



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교 육 학 석 사 학 위 논 문

결명자의 안지오텐신 변환 효소
저해작용과 그 안트라퀴논 성분



2007년 8월

부경대학교 교육대학원

영양교육전공

이 향

교 육 학 석 사 학 위 논 문

결명자의 안지오텐신 변환 효소
저해 작용과 그 안트라퀴논 성분

지도교수 최재수

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.



2007년 8월

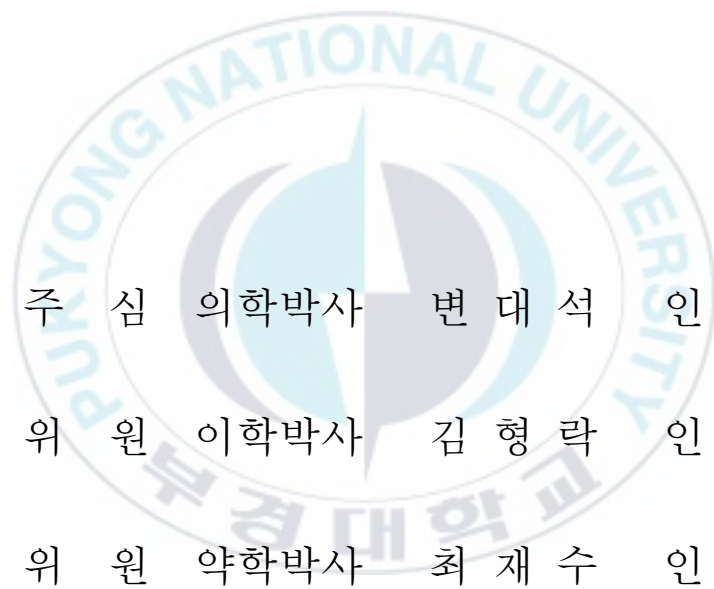
부경대학교교육대학원

영양교육전공

이 향

이향의 교육학석사 학위논문을 인준함.

2007년 8월 30일



목 차

Abstract	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 시약 및 기기	6
2-1. 시약	6
2-2. 기기	7
3. 방법	8
3-1. 추출 및 분획	8
3-2. 성분 분리	10
3-2-1. Acid hydrolysis 방법	10
3-3. 결명자 EtOAc 획분의 성분 분리	11
3-4. 결명자 EtOAc 획분에서 분리된 성분의 분광학적 성질	13
4. 활성 실험	18
4-1. ACE 저해활성	18
4-2. Kinetics 분석	18
4-3. 활성산소종 생성 억제 활성	19
4-4. Peroxynitrite 소거 활성	23
III. 결과 및 고찰	
1. 결명자 MeOH 추출물과 각 획분들의 ACE 저해활성	26
2. 결명자 EtOAc 획분에서 분리된 화합물	30

3. 분리된 화합물의 ACE 저해활성 -----	38
3-1. Kinetics 분석을 통한 gluco-aurantioobtusin의 ACE 저해활성-	38
3-2. ACE 저해활성과 항산화 활성-----	39
IV. 요약 및 결론 -----	44
V. 참고 문헌 -----	46



Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of *Cassia tora* and its anthraquinone constituents

Hyang Lee

Graduate School of Education
Pukyong National University

Abstract

The renin-angiotensin system plays a relevant role in the regulation of an organism's water, electrolytes and blood. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) is a zinc-containing enzyme, and plays an important physiological role in regulating blood pressure. This enzyme increases blood pressure by hydrolyzing the decapeptide angiotensin I to potent vasoconstrictor, angiotensin II, which exercise a powerful vasoconstrictive action and stimulates the secretion of aldosterone, which promotes sodium and water retention in the kidneys and the consequent increase in artery pressure. Therefore, inhibition of ACE results in an overall anti-hypertensive effect. As food and natural herbal plants are rich sources of bioactive chemicals, and are mostly free from harmful side effects. The objective of this study was investigate the inhibition of ACE activity by *Cassia tora* which consumed as tea in Korea.

The dried or roasted seeds of *Cassia tora* L. (Leguminosae) are used in Chinese herbal medicine to improve vision and it is also reputed for its medicinal value as an aperient, diuretic and antihypertension. In the present studies, the ACE inhibitory activity of the MeOH extract and its organic solvent soluble fractions such as CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH fraction and H₂O layer from dried or roasted seeds of *C. tora* were evaluated.

The MeOH extracts from raw and roasted seed of the *C. tora* had potent inhibitory effects on ACE activity and the inhibitory activities increased with the increase of extract concentration. They were partitioned successively with several solvents, and their ACE inhibitory properties were further assessed at concentration of between 32.69 to 169.72 µg/ml. The EtOAc soluble fractions obtained from raw and roasted MeOH extracts evidenced significant inhibitory activities with the IC₅₀ values of 94.65 ± 0.92 µg/mL and

74.94 ± 0.08 µg/mL, respectively. Further detailed phytochemical investigations of the ACE inhibitory activities of the EtOAc fractions were conducted by the repeated chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 and RP-18 gel columns, and led to the isolation of seven anthraquinones, [questin (**1**), 2-hydroxyemodin 1-methylether (**2**), emodin (**3**), alaternin (**4**), glucoobtusifolin (**5**), gluco-aurantioobtusin (**7**), cassitoroside (**8**), toralactone gentiobioside (**9**)], two naphthopyrone glycosides [cassiaside (**6**), chrysophanol triglucoside (**10**)] and a naphthalene glycoside [cassitoroside (**8**)]. The structural identifications of these compounds were performed by analysis of 1D(¹H-NMR, ¹³C-NMR) and 2D NMR(HMQC and HMBC), FAB-Mass spectral data, and by comparison with published spectral data. The ACE inhibitory effects of the ten isolated compounds, as well as obtusifolin (**5a**) and aurantioobtusin (**7a**) were obtained from **5** and **7** by acid hydrolysis, respectively. Among the tested compounds **1**, **5**, **6**, **8-10** did not show ACE inhibitory activity within tested concentrations and **2-4**, **7** exhibited ACE inhibitory activity. Especially ACE inhibitory properties of gluco-aurantioobtusin (**7**) was ranked quite high, with IC₅₀ values of 30.24 ± 0.20 µM, which manifested in a concentration-dependent manner. In these ACE assay **2-4** manifested marginal inhibitory activity, with IC₅₀ values of 219.66 ± 1.43, 236.11 ± 6.61 and 841.75 ± 0.36 µM, respectively. The inhibition kinetics for the **7** was analyzed by Lineweaver-Burk plots. The results indicated that **7** exhibited a competitive-type of inhibition with respect to the substrate(FAPGG). The equilibrium constant for inhibitor binding, K_i value of **7** was estimated to be 8.3 × 10⁻⁵ M. Because of ACE has been reported to be implicated in cell oxidative stress by augmenting the generation of both reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrite, the inhibitory and scavenging activities of **7** on total ROS generation and on ONOO⁻ were also evaluated. The result that **7** evidenced marked inhibitory and scavenging activities, with IC₅₀ value of 49.64 ± 0.37 µM for total ROS generation, and 4.60 ± 1.12 µM for ONOO⁻. According to the results of the peroxynitrite and ACE assays, *C. tora* and its isolated anthraquinones may take certain parts on the ACE-related mechanism in rennin-angiotensin systems, associated with the pathogenesis of diabetes, hypertension, thrombosis, and ROS generation.

I. 서론

결명자 (*Cassia tora* L.)는 북아메리카산 콩과식물인 긴강남차의 종자로서 중국, 우리나라 등지에서 약용으로 재배되고 있다 (이, 1985). 눈을 밝게 한다는 뜻으로 결명자라 하였고, 종자의 모양이 말발굽과 비슷하다 해서 마제결명 (馬蹄決明)이라고도 한다 (赤松金芳, 1980). 결명자의 종류는 여러가지가 있는데, 보통 중국, 한국산은 *Cassia tora*를 말하고, 일본의 하부차는 *Cassia tora*와 *Cassia obtusifolia* 모두를 뜻한다 (赤松金芳, 1980). 또한 *C. occidentalis*, *C. torasa*, *C. sophera*의 3종은 토초결명 (土草決明)이라 불리며, 종자는 양의 콩팥모양을 하고 있다 (赤松金芳, 1980).

결명자는 독특한 맛과 향을 가지는 전통기호 음료로서 이용되고 있고 한국과 중국 등 아시아 지역에서 일상적으로 소비되고 있다. 결명자는 전통적으로 하제, 혈압강하제등 약학적인 활성을 보여 다양한 질병에 효과적으로 대항하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Zhenbao *et al*, 2007). 예로부터 한방에서는 눈의 흰자위에 붉게 핏발이 서고 붓거나 뜨거운 눈물이 날 때 (眼目赤腫), 눈이 뿌옇게 되었을 때 ‘결명산 (決明散)’을 처방하였고, 인도에서는 결명자 가루의 수반죽을 피부병 치료에 사용하기도 하였다 (Acharya and Chatterjee, 1975). 한편 결명자는 종자 뿐만 아니라 잎과 뿌리 등 식물 전체가 농가진 (impetigo), 궤양 (ulcers), 기생충병 (helminthiasis), 하제 (purgative)의 치료에 사용되기도 한다 (Dailziel, 1955; Irving, 1961).

결명자의 성분에 대한 연구를 살펴보면 anthraquinone과 naphtho-pyrone 배당체 성분에 대해 chrysophanol, physcion, obtusin, aurantio-obtusin, rubrofusarin, nor-rubrofusarin (Kimura *et al.*, 1964), aloe-emodin, emodin, rhein

(Tabata *et al.*, 1975), obtusifolin-monoglucoside, physcion-8- β -gentiobioside, chrysophanol-triglucoside, chrysophanol-tetraglucoside (Wong *et al.*, 1988), chrysophanol-1- β -gentiobioside (Ragaunathan *et al.*, 1974) 그리고 rubrofusarin- β -D-gentiobioside (Kaneda *et al.*, 1969, Ragaunathan *et al.*, 1974, Wong *et al.*, 1989), rubrofusarin glycoside, cassiaside, toralactone- β -D-gentiobioside (Wong *et al.*, 1989), toralactone (Takahashi and Takido, 1973), cassitoroside (choi, 1995), alaternin 2-O- β -D-glucopyranoside (Lee, 1998)이 보고 되었다. 그외에도 β -sitosterol (Ragaunathan *et al.*, 1974), torachrysone (Shibata *et al.*, 1969)화합물이 보고되었으며, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid가 결명자에서 분리된 주요 지방산으로 보고되었다 (Koshioka *et al.*, 1978). 그리고 결명자를 볶았을 때 생성되는 향기 성분은 GC와 GC/MS로 분리, 확인한 결과 볶음 온도가 높아지고, 시간이 길어짐에 따라 pyrazine류, furan류의 상대적 함량이 크게 증가하였다고 한다 (Kim, *et al.*, 1995).

결명자에서 보고된 생리활성 연구를 살펴보면 Choi 등 (1997)은 결명자에서 분리한 anthraquinone 배당체가 aflatoxin B₁에 대항하는 저해효과를 나타냄을 밝혔고, 다른 연구에서는 anthraquinone이 mycotoxin의 돌연변이 유발력을 억제하는 항돌연변이로 작용할 수 있음이 보고되었다 (Hau *et al.*, 1995). 또한 결명자 추출물이 ethanol로 유도된 간세포독성을 가지는 쥐의 hepatic enzymes 즉 catalase, superoxide, dismutase, glutathione peroxidase의 활성을 증가시켜 간보호 효과를 보이는 것이 발견되었다 (Choi *et al.*, 2002). 뿐만 아니라 결명자의 항고혈압 효과와 관련해서 Koo 등(1976)은 결명자의 물, methanol 추출물이 마취한 쥐에게 저혈압 효과를 나타내었으며 이에 대한 주된 원인물질을 배당체라고 보고하였다. 최근에 Patil 등 (2004)은 결명자의 ethanol 추출물, ether soluble fraction, water soluble fraction을 정맥주사한 쥐에서 혈청 total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol의 수치는 감소 하였고,

HDL-cholesterol의 수치는 증가하여 결명자가 저지혈증 효과가 있음을 증명하였다. 즉 앞서서 보고된 결명자의 생리활성은 antioxidant (Yen *et al.*, 1998; Zhanbao *et al.*, 2006), antihepatotoxic (Wong *et al.*, 1989b), antiallergic (Zhang and Yu 2003), antimutagenic (Choi *et al.*, 1998), antifungal (Kim *et al.*, 2004), radical scavenging (Choi *et al.*, 1994), antimicrobial (Hatano *et al.*, 1999), hypotensive activity (Koo *et al.*, 1976a, 1976b; Chan *et al.*, 1976)등으로 다양한 생물학적이고 약학적인 활성을 가지는 것으로 밝혀지고 있다.

본 연구에서는 고혈압이 심혈관 질환과 신장병의 주된 위험인자이고, 전세계의 건강상의 문제로 대두됨에 따라 (Loizzo *et al.*, 2007) 아시아 여러 나라에서 쉽게 재배되고 일상적인 음료로 섭취 할 수 있는 결명자에 대해 항고혈압 효과와 그 원인물질을 연구하였다.

Rennin-angiotensin system은 생체 수분과 전해질, 혈액의 조절에 중요한 역할을 한다. Angiotensin-converting enzyme (ACE, peptidyl depeptide hydrolase EC 3.4.14.1)은 아연을 함유하고 있는 금속이온효소로 심혈관과 신장질환, 혈압의 조절과 같은 중요한 생리적 기능을 수행한다. 특히 다양한 심혈관계 증후군은 고혈압에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. Renin angiotensin system에서 ACE의 대사 활성은 renin에 유도된 decapeptide angiotensin I (aspartic acid-arginine-valine-tyrosine-isoleucine-histidine-proline-phenylalanine-histidine-leucine)이 강력한 혈관수축제인 octapeptide angiotensin II (aspartic acid-arginine-valine-tyrosine-isoleucine-histidine-proline-phenylalanine)로 가수분해 됨에 따라 혈압이 증가하는 것으로 보고 있다. angiotensin II는 신장과 심혈관 조직에서 aldosterone의 분비를 자극하여, 인체에 염분과 물의 보유를 증가시키고, 신장에서 rennin의 생성을 증가시킨다. 또한 ACE는 Kallikrein-kinin system에 관여하여 모세혈관을 확장해서 혈압을 내리는 bradykinin의 생성을 저하시킨다. 뿐만 아니라 세포의 산화적 stress와 관련이 있어 reactive oxygen spesies (ROS)와

peroxynitrite의 생성을 증가시키고 ACE가 유도되는 동안 혈소판의 응집과 흡착으로 인해 혈전증 발생을 높인다. 따라서 ACE 대사활동의 연속성을 고려하면 ACE의 대사를 조절 할 수 있는 저해제는 고혈압과 다른 심혈관, 신장 질환, 그리고 세포의 산화적 스트레스와 관련된 질병을 예방할 수 있을 것이다. 합성 ACE 저해제로 captopril, benazepril, enalapril, lisinopril 등이 일반적으로 처방되고 있다. 그러나 이 합성 ACE 저해제에 대해서는 기침 (coughing), 미각이상 (taste disturbances), 칼륨혈증 (hyperkalemia), 피부습진 (skin rashes)등의 부작용이 보고되고 있다 (Atkinson & Robertson 1979). 따라서 천연에 존재하는 강력하고 새로운 ACE 저해제의 검색과 발견은 부작용 없이 혈관과 관련된 질병의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이다. 본 연구에서는 예로부터 항고혈압 효과가 있다고 알려진 결명자로 ACE 저해효과를 실험하였고 그 원인물질에 대해 규명하였다. 생결명자와 볶음 결명자의 MeOH 추출물과 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물에 대해 ACE 저해활성을 실험하였다. 그 결과 생결명자의 MeOH 추출물이 볶음 결명자와 비교했을 때 더 높은 활성을 보였고 활성은 농도의존적으로 증가하였다. 두 추출물의 분획물에서는 EtOAc 획분이 가장 높은 활성을 나타내었다. 이로써 ACE 저해를 보이는 활성물질이 극성인 EtOAc 획분에 많이 녹아 있음을 알 수 있었다. 더 자세한 원인물질을 밝히기 위해 EtOAc 획분을 Silica gel column chromatography와 Sephadex LH-20, RP-18을 사용하여 성분을 분리하였고 분리된 화합물의 구조는 IR, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC, HMQC 및 EIMS등의 분광학적 방법과 문헌의 spectral data를 이용하여 화합물 **1~10**으로 동정하였다. 이들 분리한 화합물에 대해 ACE 저해활성을 실험한 결과 **2-4,7**에서 활성이 나타났으며 특히 gluco-aurantioobtusin (**7**)은 가장 높은 ACE 저해효과를 보였다. Kinetics를 이용하여 gluco-aurantioobtusin (**7**)은 경쟁적 저해제이며 기질 대신 효소와

결합하는 방식으로 직접적으로 저해작용을 나타냄을 알 수 있었다. ACE와 ROS, RNS와의 관련성을 고려하여, 항혈전증 효과가 보고된 **5**, **7** 그리고 이것을 산가수분해 하여 얻은 **5a**, **7a**에 대해 ACE 저해활성과 ROS, ONOO⁻ 소거 활성을 평가하였다. 그 결과 높은 ACE 저해효과를 보인 **7**뿐만 아니라 **5**, **5a**, **7a**도 뛰어난 ROS, ONOO⁻ 소거활성을 보임이 밝혀졌다. 결명자 MeOH 추출물과 분획물 그리고 분리된 화합물의 ACE 저해활성, ROS, ONOO⁻ 소거 활성을 통해 결명자의 anthraquinone 배당체, 특히 gluco-aurantioobtusin (**7**)이 결명자의 ACE 저해활성을 보이는 항고혈압인자 중 하나임을 증명하였다.



II. 실험 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 결명자 (*Cassia tora*)는 2005년 부산에 소재한 한방약 협동조합에서 국산으로 구입하였다. 식물 표본은 본 연구실에 보관하였다 (NO. 20050928).

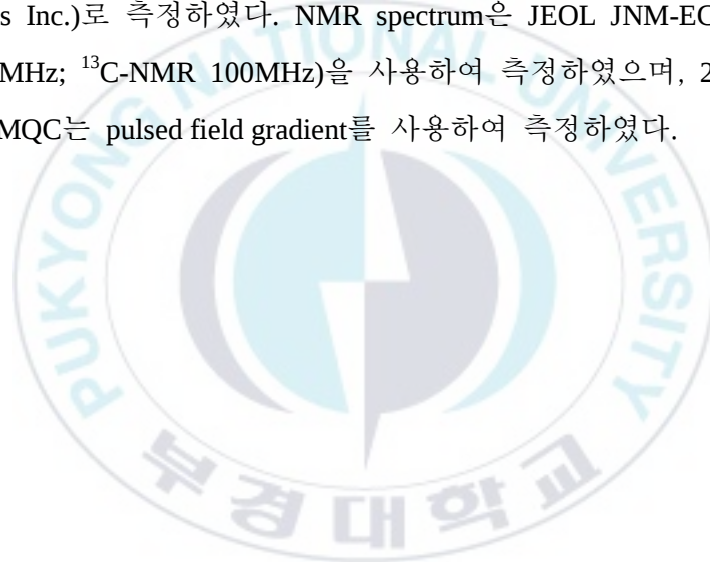
2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Column packing materials은 Kiesel gel 60 (Si gel, 70-230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734)과 Sephdex LH-20 (bead size 25-100 μ m, Sigma), RP-18 (Lichroprep[®] RP-18, 40-63 μ m, Merck)을 사용하였으며, TLC (Thin layer chromatography) plate는 kieselgel 60 F₂₅₄ (0.25 mm, precoated, Merck, Art. 5715)과 RP 18 F_{254S} (Merck, Art. 5685)를 사용하였으며, spray reagent는 50% H₂SO₄을 사용하였다. 추출 및 column chromatography에는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정시 사용한 용매는 DMSO-*d*₆ (Merck, deuterium degree 99.95%), CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95%)이다. ACE (1 Unit, rabbit lung), FAPGG (N-[3-(2-furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly), captopril, DL-penicillamin (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 DHR 123 (dihydrorhodamine 123)은 Molescular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였으며, ONOO⁻는 Cayman Chemicals Company (Ann Arbor, MI, USA)으로부터 구입하여 항산화 활성 실험을 시행하였다.

2-2. 기기

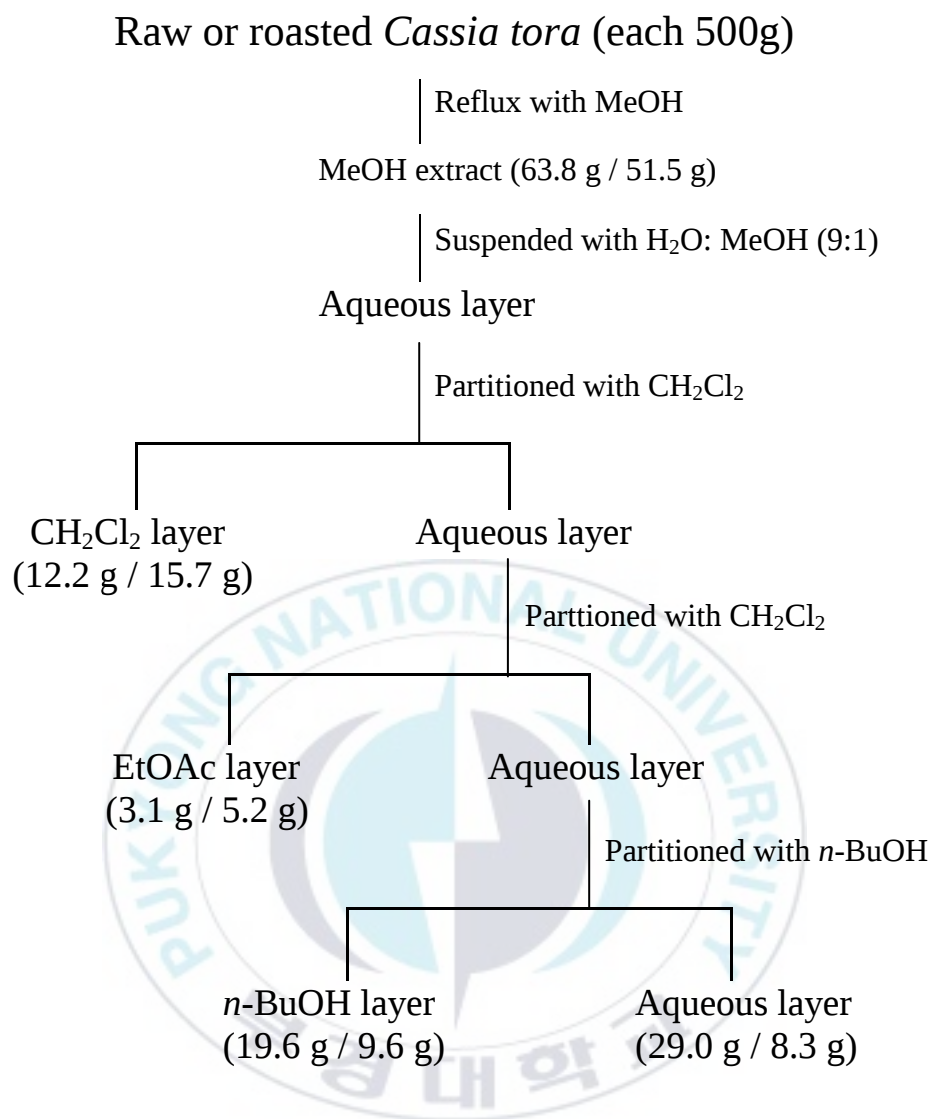
IR spectrum은 Perkin-Elmer 2000 spectrophotometer를 사용하여 KBr disc 법으로 측정하였다. UV spectrophotometer는 VARIAN UV-Visible spectrophotometer를 사용하였고, CD 측정은 JASCO-715 spectropolarimeter를 사용하여 측정하였으며, 선광도는 Perkin-Elmer polarimeter 341 (USA)을 사용하였다. 또한 EIMS는 JEOL JMS-700 spectrometer를 사용하였다. TLC plate에 의한 화합물 검색시 UV lamp (Model ENF-20C, spectroline, USA)로 장파장 (365nm), 단파장 (254nm)에서 각각 관찰하였다. 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)와 oxidized DHR 123의 형광 강도는 microplate fluorescence reader FLX800 (Bio-Tek Instruments Inc.)로 측정하였다. NMR spectrum은 JEOL JNM-ECP 400 (^1H -NMR 400MHz; ^{13}C -NMR 100MHz)을 사용하여 측정하였으며, 2D-NMR 인 HMBC, HMQC는 pulsed field gradient를 사용하여 측정하였다.



3. 방법

3-1. 추출 및 분획

생결명자 (Raw *C. tora*)와 볶은 결명자 (Roasted *C. tora*) MeOH 추출물 및 각 용매 별 분획과정은 Scheme 1에 나타내었다. 각각 (500 g) 분쇄하여 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 3 L의 MeOH에 넣은 후 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과 하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 생결명자에서 63.8 g MeOH 추출물을 얻고, 볶은 결명자에서 51.5 g을 얻었다. 그 중 각각의 시료에서 MeOH 추출 농축액 약 0.5 g 을 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다. 나머지는 H₂O:MeOH (9/1, v/v)의 혼합용매로 녹인 다음 분획 깔대기에 부어 동량의 CH₂Cl₂를 넣어 가용부를 모아 무수망초 (sodium sulfate, anhydrous)로 처리한 다음 농축하였다. 이와 같은 방법으로 더 반복하여 CH₂Cl₂ 분획을 12.2 g / 15.7 g 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 H₂O 분획층에 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 획분 3.1 g / 5.2 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법을 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분 19.6 g / 9.6 g과 하층의 H₂O 획분 29.0 g / 8.3 g을 얻었다.



Scheme 1. Extraction and fractionation of raw or roasted *C. tora*. (Figures in parenthesis indicate yields of raw and roasted seeds)

3-2. 성분의 분리

결명자 (*Cassia tora*)의 MeOH 추출물과 그 분획들 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 층에 ACE 저해활성을 시험하였다. 이에 EtOAc 분획에서 높은 활성을 보였으며 Silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 활성 성분을 분리, 동정하였다.

각 subfraction 및 분리·정제된 화합물에 대하여 CH₂Cl₂:MeOH (20:1), CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (10:1:0.1, 7:1:0.1, 5:1:0.1), Hexane:EtOAc (4:1) 전개용매로서 TLC 하여 50% H₂SO₄ (TLC sprayer, Merck)로 발색시켜 200°C 의 hot plate 에서 탄화시켰다. 그리고 254 nm와 365 nm의 UV lamp를 사용하여 형광을 띠는 물질을 검출하였다.

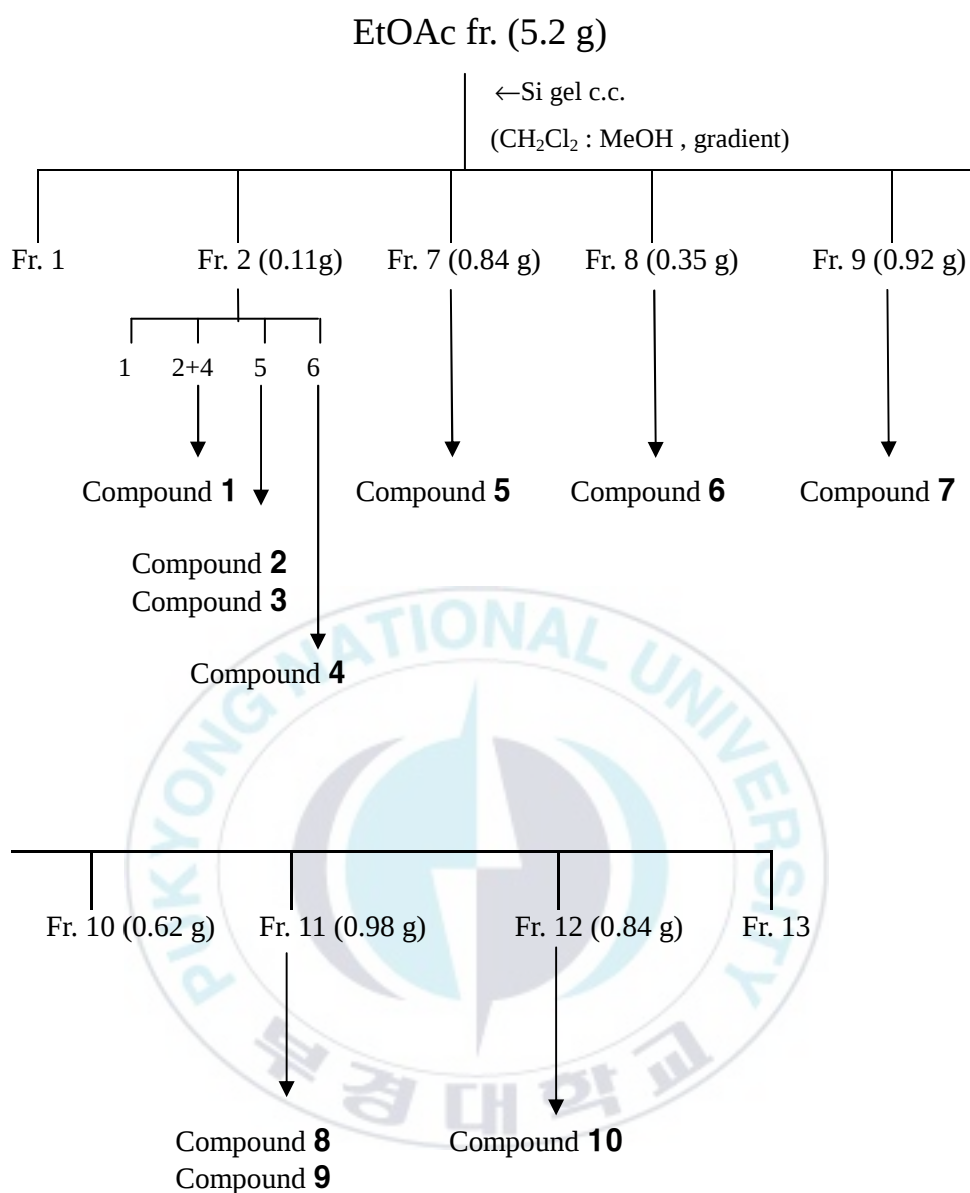
3-2-1. Acid hydrolysis 방법

5 mg의 시료를 5%HCl (5 mL)에서 3시간 동안 환류 냉각시킨 후, 반응액을 농축시켰다. 이후 EtOAc로 분획하여 그 EtOAc 분획 (aglycone)과 H₂O (sugar)층을 농축하고 MeOH로 재결정하거나 적절한 column chromatography하여 정제하였다 (Park *et al.*, 1991)..

3-3. 결명자 EtOAc 획분의 성분 분리

결명자의 MeOH 추출물로부터 얻은 EtOAc 획분을 대상으로 성분 분리한 과정을 Scheme 2에 나타내었다. 결명자 EtOAc 획분 5.2 g을 전개용매 CH₂Cl₂:MeOH (CH₂Cl₂:MeOH=20:1→1:1, MeOH, gradient)로서 silica gel column chromatography하여 13개의 subfractions (fr.1-13)을 얻었다.

Fr. 2 (0.11 g)을 전개용매 Hexane:EtOAc (4:1)로 silica gel column chromatography하여 subfraction (fr. 2-1 ~ fr. 2-6)을 얻었으며 이중 fr. 2-1을 전개용매 Hexane:EtOAc (5:1, MeOH, gradient)로 silica gel 하여 compound **1** (questin, 5 mg)을 분리하였으며, fr. 2-2 와 fr. 2-4를 합쳐 MeOH 재결정법에 의해 compound **2** (2-hydroxyemodin 1-methylether, 13 mg) 와 compound **3** (emodin, 15 mg)으로 각각 분리하였다. Fr. 2-5를 60% MeOH를 이용하여 RP-18 column chromatography 하여 compound **4** (alaternin, 12 mg)를 얻었다. Fr. 7 (0.84 g)을 silica gel (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O, 15:1:0.1)과 RP-18 column chromatography를 이용하여 compound **5** (gluco-obtusifolin, 45 mg)로 분리하였고, Fr. 8 (0.35 g)을 MeOH 재결정법에 의해 compound **6** (cassiaside, 120 mg)으로 분리하였다. Fr. 9 (0.92 g) 는 전개용매 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (15:1:0.1)를 사용하여 silica gel column chromatography 하여 compound **7** (gluco-aurantioobtusin, 107 mg)으로 분리하였고, Fr. 11 (0.98 g)을 전개용매 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (7:1:0.1)로 silica gel column하여 compound **8** (cassitoroside, 20 mg) 과 compound **9** (toralactone gentiobioside, 80 mg)를 얻었다. Fr. 12 (0.84 g)을 전개용매 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (5:1:0.1→1:1, MeOH, gradient)를 이용하여 silica gel column하였고 RP-18 column chromatography로 정제하여 compound **10** (chrysophanol triglucoside, 20 mg)으로 분리하였다. 생결명자의 EtOAc fraction (3.1 g)에 대해서도 비슷한 방법으로 chromatograph 하여 compound **1-10**을 얻었다.



Scheme 2. Isolation of compounds **1–13** from the EtOAc
fraction of roasted *C. tora*

3-4. 결명자 EtOAc 획분에서 분리된 성분의 분광학적 성질.

화학적 이동 (chemical shift)은 용매 peak를 기준으로, 혹은 내부 표준물질 tetramethylsilane (TMS)을 사용하여 ppm 단위를 나타내었다. 즉 DMSO- d_6 는 δ_H 2.50과 δ_C 39.5 ppm에서의 peak, $CDCl_3$ 는 내부표준 물질 (TMS)을 기준으로 나타내었다. 1H -NMR와 ^{13}C -NMR의 다중도 (multiplicities)는 각각 s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (double doublet), brd (broad doublet), brt (broad triple) 그리고 m (multiplet)으로 표시하였다.

Compound **1** (Questin)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.39 (OH), 7.41 (1H, s, H-4), 7.16 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-5), 7.10 (1H, s, H-2), 6.77 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-7), 3.88 (3H, s, OCH₃), 2.38 (3H, s, CH₃); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 185.9 (C-9), 182.5 (C-10), 163.6 (C-8), 166.0 (C-6), 124.1 (C-2), 161.7 (C-1), 136.7 (C-11), 146.3 (C-3), 118.9 (C-4), 132.1 (C-14), 114.5 (C-13), 111.7 (C-12), 107.8 (C-5), 105.1 (C-7), 56.2 (OCH₃), 21.3 (CH₃).

Compound **2** (2-Hydroxyemodin 1-methylether)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.11 (OH), 10.68 (OH), 7.77 (1H, s, H-4), 7.04 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-5), 6.53 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-7), 3.79 (3H, s, OCH₃), 2.28 (3H, s, CH₃); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 186.5 (C-9), 180.9 (C-10), 164.6 (C-8), 164.6 (C-6), 155.8 (C-2), 147.2 (C-1), 134.5 (C-11), 131.9 (C-3), 126.0 (C-4), 124.8 (C-14), 123.7 (C-13), 110.2 (C-12), 107.5 (C-7), 107.2 (C-5), 61.2 (OCH₃), 16.5 (CH₃).

Compound **5** (Gluco-obtusifolin)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 12.76 (OH), 7.87 (1H, s, H-4), 7.74 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-6), 7.64 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-5), 7.34 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-7), 5.02 (1H,

d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.42-3.06 (m, glucosyl-H), 3.89 (3H, s, OCH₃), 2.43 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 188.0 (C-9), 181.4 (C-10), 161.4 (C-8), 154.7 (C-2), 153.3 (C-1), 141.5 (C-3), 136.5 (C-6), 132.6 (C-11), 129.7 (C-14), 125.2 (C-4), 124.6 (C-13), 124.1 (C-7), 118.4 (C-5), 116.9 (C-12), 103.8 (C-1'), 77.4 (C-3'), 76.4 (C-5'), 74.1 (C-2'), 69.8 (C-4'), 61.5 (C-6'), 60.9 (OCH₃), 17.6 (CH₃).

Compound **5a** (Obtusifolin)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 12.79 (OH), 10.33 (OH), 7.82 (1H, s, H-4), 7.73 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.63 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 3.82 (3H, s, OCH₃), 2.30 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 188.4 (C-9), 180.9 (C-10), 161.4 (C-8), 155.7 (C-2), 147.3 (C-1), 136.4 (C-6), 132.7 (C-3), 132.7 (C-11), 125.9 (C-4), 124.9 (C-14), 123.7 (C-7), 123.6 (C-13), 118.2 (C-5), 116.7 (C-12), 61.2 (OCH₃), 16.6 (CH₃).

Compound **6** (Cassiaside)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 14.94 (OH), 10.33 (OH), 7.06 (1H, s, H-10), 6.72 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-9), 6.68 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-7), 6.16 (1H, s, H-3), 4.97 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 5.10-3.10 (m, glucosyl-H), 2.37 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 183.7 (C-4), 168.6 (C-2), 162.1 (C-5), 159.7 (C-8), 158.3 (C-6), 152.3 (C-11), 140.4 (C-14), 106.9 (C-3), 106.5 (C-13), 103.0 (C-12), 102.5 (C-9), 101.6 (C-7), 101.3 (C-1'), 99.9 (C-10), 77.2 (C-5'), 76.4 (C-3'), 73.5 (C-2'), 69.5 (C-4'), 60.6 (C-6'), 20.1 (CH₃).

Compound **7** (Gluco-aurantioobtusin)

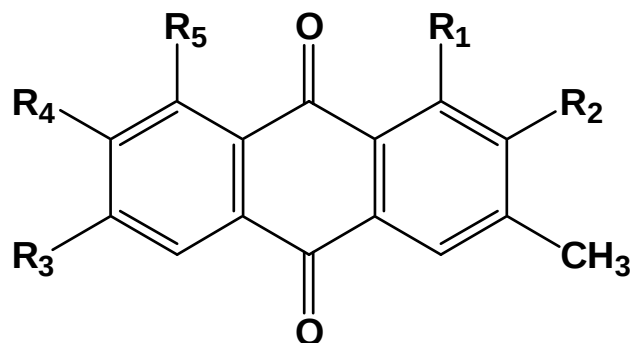
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 13.08 (OH), 7.78 (1H, s, H-4), 7.43 (1H, s, H-5), 5.16 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 3.52-3.24 (m, glucosyl-H), 3.88 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 2.28 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 187.6 (C-9), 180.0 (C-10), 156.2 (C-8), 155.8 (C-2), 155.5 (C-6), 147.3 (C-1), 141.5 (C-7),

132.4 (C-3), 128.2 (C-11), 126.0 (C-4), 124.7 (C-14), 123.6 (C-13), 113.5 (C-12), 106.3 (C-5), 100.4 (C-1'), 77.4 (C-3'), 76.5 (C-5'), 73.3 (C-2'), 69.4 (C-4'), 61.2 (OCH₃), 60.5 (OCH₃), 60.4 (C-6'), 16.6 (CH₃).

Compound **7a** (Aurantio-obtusin)

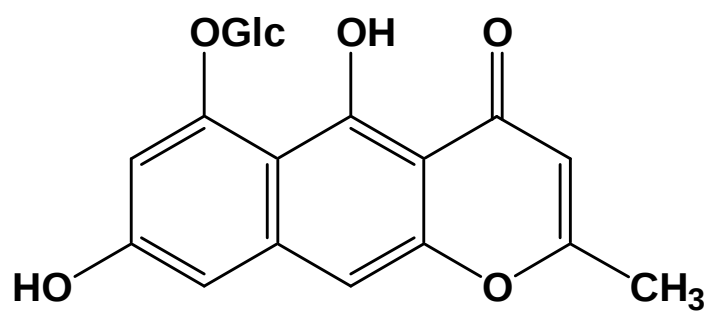
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 13.25 (OH), 10.85 (OH), 10.34 (OH), 7.75 (1H, s, H-4), 7.15 (1H, s, H-5), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.79 (3H, s, OCH₃), 2.27 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 187.2 (C-9), 180.4 (C-10), 156.9 (C-8), 156.6 (C-6), 155.5 (C-2), 147.2 (C-1), 139.4 (C-7), 132.0 (C-3), 128.5 (C-11), 125.9 (C-4), 124.9 (C-14), 123.7 (C-13), 111.1 (C-12), 107.7 (C-5), 61.2 (OCH₃), 60.0 (OCH₃), 16.5 (CH₃).



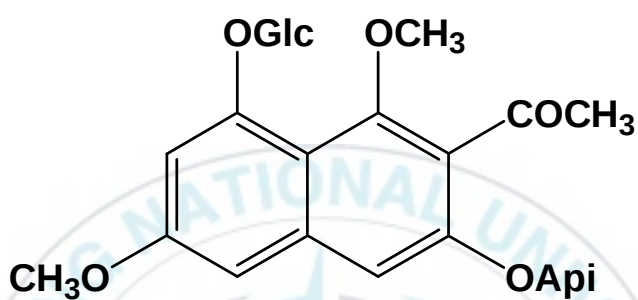


Questin(**1**) : R₁=R₃=OH, R₂=R₄=H, R₅=OMe
 2-hydroxyemodin 1-methylether(**2**) : R₁=OMe, R₂=R₃=R₅=OH, R₄=H
 Emodin(**3**) : R₁=R₃=R₅=OH, R₂=R₄=H
 Alaternin(**4**) : R₁=R₂=R₃=R₅=OH, R₄=H
 Gluco-obtusifolin(**5**) : R₁=OMe, R₂=O-Glu, R₃=R₄=H, R₅=OH
 Gluco-aurantioobtusin(**7**) : R₁=R₄=OMe, R₂=R₅=OH, R₃=O-Glu
 Obtusifolin (**5a**) : R₁=OMe, R₂=R₃=R₄=H, R₅=OH
 Aurantioobtusin(**7a**) : R₁=R₄=OMe, R₂=R₅=OH, R₃=H
 Chrysophanol triglucoside(**10**) : R₁=R₅=OH, R₂=O-Glu-Glu-Glu, R₃=R₄=H

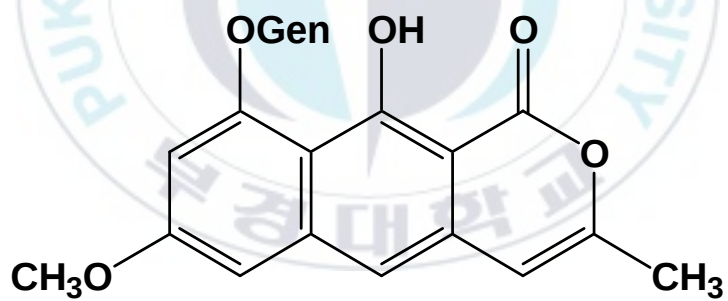
Fig. 1. Chemical structure of compounds from *C. tora*.



Cassiaside (6)



Cassitoroside (8)



Toralactone gentiobioside (9)

Fig. 1. Chemical structure of compounds from *C. tora*.

4. 활성 실험

4-1. ACE 저해활성

ACE 저해활성 측정은 Hou 등 (2003)의 방법을 변형하여 FAPGG를 기질로 사용하여 시험하였다. 요약하면 FAPGG (0.5 mM)와 다양한 농도 (0.12- 1 mg/mL)의 시료를 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 완전히 녹여 측정하는 방법이다. ACE 20 μ L와 다양한 농도의 시료 (20.49-163.93 μ g/mL) 200 μ L를 혼합하고 negative control로 50 mM Tris-HCl buffer를 이용하였다. 그런 다음 반응 혼합액에 기질인 0.5 mM FAPGG를 1mL 더하여 345nm 파장에서 0, 5, 30, 60 min의 시간차를 두고 광학 밀도를 측정하였다. ACE 저해활성은 시료 (μ g/mL)와 화합물 (μ M)의 50% 저해 농도 (IC_{50})로 나타내었다. 시료가 가지는 고유의 색으로부터의 장애를 막기 위해 0 min에서의 모든 광학 밀도 값을 60 min의 값으로 뺐으며 percentage 저해 값을 다음의 반응식을 이용하여 계산하였다. $(1 - [OD_{sample/0min} - OD_{sample/60min}] / [OD_{control/0min} - OD_{control/60min}]) \times 100$. Positive control로 captopril을 0.06-1.63 ng/mL 농도로 사용하였다.

4-2. Kinetics 분석

반응 혼합물로 50 mM Tris-HCl buffer 에 ACE 와 기질 FAPGG (0.1-1 mM)을 다른 네 가지 농도로 준비한 후 여러 농도의 시료를 반응 혼합물에 각각 더한다. ACE 의 Michaelis constant (K_m)와 maximal velocity (V_{max})는 Lineweaver-Burk plot 로 구하였다. 경쟁적 저해에 대한 속도 방정식은 $1/V = K_m / V_{max} (1 + [I] / K_i) 1/[S] + 1/ V_{max}$ 이며 경쟁적 저해제의 저해상수 (K_i)은 $K_{mapp} = K_m [1 + ([I] / K_i)]$ 로 계산하였다

4-3. 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 radical 이 되는데 이들을 reactive oxygen species (ROS)라 한다.

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

Scheme 3에 나타내었듯이, LPS 처리한 수컷 Wistar rats (체중 150-200 g)의 신선한 kidney homogenate 상등액 190 μ l에 여러 농도의 extract나 compound를 10 μ l를 혼합하고, 12.5 mM DCFH-DA를 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 100배 희석한 것 50 μ l와 함께 5분간 shaking 한다. 생성된 reactive oxygen species (ROS)는 microplate fluorescence spectrophotometer (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT) 에서 excitation

wavelength 485 nm와 emission wavelength 530 nm에서 3~5분 간격으로 30분간 측정하였다 (LeBel and Bondy, 1990). 형광 강도가 증가하지 않은 것은 실험한 화합물이 활성 산소종을 소거하여, DCFH가 산화되지 않았으므로 항산화 물질임을 의미한다.



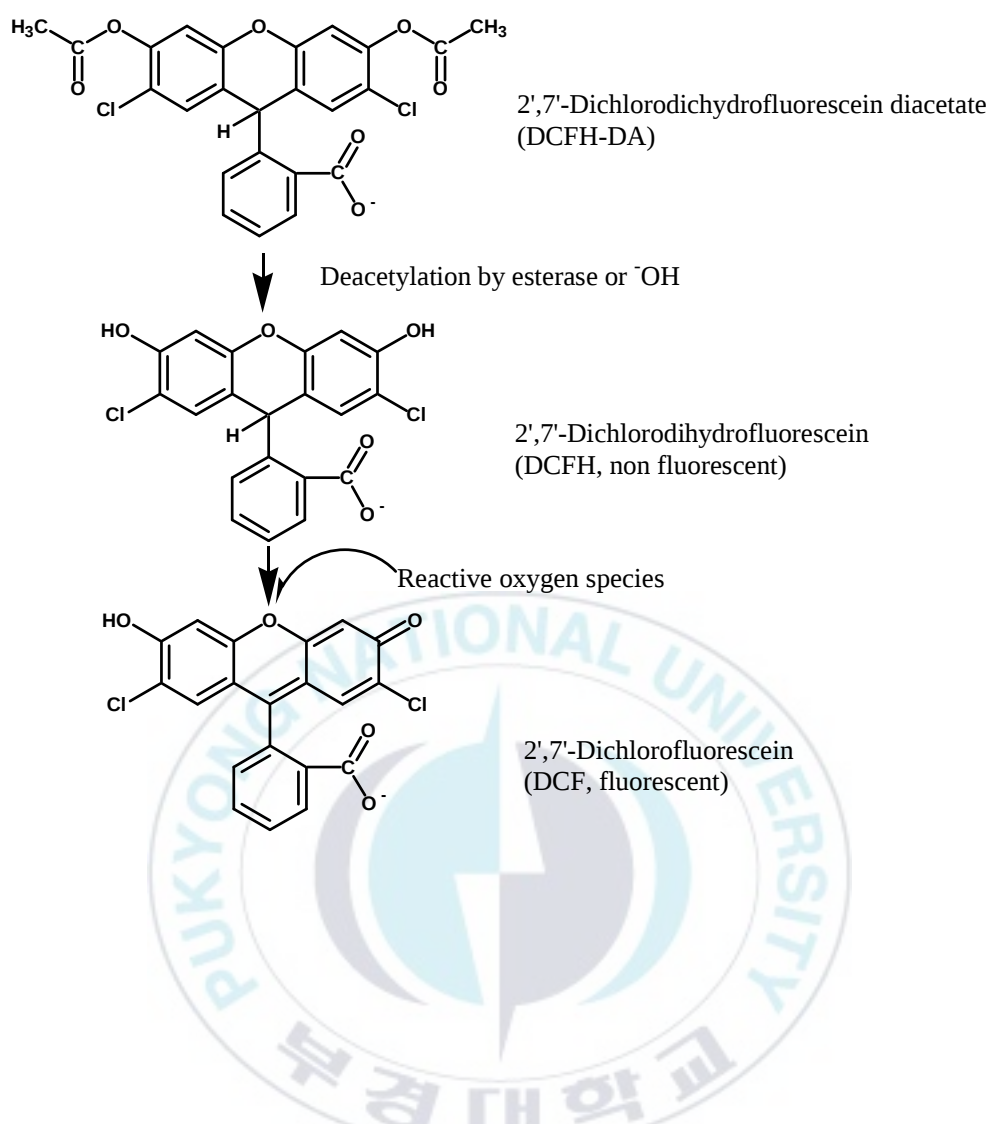
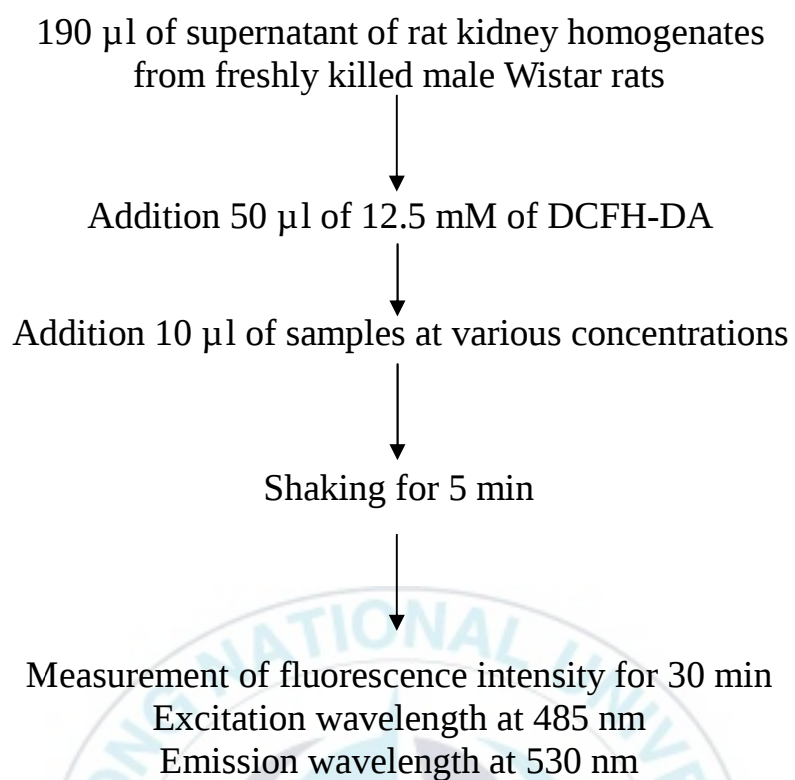


Fig. 2. Assay of the inhibitory activity on the ROS generation.
(Label and Bondy, 1990)



Scheme 3 . Measurement of the inhibition on the ROS generation by DCF method.

4-4. Peroxynitrite 소거 활성화

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 proton화되어 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 활성화에 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 4). 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. 3). 이 형광물질을 microplate fluorescence reader FL 800 (Bio-Tek Instruments Inc.)로 excitation, emission wavelength 각각 480 nm와 530 nm에서 측정하였다. 결과는 DHR 123 산화 저해 백분율로서 $\text{mean} \pm \text{standard error}$ ($n = 3$)로 나타내었다.



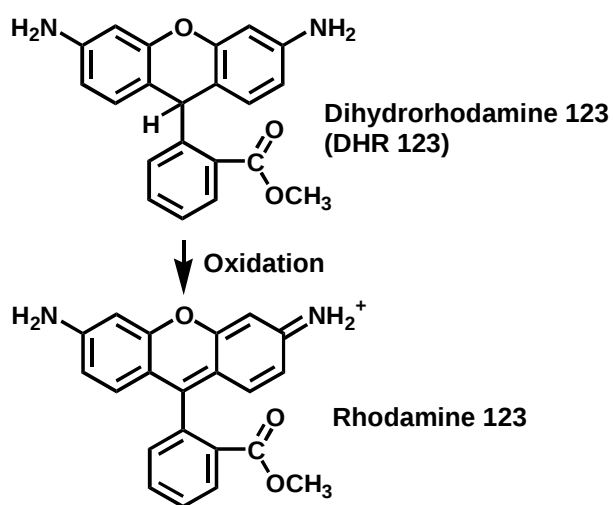
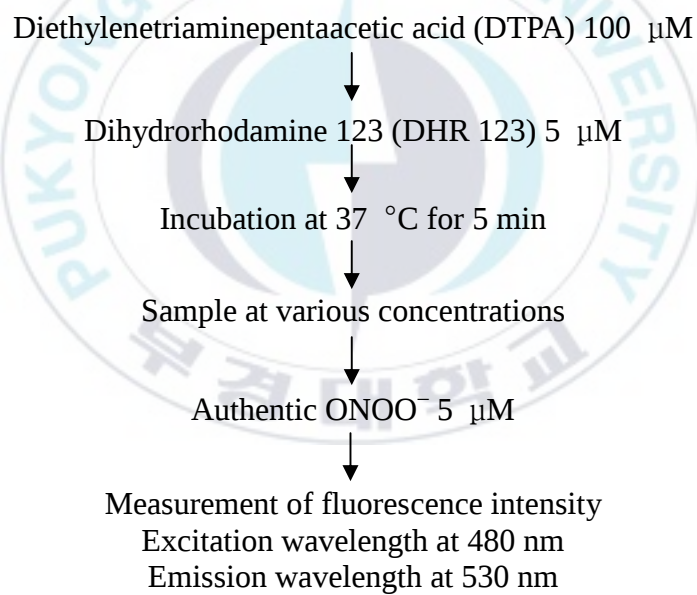


Fig. 3. ONOO^- -mediated oxidation of DHR 123.

(Crow, 1997)



Scheme 4. Measurement of the ONOO^- scavenging activity.

III. 결과 및 고찰

1. 결명자 MeOH 추출물과 각 획분들의 ACE 저해활성

결명자와 볶음 결명자의 MeOH 추출물 그리고 각 획분물 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O 에 대하여 ACE 저해활성을 시험하였다. Fig 4는 생결명자와 볶음 결명자의 MeOH 추출물의 ACE 저해효과에 대한 곡선을 나타낸다. 그 결과 두 추출물 모두에서 강력한 저해효과가 발견되었으며, 저해활성은 추출물의 농도가 증가함에 따라 함께 증가하였다. 실험 결과로 생결명자 추출물의 IC_{50} ($34.2/1 \mu\text{g/mL}$) 값이 볶음 결명자의 IC_{50} ($66.97 \mu\text{g/mL}$) 값과 비교했을 때 더 높게 나타났다. 즉 생결명자 추출물이 볶음 결명자와 비교했을 때 더 높은 ACE 저해활성을 보였다. 그러나 볶음 결명자 추출물은 높은 농도에서는 생결명자 추출물 보다 더 큰 ACE 저해활성을 나타냈는데 이 결과로 결명자를 볶는 과정이 ACE 저해활성 성분에 영향을 미친다고 예상 할 수 있었다.

Positive control로 잘 알려진 ACE 저해제 captopril로 저해활성을 비교하였으며 그 결과 captopril은 결명자 추출물 보다 훨씬 높은 활성을 나타내었다. 실험 결과에서 비록 결명자의 ACE 저해활성은 captopril 보다는 덜하지만, 결명자 추출물이 ACE 저해제로 활용 될 수 있음을 보여준다. 왜냐하면 안전성이 ACE 저해제의 가장 중요한 고려 사항이기 때문이다. 특히 항고혈압 기전에 있어 결명자 추출물은 유전자독성 (genotoxicity)에 안전하며, 또한 항산화 활성도 보이는 것으로 나타났기 때문이다 (Choi *et al.*, 1994, 1997, Yen *et al.*, 1999). 결명자의 MeOH 추출물에서 ACE 저해활성이 두드러지게 나타났기 때문에 다음으로 그것들을 여러 용매를 이용하여 분획하였다. 그리고 획분에 대해서도 ACE 저해활성을 $32.69\sim 169.72 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 실험하였다. Table 1에

보는 바와 같이 생결명자로 얻은 EtOAc 획분과 볶음 결명자의 MeOH 추출물이 눈에 띄는 저해활성을 보였고, IC_{50} 값이 94.65 ± 0.92 , $74.94 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ 로 각각 나타났다. 이것은 다른 fraction이 약한 활성을 보인데 반해 EtOAc fraction 이 주목할 만한 ACE 저해를 보였다는 점에서 흥미롭다. 결명자의 MeOH 추출물로부터 얻은 여러 fraction의 상대적인 저해 효과의 차이는 구조적 차이에 의해 설명 될 수 있다. 즉 anthraquinone, naphthopyrone 배당체는 극성인 EtOAc 용매에 녹아있으며 이는 식품으로 섭취했을 때 대부분 물에 용해 된다는 점에서 건강적인 측면에 큰 이점을 가져다 줄 수 있을 것이다.



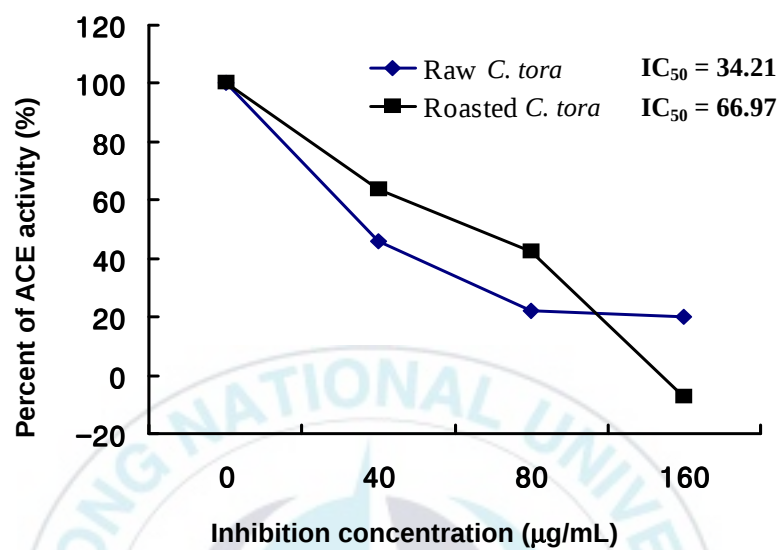


Fig. 4. Dose-dependent inhibition of ACE activities by MeOH extracts from raw or roasted *C. tora*.

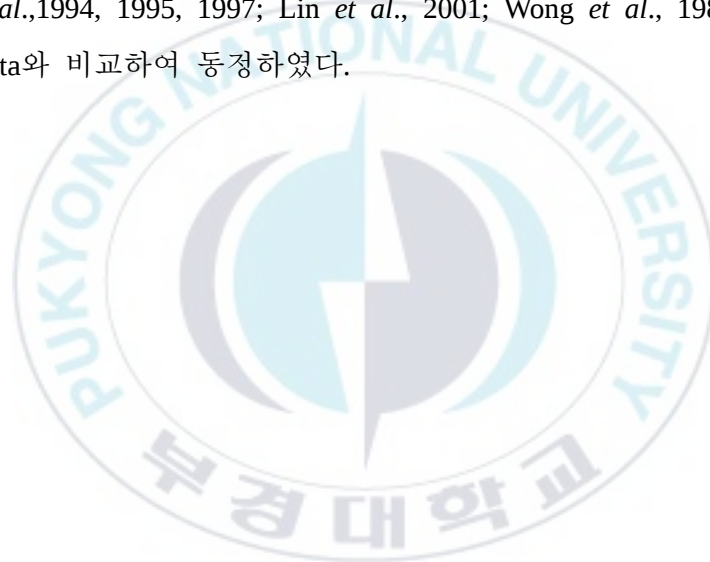
Table 1. ACE inhibitory activity of several fractions obtained from *C. tora*

Fractions	IC ₅₀ (μg/mL) [†]	
	Raw <i>C. tora</i>	Roasted <i>C. tora</i>
MeOH	176.35 ± 2.91	135.47 ± 2.59
CH ₂ Cl ₂	309.83 ± 5.18	148.52 ± 0.34
EtOAc	94.65 ± 0.92	74.94 ± 0.08
<i>n</i> -BuOH	114.59 ± 2.12	238.42 ± 5.96
H ₂ O	356.17 ± 3.35	170.31 ± 0.08

[†]Mean ± SE (n = 3). The 50% inhibition concentration of a positive control, captopril is 2.59 ng/mL.

2. 결명자 EtOAc 획득에서 분리된 화합물

ACE 저해효과가 높게 나타난 EtOAc fraction의 더 자세한 phytochemical 연구를 위해 silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography을 사용하여 7개의 anthroquinone [questin (**1**), 2-hydroxyemodin 1-methylether (**2**), emodin (**3**), alaternin (**4**), gluco-obtusifolin (**5**), gluco-aurantio-obtusin (**7**), chrysophanol triglucoside (**10**)], 2개의 naphthopyrone 배당체 [cassiaside (**6**), toralactone gentiobioside (**9**)]와 naphthalene 배당체 [cassitoroside (**8**)]를 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 IR, UV, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC, HMQC 및 EIMS등의 분광학적 방법과 여러 문헌치 (Choi *et. al.*, 1994, 1995, 1997; Lin *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 1988, 1989)의 spectral data와 비교하여 동정하였다.



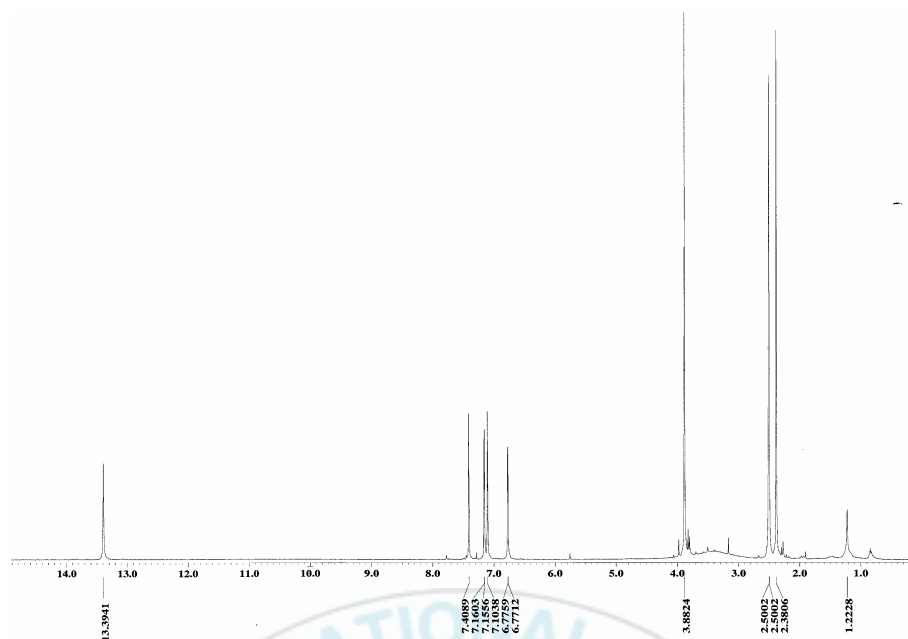


Fig. 5. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in $\text{DMSO}-d_6$

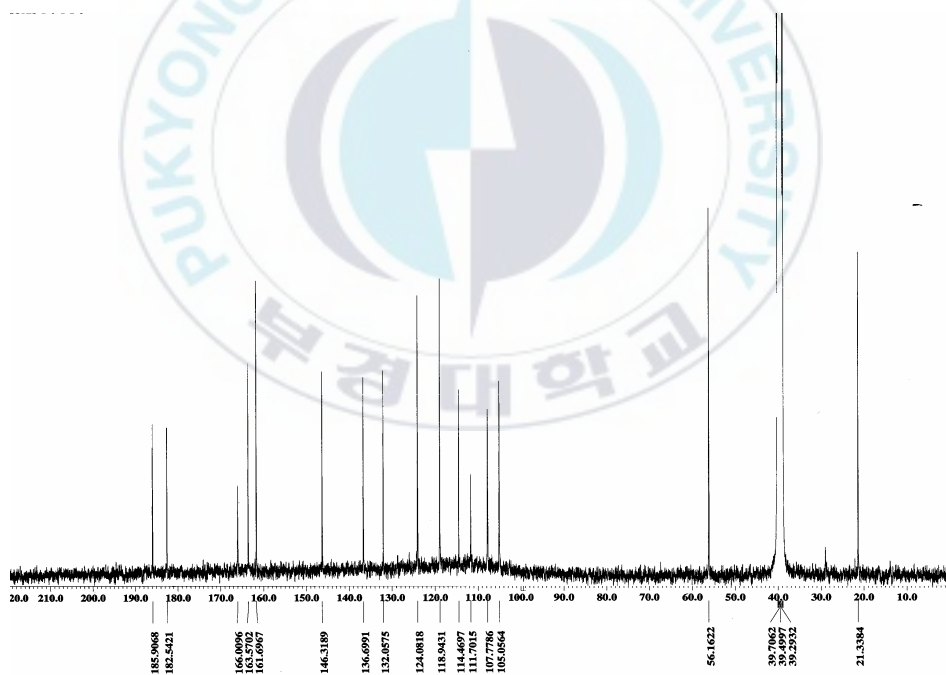


Fig. 6. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in $\text{DMSO}-d_6$

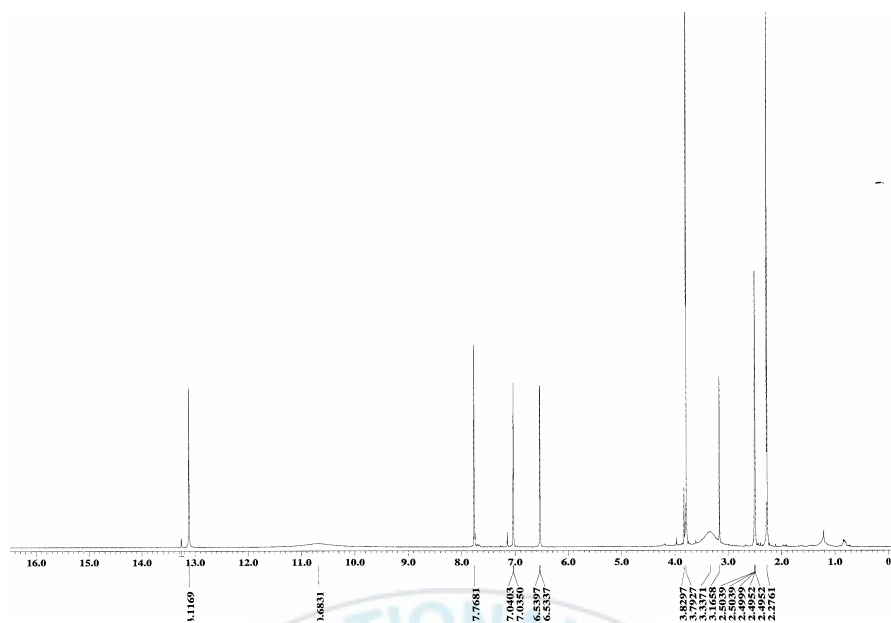


Fig. 7. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in $\text{DMSO}-d_6$

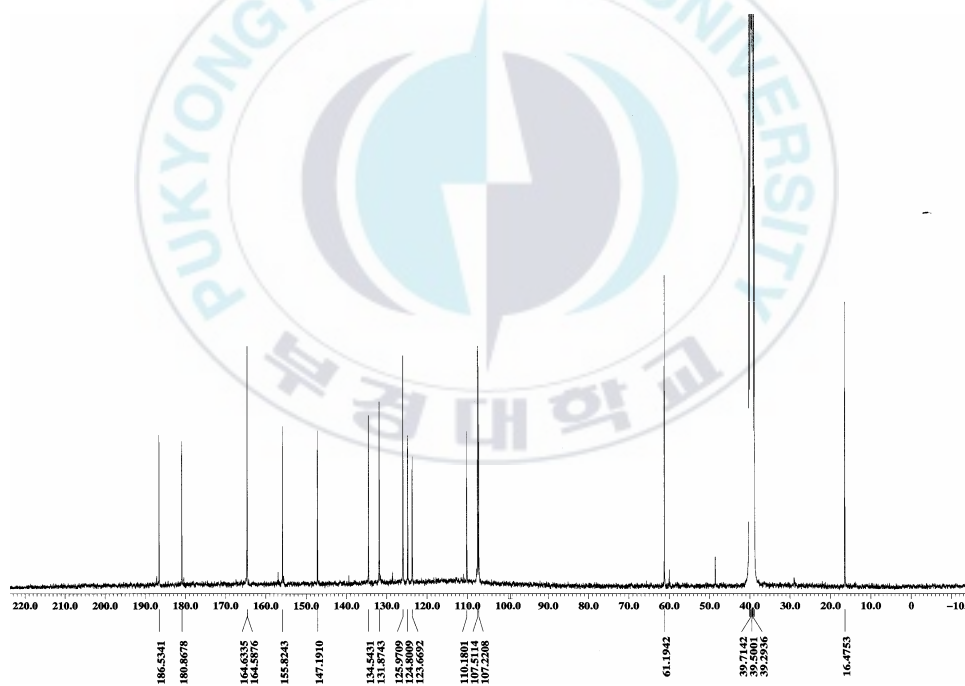


Fig. 8. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in $\text{DMSO}-d_6$

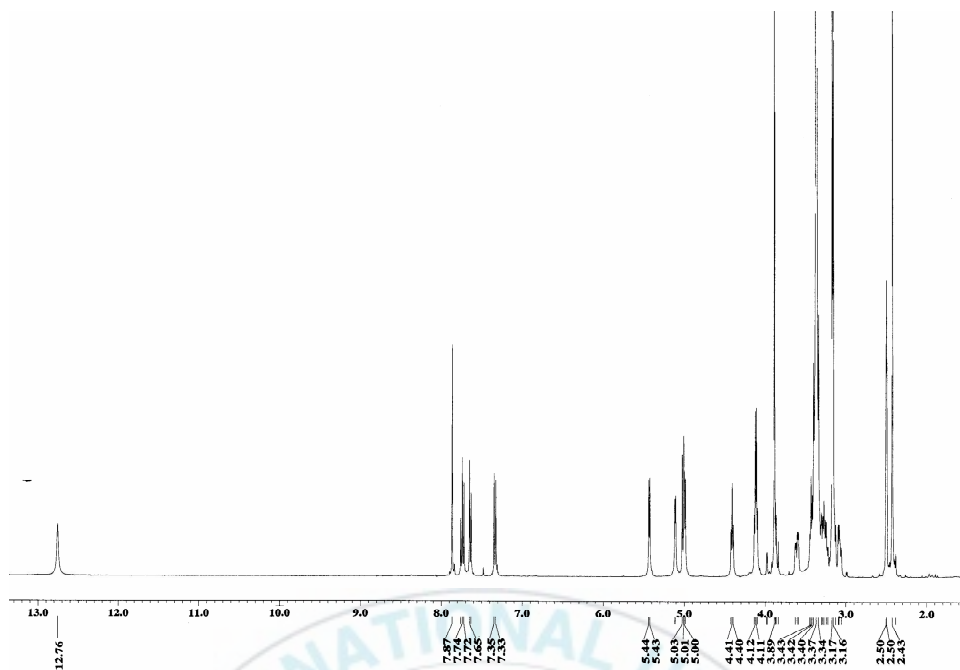


Fig. 9. ^1H -NMR spectrum of compound **5** in $\text{DMSO}-d_6$

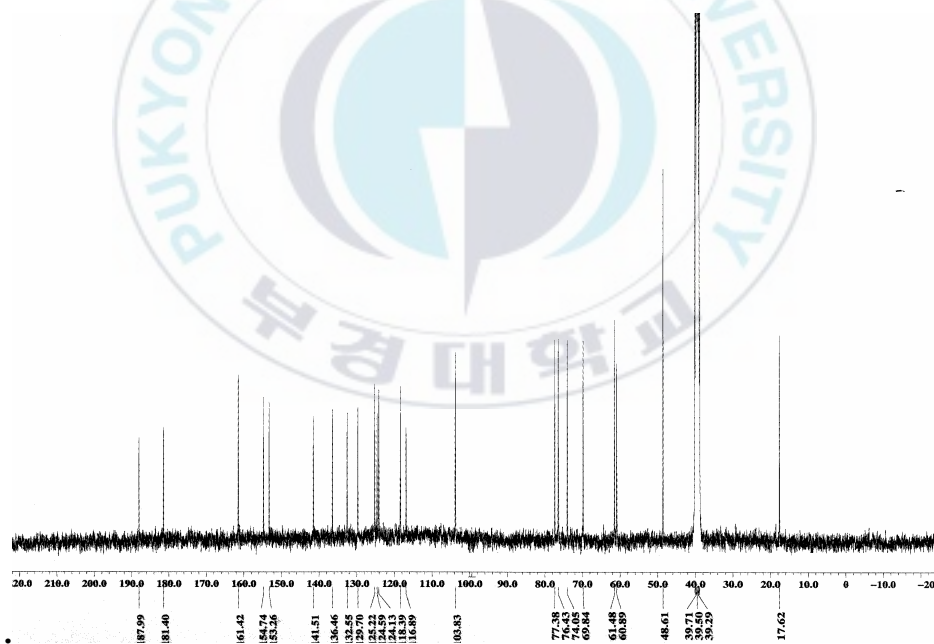


Fig. 10. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5** in $\text{DMSO}-d_6$

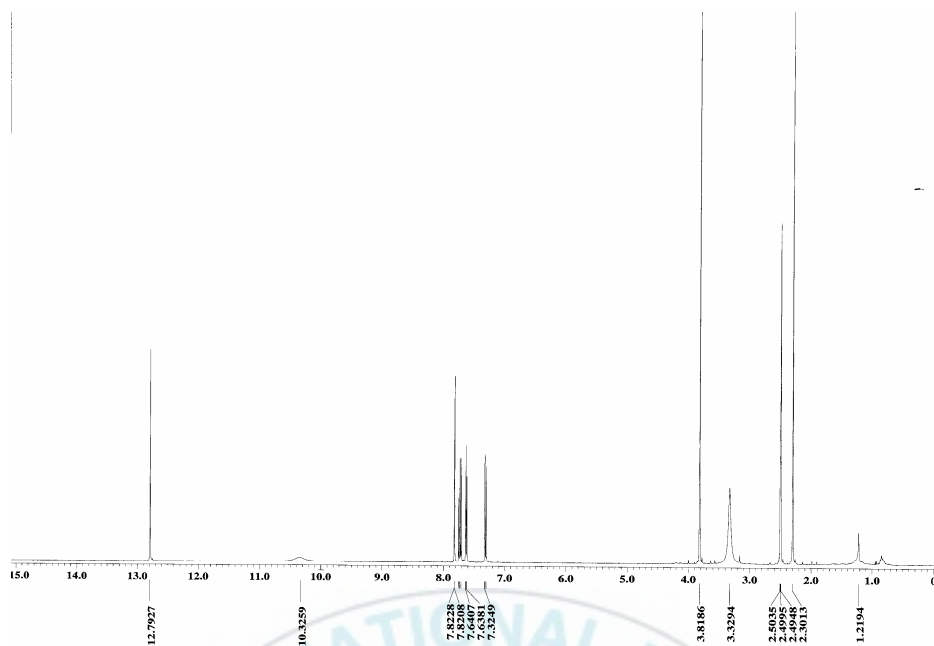


Fig. 11. ^1H -NMR spectrum of compound **5a** in $\text{DMSO}-d_6$

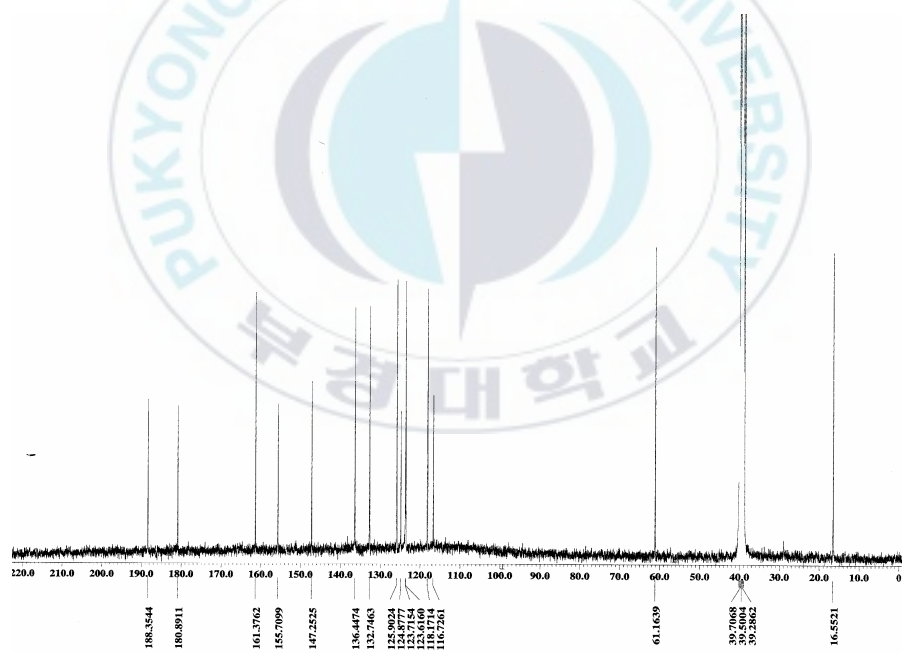


Fig. 12. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5a** in $\text{DMSO}-d_6$

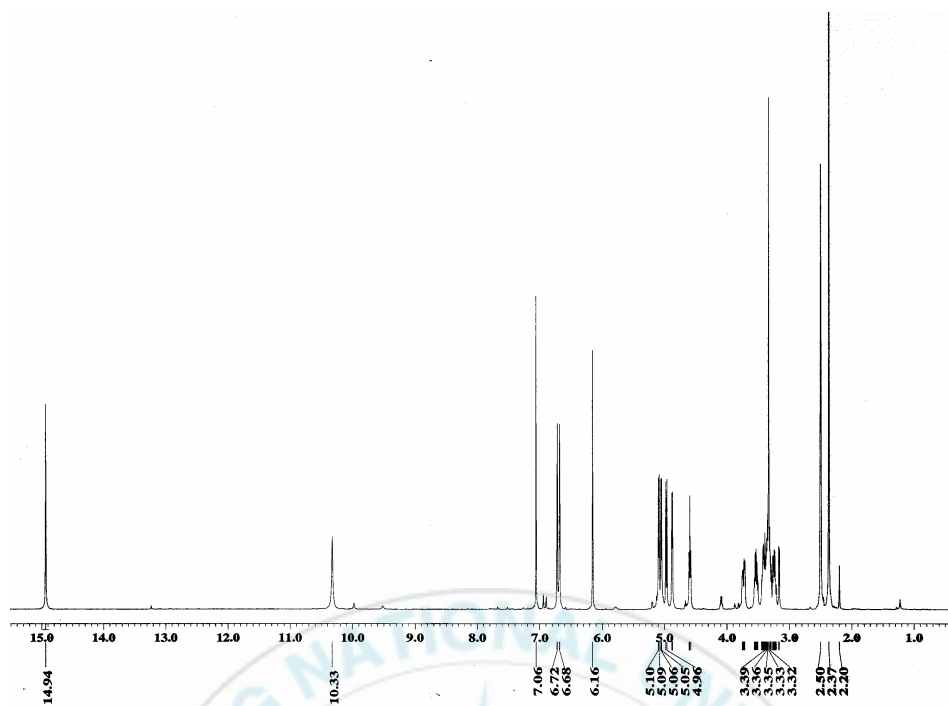


Fig. 13. ^1H -NMR spectrum of compound **6** in $\text{DMSO}-d_6$.

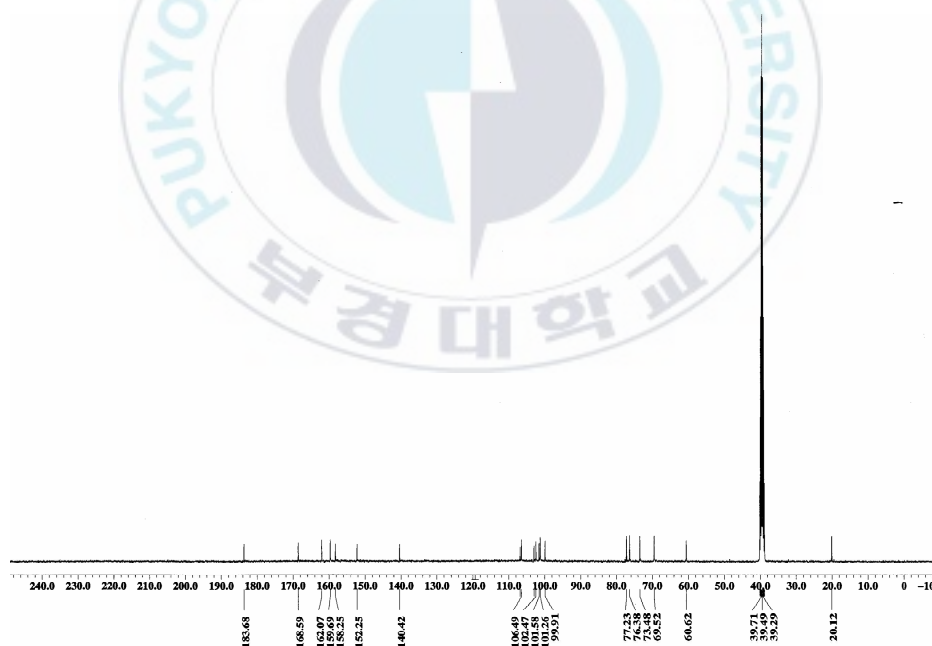


Fig. 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in $\text{DMSO}-d_6$.

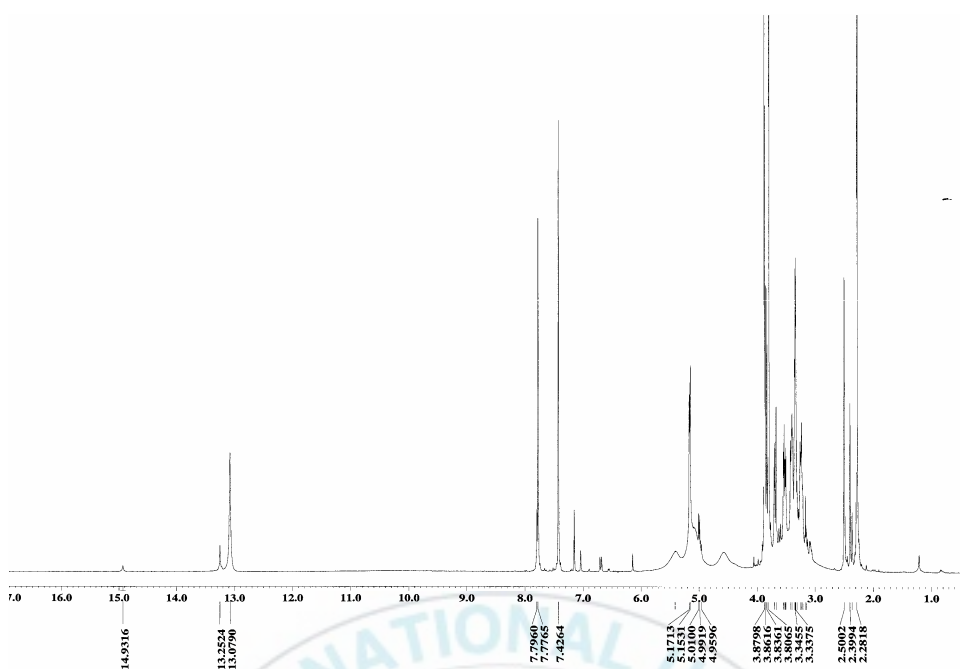


Fig. 15. ^1H -NMR spectrum of compound **7** in $\text{DMSO}-d_6$

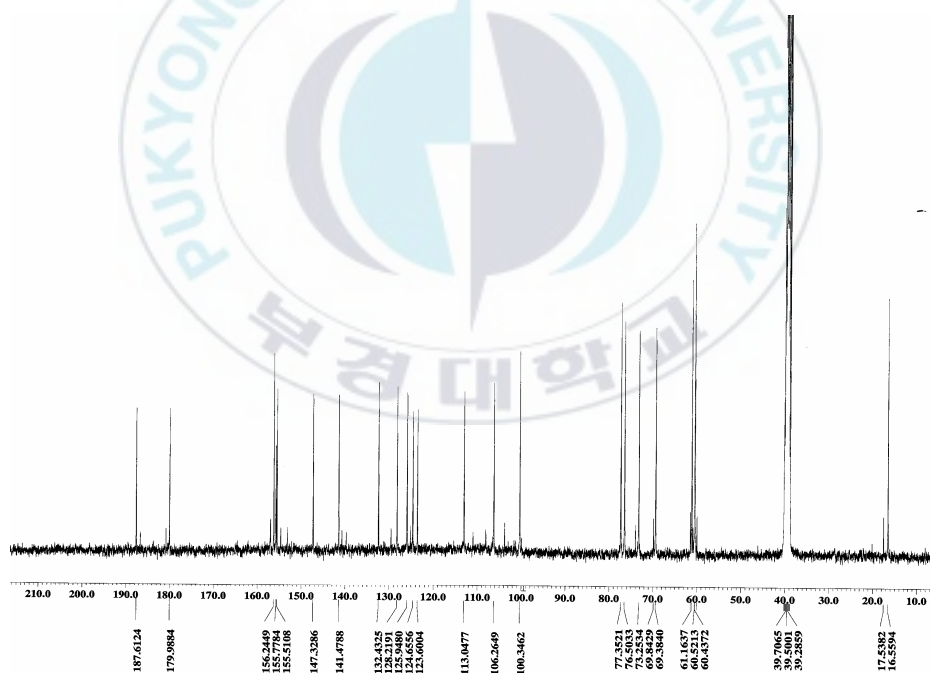


Fig. 16. ^{13}C -NMR spectrum of compound **7** in $\text{DMSO}-d_6$

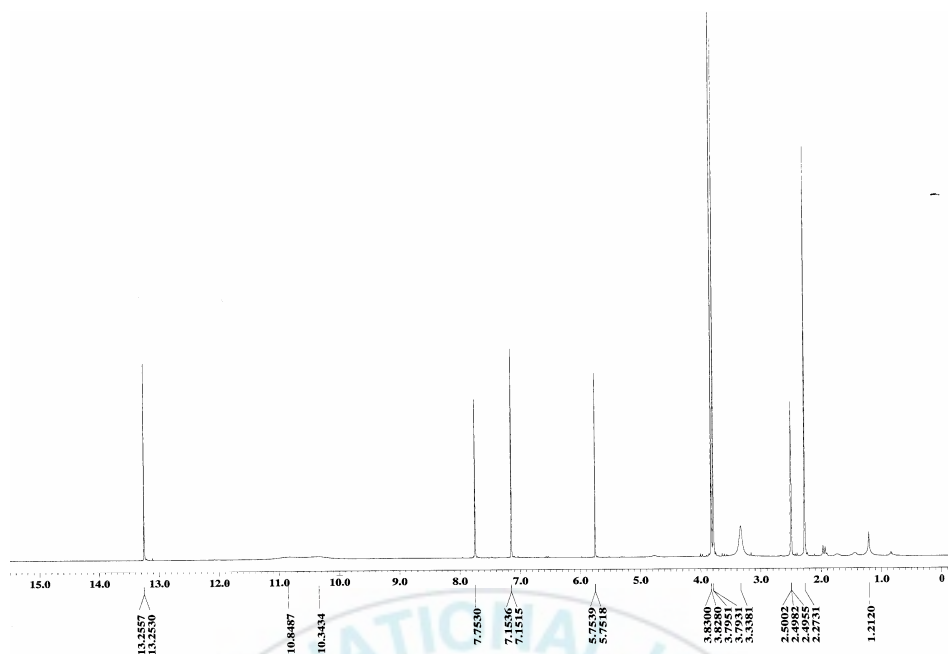


Fig. 17. ^1H -NMR spectrum of compound **7a** in $\text{DMSO-}d_6$

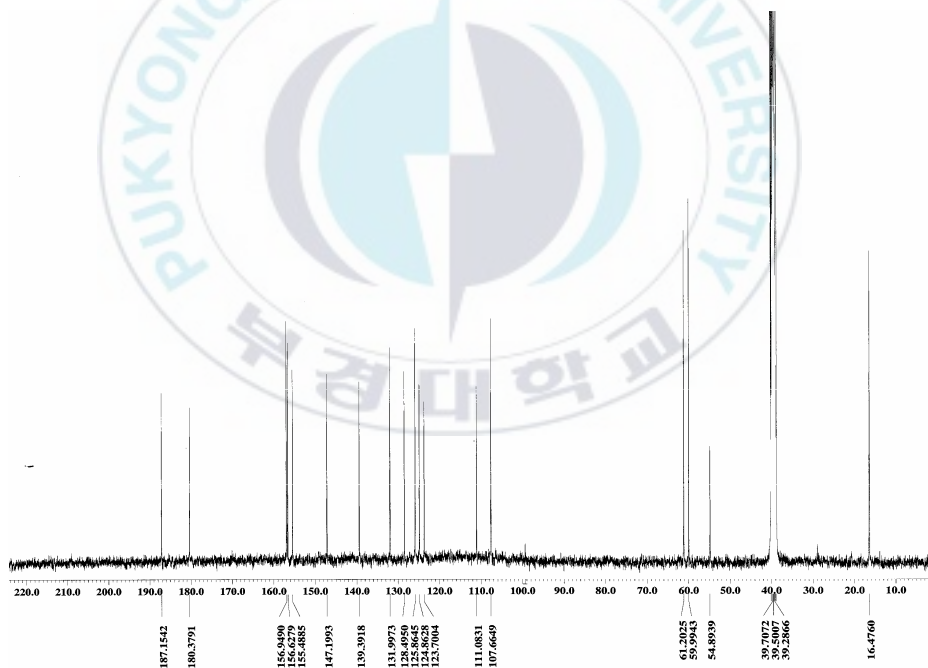


Fig. 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound **7a** in $\text{DMSO-}d_6$

3. 분리된 화합물의 ACE 저해활성

결명자 EtOAc, 획분을 대상으로 Silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography을 사용하여 10종의 화합물을 분리하였고 분리한 화합물과 **7**, **5**를 산가수분해하여 얻은 **5a**, **7a**에 대해 ACE 저해활성을 평가하였다(Table 2). 실험 결과 **2-4**, **7**에 대해 ACE 저해활성이 나타났으며 2-hydroxyemodin 1-methylether (**2**), emodin (**3**), alaternin (**4**)의 IC_{50} 값은 219.66 ± 1.43 , 236.11 ± 6.61 , $841.75 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$ 로 약한 활성을 보였지만 이들 화합물에서 ACE 저해효과가 있음이 증명되었다. Gluco-aurantioobtusin (**7**)은 IC_{50} 값 $30.24 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$ 을 가져 실험한 화합물 중에서 가장 높은 ACE 저해활성을 보였다. 이는 Fig. 19 에서 보는 바와 같이 농도의존적으로 활성을 보였으며 결명자가 ACE 저해효과를 보이는데 있어 원인물질 중 하나로 예측 할 수 있었다. 한편 **1**, **5**, **6**, **8-10**은 실험한 농도 내에서는 활성을 보이지 않았고, gluco-obtusifolin(**5**), gluco-aurantioobtusin(**7**)의 glucose기를 제거한 **5a**, **7a**에 대해서도 저해효과가 나타나지 않았다. Gluco-aurantioobtusin(**7**)이 높은 활성을 보인데 비해 **7a**는 활성을 보이지 않은 것으로 보아 이들의 구조적인 차이, 즉 glucose기의 도입여부가 ACE 저해효과를 보이는데 중요하게 작용할 것이라고 추론 할 수 있었다.

3-1. Kinetics 분석을 통한 gluco-aurantioobtusin의 ACE 저해활성

Gluco-aurantioobtusin (**7**)의 ACE 저해에 대한 Kinetics을 보기 위해 Lineweaver-Bark plot을 도식화하였으며 Fig. 20에 나타내었다. Gluco-aurantioobtusin (**7**)을 0, 20, 30, 80 μM 의 4가지의 다른 농도로 첨가하였을 때 얻은 선이 모두 Y축에서 교차하였으며 **7**의 저해제 결합에 대한 평형상수 K_i 값은 $8.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ 로 나타났다. 이로써 **7**은 기질에 대해 경쟁적

형태로 저해를 보임을 알 수 있었다. 경쟁적 저해는 **7**이 효소와 기질이 결합하는 부위에 기질 대신 붙어 직접적으로 활성을 저해하는 방식이다. 고혈압 치료제로 공인된 ACE 저해제 captopril에 대한 Kinetics을 보면 captopril 역시 경쟁적 저해제로 K_i 값은 5.06 ng/mL로 **7**보다 더 효과적으로 ACE 저해활성을 보이는 것으로 나타났다.

3-2. ACE 저해활성과 항산화 활성

ACE는 세포의 산화적 스트레스, 활성산소종 (ROS)과 질소종 (RNS)의 발생과 관련되어 있으며 혈소판의 응집, 흡착으로 인한 혈전증의 발생을 증가시키는 것으로 보고되고 있다 (McFarlane *et al.*, 2003). 따라서 compound **7**의 ROS와 ONOO⁻ 소거활성에 대해서도 평가하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 compound **7**은 ROS에 대해 IC₅₀ 값 49.64 ± 0.37 µg/mL (positive control; trolox: 26.07 ± 1.05 µM)을 가져 소거활성을 보였으며, ONOO⁻에 대해서도 IC₅₀ 값 4.60 ± 1.12 µg/mL (positive control; penicilamine: 0.24 ± 0.04 µM)을 가져 주목할 만한 소거효과를 나타내었다. 게다가 compound **7**은 Yun-Choi (1990)등에 의해 혈소판 항응집성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 한편 gluco-obtusifolin(**5**)의 ACE 활성은 실험한 농도에서는 나타나지 않았지만 ROS, ONOO⁻ 소거에 대해서는 활성을 보였고, 이 역시 혈소판 항응집성을 가지는 것으로 보고된 바 있다(Yun-Choi,1990).

ACE 저해와 ROS, peroxynitrite 소거 활성 실험의 결과로 gluco-aurantioobtusin은 ACE 대사에서 ACE의 활성을 저해 할 뿐만 아니라 ROS와 peroxynitrite에 대해서도 소거효과를 보이는 것으로 나타났다. 유사하게 항고혈압 치료제로 널리 사용되고 있는 captopril 역시 ACE 저해효과와 함께 낮은 농도 내에서 free radical 소거력을 가지는 것으로 알려져 있다 (Tamba and Torreggiani, 2000; Nakagawa *et al.*, 2006).

Table 2. ACE inhibitory activities of isolated compounds (**1–10**)
at 163.93 $\mu\text{g/mL}$

Fractions	Inhibition %
	Mean $\pm$ SE
Compounds 1, 5, 6, 8–10	n.a
Compound 2	47.52 $\pm$ 0.50
Compound 3	45.79 $\pm$ 0.25
Compound 4	24.26 $\pm$ 0.99
Compound 7	137.62 $\pm$ 1.73

n.a : no activity within tested concentration

% Inhibition of positive control, captopril is 87.87 $\pm$ 0.25% at 1.63 ng/mL

Table 3. Comparative Inhibitory/or scavenging activities of **5**, **5a**, **7**, **7a** on ACE, total ROS generation and ONOO⁻

Compounds	IC ₅₀ (μg/mL)		
	ACE [†]	ROS [‡]	ONOO ^{-*}
Gluco-obtusifolin (5)	n.a.	168.88 ± 4.69	50.68 ± 1.89
Obtusifolin (5a)	n.a.	264.33 ± 2.97	38.99 ± 1.85
Gluco-aurantioobtusin (7)	30.24 ± 0.20	49.64 ± 0.37	4.60 ± 1.12
Aurantioobtusin (7a)	n.a.	152.00 ± 3.24	1.43 ± 0.24

[†]IC₅₀ of a positive control, captopril is 0.28 ng/mL

[‡]ROS; trolox as positive control showed 50% inhibition concentration (IC₅₀) at 26.07 ± 1.05 μg/mL

*ONOO⁻ peroxynitrite; penicillamine as positive control showed 50% inhibition concentration (IC₅₀) at 0.24 ± 0.04 μg/mL

IC₅₀ from the ACE, ROS, and ONOO⁻ assay represented as mean ± SE.

n.a., no activity within tested concentration (163.93 μg/mL).

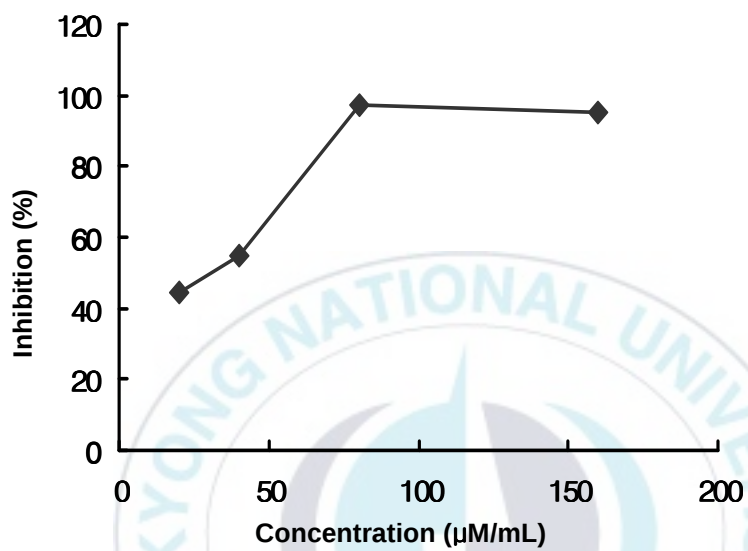


Fig. 19. Concentration – dependent ACE inhibitory of gluco-aurantioobtusin.

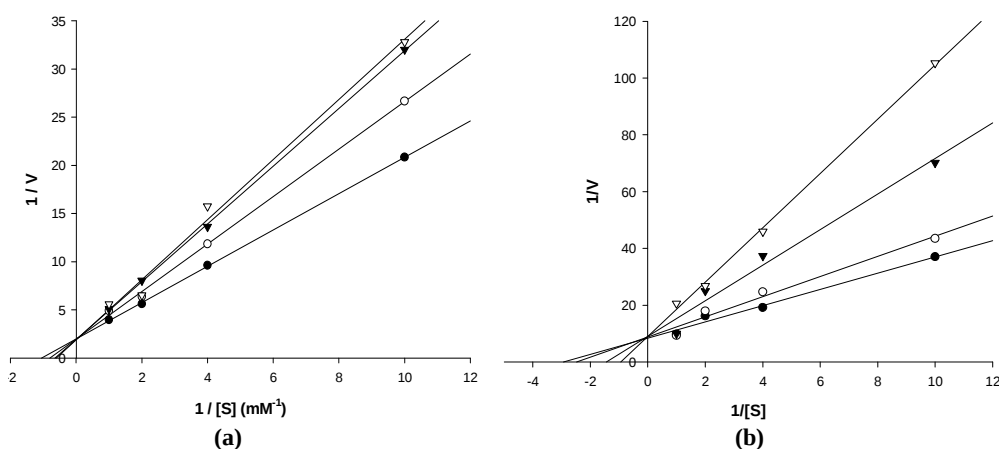


Fig. 20. Lineweaver-Burk plots for the inhibition of ACE by gluco-aurantio obtusin (a) and captopril (b). (a) : The reaction was done in the presence of gluco-aurantio obtusin [final concentration of 0 ($\bullet$), 20 ($\circ$), 40 ($\blacktriangledown$), and 80 μM ($\triangledown$)]. $V_{\text{max}} = 0.52 \mu\text{mole/mL}$, $K_m = 9.5 \times 10^{-4} \text{ M}$. The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 8.3 \times 10^{-5} \text{ M}$. $1/V$: $1/(\Delta\text{O.D./min})^{-1}$. (b) : The reaction was done in the presence of captopril [final concentration of control ($\bullet$) and 1.63 ($\circ$), 3.26 ($\blacktriangledown$), 8.15 ng ($\triangledown$)]. $V_{\text{max}} = 0.125 \text{ ng/mL}$, $K_m = 0.33 \text{ mM}$. The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 5.06 \text{ ng/mL}$. $1/V$: $1/(\Delta\text{O.D./min})^{-1}$.

IV. 요약 및 결론

Rennin-angiotensin system은 생체 수분과 전해질, 혈액의 조절에 중요한 역할을 한다. ACE는 아연을 함유하고 있는 금속이온효소로서 angiotensin I을 가수분해하여 강력한 혈관수축 작용을 하는 angiotensin II로 변화시켜 신장과 심혈관 조직에서 aldosterone의 분비를 자극하고, 염분과 수분의 보유를 증가시켜 혈압을 상승시킨다. 따라서 ACE 작용을 조절하는 것은 전반적인 혈관질환을 예방하는데 중요하다고 볼 수 있다. 합성의 ACE 저해제는 여러 부작용을 나타내기 때문에 본 연구에서는 여러 문헌에 항고혈압효과가 보고 되었고, 일상적인 음료로 쉽게 접할 수 있는 결명자 추출물을 이용하여 ACE 저해활성을 평가하였고, 그 원인 물질을 규명하였다.

먼저 생결명자와 볶은 결명자의 MeOH 추출물과 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 획분에 대해 ACE 저해활성을 실험하였다. 실험 결과로 생결명자와 볶은 결명자의 MeOH 추출물에서 농도의존적으로 강력한 저해활성을 보였다. 생결명자 추출물의 활성 (IC₅₀=34.2/1 µg/mL)이 볶은 결명자 (IC₅₀=66.97 µg/mL) 추출물의 값과 비교했을 때 더 높게 나타났으며 높은 농도에서는 오히려 볶은 결명자에서 더 높은 활성을 보였다. 이로써 볶는 과정이 ACE 저해에 영향을 미칠 수 있음을 추론할 수 있었다. 생결명자와 볶은 결명자의 분획물 중 EtOAc 획분이 가장 높은 ACE 저해효과를 나타내어 활성을 가지는 원인 물질이 EtOAc 획분에 많이 녹아 있는 것으로 보고 더 자세히 원인 물질을 밝히기 위해 반복적으로 column chromatography하여 7개의 anthroquinone [questin (**1**), 2-hydroxyemodin 1-methylether (**2**), emodin (**3**), alaternin (**4**), gluco-obtusifolin (**5**), gluco-aurantioobtusin (**7**), chrysophanol triglucoside (**10**)], 2개의 naphthopyrone 배당체 [cassiaside (**6**), toralactone gentiobioside (**9**)]와 naphthalene 배당체

[cassitoroside (**8**)]를 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 IR, UV, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC, HMQC 및 EIMS 등의 분광학적 방법을 이용하여 동정하였다.

분리된 화합물의 ACE 저해효과를 시험한 결과 **2-3**, **7** 화합물에서 활성을 나타내었으며 IC_{50} 값은 219.66 ± 1.43 , 236.11 ± 6.61 , 841.75 ± 0.36 , $30.24 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$ 로 각각 나타났다. 특히 gluco-aurantioobtusin (**7**)은 가장 높은 ACE 저해활성을 보여 결명자의 주된 항고혈압인자 중 하나로 추론할 수 있었다. ACE 저해활성에 대해 **7**의 Kinetics를 보면 K_i 값은 $8.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ 로 나타났고, captopril과 같이 경쟁적 저해제임을 확인 하였다. 한편 ACE는 ROS, RNS의 발생, 혈소판 응집과 밀접한 관련성이 있다고 보고되고 있어 ROS/ONOO $^-$ 에 대한 소거활성에 대해서도 실험하였다. 실험결과 높은 ACE 저해활성을 보인 **7**은 ROS에 대해 IC_{50} 값 $49.64 \pm 0.37 \mu\text{g/mL}$ (positive control; trolox: $26.07 \pm 1.05 \mu\text{M}$), ONOO $^-$ 에 대해 IC_{50} 값 $4.60 \pm 1.12 \mu\text{g/mL}$ (positive control; penicilamine: $0.24 \pm 0.04 \mu\text{M}$)을 가져 주목할 만한 소거효과를 나타내었다. 혈소판 항응집성이 보고된 **5**와 **5**, **7**을 산가수분해하여 얻은 **5a**, **7a**도 ROS, ONOO $^-$ 에 대해 소거활성을 보였다.

ACE 저해활성, ROS/ONOO $^-$ 소거활성 실험을 통해 결명자와 분리된 anthraquinon 화합물들이 Rennin-angiotensin system에서 ACE 대사와 관련하여 항고혈압 작용을 할 수 있음을 증명 하였다. 이런 관점에서 봤을 때 결명자는 부작용 없는 자연적인 ACE 저해제로 산화적 스트레스와 관련된 질병, 심혈관계질환과 신장질환, 뇌졸중 등을 예방하는데 있어 효과적으로 활용 될 수 있을 것이다.

V. 참고 문헌

- 이창복, 대한식물도감, 향문사, p. 466 (1985)
- 이희정, 결명자 중의 항돌연변이성 성분의 분리 및 동정, 부경대학교 식품생명과학과 박사학위논문 (1998)
- 赤松金芳, 和漢藥. 医歯薬出版株式會社, p. 350 (1980)
- Acharya, T. K., Chatterjee, I. B., Isolation of chrysophanic acid-9-anthrone, the major antifungal principle of *Cassia tora*. *Lloydia*, 38, 218-220 (1975)
- Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. T., Scherch, H. M., Sethy, V. H., 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)
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Mahmood, N. Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1043-1053 (1999)
- Atkinson, A. B., & Robertson, J. I. S. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *Lancet Neurology*, 2, 836-839 (1979)
- Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejza, P. Seeds, M. C. and Thomas, M., Flowcytoetric studies of oxidative product formation by neutrophils; a graded response to memberane stiulation, *J. Immun.*, 130, 1910-1917 (1983)
- Chan, S. H., Koo, A., Li, K. M., The involvement of medullary reticular formation in the hypotensive effect of extract from seeds of *Cassia tora*. *American Journal of Chinese Medicine*, 4, 383-389 (1976)
- Chen, S. J., Chang, C. T., Chung, Y. C., Chou, S. T. Studies on the inhibitory effect of Graptopetalum paraguayense E. Walther extracts on the angiotensin converting enzyme. *Food Chemistry*, (2005)
- Chidume, F. C., Kwanashie, H. O., Adekeye, J. O., Wambebe, C., Ganmaniel K. S. Antionociceptive and smooth muscle contraction activities of the methanolic

- extract of *Cassia tora* leaf. *Journal of ethnopharmacology*, 81, 205-209 (2002)
- Choi, J. S., Lee H. L. and Kang, S. S. Alaternin, cassiaside and rubrofusarin gentiobioside, radical scavenging principles from the seeds of *Cassia tora* on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Arch. Pharm. Res.*, 17, 462-466 (1994)
- Choi, J. S., Jung, J. H., Lee, H. J., Lee, J. H. and Kang, S. S. A naphthalene glycoside from *Cassia tora*. *Phytochemistry*, 40, 997-999 (1995)
- Choi, J. S., Lee, H. J., Park, K. Y., Ha, J. O., Kang, S. S., In vitro antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*. *Planta Medica*, 63, 11-14 (1997)
- Choi, J. S., Lee, H. J., Park, K. Y., Jung, G. O., and Kang, S. S., In vitro antimutagenic effects of naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*. *Planta Med.*, 64, 100-104 (1998).
- Cho, J. H., Cho, S. D., Hu, H., Kim, S. H., Lee, S. K., Lee, Y. S., Kang, K. S. The roles of ERK 1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*, 23, 1163-1169 (2002)
- Choi, H. S., Cha, S. S., Na, M. S., Shin, K. M., Lee, M. Y., Effect of the ethanol extracts of *Cassia tora* L. of antioxidative compounds and lipid metabolism in hepatotoxicity of rats-induced by ethanol. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 30, 1177-1183 (2002)
- Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y., Kye, I. S., No, J. K., Baek, B. S. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4484-4486 (1998)
- Cleland JGF, Swedberg K, Poole-Wilson PA. Successes and failure of current treatment of heart failure. *Lancet.*, 352, S1190-S128 (1998)
- Cuzzocrea, S., Tan, D. X., Costantino, G., Mazzon, E., Caputi, A. P., Reiter, R. J. The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy

- in the rat. *FASEB J.*, 13, 1930-1938 (1999)
- Dalziel, J. M. The Useful Plants of West Tropical Africa. Crown Agents, London, 260~265 (1955)
- Delia, D., Aiello, A., Meroni, L., Nicoline, 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., 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)
- Friedman, M., Bayer, S.O., The Mechanism underlying hypocholesterolemia induced by Triton WR 1339. *American Journal of Physiology*, 190, 439-445 (1957)
- Goretta, L. A., Ottaviani, J. I., Fraga, C. G. Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme Activity by Flavanol-Rich Foods. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 229-234 (2006)
- Guan, Y., Zhao, S., Yishou jiangzhi (de-blood-lipid) tablets in the treatment of hyperlipidemia. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 15, 178-179 (1995)
- Haenen, G. R. M. M., Paquay, J. B. G., Korthouwer, R. E. M., Bast, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoid. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 236, 590-593 (1997)
- Hao, N. J., Huang, M. P., Lee, H., Structure-activity relationships of anthraquinones as inhibitors of 7-ethoxycoumarin O-deethylase and mutagenicity of a-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Mutation Research*, 328, 183-191 (1995)
- Hatano, T., Uebayashi, H., Ito, H., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T. Phenolic constituents of *Cassia tora* seeds and antibacterial effect of some naphtholones and anthraquinones on methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47, 1121-1127 (1999)
- Hempel, S. T., Buettner, G. R., Omalley, Y. Q., Wessels, D. A., 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)
- Hou, W. C., Chen, H. J. and Lin, Y. H. Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1706-1709 (2003)
- J. Zhenbaao, T. Feia, G. Lingb, T. Guanajuna, D. Xiaolina, Antioxidant properties of extracts from juemingzi (*Cassia tora* L.) evaluated in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1072-1077 (2007)
- Jung, H. A., Hyun, S. K., Kim, H. R., Choi, J. S. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*, 72, 1292-1299 (2006)
- Kaneda, M., Morishita, E. and Shibata, S., Chemical studies on the oriental plant drugs. XXI. The constituents of *Cassia tora* L.(2). A glycoside of rubrofusarin. *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 458-461 (1969)
- Kaur, G., Alan, S., Jabbar, Z., Javed, K., Athar, M. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *J. Ethnopharmacology*, 108, 340-348 (2006)
- Kee, C. H., The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press, Boca Raton, p. 103 (1997)
- Kim, Y. M., Lee, C. H., Kim, H. G., and Lee, H. S., Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6096-6100 (2004).
- Kim J. K., Hawer, W. D., Ha, J. H., Moon, K. D. and Chang, S. K., Changes of volatile flavor components on roasting conditions in *Cassia tora* seeds. *Korean J. Food Sci Technol.*, 27, 736-741 (1995)
- Kimura y., Takido, M, and Takahasi, S., On the constituents of the seed of *Cassia tora* L. (I), *Shoyakugaku Zasshi*, 18, 28-29 (1964)
- Koo, A., Chan, W. S., Li, K. M. Extraction of hypotensive principles from seeds of

- Cassia tora*. American Journal of Chinese Medicine 4, 245-248 (1976a)
- Koo, A., Chan, W. S., Li, K. M. A possible reflex mechanism of hypotensive action of extract from *Cassia tora* seeds. *American Journal of Chinese Medicine* 4, 249-255 (1976b)
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S. Peroxynitrite mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 149-156 (1994)
- Koshioka, M., Hotta, N., Ishii, Y. and Takino, Y., Studies on the evaluation of crude drug(III), Quantitative estimation of fatty acids in *Cassia* seeds. *Shoyakugaku Zasshi*, 32, 173-176 (1978)
- Kurup, P. G., Krishnamurthy, S., A predictable relationship between total and different lipoprotein cholesterol values and triglycerides in fasting plasma of normal healthy subjects. *Medical and Nutritional Research Communication*, 28-32 (1993)
- LeBel, C. P., Bondy, S. C. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosome. *Neurochem. Int.*, 17, 435-440 (1990)
- Lee, G. Y., Jang, D. S., Lee, Y. M., Kim, J. M., Kim, J. S. Naphthopyrone Glucosides from the Seeds of *Cassia tora* with Inhibitory Activity on Advanced Glycation End Products. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 587-590 (2006)
- Lim, J. Y., Ishiguro, K., Kubo, I. Tyrosinase inhibitory *p*-coumaric acid from ginseng leaves. *Phytother. Res.*, 13, 371-375 (1999)
- Loizzo, M. R., Said A., Tundis, S., Rashed, K., Statti, G. A., Hufner, A., Menichini, F., Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme(ACE) by Flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa*. *Phytotherapy Research*, 21, 32-36 (2007)
- Maity, T. K., Mandal, S.C., Bhakta, T., Pal, M., Saha, B.P., Metabolism of 1,8-dihydroxy 3-hydroxy methyl anthraquinone isolated from the leaves of *Cassia tora* in albino rats. *Phytotherapy Research*, 15, 459-460 (2001)
- McFarlane, S. L., Kumar, A. and Sowers, J. R. Mechanisms by which angiotensin-

- converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.*, 91(suppl), 30H-37H (2003)
- Menconi, M. J., Unno, N., Smith, M., Aguirre, D. E., 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)
- Nakagawa K, Ueno A, Nishikawa Y. Interactions between carnosine and captopril on free radical scavenging activity and angiotensin-converting enzyme activity *in vitro*. *Yakugaku zasshi*, 126, 37-42 (2006)
- Nonoyama, N., Chiba, K., Hisatome, K., Suzuki, H., Shintani, F. Nitration and hydroxylation of substituted phenols by peroxynitrite. Kinetic feature and an alternative mechanistic view. *Tetrahedron Lett.*, 40, 6933-6937 (1999)
- Paoletti, R., Comparative studies on hypercholesterolemic agents. *American Journal of Clinical Nutrition*, 10, 277-284 (1962)
- Patil, U. K., Saraf, S., Dixit, V. K., Hypolipidemic activity of seeds of *Cassia tora* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 249-252 (2004)
- Ragaunathan, K., Harihararo, V. and Rangaswaki, S., Chrysophanol-I- β -gentiobioside, a new anthraquinone glycoside from *Cassia tora* Linn. *Indian J. Chemistry*, 12, 1251-1253 (1974)
- Shibata, S., Morishita, E., Kaneda, M., Kimura, Y., Takido, M. and Takahashi, S., Chemical of studies on the oriental plant drugs. XX. The constituents of *Cassia tora* L.(1), The structure of torachrysone. *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 454-457 (1969)
- Tabata, M., Hiraoka, N., Ikenouse, M., Sano, Y. and Konoshima, M., The production of anthraquinones in callus cultures of *Cassia tora*. *J. Nat. Prod*, 38, 131-134 (1975)
- Takahasho, S. and Takodo, M., Studies on the constituents of *Cassia tora* L. II.(on the purgative crude drugs. VII). The structure of the new naphtho-a-pyrone derivative, toralactone. *Yakugaku Zasshi*, 93, 261-267 (1973)

- Tamba, M. and Torreggiani, A. Free radical scavenging and copper chelation : a potentially beneficial action of captopril. *Free Radic. Res.*, 32, 199-211 (2000)
- Tiwari, R. D., Behari, J. R., Chemical examination of roots of *Cassia tora*. *Planta Medica*, 21, 393-397 (1972)
- Wang, H. Joseph, J. A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 612-616 (1999)
- Wong, S. M., Wong, M. M., Seligmann, O., and Wagner, H., New antihepatotoxic naphtho-pyrone glycosides from the seeds of *Cassia tora*. *Planta Med.*, 55, 276-280 (1989b).
- Yen, G. C., Chung, D. Y., Antioxidant effects of extracts from *Cassia tora* L. prepared under different degrees of roasting on the oxidative damage to biomolecules. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 1326-1332 (1999)
- Yen-Choi, H. S., Kim, J. H. and Takido, M. Potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources, V. Anthraquinones from seeds of *Cassia obtusifolia* and related compounds. *J. Nat. Prod.*, 53, 630-633 (1990)
- Zhang, Z. and Yu, B., Total synthesis of the antiallergic naphtho- α -pyrone tetraglucoside, cassiaside C2, isolated from *Cassia* seeds. *J. Org. Chem.*, 68, 6309-6313 (2003).

감사의 글

과정 동안 관심과 사랑으로 후원해 주신 많은 분들께 진심으로 감사드립니다. 대학원 생활은 지금까지 겪어보지 못했던 많은 일을 경험했던 시간이었습니다. 힘들기도 했지만 앞으로 살아가는데 필요한 마음가짐과 전공에 대한 깊이 있는 공부를 할 수 있었던 소중한 시간이었습니다. 그 시간 동안 격려해 주시고 학문에 대한 자세와 열정을 가르쳐 주셨던 지도교수님이신 최재수 교수님께 가장 먼저 감사드립니다. 그리고 바쁘신 시간 중에 논문을 심사해 주신 변대섭 교수님, 김형락 교수님과 많은 가르침을 주신 최진호 교수님, 남택정 교수님, 류홍수 교수님, 류은순 교수님께도 감사드립니다. 또 학부 4년 동안 저를 가르쳐 주셨던 동의대학교 식품영양학과 은사님과 조교생활 3년 동안 후원해 주셨던 평생교육학과 교수님들께도 깊은 감사의 뜻을 전합니다.

실험실에서 생활하는 동안 서로에 대한 배려와 연구에 대한 열정을 배울 수 있었습니다. 실험에 대해 전혀 몰랐던 저에게 많은 도움을 주고 큰 힘이 되어 준 현숙경 선배와 짧은 시간이었지만 동고동락하며 많은 것을 배울 수 있었던 정현아, 정유정, 윤나영 선배와 정다미에게도 고마움을 전합니다. 또 2년 반 동안의 시간 동안 의지하고 같이 달려온 김혜란, 정은진과 교육대학원 후배들에게도 감사하며 앞으로도 서로에게 보탬이 되는 소중한 인연으로 이어갔으면 좋겠습니다. 그리고 항상 따뜻한 관심으로 힘이 되어 주었던 보고 싶은 지인들과 많은 추억을 공유하고 있는 동의대학교 인문대 조교들에게도 고마움을 전합니다.

마지막으로 늦게까지 공부하는 딸을 아무 말 없이 지원해 주셨던 든든한 버팀목인 부모님과 동생들에게 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

감사합니다.

2007년 7월

이 향 드림