

이학석사 학위논문

염생식물 함초(*Salicornia herbacea*)로부터  
이차 대사 물질들의 분리와 구조결정

Isolation and Characterization of Secondary Metabolites  
from the Salt Marsh Plant *Salicorniac herbacea*

지도교수 서 영 완

2005년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

김 유 아

이학석사 학위논문

염생식물 함초(*Salicornia herbacea*)로부터  
이차 대사 물질들의 분리와 구조결정

Isolation and Characterization of Secondary Metabolites  
from the Salt Marsh Plant *Salicorniac herbacea*

지도교수 서 영 완

2005년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

김 유 아

본 논문을 김유아의 이학석사 학위논문으로 인준함.

2004년 12월

위원장 농학박사 안 중 응



위원 이학박사 임 선 영



위원 이학박사 서 영 완



한국해양대학교 대학원

# 목 차

	page
List of schemes .....	i
List of tables .....	ii
List of figures .....	iii
List of abbreviations .....	vi
Abstract .....	1
1. 서론 .....	4
2. 재료 및 방법 .....	9
2.1 재료 .....	9
2.2 시약 .....	9
2.3 기기 .....	10
2.4 실험 동물 .....	11
2.4.1 재료 .....	11
2.4.2 처리 방법 .....	11
2.5 항산화 활성 실험 .....	13
2.5.1 DPPH radical 소거 활성 .....	13
2.5.2 Peroxynitrite 소거 활성 .....	16
2.6 In vitro 면역 세포 조절 실험 .....	19

3. 결과 및 고찰 .....	21
3.1 염생식물 <i>Salicornia herbacea</i> 의 대사물질 .....	21
3.2 항산화 활성 .....	55
3.2.1 추출 및 분획물의 항산화 활성 .....	55
3.2.1.1 DPPH radical 소거 효과 .....	55
3.2.1.2 Peroxynitrite (ONOO <sup>-</sup> ) 소거 효과 .....	56
3.2.2 이차대사물질들의 항산화 활성 .....	59
3.2.2.1 DPPH radical 소거 효과 .....	59
3.2.2.2 Peroxynitrite (ONOO <sup>-</sup> ) 소거 효과 .....	60
3.3 In vitro 면역 세포 조절 실험 .....	63
3.3.1 추출 및 분획물의 면역 세포 조절 효과 .....	63
3.3.2 이차대사물질들의 면역 세포 조절 효과 .....	66
4. 결론 .....	68
5. 참고문헌 .....	71
감사의 글 .....	75

## List of schemes

Scheme	page
Scheme 1. Procedure of the thymus, spleen cell preparation. ....	12
Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity. ....	15
Scheme 3. Measurement of peroxinitrite scavenging activity. ....	18
Scheme 4. Measurement of the cell death inhibition activity. ....	20
Scheme 5. Procedure of extraction and various fraction from <i>S. herbacea</i> . .....	21
Scheme 6. Isolation of the compounds 1-5 from <i>S. herbacea</i> . ....	22

## List of tables

<b>Table</b>	<b>page</b>
Table 1. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral Data for Compound <b>1</b> . .....	28
Table 2. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral Data for Compound <b>2</b> . .....	29
Table 3. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral Data for Compound <b>3</b> . .....	30
Table 4. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral Data for Compound <b>4</b> . .....	31
Table 5. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral Data for Compound <b>5</b> . .....	32
Table 6. DPPH radical scavenging effect of <i>S. herbacea</i> crude extract and fractions (EDA(%)). .....	55
Table 7. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> fractions on $\text{ONOO}^-$ from decomposition of SIN-1 ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ). .....	56
Table 8. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> fractions on authentic $\text{ONOO}^-$ ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ). .....	56
Table 9. DPPH radical scavenging effect of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> (EDA(%)). .....	59
Table 10. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> on $\text{ONOO}^-$ from decomposition of SIN-1 ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ). .....	60
Table 11. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> on authentic $\text{ONOO}^-$ ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ). .....	60
Table 12. Thymus cell survival effect of <i>S. herbacea</i> crude extract and fractions. ....	64
Table 13. Spleen cell survival effect of <i>S. herbacea</i> crude extract and fractions. ....	64
Table 14. Thymus cell survival effect of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> . ....	66
Table 15. Spleen cell survival effect of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> . ....	66

## List of figures

Fig.	page
Fig. 1. Photograph of <i>Salicornia herbacea</i> . .....	08
Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol. ....	14
Fig. 3. Peroxynitrite (ONOO <sup>-</sup> ) mediated oxidation of DHR123. ....	17
Fig. 4. Chemical structure of compound <b>1-3</b> from <i>S. herbacea</i> . ....	33
Fig. 5. Chemical structure of compound <b>4-5</b> from <i>S. herbacea</i> . ....	34
Fig. 6. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	35
Fig. 7. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	35
Fig. 8. DEPT spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	36
Fig. 9. gDQCOSY spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	36
Fig. 10. TOCSY spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	37
Fig. 11. NOESY spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	37
Fig. 12. gHMQC spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	38
Fig. 13. gHMBC spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	38
Fig. 14. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>1-Ac</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	39
Fig. 15. gDQCOSY spectrum of compound <b>1-Ac</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	39
Fig. 16. TOCSY spectrum of compound <b>1-Ac</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	40
Fig. 17. gHSQC spectrum of compound <b>1-Ac</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	40
Fig. 18. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	41
Fig. 19. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	41
Fig. 20. DEPT spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	42
Fig. 21. gDQCOSY spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	42
Fig. 22. TOCSY spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	43
Fig. 23. ROESY spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	43
Fig. 24. gHMQC spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	44



<b>Fig.</b>	<b>page</b>
Fig. 25. gHMBC spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	44
Fig. 26. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	45
Fig. 27. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	45
Fig. 28. DEPT spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	46
Fig. 29. gDQCOSY spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	46
Fig. 30. TOCSY spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	47
Fig. 31. ROESY spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	47
Fig. 32. gHSQC spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	48
Fig. 33. gHMBC spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	48
Fig. 34. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	49
Fig. 35. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	49
Fig. 36. gDQCOSY spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	50
Fig. 37. TOCSY spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	50
Fig. 38. gHMQC spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	51
Fig. 39. gHMBC spectrum of compound <b>4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	51
Fig. 40. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	52
Fig. 41. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	52
Fig. 42. gDQCOSY spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	53
Fig. 43. TOCSY spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	53
Fig. 44. gHMQC spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	54
Fig. 45. gHMBC spectrum of compound <b>5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	54
Fig. 46. DPPH radical scavenging effect of <i>S. herbacea</i> crude extract and fractions. ....	57
Fig. 47. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> fractions on ONOO <sup>-</sup> from decomposition of SIN-1 (50 μg/ml). ....	58

<b>Fig.</b>	<b>page</b>
Fig. 48. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> fractions on authentic ONOO <sup>-</sup> (50µg/ml). .....	58
Fig. 49. DPPH radical scavenging effect of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> . ..	61
Fig. 50. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> on ONOO <sup>-</sup> from decomposition of SIN-1 (50µg/ml). .....	62
Fig. 51. Scavenging activity of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> on authentic ONOO <sup>-</sup> (50µg/ml). .....	62
Fig. 52. Thymus cell survival effect of <i>S. herbacea</i> crude extract and fractions. ..	65
Fig. 53. Spleen cell survival effect of <i>S. herbacea</i> crude extract and fractions. ..	65
Fig. 54. Thymus cell survival effect of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> . .....	67
Fig. 55. Spleen cell survival effect of <i>S. herbacea</i> compounds <b>1-5</b> . .....	67

## List of abbreviations

BHA	: Butylated hydroxyanisole
BHT	: Butylated hydroxytoluene
CD <sub>3</sub> OD	: deuterium methanol
CHCl <sub>3</sub>	: chloroforme
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: dichloromethane (methylene chloride)
<sup>13</sup> C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2,3-dihydroindole-5,6-quinone
DTPA	: diethylenetriaminepenta acetic acid
Fig.	: Figure
H <sub>2</sub> O	: water
<sup>1</sup> H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HPLC	: high performed liquid chromatography
Hz	: herz(sec <sup>-1</sup> )
MeOH	: methanol
NaOH	: sodium hydroxide
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO·	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
·OH	: hydroxyl radical
ONOO <sup>-</sup>	: peroxyxynitrite
RP	: reverse phase
SIN-1	: 3-morpholinsydnonimine
TLC	: thin layer chromatography
UV	: Ultraviolet

# Isolation and Characterization of Secondary Metabolites from the Salt Marsh Plant *Salicornia herbacea*

You-Ah Kim

Department of Marine Bioscience and Environment, Graduate  
School, Korea Maritime University

## Abstract

In general, extreme environments are defined as being extreme in one or several physical parameters such as temperature, salinity or pressure. However, in these systems the external variables remain relatively stable over time. On the other hand, a marine system with a high variability in physical parameters such as temperature, salinity or radiation can be considered to be extreme one. Tidal flats, salt marshes, and mangrove ecosystems belong to this type of extreme environment on a daily, seasonal and annual basis. Salt marshes and tidal flats experience regular and irregular external influences. Also, organisms in these extreme environments have to adapt by developing specific responses which often include the synthesis of unusual secondary metabolites.

*Salicornia herbacea* (also known as glasswort) is one of the most salt tolerant plants growing on salt marshes and tidal flats along the western coast of Korea. It has been not only eaten as a food but also

used in folk medicine such as constipation, obesity, diabetes, etc. Nevertheless, studies on its secondary metabolites have little been done until now.

In our search for novel compounds from the salt marsh plants, we collected the salt wort *S. barbacea* from Daebudo, Ansan in Korea. The crude extracts of these specimens were evaluated for its potential to scavenge DPPH radical and peroxy nitrite and to immunomodulate both a mouse thymus and spleen cells. On the basis of moderate effects obtained in both bioassay systems, the combined crude extracts of the glasswort were fractionated with *n*-hexane, 85% aq. MeOH, and *n*-BuOH. Scavenging activities of the crude extracts and their fractions on DPPH radical increased in the order of *n*-BuOH > 85% aq. MeOH > crude extract > *n*-hexane > water, showing 85.2, 70.0, 58.2, 27.7, and 25.7% in their scavenging ratios at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively.

The scavenging activities of these four fractions on authentic  $\text{ONOO}^-$  increased in the order of 85% aq. MeOH > *n*-BuOH > *n*-hexane > water and were 71.5, 70.8, 44.2, and 34.9% in their scavenging ratios, respectively, at concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  while inhibitory activities against the generation of  $\text{ONOO}^-$  differed, 85% aq. MeOH > *n*-BuOH > water > *n*-hexane fractions at 96.2, 90.0, 83.9, and 65.9% in their scavenging ratios, respectively.

Also, in a immunomodulatory test using a mouse thymus and spleen cells, treatment of each of the mouse thymus and spleen cells with the four fractions resulted in a significant extension of cell survival in culture in order of *n*-BuOH > *n*-hexane > 85% aq. MeOH > water.

Considering all these results, *n*-BuOH soluble fraction was selected for further separation. C<sub>18</sub> flash column chromatography followed by silica gel column chromatography and repeated reversed-phase HPLC resulted in the isolation of the two new triterpene saponins **1-2** and the two known triterpene saponins **3-4** and a known flavonoid glycoside **5**. The structure of the isolated compounds were established by extensive 2D NMR experiments, <sup>1</sup>H COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, and HMBC, and through comparison with published spectral data.

In our measurement for evaluating scavenging effect on DPPH radical and authentic ONOO<sup>-</sup> and inhibitory activity of ONOO<sup>-</sup> generated from SIN-1, compound **5** exhibited potent scavenging activity on the DPPH radical and authentic ONOO<sup>-</sup> as well as inhibitory activity of induced ONOO<sup>-</sup> from SIN-1, comparable with that of BHT on DPPH radical at 100 μg/ml and those of penicillamine and L-ascorbic acid on ONOO<sup>-</sup> at 50 μg/ml. Compounds **1-3** also revealed significant scavenging and inhibitory effects on authentic ONOO<sup>-</sup> and ONOO<sup>-</sup> generated from SIN-1, respectively.

## 1. 서론

삼면이 바다로 둘러싸여 있는 우리나라 해안은 물리적 요소 등 여러 가지 주변 환경의 영향을 받아 끊임없이 변화하며, 그로 인해 해안마다 각기 독특한 특성을 지니게 된다. 동해안은 암석 해안으로 전형적인 해식애가 발달되어 있고, 남·서해안은 세계적인 리아스식 해안으로 특히 서해안은 조차가 심해 간석지가 발달하기에 이상적인 조건을 갖추고 있어 북해연안, 미국 동부, 아마존 하구, 캐나다 동부해안과 더불어 세계 5대 간석지에 해당한다. 1992년 리우회의 이후 해양 및 연안자원의 중요성에 대한 인식이 높아짐에 따라 최근 그 연구투자가 증가 되고 있다. 간석지는 생물의 종류가 다양하고 영양염류와 에너지가 풍부하며, 생태계별 생산성도 높다. 미국의 한 연구에 따르면 경제성 측면에서도 해안습지가 육지보다 17배나 높은 것으로 분석되며, 국내 연구에서도 간척지에 비해 2배정도의 경제적 가치를 지닌 것으로 판단하고 있다. 또한 국제적으로 유전자를 확보하려는 경쟁이 어느 때보다 치열한 요즘, 간석지는 종 다양성의 측면에서도 경쟁력이 매우 높아 앞으로 연구 결과에 따라 상당한 부가 가치를 나타낼 것으로 사료된다.

간척지의 높은 지면에 대조 시에 바닷물이 들어오면 소금기에 잘 견디는 염생식물이 자라기 시작하는데 이처럼 해양환경과 육상환경이 만나는 반육상 환경의 간척지를 염생 습지 (salt marsh)라고 한다. 염생 습지에 서식하는 식물로는 미국의 동부 연안에서 나는 염생식물인 스파르티나와 열대 및 아열대 지역의 맹그로브 (mangrove)가 잘 알려져 있으며 우리나라에서는 총 50과 139종의 염생식물이 있는 것으로 조사되었고, 함초 (*Salicornia herbacea*), 갈대 (*Phragmites communis*), 칠면초 (*Suaeda japonica*), 나문재 (*Suaeda asparagoides*), 해홍나물 (*Suaeda maritima*), 수송나물 (*Salsola komarovi*) 등이 주류를 이룬다. 염생 습지 식생의 지형적 대상 분포를 보면 대체적으로 지형이 낮고 조수의 침수횟수가 많은 저위 염습지에는 칠면초, 함초, 갈대, 천

일사초 (*Carex scabrifolia*) 군락이 나타나고, 지형이 높고 조수의 영향을 거의 받지 않는 고위염습지에서는 나문재, 모새달 (*Phacelurus lalifolius*) 군락이 나타나며, 이들의 중간 염습지에서는 가는갯능쟁이 (*Atriplex gmelini*), 갯개미취 (*Aster tripolium*), 갯잔디 (*Zoysia sinica*) 군락이 형성된다.<sup>1,2)</sup>

염생식물 (halophyte)에 대한 정의는 분류 기준에 따라, 예들 들어 식물이 생육하는 토양의 염분농도, 식물의 생리적 특성, 염분이 식물에 영양을 공급하는 방법 등, 조금씩 차이가 있으나 일반적으로 호숫가와 암염 (岩鹽)과 같이 토양의 염분농도가 높아 일반 육상 식물이 생육할 수 없는 지대에서 자라는 식물을 말한다. 염분은 토양의 삼투압을 높이는 역할을 하여 식물체가 토양으로부터 수분을 흡수하는 것을 방해할 뿐만 아니라 식물체 안에 지나치게 염분이 존재할 경우 생리적으로 악영향을 미치게 된다. 특히 간석지에서 사는 식물들은 밀물 때의 공기 부족과 썰물 때의 염분을 극복해야 한다. 그럼에도 불구하고 간석지나 해안 사구지역에는 의외로 많은 식물들이 독특한 형태와 생명력으로 무리를 이루어 자라고 있다. 이는 모두 세포 안에 많은 소금기가 들어 있어 높은 삼투압을 가지기 때문에 토양 용액의 침투가 높을 때도 물을 빨아들일 수 있는 특색이 있기 때문이다. 염생식물의 발아 시기는 3월 중순 경에 칠면초와 함초가 가장 이르게 나타나고, 3월 말에 가는갯능쟁이, 4월 중순 갯개미취, 4월 말에 나문재 순이며, 발아기간은 칠면초 75일, 함초 90일, 가는갯능쟁이 30일, 갯개미취 45일, 나문재 30일 등으로 보고 되고 있다. 염생식물은 성장 특징에 따라 3군으로 나누는데, 제 1군은 초기에 성장이 급격히 증가하다 이 후 서서히 증가하는 부류로 칠면초, 함초 등이 있다. 제 2군은 초기에는 서서히 증가하지만 중기 이후 크게 증가하는 가는갯능쟁이, 갯개미취 등이다. 제 3군은 늦은 시기에 출현하여 급격히 성장하는 나문재 등이 있다. 이들은 먹이 연쇄 기초 생산자로서 먹이 사슬에서 중요한 역할을 한다. 또한, 오염물질을 직접 흡수하여 연안 해역의 부영양화를 방지하며, 토양 미생물에 의한 오염물질의 분해 능력을 증가시켜 토양 내 오염물질의 정화능력을 축



진시켜준다. 그리고 육상생태계와 매우 다른 환경에서 생육하기 때문에 육상 생물에서 발견할 수 없는 유용한 유전자원이나 신물질이 염생식물에서 발견될 확률이 매우 높아 약리학적으로도 높은 잠재력을 지니고 있다.<sup>3)</sup>

함초 (*Salicornia herbacea*)는 우리나라 서해안 갯벌에서 군락을 이루며 자생하는 한해살이풀로 통통하고 마디가 있는 풀이라는 뜻에서 ‘통통마디’라고도 부른다. 중국의 옛 의학책인 『신농초본경』에는 맛이 몹시 짜다고 하여 함초 (鹹草), 염초 (鹽草)라고 하였고, 또 몹시 희귀하고 신령스러운 풀로 여겨 신초 (神草)라고도 하며, 전체 모양이 산호를 닮았다 하여 산호초라고도 한다.<sup>4)</sup> 조간대 상부의 진흙성분이 비교적 딱딱한 곳에 모여서 자라며 바닷물 성분이 있어야 살아가는 식물이지만, 칠면초, 나문재와는 달리 바닷물에 잠기면 죽는다. 줄기에 마디가 많고 두드러지며 가지는 2~3번 갈라져서 마주 난다. 가지는 다육질로 비대하고 진한 녹색이며 잎은 없다 (Fig. 1). 10~40cm쯤 자라고 꽃은 6~8월 가지 끝에 피며 열매는 10월에 납작하고 까맣게 익는다. 봄부터 여름까지는 줄기와 가지가 진한 녹색이다가 가을이 되면 붉게 변한다.<sup>5)</sup> 함초의 생리적 특성으로는 바닷물 속에 녹아 있는 소금을 비롯하여 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 철, 인 등 갖가지 미네랄을 흡수하면서 자란다는 것이다.<sup>6)</sup> 또한 필수 지방산인 리놀렌산도 약 50%로 다량 함유되어 있으며, 체내에서 합성이 불가능해 반드시 외부로부터 섭취해야하는 발린, 류신, 이소류신, 트레오닌, 페노알라닌, 메치오닌, 라이신, 히스티딘과 같은 필수 아미노산의 함량이 총 아미노산 함량 대비 약 40%를 함유한 것으로 나타났다. 이런 특징을 지닌 함초는 숙변을 제거하고 변비를 없애고, 암, 축농증, 관절염, 고혈압, 요통, 비만증, 치질, 당뇨병, 갑상선염, 천식, 기관지염, 간질환 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup> 우리나라는 예로부터 민간에서 봄철 몸이 나른하고 밥맛이 없을 때 함초 나물을 먹으면 눈이 맑아지고 밥맛이 좋아진다는 얘기가 전해지며, 황해도 지방에서는 함초를 소화불량, 위장병, 간염, 신장병 등의 약으로 썼다고 한다. 또 유럽에서는 함초의 어린줄기를 샐러드로 만들어 먹기도 하고,

일본에서는 천연기념물로 지정되어 있다고 한다.<sup>8)</sup> 최근 우리나라에서 함초의 독특한 짠맛과 다양한 생리적 효능이 구전되어 전라남도 해남 등지에서 식용화 되고 있으며, 생체나 분말형태로 식품과 의약품으로 판매되고 있다.<sup>5)</sup>

최근 민간으로만 전해지던 함초의 약리 효과에 대한 과학적인 분석이 활발하게 진행되고 있다. Kim (2001) 등은 자생지 함초의 생육단계별 무기성분의 변화를 파악하여 최적의 채취시기를 알아보고, 온실 내에서 인공상토를 이용해 염수농도별로 시험재배 하여 생육 및 무기 성분 흡수경향 변화와 재배 가능성을 알아보고자 하는 실험을 실시하였다. 그 결과, 이용 시기는 6월말이며, 상토 및 비료 시비량 조절로 해수 농도 및 재배의 적절한 관리를 통해 함초 생산량을 증대시킬 수 있을 것이라는 결론을 내렸다.<sup>9)</sup> Min (2002) 등은 함초의 화학적 성분 분석을 실시하여 함초 부위별로 구체적인 아미노산, 미네랄, 당 등의 함량을 제시하였다.<sup>10,11)</sup> 더 나아가, 이를 산업적 이용 가능성을 탐색하고자 Lee (2002) 등은 항균실험, 전자공여능 측정, tyrosinase 저해활성 측정, ACE (Angiotensin converting enzyme) 저해활성 측정, 암세포증식 억제능 측정 실험 등을 통해 여드름 억제, 노화 방지, 미백, 모공수축, 자외선 차단제 등의 화장품으로써의 개발 가능성을 시사했으며, 의약품 소재로도 응용 가능한 분야임을 확인하였다.<sup>12,13)</sup> 그 외에도 항산화, 항당뇨, 혈중 콜레스테롤 감소, 혈중 지질 감소, 면역 활성화 등 다수의 연구가 진행되어 보고 된 바 있다.<sup>14-17.)</sup>

따라서 염생식물의 대표 종인 함초의 화학적 성분에 관한 탐색연구를 수행하였으며 함초로부터 saponin 계열의 화합물들과 하나의 flavonoid 성분을 분리, 동정하였다. 또한 시료의 추출 및 용매 분획, 그리고 분리된 화합물에 대한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), peroxy nitrite (ONOO<sup>-</sup>), 3-morpholinsyndnonimine (SIN-1)에 대한 항산화효과를 측정하였고, in vitro 상에서 mouse의 thymus, spleen cell을 이용해 면역 세포 조절 실험을 하였다.



Fig. 1 Photograph of *Salicornia herbacea*.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료

본 실험에 사용한 함초는 2002년 7월 경기도 안산시 대부도 조간대에서 채집하였다.

### 2.2 시약

Column packing materials는 RP 18 (YMC-GEL ODS-A, 12nm, S-75  $\mu\text{m}$ ), Silica gel (silica gel 60, 0.063~0.200mm, Merck), sephadex LH-20 (bead size 25~100 $\mu\text{m}$ , Sigma)을 사용하였으며, TLC plate는 Silica gel 60 F254s (0.5mm, Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 사용하였다. NMR 측정에 사용한 용매는  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%)이다.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical과, L-ascorbic acid, penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)는 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 peroxyntirite ( $\text{ONOO}^-$ )는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. DMSO (dimethyl sulfoxide)는 Junsei에서 구입하였고, 그 외 ethanol, methanol, acetone과 methylene chloride는 Junsei사의 일급시약을 증류하여 사용하였다.

동물 세포 배양에 필요한 HY medium powder와 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medium powder는 Sigma에서 구입 하였고 (ST. Louis, MO, USA), FBS (Fetal Bovine Serum)는 HyClone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

## 2.3 기기

Varian RI detector와 high performed liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)를 사용하여 화합물을 정제·분리하였다. 사용한 HPLC column은 YMC pack ODS-A (250×10mm, S 5 $\mu$ m, 12mm)를 사용하였고 guard column (7.5×4.6mm, Alltech)을 사용하였다. 분리한 화합물의 구조를 동정하기 위하여 Varian NMR 300 과 600 spectrometer를 사용하였다. UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio-TEK instruments, USA)가 항산화 활성 측정에 사용되었으며 그 외에 Rotary Evaporator (EYELA, JAPAN), Vacuum pump, pH Meter, Water bath, Pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.

UV ELISA reader LabTech (DAIHAN LABTECH., LTD)가 MTT assay 측정에 사용되었으며 그 외에 Centrifuge (HANIL KOREA), CO<sub>2</sub> incubator (NAPCO, USA), Inverted Microscope (OLYMPUS CK2) 등을 사용하였다.

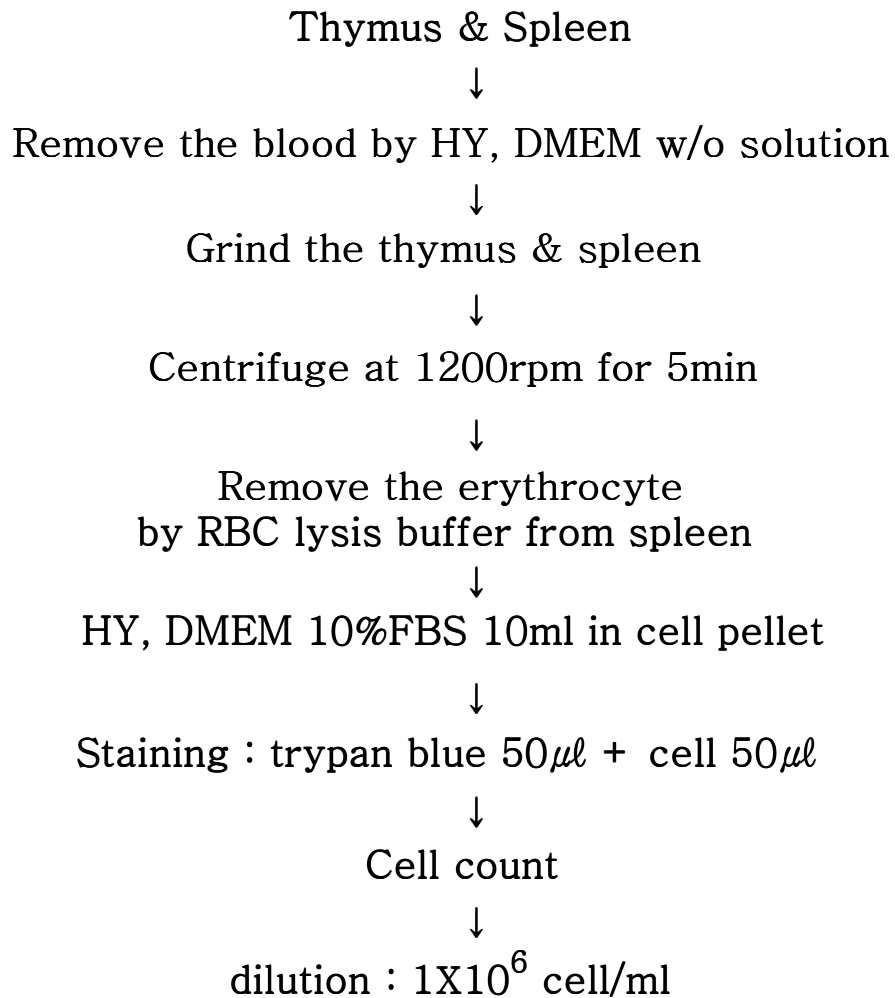
## 2.4 실험동물

### 2.4.1. 재료

실험동물: BALB/C 암컷 mouse를 (주) 바이오 링크에서 분양 받아 김해 인제대학교의 실험동물 사육장에서 규정대로 사육하여 4-6주에 사용하였다.

### 2.4.2. 처리 방법

4-6주된 BALB/C 암컷 mouse의 갈비뼈 아래 가죽을 절개한 후 복막 밑의 spleen을 분리하고 심장과 폐 위쪽의 좌우 두 개의 thymus를 분리하여 각각 DMEM w/o, HY w/o 배지에 넣었다. 각각의 조직을 멸균된 frosted end slide glass로 grind하여 cell 을 배지로 분리시켰다. 이 세포 현탁액을 15 ml tube에 옮겨 상등액을 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 이때 spleen은 cell pellet에 적혈구 용혈 완충 용액 (Red Blood Cell Lysis Buffer)을 2 ml 넣어 섞은 후 2분가량 상온에서 반응시켰다. DMEM w/o 배지 40 ml 넣고 곧바로 1200 rpm 에서 5분간 원심 분리하였고 다시 pellet에 DMEM 10% FBS 10 ml 넣었다. 준비된 cell 50  $\mu$ l에 trypan blue 50  $\mu$ l 섞어 cell을 count하고 cell수가  $1 \times 10^6$  cell/ml 되게 DMEM 10% FBS으로 희석하였다. Thymus는 cell pellet에 HY 10% FBS 10 ml 넣은 후 spleen과 동일 방법으로 cell을 count하고 HY 10% FBS로 희석하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Procedure of the thymus, spleen cell preparation.

## 2.5 항산화 활성 실험

### 2.5.1 DPPH radical 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical을 이용한 항산화능 측정법은 주로 phenolics 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용된다. DPPH alcohol 용액은 518 nm에서 강한 UV 흡수가 있으며, 실온에서 1시간 정도는 매우 안정한 free radical이다. 전자공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 됨으로써 518 nm에서 나타났던 DPPH의 특이적인 흡수 band가 사라지게 되는데, 가시적인 DPPH의 보라색은 안정해진 분자의 몰수에 비례하여 노란색으로 변하여 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 관찰할 수 있다 (Fig. 2). 이러한 DPPH는 dioxane이나 CCl<sub>4</sub>와 같은 비극성 용매 내에서는 2차, 3차 산화 반응이 일어나기도 하나 alcohol 용액 내에서는 비교적 안정하다. 왜냐하면 DPPH의 질소 원자와 alcohol간에 수소 결합이 형성되기 때문이다.<sup>18)</sup> DPPH radical 소거 활성은 안정해진 분자의 흡광도를 측정함으로써 검색하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

먼저 각 농도별 시료를 MeOH에 녹여 준비하였다. DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹이고, 원액 1200  $\mu$ l에 DMSO 500  $\mu$ l와 EtOH를 3000  $\mu$ l를 혼합하여 DPPH 희석액을 준비하였다. 준비된 DPPH 희석액은 cuvette에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 맞추었다. 흡광도를 맞춘 희석액 900  $\mu$ l와 시료 100  $\mu$ l를 혼합하고 10분후 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내었다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다 (Scheme 2).

$$\text{EDA (electron donating ability)}(\%) = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$



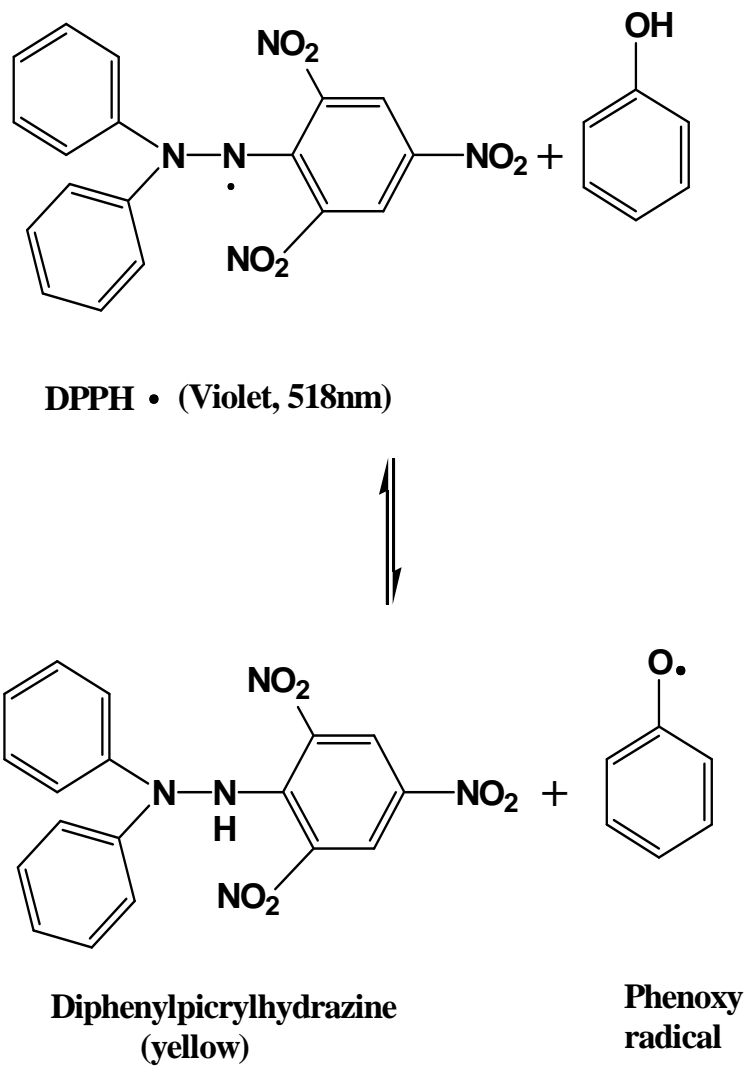
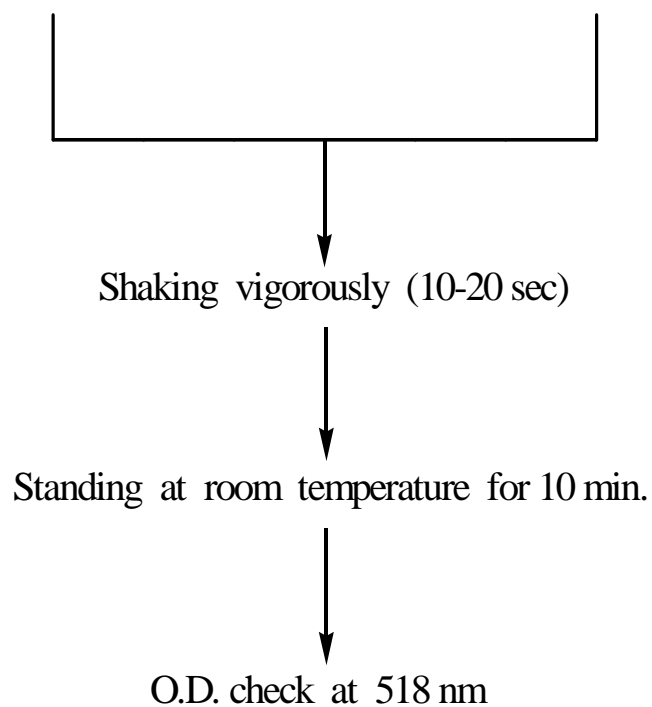


Fig. 2 Scavenging of the DPPH radical by phenol.<sup>19)</sup>

MeOH solution of sample  
at various concentrations

Solution of DPPH (2mg)  
in MeOH (15mL)



Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging

## 2.5.2 Peroxynitrite 소거 활성

Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )는 superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ )와 nitric oxide ( $\text{NO}\cdot$ ) 사이의 반응물로써, macrophage가 생물체내 침입하는 병원체를 포식할 수 있도록 하는 강력한 산화제의 일종이다. 즉, 활성화된 macrophage는 superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ )와 nitric oxide ( $\text{NO}\cdot$ )를 동시에 만들게 되고, 이어 급속한 속도로 생성된 peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )는 다양한 병원균을 제거한다. 반면에 세포 대사 과정에서 과도한 양의 생성은 단백질의 thiol ( $-\text{SH}$ ) 작용기나 tyrosine의 nitration, 지질과산화 반응을 일으켜 세포 대사나 signal transduction에 영향을 주어 오히려 염증이나 apoptosis에 의한 세포사를 유발하게 한다. 그러나 생물체내에는 peroxynitrite를 불활성화 시키는 내인성 효소가 부족하기 때문에 특이적인 peroxynitrite의 소거제의 개발은 매우 중요하다.<sup>20,21</sup>  $\text{ONOO}^-$  소거 활성은 dihydrorhodamine (DHR-123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 (Fig. 3). 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

시료는 10% ethanol에 녹여 준비하였다. DHR123 (5 mM)은 dimethylformamide로 녹이고 stock 용액은 질소로 purge  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 에 보관하며 사용하기 직전에  $5\text{ }\mu\text{M}$ 의 DHR123으로 희석하였다. 단, 아이스 bath상에서 암실에서 행하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid)  $100\text{ }\mu\text{M}$  (f.c.)을 혼합하여 조제하며 냉장 보관하였다. buffer 용액에 DHR123 용액을 혼합한 뒤 각 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 multidetection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가할 경우는 실온에서 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. SIN-1에 의한 DHR123의 산화는 점진적으로 일어나는 반면에 authentic peroxynitrite는 아주 급속히 산화를 시키기 때문이다. Excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측

정하였다. 그리고  $\text{ONOO}^-$  (f.c.  $10\mu\text{M}$ )의 바탕용액은  $0.3\text{N NaOH}$ 를 사용하였고, 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다 (Scheme 3).<sup>22)</sup>

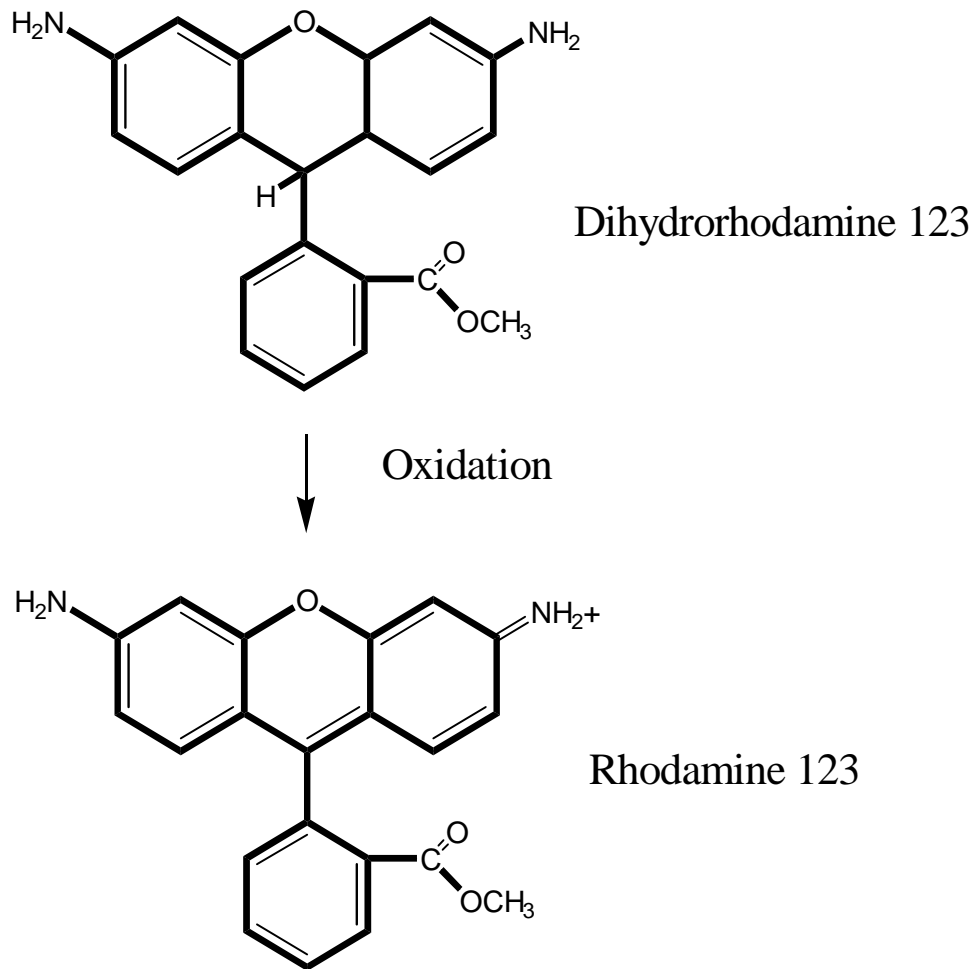


Fig.3 Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) mediated oxidation of DHR123.<sup>23)</sup>

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)

100 $\mu$ M



Dihydrorhodamine123 5 $\mu$ M



Incubation at 37 $^{\circ}$ C for 1 min



Sample



SIN-1 200 $\mu$ M or peroxynitrite 5 $\mu$ M



Measurement of fluorescence intensity

Excitation wavelength at 480nm

Emission wavelength at 525nm

Scheme 3. Measurement of peroxynitrite scavenging activity.

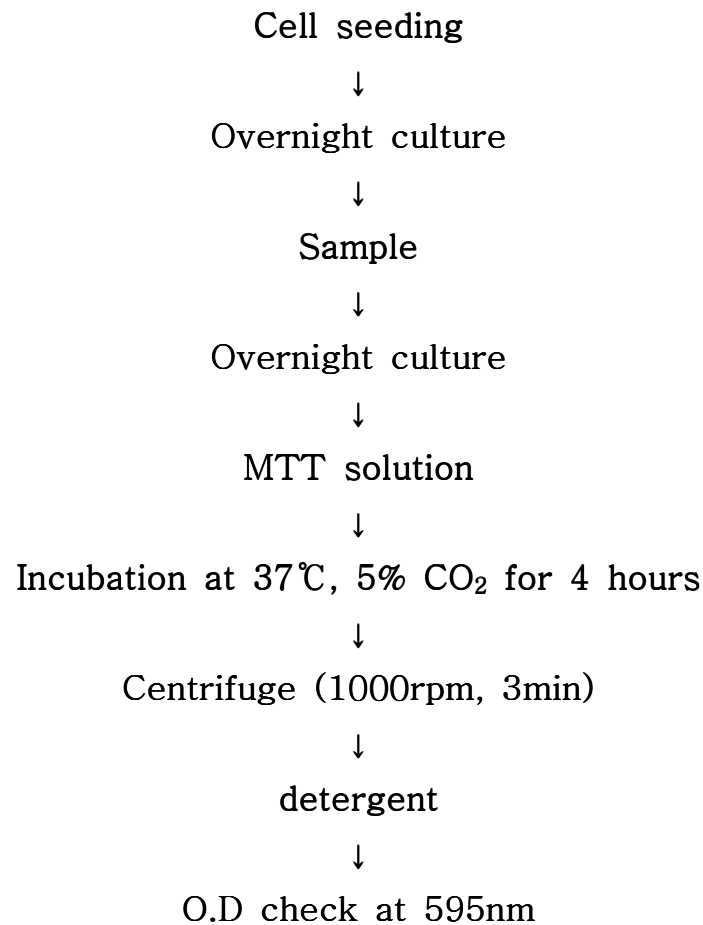
## 2.6 In vitro 면역 세포 조절 실험

함초 추출물의 면역 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 mouse의 thymus cell과 spleen cell에 대한 효과를 in vitro에서 실험하였다. 면역에 관여하는 백혈구와 림프구는 골수에서 생성되고 이 미성숙된 세포들은 골수를 나와 성숙 세포가 된 후 직접적으로 면역 작용을 하게 된다. thymus cell은 T cell이 분화 성숙하는 장기이고 spleen은 T·B cell과 마크로파지가 존재한다. 이 곳에서 마크로파지는 혈관으로 들어온 이물질에 대해 포식 작용을 하고 T cell과 B cell은 항원이나 항원 제시 세포와 접촉하여 성숙하기도 하며 이물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 장기이다. 이 실험은 MTT를 이용하여 실험하였다.

MTT assay는 세포의 증식을 알아보는 가장 간단하면서도 정확성이 있는 방법 중 하나이다. yellow tetrazolium salt MTT는 살아있는 세포에서 물에 녹지 않는 formazan crystal로 환원이 된다. 이 크리스탈은 나중에 DMSO 혹은 detergent로 처리 후 생성된 크리스탈의 양을 흡광도로 측정한다. 즉, 살아있는 세포의 수가 많을 수록 이 크리스탈의 생성도 많아지게 된다. 그러므로 이러한 방법을 통해 면역세포 조절 정도를 확인 할 수 있다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

먼저 4-6주된 mouse thymus와 spleen을 파쇄 하여 cell ( $1 \times 10^6/ml$ )을 준비하고 96 well microplate에 각각 분주하였다. 세포는 종류마다 그리고 처리하는 기간마다 다르기 때문에 미리 적절한 흡광도 (0.2-0.8)가 나오도록 세포주에 맞게 세포량과 처리기간을 결정하였다. 시료는  $100 \mu l/ml$  농도로 만들어 사용하였으며, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)는 5 mg MTT/ml FBS로 만들어 각 well에  $20 \mu l$ 씩 분주하여 섞어 준 후 보라색 침전이 생길 때까지 배양하였다. 이때, MTT 용액은 5 mg/ml PBS로 필터처리를 하고 빛에 민감하기 때문에 포일로 감싸서 냉장보관 하였

다. 배양 후 sample과 control로 나눈 뒤, control에는 phosphate buffer solution (PBS) 20  $\mu\text{l}$ , sample에는 추출물 20  $\mu\text{l}$ 를 처리하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 다시 4시간 배양하였다. MTT positive control에 침전이 생기고 negative control에 침전이 생기려고 할 때 (약 3시간에서 5시간) detergent를 처리하였다. detergent 처리 후 현미경으로 관찰 시 푸른색의 formazan crystal이 다 용해된 것이 확인되면 595 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Scheme 4).

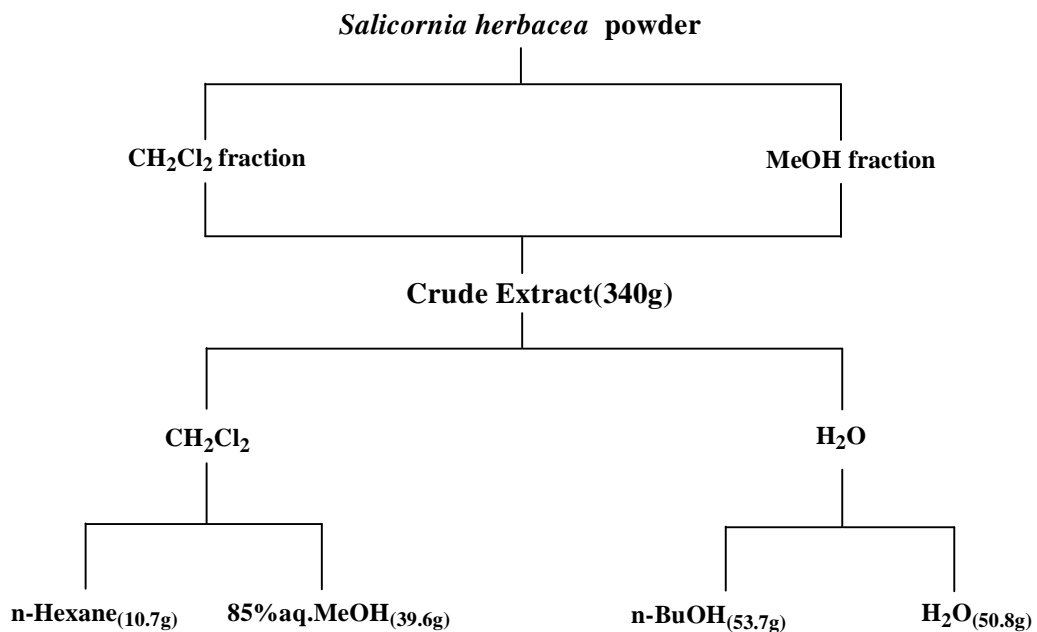


Scheme 4. Measurement of the cell death inhibition activity.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 염생식물 *Salicornia herbacea*의 대사물질

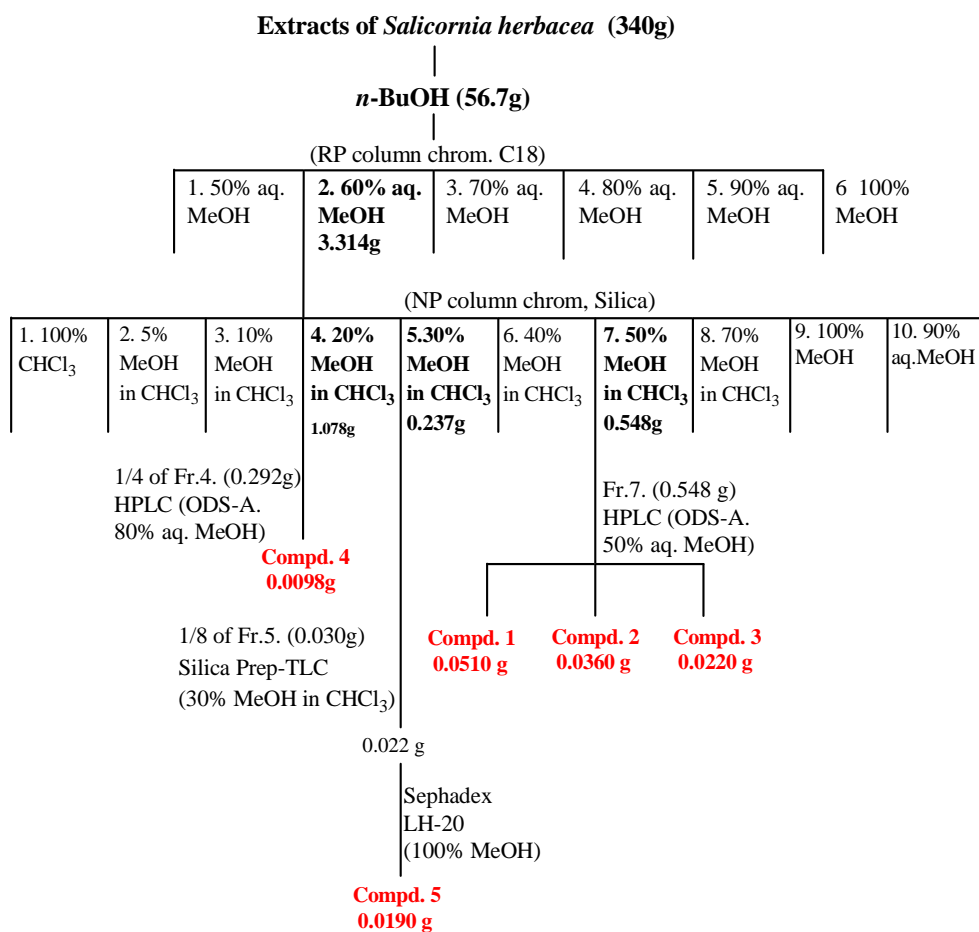
함초 (*S. herbacea*)는 2002년 7월 경기도 안산시 대부도 조간대에서 채집하였으며 응달에서 건조하였다. 건조한 시료를 잘게 잘라 methylene chloride로 추출하고 다시 methanol로 반복해서 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 methylene chloride와 methanol의 조추출물을 합하여 다시 methylene chloride와 물을 이용하여 분배하였으며 methylene chloride 층은 다시 85% 메탄올 수용액층과 *n*-hexane 층으로 분배하였고 물층은 다시 *n*-BuOH층과 물로 분배하였다 (Scheme 5).



Scheme 5. Procedure of extraction and various fractions from *S. herbacea*.



*n*-BuOH 층에 대해서 용매를 제거한 후에 reversed phase C<sub>18</sub> 고속 감압 크로마토그래피를 실시하였다. 용리용매는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq. MeOH, 100% MeOH, 그리고 100% EtOAc를 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼 측정 결과 60-80% aq. MeOH 분획에서 흥미있는 peak들이 발견되었다. HPLC를 이용하여 C<sub>47</sub> linear polyacetylene 유도체들인 모두 5개의 물질들을 분리하였으며 이 물질들에 대한 구조는 분광자료의 해석에 의하여 결정되었다 (Scheme 6).



Scheme 6. Isolation of the compounds 1-5 from *S. herbacea*.

주대사물질 compound **1**이 끈끈한 gum의 형태로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석과  $^{13}\text{C}$  NMR에 의해서  $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{15}$ 로 확인되었다. 이 화합물의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  3 - 5에 나타난 peak들과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  110 - 60에 나타난 많은 신호들은 많은 oxygenated carbon 들의 존재를 보여 주었으며 특히  $\delta$  104.6과 95.8에 나타난  $^{13}\text{C}$  NMR 신호와  $\delta$  5.36과 4.18에 나타난 대응하는  $^1\text{H}$  NMR 신호들은 이 화합물이 2개의 sugar를 가지고 있음을 나타내었다. 또한  $\delta$  209.5의 탄소 신호와 대응하는  $\delta$  9.42 의 수소 신호는 하나의 알데히드기가 존재함을 보여 주었으며  $\delta$  177.5와 177.0 에 나타난 2개의 quaternary carbon signal들은 2개의 ester 혹은 carboxylic acid기가 존재함을 나타내었다. 이 뿐만 아니라  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  149.5 (C), 144.4 (C), 124.5 (CH), 107.6 ( $\text{CH}_2$ )의 탄소 신호로 보아 2개의 이중결합의 존재가 확인되었다.  $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{15}$ 의 분자식을 고려해 볼 때 아직도 5개의 불포화도가 추가적으로 존재함을 나타내어 triterpenoid saponin 계열의 화합물임을 나타내었다.

Compound **1**의 aglycone 구조는  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, HSQC, HMBC 실험 등 2D-NMR 실험에 의해서 결정되었다. 특히 4개의 methyl기와 주변의 탄소들 사이에 발견되는 2-bond 혹은 3-bond correlation들은 구조를 결정하는데 크게 기여하였다.  $\delta$  1.10의 methyl proton 신호와  $\delta$  9.42의 aldehyde proton 신호는  $\delta$  82.8의 탄소 신호와 long-range correlation을 보여 A ring의 3번 위치가 oxymethine 임을 보여 주었으며 또  $\delta$  1.10의 methyl proton과  $\delta$  209.5의 aldehyde carbon, 그리고  $\delta$  9.42의 aldehyde proton과  $\delta$  10.5의 methyl carbon의 long-range correlation에 의해서 23번 탄소가 산화된 aldehyde functionality가 확인되어  $3\beta$ -hydroxy-4-formyl-4-methyl triterpenoid 유도체임이 밝혀졌다. H-23와 H-25 methyl proton 및 H-24 formyl proton과 주변의 탄소들 (C-1, C-3, C-4, C-5, C-10)사이의 HMBC correlation들 또한 이러한 해석을 지지하였다. C-3에 methine과 anomeric

methine ( $\delta_{\text{H}}$  4.18,  $\delta_{\text{C}}$  104.6) 상호간의 분명한 HMBC correlation들은 C-3 위치에 glycosydic bond가 연결되어 있음을 나타내었다.  $\delta$  1.21의 H-27는  $\delta$  144.4 (C) 및  $\delta$  43.1 (C)과 long-range coupling을 가지며  $\delta$  5.33 (1H, t, 3.3 Hz)의 olefinic proton은  $\delta$  43.1 (C)과 coupling을 하여 이 이중결합의 위치는 C-12로 결정되었다. 유사하게 exomethylene double bond의 위치 또한 olefinic proton들과 인접한 탄소들 (C-19, C-20, C-21)간의 long-range correlation에 의해서 C-20(29)로 결정되었다. 마지막으로  $\delta$  5.36에 나타난 sugar의 anomeric proton과  $\delta$  177.5의 quaternary carbon 사이에 HMBC correlation이 관찰되어 sugar 하나가 C-28에 ester 형태로 결합되어 있음을 보여 주었다. 이러한 해석은 알려진 관련 유도체들과 NMR 데이터를 비교하였을 때 문헌에 보고된 값과 잘 일치하였다.<sup>24-27)</sup>

Compound **1**은 2개의 sugar moiety들을 가지고 있으며 이들의 입체 화학적 구조는 먼저 compound **1**의 NMR data와 알려진 화합물들과의 NMR data 비교 및 compound **1**을 peracetylation 시킨 후에 얻어진 compound **1** acetate의 2-D NMR data의 해석에 의해서 결정되었다. Vicinal proton-proton coupling constants 값에 의하여 H-1'~H-5' 및 H-1''~H-5''의 orientation은 모두 axial로 밝혀졌으며 H-1'과 H-5' 그리고 H-1''와 H-5'' 사이의 강한 NOESY correlation은 이 2개의 sugar가 각각 D-glucopyranose와 D-glucopyranose임을 보여 주었다. Compound **1**의 sugar 부분의  $^{13}\text{C}$  NMR data를 문헌치와 비교해 보면 이러한 해석과 잘 일치함을 알 수 있었다.<sup>28-30)</sup>

이 sugar들이 aglycone과 연결된 위치는 compound **1**의 HMBC 실험에서 나타난 H-1'과 C-3 그리고 H-1''와 C-28 사이의 long-range correlation에 의해서 glucuronic acid는 aglycone의 3번 위치에 glucose는 aglycone의 28번 위치에 연결되어 있음이 확인되었다. 이와 같이 compound **1**의 구조는

3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β-hydroxy-23-oxo-30-norolean-12:20 (29)-dien-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside로 결정되었다.

유사한 대사물질 compound **2**가 무색의 gum의 형태로 분리되었으며 이 물질의 분자식 C<sub>41</sub>H<sub>62</sub>O<sub>15</sub>은 고분별능 질량분석과 <sup>13</sup>C NMR에 의해서 결정되었다. 이 물질의 분광 스펙트럼은 compound **1**와 상당히 유사하였으나 약간의 차이점이 발견되었다. <sup>13</sup>C NMR에서 δ 209.5에 나타났던 peak가 사라지고 δ 64.4에 새로운 peak가 나타났다. 이것은 23번의 aldehyde기가 hydroxymethylene group으로 환원되었음을 의미하였다. 대응하는 변화가 <sup>1</sup>H NMR에서도 나타나 δ 9.42 (1H, s)에 나타났던 peak가 사라지고 δ 3.22 (2H, s)에 새로운 peak가 발견되었다. 이 모든 변화는 HSQC와 HMBC 실험에 의하여 compound **1**의 23번 위치에 존재하는 aldehyde기가 hydroxymethylene기로 환원된 것으로 확인되었다. 그러므로 compound **2**의 구조는 3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β,23-dihydroxy-30-norolean-12:20(29)-dien-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside로 결정되었다. 이 화합물에 대한 문헌조사 결과 신규의 화합물로 확인되었으며 aglycone에 대한 NMR spectral data는 이전에 보고되었다.<sup>31)</sup>

다른 유사한 대사물질 compound **3** 역시 무색의 gum으로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석과 <sup>13</sup>C NMR에 의해서 C<sub>42</sub>H<sub>64</sub>O<sub>14</sub>로 확인되었다. 이 물질의 일차원 핵자기 공명 분광 스펙트럼은 compound **1**와 유사하였지만 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼을 자세히 분석해 보면 상당한 차이점이 발견되었다. δ 149.5 (C)와 107.6 (CH<sub>2</sub>)에 나타났던 피크가 사라지고 δ 33.5와 24.0에 새로운 2개의 methyl carbon signal 나타났다. 뿐만 아니라 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서 δ 4.62 (1H, s)와 4.61 (1H, s)에 나타났던 2개의 peak가 사라지고 δ 0.92와 0.90에 새로운 2개의 methyl proton peak들이 관찰되었다. 이러한 signal의 변화는 compound **1**의 20번과 29번 사이의 이중

결합이 환원되고 20번 위치에 새로운 methyl group이 첨가됨으로써 설명이 가능하였다. 또한 HSQC와 HMBC 실험에 관찰된 correlation들은 이러한 해석을 지지하였다. 그러므로 compound **3**의 구조는 3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β-hydroxy-23-oxo-olean-12-en-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside로 결정되었다. 문헌조사 결과 이 물질은 C. Borel등에 의해 분리된 화합물이었으나 이 화합물 자체의 NMR 스펙트럼 데이터는 보고 되지 않았으며 단지 가수분해 후에 얻어진 aglycone과 sugar에 대한 구조결정으로 전체적인 구조가 제안되었다.<sup>29)</sup>

유사한 계열의 관련된 대사물질 compound **4**가 무색의 gum으로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 역시 고분별능 질량분석과 <sup>13</sup>C NMR에 의해서 C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>9</sub>로 확인되었다. 이 물질의 분광 스펙트럼은 compound **3**와 유사하였으나 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼에서 compound **3**에 존재하는 δ 60 - 80 사이의 oxygenated carbon들 중에 6개가 사라졌으며 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서도 대응하는 변화가 나타나 δ 3 - 5 사이에 존재하는 peak들 중에 5 개의 oxymethine 및 1 개의 oxymethylene peak가 사라졌다. 이러한 변화는 화합물 compound **3**의 aglycone moiety C-28 (carbonyl carbon)에 ester 형태로 연결되었던 glucose가 제거된 형태의 화학구조와 잘 일치하였다. 그러므로 compound **4**의 구조는 3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β-hydroxy-23-oxo-olean-12-en-28-oic acid로 결정되었다. 이 물질 역시 이전에 compound **3**의 구조를 결정하기 위한 화학 유도체 변환 과정 중 알칼리 가수분해 산물로 얻어 졌으나 아직까지 이차 대사물질로 분리 보고된 적은 없으며 또한 compound **3**과 마찬가지로 NMR 스펙트럼 데이터는 지금까지 보고 되지 않았다.<sup>29)</sup>

마지막으로 대사물질 compound **5**가 노란색의 고체로 분리되었으며 이 물질의 분자식 또한 <sup>13</sup>C NMR과 고분별능 질량분석 데이터에 의하여 C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub>

로 결정되었다. 이 물질의 NMR 분광 스펙트럼의 형태는 지금까지 분리된 화합물과 패턴이 완전히 달랐다. NMR 스펙트럼에서  $\delta$  5.35 (1H, d,  $J=6.9$  Hz)에 나타난 수소 신호와  $\delta$  102.6에 나타난 탄소 신호는 HMQC 실험에 의하여 확인된 전형적인 anomeric signal로서 sugar 하나가 존재함을 보여 주었다. 추가적으로  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  80 - 60 영역에 나타난 6개의 methine carbon 신호들과  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  3.0 - 4.0 영역에 나타난 여러 개의 수소 신호들 역시 이 사실을 지지하였다.  $\delta$  102.6의 anomeric carbon 신호를 제외한  $\delta$  90 이하에 나타난 15개의 탄소신호들의 패턴은 전형적인 flavonol moiety가 존재함을 나타내어 이 화합물이 flavonol glycoside 유도체임을 보여 주었다. HMBC 실험에서 sugar의 anomeric proton ( $\delta$  5.35)이  $\delta$  134.1의 탄소신호와 long-range correlation을 나타내어 sugar가 flavonol aglycone의 3번 위치에 연결되어 있음이 확인 되었다. 이러한 정보와 함께 문헌조사를 실시한 결과 이전에 동일한 식물시료에서 얻어진 isorhamnetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside임이 확인되었으며 보고 된 분광데이터와 잘 일치하였다 (Table1-5; Fig 4-45).<sup>32)</sup>

**Table. 1**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Data for Compound 1.

position	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
1	1.69 (1H, m), 1.12 (1H, m)	39.4t
2	2.04 (1H, m), 1.78 (1H, m)	25.7t
3	3.95 (1H, dd, 11.6, 4.5)	82.8d
4	–	56.5s
5	1.35 (1H, br d, 10.2)	48.8d
6	1.51 (1H, m), 0.91 (1H, m)	21.5t
7	1.52 (1H, m), 1.24 (1H, m)	33.3t
8	–	41.2s
9	1.71 (1H, m)	48.9d
10	–	37.1s
11	1.94 (2H, m)	24.6t
12	5.33 (1H, t, 3.3)	124.5d
13	–	144.4s
14	–	43.1s
15	1.82 (1H, m), 1.12 (1H, m)	29.0t
16	2.18 (1H, m), 1.84 (1H, m)	24.2t
17	–	48.3s
18	2.74 (1H, dd, 13.1, 4.6)	48.6d
19	2.56 (1H, dd, 14.5, 13.1), 2.09 (1H, dd, 14.5, 4.6)	42.7t
20	–	149.5s
21	2.24 (1H, m), 2.13 (1H, m)	31.0t
22	1.91 (1H, m), 1.55 (1H, m)	38.5t
23	9.42 (1H, s)	209.5d
24	1.10 (3H, s)	10.5q
25	1.00 (3H, s)	16.3q
26	0.81 (3H, s)	17.9q
27	1.21 (3H, s)	26.5q
28	–	177.5s
29	4.62 (1H, s), 4.61 (1H, s)	107.6t
1'	4.18 (1H, d, 7.7)	104.6d
2'	3.12 (1H, dd, 9.2, 7.7)	75.3d
3'	3.31 (1H, m)	77.9d
4'	3.40 (1H, m)	73.7d
5'	3.51 (1H, d, 9.8)	76.5d
6'	–	177.0s
1''	5.36 (1H, d, 8.2)	95.8d
2''	3.31 (1H, m)	74.0d
3''	3.42 (1H, m)	78.3d
4''	3.34 (1H, m)	71.2d
5''	3.35 (1H, m)	78.8d
6''	3.80 (1H, br d, 11.5), 3.67 (1H, dd, 11.5, 4.8)	62.6t

<sup>a,b</sup> Measured in CD<sub>3</sub>OD at 600 and 150 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, NOESY, DEPT, HMQC, and HMBC experiments.

**Table. 2**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Data for Compound 2.

position	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
1	1.61 (1H, m), 0.98 (1H, m)	39.6t
2	1.96 (1H, m), 1.76 (1H, m)	26.3t
3	3.68 (1H, m)	82.2d
4	–	43.9s
5	1.26 (1H, m)	48.2d
6	1.49 (1H, m), 1.35 (1H, m)	24.2t
7	1.62 (1H, m), 1.27 (1H, m)	33.4t
8	–	40.7s
9	1.64 (1H, m)	49.0d
10	–	37.7s
11	1.92 (2H, m)	24.6t
12	5.32 (1H, t, 3.1)	124.3d
13	–	144.3s
14	–	43.0s
15	1.84 (1H, m), 1.13 (1H, m)	28.9t
16	2.19 (1H, m), 1.85 (1H, m)	24.2t
17	–	48.4s
18	2.73 (1H, dd, 13.5, 4.1)	48.6d
19	2.56 (1H, dd, 13.5, 13.5), 2.08 (1H, dd, 13.5, 4.1)	42.6t
20	–	149.4s
21	2.23 (1H, m), 2.12 (1H, m)	30.9t
22	1.91 (1H, m), 1.56 (1H, m)	38.4t
23	3.64 (1H, d, 11.5), 3.27 (1H, d, 11.5)	64.8t
24	0.70 (3H, s)	13.4q
25	0.98 (3H, s)	16.5q
26	0.80 (3H, s)	17.8q
27	1.20 (3H, s)	26.4q
28	–	177.4s
29	4.62 (1H, s), 4.61 (1H, s)	107.4t
1'	4.44 (1H, d, 7.8)	105.0d
2'	3.26 (1H, m)	75.0d
3'	3.39 (1H, m)	78.1d
4'	3.43 (1H, m)	73.6d
5'	3.41 (1H, d, 8.8)	76.5d
6'	–	177.0s
1''	5.37 (1H, d, 8.2)	95.8d
2''	3.33 (1H, m)	73.9d
3''	3.44 (1H, m)	78.2d
4''	3.36 (1H, m)	71.1d
5''	3.35 (1H, m)	78.6d
6''	3.80 (1H, dd, 11.8, 1.5), 3.68 (1H, m)	62.4t

<sup>a,b</sup> Measured in CD<sub>3</sub>OD at 600 and 150 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, ROESY, DEPT, HMQC, and HMBC experiments.



**Table. 3**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Data for Compound 3.

position	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
1	1.75 (1H, m), 1.14 (1H, m)	39.2t
2	1.97 (1H, m), 1.74 (1H, m)	25.5t
3	3.92 (1H, dd, 11.5, 4.1)	83.0d
4	-	56.3s
5	1.32 (1H, m)	48.9d
6	1.49 (1H, m), 0.83 (1H, m)	21.4t
7	1.49 (1H, m), 1.22 (1H, m)	33.2t
8	-	41.0s
9	1.66 (1H, m)	48.9d
10	-	36.9s
11	1.92 (2H, m)	23.9t
12	5.25 (1H, t, 3.2)	123.5d
13	-	144.8s
14	-	43.0s
15	1.78 (1H, m), 1.07 (1H, m)	28.8t
16	2.03 (1H, m), 1.69 (1H, m)	24.5t
17	-	48.0s
18	2.84 (1H, dd, 13.2, 3.9)	42.6d
19	1.67(2H, m)	47.1t
20	-	31.5s
21	1.38 (1H, m), 1.19 (1H, m)	34.8t
22	1.72 (1H, m), 1.61 (1H, m)	33.1t
23	9.41 (1H, s)	209.6d
24	1.09 (3H, s)	10.4q
25	0.98 (3H, s)	16.2q
26	0.78 (3H, s)	17.7q
27	1.16 (3H, s)	26.4q
28	-	178.3s
29	0.90 (3H, s)	33.5q
30	0.92 (3H, s)	24.0q
1'	4.20 (1H, d, 7.8)	104.5d
2'	3.12 (1H, dd, 8.3, 7.8)	75.0d
3'	3.31 (1H, m)	77.6d
4'	3.41 (1H, m)	73.5d
5'	3.42 (1H, m)	76.6d
6'	-	178.3s
1''	5.36 (1H, d, 8.3)	95.7d
2''	3.33 (1H, m)	73.8d
3''	3.42 (1H, m)	78.1d
4''	3.34 (1H, m)	71.0d
5''	3.57 (1H, m)	78.6d
6''	3.81 (1H, br d, 11.2), 3.67 (1H, dd, 11.2, 3.9)	62.3t

<sup>a,b</sup> Measured in CD<sub>3</sub>OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, ROESY, DEPT, HSQC, and HMBC experiments.

**Table. 4**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Data for Compound 4.

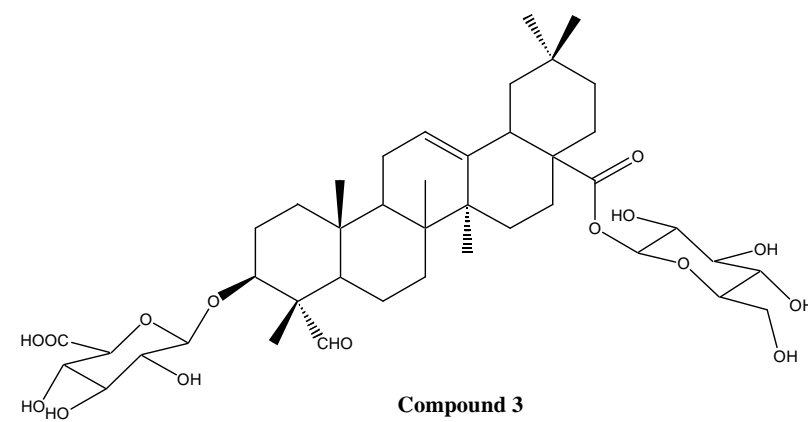
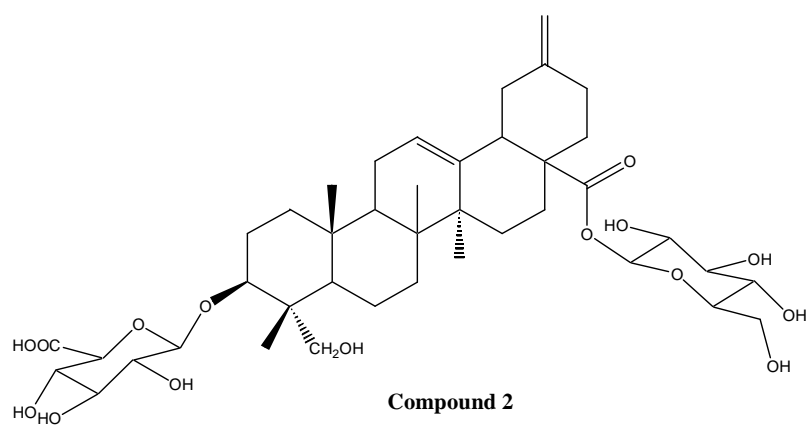
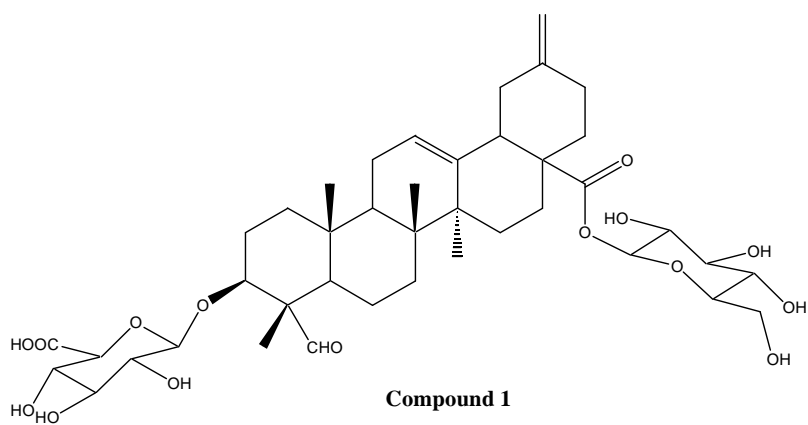
position	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
1	1.69 (1H, m), 1.15 (1H, m)	39.2t
2	1.93 (1H, m), 1.69 (1H, m)	25.8t
3	3.86 (1H, dd, 11.4, 4.3)	83.5d
4	–	56.1s
5	1.32 (1H, m)	49.0d
6	1.60 (1H, m), 0.91 (1H, m)	21.4t
7	1.51 (1H, m), 1.21 (1H, m)	33.6t
8	–	40.9s
9	1.69 (1H, m)	48.8d
10	–	37.0s
11	1.92 (2H, m)	23.9t
12	5.24 (1H, t, 3.3)	123.3d
13	–	145.0s
14	–	43.0s
15	1.73 (1H, m), 1.06 (1H, m)	28.8t
16	1.97 (1H, m), 1.55 (1H, m)	24.5t
17	–	47.6s
18	2.83 (1H, dd, 13.7, 3.9)	42.7d
19	1.69(1H, m), 1.12(1H, m)	47.2t
20	–	31.6s
21	1.33 (1H, m), 1.22 (1H, m)	34.9t
22	1.70 (1H, m), 1.51 (1H, m)	33.3t
23	9.39 (1H, s)	208.7d
24	1.12 (3H, s)	10.5q
25	1.00 (3H, s)	16.1q
26	0.82 (3H, s)	17.7q
27	1.18 (3H, s)	26.5q
28	–	172.5s
29	0.91 (3H, s)	33.8q
30	0.94 (3H, s)	24.0q
1'	4.24 (1H, d, 7.7)	105.0q
2'	3.11 (1H, dd, 9.1, 7.7)	74.8d
3'	3.30 (1H, dd, 9.1, 9.6)	77.4d
4'	3.46 (1H, dd, 9.1, 9.1)	73.0d
5'	3.74 (1H, d, 9.6)	76.5d
6'	–	181.5s

<sup>a,b</sup> Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, DEPT, HMQC, and HMBC experiments.

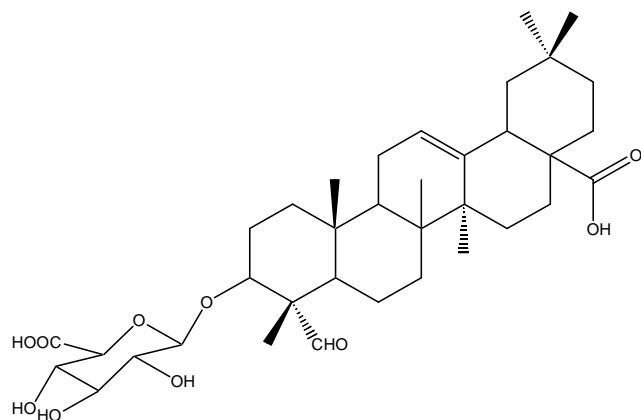
**Table. 5  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Data for Compound 5.**

position	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
1	-	-
2	-	157.3s
3	-	134.1s
4	-	178.0s
5	-	161.6s
6	6.14 (1H, s)	99.0d
7	-	165.3s
8	6.32 (1H, s)	93.8d
9	-	157.1s
10	-	104.4s
1'		121.81s
2'	7.88 (1H, s)	113.10d
3'	-	147.08s
4'	-	149.52s
5'	6.87 (1H, d, 7.8)	114.77d
6'	7.53 (1H, d, 7.8)	122.61d
4-OMe	3.92 (3H, s)	55.7q
1''	5.35 (1H, d, 6.9)	102.59d
2''	3.47 (1H, m)	74.78d
3''	3.47 (1H, m)	76.88d
4''	3.29 (1H, m)	70.33d
5''	3.27 (1H, m)	77.32d
6''	3.73 (1H, dd, 11.8, 1.5), 3.55 (1H, dd, 11.8, 5.0)	61.42t

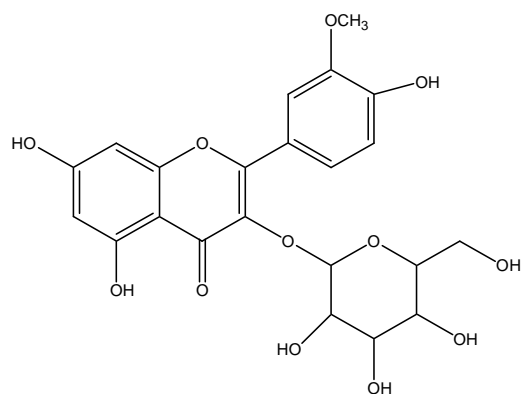
<sup>a,b</sup> Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, DEPT, HMQC, and HMBC experiments.



**Fig. 4** Chemical structure of compounds 1-3 from *S. herbacea*.



**Compound 4**



**Compound 5**

**Fig. 5** Chemical structure of compounds 4-5 from *S. herbacea*.

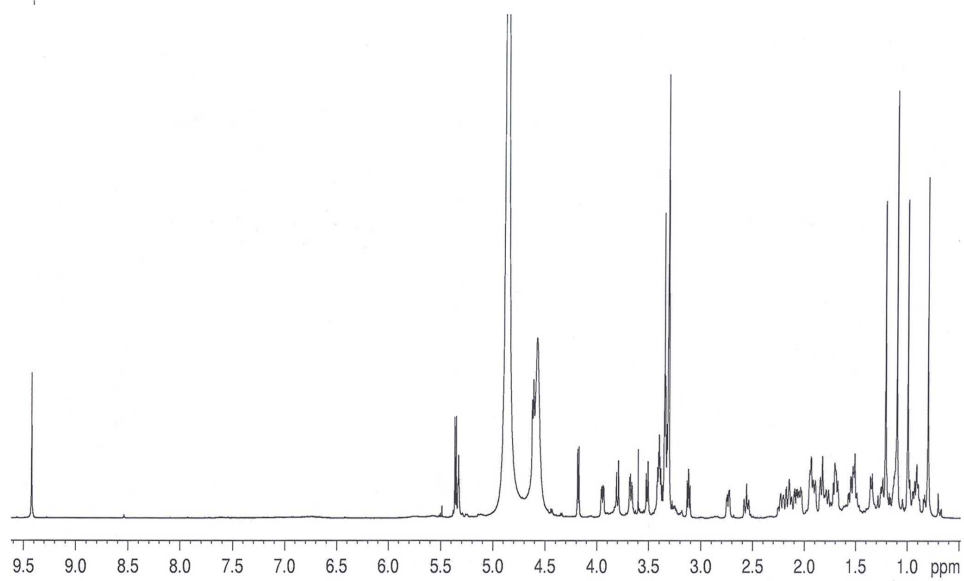


Fig. 6 <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.

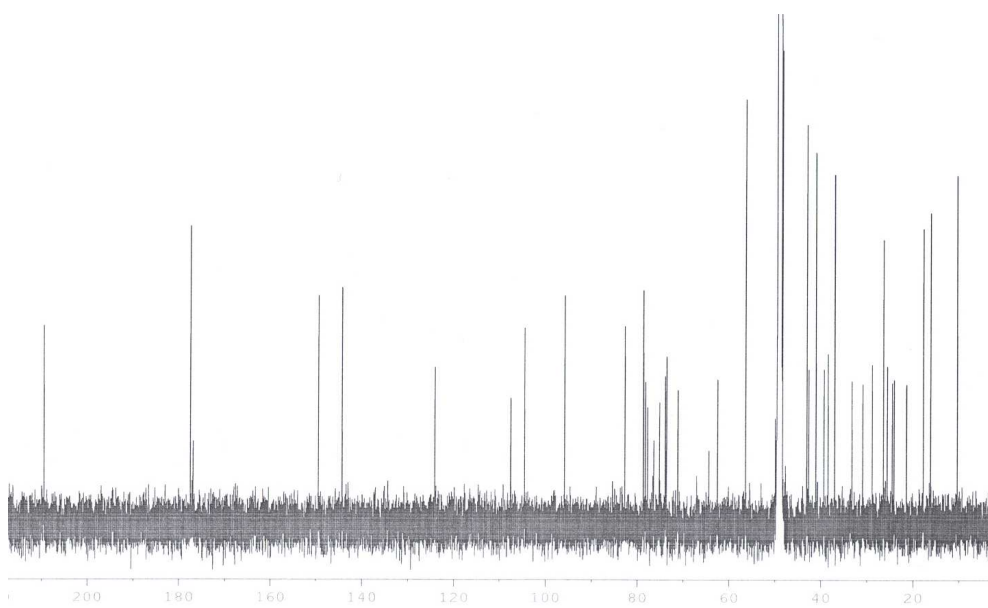


Fig. 7 <sup>13</sup>C NMR spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.

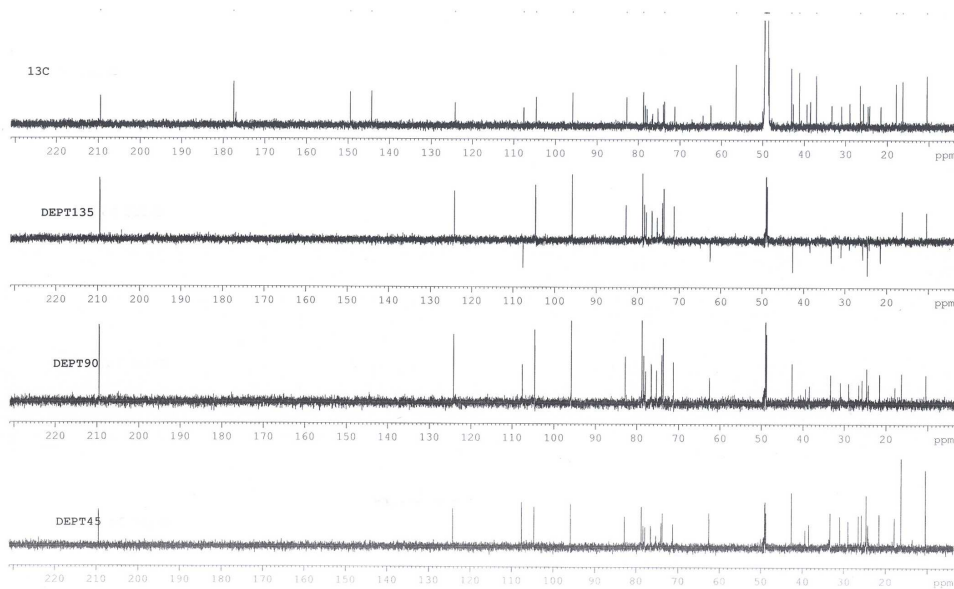


Fig. 8 DEPT spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.

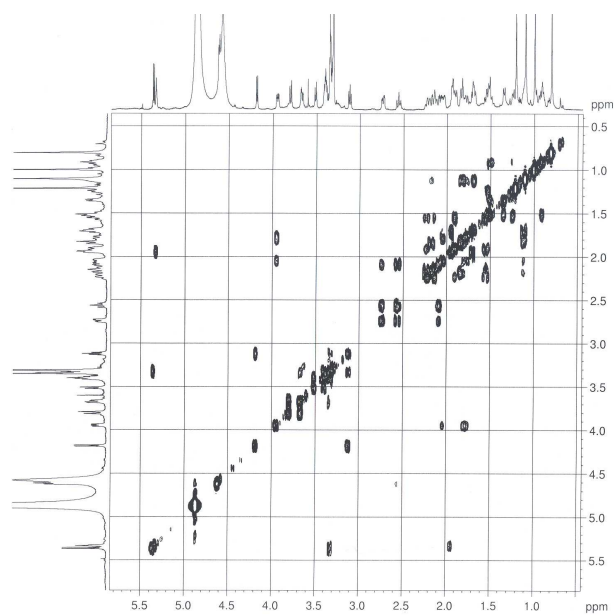


Fig. 9 gDQCOSY spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.

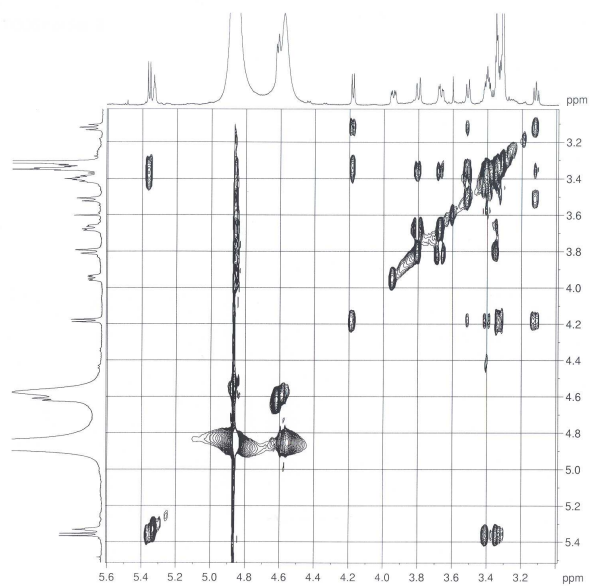


Fig. 10 TOCSY spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.

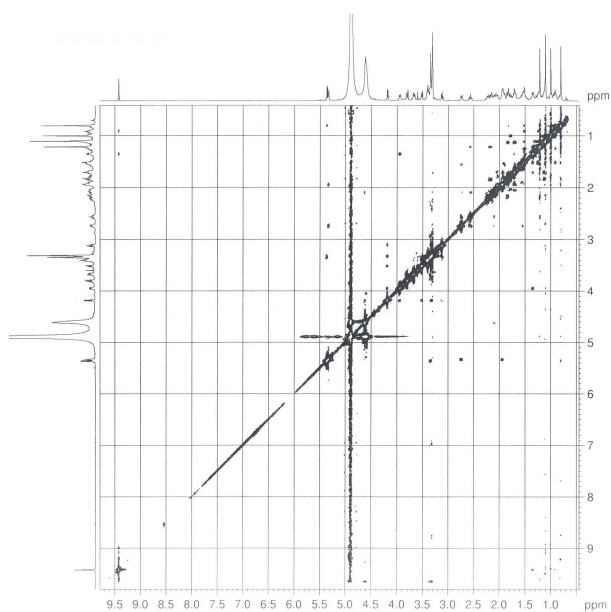


Fig. 11 NOESY spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.



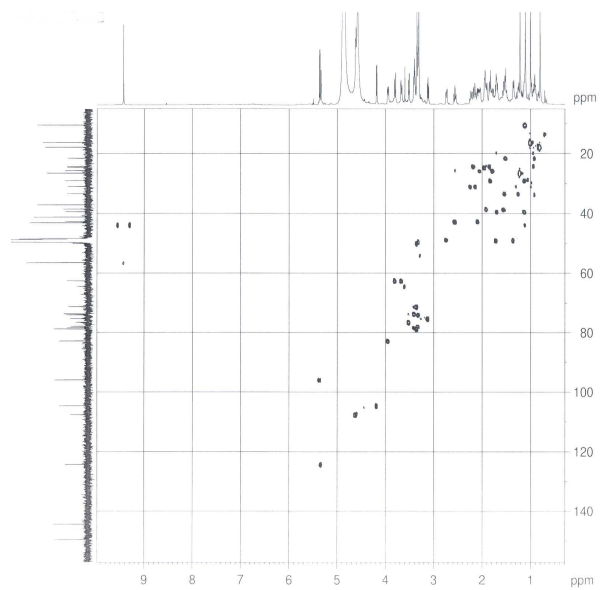


Fig. 12 gHMQC spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.

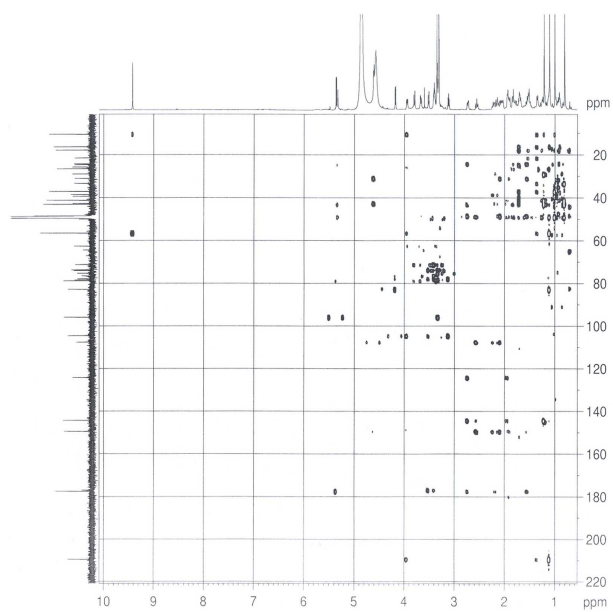


Fig. 13 gHMBC spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.

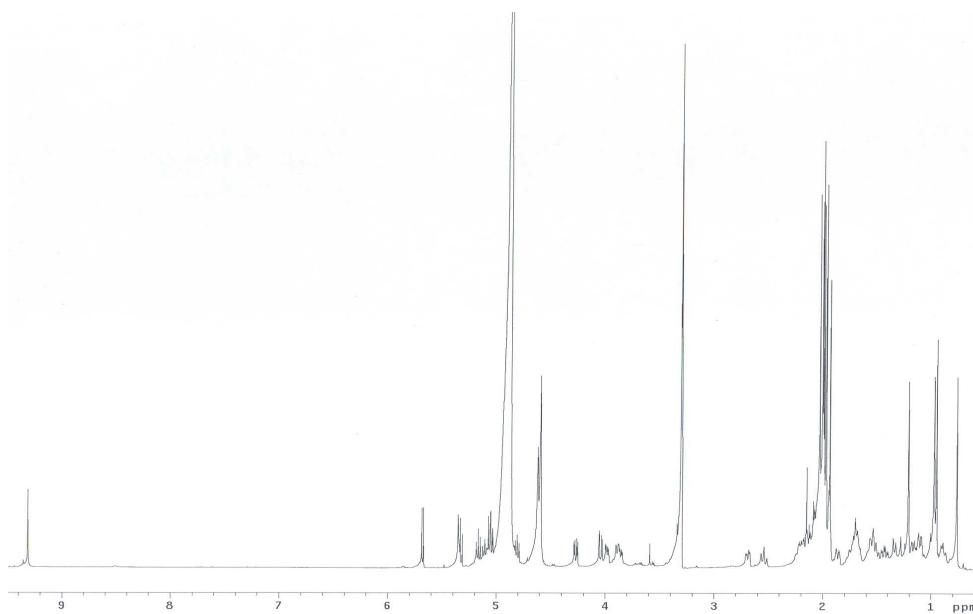


Fig. 14  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1-Ac in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

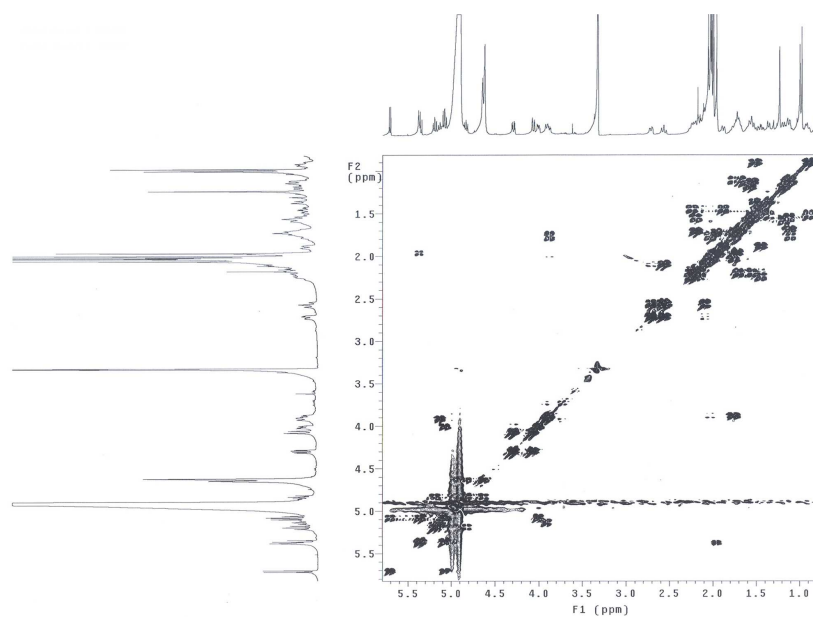


Fig. 15 gDQCOSY spectrum of compound 1-Ac in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

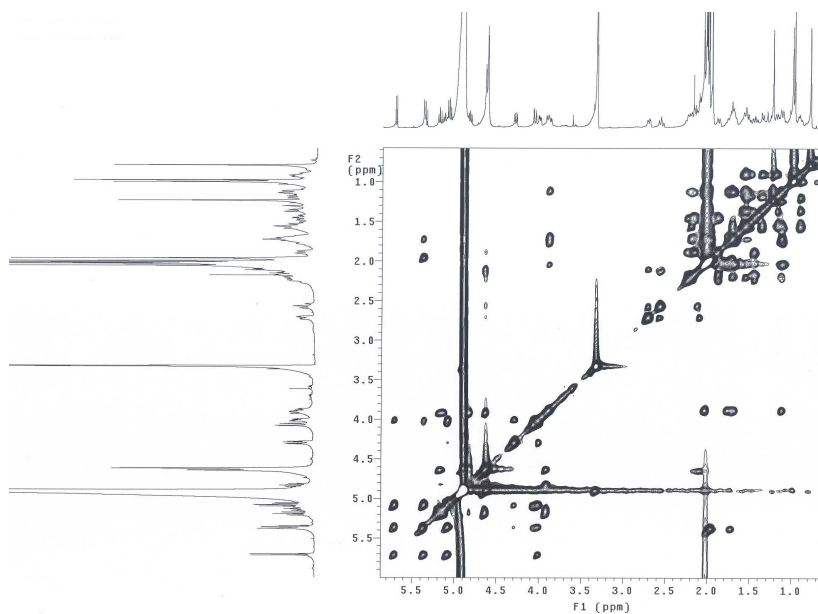


Fig. 16 TOCSY spectrum of compound 1-Ac in CD<sub>3</sub>OD.

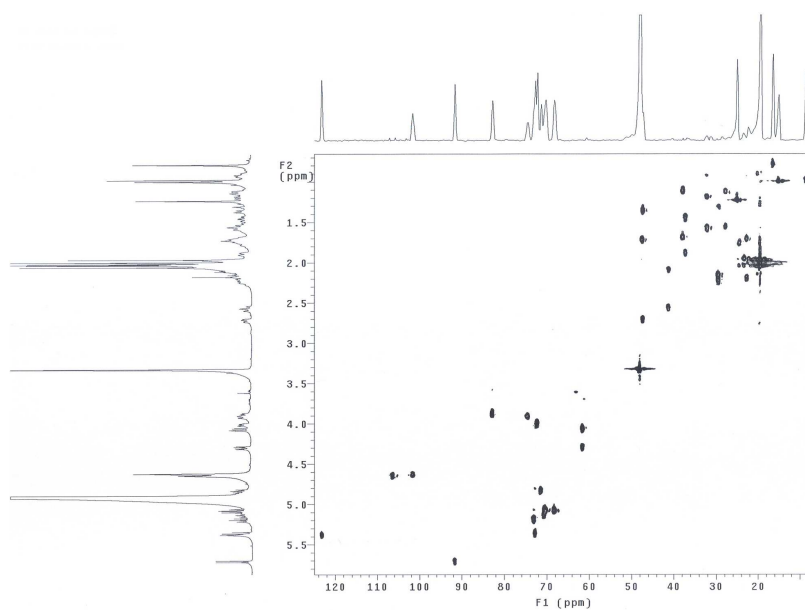


Fig. 17 gHSQC spectrum of compound 1-Ac in CD<sub>3</sub>OD.

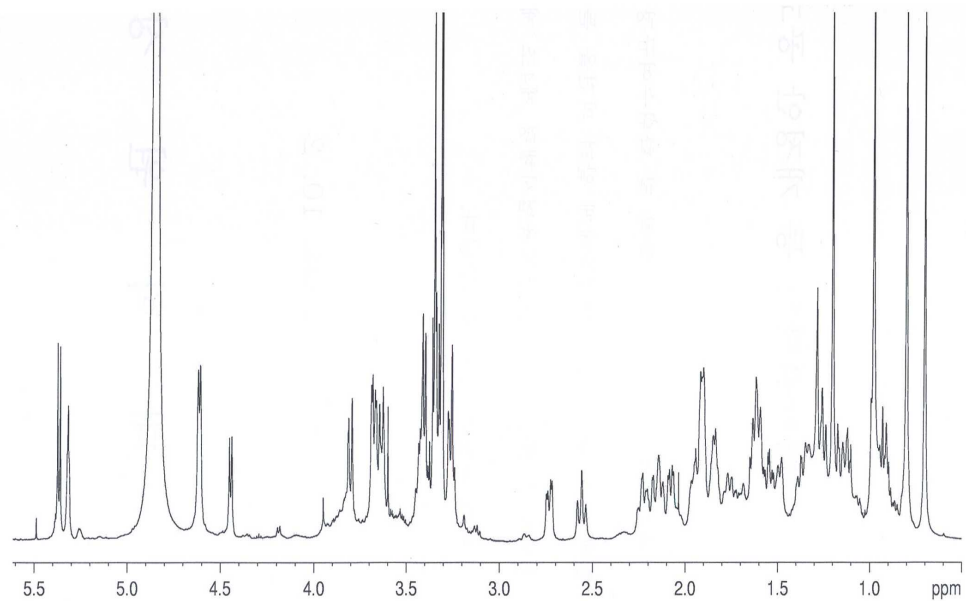


Fig. 18  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

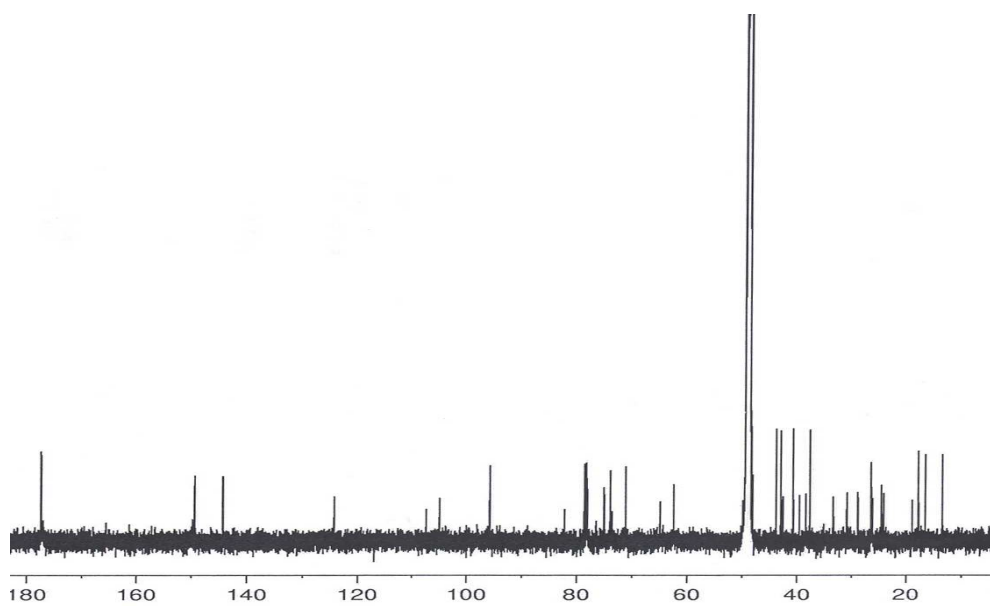


Fig. 19  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

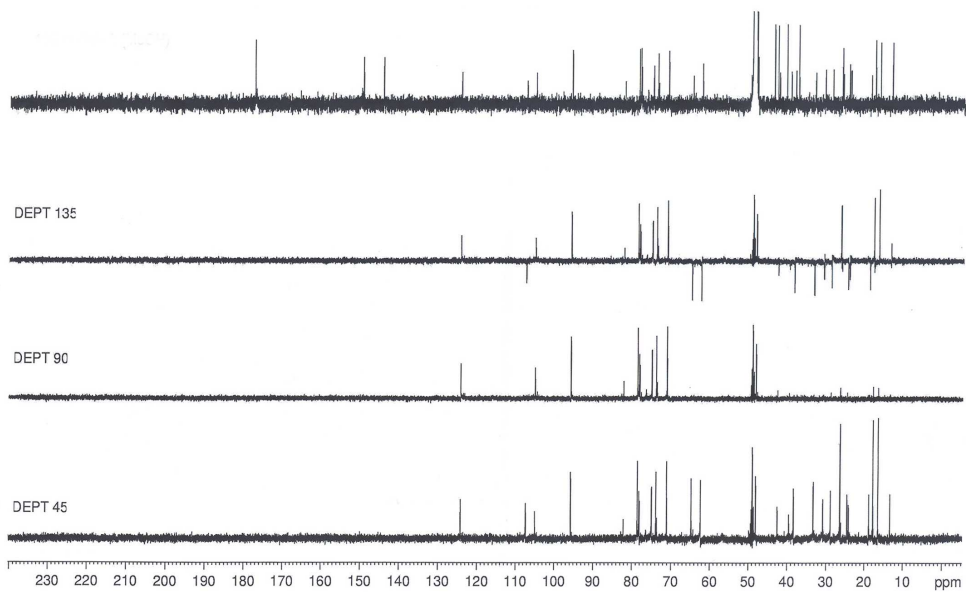


Fig. 20 DEPT spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.

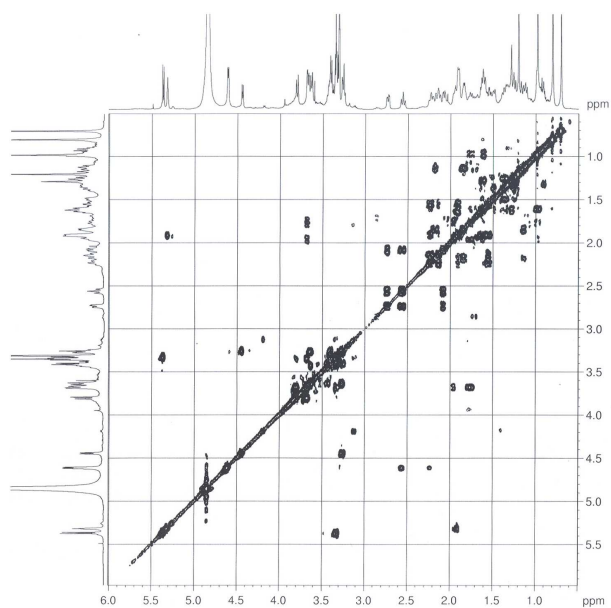


Fig. 21 gDQCOSY spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.

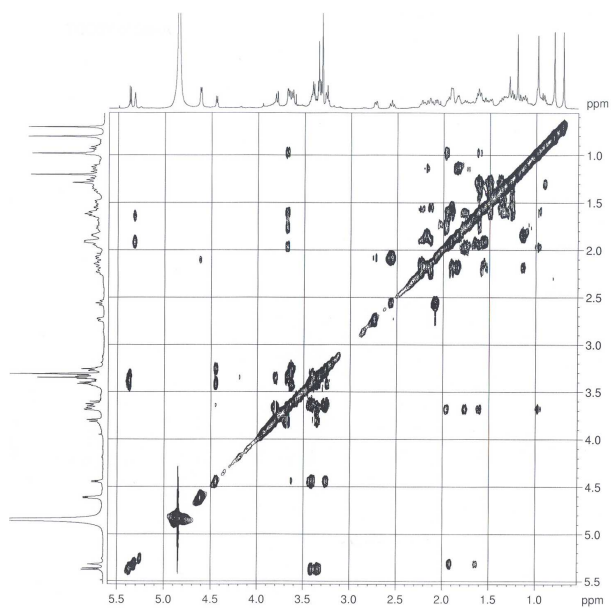


Fig. 22 TOCSY spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.

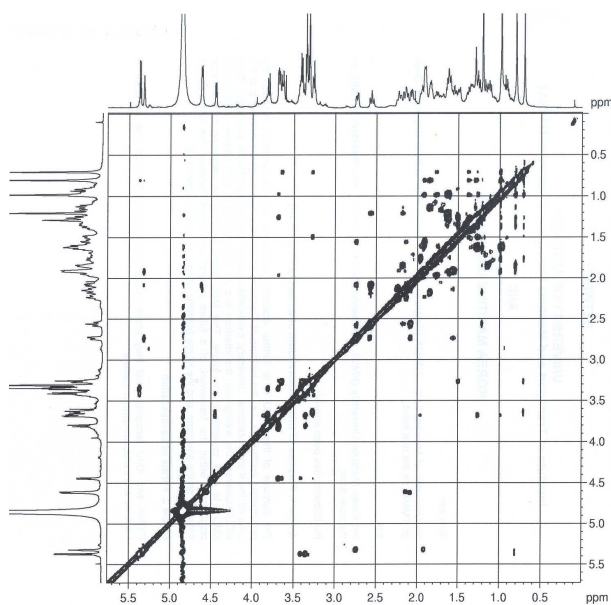


Fig. 23 ROESY spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.

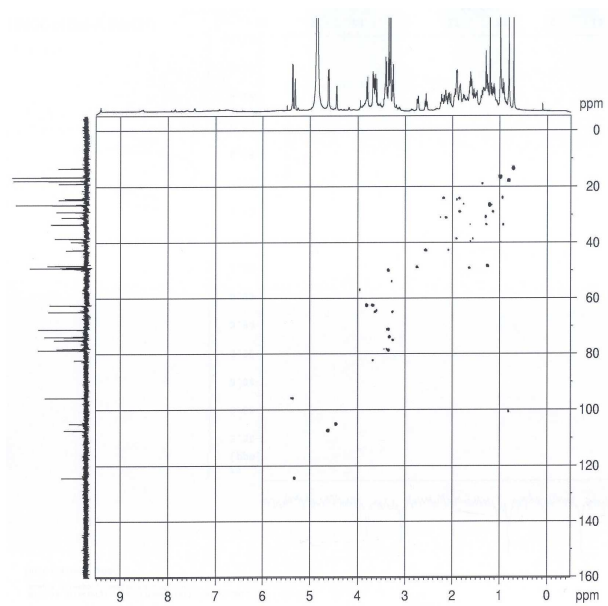


Fig. 24 gHMQC spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.

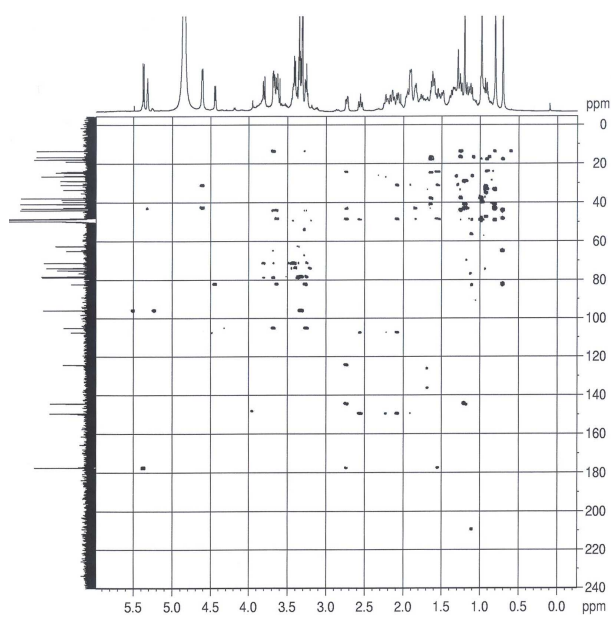


Fig. 25 gHMBC spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.

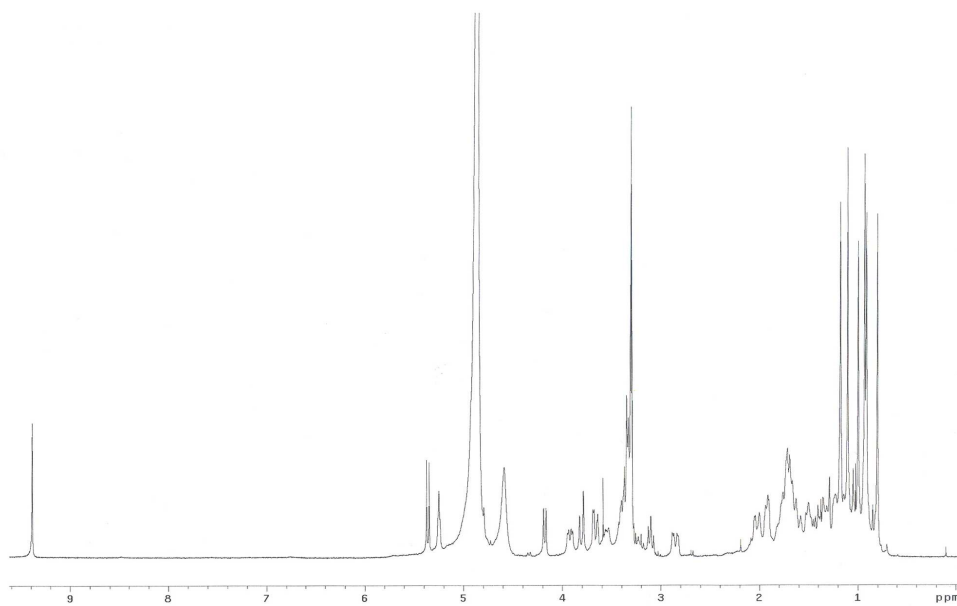


Fig. 26  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

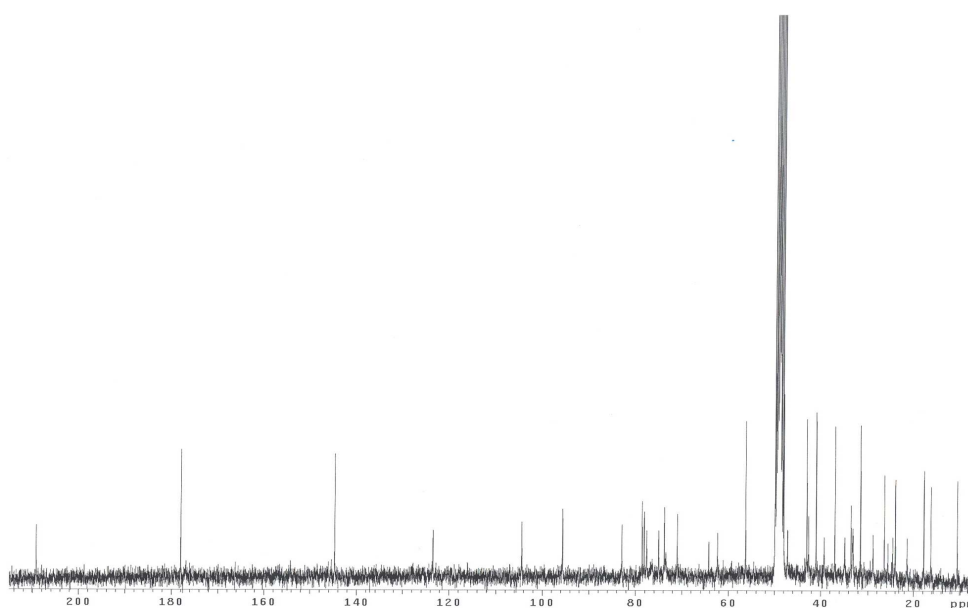


Fig. 27  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



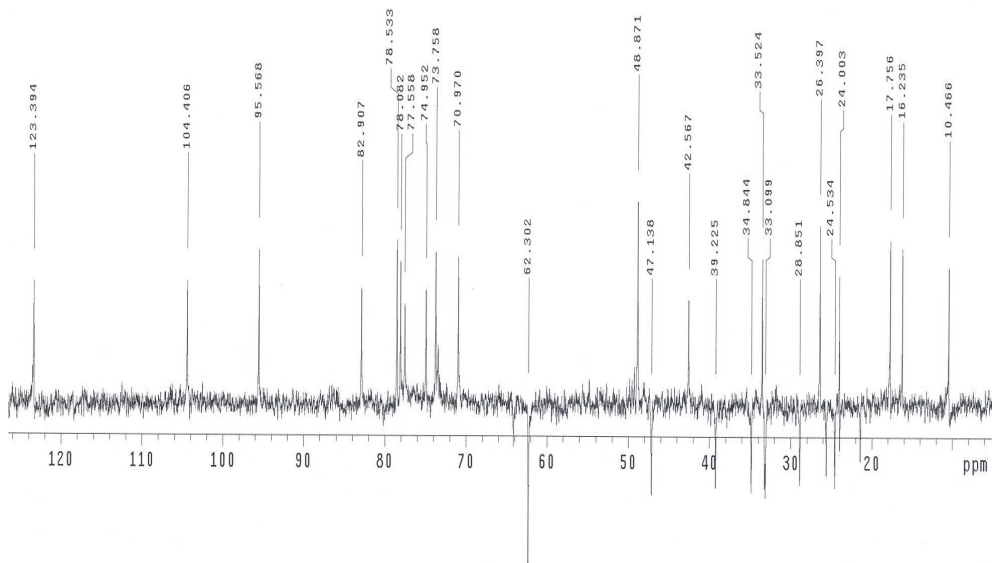


Fig. 28 DEPT spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.

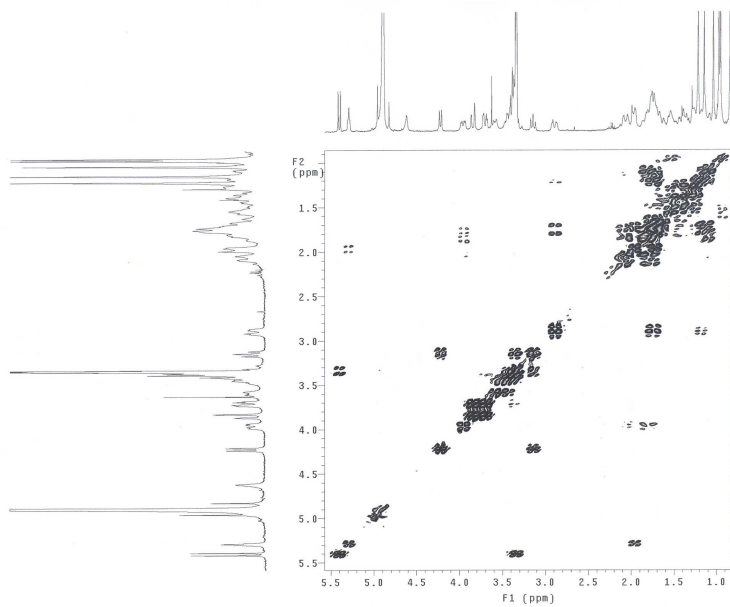


Fig. 29 gDQCOSY spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.

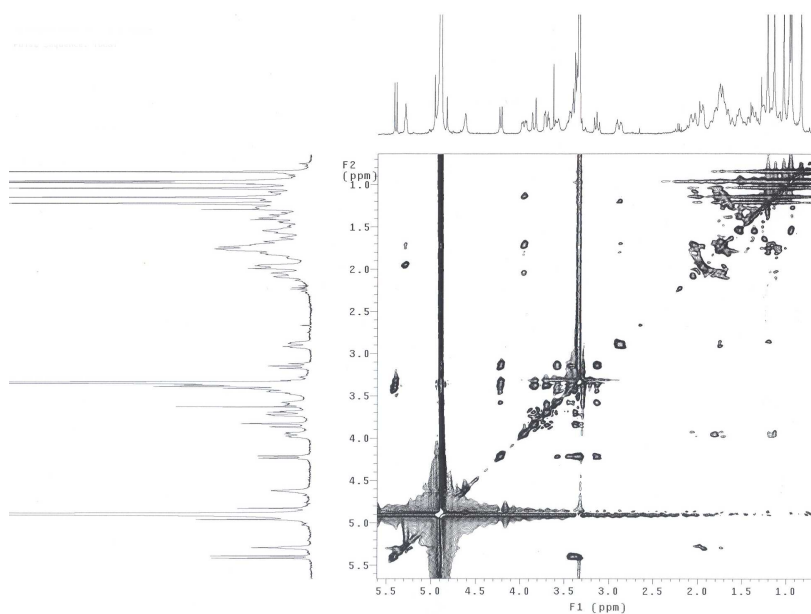


Fig. 30 TOCSY spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.

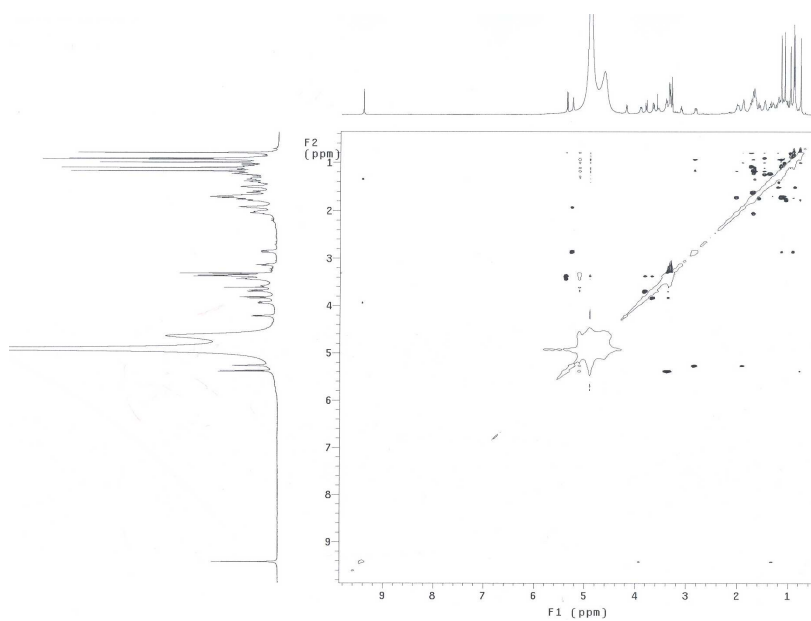


Fig. 31 ROESY spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.

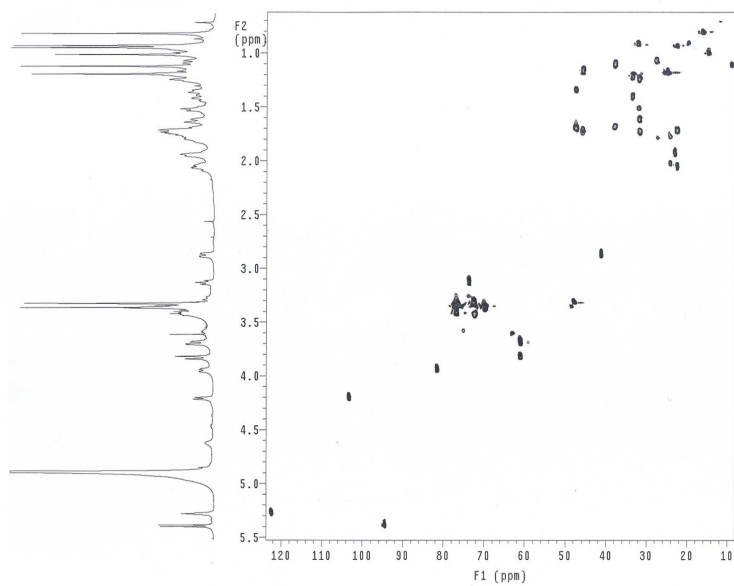


Fig. 32 gHSQC spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.

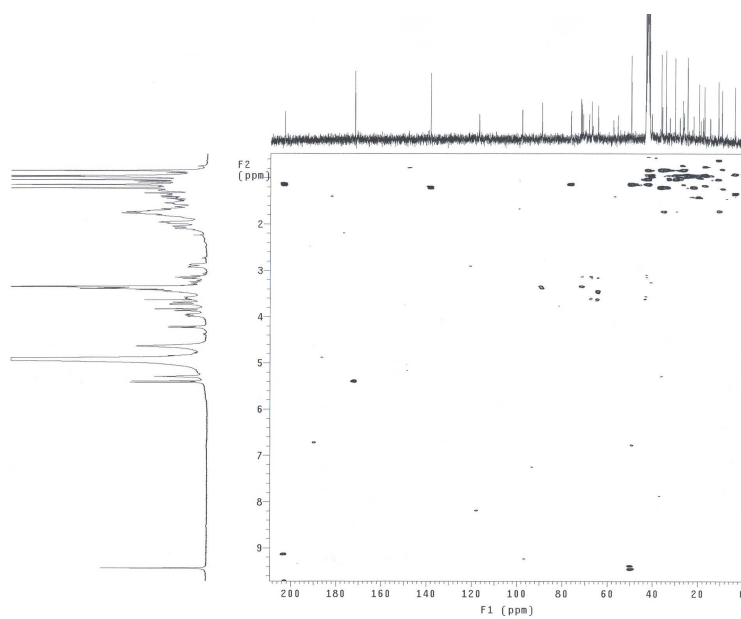


Fig. 33 gHMBC spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.

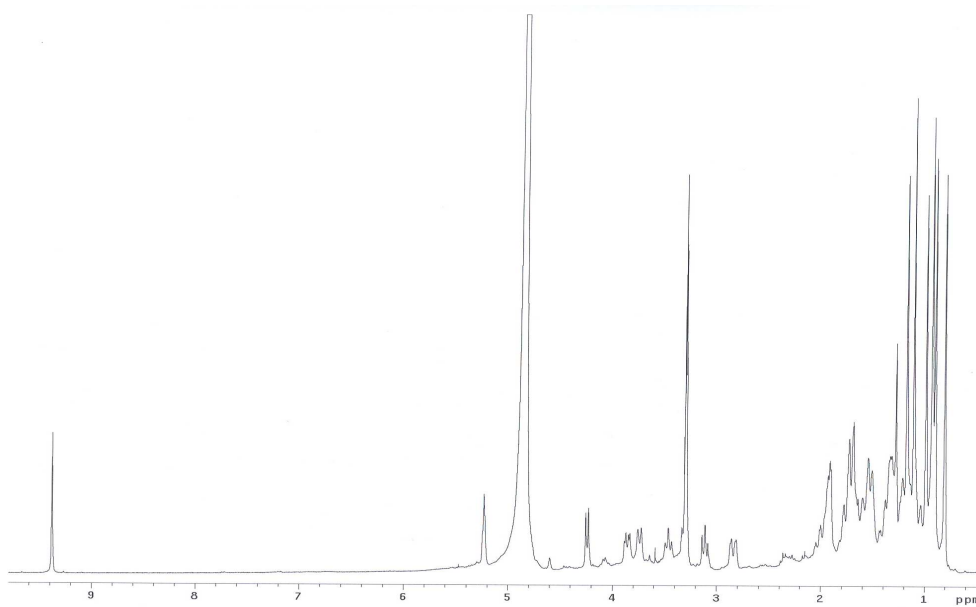


Fig. 34 <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 4 in CD<sub>3</sub>OD.

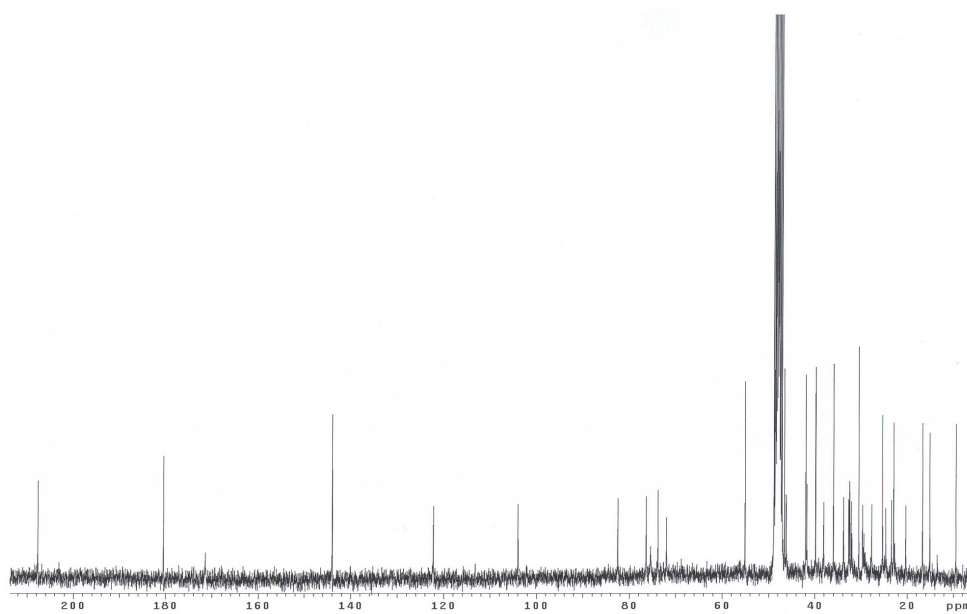


Fig. 35 <sup>13</sup>C NMR spectrum of compound 4 in CD<sub>3</sub>OD.

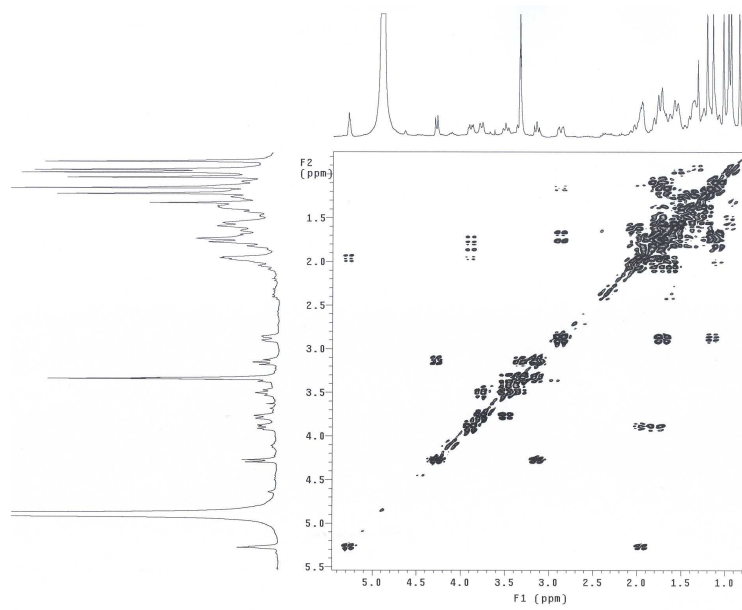


Fig. 36 gDQCOSY spectrum of compound 4 in CD<sub>3</sub>OD.

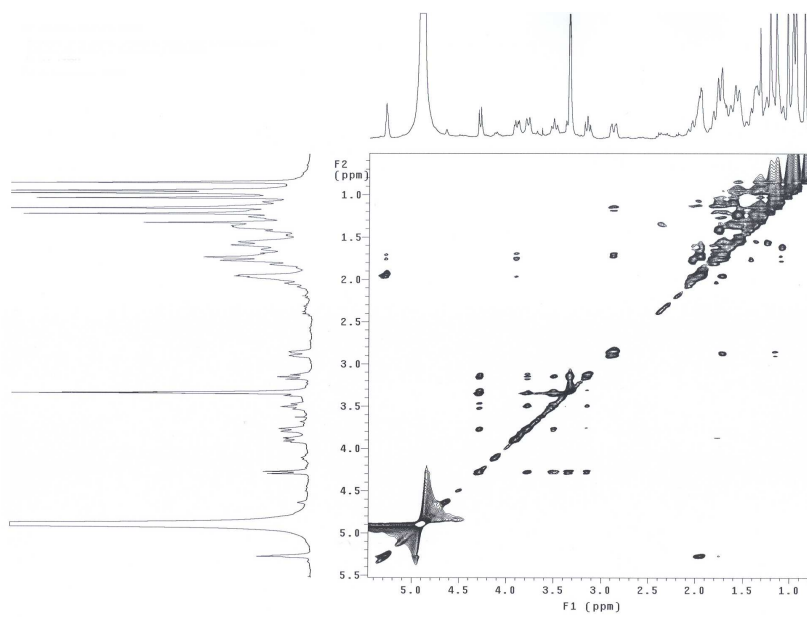


Fig. 37 TOCSY spectrum of compound 4 in CD<sub>3</sub>OD.

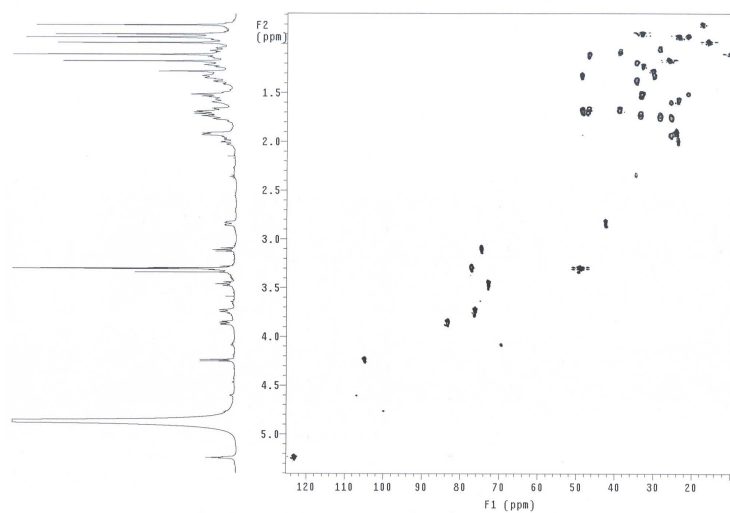


Fig. 38 gHMBC spectrum of compound 4 in CD<sub>3</sub>OD.

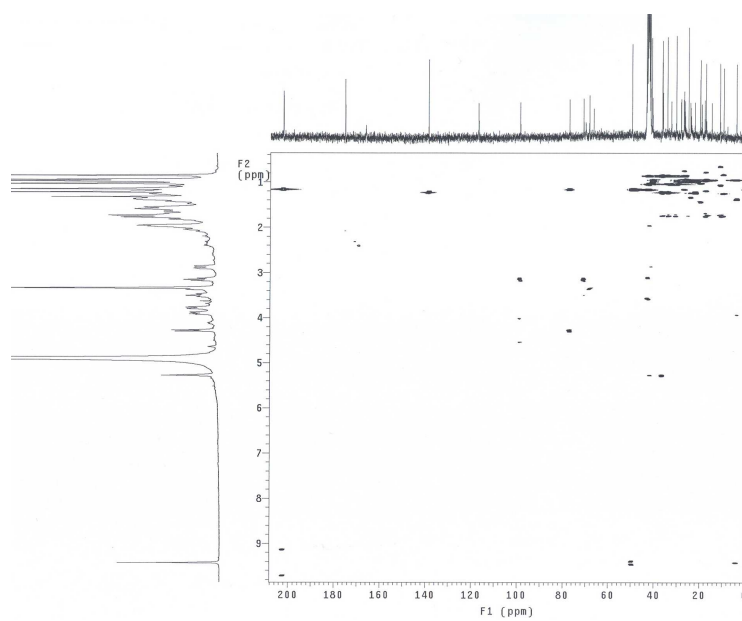


Fig. 39 gHMBC spectrum of compound 4 in CD<sub>3</sub>OD.

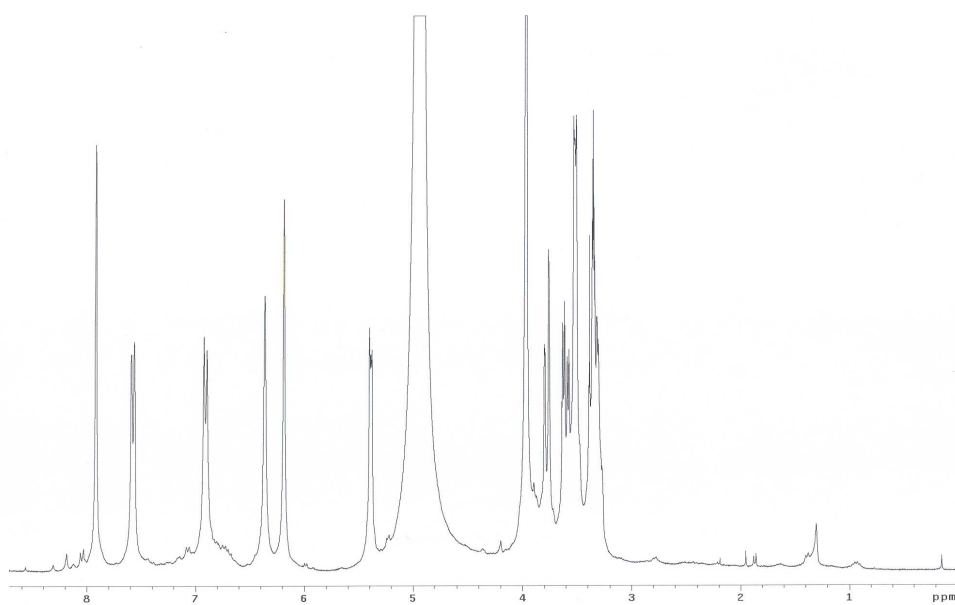


Fig. 40  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

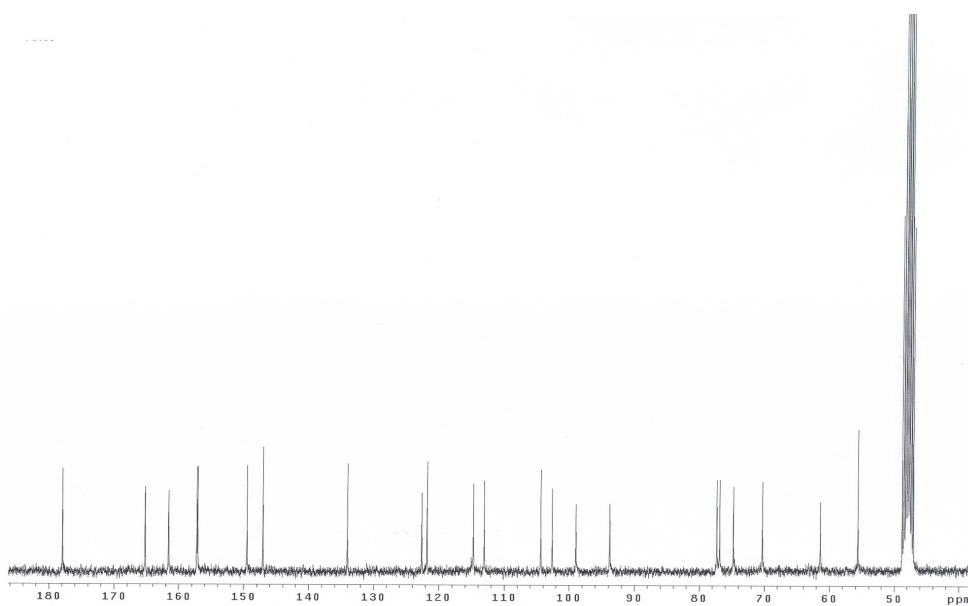


Fig. 41  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

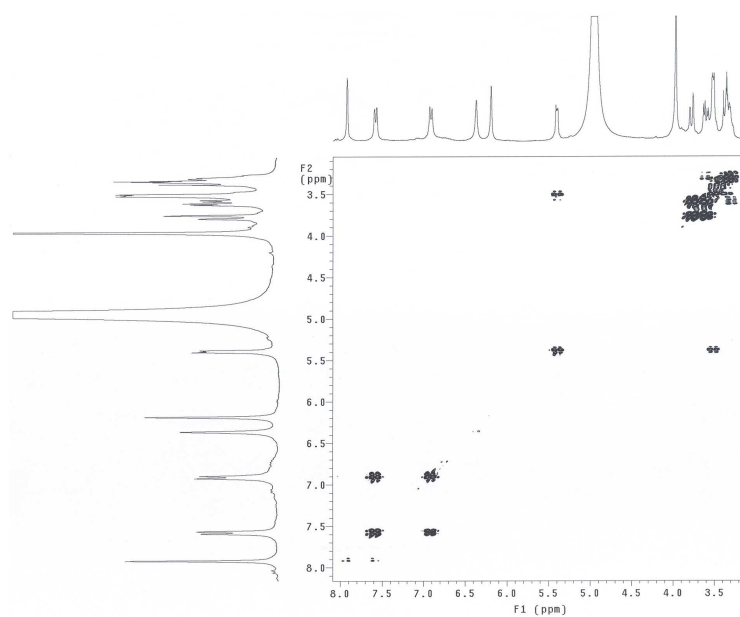


Fig. 42 gDQCOSY spectrum of compound 5 in CD<sub>3</sub>OD.

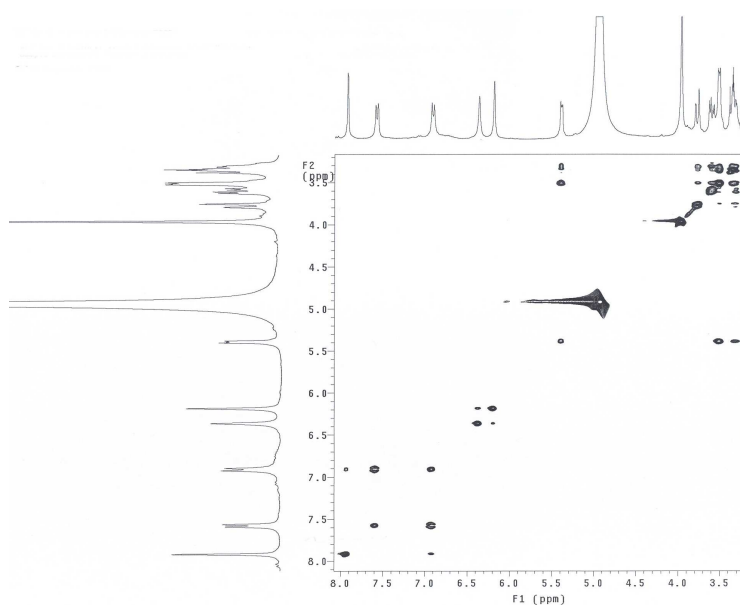


Fig. 43 TOCSY spectrum of compound 5 in CD<sub>3</sub>OD.



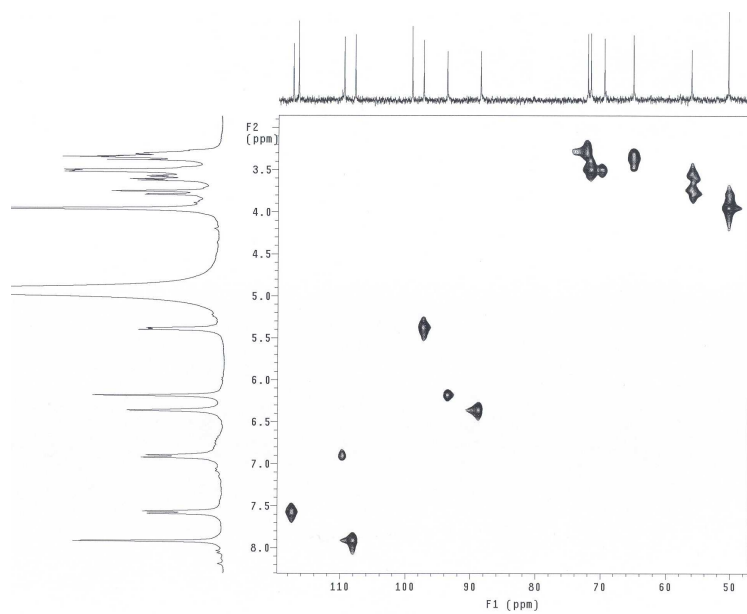


Fig. 44 gHMQC spectrum of compound 5 in CD<sub>3</sub>OD.

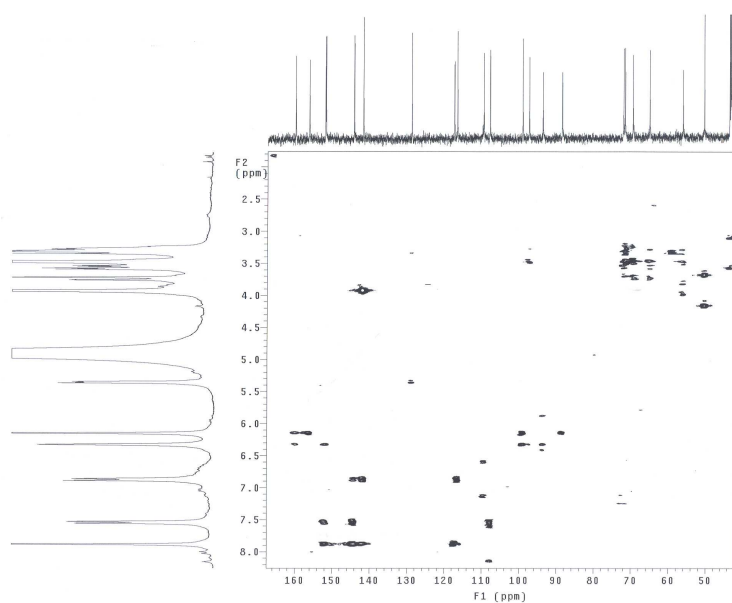


Fig. 45 gHMBC spectrum of compound 5 in CD<sub>3</sub>OD.

## 3.2 항산화 활성

### 3.2.1 추출 및 분획물의 항산화 활성

#### 3.2.1.1 DPPH radical 소거 효과

DPPH radical에 대한 전자공여능을 측정한 결과 함초 조추출물이 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 58.2%, 40.8%, 30.9%의 소거율을 나타내어 약간의 효과가 있는 것으로 나타났다. 함초 각각의 분획물을 같은 농도에서 측정한 결과 *n*-BuOH fr.이 85.2%, 52.4%, 33.9%로 대조군 BHT (86.9%, 79.1%, 63.2%)에 상응하는 효과를 지님을 확인할 수 있었다. 또한 85% aq. MeOH fr.에서는 동일 농도에서 70.0%, 56.9%, 49.3%로 *n*-BuOH fr. 다음으로 효과가 좋았으며 이는 대조군 BHA (68.0%, 54.9%, 39.7%)에 상응하는 결과이다. 그 외 H<sub>2</sub>O fr.은 25.7%, 19.7%, 16.1%로 거의 효과가 없는 것으로 나타났으며, *n*-hexane fr. 역시 27.7%, 19.6%, 15.6%로 효과가 없었다 (Table 6).

Table 6. DPPH radical scavenging effect of *S. herbacea* crude extract and fractions (EDA(%)).

Sample	Concentrate		
	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
Crude Extract	58.2	40.8	30.9
<i>n</i> -hexane fr.	27.7	19.6	15.6
85% aq. MeOH fr.	70.0	56.9	49.3
<i>n</i> -BuOH fr.	85.2	52.4	33.9
H <sub>2</sub> O fr.	25.7	19.7	16.1
BHT	86.9	79.1	63.2
BHA	68.0	54.9	39.7

### 3.2.1.2 Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) 소거 효과

함초 추출물과 분획물에 대해 SIN-1과 authentic peroxynitrite를 이용하여 항산화활성을 50 µg/ml 농도에서 측정하였다. SIN-1은 in vitro 상에서 nitric oxide (NO·)와 superoxide anion (·O<sub>2</sub>)을 동시에 생성시키는데 이를 첨가한 결과에서 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O, *n*-hexane fr.은 모두 좋은 소거 효과를 보였다. 소거 정도는 각각 99.8%, 99.5%, 83.9%, 44.2%로 나타났다. 결과에서 알 수 있듯이 85% aq. MeOH fr.과 *n*-BuOH은 대조군인 L-ascorbic acid (100.3%), penicillamine (99.2%) 보다는 소거 효과가 크게 나타났고, H<sub>2</sub>O fr. 역시 좋은 소거 효과를 보임을 확인할 수 있었다 (Table 7). 반면에 authentic peroxynitrite를 첨가한 결과에서는 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O, *n*-hexane fr. 소거 정도가 각각 71.5%, 70.8%, 34.5%, 44.2%로 SIN-1을 첨가한 결과보다는 소거 활성이 현저하게 낮게 나타났다. 하지만 여전히 85% aq. MeOH, *n*-BuOH fr.은 높은 소거 효과를 땀을 확인할 수 있었다 (Table 8).

**Table 7. Scavenging activity of *S. herbacea* fractions on ONOO<sup>-</sup> from decomposition of SIN-1 (50 µg/ml).**

Sample	% inhibition
<i>n</i> -hexane fr.	44.2 ± 6.3
85% aq. MeOH fr.	99.8 ± 0.1
<i>n</i> -BuOH fr.	99.5 ± 0.3
H <sub>2</sub> O fr.	83.9 ± 8.9
L-ascorbic acid	100.3 ± 3.3
Penicillamine	99.2 ± 0.2

Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

**Table 8. Scavenging activity of *S. herbacea* fractions on authentic ONOO<sup>-</sup> (50 µg/ml).**

Sample	% inhibition
<i>n</i> -hexane fr.	44.2 ± 6.3
85% aq. MeOH fr.	71.5 ± 7.6
<i>n</i> -BuOH fr.	70.8 ± 4.7
H <sub>2</sub> O fr.	34.5 ± 14.8
L-ascorbic acid	98.5 ± 0.8
Penicillamine	92.0 ± 2.3

Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

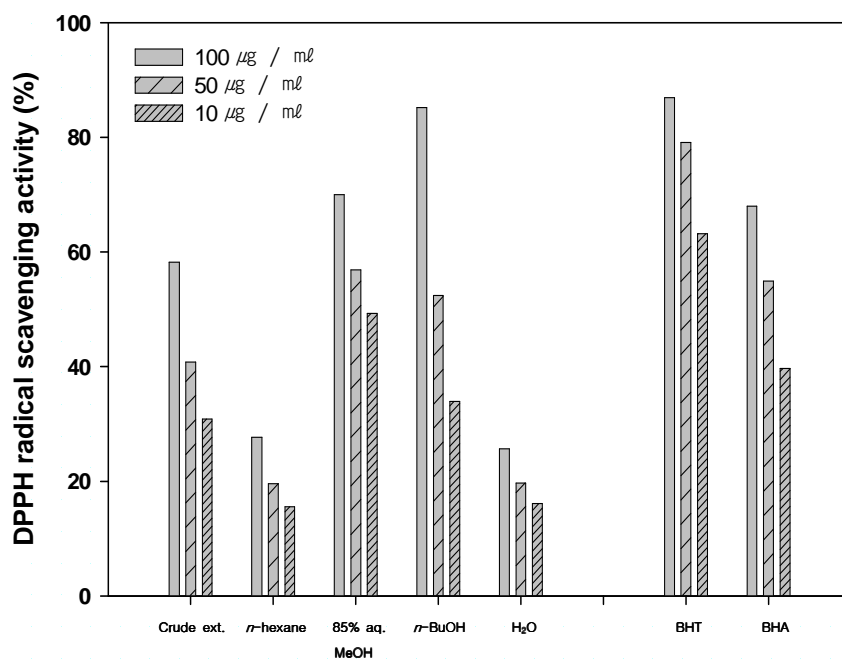


Fig. 46 DPPH radical scavenging effect of *S. herbacea* crude extract and fractions.

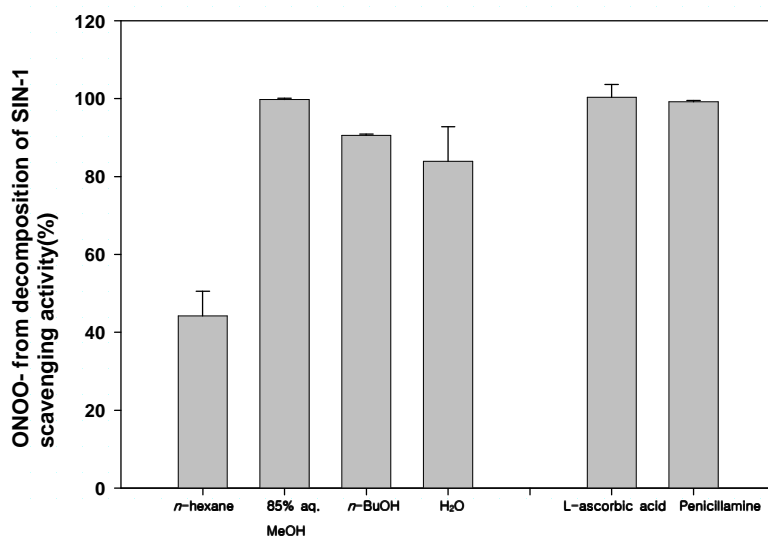


Fig. 47 Scavenging activity of *S. herbacea* fractions on ONOO<sup>-</sup> from decomposition of SIN-1 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

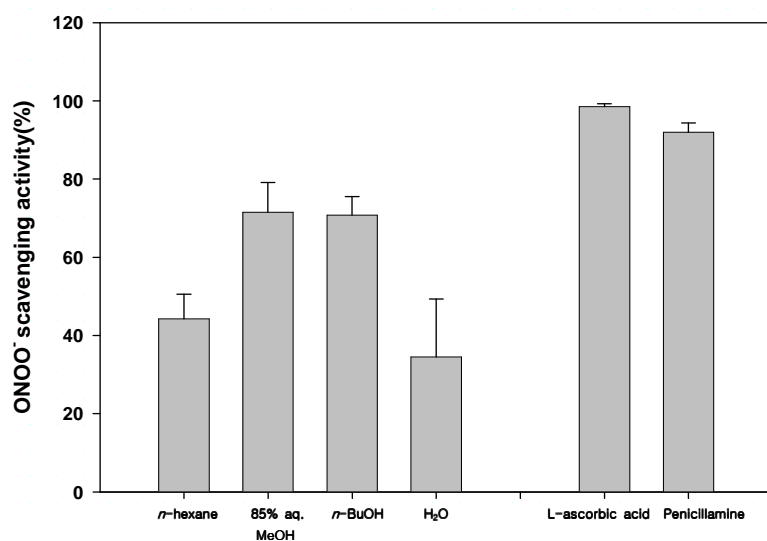


Fig. 48 Scavenging activity of *S. herbacea* fractions on authentic ONOO<sup>-</sup> (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

### 3.2.2 이차대사물질들의 항산화 활성

#### 3.2.2.1 DPPH radical 소거 효과

Compound 2의 DPPH radical에 대한 전자공여능을 측정한 결과 300, 200, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 49.0%, 36.8%, 24.3%의 소거율을 나타내어 조금 효과가 있는 것으로 나타났다. 하지만 compound 1, 3, 4를 같은 농도에서 측정한 결과 compound 1이 27.8%, 20.6%, 16.0%, compound 3이 32.9%, 26.1%, 19.3%로 나타났고 compound 4는 21.7%, 18.1%, 14.7%로 모두 거의 효과가 없었다. 하지만 compound 5를 같은 농도에서 측정한 결과 71.0%, 65.2%, 56.8%로 대조군 BHT (84.8%, 83.5%, 71.7%)에 상응하는 효과를 지님을 확인할 수 있었다 (Table 9).

**Table 9.** DPPH radical scavenging effect of *S. herbacea* compounds 1-5 (EDA(%)).

Sample	Concentrate		
	300 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Compound 1	27.8	20.6	16.0
Compound 2	49.0	36.8	24.3
Compound 3	32.9	26.1	19.3
Compound 4	21.7	18.1	14.7
Compound 5	71.0	65.2	56.8
BHT	84.8	83.5	71.7
BHA	85.0	85.0	79.8

### 3.2.2.2 Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) 소거 효과

화합물에 대한 SIN-1과 authentic peroxynitrite 항산화활성을 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 측정하였다. SIN-1을 첨가한 결과에서 compound 1-4의 소거 정도는 각각 77.2%, 79.8%, 80.7%, 57.7%로 조금 소거 효과가 있는 것으로 나타났다. 이에 반해 compound 5는 101.0%로 대조군 L-ascorbic acid (114.2%)에는 못 미치지만 penicillamine (109.2%)과는 유사한 효과를 보임을 확인 할 수 있었다 (Table 10).

반면에 authentic peroxynitrite를 첨가한 결과에서는 compound 2의 소거효과가 95.3%로 대조군 L-ascorbic acid (100.2%), penicillamine (96.3%)과 유사한 효과를 보임을 확인 할 수 있었다. Compound 1, 3, 4의 소거 정도는 각각 88.2%, 86.8%, 65.9%로 역시 소거 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 compound 5는 98.1%로 대조군과 유사한 효과를 보임을 확인 할 수 있었다 (Table 11).

**Table 10. Scavenging activity of *S. herbacea* compounds 1-5 on ONOO<sup>-</sup> from decomposition of SIN-1 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).**

Sample	% inhibition
Compound 1	77.2 $\pm$ 0.5
Compound 2	79.8 $\pm$ 1.1
Compound 3	80.7 $\pm$ 0.4
Compound 4	57.7 $\pm$ 0.7
Compound 5	101.0 $\pm$ 1.1
L-ascorbic acid	114.2 $\pm$ 0.2
Penicillamine	109.2 $\pm$ 0.1

Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

**Table 11. Scavenging activity of *S. herbacea* compounds 1-5 on authentic ONOO<sup>-</sup> (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).**

Sample	% inhibition
Compound 1	88.2 $\pm$ 0.2
Compound 2	95.3 $\pm$ 0.1
Compound 3	86.8 $\pm$ 0.1
Compound 4	65.9 $\pm$ 0.2
Compound 5	98.1 $\pm$ 1.1
L-ascorbic acid	100.2 $\pm$ 0.1
Penicillamine	96.3 $\pm$ 0.1

Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

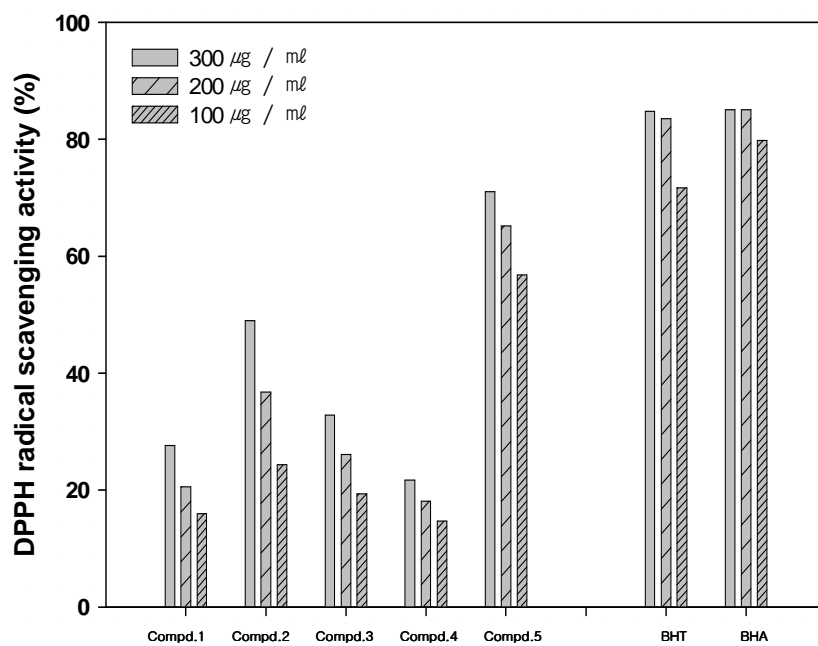


Fig. 49 DPPH radical scavenging effect of *S. herbacea* compounds 1-5.



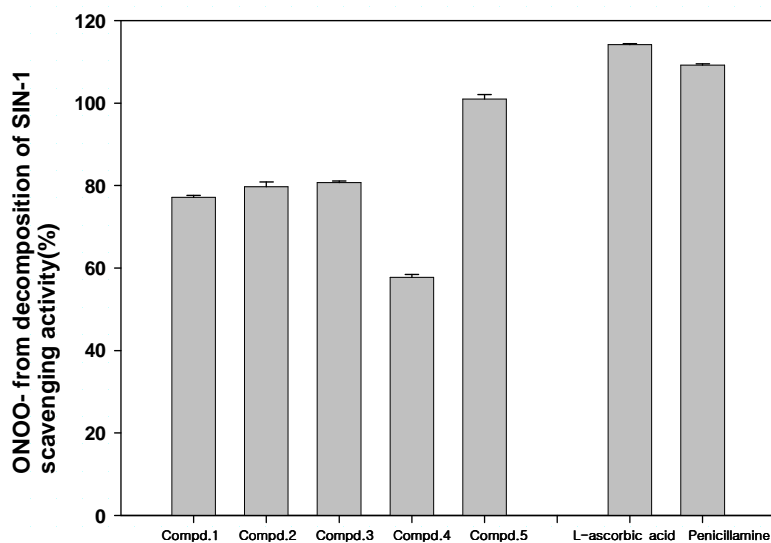


Fig. 50 Scavenging activity of *S. herbacea* compounds 1-5 on ONOO<sup>-</sup> from decomposition of SIN-1 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

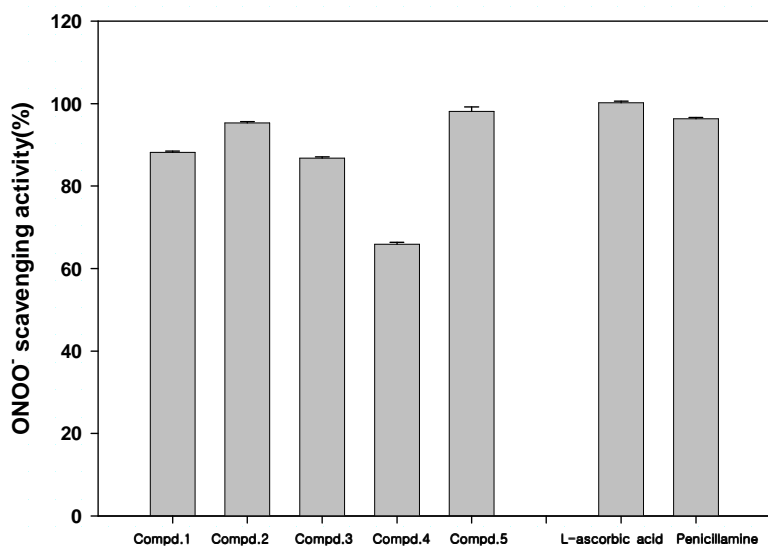


Fig. 51 Scavenging activity of *S. herbacea* compounds 1-5 on authentic ONOO<sup>-</sup> (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

### 3.3 In vitro 면역 세포 조절 실험

#### 3.3.1 추출 및 분획물의 면역 세포 조절 효과

함초 추출물과 분획물에 대해 MTT assay를 이용하여 thymus과 spleen의 면역 관련 세포에 미치는 영향을 측정하였다. in vitro 상에서 MTT는 살아있는 세포에서 물에 녹지 않는 formazan crystal로 환원이 되는데 Crude extract, *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O fr.에서 좋은 저해 효과를 보였다. Thymus cell에 대한 영향은 control을 100%로 보았을 때와 비교해 각각 242.7%, 202.1%, 144.8%, 575.1%, 99.7%로 나타났다. 결과에서 알 수 있듯이 *n*-BuOH fr.은 control에 비해 6배 정도의 세포사 저해 효과가 있음을 보였다, *n*-hexane과 85% aq. MeOH fr.은 각각 2배, 1.5배 정도 저해 효과를 보임을 확인할 수 있었다. 하지만 H<sub>2</sub>O fr.은 거의 효과가 없는 것으로 나타났다 (Table 12). Spleen cell을 이용한 세포사 저해 정도는 control (100%)과 비교해 각각 194.3%, 210.5%, 135.3%, 564.8%, 71.0%로 나타났다. Thymus와 마찬가지로 *n*-BuOH fr.은 control에 비해 6배 정도 저해 효과가 있었고 *n*-hexane과 85% aq. MeOH fr.은 각각 2배, 1.5배 효과가 있었으며 H<sub>2</sub>O fr.은 효과가 없는 것으로 나타났다 (Table 13). 이를 통해 함초의 일부 추출물이 면역관련 장기인 thymus와 spleen cell의 활성을 증가시킴을 알 수 있었으며, 이것은 아마도 함초가 세포의 증식을 자극시키거나 세포의 apoptosis를 억제하는 것이라 추측된다.

**Table 12. Thymus cell survival effect of *S. herbacea* crude extract and fractions.**

Sample	% inhibition
Crude Extract	242.7 ± 2.5
<i>n</i> -hexane fr.	202.1 ± 36.5
85% aq. MeOH fr.	144.8 ± 16.8
<i>n</i> -BuOH fr.	575.1 ± 42.0
H <sub>2</sub> O fr.	99.7 ± 11.8
Control	100.0 ± 13.5

Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

**Table 13. Spleen cell survival effect of *S. herbacea* crude extract and fractions.**

Sample	% inhibition
Crude Extract	194.3 ± 9.6
<i>n</i> -hexane fr.	210.5 ± 9.9
85% aq. MeOH fr.	135.3 ± 14.5
<i>n</i> -BuOH fr.	564.8 ± 14.5
H <sub>2</sub> O fr.	71.0 ± 5.7
Control	100.0 ± 5.7

Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

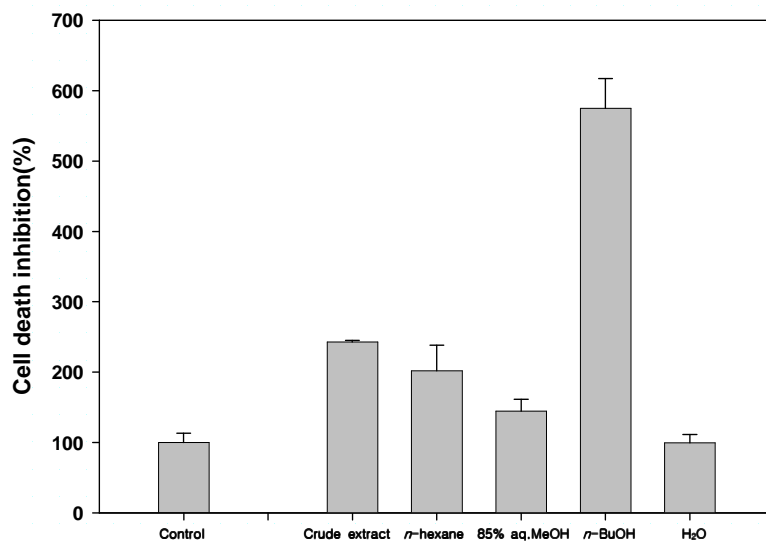


Fig. 52 Thymus cell survival effect of *S. herbacea* crude extract and fractions. Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

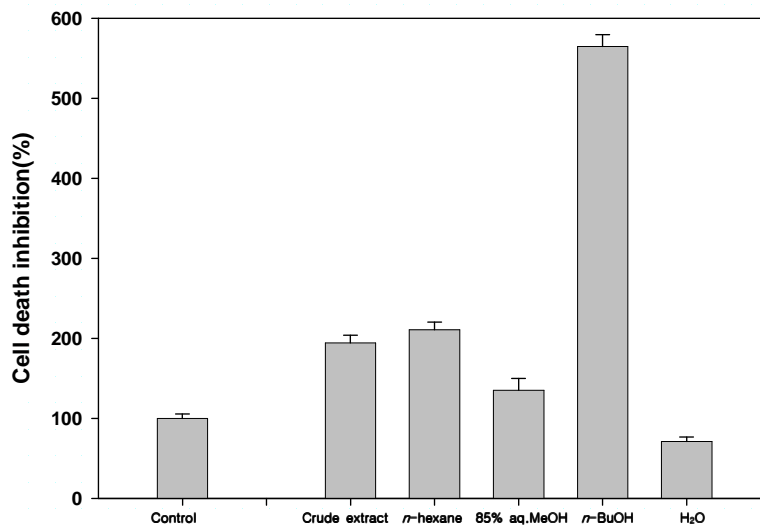


Fig. 53 Spleen cell survival effect of *S. herbacea* crude extract and fractions. Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

### 3.3.2 이차대사물질들의 면역 세포 조절 효과

Compound 1-5의 thymus cell을 이용한 세포사 저해 정도는 control을 100%로 보았을 때와 비교해 각각 93.1%, 120.6%, 67.9%, 28.2%, 75.6%로 나타나 거의 효과가 없는 것으로 확인되었다 (Table 14). Spleen cell을 이용한 세포사 저해 정도는 control (100%)과 비교해 각각 91.7%, 124.2%, 75.8%, 40.9%, 100.0%로 나타났다. 역시 thymus와 마찬가지로 효과가 없는 것으로 확인 되었다 (Table 15).

**Table 14. Thymus cell survival effect of *S. herbacea* compounds 1-5.**

Sample	% inhibition
Compound 1	93.1 ± 5.3
Compound 2	120.6 ± 2.1
Compound 3	67.9 ± 6.5
Compound 4	28.2 ± 0.5
Compound 5	75.6 ± 2.1
Control	100.0 ± 0.8

Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

**Table 15. Spleen cell survival effect of *S. herbacea* compounds 1-5.**

Sample	% inhibition
Compound 1	91.7 ± 2.4
Compound 2	124.2 ± 2.8
Compound 3	75.8 ± 8.3
Compound 4	40.9 ± 1.2
Compound 5	100.0 ± 2.7
Control	100.0 ± 1.8

Each data is represented as the mean ± SEM of three experiments.

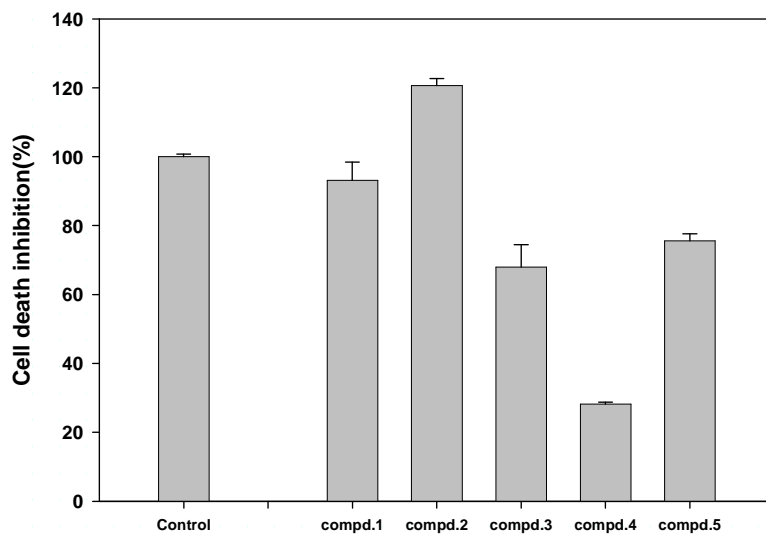


Fig. 54 Thymus cell survival effect of *S. herbacea* compounds 1-5. Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

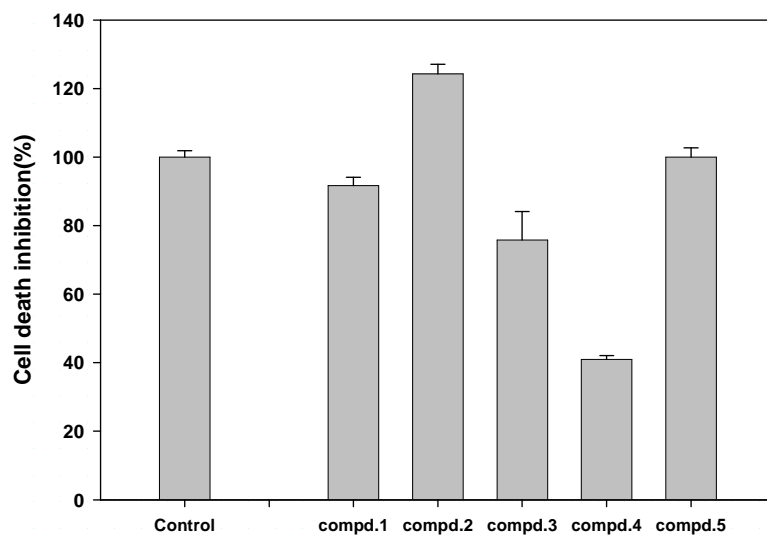


Fig. 55 Spleen cell survival effect of *S. herbacea* compounds 1-5. Each data is represented as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

#### 4. 결 론

함초 (*Salicornia herbacea*)는 우리나라 서해안 갯벌에서 군락을 이루며 자생하는 한해살이 풀로 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 철, 인 등 갖가지 미네랄과 효소 등을 줄기와 가지에 농축한 상태로 지니고 있다. 이런 특징을 지닌 함초는 숙변을 제거하고 변비를 없애고, 암, 축농증, 관절염, 고혈압, 요통, 비만증, 치질, 당뇨병, 갑상선염, 천식, 기관지염, 간질환 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이런 효과를 지닌 함초의 생리 활성 물질을 탐색하고자 경기도 안산시 대부도에서 함초를 채집하여 조추출물을 제조하고 분획하여 각각을 DPPH radical과 peroxyntirite 소거 효과 그리고 MTT assay를 통한 면역 세포 조절 효과를 탐색하였다.

DPPH radical 소거 효과 검색 결과 함초 조추출물이 100  $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 23.8%로 낮은 소거율을 보였다. 하지만 분획물 측정 결과 동일 농도에서 *n*-BuOH 과 85% aq. MeOH fr.이 각각 85.2%, 70.0%로 대조군인 BHT (86.9%)와 BHA (68.0%)와 비교해 좋은 효과를 보임을 알 수 있었다. 이에 반해 H<sub>2</sub>O와 *n*-hexane fr. 큰 효과가 없었다.

Peroxyntirite 소거활성은 in vitro상에서 실험하였다. SIN-1 실험 결과 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O, *n*-hexane fr.은 각각 99.8%, 99.5%, 83.9%, 44.2%로 우수한 소거 효과를 나타냈으며 대조군인 L-ascorbic acid (100.3%)과 penicillamine (99.2%)와도 견줄 만 하다. Authentic peroxyntirite 첨가 실험 결과는 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O, *n*-hexane fr. 소거 정도가 각각 71.5%, 70.8%, 34.5%, 44.2%로 SIN-1을 첨가한 결과보다는 소거 활성이 낮지만 85% aq. MeOH, *n*-BuOH fr.은 여전히 좋은 결과를 나타냈다.

Thymus cell을 이용한 MTT assay 결과는 control에 비해 *n*-BuOH fr.이 6배 정도 세포사 저해 효과가 있음을 보였다, *n*-hexane과 85% aq. MeOH

fr.은 각각 2배, 1.5배 정도 소거 효과를 보임을 확인할 수 있었다. 하지만 H<sub>2</sub>O fr.은 거의 효과가 없는 것으로 나타났다. Spleen cell을 이용한 MTT assay 결과는 thymus와 마찬가지로 *n*-BuOH fr.이 control에 비해 6배 정도 저해 효과가 있었고 *n*-hexane과 85% aq. MeOH fr.은 각각 2배, 1.5배 효과가 있었으며 H<sub>2</sub>O fr.은 효과가 없는 것으로 나타났다.

조추출물 중 항산화 효과와 면역 세포 조절 효과를 보였던 *n*-BuOH은 RP flash column chromatography, silica column chromatography 그리고 역상 HPLC 하여 compound 1-4를 분리 할 수 있었다. 또한 silica prap. TLC와 sephadex LH-20을 통해 compound 5를 분리하였다. Compound 1과 2는 신물질로써 구조는 각각 3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β-hydroxy-23-oxo-30-norolean-12:20(29)-dien-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside 와 3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β,23-dihydroxy-30-norolean-12:20(29)-dien-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside로 결정되었다.

Compound 3-5는 기지물질로써 그 구조는 각각 3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β-hydroxy-23-oxo-olean-12-en-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside, 3-O-β-D-glucuronopyranosyl 3β-hydroxy-23-oxo-olean-12-en-28-oic acid 그리고 isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside임이 확인되었다. 역시 각각을 DPPH radical과 peroxyntirite 소거 효과 그리고 MTT assay를 통한 면역 세포 조절 효과를 탐색하였다.

DPPH radical 소거활성 검색 결과 compound 1-4 모두 거의 효과가 없었다. 하지만 compound 5를 300, 200, 100 μg/ml 농도에서 측정한 결과 71.0%, 65.2%, 56.8%로 대조군 BHT (84.8%, 83.5%, 71.7%)에 상응하는 효과를 지님을 확인할 수 있었다.

SIN-1을 첨가한 peroxyntirite 소거활성 검색 결과 50 μg/ml농도 compound 1-4의 소거 정도는 각각 79.8%, 77.2%, 80.7%, 57.7%로 소거



효과가 조금 있는 것으로 나타났다. 이에 반해 compound 5는 101.0%로 대조군 L-ascorbic acid (114.2%), penicillamine (109.2%)과 유사한 효과를 보임을 확인 할 수 있었다. Authentic peroxyxynitrite를 첨가한 결과에서 compound 2-4는 각각 88.2%, 86.8%, 65.9%의 소거 효과를 보였고, compound 1, 5는 각각 95.3%, 98.1%로 대조군 L-ascorbic acid (100.2%), penicillamine (96.3%)과 유사한 효과를 보임을 확인 할 수 있었다.

마지막으로 compound 1-5의 thymus, spleen cell을 이용한 apoptosis 저해 정도는 control과 비교해 거의 효과가 없는 것으로 확인되었다.

위의 실험 결과, 함초의 분획물 특히 *n*-BuOH fr.은 DPPH와 peroxyxynitrite 소거에 효과를 보이며 MTT assay를 통해 함초의 일부 추출물이 면역관련 장기인 thymus와 spleen cell의 활성을 증가시킴을 알 수 있었고, 이것은 아마도 함초가 세포의 증식을 자극시키거나 세포의 apoptosis를 억제하는 것이라 추측할 수 있었다. 이에 반해 분리된 이차대사물질들은 저조한 활성을 보임을 확인할 수 있었다. 이는 아직 분획물에 활성을 보이는 물질이 남아 있을 것으로 생각되며 향후 더 분리될 가능성이 있을 것으로 보인다.

## 5. 참고문헌

1. 환경부 (1997-1999), 제 2차 전국 자연환경조사보고서.
2. Min, B. M. (1998), Vegetation on the West Coast of Korea, Ocean Reserch, 20, 167-178.
3. 임병선, 이점숙 (1985), 염분이 식물의 생장에 미치는 영향에 관하여, 연안생물연구, 2, 33-40 .
4. Lee, T. B. (1989), In Illustrated Flora of Korea (4th ed.), Hyang Mun Sa, Seoul.
5. Jo, Y. C., J. H. Ahn, S. M. Chon, K. S. Lee, T. J. Bae and D. S. Kang (2002), Studies on pharmacological effects of Glasswort (*Salicornia herbacea* L.), Korean J. Medicinal Crop Sci., 10(2), 93-99.
6. Flowers, T. J., P. E. Troke,, and A. R. Yeo (1997), The mechanisms of salt tolerance in halophytes, Ann. Rev. Plant Physiol., 28, 89-121.
7. Bang, M. A., H. A. Kim and Y. J. Cho (2002), Hypoglycemic and acntioxidant effect of dietary hamcho powder in streptozotocin-induced Diabetic rats, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 31(5), 840-846.
8. Greenway, H. and R. Munns (1980), Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes, Ann. Rev. Plant Physiol., 83, 510-516 .
9. Kim, Y.-S., M.-R., Huh and J.-C., Park (2001), Effects of culture media and seawater on growth and mineral concentrations in Glasswort (*Salicorni herbacea*), 원예과학기술지 19(3), 342-347.
10. Min, J.-G., D.-S., Lee, T.-J., Kim, J.-H., Park, T.-Y., Cho and

- D.-I., Park (2002), Chemical composition of *Salicornia herbacea* L., J. Food Sci. Nutr., 7(1), 105-107.
11. Min, J.-G., K.-T., Son, J.-H., Kim, T.-J. Kim and J.-H., Park (2002), Physiological and Functional properties of *Salicornia herbacea* (Tungtungmadi) Leaf Extracts, Nutraceuticals & Food, 7, 261-264.
  12. Lee, J.-T., B.-J. An (2002), Detection of physical activity of *Salicornia herbacea* Kor. J. Herbology, 17(2), 61-69.
  13. Lee, J.-T., Y.-S., Jeong and B.-J., An (2002), Physiological activity of *Salicornia herbacea* and Its application for Cosmetic materials, Kor. J. Herbology, 17(2), 51-60.
  14. Han, S.-K., and S.-M., Kim (2003), Antioxidative Effect of *Salicornia herbacea* L. Grown in Closed Sea Beach, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 32(2), 207-210.
  15. Han, S. K., S. M. Kim and B. S. Pyo (2003), Antioxidative effect of Glasswort(*Salicornia herbacea* L.) on the lipid oxidation of pork, Korean J. Food Sci. Ani. Resour., 23(1), 46-49.
  16. Im, S.-A, G.-W., Kim and C.-K., Lee (2003), Immunomodulatory activity of *Salicornia herbacea* Components. Natural product Sciences, 9(4), 273-277.
  17. Im, S, J., Lee, I., Yang, K., Shin, M., Kim, G., Kim, S., Song, C., Lee, Activation of a mouse macrophage cell line RAW 264.7 *Salicornia herbacea*.
  18. Ancerewicz, J., E. Migliavacca, P. A. Carrupt, B. Testa, F. Bree, R. Zini, J. P. Tillement, S. Labidalle, D. Guyot, A. M. Chauvet-Monges, A. Crevat and A. L. Ridant (1998),

- Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 113-120.
19. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 26, 1199-1200.
  20. Sandoval M., R.A. Ronzio, D.N. Muanza, D.A. Clark, and M.J.S. Miller (1997), Peroxynitrite-induced apoptosis in epithelial(T84) and macrophage(RAW 264.7) cell lines :Effect of legume-derived polyphenols(phytolens) NITRIC OXIDE, *Biology and Chemistry*, 1(6), 476-483.
  21. Thomson L., A. Denicola and R. Radi. (2003), The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 55-64.
  22. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman (1994), Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radical Biology Medicine*, 16, 149-156.
  23. Crow, J. P. (1997), Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicator of peroxynitrite in vivo, Implications for intracellular measurement of peroxynitrite in vivo, Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species Nitric oxide, *Biology and Chemistry*, 1(2), 145-151.
  24. Shao, C.-J., R. Kasai, J.-D. Xu, and O. Tanaka (1989), Saponins from leaves of *Acanthopanax senticosus* HARMS., *Ciwujii. II.*, *Chem. Pharm. Bull.* 37(1), 42-45.
  25. Bouguet-Bonnet, S., M. Rochd, P. Mutzenhardt, and M. Henry

- (2002), Total assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of three triterpene saponins from roots of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, Magn. Reson. Chem., 40, 618–621.
26. Ikuta, A., and H. Itokawa (1989), 30-Noroleanane saponins from callus tissues of *Akebia quinata*, Phytochemistry, 28(10), 2663–2665.
27. Wang, H.-B., D.-Q. Yu, X.-T. Liang, N. Watanabe, M. Tamai, and S. Omura (1989), Yemuoside YM<sub>7</sub>, YM<sub>11</sub>, YM<sub>13</sub>, and YM<sub>14</sub>: four nortriterpenoid saponins from *Stauntonia chinensis*, 55, 303–306.
28. Bouguet-Bonnet, S., M. Rochd, P. Mutzenhardt, and M. Henry (2002), Total assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of three triterpene saponins from roots of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, Magn. Reson. Chem., 40, 618–621.
29. Borel, C., M. P. Gupta, and K. Hostettmann (1987), Molluscicidal saponins from *Swartzia simplex*, Phytochemistry, 26(10), 2685–2689.
30. Li, H.-Y., K. Koike, and T. Ohmoto (1993), Dianchinenosides A and B, two new saponins from *Dianthus chinensis*, J. Nat. Prod., 56(7), 1065–1070.
31. Ikuta, A., and H. Itokawa (1989), 30-Noroleanane saponins from callus tissues of *Akebia quinata*, Phytochemistry, 28(10), 2663–2665.
32. Park, S.-H., and K.-S. Kim (2004), Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L., J. Korean Soc. Ap