

이학석사 학위논문

울금(*Curcuma longa*)의
peroxynitrite 소거 활성

지도교수 최 재 수

이 논문을



출함

2002년 8월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

김 병 수

김병수의 이학석사 학위논문을 인준함

2002년 6월 29일

주 심	농학박사	남	택	정	
위 원	이학박사	김	형	락	
위 원	약학박사	최	재	수	

목 차

Abstract	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
2. 시약 및 기기	7
2-1. 시약	7
2-2. 일반 실험방법과 기기	7
3. 성분의 추출, 분획과 동정	8
4. 화합물의 Spectral data	10
4-1. Compound 1 (Curcumin I)의 spectral data	10
4-2. Compound 2 (Curcumin II)의 spectral data	10
4-3. Compound 3 (Curcumin III)의 spectral data	11
5. Peroxynitrite 소거활성 측정	13
III. 결과 및 고찰	15
1. 수종 식물의 peroxynitrite 소거활성	15
2. 울금 분획물의 peroxynitrite 소거활성과 화합물의 분리 및 동정	15
3. 분리된 화합물의 구조분석	19

3-1. 활성 물질 compound 1 (curcumin I)의 구조	19
3-2. 활성 물질 compound 2 (curcumin II)의 구조	19
3-3. 활성 물질 compound 3 (curcumin III)의 구조	20
4. 분리된 화합물의 Peroxynitrite 소거 효과	30
IV. 요약 및 결론	35
V. 참고문헌	37

Peroxynitrite Scavenging Activity of *Curcuma longa*

Byung-Soo Kim

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

Abstract

The *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), native to South and Southeast Tropical Asia, has a long and distinguished human use in Eastern civilization. Rhizome of *C. longa* along with its primary constituent curcumin is known for its antioxidant and cytoprotective role. Peroxynitrite is a cytotoxic intermediate produced by the reaction between the superoxide anion (O_2^-) and nitric oxide (NO). The aim of this study was to investigate the scavenging effects of *C. longa* on authentic peroxynitrite, and further studies are planned that will attempt to identify the active principles from the active fraction. The methanolic extract of *C. longa* showed 50% scavenging activity (IC_{50}) at concentration of $1.7 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$, and thus fractionated with several solvents. The peroxynitrite scavenging activity potential of the individual fraction was in the order of ethyl acetate > dichloromethane > water fraction. The ethyl acetate soluble fraction exhibiting strong scavenging activity was further purified by repeated silica gel column chromatography. The structures of all isolated compounds 1 ~ 3 were elucidated as diarylheptanoids, curcumin I, curcumin II and curcumin III by spectroscopic methods such as $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ respectively. Peroxynitrite scavenging diarylheptanoids, curcumin I(1), curcumin II(2), curcumin III(3) were isolated as active principles.

Compounds 1 - 3 showed the peroxynitrite scavenging activities with IC₅₀ values of 4.0 ± 0.04, 6.4 ± 0.30 and 29.7 ± 1.29 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Penicillamine as positive control exhibited IC₅₀ value of 3.4 ± 0.36 μM . The structure-activity relationship of diarylheptanoids on peroxynitrite was also discussed.

I. 서 론

최근에는 천연물에 있어 항산화 활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 이유는 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)의 경우 뛰어난 항산화 효력과 저렴한 가격 때문에 널리 사용되어져 왔으나, 이들이 암을 유발시키는 등 인체에 대해 독성을 갖는다는 사실 (Branen, 1975)이 보고된 이후 천연 항산화제의 개발에 관심이 집중되었다. 비록 tocopherol (Koskas 등, 1984), L-ascorbic acid (Gow and Flick, 1985 ; Han 등, 1990 ; Nishima, 1991)와 같은 천연 항산화제가 널리 사용되기는 하나, 천연 그 중에서도 특히 식물로부터 매우 효력 있고 안전하며 경제적인 항산화제의 발견을 위한 연구가 끊임없이 계속되고 있다 (Nagatsu 등, 1995). 천연물의 분리가 18세기 말 포도에서 tartaric acid, 레몬에서 citric acid가 분리되는 등 천연물 화학의 근대 과학적 연구가 시작되어 (우원식, 1996) 근래에는 천연물 중에서도 특히 생리활성을 가지는 항산화제에 관한 연구가 Olcott (1937) 등에 의해 tocopherol이 항산화력을 가짐이 밝혀진 이래, 여러 종류의 식물류에서 항산화 성분인 flavonoids들의 분리, 동정하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며 (Torel, 1986 ; Larson, 1988) 그 외에 많은 항산화 성분들이 천연물로부터 밝혀지고 있다.

지질 과산화 (lipid peroxidation)의 억제제들과 같은 항산화제들은 식품을 보호뿐만 아니라 살아있는 세포들에게 있어서 산화적인 손상을 방어하는 중요한 화합물이다. 천연 식물 자원으로부터 얻어지는 많은 천연물들은 활성산소 소거제, 유리 라디칼 소거제 또는 환원제로서 그들의 자연적인 환경에서 산화 과정을 지연시키는 것으로 보고되어져 왔다 (Pratt, 1994 ; Larson, 1988).

Superoxide (O_2^-)와 nitric oxide (NO)들이 염증과 허혈성 및 관류과정에 관련되어 있다고 보고되고 있다. 또한 NO는 O_2^- 와 반응하여 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 발생시켜서 세포에 유해한 작용을 초래하여 노화과정 및 염증, 동맥경화, 허혈성 질환, 관류, 암 등과 같은 질환에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 최근에 제안된 “Inflammation Hypothesis of Aging” (정해영 등, 2000)에 의하면 노화과정에서 염증반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS (inducible NO synthase)의 유도에 따른 NO의 대량 생성이

peroxynitrite생성을 더욱 증가시켜, 세포 및 조직 손상을 가져와 노화과정을 촉진하는 것으로 사료된다. 특히 생체에는 peroxynitrite에 대한 특이한 제거효소가 없으므로 peroxynitrite에 의한 세포손상을 미연에 방지하는 것이 노화를 조절하고, 노인성질환을 예방하는데 매우 중요하다. 그러므로 peroxynitrite scavenger를 활용하여 peroxynitrite에 의한 세포의 손상을 예방하는 것은, 노화를 조절할 수 있는 가능성을 제시해 준다고 하였다. 그러므로 본 연구에서는 울금을 비롯하여 여러 가지 식물 추출물들의 peroxynitrite scavenger로서 활용할 수 있는지를 중점적으로 연구하였다. 그 결과 가장 많이 상용하고 있는 울금에 대한 peroxynitrite scavenger를 밝히고자 하였다.

울금 (*Curcuma longa* L.)은 생강과 (Zingiberaceae)에 속하는 다년생 숙근 초본으로, 원산지가 열대아시아 지방이며 분포지역은 남아시아(인도)·동남아시아·중국 등지에서 널리 재배되고 있으며, 천연 그대로로서 오랜기간 동안 인간에게 사용되었다 (Scartezzini and Speroni, 2000). 울금은 근경이 괴상으로 가로로 자른면은 황색을 띠고, 향이 있다. 잎은 크고 길이 30~90cm, 폭은 10~20cm로 잎끝은 뾰족하고 기부는 삼각형, 윗면은 푸른색이며, 꽃은 수상화로서 늦은 봄부터 가을철에 피며 길이 약 30cm, 포편은 엷은 녹색으로 난형, 길이 4~5cm, 화관은 여두 모양의 황색이며 길이 2.5cm, 근경을 울금 또는 천옥금이라 한다. 우리 나라에서는 울금(乙金), 걸금(乞金), 옥금(玉金), 왕금(王金), 심황(深黃)이라고도 부르며, 북부의 산악지대를 제외한 각지에서 재배한다. 겨울에 뿌리줄기를 움에 보관하였다가 봄에 밭에 심는다. 울금속(屬)의 다년초에 봄에 핑크색 꽃을 피우는 춘울금과 가을에 흰색의 꽃을 피우는 추울금 2종류가 있다. 모두 지상부는 파초와 비슷한 형태로 높이 1.5m생강을 닮은 큰 뿌리가 있으며 가끔 이 뿌리의 털끝에서 큰 뿌리가 나기도 한다. 뿌리를 파서 잘라 보면 양쪽 다 높은 방향성이 있고 안의 색깔이 다르며 춘울금은 선황색, 추울금은 오렌지색을 보인다. 건조한 분말을 보면 이러한 차이를 잘 알 수 있다. 또한 춘울금은 약간 매운맛과 쓴맛이 있고 추울금은 쓴맛이 없다. 뛰어난 약효를 발휘하는 생약으로 이용되는 것은 춘울금의 뿌리로 양자의 구별을 확실히 할 수 있게 된 것은 근래의 연구성과이다. 중국에서는 울금을 한약재로서 강황이라고 하고 울금의 근경을 삶아서 말린 것을 말하며 담즙의 분비를 촉진하고, 혈압을 강하시키며, 항균 작용 등이 있다고 하여 급성·

만성 담낭염, 담석증, 황달, 담관염의 치료에 쓰이고, 기혈을 채워 생기는 창만동통, 월경통, 폐경 등에도 효능이 있다고 알려져 있다 (지형준, 1999 ; 김형균 등 2000). 그리고 인도에서는 향신료로서 카레의 원료로 사용하고 있고 원료로 사용되는 것은 추울금으로 특유의 맛과 향이 터메롤 (tumerol) 이라는 향신료가 주성분이다 (김동훈, 2001). 또한 예로부터 중국과 우리나라에서는 염색시 염료 (미얀마의 승려복 등)로서도 많이 사용되어져 왔다 (조경래, 2000).

이러한 울금의 일반성분을 분석하면 대체적으로 essential oil (정유), plant pigment (식물색소), starch (전분)가 주요성분으로서 내용을 보면, essential oil은 전체의 울금성분에 0.3~7.2%를 차지하며, 그 중에는 *d*-camphene (0.8%), camphor (2.5%), sesquiterpene (65.5%), sesquiterpene alcohol (22%)으로 구성되어 있고, plant pigment는 curcumin (0.3~5.4%)과 미량의 demethoxycurcumin으로 구성되어 있으며, starch 30~40%, 조섬유 5%, 회분 4%, 수분 16% 정도를 함유하고 있다 (지형준, 1999).

울금에 관한 지금까지의 연구보고로는 울금의 근경 (뿌리줄기)은 그것의 주성분 curcumin과 함께 항산화제와 세포보호 역할을 가진다고 알려져 있다 (Soudamini 등, 1992 ; Ramsewak 등, 2000). 울금에서 항산화 활성성분은 curcumin과 그것의 항산화로서 밝혀져 왔었다 (Toda 등, 1985). 울금은 식품계에서 뿐만아니라 생체계에서도 강한 항산화활성을 가진다 (Kunchundy and Rao, 1989, 1990 ; Huang and Ferraro, 1992 ; Sharma, 1976). 최근에, 생체계에서의 항산화 활성은 몇몇 과산화-관련 질환을 방어하는 것으로 주목을 받아왔다 (Ruby 등, 1995). Masuda 등 (1999)은 curcumin의 항산화 기전에 대한 화학적인 연구에서 curcumin은 라디칼을 형성하여 그것의 2분자체 (dimerization)를 만들고 계속해서 다분자체 (polymerization)를 만들므로써 사슬-차단 (chain-breaking) 항산화제로서 작용한다고 밝혔다. 최근에, Kato 등 (1997)은 curcumin이 peroxy-nitrite에 의해서 변화된 콜라겐에서 3-nitrotyrosin의 형성과정에 강한 억제 효과를 가진다고 보고하였다. 본 연구에서는 이 울금에 관하여 peroxy-nitrite 소거 활성에 대한 자세한 연구들이 보고되어 있지 않기 때문에 연구를 시작하였다. 그 결과 Table 1에서는 지금까지 연구된 여러 가지 식물 추출물들의 peroxy-nitrite에서 강한 소거 활성을 나타낸것들을 표현하였

으며 이와 비교할 때 울금에서도 분리된 활성성분에서 비교적 높은 소거 활성이 있음을 확인하였다. 그리고 울금의 활성성분에서 3가지 밝혀진 diarylheptanoids인 curcumin I(1), curcumin II(2) 그리고 curcumin III(3)이 분리하였으며 각각의 curcumin I ~ III은 peroxyinitrite의 소거작용 실험을 한 결과 강한 항산화 활성이 나타났음을 밝혔다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 울금 (*Curcuma longa* L.)의 근경은 2000년 4월 부산지방의 건재상으로부터 구입하였고 울금 표본 (no. WP 010)은 부경대학교 식품생명공학부에 보관하였다. 또한 24종 (고사리의 23종)의 식물들의 메탄올 추출물들은 한국생명공학원의 자생식물 사업단으로부터 구입하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Penicillamine은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. DHR 123 (Dihydrorhodamine 123)와 peroxyxynitrite는 고순도이며 각각 Molecular Probes(Eugene, Oregon, USA), 그리고 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)으로부터 구입하였다.

2-2. 일반 실험방법과 기기

^1H -와 ^{13}C -NMR spectra는 Varian UNIYT-400 spectrometer를 이용하였으며 화학이동치 (Chemical shift)는 각각의 잔류 용매 피크를 기준으로 δ 치로서 기록하였다. ^1H -그리고 ^{13}C -NMR signal들의 다양성들은 s (단일선), d (이중선), 그리고 m (다중선)으로 기록하였다. 칼럼 크로마토그래피는 silica gel (Merck, 70-230 mesh)를 가지고 실험하였다. TLC는 Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (0.25 mm)를 사용하였고 화합물의 확인은 50% H₂SO₄를 사용하여 검출하였다.

3. 성분의 추출, 분획 및 동정

울금 (200g)의 건조된 근경을 Scheme I에 나타난 바와같이 MeOH로서 3시간 동안 환류시켰다. 총 여과액을 40°C에서 진공에서 건조되도록 농축하여 MeOH 추출물 (21 g)을 얻었다. 또한 peroxyinitrite 비교실험을 하기 위하여 24종의 식물 (고사리의 23종)은 울금과 같은 방법으로 MeOH 추출물만을 얻었다. 울금 추출물은 H₂O에서 현탁시킨후, 그 다음에 CH₂Cl₂와 EtOAc를 가지고 분획하고, 계속적으로, CH₂Cl₂ 추출물 (14.4g), EtOAc 추출물 (2.2g)과 H₂O 잔류물 (3.5g)을 얻었다. EtOAc 추출물 (2g)은 Si gel column (12×60, Silica gel 60, Merck, 200 g)을 통해서 CH₂Cl₂-MeOH (100:1 to 10:1) 용매를 이용하여 chromatography하여 8가지 분획물을 얻었다 (Fr.1 - Fr.8). 분획 1 (500mg)은 다시 CH₂Cl₂으로 chromatography하여 compound 1 (80mg, curcumin I)을 얻었고 분획 2와 3 (400mg)을 합하여 CH₂Cl₂-MeOH (100:1)용매로서 다시 Si gel column을 행하여 compound 1 (20mg)와 compound 2 (60mg, curcumin II)를 분리하였으며 분획 4로부터 compound 3 (50mg, curcumin III)를 분리하고 여과액 (250mg)은 다시 EtOAc을 가지고 Si gel column chromatography를 행하여 compound 3 (120mg)을 얻었다.

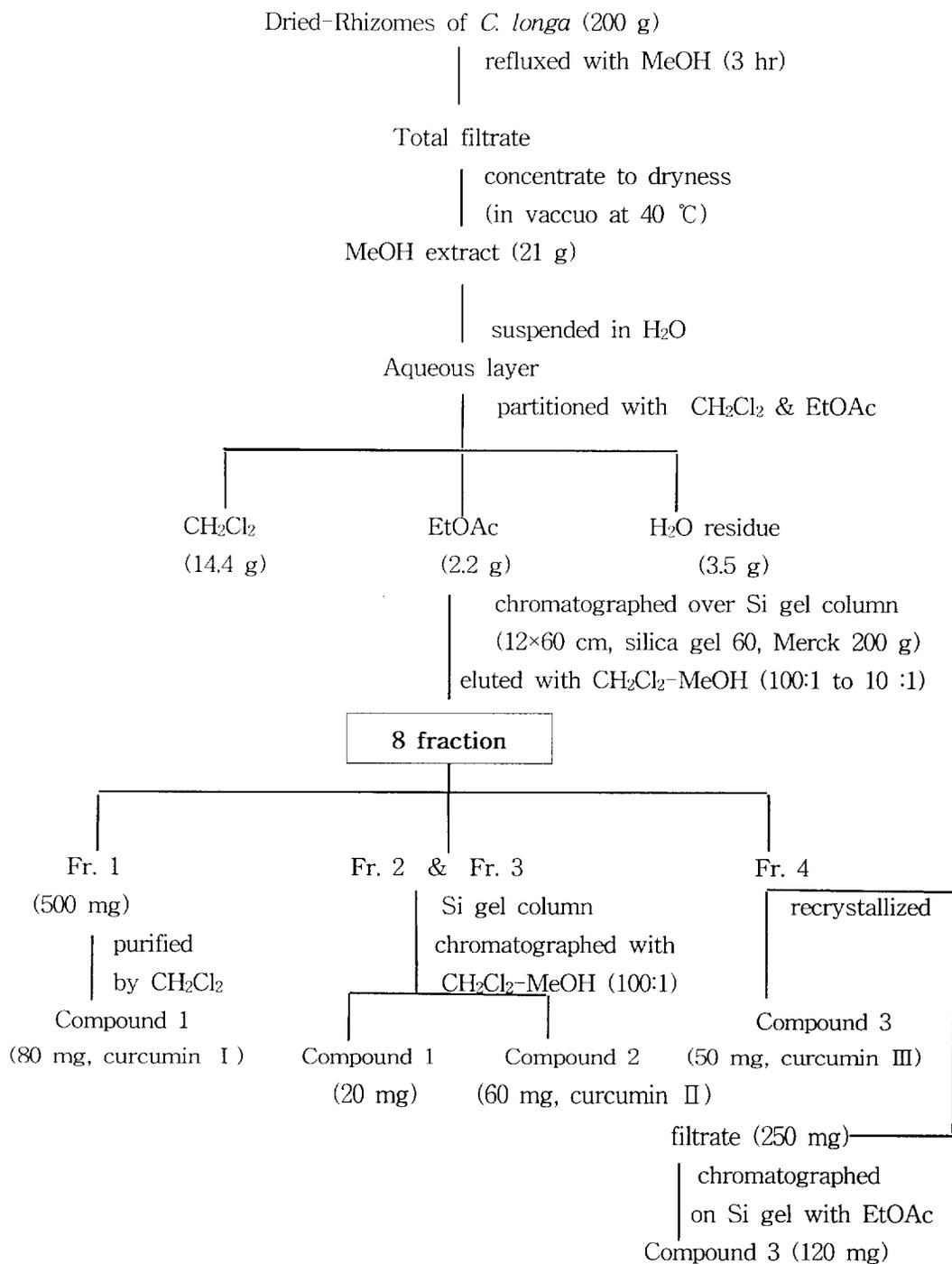


(A)



(B)

Photo. 1. 울금 (*Curcuma longa* L.)의 꽃 (A)과 근경 (B)



Scheme 1. Extraction, fractionation and isolation of *C. longa*

4. 화합물들의 Spectral data

4-1. Compound 1 (Curcumin I)의 spectral data

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) ; 3.86 (6H, s, 2 x OCH₃), 5.92 (1H, s, H-4), 6.65 (2H, d, J = 16.0 Hz, H-2, 7), 6.83 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-5', 5''), 7.12 (2H, d, J = 2.0 & 8.3 Hz, H-6', 6''), 7.28 (2H, d, J = 2.0, H-2', 2''), 7.55 (2H, d, J = 16.0 Hz, H-1, 6),

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.0 MHz, acetone- d_6) ; 184.96 (C-3, 5), 150.45 (C-4', 4''), 149.21 (C-3', 3''), 141.86 (C-1, 7), 128.64 (C-1', 1''), 124.27 (C-6', 6''), 122.77 (C-2, 6), 116.69 (C-5', 5''), 112.02 (C-2', 2''), 102.13 (C-4), 56.77 (2 x OCH₃)

4-2. Compound 2 (Curcumin II)의 spectral data

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) ; 3.86 (3H, s, OCH₃), 5.92 (1H, s, H-4), 6.60 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 6.66 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2), 6.83 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.85 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3'', 5''), 7.11 (1H, d, J = 1.7 & 8.5 Hz, H-6'), 7.28 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-2'), 7.51 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2'', 6''), 7.55 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-6), 7.56 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-1),

^{13}C -NMR (100.0 MHz, acetone- d_6) ; 185.01 (C-3), 184.92 (C-5), 160.96 (C-4''), 150.47 (C-4'), 149.23, (C-3'), 141.85 (C-1), 141.50 (C-7), 131.42 (C-2'', 6''), 128.63(C-1'), 128.16 (C-1''), 124.32 (C-6'), 122.73 (C-2), 122.51 (C-6), 117.25 (C-3'', 5''), 116.68 (C-5'), 111.96 (C-2'), 102.17 (C-4), 56.77 (OCH₃)

4-3. Compound 3 (Curcumin III)의 spectral data

^1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) ; 5.92 (1H, s, H-4), 6.61 (2H, d, J = 16.0 Hz, H-2, 6), 6.85 (2H, d, J = 8.5 Hz , H-3', 4'), 6.85 (2H, d, J = 8.5, H-3'', 5''), 7.51 (2H, d, J = 8.5Hz , H-2', 6'), 7.51 (2H, d, J = 8.5, H-2'', 6''), 7.56 (2H, d, J = 16.0Hz, H-1, 7),

^{13}C -NMR (100.0 MHz, acetone- d_6) ; 184.96 (C-3, 5), 160.91 (C-4', 4''), 141.50 (C-1, 7), 131.42 (C-2', 6', 2'', 6''), 128.16 (C-1',1''), 122.49 (C-2, 6), 117.24 (C-3', 5', 3'', 5''), 102.22 (C-4)

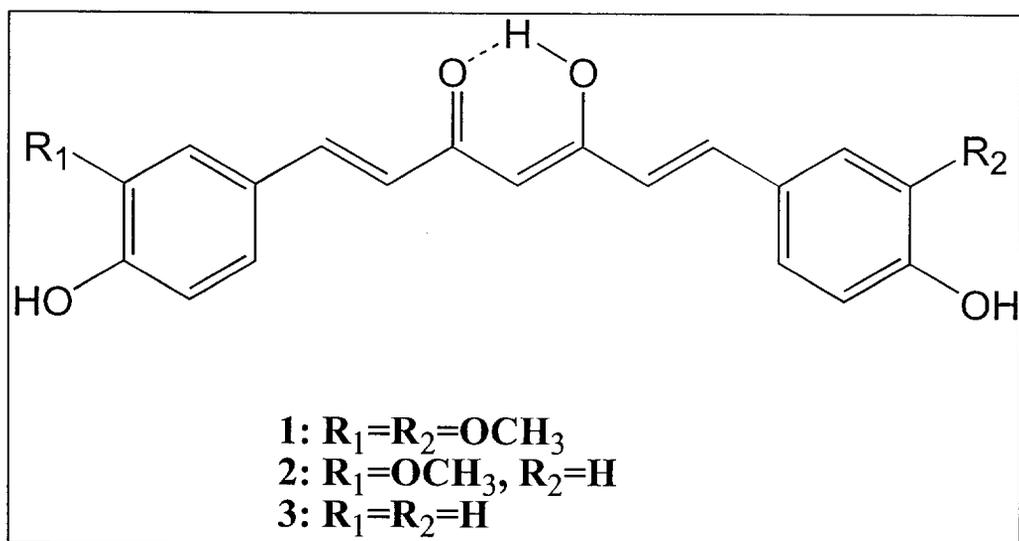
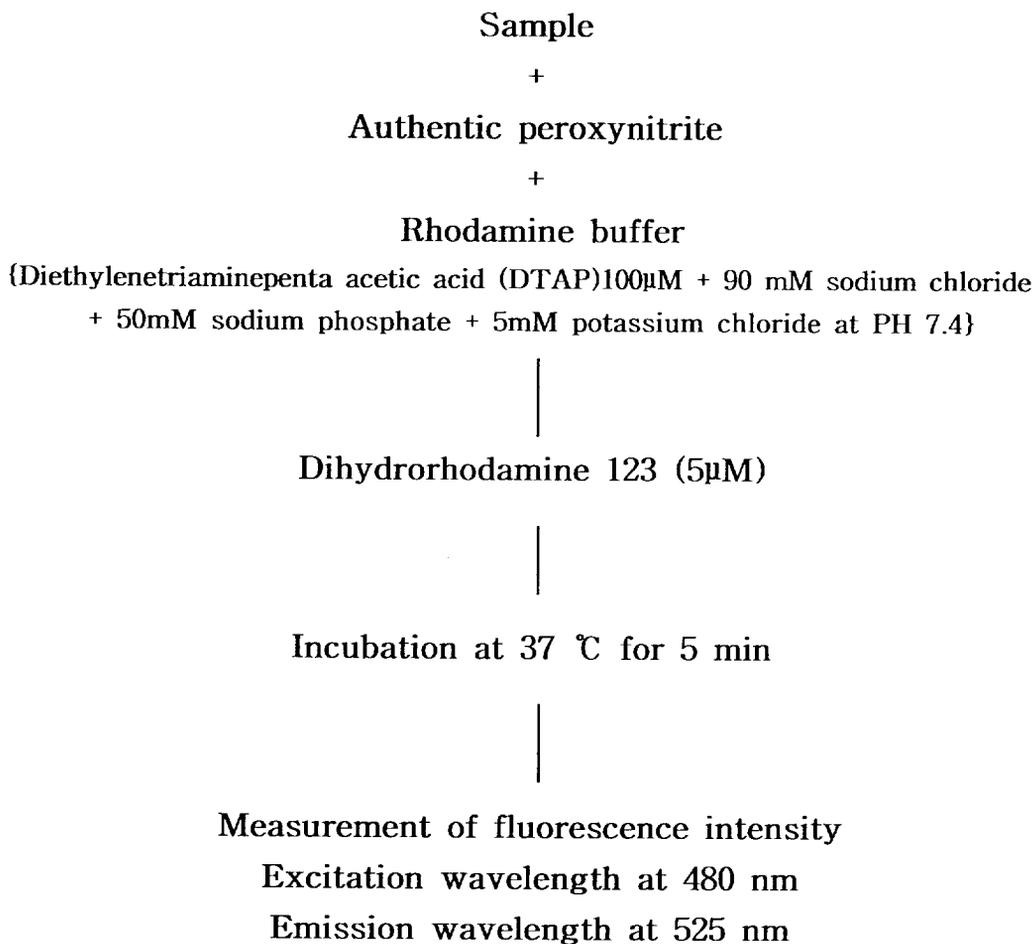


Fig. 1. Structures of isolated compounds 1 - 3

5. Peroxynitrite 소거활성 측정

ONOO⁻를 측정하는 방법은 peroxynitrite에 의해 형성된 단백질 tyrosine 잔기의 니트로화를 측정하는 방법으로 UV-visible 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 있으나 본 연구에서는 peroxynitrite의 소거 활성의 측정은 Kooy 등 (1994)의 방법을 변형하여 DHR 123의 산화를 측정함으로써 수행하였다. 질소 처리하여 불순물이 제거된 상태로 dimethylformamide에서 DHR 123 (5mM)은 저장용액 (stock solution)으로 -80°C에서 저장되었다. 그리고 나서 이 용액을 실험하기 전까지 빛에 노출시키지 않은 상태로 냉동보관하였다. 완충액 (Buffer)은 90 mM sodium chloride, 5 mM sodium phosphate, 5 mM potassium chloride로 PH 7.4에 맞추었으며, 100 µM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)로 구성된 완충액은 각각 순도가 높은 탈이온화수로 제조하였으며, 질소처리하여 불순물을 제거하였다. DHR 123은 peroxynitrite에 의해 빠르게 산화되었으며, 그것의 최종 형광 강도는 시간이 지나도 변하지 않은채 남아 있었다. 산화된 DHR 123의 형광 강도는 여기파장이 480nm이고 방출파장이 530nm인 microplate fluorescence reader (FL 500, Bio-Tek Instruments)에서 측정되었다. 형광 강도는 최종 형광 강도에서 배경 형광을 뺀 값에 대한 평균값 (n=3)으로 하였다. 소거효과는 DHR 123의 산화 억제 퍼센트로서 나타냈었다 (Scheme 2).



※ Results were expressed as means \pm S.E. for the final fluorescence intensity minus background fluorescence.

Scheme 2.

Measurement of authentic peroxyxynitrite scavenging activity

III. 결과 및 고찰

1. 수종 식물의 peroxynitrites 소거 활성

히드록실 라디칼을 포함해서 프리라디칼과 활성산소, 활성질소종, peroxynitrite는 여러 가지 인간 질병들의 원인에 관여 하고 있다 (Pincemail, 1995). superoxide와 nitric oxide가 반응해서 만들어지는 peroxynitrite는 단백질, 지질, 그리고 DNA와 같은 몇몇 세포성분들을 산화시킬 수 있는 독성 세포종들이며, Alzheimer's 질환, 류마티성 관절염, 암, 그리고 동맥경화증 (Squadrito and Pryor, 1998)과 같은 질환이 관련되어 있다고 알려져 있다. Table 1에서는 여러 가지 식물 (고사리외 24종)추출물들의 peroxynitrite에서 강한 소거 활성을 나타낸 것들을 표현하였으며 본 실험결과를 비교하면 가장 높은 소거활성을 나타낸 것은 파리 ($1.10 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$)와 썸바귀 ($1.35 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$)이며 그 다음으로 울금 ($1.7 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$)이 높은 활성을 나타내었다. 따라서 본 연구의 주제를 선정하는데 있어서 울금을 사용하게 된 것은 비교적 높은 peroxynitrite의 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 울금이 한약재와 식품으로 사용되고 있는 식물이므로 연구에 용이함을 판단한 결과 본 연구의 주제를 울금으로 선택하였다. 따라서 authentic peroxynitrites에 대한 MeOH 추출물의 소거 효과들을 검토하였고 MeOH 추출물로부터 CH_2Cl_2^- , EtOAc^- , 그리고 H_2O^- 수용성 분획과 같은 용매분획물들을 얻어서 소거효과를 검토하였으며 이들 활성 분획물들로부터 활성성분들을 분리 동정하였다.

2. 울금 분획물의 peroxynitrites 소거활성과 화합물의 분리 및 동정

Table 2에서 보는바와 같이 울금의 MeOH 추출물의 소거 활성과 그것의 CH_2Cl_2^- , EtOAc^- , 그리고 H_2O^- 수용성 분획들과 같은 용매 분획물들의 peroxynitrite 소거활성은 $\text{EtOAc} > \text{CH}_2\text{Cl}_2 > \text{MeOH} > \text{H}_2\text{O}$ 의 순으로, 그들의 IC_{50} 는 각각 0.3 ± 0.08 , 1.3 ± 0.09 , 1.7 ± 0.08 , 그리고 $55.0 \pm 7.67 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타냈고, 울금의 MeOH 추출물의 EtOAc 수용성 분획이 가장 현저한 peroxynitrites 소거효과를 가진다는 사실을 밝혔다. EtOAc -분획의 소거효과가 peroxynitrite

소거제로 잘 알려진 penicillamine의 소거활성을 증가하였다. CH_2Cl_2 분획 또한 강한 소거 활성을 보여주었지만 EtOAc분획보다는 약간 낮게 나타났다. 반면에, H_2O 수용성분획은 그들 중에서 가장 약한 활성을 보여주었다. 이러한 결과들은 비교적 약한 극성성질을 가진 울금의 MeOH 추출물뿐만 아니라 MeOH 추출물의 CH_2Cl_2 -과 EtOAc 분획들이 peroxy-nitrite의 소거효과를 나타내고 이들의 peroxy-nitrite 소거 활성은 울금의 항산화 활성에 기여 할 것으로 추측된다. CH_2Cl_2 -과 EtOAc 분획 양쪽 모두는 높은 소거 활성들을 가지며 반면에 H_2O 분획은 약한 활성을 보여주었다. peroxy-nitrite에 대한 울금의 MeOH 추출물로부터 유도된 분획들의 상당한 소거 효과들은 아마도 그 속에 함유되어 있는 성분들의 조성차이로 설명될 수 있다. 분획물의 소거활성 성분들은 diarylheptanoids였다. 왜냐하면 이들은 울금류(Jitoe 등, 1992)에서 널리 존재하는 것으로 알려져 있고 dichloromethane과 ethyl acetate에서 용해하는 극성 성질을 가지고 있기 때문이다. 그러므로, 가장 활성이 강한 EtOAc-가용성 분획물을 연속적인 칼럼 크로마토그래픽으로 정제하여 이미 잘 알려진 diarylheptanoids 1-3으로 분리 동정 하였다 (Fig. 1). 이들 화합물들은 curcumin I, II, 그리고 III으로 나타났으며, 이들의 구조는 이미 잘 알려진 분광광도데이터의 비교와 표준품들을 가지고 비교하므로써 결정 하였다 (Roughley & Whiting, 1973).

Table 1. Peroxynitrite scavenging activities of extracts derived from various plant

Korean name	Part	Latin name	ONOO ⁻
고사리	AP	<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i> (Pteridaceae)	11.80±0.46
골잎원추리	AP	<i>Hemerocallis lilioasphodelus</i> (Liliaceae)	5.93±0.80
기린초	AP	<i>Sedum kamtschaticum</i> (Crassulaceae)	6.43±0.27
긴강남차	AP	<i>Cassia tora</i> (Fabaceae)	7.76±0.27
짜리	AP	<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>francheti</i> (Solanaceae)	1.10±0.10
다래(잎)	LF	<i>Actinidia arguta</i> (Actinidiaceae)	7.28±0.88
달맞이꽃	AP	<i>Oenothera odorata</i> (Onagraceae)	2.24±0.05
도라지	AP	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Campanulaceae)	4.24±0.54
무화과	AP	<i>Picus carica</i> (Moraceae)	11.15±0.94
무화과(잎)	LF	<i>Picus carica</i> (Moraceae)	5.72±0.42
부추	AP	<i>Allium tuberosum</i> (Liliaceae)	5.41±0.51
사철쭉	AP	<i>Artemisia capillaris</i> (Compositae)	5.86±0.73
산무추	AP	<i>Allium thunbergii</i> (Liliaceae)	12.75±0.86
산초	AP	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> (Rutaceae)	5.68±0.34
산초(잎)	LF	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> (Rutaceae)	3.02±0.83
삼백초	AP	<i>Saururus chinensis</i> (Saururaceae)	2.92±0.16
석결명	AP	<i>Cassia ossidentalis</i> (Fabaceae)	5.97±1.09
속나물	AP	<i>Galium verum</i> var. <i>asiaticum</i>	4.18±0.08
썸바귀(전초)	WP	<i>Ixeris dentata</i> (Compositae)	1.35±0.08
양하	AP	<i>Zingiber mioga</i> (Zingiberaceae)	5.62±1.46
왕원추리	AP	<i>Hemerocallis fulva</i> var. <i>Kwanso</i> (Liliaceae)	10.33±0.79
원추리	AP	<i>Hemerocallis fulva</i> (Liliaceae)	8.96±0.21
윤판나물	AP	<i>Disporum sessile</i> (Liliaceae)	14.76±1.06
짚신나물	AP	<i>Agrimonia pilosa</i> (Rosaceae)	7.79±1.33
울금	RZ	<i>Curcuma longa</i> L. (Zingiberaceae)	1.70±0.04
Penicillamine			13.14±0.52

※ AP : Areal part (지상부), LF : Leaf (잎), RZ : Rhizome (근경), WP : Whole plant (전초)

※ Penicillamine : 합성 항산화제 (대조 화합물)

※ ^oONOO⁻: Inhibitory activity of peroxynitrite (IC₅₀:µg/ml).

Table 2. Peroxynitrite scavenging activities of extracts derived from *C. longa*

Extracts	ONOO ^{-a}
methanol	1.70 ± 0.08
dichloromethane	1.30 ± 0.09
ethyl acetate	0.30 ± 0.08
water	55.00 ± 7.67
penicillamine	13.14 ± 0.52

^aONOO⁻: Inhibitory activity of peroxynitrite (IC₅₀:µg/ml).

3. 분리된 화합물의 구조분석

올금에서 분리 정제한 화합물들의 구조를 밝히기 위해 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 분광학적인 방법을 사용하였다.

3-1. 활성 물질 compound 1 (curcumin I)의 구조

Compound I은 주황색 분말로 vanillin 황산 시약에 의하여 적색으로 발색된다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 2)은 완전히 일치된 대칭구조의 spectrum이 관찰되었다. Aromatic ring에서 ABX type ($\delta 7.28$, $\delta 6.83$, $\delta 7.12$)와 2개의 olefinic proton이 서로 *trans*-coupling하는 proton signal ($\delta 7.55$, $\delta 6.65$)이 관찰되었고, aliphatic region에서 methoxyl기에 기인한 3H분의 proton signal이 관찰되었다 (Table 3). $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 3)에서 sp^2 carbon peak ($\delta 112.02$, $\delta 116.69$, $\delta 124.27$, $\delta 141.86$, $\delta 122.77$)와 sp^2 quaternary carbon peak ($\delta 128.64$, $\delta 149.21$, $\delta 150.45$)가 관찰되고, $\delta 56.77$ 에 methoxyl기가 기인한 carbon signal이 관찰되었다 (Table 3). 그리고 ketone에 기인한 signal ($\delta 184.96$)과 $\delta 102.13$ 에 저자장 shift되어 있는 methylene carbon signal이 관찰되었다. 따라서 이 화합물은 문헌에 소개된 spectra data와 비교하여 curcumin I으로 결론지었다 (Masuda 등, 1992 ; Chun 등, 1999 ; 김정하, 2000).

3-2. 활성 물질 compound 2 (curcumin II)의 구조

Compound II의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Fig. 4)에서는 aliphatic region에서 methoxyl기에 기인한 3H분의 proton signal ($\delta 3.86$)이 관찰되고, aromatic ring에서 ABX type ($\delta 7.28$, $\delta 6.83$, $\delta 7.11$)와 A_2B_2 type의 proton ($\delta 7.51$, $\delta 6.85$)의 peak pattern이 동시에 관찰되었다. 2개의 olefinic proton이 서로 *trans*-coupling하는 proton signal ($\delta 7.56$, $\delta 6.66$)이 관찰되고 $\delta 5.92$ 에 저자장 shift 하고 있는 1H분의 proton signal이 관찰되었다 (Table 4). $^{13}\text{C-NMR}$

spectrum (Fig. 5)에서 sp^2 carbon signal이 δ 111.96, δ 116.68, δ 124.32, δ 122.51, δ 141.50 & 117.25, δ 131.42, δ 141.85, δ 122.73 과 sp^2 quaternary carbon signal이 δ 128.63, δ 149.23, δ 150.47 & 128.16, δ 111.96에 나타났고, δ 56.77에 methoxy기가 기인한 carbon signal이 관찰되었다 (Table 4). 그리고 ketone에 기인한 2개의 signal (δ 185.01, δ 184.92)과 δ 102.17에 저자장 shift되어 있는 methylene carbon signal이 관찰되었다. 따라서, 이 화합물은 문헌에 소개된 spectra data와 비교하여 demethoxy curcumin인 curcumin II로 결론지었다 (Masuda 등, 1992 ; Chun 등, 1999 ; 김정하, 2000).

3-3. 활성 물질 compound 3 (curcumin III)의 구조

Compound III의 1H -NMR spectrum (Fig. 6)은 완전히 일치된 대칭구조의 spectrum이 관찰되었다. Aromatic ring에서 A_2B_2 type의 proton (δ 7.51, δ 6.85)의 peak pattern과 2개의 olefinic proton이 서로 *trans*-coupling하는 proton signal이 관찰되었다 (Table 5). ^{13}C -NMR spectrum (Fig. 7)에서 sp^2 carbon peak(δ 117.24, δ 131.42, δ 141.50, δ 122.49)와 sp^2 quaternary carbon peak(δ 128.16, δ 117.24, δ 160.91)가 나타났고, ketone에 기인한 signal (δ 184.96)과 δ 102.22에 저자장 shift 되어 있는 methylene carbon signal이 관찰되었다 (Table 5). 따라서 이 화합물은 문헌의 spectra data와 비교하여 bisdemethoxy-curcumin인 curcumin III로 결론지었다 (Masuda 등, 1992 ; Chun 등, 1999 ; 김정하, 2000).

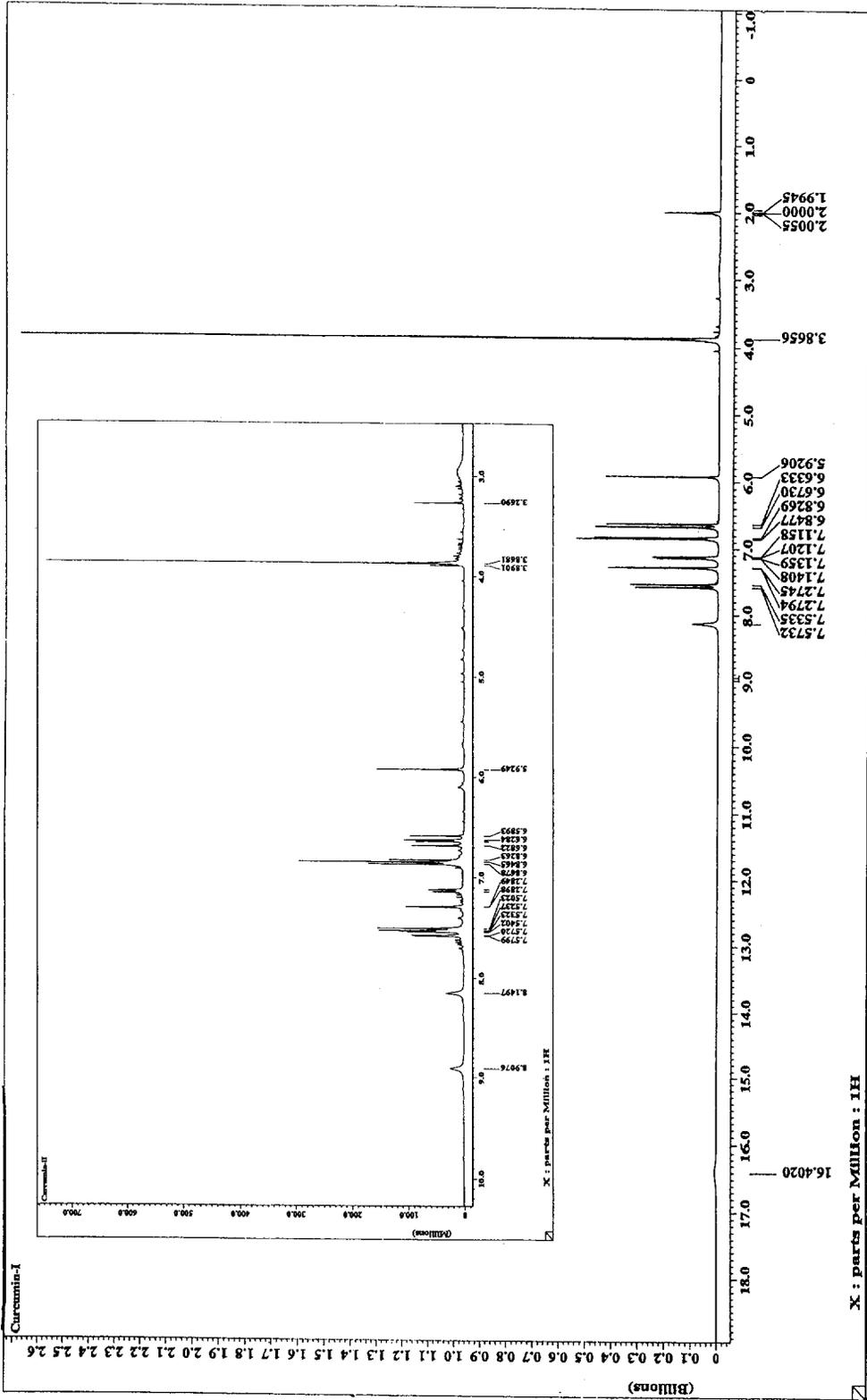


Fig. 2 ^1H - NMR spectrum of Curcumin I in acetone - d_6

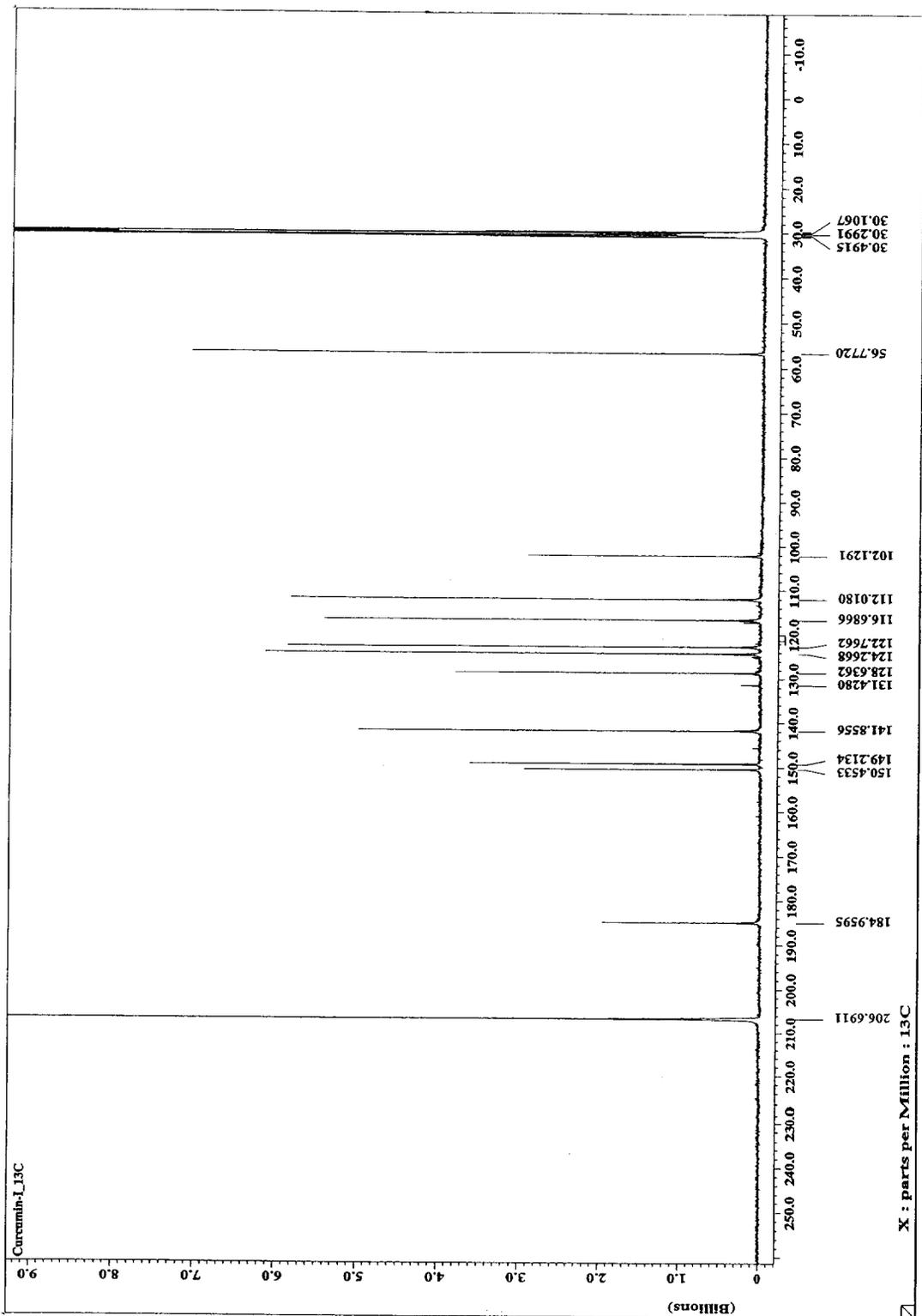


Fig. 3 ^{13}C - NMR spectrum of Curcumin I in acetone - d_6

Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR data for curcumin I (acetone- d_6)

Position	^1H -NMR	^{13}C -NMR
1	7.55(2H, d, $J=16.0$ Hz)	141.86
2	6.65(2H, d, $J=16.0$ Hz)	122.77
3		184.96
4	5.92(1H, s)	102.13
5		184.96
6	7.55(2H, d, $J=16.0$ Hz)	122.77
7	6.65(2H, d, $J=16.0$ Hz)	141.86
1'		128.64
2'	7.28(2H, d, $J=2.0$)	112.02
3'		149.21
4'		150.45
5'	6.83(8.3)(2H, d, $J=8.3$ Hz)	116.69
6'	7.12(2H, dd, $J=2.0$ & 8.3)	124.27
1''		128.64
2''	7.28(2H, d, $J=2.0$)	112.02
3''		149.21
4''		150.45
5''	6.83(8.3)(2H, d, $J=8.3$ Hz)	116.69
6''	7.12(2H, dd, $J=2.0$ & 8.3)	124.27
OCH ₃	3.86(6H, s, 2×OH ₃)	56.77(2×OCH ₃)

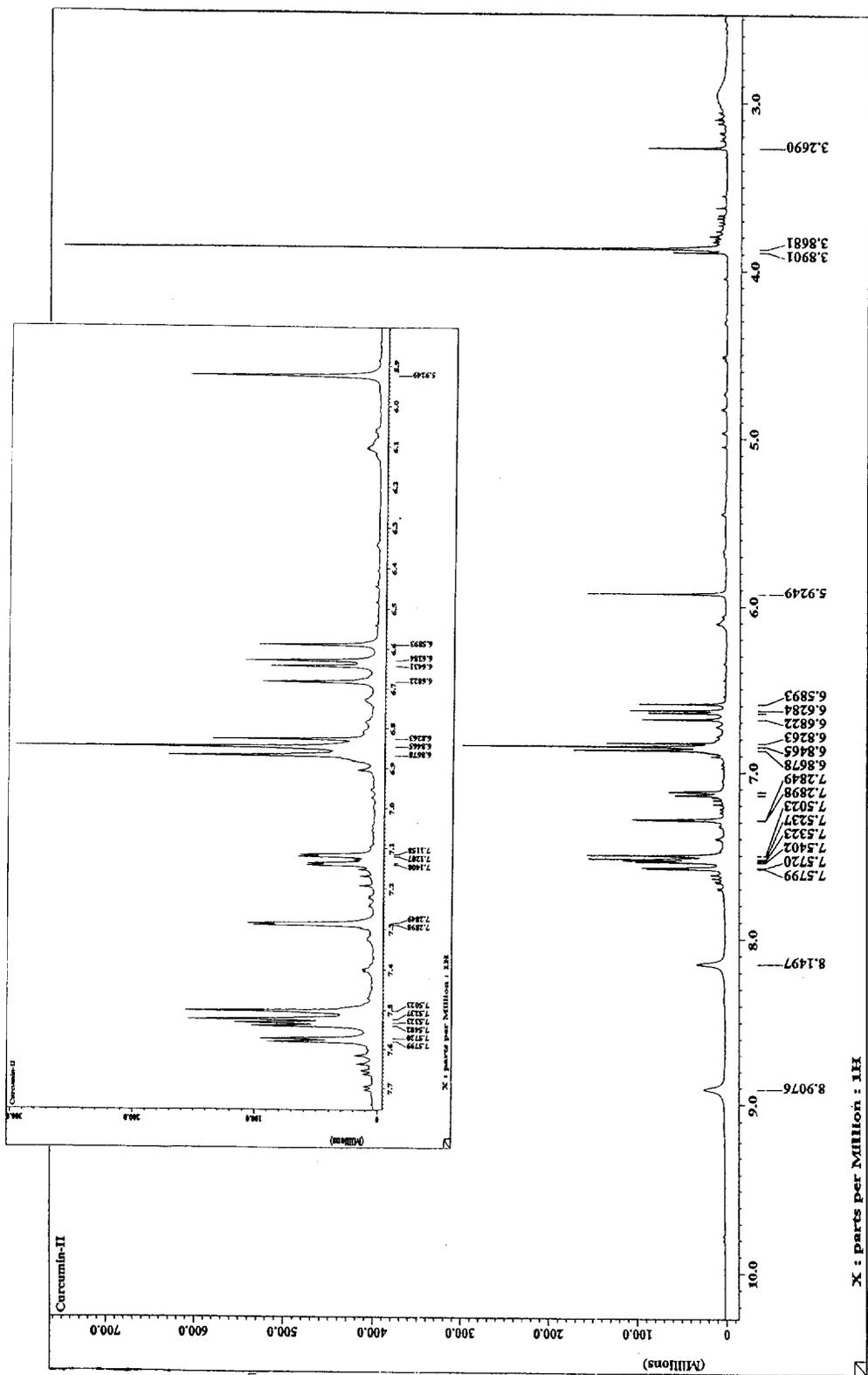


Fig. 4 ^1H - NMR spectrum of Curcumin II in acetone - d_6

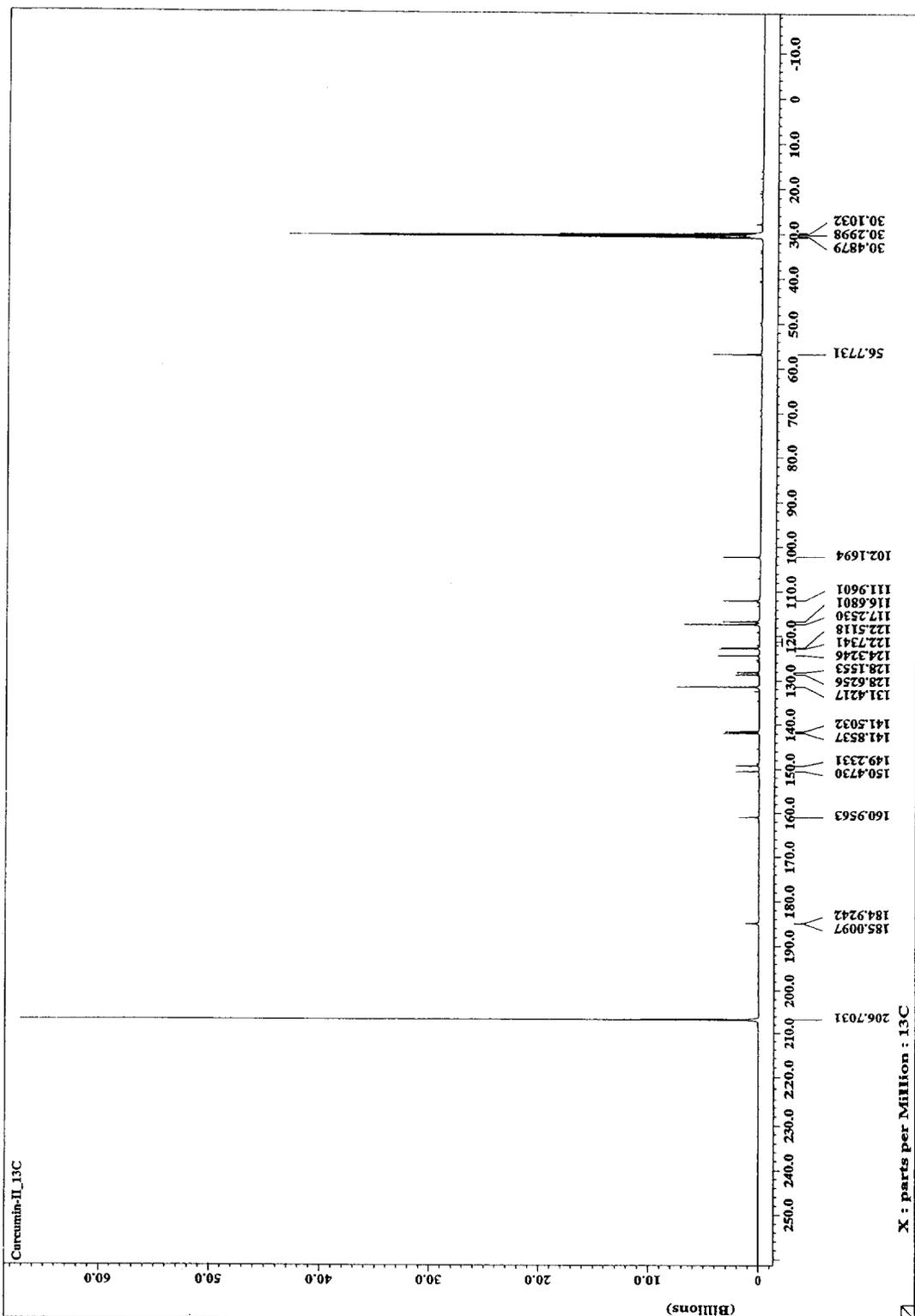


Fig. 5 ¹³C - NMR spectrum of Curcumin II in acetone - d₆

Table 4. ^1H - and ^{13}C -NMR data for curcumin II (acetone- d_6)

Position	^1H -NMR	^{13}C -NMR
1	7.56(1H, d, $J=16.0$ Hz)	141.85
2	6.66(1H, d, $J=16.0$ Hz)	122.73
3		185.01
4	5.92(1H, s)	102.17
5		184.92
6	7.55(1H, d, $J=16.0$ Hz)	122.51
7	6.60(1H, d, $J=16.0$ Hz)	141.50
1'		128.63
2'	7.28(1H, d, $J=1.7$)	111.96
3'		149.23
4'		150.47
5'	6.83(1H, d, $J=8.5$ Hz)	116.68
6'	7.11(1H, dd, $J=1.7$ & 8.5)	124.32
1''		128.16
2''	7.51(1H, d, $J=8.5$)	131.42
3''	6.85(1H, d, $J=8.5$)	117.25
4''		160.96
5''	6.85(1H, d, $J=8.5$ Hz)	117.25
6''	7.51(1H, d, $J=8.5$)	131.42
OCH ₃	3.86	56.77

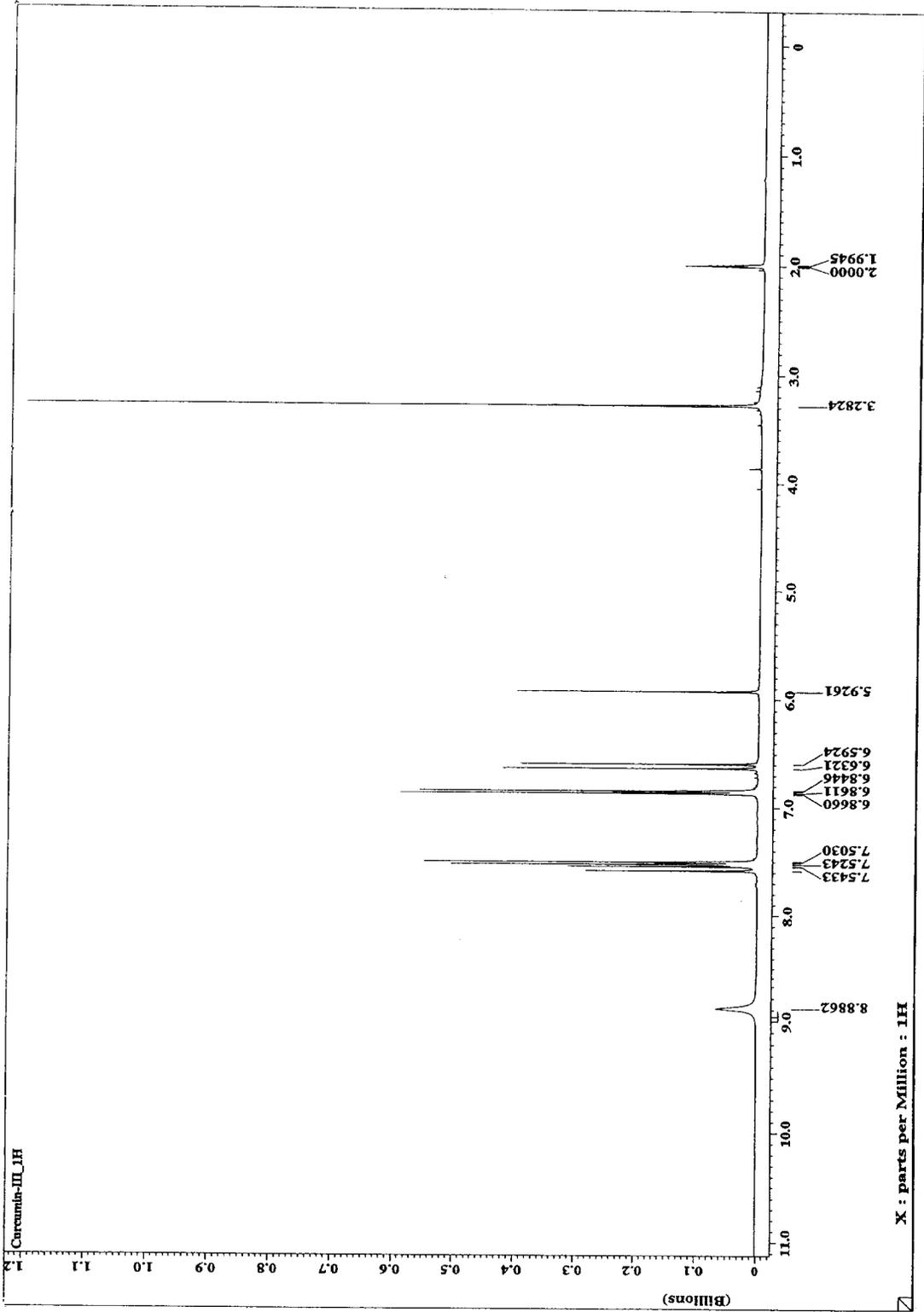


Fig. 6 ^1H - NMR spectrum of Curcumin III in acetone - d_6

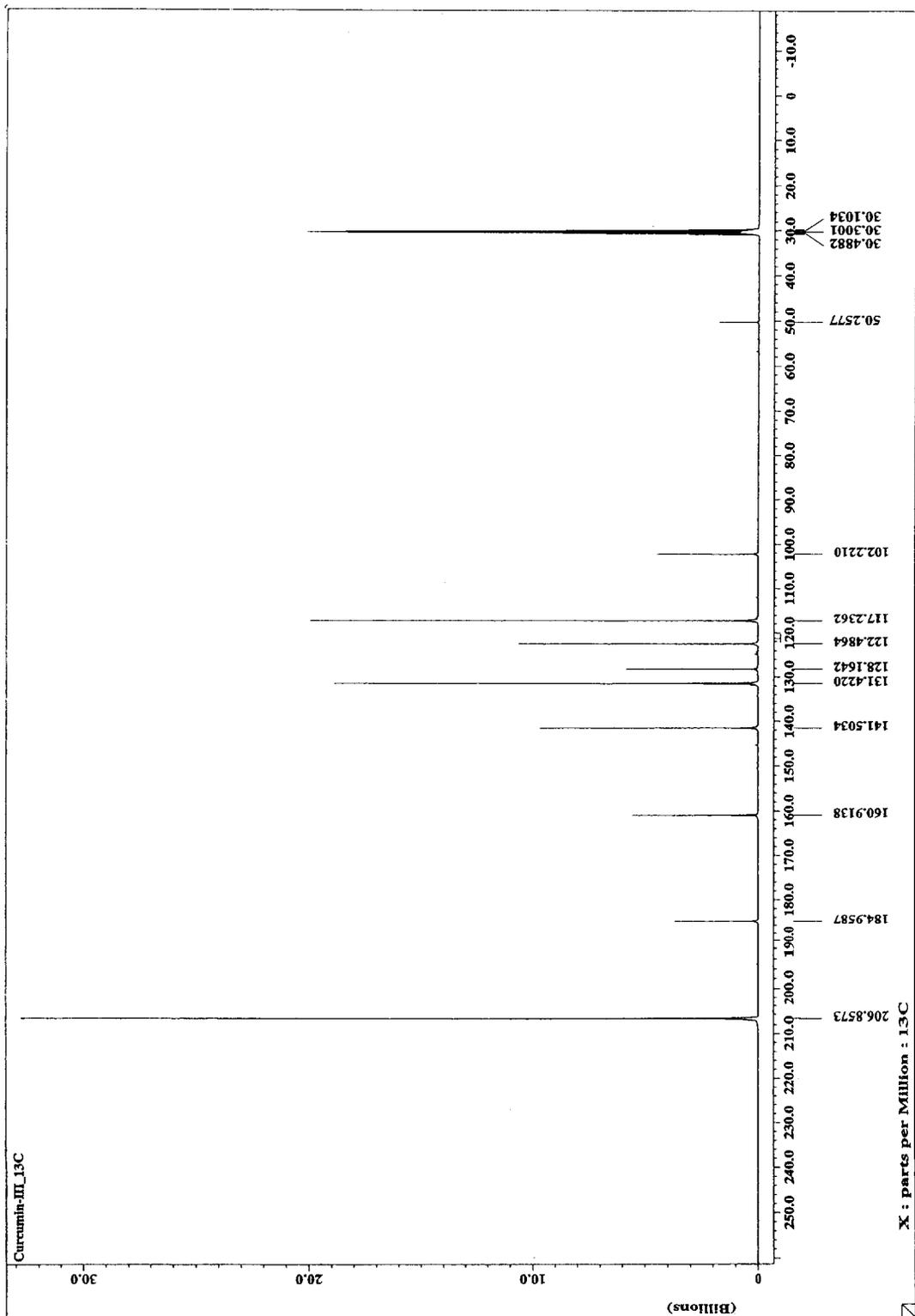


Fig. 7 ^{13}C - NMR spectrum of Curcumin III in acetone - d_6

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data for curcumin III (acetone- d_6)

Position	^1H -NMR	^{13}C -NMR
1	7.56(2H, d, $J=16.0$ Hz)	141.50
2	6.61(2H, d, $J=16.0$ Hz)	122.49
3		184.96
4	5.92(1H, s)	102.22
5		184.96
6	6.61(2H, d, $J=16.0$ Hz)	122.49
7	7.56(2H, d, $J=16.0$ Hz)	141.50
1'		128.16
2'	7.51(2H, d, $J=8.5$ Hz)	131.42
3'	6.85(2H, d, $J=8.5$ Hz)	117.24
4'	6.85(2H, d, $J=8.5$ Hz)	160.91
5'	7.51(2H, d, $J=8.5$ Hz)	117.24
6'		131.42
1''		128.16
2''	7.51(1H, d, $J=8.5$)	131.42
3''	6.85(2H, d, $J=8.5$)	117.24
4''		160.91
5''	6.85(2H, d, $J=8.5$)	117.24
6''	7.51(1H, d, $J=8.5$)	131.42
OCH ₃		

4. 분리된 화합물의 peroxynitrite 소거 효과

ONOO⁻는 두 개의 비교적 안정적인 free radical인 [•]NO와 [•]O₂⁻의 반응에 의해서 in vivo에서 생성된다. Nitric oxide (NO)는 짝없는 전자를 가진 free radical로서 이들의 반작용은 매우 약하며 hydrogen 분리나 radical 결합같은 대표적인 radical 반응은 보이지 않는다. 그러나 내피세포혈관, 대식세포내에서 NO와 superoxide (O₂⁻)가 동시에 생성되면, NO와 O₂⁻는 즉시 반응하여 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성한다 (Chung 등, 1998). ONOO⁻는 NO·와 유사한 생리작용을 가지며, 단백질과 펩타이드의 methionine 잔기, thio ether의 산화 및 지질 과산화를 유도하여 세포독성을 야기할 뿐만 아니라 생리적인 PH에서 proton화되거나 분해되기 전에 세포막의 산화 또는 세포막을 통과한 후 매우 빠르게 반응하므로 반응속도는 H₂O₂에 비해 수천 배에 이르는 것으로 알려져 있으며, 일차 배양된 신경세포에서 수초간의 짧은 시간 내에 급속한 손상을 유발하는 등 많은 만성질환과 관련된 것으로 보고 있다. 또한 pKa 6.8에서 peroxynitrous acid (ONOOH)로 전환되어 nitrogen dioxide, nitronium ion 및 hydroxy radical의 전구체로 작용한다. Peroxynitrite의 주요한 생리적 작용은 NO와 [•]O₂⁻보다 독성이 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanyl cyclase의 자극, tyrosine 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과 산화의 유도에 의한 세포독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아에 의한 호흡억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribose synthase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다 (Haenen 등, 1997 ; Pannala 등, 1997; Lin 등, 1997 ; Halliwell 등, 1997 ; Althaus 등, 1994). 이러한 peroxynitrite의 제거활성을 가지는 것들로는 flavonoid, catechin, polyphenol, ergothioneine, penicllamine 등이 잘 알려져 있다.

Table 6와 Fig. 8에서는 분리된 diarylheptanoids의 peroxynitrite 소거활성을 나타내었다. 이 결과들은 방향족 3-methoxy-4-hydroxy cinnamoyl (feruloyl)기가

peroxynitrite의 강력한 소거제임을 나타낸 반면에 coumaroyl기를 가진 curcumin III는 소거효과가 낮았다. 특히, feruloyl기를 두 개 함유하는 curcumin I는 가장 강력한 소거 활성을 보여주었다. Curcumin I의 소거 활성은 penicillamine과 비교 검토하였으며 이들 화합물들의 양쪽모두는 효과적으로 peroxynitrite를 소거했다. Curcumin I과 penicillamine의 50% authentic peroxynitrite을 소거하기 위한 농도는 $4.0 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 와 $3.40 \pm 0.34 \mu\text{M}$ 이었으며 curcumin I은 효과적이었다는 것을 나타낸다. peroxynitrite 소거활성에 대한 울금의 MeOH 추출물, curcumin I, II, 그리고 III의 상대적인 소거 효과들은 구조적인 차이로 설명될 수 있다. 구조적으로, curcumin I은 두 개의 *ortho*-methoxylated phenols과 한 개의 β -diketone으로 이루어져 있으며, 그리고 그들은 모두 공액결합 (conjugated)되어 있고, curcumin III는 두 개의 *para*-hydroxylated phenols과 한 개의 β -diketone으로 이루어진 반면에, curcumin II는 각각 *ortho*-methoxylated와 *para*-hydroxylated phenols, 그리고 β -diketone으로 이루어져 있다. 이러한 결과로부터 *ortho*-methoxylated phenol (feruloyl group)이 가장 높은 peroxynitrite 소거 활성을 나타내기 위하여 필요하다는 것을 증명했다. 이 결과들은 peroxynitrite 의존성 tyrosine nitration을 억제하는 최근의 연구결과와도 잘 일치하였다. ; ferulic acid는 *p*-coumaric acid보다 더욱 더 강력하다 (Pannala 등, 1998). Hydroxycinnamates와 관계된 phenolic acids는 그들의 수소-공여 특성 (Rice-Evans 등, 1996)과 금속-킬레이트화 특성 (Salah 등, 1995)에 의해서 강력한 항산화제들로서의 기능을 한다고 보고 되었다. 몇몇 연구들은 이 화합물들은 단백질-결합과 유리 tyrosine의 peroxynitrite으로 인한 nitration을 막을 수 있었고 dihydrorhodamin 123과 DNA (OShima 등, 1998)의 peroxynitrite으로 인한 산화를 억제 할 수 있다. 이 결과들은 나타난 peroxynitrite 소거 활성이 화학 구조의 변화에 의해서 이루어지고 따라서 여러 가지 다른 종류들의 화합물들의 소거활성들에 대하여서도 적용된다고 할 수 있다. Phenolic 화합물들은 *p*-coumaric acid와 ferulic acid와 같은 monohydroxylate 구조들의 경우에서와 같은, peroxynitrite으로 인한 nitration에 관한 기질로서 작용하거나, caffeic acid와 같은 catechol 구조들에 대해 증명되어져 왔었던 활성 질소종들은 환원에 대해서 tyrosine의 peroxynitrite으로 인한 nitration (질소화)를 억제 할 수 있다 (Pannala 등, 1997 ; 1998 ; Kerry

and Rice-Evans, 1999).

Table 6. Peroxynitrite scavenging activities of isolated compounds derived from *C. longa*

Extracts	ONOO ^{-a}
curcumin I	4.00 ± 0.04
curcumin II	6.40 ± 0.30
curcumin III	29.70 ± 1.29
penicillamine	3.40 ± 0.36

^aONOO⁻: Inhibitory activity of peroxynitrite (IC₅₀: μM).

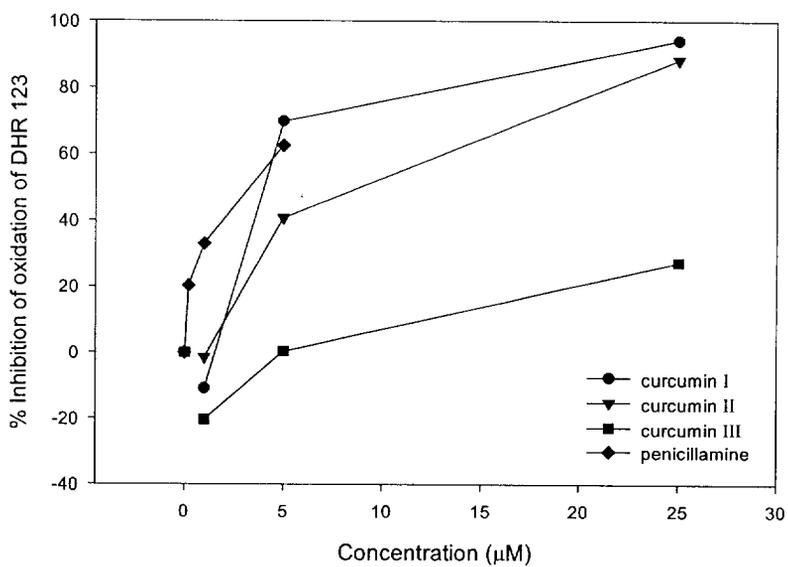


Fig. 8. Concentration-dependent scavenging of compounds 1 - 3, and penicillamine on authentic peroxynitrite.

IV. 요약 및 결론

울금 (*Curcuma longa* L.)은 생강과 (Zingiberaceae)에 속하는 다년생 속근 초본으로 한약재, 식품으로는 향신료, 염색시 염료로 사용되는 다기능성 식물로서 동남아시아, 중국 및 우리나라에서 오랜기간 동안 사용되어져 왔다. 본 연구에서는 울금의 항산화 활성을 검색하고 그 활성성분을 구명하여 합성 항산화제를 대체할 수 있는 천연 항산화제를 개발할 목적으로 연구를 행하였다.

Peroxynitrite는 superoxide와 anion (O_2^-)과 nitrite oxide (NO)가 반응해서 생성되는 세포독성 중간매개체이다. 특히 본 연구에서는 이 울금에 관하여 peroxynitrite 소거 활성에 대한 기준에 자세한 연구들이 보고되어 있지 않기 때문에 이에 연구의 중점을 두어 실험하였다.

울금의 MeOH 추출물의 소거 활성과 그것의 CH_2Cl_2 -, EtOAc-, 그리고 H_2O - 수용성 분획들과 같은 용매 분획물들의 peroxynitrite 소거활성은 EtOAc > CH_2Cl_2 > MeOH > H_2O 의 순으로 나타났고, 울금의 MeOH 추출물의 EtOAc 수용성 분획이 가장 현저한 peroxynitrites 소거효과를 가진다는 사실을 밝혔다. EtOAc-분획의 소거효과가 peroxynitrite 소거제로 잘 알려진 penicillamine의 소거활성을 능가하였다. CH_2Cl_2 분획 또한 강한 소거 활성을 보여주었지만 EtOAc분획보다는 약간 낮게 나타났다. 반면에, H_2O 수용성 분획은 그들 중에서 가장 약한 활성을 보여주었다. 이러한 결과들은 비교적 약한 극성성질을 가진 울금의 MeOH 추출물뿐만 아니라 MeOH 추출물의 CH_2Cl_2 -과 EtOAc 분획들이 peroxynitrite의 소거효과를 나타내고 이들의 peroxynitrite 소거 활성은 울금의 항산화 활성에 기여 할 것으로 추측된다. CH_2Cl_2 -과 EtOAc 분획 양쪽 모두는 높은 소거 활성들을 가지며 반면에 H_2O 분획은 약한 활성을 보여주었다. Peroxynitrite에 대한 울금의 MeOH 추출물로부터 유도된 분획들의 상당한 소거 효과들은 아마도 그 속에 함유되어 있는 성분들의 조성차이로 설명될 수 있다. 분획물의 소거활성 성분들은 분석하여 동정한 결과 diarylheptanoids였다. 그러므로, 가장 활성이 강한 EtOAc-가용성 분획물을 연속적인 칼럼 크로마토그래픽으로 정제하여 분리 정제한 화합물들의 구조를 밝히기 위해 1H -NMR, ^{13}C -NMR 등의 분광학적인

방법을 사용하여 diarylheptanoids 1-3으로 분리 동정하였다. 이들 화합물들은 curcumin I, II, 그리고 III으로 나타났으며, 이들의 구조는 이미 잘 알려진 분광광도데이터의 비교와 표준품을 가지고 비교에 의해서 결정하였다. 따라서 본 연구에서는 분리 동정된 curcumin I~III은 peroxynitrite의 소거작용 실험을 한 결과 강한 항산화 활성이 나타났음을 밝혔다. 따라서 본 연구 결과는 울금의 메탄올 추출물과 그것의 다양한 분획물들, 그리고 이들로부터 분리한 성분들이 peroxynitrite로 인한 동맥경화, 허혈 및 관류, 그리고 염증이 발생하는 것을 억제하는 경향을 나타내었고 이들 천연화합물들이 생체조건의 병리학적인 상태에서 다양한 peroxynitrite으로 인한 손상들을 예방하는 연구가 진행된다면 더욱 더 의미가 있으리라고 여겨진다.

V. 참고 문헌

- Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. T., Scherch, H. M., Sethy, V H and Von Voigtlander, P. F. (1994) : Structure activity relationships of peroxy-nitrite scavengers. An approach to nitric oxide neurotoxicity. *Res. Commun. Chem. Datho. Pharmacol.*, 83(3), 243-249
- Andrew M. Anderson, Matthew S. Mitchell and Ram S. Mohan (2000) : Isolation of curcumin from Tumeric, *Journal of Chemical Education*, 77, 359
- Ferreira, L. A. F., Henriques, O. B., Andreoni, A. A. S., Vital, G. R. F., Campos, M. M. C., Harbermehl, G. G. and de Moraes, V. L. G. (1992) : Antivenom and biological effects of ar-tumerone isolated from *Curcuma longa* Zingiberaceae, *Toxicon.*, 30, 1211
- Beckman J. S. (1994) : Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hefpe. Seyler.*, 375, 81-88
- Branen, A. S. (1975) : Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*, 1, 59-62
- Chignell Colin F, Piotr Biesk, Krzysztof J. Rezka, Ann G. Motten, Robert H. Silk and Thomas A. Dahl (1994) : Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochemistry and Photobiology*, 59, 295
- Chun, K. S., Sohn, Y. W. Kim, H. S., Kim, O. H., Park, K. K., Lee, A. R. Lee, J. Y. Moon, A. R., Lee S. S. and Such, Y. J, (1999) : Anti-tumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structully related to curcumin. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428, 49
- Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y., Kye, I. S., No, J. K. and Back, B. S. (1998) : Peroxy-nitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4484-4486.
- Chung, H. Y., Kim H. J., and Kim J. W. (2000) : The inflammation hypothesis of aging : Molecular modulation by calorie restriction.
- Geoffrey N. Roth, Amitahb Chandra, and Muraleedharan (1998) : Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *J. Natural*

Products, 61, 542

- Gow, Y. Y. and Flick, G. J. Jr (1985) : Effect of ascorbyl palmitate on the quality of frying fats for deep frying operations. *JAOCs*, 62, 1666-1667.
- Han, D., Yi, O. S. and Shin, H. K (1990) : Antioxidative effect of ascorbic acid solubilized in oils via reversed micells. *J. Food. Sci.*, 55, 247-249
- Haenen, G. R. M. M., Paquay, J. B. G., Korthouwer, R. E. M. and Bast, A. (1997) : Peroxynitrite scavenging by flavonoid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 590-593.
- Halliwell B (1997) : Hypothesis - What nitrates tyrosine ? Is nitrotyrosine specific as a biomaker of peroxynitrite formation in vivo ? *FEBS. Lett.*, 411, 157-160
- Hostettmann, K., Hostettmann, M. and Marston, A. (1968) : "Preparative chromatography techniques, application in natural product isolation". Springer Verlag, Berlin
- Huang MT and Ferraro T. (1992) : Phenolic compounds in food and cancer prevention. *In Phenolic compounds in food and their effects on health. Antioxidants and Cancer Prevention*, ACS Symposium Series 507 ; Houn, M. T., Ho, C. T., Lee, C. Y., (Eds) ; American Chemical Society : Washington, DC. 8-34.
- Jitoe A, Masuda T, Tengah, IGP, Suprapta, DN, Gara, IW and Nakatani, N. (1992) : Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *J. Agric. Food. Chem.* 40, 1337-1340.
- Kato Y, Ogino Y, Aoki T, Uchida K, Kawakishi S and Osawa T. (1997) : Phenolic antioxidants prevent peroxynitrite-derived collagen modification in vitro. *J. Agric. Food. Chem.*, 45, 3004-3009.
- Kerry N. and Rice-Evans C. (1999) : Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationship. *J. Neurochem.*, 73, 247-253.
- Kim AR, Zou YN, Park TH, Choi JS, Chung HY. (2001) :

- Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytotherapy Res.* (submitted)
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos H and Beckman, J. S. (1994) : Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol. Med.*, 16, 149-156.
 - Koskas, J. P., Cillard, J. and Chillard, P. (1984) : Antioxidation of linoleic acid and behavior of its hydroxides with and without tocopherols. *JAOCS*, 61, 1467-1471.
 - Kunchundy E and Rao MNA. (1989) : Effect of curcumin on hydroxyl radical generation through Fenton reaction. *Int. J. Pharmacol.*, 57, 173-176.
 - Kunchundy E and Rao MNA. (1990) : Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int. J. Pharmacol.*, 58, 237-240.
 - Larson RA. (1988) : The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.
 - Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B and Wong PYK (1995) : Peroxynitrite induced apoptosis in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 270, 16487-16490
 - Lin KT, Xue JY, Sun FF and Wong PYK (1997) : Reactive oxygen species participate in peroxynitrite induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 115-119.
 - Masuda T, Hidaka K, Shinohara A, Maekawa T, Takeda Y and Yamaguchi, H. (1999) : Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: Analysis of radical reaction products from curcumin. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 71-77.
 - Masuda, T., Isobe, T., Jito, A., and nakatani, N. (1992) : Antioxidative curcuminoids from Rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza*, *Phytochemistry*, 31, 3645
 - Miller MJ, Thompson JH, Zhang XJ, Sadowska-Krowicka H, Kakkis JL, Munshi UK, Sandoval M, Rossi JL, Eloby-Childress S Beckman JS, Ye Yz, Rodi CP, Manning PT, Currie MG and Clark DA (1995) : Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite

- formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology*, 109, 1475-1483
- Nagatsu, A., Tenmaru, T., Matsuura, H., Murakami, N., Kobayashi, T., OKuyama, H. and Sakakibaba, J. (1995) : Novel antioxidants from roasted perilla seed. *Chem. Pharm. Bull.*, 43(5), 887-889
 - Nishima, A. (1991) : Antioxidant effects of tocopherols and L-ascorbic acid on ethyl eicosapentaenoate and methyl linolate, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1665~1668.
 - Olclott, E. (1973) : Antioxidative activity of tocopherol to lard. *J. Am Chem. Soc.*, 59, 1008-1011.
 - Oshima H, Yoshie Y, Auriol S, and Gilibert I. (1998) : Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids : effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion. *Free. Radic. Biol Med.*, 25, 1057-1065.
 - Pannala A, Rice-Evans CA, Halliwell B, and Singh, S. (1997) : Inhibition of peroxyxynitrite mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232 : 164-168.
 - Pannala A, Razaq R, Halliwell B, Singh S, and Rice-Evans CA. (1998) : Inhibition of peroxyxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates : Nitration or electron donation ? *Free. Radic. Biol. Med.*, 24, 594-606.
 - Pincemail, J. J. (1995) : Free radicals and antioxidants in human diseases. In *Analysis of Free radicals in Biological Systems*. Favier, A. E., Cadet, J., Kalyanaraman, B., Fontecave, M., Pierre, J-L. (eds). Birkhauser Verlag, Berlin, 83-98.
 - Pratt D.E. (1994) : Natural anti-oxidants from plant material. In *Phenolic compounds and their effects on health II*, ACS symposium series 547, American Chemical Society, Washington DC. 54-71
 - Ramsewak R.S., DeWitt D.L., and Nair M.G. (2000) : Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities on curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, 7, 303-308.
 - Rice-Evans C. A., Miller N. J., and Paganga G. (1996) : Structure-antioxidant

- relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radic. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Richard H., Thomas G. Hartman, Chi-Tang Ho and Robert T. Rosen, (1996) : Characterization of powdered tumeric by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. chromatography A*, 740, 51
 - Roughley P. J. and Whiting D. A. (1973) : Experiments in the biosynthesis of curcumin. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 1, 2379.
 - Royall J. A., Kooy N. W. and Beckman J. S. (1995) : Nitric oxide-related oxidants in acute lung injury. *New. Horiz.*, 3, 113-122
 - Ruby A. J., Kuttan G., Babu K. D., Rajasekharan K. N., and Kuttan R. (1995) : Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer. Lett.*, 94, 79-83.
 - Russell L. Rouseff (1988) : High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in Tumeric and Annatto, *J. Food Science*, 53, 1823
 - Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, and Rice-Evans C. (1995) : Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 339-346.
 - Scartezzini P, and Speroni E. (2000) : Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 71a, 23-43.
 - Sharma OP. (1976) : Antioxidant activity of curcumin and related substances. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1811-1812.
 - Soudamini K. K., Unnikrishnan M. C., Soni K. B., and Kuttan R. (1992) : Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 36, 239-243.
 - Squadrito G. L., and Pryor W. A. (1998) : Oxidative chemistry of nitric oxide : the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free. Radic. Biol. Med.*, 25, 392-403.
 - Toda S, Miyase T., Arichi H., Tanizawa H, and Takino Y. (1985) :

- Natural antioxidants . Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 1725-1728.
- Torel, J., Chillard, J. and Chillard, P. (1986) : Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxyradical. *Phytochemistry*, 25(2), 383~385
 - Van der Vliet A, Smith D, O'Neil CA, Kaur H, Darley-Usmar V, Cross CE and Halliwell B, (1994) : Interaction of peroxy-nitrite with human plasma and its constituents : Oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J.*, 303, 295-301
 - Zhu L, Gunn C. and Beckman J. S., (1992) : Bactericidal activity of peroxy-nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, 452-457
 - 강삼식, 손건호 (2000) : 천연물성분 구조결정법, 서울대학교 출판부
 - 김동훈 (2001) : 식품화학, 탐구당, 194~198
 - 김정하 (2000) : 강황으로부터 분리한 tyrosinase 활성억제 물질의 탐색 및 분리, 영남대학교 석사학위 논문
 - 김형균, 김형민, 송봉근, 이연정, 정현택 (2000) : 한약의 약리, 고려의학, 234 ~ 235
 - 우원식 (1996) : 천연물화학 연구법, 서울대학교 출판부
 - 육창수, 안덕균 (1972) : 현대 본초학, 고문사, 335~336
 - 조경래 (2000) : 천연 염료와 염색, 형설출판사, 113~114
 - 지형준 (1999) : 건강식품생약, 서울대학교 출판부, 110 ~ 111
 - 한신영 (2001) : 울금 추출물의 염색성과 향균·항돌연변이 기능성 및 활성 물질의 분리 동정, 부산대학교 박사학위 논문

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많은 분들의 아낌없는 도움과 격려에 이 자리를 빌어 깊은 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 군생활을 하는 동안에 대학원을 다닐 수 있도록 학문의 기회를 열어주시고 아낌없는 지도와 격려로 이끌어 주신 최 재수 교수님의 은혜에 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 와중에서도 각별한 관심과 세심한 배려로 논문이 완성되도록 지도하여주신 남택정 교수님, 김형락 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 대학원 생활에서 많은 지도와 편달을 하여주신 최진호 교수님, 류홍수 교수님, 변대석 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한 따뜻한 관심과 격려를 주신 육군수의병과장 노천섭 대령님, 제52군지단장 김성진 대령님, 식품검사대장 정수관 중령님, 항상 기억하시고 저를 지켜봐 주시며 격려하여 주신 경상대학교 김종섭 교수님,곽수동 교수님, 경성대학교 신영희 교수님, 논문 자료를 위해서 도와주신 신라대학교 조경래 교수님께도 감사의 마음을 전해 드립니다.

실험실에서 많은 따뜻한 관심과 도움을 주었던 강혜숙씨, 정현아씨, 정미정씨, 우주정씨 그리고 실험과정과 여러 가지로 대학원 생활을 위해 많은 도움을 준 김정은씨에게 고마운 마음의 인사를 전하고 싶습니다. 아울러 대학원생활에서 여러 가지로 도움을 주었던 강도영씨, 김대익씨, 권지영씨, 박수현씨, 백승진씨, 논문정리에 도움을 주고 항상 가까이에서 나를 잘 보좌해준 홍원우 소위 그 외 많은 도움을 주신 분들과 선후배분들 그리고 오랜동안 함께하며 도와준 좋은 벗들에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 오늘이 있기까지 저를 낳아주시고 길러주신 부모님과 항상 여러 가지로 도움과 배려해준 형제와 친지분들에게도 감사의 마음을 전하며 특히 항상 헌신적인 사랑으로 저와 형제들을 키우기 위해서 베푸신 어머님의 바다 보다 깊고 하늘보다 넓은 사랑에 깊은 감사를 드리며 조금이나마 보답하고자 이 작은 결실을 바칩니다.