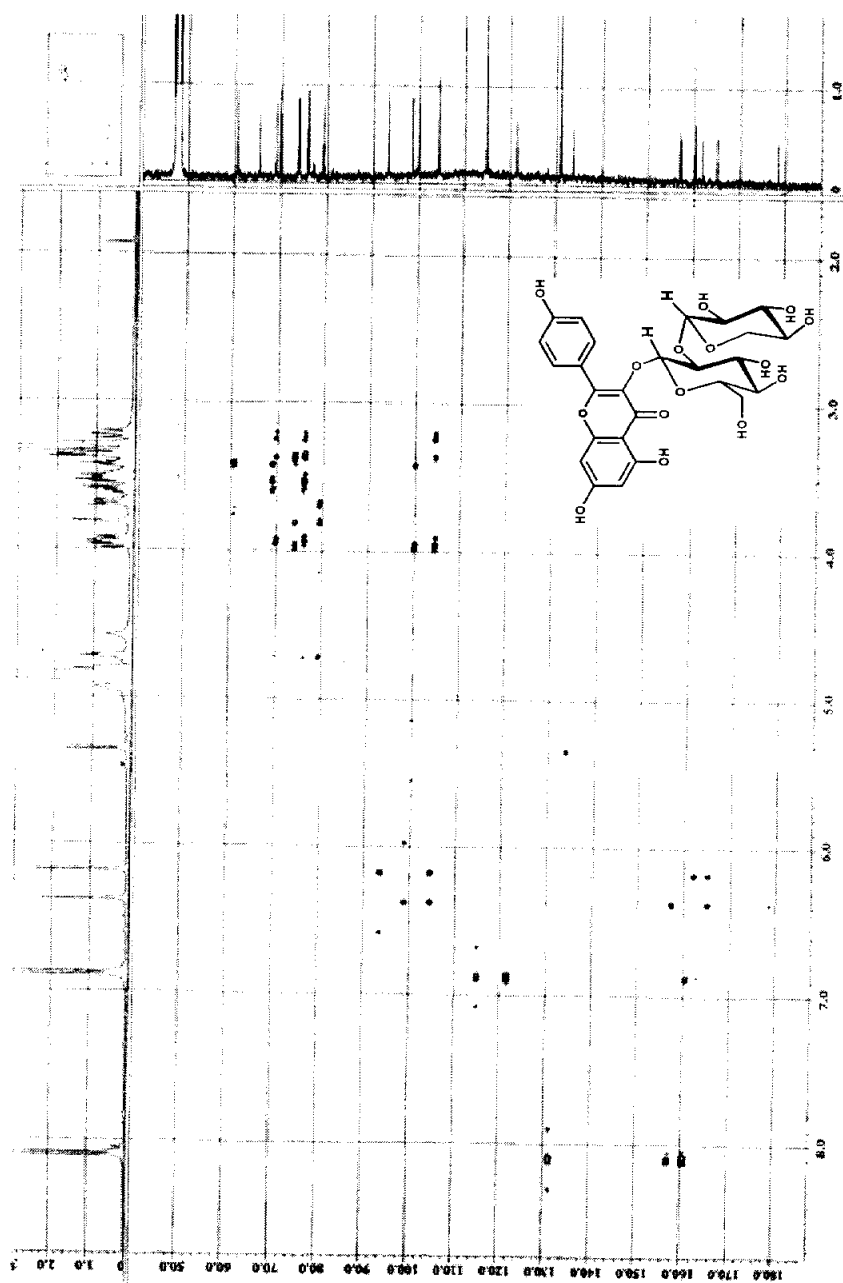


Fig. 14. HMBC spectrum of compound **21** in CD_3OD .

3-1-2. 1종의 flavanone 화합물의 구조결정 (13)

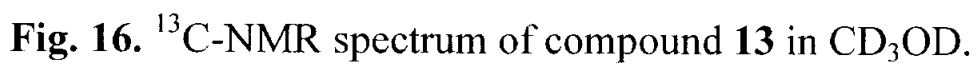
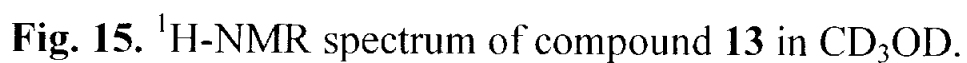
Compound **13**은 CD₃OD로 ¹H-NMR (Fig. 15)과 ¹³C-NMR spectrum (Fig. 16)을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Choi *et al.*, 1991b). Flavanone 화합물의 특징적인 signals [δ_H 2.74 (H-3a), δ_H 3.16 (H-3b), δ_H 5.36 (H-2)]을 관찰할 수 있었고, δ_H 6.18 (H-6)과 δ_H 6.20 (H-8)의 signals은 5, 7 위치에 hydroxy group가 치환되어 있으며, 7번에 당이 결합된 flavanone 화합물임을 추정할 수 있었다 (강 등, 2000; Choi *et al.*, 1991b; Agrawal, 1989). 또한 ¹³C-NMR spectrum (Fig. 16)에서 δ_C 81.51과 δ_C 44.96에서 flavanone 화합물의 특징적인 C2-C3의 결합을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside, 즉 prunin으로 동정하였다.

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

분리한 isoflavone 화합물은 aqueous MeOH로 재결정하여 미색 분말형 화합물로서 얻을 수 있었다. 또한 장, 단파 (각각 365 nm, 254 nm)에서 spot을 확인할 수 있었고, 50% H₂SO₄ 용액 처리 후 hot plate에서 탄화시켰을 때 담갈색으로 나타났다 (우, 1996). 화합물 **1**, **2**, **7**, **11**, **14**은 DMSO-*d*₆로 compound **16**은 CD₃OD로 각각 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였고, prunetin (**1**) [Farka *et al.*, 1969], genistein (**2**) [Wang *et al.*, 1999b], prunetin 4'-O- β -D-glucopyranoside (**7**) [Geibel, 1995; Geibel and Feucht, 1991; Geibel *et al.*, 1990], prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside (**11**) [Khalid *et al.*, 1989], genistin (**14**) [Wang *et al.*, 1999b], orobol 7-O- β -D-glucopyranoside (**16**) [Agrawal, 1989; Arora *et al.*, 2000]로 구조 결정할 수 있었다. Isoflavonoid를 DMSO-*d*₆로 NMR 측정하였을 경우 5번위치에 free hydroxy group을 가진 isoflavonoid 화합물은 특징적으로 δ_H 9-13에서 signal을 보인다 (우, 1996; 강, 2000; Agrawal, 1989). Compound **7**과 **11**은 prunetin 배당체이며 당의 결합

위치가 각각 4' 그리고 5번으로 차이점을 보였다. 이에 화합물 **11**을 acid hydrolysis하여 당 제거 위치에서 나타나는 free hydroxy group의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ signals을 문헌치와 비교함으로써 당의 위치를 확정하였다. Compound **11**의 가수분해물의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ signals은 prunetin (**1**)과 동일하게 나타났으며, 원시료의 NMR data와 비교해볼 때 δ_{H} 12.96 (1H, brs, 5-OH)의 signal이 새로이 나타났고, C-4의 δ_{C} 175.02가 δ_{C} 180.40로 저자장이동한 것으로 보아 당의 결합위치는 C-5의 hydroxy group으로 확인할 수 있었고 (Mabry *et al.*, 1970), 그 결과 이 화합물의 구조는 prunetin 5-O- β -D-glucopyranoside로 결정하였다.

Compound **16**의 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 17)과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 18)에서 flavonoid의 B 환에 *ortho*-dihydroxy group을 가지는 proton signals [δ_{H} 7.03 (1H, d, $J = 2.0$, H-2'), δ_{H} 6.86 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$, H-6'), δ_{H} 6.81 (1H, d, $J = 8.2$, H-5')]과 isoflavonoid의 특징적인 H-2의 signal (δ_{H} 8.21, s)이 관찰되었다. 또한 δ_{H} 4.95 (d, $J = 7.4$, H-1'')에서 당의 존재가 확인되었다. 당의 결합 위치를 확정하기 위해 HMBC spectrum (Fig. 19)를 측정하였으며, δ_{H} 4.95가 orobol 골격의 C-7 (δ_{C} 165.57)과 correlation하는 것으로 보아 orobol 7-O- β -D-glucopyranoside임을 최종 확인할 수 있었다.



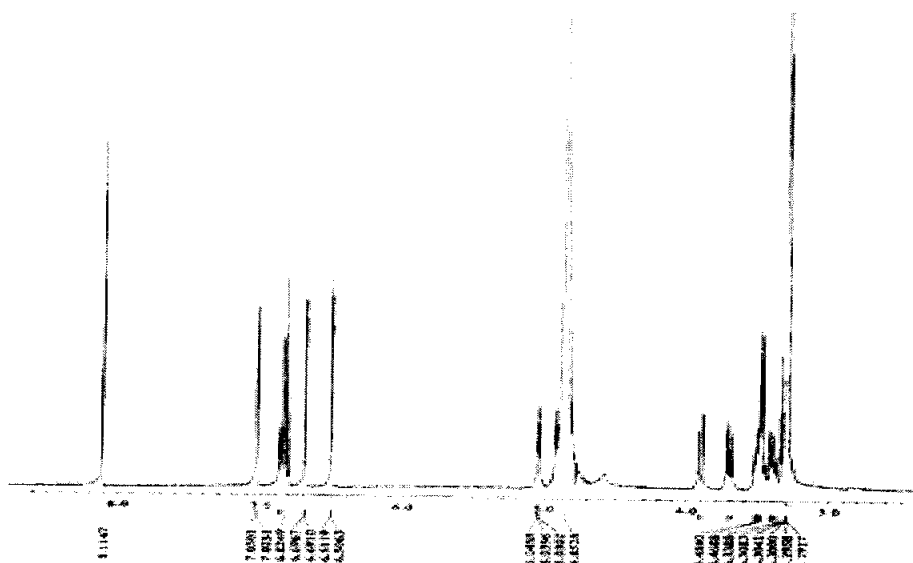


Fig. 17. ^1H -NMR spectrum of compound **16** in CD_3OD .

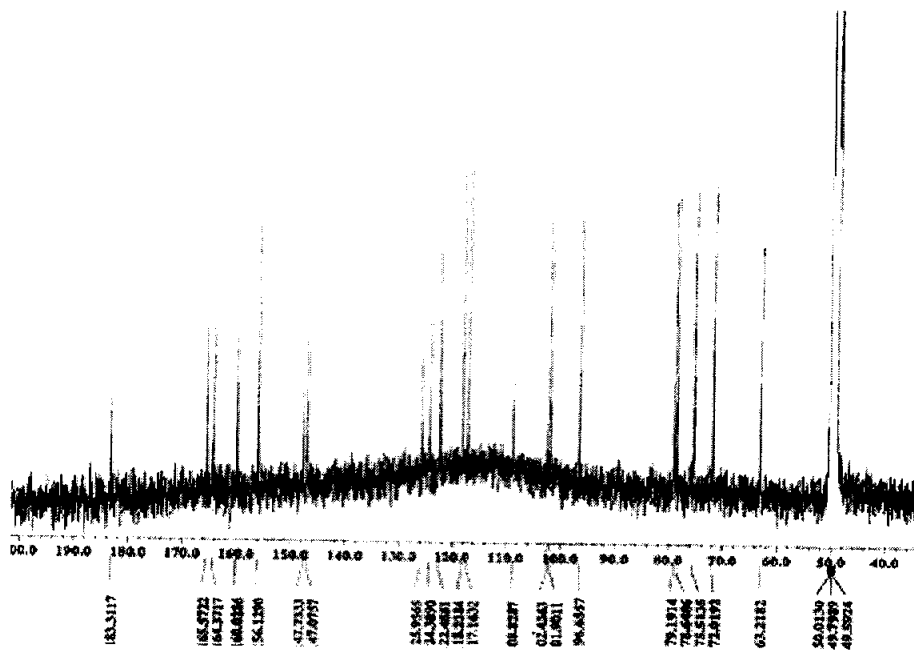


Fig. 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound **16** in CD_3OD .

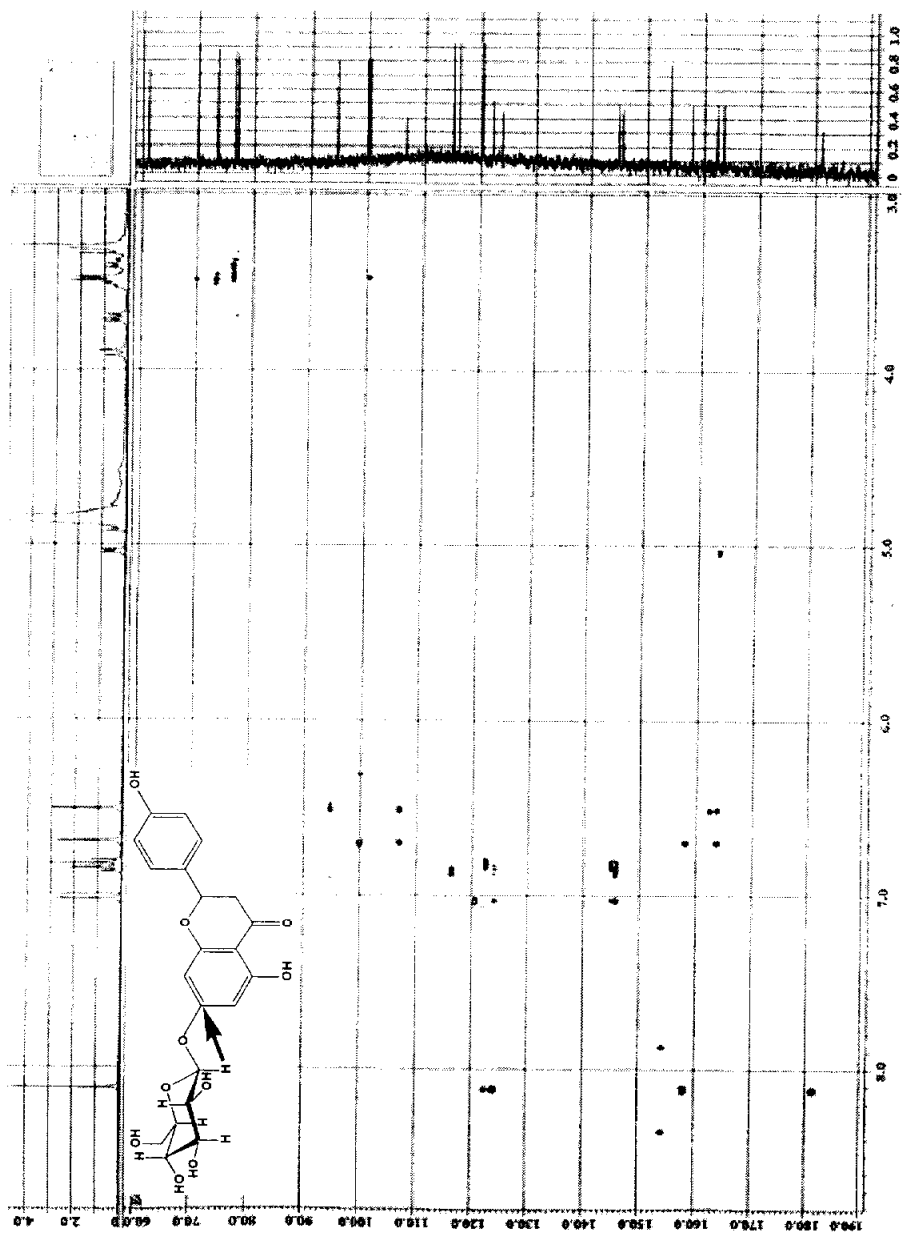


Fig. 19. HMBC spectrum of compound 16 in CD_3OD .

3-2. Triterpenoid 화합물의 구조 결정 (3, 4, 6, 10, 17, 18)

Triterpenoid는 6개의 isoprene 단위로 이루어진 화합물로서 비교적 복잡한 환상구조를 가지며, 거의 모두가 OH, CHO, COOH 등의 관능기를 갖고 있다. 용점이 높고 광학활성을 나타낸다. Liebermann-Burchard 반응시액 ($\text{Ac}_2\text{O-H}_2\text{SO}_4$)에 홍색 내지 적색을 나타낸다. 천연에는 유리형 또는 에스테르형 혹은 배당체를 이루며 존재한다. 두 분자의 farnesyl pyrophosphate에서 이루어진 squalene으로부터 유도된 화합물 군으로서 40여종이상의 기본골격이 알려져 있으며, 4000종 이상의 화합물들이 보고되었다. 기본골격에 따라 4 환성 triterpenoid와 5 환성 triterpenoid로 대별될 수 있다 (강 등, 2000; 우, 1996). Triterpenoid 화합물의 생리활성을 살펴보면, 세포독성 (Numata *et al.*, 1989; Yamagishi *et al.*, 1988)을 가지고 있어서 HeLa cell, MK-cell 등 다양한 암 세포에 대한 항증식작용 (Castro *et al.*, 1997)을 나타내며, VSV (vesicular stomatitis virus), HRV 1B (rhinovirus type 1B), HIV에 대한 항바이러스 활성 (Poehland *et al.*, 1987; Aquino *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1996; Kashiwada *et al.*, 1998)이 보고되고 있다. 또한 *Panax ginseng*에서 분리된 ginsenoside 화합물은 종양의 전이를 억제하는 효과가 있다고 한다 (Mochizuki *et al.*, 1995). 뿐만 아니라 triterpenoid 배당체에서 저혈당효과 (Yoshikawa *et al.*, 1996b)와 함께 알코올 흡수 저해효과 (Yoshikawa *et al.*, 1996c), 염증에 대한 억제효과 (Yasukawa *et al.*, 1996), 마우스의 대식세포에서의 NO 생성을 억제하는 활성 (Honda *et al.*, 2000)을 가진다고 한다. 최근 새로이 triterpenoid의 항산화활성에 관한 연구가 진행되고 있다 (Zhu *et al.*, 1999; Song and Yen, 2002; Hamburger *et al.*, 2002). 뱀나무 잎의 EtOAc 획분에서 분리한 triterpenoid 화합물은 IR, UV, EIMS, LR-, HR-FABMS를 측정하거나 pyridine- d_5 혹은 CDCl_3 를 용매로 하여 1D NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)과 2D-NMR (HMQC, HMBC, COSY, NOESY) 등의 분광학적 방법을 사용하여 구조를 분석하였다. 그 구조는 Fig. 3과 4에서 제시하였고 NMR data는 3-2-2 단락과 Table 4에서 자세히 제시하였다.

Compound 3, 4, 6, 10, 18의 $^1\text{H-NMR}$ 와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (pyridine- d_5)은 문헌치와 일치함으로서 그 화합물들의 구조를 각각 ursolic acid (3) [Takeoka *et*

al., 2000; Jung *et al.*, 1999], 2 α -hydroxyursolic acid (**4**) [Jung *et al.*, 1999], 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**6**) [Chusheng *et al.*, 1988], 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**10**) [Sakakibara *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1998; Guang-Yi *et al.*, 1989], 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (**18**) [El Lahlou *et al.*, 1999]로 동정하였다.

Compound **17**은 흰색 무정형 분말로서 분리되었으며, IR spectrum (Fig. 20)에서는 3422 cm⁻¹, 1074 cm⁻¹에서 각각 hydroxy group과 glycosidic linkage에 기인하는 peak가 나타났다. 이 관능기, 즉 hydroxy group의 위치를 확인하기 위해 EIMS spectrum (Fig. 22)를 측정하였으며, ursane계 혹은 oleanane계 triterpenoid 화합물에서 특징적으로 나타나는 *retro* Diels-Alder 분해 반응에 기인된 ion peak가 나타났다 (강 등, 2000). 즉, 이 화합물의 EIMS spectrum에서 *m/z* (% intensity) 488 ([M-glucose+1], 0.38), 248 (100), 203 (84.85), 240 (2.83), 239 (12.66)의 ion peaks가 나타나는 것으로서 hydroxy group이 D/E 환이 아닌 A/B 환에 존재한다는 것을 알 수 있었다 (Scheme 8) [El Lahlou *et al.*, 1999]. ¹H-NMR (Fig. 23)과 ¹³C-NMR spectrum (Fig. 24)에서 δ_H 2.49 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H-18)와 δ_C 126.01 (C-12), δ_C 138.38 (C-13)의 signals이 나타나는 것으로 보아, 이 화합물은 ursane계 triterpenoid임을 알 수 있었고 (Doddrell *et al.*, 1974), triterpenoid aglycone에 상응하는 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum은 화합물 **6**과 일치하였다 (Chusheng *et al.*, 1988). 또한 δ_H 6.24 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1')와 δ_C 62-96 (95.67, 74.00, 78.85, 71.16, 79.16, 62.27)로부터 당에 존재를 확인할 수 있었다. 또한 HMBC spectrum (Fig. 25)에서 δ_H 6.24의 당의 signal이 triterpenoid의 carboxyl group에 해당되는 δ_C 176.20와 correlation 하는 것으로 보아 그 구조는 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (**17**)임을 동정할 수 있었고, LR-FABMS (positive ion)에서 *m/z* 673에서 [M + Na]⁺ ion peak가 관찰되어, 분자식이 C₃₆H₅₈O₁₀임을 재확인하였다 (Fig. 21).

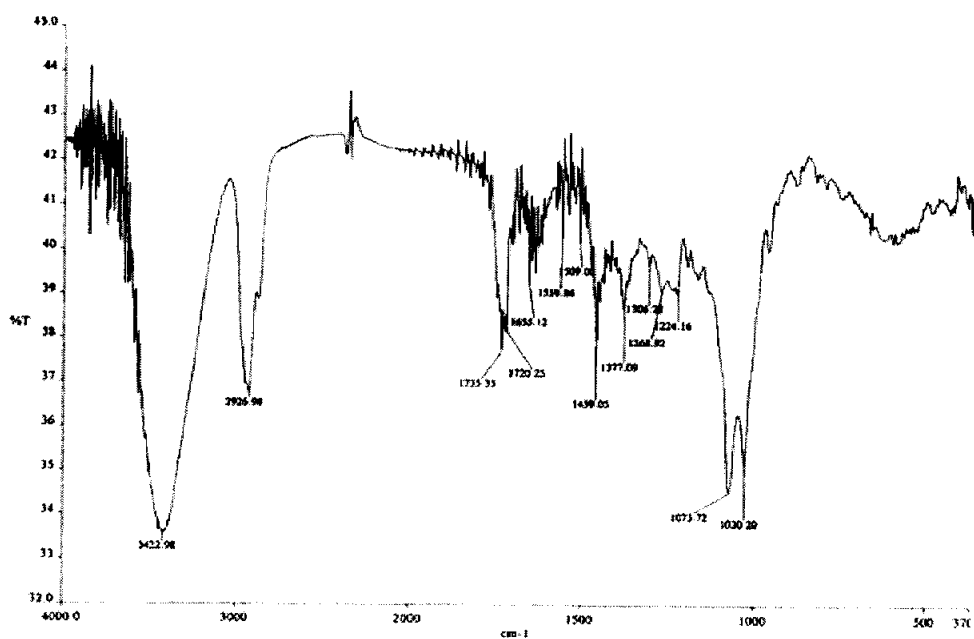


Fig. 20. IR spectrum of compound 17.

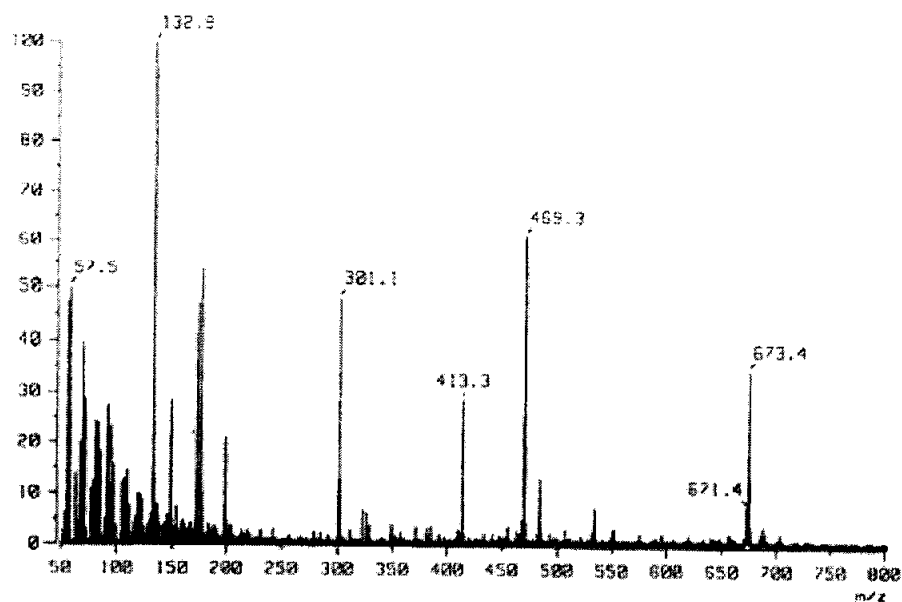


Fig. 21. LR-FABMS spectrum of compound 17.

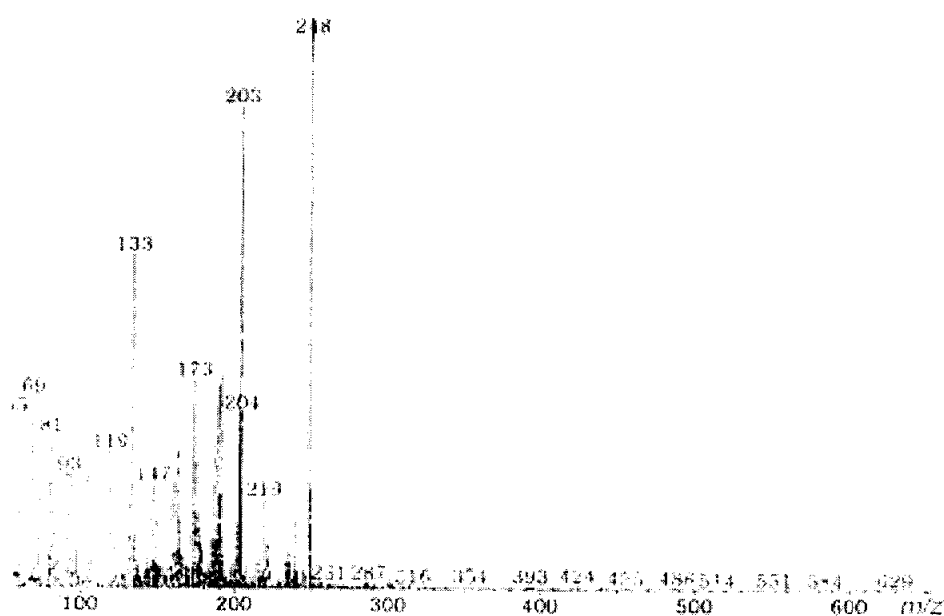
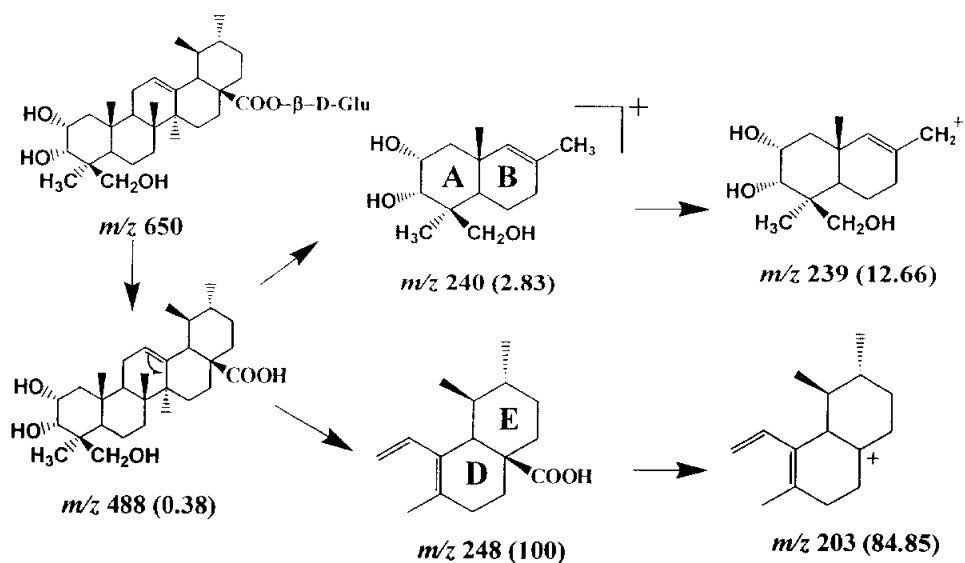
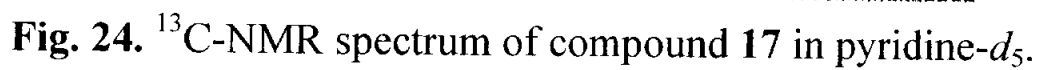
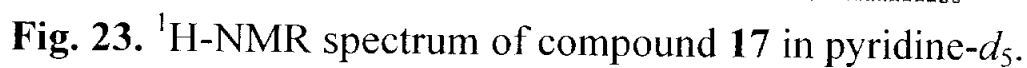


Fig. 22. EI-MS spectrum of compound 17.



Scheme 8. *retro* Diels-Alder fragmentation of compound 17.



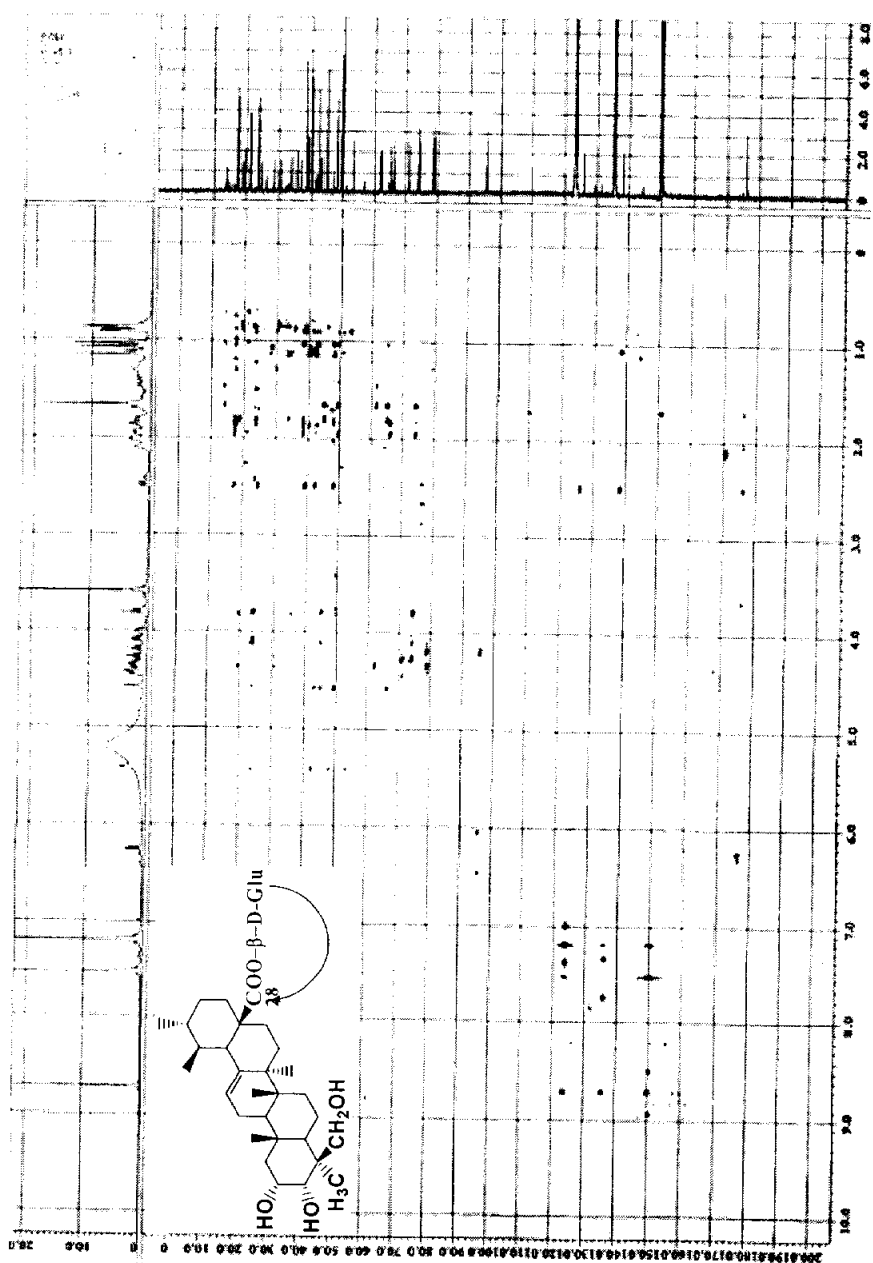


Fig. 25. HMBC spectrum of compound **17** in pyridine-*d*₅.

Table 4. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data (pyridine- d_5) of isolated triterpenoids **17** and **18** from *P. serrulata* var. *spontanea*

	17		18	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	0.81, d, $J=3.1$ 1.95, d, $J=3.4$	43.25 (CH_2)	0.84, d, $J=12.5$ 1.92, d, $J=2.0, 12.5$	43.15 (CH_2)
2	4.45, dt, $J=4.0, 11.6$	66.20 (CH)	4.44, dd, $J=2.0, 10.0$	66.30 (CH)
3	4.57, brd, $W_{1/2} = 6$	74.19 (CH)	4.58, d, $J=2.0$	74.23 (CH)
4		45.12 (C)		45.15 (C)
5	1.81, m	49.44 (CH)	1.84, d, $J=12.5$	49.53 (CH)
6	1.64, m	18.87 (CH_2)	1.65, m	19.11 (CH_2)
7	1.39, m	33.95 (CH_2)	1.65, m	33.96 (CH_2)
8		40.36 (C)		40.80 (C)
9	1.86, m	48.13 (CH)	2.08, d, $J=7.6$	47.87 (CH)
10		38.50 (C)		38.60 (C)
11	2.01, m	23.91 (CH_2)	2.10, m	24.35 (CH_2)
12	5.41, s	126.01 (CH)	5.51, s	128.37 (CH)
13		138.38 (C)		139.24 (C)
14		42.46 (C)		42.12 (C)
15	1.13, m	28.57 (CH_2)	1.20, m, 2.40, m	29.20 (CH_2)
16	1.93, m	24.61 (CH_2)	1.94, m	26.10 (CH_2)
17		48.32 (C)		48.64 (C)
18	2.49, d, $J=11.3$	53.26 (CH)	2.89, s	54.40 (CH)
19	0.87, d, $J=5.2$	39.27 (CH)		72.66 (C)
20	0.87, d, $J=5.2$	39.09 (CH)	1.30, m	42.12 (CH)
21	1.33, m	30.76 (CH_2)	1.20, m	26.70 (CH_2)
22	1.88, m	36.75 (CH_2)	1.84, m, 2.00, m	37.73 (CH_2)
23	1.65, s	23.77 (CH_3)	1.64, s	23.78 (CH_3)
24	3.80, dd, $J=10.9, 16.0$ 4.10, dd, $J=5.2, 16.0$	65.16 (CH_2)	3.81, d, $J=10.8$ 4.11, d, $J=11.1$	65.19 (CH_2)
25	1.03, s	17.27 (CH_3)	1.05, s	17.20 (CH_3)
26	1.14, s	17.57 (CH_3)	1.18, s	17.40 (CH_3)
27	1.11, s	23.67 (CH_3)	1.59, s	24.50 (CH_3)
28		176.20 (C)		177.08 (C)
29	0.86, d, $J=5.2$	21.20 (CH_3)	1.04, d, $J=6.3$	16.70 (CH_3)
30	0.89, d, $J=6.5$	17.31 (CH_3)	1.36, s	26.98 (CH_3)
Glu-1'	6.24, d, $J=8.0$	95.67 (CH)	6.26, d, $J=8.1$	95.83 (CH)
2'	4.18, m	74.00 (CH)	4.20, m	74.01 (CH)
3'	4.27, m	78.85 (CH)	4.28, m	78.90 (CH)
4'	4.35, m	71.16 (CH)	4.32, m	71.24 (CH)
5'	4.00, m	79.16 (CH)	4.02, m	79.24 (CH)
6'	4.37, dd, $J=4.6, 12.0$ 4.44, dd, $J=4.0, 11.6$	62.27 (CH_2)	4.45, dd, $J=2.0, 12.0$ 4.36, dd, $J=4.5, 12.0$	62.35 (CH_2)

3-3. Sphingolipid 화합물의 구조 결정 (8)

Sphingolipid는 sphingoid 기본골격에 amide가 결합된 비극성 aliphatic tail과 극성 headgroup으로 이루어진 화합물이다. Alkyl chain의 길이 (C_{14} - C_{22}), 불포화도, 이중결합의 위치, 4번 위치에 hydroxy group의 유무, alkyl chain의 branching 정도에 따라 70 여종 이상이 존재한다. Sphingoid 기본골격의 amino group은 대개 long-chain fatty acid로 치환되어있는데 이 fatty acid도 chain의 길이, 불포화도 등에 따라 다양하게 존재한다. Sphingonine의 기본골격의 C4-C5에 이중결합이 하나 더 존재하는 것을 ceramide라고 한다 (Merrill *et al.*, 1997; Vesper *et al.*, 1999). Sphingolipid는 세포막, 지단백, 그리고 또다른 지질을 풍부하게 함유하고 있는 구조인 피부 등에 존재한다. 대다수 식품, 특히 포유동물 기원의 식품의 구성성분이며 sphingomyelins, cerebroside, globosides, gangliosides, 혹은 sulfatides 등 다양한 sphingolipid가 존재한다. 식물에 존재하는 sphingolipid는 대부분 cerebroside로 하나 혹은 여러 개의 glucose, galactose, mannose와 inositol 등과 결합하고 있다 (Vesper *et al.*, 1999). 우유에서 분리된 sphingomyelin과 glycosphingolipid는 초기단계의 결장암을 억제하며, 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 처리된 암 마우스에서 adenocarcinomas (선암)과 adenomas (선종)의 비율을 저하시켰다는 보고가 있다 (Dillehay *et al.*, 1994; Schmelz *et al.*, 1996; 2000). 또한 동물실험에서 sphingolipid 공급군에서 혈장내 저밀도 지단백 (LDL) 콜레스테롤을 낮추고 고밀도 지단백 (HDL)을 증가시켰다고 한다 (Imaizumi *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1997)

이 화합물은 무정형 흰색 분말로 분리되었으며, LR-FABMS (Fig. 31a)에서 $[M+Na]^+$ ion peak가 m/z 866.6에서 나타났고, HR-FABMS (Fig. 31b)에서는 m/z

866.6697으로 측정되어, 계산치 (Calc. for 867.2611)와 DEPT spectrum (Fig. 28)과 비교하여 분자식을 $C_{48}H_{93}NO_{10}$ 으로 결정하였다. 1H -NMR (Fig. 26)과 ^{13}C -NMR data (Fig. 27)에서 2개의 terminal methyl groups [δ_H 0.87 (t-like, $J = 7.0$ Hz)]과 2개의 aliphatic long chain [δ_H 1.24 (CH_2) $_n$]의 signals을 확인하였고, 질소와 결합된 탄소(δ_C 51.67)와 amide carbonyl group (δ_C 175.6)의 signals의 관찰로 당의 존재를 추정할 수 있었다. 특히 δ_H 5.26 (H-2), δ_C 70.38 (C-1), 51.67 (C-2), 75.82 (C-3), 72.35 (C-4), 175.56 (C-1'), 72.40 (C-2')에 해당하는 sphingoid 골격의 화학적 이동치는 실제로 (2*S*,3*S*,4*R*)-phytosphingosine의 문헌치 (Kang *et al.*, 1999; Sang *et al.*, 2002)와 일치하여 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-[(2'*R*)-2'-hydroxypalmitoylamino]-8-octadecene-1,3,4-triol로 추정할 수 있었다. 그리고 HMBC (Fig. 29) spectrum에서 δ_H 4.2 (m, H-1a)은 δ_C 72.40 (C-2')과 당의 signal인 δ_H 4.8 (d, H-1'')은 δ_C 70.38 (C-1)과, δ_H 4.6 (m, H-1)은 δ_C 51.67 (C-2)과, δ_H 8.6 (NH)은 δ_C 175.56 (C-1')과 correlation하고 있는 것으로 보아 이들 구조가 인접해 있음을 추정할 수 있었다. 또한 이중결합을 이루는 탄소 C-8과 C-9은 이웃하는 탄소의 화학적 이동치가 δ_C 32-33 일때는 *trans*로, δ_C 27-28 일때는 *cis*로 확인할 수 있는데 (Stothers, 1972), 이 화합물의 경우 δ_C 27.5 (C-7')와 δ_C 27.9 (C-10')에서 관측됨으로서 *cis* 즉, Z-configuration함을 추정할 수 있었다. 그리고 1H - 1H COSY spectrum (Fig. 30)에서 amide group에 기인되는 δ_H 8.6이 δ_H 5.4 (H-2)와 cross-peak를 이루고 있으며, 특히 H-1의 δ_H 4.7과도 correlation을 형성하고 있는 것으로 나타났다. 이들 실험 data와 sphingoid moiety의 signal이 문헌치 (Sang *et al.*, 2002)와 일치하는 것으로 보아 이 sphingolipid의 구조는 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-[(2'*R*)-2'-hydroxypalmitoylamino]-8-octadecene-1,3,4-triol의 sphingoid 골격과 2개의 long chain fatty acid로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다. Kang 등 (Kang *et*

al., 1999)에 의해 제시된 *aralia cerebroside*와 fatty acid moiety에서 유사한 구조를 띄나 이 화합물은 *Z* configuration을 하고 있으며 $-(CH_2)$ -unit가 8개가 더 결합되어있는 것으로 사료된다. 다음은 *Aralia elata*에서 분리한 *cerebroside*인 *aralia cerebroside*이며 벚나무에서 분리한 sphingolipid와 유사한 구조이기 때문에 그 1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum을 제시하였다.

Aralia cerebroside: 1H -NMR (pyridine- d_5 , 300MHz) δ 0.86 (6H, t-like, $J = 6.8$ Hz, $2 \times Me$), 1.25 [s, $(CH_2)_n$], 3.85 (1H, m, H-5''), 3.98 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2''), 4.17 (2H, m, H-4, 3''), 4.27 (1H, m, H-3), 4.30 (1H, H-4''), 4.31 (1H, dd, $J = 5.1, 12.9$ Hz, H-6''), 4.46 (1H, dd, $J = 4.7, 10.5$ Hz, H-1), 4.55 (1H, m, H-2'), 4.69 (1H, dd, $J = 6.6, 10.5$ Hz, H-1), 4.93 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1''), 5.26 (1H, m, H-2), 5.45 (1H, dt, $J = 5.8, 15.6$ Hz, H-8), 5.52 (1H, dt, $J = 5.6, 15.6$ Hz, H-9), 8.53 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, N-H); ^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 75.5MHz) δ 14.3 (Me), 23.0, 25.8, 26.7, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 30.0, 32.1 (C-7), 33.0 (C-10), 33.3, 33.8, 35.6 (all CH_2), 51.7 (C-2), 62.6 (C-6''), 70.5 (C-1), 71.4 (C-4''), 72.4 (C-4, 2'), 75.1 (C-2''), 75.9 (C-3), 78.4 (C-3''), 78.6 (C-5''), 105.6 (C-1''), 130.6 (C-9), 130.8 (C-8), 175.6 (C-1') [Kang *et al.*, 1999].

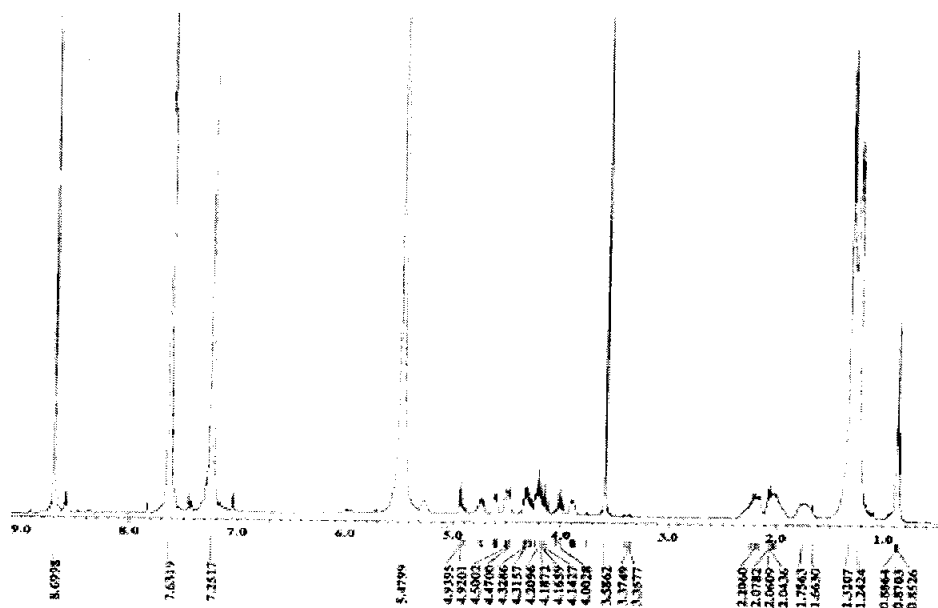


Fig. 26. ^1H -NMR spectrum of compound **8** in pyridine- d_5 .

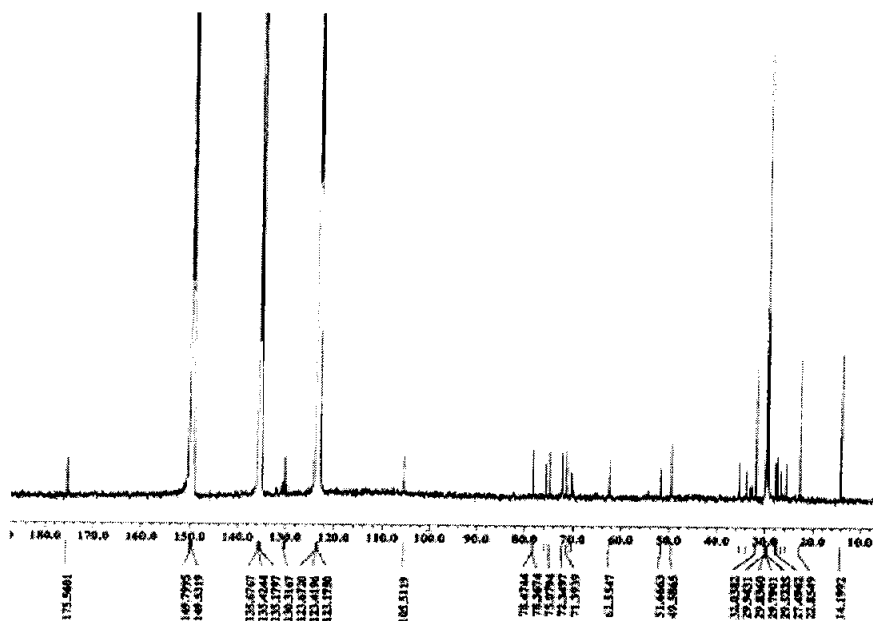


Fig. 27. ^{13}C -NMR spectrum of compound **8** in pyridine- d_5 .

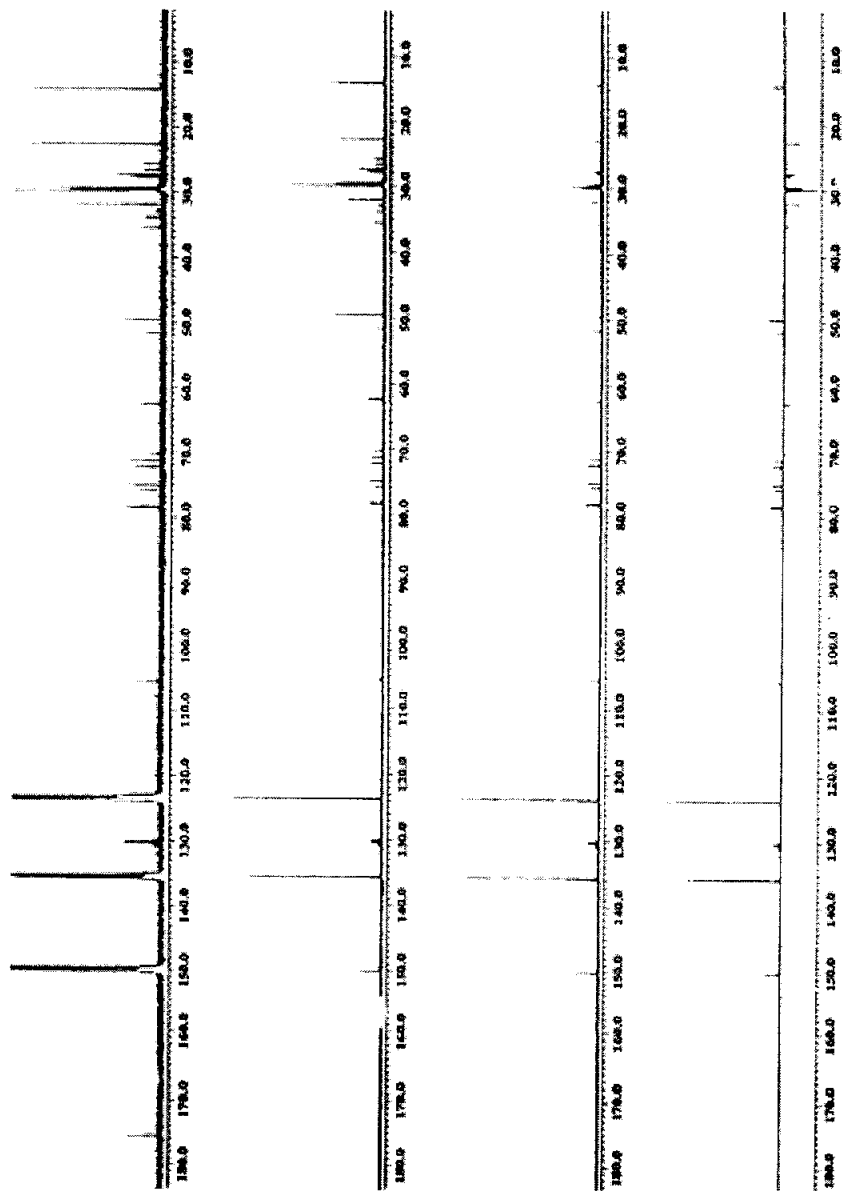


Fig. 28. DEPT spectrum of compound 8 in pyridine- d_5 .

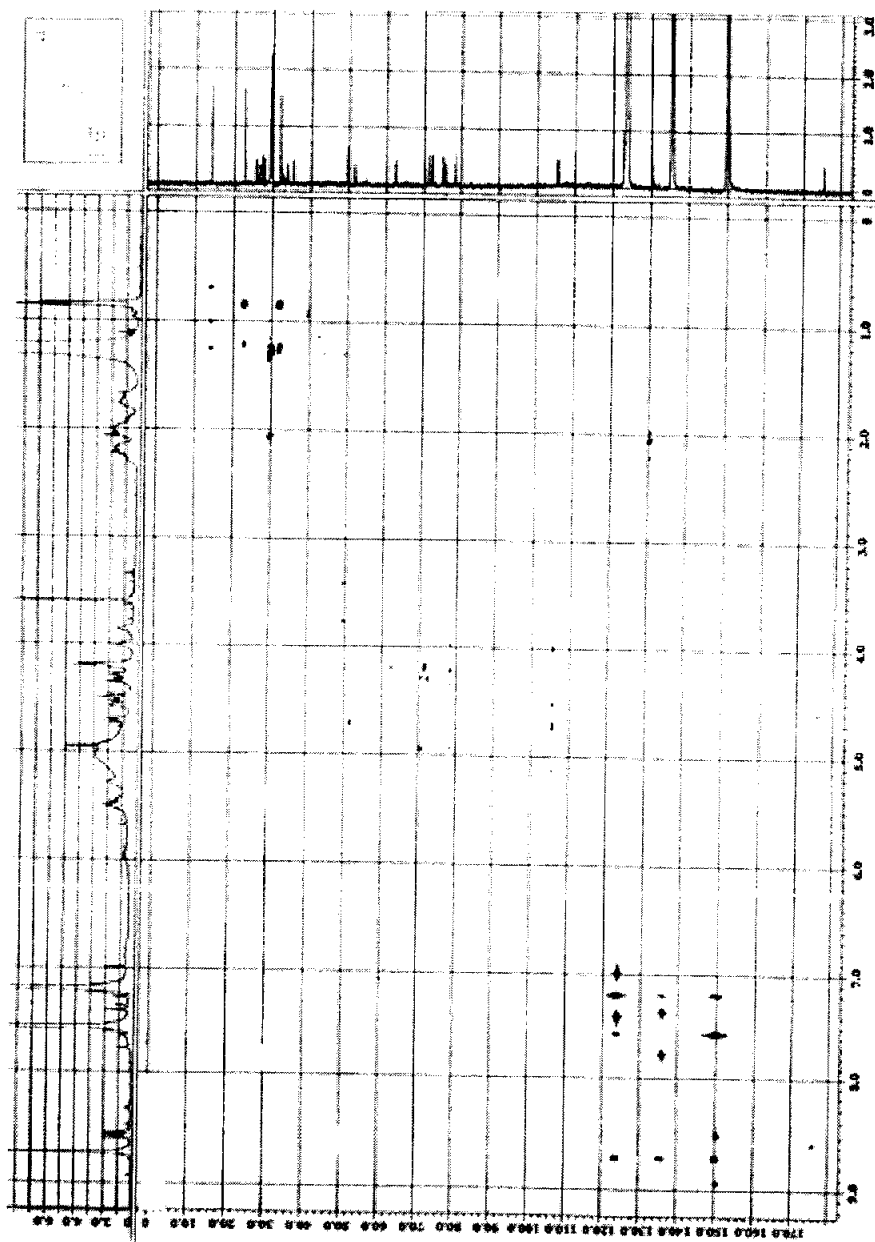


Fig. 29. HMBC spectrum of compound **8** in pyridine- d_5 .

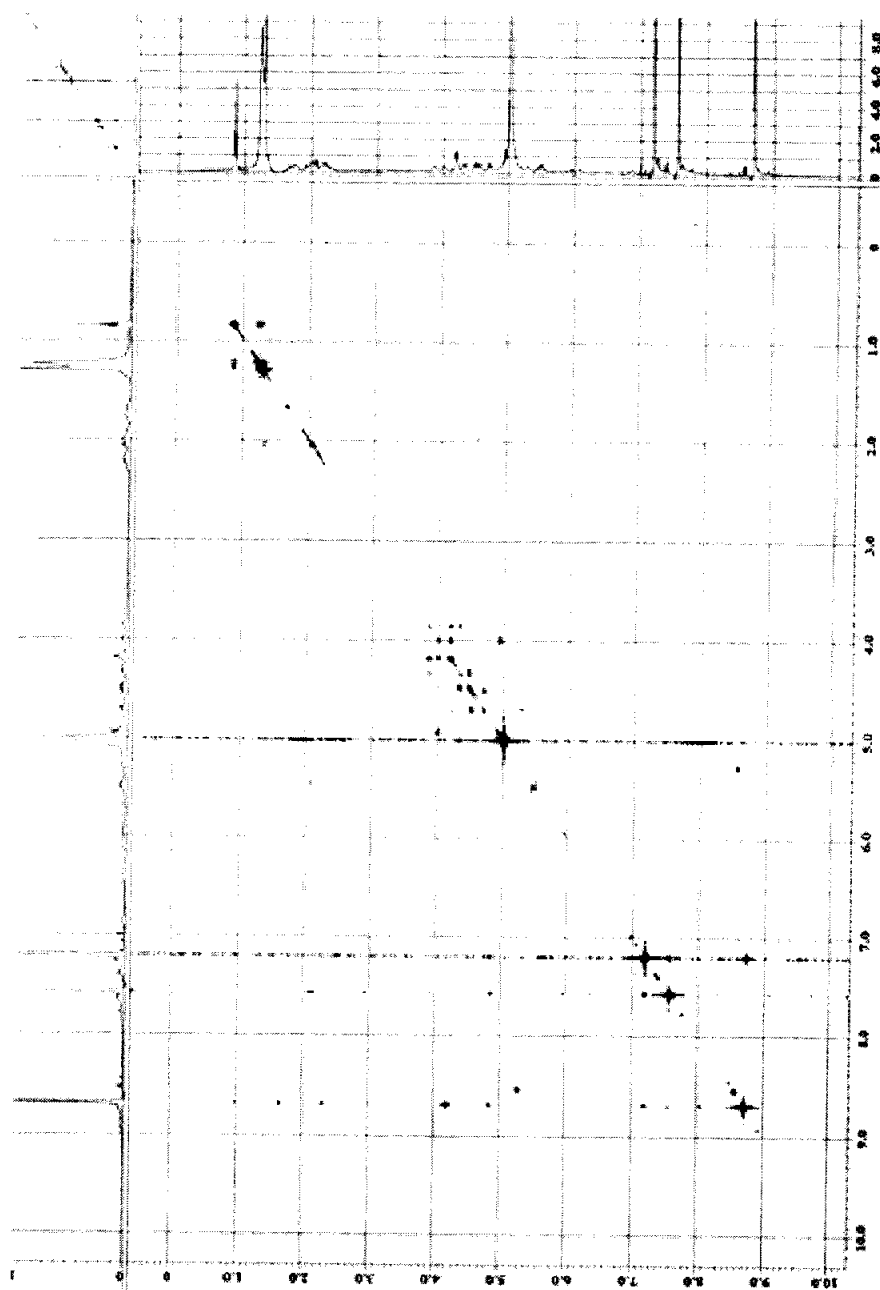


Fig. 30. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound **8** in pyridine- d_5 .

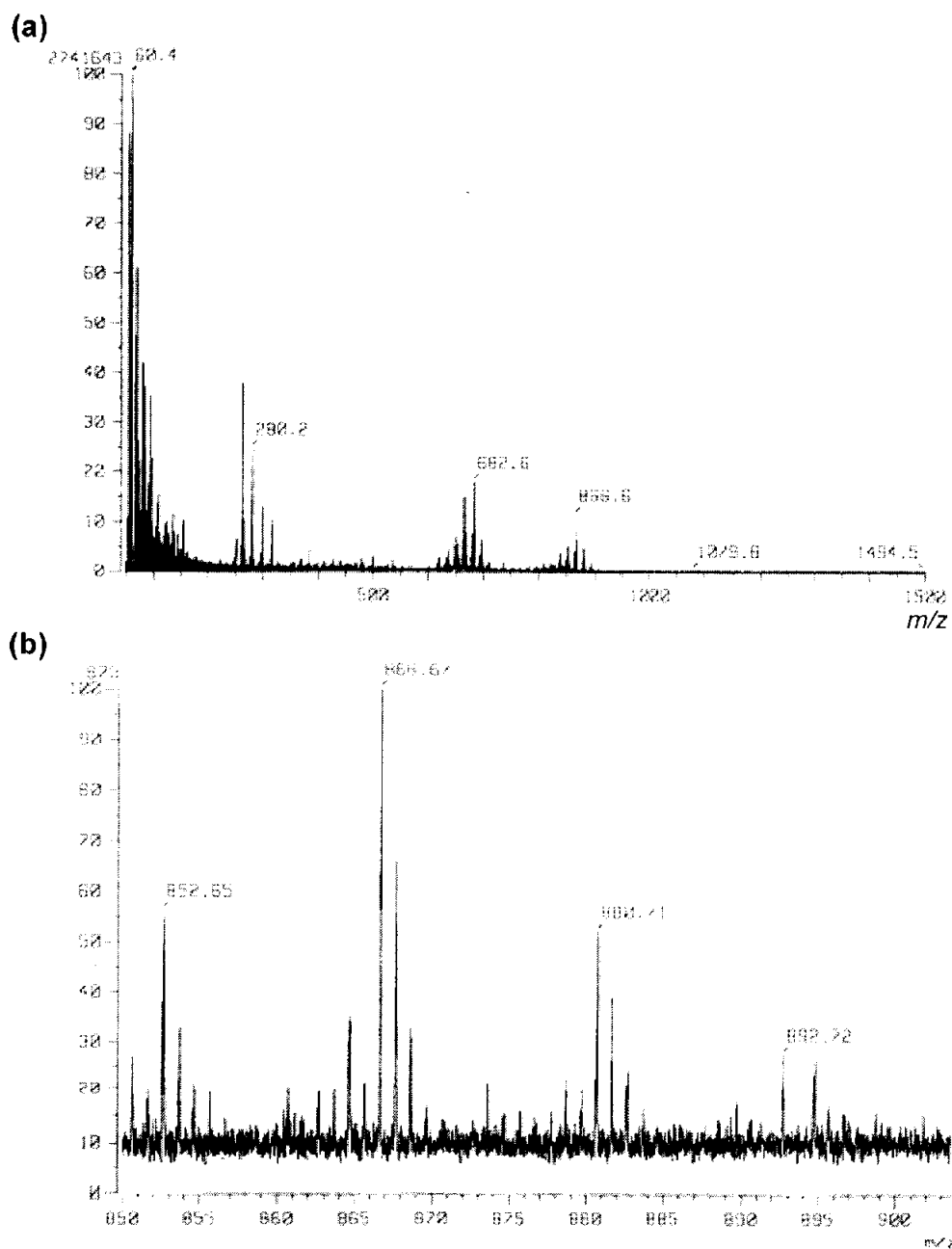


Fig. 31. FABMS spectrum of compound **8**
(a) LR- (b) HR-FABMS

3-4. Phenol성 화합물의 구조 결정 (19)

이 화합물은 무정형 흰색 분말로 분리되었다. LR-(Fig. 38a)과 HR-FABMS spectrum (Fig. 38b)에서 m/z 453.1162의 $[M + Na]^+$ peak가 관찰되었고, ^{13}C NMR (Fig. 34)과 DEPT data (Fig. 35)에 의해 분자식을 $C_{22}H_{22}O_9$ 으로 결정하였다. UV spectrum (Fig. 32)에서 NaOMe 첨가시 264 nm (3.96)의 흡수대가 255 nm (4.12)로 저자장 이동한 것으로 보아 산의 존재를 확인할 수 있었다. 1H 과 ^{13}C NMR spectra (Table 5)는 하나의 hydroxy cinnamic acid, glycosidic group과 benzoyl group에 기인된 signals을 확인할 수 있었다. 1H NMR spectrum (Fig. 33)에서 δ_H 5.95 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-8), 6.91 (1H, dd, $J = 7.5$ Hz, H-5), 7.03 (1H, dd, $J = 7.5$ Hz, H-4), 7.11 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-3), 7.24 (1H, d, $J = 12.6$, H-7), 7.47 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6)에서 *o*-hydroxy cinnamic acid 유도체의 특징적인 화학적 이동치가 나타났으며, ^{13}C NMR spectrum (Fig. 34)에서도 이에 상응하는 δ_C 171.48, 157.20, 139.33, 132.30, 131.80, 127.77, 123.70, 122.58, 117.59의 signals이 나타났다. 또한 C7-C8 double bond는 J 치 ($J = 12.6$ Hz)가 작기 때문에 *cis*-configuration함으로 추정할 수 있었다. 1H NMR spectrum (Fig. 33)에서 δ_H 4.93 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)에서 당의 존재와, δ_H 7.45 (2H, dd, $J = 7.6$ Hz, H-3'', H-5''), 7.61 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-4''), 8.01 (2H, d, $J = 7.9$ Hz, H-2'', H-6'')에서 benzoyl group의 존재를 확인할 수 있었다. ^{13}C NMR spectrum에서 당의 methylene 탄소 (C-6')가 δ_C 66.09로 저자장 이동하고, 이웃하는 탄소 (C-5')가 δ_C 72.72로 고자장 이동한 것으로 보아 benzoyl group이 당의 6번 탄소에 결합되어 있음을 알 수 있었다. HMQC (Fig. 36)와 HMBC spectrum (Fig. 37)에서 benzoyl carbonyl group (δ_C 168.55)과 H-6' (δ_H 4.43, δ_H 4.69) 그리고 C-2 (δ_C 157.20)와 H-1' (δ_H 4.93) 사이에 나타나는 correlation으로 benzoyl group이 β -glucopyranose의 C-6'과 결합하고 있음을 추정할 수 있었다. 이상의 분광학적 방법을 통해 이 화합물은 2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl *o*-(*Z*)-coumaric acid로 동정하였으며, 천연에서 처음으로 분리된 신규화합물이다 (Table 5).

Table 5. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data (CD_3OD) of phenolic compound **19** from *P. serrulata* var. *spontanea*

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

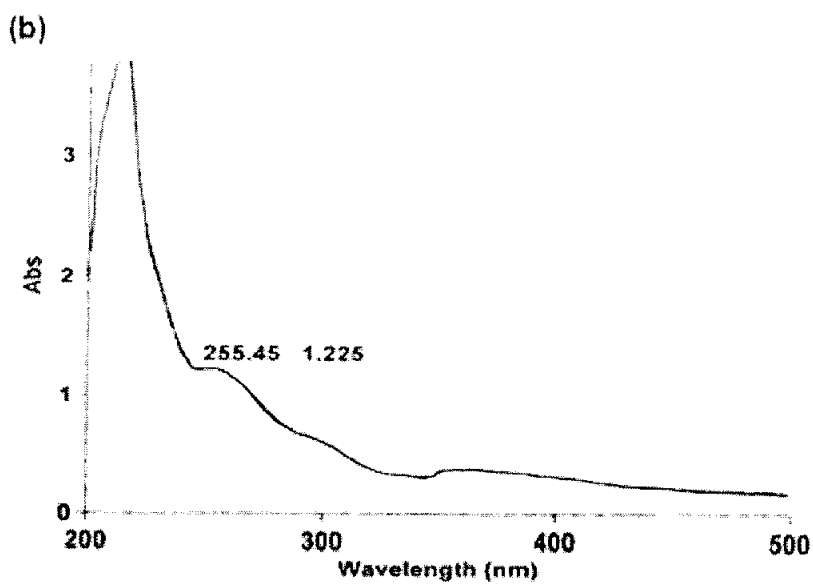
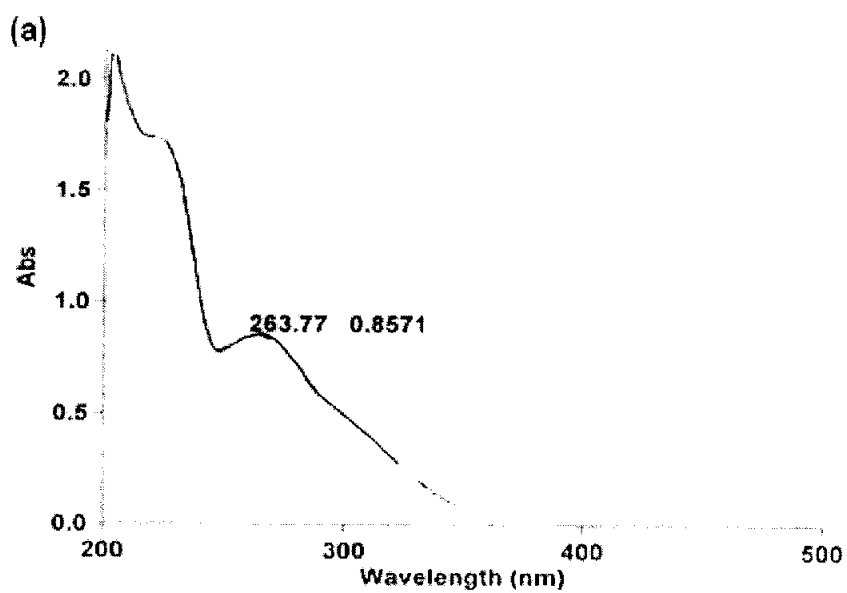


Fig. 32. UV spectrum of compound **19**
(a) MeOH (b) MeOH + NaOMe

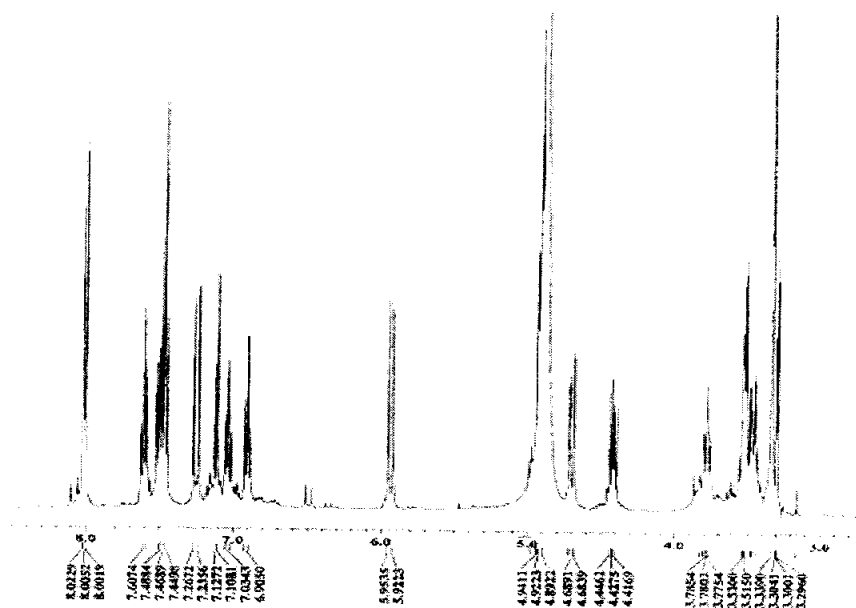


Fig. 33. ^1H -NMR spectrum of compound **19** in CD_3OD .

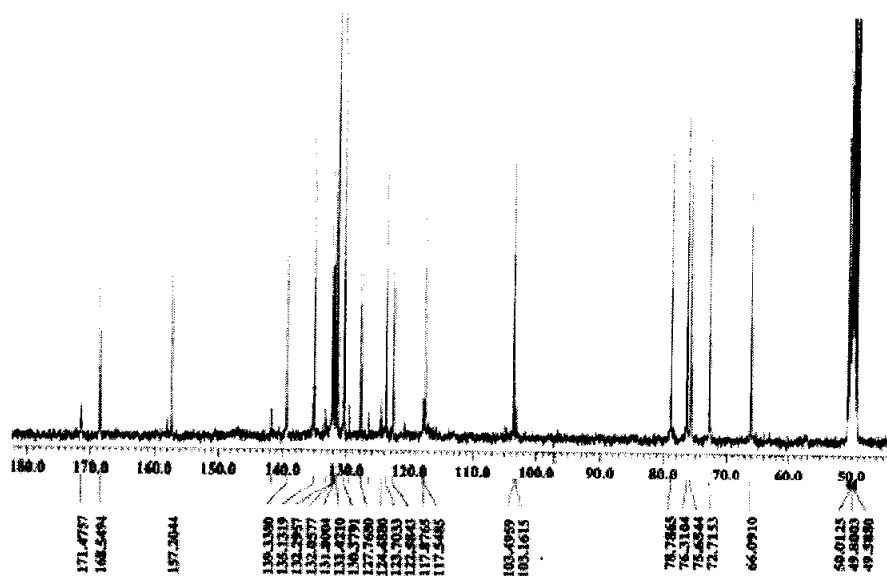


Fig. 34. ^{13}C -NMR spectrum of compound **19** in CD_3OD .

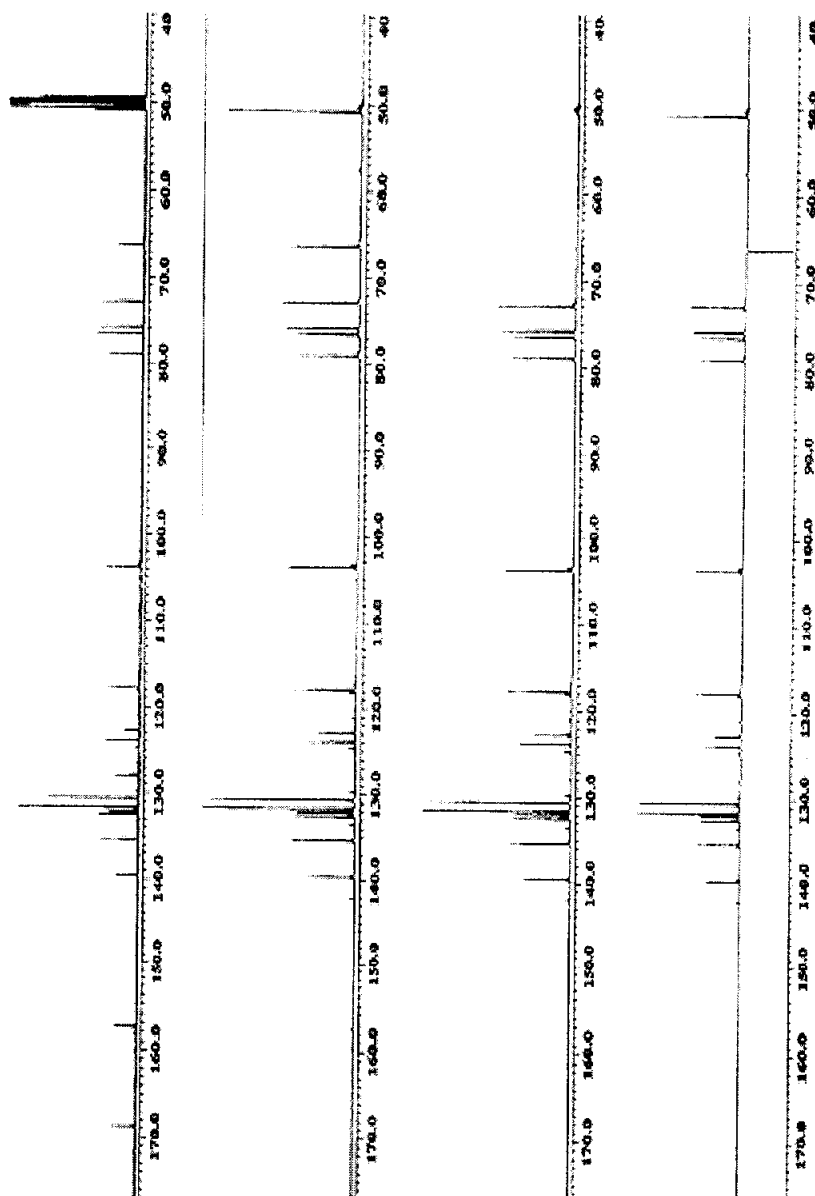


Fig. 35. DEPT spectrum of compound 19 in CD₃OD.

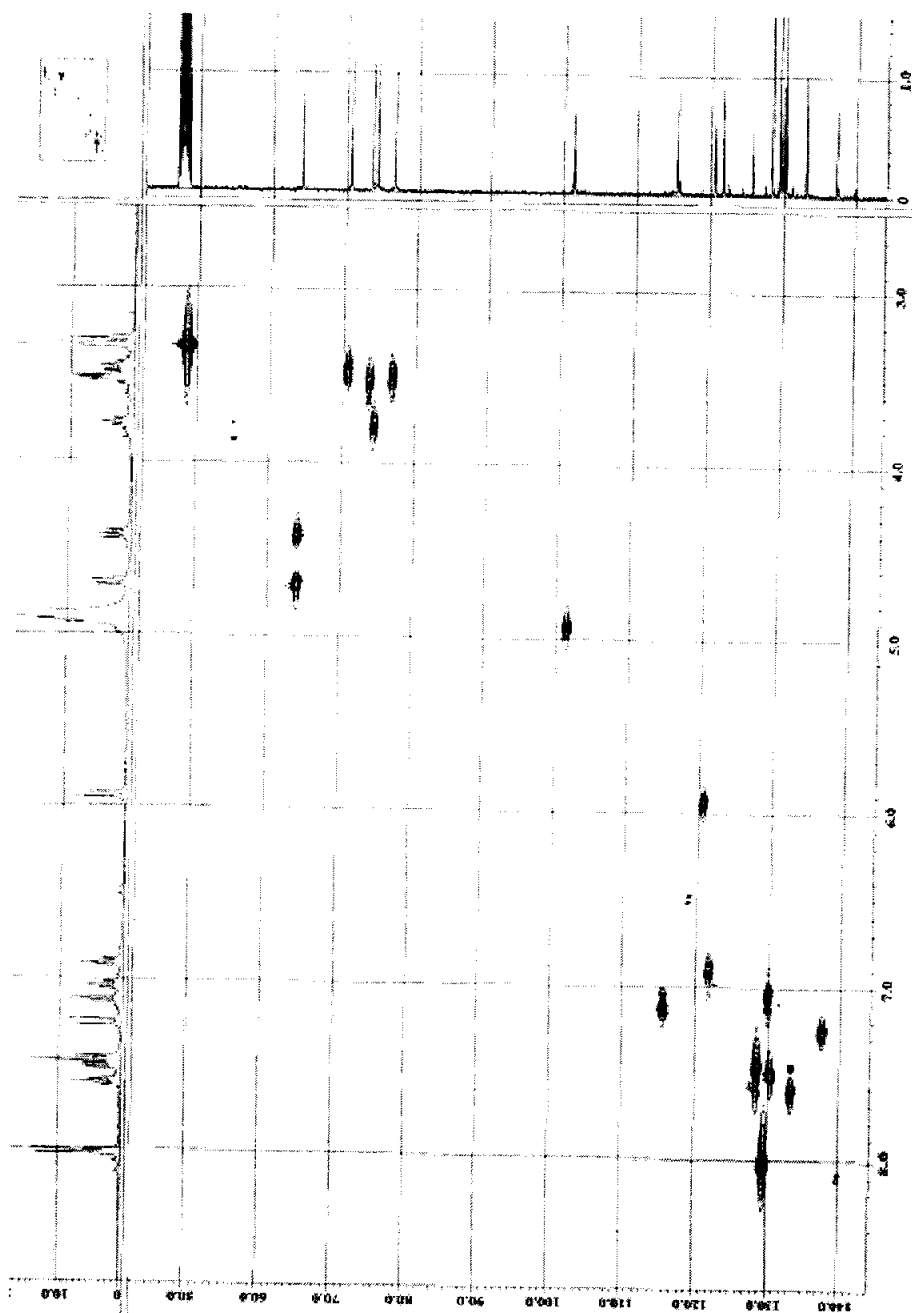


Fig. 36. HMQC spectrum of compound **19** in CD₃OD.

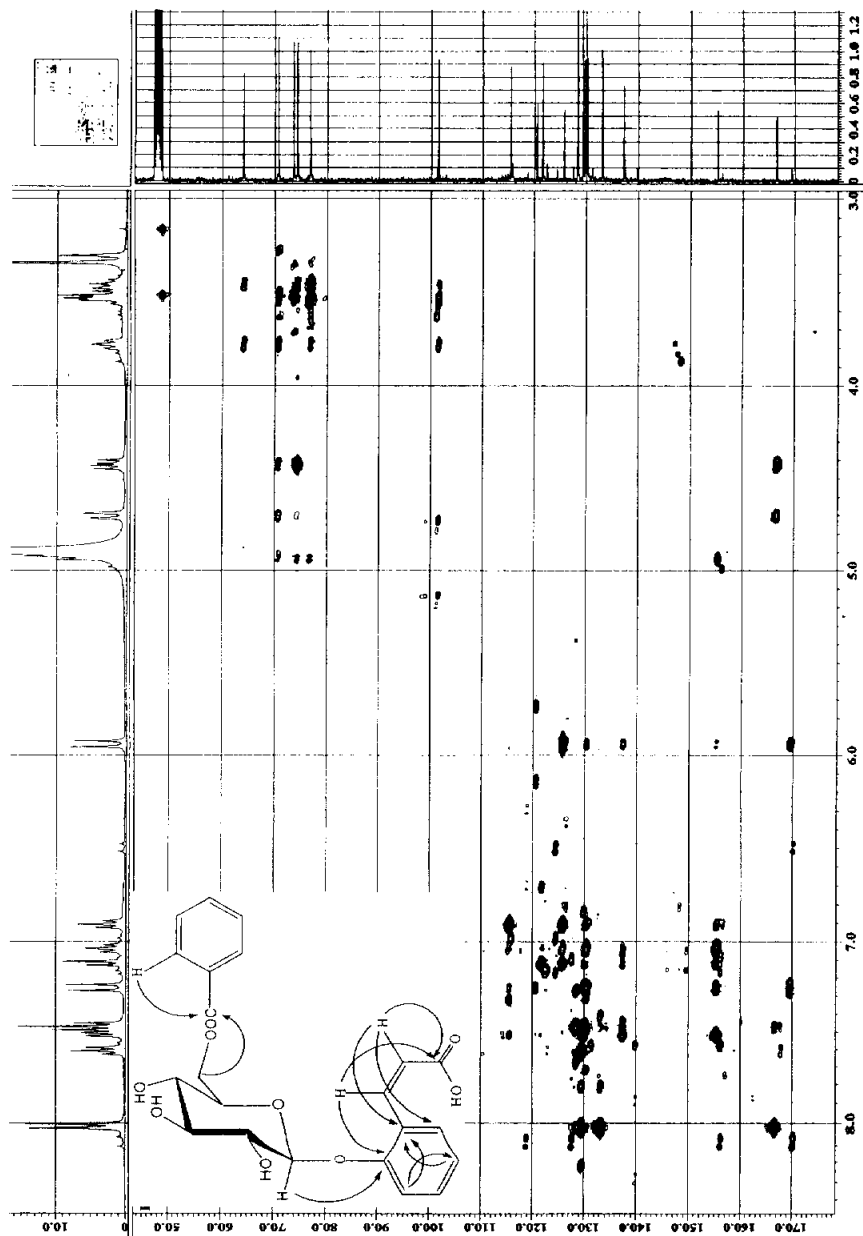


Fig. 37. HMBC spectrum of compound **19** in CD_3OD .

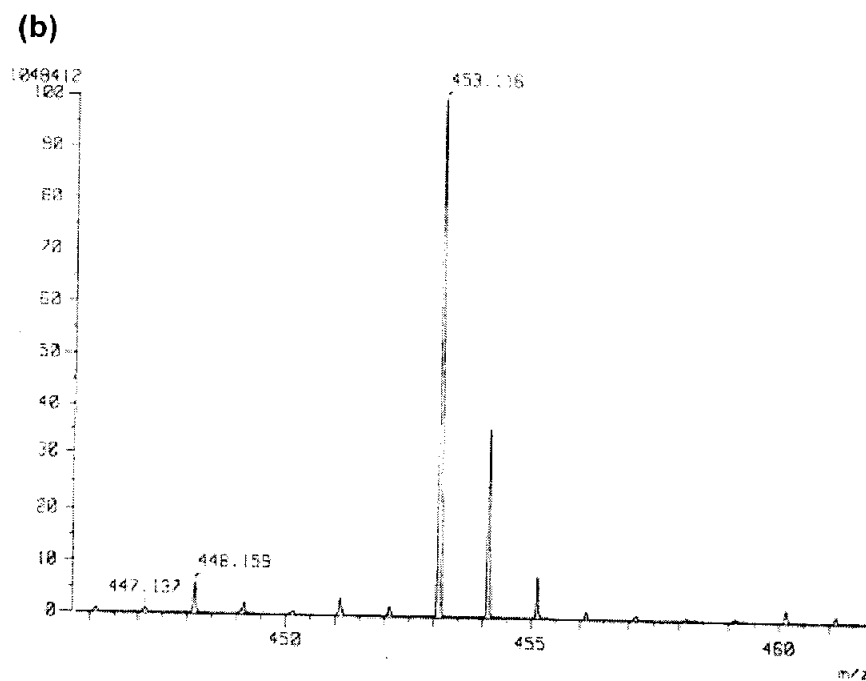
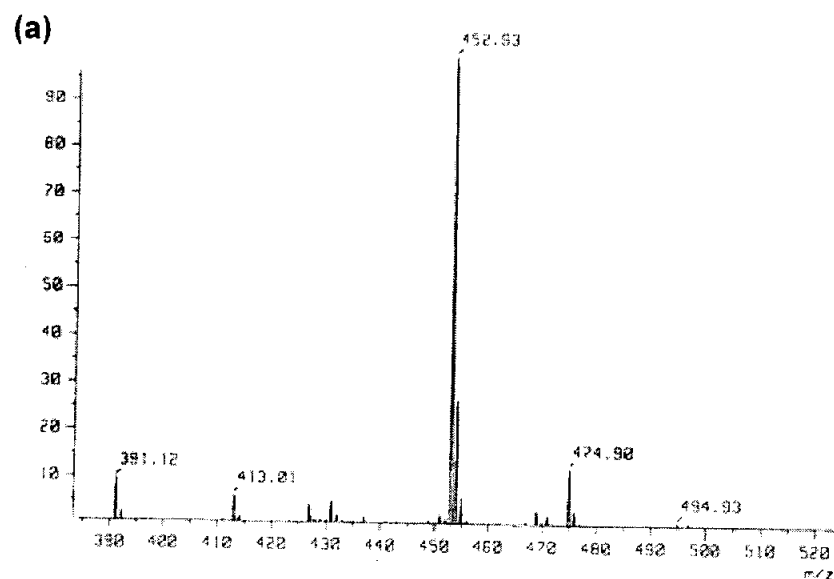


Fig. 38. FABMS spectrum of compound **19**
(a) LR- (b) HR-FABMS

4. 분리된 화합물들의 항산화 활성

DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO^- 소거활성이 높게 나타난 뽕나무 EtOAc 획분을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, Sep-Pak C18 cartridge, 그리고 RP 18 column chromatography를 수행하여 항산화활성 성분을 분리하였다. 13 종의 flavonol 화합물 (1, 2, 5, 7, 9, 11-16, 20, 21)과 6 종의 triterpenoid 화합물 (3, 4, 6, 10, 17, 18), 1 종의 sphingolipid (8) 와 phenol성 화합물 (19)을 각각 분리, 정제하였으며, 그 중에서 6 종의 flavonol 화합물인 quercetin (5), kaempferol 3-*O*- α -L-arabinofuranoside (9), kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranoside (12), kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (15), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (20) kaempferol 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (21)과 5종의 isoflavone 화합물인 prunetin (1), genistein (2), prunetin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (7), prunetin 5-*O*- β -D-glucopyranoside (11), genistin (14), 6종의 triterpenoid 화합물인 ursolic acid (3), 2 α -hydroxyursolic acid (4), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6), 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10), 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (17), and 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (18), 그리고 하나의 phenol성 화합물인 2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl *o*-(*Z*)-coumaric acid (19)를 대상으로 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO^- 소거활성을 평가하였다.

4-1. Flavonoid 화합물과 phenol성 화합물의 항산화활성

6종의 flavonol 화합물과 5종의 isoflavone 화합물, 그리고 하나의 phenol성 화합물의 항산화활성 실험결과를 Table 7로 나타내었다. Quercetin (5)과 그 배당체인 quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (20)은 DPPH radical 소거활성이 각각 IC_{50} 3.54 μM 와 4.63 μM 로 대조군인 L-ascorbic acid의 11.50 μM 에 비해 2 배 정도 활성이 강하게 나타났다. 또한 ONOO^- 에 대한 소거 활성 역시 IC_{50}

$0.93 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 와 $1.08 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 로 대조군인 penicillamine의 $3.20 \pm 0.36 \mu\text{M}$ 에 비해 약 3배의 활성을 보였다. Quercetin은 구조내 catechol을 가지고 있기 때문에 (Okawa *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1996, Haenen *et al.*, 1997), peroxy radical에 대해서도 H-donor로 작용하여 항산화활성을 나타내는데 (Torel *et al.*, 1986), 본 실험에서도 free radical 소거 활성 (Burda and Oleszek, 2001)에 의해 항산화활성을 나타낸 것으로 여겨진다. 그러나 활성산소종 억제실험계에서는 $40 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 이 두 화합물은 양성대조군인 Trolox의 활성에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었다. 그리고 4종류의 kaempferol 배당체들은 3가지 실험계에서 다소 낮은 활성을 나타내었는데 이는 활성에 중요한 영향을 미치는 3번 위치의 hydroxy group에 모두 당에 치환된 배당체이기 때문으로 여겨진다 (Heijnen *et al.*, 2001; Bor *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1997; Foti *et al.*, 1996). Isoflavone 화합물인 genistein (2)과 그 배당체인 genistin (14)는 DPPH radical과 ONOO⁻에 대한 소거 활성을 다소 나타내었고, genistin (14)의 경우 당의 결합으로 genistein (2)의 활성보다 약간 낮게 나타났다. 특히 isoflavonoid의 DPPH radical 소거활성은 3번 위치 hydroxy group가 없기 때문에 다른 종류의 flavonoid 화합물보다 약하게 나타난다 (Okawa *et al.*, 2001). 그러나, 또다른 isoflavone 화합물인 prunetin (1), prunetin 4'-O-β-D-glucopyranoside (7), prunetin 5-O-β-D-glucopyranoside (11)은 사용한 항산화 실험계에서 활성을 나타내지 않았다. Isoflavonoid의 항산화활성은 실제로 liposomal system에서 대사를 받아 coumestrol이나 equol 되면 H-donor로 작용하여 금속이온에 의한 peroxy radical 혹은 free radical을 소거하며, 특히 4' 위치의 hydroxy group이 중요하게 작용한다고 한다 (Arora *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1998). 이외에도 isoflavonoid는 ROS에 의한 지질과산화를 억제한다고 한다 (Toba and Shirataki, 1999). Phenol성 화합물인 2-O-β-(6'-benzoyl)-glucopyranosyl o-(Z)-coumaric acid (19)은 ONOO⁻ 실험계에서 $\text{IC}_{50} 6.78 \pm 0.35 \mu\text{M}$ 로 좋은 활성을 보였는데, 이는 화합물 구조내 hydroxycinnamic

acid을 가지고 있기 때문인 것으로 여겨지며, 특히 이러한 구조들은 ONOO⁻에 대한 소거 활성이 보고된 바 있다 (Foley *et al.*, 1999; Natella *et al.*, Cuvelier *et al.*, 1992; Pannala *et al.*, 1998; Ketsawatsakul *et al.*, 2000).

Table 6. Antioxidant activities of flavonoids and a phenolic compound isolated from *P. serrulata* var. *spontanea*

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

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

4-2. Triterpenoid 화합물의 항산화활성

벗나무에서 분리한 6종의 triterpenoid 화합물에 대한 항산화활성 실험결과를 Table 8에 요약하였다. 실험에 사용된 triterpenoid 화합물은 고농도에서도 DPPH radical scavenger로서 활성을 나타내지 않았으나, 활성산소종 억제 실험계에서는 높은 활성을 나타내었고, 그 상대적 활성 정도는 2 α -hydroxyursolic acid (**4**) > 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**6**) $\geq$ ursolic acid (**3**) > Trolox (as positive control) > 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside (**17**) $\geq$ 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**10**) $\geq$ 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-O- β -D-glucopyranoside (**18**)로 나타났다. 또한 compound **6**과 **18**은 각각 IC₅₀ (50 % inhibition concentration) 4.90 $\pm$ 0.38 μ M와 IC₅₀ 6.88 $\pm$ 0.46 μ M로 강한 ONOO⁻ 소거활성을 나타내었으며, 이는 양성 대조군인 penicillamine의 IC₅₀ 5.11 $\pm$ 0.23 μ M에 상응하는 활성이었다. 그리고 compound **10**과 **17**은 각각 IC₅₀ 25.18 $\pm$ 2.68 μ M과 82.05 $\pm$ 2.80 μ M로 ONOO⁻ 소거활성을 나타내었으나, 반면 compound **3**과 **4**는 ONOO⁻ 소거활성을 나타내지 않았다.

Triterpenoid 화합물은 주로 항바이러스, 세포독성에 대한 연구가 주로 이루어져왔으나 (Poehland *et al.*, 1987; Aquino *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1996; Kashiwada *et al.*, 1998), 근자에 이르러 버섯에서 분리한 4환성 triterpenoid 화합물과 달맞이꽃 등에서 분리한 몇 종류의 triterpenoid 화합물의 항산화활성이 보고되고 있다 (Zhu *et al.*, 1999; Song and Yen, 2002; Hamburger *et al.*, 2002). 또한 dihydro- γ -pyronyl-triterpenoid, 즉 chromosaponin I은 수용성 radical initiator 인 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride가 유도하는 soybean phosphatidylcholine의 산화를 억제한다고 한다 (Tsujino *et al.*, 1994). 이러한 지질과산화에 대한 triterpenoid 화합물의 높은 억제활성은 이들 화합물의 지용성에 의한 것으로 보고되고 있다 (Song and Yen, 2002).

Table 7. Antioxidant activities of triterpenoids isolated from *P. serrulata* var. *spontanea*

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

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

5. Flavonoid 화합물의 구조와 ONOO⁻ 소거활성 상관관계

ONOO⁻는 자극을 받은 대식세포, 호중구, 내피세포에서 $\cdot\text{O}_2^-$ 와 NO $\cdot$ 의 상호반응에 의해 생성되며, 동맥경화성 심장질환, 급성폐렴, 만성 염증시 *in vivo*에서도 되어 상피세포와 적혈구를 손상시키며, 그리고 퇴행성 질환과의 연관성에 대한 보고가 있다 (Hippeli and Elstner, 1997). 이러한 ONOO⁻의 산화적 손상에 대한 flavonoid 화합물의 보호 활성에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. Flavonoid 화합물에 대한 ONOO⁻ 소거활성은 이미 Haenen 등 (1997)에 의해 연구된 바 있으며, 이들은 flavonoid의 hydroxy group, 특히 3',4'-dihydroxy catechol group이 ONOO⁻ 소거활성에 기여하고 있다고 밝혀내었다. 그러나 제한적인 flavonoid 화합물, 특히 flavonol 화합물만을 실험에 사용하였기 때문에 구조-활성 상관관계를 추론하기 위해서는 더 많은 flavonoid로 실험할 필요성이 제기되었다. 이에 본 실험실에서는 수종의 flavone 화합물, flavonol 화합물, flavanone 화합물, flavan 화합물을 대상으로 직접적인 ONOO⁻ 소거활성을 살펴보았다.

5-1. Flavonol 화합물의 ONOO⁻ 소거활성

활성실험에 사용한 모든 flavonoid 화합물은 농도 의존적으로 소거활성을 나타내었다 (Table 8, Fig. 39). Flavonol (IC₅₀)의 소거활성 정도는 quercetin $\geq$ quercetin 3-O-glycosides > morin > galangin $\geq$ kaempferol 순으로 측정되었다. 이러한 결과로서 flavonol의 C-3 hydroxy group이 소거활성에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다 (Heijnen *et al.*, 2001). 구조-동력학적 관점에서 radical 소거 활성물질은 free radical에게 전자나 수소를 제공하거나, 전자쌍을 받아서 활성을 나타내는데, C-3 위치의 free hydroxy group은 4-keto group과 수소결합을 형성시킴으로써 free radical 소거활성을 증진시킨다고 한다 (William *et al.*, 1975; Heijnen, C. G. M. *et al.*, 2001). 반면, B-ring의 C-4'

위치에 hydroxy group을 가진 galangin과 kaempferol은 다소 약한 활성을 나타내었다. Apigenin, chrysin과 같이 C-3 위치에 hydroxy group이 없는 화합물은 소거활성을 나타내지 않았다. Fisetin, quercetin, isorhamnetin와 같이 kaempferol C-4' 위치의 hydroxy group에 *ortho* hydroxy group (*o*-dihydroxy group)이나 methoxy group이 첨가되면, flavonol의 소거활성이 증진되었다. 이렇게 *o*-dihydroxy group (catechol skeleton)이 존재할 경우 그 효과는 quercetin의 C-3 hydroxy group이 glycosylation된 quercetin 3-*O*-glycoside와 비슷하게 측정되었으나, *o*-dihydroxy group이 존재하지 않을 경우, glycosylation과 methylation 됨에 따라 그 활성은 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

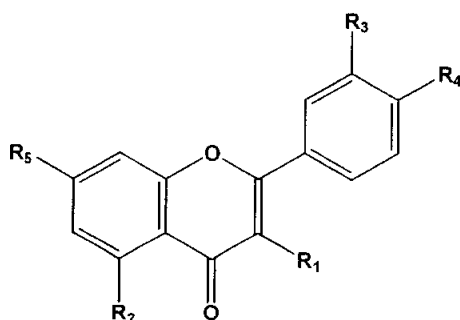
Table 8. IC₅₀ values for the ONOO⁻ scavenging effect of flavonols

Compounds	IC ₅₀ values ^a (μM)		
Fisetin	1.34	±	0.24
Galangin	3.37	±	0.99
Galangin 3- <i>O</i> -methylether	N ^b		
Isorhamnetin 3- <i>O</i> -galactoside	2.08	±	0.61
Kaempferol	4.35	±	0.27
Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	N		
Kaempferol 7- <i>O</i> -glucoside	N		
Kaempferide	N		
Quercetin	0.93	±	0.12
Quercetin 3- <i>O</i> -arabinoside	1.25	±	0.17
Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside	0.96	±	0.14
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside	1.08	±	0.06
Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside	0.97	±	0.14
Penicillamine ^c	2.91	±	0.64

^a IC₅₀ value ± SE obtained from three separate experiments are shown.

^b N, no effect up to a concentration of 10 μM.

^c penicillamine used as positive control.



Fisetin	$R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$
Galangin	$R_1 = R_2 = R_5 = \text{OH}, R_3 = R_4 = \text{H}$
Galangin 3- <i>O</i> -methylether	$R_1 = \text{OMe}, R_2 = R_5 = \text{OH}, R_3 = R_4 = \text{H}$
Isorhamnetin 3- <i>O</i> -galactoside	$R_1 = \text{O-Gal}, R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_3 = \text{OMe}$
Kaempferol	$R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$
Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	$R_1 = \text{O-Glu}, R_3 = \text{H}, R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
Kaempferol 7- <i>O</i> -glucoside	$R_1 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, \text{OH}, R_5 = \text{O-Glu}$
Kaempferide	$R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OMe}$
Quercetin	$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
Quercetin 3- <i>O</i> -arabinoside	$R_1 = \text{O-Ara}, \text{H}, R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside	$R_1 = \text{O-Gal}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside	$R_1 = \text{O-Glu}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside	$R_1 = \text{O-Rut}, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}$

Fig. 39. Chemical structures of flavonols used in ONOO^- scavenging test.

5-2. Flavone 과 flavan 화합물의 ONOO⁻ 소거활성

실험에 사용한 flavone 과 flavan 화합물의 종류와 ONOO⁻ 소거활성을 각각 Table 9 와 Fig. 40 과 41 에 나타내었다. 이 두 종류의 화합물이 나타내는 소거활성 기전은 flavonol 과 유사하였으며, A-ring 혹은 B-ring 에 *ortho*-hydroxy group 가 존재하였을 때 높게 나타났다. *o*-Dihydroxy functional group 을 가지는 flavone 인 luteolin 과 baicalin 은 각각 $1.43 \pm 0.27 \mu\text{M}$, $1.44 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 으로 대조군인 penicillamine 의 $2.91 \pm 0.64 \mu\text{M}$ 에 비해 약 2 배 강한 활성을 나타내었다. 또한 Flavan 화합물인 catechin 도 $1.16 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 에서 강력한 소거활성을 보이는 것으로 보아 4-oxo functional group 은 소거활성에 관여하지 않음을 알 수 있었다.

Table 9. IC₅₀ values for the ONOO⁻ scavenging effect of flavones and a flavan^a

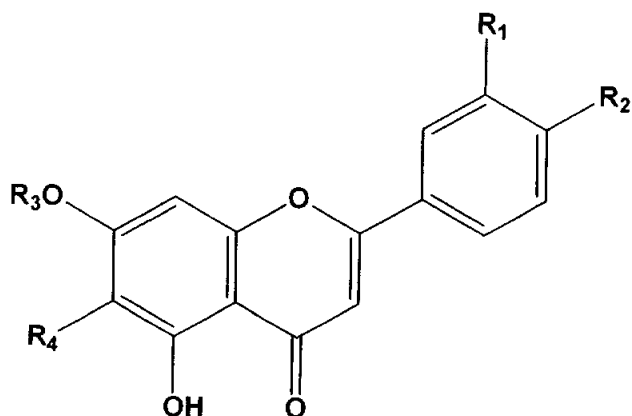
Compounds	IC ₅₀ values ^b (μM)
Acacetin	N ^c
Acacetin 7- <i>O</i> -rutinoside	N
Apigenin	N
Apigenin 7- <i>O</i> -neohesperidose	N
Baicalin	1.44 ± 0.12
Chrysin	N
Luteolin	1.43 ± 0.27
Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	1.81 ± 0.13
Catechin	1.16 ± 0.06
Penicillamine ^d	2.91 ± 0.64

^a The flavan tested was catechin.

^b IC₅₀ value $\pm$ SE obtained from three separate experiments are shown.

^c N, no effect up to a concentration of $10 \mu\text{M}$.

^d penicillamine used as positive control.



Acacetin	$R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = R_4 = H$
Acacetin 7- <i>O</i> -rutinoside	$R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = Rut, R_4 = H$
Apigenin	$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = R_4 = H$
Apigenin 7- <i>O</i> -neohesperidose	$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = neohesperidose, R_4 = H$
Baicalin	$R_1 = R_2 = H, R_3 = Glucuronide, R_4 = OH$
Chrysin	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
Luteolin	$R_1 = R_2 = OH, R_3 = R_4 = H$
Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	$R_1 = R_2 = OH, R_3 = Glu, R_4 = H$

Fig 40. Chemical structures of flavones used in $ONOO^-$ scavenging test.

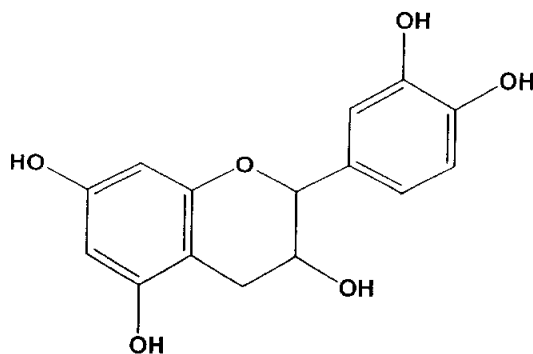


Fig 41. Chemical structure of a flavan, catechin used in $ONOO^-$ scavenging test.

5-3. Flavanone 화합물의 ONOO⁻ 소거활성

ONOO⁻ 소거활성에 사용한 flavanone과 그 결과는 각각 Table 10과 Fig. 42에 나타내었다. Aromadendrin과 taxifolin이 각각 $6.01 \pm 1.16 \mu\text{M}$ 와 $3.94 \pm 0.40 \mu\text{M}$ 으로 활성을 나타내기 때문에 C2-C3 이중결합은 catechol 기능을 가진 flavonoid의 소거 활성과는 연관성이 없다는 것을 알 수 있었다. Flavonol 화합물과 마찬가지로 구조내 C-3, C-4' 위치에 hydroxy group는 소거활성을 나타내며, B-ring의 catechol group에 의해 활성이 현저히 증가된다. 더욱이 hesperetin 5-O-glucoside와 luteolin 7-O-glucoside와 같이 C-5와 C-7위치에서 hydroxy group이 glycosylation되면 구조에 따라 다양한 활성을 보이는데 이는 C-5과 C-7 hydroxyl group이 소거활성에 영향을 미치지 않기 때문이다. Eriodictyol의 C-3' hydroxy group이 methoxyl group으로 치환되면 소거활성은 증가하지만, C-3에 또 다른 hydroxy group이 결합되어도 활성에는 변화가 없었다.

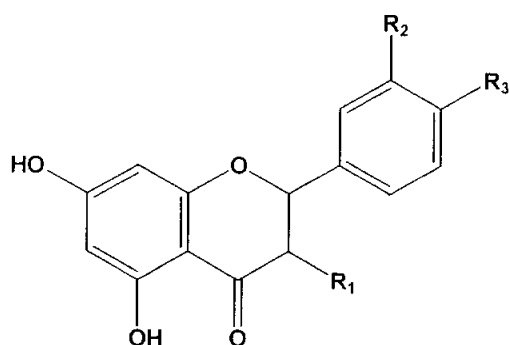
Table 10. IC₅₀ values for the ONOO⁻ scavenging effect of flavanones

Compounds	IC ₅₀ values ^a (μM)	
Aromadendrin	6.01 ±	1.16
Eriodictyol	4.45 ±	0.70
Hesperetin	2.57 ±	0.36
Hesperetin 5- <i>O</i> -glucoside	2.99 ±	0.41
Naringenin	N ^b	
Naringenin 7- <i>O</i> -glucoside	N	
Naringenin 7- <i>O</i> -neorutinoside	N	
Taxifolin	3.94 ±	0.40
Penicillamine ^c	2.91 ±	0.64

^a IC₅₀ value ± SE obtained from three separate experiments are shown.

^b N, no effect up to a concentration of 10 μM.

^c penicillamine used as positive control.



Aromadendrin	R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₃ = R ₄ = OH
Eriodictyol	R ₁ = H, R ₂ = R ₃ = R ₄ = OH
Hesperetin	R ₁ = H, R ₂ = OH, R ₃ = OMe, R ₄ = OH
Hesperetin 5- <i>O</i> -glucoside	R ₁ = O-Glu, H, R ₂ = OH, R ₃ = OMe, R ₄ = OH
Naringenin	R ₁ = R ₂ = H, R ₃ = OH, R ₄ = OH
Naringenin 7- <i>O</i> -glucoside	R ₁ = R ₂ = H, R ₃ = OH, R ₄ = O-Glu
Naringenin 7- <i>O</i> -neorutinoside	R ₁ = R ₂ = H, R ₃ = OH, R ₄ = O- neorutinoside
Taxifolin	R ₁ = R ₂ = R ₃ = R ₄ = OH

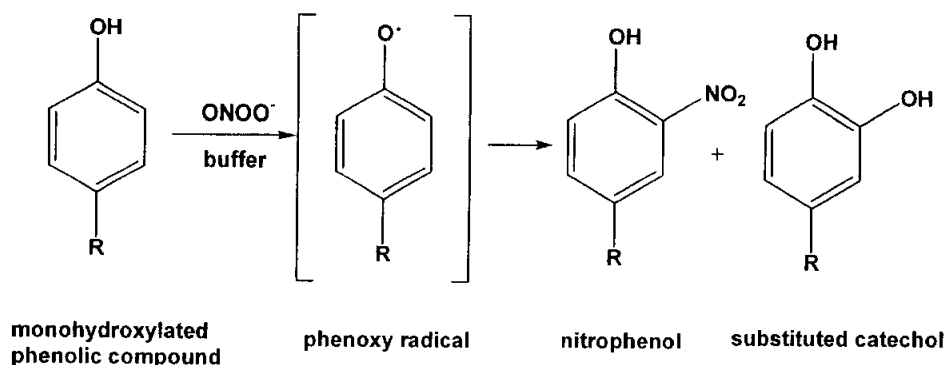
Fig. 42. Chemical structures of flavanones used in ONOO⁻ scavenging test.

5-4. Flavonoid 화합물의 구조와 ONOO⁻ 소거활성 상관관계

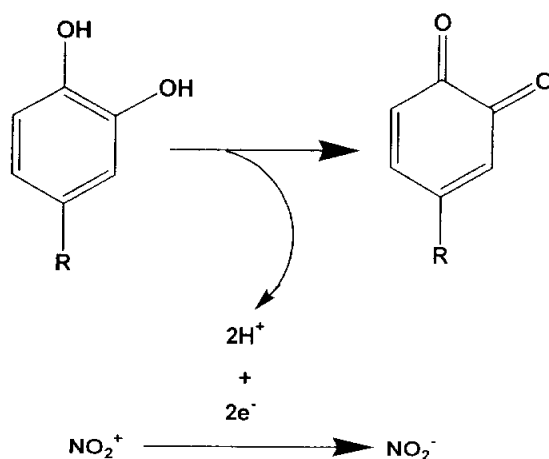
ONOO⁻에 대한 수종의 flavonoid 소거활성을 IC₅₀를 비교해 봄으로서 구조-활성 상관관계를 밝히고자 하였다. A-ring 혹은 B-ring에 *o*-dihydroxy 기능을 가지고 있고, 3번 위치에 hydroxyl기를 가진 flavonoid 화합물은 C2-C3 이중결합의 유무에 상관없이 소거활성을 나타내었다.

Flavonoid의 ONOO⁻ 소거활성 기전 아직 연구중에 있으나, 화합물의 기본골격과 다른 구조적 요건들이 소거 기전에 중요하게 작용하는 것으로 판명되었다. Pannala 등 (1998)은 ONOO⁻의 2가지 소거활성 기전을 제시하였는데, (1) nitration (2) electron donation에 의해 활성이 나타난다고 한다. *p*-Coumaric acid 그리고 ferulic acid 와 같이 monohydroxy group을 가진 phenolic 화합물은 자신이 nitration됨으로서 ONOO⁻ 소거활성을 나타내고, *o*-dihydroxy group을 가진 catechol 구조의 경우 electron donation 기전을 통해 활성질소종을 감소시킨다고 한다 (Pannala *et al.*, 1997, 1998, Kerry and Rice-Evans, 1999).

(a)



(b)



Scheme 9. Two possible mechanisms of the scavenging activity on ONOO^- (Pannala *et al.*, 1997, 1998, Kerry and Rice-Evans, 1999; Nonoyama *et al.*, 1999).

- (a) Nitration: monohydroxylated phenolic compounds such as ferulic acid and *p*-coumaric acid are acting as alternative substrates for nitration
(b) Electron donation: catechol structures such as caffeic acid reduce RNS

IV. 요약 및 결론

ROS와 RNS와 같은 반응성이 강한 free radical에 의한 산화적 손상을 방지하기 위하여 천연물로부터 항산화활성 성분을 분리, 동정, 개발하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 이에 자생하는 수종의 뽕나무 속 식물을 선택하여 활성성분을 분리하였고, DPPH radical 소거 활성법과, 활성산소종 생성 억제활성법 그리고 ONOO⁻ 소거활성법을 사용하였다. 한국에서 자생하는 뽕나무 속인 *P. buergeriana* (섬개뽕나무), *P. davidiana* (산복사), *P. padus* (귀룽나무), *P. pendula* for. *ascendens* (올뽕나무), *P. sargentii* (산뽕나무), *P. serrulata* var. *spontanea* (뽕나무), 그리고 *P. yedoensis* (왕뽕나무)의 MeOH 추출물에 대한 항산화활성을 검색하였다.

1. 섬개뽕나무의 잎을 제외한 모든 MeOH 추출물에서 강한 DPPH 소거활성을 보였는데, 특히 올뽕나무의 수피의 MeOH 추출물의 소거활성(IC₅₀ 1.63 µg/mL) 대조군으로 사용된 항산화제인 L-ascorbic acid (IC₅₀ 1.7µg/mL)과 유사한 활성을 나타내었다. 또한 산복사, 귀룽나무의 각 부분별 MeOH 추출물과 산뽕나무의 가지, 뽕나무의 심재 그리고, 왕뽕나무 가지의 MeOH 추출물의 DPPH 소거활성이 < IC₅₀ 10 µg/mL로 나타내었고, 산뽕나무 잎과 수피의 radical 소거 활성의 IC₅₀가 각각 18.99 µg/mL와 15.69 µg/mL로, 뽕나무의 잎과 꽃은 각각 21.88 µg/mL, 14.30 µg/mL로 측정되었다. 수종의 뽕나무들의 부위별 DPPH radical 소거활성을 살펴보면 주로 가지와 심재에서 가장 좋은 활성을 나타내었고 잎과 꽃, 그리고 열매 순으로 활성이 나타났다. 특히 섬개뽕나무의 경우 잎에서의 활성은 나타나지 않는 반면, 수피와 심재에서는 각각 3.35 µg/mL와 4.00 µg/mL으로 강한 활성을 나타내었다.

2. 왕벚나무 가지와 벚나무 심재의 억제율 (%)은 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $72.06 \pm 1.35\%$ 와 $71.20 \pm 0.63\%$ 로 가장 높았고, 대조군인 Trolox ($73.56 \pm 0.31\%$)와 유사한 활성을 보였다. 섬개벚나무 잎과 벚나무 수피의 활성산소종 생성 억제 활성은 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 매우 낮은 반면, 섬개벚나무, 울벚나무의 활성은 모든 부위에서 50% 이상의 활성을 나타내었다. 특히 산복사 그리고 벚나무의 잎과 꽃의 MeOH 추출물의 경우 DPPH와 ONOO^- 와 같은 다른 항산화제와는 달리 억제활성이 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $13.18 \pm 12.87\%$ 그리고 $6.90 \pm 2.70\%$, $12.22 \pm 1.63\%$ 으로 낮게 측정되었다. 이외 다른 벚나무 MeOH 추출물이 활성산소종에 대해 30%에서 60% 정도의 좋은 활성을 나타내었다.
3. 수종 벚나무 MeOH 추출물의 ONOO^- 소거활성을 측정하기 위해 직접적인 합성 ONOO^- 소거 활성을 측정하였다. 산복사와 산벚나무의 잎과 가지는 ONOO^- 소거활성이 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $92.84 \pm 0.16\%$ 와 $91.92 \pm 0.88\%$, $91.63 \pm 0.39\%$ 로 가장 높게 나타났으며, 울벚나무의 수피, 산벚나무의 꽃, 그리고 왕벚나무 잎에서도 동일농도에서 각각 $76.28 \pm 0.21\%$ 와 $80.63 \pm 0.81\%$, $72.85 \pm 3.88\%$ 로 모두 대조군인 penicillamine ($71.14 \pm 0.47\%$)보다 높은 활성을 나타내었다. 섬개벚나무 잎의 MeOH 추출물이 $8.22 \pm 2.75\%$ 로 낮은 활성을 나타내었으나, 이외 실험한 대부분의 벚나무 MeOH 추출물은 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 50% 정도의 좋은 ONOO^- 소거활성을 나타내었다.
4. 산복사와 왕벚나무 잎 그리고 벚나무의 잎, 수피, 꽃의 MeOH 추출물 그리고 각 희분 (CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 희분)과 H_2O 층에 대하여 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO^- 소거활성을 측정하였다. 산복사의 DPPH radical 소거 활성은 EtOAc 희분 > *n*-BuOH 희분 > MeOH 추출물 >> CH_2Cl_2 희분 >> H_2O 층 순으로

나타났으며, 산복사 MeOH 추출물의 활성산소종 억제활성은 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $83.78 \pm 1.31\%$ 로 측정되었고, H_2O 층을 제외한 모든 희분, EtOAc 희분, CH_2Cl_2 희분, *n*-BuOH 희분에서는 각각 $83.18 \pm 3.30\%$ 와 $70.39 \pm 3.70\%$, $56.71 \pm 3.42\%$ 로 높게 나타났다. 또한 산복사는 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 MeOH 추출물과 EtOAc 희분, CH_2Cl_2 희분, *n*-BuOH 희분에서 모두 70% 이상의 강력한 ONOO^- 소거활성을 나타내었는데, 이는 대조군인 penicillamine의 소거활성이 $74.14 \pm 0.47\%$ 임을 생각하면 상당히 높은 활성을 가짐을 알 수 있었다. 왕벚나무 잎의 EtOAc 희분에서 DPPH radical 소거 활성과 ONOO^- 소거활성이 각각 IC_{50} 6.08 $\mu\text{g/mL}$ 와 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $87.24 \pm 1.11\%$ 억제율로서 가장 높게 나타났으나, 활성산소종 억제활성은 거의 나타내지 않았다.

5. 벚나무의 잎, 가지, 꽃의 MeOH 추출물 그리고 각 희분 (CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 희분)과 H_2O 층에 대하여 DPPH radical 소거 활성과, 활성산소종 생성 억제활성 그리고 ONOO^- 소거활성을 측정하였다. 벚나무 잎의 EtOAc 희분은 DPPH radical 소거활성이 IC_{50} 7.98 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 또한 ONOO^- 에 대해서는 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $95.37 \pm 0.12\%$ 소거함으로서 실험한 희분 중 가장 강하게 나타났다. 특히 ONOO^- 소거활성은 H_2O 층을 제외하고 모두 65% 이상의 강한 소거활성을 나타내었는데, 이는 대조군인 penicillamine의 소거율이 $74.14 \pm 0.47\%$ 임을 고려해볼 때 상당히 높은 활성임을 알 수 있었다. 그러나 잎의 경우 활성산소종에 대한 억제활성은 EtOAc 희분에서도 $27.7 \pm 4.2\%$ 로 낮게 나타났다. 잎과 마찬가지로 벚나무 수피의 경우도 EtOAc 희분이 DPPH radical 소거활성과 ONOO^- 소거율이 각각 IC_{50} 5.65 $\mu\text{g/mL}$ 과 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $87.54 \pm 0.15\%$ 로 가장 높았으며, 이외 다른 희분에서는 낮게 나타났다. 벚나무의 꽃의 DPPH radical 소거활성은 EtOAc 희분 > *n*-BuOH 희분 > MeOH 추출물 > H_2O 층 >> CH_2Cl_2 희분

순으로 나타났으며, IC₅₀는 각각 2.3, 2.8, 14.3, 19.75, 64.45 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, ONOO⁻소거활성은 H₂O층을 제외하고 모두 65% 이상의 강한 소거활성을 나타내었다. 벚나무의 수피와 꽃의 EtOAc 획분은 활성산소종 억제활성이 40 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $48.34 \pm 1.25\%$ 와 $52.56 \pm 0.68\%$ 로 나타났다.

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

7. 6종의 flavonol 화합물과 5종의 isoflavone 화합물, 그리고 하나의

phenol성 화합물에 대하여 항산화활성을 측정하였다. Quercetin (5)과 그 배당체인 quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (20)은 DPPH radical 소거활성이 각각 IC_{50} 3.54 μ M와 4.63 μ M로 대조군인 L-ascorbic acid의 11.50 μ M에 비해 2배 정도 활성이 강하게 나타났다. 또한 ONOO⁻에 대한 소거 활성 역시 IC_{50} 0.93 $\pm$ 0.14 μ M와 1.08 $\pm$ 0.06 μ M로 대조군인 penicillamine의 3.20 $\pm$ 0.36 μ M에 비해 약 3배의 활성을 보였다. 그러나 활성산소종 억제실험계에서는 40 μ g/mL 농도에서 이 두 화합물은 양성대조군인 Trolox의 활성에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었다. 그리고 4종류의 kaempferol 배당체들은 3가지 실험계에서 다소 낮은 활성을 보였다. Isoflavone 화합물인 genistein (2)과 그 배당체인 genistin (14)는 DPPH radical과 ONOO⁻에 대한 소거 활성을 나타내었고, genistin (14)의 경우 당의 결합으로 genistein (2)의 활성보다 약간 낮게 나타났다. 그러나, 또다른 isoflavone 화합물인 prunetin (1), prunetin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (7), prunetin 5-*O*- β -D-glucopyranoside (11)은 사용한 항산화 실험계에서 활성을 나타내지 않았다. Phenol성 화합물인 2-*O*- β -(6'-benzoyl)-glucopyranosyl *o*-(*Z*)-coumaric acid (19)은 ONOO⁻ 실험계에서 IC_{50} 6.78 $\pm$ 0.35 μ M로 좋은 활성을 나타내었다.

8. 빛나무에서 분리한 6종의 triterpenoid 화합물에 대해 항산화활성을 실험하였다. 사용된 triterpenoid 화합물은 고농도에서도 DPPH radical scavenger로서 활성을 나타내지 않았으나, 활성산소종 억제 실험계에서는 높은 활성을 나타내었고, 그 상대적 활성 정도는 2 α -hydroxyursolic acid (4) > 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (6) $\geq$ ursolic acid (3) > Trolox (as positive control) > 2 α , 3 α , 24-trihydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (17) $\geq$ 1 β , 2 α , 3 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid (10) $\geq$ 2 α , 3 α , 19 α , 24-tetrahydroxy-urs-12-en-28-*O*- β -D-glucopyranoside (18)로 나타났다. 또한 compounds 6과 18은 각각 IC_{50} (50% inhibition

concentration) $4.90 \pm 0.38 \mu\text{M}$ 와 IC_{50} $6.88 \pm 0.46 \mu\text{M}$ 로 강한 ONOO^- 소거활성을 나타내었으며, 이는 양성 대조군인 penicillamine의 IC_{50} $5.11 \pm 0.23 \mu\text{M}$ 에 상응하는 활성이었다. 그리고 compounds 10과 17은 각각 IC_{50} $25.18 \pm 2.68 \mu\text{M}$ 과 $82.05 \pm 2.80 \mu\text{M}$ 로 ONOO^- 소거활성을 나타내었으나, 반면 compounds 3과 4는 ONOO^- 소거활성을 나타내지 않았다.

9. 마지막으로 flavonoid 화합물의 구조와 ONOO^- 억제활성과의 상관관계를 살펴보았다. 활성실험에 사용한 모든 flavonol 화합물은 농도 의존적으로 소거활성을 나타내었다. Flavonol (IC_{50})의 소거활성 정도는 quercetin $\geq$ quercetin 3-*O*-glycosides $>$ morin $>$ galangin $\geq$ kaempferol 순으로 관찰되었다. 반면, B-ring의 C-4' 위치에 hydroxy group을 가진 galangin과 kaempferol은 다소 약한 활성을 나타내었다. Apigenin, chrysin과 같이 C-3 위치에 hydroxy group이 없는 화합물은 소거활성을 나타내지 않았다. Fisetin, quercetin, isorhamnetin와 같이 kaempferol C-4' 위치의 hydroxy group에 *ortho* hydroxy group (*o*-dihydroxy group)이나 methoxy group이 첨가되면, flavonol의 소거활성이 증진되었다. Quercetin의 C-3 hydroxy group이 glycosylation된 quercetin 3-*O*-glycoside와 비슷하게 측정되었으나, *o*-dihydroxy group이 존재하지 않을 경우, glycosylation과 methylation 됨에 따라 그 활성은 급격히 감소되었다.
10. 실험에 사용한 flavone과 flavan 화합물의 종류와 ONOO^- 소거활성 기전은 flavonol과 유사하였으며, A-ring 혹은 B-ring에 *ortho*-hydroxy group가 존재하였을 때 높게 나타났다. *o*-Dihydroxy functional group을 가지는 flavone인 luteolin과 baicalin은 각각 $1.43 \pm 0.27 \mu\text{M}$, $1.44 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 으로 대조군인 penicillamine의 $2.91 \pm 0.64 \mu\text{M}$ 에 비해 약 2 배 강한

활성을 나타내었다. 또한 Flavan 화합물인 catechin도 $1.16 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 에서 강력한 소거활성을 보였다.

11. ONOO^- 소거활성에 사용한 flavanone인 aromadendrin과 taxifolin이 각각 $6.01 \pm 1.16 \mu\text{M}$, $3.94 \pm 0.40 \mu\text{M}$ 으로 활성을 나타내었다. Flavonone 화합물 내에 C-3, C-4' 위치에 hydroxy group는 소거활성을 나타내며, B-ring의 catechol group에 의해 활성이 현저히 증가되었다. 더욱이 hesperetin 5-O-glucoside와 luteolin 7-O-glucoside와 같이 C-5와 C-7위치에서 hydroxy group의 glycosylation은 구조에 따라 다양한 활성을 나타내었다. Eriodictyol의 C-3' hydroxy group이 methoxyl group으로 치환되면 소거활성은 증가하지만, C-3에 또 다른 hydroxy group이 결합되어도 활성에는 변화가 없었다.

V. 참고문헌

- 강삼식, 손건호, Part 8. triterpenoids; Part 20. flavonoids, 천연물성분 구조결정법, 서울대학교 출판부, 2000.
- 김재길, 원색천연약물대사전, 남산당, 1997.
- 우원식, 천연물화학연구법 pp. 14, 서울대학교 출판부, 1996.
- 이영노, 원색한국식물도감, (주) 교학사, 1997.
- 이창복, 대한식물도감, 경문사, 1985.
- Abdallah, O. M., Kamel, M. S., and Mohamed, M. H., Phenylpropanoid glycosides of *Prunus ssiori*, *Phytochem.*, 37(6), 1689–1692, 1994.
- Agrawal, P. K., *Carbon-13 NMR of flavonoids*, pp. 209, Elsevier Science Publishing Company, New York, 1989.
- Agrawal, P. K., NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochem.*, 31, 3307–3330, 1992.
- Ahmad, V. U., Bano, S. and Bano, N, A triterpene acid from *Nepeta hindostana*, *Phytochem.*, 25, 1487–1488, 1986.
- 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(3), 243–249, 1994.
- Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C., Conti, C. and Stein, M. L., Plant metabolites. structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*, *J. Nat. Prod.*, 52, 679–685, 1989.
- Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M., The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.*, 73, 239–244, 2001.
- Arora, A., Nair, M. G. and Strasburg, G. M., Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system, *Arch. Biochem. Biophys.*, 356(2), 133–141, 1998.
- Arora, A., Valcic, S., Cornejo, S., Nair, M. G., Timmermann, B. N. and Liebler, D.,

- Reactions of genistein with alkylperoxy radicals, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 638–645, 2000.
- Auroma, O., Spencer, J. P. E. and Mahmood, N., Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1043–1053, 1999.
- Baker, E. A., Bukovac, M. J., and Flore, J. A., Ontogenetic variations in the composition of peach leaf wax, *Phytochem.*, 18(5), 781–784, 1979.
- Balavoine G. G. and Genleti, Y. V., Peroxynitrite scavenging by different antioxidants, Part I: convenient assay, *Nitric Oxide*, 3, 40–54, 1999.
- 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.
- Beninger, C. W., Hosfield, G. L. and Nair, M. G., Flavonol glycosides from the seed coat of a new manteca-type dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2906–2910, 1998.
- Bilia, A. R., Cecchini, C., Marsili, A. and Morelli, I., Coumarins and other constituents of *Prunus prostrata*, *J. Nat. Prod.*, 56(12), 2142–2148, 1993.
- Bilia, A. R., Morelli, I., Hamburger, M. and Hostettmann, K., Flavans and A-type protoanthocyanidins from *Prunus prostrata*, *Phytochem.*, 43(4), 887–891, 1996.
- Blois, M. S., Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199–1202, 1958.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C., Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30, 609–615, 1997.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Stettmaier, K., Antioxidant effects of flavonoids, *Biofactor*, 6, 399–402, 1997.
- Branen, A. L., Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated

- hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59–63, 1975.
- Burda, S., Oleszek, W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774–2779, 2001.
- Burkhardt, S., Tan, D.X., Manchester, L.C., Hardeland, R., and Reiter, R.J., Determination and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4898–4902, 2001.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R. L., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 749–760, 1997.
- Castro, V. H., Ramirez, E., Mora, G. A., Iwase, Y., Nagao, T., Okabe, H., Matsunaga, H., Katano, M and Mori, M., Structures and antiproliferative activity of saponins from *Sechium pittieri* and *S. talamancense*, *Chem. Pharm. Bull.*, 45(2) 349–358, 1997.
- Chandra, A., Nair, M. G., Iezzoni, A., Isolation and stabilization of anthocyanins from tart cherries (*Prunus cerasus* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1062–1065, 1993.
- Choi, H. R., Choi, J. S., Han, Y. N., Bae, S. J., and Chung, H. Y., Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytother. Res.*, 16, 364–367, 2002.
- 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, *Phytochem. Res.*, 16, 232–235, 2002.
- Choi, J. S., Suh, S. S., Young, H. S. and Park, H. J., Hypolipemic and hypoglycemic activities of *Prunus davidiana* in high fat-fed rats, *Arch. Pharm. Res.*, 14(1), 44–47, 1991a.
- Choi, J. S., Yokozawa, T. and Oura, H., Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*, *J. Nat. Prod.*, 54(1), 218–224, 1991c.
- Choi, J. S., Yokozawa, T. and Oura, H., Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin, *Plant Med.*, 57(3), 208–211, 1991b.
- Chung, H. Y., Choi, H. R., Park, H. J., Choi, J. S. and Choi, W. C., Peroxynitrite scavenging and cytoprotective activity of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether from the marine alga *Symphyocladia latiscula*, *J. Agric. Food Chem.*,

- 49, 3614–3621, 2001.
- 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.
- Chusheng, H.; Zhuangxin, Z.; Gansun, L.; Jun, Z. Isolation and identification of two new triterpenes from *Actinidia eriantha*. *Acta Botanica Yunnanica*, 10, 93–100, 1998.
- Cuvelier, M.-E., Richard, H. and Berset, C., Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenols: structure-activity relationship, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(2), 324–325, 1992.
- 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.
- De Almeida, A. P., Miranda, M. M. F. S., Simoni, I. C., Wigg, M. D., Lagrota, M. H. C. and Costa, S. S., Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea Americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytother. Res.*, 12, 562–567, 1998.
- 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(5), 943–948, 1997.
- Dillehay, D. L., Webb, S. J., Schemelz, E. M., Merrill, A. H., Jr., Dietary shingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice, *J. Nutr.*, 124, 615–620, 1994.
- Doddrell, D. M., Khong, P. W. and Lewis, K. G., The stereochemical dependence of ^{13}C chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as an aid to structural assignment, *Tetrahedron Lett.*, 27, 2381–2384, 1974.
- Dogasaki, C., Murakami, H., Nishijima, M., Yamamoto, K. and Miyazaki, T., Antimutagenic activities of hexane extracts of the fruits extract and the kernels of *Prunus mune* Sieb. et Zucc., *Yakugaku Zasshi*, 112(8), 557–584, 1992.
- Donovan, J. L., Meyer, A. S. and Waterhouse, A. L., Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prunes juice (*Prunus domestica*), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1247–1252, 1998.

- Dreher, D. and Junod, F., Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer*, 32A(1), 3038, 1996.
- El Lahlou, H., Hirai, N., Tsuda, M. and Ohigashi, H., Triterpene phytoalexins from nectarine fruits, *Phytochem.*, 52, 623–629, 1999.
- Fang, N., Yu, S., and Prior, R. L., LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums, *J. Agric. Food Chem.*, in press, 10, 2002.
- Farkas, L., Nógrádi, M., Antus, S., and Gottsegen, Á., About the existence of padmakastein and padmakastin, *Tetrahedron.*, 25, 1013–1019, 1969.
- Fici, G. J., Althaus, J. S. and Von Voigtlander, P. E., Effects of lazardoids and a peroxynitrite scavengers in a cell model of peroxynitrite 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.
- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. and Rubero, G., Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 497–501, 2002.
- Fourneau, C., Hocquemiller, R. and Cavé, A., Triterpenes from *Prunus africana* bark, *Phytochem.*, 42(5), 1387–1389, 1996.
- Geibel, M., Feucht, W., Flavonoid 5-glucosides from *Prunus cerasus* bark and their characteristic weak glucosidic bonding, *Phytochem.*, 30, 1519–1521, 1991.
- Geibel, M., Geiger, H., and Treuter, D., Tectochrysin 5- and genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*, *Phytochem.*, 29, 1351–1353, 1990.
- Geibel, M., Sensitivity of the fungus *Cytospora prsonii* to the flavonoids of *Prunus cerasus*, *Phytochem.*, 38, 599–601, 1995.
- Geissman, T. A., The flavonoid constituents of normal and virus infected peach and cherry leaves, *Arch. Biochem. Biophysics.*, 60, 21–23, 1956.
- González, A. G., Irizar, A. C., Ravelo, A. G., and Fernández, M. F., Type A proanthocyanidins from *Prunus spinosa*, *Phytochem.*, 31(4), 1432–1434, 1992.
- Griffiths, H. R. and Lunec, J., The C1q binding activity of IgG is modified in vitro by

- reactive oxygen species: implications for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.*, 388, 161–164, 1996.
- Gross, J., and Eckhardt, G., Structures of persicaxanthin, persicachrome and other apocarotenols of various fruits, *Phytochem.*, 20(9), 2267–2269, 1981.
- Guang-Yi, L.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. Pentacyclic triterpenes from the fruits of *Rosa sterilis*, *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 162–166.
- Haenen, G. R. M. M., Paquay, J. B. G., Korthouwer, R. E. M. and Bast, A., Peroxynitrite scavenging by flavonoid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 590–593, 1997.
- Hamburger, M., Riese, U., Graf, H., Melzig, M. F., Ciesielski, S., Baumann, D., Dittmann, K. and Wegner, C., Constituents in evening primrose oil with radical scavenging cyclooxygenase and neutrophil elastase inhibitory activities, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5533–5538, 2002.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M. A., Fujita, Y., Yas Uhara t., Yosyida, 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(8), 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 peroxynitrite 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.
- Henning, W., and Herrmann, K., Flavonol glycosides of plums of the species *Prunus domestica* L. and *Prunus salicina* Lindley, 12 phenolics of fruits, *Z. Lebensm.-Unters. Forsh. A*, 171, 111–118, 1980.
- Henning, W. and Herrmann. K., Flavonol tetraglycosides from the leaves of *Prunus cerasus* and *P. avium*, *Phytochem.*, 19, 2727–2729, 1980.
- Heo, M. Y., Kim, S. H., Yang, H. E., Lee, S. H., Jo, B. K., and Kim, H. P., Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the

- flowers of *Prunus persica* extract, *Mutat. Res.*, 496, 47–59, 2001.
- Hippeli, S. and Elstner, E. F., Hydroxy-radical type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of hydroxy-radical and peroxynitrite toxicity, *Z. Naturforsch.*, 52C, 555–563, 1997.
- Honda, T., Gribble, G. W., Suh, N., Finlay, H. J., Rounds, B. V., Bore, L., Favaloro, F., Jr., Wang, Y., Sporn, M. B., Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages, *J. Med. Chem.*, 43, 1866–1877, 2000.
- Horvat, R. J., Chapman, G. W. Jr., Senter, S. D., and Robertson, J. A., Comparison of the volatile compounds from several commercial plum cultivars, *J. Sci. Food Agric.*, 60, 21–23, 1992.
- Hosteman, K. and Marston, A., *Saponins*, Cambridge university press, 175–197, 1995.
- Huang, S.-W., Frankel, E. N., Schwarz, K. and German, J. B., Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2496–2502, 1996.
- Ichikawa, K., Kinoshita, T., and Sankawa, U., The screening of chinese crude drugs for Ca^{2+} antagonist, activity: identification of active principles from the aerial part of *Pogostemon cablin* and the fruits of *Prunus mume*, *Chem. Pharm. Bull.*, 37(2), 345–348, 1989.
- Imaizumi, K., Tominaga, A., Sato, M. and Sugano, M., Effects of dietary sphinolipids on levels of serum and liver lipids in rats, *Nutr. Res.*, 12, 543–548, 1992.
- Jung, H. A., Park, J. C., Chung, H. Y., Kim, J., and Choi, J. S., Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*, *Arch. Pharm. Res.*, 22, 213–218, 1999.
- Kang, S. S., Kim, J. S., Xu, Y. N. and Kim, Y. H., Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata*, *J. Nat. Prod.*, 62, 1059–1060, 1999.
- Kashiwada, T., Wang, H.-K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Cosentino, L. M., Kozuka, M., Okabe, H., Ikeshiro, Y., Hu, C.-Q., Yen, E. and Lee, K.-H., Anti-AIDS agents. 30. anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids, *J. Nat. Prod.*, 61, 1090–1095, 1998.

- Kayano, S.-I., Kikuzaki, H., Fukutsuka, N., Mitani, T., and Nakatani, N., Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist, *J. Agric. Food Chem.*, in press, 2002.
- 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.
- Khalid, S. A., Gellért, M., Szendrei, K., and Duddeck, H., Prunetin 5-*O*- β -D-glucopyranoside, and isoflavone from the peduncle of *Prunus avium* and *P. cerasus*, *Phytochem.*, 28(5), 1560–1561, 1989.
- Kim, H. J., Woo, E. R., and Park, H. K., A novel lignan and flavonoids from *Polygonum aviculare*. *J. Nat. Prod.*, 57, 581–586, 1994.
- Kim, Y. M., Yang, H. E., Kim, J. H., Heo, M. Y., and Kim, H. P., Protection of the flowers of *Prunus persica* extract from ultraviolet B-induced damage of normal human keratinocytes, *Arch. Pharm. Res.*, 23(4), 396–400, 2000.
- Kim, Y. M., Yang, H. E., Park, B. K., Heo, M. Y., Jo, B. K. and Kim, H. P., The extract of the flowers of *Prunus persica*, a new cosmetic ingredient, protects against solar ultraviolet-induced skin damage *in vivo*, *J. Cosmet. Sci.*, 53(1), 27–34, 2002.
- Kitajima, J. and Tanaka, Y., Constituents of *Prunus zippeliana* leaves and branches, *Chem. Pharm. Bull.*, 41(11) 2007–2009, 1993.
- Kobayashi, T., Shimizugawa, T., Osakabe, T., Watanabe, S. and Okuyama, H. A., A long-term feeding of sphingolipids affected the levels of plasma cholesterol and hepatic triacylglycerol but not tissue phospholipids and sphingolipids, *Nutr. Res.*, 17, 111–114, 1997.
- Kojima, H. and Ogura, H., Configurational studies on hydroxy groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanane and ursane-type triterpenes by NMR spectroscopy. *Phytochem.*, 28, 1703–1710, 1989.
- Kojima, H., Tominaga, H., Sato, S. and Ogura, H., Pentacyclic triterpenoids from *Prunella vulgaris*, *Phytochem.*, 26, 1107–1111, 1987.

- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S., Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamin 123, *Free Radical. Biol. Med.*, 16, 149–156, 1994.
- LeBel, C. P. and Bondy, S. C., Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosome, *Neurochem. Int.*, 17(3), 435–440, 1990.
- Lee, K. S., Mbwambo, Z. H., Chung, H. S., Luyengi, L., Gamez, E. J. C., Mehta, R. G., Kinghorn, D. and Pezzuto, J. M., Evaluation of the antioxidant potential of natural products, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 1, 35–46, 1998.
- Li, B. Z., Wang, B. G., Jia, Z. J., Pentacyclic triterpenoids from *Rubus xanthocarpus*, *Phytochem.*, 49, 2477–2481, 1998.
- 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.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomass, M. B., *The systematic identification of flavonoids*, Springer, Heidelberg, 1970.
- Matsuda, H., Nakamura, S., and Kubo, M., Studies of cuticle drugs from natural sources. II. Inhibitory effects of *Prunus* plants on melanin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, 17(10), 1417–1420, 1994.
- 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, *Biochim. Biophys. Acta*, 1425, 189–203, 1998.
- Merrill, A. H., Jr., Schemelz, E. M., Dillehay, D. L., Rice, L. G., Meredith, F. and Riley, R. T., Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets, *J. Nutr.*, 127, 830–833, 1997.
- Mitchell, J. H., Gardner, P. T., McPhail, D. B., Morrice, p. c., Collins, A. R. and Duthie, G. G., Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems, *Arch. Biochem. Biophys.*, 360(1), 142–148, 1998.
- Mochizuki, M., Yoo, Y. C., Matzuzawa, K., Sato, K., Saiki, I., Tono-oka, S., Samukawa, K.-I. and Azuma, I., Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of *Red ginseng*, *Biol. Pharm. Bull.*, 18(9), 1197–1202, 1995.

- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, C., Domínguez, M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J. and Parajó, J. C., Natural antioxidant from residual sources, *Food Chem.*, 72, 145–171, 2001.
- Moutounet, M., Dubois, P., Jouret, C., Major volatile compounds in dried plums, *C. R. Acad. Agric. Fr.*, 581–585, 1975.
- Nagarajan, G. R., and Parmar, V. S., Phloracetophenone derivatives in *Prunus domestica*, *Phytochem.*, 16, 614–615, 1977.
- Nakatani, N., Kayano, S.-I., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., and Mitani, T., Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5512–5516, 2000.
- Natella, F., Nardini, M., Felice, M. D. and Scaccini, C., Benzoic acid and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relationship, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1453–1459, 1999.
- 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 Lett.*, 40, 6933–6937, 1999.
- Numata, A., Yang, P., Takahashi, C., Fujiki, R., Nabae, M. and Fujita, E., Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, gorseishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 37(3) 648–651, 1989.
- Okawa, M., Junei, K., Nohara, T. and Ono, M., DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull.*, 24(10), 1202–1205, 2001.
- Olden, E. J. and Nybom, N., On the origin of *Prunus cerasus*, L. *Hereditas*, 59, 327, 1968.
- Olszewska, M. and Wolbis, M., Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L., *Acta Pol. Pharm.*, 58(5), 367–372, 2001.
- Osawa, T., Kumazawa, S. and Kawakishi, S., Prunusols A and B, novel antioxidative tocopherol derivatives from the leaf wax of *Prunus grayana* Maxim., *Agric. Biol. Chem.*, 55(7), 1727–1731, 1991.

- Pannala, A., Rajaq, R., Halliwell, B., Singn, S., Rice-Evans, C. A., Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 594–606, 1998.
- Pannala, A., Rice-Evans, C. A., Halliwell, B., Singn, S., Inhibition of peroxynitrite mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 164–168, 1997.
- Park, H. J., Young, H. S., Park, K. Y., Rhee, S. H., Chung, H. Y. and Choi, J. S., Flavonoids from the whole plants of *Orostachys japonicus*, *Arch. Pharm. Res.*, 14(2), 167–171, 1991.
- Parmar V. S., Vardhan, A., Nagarajan, G. R., and Jain, R., Dihydroflavonols from *Prunus domestica*, *Phytochem.*, 31, 2185–2186, 1992.
- Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H. J., Freeman, B. A. and Darley-Usmar, V. M., Biological aspects of reactive nitrogen species, *Biochem. Biophys. Acta*, 1411, 385–400, 1999.
- Poehland, B. L., Carté, B. K., Francis, T. A., Hyland, L. J., Allaudeen, H. S. and Troupe, N., In vitro antiviral activity of dammar resin triterpenoids, *J. Nat. Prod.*, 50, 706–713, 1987.
- Prasad, D., A new aromatic glycoside from the roots of *Prunus armeniaca*, *Fitoterapia* 70, 266–268, 1999.
- Prasad, D., Joshi, K., Pant, G., Rawat, M.S.M., Inoue, K., Shigu, T., and He, Z.D., An A-type proanthocyanidin from *Prunus armeniaca*, *J. Nat. Prod.*, 61, 1123–1125, 1998.
- Prasad, D., Two A-type proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots, *Fitoterapia*, 71, 245–253, 2000.
- Rawat, M.S.M., Pant, G., Prasad, D., Joshi, K., and Pande C. B., Plant growth inhibitors (proanthocyanodins) from *Prunus armeniaca*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, 13–23, 1998.
- Rawat, M.S.M., Prasad, D., and Joshi, K., Pant, G., Proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* Roots, *Phytochem.*, 50, 321–324, 1999.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 20(7),

933–956, 1996.

- Sakakibara, J., Kaiya, T., Triterpenoids of *Rhododendron japonicum*, *Phytochem.*, 22, 2547–2552, 1983.
- Sang, S., Lapsley, K., Rosen, R. T., and Ho, C.T., New prenylated benzoic acid and other constituents from almond hulls (*Prunus amygdalus* Batsch), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 607–609, 2002a.
- Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W.S., Lachance, P. A. Ho, C.T., and Rosen, R. T., Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2459–2463, 2002b.
- Sang, S., Cheng, X., Fu, H.Y., Shieh, D.E., Bai, N., Lapsley, K., Stark, R. E., Rosen, R. T., and Ho, C.T., New type sesquiterpene lactone from almond hulls (*Prunus amygdalus* Batsch), *Tetrahedron Lett.*, 43, 2547–2549, 2002c.
- Sang, S., Kikuzaki, H., Lapsley, K., Rosen, R. T., Nakatani, N., and Ho, C.T., Sphingolipid and other constituents from almond nuts (*Prunus amygdalus* Batsch), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4709–4712, 2002d.
- Sawa, T., Akaike, T. and Maeda, H., Tyrosine nitration by peroxynitrite formed nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, 275(42), 32467–32474, 2000.
- Sawada, M. and Carlson, J. C., Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat, *Mech. Aging Dev.*, 41, 125–137, 1987.
- Scaller, D. R. and Von Elbe, J. H., Polyphenols in montmorency cherries, *J. Food Sci.*, 35, 762–765, 1970.
- Scarpato, R., Pistelli, L., Bertoli, A., Nieri, E., and Migliore, L., *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity of five new chemical compounds of plant origin by means of the human lymphocyte micronucleus assay, *Toxicology In Vitro*, 12, 153–161, 1998.
- Schemelz, E. M., Dillehay, D. L., Webb, S. J., Reiter, A., Adams, J., Merrill, A. H., Jr., Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the propotion of adenomas versus adenomacarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphinolipids and colon carcinogenesis, *Cancer Res.*, 56, 4936–4941, 1996.

- Schemelz, E. M., Sullards, M. C., Dillehay, D. L., Merrill, A. H., Jr., Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by diary glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice, *J. Nutr.*, 130, 522–527, 2000.
- Schwab, W., Scaller, D. R., and Schreier, P., Glycosidically bound aroma components from sour cherry, *Phytochem.*, 29, 607–612, 1990.
- Shimomura, H., Sashida, Y., and Adachi, T., Phenolic glucosides from *Prunus grayana*, *Phytochem.* 26(1), 249–251, 1987a.
- Shimomura, H., Sashida, Y., and Adachi, T., Cyanogenic and phenylpropanoid glucosides from *Prunus grayana*, *Phytochem.* 26(8), 2363–2366, 1987b.
- Shimomura, H., Sashida, Y., and Adachi, T., Phenylpropanoid glucoside esters from *Prunus buergeriana*, *Phytochem.*, 27(2), 641–644, 1988.
- Shimomura, H., Sashida, Y., and Yoshinari, K., Phenolic glucoside from the heartwood of *Prunus grayana*, *Phytochem.* 28(5), 1499–1502, 1989.
- Shrikhande, A. J., and Francis, F. J., Flavone glycosides of sour cherries, *J. Food Sci.*, 38, 1035–1037, 1973.
- 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, Vol. 1, pp. 1728, 1989.
- Sohal, R. S., Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process, *Free Radic. Biol. Med.*, 33(1), 37–44, 2002.
- Son, S. and Lewis, B. A., Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 468–472, 2002.
- Song, T.-Y. and Yen, G.-C., Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3322–3327, 2002.
- Squadrito, G. L. and Pryor, W. A., Oxidative chemistry of nitric oxide: the role of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide, *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 392–403, 1998.

- Stohr, H., Moshel, H.D., Herrmann, K., The phenolics of fruits. VII. The phenolics of cherries and plums and the changes in catechins and hydroxycinnamic acid derivatives during the development of fruits, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 159, 85–91, 1975.
- Stothers, J. B., *Carbon-13 NMR spectroscopy*, Academic Press: New York, 1972.
- Takeoka, G., Dao, L., Teranishi, R., Wong, R., Flessa, S., Harden, L., and Edwards, R., Identification of three triterpenoids in almond hulls, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3437–3439, 2000.
- Teotia, S. and Singh, M., Hypoglycemic effect of *Prunus amygdalus* seeds in albino rabbits, *Indian J. Exp. Biol.*, 35(3), 295–296, 1997.
- Toda, S. and Shirataki, Y., Inhibitory effects of isoflavones on lipid peroxidation by reactive oxygen species, *Phytochem. Res.*, 13, 163–165, 1999.
- Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P., Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phytochem.*, 25(2), 383–385, 1986.
- Van Dyke, K., McConnell, P., Marquardt, L., Green tea extract and its polyphenols markedly inhibit luminol-dependent chemiluminescence activated by peroxynitrite or SIN-1, *Luminescence*, 15, 37–43, 2000.
- Vesper, H., Schemelz, E. M., Nilolova-Karakashian, M. N., Dillehay, D. L., Lynch, D. V. and Merrill, A. H., Jr., Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition, *J. Nutr.*, 129, 1239–1250, 1999.
- Wang, H. and Joseph, J. A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 612–616, 1999.
- Wang, H., Nair, M. G., Iezzoni, A., Strasburg, G. M., Booren, A. M. and Gray, J. I., Quantification and characterization of anthocyanins in Balaton tart cherries, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2556–2560, 1997.
- Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Booren, A. M. and Gray, J. I., Novel antioxidant compounds from Tart cherries (*Prunus cerasus*), *J. Nat. Prod.*, 62, 86–88, 1999a.
- Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Booren, A. M. and Gray, J. I., Antioxidant polyphenols from Tart cherries (*Prunus cerasus*), *J. Agric. Food Chem.*, 47,

840–844, 1999b.

- Williams, R. F., Shinkai, S., Bruice, T. C., Radical mechanisms for 1,5-dihydroflavin reduction of carbonyl compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 1763–1767, 1975.
- Woo, W. S., Choi, J. S. and Tovivich, P., A sapogenin of *Randia siamensis*, *Arch. Pharm. Res.*, 7(1), 57–60, 1984.
- Xu, H.-X., Zeng, F.-Q., Wan, M. and Sim, K.-Y., Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*, *J. Nat. Prod.*, 59(7), 643–645, 1996.
- Yamagaishi, T., Zhang, D.-C., Chang, J.-J., McPhail, D. R., McPhail, A. T. and Lee, K.-H., The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and -B, *Phytochem.*, 27(10), 3213–3216, 1988.
- Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., Electrochemical method for estimating the autoxidative effects of methanol extracts of crude drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, 42(8), 1663–1665, 1994.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kasahara, Y., Kimura, Y., Yamanocuchi, S., Kumaki, K., Tamura, T., and Takino, M., Inhibitory effect of di-, trihydroxy triterpenes from the flowers of Compositae on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 19(10), 1329–1331, 1996.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I., Study on the inhibitory effect 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(7), 1919–1921, 1989.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Ishiwada, T., Morikawa, T., Kagawa, Y., Higashi, Y. and Matsuda, H., New flavonol oligoglycosides and polyacylated sucrose with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers of *P. mume*, *J. Nat. Prod.*, in press, 2002a.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Harada, E., Morikawa, T., Yamahara, J., Matsuda, H.,

Bioactive saponin and glycosides. VII. On the hypoglycemic principles from the root cortex of *Aralia elata* SEEM.: structure related hypoglycemic activity of oleanolic acid oligoglycoside, *Chem. Pharm. Bull.*, 44(10), 1923–1927, 1996b.

Yoshikawa, M., Murakami, T., Yoshizumi, S., Murakami, T., Yamahara, J. and Matsuda, H., Bioactive saponin and glycosides. V. acylated polyhydroxyolean-12-ene triterpene oligoglycosides, camelliasaponins A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, and C₂, from the seeds of *Camellia japonica* L.: structures and inhibitory activity on alcohol absorption, *Chem. Pharm. Bull.*, 44(10), 1899–1907, 1996c.

Yoshinari, K., Sashida, Y., and Shimomura, H., Two new lignan xylosides from the barks of *Prunus ssiori* and *Prunus padus*, *Chem. Pharm. Bull.*, 37(12), 3301–3303, 1984.

Yoshinari, K., Shimazaki, N., Sashida, Y., and Mimaki, Y., Flavanone xyloside and lignans from *Prunus jamasakura* bark, *Phytochem.*, 29(5), 1675–1678, 1990.

Young, H. S., Park, J. C., Park, H. J., Lee, J. H., and Choi, J. S., Phenolic compounds of the leaves of *Eucommia ulmoides*. *Arch. Pharm. Res.*, 14(2), 114–117, 1991.

Zhu, M, Chang, Q., Wong, C. L. Chong, F. S. and Li, R. C., Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*, *Phytother. Res.*, 13, 529–531, 1999.

Zou, Y., Kim, A. R., Kim, J. E., Choi, J. S. and Chung, H. Y., Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid (3,5-dimethoxyl-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncia*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5884–5890, 2002.

감사의 글

새로운 학문의 길을 열어주시고, 부족한 저에게 변함없는 관심과 가르침으로 인도해 주셨으며, 바른 삶의 자세와 가치관을 몸소 보여주셨던 최재수 교수님께 깊은 존경과 감사의 마음을 전합니다.

또한 바쁘신 중에도 부족한 논문을 심사하시며 조언해주신 최진호 교수님께 감사를 드리며, 세심하게 지적 교정해 주신 손병화 교수님, 부산대학교 정해영 교수님께 감사를 드립니다. 평소 많은 관심과 도움을 주신 남택정 교수님께도 깊은 감사를 드리며, 류홍수 교수님과 변대석, 김형락 교수님께도 감사를 드립니다.

함께 한 시간이 너무나도 소중한 여러 선배님과 후배님들께도 감사를 드립니다. 특히 실험실의 선배님이신 지현 언니, 소영언니, 희정 언니, 혜진 언니, 그리고 혜숙 언니께 감사의 마음을 전합니다. 같은 실험실에서 오랜 시간 함께 했던 늘 열심히 하는 후배 미정이, 귀여운 주정이에게 고마운 마음을 전하며, 지금은 직업전선에 있는 정은이, 김병수 씨, 학부생으로 많은 실험을 했던(?) 은경이, 새로 신입생이 된 나영이에게도 고마움을 전합니다. 같은 대학교는 아니지만, 한 실험실에서 누구보다 열심히 실험한 수옥 씨, 춘환이에게도 감사의 마음을 보내며, 멀리 미국에서 열심히 하고 있을 미진이에게도 감사의 마음을 전합니다.

그리고 공실관 연구원 선생님들, 특히 박성민 선생님, 정용실 언니, 지성희 선생님 많은 도움 주셔서 감사합니다.

멀리서 항상 응원하고 있었던 오빠 내외, 귀엽고 이쁜 조카 윤화, 미소, 그리고 자주 찾아와 기쁨이 되었던 언니 내외, 씩씩한 조카 호준이와 민지에게도 사랑의 마음을 전합니다.

오늘이 있기까지 헌신적인 사랑과 관심으로 뒷바라지 해주셨고,
부족한 막내를 늘 자랑스럽게 여기시는 사랑하는 어머니, 아버지께
오늘의 영광을 드립니다.

짧은 글로 저에게 힘이 되어주신 분들께 감사의 마음을
나타내기에는 부족함을 느낍니다. 지금이 새로운 시작으로 여기고
여러분의 기대에 어긋나지 않는 사람이 되겠습니다.

2002년 12월 정현아 올림