



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](#)

博士學位論文

제주 식물자원을 이용한 천식  
의약품 활성소재 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

韓 宗 憲

2019年 2月

# 제주 식물자원을 이용한 천식 의약품 활성소재 연구



指導教授 姜 昌 禧

韓 宗 憲

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2018年 12月

韓宗憲의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	李南昊	
委 員	金基玉	
委 員	崔龍文	
委 員	玄昌文	
委 員	姜昌禧	

濟州人學校 人學院

2018年 12月

Study of Medicinal Activation Materials for  
Asthma from the Natural Plants in Jeju Island

Jong-Heon Han  
(Supervised by professor Chang-Hee Kang)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of Doctor of Philosophy

2018. 12.

This dissertation has been examined and approved.

Nam Ho Lee  
Kjm Aelle  
Yong Mun Choi  
CHANG-GU HYUN  
Chang Aee Bang

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY





# LIST OF CONTENTS

LIST OF CONTENTS .....	i
LIST OF TABLES .....	iv
LIST OF FIGURE .....	ix
LIST OF SCHEMES .....	xx
ABSTRACT .....	xxi
I. 서 론 .....	1
II. 실험방법 .....	10
1. 시약 및 기기 .....	10
1-1. 시약 .....	10
1-2. 기기 .....	12
2. 시험방법 .....	13
III. 결과 및 고찰 .....	31
1. 식물자원 탐색 및 선정 .....	31
1-1. 제주 식물자원 탐색 .....	23
1-2. 천식 억제 효능 탐색 및 식물자원 선정 .....	39
2. 곰의말채나무 천식효능 탐색 .....	48
2-1. 곰의말채나무 특성 .....	48
2-2. 곰의말채나무 잎 추출 .....	50
2-3. 곰의말채나무 잎 추출 성분 활성 확인 .....	51
2-4. 곰의말채나무 가지 추출 .....	54
2-5. 곰의말채나무 가지 추출 성분 활성 확인 .....	55
2-6. 곰의말채나무 추출 성분 구조 분석 .....	58

2-6-1. 표준물질 분석 .....	58
2-6-2. 추출 성분 분석 .....	58
2-7. 곰의말채나무 추출 성분 동물 실험 .....	106
2-7-1. 기도과민성에 미치는 영향 .....	106
2-7-2. 활성산소족 억제 효과 .....	108
2-7-3. 폐포 세척액 내 염증세포 침윤 억제 효과 .....	109
2-7-4. 염증성 Cytokine 생성 억제 효과 .....	111
2-7-5. Immunoglobulin-E 생성 억제 효과 .....	114
2-7-6. 폐조직 내 염증세포 침윤 억제 효과 .....	115
2-7-7. 점액분비 억제 효과 .....	118
3. 조록나무 천식효능 탐색 .....	121
3-1. 조록나무 특성 .....	121
3-2. 조록나무 잎 추출 .....	123
3-3. 조록나무 잎 추출 성분 활성 확인 .....	124
3-4. 조록나무 가지 추출 .....	127
3-5. 조록나무 가지 추출 성분 활성 확인 .....	128
3-6. 조록나무 추출 성분 구조 분석 .....	131
3-6-1. 화합물 구조 동정 .....	131
3-6-2. 추출 성분 분석 .....	136
3-7. 조록나무 추출 성분 동물 실험 .....	150
3-7-1. 기도과민성에 미치는 영향 .....	150
3-7-2. 활성산소족 억제 효과 .....	152
3-7-3. 폐포 세척액 내 염증세포 침윤 억제 효과 .....	153
3-7-4. 염증성 Cytokine 생성 억제 효과 .....	155
3-7-5. Immunoglobulin-E 생성 억제 효과 .....	158
3-7-6. 폐조직 내 염증세포 침윤 억제 효과 .....	160
3-7-7. 점액분비 억제 효과 .....	163
4. 윤노리나무 천식효능 탐색 .....	166
4-1. 윤노리나무 특성 .....	166

4-2. 윤노리나무 잎 추출 .....	168
4-3. 윤노리나무 잎 추출 성분 활성 확인 .....	169
4-4. 윤노리나무 가지 추출 .....	172
4-5. 윤노리나무 가지 추출 성분 활성 확인 .....	173
4-6. 윤노리나무 추출 성분 구조 분석 .....	176
4-6-1. 화합물 구조 동정 .....	176
4-6-2. 추출 성분 분석 .....	179
4-8. 윤노리나무 추출 성분 동물 실험 .....	190
4-8-1. 기도과민성에 미치는 영향 .....	190
4-8-2. 활성산소종 억제 효과 .....	192
4-8-3. 폐포 세척액 내 염증세포 침윤 억제 효과 .....	193
4-8-4. 염증성 Cytokine 생성 억제 효과 .....	195
4-8-5. Immunoglobulin-E 생성 억제 효과 .....	198
4-8-6. 폐조직 내 염증세포 침윤 억제 효과 .....	200
4-8-7. 점액분비 억제 효과 .....	203
5. 조록나무 추출물 독성 연구 .....	206
5-1. 사망유무 .....	206
5-2. 일반증상 .....	207
5-3. 체중변화 .....	209
5-4. 육안적 부검소견 .....	211
 IV. 요약 및 결론 .....	 213
 V. 참 고 문 헌 .....	 215

## LIST OF TABLES

Table 1. Doctor's diagnosis rate of asthma outbreaks among Korean adults aged 19 years and over, 2007–2016 <sup>2)</sup> . .....	1
Table 2. Asthma development and symptom expression factor. ....	2
Table 3. The design of animal group in experiment for anti-asthma with mouse model. ....	19
Table 4. Individual Body Weights (g) during an Acclimation Period. ....	24
Table 5. The design of animal group in experiment for toxicity studies in rat. ....	26
Table 6. Instrumental conditions of Positive electrospray ionization mode for UHPLC LTQ–Orbitrap XL MS. ....	28
Table 7. Instrumental conditions of Negative electrospray ionization mode for UHPLC LTQ–Orbitrap XL MS. ....	29
Table 8. Instrumental conditions for negative electrospray ionization mode for LCQ Fleet Ion Trap MS. ....	30
Table 9. List of natural plants sampled in Jeju area. ....	31
Table 10. Screening of a plant extract library for PDE4 & GSNOR inhibitors. ....	39
Table 11. IC <sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% <i>aq.</i> EtOH extract and its solvent fractions of <i>C. macrophylla</i> (leaves). ....	51
Table 12. IC <sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% <i>aq.</i> EtOH extract and its solvent fractions of <i>C. macrophylla</i> (Branches). ....	55
Table 13. Identification for Standards by using LCQ Ion Trap MS/MS. ....	58

Table 14. Identification of standards from of <i>C. macrophylla</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	90
Table 15. Identification of standards from of <i>C. macrophylla</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	94
Table 16. Identification of standards from of <i>C. macrophylla</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	97
Table 17. Identification of standards from of <i>C. macrophylla</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	100
Table 18. Identification of standards from of <i>C. macrophylla</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction. ....	103
Table 19. Effects of test material-42 on airway hyperresponsiveness and result of one-way ANOVA. ....	107
Table 20. Effects of test material-42 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ...	108
Table 21. Effects of test material-42 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ...	110
Table 22. Effects of test material-42 on IL-5 and IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ...	112
Table 23. Effects of test material-42 on ovalbumin-specific IgE in serum and result of one-way ANOVA. ....	114
Table 24. Effects of test material-42 on inflammatory responses in lung tissue and result of one-way ANOVA. ....	116
Table 25. Effects of test material-42 on mucus production in lung tissue and result of one-way ANOVA. ....	118
Table 26. IC <sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% <i>aq.</i> EtOH extract and its solvent fractions of <i>D. racemosum</i> (leaves). ....	124

Table 27. IC <sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% <i>aq.</i> EtOH extract and its solvent fractions of <i>D. racemosum</i> (Branches). .....	128
Table 28. The 13 compounds identified in <i>D. racemosum</i> . .....	131
Table 29. Identification of standards from of <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	136
Table 30. Identification of standards from of <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	140
Table 31. Identification of standards from of <i>D. racemosum</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	144
Table 32. Identification of standards from of <i>D. racemosum</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	148
Table 33. Effects of test material-71 on airway hyperresponsiveness and result of one-way ANOVA. ....	151
Table 34. Effects of test material-71 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ....	152
Table 35. Effects of test material-71 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ....	154
Table 36. Effects of test material-71 on IL-5 and IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ....	156
Table 37. Effects of test material-71 on ovalbumin-specific IgE in serum and result of one-way ANOVA. ....	158
Table 38. Effects of test material-71 on inflammatory responses in lung tissue and result of one-way ANOVA. ....	160
Table 39. Effects of test material-71 on mucus production in lung tissue and result of one-way ANOVA. ....	163
Table 40. IC <sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% <i>aq.</i> EtOH extract and its solvent fractions of <i>P. villosa</i> (leaves). ....	169

Table 41. IC <sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% <i>aq.</i> EtOH extract and its solvent fractions of <i>P. villosa</i> (branches). .....	173
Table 42. Identification of five flavonoid compounds from <i>P. villosa</i> extract. ....	176
Table 43. Identification of standards from of <i>P. villosa</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	179
Table 44. Identification of standards from of <i>P. villosa</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	181
Table 45. Identification of standards from of <i>P. villosa</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	183
Table 46. Identification of standards from of <i>P. villosa</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	186
Table 47. Identification of standards from of <i>P. villosa</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction. ....	189
Table 48. Effects of test material-94 on airway hyperresponsiveness and result of one-way ANOVA. ....	191
Table 49. Effects of test material-94 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ...	192
Table 50. Effects of test material-94 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ...	194
Table 51. Effects of test material-94 on IL-5 and IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA. ...	196
Table 52. Effects of test material-94 on ovalbumin-specific IgE in serum and result of one-way ANOVA. ....	198
Table 53. Effects of test material-94 on inflammatory responses in lung tissue and result of one-way ANOVA. ....	200
Table 54. Effects of test material-94 on mucus production in lung tissue and result of one-way ANOVA. ....	203

Table 55. Summary of Mortality. ....	206
Table 56. Individual Clinical Signs for male. ....	207
Table 57. Individual Clinical Signs for female. ....	208
Table 58. Individual body weights for male. ....	210
Table 59. Individual body weights for female. ....	211
Table 60. Summary of necropsy findings. ....	211
Table 61. Individual necropsy findings for male. ....	212
Table 62. Individual necropsy findings for female. ....	212



## LIST OF FIGURES

Figure 1. A Simplified Scheme of the System of Type 1 helper T (Th1) and Type 2 Helper T (Th2) cells. ....	4
Figure 2. Phosphodiesterase4A structure. ....	6
Figure 3. S-nitrosoglutathione(GSNO) structure. ....	8
Figure 4. LANCE® <i>Ultra</i> cAMP assay principle. ....	14
Figure 5. Control Structure (Roilpram) structure. ....	15
Figure 6. GSNO reductase assay. ....	18
Figure 7. Diagram for the experiment. ....	20
Figure 8. Bar graph for PDE4 enzyme and GSNO reductase inhibition. ....	47
Figure 9. The spectimen of <i>Cornus macrophylla</i> Wall. ....	49
Figure 10. Photograph of the leave of <i>Cornus macrophylla</i> Wall. ....	49
Figure 11. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from leaves of <i>C. macrophylla</i> . ....	52
Figure 12. Results of GSNO reductase inhibition assay for extraction from leaves of <i>C. macrophylla</i> . ....	53
Figure 13. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of <i>C. macrophylla</i> . ....	56
Figure 14. Results of GSNOR reductase inhibition assay for extraction from branches of <i>C. macrophylla</i> . ....	57
Figure 15. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Catechin standard material. ....	59
Figure 16. Result of Catechin in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	60
Figure 17. Proposed fragmentation of Catechin. ....	61

Figure 18. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Quercitrin standard material. ....	62
Figure 19. Result of 4-O-Caffeoylquinic acid in Primary Mass Spectrum(MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	63
Figure 20. Proposed fragmentation of 4-O-Caffeoylquinic acid. ....	64
Figure 21. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Procyanidin B2 standard material. ....	65
Figure 22. Result of Procyanidin B2 in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	66
Figure 23. Proposed fragmentation of Procyanidin B2. ....	67
Figure 24. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Pyocyanidin C1 standard material. ....	68
Figure 25. Result of Pyocyanidin C1 in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	69
Figure 26. Proposed fragmentation of Pyocyanidin C1. ....	70
Figure 27. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Epicatechin gallate standard material. ....	71
Figure 28. Result of Epicatechin gallate in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	72
Figure 29. Proposed fragmentation of Epicatechin gallate. ....	73
Figure 30. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Hyperoside standard material. ....	74
Figure 31. Result of Hyperoside in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	75
Figure 32. Proposed fragmentation of Hyperoside. ....	75
Figure 33. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Rutin standard material. ....	76
Figure 34. Result of Rutin in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	77

Figure 35. Proposed fragmentation of Rutin. ....	78
Figure 36. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Nicotiflorin standard material. ....	79
Figure 37. Result of Nicotiflorin in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	80
Figure 38. Proposed fragmentation of Nicotiflorin. ....	81
Figure 39. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Quercitrin standard material. ....	82
Figure 40. Result of Quercitrin in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	83
Figure 41. Proposed fragmentation of Quercitrin. ....	83
Figure 42. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Quercetin standard material .....	84
Figure 43. Result of Quercetin in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	85
Figure 44. Proposed fragmentation of Quercetin. ....	86
Figure 45. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Kaempferol standard material. ....	87
Figure 46. Result of Kaempferol in Primary Mass Spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2). ....	88
Figure 47. Proposed fragmentation of Kaempferol. ....	89
Figure 48. Total ion chromatogram (MS1) of <i>C. macrophylla</i> (leaves) 70% ethyl alcohol extract. ....	91
Figure 49. Identification of Catechin from of <i>C. macrophylla</i> 70% ethylalcohol extract. ....	91
Figure 50. Identification of Pyocyanidin B2 from <i>C. macrophylla</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	92
Figure 51. Identification of Hyperoside from <i>C. macrophylla</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	92

Figure 52. Identification of Rutin from <i>C. macrophylla</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	93
Figure 53. Identification of Quercetin from <i>C. macrophylla</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	93
Figure 54. Identification of Kaempferol from <i>C. macrophylla</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	94
Figure 55. Total ion chromatogram (MS1) of <i>C. macrophylla</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	95
Figure 56. Identification of Catechin from <i>C. macrophylla</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	95
Figure 57. Identification of Rutin from <i>C. macrophylla</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	96
Figure 58. Identification of Quercetin from <i>C. macrophylla</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	96
Figure 59. Identification of Kaempferol from <i>C. macrophylla</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	97
Figure 60. Total ion chromatogram (MS1) of <i>C. macrophylla</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	98
Figure 61. Identification of Catechin from <i>C. macrophylla</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	98
Figure 62. Identification of Hyperoside from <i>C. macrophylla</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	99
Figure 63. Identification of Quercitrin from <i>C. macrophylla</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	99
Figure 64. Total ion chromatogram (MS1) of <i>C. macrophylla</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	100
Figure 65. Identification of Catechin from <i>C. macrophylla</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	101

Figure 66. Identification of Pyocyanidin B2 from <i>C. macrophylla</i> (Branch) ethyl acetate fraction.-----	101
Figure 67. Identification of Pyocyanidin C2 from <i>C. macrophylla</i> (Branch) ethyl acetate fraction.-----	102
Figure 68. Identification of Hyperoside from <i>C. macrophylla</i> (Branch) ethyl acetate fraction.-----	102
Figure 69. Identification of Quercitrin from <i>C. macrophylla</i> (Branch) ethyl acetate fraction.-----	103
Figure 70. Total ion chromatogram (MS1) of <i>C. macrophylla</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction.-----	104
Figure 71. Identification of Pyocyanidin B2 from <i>C. macrophylla</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction.-----	104
Figure 72. Identification of Pyocyanidin C2 from <i>C. macrophylla</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction.-----	105
Figure 73. Identification of Rutin from <i>C. macrophylla</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction.-----	105
Figure 74. Effects of test material-42 on airway hyperresponsiveness.-----	107
Figure 75. Effects of test material-42 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid.-----	109
Figure 76. Effects of test material-42 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid.-----	111
Figure 77. Effects of test material-42 on IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid.-----	113
Figure 78. Effects of test material-42 on IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid.-----	113
Figure 79. Effects of test material-42 on ovalbumin-specific IgE in serum. -----	115
Figure 80. Effects of test material-42 on inflammatory responses in lung tissue.-----	117

Figure 81. Effects of test material-42 on inflammatory responses in lung tissue. ....	117
Figure 82. Effects of test material-42 on mucus production in lung tissue. ....	119
Figure 83. Effects of test material-42 on mucus production in lung tissue. ....	120
Figure 84. The spectimen of <i>Distylium racemosum</i> Siebold. Et Zucc. ....	122
Figure 85. Photograph of the leave of <i>Distylium racemosum</i> Siebold. Et Zucc. ....	122
Figure 86. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of <i>C. macrophylla</i> . ....	125
Figure 87. Results of GSNOR reductase inhibition assay for extraction from leaves of <i>D. racemosum</i> . ....	126
Figure 88. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of <i>D. racemosum</i> . ....	129
Figure 89. Results of GSNOR reductase inhibition assay for extraction from branches of <i>D. racemosum</i> . ....	130
Figure 90. The photodiode array chromatogram of <i>D. racemosum</i> ethyl acetate fraction and five flavonoid compounds is shown (UHPLC-HRMS). ---	132
Figure 91. The high-resolution mass spectra of <i>D. racemosum</i> ethyl acetate fraction (a~d). ....	132
Figure 92. The high-resolution mass spectra of <i>D. racemosum</i> ethyl acetate fraction (e~j). ....	133
Figure 93. The high-resolution mass spectra of <i>D. racemosum</i> ethyl acetate fraction (k~m). ....	134
Figure 94. Structures of the identified compound from <i>D. racemosum</i> ethyl acetate fraction is shown (UHPLC-HRMS). ....	135
Figure 95. Total ion chromatogram (MS1) of <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	137

Figure 96. Identification of Hyperoside from <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	137
Figure 97. Identification of Rutin from <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	138
Figure 98. Identification of Nicotiflorin from <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	138
Figure 99. Identification of Quercitrin from <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	139
Figure 100. Identification of Quercetin from <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	139
Figure 101. Identification of Kaempferol from <i>D. racemosum</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	140
Figure 102. Total ion chromatogram (MS1) of <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	131
Figure 103. Identification of Catechin from <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	131
Figure 104. Identification of Hyperoside from <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	142
Figure 105. Identification of Nicotiflorin from <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	142
Figure 106. Identification of Quercitrin from <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	143
Figure 107. Identification of Quercetin from <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	143
Figure 108. Identification of Kaempferol from <i>D. racemosum</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	144
Figure 109. Total ion chromatogram (MS1) of <i>D. racemosum</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	145

Figure 110. Identification of 4-O-Caffeoylquinuc acid from <i>D. racemosum</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	145
Figure 111. Identification of Hyperoside from <i>D. racemosum</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	146
Figure 112. Identification of Rutin from <i>D. racemosum</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	146
Figure 113. Identification of Nicotiflorin from <i>D. racemosum</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	147
Figure 114. Identification of Quercitrin from <i>D. racemosum</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	147
Figure 115. Total ion chromatogram (MS1) of <i>D. racemosum</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	148
Figure 116. Identification of Catechin from <i>D. racemosum</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	149
Figure 117. Identification of Epicatechin gallate from <i>D. racemosum</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	149
Figure 118. Effects of test material-71 on airway hyperresponsiveness. ....	151
Figure 119. Effects of test material-71 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid. ....	153
Figure 120. Effects of test material-71 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid. ....	155
Figure 121. Effects of test material-71 on IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid. ....	157
Figure 122. Effects of test material-71 on IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid. ....	157
Figure 123. Effects of test material-71 on ovalbumin-specific IgE in serum. .....	159
Figure 124. Effects of test material-71 on inflammatory responses in lung tissue. ....	161



Figure 125. Effects of test material-71 on inflammatory responses in lung tissue. ....	162
Figure 126. Effects of test material-71 on mucus production in lung tissue. ....	164
Figure 127. Effects of test material-71 on mucus production in lung tissue. ....	165
Figure 128. The specimen of <i>Pourthiaea villosa</i> (Thunb.) Decne. ....	167
Figure 129. Photograph of the leave of <i>Pourthiaea villosa</i> (Thunb.) Decne. ....	167
Figure 130. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from leaves of <i>P. villosa</i> . ....	170
Figure 131. Results of GSNOR reductase inhibition assay from leaves of <i>P. villosa</i> . ....	171
Figure 132. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of <i>P. villosa</i> . ....	174
Figure 133. Results of GSNOR reductase inhibition assay from branches of <i>P. villosa</i> . ....	175
Figure 134. The photodiode array chromatogram of <i>P. villosa</i> leaf <i>n</i> -butanol fraction and five flavonoid compounds is shown (UHPLC-HRMS). ....	177
Figure 135. The high-resolution mass spectra of BuOH fraction (A) are compared with those of five standard compounds (B). ....	177
Figure 136. Structures of the identified compound from <i>P. villosa</i> leaf <i>n</i> -butanol fraction is shown (UHPLC-HRMS). ....	178
Figure 137. Total ion chromatogram (MS1) of <i>P. villosa</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	179
Figure 138. Identification of Quercitrin from <i>P. villosa</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	180

Figure 139. Identification of Quercetin from <i>P. villosa</i> 70% ethyl alcohol extract. ....	180
Figure 140. Total ion Chromatogram (MS1) of <i>P. villosa</i> (leaves) ethyl extract acetate fraction. ....	181
Figure 141. Identification of Hyperoside from <i>P. villosa</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	182
Figure 142. Identification of Quercitrin from <i>P. villosa</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	182
Figure 143. Identification of Quercetin from <i>P. villosa</i> (leaves) ethyl acetate fraction. ....	183
Figure 144. Total ion chromatogram (MS1) of <i>P. villosa</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	184
Figure 145. Identification of Hyperoside from <i>P. villosa</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	184
Figure 146. Identification of Rutin from <i>P. villosa</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	185
Figure 147. Identification of Nicotiflorin from <i>P. villosa</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	185
Figure 148. Identification of Quercitrin from <i>P. villosa</i> (leaves) <i>n</i> -butanol fraction. ....	186
Figure 149. Total ion chromatogram (MS1) of <i>P. villosa</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	187
Figure 150. Identification of Catechin from <i>P. villosa</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	187
Figure 151. Identification of Epicatechin gallate from <i>P. villosa</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	188
Figure 152. Identification of Hyperoside from <i>P. villosa</i> (Branch) ethyl acetate fraction. ....	188

Figure 153. Total ion chromatogram (MS1) of <i>P. villosa</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction.-----	189
Figure 154. Identification of Catechin from <i>P. villosa</i> (Branch) <i>n</i> -butanol fraction.-----	189
Figure 155. Effects of test material-94 on airway hyperresponsiveness.-----	191
Figure 156. Effects of test material-94 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid.-----	193
Figure 157. Effects of test material-94 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid.-----	195
Figure 158. Effects of test material-94 on IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid.-----	197
Figure 159. Effects of test material-94 on IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid.-----	197
Figure 160. Effects of test material-94 on ovalbumin-specific IgE in serum.-----	199
Figure 161. Effects of test material-94 on inflammatory responses in lung tissue.-----	201
Figure 162. Effects of test material-94 on inflammatory responses in lung tissue.-----	202
Figure 163. Effects of test material-94 on mucus production in lung tissue.-----	204
Figure 164. Effects of test material-94 on mucus production in lung tissue.-----	205
Figure 165. Body weights in male SD rats.-----	209
Figure 166. Body weights in female SD rats.-----	210

## LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Procedure of extraction and various fraction from dried leaves of <i>C. macrophylla</i> .....	50
Scheme 2. Procedure of extraction and various fraction from dried Branch of <i>C. macrophylla</i> .....	54
Scheme 3. Procedure of extraction and various fraction from dried leaves of <i>D. racemosum</i> .....	123
Scheme 4. Procedure of extraction and various fraction from dried branch of <i>C. macrophylla</i> .....	127
Scheme 5. Procedure of extraction and various fraction from dried leaves of <i>P. villosa</i> .....	168
Scheme 6. Procedure of extraction and various fraction from dried branches of <i>P. villosa</i> .....	172

## ABSTRACT

The purpose of this study is to discover natural products for the anti-asthmatic activity using the solvent-extracts derived from native 100 plants in Jeju area. The extracts were tested for the ability to inhibit Phosphodiesterase4(PDE4) (Target 1) and GSNO reductase (Target 2), which are recently considered as therapeutic targets for asthma. The hits that showed excellent efficacy against two targets were further characterized by separation of leaves and branches, extraction and solvent (n-hexane, ethyl acetate, and n-butanol) fractionation, and then testing the activity of each extract against the targets in vitro. These efforts led to the identification of *C. macrophylla*, *D. racemosum*, and *P. villosa*. The efficacy of three natural products was further evaluated in a mouse model of allergic asthma, and chemical ingredients of each plant were analyzed using UHPLC-HR MS/MS and LCQ Fleet Ion Trap MS.

In a mouse model of allergic asthma, *D. racemosum* extract was best among the natural products with regards to the anti-inflammatory activity; administration of *D. racemosum* to a mouse model of allergic asthma significantly reduced inflammatory response in the lung, as well as serum immunoglobulin E levels. In addition, *D. racemosum* exhibited no detectable toxicity in rats; at a dose of 2,000 mg/kg, *D. racemosum* did not cause any changes in body weight and organs in male and female animals.

UHPLC-HR MS/MS and a dereplication method were applied to analyze the compound ingredients in three excellent resources, and as a results, 13 and 5 types of compounds were identified in *D. racemosum* and *P. villosa*, respectively. Eleven compounds among identified compounds were purchased and the qualitative confirmation test was carried out using LCQ Fleet Ion Trap MS for three natural products (*C. macrophylla*, *D. racemosum*, and *P. villosa*).

The analyses identified 8 compounds in *C. macrohylla* and 11 compounds in *P. villosa*. In addition, 14 compounds were identified in *D. racemosum* which showed the best anti-inflammatory effects in an animal model of asthma. It is of interesting that catechin, hyprosides, rutin, quercitrin, and quercetin were included in all three plant extracts.

In conclusion, our results suggest that the extract of *D. racemosum* exhibits an excellent anti-asthmatic effect, and provide sufficient basis for the extract of *D. racemosum* to be used as an asthma medicine, although mechanism of action and the active ingredients need to be further investigated.

## I. 서 론

천식은 가장 흔한 만성 기도 질환 중 하나로 호흡곤란, 천명, 가슴답답함, 기침과 같은 증상이 계절 또는 악화인자 등에 따라 다양하게 변화하는 것을 특징으로 한다. 잘 알려진 악화인자로는 운동, 알레르겐(항원) 혹은 자극성 물질, 날씨 변화, 감기를 비롯한 호흡기 바이러스 감염 등이 있다. 천식의 증상과 호기 기류제한은 자연적으로 또는 치료에 의해 회복되어 전혀 증상이 없을 수도 있지만 천식 급성 악화는 생명을 위협할 수도 있기 때문에 환자 개인과 사회에 상당한 부담을 야기한다. 우리나라에서 천식의 유병률은 소아에서도 조금씩 증가하고 있고 성인에서도 증가하고 있는데 특히 60세 이상의 노인 연령층에서 유병률이 높다. 전세계적으로 3억명 이상의 환자가 있다고 보고되고 있고 국내에서도 소아 천식은 이전에 보였던 빠른 유병의 증가가 꺾이면서 증가추세가 완화되어가고 있지만 성인 천식은 지속적으로 증가하고 있으며 이는 빠르게 고령화 사회에 진입하고 있는 우리나라에서 향후 천식이 지금보다도 더 큰 사회적 부담으로 다가올 가능성을 시사한다고 하겠다(Table 1).<sup>1)</sup>

Table 1. Doctor's diagnosis rate of asthma outbreaks among Korean adults aged 19 years and over, 2007-2016<sup>2)</sup>.

Year	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Prevalence Rate (%)	2.2	2.7	2.8	3.1	3.0	2.7	2.8	3.0	3.1	2.5

천식은 발생요인이 다양하고 환자에 따라 질환의 발생시기, 진전양상 및 치료 예후 등의 차이가 있어 질병부담이 큰 질환이며 조기발견 및 조기치료가 필요하다.<sup>3)</sup> 근세기 동안 천식 및 알레르기 질환은 산업화된 국가에서 더 흔하게 된 반면 미개발구에서 아토피 유병율은 여전히 낮다.<sup>4-5)</sup> 따라서 천식은 사회가 발전할 수록 유병률과 사회경제적 부담이 급증하고 있으며 미래에도 지속될 것으로 예

측된다.<sup>6)</sup> 또한 천식은 출생 직후 영유아기부터 노인 천식까지 전 연령에서 발생하며 발생시기와 연령에 따라 다른 경과를 보이는 질환이고, 국가, 인종, 연령에 따른 유발요인 및 악화요인, 자연경과, 치료효과 등이 차이가 있어 그에 따른 국가적 대응이 요구되는 질환이다.<sup>7)</sup>

천식은 숙주인자와 환경인자가 복합적으로 작용하여 나타나는 대표적인 복합적인 유전질환이다(Table 2). 가족적으로 발생하는 경향이 있으며 아토피는 천식 발생에 매우 중요한 요소이다. 천식의 1차적인 예방은 천식의 발생자체를 막는 것인데, 이를 위해서는 각종 알레르겐을 회피 하고 간접흡연으로부터 태아와 영유아를 보호하는 것이 중요하다. 천식의 2차 예방은 천식악화를 방지하는 것으로 환경관리 및 악화인자의 회피가 중요하다.<sup>8)</sup> 흡입 항원 노출은 알레르기 천식의 발생 및 지속에 분명한 필요 조건이며 집먼지 진드기나 바퀴벌레와 같은 항원은 노출이 높은 경우 감작의 위험이 높다.<sup>9-10)</sup>

Table 2. Asthma development and symptom expression factor.

Host factor
Genetic factor
Atopy related gene
Airway hyperresponsiveness related gene
Obesity, Gender
Environmental factor
Allergen
Indoor: House dust mite, Animals(dog, cat, house mouse), Cockroach, Mycelium, Yeast
Outdoor: Pollen, Fungus, Mycelium, Yeast
Infection(mostly, viral)
Occupational sensitizer
Smoking
Secondhand smoking, Tobacco smoking
Indoor/Outdoor air pollution
Food

천식의 근본적인 병태생리적 특성들은 면역계의 다양한 유형의 세포들과 히스 타민, 류코트리엔, 다양한 전염증성(proinflammatory) 싸이토카인(Cytokine)과 케



모카인(Chemokine)과 같은 염증 매개 물질들 간의 상호 연결을 포함한다.<sup>11)</sup> 천식의 급성기에는 항원의 자극에 의해 비만세포에서 방출되는 히스타민과 류코트리엔이 기관지의 수축을 유발해 호흡곤란 증상을 일으킨다.<sup>12)</sup> 알레르겐에 대한 지속적인 노출은 만성 염증을 유발할 수 있으며 이는 호산구, 호중구, 대식세포, CD4<sup>+</sup> 림프구와 같은 염증성 세포들의 기도 조직 내 유입과 관련이 있다.<sup>13)</sup> 천식은 주변 환경의 알레르기 유발 항원에 의해 유발되며 2형 도움T세포(type 2 helper T, Th2)에 의해 유도되는 생물학적 캐스케이드가 염증반응의 시작에 주요 역할을 수행한다는 사실이 제안된 바 있다. 염증성 Cytokine [Interleukin (IL)-4,5,13]의 생성, 활성화된 B세포에 의한 이미뉴글로불린(IgE, immunoglobulin E) 분비, 호산구, 대식세포와 같은 염증세포의 기도벽 내 침윤 과정은 동물 모델과 사람에서 알레르기 천식을 평가할 때 사용되는 가장 잘 알려진 지표 중 하나이다.<sup>17)</sup> 대기 중의 알레르기항원이 기도로 들어와서 IgE를 생성하는 과정은 알레르기항원이 항원전달세포(antigen presenting cell)인 가지세포(dendritic cell)와 결합하여 림프절로 이동하는 것으로부터 시작된다.<sup>14)</sup> 항원과 결합된 항원전달세포가 림프절 내의 naïve T-helper cell (Th0)에 작용하여 Th0가 분화되는 과정은 확실히 밝혀져 있지 않다. 천식의 기도염증에서는 Th2세포가 우세한데 그 기전은 확실히 규명되지 않았지만 Th0세포의 일차 분화시기에 알레르기 항원에 의해 자극된 전구 CD4 T-세포에서 분비되는 IL-4에 의해 Th2 세포로 분화된다. 반면 바이러스, 세균 등의 항원에 의해서 대식세포로부터 분비되는 IL-12에 의해 Th1 세포로 분화된다고 알려져 있다(Figure 1).<sup>15)</sup>

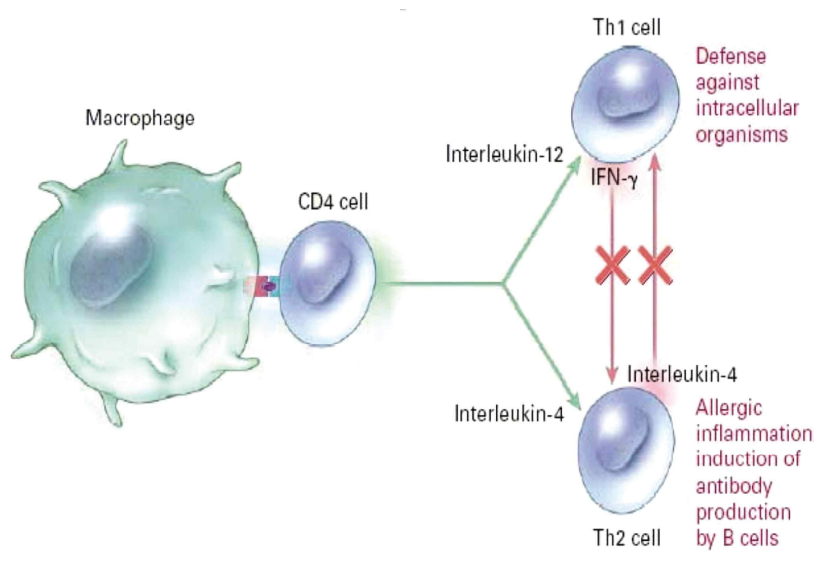


Figure 1. A Simplified Figure of the System of Type 1 helper T (Th1) and Type 2 Helper T (Th2) cells.

천식의 대표적인 치료제로는 흡입 또는 전신 스테로이드제, 류코트리엔 길항제, 베타2 항진제, 테오필린 등 잔틴계 약물 등이 보고되어 지고 있다.<sup>16-17)</sup> 최근에 개발되어 오고 있는 천식 치료제는 기도 폐쇄의 증상을 완화시키는 약물(예컨대, 기관지 확장제)과 기도 염증을 억제하는 약물로 분류될 수 있다. 기관지 확장제로 사용되는 약물에는 베타2 항진제, 항콜린제, 테오필린제 등이 기도 염증 반응을 억제하는 약물에는 스테로이드제, 항류코트리엔제, 크로몰린 제제 등이 포함되는데 다양한 부작용이 보고되고 있다.

경구용 스테로이드는 고용량에서 장기적으로 흡입하면 용량과 사용기간에 비례하여 부신 억제, 골밀도 감소, 성장 장애, 눈과 피부 합병증과 같은 전신부작용이 발생할 수 있다.<sup>18)</sup>

베타2 교감신경 항진제는 흡입용 스테로이드와 함께 복합 흡입제로 쓰며, 단독으로 쓰는 경우는 없다.<sup>19)</sup> 단기간 작용 베타2 항진제는 기도 확장효과만 있을 뿐 항알레르기 염증 효과나 기도 과민성에는 효과가 없다. 스테로이드의 병용치료는 베타 수용체의 수를 증가시켜 내성을 예방 또는 감소시킨다. 제일 큰 임상적인 문제로는 안전성이 된다. 1960년대 이소프로테레놀(isoproterenol)의 고용량 메

틸렌 디페닐 디이소시아네이트(MDI, Methylene diphenyl diisocyanate)의 출시 후 처음 안정성에 의심이 되고 1970년대 페노테롤(fenoterol)의 사용과 사망률의 증가가 보고된 뉴질랜드(new Zealand)의 보고가 이를 증명하였다.<sup>20)</sup>

테오필린(theophylline)은 1970년도에 미국 많이 쓰이다가 1980년대부터는 사용이 새로운 약제의 개발과 테오필린(theophylline)의 부작용 때문에 사용이 점차 감소되었다. 그러나 아직 우리나라에서는 가장 많이 사용되는 경구용 약제이다. 독스필린(Doxofylline)은 새로운 메틸잔틴(methylxanthine) 유도체로 부작용이 적으면서 효과가 좋다. 흡입용 스테로이드의 사용에도 증상이 재발하는 지속성 경증 이상의 환자에게 적응이 되고 있다. 그러나 면역 조절능이 있음이 최근에 밝혀지고 스테로이드 사용중인 환자에서 테오필린(theophylline)의 복용을 중단하면 증상의 재발이 되면서 기도내 활성화 T림프구의 증가가 다시 나타나는 점등으로 지속적으로 저용량 사용의 시도가 고려되기도 한다.<sup>21)</sup> 따라서, 천식의 근본적인 치료를 위한 새로운 작용점의 연구와 함께, 약물에 대한 부작용을 최소화 하고 독성이 적으며 치료 효과가 탁월한 천연물 및 화합물 개발이 끊임없이 진행되고 있다.

염증은 천식의 발병 기전에 주요한 역할을 하기 때문에 염증 매개물질의 분비를 억제하고 염증 반응을 제한하는 치료 전략들이 개발되어 왔다. 다양한 세포 환경에서 고리형아데노신일인산(cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 특이적 인산에스테르가수분해효소(Phosphodiesterases, PDEs)를 억제할 경우 항염증 작용이 일어나는 것이 입증되었기 때문에 cAMP-특이적 PDEs의 동형 단백질(Isoform)들은 많은 관심을 끌었다.<sup>22)</sup> PDE4는 그 특징이 잘 밝혀진 동형단백질 중 하나로 그 억제제는 천식을 포함한 염증성 질환의 새로운 치료제로 간주되어 왔다(Figure 2).<sup>23)</sup> 이러한 사실은 염증세포에서 PDE4를 억제할 경우 TNF- $\alpha$ 를 포함한 다양한 전염증성 매개물질의 방출을 감소시킨다는 연구 결과에 근거하고 있다.<sup>24)</sup>

PDE4 계열의 물질은 4개의 유전자(PDE4 A, B, C, D)로 구성되어 있는데 각 유전자에는 RNA 전사체의 대체스플라이싱(alternative splicing)과 다양한 프로모터의 사용으로 인한 여러 종류의 아형이 있다. PDE4에 이렇게 다양한 동형단백질이 존재하는 이유는 아직 밝혀지지 않았다. 그러나 PDE4 계열의 단백질들이

조직특이적인 발현 양상을 가지며 그 기능적 역할이 서로 중복되지 않는다는 사실이 보고된 바 있다.<sup>25)</sup> 이는 현재 임상시험이 진행 중인 대부분의 비특이적 PDE4 억제제들이 구역과 다른 위장장애와 같은 부작용을 동반한다는 관찰 결과와 일치하며 이는 PDE4억제의 부작용을 피하기 위해서는 아형-특이적인 PDE4 억제제의 개발이 필요하다는 것을 시사한다.

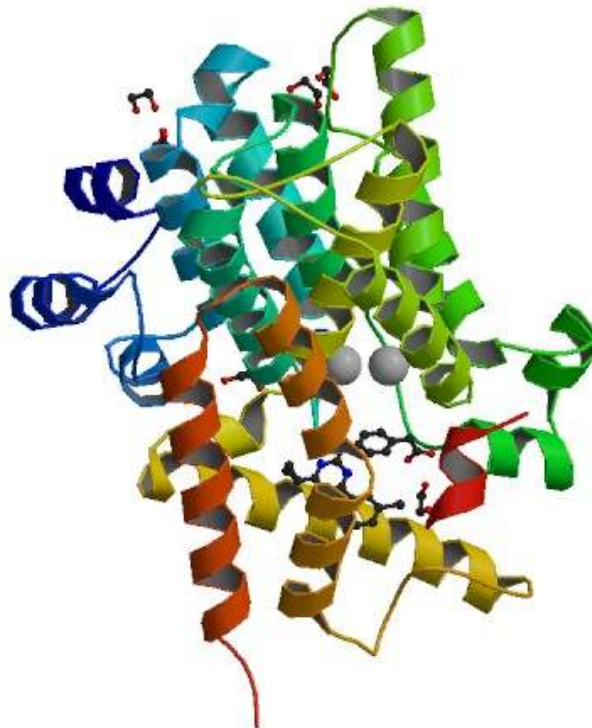


Figure 2. Phosphodiesterase4A1A structure.

또한, 천식은 주변 환경의 알레르기 유발 항원에 의해 유발되며 2형 도움 T세포 (T helper type 2 cells, TH2)에 의해 유도되는 생물학적 캐스케이드가 염증반응의 시작에 주요 역할을 수행한다는 사실이 제안된 바 있다.<sup>26)</sup> 염증성 Cytokine [Interleukin (IL)-4,5,13]의 생성, 활성화된 B세포에 의한 IgE 분비, 호산구, 대식세포와 같은 염증세포의 기도벽 내 침윤 과정은 동물 모델과 사람에서 알레르기 천식을 평가할 때 사용되는 가장 잘 알려진 지표 중 하나이다. 따라서, 기도의

염증반응을 억제하기 위한 치료 전략들이 천식 치료를 위해 개발되어 왔다.<sup>27)</sup> PDE4는 주요 염증 세포에서 모두 발현되고 cAMP(cyclic 3',5'-adenosine monophosphate)를 분해하여 비활성화시키는 효소이다. PDE4의 활성을 억제시킬 경우, 세포내 cAMP의 양이 증가하여 기도에서 평활근의 이완 작용과 면역세포의 기능 저하로 인한 항염증 작용을 유도할 수 있다. 최근 PDE4 저해제로서 대표적인 약물로 주목받고 있는 Daxas(Roflumilast)는 천식 질환과 비슷한 증상을 나타내는 만성 폐쇄성 폐질환의 치료제로 품목허가를 받았다. Daxas의 임상시험 중 구토, 설사, 두통, 체중감소, 복부통증 등의 부작용이 발견되었으나, 이러한 이상 증상들은 치료 기간 동안에 사라진 것으로 보고되었다. 또한, 상기 Daxas 외에도 수개의 PDE4 저해제들이 천식 치료제로서 개발되고 있으나, 구토와 같은 부작용 때문에 개발이 중단되거나 허가가 지연되고 있는 실정이다.<sup>25)</sup>

기체 분자 형태로 존재하는 산화 질소는 혈류량, 심혈관계 생리학 및 기도의 평활근 조절 등 다양한 생물학적 과정에서 역할을 담당하고 있다.<sup>28)</sup> 산화질소의 역할은 반응성 시스테인 황이 공유변이 되어 단백질과 글루타치온에 각각 S-nitrosylation과 S-nitrosothiols 분자를 형성하여 부분적으로 매개된다.<sup>29)</sup> 또한 산화 질소와 글루타치온의 부가 생성물인 S-nitrosoglutathione (GSNO) (Figure 3)은 생체 활용이 가능한 산화 질소의 저장기 역할을 하기 때문에 GSNO의 수치는 산화 질소의 생체이용률 및 항상성에 영향을 끼친다고 판단되어 진다.<sup>30)</sup> GSNO는 내부적으로 발생하는 내생성 기관지 확장제로, 평활근을 이완시켜 기관지 및 세기관지를 확장시킨다. 이는 천식 기도의 GSNO 수치가 정상 기도의 GSNO 수치에 비해 낮게 관찰된다는 점과, 동물 모델 실험에서 GSNO 수치의 회복이 기관지 수축 및 염증의 감쇠와 연관되어 있다는 실험 결과로 뒷받침된다.<sup>31)</sup> 이러한 결과는 GSNO 대사가 천식의 치료적 개입을 위한 목표로 설정될 수 있음을 의미한다. GSNO 대사는 주로 GSNO의 비가역적 환원을 불안정한 S-(*n*-hydroxyamino) glutathione으로 변환되는 것을 촉진시키는 GSNO 환원효소에 의해 좌우된다.<sup>32)</sup> GSNO 환원효소는 두 개의 서브유닛으로 구성된 NADH(니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드) 의존성 동종 이량체 효소로써 초매도메인인 *n* 터미널과 보조인자 결합 도메인인 *c* 터미널로 이루어져 있다.<sup>33)</sup> 단백질 결정학에서 나타난 GSNO 환원효소의 구조적 정보를 살펴보면, 아연 분자가

두 개의 시스테인 residue와 하나의 히스티딘 residue와 함께 활성 부위에 붙어 효소 반응을 촉진한다는 것을 알 수 있다.<sup>34)</sup> 천식 기도에서는 주로 향상된 GSNO 환원 효소 활성이 관찰되는데, 이는 GSNO의 손실로 이어지며 정상적인 폐의 생리학적 및 기능 유지 실패에 기여하게 된다. 생쥐에서 GSNO 환원 효소의 유전적 결실을 연구한 결과, GSNO 환원 효소 결실이 폐의 S-nitrosothiols 수치를 증가시키고 메타콜린(기관지 수축 인자 작용제)으로 인한 과민성 기도에 덜 민감한 것으로 나타나며 이러한 개념을 지지하였다.<sup>35)</sup> 또한, 알레르기성 천식이 있는 마우스 모델에서 GSNO 환원 효소 활성을 약리학적으로 억제하였을 때, 기관지 확장 및 항염증 효과를 기대할 수 있었다.<sup>31)</sup> GSNO 환원 효소를 천식을 위한 표적치료로 사용하기 위하여 상당한 노력이 집중되고 있다. 현재 GSNO 환원 효소의 소분자 억제제인 N6022가 개발되어 천식 환자에서 임상 시험 중에 있다.<sup>36)</sup> N6022는 GSNO 환원 효소를 강력하게 억제하며 생체 내에서 수용 가능한 안전성 프로파일을 보였지만 화합물의 높은 극성 등으로 인해 경구 생체 이용률은 매우 낮은 것으로 조사되었다.<sup>37)</sup>

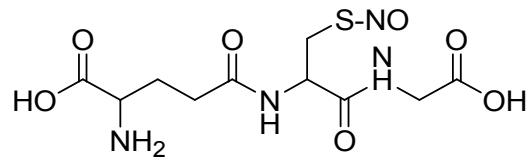


Figure 3. S-nitrosoglutathione(GSNO) structure.

마우스와 랫드의 경우 면역 관련 연구를 위한 동물모델로 많이 이용되고 있다.<sup>38)</sup> 특히 마우스의 경우 유전학적 배경이 명확하고 종 특이성 항체가 다양하게 개발되어 있어 실험에 적합하지만 크기가 작아 다량의 세포를 확보하기 어렵고 기도직경이 작다. 또한 마우스의 경우 1차기관지 상피가 사람의 경우와 달리 거짓중층원주세포(pseudostratifiedcolumnarcell)가 아니라 단층원주상피세포(simplecolumnarcell)이며 술잔세포가 드물고 점막 밑 샘(gland)이 없는 등 기도의 조직학적 구성과 매개인자에 차이점이 있지만 다루기 쉽다는 장점을 가지고 있어 동물모델 개발에 많이 사용하고 있다.<sup>39)</sup> Lipopolysaccharide (LPS)와 같은

내독소 및 다른 선천 면역 자극제는 흡입 항원이 유효한 적응 면역(후천 면역) 반응을 유발시키는데 필요한 것으로 알려져 있으며 LPS는 주로 Toll-like receptor 4 (TLR4)를 통해 선천면역계의 수지상세포를 활성화시키고 수지상세포와 T세포의 상호작용과 사이토카인 생성 패턴에 따라 이후의 염증 반응 타입이 결정됨이 최근 밝혀졌다.<sup>40-41)</sup> 하지만 항원과 aluminum hydroxide 전신 감작 프로토콜에서 전신적 LPS 노출의 경우는 대부분 항원 특이 반응을 억제하였으나 LPS 흡입 노출은 반응을 감소시키기도 증가시키기도 하였다.<sup>42-45)</sup> 사람에서 LPS 연구를 시행하기에는 여러 가지 제약이 있기 때문에 주로 동물 천식 모델에서 연구가 이루어져 왔으며 ovalbumin (OVA)이 항원으로 널리 사용되는데 대부분의 연구에서 이용되는 시판용 commercial OVA 내에는 LPS가 오염되어 있기도 항원 유발 염증 반응에 영향을 주기에 충분한 정도라고 알려져 있다.<sup>46-47)</sup>

본 연구의 목적은 제주도에서 자생하는 천연 자원들로부터 항천식 소재 연구를 통해 라이브러리를 구축하고 우수 활성을 나타내는 천연 소재에 대하여 심층 연구를 통해 신약 개발의 가능성을 확인하고자 하였다.

이를 위해 기관지 염증 기전과 관련 있는 Phosphodiesterase(PDEs) enzyme 활성 연구 및 기관지 확장 기전과 관련 있는 GSNO reductase 활성 연구를 수행하였으며, 두 기전에서 효능이 우수한 3종에 대하여 분획물 효능, 성분 분석, 동물실험을 진행하였으며, 가장 우수한 1종에 대하여 독성 연구를 진행하였다.



## II. 실험방법

### 1. 시약 및 기기

#### 1-1. 시약

##### 1-1-1. 추출 용매

시료의 추출에 대정(주)이 18 L 공업용 시약 methyl alcohol, ethyl alcohol, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol 용매를 사용하였다.

##### 1-1-2. Phosphodiesterase4 Assay(효소 측정)

효소측정 시약 Phosphodiesterase4는 BPS Bioscience Co.(San Diego, USA)에서 구입했으며, LANCE Ultra cAMP kit는 Perkin Elmer Co.(Waltham, MA, USA) 제품을 사용하였다. LANCE Ultra cAMP kit에는 cAMP standard (50  $\mu$  M), Eu-cAMP tracer, ULight™-anti-cAMP, cAMP Detection Buffer, BSA Stabilizer (7.5% solution)이 포함되어 있다. 그 외에 Hank's balanced salt solution(HBSS, Invitrogen Co., USA (14025-092)), HEPES Buffer Solution (1 M) Invitrogen Co., USA (15630-080)), Forskolin (Sigma Co., USA (F6886)), IBMX (Sigma Co., USA (I7018)), Dimethyl sulfoxide ((DMSO), Sigma Co., USA (D8418)) 384-well plate (Greiner Bio-One Co., Germany (E151135F)), Tips (12.5  $\mu$ l, Thermo Scientific Co., USA))을 사용하였다.

##### 1-1-3. GSNO reductase Assay(환원효소 측정)

cDNA 합성을 위한 시약으로 Trizol (Invitrogen Co.), pET28a vector (Novagen), Rosetta2 (DE3) (Stratagene), isopropyl-1-thio- $\beta$



-D-galactopyranoside를 사용하였고, 유전자 증폭을 위하여 Platinum blue PCR superMix (Invitrogen사), 아가로스 겔 분리 키트(GeneAll사)를 사용하였다. GSNO reductase 염기 서열을 확인하기 위한 시약으로 T easy 벡터(promega사), T4 DNA 리가아제(enzymomics사), DH5a 컴피턴트 세포(competent cell), 암피실린(Ampicilin)을 사용하였다.

GSNO reductase 재조합 단백질의 분리 정제를 위하여 Ni-Sepharose high performance(GE healthcare사), His6-tagged protein (Thermo Scientific Co., USA), Ni<sup>2+</sup>-nitrotriacetic acid Superflow column (Qiagen, Seoul, Korea), imidazole (Sigma-Aldrich Co., USA (56750)), HEPES (Sigma-Aldrich Co., USA (H3375)), NaCl (Sigma-Aldrich Co., USA (S9888)), 10% glycerol (Sigma-Aldrich Co., USA (G9012))를 사용하였다.

환원효소(GSNO reductase) 측정에는 S-Nitrosoglutathione (Sigma-Aldrich Co., USA (N4148)), NADH (Sigma-Aldrich Co., USA (606-68-8)), Dimethyl sulfoxide (Sigma Co., USA (D8418)), 96-well plate (Greiner Bio-One Co., Germany (M0812)) 등을 사용하였다.

#### 1-1-4. 표준 물질

추출물과 표준물질 비교 분석 실험에는 Catechin (Sigma-Aldrich Co., USA (43412)), Quercitrin (Sigma-Aldrich Co., USA (Q3001)), Hyperoside (HWI group Co., Germany (0018-05-85)), Nicotiflorin (Extrasynthese Co., France (1053S)), Procyanidin B1 (Sigma-Aldrich Co., USA (50878)), Rutin (Sigma-Aldrich Co., USA (R5143)), Baicalin (Sigma-Aldrich Co., USA (572667)) 시약을 사용하였다.

#### 1-1-5. 화합물 분석

고분해능 질량분석기 이온트랩 질량분석기 사용된 용매 및 버퍼는 Acetonitrile (Merck Co., USA, 4L (75-05-8)), Formic acid (Sigma-Aldrich Co., USA

(64-18-6))를 사용하였다.

## 1-2. 기기

### 1-2-1. Phosphodiesterase4 억제 효능 측정

Phosphodiesterase4 억제 효능 측정을 위한 분석기기는 Multilable Reader (PerkinElmer Inc, USA)를 사용하였다.

### 1-2-2. 환원효소 억제 효능 측정

환원효소(GSNO reductase) 억제 효능은 Flextation SoftMax Pro sofBRare (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 1-2-3. 화합물 분석

추출물질의 구조 분석에는 고분해능 질량분석기인 UHPLC-HR MS/MS (LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였고, 표준물질과의 비교분석을 정성용 질량분석기는 LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 이용하였다.

컬럼은 ACQUITY BEH C18 (150×2.1 mm, 1.7 μm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)와 Hypersil GOLD (1.9μm, 2.0x50 mm, Thermo LB Science Co., USA)를 사용하였다.

## 2. 시험방법

### 1-1. 식물의 추출 및 용매 분획

시료는 열풍건조기(40°C)를 이용하여 건조하였으며, 건조된 시료를 쇠질 분쇄하여 70% methyl alcohol (MeOH) 또는 ethyl alcohol (EtOH)로 하여 시료의 20배 부피로 가하여 침출하였다. 24시간 교반하면서 추출한 후 감압여과장치를 이용하여 여과하였다. 이를 3회 반복하여 여과액을 얻었고, 여액은 농축 후 동결 건조하여 추출물을 얻었다.

용매분획물을 동결건조하여 얻은 분말 추출물은 정제수 1 L에 현탁하고, 분별 깔때기를 이용하여 *n*-hexane (*n*-Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)을 차례로 각각 1 L씩 3회 가하여 *n*-hexane fraction (*n*-Hex fr.), ethyl acetate fraction (EtOAc fr.), *n*-butanol (*n*-BuOH fr.)fraction 및 H<sub>2</sub>O fraction (H<sub>2</sub>O fr.)의 분획물을 얻었다.

### 1-2. Phosphodiesterase enzyme 억제 연구

Phosphodiesterase (PDEs) enzyme 억제 효과 측정을 위해 시간분해형광공명 에너지전이 면역시험법(time resolved fluorescence resonance energy transfer immunoassay)을 이용하여 cAMP의 수치를 정량하였다. TR-FRET법은 에너지 주개(donor)인 유로퓸(Eu) 킬레이트-표지된 cAMP tracer와 에너지 받개(acceptor)인 Ulight-표지된 cAMP 항체 사이의 거리가 짧아지면, 에너지 주개인 유로퓸으로부터 에너지 받개인 Ulight로 에너지가 전이된다. 이 방법은 Ulight-항-cAMP와 free-cAMP 사이의 경쟁적 저해를 이용한 것으로서, PDE4에 의해 free cAMP가 많이 분해되어 수치가 낮아질 경우에는 형광공명에너지전이가 증가하게 되고, 반대로 PDE4A1의 활성이 저해되어 free cAMP의 수치가 높아질 경우에는 free cAMP와 Ulight-표지된 cAMP 사이의 경쟁적 저해에 의해 형광공명에너지전이가 감소하게 된다(Figure 4).

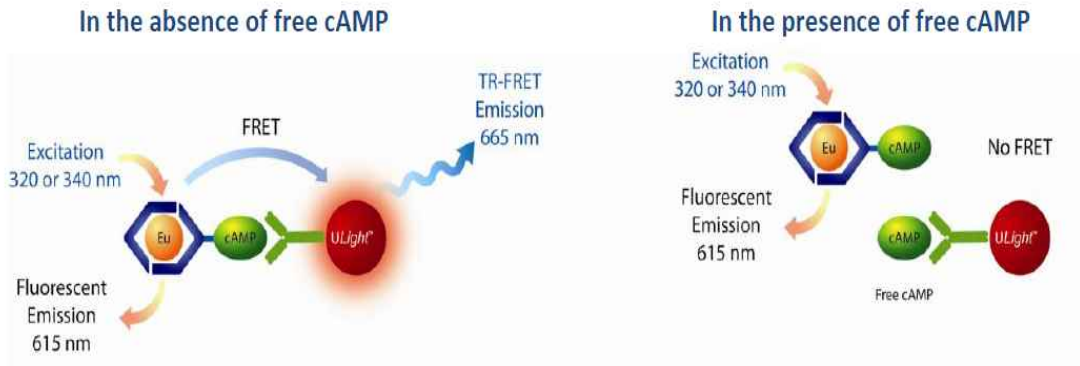


Figure 4. LANCE® *Ultra* cAMP assay principle.

사용한 시약은 LANCE *Ultra* cAMP 키트(PerkinElmer)이며, PDE4 효소는 BPS Bioscience사에서 구입하였다. 효소반응완충액(1xHBSS, 5 mM HEPES, pH 7.4, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA)에 희석시킨 0.8 µg/µL PDE4 2.5 µL와 4% DMSO 용액 2.5 µL를 5분 동안 반응시킨 후에, 12 nM의 cAMP 5 µL를 혼합하여 1시간 동안 더 반응시켰다. 이 때 기준 화합물로서, 최종농도 20 µM의 Rolipram (Sigma사)을 사용할 수 있다(Figure 5). 효소 반응 이후에 형광에너지 공명 수치를 측정하기 위해 stop/detection 완충액(1 mM IBMX, Sigma사)에 각각 1/50과 1/150로 희석시킨 Eu-cAMP tracer와 Ulight-항-cAMP를 넣고 반응을 진행하였으며, 1시간 후에 Envision plate reader (PerkinElmer사)를 통해 340 nm 여기(excitation), 665 nm 방출(emission) 수치를 측정하여 PDE4의 활성을 측정하였다. 최종 부피가 20 µL인 점을 고려하여 384 웰 small volume microplate (Greiner사)를 사용하였다.

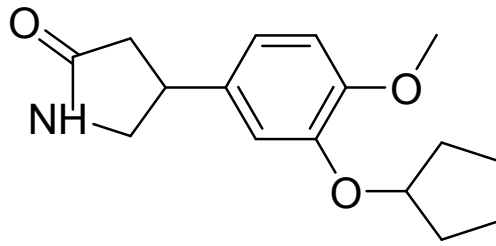


Figure 5. Control Structure (Roilpram) structure.

### 1-3. GSNO reductase 억제 연구

#### 1-3-1. GSNO 리덕타아제의 유전자 클로닝

임신한지 18일째의 SD (Sprague-Dawley) 래트(rat)의 배아에서 전뇌 피질을 분리하여 키운 신경구(Neurosphere)로부터 트리졸 시약(Invitrogen사)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 역전사효소(Superscript reverse transcriptase, Invitrogen사) 및 oligo-d(T)20 프라이머를 이용하여 65°C에서 5분, 50°C에서 50분, 85°C에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA의 합성에 사용한 프라이머는 다음과 같다: 포워드(forward) 프라이머 - GGA TCC GCG AAC CAG GTG ATC AGG, 리버스(reverse) 프라이머 - GCGGCCGC GAG TGC AGG ATG GGC AGT ACT.

이어서, Platinum blue PCR superMix (Invitrogen사)를 이용하여 상기 cDNA로부터 해당 유전자를 증폭시켰다. 이 때 PCR은 94°C에서 5분 동안 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 55°C에서 30초 동안 결합, 72°C에서 1분 30초 동안 합성의 사이클을 35회 반복하여 수행하였다. 이에 따라 증폭된 cDNA를 1% 아가로스 겔에서 분리한 후 에티뒀 브로마이드로 염색하였으며, 아가로스 겔 분리 키트(GeneAll사)를 이용하여 삽입 DNA 단편을 준비하였다.

삽입 cDNA와 T easy 벡터(promega사)를 EP 튜브에 넣고 T4 DNA 리가아제(enzygnomics사)를 첨가한 후, 18°C에서 6시간 동안 결합 반응을 수행하였다. 이와 같이 반응시킨 반응액을 DH5a 컴피턴트 세포(competent cell)에 넣고 얼음에

서 30분 동안 반응시킨 후, 42°C에서 1분 동안 열충격(heatshock) 반응을 수행하였으며, 이어서 SOB 배지를 넣고 37°C에서 40분 동안 배양하였다. 그 동안, 암피실린(Ampicilin)이 함유된 LB 아가로스 플레이트에 X-gal:IPTG를 스프레딩하여 건조시켜 준비해두었다. 40분 동안 배양한 E.coli를 원심분리시켜 가라앉힌 후, 앞서 미리 준비해둔 플레이트에 스프레딩하여 16시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양시켰다. 콜로니들 중에서 흰색의 콜로니만 선별하여 대량 배양시켰으며, 그 후 시퀀싱을 통해 GSNO 리덕타아제의 염기서열을 확인하였다.

염기서열이 확인된 GSNO 리덕타아제를 T easy 벡터로부터 N-말단에 His가 태깅된 pET-28a 벡터로 이동시키기 위해, pET-28a 벡터와 GSNO 리덕타아제/T easy 벡터를 각각 제한효소 BamHI과 NotI로 절단한 후에 상기 방법과 동일한 방법으로 GSNO 리덕타아제 삽입 단편과 pET-28a 벡터를 결합시켰다(Figure 3, A panel). 형질전환을 위해 사용한 E.coli는 Rosetta2 (DE3) 컴피턴트 세포(Novagen사)로서 42°C에서 1분 동안 열충격을 통해 유전자를 도입하였으며, 카나마이신을 이용해 콜로니를 선별하고 염기서열 분석을 통해 실험 결과를 확인하였다.

### 1-3-2. GSNO 리덕타아제 재조합 단백질의 분리 정제

N-말단에 히스티딘 tag가 부착되어 있는 pET-28a 벡터에 클로닝된 GSNO 리덕타아제 플라스미드를 Rosetta2 (DE3) 컴피턴트 세포에 도입하여 형질전환시켰다. GSNO 리덕타아제 재조합 단백질을 발현시키기 위해, 상기 형질전환시킨 세포를 LB 배지에서 2시간 동안 성장시킨 후(O.D 600 nm에서 0.8), 0.5mM의 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 넣고 25°C에서 6시간 동안 형질유도하였다. 단백질은 Ni-Sepharose high performance(GE healthcare사)와 이미다졸(Sigma사)을 이용하여 분리하였다. 컬럼에서의 단백질 분리는 20 mM HEPES, pH 7.4 완충액과 250 mM NaCl, 10% 글리세롤, 0.1% Tween-20, 500 mM 이미다졸, 1% Protein 억제제를 사용하여 수행하였다. 분리된 단백질은 100 mM 인산나트륨 pH 7.4, 100 mM KCl, 10% 글리세롤의 투석 완충액(dialysis buffer)에 넣고, 4°C에서 24시간 동안 교반시켜 이미다졸을 제거하고, 완충액을

100 mM 인산나트륨으로 교환하였다. 분리 정제된 단백질은 10% SDS-PAGE에서 전기영동시킨 후, 쿠마씨 블루로 염색하여 확인하였다(Figure 6, B panel).

### 1-3-3. GSNO 리덕타아제의 활성 측정

GSNO 리덕타아제 활성 억제 효과를 측정하기 위하여, GSNO 리덕타아제의 효소활성 측정 방법을 설계하였다. GSNO 리덕타아제는 GSNO를 환원시키며, 이 과정에서 조효소 NAD의 환원형인 NADH가 산화되어  $\text{NAD}^+$ 로 전환된다. NADH는 흡광도 340 nm에서 측정할 수 있으며, GSNO 리덕타아제의 효소활성은 흡광도 340 nm(A340)에서 일정 시간 간격으로 NADH 값을 측정함으로써 얻을 수 있다. 사용한 모든 시약들은 100  $\mu\text{M}$ 의 염화아연을 포함하는 100 mM의 인산나트륨 완충액에 희석시켜 사용하였다. 측정 방법은 96-웰 플레이트에서 800 nM의 GSNO 리덕타아제 25  $\mu\text{L}$ 와 4% DMSO 용액 25 $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 30°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 미리 혼합해 놓은 기질 용액(1 mM의 GSNO, 0.5 mM의 NADH) 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 그 후, 340 nm에서의 흡광도를 5분 동안 20초 간격으로 측정하여,  $V_{\text{max}}$  값을 획득하였다. 이와 같이 획득한 값은 Flexstation SoftMax pro 소프트웨어(Molecular device)의 Kinetics를 이용하여,  $V_{\text{max}}$  값을 계산하였다.

양성 대조군으로서, GSNO 리덕타아제의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는 N6022 화합물 1  $\mu\text{M}$ 을 사용하였고(Figure 6, C panel) 음성 대조군(DMSO)의  $V_{\text{max}}$  값과 비교하여, N6022에 의해 GSNO 리덕타아제의 활성이 억제되는 정도를 측정하였다(Figure 6, D panel).

96-웰 플레이트에서 800 nM의 GSNO 리덕타아제 25  $\mu\text{L}$ 와 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DMSO 4%)의 추출물 25  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 30°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 미리 혼합해 놓은 기질 용액(1 mM의 GSNO, 0.5 mM의 NADH) 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 그 후, 340 nm에서의 흡광도를 5분 동안 20초 간격으로 측정하여  $V_{\text{max}}$  값을 얻었다. 시료 용액의 대조군은 추출물과 동일한 농도의 DMSO(최종 1%)를 사용하였으며, 이 때 획득한 측정값을 100으로 정하였다.

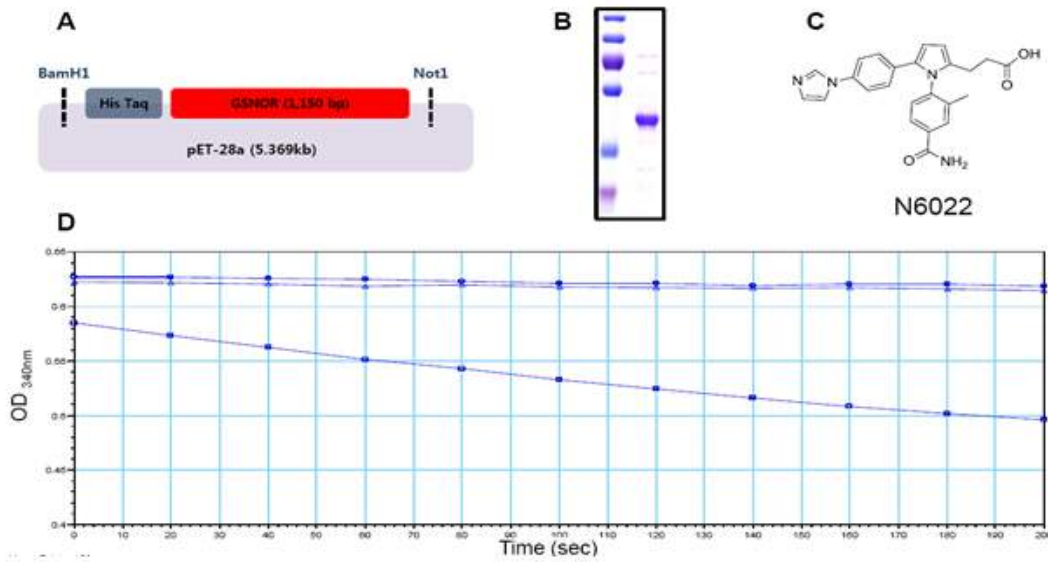


Figure 6. GSNO reductase assay.

#### 1-4. 마우스 활용 항천식 연구

마우스를 활용한 항천식 연구는 한국생명공학연구원에 의뢰하여 진행하였으며, 동물실험 승인번호는 KRIBB-AEC-14092(승인날짜: 2014.06.11.)이다.

##### 1-4-1. 동물실험

항천식 연구를 위한 동물실험은 6 주령의 암컷 마우스 SPF (specific pathogen-free) Balb/c 생쥐 (20 g, Samtako, Korea Co.)를 이용하였다. 마우스 모델에서 항천식 동물 실험에서 Normal Control은 천식 유도를 하지 않았으며, 나머지에 대하여 천식 유도를 하였다. 천식 유도된 동물에 대하여 Table 3과 같이 처리를 하였다.



Table 3. The design of animal group in experiment for anti-asthma with mouse model.

Type	Treatment	No. of mice
NC(Normal Control)	No Treatment	4
OVA(Ovalbumin)	Asthma induced	7
Dex(Dexamethason)	Asthma induced + Dexamethason	4
C.	42-30 Asthma induced + 42(30mg/mL)	7
macrophylla	42-60 Asthma induced + 42(60mg/mL)	7
D.	71-30 Asthma induced + 71(30mg/mL)	7
racemosum	71-60 Asthma induced + 71(60mg/mL)	7
P. villosa	94-30 Asthma induced + 94(30mg/mL)	7
	94-60 Asthma induced + 94(60mg/mL)	7

#### 1-4-2. 난백알부민(Ovalbumin, OVA) 유도 천식 모델 및 시료 투여

1주간의 순화기간을 거친 생쥐에게 2주 간격으로 2 mg 수산화알루미늄 (A8222, Sigma-Aldrich, MO, USA)과 Ovalbumin 20 ug (A5503, Sigma-Aldrich)을 현탁한 인산완충용액 200 uL을 복강에 주입하여 감작시켰다. 첫 번째 Ovalbumin 복강투여 후 21일부터 23일까지 1% Ovalbumin을 초음파분무기 (NE-U12, Omron Corp., Japan)를 이용하여 30 분간 흡입시켰다. 마지막 Ovalbumin 노출 후 24시간 뒤, 기도과민성을 측정하였고, 48시간 뒤에 펜토바비탈 (50 mg/kg, Entobal, Hanil, Korea)를 복강투여하여 마취시킨 후 복대정맥을 통하여 혈액을 채취하였고, 기관지 절개를 실시하여 총 1.4 mL의 PBS로 기관지 폐포 세척을 실시하여 검체를 수거하였다. 실험군은 정상대조군 (NC, Ovalbumin 투여 및 흡입하지 않는 군), 천식유발군 (OVA, Ovalbumin 투여 및 흡입한 군), 약물대조군 (DEX, Dexamethason, 30 mg/kg 투여 + Ovalbumin 투여 및 흡입한 군), 시료투여군 (곰의말채나무, 조록나무, 윤노리나무 추출물을 각각 30 mg/kg 과 60 mg/kg 투여 + Ovalbumin 투여 및 흡입한 군)으로 설정하여 진행되었다. 약물 및 시료는 첫 번째 Ovalbumin 투여 후 18일부터 23일까지 경구투여하였으며, 각 군당 7 마리의 생쥐를 사용하였다(Figure 7).

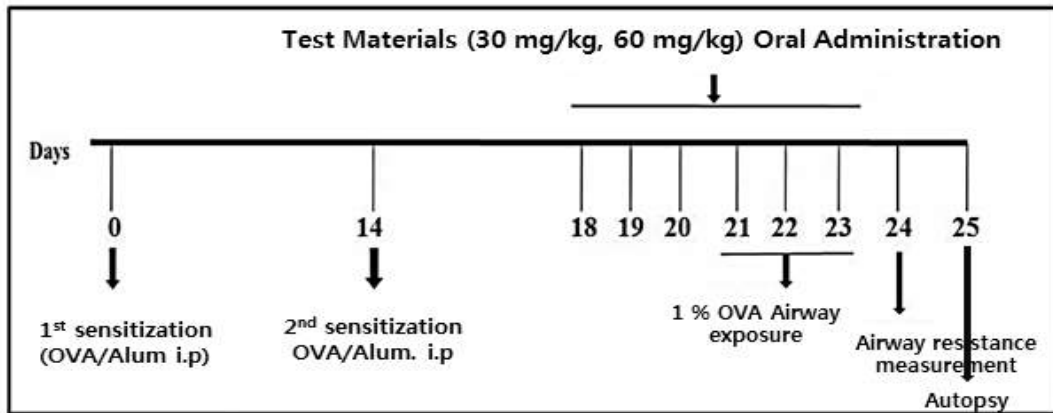


Figure 7. Diagram for the experiment.

#### 1-4-3. 기도과민성 측정

폐기능이 정상이지만 기관지천식에 합당한 증상을 가진 환자는 메타콜린, 히스타민, 만니톨 또는 운동유발에 의한 기도과민성의 측정으로 천식의 진단을 확실하게 할 수 있다.<sup>48)</sup> 비 특이적 기도과민성은 methylcholine 기관지유발검사를 시행하였다. 천식 발생에 의한 기도과민성(Airway hyperresponsiveness)을 측정하기 위해 one chamber plethysmography (All Medicus, Korea)를 이용하였다. 기도 저항의 정도는 enhanced pause (Penh)을 측정하여 평가하였다. Penh의 측정은 정상 호흡 상태에서 기저값을 측정한 후 PBS를 초음파분무기를 이용하여 3분간 흡입시킨 후 3분간 측정하였다. 이후 methylcholine (A2251, Sigma-Aldrich)을 10, 20, 30 mg/mL의 농도로 점차 증가시키면서 흡입시킨 후 Penh 값을 측정하였다. 기도 저항을 나타내는 지표인 Penh는 자동 계측한 호기 시간(Expiration time, Te), 이완시간(Relaxation time, RT), 최대호기유속(Peak expiratory flow, PEF)과 최대흡기유속 (Peak inspiratory, PIF)으로부터 자동 산출되는 지표이며 공식은  $Penh = (Te/RT-1) \times PEF/PIF$ 이다.<sup>49)</sup>

#### 1-4-4. 기관지 폐포 세척액 분리 및 염증세포수 측정

기관지천식은 기도 염증과 과민성을 특징으로 하는 질환으로 호산구 및 림프구, 비만세포 등의 활성화된 염증 세포들의 기도 내 침윤 소견이 뚜렷하다.<sup>50)</sup> 기도 내로 침윤된 호산구는 활성화되어 호산구양이온단백(eosinophil cationic protein)을 포함한 과립단백이나 아라키돈산 대사물을 분비하여 기도평활근 수축, 기도상피세포 탈락 및 점액분비를 증가시켜 기관지 천식의 병태생리에 매우 중요한 역할을 하고 있다.<sup>51)</sup> 기도 과민성을 측정하고 24시간 후 PBS와 주사기를 이용하여 각 개체의 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)은 회수된 다음 Cytospin (Hanil, Korea)을 이용하여 세포를 슬라이드에 부착시킨 후, Diff-Quik 염색 (Sysmex, Switzerland)을 실시하여 호산구를 비롯한 그 외 염증세포를 현미경을 통해 검경한 후, 400배 배율에서 각 sample당 4곳의 현미경 사진촬영을 하였고, 이에 따른 각 sample 당 염증세포 수를 개수하였다.

#### 1-4-5. 기관지 폐포 세척액 내 cytokine 분석

호산구가 골수에서 만들어지고 기도 내로 이동하여 활성화되는 과정에서는 T helper (Th) 세포, 특히 T helper 2 (Th2) 세포와 Th2 세포에서 분비하는 IL-3 (interleukin-3), IL-5 (interleukin-5), GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)이 중요한 역할을 한다.<sup>52)</sup> 또한 Th2 세포는 IL-4와 IL-13을 분비하여 B 세포로부터 항원 특이 IgE를 생산하여 천식의 병인기전에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것은 잘 알려져 있다.<sup>53)</sup> 기관지 폐포 세척액 내 cytokine 분석을 위하여 각 개체에서 분리한 기관지 폐포 세척액(BALF)에서 Interleukin-5, Interleukin-13 의 생성량은 시판용 효소면역분석 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) kit (R&D System, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 cytokine 분석은 제조사의 실험방법에 따라 실시하였으며, ELISA reader(Molecular Devices, USA) 기를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 1-4-6. 혈청내 Ovalbumin 특이 Immunoglobulin-E (IgE) 측정

만성 기도염증 알레르겐에 의한 천식의 주요 증상은 알레르겐의 특이적인 immunoglobulin E (IgE) 항체 형성으로 기도점액 분비와 기도과민성으로 인한 기도폐쇄를 들 수 있다.<sup>54)</sup> Immunoglobulin E 분석은 후대정맥을 통하여 수득한 혈액은 상온에서 30분간 반응시킨 후, 원심분리 (3000 rpm, 15 min) 하여 혈청을 얻었다. 혈청 내 Ovalbumin 특이 Immunoglobulin-E의 측정을 위하여 ELISA법을 이용하였다. Ovalbumin 특이 Immunoglobulin-E는 시판되는 Immunoglobulin-E (Biolegend Ins., USA)를 사용하여 측정하였으며, Ovalbumin 특이 Immunoglobulin-E는 96-well flat bottom ELISA plate에 Ovalbumin을 20 ug/mL의 농도로 0.1 M NAHCO<sub>3</sub> 완충액 (pH 8.3)에 녹여 4°C에서 16시간 반응시켰다. 그 후 1% bovine serum albumin 이 함유된 PBS로 비특이 반응을 억제시켰다. 혈청 검체는 1:400 으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 0.05% BReen 20이 함유된 PBS로 세척하였다. peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-rat IgG polyclonal A를 4,000 배 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, 발색은 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate로 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 1-4-7. 조직병리 검사

세척 또는 호산구는 치료 천식 및 성인의 폐 기능 변화와 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>55)</sup> 조직병리 검사는 폐를 떼어내어 즉시 10% formaldehyde 용액에 고정 한 후 세절하여 흐르는 물에 8 시간 수세한 다음, epoxy에 포매하고, 이것을 microtome으로 절편을 만들어 표준방법에 의하여 폐조직내 염증을 관찰하기 위하여 Hematoxylin & Eosin 염색을, 기관지 내 점액분비를 관찰하기 위하여 periodic acid Schiff (PAS, IMEB Inc., USA) 염색 수행하였다. 광학현미경을 이용하여 폐조직의 병리학적 변화를 검경하였다. 조직의 염증 및 점액생산 지수는 이미지분석소프트웨어(IMT-i software, Vancouver, Canada)를 이용하여 측정하였다.

#### 1-4-8. 통계처리

여러 변수에 따른 평균값과 표준편차 (mean±SD)로 계산하였고 각 집단 간의 비교는 SPSS 10.0을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고, 사후검정으로 Dunnett's multiple comparison test를 이용하여, 각 그룹간 유의성을 검증하였다. 통계적으로 p 값이 0.05 미만인 경우에 유의적 차이가 있다고 판정하였다.

#### 1-5. Rat 활용 독성 연구

Rat를 활용한 독성 연구는 (주)바이오톡스텍(Biototech Co., Ltd)에 의뢰하여 GLP (Good Laboratory Practice) 규정을 준수하였으며, 식품의약품안전처 고시 제 2014-67호(2014.2.12.) “비임상시험관리기준”에 따라 진행되었다. 또한, 동물보호법(제정 1991년5월31일 법률제4379호, 일부개정2015년 1월20일 법률 제13023호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: 150146).

##### 1-5-1. 동물실험

독성 연구를 위한 동물실험은 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF 계통의 Rat를 사용하였고 생산처 및 구입처는 ORIENTBIO INC., Korea 이다.

##### 1-5-2. 시험물질의 조제

시험물질은 전자저울 (CP323S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 유발에 넣고, 부형제를 일부 넣어 현탁시켰다. 조제병에 조제물을 옮긴 후, 부형제를 가하여 규정농도 (200 mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 투여당일 조제하였다.

1-5-3. 시험계

수컷은 6주령 10마리로 122.5~135.2 g 체중범위를 확인하였고, 암컷은 6주령 10마리로 102.6~114.1 g 체중범위를 확인할 수 있었다(Table 4).

검역·순화는 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수 시 검역실에서 3일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화 (Table 3)를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다(Table 4).

Table 4. Individual body weights (g) during an acclimation period.

Male				Female			
Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group Assignment	Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group Assignment
1101	1010	133.7	202.2	2101	2011	102.6	134.2
1102	1002	132.7	201.6	2102	2002	108.9	144.4
1103	1007	127.5	182.6	2103	2001	108.4	141.6
1104	1003	125.0	183.8	2104	2012	104.9	135.5
1105	1006	122.5	192.6	2105	2006	112.3	148.0
1201	1008	131.4	177.1	2201	2003	114.0	147.7
1202	1011	132.1	198.2	2202	2005	106.4	133.7
1203	1005	135.2	195.6	2203	2009	114.1	139.2
1204	1012	131.0	196.7	2204	2010	109.2	141.9
1205	1001	131.7	195.7	2205	2007	111.3	140.8
	1004	133.8	212.2		2004	107.7	154.4
	1009	133.5	175.0		2008	113.4	155.6
Mean		130.8	192.8	Mean		109.4	143.1
S.D.		3.9	11.1	S.D.		3.7	7.3
N		12	12	N		12	12

개체 및 사육상자 식별은 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화 기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

#### 1-5-4. 사육환경 조건

사육상자의 종류 및 크기는 스테인레스 철망사육상로, 260W×350D×210H (mm)를 사용하였고, 사육상자당 수용동물 수는 검역 순화기간에는 3마리, 관찰기간에는 1마리로 하였다. 온도 실측치는 21.6~23.8 °C(허용범위: 19.0~25.0 °C)이며, 상대습도 실측치는 42.2~61.8%(허용범위: 30.0~70.0%)이었다. 또한, 명암주기(조명시간)는 12시간/일(오전 7시부터 오후 7시), 조도는 150~300 Lux를 사육환경 조건으로 하였다.

#### 1-5-5. 사료

사료 종류는 실험동물용 고형사료(Lot No. 2918C-100114MA, Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.)를 사용하였다.

#### 1-5-6. 투여

투여경로는 경구투여로 진행하였으며, 투여액량은 10 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 투여당일의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기(3 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

#### 1-5-7. 군구성 및 투여용량

Rat 구성은 대조군 수컷과 암컷 각 5마리, 시험물질 투여군으로 수컷과 암컷 각 5마리 총 10마리를 활용하였다(Table 5). 투여용량은 본시험의 예비시험(Biotoxtech Study No.: B15117P1)으로 2,000 mg/10 mL/kg을 암수 각 1마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 투여용량은 2,000 mg/kg의 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여

군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

Table 5. The design of animal group in experiment for toxicity studies in rat.

Group	Dose (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Animals (animal ID)	
			Males	Females
G1 Control	0	10	5 (1101~1105)	5 (2101~2105)
G2 Test substance	2,000	10	5 (1201~1205)	5 (2201~2205)

#### 1-5-8. 관찰 및 검사

일반증상 관찰은 투여당일(0일)에는 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반 상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 체중측정은 투여당일(투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14일(부검일)에 측정하였다. 부검은 관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대해서 CO<sub>2</sub>가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다.

#### 1-5-9. 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한 결과 (유의수준: 0.05), 등분산이 인정되어 Student t-test를 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).



## 1-6. 화합물 분석

### 1-6-1. 추출 성분 분리 분석

추출 성분은 LC/MS 분리분석법으로 화합물을 동정하였다. 분석기기는 Accela UHPLC 시스템 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 연결된 고해상도 LTQ-Orbitrap XL 질량분석기를 사용하여 분석하였다. ACQUITY BEH C18 (150×2.1mm, 1.7 $\mu$ m; Waters Corporation, Milford, MA, USA) 컬럼을 이용해 다양한 성분들을 그 극성에 따라 분리하였다. 유속과 주입량은 각각 0.4 mL/min, 2  $\mu$ L이었고 용매 A (0.1% Formic acid이 함유된 dH<sub>2</sub>O) 와 용매 B (0.1% Formic acid이 함유된 Acetonitrile)를 이용하였다.

윤노리나무 추출물은 경우 이동상 조건은 0~20 분에 5~30% B(선형 구배), 20~24 분에 30~100% B (선형 구배), 24~27 분에 100% B (등용매 구배)로 분석하였다. 샘플 화합물과 표준 화합물은 Photodiode Array의 200~600 nm에서 검출되었다. Negative 전기분무이온화 모드에서 MS의 조건 최적화되었고 분무전압 4.0 kV, 모세관전압 35 V, 온도 300 °C. 전체스캔질량스펙트럼은 음이온 모드에서 100-1000의 m/z 범위에서 측정하였고, MS/MS 스펙트럼은 충돌유도분리작용법으로 데이터를 수집하였다.(Table 6).

조록나무 추출물은 경우 이동상 조건은 0~1 분에 5% B(등용매 구배), 1~15 분에 5~55% B (선형 구배), 15~16 분에 100% B (등용매 구배)로 분석하였다. 샘플 화합물과 표준 화합물은 Photodiode Array의 200~600 nm에서 검출되었다. Positive 전기분무이온화 모드에서 MS의 조건이 최적화되었고 분무전압 4.0 kV, 모세관전압 35 V, 온도 300 °C. 전체스캔질량스펙트럼은 양이온 모드에서 100~1000의 m/z 범위에서 측정하였다(Table 7).

MS/MS 스펙트럼은 충돌유도분리작용법으로 데이터를 수집하였고, 데이터 수집 및 데이터 분석에는 XCALIBUR 소프트웨어(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하였다.

Table 6. Instrumental conditions of positive electrospray ionization mode for UHPLC LTQ-Orbitrap XL MS.

Control Factor	Conditions		
Injection volume	2 $\mu$ L		
Column	ACQUITY BEH C18 (150 $\times$ 2.1 mm, 1.7 $\mu$ m)		
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O with 0.1% formic acid B: acetonitrile with 0.1% formic acid		
Flow rate	0.4 mL/min		
Spray voltage	4.0 kV		
Capillary voltage	35 V		
Mass resolving power	30,000 full		
m/z range	100 ~ 1,000		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
Gradient	20	70	30
	24	0	100
	27	0	100

Table 7. Instrumental conditions of negative electrospray ionization mode for UHPLC LTQ-Orbitrap XL MS.

Control Factor	Conditions		
Injection volume	2 $\mu$ L		
Column	ACQUITY BEH C18 (150 $\times$ 2.1 mm, 1.7 $\mu$ m)		
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O with 0.1% formic acid B: acetonitrile with 0.1% formic acid		
Flow rate	0.4 mL/min		
Spray voltage	4.0 kV		
Capillary voltage	35 V		
Mass resolving power	30,000 full		
m/z rage	100 ~ 1,000		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
Gradient	1	95	5
	15	45	55
	16	0	100

## 1-6-2. 추출 성분의 화합물 구조 확인

추출 성분의 화합물 구조는 LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 분석하였다. Hypersil GOLD (1.9  $\mu\text{m}$ , 2.0 x 50 mm, Thermo LB Science Co., USA) 컬럼을 이용해 성분들을 그 극성에 따라 분리하였다. 유속과 주입량은 각각 0.4 mL/min, 10  $\mu\text{L}$ 이었고 용매 A (0.1% Formic acid이 함유된 dH<sub>2</sub>O와 용매 B (Acetonitrile)를 이용하였다. 이동상 조건은 0~1 분에 5% B(등용매 구배), 1~20 분에 5~55 % B (선형 구배), 20~25 분에 55~100 % B (등용매 구배)로 분석하였다. 샘플 화합물과 표준 화합물은 Photodiode Array의 200~600 nm에서 검출하였다. Negative 전기분무 이온화 모드에서 MS 조건을 최적화하였고 분무전압 5.0 kV, 온도 275°C. 전체스캔질량스펙트럼은 음이온 모드에서 100~1000의 m/z 범위에서 측정하였다. MS/MS 스펙트럼은 충돌 유도 분리작용법으로 데이터를 수집하였다(Table 8).

Table 8. Instrumental conditions for negative electrospray ionization mode for LCQ Fleet Ion Trap MS.

Control Factor	Conditions		
Injection volume	10 $\mu\text{L}$		
Column	Hypersil GOLD(1.9 $\mu\text{m}$ , 2.0x50 mm)		
Mobile phase	A: dH <sub>2</sub> O with 0.1% formic acid B: acetonitrile		
Flow rate	0.4 mL/min		
Spray voltage	5.0 kv		
Capillary voltage	35 V		
m/z range	100~10,000		
	Time (min)	A (%)	B (%)
Gradient	0	95	5
	1	95	5
	20	45	55
	25	0	100

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 식물자원 탐색 및 선정

##### 1-1. 제주 식물자원 탐색

실험에 사용된 시료들은 2004년 8월부터 12월 사이에 제주에서 자생하고 있는 식물들을 중심으로 수집 되었다. 제주동부지역과 남부지역을 중심으로 주로 채집 되었으며, 제주테크노파크에 정보가 구축되어져 있다. 100종의 식물들을 과명에 따라 분류한 결과 총 52종으로 나눌 수가 있었다. 장미과가 9종, 콩과 8종, 국화과, 녹나무과, 뽕나무과, 참나무과가 각각 4종이 확인되었다. 채집된 식물들 중 나무들은 잎(Leaf: LF), 가지(Breach: BR) 분류하고, 풀 종류는 전초(Whole plant: WP)를 사용하는 등 부위별로 분류하여 추출하였다. 100종의 식물에 대해 각각 Tag를 부여하였으며, 학명(한글명), 채집 부위, 추출 용매를 Table 9에 나타내었다.

Table 9. List of natural plants sampled in Jeju area.

No.	Tag	Korea Name	Scientific Name	Part Used	Extraction Solvent
001	04-01	찔레나무	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	LF&BR	70% MeOH
002	04-03	취뽕나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.	LF&BR	70% EtOH
003	04-04	인동덩굴	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	WP	70% MeOH
004	04-12	당유자 (唐柚子)	<i>Citrus grandis</i> Osbeck	LF	70% MeOH

005	04-20	감자(柑子)	<i>Citrus benikoji</i> Hort. et Tanaka	LF	70% MeOH
006	04-21	구지뽕나무	<i>Cudrania tricuspidata</i> (Carr.) Breau ex Lavallee	LF&BR	70% MeOH
007	04-22	천선과나무	<i>Ficus erecta</i> Thunb.	LF&BR	70% MeOH
008	04-23	양하	<i>Zingiber mioga</i> (Thunb.) Rosc.	WP	70% MeOH
009	04-25	구상나무	<i>Abies koreana</i> Wilson	LF	70% MeOH
010	04-26	하귤	<i>Citrus natsudaidai</i> Hayata	LF	70% EtOH
011	04-27	마삭줄	<i>Trachelospermum asiaticum</i> (Sieb. et Zucc.) Nakai	WP	70% MeOH
012	04-28	모람	<i>Ficus oxyphylla</i> Miq. Ex Zoll.	WP	70% MeOH
013	04-29	암대극	<i>Euphorbia jolkini</i> Boissier	WP	70% MeOH
014	04-30	갯완두	<i>Lathirus japonicus</i> Wildenow	WP	70% MeOH
015	04-32	쇠무릎	<i>Achyranthes Japonica</i> (Miq.) Nakai	WP	70% MeOH
016	04-33	남오미자	<i>Kadsula japonica</i> (L.) Dunal	WP	70% MeOH
017	04-34	천문동	<i>Asparagus cochichinensis</i> (Lour.) Merr.	WP	70% MeOH
018	04-35	아왜나무	<i>Viburnum odoratissimum</i> Ker-Gawler	LF&BR	70% MeOH

019	04-36	관중	<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai	WP	70% MeOH
020	04-37	개면마	<i>Matteuccia orientalis</i> (Hook) Trev.	WP	70% MeOH
021	04-39	밤나무	<i>Castanea crenata</i> Sieb. et Zucc.	LF&BR	70% MeOH
022	04-44	박새	<i>Veratrum oxysepalum</i> Turcz.	WP	70% MeOH
023	04-45	산뽕나무	<i>Morus bombycis</i> Koidzumi	LF,BR	70% MeOH
024	04-46	굴거리나무	<i>Daphniphyllum macropodum</i> Miquel	LF,BR	70% MeOH
025	04-48	알파리	<i>Tubocapsicum anomalum</i> (Franch. Et Sav.) Makino	LF,BR	70% MeOH
026	04-51	비목나무	<i>Lindera erythrocarpa</i> Makino	LF,BR	70% MeOH
027	04-52	홍지네고사리	<i>Dryopteris Erythrosora</i>	WP	70% MeOH
028	04-57	석송	<i>Lycopodium clavatum</i> var. <i>nipponicum</i> Nakai	LF,BR	70% MeOH
029	04-60	고삼	<i>Sophora flavescens</i> Solander ex Aiton	WP	70% MeOH
030	04-62	붉가시나무	<i>Quercus acuta</i> Thunb. Ex Murray	LF,BR	70% MeOH
031	04-63	작살나무	<i>Callicarpa japonica</i> Thunb.	LF,BR	70% MeOH
032	04-65	예덕나무	<i>Mallotus japonicus</i> (Thunb.) Muller-Arg.	LF,BR	70% MeOH

033	04-68	참가시나무	<i>Quercus salicina</i> Blume	LF,BR	70% MeOH
034	04-69	강활	<i>Ostericum praetericum</i> Kitagawa	WP	70% MeOH
035	04-70	흰새택이	<i>Neolitsea aciculata</i> (blume) Koidz	WP	70% MeOH
036	04-74	청미래덩굴	<i>Smilax chiana</i> L.	WP	70% MeOH
037	04-78	매죽나무	<i>Styrax japonica</i> Sieb. et Zucc.	LF,BR	70% MeOH
038	04-79	이나무	<i>Idesia Policarpa</i> Maxim.	LF,BR	70% MeOH
039	04-80	산수국	<i>Hydrangea macrophylla</i> <i>var.acuminata</i> (Sieb. et Zucc.) Makino	WP	70% MeOH
040	04-81	사람주나무	<i>Sapium japonicum</i> (Siebold & Zucc.) Pax & Hoffm	LF,BR	70% MeOH
041	04-82	탱자	<i>Poncirus trifoliata</i> Rafin.	미성숙	70% MeOH
042	04-86	곰의말채나무	<i>Cornus macroPhylla</i> Wall	LF,BR	70% EtOH
043	04-87	가막살나무	<i>Viburnum dilatatum</i> Thunb.	LF,BR	70% EtOH
044	04-89	고사리	<i>Pteridium aquilinum var.</i> <i>latiusculum</i> (Desv.) Underwoodex Heller	WP	70% MeOH
045	04-91	참느릅나무	<i>Ulmus Parvifolia</i> Jacquin	LF,BR	70% EtOH
046	04-92	노린재나무	<i>Symplocos chinensis for.Pilosa</i> (Nakai) Ohwi	LF,BR	70% MeOH



047	04-93	종가시나무	<i>Quercus glauca</i> Thunb.	LF, BR	70% MeOH
048	04-96	자귀나무	<i>Albizzia julibrissin</i> Durazz.	LF, BR	70% MeOH
049	04-97	창포	<i>Acorus calamus</i> Linnaeus var. <i>angustatus</i> Besser	WP	70% MeOH
050	04-98	개속새	<i>Equisetum ramosissimum</i> Desfontaines	WP	70% EtOH
051	04-99	쑥	<i>Artemisia princeps</i> Pampanini	WP	70% MeOH
052	04-100	비쑥	<i>Artemisia scoparia</i> Waldstein & Kitabel	WP	70% EtOH
053	04-106	초종용	<i>Orobanche cerulescens</i> Stephan	WP	70% EtOH
054	04-107	갯패랭이꽃	<i>Diathus japonicus</i> Thunb.	WP	70% EtOH
055	04-109	갯금불초	<i>Wedelia prostrata</i> (Hook. Et Arn.) Hemsley	WP	70% EtOH
056	04-118	흑삼능	<i>Sparganium japonicum</i> Rothert	WP	70% EtOH
057	04-121	개머루	<i>Ampelopsis heterophylla</i> (Thunb.) Siebold & Zucc.	WP	70% EtOH
058	04-122	큰뻬무	<i>Geum aleppicum</i> Jacquin	WP	70% MeOH
059	04-125	미국자리공	<i>Phytolacca americana</i> L.	WP	70% EtOH
060	04-126	층층나무	<i>Cornus controversa</i> Hensley ex Prain	WP	70% EtOH

061	04-129	음나무	<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb.) Koidz	LF,BR	70% EtOH
062	04-130	섬개벚나무	<i>Prunus buergeriana</i> Miquel	LF,BR	70% EtOH
063	04-131	호랑가시나무	<i>Ilex cornuta</i> Lindley et Paxton	LF,BR	70% EtOH
064	04-132	산개벚나무	<i>Prunus maximowiczii</i> Ruprecht	LF,BR	70% EtOH
065	04-133	팔손이나무	<i>Fatsia japonica</i> (Thunb.) Decaisne et Planchon	LF,BR	70% EtOH
066	04-134	센달나무	<i>Machilus japonica</i> Sieb. et Zucc.	LF,BR	70% EtOH
067	04-135	감탕나무	<i>Ilex integra</i> Thunb.	LF,BR	70% EtOH
068	04-136	후박나무	<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	LF,BR	70% EtOH
069	04-138	사스레피나무	<i>Eurya japonica</i> Thunb.	LF,BR	70% MeOH
070	04-139	유동	<i>Aleurites fordii</i> Hemsl.	LF,BR	70% EtOH
071	04-140	조록나무	<i>Distylum racemosum</i> Sieb. Et Zucc.	LF,BR	70% EtOH
072	04-142	주목	<i>Taxus cuspidata</i> Sieb. Et Zucc.	LF,BR	70% EtOH
073	04-143	팡팡나무	<i>Ilex crenata</i> Thunb.	LF,BR	70% EtOH
074	04-144	솔비나무	<i>Maackia fauriei</i> (H.Lév.) Takeda	LF,BR	70% MeOH

075	04-145	덩굴곽향	<i>Teucrium viscidum</i> var. <i>miquelianum</i> (Maxim) Hara	WP	70% MeOH
076	04-146	말오줌때	<i>Euscaphis japonica</i> (Thunb.) Kanitz	WP	70% MeOH
077	04-147	비수리	<i>Lespedeza cuneata</i> (Dumont d. Cours.) G. Don	WP	70% MeOH
078	04-148	황칠나무	<i>Dendropanax morbiferum</i> Leveille In Fedde	LF,BR	70% MeOH
079	04-149	감국	<i>Chrysanthemum frutescens</i> L.	LF,BR	70% EtOH
080	04-152	낭아초	<i>Indigofera pseudo-tinctoria</i> Matsum.	WP	70% MeOH
081	04-154	쑥	<i>Pueraria Lobata</i> (Willd.) Ohwi	WP	70% MeOH
082	04-155	딱지꽃	<i>Potentilla chinensis</i> Seringe	WP	70% EtOH
083	04-156	석류풀	<i>Mollugo pentaphylla</i> L.	WP	70% EtOH
084	04-157	순비기나무	<i>Vitex rotundifolia</i> L.	LF,BR	70% MeOH
085	04-158	나문재	<i>Suaeda guluca</i> (Bunge) Bunge	WP	70% EtOH
086	04-160	으아리	<i>Clematis mandshurica</i> Ruprecht	WP	70% MeOH
087	04-161	단풍나무	<i>Acer palmatum</i> Thunb.	LF,BR	70% EtOH
088	04-162	붓순나무	<i>Illicium anisatum</i> L.	LF	70% MeOH

089	04-162- 1	붓순나무	<i>Illicium anisatum</i> L.	BR	70% EtOH
090	04-164	돈나무	<i>Pittosporum tobira</i> (Thunb.) Aiton	LF,BR	70% MeOH
091	04-166	후피향나무	<i>Ternstroemia gymnanthera</i> (Wight et Arn.) Sprague	LF,BR	70% EtOH
092	04-167	광나무	<i>Ligustrum japonicum</i> Thunb.	LF,BR	70% EtOH
093	04-168	빗죽이나무	<i>Cleyera japonica</i> Thunb.	LF,BR	70% EtOH
094	04-169	윤노리나무	<i>Pourthiaea villosa</i> (Thunb.) Decaisne	LF,BR	70% EtOH
095	04-170	소귀나무	<i>Myrica rubra</i> (lour.) Sieb. Et Zucc.	LF,BR	70% EtOH
096	04-172	무환자나무	<i>Sapindus mukorossi</i> Gaetner	LF,BR	70% EtOH
097	04-173	복숭아나무	<i>Prunus persica</i> (Linnaeus0) Batsch	LF,BR	70% EtOH
098	04-174	실거리나무	<i>Caesalpinia decapetala</i> (Roth) Alst.	LF,BR	70% EtOH
099	04-176	꾸지딸기	<i>Rubus trifidus</i> Thunb.	WP	70% EtOH
100	04-178	짚신나물	<i>Agrmonia pilosa</i> Ledeb.	WP	70% EtOH

## 1-2. 천식 억제 효능 탐색 및 식물자원 선정

100종의 식물 추출물에 대하여 PDE4 및 GSNO 억제 연구를 진행하였다. 연구 결과 80% 이상 inhibition을 나타내는 추출물이 PDE4에서 6종, GSNO에서 5종이 확인되었다. PDE4에서는 예덕나무 (No.32, 93.9%), 사람주나무 (No.40, 83.7%), 곰의말채나무 (No.42, 87.3%), 조록나무 (No.71, 83.2%), 단풍나무 (No.87, 100.0%), 윤노리나무 (No.94, 91.1%)가, GSNO에서는 비목나무 (No.26, 84.8%), 곰의말채나무 (No.42, 95.9%), 조록나무 (No.71, 97.0%), 빗죽이나무 (No.93, 86.3%), 윤노리나무 (No.94, 91.7%) 효능을 나타냈다(Table 10).

두가지 타겟(PDE4, GSNO)에서 80% 이상 활성을 나타내는 곰의말채나무 (No.42), 조록나무 (No.71), 윤노리나무 (No.94) 3종에 대하여 심층 연구를 진행하였다(Figure 8).

Table 10. Screening of a plant extract library for PDE4 & GSNOR inhibitors.

No.	Tag	Korea Name	Scientific Name	PDE4 % inhibition	GSNOR % inhibition
001	04-01	찔레나무	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	46.4%	41.4%
002	04-03	취풍나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.	18.5%	2.5%
003	04-04	인동덩굴	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	37.6%	2.9%
004	04-12	당유자 (唐柚子)	<i>Citrus grandis</i> Osbeck	30.6%	7.7%
005	04-20	감자(柑子)	<i>Citrus benikoji</i> Hort. et Tanaka	31.7%	9.1%
006	04-21	구지뽕나무	<i>Cudrania tricuspidata</i> (Carr.) Breau ex Lavallee	38.9%	5.7%

007	04-22	천선과나무	<i>Ficus erecta</i> Thunb.	21.0%	4.9%
008	04-23	양하	<i>zingiber mioga</i> (Thunb.) Rosc.	24.5%	13.6%
009	04-25	구상나무	<i>Abies koreana</i> Wilson	50.5%	49.5%
010	04-26	하귤	<i>.Citrus natsudaidai</i> Hayata	44.2%	9.8%
011	04-27	마삭줄	<i>Trachelospermum asiaticum</i> (Sieb. et Zucc.) Nakai	17.7%	13.0%
012	04-28	모람	<i>Ficus oxyphylla</i> Miq. Ex Zoll.	40.7%	4.6%
013	04-29	암대극	<i>Euphorbia jolkini</i> Boissier	24.6%	10.5%
014	04-30	갯완두	<i>Lathirus japonicus</i> Wildenow	28.4%	10.2%
015	04-32	쇠무릎	<i>Achyranthes Japonica</i> (Miq.) Nakai	5.6%	6.9%
016	04-33	남오미자	<i>Kadsula japonica</i> (L.) Dunal	62.7%	76.1%
017	04-34	천문동	<i>Asparagus cochichinensis</i> (Lour.) Merr.	37.2%	2.9%
018	04-35	아왜나무	<i>Viburnum odoratissimum</i> Ker-Gawler	27.1%	74.0%
019	04-36	관중	<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai	16.7%	37.2%
020	04-37	개면마	<i>Matteuccia orientalis</i> (Hook) Trev.	28.5%	16.8%

021	04-39	밤나무	<i>Castanea crenata</i> Sieb. et Zucc.	51.0%	63.4%
022	04-44	박새	<i>Veratrum oxysepalum</i> Turcz.	57.5%	-0.9%
023	04-45	산뽕나무	<i>Morus bombycis</i> Koidzumi	43.1%	20.3%
024	04-46	굴거리나무	<i>Daphniphyllum macropodum</i> Miquel	58.9%	25.4%
025	04-48	알파리	<i>Tubocapsicum anomalum</i> (Franch. Et Sav.) Makino	25.7%	11.2%
026	04-51	비목나무	<i>Lindera erythrocarpa</i> Makino	68.1%	84.8%
027	04-52	홍지네고사리	<i>Dryopteris Erythrosora</i>	42.3%	38.6%
028	04-57	석송	<i>Lycopodium clavatum</i> var. nipponicum Nakai	35.1%	5.2%
029	04-60	고삼	<i>Sophora flavescens</i> Solander ex Aiton	40.5%	16.9%
030	04-62	붉가시나무	<i>Quercus acuta</i> Thunb. Ex Murray	68.2%	51.2%
031	04-63	작살나무	<i>Callicarpa japonica</i> Thunb.	70.0%	16.7%
032	04-65	예덕나무	<i>Mallotus japonicus</i> (Thunb.) Muller-Arg.	93.9%	47.4%
033	04-68	참가시나무	<i>Quercus salicina</i> Blume	0.0%	16.4%
034	04-69	강활	<i>Ostericum praetericum</i> Kitagawa	35.2%	8.2%

035	04-70	흰새덕이	<i>Neolitsea aciculata</i> (blume) Koidz	54.3%	42.0%
036	04-74	청미래덩굴	<i>Smilax chiana</i> L.	49.2%	30.9%
037	04-78	때죽나무	<i>Styrax japonica</i> Sieb. et Zucc.	60.8%	23.4%
038	04-79	이나무	<i>Idesia Policarpa</i> Maxim.	56.7%	10.9%
039	04-80	산수국	<i>Hydrangea macrophylla</i> <i>var.acuminata</i> (Sieb. et Zucc.) Makino	26.8%	19.9%
040	04-81	사람주나무	<i>Sapium japonicum</i> (Siebold & Zucc.) Pax & Hoffm	83.7%	64.8%
041	04-82	탱자	<i>Poncirus trifoliata</i> Rafin.	22.6%	4.9%
042	04-86	곰의말채나무	<i>Cornus macroPhylla</i> Wall	87.3%	95.9%
043	04-87	가막살나무	<i>Viburnum dilatatum</i> Thunb.	28.1%	37.8%
044	04-89	고사리	<i>Pteridium aquilinum var.</i> <i>latiusculum</i> (Desv.) Underwoodex Heller	40.6%	56.3%
045	04-91	참느릅나무	<i>Ulmus Parvifolia</i> Jacquin	60.0%	51.9%
046	04-92	노린재나무	<i>Symplocos chinensis for.Pilosa</i> (Nakai) Ohwi	50.5%	18.4%
047	04-93	종가시나무	<i>Quercus glauca</i> Thunb.	55.6%	48.1%
048	04-96	자귀나무	<i>Albizzia julibrissin</i> Durazz.	24.8%	4.4%



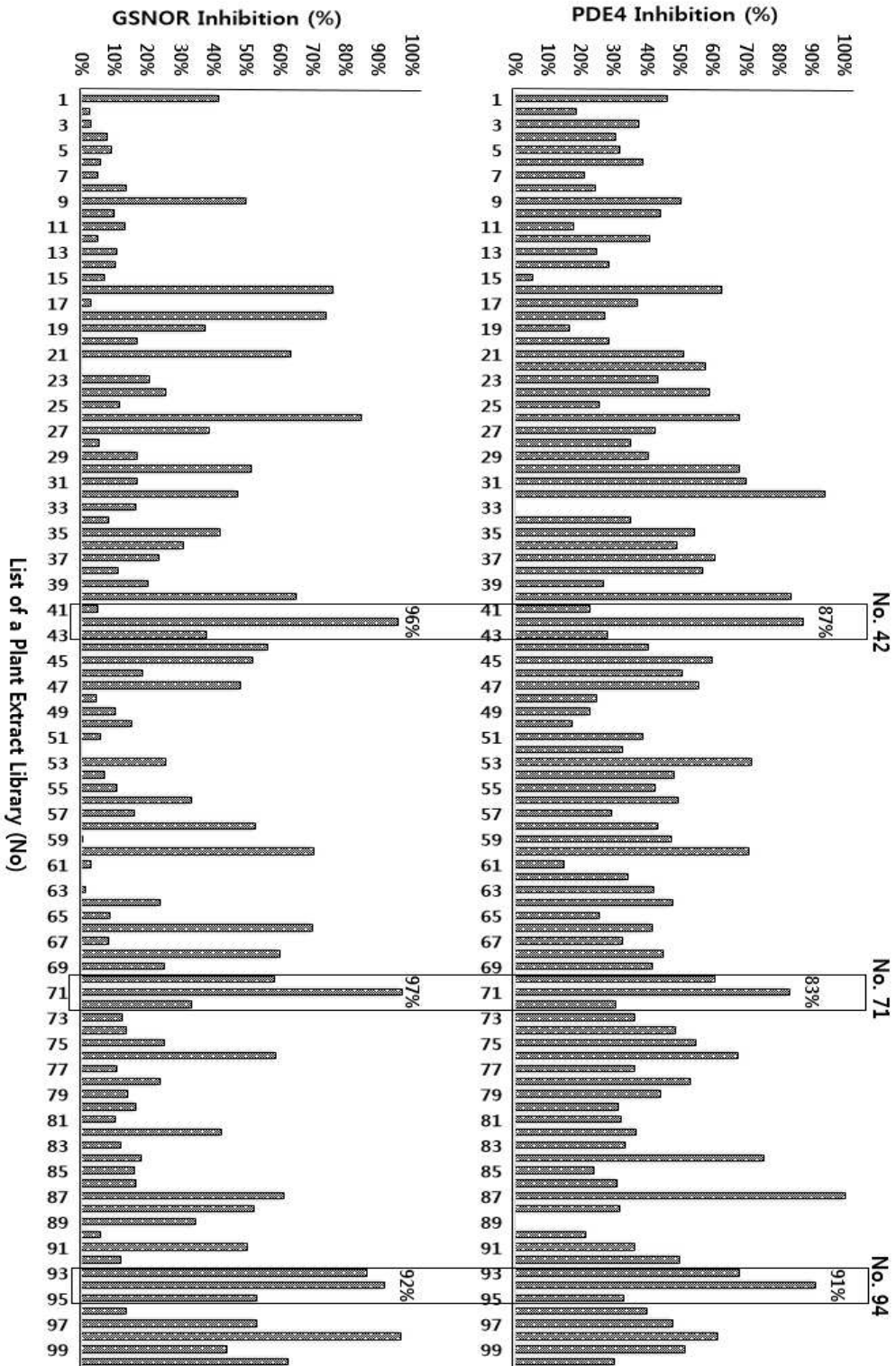
049	04-97	창포	<i>Acorus calamus</i> Linnaeus var.angustatus Besser	22.5%	10.4%
050	04-98	개속새	<i>Equisetum ramosissimum</i> Desfontaines	17.4%	15.0%
051	04-99	쭈	<i>Artemisia princeps</i> Pampanini	38.7%	5.7%
052	04-100	비쭈	<i>Artemisia scoparia</i> Waldstein & Kitabel	32.5%	-1.7%
053	04-106	초종용	<i>Orobanche cerulescens</i> Stephan	71.6%	25.5%
054	04-107	갯패랭이꽃	<i>Diathus japonicus</i> Thunb.	48.3%	7.1%
055	04-109	갯금불초	<i>Wedelia prostrata</i> (Hook. Et Arn.) Hemsley	42.6%	10.7%
056	04-118	흑삼능	<i>Sparganium japonicum</i> Rothert	49.7%	33.2%
057	04-121	개머루	<i>Ampelopsis heterophylla</i> (Thunb.) Siebold & Zucc.	29.5%	16.1%
058	04-122	큰뻬무	<i>Geum aleppicum</i> Jacquin	43.3%	52.5%
059	04-125	미국자리공	<i>Phytolacca americana</i> L.	47.6%	0.1%
060	04-126	층층나무	<i>Cornus controversa</i> Hensley ex Prain	70.7%	70.5%
061	04-129	음나무	<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb.) Koidz	14.8%	2.9%
062	04-130	섬개벚나무	<i>Prunus buergeriana</i> Miquel	34.3%	-2.0%

063	04-131	호랑가시나무	<i>Ilex cornuta</i> Lindley et Paxton	41.9%	1.0%
064	04-132	산개벚나무	<i>Prunus maximowiczii</i> Ruprecht	47.9%	23.6%
065	04-133	팔손이나무	<i>Fatsia japonica</i> (Thunb.) Decaisne et Planchon	25.7%	8.5%
066	04-134	센달나무	<i>Machilus japonica</i> Sieb. et Zucc.	41.7%	69.7%
067	04-135	감탕나무	<i>Ilex integra</i> Thunb.	32.6%	8.1%
068	04-136	후박나무	<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	45.1%	59.8%
069	04-138	사스레피나무	<i>Eurya japonica</i> Thunb.	41.5%	25.2%
070	04-139	유동	<i>Aleurites fordii</i> Hemsl.	60.8%	58.4%
071	04-140	조록나무	<i>Distylum racemosum</i> Sieb. Et Zucc.	83.2%	97.0%
072	04-142	주목	<i>Taxus cuspidata</i> Sieb. Et Zucc.	30.7%	33.4%
073	04-143	쌍쌍나무	<i>Ilex crenata</i> Thunb.	36.1%	12.3%
074	04-144	솔비나무	<i>Maackia fauriei</i> (H.Lév.) Takeda	48.7%	13.3%
075	04-145	덩굴곽향	<i>Teucrium viscidum</i> var. <i>miquelianum</i> (Maxim) Hara	54.9%	25.2%
076	04-146	말오줌때	<i>Euscaphis japonica</i> (Thunb.) Kanitz	67.4%	58.7%

077	04-147	비수리	<i>Lespedeza cuneata</i> (Dumont d. Cours.) G. Don	36.2%	10.7%
078	04-148	황칠나무	<i>Dendropanax morbiiferum</i> Leveille In Fedde	53.3%	23.6%
079	04-149	감국	<i>Chrysanthemum frutescens</i> L.	43.9%	13.8%
080	04-152	낭아초	<i>Indigofera pseudo-tinctoria</i> Matsum.	31.2%	16.5%
081	04-154	취	<i>Pueraria Lobata</i> (Willd.) Ohwi	32.0%	10.4%
082	04-155	딱지꽃	<i>Potentilla chinensis</i> Seringe	36.6%	42.2%
083	04-156	석류풀	<i>Mollugo pentaphylla</i> L.	33.5%	12.0%
084	04-157	순비기나무	<i>Vitex rotundifolia</i> L.	75.3%	18.1%
085	04-158	나문재	<i>Suaeda guluca</i> (Bunge) Bunge	23.9%	15.8%
086	04-160	으아리	<i>Clematis mandshurica</i> Ruprecht	30.9%	16.4%
087	04-161	단풍나무	<i>Acer palmatum</i> Thunb.	100.0%	61.3%
088	04-162	붓순나무	<i>Illicium anisatum</i> L.	31.9%	52.2%
089	04-162-1	붓순나무	<i>Illicium anisatum</i> L.	0.0%	34.5%
090	04-164	돈나무	<i>Pittosporum tobira</i> (Thunb.) Aiton	21.3%	5.6%

091	04-166	후피향나무	<i>Ternstroemia gymnanthera</i> (Wight et Arn.) Sprague	36.2%	50.1%
092	04-167	광나무	<i>Ligustrum japonicum</i> Thunb.	49.7%	11.9%
093	04-168	빗죽이나무	<i>Cleyera japonica</i> Thunb.	68.1%	86.3%
094	04-169	윤노리나무	<i>Pourthiaea villosa</i> (Thunb.) Decaisne	91.1%	91.7%
095	04-170	소귀나무	<i>Myrica rubra</i> (lour.) Sieb. Et Zucc.	32.8%	53.0%
096	04-172	무환자나무	<i>Sapindus mukorossi</i> Gaetner	39.8%	13.7%
097	04-173	복숭아나무	<i>Prunus persica</i> (Linnaeus0) Batsch	47.9%	53.1%
098	04-174	실거리나무	<i>Caesalpinia decapetala</i> (Roth) Alst.	61.3%	96.5%
099	04-176	꾸지탈기	<i>Rubus trifidus</i> Thunb.	51.7%	44.0%
100	04-178	짚신나물	<i>Agrmonia pilosa</i> Ledeb.	30.3%	62.5%

Figure 8°. Bar graph for PDE4 enzyme and GSNO reductase inhibition°



## 2. 곰의말채나무 천식효능 탐색

### 2-1. 곰의말채나무 특성

곰의말채나무(*Cornus macrophylla* Wall.)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 영명으로는 Largeleaf Dogwoodm Chinese Dogwood이다. 낙엽활엽교목으로 한국, 일본, 중국 남부, 대만, 히말라야에 자생한다. 우리나라 분포지는 중부이남, 전라도, 경상도, 제주도 이다. 숲속에서 자라며 높이 15 m에 달한다. 잎은 마주나기하며 넓은 달걀형이고 점첨두이며 넓은 예형, 절저 또는 원저이고, 길이 8~18 cm로, 표면에 잔복모가 있으며 뒷면은 흰빛이 돌고 털이 많으며, 톱니가 없고, 측맥은 6~10쌍이며 잎자루 길이는 1~3 cm이다. 꽃은 원추상 취산꽃차례로 지름 8~14 cm이고 꽃대는 길이 3~4 cm이며, 꽃잎은 넓은 피침형 또는 긴 타원형으로 길이 5 mm로 수술대와 길이가 같고, 7~8월에 핀다. 열매는 핵과로 둥글며 지름 6 mm로 짙은 검은색으로 종자는 둥글고 오목한 점이 많으며, 9월에 성숙한다. 줄기는 높이가 15 m에 달하고 나무껍질은 회갈색으로 불규칙하게 세로로 갈라져 감나무 나무껍질과 비슷하며, 가지는 털이 없고 황갈색 또는 적갈색으로 광택이 난다.<sup>57-58)</sup>

곰의말채나무는에서 정원수나 공원수,가로수, 목재는 공예재나 기구재, 가구재, 펠감용으로 쓰이며, 심재는 양자목(惊子木), 껍질은 정랑피(丁榔皮)라 하며 약용으로 사용된다고 알려져 있다. 분리 보고 되어진 화합물로는 Rengyoline, Ethyl gallate, Catechin, micromerol, Quercitrin, Afzelin<sup>59)</sup> 있다.



Figure 9. The specimen of *Cornus macrophylla* Wall.

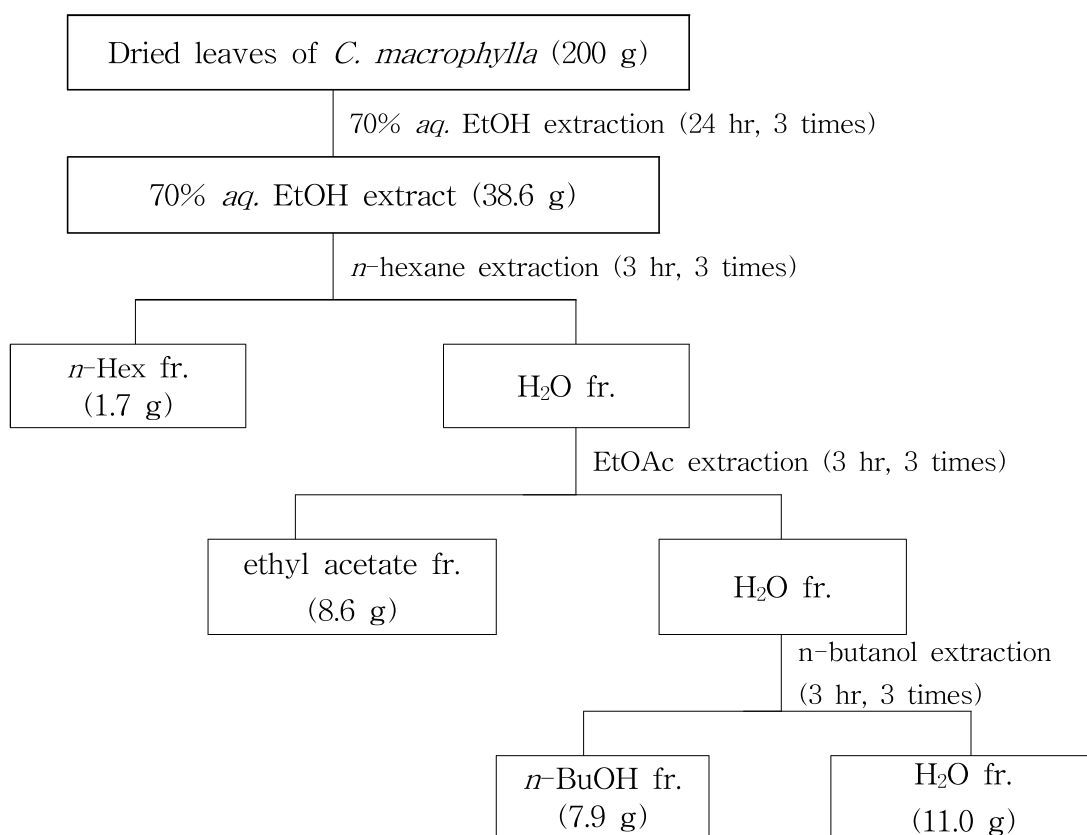


Figure 10. Photograph of the leaf of *Cornus macrophylla* Wall.



## 2-2. 곰의말채나무 잎 추출

곰의말채나무 잎(42-1) 건조 시료 200 g을 70% ethyl alcohol에 추출하여 추출물 38.6 g(yield : 19.3%)을 얻었고, 추출물 30 g을 정제수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 활용하여 *n*-hexane fraction (1.7 g), ethyl acetate fraction (8.6 g), *n*-butanol fraction (7.9 g) and H<sub>2</sub>O fraction (11.0 g)을 얻어 연구에 활용하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of extraction and various fraction from dried leaves of *C. macrophylla*.



### 2-3. 곰의말채나무 잎 추출성분 활성 확인

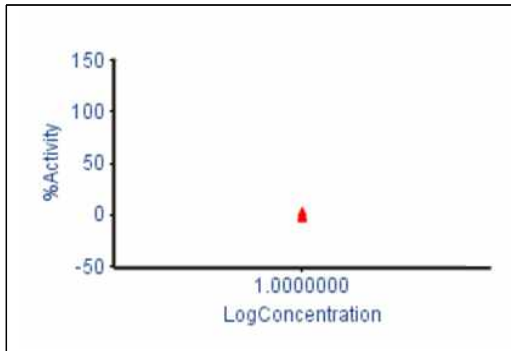
70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 PDE4 enzyme 활성을 측정한 결과를 Table 6 나타내었다. *n*-hexane fraction을 제외한 나머지 fraction(70% *aq.* EtOH extract, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O solvent fractions)에서는 PDE4 enzyme 활성 결과가 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-butanol fraction < ethyl acetate fraction. 그들 중, ethyl acetate fraction(IC<sub>50</sub>: 13.9 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다.

70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 GSNO reductase 활성을 측정한 결과를 Table 6에 나타내었다. GSNO reductase 활성 또한 *n*-hexane fraction을 제외한 나머지 fraction(70% *aq.* EtOH extract, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O solvent fractions)에서는 GSNO reductase 활성 결과가 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < ethyl acetate fraction < *n*-butanol fraction. 그들 중, *n*-butanol fraction (IC<sub>50</sub>: 13.1 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다(Table 11, Figure 11-12).

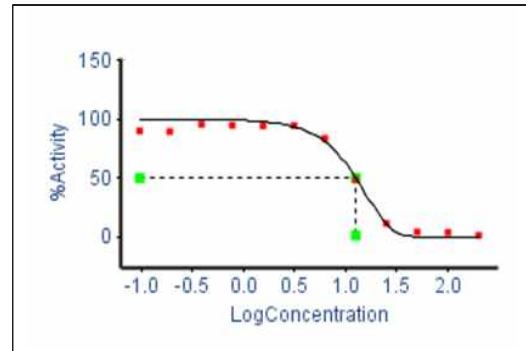
Table 11. IC<sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% *aq.* EtOH extract and its solvent fractions of *C. macrophylla* (leaves).

Samples	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	PDE4	GSNO
42 EtOH extract	12.6	15.5
42-1 <i>n</i> -Hex fraction	NA	NA
42-1 EtOAc fraction	13.9	36.1
42-1 <i>n</i> -BuOH fraction	20.1	13.1
42-1 H <sub>2</sub> O fraction	77.0	36.3

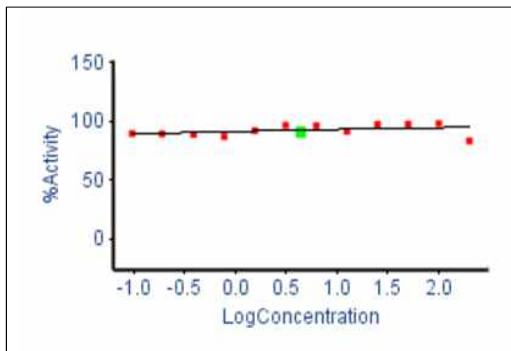
(A) Rolipram



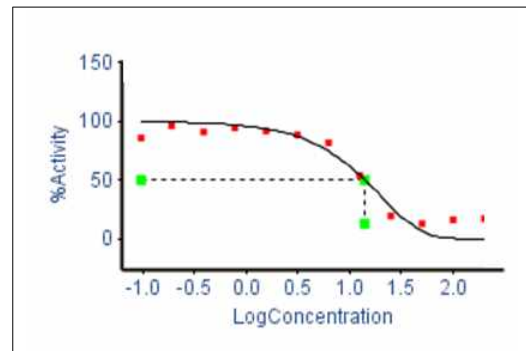
(B) 42 EtOH extract



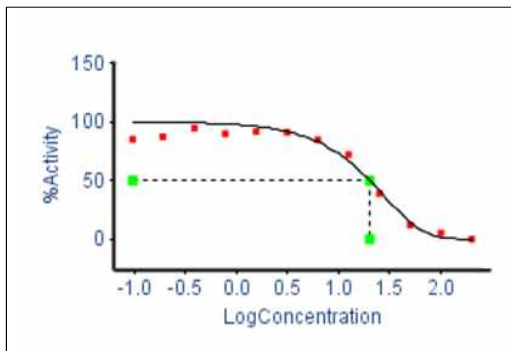
(C) 42-1 *n*-Hex fraction



(D) 42-1 EtOAc fraction



(E) 42-1 *n*-BuOH fraction



(F) 42-1 H<sub>2</sub>O fraction

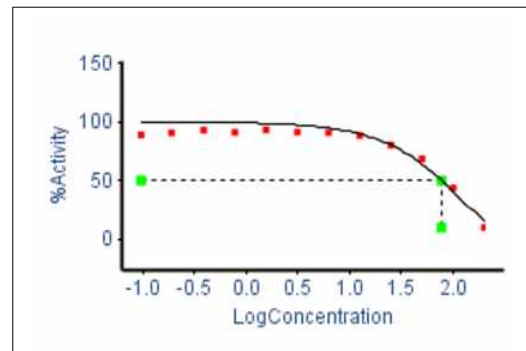
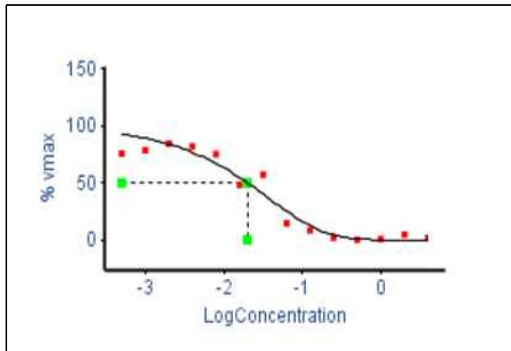
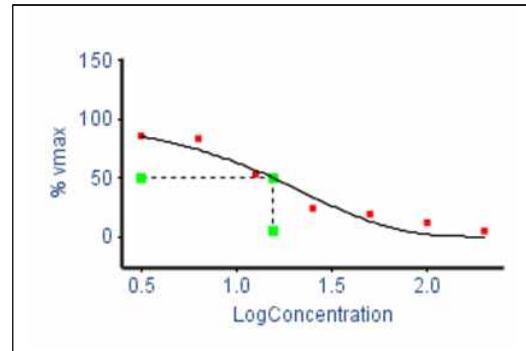


Figure 11. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from leaves of *C. macrophylla*.

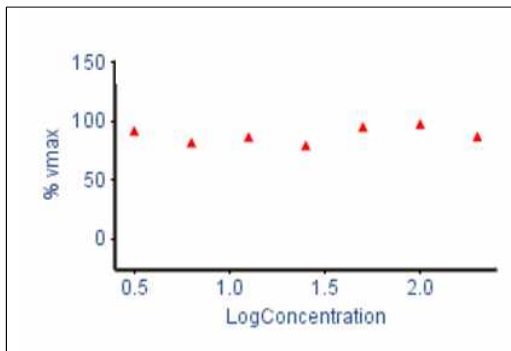
(A) N6022



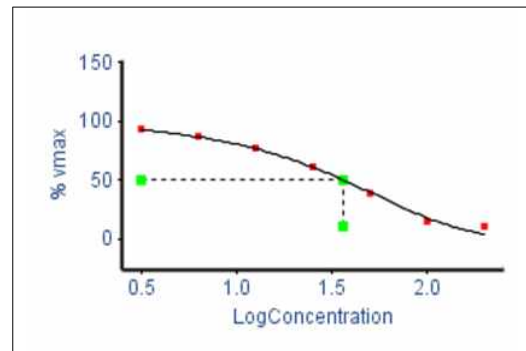
(B) 42 EtOH extract



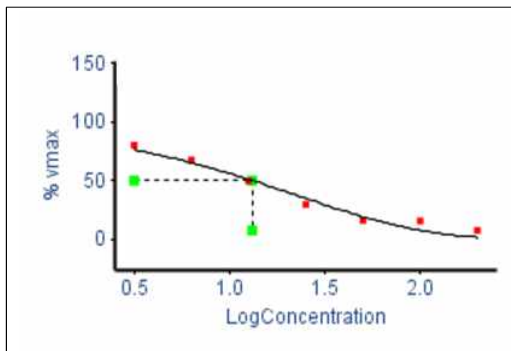
(C) 42-1 *n*-Hex fraction



(D) 42-1 EtOAc fraction



(E) 42-1 *n*-BuOH fraction



(F) 42-1 H<sub>2</sub>O fraction

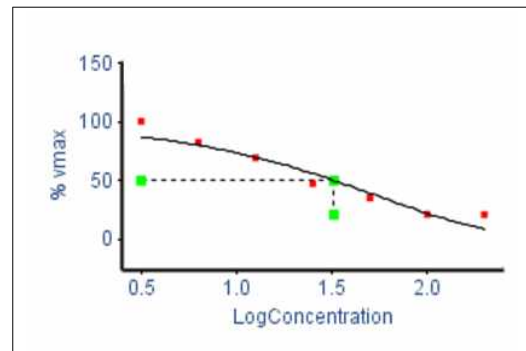
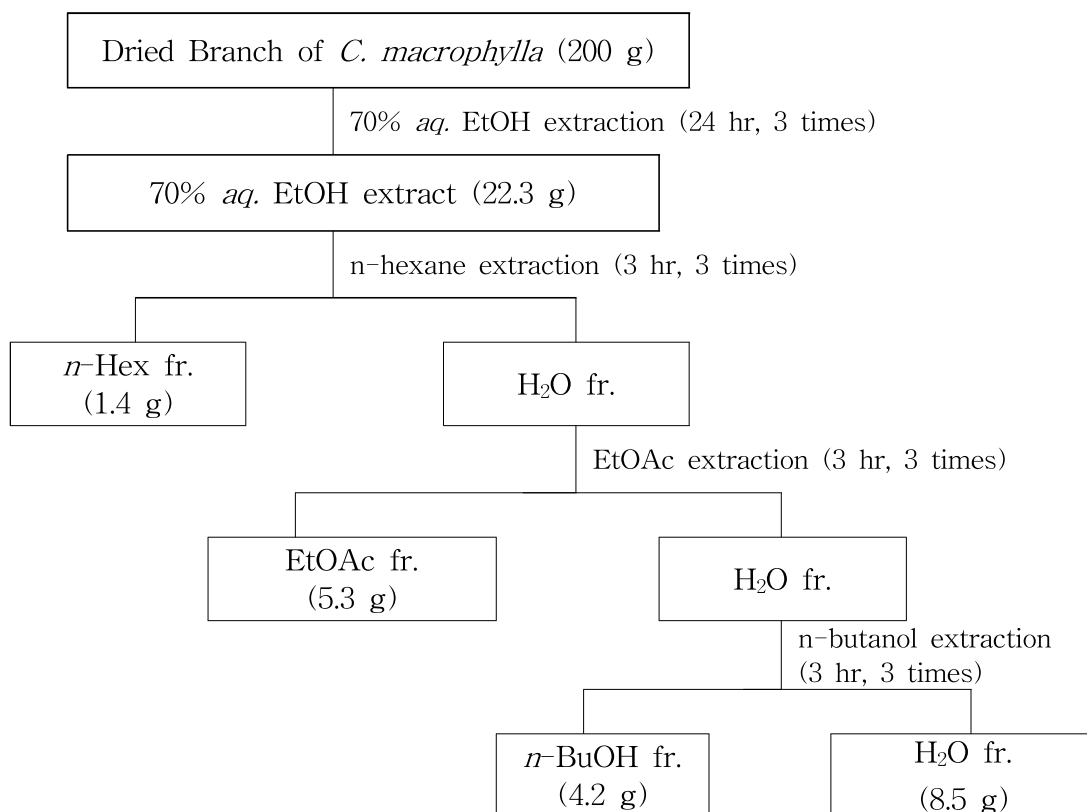


Figure 12. Results of GSNO reductase inhibition assay for extraction from leaves of *C. macrophylla*.

#### 2-4. 곰의말채나무 가지 추출

곰의말채나무 가지(42-2) 건조 시료 200 g을 70% ethyl alcohol에 추출하여 추출물 22.3 g (yield : 11.2%)을 얻었고, 추출물 20 g을 정제수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 활용하여 *n*-hexane fraction (1.4 g), ethyl acetate fraction (5.3 g), *n*-butanol fraction (4.2 g) and H<sub>2</sub>O fraction (8.5 g)을 얻어 연구에 활용하였다(Scheme 2).



Scheme 2. Procedure of extraction and various fraction from dried branches of *C. macrophylla*.

2-5. 곰의말채나무 가지 추출성분 활성 확인

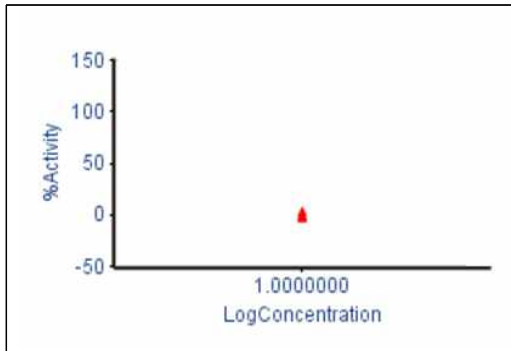
70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 PDE4 enzyme 활성을 측정한 결과를 Table7 나타내었다. *n*-hexane fraction을 제외한 나머지 fraction(70% *aq.* EtOH extract, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O solvent fractions)에서는 PDE4 enzyme 활성 결과가 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-butanol fraction < ethyl acetate fraction. 그들 중, ethyl acetate fraction(IC<sub>50</sub>: 5.3 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다.

70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 GSNO reductase 활성을 측정한 결과를 Table 7에 나타내었다. 70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 모든 fraction에서 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < ethyl acetate fraction < *n*-butanol fraction. 그들 중, *n*-butanol fraction (IC<sub>50</sub>: 11.4 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다(Table 12, Figure 13-14).

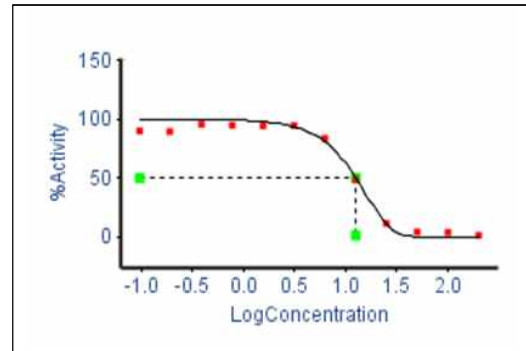
Table 12. IC<sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% *aq.* EtOH extract and its solvent fractions of *C. macrophylla* (branches).

Samples	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	PDE4	GSNO
42 EtOH extract	12.6	15.5
42-2 <i>n</i> -Hex fraction	NA	58.9
42-2 EtOAc fraction	5.3	55.3
42-2 <i>n</i> -BuOH fraction	8.0	11.4
42-2 H <sub>2</sub> O fraction	170.5	32.4

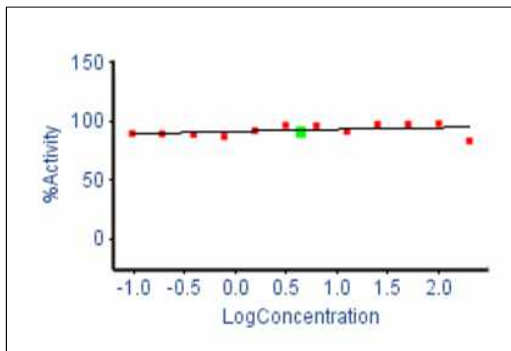
(A) Rolipram



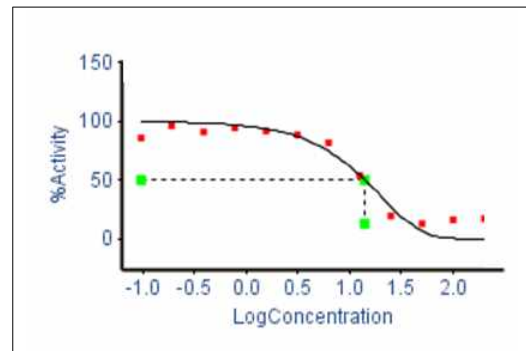
(B) 42 EtOH extract



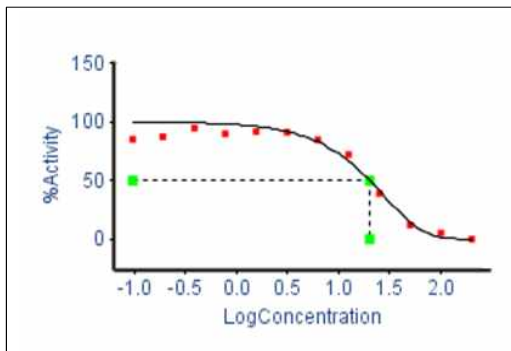
(C) 42-2 *n*-Hex fraction



(D) 42-2 EtOAc fraction



(E) 42-2 *n*-BuOH fraction



(F) 42-2 H<sub>2</sub>O fraction

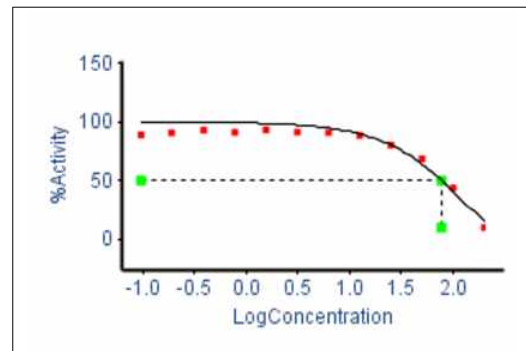
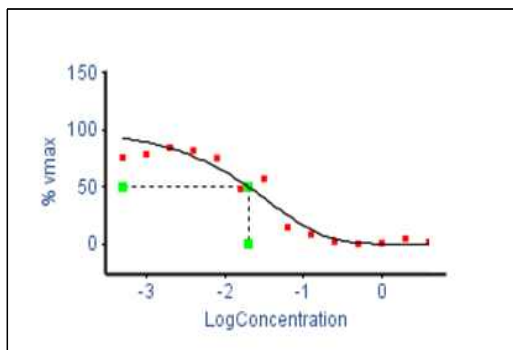
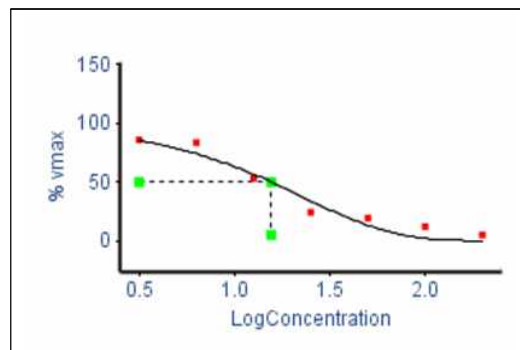


Figure 13. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of *C. macrophylla*.

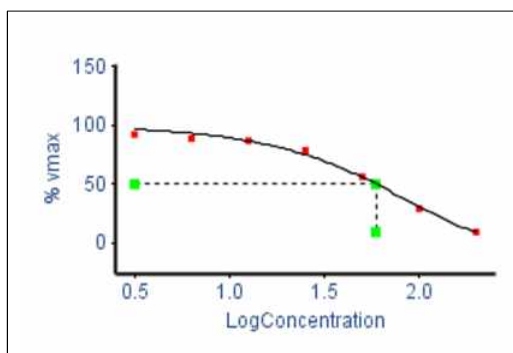
(A) N6022



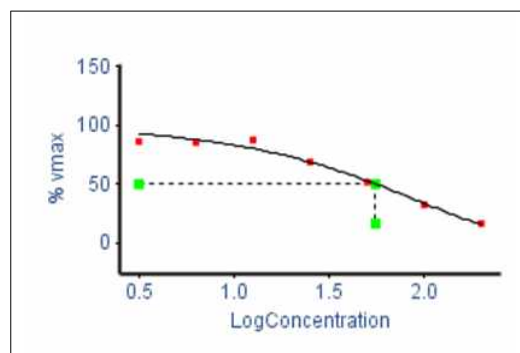
(B) 42 EtOH extract



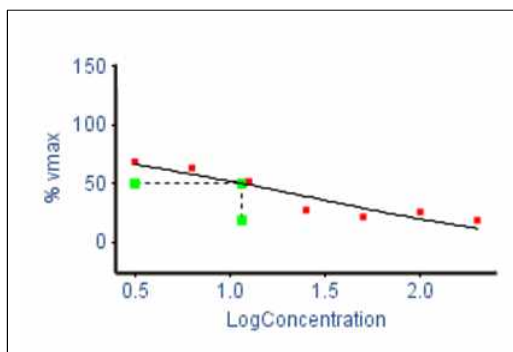
(C) 42-2 *n*-Hex fraction



(D) 42-2 EtOAc fraction



(E) 42-2 *n*-BuOH fraction



(F) 42-2 H<sub>2</sub>O fraction

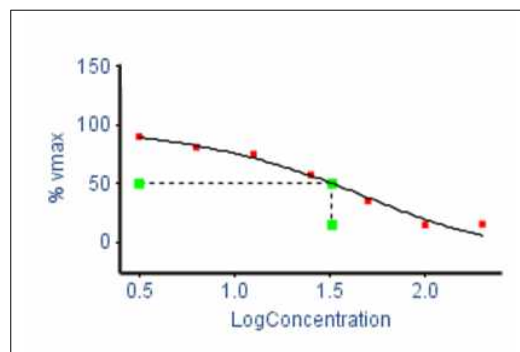


Figure 14. Results of GSNOR reductase inhibition assay for extraction from branches of *C. macrophylla*.

## 2-6. 곰의말채나무 추출 성분 구조 분석

### 2-6-1. 표준물질 분석

일반적으로 식물 성분으로 보고되어 지고 있는 표준물질 11종을 구입하여 LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 분석 조건을 확립하였다. Negative mode에서 spray voltage 4.0 kV, capillary voltage 35 V, mass resolving power 30,000 full에서 최적의 분석 조건으로 확인하였고, 표준물질 11종에 대한 분석 결과는 Table 13 과 같다.

Table 13. Identification for standards by using LCQ Ion Trap MS/MS.

Standards	MW	R <sub>t</sub> (min)	UV (λ <sub>max</sub> , nm)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)
Catechin	290	3.22	279	289	205, 245
4-O-Caffeoylquinuc acid	354	4.08	326	353	173, 179
Pyocyanidin B2	578	5.15	279	577	407, 425
Pyocyanidin C1	866	8.18	279	865	577, 695
Epicatechin gallate	442	10.95	278	441	169, 289
Hyperoside	464	10.98	256, 354	463	301
Rutin	610	10.98	256, 353	609	301
Nicotiflorin	594	12.53	265, 347	593	285
Quercitrin	448	13.01	256, 349	447	301
Quercetin	302	16.95	255, 372	301	151, 179
Kaempferol	286	20.10	367, 265	285	243, 257



### 2-6-1-1. Catechin 표준물질

Catechin 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 3.22 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 279.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 15). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 3.35 min, primary ion의 m/z 값은 289 [M - H]<sup>-</sup>을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 3.40 min, fragments ion의 m/z 값은 245 [M - H - 35]<sup>-</sup>, 205 [M - H - 84]<sup>-</sup>을 확인할 수 있었다(Figure 16). 로즈우드(*Aniba parviflora*) 추출물에서 Catechin 성분이 포함되어 있으며, 분석 결과 245 m/z와 205 m/z의 비가 100대 50으로 나타난다고 보고되고 있다(Figure 17).<sup>60)</sup>

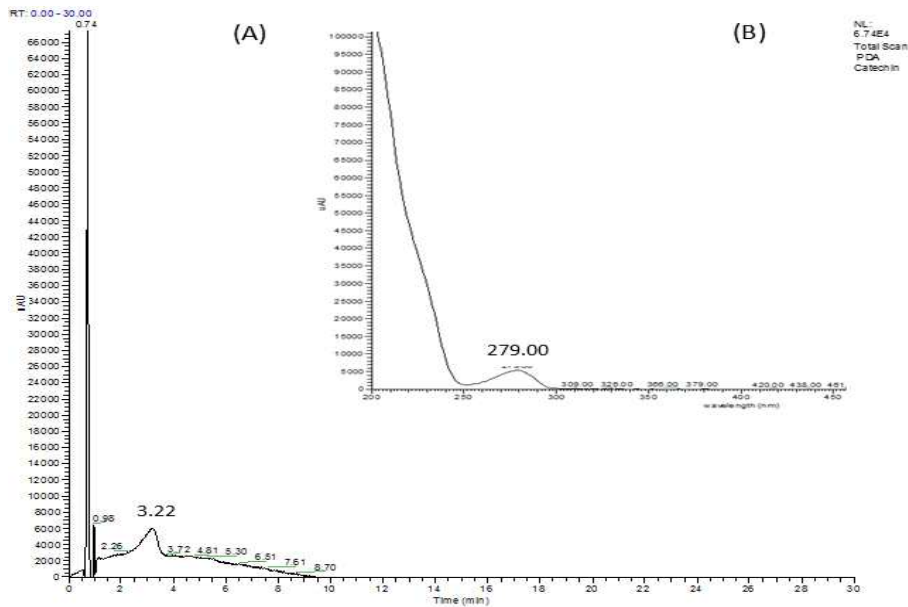


Figure 15. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Catechin standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

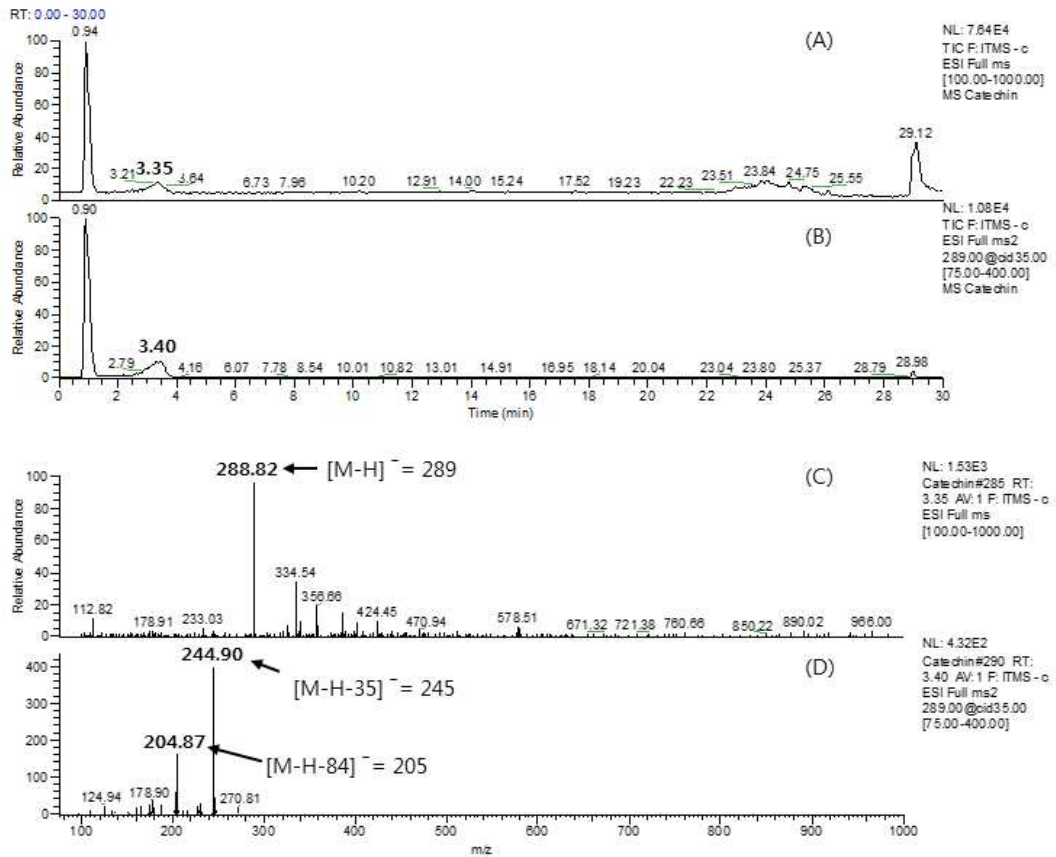


Figure 16. Result of Catechin in primary mass spectrum (MS1) and secondary mass spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  289 in negative ionization mode.

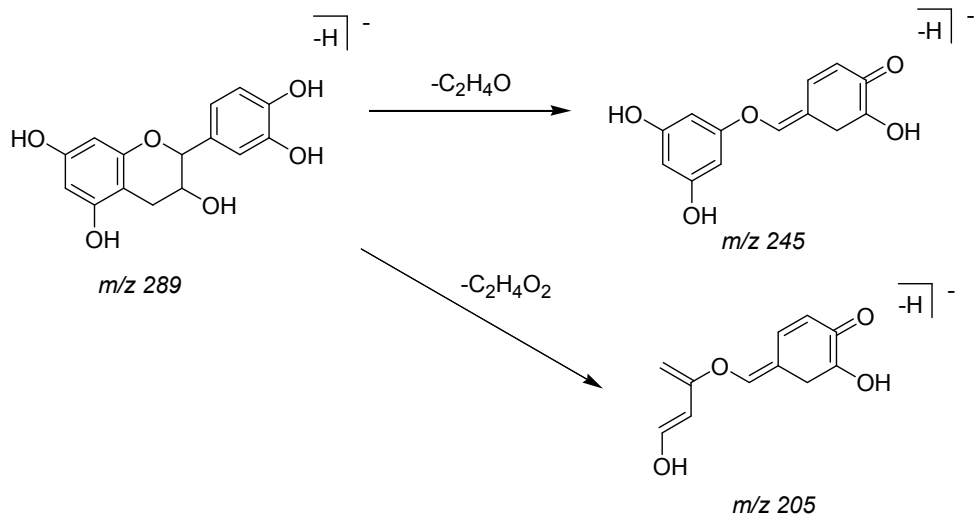


Figure 17. Proposed fragmentation of Catechin.

## 2-6-1-2. 4-O-Caffeoylquinic acid 표준물질

4-O-Caffeoylquinic acid 성분에 대한 total ion chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 4.08 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 326.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 18). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 4.21 min, primary ion의  $m/z$  값은 353  $[M-H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 4.24 min, fragments ion의  $m/z$  값은 179  $[M-H-174]^-$ 와 173  $[M-H-180]^-$ 를 확인할 수 있었다(Figure 19). Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry chlorogenic acid 이성질체에 대한 분석에서 4-O-Caffeoylquinic acid 분석 결과  $m/z$  353.1  $\rightarrow$  190.7  $\rightarrow$  172.6 또는  $m/z$  353.1  $\rightarrow$  178.8 값을 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 20).<sup>61)</sup>

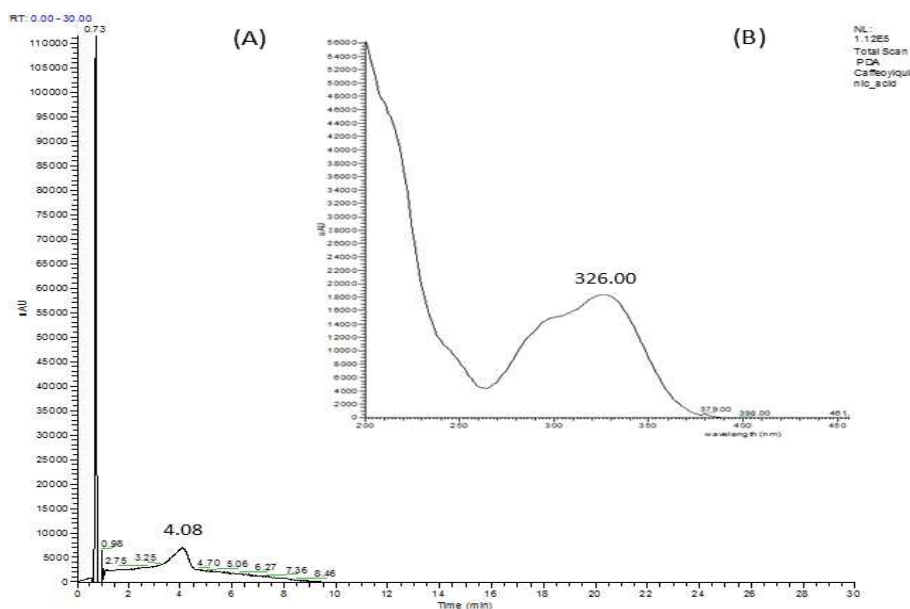


Figure 18. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Quercitrin standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

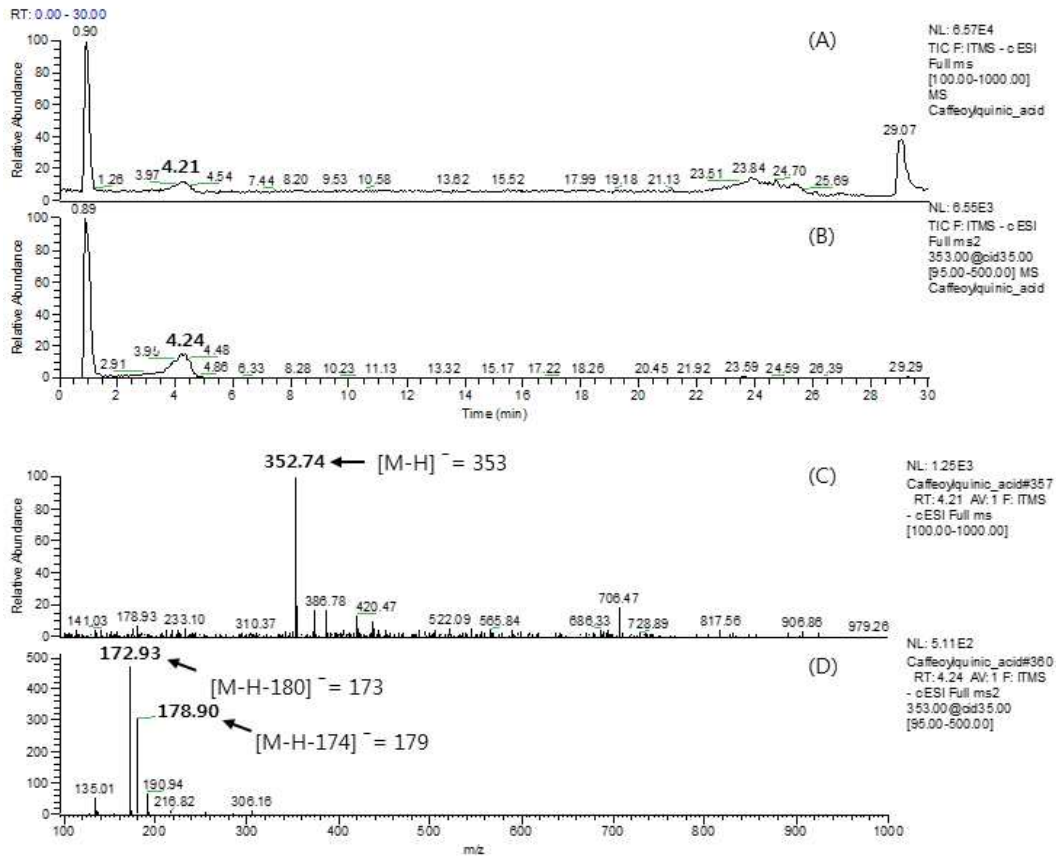


Figure 19. Result of 4-O-Caffeoylquinic acid in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  353 in negative ionization mode.

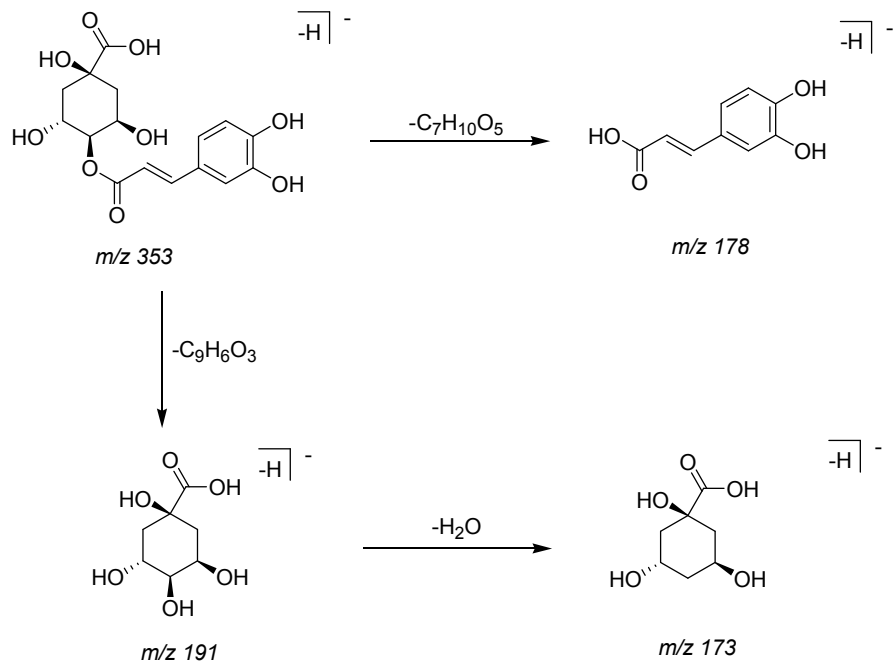


Figure 20. Proposed fragmentation of 4-O-Caffeoylquinic acid.

### 2-6-1-3. Procyanidin B2 표준물질

Procyanidin B2 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 5.15 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 279.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 21). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 5.34 min, primary ion의  $m/z$  값은 577  $[M-H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 5.33 min, fragments ion의  $m/z$  값은 257  $[M-153]^-$ , 407  $[M-H-170]^-$ , 289  $[M-H-288]^-$ 을 확인할 수 있었다(Figure 22). HPLC-qTOF-MS/MS 이용한 Procyanidins B2성분 분석 결과  $[M-H]^-$ 에서 (m/z)577.1225의 fragments ion  $m/z$  값은 109.0138, 121.0139, 123.0284, 125.0081, 137.0077, 151.0232, 159.0269, 161.0097, 163.0197, 179.0178, 189.0348, 203.0529, 221.0645, 245.0625, 271.0448, 287.0327, 289.0541, 299.0364, 315.0697, 321.0582, 339.0693, 407.0601, 425.0709 결과가 보고되어 지고 있다(Figure 23).<sup>62)</sup>

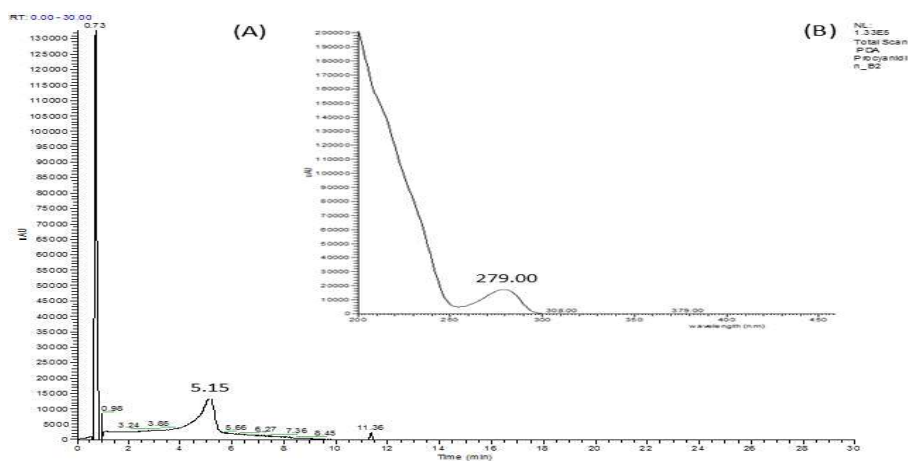


Figure 21. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Procyanidin B2 standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

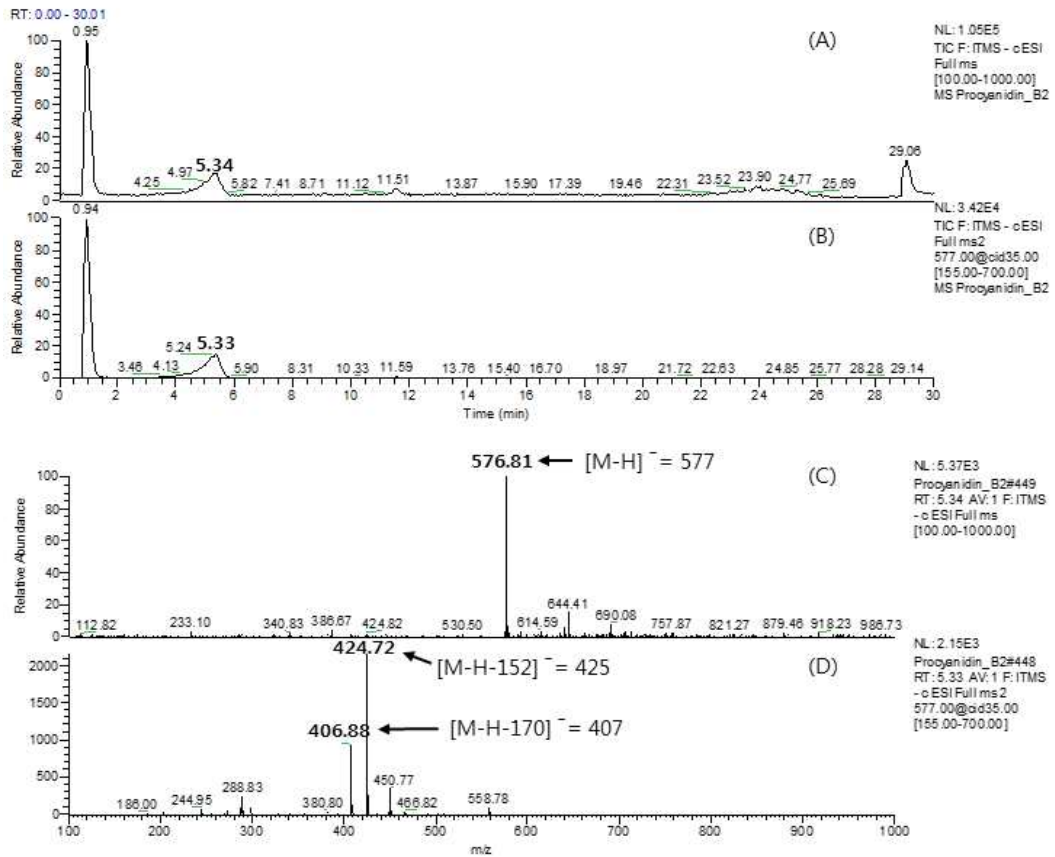


Figure 22. Result of Procyanidin B2 in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of m/z 577 in negative ionization mode.



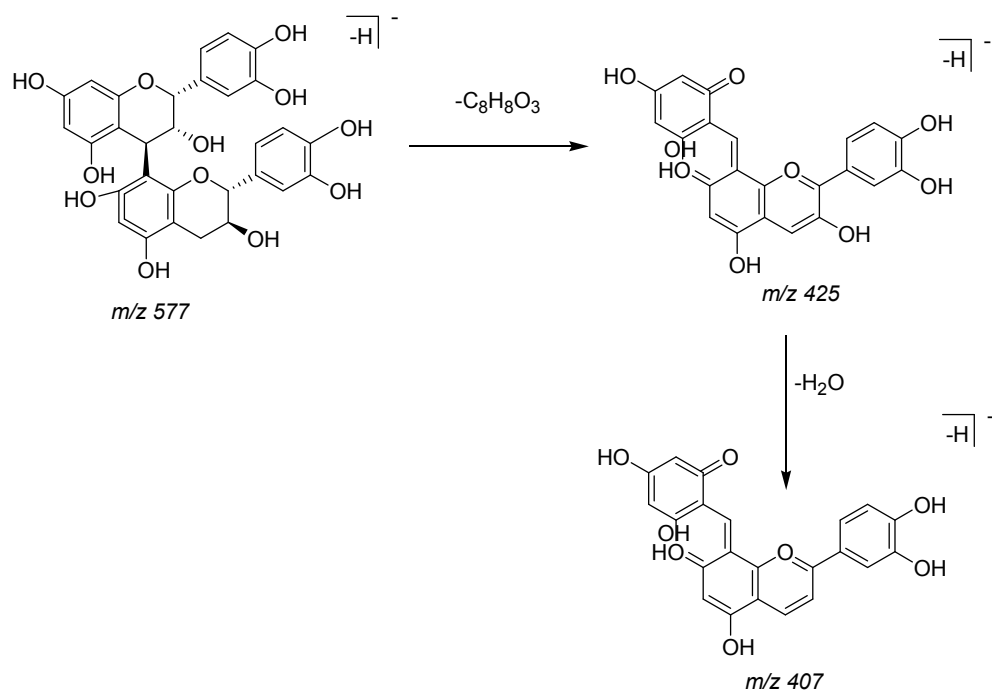


Figure 23. Proposed fragmentation of Procyanidin B2.

#### 2-6-1-4. Pyocyanidin C1 표준물질

Pyocyanidin C1 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 8.18 min으로 나타났으며, Photo Diode Array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 279.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 24). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 8.37 min, primary ion의  $m/z$  값은 865  $[M-H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 8.38 min, fragments ion의  $m/z$  값은 739  $[M-H-126]^-$ , 695  $[M-H-170]^-$ , 577  $[M-H-288]^-$ 을 확인할 수 있었다(Figure 25). 코코아에서의 Pyocyanidin C1 분석 결과 fragments ion의  $m/z$  695.1 (100), 577.1 (64), 739.1 (49), 713.1 (36), 407.2 (29), 575 (25), 425 (21)으로 확인이 되었다(Figure 26).<sup>63)</sup>

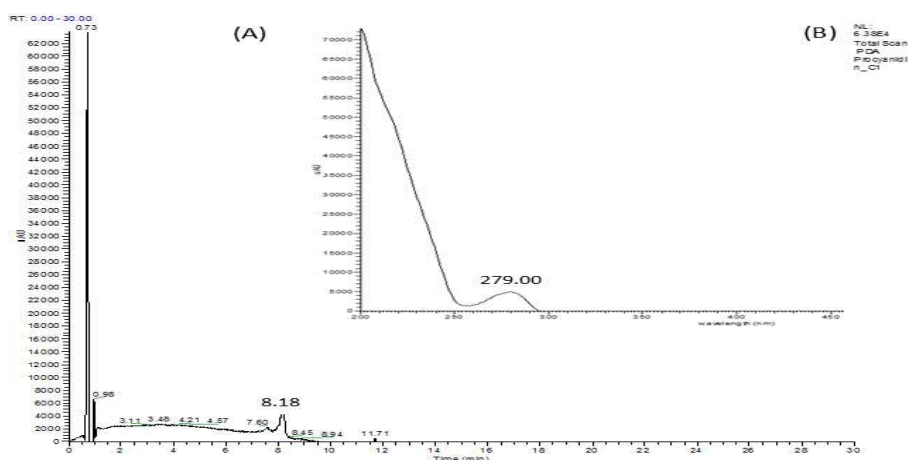


Figure 24. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Procyanidin C1 standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

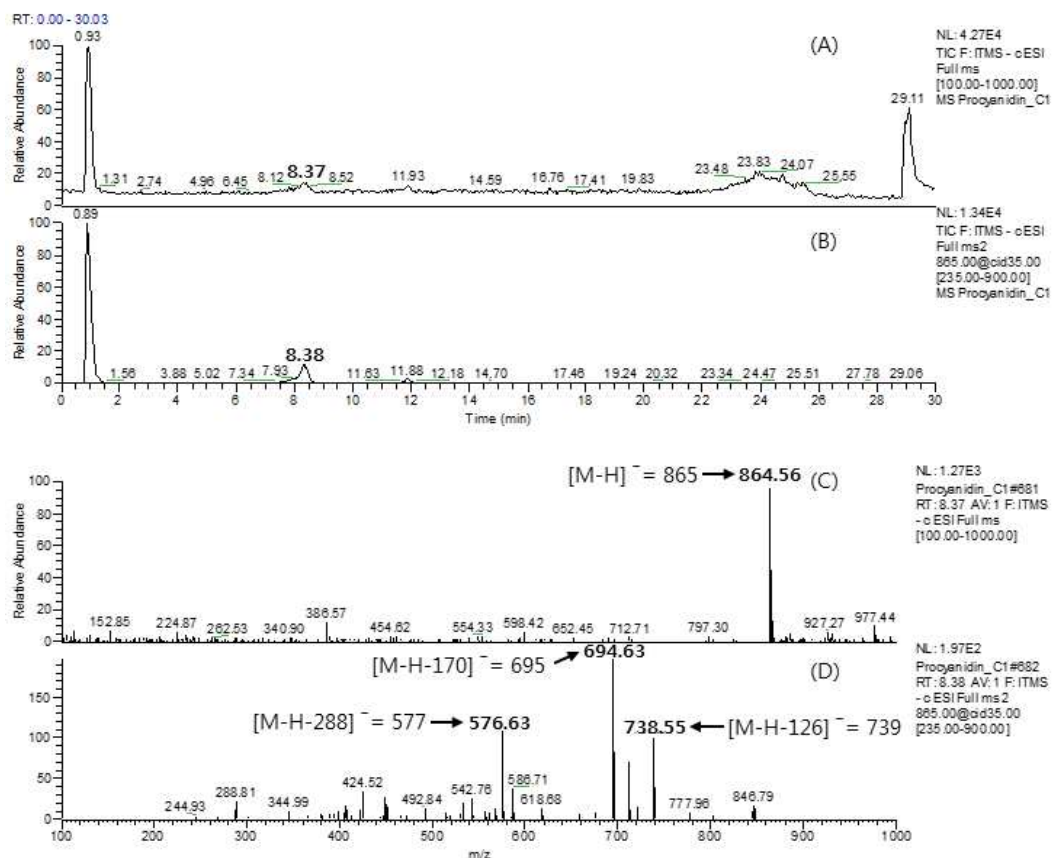


Figure 25. Result of Pyocyanidin C1 in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  865 in negative ionization mode.

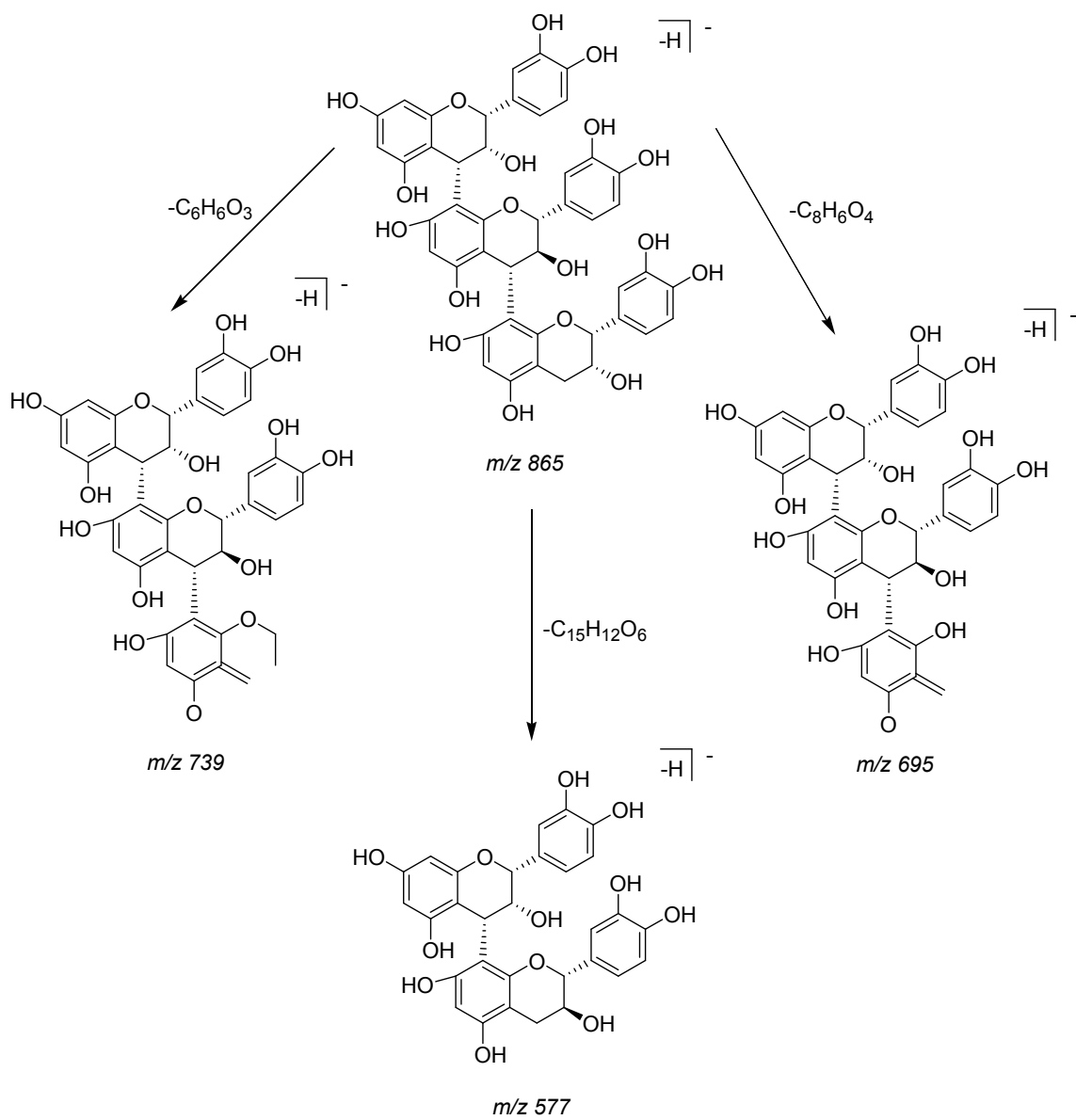


Figure 26. Proposed fragmentation of Pyocyanidin C1.

### 2-6-1-5. Epicatechin gallate 표준물질

Epicatechin gallate 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 10.95 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 278.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 27). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 11.11 min, primary ion의  $m/z$  값은 441  $[M - H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 11.12 min, fragments ion의  $m/z$  값은 289  $[M - H - 153]^-$ , 169  $[M - H - 272]^-$ 을 확인할 수 있었다(Figure 28). 녹차 추출물로부터의 Thermo Scientific LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer 활용한 Epicatechin gallate 분석에서 primary ion의  $m/z$ 는 441 fragments ion  $m/z$  값은 289, 169으로 이미 보고되어 지고 있다(Figure 29).<sup>64)</sup>

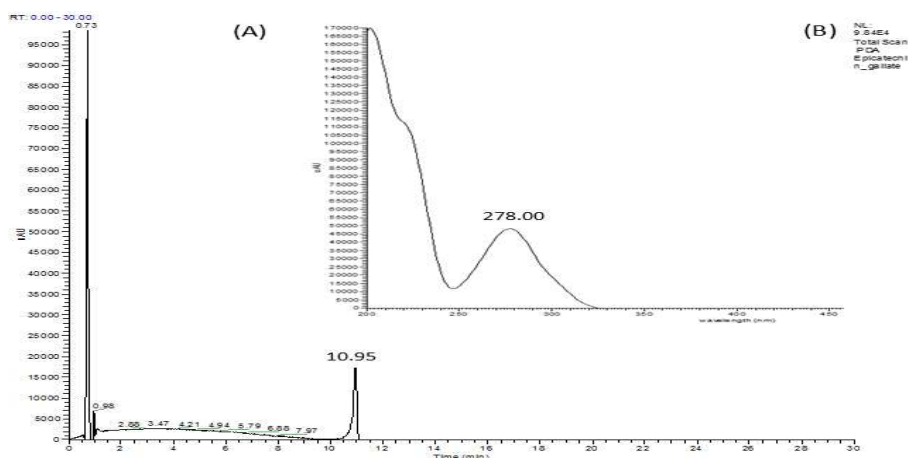


Figure 27. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Epicatechin gallate standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

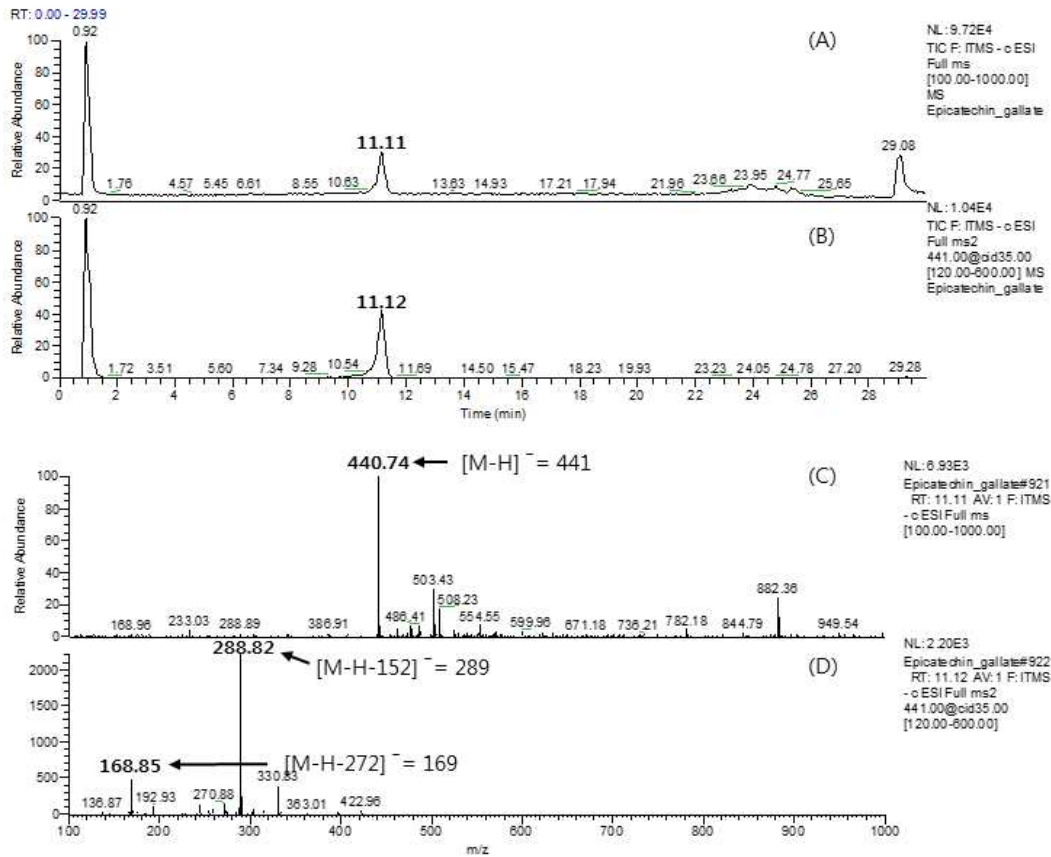


Figure 28. Result of Epicatechin gallate in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of m/z 441 in negative ionization mode.

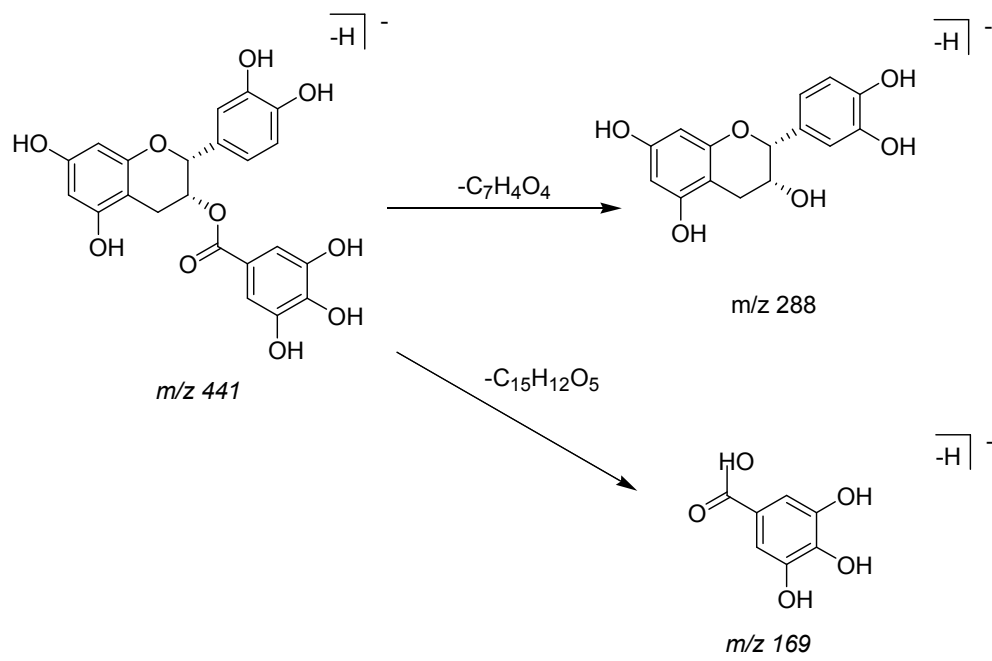


Figure 29. Proposed fragmentation of Epicatechin gallate.

#### 2-6-1-6. Hyperoside 표준물질

Hyperoside 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 10.98 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 256.00 nm와 354.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 30). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 11.16 min, primary ion의  $m/z$  값은 463 [M - H]<sup>-</sup>을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 11.16 min, fragments ion의  $m/z$  값은 301 [M-H-162]<sup>-</sup>을 확인할 수 있었다(Figure 31). LC MS/MS 이용한 Hyperoside 분석 결과  $m/z$  463.1 → 300.1 fragmentation 된다고 보고되고 있다(Figure 32).<sup>65)</sup>

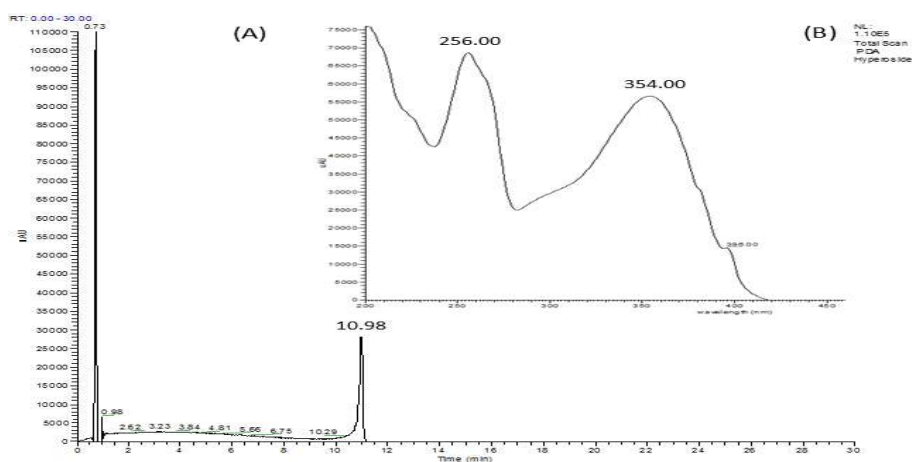


Figure 30. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Hyperoside standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.



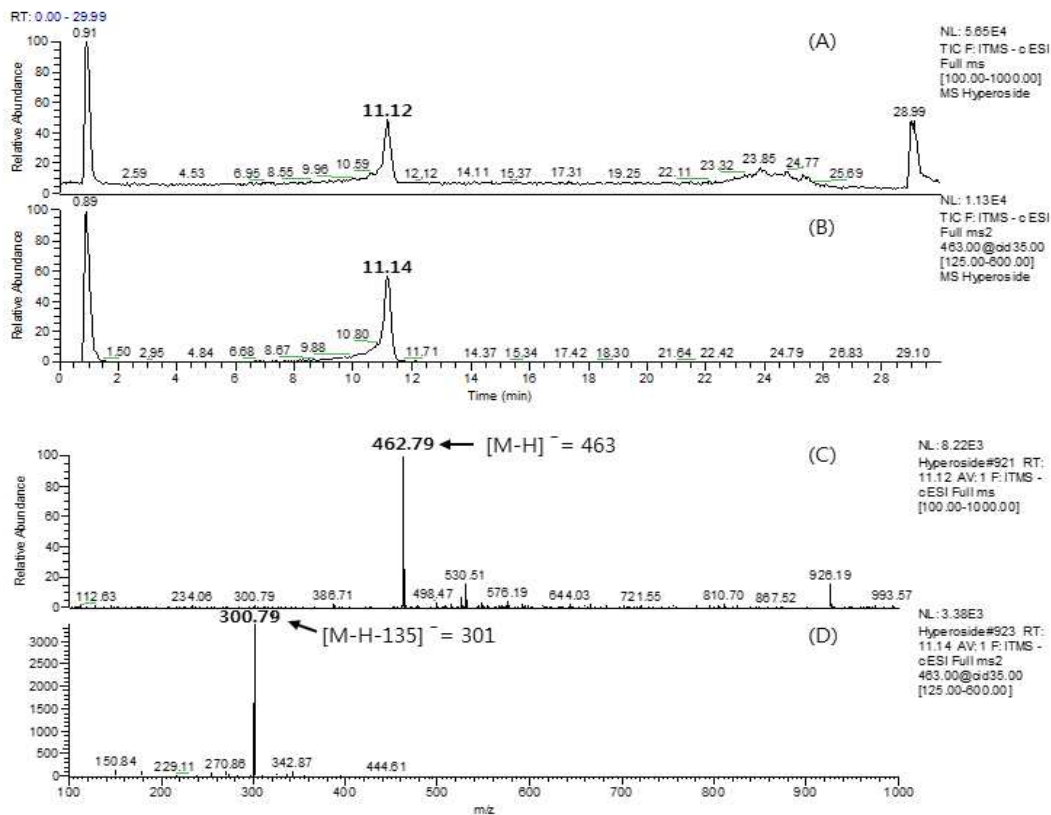


Figure 31. Result of Hyperoside in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  463 in negative ionization mode.

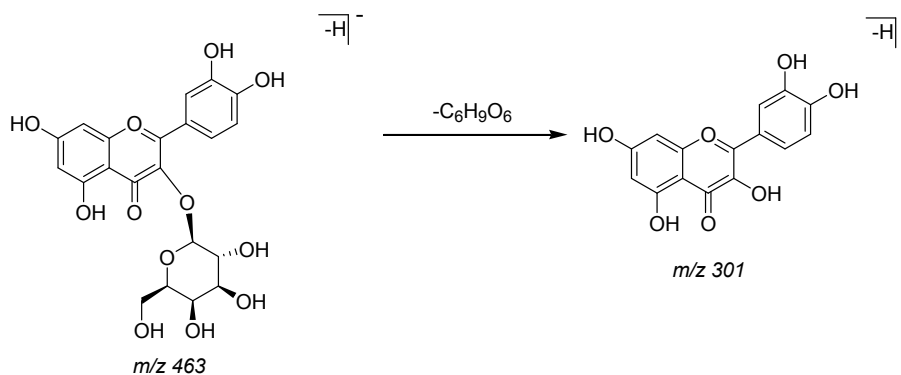


Figure 32. Proposed fragmentation of Hyperoside.

### 2-6-1-7. Rutin 표준물질

Rutin 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 10.98 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 256.00 nm와 353.00nm로 확인할 수 있었다(Figure 33). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 11.14 min, primary ion의  $m/z$  값은 609  $[M - H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 11.16 min, fragments ion의  $m/z$  값은 301  $[M - H - 308]^-$ 을 확인할 수 있었다(Figure 34). UPLC - MS-MS 활용 positive ionization mode에서 Rutin 분석 결과  $[M+H]^+$ 에서  $m/z$  값이 610.91, MRM에서 302.98 값을 나타냈으며<sup>66)</sup> 이는 negative ionization mode에서  $m/z$  값은 609,  $m/z$  값은 301을 예측할 수 있다(Figure 35).

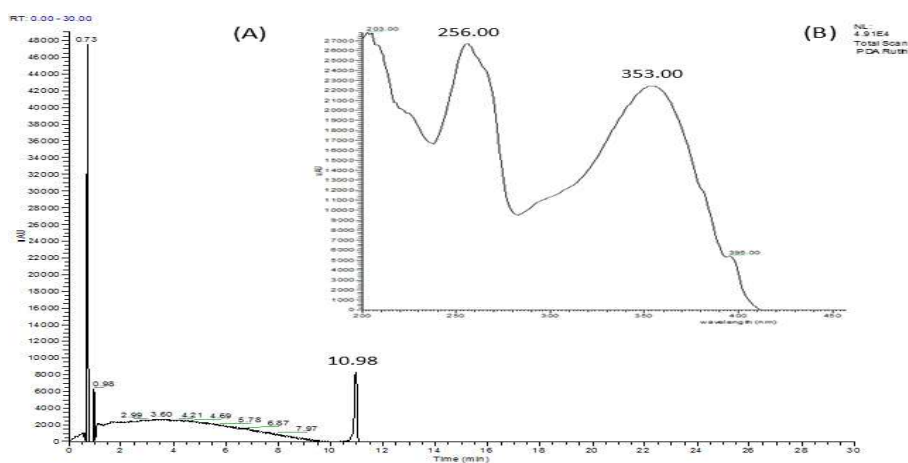


Figure 33. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Rutin standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

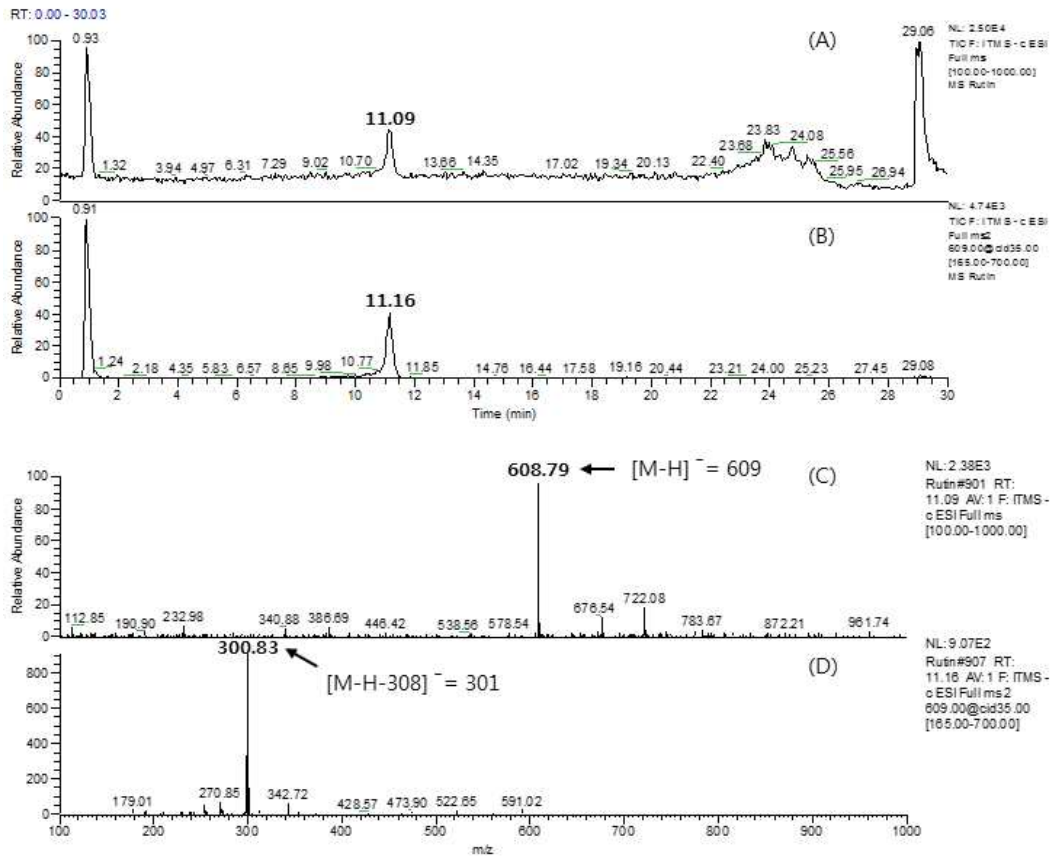


Figure 34. Result of Rutin in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of m/z 609 in negative ionization mode.

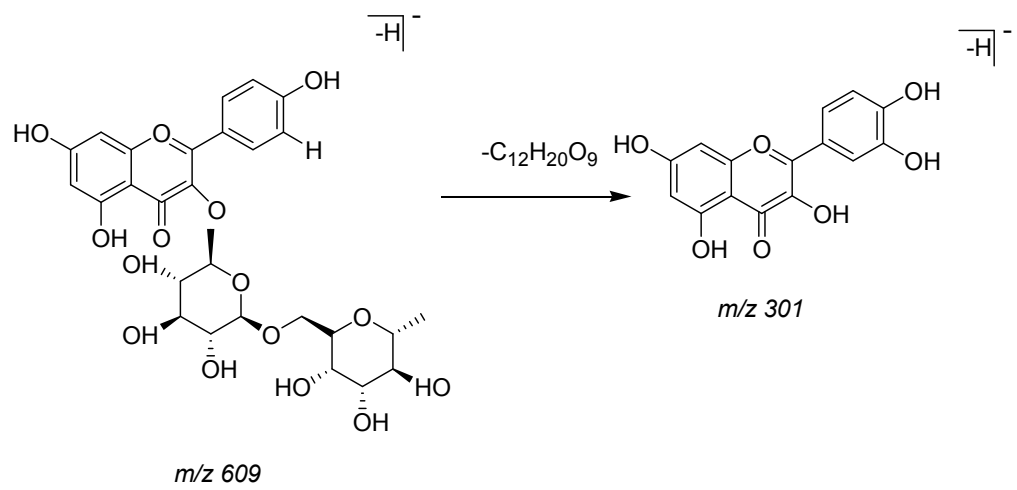


Figure 35. Proposed fragmentation of Rutin.

### 2-6-1-8. Nicotiflorin 표준물질

Nicotiflorin 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 12.53 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 265.00 nm와 347.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 36). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 12.56 min, primary ion의  $m/z$  값은 593  $[M-H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 12.70 min, fragments ion의  $m/z$  값은 285  $[M-H-308]^-$ 을 확인할 수 있었다(Figure 37). 까마귀베개(Rhamnaceae)로 부터의 Nicotiflorin 성분 분석에서 TOF MS/MS 실험결과 MS1에서  $m/z$  593.151 MS/MS에서  $m/z$  285.038, 255.029, 227.034 값을 확인하였다(Figure 38).<sup>67)</sup>

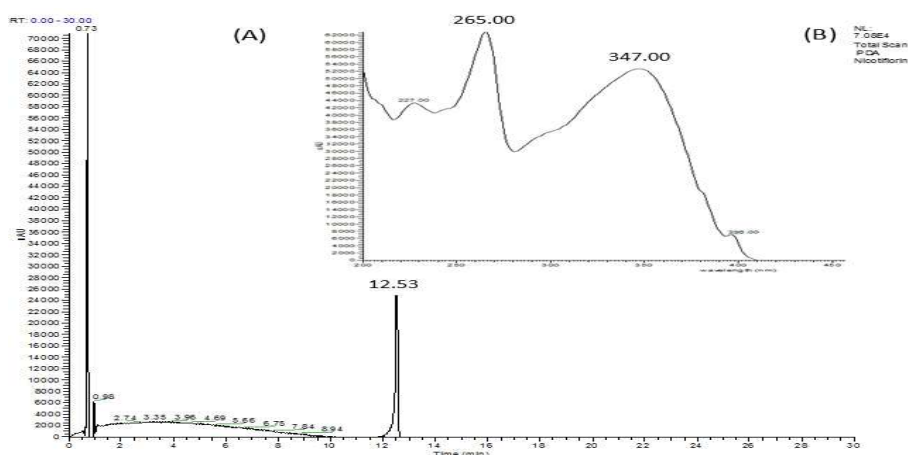


Figure 36. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Nicotiflorin standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

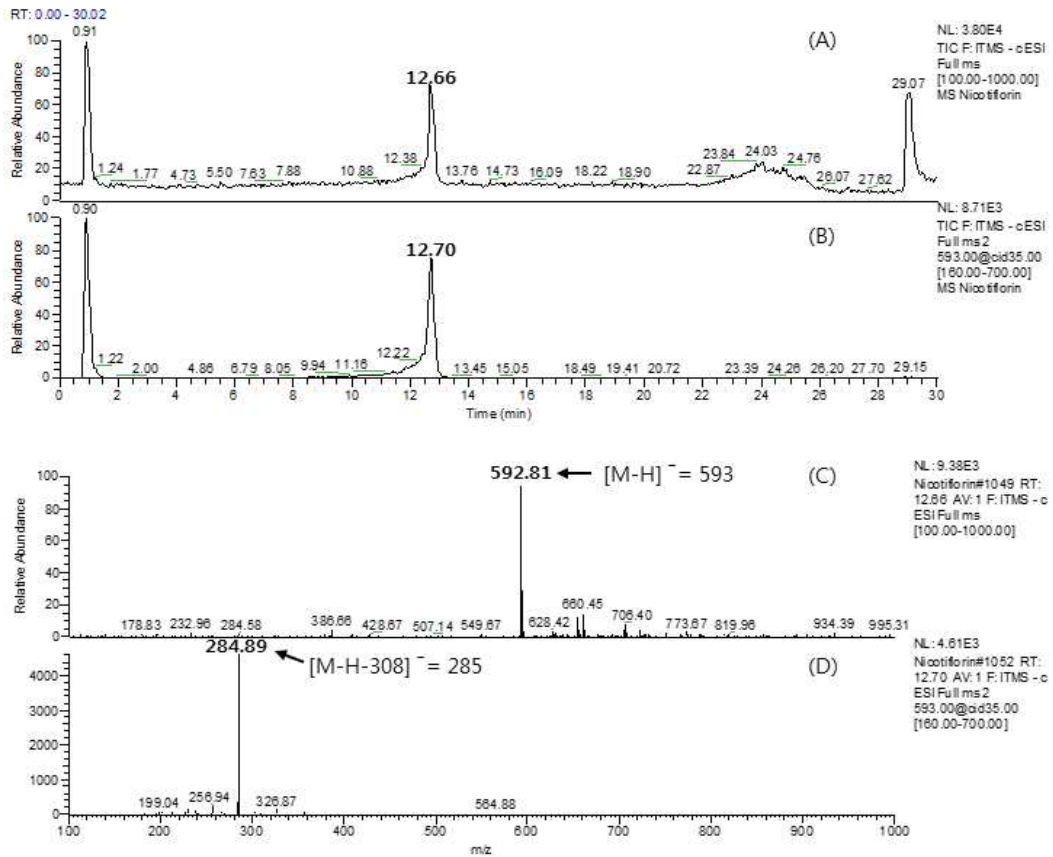


Figure 37. Result of Nicotiflorin in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  593 in negative ionization mode.

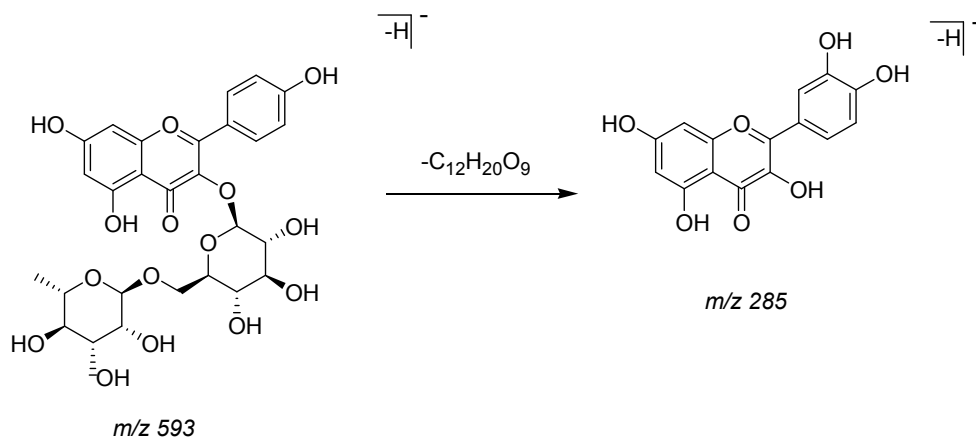


Figure 38. Proposed fragmentation of Nicotiflorin.

### 2-6-1-9. Quercitrin 표준물질

Quercitrin 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 13.01 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 256.00 nm와 349.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 39). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 13.14 min, primary ion의  $m/z$  값은 447  $[M - H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 13.16 min, fragments ion의  $m/z$  값은 301  $[M - H - 146]^-$ 을 확인할 수 있었다(Figure 40). 개모밀덩굴(Polygonum capitatum)에서 Quercitrin 분석 결과 positive ionization mode에서  $m/z$  449.0  $\rightarrow$  303.0 fragmentation 되며<sup>68)</sup> negative ionization mode에서 447.0  $\rightarrow$  301.0 됨을 짐작 할 수 있다(Figure 41).

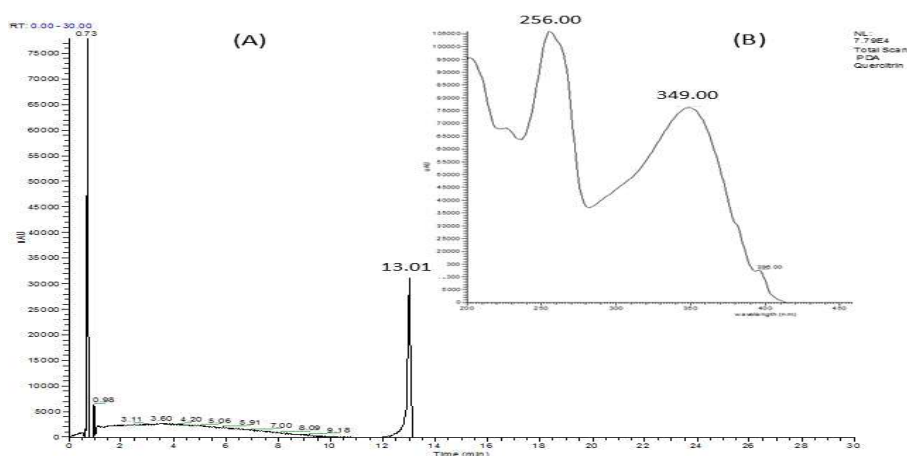


Figure 39. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Quercitrin standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.



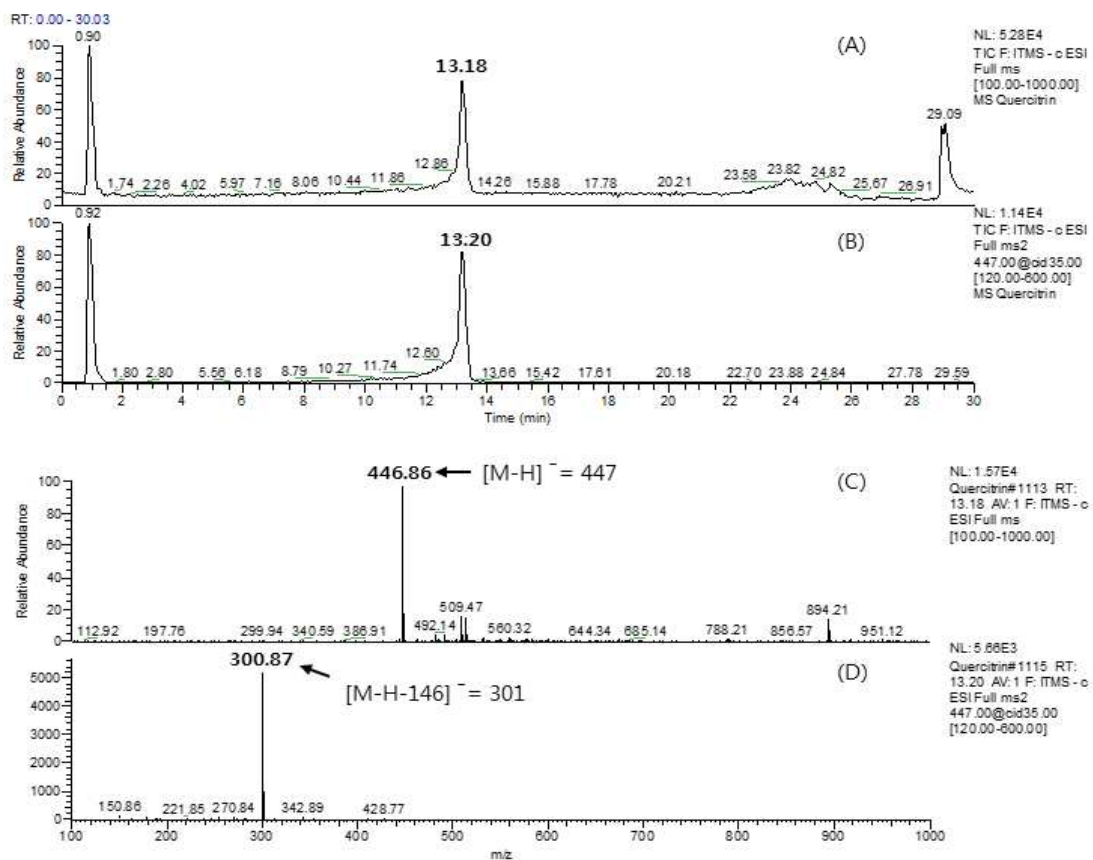


Figure 40. Result of Quercitrin in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  447 in negative ionization mode.

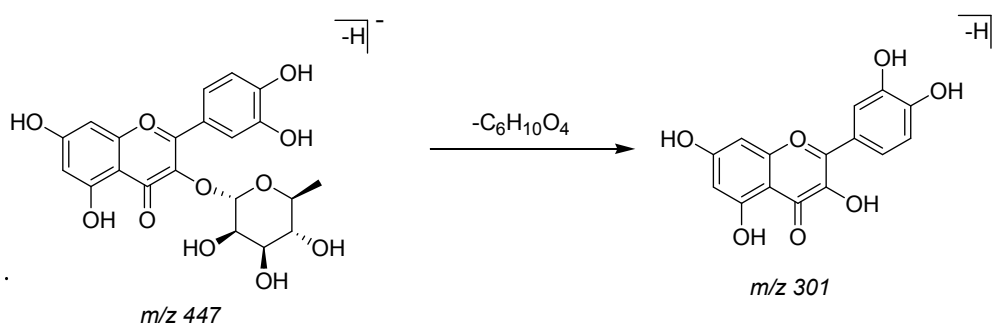


Figure 41. Proposed fragmentation of Quercitrin.

## 2-6-1-10. Quercetin 표준물질

Quercetin 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 16.95 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 255.00 nm와 372.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 42). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 17.16 min, primary ion의  $m/z$  값은 301 [M - H]<sup>-</sup>을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 17.12 min, fragments ion의  $m/z$  값은 179 [M - H-122]<sup>-</sup>와 151 [M - H-150]<sup>-</sup>을 확인할 수 있었다(Figure 43). UFLC XR Ultra high performance liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) 이용한 Quercetin 분석 결과 negative ionization mode에서  $m/z$  301.0367, fragments ionization  $m/z$  273.042, 243.028, 178.998, 151.004, 121.030 값이 확인되었다(Figure 44).<sup>69)</sup>

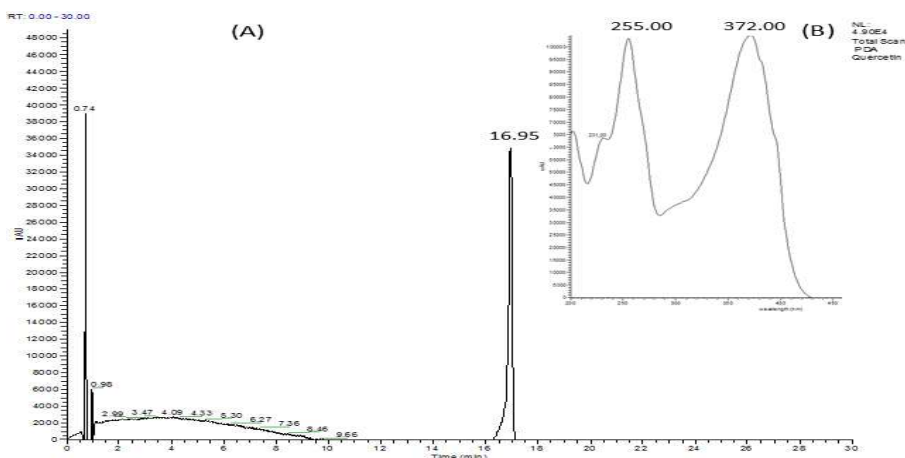


Figure 42. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Quercetin standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

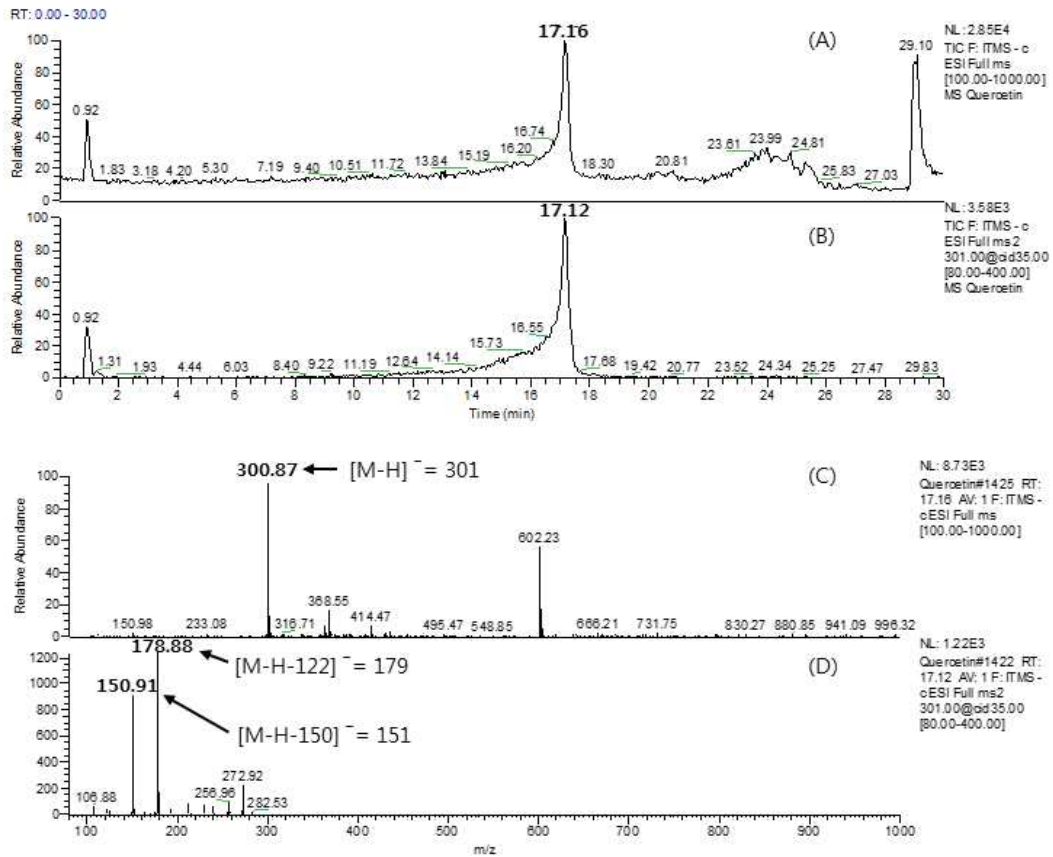


Figure 43. Result of Quercetin in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of m/z 301 in negative ionization mode.

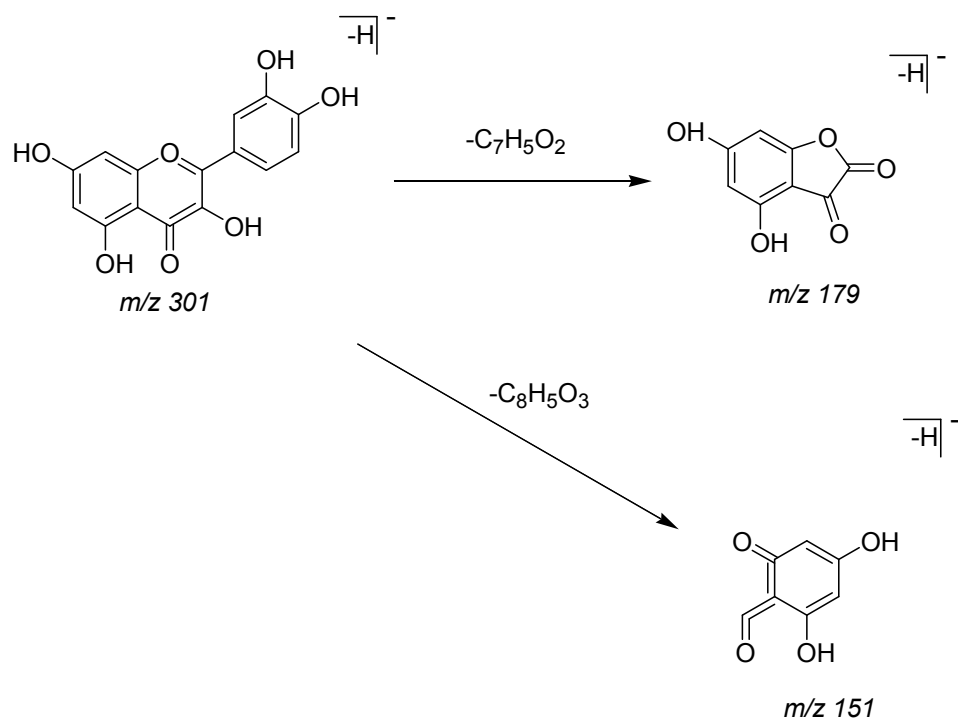


Figure 44. Proposed fragmentation of Quercetin.

## 2-6-1-11. Kaempferol 표준물질

Kaempferol 성분에 대한 total scan PDA chromatogram을 얻었다. 검출기에 도달하는 시간(머무름 시간)은 20.10 min으로 나타났으며, photo diode array 검출기에서의 UV  $\lambda_{max}$ 는 265.00 nm와 367.00 nm로 확인할 수 있었다(Figure 45). Primary mass spectrum (MS1)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 20.25 min, primary ion의  $m/z$  값은 284  $[M - H]^-$ 을 확인할 수 있었다. 또한, secondary mass spectrum (MS2)에서의 total ion chromatogram에서 머무름 시간은 20.27 min, fragments ion의  $m/z$  값은 257  $[M - H - 28]^-$ , 243  $[M - H - 243]^-$ 을 확인할 수 있었다(Figure 46). 정향나무(*Syzygium aromaticum*)에서 Kaempferol의 primary ion의  $m/z$  값은 285(negative mode)에서 fragments ion에서  $m/z$  값이 268, 257, 255, 243, 239, 227, 211, 187, 159, 143, 131, 117, 93, 83, 65의 결과가 나온다고 보고되어 지고 있다(Figure 47).<sup>70)</sup>

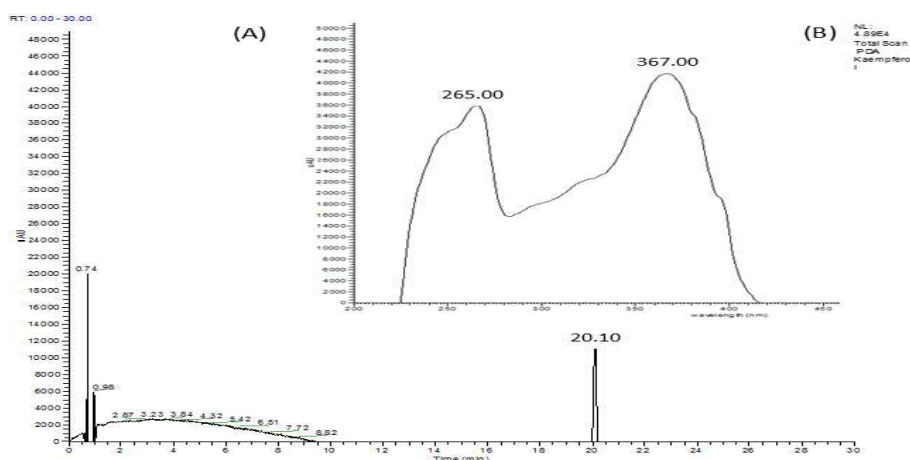


Figure 45. Ion chromatogram of Ion-Trap MS for Kaempferol standard material; (A) Total scan PDA. (B) PDA spectrm.

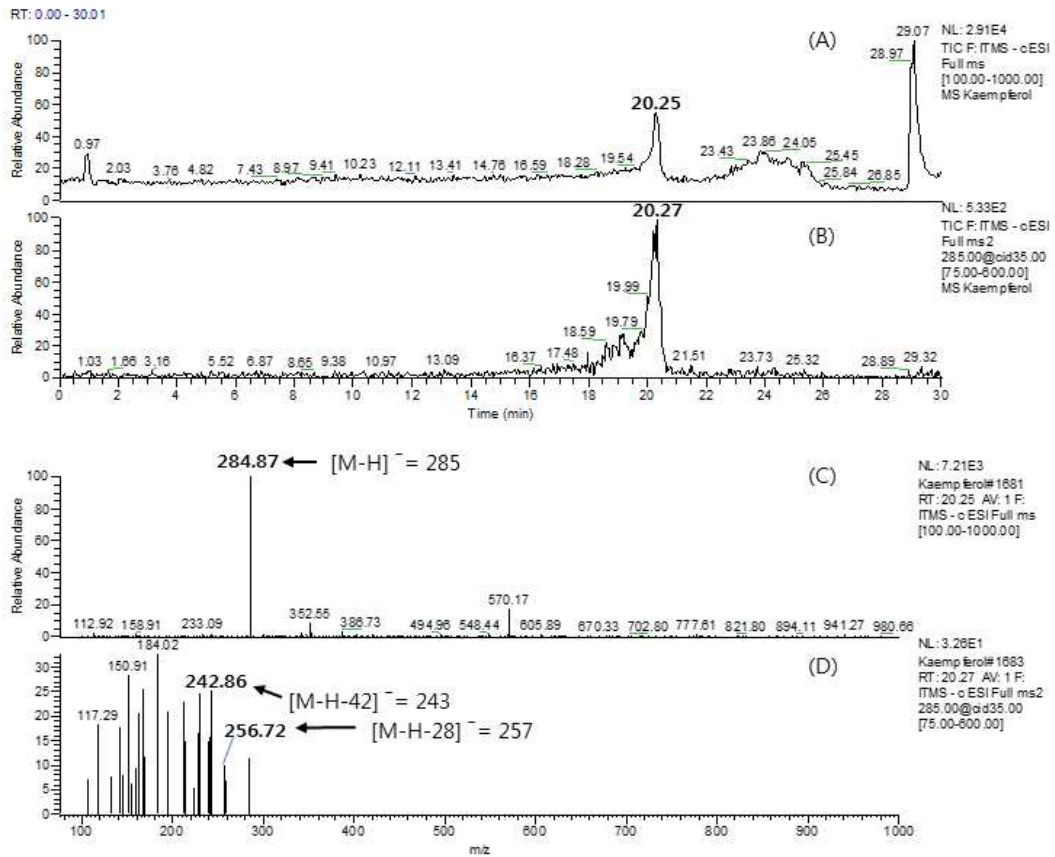


Figure 46. Result of Kaempferol in primary mass spectrum (MS1) and Secondary Mass Spectrum (MS2); (A) Total ion chromatogram (MS1). (B) ESI-MS spectrum in negative ionization mode. (C) Total ion chromatogram (MS2). (D) ESI-MS/MS spectrum of m/z 285 in negative ionization mode.

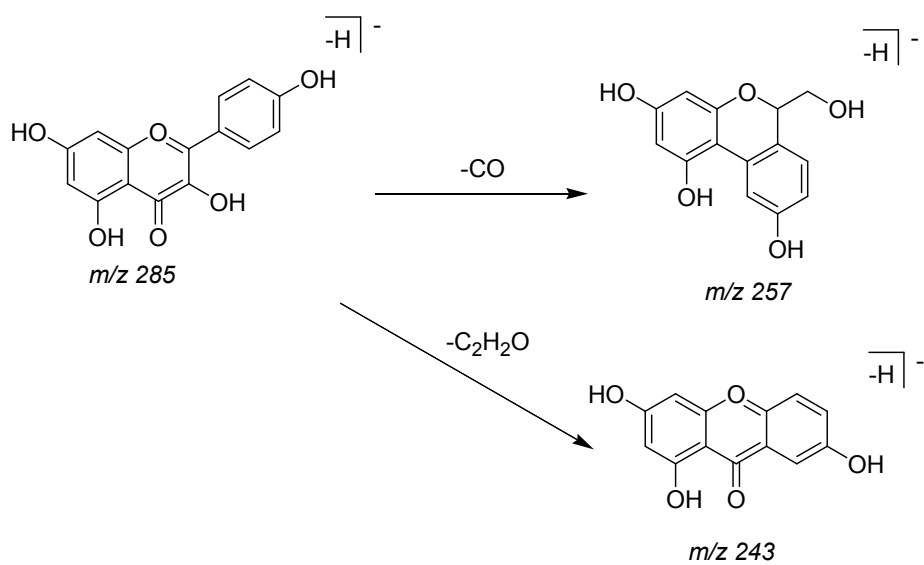


Figure 47. Proposed fragmentation of Kaempferol.

## 2-6-2. 추출 성분 분석

### 2-6-2-1. 곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물(잎, 가지)

곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물과 표준물질(STD) 11종을 비교 분석을 통해 정성 확인 과정을 진행하였다. 표준물질 Catechin을 비교한 결과 Primary mass spectrum (MS1)에서 total ion chromatogram에서 곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물의 머무름 시간은 3.38 min (Catechin: 3.35 min)이었으며, ESI-MS spectrum in negative ionization mode에서  $m/z$ 값은 288.94 (Catechin:  $m/z$  288.82)으로 나타났다. secondary mass spectrum (MS2)에서는 total ion chromatogram에서 곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물의 머무름 시간은 3.47 min (Catechin: 3.40 min)이었으며, ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  289 in negative ionization mode에서 fragments ion  $m/z$ 값은 244.88, 204.84 (Catechin:  $m/z$  244.909, 204.87)으로 나타나 곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물에 Catechin이 포함되어 있음을 확인하였다. 같은 방법으로 Pyocyanidin B2, Hyperoside, Rutin, Quercetin, Kaempferol 등 6종의 성분을 확인하였고, 곰의말채나무 추출물 분리 후 구조분석을 통해 Quercetin, Kaempferol을 확인된 바 있다(Table 14, Figure 48-54).<sup>71)</sup>

Table 14. Identification of standards from of *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
3.38	288.94	244.88, 204.84	Catechin
5.38	577.46	424.87, 406.98	Pyocyanidin B2
10.95	462.84	300.84	Hyperoside
10.98	608.89	300.90	Rutin
17.26	300.88	178.91, 150.86	Quercetin
20.29	284.97	256.84, 242.78	Kaempferol



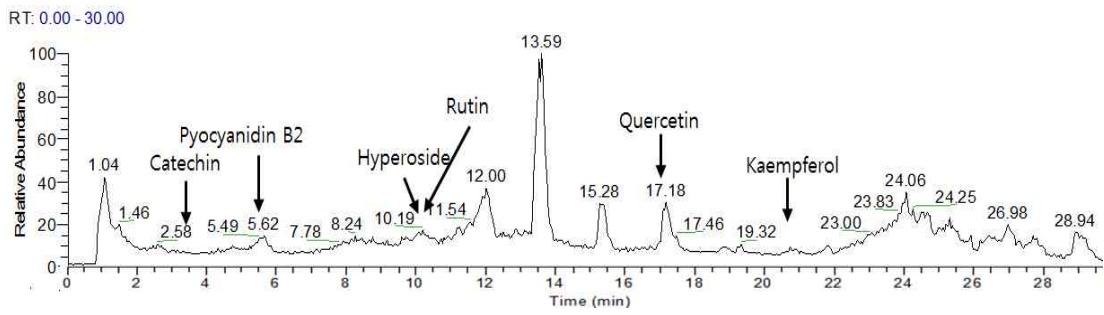


Figure 48. Total ion chromatogram (MS1) of *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract.

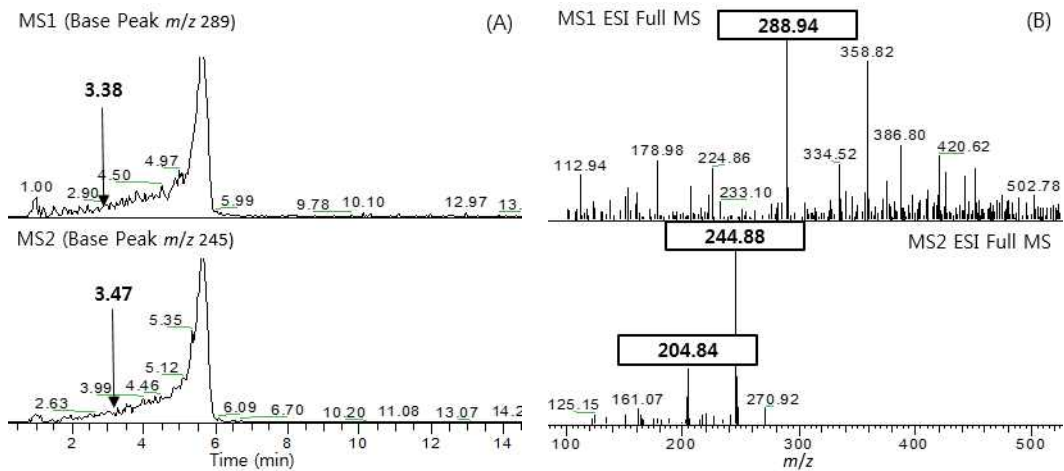


Figure 49. Identification of Catechin from of *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

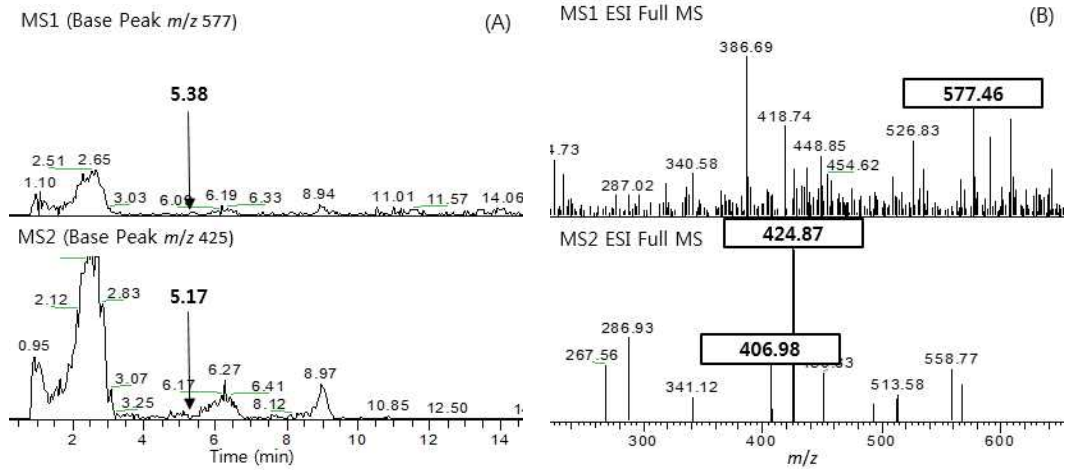


Figure 50. Identification of Pyocyanidin B2 from *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract; ; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

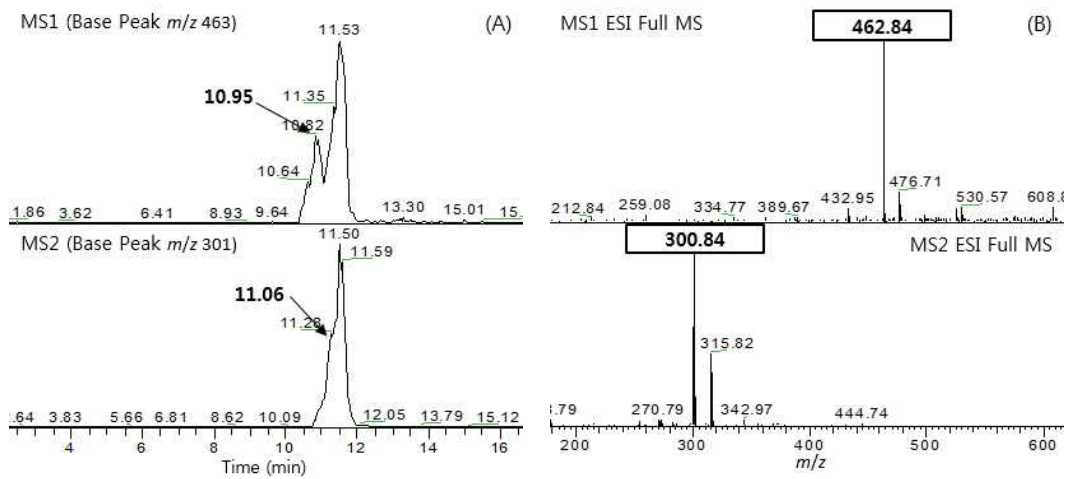


Figure 51. Identification of Hyperoside from *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

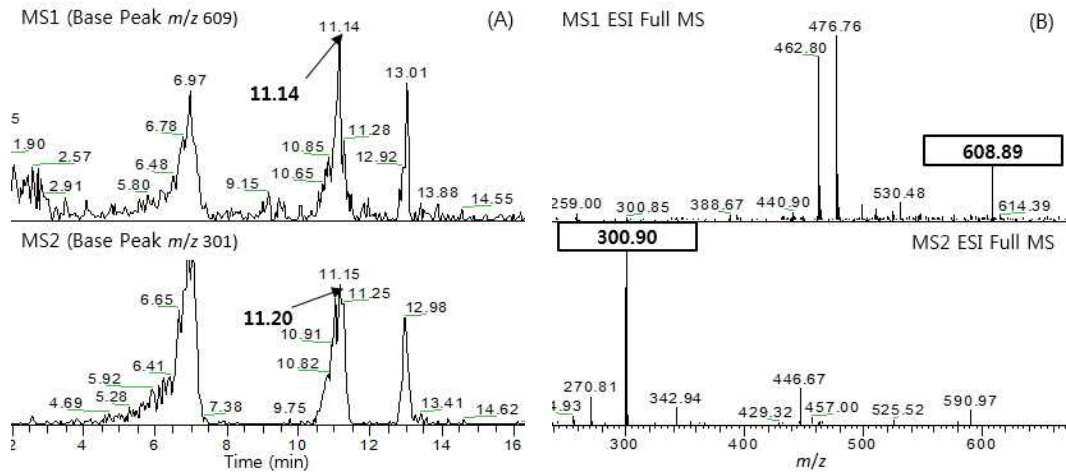


Figure 52. Identification of Rutin from *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

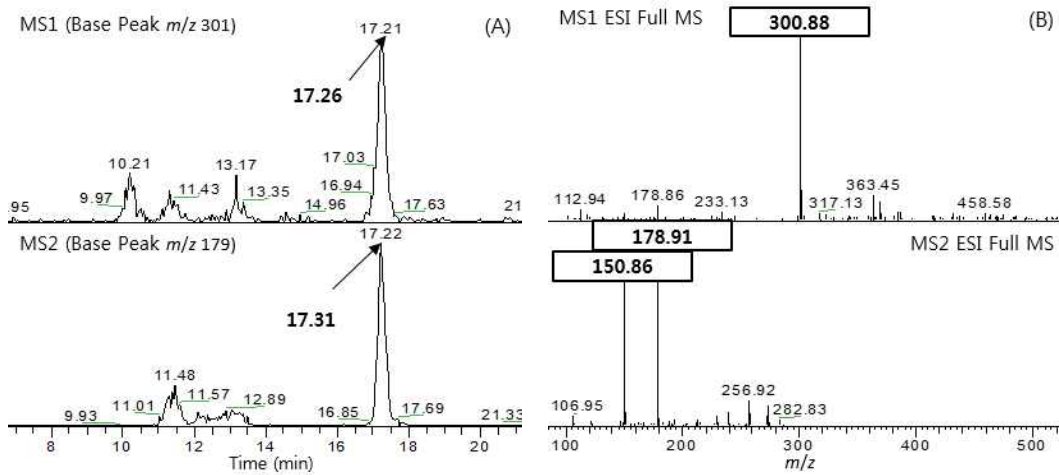


Figure 53. Identification of Quercetin from *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

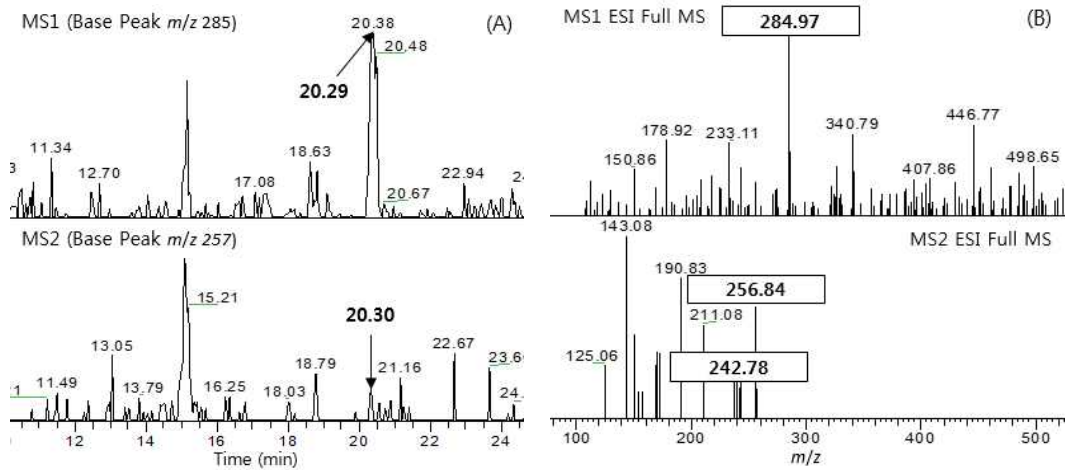


Figure 54. Identification of Kaempferol from *C. macrophylla* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

#### 2-6-2-2. 곰의말채나무 잎 ethyl acetate fraction

곰의말채나무 잎 ethyl acetate fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석을 통해 정성 확인 과정을 진행하였다. 곰의말채나무 잎 ethyl acetate fraction의 성분들은 곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물(잎, 가지)에서 확인된 성분들과 유사하였으며, Pyocyanidin B2, Hyperoside를 제외한 Catechin, Rutin, Quercetin, Kaempferol 등 4종의 성분을 할 수 있었다(Table 15, Figure 55-59).

Table 15. Identification of standards from of *C. macrophylla* (leaves) ethyl acetate fraction.

$R_t$ (min, MS1)	MS1 $[M-H]^-$	MS2 (MS/MS)	Identification
3.32	288.94	244.91, 204.91	Catechin
11.15	608.74	300.93	Rutin
17.20	300.86	178.91, 150.81	Quercetin
20.31	284.87	256.72	Kaempferol

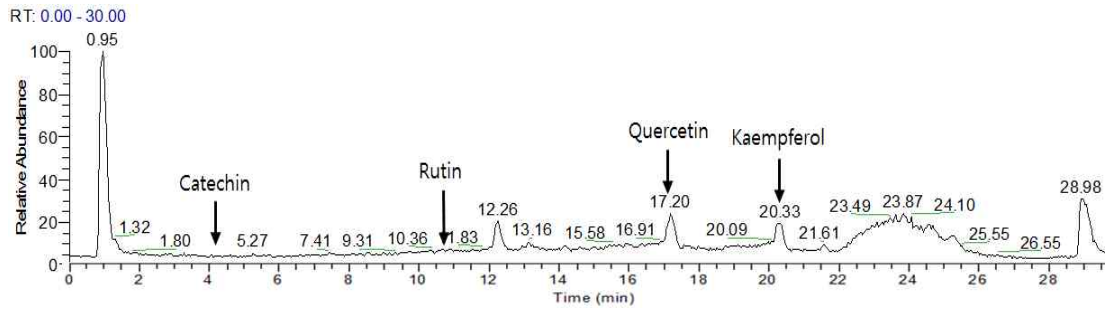


Figure 55. Total ion chromatogram (MS1) of *C. macrophylla* (leaves) ethyl acetate fraction.

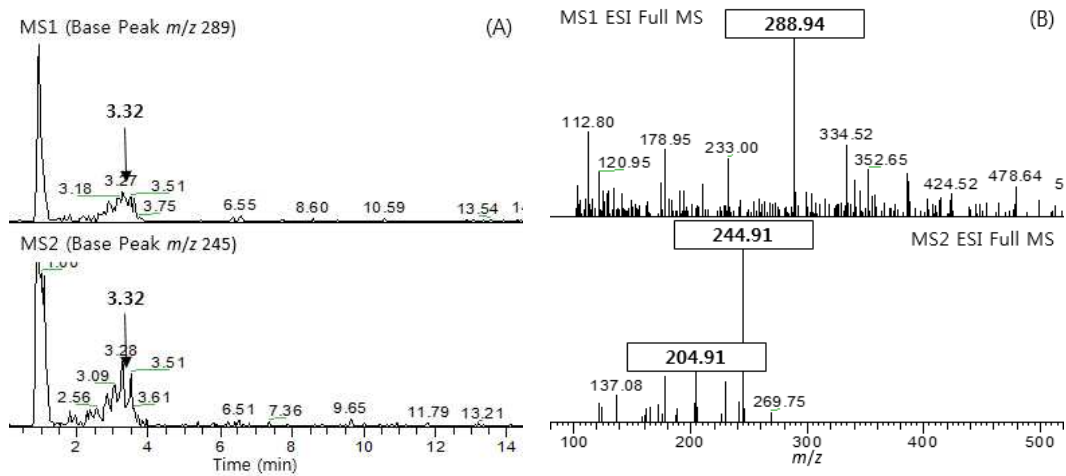


Figure 56. Identification of Catechin from *C. macrophylla* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

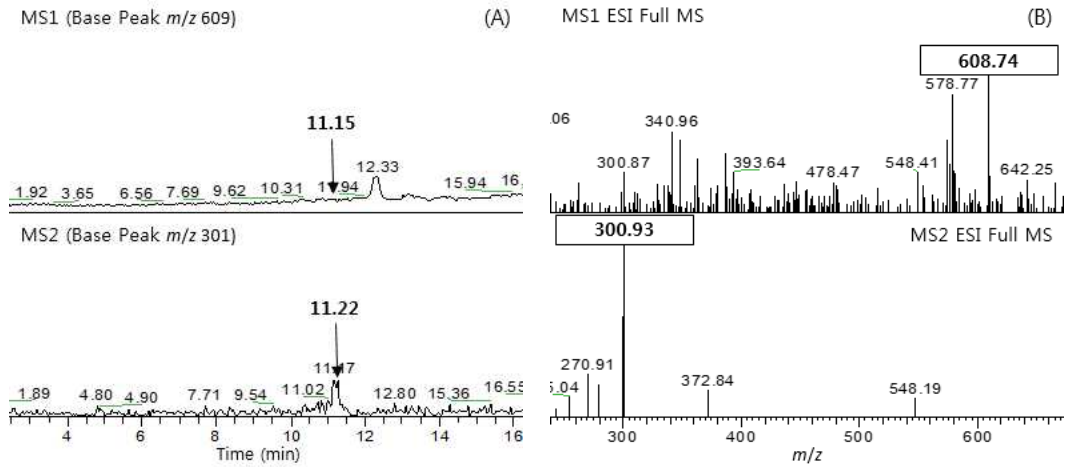


Figure 57. Identification of Rutin from *C. macrophylla* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

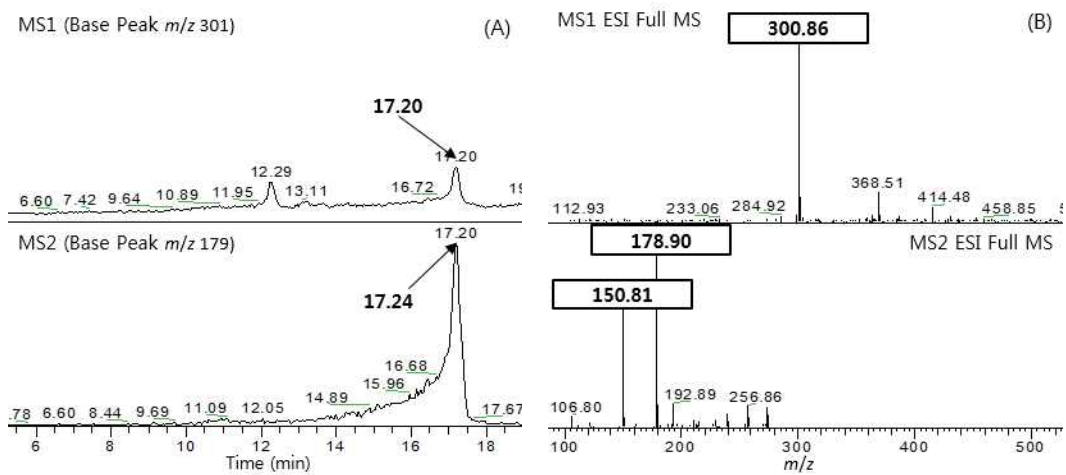


Figure 58. Identification of Quercetin from *C. macrophylla* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

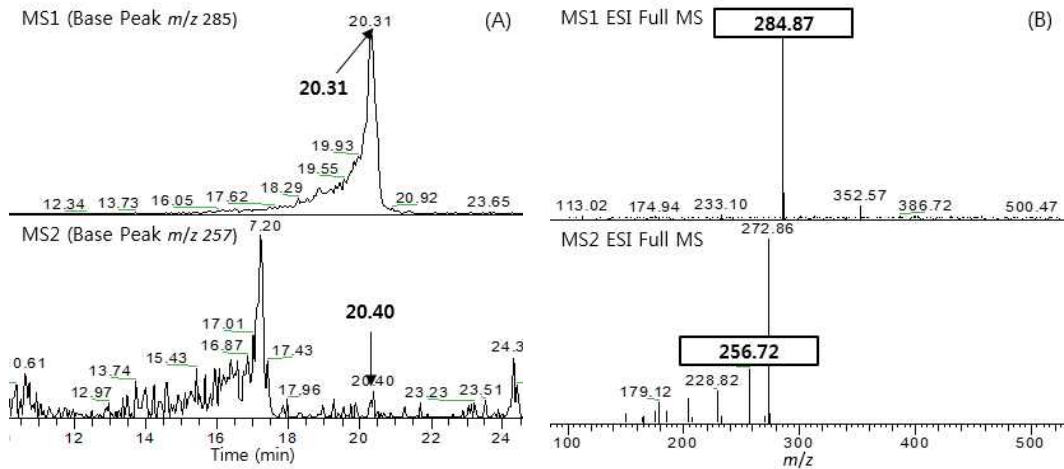


Figure 59. Identification of Kaempferl from *C. macrophylla* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

### 2-6-2-3. 곰의말채나무 잎 *n*-butanol fraction

곰의말채나무 잎 *n*-butanol fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석을 통해 정성 확인 과정을 진행하였다. 곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물과 곰의말채나무 잎 ethyl acetate fraction에서 확인된 잎 Catechin,, Hyperoside이 확인되 되었고, 특이하게 Quercitrin이 곰의말채나무 잎 *n*-butanol fraction에서 확인이 되었다(Table 16, Figure 60-63).

Table 16. Identification of standards from of *C. macrophylla* (leaves) *n*-butanol fraction.

$R_t$ (min, MS1)	MS1 $[M-H]^-$	MS2 (MS/MS)	Identification
3.37	288.96	244.76, 204.94	Catechin
11.57	463.00	301.00	Hyperoside
13.11	446.94	300.99	Quercitrin

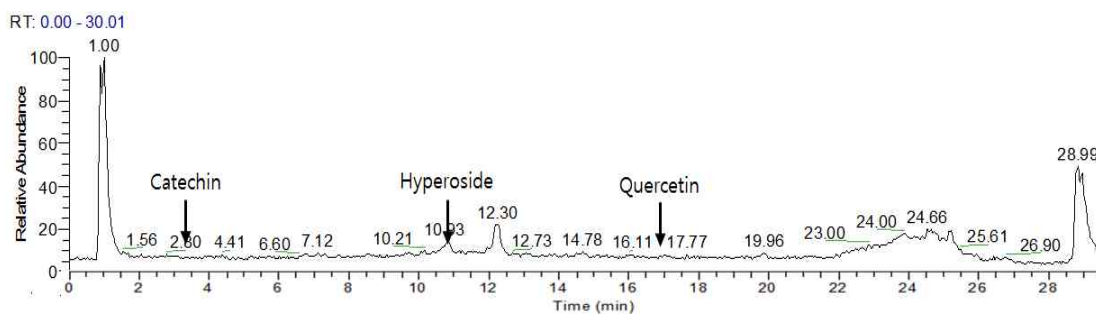


Figure 60. Total ion chromatogram (MS1) of *C. macrophylla* (leaves) *n*-butanol fraction.

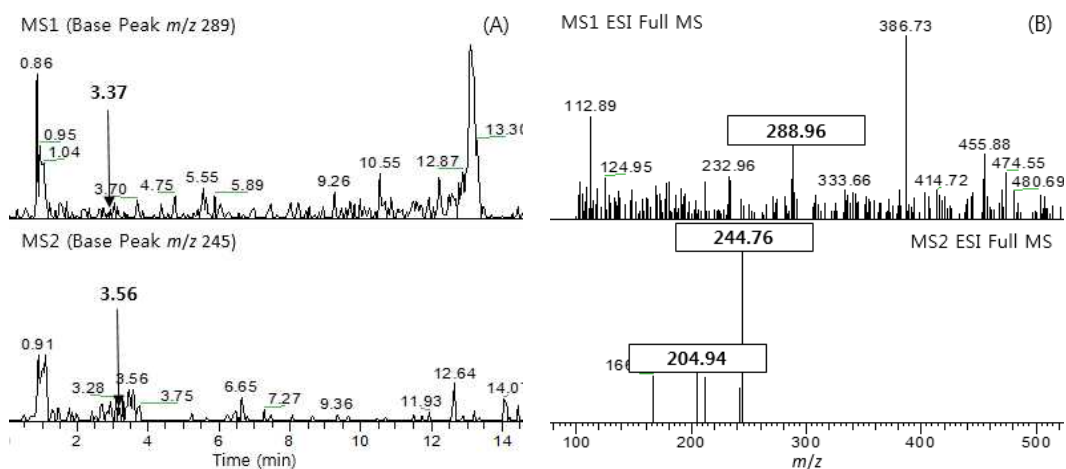


Figure 61. Identification of Catechin from *C. macrophylla* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.



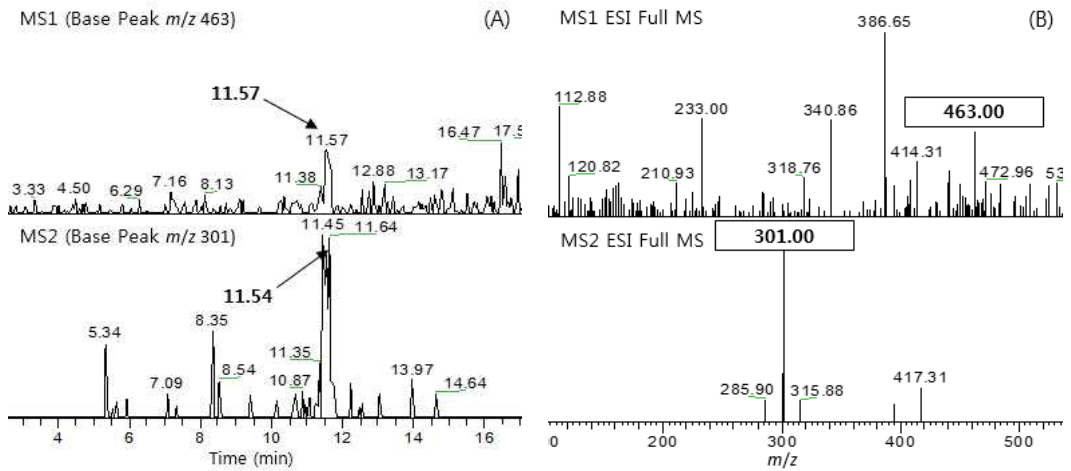


Figure 62. Identification of Hyperoside from *C. macrophylla* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

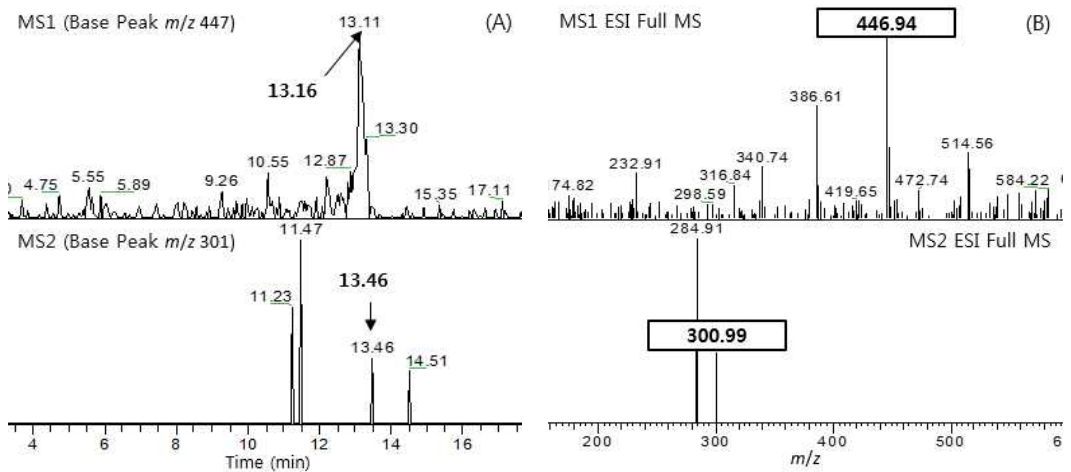


Figure 63. Identification of Quercitrin from *C. macrophylla* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

2-6-2-4. 곰의말채나무 가지 ethyl acetate fraction

곰의말채나무 가지 ethyl acetate fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석을 통해 정성 확인 과정을 진행하였고 5종의 성분을 확인하였다. 곰의말채나무 잎 ethyl acetate fraction에서 확인된 성분 중 Catechin만 동일하였으며, 나머지 Pyocyanidin B2, Pyocyanidin C2, Hyperoside, Quercitrin은 곰의말채나무 잎 ethyl acetate fraction에서는 확인되지 않고 곰의말채나무 가지 ethyl acetate fraction에서 확인되었다. 그리고 곰의말채나무 70% ethyl alcohol 추출물(잎, 가지)에 없었던 Pyocyanidin C2이 확인되었다(Table 17, Figure 64-69).

Table 17. Identification of standards from of *C. macrophylla* (Branch) ethyl acetate fraction.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
3.22	288.76	244.92, 205.26	Catechin
5.38	576.60	424.75, 406.90	Pyocyanidin B2
8.47	864.61	694.61, 576.70	Pyocyanidin C2
11.57	462.74	300.74	Hyperoside
13.25	446.71	300.86	Quercitrin

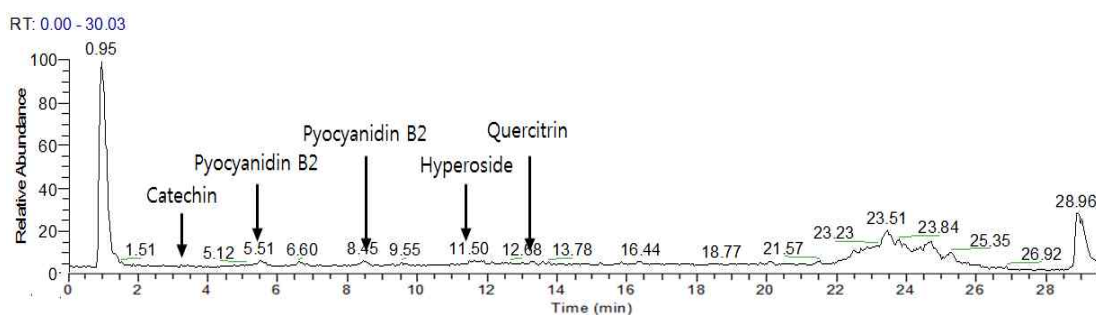


Figure 64. Total ion chromatogram (MS1) of *C. macrophylla* (Branch) ethyl acetate fraction.

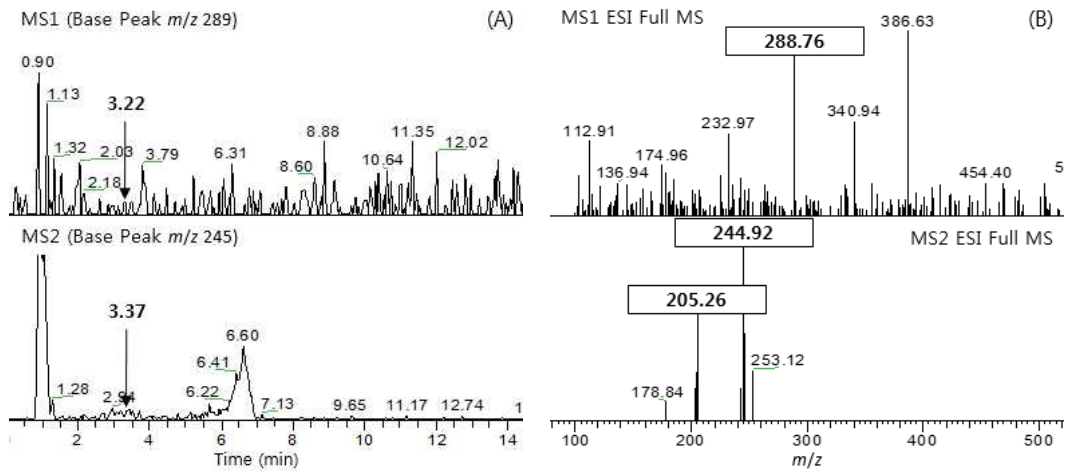


Figure 65. Identification of Catechin from *C. macrophylla* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

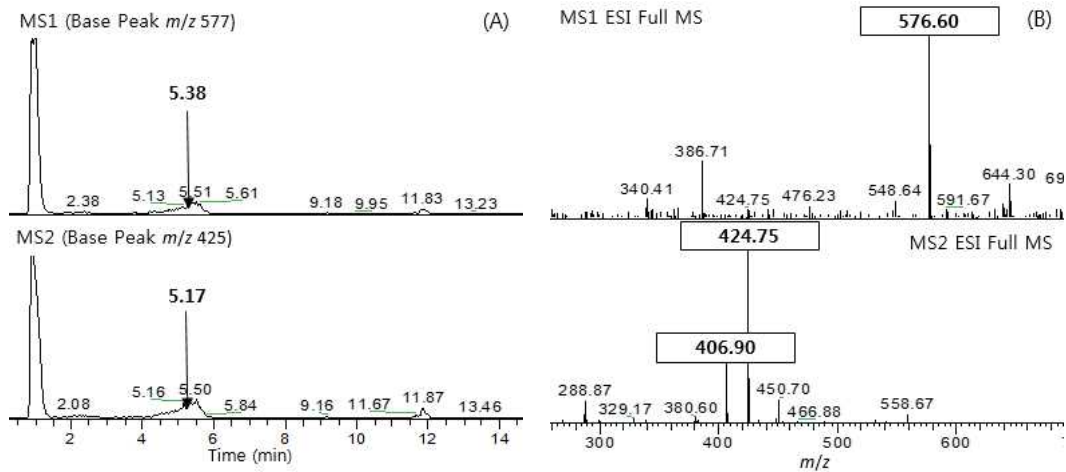


Figure 66. Identification of Pyocyanidin B2 from *C. macrophylla* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

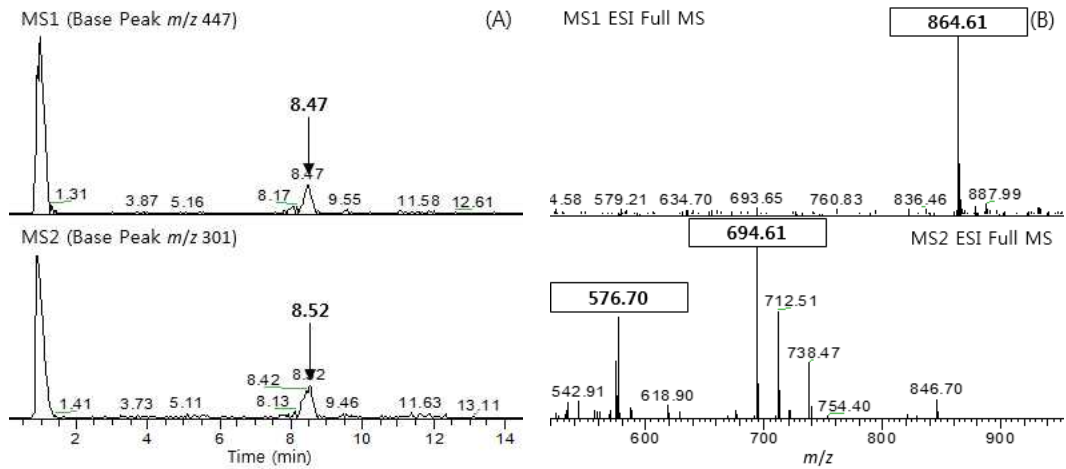


Figure 67. Identification of Pyocyanidin C2 from *C. macrophylla* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

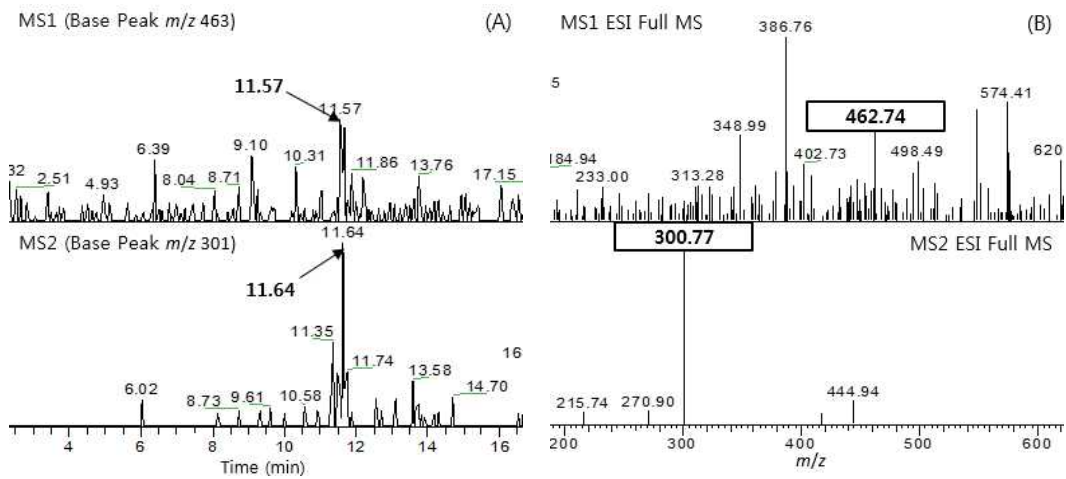


Figure 68. Identification of Hyperoside from *C. macrophylla* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

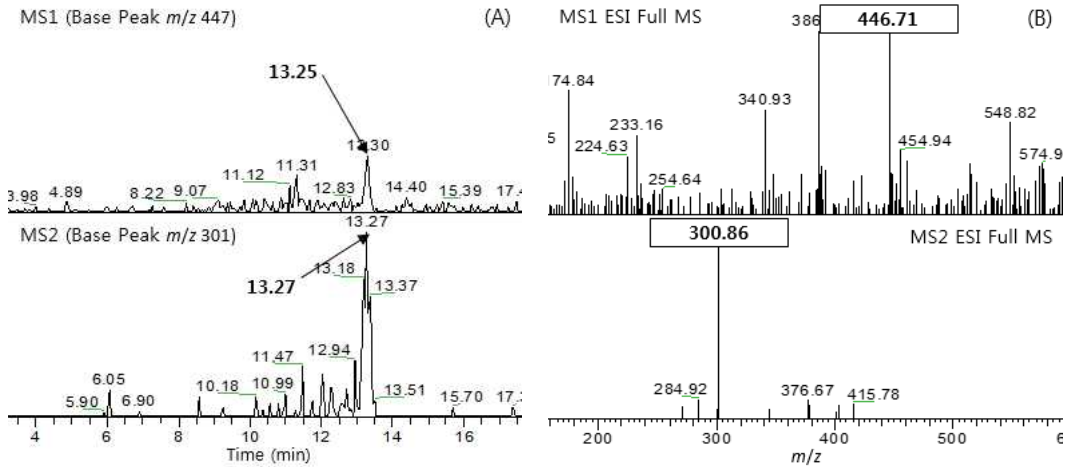


Figure 69. Identification of Quercitrin from *C. macrophylla* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum..

#### 2-6-2-2. 곰의말채나무 가지 *n*-butanol fraction

곰의말채나무 가지 *n*-butanol fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석을 통해 정성 확인 과정을 진행하였고, 그 결과 Pyocyanidin B2, Pyocyanidin C2, Rutin 등 3종 성분을 확인하였다. 이는 곰의말채나무 잎 *n*-butanol fraction 성분들과 상의한 결과이며 식물의 잎과 가지의 포함된 성분들이 차이가 있음을 시사한다(Table 18, Figure 70-73).

Table 18. Identification of standards from of *C. macrophylla* (Branch) *n*-butanol fraction.

$R_t$ (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
5.30	576.61	424.74, 406.78	Pyocyanidin B2
8.48	864.60	694.59, 576.72	Pyocyanidin C2
11.25	608.73	300.60	Rutin

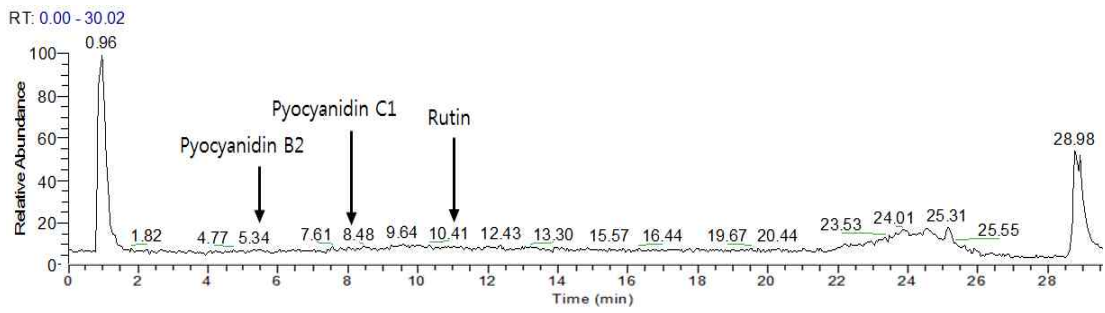


Figure 70. Total ion chromatogram (MS1) of *C. macrophylla* (Branch) *n*-butanol fraction.

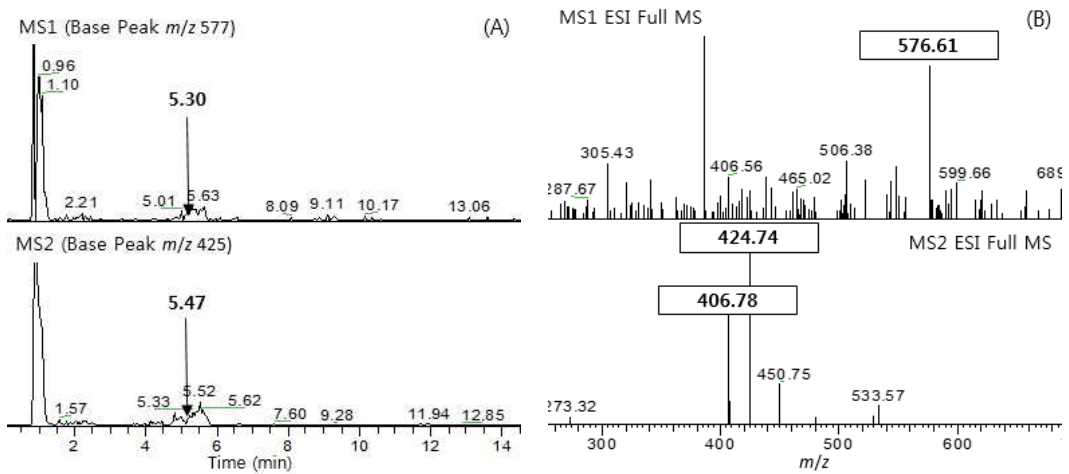


Figure 71. Identification of Pyocyanidin B2 from *C. macrophylla* (Branch) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

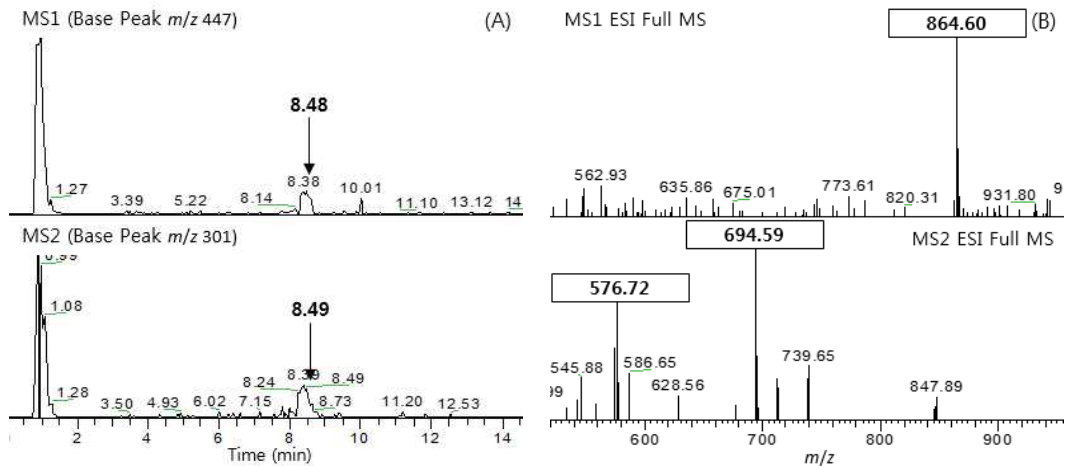


Figure 72. Identification of Pyocyanidin C2 from *C. macrophylla* (Branch) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

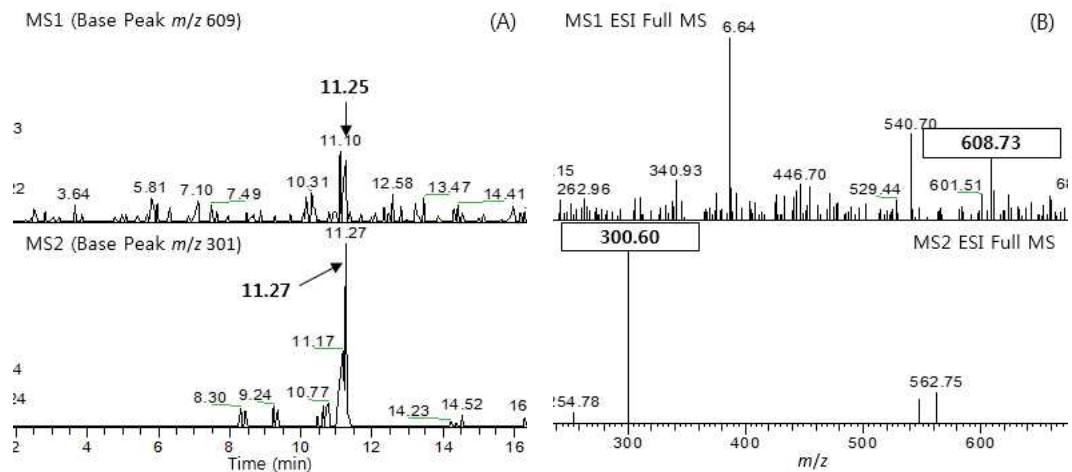


Figure 73. Identification of Rutin from *C. macrophylla* (Branch) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

## 2-7. 곰의말채나무 추출 성분 동물 실험

### 2-7-1. 기도과민성 미치는 영향

천식에 있어 기도과민성은 주요 증상 중에 하나이다. 본 실험에서 천식유도군(OVA)은 methylcholine 농도가 증가함에 따라 정상대조군(NC)에 비하여 기도과민성이 크게 증가하였다. 반면, 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유도군에 비해 methylcholine의 농도가 증가함에 따라 기도과민성이 현저하게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(42-30), 시료물질 60 mg/kg(42-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 methylcholine 농도 10 mg/mL에서 13.170, 20 mg/mL에서 3.806, 30 mg/mL에서 0.883으로 나타내었다. F 분포도에서의 기각치 3.63(집단간(3)-1=2, 집단내(19)-3=16)\_(보다 높은 값을 나타내는 두 개의 농도(10 mg/mL, 20 mg/mL)로 확인이 되었다. F 기각치 보다 높은 10 mg/mL, 20 mg/mL의 P-value을 확인한 결과 OVA/42-30의 10 mg/mL 농도에서 0.001( $P < 0.05$ )로 유의성이 관찰되었고, 나머지는 유의성이 관찰되지 않았다. 따라서 투여한 군에서는 천식대조군에 비해 methylcholine 농도가 증가함에 따라 기도과민성이 감소하였으나 이러한 감소는 천식대조군과 비교하여 통계학적 유의성 없음을 확인할 수 있었다(Table 19, Figure 74).



Table 19. Effects of test material-42 on airway

hyperresponsiveness and result of one-way ANOVA.

Airway Hyperresponsiveness (Penh)	Concentration (mg/mL)			
	0	10	20	30
NC	0.31±0.04	0.43±0.03	0.64±0.14	1.30±0.10
OVA	0.69±0.09	1.12±0.18	3.56±0.78	6.08±1057
DEX	0.47±0.04	0.57±0.07	0.86±0.33	2.77±0.73
42-30	0.42±0.19	0.57±0.19	2.69±0.42	5.12±1.04
42-60	0.44±0.22	0.95±0.22	3.45±0.53	5.54±1.31
F-value		13.170	3.806	0.833
F-distribution		3.63	3.63	3.63
P-value	OVA/42-30	0.001	0.082	
	OVA/42-60	0.376	0.989	

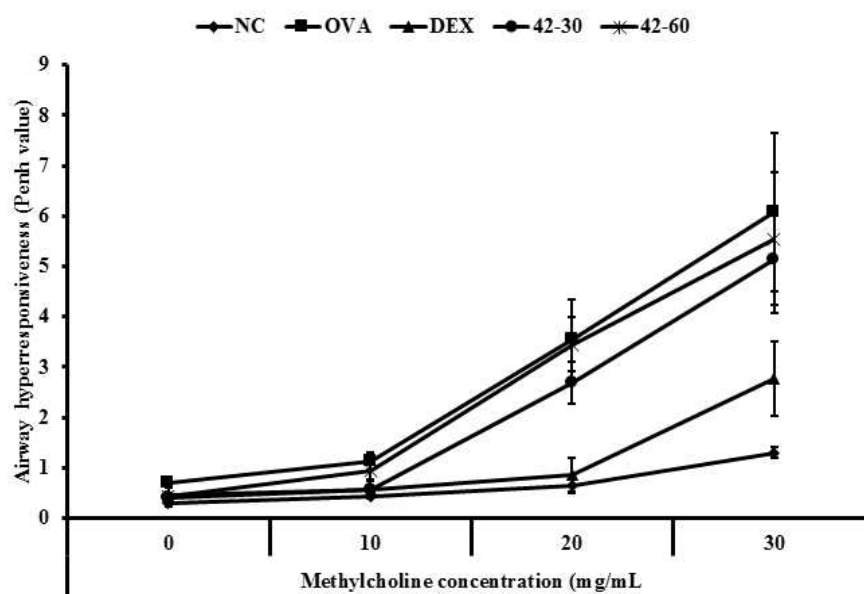


Figure 74. Effects of test material-42 on airway hyperresponsiveness.

## 2-7-2. 활성산소족 억제 효과

반응성 활성산소족(Reactive oxygen species, ROS)는 천식의 발달에 있어 염증세포의 침윤을 비롯한 다양한 천식의 임상증상을 일으키는 중요한 요인 중 하나이다. 본 실험에서 천식유도군(OVA)은 정상대조군(NC)에 비해 기관지 폐포 세척액 내 반응성활성 산소족의 생성이 현저하게 증가하였다. 반면, 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유도군(OVA)에 비해 반응성 활성산소족의 생성이 현저하게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(42-30), 시료물질 60 mg/kg(42-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 8.542로 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 높은 값을 나타냄을 확인할 수 있었다. P-value을 확인한 결과 OVA/42-30에서 0.128로( $P>0.05$ ) 유의성 없었고, OVA/42-60 또한 0.169로( $P>0.05$ ) 유의성 관찰되지 않았다(Table 20, Figure 75).

Table 20. Effects of test material-42 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	ROS Production (Fluorencence)
NC	2,798.56±961.86
OVA	11,794.76±1,385.53
DEX	6,137.66±1,240.87
42-30	9,757.91±1,966.33
42-60	13,436.45±1,600.79
F-value	8.542
F-distribution	3.55
P-value	OVA/42-30 0.128
	OVA/42-60 0.169

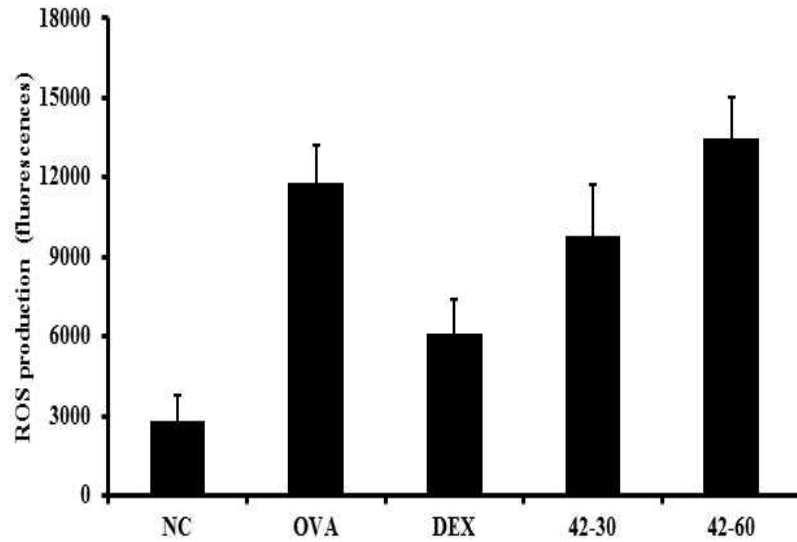


Figure 75. Effects of test material-42 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid.

### 2-7-3. 폐포 세척액 내 염증세포 침윤 억제 효과

천식에 있어, 호산구의 침윤은 천식을 진단할 수 있는 중요한 지표이다. 본 실험에서도, 천식유발군(OVA)은 기관지 폐포 세척액 내 호산구를 비롯한 염증세포의 수가 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면, 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)에서는 천식유발군에 비교하여 기관지 폐포 세척액 내 염증세포 수가 현저하게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(42-30), 시료물질 60 mg/kg(42-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 Eosinophil에서 2.246, Macrophage에서 5.590, Lymphocyte에서 2.554, Neutrophil에서 1.413, Total cell에서 4.532로 확인이 되었다. Macrophage와 Total cell의 P-value을 확인한 결과 OVA/42-30의 0.04( $P < 0.05$ )로 유의성이 관찰되었고, 나머지는 유의성이 관찰되지 않았다. Macrophage의 수는

천식유도군(OVA)에 비해 감소하였으며, 이로 야기된 기관지 폐포 세척액 내 총 염증세포 수 또한 천식유도군(OVA)에 비해 30 mg/kg(42-30) 투여군에서 17.6%, 60 mg/kg(42-60) 투여군에서 16.3% 감소되었다(Table 21, Figure 76).

Table 21. Effects of test material-42 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory cell (per×400 magnification site)				
	Eosinophil	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil	Total cell
NC	0	14.8±1.9	0.5±0.1	0	15.3±1.9
OVA	109.5±17.4	136.1±23.2	2.4±1.1	7.9±2.3	255.9±38.6
DEX	24.0±2.5	28.5±3.9	3.5±0.7	1.9±0.5	57.8±5.3
42-30	92.8±22.6	106.2±12.3	2.4±1.5	8.6±1.4	211.0±27.2
42-60	89.7±15.7	113.0±15.2	4.1±2.2	7.2±0.8	214.1±26.2
F-value	2.246	5.590	2.554	1.413	4.532
F-distribution	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55
P-value	OVA/42-30	0.040			0.080
	OVA/42-60	0.139			0.104

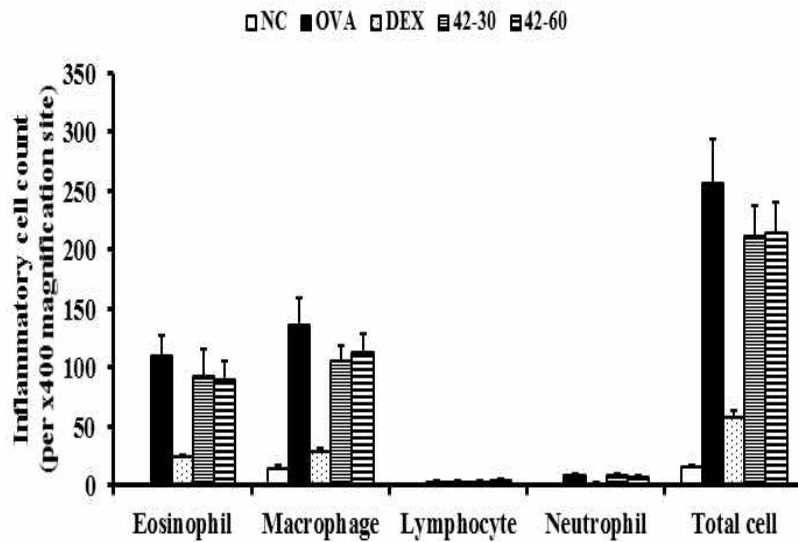


Figure 76. Effects of test material-42 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid.

#### 2-7-4. 염증성 Cytokine 생성 억제 효과

천식에 있어, 염증성 Cytokine인 Interleukin-5 (IL-5) 그리고 Interleukin - 13 (IL-13)은 천식의 발달에 있어 중요한 매개체이다. 이러한 Cytokine은 호산구의 침윤 및 활성을 크게 증가시켜, 천식의 임상증상들을 더욱 악화시킨다. 본 실험에서, 천식유발군(OVA)은 기관지 폐포 세척액 내 Interleukin-5 와 Interleukin - 13의 생성이 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면, Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 염증성 Cytokine의 생성이 크게 감소되었다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(42-30), 시료물질 60 mg/kg(42-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 Interleukin-5에서 1.604, Interleukin - 13에서 0.973으로 확인이 되었다. F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 모두 낮은 값으로 확인이 되었다. 또한 P-value을 확인한 결과 OVA/42-30의

Interleukin-5과 Interleukin - 13 각각 0.270과 0.984( $P>0.05$ ) 값으로 유의성이 관찰되지 않았고, OVA/42-60의 Interleukin-5과 Interleukin - 13 값은 0.492, 0.221( $P>0.05$ )로 유의적 차이가 없었다(Table 22, Figure 77-78).

Table 22. Effects of test material-42 on IL-5 and IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Cytokine (pg/mL)		
	IL-5	IL-13	
NC	6.92±2.10	11.53±2.08	
OVA	29.85±4.44	54.42±7.97	
DEX	17.26±3.82	25.43±5.66	
42-30	25.40±5.04	52.36±15.26	
42-60	26.52±5.00	46.61±7.56	
F-value	1.604	0.973	
F distribution	3.55	3.55	
P-value	OVA/42-30	0.270	0.984
e	OVA/42-60	0.492	0.221

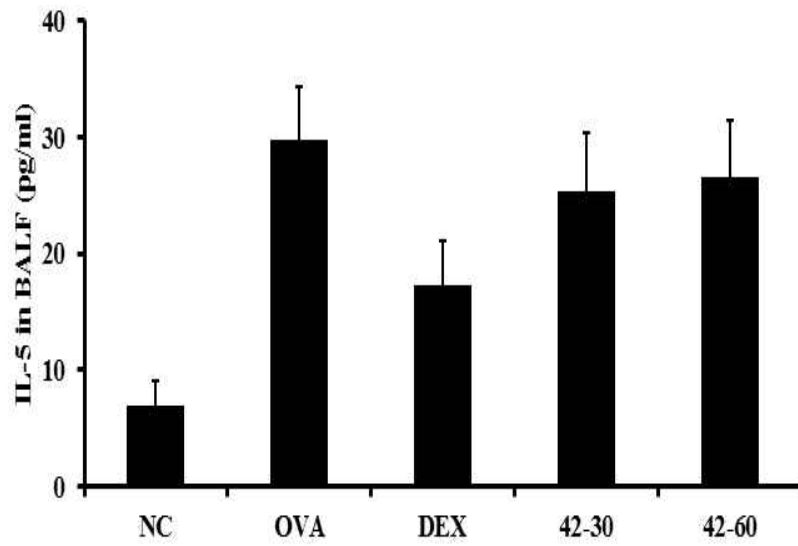


Figure 77. Effects of test material-42 on IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid.

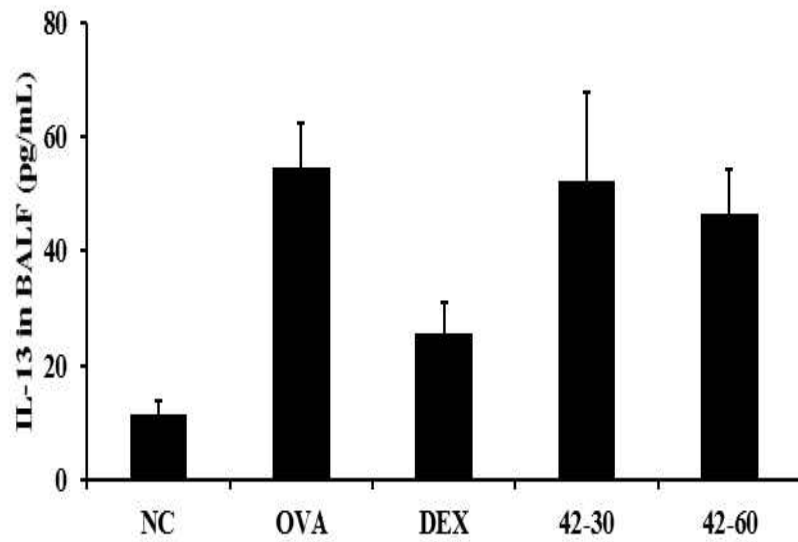


Figure 78. Effects of test material-42 on IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid.

### 2-7-5. Immunoglobulin-E 생성 억제 효과

Immunoglobulin은 천식의 여러 임상증상을 발현시키는데 중요한 매개체로 인식되고 있다. 본 실험에서도, 천식유발군(OVA)에서 Ovalbumin 특이성 Immunoglobulin-E의 생성이 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였으며, 반면 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 Immunoglobulin-E의 생성이 크게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(42-30), 시료물질 60 mg/kg(42-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 0.891로 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 낮은 것을 확인할 수 있었다. P-value을 확인한 결과 OVA/42-30은 0.617( $P>0.05$ )로 유의성이 관찰되지 않았고, OVA/42-60 또한 0.557( $P>0.05$ ) 유의적 차이가 없었다(Table 23, Figure 79).

Table 23. Effects of test material-42 on ovalbumin-specific IgE in serum and result of one-way ANOVA.

Type	OVA-specific IgE (ng/mL)
NC	0
OVA	169.70±35.46
DEX	32.13±8.25
42-30	148.18±36.74
42-60	145.78±38.47
F-value	0.891
F distribution	3.55
P-value	
OVA/42-30	0.617
OVA/42-60	0.557



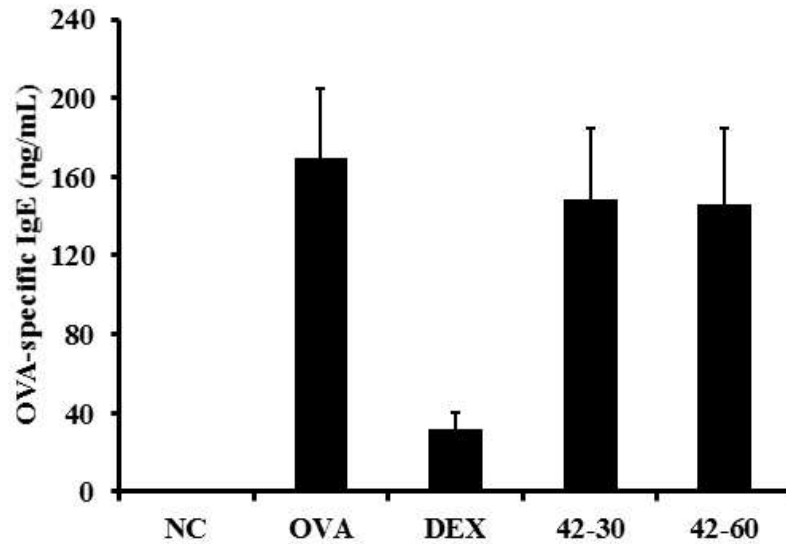


Figure 79. Effects of test material-42 on ovalbumin-specific IgE in serum.

#### 2-7-6. 폐조직 내 염증세포 침윤 억제 효과

Ovalbumin으로 유발된 천식유발군(OVA)은 정상군(NC)에 비해 기관지 주위 염증세포의 침윤이 크게 증가하였다. 반면, 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포의 침윤이 감소되었다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(42-30), 시료물질 60 mg/kg(42-60) 처리 조직의 염증 및 점액생산 지수를 확인하기 위해 이미지분석소프트웨어 (IMT-i software, Vancouver, Canada)를 이용하여 측정된 결과, F-value는 2.583로 F 분포도에서의 기각치 3.89(집단간(3)-1=2, 집단내(15)-3=12) 보다 낮게 나타났다. P-value값을 확인한 결과 OVA/42-30은 0.402( $P>0.05$ )로 유의성이 없었고, OVA/42-60 또한 0.130( $P>0.05$ ) 유의적 차이가 확인되지 않았다. 따라서, 시료물질 42 투여군 중 60 mg/kg 투여군에서 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포 침윤의 미약한 감소가 관찰되었다(Table 24, Figure 80-81).

Table 24. Effects of test material-42 on inflammatory responses in lung tissue and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Responses (%)	
NC	1.84±0.19	
OVA	14.98±1.88	
DEX	4.21±0.91	
42-30	13.12±2.01	
42-60	12.50±1.45	
F-value	2.583	
F-distribution	3.89	
P-value	OVA/42-30	0.402
	OVA/42-60	0.130

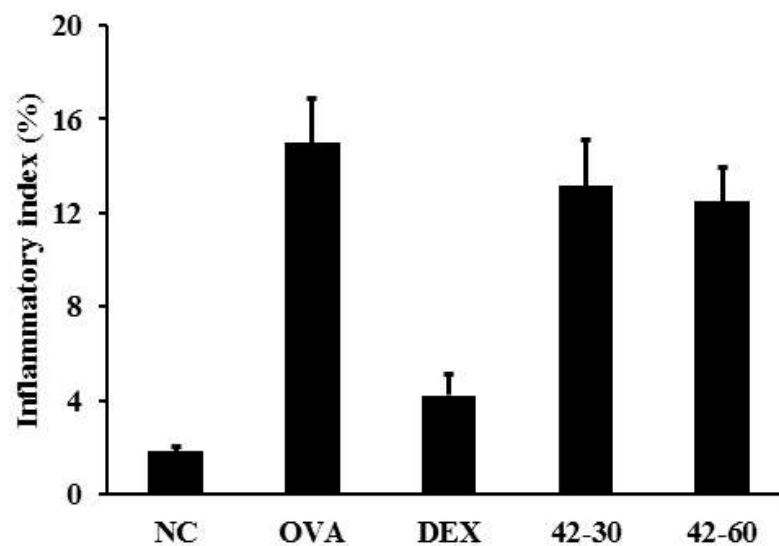
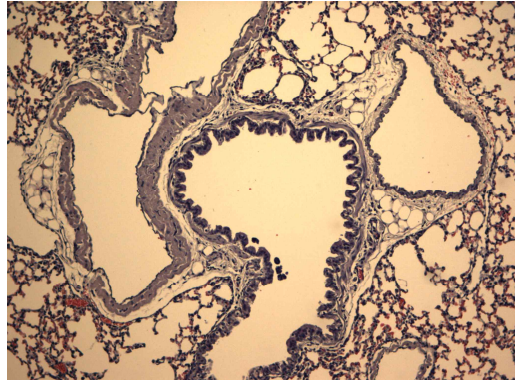
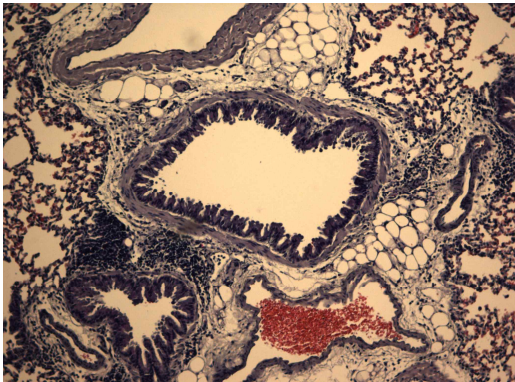


Figure 80. Effects of test material-42 on inflammatory responses in lung tissue.

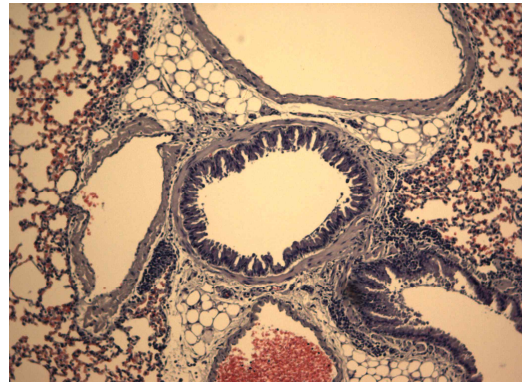
A. NC



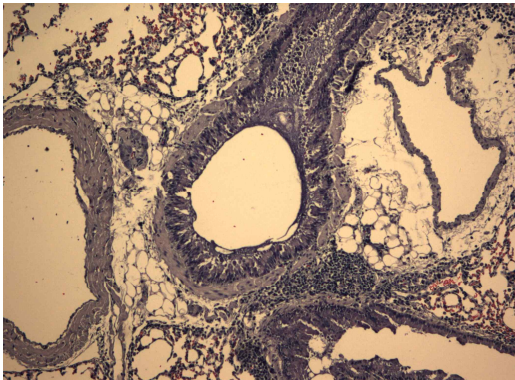
B. OVA



C. DEX



D. 42-30



E. 42-60

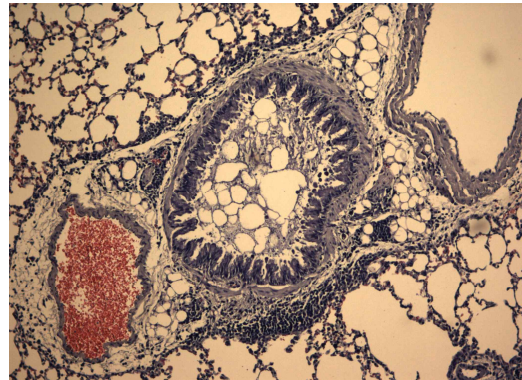


Figure 81. Effects of test material-42 on inflammatory responses in lung tissue.

### 2-7-7. 점액분비 억제 효과

Ovalbumin으로 유발된 천식유발군(OVA)은 기관지 내 점액분비가 정상군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 점액분비가 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(42-30), 시료물질 60 mg/kg(42-60) 처리 조직의 염증 및 점액생산 지수를 확인하기 위해 이미지분석소프트웨어 (IMT-i software, Vancouver, Canada)를 이용하여 측정한 결과, F-value는 0.943로 F 분포도에서의 기각치 3.89(집단간(3)-1=2, 집단내(15)-3=12) 보다 높은 것을 확인할 수 있었다. P-value값을 확인한 결과 OVA/42-30은 0.943( $P>0.05$ )로 유의성이 없었고, OVA/42-60은 0.519( $P>0.05$ ) 유의적 차이가 없었다. 따라서, 시료물질 42 투여군은 천식유발군(OVA)과 차이가 나타나지 않음을 확인하였다(Table 25, Figure 82-83).

Table 25. Effects of test material-42 on mucus production in lung tissue and result of one-way ANOVA.

Type	Mucus production (%)
NC	0.49±0.22
OVA	17.42±2.48
DEX	9.73±1.32
42-30	16.65±2.46
42-60	15.75±1.42
F-value	0.733
F-distribution	3.89
P-value	
OVA/42-30	0.943
OVA/42-60	0.519

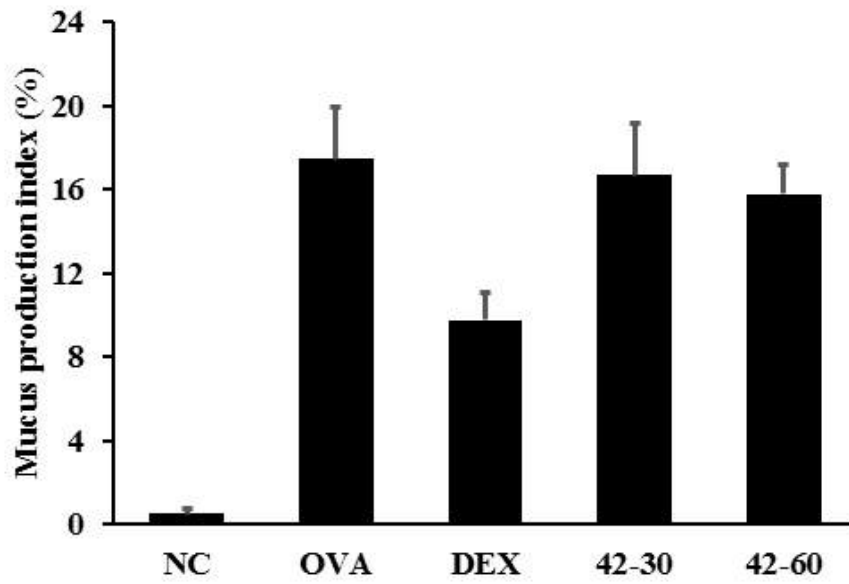
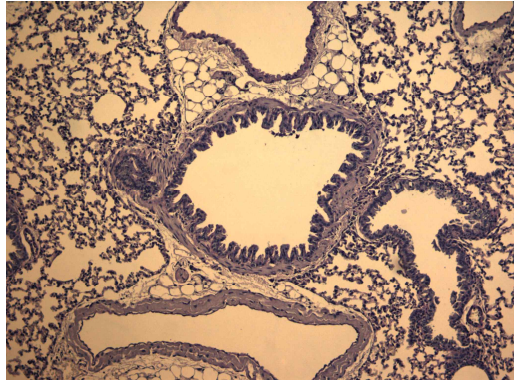


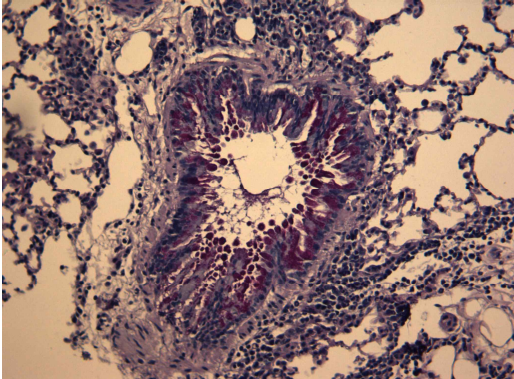
Figure 82. Effects of test material-42 on mucus production in lung tissue.



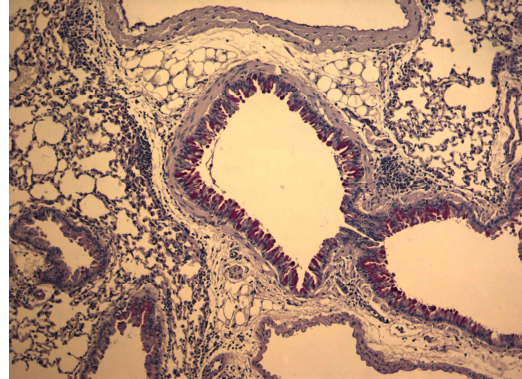
A. NC



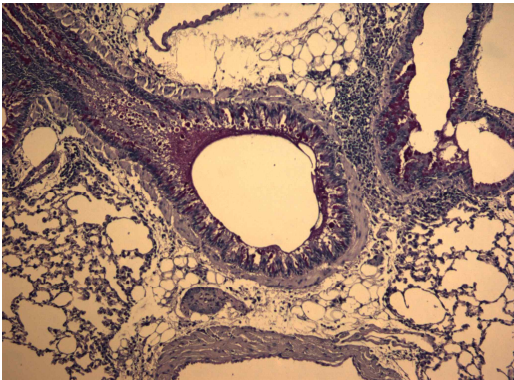
B. OVA



C. DEX



D. 42-30



E. 42-60

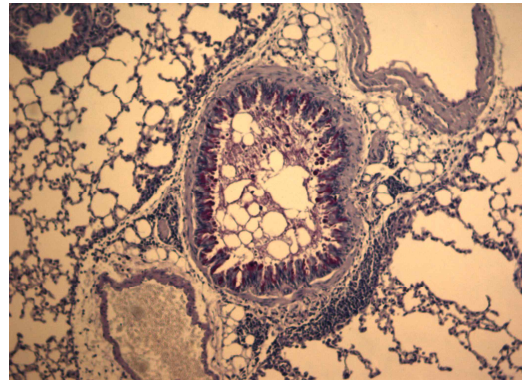


Figure 83. Effects of test material-42 on mucus production in lung tissue.

### 3. 조록나무 천식효능 탐색

#### 3-1. 조록나무 특성

조록나무(*Distylium racemosum* Siebold. Et Zucc.)는 조록나무과(Hamamelidaceae)에 속하는 영명으로는 Isu Tree이다. 상록 활엽 교목으로 한국, 중국, 대만, 일본에 자생한다. 우리나라 분포지는 전라남도, 제주도 이다. 숲속에서 자라며 높이 10~20 m에 달한다. 잎은 길이 3~6(8) cm, 폭 1.5~3 cm로서 어긋나기하며 두껍고 타원형 또는 좁은 거꿀달걀모양이며 첨두 또는 둔두이고 예저이며 가죽질이고 가장자리는 밋밋하며 광택이 나고 양면에 털이 없으며 잎자루 길이는 3~8 mm이고 턱잎이 일찍 떨어진다. 붉나무처럼 앞에 충영이 잘 생긴다. 꽃은 잡성주로서 꽃부리없이 붉은 꽃받침으로만 구성된 작은 꽃이 4~5월경에 핀다. 총상꽃차례는 액생하고 별모양의 털이 있으며 길이 8 cm정도이고 꽃받침은 붉은색으로 5~6개로 갈라지며 피침형이고 겉에 갈색의 성모가 있다. 수술은 6~8개이며 꽃밥은 적색이고 암술은 수꽃에서는 퇴화되며 양성꽃에 1개 있고 씨방은 2실이며 겉에 성모가 있고 암술대는 1개로서 2개로 갈라진다. 열매는 삭과는 길이 1~1.5 cm이고 목질이며 겉에 밀모가 있고 9~10월에 익으며 2개로 갈라져서 종자가 나온다. 줄기는 교목이나 대개 관목상으로 자라며 수형이 타원형이다. 바람에 민감하여 주풍방향의 반대편으로 수관이 비뚤어져 모양을 이루며 나무껍질은 적갈색이고 가지에 성모가 있으나 곧 없어진다.<sup>57-58)</sup>

조록나무는 정원수, 공원수, 기구재, 약기재, 조각재로 쓰이며, 민간요법으로는 입은 해독, 소종, 기어, 이습의 효능이 있으며, 주로 나력에 치료에 사용한다고 알려져 있다.<sup>72)</sup> 분리 보고 되어진 화합물로는 Abscisic acid, 6''-O-galloylsalidroside,<sup>73)</sup> 2,7-Dihydroxy-1,6-dimethoxy-9-methyldibenzofuran, 3,7-Dihydroxy-6-methoxy-2,7-dimethyldibenzofuran<sup>74)</sup> 이 있다.



Figure 84. The specimen of *Distylium racemosum*  
Siebold. Et Zucc.

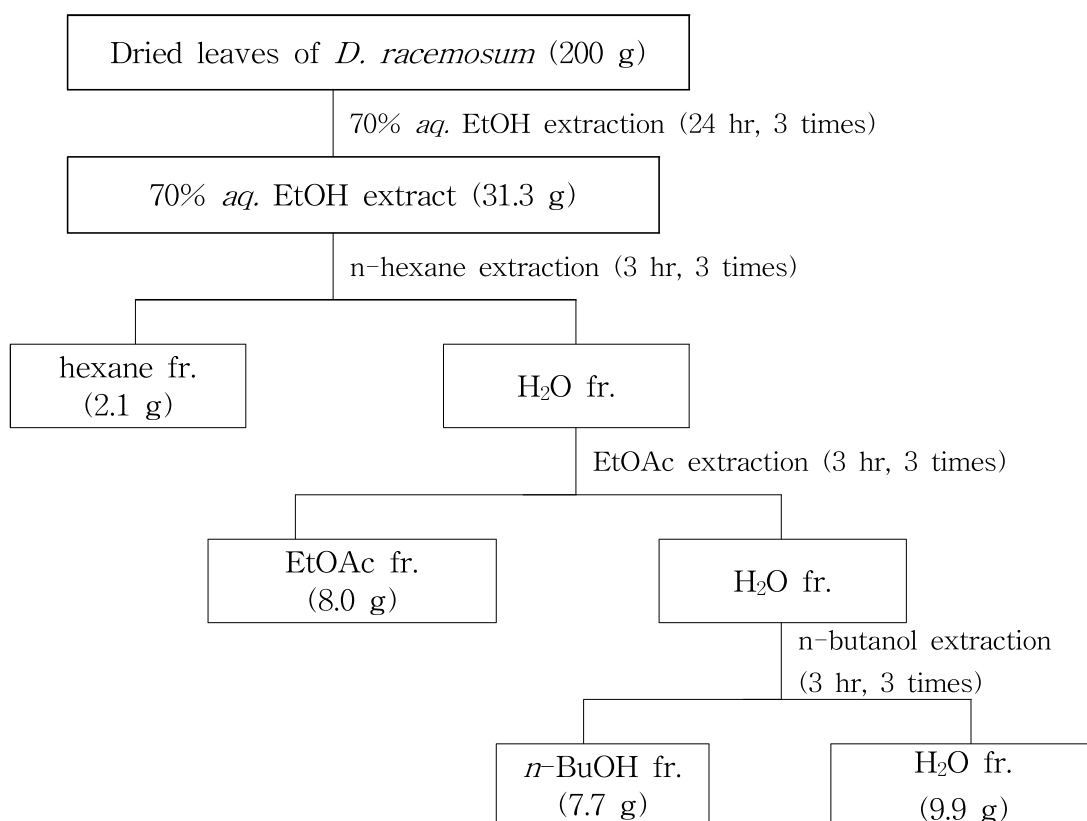


Figure 85. Photograph of the leave of *Distylium racemosum*  
Siebold. Et Zucc.



### 3-2. 조록나무 잎 추출

조록나무 잎(71-1) 건조 시료 200 g을 70% ethyl alcohol에 추출하여 추출물 31.3 g(yield : 15.7%)을 얻었고, 추출물 28 g을 정제수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 활용하여 *n*-hexane fraction (2.1 g), ethyl acetate fraction (8.0 g), *n*-butanol fraction (7.7 g) and H<sub>2</sub>O fraction (9.9 g)을 얻어 연구에 활용하였다 (Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of extraction and various fraction from dried leaves of *D. racemosum*.

### 3-3. 조록나무 잎 추출 성분 활성 확인

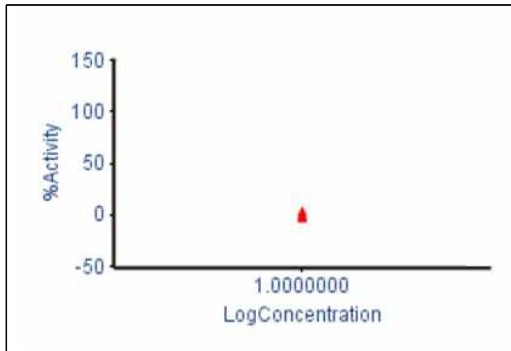
70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 PDE4 enzyme 활성을 측정한 결과를 Table 8에 나타내었다. 70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 모든 fraction에서 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-butanol fraction < ethyl acetate fraction. 그들 중, ethyl acetate fraction (IC<sub>50</sub>: 2.4 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다.

70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 GSNO reductase 활성을 측정한 결과를 Table 8에 나타내었다. GSNO reductase 활성 또한 70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 모든 fraction에서 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-butanol fraction < ethyl acetate fraction. 그들 중, ethyl acetate fraction (IC<sub>50</sub>: 6.6 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다(Table 26, Figure 86-87).

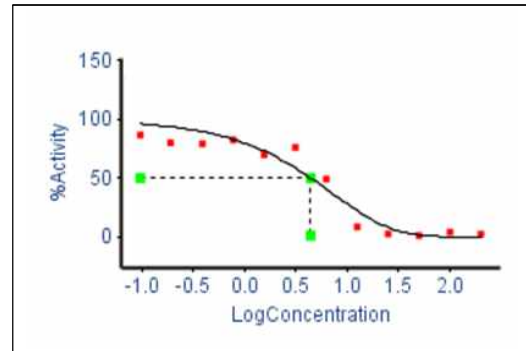
Table 26. IC<sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% *aq.* EtOH extract and its solvent fractions of *D. racemosum* (leaves).

Samples	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	PDE4	GSNO
71 EtOH extract	4.4	17.4
71-1 <i>n</i> -Hex fraction	108.9	103.0
71-1 EtOAc fraction	2.4	6.6
71-1 <i>n</i> -BuOH fraction	4.9	14.1
71-1 H <sub>2</sub> O fraction	13.7	27.1

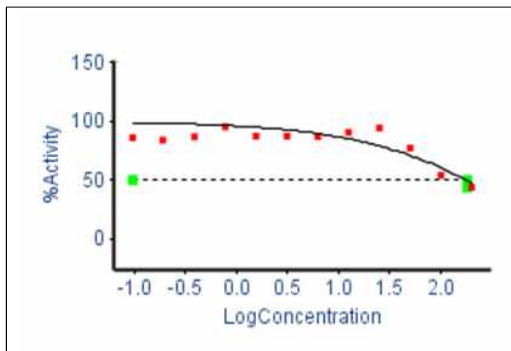
(A) Rolipram



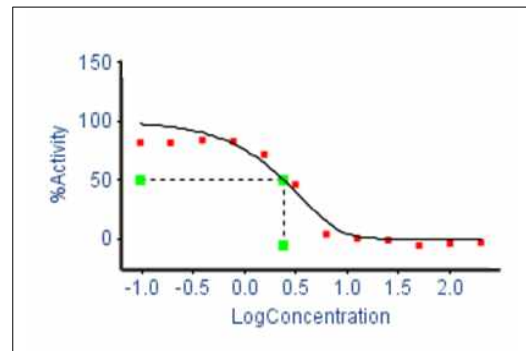
(B) 71 EtOH extract



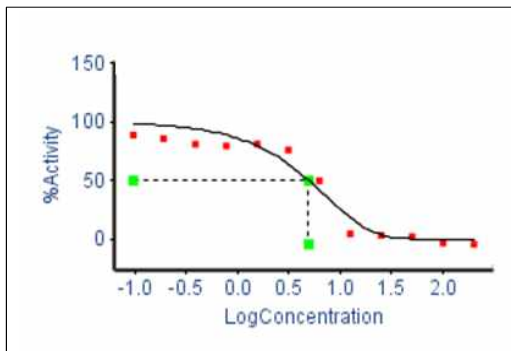
(C) 71-1 *n*-Hex fraction



(D) 71-1 EtOAc fraction



(E) 71-1 *n*-BuOH fraction



(F) 71-1 H<sub>2</sub>O fraction

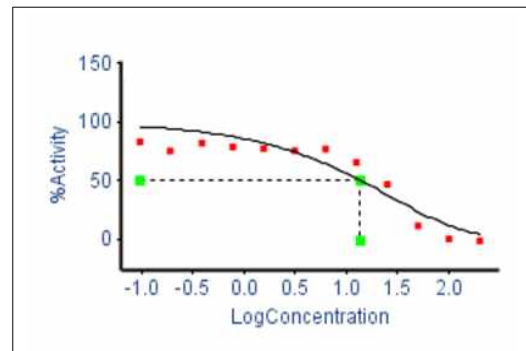
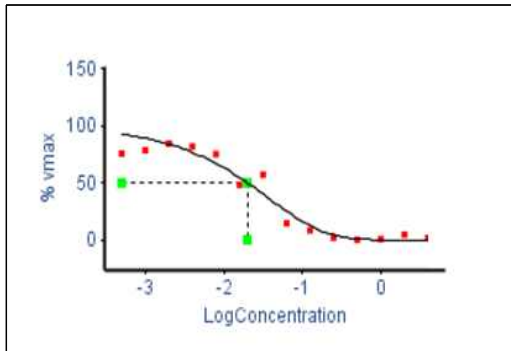
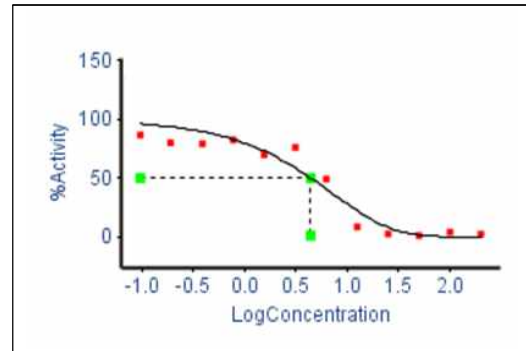


Figure 86. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of *C. macrophylla*.

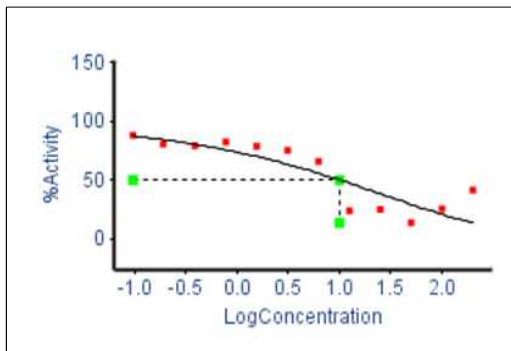
(A) N6022



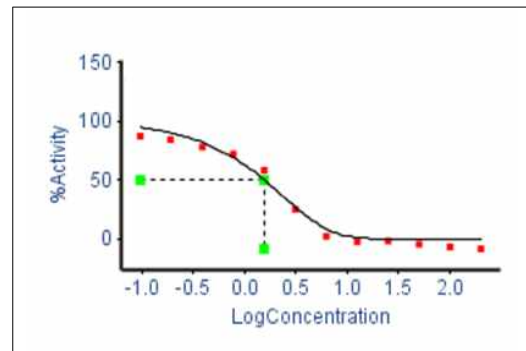
(B) 71 EtOH extract



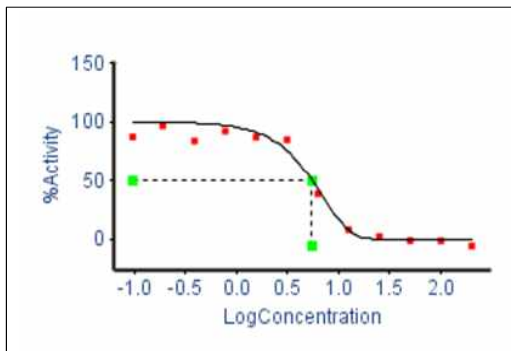
(C) 71-1 *n*-Hex fraction



(D) 71-1 EtOAc fraction



(E) 71-1 *n*-BuOH fraction



(F) 71-1 H<sub>2</sub>O fraction

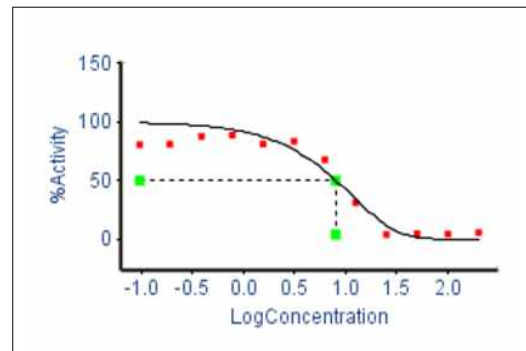
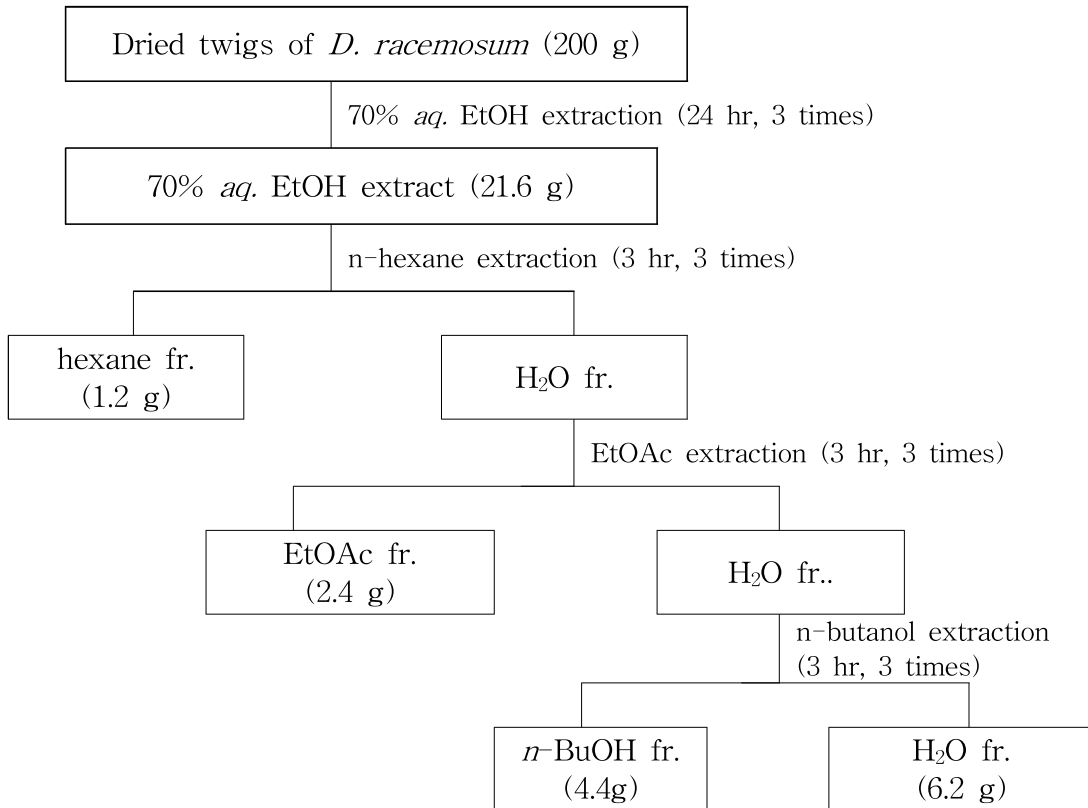


Figure 87. Results of GSNOR reductase inhibition assay for extraction from leaves of *D. racemosum*.

### 3-4. 조록나무 가지 추출

조록나무 가지(71-2) 건조 시료 200 g을 70% ethyl alcohol에 추출하여 추출물 21.6 g(yield : 10.8%)을 얻었고, 추출물 15 g을 정제수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 활용하여 *n*-hexane fraction (1.2 g), ethyl acetate fraction (2.4 g), *n*-butanol fraction (4.4 g) and H<sub>2</sub>O fraction (6.2 g)을 얻어 연구에 활용하였다 (Scheme 4).



Scheme 4. Procedure of extraction and various fraction from dried branches of *C. macrophylla*.

### 3-5. 조록나무 가지 추출 성분 활성 확인

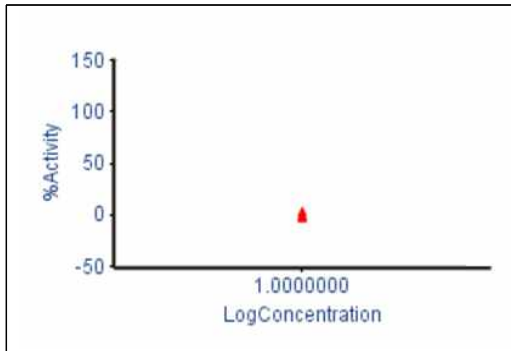
70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 PDE4 enzyme 활성을 측정한 결과를 Table 9d에 나타내었다. 70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 모든 fraction에서 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-butanol fraction < ethyl acetate fraction. 그들 중, ethyl acetate fraction (IC<sub>50</sub>: 1.6 µg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다.

70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 GSNO reductase 활성을 측정한 결과를 Table 9에 나타내었다. GSNO reductase 활성 또한 70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 모든 fraction에서 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-butanol fraction < ethyl acetate fraction. 그들 중, ethyl acetate fraction(IC<sub>50</sub>: 6.0. µg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다(Table 27, Figure 88-89).

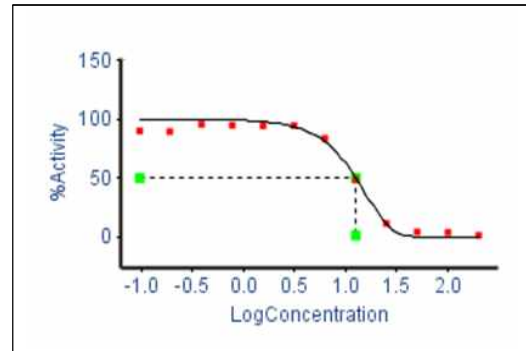
Table 27. IC<sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% *aq.* EtOH extract and its solvent fractions of *D. racemosum* (Branches).

Samples	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	PDE4	GSNO
72 EtOH extract	4.4	17.4
71-2 <i>n</i> -Hex fraction	10.0	31.9
71-2 EtOAc fraction	1.6	6.0
71-2 <i>n</i> -BuOH fraction	5.5	9.6
71-2 H <sub>2</sub> O fraction	8.0	36.7

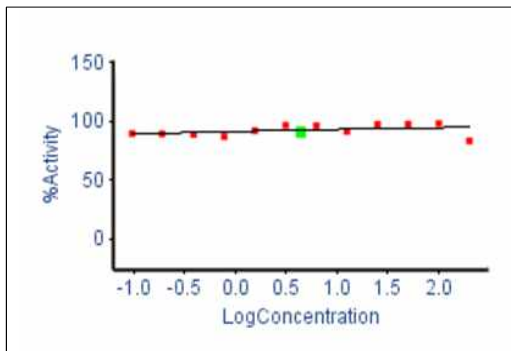
(A) Rolipram



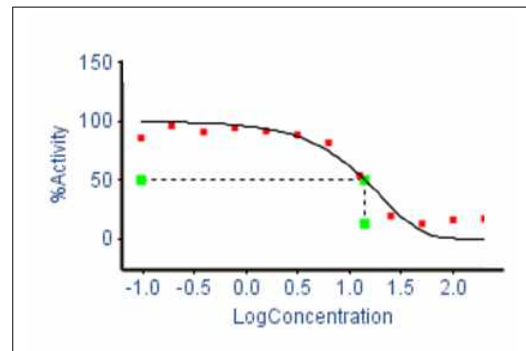
(B) 71 EtOH extract



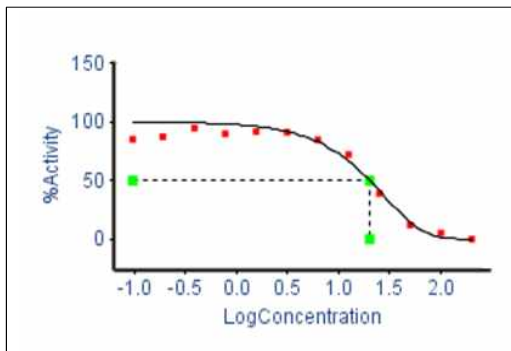
(C) 71-2 *n*-Hex fraction



(D) 71-2 EtOAc fraction



(E) 71-2 *n*-BuOH fraction



(F) 71-2 H<sub>2</sub>O fraction

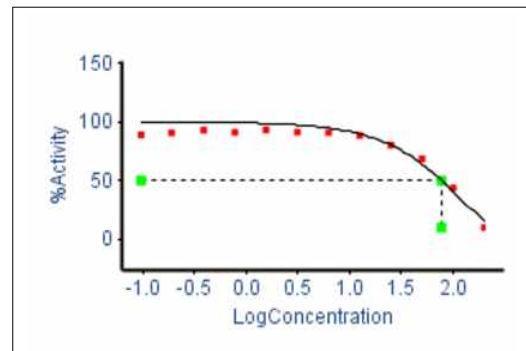
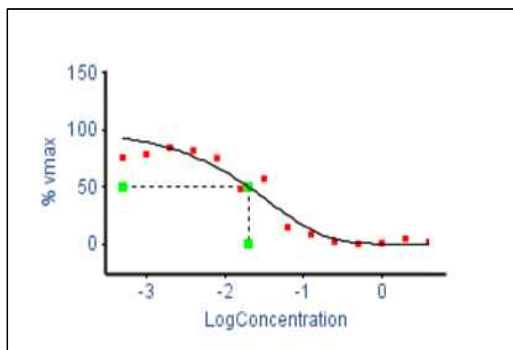
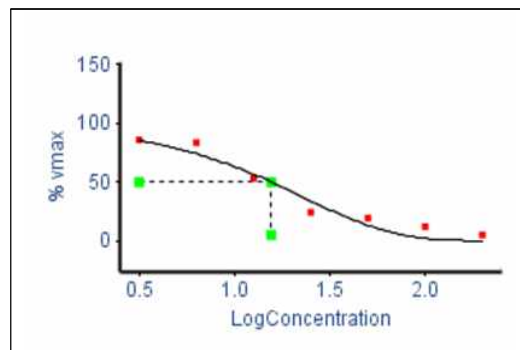


Figure 88. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of *D. racemosum*.

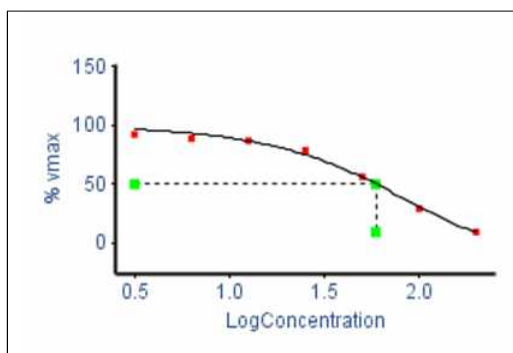
(A) N6022



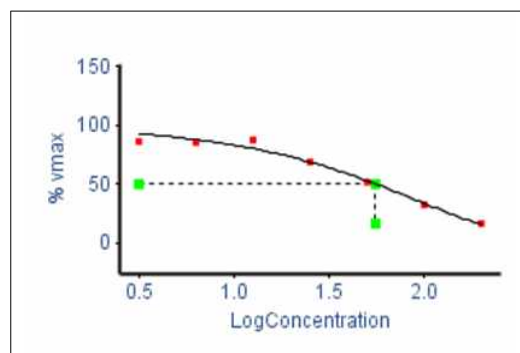
(B) 71 EtOH extract



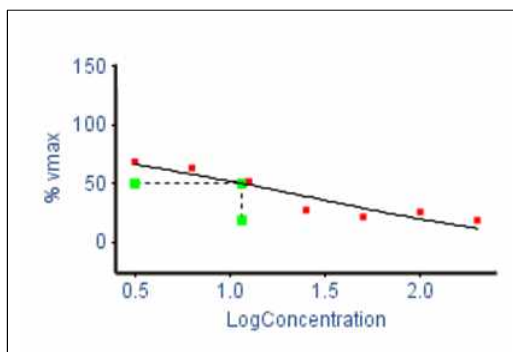
(C) 71-2 *n*-Hex fraction



(D) 71-2 EtOAc fraction



(E) 71-2 *n*-BuOH fraction



(F) 71-2 H<sub>2</sub>O fraction

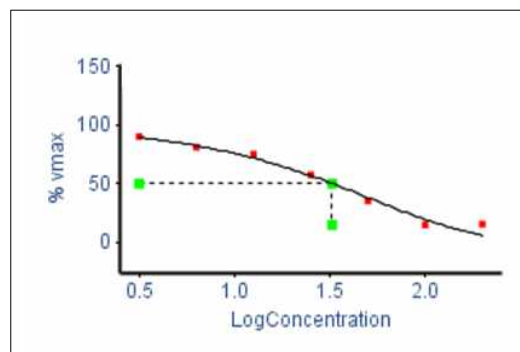


Figure 89. Results of GSNOR reductase inhibition assay for extraction from branches of *D. racemosum*.



### 3-6. 조록나무 추출 성분 구조 분석

#### 3-6-1. 화합물 구조 동정

Ethyl acetate fraction이 다른 추출물이나 조추출물에 비해 강한 억제성 활성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 이는 ethyl acetate fraction이 활성 구성물을 분리해 내기에 좋은 재료임을 의미했다. Ethyl acetate fraction의 구성 성분을 알아보기 위해 액체크로마토그래피-질량분석기(UHPLC-MS/MS)를 이용하여 탐색을 시행하였다. 분석 후 스펙트럼 데이터 검색을 시행해 부탄올 분획물의 각 성분的高해상도 질량 스펙트럼과 MS/MS 조각이온을 온라인으로 이용가능한 천연물질 데이터베이스에 명시된 화합물과 연관지었다. 데이터베이스 검색 결과 catechin, Chlorogenic acid, 4-*O*-Caffeoylquinic acid, Ethyl gallate, Myricitrin, Epicatechin gallate, Hyperoside, Nicotiflorin, Astragalin, Quercitrin, Kaempferin, Quercetin, Kaempferol 13개의 연관성 있는 성분들을 발견했다(Table 28, Figure 90-94).

Table 28. The 13 compounds identified in *D. racemosum*.

Entry	R <sub>t</sub> (min)	m/z ([M+H] <sup>+</sup> )	Calculated Formula	Δ ppm	MS/MS Fragment ion	Identification
a	4.11	291.0861	C15 H15 O6	-0.909	123,139,165	Catechin
b	4.29	355.1021	C16 H19 O9	-0.644	163	Chlorogenic acid
c	4.55	355.1022	C16 H19 O9	-0.362	163	4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid
d	6.39	199.0601	C9 H11 O5	-0.201	127,171	Ethyl gallate
e	6.63	465.1022	C21 H21 O12	-1.145	319	Myricitrin
f	6.69	443.0968	C22 H19 O10	-1.158	273	Epicatechin gallate
g	6.82	465.1022	C21 H21 O12	-1.145	303	Hyperoside
h	7.27	595.1652	C27 H30 O15	-1.002	287,449	Nicotiflorin
i	7.51	449.1073	C21 H21 O11	-1.153	287	Astragalin
j	7.61	449.1075	C21 H21 O11	-0.708	303	Quercitrin
k	8.4	433.1125	C21 H21 O10	-0.885	287	Kaempferin
l	9.44	303.0498	C15 H11 O7	-0.525	165,229,257, 285	Quercetin
m	10.8	287.0547	C15 H11 O6	-1.061	121,153,165, 213,241	Kaempferol

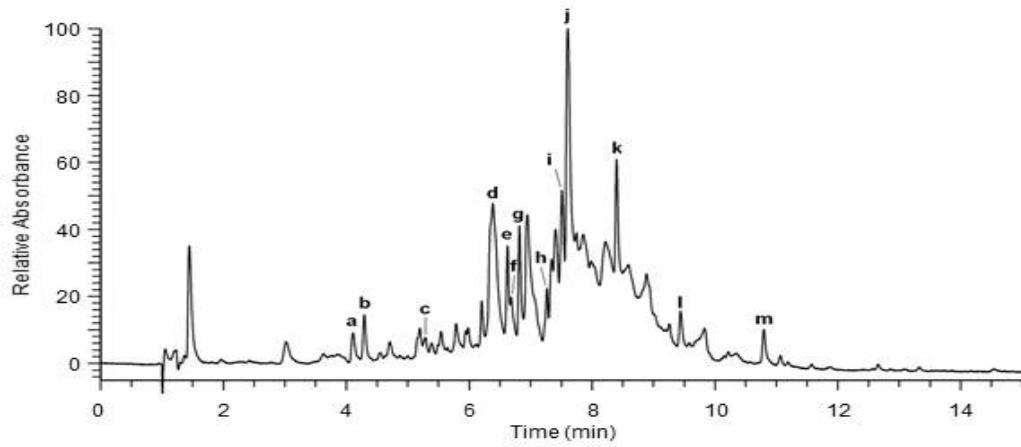


Figure 90. The photodiode array chromatogram of *D. racemosum* ethyl acetate fraction and five flavonoid compounds is shown (UHPLC-HRMS).

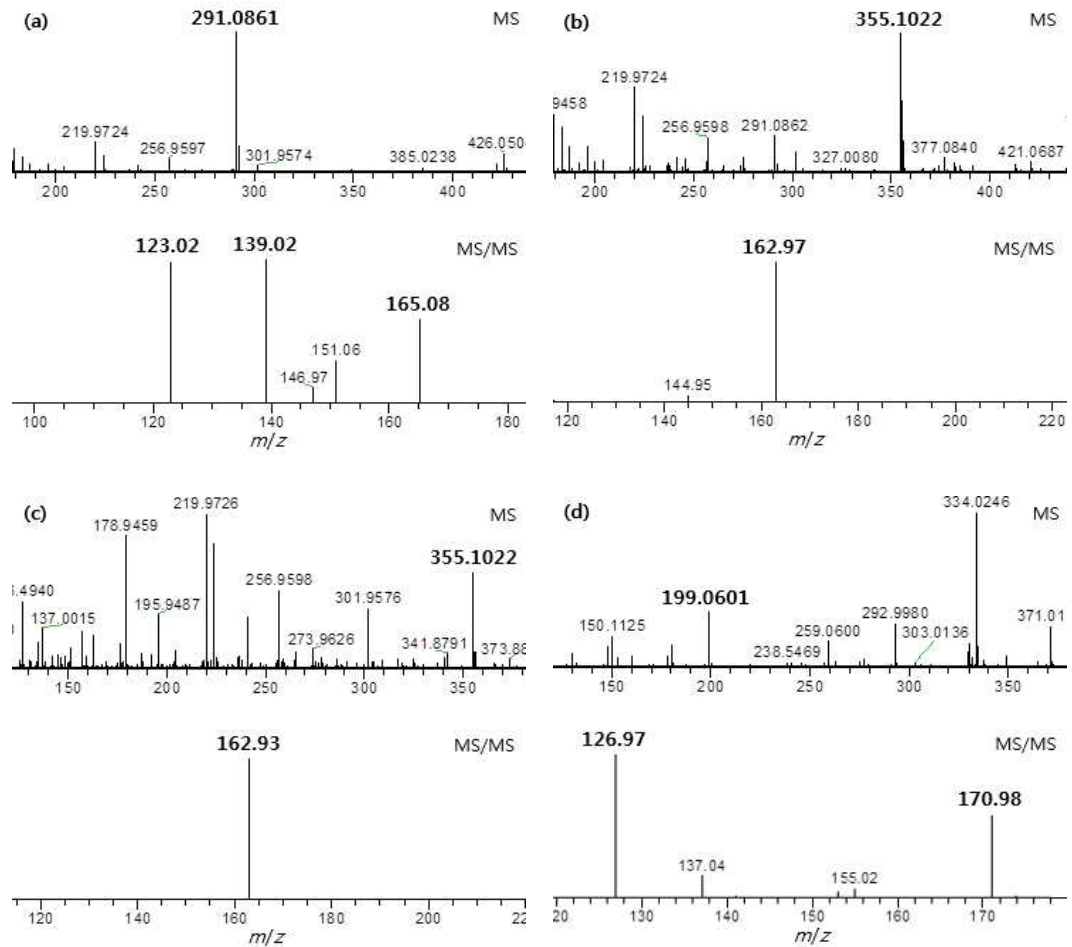


Figure 91. The high-resolution mass spectra of *D. racemosum* ethyl acetate fraction (a~d).

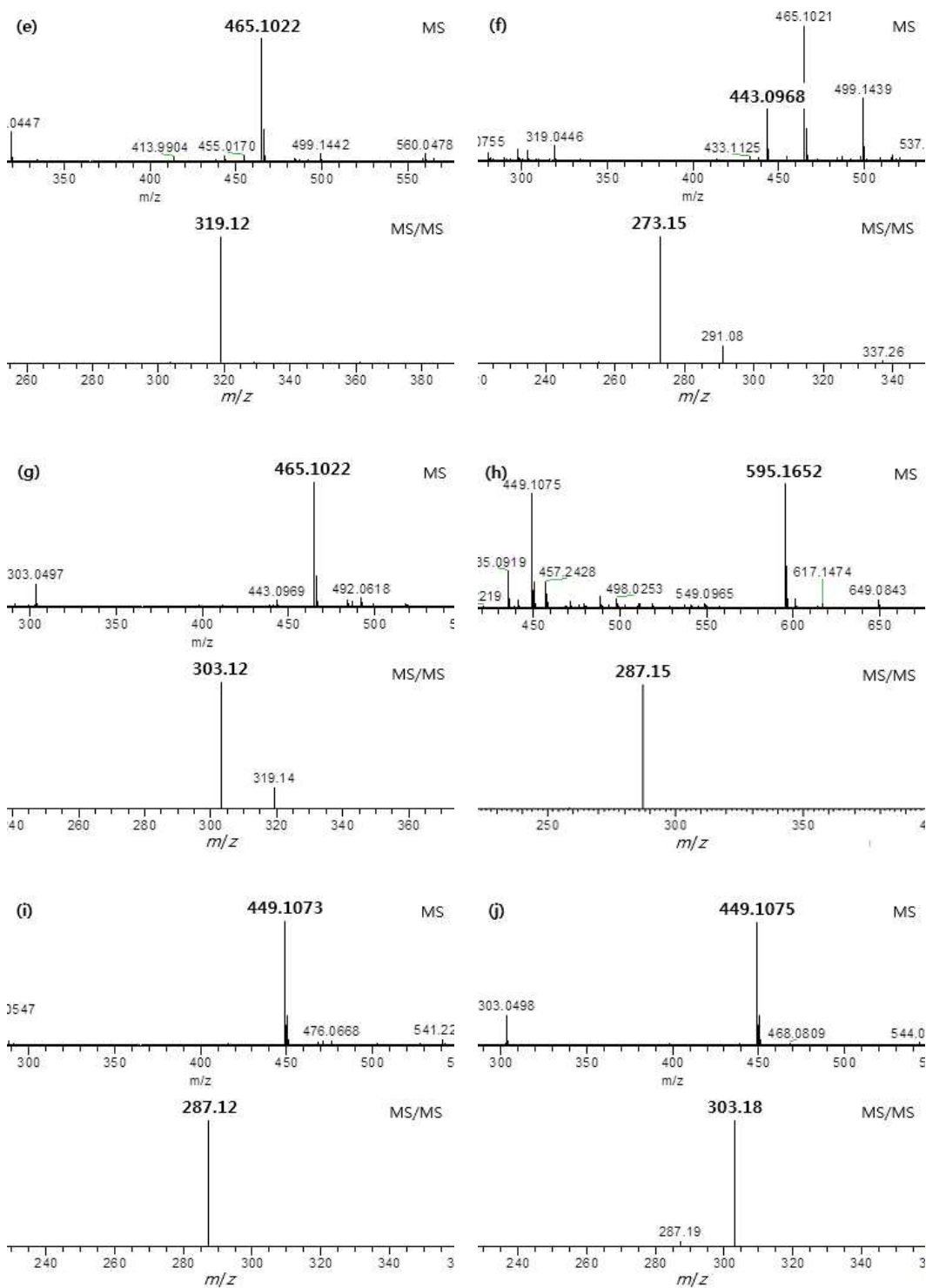


Figure 92. The high-resolution mass spectra of *D. racemosum* ethyl acetate fraction (e~j).

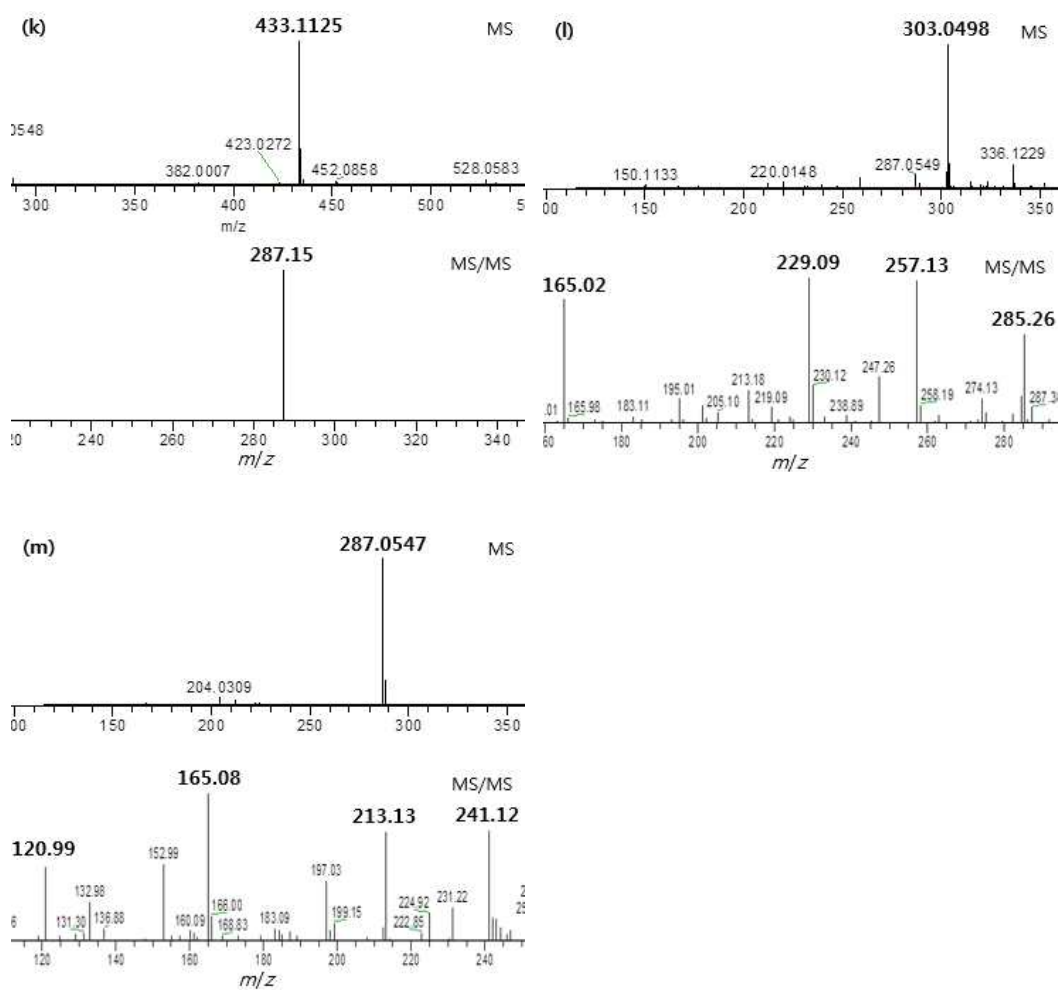


Figure 93. The high-resolution mass spectra of *D. racemosum* ethyl acetate fraction (k~m).

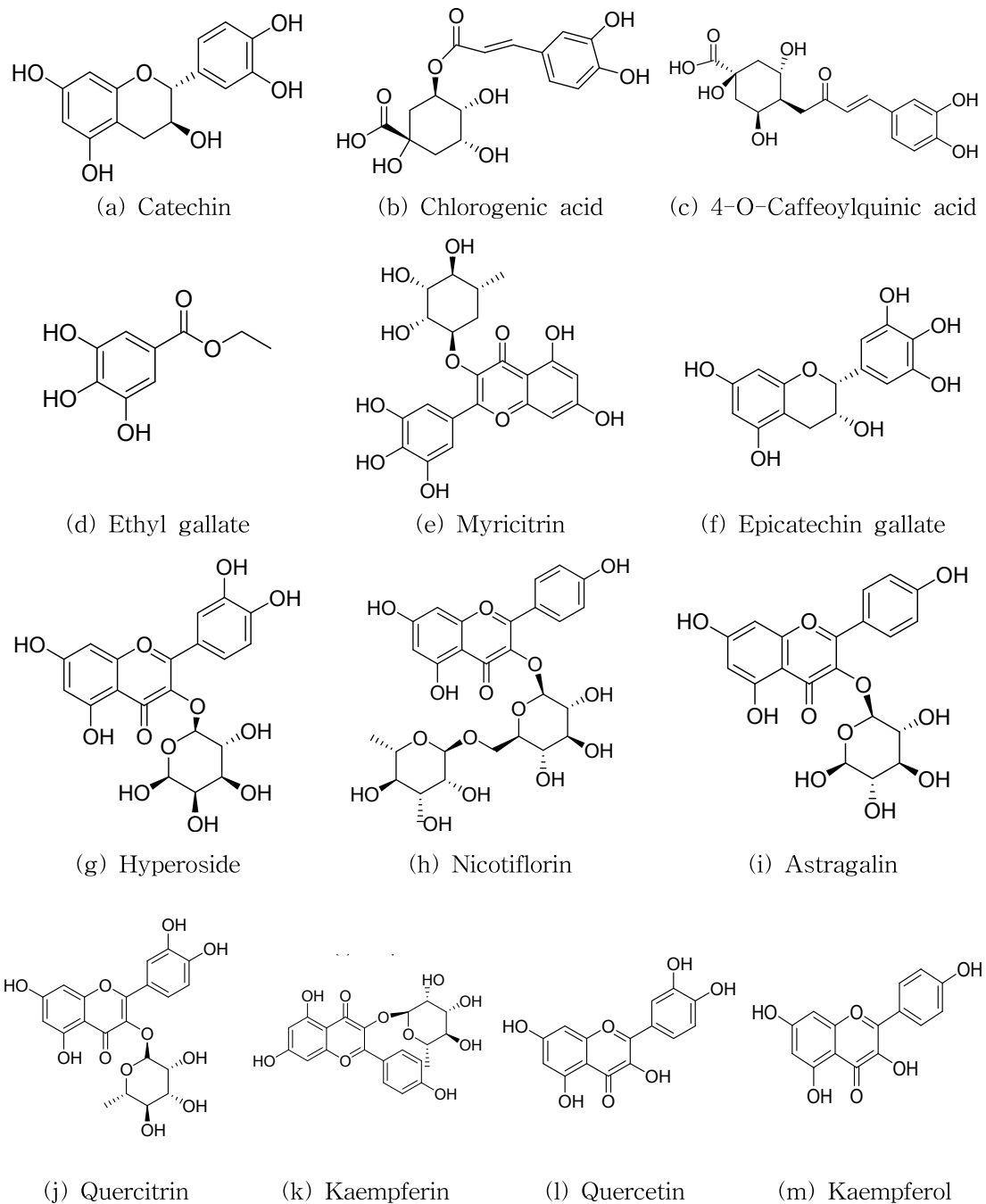


Figure 94. Structures of the identified compound from *D. racemosum* ethyl acetate fraction is shown (UHPLC-HRMS).

### 3-6-2. 추출 성분 분석

#### 3-6-2-1. 조록나무 70% ethyl alcohol 추출물(잎, 가지)

조록나무 70% ethyl alcohol 추출물을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석을 통해 진행하였다. 그 결과 Hyperoside, Rutin, Nicotiflorin, Quercitrin, Quercetin, Kaempferl 등 총 6종이 조록나무 잎 70% ethyl alcohol 추출물의 성분으로 확인할 수 있었다. 조록나무 70% ethyl alcohol 추출물과 표준물질 Nicotiflorin을 비교해보면 primary Mass Spectrum (MS1)에서 total ion chromatogram에서 조록나무 70% ethyl alcohol 추출물의 머무름 시간은 12.73 min (Nicotiflorin: 12.66 min)이었으며, ESI-MS spectrum in negative ionization mode에서  $m/z$ 값은 592.97 (Nicotiflorin:  $m/z$  592.81)으로 나타났다. Secondary mass spectrum (MS2)에서는 total ion chromatogram에서 조록나무 70% ethyl alcohol 추출물의 머무름 시간은 12.76 min (Nicotiflorin: 12.70 min)이었으며, ESI-MS/MS spectrum of  $m/z$  593 in negative ionization mode에서 fragment ion  $m/z$ 값은 284.91 (Nicotiflorin:  $m/z$  284.89)으로 나타나 조록나무 70% ethyl alcohol 추출물에 Nicotiflorin이 포함되어 있음을 확인하였다. 곰의말채나무 추출물 및 fraction에서 확인되지 않았던 성분이며, 나머지 성분들은 곰의말채나무 추출물 및 fraction에서도 확인되었다. 조록나무 추출물 및 ethyl acetate fraction에서 분리를 통해 Quercitrin이 있음이 보고되어 지고 있다(Table 29, Figure 95-101).<sup>75)</sup>

Table 29. Identification of standards from of *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
11.45	462.82	300.80	Hyperoside
11.14	608.92	300.85	Rutin
12.73	592.97	284.91	Nicotiflorin
13.25	446.84	300.80	Quercitrin
17.18	300.83	178.91, 150.81	Quercetin
20.17	284.97	256.99, 242.88	Kaempferol

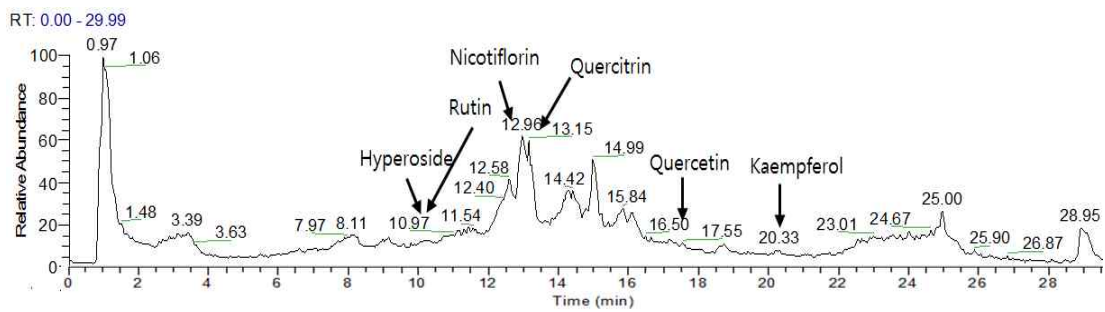


Figure 95. Total ion chromatogram (MS1) of *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract.

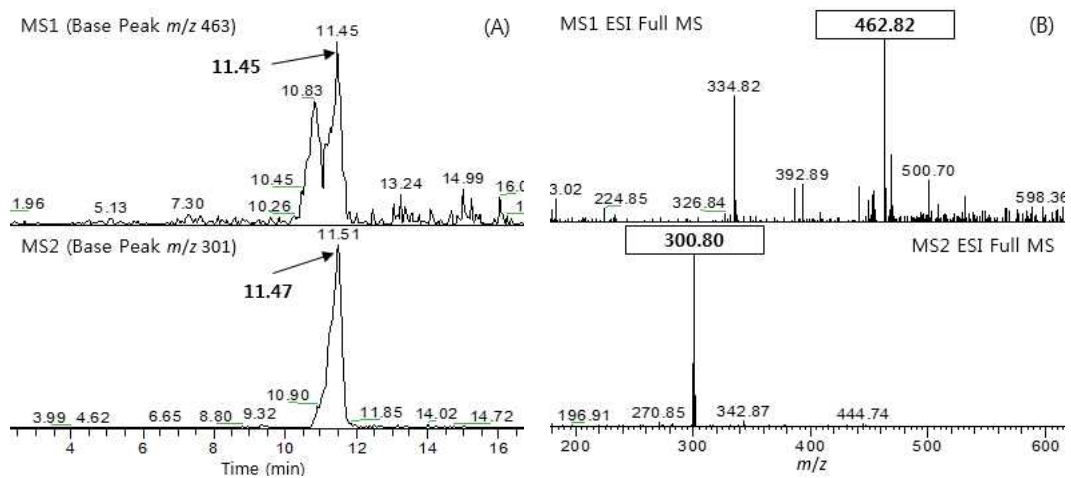


Figure 96. Identification of Hyperoside from *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

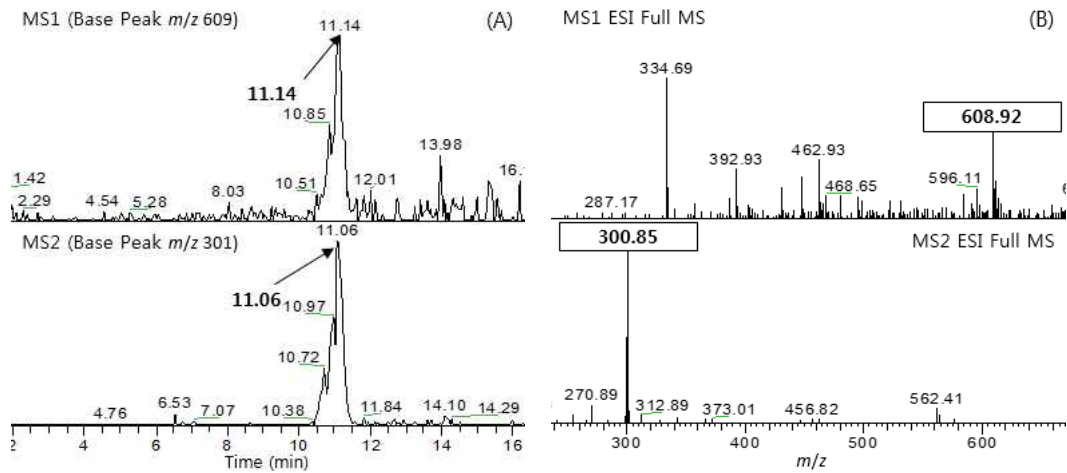


Figure 97. Identification of Rutin from *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

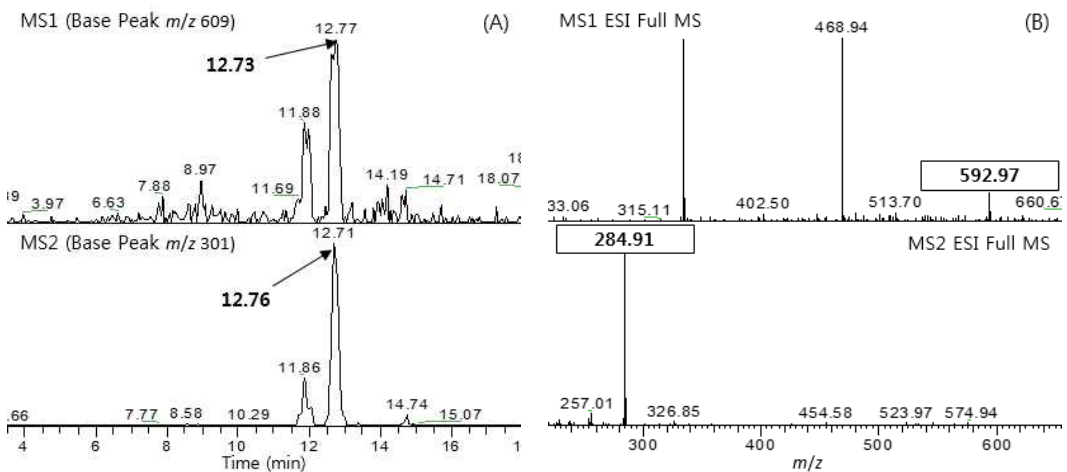


Figure 98. Identification of Nicotiflorin from *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.



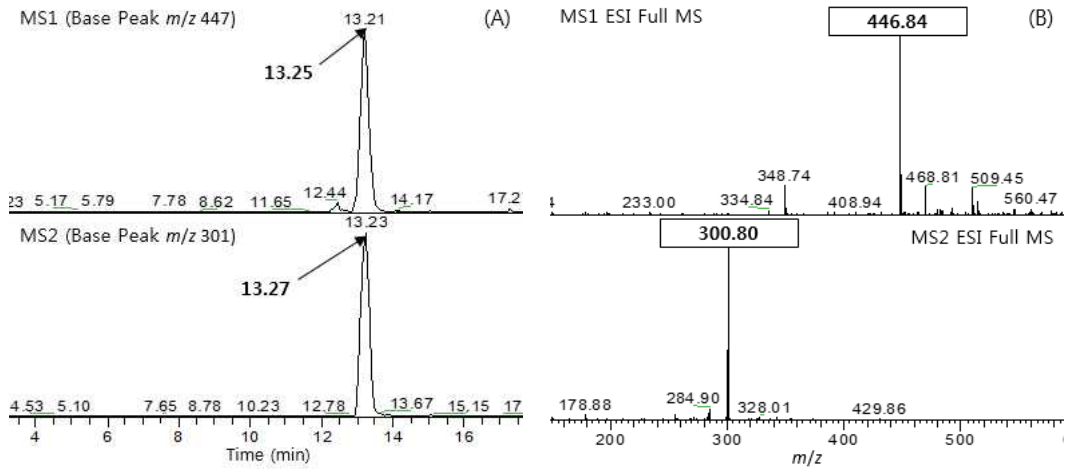


Figure 99. Identification of Quercitrin from *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

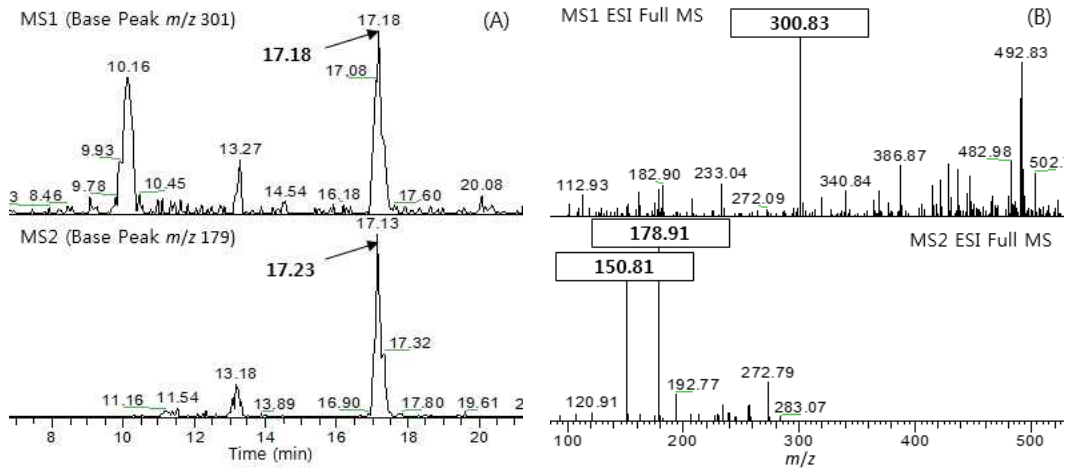


Figure 100. Identification of Quercetin from *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

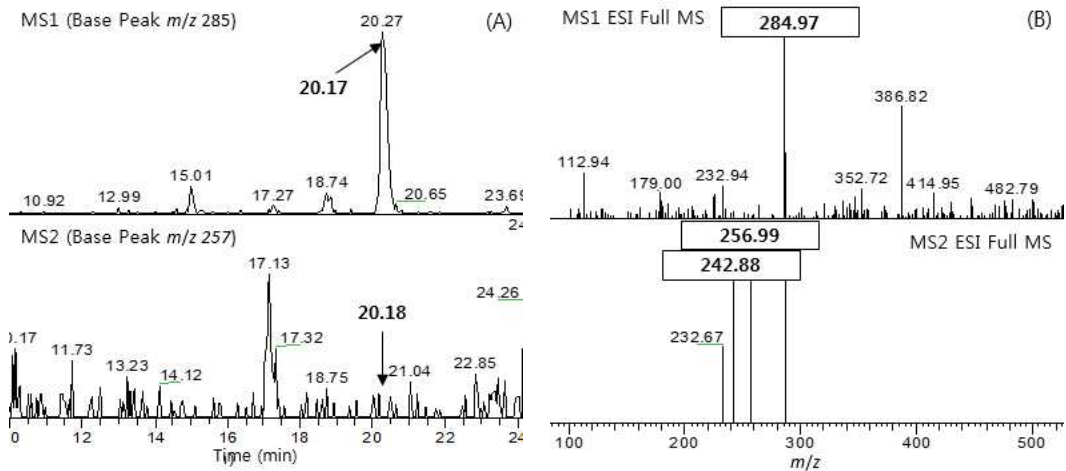


Figure 101. Identification of Kaempferol from *D. racemosum* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

### 3-6-2-2. 조록나무 잎 ethyl acetate fraction

조록나무 잎 ethyl acetate fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석 결과 총 6종 성분이 확인되었으며, Catechin을 제외하고 Hyperoside, Nicotiflorin, Quercitrin, Quercetin, Kaempferol은 조록나무 70% ethyl alcohol 추출물과 동일하게 나타났다(Table 30, Figure 102-108).

Table 30. Identification of standards from of *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
3.41	288.91	244.83, 204.86	Catechin
11.47	462.81	300.80	Hyperoside
12.73	592.93	284.91	Nicotiflorin
13.19	446.84	300.83	Quercitrin
17.19	300.87	178.88, 150.92	Quercetin
20.23	284.84	257.00, 242.77	Kaempferol

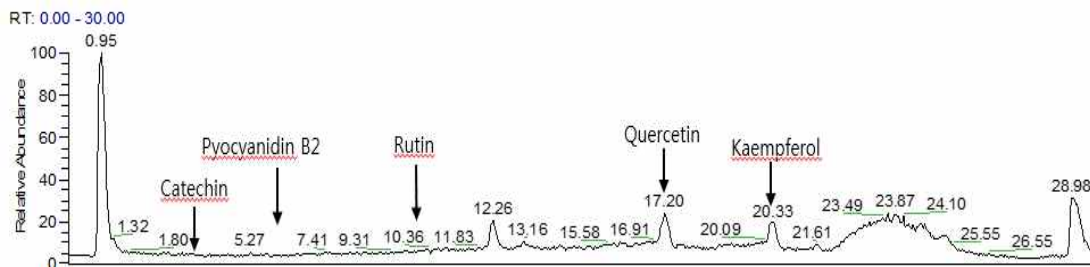


Figure 102. Total ion chromatogram (MS1) of *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction.

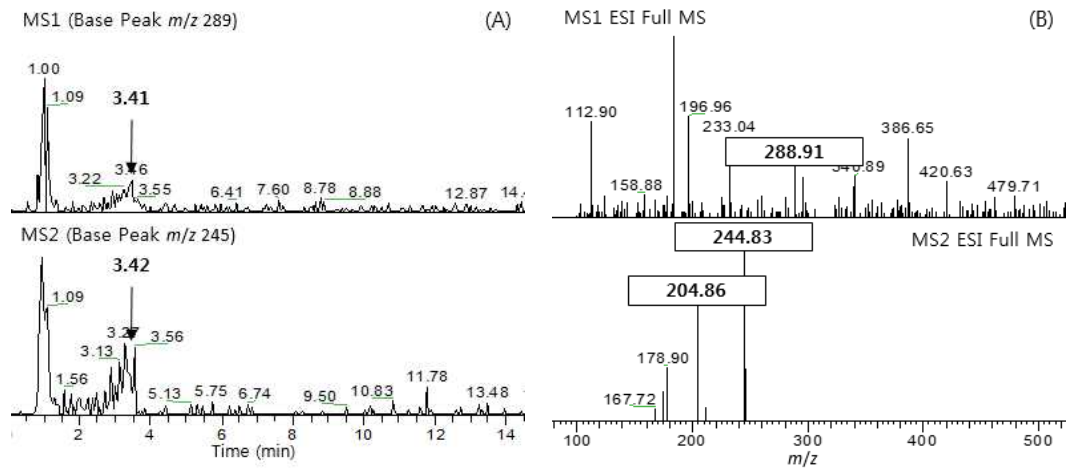


Figure 103. Identification of Catechin from *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

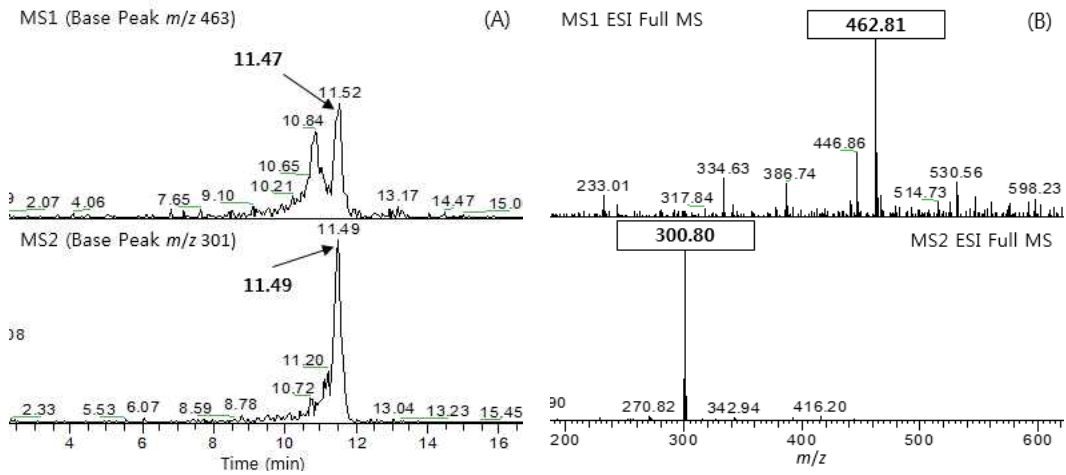


Figure 104. Identification of Hyperoside from *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

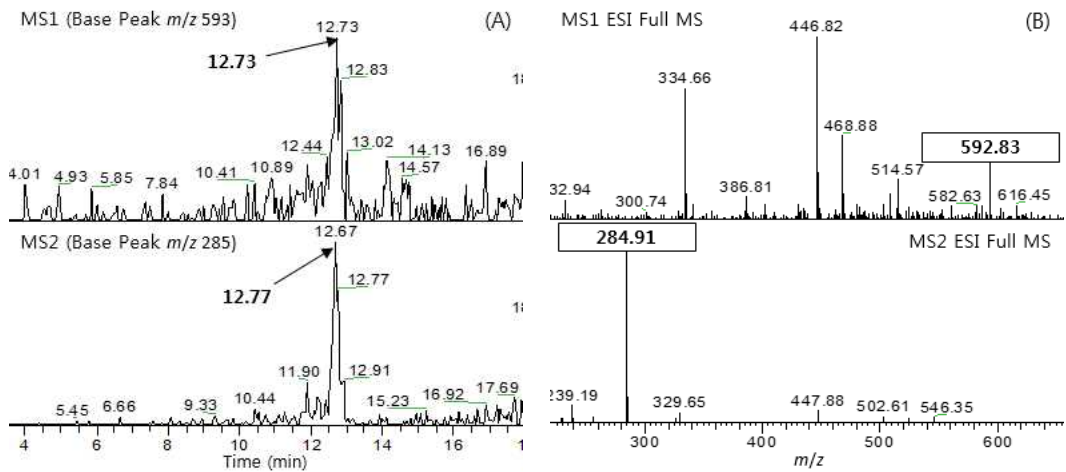


Figure 105. Identification of Nicotiflorin from *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

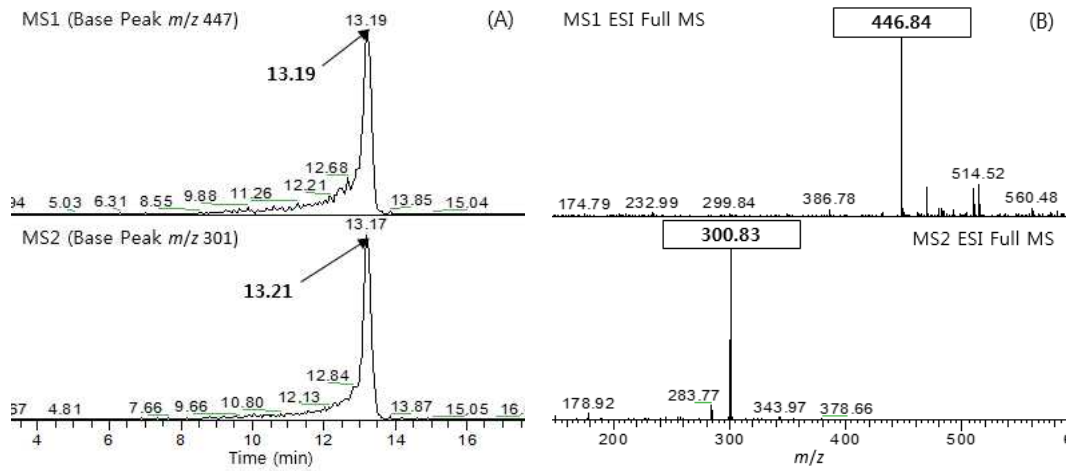


Figure 106. Identification of Quercitrin from *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

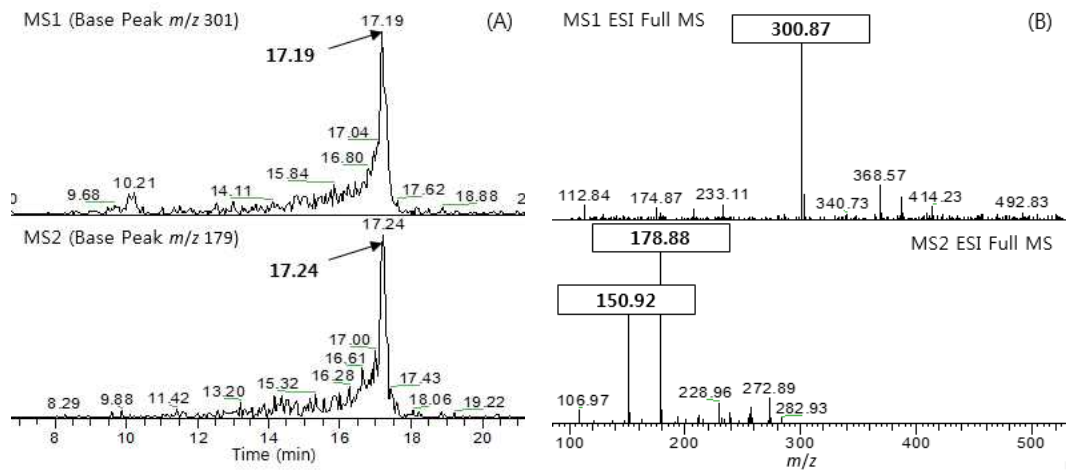


Figure 107. Identification of Quercetin from *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

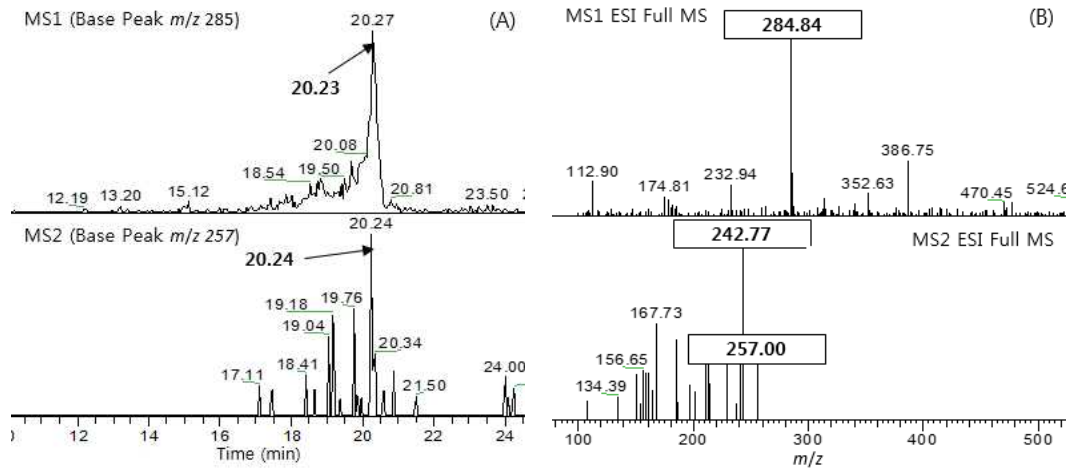


Figure 108. Identification of Kaempferol from *D. racemosum* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

### 3-6-2-3. 조록나무 잎 *n*-butanol fraction

조록나무나뭇잎 *n*-butanol fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석을 통해 4-O-Caffeoylquinic acid, Hyperoside, Rutin, Nicotiflorin, Quercitrin 등 5종의 화합물을 확인하였다. 4-O-Caffeoylquinic acid는 본 연구에서 유일하게 조록나무 잎 *n*-butanol fraction에서만 확인이 되었고, 나머지는 조록나무 70% ethyl alcohol 추출물과 유사하게 나타났다(Table 31, Figure 109-114).

Table 31. Identification of standards from of *D. racemosum* (leaves) *n*-butanol fraction.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
4.46	352.74	178.92, 172.90	4-O-Caffeoylquinic acid
11.33	462751	300.81	Hyperoside
11.10	608.76	300.82	Rutin
12.59	592.86	284.97	Nicotiflorin
13.11	446.80	300.83	Quercitrin

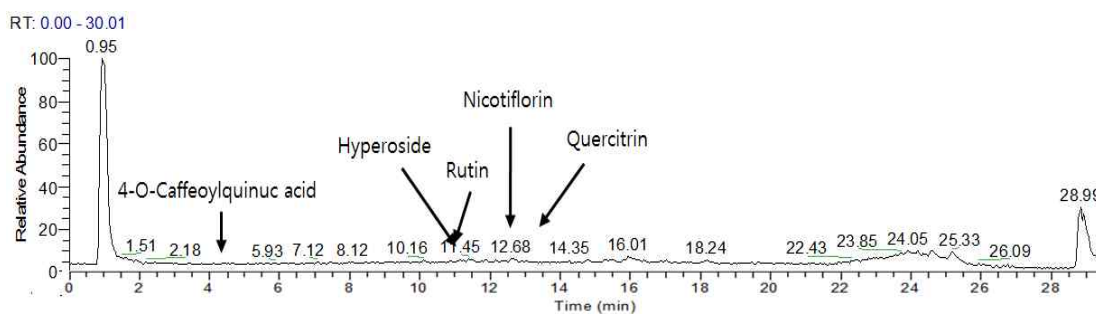


Figure 109. Total ion chromatogram (MS1) of *D. racemosum* (leaves) *n*-butanol fraction.

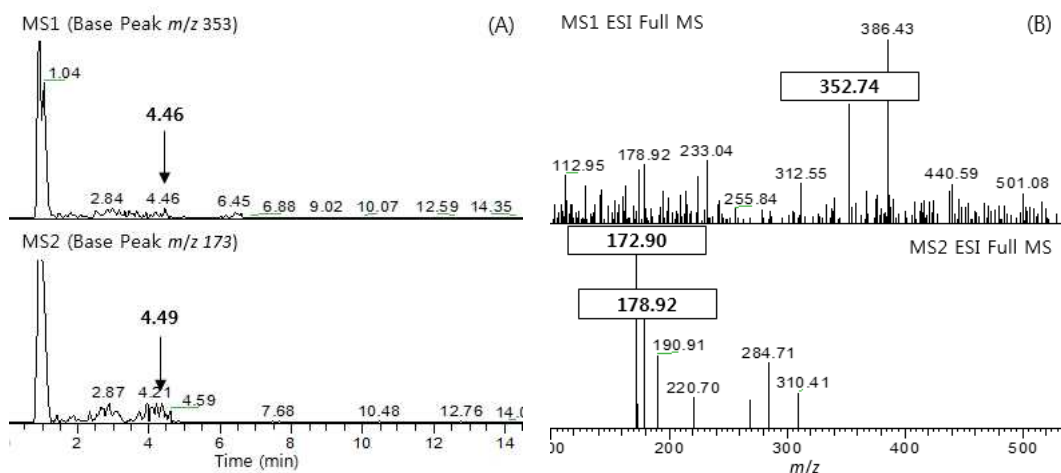


Figure 110. Identification of 4-O-Caffeoylquinuc acid from *D. racemosum* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

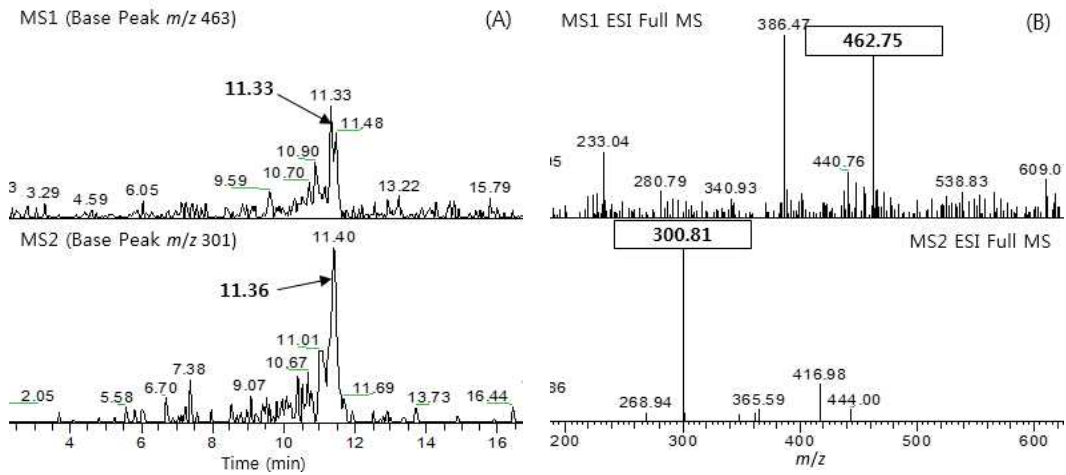


Figure 111. Identification of Hyperoside from *D. racemosum* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

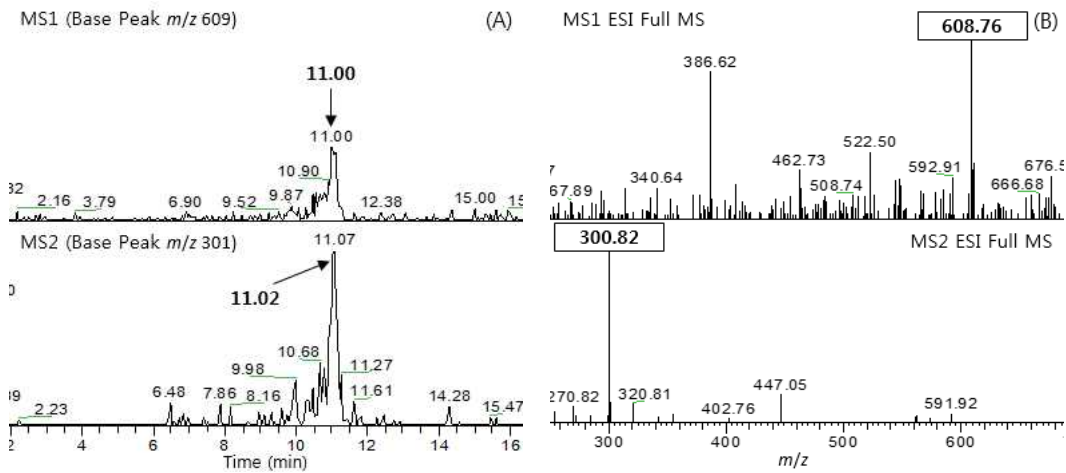


Figure 112. Identification of Rutin from *D. racemosum* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.



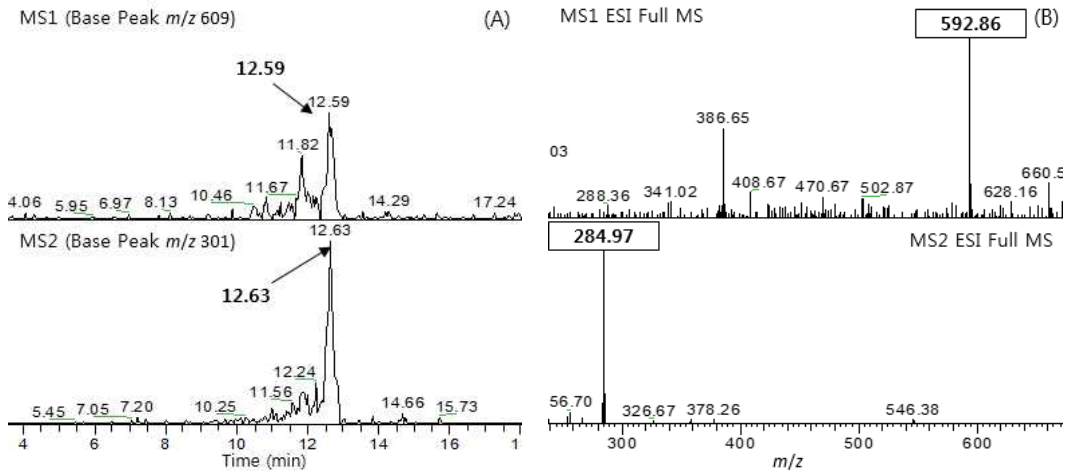


Figure 113. Identification of Nicotiflorin from *D. racemosum* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

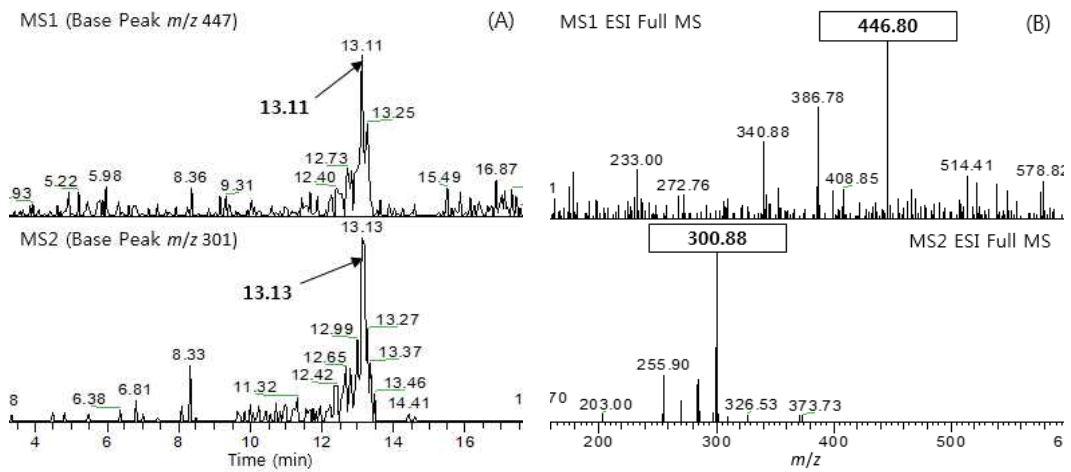


Figure 114. Identification of Quercitrin from *D. racemosum* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

3-6-2-4. 조록나무 가지 ethyl acetate fraction

조록나무 가지 ethyl acetate fraction에서는 Catechin, Epicatechin gallate 2종이 확인하였다. Catechin은 조록나무 잎 ethyl acetate fraction에서도 확인이 되었지만 Epicatechin gallate는 조록나무 가지 ethyl acetate fraction에서만 확인이 되었다(Table 32, Figure 115-117).

Table 32. Identification of standards from of *D. racemosum* (Branch) ethyl acetate fraction.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
3.41	288.91	244.92, 204.88	Catechin
11.28	440.76	289.01, 168.88	Epicatechin gallate

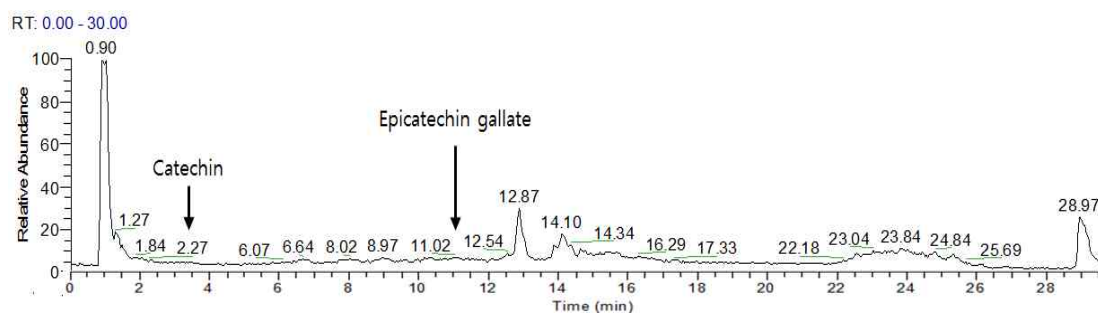


Figure 115. Total ion chromatogram (MS1) of *D. racemosum* (Branch) ethyl acetate fraction.

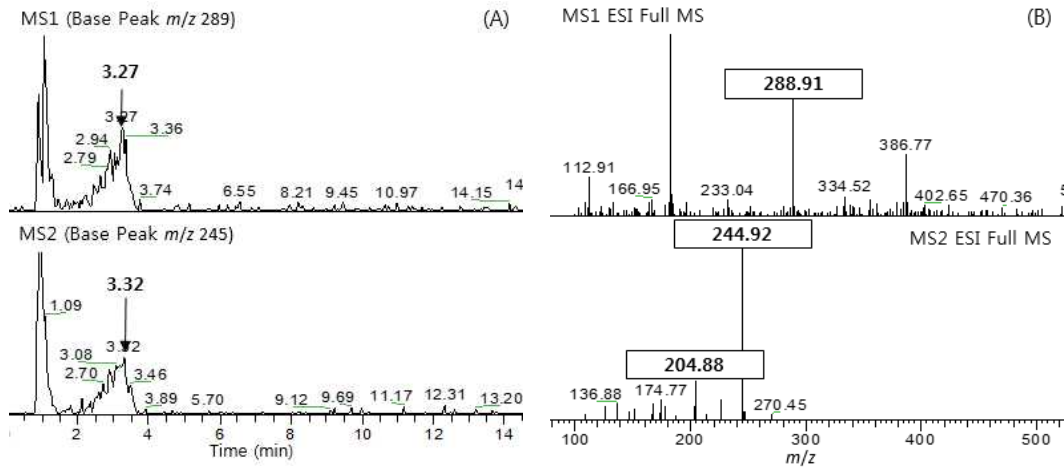


Figure 116. Identification of Catechin from *D. racemosum* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

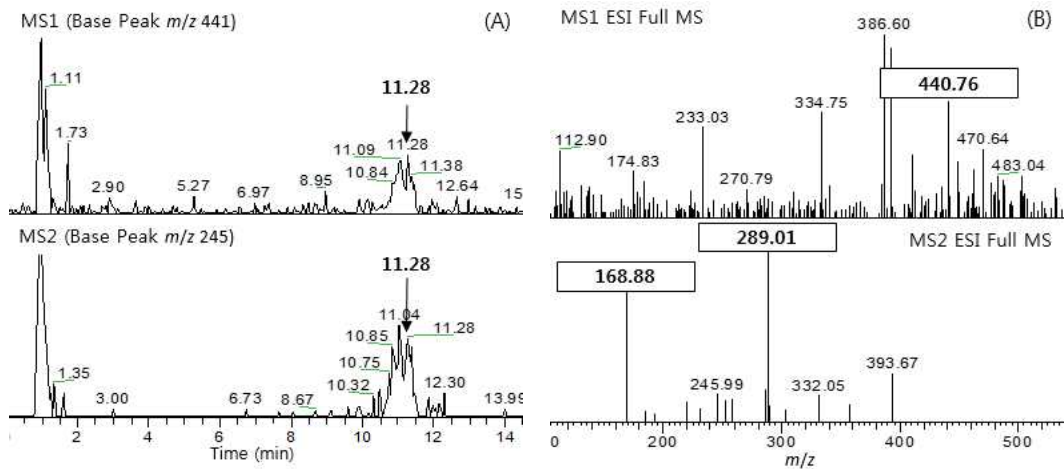


Figure 117. Identification of Epicatechin gallate from *D. racemosum* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

### 3-6-2-2. 조록나무 가지 *n*-butanol fraction

조록나무 가지 *n*-butanol fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석을 하였으나 성분이 확인되지 않았다.

### 3-7. 조록나무 추출 성분 동물 실험

#### 3-7-1. 기도과민성 미치는 영향

천식유도군(OVA)은 methylcholine 농도가 증가함에 따라 정상대조군(NC)에 비하여 기도과민성이 크게 증가하였다. 반면, Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군에 비해 methylcholine 농도가 증가함에 따라 기도과민성이 크게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(71-30), 시료물질 60 mg/kg(71-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. 그 결과 F-value는 methylcholine 농도 10 mg/mL에서 0.932, 20 mg/mL에서 6.249, 30 mg/mL에서 7.406으로 나타내었다. F 분포도에서의 기각치 3.63(집단간(3)-1=2, 집단내(19)-3=16) 보다 높은 값을 나타내는 두 개의 농도(20 mg/mL, 30 mg/mL)로 확인이 되었다. F 기각치 보다 높은 20 mg/mL의 P-value을 확인한 결과 OVA/71-30에서 0.015( $P < 0.05$ )로 유의성이 관찰되었고, OVA/71-60에서는 0.096( $P > 0.05$ )로 유의성이 관찰되지 않았다. 또한, 30 mg/mL의 P-value을 확인한 결과 OVA/71-30에서 0.033( $P < 0.05$ )로 유의성이 관찰되었고, OVA/71-60에서도 0.019( $P < 0.05$ )로 유의성이 관찰되었다. 따라서 시료물질 71 투여군은 천식유발군(OVA)에 비해 기도과민성이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(Table 33, Figure 118).

Table 33. Effects of test material-71 on airway

hyperresponsiveness and result of one-way ANOVA.

Airway Hyperresponsiveness (Penh)	Concentration (mg/mL)			
	0	10	20	30
NC	0.31±0.04	0.43±0.03	0.64±0.14	1.30±0.10
OVA	0.77±0.17	1.46±0.53	4.52±1.21	6.68±1.77
DEX	0.51±0.10	0.59±0.18	1.44±0.39	2.84±0.90
71-30	0.55±0.12	1.19±0.51	2.40±0.98	4.04±1.37
71-60	0.55±0.10	1.06±0.59	2.91±1.19	3.88±1.20
F-value		0.932	6.249	7.406
F distribution		3.63	3.63	3.63
P-value	OVA/71-30		0.015	0.033
	OVA/71-60		0.096	0.019

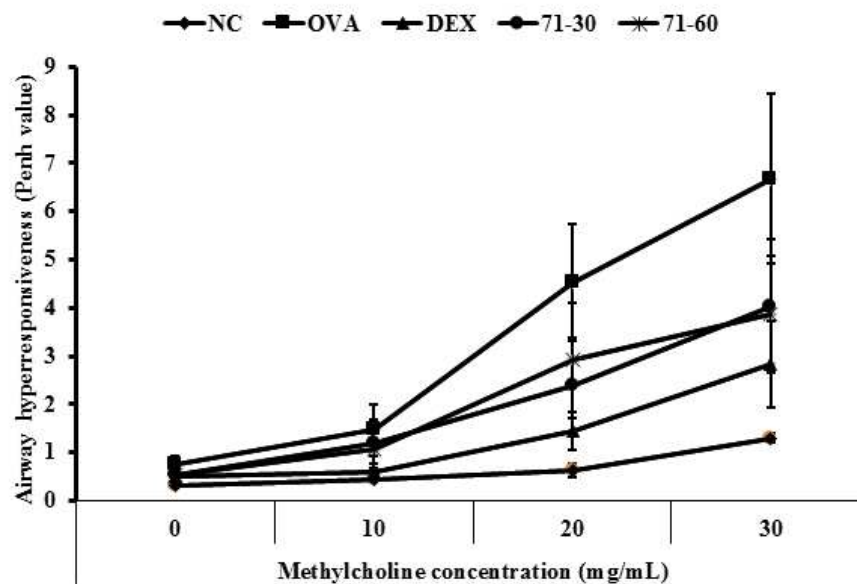


Figure 118. Effects of test material-71 on airway hyperresponsiveness.

### 3-7-2. 활성산소족 억제 효과

천식유도군(OVA)은 정상대조군(NC)에 비해 기관지 폐포 세척액 내 반응성활성 산소족의 생성이 현저하게 증가하였다. 반면, 약물대조군 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유도군(OVA)에 비해 반응성 활성산소족의 생성이 약 57.5% 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(71-30), 시료물질 60 mg/kg(71-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. 그 결과, F-value는 7.770으로 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 높은 값을 나타냄을 확인할 수 있었다. P-value을 확인한 결과 OVA/71-30에서 0.027로 ( $P<0.05$ ) 유의성 있었고, OVA/71-60 또한 0.013로( $P<0.05$ ) 유의성 관찰되었다. 30 mg/kg(71-30) 투여군은 28.3%, 60 mg/kg(71-60) 투여군은 30.8%의 반응성 활성산소족의 생성이 천식유도군(OVA)에 비해 감소되었다(Table 34, Figure 119).

Table 34. Effects of test material-71 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	ROS Production (Fluorencence)	
NC	4,676.72±492.04	
OVA	10,461.09±1892.30	
DEX	4,443.63±1,604.96	
71-30	7,504.64±1,689.83	
71-60	7,243.18±1,481.96	
F-value	7.770	
F-distribution	3.55	
P-value		
	OVA/71-30	0.027
	OVA/71-60	0.013

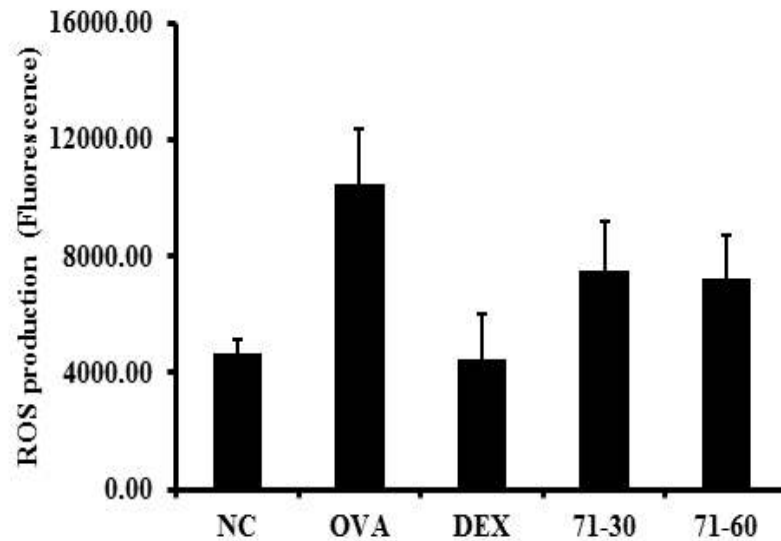


Figure 119. Effects of test material-71 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid.

### 3-7-3. 폐포 세척액 내 염증세포 침윤 억제 효과

천식유발균(OVA)에서는 기관지 폐포 세척액 내 호산구를 비롯한 염증세포의 수가 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면, Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발균(OVA)에 비해 염증세포 수가 현저하게 감소하였다.

천식유도균(OVA), 시료물질 30 mg/kg(71-30), 시료물질 60 mg/kg(71-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. 그 결과, F-value는 Eosinophil에서 16.569, Macrophage에서 50.449, Lymphocyte에서 26.934, Neutrophil에서 2.837, Total cell에서 42.353로 확인이 되었다. F 분포도에서의 기각치 3.55 (집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18)보다 높은 값을 나타내는 염증세포에는 Neutrophil를 제외한 Eosinophil, Macrophage, Lymphocyte 및 Total cell로 확인이 되었다. OVA/71-30에서의 P-value은 Eosinophil 0.008(P<0.05), Macrophage 0(P<0.05), Lymphocyte 0.02(P<0.05), Neutrophil 0.391(P>0.05),

Total cell 0.01(P<0.05)로 Neutrophil 제외하고 모두 유의성이 있었고, OVA/71-60 또한 P-value은 Eosinophil 0.013(P<0.05), Macrophage 0(P<0.05), Lymphocyte 0.03(P<0.05), Neutrophil 0.204(P>0.05), Total cell 0(P<0.05)로 Neutrophil 제외하고 모두 유의성이 있었다. 그리고 시료물질 71 투여군 염증세포의 수는 천식유발군(OVA)에 비해 30 mg/kg 투여군(71-30)은 52.3%, 60 mg/kg 투여군(71-60)은 54.9% 감소되었다(Table 35, Figure 120).

Table 35. Effects of test material-71 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Cell (per×400 magnification site)					
	Eosinophil	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil	Total cell	
NC	0±0	11.1±1.65	0.35±0.14	0.25±0.18	11.7±1.72	
OVA	118.29±34.75	90.86±10.96	9.82±2.95	7.54±6.56	226.50±41.99	
DEX	15.65±4.58	26.05±2.58	4.45±0.97	2.85±1.04	49±6.12	
71-30	56.50±9.03	44.79±5.75	5.68±1.08	1.14±2.97	108.11±11.82	
71-60	63.07±13.05	37.93±13.85	4.46±0.85	1.18±2.57	102.18±23.14	
F-value	16.569	50.449	26.934	2.837	42.353	
F-distribution	3.55	3.55	3.552	3.55	3.55	
P-value	OVA/71-30	0.008	0	0.02	0.391	0.01
	OVA/71-60	0.013	0	0.03	0.204	0.00



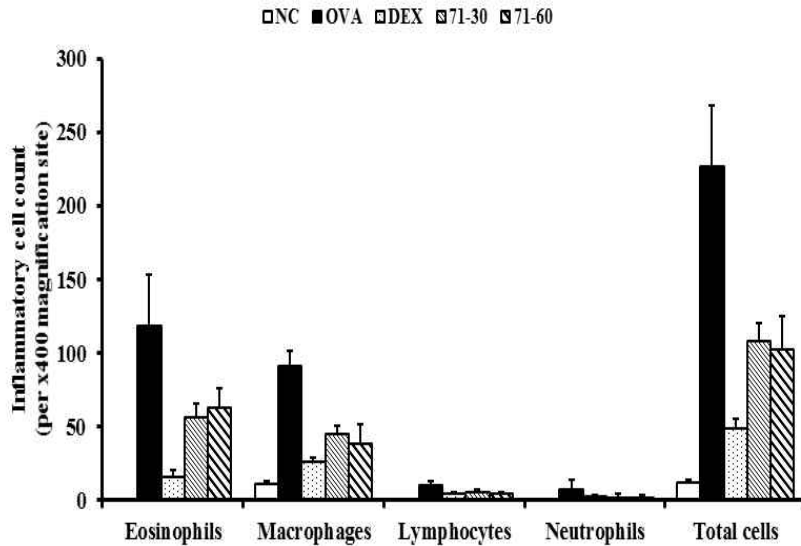


Figure 120. Effects of test material-71 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid.

#### 3-7-4. 염증성 Cytokine 생성 억제 효과

천식유발균(OVA)에서 기관지 폐포 세척액 내 Interleukin-5 와 Interleukin - 13의 생성이 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면, Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발균(OVA)에 비해 Cytokine 생성이 크게 감소되었다.

천식유도균(OVA), 시료물질 30 mg/kg(71-30), 시료물질 60 mg/kg(71-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 Interleukin-5에서 11.498, Interleukin - 13에서 0.045로 확인이 되었다. Interleukin-5는 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 높게 나타났고, Interleukin - 13은 F 분포도에서의 기각치 3.55 보다 낮게 나타났다. 따라서 Interleukin-5의 P-value를 확인한 결과 OVA/71-30은 0.010, OVA/71-60은 0.001로 유의성이 관찰되지 되었다. 또한 천식유발균(OVA)에 비해 Interleukin-5는 30 mg/kg 투여군(71-30)은 33.8%, 60 mg/kg 투여군(71-60)은 39.1% 감소되었으며,

Interleukin-13은 30 mg/kg 투여군(71-30)은 17.0%, 60 mg/kg 투여군(71-60)은 26.4%가 감소되었다(Table 36, Figure 121-122).

Table 36. Effects of test material-71 on IL-5 and IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Cytokine (pg/mL)	
	IL-5	IL-13
NC	7.01±2.41	13.51±2.13
OVA	34.91±4.85	78.89±14.58
DEX	25.37±7.58	34.07±9.58
71-30	23.10±6.87	65.44±15.28
71-60	21.28±5.43	58.05±13.70
F-value	11.498	0.045
F distribution	3.55	3.55
P-value	OVA/71-30	0.010
	OVA/71-60	0.001

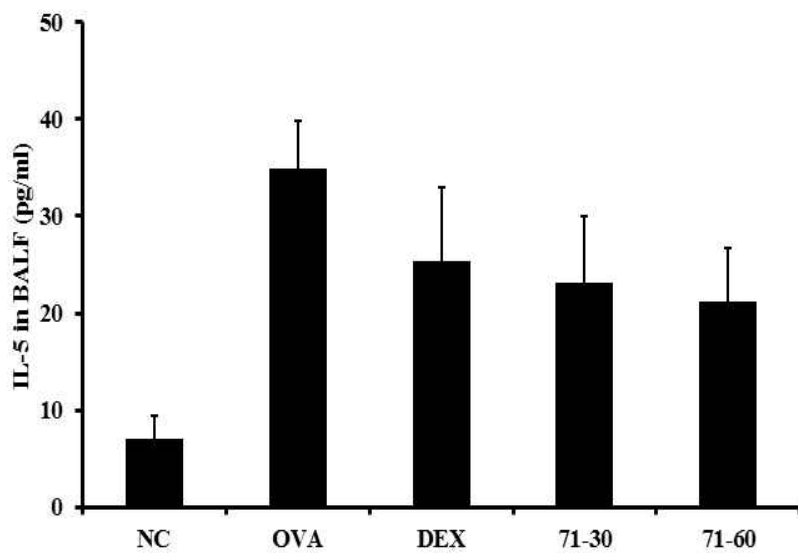


Figure 121. Effects of test material-71 on IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid.

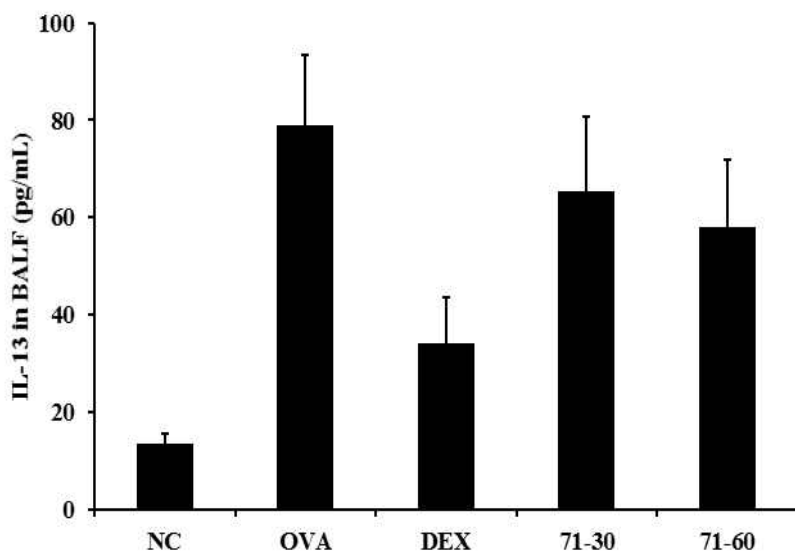


Figure 122. Effects of test material-71 on IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid.

### 3-7-5. Immunoglobulin-E 생성 억제 효과

천식유발군(OVA)에서 Ovalbumin 특이성 Immunoglobulin-E의 생성이 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였으며, 반면 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 Ovalbumin 특이성 Immunoglobulin-E의 생성이 현저하게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(71-30), 시료물질 60 mg/kg(71-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 10.936로 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 낮은 것을 확인할 수 있었다. P-value값을 확인한 결과 OVA/71-30은 0.011( $P<0.05$ )로 유의성이 관찰되었고, OVA/71-60 또한 0.002( $P<0.05$ ) 유의적 차이가 있었다. 또한, 시료물질 71 투여군에서 Ovalbumin 특이성 Immunoglobulin-E의 생성이 천식유발군(OVA)에 비해, 30 mg/kg 투여군(71-30)에서 37.0%, 60 mg/kg 투여군(71-60)은 45.6%가 감소되었다(Table 37, Figure 123).

Table 37. Effects of test material-71 on ovalbumin-specific IgE in serum and result of one-way ANOVA.

Type	OVA-specific IgE (ng/mL)
NC	0
OVA	141.67±26.38
DEX	19.27±7.61
71-30	89.24±28.05
71-60	77.00±27.99
F-value	10.936
F distribution	3.55
P-value OVA/71-30	0.011
e OVA/71-60	0.002

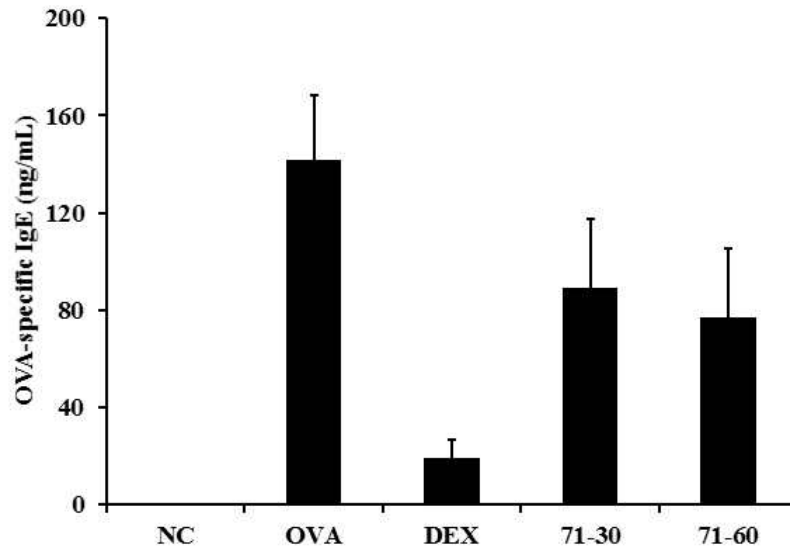


Figure 123. Effects of test material-71 on ovalbumin-specific IgE in serum.

### 3-7-6. 폐조직 내 염증세포 침윤 억제 효과

Ovalbumin으로 유발된 천식유발군(OVA)은 정상군(NC)에 비해 기관지 주위 염증세포의 침윤이 크게 증가하였다. 반면, 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포의 침윤이 감소되었다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(71-30), 시료물질 60 mg/kg(71-60) 처리 조직의 염증 및 점액생산 지수를 확인하기 위해 이미지분석소프트웨어(IMT-i software, Vancouver, Canada)를 이용하여 측정된 결과, F-value는 7.356로 F 분포도에서의 기각치 3.89(집단간(3)-1=2, 집단내(15)-3=12) 보다 높은 것을 확인할 수 있었다. P-value값을 확인한 결과 OVA/71-30은 0.095( $P>0.05$ )로 유의성이 없었고, OVA/71-60은 0.012( $P<0.05$ ) 유의적 차이가 있었다. 따라서, 71 시료물질 60 mg/kg처리한 투여군(71-60)은 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포 침윤의 유의성 있게 감소함을 확인하였다(Table 38, Figure 124-125).

Table 38. Effects of test material-71 on inflammatory responses in lung tissue and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Responses (%)
NC	1.47±0.44
OVA	13.42±1.70
DEX	4.15±1.29
71-30	10.11±2.24
71-60	8.66±2.05
F-value	7.356
F-distribution	3.89
P-value	
OVA/71-30	0.086
OVA/71-60	0.012

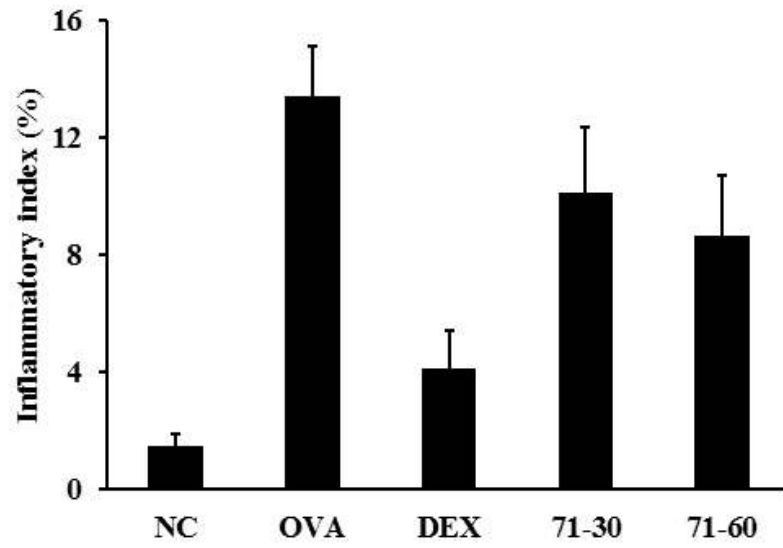
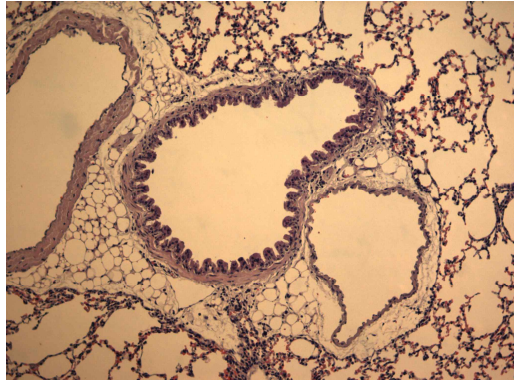
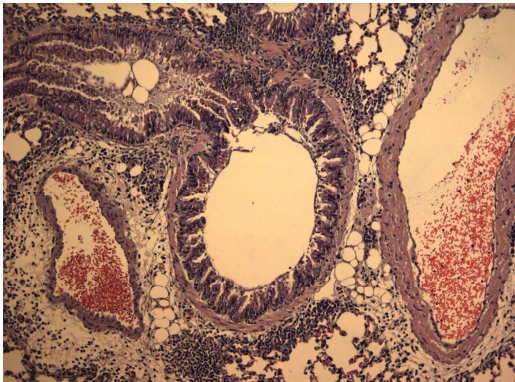


Figure 124. Effects of test material-71 on inflammatory responses in lung tissue.

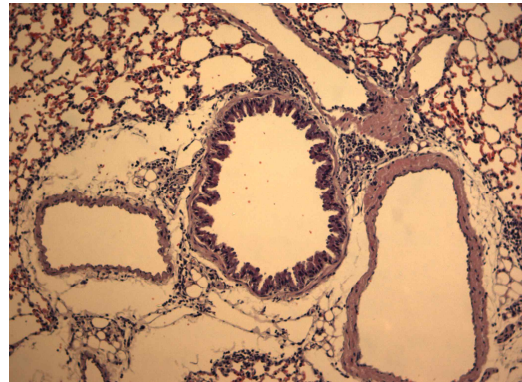
A. NC



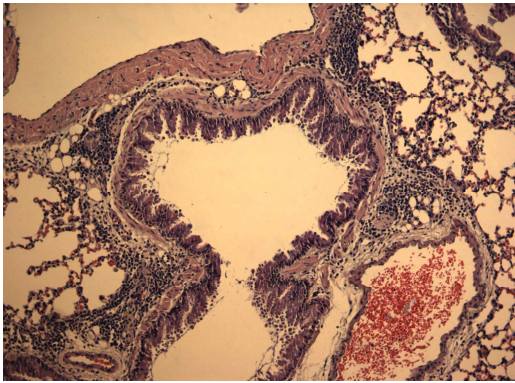
B. OVA



C. DEX



D. 71-30



E. 71-60

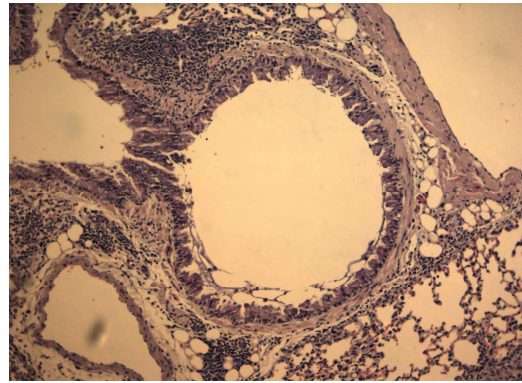


Figure 125. Effects of test material-71 on inflammatory responses in lung tissue.



### 3-7-7. 점액분비 억제 효과

Ovalbumin으로 유발된 천식유발군(OVA)은 기관지 내 점액분비가 정상군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 점액분비가 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(71-30), 시료물질 60 mg/kg(71-60) 처리 조직의 염증 및 점액생산 지수를 확인하기 위해 이미지분석소프트웨어(IMT-i software, Vancouver, Canada)를 이용하여 측정된 결과, F-value는 6.592로 F 분포도에서의 기각치 3.89(집단간(3)-1=2, 집단내(15)-3=12) 보다 높은 것을 확인할 수 있었다. P-value값을 확인한 결과 OVA/71-30은 0.196(P>0.05)로 유의성이 없었고, OVA/71-60은 0.019(P<0.05) 유의적 차이가 있었다. 따라서, 71 시료물질 60 mg/kg처리한 투여군(71-60)은 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포 침윤의 유의성 있게 감소함을 확인하였다(Table 39, Figure 126-127).

Table39. Effects of test material-71 on mucus production in lung tissue and result of one-way ANOVA.

Type	Mucus Production (%)
NC	0.52±0.21
OVA	17.09±2.07
DEX	9.27±1.60
71-30	14.48±1.99
71-60	12.56±1.87
F-value	6.592
F-distribution	3.89
P-value	OVA/71-30
	OVA/71-60
	0.196
	0.019

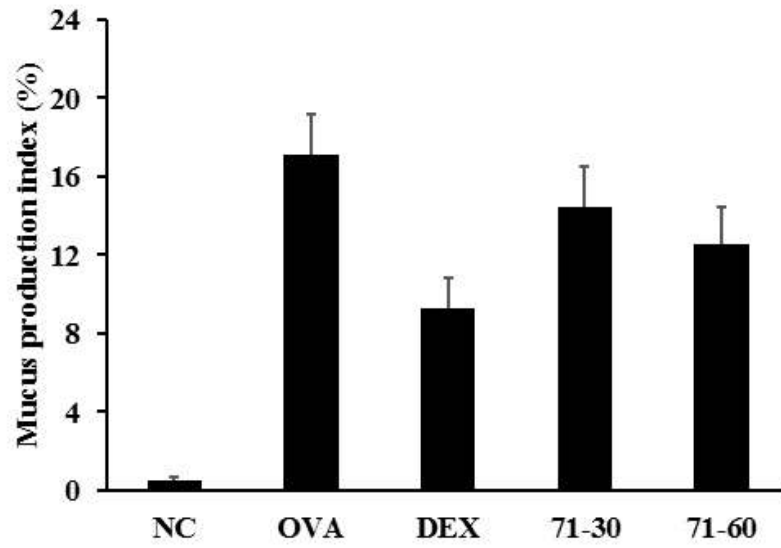
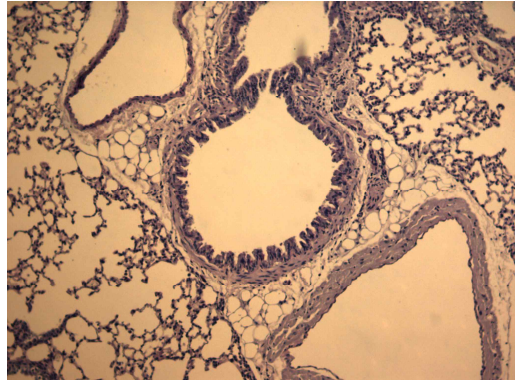
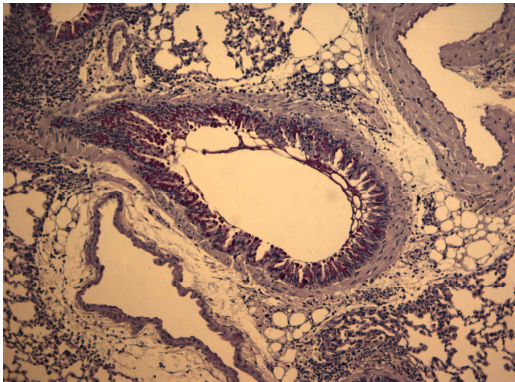


Figure 126. Effects of test material-71 on mucus production in lung tissue.

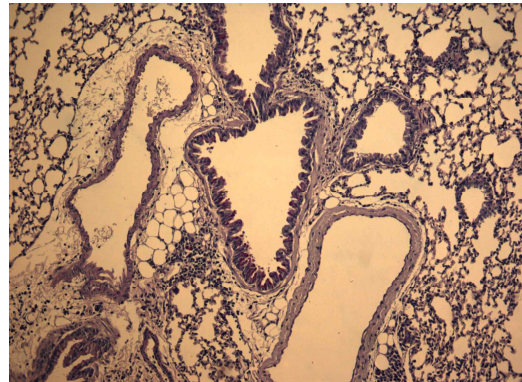
A. NC



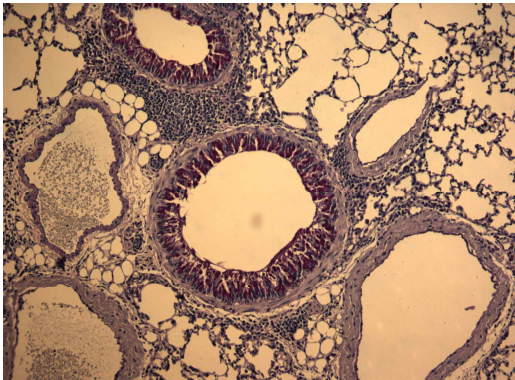
B. OVA



C. DEX



D. 71-30



E. 71-60



Figure 127. Effects of test material-71 on mucus production in lung tissue.

#### 4. 윤노리나무 천식효능 탐색

##### 4-1. 윤노리나무 특성

윤노리나무(*Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne.)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 영명으로는 Brown Oriental Photinia 이다. 낙엽 활엽 관목으로 한국, 중국, 일본에 자생한다. 우리나라 분포지는 전라남도, 경상남도, 제주도 이다. 숲속에서 자라며 높이 5 m에 달한다. 잎은 어긋나기하며 거꿀달걀형이고 점첨두, 예저이며 길이는 3~8 cm 폭 2~5 cm이고, 잎자루는 길이 1~5 mm로 털이 있으나 점차 거의 없어지고 가장자리에 잘고 예리한 톱니가 있다. 꽃은 편평꽃차례로 지름 3~5 cm이고 흰색 꽃이 피며, 흰색 털이 밀생하고 꽃잎은 거꿀달걀상이며 원형이고, 수술은 20개이고 암술대는 2~4개로 밑부분이 합쳐지며, (4)5월에 개화한다. 열매는 타원형이며 길이 8 mm로 붉은색이며 8~9월에 성숙한다. 열매가 커짐에 따라 갈색 껍질눈이 열매자루와 소과경에 생긴다. 줄기는 밑에서 옆으로 자라며 몇 개의 수간이 올라온다. 일년생가지에는 백색털과 타원형의 껍질눈이 있다.<sup>57-58)</sup>

윤노리나무는 가로수, 녹음수, 정원수, 분재로 쓰이며, 민간요법으로는 뿌리는 모염석남근이라 하여 약용으로 쓰이고 있다.<sup>76)</sup> 분리 보고 되어진 화합물로는 Ursolic acid, Arjunolic acid, Daucosterol, Myricanol, Gallic acid, Myricetin, Myricitrin, Quercitrin<sup>77)</sup> 이 있다.



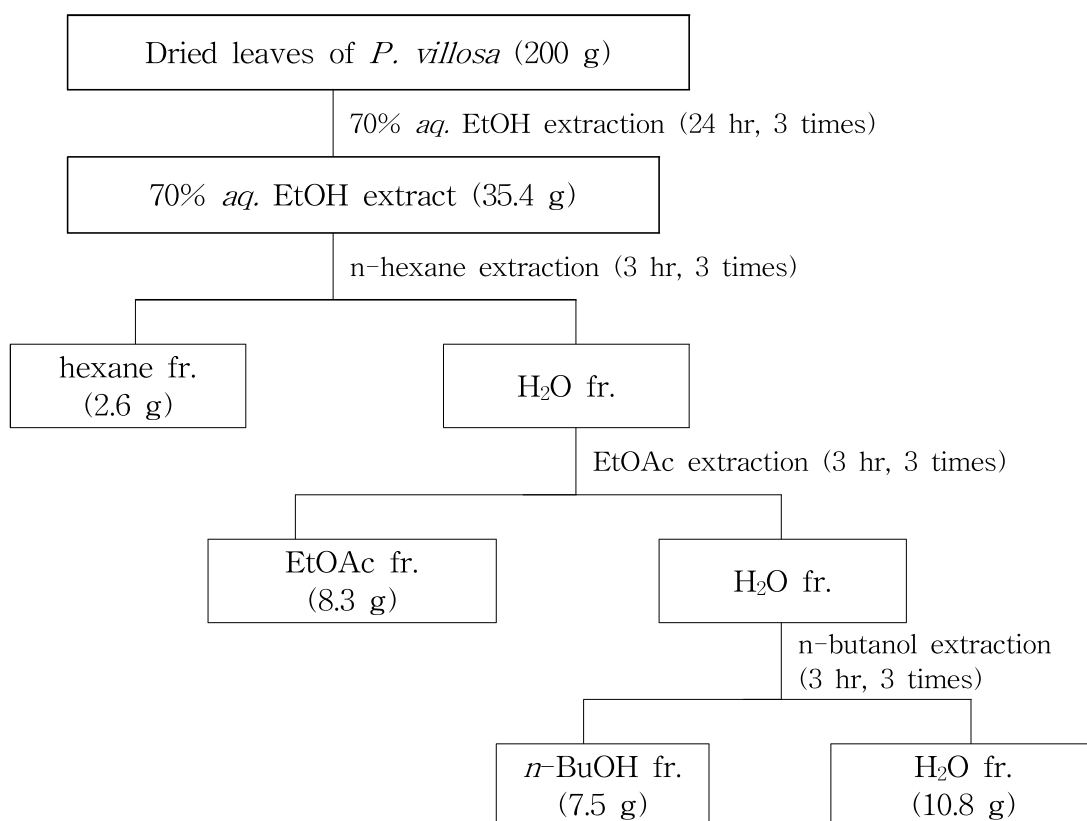
Figure 128. The specimen of *Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne.



Figure 129. Photograph of the leaf of *Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne.

#### 4-2. 윤노리나무 잎 추출

윤노리나무 잎(94-1) 건조 시료 200 g을 70% ethyl alcohol에 추출하여 추출물 35.4 g(yield : yield : 17.7%)을 얻었고, 추출물 28 g을 정제수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 활용하여 *n*-hexane fraction (2.6 g), ethyl acetate fraction (8.3 g), *n*-butanol fraction (7.5 g) and H<sub>2</sub>O fraction (10.8 g)을 얻어 연구에 활용하였다(Scheme 5).



Scheme 5. Procedure of extraction and various fraction from dried leaves of *P. villosa*.



#### 4-3. 윤노리나무 잎 추출 성분 활성 확인

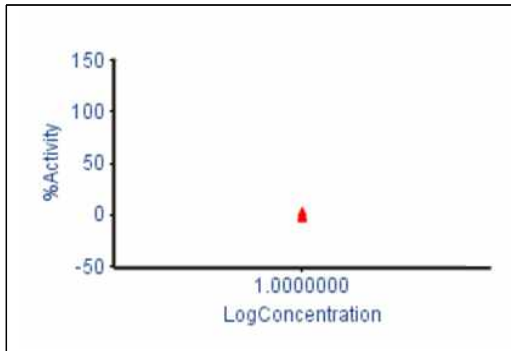
70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 PDE4 enzyme 활성을 측정한 결과를 Table 11에 내었다. 70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 모든 fraction에서 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < ethyl acetate fraction < *n*-butanol fraction. 그들 중, *n*-butanol fraction (IC<sub>50</sub>: 24.9 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다.

70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 GSNO reductase 활성을 측정한 결과를 Table 11에 나타내었다. ethyl acetate fraction을 제외한 나머지 fraction (70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O solvent fractions)에서는 GSNO reductase 활성 결과가 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : ethyl acetate fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-hexane fraction < *n*-butanol fraction. 그들 중, *n*-butanol fraction (IC<sub>50</sub>: 19.8 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다(Table 40, Figure 130-131).

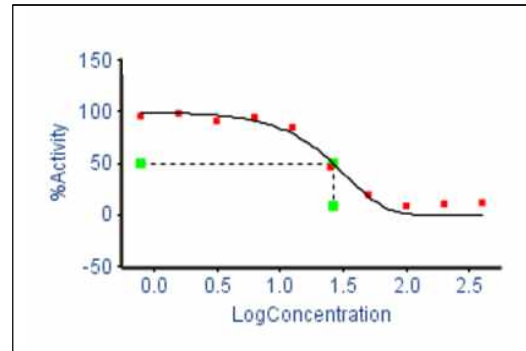
Table 40. IC<sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% *aq.* EtOH extract and its solvent fractions of *P. villosa* (leaves).

Samples	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	PDE4	GSNO
94 EtOH extract	26.3	16.4
94-1 <i>n</i> -Hex fraction	326.6	166
94-1 EtOAc fraction	29.5	NA
94-1 <i>n</i> -BuOH fraction	24.9	19.8
94-1 H <sub>2</sub> O fraction	114.9	235.4

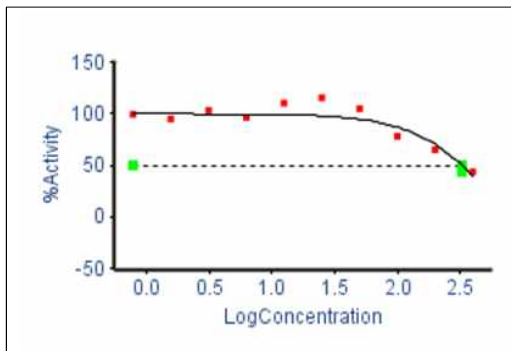
(A) Rolipram



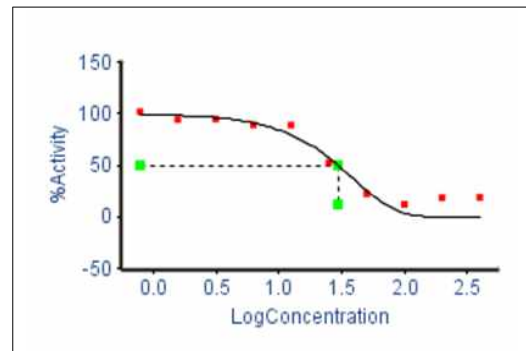
(B) 94 EtOH extract



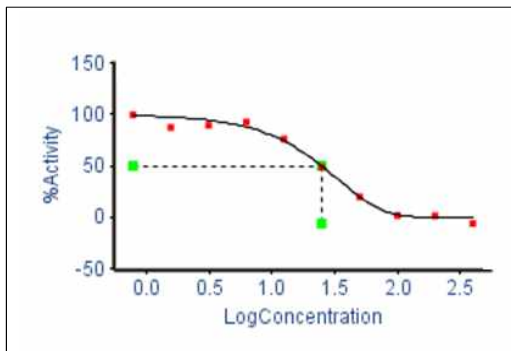
(C) 94-1 *n*-Hex fraction



(D) 94-1 EtOAc fraction



(E) 94-1 *n*-BuOH fraction



(F) 94-1 H<sub>2</sub>O fraction

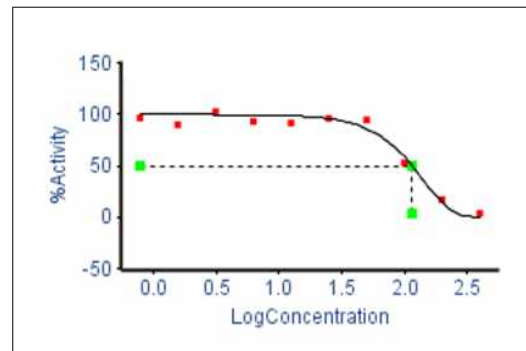
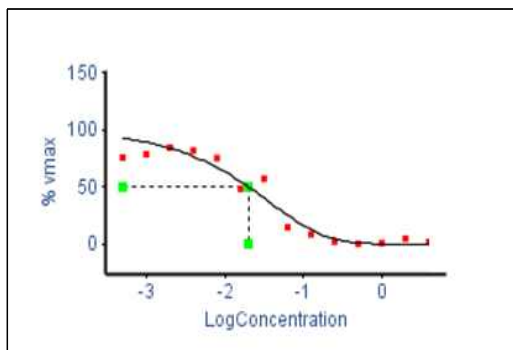


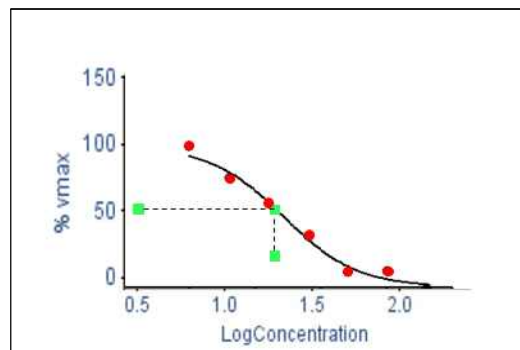
Figure 130. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from leaves of *P. villosa*.



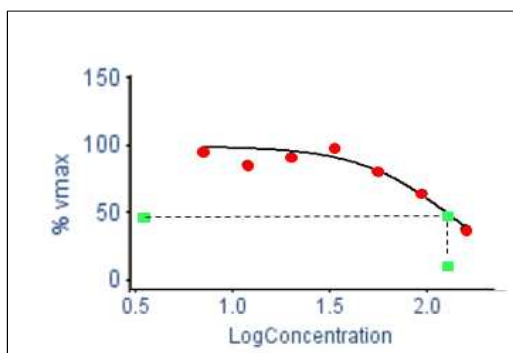
(A) N6022



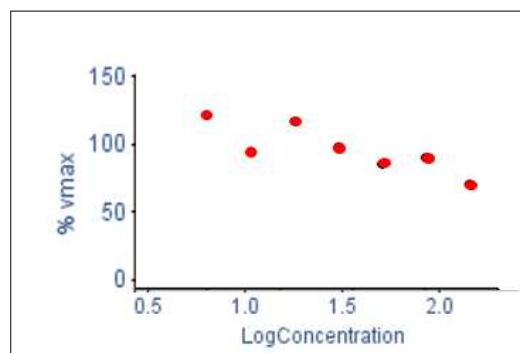
(B) 94 EtOH extract



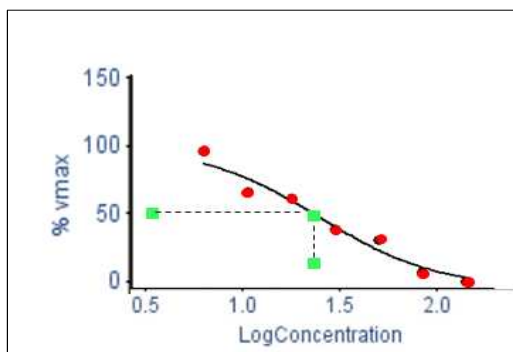
(C) 94-1 *n*-Hex fraction



(D) 94-1 EtOAc fraction



(E) 94-1 *n*-BuOH fraction



(F) 94-1 H<sub>2</sub>O fraction

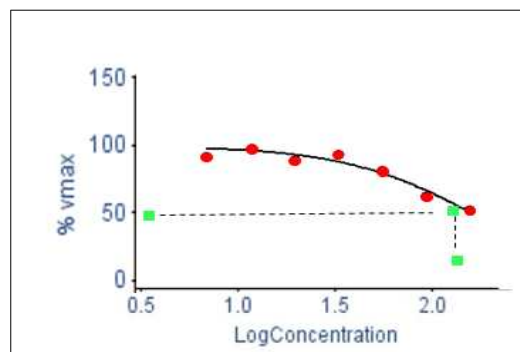
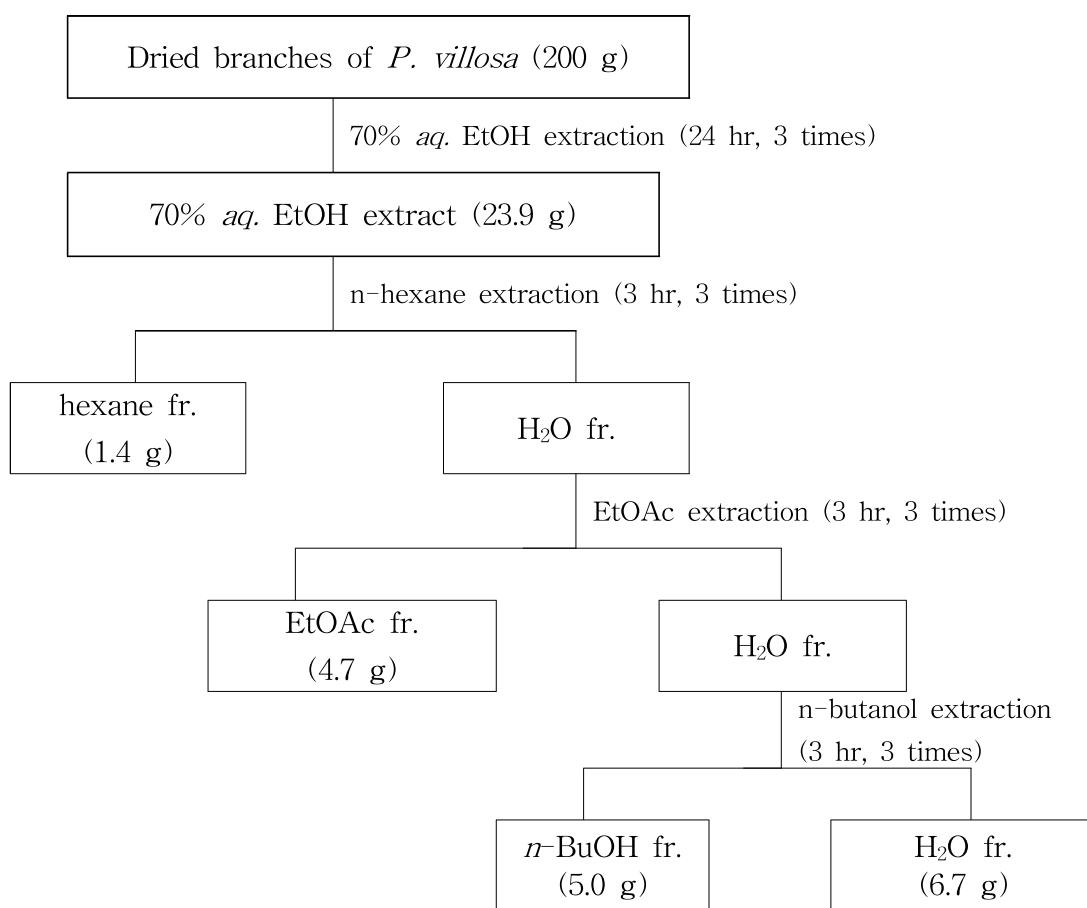


Figure 131. Results of GSNOR reductase inhibition assay from leaves of *P. villosa*.

#### 4-4. 윤노리나무 가지 추출

윤노리나무 가지(94-2) 건조 시료 200 g을 70% ethyl alcohol에 추출하여 추출물 23.9 g(yield : 12.0%)을 얻었고, 추출물 15 g을 정제수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 활용하여 *n*-hexane fraction (1.4 g), ethyl acetate fraction (4.7 g), *n*-butanol fraction (5.0 g) and H<sub>2</sub>O fraction (6.7 g)을 얻어 연구에 활용하였다 (Scheme 6).



Scheme 6. Procedure of extraction and various fraction from dried branches of *P. villosa*.

#### 4-5. 윤노리나무 가지 추출 성분 활성 확인

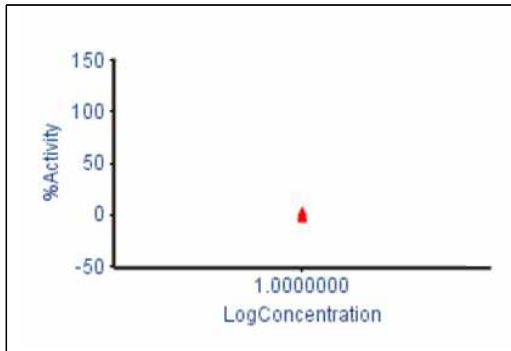
70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 PDE4 enzyme 활성을 측정한 결과를 Table12에 나타내었다. 70% *aq.* EtOH extract, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O 모든 fraction에서 PDE4 enzyme 활성 결과가 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < H<sub>2</sub>O fraction < ethyl acetate fraction < *n*-butanol fraction. 그들 중, *n*-butanol fraction (IC<sub>50</sub>: 56.3 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다.

70% ethyl alcohol 추출물과 분획물들을 이용하여 GSNO reductase 활성을 측정한 결과를 Table 12에 나타내었다. *n*-hexane fraction을 제외한 나머지 fraction (70% *aq.* EtOH extract, ethyl acetate, *n*-butanol, H<sub>2</sub>O solvent fractions)에서 GSNO reductase 활성 결과가 농도 의존적 나타났다. 활성은 다음과 같은 순으로 증가하였다. : *n*-hexane fraction < ethyl acetate fraction < H<sub>2</sub>O fraction < *n*-butanol fraction. 그들 중, *n*-butanol fraction (IC<sub>50</sub>: 24.4 μg/mL) 다른 fraction에 비해 가장 높은 활성을 보였다(Table 41, Figure 132-133).

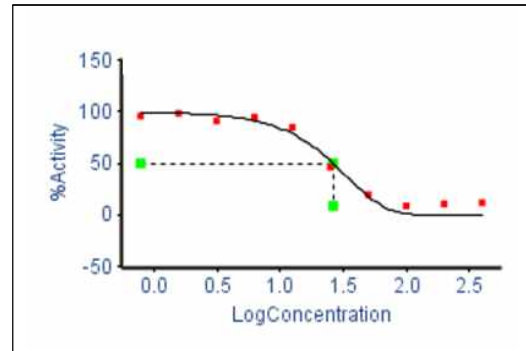
Table 41. IC<sub>50</sub> value of Phosphodiesterase enzyme & GSNO reductase inhibition activity for 70% *aq.* EtOH extract and its solvent fractions of *P. villosa* (branches).

Samples	IC <sub>50</sub> (μg/mL)		
	PDE4	GSNO	
94	EtOH extract	26.3	16.4
94-2	<i>n</i> -Hex fraction	365.2	NA
94-2	EtOAc fraction	57.7	101.4
94-2	<i>n</i> -BuOH fraction	56.3	13.7
94-2	H <sub>2</sub> O fraction	236.8	24.4

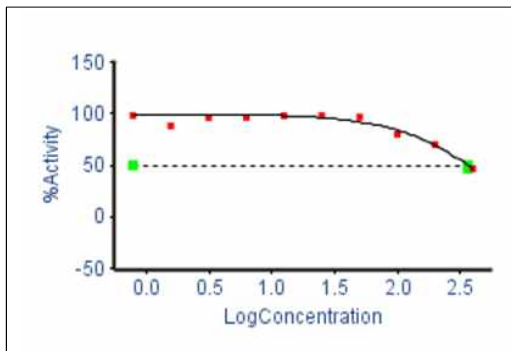
(A) Rolipram



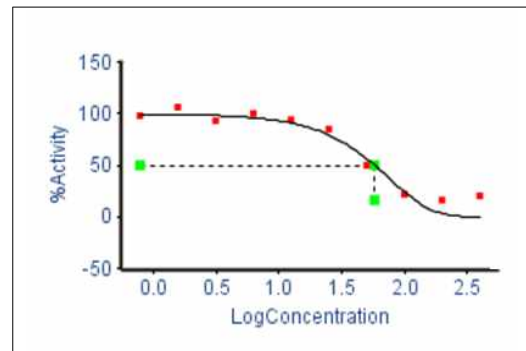
(B) 94 EtOH extract



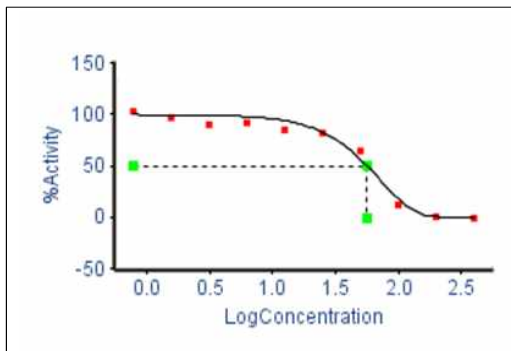
(C) 94-2 *n*-Hex fraction



(D) 94-2 EtOAc fraction



(E) 94-2 *n*-BuOH fraction



(F) 94-2 H<sub>2</sub>O fraction

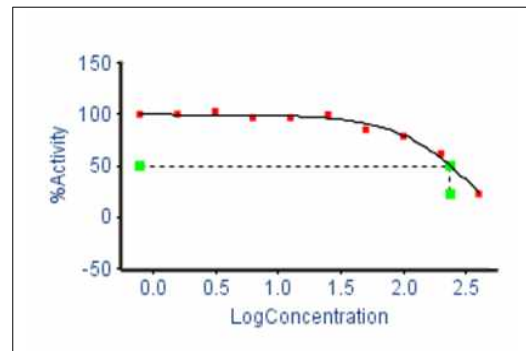
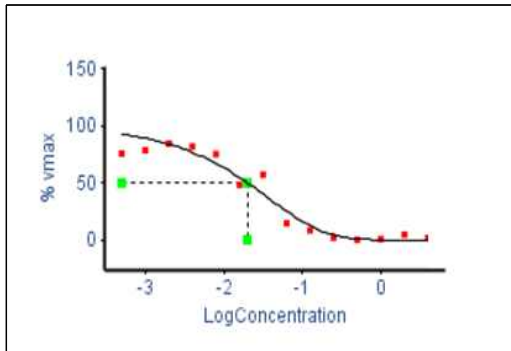
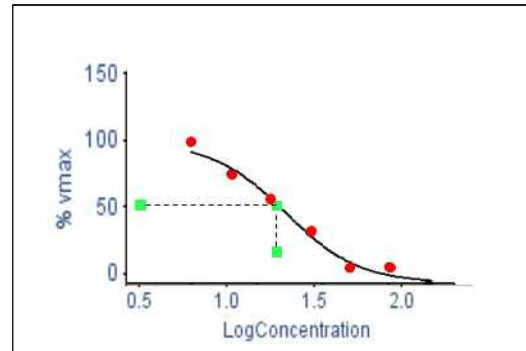


Figure 132. Results of PDE4 enzyme inhibition assay for extraction from branches of *P. villosa*.

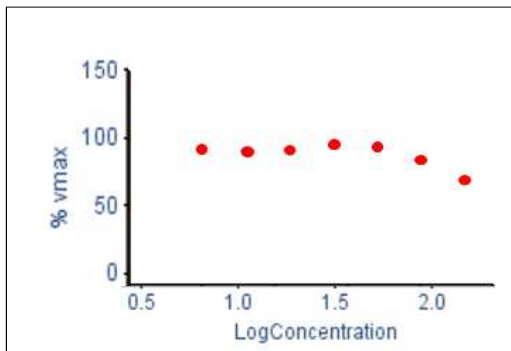
(A) N6022



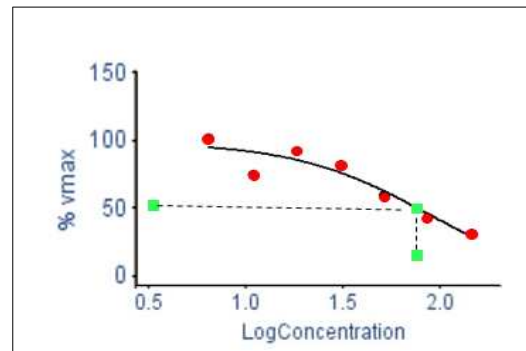
(B) 94 EtOH extract



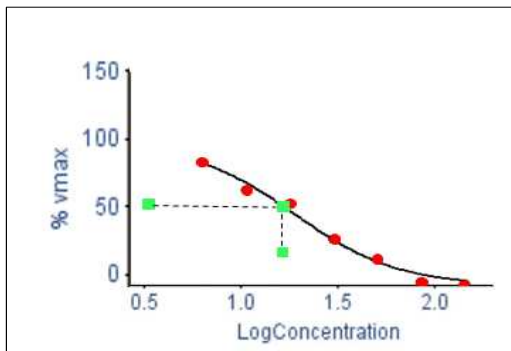
(C) 94-1 *n*-Hex fraction



(D) 94-1 EtOAc fraction



(E) 94-1 *n*-BuOH fraction



(F) 94-1 H<sub>2</sub>O fraction

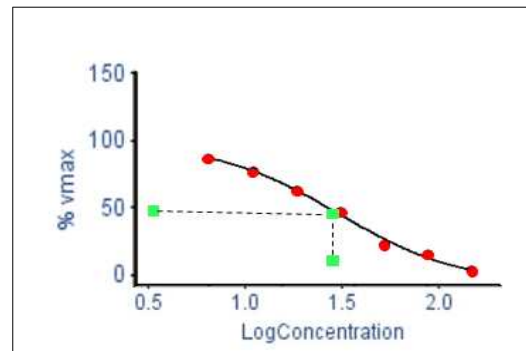


Figure 133. Results of GSNOR reductase inhibition assay from branches of *P. villosa*.

#### 4-6. 율노리나무 추출 성분 구조 분석

##### 4-6-1. 화합물 구조 동정

율노리나무 분획물 중 *n*-butanol fraction이 다른 추출물이나 조추출물에 비해 강한 억제성 활성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 이는 *n*-butanol이 활성 구성물을 분리해 내기에 좋은 재료임을 의미했다. Ethyl acetate fraction의 구성 성분을 알아보기 위해 액체크로마토그래피-질량분석기(Ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)를 이용하여 탐색을 시행하였다. 분석 후 스펙트럼 데이터 프로파일링 결과는 페놀성 화합물의 고해상도 MS와 MS/MS 스펙트럼 특성들을 통상적인 표준 화합물의 특성과 비교함으로써 확인되었다(Figure 51). 머무름시간 (retention time)이 5.16, 6.45, 8.35, 12.20, 14.70분인 화합물은 각각 Procyanidin B2, Procyanidin C1, Rutin, Baicalin, Wogonoside 확인되었다(Table 42, Figure 134-136).

Table 42. Identification of five flavonoid compounds from *P. villosa* extract.

R <sub>T</sub> (min)	[MH] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	Calculated Formula	Δppm	MS/MS ( <i>m/z</i> )	Identification
5.14	577.1339	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	-0.183	289,407,425,451	Procyanidin B2
6.45	865.1964	C <sub>45</sub> H <sub>37</sub> O <sub>18</sub>	-1.249	287,407,577,695,739	Procyanidin C2
8.35	609.1449	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	-0.182	301	Rutin
12.20	445.0765	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	0.005	269,175	Baicalin
14.70	459.0924	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	0.440	283,175	Wogonoside

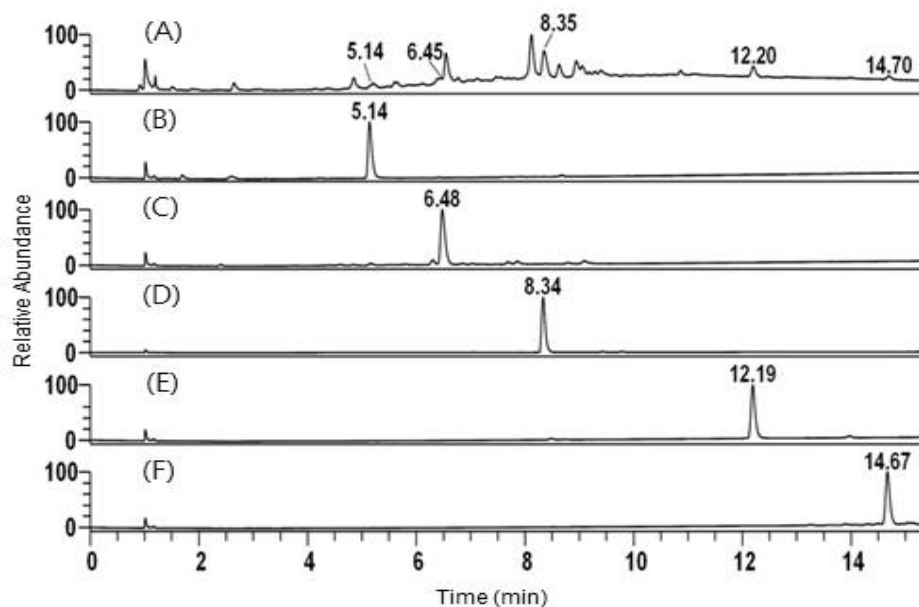


Figure 134. The photodiode array chromatogram of *P. villosa* leaf *n*-butanol fraction and five flavonoid compounds is shown (UHPLC-HRMS); (A) *P. villosa* leaf *n*-butanol fraction. (B) Procyanidin B2, (C) Procyanidin C2, (D) Rutin, (E) Baicalin, (F) Wogonoside.

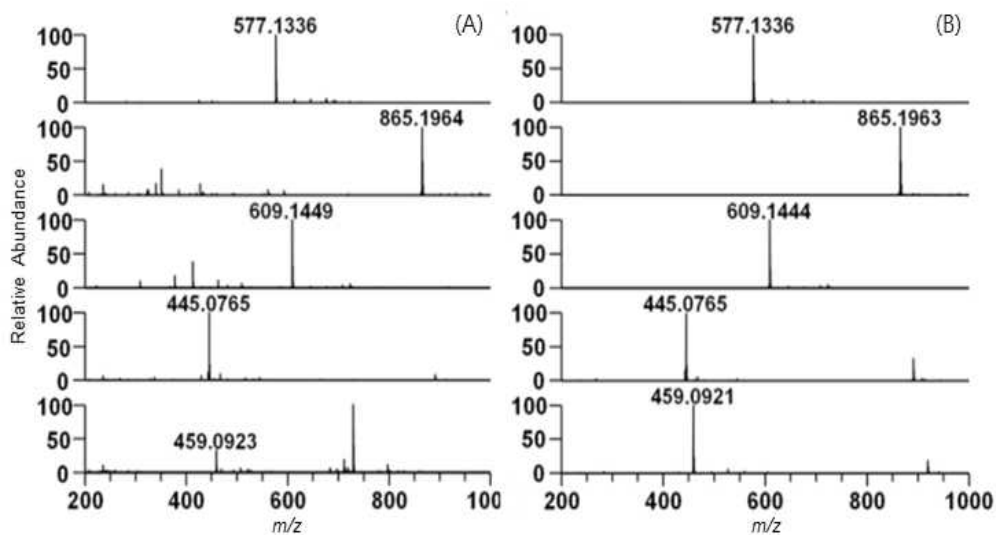


Figure 135. The high-resolution mass spectra of BuOH fraction (A) are compared with those of five standard compounds (B).

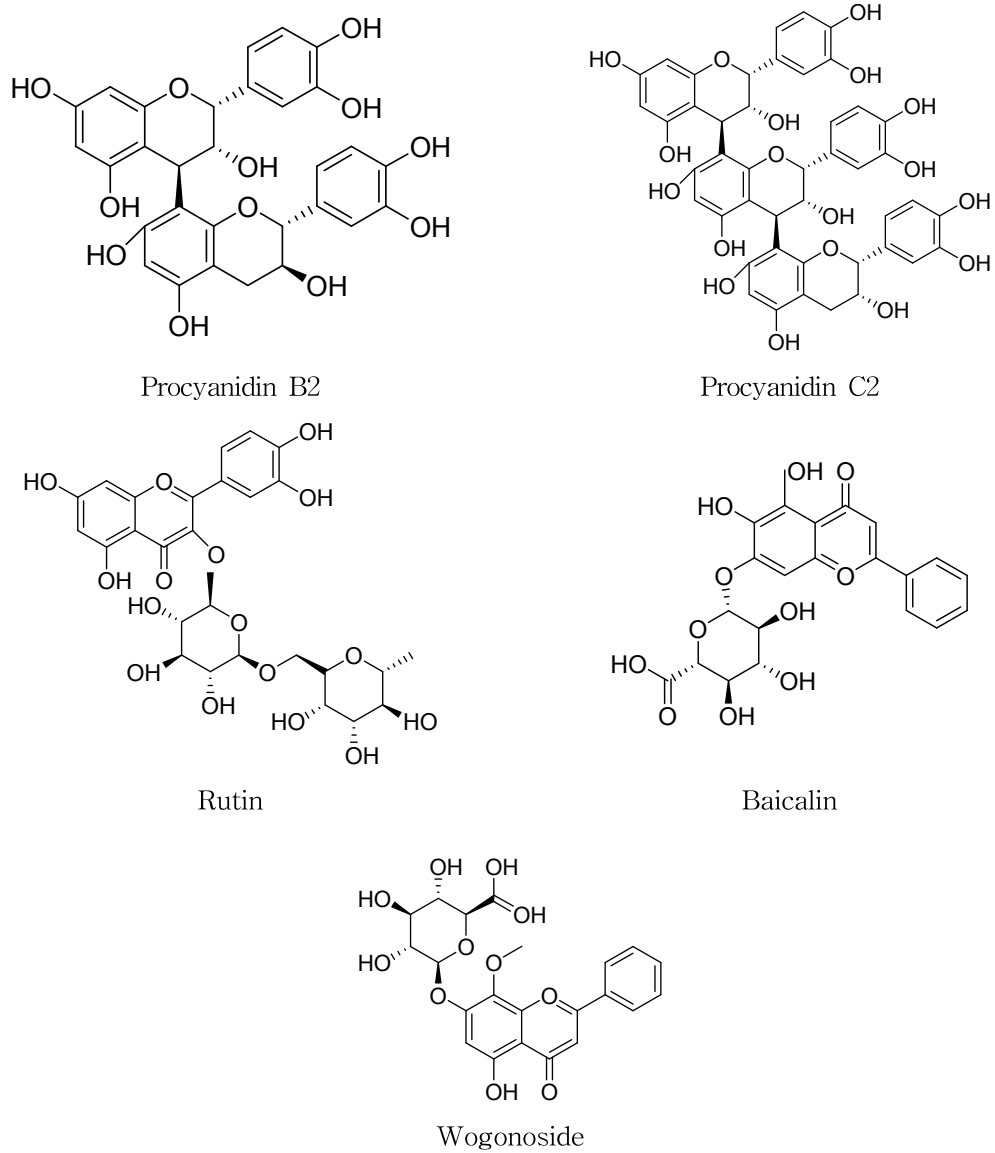


Figure 136. Structures of the identified compound from *P. villosa* leaf *n*-butanol fraction is shown (UHPLC-HRMS).



#### 4-6-2. 추출 성분 분석

##### 4-6-2-1. 윤노리나무 70% ethyl alcohol 추출물(잎, 가지)

윤노리나무 잎 70% ethyl alcohol 추출물을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석 결과 Quercitrin, Quercetin 2종을 확인하였다. 이 두 성분은 곰의말채나무 및 조록나무에서도 확인된 성분들이다(Table 43, Figure 137-139).

Table 43. Identification of standards from of *P. villosa* 70% ethyl alcohol extract.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
13.19	446.81	300.82	Quercitrin
17.20	300.80	178.88, 150.85	Quercetin

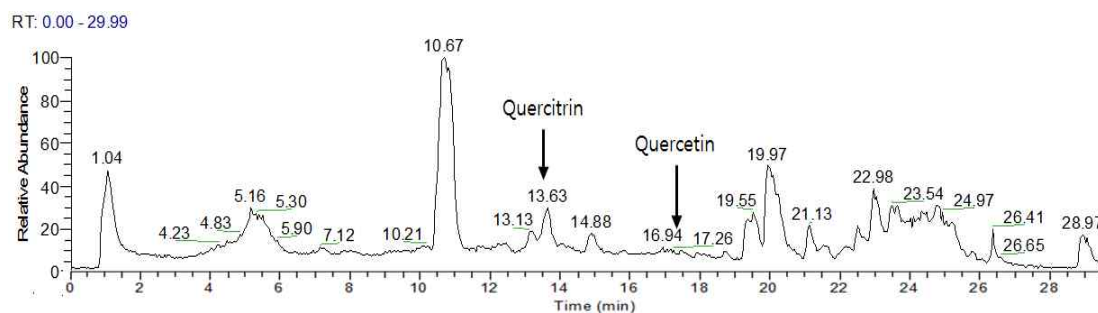


Figure 137. Total ion chromatogram (MS1) of *P. villosa* 70% ethyl alcohol extract.

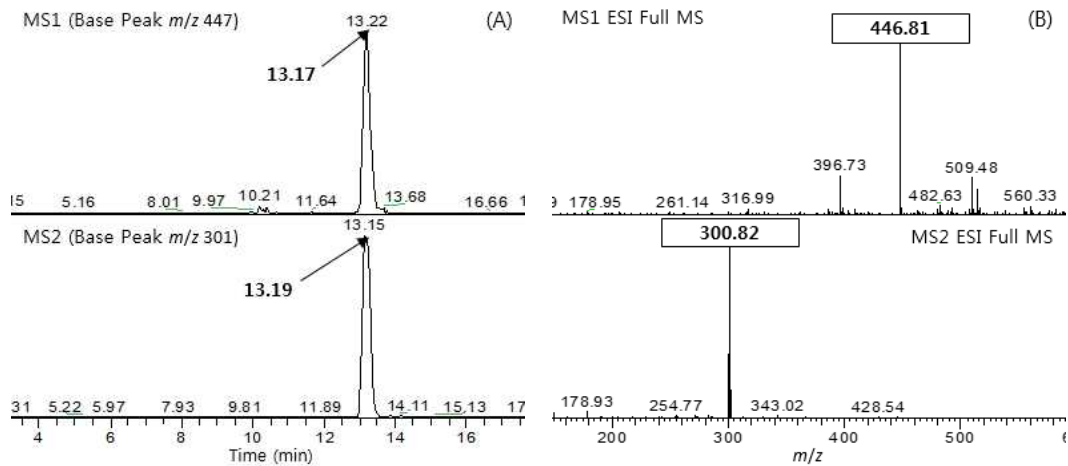


Figure 138. Identification of Quercitrin from *P. villosa* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

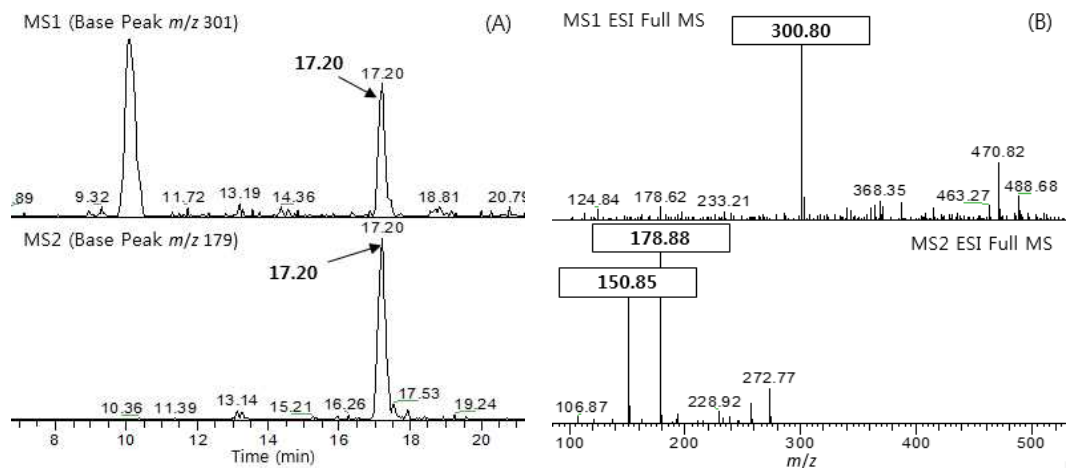


Figure 139. Identification of Quercetin from *P. villosa* 70% ethyl alcohol extract; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

4-6-2-2. 율노리나무 잎 ethyl acetate fraction

율노리나무 잎 ethyl acetate fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석 진행하였다. 그 결과 율노리나무 70% ethyl alcohol 추출물에서와 동일한 Hyperoside, Quercitrin, Quercetin 3종 성분을 포함하고 있었다(Table 44, Figure 140-143).

Table 44. Identification of standards from of *P. villosa* (leaves)ethyl acetate fraction.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H]	MS2 (MS/MS)	Identification
10.60	462.72	300.91	Hyperoside
13.09	446.80	300.80	Quercitrin
17.04	300.86	178.97, 151.02	Quercetin

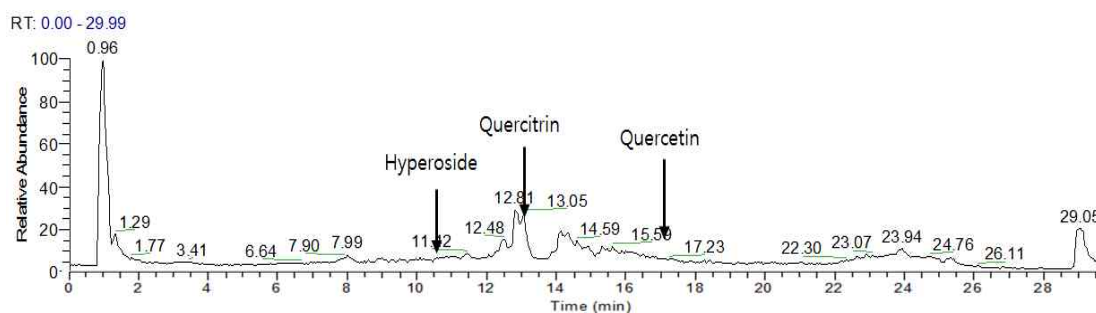


Figure 140. Total ion chromatogram (MS1) of *P. villosa* (leaves) ethyl acetate fraction.

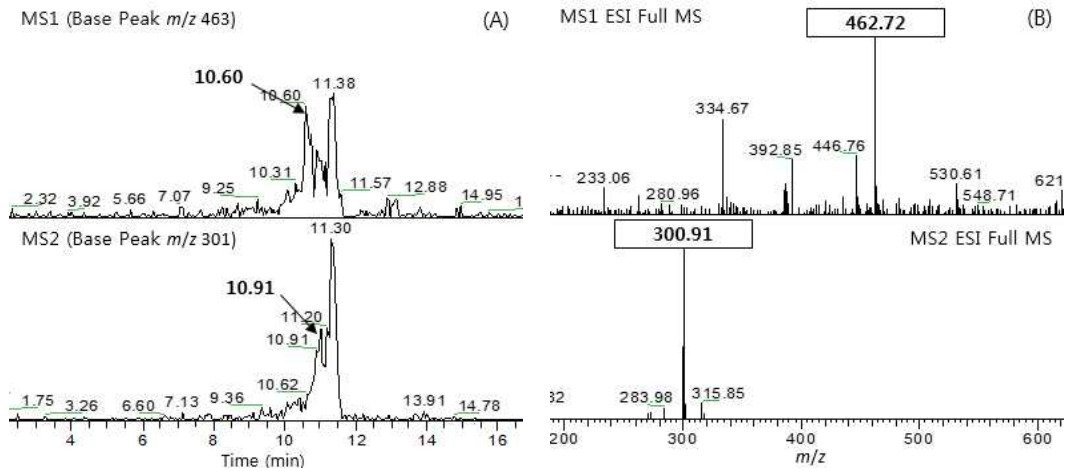


Figure 141. Identification of Hyperoside from *P. villosa* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

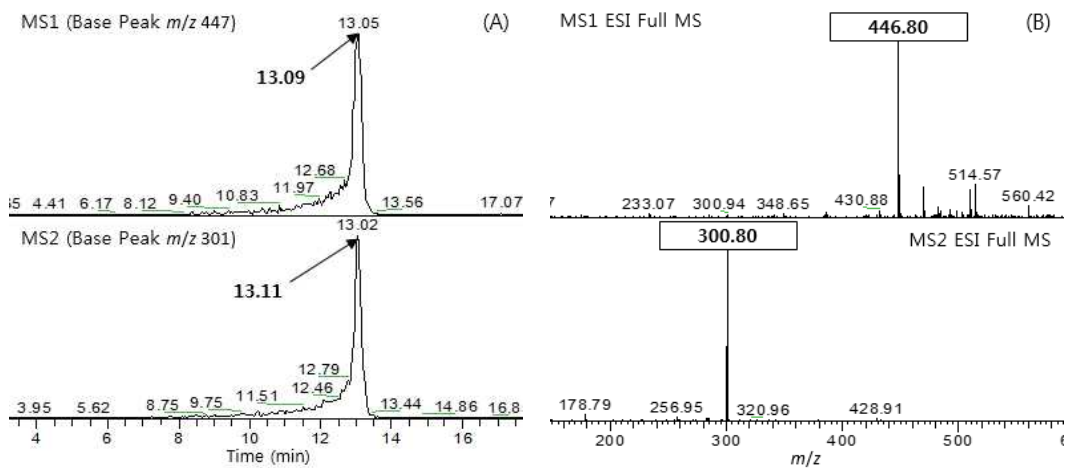


Figure 142. Identification of Quercitrin from *P. villosa* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

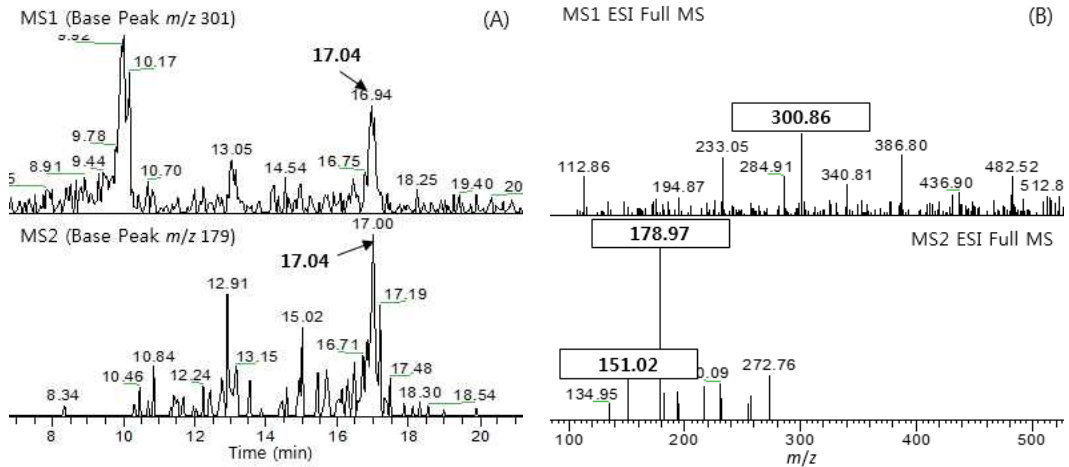


Figure 143. Identification of Quercetin from *P. villosa* (leaves) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

### 2-6-2-3. 윤노리나무 잎 *n*-butanol fraction

윤노리나무 잎 *n*-butanol fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석에서는 윤노리나무 잎 ethyl acetate fraction에서 확인된 Hyperoside, Quercitrin을 포함하여 Rutin, Nicotiflorin을 확인할 수 있었다(Table 45, Figure 144-148).

Table 45. Identification of standards from of *P. villosa* (leaves) *n*-butanol fraction.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
11.38	462.90	300.83	Hyperoside
11.15	608.84	300.77	Rutin
12.59	592.85	284.79	Nicotiflorin
13.06	446.76	300.92	Quercitrin

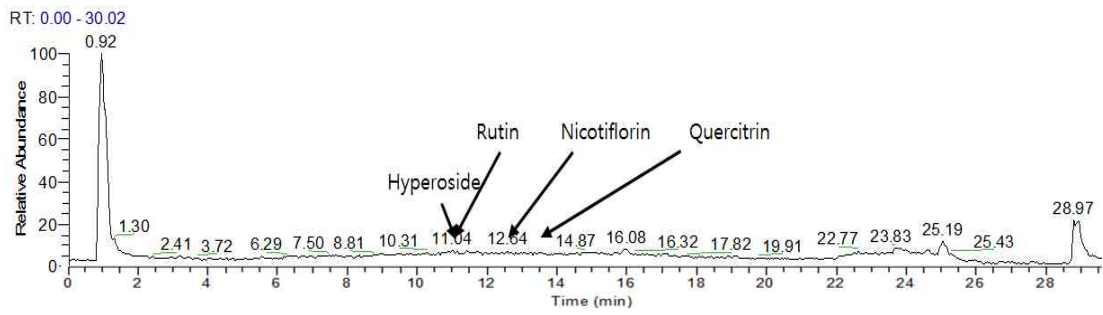


Figure 144. Total ion chromatogram (MS1) of *P. villosa* (leaves) *n*-butanol fraction.

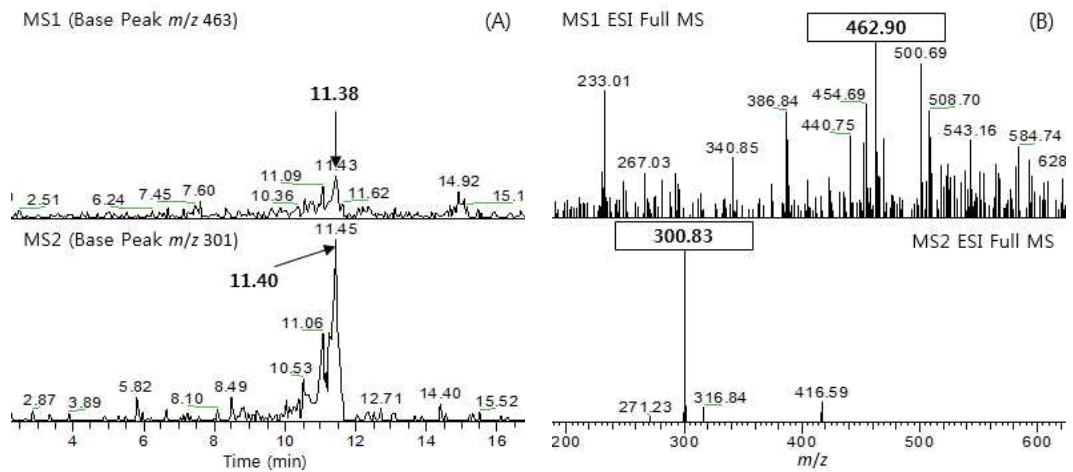


Figure 145. Identification of Hyperoside from *P. villosa* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

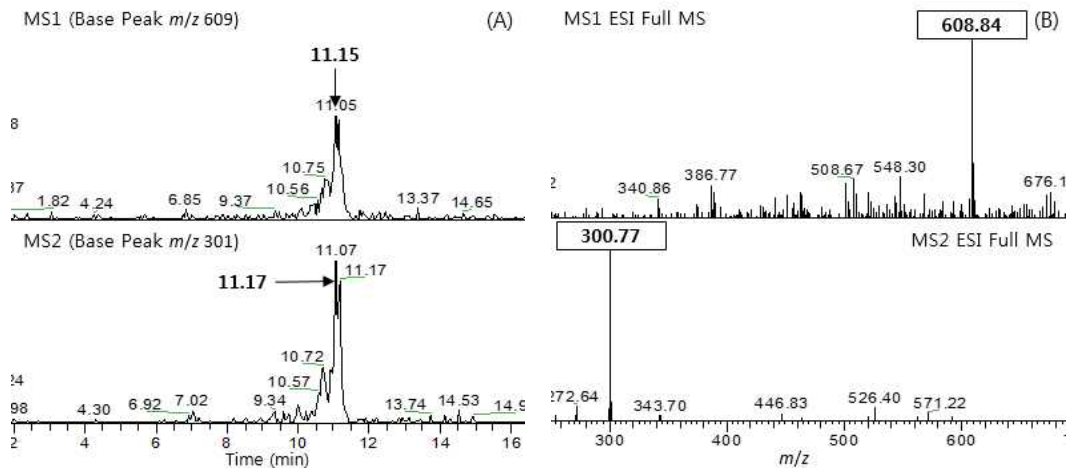


Figure 146. Identification of Rutin from *P. villosa* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

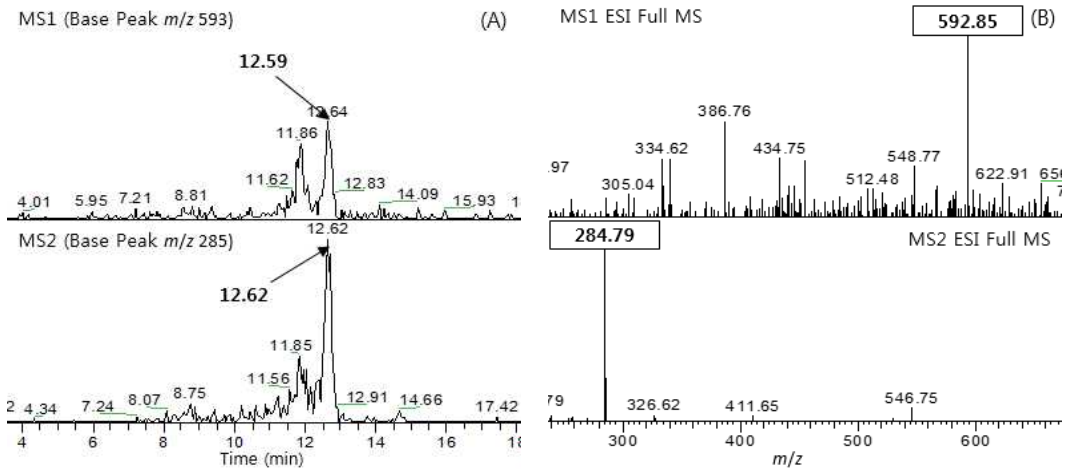


Figure 147. Identification of Nicotiflorin from *P. villosa* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

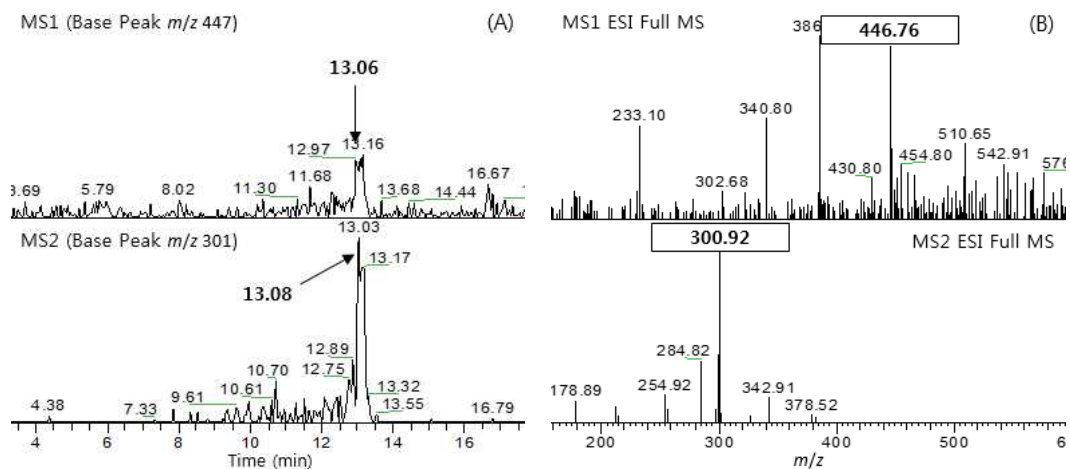


Figure 148. Identification of Quercitrin from *P. villosa* (leaves) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

4-6-2-4. 윤노리나무 가지 ethyl acetate fraction

윤노리나무 가지 ethyl acetate fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석 결과는 Catechin, Epicatechin gallate, Hyperoside 등 3종이 확인하였다(Table 46, Figure 149-152).

Table 46. Identification of standards from of *P. villosa* (Branch) ethyl acetate fraction.

$R_t$ (min, MS1)	MS1 $[M-H]^-$	MS2 (MS/MS)	Identification
3.41	288.83	244.93, 204.61	Catechin
11.14	440.65	288.90, 16899	Epicatechin gallate
11.43	462.86	300.90	Hyperoside



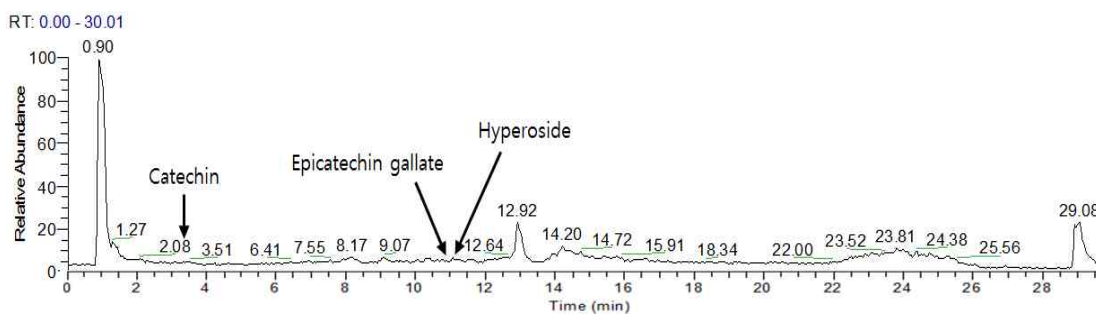


Figure 149. Total ion chromatogram (MS1) of *P. villosa* (Branch) ethyl acetate fraction.

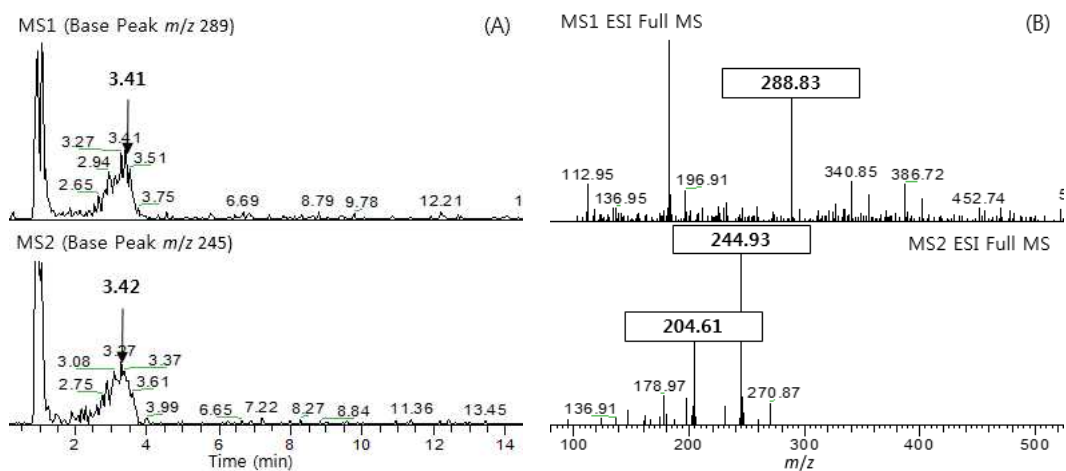


Figure 150. Identification of Catechin from *P. villosa* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

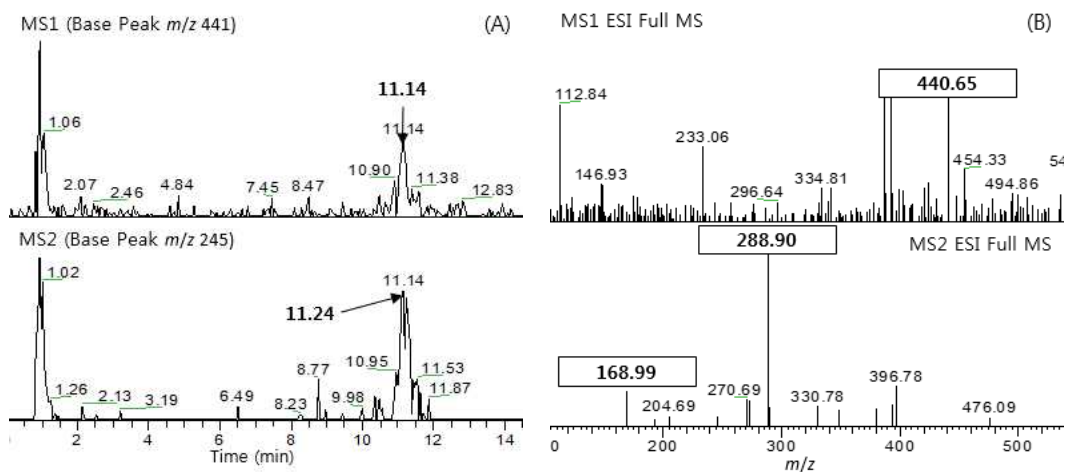


Figure 151. Identification of Epicatechin gallate from *P. villosa* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

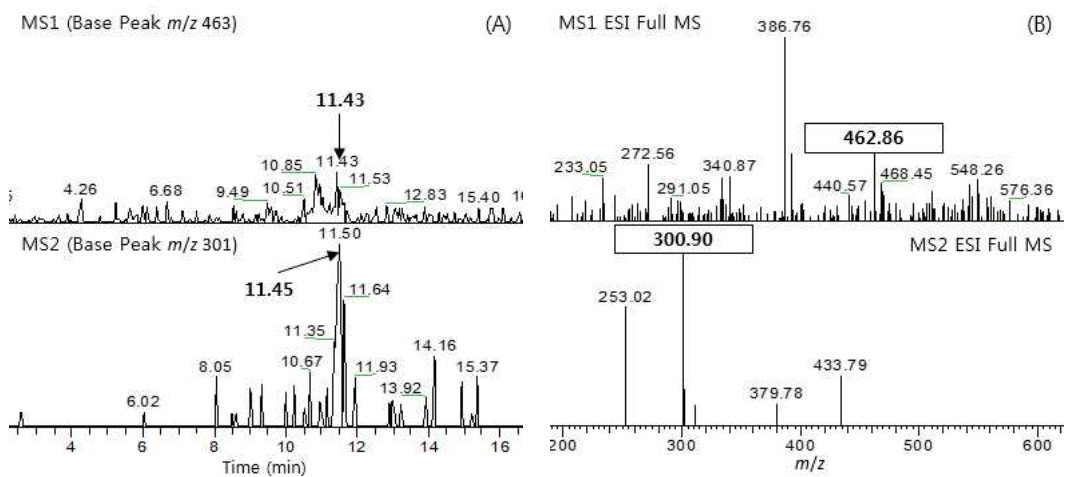


Figure 152. Identification of Hyperoside from *P. villosa* (Branch) ethyl acetate fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

4-6-2-2. 윤노리나무 가지 *n*-butanol fraction

윤노리나무 가지 *n*-butanol fraction을 표준물질(STD) 11종과 비교 분석 결과 Rutin 1종이 확인하였다(Table 47, Figure 153-154).

Table 47. Identification of standards from of *P. villosa* (Branch) *n*-butanol fraction.

R <sub>t</sub> (min, MS1)	MS1 [M-H] <sup>-</sup>	MS2 (MS/MS)	Identification
11.15	608.77	300.80	Rutin

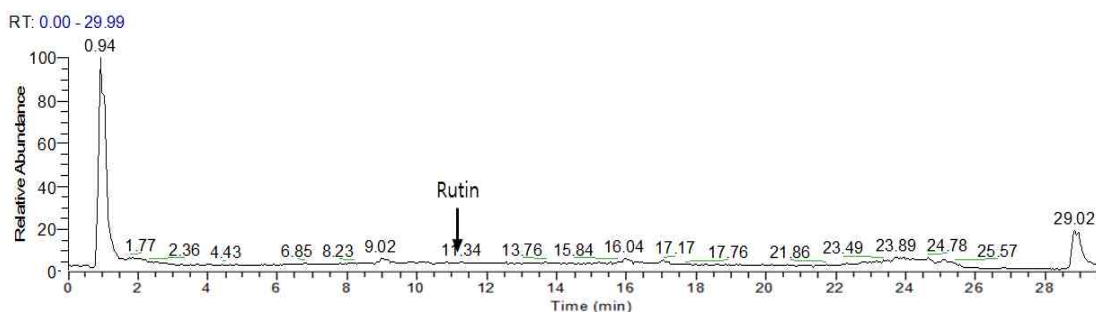


Figure 153. Total ion chromatogram (MS1) of *P. villosa* (Branch) *n*-butanol fraction.

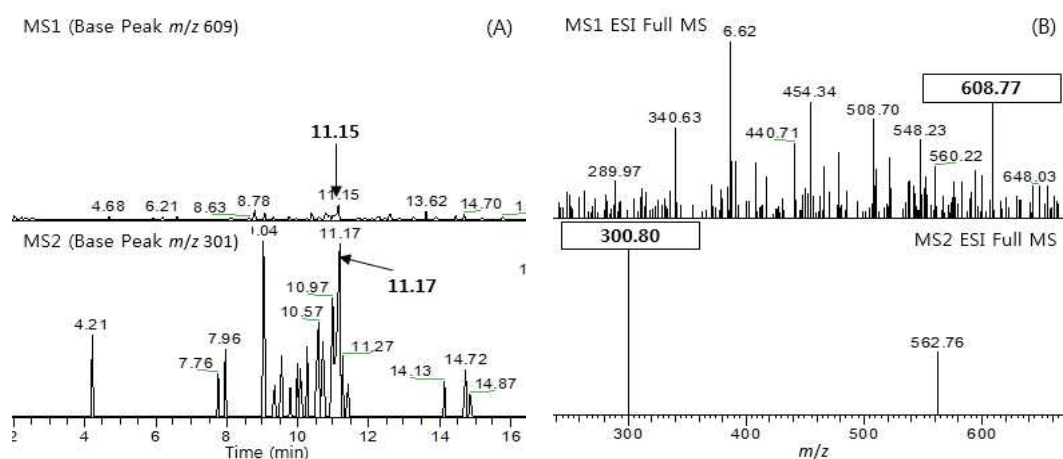


Figure 154. Identification of Catechin from *P. villosa* (Branch) *n*-butanol fraction; (A) Total ion chromatogram. (B) MS spectrum.

#### 4-8. 율노리나무 추출 성분 동물 실험

##### 4-8-1. 기도과민성 미치는 영향

천식유도군(OVA)은 methylcholine 농도가 증가함에 따라 정상대조군(NC)에 비하여 기도과민성이 크게 증가하였다. 반면, 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유도군(OVA)에 비해 methylcholine 농도가 증가함에 따라 기도과민성이 크게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(94-30), 시료물질 60 mg/kg(94-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 methylcholine 농도 10 mg/mL에서 1.873, 20 mg/mL에서 0.527, 30 mg/mL에서 2.177으로 나타내었다. F 분포도에서의 기각치 3.63(집단간(3)-1=2, 집단내(19)-3=16) 보다 모두 낮은 값으로 확인이 되었다. 따라서 시료물질 94 투여한 군에서 천식대조군(OVA)에 비해 methylcholine 농도가 증가함에 따라 기도과민성이 감소하였으나 이러한 감소는 천식대조군과 비교하여 통계학적 유의성 없음을 확인할 수 있었다(Table 48, Figure 155).

Table 48. Effects of test material-94 on airway

hyperresponsiveness and result of one-way ANOVA.

Airway Hyperresponsiveness (Penh)	Concentration (mg/mL)			
	0	10	20	30
NC	0.31±0.04	0.43±0.03	0.64±0.14	1.30±0.10
OVA	0.77±0.17	1.46±0.53	4.52±1.21	6.68±1.77
DEX	0.51±0.10	0.59±0.18	1.44±0.39	2.84±0.90
94-30	0.60±0.12	1.16±0.66	3.12±1.32	5.99±2.98
94-60	0.65±0.18	1.35±0.40	3.57±1.22	5.13±1.31
F-value		0.527	2.177	0.862
F-distribution		3.63	3.63	3.63
P-value	OVA/94-30	0.744	0.199	0.941
	OVA/94-60	0.961	0.431	0.260

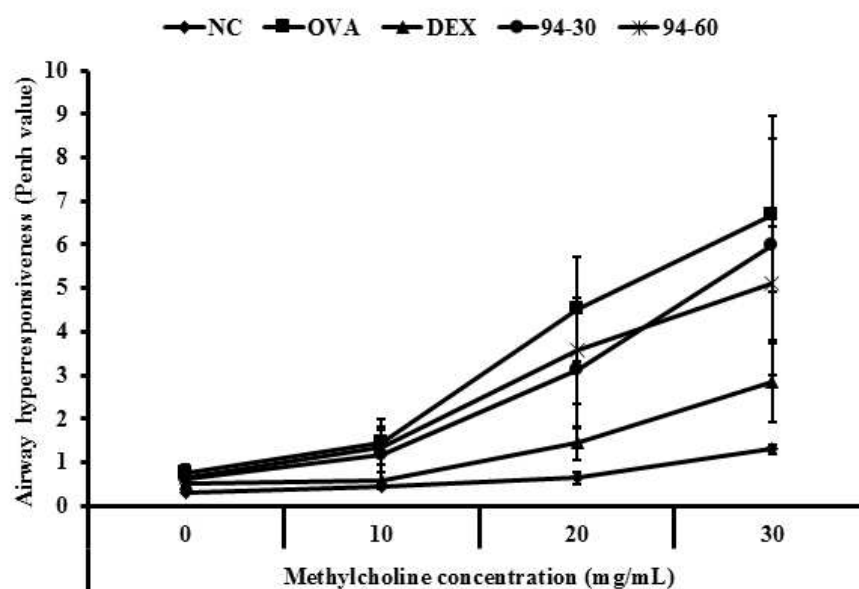


Figure 155. Effects of test material-94 on airway hyperresponsiveness.

#### 4-8-2. 활성산소족 억제 효과

천식유도군(OVA)은 정상대조군(NC)에 비해 기관지 폐포 세척액 내 반응성활성 산소족의 생성이 현저하게 증가하였다. 반면, 약물대조군이 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유도군(OVA)에 비해 반응성 활성산소족의 생성이 약 57.5% 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(94-30), 시료물질 60 mg/kg(94-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 4.425로 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 높은 값을 나타냄을 확인할 수 있었다. 그러나 P-value을 결과는 OVA/94-30에서 0.879로(P>0.05) 유의성 없었고, OVA/94-60에서는 0.042로(P<0.05) 유의성 관찰되었다. 시료물질 94 투여군 중, 60 mg/kg 투여군(94-60)은 천식유도군(OVA)에 비해 반응성 활성산소족 생성이 23.0% 억제되었다(Table 49, Figure 156).

Table 49. Effects of test material-94 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	ROS Production (Fluorencence)
NC	4,676.72±492.04
OVA	10,461.09±1,892.30
DEX	4,443.63±1,604.96
94-30	9,825.37±1,695.79
94-60	8,053.88±963.62
F-value	4.425
F-distribution	3.55
P-value	
OVA/94-30	0.879
OVA/94-60	0.042

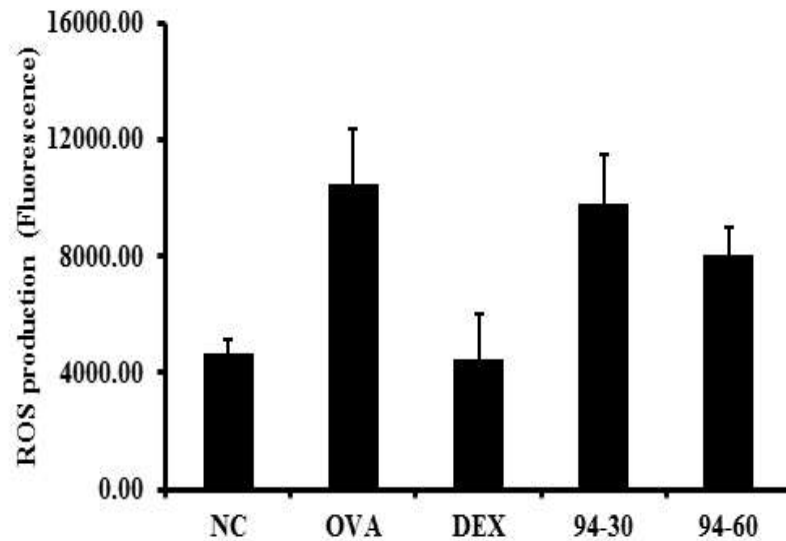


Figure 156. Effects of test material-94 on reactive oxygen species in bronchoalveolar lavage fluid.

#### 4-8-3. 폐포 세척액 내 염증세포 침윤 억제 효과

천식유발군(OVA)에서 기관지 폐포 세척액 내 염증세포의 수가 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면, Dexamethason 투여군(DEX)에서는 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포 수가 크게 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(94-30), 시료물질 60 mg/kg(94-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. 그 결과, F-value는 Eosinophil에서 6.721, Macrophage에서 14.054, Lymphocyte에서 24.741, Neutrophil에서 1.951, Total cell에서 16.539로 확인이 되었고, Neutrophil를 제외하고 F 분포도의 기각치인 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 높게 나타났다. Eosinophil의 P-value는 OVA/94-30의 0.09( $P > 0.05$ )로 유의성이 없었으며 OVA/94-60는 0.39( $P < 0.05$ )로 유의성 있었다. Macrophage의 P-value는

OVA/94-30에서 0.021(P<0.05), OVA/94-60서 0(P<0.05)로 유의성 있었고, Lymphocyte의 OVA/94-30에서 0.002(P<0.05), OVA/94-60서 0.003(P<0.05)로 유의성 있었다. Total cell에서의 또한 P-value는 OVA/94-30에서 0.014(P<0.05), OVA/94-60서 0.002(P<0.05)로 유의성 있었다. 그리고 시료물질 94 투여군과 천식유발군(OVA)의 염증세포 수를 비교해 보면, 30 mg/kg 투여군(94-30)은 29.3%, 60 mg/kg 투여군(94-60)은 40.8%가 감소되었다. 특히, 호산구와 대식세포는 천식유발군(OVA)에 비해 시료물질 71의 30 mg/kg 투여군(94-30)은 각각 30.8%, 24.6% 감소하였으며, 60 mg/kg 투여군(94-60)은 각각 38.6%, 38.9%가 감소되었다(Table 50, Figure 157).

Table 50. Effects of test material-94 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Cell (per×400 magnification site)					
	Eosinophil	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil	Total cell	
NC	0	11.1±1.65	0.35±0.14	0.25±0.18	11.7±1.72	
OVA	118.29±34.75	90.86±10.96	9.82±2.95	7.54±6.56	226.50±41.99	
DEX	15.65±4.58	26.05±2.58	4.45±0.97	2.85±1.04	49±6.12	
94-30	81.89±14.46	68.46±14.50	8.46±1.31	1.36±4.71	160.18±21.63	
94-60	72.61±20.32	55.50±12.16	4.86±0.81	1.21±2.38	134.18±25.42	
F-value	6.721	14.054	24.741	1.951	16.539	
F-distribution	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	
P-value	OVA/94-30	0.090	0.021	0.002	0.958	0.014
	OVA/94-60	0.039	0.000	0.003	0.247	0.002



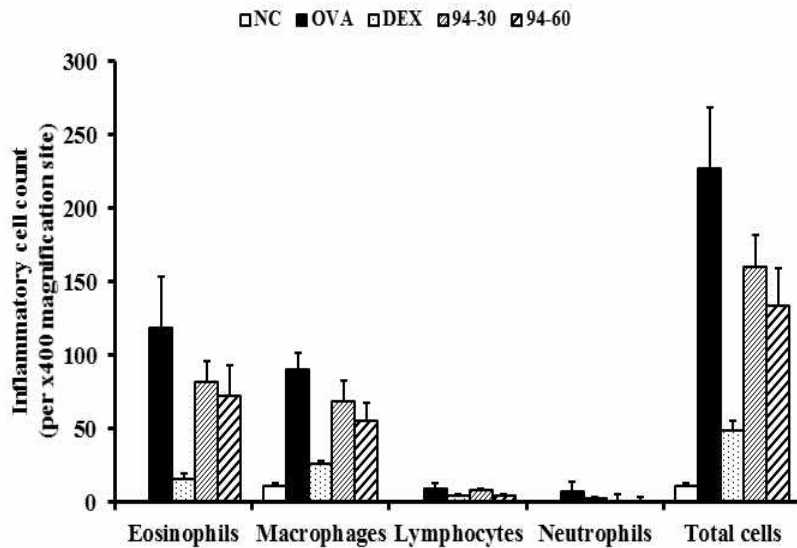


Figure 157. Effects of test material-94 on inflammatory cell count in bronchoalveolar lavage fluid.

#### 4-8-4. 염증성 Cytokine 생성 억제 효과

천식유발군(OVA)에서 기관지 폐포 세척액 내 Interleukin-5 와 Interleukin - 13의 생성이 정상대조군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 Immunoglobulin-E의 생성이 크게 감소되었다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(94-30), 시료물질 60 mg/kg(94-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시한 결과, F-value는 Interleukin-5에서 13.678, Interleukin - 13에서 4.968으로 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 모두 높게 값으로 확인이 되었다. P-value을 확인한 결과 Interleukin-5의 OVA/94-30은 0(P<0.05)로 유의성이 있었고, OVA/94-60은 0.085(P>0.05) 값으로 유의성이 관찰되지 않았다. 또한 Interleukin-13의 OVA/94-30은 0.044(P<0.05)로 유의성이 있었고, OVA/94-60은

0.335( $P>0.05$ ) 값으로 유의성이 관찰되지 않았다. 그리고 시료물질 94 투여군과 천식유발군(OVA)과의 Interleukin의 농도를 비교한 결과, Interleukin-5는 30 mg/kg 투여군(94-30)은 46.8%, 60 mg/kg 투여군(94-60)은 23.2% 감소되었으며, Interleukin-13은 30 mg/kg 투여군(94-30)은 34.7%, 60 mg/kg 투여군(94-60)은 14.8%가 감소되었다(Table 51, Figure 158-159).

Table 51. Effects of test material-94 on IL-5 and IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Cytokine (pg/mL)	
	IL-5	IL-13
NC	7.01±2.41	13.51±2.13
OVA	34.91±4.85	78.89±14.58
DEX	25.37±7.58	34.07±9.58
94-30	18.57±5.35	51.55±20.60
94-60	26.83±7.10	67.19±12.57
F-value	13.678	4.968
F distribution	3.55	3.55
P-value	OVA/94-30	0.000
	OVA/94-60	0.085

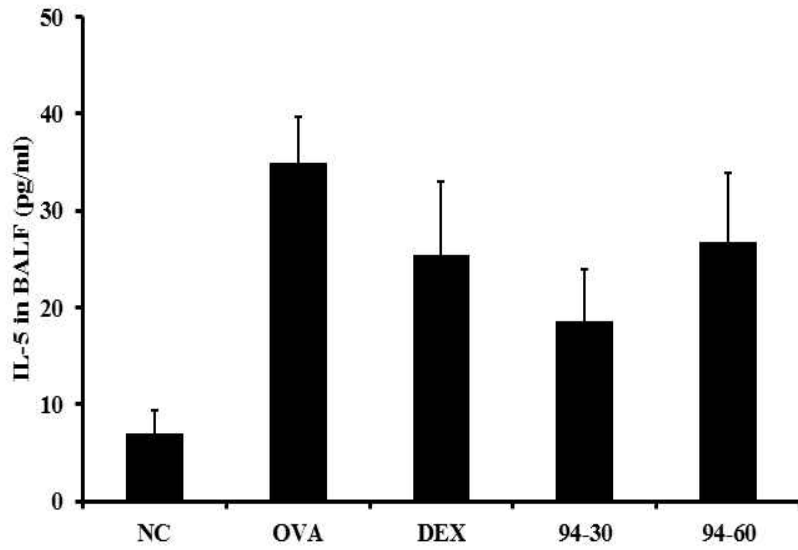


Figure 158. Effects of test material-94 on IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid.

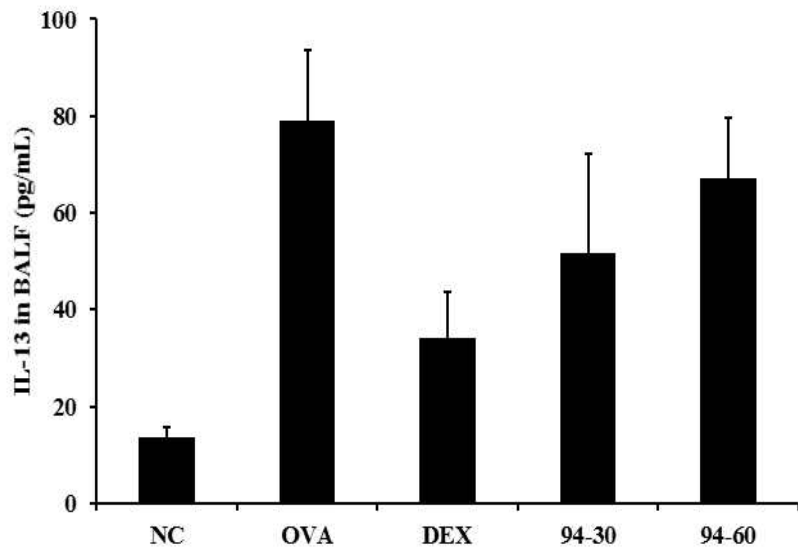


Figure 159. Effects of test material-94 on IL-13 production in bronchoalveolar lavage fluid.

#### 4-8-5. Immunoglobulin-E 생성 억제 효과

천식유발군(OVA)에서 Ovalbumin 특이성 Immunoglobulin-E의 생성이 정상대조군에 비해 현저하게 증가하였으며, 반면 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 Immunoglobulin-E의 생성이 크게 감소되었다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(94-30), 시료물질 60 mg/kg(94-60) 처리 결과를 활용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. 그 결과, F-value는 6.354로 F 분포도에서의 기각치 3.55(집단간(3)-1=2, 집단내(21)-3=18) 보다 높게 나타났고, P-value을 확인한 결과 OVA/94-30은 0.966( $P>0.05$ )으로 유의성이 관찰되지 않았으나, OVA/94-60은 0.037( $P<0.05$ ) 유의적 차이가 있었다. 시료물질 94 투여군 중 60 mg/kg 투여군(94-60)에서 천식유발군(OVA)에 비해 31.0% Ovalbumin 특이성 Immunoglobulin-E의 생성이 감소되었다(Table 52, Figure 160).

Table 52. Effects of test material-94 on ovalbumin-specific IgE in serum and result of one-way ANOVA.

Type	OVA-specific IgE (ng/mL)
NC	0
OVA	141.67±26.38
DEX	19.27±7.61
42-30	147.83±29.69
42-60	97.78±29.74
F-value	6.354
F distribution	3.55
P-value	
OVA/42-30	0.966
OVA/42-60	0.037

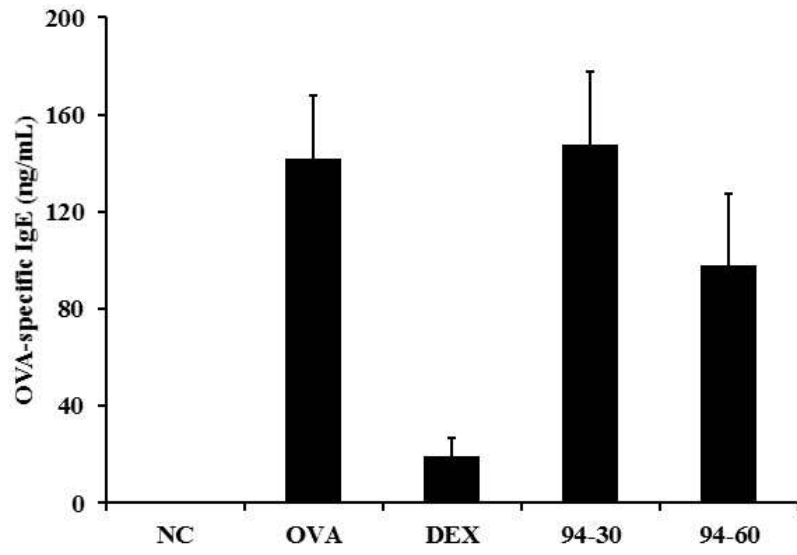


Figure 160. Effects of test material-94 on ovalbumin-specific IgE in serum.

#### 4-8-6. 폐조직 내 염증세포 침윤 억제 효과

Ovalbumin으로 유발된 천식유발군(OVA)은 정상군(NC)에 비해 기관지 주위 염증세포의 침윤이 크게 증가하였다. 반면, 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포의 침윤이 감소되었다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(94-30), 시료물질 60 mg/kg(94-60) 처리 조직의 염증 및 점액생산 지수를 확인하기 위해 이미지분석소프트웨어 (IMT-i software, Vancouver, Canada)를 이용하여 측정 한 결과, F-value는 3.536로 F 분포도에서의 기각치 3.89(집단간(3)-1=2, 집단내(15)-3=12) 보다 낮게 나타났다. P-value값을 확인한 결과 OVA/94-30은 0.694( $P>0.05$ )로 유의성이 없었고, OVA/94-60 또한 0.075( $P>0.05$ ) 유의적 차이가 확인되지 않았다. 따라서, 94 시료물질 60 mg/kg처리한 투여군(94-60)은 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포 침윤의 미약한 감소가 관찰되었다(Table 53, Figure 161-162).

Table 53. Effects of test material-94 on inflammatory responses in lung tissue and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory Responses (%)
NC	0.52±0.21
OVA	17.09±2.07
DEX	9.27±1.60
94-30	15.79±2.07
94-60	13.77±1.82
F-value	3.536
F-distribution	3.89
P-value	OVA/94-30
	0.694
	OVA/94-60
	0.075

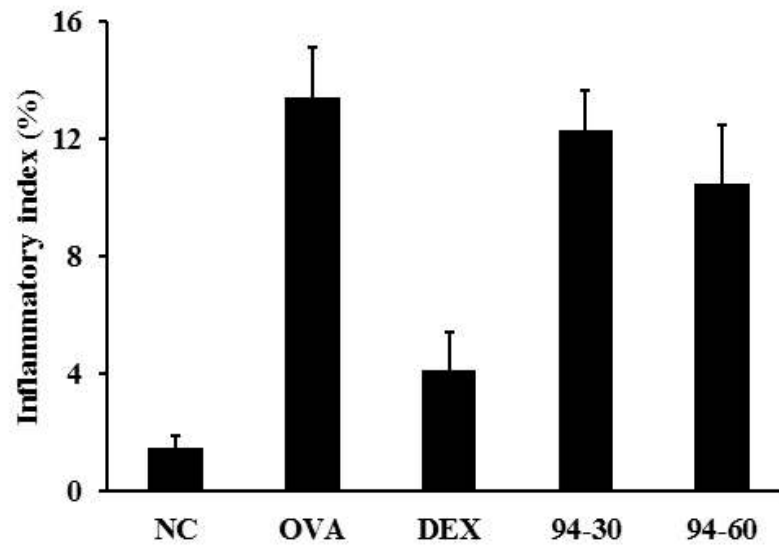
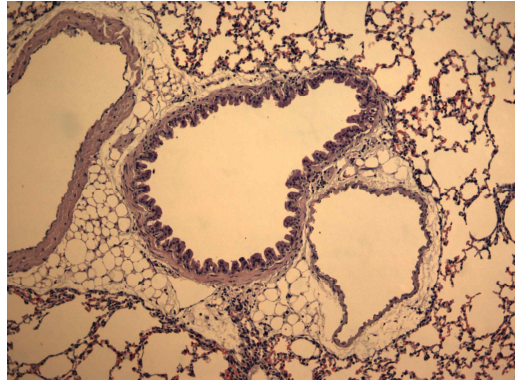
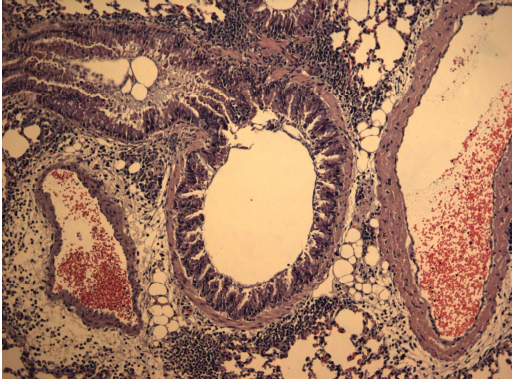


Figure 161. Effects of test material-94 on inflammatory responses in lung tissue.

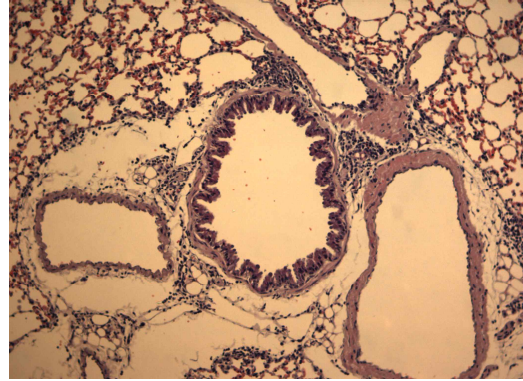
A. NC



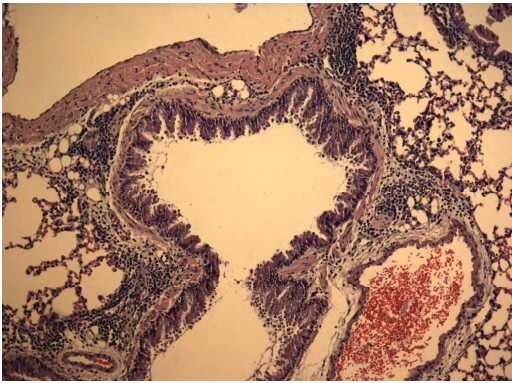
B. OVA



C. DEX



D. 94-30



E. 94-60

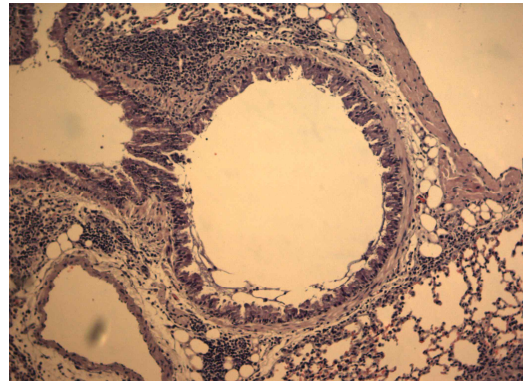


Figure 162. Effects of test material-94 on inflammatory responses in lung tissue.



#### 4-8-7. 점액분비 억제 효과

Ovalbumin으로 유발된 천식유발군(OVA)은 기관지 내 점액분비가 정상군(NC)에 비해 현저하게 증가하였다. 반면 약물대조군인 Dexamethason 투여군(DEX)은 천식유발군(OVA)에 비해 점액분비가 감소하였다.

천식유도군(OVA), 시료물질 30 mg/kg(94-30), 시료물질 60 mg/kg(94-60) 처리 조직의 염증 및 점액생산 지수를 확인하기 위해 이미지분석소프트웨어 (IMT-i software, Vancouver, Canada)를 이용하여 측정된 결과, F-value는 3.536로 F 분포도에서의 기각치 3.89(집단간(3)-1=2, 집단내(15)-3=12) 보다 낮게 나타났다. P-value값을 확인한 결과 OVA/94-30은 0.694( $P>0.05$ )로 유의성이 없었고, OVA/94-60은 0.075( $P>0.05$ ) 유의적가 보이지 않았다. 따라서, 94 시료물질 60 mg/kg처리한 투여군(94-60) 은 천식유발군(OVA)에 비해 염증세포 침윤이 미약한 감소가 관찰되었다(Table 54, Figure 163-164).

Table 54. Effects of test material-94 on mucus production in lung tissue and result of one-way ANOVA.

Type	Inflammatory responses (%)	
NC	0.52±0.21	
OVA	17.09±2.07	
DEX	9.27±1.60	
94-30	15.79±2.07	
94-60	13.77±1.82	
F-value	3.536	
F-distribution	3.89	
P-value	OVA/94-30	0.694
	OVA/94-60	0.075

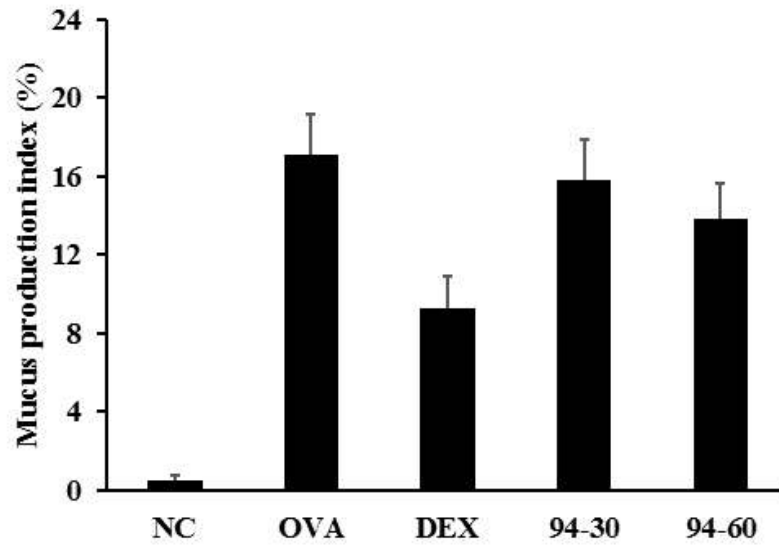
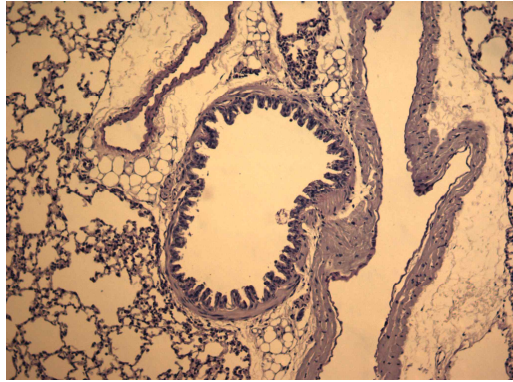
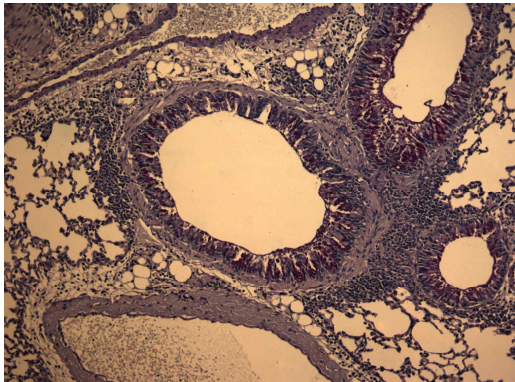


Figure 163. Effects of test material-94 on mucus production in lung tissue.

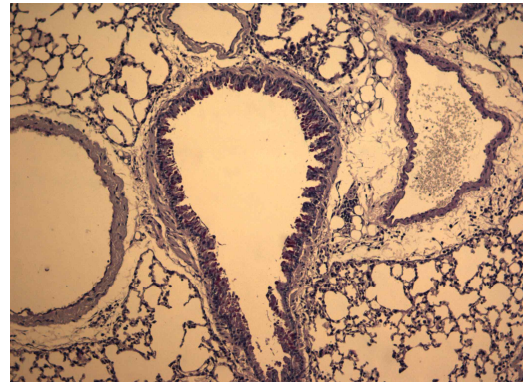
A. NC



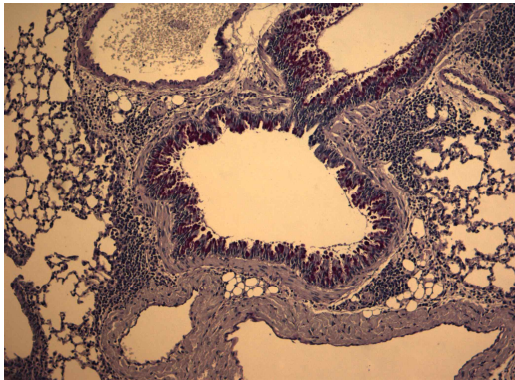
B. OVA



C. DEX



D. 94-30



E. 94-60

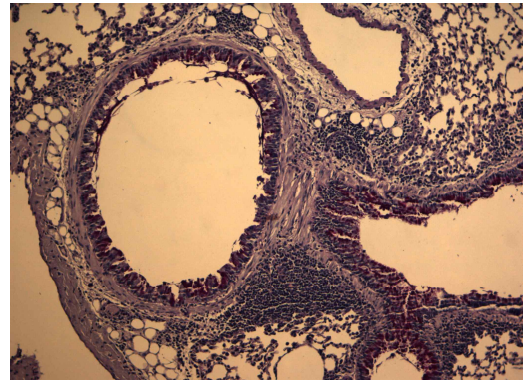


Figure 164. Effects of test material-94 on mucus production in lung tissue.

## 5. 조록나무 추출물 독성 연구

독성 연구를 위해 잎, 가지 포함한 조록나무 70% 에탄올 추출물을 대량 확보하고, Good Laboratory Practice Regulations (GLP) 시설에서 독성 연구를 진행하였다. 또한, 조록나무 70% 에탄올 추출물 조록나무 추출물 Sprague-Dawley계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 2,000 mg/kg의 용량 및 대조군 (주사용수)의 2군으로 하고, 암수 각각 5마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

본 독성 연구 결과를 종합해보면 조록나무 추출물에 대하여 단회 경구투여 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

### 5-1. 사망유무

수컷(Male)의 대조군(G1)과 시험물질 투여군(G2), 암컷(Female)의 대조군(G1)과 시험물질 투여군(G2)을 14일간 관찰하였다. 그 결과 암수 대조군 및 2,000 mg/kg 투여군에서 사망사례는 없었다(Table 55).

Table 55. Summary of mortality.

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of Animals	Days after Dosing														Mortality	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5



Table 57. Individual clinical signs for female.

Group/ Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical Sign	Hours(Day 0) after Dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	2101	-	-	-	-	-	-
	2102	-	-	-	-	-	-
	2103	-	-	-	-	-	-
	2104	-	-	-	-	-	-
	2105	-	-	-	-	-	-
G2 2,000	2201	-	-	-	-	-	-
	2202	-	-	-	-	-	-
	2203	-	-	-	-	-	-
	2204	-	-	-	-	-	-
	2205	-	-	-	-	-	-

Group/ Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical Sign	Days after Dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 2,000	2201	compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2202	compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2203	compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2204	compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2205	compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-:No observable abnormality

+: observable abnormality

### 5-3. 체중변화

수컷(Male)의 대조군(G1)과 시험물질 투여군(G2), 암컷(Female)의 대조군(G1)과 시험물질 투여군(G2)을 14일간 관찰하였다. 그 결과 수컷(Male) 대조군(G1) 첫날 5마리 평균 166.9 g에서 14일 후 333.8 g으로 166.9 g 증가하였고, 수컷(Male) 시험물질 투여군(G2) 평균 167.5 g에서 14일 후 318.8 g으로 151.3 g이 서서히 증가하였다. 그러나 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다(Table 58, Figure 165).

암컷(Female) 대조군(G1) 첫날 5마리 평균 121.7 g에서 14일 후 193.4 g으로 71.7 g 증가하였고, 암컷(Female) 시험물질 투여군(G2) 평균 121.6 g에서 14일 후 187.7 g으로 66.1 g이 서서히 증가하였으나, 수컷(Male) 시험결과와 마찬가지로 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다(Table 59, Figure 166).

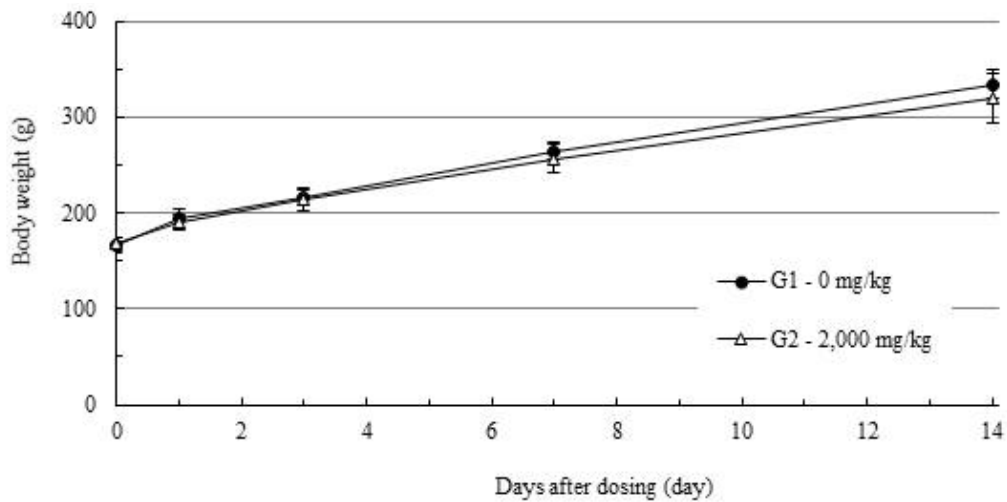


Figure 165. Body weights in male SD rats.



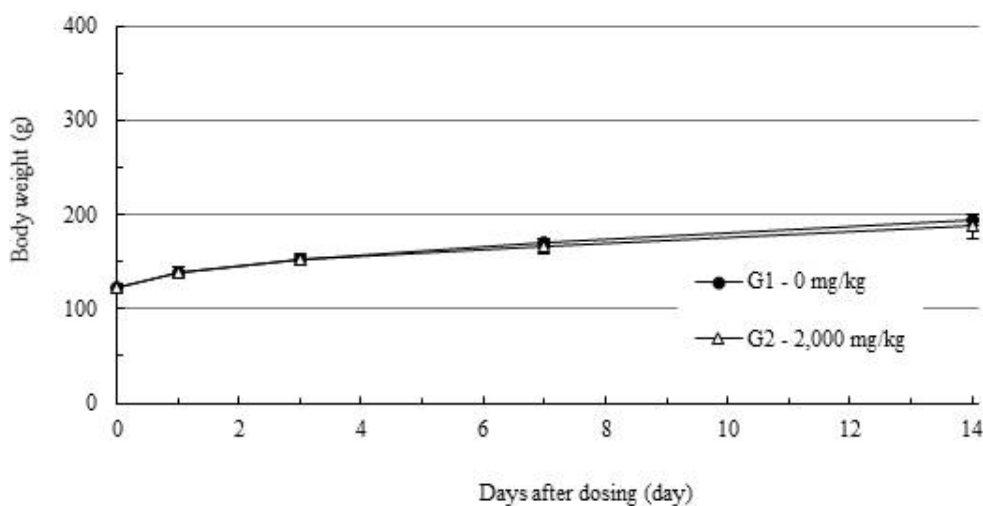


Figure 166. Body weights in female SD rats.

Table 58. Individual body weights for male.

Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Days after Dosing (g)					Gain 0~14
		0	1	3	7	14	
G1 0	1101	174.5	202.6	227.2	273.7	351.9	177.4
	1102	173.9	203.9	227.2	274.3	345.0	171.1
	1103	156.7	181.7	208.0	256.6	315.5	158.8
	1104	161.2	185.9	210.6	258.1	325.0	163.8
	1105	168.4	192.0	210.3	257.5	331.5	163.1
	Mean	166.9	193.2	216.7	264.0	333.8	166.8
	S.D	7.8	9.9	9.7	9.1	14.8	7.4
N	5	5	5	5	5	5	
G2 2,000	1201	155.1	177.0	195.0	231.8	273.6	118.5
	1202	168.6	187.2	217.0	261.2	331.2	162.6
	1203	174.2	193.1	213.1	254.5	320.9	146.7
	1204	171.0	193.1	219.9	265.1	335.2	164.2
	1205	168.8	197.2	220.8	270.4	333.2	164.4
	Mean	167.5	189.5	213.2	256.6	318.8	151.3
	S.D	7.3	7.9	10.6	15.0	25.9	19.8
N	5	5	5	5	5	5	



Table 59. Individual body weights for female.

Group/Dose (mg/kg)	Animal ID	Days after Dosing (g)					Gain 0~14
		0	1	3	7	14	
G1 0	2101	119.9	136.3	146.9	165.8	187.4	67.5
	2102	124.6	143.1	157.9	173.8	200.3	75.7
	2103	122.0	137.1	152.1	173.6	199.2	77.2
	2104	116.6	131.3	147.2	171.3	191.5	74.9
	2105	125.6	145.3	153.8	163.5	188.6	63.0
	Mean	121.7	138.6	151.6	169.6	193.4	71.7
	S.D	3.6	5.6	4.6	4.7	6.0	6.1
N	5	5	5	5	5	5	
G2 2,000	2201	126.7	145.0	158.8	171.2	197.7	71.0
	2202	116.4	132.4	144.4	152.8	165.7	49.3
	2203	124.2	140.7	153.3	170.0	195.8	71.6
	2204	118.1	134.4	149.6	163.3	184.9	66.8
	2205	122.4	141.4	156.9	170.0	194.4	72.0
	Mean	121.6	138.8	152.6	165.5	187.7	66.1
	S.D	4.3	5.2	5.8	7.7	13.3	9.6
N	5	5	5	5	5	5	

#### 5-4. 육안적 부검조건

관찰기간 종료 후(14일 후) 수컷(Male) 대조군(G1)과 시험물질 투여군(G2), 암컷(Female) 대조군(G1)과 시험물질 투여군(G2)에 대하여 부검을 실시하였다. 그 결과 암수 대조군 및 2,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

Table 60. Summary of necropsy findings.

Sex	Male		Female	
	G1	G2	G1	G2
Group	G1	G2	G1	G2
Dose (mg/kg)	0	2,000	0	2,000
No. of animals	5	5	5	5
Unremarkable findings	5	5	5	5
No. of examined	5	5	5	5

External surface and all organs in body cavity were unremarkable.

Table 61. Individual necropsy findings for male.

Group/ Dose(mg/kg)	Animal ID	Organs*	Necropsy Findings	Type of Sacrifice	Day of Sacrifice
G1 0	1101	All	Unremarkable findings	S	14
	1102	All	Unremarkable findings	S	14
	1103	All	Unremarkable findings	S	14
	1104	All	Unremarkable findings	S	14
	1105	All	Unremarkable findings	S	14
G2 2,000	1201	All	Unremarkable findings	S	14
	1202	All	Unremarkable findings	S	14
	1203	All	Unremarkable findings	S	14
	1204	All	Unremarkable findings	S	14
	1205	All	Unremarkable findings	S	14

\*External surface and organ in body cavity

S: Scheduled

Table 62. Individual necropsy findings for female.

Group/ Dose(mg/kg)	Animal ID	Organs*	Necropsy Findings	Type of Sacrifice	Day of Sacrifice
G1 0	2101	All	Unremarkable findings	S	14
	2102	All	Unremarkable findings	S	14
	2103	All	Unremarkable findings	S	14
	2104	All	Unremarkable findings	S	14
	2105	All	Unremarkable findings	S	14
G2 2,000	2201	All	Unremarkable findings	S	14
	2202	All	Unremarkable findings	S	14
	2203	All	Unremarkable findings	S	14
	2204	All	Unremarkable findings	S	14
	2205	All	Unremarkable findings	S	14

\*External surface and organ in body cavity

S: Scheduled

#### IV. 요약 및 결론

제주에서 자생하고 있는 식물자원 100종을 대상으로 PDE4 enzyme 억제 및 GSNO reductase 억제 연구를 수행하였다. 그 결과 80% 이상의 PDE4 enzyme 억제 활성을 나타내는 식물 6종과 80% 이상의 GSNO reductase 억제 활성 식물 6종을 확인하였다. 또한 PDE4 enzyme과 GSNO reductase에서 동시에 80% 이상의 효능을 나타내는 곰의말채나무, 조록나무, 윤노리나무 3종을 확인하였다.

곰의말채나무 잎 추출물의 PDE4 enzyme 억제 활성은 ethyl acetate fraction이 *n*-butanol fraction보다 우수한 반면, GSNO reductase 억제 연구에서는 *n*-butanol fraction이 ethyl acetate fraction에서 보다 우수한 활성을 나타내었다. 곰의말채나무 가지 추출물의 PDE4 enzyme 억제 활성은 ethyl acetate fraction이 *n*-butanol fraction보다 우수한 반면, GSNO reductase 억제 연구에서는 *n*-butanol fraction이 ethyl acetate fraction에서 보다 우수한 활성을 나타내었다. 그리고 잎 추출물보다 가지 추출물에서 효능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

조록나무 잎 추출물의 PDE4 enzyme 억제 연구에서는 ethyl acetate fraction이 *n*-butanol fraction보다 우수한 활성을 나타냈으며, GSNO reductase 억제 연구에서도 ethyl acetate fraction이 *n*-butanol fraction보다 우수한 활성을 보였다. 조록나무 가지 추출물의 PDE4 enzyme 억제 활성은 ethyl acetate fraction이 *n*-butanol fraction보다 우수하였고, GSNO reductase 억제 연구에서도 ethyl acetate fraction이 *n*-butanol fraction보다 우수한 활성을 나타내었다. 또한 조록나무의 경우 잎 추출물보다 가지 추출물의 효능이 뛰어난 것을 확인하였다.

윤노리나무 잎 추출물의 PDE4 enzyme 억제 활성은 *n*-butanol fraction이 ethyl acetate fraction보다 다소 우수하였고, GSNO reductase 억제 효과 역시 *n*-butanol fraction이 우수한 것으로 확인되었다. 윤노리나무 가지 추출물의 PDE4 enzyme 억제 활성은 ethyl acetate fraction과 *n*-butanol fraction이 비슷하고, GSNO reductase 억제는 *n*-butanol fraction이 ethyl acetate fraction에 비해 높은 활성을 나타내었다. 그리고 곰의말채나무와 조록나무와 달리 가지 추출물보다 잎 추출물에서 효능이 더 크 결과를 나타내었다.

마우스를 활용한 항천식 연구에서 곰의말채나무와 윤노리나무는 천식 예방 및 치료 효과가 미약한 것으로 나타났다. 그러나 조록나무는 천식 기도과민성을 비롯한 반응성 산소족의 생성, 호산구증가증, Cytokine 및 면역글로블린 생성, 그리고 조직학적 검사 시 용량의존적인 천식 예방 및 치료 효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 조록나무를 활용하여 랫드 활용 독성 연구를 수행한 결과, 조록나무 추출물은 랫드에 단회 경구투여에서 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 조사되었다.

추출물에 포함된 성분의 화합물 구조를 분석한 결과 곰의말채나무 추출물에서는 Catechin 등 8종(Catechin, Pyocyanidin B2, Pyocyanidin C1, Hyperoside, Rutin, Quercitrin, Quercetin, Kaempferol) 성분을 확인하였고, 윤노리나무 추출물에서 Baicalin 등 11종(Catechin, Epicatechin gallate, Hyperoside, Rutin, Nicotiflorin, Quercitrin, Quercetin, Pyocyanidin B2, Pyocyanidin C1, Baicalin, Wogonoside) 성분을 확인하였다. 반면 항천식 효능이 가장 우수한 조록나무 추출물에서 14종(Catechin, 4-O-Caffeoylquinic acid, Epicatechin gallate, Hyperoside, Rutin, Nicotiflorin, Quercitrin, Quercetin, Kaempferol, Chlorogenic acid, Ethyl gallate, Myricitrin, Astragalin, Kaempferin)을 확인하였다. 그리고 Catechin, Hyperoside, Rutin, Quercitrin, Quercetin 성분은 대상 식물 3종 모두에 포함되어 있음을 확인할 수 있었다.

결론적으로, *D. racemosum*의 추출물은 우수한 항 천식 효과를 나타내며, *D. racemosum*의 추출물이 천식 약으로 사용될 수 있는 충분한 근거를 제공하지만, 작용 기작과 활성 성분은 추가 조사가 필요하다.

## V. 참고 문헌

1. Jo SH (2015) Korean Guideline for Asthma, *The Korean Academy Of Asthma, Allergy and Clinical Immunology*, 9-11.
2. Ministry of Health and Welfare (2016) Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Korea Centers for Disease Control and Prevention*, No.117002.
3. Bunyavanich S, Schadt EE. (2015) Systems biology of asthma and allergic diseases: a multiscale approach, *J Allergy Clin Immunol*, 135, 31-42.
4. Horner AA, Raz E (2003) Do microbes influence the pathogenesis of allergic diseases Building the case for Toll -like receptor ligands, *Curr Opin Immunol*, 15, 614-9.
5. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis, *Nat Rev Immunol*, 1, 69-75.
6. Uphoff EP, Cabieses B, Wright J, Pickett KE (2015) International prevalence rates of asthma and allergy are associated with income inequality, *J Allergy Clin Immunol*, 136, 189-190.
7. Huang YJ, Boushey HA (2015) The microbiome in asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 135, 25-30.
8. Lee YM (2013) Chronic Obstructive Pulmonary Disease and management of asthmatic patients, *Korean Association of Internal Medicine*, 86, 36-42.
9. Huss K, Adkinson NF, Jr., Eggleston PA, Dawson C, Van Natta ML, Hamilton RG (2001) House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program, *J Allergy Clin Immunol*, 107, 48-54.
10. Platts-Mills TA, Woodfolk JA, Erwin EA, Aalberse R (2004) Mechanisms of tolerance to inhalant allergens: the relevance of a modified Th2 response to allergens from domestic animals, *Springer Semin Immunopathol*, 25, 271-9.

11. Vijverberg SJ, Hilvering B, Raaijmakers JA, Lammers JW, Maitlandvan der Zee AH, Koenderman L (2013) Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. *Biologics*, 7, 199 - 210.
12. Cohn L, Elias JA, Chupp GL (2004) Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*, 22, 789 - 815.
13. Li S, Aliyeva M, Daphtary N, Martin RA, Poynter ME, *et al* (2014) Antigen-induced mast cell expansion and bronchoconstriction in a mouse model of asthma, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 306, L196 - L206.
14. Fireman P (2003) Understanding asthma pathophysiology, *Allergy Asthma Proc*, 24, 79 - 83.
15. Reddel HK, Busse WW, Pedersen S, Tan WC, Chen YZ, Jorup C, Lythgoe D, O'Byrne PM (2017) Should recommendations about starting inhaled corticosteroid treatment for mild asthma be based on symptom frequency: A post-hoc efficacy analysis of the START study, *Lancet*, 389, 157 - 166.
16. Noah TL, Becker S (2000) Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus, *Clin Immunol*, 97, 43-49.
17. Yoon-Seok Chang (2016) Practical Guideline of Asthma Management (Korean Guideline for Asthma 2015), *Korea Centers for Disease Control and Prevention*, 90(4), 298-306.
18. Jong-Myung Lee (2007) Inhaled Corticosteroids in Asthma, *J Korean Med Assoc*, 50(10), 894-902.
19. Chun-Sik Park (2008) Elderly asthma, *Korea Centers for Disease Control and Prevention*, 74(2), S274-S281.
20. Scarpace PJ, Tumer N, Mader DL (1991) Beta adrenergic function in aging: Basic mechanisms and clinical implications, *Drugs Aging*, 1, 116-129.

21. Pearce N, Beasley R, Crane J, et al (1995) End of the New Zealand asthma mortality epidemic, *Lancet*, 345, 41-44.
22. Zell M, Curtis RA, Troyer WG Jr, Fischer JH (1985) Volume of distribution of theophylline in acute exacerbations of reversible airway disease: Effect of body weight, *Chest*, 87, 212-216.
23. Banner KH, Press NJ. Dual (2009) PDE3/4 inhibitors as therapeutic agents for chronic obstructive pulmonary disease, *Br J Pharmacol*, 157, 892 - 906.
24. Kumar N, Goldminz AM, Kim N, Gottlieb AB (2013) Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases, *BMC Med*, 11, 96.
25. Page CP, Spina D (2012) Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases, *Curr Opin Pharmacol*, 12, 275 - 286.
26. Houslay MD (2010) Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown, *Trends Biochem Sci*, 35, 91 - 100.
27. Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM (2002) Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo, *Nature*, 420, 825 - 829.
28. B. Lima, M. T. Forrester, D. T. Hess, J. S. Stamler (2010) S-nitrosylation in cardiovascular signaling, *Circ. Res*, 106, 633.
29. D. T. Hess, A. Matsumoto, S. O. Kim, H. E. Marshall, J. S. Stamler (2005) Role of constitutive nitric oxide synthase in regulation of Helicobacter pylori-induced gastric mucosal cyclooxygenase-2 activation through S-nitrosylation: mechanism of ghrelin action, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 6, 150.
30. B. Gaston, J. Reilly, J. M. Drazen, J. Fackler, P. Ramdev, D. Arnette, M. E. Mullins, D. J. Sugarbaker, C. Chee, D. J. Singel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90, 10957.
31. J. P. Blonder, S. C. Mutka, X. Sun, J. Qiu, L. H. Green, N. K. Mehra, R. Boyanapalli, M. Suniga, K. Look, C. Delany (2014) Pharmacologic inhibition of S-nitrosoglutathione reductase protects against experimental asthma in BALB/c mice through attenuation of both bronchoconstriction

- and inflammation. *BMC Pulm. Med*, 14, 3.
32. L. Liu, A. Hausladen, M. Zeng, L. Que, J. Heitman, J. S. Stamler (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans, *Nature*, 410, 490-494.
  33. P. C. Sanghani, W. F. Bosron, T. D. Hurley (2002) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes, *Biochemistry*, 41(35), 10778-10786.
  34. Z. N. Yang, W. F. Bosron, T. D. Hurley (1997) Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, *J. Mol. Biol.*, 265, 330-343.
  35. L. G. Que, L. Liu, Y. Yan, G. S. Whitehead, S. H. Gavett, D. A. Schwartz, J. S. Stamler (2005) Protection from experimental asthma by an endogenous bronchodilator, *Science*, 308, 1618-1621.
  36. L. S. Green, L. E. Chun, A. K. Patton, X. Sun, G. J. Rosenthal, J. P. Richards (2012) Mechanism of inhibition for N6022, a first-in-class drug targeting S-nitrosoglutathione reductase, *Biochemistry*, 51, 2157-2168.
  37. X. Sun, J. W. F. Wasley, J. Qiu, J. P. Blonder, A. M. Stout, L. S. Green, S. A. Strong, D. B. Colagiovanni, J. P. Richards, S. C. Mutka, L. Chun, G. J. Rosenthal (2011) Discovery of S-Nitrosoglutathione Reductase Inhibitors: Potential Agents for the Treatment of Asthma and Other Inflammatory Diseases. *ACS Med. Chem. Lett*, 2, 402-406.
  38. Bellofiore S, Martin JG (1994) Antigen challenge of sensitized brown Norway rats, *Am J Respir Crit Care Med*, 150, 218-226.
  39. Avtandilov GG, Batsura YD (1974) Morphometric study of the lungs of experiment animals, *Bull Exp Biol Med*, 144, 4651-4656.
  40. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN (2009) House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells, *Nat Med*, 15, 410-416.



41. Zhu Z, Oh SY, Zheng T, Kim YK (2010) Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma, *Clin Exp Allergy*, 40, 536-546.
42. Gerhold K, Blumchen K, Bock A, et al (2002) Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity, *J Allergy Clin Immunol*, 110, 110-6.
43. Delayre-Orthez C, de Blay F, Frossard N, Pons F (2004) Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse, *Clin Exp Allergy*, 34, 1789-95.
44. Murakami D, Yamada H, Yajima T, Masuda A, Komune S, Yoshikai Y (2007) Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses, *Clin Exp Allergy*, 37, 339-47.
45. Komlosi ZI, Pozsonyi E, Tabi T, et al (2006) Lipopolysaccharide exposure makes allergic airway inflammation and hyper-responsiveness less responsive to dexamethasone and inhibition of iNOS, *Clin Exp Allergy*, 36, 951-9.
46. Watanabe J, Miyazaki Y, Zimmerman GA, Albertine KH, McIntyre TM (2003) Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity, *J Biol Chem*, 278, 42361-8.
47. Tsuchiya K, Siddiqui S, Risse PA, Hirota N, Martin JG (2012) The presence of LPS in OVA inhalations affects airway inflammation and AHR but not remodeling in a rodent model of asthma, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303, L54-63.
2. Ministry of Health and Welfare (2016) Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Korea Centers for Disease Control and Prevention*, No.117002.

48. Woo kyung Kim (2011) A test to asthma diagnose, *Korea Centers for Disease Control and Prevention*, 186, S183-190.
49. Jin sook Kim, Jung Mi Lee, et al (2004) The Preventive Effect of Allergic Inflammation by Induction of Oral Tolerance in a Mouse Model of Chronic Asthma, *Tuberc Respir Dis*, 57, 425-433.
50. Jonathan PA, Lee TH (1992) The pathobiology of bronchial asthma, *Adv Immunol*, 51, 323-32.
51. Frigas E, Gleich GJ (1986) The eosinophil and the pathology of asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 77, 527-37.
52. Kay AB (1988) Leukocytes in asthma, *Immunol Invest*, 17, 679-705.
53. Vercelli D (2001) Immunoglobulin E and its regulators, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1, 61-5.
54. Oh, J. W., C. M. Seroogy, E. H. Meyer, O. Akbari, G. Berry, C. G. Fathman, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu (2002) CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation, *J Allergy Clin Immunol*, 110, 460-468.
55. Bossley CJ, et al (2012) Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines, *J Allergy Clin Immunol*, 129, 974 - 82.
57. Korea Biodiversit Information System, Plant Resource(<http://www.nature.go.kr>)
58. National Institute of Biological Resources(<https://species.nibr.go.kr>)
59. Ryeo Kyeong Ko (2012) Chemical Constituents and Cosmetics-Related Activities from Plants in Jeju Island, *Jeju National University*, dissertation of the degree of Doctor, 137-150.
60. R. S. Galaverna,<sup>a</sup> P. T. B. Sampaio,<sup>b</sup> L. E. S. Barata,<sup>c</sup> M. N. Eberlina and C. H. V. Fidelis (20115) Differentiation of two morphologically similar Amazonian Aniba species by mass spectrometry leaf fingerprinting, *Royal society of chemistry*, 7, 1984-190.
61. Jamie L. Willems , Mona M. Khamis , Waleed Mohammed Saeid , Randy

- W. Purves , George Katselis , Nicholas H. Low , Anas El-Aneed (2016) Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 993, 164-174.
62. Seyit Yuzuak, James Ballington and De-Yu Xie (2018) HPLC-qTOF-MS/MS-Based Profiling of Flavan-3-ols and Dimeric Proanthocyanidins in Berries of Two Muscadine Grape Hybrids FLH 13-11 and FLH 17-66, *Metabolites*, 8, 57.
63. Cédric De Taeye, Marie-Lucie Kankolongo Cibaka and Sonia Collin (2017) Occurrence and Antioxidant Activity of C1 Degradation Products in Cocoa, *Foods*, 6, 18.
64. Ivan M. Savić1, Vesna D. Nikolić1, Ivana M. Savić1, Ljubisa B. Nikolić1, Marko D. Jović, Maja D. Jović (2014) The Qualitative Analsis Of The Green Tea Extract Using ESI-MS Method, *Advanced technologies*, 3(1), 30-37.
65. Donghui Zhou, Yuanzhe Jin, Fengchen Yao, Zhiying Duan, Qi Wang, Jing Liu (2013) Validated LC MS/MS method for the simultaneous determination of hyperoside and 2"-O-galloylhyperin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study in rats, *Biomedical Chromatography*, 28, 1057-1063.
66. Mengchun Chen, Xiaoqian Zhang, Hao Wang, Baoli Lin, Shuanghu Wang and Guoxin Hu1 (2014) Determination of Rutin in Rat Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Application to Pharmacokinetic Study, *Journal of Chromatographic Science*, 53, 519 - 525.
67. Kyo Bin Kang, Madeleine Ernst, Justin J. J. van der Hooft, Ricardo R. da Silva1, Junha Park, Marnix H. Medema, Sang Hyun Sung and Pieter C. Dorrestein (2018) Comprehensive mass spectrometry-guided plant specialized metabolite phenotyping reveals metabolic diversity in the

cosmopolitan plant family Rhamnaceae, *bioRxiv preprint first posted online*, doi: Nov.7.

68. Jun-Xiao Ye, Wang Wei, Li-Hui Quan, Chun-Yu Liu, Qi Chang, Yong-Hong Liao (2010) An LC - MS/MS method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of Shuang-huang-lian in rats, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52, 625 - 630.
69. Yeqing Chen, Hongli Yu, Hao Wu, Yaozong Pan, Kuilong Wang, Yangping Jin and Chengchao Zhang (2015) Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration, *Molecules*, 20, 18352-18366
70. A. Fathoni, E. Saepudin, A. H. Cahyana, D. U. C. Rahayu, and J. Haib (2016) Identification of Nonvolatile Compounds in Clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado, *International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences*, 1862, 030079-1 - 030079-10.
- 71) Sang Yeol Lee, Young-Jin So, Moon Sam Shin, Jae Youl Cho and Jongsung Lee (2014) Antibacterial Effects of Afzelin Isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, A Leading Cause of Illness in Immunocompromised Individuals, *Molecules*, 19, 3173-3180.
72. Jong hee Park, Korean herb book 한국약초도감 (2004)
73. Jeong Mi Kim, Ryeo Kyeong Ko, Jin Won Hyun, and Nam Ho Lee (2009) Identification of New Dibenzofurans from *Distylium racemosum*, *Bull. Korean Chem. Soc*, Vol. 30, No. 6.
74. Ryeo Kyeong Ko, Sunjoo Lee, Chang-Gu Hyun, and Nam Ho Lee (2009) New Dibenzofurans from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc, *Bull. Korean Chem. Soc*, Vol. 30, No. 6.
75. Hee-Jung Bu, Sunjoo Lee (2016) Antioxidation and Anti-wrinkle Activity of Extract Obtained from *Cornus macrophylla* Wall, and of its Isolated

Substance, *J Invest Cosmetol*, 12, 323-329.

76. Il hyuk kim et al (1991) 신약품식물학, 학창사.

77. Ha Na Ko, Ji Mi Kang, Hyung Min Kim, Jong Heon Han, and Nam Ho Lee (2017) Anti-Inflammatory Constituents from the Branches of *Pourthiaea villosa* (Thunb.) Decne. *Bull. Korean Chem. Soc*, Vol. 38, No. 7.