

碩士學位論文

제주산

자금우(*Ardisia japonica* Blume.)를

이용한 생리활성 검색



濟州大學校 大學院

化學科

金 俸 奭

2002年 12月

제주산

자금우(*Ardisia japonica* Blume.)를

이용한 생리활성 검색

指導教授 鄭 憲 商

金 俸 奭

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2002年 12月

金俸奭의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ 印

委 員 \_\_\_\_\_ 印

委 員 \_\_\_\_\_ 印


濟州大學校 大學院

2002年 12月

Screening of Bioactivity  
using *Ardisia japonica* Blume. in Jeju

Bong-Seok Kim

(Supervised by Professor Duk Sang Jung)

 제주대학교 중앙도서관  
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE  
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 12.

## ABSTRACT

We searched a menstruation activity with various ways with a methanol extract of the *Ardisia japonica* which we collected in Jeju island.

The *Ardisia japonica* displayed radical activity measurement and acetylcholinesterase suppression activity measurement and an activity to have excelled in  $\alpha$ -glucosidase activity measurement. Divided a methanol extract of *Ardisia japonica* into  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  layer and *n*-BuOH layer,  $\text{H}_2\text{O}$  layer, and measured a bioactivity.

Therefore, Study about a methanol layer of the *Ardisia japonica* has to be continuously progressed.



# 목 차

ABSTRACT .....	i
목 차 .....	ii
List of Figures .....	iii
List of Tables .....	iv
Abbreviation .....	v
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 실험재료 .....	5
2. 시약 및 기기 .....	5
3. 실험방법 .....	6
1) 라디칼 소거 활성 측정 .....	6
2) Acetylcholinesterase 억제 활성 측정 .....	6
3) $\alpha$ -glucosidase 활성 측정 .....	7
4) 암세포 증식 억제 효과 측정 .....	8
5) Inflammatory cytokine 억제 효과 측정 .....	8
6) 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	9
III. 결과 및 고찰 .....	13
1) 80% 메탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 라디칼 소거 활성 .....	13
2) 각 용매 분획들의 acetylcholinesterase 억제 활성 .....	17
3) $\alpha$ -glucosidase 활성 .....	20
4) 암세포 증식 억제 효과 .....	21
5) Inflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ ) 억제 효과 .....	22
6) 유효성분에 대한 분리 .....	23
IV. 결 론 .....	26
V. 참 고 문 헌 .....	28

## List of Figures

Figure 1. Isolation procedure of <i>Ardisia japonica</i> .....	11
Figure 2. Isolation procedure of fr. B1-1 by Prep-TLC with CHCl <sub>3</sub> /MeOH /H <sub>2</sub> O (2 /8 /0.2) .....	12
Figure 3. Proposed mechanism for the formation of oxidative stress <i>in vivo</i> .....	15
Figure 4. DPPH radical scavenging effects of <i>Ardisia japonica</i> .....	15
Figure 5. Radical scavenging effect to have been based on each concentration of MeOH Ext. and BuOH layer of <i>Ardisia japonica</i> .....	16
Figure 6. The active site and catalytic mechanism of consists of two subsites. ....	17
Figure 7. Ellman's assay for determination of AChE activity .....	19
Figure 8. Inhibitory effect of several extracts of <i>Ardisia japonica</i> on the growth of HL-60 cells .....	22
Figure 9. <sup>1</sup> H NMR data of B1-1 in CD <sub>3</sub> OD .....	24
Figure 10. <sup>13</sup> C NMR data of B1-1 in CD <sub>3</sub> OD .....	25

## List of Tables

Table 1. Some characters of reactive oxygen species or its derivatives .....	14
Table 2. DPPH radical scavenging effects of <i>Ardisia japonica</i> and Vit. C and Vit. E .....	16
Table 3. DPPH radical scavenging effects of several extracts of <i>Ardisia japonica</i> .....	16
Table 4. Acetylcholinesterase inhibition effects of several extracts of <i>Ardisia japonica</i> .....	18
Table 5. The activity measurement results of $\alpha$ -glucosidase .....	21
Table 6. TNF- $\alpha$ suppression effect measurement results to have been based on each layer of <i>Ardisia japonica</i> .....	23

## Abbreviation

DTNB : 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrayl

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide





## I. 서 론

현대 문명이 발달하면서 인간은 각종 편리함 속에서 살게 되었고 그 편리함속에 살아가면서 점차 건강에 대한 관심을 가지게 되었다. 과거의 주요 사망원인이었던 여러 질병들이 공중위생과 의료기술의 발달로 인해 치료가 가능해지면서 인간의 수명이 연장되어 인류는 노령화 시대에 접어들게 되었다. 노령인구가 증가함에 따라 노화, 치매, 당뇨, 암 등이 대표적인 질병으로 대두되기 시작하였다.

최근에 인간 누구에게나 찾아오는 생체기능의 불가항역적이라고 여겨지는 노화에 대해 많은 관심을 가지게 되었다. 노화의 원인중의 하나는 산소에 의한 것인데, 산소는 호흡을 통하여 에너지를 체내에 공급하도록 하는 등 생명 유지에 절대적으로 필요한 요소이지만 에너지 생성과정, 정상적인 신진대사과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성산소(active oxygen)를 생성하게 된다. 과잉 생성된 활성 산소는 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 즉, 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨스병 등의 뇌질 환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류머티스, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 활성산소에 의한 지질의 산화 결과 생성되는 지질과 산화물을 비롯하여 여러 가지 체재 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기함으로써 노화와 질병의 원인이 되기도 한다. 이러한 것을 방지할 수 있는 항산화 물질로는 SOD(superoxide dismutase), GPx (glutathione peroxidase), metal binding proteins, metal Se, GR(glutathionereductase) 등이 있으나 오래 전부터 인간이 이용해 오면서 안정성이 인정되고 있는 천연 약용 식물에서 합성 항산화제를 대체할 수 있는 새로운 천연 항산화제를 얻고자 하는 노력이 지속적으로 진행되어 왔다. 대표적인 천연 항

산화제는 vitamin E(tocopherol), C(ascorbate) , $\beta$ -carotenoid, albumin, uric acid, bilirubin등이 알려져 있다.<sup>1,2,3)</sup>

노령 인구의 급격한 증가로 인해 21세기 보건의료분야의 중요한 과제로 대두되고 있는 Alzheimer 질병은 중추신경계(central nervous system : CNS)에 이상이 생겨, 초기증상으로 기억력 감퇴와 언어 장애를 일으키고 병이 진행됨에 따라 주위의 도움 없이는 아무 것도 할 수 없게 돼 결국 죽음에 이르게 되는 무서운 병이다. 현재 북미, 유럽뿐만 아니라 아시아 각 국에서도 수많은 환자가 고통을 받고 있다. 산업과 의료기술이 발전함에 따라 인류의 평균수명이 늘어나고 이에 따라 치매 환자는 급격히 늘고 있으며, 우리 나라에서도 계속 환자가 증가하고 있다. 치매 환자의 비율은 연령에 따라 변하는데 85세 이상은 약 30%정도가 환자인 것으로 나타나고 있다. 이처럼 많은 환자가 발생하면서 나타나는 직접적인 의료비용 외에도 이들을 돌보는데 따른 인력의 손실과 생산성 저하 등을 고려하면 사회적, 경제적 손실은 이루 계산할 수 없는 정도이다. 따라서 세계 각국은 국가적 차원에서 치매 치료제 개발을 지원하고 있으며 우수한 제약사들도 치매약제 개발에 많은 인력과 연구비를 투자하고 있다. Alzheimer 질병은 인식기능의 기초역할을 하는 기저부 전뇌(forebrain)에 존재하는 콜린효능성 신경의 퇴화와 관련이 있다. 그래서 Alzheimer 환자에게는 acetylcholine 합성 감소, cholineacetyltransferase와 acetylcholinesterase 효소들의 활성감소, choline 섭취감소가 나타나면서 질병이 발생하게 되고 이에 따라 여러 가지 치료법이 개발되어 오고 있으며 최근에는 천연물을 이용한 치매치료제를 개발하고자 하는 연구가 가속화되어 지고 있다.<sup>4-12)</sup>

또 문명의 발달로 식생활의 변화에 따른 질병인 당뇨병(diabetes mellitus)은 그 환자가 지속적으로 증가하는 추세이다. 당뇨병은 정상의 경우 섭취한 음식물은 대부분 포도당으로 바뀌고, 혈액은 이 포도당을 몸을 구성하고 있는 세포로 운반해 준다. 포도당이 세포 속으로 이동하는데는 인슐린이 필요하다. 당뇨병은 인슐린이 제대로 만들어지지 않거나 작용을 하지 못하기 때문에 포

도당이 세포 내로 이동되지 못해 발생하는 것이다. 세포 속으로 운반되지 못한 포도당은 그대로 혈액 속에 남아 있게 되어 혈액은 당이 많은 고혈당 상태가 되고 소변으로 배출되는 것이다. 당뇨가 지속되면 백내장, 동맥경화, 위장질환, 방광염 등의 합병증의 원인 되기도 한다. 이러한 당뇨병은 일단 발병하면 완치가 어렵다. 당뇨가 혈당과 밀접한 관계가 있기 때문에 혈당을 효과적으로 조절하기 위해서 도입된 가장 직접적인 방법은 식후 혈당 증가의 내적 요인인  $\alpha$ -glucosidase를 특이적으로 억제하는 약물을 투여하여 탄수화물의 가수분해를 억제함으로써 식후 혈당의 증가를 억제하는 하게 되는데 최근에는 천연물에서 이  $\alpha$ -glucosidase에 저해 효과를 가진 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>13-14)</sup>

그리고, 식생활의 변화와 환경오염 등으로 인류가 갖게되는 또 하나의 질병인 암 역시 그 환자의 수가 전세계적으로 계속 증가하고 있는 추세이며, 효과적인 치료법이 절실히 요망되고 있다. 이러한 암 질환의 치료법에는 수술요법, 방사선요법과 항암 화학요법이 주로 사용되어 왔다. 의학기술 발달로 인하여 다양한 방법으로 암 치료가 개선되기는 했으나 만족 할 만한 치료효과는 이루어지지 않고 있다. 이러한 한계성을 극복하는 문제와 관련하여 최근에는 민간에서 오랫동안 사용되고 있는 천연물에서 항암물질을 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>15)</sup>

본 연구에서는 제주의 자생식물인 자금우의 메탄올 추출물을 이용하여 DPPH 라디칼을 소거하는 능력과 acetylcholinesterase 억제활성을 중심으로 항당뇨, 항암, 항염 등 여러 가지 생리활성을 검색하였다.

자금우(紫金牛)는 자금우과의 늘푸른 떨기나무 자금우, *Ardisia japonica* Blume.의 지상부이다. 자금우는 일본, 대만, 중국 및 우리 나라 제주도, 남부지방, 다도해 섬지방의 해발 500~1,300m 지역 대개는 저지대산지(低地帶山地)의 상록수림 밑 그늘에 흔히 자생(自生)한다. 자금우는 상록소관목(常綠小灌木)이며 높이 15~20cm이고 지하경(地下莖) 끝이 지상으로 올라와서 지상경

(地上莖)으로 되며 비스듬히 자라고 어린 가지의 끝 부근에 선모(腺毛)가 있으며 다른 부분에는 털이 없다. 잎은 윤생(輪生)하거나 대생(對生)하며 타원형 또는 난형이고 첨두(尖頭)이며 예저(銳底)로서 길이 6~13cm, 너비 2~5cm이고 가장자리에 잔 톱니가 있다.

6월에 꽃이 피고 꽃은 백색이며 양성(兩性)으로 화서(花序)는 엽액(葉腋) 또는 포액(苞腋)에 산형(傘形)으로 달리고 밑으로 처지며 화서(花序)에 선모가 있고 화경(花梗)은 길이 10mm이하이며 2~3개의 꽃이 달린다. 꽃받침 잎은 난형이고 첨두이며 녹모(綠毛)가 있고 화관(花冠)은 수레바퀴 모양이며 5개로 갈라진 열편은 끝이 뾰족하고 흑색 점이 있다. 9월에 열매가 성숙되며 핵과는 편구형이고 지름 10mm 정도이며 붉은 색으로 익고 다음해 꽃이 필 때까지 달려있다. 현재까지 자금우의 밝혀진 성분으로써는 주성분은 bergenin이며 triterpene 화합물, tannin, quercitrin, myricitrin, ilexol 등이 함유되어 있다고 밝혀져 있다.

자금우(*Ardisia japonica*)는 한방에서 비교적 좋은 진해·거담작용을 나타내는데, 특히 폐열(肺熱)로 인한 해수, 호흡촉급(呼吸促急), 가래가 많을 때에 단방으로 달여서 복용한다. 습열(濕熱)로 인한 황달에 쓰고, 이뇨작용이 있어서 급만성신우신염에 쓰인다. 얼굴과 눈이 부은 증상에도 유효하다. 어혈(瘀血)로 인한 동통(疼痛) 제거로 타박상, 사지마비동통, 관절염 및 굴신이 자유스럽지 못한 데 쓰인다. 활발한 혈액 순환 작용으로 월경폐색으로 인한 복통을 치료한다고 알려져 있다.<sup>16-18)</sup>

지금까지 자금우(*Ardisia japonica*)의 대한 연구는 많이 진행되어 있지만 다양한 방법에서의 생리활성에 대한 연구는 그다지 많지 않다.

이에 본 연구의 목적은 자금우의 항산화 효과를 나타내는 물질과 acetylcholinesterase 억제활성 및 여러 가지 방법으로 활성을 검색하고 유효성분을 분리하는데 있다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 자금우는 제주도 북제주군 조천읍 선흘리에 자생하는 것을 2000년 9월에 채취하여 수세한 후, 통풍이 잘 되는 곳에서 음건한 후 세절하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기



본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co., Junsei Co., Hyman Co.의 제품을 사용하였다. 항산화 활성 측정시 사용한 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)은 Aldrich Co.의 제품을 사용하였고 acetylcholinesterase 억제 활성 측정시 사용한 acetylcholinesterase(E.C.3.1.1. 7), 기질로 사용한 acetylthiocholine, 그리고 coupling agent로 사용한 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)는 모두 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였다. 완충용액으로는 0.1 M, pH 7.3, 0.1 N NaCl을 포함한 sodium phosphate를 사용하였다. 또한  $\alpha$ -glucosidase 활성 시험에 사용된  $\alpha$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside는 Sigma Co.의 제품을 사용하였다. 자외선 분광광도계는 Hewlett Packard 8453을 사용하였고, 유효성분 분리 과정에서는 Normal-phase silicagel column chromatography에는 Silica gel 60(230-400 mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC는

precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F<sub>254</sub>. 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3 % KMnO<sub>4</sub>, 20 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25 % NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. HPLC는 Waters 2487(Dual  $\lambda$  absorbance detector, Waters)를 사용하였고, ODS column(Prep Nova-Pak HR C18, 7.8×300 mm column)을 장착하여 분리했다. 구조분석에 이용되는 NMR은 JNM-LA 400 (FT NMR system, JEOL)을 이용하였다.

### 3. 실험방법

#### 1) 라디칼 소거 활성 측정<sup>19)</sup>

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 약 2 mg을 에탄올 15 ml에 녹여 DPPH용액을 제조하였다. 이 용액 200  $\mu$ l에 Dimethyl sulfoxide 500  $\mu$ l와 EtOH 300  $\mu$ l를 첨가시키고 준비된 용액을 UV-Visible spectrophotometer를 이용하여 517 nm의 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94 - 0.97이 되도록 적당량의 에탄올을 첨가하면서 조정하였다. 실험에 사용할 농축된 시료 1 mg에 메탄올 1 ml를 섞은 후 충분히 녹이고 준비된 DPPH용액 450  $\mu$ l에 시료용액 50  $\mu$ l 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분동안 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 효과는 DPPH의 흡광도가 50 % 감소할 때 나타나는 시료의 농도(RC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

#### 2) Acetylcholinesterase 억제 활성 측정<sup>20)</sup>

효소활성은 Ellman 방법<sup>21)</sup>을 사용하여 측정하였다. 측정에 앞서 농도가 0.1

M이고 pH 7.3인 sodium phosphate 완충용액 1 ℓ를 제조하였고 반응의 기질인 acetylthiocholine의 농도와 DTNB의 농도는 5 mM로 하여 10 ml를 제조하였고 효소를 10 unit를 제조하였다. 흡수파장은 412 nm로 하였다. 반응속도는 60초 동안의 초기속도를 측정하였다. 효소억제 활성은 기준반응(control reaction :  $1.5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3}$  Au/sec)에 대한 억제반응의 초기속도비로 하였다. acetylcholinesterase 억제 활성 검색은 다음과 같이 측정하였다.

$$inhibition(\%) = 100 - \left( \frac{S.T.}{C.T.} \times 100 \right)$$

S.T.는 효소 control test 값이고 C.T.는 Sample test 값이다.

### 3) $\alpha$ -glucosidase 활성 측정<sup>14)</sup>

#### ① 특이적 $\alpha$ -glucosidase (p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)

##### 활성 측정

자금우의 메탄올 추출물을 이용하여 2 mM의 기질에 조효소액 및 검액을 가하여 30분간 배양 후, 1 M glycine-NaOH (pH 9.0)로 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 405 nm에서 상등액 0.8 ml의 흡광도를 측정하였다.

#### ② maltase와 sucrase 활성 측정

조효소액, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0), 기질(maltose는 2 mM, sucrose는 10 mM) 및 검액을 가하여 40분간(sucrose는 3시간) 37 °C에서 배양한 다음, 끓는 수욕상에서 효소를 불활성화시키고 원심 분리하여 상등액 0.1 ml에 O-phenyenediamine 5 mg/100 ml, peroxidase 0.5 mg/100 ml, glucose oxidase 0.1 mg/100 ml 등으로 조제한 반응액 0.75 ml를 가하여 30분간 배양후, 1 N HCl을 가하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 암세포 증식 억제 효과 측정<sup>15)</sup>

전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포주를 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10 %의 fetal bovine serum(FBS)가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37 °C, 50 % CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하여 세포를 배양하였다.

세포의 대사활성 측정은 HL-60 세포를 3.2×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 96 well plate의 각 well에 넣고, 시료를 100 µg/ml의 농도로 첨가하였다. 이를 4일간 배양 한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 110 µg을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide 150 µl를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장 억제 정도를 조사하였다.

#### 5) Inflammatory cytokine (TNF-α) 억제효과 측정<sup>22-23)</sup>

시험약물 및 추출물은 EtOH : PBS(1:1)로 조제된 vehicle을 100 %로 하여 녹인 후 다시 배지를 이용하여 각각의 농도로 희석하였다. 또한 약물 처리시 각 Well당 vehicle의 농도는 세포의 TNF-α 생성분비에 영향을 미치지 않는 0.2 % 이하로 하였다. in vitro TNF-α 생성 및 정량은 Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포를 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)과 5 %의 FBS를 함유하는 RPMI1640배지를 이용해서 1×10<sup>6</sup> Cell/ml로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고, 5 % CO<sub>2</sub> 및 37 °C에서 18시간 동안 전배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50 µl와 450 µl의 Lipopolysaccharide(최종농도 1 µg/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 4.5시간 후 배양 배지



를 원심분리(12,000 rpm, 3분간)하여 상층액을 얻고 정량 전까지  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  이하에서 보관하였다. TNF- $\alpha$ 의 정량은 ELISA kit를 이용하여 정량 하였다.

## 6) 시료의 추출 및 유효성분 분리

### ① 자금우로부터의 유효성분 분리 과정

제주도 북제주군 조천읍 선흘리 일대에서 자생하는 자금우 전초를 채집하여 이물질을 제거하고 깨끗하게 씻어 통풍이 잘 되는 곳에서 건조한 후 미세분말로 파쇄하여 시료로 사용하였다. 자금우의 분말 1224 g을 80 % 메탄올 12 L에 침적하고 실온에서 3개월간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였다. 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 2회 반복 실시하였다. 이렇게 얻어진 여액을  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 회전농축기를 이용 농축하여 80 %메탄올 추출물 185 g을 얻었다. 이 80 % 메탄올 추출물 중 6.4 g을 취하여 dichloromethane과 60 % 메탄올을 사용하여 용매분획하였다. dichloromethane 층(1.1 g)과 60% 메탄올층(5.2 g)으로 용매분획하였다(Figure 1). 이렇게 얻어진 유기용매 분획들 가운데 60 % 메탄올층을 다시 증류수에 현탁하고 separatory funnel에서 n-BuOH를 사용하여 n-BuOH층과  $\text{H}_2\text{O}$ 층으로 용매분획하였다. 이들 분획 중 n-BuOH층(2.1 g)을 가지고 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 % 메탄올을 사용하여 reverse-phase column chromatography로 각각의 분획들로 분리하였다. 이 중 60 %, 80 % 메탄올 분획을 sephadex LH-20을 가지고 column chromatography와 preparative silica TLC를 이용하여 UV-Visible에 활성을 보이는 4개의 분획을 얻었으며 이 분획중 fr. B1-1을 NMR 기기로 확인하였다.

### ② Reverse-phase column chromatography에 의한 분리과정

과정 ①에서 얻어진 각 분획들을 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 % 메탄올을 순차적으로 사용하여 reverse-phase column chromatography( $3\times 15$ , Silica

gel 100 C18- Reversed phase)로 분리하였다. 이렇게 얻어진 fraction들을 회전농축기로 농축하여 각각 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 % 메탄올의 4개의 분획들을 얻을 수 있었다(Figure 1).

### ③ Prep TLC에 의한 분리과정

과정 ②에서 얻어진 분획들을 sephadex LH-20 column chromatography(전개용매 : 80 % MeOH)를 통해 얻어진 분획들을 TLC plate(20 PLC plates 20 ×20cm, Silica gel 60 F<sub>254</sub>. 0.5mm)를 사용하여 TLC chamber에서 전개용매(CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O = 2 /8 /0.2 )로 전개시켜 4개의 분획들을 얻을 수 있었다(Figure 2).



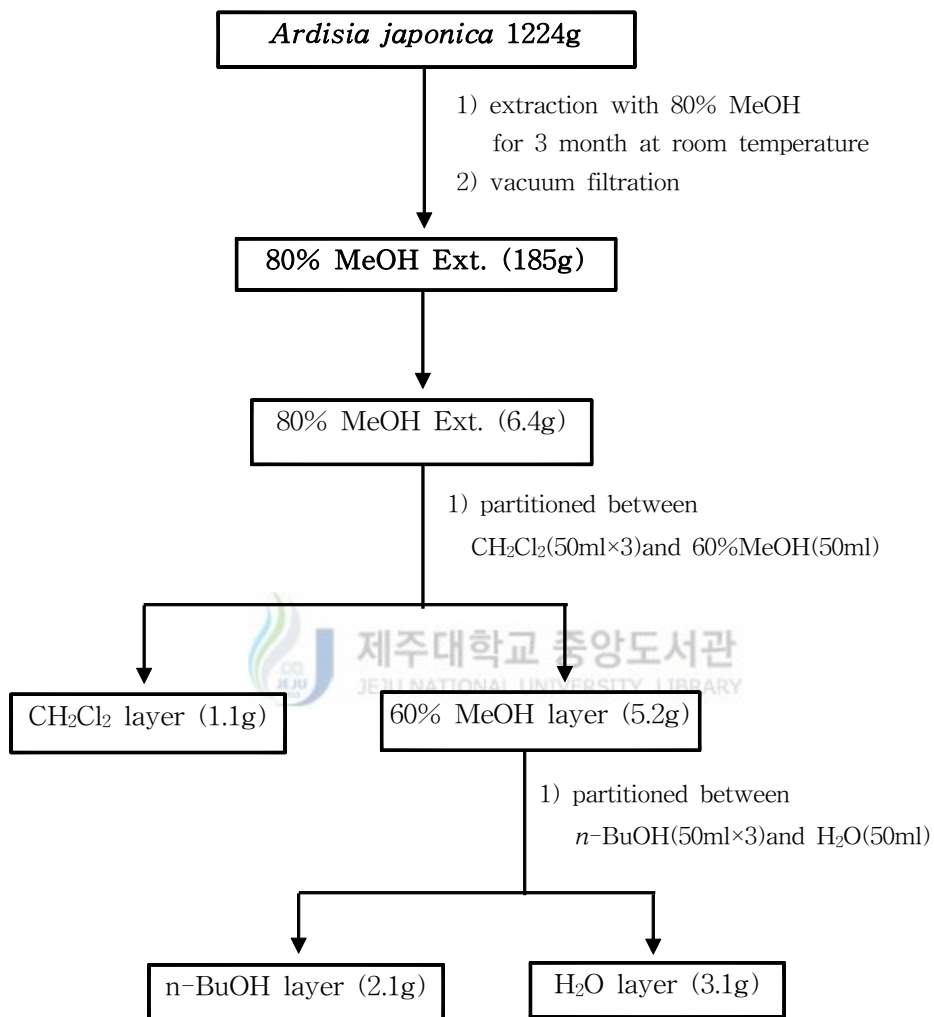


Figure 1. Isolation procedure of *Ardisia japonica*

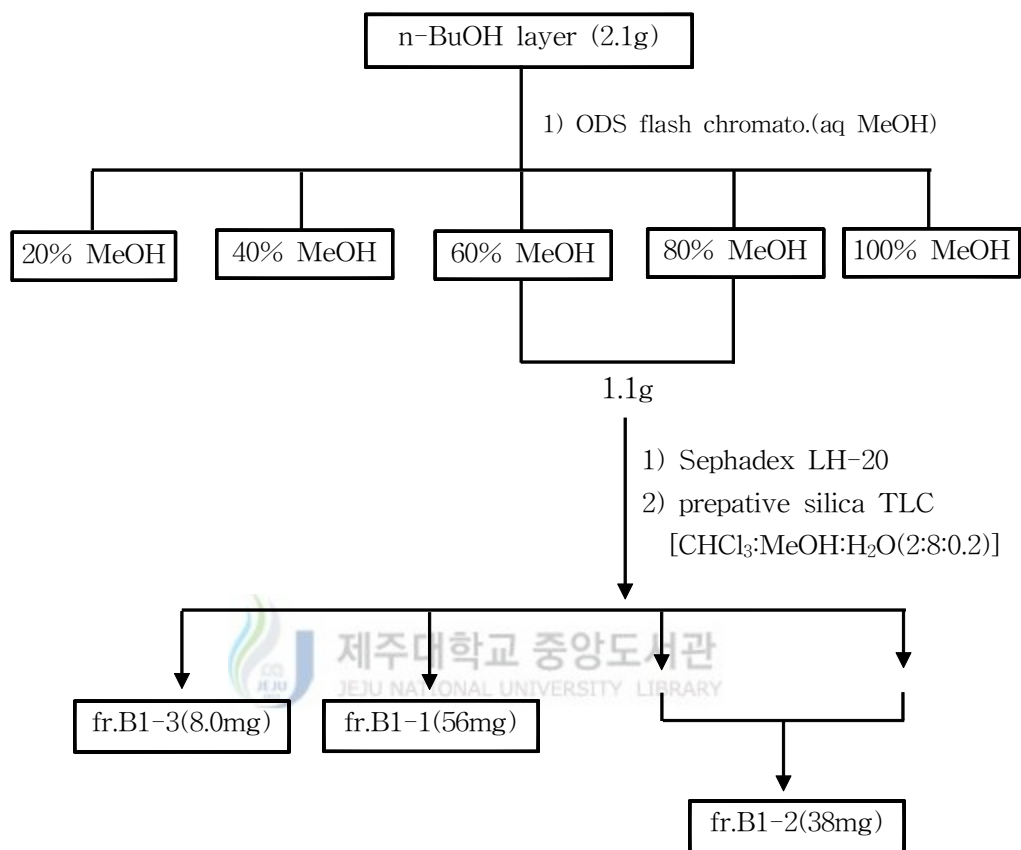


Figure 2. Isolation procedure of fr. B1-1 by Prep TLC with  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2 / 8 / 0.2)

### III. 결과 및 고찰

#### 1) 80 % 메탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 라디칼 소거 활성

자금우 건조분말(1224 g)을 80 % MeOH로 추출한 후, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>와 60 % MeOH을 사용하여 각각 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층과 60 % MeOH층으로 용매분획하였다. 이렇게 얻어진 60 % MeOH층을 다시 n-BuOH층과 H<sub>2</sub>O층으로 용매분획하였다.

라디칼 소거 활성 능력 측정에 사용된 DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical 화합물로서, 시료에 의하여 라디칼이 제거되면 UV 분광기에서 517 nm의 흡수파장이 사라지게 된다.

생체내에서 생성되는 free radical은 최외각 전자껍질에 짝짓지 않은 전자(unpaired electron)를 포함하는 화학종으로 대체로 강한 반응성을 나타낸다. 이들은 탐식작용, prostaglandin 합성과 같은 생리적 과정에서뿐만 아니라 많은 효소촉매반응의 중간물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 강한 반응성 때문에 인접한 세포성분들을 무차별 공격하여 손상을 일으킬 수 있다. 이러한 free radical은 여러 환경적의 원인으로부터 질병이 나타날 수 있다 (Table 1, Figure 3). 생체는 free radical을 소거함으로써 자신을 보호하는 항산화제들(antioxidants)을 가지고 있으며 본 실험에서는 용매분획과정에서 얻어진 세 개의 용매분획층을 가지고 제조된 DPPH용액 200  $\mu$ l에 Dimethyl sulfoxide 500  $\mu$ l와 EtOH 300  $\mu$ l를 첨가시키고 준비된 용액을 UV-Visible spectrophotometer을 이용하여 517 nm의 파장에서 대조군의 흡광도가 0.94-0.97이 되도록 적당량의 메탄올을 첨가하면서 조정하였다. 실험에 사용할 농축된 시료 1 mg에 메탄올 1 ml를 섞은 후 충분히 녹이고 준비된 DPPH 용액 450  $\mu$ l에 시료용액 50  $\mu$ l 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분동안 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Species	Chemical symbol	Properties
Superoxide anion	$O_2^{\cdot -}$	Good reductant, poor oxidant
Silgle oxygen	$^1O_2$	Powerful oxidizing agent with a half-life of $10^{-6}$ sec
Hydroxyl radical	$HO \cdot$	Extremely reactive addition abstraction and electron transfer reactions
Perhydroxyl radical	$HO_2 \cdot$	Stronger oxidant and more lipid soluble than superoxide
Peroxyl radical	$ROO \cdot$	Low oxidizing ability relative to $HO \cdot$ but greater diffusibility
Alkoxy radical	$RO \cdot$	Intermediate in its reactivity with lipid between $ROO \cdot$ and $HO \cdot$
Hydrogen peroxide	$H_2O_2$	Oxidant but reactions with organic substrates are sluggish High diffusion capacity

Table 1. Some characters of reactive oxygen species or its derivatives<sup>1)</sup>

그 결과 대조군으로 사용된 대표적인 항산화 물질인 비타민 C, 비타민 E와 자금우 메탄올 추출물을 비교한 결과 자금우 메탄올 추출물이 활성산소 소거 효과가 탁월함을 확인하였다(Figure 4, Table 2). 또한 자금우 메탄올 추출물의 용매분획층을 같은 방법으로 활성산소 소거 효과를 측정한 결과 *n*-BuOH 층이 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층과 H<sub>2</sub>O층보다 우수한 효과를 보임을 확인하였다(Table 3).

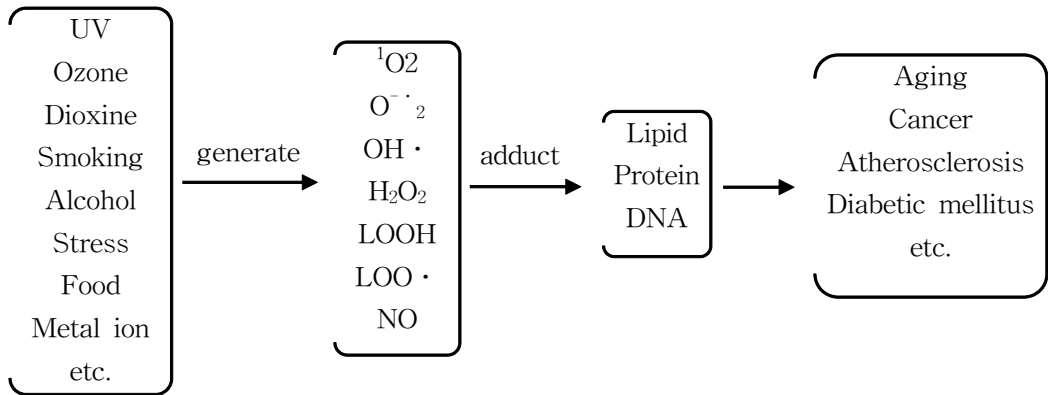


Figure 3. Proposed mechanism for the formation of oxidative stress *in vivo*<sup>1)</sup>

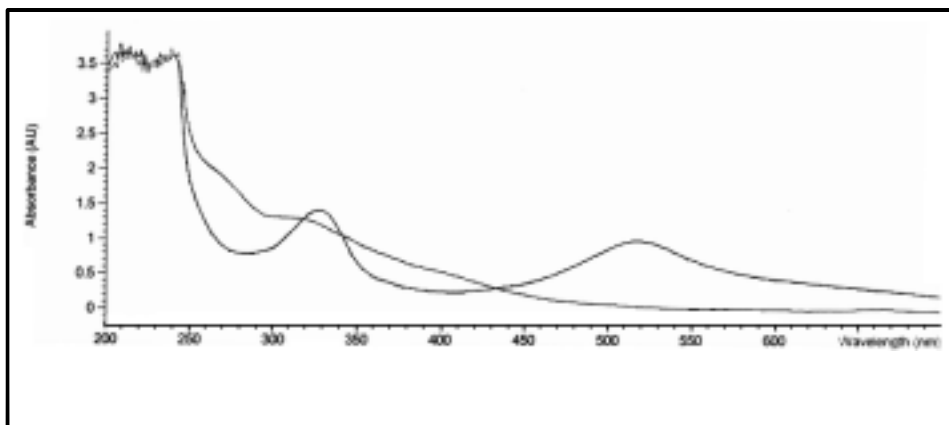


Figure 4. DPPH radical scavenging effects of *Ardisia japonica*

	Antioxidative activity against DPPH(RC <sub>50</sub> )
Vit.C	3
Vit. E	17
자금우	8.9

Table 2. DPPH radical scavenging effects of *Ardisia japonica* and Vit.C and Vit .E

Fraction	Antioxidative activity against DPPH (RC <sub>50</sub> )
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45.5
n-BuOH	5.6
H <sub>2</sub> O	22.0

Table 3. DPPH radical scavenging effects of several extracts of *Ardisia japonica*

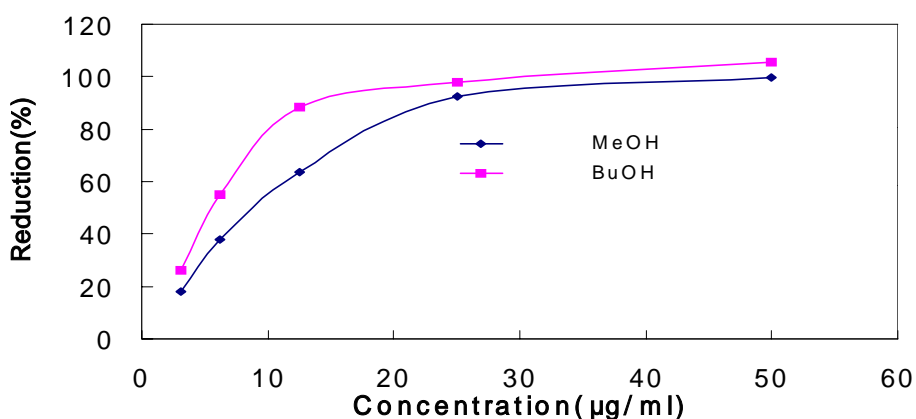


Figure 5. Radical scavenging effect to have been based on each concentration of MeOH Ext. and BuOH layer of *Ardisia japonica*



## 2) 각 용매 분획들의 acetylcholinesterase 억제 활성

Acetylcholinesterase (acetylcholine hydrlase, EC3.1.1.7)는 신경세포와 신경근접합부를 지나는 신경세포간 접합부위 회로 등의 신경전달신경계에서 중요한 효소로 신경전달물질인 acetylcholine을 acetate와 choline으로 가수분해시킨다. 신경근접합부 전막에 신경자극이 도착하면 신경접합부 틈에서 acetylcholine방출을 유도하며, acetylcholine는 신경근접합부 후막에서 확산되어 특정 수용체들에 의해 결합되어진 후, 이 효소에 의해서 가수분해되고 신경근접합부 후막의 편극화에 의해서 재저장된다.<sup>24-25)</sup>

Acetylcholinesterase의 활성자리는 alcohol부분에 관계된 특성을 결정하는 anionic site와 실제 촉매과정에 관여하는 esteratic site로 이루어져 있다 (Figure 6).

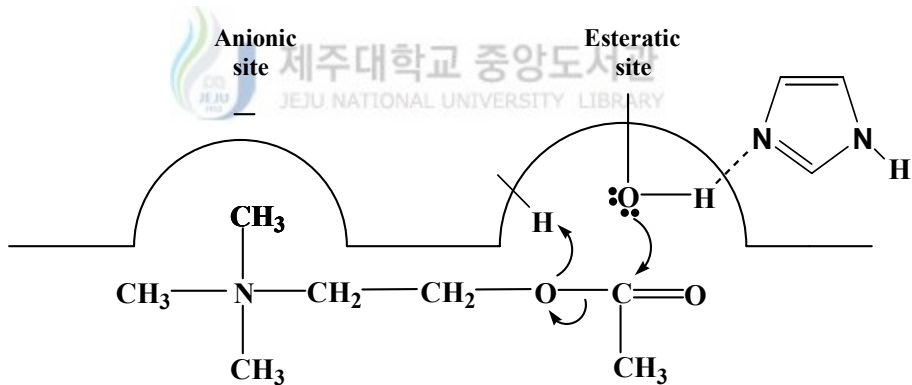


Figure 6. The active site and catalytic mechanism of acetylcholinesterase consists of two subsites.

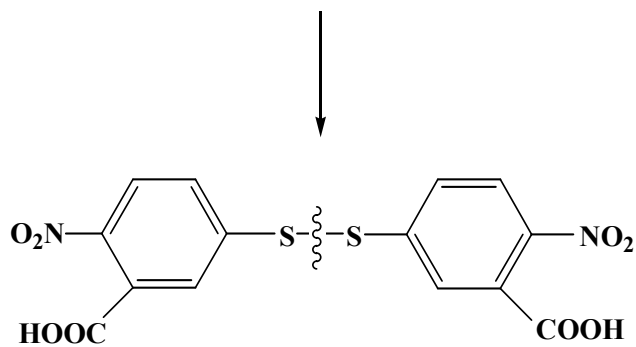
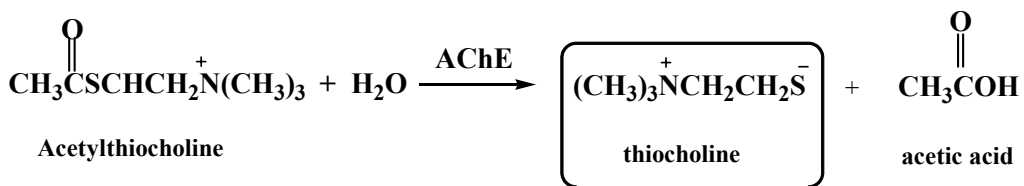
Anionic site는 이름이 암시하는 것처럼 acetylcholine의 부분적으로 양성인 4차 암모늄 머리 쪽을 선호하는 전기적으로 음성인 자리이다. acetylcholine의 대부분의 결합은 anionic site의 쿨롱 및 소수성 상호작용의 합이 가장 크며

이는 단순히 기질을 결합하고 배양하는데 제한되지 않고 스스로 큰 촉매효과를 가진다. Esteratic site에 존재하는 serin 잔기의 수산기는 친핵체로서, histidine의 imidazole은 serin 잔기의 친핵성도를 증진시키는 general base로서 작용하고 proton은 choline dipolar ion보다는 이탈기로 만들기 위해 전달되는 촉매로서 역할을 하여 acetylcholine를 choline과 acetyl enzyme으로 가수분해 시킨다.<sup>26-27)</sup> Esteratic site의 acetyl enzyme 유도체가 촉매과정에 포함되므로 이 자리 주위 구조가 길질의 산 기능에 관계된 특성을 결정한다.

본 실험에서의 acetylcholinesterase 억제활성의 검색은 Ellman's coupled enzyme assay를 사용하여 확인하였다(Figure 7). 효소의 기질인 acetylthiocholine이 acetylcholinesterase에 의해 가수분해되면 thiocholine이 생성되는데 이 화합물이 DTNB와 반응하여 새로운 dithio 화합물과 노란색의 2-nitrobenzoic acid의 thio 음이온을 만든다. 이렇게 생성된 음이온은 410 nm에서 촉매활성이 측정되어<sup>47-48)</sup> 분광광도계(UV)에서 정확히 검출되기 때문에 음이온의 생성속도를 측정함으로써 효소의 활성을 측정할 수 있다. 자금우의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층과 n-BuOH층 그리고 H<sub>2</sub>O층 분획들을 위 과정에 의하여 실험을 한 결과 n-BuOH층이 가장 좋은 활성을 보임을 확인 할 수 있었다(Table 4). CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층인 경우는 결과를 알 수가 없었다. 그 이유는 색소에 의한 UV측정이 장애를 받아서 정확한 측정이 불가능한 것으로 여겨진다.

Fraction	Acetylcholinesterase Inhibition (20 mg/ml)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-
n-BuOH	79.5 %
H <sub>2</sub> O	18.4 %

Table 4. Acetylcholinesterase inhibition effects of several extracts of *Ardisia japonica*



5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)

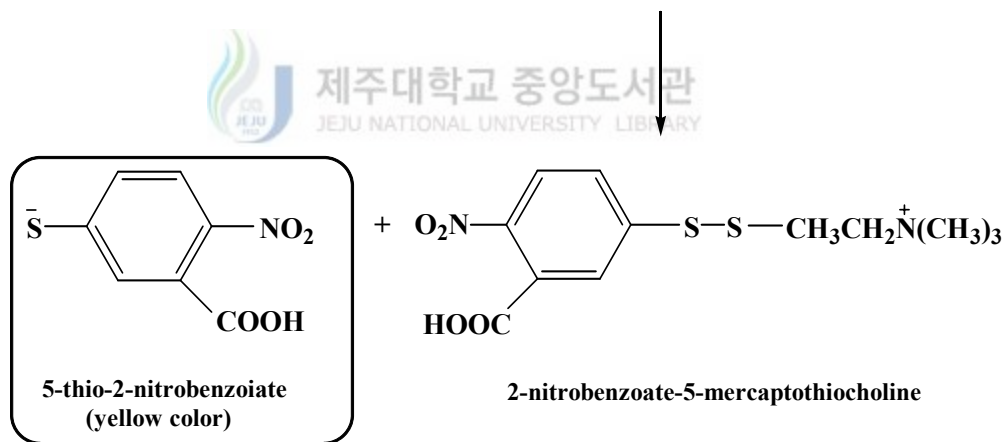


Figure 7. Ellman's assay for determination of  
Acetylcholinesterase activity

### 3) $\alpha$ -glucosidase 활성

$\alpha$ -glucosidase (sucrase, maltase, glucoamylase, isomaltase, lactase)에 대한 저해제는 소장점막에서 이당류와 과당류의 분해속도를 늦추어서 식후 혈당상승을 억제한다.  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 전분과 이당류 섭취에 의한 식후 혈당상승을 억제하는 데에  $\alpha$ -amylase보다 더 특이적이며 조절하기 쉽다고 하며, 임상실험 중인 것고 있고 이미 약제로서 시판되는 것도 있다. 혈당강하제로 사용되어온 sulfonylureas 계통의 화합물과는 달리,  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 인슐린의 분비를 감소시켜서 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 인슐린 분비를 감소시켜서 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 인슐린 분비능을 보존시키는 잇점이 있다. 또  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 당뇨병 환자에게 동맥경화증과 고혈압을 유발시키는 고인슐린혈증을 일으키지 않는다. 이러한 이유로 인하여 수년간에 걸친 여러  $\alpha$ -glucosidase 저해제들에 관한 연구들이 이루어지고 있고 천연물을 이용한 연구도 많이 이루어지고 있다. 본 실험에서도 자금우를 이용하여 비특이적  $\alpha$ -glucosidase 활성 측정과 maltase와 sucrase의 활성 측정을 하였다. 비특이적  $\alpha$ -glucosidase 활성 측정은 2 mM의 기질에 조효소액 및 검액을 가하여 30분간 배양 후, 1 M glycine-NaOH (pH 9.0)로 반응을 정지시킨 후, 원심분리하여 405 nm에서 상등액 0.8 ml의 흡광도를 측정하였다.

또한 maltase와 sucrase의 활성측정은 조효소액, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, sucrase는 6.0), 기질(maltose는 2 mM, sucrose는 10 mM 및 검액을 가하여 40분간(sucrase는 3시간) 37 °C에서 배양한 다음, 끓는 수욕상에서 효소를 불활성화시키고 원심 분리하여 상등액 0.1ml에 o-phenylenediamine 5 mg/100 ml, peroxidase 0.5 mg/100 ml, glucose oxidase 0.1 mg/100 ml 등으로 조제한 반응액 0.75 ml를 가하여 30분간 배양후, 1 N HCl를 가하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 계산한 결과로 자금우의 메탄올 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 활성이 높음을 알 수 있었다. (Table 5).

기질 sample	$\alpha$ -PNGD(%)	maltose(%)	sucrose(%)
자금의 메탄올 추출물	91%	92%	87%

Table 5. The activity measurement results of  $\alpha$ -glucosidase

#### 4) 암세포 증식 억제 효과

자금우의 메탄올 추출물과 용매분획된 층들이 암세포 증식 억제에 효과가 있는지 조사하여 보았다. 암세포는 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60을 이용하여 각각의 시료들을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 세포의 성장증식에 따른 대사활성은 tetrazolium salt의 하나인 MTT 110  $\mu\text{g}$ 을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide 150  $\mu\text{l}$ 를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사용된 MTT assay는 살아 있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소가 노란색의 MTT를 자주색의 formazan 결정으로 변화시키는 성질을 이용한 것으로, 이 결정을 acid isopropanol, mineral oil 또는 dimethyl sulfoxide로 균일화 시킨 뒤 흡광도를 재어 산 세포의 비율을 측정하는 것이다. 이 MTT assay는 반자동화되어 있어 정량적 결과를 비교적 객관적으로 단시일내 얻을 수 있는 장점이 있어 현재 항암제 선별과 암 기초 연구에 널리 사용되기 시작하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장 억제 정도를 조사하였다. 조사 결과, 자금우의 메탄올 추출물과 각각의 용매분획층들에서는 암세포 증식 억제 효과가 적음을 알 수 있었다(Figure 4).

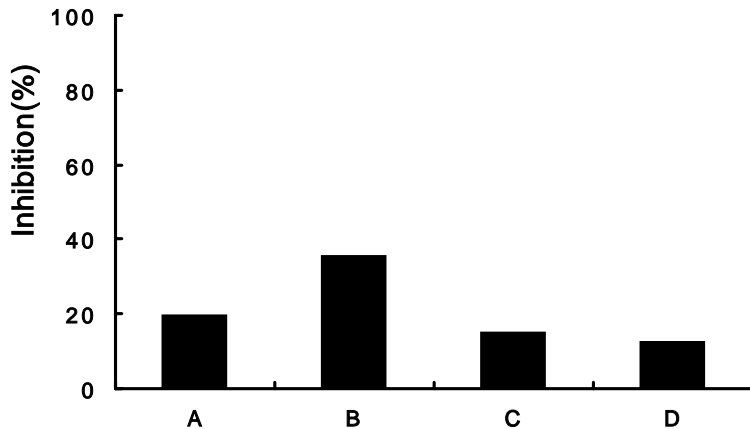


Figure 8. Inhibitory effect of several extracts of *Ardisia japonica* on the growth of HL-60 cells

A : treatment of 80 % MeOH Ext. B : treatment of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Ext.

C : treatment of n-BuOH Ext. D : treatment of H<sub>2</sub>O Ext.

##### 5) Inflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ ) 억제 효과

Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 는 Septic shock, autoimmune disease, obesity 및 AIDS 등의 여러 염증 질환이나 알러지 및 바이러스 질환 등에 관여하는 proinflammatory cytokine의 하나이다. Macrophage나 혈액내 monocyte 등에 의해 분리되며 Lipopolysaccharide(LPS)와 같은 bacterial endotoxin 및 여러 mitogen 등에 의해 그 분비가 촉진된다. 관절 혈액에서 정상인에서보다 높은 농도의 TNF- $\alpha$ 가 측정된다. TNF- $\alpha$  soluble receptor binding protein은 류머티스 관절염 환자의 증상을 호전시키는 등 기대를 받고 있으나 워낙 고가의 제품이기 때문에 대다수의 환자에게는 적용될 수 없는 단점을 가지고 있기에 천연물로부터 TNF- $\alpha$ 를 저해하는 물질을 도출할 수 있다면 많은 환자들에게 도움이 될 것이라 여겨진다. 이러한 이유로 인해 본 실험에서도 TNF- $\alpha$  억제 효과를 측정해 보았다. Murine macrophage 세

포주인 RAW264.7세포 ( $1 \times 10^6$  cells/ml)를 24 well plate에서 18시간 배양하여 LPS( $1 \mu\text{g/ml}$ )를 처리하여 TNF- $\alpha$  생성을 자극, 동시에 농도에 따라 희석된 시험물질, 비교물질을 처리하여 6시간 동안 동일 조건에서 배양한 다음 세포를 제거, 상등액 중의 TNF- $\alpha$  양을 ELISA 방법으로 정량 하였다. Vehicle 처리 well에서 정량 된 TNF- $\alpha$ 에 대해 시험약물 처리 후 정량 된 TNF- $\alpha$  양을 백분율로 환산하였다. 그 결과 자금우의 메탄올 추출물과 각각의 용매분획층들에서는 TNF- $\alpha$ 억제효과가 낮음을 알 수 있었다.

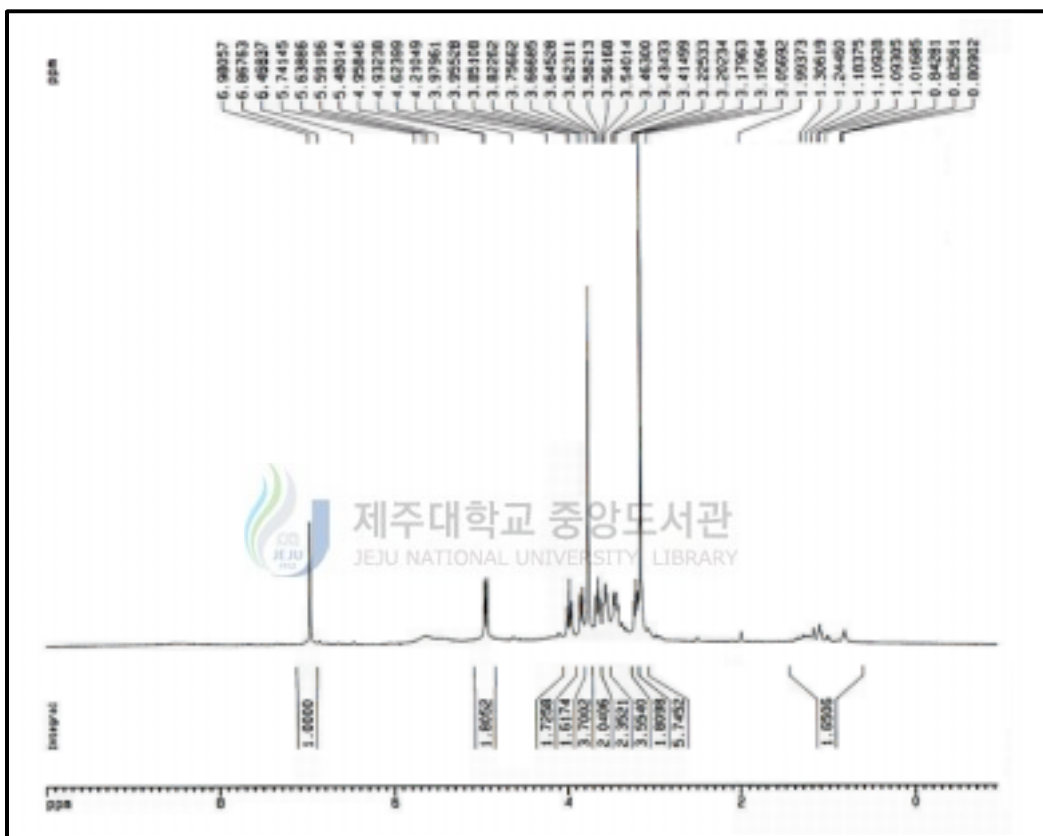
	layer	Inhibition(%)
자금우	MeOH Ext.	-37.77
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.23
	n-BuOH	3.04
	H <sub>2</sub> O	-4.60

Table 6. TNF- $\alpha$  suppression effect measurement results to have been based on each layer of *Ardisia japonica*

## 6) 유효성분에 대한 분리

자금우 전초 분말을 가지고 MeOH 추출물을 얻었다. 이 MeOH 추출물을 다시 자금우의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층과 n-BuOH층 그리고 H<sub>2</sub>O층 으로 분리하였다. 이 용매분획층 중 n-BuOH층을 가지고 40 %, 60 %, 80 %, 100 % 메탄올을 사용하여 reverse-phase column chromatography로 각각의 분획들로 분리하였다. 이 중 60 %, 80 % 메탄올 분획을 sephadex LH-20을 사용하여 column chromatography와 preparative silica TLC를 이용하여 UV-Visible에 활성을 보이는 4개의 분획을 얻었다. 이렇게 얻어진 분획 중 fr. B1-1 을 NMR 기기로 확인하였다. 그 결과 fr. B1-1의 <sup>1</sup>H NMR 데이터에서 fr. B1-1은 3~4 ppm사 이에서 나타나는 peak로 보아 sp<sup>3</sup> 혼성을 이루고 있지만 전기음성도가 큰 원

소가 치환되어 있는 경우로 예측되며 4.94 ppm에 나타나는 peak로 보아  $sp^2$  혼성을 이루고 있지만 불포화 탄화수소의 경우라 예측되며 6.98 ppm에 나타나는 peak로 보아 방향족 화합물에 포함되는 수소의 peak라 예측할 수 있었다(Figure 9).



$^1\text{H-NMR}$  : 400MHz

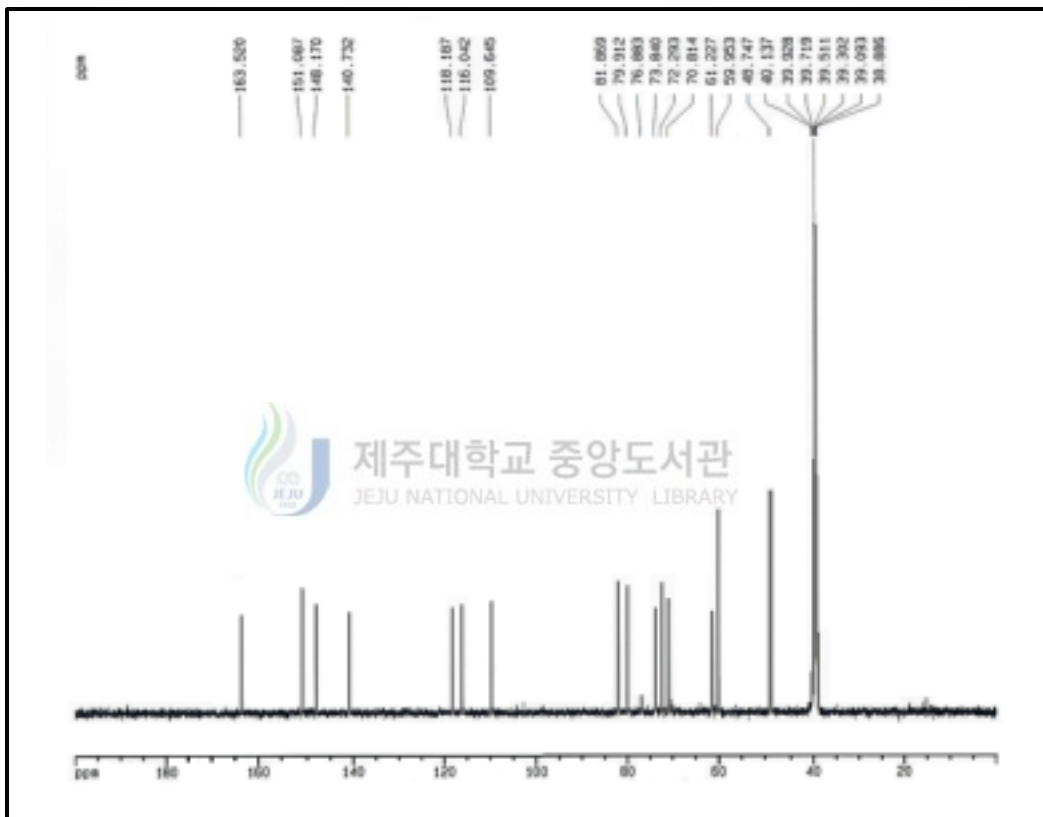
Figure 9.  $^1\text{H}$  NMR data of fr. B1-1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

또한 fr. B1-1의  $^{13}\text{C}$  NMR 데이터에서 fr. B1-1은 탄소 수가 23개인 물질임을 예측할 수 있었으며 peak가 40~70 ppm 부근에 나타나는 것으로 보아  $sp^3$  혼성을 이루고 있지만 전기음성도가 큰 원소가 치환되어 있는 탄소라 여겨 졌고 peak가 110~150 ppm 부근에 나타나는 것으로 보아  $sp^2$  혼성을 이루



고 있지만 불포화탄화수소를 포함하는 경우이거나 방향족 고리의 탄소의 경우라 예측되어 졌다. 그리고 169.52 ppm에서 나타나는 peak는 카르보닐 그룹이 있는 경우의 탄소라 예측할 수 있었다(Figure 10).

이상의 NMR 데이터로 보아 fr. B1-1이 순수한 물질일 것이라 예측되어 졌다.



$^{13}\text{C}$ -NMR : 100MHz

Figure 10.  $^{13}\text{C}$  NMR data of fr. B1-1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## IV. 결론

제주에서 자생하는 자금우를 채취하여 80 % MeOH로 추출한 추출물과 용매분획한  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , n-BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$ 층을 가지고 라디칼 소거활성 효과, acetylcholinesterase 억제활성 효과,  $\alpha$ -glucosidase 억제활성 효과, 암세포 성장 억제 효과, TNF- $\alpha$  억제 효과를 측정하였다. 그 결과 라디칼 소거활성 효과와 아세틸콜린에스터라제 억제활성 효과 그리고,  $\alpha$ -glucosidase 억제 효과 측정에서 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

라디칼 소거활성 효과 측정은 DPPH법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 Blois법을 이용하였다. 항산화 효과를 갖는 활성산소계나 tocopherol, flavonoid 등의 phenolic 화합물이 존재하게 되면 라디칼이 소거되어 환원되면서 517 nm에서의 최대 흡광도가 사라지게 된다. 그 결과의 값은 DPPH 용액이 50 % 환원 되었을 때의 시료의 농도를  $\text{RC}_{50}$ 으로 표현하였다. 따라서  $\text{RC}_{50}$ 값이 작게 나올수록 작은 양으로도 항산화 활성 효과를 볼 수 있다는 것이다. 자금우의 메탄올 추출물의  $\text{RC}_{50}$ 값은 8.9로써 대조군으로 사용된 비타민 E보다 월들이 높은 항산화 활성 효과를 보임을 알 수 있었다. 이는 자금우의 메탄올 추출물 안에 페놀계 물질이 함유되어 있는 것으로 보인다.

아세틸콜린에스터라제 억제활성 측정에서는 효소활성은 Ellman방법을 사용하여 측정하였다. 효소의 활성인 아세틸콜린에스터라제가 가수분해되면 thiocholine이 생성되는데, 이 화합물이 DTNB와 반응해 새로운 dithio 화합물과 2-니트로벤조산의 thio 음이온을 만든다. 이렇게 생성된 이 음이온은 UV에 정확하게 검출되기 때문에 UV에 의해 이 음이온의 생성속도를 측정함으로써 효소의 활성을 측정할 수 있었다. 본 실험에서는 용매분획한 층을 가지고 실험을 하였다. 자금우의 용매분획층 중에서 n-BuOH층이 79.5 %의 높은 억제 효과를 보임을 알 수 있었다.

혈당을 감소시키는 효과를 가져오게 하는 것으로 알려져 있는  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 측정한 결과 자금우의 메탄올 추출물은 특이적  $\alpha$ -glucosidase( $\alpha$ -PNGD) 활성이 91 %였고 maltose와 sucrose 활성은 각각 92 %와 87 %으로 높은 활성을 보임으로써 항당뇨의 효과를 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

암세포 증식 억제 효과 측정과 TNF- $\alpha$  억제 효과 측정 실험에서는 자금우의 메탄올 추출물과 각각의 용매분획층을 가지고 실험을 실시 한 결과 두가지 실험 모두가 활성을 보이지 않음을 확인 할 수 있었고 이에 자금우에서는 항암효과와 항염효과를 가지는 물질이 포함되지 않은 것이라 여겨진다. 물론 지속적으로 다른 방법으로 실험을 진행 할 필요는 있을 것으로 보인다.

그리고 자금우의 유효성분의 분리에 있어서는 활성을 보였던 자금우의 n-BuOH층을 사용하여 fraction B1-1 얻었고 이 얻어진 fraction B1-1을 NMR를 이용하여 확인한 결과 fr. B1-1은 순수한 물질로 예측되어 졌다. 이 분획을 NMR의 다양한 기법과 UV, IR, Mass 등을 이용하여 정확한 구조를 밝혀야 할 것이며 아직까지 분리되지 않은 나머지 n-BuOH층의 분획들도 분리하여 그 구조를 밝혀야 할 것이다.

이상과 같이 자금우의 메탄올 추출물을 가지고 여러 가지 생리활성을 검색하여 보았다. 그 결과 자금우는 최근 현대인들이 관심을 가지고 있는 질병인 노화, 치매, 당뇨에 활성을 보이는 물질은 함유하고 있는 것으로 확인되었고 다각적인 방법으로 활용방안을 모색해야 할 것이다.

## V. 참고문헌

1. 강명화, 류수노, 민관식, 김관수, 방진기, 이봉호 (1999) 식물 향산화 물질에 대한 최근연구 동향. 韓國國際農業開發學會誌 11(2) : 207-215.
2. 류수노, 이봉호, (1998) 식물함유 향산화성분에 대한 일본 미국의 연구동향 韓國國際農業開發學會誌 10(2) : 13-23
3. 김종평, 유익동 (1998) 노화억제를 위한 향산화제 연구. 생명공학동향 제6권 제2호
4. Kovach, I. M.; Larson, M.; Schowen, R. L. *J. Am. chem. Soc.*, 108, 3054, 1986.
5. Quinn, D. M. *Chemical Review*, 87, 955, 1987.
6. Prody, C.A., Gratt, A., Zevin-Sonbin D., Goldberg, O., Soreq H. Isolation and characterization of full length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3555-3559, 1987.
7. Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., Macphée-Quigley K. Primary structure of Torpedo California acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* 319, 407-409, 1986.
8. Soreq, H., M., Prody, C. A., Modeling of receptor ligand interactions. In : *theoretic Aspects and Application to Drug design.*, eds. Golombek A., Rein R., Liss, New York, 347-359. 1989.
9. Taylor, P. IN : *Pharmacological Basis of therapeutics* ; Gilman, A. G., Goodman, L. S., Murad, F., Eds; MacMillan: New York, 1985; pp 110~129.
10. Summers, W. K.; Majovski, L. V.; Marsh, G. M.; Tachiki, K.; Kling, A.

- N. Engl. J. Med.*, 315, 1241, 1986.
11. Thai, L. J.; Fuld, P.A.; Masur, D.M.; Sharples, N.S. *Ann. Neurol.*, 13, 491, 1983.
  12. Arthur J. Vander, James H. Sherman, Dorothy S. Luciano, *Human physiology : the mechanisms of body function*. 6th ed. 207-208 1994.
  13. 최혁재, 김남재, 김동현 (2000) 석이에서 분리한 GF974의  $\alpha$ -Glucosidase 저해효과. *생약학회*, Vol. 31. No. 3 , 268-272.
  14. Choi, Hyuck-Jai Kim, Nam-Jae Kim, Dong-Hyun (2001) Inhibitory Effects of Crude Drugs on  $\alpha$ -Glucosidase, *東西醫學研究所 論文集*, Vol.2000 No.1 51-56.
  15. 김상철, 박수영, 허규희, 김세재, 강희경(2001) HL-60 백혈병 세포의 성장에 대한 노랑하늘타리의 효과. *Cheju journal of Life Science*, Vol.4. No.4, 95-102
  16. 안덕균(1999), *원색한국본초도감*, 지학사, p608.
  17. 이영노, 이경서, 신용만(2001), *제주자생식물도감*, 여미지, p374.
  18. 김태경(1996), *한국의 자원식물III*, 서울대학교 출판부, p233
  19. Blois, M S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical *Nature* 181: 1199-1200.
  20. 이봉호, 최병욱, 유건식, 이은석, 강기정, 황도연, 홍남두(1997) 생약의 아세틸콜린에스터라제 억제활성 검색. *생약학회지*, Vol.28. No.4 : 167-173.
  21. Ellmans G. L., Courtney K. D., Andress V. Jr., Featherston, R. M.,(1961). *Biochem. Pharmacol.*, 88-95
  22. 조재열, 박지수, 유은숙, 백경엽, 박명환(1998) 간 보호제 및 담즙산류들이 마크로파지 세포주에서 TNF- $\alpha$ 분비에 미치는 효과. *약학회지 제42권 제1호* : 82-80.
  23. 조재열, 박지수, 유은숙, 백경엽, 박명환, 한병훈(1998) 인삼 사포닌류가 중

양괴사인자의 생성 및 T세포 증식에 미치는 효과. 약학회지 제42권 제3호  
: 296-301

24. Dale, H. H. (1914); *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 6, 147.

25. K. B. Augustinnson and D. Nachmansohn(1944), *science* 100, 454.

26. Adams, D. H.; whittaker, V. P.; *BBA*, 1950, 4, 543

27. Wilson, I. B.; Bergmann, F.; *JBC*, 1950, 185, 479.

