







2009년 8윌 박사학위논문

이질풀(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc)과 딱총나무(*Sambucus williamsii var. coreana* Nakal)의 화학성분 및 생리활성에 관한 연구

조선대학교 대학원

약 학 과

류 경 학



이질풀(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc)과 딱총나무(*Sambucus williamsii var. coreana* Nakal)의 화학성분 및 생리활성에 관한 연구

Chemical Constituents and Biological activities from the *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc and *Sambucus williamsii var. coreana* NakaL

2009 년 8 월 25 일

조선대학교 대학원

약 학 과

류 경 학



이질풀(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc)과 딱총나무(*Sambucus williamsii var. coreana* Nakal)의 화학성분 및 생리활성에 관한 연구

지도교수 우 은 란

이 논문을 약학 박사학위신청 논문으로 제출함

2009년 4월 20일

조선대학교 대학원

약 학 과

류 경 학



류경학의 약학 박사학위 논문을 인준함



2009년 6월

조선대학교 대학원

Contents

Contents I
List of SchemesV
List of TablesVI
List of Figures
List of SymbolsX
AbbreviationXI
Abstract ······XIII
I.서 론 ·······1
Ⅱ.생약의 연구사6
1. 이질풀 (<i>Geranium thunbergii</i> Sieb <i>.et</i> Zucc)6
2. 딱총나무 (<i>Sambucus williamsii</i> var. coreana Nakal)8
비.실 험
1. 실험재료
2. 시약 및 기기13
2-1. 시약13
2-1-1. 분석용 시약13
2-1-2. Packing materials13
2-1-3. TLC plate14
2-1-4. Cell cycle14
2–2. כוכ 14
3. 추출 및 분획15
3-1. 이질풀(<i>G.thunbergii</i>)에 대한 추출 및 분획15
3-2. 딱총나무(<i>S.williamsii</i>)에 대한 추출 및 분획16
4. 이질풀과 딱총나무 분획에서 compound의 분리16
4-1. 이질풀의 EtOAc 분획에서 compound 분리

1-1-1 Compound 1
4 1 1. compound 1 17
4-1-2. Compound 2
4-1-3. Compound 3
4-1-4. Compound 4
4-1-5. Compound 5
4-1-6. Compound 621
4-1-7. Compound 721
4-2. 딱총나무의 CH2Cl2 분획에서 compound 분리
4-2-1. Compound 824
4-2-2. Compound 925
4-2-3. Compound 1026
4-2-4. Compound 11
4-2-5. Compound 1227
4-2-6. Compound 1328
4-2-7. Compound 14
4-2-8. Compound 15
4-2-9. Compound 16
4-2-10. Compound 17
4-2-11. Compound 18
4-2-12. Compound 19
4-2-13. Compound 2034
4-2-14. Compound 21
4-2-15. Compound 22
4-3. 딱총나무의 EtOAc 분획에서 compound 분리
4-3-1. Compound 23
4-3-2. Compound 24
4-3-3. Compound 25
5. 생리활성 실험방법 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

5-1. NBT superoxide scavenging assay40
5-2. Cytotoxic activity assay
5-3. MG-63 cell line에서 hlL-6의 유리 확인42
5-4. Antifungal activity assay43
Ⅳ. 결과 및 고찰44
1. 이질풀의 EtOAc 분획 compound 구조 동정44
1-1. Compound 1의 구조 동정44
1-2. Compound 2의 구조 동정45
1-3. Compound 3의 구조 동정46
1-4. Compound 4의 구조 동정47
1-5. Compound 5의 구조 동정48
1-6. Compound 6의 구조 동정49
1-7. Compound 7의 구조 동정50
2. 딱총나무 CH ₂ Cl ₂ 분획 compound 구조 동정
2-1. Compound 8의 구조 동정
2-2. Compound 9의 구조 동정53
2-3. Compound 10의 구조 동정
2-4. Compound 11의 구조 동정
2-5. Compound 12의 구조 동정
2-6. Compound 13의 구조 동정58
2-6. Compound 14의 구조 동정59
2-7. Compound 15의 구조 동정60
2-8. Compound 16의 구조 동정61
2-9. Compound 17의 구조 동정62
2-10. Compound 18의 구조 동정63
2-11. Compound 19의 구조 동정64
2-12. Compound 20의 구조 동정66
2-13. Compound 21의 구조 동정66

2-14. Compound 22의 구조 동정68
3. 딱총나무 EtOAc 분획 compound 구조 동정69
3-1. Compound 23의 구조 동정69
3-2. Compound 24의 구조 동정
3-3. Compound 25의 구조 동정
4. 생리활성 결과 ~~~~~72
4-1. NBT superoxide scavenging assay72
4-2. Cytotoxic activity assay73
4-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인
4-4. Antifungal activity74
V. 결 론 ······75
1. 이질풀 (<i>Geranium thunbergii</i>) ······75
2. 딱총나무 (<i>Sambucus williamsii</i>)
Ⅵ. 참 고 문 헌
APPENDIX

List of Schemes

Scheme	Ι.	Extraction and fractionation of MeOH extract from
		Geranium thunbergii90
Scheme	Π.	Extraction and fractionation of MeOH extract from
		Sambucus williamsii90
Scheme	III .	Isolation of compounds 1~7 from EtOAc extract of
		Geranium thunbergii91
Scheme	IV.	Isolation of compounds 8, 9, 13 and 15~16 from
		CH ₂ Cl ₂ extract of <i>Sambucus williamsii</i> 91
Scheme	۷.	Isolation of compounds 10~12 and 14 from CH_2CI_2
		extract of <i>Sambucus williamsii</i> 92
Scheme	VI.	Isolation of compounds 17~22 from CH ₂ Cl ₂
		extract of <i>Sambucus williamsii</i> 92
Scheme	VII.	Isolation of compounds 23~25 from EtOAc
		extract of <i>Sambucus williamsii</i>

List of Tables

Table 1.	Antioxidative activities of fraction extract from
	Geranium thunbergii
Table 2.	Cytotoxic activity of fraction extract from
	Geranium thunbergii94
Table 3.	Antioxidative activities of fraction extract from
	Sambucus williamsii94
Table 4.	Cytotoxic activity of fraction extract from
	Sambucus williamsii95
Table 5.	Antifungal activity of compound 17, 18
	and 21 from <i>Sambucus williamsii</i> 95

List of Figures

Fig.1. Geranium thunbergii Sieb. et Zucc11
Fig.2. Sambucus willimasii var. coreana Nakal
Fig.3. Structures of isolated compounds 1-7 from
Geranium thunbergii96
Fig.4. Structures of isolated compounds 8-16 from
Sambucus williamsii ·····97
Fig.5. Structures of isolated compounds 17-25 from
Sambucus williamsii98
Fig.6. Effects of compounds 1~6 on TNF- α induced hlL-6
production from MG-63 cells99
Fig.7. Effects of compounds 17, 18 and 21 on antifungal
activity from Fungal cells100
Fig.8. $^{1}H-NMR$ spectrum of compound 1 (500 MHz CD ₃ OD)101
Fig.9. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 1 (125 MHz CD_3OD)102
Fig.10. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2 (500 MHz CD_30D)103
Fig.11. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 2 (125 MHz CD_3OD)104
Fig.12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 3 (500 MHz CD_30D)105
Fig.13. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 3 (125 MHz CD_3OD)106
Fig.14. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 4 (500 MHz CD_30D)107
Fig.15. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 4 (125 MHz CD_3OD)108
Fig.16. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 5 (300 MHz CD_30D)109
Fig.17. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 5 (75 MHz CD_3OD)
Fig.18. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 6 (300 MHz CD_3OD)111
Fig.19. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 6 (75 MHz CD_3OD)
Fig.20. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 7 (500 MHz CD_3OD)113

Fig.21. ¹³C-NMR spectrum of compound 7 (125 Mtz CD₃OD)114 Fig.22. ¹H-NMR spectrum of compound 8 (500 MHz CDCl₃)115 Fig.23. ¹³C-NMR spectrum of compound 8 (125 MHz CD₃OD)116 Fig.24. FAB-MS spectrum-A of compound 9 (positive)117 Fig.25. FAB-MS spectrum-B of compound 9 (positive)118 Fig.26. ¹H-NMR spectrum of compound 9 (500 MHz CDCI₃)119 Fig.27. ¹³C-NMR spectrum of compound 9 (125 MHz CDCl₃)120 Fig.28. HSQC spectrum of compound 9 (500 MHz CDCl₃)121 Fig.29. HMBC spectrum of compound 9 (500 MHz CDCl₃)122 Fig.30. ¹H-NMR spectrum of compound 10 (500 MHz CDCI₃)123 Fig.31. ¹³C-NMR spectrum of compound 10 (125 MHz CDCI₃)124 Fig.32. HSQC spectrum of compound 10 (500 MHz CDCI₃)125 Fig.33. HMBC spectrum of compound 10 (500 MHz CDCl₃)126 Fig.34. ¹H-NMR spectrum of compound 11 (500 MHz CDCI₃)127 Fig.35. ¹³C-NMR spectrum of compound 11 (125 MHz CDCI₃)128 Fig.36. ¹H-NMR spectrum of compound 12 (500 MHz CD₃OD)129 Fig. 37. ¹³C-NMR spectrum of compound 12 (125 MHz CD₃OD)130 Fig.38. ¹H-NMR spectrum of compound 13 (500 MHz CDCl₃)131 Fig. 39. ¹³C-NMR spectrum of compound 13 (125 Mtz CDCl₃)132 Fig.40. ¹H-NMR spectrum of compound 14 (500 MHz CDCI₃)133 Fig.41. ¹³C-NMR spectrum of compound 14 (125 MHz CDCI₃)134 Fig.42. ¹H-NMR spectrum of compound 15 (500 MHz CDCI₃)135 Fig.43. ¹³C-NMR spectrum of compound 15 (125 Mtz CDCI₃)136 Fig.44. HSQC spectrum of compound 15 (500 MHz CDCI₃)137 Fig.45. HMBC spectrum of compound 15 (500 MHz CDCI₃)138 Fig.46. ¹H-NMR spectrum of compound 16 (500 MHz CDCI₃)139 Fig.47. 13 C-NMR spectrum of compound 16 (125 MHz CDCI₃)140 Fig.48. HSQC spectrum of compound 16 (500 MHz CDCI₃)141

Fig.49.	HMBC spectrum of compound 16 (500 MHz $\mbox{CDCl}_3\mbox{)}$ 142
Fig.50.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 17 (300 MHz CD_30D)143
Fig.51.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 17 (75 MHz CD_3OD)143
Fig.52.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 18 (500 MHz CD_30D)145
Fig.53.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 18 (125 MHz CD_3OD)146
Fig.54.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 19 (500 MHz CD_30D)147
Fig.55.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 19 (125 MHz CD_3OD)148
Fig.56.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 20 (500 MHz CD_30D)149
Fig.57.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 20 (125 MHz CD_3OD)150
Fig.58.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 21 (500 MHz CD_30D)151
Fig.59.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 21 (125 MHz CD_3OD)152
Fig.60.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 22 (500 MHz CD_30D)153
Fig.61.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 22 (125 MHz CD_3OD)154
Fig.62.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 23 (500 MHz CD_30D)155
Fig.63.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 23 (125 MHz CD_3OD)156
Fig.64.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 24 (500 MHz CD_30D)157
Fig.65.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 24 (125 MHz CD_3OD)158
Fig.66.	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 25 (500 MHz CD_30D)159
Fig.67.	$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 25 (125 MHz CD_3OD)160

List of Symbols

```
br : broad
```

- c : concentration
- d : doublet
- dd : double doublet
- Hz : hertz (sec⁻¹)
- M : Mole
- M⁺ : Molecular Ion
- m/z: Mass/charge ratio
- M.W. : Molecular Weight
- MHz : mega hertz (sec⁻¹)
- nm : nano meter
- p : product
- pp. : page
- ppm : part per million
- s : singlet
- S : substrate
- t : triplet
- $[\alpha]_{D}$: specific rotation at sodium D-line
- δ : chemical shift (ppm)

Abbreviation

- *n*-BuOH : *n*-butyl alchol
- C.C. : column chromatography
- CHCl₃ : chloroform
- CH₂Cl₂ : methylene chloride
- DEPT : diatortionless enhancement by polarization transfer
- DMEM : eulbecco's modified eagle medium
- DMSO : dimethylsulfoxide
- EI-MS: electron impact Mass spectroscopy
- EtOAc : ethyl acetate
- EtOH : ethyl alcohol
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
- FAB-MS : fast atom bombardment Mass spectroscopy
- FBS : fetal bovine serum
- Fig. : Figure
- Fr. : Fraction
- HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
- HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity
- hlL-6 : human interleukin-6
- H₂O : water
- IC₅₀ : 50% inhibition concentration
- IR : infrared spectroscopy
- MeOH : methyl alcohol
- MTT : 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- m.p. : melting point
- NMR : nuclear magnetic resonance spectroscopy
- SRB : sulforhodamine B



RP : reverse phase TLC : thin layer chromatography TNF- α : tumor necrosis factor- α Tz : zero time T : test TMB : tetra methyl benzidine UV : ultraviolet spectroscopy



ABSTRACT

Chemical Constituents and Biological activities from the *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc and *Sambucus williamsii var*. *coreana* NakaL

> LIU, QING-HE Advisor : Prof. Woo, Eun-Rhan, Ph.D. Department of Pharmacy, Graduate School of Chosun University.

Geranium thunbergii Sieb. et Zucc(Geraniaceae) is a perennial plant and is distributed in Korea, China, and Japan. In traditional medicine. the whole plants are used as an ant ihemorrhage. sterilization, diarrhea, and astringent. Previous phytochemical studies on this species afforded tannins and flavonoids, such as geraniin, corilagin, ellagic acid, gallic acid, guercetin, kaempferol, and kaempferol-7-rhamnoside. In an ongoing investigation into biologically active compounds from natural products, the EtOAc soluble fraction of methanol extract from G. thunbergii. showed significant antioxidative activity on the NBT superoxide scavenging assay and inhibitory effect on TNF- α induced hIL-6 production in the MG-63 cell. By means of the repeated column chromatography using silica gel, HP-20, Sephadex LH-20, LiChroprep RP-18, three flavonoids afzelin (1), quercetin $3-\theta-\alpha-$ (2), Kaempferol-3-0- α -rutinoside L-rhamnopyranoside (3). three phenylic acids gallic acid(4), protocatechuic acid (5), gallic acid methyl ester (6) and one tannin Isocorilagin (7) were isolated. Their structures of compounds 1~7 were determined by chemical analysis, as well as, 1D- with 2D-NMR sepectroscopy. Among them, compounds 3 and 5~7

were isolated from this plant for the first time. In vitro cell cytotoxicity was evaluated by SRB method and compounds 1~6 showed no cytotoxic activity. Compound 4, 5 and 6 showed inhibitory effect on TNF- α induced hIL-6 production in the MG-63 cell. Therefore, compounds 4~6 may be developed for the anti-inflammatory agents and treatment of disease by overexpression of hIL-6.

Korean Sambucus williamsii var. coreana(Caprifoliaceae) was plants usually used in popular medicine of Korea for prevention and treatment of bone diseases for thousands of years. A tree widely distributed in korea, china and japan, has been used for have been known to possess expelling the wind, remove dampness through diuresis, prompt blood flow, relieve pain activities, and have been used for rheumatic arthritis, lumbodynia, bone fracture and external hemorrhage, chemical investigation on this species has been seldom reported previously. However, chemical investigation on this species has been seldom reported previously. Only several lignans. phenolic acids. triterpenoids and steroids have been isolated until now, such as oleanolic acid, betulic acid, ursolic acid, vanillin, coniferyl alcohol, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, (-)-syringaresinol, (-)-pinoresinol, (-)-dihydrodehydrodiconiferyl alchohol, stigmasterol. During our search for the phytochemical studies on Korean medicinal plants, seven triterpenoids, two sterols, nine lignans were isolated from the CH₂Cl₂- and EtOAc- soluble fraction of the stem bark of S. williamsii, through repetitive column chromatography method using silica gel, HP-20, Sephadex-LH 20 and RP-18. By analyses of spectroscopic data and comparison of their data with those of published values, the compounds were identified as α -amyrin-3- β -palmitate (8), 11-keto- α -ayrin palmitate (9), betulonic acid (10), oleanonic acid (11), betulinic acid (12), β -amyrin (13), ursolic acid latone (14), β -sitosterol (15), stigmasterol (16), (+)-pinoresinol (17),

(-)-lariciresinol (18), (+)-lariciresinol (19), 8-hydroxy pinoresinol (20), (-)-olivil (21), (+)-medioresinol (22), (-)-olivil 9- θ - β -glucopyranoside (23), dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'- θ - β -glucoside (24), glochidioside (25). Among these compounds 8~11, 13, 14 and 19~25 were isolated from this plant for the first time. Among these isolates, the compounds 17, 18 and 21 in vitro using methods micro-dilution and MTT-assay of the experimental anti-fungal. The result express these compounds has different degree to the *T. beigelii, M. furfur* and *C. albicans* fungi cell to repress a function. So compounds 17, 18 and 21 cause to these fungis of the disease have a treatment function.

Key words : *Geranium thunbergii, Geraniaceae, Sambucus williamsii, Caprifoliaceae,* flavonoids, phenylic acid, triterpenoids, lignans, hlL-6, anti-fungal.

Ⅰ.서 론

최근 인류가 직면하고 있는 질병의 치료와 예방을 목적으로 천연물로부터 새로운 생리활성물질을 찾아 신약을 개발하고자 많은 노력을 하고 있다.

천연물 유래의 항암제 개발에는 그 동안 미국 NCI (National Cancer Institute)내에서 천연물의 조달, 활성검색, 전 임상연구, 활성물질의 임상평가 등의 체계적인 연구와 노력으로 어느 정도는 성과가 있었지만 아직도 완전히 해결되지 못한 실정임은 주지의 사실이다. Annual Reports of Medicinal Chemistry에 따르면 1983년부터 1994년까지 새롭게 승인된 항암제 31 종중에 19 종인 약 61 %의 약물이 천연물로부터 분리되어 개발되었거나, 반 합성 유도체 또는 천연 model에서 기인된 합성품이다.

최근의 약물 개발의 경향에서 볼 때 항암제 분야에서의 천연물이 차지하는 비중은 매우 크며, 앞으로 생화학 및 분자생물학에서 새로운 작용기전이 밝혀지면, 그 새로운 작용기전에 작용하는 우수한 신규 항암제나 lead 화합물을 천연물로부터 도출해내어 개발하는 것은 매우 중요한 일이다.

한편 최근 활발히 진행된 화학요법제의 개발과 다양한 항생물질의 발견으로 미생물 감염질환의 치료가 용이해졌지만 각종 질병의 치료 및 농축산물의 생산성을 증대시킬 목적으로 항생제의 무분별한 남용으로 항생제 내성 미생물의 출현과 인하여 미생물질환의 치료에 어려움을 초래하고 있다. 항진균제는 크게 표면의 감염부위에 직접 작용하는 국소성 제제와 많은 조직과 기관에 흡수 이행되어 작용하는 전신성제제로 대별할 수 있다. 항진균제들 대부분 독성이 강하고 부작용이 많아 아직도 진균 감영증에 안심하고 사용할 만한 항균제가 거의 없다. 따라서 자연에 풍부하게 존재하는 천연물로부터 항균성 있는 우수한 후보물질을 개발하는 것도 중요한 일이다.

천연물로부터 항암 혹은 항 진균 활성이 있는 화합물을 분리하기 위해서는 천연물화학과 같은 학문을 익히는 것이 필수이다.

천연물화학은 식물, 미생물, 및 동물 생물자원에 존재하거나 분리한 화합물(주로 유기화합물)의 생합성 과정, 분리, 화학구조 및 생리활성 등을

연구하는 학문으로 천연, 주로 식물에 존재하는 화합물을 분리하여 화학구조를 규명하고 활용법의 개발 등을 주요 내용으로 한다.

고전적인 의미에서 천연물화학은 주로 이들 생물자원으로부터 유용한 물질을 분리, 정재하고 이들의 화학적인 구조를 결정하며 이러한 화합물들의 생물활성(생물에 대한 작용)을 연구하는 학문이었다. 이러한 연구 과정에서 천연물화학은 다양한 인접과학, 예컨대 유기화학, 분석화학, 생화학 또는 약리학 등의 지원 내지 협조체제를 필요로 한다.

천연물의 분리 및 화학구조에 관한 연구는 유기화학의 발전과 그 역사를 함께하여 초창기 유기화학의 발전을 주도하였다. 유럽에서 태동한 천연물화학은 동양의학의 오랜 전통을 가지고 있으면서 19세기 이후 독일과 외교적으로나 학문적으로 밀접한 유대관계를 가진 일본에서 근대과학의 매력적으로 인식되어 크게 발전하게 된다. 최근 주목에서 탁월한 항암성분인 paclitaxel이 분리되면서 전 세계적으로 식물자원의 활용과 천연물화학에 대하여 새로운 관심이 고조되고 있다.

천연물은 당, 지방산, 아미노산과 같이 모든 생물에 존재하며, 생화하는데 필요한 기본대사에 관여하는 물질(1차 대사산물)과 alkaloid, terpenoid, flavonoid와 같이 어느 특정생물에만 분포되어 있는 성분(2차 대사산물)으로 크게 나눌 수 있다. 2차대사산물은 특징은 그 구조가 다양하고 복잡하기 때문에 천연물화학의 연구대상은 주로 2차대사산물에 치중되어 왔으며, 이들의 화학구조 결정 및 합성에 관한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 수많은 천연물의 구조가 규명됨에 따라 복잡한 천연물의 구조에는 어느 일정한 규칙성이 있다는 것이 밝혀졌으며, 이와 같이 규칙성은 미지의 천연물 구조를 추정하는데 도움이 될 뿐만 아니라 여러 천연물의 체내 생합성과정을 체계화하는데 기초가 되었다.

동물이나 미생물은 대부분의 최종 대사산물을 체외로 배설하지만 식물은 대부분을 체내에 축적하므로 2차 대사산물이라 하면 모두가 식물성분이라 해도 과언이 아니다. 과거에는 2차 대사산물을 배설물로 취급하였으나 근래 식물 상호간에 2차 대사산물이 중요한 역할을 하고 있다는 것이 점차 밝혀져 천연물화학 연구가 더욱더 중요시되고 있다.

최근에는 생물자원에 존재하는 생리활성물질의 분리뿐만 아니라

생리활성물질의 식물체를 이용한 생산의 증대, 생산 조절 등을 위한 식물대사(생합성) 연구 및 대사 효소의 유전공학적 조절 연구도 천연물화학 영역에 포함되어 활발한 연구 성과를 내고 있다.

이들 생리활성 성분들을 대부분 2차 대사산물(secondary metabolites)로서 어느 특정생물에만 분포되어 있으며 식물체 생합성과정 중 소량씩 생성되는데, 지방산화합물, flavonoids, terpenoid, steroid, alkaloid, quinine, tannin, peptide, indole, coumarin 및 plant sterol 등이 포함된다.

한국에는 실제로 분포된 식물자원은 약 4천종 이상이 알려져 있으며, 동물, 곤충, 미생물 그리고 해양식물까지 합쳐보면 천연물 자원은 시로 엄청날 뿐만 아니라, 부가가치가 높은 연구개발 대상 분야로서 무한한 가능성을 내포하고 있다고 볼 수 있다.

이런 배경 하에서 천연물로부터 생리활성 물질을 분리하기 위해 지금까지 사용되어온 가장 보편적인 방법은 극성이 다른 여러 가지 용매(water, methanol, chloroform, butanol, ethyl acetate, hexane, petroleum ether)로 추출하여 각각의 분획을 나눈다. 분획은 다시 여지 chromatography, 박층 chromatography, 기체 chromatography, 고속액체 chromatography 등으로 재분리하고 화합물로 분리하는 과정을 거치게 된다, 이렇게 얻어진 화합물은 재결정 등의 과정을 통해 순수하게 분리 한다. 적외선 분광광도계(IR), 자외선 분광광도계(UV), 핵자기공명측정기(NMR), 질량분석기(MS) 등 기기장치가 천연물화학 연구에 도입됨에 따라 복잡한 화합물의 입체구조가 용이하게 해석 될 수 있게 되었으며, 더구나 X선 결정해석법과 전자계산기 발달됨에 따라 절대구조를 용이하게 결정할 수 있게 되었다.

hlL (human interleukin)-6는 cytokine 일종의 단백질 그룹으로 일부는 림프구 계통의 세포가 생성하여 면역조정 역할을 하며 조혈작용을 조절한다. 대부분의 cytokine은 표적세포의 세포표면 수용기를 통하여 작용하며 호르몬과 유사하다. 항세포증식작용, 항미생물작용, 항종양작용의 기능을 하기 때문에 감염, 염증, 자가면역질환, 종양치료제로 사용되고 있다. 이러한 여러 기능을 가진 hlL-6의 생산 조절이 잘못되면 류마티스 관절염,

간경변, 건선 피부병, 다발성 골수종, 심장 점액종, 후천성 면역 결핍증 등의 여러 가지 자가 면역 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 한편 다발성 골수종, 류마티스 관절염, 조기 분만 및 조기 양막파열 산모의 경우, 여러 조직에서 hlL-6가 높은 수준으로 검출 되는 것으로 보고 되였다. 또한 염증성 신경 관절 질환(관절염, 신경통, 근육통)에 관한 많은 연구가 보고 되어졌다.¹²⁻¹⁴⁾

장기이식 및 감염병 치료제의 개발 등 여러 가지 의학기술의 발전과는 반대로 진균 감염증은 과거 20년간 계속 증가하여 왔다. Trichosporon beigelii는 이전에는 Trichosporon cutaneum으로 불리던 효소에 소하는 진균으로 Deuteromyces강, Cryptococcaceae과 Trichosporon속으로 분류된다. 주로 토양이나 물에서 발견되고 , 피부와 소화기계의 정상 세균총의 일종이다. 감염원으로 작용하는 경우 대부분 비침습적인 감염에 그쳐서 모간에 백색의 결절을 형성하는 모발피부 감염인 백사모증이 비교적 흔한 감염으로 알려져 있다. Candida albicans는 건강한 사람에게는 정상 균총으로 존재하고 있으나 암환자, 장기이식환자, 후천성 면역결핍환자, 장기 입원환자 등 면역이 저하된 환자에게는 치명적인 전신 감염을 일으킨다. 칸디다 균주가 병을 일으키기 위하여 면역 상태 등의 숙주 측의 요인뿐만 아니라 칸디다 균주 자체의 독성 인자가 중요한 역할을 한다. 이들 독성 인자 중 조직 침습에 관여하는 독성 인자로서 proteinase와 phospholipaserk 알려져 있다. 또한 malassezia furfur는 오래 동안 피부에 서식하는 규류로 특정조건에서 피부 등의 표면 감염을 일으키는 원인이 될 수 있고, 이식환자 등에서는 기회주의 병원체가 될 수 있다. malassezia fur fur가 yeast 형태에서 병원성인 균사형태로 바뀌어 피부의 각질층을 침입할 rudpityriasis versicolor(PV)라는 피부질환을 일으키며, 이는 통상적으로 어루러기로 잘 알려져 있다. 보통 아동과 신생아에서 보고되었지만, 대부분은 피지선의 활동이 최고조인 청소년들과 젊은이들 그리고 특히 땀을 많이 흘리는 운동선수들에게서 발견되고 화장품의 부작용으로 나타나기도 한다. 대부분의 환자들은 자각증상이 없고 몇몇 경우는 가려움을 유발하기도 하며 자주 치료를 하여야한다. 또한 사람 및

동물의 피모 및 피부각질층에 침범하여 피부상상균증도 일으키는데 피부과 영역에서 가장 빈도가 높은 감염성 질환으로 된다.^{15~17)}

위와 같은 연구배경을 바탕으로 천연물. 특히 생약으로부터 새로운 항암제, 항균제를 개발 후보물질을 제시하고자 한다. 이를 위해 수백 종 생약의 MeOH 추출물을 세포독성이 없는 농도에서 항산화활성 및 항암활성을 검색하였으며, 이들 중 이질풀 (Geranium thunbergii)과 딱총나무 (Sambucus williamsii)의 MeOH 추출물이 항산화활성 및 항암활성이 있는 것으로 보아 이들의 MeOH 분획으로부터 항산화활성이 있고 항암작용도 있는 화합물이 있음을 사료되어 본 연구에 착수하였다. 본 연구에서는 성분연구가 미약한 이질풀 EtOAc 분획과 딱총나무의 CH₂Cl₂, EtOAc 분획으로부터 sterols 2종, lignans 9종, triterpenoids 7종, flavonoid glycosides 3종, 단순 phenol류 3종을 분리하였으며, 화학적인 기기분석과 분광학적인 성상 및 문헌들과의 비교를 토대로 하여 각각의 구조를 동정하였다. 분리한 compounds 중 1~6 에 대하여 세포독성이 없는 농도에서 TNF-α에 의해 유도된 hlL-6의 억제작용을 알아보기 위하여 MG-63 세포주를 이용한 hIL-6의 유리, 억제 실험을 실시하였으며, 또한 compound 17, 18 및 21에 대하여 Trichosporon beigelii. Malassezia furfura 및 Candida albicans 과 같은 진균세포를 이용하여 미생물의 성장을 억제한 compound의 최소 농도 MIC 값을 측정하여 항진균 작용을 검토하였으며, 긍정적으로 앞에서 기술한 여러 가지 질환에 대한 치료제 개발의 가능성을 탐색하고자 하였다.

Ⅱ. 생약의 연구사

1. 이질풀 (Geranium thunbergii Sieb .et Zucc)

이질풀 (*Geranium thunbergii* Sieb .et Zucc.)은 쥐손이풀목 (*Geraniales*) 쥐손이풀속 (*Geranium* LINNE) 쥐손이풀과 (*Geraniaceae*)에 속하는 다년생 초본이다.

쥐손이풀목은 쥐손이풀과 (Geraniaceae), 괭이밥과 (Oxalidaceae), 아마과 (Linaceae), 한련과 (Tropaeolaceae), 운향과 (Rutaceae), 소태나무과 (Simarubaceae), 멀구슬나무과 (Meliaceae), 원지과 (Polygalaceae), 대극과 (Euphorbiaceae) 등으로 나누어져 있다.

쥐손이풀과 식물은 온대지방과 열대지방의 고산지대에 약 250종이 분포하고 한국에 약 16종 분포한다. 초본식물이며 잎은 장상엽 또는 3갈래로 갈라진다. 꽃은 방사상칭이며 꽃받침과 꽃잎이 5개이고 꿈샘덩이가 5개 있으며 웅예는 10개이고 자방은 1실이며 익으면 삭과가 되고 5갈래로 갈라진다. 쥐손이풀과 식물에는 쥐손이풀 (*Geranium sibiricum* LINNE), 이질풀 (*Geranium thunbergii* SIEBLD et ZUCCARINI), 세잎쥐손이 (*Geranium wilfordii* MaxINOWICZ), 큰세잎쥐손이 (*Geranium knuthii* NaKAI), 우단쥐손이 (*Geranium vlassovianum* FISCH), 좀쥐손이 (*Geranium tripartitum* R. КИМТН), 제라늄(*Pelargonium inquinans* AIT) 등이 있다.¹⁾

본 생약은 한방에서 현초(玄草) 또는 현지초(玄之草)라고 하며 전초를 가을에 재취하여 다듬어서 말린 것을 말한다. 산야 혹은 원야에서 자라는 다년생초본으로서 옆으로 비스듬히 또는 기어가면서 길이 50cm 정도 벋으며 위로 퍼진 털이 있고 뿌리가 여러 개로 갈라진다. 잎은 대생하며 엽병이 있고 장상으로 3~5개로 갈라지며 양면에 흔히 흑색의 무늬가 있고 너비는 3~7cm이며 표면에 복모가 있고 뒷면 맥 위에 비스듬히 선 곱슬 털이 있다. 열편은 도란형이며 둔두이고 얕게 3개로 갈라지며 윗부분에 불규칙한 톱니가 있고 탁엽은 서로 떨어진다. 8~9월에 꽃이 피며 지름 1~1.5 cm로서 연한 홍색, 홍자색, 또는 백색이며 화경에서 2개의 소화경이 갈라져 각각 1개의 꽃이 달린다. 소화경과 꽃받침에 짧은 털과 더불어 퍼진 긴 선모가 있으며

자방에 털이 있고 암술머리는 길이 2 mm 정도이다. 10월에 열매가 성숙되며 삭과는 5개로 갈라져서 위로 말리며 5개의 종자가 들어 있다.^{2.4.5)}

이질풀은 고, 신, 미온의 성미를 나타내며, 거풍제습 및 지사 효능 즉 풍습을 제거시키고 경락을 소통시켜 골격과 근육을 강건하게 하므로 사지마비동통, 관절불리, 타박상 등에 활용되고, 이질과 만성설사복통, 장염에 효과 있으며, 피부가려움증과 옴, 악창에도 효력을 보인다.^{3,5)}

약리작용을 보면 이질풀의 전액은 적리균, 장티프스, 대장균 프레스로우 장염균, 겔트넬장염균에 대하여 시험관에서 살균작용이 있으며 장의 긴장도를 높이고, 종조근 운동을 억제하지만, 긴장증가는 장의 평활근의 자기작용에 의해서 종조근 운동의 억제는 교감신경의 흥분에 의한 것이다. 또한 십이지장 및 소장의 유동운동을 억제하고 정장작용이 있다. 그러나 망장에서는 묽은 전액은 역유동, 진한 전액은 직유동을 촉진하며, 대장은 진한 전액만이 유동운동을 촉진하는 작용도 있다고 한다.³⁾ 물로 달인 액은 위 내 투여에서 부변량을 감소시키지만 피하 주사로는 효력이 없고, 다량 투여할 때 사하작용이 일어난다.⁴⁾

성분연구로는 전초에 tannin과 flavonoid가 주성분으로서 tannin은 앞에 약 20%, 전초에 약 5%를 함유하며 주성분은 ellagitannin의 하나인 geraniin이다. pyrogallol, epicatechin, gallic acid, ellagtannin이 있고, flavonoid는 quercetin, protocatechuic acid, kaempferitrin, kaempferol-7-rhamnoside, kaempferol이 있으며 등이 함유되어 있다고 한다.^{3,4,)} 그 밖에 Liu⁶⁾ 등이 이 식물의 CH₂Cl₂ 분획으로부터 4-hydroxykobusin, (+)methyl piperitol, 7,7 '-dihydroxybursehernin, kaempferol-3-*O*-*α*-L-rhamno pyranoside을 화합물을 분리하였다고 보고되었다.

임상보고에서 세균성이질에 매일 이 약물을 30g을 물을 넣고 달여서 2~3회 복용하며, 급만성장염의 치유율이 높고 국부감염증에 항균, 소염 작용을 나타내므로 포진성 각막염에 달인 물을 여과하여 눈에 바른다. 신경통에 매일 20~30g씩 물을 넣고 달여서 복용하며, 재생불량성 빈혈에도 매일 30g을 물에 넣고 달여서 설탕을 넣고 복용한다. 유선증식증에도 30~60g 물을 넣고 달여서 차로 복용한다.⁵⁾

2. 딱총나무 (Sambucus williamsii var. coreana Nakal)

딱총나무 (*Sambucus williamsii* var. *coreana* NakaL)는 꼭두서니목 (*Rubiales*) 인동과 (*Caprifoliaceae*) 딱총나무속 (*Sambucus* LINNE)에 속하는 낙엽관목이다.

꼭두서니목(*Rubiales*)에는 꼭두서니과 (*Rubiaceae*), 연복초과 (*Adoxaceae*) 인동과 (*Caprifoliaceae*), 마타리과 (*Valerianaceae*), 산토끼꽃과 (*Dipsaca-ceae*) 등이 있다.

인동과 식물은 낙엽 · 상록관목 또는 덩굴성 목본이며 드물게 소교목이다. 있은 단엽 도는 우상복엽으로 대생하며 꽃은 양성으로 취산, 산방, 원추화서와 총상 및 수상화서를 형성하고 포와 소포가 있거나 없다. 꽃받침과 화관열편은 4~5이며 자방은 상위이고 열매는 장과·핵과 또는 삭과이다. 13속 500종이 전 세계 북온대 및 열대 고산 지역에 분포하며 특히 동아시아 북미 동부 지역에 가장 많이 분포한다. Abelia(댕강나무속, Abelie)는 20종으로 구성되며 동북아시아 주요 분포지이고 한국에는 댕강나무 등 5종이 자생하며 좀댕강나무 등은 3종이 도입되어 있다. 인동과에는 딱총나무속 (Sambucus LINNE), 가막살나무속 (Viburnum LINNE), 댕강나무속 (Abelia R. BROWN), 병꽃나무속 (Weigela THUNBERG), 인동속 (Lonicera LINNE) 등이 있다.

딱총나무속 식물은 세계에 약 20종이 분포하고 한국에는 8종이 자라며 소교목 또는 관목이고 간혹 초본이며 잎은 대생하고 기수1회우상복엽이며 소엽에 톱니가 있고 엽병에 밀선이 있다. 꽃은 백색이며 산방화서를 이루고 꽃받침은 3~5개의 톱니가 있으며 화관은 방사상 종형이고 3~5개로 갈라지며 5개의 수술과 화주는 3개로 갈라지고 열매는 핵과이며 종잔가 3~5개 들어 있다. 한국에서 주로 자라는 딱총나무속 식물은 말오줌나무 (*Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakaı) T. LEE), 덧나무 (*Sambucus aieboldiana* BLUME, 지렁쿠나무 (*Sambucus sieboldiana var. miquelii* (Nakaı.) Hara), 넓은 잎 딱총나무 (*Sambucus latipinna* Nakaı), 딱총나무 (*Sambucus williamsii var coreana* Nakaı) 등이 있다.⁷⁾

본 생약은 한방에서 접골목이라고 하며 주로 줄기와 가지를 수시로

채취하여 건조한 것을 약용으로 사용한다.『신수본초』의 목부에 하품에 수재되어 있으며 근골을 붙인다는 의미에서 그 이름이 접골목이라 유래되었다.⁹⁾ 속명은 고려접골목, 당접골목, 당딱총나무, 청딱총나무라고 하며 분포지역은 일본, 중국 및 한국의 남부지방, 중부지방, 북부지방의 해발 100~1600m 지역, 산기슭, 습지 및 곡간에 자생한다.⁷⁾

딱총나무는 산골짝의 어느 정도 공중습기가 있는 곳에서 자라는 낙엽관목이며 높이가 3 m 안팎이고 줄기의 골속이 암갈색이며 소지에 털이 없고 동아는 둔두이다. 잎은 대생하며 2~3쌍의 소엽으로 구성된 기수 1회우상복엽이고 소엽은 긴 타원형, 타원형 또는 타원상 난형이며 급한 점첨두이고 예저로서 길이 5~14 cm 이며 양면에 털이 없고 가장자리의 톱니가 뾰족하며 안으로 굽지 않는다. 화서는 짧은 원추화서로서 입상의 돌기가 있고 털이 없으며 꽃은 5월에 피고 화관은 황록색이 돌며 털이 없고 꽃밥은 황색이다. 열매는 둥글며 7월에 암홍색으로 익는다. 기본종은 화서에 입상의 돌기가 없으며 청딱총나무(*Sambucus Williams ii* Have)라고 한다.⁸⁾

딱총나무는 식용, 관상용, 공업용, 약용에 쓰이고 관상수 및 울타리용에 쓰며 한방과 민간에서는 거풍습약으로 성미는 감, 고, 평하고 거풍이습, 활혈지통의 효능이 있어 풍습성관절염, 요통, 골절상, 외상 출혈에 유효하며 활혈작용이 있어서 산후의 어혈 제거 및 타박상에 쓴다. 두드러기, 피부가려움증에 물을 넣고 달여서 욕탕제로 사용하며 골절유합 촉진에 현저한 반응을 나타낸다.¹¹⁾

약리작용은 줄기 달인 액을 쥐에게 투어하면 진정작용이 있는데 morphine보다는 약하나 sulpyrine보다는 강하다.¹⁰⁾ 접골목의 물 추출액을 가토에 대하여 경구, mouse에 대해서 경구 및 피하 주사하면 현저한 이뇨 작용이 있다. 이 물 추출액은 알콜 및 그밖에 유기용매에 거의 불용이므로 유효성분은 무기염류가 주라고 생각한다.¹¹⁾

성분연구로는 cerylalcohol, betulin, oleanolic acid, betulic acid, ursolic acid, *α*-amyrin, vanillin, acetovanillone, coniferyl alcohol, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, protocatechuic acid, sambucunol A, sambucunol B, buddlenol G, (-)-syringaresinol, (-)-pinoresinol, 3-propanediol, (-)-lariciresinol,

- 9 -

(-)-dihydrodehydrodiconiferyl alchohol, stigmasterol, sitosterol-3glucoside 등 화합물을 분리, 보고되었다.^{10,11)}

생리활성에 관한 연구로는 Xu-Juan Yang¹⁸⁻²⁰⁾ 등이 딱총나무에서 분리된 triterpene류, 페놀류, lignan류 등 화합물에 대하여 쥐의 성골세포 (UMR106)에 대한 증식 실험과 UMR106 세포에 대한 ALP (alkaline phosphatase)의 활성실험을 연구한 것이 보고되었다.





Fig.1. Geranium thunbergii Sieb. et Zucc



Fig.2. Sambucus williamsii var. coreana Nakal

Ⅲ.실 험

1. 실험재료

실험에 이용된 이질풀(*G. thunbergii*)과 딱총나무(*S. williamsii*)는 2003년 4월 조선대학교 약학대학 약초원에서 채취하여 건조하여 세절한 것을 사용하였고, 생약은 전문가의 동정과정을 거쳤고, 표본은 조선대학교 약학대학 표본실에 보관중이다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시 약

2-1-1. 분석용 시약

추출 및 분획용 시약은 특급 또는 1급 시약을 재차 증류하여 정제된 것을 사용하였으며, TLC와 chromatography용 시약은 1급 시약을 증류하여 정제된 것 또는 특급 시약을 사용하였다. TLC 발색용 시약은 10% H₂SO₄ (in H₂O)을 사용하였다. spray reagent는 각각 50% H₂SO₄, Mg-HCI, Zn-HCI 및 FeCl₃ 용액(phenol성 혹은 flavonoid 화합물)과 Liebermann-Burchard 반응시액 (triterpenoid와 sterol 화합물)을 사용하였다.

NMR 측정시 사용한 용매는 CD₃OD (Merck, deuterium degree 99.95%), CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95%)이다.

2-1-2. Packing materials

Column chromatography의 packing material로는

- 1) Kieselgel 60(63~200 µm, Art. 1.07734.9025, Merck),
- 2) Kieselgel 60(40~63 µm, Art. 1.09385.1000, Merck),
- 3) Lipophlic Sephadex LH-20(25~100 µm, Lot 81K1092, Sigma)
- 4) LiChroprep RP-18(40~63 µm, L610400 138, Merck),
- 5) MCI gel CHP-20P(75~150 µm, Mitsubishi Chemical Co., Ltd)
- 6) Diaion® HP-20(250 µm, Lot 160420J, SUPELCO)

2-1-3. TLC plate

Thin layer chromatography 용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate(layer thickness 0.25 mm, 20× 20 cm, Art, 1.05715.0001, Merck)와 precoated RP-18 F_{254s} plate(layer thickness 0.25 mm, 20× 20 cm. Art. 1.15423.0001, Merck)를 사용하였다.

2-1-4. Cell cycle

Cell media(DMEM)은 Jeil Biotechservices사에서 구입하였고, collagenase는 Worthington Biochemical 제품을 이용하였다. 그 외에 실험에 사용된 시약은 Sigma 제품을 사용하였다. Type I procollagen에 대한 항체는 monoclonal anti-type I procollagen aminoterminal extension peptide(SP1.D8) anti(Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, 이용하였고. MMP-1에 대한 항체는 IA)를 monoclonal anti-MMP-1 anti(Oncogene, Co. Boston, MA., USA) 제품을 이용하였으며, Bcl과 Bax-2에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(santa cruz, CA, USA) 제품을 이용하였다. Epigallocatechin-3-gallate(EGCG, m.w. 458.4)는 Type I procollagen espression과 Matrix Metalloproteinase -1 expression의 활성검색에positive control로 사용하였으며, Pharmafood(Kyoto, Japan)의 제품을 이용하였다. Trichosporon beigelii (KCTC 7707)와 Malassezia furfur (KCTC 7744)는 한국생명공학연구소 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB))의 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures (KCTC))에서, *Candida albicans* (ATCC 90028)는 미국 ATCC (American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA))에서 분양 받았다.

2-2. 기기

실험에 사용한 기기는 다음과 같다. 1) Rotary evaporator : BUCHI rotavapor R-114 (Switzerland), EYELA N-N series (*Japan*)

2) Melting point : Fisher Scientific (Model 307N0043, Canada)
3) IR specturm : JASCO FT/IR-300E (Jasco Co., Japan)
4) UV : JASCO V-550 (Jasco Co., Japan)
5) FAB-MS : JMS 700(JEOL)
6) ¹H-NMR : Varian Unity Inova spectrometer (500 MHz) Varian Unity Inova spectrometer (300 MHz)
¹³C-NMR : Varian Unity Inova spectrometer (125 MHz) Varian Unity Inova spectrometer (75 MHz)
7) Polarimeter : AUTOPOL[®] IV automatic polarometer (Rudolph Research Flangers, NJ 07836)
8) ELISA Reader : Molecular Devices Emax, Sunnyvale, CA, USA
9) EI-MS : Hewlett-Packard, MS Engine-5989 A
10) ESI-MS : Finnigan Co., Navigator
11) UV Iamp detector (254 nm, 365 nm) : UVGL-25 (UVP. INC. San Gabriel, CA 91778 U.S.A)

3. 추출 및 분획

3-1. 이질풀(G. thunbergii)에 대한 추출 및 분획

이질풀(Geranium thunbergii, 건조중량 : 460 g)은 MeOH 3ℓ를 추출용매 로 하여 80℃에서 3시간동안 가끔 진탕하면서 3회에 걸쳐 추출하여 82.916g 의 MeOH extract를 얻었다. MeOH .ext에 water를 넣고 포화시킨 후에 CH₂Cl₂ 용매를 가하여 추출하였다. 계속하여 용매의 극성을 높여 가면서 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획으로 나누었다. 각 용매에 녹는 분획들을 감압 조건 하에서 농축하여 동결건조 시킨 후 얻은 각 분획의 중량은 각각 CH₂Cl₂ (12.179g), EtOAc (20.969g), *n*-BuOH (12.432g)과 H₂O (22.489g) extract를 얻었다. (Scheme I)

이질풀의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대한 antioxidative activity (Table 1)와 HCT₁₅와 SK-OV-3의 cell line을 이용한 cytotoxic activity (Table 2) 검색 결과로부터 EtOAC 분획이 가장 좋은 antioxidative

activity와 cytotoxic activity을 나타냈다. 이로부터 이질풀의 EtOAc의 extract 분획으로부터 antioxidative activity와 cytotoxic activity가 있는 물질을 분리하기 위하여 이질풀의 EtOAc 분획에 대하여 화합물 분리, 정제 실험을 실시하였다.

3-2. 딱총나무(S. williamsii) 에 대한 추출 및 분획

딱총나무(Sambucus williamsii, 건조중량 : 840g)를 MeOH 3ℓ를 추출용매 로 하여 80℃에서 3시간동안 가끔 진탕하면서 3회에 걸쳐 추출하여 57.096g 의 MeOH extract를 얻었다. MeOH .ext에 water를 넣고 포화시킨 후에 CH₂Cl₂를 가하여 추출하였다. 계속하여 용매의 극성을 높여 가면서 EtOAC, *n*-BuOH와 H₂O 분획으로 나누었으며 이들 분획들을 감압 조건하에서 농축하여 동결건조 시킨 후 얻은 각 분획의 중량은 각각 CH₂Cl₂ (18.606g), EtOAC (5.029g), *n*-BuOH (1.956g), H₂O (19.070g) extract를 얻었다. (Scheme II)

딱총나무의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대한 antioxidative activity (Table 3)와 HCT₁₅와 SK-OV-3의 cell line을 이용한 cytotoxic activity (Table 4) 활성검색 결과로부터 CH₂Cl₂와 EtOAc 분획이 가장 좋은 antioxidative activity와 cytotoxic activity을 나타냈다. 이로부터 딱총나무의 CH₂Cl₂와 EtOAc extract 분획으로부터 antioxidative activity와 cytotoxic activity가 있는 물질을 분리하기 위하여 본 실험을 시작하였다.

4. 이질풀과 딱총나무 분획에서 compound 분리

4-1. 이질풀의 EtOAc 분획에서 compound 분리

이질풀의 MeOH 추출물로부터 얻은 EtOAc 분획을 대상으로 성분분리한 과정은 SchemeIII 에서 나타내었다. 이질풀 EtOAc fraction 약 2g 을 전개용매 MeOH:H₂O (0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 1:0)로서 HP-2O (250 µm)을 이용한 column chromatography를 실시하여 5개의 새로운 subfractions (fr. E-1 ~ E-5)을 얻었다. 그중 fr. E-1을 전개용매 MeOH:H₂O (5:95)로 Lichroprep RP-18 (40~63 µm) column chromatography를 실시하여 compound 4 (9.6mg)를
얻었다. Fr. E-2를 전개용매 MeOH:H₂O (1:2→1:0, gradient)로 Lipophlic Sephadex LH-2O (25~100 /m) column chromatography와 용매조건 MeOH:H₂O (1:9)로 LiChroprep RP-18(40-63 /m) column chromatography를 실시하여 compound 5 (10.4mg), compound 6 (26.8 mg) 및 compound 7 (3.4 mg)을 얻었다. Fr. E-4를 전개용매 MeOH:H₂O (3:7→1:0, gradient)로 Lichroprep RP-18(40-63 /m) column chromatography와 용매조건 CHCl₃:MeOH (5:1→1:1, gradient)로 silica gel 60 (40~63 /m) column chromatography를 실시하여 compound 1 (8.3 mg), compound 2 (70.1 mg) 및 compound 3 (10.6 mg)을 얻었다.

화학적 이동 (chemical shift)은 용매 peak를 기준으로, 혹은 내부표준 물질로 tetramethylsilane (TMS)을 사용하여 ppm로 그 단위를 나타내었다. 즉 CD₃OD는 *δ*H 3.30과 *δ*C 49.00± 0.01 ppm에서의 peak, CDCl₃는 *δ*H 7.26과 *δ*C 77.16± 0.06 ppm에서의 peak를 기준으로 나타내었다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum에서 chemical shift는 TMS를 내부표준물질로 하는 *δ* 값(ppm)으로 나타냈고 결합정수(*J* 값)은 Hz로 나나냈다. (signal 표시는 다음과 같은 약어를 사용하였다. s-singlet, d-doublet, t-triplet, dd-double doublet, dt-double triplet, ddd-double double doublet, br s-broad singlet, br dbroad doublet, br t-broad triplet, m-multiplet로 표시하였다.)

4-1-1. Compound 1 - afzelin

Yellow amorphous solid Molecular formula : C₂₁H₂₀O₁₀ FeCl₃, Mg-HCl, Zn-HCl test : positive m.p. : 172~174 °C [α]²⁴_D (c 0.5, MeOH) : - 73.5° UV λ_{max} (MeOH) nm : 342, 265 (MeOH), 390, 325, 272 (NaOMe), 393 345 303 273 (AlCl₃), 397, 343, 301, 274 (AlCl₃+HCl), 343, 265 (NaOAc), 342, 264 (NaOAC+H₃BO₃)

IR _{Vmax} (KBr) cm⁻¹ : 3370(-OH), 2361, 1651(C=O), 1607(aromatic C=C), 1176(glycosidic C-O)

ESI-MS *m*/*z* : 431 [M-H]⁻, 455 [M+Na]⁺ 286 [M-hexose]⁻

¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) : δ

7.71(2H, d, J=8.5 Hz, H-2'/H-6'), 6.88(2H, d, J=8.5 Hz, H-3'/H-5'), 6.11(1H, d, J=2.5 Hz, H-8), 6.00(1H, d, J=2.5 Hz, H-6), 5.33(1H, d, J=1.5 Hz, Rha-H-1"), 4.21(1H, dd, J=1.5 3.0 Hz, Rha-H-2"), 3.73(1H, dd, J=3.5, 9.0 Hz, Rha-H-3), 3.35(2H, m, Rha-H-4"/H-5"), 0.92(3H, d, J=6.0 Hz, Rha-H-6")

 13 C-NMR (125MHz, CD₃OD) : δ

178.63(s, C-4), 163.09(s, C-7), 162.75(s, C-5/C-4'), 159.48(s, C-9), 158.29(s, C-2), 135.53(s, C-3), 131.84(d, C-2'/6'), 122.39(s, C-1'), 117.13(d,C-3'/C-5'), 103.62(s, C-10), 103.35(d, Rha-1"), 97.32(d, C-8), 73.46(d, Rha-4"), 72.32(d, Rha-2"), 72.12(d, Rha-3"), 72.08(d, Rha-5"), 17.80(q, Rha-6").

4-1-2. Compound 2 - quercetin 3-0- α -L-rhamnopyranoside

Yellow amorphous solid Molecular formula : C₂₁H₂₀O₁₁ FeCl₃, Mg-HCl, Zn-HCl test : positive m.p. : 178~180 °C [α]²⁴_D (c 0.1, MeOH) : - 178° UV λ_{max} (MeOH) nm: 254, 350 IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3320, 1660, 1610, 1500, 1450, 1360, 1140 EI-MS *m/z* : 447 [M-H]⁻, 471 [M+Na]⁺

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ

7.33(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.30(1H, dd, *J*=2.0 8.5 Hz, H-5'),
6.90(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6'), 6.33(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.17(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.34(1H, d, *J*=1.5 Hz, Rha-H-1"), 4.20(1H, dd, *J*=1.5 3.5 Hz, Rha-H-2"), 3.75(1H, dd, *J*=3.5 9.5 Hz, Rha-H-3"),
3.43(2H, m, Rha-H-4"/H-5"), 0.92(3H, d, *J*=6.0 Hz, Rha-H-6")
¹³C-NMR (125 Mtz, CD₃OD) : δ

179.62(s, C-4), 163.28(s, C-7), 161.77(s, C-2), 159.26(s, C-5), 158.81(s, C-9), 150.05(s, C-4'), 146.64(s, C-3'), 136.26(s, C-3), 123.12(d, C-6'), 122.98(s, C-1'), 117.03(d, C-2'), 116.26(d, C-5'), 105.58(s, C-10), 103.69(d, Rha-1"), 100.52(d, C-6), 95.25(d, C-8), 73.43(d, Rha-4"), 72.28(d, Rha-3"), 72.17(d, Rha-5"), 72.07(d, Rha-2"), 17.80(d, Rha-6")

4-1-3. Compound 3 - kaempferol-3-0-rutinoside

Yellow amorphous solid Molecular formula : $C_{27}H_{30}O_{15}$ m.p. : 190~192 °C FeCl₃, Mg-HCl, Zn-HCl test : positive [α]_D (c 0.31, MeOH) : - 9.5° UV λ_{max} (MeOH) nm: 266, 349 IR v_{max} (KBr) cm⁻¹: 3321, 1660 LC-MS m/z : 595.7 [M+H]⁺, 617.7 [M+Na]⁺

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ

8.07(2H, d, J=9.0 Hz, H-2'/H-6'), 6.86(2H, d, J=9.0 Hz, H-3'/H-5'), 6.25(1H, d, J=1.5 Hz, H-8), 6.09(1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 4.93(1H, d, J=8.0 Hz, GIc-H-1"), 4.51(1H, s, Rha-H-1""), 3.81~3.23(9H, m, GIc-H-2", H-3", H-4", H-5", H-6"; Rha-H-2"", H-3"", H-4"", H-5""), 0.94(3H, d, J=6.5 Hz, Rha-H-6"")



13 C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ

178.94(s, C-4), 162.78(s, C-7), 161.91(s, C-5), 159.16(s, C-9/4'), 158.63(s, C-2), 135.69(s, C-3), 132.49(d, C-3'/5'), 122.85(s,C-1'), 116.32(d, C-2'/6'), 106.52(d, C-6), 96.48(d, C-8), 102.61(d, Glc-1"), 74.03(d, Glc-2"), 75.49(d, Glc-3"), 69.87(d, Glc-4"), 75.35(d, Glc-5"), 67.59(d, Glc-6"), 102.08(d, Rha-1"), 72.43(d, Rha-2"/4"), 72.21(d, Rha-3"), 73.15(d, Rha-5"), 18.12(q, Rha-6").

4-1-4. Compound 4 - gallic acid

White crystal Molecular formula : C₇H₆O₅ m.p. : 215~217°C UV λ_{max} (MeOH) nm : 218, 275 IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ :3400, 1700, 1620, 1330, 1250 ESI-MS *m/z* : 170 [M]⁺

¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) : δ
7.06(2H, s, H-2, 6)
¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) : δ
122.22(s, C-1), 110.46(d, C-2/C-6), 146.53(s, C-3/C-5), 139.70(s, C-4), 170.60(s, C-7).

4-1-5. Compound 5 - protocatechuic acid

Brown powder Molecular formula : $C_7H_6O_4$ m.p. : 199~200°C UV λ_{max} (MeOH) nm : 218, 273 IR v_{max} (KBr) cm⁻¹: 3444, 1635 EI-MS m/z : 154 [M]⁺

¹H-NMR (300^{MHz}, CD₃0D) : δ

7.42(1H, d, *J*=7.2 Hz, H=5), 7.41(1H, d, *J*=1.8 Hz, H=2), 6.79(1H, d d, *J*=1.8, 7.2 Hz, H=6)
¹³C-NMR (75M¹z, CD₃OD) : δ
170.42(s, -<u>C</u>OOH), 151.50(s, C=4), 145.05(s, C=3), 123.86(d, C=6), 123.21(s, C=1), 117.69(d, C=2), 115.73(d, C=5)

4-1-6. Compound 6 - gallic acid methyl ester

Bright yellow powder Molecular formula : C₈H₈O₅ m.p. : 194~196°C UV λ_{max} (MeOH) nm : 276 IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3360, 1690, 1620, 1370, 1329, 1260 ESI-MS *m/z* : 184 [M]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CD₃CD) : δ
7.04(2H, s, H-2/6), 3.81(3H, s, COOCH₃)
¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) : δ
168.99(s, -COOCH₃), 146.47(s, C-3/5), 139.72(s, C-4), 121.40(s, C-1), 109.99(d, C-2/6), 52.27(q, -COOCH₃).

4-1-7. Compound 7 - isocorilagin

White powder Molecular formula : C₈H₈O₅ m.p. : 217~218 °C [α]_D (c 0.1, MeOH) : - 58° IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3383, 1715, 1617, 1516, 1443, 1025. FAB-MS *m/z* : 623 [M-H]⁻, 464 [M-galloy1]⁻

¹H-NMR (300 MHz, CD₃CD) : δ

7.04(s, Gal H-2/6), 6.65, 6.67(s, 2CH of HHBP); 6.35 (d, J=2.1 Hz, Glc H-1); 4.95(br s (overlapping with solvent peak, Glc-H-5)), 4.80(br s (overlapping with solvent peak, Glc-H-3)); 4.53(d, J=8.1 Hz, Glc-Ha-6); 4.47(dd, J=3.3, 8.1 Hz, Glc-H); 4.15(dd, J=8.1, 11.1 Hz, Glc-Hb-6); 3.97(d, J=9.0 Hz, Glc-H-2).

- ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) : δ
 - Glc : 95.18(C-1), 69.63(C-2), 76.36(C-3), 65.18(C-4), 71.82(C-5), 62.63(C-6)
 - Gal : 120.78(C-1^{"'}), 111.10(C-2^{"'}/C-6^{"'}), 146.54(C-3^{"'}/C-5^{"'}), 140.56 (C-7^{"''}), 166.84(C=0)
 - HHBP : 125.64(C-1'), 110.30(C-2'), 145.38, 146.20(C-3'/C-5'), 137.84(C-4'), 116.87(C-6'), 168.67(C=0)
 - HHBP : 125.61(C-1"), 108.47(C-2"), 145.48, 146.78(C-3"/C-5"), 138.34(C-4"), 117.36(C-6"), 170.27(C=0)

4-2. 딱총나무의 CH₂Cl₂ 분획에서 compound 분리

딱총나무의 MeOH 추출물로부터 얻은 CH₂Cl₂ 분획을 대상으로 성분 분리한 과정은 SchemeeIV와 V에서 나타내었다. 딱총나무 CH₂Cl₂ 분획 약 4.2 g을 전개용매 *n*-Hexane:EtOAc (100:1→1:1, gradient)와 CHCl₃:MeOH:H₂O (30:1: 0.1→1:1:0.1, gradient)로서 silica gel 60 (63~200 /m) column chromatography를 실시하였으며, column에서 나오고 있는 분액들을 받아 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254s} TLC pattern으로 검토한 후 유사한 분액들을 합쳐서 8개의 새로운 subfractions (fr. D-1 ~ D-8)을 얻었다. Fr. D-2 (279.39 mg)를 전개용매 *n*-Hexane:Acetone (100:1→20:1 gradient)로 silica gel C.C.를 실시하여 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254s} TLC pattern으로 검토한 후 재차 4개의 subfractions (fr. D-2-1 ~ D-2-4)으로 나누었다. 이중 fr. D-2-1-1에 대하여 용매조건 *n*-Hexane:Acetone [1) 100:1→20:1, 2)

500:1→10:1, 3) 60:1→40:1 gradient]로 silica gel C. C.을 반복 실시하여 compound 8 (15.28mg)을 분리하였다. Fr. D-2-2 (92.01mg)을 용매조건 *n*-Hexane:Acetone (500:1→4:1, gradient) \leq silica C.C.을 ael 실시하였으며 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254s} TLC pattern으로 검토한 후 새로운 5 개의 subfractions (fr. D-2-2-1 ~ D-2-2-5)로 나누었다. 이중 fr. D-2-2-2 (22.14mg)를 용매조건 Iso-PrOH:H₂O (1:4)로 Sephadex LH-2O. C.C.을 실시하여 compound 9 (14.06mg)를 분리하였고, fr. D-2-2-4 (32.92mg)을 용매조건 *n*-Hexane:Acetone (100:1→10:1, gradient)로 silica gel C.C.을 실시하여 compound 15 (19.28mg)를 분리하였다. Fr. D-2-3 (30.78mg)을 용매조건 *n*-Hexane:Acetone (500:1→4:1, gradient)로 silica gel C.C.을 실시하여 5개의 새로운 subfractions (fr. D-2-3-1 ~ D-2-3-5)을 나누었고 이 중 fr. D-2-3-2 (22.14mg)을 용매조건 *n*-Hexane:Acetone (20:1→4:1, gradient)으로 fr. D-2-3-4 (32.94mg)을 용매조건 *n*-Hexane: Acetone (100:1→10:1, gradient)로 각각 silica gel C.C.을 실시하여 compound 13 (4.43mg)과 compound 16 (4.40mg)을 분리하였다. Fr. D-3 (807.19mg)을 용매조건 *n*-Hexane:Acetone (1000:1→1:1, gradient)로 silica gel C.C.을 실시하여 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254s} TLC pattern으로 검토한 후 5개의 새로운 subfractions (fr. D-3-1~D-3-5)을 나누었다. 이 중 fr. D-3-2 (70.36mg)을 용매조건 *n*-Hexane:EtOAc:Acetone (100:1:1→1:1:1, gradient)로 silica gel C.C.과 Iso-PrOH:H₂O (4:6)로 Sephadex LH-2O C.C.을 실시하여 compound 10 (5.80mg)을 분리하였고, fr. D-3-3 (458.12mg)을 용매조건 *n*-Hexane:Acetone (50:3→10:1, gradient)로 silica gel C.C.과 Iso-PrOH:H₂O (3:7)로 Sephadex LH-2O C.C.을 실시하여 compound 11 (10.39mg)과 compound 14 (3.28mg)를 분리하였다. Fr. D-3-4 (17.39mg)을 용매조건 *n*-Hexane:Acetone (15:1→1:1, gradient)로 silica gel C.C.를 실시하여 compound 12 (8.03mg)를 분리하였다. Fr. D-6 (1269.94mg)을 (100:1→1:1, gradient)와 용매조건 *n*-Hexane:Acetone CHC1₃:MeOH (20:1→1:1, gradient)로 silica gel C.C.을 실시하여 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254s} TLC pattern으로 검토한 후 7개의 새로운 subfractions (D-6-1 ~

D-6-7)을 얻었다. 이중 fr. D-6-3 (141.36mg)을 용매조건 MeOH:H₂O (2:3)로 Sephadex LH-2O C.C.을 실시하여 compound 17 (46.58mg)을 분리하였다. Fr. D-6-4 (208.07mg)을 용매조건 MeOH:H₂O (3:8)로 MCI gel C.C.을 실시하여 compound 18 (4.67mg)과 compound 22 (7.82mg)을 분리하였다. Fr. D-6-5 (214.71mg)를 용매조건 MeOH:H₂O (3:7)로 MCI gel C.C.을 실시하여 compound 19 (5.32mg)와 compound 20 (1.62mg)을 분리하였다. Fr. D-6-6 (266.21mg)을 용매조건 MeOH:H₂O (3:7)로 MCI gel C.C.을 실시하여 compound 21 (3.88mg)을 분리하였다.

4-2-1. Compound 8 - α -amyrin-3- β -palmitate

White powder

Molecular formula : C₄₆H₈₀O₂

Liebermann-Burchard test : positive

m.p. : 77~78 ℃

IR _{Vmax} (KBr) cm⁻¹ : 3445(OH), 2924, 2853(C-H), 1732(C=O), 1626(alkene,

C=C), 1462, 1379, 1178(C-O), 989.

EI-MS *m/z* : 665 [M+H]⁺, 409, 218.

```
<sup>1</sup>H-NMR (CDCI<sub>3</sub> 300 MHz) : \delta
```

5.10(1H, t, J=3.6 Hz, H-12), 4.47(1H, dd, J=3.6, 10.8 Hz, H-3), 2.28(1H, d, J=7.5 Hz, H-18), 1.04, 0.99, 0.95, 0.89, 0.85, 0.84, 0.83, 0.77, 0.76(27H, s, H-23~30, 16').

 13 C-NMR (CDCI₃ 75 MHz) : δ

38.41(t, C-1), 25.15(t, C-2), 80.52(s, C-3), 37.70(s, C-4), 55.22(d, C-5), 18.22(t, C-6), 32.82(t, C-7), 40.81(s, C-8), 47.60(d, C-9), 36.76(s, C-10), 23.34(s, C-11), 124.29(d, C-12), 139.58(s, C-13), 42.03(s, C-14), 22.60(t, C-15), 26.57(t, C-16), 33.70(s, C-17), 59.02(d, C-18), 39.62(d, C-19), 39.58(d, C-20), 31.23(t, C-21),41.51(t, C-22), 16.83(q, C-23), 28.05(q, C-24),



15.70(q, C-25), 16.79(q, C-26), 23.21(q, C-27), 28.72(q, C-28), 17.49(q, C-29), 21.38(q, C-30), 173.62(s, C-1'), 34.82(t, C-2'), 31.92(t, C-3'), 29.69~29.19(t, C-4'~C-13'), 28.05(t, C-14'), 22.68(t, C-15'), 14.11(q, C-16')

4-2-2. Compound 9 - 11-keto- α -amyrin palmitate

White powder

Molecular formula : C₄₆H₇₈O₃

Liebermann-Burchard test : positive

m.p. : 80~82 ℃

IR v_{max} KBr cm⁻¹ : 3445, 2924, 2851, 1732, 1616, 1456, 1389, 1213, 983 EI-MS m/z : 679.53 [M+H]⁺, 663.43 [M+H-CH₄]⁺, 423.32 [M-C₁₆H₃₁O₂]⁺

¹H-NMR (CDCI₃ 500 MHz) : δ

5.54(1H, s, H-12), 4.52(1H, dd, J=5.0, 12.0 Hz, H-3), 2.75(1H, d, J=14.0 Hz, H-18), 2.35(1H, s, H-9), 1.30(3H, s, H-27), 1.26(20H, m, H-4'~H-13'), 1.19(3H, s, H-25), 1.17(3H, s, H-26), 0.95(3H, s, H-30), 0.89(3H, s, H-23) 0.89(3H, t, J=7.0 Hz, H-16'), 0.88(3H, s, H-24), 0.82(3H, s, H-29), 0.80(3H, s, H-28).

 13 C-NMR (CDCI $_3$ 125 MHz) : δ



22.69(t, C-15'), 14.11(q, C-16')

4-2-3. Compound 10 - betulonic acid

White powder Molecular formula : C₃₀H₄₆O₃ Liebermann-Burchard test : positive m.p. : 255~257 ℃ $[\alpha]_{D}^{20}$ (*c* 1.00, pyridine) : + 7.0° $IR v_{max} KBr cm^{-1}$: 3440 (0H), 3100 (C00H), 1705 (C=0), 3060, 1640, 880 $(C=CH_2)$ ESI-MS m/z: 453 $[M-H]^{-}$, 477 $[M+Na]^{+}$. ¹H-NMR (CDCI₃ 500 MHz) : δ 4.74(1H, s, H-29 β), 4.62(1H, s, H-29 α), 3.01(1H, m, H-18), 1.70(3H, s, H-30), 1.07(3H, s, H-23), 1.02(3H, s, H-24), 0.99(3H, s, H-27), 0.98(3H, s, H-26), 0.93(3H, s, H-25). 13 C-NMR (CDCl₃ 125 MHz) : δ 39.59(t, C-1), 34.12(t, C-2), 218.20(s, C-3), 47.32(s, C-4), 54.91(d, C-5), 19.61(t, C-6), 33.58(t, C-7), 40.61(s, C-8), 49.83(d, C-9), 36.89(s, C-10), 20.98(t, C-11), 25.47(d, C-12), 38.46(s, C-13), 42.47(s, C-14), 30.51(t, C-15), 32.07(t, C-16), 56.34(s, C-17), 46.86(d, C-18), 49.15(s, C-19), 150.30(s, C-20), 29.65(t, C-21), 37.02(t, C-22), 26.61(a, C-23), 21.35(a, C-24), 15.94(q, C-25), 15.79(q, C-26), 14.60(q, C-27), 181.74(s, C-28), 109.76(t, C-29), 19.34(q, C-30).

4-2-4. Compound 11 - oleanonic aicd

White powder

Molecular formula : C₃₀H₄₆O₃

Liebermann-Burchard test : positive

m.p. ∶ 196~198 ℃

IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3418, 2944, 1694, 1643, 1460, 1386, 839.

ESI-MS *m*/*z* : 453.5[M-H]⁻, 477.5[M+Na]⁺

¹H-NMR (CDCI₃ 500 MHz) : δ

5.30(1H, t, J=4.0 Hz, H-12), 2.83(1H, dd, J=4.5, 13.5 Hz, H-18), 2.55(1H, ddd, J=7.0, 11.0, 16.0 Hz, H-2 β), 2.37(1H, ddd, J=4.0, 7.0, 16.0 Hz, H-2 α), 1.15(3H, s, H-27), 1.09(3H, s, H-23), 1.05(3H, s, H-25), 1.03(3H, s, H-24), 0.93(3H, s, H-30), 0.90(3H, s, H-29), 0.81(3H, s, H-26).

 13 C-NMR (CDCI $_3$ 125 MHz) : δ

39.09(t, C-1), 34.13(t, C-2), 217.71(s, C-3), 47.42(s, C-4), 55.30(d, C-5), 19.54(t, C-6), 32.15(t, C-7), 39.26(s, C-8), 46.87(d, C-9), 36.79(s, C-10), 22.90(t, C-11), 122.39(d, C-12), 143.62(s, C-13), 41.73(s, C-14), 27.66(t, C-15), 23.47(t, C-16), 46.57(s, C-17), 41.04(d, C-18), 45.80(s, C-19), 30.66(s, C-20), 33.78(t, C-21), 32.38(t, C-22), 26.43(q, C-23), 21.44(q, C-24), 15.00(q, C-25), 16.96(q, C-26), 25.82(q, C-27), 183.64(s, C-28), 23.54(q, C-29), 33.04(q, C-30).

4-2-5. Compound 12 - betulinic acid

White needles Molecular formula : $C_{30}H_{48}O_3$ Liebermann-Burchard test : positive m.p. : 280~282 °C [α]²⁰_D (c 0.34, pyridine) : + 10.2° UV λ_{max} (MeOH) nm : 241 IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3510(OH), 1710, 1615(C=C)

EI-MS m/z: 456 $[M]^+$, 438 $[M-H_20]^+$, 410 $[M-(COOH+H)]^+$

¹H-NMR (CDCI₃ 500 MHz) : δ

4.69(1H, d, $\not=$ 2.0 Hz, H-29 β), 4.56(1H, d, $\not=$ 1.5 Hz, H-29 α), 3.12(1H, dd, $\not=$ 4.5, 11.0 Hz, H-3), 1.68(3H, s, H-30), 0.99(3H, s, H-23), 0.98(3H, s, H-24), 0.94(3H, s, H-27), 0.85(3H, s, H-26), 0.75(3H, s, H-25).

13 C-NMR (CDCI₃ 125 MHz) : δ

40.26(t, C-1), 28.21(t, C-2), 79.85(d, C-3), 40.11(s, C-4), 57.07(d, C-5), 19.61(t, C-6), 35.81(t, C-7), 42.11(s, C-8), 50.83(d, C-9), 38.49(s, C-10), 22.30(t, C-11), 27.16(t, C-12), 39.68(s, C-13), 43.75(s, C-14), 31.16(t, C-15), 34.11(t, C-16), 56.83(s, C-17), 49.43(d, C-18), 49.60(s, C-19), 152.72(s, C-20), 32.10(t, C-21), 38.76(t, C-22), 28.76(q, C-23), 16.26(q, C-24), 16.95(q, C-25), 16.91(q, C-26), 15.25(q, C-27), 182.70(s, C-28), 109.95(t, C-29), 19.78(q, C-30).

4-2-6. Compound 13 - β -amyrin

White powder Molecular formula : $C_{30}H_{50}O$ Liebermann-Burchard test : positive m.p. : 197~197.5 °C [α]²⁰_D (c 1.3, benzene) : + 99.8° EI-MS m/z : 426 [M]⁺

¹H-NMR (CDCI₃ 500 MHz) : δ 5.28(1H, t, J=4.0 Hz, H-12), 3.22(1H, dd, J=4.0, 11.0 Hz, H-3), 2.82(1H, dd, J=4.0, 14.0 Hz, H-18), 0.76, 0.78, 0.90, 0.91, 0.93,



0.99, 1.14, 1.25(each 3H, s, H-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃ 125 MHz) : δ

38.40(t, C-1), 27.68(t, C-2), 79.02(s, C-3), 38.75(s, C-4), 55.21(d, C-5), 18.30(t, C-6), 32.44(t, C-7), 39.26(s, C-8), 47.62(d, C-9), 37.07(s, C-10), 37.00(t, C-11), 122.62(d, C-12), 143.59(s, C-13), 41.62(s, C-14), 27.18(t, C-15), 28.13(t, C-16), 32.63(s, C-17), 47.53(d, C-18), 46.51(d, C-19), 30.67(s, C-20), 33.80(t, C-21), 37.07(t, C-22), 15.32(q, C-23), 28.09(q, C-24), 15.54(q, C-25), 17.01(q, C-26), 25.91(q, C-27), 28.09(q, C-28), 23.56(q, C-29), 33.06(q, C-30).

4-2-7. Compound 14 - ursolic acid lactone

White powder

Molecular formula : $C_{30}H_{48}O_4$

Liebermann-Burchard : positive

m.p. : 260~263 °C

UV λ_{max} (MeOH) nm : 207

IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3498 (OH), 2972, 2843 (C-H), 1732 (C=O), 1632 (C=C) EI-MS m/z : 454 [M]⁺, 436, 410, 340, 255, 201

¹H-NMR (CDCI₃ 500 MHz) : δ

5.96(1H, d, $\not=$ 12.0 Hz, H-12), 5.54(1H, dd, $\not=$ 3.5 11.5 Hz, H-11), 3.23(1H, dd, $\not=$ 5.0 11.5 Hz, H-3), 1.16(3H, s, H-27), 1.05(3H, s, H-26), 1.00(3H, s, H-29), 0.99(3H, s, H-25), 0.93(3H, s, H-30), 0.91(3H, s, H-23), 0.79(3H, s, H-24).

 13 C-NMR (CDCI $_3$ 125 MHz) : δ

38.27(t, C-1), 34.12(t, C-2), 78.87(s, C-3), 38.91(s, C-4), 54.72(d, C-5), 17.68(t, C-6), 30.81(t, C-7), 41.67(s, C-8),



53.02(d, C-9), 36.35(s, C-10), 133.43(d, C-11), 128.81(d, C-12), 89.68(s, C-13), 41.92(s, C-14), 26.98(t, C-15), 25.53(t, C-16), 45.09(s, C-17), 60.56(d, C-18), 38.12(s, C-19), 40.25(s, C-20), 31.21(t, C-21), 31.31(t, C-22), 27.74(q, C-23), 14.90(q, C-24), 16.10(q, C-25), 18.88(q, C-26), 17.89(q, C-27), 179.92(s, C-28), 17.81(q, C-29), 19.15(q, C-30).

4-2-8. Compound 15 - β -sitosterol

White crystal
Molecular formula : C ₂₉ H ₅₀ O
Liebermann-Burchard : positive
m.p. ∶ 133~136 ℃
$[\alpha]_{D}$ (c 0.18, CHCl ₃) : - 20°
IR v _{max} (KBr) cm ⁻¹ : 3425(0H), 2961(C-H), 1636(C=C), 1057(C-O), 1022
$EI-MS m/z$: 414 $[M]^+$, 399 $[414-CH_3]^+$, 381 $[M-CH_3-H_20]^+$, 329 $[M-C_6H_{12}]^+$,
303[414-C7H ₁₁ 0] ⁺ , 273 [M-side chain-C ₃ H ₆] ⁺ , 255 [M-side
chain-H ₂ 0] ⁺ , 231 [M-side chain-ring D] ⁺ , 213 [M-side
chain-ring D-H ₂ O] ⁺
¹ H-NMR(CDCI ₃ 500 MHz) : δ
5.53(1H, m, H-6), 3.54(1H, m, H-3), 1.00(3H, s, H-19), 0.94, 0.92,

0.84(9H in total, s, H-21,H-26,H-27), 0.70(3H, s, H-18)

 13 C-NMR(CDCI₃ 125 MHz) : δ

37.25(t, C-1), 31.67(t, C-2), 71.81(s, C-3), 42.31(s, C-4), 140.75(d, C-5), 121.72(t, C-6), 31.90(t, C-7), 31.90(s, C-8), 50.13(d, C-9), 36.50(s, C-10), 21.08(s, C-11), 39.77(d, C-12), 42.32(s, C-13), 56.77(s, C-14), 24.30(t, C-15), 28.24(t, C-16), 56.05(s, C-17), 19.39(d, C-18), 11.85(s, C-19), 36.14(s, C-20), 18.77(t, C-21), 33.94(t, C-22), 26.07(q, C-23), 45.83(q, C-24),

15.00(q, C-25), 19.03(q, C-26), 19.82(q, C-27), 23.06(q, C-28), 11.98(q, C-29)

4-2-9. Compound 16 - stigmasterol

White needles Molecular formula : C₂₉H₅₀O Liebermann-Burchard : positive m.p. : 139~140 °C [α]_D (c 0.44, pyridine) : - 37° UV λ_{max} (MeOH) nm : 201 IR ν_{max} KBr cm⁻¹: 3422 (OH), 2935, 2866, 1653, 1475, 1458, 1053 (C-O) EI-MS *m/z* : 412 [M]⁺

¹H-NMR (CDCI₃ 500MHz) : δ

5.35(1H, d, J=5.0 Hz, H=6), 5.15(1H, dd, J=8.5, 15.5 Hz, H=22), 5.02(1H, dd, J=8.5, 15.0 Hz, H=23), 3.52(1H, m, H=3), 1.01(3H, s, H=18), 0.92(3H, d, J=6.5 Hz, H=21), 0.83(3H, d, J=7.0 Hz, H=27), 0.81(3H, br s, H=26), 0.68(3H, s, H=19)

 13 C-NMR (CDCI₃ 125 MHz) : δ

37.25(t, C-1), 31.66(t, C-2), 71.81(d, C-3), 42.30(t, C-4), 140.75(s, C-5), 121.71(d, C-6), 31.90(t, C-7), 31.90(d, C-8), 50.13(d, C-9), 36.45(s, C-10), 21.08(t, C-11), 39.77(t, C-12), 42.30(s, C-13), 56.77(d, C-14), 24.30(t, C-15), 29.15(t, C-16), 56.05(d, C-17), 12.50(q, C-18), 19.39(q, C-19), 40.49(d, C-20), 22.24(q, C-21), 138.31(d, C-22), 129.27(d, c-23), 51.23(d, C-24), 31.90(d, C-25), 19.03(q, C-26), 21.21(q, C-27), 25.40(t, C-28), 12.81(q, C-29).

3-2-10. Compound 17 - (+)-pinoresinol

White powder Molecular formula : C₂₀H₂₂O₆ m.p. : 122 °C [α]²⁰_D (c 0.34, CHCI₃) : + 51.5° UV λ_{max} (MeOH) : 280, 230 nm IR ν_{max} cm⁻¹ : 3448, 1608, 1520, 1480, 1380, 1100, 900, EI-MS *m/z* : 358[M]⁺ (67), 327 (10), 205 (21), 163 (31), 151 (100), 137 (2), 131 (30).

¹H-NMR (500 MHz, CD_3OD) : δ

6.92(2H, d, J=1.5 Hz, H-2/H-2'), 6.97(2H, dd, J=1.8, 8.1 Hz, H-6/H-6'), 6.74(2H, d, J=8.1 Hz, H-5/H-5'), 4.68(2H, d, J=4.5 Hz, H-7/H-7'), 4.21(2H, dd, J=7.0, 9.0 Hz, H-9eq/H-9'eq), 3.83(3H× 2, s, -0CH₃), 3.81(2H, dd, J=3.9, 9.0 Hz, H-9ax/H-9'ax), 3.11(2H, m, H-8/H-8')

 13 C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ

149.40(s, C-3/C-3'), 148.22(s, C-4/C-4'), 132.96(s, C-1/C-1'), 120.13(d, C-6/C-6'), 116.34(d, C-5/5'), 110.91(d, C-2/C-2'), 87.59(d, C-7/C-7'), 72.52(t, C-9/C-9'), 56.32(q, -OMe × 2), 55.28(d, C-8/C-8')

4-2-11. Compound 18 - (+)-lariciresinol

White powder Molecular formula : C₂₀H₂₂O₆ m.p. : 167~168 °C [α]_D (c 1.0. MeOH) : + 16.5° UV λ_{max} (MeOH) nm : 230, 280 IR ν_{max} cm⁻¹ : 3372 (OH); 2937, 2885 (C-H); 1606 (C=C); 1515, 1449 (aromatic region); 1154, 1113, 1033 (C-O-C). DCI + NH₃ *m/z* : 360 [M]⁺ (100), 151 (32), 137 (78), 122 (10).

¹H-NMR (500 MHz, CD_3OD) : δ

6.90(1H, d, $\not=$ 1.0 Hz, H-2), 6.79(1H, d, $\not=$ 1.5 Hz, H-2'), 6.78~6.75(2H, m, H-6'/H-5'), 6.71(1H, dd, $\not=$ 6.5 Hz, H-5), 6.64(1H, dd, $\not=$ 1.5 6.5 Hz, H-6), 4.74(1H, d, $\not=$ 5.5 Hz, H-7'), 3.98(1H, dd, $\not=$ 6.0 6.5 Hz, H-9' α), 3.82(1H, dd, $\not=$ 9.0 12.5 Hz, H-9 α), 3.84(3H, s, -0CH₃), 3.82(3H, s, -0CH₃), 3.72(1H, dd, $\not=$ 5.0 7.0 Hz, H-9' β), 3.63(1H, dd, $\not=$ 5.0 9.0 Hz, H-9 β), 2.93(1H, dd, $\not=$ 4.5 11.5 Hz, H-7 α), 2.73(1H, m, H-8), 2.49(1H, dd, $\not=$ 9.5 11.5 Hz, H-7 β), 2.37(1H, m, H-8').

 13 C-NMR (125 MHz, CD $_3$ OD) : δ

149.15(s, C-4'), 149.15(s, C-4), 147.19(s, C-3'), 145.95(s, C-3), 135.88(s, C-1), 133.68(s, C-1'), 122.33(d, C-6), 119.96(d, C-6'), 116.33(d, C-5), 116.13(d, C-5'), 113.54(d, C-2), 110.78(d, C-2'), 84.19(d, C-7'), 73.65(t, C-9), 60.60(t, C-9'), 56.32(q, $-0CH_3 \times 2$), 54.21(d, C-8'), 40.79(t, C-7). 33.80(d, C-8'),

4-2-12. Compound 19 - (-)-lariciresinol

White powder Molecular formula : C₂₀H₂₂O₇ m.p. : 122~123 °C [α]_D (c 1.12, MeOH) : - 24.9° UV λ_{max} (MeOH) nm : 229, 280 IR ν_{max} (KRr) cm⁻¹ : 3370, 1608, 1520, 1450, 1420, 1380, 1100, 900, 840. LC-MS *m/z* : 376

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ



6.86(1H, d, $\not\equiv$ 1.5 Hz, H-2), 6.77(1H, $\not\equiv$ 1.5 Hz, H-2').6.72(1H, m, H-6), 6.71(1H, $\not\equiv$ 8.5 Hz, H-5), 6.69(1H, $\not\equiv$ 8.0 Hz, H-5'), 6.62(1H, dd, $\not\equiv$ 1.5 8.0 Hz, H-6'), 4.70(1H, d, $\not\equiv$ 7.5 Hz, H-7'), 3.97(1H, dd, $\not\equiv$ 6.5 8.0 Hz, H-9 α), 3.82(1H, dd, $\not\equiv$ 4.0 15.0 Hz, H-9' α), 3.82(3H × 2, s, -0CH₃), 3.71(1H, dd, $\not\equiv$ 5.5 8.0 Hz, H-9 β), 3.61(1H, dd, $\not\equiv$ 6.5 1.0 Hz, H-9' β), 2.93(1H, dd, $\not\equiv$ 5.0 13.5 Hz, H-7 α), 2.73(1H, m, H-8), 2.47(1H, dd, $\not\equiv$ 11.0 13.5 Hz, H-7 β), 2.39(1H, m, H-8').

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ

150.11(s, C-3/C-3'), 149.63(s, C-4'), 148.38(s, C-4), 133.72(s, C-1'), 132.72(s, C-1), 122.39(d, C-6), 120.23(d, C-6'), 116.60(d, C-5), 116.78(d, C-5'), 113.53(d, C-2), 110.76(d, C-2'), 84.40(d, C-7'), 73.58(t, C-9), 60.61(t, C-9'), 56.45(q, $-0CH_3 \times 2$), 54.12(d, C-8'), 44.07(t, C-7). 33.82(d, C-8)

4-2-13. Compound 20 - 8-hydroxypinoresinol

White powder Molecular formula : $C_{20}H_{22}O_7$ m.p. : 183~185 °C [α]²⁰_D (c 0.5, MeOH) : + 35.5° UV λ_{max} (MeOH) nm : 230, 278 IR v_{max} cm⁻¹ :3410 (OH), 1602, 1473 (aromatic, C=C) EI-MS m/z : 374 [M]⁺ (18), 207 (28), 151 (151), 93 (45), 65 (49).

¹H-NMR (500 MHz, CD_3OD) : δ

7.05(2H, t, J=2.0 2.5 Hz, H=2/H=2'), 6.86(2H, m, H=5/H=5'), 6.79(1H, d, J=8.0 Hz, H=6'), 6.78(1H, d, J=8.5 Hz, H=6) 4.68(2H, s, H=7/H=7'), 4.21(2H, dd, J=7.0, 9.0 Hz, H=9'eq), 4.04(1H, d, J=9.0 Hz, H=9eq), 3.87(3H, s, $-0CH_3$), 3.86(1H, masked under $-0CH_3$,

H-9ax), 3.76(1H, dd, *J*=6.0 9.0 Hz, H-9'ax), 3.86(3H, s, -0C<u>H</u>₃), 3.05(1H, m, H-8').

 13 C-NMR (125 MHz, CD $_3$ OD) : δ

149.26(s, C-3), 148.86(s, C-3'), 147.67(s, C-4), 147.58(s, C-4'), 133.80(s, C-1'), 129.21(s, C-1), 121.70(d, C-6'), 120.66(d, C-6), 116.20(d, C-5), 115.81(d, C-5'), 112.91(d, C-2), 111.48(d, C-2'), 92.94(s, C-8), 89.48(d, C-7'), 87.99(d, C-7), 76.24(t, C-9), 72.19(t, C-9'), 62.54(d, C-8'), 56.58(q, C-3→0CH₃), 56.52(q, C-3'→0CH₃)

4-2-14. Compound 21 - (-)-olivil

White powder Molecular formula : C₂₀H₂₂O₇ m.p. : 122~123 °C [α]_D (c 1.12, MeOH) : - 24.9° UV λ_{max} (MeOH) nm : 280, 229 IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3370, 1608, 1520, 1450, 1420, 1380, 1100, 900, 840. LC-MS *m/z* : 376

¹H-NMR (500 MHz, CD_3OD) : δ

7.15(1H, d, J=2.0 Hz, H-2), 6.91(1H, s, H-2'), 6.88(1H, dd, J=2.08.0 Hz, H-6'), 6.74(1H, d, J=8.0 Hz, H-6), 6.72(2H, s, H-5/H-5'), 4.73(1H, d, J=7.5 Hz, H-7), 3.85(3H× 2, s, -OMe), 3.83(1H, d, J=9.0 Hz, H-9'eq), 3.82(1H, d, J=9.0 Hz, H-9'ax), 3.74(1H, dd, J=5.5 11.0 Hz, H-9eq), 3.60(1H, d, J=9.5 Hz, H-9ax), 2.99(1H, d, J=14.0 Hz, H-7'eq), 2.92(1H, d, J=14.0 Hz, H-7'ax), 2.30(1H, dd, J=5.5, 13.0 Hz, H-8').

 13 C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ

149.17(s, C-4'), 148.72(s, C-4), 147.33(s, C-3'), 146.30(s, C-3),

135.51(s, C-1), 130.57(s, C-1'), 124.02(d, C-6), 120.92(d, C-6'), 115.94(d, C-5), 115.82(d, C-5'), 115.37(d, C-2), 111.69(d, C-2'), 85.97(d, C-7'), 82.75(s, C-8), 78.11(t, C-9), 62.08(t, C-9'), 60.93(d, C-8'), 56.32(q, $-0CH_3 \times 2$), 40.79(t, C-7).

4-2-15 Compound 22 - (+)-Medioresinol

White powder Molecular formula : $C_{21}H_{24}O_7$ m.p. : 150~152 °C [α]_D²⁰ (c 0.33, MeOH) : + 23.1° UV λ_{max} (MeOH) nm : 233, 279 IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3544, 1612, 1510. ESI-MS m/z : 411 [M+Na]⁺

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ

6.95(1H, d, $\not=$ 1.0 Hz, H-2'), 6.81(1H, dd, $\not=$ 1.5, 7.0 Hz, H-6'), 6.77(1H, d, $\not=$ 7.0 Hz, H-5'), 6.65(2H, s, H-2/H-6), 4.71(2H, d, $\not=$ 3.5 Hz, H-7/H-7'), 4.25(4H, m, H-9/H-9'), 3.85(3H, s, C-3' \rightarrow 0CH₃), 3.84(3H × 2, s, C-3 \rightarrow 0CH₃/C-5 \rightarrow 0CH₃), 3.14(2H, m, H-8/H-8')

 13 C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ

149.50(s, C-3/C-5), 149.28(s, C-3'), 147.48(s, C-4'), 136.34(s, C-4), 133.93(d, C-1'), 133.29(d, C-1), 120.21(d, C-6'), 116.23(d, C-5'), 111.13(d, C-2'), 104.65(s, C-2/C-6), 87.82(d, C-7), 87.63(d, C-7'), 72.89(t, C-9), 72.78(t, C-9), 56.95(q, C-3 \rightarrow 0<u>C</u>H₃/C-5 \rightarrow 0<u>C</u>H₃), 56.55(q, C-3' \rightarrow 0<u>C</u>H₃), 55.71(d, C-8), 55.48(d, C-8')

4-3. 딱총나무의 EtOAc 분획에서 compound 분리

딱총나무의 MeOH 추출물로부터 얻은 EtOAc 분획 (4.2g)을 대상으로 성분

분리한 과정은 Scheme VI에서 나타내었다. 딱총나무의 EtOAc 분획을 전개용매 MeOH:H2O (5:95, 25:75, 40:60, 100:0)로서 HP-20을 이용한 column chromatography를 실시하여 4개의 새로운 subfractions (E-1 ~ E-4)을 얻었다. 그중 fr. E-1 (1494.04mg)을 전개용매 MeOH:H₂O (100:0, 50:50, 100:0)로 HP-20 C.C.를 실시하여 재차 3개의 subfractions (E-1-1 ~ E-1-3)을 얻었다. 그리고 fr. E-1-1 (260.62mg)을 전개용매 CHCl₃:MeOH:H₂O (10:1:0.1→1:1:0.1, gradient)로 silica gel C.C.와 용매조건 CHCl₃:CH₂Cl₂: MeOH:H₂O (30:1:1:0.1→1:1:1:0.1, gradient) 및 CHCI₃:MeOH:H₂O (10:1:0.1) 로 silica gel C.C.를 반복 실시하여 compound 24 (2.05mg)과 compound 25 (2.36mg)을 분리하였다. Fr. E-2 (2471.50mg)를 용매조건 MeOH:H₂O (0:100, 5:95, 15:85, 30:70, 100:0)로 HP-20 C.C.를 실시하여 4개의 새로운 fractions (E-2-1 ~ E-2-4)으로 분획하였다. 이중 Fr. E-2-2 (1042.32mg)를 용매조건 CHCl3:MeOH:H₂O (4:1:0.1→1:1:0.1, gradient)로 silica gel C.C.을 실시하여 silica gel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254s} TLC pattern으로 검토한 후 재차 3개의 새로운 subfractions (E-22-1 ~ E-22-3)으로 나누었고 이중 fr. E-2-2-2 (53.68mg)을 재차 용매조건 CHCl₃:MeOH:H₂O (4:1:0.1)로 silica gel C.C.을 실시하여 compound 23 (15.28mg)을 얻었다.

4-3-1. Compound 23 - (-)-olivil 9'- ∂ - β -glucopyranoside

Amorphous powder Molecular Formula : C₂₆H₃₄O₁₂ m.p. : 169~172 °C [α]_D (c 0.23, MeOH) : - 26.8° UV λ_{max} (MeOH) nm : 209, 225, 279. IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3420 (OH), 1605, 1515, 1458 (aromatic C=C), 1271, 1227, 1073 (glycosidic C-O) ESI-MS m/z : 537 [M-H]⁻

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ

7.11(1H, d, $\not=$ 1.5 Hz, H-2), 6.91(1H, s, H-2'), 6.89(1H, dd, $\not=$ 1.5 6.5 Hz, H-6), 6.75(1h, d, $\not=$ 6.5 Hz, H-5), 6.72(2H, m, H-5'/H-6'), 4.73(1H, d, $\not=$ 7.0 Hz, H-7), 4.30(1H, d, $\not=$ 6.5 Hz, GIc-H-1"), 3.85(3H, s, C-3' \rightarrow 0CH₃), 3.84(3H, s, C-3 \rightarrow 0CH₃), 3.05(1H, d, $\not=$ 11.5 Hz, H-7'eq), 2.91(1H, d, $\not=$ 12.0 Hz, H-7'ax), 2.46(1H, dd, $\not=$ 6.0 11.0 Hz, H-8').

 13 C-NMR (125 MHz, CD $_3$ OD) : δ

149.13(s, C-3), 148.66(s, C-3'), 147.42(s, C-4), 146.24(s, C-4'), 134.92(s, C-1), 130.49(s, C-1'), 124.17(d, C-6'), 120.91(d, C-6), 115.93(d, C-5'), 115.90(d, C-5), 115.52(d, C-2'), 111.66(d, C-2), 85.37(d, C-7), 82.51(s, C-8'), 77.76(t, C-9'), 68.47(t, C-9), 60.37(d, C-8), 56.55(q, C-3' \rightarrow 0CH₃), 56.53(q, C-3 \rightarrow 0CH₃), 40.83(t, C-7'), 104.96(Glc, C-1"), 78.16(Glc, C-3"/C-5"), 75.32(Glc, C-2"), 71.78(Glc, C-4"), 62.87(Glc, C-6")

4-3-2. Compound 24 - dihydrodehydrodiconiferyl alcohol $9'-O-\beta$ -glucoside

Amorphous powder Molecular formula : $C_{26}H_{33}O_{11}$ m.p. : 175~177 °C [α]_D (c 0.67, MeOH) : - 55.8° UV λ_{max} (MeOH) nm : 226, 281 IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3418, 1608, 1515, 1498 FAB-MS m/z : 521 [M-H]⁻, 545 [M+Na]⁺

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ

7.00(1H, d, $\not=$ 1.0 Hz, H-2'), 6.85(1H, dd, $\not=$ 1.0, 7.0 Hz, H-6'), 6.77(1H, d, $\not=$ 7.0 Hz, H-5'), 6.72(2H, br s, H-2/H-6), 5.58(1H, d, $\not=$ 5.5 Hz, H-7'), 4.35(1H, dd, $\not=$ 1.5, 6.5 Hz, GIc-1), 4.11(1H, dd,

J=6.5, 8.0 Hz, H-8'), 3.93(1H, d, J=8.0 Hz, H-7'), 3.92(1H, dd, J=2.5, 5.5 Hz, GIc-2), 3.85(3H, s, -0CH₃), 3.81(3H, s, -0CH₃), 3.65(1H, m, H-8'), 3.56(1H, br t, J=5.5 Hz, H-9'), 2.68(2H, br t, J=6.5 Hz, H-7), 1.91(2H, m, H-8)

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ

149.15(s, C-3), 147.58(s, C-4'), 147.55(s, C-4), 145.32(s, C-3'), 136.97(s, C-1'), 134.77(s, C-1), 129.82(s, C-5'), 119.86(d, C-6), 118.23(d, C-6'), 116.20(d-C-5), 114.36(d, C-2'), 110.68(d, C-2), 104.39(d, GIc-1), 89.11(d, C-7), 78.29(d, GIc-3), 78.06(d, GIc-5'), 75.32(d, GIc-2), 71.81(d, GIc-4), 65.12(t, C-9'), 62.91(t, GIc-6), 62.37(t, C-9'), 56.95(q, -0CH₃), 56.90(q, -0CH₃), 55.91(d, C-8), 35. 94(t, C-8'), 33.03(t, C-7')

4-3-3. Compound 25 - glochidioside

Colorless amorphous powder Molecular formula : $C_{26}H_{33}O_{11}$ m.p. : 177~178 °C [α]_D (c 1.02, MeOH) : - 13.5° UV λ_{max} (MeOH) nm : 227, 280 IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3418, 1608, 1515, 1498 FAB-MS m/z : 521 [M-H]⁻

¹H-NMR (500 MHz, CD_3OD) : δ

6.95(1H, d, $\mathcal{J}=1.5$ Hz, H-2), 6.83(1H, dd, $\mathcal{J}=1.5$ 7.0 Hz, H-6), 6.77(1H, d, $\mathcal{J}=7.0$ Hz, H-5), 6.75(2H, s, H-2'/H-6'), 5.49(1H, d, $\mathcal{J}=5.0$ Hz, H-7), 4.25(1H, d, $\mathcal{J}=6.5$ Hz, GIc-1), 3.92(1H, m, H-9' α), 3.85(3H, s, -0CH₃), 3.82(3H, s, -0CH₃), 3.75(1H, m, H-9), 3.56(1H, t, H-9' β), 3.46(1H, m, H-8), 2.62(2H, br t, $\mathcal{J}=6.5$ Hz, H-7'), 1.82(2H, m, H-8')



¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ

149.22(s, C-3), 147.65(s, C-3'), 147.61(s, C-4), 145.33(s, C-4'), 137.11(s, C-5'), 134.95(s, C-1), 129.98(s, C-1'), 119.91(d, C-6), 118.32(d, C-2'), 116.27(d, C-5), 114.35(d, C-2'), 110.93(d, C-2), 104.63(d, GIc-1), 89.35(d, C-7), 78.28(d, GIc-3), 78.05(d, GIc-5), 75.28(d, GIc-2), 71.77(d, GIc-4), 70.06(t, C-9'), 65.13(q, C-9), 62.87(t, GIc-6), 56.54(q, $-0CH_3$), 56.49(q, $-0CH_3$), 55.60(d, C-8), 33.09(t, C-7'), 33.09(t, C-8')

5. 생리활성 실험방법

5-1. NBT superoxide scavenging assay

NBT superoxide scavenging assay는 참고문헌을 응용하여 사용하였으며 다음과 같다. 15 mM Na₂EDTA (50 mM KH₂PO₄/KOH, pH 7.4 in d.w.) 용액 20 μ , 0.6 mM NBT 용액 50 μ , 50 mM KOH에 녹인 3 mM hydroxanthine 30 μ 를 취한 다음 일정농도로 녹인 sample 100 μ 를 첨가하였다. 여기에 xanthine oxidase (1 unit in 10 m² buffer)용액 50 μ 를 넣은 후 25°C incubator 안에서 30분 동안 산화가 일어나도록 반응을 시킨 다음 microplate reader를 통해 570nm 흡광도를 측정하였다 시료를 녹였던 5% DMSO (dimethylsulfoxide) in buffer 용액을 control로 하였으며 실험의 표준물질로는 allopurinol을 사용하였다.^{21,22)}



5-2. Cytotoxic activity assay

본 실험에서 사용한 암세포는 HCT₁₅ (colon adenocarcinoma-직장암주)와 SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites-난소암주)이며 암세포 증식저해활성은 sulforhodamine B (SRB) assay 방법²³⁾을 활용하였다. 즉

계대중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 우선 trypsin-CDTA 용액으로 용기부착 면으로부터 탈리시키고, 96 well flat bottom microplate (Falcon)에 가 well 당 세포수가 5×10³ (HCT₁₅), 2×10⁴ (SK-0V-3)이 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 5% CO₂ incubator내에서 24시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후 aspirator로 media를 제거하고 6농도의 log dose로 medium으로 희석한 test material 용액들을 세포가 들어 있는 well에 각각 100#l씩 3배수(triplicate)로 넣어주고 48시간동안 더 배양하였다. 검체용액 은 소량의 DMSO에 녹인 후 배지용액으로 희석하였으며 총 반응 액 중 DMSO의 농도는 1% 이하가 되도록 하였다. 검체용액은 세포에 가하기 전에 miliphore filter로 여과하여 실험의 무균상태를 유지하였다. 세포를 약물과 48시간 배양한 후 각 well의 medium을 제거하고 10% formalin solution을 100#씩 加하여 4℃에서 1시간동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥 면에 고정시킨다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 남아있는 formalin 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well당 100㎡의 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 거조시킨 후 well 당 100#l의 10mM trisma base (unbuffered)용액을 가하여 titer plate shaker로 10분간 shaking하여 염색액을 용출시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 ㎜에서 흡광도를 측정하였다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가하는 시점에서 세포수 (Tz, zero time)와 약물 대신 동량의 배지만을 가하여 48시간 배양했을 때의 세포수 (C, control) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포수 (T, test)를 각각 측정하여 다음의 수식에 따라 항암활성을 계산하였다. 즉 z>T인 경우에는 [(T-Tz)/(C-Tz)] × 100으로 계산하였고, Tz<T인 경우에는 [(T-Tz)/Tz] × 100의 수식으로 계하였다. 이렇게 계산된 값들로부터 LOTUS program의 data regression tool을 이용하여 약물이 암세포의 증식을 50% 저해하는 농도인 50% effective dose (IC₅₀)를 계산하였다.

5-3. MG-63 cell line에서 hlL-6의 유리 확인실험

세포주는 10% FBS (fetal bovine serum)가 포함된 DMEM (eulbecco's modified eagle medium) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 culture dish에 증식시킨 MG-63 세포를 24-well plate에 적정수의 세포(3× 10⁴)를 500 #쓰씩 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 µ2씩 배지를 채취하여 냉동 보관한다. 96-well plate에 |차 anti-body 100 #ℓ (anti-human |L-6 2 #g/mℓ in 0.1 M NaHCO₃)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 #1로 3번 씻어낸 후 blocking solution (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) 200 #0를 처리하고 실온에서 2시간 동안 방치한 후 washing solution 200 #로 2번 씻어낸다. 위에서 24시간 후와 48시간 후에 채취한 배양액 50 #l와 blocking solution 50 #2를 넣어 실온에서 4시간 또는 4℃에서 overnight하여 1차 anti-body와 결합하도록 하였다. 100 씨의 washing solution으로 4번 세척한 후 100 씨의 2차 anti-body (biotin conjugated rat anti-human IL-6 1 µg/㎡ in blocking solution)를 첨가 하여 45분 동안 결합시킨 뒤 결합되지 않은 2차 anti-body를 100 #2의 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 ₪ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 1% DMSO와 TNF-α(15 ng/ml)가 들어갔을 때 hlL-6의 유리정도 (%)를 control로 하였으며 실험의 표준물질로는 dexamethasone을 사용하였고 hlL-6의 유리, 확인은 control에 대한 상대적인 퍼센트(%) 즉, (rate of sample reaction/rate of control)×100으로 표시하였다.^{24,25)}

5-4. Antifungal activity assay

*T. beigelii*와 *C. albicans*는 28° C의 YPD 배지 (Difco)에서, *M. furfur*는 32° C의 1% olive oil을 첨가한 Bacto yeast extract/malt extract (YM) 배지 (Difco)에서 배양하였다.

YPD 또는 YM 배지에 접종된 진균 세포 (2×10⁴/ml)를 microtiter plate에 한 well 당 0.1 ml씩 넣었다. 최소저해농도 (MIC)는 compound를 연속적으로 2-fold dilution하는 micro-dilution법²⁶⁾과 MTT (3-(4,5-dimethyl-2thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay²⁷⁾를 이용하여 측정하였다. 48시간 배양한 후, 미생물의 성장을 억제한 compound의 최소 농도를 microtiter ELISA Reader (Molecular Devices Emax, Sunnyvale, CA, USA)에서 580 nm의 흡광도로 측정하여 MIC 값을 정했다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 이질풀의 EtOAc 분획 compound 구조 동정

1-1. Compound 1의 구조 동정

Compound 1은 황색의 분말상태로 얻어졌으며 10% 황산용액에 노란색으로 발색된다. m.p.는 172~174 °C이고 FeCl₃, Zn-HCl 및 Mg-HCl 반응에서 양성이며 IR Spectrum에서 3370(0H), 1651(C=0), 1607, 1459(aromatic C=C), 1176(glycosidic C-O) cm⁻¹의 흡수대를 나타내어 flavonoid계 배당체 화합물로 추정할 수 있다. Negative FAB-Mass spectrum에서 *m/z* 433 [M-H]⁻의 molecular ion peak, *m/z* 286에서 hexose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있어 kaempferol 모핵의 화합물에 glycoside가 결합될 수 있음을 추정할 수 있다. UV spectrum에서 342nm에서 흡수대가 나타내어 flavone이거나 flavonol 유도체임을 추정할 수 있고 shift 시약으로 NaOMe를 가하였을 때 band I의 극대파장이 48nm 장파장으로 이동하고 흡수강도가 증가함으로 C-4'위치에 이거가 존재하며 NaOAc에 band II가 50nm 장파장으로 이동하므로 C-7 위치에 이거가 존재하고 AICl₃로 가하였을 때 band I이 45nm 만큼 장파장으로 shift하고 이 극대파장은 HCl을 가해도 변하지 않으므로 C-5 위치에 이거가 존재하는 kaempferol type의 flavonol glycoside로 추정하였다.

¹H-NMR spectrum에서는 δ H 6.10과 6.00 ppm에서 A ring의 H-6, H-8 proton singer \mathcal{F} 1.5 Hz로 m-coupling하는 것을 관찰할 수 있었고 δ H 6.93 ppm에서 H-3', 5' proton singer δ H 7.71 ppm의 proton과 \mathcal{F} 8.5 Hz로서 doublet로 나타나 o-coupling함을 관찰할 수 있어 δ H 7.71 ppm의 proton이 H-2', 6'임을 확인할 수 있다. rhamnose의 anomeric proton이 δ H 5.52 ppm에서 관측되었고 δ H 0.92 ppm에서는 rhamnose의 CH₃의 3H분의 proton singer이 관측되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 C-3이 δC 135.53 ppm으로 고자장으로 shift하고 있어 3-0H에 당이 결합되어 있음을 추정할 수 있었고 δC 162.75 ppm에서

proton이 hydroxylation 된 carbon signal이 1개만 단축되어 B ring의 C-4'만 아로 치환되어 있음을 알 수 있었다. 또한 anomeric carbon이 δC 103.35 ppm에서 단축되어 C-3에 당이 1 mole 결합되어 있음을 알 수 있었고 δC 17.80 ppm에서 methyl기가 관측되어 rhamnose임을 추정할 수 있었다.

이상의 화학적인 기기분석과 분광학적 성상 및 표품, 문헌²⁸⁻³⁰⁾과의 비교로 부터 compound 1은 afzelin로 그 구조를 동정하였다.

1-2. Compound 2의 구조 동정

Compound 2는 미황색 비결정성 고체로서 10% 황산시액으로 발색하면 노란색이었고 m.p.는 178~180 °C이며, FeCl₃ test에서 초록색, Mg-HCl 및 Zn-HCi test에서 홍색을 각각 나타냈다. IR spectrum을 보면 3320 cm⁻¹에서 OH, 1660 cm⁻¹에서 C=O기, 1610, 1500, 1450 cm⁻¹에서 aromatic C=C기, 1140 cm⁻¹에서 glycosidic C-O기의 결합을 나타내는 흡수대가 나타내었다. 또한 -178°의 선광도를 나타내고 UV spectrum을 보면 254와 350 nm에서 흡수극대를 나타내어 flavonol 유도체로 추정할 수 있다. 또한 ESI-MS spectrum 측정결과 *m/z* 447에서 [M-H]⁻ molecular ion peak를 나타내어 분자량이 448임을 알 수 있었다.

¹H-NMR spectrum 중 aromatic field의 *δ*H 6.33(1H, d, *J*=2.0 Hz)과 6.17(1H, d, *J*=2.0 Hz) ppm에서 flavonoid A환의 H-8 및 H-6에 기인하는 proton이 관찰되었고, *δ*H 7.33(1H, d, *J*=2.0 Hz), 7.30(1H, dd, *J*=2.0 8.5 Hz), 6.90(1H, d, *J*=8.5 Hz)ppm에서 B환의 H-2', H-3' 및 H-6'에 기인하는 proton이 관찰되어 aglycone은 quercetin임을 추정할 수 있었다. 또한 *δ*H 5.34 ppm에서 anomeric proton이 *J*=1.5 Hz의 doublet로 나타나므로 당이 *α*결합을 하고 있음을 알 수 있었고 *δ*H 0.92 ppm에서 *J*=6.0 Hz의 doublet로 나타나는 3H 분의 signal이 관찰되어 당이 rhamnose임을 알 수 있었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 quercetin과 비교할 때 carbon C-2, C-4가 각각 δ 9.3, 1.8 ppm 저자장으로 shift 된 것이 관찰되고 C-3 carbon이 δ 2.4 ppm 고자장으로 shift 되어 관찰되므로 C-3위에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었다. δC 179.62 ppm에서 C-4 carbon의

carbonyl기를 관찰할 수 있었고 δC 150.05과 146.64 ppm에서 각각 C-3'와 C-4' carbon signal이 관찰되어 C-3'위, C-4'위의 proton이 hydroxyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었다. δC 103.69 ppm에서 당의 anomeric carbon signal을 확인할 수 있었으며, 당으로부터 기인하는 carbon signal이 δC 73.43, 72.28, 72.17, 72.07, 17.80 ppm에서 관측되었다. 특히 δC 17.80ppm에서 나타나는 carbon signal은 rhamnose에서만 나타나는 특징적인 peak이다. 이것은 산 가수분해 하여 표준 품과 같이 TLC를 한 결과 결합한 당이 L-rhamnose임을 알 수 있었다.

이상의 기기분석 결과 및 문헌³¹⁻³³⁾과의 비교로부터 compound 2는 quercetin의 C-3위의 hydroxy기가 *α*-L-rhamnese의 C-1위와 glycosylation이 일어난 flavonoid glycoside 계열 물질인 quercetin 3-*O*-*α*-Lrhamnopyranoside (quercitrin)로 그 구조를 동정할 수 있었다.

1-3. Compound 3의 구조 동정

Compound 3은 미황색 비결정성 고체로서 10% 황산시액으로 발색하면 노란색이며, Fecl₃ test에서 초록색, Mg-HCl 및 Zn-HCl test에서 홍색을 각각 나타냈다. m.p.는 190~192 ℃이며 IR spectrum (KBr window)에서는 3321 cm⁻¹에서 broad 하게 나타난 hydroxyl group과 1660 cm⁻¹의 sharp한 peak들을 통해 carbonyl group들의 functional group 정보를 알 수 있다. 또한 UV spectrum을 통해 MeOH solvent에서 일반적인 flavonoid 최대흡수 파장 값과 유사한 266, 349 nm의 흡수파장이 관찰되었으며, LC-MS spectrum에서는 *m/z* 595.7 [M+H]⁺, 617.7 [M+Na]⁺에서 ion peak들이 관찰되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 δH 8.07(2H, d, *J*=9.0 Hz)과 6.86(2H, d, *J*=9.0 Hz) ppm의 chemical shift로부터 kaemferol 기본 골격 중 B-ring에 p-hydroxy phenyl기에 위치한 proton을 확인 할 수 있었고 δH 6.25(1H, d, *J*=1.5 Hz)와 6.09(1H, d, *J*=2.0 Hz) ppm에서 A-ring proton을 확인할 수 있었다. 또한 δH 4.93(1H, d, *J*=8.0 Hz) ppm에서 glucose anomeric carbon의 proton과 δH 4.51(1H, s) ppm에서 rhamnose의 Rham-1 proton

signal이 관찰되었고, δH 3.0~4.0 ppm에 존재하는 10개의 당의 proton peak들이 관찰되었다. 그리고 δH 0.94(3H, d, *J*=6.5 Hz) ppm에서 rhamnose unit의 특징적 signal을 통해 kaemferol 모핵의 C-3번 위치에 붙어 있는 sugar의 종류가 rutinoside라는 것을 알 수 있었다.

 13 C-NMR spectrum에서 총 25개의 carbon peaks를 보여주고 있는데 δ C 132.49와 116.32 ppm에 위치한 carbon은 각각 두 종류의 carbon을 나타내므로 compound 3은 총 27개의 carbon으로 이루어져 있음을 알 수 있었다. *δ*C 102.62와 102.08 ppm에서 나타나는 signal은 각 당의 anomeric carbon peak이며 그 외 chemical shift δ C 90~180 ppm에서는 13개의 carbon peaks를 관찰 할 수 있었다. 또한 δ C 18.12 ppm의 carbon signal이 관찰됨으로써 rutinoside의 rhamnose의 특징적인 peak를 확인 할 수 있었다. methylene (-CH₂, δC 67.59 ppm)에서 2 종류의 proton chemical shift는 δH 3.80(1H, d, *声* 10.0 Hz)과 3.38(1H, m) ppm 로서 GIC-6 carbon coupling 하는 것을 HSQC를 통해 확인할 수 있었다. HMBC에서는 δC 135.69 ppm의 carbon signal이 δH 4.93(1H, d, *J*=8.0 Hz) ppm의 proton signal과 correlation하는 것을 통해 kaempferol 3번 위치에 sugar와 glycosylation 되어 있음을 확인할 수 있었으며 *δ*C 102.61 ppm의 carbon이 Glc-6의 methlene(-CH₂) proton과 correlation. δC 67.59 ppm의 carbon이 δH 4.51 ppm의 proton과 correlation 하는 것을 통해 sugar가 glucose의 C-6위와 rhamnose의 C-1위에서 결합되어 있음을 확인할 수가 있었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상 및 문헌³⁴⁻³⁶⁾과의 비교를 토대로 하여 compound 3은 kaempferol의 C-3위의 hydroxyrl가 rutinoside의 Glc-C-1위와 glycosylation이 일어난 flavonoid glycoside계열 화합물인 kaempferol 3-*O*-β-rutinoside로 그 구조를 동정할 수 있었다.

1-4. Compound 4의 구조 동정

Compound 4는 백색의 침상결정으로서 m.p.는 215~217℃이며 10% 황산시액으로 발색하면 갈색을 나타나며, FeCl₃ test에서 청색을 나타낸다. UV spectrum에서 218과 275 nm에서 강한 흡수대를 나타나는 것이 관측되고

IR spectrum에서는 3400 cm⁻¹에서 0H가 관측되었고, 1700 cm⁻¹에서 carboxylic acid에 속하는 C=0가 관측되었고, 1620 cm⁻¹에서 aromatic에 속하는 C=C를 관측되었고, 1250 cm⁻¹에서 carboxylic acid에 속하는 C-0를 관측되었다. 또한 MS spectrum에서 molecular ion peak *m/z* 170.02에서 관찰되었다.

¹H-NMR spectrum의 *δ*H 7.06(2H, s) ppm에서 두 개의 proton signal이 관측되었으며 ¹³C-NMR spectrum에서는 *δ*C 122.22, 110.46, 146.53, 139.70, 170.60 ppm에서 총 5개의 carbon signal이 관측되는데 *δ*C 110.46, 146.53 ppm에 위치한 carbon은 각각 두 종류의 carbon을 나타내므로 compound 4는 총 7개의 carbon으로 이루어져 있음을 알 수 있었다.

HSQC spectrum을 통하여 탄소에 직접 연결된 수소를 확인하였다. *δ*Η 7.06 ppm의 proton은 *δ*C 110.46 ppm의 carbon과 correlation을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

HMBC spectrum을 통하여 proton과 두 단계 이상 결합하여, 상호작용을 하는 carbon과의 관계에 대한 정보를 확인하였다. H-3위에 있는 proton은 C-1위, C-2위, C-4위, C-5위, C-7위와 carbon과 correlation하고, H-5위에 있는 proton은 C-1위, C-3위, C-4위, C-6위, C-7위의 carbon과 correlation을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상 및 문헌³⁷⁻³⁹⁾과의 비교를 토대로 하여 compound 4는 simple phenol계열 화합물의 일종인 3,4,5-trihydroxy benzoic acid (gallic acid)로 그 구조를 동정할 수 있었다.

1-5. Compound 5의 구조 동정

Compound 5는 갈색의 분말상태로서 얻어졌으며, m.p.는 199~200℃이며, 10% 황산시액으로 발색하면 갈색으로 나타내며, FeCl₃ test에서 청록색을 나타내며, IR spectrum에서는 3289 cm⁻¹에서 -OH에 기인하는 peak, 1674 cm⁻¹에서 -COOH에 기인하는 peak, 1602, 1528, 1470 cm⁻¹에서는 aromatic C=C에 기인하는 peak가 관측되었고, UV spectrum에서는 258, 294nm에서는 나타나는 것을 보아 compound 5는 benzoic acidr 계열 화합물임을 알 수 있다. El-MS spectrum에서 molecular ion peak가 *m/z* 154에서 나타났고 OH가

상실된 $[C_{6}H_{2}(OH)_{2}CO]^{+}$ ion이 m/z 137에서 나타났고 C-0기가 상실된 $[C_{6}H_{2}(OH)_{2}]^{+}$ 이온이 m/z 110에서 나타나고, m/z 79에서 $[C_{6}H_{7}]^{+}$ ion이 나타났다.

¹H-NMR spectrum에서는 δH 7.42 ppm에서 나타는 *J*=7.2 Hz의 doublet는 H-5가 H-6과 ortho coupling 하는 것에 기인하는 signal, δH 7.41 ppm에서 나타는 *J*=1.8 Hz의 doublet는 H-2가 H-6과 m-coupling 하는 것에 기인하는 signal, δH 6.79 ppm에서 나타나는 *J*=1.8 7.2 Hz의 double doublet는 H-6이 H-5와 o-coupling을 한 후 다시 H-2와 m-coupling 하는 signal가 관측되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 *S*C 170.42 ppm에서 galloyl group의 carbonyl carbon peak가 관측되었고, 151.50(C-4), 145.05(C-3), 123.86(C-6), 123.21(C-1), 117.69(C-2), 115.73(C-5) ppm에서 6개의 aromatic carbon signal이 관측되었다.

이상의 기기분석과 분광학적 성상 그리고 문헌⁴⁰⁻⁴²⁾과의 비교를 토대로 하여 이 화합물은 단순 phenol성 물질인 3,4-dihydroxybenzoic acid(protocatechuic acid)로 그 구조를 동정하였다.

1-6. Compound 6의 구조 동정

Compound 6은 백색의 분말 상태인 물질로서 10% 황산시액으로 발색하면 갈색으로 발색되며, m.p.가 194~196℃ 이며, IR spectrum에서는 3360 cm⁻¹에서 0H에 기인하는 peak, 1690 cm⁻¹에서 ester에 기인하는 peak, 1620 cm⁻¹에서 aromatic C=C에 기인하는 peak들이 관측되었다. UV spectrum에서는 일차흡수 band가 219 nm에서 매우 강하게 단파장 쪽에서 나타나고 있으며 이차흡수 band가 276nm에서 강하게 나타나고 있다. 이는 electron releasing group인 0H가 3개 결합되어 있어 hyperchromic shift 및 bathochromic shift가 동시에 일어났기 때문이다. EI-MS spectrum에서 molecular ion peak가 *m/z* 184에서 나타났고 *α*-cleavage가 일어나서 acylium ion [C₆H₂(0H)₃CO]⁺이 *m/z* 153에서 base peak로 나타나며 C-0가가 상실되어 [C₆H₂(0H)₃]⁺ 이온이 *m/z* 125에서 나타나며, [C₆H₇]⁺이 *m/z* 79에서 나타난다.

¹H-NMR spectrum에서 δH 3.81 ppm에서 methyl ester의 methyl기 proton이 singlet로 나타났으며, δH 7.04 ppm에서 2개의 aromatic proton에 기인하는 흡수가 singlet로 나타나는 것으로 보아 3개의 hydroxyl group은 benzene의 3, 4, 5위에 연속하여 치환되었음을 알 수 있었다.

¹³C-NMR spectrum에서 δC 168.99 ppm에서 galloyl group의 carbonyl기 carbon peak가 관측되었고, δC 146.47(C-3/5), 139.72(C-4), 121.40(C-1), 109.99(C-2/6) ppm에서 6개의 aromatic carbon signal이 관측되었으며, δC 52.27 ppm에서 carbomethoxyl기에 기인하는 carbon signal이 관찰되었다.

이상의 기기분석과 분광학적 성상 그리고 문헌⁴³⁻⁴⁵⁾과의 비교를 토대로 하여 이 화합물은 단순 phenol성 물질인 gallic acid methyl ester(methyl gallate)로 그 구조를 동정하였다.

1-7. Compound 7의 구조 동정

Compound 7은 무색의 비결정성 분말상태 물질로서 10% 황산시액으로 발색하면 검정색으로 되며, m.p.는 217~218℃이며, FeCl₃ 시액 및 NaNO₂ acetic acid 시액에 의해 양성반응을 나타나고 IR spectrum에서는 3383 (-OH), 1715 (C=O), 1616, 1516 (aromatic C=C) 및 1025 (glycosidic C-O) cm⁻¹에서 강한 흡수대를 관찰할 수 있어 ellagitannin계열 화합물임을 추정할 수 있다. 또한 선광도 [α]_D 값이 -50° 인 것을 관찰 되었다. FAB-MS spectrum에서는 *m/z* 633에서 [M-H]⁻의 molecular ion peak, *m/z* 465에서 [M-(galloyI-H)]⁻의 gallic acid가 탈락한 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

¹H-NMR spectrum에서는 δH 7.04 ppm에서 galloyl기에 기인하는 2H 분의 singlet signal과 δH 6.67, 6.65 ppm에서는 각각 1H 분의 HHBP기에 의한 singlet signal이 나타나기에 이 compound 내 각각 한 개의 galloyl기와 HHBP기가 존재하는 것을 알 수 있다.

glucose anomeric signal은 δH 6.35 ppm에서 1H 분의 doublet signal (*J*=2.1 Hz)로 α결합을 하는 것으로 나타났다. 또한 δH 4.95(br, s), 4.80(br, s), 4.53(d, *J*=8.1 Hz), 4.47(dd, *J*=3.3, 8.1 Hz), 4.15(dd,

*J=*8.1, 11.1 Hz), 3.97(d, *J=*9.0 Hz) ppm에서 나타난 multiplet signal은 glucose proton의 H-2, 6, H-4, 5, H-3, 5로 귀속시킬 수 있었다.

 13 C-NMR spectrum에서 당으로부터 기인하는 signal이 δ C 95.18(C-1), 69.63(C-2), 76.36(C-3), 65.18(C-4), 71.82(C-5), 62.63(C-6) ppm에서 관찰되어 한 개의 glucose가 결합되어 있는 것을 추정할 수 있었다. glucose의 C-1 signal이 일반적인 glucose의 moiety와 비교하여 약 δ 10 ppm 정도 large up field shift한 것이 관찰되는데 이는 4 C₁ glucose core를 갖는 galloyl glucose들이 galloyl group의 산화적 coupling으로 HHBP group(viz. ellagitannin)을 갖는 tannin으로 metabolization 될 때 0-3과 0-6/0-2와 0-4에 위치하는 galloyl group사이에서 발생하는 산화적 coupling은 4 C₁ core $\frac{1}{C_{4}}$ core(boat conformation)핵으로 conformation change를 일으키는 원인이 되고 또한 hydroxyl group의 C-0 bonding의 orientation에 변화를 동시에 수반하므로 이 conformation change가 glucose carbon signal의 chemical shift에 영향을 준다는 사실에 기인하여 이 compoud가 1 C₄ core(boat conformation)를 갖는 ellagitannin임을 추정할 수 있었다. δ C 170.27, 168.67, 166.84 ppm에서 -C00-에 의한 peak가 관찰되었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상 및 문헌^{46~48)} data의 비교로 compound 7은 tannin 계열 물질인 isocorilagin으로 그 구조를 동정하였다.

2. 딱총나무의 CH₂Cl₂ 분획 compound 구조 동정

2-1. Compound 8의 구조 동정

Compound 8은 백색의 분말상태 물질로서 m.p.는 77~78 ℃이며, Liebermann-Burchard 반응에서 양성 반응을 나타내고 10% 황산으로 분무한 후 가열하였을 때 분홍색으로 발색하는 것으로 보아 triterpenoid계 화합물로 추정하였다.

pseudomolecular ion ([M+H]⁺) peak가 *m/z* 665에서 나타난 FAB-MS와 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 2D(HMQC, HMBC)-NMR spectral data를 통해 위 화합물의 분자식을 C₄₆H₈₀O₂로 추정하였다.



IR spertrum에서는 2924, 2853(C-H), 1732(C=O), 1626(alkene, C=C), 1462, 1379, 1178(C-O) cm⁻¹, 강한 흡수대를 관찰되었다. EI-MS spectrum에서는 Mclafferty rearrangement에 의해 생성된 특징적인 ion이 *m/z* 409([M-C₁₆H₃₁O₂]⁺)가 관찰되었다. 또한 기타 ion peak *m/z* 218, 189가 관찰 되었고 문헌⁹⁴⁾과 비교한 후 이 화합물에 fatty acid가 있는 것으로 추정되며 EI-MS spectrum에서 잃은 질량 255 ([M-409]⁺)에 근거하여 palmilic acid로 추정되었다.

이상의 근거를 토대로 이 화합물은 triterpnoid와 fatty acid로 이루어진 화합물로 추정된다.

이 화합물의 tritrepnoid 부분을 보면 ¹H-NMR spectrum에서 8개의 angular methyl기가 각각 *δ*H 1.04, 0.99, 0.95, 0.89, 0.85, 0.84, 0.83, 0.77, 0.76 ppm에서 singlet로 관찰되었다.

¹³C-NMR 30개의 carbon이 관찰되었고, spectrum에서 이것은 DEPT spectrum을 통해 8개의 methyl, 9개의 methylene, 7개의 methine, 6개의 quaternary carbon signal이 관찰되었다. 이상의 관찰된 methyl(δ C 28.82, 28.07, 21.13, 20.49, 18.50, 17.43, 16.78, 16.54 ppm)기 carbon 그리고 olefinic(*δ*C 124.29, 139.58 ppm) carbon 및 주변 탄소들의 NMR pattern을 기존문헌^{39~40)}과 비교해 본 결과 이 화합물은 ursane계열의 α -amyrin type의 triterphoid 구조로 추정할 수 있다. 하지만 α -amyrin의 proton과 carbon sepctrum data와 비교해본 결과 ¹H-NMR spectrum에서는 *δ*H 4.47(1H. dd. J=3.6. 10.8 Hz)에서 hydroxymethine proton이 α -amyrin보다 1.31 ppm나 저자장으로 이동하였고 ¹³C-NMR spectrum에서도 C-3의 hydroxymethine carbon이 *SC* 80.28 ppm로 이동되는 signal이 관찰되어 patty acid가 C-3위에 ester된 것으로 추정된다. 기타 proton과 carbon은 기본상에서 α-amyrin과 일치하게 나타났다. 2D(HMQC, HMBC)-NMR spectrum에서 fatty acid의 carboxy기의 carbon(&C 173.62 ppm) C-1'과 H-3 hydroxymethine proton(δH 4.47 ppm)사이에서 correlation을 이룸으로 fatty acid가 C-3에 결합되어 있음을 재차 확정하였다.

fatty acid에 속하는 proton은 δ H 1.26 (20H, m, H-4'~H-13') 0.89 (3H,
t, *J*=7.0 Hz, H-16') ppm에서 관찰되었고, carbon은 *δ*C 173.69, 34.85, 30.88, 29.69~29.19, 25.16, 22.69, 14.11 ppm에서 carbon들이 관찰되었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상으로부터 이 화합물은 8개의 singlet methyl기와 1개의 double bond 및 C-3 위치의 hydroxy기와 palmilic acid의 carboxyl기가 ester 된 urane계열의 pentacyclic triterpenoid 화합물로서, 문헌⁴⁹⁻⁵¹⁾ 값과 비교한 후 α-amyrin-3-β-palmitate로 그 구조를 동정하였다.

2-2. Compound 9의 구조 동정

Compound 9는 백색의 분말상태 물질로서 m.p.는 80~82℃이며, Liebermann-Burchard 반응에서 양성반응을 나타내고 10% 황산으로 분무한 후 가열하였을 때 분홍색으로 발색하는 것으로 보아 triterpenoid계 화합물로 추정하였다.

pseudomolecular ion ([M+H]⁺) peak가 679.53에서 나타난 FAB-MS와 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 2D (HMQC, HMBC)-NMR spectral data를 통해 위 화합물의 분자식을 C₄₆H₇₈O₃로 추정하였다.

IR spertrum에서는 1732 (C=O), 1653 (COOH), 1617 (C=C), 강한 흡수대를 관찰되었다. EI-MS spectrum에서는 Mclafferty rearrangement에 의해 생성된 특징적인 ion peak가 *m/z* 423.33 ([M-C₁₆H₃₁O₂]⁺)에서, long-chain fragment ion peak가 *m/z* 495.40 ([M-C₁₃H₂₇]⁺)에서 관찰되었다. 또한 *m/z* 439.38 [M-C₁₆H₃₁≡0⁺]⁺에서 alylinm ion peak가 관찰 되었고 문헌⁹⁴⁾과 비교한 후 이 화합물에 fatty acid가 있는 것으로 추정되며 EI-MS spectrum에서 잃은 질량 255 ([M-423]⁺)에 근거하여 palmilic acid로 추정되었다.

이상의 근거를 토대로 이 화합물은 triterphoid와 fatty acid로 된 화합물인 것으로 추정된다.

이 화합물의 tritrepnoid 부분을 보면 ¹H-NMR spectrum에서 8개의 angular methyl기가 각각 δH 1.30, 1.19, 1.17, 0.95, 0.89, 0.88, 0.82, 0.80 ppm에서 singlet로 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서 30개의 carbon이 관찰되었고, 이것은 DEPT spectrum을 통해 8개의 methyl, 8개의 methylene, 7개의 methine, 7개의

quaternary carbon을 관찰되었다. 이상의 관찰된 methyl (δ C 28.82, 28.07, 21.13, 20.49, 18.50, 17.43, 16.78, 16.54)기 및 주변 탄소들의 NMR 패턴을 기존문헌과 비교해 본 결과 이 화합물은 ursane계열의 α -amyrin type의 triterphoid 구조로 추정할 수 있다. 하지만 α-amyrin의 proton과 carbon sepctrum data와 비교해본 결과 ¹H-NMR spectrum에서는 δ H 5.54(1H. s. H-12)에서 olefinic proton과 4.52 (1H, dd, *노*5.0, 12.0 Hz, H-3) ppm에서 hydroxy methine proton이 저자장으로 이동하였고 ¹³C-NMR spectrum에서도 C-3의 hydroxy methine carbon이 δ C 80.28 ppm로, C-11의 methylene carbon이 δ C 199.71 (6-membered ring ketone) ppm로, C-12의 olefinic methine carbon0 δ C 130.39 ppm로, C-13의 olefinic quaternary carbon이 SC 164.95 ppm로 이동되는 signal이 관찰되었으며 기타 proton과 carbon은 기본상에서 일치하게 나타났다. 2D (HMQC, HMBC)-NMR spectrum에서 δ C 173.69의 fatty acid carboxyl기의 carbon이 δ H 4.52 ppm의 H-3 hydroxy methine proton과 cross peak를 이름으로 지방산이 C-3에 결합되어 있음을 확인하였다. 그리고 &C 199.71 ppm의 6-membered ring ketone carbon이 δH 2.35의 H-9 methine proton과 cross peak를 이루어 C-11에 ketone carbon이 있음을 확인 할 수 있었다.

fatty acid에 속하는 proton은 ¹H-NMR spectrum에서 *&*H 1.26 (20H, m, H-4'~H-13') 0.89 (3H, t, *J*=7.0 Hz, H-16') ppm에서 관찰되었고, ¹³C-NMR spectrum에서는 *&*C 173.69, 34.85, 30.88, 29.69~29.19, 25.16, 22.69, 14.11 ppm에서 carbon들이 관찰되었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상을 종합하여 보면 이 화합물은 8개의 singlet methyl기와 1개의 ketone기, 1개의 이중결합 및 C-3 위치의 hydroxy기와 palmilic acid의 carboxyl기가 ester화 된 urane계열의 pentacyclic triterpenoid 화합물로서, 문헌⁵⁰⁻⁵²⁾ 값과 비교한 후 11-keto-α-amyrin palmitate로 그 구조를 동정하였다.

2-3. Compound 10의 구조 동정

Compound 10은 백색의 분말물질로서 m.p.는 255~257℃이며, Liebermann-

Burchard 반응에서 양성 반응을 나타내고 10% 황산으로 분무한 후 가열하였을 때 분홍색으로 발색하는 것으로 보아 triterpenoid계 화합물로 추정하였다. IR spertrum에서는 3335 (0H), 1708 (COOH), 1643, 839 (trisubstituted double bond) cm⁻¹에서 강한 흡수대를 관찰하였다. EI-MS spertrum에서는 453 [M-H]⁻, 477 [M+Na]⁺에서 ion peak를 관찰하였다.

¹H-NMR sepctrum에서는 δH 4.74(1H, s, H-29β)와 4.62(1H, s, H-29α) 에서 exo-methyllene에 기인한 olefinic proton signal과 δH 3.01(1H, m, H-18) ppm에서 methine proton signal이 관찰되었다. 또한 δH 1.07 (3H, s, H-23), 1.02 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, s, H-25)에서는 6개의 angular methyl singlet signal들이 관찰되었다.

¹³C-NMR 탄소가 spectrum에서는 30개의 관찰되었고. 이것은 DEPT spectrum을 통해 6개의 methyl, 11개의 methylene, 5개의 methine, 8개의 guaternary carbon으로 확인되었다. δC 217.71 ppm에서 6-membered ring 181.74 ppm에서 carboxyl기에 ketone기와 δC 기인하는 signal0| 관찰되었고, δ C 150.30 ppm에서 olefinic quaternary carbon과 δ C 109.76 ppm에서 olefinic methylene carbon이 관찰되었다. 또한 δC 54.91~19.61 ppm에서 다수의 methine과 methylene carbon signal들이 관찰되었으며, δC 26.61, 21.35, 15.94, 15.79, 14.60 및 19.34 ppm에서 methyl carbon signal이 관찰되었다.

이상의 관찰된 methyl기 및 주변 탄소들의 NMR 패턴을 기존문헌과 비교해 본 결과 이 화합물은 lupane 계열의 lupeol type의 triterpenoid 화합물로 추정할 수 있었다. 하지만 이 화합물에서의 hydroxy methine carbon과 proton에 해당하는 signal들이 관찰되지 않은 반면 *S*C 218.20 ppm에서 6-membered ring ketone기에 해당하는 signal이 관찰되었다. 6-membered ring ketone기의 위치는 HMQC 및 HMBC spectrum 분석을 통해 C-3위인 것으로 추정할 수 있었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상들로부터 이 화합물은 7개의 singlet methyl기와 1개의 ketone기 및 1개의 carboxyl기와 1개의

이중결합을 갖는 lupane 계열의 pentacyclic triterpene화합물로서, 문헌⁵³⁻⁵⁵⁾ 값과 비교하여 betulonic acid로 그 구조를 동정하였다.

2-4. Compound 11의 구조 동정

Compound 11은 백색의 분말물질로서 m.p.는 196~198℃이며, Liebermann-Burchard 반응에서 양성 반응을 나타내고 10% 황산으로 분무한 후 가열하였을 때 분홍색으로 발색하는 것으로 보아 triterpenoid계 화합물로 추정하였다. IR spertrum에서는 3335 (아), 1708 (COOH), 1643, 839 (trisubstituted double bond) cm⁻¹에서 강한 흡수대를 관찰하였다. ESI-MS spertrum에서는 453.5 [M-H]⁻, 477.5 [M+Na]⁺에서 peak를 관찰하였다.

¹H-NMR sepctrum에서는 δH 5.30 (J=4.0 Hz, H-12)에서 1H 분의 olefinic proton과 δH 3.35 (1H, dd, J=4.5 13.5 Hz, H-18) ppm에서 methine proton signal이 관찰되었다. 또한 δH 1.15 (3H, s, H-27), 1.09(3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-25), 1.03 (3H, s, H-24), 0.93 (3H, s, H-30), 0.90 (3H, s, H-29), 0.81 (3H, s, H-26)에서는 7개의 angular methyl singlet signal들이 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 30개의 탄소가 관찰되었고, 이것은 DEPT spectrum을 통해 7개의 methyl, 9개의 methylene, 4개의 methine, 10개의 quaternary carbon으로 확인되었다. *δ*C 217.71 ppm에서 6-membered ring ketone기와 *δ* 183.64에서 carboxyl기에 기인하는 signal이 관찰되었고, *δ*C 143.62 ppm에서 olefinic quaternary carbon과 *δ*C 122.39 ppm에서 olefinic methine carbon이 관찰되었다. 또한 *δ*C 55.30~19.54 ppm에서 다수의 methine과 methylene carbon signal들이 관찰되었으며, *δ*C 33.04, 26.43, 25.82, 23.54, 21.44, 16.96 및 15.00 ppm에서 methyl carbon signal이 관찰되었다.

이상의 관찰된 methyl기 및 주변 탄소들의 NMR 패턴을 기존문헌과 비교해 본 결과 이 화합물은 oleanane 계열의 β-amyrin type의 triterpenoid 화합물로 추정할 수 있었다. 하지만 이 화합물에서의 hydroxy methine carbon과 proton에 해당하는 signal들이 관찰되지 않은 반면 δC 217.71

ppm에서 6-membered ring ketone기에 해당하는 signal이 관찰되었다. 6-membered ring ketone기의 위치는 HMQC 및 HMBC spectrum 분석을 통해 C-3위인 것으로 추정할 수 있었다.

이상의 결과들로 이 화합물은 7개의 singlet methyl기와 1개의 ketone기 및 1개의 carboxyl기와 1개의 이중결합을 갖는 oleanane 계열의 pentacyclic triterpenoid 화합물로서, 문헌⁵⁶⁻⁵⁸⁾ 값과 비교하여 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid (Oleanonic aicd)로 그 구조를 동정하였다.

2-5. Compound 12의 구조 동정

Compound 12는 백색의 침상 결정으로서 m.p.는 280~282 °C이며, [α]₀ 값은 + 7.2° 이고, UV spectrum에서 241nm에서 극대 흡수 파장을 나타났으며, IR spectrum에서는 3510 cm⁻¹에서 0H 기가 관찰되었고, 1710 cm⁻¹에서 C=0 기가 관찰되었고, 1615 cm⁻¹에서 C=C 기가 관찰된 것을 보아 이 화합물을 triterpenoid 계열의 화합물로 추정된다. 또한 EI-MS spectrum에서는 molecular ion peak가 *m/z* 456 [M]⁺에서 관측되었고 fragment ion peak가 *m/z* 438 [M-H₂0]⁺에서 관찰되었고 fragment ion peak가 *m/z* 410 [M-(COOH+H)]⁺에서 관찰되어 이 compound에 hydroxyl group과 carboxyl group이 존재할 것으로 추정된다.

¹H-NMR spectrum에서 δH 4.69 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-29β)와 4.56 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-29α) ppm에서 exo-methyllene에 기인한 signal olefinic proton signal과 δH 3.12 (1H, dd, *J*=4.5, 11.0 Hz, H-3) ppm에서 hydroxy methine proton signal이 관찰되었다. 또한 δH 1.68 (3H, s, H-30), 0.99 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-27), 0.85 (3H, s, H-26), 0.75 (3H, s, H-25)에서는 6개의 angular methyl singlet signal들이 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 30개의 탄소가 관찰되었고, *S*C 183.64에서 carboxyl기에 기인하는 signal이 관찰되었고, exo-methyllene에 기인한 olefinic quaternary carbon이 *S*C 152.72 ppm에서, *S*C 109.95 ppm에서 exo-methyllene에 기인한 olefinic methylene carbon 관찰되었으며, *S*C

79.85 ppm에서 hydroxy methine carbon signal이 관찰되었다. 또한 다수의 methine과 methylene carbon signal은 δ C 57.07~19.61 ppm에서 관찰되었으며, methyl carbon signal은 δ C 28.76, 19.78, 16.95, 16.91, 16.26, 15.25 ppm에서 관찰되었다.

이상의 관찰된 methyl기 및 주변 탄소들의 NMR 패턴을 기존문헌과 비교해 본 결과 이 화합물은 lupane 계열의 lupeol type의 triterpenoid 화합물로 추정할 수 있다. 하지만 lupeol의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR data와 비교하여 보면 C-28위의 methyl기가 사라진 반면 carboxyl기에 기인하는 signal이 관찰되었 다. 이는 HMQC와 HMBC spectrum 분석을 통해 C-28위에 carboxyl기 있음을 확 인할 수 있다.

이상의 기기분석과 분광학적 성상 및 문헌^{59~61)}과의 비교를 토대로 이 compound는 7개의 singlet methyl기와 1개의 carboxyl기 및 1개의 exo-methyllene olefinic bond가 있는 lupane 계열의 pentacyclic triterpenoid 화합물로서, 그 구조를 3-hydroxy-20(29)-lupen-28-oic acid (betulinic acid)로 동정하였다.

2-6. Compound 13의 구조 동정

Compound 13은 백색의 분말 상태로서 m.p.는 197~197.5 ℃이고 10% H₂SO₄에 갈색으로 발색되며 Liebermann-Burchard 반응에서 양성 반응을 나타내며 IR spectrum에서는 2932 cm⁻¹에서 (C-H)에 기인하는 peak, 1219 cm⁻¹에서 alcohol C-O에 기인하는 peak를 관찰되었고 EI-MS spectrum에서는 molecular ion peak가 *m/z* 426에서 나타났고 *m/z* 411에서 [M-CH₃]⁺에서 ion peak가 관찰되고, *m/z* 393에서 [M-(CH₃+H₂O)]⁺ ion peak, *m/z* 218에서 [D/E ring]⁺ ion peak, *m/z* 203에서 [D/E ring-CH₃]⁺ ion peak가 관찰되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 δH 1.25, 1.14, 0.99, 0.93, 0.91, 0.90, 0.78, 0.76 ppm에서 8개의 methyl signal이 관찰되었고 δH 3.22(*J*=4.0, 11.0 Hz) ppm에서 double doublet signal인 hydroxy methine proton 을 관찰할 수 있었고 δH 5.28(*J*=4.0 Hz) ppm에서 doublet signal인 olefinic methine proton을 관찰 되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 총 30개의 carbon signal이 관찰되었는데 *δ*C 79.02 ppm에서 oxygenated carbon이 관찰되었고 *δ*C 143.59 ppm에서 olefinic quaternary carbon과 *δ*C 122.62 ppm에서 olefinic methine carbon이 관찰되었다. 또한 *δ*C 55.21~18.30 ppm에서 다수의 methine과 methylene carbon signal들이 관찰되었으며, *δ*C 15.32 (C-23), 28.09 (C-24), 15.54 (C-25), 17.09 (C-26), 25.91 (C-27), 28.09 (C-28), 23.56 (C-29), 33.06 (C-30) ppm에서 methyl carbon signal이 관찰되었다.

이상의 기기분석과 분광학적 성질 및 문헌⁶²⁻⁶⁴⁾과의 비교를 토대로 하여 이 화합물은 oleanane 계열의 triterpenoid 화합물이며 3-β-hydroxy-olean-12-ene (β-amyrin)으로 그 구조를 동정하였다.

2-7. Compound 14의 구조 동정

Compound 14는 백색의 분말상태로 얻어졌으며 m.p.는 260~263℃이고, Liebermann-Burchard test에서 양성반응을 나타내었으며, IR spectrum은 3498 cm⁻¹에서 hydroxy기가 관측되었고, 2972, 2843 cm⁻¹에서 C-H에 해당하는 peak가 관측되었고, 1732 cm⁻¹에서 carboxy1기에 기인하는 paek가 관측되었으며, 1632 3498 cm⁻¹에서 C=C에 기인하는 peak가 관측되었으며, UV spectrum에서는 207 nm에서 강한 흡수 파장을 나타났으므로 이 화합물을 triterpenoid 계열의 화합물로 추정된다. Mass spectrum에서는 molecular ion peak가 *m/z* 454에서 나타났으며, fragment ion이 *m/z* 439 [M-CH₃]⁺에서, [M-(COO)]⁺가 떨어져서 생성된 fragment ion이 *m/z* 410에서 나타났으므로 이 화합물에는 hydroxy1 group과 carboxy1 group이 존재할 것으로 추정된다.

¹H-NMR spectrum에서는 δH 5.96 (1H, d, *J*=12.0 Hz), 5.54 (1H, dd, *J*=3.5 11.5 Hz)에서 olefinic proton signal 관찰되었고, δH 3.23 (1H, dd, *J*=5.0 11.5 Hz)에서 hydroxy methine에 기인하는 proton이 signal이 관찰되었고, δH 1.16 (H-27), 1.05 (H-26), 1.00 (H-29), 0.99 (H-25), 0.93 (H-30), 0.91 (H-23), 0.79 (H-24) ppm에서 7개의 methyl기에 기인하는 proton signal이 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 olefinic carbon signal이 *δ*C 133.43과 128.81

ppm에서 관측되었고, hydroxy methine이 연결된 carbon은 *S*C 78.87 ppm에서 관찰되었으며 7개의 methyl carbon은 각각 *S*C 27.74, 19.15, 18.88, 17.89, 17.81, 16.10, 14.90 ppm에서 관찰되었다. 그리고 *S*C 179.92 ppm에서 carboxyl group에 기인하는 signal이 관찰되었으며, 대다수 methylene과 methine carbon signal *S*C 54.74~17.68 ppm에서 관찰되었다. 또한 *S*C 89.68 ppm에서 1개의 quaternary carbon과 *S*C 60.56 ppm에서 1개의 methine carbon signal이 관측되었다.

이상의 관찰된 methyl기 및 주변 탄소들의 NMR 패턴을 기존문헌과 비교해 본 결과 이 화합물은 ursane 계열의 ursolic acid type의 triterpenoid 화합물로 추정할 수 있었다. 하지만 이 compound를 ursolic acid의 proton과 carbon sepctrum data와 비교해본 결과 ¹H-NMR spectrum에서는 1개인 olefinic proton이 2개가 관찰되었고, ¹³C-NMR spectrum에서 C-11, C-12 및 C-18위 carbon signal이 고자장으로 각각 110, 4, 7 ppm 정도 shift 한 것이 관찰되었고, 또한 C-13, C-16, C-17, C-22위의 carbon signal이 각각 80, 4, 3, 6 ppm 정도 저자장으로 shift 한 것을 보아 C-11과 C-12위에 olefinic carbon이 있음을 알 수 있고 C-13과 C-28위의 carboxyl기가 lactone을 형성하였음을 알 수 있다.

이상의 기기분석과 분광학적 성상 및 문헌⁶⁵⁻⁶⁷⁾과 비교를 토대로 이 compound는 7개의 singlet methyl기와 1개의 olefinic double bond, 그리고 C-13과 C-28 carboxyl group이 lactone화 된 urane 계열의 pentacyclic triterpenonid 화합물로서 3β-hydroxy-urs-11-en-13(28)-lactone (ursolic acid lactone)으로 그 구조를 동정하였다.

2-8. Compound 15의 구조 동정

Compound 15는 백색의 판상결정 상태로서 m.p.는 133~136℃이며, Liebermann-Burchard 반응은 양성을 나타내었고 [α]₀ 값은 - 20°를 나타내었다. IR spectrum에서는 3425 cm⁻¹에서 (0H) 기인하는 peak, 2961 cm⁻¹에서 (C-H)에 기인하는 peak, 1636 cm⁻¹에서 (C=C)에 기인하는 peak, 1057 cm⁻¹에서 (C-O)에 기인하는 peak가 관찰되었다. EI-MS spectrum에서는

molecular ion peak가 *m/z* 414 [M]⁺에서 관찰되었고 *m/z* 399 [414-CH₃]⁺, 381 [M-CH₃-H₂0]⁺, 329 [M-C₆H₁₂]⁺, 303 [414-C₇H₁₁0]⁺, 273 [M-side chain-C₃H₆]⁺, 255 [M-side chain-H₂0]⁺, 231 [M-side chain-ring D]⁺, 213 [M-side chain-ring D-H₂0]⁺ fragment ion peak들이 관찰되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 δ H 0.70 (H-18)과 1.00 (H-19) ppm에서 3H 분의 methyl singlet signal들이 각각 관찰되었으며, δ H 5.53 (*J*=4.0 Hz, H-6) ppm에서 1H 분의 olefinic proton signal이 관찰되었고, δ H 3.51 (H-3) ppm에서는 1H 분의 hydroxy methine proton이 multiplet signal로 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서 총 29개의 carbon signal이 관찰되었고 이것은 DEPT spectrum을 통해 6개의 methyl, 10개의 methylene, 9개의 methine, 4개의 quaternary carbon으로 확인되었다. *&*C 140.75 (C-5) ppm에서 olefinic quaternary carbon과 *&*C 122.72 (C-6) ppm에서 olefinic methine carbon signal이 관찰되었고 *&*C 26.07 (C-23), 45.83 (C-24), 15.00 (C-25), 19.03 (C-26), 19.82 (C-27), 23.06 (C-28), 11.98 (C-29) ppm에서는 methyl carbon signal이 관찰되었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상 및 문헌⁶⁸⁻⁷⁰⁾들과의 비교를 토대로 이 화합물은 sterol 계열 화합물 β-sitosterol로 그 구조를 동정하였다.

2-9. Compound 16의 구조 동정

Compound 16은 백색의 판상결정 상태로서 m.p.는 140 ℃이며, 10% 황산시액으로 발색하면 분홍색으로 되며, Liebermann- Burchard 반응 양성을 나타내고, UV spectrum에서는 201 nm 극대 파장의 강한 흡수가 관찰되었고, IR spectrum에서는 3422 cm⁻¹에서 0H에 기인하는 peak, 2935 cm⁻¹에서 (C-H)에 기인하는 peak, 1653 cm⁻¹에서 (C=C)에 기인하는 peak, 1053 cm⁻¹에서 (C-O)에 기인하는 peak가 관찰되었다. EI-MS spectrum에서는 molecular ion peak가 *m/z* 413[M]⁺에서 관찰되었고 *m/z* 397 [M-CH₃]⁺, 329 [M-C₆H₁₂]⁺, 255 [M-side chain-H₂0]⁺, 213 [M-side chain-ring D-H₂0]⁺ fragment ion peak들이 관찰되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 δH 1.01 (H-18), 0.92 (H-21), 0.83 (H-27), 0.81 (H-26), 0.68 (H-19) ppm에서 3H 분의 methyl signal들이 각각 관찰되었으며, δH 5.35 (*J*=5.0 Hz, H-6), 5.15 (*J*=8.5, 15.5 Hz, H-22), 5.02 (*J*=8.5, 15.0 Hz, H-23) ppm에서 olefinic proton signal이 관찰되었고, δH 3.51 (H-3) ppm에서는 hydroxy methine proton이 multiplet로 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서 총 29개의 carbon signal이 관찰되었다. *δ*C 140.75 (C-5) ppm에서 olefinic quaternary carbon과 *δ*C 122.72 (C-6), 138.31 (C-22), 129.27 (c-23) ppm에서 olefinic methine carbon signal이 관찰되었고 *δ*C 12.50 (C-18), 19.39 (C-19), 22.24 (C-21), 19.03 (C-26), 21.21 (C-27), 12.81 (C-29) ppm에서는 methyl carbon signal이 관찰되었다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상 및 문헌⁷⁰⁻⁷²⁾들과의 비교를 토대로 이 화합물은 sterol 계열 화합물 stigmasterol로 그 구조를 동정하였다.

2-10. Compound 17의 구조 동정

Compound 17은 백색의 분말상태 물질로서 m.p.는 122℃이며, [α]₀ 값은 + 51.5°이며, 10% 황산(in EtOH)에 의하여 적색으로 발되었으며, molecular ion peak가 *m/z* 358 ([M]⁺)로 나타난 EI-MS spectrum으로부터 분자식은 C₂₀H₂₂O₆으로 추정하였다.

IR spectrum에서 3448 cm⁻¹에서 나타난 흡수대를 통하여 애가 존재함을 알 수 있으며 1608과 1480 cm⁻¹에서 나타난 흡수대를 통하여 aromatic double bond가 존재함을 알 수 있었다.

¹H-NMR spectrum에서는 3-methoxy-4-hydroxyphenyl group의 전형적인 pattern으로서 δH 6.74, 6.92, 6.97 ppm에서 3개의 aromatic proton signal들과 δH 3.83 ppm에서 1개의 aromatic methoxyl group에 의한 signal들이 관찰되었고 δH 4.68 ppm에서 oxygenated-methine 1개가 관찰되었고 δH 4.21과 3.81 ppm에서 oxygenated-methylene 1개와 δH 3.11 ppm에서 methine 1개가 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 총 10개의 signal들이 관찰되었다. 그 중 3-

methoxy-4-hydroxyphenyl group에 의한 benzene에서 유래한 6개의 signal이 δ C 149.40, 148.22, 132.96, 120.13, 116.34, 110.91 ppm에서 관측되었고 δ C 56.32 ppm에서 aromatic methoxyl carbon이 관측되었고 δ C 87.59 ppm에서 oxygenated-methine carbon이 관측되고 δ C 72.52 ppm에서 oxygenated-methylene carbon이 관측되었고 δ C 55.28 ppm에서 methine carbon이 관측되었다.

이상의 결론으로부터 이 화합물은 furofuran ring을 가졌으며 3-methoxy-4-hydroxypenyl group을 포함하는 대칭구조의 furofuran type의 lignan인 pinoresionl로 추정하였고 문헌⁷³⁻⁷⁵⁾상의 spectrum data와 비교한 후 그 구조를 (+)-pinoresinol로 동정하였다.

2-11. Compound 18의 구조 동정

Compound 18은 무색의 무정형 결정물질로서 m.p.는 167-168℃이며 10% 황산으로 분무 후 가열하였을 때 검정색으로 발색되었다. 선광도 [α]₀ 값은 +16.5°이며, HR-MS spectrum data 분석 결과 M⁺ ion의 signal이 *m/z* 360.16로 관측된 것으로부터 molecular formula가 C₂₀H₂₄O₆으로 추정된다. IR spectrum에서 3372 cm⁻¹에서 0H기가 관측되었고, 2937, 2885 cm⁻¹에서 C-H가 관측되었으며, 1606, 1515, 1449cm⁻¹에서 특징적인 aromatic region이 관측되었다. UV spectrum에서 280, 230 nm 나타난 것으로부터 이 화합물에는 benzene ring이 존재함을 알 수 있다.

¹H-NMR spectrum을 분석한 결과, 저자장 측에서 δH 6.90(1H, d, *J*=1.0 Hz, H-2), 6.79(1H, d, J=1.5 Hz, H-2'), 6.78-6.75(2H, m, H-6'/H-5'), 6.71(1H, dd, *J*=6.5 Hz, H-5), 6.64(1H, dd, *J*=1.5 6.5 Hz, H-6) ppm에서 6개의 benzene ring의 proton signal, δH 3.84와 3.82) ppm에서 benzene ring methoxyl기 및 그 외에 각각 3종씩 methylene proton과 sp³ methine proton으로 구성되어 (+)-pinoresinol의 spectrum과 비교한 결과, 상호 유사한 경향을 보였으나 (+)-pinoresinol의 7위의 methine proton signal *δ*H 4.68 ppm이 소실되어진 대신 고자장에서 *δ*H 2.93(1H, dd, *J*=4.5 11.5 Hz, H-7*α*), 2.49(1H, dd, *J*=9.5 11.5 Hz, H-7*β*) ppm에서 AB type의

signal이 새롭게 검출되어짐을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 (+)-pinoresinol의 H-7위와 H-9'위가 ether 결합한 hydrofuran환이 개환된 형태의 화합물인 lariciresinol일 가능성이 강하게 시사되었다.

DEPT법에 의한 이 compound의 ¹³C-NMR spectrum 상에서는 총 20개의 carbon signal이 관측되었고 methoxyl group에 기인하는 carbon이 *&*C 56.45 ppm에서 관측되었고 methylene에 기인하는 carbon (*&*C 73.65, 60.60, 40.79)이 3개, benzene ring methine carbon (*&*C 122.33, 119.96, 116.33, 116.13, 113.54, 110.78 ppm)이 6개, methine carbon (*&*C 84.19, 54.21, 33.80 ppm)이 3개, benzene ring에 속하는 quaternary carbon [*&*C 149.15(s, C-4/H-4'), 147.19, 145.95 ppm]이 4개 가 관측되었다.

이 화합물의 carbon C-7(*&*C 33.82 ppm)위와 C-9'(*&*C 60.61 ppm)위의 (-CH₂OH) carbon signal들이 각각 (+)-pinoresinol의 C-7위와 C-9'위들과 비교해 보면 52.5 ppm 및 11.1ppm 씩 저자장으로 shift 되어 hydrofuran 환이 개환된 것임을 확인할 수 있었다.

이 상의 각종 기기분석 결과와 분광학적 성질 및 문헌⁷⁵⁻⁷⁷⁾과의 비교로부터 이 compound는 (+)-Lariciresinol로 그 구조를 동정하였다.

2-12. Compound 19의 구조 동정

Compound 19는 무색의 무정형 결정 물질로서 m.p.는 167~168℃이며, 10% 황산으로 분무 후 가열하였을 때 검정색으로 발색되었다. 선광도 [α]₀ 값은 - 24.9°이며, LC-MS spectrum에서는 *m/z* 376에서 molecular ion peak가 관측되고, IR spectrum에서 3370 cm⁻¹에서 0H기가 관측되었고, 1608, 1520, 1450cm⁻¹에서 특징적인 aromatic region이 관측되었다. UV spectrum에서 229, 280 nm 나타난 것으로부터 이 화합물에는 benzene ring이 존재함을 알 수 있다.

¹H-NMR spectrum을 분석한 결과, 저자장 측에서 δH 6.86(1H, d, *J*=1.5 Hz, H-2), 6.77(1H, *J*=1.5 Hz, H-2').6.72(1H, m, H-6), 6.71(1H, *J*=8.5 Hz, H-5), 6.69(1H, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.62(1H, dd, *J*= 1.5 8.0 Hz, H-6') ppm에서 6개의 benzene ring의 proton signal, δH 3.82 ppm에서 2개의

benzene ring methoxyl기가 관찰된 외에 각각 3종씩 methylene proton과 sp³ methine proton으로 구성되어 (+)-pinoresinol의 spectrum과 비교한 결과, 상호 유사한 경향을 보였으나 (+)-pinoresinol의 7위의 methine proton signal δH 4.68 ppm이 소실되어진 대신 고자장에서 δH 2.93(1H, dd, *J*=5.0 13.5 Hz, H-7 α), 2.47(1H, dd, J=11.0 13.5 Hz, H-7β) ppm에서 AB type의 새롭게 검출되어짐을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 signalOl (+)-pinoresinol의 H-7위와 H-9' 위가 ether 결합한 hydrofuran환이 개환된 형태의 화합물인 lariciresinol일 가능성이 강하게 시사되었다. 그리고 δ4.73(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-7) ppm에서는 methine에 기인하는 proton signal이 관측되었고, δH 3.97(1H, dd, J=6.5 8.0 Hz, H-9α), 3.82(1H, dd, J=4.0 15.0 Hz, H=9' α), 3.71(1H, dd, J=5.5 8.0 Hz, H=9 β), 3.61(1H, dd, Æ6.5 11.0 Hz, H-9'β) ppm에서 methylene proton에 기인하는 signal이 관측되었고 δH 2.73(1H, m, H-8), 2.39(1H, m, H-8'). 에 기인하는 methine signal이 관측되었다.

DEPT법에 의한 이 compound의 ¹³C-NMR spectrum 상에서는 총 20개의 carbon signal이 관측되었고 methoxyl group에 기인하는 carbon이 *δ*C 56.45(q, -OMe×2) ppm에서 관측되었고 methylene에 기인하는 carbon 3개가*δ*C 73.58, 60.61, 44.07 ppm에서, benzene ring methine carbon 6개가 *δ*C 122.39, 120.23, 116.60, 116.78, 113.53, 110.76 ppm에서, methine carbon 3개가*δ*C 84.40, 54.12, 33.82 ppm에서, benzene ring에 속하는 quaternary carbon 4개가*δ*C 150.11(s, C-3/H-3'), 149.63, 148.38 ppm에서 관찰되었다.

이 화합물의 carbon C-7(*&*C 33.82 ppm)위와 C-9'(*&*C 60.61 ppm)위의 (-CH₂OH) carbon signal들이 각각 (+)-pinoresinol의 C-7위와 C-9' 위들과 비교해 보면 52.5 ppm 및 11.1ppm 씩 저자장으로 shift 되어 hydrofuran 환이 개환된 것임을 확인할 수 있었다.

그리고 compound 18의 선광도 [α]₀ 값은 compound 17은 - 24.9°인 반면 compound 19는 + 16.5°이다. 또한 ¹³C-NMR spectrum은 기본상 같으나 benzene ring의 C-1과 C-1'의 화학적 shift를 보면 compound 17은 1 ppm 차이지만 compound 18은 2 ppm 정도 차이가 난다. 이것으로부터 두 compound는

입체구조가 서로 다른 화합물이다.

이 상의 각종 기기분석 결과와 분광학적 성질 및 문헌⁷⁸⁻⁸⁰⁾과의 비교로부터 이 compound는 4,4',9-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan, 즉 (-)-Lariciresinol로 그 구조를 동정하였다.

2-13. Compound 20의 구조 동정

Compound 20은 무색의 결정이고 m.p.가 183~185 ℃이며, IR spectrum에서 3410 cm⁻¹에서 0H, 1602와 1473 cm⁻¹에서 aromatic ring의 특징적인 C=C double bond peak가 나타났고 EI-MS spectrum에서는 *m/z* 374에서 molecular ion peak가 나타났다.

 13 C-NMR(DEPT) data에서는 aromatic 영역에서 δ C 147.67과 147.58 ppm 에서 2개의 oxygentaed quaernary carbon peak를, δ C 133.80과 129.21 ppm 에서 quaternary carbon peak 및 δ C 121.70, 120.66, 116.20, 115.81, 112.91, 111.48 ppm 에서 6개의 methine peak가 관찰되어 trisubstituted aromatic ring이 2개 있는 화합물로 추정되었다. 나머지 carbon은 oxygenated carbon 영역에서, δ 92.94 ppm 에서 1개의 quaternary carbon, δ 89.48과 87.99 ppm 에서 2개의 methine peak 및 δ 76.24와 72.19 ppm 에서 2개의 methylene peak가 관찰되었으며, 그 외에 δ 62.54 ppm 에서 1개의 methine peak와 methoxy peak로 사료되는 2개의 peak가 δ 56.58과 56.52 ppm 에서 관찰되었다. 이상의 NMR spectrum을 분석한 결과 이 화합물은 furofuran ring을 가지고 있는 lignan 화합물로 추정하였다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상으로부터 이 compound의 구조를 (+)-8-hydroxypinoresinol로 추정하였으며, 문헌⁸¹⁻⁸³⁾상의 data와 비교하여 그 구조를 동정하였다.

2-14. Compound 21의 구조 동정

Compound 21은 백색의 분말상태 물질로서 m.p.는 122~123℃이며, 10% 황산으로 분무 후 가열하였을 때 청회색으로 발색되었다. [α]₀ 값은 MeOH에 녹여서 측정한 결과 - 24.9°로 나타났다.

IR spectrum에서 3370 cm⁻¹에 0H와 1608, 1520 cm⁻¹에서 benzene 환의 특징적인 double bond peak가 관측되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 m, p-치환기를 갖는 3치환 benzene 환 2개 [{7.15(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 6.91(1H, s, H-2'), 6.88(1H, dd, *J*=2.0 8.0 Hz, H-6'), 6.74(1h, d, *J*=8.0 Hz, H-6), 6.72(2H, s, H-5/H-5')]}, oxygenated-methylene 2개 [{3.83(1H, d, *J*=9.0 Hz, H-9'eq), 3.82(1H, d, *J*=9.0 Hz, H-9'ax), 3.74(1H, dd, *J*=5.5 11.0 Hz, H-9eq), 3.60(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-9ax)]}, oxygenated-methine 1개 {[4.73(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-7)}], methoxy 2개 {[3.85(3H× 2, q, -0Me)]}가 존재하는 것이 확인되었다. 또한 1개의 methine{2.30(1H, dd, *J*=5.5, 13.0 Hz, H-8')} 및 geminal coupling 만을 보이는 methylene signal {2.99(1H, d, *J*=14.0 Hz, H-7'eq), 2.92(1H, d, *J*=14.0 Hz, H-7'ax)}이 관측되어 이 화합물은 phenol의 dimer 화합물로 추정되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 모두 20개의 carbon signal이 관찰되었는데, 2개의 benzene에서 유래한 12개의 carbon signal이 *δ*C 149.17, 148.72, 147.33, 146.30, 135.51, 130.57, 124.02, 120.92, 115.94, 115.82, 115.37, 111.69 ppm에서 관측되었고, oxygenated-methine 탄소 1개가 *δ*C 85.97 ppm에서, oxygenated-methylene carbon 2개가 *δ*C 78.11과 62.08 ppm에서 관측되고, oxygenated-quaternary carbon 1개가 *δ*C 82.75 ppm에서 관측되었으며 *δ*C 56.32 ppm에서 aromatic methoxy에 기인하는 carbon signal이 관측되었다. 고자장 영역에서는 *δ*C 60.93 ppm에서 methine에 기인하는 carbon, *δ*C 40.79 ppm에서 methylene에 기인하는 carbon이 관측되었다.

이상의 spectrum의 검토로부터 이 compound는 methoxy group을 갖는 phenylpropane 2분자가 결합한 lignan 화합물로 추상되었으며 ¹H- 및 ¹³C-NMR의 chemical shift, coupling pattern 그리고 문헌⁸¹⁻⁸³⁾의 spectrum data와 비교한 후 이 compound 20을 4,4'8'9-Tetrahydroxy-3,3'dimethoxy-7,9'-cyclolignan ((-)-olivil)로 그 구조를 동정하였다.

2-15. Compound 22의 구조 동정

Compound 22는 백색의 분말 상태로서 m.p.는 150~152°C이며, 10% 황산으로 분무 후 가열하였을 때 검정색으로 되며, 선광도 $[\alpha]_0$ 값은 + 23.1°이고 UV spectrum에서 233과 279 nm에서 나타났으며 IR spectrum에서 3439 cm⁻¹에서 0H에 기인하는 peak, 1608과 1480 cm-1에서 aromatic double bond(C=C)에 기인하는 peak가 관찰되어 페놀성 hydroxy기가 존재함을 알 수 있다. EI-MS spectrum에서는 molecular ion peak가 m/z 389 $[M+H]^+$ 에서 관측되었고 fragment ion peak, m/z 151 및 137에서 4-hydroxy-3- methoxy-benzoyl기 ion peak, m/z 181 및 167의 이온은 4-hydroxy-3,5- dimethoxybenzoyl기 ion peak가 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 4-hydroxy-3-methoxy-benzoyl기에 속하는 signal이 δC 149.28 (C-3'), 147.48 (C-4'), 133.93 (C-1'), 120.21 (C-6'), 116.23 (C-5'), 111.13 (C-2'), 56.55 (-0CH₃) ppm에서 관찰되었고 4-hydroxy-3, 5-dimethoxybenzoyl기에 속하는 signal이 δC 149.50 (C-3/C-5), 136.34 (C-4), 133.29 (C-1), 104.65 (C-2/C-6) 및 56.95 (2× -0CH₃) ppm에서 관측되었다. 또한 aromatic functionality에 의한 signal들 이외에 δC 87.82 (C-7), 87.63 (C-7'), 72.89 (C-9), 72.78 (C-9), 55.71 (C-8), 55.48 (C-8') ppm에서 6개의 signal이 관찰되었는데 이를 통해 이 화합물은 furofran ring type의 lignan으로 추정할 수 있다.

이상의 기기분석 결과와 분광학적 성상 및 문헌^{84~86)}과의 비교를 토대로 하여 compound 21은 furofuran lignan계열 화합물인 (+)-medioresinol로 그 구조를 동정하였다.

3. 딱총나무의 EtOAc 분획 compound 구조 동정

3-1. Compound 23의 구조 동정

Compound 23은 무정형의 분말상태 물질로서 m.p.는 169~172 °C이며, 10% 황산으로 분무 후 가열하였을 때 검정색으로 발색되었다. [*α*]₀는 MeOH에 녹여서 측정한 결과 -26.8°로 나타났다.IR spectrum에서 3420 cm⁻¹에 OH에 기인하는 peak, 1605, 1515, 1458 cm⁻¹에서 aromatic C=C에 기인하는 peak, 1271, 1227, 1073 cm⁻¹에서는 glycosidic C-O에 기인하는 peak가 관찰되었다. ESI-MS spectrum 에서는 *m/z* 537 [M-H]⁻에서 molecular ion peak가 관찰되었다.

¹H-NMR spectrum에서는 m, p-치환기를 갖는 3치환 benzene 환 2개 [{δH 7.11(*J*=1.5 Hz, H-2), 6.91(H-2'), 6.89(*J*=1.5 6.5 Hz, H-6), 6.75(J=6.5 Hz, H-5), 6.72(H-5/H-6')]}, methylene proton δH 4.11(*J*=4.0 8.5 Hz, H-9eq) ppm에서 관찰되었고, oxygenated-methine 1개 δH 4.73(*J*=7.0 Hz, H-7)ppm, methoxy 2개 δH 3.85(C-3'→0CH₃), 3.84(C-3→0CH₃)ppm에서 존재하는 것이 확인되었다. 또한 1개의 methine δH 2.30(1H, dd, *J*=5.5, 13.0 Hz, H-8') 및 geminal coupling 만을 보이는 methylene signal δH 3.05(*J*=11.5 Hz, H-7'eq)와 2.91(1H, d, *J*=12.0 Hz, H-7'ax) ppm이 관측되어 이 화합물은 phenol의 dimer 화합물로 추정되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 모두 26개의 carbon signal이 관찰되었는데, 2개의 benzene에서 유래한 12개의 carbon signal이 δC 149.13 (C-3), 148.66 (C-3'), 147.42 (C-4), 146.24 (C-4'), 134.92 (C-1), 130.49 (C-1'), 124.17 (C-6'), 120.91 (C-6), 115.93 (C-5'), 115.90 (C-5), 115.52 (C-2'), 111.66 (C-2) ppm에서 관측되었고, oxygenated-methine 탄소 1개가 δC 85.97 ppm에서, oxygenated-methylene carbon 2개가 δC 78.11과 62.08 ppm에서 관측되고, oxygenated-quaternary carbon 1개가 δC 82.75 ppm에서 관측되었으며 δC 56.32 ppm에서 aromatic methoxy에 기인하는 carbon signal이 관측되었다. 고자장 영역에서는 δC 60.93 ppm에서 methine에 기인하는 carbon, δC 40.79 ppm에서 methylene에 기인하는 carbon이 관측되었다.

그리고 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum에서 glucose에 기인하는 signal들이 관측되었다. 즉, ¹H-NMR spectrum에서는 *δ*H 4.30 (*J*=6.5 Hz) ppm에서 glucoside H-1"에 기인하는 signal이 관찰되었고 ¹³C-NMR spectrum에서는 *δ*C 104.96 (Glc-1"), 78.16 (Glc-3"/Glc-5"), 75.32 (Glc-2"), 71.78 (Glc-4"), 62.87 (Glc-6") ppm에서 signal이 관측되었다.

이상의 spectrum의 검토로부터 이 compound는 methoxy group을 갖는 phenylpropane 2분자가 결합한 lignan 화합물로 추상되었으며 ¹Η 및 ¹³C-NMR의 chemical shift, coupling pattern 그리고 문헌^{87,88)}의 spectrum data와 비교한 후 이 compound를 (-)-olivil 9'-*Ο*-β-glucoside로 그 구조를 동정하였다.

3-2. Compound 24의 구조 동정

Compound 24는 백색의 무정형 분말상태로 얻었으며 m.p.는 175~177 °C이며, 10% 황산시액으로 발색하면 검정색이며, 선광도 [*α*]₀는 -55.8°(*c* 0.67, MeOH)이다. UV spectrum에서는 MeOH를 용매로서 사용하여 226과 281 nm에서 극대 파장의 peak를 관찰되고 IR spectrum에서는 3415 cm⁻¹에서 아기에 기인하는 peak, 1610, 1517, 1499 cm⁻¹에서 aromatic C=C에 기인하는 peak가 관찰되어 이 화합물에 페놀 핵이 존재함을 알 수 있다. FAB-MS spectrum에서는 *m/z* 521 [M-H]⁻에서 molecular ion peak가 나타난 것이 관찰되어 이 화합물의 분자량은 522로 판단된다.

¹H-NMR spectrum에서는 ABX type의 phenyl proton들이 δH 7.00(1H, d, *J*=1.0 Hz, H-2'), 6.85(1H, dd, *J*=1.0, 7.0 Hz, H-6'), 6.77(1H, d, *J*=7.0 Hz, H-5'), δH 6.72(2H, br s, H-2/H-6) ppm에서 관찰되었으며 두 개의 methoxy proton signal이 δH 3.85(3H, s, -0CH₃), 3.81(3H, s, -0CH₃)ppm에서 관찰되었고, 두 개의 C₃ 단위가 δH 5.58(1H, d, *J*=5.5 Hz, H-7'), 4.11(1H, dd, *J*=6.5, 8.0 Hz, H-8'), 3.93(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-7'), 3.65(1H, m, H-8'), 3.56(1H, br t, *J*=5.5 Hz, H-9'), 2.68(2H, br t, *J*=6.5 Hz, H-7'), 1.91(2H, m, H-8)ppm에서 두 개의 C₃ 단위 proton signal이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 모두 26개의 carbon signal이 관찰되었는데, 2개의 benzene에서 유래한 12개의 carbon signal이 *δ*C 1149.15(C-3), 147.58(C-4'), 147.55(C-4), 145.32(C-3'), 136.97(C-1'), 134.77(C-1), 129.82(sC-5'), 119.86(C-6), 118.23(C-6'), 116.20(C-5), 114.36(C-2'), 110.68(C-2) ppm에서 관측되었고, oxygenated-methine 탄소 1개가 *δ*C 89.11 ppm에서 관찰되었고, oxygenated-methylene carbon 2개가 *δ*C 65.12(C-9), 62.37(C-9') ppm에서 관측되고, *δ*C 56.95(q, -0CH₃), 56.90(q, -0CH₃) ppm에서 aromatic methoxy에 기인하는 carbon signal이 관측되었다. 고자장 영역에서는 *δ* 35.94(C-8'), 33.03(C-7') ppm에서 propane에 기인하는 carbon signal이 관측되었다.

그리고 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectral data에서 β-D-glucopyranosyl(J_{1",2"}=6.5 Hz)가 존재함을 알 수 있으며 이것은 negative FAB-MS에서 fragment ion peak가 m/z 359[M-H-162]⁻에서 로 관찰된 것으로부터 확인할 수 있다.

이상의 spectrum의 검토로부터 이 compound는 methoxy group을 갖는 phenylpropane 2분자가 결합한 lignan 화합물로 추상되었으며 ¹Η 및 ¹³C-NMR의 chemical shift, coupling pattern 그리고 문헌^{89,90)}의 spectrum data와 비교한 후 이 compound를 dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-*Ο*-β-glucoside로 그 구조를 동정하였다.

3-3. Compound 25의 구조 동정

Compound 25는 무색의 비결정성 분말 상태로 얻었으며, m.p.는 177~178 °C이며, 10% 황산으로 분무 후 가열하였을 때 검정색이며, 선광도 [α]D 값은 -13.5° 이며, UV spectrum에서는 227과 280nm에서 강한 흡수를 나타냈고 IR spectrum에서는 3423 cm⁻¹에서 0H에 기인하는 peak가 관측되었고 1608, 1515, 1498 cm⁻¹에서는 aromatic C=C에 기인하는 peak가 관찰되었다. HRESI-MS spectrum에서는 *m/z* 521.2039에서 [M-H]⁻에 해당되는 negative ion peak가 관측되어 이 화합물의 molecular formula는 C₂₆H₃₄O₁₁을 나타낸다. ¹H-NMR spectrum에서는 ABX type의 proton signal 이 *δ*H 6.95(1H, d, *J*=1.5 Hz, H-2), 6.83(1H, dd, *J*=1.5 7.0 Hz, H-6), 6.77(1H, d, *J*=7.0 Hz,

H-5)ppm, 그리고 2개분의 singlet signal이 *δ*H 6.75(2H, s, H-2'/H-6')ppm에서 관측되었다. 또한 두 개의 methoxy group의 proton signal이 *δ*H 3.85 (3H, s, -OCH₃), 3.82 (3H, s, -OCH₃) ppm에서 관찰되었 으며, *δ*H 5.49 (1H, d, *J*=5.0 Hz, H-7), 3.92(1H, m, H-9'α), 3.75 (1H, m, H-9), 3.56 (1H, t, H-9'β), 3.46 (1H, m, H-8), 2.62 (2H, br t, *J*=6.5 Hz, H-7'), 1.82 (2H, m, H-8') ppm에서 두 개의 C₃ 단위 proton signal이 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 benzene ring의 carbon에 귀속되는 peak들이 각각 *δ*C 149.22 (s, C-3), 147.65 (s, C-3'), 147.61 (s, C-4), 145.33 (s, C-4'), 137.11 (s, C-5'), 134.95 (s, C-1), 129.98 (s, C-1'), 119.91 (d, C-6), 118.32 (d, C-2'), 116.27 (d, C-5), 114.35 (d, C-2'), 110.93 (d, C-2) ppm에서 관찰되었고, 그리고 *δ*C 56.54 (q, -0CH₃), 56.49 (q, -0CH₃) ppm에서는 methoxy group의 carbon에 기인하는 peak가 관찰되었고 *δ*C 89.35 (d, C-7), 70.06 (t, C-9'), 65.13 (q, C-9), 55.60 (d, C-8), 33.09 (t, C-7'), 33.09 (t, C-8') ppm에서는 두 개의 C₃ 단위 carbon signal이 관찰되었다.

그리고 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectral data에서 β-D-glucopyranosyl(*J*_{1",2"}=6.5 Hz)가 존재함을 알 수 있으며 이것은 negative FAB-MS에서 fragment ion peak가 m/z 359[M-H-162]⁻에서 로 관찰된 것으로부터 확인할 수 있다.

이상의 기기분석, 분광학적 성상 및 문헌⁹¹⁻⁹³⁾과의 비교로부터 이 화합물은 neolignan glycoside 속하는 (7R, 8R)-7,8-dihydro-9'-hydroxyl-3'methoxyl-8-hydroxymethyl-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1'-benzofuranpro panol 9'-*0*-β-*D*-glucopyranoside(glochidioside)로 그 구조를 동정하였다.

4. 생리활성 결과

4-1. NBT superoxide scavenging assay

이질풀의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대하여 NBT superoxide scavenging assay에 의한 antioxidative activities를 검토하였다. 그 결과 120μg/μl인 농도에서 CH₂Cl₂ (40.5%) 분획이 활성이

있었고, 40#g/#인 농도에서는 CH₂Cl₂ (23.3%), *n*-BuOH (29.2%) 분획이 활성이 있었고, 13.3#g/#인 농도에서는 CH₂Cl₂ (14.8%), *n*-BuOH (18.4%), H₂O (28.3%) 분획이 활성이 있는 것으로 나타났다. 여기서 이질풀의 CH₂Cl₂ 분획은 고농도에서 저농도로 변하였을 때도 여전히 강한 antioxidative activities를 나타내어 이질풀의 CH₂Cl₂ 분획에서 강한 antioxidative activities가 있는 화합물이 있는 것으로 판단되며 그 순차로 *n*-BuOH, H₂O, MeOH, EtOAc 분획이 활성이 있는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

딱총나무의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대하여 NBT superoxide scavenging assay에 의한 antioxidative activities를 검토하였다. 그 결과 120, 40 및 13.3µg/µ²인 농도에서 모든 분획이 활성이 있는 것으로 나타났다.(Table 3) 여기서 딱총나무의 각 분획은 고농도에서 저농도로 변하였을 때도 여전히 강한 antioxidative activities를 나타내어 딱총나무의 각 분획에 강한 antioxidative activities가 있는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

4-2. Cytotoxic activity assay

HCT₁₅(대장암)와 SK-OV-3(난소암), 두 종의 인체유래 암세포주에 대한 시험관내 세포성장저해효과를 SRB (sulforhodamine B)방법으로 이질풀의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대하여 검색하여 본 결과(Table 2) CH₂Cl₂의 분획이 HCT₁₅와 SK-OV-3 암 세포주에 대하여 각각 10.7 (5×10³ cell/m²)과 13.1 (2×10⁴ cell/m²)인 IC₅₀ 값을 나타내어 이질풀 CH₂Cl₂ 추출물분획 중에서 우수한 cytotoxic activity를 나타내는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

딱총나무에 대한 이 두 암세포주에 대한 시험관내 세포성장저해효과 SRB 방법으로 각 분획에 대하여 검색하여 본 결과(Table 4) CH₂Cl₂의 분획이 HCT₁₅와 SK-OV-3 암 세포주에 대하여 각각 40.7 (5×10³ cell/m²)과 41.7 (2× 10⁴ cell/m²)인 IC₅₀ 값을 나타내어 딱총나무의 CH₂Cl₂ 추출물분획 중에서 우수한 cytotoxic activity를 나타내는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

4-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인

Compound 1~6에 대해 MG-63 세포에서 hIL-6의 유리정도(%)를 검토하였다. 그 결과 coumpoud 2[~]5는 MG-63 세포로부터 hIL-6의 유리가 감소하는 것으로 나타났다. afzelin (1), Quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside(quercitin) (2), Kaempferol 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (Kaempferol-3-*O*-rutinoside) (3), gallic acid (4), protocatechuic acid (5), Gallic acid methyl ester(6) 화합물에 대한 각각의 hIL-6의 유리정도는 7.6±3.0%, 21.9±5.02%, 0.5±0.01%, 62.4±7.4%, 39.2±3.9%, 57.6±3.6% 로 나타났다.

4-4. Antifungal activity

딱총나무의 분리한 compound 17, 18, 21을 YPD 또는 YM 배지에 접종된 진균 세포에 대한 억제작용을 알아보고자 하여 Antifungal activity 실험을 실시한 결과 compound 17은 C. albicans, M. furfur, T. beigelii 진균 세포에 대하여 각각 12.5, 25, 25 (µg/m/)의 억제 활성, compound 18은 위 진균세포에 대하여 각각 25, 25, 12.5 (µg/m/)의 억제 활성, compound 21은 각각 12.5, 12.5, 12.5 (µg/m/)의 억제 활성을 나타났다.

Ⅳ. 결 론

1. 이질풀 (Gernium thunbergii)

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

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

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

이질풀의 EtOAc 분획을 Silica gel, Sephadex LH-20, LiChroprep RP-18, HP-20을 이용한 column chromatography를 반복 실행하여 7개의 순수 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 분광학적 분석방법과 화학적 기기분석 및 표품, 그리고 문헌과의 비교를 토대로 하여 그 화학구조를 확인, 동정할 수 있었다. 이 화합물들은 afzelin (1), Quercetin $3-O-\alpha-L-rhamnopyranoside(quercitin)$ (2), Kaempferol $3-O-\alpha-L-rhamno$ pyranosyl- $(1\rightarrow 6)-\beta-D-$ glucopyranoside(Kaempferol-3-O-rutinoside) (3), gallic acid (4), protocatechuic acid (5), Gallic acid methyl ester (6), isocorilagin (7)로 각각 확인 동정하였다. compound 3과 5~7들은 모두 이질풀에서 처음으로 분리, 보고되는 화합물이다.

이질풀의 EtOAc 분획으로부터 분리한 compound 1~6에 대하여 세포독성이 없는 농도에서 TNF-α에 의해 유도된 hIL-6의 억제작용을 알아보고자 하여 MG-63 세포주를 이용한 hIL-6의 유리, 억제 실험을 실시한 결과 각각 7.6± 3.0%, 21.9± 5.02%, 0.5± 0.01%, 62.4± 7.4%, 39.2± 3.9%, 57.6± 3.6% 로 억제하는 활성을 나타냈다. 따라서 compound 4~6은 염증 반응 및 hIL-6의 과다 발현으로 인한 질병을 개선시키는 효과가 있을 것으로 판단된다.

2. 딱총나무 (Sambucus williamsii)

딱총나무(*Sambucus williamsii var. coreana* Nakal)는 꼭두서니목 (*Rubiales*) 인동과 (*Caprifoliaceae*) 딱총나무속 (*Sambucus* LINNE)에 속하는 낙엽관목이다.

성분연구로는 cerylalcohol, betulin, oleanolic acid, betulic acid, ursolic acid, *α*-amyrin, vanillin, acetovanillone, coniferyl alcohol, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, protocatechuic acid, sambucunol A, sambucunol B, buddlenol G, (-)-syringaresinol, (-)-pinoresinol, 3-propanediol, (-)-lariciresinol, (-)-dihydrodehydrodiconiferyl alchohol, stigmasterol, sitosterol-3glucoside 등 화합물을 분리, 보고 되었다.

딱총나무의 MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O extract에 대한 antioxidative activity과 cytotoxic activity에 대한 검색으로부터 딱총나무의 각 분획은 모두 강한 antioxidative activity과 cytotoxic activity을 나타내었다. 그 중 딱총나무의 CH₂Cl₂와 EtOAc. ext에서 antioxidative activity과 cytotoxic activity이 있는 화합물을 분리하고자 하여 본 실험을 실시하였다.

딱총나무의 CH₂Cl₂와 EtOAc 분획을 Silica gel, Sephadex LH-20, LiChroprep RP-18, HP-20을 이용한 column chromatography를 반복 실행하여 21개의 순수 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 분광학적 분석방법과 화학적 기기분석 및 표품, 그리고 문헌과의 비교를 토대로 하여 그 화학구조를 확인, 동정할 수 있었다. 이 화합물들은 α -amyrin-3- β -palmitate (8), 11-keto- α -ayrin palmitate (9), betulonic acid (10), oleanonic acid (11), betulinic acid (12), β -amyrin (13), ursolic acid latone (14), β -sitosterol (15), stigmasterol (16), (+)-pinoresinol (17), (-)-lariciresinol (18), (+)-lariciresinol (19), 8-hydroxy pinoresinol (20), (-)-olivil (21),(+)-medioresinol (22), (-)-Olivil

9'-*O*— β-glucopyranoside (23), dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-*O*β-glucoside (24), glochidioside (25)로 각각 확인 동정하였다. compound 8~11, 13, 14, 그리고 compound 19~25들은 모두 딱총나무에서 처음으로 분리, 보고되는 화합물이다.

딱총나무의 분리한 compound 17, 18, 21을 YPD 또는 YM 배지에 접종된 진균 세포에 대한 억제작용을 알아보고자 하여 Antifungal activity 실험을 실시한 결과 compound 17은 *C. albicans, M. furfur, T. beigelii* 진균 세포에 대하여 각각 12.5, 25, 25 (µg/ml)의 억제 활성을 나타냈고, compound 18은 위 진균세포에 대하여 각각 25, 25, 12.5 (µg/ml)의 억제 활성을 나타냈으며, compound 21은 각각 12.5, 12.5, 12.5 (µg/ml)의 억제 활성을 나타냈다. 따라서 compound 17, 18 및 21은 진균감염으로 인한 질병을 개선시키는 효과가 있을 것으로 판단된다.

V. 참 고 문 헌

- 1) 김태정. 『한국의 자원식물-II』. (1996) 서울대학교출판부, pp.256.
- 2) 이창복. 『대한식물도감』. (1980) 향문사:서울, pp.498:1989.
- 3) 박종희. 『한약백과도감 (하)』. (2002) 신일상사:서울, pp.923~924:394.
- 4) 배기환. 『원색도감·한국의 자연시리즈 13 한국의 약용식물』. (2000)
 교학사:서울, pp.267:326.
- 5) 안덕균. 『원색한국본초도감』. (1998) 교학사:서울, pp.296:371.
- 6) Qing-He Liu, Ji-Eun Jeong, Eun-jin Choi, Young-Hee Moon and Eun-Rhan Woo. (2006) A new furofuran lignan from *Geranium thunbergii* sieb. et zucc. *Arch. Pharm. Res.*, 29(12), pp.1109~1113.
- 7) 김태정. 『한국의 자원식물-IV』. (1996) 서울대학교출판부, pp.134.
- 8) 이창복. 『대한식물도감』. (1980) 향문사:서울, pp.702;2808.
- 9) 박종희. 『한약백과도감-(하)』. (2002) 신일상사:서울 pp.718~719.
- 10) 배기환. 『원색도감·한국의 자연시리즈 13 한국의 약용식물』. (2000) 교학사:서울, pp.472:593.
- 11) 안덕균. 『원색한국본초도감』. (1998) 교학사:서울, pp.336:428.
- 12) Chang, S. W., Baek, S. H., Kim, C. H. and Lim, S. S. (2002) Interleukin-6 and interleukin-10 in experimentally induced rat pulpal inflammation. *내한치과보존학회자*, 27, pp.232~238.
- 13) Ragab, A. A., Nalepka, J. L., Bi, Y. and Greenfield, E. M. (2002) Cytokine synergistically induce osteoclast differentiation support by immortalized or normal calvbarial eells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 283, pp.679~687.
- 14) Mysliwiec, J., Kretowski, A., Topolska, J., Stepien, A. and Kinalska, I. (2002) The influence of corticosteroids on IL-6/IL-6R system in patients with graves ophthalmopathy. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 108, pp.739~744.
- 15) Jung-III Yang, Me-Ae Kim, Eun-Young Jung, Joo-Eun Baek, Hye-Jung Ha, Hyun-Jung Kim, Dong-Jun Park, Se-Ho Chang and Un-Sil Jeon.



(2004) A case of trichosporon beigelii peritonitis in CAPD. *The Korean journal of nephrology*, 23(3), pp.518~522.

- 16) Young-Ju Kim, Geun-Bae Hwang and Young-Bae Seu. (2005) Antifungal Activity of borneolum (Borneo-Camphor) from dryobalanops aromatica against Malassezia furfur. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), pp.236~239.
- 17) Woon-Seob Shin, Kyoung-Ho Lee, Joo-Young Park and Choon-Myung Koh. (1997) Effects of Culture Condition on Secretion of Phospholipase from Candida albicans. *Korean Journal of Medical Mycology*, 2(2), pp.123~128.
- 18) Xu-Juan Yang, Nai-Li Wang, Man-Sau Wong, Sun-Chi Chan, Xin-Sheng Yao. (2005) Studies of trirepenoids isolated from Sambucus williamsii Hance and their effects on UMR106 cell proliferation phosphatase and alkaline activity. Journal of Shenvang *Pharmaceutical University*, 22(6), pp.449~457.
- 19) Xu-Juan Yang, Man-Sau Wong, Nai-Li Wang, Sun-Chi Chan, Xin-Sheng Yao. (2007) Lignans from the stems of *Sambucus williamsii* and their effects on osteoblastic UMR106 cells. *Journal of Asian Natural Products Research*, 9(7), pp.583~591.
- 20) Xu-Juan Yang, Man-Sau Wong, Nai-Li Wang, Sun-Chi Chan, Xin-Sheng Yao. (2005) Effect of phenolic acids isolated from *Sambucus Williamsii* on proliferation and differentiation of rat osteoblastic UMR106 cells. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 36(11), pp.1604~1607.
- Piao, M. S., Kim, M. R., Lee, D. G., Park, Y. K., Hahm, K. S., Moon, Y. H. and Woo, E. R. (2003) Antioxidative constituents from *Buddleia officinalls.* Arch. Pham. Res., 26, pp.453~457.
- 22) Kirby, A. J. and Schmidt, R. J. (1997) The antioxidant activity of chinese herbs for eczema and of placebo herbs-l.

Ethnopharmacology, 56, pp.103~108.

- 23) Skehan, P., Streng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mcmahon, J. and Vistica, D. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 82, pp.1107~1112.
- 24) Joo, S. S., Kang, H. C., Lee, M. W., Choi, Y. W. and Lee, D. I. (2003) Inhibition of IL-6 in osteoblast-like cell by isoflavones extracted from *Sophorae fructus. Arch. Pham. Res.*, 26, pp.1029~1035.
- 25) 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. (2004) Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch. Pharm. Res.*, 27, pp.177~183.
- 26) Lee, D. G., Kim, H. K., Kim, S. A., Park, Y., Park, S. C., Jang, S. H. and Hahm, K. S. (2003) Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, pp.305~310.
- 27) Jahn, B., Martin, E., Stueben, A. and Bhakdi, S. (1995) Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus*species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4, 5-dimethyl-2thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. *J. Clin. Microbiol*, 33, pp.661~667.
- 28) Lingmallu Jagan Mohan Rao, Hiroshi Yada, Hiroshi Ono and Mitsuru Yoshida. (2002) Acylated and non-acylated flavonol monoglycosides from the indian minor spice Nagkesar (*Mammea longifolia*). J. Agnic. Food Chem., 50, pp.3143~3146.
- 29) Shin-Kyo Chung, Young-Chan Kim, Yoshiaki Takaya, Kenji Terashima and Masatake Niwa. (2004) Novel flavonol glycoside, 7-0-methyl mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and its antioxidant effect. *J. Agni. Food Chem.*, 52, pp.4664~4668.
- 30) Fossen, T., Larsen, A., Kiremire, B. T., Andersen, O. M. (1999) Flavonoids

from blue flowers of *Nymphaea caerulea*. *Phytochemistry*, 51, pp.1133~1137.

- 31) Xi-Ning Zhong, Hideaki Otsuka, Toshinori Ide, Eiji Hirata, Anki Takushi and Yoshio Takeda. (1997) Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine Seguinii*. *Phytochemistry*, 46(5), pp.943~946.
- 32) Zhao-Feng Peng, Dieter Strack, Alfred Baumert, Ramanathan Subramaniam, Ngoh Khang Goh, Tet Fatt Chia, Swee Ngin Tan, Lian Sai Chia. (2003) Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, 62, pp.219~228.
- 33) Kyoko Ishiguro, Satoko Nagata, Hisae Fukumoto, Masae Yamaki, Shuzo Takagi and Koichiro Isoi. (1991) A flavavanonol rhamnoside from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, 30, pp.3152~3153.
- 34) Tram Ngoc Ly, Makoto Shmoyamada and Ryo Yamauchi. (2006) Isolation and Characterization of Rosmarinicc Acid Oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and Their Antioxidative Activity. J. Agric. Food Chem., 54, pp.3786~3793.
- 35) Borbála Vermes, Lorand Farkas, Mihály Nógrádi, Hildebert Wagner and Richard Dirscherl. (1976) The synthesis of afzelin, paeonoside and kaempferol 3-0-β-rutinoside. *Phytochmeistry*, 15, pp.1320~1321.
- 36) Farkas, L.; Vermes, B.; Nogradi, M.; Kalman, A. (1976) The final structure of robinin and biorobin and their total synthesis. *Phytochmeistry*, 15, pp.215~218.
- 37) Nawwar, M. A. M., Buddrus, J., Bauer, H. (1982) Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry*, 21, 1755~1758.
- 38) Bae-Cheon Cha, Sung-Bae Lee, Tae-Jin Rhim and Kwang-Hoe Lee. (2000) Constituents of antioxidative activity and free radical scaenging effect from Galla rhois (*Rhus javanica linne*). *Kor. J. Pharmacogn.*, 31(2), pp.185~189.

- 39) Jung-Su Ahn, Yong-Soo Kwon and Chang-Min Kim. (1999) Antiinflammatory constituents of Polygonum bistorta. Kor. J. Pharmacogn., 30(3), pp.345~349.
- 40) Woong-Yang Park, Sang-Cheol Lee, Beung-Tae Ahn, Seung-Ho Lee.
 (1993) Phenoic Compounds from *Acalypha australis* L. *Kor. J. Pharmacogn.*, 24(1), pp.20~25.
- 41) Sang-Hyun Lee, Bak-Kwang Kim, Seon-Haeng Cho and Kuk-Hyun Shin.
 (2002) Phytochemical constituents from the Fruits of *Acanthopanax* sessiliflorus. Arch. Pharm. Res., 25(3), pp.280~284.
- 42) Oh-Geun Kwon, Sung-Hwan Kim, Byung-Yeol Chun, Chae-Kyu Park and Kun-Ho Son. (1999) Isolation of antimicrobial components from *Moutan cortex. Kor. J. Pharmacogn.*, 30(3), pp.340~344.
- 43) Sam-Sik Kang, Ju-Sun Kim, Sook-Yun Choi and Byung-Hoon Han. (1993) Phytochemical Studies on *Peoniae Radix. Kor, J, Pharmacogn.*, 24 (3), pp.247~250.
- 44) Sun-Chae Chung, Bang-Yeon Hwang, Gab-Jin Oh, Shin-Jung Kang, Mi-Jeong Kim, Woo-Hoi Choi, Kyong-Soon Lee and Jai-Seup Ro. (1999) Chemical components from the stem bark of *Rhus javanica* L. *Kor, J, Pharmacogn.*, 30(3), pp.295~300.
- 45) Jong-Cheol Park, Young-Hee Hwang, Da-Rae Choi, Deuk-Young Jung, Ju-Gwon Park, Jong-Moon Hur, Seong-Ja Kim, Suk-Nam kim and Moon-Sung Kim. (2003) A triterpenoid glucoside and phenolic compounds from *Rosa davurica*. *Natural Product Sciences*, 9(1), pp.31~33.
- 46) Yan-Jun Zhang, David L. DeWitt, Sorimuthu Murugesan and Muraleedharan G. Nair. (2004) Novel Lipid-Peroxidation- and Cyclooxygenase- Inhibitory Tannins from *Picrorhiza kurroa* Seeds. *Chemistry & Biodiversity*, 1(3), pp.426~441.

- 47) Klaus Peter Latté, Herbert Kolodziej. (2000) Pelargoniins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*. *Phytochemistry*, 54, pp.701~708.
- 48) Mahmoud A. M. Nawwar, Sahar A. M. Hussein and Irmgard Merfort. (1999) NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica Granatum*. *Phytochemistry*, 36(3), pp.793~798.
- 49) Rie Kakuda, Koichi Machida, Yasunori Yaoita, Masafumi Kikuchi and Masao Kikuchi. (2003) Studies on the constituents of Gentiana Species. II. A new triterpenoid, and (S)-(+)- and (R)-(-)- Gentiolactones from *Geniana lutea*. *Chem. Pharm. Bull.*, 51(7), pp.885~887,
- 50) Tao Wu , Zhi-Hong Cheng, He-Ping Liu, Yan Li, Gui-Xin Chou, Zheng-Tao Wang. (2005) Liposoluble components from leaves of *llex* cornuta. Zhongguo Yaoxue Zazhi, 40(19), pp.1460~1462.
- 51) Ming-An Ou Yang, Han-Qing Wang, Jun-Hua Su, Yu-Qing Liu, Chong-Ren Yang. (1997) Triterpene esters and triterpenes from Ilex kudingcha. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 9(3), pp.19~23.
- 52) Akira Ikuta, kohei Kamiya, Toshiko Satake and Yasuhisa Saiki. (1995) Triterpenoids from callus tissue cultures of Paeonia species. *Phytochemistry*, 38(5), pp.1203~1207.
- 53) Sang-Zin Choi, Min-Cheol Yang, Sang-Un Choi, Kang-Ro Lee. (2006) Cytotoxic terpenes and lignans from the roots of *Ainsliaea*. *Archives of Pharmacal Research*, 29(3), pp.203~208.
- 54) Antonio G. Gonazlez, Jose Amaro, Braulio M. Fraga and Javier G. Luis. (1983) 3-0xo-6β-hydroxyolean-18-en-28-oic acid from Orthopter Ygium Huancuy. Phytochemistry, 22(8), pp.1828~1830.
- 55) Yuko Fukuda, Kuniyoshi Sakai, Shunyo Matsunaga, Harukuni Tokuda and Reiko Tanaka. (2006) Cancer chemopreventive effect of orally administrated lupane-type triterpenoid on ultraviolet light B



induced photocarcin ogenesis of hairless mouse. *Cancer Letters*, 240, pp.94~101.

- 56) Noboru Shirane, Yutaka Hashimoto, Kazuo Ueda, Hideyuki Takenaka and Kenji Katoh. (1996) Ring A cleavage of 3-oxo-olenan-12-en-28-oic acid by the fungus *Chaetomium Longirostre*. *Phytochemistry*, 43(1), pp.99~104.
- 57) Sang-Myung Lee, Bung-Sun Min, Cheal-Gyu Lee, Kab-Sig Kim, Yung-Hee Kho. (2003) Cytotoxic triterpenoids from the fruits of *Zizyphus Jujuba*. *Planta Med.*, 69, pp.1051~1054.
- 58) Jae-Sue Choi and Won-Sick Woo. (1984) Coumarins and triterpenoid glycosides from the roots of *Patrinia scabiosaefolia*. Arch. Pharm. *Res.*, 7(2), pp.121~126.
- 59) Jae-Chul Do, Joo-Young Chai and Kun-Ho Son. (1991) Studies on the components of Lycopus lucidus (1). Kor. J. Pharmacogn., 22(3), pp.162~165.
- 60) Lgoli, O. John and Gray I. Alexander. (2008) Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*. *International Journal of Physical Sciences*, 3(6), pp.156~158.
- 61) Dae-Keun Kim, II-Yong Nam, Jin-Wook Kim, Tae-Yong Shin and Jong-Pil Lim. (2002) Pentacyclic triterpenoids from *llex Macropoda*. Arch. *Pharm. Res.*, 25(5), pp.617~620.
- 62) Satomi Furukawa, Naomichi Takagi, Tsuyoshi Ikeda, Masateru Ono, Alaa Mohamed Nafady, Toshihiro Nohara, Hiroyuki Sugimoto, Shima Doi and Hideo Yamada. (2002) Two novel Long-Chain alkanoic acid esters of lupeol from Alecrim-Propolis. *Chem. Pharm. Bull.*, 50(3), pp.439~440.
- 63) Fabio de Sousa Menezes, Angelo Saboia Borsatto, Nuno Alvares Pereira, Francisco Jose de Abreu Matos and Maria Auxiliadora Coelho Kaplan. (1998) Chamaedrydiol, an ursane triterpene from

marsypianthes chamaedrys. *Phytochemistry*, 48(2), pp.323~325.

- 64) Ju-Sun Kim, Yoon-Jung Kim, So-Young Lee and Sam-Sik Kang. (2008) Phytochemical studies on Paeoniae radix (3) - triterpenoids. *Kor. J. Pharmacogn.*, 39(1), pp.37~42.
- 65) Hao Huang, Han-Dong Sun and Shou-Xun Zhao. (1996) Triterpenoids of Isodon Ioxothyrsus. Phytochemistry, 42(6), pp.1665~1666.
- 66) Bina S. Siddiqui, Ishrat Sultana and Sabira Begum. (2000) Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusa leaves. Phytochemistry*, 54, pp.861~865.
- 67) Hong-Cheng Wang and Yasuo Fujimoto. (1993) Triterpene esters from Eucalyptus tereticornis. Phytochemistry, 33(1), pp.151~153.
- 68) Bok-Sim Chang, Yong-Soo Kwon and Chang-Min Kim. (2004) The chemical structures and their antioxidant activity of the compounents isolated from the heartwood of *Hemiptelea Davidii*. Kor. J. Pharmacogn., 35(1), pp.80~87.
- 69) Toshihiro Akihisa, Susumu Kojima, Takao Yokota and Toshitake Tamura. (1991) 24-Methylene-25-methylcholesterol and both C-24 epimers of 24-ethyl-22-dehydrocholesterol in a freshwater green alga *Hydrodic-tyon Reticulatum. Phytochemistry*, 30(11), pp.3621-3624.
- 70) G. S. Viswanadh, P. Atchuta Ramaiah, H. Laatsch and Rajendra Maskey. (2006) Chemical constituents of the heartwood and bark of *Homonoia riparia*. J. Trop. Med. Plants, 7(2), pp.267~273.
- 71) Toshihiro Akihisa, Yuzuru Matsubara, Parthasarathi, Ghosh, Swapnadip Thakur, Naoto Shimizu, Toshitake Tamura and Taro Matsumoto. (1988) The 24α- and 24β-epimers of 24-ethylcholesta-5,22-dien-3β-ol in two Clerodendrum species. *Phytochemistry*, 27(4), pp.1169~1172.
- 72) Taro Matsumoto, Masayuki Nakagawa and Toshihiro Itoh. (1984)

 24α -methyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol from seed oil of *Helianthus Annuus. Phytochemistry*, 23(4), pp.921~923.

- 73) Joon-Ih Whang, Hyung-In Moon and Ok-Pyo Zee. (2000) Phytochemical constituents of Actinidia arguta. Kor. J. Pharmacogn., 31(3), pp.357~363.
- 74) Ju-Hee Kuk, Seung-Jin Ma, Jae-Hak Moon and Keun-Hyung Park. (2003) Isolation and lidentification of lignans as antioxidant from leaves of *Catalpa ovata* G. Don. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 18(6), pp.511~516.
- 75) Li-Hua Xie, Teruaki Akao, Kenjiro Hamasaki, Takeshi Deyama and Masao Hattori. (2003) Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of Enterococcus faecalis strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem. Pharm. Bull.*, 51(5), pp.508~515.
- 76) Fumiko Abe and Tatsuo Yamauchi. (1989) Lignan glycosides from Parsonsia laevigata. Phytochemistry, 28(6), pp.1737~1741.
- 77) Hak-Ju Lee, Sung-Suk Lee, Don-Ha Choi and Yeong-Han Kwon. (2003) Studies on biological activity of wood extractives(XI). *Mokchae Konghak*, 31(1), pp.32~40.
- 78) Erdemoglu, N., Sahin, E., Sener, B., Ide, S. (2004) Structural and spectroscopic characteristics of two lignans from *Taxus baccata* L. *Journal of Molecular Structure*, 692, pp.57~62.
- 79) Lin-Gen Zhuang, O. Seligmann, K. Jurcic and H. Wagner. (1982) Inhaltsstoffe von daphne tangutica. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45, pp.172~176.
- 80) Cowan, S., Stewart, M., Abbiw, D. K., Latif, Z., Sarker, S. D., Nash, R. J. (2001). Lignans from *Strophanthus Gratus*. *Fitoterapia*, 72, pp.80-82.

- 81) Hiroki Tsukamoto, Sueo Hisada and Sansei Nishibe. (1984) Lignans from bark of Fraxinus Mandshurica var. japonica and F. japonica. *Chem. Pharm. Bull.*, 32(11), pp.4482~4489.
- 82) Dae-Keum Kim, Jae-Soon Eun, Jong-Pil Lim, Kang-Ro Lee and Ok-Pyo Zee. (1999) Lignans from *Sorbaria Sorbifolia* var. stellipila. *Yakhak Hoeji*, 43(3), pp.285~288.
- 83) Min Wang, Jing-Yu Liang, Xue-Ting Liu, Wen Qiu. (2006) Chemical Constituents from Serissa serissoides. Chin. J. Nat. Med., 4(3), pp.198~201.
- 84) Li-Xin Zhou, and Yi Ding. (2000) Studies on chemical constituents of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 25(9), pp.541~543.
- 85) Chun-Yu Li and Yuan-Chao Li. (1999) The chemical constituents of *Tripterygium Wilfordii*. Acta Pharmaceutica Sinica, 34(8), pp.605~607.
- 86) Xing-Guo Yan, Jing-Ming Jia, Ling Tang, Li-Ying Shi, Yong-Qi Wang and Bao-Min Feng. (2008) New chemical constituents of Urtica triangularis Hand-Mass. *Chem. Pharm. Bull.*, 56(10), pp.1463~1465.
- 87) Koichi Machida, Misako Takano, Rie Kakuda, Yasunori Yaoita and Masao Kikuchi. (2002) A new lignan glycoside from the leaves of sambucus sieboldiana (Miq.) blume ex. graebn. Chem. Pharm. Bull., 50(5), pp.669~671,
- 88) Samir Kumar Sadhu, Emi Okuyama and Haruhiro Fujimoto. (2006) Prostraglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a turkish medicinal plant. *Journal of Ethnopharmaco-logy*, 108, pp.371~378.
- 89) Fumiko Abe and Tatsuo Yamauchi. (1986) Lignans from *Trachelospermum asiaticum* (Tracheolospermum. II). *Chem. Pharm. Bull.*, 34(10), pp.4340~4345.

- 90) Mi-Ran Kim, Hyung-In Moon, Jin-Ho Chung, Young-Hee Moon, Kyung-Soo Hahm and Eun-Rhan Woo. (2004) Matrix metalloproteinase-1 inhibitor from the stem bark of *styrax japonica* S. *et Z. Chem. Pharm. Bull.*, 52(12), pp.1466~1469.
- 91) Lang-Ping Dong, Wei Ni, Jin-Yang Dong, Jun-Zhu Li, Chang-Xiang Chen and Hai-Yang Liu. (2006) A new neolignan glycoside from the leaves of Acer truncatum. Molecules, 11, pp.1009~1014.
- 92) Yoshio Takeda, Chieko Mima, Toshiya Masuda, Eiji Hirata, Anki Takushi and Hideaki Otsuka. (1998) Glochidioboside, A glucoside of (7S,8S)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol from leaves of *Glochidion obovatum*. *Phytochemistry*, 49(7), pp.2137~2139.
- 93) Etsuko Sueyoshi, Hui Liu, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka, Takakatu Shinzato, Mitsunori Aramoto and Yoshio Takeda. (2007) Bridelioside, a new lignan glycoside from *Bridelia glauca* Bl. F. *balansae* (Tucht.) Hatusima. *J. Nat. Med.*, 61, pp.468~471.
- 94) Yong-Xin Wen, Xiu-Zhen Chen, Jing-Lan Jin and Gui-Ren Cheng. (1990) Studies on the constituents of *llex Kudingcha*. *Guihaia*, 10(4), pp.364~368.






Scheme I. Extraction and fractionation from Geranium thunbergii.



Scheme II. Extraction and fractionation from Sambucus williamsii.





of Sambucus williamsii.



Sambucus williamsii.



Fraction	Antioxidant activity (%)		
	120 µg/ml	40 µg/ml	13.3 μg/ml
MeOH	86.3	83.3	59.8
CH ₂ Cl ₂	40.5	23.3	14.8
EtOAc	97.4	89.9	87.8
BuOH	52.2	29.2	18.4
H ₂ O	86.1	65.8	28.3

Table 1. Antioxidative activities of fraction extract fromGeranium thunbergii.

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

Errotion	Cell line IC ₅₀ (µg/mℓ)		
Fraction	HCT ₁₅	SK-OV-3	
MeOH	22.9	<10	
CH ₂ Cl ₂	10.7	13.1	
EtOAc	<10	<10	
BuOH	>100	79.7	
H ₂ O	>100	>100	

Table 3. Antioxidative activities of fraction extract	from			
Sambucus williamsii				

Emotion	Antioxidant activity (%)		
Fraction	120 µg/ml	40 µg/ml	13.3 μg/ml
MeOH	26.4	12.3	2.2
CH ₂ Cl ₂	24.6	15.4	3.5
EtOAc	19.6	32.5	13.0
BuOH	16.4	4.1	1.1
H ₂ O	17.7	5.2	1.6

Fration	Cell line IC ₅₀ (µg/mℓ)		
	HCT ₁₅	SK-OV-3	
MeOH	41.9	43.1	
CH ₂ Cl ₂	40.7	41.7	
EtOAc	81.6	88.0	
BuOH	>100	>100	
H ₂ O	>100	>100	

Table 4. Cytotoxic activity of fraction extract from Sambucus williamsii

Table. 5. Anti-fungal activity of isolation of compounds 17, 18 and 21 from CH₂Cl₂ extract of *Sambucus williamsii*.

Compound	MIC (µg/ml)		
Compound	C. albicans	M. furfur	T. beigelii
Compound 17			
	12.5	25	25
(+)-Pinoresinol			
Compound 18			
	25	25	12.5
(+)-Lariciresinol			
Compound 21			
	12.5	12.5	12.5
(-)-Olivil			



Fig.3. Chemical structures of compounds 1-7 isolated From *G. thunbergii*



Fig.4. Chemical structures of compounds 8-16 isolated From *S. williamsii*



Fig.5. Chemical structures of compounds 17-25 isolated From *S. williamsii*



Fig.6. Effects of compounds 1~6 on TNF- α induced hIL-6 production from MG-63 cells. afzelin (comp.1), Quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside (quercitin) (comp.2), Kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (Kaempferol-3-O-rutinoside) (comp.3), gallic acid (comp.4), protocatechuic acid (comp.5), Gallic acid methyl ester (comp.6) were isolated from the EtOAc fraction of *Sambucus williamsii*. The cytokine content of the culture media was determined by ELISA as detailed under the Experimental Section. Means±S.D. and t-test significance levels were calculated on the relative values and are compared with Dexamethasone.



A. positive control B. control



C. compound

Fig.7. Effects of compounds 17, 18 and 21 on antifungal activity from Fungal cells.

A) Fungal cells were cultured in YPD broth (Difco) with aeration at 2 8°C. M. furfur was cultured at 32°C in modified Bacto yeast extract/ malt extract (YM) broth (Difco) and 1% olive oil.

B) Fungal cells $(2 \times 10^4/\text{ml})$ were inoculated into YPD or YM broth and 0.1weredispensed into microtiter plates.

C) After 48h of incubation at either 28°C or 32°C, the minimal concentration of compounds to prevent the growth of a given test organism was determined.



































































































































Collection @ chosun

(별지)

저작물 이용 허락서

학 과	약학과	학 번	2006771	7	과 정	박	사
성 명	한 글 : 류	경 학	한 문 : 劉	慶 鶴	영 문 : LIU QINGHE		
주 소	中國 長春市 南關區 上海路 2號 130000						
연락처	E-MAIL : ginghe1978@hotmail.com						
	한글:이질풀(<i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc)과 딱총나무(<i>Sambucus williamsii var</i> .						
논문	coreana Nakal)의 화학성분 및 생리활성에 관한 연구						
제목	영문:Chemical	Constit	uents and Biolo	ogical a	activities	from the	Geranium
	<i>thunbergii</i> Sieb. et Zucc and <i>Sambucus williamsii var. coreana</i> Nakal						

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.

 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용 변경은 금지함.

3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.

4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에 는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.

5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학 에 이를 통보함.

 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.

7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력 을 허락함.

동의여부 : 동의(●) 반대()

2009 년 8 월 저작자 : **류 경 학** (인)

조선대학교 총장 귀하