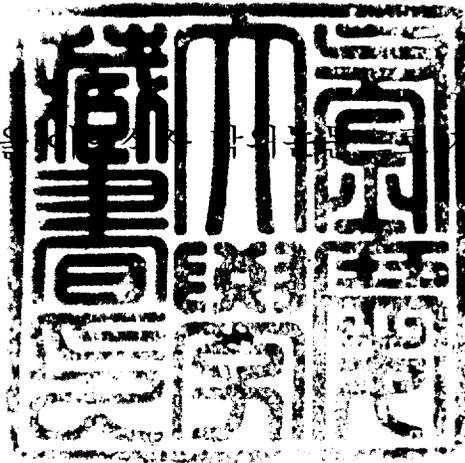


이학석사 학위논문

와송의 항보체 및 항산화 활성성분

지도교수 최재수

이 논문을 지도교수인 최재수에게 감사드립니다. 출함



2005년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

윤 나 영

윤나영의 이학석사 학위논문을 인준함

2004년 12 월 13 일

주 심 의학박사 변대석



위 원 이학박사 김형락



위 원 약학박사 최재수



목 차

Abstract	1
I. 서론	4
II. 실험 방법	8
1. 재료	8
2. 시약 및 기기	8
2-1 시약	8
2-2 기기	9
3. 성분의 추출 및 분획	10
4. 화합물의 분리	12
4-1. <i>n</i> -Hexane 획분의 성분 분리	12
4-1-1. 화합물 1-4 의 분광학적 특성	14
4-2. EtOAc 획분의 성분 분리	18
4-2-1. 화합물 5-14 의 분광학적 특성	20
5. 항보체 및 항산화 활성	25
5-1. 항보체 활성	25
5-2. 항산화 활성	28
5-2-1. DPPH radical 소거 활성	28
5-2-2. Hydroxy radical 소거 활성	30
5-2-3. Peroxynitrite 소거 활성	32
5-2-4. 활성 산소종 생성 억제 활성	35
III. 결과 및 고찰	39
1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 항보체 및 항산화 활성	39

1-1. 항보체 활성	39
1-2. 항산화 활성	41
1-2-1. DPPH radical 소거활성	41
1-2-2. Hydroxy radical 소거활성	41
1-2-3. Peroxynitrite 소거활성	42
1-2-4. 활성산소종 생성 억제활성	43
2. 화합물의 구조 결정	45
2-1. <i>n</i> -Hexane 획분에서 분리된 화합물의 구조 결정(1-4)	45
2-2. EtOAc 획분에서 분리된 화합물의 구조 결정(5-14)	55
2-2-1. Flavonol 화합물의 구조 결정(5, 8, 11-14)	55
2-2-2. Phenol성 화합물의 구조 결정(6, 7, 9, 10)	58
3. 분리된 화합물들의 항보체 및 항산화 활성	69
3-1. 항보체 활성	69
3-2. 항산화 활성	72
IV. 요약 및 결론	75
V. 참고문헌	78
감사의 글	

Anti-complement and Antioxidant Constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger

Na-Young Yoon

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

Abstaract

The *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae) is perennial herb, which is fairly distributed over Korea, China and Japan. In particular, the dried whole plants have been used as a Chinese crude drug for the treatment of fever, hemostatic, hepatitis, arthritis, eczema and intoxication, and used in folk medicine as an anti-cancer agent.

The study was carried out to investigate the anti-complement activity of the MeOH extract and its various solvent soluble fractions, such as *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH and H₂O, respectively, from *O. japonicus*. Among fractions, *n*-hexane soluble fraction with IC₅₀ value of 15.89 μg/ml, compared to rosmarinic acid (IC₅₀=64.80 μg/ml), which used as a positive control, showed the highest activity on the anti-complement activity. The active *n*-hexane soluble fraction was further purified by repeated silica gel and sephadex LH-20 column chromatography to yield compounds **1-4**. The structural identification of these compounds was performed by analysis of the

1D (^1H , ^{13}C -NMR), 2D (HMQC, HMBC) NMR, EIMS and FABMS spectral data and by comparison with the published spectral data. These isolated compounds **1-4** were characterized as β -sitosterol (**1**), hydroxyhopanone (**2**), β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-6'-*O*-palmitate (**3**) and β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**), respectively. Compounds **2** and **3** were isolated from this plant for the first time. Compound **1** showed good inhibitory effect on the complement system of classical pathway with IC_{50} value of 59.41 μM , compared to tiliroside (IC_{50} =76.50 μM) used as a positive control. Among isolated compounds, compound **3** exhibited the strongest activity on the anti-complement activity with IC_{50} value of 1.01 μM .

The anti-oxidative activity of the MeOH extract and its solvent soluble fractions, such as *n*-hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH and H_2O from *O. japonicus* was also evaluated by DPPH radical, $\cdot\text{OH}$, ONOO^\cdot and total ROS scavenging tests. Among these fractions, the EtOAc soluble fraction with IC_{50} values of 2.70, 4.79 ± 1.77 , 1.50 ± 0.01 and 1.02 ± 0.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively, on the four tested model systems, compared to L-ascorbic acid (IC_{50} =1.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), trolox (IC_{50} =6.69 \pm 1.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillamine (IC_{50} =2.21 \pm 0.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and trolox (IC_{50} =13.85 \pm 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$), acting as positive controls, had the highest activity. The active EtOAc soluble fraction was further purified by repeated silica gel, sephadex LH-20 and RP-18 column chromatography. Compounds **5-14** were isolated from the EtOAc soluble fraction of *Orostachys japonicus* A. Berger. The structural identification of these compounds was performed by analysis of the 1D (^1H , ^{13}C -NMR) and 2D (HMBC) NMR spectral data and by comparison with the

published spectral data. These isolated compounds **5-14** were characterized kaempferol (**5**), hydroquinone (**6**), methyl gallate (**7**), quercetin (**8**), gallic acid (**9**), protocatechuic acid (**10**), kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**11**), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**12**), kaempferol 3-*O*-rutinoside (**13**) and kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**), respectively.

These compounds **5-14** were individually evaluated for scavenging activity on both DPPH radicals and peroxyntirite. Compounds **8** and **9** exhibited strong antioxidant activity on DPPH radical with IC₅₀ values of 2.65 and 1.68 μ M, respectively, comparable to L-ascorbic acid (IC₅₀=7.38 μ M), as a well-known antioxidant. Compounds **5, 7-10** were high scavenging activity on peroxyntirite with IC₅₀ values of 1.76 \pm 0.56, 1.38 \pm 0.90, 0.42 \pm 0.60, 1.04 \pm 0.93 and 1.95 \pm 0.93 μ M, respectively, comparable to penicillamine (2.36 \pm 0.79 μ M). On the structure of flavonols, the existence of 3-hydroxy group proved to be important in the peroxyntirite and DPPH radical scavenging mechanism.

I. 서론

와송 (瓦松, *Orostachys japonicus* A. Berger)은 바위솔 (岩松), 와화 (瓦花), 와련화 (瓦蓮花) 등으로 불리는 돌나무과 (Crassulaceae)의 다년생 초본 식물로서 백 여년 이상 된 기와 지붕이나 산 그리고 바닷가의 바위 위에 자라며, 한국, 중국, 그리고 일본에 분포한다.

우리나라에서 자생하는 와송은 기와 지붕에서 자라는 와송 (*Orostachys japonicus* A. Berger)과 해변의 바위 위에서 자라는 둥근 바위솔 (*Orostachys malacophyllus* Fisch) 등이 있으며, 중국에서는 *Orostachys fimbriatus* Berger, *Orostachys erubescens* Ohwi, *Orostachys spinosus* C. A. Mey 등을 사용하며, 일본에서는 *Orostachys erubescens* Ohwi를 사용하나 이들이 문헌상으로 약효가 비슷한 것으로 생각된다. 와송은 육질의 다년생 초본으로 10~30cm쯤 곧게 자라며 꽃이 피고 열매를 맺으면 고사하는 특징이 있으며 여름부터 가을에 걸쳐 채취하며 뿌리를 제거한 전초를 햇볕에 말려 약용으로 한다. 건조된 와송 전초는 한방에서 해열 (解熱), 소종 (消腫), 지혈 (止血), 이습 (利濕), 해독 (解毒) 등에 사용되며 우리나라에서는 민간요법으로 암의 예방과 치료에 많이 사용되고 있다 (Park *et al.*, 1991b).

암의 예방과 치료는 면역계의 활성화와 관련이 있다. 면역계는 다양한 종류의 외부감염원 (항원, bacteria, fungi, virus 등 병원성 미생물과 다양한 종류의 allergens)으로부터 생명체 자신을 보호하기 위한 포괄적 방어체계로서 생명체 조직의 손상이나 항원에 의한 자극으로 염증반응이 시작되면 혈관과 체

액의 각종 면역세포와 염증매개 성분들이 관여하여 효소 활성화, 매개물질 분비, 혈관 확장 및 투과성 증대, 세포의 이동, 조직파괴 등의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등 외적 증상이 나타난다 (Weissmann, G., 1992, Brent, L., 1992). 염증반응을 매개하는 물질에는 체액성 물질로서 보체계 (complement system)에서는 anaphylatoxins, 하계만인자계 (Hageman factor system)에서는 kinin 등이 있으며, 조직이나 세포 활성화로 생성되는 물질로서는 아민 화합물인 histamine, serotonin, 인지질로부터 합성되는 혈소판 활성화자 (platelet activation factor, PAF) 및 불포화지방산 물질 (leukotrienes, prostaglandins, thromboxanes) 그리고 cytokine 단백질 (interleukins, tumor necrosis factor) 등 다양하게 존재하며, 각 매개물질은 특징적인 생리적 기능을 담당하고 있지만 염증반응에서 이들의 작용은 복합적으로 일어나는 것으로 알려져 있다 (Moore *et al*, 1985). 보체는 면역반응의 초기에 염증을 활성화 및 증폭작용을 하는 주요 인자이다. 보체 활성화 과정에서 생성하는 활성화단백질 (anaphylatoxins: C3a, C4a, C5a)과 복합단백질 membrane attack complex (MAC)은 다양한 질환 (류마치스성 관절염, 전신홍반성낭창, 성인호흡질환 증후군, Alzheimer성 치매)과 관련이 있으며, 장기이식 초급성 거부반응의 직접적인 원인이 되고 있다.

최근들어 생체방어계에서 중요한 역할을 담당하는 보체계 (complement system)를 활성화하는 물질 (항보체 활성화물질)들이 생체의 면역 부전상태를 개선 혹은 치료하는 면역요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 가능성이 제시되고 있다. 또한 이들이 주로 macrophage와

complement system 등과 관련이 있는 면역계를 활성화 시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.

천연물에 있어 항산화 활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 이유는 합성 산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)의 경우 뛰어난 항산화 효력과 저렴한 가격 때문에 널리 사용되어 왔으나, 이들이 암을 유발시키는 등 인체에 대한 독성을 갖는다는 사실 (Branen, 1975)이 보고된 이후 천연 항산화제의 개발에 관심이 집중되었다. 비록 tocopherol (Koskas *et al*, 1984), L-ascorbic acid (Gow and Flick, 1985 ; Han *et al*, 1990)와 같은 천연 항산화제가 널리 사용되기는 하나, 천연 그 중에서도 특히 식물로부터 매우 효력이 있고 안전하며 경제적인 항산화제의 발견을 위한 연구가 끊임없이 계속되고 있다 (Nagatsu *et al*, 1995). 천연물의 분리가 18세기 말 포도에서 tartaric acid, 레몬에서 citric acid가 분리되는 등 천연물 화학의 근대 과학적 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 외의 많은 항산화 성분들이 천연물로 밝혀지고 있다.

와송에서 연구된 생리활성 연구는 와송의 향들연변이 효과 (Park *et al*, 1991c), GTI-I 쥐 시상하부 신경 세포종에서 과산화수소로 야기되는 apoptosis에서 와송의 보호효과 (Yoon *et al*, 2000), 와송으로부터 HIV-1 protease 활성을 가지는 페놀성 화합물의 분리 (Park *et al*, 2000) 등이 있다. 따라서 본 연구는 와송의 MeOH 추출물 및 분획물에서 항보체 활성을 평가하여 활성이 가장 높은 *n*-Hexane 획분을 대상으로 silica gel과 sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 성분을 분리 동정하고, 분리된 화합물의 구조와

항보체 활성과의 관계를 조사하고자 하였다. IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC 및 EIMS, FABMS spectra 등의 분광학적 방법을 이용하여 β -sitosterol (1), hydroxyhopanone (2), β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-6'-*O*-palmitate (3) 그리고 β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside (4)를 분리 동정하였으며, 이들 화합물을 항보체 활성을 평가한 결과 항보체 활성이 나타났음을 밝혔다.

와송의 MeOH 추출물 및 분획물의 항산화 활성을 DPPH radical, hydroxyl radical, peroxynitrite 그리고 total ROS 소거 활성법으로 살펴보았다. 항산화 효과가 있는 EtOAc 획분을 대상으로 silica gel, sephadex LH-20 및 RP-18 column chromatography로 성분을 분리 동정하고, 분리된 화합물의 구조와 항산화 활성과의 관계를 조사하고자 하였다. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC 등의 분광학적 방법을 이용하여 kaempferol (5), hydroquinone (6), methyl gallate (7), quercetin (8), gallic acid (9), protocatechuic acid (10), kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (11), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (12), kaempferol 3-*O*-rutinoside (13) 그리고 kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- β -D-glucopyranoside (14)를 분리 동정 하였다. 이들 화합물을 DPPH radical과 peroxynitrite 소거 활성을 실험한 결과 항산화 활성이 나타났음을 밝혔다.

II. 실험 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 와송 (*Orostachys japonicus* A. Berger)은 2003년 8월 경남 함천군에서 재배한 것을 구입하여 사용하였다. 식물 표본은 본 연구실에 보관하였다 (No. 20030827).

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Column packing material은 kieselgel 60 (70~230 mesh, Merck, Art. 7734)과 sephadex LH-20 (bead size 25~100 μm , Sigma), RP-18 (Lichroprep[®] RP-18, 40~63 μm , Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (0.25 mm, precoated Merck, Art. 5715)와 RP-18 F_{254s} (Merck, Art. 5685)를 사용하였으며, 발색시약은 50% H₂SO₄을 분사하여 hot plate에 태워서 발색되는 색을 관찰하였다. 추출 및 column chromatography에는 시약상으로부터 1급 시약을 구입하여 사용하였다. NMR 측정에 사용한 용매는 DMSO-*d*₆ (Merck, deuterium degree 99.95%), CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95%), pyridine-*d*₅ (Aldrich Chemicals, deuterium degree 99%)이다.

양 적혈구 (SRBC)는 충남대학교 농과대학으로부터 전혈을 분양 받았으며, 사람 혈청은 지원자로부터 직접 채혈하였다. 그리고 hemolysin, gelatin, MgCl₂, CaCl₂, Sodium barbital 과 barbituric acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo,

USA)에서 구입하였다. Tiliroside와 rosmarinic acid는 *Magnolia fargesii*과 *Agastache rugosa*로부터 직접 분리하여 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical과 L-ascorbic acid은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, peroxyntirite (ONOO⁻)는 Cayman Chemmical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

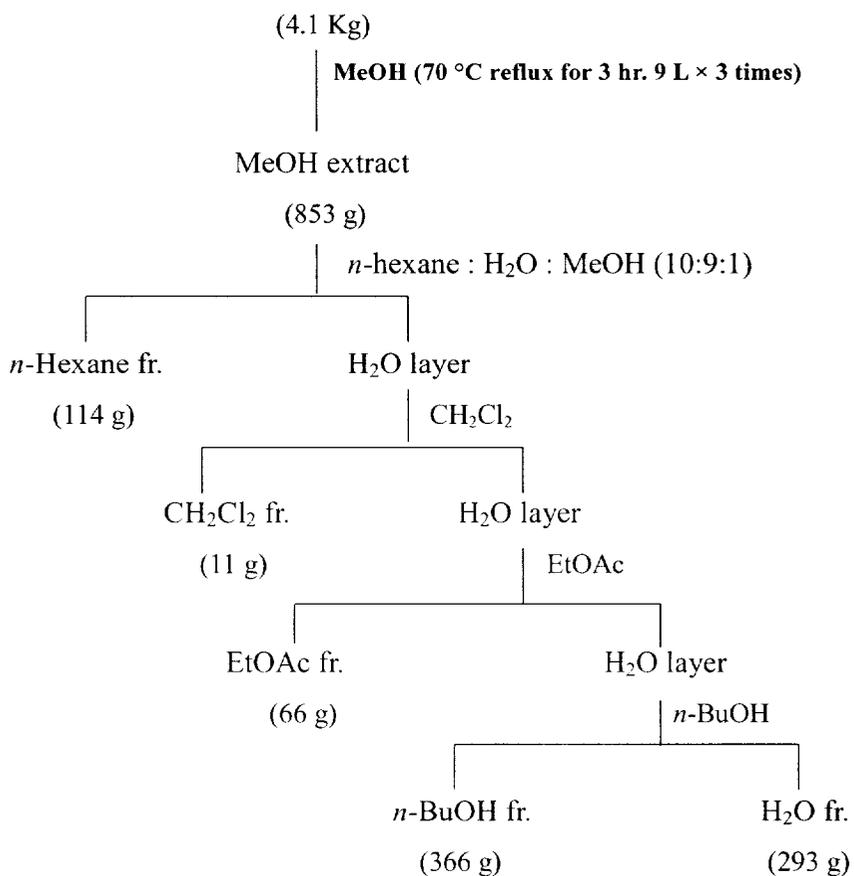
2-2. 기기

¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 JNM ECP-400 spectrometer (JEOL, Japan)로 측정하였으며, two-dimension NMR인 HMQC, HMBC는 pulsed field gradient를 사용하여 측정하였다. EIMS는 GC-MS QP-5050A (Shimadzu, Japan)에서, LR-, HR-FABMS는 JMS-HX110A / HX110A Tandem mass spectrometer (JEOL)로 측정하였다. IR은 고체시료의 경우 Perkin-Elmer 2000 spectrophotometer에서 KBr disc법으로 각각 측정하였다. TLC상의 화합물 검색을 위해 장파장 (365 nm)과 단파장 (245 nm) 겸용 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, U.S.A)를 사용하였다. DPPH radical 측정은 microplate reader spectrophotometer VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)로 하였고, total ROS와 peroxyntirite 지해활성은 microplate fluorescence reader FL 800 (Bio-Tek instruments Inc.)에서 측정하였다.

3. 성분의 추출 및 분획

잘 말린 와송 (*Orostachys japonicus* A. Berger) 4.1 kg을 methanol (9 L)을 넣고 70°C의 수욕상에서 3시간 동안 환류 냉각기를 사용하여 3회 추출 후 여과하고, 그 여액을 rotary vacuum evaporator에서 농축하여 MeOH 추출물 853 g을 얻었다. 메탄올 추출물은 계통적 분석법에 따라 순차적으로 분획하여, *n*-hexane soluble fraction (114 g), CH₂Cl₂ soluble fraction (11 g), EtOAc soluble fraction (66 g), *n*-BuOH soluble fraction (366 g) 그리고 H₂O fraction (293 g)으로 나누었으며, 그 과정은 Scheme 1에 나타내었다.

Orostachys japonicus A. Berger

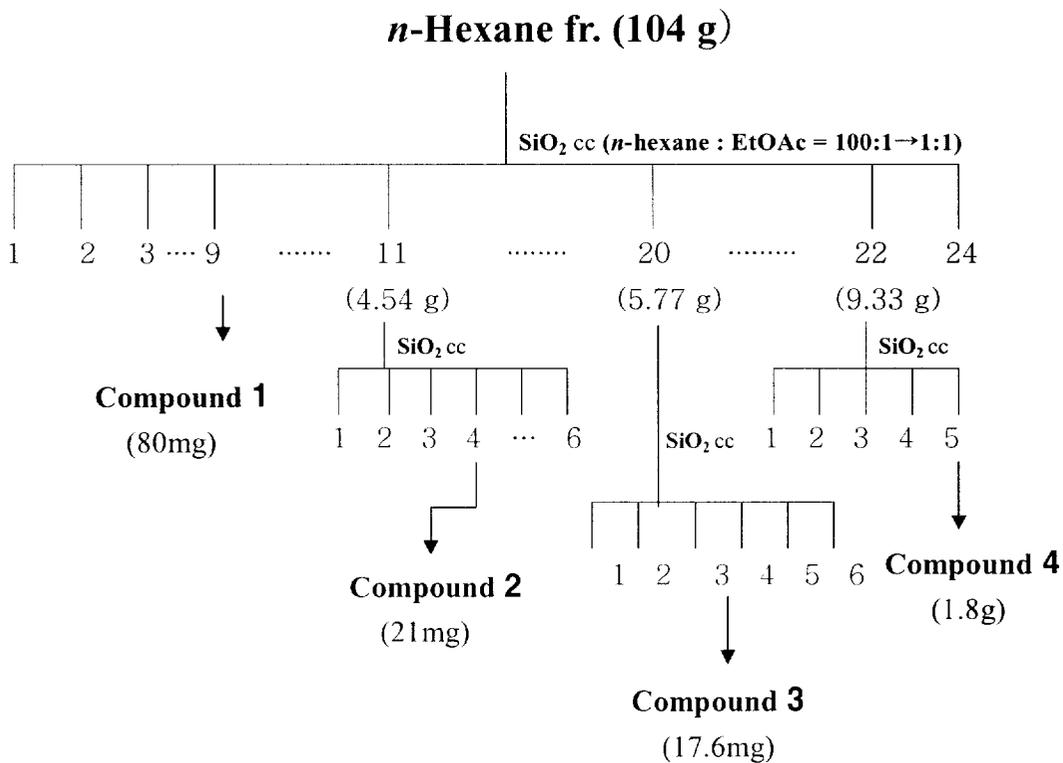


Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of *Orostachys japonicus* A. Berger.

4. 화합물의 분리

4-1. *n*-Hexane 획분의 성분 분리

항보체 활성이 가장 높았던 와송의 *n*-Hexane 분획물 (104 g)을 *n*-hexane : EtOAc (100:1~1:1) 용매로 silica gel column chromatography하여 Scheme 2와 같이 24개의 subfractions (F1~F24)으로 나누었다. 이들 중 F-9, F-11, F-20, F-22을 각각 column chromatography하여 *n*-hexane : EtOAc = 5:1 그리고 CH₂Cl₂ : EtOAc : MeOH = 15:1:1의 용매로서 각각의 화합물 **1-4**를 순수하게 분리하였다. 이들 화합물은 각각 β -sitosterol, hydroxyhopanone, β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-6'-*O*-palmitate 그리고 β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside로 분광학적 기기분석에 의하여 구조를 확인하였다.



Scheme 2. Isolation of compounds **1-4** from the *n*-hexane fraction of *Orostachys japonicus* A. Berger.

4-1-1. 화합물 1-4의 분광학적 특성

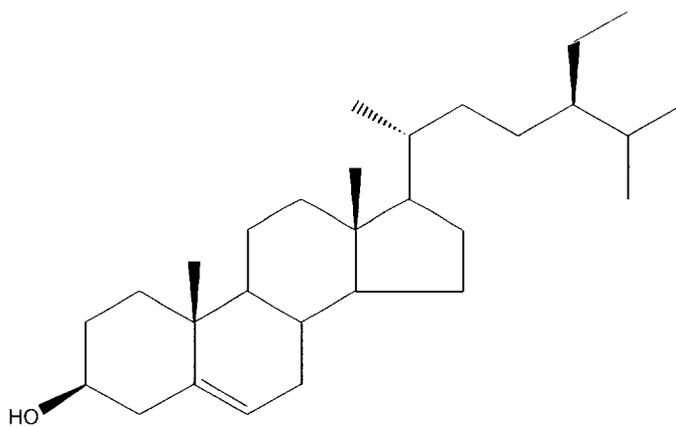
Compound 1 (β -Sitosterol): Amorphous white powder. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.35 (1H, d, $J=5.3$ Hz, H-6), 3.54 (1H, m, 3-OH), 2.04 (1H, d, $J=4.4$ Hz, H-12), 2.02 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-2), 1.99 (1H, m, H-12), 1.96 (1H, m, H-8), 1.88 (1H, s, H-1), 1.86 (1H, d, $J=3.1$ Hz, H-2), 1.67 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-25), 1.52 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-11), 1.50 (1H, s, H-7), 1.16 (1H, d, $J=4.3$ Hz, H-23), 1.12 (1H, s, H-17), 1.08 (1H, s, H-17), 1.02 (3H, s, CH_3 -19), 1.01 (1H, s, H-14), 0.98 (2H, s, H-9, 15), 0.96 (1H, d, $J=5.8$ Hz, H-24), 0.82 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-27, 29), 0.79 (1H, s, H-29), 0.69 (3H, s, CH_3 -18), 0.65 (1H, s, H-29); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 568 (C-14), 56.0 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13), 42.3 (C-4), 39.8 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 36.1 (C-20), 33.9 (C-22), 31.9 (C-7, 8), 31.6 (C-2), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 26.0 (C-23), 24.3 (C-15), 23.1 (C-28), 21.1 (C-11), 19.8 (C-27), 19.4 (C-19), 19.0 (C-26), 18.8 (C-21), 12.0 (C-29), 11.9 (C-18).

Compound 2 (Hydroxyhopanone): Amorphous white powder. $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$. EI mass spectrum m/z : 442 $[\text{M}]^+$, IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3467, 1708. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 1.41 (3H, s, H-30), 1.36 (3H, s, H-29), 1.13 (3H, s, H-23), 1.03 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-28). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 216.4 (C-3), 72.4 (C-22), 54.8 (C-5), 51.5 (C-21), 50.2 (C-13), 49.7 (C-9), 47.3 (C-4), 44.3 (C-18), 42.1 (C-14), 41.7 (C-8), 41.7 (C-19), 39.5 (C-1), 36.8 (C-10), 34.7 (C-15), 34.3 (C-2), 32.8 (C-7), 31.4 (C-30), 29.8 (C-29), 26.9 (C-23), 26.6 (C-20), 24.3 (C-12), 22.2 (C-16), 21.7 (C-11), 21.2 (C-24), 19.9 (C-6), 17.0 (C-27), 16.5 (C-26 and 28), 15.7 (C-25).

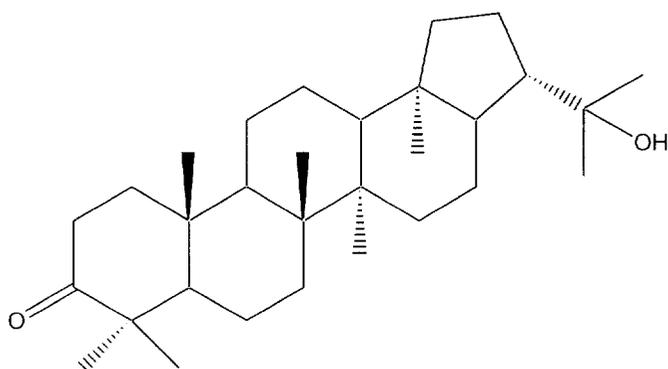
Compound 3 (β -Sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-6'-*O*-palmitate):

Amorphous powder, C₅₁H₉₀O₇. Positive LR-FABMS *m/z* 838 [C₅₁H₉₀O₇+Na+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.36 (1H, m, H-6'), 4.42 (1H, d, *J*=5.3 Hz, H-6'), 4.38 (1H, d, *J*=7.4 Hz, H-1'), 4.30 (1H, d, *J*=11.0 Hz, H-6'), 3.58 (1H, s, H-3'), 3.55 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-3), 3.46 (1H, d, *J*=3.5 Hz, H-1), 3.40 (1H, s, H-4'), 3.37 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-5'), 2.33 (2H, t, *J*=7.5 Hz, H-2''), 2.27 (2H, d, H-4), 2.03 (2H, d, *J*=6.4 Hz, H-11, H-12), 1.95 (1H, s, H-2), 1.85 (2H, d, *J*=12.9 Hz, H-1), 1.61 (2H, m, H-3''), 1.49 (2H, s, H-8, H-11), 1.26 (2H, br s, H-28, 4'', 5'', 6'', 7''~12'', 13'', 14'', 15''), 1.00 (3H, s, H-19), 0.93 (1H, s, H-24), 0.91 (1H, s, H-4''), 0.88 (3H, s, H-16''), 0.85 (1H, s, H-26), 0.68 (3H, s, H-18) ; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 174.5 (C-1''), 140.3 (C-5), 122.1 (C-6), 101.2 (C-1'), 79.7 (C-3), 76.1 (C-3'), 73.9 (C-5'), 73.5 (C-2'), 70.2 (C-4'), 63.4 (C-6'), 56.8 (C-14), 56.1 (C-17), 50.2 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13), 39.8 (C-12), 38.9 (C-4), 37.3 (C-1), 36.7 (C-10), 36.2 (C-20), 34.3 (C-2''), 33.9 (C-22), 31.9 (C-7, 8), 29.8 (C-7''~12''), 29.7 (C-6''), 29.6 (C-5''), 29.4 (C-2), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 25.0 (C-23), 24.3 (C-15), 23.1 (C-28), 22.7 (C-15''), 21.1 (C-11), 19.8 (C-26), 19.4 (C-19), 19.0 (C-27), 18.8 (C-21), 14.1 (C-16'').

Compound 4 (β -Sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside): Amorphous white powder.

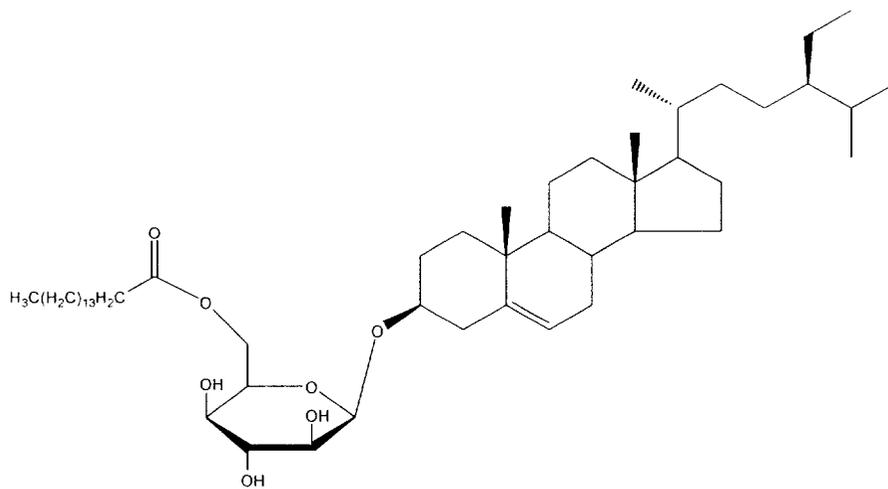


Compound 1

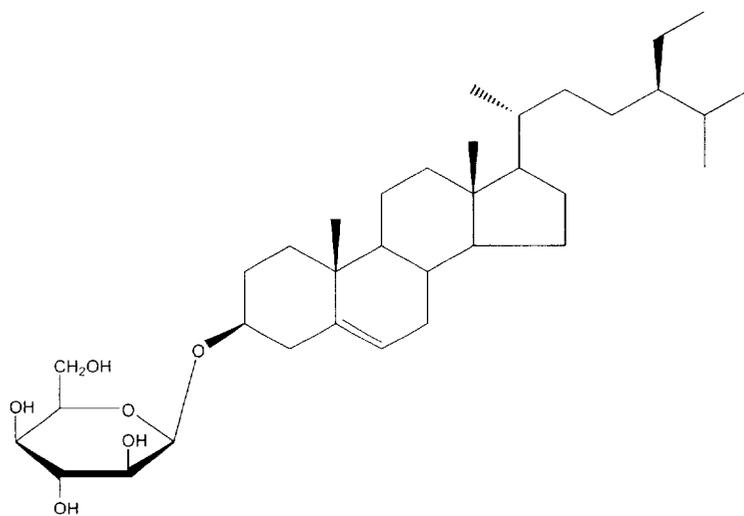


Compound 2

Fig. 1. Chemical structures of compounds **1** and **2**.



Compound 3

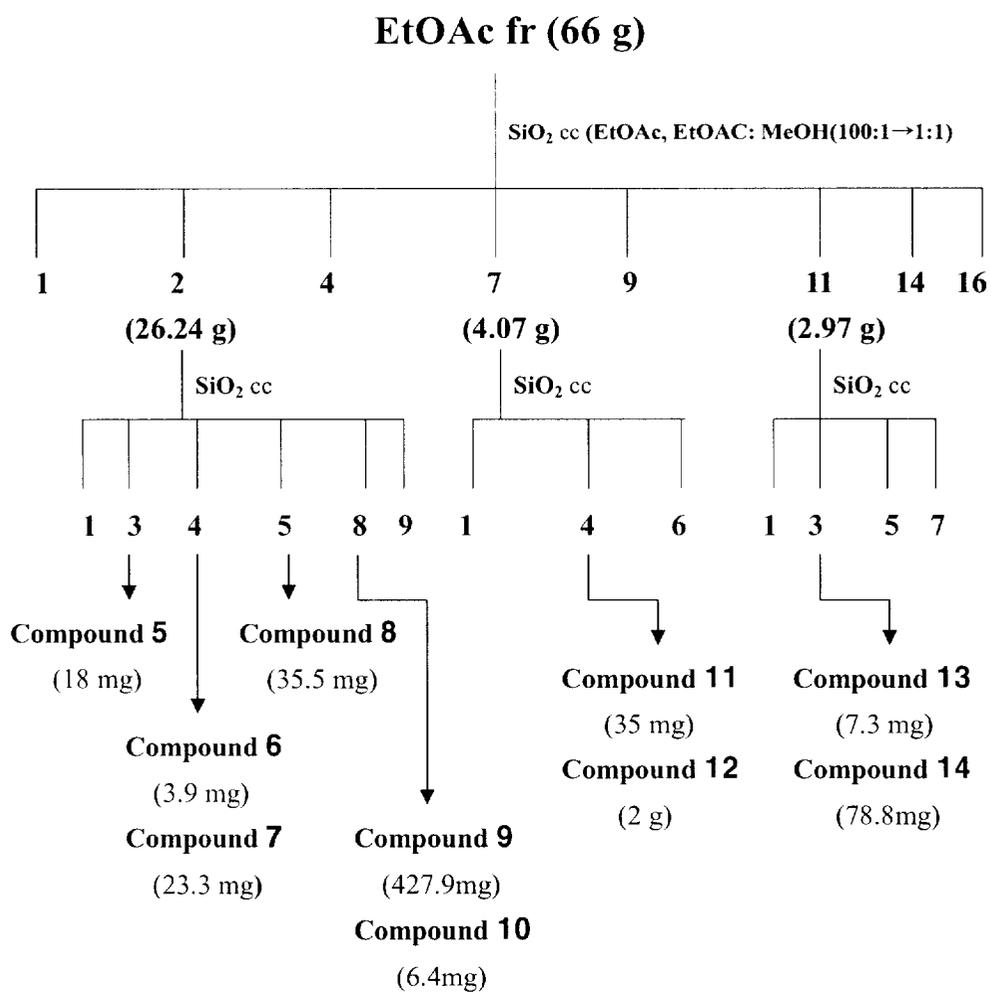


Compound 4

Fig. 2. Chemical structures of compounds **3** and **4**.

4-2. EtOAc획분의 성분 분리

DPPH radical, hydroxyl radical, ONOO⁻ 소거 활성법, 세포내 활성산소종 생성 억제 활성법을 사용한 항산화 실험계에서 활성이 가장 높게 나타난 EtOAc획분 (66 g)을 EtOAc, EtOAc : MeOH = 100:1~1:1로 silicagel column하여 16개의 subfractions으로 나누었다(Scheme 3). 이들 중 F-2, F-7, F-11을 각각 column chromatography하여 CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O = 7:1:0.1, 5:1:0.1과 CH₂Cl₂ : MeOH : Acetic acid = 7:1:0.1, 5:1:0.1의 용매로서 각각 순수하게 10개의 화합물 **5-14**를 분리하였다. 이들 화합물들은 각각 kaempferol, hydroquinone, methyl gallate, quercetin, gallic acid, protocatechuic acid, kaempferol 3-*O*-β-D-glucopyranoside, quercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside, kaempferol 3-*O*-rutinoside 그리고 kaempferol 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl 7-*O*-β-D-glucopyranoside로 분광학적 기기분석에 의하여 구조를 확인하였다.



Scheme 3. Isolation of compounds **5-14** from the EtOAc fraction of *Orostachys japonicus* A. Berger

4-2-1. 화합물 5-14의 분광학적 특성

Compound 5 (Kaempferol): Yellow powder. mp : 276-287°C.

Compound 6 (Hydroquinone): Amorphous white powder. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.0 (C-1, 4), 131.0 (C-2, 6), 114.4 (C-3, 5).

Compound 7 (Methyl gallate): Amorphous white powder. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.94 (2H, s, H-2, 6), 3.74 (3H, s, CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.3 (C-7), 145.6 (C-3, 5), 138.5 (C-4), 119.3 (C-1), 108.5 (C-2, 6), 51.6 (7-CH₃).

Compound 8 (Quercetin): Yellow powder. mp : 313-314°C.

Compound 9 (Gallic acid): Amorphous white powder. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.91 (2H, s, H-2, 6). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.5 (C-7), 145.4 (C-3, 5), 138.0 (C-4), 120.5 (C-1), 108.7 (C-2, 6).

Compound 10 (Protocatechuic acid): Amorphous white powder. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.33 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 7.27 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.4 (C-7), 150.0 (C-4), 144.9 (C-3), 121.8 (C-1, 6), 116.6 (C-2), 115.1 (C-5).

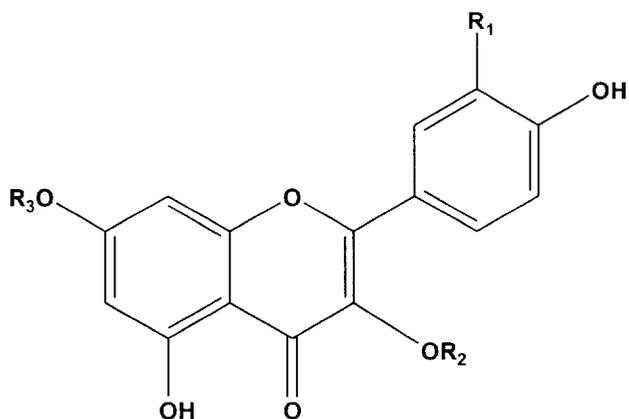
Compound 11 (Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside): Yellow powder. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.62 (1H, s, 5-OH), 8.04 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, *J*=8.9 Hz, H-3', 5'), 6.43 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, s, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.46 (1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1"). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.4 (C-4), 164.6 (C-7), 161.2 (C-5), 160.0 (C-4'), 156.4 (C-9), 156.2 (C-2), 133.2 (C-3), 130.9 (C-2', 6'), 120.9 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 103.9 (C-10), 100.9 (C-1"), 98.8 (C-6), 93.7 (C-8), 77.5 (C-5"), 76.4 (C-3"), 74.2 (C-2"), 69.9 (C-4"), 60.8 (C-6").

Compound 12 (Quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside): Yellow powder. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.60 (1H, s, 5-OH), 7.59 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.57 (1H, dd, *J*=2.0, 9.0 Hz, H-6'), 6.84 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-6), 6.20 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-8), 5.46 (1H, d, *J*=7.3 Hz, H-1"). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.4 (C-4), 164.2 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-2), 156.1 (C-9), 148.5 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.6 (C-6'), 121.2 (C-1'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.9 (C-10), 100.9 (C-1"), 98.7 (C-6), 93.5 (C-8), 77.6 (C-5"), 76.5 (C-3"), 74.1 (C-2"), 69.9 (C-4"), 61.0 (C-6").

Compound 13 (Kaempferol 3-O-D-rutinoside): Yellow powder. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.56 (1H, s, 5-OH), 7.98 (2H, d, *J*=9.0 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.33 (1H, d, *J*=7.4 Hz, H-1"), 4.40 (1H, br s, H-1"), 0.98 (3H, d, *J*=6.1 Hz, H-6"). ¹³C-NMR (100

MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.4 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 159.9 (C-4'), 156.8 (C-9), 156.5 (C-2), 133.2 (C-3), 130.9 (C-2', 6'), 120.9 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 104.0 (C-10), 101.3 (C-1''), 100.7 (C-1'''), 98.7 (C-6), 93.7 (C-8), 76.3 (C-3''), 75.8 (C-5''), 74.2 (C-2''), 71.8 (C-4'''), 70.6 (C-4''), 70.3 (C-3'''), 69.9 (C-2'''), 68.2 (C-5'''), 66.9 (C-6''), 17.7 (C-6''').

Compound 14 (Kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- β -D-glucopyranoside): Yellow powder. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.61 (1H, s, 5-OH), 8.24 (1H, s, 4'-OH), 7.78 (2H, d, *J*=8.9 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3', 5'), 6.77 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-8), 6.46 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-6), 5.33 (1H, s, H-1''), 5.07 (1H, d, *J*=7.3 Hz, H-1'''), 0.80 (3H, s, H-6''). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 178.0 (C-4), 162.9 (C-7), 160.0 (C-4'), 157.8 (C-9), 156.1 (C-2), 134.5 (C-3), 130.7 (C-2', 6'), 120.3 (C-1'), 115.5 (C-3', 5'), 105.8 (C-10), 101.8 (C-1''), 99.9 (C-1'''), 99.4 (C-6), 94.7 (C-8), 77.2 (C-5'''), 76.4 (C-3'''), 73.1 (C-2'''), 71.1 (C-4''), 70.7 (C-5''), 70.3 (C-3''), 70.1 (C-2''), 69.6 (C-4'''), 60.6 (C-6''), 17.5 (C-6'').



Compound 5 : $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$

Compound 8 : $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H$

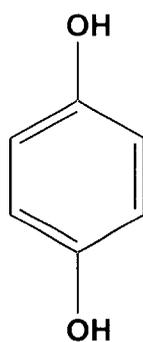
Compound 11 : $R_1 = H, R_2 = \text{Glu}, R_3 = H$

Compound 12 : $R_1 = OH, R_2 = \text{Glu}, R_3 = H$

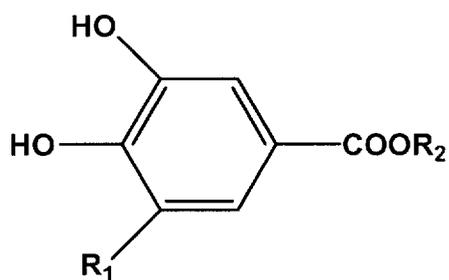
Compound 13 : $R_1 = H, R_2 = \text{Glu (6} \rightarrow \text{1)Rha}, R_3 = H$

Compound 14 : $R_1 = H, R_2 = \text{Rha}, R_3 = \text{Glu}$

Fig. 3. Chemical structures of compounds **5, 8, 11-14.**



Compound 6



Compound 7 : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$

Compound 9 : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

Compound 10 : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$

Fig. 4. Chemical structures of compounds **6**, **7**, **9** and **10**.

5. 항보체 및 항산화 활성

5-1. 항보체 활성

면역계 중 보체는 체액성 면역에 관여하는 주요인자로서 면역반응 초기단계에서 항원 제거작용과 함께 다양한 염증관련 반응 활성을 매개하는 역할을 하여 체내 여러 가지 기능을 조절하는 펩타이드를 생산하는 중요한 수단이다 (Rother *et al*, 1985; Kimball, 1990). 보체는 혈장 단백질 건조중량 중 15%를 차지하며 serum protein 및 glycoprotein 21종, 보체 수용체 8종 등 다양한 성분으로 구성되어 있고, 간세포, 체내 주요기관의 내피세포, 면역세포 등에서 생성된다 (Kuby, 1994; Stunk *et al*, 1988). 보체 초기 활성화 방식은 외부 감염원이나 직접적인 세포손상 등에 의한 경우 (alternative pathway, 이하 AP)와 면역 복합체 (Ag-Ab complex)에 의한 경우 (classical pathway, 이하 CP)의 2가지로 구분된다. AP에 의한 보체 활성화는 면역복합체 생성이전에 감염 미생물에 대한 생체의 초기 방어기작으로서 중요한 역할을 하며, 특정 항원에 대한 항체가 존재하거나 생성되면 CP과정으로 활성화된다. 각 과정으로 보체 활성화 반응을 시작하면 일련의 연쇄반응으로 구성 성분들이 차례로 활성화 하여 보체 활성 성분 C5b를 공통으로 생성하며, membrane attack complex (MAC) 생성과정은 동일하게 진행된다. 항원에 대한 보체의 직접적인 작용은 MAC에 의한 용혈작용이다. 항원의 표면에서 보체 활성성분 C5b에 보체 성분 (C6, C7, C8 및 C9)이 차례로 결합하여 최종적으로 원통형태의 MAC (내경:70-100Å)이 형성되면 항원 세포막 내부로 관통하여 항원세포에 삼투용혈을 유발하며, 대부분의 enveloped virus (herpes virus, myxoviruses, paramyxoviruses, retroviruses)와 G(-) bacteria 등은 MAC에 의한 용혈작용으로 제거된다. 한편, 염증반응에서 보체의 활성화가 중요한 이유는 활성화 과정중 생성되는 펩타이드 (anaphylatoxins: C3a, C4a, C5a)가 염증세포 (PMNs, macrophage, monocyte, lymphocyte, mast cell)를 활성화하여 전반적인 염증반응 (혈과 투과성 증가,

평활근 수축, 염증세포 유인, 탐식작용 유도, opsonin 작용)을 증가시키는 매개체 역할을 하기 때문이다 (Sumdsmo *et al*, 1983). 그리고 MAC도 cAMP, inositol phosphate intermediates, arachidonic metabolites 등의 생성에 중요한 2차 신호 전달자로서 염증반응에 중요한 역할을 한다 (Nicholson *et al*, 1993).

보체 저해활성 물질 탐색에 사용한 방법은 변형된 Mayer 법이다 (Lee *et al*, 2004). 고전 경로에 사용되는 실험법으로 일반 사람 혈청 ($80\mu\text{l}$)의 희석액을 시료를 첨가하거나 첨가하지않은 GVB⁺⁺용액 (gelatin veronal buffer ; $80\mu\text{l}$)과 혼합한다. 각각의 시료는 DMSO에 녹이고, negative control로 사용한다. 그 혼합물은 37°C에서 30분간 예비 배양시키고, 감작적혈구 (양의 적혈구, $40\mu\text{l}$)를 첨가한다. 동일한 조건하에서 배양한 후, 그 혼합물은 4°C에서 1500rpm으로 원심분리한다. 그리고 상층액 $100\mu\text{l}$ 를 450nm에서 흡광도를 측정한다. Rosmarinic acid와 Tiliroside는 positive control로 사용하였다. 항보체 활성은 세번 측정한 평균으로 나타내었으며, 보체 의존적 용혈률로부터 IC₅₀ 값을 나타내었다 (Oh *et al*, 1996, Yamada *et al*, 1985).

Human serum of $80\mu\ell$ mix with a gelatin veronal buffer of $80\mu\ell$



Dissolve each sample in DMSO



Pre-incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min



Add sensitized erythrocytes (sheep red blood cell, $40\mu\ell$.)



Incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min



Measurement of optical density at 450 nm

Scheme 4. Measurement of anti-complement activity

5-2. 항산화 활성

5-2-1. DPPH radical 소거 활성

DPPH radical 소거 실험은 광범위하게 쓰이는 간단하고 편리한 항산화 검색법으로서, 특히 phenol과 aromatic amine 화합물의 항산화능 측정에 많이 사용된다 (Blois, 1958). 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지는 홀수 전자 때문에 520 nm에서 특징적인 강한 흡수 band를 보인다. 그러나 phenolic compound와 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하면 이로부터 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 이때 특징적인 흡수 band도 사라지고 안정한 분자로 전환된다. 즉, 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색이 노란색으로 변하여 (Fig. 5) 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 관찰할 수 있다.

각 시료의 DPPH radical에 대한 소거능 측정은 각 농도별 시료 (1.25~320 $\mu\text{g/mL}$)를 MeOH에 녹여 160 μL 씩 취하여 1.5×10^{-4} M의 DPPH MeOH 용액 40 μL 와 잘 혼합한다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader spectrophotometer VERSA max로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Scheme 5). 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC_{50})를 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

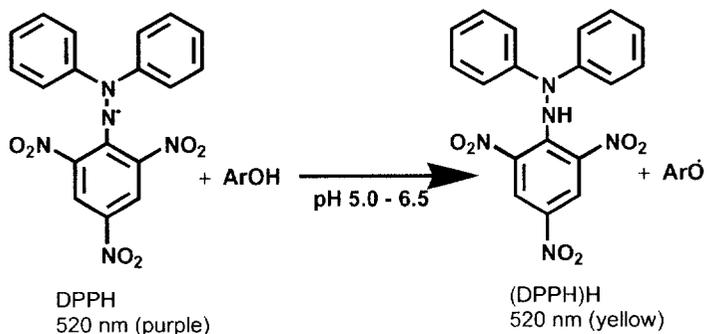
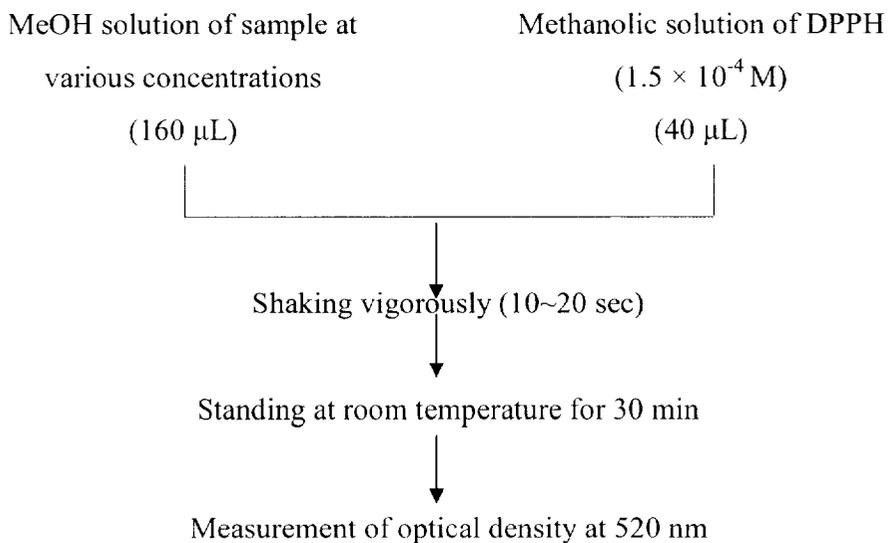


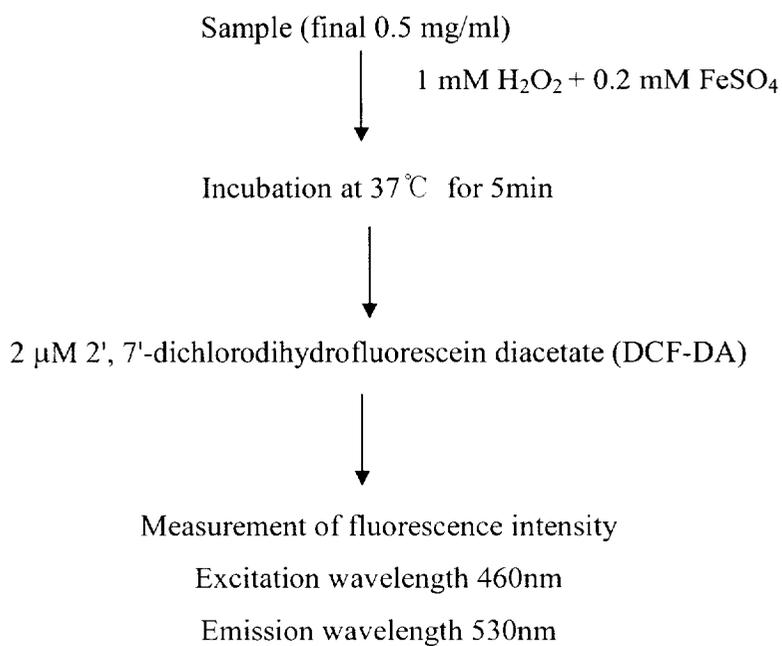
Fig. 5. DPPH radical scavenging action of antioxidants [ArOH].
(Blois, 1958)



Scheme 5. Measurement of DPPH radical scavenging activity.

5-2-2. Hydroxy radical 소거 활성

활성산소의 종류로는 superoxide radical, hydroxy radical, hydrogen peroxide 및 singlet oxygen 등이 있다. 그 중에서 hydroxy radical은 fenton 반응에서 Fe_2^+ 와 같은 전이 금속이 존재할 때 H_2O_2 로부터 생성되어진다. 일반적으로 hydroxy radical은 짧은 반감기 ($\sim 10^{-9}$ sec)를 가지기 때문에 매우 반응성이 높다. 각 농도의 시료 (최종농도 0.5 mg/mL)에 1mM H_2O_2 그리고 0.2 mM FeSO_4 를 잘 섞어서 37 °C에서 5분 동안 배양하였다. 배양시킨 후 2 μM 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA)를 첨가시킨 후 산화된 DCF의 형광 강도를 microplate reader를 사용하여 excitation wavelength 460nm, emission wavelength 530nm에서 30분간 형광 변화를 측정하였다 (Lebel *et al*, 1990) (Scheme 6).



Scheme 6. Measurement of the hydroxy radical scavenging effect
(LeBel *et al*, 1990)

5-2-3. Peroxynitrite 소거활성

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

ONOO^- 소거능은 Kooy *et al.* (1994)의 방법을 약간 변형하여 DHR 123의 산화를 측정하였다 (Scheme 7). Dimethylformamide로 녹인 DHR 123 (5 mM)는 질소 충전하여 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 stock solution으로 저장하였다. 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate, 5 mM potassium chloride로 조제한 buffer (pH 7.4)를 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μM 과 섞어, DHR 123의 최종

농도가 5 μM 이 되도록 한다. 이 working solution에 시료와 authentic ONOO^- 를 첨가하면 5분 후, 비형광성의 DHR 123이 형광성의 rhodamine 123으로 바뀌게 된다 (Fig. 6). 이 형광물질을 microplate fluorescence reader FL 500 (Bio-Tek Instruments Inc.)로 excitation, emission wavelength 각각 480 nm와 530 nm에서 측정하였다. 결과는 DHR 123 산화 저해 백분율로서 mean \pm standard error ($n = 3$)로 나타내었다.

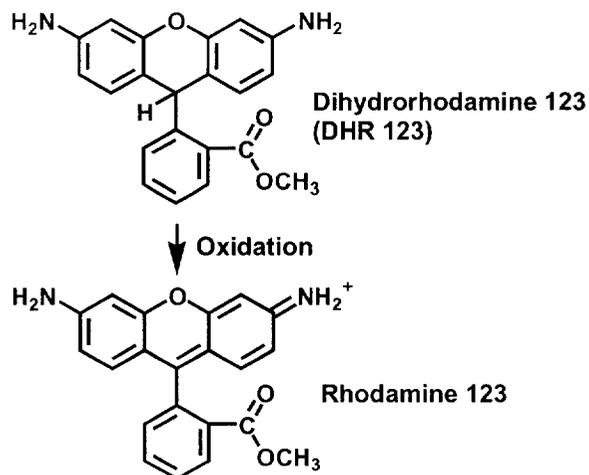


Fig. 6. ONOO⁻-mediated oxidation of DHR 123.

(Crow, 1997)

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μM



Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) 5 μM



Incubation at 37 °C for 5 min



Sample at various concentrations



Authentic ONOO⁻ 5 μM



Measurement of fluorescence intensity

Excitation wavelength at 480 nm

Emission wavelength at 530 nm

Scheme 7. Measurement of the ONOO⁻ scavenging activity.

5-2-4. 활성산소종 생성 억제 활성

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

지방 산화에 의한 생물학적 조직의 손상정도를 측정하기 위해, 세포 배양계에서 비형광 probe인 DCFH-DA를 이용하여 생물 세포의 활성 산소종을 직접적으로 정량 측정하는 방법을 이용하는데, 이는 산화적 스트레스에 의해 발생하는 초기 세포내 산화반응을 신속하게 측정할 수 있다 (Hempel *et al.*, 1999; Wang and Joseph, 1999). DCFH-DA는 안정한 비형광성 분자로 세포막에 쉽게 교차 결합하며 세포내 존재하는 esterase에 의해 deacetylation되어 비형광성 환원물질인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 전환된다. DCFH는 세포내 활성 산소가 존재하면 급격히 산화되어 형광성 산화물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)가 형성되므로 (Fig. 7), 이 형광의 변화를 측정함으로써 세포내 활성 산소종 특히, $\cdot O_2$ 의 초기 생성량을 정량할 수 있게 된다 (LeBel *et al.*, 1990). 그러나 DCFH-DA는 수용성 활성산소종에 대해서는 특이성이 없기 때문에 그 사용에 다소 제한되는 문제가 있다 (Delia *et al.*, 1997).

Scheme 8에 나타내었듯이, 수컷 Wistar rats (체중 150-200 g) 의 신선한 kidney homogenate를 준비하고, 이것을 extract나 compound의 여러 농도의 현탁액에 혼합하여 12.5 μ M DCFH-DA의 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) solution과 함께 37 °C에서 30분간 배양한다. 생성된 reactive oxygen species (ROS)는 microplate fluorescence spectrophotometer (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT) 에서 excitation wavelength 460 nm와 emission wavelength 530 nm에서 각각 30분간 측정하였다 (LeBel *et al.*, 1990). 형광 강도가 증가하지

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

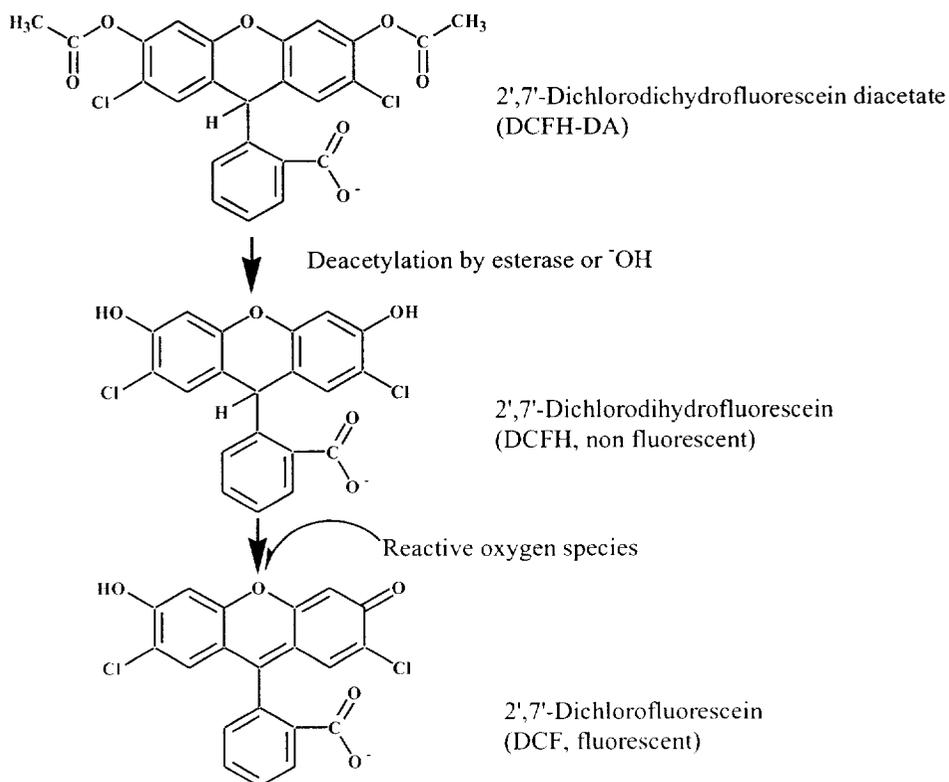
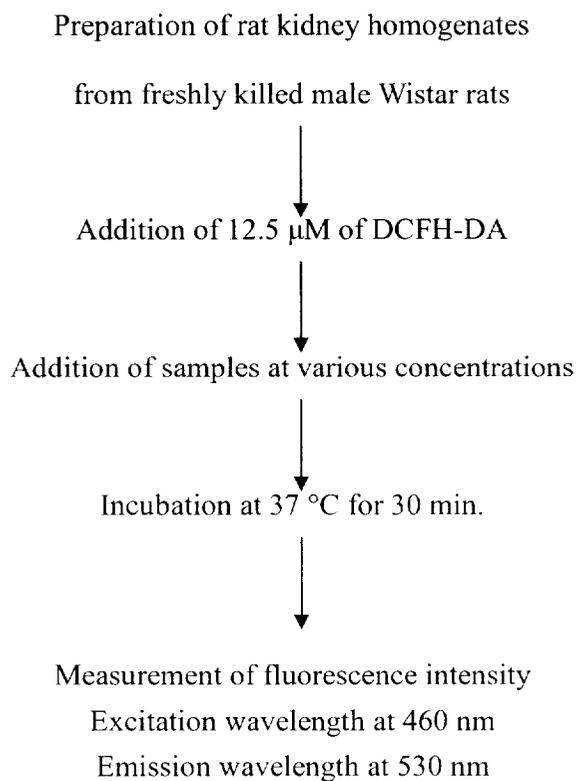


Fig. 7. Assay of the inhibitory activity on the ROS generation.
(Crow, 1997)



Scheme 8. Measurement of the inhibition on the ROS generation by DCF method.

III. 결과 및 고찰

1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 항보체 및 항산화 활성

1-1. 항보체 활성

와송의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 각 분획물들의 항보체 활성을 측정하여 IC_{50} ($\mu g/ml$)로 나타내었으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 와송의 MeOH 추출물과 분획물들의 IC_{50} 값은 *n*-hexane 분획물 (IC_{50} 15.89 $\mu g/ml$) > CH_2Cl_2 분획물 (IC_{50} 15.89 $\mu g/ml$) > MeOH 추출물 (IC_{50} 41.27 $\mu g/ml$) > EtOAc 분획물 (IC_{50} 130.70 $\mu g/ml$) > *n*-BuOH 분획물 (> 200) > H_2O 분획물 (> 200)의 순으로 나타났다. 와송의 MeOH 추출물과 분획물의 항보체 활성 실험에서 *n*-hexane, CH_2Cl_2 분획물은 대조군으로 사용되는 rosmarinic acid (IC_{50} 64.80 $\mu g/ml$)와 비교하였을 때, 이들 두 분획물이 3배 이상 활성이 높은 것으로 나타났다. 이들 중 항보체 활성이 가장 높고 수율이 많은 *n*-hexane 분획물로부터 항보체 활성 물질을 분리하고자 하였다.

Table 1. The anti-complement activity of MeOH extract and its various fractions from *O. japonicus*

Fractions	IC ₅₀ (μ g/ml)
MeOH extract	41.27
<i>n</i> -Hexane	15.89
CH ₂ Cl ₂	16.25
EtOAc	130.70
<i>n</i> -BuOH	> 200
H ₂ O	> 200
Rosmarinic acid ^a	64.80

^a rosmarinic acid used as positive control

1-2. 항산화 활성

1-2-1. DPPH radical 소거활성

와송의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 각 분획물들의 DPPH radical 소거활성을 측정하여 50% DPPH radical 소거 활성을 나타내는 IC₅₀ 값 ($\mu\text{g/ml}$)으로 나타내었으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. MeOH 추출물과 분획물의 DPPH radical 소거활성은 EtOAc 분획물 (IC₅₀=2.70 $\mu\text{g/ml}$) > CH₂Cl₂ 분획물 (IC₅₀=10.45 $\mu\text{g/ml}$) > MeOH 추출물 (IC₅₀=31.70 $\mu\text{g/ml}$) > *n*-BuOH 분획물 (IC₅₀=45.10 $\mu\text{g/ml}$) > *n*-hexane 분획물 (IC₅₀=47.00 $\mu\text{g/ml}$) > H₂O 분획물 (>100)의 순으로 나타났다. MeOH 추출물과 분획물들 중에서 EtOAc 분획물이 DPPH radical 소거활성이 가장 높았으나 대조군인 L-ascorbic acid (IC₅₀=1.35 $\mu\text{g/ml}$) 보다 DPPH radical 소거활성이 낮게 나타났다. MeOH 추출물, *n*-hexane, CH₂Cl₂ 그리고 *n*-BuOH 분획물들은 DPPH radical 소거활성이 다소 약하게 나타났으며, H₂O 분획물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서도 DPPH radical 소거활성이 나타나지 않았다.

1-2-2. Hydroxy radical 소거활성

와송의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 각 분획물의 hydroxy radical 소거활성을 측정하여 50% hydroxy radical 소거 활성을 나타내는 IC₅₀ 값 ($\mu\text{g/ml}$)으로 나타내었으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. MeOH 추출물 및 분획물의 hydroxy radical 소거 활성을 살펴보면

MeOH 추출물과 *n*-Hexane 분획물은 전혀 효과가 나타나지 않았으며, CH₂Cl₂과 H₂O 분획물은 100 μ g/ml 이상에서도 효과를 나타내지 못했다. EtOAc 분획물은 IC₅₀값이 대조군인 trolox (IC₅₀ =6.69 \pm 1.84 μ g/ml)보다 낮은 4.79 \pm 1.77 μ g/ml로 hydroxy radical 소거 활성이 높게 나타났으며, *n*-BuOH 분획물은 IC₅₀ 값이 35.03 \pm 2.78 μ g/ml로 다소 약한 hydroxy radical 소거 활성이 나타났다. 따라서 hydroxy radical 소거 활성물질은 EtOAc 분획물에 존재한다는 사실을 알 수 있었으며, 그 결과 이 물질은 다소 극성을 가진 물질임을 유추할 수 있었다.

1-2-3. Peroxynitrite 소거활성

와송의 MeOH 추출물과 각 분획물의 peroxynitrite 소거활성은 50% peroxynitrite 소거활성을 나타내는 IC₅₀ 값 (μ g/ml)으로 나타내었으며, 그 결과는 Table 2에 제시하였다. MeOH 추출물과 분획물의 IC₅₀ 값 (μ g/ml)은 EtOAc 분획물 (1.02 \pm 0.22 μ g/ml) > CH₂Cl₂ 분획물 (9.66 \pm 0.84 μ g/ml) > MeOH 추출물 (14.57 \pm 1.38 μ g/ml) > *n*-BuOH 분획물 (16.07 \pm 0.91 μ g/ml) > H₂O 분획물 (>100) 순으로 나타났으며, *n*-hexane 분획물은 효과가 전혀 나타나지 않았다. EtOAc 분획물은 대조군인 penicillamine 보다 낮은 저해 농도 (IC₅₀=1.02 \pm 0.22 μ g/ml)를 나타내었다. MeOH 추출물, CH₂Cl₂ 분획물 그리고 *n*-BuOH 분획물은 대조군에 비해 다소 약한 peroxynitrite 활성을 나타내었다.

1-2-4. 활성산소종 생성 억제활성

와송 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 각 분획물의 활성 산소종 (reactive oxygen species; ROS) 생성 억제능력에 관한 결과는 Table 2 에 나타내었다. *n*-hexane 분획물에서 활성 산소종 소거활성은 전혀 나타나지 않았으며, *n*-BuOH과 H₂O 분획물에서는 100 μ g/ml 이상에서도 소거활성이 나타나지 않았다. MeOH 추출물과 CH₂Cl₂ 분획물은 다소 약한 활성 산소종 소거활성이 나타났다. EtOAc 분획물 (IC₅₀=1.50 \pm 0.01 μ g/ml)은 대조군인 trolox (IC₅₀=13.85 \pm 0.24 μ g/ml)보다 8배 이상의 높은 활성 산소종 소거활성을 나타내었다. 활성 산소종 소거활성이 가장 높은 EtOAc 분획물에서 활성 산소종 소거활성을 가진 항산화 물질을 분리하고자 하였다.

Table 2. The scavenging activity of MeOH extract and its various fractions from *O. japonicus* on DPPH radical, $\cdot\text{OH}$, ONOO^- and total ROS.

Fractions	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	DPPH ^a	$\cdot\text{OH}$ ^b	ONOO^- ^c	Total ROS ^d
MeOH extract	31.70	NS ^d	14.57 \pm 1.38	32.25 \pm 1.77
<i>n</i> -hexane	47.00	NS	NS	NS
CH_2Cl_2	10.45	> 100	9.66 \pm 0.84	36.45 \pm 0.31
EtOAc	2.70	4.79 \pm 1.77	1.02 \pm 0.22	1.50 \pm 0.01
<i>n</i> -BuOH	45.10	35.3 \pm 2.78	16.07 \pm 0.91	> 100
H_2O	> 400	> 100	> 100	> 100
L-Ascorbic acid	1.35			
Trolox		6.69 \pm 1.84		13.85 \pm 0.24
Penicillamine			2.21 \pm 0.21	

^aDPPH is free radical scavenging activity (IC_{50} : $\mu\text{g}/\text{ml}$), ^b $\cdot\text{OH}$ is the inhibitory activity of hydroxyl radical generation in 1.0mM H_2O_2 and 0.2mM FeSO_4 at the test concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (IC_{50} : $\mu\text{g}/\text{ml}$). ^c ONOO^- is the inhibition activity of aurthetic peroxynitrite (IC_{50} : $\mu\text{g}/\text{ml}$). ^dROS is the inhibitory activity of total radical generation in kidney postmicrosomal fraction at the concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (IC_{50} : $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2. 화합물의 구조 결정

2-1. *n*-Hexane 희분에서 분리된 화합물의 구조 결정

Compound 1 (β -sitosterol)은 흰색의 무정형 결정으로서 분리되었으며, 용매 CDCl_3 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 8)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 9) spectrum을 측정하여 그 data는 문헌치와 비교하여 β -sitosterol로 결정하였으며, β -sitosterol 표준품과 비교 TLC 하여 β -sitosterol임을 확인하였다 (Greca *et al.*, 1990).

Compound 2 (Hydroxhopanone)은 흰색의 무정형 결정으로 분리되었으며, 용매 pyridine- d_5 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 12)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 13) spectrum을 측정하여 그 data는 문헌치와 비교하였다 (Poehland *et al.*, 1987). EI-MS spectrum (Fig. 11)에서 m/z 442 $[\text{M}]^+$ (100), 409 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$, 205 (65)의 분열 peak를 나타냈으며, IR spectrum (Fig. 10)에서는 hydroxy group (3467 cm^{-1})과 carbonyl group (1708 cm^{-1})을 나타내는 흡수가 나타났다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서는 δ_{H} : 0.84, 0.93, 0.94, 0.95, 1.03, 1.13, 1.36, 1.41에서 8개의 tertiary methyl (CH_3)을 나타내는 singlet의 proton signals이 나타났다. 이 signals의 화학적 이동치를 문헌치 (Meselhy *et al.*, 1997)와 비교하여 일치함으로서 hopane 골격을 가진 화합물이라는 것을 추정할 수 있었다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 carbonyl group (δ_{C} : 216.4)의 signal과, β -form의 hydroxy group (δ_{C} : 72.4)의 signal이 관찰되었다.

IR spectrum, EI-MS, $^1\text{H-NMR}$ 그리고 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 분광학적 분석에

의해 화합물 **2**는 triterpenoid인 hopane의 골격을 가지며, C-3에 carbonyl group과 C-22에 β -form의 hydroxy group을 가지는 hydroxyhopanone으로 동정하였다 (Tanaka *et al*, 1992). 이 화합물은 *Abies veichii* (Tanaka *et al*, 1992) 등에서 분리되었으나 와송에서는 처음으로 분리 되었다

Compound 3 (β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranosyl-6'-O-palmitate)은 무정형 결정의 형태로서 분리되었으며, 용매 CDCl_3 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 15)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 16) spectrum을 측정하여, 그 data는 문헌치와 비교하였다 (Ulubelen *et al*, 1988; Nguyen. *et al*, 2004). 이 화합물은 Liebermann-Burchard (적색에서 청색으로 변색) 및 Molish 반응에서 양성을 나타내었으므로 sterol glycoside로 추정할 수 있었다. 또한 IR spectrum 측정에서 3400cm^{-1} 인 hydroxy group, 1735 와 1250cm^{-1} 인 ester, 1020 , 1060 그리고 1080cm^{-1} 인 glycosidic bond에 기인하는 흡수 band를 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ 에서 fatty acid ester를 나타내는 δ_{H} 0.88 (3H, s)에서 terminal methyl group, δ_{H} 1.26에서 aliphatic long chain $[(-\text{CH}_2-)_n]$, 그리고 δ_{H} 2.36 (t, $J=7.5\text{ Hz}$)에서 carbonyl group에 결합된 methylene이 관찰됨으로써 지방산 ester를 확인하였다. 그러므로 이 화합물이 acylated sterol glycoside로 추정할 수 있었다. 이 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 화합물 **1**과 비교하여 aglycone이 β -sitosterol임을 알 수 있었으며, δ_{H} 4.38 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$, H-1')과 δ_{C} 63-101 (101.1, 73.5, 76.5, 70.2, 73.9, 63.4)로부터 β -D-glucose를 확인하였다. 그리고 positive LR-FABMS spectrum (Fig. 14)을 측정하여 m/z 838인 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$ 의 의사 분자 이온 peak가 나타나므로 지방산 ester가

탄소가 16개인 palmitic acid라는 것을 알 수 있었다. 지방산 ester의 결합위치를 알기 위해서 HMQC (Fig. 17)와 HMBC (Fig. 18) spectrum을 측정하였다. HMBC spectrum 측정에 의해 β -D-glucose의 H-1' [δ_{H} 4.38 (1H, d, $J=7.3$ Hz)]은 β -sitosterol의 C-3 (δ_{C} 79.7)에 long range correlation하였으며, β -D-glucose의 H-6' [δ_{H} 4.30 (1H, d, $J=11.0$ Hz)]은 palmitic acid의 C-1" (δ_{C} 175.5)과 long range correlation하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 분자량이 814이며, 분자식이 $\text{C}_{51}\text{H}_{90}\text{O}_7$ 인 β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranosyl-6'-O-palmitate임을 확인하였다.

또한 이 화합물은 *Centaurea regia* (Ulubelen. *et al.*, 1988)와 *Plumbago zeylanica* (Nguyen *et al.*, 2004)에서 분리되었으며, 이들 문헌과 비교하여 최종적으로 확인하였다. 그리고 이 화합물은 흑색종 세포인 Bowes와 유방암 세포인 MCF7 세포에 대한 세포독성 평가도 보고되었다 (Nguyen *et al.*, 2004). 그러나 와송에서는 처음으로 분리된 화합물이다.

Compound 4는 β -Sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside로 표준품과 함께 TLC 비교하여 일치함으로서 확인하였다.

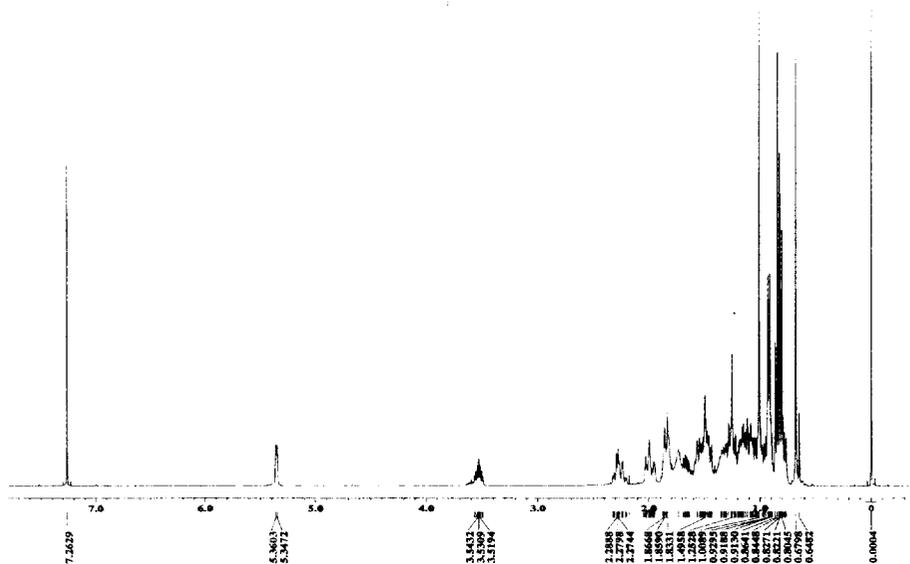


Fig. 8. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

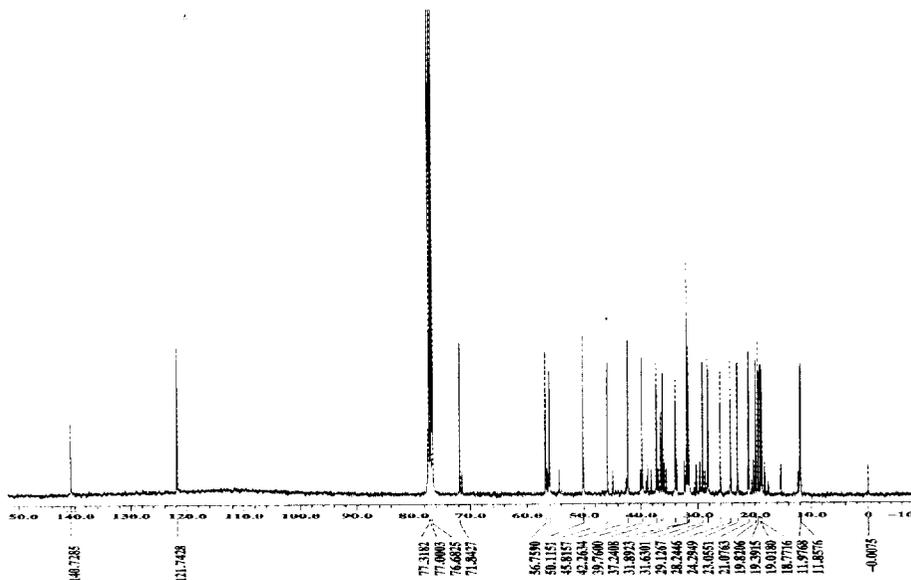


Fig. 9. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

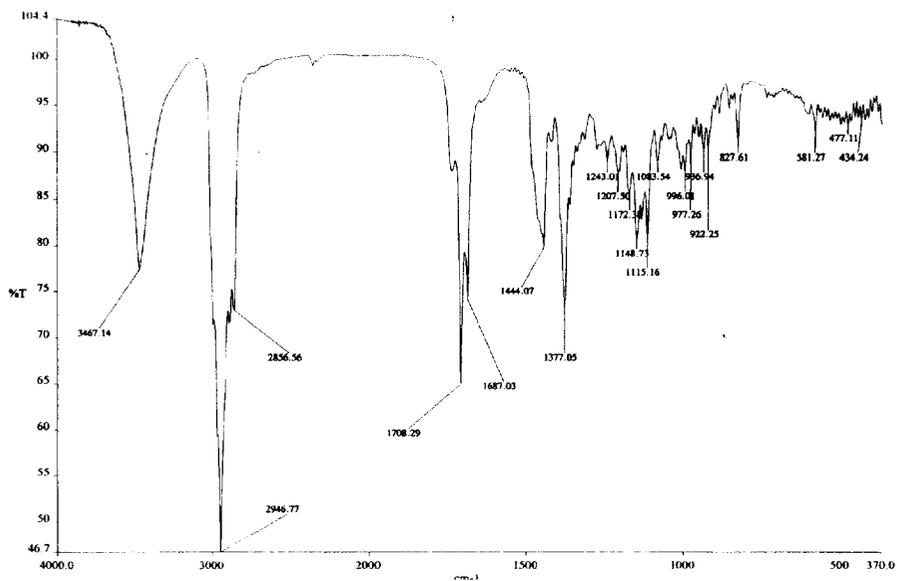


Fig. 10. IR spectrum of compound **2**

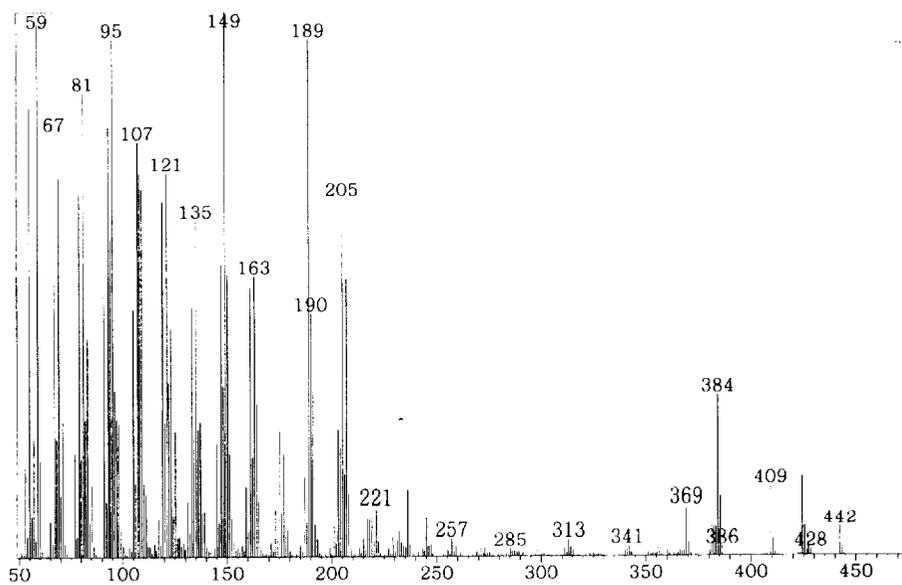


Fig. 11. EI-MS spectrum of compound **2**

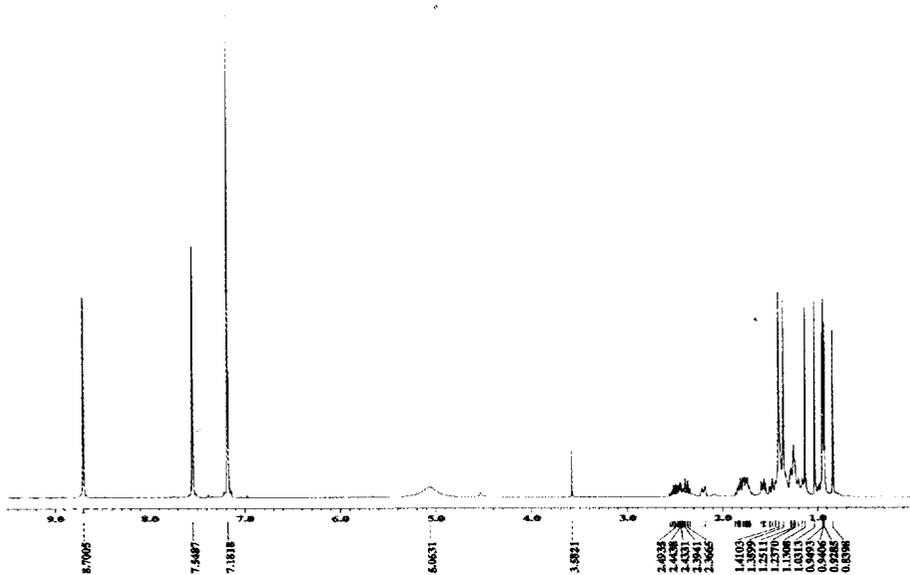


Fig. 12. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in pyridine- d_5

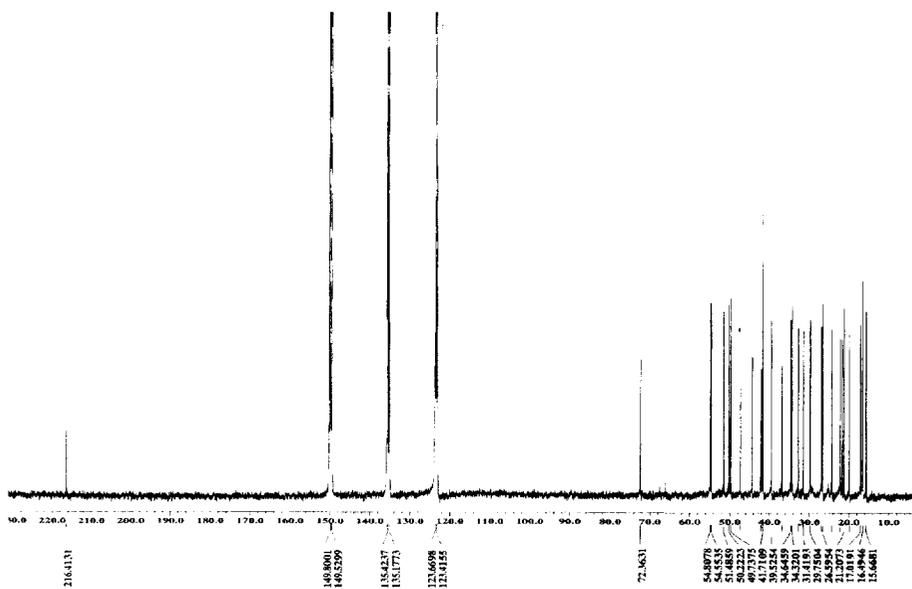


Fig. 13. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in pyridine- d_5

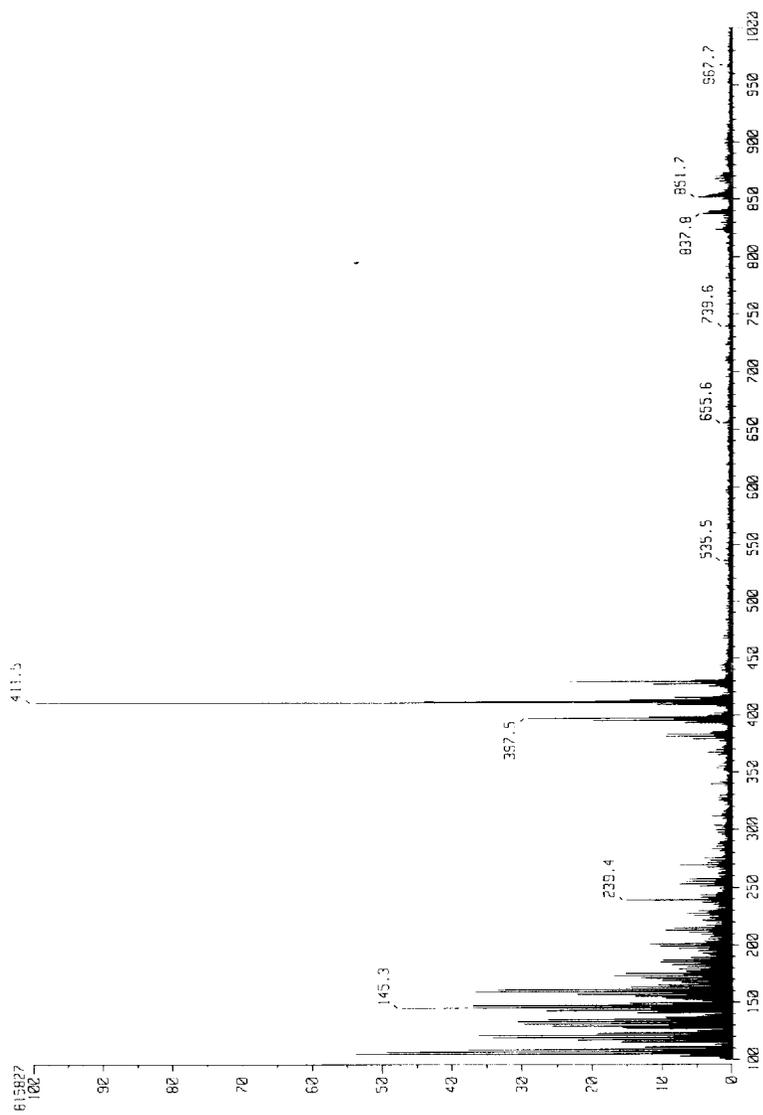


Fig. 14. LR-FABMS spectrum of compound **3**

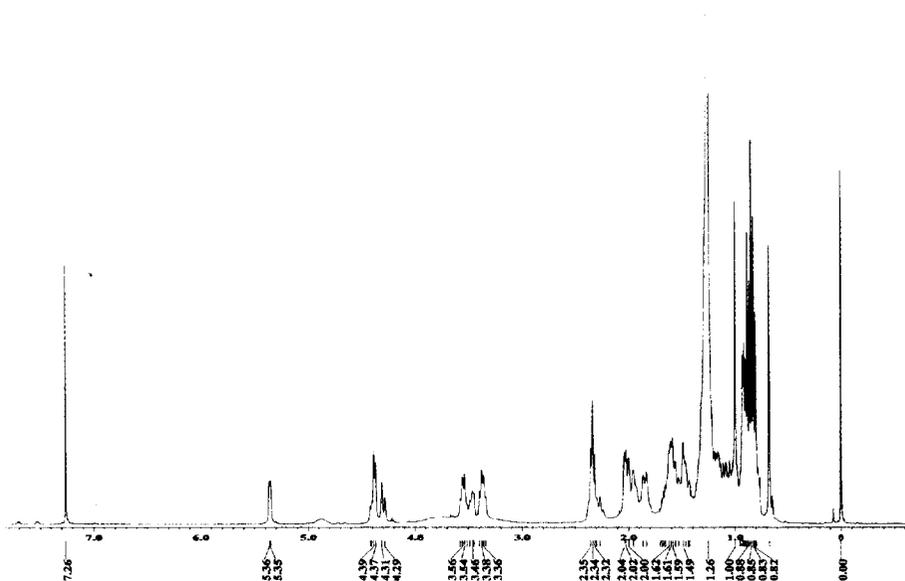


Fig. 15. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3

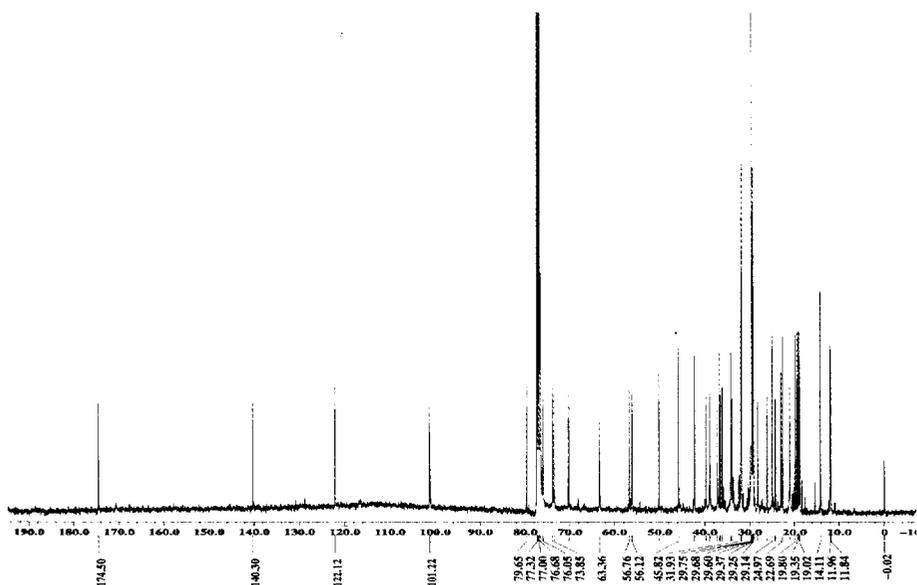


Fig. 16. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3

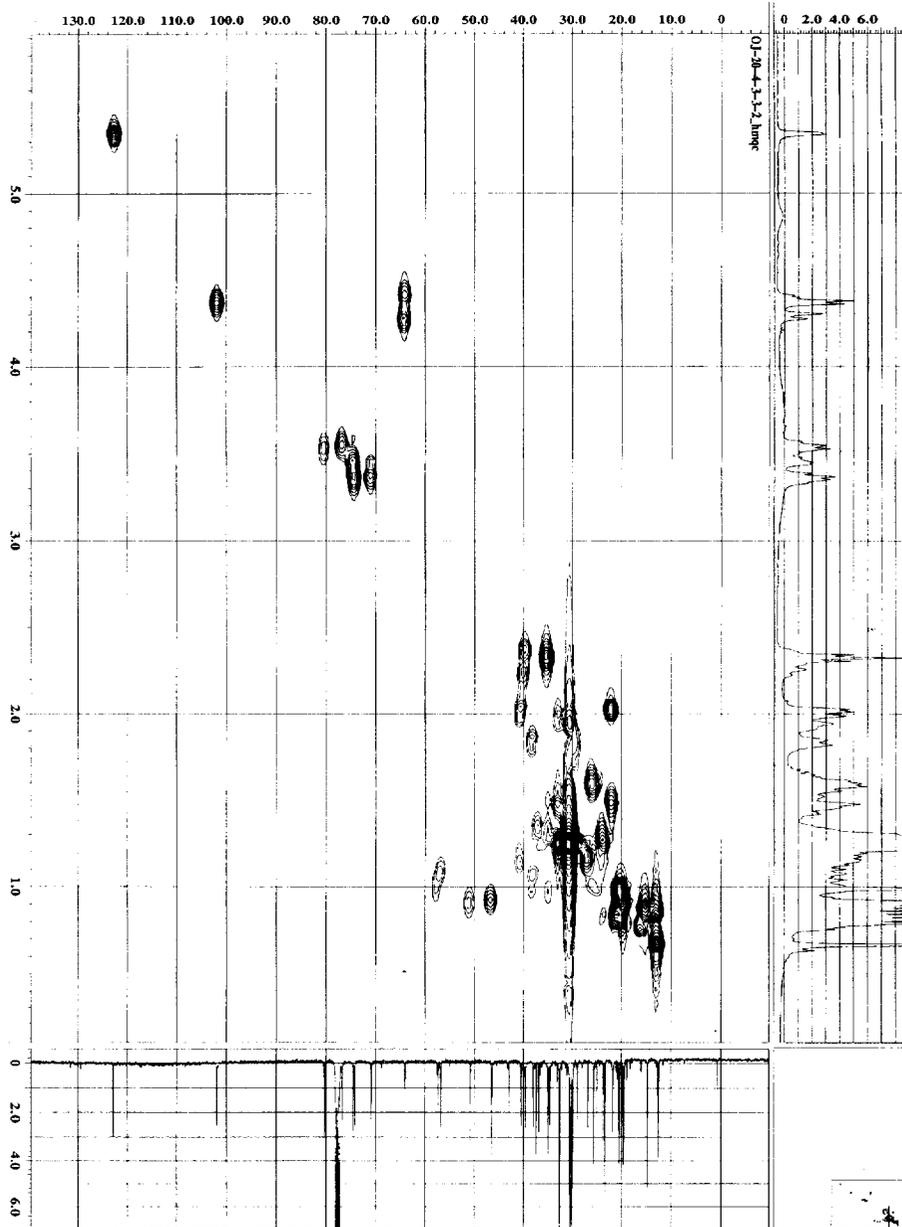


Fig. 17. HMQC spectrum of compound **3** in CDCl₃

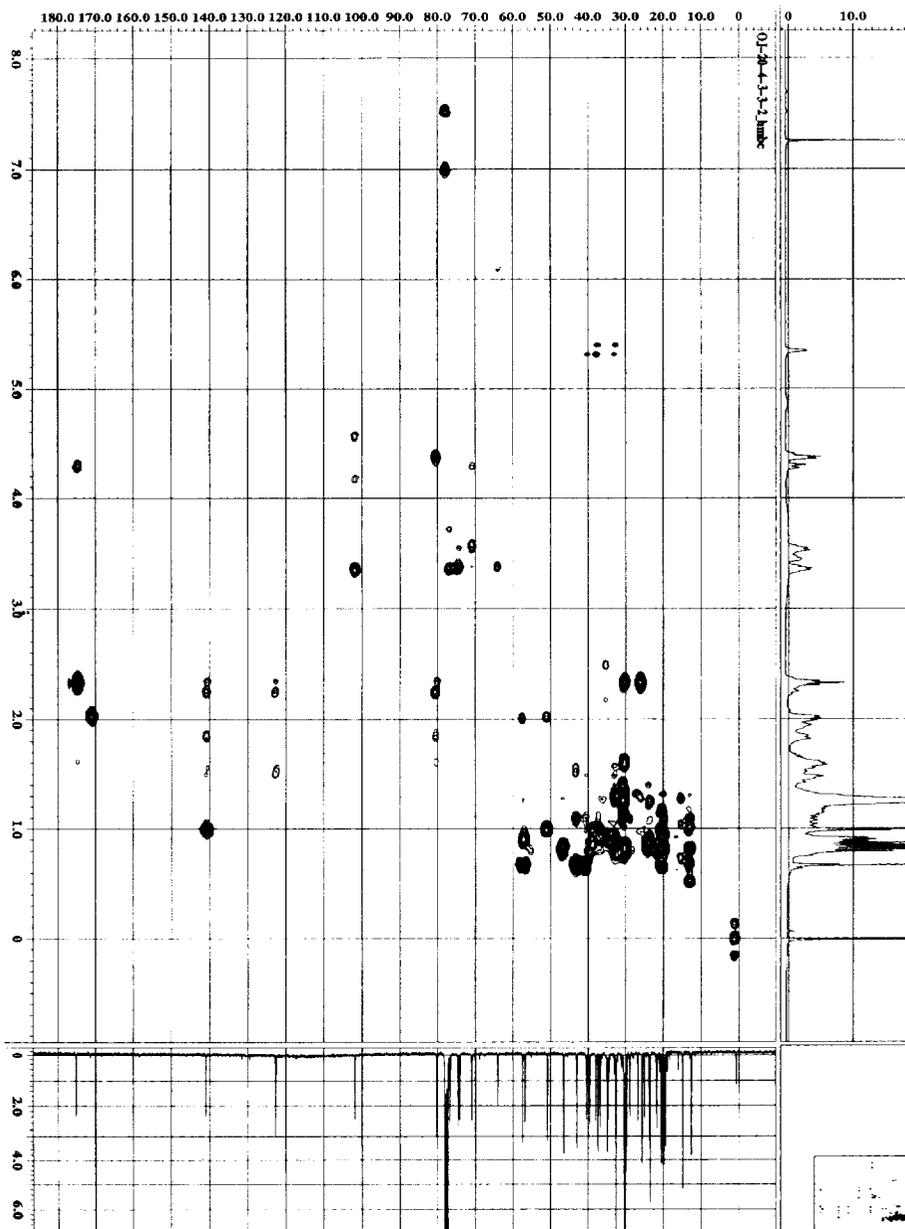


Fig. 18. HMBC spectrum of compound **3** in CDCl₃

2-2. EtOAc 획분에서 분리된 화합물의 구조 결정

2-2-1. Flavonol 화합물의 구조결정 (5, 8, 10-14)

Compound 5 (Kaempferol)은 노란색 분말 상태로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC 하여 kaempferol임을 확인하였다.

Compound 8 (Quercetin)은 노란색 분말 상태로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC 하여 quercetin임을 확인하였다.

Compound 11 (Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside)은 노란색 분말로 분리되었다. 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 27)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 28) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Park *et al.*, 1991a). $^1\text{H-NMR}$ 에서 특징적인 signal인 *meta-coupling*하고 있는 proton signal [δ_{H} 6.21 (1H, $J=2.0$ Hz, H-6)과 δ_{H} 6.44 (1H, $J=2.0$ Hz, H-8)] 부근의 double signal과 A_2B_2 type의 B환의 proton들의 존재를 나타내는 signal [δ_{H} 6.21 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-3' and 5')과 δ_{H} 8.02 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-2', 6')]이 관찰되어 kaempferol을 골격으로 하는 화합물임을 추정할 있었다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 kaempferol의 B환에 기인하는 signals [δ_{C} 130.9 (C-2', 6'), δ_{C} 115.1 (C-3', 5')]이 관찰되었다. $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 당의 1번에 기인하는 proton signal δ_{H} 5.46 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1'')과 δ_{C} 100.9 (C-1'')로부터 β -D-glucose가 존재함을 확인하였다. 따라서 이 화합물은 kaempferol C-3 위치에 β -D-glucose가 결합한 화합물임을 확인할 수 있었다.

Compound 12 (Quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside)은 노란색 분말 상태로 분리되었다. 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 29)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 30) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Gluchoff-fiasson *et al*, 1997). $^1\text{H-NMR}$ 에서 *meta*-coupling 하는 특징적인 proton signal [δ_{H} 6.40 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6)과 δ_{H} 6.84 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8)]과 *ortho*-dihydroxy group을 가진 B환의 특징적인 proton signal [δ_{H} 6.84 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-5')과 δ_{H} 7.59 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2') 그리고 δ_{H} 7.57 (1H, dd, $J=2.0, 9.0$ Hz, H-6')]이 관찰되어 quercetin 을 골격으로 하는 화합물이라는 것을 확인할 수 있었다 (강 등, 2000). $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 당의 1번에 기인하는 proton signal δ_{H} 5.46 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1")과 δ_{C} 100.9 (C-1")로부터 β -D-glucose가 존재함을 확인하였다. 따라서 이 화합물은 quercetin의 C-3 위치에 β -D-glucose가 결합한 화합물임을 확인할 수 있었다.

Compound 13 (kaempferol 3-*O*-rutinoside)은 노란색 분말 상태로 분리되었다. 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 31) 과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 32) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Lee *et al*, 1992). Compound **11**과 비교하여 이 화합물이 kaempferol 골격을 가진 화합물임을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 당의 1번에 기인하는 proton signals [δ_{H} 5.33 (1H, d, $J=7.4$ Hz)과 δ_{H} 4.40 (1H, br s,)]과 carbon signals (δ_{C} 101.3, 100.7)이 관찰되어 kaempferol에 2분자의 당이 결합한 구조임을 추정할 수 있었으며, 그 당은 β -D-glucose와 α -L-rhamnose임을 알 수 있었다. 따라서 이 화합물은 kaempferol 3-*O*- β -D-

glucopyranosyl-(6→1) α -L-rhamnopyranoside 즉, 이 화합물은 kaempferol 3-rutinoside임을 확인할 수 있었다.

Compound 14 (Kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- β -D-glucopyranoside)은 노란색 분말 상태로 분리되었다. 용매 DMSO-*d*₆로 ¹H-NMR (Fig. 33)과 ¹³C-NMR (Fig. 34) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Park *et al*, 1991a). Compound **11**과 비교하여 이 화합물이 kaempferol 골격을 가진 화합물임을 알 수 있었다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum에서 당의 1번에 기인하는 proton signals [δ_{H} 5.33 (1H, s), δ_{H} 5.07 (1H, d, $J=7.3$ Hz)]과 carbon signals (δ_{C} 101.8, 99.99)이 관찰되어 kaempferol에 2분자의 당이 결합한 구조임을 추정할 수 있었으며, 그 당은 β -D-glucose와 α -L-rhamnose임을 알 수 있었다. 당의 결합 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR인 HMBC spectrum (Fig. 35)을 측정하여, α -L-rhamnose의 H-1" [δ_{H} 5.33 (1H, s)]는 kaempferol의 C-3 (δ_{C} 134.5)과 long range correlation 하며, β -D-glucose의 H-1" [δ_{H} 5.07 (1H, d, $J=7.3$ Hz)]은 kaempferol C-7 (δ_{C} 162.9)에 long range correlation 하는 것으로 보아 이 화합물은 kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- β -D-glucopyranoside로 구조를 동정하였다.

2-2-2. Phenol 성 화합물의 구조결정 (6, 7, 9, 10)

Compound 6 (Hydroquinone)은 무정형 흰색 결정으로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 19)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 20) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하여 hydroquinone임을 확인하였다 (Kawagishi *et al*, 2002).

Compound 7 (Methyl gallate)은 무정형 흰색 결정으로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 21)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 22) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Park *et al*, 2000). $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ_{C} 108.5 (C-2, 6), δ_{C} 145.6 (C-3, 5)에서 aromatic signals이 관찰되었으며, oxygen-bearing aromatic ring [δ_{C} 145.6 (C-3, 5), δ_{C} 138.5 (C-4)], ketone group [δ_{C} 166.3 (C-7)] 그리고 methyl group [δ_{C} 51.6 (7- CH_3)]을 나타내므로 이 화합물은 methyl gallate로 결정되었으며, 표준품과 비교 TLC 하여 methyl gallate임을 확인하였다.

Compound 9 (Gallic acid)은 무정형 흰색 결정으로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 23)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 24) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Lee *et al*, 1994). 이 화합물은 화합물 7과 비교하여 C-7에 methyl group이 없는 gallic acid로 결정하였으며, 표준품과 비교 TLC 하여 gallic acid임을 확인하였다.

Compound 10 (Protocatechuic acid)은 무정형 흰색 결정으로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 25)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 26) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Hur *et al*, 2001). δ_{H} 6.77 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5),

δ_{H} 7.27 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6), δ_{H} 7.32 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2)에서 ABX type의 aromatic signals이 관찰되었다. ^{13}C -NMR spectrum 에서는 oxygen-bearing aromatic ring [δ_{C} 150.0 (C-4), 144.9 (C-3)]과 ketone group [δ_{C} 167.3 (C-7)]을 나타나므로 이 화합물이 protocatechuic acid임을 결정하였고, 표준품과 비교 TLC 하여 protocatechuic acid 임을 확인하였다.

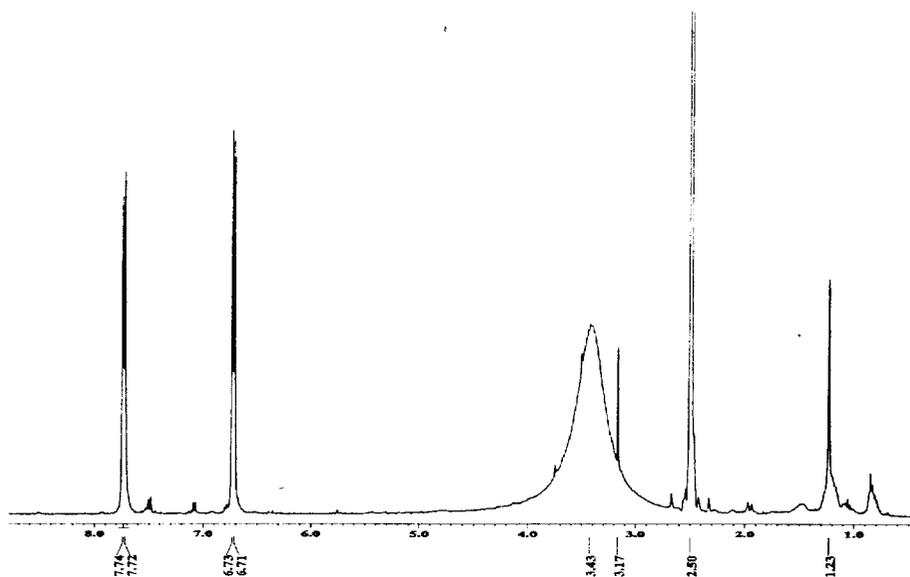


Fig. 19. ^1H -NMR spectrum of compound **6** in $\text{DMSO-}d_6$

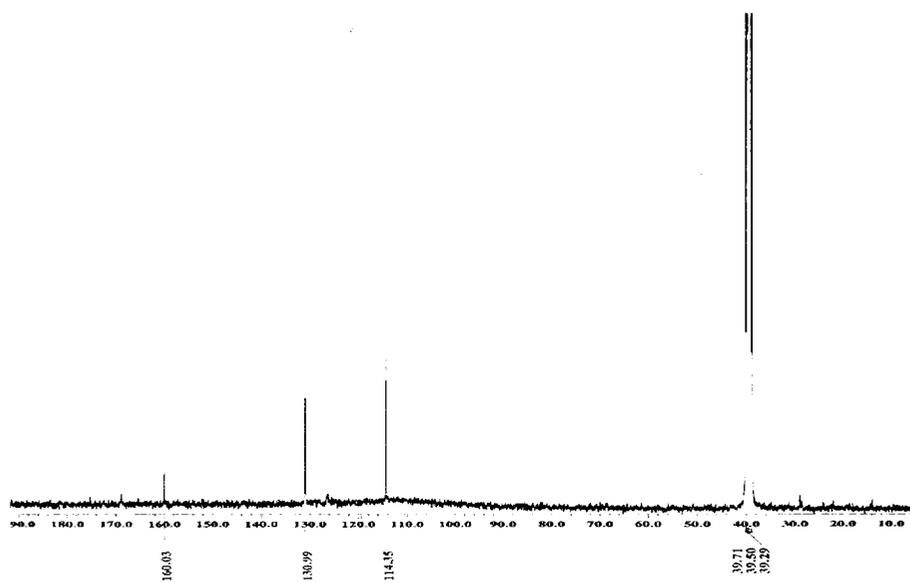


Fig. 20. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in $\text{DMSO-}d_6$

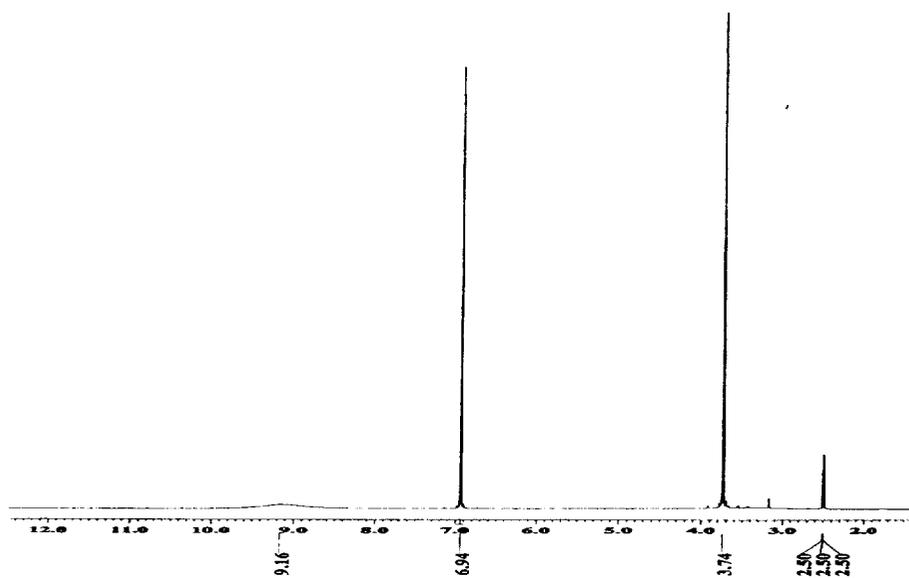


Fig. 21. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **7** in $\text{DMSO-}d_6$

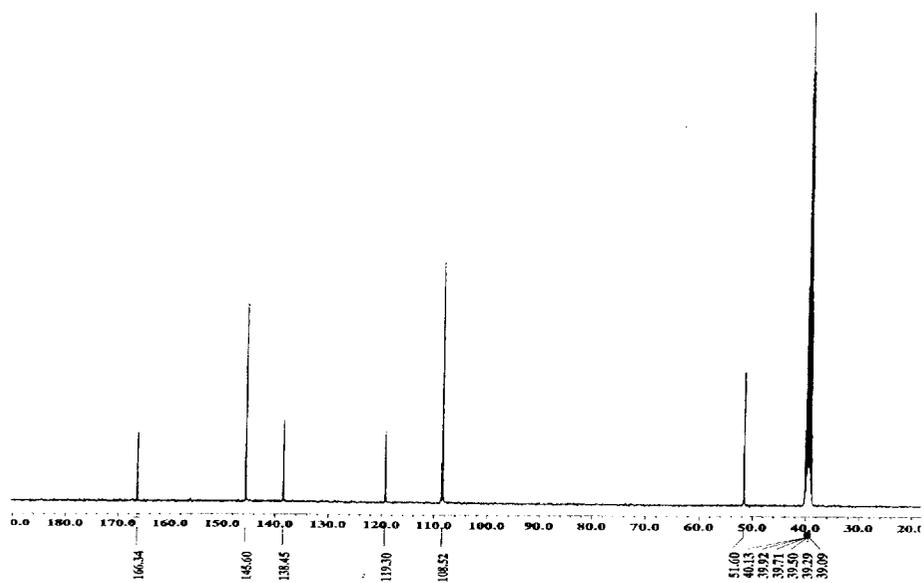


Fig. 22. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **7** in $\text{DMSO-}d_6$

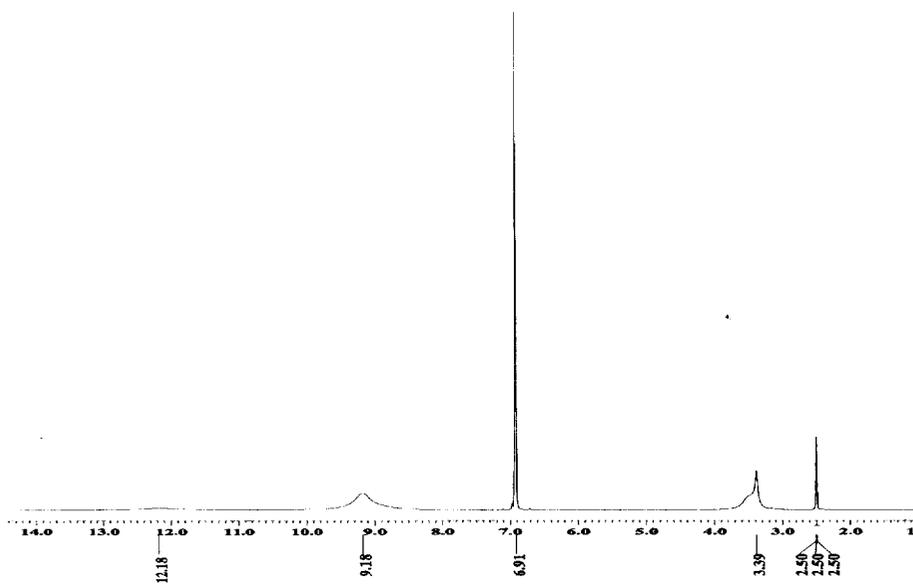


Fig. 23. ^1H -NMR spectrum of compound **9** in $\text{DMSO-}d_6$

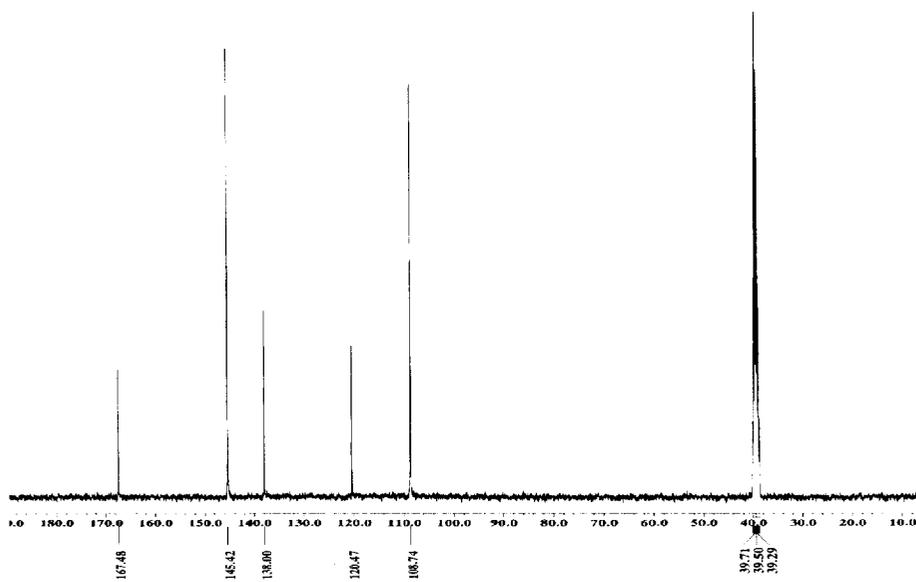


Fig. 24. ^{13}C -NMR spectrum of compound **9** in $\text{DMSO-}d_6$

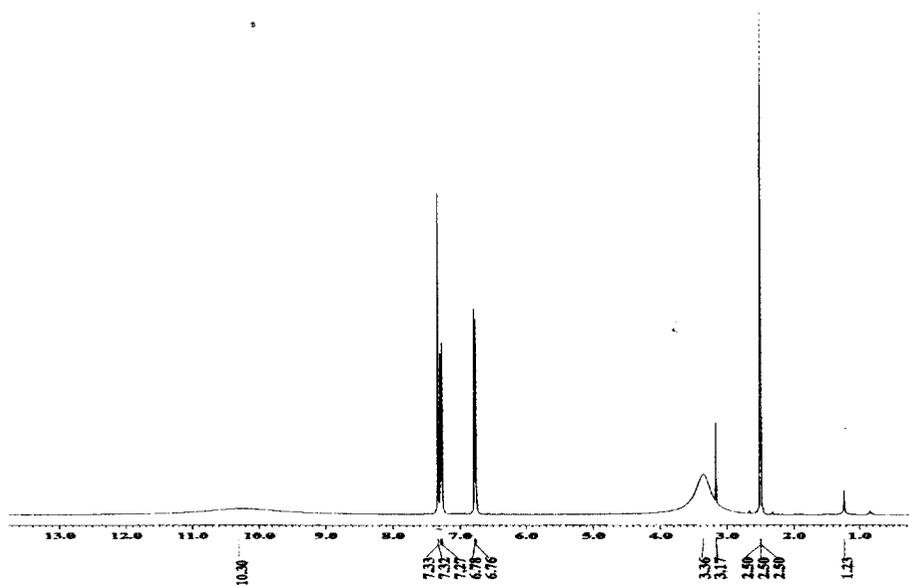


Fig. 25. ^1H -NMR spectrum of compound **10** in $\text{DMSO-}d_6$

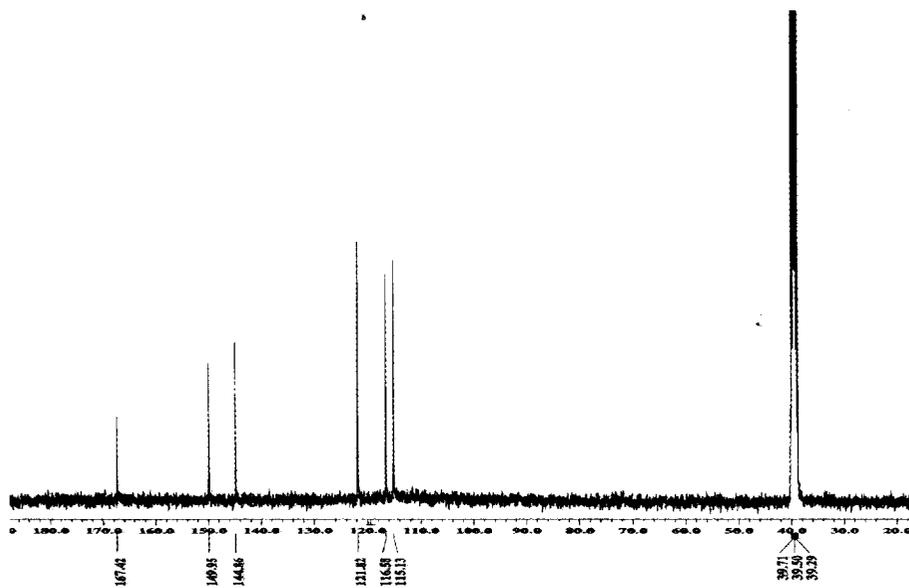


Fig. 26. ^{13}C -NMR spectrum of compound **10** in $\text{DMSO-}d_6$

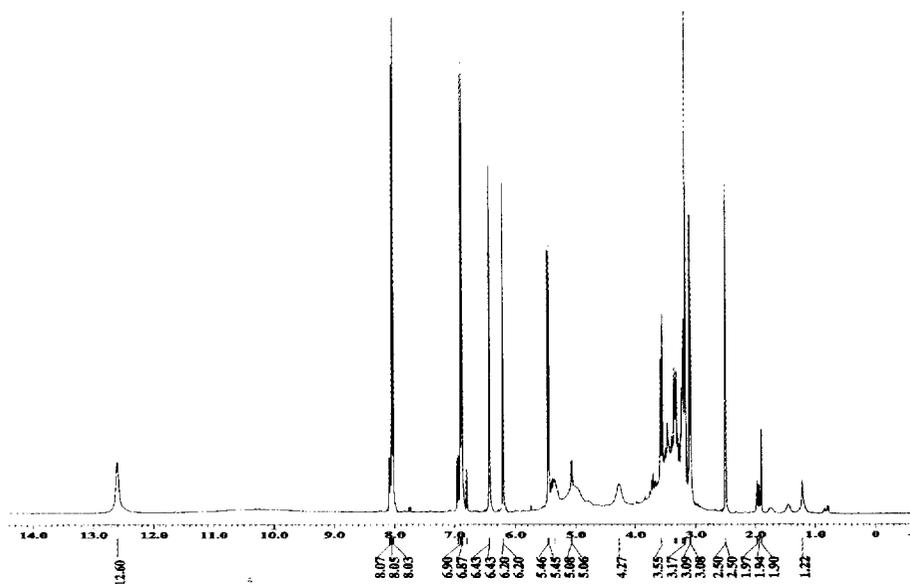


Fig. 27. ^1H -NMR spectrum of compound **11** in $\text{DMSO-}d_6$

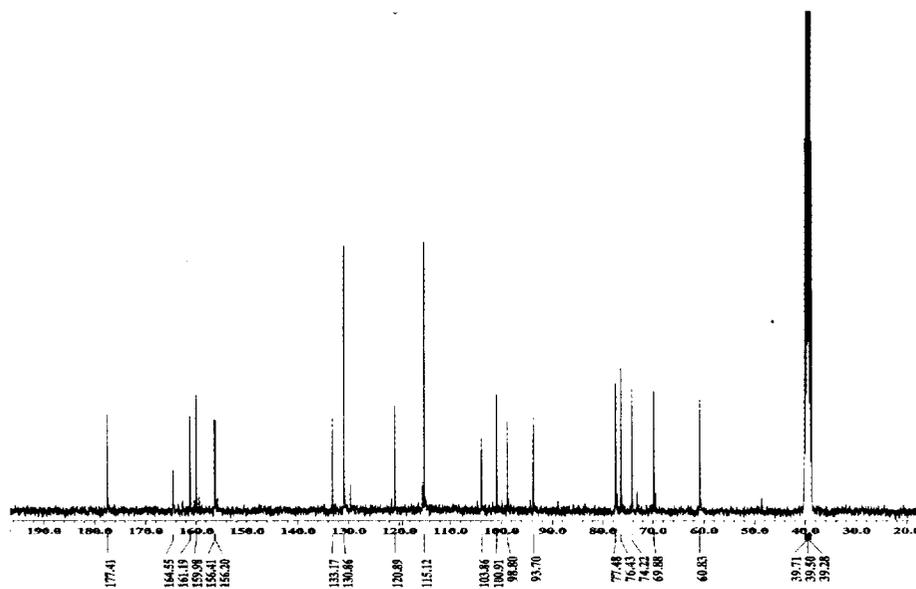


Fig. 28. ^{13}C -NMR spectrum of compound **11** in $\text{DMSO-}d_6$

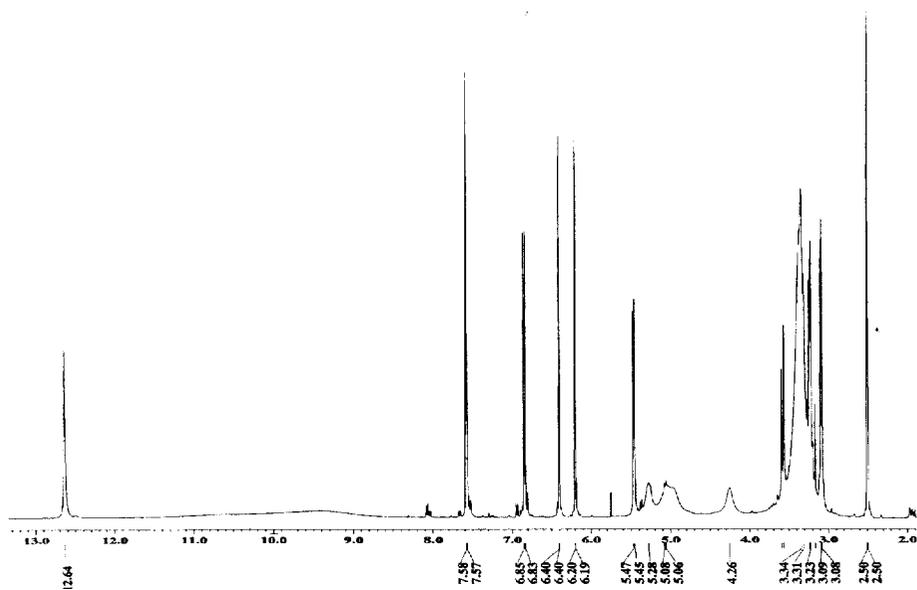


Fig. 29. ^1H -NMR spectrum of compound **12** in $\text{DMSO-}d_6$

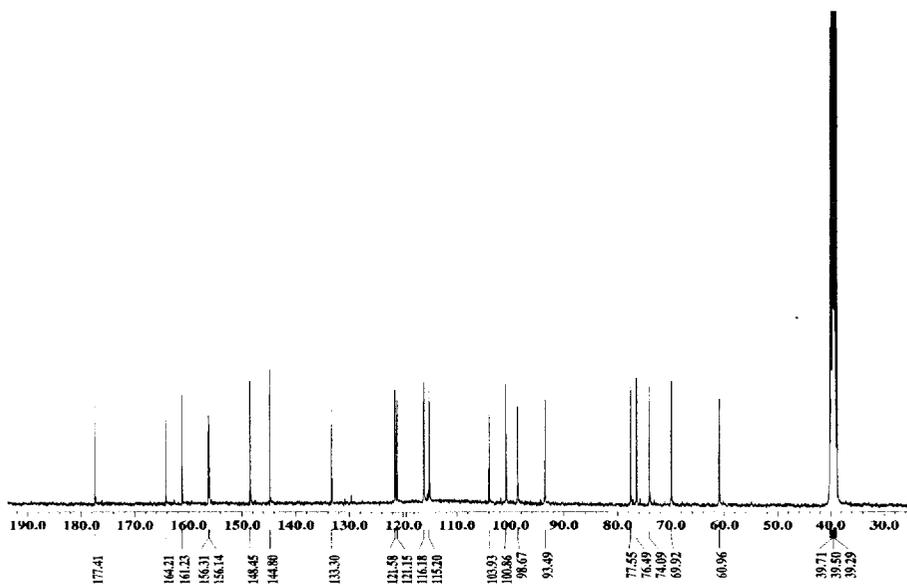


Fig. 30. ^{13}C -NMR spectrum of compound **12** in $\text{DMSO-}d_6$

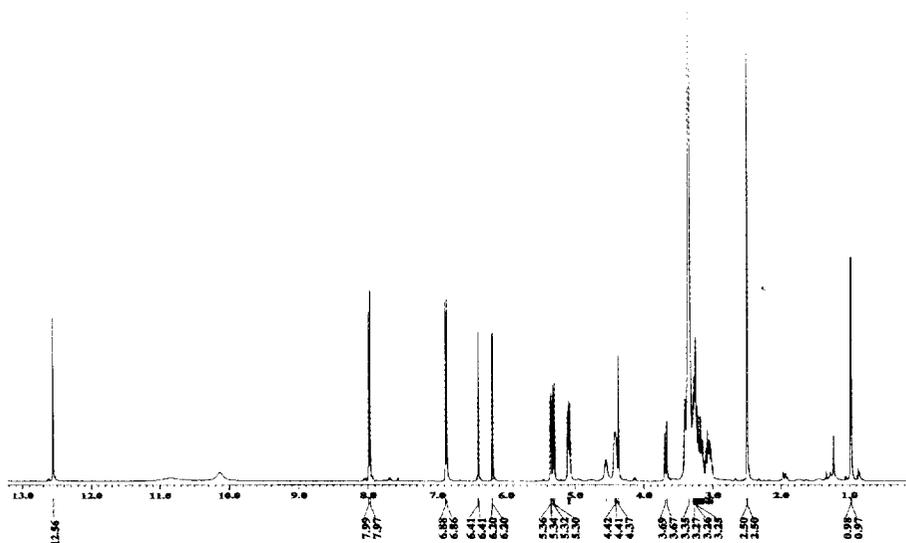


Fig. 31. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **13** in $\text{DMSO-}d_6$

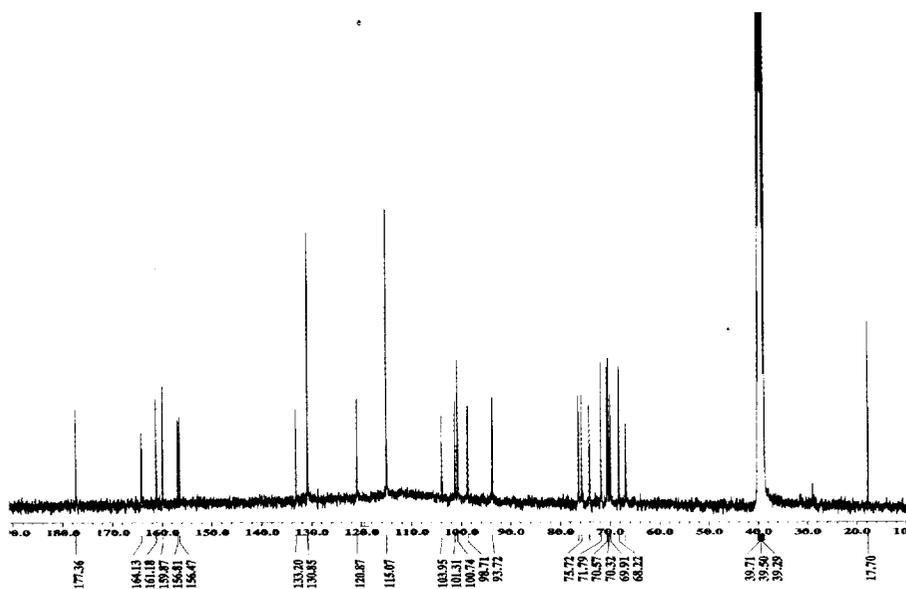


Fig. 32. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **13** in $\text{DMSO-}d_6$

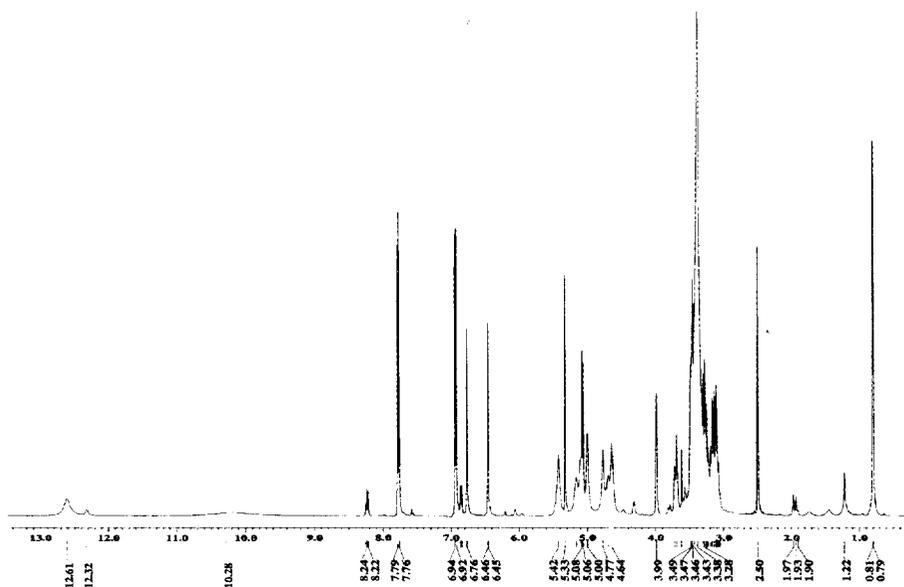


Fig. 33. ^1H -NMR spectrum of compound **14** in $\text{DMSO-}d_6$

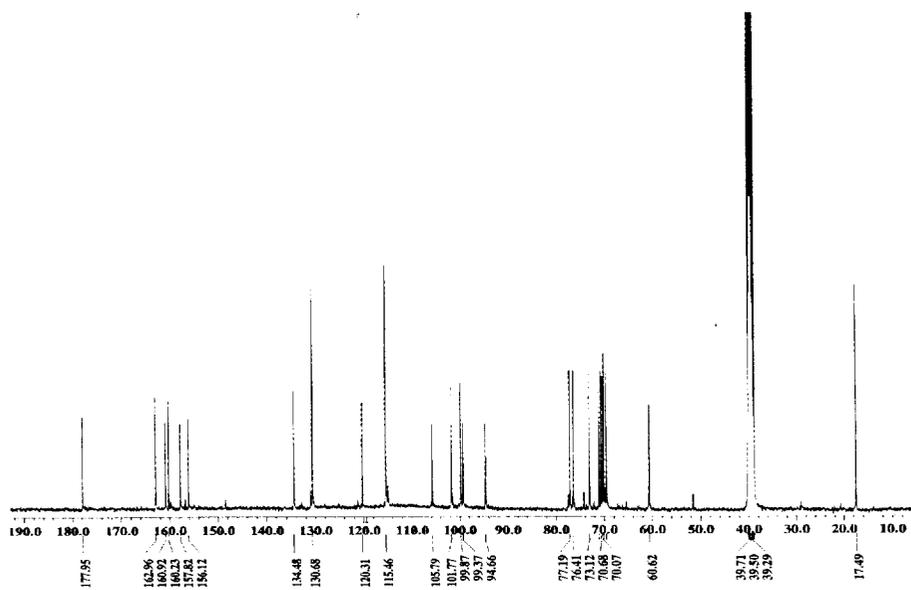


Fig. 34. ^{13}C -NMR spectrum of compound **14** in $\text{DMSO-}d_6$

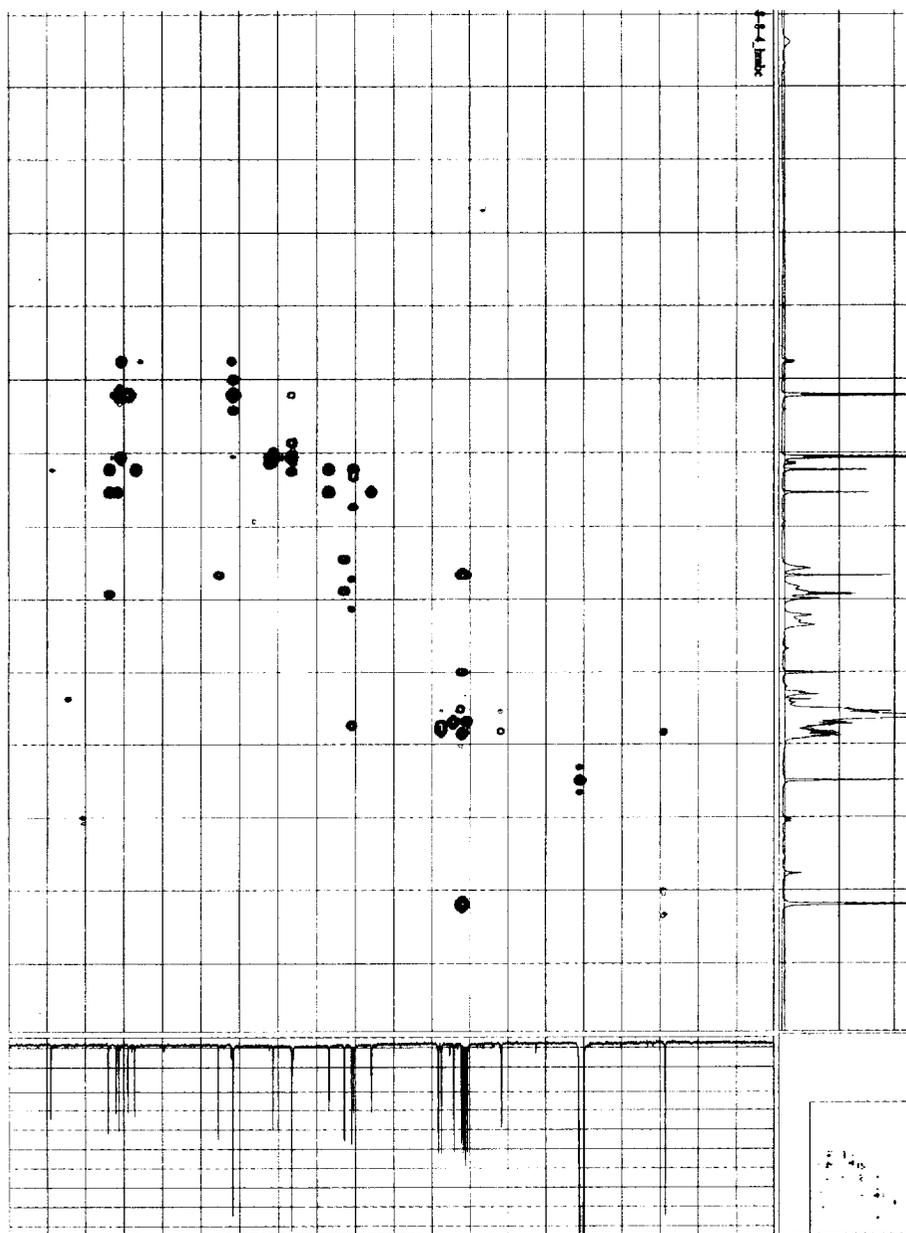


Fig. 35. HMBC spectrum of compound **14** in DMSO- d_6

3. 분리된 화합물들의 항보체 및 항산화 활성

3-1. 항보체 활성

와송의 *n*-Hexane 획분으로부터 분리한 4종의 화합물 **1-4**을 보체계의 고전 경로 (classical pathway)에서의 저해 효과를 측정하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 분리된 화합물 가장 효과가 큰 β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-6'-*O*-palmitate (**3**)은 IC₅₀ 값이 1.01 μ M로 대조군인 tiliroside (IC₅₀=76.50 μ M) 보다 70배 더 강한 활성이 나타났다. 그리고 β -sitosterol (**1**)은 IC₅₀ 값이 59.41 μ M로 대조군인 tiliroside (IC₅₀=76.50 μ M) 보다 높은 활성을 나타내었다. 그러나 hydroxyhopanone (**2**)과 β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**)은 효과가 나타나지 않았다.

항보체 활성이 큰 화합물 **1**의 용혈 저해 효과는 C-3의 hydroxy group의 존재하기 때문에 나타난다. 그러나 화합물 **4**와 같이 C-3 위치에 glycosylation이 되면 그 활성이 급격히 감소된다. 가장 높은 항보체 활성을 나타낸 화합물 **3**의 활성은 β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside의 C-6' 위치에 포화 지방산 ester가 결합되어 있기 때문에 나타난다. 그러므로 sterol의 C-3의 hydroxy group과 acylated sterol glycoside의 지방산 ester는 항보체 활성에 중요한 역할을 한다.

Table 3. Inhibition effects of compounds **1–4** on the complement system of classical pathway

Compounds	IC₅₀ (μM)^a
β-Sitosterol (1)	59.41
Hydroxyhopanone (2)	>100
β-Sitosteryl-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-6'- <i>O</i> -palmitate (3)	1.01
β-Sitosteryl-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (4)	>100
Tilioside ^c	76.50

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

^b Tilioside used as positive control.

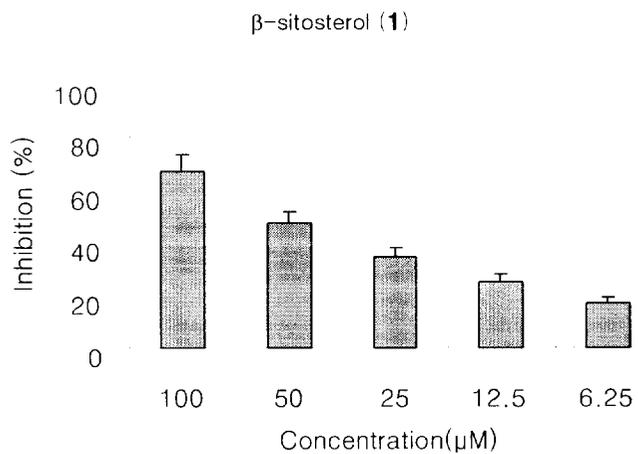


Fig.36. Inhibitory effects of compound **1** on complement system

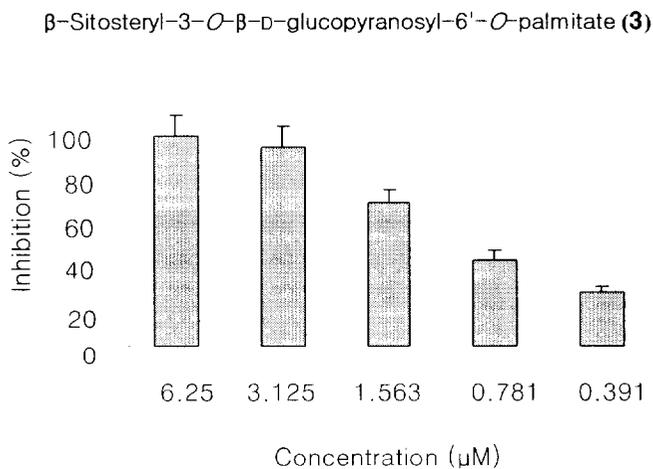


Fig.37. Inhibitory effects of compound **3** on complement system

3-2. 항산화 활성

와송 EtOAc 획분으로부터 분리한 6종의 flavonol 화합물 **5**, **8**, **11-14**과 4종의 phenol성 화합물 **6**, **7**, **9**, **10**의 DPPH radical과 peroxyntirite 소거 활성을 측정하여 항산화 활성을 평가하였고, 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 분리된 화합물 중 DPPH radical 소거 활성에서 가장 효과가 큰 methyl gallate (**7**)은 IC₅₀ 값이 1.68 μM로 대조군인 L-ascorbic acid (IC₅₀=7.38 μM)보다 4배 정도 활성이 강하게 나타났다. 또한 화합물 **8**과 **9**은 DPPH radical 소거 활성에서 IC₅₀ 값이 각각 2.65와 1.43 μM로 L-ascorbic acid (IC₅₀=7.38 μM)보다 높은 활성을 나타내었다. peroxyntirite 소거활성에서 quercetin (**8**)은 IC₅₀ 값이 0.42 ± 0.60 μM로 분리된 화합물 중 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 화합물 **5**, **7**, **9** 그리고 **10**은 IC₅₀ 값이 각각 1.76 ± 0.56, 1.04 ± 0.18, 1.38 ± 0.90 그리고 1.95 ± 0.93 μM로 penicillamine (IC₅₀=2.36 ± 0.79 μM)보다 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성이 큰 화합물 **7-9**의 DPPH radical과 peroxyntirite 소거 효과는 aromatic ring에 두 개 이상의 free hydroxy group이 *ortho* 위치로 결합되어 있기 때문에 나타나며, 효과의 강도는 free hydroxy group의 수와 methyl group의 존재와 관련이 있다 (Sroka *et al*, 2003). 그러므로 C-3, 4의 위치에 두개의 hydroxy group을 가진 **10** 보다 C-3, 4, 5 위치에 세 개의 hydroxy group을 가진 화합물 **7**과 **9**의 효과가 더 크게 나타난다 (Sorka *et al*. 2003; Ohsugin *et al*, 1999).

Flavonol 화합물에서의 항산화 효과는 C-3의 hydroxy group이 중요한 역할을 한다. Radical 소거물질은 free radical에게 전자나 수소를 제공하거나, 전자

쌍을 받아서 활성을 나타내는데, C-3위치의 free hydroxy group은 4-keto group과 수소결합을 형성시킴으로써 free radical 소거 활성을 증진시킨다. 반면에 B-ring의 C-4' 위치에 hydroxy group을 가진 kaempferol은 다소 약한 활성을 나타내지만, quercetin과 같이 kaempferol의 C-4' 위치에 hydroxy group에 *ortho* hydroxy group (*o*-dihydroxy group)이 첨가되면, flavonol의 소거 활성이 증가된다. *o*-dihydroxy group이 존재하지 않을 경우 C-3 위치에 glycosylation이 되면 그 활성은 급격히 감소된다 (Marjeta *et al*, 2003).

Table 4. DPPH radical and peroxynitrite scavenging activity of compounds **5-14**

Compounds	IC ₅₀ (μM) ^a	
	DPPH radical	ONOO ⁻
5	14.89	1.76 ± 0.56
6	>100	12.57 ± 0.92
7	1.68	1.04 ± 0.18
8	2.65	0.42 ± 0.60
9	1.43	1.38 ± 0.90
10	8.44	1.95 ± 0.93
11	>100	4.66 ± 0.51
12	24.68	3.81 ± 0.48
13	>100	2.89 ± 0.54
14	>100	7.64 ± 1.38
L-Ascorbic acid^b	7.38	
Penicillamine^c		2.36 ± 0.79

^aIC₅₀ value obtained from three separate experiments are shown. ^bL-ascorbic acid used as positive control. ^cpenicillamine used as positive control.

IV. 요약 및 결론

한방에서 암의 치료 또는 예방에 사용되는 와송으로부터 항보체 및 항산화 활성을 검색하고, 그 활성 성분을 분리·동정하고, 이들 화합물의 구조-활성 상관 관계를 규명하고자 하였다.

항보체 활성이 높은 *n*-Hexane 획분을 silica gel과 sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 4종의 화합물을 분리하였다. 이들 화합물들의 구조는 IR, 1D (^1H , ^{13}C -NMR), 2D (HMQC, HMBC) NMR, EIMS, 그리고 FABMS spectrum 등의 분광학적 방법을 이용하여 각각 β -sitosterol (**1**), hydroxyhopanone (**2**), β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-6'-*O*-palmitate (**3**) 그리고 β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**)로 동정하였다. 이들 화합물들 중 화합물 **2**와 **3**은 와송에서는 처음으로 분리된 화합물이다. 분리된 화합물 **1-4**를 항보체 활성을 측정된 결과 화합물 **3**은 IC_{50} 값이 $1.01\ \mu\text{M}$ 로 대조군인 tiliroside ($\text{IC}_{50}=76.50\ \mu\text{M}$) 보다 70배 더 강한 활성이 나타내었으며, 화합물 **1**은 IC_{50} 값이 $59.41\ \mu\text{M}$ 로 대조군인 tiliroside ($\text{IC}_{50}=76.50\ \mu\text{M}$) 보다 높은 활성을 나타내었다. 그러나 화합물 **2**와 **4**는 효과가 나타나지 않았다. 항보체 활성이 큰 화합물 **1**의 용혈 저해 효과는 C-3 위치에 hydroxy group이 존재하기 때문에 나타난다. 그러나 화합물 **4**와 같이 C-3 위치에 glycosylation이 되면 그 활성이 급격히 감소된다. 가장 높은 항보체 활성을 나타낸 화합물 **3**의 활성은 β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside의 C-6' 위치에 포화 지방산 ester가 결합되어 있기 때문에 나타난다. 그러므로 sterol의 C-3 위치에 hydroxy group과 acylated

sterol glycoside의 지방산 ester는 항보케 활성에 중요한 역할을 한다.

DPPH radical, hydroxyl radical, peroxyntirite 그리고 ROS 소거 활성의 항산화 활성 평가에서 가장 활성이 높은 EtOAc 획분을 silica gel, sephadex LH-20 그리고 RP-18 column chromatography 행하여 10종의 화합물을 분리하였다. 이들 화합물 구조는 1D (^1H , ^{13}C -NMR)와 2D (HMBC) NMR 등의 분광학적 방법을 이용하여 각각 kaempferol (**5**), hydroquinone (**6**), methyl gallate (**7**), quercetin (**8**), gallic acid (**9**), protocatechuic acid (**10**), kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**11**), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**12**), kaempferol 3-*O*-rutinoside (**13**) 그리고 kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**)로 동정하였으며, 분리된 화합물 **5-14**를 DPPH radical과 peroxyntirite 소거 활성을 측정하여 항산화 활성을 평가하였다. 분리된 화합물 중 DPPH radical 소거 활성에서 가장 효과가 큰 화합물 **7**은 IC_{50} 값이 $1.68 \mu\text{M}$ 로 대조군인 L-ascorbic acid ($\text{IC}_{50} = 7.38 \mu\text{M}$)보다 4배 정도 활성이 강하게 나타났다. 또한 화합물 **8**과 **9**은 DPPH radical 소거 활성에서 IC_{50} 값이 각각 2.65 와 $1.43 \mu\text{M}$ 로 L-ascorbic acid ($\text{IC}_{50} = 7.38 \mu\text{M}$)보다 높은 활성을 나타내었다. peroxyntirite 소거활성에서 화합물 **8**은 IC_{50} 값이 $0.42 \pm 0.60 \mu\text{M}$ 로 분리된 화합물 중 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 화합물 **5**, **7**, **9** 그리고 **10**은 IC_{50} 값이 각각 1.76 ± 0.56 , 1.04 ± 0.18 , 1.38 ± 0.90 그리고 $1.95 \pm 0.93 \mu\text{M}$ 로 penicillamine ($\text{IC}_{50} = 2.36 \pm 0.79 \mu\text{M}$)보다 높은 활성을 나타내었다. 항산화 활성이 큰 화합물 **7-9**의 DPPH radical과 peroxyntirite 소거 효과는 aromatic ring에 두 개 이상의 free hydroxy group이 *ortho* 위치로 결합되어 있기 때문에 나타나며, 효과의 강도는 free hydroxy

group의 수와 methyl group의 존재와 관련이 있다. 그러므로 C-3, 4의 위치에 두개의 hydroxy group을 가진 **10** 보다 C-3, 4, 5 위치에 세 개의 hydroxy group을 가진 화합물 **7**과 **9**의 효과가 더 크게 나타난다. Flavonol 화합물에서의 항산화 효과는 C-3의 hydroxy group이 중요한 역할을 한다. Radical 소거물질은 free radical에게 전자나 수소를 제공하거나, 전자쌍을 받아서 활성을 나타내는데, C-3 위치의 free hydroxy group은 4-keto group과 수소결합을 형성시킴으로써 free radical 소거 활성을 증진시킨다. 반면에 B-ring의 C-4' 위치에 hydroxy group을 가진 kaempferol은 다소 약한 활성을 나타내지만, quercetin과 같이 kaempferol의 C-4' 위치에 hydroxy group에 *ortho* hydroxy group (*o*-dihydroxy group)이 첨가되면, flavonol의 free radical 소거 활성이 증가된다. *o*-dihydroxy group이 존재하지 않을 경우 C-3 위치에 glycosylation이 되면 그 활성은 급격히 감소된다.

이상과 같은 결과로 와송 분획물의 항보체 및 항산화 활성을 나타내는 직접적인 물질은 이들 화합물로부터 나타나는 것으로 여겨진다.

V. 참고문헌

- 강삼식, 손건호, 천연물성분 구조결정법, p 585-740, 서울대학교 출판부, 2000.
- 이창복, 원색 대한 식물 도감, p. 456, 경문사, 2003.
- 오세량, 생약 항보체 혈소판 길항성분, 서울대학교 대학원 박사학위 논문, 1997.
- Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. T., Scherch, H. M., Sethy, V. H and Von voigtlander, P. F., Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers. An approach to nitric oxide neurotoxicity, *Res. Commu. Chem. Datho. Pharmacol.* 83, 243-249, 1994.
- Auroma, O. I., 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.
- Blois, M. S., Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200, 1958.
- Branen, A. L., Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 59-63, 1975.
- Brent, L., Roitt, I. M., and Delves, P. J., Immuno response in encyclopedia of immunology, Academic Press Ltd. London, 1992.
- 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.
- Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y., Kye, I. S., No, J. K and Baek, B. S., Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin, *J. Agric. Food Chem.* 46, 4484-4486, 1998.
- Crow, J. P., Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1, 145-157, 1997.
- 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.
- Delia, D., Aiello, A., Meroni, L., Nicolini, M., Reed, J. C. and Pierotti, M., Role of antioxidants and intracellular free radicals in retinamide-induced cell death, *Carcinogenesis*, 18, 943-948, 1997.
- 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.
- Gluchoff-fiasson, K., Fiasson, J. L. and Waton, H., Quercetin glycosides from European aquatic *Ranunculus* species of subgenus *Batrachium*, *Phytochemistry*, 45, 1063-1067, 1997.
- Gow, Y. Y. and Flick, G. J., Effect of ascorbyl palmitate on the quality of frying fats for

- deep frying operations, *JAOCs*, 62, 1666-1667, 1985.
- Greca, M. C., Monaco, P. and Previtera, L., Stigmasterols from *Typha latifolia*, *Journal of Natural Products*, 53, 1430-1435, 1990.
- Haenen, G. R. M. M., Paguay, J. B. G., Korthouwer, R. E. M. and Bast, A., Peroxynitrite scavenging by flavonoid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 590-593, 1997.
- Han, D., Yi, O. S. and Shin, H. K., Antioxidative effect of ascorbic acid solubilized in oils via reversed micells, *J. Food. Sci.*, 55, 247-249, 1990.
- Hempel, S. T., Buettner, G. R., Omalley, 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.
- Hur, J. M., Park, J. C and Hwang, Y. H., Aromatic acid and flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum piperium*, *Natural Product Sciences*, 7, 23-26, 2001.
- Kawagishi, H., Hamajima, K. and Inoue, Y., Novel hydroquinone as a matrix metalloproteinase inhibitor from the mushroom, *Piptoporus betulinus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2748-2750, 2002.
- Kimbell, J. W., Introduction to immunology, Chap. 12, Mcmillan Publishing Company, U.S.A., 1994.
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S., Peroxynitrite mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 149-156, 1994.

- Koskas, J. P., Cillard, J. and Cillard, P., Antioxidation of linoleic acid and behavior of its hydroxides with and without tocopherols, *JAACS*, 61, 1467-1471, 1984.
- Kuby, J., Complement in immunology 2nd ed. Chap.15, W. H. Freeman Company, U.S.A., 1994.
- LeBel, C. P. and Bondy, S. C., Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosome, *Neurochem. Int.*, 17, 435-440, 1990.
- Lee, I. R. and Yang, M. Y., Phenolic compounds from *Duchesnea chrysantha* and their cytotoxic activity in human cancer cell, *Arch. Pharm Res.*, 17, 476-479, 1994.
- Lee, M. W., Lee, Y. A., Park H. M., Toh S.H and Jang H. D, Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor, *Arch. Pharm. Res.*, 23, 455-458, 2000.
- Lee, S. C., Ahn, B. T., Park, W. Y., Lee, S. H., Ro, J. S., Lee, K. S. and Ryu, E. K., Pharmacognostical study on the *Euphorbia ebracteolata*, *Kor. J. Pharmacogn.*, 23, 126-131, 1992.
- Lee, S. M., Park, J. G., Lee, Y. H., Lee, C. G. and Min, B. S., Anti-complement activity of triterpenoids from fruits of *Zizyphus jujuba*, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 1883-1886, 2004.
- 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.
- Marjeta S., Marjana N., Henry D. C and Veronika A., Antioxidant activity of

- Sempervivum tectorum* and its components, *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 2766-2771, 2003.
- 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.
- Meselhy, M. R. and Aboutabl, E., Hopane-type saponins from *Polycarpon succulentum* Growing in Egypt, *Phytochemistry*, 44, 925-929, 1997.
- Moore, T. L. and Weiss, T. D, Mediators of inflammation, *Semin Arthritis Rheum*, 14, 242-262, 1985
- Nagatsu, A., Tenmura, T., Matsuura, H., Murakami, N., Kobayashi, T., Okuyama, H. and Sakakibaba, J., Novel antioxidants from roasted perilla seed. *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 887-889, 1995.
- Nguyen, A. T., Malonne, H., Duez R., Vanhaelen-fastre, R., Vanhaelen, M and Fontaine, J., Cytotoxic constituents from *Plumnago zeylanica*, *Fitoterapia*, 75, 500-504, 2004.
- Nicholson, W. A. and Halperin, J. A., Membrane signaling by complement C5b-9, the membrane attack complex, *Immunol. Res.*, 12, 244-257, 1993.
- 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.

- Oh sugi, M., Fan, W., Hase, K., Xiong, Q., Tenzuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., Saitoh, T., Tazawa, K. and Kadota, S., Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing- tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*, *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 111-119, 1999.
- Oh, S. R., Jung, K. Y., Kim, J. H. and Lee, H. K., In vitro anticomplementary activity of phenylpropanoids from *Agastche rugosa*, *Kor. J. Pharmacogn.*, 27, 20-25, 1996.
- Park, H. J., Han, S. Y., 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, 167-171, 1991a.
- Park, H. J., Han, S. Y., Kang, J. O., Rhee, S. H and Choi, J. S., A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger, *Kor. J. Phamacogn.*, 22, 78-84, 1991b.
- Park, H. J., Moon, S. H., Park, K. Y., Choi, J. S., Chung, H. Y., Han, S. Y and Suh, S.S., Antimutagenic effect of *Orostacys japonicus*, *Yakhak Hoeji*, 35, 253-257, 1991c.
- Park, J. G., Park, J. C., Hur, J. M., Park, S. J., Choi, D. R., Shin, D. Y., Park, K. Y., Cho, H. W. and Kim, M. S., Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having Anti-HIV-1 Protease Activity, *Natural Products Sciences*, 6, 117-121, 2000.
- Poehland, B. L., Carte, B. K., Francis, T. A., Hyland, L. J., Allaudeen, H. S. and Troupe, N., In vitro antiviral activity of mammar resin triterpenoids, *Journal of Natural Products*, 50, 706-713, 1987.
- Rother, K., Rother, U. and Hansch, G, The role of complement in inflammation, *Path.*

- Res. Pract.*, 180, 117-124, 1985.
- Sroka, Z. and Cisowski, W., Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753-758, 2003.
- Stunk, R. C., Eidlen, D. M. and Mason, R. J., Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways, *J. Clin. Invest.*, 81, 1419-1426, 1988.
- Sumdsmo, J. S. and Fair, D. S., Relationship among the complement, kinin, coagulation and fibrinolytic system in the inflammatory reaction. *Clin. Physiol. Biochem.*, 1, 225-284, 1983.
- Tanaka, R. and Matsunaga, S., Saturated hopane and gammacerane triterpene-diols from the stem bark of *Abies veitchii*, *Phytochemistry*, 31, 3535-3539, 1992.
- Ulubelen, A., Okasoz, S. and Mericli, A., Palmitic acid ester of sitosterol 3 β -glucoside from *Centaurea regia*, *Phytochemistry*, 27, 3964-3965, 1988.
- Van Dyke, K., McConnell, P. and Marquardt, L., Green tea extract and its polyphenols markedly inhibit luminol-dependent chemiluminescence activated by peroxynitrite or SIN-1, *Luminescence*, 15, 37-43, 2000.
- Wang, H and Joseph, J. A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 612-616, 1999.
- Weissimann, G., Gallin, J. I., Goldstein, I. M. and Snyderman, R., 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, 1992.
- Yamada, H., Ohtani, K., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Otasuka, Y., Ueno, Y. and Omura,

S., Purification and chemical properties of anticomplementary polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps*, *Planta Medica*, 51, 121-125, 1985.

Yoon, Y. S., Kim, K. S., Hong, S. G., Kang, B. J., Lee, M. Y. and Cho, D. W., Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line, *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 73-78, 2000.

감사의 글

학부과정에서부터 지금까지 많이 부족한 저에게 끊임없는 관심과 가르침으로 진정한 학문의 길로 인도해주시고, 따뜻한 격려와 아낌없는 사랑으로 감싸주신 최재수 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

또한 바쁘신 와중에도 부족한 논문을 깊은 관심으로 심사해주시고 교정해주신 변대석 교수님, 김형락 교수님께 감사 드립니다. 그리고 평소에 큰 가르침을 주신 최진호 교수님, 류홍수 교수님, 남택정 교수님, 류은순 교수님께도 감사 드립니다.

실험실에서 오랜 시간 함께한 여러 선·후배님들께도 감사의 마음을 전합니다. 특히, 후배에게 따뜻한 격려와 조언을 해주신 박혜진 박사님, 현아 언니, 혜숙 언니께 감사 드립니다. 힘들 때 마다 따뜻한 위로와 격려를 해준 미정 언니, 실험에 많은 조언을 해준 고마운 숙경 언니, 지쳐있는 후배들에게 활력소가 되어준 유정 언니, 옆에서 항상 힘이 되어준 주정 언니, 2년 동안 동고동락하며 많은 도움을 준 동기 회진이, 실험실 막내 춘환씨, 친동생처럼 아껴주고 힘이 되어준 정은 언니, 짧은 시간이었지만 함께 실험했던 영란 언니에게도 감사 드립니다.

동기 남주 언니와 경화씨, 그리고 그 외 여러 선·후배님들께 감사 드립니다. 항상 뒤에서 걱정해주고 응원해주는 친구들에게도 고마움을 전합니다.

그리고 공동실험실습관 선생님들 특히, 박성민, 지성희, 류영철 선생님께 감사 드립니다.

손너를 걱정해주시는 할머니, 공부 열심히 하라고 격려해주시는 친지분들께 감사 드립니다. 특히, 암 투병 중에도 불구하고 항상 힘이 되어주시는 셋째 이모께 감사의 마음을 전하며, 빠른 쾌유를 기원합니다.

동생을 진심으로 아껴주는 오빠, 오늘이 있기까지 헌신적인 사랑과 관심으로 지켜봐 주신 사랑하는 어머니, 딸을 믿고 힘이 되어주신 자랑스런 아버지께 이 작은 결실을 바치며, 진심으로 감사 드립니다.

저에게 따뜻한 사랑과 관심을 보여주신 많은 분들에게 최선을 다하는 모습으로 보답하겠습니다.

2004년 12월

윤나영 올림