

碩士學位論文

우묵사스레피(*Eurya emarginata*)를
이용한 활성성분 Eutigosides의 분리



濟州大學校 大學院

化學科

文志榮

2003年 12月

우묵사스레피(*Eurya emarginata*)를
이용한 활성성분 Eutigosides의 분리

指導教授 李 南 昊

文 志 榮

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2003年 12月

文志榮의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印


濟州大學校 大學院

2003年 12月

Separation of Eutigosides, Bioactive
Compounds from *Eurya emarginata*

Moon-Ji Young

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12.

ABSTRACT

iii

We have examined the effect of extracts of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 leukemia cells. By way of MTT assay method, the crude aq. methanol extract and ethyl acetate fraction were observed to have considerable cell growth inhibitory effects.

Trial was made to isolate and identify the bioactive components. The 80% methanol extracts was partitioned to hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and residual water fractions. The ethyl acetate fraction, which showed desirable activities, was further purified using reverse-phase silica gel column chromatography followed by sephadex LH-20 column chromatography and HPLC to give JA-A, JA-C, JA-D as pure compounds. The compounds were analyzed by ^1H and ^{13}C NMR spectra, and identical to be eutigoside C, eutigoside B and cornoside, all of which were previously isolated from other plant sources.

목 차

iii

ABSTRACT	i
List of Figures	iii
List of Tables	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 재료	3
2. 시약 및 기기	3
3. 실험방법	4
3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리	4
3-2. 항암활성 검색	8
3-3. NO생성 억제 효과	9
III. 결과 및 고찰	10
1. 항암활성 결과	10
1-1. 80% 메탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 암세포 증식 억제효과 ..	10
1-2. EtOAc층 분획들에 대한 암세포 증식 억제효과	12
1-3. JA-A와 JA-C의 HL-60세포에 대한 암세포 증식 억제효과	13
2. 염증성 생체지표인 NO생성 억제 효과	13
2-1. JA-A와 JA-C의 RAW264.7에 대한 NO생성 억제 효과	13
3. JA-A와 JA-C의 분리 및 구조 확인	14
4. JA-D1의 ¹ H-NMR 결과	26
IV. 결 론	29
V. 참 고 문 헌	31

List of Figures

iii

Figure 1. Structures of isolated compounds from <i>Eurya emarginata</i>	2
Figure 2. Isolation procedure of <i>Eurya emarginata</i>	6
Figure 3. Inhibitory effect of several extracts of <i>Eurya emarginata</i> on the growth of HL-60 cells	10
Figure 4. DNA fragmentation by several extracts of <i>Eurya emarginata</i> in HL-60 cells	11
Figure 5. Inhibitory effect of EtOAc fractions of <i>Eurya emarginata</i> on the growth of HL-60 cells	12
Figure 6. Inhibitory effect of <i>Eurya emarginata</i> on the growth of HL-60 cells	13
Figure 7. Effects of <i>Eurya emarginata</i> on nitrite accumulation in RAW264.7 macrophages	14
Figure 8. TLC spots of JA, JB, JC	15
Figure 9. ¹ H-NMR spectrum of JA-A	18
Figure 10. ¹³ C-NMR spectrum of JA-A	19
Figure 11. DEPT of JA-A	20
Figure 12. ¹ H-NMR spectrum of JA-C	21
Figure 13. ¹³ C-NMR spectrum of JA-C	22
Figure 14. Structure of JA-A(Eutigoside C)	25
Figure 15. Structure of JA-C(Eutigoside B)	25
Figure 16. ¹ H-NMR spectrum of JA-D	27
Figure 17. Structure of JA-D(cornoside)	28

List of Tables

iii

Table 1. JA-A와 Eutigoside C의 NMR data 비교	23
Table 2. JA-C와 Eutigoside B, Neocalceolarioside D의 NMR Data 비교	24
Table 3. JA-D와 Conorside 의 NMR data 비교	28



I. 서 론

iii

최근 식생활 습관의 변화와 산업발전에 따른 환경오염, 스트레스등의 증가에 따라 세계적으로 암 발생률과 사망률이 날로 증가하고 있으며, 이는 현대사회의 가장 큰 문제가 되고 있는 질병중의 하나이기도 하다. 20세기에 들어 암이라는 질병이 인간에게 부각되어 항암제 개발에 관한 연구가 전 세계적으로 광범위하게 수행되고 있고 시의성도 있지만 현재 사용되고 있는 암치료제의 대부분이 합성화학약품이나 방사선을 이용한 것으로 대개가 강한 독성을 보이거나 부작용이 수반되는 문제점들이 나타나고 있는 실정이다. 이런 문제점들을 극복하기 위해 천연물로부터 부작용 및 독성이 적고 선택적인 항암효과를 나타내는 새로운 항암제를 개발하려는 연구들이 활발이 진행되고 있다.^{1,2)}

이에 본 연구에서는 항암활성이 있다고 알려져 있는 제주 자생식물인 우목사스레피를 연구 시료로 선택하였다. 우목사스레피(*Eurya emarginata*)는 차나무과(Theaceae)에 속하는 상록관목으로 섬쥐똥나무 또는 개사스레피나무라고도 불린다. 주로 우리나라의 제주도와 경상남도·전라남도의 해안산지, 일본, 대만, 중국, 인도 등지에 자생한다. 높이 2~3 m, 작은 가지에 연한 황갈색 털이 뺨뺨히 나고, 잎은 호생(互生)하며 2줄로 배열되어 있고, 가죽질이며 좁은 도란형으로 끝이 오목하게 들어가 있다. 길이 1~5 cm, 너비 1~1.2 cm로 양면에 털이 없으며 표면은 짙은 녹색, 뒷면은 연한 녹색이며 가장자리가 뒤로 젖혀지고, 물결 모양의 둔한 톱니가 있으며, 입자루의 길이는 2 mm이다.

4~5월에 꽃이 피고, 꽃은 연한 녹색이며, 지름 4~5 cm이고, 잎겨드랑이에 밑을 향해 1~3송이씩 달린다. 꽃받침은 2개이고, 관원형이며, 길이 1.5~2 mm이고 털이 없으며 가장자리가 막질(膜質)이다. 꽃잎은 난형이며 길이 2

mm이고 암술대는 길이 1 mm이다. 10월에 열매가 성숙되고 장과(漿果)는 둥글며, 지름 7~10 cm이고, 자흑색으로 털이 없다. 우묵사스레피는 식용·관상용·공업용에 쓰이고, 정원수 및 민간에서는 잎을 거담·이뇨에 약으로 쓴다.^{3,4)}

우묵사스레피 유기용매 추출물의 화학성분에 대한 연구는 보고된 것이 거의 없다. 유일하게 확인된 논문은 1974년 Morita등이 발표한 것이다. 이 논문에서 우묵사스레피의 잎을 메탄올로 추출하여 플라보노이드인 chrysoeriol, hyperin, quercitrin을 분리, 보고하였다(Figure 1).⁵⁾

본 연구는 우묵사스레피의 활성성분에 대한 연구결과를 토대로 새로운 활성 물질을 규명하고자 생리활성을 보이는 물질의 구조를 분리하여 동정하였다.

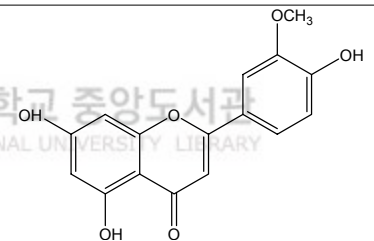
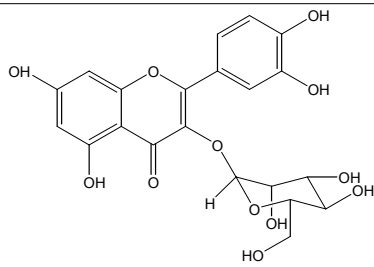
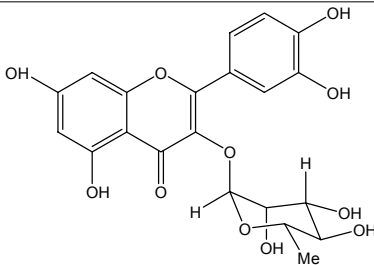
Name	Structure
chrysoeriol	
hyperin	
quercitrin	

Figure 1. Structures of isolated compounds from *Eurya emarginata*

II. 재료 및 방법

iii

1. 재료

본 연구에 사용되는 우묵사스레피의 잎은 2000년도 5월경 제주대학교 교정에서 채집하여, 실온에서 자연 건조시킨 후 완전히 마른 잎을 분쇄하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck社 및 Junsei社의 제품을 사용하였다. Sephadex column chromatography에는 Sephadex LH-20(25~100 μ)를 사용하였고, normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(230-400 mesh ASTM, Merck), reverse-phase column chromatography에는 Silica gel 100(RP-18, 230-400 mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC(Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Waters Delta prep 4000(preparative chromatography system, Waters)를 사용하였고, ODS column(Prep Nova-Pak HR C₁₈, 7.8×300 mm column)을 장착하여 분리했다. 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resona

nce)은 JNM-LA 400 (FT NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR측정시 용매로는 CD_3OD 과 $CDCl_3$ 이 사용되었다. 분리 물질의 광학회절을 확인하기 위해 Polarimeter는 Jasco P-1034를 사용하였고, MeOH을 용매로 하여 측정하였다. 분리된 화합물의 질량분석을 위해 EIMS(Electron Impact Mass Spectrum)를 사용하였다.

3. 실험방법

3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

3-1-1. 우묵사스레피의 메탄올 추출 및 용매분획

우묵사스레피 건조분말 150 g을 80% 메탄올 1 L에 침적하고, 실온에서 24 시간동안 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만을 취하였다. 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 3회 반복 실시하고 여액을 감압농축하여 80% 메탄올 추출물 48.8 g을 얻었다. 이 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁하고 separate funnel에서 *n*-Hexane과 EtOAc, *n*-Butanol을 사용하여 순차적으로 용매분획하여 Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H_2O 층을 얻었다(Figure 2).

3-1-2. 역상실리카겔 column chromatography에 의한 분리과정

용매분획하여 얻어진 각 분획층들 중에서 EtOAc층 일부를 역상실리카겔

(Silica gel 100 C₁₈- Reversed phase)을 충전한 칼럼(3×15)을 이용하여 분리하였다. 용출용매는 20%, 40%, 60%,ⁱⁱⁱ80%, 100% 메탄올을 순차적으로 사용하였다. 이렇게 얻어진 분획들을 회전농축기로 농축하여 5개의 분획들을 얻을 수 있었다(Figure 2).

3-1-3. Sephadex column chromatography에 의한 분리과정

3-1-2에서 얻어진 5개의 분획들 중에서 분획 1을 분리하기 위하여 glass column에 sephadex LH-20을 충전시킨다. 분획 1을 소량의 메탄올로 녹인 후 충전된 column에 전개용매(CH₂Cl₂/acetone/MeOH = 3/2/0 to 1/4/0 to 2/7/1)를 사용하여 전개시키고, 분취용액을 감압농축하여 32개의 분획을 얻었다(Figure 2).



3-1-4. JA-A 및 JA-C의 분리과정

3-1-3에서 얻어진 분획들 중 일부를 ODS column을 장착한 HPLC 기기로 JA-A(R_t = 13.3 min)와 JA-C(R_t = 9.5 min)를 순수 분리하였다(Figure 2). 이 때 이동상은 30% CH₃CN을 30분에 걸쳐서 100%로 하는 gradient 통과법을 이용하였다.

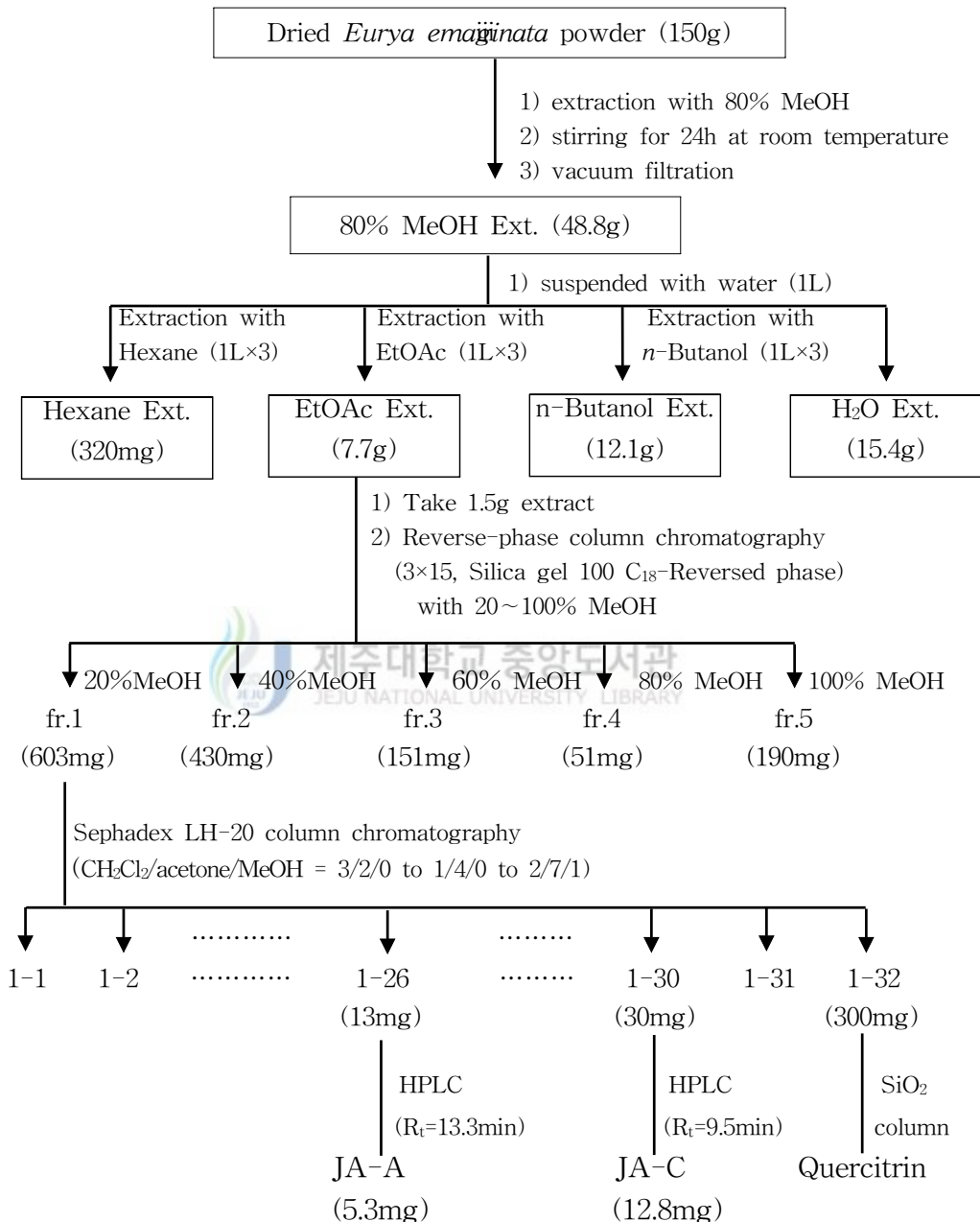


Figure 2. Isolation procedure of *Eurya emarginata*

3-1-5. JA-D의 분리과정

iii

우묵사스레피 건조분말 175.8 g을 가지고 80% 메탄올 추출물 58.2 g과 Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H₂O층 4개의 용매분획층들을 얻었다. 각 분획층들 중에서 EtOAc층(10.0 g)을 분리하기 위하여, glass column(5×22)에 silica gel(Kieselgel 60, 230-400 mesh ASTM, Merck)을 충전시킨 후, EtOAc층 가운데 일부를 소량의 메탄올로 녹이고, 충전된 column에 전개용매(EtOAc/MeOH = 10/1)를 사용하여 전개시키고, 감압농축하여 8개의 분획들을 얻었다.

분획 5(3.6 g)를 가지고 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올을 500 ml씩 순차적으로 사용하여 역상실리카겔(Silica gel 100 C₁₈- Reversed phase)을 충전한 칼럼(3×15)을 이용하여 분리하였다. 분리된 분획들을 감압농축하여 5개의 분획들을 얻을 수 있었다. 분획 5-4(2.5 g)를 가지고 순상실리카겔(Kieselgel 60 Normal-phase)을 충전한 칼럼(3×15)을 이용하여 분리한 후, 전개용매(CHCl₃/MeOH/H₂O = 7.5/2.5/0.3)로 전개시켜 7개의 분획들을 얻을 수 있었다. 분획 5-4-4(143.9 mg)를 가지고 TLC plate(20 PLC plates 20×20 cm, Silica gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm)를 사용하여 TLC chamber에서 전개용매 (CHCl₃/MeOH/H₂O = 7.5/2.5/0.3)로 전개시켜 5개의 분획들을 얻을 수 있었다. 그 중 분획 4(79.6 mg)를 가지고 ODS column(μ Bondapak C₁₈, 7.8×300 mm column)이 장착된 HPLC(High performance liquid chromatography)를 사용하여 70% 메탄올을 전개용매로 전개시켜 JA-D를 분리할 수 있었다.

3-2. 항암활성 검색

iii

3-2-1. 세포배양

급성 전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포주를 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/ml의 penicillin-streptomycin(GIBCO)과 10%의 fetal bovine serum(FBS, GIBCO)가 함유된 RPMI 1640 배지(GIBCO)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다.

3-2-2. 세포의 대사활성 측정

우묵사스레피 추출물 처리에 의한 HL-60 세포의 증식억제는 세포의 대사활성을 측정하여 알아보았다. HL-60 세포 (2.5×10^5 /ml)를 96 well plate의 각 well에 넣고, 시료를 농도별로 첨가하였다.

이를 4 일간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) 100 μ g을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 150 μ l를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 MTT formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(BIO-TEK INSTRUMENTS, INC)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제 정도를 조사하였다.

3-2-3. Analysis for DNA fragmentation

iii

HL-60 세포 ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$)에 우묵사스레피 잎의 용매 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 30분(100 V)동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator하에서 DNA단편화 현상을 관찰하였다.

3-3. NO생성억제 효과

3-3-1. Nitric oxide (NO) assay

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시료 농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 동시에 처리하여 48시간 배양하였다. 처리한 LPS(lipopolysaccharide)는 내독소 (endotoxin)로 잘 알려진 그람-음성세균의 세포외막에 존재하며, 단핵식세포로부터 다양한 염증 발병 인자로 알려진 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), inter leukin-1 β (IL-1 β)과 같은 pro-inflammatory cytokines를 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁸⁾ 배양 후 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μl 와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1 % (w/v) naphylethylene diamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μl 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

iii

1. 항암활성 결과

1-1. 80% 메탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 암세포 증식 억제효과

우묵사스레피의 80% 메탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후, MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정함으로써 HL-60세포의 세포 증식에 따른 대사활성을 확인하였다. 그 결과, 80% 메탄올 추출물과 EtOAc층에서 HL-60세포의 세포 증식을 현저히 억제시킴을 알 수 있었다(Figure 3).

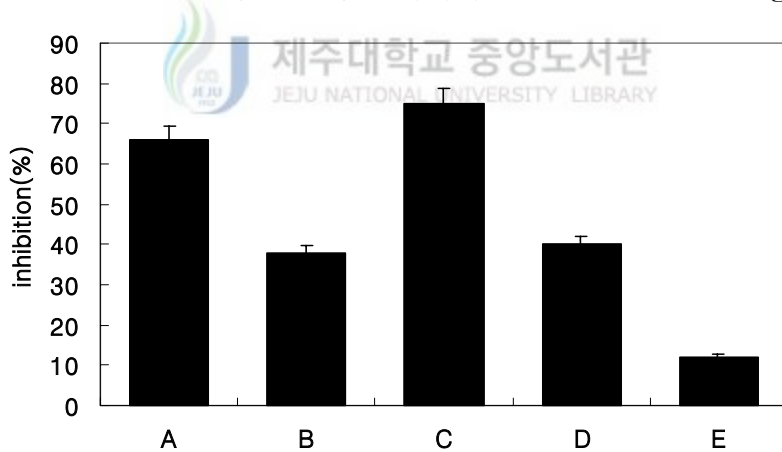


Figure 3. Inhibitory effect of several extracts of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 cells

- A : treatment of 80 % MeOH Ext. B : treatment of Hexane Ext.
C : treatment of EtOAc Ext. D : treatment of n-Butanol Ext.
E : treatment of H₂O Ext.

또한 이러한 HL-60세포의 세포증식에 대한 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 확인하기 위하여 apoptosis_{iii}유도에 의하여 나타나는 현상 중 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. 그 결과, EtOAc층에서 DNA 단편화 현상이 가장 잘 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 4). 이러한 결과로부터 우묵사스레피의 EtOAc분획이 나타내는 HL-60세포의 세포증식 억제효과가 HL-60세포의 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.

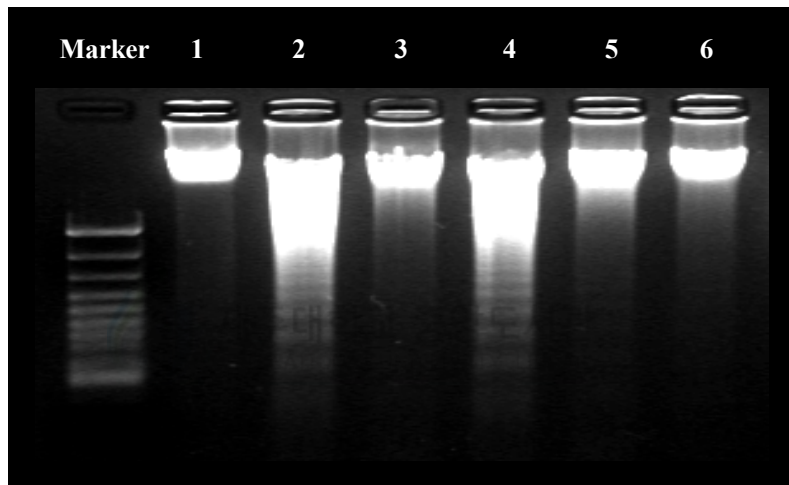


Figure 4. DNA fragmentation by several extracts of *Eurya emarginata* in HL-60 cells

Lane 1 : Control	Lane 2 : 80% MeOH Ext.
Lane 3 : Hexane Ext.	Lane 4 : EtOAc Ext.
Lane 5 : n-Butanol Ext.	Lane 6 : H ₂ O Ext.

1-2. EtOAc층 분획들에 대한 암세포 증식 억제효과

iii

용매분획층인 EtOAc층을 역상실리카겔 column chromatography를 이용하여 5개의 분획으로 분리한 후, 각 분획을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후 MTT assay한 결과, 5개의 분획 중 분획 4와 분획 5 두 개의 분획에서 현저한 세포증식 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다(Figure 5).

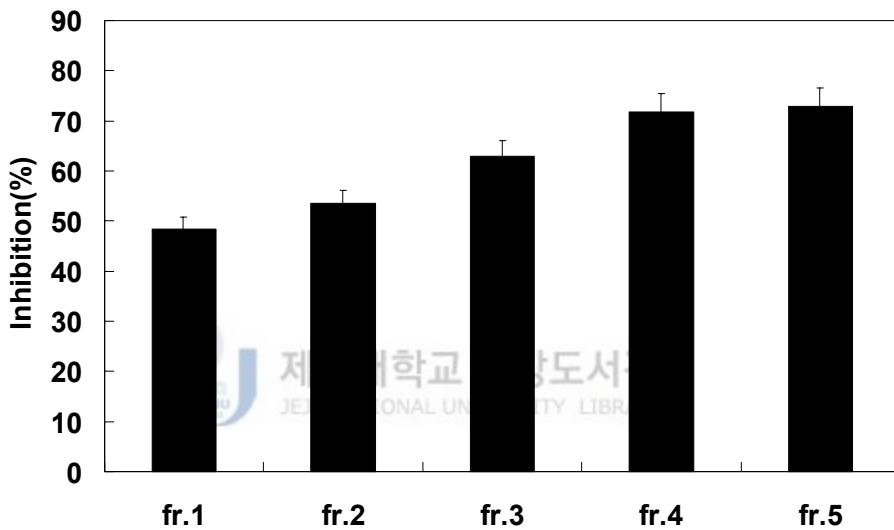


Figure 5. Inhibitory effect of several EtOAc-fractions of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 cells

fr.1 : treatment of 20 % MeOH elution

fr.2 : treatment of 40 % MeOH elution

fr.3 : treatment of 60 % MeOH elution

fr.4 : treatment of 80 % MeOH elution

fr.5 : treatment of 100 % MeOH elution

1-3. JA-A와 JA-C의 HL-60세포에 대한 암세포 증식 억제 효과

iii

단일 화합물로 분리된 JA-A와 JA-C를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하여 HL-60 세포를 처리한 후 MTT assay한 결과, JA-A에서 HL-60세포의 세포증식 억제효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 6).

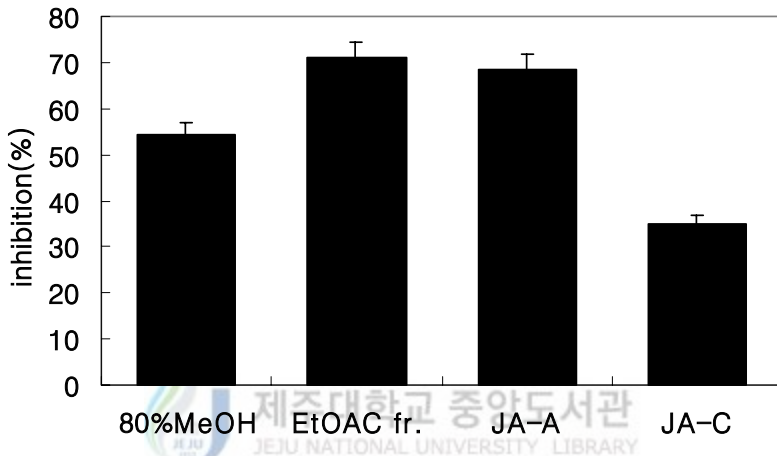


Figure 6. Inhibitory effect of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 cells.

2. 염증성 생체지표인 NO생성 억제결과

2-1. JA-A와 JA-C의 RAW264.7에 대한 NO생성 억제효과

JA-A와 JA-C를 시료 농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 LPS(lipopolysaccharide) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 동시에 처리하여 염증성 생체지표인 NO생성 억제효과를 확인한 결과, JA-A와 JA-C에서 NO생성 억제효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 7).

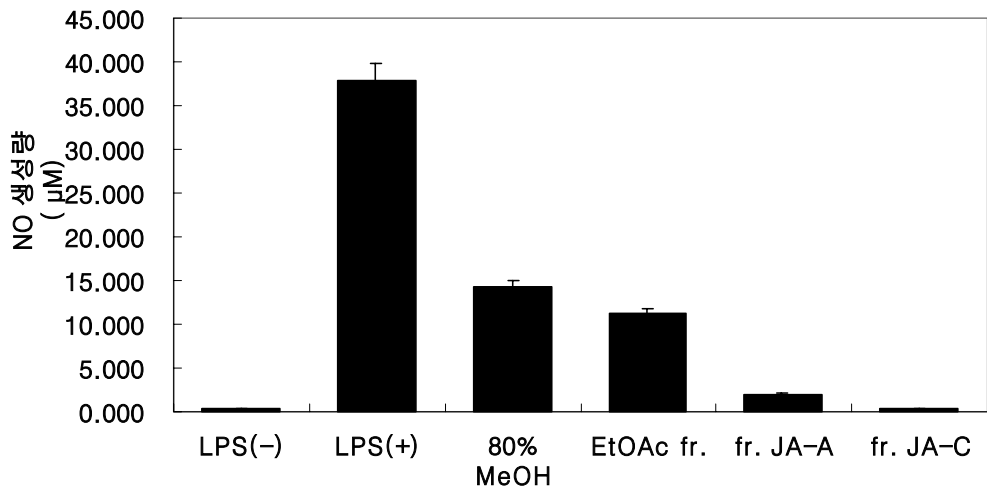


Figure 7. Effects of *Eurya emarginata* on nitrite accumulation in RAW264.7 macrophages.



3. JA-A, JA-C의 분리 및 구조 확인

우묵사스레피 건조분말(150g)을 80% 메탄올로 추출한 후 *n*-Hexane, EtOAc, *n*-Butanol을 사용하여 순차적으로 각각 Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H₂O층으로 용매분획 하였다. 그 중 EtOAc층을 가지고 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올을 사용하여 역상실리카겔 column chromatography로 분리한 결과 5개의 분획들을 얻을 수 있었다. 이 중 3개의 분획을 전개용매(CHCl₃/MeOH = 4/1)를 사용하여 TLC로 확인하였다. 그 패턴은 Figure 8과 같다. 여기서 JA, JB, JC는 각각 20%, 40% 및 60% 메탄올 분획을 나타낸다.

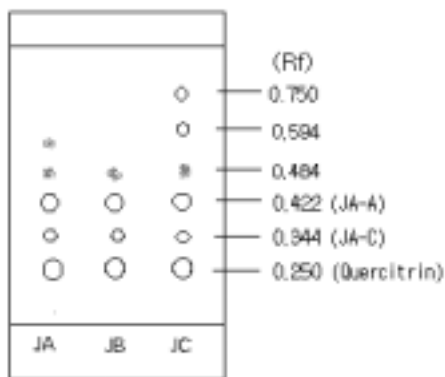


Figure 8. TLC spots of JA, JB, JC

분리한 분획 중 양이 많은 20% 메탄올 분획을 가지고 전개용매 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}/\text{MeOH} = 3/2/0$ to $1/4/0$ to $2/7/1$)를 사용하여 Sephadex column chromatography로 32개의 분획을 얻었다. 그 중 분획 **1-26**과 분획 **1-30**을 용매 50% CH_3CN 을 이동상으로 사용하여 역상 HPLC로 분리하였다. 이렇게 얻어진 분획들을 NMR기기로 확인하였다.

이 중에서 JA-A의 NMR스펙트럼의 경우 $^1\text{H-NMR}$ 을 확인한 결과 δ_H 6.97(2H, m), 6.06(2H, d, 10.4Hz), 7.62(2H, m), 7.40(3H, m)에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음이 예상되었고, 3.65(1H, dt, 10.2, 6.5Hz), 3.92(1H, dt, 10.2, 6.5Hz), 4.32(1H, dd, 11.8, 2.0Hz), 4.50(1H, dd, 11.8, 2.0Hz)에서 나타나는 signal로 보아 sp^3 혼성구조에 전기음성도가 큰 O원자가 붙어 있는 형태라는 것을 예상할 수 있었다. 그리고, δ_H 4.25(1H, d, 7.8Hz), 3.34(2H, m), 3.51(1H, dd, 9.0, 6.0Hz)에서 나타나는 signal들은 당의 형태에 붙어 있는 수소라는 것을 예측할 수 있었다. 또한, 2.04(2H, t, 6.5Hz)에서 나타나는 signal은 sp^3 혼성에 의한 포화탄화수소임을 예상할 수 있었고, 7.71(1H, d, 16.0Hz)과 6.56(1H, d, 16.0Hz)에서 signal들이 나타나는 것으로

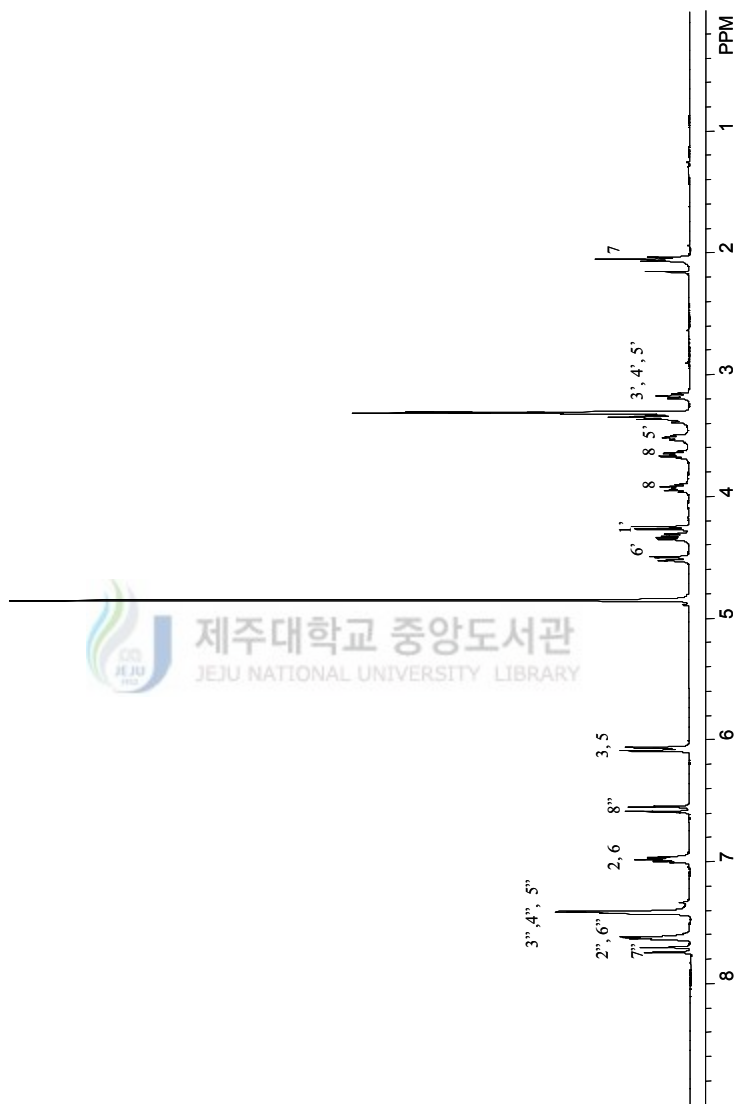
보아 sp^2 혼성을 이루는 불포화 탄화수소임을 예상할 수 있었다(figure 9). ^{13}C NMR스펙트럼을 통해서도 탄소수가 23개임을 확인할 수 있었고, δ_c 187.8 ppm에서 나타나는 작은 intensity의 signal로 보아 방향족 고리 탄소에 carbonyl group이 존재함을 예상할 수 있었다. 168.5 ppm에서 signal이 나타나는 것으로 에스테르 형태에 carbonyl group이 존재한다는 것을 예상할 수 있었다. 100 ppm 이상 160 ppm 이하에서 나타나는 signal들로 sp^2 혼성구조를 갖는 불포화탄화수소 및 방향족 고리의 탄소가 존재함을, 65.9 ppm에서 나타나는 signal들은 sp^3 혼성구조에 전기음성도가 큰 O원자가 붙어 있는 형태라고 예상할 수 있었다. 또한, 70~110 ppm 사이에 signal이 나타나는 것으로 보아 당의 형태에 탄소가 존재함을 예측할 수 있었다(figure 10). DEPT NMR 데이터를 분석하면 3개의 CH_2 와 14개의 CH 탄소가 존재함을 확인할 수 있었다(Figure 11).

이상과 같은 정보를 종합하여 볼 때, JA-A는 부분구조(substructure)로 한 개의 당, 한 개의 cinnamic acid 구조, 한 개의 ethyl quinone 구조를 갖고 있음을 예측할 수 있었다. 이러한 구조의 quinoid 배당체를 문헌 검색한 결과, 기지 물질인 eutigoside C(Figure 13)와 스펙트럼이 일치하였다. Eutigoside C는 1992년 근연식물인 과푸아 뉴기니아 *Eurya tigang*에서 분리 보고된 물질이다. 그러나 *E. tigang* 이외의 식물에서 eutigoside C가 분리 보고된 적은 없다. Eutigoside C와 JA-A의 스펙트럼(1H 및 ^{13}C NMR) 비교 데이터를 Table 1에 나타내었다.

JA-C는 JA-A와 1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼이 거의 일치하였다. 1H NMR 스펙트럼에서 관찰되는 유일한 차이점은, JA-C에서 H-4"가 없어지고, H-5" 및 H-6"가 up-field로 이동되었음을 알 수 있다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서는, JA-C에서 C-4"가 30 ppm down-field로 이동하고, C-5"가 15 ppm up-field로 이동하였음이 관찰되었다. 이러한 패턴은 C-4"에 H 대신 OH로

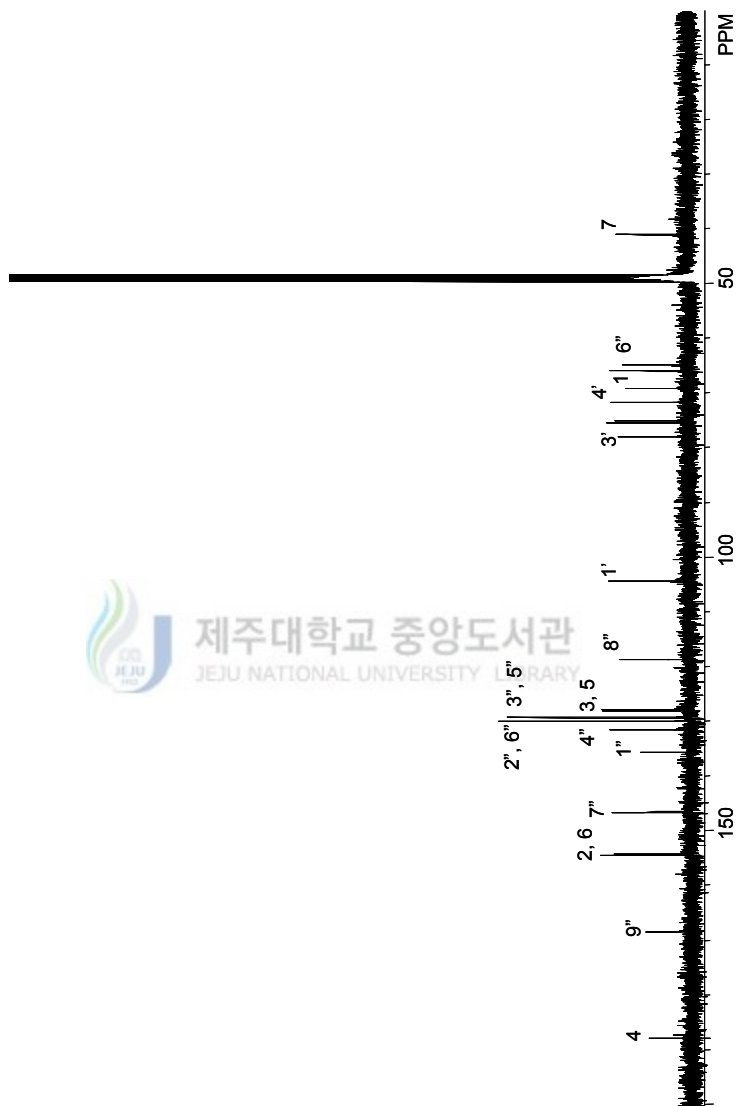
치환되어 나타나는 대표적인 현상이다. 따라서, JA-C는 JA-A의 cinnamic acid 구조 대신 *p*-coumaric acid가 부분구조를 차지하고 있음을 알 수 있다. 따라서, JA-C는 Figure 15와 같은 구조를 나타낸다. 문헌 조사 결과, JA-C는 기지물질인 eutigoside B 및 neocalceolarioside D와 일치하였다. 두 물질은 모두 동일한 구조이나, 유사한 시기에 상이한 식물체로부터 분리됨으로서 다른 이름으로 명명되었다. Eutigoside B는 앞서 언급한 *E. tigang*에서 분리 보고된 물질이다. 한편 몰푸레나무과(Oleaceae)의 *Abeliophyllum distichum*에서도 동일물질이 분리되어 neocalceolarioside D라고 명명되었다. Eutigoside B, neocalceolarioside D 및 JA-C의 NMR 스펙트럼은 Table 2에 비교 정리하였다. ^{9,10)}

JA-A와 JA-C의 polarimeter 측정 결과는 JA-A의 경우 3.8 mg을 메탄올 1 ml에 녹여 측정한 결과 optical rotation값이 $[\alpha]_D^{20} = -10$ (c = 0.0038)임을 확인할 수 있었다. 문헌과 비교해 본 결과 NMR을 통해 확인된 euticoside C와 같은 광학회절을 갖는 동일한 절대배열의 물질임을 확인할 수 있었다. JA-C의 경우 2.8 mg을 메탄올 1 ml에 녹여 측정한 optical rotation값이 $[\alpha]_D^{20} = -13$ (c = 0.0028)임을 확인할 수 있었고, 문헌과 비교한 결과 NMR을 통해 확인된 eutigoside B와 같은 광학회절을 갖는 동일한 절대배열의 물질임을 확인할 수 있었다. ⁹⁾



¹H-NMR : 400MHz in CD₃OD

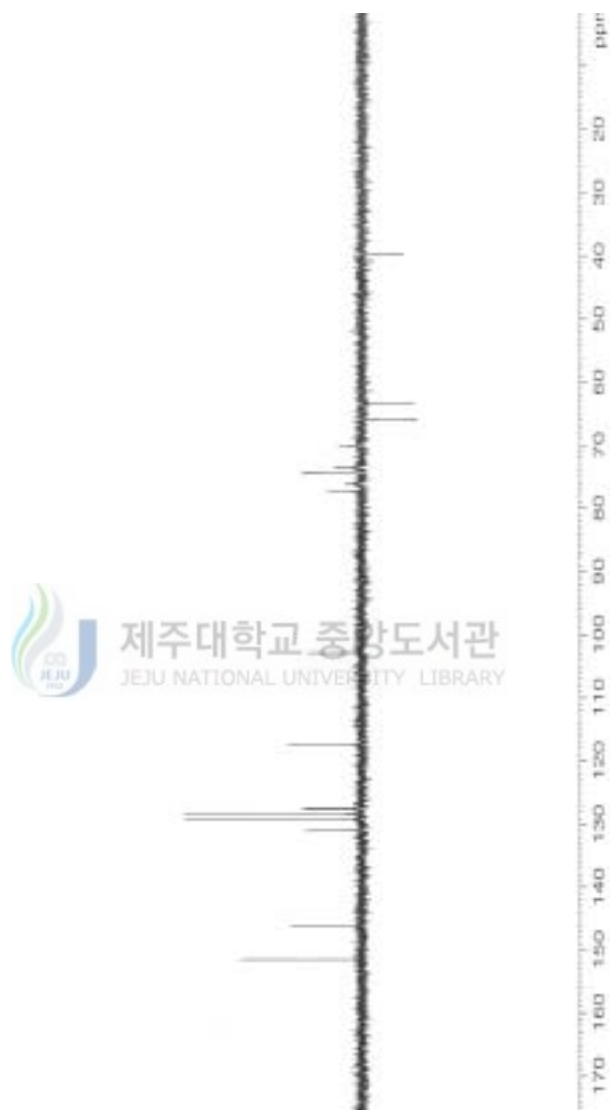
Figure 9. ¹H-NMR spectrum of JA-A



^{13}C -NMR : 100MHz in CD_3OD

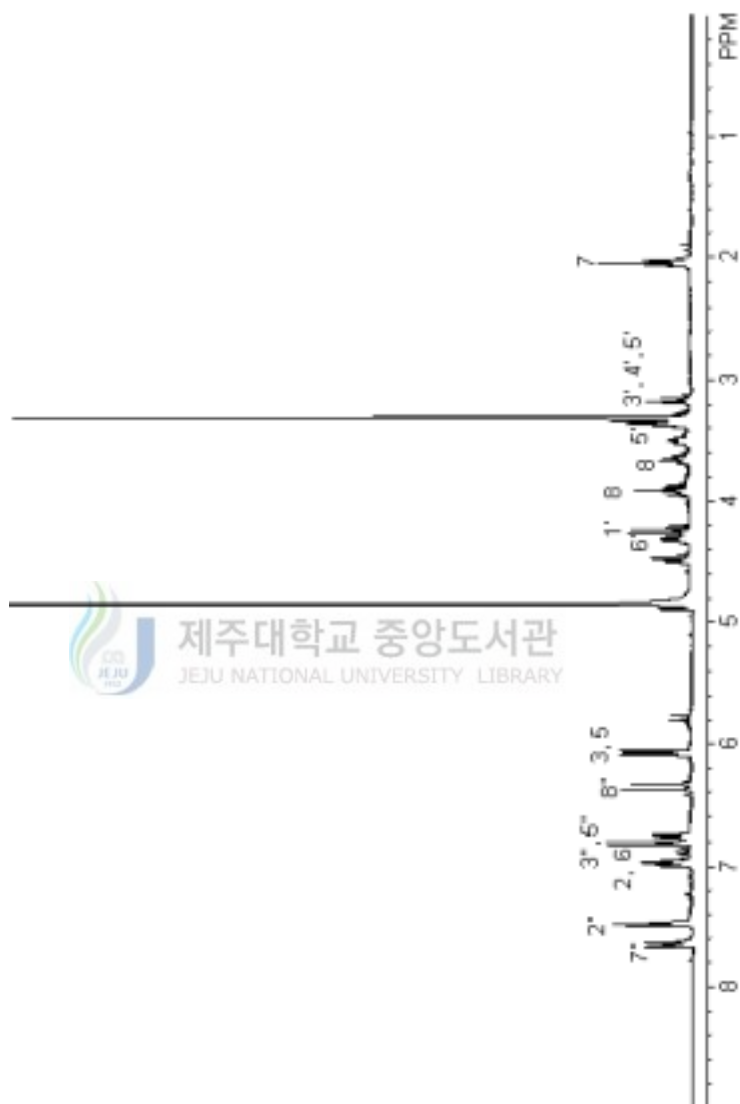
Figure 10. ^{13}C -NMR spectrum of JA-A

iii



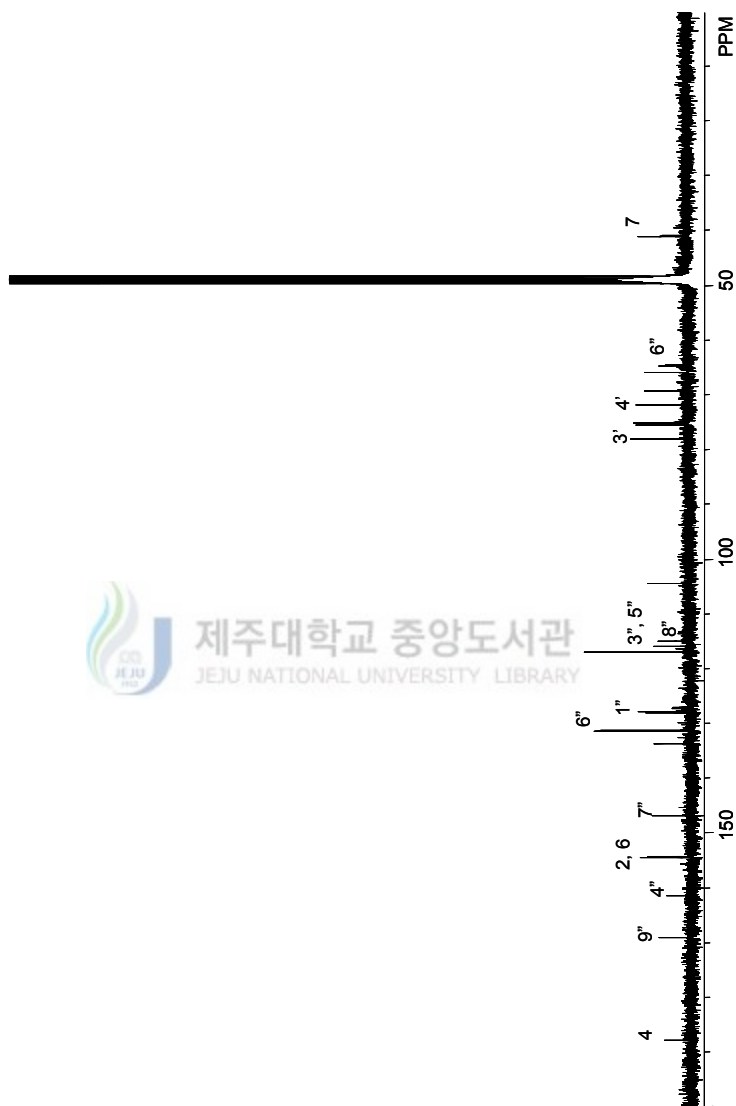
¹³C-NMR : 100MHz in CD₃OD+CDCl₃, 135DEPT

Figure 11. DEPT of JA-A



¹H-NMR : 400MHz in CD₃OD

Figure 12. ¹H-NMR spectrum of JA-C



^{13}C -NMR : 100MHz in CD_3OD

Figure 13. ^{13}C -NMR spectrum of JA-C

Table 1. JA-A와 Eutigoside C의 NMR Data 비교

position	JA-A		iii	eutigoside C	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi, J/Hz)	DEPT	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi, J/Hz)
1	69.2			69.2	
2	154.4	6.97 (2H, m)	CH	154.3	6.69 (2H, d, 9.0)
3	128.0	6.06 (2H, d, 10.4)	CH	127.8	6.05 (2H, d, 9.0)
4	187.8			187.8	
5	127.9	6.06 (2H, d, 10.4)	CH	127.7	6.05 (2H, d, 9.0)
6	154.3	6.97 (2H, m)	CH	154.2	6.69 (2H, d, 9.0)
7	41.0	2.04 (2H, t, 6.5)	CH ₂	41.0	2.04 (2H, t, 5.0)
8	65.9	3.92 (1H, dt, 10.2, 6.5) 3.65 (1H, dt, 10.2, 6.5)	CH ₂	65.9	3.96 (1H, m) 3.66 (1H, m)
1'	104.4	4.25 (1H, d, 7.8)	CH	104.4	4.33 (1H, d, 7.8)
2'	75.4	3.16 (1H, dd, 9.0, 7.8)	CH	75.4	3.35~3.39 (1H, m)
3'	77.9	3.34 (2H, m)	CH	77.9	3.35~3.39 (2H, m)
4'	71.7	3.34 (2H, m)	CH	71.7	3.22 (2H, t)
5'	75.0	3.51(1H, dd, 9.0, 6.0)	CH	75.0	3.52 (1H, m)
6'	64.8	4.50 (1H, dd, 11.8, 2.0) 4.32 (1H, dd, 11.8, 2.0)	CH ₂	64.8	4.53 (1H, dd, 11.8, 2.2) 4.34 (1H, dd, 11.8, 2.2)
1''	135.7			135.7	
2''	130.1	7.62 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
3''	129.3	7.40 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
4''	131.6	7.40 (3H, m)	CH	130.8	7.40 (3H, m)
5''	129.3	7.40 (3H, m)	CH	129.2	7.40 (3H, m)
6''	130.1	7.62 (2H, m)	CH	129.9	7.76 (2H, m)
7''	146.5	7.71 (1H, d, 16.0)	CH	146.5	7.72 (1H, d, 16.2)
8''	118.7	6.56 (1H, d, 16.0)	CH	115.9	6.55 (1H, d, 16.2)
9''	168.5			168.5	

$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CD_3OD .

Table 2. JA-C 와 Eutigoside B, Neocalceolarioside D의 NMR Data 비교

posi- tion	JA-C		Eutigoside B		Neocalceolarioside D	
	^{13}C	^1H (multi, J/Hz)	^{13}C	^1H (multi, J/Hz)	^{13}C	^1H (multi, J/Hz)
1	69.2		69.2		69.2	
2	154.4	6.97 (2H, m)	154.3	6.97 (2H, dd, 10.2)	154.4	6.97 (2H, dd, 10.0, 2.0)
3	128.0	6.07 (2H, d, 10.0)	128.0	6.07 (2H, dd, 10.2)	127.9	6.07 (2H, dd, 10.0, 2.0)
4	187.8		187.8		187.8	
5	127.9	6.07 (2H, d, 10.0)	127.9	6.07 (2H, dd, 10.2)	128.0	6.08 (2H, dd, 10.0, 2.0)
6	154.3	6.97 (2H, m)	154.3	6.99 (2H, dd, 10.2)	154.3	6.99 (2H, dd, 10.0, 2.0)
7	41.0	2.04 (2H, t, 6.1)	41.0	2.03 (2H, t, 6.6)	41.0	2.04 (2H, t, 6.6)
8	65.9	3.92 (1H, dt, 11.9, 6.1) 3.64 (1H, dt, 11.9, 6.1)	65.9	3.96 (1H, m) 3.66 (1H, m)	65.9	3.93 (1H, dt, 10.1, 6.5) 3.65 (1H, dt, 10.1, 6.5)
1'	104.4	4.24 (1H, d, 7.8)	104.9	4.32 (1H, d, 7.8)	104.3	4.25 (1H, d, 8.0)
2'	75.0	3.16 (1H, dd, 9.0, 7.8)	75.5	3.18 (1H, dd, 9.0, 8.0)	75.0	3.18 (1H, dd, 9.0, 8.0)
3'	77.9	3.31~3.39 (2H, m)	77.9	3.31~3.39 (2H, m)	77.9	3.31~3.39 (2H, m)
4'	71.8	3.31~3.39 (2H, m)	71.8	3.31~3.39 (2H, m)	71.7	3.31~3.39 (2H, m)
5'	75.5	3.49 (1H, dd, 9.0, 6.0)	75.0	3.52 (1H, m)	75.4	3.50 (1H, ddd, 9.0, 6.3, 2.3)
6'	64.6	4.48 (1H, dd, 12.0, 2.2) 4.29 (1H, dd, 12.0, 6.0)	64.6	4.48 (1H, dd, 11.8, 2.2) 4.34 (1H, dd, 11.8, 2.2)	64.6	4.48 (1H, dd, 12.0, 6.5) 4.31 (1H, dd, 12.0, 6.5)
1''	127.1		127.0		127.1	
2''	131.2	7.47 (2H, d, 8.6)	131.2	7.47 (2H, d, 8.6)	131.2	7.47 (2H, AA'BB', 8.5)
3''	116.9	6.81 (2H, br, d, 8.6)	116.9	6.81 (2H, br, d, 8.6)	116.9	6.81 (2H, AA'BB', 8.5)
4''	161.4		161.5		161.3	
5''	116.9	6.81 (2H, br, d, 8.6)	116.9	6.81 (2H, br, d, 8.6)	116.9	6.81 (2H, br, d, 8.6)
6''	131.2	7.47 (2H, d, 8.6)	131.2	7.47 (2H, d, 8.6)	131.2	7.47 (2H, d, 8.6)
7''	146.8	7.63 (1H, d, 16.0)	146.8	7.64 (1H, d, 16.2)	146.8	7.64 (1H, d, 16.0)
8''	115.0	6.35 (1H, d, 16.0)	114.9	6.35 (1H, d, 16.2)	114.9	6.35 (1H, d, 16.0)
9''	169.1		169.1		169.1	

^1H -NMR : 400MHz in CD_3OD , ^{13}C -NMR : 150MHz in CD_3OD .

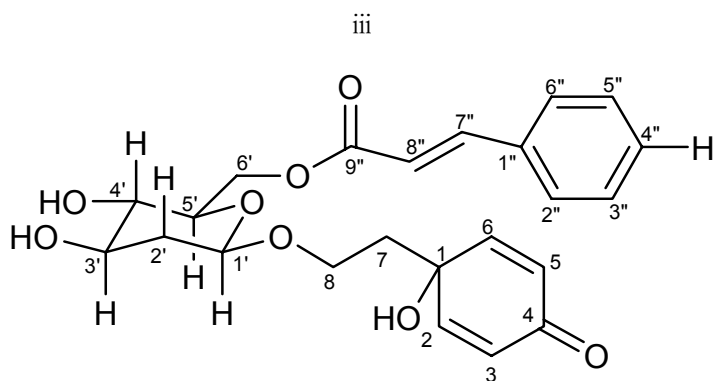


Figure 14. Structure of JA-A(Eutigoside C)

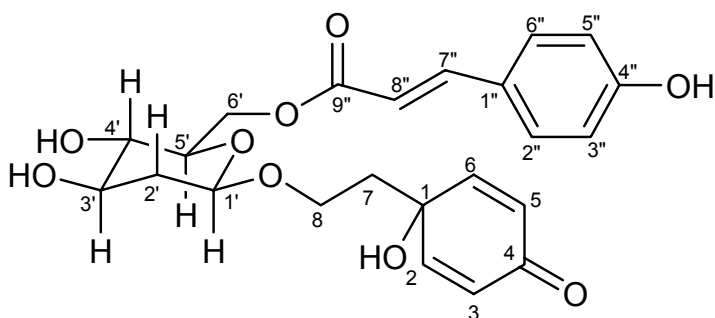


Figure 15. Structure of JA-C(Eutigoside B)

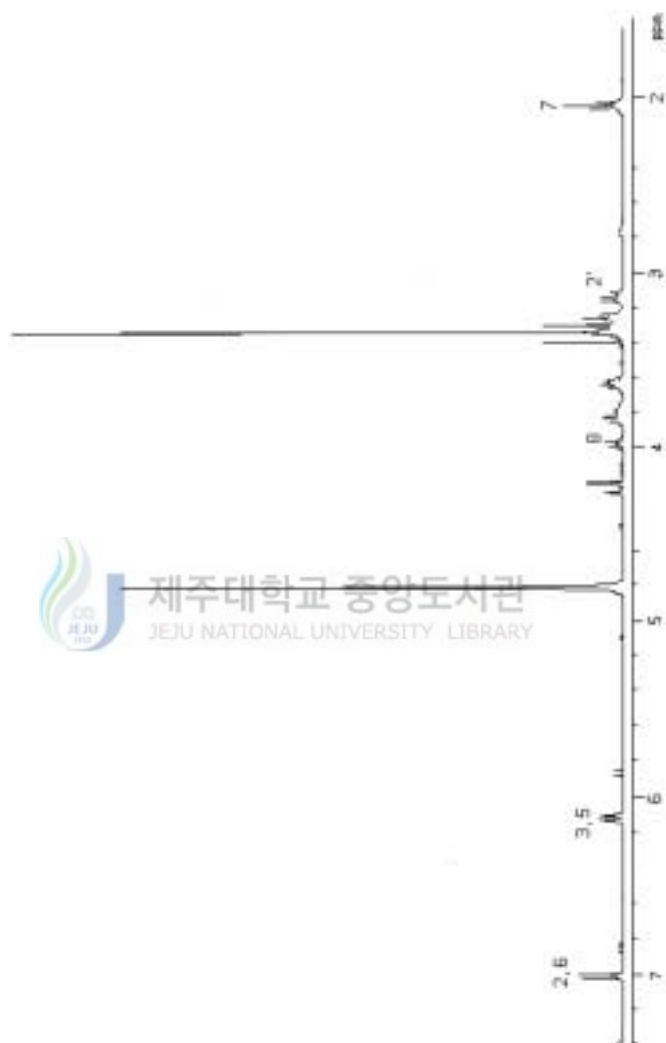
4. JA-D의 $^1\text{H-NMR}$ 결과

iii

JA-D를 NMR로 확인한 결과, 원하는 순도에는 못 미치지만 거의 순수하게 분리된 것으로 보여진다(Figure 16). $^1\text{H-NMR}$ 을 확인한 결과 major peak로 2, 6, 7 ppm부근에서 나타나는 signal로 보아 quinol 화합물이며, 3~5 ppm에서 나타나는 signal로 보아 glucose 배당체일 것으로 예상되어 문헌과 비교 분석한 결과 JA-D은 glucose 배당체로 cornoside라는 quinol화합물의 하나일 것으로 예상되어졌다. Cornoside는 1973년 남미의 층층나무과(Cornaceae)의 *Cornus femina*에서 처음 분리 보고된 물질이다. 그 이후 몰푸레나무과(Oleaceae)의 *Forsythia suspensa*와 현삼과(Scrophulariaceae)의 *Calceolaria hypericina*에서도 분리되었다. 또 앞에서 언급한 eutigoside B가 분리된 몰푸레나무과(Oleaceae)의 *Abeliophyllum distichum*에서도 cornoside가 분리되었다.

Cornoside와 JA-D의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 Table 3에 비교 정리하였다.¹⁰⁻¹³⁾





$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD

Figure 16. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of JA-D

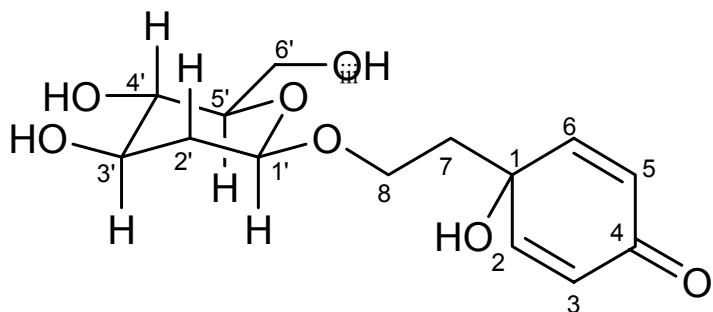


Figure 17 . Structure of JA-D(Cornoside)

Table 3. JA-D와 Cornoside의 NMR Data 비교

position	JA-D	Cornoside
	^1H (multi, J /Hz)	^1H (multi, J /Hz)
1		
2	7.01 (2H, d, 10.2)	7.02 (2H, d, 10.0)
3	6.11 (2H, br d, 10.2)	6.12 (2H, br d, 10.0)
4		
5	6.11 (2H, br d, 10.2)	6.12 (2H, br d, 10.0)
6	7.01 (2H, d, 10.2)	7.02 (2H, d, 10.0)
7	2.04 (2H, br t, 6.6)	2.04 (2H, br t, 6.5)
8	3.98 (1H, dt, 10.2, 6.5) 3.64 (1H, m)	3.99 (1H, dt, 10.0, 6.4) 3.64 (1H, dt, 10.0, 6.3)
1'	4.22 (1H, d, 7.8)	4.22 (1H, d, 7.9)
2'	3.13 (1H, br t, 8.9)	3.14 (1H, br t, 8.2)
3'		
4'		
5'		
6'	3.63 (1H, m) 3.85 (1H, br d, 11.9)	3.63 (1H, br d, 12.0) 3.84 (1H, br d, 12.0)

$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD

$^1\text{H-NMR}$: 500MHz in CD_3OD

IV. 결 론

iii

80% 메탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후, MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정함으로써 HL-60세포의 세포 증식에 따른 대사활성을 확인하였다. 그 결과, 80% 메탄올 추출물과 EtOAc층에서 HL-60세포의 세포 증식을 현저히 억제시킴을 알 수 있었다. 또한, 이러한 HL-60세포의 세포증식에 대한 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 확인하기 위해 apoptosis 유도에 의하여 나타나는 현상중 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. 80% 메탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 12시간 뒤에 DNA 단편화 현상을 관찰한 결과, EtOAc층에서 DNA 단편화 현상이 가장 잘 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 우묵사스레피의 EtOAc분획이 나타내는 HL-60세포의 세포증식 억제효과가 HL-60세포의 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었다. 이 EtOAc층을 역상실리카 겔 column chromatography, sephadex column chromatography, 순상실리카 겔 column chromatography, HPLC 등으로 분리하였고, 이 분획들은 NMR 기기로 확인한 결과 JA-A, JA-C, JA-D가 비교적 순수하게 분리되었다는 것을 확인할 수 있었다(Figures 9, 10, 14, 15, 16).

JA-A, JA-C, JA-D의 NMR data를 문헌들과 비교 분석한 결과, quinol구조를 갖고 있는 eutigoside C(JA-A), eutigoside B(JA-C), cornoside(JA-D)임을 확인할 수 있었다. JA-A의 경우 MTT assay에 대한 세포증식에 따른 대사활성을 확인한 결과 HL-60세포의 세포 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Figure 6). 또 염증성 생체지표인 NO생성 억제정도를 확인한 결과 좋은 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 7). JA-C의 경우 MTT

assay에 대한 세포증식에 따른 대사 활성에서는 좋은 효과가 나타나지 않았지만 NO생성 억제정도를 확인한 결과에서는 JA-A보다 더 좋은 억제효과가 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 6, 7).

향후 JA-D를 고순도로 확보하여, 더욱 명확한 구조동정 과정이 필요할 것이다. 또한, 우묵사스레피 추출물에 포함된 minor compound 들을 분리 정제하여, 항암 활성 data를 더욱 정밀하게 비교 분석하는 작업이 진행되어야 할 것이다.



V. 참고문헌

iii

1. 남상해, 양인석 “산국으로부터 항암활성 성분의 분리” , *Agric. Chem. and Biotech.*, **1995**, 38(3), 273.
2. 박종대, 이유희, 박남민, 김신일, 안병준 “강진항의 항암활성 성분” , *Kor. J. Pharmacogn*, **1995**, 26(4), 323.
3. 김태정 “한국의 자원식물 III” , 서울대학교 출판부, **1996**, 115.
4. 이영노, 이경서, 신용만 “제주자생식물도감” , 여미지, **2001**, 181.
5. Morita, N.; Shimizu, M.; Kasli, M.; Kubo, Y. “Studies on Medical resources. XXXIV. The constituents of Genus *Eurya*.(1). *E. japonica* THUNB. and *E. emarginata*, MAKINO” , *Yakugaku Zasshi*, **1974**, 94, 872-874.
6. An S. J.; Pae H. O.; Oh G. S.; Choi B. M.; Jeong S.; Jang S. I.; Oh H.; Kwon T. O.; Song C.; Chung H. T. “Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 production in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophage by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *catalpaovata* G. Don (Bignoioaceae)” , *Int. Immunopharmacol.*, **2002**, 2, 1173-1181.
7. Scott M. G.; Hancick R. E. “Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system” , *Crit. Rev. Immunol.*, **2000**, 20, 407-431.
8. Ashutosh K. M.; Amita A.; and Sita N. “Gold sodium thiomalate (GSTM) inhibits lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor- α throught ceramide pathway” , *Cell. Immunol.*, **2002**, 219, 1-10.
9. Ikhlas A.; Khan; Clemens, A. J.; Erdelmeiem; Dtto S. “New phenolic glucosides from the leaves of *Eurya tigang*” , *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55(9),

1270-1274.

10. Kuwajima, H.; Takahashi, M.; Ito, M.; Wu, H.; Takaishi, K.; Inoue, K. "Aquinol glucoside from *Abeliophyllum distichum*", *Phytochemistry*, **1993**, 33(1), 137-139.
11. Rosendal Jensen, S.; Kjaer, A.; Juhl Nielsen, B. "Aquinol glucoside isolated from *Cornus* species", *Acta Chem. Scand*, **1973**, 27(1), 367-369
12. Katsya, E.; Hiroshi, H. "Structures of rengyol, rengyoxide, and rengyolone, new cyclohexylethane derivatives from *Forsythia suspensa* fruits", *Can. J. Chem.*, **1984**, 62, 2011-2014.
13. Nicoletti, M.; Galeffi, C.; Messana, I.; Marini-Bettolo, G. B.; Garbarino, J. A.; Gambaro, V. "Phenylpropanoid glycosides from *Calceolaria hypericina*", *Phytochemistry*, **1988**, 27(2), 639-641.
14. 양홍철, 박수영, 강희경, 이남호 "우묵사스레피의 플라보노이드 화합물의 분리 및 동정", *Cheju Journal of Life Science*, **2001**, 4(4), 103-110.
15. 박수영, 강희경 "HL-60 세포의 성장에 대한 제주 자생 식물체의 효과", *Cheju Journal of Life Science*, **2000**, 3(3), 85-94.

감사의 글

iii

대학에 입학한지가 엇그제 같은데, 벌써 학부 4년이 지나고 이제 대학원 생활의 두 해도 마무리 지으려 합니다. 학교생활을 하는 동안 그리고 이 논문이 나오기까지 여러 분들의 도움이 있었습니다. 그 분들께 감사의 마음을 전합니다.

먼저 논문이 완성되기까지 부족한 점이 많은 저를 믿고 지도해 주신 이남호 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 6년간 많은 가르침을 주신 한성빈 교수님, 정덕상 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 이선주 교수님, 김원형 교수님께 감사드리며, 논문 실험에 도움을 주신 강희경 교수님과 박수영 선생님께도 감사드립니다.

또한 항상 힘이 되어주고 많은 조언을 해주시는 실험실의 종석 오빠, 진석 오빠, 홍철 오빠, 태현 오빠, 정미 언니, 영민이, 함께 졸업하는 희철이 오빠와 대학원 생활을 함께 한 선배님들 그리고 후배들과 언제나 힘들고 지칠때마다 격려와 위로를 아끼지 않았던 친구들 모두 고맙습니다.

끝으로 늘 묵묵히 지켜봐 주시고 격려해 주시는 할머니, 아빠, 엄마 그리고 멀리 있어도 힘이 되는 동생(정운)에게 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

이제는 이 분들에게 도움이 되는 사람으로 살기 위해 노력하겠습니다. 이것이 끝이 아니라 새로 시작하는 마음으로

2003년 12월

문 지 영 올림