

2006年 8月
博士學位論文

권 백(*Selaginella tamariscina*)의
항암 활성성분

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

盧 銀 美

권백(*Selaginella tamariscina*)의
항암 활성성분

*Antitumor constituents of
Selaginella tamariscina Spring.*

2006年 8月 25日

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

盧 銀 美

권백(*Selaginella tamariscina*)의
향암 활성성분

指導教授 文 永 熙

이 論文을 博士學位申請 論文으로 제출함.

2006年 4月 日

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

盧 銀 美

盧 銀 美의 博士學位論文을 認准함.

委員長 忠北大學校 教授 盧載燮

委 員 朝鮮大學校 教授 高玉鉉

委 員 朝鮮大學校 教授 崔俊植

委 員 朝鮮大學校 教授 禹銀蘭

委 員 朝鮮大學校 教授 文永熙

2006年 6月 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	7
1. 實驗材料	7
2. 試藥 및 器機	7
2-1. 試藥	7
2-2. 器機	8
2-3. 細胞株	8
3. 化合物의 分離	9
3-1. 抽出 및 分割	9
3-2. CH ₂ Cl ₂ 分割으로부터 compound의 分離	10
3-2-1. Compound 1의 分離	12
3-2-2. Compound 2의 分離	13
3-2-3. Compound 3의 分離	14
3-2-4. Compound 4, 5의 分離	15
3-2-5. Compound 6의 分離	17

4. 抗癌活性	18
III. 結果 및 考察	20
1. Compound 1의 構造	20
2. Compound 2의 構造	20
3. Compound 3의 構造	21
4. Compound 4의 構造	22
5. Compound 5의 構造	22
6. Compound 6의 構造	23
7. Compounds 1-6의 抗癌活性	25
IV. 結論	27
V. 參考文獻	29
APPENDIX	32

List of Schemes

Scheme I . Extraction and fractionation of <i>Selaginella tamariscina</i> Spring.	9
Scheme II. Purification procedure of CH ₂ Cl ₂ fraction of <i>Selaginella tamariscina</i> Spring.	10
Scheme III. Purification procedure of compounds 1-3 from <i>Selaginella tamariscina</i> Spring.	11
Scheme IV. Purification procedure of compounds 4-6 from <i>Selaginella tamariscina</i> Spring.	12

List of Tables

Table 1. Antitumor activity of various extracts of <i>Selaginella tamariscina</i> Spring.	24
Table 2. Antitumor activity of compounds 1–6 isolated from <i>Selaginella tamariscina</i> Spring.	24

List of Figures

Fig. 1 Anticancer agents and precursor from plants.....	4
Fig. 2. Chemical structures of compounds 1–6 isolated from <i>Selaginella tamariscina</i> Spring.	25
Fig. 3. ^1H -NMR spectrum of compound 1 (500 MHz, CDCl_3)	33
Fig. 4. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (125 MHz, CDCl_3)	34
Fig. 5. HSQC spectrum of compound 1	35
Fig. 6. HMBC spectrum of compound 1	36
Fig. 7. EI-MS spectrum of compound 1	37
Fig. 8. ^1H -NMR spectrum of compound 2 (500 MHz, CDCl_3)	38
Fig. 9. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (125 MHz, CDCl_3)	39

Fig. 10. HSQC spectrum of compound 2	40
Fig. 11. EI-MS spectrum of compound 2	41
Fig. 12. ^1H -NMR spectrum of compound 3 (500 MHz, CDCl_3)	42
Fig. 13. ^{13}C -NMR spectrum of compound 3 (125 MHz, CDCl_3)	43
Fig. 14. HSQC-1 spectrum of compound 3	44
Fig. 15. HSQC-2 spectrum of compound 3	45
Fig. 16. EI-MS spectrum of compound 3	46
Fig. 17. ^1H -NMR spectrum of compound 4 (500 MHz, CDCl_3)	47
Fig. 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (125 MHz, CDCl_3)	48
Fig. 19. ^1H -NMR spectrum of compound 5 (500 MHz, CDCl_3)	49
Fig. 20. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 (125 MHz, CDCl_3)	50
Fig. 21. ^1H -NMR spectrum of compound 6 (500 MHz, CDCl_3)	51
Fig. 22. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 (125 MHz, CDCl_3)	52
Fig. 23. HSQC spectrum of compound 6	53
Fig. 24. EI-MS spectrum of compound 6	54

Abstract

Antitumor constituents of Selaginella tamariscina Spring.

Roh, Eun Mi

Advisor : Prof. Moon, Young-Hee, Ph.D.

Department of Pharmacy,

Graduate School of Chosun University.

Selaginella tamariscina Spring (Selaginellaceae) is a perennial plant and is distributed in Korea, China, and Japan. In traditional medicine, the whole plants are used as an antiinflammatory, antihemorrhage, anticancer, and astringent. Previous phytochemical studies on this species afforded biflavonoids, triterpenoids, and flavonoids. In an ongoing investigation into antitumor active compounds from natural products, the methylene chloride soluble fraction of methanol extract from *Selaginella tamariscina* Spring (Selaginellaceae) showed significant antitumor activity on the human cancer cell lines. By means of the activity-oriented purification procedure, 4a, 5a - 4, 14-dimethylcholest-8-en-3-one(1) ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one(2), ergosterol endoperoxide(3)

cholest-5-ene-3,7-diol(7 β -hydroxycholesterol)(4), stigmasta-5-ene-3 β -7 β -diol(7 β -hydroxysitosterol)(5), stigmasta-5-ene-3 β -7 α -diol(7 α -hydroxysitosterol) (6) were isolated. Their structures were determined by chemical analysis, as well as, 1D- with 2D-NMR spectroscopy. All compounds were isolated from this plant for the first time. Cytotoxic activity of isolated compounds was evaluated by SRB method against five human cancer cell lines. Most of the isolated compounds showed potent antitumor activity except for compound 1. It is of interest to compare the antitumor activity of compound 5 with that of compound 6. Compounds 2-6 could be mainly responsible for the potent antitumor effect of an methylene chloride soluble fraction of *S. tamariscina*, and might be suitable for further development as a leading antitumor agent.

I. 緒論

癌은 전세계적으로 主要 死亡原因이 되는 疾患으로서 環境汚染, 각 종 스트레스의 增加, 高脂肪 食餌의 增加, 吸煙 人口의 增加 및 노령화 등 다양한 個人的, 社會的, 環境的인 요인들에 의해 그 癲病률은 增加하는 추세에 있다. 우리나라의 경우, 최근 10년간 암으로 인한 사망률은 人口 10만 명당 1993년 110.6명에서 2003년 131.8명으로 21.2명이 增加한 것으로 나타났고 또한, 國立암센터에서 발표한 2002년도 중앙암 등록현황을 보면, 암 發生數는 전체 99,025건으로 2001년의 91,944건과 비교하여 7.7%가 增加한 것으로 나타나고 있다. 따라서 우리나라에서의 암 發生率 및 死亡率은 꾸준히 增加하는 추세이며, 암환자의 醫療費 및 그에 따른 사회적 費用이 연간 1조 3천억원 이상에 이른다고 分析, 報告되고 있다. 특히 價格이 비싸고 供給이 원활하지 않은 항암제인 경우 治療 혜택을 받을 수 있는 대상자가 限定될 수밖에 없어 이로 인하여 社會 계층 간에 위화감이 조성될 憂慮가 있을 뿐만 아니라, 現在 癌治療에 많이 利用되고 있는 藥物은 대부분 外國에서 개발되어 輸入에 依存하고 있는 실정이기 때문에 國民과 國家가 부담해야 하는 치료비가 증가할 수밖에 없다. 따라서 國內에서의 새로운 항암제의 開發은 輸入 代替效果에 의한 國民 의료비의 節減, 治療 혜택을 받을 수 있는 대상자의 擴大에 의한 社會 福祉 및 사회 통합의 증대, 나아가 항암제輸出로 인한 高附加 價值 創出을 통해 國가 經濟 發展 및 人類 福祉 向上에 寄與할 수 있다는側面에서 價值가 크다고 할 수 있다. 현재 臨床에서 使用 중인 抗癌性 化學療法製 중에는 天然 藥用植物로부터 先導物質로 하여 암치료제로 應用되는 것이 많은데, 대표

적인 것으로는 北美 太平洋 연안 등에 많이 自生하고 있는 藥用植物인 주목나무 (*Taxus brevifolia*) 껌질로부터 얻어진 物質로서 택솔 (taxol: 일반명 paclitaxel)이 있으며 이는 여성암 중 유방암, 난소암에 특히 有效한 效能이 發見되고¹⁾, 일일초 (*Catharanthus roseus*)에서 얻어진 것으로는 vinblastine, vincristine²⁻⁴⁾등의 vinca alkaloid 성분으로 血液癌을 비롯한 여러 암종에 유효하게 利用되고 있으며, 중국의 藥用植物 중의 하나인 憲樹 (*Camptotheca acuminata*)로부터 camptothecin⁵⁾이라는 物質이 抗癌 효능을 지니고 있어 이로부터 생물학적 藥效性을 增加시킨 새로운 物質이 항암제로 사용되고 있다. 이밖에 북미 또는 캐나다에 自生하는 포도휘름 (*Podophyllum peltatum*)의 뿌리로부터 분리된 podophyllotoxin과 그 유도체인 etoposide 및 teniposide가 있다⁶⁾ (Fig.1 참조). 또한, 담자균류에 함유된 단백 다당체 성분이 宿住에 대해 毒作用을 일으키지 않으면서 항종양작용을 나타냄이 報告되었고⁷⁻⁹⁾, 이러한 항암성분은 副作用이 거의 없을 뿐만 아니라 食用으로 할 수 있으므로, 최근 계속 增加하고 있는 암 환자에게 숙주의 免疫活性 增加에 의한 抗癌作用¹⁰⁾ 등으로 實用價值가 더욱 높아지고 있으며, 微生物 代射產物로부터 抗生 效能을 지닌 항암제 (actinomycin D, adriamycin, mitomycin C, bleomycin) 등도 利用되고 있다. 이외 현재 下等 植物에서 高等식물에 이르기까지 微生物, 海洋生物 등 다양한 天然物로부터 항암제를 開發 중에 있으며 국내에서도 自生植物 및 한방 生藥을 중심으로 항암활성을 지닌 물질을 찾고자 많은努力을 하고 있는 실정이다. 이러한 目的에 부응하여, 본 연구에서는 天然物로부터 항암 활성을 지닌 物質을 分離, 精製하고 優秀한

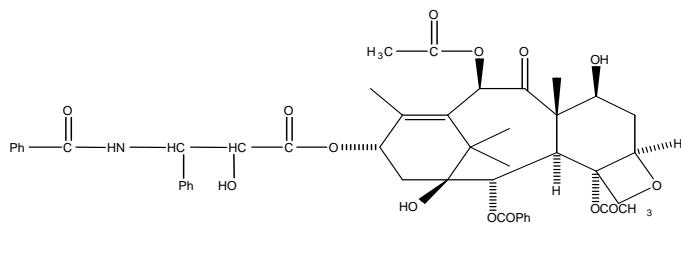
항암 先導物質을 導出하기 위하여 數種의 MeOH 抽出物에 대한 항암활성을 檢索한 結果 부처손의 CH_2Cl_2 分割物이 強力한 항암활성을 나타냄을 관찰하고 이 식물에 대한 活性成分의 分離, 精製를 실시하였다.

부처손과(Selaginellaceae)에는 *Selaginella* I 속으로 구성되고 異形胞子, 舌葉 및 擔根体가 있으며 잎이 4줄로 달려있다. *Selaginella*는 세계적으로 널리 분포하지만 대개 热帶에 집중되어 있다. 몇 종은 사막이나 습기가 없는 環境에서도 자라지만, 대개 그늘이 지고 습기가 많은 곳에서 자란다. 우리나라에서는 6종이 자라고 있으며, 그중 부처손(*Selaginella tamariscina* Spring)이 가장 널리 분포된 늘푸른 여러해살이풀이다. 마른 바위에 붙어서 자라는데 비가 와서 물기가 있으면 새파랗게 살아나도 가물면 잎이 공처럼 둥글게 말라 오그라 들어 죽은 것처럼 보인다. 줄기는 빽빽하게 모여나고 높이는 15~29cm이며, 비늘조각 같은 잎이 빽빽하게 붙는다.¹¹⁻¹³⁾

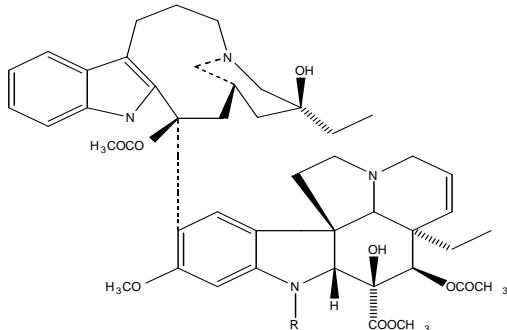
잎은 4줄로 늘어 서 있고 끝이 실처럼 길어지며 가장자리에 작은 톱니가 있다. 胚子囊 이삭은 잔가지 끝에 1개씩 달리고 네모지며 길이 5~15mm쯤이다. 우리나라 곳곳의 바위에 붙어 자라며, 日本, 中國, 타이완, 필리핀 등에도 自生한다. 겨울철에도 죽은 것처럼 오그라들었다가 봄철 비가 오면 금방 새파랗게 살아나는 生命力이 뛰어난 植物이다. 萬年松, 萬年草, 長生不死草, 不死草, 回陽草, 交趾 등의 많은 이름으로 불리고 한약명으로는 卷柏이라고 부른다. 권백은 여성들의 子宮出血이나 生理不順, 生理痛에 효험이 크고 痘疾, 腸出血, 脫肛, 피오줌 등에도 좋다. 몸을 따뜻하게 하는 効果가 있어서 여성의 子宮이 冷하여 妊娠을 하지 못하는 데에도 効果가

있다. 慢性肝炎, 肝硬化症, 黃疸, 기침, 腎臟結石, 精神分裂症, 갓가지암, 기관지염, 폐렴, 편도선염에도 效驗이 있으며 老人們이 힘이 없고 몸이 나른할 때 부처손을 달여 먹으면 기운이 난다고 알려져 있으며 中國에서는 癌治療藥으로 널리 쓰이고 있다.¹⁴⁾

본 연구에서는 天然物로부터 抗癌活性을 지닌 物質을 分離, 精製하고 우수한 抗癌 선도물질을 導出하기 위하여 數種의 MeOH抽出物에 대한 抗癌活性을 檢索한 結果 권백의 CH₂Cl₂分劃物이 強力한 抗癌活性을 나타냄을 관찰하고 이 植物에 대한 活性成分의 分離, 精製를 실시하였다.

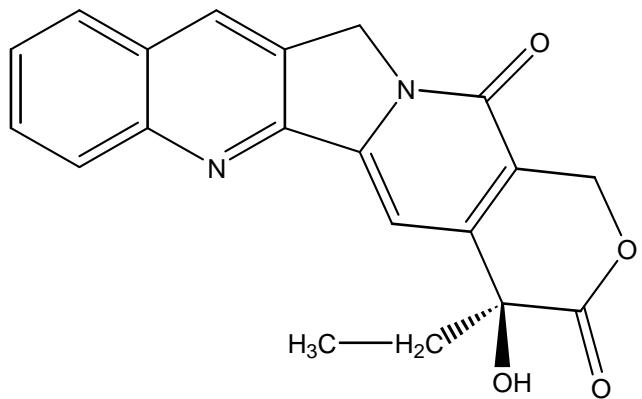


Taxol (Ph = Phenyl)

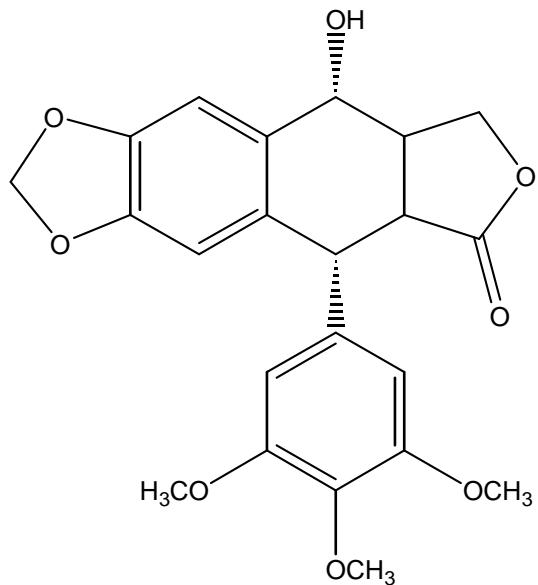


Vinblastine : R = CH₃
Vincristine : R = CHO

Fig. 1. Anticancer agents and precursor from plants

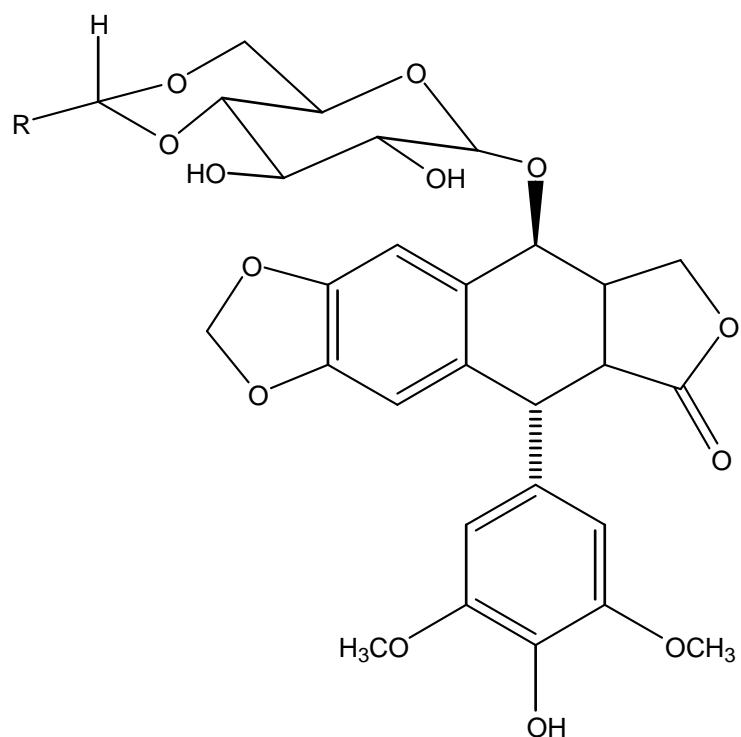


Camptothecin



Podophyllotoxin

Fig. 1. Anticancer agents and precursor from plants (continued)



Etoposide : R = CH₃

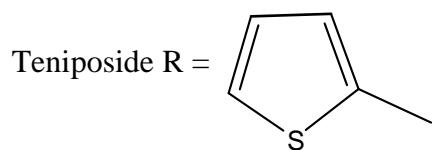


Fig. 1. Anticancer agents and precursor from plants (continued)

II. 實 驗

1. 實驗材料

實驗에 사용한 권백(*Selaginella tamariscina* Spring.)은 2003年 4月 광주시내 乾材商에서 購入하였으며 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) 等을 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 F_{254S} plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 使用하였다. Prepartive thin layer chromatography (PTLC)用 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate(layer thickness 0.5 mm, 20×20 cm. Art. 5744, Merck)와 precoated RP-18 F_{254S} 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

^{13}C -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

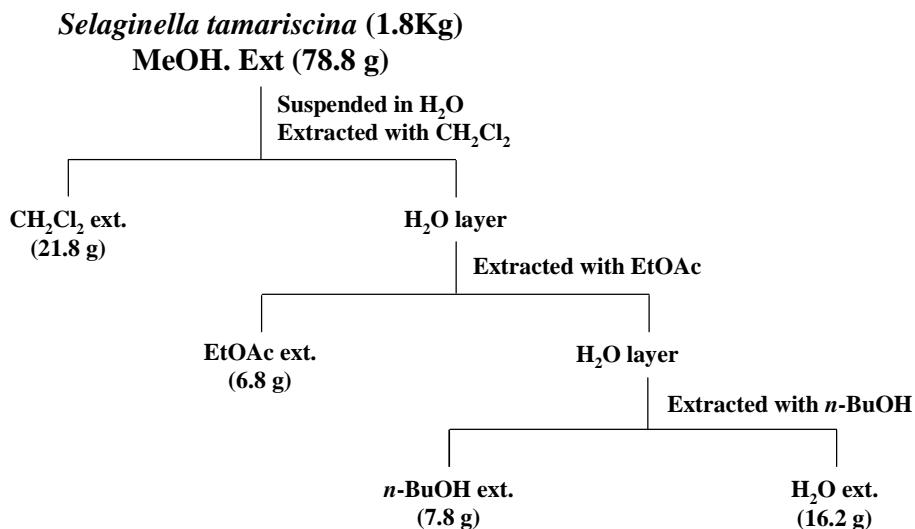
2-3. 細胞株

本 實驗에 使用한 인체 암세포주는 A-549(폐암), HCT15(대장암), MES-SA(난소암), SK-MEL-2(피부암), SK-OV-3(난소암) 세포주로서 韓國細胞株銀行으로부터 分讓받았으며 癌細胞 增殖沮害活性은 sulforhodamine B (SRB) assay 方法⁽¹⁵⁾을 活用하였다.

3. 化合物의 分離

3-1. 抽出 및 分割

권백 (*Selaginella tamariscina* Spring.) 건조중량 : 1.8kg)는 MeOH 8ℓ를抽出溶媒로 하여 4시간씩 3회에 걸쳐 가끔 진탕하면서抽出하였다. 얻어진抽出液을 減壓濃縮하여 乾燥 重量 78.79 g의 MeOH extract를 얻었다. 이를 증류수에 혼탁시키고 이어서 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol 順序로 系統的 抽出法에 의해 分割하여 methylene chloride frac. (21.78g), ethyl acetate frac. (6.80g), *n*-butanol frac. (7.78g), H₂O frac. (16.18g)을 얻었다(Scheme I).



Scheme I Extraction and fractionation of *Selaginella tamariscina* Spring.

권백의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대해 A 549, HCT-15, MES-SA, SK-MEL-2, SK-OV-3의 人體 癌細胞에 대한 細胞毒性(Table 1)을 檢索한 結果 CH₂Cl₂의 分割이 가장 탁월한 항암활성

을 나타내 권백의 CH_2Cl_2 의 分割에 대한 activity-oriented purification procedure를 수행하였다.

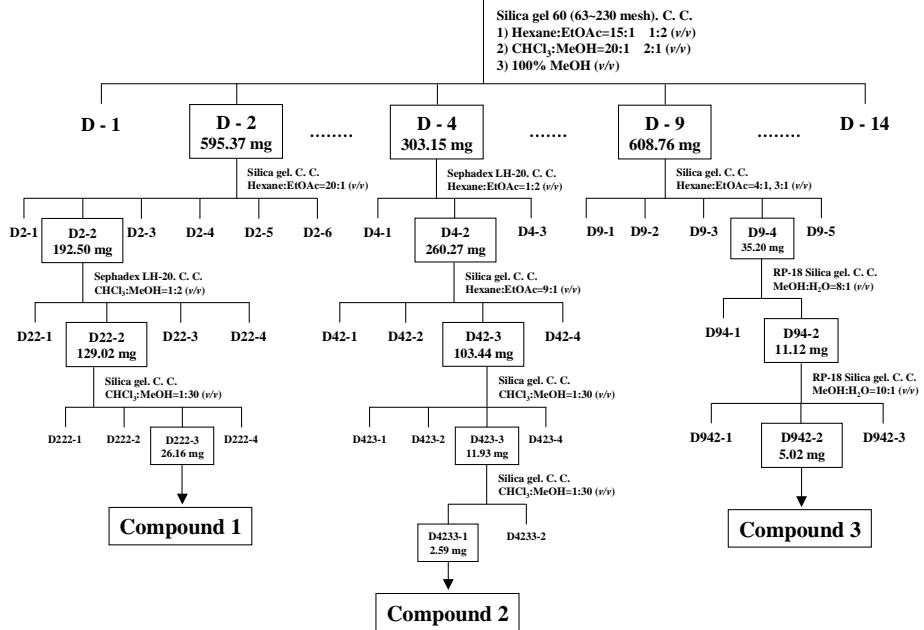
3-2. CH_2Cl_2 分割으로부터 compound의 分離

권백의 CH_2Cl_2 fraction (10g)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=15:1에서 시작하여 EtOAc의 양을 점진적으로 늘려 1:2까지 훌린 후, 溶媒를 바꾸어 CHCl_3 :MeOH=10:1로부터 시작하여 2:1까지 展開溶媒의 極性을 올리면서 溶出시켰으며 마지막에는 100%의 MeOH로 column을 깨끗이 씻어주었다. 각각의 分割들을 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S} TLC pattern으로 檢討한 후 類似한 것들을 합쳐서 14개의 小分割으로 나누었다. (Scheme II)

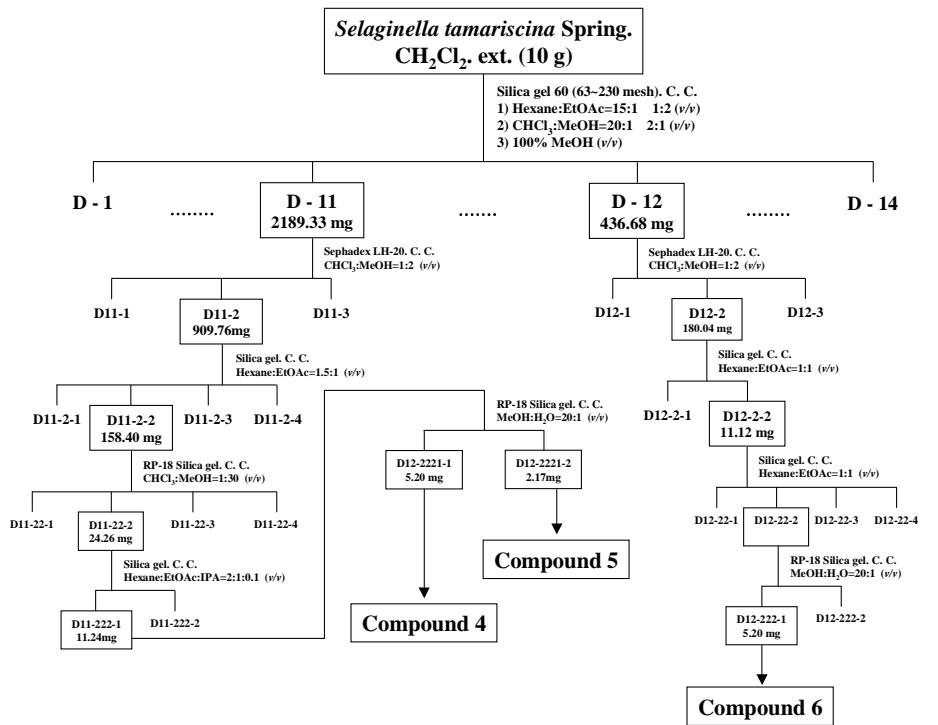
<i>Selaginella tamariscina</i> Spring. CH_2Cl_2 ext. (10 g)													
Silica gel 60 (63~230 mesh), C. C.													
1) Hexane:EtOAc=15:1 1:2 (v/v)													
2) CHCl_3 :MeOH=20:1 2:1 (v/v)													
3) 100% MeOH (v/v)													
D - 1	D - 2	D - 3	D - 4	D - 5	D - 6	D - 7	D - 8	D - 9	D - 10	D - 11	D - 12	D - 13	D - 14
617.00 mg	595.37 mg	140.64 mg	303.15 mg	825.78 mg	819.22 mg	450.16 mg	536.95 mg	608.76 mg	334.23 mg	2189.33 mg	436.68 mg	731.85 mg	108.34 mg

Scheme II Purification procedure of CH_2Cl_2 fraction of *Selaginella tamariscina* Spring.

***Selaginella tamariscina* Spring.**
CH₂Cl₂, ext. (10 g)



Scheme III Purification procedure of compounds 1–3 from *Selaginella tamariscina* Spring.



Scheme IV Purification procedure of compounds 4-6 from *Selaginella tamariscina* Spring.

3-2-1. Compound 1의 分離

Subfraction D2 (720.29mg)을 silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 *n*-Hexane:EtOAc (20:1→1:1)의 溶媒條件으로 column chromatography 를 實施하였다. Silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S} TLC pattern으로 檢討한 後 類似한 것들을 합쳐서 6個의 小分劃(D21-D26)으로 나누었다. 나누어진 소分劃 D22 (192.50mg)를 다시 silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 CHCl₃:MeOH(1:2) 溶媒條件으로 column chromatography를 實시하여 4개의 小分劃으로 나누고 이어 小分劃 D222 (129.02 mg)를 RP silica gel을 お用하여 CHCl₃:MeOH(1:30)의 용매 조건으로 精製하여 純

粹化合物 compound 1 (25.16mg)을 얻었다. compound 1은 노랑색의 분말상태로 UV 吸收는 거의 없으며 10% 黃酸 溶液에서 褐色으로 發色되었다. (Scheme III)

Yellow powder

Molecular formula : C₂₉H₄₈O

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 2.45, 2.35(2H, m, H-2), 0.74(3H, s, H-18), 1.20(3H, s, H-19), 0.90(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.86(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-26), 0.88 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), 1.03(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-28), 0.88(3H, s, H-29)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 37.13(t, C-1), 37.99(t, C-2), 213.53(s, C-3), 45.02(d, C-4), 49.75(d, C-5), 22.06(t, C-6), 25.47(t, C-7), 132.40 (s, C-8), 136.61(s, C-9), 36.58(s, C-10), 21.89(t, C-11), 30.99(t, C-12), 44.47(s, C-13), 49.87(s, C-14), 30.80(t, C-15), 28.18(t, C-16), 50.51(d, C-17), 15.79(q, C-18), 17.49(q, C-19), 36.47(d, C-20), 18.72(q, C-21), 36.44(t, C-22), 24.10(t, C-23), 39.50(t, C-24), 27.99(d, C-25), 22.53(q, C-26), 22.82(q, C-27), 11.44(q, C-28), 24.39(q, C-29)

EI-MS *m/z* : 412, 397, 243, 231

3-2-2. Compound 2의 分離

Subfraction D4 (557.05mg)를 Sephadex LH 20을 利用하여 CHCl₃:MeOH (1:2)인 溶媒條件으로 column chromatography를 實施하여 3개의 小分劃(D41-D43)으로 나누었다. 小分劃 D42(395.27mg)를 다시 silica gel column chromatography를 실시하여 *n*-Hexane:EtOAc (9:1)인 溶媒條件下에서 용출하여 4개의 小分劃으로 나누고 小分劃 D422(17.87mg)를 RP silicagel 및 silica gel column chromatography를

反復實施하여 compound 2 (2.59mg)를 얻었다. compound 2는 노랑색의粉末로 UV 短波長 (254nm), 長파장(365nm)에서 하늘색의 螢光吸收가 있었고, 10% 黃酸溶液에서 연두색으로 發色되었다. (Scheme III)

Yellow powder

Molecular formula : C₂₈H₄₀O

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.03(1H, d, $J=9.5$ Hz, H-6), 6.61(1H, d, $J=9.5$ Hz, H-7), 0.96(3H, s, H-18), 1.00(3H, s, H-19), 1.06(1H, d, $J=7.0$ Hz, H-21), 5.20(1H, dd, $J=15.0, 7.5$ Hz, H-22), 5.26(1H, dd, $J=15.0, 7.5$ Hz, H-23), 0.83(3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26 or H-27), 0.85(3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26 or H-27), 0.93(3H, d, $J=7.0$ Hz, H-28)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 34.14(t, C-1), 18.95(t, C-2), 199.50(s, C-3), 123.00(d, C-4), 164.38(s, C-5), 124.47(d, C-6), 134.00(d, C-7), 124.42(s, C-8), 44.34(d, C-9), 36.76(s, C-10), 25.37(t, C-11), 34.12(t, C-12), 43.99(s, C-13), 156.08(s, C-14), 35.60(t, C-15), 27.71(t, C-16), 55.71(d, C-17), 18.98(q, C-18), 16.65(q, C-19), 39.27(d, C-20), 21.22(q, C-21), 135.00(d, C-22), 132.54(d, C-23), 42.87(d, C-24), 33.09(d, C-25), 19.65(q, C-26), 19.9 (q, C-27), 17.63(q, C-28),

EI-MS *m/z* : 392, 268, 253

3-2-3. Compound 3의 分離

Sufraktion D9 (284.04mg)을 *n*-Hexane:EtOAc(4:1→3:1)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 5個의 小分割(D91-D95)으로 나누었다. 나누어진 小分割 D93 (35.20mg)을 다시 RP Silica gel을 利用하여 MeOH:H₂O (8:1)의 溶媒條件下에서 column chromatography를 實

施하여 2개의 小分劃으로 나누고 小分劃 D942(11.12mg)을 RP Silica gel을 利用하여 MeOH:H₂O (10:1)인 溶媒條件下에서 column chromatography를 實施하여 compound 3 (5.02mg)을 얻었다. compound 3은 무색의 oil상으로 UV 短波長 (254nm)에서 검정색으로 나타냈고, 10% 蔡酸溶液에서 보라색으로 發色되었다. (Scheme III)

Colorless oil

Molecular formula : C₂₈H₄₄O₃

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 3.97(1H, m, H-3), 6.24(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6), 6.50(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7), 0.84(3H, s, H-18), 0.88(3H, s, H-19), 1.00(3H, d, $J=8.5$ Hz, H-21), 5.14(1H, dd, $J=15.5, 8.0$ Hz, H-22), 5.23(1H, dd, $J=15.5, 8.0$ Hz, H-23), 0.81(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-26), 0.83(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), 0.91(3H, $J=6.5$ Hz, H-28)

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) δ : 34.68(t, C-1), 30.12(t, C-2), 66.46(d, C-3), 36.95(t, C-4), 82.13(s, C-5), 135.40(d, C-6), 130.74(d, C-7), 79.41(s, C-8), 51.08(d, C-9), 36.92(s, C-10), 23.39(t, C-11), 39.33(t, C-12), 44.55(s, C-13), 51.67(d, C-14), 20.62(t, C-15), 28.63(t, C-16), 56.19(d, C-17), 12.86(q, C-18), 18.16(q, C-19), 39.71(d, C-20), 20.86(q, C-21), 135.19(d, C-22), 132.30(d, C-23), 42.76(d, C-24), 33.05(d, C-25), 19.62(q, C-26), 19.93(q, C-27), 17.54(q, C-28).

EI-MS *m/z* : 428, 413, 376, 251

3-2-4. Compound 4, 5의 分離

Sufraction D11 (313.31mg)을 CHCl₃: MeOH (1:2)의 溶媒條件으로 Sephadex LH 20을 利用하여 column chromatography를 實施하였다. 各各 分割들은 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S} TLC pattern으로 確認하여 分離된 程度에 따라 3個의 小分劃으로 나누었다. 나누어진 小分劃

D112 (283.67mg)를 다시 silica gel 60 (40~63 mesh)을 利用하여 n -Hexane:acetone (1.5:1)의 溶媒로 column chromatography를 實施하여 4개의 小分劃으로 나누고 小分劃 D11-22(158.40mg)를 RP silica gel, Sephadex LH-20을 利用하여 column chromatography를 反復 實施하여 compound 4 (0.95mg), compound 5(2.17mg)를 얻었다. compound 4, 5는 흰색 分 말상태로 UV 短波長 (254nm)에서 흡수가 없었고, 10% 黃酸溶液에서 맑은 청색으로 發色되었다. (Scheme IV)

Compound 4

White powder

Molecular formula : C₂₇H₄₆O₂

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 3.54(1H, m, H-3), 5.29(1H, br s, H-6), 3.84(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 0.69(3H, s, H-18), 1.05(3H, s, H-19), 0.92(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.86(3H, d, $J=2.5$ Hz, H-26), 0.87(3H, d, $J=2.5$ Hz, H-27)

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) δ : 36.92(t, C-1), 31.55(t, C-2), 71.44(d, C-3), 41.71(t, C-4), 143.47(s, C-5), 125.42(d, C-6), 73.36(d, C-7), 40.90(d, C-8), 48.25(d, C-9), 36.43(s, C-10), 21.07(t, C-11), 39.49(t, C-12), 42.92(s, C-13), 55.44(d, C-14), 26.37(t, C-15), 28.00(t, C-16), 55.94(d, C-17), 11.81(q, C-18), 19.15(q, C-19), 36.19(d, C-20), 18.76(q, C-21), 35.72(t, C-22), 23.82(t, C-23), 39.55(t, C-24), 28.53(d, C-25), 22.54(q, C-26), 22.80(q, C-27)

Compound 5

White powder

Molecular formula : C₂₉H₅₀O₂

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ : 3.54(1H, m, H-3), 5.29(1H, br s,

H-6), 3.84(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 0.69(3H, s, H-18), 1.05(3H, s, H-19), 0.92(3H,d, $J=7.0$ Hz, H-21), 0.82(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-26), 0.81(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), 0.86(3H, t, $J=7.5$ Hz, H-29)

^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 36.93(t, C-1), 31.56(t, C-2), 71.44(d, C-3), 41.71(t, C-4), 143.47(s, C-5), 125.43(d, C-6), 73.36(d, C-7), 40.91(d, C-8), 48.25(d, C-9), 36.43(s, C-10), 21.07(t, C-11), 39.55(t, C-12), 42.92(s, C-13), 55.36(d, C-14), 26.09(t, C-15), 28.55(t, C-16), 55.95(d, C-17), 11.81(q, C-18), 19.15(q, C-19), 36.09(d, C-20), 18.83(q, C-21), 33.97(t, C-22), 26.38(t, C-23), 45.84(t, C-24), 29.13(d, C-25), 19.01(q, C-26), 19.81(q, C-27), 23.06(t, C-28), 11.97(q, C-29)

EI-MS m/z : 430, 412, 398, 396, 384

3-2-5. Compound 6의 分離

Subfraction D12 (541.90mg)을 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:2) 溶媒條件으로 Sephadex LH-20을 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 3個의 小分割(D12-1, D12-2, D12-3)으로 나누었다. 나누어진 小分割 D12-2 (380.04mg)을 다시 silica gel을 利用하여 *n*-Hexane:EtOAc (20:1→1:1)의 溶媒條件下에서 column chromatography를 反復實施하여 compound 6 (8.32mg)을 얻었다. compound 6은 흰색 固體狀態로 UV 短波長 (254nm)에서 吸收가 없었고, 10% 黃酸溶液에서 맑은 청색으로 發色되었다. (Scheme IV)

White powder

Molecular formula : $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$

^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 5.60(1H, dd, $J=5.5$, 1.5 Hz, H-6),

3.86(1H, t, $J=4.0$ Hz H-7), 3.60(1H, m, H-8), 1.00(3H, s, H-19), 0.93(3H,d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.82(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-26), 0.84(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), 0.95(3H, t, $J=7.5$ Hz, H-29)

^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 37.01(t, C-1), 31.37(t, C-2), 71.36(d, C-3), 42.01(t, C-4), 146.24(s, C-5), 123.87(d, C-6), 65.36(d, C-7), 37.52(d, C-8), 42.26(d, C-9), 37.40(s, C-10), 20.70(t, C-11), 39.17(t, C-12), 42.14(s, C-13), 49.43(d, C-14), 24.30(t, C-15), 28.27(t, C-16), 55.36(d, C-17), 11.62(q, C-18), 18.24(q, C-19), 36.10(d, C-20), 18.80(q, C-21), 33.92(t, C-22), 25.93(t, C-23), 45.84(t, C-24), 29.13(d, C-25), 19.02(q, C-26), 19.79(q, C-27), 23.06(t, C-28), 11.98(q, C-29)

EI-MS m/z : 430, 412, 394, 379, 353

4. 抗癌活性

本 實驗에 使用한 인체 암세포주는 A-549(폐암), HCT15(대장암), MES-SA(난소암), SK-MEL-2(피부암), SK-OV-3(난소암) 세포주이며 癌細胞 增殖沮害活性은 sulforhodamine B (SRB) assay 方法⁽¹⁵⁾을 活用하였다. 즉 繼代중인 細胞들을 實驗에 使用하기 위하여 우선 trypsin-EDTA 溶液으로 容器附着面으로부터 脫離시키고, 96 well flat bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 細胞數가 5×10^3 (cells/ml) ~ 2×10^4 (cells/ml)이 되도록 分주하였다. 分주된 細胞들은 5% CO_2 incubator內에서 24時間 培養하여 바닥에 附着시킨 後 aspirator로 media를 除去하고 6 濃度의 log dose로 medium으로 稀釋한 test material 溶液들을 細胞가 들어 있는 well에 각各 $100\mu\text{l}$ 씩 3倍數 (triplicate)로 넣어주고 48시간동안 더 培養하였다. 檢體溶液은 少量의 DMSO에 녹인 後 배지용액으로 稀釋하였으며 總反應 액 중 DMSO의 濃度는 1% 以下가 되도록 하였다. 檢體溶液은 細胞에 加하기 前에

miliphore filter로 濾過하여 實驗의 無菌狀態를 維持하였다. 細胞를 藥物과 48시간 培養한 後 各 well의 medium을 除去하고 10% formalin solution을 $100\mu\ell$ 씩 加하여 4°C에서 1시간동안 放置하여 細胞들을 plate의 바닥 面에 固定시켰다. 細胞의 固定이 끝난 後 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 $100\mu\ell$ 의 1% acetic acid 溶液에 0.4% SRB를 녹인 染色溶液을 가하여 30분간 細胞를 染色하고 다시 1% acetic acid 溶液으로 5-6回 洗滌하여 細胞에 結合하지 않은 過剩의 SRB를 除去하였다. 이렇게 染色된 cell plate들을 다시 室溫에서 乾燥시킨 後 well 당 $100\mu\ell$ 의 10mM trisma base (unbuffered) 溶液을 加하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 染色液을 용출시킨 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 계산하기 위하여 藥物을 加하는 始點에서 細胞 數(T_z , zero time)와 藥物 대신 동량의 배지만을 加하여 48시간 培養했을 때의 細胞 數(C , control) 및 各濃度의 藥物과 함께 48시간 培養했을 때의 細胞 數(T , test)를 각各 測定하여 다음의 수식에 따라 抗癌活性을 計算하였다. 即 $T_z > T$ 인 경우에는 $[(T - T_z) / (C - T_z)] \times 100$ 으로 計算하였고, $T_z < T$ 인 경우에는 $[(T - T_z) / T_z] \times 100$ 의 數式으로 計算하였다. 이렇게 計算된 數値로부터 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 (IC_{50})를 計算하였다.

III. 結 果 및 考 察

1. Compound 1의 構造

Compound 1은 노랑색의 粉末상태로 얻어졌으며, 10% 황산용액에 의하여 褐色으로 發色되고 Liebermann-Burchard reaction에 양성으로 나타났다. 이 화합물의 ^1H -NMR spectrum을 보면 δ 0.74 및 1.20에서 H-18, 19의 methyl peak가 觀察되었고 δ 0.90, 0.86, 0.88, 1.03에서 H-21, 26, 27, 28의 methyl peak가 $J=6.5$ Hz의 doublet로 관찰되었다. 또한 δ 0.88에 H-29의 methyl peak가 觀察되었다. 또한 C-3에 존재하는 oxo 그룹으로 인해 H-2의 피크가 δ 2.45, 2.35로 이동하여 multiplet으로 觀察되었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 215.53에서 C-3의 카르보닐 피크가 나타났고 δ 135.61, 132.40에서 C-8, 9의 double bond에 기인하는 피크가 관측되었다. Mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 412에서 나타났다. 이상의 ^1H -, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, MS 등의 分光學的인 데이터 및 이화학적인 데이터를 綜合한 結果 compound 1은 문헌에 인용된 4a, 5a)-4,14-dimethylcholest-8-en-3-one로 紛明하였으며 compound 1은 이 植物로부터 처음으로 분리된 化合物이다.⁽¹⁶⁻¹⁹⁾

2. Compound 2의 構造

Compound 2는 黃色의 粉末상으로 얻어졌으며, UV 短波長 (254nm), 장파장(365nm)에서 하늘색의 螢光吸收가 있었고, 10% 黃酸溶液에서 연두색으로 發色되었다. Liebermann-Burchard 반응에陽性으로 나타났다. ^1H -NMR spectrum에서 δ 0.96, 1.00에 각각 H-18, H-19의 methyl group peak가 나타났고 δ 1.06, 0.83, 0.85, 0.93에 H-21, 26, 27, 28의 methyl group peak가 $J=7.0$ Hz의 doublet로 觀察되었다. 한편 olefinic proton인 H-6, 7의 수소가 δ 6.03, 6.61에 $J=9.5$ Hz의 doublet로, H-22,

23의 수소가 δ 5.20, 5.23에 double doublet, $J=15.0, 7.5$ Hz로 觀察되었다. 한편 카르보닐기의 옆에 隣接한 H-4는 δ 5.74에 singlet로 나타났다. 化合物 2의 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 123.00, 164.38, 124.47, 134.00에서 C-4, 5, 6, 7의 conjugated double bond 피크가 觀察되었고, δ 135.70, 132.54에서 C-22, 23의 double bond 피크가, δ 199.50에 C-3에 由來하는 카르보닐 피크가 觀察되었다. Mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 382에 나타났다. 이상의 ^1H -, ^{13}C -NMR, HSQC, MS 등의 分光學的인 데이터 및 이화학적인 데이터를 종합한 結果 compound 2는 문헌에 引用된 Ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one으로 규명하였으며 compound 2는 이 植物로부터 처음으로 分離된 化合物이다.⁽¹⁹⁻²²⁾

3. Compound 3의 構造

Compound 3은 무색의 oil상으로 얻어졌으며 UV 短波長 (254nm)에서 검정색으로 나타냈고, 10% 黃酸溶液에서 보라색으로 發色되었다. Liebermann-Burchard reaction에 陽性으로 나타났다. ^1H -NMR spectrum에서 δ 0.84, 0.88에 각각 H-18, 19에 기인하는 methyl group peak가 나타났고 δ 1.0, 0.81, 0.83, 0.91에 H-21, 26, 27, 28에 기인하는 methyl group peak가 $J=6.5$ Hz의 doublet로 觀察되었다. 한편 δ 6.24, 6.50에 olefinic proton인 H-6, 7이 각각 $J=8.5$ Hz의 doublet로 觀察되어 C-5와 C-8은 α -system으로 추정되었다. 이밖에 δ 5.14, 5.23에 H-22, 23의 수소피크가 double doublet, $J=15.5, 8.0$ Hz로 觀察되었으며 δ 3.97에 H-3 수소피크가 multiplet으로 觀察되었다. ^{13}C -NMR spectrum은 δ 66.46에서 C-3의 hydroxy 피크가 觀察되었고 δ 82.13, 79.41에 C-5, 8의 endoperoxide에 起因하는 피크가 觀察되었으며 δ 135.40 130.74에 olefinic carbon인 C-6, 7의 피크가 觀察되었다. Mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 428에 나타났다. 이상의 ^1H -, ^{13}C -NMR, HSQC, MS 등의 分光學的인 데이터 및 理化學的인 데이터를 종합한 結果

compound 3은 文獻에 引用된 Ergosterol endoperoxide로 규명하였으며 compound 3은 이 植物로부터 처음으로 分離된 化合物이다.^(19-20, 23-24)

4. Compound 4의 構造

Compound 4, 5는 흰색 粉末狀態로 UV 短波長 (254nm)에서 吸收가 없었고, 10% 黃酸溶液에서 맑은 青色으로 發色되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 0.69, 1.05에 각각 H-18, 19에 起因하는 methyl group peak가 나타났고 δ 0.92에 H-21에 起因하는 methyl group peak가 $J=6.5$ Hz의 doublet로 觀察되었다. 또한 δ 0.86 (3H, d, $J=2.5$ Hz)과 0.87 (3H, d, $J=2.5$ Hz)에서 H-26과 27에 해당하는 methyl group peak가 나타났으며 δ 3.54 (1H, m)와 3.84 (1H, d, $J=8.0$ Hz)에서는 oxygenated proton인 H-3과 H-7의 peak가 觀察되었고, olefinic proton인 H-6의 peak가 δ 5.29 (1H, br s)에서 觀察되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 모두 27개의 carbon peak를 確認하였고 δ 71.44와 73.66에서 oxygenated carbon인 C-3과 C-7을 觀察하였고, δ 143.47과 125.42에서 C-5와 C-6의 olefinic carbon peak를 觀察하였다. Mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 428에 나타났다. 이상의 ^1H -, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 分光學的인 데이터 및 理化學的인 데이타를 종합한 結果 compound 4는 文獻에 引用된 Cholest-5-ene-3,7-diol (7β -hydroxy cholesterol)로 규명하였으며 compound 4는 이 植物로부터 처음으로 分離된 化合物이다.^(19-20, 23-24)

5. Compound 5의 構造

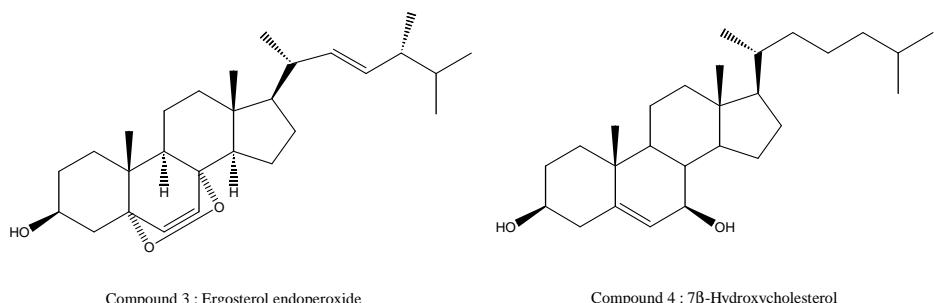
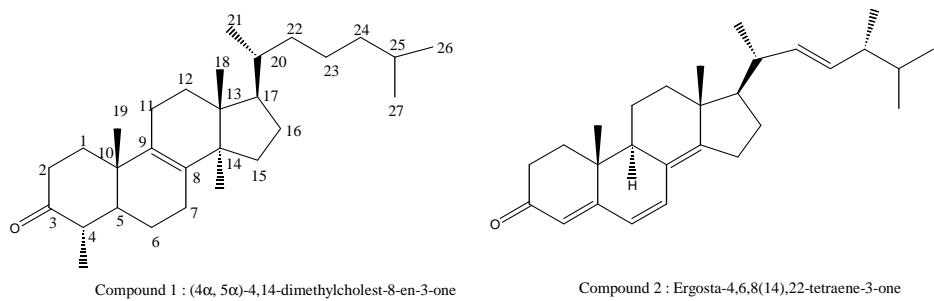
Compound 5는 흰색 粉末狀態로 UV 短波長 (254nm)에서 흡수가 없었고, 10% 黃酸溶液에서 맑은 青色으로 發色되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 0.69, 1.05에 각각 H-18, 19에 기인하는 methyl group peak가 나타났고, δ 0.92에 H-21에 기인하는 methyl group peak가 $J=7.0$ Hz의

doublet로 관찰되었다. 한편 δ 0.81, 0.86에 H-27, 29에 해당하는 methyl group peak가 $J=6.5, 7.5$ Hz의 doublet로 각각 나타났고 δ 3.54에 H-3에 해당하는 피크가 multiplet으로 관찰되었다. δ 5.29에서 H-6에 해당하는 피크가 br. s로, δ 3.84에 H-7에 해당하는 수소피크가 $J=8.0$ Hz의 doublet로 관찰되었다. ^{13}C -NMR spectrum은 δ 71.44에서 C-3의 hydroxy 피크가 관찰되었고 δ 143.47, 125.43에 double bond인 C-5, C-6의 피크가 관찰되었으며 δ 73.36에 C-7의 hydroxy 피크가 관찰되었다. Mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 430에 나타났다. 이 상의 ^1H -, ^{13}C -NMR, MS 등의 分光學的인 데이터 및 理化學的인 데이터를 종합한 결과 compound 5는 文獻에 引用된 Stigmasta-5-ene-3 β -7 β -diol (7 β -hydroxy sitosterol)로 규명하였으며 compound 5는 이 植物로부터 처음으로 分離된 化合物이다.^(19-20, 25-26)

6. Compound 6의 構造

Compound 6은 化合物 5의 立體異性体로 分광학적인 데이터 및 이화학적인 성질이 化合物 5와 매우 흡사하였다. Compound 6은 흰색 분말 상태로 UV 短波長 (254nm)에서 吸收가 없었고, 10% 黃酸溶液에서 맑은 青色으로 發色되었다. ^1H -NMR spectrum에서 δ 1.00에 H-19에 기인하는 methyl group peak가 나타났고 δ 0.93에 H-21에 기인하는 methyl group peak가 $J=6.5$ Hz의 doublet로 관찰되었다. 한편 δ 0.82, 0.84에 H-26, 27에 해당하는 methyl group peak가 각각 $J=6.5$ Hz의 doublet로 나타났고 δ 0.95에 H-29에 起因하는 methyl group peak가 $J=7.5$ Hz의 doublet로 관찰되었다. 化合物 5와는 달리 δ 5.60에서 H-6에 해당하는 피크가 double doublet $J=5.5, 1.5$ Hz로, δ 3.86에 H-7에 해당하는 수소 피크가 triplet-like하게 관찰되었고 δ 3.60에 H-8 피크가 multiplet로 관찰되었다. ^{13}C -NMR spectrum의 경우 δ 71.36에서 C-3의 hydroxy 피크가 관찰되었고 化合物 5와는 달리 δ 146.24 123.87에 double bond인

C-5, 6의 피크가 관찰되었으며 δ 65.36에 C-7의 hydroxy 피크가 관찰되었다. Mass spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 430에 나타났다. 이상의 ^1H -, ^{13}C -NMR, HMQC, MS 등의 분광학적인 데이터 및 이화학적인 데이터를 종합한 결과 compound 6은 文獻에 引用된 Stigmasta-5-ene-3 β -7 α -diol (7 α -hydroxysitosterol)로 규명하였으며 compound 6은 이 植物로부터 처음으로 分離된 化合物이다.^{(19-20), (25-26)}



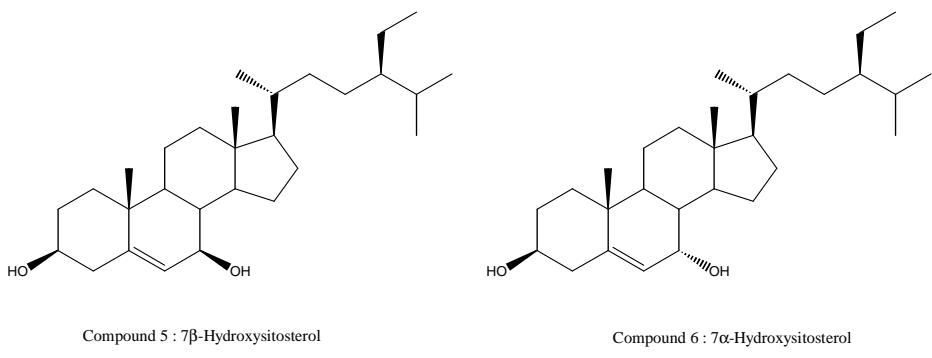


Fig. 2. Chemical structure of compounds 1–6 isolated from *S. tamariscina*

7. Compounds 1–6의 抗癌活性

권백의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대하여 인체 암세포주인 A-549(폐암), HCT15(대장암), MES-SA(난소암), SK-MEL-2(피부암), SK-OV-3(난소암) 細胞에 대한 시험관내 細胞 成長沮害效果를 SRB (sulforhodamine B)方法으로 檢索하여 본 結果 CH₂Cl₂의 分획이 5종의 인체 암세포주에 대하여 각각의 IC₅₀ 값이 17.0 μ g/mL, 7.8 μ g/mL, 15.8 μ g/mL, 12.8 μ g/mL, 8.9 μ g/mL로 나타나 권백의 CH₂Cl₂ 분획이 가장 우수한 cytotoxic activity를 나타냈다(Table 1). 이들 분획에 대한 活性-指向 精製를 실시하여 6개의 화합물을 순수하게 分離하였고 이들 化合物에 대한 항암활성을 檢索한 結果 Table 2에 나타내고 있는 것과 같이 compound 1은 항암활성이 없는 것으로 나타났고 compounds 2–5는 良性對照藥物로 사용한 doxorubicin 과 비슷한 약효를 나타냈다. 흥미로운 사실은 compound 5와 6은 C-7 위치의 수산기의 配置의 차이가 있을 뿐인데 7β -Hydroxysitosterol인 compound 5는 優秀한 活性을 나타낸 반면 7α -Hydroxysitosterol인 compound 6은 活性이 현저히 低下된 것으로 나타나 이들 化合物

에 있어 C-7 위치의 수산기의 空間配置가 活性發現에 있어 重要한 역할을 하는 것으로 판단된다.

Table 1. Antitumor activity of various extracts of *S. tamariscina*

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)				
	A-549	HCT-15	MES-SA	SK-MEL-2	SK-OV-3
MeOH	27.8	21.8	22.8	22.6	16.9
MC	17.0	7.8	15.8	12.8	8.9
EtOAc	19.0	18.2	16.3	7.8	9.2
BuOH	>100	>100	>100	77.1	80.7
H ₂ O	>100	>100	>100	>100	>100

Table 2. Antitumor activity of compounds 1-6 isolated from *S. tamariscina*

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)				
	A-549	HCT-15	MES-SA	SK-MEL-2	SK-OV-3
1(D-2-223)	>100	>100	>100	>100	>100
2(D-4-2331)	*4.71	3.77	4.55	3.76	5.12
3(D-9-422)	8.70	7.44	6.80	4.22	8.88
4(D-11-22211)	5.43	2.72	2.37	3.15	4.50
5(D-11-22212)	8.67	5.97	6.29	3.68	5.80
6(D-12-2313)	83.4	73.57	96.10	14.55	>100
Doxorubicin	0.14	0.73	0.08	0.21	0.29

IV. 結 論

권백(*Selaginella tamariscina* Spring)은 부처손과(Selaginellaceae)에 속하는 多年生草本으로서 우리나라 全國 각 지방에서 自生하고 日本, 中國 등지에서도 자라며 成分으로는 數種의 biflavanoid에 대한 研究가 알려져 있다. 天然物로부터 항암活性을 지닌 物質을 分離精製하고 優秀한 항암先導物質을 導出하기 위하여 數種의 MeOH 抽出物에 대한 항암活性을 檢索한 결과 권백의 CH₂Cl₂ 分割物이 強力한 항암活性을 나타냄을 觀察하고 이 植物에 대한 活性成分의 分離, 精製를 실시하였다. 권백의 CH₂Cl₂ 分割에 대해 Silica gel, Sephadex LH-20, LiChroprep RP-18을 利用한 activity-oriented purification procedure를 실시하여 6개의 化合物을 分離하였다. 分離된 化合物은 分光學的 分析方法과 化學的 機器分析, 文獻과의 比較를 토대로 하여 그 化學構造를 確認, 動靜할 수 있었다. 이 化合物들은 4a, 5a - 4, 14-dimethylcholest-8-en-3-one(1), ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one(2), ergosterol endoperoxide(3), cholest-5-ene-3,7-diol(7β-hydroxycholesterol)(4), stigmasta-5-ene-3β-7β-diol(7β-hydroxysitosterol)(5), stigmasta-5-ene-3β-7α-diol(7α-hydroxysitosterol)(6)로 각각 確認 動靜하였다. 이 化合物들은 모두 권백에서 처음으로 分離, 報告되는 化合物이다. 分離된 化合物에 대한 항암활성을 檢索한 結果 化合物 1은 活性이 없었으며 化合物 2-6은 良性對照藥物로 使用한 doxorubicin과 비슷한 藥效를 나타냈다. 흥미로운 사실은 compound 5와 6은 C-7 位置의 수산기의 配置의 차이가 있을 뿐인데 7β-Hydroxysitosterol인 compound 5는 優秀한 活性을 나타낸 반면 7α-Hydroxysitosterol인 compound 6은 活性이 현저히 低下된 것으로 나타나 이를 化合物에 있어 C-7 位置의 수산기의 空

間配置가 活性發現에 있어 重要한 役割을 하는 것으로 判斷된다. 권
백의 CH₂Cl₂ 分割으로부터 活性-指向 分割에 의해 얻어진 5개의 化
合物들은 뛰어난 細胞毒性을 나타내고 있으므로 抗癌製 開發에 있어
서 候補物質로 開發될 수 있을 것으로 사료되어 더 많은 研究가 進
行되어야 할 것으로 判斷된다.

V. 參 考 文 獻

- 1) Shigemori, H., and Kobayashi, J. Biological activity and chemistry of taxoids from japanese yew, *Taxus cuspidata*. *J. Nat. Prod.*, 67, 245–256 (2004).
- 2) Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. C., and Mcphail, A. T. Plant Antitumor Agents. VI. The isolation and stucture of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325–2327 (1971).
- 3) Mukhopadhyay, S., Sayed, A. E., Handy, G. A., and Cordell, G. A. Catharanthus alkaloids XXXVII. 16-EPI-Z-isositsirikine, a monomeric indole alkaloid with antineoplastic activity from *Catharanthus roseus* and *Rhazya stricta*. *J. Nat. Prod.*, 46, 409–413 (1983).
- 4) Sayed, A. E., Handy, G. A., and Cordell, G. A. Catharanthus alkaloids, XXXVIII. Confirming structural evidence and antineoplastic activity of the bisindole alkaloids leurosine-N^b-oxide(pleurosine), roseadine and vindolicine from *Catharanthus roseus*. *J. Nat. Prod.*, 46, 517–527 (1983).
- 5) Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmer, K. H., Mcphail, H. T., and Sim, G. A. Plant antitumor agents I . The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 3888–3890 (1966).
- 6) William, O. F., Cancer chemotherapeutic agents, ACS: USA, p. 239–260 (1995).
- 7) Kim, H. R., Shim, M. J., Kim, J. W., Kim, H. W., Lee, C. O., Chung, K. S., Shim, M. J., and Kim, B. K. Studies on constituents of the higher fungi of Korea XXXVII, antitumor components of *Armillariella mella*. *Kor. J. Mycol.*, 11, 151–157 (1983).
- 8) Suzuki, I., Itanti, T., Ohno, N., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T., and Yadomae, T. Antitumor activity of a polysaccharide fraction extracted from cultured fruiting bodies of *Grifola frondosa*. *J. Pharm. Dyn.*, 7, 492–500 (1984).

- 9) Ohno, N., Shinohara, H., and Yadomae, T. Physicochemical properties and immunomodulating activities of hot water extract from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 5071–5078 (1986).
- 10) Judith, G. G., Paul, W. K., and Steven, B. M. Interleukin-I mediated induction of k-light chain synthesis and surface immunoglobuline expression on pre B cells. *J. Immunol.*, 132, 223–230 (1984).
- 11) 이창복. 『대한식물도감』, 鄕文社:서울, p. 5 (1993).
- 12) 배기환. 『원색도감 · 한국의 자연시리즈 13 한국의 약용식물』, 교학사: 서울, p. 14 (2000).
- 13) 김태정. 『韓國의 資源植物 V』, 서울대학교출판부, p. 281 (1996).
- 14) 박종희. 『한약백과도감 (하)』, 신일상사: 서울, p. 99 (2002).
- 15) 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).
- 16) Paryzek, Z., and Martynow, J. Tetracyclic triterpenes. Part 16. Synthesis of 31-norcucurbitane and fusidane derivatives in the skeletal rearrangements of 9,11-epoxy-4 β -demethyl-5 α -lanostanes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2, 201–207 (1996).
- 17) Das, B., and Srinivas, K. V. N. S. Dihydroxysterols from the marine red alga, *Gracilaria edulis*. *Phytochemistry*, 31(12), 4371–4373 (1992).
- 18) Akihisa, T., Hayashi, Y., Patterson, G. W., Shimizu, N., and Tamura, T. 4 α -Methylvernosterol and other sterols from *Vernonia anthelmintica* seeds. *Phytochemistry*, 31 (5), 1759–1763 (1992).
- 19) Mahato, S. B., Nandy, A. K., and Roy, G. Triterpenoids. *Phytochemistry*, 31 (7), 2199–2249 (1992).
- 20) Mahato, S. B., and Kundu, A. P. C-NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*,

- 37 (6), 1517–1575 (1994).
- 21) Kwon, H. C., Zee, S. D., Cho, S. Y., Choi, S. U., and Lee, K. R. Cytotoxic ergosterols from paecilomyces sp. J300. *Arch Pharm Res*, 25 (6), 851–855 (2002).
- 22) Das, B., and Srinivas, K. V. N. S. Minor C₂₉-steroids from the marine red alga, *Gracilaria edulis*. *Phytochemistry*, 31 (7), 2427–2429 (1992).
- 23) Notaro, G., Piccialli, V., and Sica, D. New steroid hydroxyketones and closely related diols from the marine sponge *Cliona copiosa*. *J. Nat Prod.*, 55 (11), 1588–1594 (1992).
- 24) Fukuyama, Y., Nakano, Y., Wu, G. P., Rui, W., Sumitomo, J., Jinxian, B., and Nakagawa. In vitro fibrinolytic phytosterols isolated from the roots of *Spatholobus suberetus*. *Planta med*, 34–36 (1988).
- 25) Reisch, J., and Cramer, M. 7β-Hydroxycholesterol, eine ubiquitäre Signalsubstanz im thymusgewebe. *Pharmazie*, 49, 75–76 (1994).
- 26) Das, B., Venkateswarlu, Y., Srinivas, K. V. N. S., and Rama Rao, A. V. 5α-Poriferast-9(11)-en-3β-ol from the marine red alga, *Gracilaria edulis*. *Phytochemistry*, 31 (3), 1054–1055 (1992).

APPENDIX

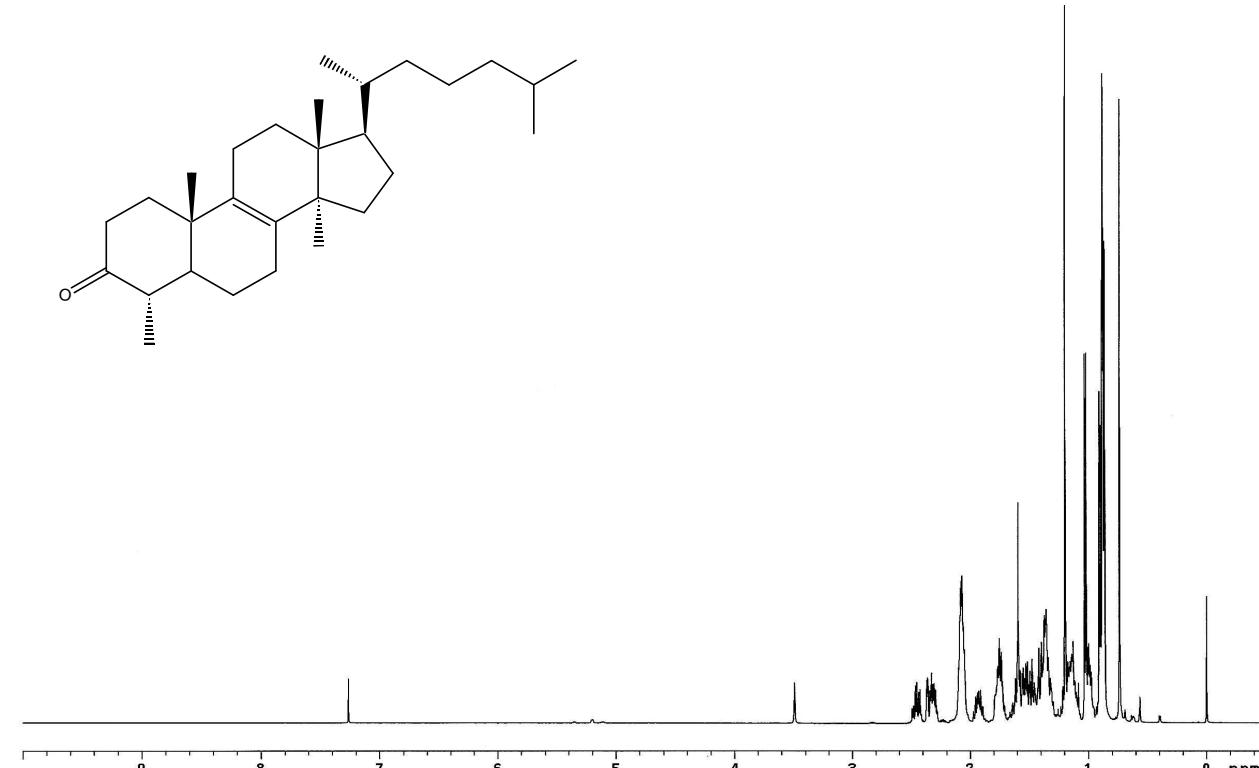


Fig 3. ^1H -NMR spectrum of compound 1 (500 MHz, CDCl_3)

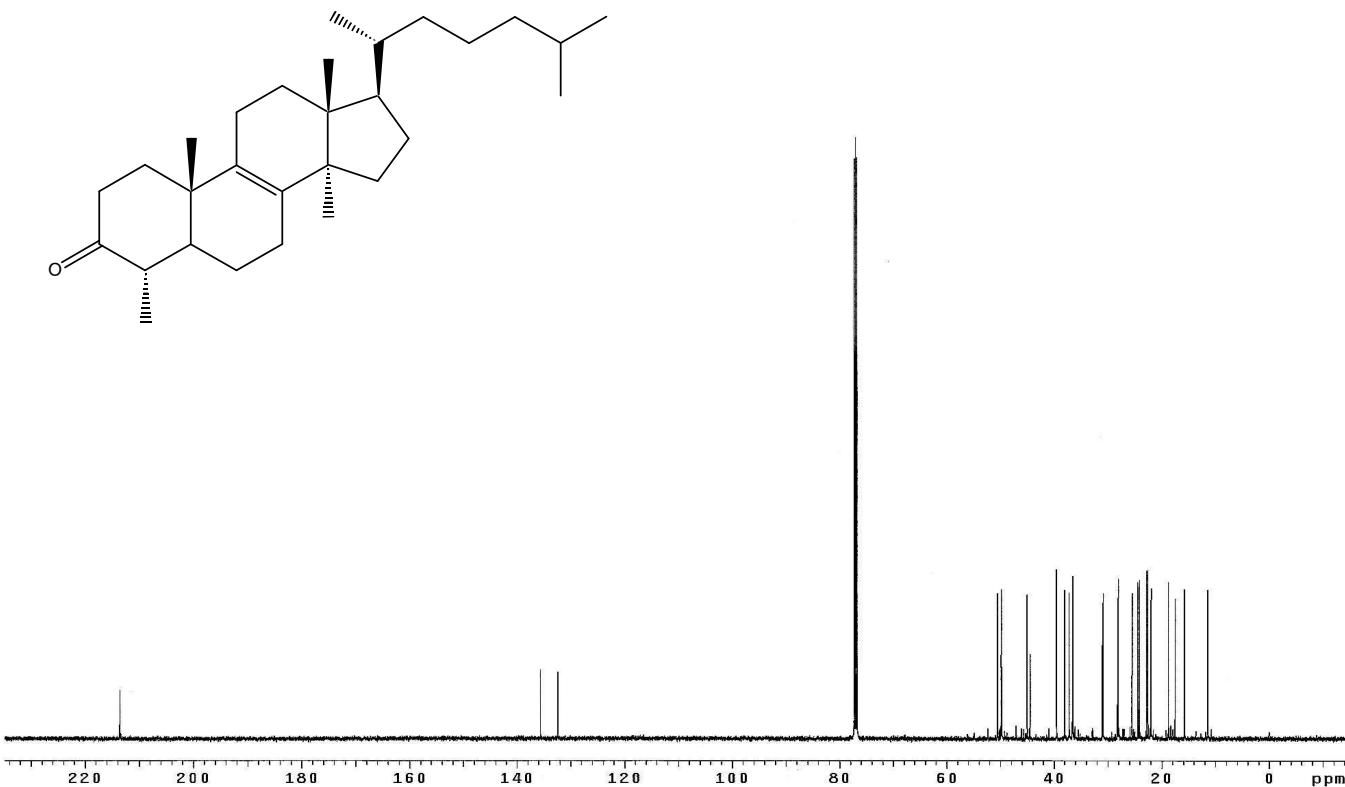


Fig.4. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (125 MHz, CDCl_3)

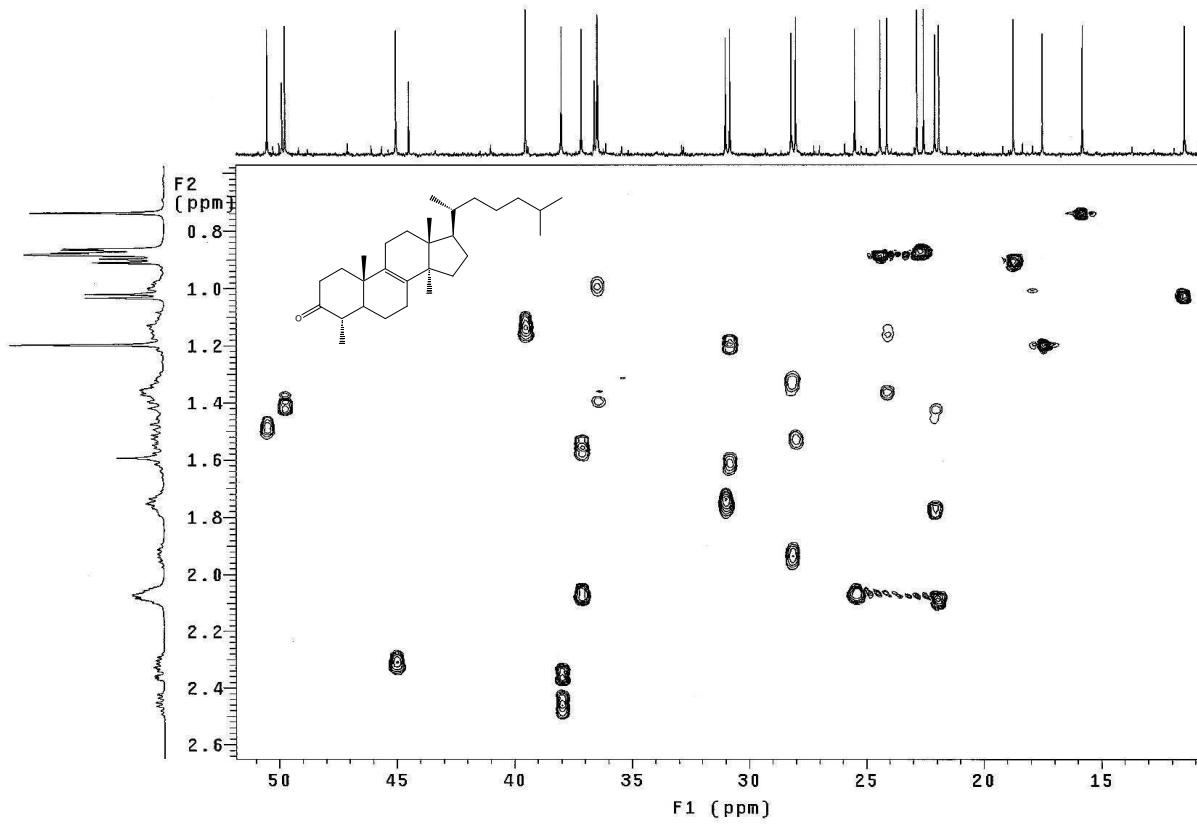


Fig.5. HSQC spectrum of compound 1

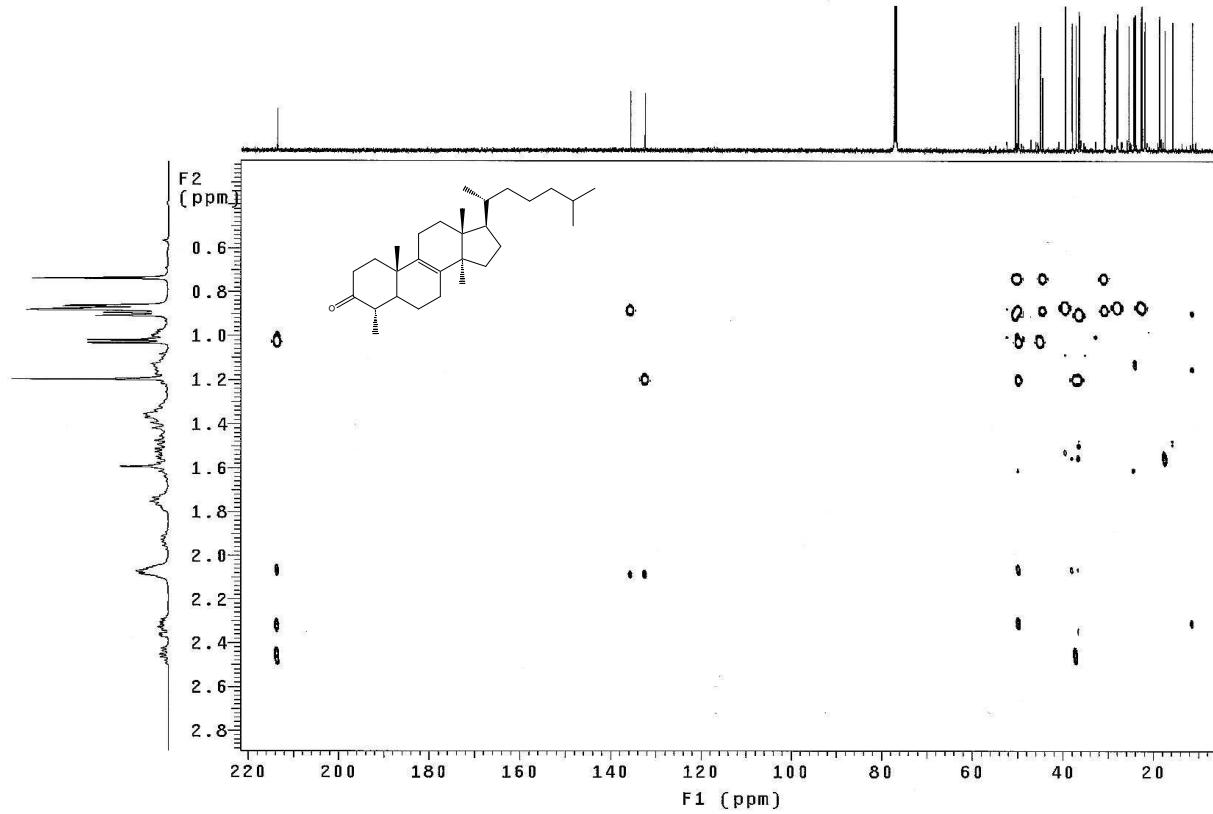


Fig.6. HMBC spectrum of compound 1

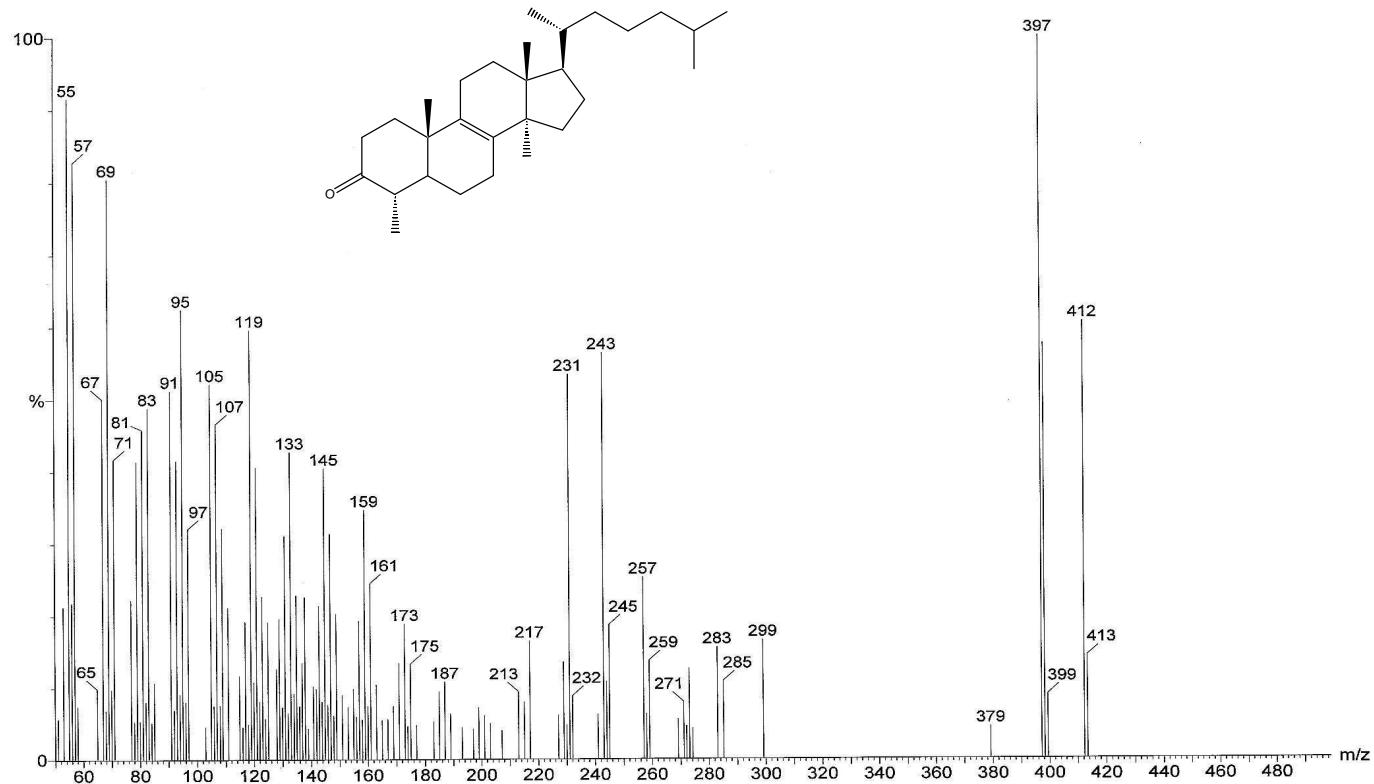


Fig.7. EI-Mass spectrum of compound 1

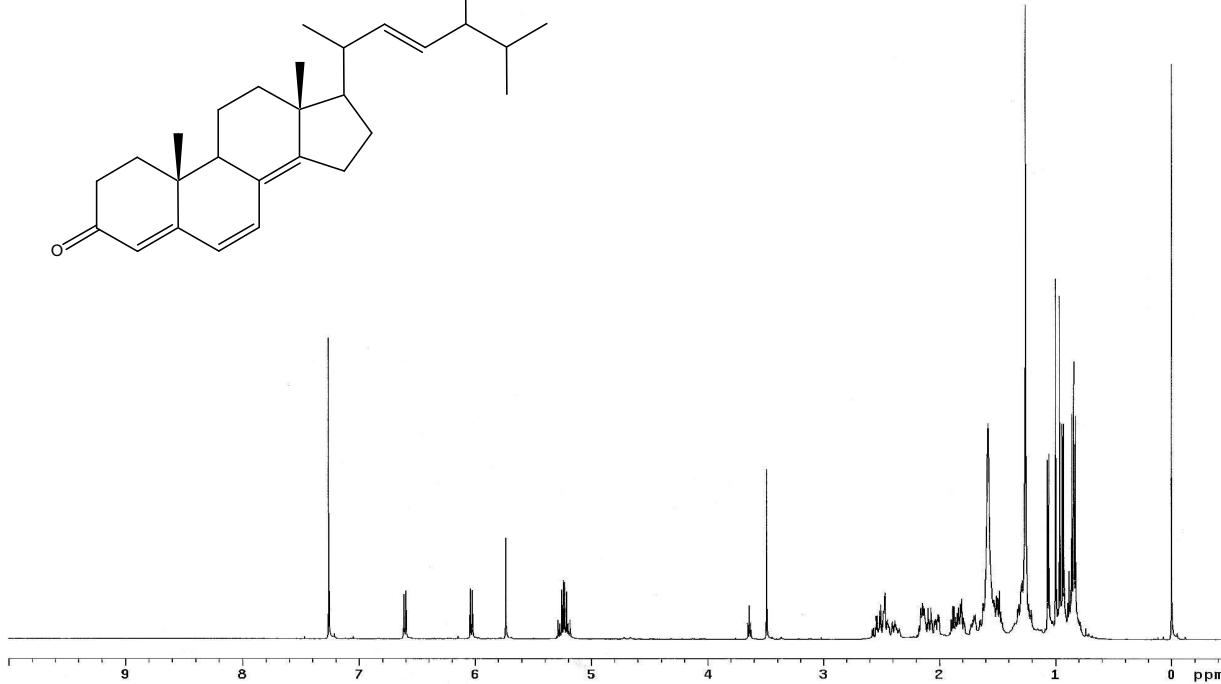
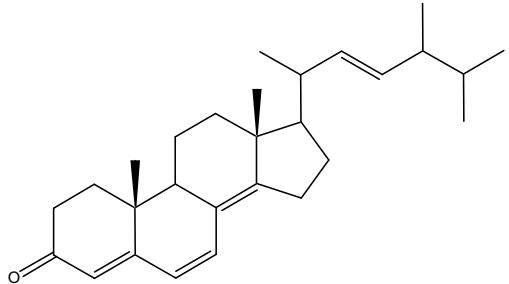
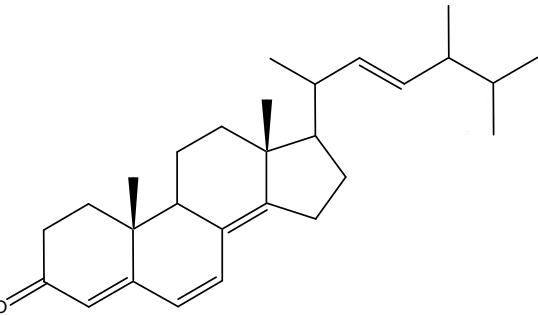


Fig.8. ^1H -NMR spectrum of compound 2 (500 MHz, CDCl_3)



- 39 -

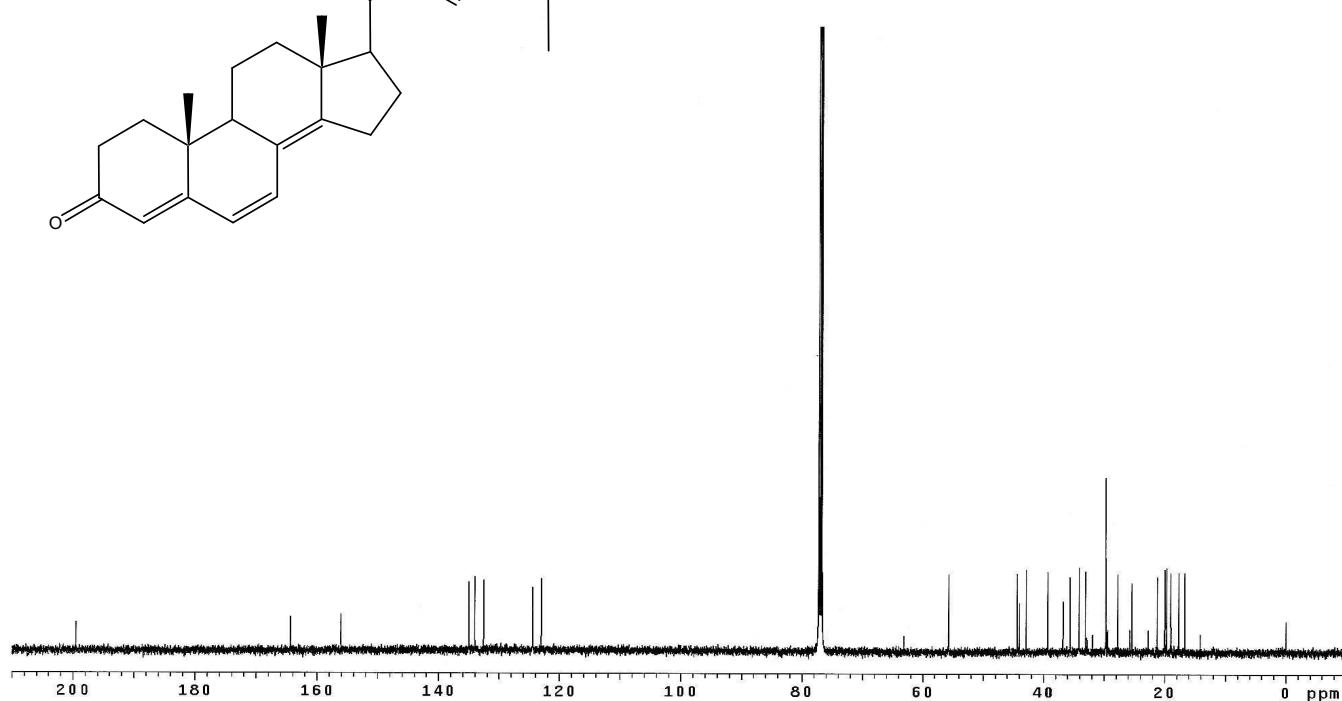


Fig.9. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (125 MHz, CDCl_3)

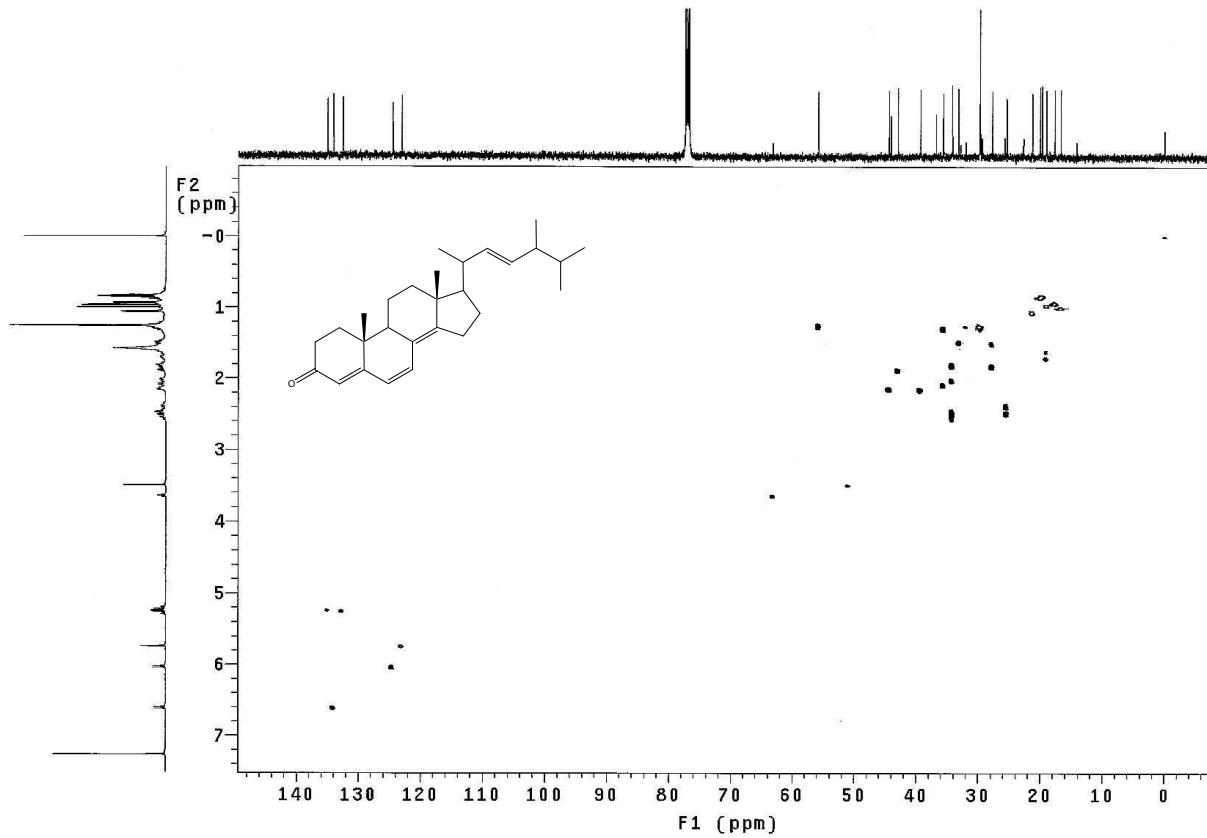


Fig.10. HSQC spectrum of compound 2

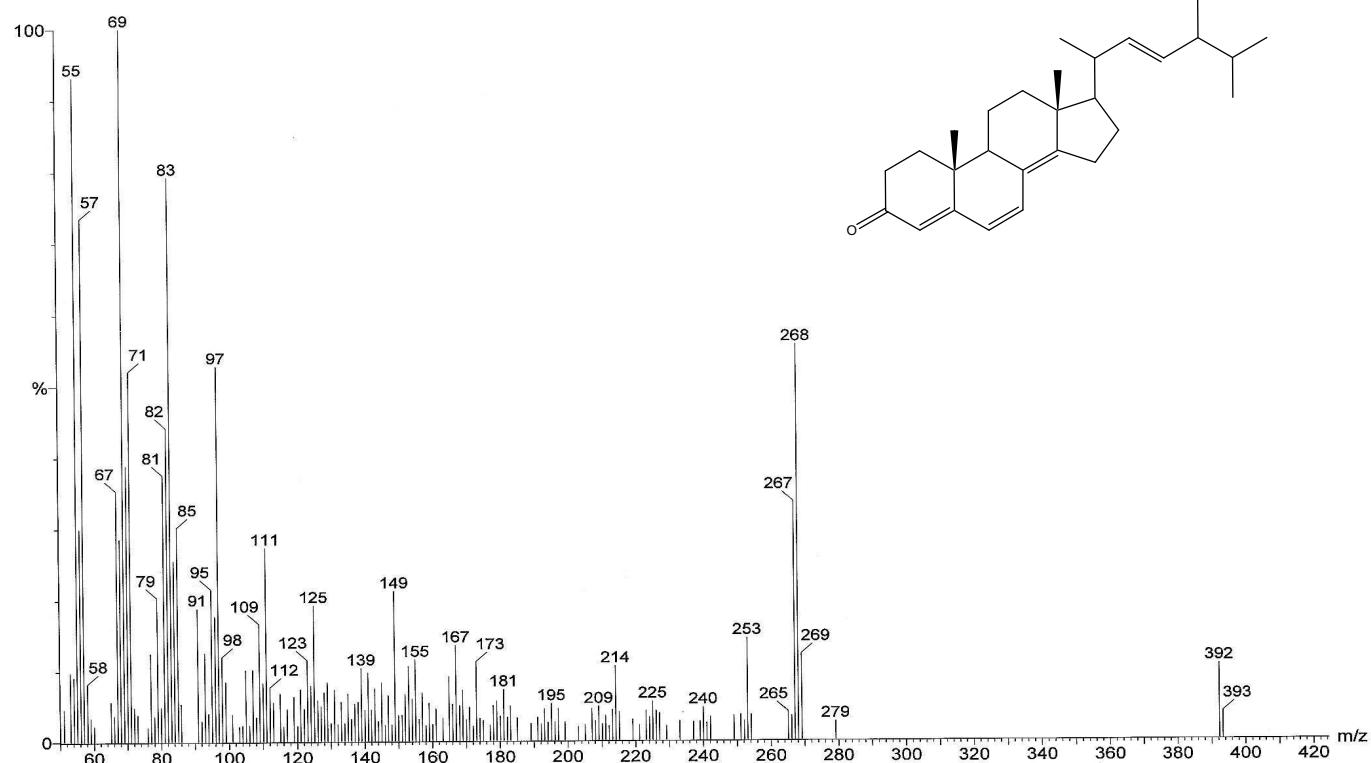


Fig.11. El-Mass spectrum of compound 2

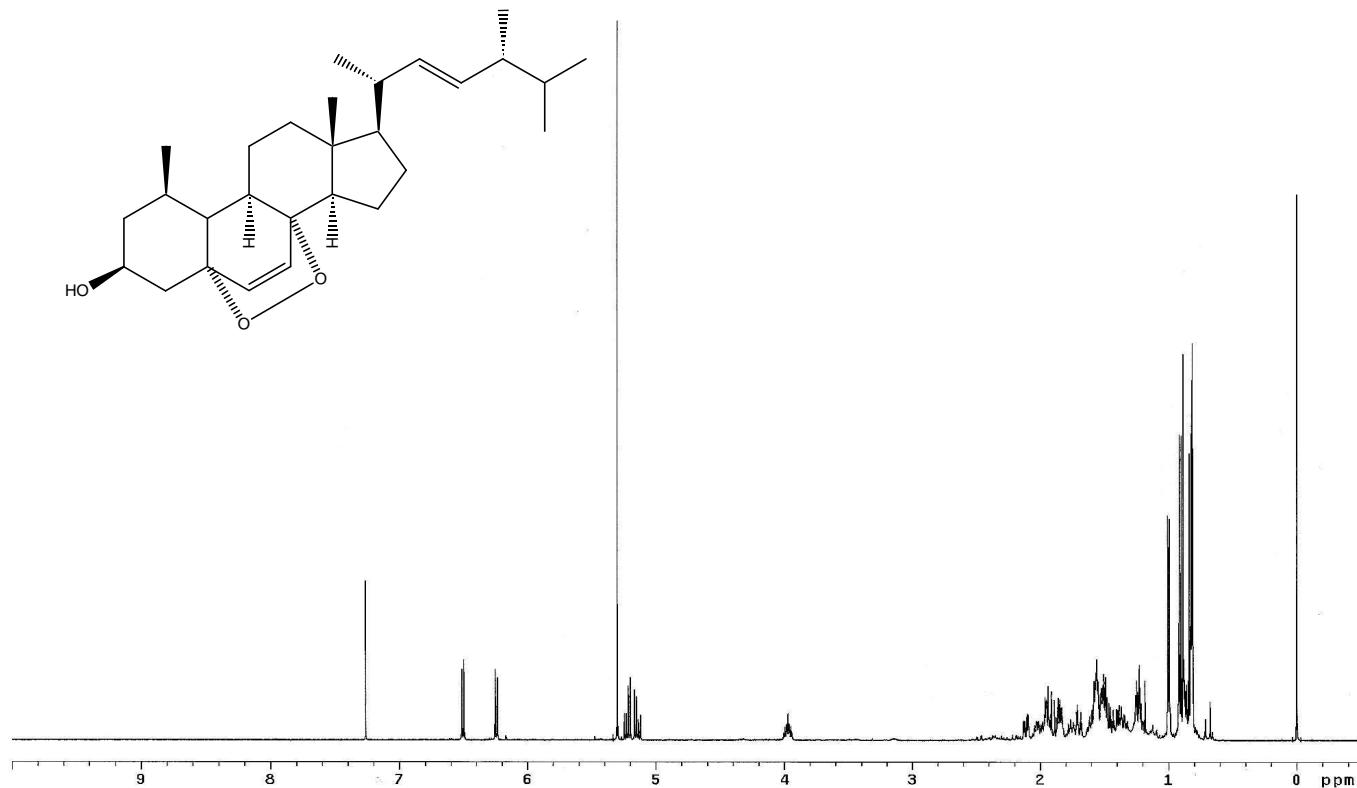


Fig.12. ^1H -NMR spectrum of compound 3 (500 MHz, CDCl_3)

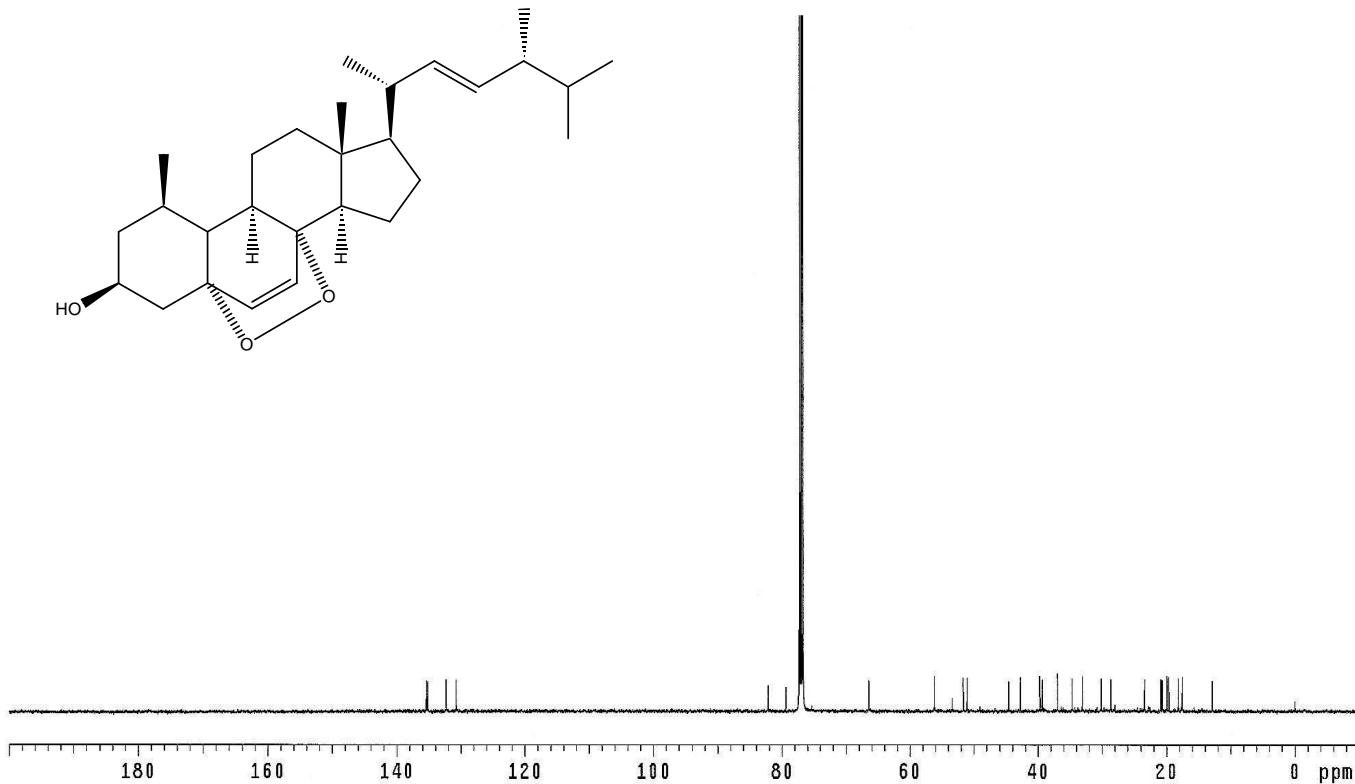


Fig.13. ^{13}C -NMR spectrum of compound 3 (125 MHz, CDCl₃)

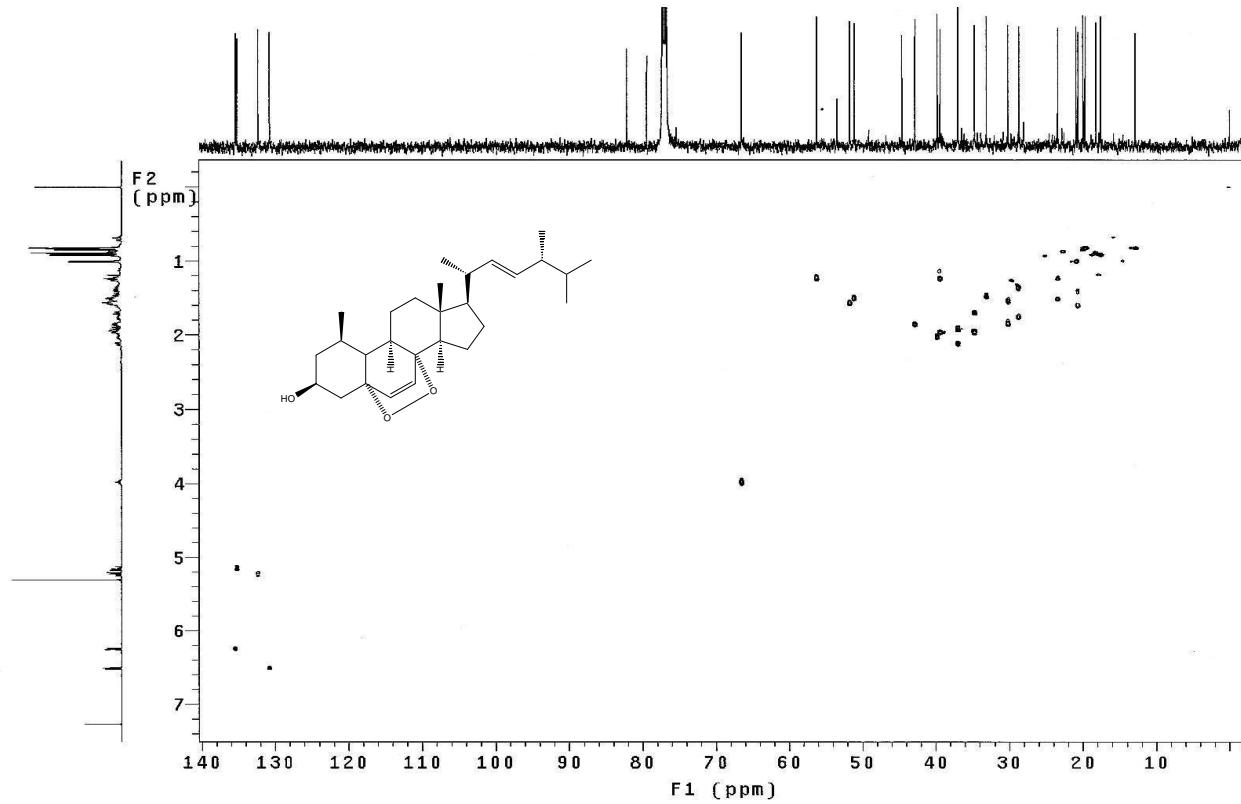


Fig.14. HSQC-1 spectrum of compound 3

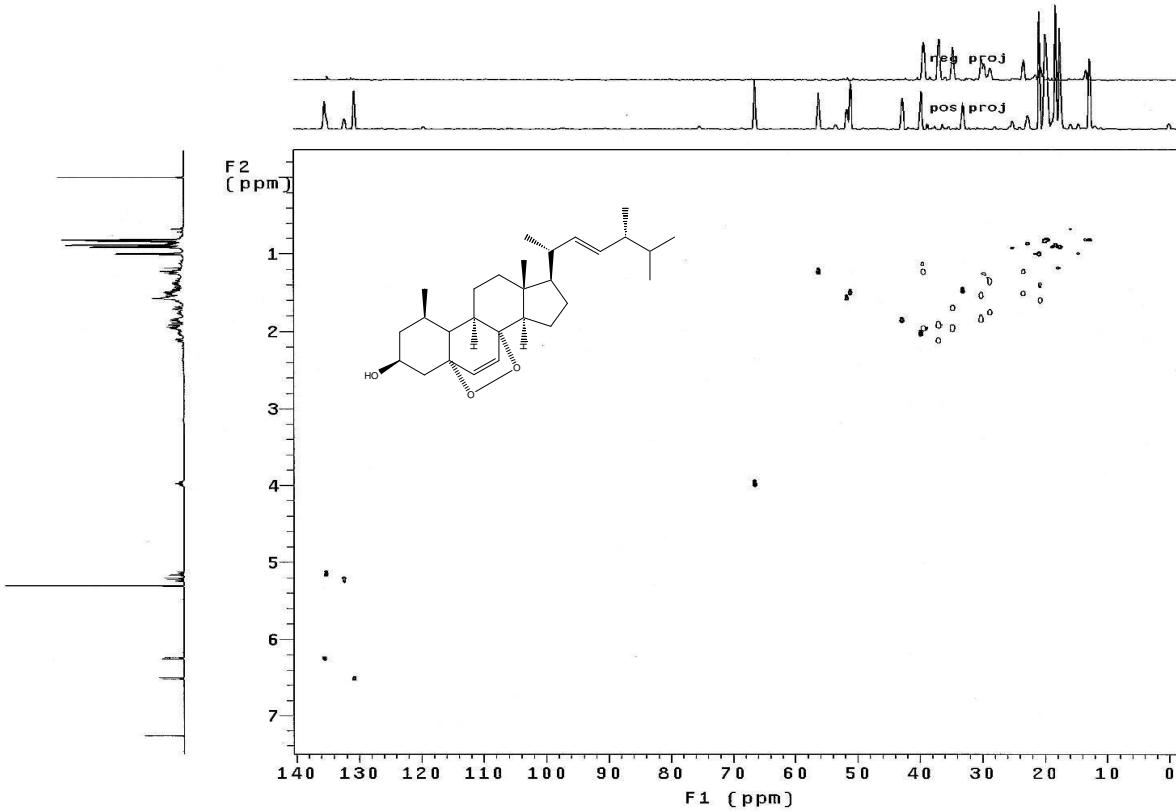


Fig.15. HSQC-2 spectrum of compound 3

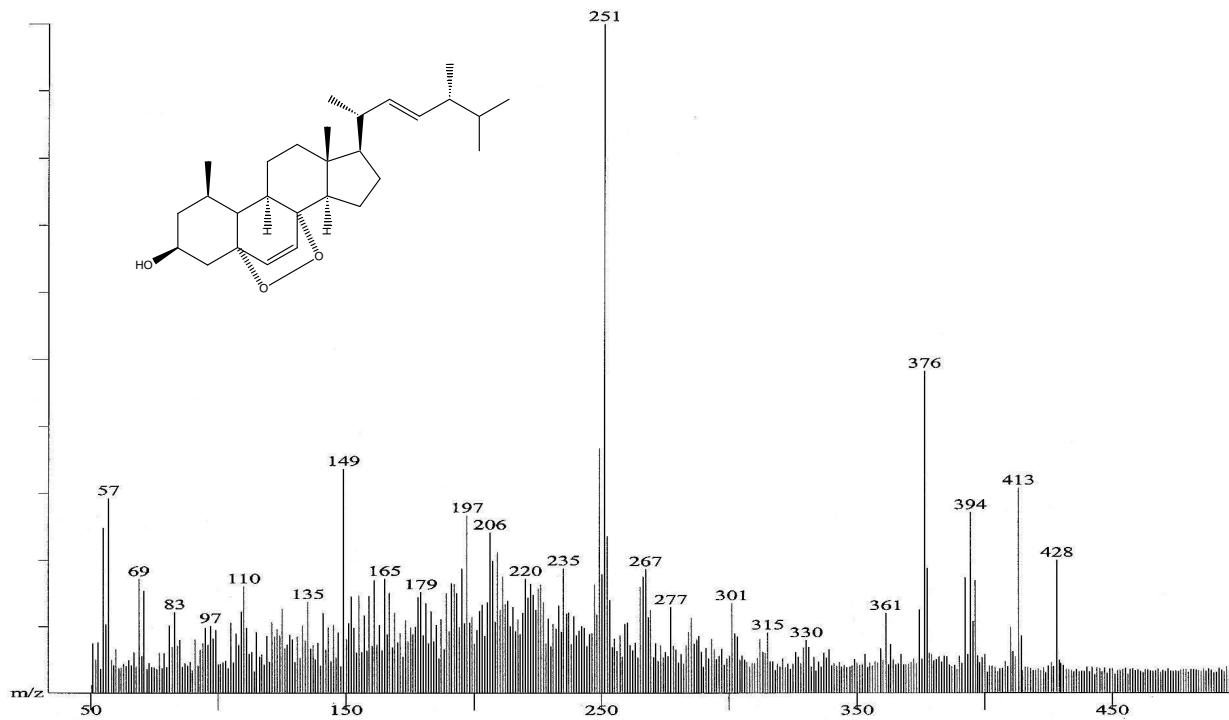


Fig.16. El-Mass spectrum of compound 3

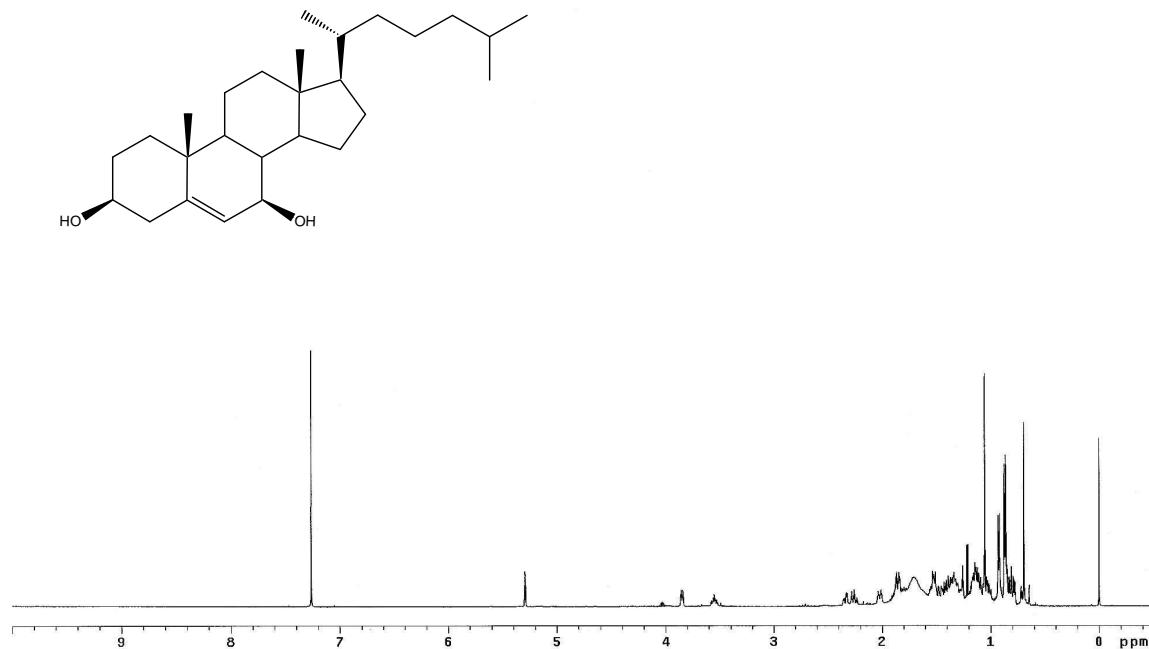


Fig.17. ¹H-NMR spectrum of compound 4 (500 MHz, CDCl₃)

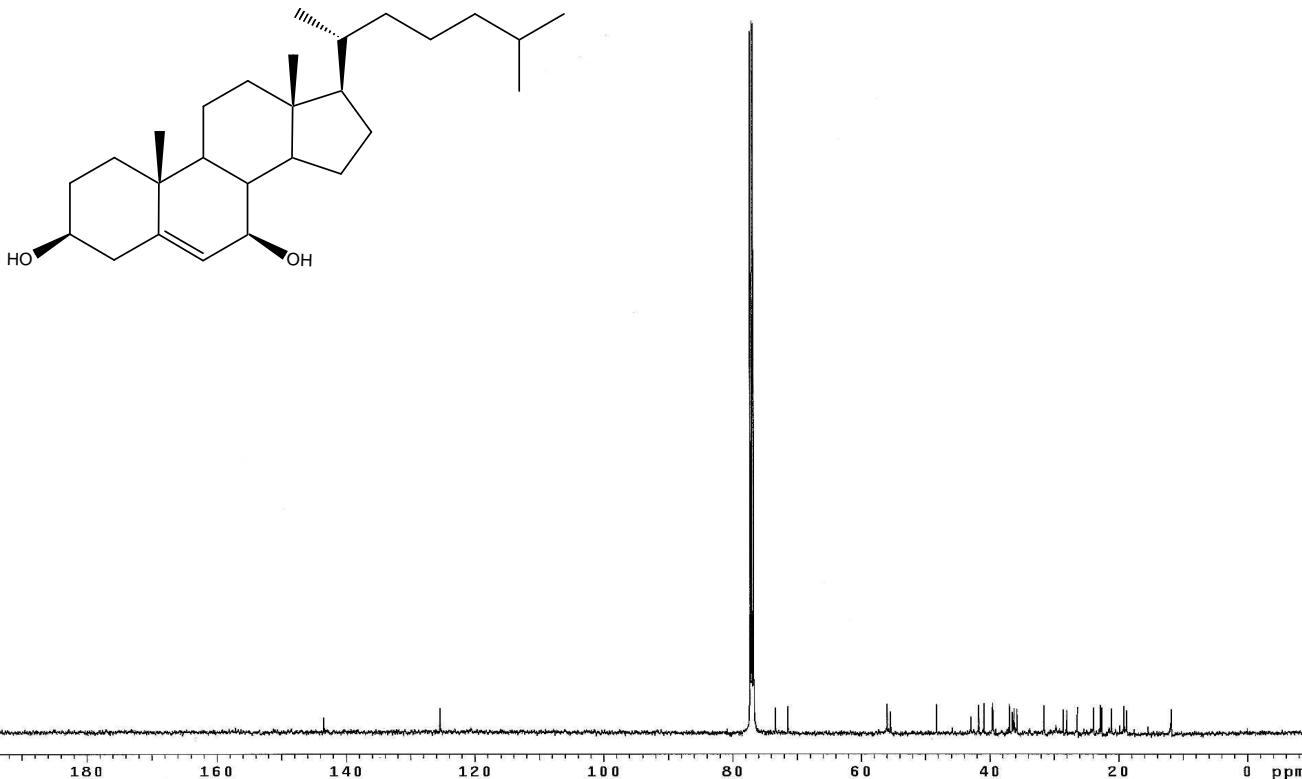


Fig.18. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (125 MHz, CDCl_3)

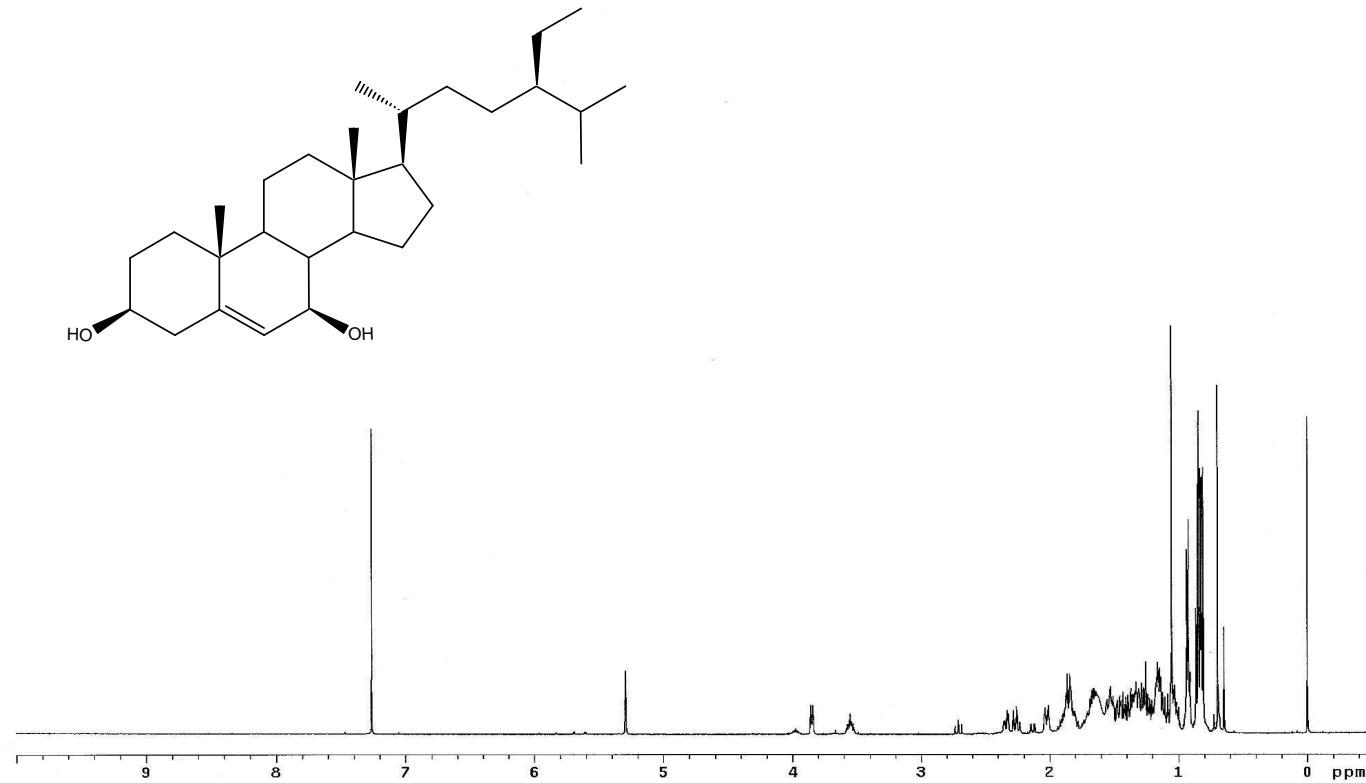


Fig.19. ^1H -NMR spectrum of compound 5 (500 MHz, CDCl_3)

- 05 -

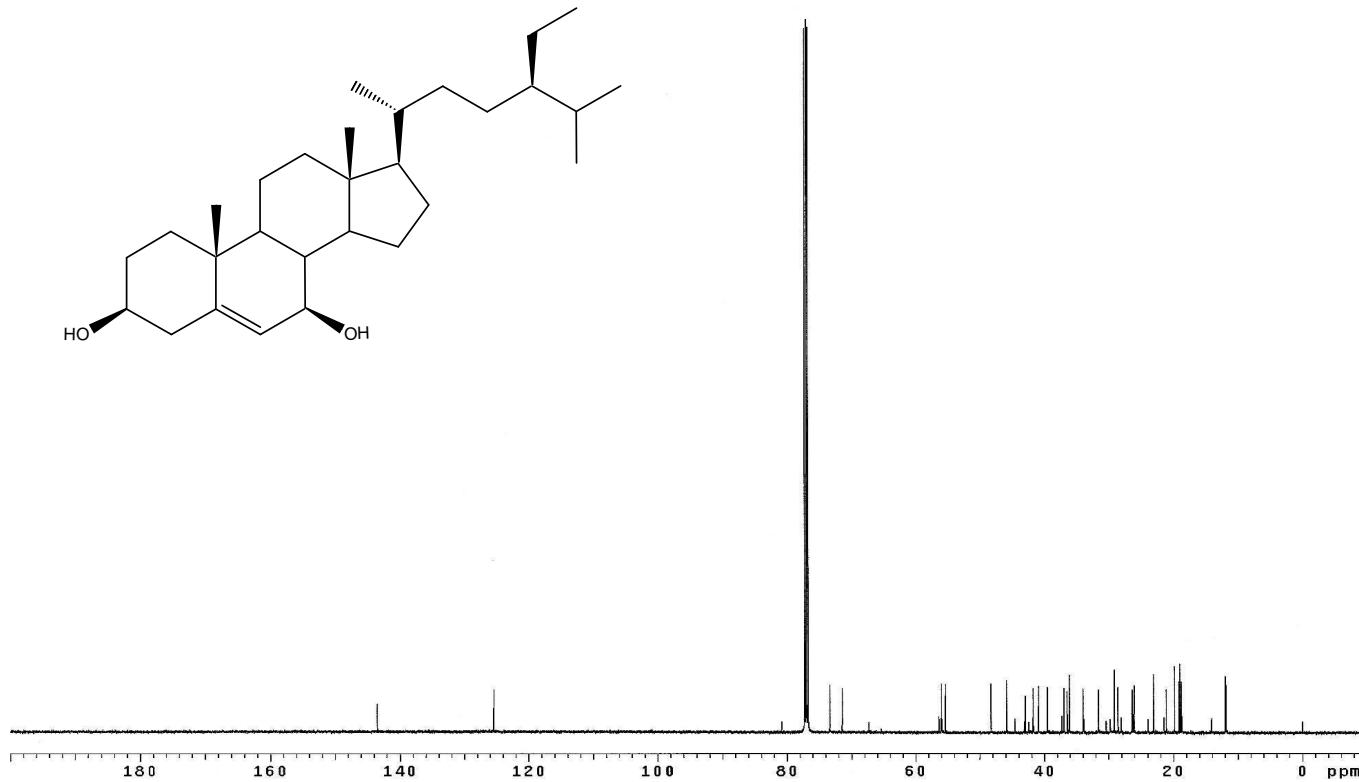


Fig.20. ^{13}C -NMR spectrum of compound 5 (125 MHz, CDCl₃)

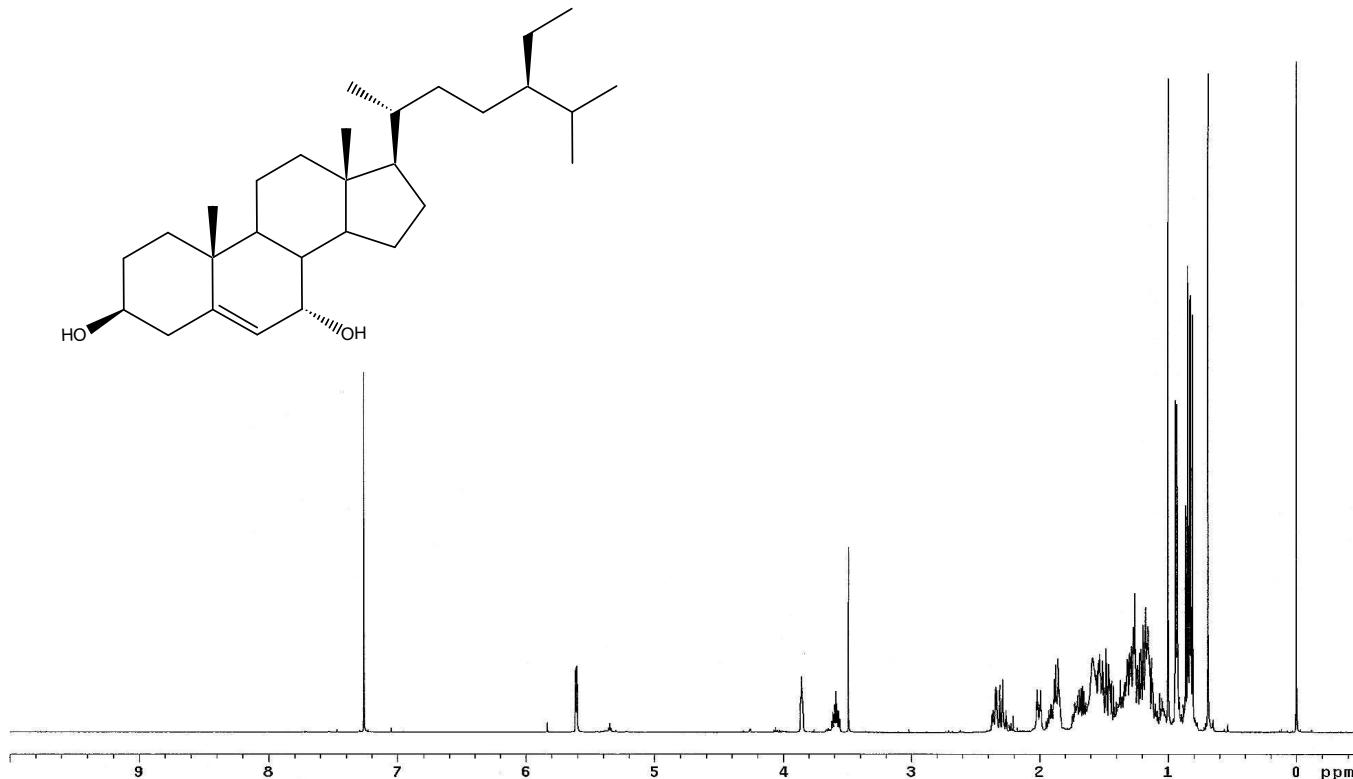


Fig.21. ^1H -NMR spectrum of compound 6 (500 MHz, CDCl_3)



Fig.22. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6 (125 MHz, CDCl₃)

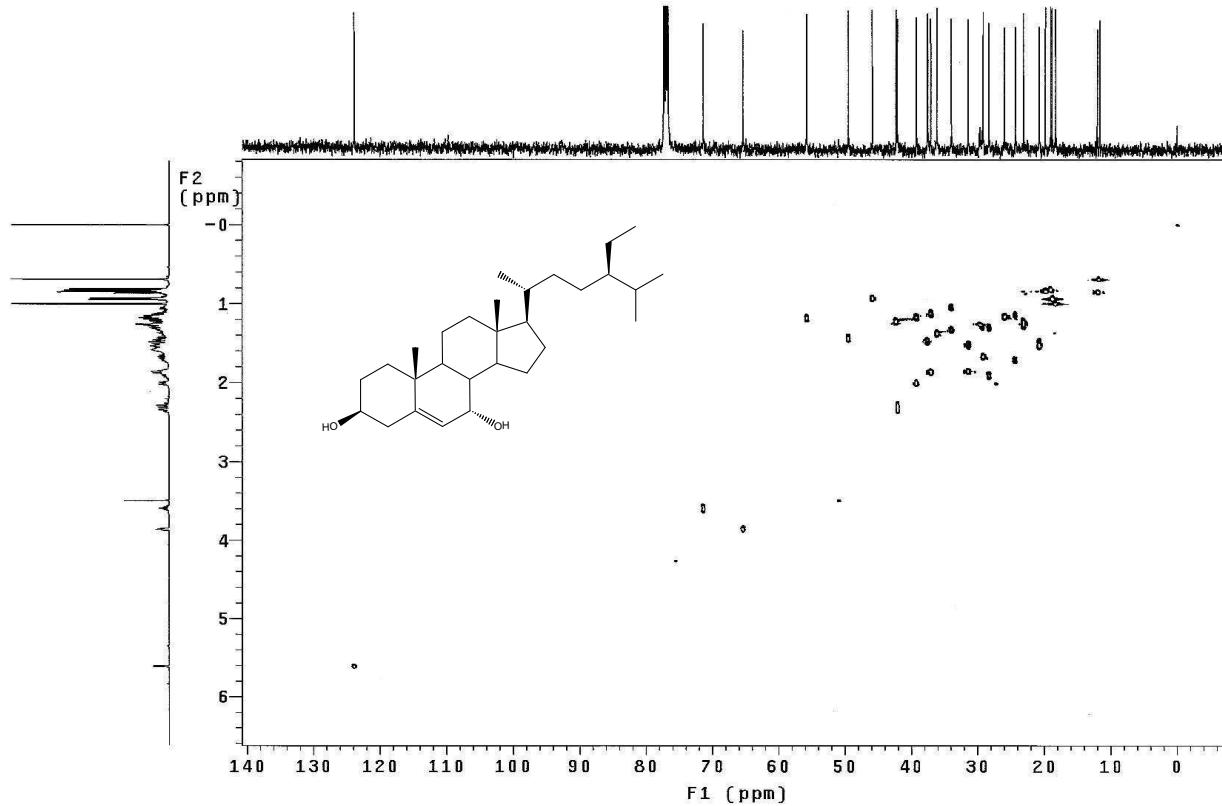


Fig.23. HSQC spectrum of compound 6

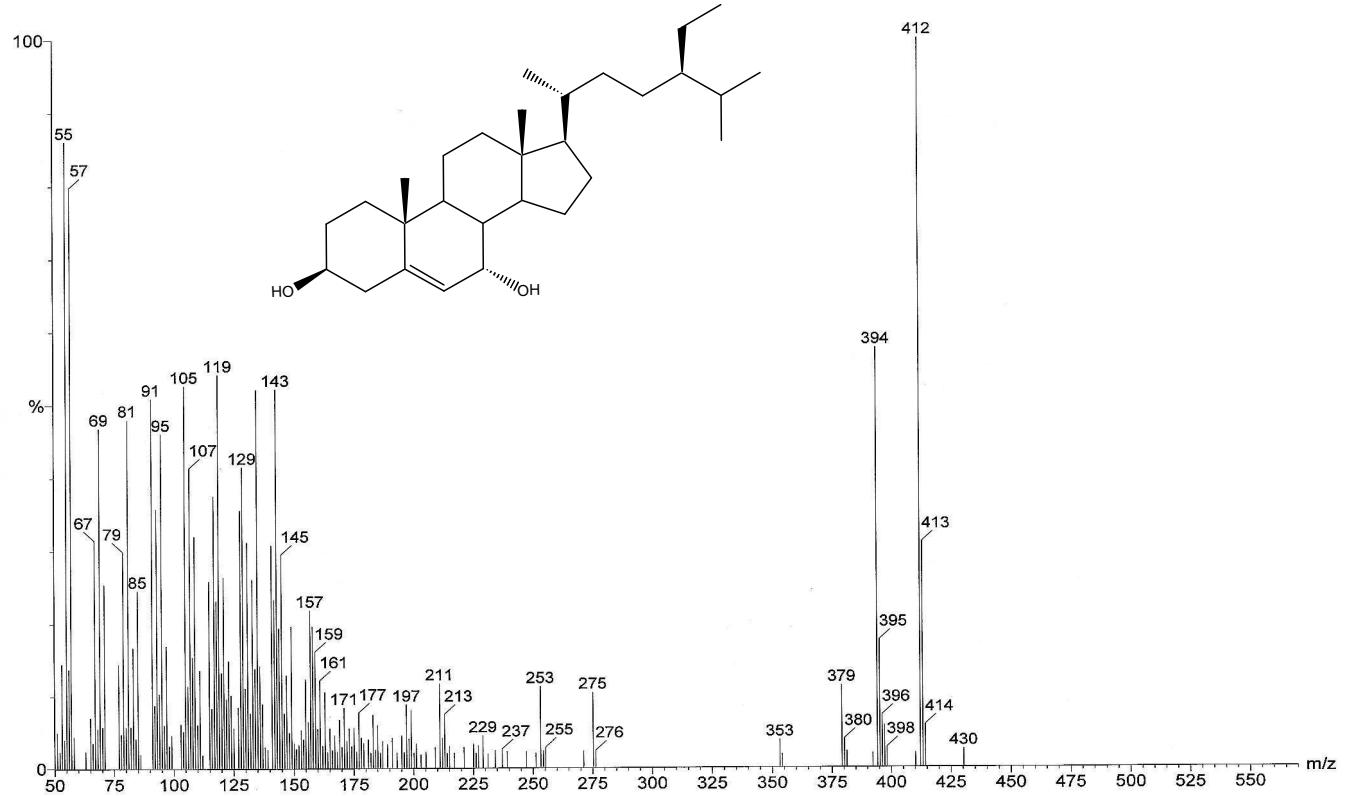


Fig.24. El-Mass spectrum of compound 6