

2006年 2月
碩士學位論文

이질풀 (*Geranium thunbergii*)의
化學成分 및 生理活性에 관한 研究

朝鮮大學校 大學院

藥學科

劉慶鶴

이질풀(*Geranium thunbergii*)의
化學成分 및 生理活性에 관한 研究

*Phytochemical constituents and biological activities of
Geranium thunbergii Sieb. et Zucc.*

2006년 2월 24일

朝鮮大學校 大學院

藥學科

劉慶鶴

이질풀(*Geranium thunbergii*)의
化學成分 및 生理活性에 관한 研究

指導教授 禹銀蘭

이 論文을 碩士學位申請 論文으로 제출함.

2005年 10月 20日

朝鮮大學校 大學院

藥學科

劉慶鶴

劉慶鶴의 碩士學位 論文을 認准함.

委員長 朝鮮大學校 教授 文 永 熙(印)

委 員 朝鮮大學校 教授 高 玉 鉉(印)

委 員 朝鮮大學校 副教授 禹 銀 蘭(印)

2005年 11月 21日

朝鮮大學校 大學院

Contents

<i>Contents</i>	I
<i>List of Schemes</i>	III
<i>List of Tables</i>	III
<i>List of Figures</i>	IV
<i>Abstract</i>	V

I. 緒 論	1
II. 實 驗	4
1. 實驗材料	4
2. 試藥 및 器機	4
2-1. 試藥	4
2-2. 器機	5
3. 化合物의 分離	6
3-1. 抽出 및 分割	6
3-2. CH ₂ Cl ₂ 分割으로부터 compound의 分離	6
3-2-1. Compound 1의 分離	9
3-2-2. Compound 2의 分離	10
3-2-3. Compound 3의 分離	11
3-2-4. Compound 4의 分離	13
3-2-5. Compound 5의 分離	14
3-2-6. Compound 6의 分離	15

4. 生理活性	17
4-1. NBT superoxide scavenging assay	17
4-2. Cytotoxic activity assay	17
4-3. MG-63에서 hIL-6의 遊離 確認	19
III. 結果 및 考察	21
1. Compound 1의 構造	21
2. Compound 2의 構造	21
3. Compound 3의 構造	22
4. Compound 4의 構造	23
5. Compound 5의 構造	23
6. Compound 6의 構造	24
7. 生理活性 結果	27
7-1. NBT superoxide scavenging assay	27
7-2. Cytotoxic activity assay	27
7-3. MG-63에서 hIL-6의 遊離 確認	27
IV. 結 論	29
V. 參 考 文 獻	31
APPENDIX	35

List of Schemes

Scheme I. Extraction and fractionation of MeOH extract from <i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	7
Scheme II. Isolation of compounds 1, 2 and 6 from CH ₂ Cl ₂ extract of <i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	7
Scheme III. Isolation of compounds 3, 4 and 5 from CH ₂ Cl ₂ extract of <i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	8

List of Tables

Table 1. Antioxidative activities of fraction extract from <i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	36
Table 2. Cytotoxic activity of fraction extract from <i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	36

List of Figures

Fig. 1.	Structures of isolated compounds 1, 2, 3, 4, 5, and 6 from <i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc.	26
Fig. 2.	Effects of Compounds 2~5 on TNF- α induced hIL-6 production from MG-63 cells	28
Fig. 3.	^1H -NMR spectrum of compound 1 (300 MHz, CD_3OD)	37
Fig. 4.	^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (75 MHz, CD_3OD)	38
Fig. 5.	^1H -NMR spectrum of compound 2 (500 MHz, CD_3OD)	39
Fig. 6.	^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (125 MHz, CD_3OD)	40
Fig. 7.	^1H -NMR spectrum of compound 3 (500 MHz, CD_3OD)	41
Fig. 8.	^{13}C -NMR spectrum of compound 3 (125 MHz, CD_3OD)	42
Fig. 9.	^1H -NMR spectrum of compound 4 (500 MHz, CD_3OD)	43
Fig. 10.	^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (125 MHz, CD_3OD)	44
Fig. 11.	^1H -NMR spectrum of compound 5 (500 MHz, CD_3OD)	45
Fig. 12.	^{13}C -NMR spectrum of compound 5 (125 MHz, CD_3OD)	46
Fig. 13.	EI-Mass spectrum of compound 5	47
Fig. 14.	HR-Mass spectrum of compound 5	48
Fig. 15.	^1H -NMR spectrum of compound 6 (500 MHz, CD_3OD)	49
Fig. 16.	^{13}C -NMR spectrum of compound 6 (125 MHz, CD_3OD)	50

Abstract

Phytochemical constituents and biological activities of Geranium thunbergii Sieb. et Zucc.

Liu, Qing-He

Advisor : Prof. Woo, Eun-Rhan, Ph.D.

Department of Pharmacy,

Graduate School of Chosun University.

Geranium thunbergii Sieb. et Zucc. (Geraniaceae) is a perennial plant and is distributed in Korea, China, and Japan. In traditional medicine, the whole plants are used as an antihemorrhage, sterilization, diarrhea, and astringent. Previous phytochemical studies on this species afforded tannins and flavonoids, such as geraniin, corilagin, ellagic acid, gallic acid, quercetin, kaempferol, and kaempferol-7-rhamnoside. In an ongoing investigation into biologically active compounds from natural products, the methylene chloride soluble fraction of methanol extract from *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. (Geraniaceae) showed significant antioxidative activity on the NBT superoxide scavenging assay and inhibitory effect on TNF- α induced hIL-6 production in the MG-63 cell. By means of the repeated column chromatography using silica

gel, Sephadex LH-20, LiChroprep RP-18, two sterols 7-oxositosterol (1) and sterol mixture (2), three lignans (+)methyl piperitol (kobusin) (3) 7,7'-dihydroxy bursehernin(4), 4- α -hydroxykobusin (5), and one flavonol glycosides, kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (6) were isolated. Their structures of compounds 1~6 were determined by chemical analysis, as well as, 1D- with 2D-NMR spectroscopy. Among them, 4- α -hydroxykobusin (5) was isolated for the first time in nature, and compounds 2~5 were isolated from this plant for the first time. In vitro cell cytotoxicity was evaluated by SRB method and compounds 2~5 showed no cytotoxic activity. Compound 2 and 4 showed inhibitory effect on TNF- α induced hIL-6 production in the MG-63 cell. Therefore, compounds 2 and 4 may be developed for the anti-inflammatory agents and treatment of disease by overexpression of hIL-6.

I. 緒 論

이질풀(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.)은 쥐손이풀과(*Geraniaceae*)에 속하는 多年生草本으로서 우리나라 全國 各 地方의 山野地와 原野地에서 흔히 自生하고 日本, 中國(河北省, 山東省, 雲南省, 四川省, 湖北省等)에서도 産出된다.^(3,4)

쥐손이풀과(*Geraniaceae*)는 世界에 11 屬 850 種, 우리나라에는 3屬 20 種이 자란다. 그 중 *geranium*屬 植物은 14種 3變種이 自生하고 있다.^(1,2)

全草는 높이가 50cm 안팎이고 옆으로 비스듬히 또는 기어가면서 뻗어 나가며 위로 퍼진 털이 있고 뿌리가 여러 개로 갈라진다. 잎은 對生하며 葉柄이 있고 掌狀으로 3~5개로 갈라지며 兩面에 흔히 黑色의 무늬가 있고 너비는 3~7cm이며 표면에 伏毛가 있고 뒷면 脈위에 비스듬히 선 곱슬털이 있다. 열편은 도란형이며 鈍頭이고 얇게 3개로 갈라지며 頂부분에 불규칙한 톱니가 있고 托葉은 서로 떨어진다. 8~9월에 꽃이 피고 꽃은 연한 紅色, 紅紫色, 또는 白色이며 花梗에서 2개의 小花梗이 갈라져 각각 1개의 꽃이 달린다. 小花梗과 꽃받침에 짧은 털과 더불어 퍼진 긴 腺毛가 있으며 子房에 털이 있고 암술머리는 길이 2mm 程度이다. 10월에 열매가 成熟되며 蒴果는 5개로 갈라져서 위로 말리며 5개의 種子가 들어 있다.⁽³⁾

本 生藥은 한방에서는 현초(玄草 또는 老鶴草)라고 하며 가을에 全草를 採取하여 다듬어서 말린 것을 쓴다. 또한 苦, 辛, 微溫의 性味를 나타내어 血을 活性化하고, 風을 除去하며, 清血解毒의 效能이 있고 經絡을 잘 通하게하며, 筋骨을 健康하게 하는 效能이 있으며, 류마티스, 風濕疼痛, 구련마목(拘攣麻木), 打撲傷, 中風 등의 痛症에 使用되며 赤

痢, 疫痢, 帶下症, 膀胱炎, 皮膚病, 瘡腫, 胃潰瘍 等に 對하여 消炎, 制菌作用도 있다고 掲載되어 있다.^(3,4)

煎液은 赤痢菌, 장티프스, 大腸菌, 프레스로우腸炎菌, 켈트넬腸炎菌에 對해서 試驗管에서 殺菌作用이 있으며 腸의 緊張度를 높이고, 종조근 運動을 抑制하지만, 緊張增加는 腸의 平滑筋의 자기作用에 의해서 종조근 運動의 抑制는 交感神經의 興奮에 의한 것이다. 또한 十二指腸 및 小腸의 蠕動運動을 抑制하고, 整腸作用이 있다, 그러나 망장에서는 묽은 煎液은 逆流動, 진한 煎液은 直流動을 促進하며, 大腸은 진한 煎液만이 流動運動을 促進하는 작용도 있다고 한다.

成分연구로는 전초에 tannin과 flavonoid가 주성분으로서 tannin은 앞에 약 20%, 全草에 약 5%를 含有하며 主成分은 ellagitannin의 하나인 geraniin이다. 그 밖에 pyrogallol, epicatechin, gallic acid, ellag-tannin이 있고, flavonoid는 quercetin, kaempferol-7-rhamnoside, kaempferol이 있으며, 其他 成分으로는 succinic acid, protocatechuic acid 等도 含有되어 있다고 한다.^(4,5)

hIL (human interleukin)-6는 cytokine 일종의 蛋白質 그룹으로 일부는 림프구 系統의 細胞가 生成하여 免疫調整 役割을 하며 造血作用을 調節한다. 大部分의 cytokine은 表迹細胞의 細胞表面 受容器를 통하여 作用하며 호르몬과 類似하다. 抗細胞增殖作用, 抗微生物作用, 抗腫瘍作用의 機能을 하기 때문에 感染, 炎症, 자가免疫疾患, 腫瘍治療劑로 使用되고 있다. 이러한 여러 技能을 가진 hIL-6의 生産 調節이 잘못되면 류마티스 關節炎, 肝硬變, 乾癬 皮膚病, 多發性 骨髓腫, 心臟 粘液腫, 後天性 免疫 缺乏症 등의 여러 가지 자기免疫疾患을 誘發하는 것으로 알려져 있다. 한편 多發性 骨髓腫, 류마티스 關節炎, 早期 分娩 및 早期 羊膜破裂 産母의 경우, 여러 組織에서 hIL-6가 높은 水準으로 檢出되는 것으로 報告되었다. 또한 炎症性 神經 關節 疾患(關節炎, 神經痛, 筋

肉痛)에 관한 많은 研究가 報告되어졌다.^(27~29)

따라서 本 研究에서는 成分研究가 微弱한 이질폴의 CH_2Cl_2 分割으로 부터 sterols 2種 , lignans 3種(신규 1種) 및 flavonol glycoside 1種을 分離하였고, 化學的인 機器分析과 分光學的인 分析, 그리고 文獻들과의 比較를 토대로 하여 各各의 構造를 確認 동정하였다. 分離한 化合物을 細胞毒性이 없는 濃度에서 TNF(tumor nectosis factor)- α 에 의해 誘導된 hIL-6의 抑制作用을 알아보기 위하여 MG-63 세포주를 利用한 hIL-6의 遊離, 抑制實驗을 實施하였으며, 肯定的으로 앞에서 記述한 여러 가지 疾患에 대한 治療劑 開發의 可能性을 探索하고자 하였다.

II. 實 驗

1. 實驗材料

實驗에 利用된 이질풀(*Geranium thunbergii*)은 2003年 4月 朝鮮大學校 藥學大學 藥草園에서 採取하였으며 專門家の 同定 過程을 거쳐 사용하였으며, 標本은 朝鮮大學校 藥學大學 標本室에 保管中이다.

2. 試藥 및 器機

2-1. 試藥

① 溶媒

抽出 및 分割用 試藥은 1級 試藥을 使用하였으며, TLC와 chromatography用 試藥은 1級 또는 特級 試藥을 使用하였다.

② Packing materials

Column chromatography의 packing material로는 Kieselgel 60(63~200 μm , Art. 7734, Merck)와 Kieselgel 60(40-63 μm , Art. 9385, Merck), Lipophilic Sephadex LH-20(25-100 μm , Lot 81K1092, Sigma), LiChroprep RP-18(40-63 μm , L610400 138, Merck), MCI gel CHP20P(75-150 μ , Mitsubishi Chemical Corporation) 등을 使用하였다.

③ TLC

Thin layer chromatography用 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F₂₅₄S plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 使用하였다. preparative thin layer chromatography (PTLC)용 은 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate(layer thickness 0.5 mm, 20×20 cm. Art. 5744, Merck)와 precoated RP-18 F₂₅₄S plate(layer thickness 1 mm, 20×20 cm. Art. 5434, Merck)를 使用하였다.

2-2. 器機

實驗에 使用한 器機는 다음과 같다.

MP : Fisher Scientific (Model 307N0043, Canada)

IR : JASCO FT/IR-300E (Jasco Co., Japan)

UV : JASCO V-550 (Jasco Co., Japan)

FAB-MS : JMS 700(JEOL)

¹H-NMR : Varian Unity Inova 500 MHz and 300 MHz

¹³C-NMR : Varian Unity Inova 125 MHz and 75 MHz

Polarimeter : AUTOPOL[®] IV automatic polarometer

(Rudolph Research Flangers, NJ 07836)

HPLC pump : Waters 1525 Binary HPLC pump

HPLC UV Detector : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector

GC/Mass System : Hewlett-Packard 5985

3. 화합물의 分離

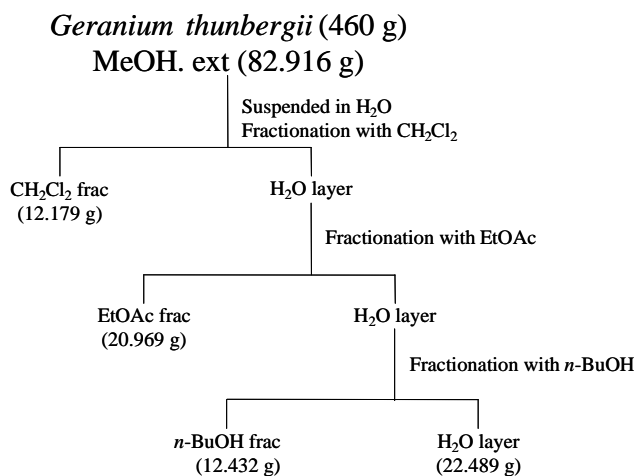
3-1. 抽出 및 分割

이질풀(*Geranium thunbergii*, 乾燥重量 : 460 g)은 MeOH 8ℓ를 抽出溶媒로 하여 80℃에서 4時間동안 3회에 걸쳐 震蕩하면서 抽出하여 82.916g의 MeOH extract를 얻었다. MeOH ext에 water를 넣고 飽和시킨 後에 CH₂Cl₂를 加하여 抽出하였다. 繼續하여 용매의 極性を 높여 가면서 EtOAc, *n*-BuOH와 H₂O 分割으로 나누었다. 各 溶媒에 녹는 分割들을 減壓下에서 濃縮하여 CH₂Cl₂ (12.179g), EtOAc (20.969g), *n*-BuOH (12.432g)과 H₂O (22.489g) extract를 各各 얻었다(Scheme I).

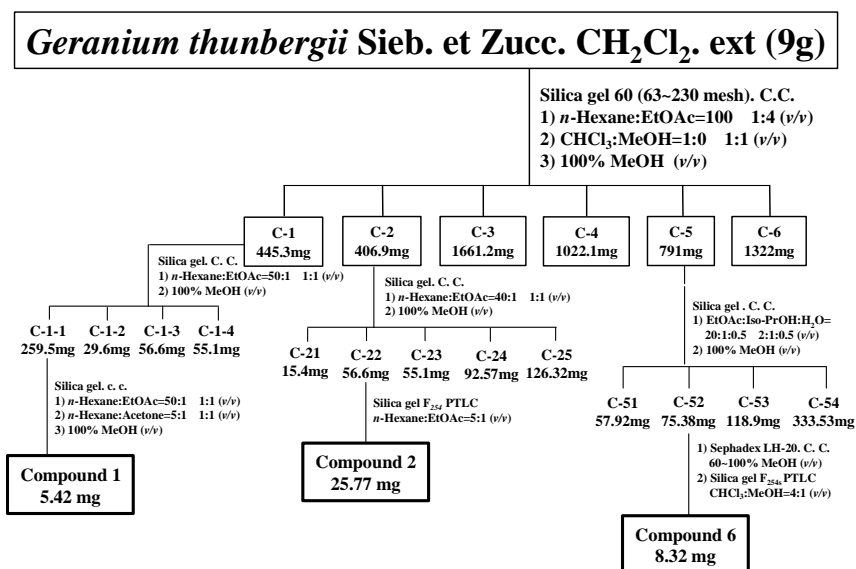
이질풀의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 對한 antioxidative activity(Table 1)와 HCT₁₅와 SK-OV-3의 cell line을 利用한 cytotoxic activity(Table 2) 檢索 結果로부터 CH₂Cl₂의 分割이 가장 좋은 antioxidative activity와 cytotoxic activity를 나타냈다. 이로부터 이질풀의 CH₂Cl₂의 extract 分割으로부터 antioxidative activity와 cytotoxic activity가 있는 物質을 分離하기 위하여 本 實驗을 시작하였다.

3-2. CH₂Cl₂ 分割으로부터 compound의 分離

이질풀의 CH₂Cl₂ fraction (9g)을 Silica gel 60 (63~200 mesh)을 利用한 open column chromatography를 實施하였다. 처음 使用한 展開溶媒는 *n*-Hexane:EtOAc=50:1에서 1:1까지 흘린 후, 溶媒를 바꾸어 CHCl₃:MeOH=1:0으로부터 시작하여 1:1까지 展開溶媒의 極性を 올리면서 溶출시켰으며 마지막에는 100%의 MeOH로 column을 깨끗이 씻어 주었다. 各各의 分割들을 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F₂₅₄S TLC pattern으로 檢討한 후 類似한 것들을 합쳐서 6개의 소 分割으로 나누었다(Scheme II, III).

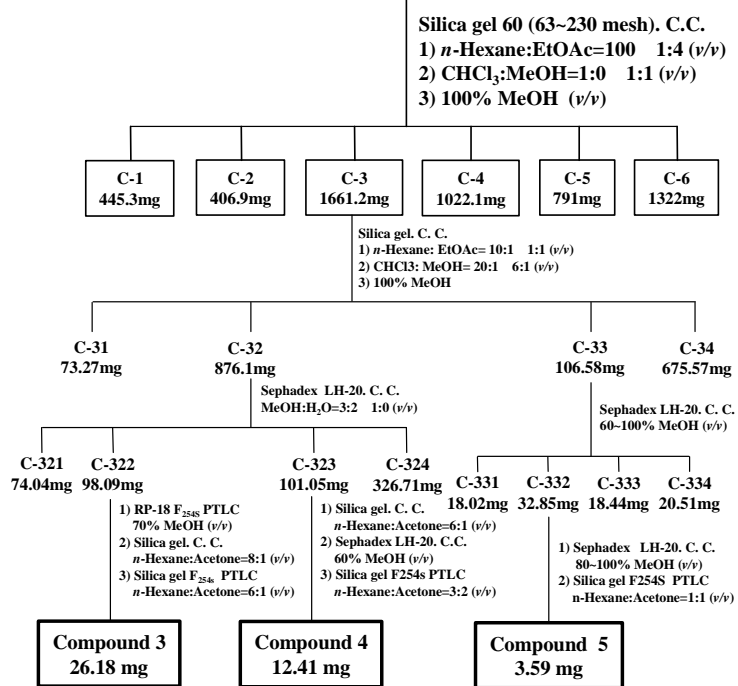


Scheme I. Extraction and fractionation of the MeOH extract from *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.



Scheme II. Isolation of compounds 1, 2 and 6 from CH₂Cl₂ extract of *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.

***Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. CH₂Cl₂. ext (9g)**



*Scheme III. Isolation of compounds 3, 4 and 5 from CH₂Cl₂ extract of
 Geranium thunbergii Sieb. et Zucc.*

3-2-1. Compound 1의 分離

Subfraction C-1 (445.3mg)을 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 *n*-Hexane:EtOAc (50:1→1:1)인 溶媒條件으로 column chromatography를 實施하였다. Silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F₂₅₄S TLC pattern으로 檢討한 後 類似한 것들 합쳐서 4個의 소 分劃으로 나누었다. 나누어진 소 分劃 C-1-1 (259.5mg)을 다시 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 *n*-Hexane:EtOAc (50:1→1:1)와 *n*-Hexane:acetone (5:1→1:1)인 溶媒條件으로 column chromatography로 精製하여 純粹化合物 compound 1 (5.42mg)을 얻었다. compound 1은 UV 短波長(254nm)에서 희미한 노란 色螢光을 나타냈고, 10% 黃酸溶液에서 노란색으로 發色되었다.

White crystal

Molecular formula : C₂₉H₄₆O₂

Molecular weight : 426

MP : 162°C

IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3449 (OH), 1648 (C=O), 1055(C-O)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ :

3.67(1H, m, H-3), 5.69(1H, d, $J=1.5$ Hz, H-6), 0.69(3H, s, 18-CH₃), 1.20(3H, s, 19-CH₃), 0.93(3H, d, $J=6.6$ Hz, 21-CH₃), 0.82(3H, s, 26-CH₃), 0.80(3H, s, 27-CH₃), 0.85(3H, s, 29-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ :

36.35(t, C-1), 31.19(t, C-2), 70.54(d, C-3), 43.81(t, C-4), 165.07(s, C-5), 126.13(d, C-6), 202.36(s, C-7), 45.42(d, C-8), 49.96(d, C-9), 38.27(s, C-10), 21.22(t, C-11), 38.70(t, C-12), 41.81(s, C-13), 49.83(d, C-14), 26.31(t, C-15), 28.57(t, C-16), 54.70(d, C-17), 11.93(q, C-18), 17.31(q, C-19), 39.09(d, C-20), 18.93(q, C-21), 33.94(t, C-22), 26.07(t, C-23), 45.82(d, C-24),

29.12(d, C-25), 19.81(q, C-26), 19.04(q, C-27), 23.04(t, C-28),
11.98(q, C-29)

3-2-2. Compound 2의 分離

Subfracton C-2 (406.9mg)를 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 *n*-Hexane:EtOAc (40:1→1:1)인 溶媒條件으로 column chromatography를 實施하였고 마지막에는 100% MeOH로 column을 깨끗이 씻었다. Silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S} TLC pattern으로 檢討한 後 類似한 것들 합쳐서 5개의 소 分割으로 나누었다. 나누어진 소 分割 C-2-2 (56.6mg)를 다시 Silica gel F₂₅₄를 利用하여 *n*-Hexane:EtOAc (5:1)인 溶媒條件下에서 PTLC로 精製하여 純粹化合物 compound 2 (25.77mg)를 얻었다. compound 2는 UV 短波長 (254nm)에서 螢光吸收가 없는 것으로 나타냈고, 10% 黃酸溶液에서 붉은색으로 發色되었다.

White crystal

Molecular formula : C₂₉H₅₀O

Molecular weight : 414

MP : 133-136 °C

[α]_D : -20° (*c* 0.18, CHCl₃)

IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3410 (OH), 2950 (CH), 1640 (C=C), 1060(C-O),
840, 800 (trisubstituted double bond)

MS m/z (rel. int.) : 414(M⁺, 91.8), 412(M⁺, 1.2), 400(M⁺, 8.9), 399(414
-CH₃, 29.7), 397(412-CH₃, 16.1), 396(414-H₂O, 49.3), 367[400-
(H₂O+CH₃), 2.7], 329(414-C₆H₁₂, 14.4), 303(414-C₇H₁₁O, 18.4),
273(M-sc-C₃H₆, 36.4), 229(M-sc-C₃H₈, 17.6), 213(M-sc-C₃H₆
-H₂O, 63.9), 43(100)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ :

5.35 (1H, br d, $J=4.5\text{Hz}$, C-6), 3.52 (1H, m, C-3), 1.01 (3H, s, C-19), 0.68 (3H, s, C-18)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ :

37.25 (t, C-1), 31.8 (t, C-2), 71.80 (d, C-3), 42.31 (t, C-4), 140.0 (s, C-5), 121.71 (d, C-6), 31.65 (t, C-7), 31.87 (d, C-8), 50.15 (d, C-9), 36.50 (s, C-10), 21.07 (t, C-11), 39.77 (t, C-12), 42.29 (s, C-13), 56.86 (d, C-14), 24.35 (t, C-15), 28.24 (t, C-16), 56.15 (d, C-17), 11.85 (q, C-18), 19.38 (q, C-19), 36.18 (d, C-20), 18.71 (q, C-21), 33.94 (t, C-22), 26.07 (t, C-23), 45.81 (d, C-24), 29.15 (d, C-25), 19.80 (q, C-26), 19.03 (q, C-27), 23.06 (t, C-28), 12.04 (q, C-29)

3-2-3. Compound 3의 分離

Sufracation C-3 (1661.2mg)을 *n*-Hexane:EtOAc(10:1→1:1)과 CHCl_3 :MeOH (20:1→6:1)의 溶媒條件으로 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 column chromatography를 實施하였다. 各各의 分割들은 Silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S} TLC pattern으로 確認하여 分離된 程度에 따라 4個의 소 分割으로 나누었다. 나누어진 소 分割 C-3-2 (876.1mg)을 다시 Sephadex LH-20을 利用하여 MeOH:H₂O (3:2→1:0)인 溶媒條件下에서 column chromatography를 實施하였고 再次 TLC로 確認한 後 4個의 소 分割으로 나누었다. 나누어진 소 分割 C-3-2-2 (98.09mg)을 처음은 RP-18 F_{254S}를 利用하여 70% MeOH인 溶媒로 PTLC를 實施하였고, 다음은 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 *n*-Hexane:acetone (8:1)인 溶媒로 column chromatography를 實施하였고, 마지막에는 Silica gel F_{254S}를 利用하여 *n*-Hexane:acetone (6:1)인 溶媒條件으로 PTLC를 實施하여 純粹化合物 compound 3 (26.18mg)을 얻었다. 이는 HPLC에서

60% MeOH 溶媒條件으로 [R_t]=11.053 min에서 하나의 peak로 確認되었다. compound 3은 UV 短波長 (254nm)에서 褐色螢光으로 나타냈고, 10% 黃酸溶液中에서 褐色으로 發色되었다.

White crystal

Molecular formula : C₂₁H₂₂O₆

Molecular weight : 370

MP : 74-76 °C

[α]_D : +58.6° (c 3.33 CHCl₃)

UV λ_{max} (MeOH) nm : 232, 284

IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹ : 1610, 1595, 1505, 1490, 1250

¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ :

6.97(1H, s, H-2'), 6.92(2H, s, H-2''/6'), 6.88(1H, d, J=1.5 Hz, H-2''), 6.84(1H, dd, J=2.0 8.5 Hz, H-5'), 6.81(1H, d, J=8.0 Hz, H-6''), 5.92(2H, s, -OCH₂O-), 4.72(2H, dd, J=5.0 10.0 Hz, H-2/6), 4.23(2H, dd, J=1.5 9.0 Hz, H-4a/8a), 3.85(2H, dd, J=4.0 9.0 Hz, H-4b/8b), 3.83(3H, s, -OCH₃), 3.81(3H, s, -OCH₃), 3.11(2H, m, H-1/5)

¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) δ :

150.81(s, C-3''), 150.32(s, C-4''), 149.56(s, C-3'), 148.75(d, C-4'), 136.68(s, C-1'), 135.42(s, C-1''), 120.78(d, C-6'), 119.96(d, C-6''), 113.07(d, C-5''), 111.35(d, C-2''), 109.14(d, C-5'), 107.69(d, C-2'), 102.54(t, -OCH₂O), 87.50(d, C-2), 87.38(d, C-6), 72.86(t, C-4), 72.82(t, C-8), 56.68(q, -OCH₃), 56.65(q, -OCH₃), 55.75(d, C-5), 55.56(d, C-1).

3-2-4. Compound 4의 分離

Sufracation C-3 (1661.2mg)을 *n*-Hexane:EtOAc (10:1→1:1)과 CHCl₃:MeOH (20:1→6:1)의 溶媒條件으로 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 column chromatography를 實施하였다. 各各義 分割들은 Silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F₂₅₄S TLC pattern으로 確認하여 分離된 程度에 따라 4個의 소 分割으로 나누었다. 나누어진 소 分割 C-3-2 (876.1mg)을 다시 Sephadex LH-20을 利用하여 MeOH:H₂O (3:2→1:0)인 溶媒條件下에서 column chromatography를 實施하였고 再次 TLC로 確認한 後 4個의 소 分割으로 나누었다. 나누어진 소 分割 C-3-2-3 (101.05mg)을 처음 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 *n*-Hexane:acetone (6:1)인 溶媒로 column chromatography를 實施하였고, 다음은 Sephadex LH-20을 利用하여 60% MeOH인 溶媒로 column chromatography를 實施하였고, 마지막에는 Silica gel F₂₅₄S를 利用하여 *n*-Hexane:acetone (3:2)인 溶媒條件下에서 PTLC를 實施하여 純粹化合物 compound 4 (12.41mg)를 얻었다. 이는 HPLC에서 60% MeOH 溶媒條件으로 [R_t]=8.354 min에서 하나의 peak로 確認되었다. compound 4는 UV 短波長 (254nm)에서 褐色螢光으로 나타냈고, 10% 黃酸溶液에서 褐色으로 發色되었다.

White crystal

Molecular formula : C₂₁H₂₂O₈

Molecular weight : 402

¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ :

6.96(2H, m, H-5/5'), 6.93(1H, dd, *J*=1.5 8.5 Hz, H-6'),
6.88(1H, t, *J*=3.5 Hz, H-2), 6.79(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-6), 6.79(1H,
d, *J*=7.5 Hz, H-2'), 5.93(2H, s, -OCH₂O-), 5.41(1H, d, *J*=4 Hz,
H-7'), 5.21(1H, d, *J*=3.5 Hz, H-7), 4.29(1H, dd, *J*=7.0 9.5 Hz,

H-9), 4.02(1H, dd, $J=4.5$ 9.5Hz, H-9), 3.84(3H, s, -OCH₃), 3.82(3H, s, -OCH₃), 3.60(1H, dd, $J=4.0$ 9.5 Hz, H-8'), 3.38(1H, m, H-8)

¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) δ :

179.49(s, CO-9'), 151.05(s, C-3'/4'), 149.62(s, C-3), 148.91(s, C-4), 136.00(s, C-1), 133.87(s, C-1'), 120.42(d, C-6), 119.67(d, C-6'), 113.18(d, C-5), 110.96(d, C-5'), 109.23(d, C-2), 107.38(d, C-2'), 102.66(t, -OCH₂O-), 86.79(d, C-7'), 85.05(d, C-7), 74.00(t, C-9), 56.73(q, -OCH₃), 56.66(q, -OCH₃), 54.68(d, C-8'), 51.10(d, C-8)

3-2-5. Compound 5의 分離

Subfraction C-3 (1661.2mg)을 *n*-Hexane:EtOAc (10:1→1:1)과 CHCl₃:MeOH(20:1→6:1)의 溶媒條件으로 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 column chromatography를 實施하였다. 各各의 分割들은 Silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F₂₅₄S TLC pattern으로 確認하여 分離된 程度에 따라 4個의 小 分割으로 나누었다. 나누어진 小 分割 C-3-3 (106.58mg)을 다시 Sephadex LH-20을 利用하여 MeOH:H₂O (3:2→1:0)인 溶媒條件下에서 column chromatography를 實施하였고 TLC로 確認한 後 4個의 小 分割으로 나누었다. 그 중 C-3-3-2 (32.85mg)를 처음은 Sephadex LH-20을 利用하여 80% MeOH인 溶媒로 column chromatography를 實施하였고 마지막에는 Silica gel F₂₅₄를 利用하여 *n*-Hexane:acetone (1:1)인 溶媒로 PTLC를 實施하여 純粹化合物 compound 5 (3.59mg)를 얻었다. 이는 HPLC에서 60% MeOH 溶媒條件으로 [R_t]=6.839 min에서 하나의 peak로 確認되었다. compound 5는 UV 短波長 (254nm)에서 褐色 螢光으로 나타났고, 10% 黃酸溶液에서 검정색으로 發色되었다.

White crystal

Molecular formula : C₂₁H₂₂O₇

EI-Mass (In CHCl₃) *m/z* : 386[M⁺(100)], 339(20), 267(12), 177(60)

HR-Mass (In CHCl₃) *m/z* : 386.1363 (calcd for C₂₁H₂₂O₇, 386.1366)

MP : 43~45°C

[α]_D : -42° (*c* 0.63 MeOH)

¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ :

7.21(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2''), 6.98(1H, dd, *J*=2.0, 8.0 Hz, H-6''),
6.90(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5''), 6.88(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'),
6.85(1H, dd, *J*=2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.79(1H, d, *J*=7.5Hz, H-5'),
5.94(2H, s, -OCH₂O-), 5.50(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-4), 4.90(1H, d,
J=7.0 Hz H-2), 4.82(1H, , H-6), 4.21(1H, dd, *J*=6.0, 9.0 Hz,
H-8a), 4.02(1H, dd, *J*=2.5, 9.0 Hz, H-8b), 3.85(3H, s, -OCH₃),
3.82(3H, s, -OCH₃), 3.14(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1), 2.84(1H, t,
J=7.5 Hz, H-5)

¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) δ :

150.80(s, C-3''), 150.19(s, C-4''), 149.65(s, C-3'), 148.83(d,
C-4'), 137.25(s, C-1'), 137.04(s, C-1''), 120.55(d, C-6'),
120.12(d, C-6''), 112.81(d, C-5''), 111.55(d, C-2''), 109.22(d,
C-5'), 107.34(d, C-2'), 102.97(d, C-4), 102.58(t, -OCH₂O),
88.70(d, C-2), 85.07(d, C-6), 73.24(t, C-8), 63.79(d, C-5),
56.69(q, -OCH₃), 56.57(q, -OCH₃), 55.09(d, C-1)

3-2-6. Compound 6의 分離

Subfraction C-5 (791mg)을 EtOAc:Iso-PrOH:H₂O (20:1:0.5→2:1:0.5) 溶媒條件으로 Silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 column chromatography를 實施하였다. 各各의 分割들은 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18

F_{254S} TLC pattern으로 確認하여 分離된 程度에 따라 4個의 소 分割으로 나누었다. 나누어진 소 分割 C-5-2 (75.38mg)을 다시 Sephadex LH-20을 利用하여 MeOH:H₂O (3:2→1:0)인 溶媒條件下에서 column chromatography를 實施하였고 繼續하여 Silica gel F_{254S}를 利用하여 CHCl₃:MeOH (4:1)인 溶媒條件으로 PTLC를 實施하여 純粹化合物 compound 6 (8.32mg)을 얻었다. 이는 HPLC에서 60% MeOH 용매條件으로 [R_t]=5.502 min에서 하나의 peak로 確認되었다. compound 6은 UV 短波長 (254nm)에서 노란색螢光으로 나타냈고, 10% 黃酸溶液에서 노란색으로 發色되었다.

White crystal

Molecular formula : C₂₁H₂₀O₁₀

FAB-MS (positive) : m/z 433 [M + H]⁺

M. P. : 172~174 °C

[α]_D²⁵ : -73.5°(c 0.5 MeOH)

IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3747, 3370, 2361, 1651, 1607, 1176

UV λ_{max} nm : 342, 265 (MeOH), 390, 325, 272 (NaOMe), 393 345 303
273 (AlCl₃), 397, 343, 301, 274 (AlCl₃+HCl), 343, 265
(NaOAc), 342, 264 (NaOAc+H₃BO₃)

¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ :

7.71(2H, d, J =8.5 Hz, H-2'/6'), 6.88(2H, d, J =8.5 Hz, H-3'/5'),
6.10(1H, d, J =1.5 Hz, H-8), 6.00(1H, d, J =1.5 Hz, H-6), 5.32(1H,
d, J =1.5 Hz, Rha-1''), 4.21(1H, dd, J =1.5 3.0 Hz, Rha-2''),
3.73(1H, dd, J = 3.5 9.0 Hz, Rha-3''), 3.30(2H, m, Rha-4''/5''),
0.92(3H, d, J =6.0 Hz, Rha-6'')

¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) δ :

178.63(s, C-4), 163.09(s, C-7), 162.75(s, C-5), 159.48(s, C-2/4'),

158.29(s, C-9), 135.53(s, C-3), 131.84(d, C-2'/6'), 122.39(s, C-1'), 117.13(d, C-3'/5'), 103.62(s, C-10), 103.35(d, Rha-1''), 103.19(d, C-6), 97.32(d, C-8), 73.46(d, Rha-4''), 72.32(d, Rha-3''), 72.12(d, Rha-5''), 72.08(d, C-2''), 17.80(q, Rha-6'')

4. 生理活性

4-1. NBT superoxide scavenging assay

NBT superoxide scavenging assay는 參考文獻을 應用하여 使用하였으며 다음과 같다. 15 mM Na₂EDTA (50 mM KH₂PO₄/KOH, pH 7.4 in d.w.) 溶液 20 μl, 0.6 mM NBT溶液 50 μl, 50 mM KOH에 녹인 3 mM hydroxanthine 30 μl를 취한 다음 一定濃度로 녹인 sample 100 μl를 添加하였다. 여기에 xanthine oxidase (1 unit in 10 ml buffer)溶液 50 μl를 넣은 後 25°C incubator 안에서 30分 동안 산화가 일어나도록 反應을 시킨 다음 microplate reader를 통해 570nm 吸光度를 測定하였다 試料를 녹였던 5% DMSO (dimethylsulfoxide) in buffer 溶液을 control 로 하였으며 實驗의 標準物質로는 allopurinol을 使用하였다.^(33,34)

$$\text{Anti-oxidative activity (\%)} = \frac{\text{rate of control reaction} - \text{rate of sample reaction}}{\text{rate of control reaction}} \times 100$$

4-2. Cytotoxic activity

本 實驗에서 使用한 癌細胞는 HCT₁₅ (colon adenocarcinoma-直腸癌 주)와 SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites-卵巢癌 주)이며 癌細胞 增殖저해活性은 sulforhodamine B (SRB) assay 方法⁽³¹⁾을 活用하였다. 즉 繼代중인 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 우선 trypsin-CDTA 溶液으로 容器附着 面으로부터 脫離시키고, 96 well flat

bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 세포수가 5×10^3 (HCT₁₅), 2×10^4 (SK-OV-3)이 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 5% CO₂ incubator 내에서 24시간 배양하여 바닥에附着시킨 후 aspirator로 media를除去하고 6농도의 log dose로 medium으로 稀釋한 test material 溶液들을 세포가 들어 있는 well에 각각 100 μ l씩 3배數 (triplicate)로 넣어주고 48시간동안 더 배양하였다. 檢體溶液은 少量의 DMSO에 녹인 후 배지용액으로 稀釋하였으며 總反應액 중 DMSO의 濃도는 1% 以下가 되도록 하였다. 檢體溶液은 세포에 加하기 前에 miliphore filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 세포를 藥物과 48시간 배양한 후 각 well의 medium을 除去하고 10% formalin solution을 100 μ l씩 加하여 4°C에서 1시간동안 放置하여 세포들을 plate의 바닥 面에 固定시킨다. 세포의 固定이 끝난 후 plate를 蒸溜水로 5-6회 洗滌하여 남아있는 formalin溶液을 完全히 除去하고 室溫에서 남은 물기가 없도록 乾燥시켰다. 完全히 乾燥된 plate는 well당 100 μ l의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色溶液을 加하여 30분간 세포를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5-6회 洗滌하여 세포에 結合하지 않은 過剩의 SRB를 除去하였다. 이렇게 染色된 cell plate들을 다시 室溫에서 乾燥시킨 후 well 당 100 μ l의 10mM trisma base (unbuffered) 溶液을 加하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 染色液을 溶출시킨 후 microplate reader를 使用하여 540 nm에서 吸光度를 測定하였다. 癌細胞들에 대한 藥物의 效果를 計算하기 위하여 藥物을 加하는 始點에서 細布數(Tz, zero time)와 藥物 대신 동량의 배지만을 加하여 48시간 배양했을 때의 세포數(C, control) 및 各濃도의 藥物과 함께 48시간 배양했을 때의 細布數(T, test)를 各各 測定하여 다음의 수식에 따라 抗癌活性을 計算하였다. 卽 Tz>T인 경우에는 $[(T-Tz)/(C-Tz)] \times 100$ 으로 計算하였고, Tz<T인 경우에는 $[(T-Tz)/Tz] \times 100$ 의 數式으로 計算하였다. 이렇게 計算된 값들로부터 LOTUS program의 data regression

tool을 利用하여 藥物이 癌細胞의 增殖을 50% 저해하는 濃度인 50% effective dose (IC₅₀)를 計算하였다.

4-3. MG-63에서 hIL-6의 遊離 確認 實驗

細胞주는 10% FBS (fetal bovine serum)가 包含된 DMEM (eulbecco's modified eagle medium) 배지를 使用하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 culture dish에 增殖시킨 MG-63 細胞를 24-well plate에 適正數의 細胞(3×10⁴)를 500 μl씩 接種한 後 하루 동안 incubation하고 배지를 交替하였다. 여기에 TNF(tumor necrosis factor)-α와 SRB assay를 통해 얻은 細布毒性이 없는 濃度の sample을 處理한 後 37°C incubator에서 培養한 後 24시간과 48시간 뒤 각각 70 μl씩 배지를 採取하여 冷凍 保管한다. 96-well plate에 1次 anti-body 100 μl(anti-human IL-6 2 μg/ml in 0.1 M NaHCO₃)를 넣은 後 4°C에서 overnight하여 1次 anti-body가 96 well plate에 附着되도록 하였다. 結合되지 않은 1次 anti-body를 씻어내기 위해 washing solution [0.05% Tween 20 in (PBS) phosphate buffered saline] 100 μl로 3번 씻어낸 後 blocking solution (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) 200 μl를 處理하고 室溫에서 2시간 동안 放置한 後 washing solution 200 μl로 2번 씻어낸다. 위에서 24시간 後와 48시간 後에 採取한 培養液 50 μl와 blocking solution 50 μl를 넣어 室溫에서 4시간 또는 4°C에서 overnight하여 1次 anti-body와 結合하도록 하였다. 100 μl의 washing solution으로 4번 洗滌한 後 100 μl의 2차 anti-body (biotin conjugated rat anti-human IL-6 1 μg/ml in blocking solution)를 添加하여 45분 동안 結合시킨 뒤 結合되지 않은 2次 anti-body를 100 μl의 washing solution으로 6번 洗滌하여 씻어낸다. 100 μl의 Streptavidin HRP (0.1% BSA, 0.05% Tween20 in tris buffered saline, pH 7.3)를 添加하여 20분 동안 結合시킨 뒤 washing solution으로 6번 洗滌한다. TMB (Tetra

Methyl Benzidine) 100 μ l를 넣어 發色시킨 즉시 micro plate reader를 사용하여 450 nm 波長에서 吸光度를 測定하였다. 1% DMSO와 TNF- α (15 ng/ml)가 들어갔을 때 hIL-6의 遊離程度(%)를 control로 하였으며 實驗의 標準物質로는 dexamethasone을 使用하였다. hIL-6의 遊離, 確認은 control에 對한 相對的인 퍼센트 卽, $(\text{rate of sample reaction}/\text{rate of control}) \times 100$ 으로 表示하였다.^(30,31)

III. 結果 및 考察

1. Compound 1의 構造

Compound 1(mp 162°C)은 백색의 침상결정으로 얻어졌으며, 10% 황산용액에 의하여 노란색으로 발색된다. Liebermann-Burchard reaction에 양성이고 그의 IR spectrum은 3449 cm^{-1} 에서 OH에 의한 흡수, 1640 cm^{-1} 에서 olefinic absorption, 1619 cm^{-1} 부근에서 C=O, 1050 cm^{-1} 에서 C-O에 의한 흡수가 나타나고 있다. 이 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 보면 δ 0.69 ppm 및 1.20 ppm에서 2개의 angular methyl group을 나타내는 peak가 관찰되며, δ 3.67 ppm에 저자장으로 shift하고 있는 multiplet은 C-3에 존재하는 proton (CH-OH)으로 추정되며, δ 5.69 ppm에 고자장으로 shift하고 있는 olefin proton signal은 C-6의 proton으로 추정되었다. 또한, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에 의해서 보면 δ 70.54 ppm에서 C-3의 signal이 나타났고 δ 202.36 ppm에서 C=O에 기인하는 signal이 관측되었으며, C=O의 영향으로 δ 165.07와 δ 126.13 ppm에 고자장으로 shift하는 C-5와 C-6의 sp^2 carbon signal 관찰되었으며, Mass spectrum에서 molecular weight가 m/z 426.681에서 나타나기에 이 화합물을 7-oxositosterol로 추정하였으며 또한 문헌^(6~8)에 소개된 spectral data와 비교하여 그 구조를 확인할 수 있었다.

2. Compound 2의 構造

Compound 2(m.p. 133°C)은 백색의 침상결정으로 얻어졌으며, 10% 황산용액에 의하여 붉은색으로 발색된다. Liebermann-Burchard reaction에 양성이고 그의 IR spectrum은 전형적인 sterol의 spectrum을 보여줌으로 sterol계열 화합물로 추정하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 0.68 ppm 및 1.01ppm에서 각각 C-18 및 C-19의 methyl기의 signal이 나타

나고 δ 5.36 ppm에서 olefinic proton이 나타나는 것으로 보아 이중결합은 5번 탄소에 있는 것으로 추정된다⁽⁹⁾. 이 화합물의 Mass spectrum에서 분자량 peak가 m/z 414, 412 및 400에서 각각 나타나는 것으로 보아 β -sitosterol 외에 미량의 stigmasterol 및 campesterol이 함유된 sterol의 혼합물로 추정된다^(9,10). 따라서 GC/Mass spectrum으로 분석한 결과 β -sitosterol, stigmasterol 및 campesterol이 각각 71.5%, 18.9%, 9.5%의 비로 존재하는 sterol의 혼합물임을 확인하였고 retention time은 각각 15.5, 13.7 및 12.9 min 이었다. 이와 같은 추정은 이 물질의 ¹³C-NMR spectrum을 측정하여 문헌치의 것과 비교하여 확인할 수 있었으며 표준품과 직접적으로 대조하여 이를 확인할 수 있었다⁽¹¹⁾.

3. Compound 3의 構造

Compound 3은 viscous oil상으로 얻어졌으며, 10% 황산시액에 의하여 진한 갈색으로 발색된다. ¹H-NMR spectrum은 δ 3.83, 3.81 ppm에서 각각 2개의 methoxy groups에 기인하는 3H분의 singlet이 관찰되며 δ 5.92 ppm에서 methylenedioxy group에 기인하는 2H분의 singlet이 관찰되었다. 그리고 δ 4.71~4.74 ppm에서 benzylic hydrogen에 기인하는 2H분의 doublet ($J=5.0\text{Hz}$), δ 3.84~4.25 ppm에서 methylene proton에 기인하는 4H분의 signal이 관찰되므로 phenyl group의 configuration은 diequatorial로 추정하였다. ¹³C-NMR spectrum은 δ 102.54 ppm에서 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되고 δ 56.68 ppm와 56.65 ppm에서 각각 1개의 methoxy groups에 기인하는 signal이 관찰되고 δ 136.68, 135.24 ppm에서 equatorial aryl group에 기인하는 2개의 signal이 관찰됨으로, 이 화합물을 (+)methyl piperitol (kobusin)로 결론 짓고 문헌^(12~15)에 소개된 spectral data와 비교하여 그 구조를 확인할 수 있었다.

4. Compound 4의 構造

Compound 2는 viscous oil상으로 얻어졌으며 10% 황산용액에 의하여 갈색으로 발색된다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 δ 3.84, 3.82 ppm에서 각각 2개의 methoxy groups에 기인하는 3H분의 singlet가 관찰되며 δ 5.93 ppm에서 methylenedioxy group에 기인하는 2H분의 singlet이 관찰되었다. 그리고 δ 4.29, 4.02 ppm에서 methylene protons에 기인하는 singlet가 관찰되었고 δ 6.79~6.96 ppm에서 aromatic protons에 기인하는 singlet가 관찰되므로 이것은 전형적인 trisubstituted butyrolectoelignan type에 속하는 화합물로 추정되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로부터 δ 179.49 ppm에서 carbonyl에 기인하는 signal이 관찰되었고 δ 107.38, 113.18, 120.42, 109.23, 110.96, 119.67 ppm에서 aromatic에 기인하는 signal이 관찰되었고 δ 56.73, 56.66 ppm에서 methoxy groups에 기인하는 2개의 signal이 관찰되었다. 그리고 δ 102.66 ppm에서 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되므로 이 화합물을 7, 7'-dihydroxy bursehernin로 결론짓고 문헌^(16~20)에 소개된 spectral data와 비교하여 그 구조를 확인할 수 있었다.

5. Compound 5의 構造

Compound 5은 백색의 침상결정으로 얻어졌으며, 10% 황산용액으로 발색하면 검정색으로 발색된다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 δ 7.21~6.79ppm에서 두 개의 1,3,4-trisubstituted phenyl groups에 기인하는 1H 분의 6개 singlet가 관찰되었다. 그리고 δ 3.85와 3.82ppm에서 각각 2개의 methoxy groups에 기인하는 3H 분의 singlet이 관찰되었고 δ 5.94ppm에서 methylene dioxy group에 기인하는 2H 분의 singlet가 관찰되었다. 그리고 δ 5.50ppm에서 hemiacetal methine에 기인하는 1H 분의 singlet가 관찰되었고 δ 4.91과 4.90ppm에서 benzylic hydrogen에 기인하는 2H 분의 doublet, δ 4.21과 4.02ppm에서 methylene proton에 기인하

는 2H분의 singlet가 관찰되므로 phenyl group의 configuration은 diequatorial로 추정하였다. ^{13}C -NMR spectrum은 δ 102.58ppm에서 methylenedioxy group에 기인하는 signal이 관찰되고 δ 56.69과 56.57 ppm에서 각각 2개의 methoxy groups에 기인하는 signal이 관찰되고 δ 137.25, 137.04 ppm에서 equatorial aryl group에 기인하는 2개의 signal이 관찰되고 δ 102.97ppm에서 hemiacetal methine에 기인하는 signal이 관찰되었다. HMBC에서 보면 δ 149.65(C-3'')과 148.83(C-4'') ppm의 carbon signal은 δ 5.98 ppm에 나타나는 methylene dioxy group에 기인하는 proton signal과 상호관계를 나타내고 δ 137.04(C-1')와 137.25 (C-1'') ppm의 carbon signal은 δ 4.90(H-2)과 4.82(H-6)에 기인하는 proton signal과 상호관계를 가지며 δ 150.80(C-3')와 δ 150.89(C-4') ppm의 carbon signal은 δ 3.85와 3.82 ppm에 나타나는 methoxy group에 기인하는 proton signal과 상호관계를 나타낸다. NOESY에서 proton H-4에 영향을 주었을 때 proton H-1은 영향을 나타내지 않았다. EI-Mass spectrum에서 m/z 386의 molecular ion peak가 나타났다.

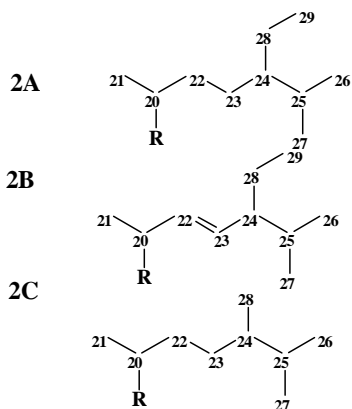
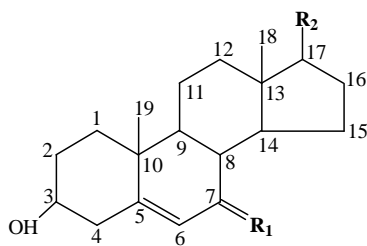
이상의 spectral data와 문헌^(21~23)을 비교하였을 때 이 화합물은 lignan 계열의 화합물인 (+)methyl piperitol (kobusin)의 C-4 위치에 α -hydroxy기가 치환되어 있음을 알 수가 있어 compound 5의 구조를 4- α -hydroxykobusin으로 동정하였다. compound 5는 천연으로부터 처음으로 분리, 보고되는 신규화합물이다.

6. Compound 6의 構造

Compound 6은 황색의 분말로서 얻어 졌으며 10% 황산용액에 노란색으로 발색된다. mp. 172~174 °C 이고 FeCl_3 반응과 $\text{Mg} + \text{HCl}$ 반응에서 양성이며 IR Spectrum에서 3370(OH), 1651(C=O), 1607, 1459(aromatic C=C), 1176(Sugar C-O) cm^{-1} 의 흡수대를 나타내어 flavonoid계 배당체 화합물로 추정할 수 있다. Negative FAB-Mass spectrum에서 m/z 433

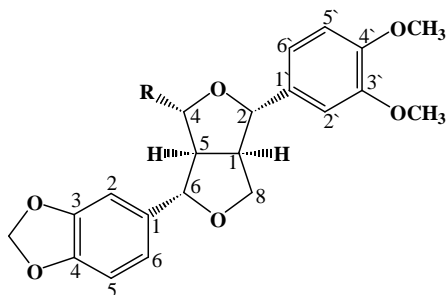
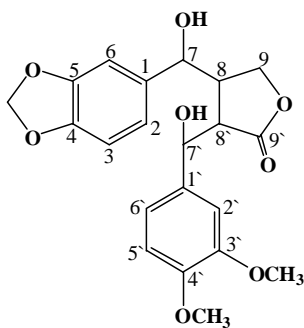
[M+H]⁺에서 [M-H]⁻의 molecular ion peak를 m/z 286에서 hexose가 탈락된 fragmentation peak를 관찰할 수 있어 kaempferol 모핵의 화합물에 glycoside가 결합될 수 있음을 추정할 수 있다. UV spectrum에서 342nm에서 흡수대가 나타내어 flavone이거나 flavonol 유도체임을 추정할 수 있고 shift 시약으로 NaOMe를 가하였을 때 band I의 극대파장이 48nm 장파장으로 이동하고 흡수강도가 증가함으로 C-4' 위치에 OH가 존재하며 NaOAc에 band II가 50nm 장파장으로 이동하므로 C-7 위치에 OH가 존재하고 AlCl₃로 가하였을 때 band I이 45nm만큼 장파장으로 shift하고 이 극대파장은 HCl을 가해도 변하지 않으므로 C-5 위치에 OH가 존재하는 kaempferol type의 flavonol glycoside로 추정하였다. ¹H-NMR spectrum에서는 δ 6.10과 6.00 ppm에서 A ring의 H-6, H-8 proton singer이 $J=1.5$ Hz로 m-coupling하는 것을 관찰할 수 있었고 δ 6.93 ppm에서 H-3', 5' proton singer이 δ 7.71 ppm의 proton과 $J=8.5$ Hz로서 doublet로 나타나 o-coupling함을 관찰할 수 있어 δ 7.71 ppm의 proton이 H-2', 6'임을 확인할 수 있다. Rhamnose의 anomeric proton이 δ 5.52 ppm에서 관측되었고 δ 0.92 ppm에서는 Rhamnose의 CH₃의 3H분의 proton singer이 관측되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 C-3이 δ 135.53 ppm으로 고자장으로 shift하고 있어 3-OH에 당이 결합되어 있음을 추정할 수 있었고 δ 162.75 ppm에서 proton이 hydroxylation된 carbon signal이 1개만 단축되어 B ring의 C-4'만 OH로 치환되어 있음을 알 수 있었다. 또한 anomeric carbon이 δ 103.35 ppm에서 단축되어 C-3에 당이 1 mole 결합되어 있음을 알 수 있었고 δ 17.80 ppm에서 methyl기가 관측되어 rhamnose임을 추정할 수 있었다.

이상의 화학적인 기기분석과 분광학적 분석 결과 및 표준, 문헌⁽²⁴⁻²⁶⁾과의 비교로부터 compound 6은 kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside(afzelin)로 그 구조를 확인할 수 있었다.

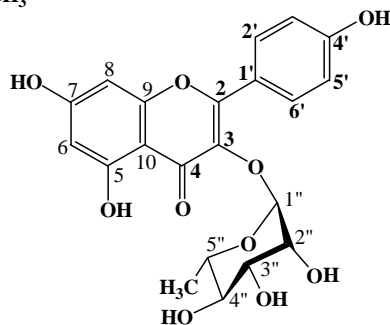


Compound 1 $R_1=O, R_2=2A$
 Compound 2 a: $R_1=H_2, R_2=2A$
 b: $R_1=H_2, R_2=2B$
 c: $R_1=H_2, R_2=2C$

Compound 4



Compound 3 $R=H$
 Compound 5 $R=OH$



Compound 6

Fig 1. Chemical structures of compounds 1~6 isolated From *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.

7. 생리활성 결과

7-1. NBT superoxide scavenging assay

이질풀의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대하여 NBT superoxide scavenging assay에 의한 antioxidative activities를 검토하였다. 그 결과 120 μ g/ μ l인 농도에서 CH₂Cl₂ (40.5%) 분획이 활성이 있었고, 40 μ g/ μ l인 농도에서는 CH₂Cl₂ (23.3%), *n*-BuOH (29.2%) 분획이 활성이 있었고, 13.3 μ g/ μ l인 농도에서는 CH₂Cl₂ (14.8%), *n*-BuOH (18.4%), H₂O (28.3%) 분획이 활성이 있는 것으로 나타났다. 여기서 이질풀의 CH₂Cl₂ 분획은 고농도에서 저농도로 변하였을 때도 여전히 강한 antioxidative activities를 나타내어 이질풀의 CH₂Cl₂ 분획에서 강한 antioxidative activities가 있는 화합물이 있는 것으로 판단되며 그 순차로 *n*-BuOH, H₂O, MeOH, EtOAc 분획이 활성이 있는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

7-2. Cytotoxic activity assay

HCT₁₅와 SK-OV-3, 두 종의 인체유래 암세포주에 대한 시험관내 세포성장저해효과를 SRB (sulforhodamine B)방법으로 이질풀의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대하여 검색하여 본 결과 CH₂Cl₂의 분획이 HCT₁₅와 SK-OV-3 암 세포주에 대하여 각각 10.7 (5 \times 10³ cell/ml)과 13.1 (2 \times 10⁴ cell/ml)인 IC₅₀ 값을 나타내어 이질풀 CH₂Cl₂ 추출물분획 중에서 우수한 cytotoxic activity를 나타내는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

7-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인

순수화합물 2~5에 대해 MG-63 세포에서 hIL-6의 유리정도(%)를 검토하였다. 그 결과 compound 2~5는 MG-63 세포로부터 hIL-6의 유리

가 감소하는 것으로 나타났다. sterol mixture (2), (+)methyl piperitol (kobusin) (3), 7,7'-dihydroxy bursehernin(4), 4-hydroxykobusin (5) 화합물에 대한 각각의 hIL-6의 유리정도는 100 ± 3.56 , 28.4 ± 4.49 , 82.9 ± 6.33 , 39.5 ± 7.76 , $60.7 \pm 9.74\%$ 로 나타났다(Fig 2).

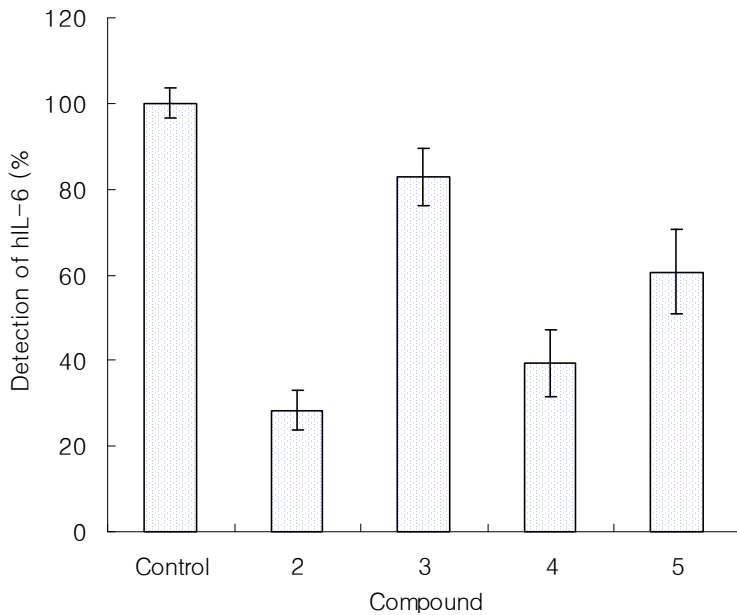


Fig 2. Effects of compounds 2~5 on TNF- α induced hIL-6 production from MG-63 cells. The cytokine content of the culture media was determined by ELISA. means \pm S.D. *t*-test and significance levels were calculated on the relative values and are compared with dexamethasone.

IV. 結 論

이질풀(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.)은 쥐손이풀과(*Geraniaceae*)에 속하는 다년생초본으로서 우리나라 전국 각 지방에서 자생하고 일본, 중국 등 지에서도 산출된다.

성분에 관한 연구를 보면 tannin계열과 flavonoid계열 화합물에 대한 분리 외에는 기타 성분의 연구가 미흡한 것으로 사료되어 본 식물체로부터 새로운 화합물을 분리하려고 시도하였다.

이질풀의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대한 antioxidative activity과 cytotoxic activity에 대한 검색으로부터 이질풀 CH₂Cl₂ ext에서 강한 antioxidative activity과 cytotoxic activity을 나타내어 이질풀의 CH₂Cl₂ ext에서 antioxidative activity과 cytotoxic activity이 있는 화합물을 분리하고자 하여 본 실험을 실시하였다.

이질풀의 CH₂Cl₂ 분획을 Silica gel, Sephadex LH-20, LiChroprep RP-18을 이용한 column chromatography와 Silica gel F₂₅₄, Sephadex LH-20 F_{254S}를 이용한 PTLC를 반복 실행하여 6개의 순수 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 분광학적 분석방법과 화학적 기기분석, 및 표품, 그리고 문헌과의 비교를 토대로 하여 그 화학구조를 확인, 동정할 수 있었다. 이 화합물들은 7-Oxositosterol (1), sterol mixture (2), (+)methyl piperitol (kobusin) (3), 7,7'-dihydroxy bursehernin (4), 4- α -hydroxykobusin (5), kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (6)로 각각 확인 동정하였다. compound 3~6들은 모두 이질풀에서 처음으로 분리, 보고되는 화합물이다. compound (2)는 sterol mixture로서 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol의 구성비(%)는 7.7:34.0:58.3이었고 compound (5) 4- α -hydroxykobusin은 지금까지 천연으로부터 분리 보고 되지 않았던 신규화합물이다.

이질폴의 CH_2Cl_2 분획으로부터 분리한 화합물을 세포독성이 없는 농도에서 $\text{TNF-}\alpha$ 에 의해 유도된 hIL-6의 억제작용을 알아보고자 하여 MG-63 세포주를 이용한 hIL-6의 유리, 억제 실험을 실시한 결과 compound 2와 4는 hIL-6이 유리를 억제하는 것으로 확인되었다. 따라서 compound 2와 4는 염증 반응 및 hIL-6의 과다 발현으로 인한 질병을 개선시키는 효과가 있을 것으로 판단된다.

V. 參 考 文 獻

- 1) 이창복. 『대한식물도감』, 鄉文社:서울, p. 498, (1993).
- 2) 배기환. 『원색도감·한국의 자연시리즈 13 한국의 약용식물』, 교학사:서울, p. 548, (2000).
- 3) 김태정. 『韓國의 資源植物 II』, 서울대학교출판부, p. 256, (1996).
- 4) 박종희. 『한약백과도감 (하)』, 신일상사:서울, p. 923-924, (2002).
- 5) 藥品植物學研究會. 『新·藥品植物學』, 學窓社:서울, p. 290-291, (1998).
- 6) Marina Della Greca, Pietro Monaco, and Lcio Previtiera. stigmasterols from *Typha Latifolia*. *J. Nat. Prod.* 53, 6, 1430-1435, (1990).
- 7) G. Schroeder, M. Rohmer, J. P. Back, And R. Anton. *Phytochemistry*: 19, 2213, (1980).
- 8) Sui-Ming Wong, John M.Pezzuto, Harry H. S. Fongand Norman R. farnsworth. isolation and characterization of a new triterpene From *Iris Missouriensis*. *J. nat. Prod.* 49 (2), 330, (1986).
- 9) Garg, V. K. and W. R. nes, codisterol and other Δ^5 -Sterols in the seeds of *Cucubita maxima*. *Phytochemistry*: 23, 2925, (1984).
- 10) Jae Chul do , Kun Ho Son and Sam Sik Kang. original articles studies on the constituents of the roots of *Rubus parvifolius*(I). *Kor. J. Pharmacogn.* 19 (3), 170-173, (1988).
- 11) Kim, C. H., and Kang S. S.. *Yakhak Hoeji*. 30 (3), 139-142, (1986).
- 12) Latip, J., Hartley, T.G., and Waterman, P.G. lignans and coumarins metabolites form *Melicope hayesii*. *Phytochemistry*: 51, 107-110, (1999).
- 13) Tsuyoshi Ogiku, Shin-ichi Yoshida, Hiroshi Ohmizu,* and Tameo Iwasaki*. stereocontrolled syntheses of diequatorial and *Axial Equatorial* furofuran lignans. *American Chemical Society*: 60, 1148-1153, (1995).

- 14) Kamikado, T., Chang, C. F., Murakoshi, S., Sakurai, A., and Tamur, S. isolation and structure elucidation of growth inhibitors on silkworm larvae from *Magnolia kobus* DC. *Agr. Biol. Chem.* 39, 833-836, (1975).
- 15) Xu G. H., Kim J. A., Park S. H., Son A. R., Chang T. S., Chang H. W., Chung S. R., and Lee S. H. isolation of melanin biosynthesis inhibitory compounds from the flowers of *Magnolia denudata*. *Kor. J. Pharmacogn.* 35 (2), 152~156, (2004).
- 16) Lim YH, Lee MJ, Shin DH, Chang HB, Hong SW, Moon EY, Lee DK, Yoon SJ, Woo WS. cytotoxic constituents from the roots of *Anthriscus sylvestris*. *Arch Pharm Res.* 22 (2), 208-12, (1999).
- 17) Yamaguchi, H., Arimoto, M., Yamamoto, K. and Numata, A. studies on the constituents of the seeds of *Hernandia ovigera* L.. *Yakugaku Zasshi.* 99, 674-677, (1979).
- 18) Y. H. Lim., M. J. Leem., D. H. Shin., H. B. Chang., S. W. Hong., E. Y. Moon., D. K. Lee., S. J. Yoon., and W. S. Woo.. cytotoxic constituents from the roots of *Anthriscus sylvestris*. *Arch Pharm Res.* 22 (2), 208-212, (1999).
- 19) H. C. Kwon., S. U. Choi., J. O. Lee., K. H. Bae., O. P. Zee. and K. R. Lee. Two New lignans from *Lindera obtusiloba* Blume. *Arch Pharm Res.* 22 (4), 417-422, (1999).
- 20) M. R. Kim., H. I. Moon., J. H. Chung., Y. H. Moon., K. S. Hahm., and E. R. Woo.. matrix metalloproteinase-1 inhibitor from the stem bark of *Styrax Japonica* S. et Z.. *Chem Pharm Bull.* 52 (12), 1466-1469, (2004).
- 21) Mathieu Tene, Pierre Tane, Beiban L. Sondengam, Joseph D. Connolly. lignans from the roots of *Echinops giganteus*. *Phytochemistry.* 65, 2101-2105, (2004).
- 22) Tsuyoshi Ogiku, Shin-ichi Yoshida, Hiroshi Ohmizu, and Tameo Iwasaki.

- stereocotrolled syntheses of siequatorial and axial-equatorial furofuran lignans. *J. Org. Chem.* 60, 1148-1153, (1995).
- 23) Ahemd A. Ahmed, Ahmed A. Mahmoud, Eptehal T. Ali, Olga Tzakou, Maria Couladis, Tom J. Mabry, Tamas Gati, Gabor Toth. two highly oxygenated eudesmanes and 10 lignans from *Achillea holosericea*. *Phytochemistry*. 59, 851-856, (2002).
- 24) Lingmallu Jagan Mohan Rao, Hiroshi Yada, Hiroshi Ono, and Mitsuru Yoshida. acylated and non-acylated flavonol monoglycosides from the indian minor spice Nagkesar(*Mammea longifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 50, 3143-3146, (2002).
- 25) Shin-Kyo Chung, Young-Chan Kim, Yoshiaki Takaya, Kenji Terashima, and Masatake Niwa. novel flavonol glycoside, 7-O-methyl mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and its antioxidant effect. *J. Agni. Food Chem* 52, 4664-4668, (2004).
- 26) Torgils Fossen, Asmund Larsen, Bernard T. Kiremire, yvind M. Andersen. flavonoids from blue flowers of *Nymphaea caerulea*. *Phytochemistry*. 51, 1133-1137, (1999).
- 27) Chang S. W., D. D. S., Baek S. H., M. S. D., Ph. D., Kim C. H and Lim S. S.. interleukin-6 and interleukin-10 in experimentally induced rat pulpal inflammation. *대한치과보존학회지* 27, 232-238, (2002).
- 28) Ragab A. A., Nalepka J. L., Bi Y. and Greenfield E. M. cytokine synergistically induce osteoclast differentiation support by immortalized or normal calvbarial eells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283, 679-687, (2002).
- 29) Mysliwiec J., Kretowski A., Topolska J., Stepień A. and Kinalska I. the influence of corticosteroids on IL-6/IL-6R system in patients with graves ophthalmopathy. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 108, 739-744, (2002).

- 30) Joo S. S., Kang H. C., Lee M. W., Choi Y. W. and Lee D. I. inhibition of IL-6 in osteoblast-like cell by isoflavones extracted from *Sophorae fructus*. *Arch Pharm Res*. 26, 1029-1035, (2003).
- 31) Kim J. H., Cho Y. H., Park S. M., Lee K. E., Lee J. J., Lee B. C., Pyo H. B., Song K. S., Park H. D. and Yun Y. P.. antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch Pharm Res*. 27, 177-183, (2004).
- 32) Skehan, P., Streng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., and vistica, D. new colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 1107-1112, (1990).
- 33) Piao M. S., Kim M. R., Lee D. G., Park Y. K., Hahm K. S., Moon Y. H. and E. R. Woo, antioxidative constituents from *Buddleia officinalis*. *Arch Pharm. Res.* 26, 453-457, (2003).
- 34) Kirby A. J. and Schmidt R. J. the antioxidant activity of chinese herbs for eczema and of placebo herbs- I. *Ethnopharmacology*. 56, 103-108, (1997).

APPENDIX

Table 1. Antioxidative activities of fraction extract from *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.

Fraction	Antioxidant activity (%)		
	120 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	13.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
MeOH	86.3	83.3	59.8
<i>CH₂Cl₂</i>	40.5	23.3	14.8
EtOAc	97.4	89.9	87.8
BuOH	52.2	29.2	18.4
H ₂ O	86.1	65.8	28.3

Table 2. Cytotoxic activity of fraction extract from *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.

Fration	Cell line IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	HCT ₁₅	SK-OV-3
MeOH	22.9	<10
<i>CH₂Cl₂</i>	10.7	13.1
EtOAc	<10	<10
BuOH	>100	79.7
H ₂ O	>100	>100

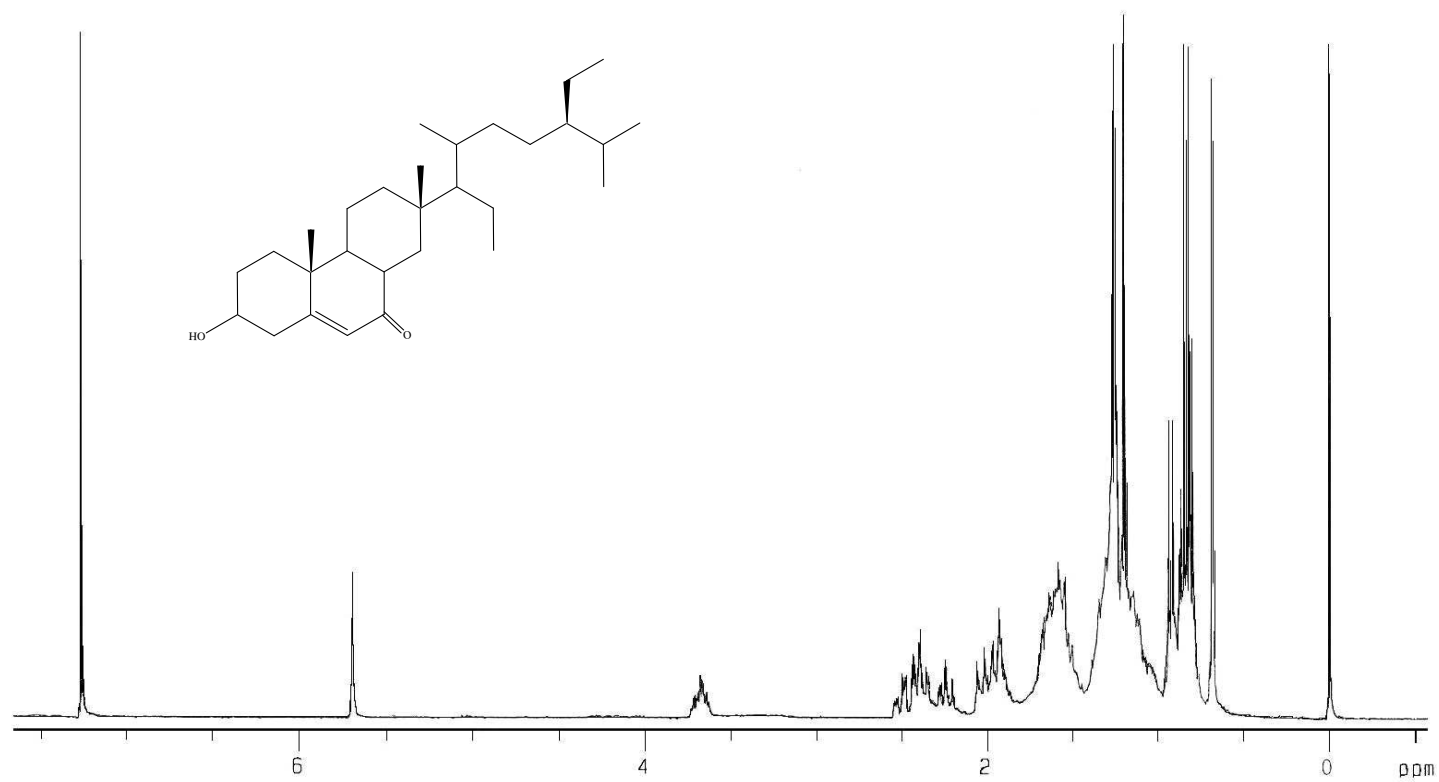


Fig.3. ¹H-NMR spectrum of compound 1 (300 MHz, CDCl₃)

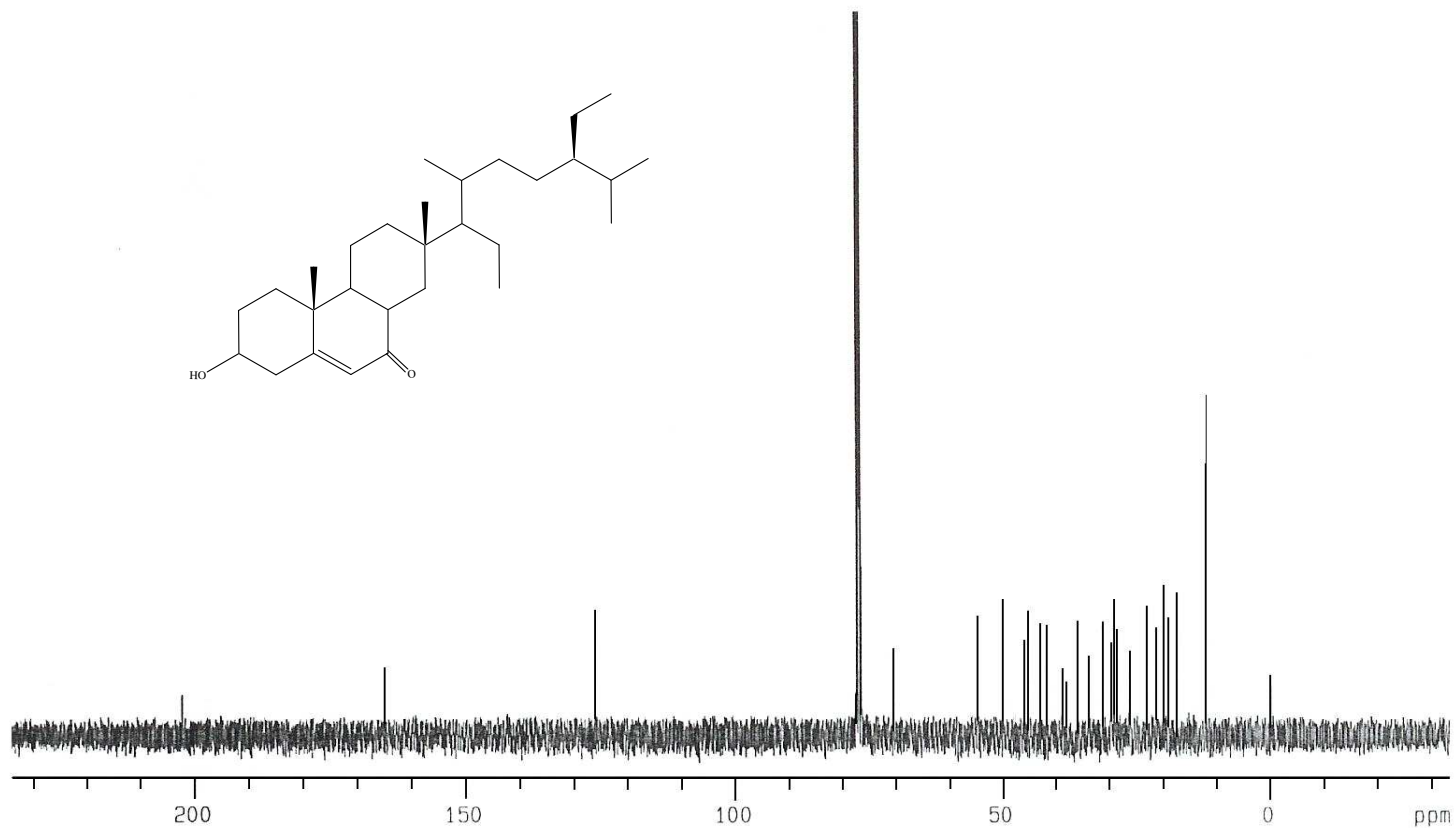


Fig.4. ¹³C-NMR spectrum of compound 1 (75 MHz, CDCl₃)

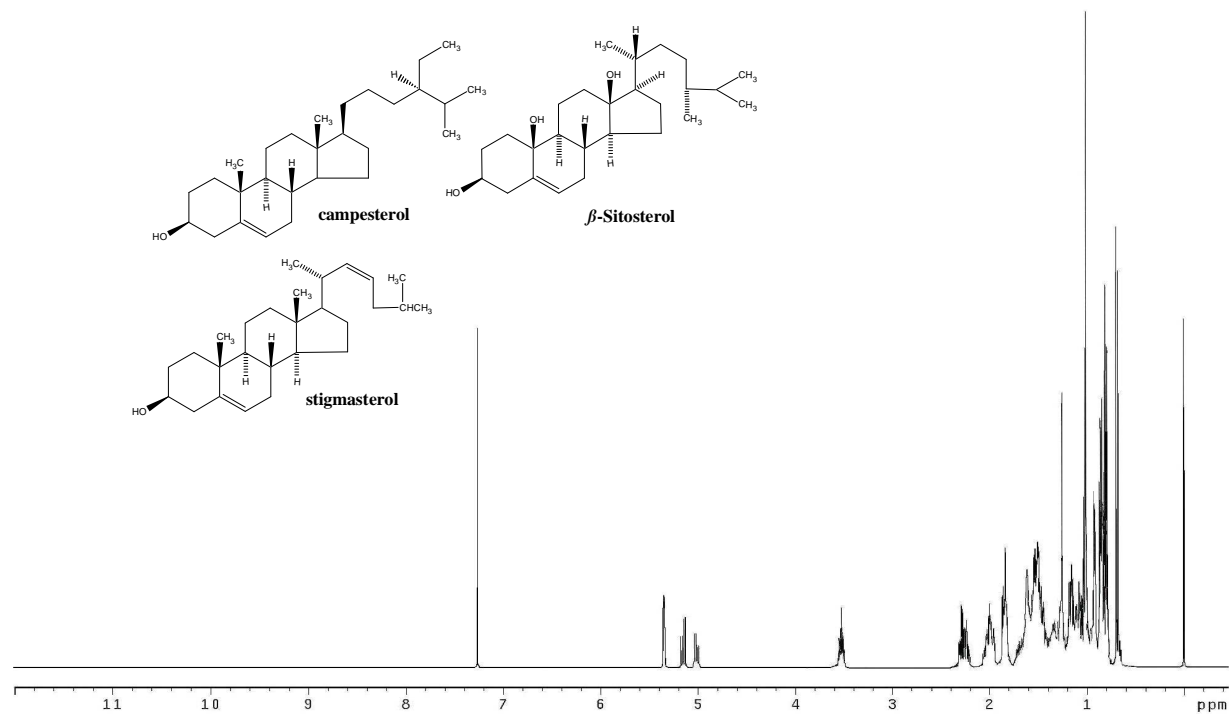


Fig.5. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2 (500 MHz, CDCl_3)

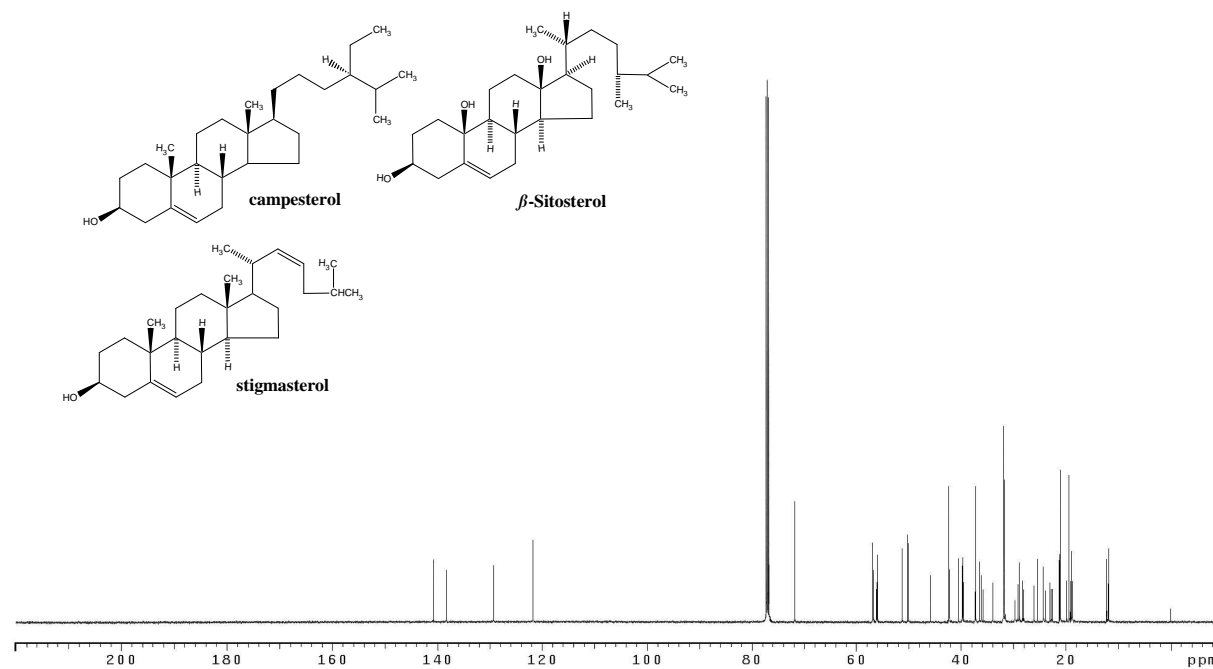


Fig.6. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (125 MHz, CD_3OD)

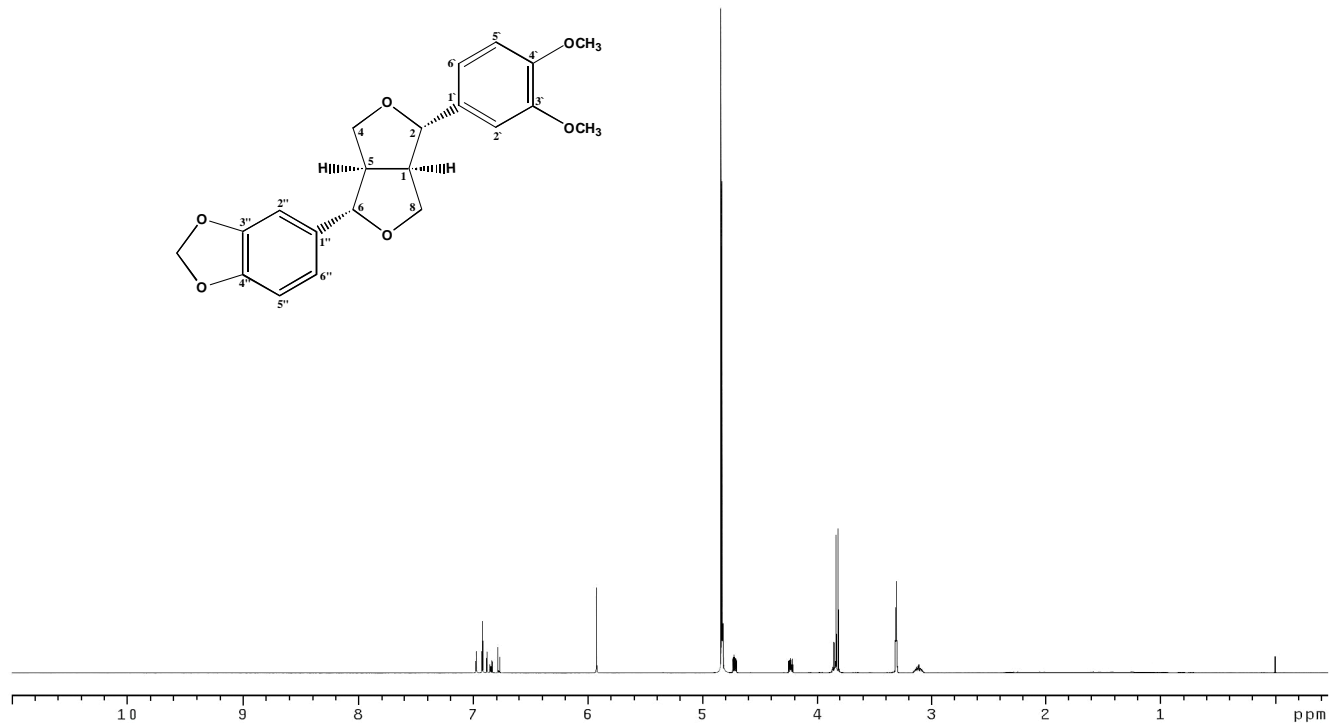


Fig.7. ¹H-NMR spectrum of compound 3 (500 MHz, CD₃OD)

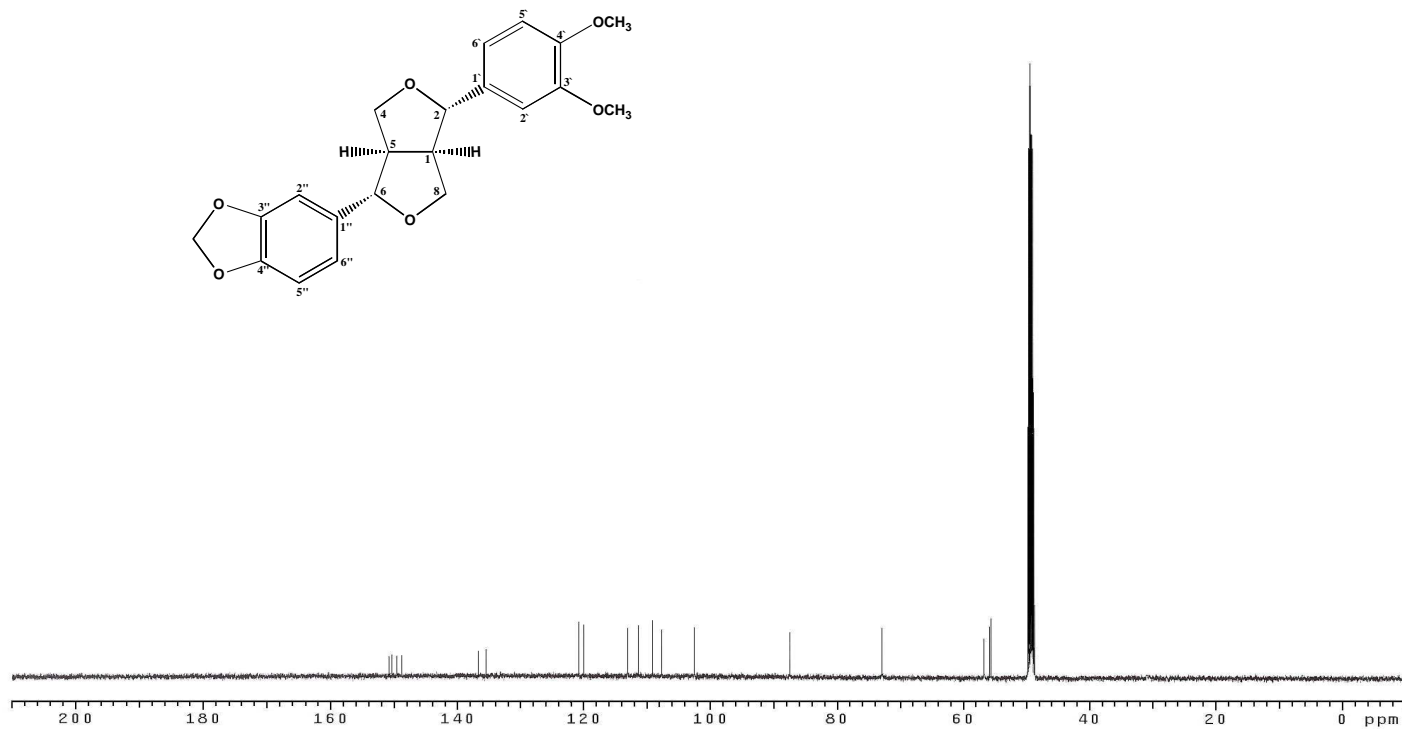


Fig.8. ¹³C-NMR spectrum of compound 3 (125 MHz, CD₃OD)

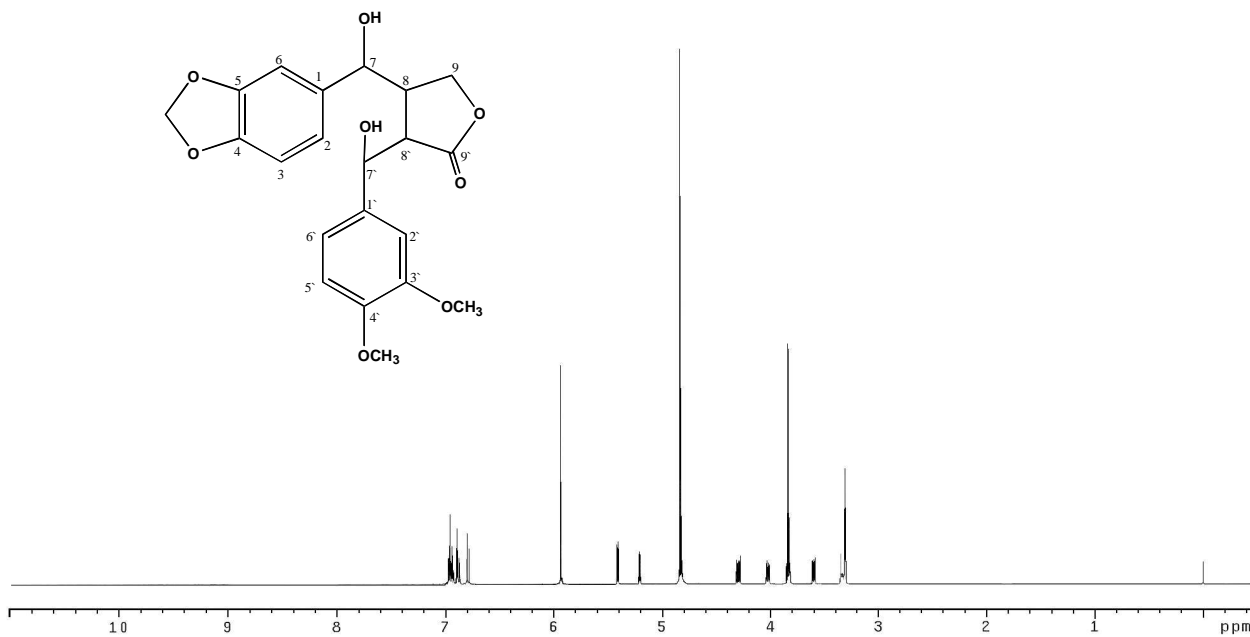


Fig.9. ¹H-NMR spectrum of compound 4 (500 MHz, CD₃OD)

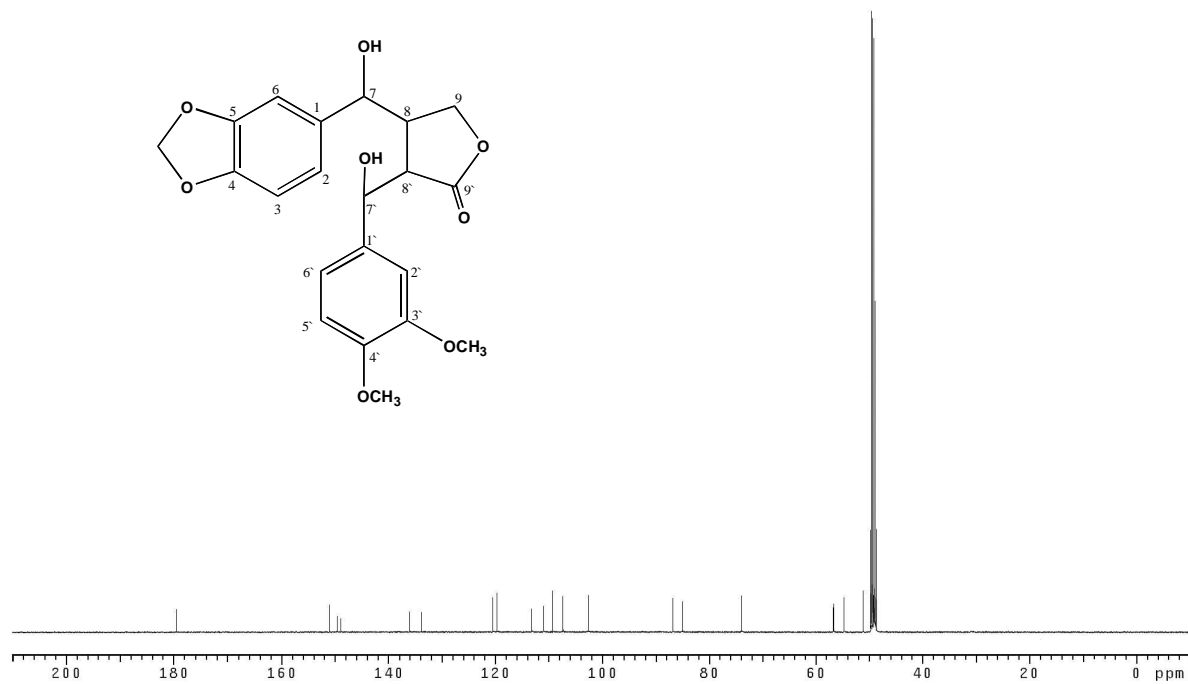


Fig.10. ¹³C-NMR spectrum of compound 4 (125 MHz, CD₃OD)

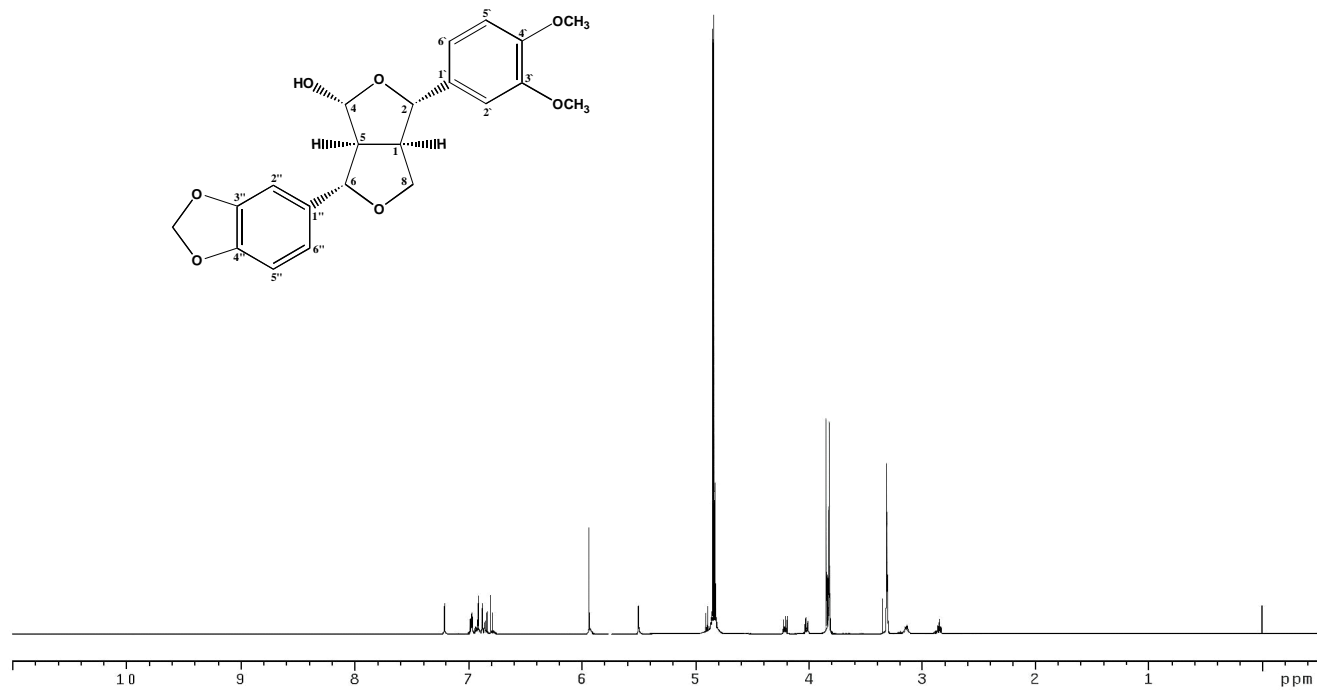


Fig.11. ¹H-NMR spectrum of compound 5 (500 MHz, CD₃OD)

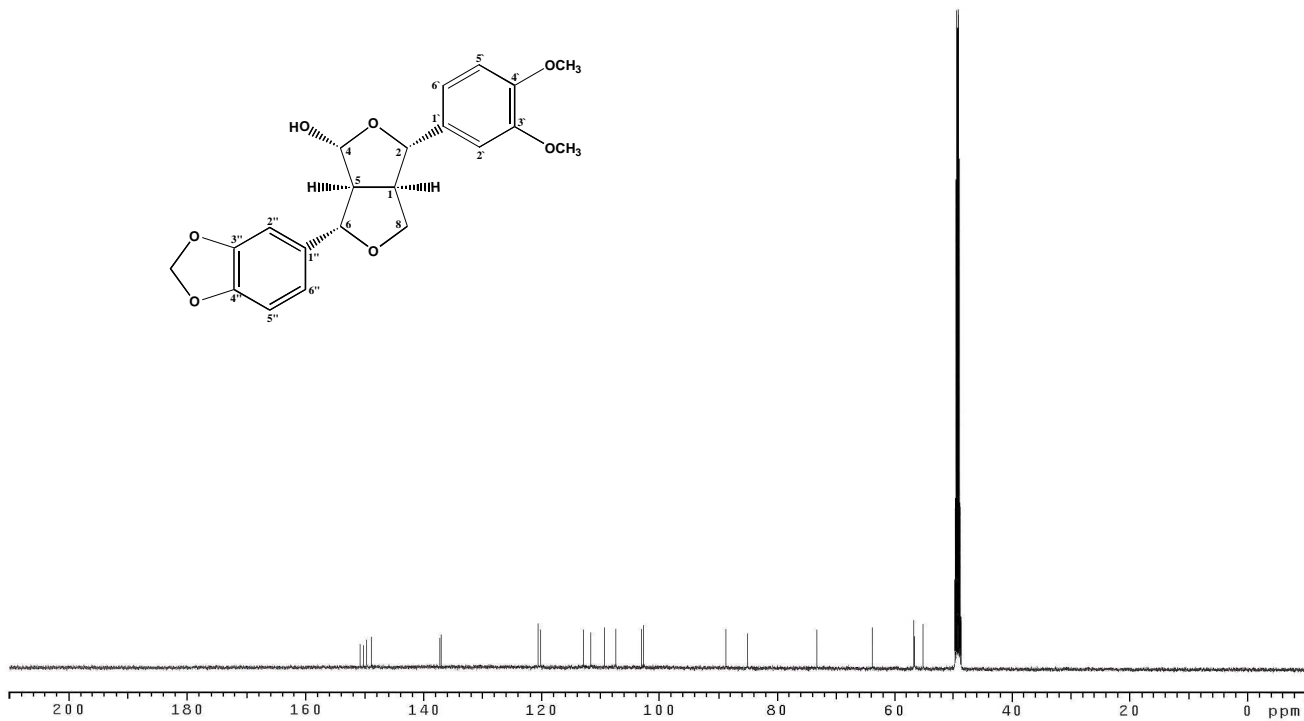


Fig.12. ¹³C-NMR spectrum of compound 5 (125 MHz, CD₃OD)

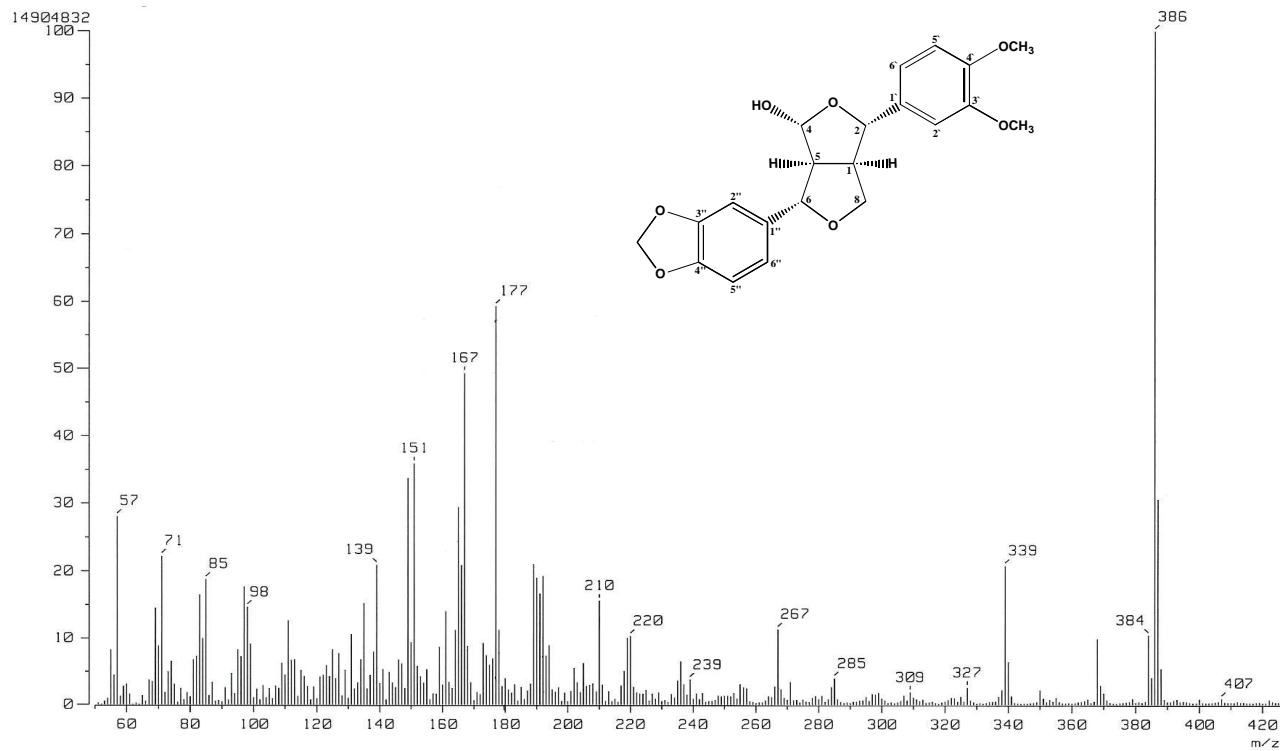


Fig.13. EI-Mass Reserve spectrum of compound 5

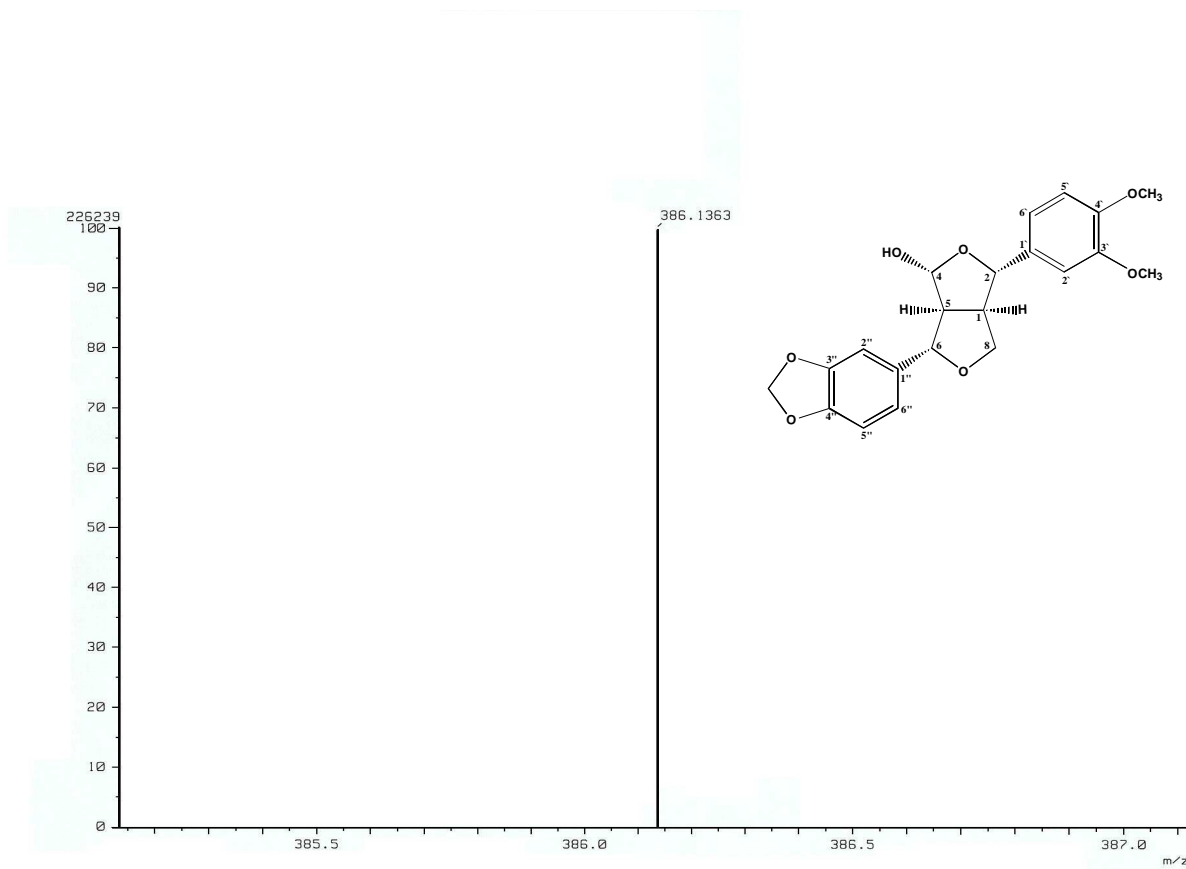


Fig.14. HR-Mass Direct spectrum of compound 5

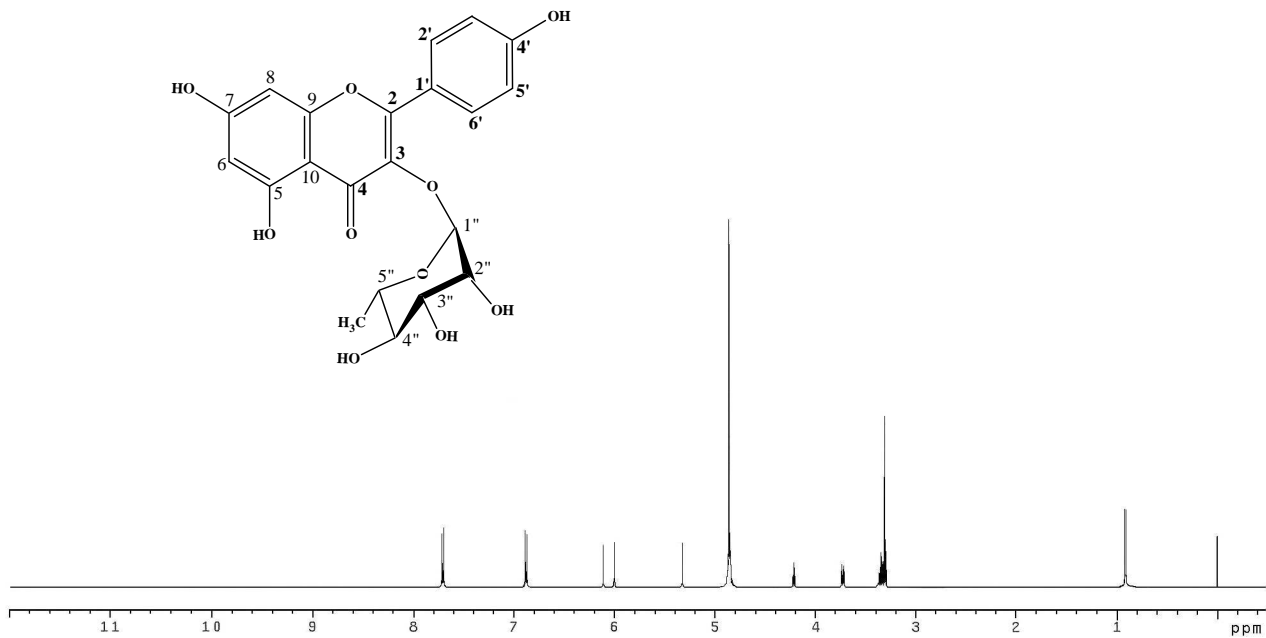


Fig.15. ¹H-NMR spectrum of compound 6 (500 MHz, CD₃OD)

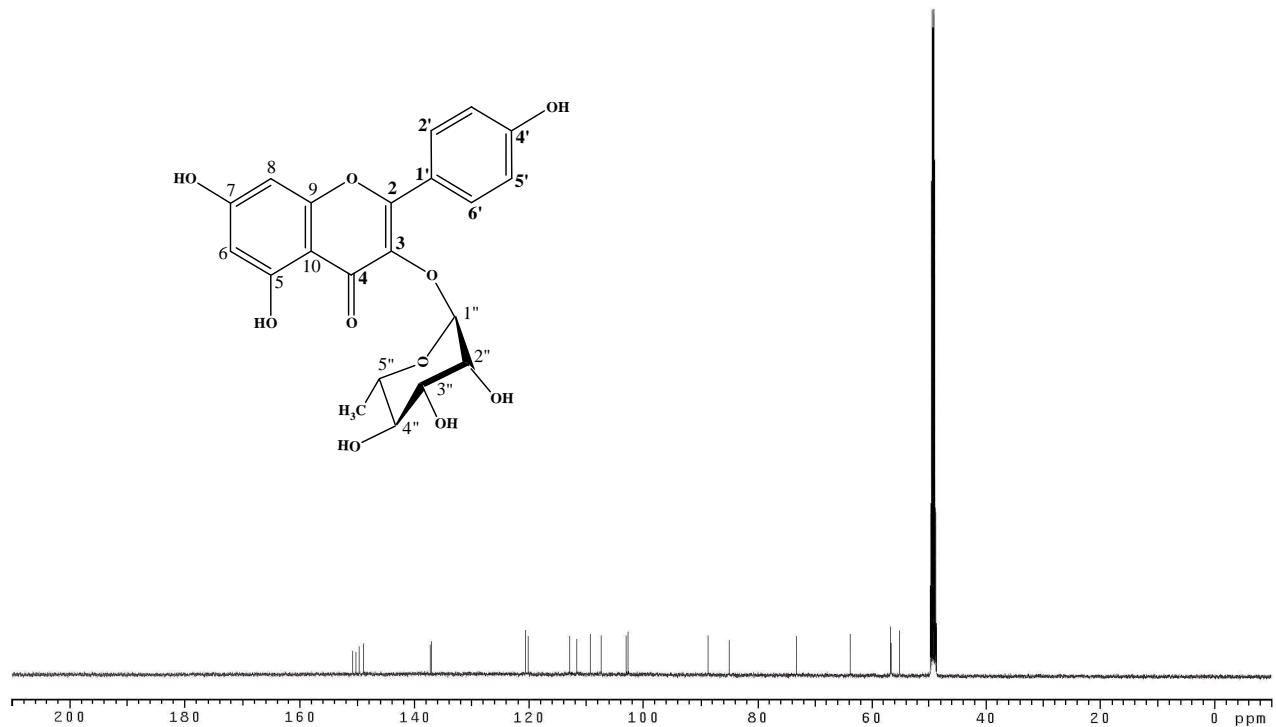


Fig.16. ¹³C-NMR spectrum of compound 6 (125 MHz, CD₃OD)