



2007년 8월

### 석사학위 논문

# 익모초(*Leonurus sibiricus* L.)의 새로운 labdane diterpenoids 분리 및 구조 규명

# 조 선 대 학 교 대 학 원



문 현 택

# 익모초(*Leonurus sibiricus* L.)의 새로운 labdane diterpenoids 분리 및 구조 규명

Isolation and structure determination of new labdane diterpenoids from *Leonurus sibiricus* L.

2007년 8월 24일

조선대학교 대학원 약 학 과 문 현 택

# 익모초(*Leonurus sibiricus* L.)의 새로운 labdane diterpenoids 분리 및 구조 규명 지도교수 우 은 란 이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함 2007년 4월

조 선 대 학 교 대 학 원

약 학 과

문 현 택

## 문현택의 석사학위 논문을 인준함

## 위원장 조선대학교 교수 유 진 철 (인)

### 위 원 조선대학교 교수 홍 준 희 (인)

## 위 원 조선대학교 교수 우 은 란 (인)

## 2007년 5월

## 조 선 대 학 교 대 학 원

## Contents

ContentsI
List of SchemesIII
List of TablesIV
List of FiguresV
Abstract

<b>I.서</b> 론····································
비.실 험
1. 실험재료
2. 시약 및 기기
2-1. 시약3
2–2. ارار
3. 화합물의 분리
3-1. 추출 및 분획5
3-2. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 분획으로부터 compound의 분리
3-2-1. Compound 1, 2의 분리6
3-2-2. Compound 3의 분리
3-2-3. Compound 4의 분리7
3-2-4. Compound 5, 6의 분리8
4. 생리활성
4-1. NBT superoxide scavenging assay11

4-2. Cytotoxic activity assay
4-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인
Ⅲ. 결과 및 고찰
1. Compound 1, 2의 구조16
2. Compound 3의 구조18
3. Compound 4의 구조19
4. Compound 5의 구조20
5. Compound 6의 구조
6. 생리활성 결과
6-1. NBT superoxide scavenging assay24
6-2. Cytotoxic activity assay
6-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인
<b>Ⅳ.</b> 결 론
V. 참고 문 현 ··································
APPENDIX

## List of Schemes

Scheme	Ι.	Extraction and fractionation of MeOH extract from
		Leonurus sibiricus L5
Scheme	11.	Fractionation of the $CH_2CI_2$ extract from
		Leonurus sibiricus L6
Scheme	III .	Isolation of compounds 1-6 from $CH_2CI_2$ extract of
		Leonurus sibiricus L

## List of Tables

Table 1.	<sup>1</sup> H-NMR spectral data of compounds 1-6 from
	Leonurus sibiricus L14
Table 2.	<sup>13</sup> C-NMR spectral data of compounds 1-6 from
	Leonurus sibiricus L15

## List of Figures

Fig.	1.	Structures of compounds 1-6 isolated from
		Leonurus sibiricus L10
Fig.	2.	Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of
		compound 125
Fig.	3.	Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of
		compound 225
Fig.	4.	Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of
		compound 3 ·····26
Fig.	5.	Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of
		compound 4
Fig.	6.	Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of
		compound 527
Fig.	7.	Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of
		compound 627
Fig.	8.	Selected <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C long-range correlations
		in HMBC spectrum of compound 1/228
Fig.	9.	Selected <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C long-range correlations
		in HMBC spectrum of compound 328
Fig.	10.	Selected <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C long-range correlations
		in HMBC spectrum of compound 429
Fig.	11.	Selected <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C long-range correlations
		in HMBC spectrum of compound 529
Fig.	12.	Selected <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C long-range correlations
		in HMBC spectrum of compound 6
Fig.	13.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 1/2 (500 MHz, CDCl_3) $\cdots\cdots\cdots$ 35
Fig.	14.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 1/2 (125 MHz, CDCI_3) $\cdots\cdots\cdots\cdots36$

Fig. 15.	HR-EI-Mass spectrum of compound 1/2
Fig. 16.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 3 (500 MHz, CDCl_3)38
Fig. 17.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 3 (125 MHz, CDCl_3) $\cdots\cdots\cdots\cdots39$
Fig. 18.	HR-FAB-Mass spectrum of compound 340
Fig. 19.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 4 (500 MHz, CDCl_3)41
Fig. 20.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 4 (125 MHz, CDCl_3) $\cdots\cdots\cdots$ 42
Fig. 21.	HR-EI-Mass spectrum of compound 443
Fig. 22.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 5 (500 MHz, CDCl_3)44
Fig. 23.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 5 (125 MHz, CDCl_3) $\cdots\cdots\cdots$ 45
Fig. 24.	HR-FAB-Mass spectrum of compound 5
Fig. 25.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 6 (500 MHz, CDCI3)47
Fig. 26.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 6 (125 MHz, CDCl_3) $\cdots\cdots\cdots$ 48
Fig. 27.	HR-EI-Mass spectrum of compound 6

## Abstract

# Isolation and structure determination of new labdane diterpenoids from *Leonurus sibiricus* L.

Moon, Hyun-teak Advisor : Prof. Woo, Eun-Rhan, Ph.D. Department of Pharmacy. Graduate School of Chosun University.

In our continuing to search for the bioactive compounds from natural source, the  $CH_2CI_2$ -soluble fraction of MeOH extract aerial parts of the plant *Leonurus sibiricus* L. showed siginificant antioxidative activity, cell cytotoxicity, and anti-inflammatory activity in an in vitro assay. Bioassay-guided isolation of this fraction led to the purification of six new bis-spirolabdane-type diterpenoids,  $3\alpha$ -acetoxy-leoheteronone E (1),  $3\alpha$ -acetoxy-15-epileoheteronone E (2),  $3\alpha$ -acetoxy-leoheteronone C (3), leoheteronone F (4),  $3\alpha$ -acetoxy-leoheteronone A (5) and leohetero none G (6). Their structures were determined by physical and spectrosc opic analyses.

Compound 1/2 were isolated as epimeric pairs at C-15, the other compounds 3, 4, 5, and 6 were obtained in pure form. All of these compounds especially have either hydroxyl group or acetoxyl group at C-3 position, for that reason they are considered as new compounds.

In vitro anti-inflammatory activity was evaluated by inhibition % of hIL-6 production in TNF- $\alpha$  stimulated MG-63 cell line. Compound 6, isolated from the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction, exhibited hIL-6 inhibition activity, decreased to 66.4±1.1%.

#### Ⅰ.서 론

익모초(*Leonurus sibiricus* L.)는 꿀풀과*(Labiatae*)에 속하는 2년생 초본으로서 우리나라 전국 각처의 원야지 인가 부근 빈터 및 밭둑 등에 자생한다.

전초는 높이 150cm 안팎이고 줄기는 둔하게 네모지며 백색털이 있어 전체에 백 록색이 돌고 가지가 갈라진다. 꽃은 7~9월에 피고 연한 홍자색이며 윗부분의 엽액 에 몇 개씩 층층으로 달리고 꽃받침은 5개로 갈라지며 끝이 바늘처럼 뾰족하고 화 관은 아래위 2개로 갈라지며 밑부분의 것이 다시 3개로 갈라지고 가운데 것이 가 장 크며 붉은색의 줄이 있고 4개의 수술 중 2개가 길다. 열매는 9월에 성숙되며 분과는 5분과이고 넓은 난형이며 약간 편평하고 3개의 능각이 있으며 털이 없고 꽃받침 속에 들어있다.<sup>(1)</sup>

꿀풀과(*Labiatae*)는 줄기와 가지는 네모지고, 잎은 마주 나거나 돌려 나고, 턱 잎은 없다. 꽃은 양성화로 대개 입술 모양, 꽃받침의 톱니는 5개, 꽃잎은 통 모양 으로 가장자리는 4~5갈래이다. 수술은 4개 또는 2개로 꽃통에 붙고, 꽃밥은 2실, 자방은 상위, 암술대는 단일하고 위에서 2갈래, 배주는 4개, 열매는 수과 같은 소 견과가 4개, 배유는 소량이거나 없다. 세계에 200속 3500종, 우리나라에는 25속 55종이 분포한다.

이 식물은 한방에서 전초를 익모초라고 하며, 활혈, 거어, 조경, 소수의 효능 이 있고, 산후출혈, 월경불순, 태루난산, 포의불하, 혈뇨, 사혈, 산후혈훈을 치료 한다. 열매는 충위자라고 하며, 활혈, 거어, 조경, 청열의 효능이 있고, 월경불 순, 대하, 산후어혈에 의한 통증을 치료한다.<sup>(2)</sup>

성분과 그 약리작용으로는 flavonoids인 rutin, genkwanin과 alkaloids로서 leonurine, leonuridine, strachydrine, 4-guanidinobutanol, 4-guanidinobutyric acid을 함유하며, terpenoids인 labdane diterpenes, furanoditerpen-lactones과 기타 essential oil, protocatechol, benzoic acid, 지방산을 함유한다.

Essential oil은 현저한 이뇨작용을 나타내며 자율운동을 감소시켜 자궁이완을 일으키고, leonurine은 자궁수축을 일으키는 주성분으로 이뇨 및 용혈작용이 있으 며 guanidine 화합물로서 당대사에 영향을 주어 혈당강하에 기여한다. 또 labdane 계열의 diterpenes은 그 성분 중 일부가 anti-platelet aggregation activity가 있다는 보고가 있으며, LS-1,2, leonotinin, leonotin, dubiin, nepetaefuran 같 은 furanoditerpen-lactones은 조직 배양된 leukemia cell에 대한 cytotoxic activity (IC<sub>50</sub>:50~60µg/mℓ)를 나타낸다고 한다. 익모초 ext.는 토끼, 기니피그, 개 등의 적출자궁에 대한 자궁수축을 나타내고, 흰 생쥐에 대하여 암을 78% 억제 했다는 실험보고가 있고. 또한 MeOH ext.는 쥐 복강 및 경구 투여 실험에서 Analgesic and anti-inflammatory activity가 있다고 한다. 그러나 약효에 대한 연구가 쥐, 토끼 등의 동물을 대상으로 한 것이어서 임상적 기전에 대한 연구 보 고는 미약한 실정이다.<sup>(3-6)</sup>

이러한 약리작용에 근거하여 익모초의 MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획 으로 NBT assy를 통한 항산화활성, SRB 방법을 이용한 세포독성, 그리고 TNF-α에 의해 유도된 MG-63 세포주의 hIL-6 유리저해활성을 검색하였다. 그 결과 익모초의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획이 위 여러 활성을 가진 것으로 나타났고, 이를 바탕으로 익모초의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획으로부터 화합물 분리를 실행하였다.

여기서 hlL(human interleukin)-6는 cytokine 일종으로 항세포증식작용, 항미생 물작용, 항종양작용 등 면역조절에 중요한 역할을 한다. 이러한 여러 기능을 가진 hlL-6의 생산 조절이 잘못되어 과잉 생산되면 여러 가지 자가 면역질환과 염증성 신경 관절 질환을 유발하는 것으로 알려졌고 이에 관한 많은 연구가 보고되어져있 다.<sup>(14-16)</sup>

따라서 분리한 화합물을 세포 독성이 없는 농도에서 TNF-α에 의해 유도된 hlL-6의 억제작용을 알아보기 위하여 MG-63 세포주를 이용한 hlL-6의 유리 억제 실험을 실시하였다.

익모초 (*Leonurus sibiricus* L.) CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> 분획에서 새로운 6개의 bis-spirolabdane -type diterpenoids을 분리하였다. 성분 분리는 open column chromatography를 통 하여 이루어졌고, 분광학적 분석(NMR)에 의하여 구조가 분석되었다. 이 화합물 중 compound 1/2는 C-15 위치에 hydroxyl group이 붙은 epimeric pairs으로, 나머지 화합물들은 pure form으로 분리되었다. 이 6개의 화합물들은 모두 특징적으로 C-3 위치에 hydroxyl group이나 acetoxyl group이 존재함으로써 신규화합물로 인 정되며 이에 관한 전반적인 실험 내용을 보고하자 한다.

#### Ⅱ.실 험

1. 실험재료

실험에 이용된 익모초(*Leonurus sibiricus* L.)는 2003년 7月 조선대학교 약학대학 약초원에서 채취하여 전문가의 동정 과정을 거쳐 사용하였으며, 표본은 조선대학교 약학대학 표본실에 보관 중이다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

① 용매

추출 및 분획용 시약은 1급 시약을 사용하였으며, TLC와 chromatography용 시약 은 1급 또는 특급 시약을 사용하였다.

2 Packing materials

Column chromatography의 packing material로는 Kieselgel 60(63-200 #m, Art. 7734, Merck)와 Kieselgel 60(40-63 #m, Art. 9385, Merck), Lipophlic Sephadex LH-20(25-100 #m, Lot 81K1092, Sigma), LiChroprep RP-18(40-63 #m, L610400 138, Merck), MCl gel CHP20P(75-150 #, Mitsubishi Chemical Corporation) 등을 사용하였다.

3 TLC

Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F<sub>254</sub> plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F<sub>254</sub>s plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 사 용하였다. prepartive thin layer chromatography (PTLC)용은 plate는 precoated silica gel 60 F<sub>254</sub> plate(layer thickness 0.5 mm, 20×20 cm. Art. 5744, Merck) 와 precoated RP-18 F<sub>254</sub>s plate(layer thickness 1 mm, 20×20 cm. Art. 5434, Merck)를 사용하였다.

2-2. 기기

실험에 사용한 기기는 다음과 같다.

IR : PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer FAB-MS : JMS 700(JEOL) <sup>1</sup>H-NMR : Unity Inova FT-NMR spectrometer 500 MHz <sup>13</sup>C-NMR : Unity Inova FT-NMR spectrometer 125 MHz Polarimeter : AUTOPOL<sup>®</sup> IV automatic polarimeter (Rudolph Research Flangers, NJ 07836) HPLC pump : Waters 1525 Binary HPLC pump HPLC UV Detector : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector 3. 화합물의 분리

3-1. 추출 및 분획

익모초(*Leonurus sibiricus* L.) Ikg을 MeOH 9ℓ로 80℃에서 3시간동안 3회에 걸 쳐 진탕하면서 추출한 후 여과, 감압 농축하여 151.161g의 MeOH extract를 얻었 다. 이를 증류수로 현탁하고 methylene chloride (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) 순서의 계통적 분획법으로 분획하였다. (Scheme I).



## Scheme I. Extraction and fractionation of the MeOH extract from *Leonurus sibiricus* L.

3-2. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획으로부터 compound의 분리

익모초의 MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획에 대한 항산화 활성, 세포 독성, 그리고 hIL-6 유리 저해 활성을 검색한 결과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획에서 위 세가지 활 성들이 나타났다. 이를 바탕으로 익모초의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획으로부터 위의 여러 생리 활 성을 가진 물질을 분리하고자 본 실험을 시작하였다. 의모초의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ext.(15g)중 색소를 포함한 불필요한 부분을 제거하고 실험의 효율을 높이기 위하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획을 *n*-Hexane : MeOH : H<sub>2</sub>O = 10 : 9 : 1 혼합용 매로 분획을 나누어 Hexane층(7.2g)과 MeOH・H<sub>2</sub>O 혼합층(7.6g)을 얻었다. 그 후 *n*-Hexane, acetone 용매 비율을 조절하며 Silica gel 60 (63-200 mesh)을 이용한 open column chromatography를 실시하여 Hexane층에서 5개의 소분획을, MeOH・H<sub>2</sub>O 혼합층에서 3개의 소분획을 얻었다. (Scheme II).



## Scheme II. Fractionation of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract from *Leonurus sibiricus* L.

3-2-1. Compound 1, 2의 분리

Subfraction DH1 (4g)을 *n*-Hexane : Acetone(4:1→1:3) 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각 의 분획들을 Silica gel 60 F<sub>254</sub>와 RP-18 F<sub>254</sub>s TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 15개의 소 분획으로 나누었다.

이 분획들 중 DH17 (260mg)분획을 MeOH : H<sub>2</sub>O(2:1), CH<sub>3</sub>CN : MeOH : H<sub>2</sub>O(3:1:6) 의 용매조건으로 LiChroprep RP-18을 이용한 column chromatography를 반복 실시 하여 compound 1, 2 (33.6mg)을 얻었다. compound 1, 2는 분리되지 않은 epimeric mixture로 얻어졌고, UV 단파장(254nm)과 장파장(365nm)에서 모두 흡수를 보이지 않았으며, 10% 황산용액으로 발색 시 짙은 보라색을 나타내었다.

Compound 1/2: <sup>1</sup>H- , <sup>13</sup>C-NMR data (Table 1, 2)

White amorphous powder

Molecular formula : C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub>

HR-EI-MS : m/z 452.2408 [M]<sup>+</sup>(calcd for C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub>: 452.2410)

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> : -5.742 ° (c=1.25, MeOH)

IR <sub>Vmax</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3442, 2959, 2873, 1737, 1466, 1373, 1244

#### 3-2-2. Compound 3의 분리

Subfraction DH14 (300mg)을 Silica gel 60을 이용하여 *n*-Hexane : Acetone (4:1) 용매조건으로 column chromatography를 실시하여 8개의 소분획을 얻었다. 이 소분획 중 DH146 (78.5mg)을 CH<sub>3</sub>CN : MeOH : H<sub>2</sub>O(3:1:6)용매조건으로 LiChroprep RP-18을 이용한 column chromatography를 반복 실시하고, CH<sub>3</sub>CN : MeOH : H<sub>2</sub>O(2:1:7)를 전개용매로 MCI gel CHP2OP로 정제하여 compound 3 (1mg)을 얻었 다. 이 화합물은 UV 흡수는 거의 없었으며, 10% 황산용액으로 발색 시 짙은 보라 색을 나타내었다.

 $^{1}\text{H-}$  ,  $^{13}\text{C-NMR}$  data ( Table 1, 2)

White amorphous powder

Molecular formula : C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub>

HR-FAB-MS : m/z 489.2835 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub>Na : 489.2836)

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> : +31.357 ° (c=0.5, MeOH)

IR <sub>*V*max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup>: 2954, 2897, 1740, 1463, 1215

3-2-3. Compound 4의 분리

Subfraction DH145 (73.6mg)를 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O(4:6)를 용매조건으로 하여 LiChroprep RP-18을 이용한 column chromatography를 실시하고, CH<sub>3</sub>CN : MeOH : H<sub>2</sub>O(3:1:6)를 전개용매로 LiChroprep RP-18로 정제하여 compound 4 (6.2mg)을 얻었 다. 이 화합물 UV 흡수는 거의 없었으며, 10% 황산용액에서 짙은 보라색으로 발색 된 후 갈색으로 변화였다.

 $^{1}\text{H-}$  ,  $^{13}\text{C-NMR}$  data (Table 1, 2)

White amorphous powder

Molecular formula : C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub>

HR-EI-MS : m/z 466.2566 [M]<sup>+</sup>(calcd for C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub> : 466.2567)

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> : +14.093 ° (c=1.2, MeOH)

#### 3-2-4. Compound 5, 6의 분리

Subfraction DH16 (476mg)을 Silica gel을 이용하여 *n*-Hexane : Acetone(4:1) 용매조건으로 column chromatography를 실시하여 7개의 소분획을 얻었다. 이 소분 획 중 DH165 (130mg)을 CH<sub>3</sub>CN : MeOH : H<sub>2</sub>O(3:1:6)용매조건으로 LiChroprep RP-18 을 이용한 column chromatography를 실시하여 다시 5개로 분획하였다. 그 중 DH1653 (35mg)을 LiChroprep RP-18와 Sephadex LH-20를 이용하여, 용매조건 CH<sub>3</sub>CN : MeOH : H<sub>2</sub>O(2:1:7)로 column chromatography를 반복 실시하고. 같은 용매조건으 로 MCI gel CHP2OP로 정제하여 compound 5 (4.5mg), compound 6 (4mg)을 얻었다. 이 화합물들은 노란색을 띠는 oil상태로 UV 흡수는 없었으며, 10% 황산용액으로 발색 시 갈색을 나타내었다.

#### compound 5

<sup>1</sup>H- , <sup>13</sup>C-NMR data (Table 1, 2) Yellowish oil Molecular formula : C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub> HR-FAB-MS : *m/z* 447.2915 [M+Na]<sup>+</sup>(calcd for C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub>Na : 447.2917) [α]<sub>0</sub><sup>25</sup> : +19.197 ° (c=1.0, MeOH) IR <sub>*V*max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup> : 3442, 2945, 2832, 1746, 1470, 1369, 1245

compound 6

<sup>1</sup>H- , <sup>13</sup>C-NMR data (Table 1, 2) Yellowish oil Molecular formula : C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub> HR-EI-MS : *m/z* 424.2459 [M]<sup>+</sup>(calcd for C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub> : 424.2461) [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> : +19.929°(c=1.0, MeOH) IR <sub>*V*max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup> : 3446, 2956, 2873, 1738, 1470, 1369, 1246



Scheme III. Isolation of compounds 1-6 from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract of *Leonurus sibiricus* L.







R Compound 5 α-OMe Compound 6 β-OMe



#### 4. 생리활성

4-1. NBT superoxide scavenging assay

NBT superoxide scavenging assay는 참고문헌을 응용하여 사용하였으며 다음과 같다. 15 mM Na<sub>2</sub>EDTA (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KOH, pH 7.4 in d.w.) 용액 20  $\mu$ , 0.6 mM NBT 용액 50  $\mu$ , 50 mM KOH에 녹인 3 mM hydroxanthine 30  $\mu$ 를 취한 다음 일정농도로 녹인 sample 100  $\mu$ 를 첨가하였다. 여기에 xanthine oxidase (1 unit in 10 m buffer)용액 50  $\mu$ 를 넣은 후 25°C incubator 안에서 30분 동안 산화가 일어나도 록 반응을 시킨 다음 microplate reader를 통해 570nm 흡광도를 측정하였다 시료 를 녹였던 5% DMSO (dimethylsulfoxide) in buffer 용액을 control로 하였으며 실험의 표준물질로는 allopurinol을사용하였다.<sup>(20,21)</sup>

#### Anti-oxidative activity (%) = rate of control reaction - rate of sample reaction rate of control reaction x 100

4-2. Cytotoxic activity

이 실험에서 사용한 암세포는 MG-63 (Osteosarcoma-골육암세포주)이며 암세포 증식저해활성은 sulforhodamine B (SRB) assay 방법<sup>(31)</sup>을 활용하였다. 즉 계대중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 우선 trypsin-CDTA 용액으로 용기부착 면으로부 터 탈리시키고, 96 well flat bottom microplate (Falcon)에 well 세포수가 3× 10<sup>4</sup>이 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 5% CO<sub>2</sub> incubator내에서 24시간 배양하 여 바닥에 부착시킨 후 aspirator로 media를 제거하고 6농도의 log dose로 medium 으로 희석한 test material 용액들을 세포가 들어 있는 well에 100<sup>µℓ</sup>씩 3배수 (triplicate)로 넣어주고 48시간동안 더 배양하였다. 검체용액은 소량의 DMSO에 녹인 후 배지용액으로 희석하였으며 총 반응 액 중 DMSO의 농도는 1% 이하가 되도 록 하였다. 검체용액은 세포에 가하기 전에 miliphore filter로 여과하여 실험의 무균상태를 유지하였다. 세포를 약물과 48시간 배양한 후 well의 medium을 제거하 고 10% formalin solution을 100<sup>µℓ</sup>씩 가하여 4℃에서 1시간동안 방치하여 세포들

을 plate의 바닥 면에 고정시킨다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 증류수로 5-6 회 세척하여 남아있는 formalin용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없 도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well에 100ᄱ의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5-6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과잉의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조시킨 후 well에 100ᄱ의 10mM trisma base (unbuffered)용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 염색 액을 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였 다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가하는 시점에서 세 포 수(Tz, zero time)와 약물 대신 동량의 배지만을 가하여 48시간 배양했을 때 의 세포 수(C. control) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포 수 (T, test)를 각각 측정하여 다음의 수식에 따라 항암활성을 계산하였다. 즉 Tz>T ρI 경우에는 [(T-Tz)/(C-Tz)] 제 00으로 계산하였고, Tz<T인 경우에는 [(T-Tz)/Tz] × 00의 수식으로 계산하였다. 이렇게 계산된 값들로부터 LOTUS program의 data regression tool을 이용하여 약물이 암세포의 증식을 50% 저해하 는 농도인 50% effective dose (IC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

#### 4-3. MG-63 cell line에서 hlL-6의 유리 확인

세포주는 10% FBS (fetal bovine serum)가 포함된 DMEM (eulbecco's modified eagle medium) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 culture dish에 증식 시킨 MG-63 세포를 24-well plate에 적정수의 세포(3 × 0<sup>4</sup>)를 500 #0억 접종한 후 하루 동안 incubation하고 배지를 교체하였다. 여기에 TNF(tumor necrosis factor)-α와 SRB assay를 통해 얻은 세포독성이 없는 농도의 sample을 처리한 후 37℃ incubator에서 배양한 후 24시간과 48시간 뒤 각각 70 #0억 배지를 채취하여 냉동 보관한다. 96-well plate에 I차 anti-body 100 #0(anti-human IL-6 2 #g/m0 in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>)를 넣은 후 4℃에서 overnight하여 1차 anti-body가 96 well plate에 부착되도록 하였다. 결합되지 않은 1차 anti-body를 씻어내기 위해 washing solution [0.05% Tween 20 in (PBS) phosphate buffered saline] 100 #0

로 3번 씻어낸 후 blocking solution (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) 200 #l를 처리하고 실온에서 2시간 동안 방치한 후 washing solution 200 #l로 2 번 씻어낸다. 위에서 24시간 후와 48시간 후에 채취한 배양액 50 #l와 blocking solution 50 ₩를 넣어 실온에서 4시간 또는 4℃에서 overnight하여 1차 anti-body와 결합하도록 하였다. 100  $\mu$ 의 washing solution으로 4번 세척한 후 100 μl의 2차 anti-body (biotin conjugated rat anti-human IL-6 1 μg/ml in blocking solution)를 첨가 하여 45분 동안 결합시킨 뒤 결합되지 않은 2차 anti-body를 100 #l의 washing solution으로 6번 세척하여 씻어낸다. 100 #l의 Streptavidin HRP (0.1% BSA, 0.05% Tween20 in tris buffered saline, pH 7.3)를 첨가하여 20분 동안 결합시킨 뒤 washing solution으로 6번 세척한다. TMB (Tetra Methyl Benzidine) 100 #0를 넣어 발색시킨 즉시 micro plate reader를 사용하여 450 메 파장에서 흡광도를 측정하였다. 1% DMSO와 TNF-α(15 ng/ml)가 들어갔을 CCH hIL-6의 유리정도(%)를 control로 하였으며 실험의 표준물질로는 dexamethasone을 사용하였다. hlL-6의 유리 확인은 control에 대한 상대적인 퍼센 트 즉, (rate of sample reaction/rate of control) 제00으로 표시하였다.<sup>(17,18)</sup>

position	compound 1	compound 2	compound 3	compound 4	compound 5	compound 6
1	1.14(m) 1.59(m)	1.17(m) 1.70(m)	1.14(m) 1.62(m)	1.14(m) _	1.09(m) 1.93(m)	1.12(m) 1.93(m)
2	1.70(m) 1.96(m)	1.70(m) 1.91(m)	1.69(m) 1.90(m)	1.68(m) -	1.65(m) 1.95(m)	1.65(m) 1.95(m)
3	4.64(m)	4.64(m)	4.64(t, 2.5)	4.64(br s)	3.40(br s)	3.43(br s)
5	2.20(m)	2.16(m)	2.19(m)	2.24(m)	2.19(m)	2.18(m)
6	2.26(m) 2.50(m)	2.29(m) 2.55(m)	2.26(m) 2.51(dd, 14, 12)	2.27(m) 2.52(dd, 14, 12)	2.24(m) 2.51(dd, 14.5, 12)	2.22(m) 2.51(dd, 14, 12)
11	2.32(m) -	2.18(m)	2.18(m) 2.28(m)	2.17(m) 2.26(m)	2.18(m) 2.24(m)	2.22(m) -
12	2.26(m) 2.30(m)	2.05(m) 2.14(m)	1.97(m) 2.17(m)	2.17(m) 2.27(m)	1.96(m) 2.15(m)	2.16(m) 2.35(m)
14	2.01(m) 2.45(m)	2.16(m) 2.33(m)	2.21(m) 2.31(m)	1.98(d, 13) 2.42(dd, 12.5, 5.5)	2.19(m) 2.28(m)	1.96(m) 2.33(m)
15	5.53(d, 5)	5.42(dd, 5, 2.5)	4.94(dd, 6, 4)	5.00(d, 5.5)	4.93(dd, 5.5, 4)	4.99(d, 5)
16	3.53(d, 8.5) 3.85(d, 8.5)	3.55(d, 8.5) 4.06(d, 8.5)	3.49(d, 8) 3.74(d, 8)	3.77(d, 8.5) 3.89(d, 8.5)	3.58(d, 8) 3.92(d, 8)	3.83(d, 9) 4.06(d, 9)
17	1.41(s)	1.44(s)	1.39(s)	1.40(s)	1.33(s)	1.31(s)
18	0.87(s)	0.88(s)	0.88(s)	0.88(s)	0.96(s)	0.96(s)
19	0.91(s)	0.91(s)	0.90(s)	0.90(s)	0.85(s)	0.86(s)
20	1.20(s)	1.20(s)	1.17(s)	1.19(s)	1.19(s)	1.17(s)
3-OCOC <u>H</u> 3	2.07(s)	2.03(s)	2.06(s)	2.04(s)	-	_
8-OCOC <u>H</u> 3	2.08(s)	2.09(s)	2.08(s)	2.08(s)	2.06(s)	2.07(s)
15-OC <u>H</u> 3	-	-	3.34(s)	3.30(s)	3.34(s)	3.28(s)

## Table 1. <sup>1</sup>H-NMR spectral data of compounds 1-6 ( $\delta$ in ppm, J in Hz, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

position	compound 1	compound 2	compound 3	compound 4	compound 5	compound 6
1	26.5	26.8	26.4	26.6	26.2	26.1
2	22.2	22.2	22.3	22.2	24.6	24.7
3	77.1	77.1	77.2	77.5	75.2	75.3
4	37.6	37.6	37.6	37.6	38.5	38.6
5	43.3	44.6	44.5	44.1	42.9	43.6
6	35.3	35.3	35.2	35.4	35.5	35.4
7	205.7	205.6	205.1	205.7	205.3	205.6
8	87.5	87.5	87.4	87.6	87.6	87.6
9	96.4	97.2	96.4	96.5	96.6	96.7
10	43.2	43.2	43.1	43.3	43.4	43.2
11	28.5	28.0	28.0	28.5	28.1	28.5
12	39.3	36.8	39.7	39.4	39.3	39.9
13	90.6	91.2	90.6	90.9	90.8	91.3
14	46.7	46.3	46.0	46.4	46.4	47.3
15	98.2	98.2	104.3	104.8	104.4	105.1
16	77.9	75.4	74.3	77.7	74.8	77.9
17	15.7	16.1	15.8	15.8	15.6	15.7
18	27.3	27.4	27.4	27.4	27.8	27.7
19	21.3	21.3	21.4	21.4	21.8	21.8
20	18.0	18.0	17.8	18.1	18.0	17.9
3-0 <u>C</u> 0CH3	170.5	170.4	170.5	170.5	-	-
3-0C0 <u>C</u> H₃	21.3	21.1	21.3	21.2	-	-
8-0 <u>C</u> 0CH <sub>3</sub>	169.1	169.0	169.0	169.1	169.0	169.0
8-0C0 <u>C</u> H3	21.3	21.3	21.4	21.3	21.4	21.4
15-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	_	-	55.0	54.8	55.0	54.6

## Table 2. <sup>13</sup>C-NMR spectral data of compounds 1-6

(  $\delta$  in ppm, 125 MHz, CDCl\_3)

#### Ⅲ. 결 과 및 고 찰

1. Compound 1, 2의 구조

Compound 1/2는 무정형 백색 분말 상태의 epimeric mixture로 분리되었다. [α]<sup>25</sup>는 -5.742°로 측정되었고, 분자식은 <sup>13</sup>C-NMR**(Table 2)**과 HR-EI-MS(*m/z* 452. 2408 [M]<sup>+</sup>)로부터 C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>Os로 결정되었다. 그리고 IR spectrum으로부터 hydroxyl(34 42cm<sup>-1</sup>)과 ester(1737cm<sup>-1</sup>) functional group의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR(**Ta** ble 1, 2)과 HSQC spectrum data로부터 이 화합물이 4개의 tertiary methyl groups $[1/2: \delta_{H} 1.41(s)/1.44(s), 0.87(s)/0.88(s), 0.91(s)x2, 1.20(s)x2; \delta_{C}$ 15.7/16.1, 27.3/27.4, 21.3x2, 18.0x2], 1개의 ketone group[1/2:δc 205.7/205. 6], 1개의 oxygenated methylene group[1/2:δ<sub>H</sub> 3.53/3.55 (both d, J = 8.5Hz), 3.85/4.06 (both d, J = 8.5Hz); δc 77.9/75.4], 2개의 oxygenated methine grou  $ps[1/2: \delta_{H} 4.64(m)x^{2}, 5.53(d, J = 5Hz)/5.42(dd, J = 5, 2.5Hz); \delta_{C} 77.1x^{2}, 9$ 8.2x2], 3개의 oxygenated quaternary carbons[1/2: &c 87.5x2, 96.4/97.2, 90.6/ 91.2], 2개의 acetoxyl groups[1/2: δн 2.07(s)/2.03(s), 2.08(s)/2.09(s); бс 170.5/170.4, 169.1/169.0, 21.3/21.1, 21.3x2], 6개의 methylene groups[1/2: &c 26.5/26.8, 22.2x2, 35.3x2, 28.5/28.0, 39.3/36.8, 46.7/46.3], 1개의 methine group[1/2:δ<sub>H</sub> 2.20(m)/2.16(m); δc 43.3/44.6] 그리고 2개의 quaternary carbons[1/2:δc 37.6x2, 43.2x2]를 지닌 탄소 24개로 이루어진 화합물로 밝혀졌 다.

OI 화합물의 구조는 HMBC와 NOESY spectrum data를 분석하여 결정하였다. HMBC(Fig. 8)로부터 C-13(1/2: δc 90.6/91.2)과 H-15(1/2: δ<sub>H</sub> 5.53/5.42), H<sub>2</sub>-14(1 /2: δ<sub>H</sub> 2.01/2.16, 2.45/2.33), H<sub>2</sub>-16(1/2: δ<sub>H</sub> 3.53/3.55, 3.85/4.06) 사OI, C-9(1/ 2: δc 96.4/97.2)와 H-12(1/2: δ<sub>H</sub> 2.26/2.05), Me-17(1/2: δ<sub>H</sub> 1.41/1.44), Me-20(1 /2: δ<sub>H</sub> 1.20x2) 사OI, C-8(1/2: δc 87.5x2)과 Me-17(1/2: δ<sub>H</sub> 1.41/1.44), 8-0COCH<sub>3</sub>( 1/2: δ<sub>H</sub> 2.08/2.09) 사OI, C-7(1/2: δc 205.7/205.6)과 Me-17(1/2: δ<sub>H</sub> 1.41/1.44), H<sub>2</sub>-6(1/2: δ<sub>H</sub> 2.26/2.29, 2.50/2.55) 사OI, C-10(1/2: δc 43.2x2)과 H<sub>2</sub>-1(1/2: δ<sub>H</sub> 1.14/1.17, 1.59/1.70), Me-20(1/2: δ<sub>H</sub> 1.20x2), H-5(1/2: δ<sub>H</sub> 2.20/2.16) 사OI, C-4(1/2: δc 37.6x2)와 Me-18(1/2: δ<sub>H</sub> 0.87/0.88), Me-19(1/2: δ<sub>H</sub> 0.91x2), H-5(1/2: δ<sub>H</sub> 2.20/2.16) 사OI, C-3(1/2: δc 77.1x2)과 Me-18(1/2: δ<sub>H</sub> 0.87/0.88), Me-19(1/2: бн 0.91x2)사이, C-5(1/2: бс 43.3/44.6)와 Me-19(1/2: бн 0.91x2)사 01, 3-0<u>C</u>0CH<sub>3</sub>(1/2: δ c 170.5/170.4)와 H-3(1/2: δ<sub>H</sub> 4.64x2), 3-0C0CH<sub>3</sub>(1/2: δ<sub>H</sub> 2.07/2.03)사이 3-0C0CH<sub>3</sub>(1/2:δc 21.3/21.1)와 H-2(1/2:δ<sub>H</sub> 1.70x2)사이, C-6(1/2 :δc 35.3x2)과 H-5(1/2:δ<sub>H</sub> 2.20/2.16)사이, 그리고 C-11((1/2: δc 28.5/28.0 )과 H-12(1/2:δ<sub>H</sub> 2.26/2.05)사이의 cross-peaks를 관찰할 수 있었다. 또 NOESY spectrum**(Fig. 2, 3)**으로부터 H-3(δ<sub>H</sub> 4.64x2)이 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.87, 0.88), Me-19(δ Η 0.91x2), H2-2(δH 1.70x2, 1.96, 1.91)과 비슷한 정도의 NOE를 나타냄으로써 H-3가 β배향이고, C-3의 chiral center가 R configuration임이 밝혀졌다. 또 α 배향의 H-5(δ<sub>H</sub> 2.20, 2.16)가 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.87, 0.88)과 밀접한 관련을 나타내 Me-18은 α배향을 C-5은 S 배열로 분석되었다. 그리고 H-5와 Me-18, H-6α(δ<sub>H</sub> 2.26, 2.29), Me-17(δ<sub>H</sub> 1.41, 1.44)사이, β배향의 Me-20(δ<sub>H</sub> 1.20x2)와 axial 8-0Ac(δ<sub>H</sub> 2.08, 2.09)사이에 cross-peak가 관찰되어 Me-17은 α, 8-0Ac는 β배향 으로 C-8위가 R 배열을 나타내었다. Me-20과 H-11(δμ 2.32, 2.18)관계로 C-9는 S 배열을, Me-20과 Me-19의 관계로 Me-19는 β배향이고 C-10위는 S 배열을 가졌다. Me-17과 H₂-14(δH 2.01, 2.33)사이의 NOE로 C-13위는 S 배열을 나타냈다. 그리고 compound 1의 경우 H-15(δμ 5.53)과 H2-12((δμ 2.26, 2.30)은 아무런 관계를 나 타내지 않았고, 반면 compound 2에서는 H-15(δ<sub>H</sub> 5.42)와 H-12(δ<sub>H</sub> 2.14)가 관계를 가짐으로써 compound 1은 H-15가 α 배향, 그리고 C-15는 R 배열, compound 2는 β배향, S 배열로 분석되었다. 위 분석 결과 compound 1/2는 (*3R, 5S, 8R, 9S,* **10S, 13S, 15R/S**)-3α, 8β-diacetoxy-9, 13; 15, 16-diepoxy-labdane-7-ones라 는 bis-spirolabdane-type의 diterpenoids로 밝혀졌다.<sup>(7-9)</sup> Compound 1/2는 불포화 도가 7로써 4개의 환과 3개의 이중결합을 갖는데, 2개의 환은 특징적인 chemical shift 값을 갖는 두 개의 oxygenated quaternary carbons, C-9(1/2:δc 96.4/97.2), C-13(1/2:δc 90.6/91.2)으로 연결된 spiro-tetrahydrofuran 링이 다. 이 화합물은 C-3위치에 α-acetoxyl group이 존재함으로써 신규화합물로 인 정된다. 이 화합물의 특징은 첫 번째로 C-6위치의 두 proton의 배향이 뚜렷이 구 분되며, Chemical shift 값이 H-6α는 2.26/2.29를 나타내고 H-6β는 2.50/2.55를 나타낸다. 두 번째로 C-3위치에 OAc의 존재로 인하여 δc 77.1x2, δμ4.64x2의 값 을 갖는다. 마지막으로 C-16의 두 수소[1/2:δ<sub>H</sub> 3.53/3.55 (both d, J = 8.5Hz), 3.85/4.06 (both d, / = 8.5Hz)]는 모두 doublet으로 뚜렷한 짝지음 상수를 나타 내는 것을 볼 수 있다.(table 1)

#### 2. Compound 3의 구조

Compound 3은 무정형 백색 분말 상태로 UV흡수는 거의 없었다. [α]<sub>0</sub><sup>25</sup>는 +31.357°로 측정되었고, 분자식은 <sup>13</sup>C-NMR(**Table 2**)과 HR-FAB-MS(*m/z* 489.2835 [M+Na]<sup>+</sup>)로부터 C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub>로 결정되었다. 그리고 IR spectrum으로부터 ester(1739cm<sup>-1</sup>) ) functional group의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR(**Table 1, 2**)과 HSQC spectrum data분석결과, 이 화합물은 compound 1/2와 같은 pattern에 1개의 methoxyl group[δ<sub>H</sub> 3.34(s); δc 55.0]이 추가된 탄소 25개로 이루어진 화합물로 밝혀졌다.

이 화합물의 구조는 HMBC와 NOESY spectrum data를 분석하여 결정하였다. HMBC(Fig. 9)로부터 C-15[δc 104.3]와 15-00H<sub>3</sub>[δ<sub>H</sub> 3.34(s)]사이, C-2[δc 22.3] 과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.88(s)]사이, C-13[δc 90.6]과 H-15[δ<sub>H</sub> 4.94(dd, J = 6, 4)],  $H_2-14[\delta_H 2.21(m), 2.31(m)], H_2-16[\delta_H 3.49(d, J = 8), 3.74(d, J = 8)] \land IOI,$ C-9[δс 96.4]와 H-12[δн 1.97(m)], Me-17[δн 1.39(s)], Me-20[δн 1.17(s)]사 이, C-8[δc 87.4]과 Me-17[δ<sub>H</sub> 1.39(s)], 8-0C0C<u>H</u>3[δ<sub>H</sub> 2.08(s)]사이, C-7[δc 205.1]과 Me-17[δ<sub>H</sub> 1.39(s)], H<sub>2</sub>-6[δ<sub>H</sub> 2.26(m), 2.51(dd, J = 14, 12)]사이, С-10[δс 43.1]과 H<sub>2</sub>-1[δ<sub>H</sub> 1.14(m), 1.62(m)], Ме-20[б<sub>H</sub> 1.17(s)], Н-5[б<sub>H</sub> 2.19(m)]사이, C-4[δc 37.6]와 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.88(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.90(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.19(m)]사이, C-3 [δс 77.2 ]과 Me-18[δн 0.88(s)], Me-19[δн 0.90(s)]사이, С-5[δс 44.5] 와 Ме-19[бн 0.90(s)]사이, 3-ОСОСН<sub>3</sub>[δс 170.5]와 Н-3[бн 4.64(t, ノ = 2.5)], 3-0C0CH<sub>3</sub>[δ<sub>H</sub> 2.06(s)]사이, 3-0C0CH<sub>3</sub>[δc 21.3]와 H-2[δ<sub>H</sub> 1.69(m)] 사이, C-6[δc 35.2]과 H-5[δH 2.19(m)] 사이, 그리고 C-11[δc 28.0]과 H-12[δ<sub>H</sub> 1.97(m)]사이의 cross-peaks를 관찰할 수 있었다. 또 NOESY spectrum**(Fig. 4)**으로부터 H-3(δ<sub>H</sub> 4.64)이 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.88), Me-19(δ<sub>H</sub> 0.90), H2-2(δH 1.69, 1.90)과 비슷한 정도의 NOE를 나타냄으로써 H-3가 β배향이고, C-3 의 chiral center가 R 배열임이 밝혀졌다. 또 α배향의 H-5(δ<sub>H</sub> 2.19)가 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.88)과 밀접한 관련을 나타내 Me-18은 α배향을 C-5은 S 배열로 분석되었다. 그 리고 H-5와 Me-18, H-6α(δ<sub>H</sub> 2.26), Me-17(δ<sub>H</sub> 1.39)사이, β배향의 Me-20(δ<sub>H</sub> 1.17)와 axial 8-0Ac(δH 2.08)사이에 cross-peak가 관찰되어 Me-17은 α, 8-0Ac는 β배향으로 C-8위가 R 배열을 나타내었다. Me-20과 H-11(δ<sub>H</sub> 2.18, 2.28)관계로 C-9는 S 배열을, Me-20과 Me-19의 관계로 Me-19는 β배향이고 C-10위는 S 배열을 가졌다. Me-17과 H₂-14(δH 2.21, 2.31)사이의 NOE로 C-13위는 S 배열을 나타냈다.

H-15(δ<sub>H</sub> 4.94)와 H-12(δ<sub>H</sub> 2.20)가 관계를 가짐으로써 H-15는 β배향, C-15는 S 배열로 분석되었다. 위 분석 결과 compound 3은 (*3R, 5S, 8R, 9S, 10S, 13S, 15S*)-3α, 8-diacetoxy-9, 13 ; 15, 16-diepoxy-15α-methoxylabdane-7-one라는 bis-spirolabdane-type의 diterpenoids로 밝혀졌다.<sup>(7-9)</sup>

이 화합물은 불포화도가 7로써 4개의 환과 3개의 이중결합을 갖는데, 2개의 환 은 특징적인 chemical shift 값을 갖는 두 개의 oxygenated quaternary carbons, C-9(δc 96.4),C-13(δc 90.6)으로 연결된 spiro-tetrahydrofuran 링이다. 이 화합물은 compound 1/2의 C-15위치 hydroxyl group이 methoxyl group[δ<sub>H</sub> 3.34(s); δc 55.0]으로 치환됨으로써 C-15의 δc는 104.3으로 compound 1/2보다 +Δ6정도 downfield shift로, δ<sub>H</sub>는 4.94 로 -Δ0.5정도 upfield 값을 가는 것이 특징이고, C-3위치에 α-acetoxyl group이 존재함으로써 신규화합물로 인정된다. C-6위치의 두 proton의 배향이 뚜렷이 구분되며, Chemical shift 값이 H-6α는 2.26(m)를 나 타내고 H-6β는 2.51(dd, *J* = 14, 12)를 나타낸다. 또 C-3위치에 OAc의 존재로 인 하여 δc 77.2 δ<sub>H</sub> 4.64(t, *J* = 2.5)의 값을 갖는다. 마지막으로 C-16의 두 수소 [δ<sub>H</sub> 3.49(d, *J* = 8), 3.74(d, *J* = 8)]는 모두 doublet으로 뚜렷한 짝지음 상수를 나타내는 것을 볼 수 있다.(table 1)

#### 3. Compound 4의 구조

Compound 4는 무정형 백색 분말 상태로 UV흡수는 거의 없었다. [α]<sub>0</sub><sup>25</sup>는 +14.093°로 측정되었고, 분자식은 <sup>13</sup>C-NMR(**Table 2**)과 HR-EI-MS(*m/z* 466.2566 [M]<sup>+</sup>)로부터 C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub>로 결정되었다. 그리고 IR spectrum으로부터 ester(1740cm<sup>-1</sup>) functional group의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR(**Table 1, 2**)과 HSQC spectrum data분석결과, 이 화합물은 compound 3과 같은 pattern인 탄소 25개로 이루어진 화합물로 밝혀졌다.

이 화합물의 구조는 HMBC와 NOESY spectrum data를 분석하여 결정하였다. HMBC(Fig. 10)로부터 C-13[&c 90.9]과 H-15[&bH 5.00(d, J = 5.5)], H<sub>2</sub>-14[&bH 1.98(d, J = 13), 2.42(dd, J = 12.5, 5.5)], H<sub>2</sub>-16[&bH 3.77(d, J = 8.5), 3.89(d, J = 8.5)]사이, C-9[&c 96.5]와 H-12[&bH 2.17(m)], Me-17[&bH 1.40(s)], Me-20[&bH 1.19(s)]사이, C-8[&c 87.6]과 Me-17[&bH 1.40(s)], 8-0COCH<sub>3</sub>[&bH 2.08(s)]사이, C-7[&c 205.7]과 Me-17[&bH 1.40(s)], H<sub>2</sub>-6[&bH 2.27(m), 2.52(dd, J = 14, 12)]사이, C-10[&c 43.3]과 H-1[&bH 1.14(m)], Me-20[&bH 1.19(s)], H-5

[δ<sub>H</sub> 2.24(m)]사이, C-4[δc 37.6]와 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.88(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.90(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.24(m)]사이, C-3[δc 77.5]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.88(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.90(s)] 사이, C-5[δc 44.1] 와 Me-19[δ<sub>H</sub> 0.90(s)]사이, 3-0C0CH<sub>3</sub>[δc 170.5]와 H-3[δ<sub>H</sub> 4.64(br s)], 3-0C0CH<sub>3</sub>[δ<sub>H</sub> 2.04(s)]λŀ0I, 3-0C0CH<sub>3</sub>[δc 21.2]와 H-2[δ<sub>H</sub> 1.68(m)] 사이, C-6[&c 35.4]과 H-5[&<sub>H</sub> 2.24(m)]사이, C-15[&c 104.8]와 15-0CH<sub>3</sub>[&<sub>H</sub> 3.30(s)]사이, C-2[δc 22.2]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.88(s)]사이, 그리고 C-11[δc 28.5] 과 H-12[δ<sub>H</sub> 2.17(m)]사이의 cross-peaks를 관찰할 수 있었다. 또 NOESY spectrum(Fig. 5)으로부터 H-3(δ<sub>H</sub> 4.64)이 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.88), Me-19(δ<sub>H</sub> 0.90), H2-2(δ<sub>H</sub> 1.68, 1.93)과 비슷한 정도의 NOE를 나타냄으로써 H-3가 β배향이고, C-3 의 chiral center가 R configuration임이 밝혀졌다. 또 α배향의 H-5(δ<sub>H</sub> 2.24)가 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.88)과 밀접한 관련을 나타내 Me-18은 α배향을 C-5은 S 배열로 분석되 었다. 그리고 H-5와 Me-18, H-6α(δ<sub>H</sub> 2.27), Me-17(δ<sub>H</sub> 1.40)사이, β배향의 Me-20(δ<sub>H</sub> 1.19)와 axial 8-OAc(δ<sub>H</sub> 2.08)사이에 cross-peak가 관찰되어 Me-17은 α, 8-0Ac는 β배향으로 C-8위가 R 배열을 나타내었다. Me-20과 H-11(δ<sub>H</sub> 2.17)관 계로 C-9는 S 배열을, Me-20과 Me-19의 관계로 Me-19는 β배향이고 C-10위는 S 배 열을 가졌다. Me-17과 H₂-14(δμ 2.17, 2.42)사이의 NOE로 C-13위는 S 배열을 나타 냈다. H-15(δμ 5.00)와 H₂-12(δμ 2.17, 2.27)가 아무런 관계를 가지지 않아 H-15 는 α배향, C-15는 R 배열로 분석되었다. 위 분석 결과 compound 4는 (*3R, 5S,* **8R, 9S, 10S, 13S, 15R**)-3α, 8β-diacetoxy-9, 13; 15, 16-diepoxy-15β-methox ylabdane-7-one라는 bis-spirolabdane-type의 diterpenoids로 밝혀졌다.<sup>(7-9)</sup> 0 화합물은 15-methoxyl group이 β 배향으로써 α 배향인 compound 3과 차이를 나 타냈는데, C-16의 chimical shift 값이 77.7로써 compound 3보다 +∆3.3 downfield에 나타난 것이 특징이다. C-6위치의 두 proton의 배향이 뚜렷이 구분되 며, Chemical shift 값이 H-6α는 2.27(m)를 나타내고 H-6β는 2.52(dd, J = 14, 12)를 나타낸다. 또 C-3위치에 OAc의 존재로 인하여 δc 77.5 δ<sub>H</sub> 4.64(br s)의 값 을 갖는다. 마지막으로 C-16의 두 수소[δμ3.77(d, J = 8.5), 3.89(d, J = 8.5)] 는 모두 doublet으로 뚜렷한 짝지음 상수를 나타내는 것을 볼 수 있다.(table 1) 이 화합물도 C-3위치에 α-acetoxyl group이 존재함으로써 신규 화합물로 인정된다.

4. Compound 5의 구조

Compound 5는 노란색을 띠는 오일 상태로 분리되었다.  $[\alpha]_{D}^{25}$ 는 +19.197  $^{\circ}$ 로

측정되었고, 분자식은 <sup>13</sup>C-NMR**(Table 2)**과 HR-FAB-MS(*m/z* 447.2915 [M+Na]<sup>+</sup>)로부터 C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub>로 결정되었다. 그리고 IR spectrum으로부터 hydroxyl(3442cm<sup>-1</sup>)과 ester(17 46cm<sup>-1</sup>) functional group의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR**(Table 1, 2)**과 HSQC spectrum data분석결과, 이 화합물은 compound 4와 거의 같은 pattern이지만 1개 의 acetoxyl group이 제거된 탄소 23개로 이루어진 화합물로 밝혀졌다.

이 화합물의 구조는 HMBC와 NOESY spectrum data를 분석하여 결정하였다. HMBC(Fig. 11)로부터 C-13[δc 90.8]과 H-15[δ<sub>H</sub> 4.93(dd, J = 5.5, 4)], H<sub>2</sub>-14  $[\delta_{H} 2.19(m), 2.28(m)], H_2-16[\delta_{H} 3.85(d, J = 8), 3.92(d, J = 8)]$   $\Lambda$  [0], C-9 [δc 96.6]와 H-12[δ<sub>H</sub> 1.96(m)], Me-17[δ<sub>H</sub> 1.33(s)], Me-20[δ<sub>H</sub> 1.19(s)]λΗ0, C-8[δс 87.6]과 Me-17[δн 1.33(s)], 8-0C0C<u>H3</u>[δн 2.06(s)]사이, C-7[δс 205.3] 과 Me-17[δн 1.33(s)], H2-6[δн 2.24(m), 2.51(dd, J = 14.5, 12)]사이, C-10[δ с 43.4]과 H-1[δ<sub>H</sub> 1.09(m)], Me-20[δ<sub>H</sub> 1.19(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.19(m)]사이, C-4[δс 38.5]와 Me-18[δн 0.96(s)], Me-19[δн 0.85(s)], H-5[δн 2.19(m)]사이, C-3 [δ c 75.2]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.85(s)]사이, C-5[δc 42.9] 와 Me-19 [δ<sub>H</sub> 0.85(s)]사이, C-6[δc 35.5]과 H-5[δ<sub>H</sub> 2.19(m)] 사이, C-15[δc 104.4]와 15-OCH₃[δμ 3.34(s)]사이, C-2[δc 24.6]과 Me-18[δμ 0.96(s)]사이, 그리고 C-11[δc 28.1]과 H-12[δ<sub>H</sub> 1.96(m)]사이의 cross-peaks를 관찰할 수 있었다. 또 NOESY spectrum**(Fig. 6)**으로부터 H-3(δ<sub>H</sub> 3.40)이 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.96), Me-19(δ<sub>H</sub> 0.85), H₂-2(δ<sub>H</sub> 1.69, 1.95)과 비슷한 정도의 NOE를 나타냄으로써 H-3가 β배향이 고, C-3의 chiral center가 R configuration임이 밝혀졌다. 또 α배향의 H-5(δ<sub>H</sub> 2.19)가 Me-18(δμ 0.96)과 밀접한 관련을 나타내 Me-18은 α배향을 C-5은 S 배열 로 분석되었다. 그리고 H-5와 Me-18, H-6α(δ<sub>H</sub> 2.24), Me-17(δ<sub>H</sub> 1.33)사이, β배 향의 Me-20(δ<sub>H</sub> 1.19)와 axial 8-0Ac(δ<sub>H</sub> 2.06)사이에 cross-peak가 관찰되어 Me-17은 α, 8-0Ac는 β배향으로 C-8위가 R 배열을 나타내었다. Me-20과 H-11(δ<sub>H</sub> 2.24)관계로 C-9는 S 배열을, Me-20과 Me-19의 관계로 Me-19는 β배향이고 C-10위 는 S 배열을 가졌다. Me-17과 H₂-16(δμ 3.58, 3.92)사이의 NOE로 C-13위는 R 배열 을 나타냈다. H-15(δμ 4.93)와 H-12(δμ 2.15)가 밀접한 관계를 가져 H-15는 β배 향, C-15는 R 배열로 분석되었다. 위 분석 결과 compound 5는 (*3R, 5S, 8R, 9S, 10S, 13R, 15R*)-3α-hydroxy-8β-acetoxy-9, 13; 15, 16-diepoxy-15α-methoxyla bdane-7-one라는 화합물로 밝혀졌다.<sup>(7-9)</sup>

이 화합물은 불포화도가 6로써 4개의 환과 2개의 이중결합을 갖는데, 2개의 환

은 특징적인 chemical shift 값을 갖는 두 개의 oxygenated quaternary carbons, C-9(δc 96.6),C-13(δc 90.8)으로 연결된 spiro-tetrahydrofuran 링이다. 이 화 합물은 C- 13위가 R 배열로 compound 1-4와 가장 큰 차이를 보이고, C-3위치의 α-acetoxyl group이 α-hydroxyl group으로 치환됨으로써 C-3의 chemical shift 값이 75.2로써 compound 1-4보다 -Δ2정도 upfield에 나타난 것이 특징이다. 또한 C-15의 methoxyl group이 α 배향으로 δc가 특징적으로 74점대를 나타내었다. C-6위치의 두 proton의 배향이 뚜렷이 구분되며, Chemical shift 값이 H-6α는 2.24(m)를 나타내고 H-6β는 2.51(dd, *J* = 14.5, 12)를 나타낸다. C-16의 두 수소 [δ<sub>H</sub> 3.85(d, *J* = 8), 3.92(d, *J* = 8)]는 모두 doublet으로 뚜렷한 짝지음 상수를 나타내는 것을 볼 수 있다.(table 1) 이 화합물은 C-3위치에 α-hydroxyl group이 존재함으로써 신규 화합물로 인정된다.

#### 5. Compound 6의 구조

Compound 6은 노란색을 띠는 oil 상태로 분리되었다. [α]<sub>0</sub><sup>25</sup> 는 +19.929°로 측정되었고, 분자식은 <sup>13</sup>C-NMR**(Table 2)**과 HR-EI-MS(*m/z* 424.2459 [M]<sup>+</sup>)로부터 C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub>로 결정되었다. 그리고 IR spectrum으로부터 hydroxyl(3446cm<sup>-1</sup>)과 ester(17 38cm<sup>-1</sup>) functional group의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR(Table 1, 2)과 HSQC spectrum data분석결과, 이 화합물은 compound 5와 같은 pattern의 탄소 23개로 이루어진 화합물로 밝혀졌다.

이 화합물의 구조는 HMBC와 NOESY spectrum data를 분석하여 결정하였다. HMBC(Fig. 12)로부터 C-13[るс 91.3]과 H-15[る<sub>H</sub> 4.99(d, J = 5)], H<sub>2</sub>-14[δ<sub>H</sub> 1.96(m), 2.33(m)], H<sub>2</sub>-16[δ<sub>H</sub> 3.83(d, J = 9), 4.06(d, J = 9)]사이, C-9[δс 96.7]와 H-12[δ<sub>H</sub> 2.16(m)], Me-17[δ<sub>H</sub> 1.31(s)], Me-20[δ<sub>H</sub> 1.17(s)]사이, C-8[δ с 87.6]과 Me-17[δ<sub>H</sub> 1.31(s)], 8-0C0CH<sub>3</sub>[δ<sub>H</sub> 2.07(s)]사이, C-7[δс 205.6]과 Me-17[δ<sub>H</sub> 1.31(s)], H<sub>2</sub>-6[δ<sub>H</sub> 2.22(m), 2.51(dd, J = 14, 12)]사이, C-10[δс 43.2]과 H-1[δ<sub>H</sub> 1.12(m)], Me-20[δ<sub>H</sub> 1.17(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)]사이, C-4[δс 38.6]와 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.86(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)]사이, C-3 [δ с 75.3]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.86(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)]사이, C-3[δ c 75.3]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.86(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)], HoI, C-3[δ c 75.3]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.86(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)], HoI, C-3[δ c 75.3]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.86(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)], HoI, C-3[δ c 75.3]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.86(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)], HoI, C-3[δ c 75.3]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], Me-19[δ<sub>H</sub> 0.86(s)], H-5[δ<sub>H</sub> 2.18(m)], HoI, C-15[δ<sub>C</sub> 105.1]와 15-0CH<sub>3</sub>[δ<sub>H</sub> 3.28(s)], HoI, C-2[δ<sub>C</sub> 24.7]과 Me-18[δ<sub>H</sub> 0.96(s)], HoI, 그리고 C-11[δ<sub>C</sub> 28.5]과 H-12[δ<sub>H</sub> 2.16(m)], HoI = cross-peaks를 관찰할 수 있었다. 또 NOESY spectrum**(Fig. 7)**으로부터 H-3(δ<sub>H</sub> 3.43)이 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.96), Me-19(δ<sub>H</sub> 0.86), Hp-2(δμ 1.65, 1.95)과 비슷한 정도의 NOE를 나타냄으로써 H-3가 β배향이 고, C-3의 chiral center가 R configuration임이 밝혀졌다. 또 α배향의 H-5(δ<sub>H</sub> 2.18)가 Me-18(δ<sub>H</sub> 0.96)과 밀접한 관련을 나타내 Me-18은 α배향을 C-5은 S 배열 로 분석되었다. 그리고 H-5와 Me-18, H-6α(δ<sub>H</sub> 2.22), Me-17(δ<sub>H</sub> 1.31)사이, β배 향의 Me-20(δ<sub>H</sub> 1.17)와 axial 8-0Ac(δ<sub>H</sub> 2.07)사이에 cross-peak가 관찰되어 Me-17은 α, 8-0Ac는 β배향으로 C-8위가 R 배열을 나타내었다. Me-20과 H-11(δ<sub>H</sub> 2.22)관계로 C-9는 S 배열을, Me-20과 Me-19의 관계로 Me-19는 β배향이고 C-10위 는 S 배열을 가졌다. Me-17과 H2-16(δ<sub>H</sub> 3.83, 4.06)사이의 NOE로 C-13위는 R 배열 을 나타냈다. H-15(δμ 4.99)와 H2-12(δμ 2.16, 2.35)가 아무런 관계를 가지지 않 아 H-15는 α배향, C-15는 S 배열로 분석되었다. 위 분석 결과 compound 6은 (3R, **55. 8R. 9S. 10S. 13R. 15S**)-3α-hydroxy-8β-acetoxy-9, 13; 15, 16-diepoxy-15  $\beta$ -methoxylabdane-7-one라는 화합물로 밝혀졌다. $^{(7-9)}$  이 화합물은 불포화도가 6 로써 4개의 환과 2개의 이중결합을 갖는데, 2개의 환은 특징적인 chemical shift 값을 갖는 두 개의 oxygenated quaternary carbons, C-9(δc 96.7),C-13(δc spiro-tetrahydrofuran 링이다. 그리고 C-15가 α 배향인 91.3)으로 연결된 compound 5와는 달리 C-15의 methoxyl group이 β 배향으로 δc가 특징적으로 77.9를 나타내었다. 이 화합물은 C-6위치의 두 proton의 배향이 뚜렷이 구분되며, Chemical shift 값이 H-6α는 2.22(m)를 나타내고 H-6β는 2.51(dd, J = 14, 12) 를 나타낸다. C-16의 두 수소[δ<sub>H</sub> 3.83(d, J = 9), 4.06(d, J = 9)]는 모두 doublet으로 뚜렷한 짝지음 상수를 나타내는 것을 볼 수 있다.(table 1) 이 화합 물은 C-3위치에 α-hydroxyl group이 존재함으로써 신규 화합물로 인정된다.

Compound 1-6은 모두 두 개의 spiro-tetrahydrofuran 링을 갖는 4개의 환으로 구성된 bis-spirolabdane-type의 diterpenoids이다. 이 화합물들은 C-3위치에 α -hydroxyl group나 α-acetoxyl group가 존재함으로써 신규화합물로 인정된다. 이 화합물들의 특징은 첫 번째로 C-6위의 두 proton의 배향이 뚜렷이 구분되며 Chemical shift 값이 H-6α 는 2.2-2.3을 나타내고 H-6β는 2.5-2.6을 나타내는데 compound 3-6의 H-6β의 δ<sub>H</sub>와 짝지음 상수는 차례대로 2.51, dd, *J* = 14, 12/ 2.52, dd, *J* = 14, 12/ 2.51, dd, *J* = 14.5, 12/ 2.51, dd, *J* = 14, 12.를 갖는 다. 두 번째로 C-3위치에 OAc를 갖는 compound 1-4는 δc 77, δ<sub>H</sub> 4.64의 값을 갖 고, OH를 갖는 compound 5, 6은 δc 75, δ<sub>H</sub> 3.4로 나타나 compound 1-4보다는 upfield의 chimical shift 값을 갖는 것을 알 수 있다. 또한 compound 1-4의 Me-18, 19의 δ<sub>H</sub>는 0.96, 0.85의 값을 갖는 반면 compound 5, 6의 δ<sub>H</sub>은 Me-18, 19 가 0.87, 0.90으로 역전되는 것을 알 수 있다. 마지막으로 compound 1-6에서 C-16 의 두 수소는 모두 doublet으로 뚜렷한 짝지음 상수를 나타내는 것을 볼 수 있 다.(table 1) 또한 C-16의 chimical shift값이 77-78을 나타내면 H-15가 α배향 을, 74-75의 upfield에서 나타나면 β배향을 갖는 것을 볼 수 있다.<sup>(7)</sup>

#### 7. 생리활성 결과

7-1. NBT superoxide scavenging assay

익모초의 MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O extract에 대하여 NBT superoxide scavenging assay에 의한 antioxidative activities를 검토하였다. 그 결과 100/kg / # 인 농도에서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60.2%) 분획이 활성이 있었고, 50/kg / # 인 농도에서는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40.7%), EtOAc (0.14%) 분획이 활성이 있었고, 25/kg / # 인 농도에서는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15.7%) 분획이 활성이 있는 것으로 나타났다. 여기서 익모초의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분 획은 고농도 강한 antioxidative activities를 나타내어 익모초의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획에서 강한 antioxidative activities가 있는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

#### 7-2. Cytotoxic activity assay

MG-63 인체유래 암세포주에 대한 시험관내 세포성장 저해효과를 SRB (sulfor hodamine B)방법으로 익모초의 MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획에 대하여 검색해 본 결과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>의 분획이 MG-63 암 세포주에 대하여 147.9 µg/m<sup>2</sup>인 IC<sub>50</sub> 값을 나타내어 익모초 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물 분획 중에서 우수한 cytotoxic activity 를 나타내는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

#### 7-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인

익모초의 MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획 및 compound 1/2, 4, 6에 대하 여 MG-63 세포에서 hIL-6의 유리정도(%)를 검토하였다. 그 결과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>분획과 이 분획에서 분리된 coumpoud 6이 MG-63 세포로부터 hIL-6의 유리가 현저히 감소하는 것으로 나타났다. compound 1/2, 4, 6에 대한 각각의 hIL-6의 유리정도는 18.6± 7.0%, 10.8±4.6%, 66.4±1.1%로 나타났다.



Fig. 2. Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of compound 1







Fig. 4. Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of compound 3



Fig. 5. Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of compound 4



Fig. 6. Selected key NOE correlations in NOESY spectrum of compound 5







Fig. 8. Selected <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range correlations in HMBC spectrum of compound 1/2



Fig. 9. Selected <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range correlations in HMBC spectrum of compound 3



Fig. 10. Selected <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range correlations in HMBC spectrum of compound 4



Fig. 11. Selected <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range correlations in HMBC spectrum of compound 5



Fig. 12. Selected <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range correlations in HMBC spectrum of compound 6

#### Ⅳ. 결 론

익모초의 전초는 활혈, 거어, 조경, 소수의 효능이 있고, 산후출혈, 월경불순, 태루난산, 포의불하, 혈뇨, 사혈, 산후혈훈을 치료한다. 열매를 충위자라고 하며, 활혈, 거어, 조경, 청열의 효능이 있고, 월경불순, 대하, 산후어혈에 의한 통증을 치료한다. 약리작용으로는 전초의 물 추출물이 토끼, 개의 적출 자궁에 대하여 흥 분작용을 가지고, 정맥주사시 혈압을 강하시킨다.

성분에 관한 연구를 보면 flavonoids인 rutin, genkwanin과 alkaloids로서 leonurine, leonuridine, strachydrine, 4-guanidinobutanol, 4-guanidinobutyric acid을 함유하며, terpenoids인 labdane diterpenes, furanoditerpen-lactones과 기타 essential oil, protocatechol, benzoic acid, 지방산을 함유하는 것으로 나 타나는데, 최근 연구에 따르면 bis-spirolabdane-type의 diterpenoids가 여러 생 리활성을 가진으로 밝혀져 새로운 bis-spirolabdane-type diterpenoids 분리를 시 도하였다.

익모초 (*Leonurus sibiricus* L.) CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> 분획에서 새로운 6개의 bis-spirolabdane -type diterpenoids, 3α-acetoxyleoheteronone E (1), 3α-acetoxy-15-epileohet eronone E (2), 3α-acetoxyleoheteronone C (3), leoheteronone F (4), 3α -acetoxy-leoheteronone A (5) and leoheteronone G (6)을 분리하였다. 성분 분리 는 open column chromatography를 통하여 이루어졌고, 분광학적 분석(NMR)에 의하 여 구조가 분석되었다.

위 화합물 중 compound 1/2는 C-15 위치에 hydroxyl group이 붙은 epimeric pairs으로, 나머지 화합물들은 pure form으로 분리되었다.

이 6개의 화합물들은 모두 특징적으로 C-3 위치에 hydroxyl group이나 acetoxyl group이 존재함으로써 신규화합물로 인정된다. 그리고 익모초의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획으로부 터 분리한 화합물을 세포독성이 없는 농도에서 TNF-α에 의해 유도된 hlL-6의 억 제작용을 알아보고자 하여 MG-63 세포주를 이용한 hlL-6의 유리 억제 실험을 실시 한 결과 compound 6이 hlL-6이 유리를 억제하는 것으로 확인되었다. 따라서 compound 6은 염증 반응 및 hlL-6의 과다 발현으로 인한 질병을 개선시키는 효과 가 있을 것으로 판단된다.

#### V. 참 고 문 헌

- 1) 김 태 정. 『한국의 자원식물 IV』, 서울대학교출판부, 1996, p.53
- 배 기 환. 『원색도감 한국의 자연시리즈 13 한국의 약용식물』, 서울:교학
  사, 2000, p.437
- Boalino D.M., McLean S., Reynolds W.F., Tinto W.F. Labdane diterpenes of Leonurus sibiricus. J Nat Prod. 2004 Apr;67(4):714-7
- 4) Satoh M., Satoh Y., Isobe K., Fujimoto Y.. Studies on the constituents of Leonurus sibiricus L. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2003 Mar;51(3):341-2
- 5) Nagasawa H., Inatomi H., Suzuki M., Mori T. Further study on the effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer Res.* 1992 Jan-Feb;12(1):141-3
- 6) Islam M.A., Ahmed F., Das A.K., Bachar S.C. Analgesic and anti-inflammato ry activity of *Leonurus sibiricus*. *Fitoterapia*. 2005 Jun;76(3-4):359-62.
- 7) Giang P.M., Son P.T., Matsunami K., Otsuka H. New bis-spirolabdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* Sw. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2005 Nov;53(11):1475-9
- 8) Tademir D., Wright A. D., Sticher O. New Furanoid and seco-Labdane Diterp enes from *Leonurus persicus*. *J. Nat. Prod*. 1996, 59, 131-134
- 9) Tademir D., Wright A. D., Sticher O. Detailed <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR investigatio ns of some diterpenes isolated from *Leonurus persicus*. *J. Nat. Prod*. 1995, 58, 1543-1554
- 10) Giang P.M., Son P.T., Matsunami K., Otsuka H. New Labdane-type-diterpeno ids from *Leonurus heterophyllus* SW. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2005 Aug;53(8):938-41
- 11) Ono M., Yamamoto M., Yanaka T., Ito Y., Nohara T. Ten new labdane-type diterpenes from the fruit of *Vitex rotundifolia*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2001 Jan;49(1):82-6

- 12) Ono M., Yamamoto M., Masuoka C., Ito Y., Yamashita M., Nohara T. Diterpe nes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. J Nat Prod. 1999 Nov;62(11):1 532-7
- Tademir D., Sticher O. Further Labdane Diterpenoids isolated from *Leonur* us persicus. J. Nat. Prod. 1997, 60, 847-879
- 14) 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* 2002, 27, 232-238.
- 15) 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.* 2002, 283, 679-687.
- 16) Mysliwiec J., Kretowski A., Topolska J., Stepien A. and Kinalska I.. the influence of corticosteroids on IL-6/IL-6R system in patients with graves ophthalmopathy. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2002, 108, 739-744.
- 17) 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 Pham Res.* 2003, 26, 1029-1035.
- 18) 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.* 2004, 27, 177-183.
- Skehan, P., Streng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mcmahon, J., and vistic a, D. new colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1990, 82, 1107-1112.
- 20) 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 officinalls. Arch. Pham. Res.* 2003, 26, 453-457.
- Kirby A. J. and Schmidt R. J. the antioxidant activity of chinese herbs for eczema and of placebo herbs- | *Ethnopharmacology*. 1997, 56, 103-108.





Fig. 13. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 1/2 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



Fig. 14.  $^{13}\mathrm{C-NMR}$  spectrum of compound 1/2 (125 MHz,  $\mathrm{CDCI}_3)$ 



Fig. 15. HR-EI-Mass spectrum of compound 1/2

- 37 -



Fig. 16. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 3 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

-38 -



Fig. 17. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 3 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

- 39 -



Fig. 18. HR-FAB-Mass spectrum of compound 3



Fig. 19.  $^{1}\text{H-NMR}$  spectrum of compound 4 (500 MHz, CDCl\_3)

- 41 -



Fig. 20.  $^{13}\mathrm{C-NMR}$  spectrum of compound 4 (125 MHz,  $\mathrm{CDCI}_3)$ 



Fig. 21. HR-EI-Mass spectrum of compound 4

- 43 -



Fig. 22. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 5 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

- 44 -



Fig. 23. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 5 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

- 45 -



Fig. 24. HR-FAB-Mass spectrum of compound 5

- 46 -



Fig. 25. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 6 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

- 47 -



Fig. 26. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 6 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



Fig. 27. HR-EI-Mass spectrum of compound 6

- 49 -

#### 감사의 글

감사합니다. 우은란 교수님, '성실'하여라 입이 닿도록 충고를 아끼지 않으시고 넓은 아량으로 여기까지 이끌어 주신 분, 이글을 쓰는데 먼저 죄송스런 마음이 앞섭니다.

바쁘신 가운데도 심사를 맡아 귀한 고견을 주시고, 논문을 다듬 어 주신 유진철 교수님과 이 논문이 있기까지 무엇보다 도움이 되 도록 유기 화학적 기초를 튼실하게 닦아주신 홍준희 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

진심어린 충고와 격려로 오히려 부담을 주신 최후균 학장님, 학 교를 떠나서도 학교를 생각하게 할 수 있는 마음을 주셔서 감사합 니다.

자주 찾아뵙진 못했지만 학교에 계시다는 이유만으로 마음이 든 든하고 웃음 짓게 해주신 한효경 평생지도교수님, 정년퇴임은 하셨 지만 큰아버지처럼 항상 자상하게 대해주신 문영희 교수님, 뵐 때 마다 한마디씩 조언을 꼭 해주시던 이원재 교수님, 뵌 지는 얼마 되지 않았지만 일의 진행사항에 관심 가져주신 오원근 교수님께 진 심으로 감사드립니다.

제 앞길을 챙겨주신다며 물심양면으로 돌보아주신 믿음직스런 우 리 반상준 형님, 그리고 우리 은파, 재상, 상희, 창엽, 지영, 동 헌, 재환, 찬종, 소희, 갑수, 미라, 실험실 가족 경학, 은진 항상 부족한 동생이자 형이자 오빠인 나에게 아주 큰 의지가 되어준 사 람들 고맙습니다.

우리가족, 아버지, 어머니, 은경 누나, 윤경 누나, 동생 현경, 큰 매형, 작은 매형 그리고 조카 소연, 희원에게 감사드립니다.

이 모든 분들의 도움과 격려가 있었기에 이 작은 결실을 맺을 수 있었습니다. 이 분들의 은혜에 보답하기 위해 이제 시작이란 마음 으로 더욱 정진할 것을 약속드립니다. 2007년 5월